



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# PŘÍPRAVA A POSOUZENÍ APLIKAČNÍHO POTENCIÁLU BIODEGRADABILNÍCH FILMŮ NA BÁZI KOPOLYMERŮ PHA

PREPARATION OF BIODEGRADABLE FILMS FROM PHA COPOLYMERS AND EVALUATION OF THEIR APPLICATION  
POTENTIAL

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Lenka Drotárová

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2022

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1621/2021 Akademický rok: 2021/22  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Lenka Drotárová**  
Studijní program: Spotřební chemie  
Studijní obor: Spotřební chemie  
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Příprava a posouzení aplikačního potenciálu biodegradabilních filmů na bázi kopolymerů PHA

### Zadání diplomové práce:

1. Zpracovat literární rešerši na téma i. moderní biomateriálové aplikace PHA a ii. možnosti ovlivnění materiálových vlastností monomerním složením PHA.
2. Realizovat sérii kultivačních experimentů za účelem produkce PHA materiálů s různým monomerním složením.
3. Připravit modelové filmy kopolymerních PHA a stanovit jejich relevantní vlastnosti dle požadavků aplikačních oblastí, zvolených dle výsledků literární rešerše.
4. Na základě získaných experimentálních dat zhodnotit potenciál využitelnosti kopolymerních PHA materiálů v oblasti vývoje moderních biomateriálů.

### Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Lenka Drotárová  
studentka

-----  
Ing. Petr Sedláček, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

-----  
prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## **Abstrakt**

Diplomová práca sa zaoberá prípravou biodegradabilných filmov na báze kopolymérov PHA a následným preštudovaním ich materiálových vlastností. Hlavným cieľom práce je posúdiť aplikačný potenciál PHA kopolymérnych filmov v biomedicínskom priemysle. Teoretická časť práce sa zaoberá charakterizáciou polyhydroxyalkanoátov a ich kopolymérov, z hľadiska fyzikálnych vlastností, syntézy, biodegradácie či PHA producentov. V literárnej rešerši sú popísané súčasné trendy v spracovaní a využití PHA v biomedicíne. V experimentálnej časti práce bola prevedená kultivácia bakteriálnych kmeňov *Aneurinibacillus* sp. H1 a *Cupriavidus necator* H16. Počas kultivácie *Aneurinibacillus* sp. H1 boli použité rôzne pomery substrátov glycerolu a 1,4-butándiolu, v snahe získať kopolyméry P(3HB-co-4HB) o rôznom monomérom zložení. Pomocou extrakcie boli zo získanej biomasy vyizolované polymérne filmy, ktoré boli charakterizované pomocou metód GC-FID, FTIR a SEC-MALS. Následne boli vybraté kopolymérne filmy s obsahom 4HB 65,25 a 43,61 hm. % a homopolymérny PHB film, ktoré boli podrobené uvoľňovacím experimentom. Na uvoľňovacie experimenty boli použité liečivá ibuprofén a kyselina acetylsalicylová, u ktorých bolo sledované uvoľňovanie z filmu do fyziologického roztoku pomocou UV-VIS spektroskopie. Na základe získaných dát bol overený aplikačný potenciál PHA kopolymérnych filmov ako nosičového systému v biomedicínskom využití.

## **Abstract**

This diploma thesis deals with the production of biodegradable PHA copolymer films and the subsequent study of their material properties. The main goal of this thesis is to assess the application potential of PHA copolymer films in the biomedical industry. The theoretical part of the thesis deals with the characterization of polyhydroxyalkanoates and their copolymers, in terms of physical properties, synthesis, biodegradation or PHA producers. The current research in the processing and use of PHA in biomedicine is described in the literature search. The cultivation of bacterial strains of *Aneurinibacillus* sp. H1 and *Cupriavidus necator* H16 was done in the experimental part. Different ratios of glycerol and 1,4-butanediol substrates were used during the cultivation of *Aneurinibacillus* sp. H1, to obtain copolymers of P(3HB-co-4HB) with a different monomer composition. Polymer films were isolated from the obtained biomass by the extraction method and were characterized by GC-FID, FTIR and SEC-MALS methods. Subsequently, copolymer films containing of 65,25 and 43,61 wt. % 4HB and homopolymer PHB film were selected for release experiments. The drugs, ibuprofen and acetylsalicylic acid, were used for release experiments, their release from the polymer film into the physiological solution was monitored by UV-VIS spectroscopy. Based on the obtained data, the application potential of PHA copolymer films as a carrier system in biomedical use was verified.

## **Kľúčové slová**

polyhydroxyalkanoáty, kopolymér, film, nosičový systém, uvoľňovanie liečiva

## **Keywords**

polyhydroxyalkanoates, copolymer, film, carrier system, drug release

DROTÁROVÁ, Lenka. *Příprava a posouzení aplikačního potenciálu biodegradabilních filmů na bázi kopolymerů PHA* [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-11]. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139076>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petr Sedláček.

### **Prehlásenie**

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne, a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....

podpis študenta

### **PodĎakovanie**

Na úvod by som rada poďakovala vedúcemu mojej diplomovej práce Ing. Petrovi Sedláčkovi, Ph.D., za odbornú pomoc a cenné rady pri spracovaní výsledkov či písaní teoretickej časti práce. Ďalej by som rada poďakovala konzultantke mojej práce Ing. Eve Slaninovej Ph.D., za pomoc pri práci v laboratóriu a pri spracovaní výsledkov. Nakoniec by som sa chcela poďakovať mojej rodine a priateľom za podporu.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	7
2	TEORETICKÁ ČASŤ.....	8
2.1	Polyhydroxyalkanoáty .....	8
2.1.1	Základná charakteristika a štruktúra PHA.....	8
2.1.2	Fyzikálne vlastnosti .....	9
2.1.3	Biosyntéza PHA.....	10
2.1.4	Biodegradácia PHA .....	12
2.2	Kopolyméry na báze PHA .....	13
2.2.1	Syntéza kopolymérov PHA .....	13
2.2.2	Fyzikálne vlastnosti kopolymérov PHA .....	14
2.2.3	Poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát).....	16
2.2.4	Poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) .....	16
2.3	Modelové mikroorganizmy produkujúce PHA.....	17
2.3.1	Bakteriálny kmeň <i>Cupriavidus necator</i> H16.....	17
2.3.2	Bakteriálny kmeň <i>Aneurinibacillus</i> sp. H1 .....	18
2.4	Aplikácia polyhydroxyalkanoátov v medicínskom priemysle.....	18
2.4.1	Nosičové systémy pre uvoľňovanie liečiv .....	19
2.4.2	Biomateriály v tkanivovom inžinierstve.....	22
2.5	Súčasný trendy vo využití PHA v biomedicíne .....	22
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	24
3.1	Použité mikroorganizmy, chemikálie a prístroje .....	24
3.1.1	Použité mikroorganizmy.....	24
3.1.2	Použité chemikálie.....	24
3.1.3	Použité prístroje .....	24
3.2	Kultivácia mikroorganizmov .....	25
3.2.1	Príprava komplexných inokúl.....	25
3.2.2	Kultivácia <i>Aneurinibacillus</i> sp. H1 v produkčnom médiu .....	25
3.2.3	Kultivácia <i>Cupriavidus necator</i> H16.....	26
3.3	Stanovenie obsahu biomasy .....	27
3.3.1	Spektrofotometrické stanovenie obsahu biomasy.....	27
3.3.2	Gravimetrické stanovenie obsahu biomasy .....	27
3.4	Stanovenie obsahu PHB v biomase pomocou GC-FID .....	28

3.5	Extrakcia polyméru pomocou prístroja Soxtherm .....	28
3.6	Stanovenie molekulovej hmotnosti polymérnych filmov .....	28
3.7	Inkorporácia liečiva do PHA filmu.....	28
3.7.1	Inkorporácia acylpyrínu a kyseliny acetylsalicylovej.....	29
3.7.2	Inkorporácia ibuprofenu .....	29
3.8	Sledovanie uvoľňovania liečiva pomocou spektrofotometrickej metódy.....	29
3.8.1	Stanovenie kalibračných kriviek pre aktívne látky.....	30
4	VÝSLEDKY A DISKUSIA .....	31
4.1	Kultivácia bakteriálnych kmeňov <i>Aneurinibacillus</i> sp. H1 a <i>C. necator</i> H16 .....	31
4.1.1	Stanovenie obsahu biomasy.....	31
4.2	Charakterizácia PHA filmov.....	32
4.2.1	Stanovenie obsahu PHA v biomase a vo vyextrahovaných filmoch .....	32
4.2.2	Charakterizácia chemickej štruktúry PHA filmov pomocou FTIR .....	33
4.2.3	Stanovenie molekulovej hmotnosti PHA filmov pomocou SEC-MALS ..	34
4.3	Uvoľňovacie experimenty aktívnych látok z PHA filmov .....	35
4.3.1	Štúdium uvoľňovania acylpyrínu a kyseliny acetylsalicylovej .....	35
4.3.2	Štúdium uvoľňovania ibuprofenu .....	42
4.3.3	Porovnanie kinetiky uvoľňovania ibuprofenu z PHA filmov a z komerčnej náplasti Nurofen .....	48
5	ZÁVER.....	51
6	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV .....	53
7	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK .....	59
8	PRÍLOHY .....	60
8.1	Kalibračná krivka pre stanovenie obsahu 3HB v biomase .....	60
8.2	Charakterizácia štruktúry PHA filmov pomocou FTIR.....	61
8.2.1	FTIR spektrá PHA filmov bez inkorporovaného liečiva.....	61
8.2.2	FTIR spektrá PHA filmov s inkorporovaným liečivom .....	63

# 1 ÚVOD

Syntetické plasty, ako jedny z najviac využívaných materiálov vo svete, predstavujú základný stavebný pilier nie jedného priemyselného odvetvia, čím sa stali neoddeliteľnou súčasťou nášho moderného života. Vďaka širokej škále vlastností našli aplikačný potenciál v rôznych smeroch priemyslu. Predovšetkým sú využívané ako obalové materiály, fľaše, tašky, ktorých spotreba v každodennom živote je enormná, čím sa zvyšuje dopyt po ich výrobe. So zvyšujúcou sa výrobou však dochádza k hromadeniu týchto syntetických materiálov, v dôsledku nedostatočnej recyklácie. Degradácia syntetických plastov trvá niekoľko desiatok až stoviek rokov, čo má za následok výrazné znečistenie životného prostredia. Riešením tohto problému by mohlo byť nahradenie týchto syntetických plastov za biologicky rozložiteľné bioplasty.

Jedným zo zástupcov spomínaných biodegradabilných plastov, sú polyméry zo skupiny polyhydroxyalkanoátov (PHA). PHA sú produkované radom mikroorganizmov prostredníctvom mikrobiálnej fermentácie. Jedná sa o biomateriály, ktorých významnou vlastnosťou je predovšetkým biokompatibilita a biodegradabilita. Práve vďaka ich prirodzenej stopercentnej rozložiteľnosti, si získali veľkú pozornosť vedcov po celom svete. Fyzikálne vlastnosti homopolymérov PHA, však nie sú tak rozmanité ako vlastnosti syntetických polymérov, čím sa zužuje škála ich využitia. Avšak vďaka dlhým študovaniam PHA produkujúcich mikroorganizmov, boli objavené rôzne kopolyméry na báze PHA s významne lepšími vlastnosťami.

Zloženie kopolymérov PHA závisí na druhu produkujúceho mikroorganizmu, kultivačných podmienkach a použitom zdroji uhlíka. Najväčší vplyv na monomérené zloženie kopolyméru majú uhlíkové substráty (resp. prekurzory), ktoré dokážu ovplyvniť nie len typ monoméru, ale zmenou pomeru jednotlivých substrátov je možné ovplyvniť aj jeho percentuálne zastúpenie vo výslednom kopolyméry. Zmenou monoméreného zloženia je možné výrazne ovplyvniť rôzne fyzikálne vlastnosti polyméru, ako sú napríklad teplota topenia, kryštalinita, pružnosť alebo pevnosť. Monoméreným zložením je taktiež možné významne zvýšiť teplotu degradácie, čím sa signifikantne rozširuje aplikačný potenciál PHA.

Aplikácia PHA však nekončí len v náhrade klasických plastov v obalových materiáloch. Široké využitie nachádzajú predovšetkým v biomedicíne a farmácii, kde sú používané na prípravu šijacích chirurgických materiálov, obvazových a krycích materiálov, implantátov, tkanivových výplní a iné. PHA polyméry vďaka svojej štruktúre, predstavujú taktiež vhodný materiál pre nosičový systém s inkorporovanou liečivou látkou. Liečivo, je tak vďaka PHA nosiču možné transportovať priamo do cieľového miesta, čím sa zvyšuje účinnosť jeho terapeutického účinku. Pomocou postupného uvoľňovania liečiva, nie je potrebné opakované dávkovanie, vďaka čomu organizmus nie je namáhaný prijímaním väčších dávok aktívnej látky.

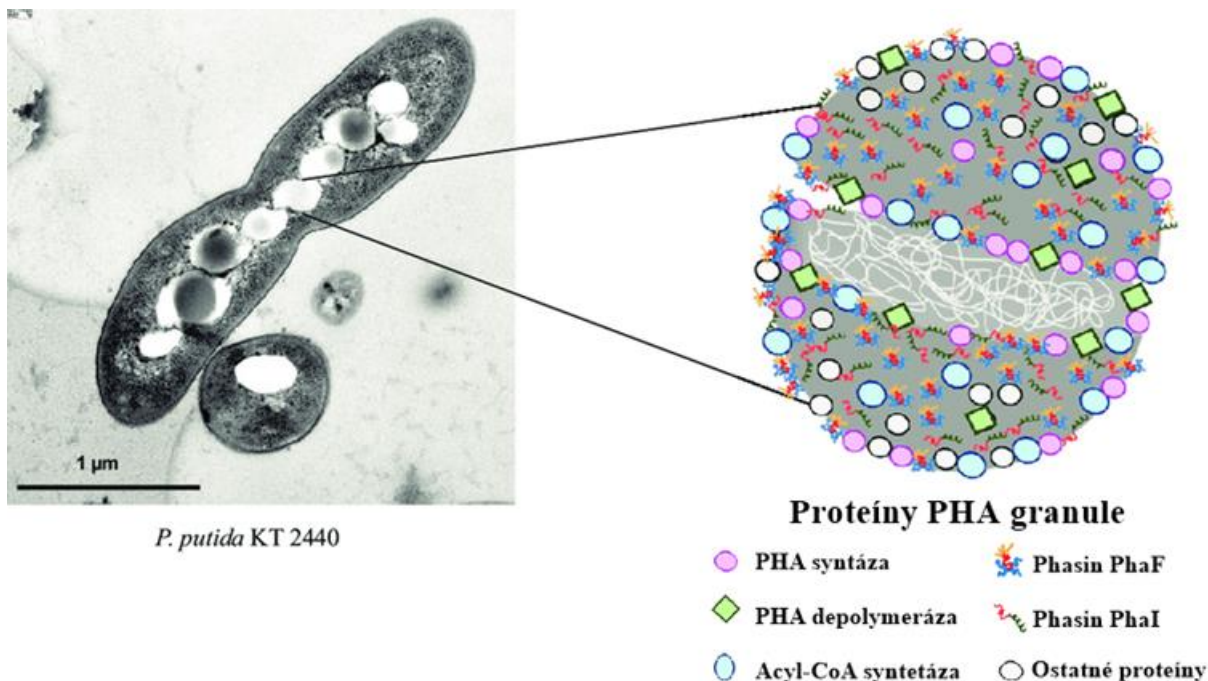
## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 Polyhydroxyalkanoáty

V dôsledku nepriaznivých podmienok vyskytujúcich sa v životnom prostredí, sa mikroorganizmy snažia vyvážiť nedostatok živín napríklad tvorbou lipidových inklúzií, ktoré slúžia ako rezervný zdroj energie a uhlíka. Mikrobiálnou fermentáciou sa vytvárajú polymérne granule na báze polyesterov, ktoré sa akumulujú v cytoplazme bunky. Medzi najčastejšie prirodzene produkované biopolyméry patria polyhydroxyalkanoáty, ale taktiež aj kyselina polymliečna, kyselina polyjantárová a iné. Tieto biologicky degradabilné materiály predstavujú veľký potenciál pri náhrade petrochemických plastov, ktorých záťaž na životné prostredie je čím ďalej závažnejšia.

#### 2.1.1 Základná charakteristika a štruktúra PHA

Z chemického hľadiska sú polyhydroxyalkanoáty (PHA) lineárne polyestery 3-, 4-, 5- a 6-hydroxyalkánových kyselín, ktoré sú akumulované vo forme granúl (viď Obrázok 1) širokou škálou mikroorganizmov, ako sú grampozitívne/gramnegatívne baktérie, huby, kvasinky či riasy [1]. Monoméne jednotky sú spojené esterovou väzbou, kedy je karboxylová skupina jednej podjednotky pripojená k hydroxylovej skupine druhej podjednotky. Syntéza PHA je u niektorých mikroorganizmov prirodzená počas fázy rastu (napr. *Escherichia coli*, *Alcaligenes latus*), u iných je zase podmienená limitujúcimi podmienkami ako nedostatok dusíka, fosforu alebo kyslíka, či v prostredí v nadbytku uhlíka (napr. *Cupriavidus necator* H16, *Pseudomonas oleovorans*) [1, 2].



Obrázok 1: Štruktúra PHA granule [3]

Ako už bolo zmienené vyššie, PHA sa v granulovej forme akumulujú v bunkovej cytoplazme (viď Obrázok 1), pričom veľkosť granúl sa pohybuje od 0,2 do 0,5  $\mu\text{m}$  v závislosti na bakteriálnom kmeni a kultivačných podmienkach. Môžu sa ukladať vo vysokých



koncentráciách (až 90 hm.% suchej biomasy) a vďaka proteínovému obalu obsahujúceho proteíny phasíny (viď Obrázok 1), nenarúšajú osmotický stav bunky [2]. Na základe počtu uhlíkov v monomérskej jednotke je možné klasifikovať PHA do troch skupín. Prvá skupina predstavuje PHA s krátkym reťazcom (scl-PHA, *short chain lenght*), obsahujúce 3–5 atómov uhlíka, napr. poly(3-hydroxybutyrát), poly(3-hydroxyvalerát). Do druhej skupiny patria PHA so stredným reťazcom (mcl-PHA, *medium chain lenght*), obsahujúce 6-14 atómov uhlíka, napr. poly(3-hydroxyoktanoát). Tretiu skupinu tvoria PHA s dlhým reťazcom (lcl-PHA, *long chain lenght*), ktoré obsahujú viac 15 a viac atómov uhlíka, napr. poly(3-hydroxypentadekanoát) [2-5].

S dĺžkou reťazca sa menia vlastnosti polyméru, kedy polyméry s krátkym reťazcom majú tvrdý, krehký, kryštalický charakter a ich teplota topenia je vyššia ako u polymérov so stredným a dlhým reťazcom, ktoré sú zvyčajne mäkké a elastické. Bolo potvrdených viac ako 150 monomérsnych jednotiek tvoriacich reťazce PHA, pričom každá má jedinečné charakteristické vlastnosti a mieru biodegradability. Zloženie monomérsnych jednotiek je dané druhom baktérie, typom PHA syntázy katalyzujúcej biosyntézu a substrátom, ktorý je pridávaný do média (zdroj uhlíka). Kombináciou rôznych typov monomérov PHA je možné získať kopolyméry so špecifickými vlastnosťami pre konkrétne aplikácie, napríklad v medicíne alebo farmaceutickom priemysle [2-7].

### 2.1.2 Fyzikálne vlastnosti

Fyzikálne vlastnosti polymérov skupiny PHA sa líšia v závislosti na ich monomérsnom zložení, vďaka čomu vykazujú široký rozsah špecifických vlastností, ktoré sú využiteľné v rôznych aplikáciách. Vlastnosti homopolymérov PHA, teda polymérov tvorených jedným typom monoméru, sa vo väčšine prípadov pohybujú v pomerne v úzkom rozpätí, na rozdiel od kopolymérov, ktoré sú tvorené viac ako jedným typom monoméru. Za najväčšiu prednosť materiálov na báze PHA sa určite považuje ich biodegradabilita a biokompatibilita, čím nie sú toxické ako k ľudskému organizmu tak aj k životnému prostrediu. Vo všeobecnosti PHA vykazujú podobné vlastnosti (elasticita, pevnosť a iné) ako syntetické plasty na báze ropy (napr. polypropylén, polyetylén). PHA polyméry nie sú rozpustné vo vode, vďaka čomu majú dobrú odolnosť voči vlhkosti, zatiaľ čo sú dobre rozpustné v organických rozpúšťadlách, predovšetkým v chloroforme a ďalších chlórovaných rozpúšťadlách. Na rozdiel od iných bioplastov a petrochemických plastov sú stabilné voči pôsobeniu UV žiarenia. Modifikáciou PHA pridaním iných monomérsnych jednotiek je možné dosiahnuť lepšie mechanické vlastnosti, ako napríklad elasticita či bariérové vlastnosti. Monomérsne zloženie ďalej taktiež ovplyvňuje biodegradáciu, pevnosť v ťahu, Youngov modul či priestupnosť vody alebo kyslíka (vplyv monomérsneho zloženia bude ďalej opísané v kapitole 2.2.2) [1, 2].

#### 2.1.2.1 Mechanické a tepelné vlastnosti PHA

PHA sú čiastočne kryštalické materiály a môžu sa chovať ako termoplasty alebo elastoméry. Tepelné vlastnosti amorfnej fázy sú popísané pomocou teploty skleneného prechodu ( $T_g$ ), zatiaľ čo tepelné vlastnosti kryštalickej fázy sú popísané teplotou topenia ( $T_m$ ) [1]. Teplota topenia sa pohybuje od 40 do 180 °C v závislosti na zvyšujúcom sa počte atómov uhlíka v bočnom reťazci. Teplota skleneného prechodu je v rozmedzí od -50 do 4 °C, ktorá je na rozdiel od  $T_m$

nepriamo úmerná dĺžke bočného reťazca, teda s rastúcim počtom uhlíkov dochádza k poklesu  $T_g$ . Teploty skleneného prechodu scl-PHA majú nižšie hodnoty v porovnaní s mcl-PHA a lcl-PHA, na základe čoho sa u scl-PHA zvyšuje ich kryštalický charakter (kryštalinita v rozsahu 60–80 %) a krehkosť. Mcl-PHA majú nižšiu kryštalinitu (24 %), kvôli nepravidelným postranným reťazcom, čím sa zlepšujú ich elastoméne vlastnosti. V dôsledku nízkej  $T_m$  mcl-PHA, však tieto vlastnosti vykazujú len v úzkom teplotnom rozsahu a pri teplote vyššej ako ich  $T_m$  sa stávajú úplne amorfnými [1, 2, 8, 9].

### 2.1.2.2 UV stabilita PHA

Na rozdiel od biologickej či tepelnej degradácie, fotodegradácia kopolymérov a homopolymérov PHA nebola doteraz dostatočne preštudovaná a existuje len veľmi málo štúdií na túto problematiku. Poznatky o fotodegradácii sú však rovnako potrebné, nakoľko sa PHA používa na prípravu rôznych zdravotníckych pomôcok, vrátane obväzových a krycích materiálov, ktoré sú zvyčajne priamo vystavené slnečnému žiareniu. UV žiarenie spôsobuje v PHA sieťovacie reakcie a štiepne reakcie, ktoré sú v tomto prípade prevládajúce. Bolo zistené, že po expozícii PHB UV žiarením, dochádza k zníženiu molekulovej hmotnosti, teploty topenia, k zhoršeniu reologických (znížená viskozita) a mechanických vlastností a zvýšeniu povrchovej kryštalinity. Ukázalo sa že, zvýšená kryštalinita na povrchu PHB bola zodpovedná za oneskorenie biologickej degradácie. Akonáhle však došlo k spotrebovaniu tejto vrchnej vrstvy, došlo k zlepšeniu degradácie, čo mohlo byť spôsobené už degradovanými molekulami vyskytujúcimi sa pod touto vrstvou, ktoré sa nepremenili z amorfnej formy do formy kryštálov. Pôsobením UV tiež dochádza k morfológickým zmenám PHB, ako sú praskliny na povrchu či k zmenám zafarbenia polyméru [10].

### 2.1.3 Biosyntéza PHA

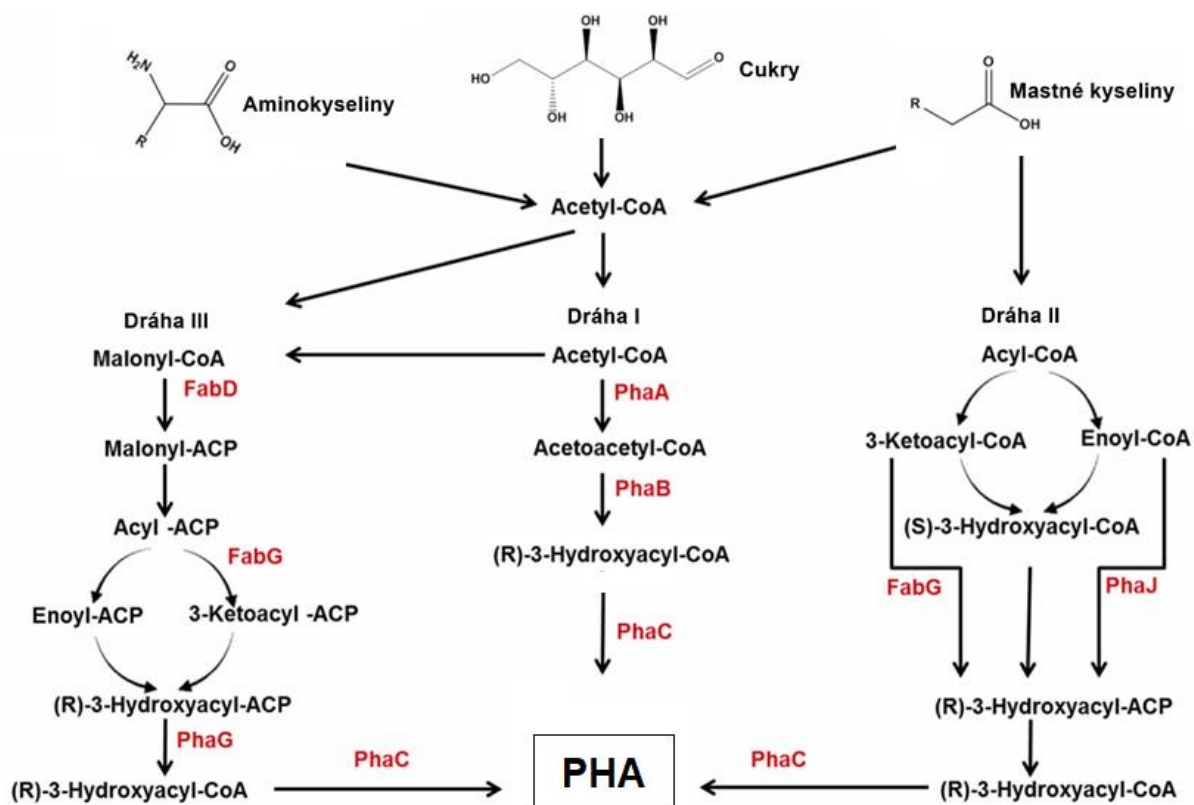
V súčasnosti bolo popísaných niekoľko syntetických dráh (vid' Obrázok 2), prebiehajúcich v cytoplazme bakteriálnej bunky, ktoré vedú k tvorbe PHA. Tieto syntetické dráhy sú v určitej miere spojené s mnohými dôležitými metabolickými dráhami, ako glykolytické a pentózofosfátové dráhy, Krebsov cyklus, biosyntézy a degradácie aminokyselín či mastných kyselín [11].

Syntetická dráha I, charakterizovaná pre syntézu poly(3-hydroxybutyrátu), začína kondenzáciou dvoch molekúl acetyl-CoA z cyklu trikarboxylových kyselín, katalyzovanou  $\beta$ -ketotiolázou (PhaA), za vzniku acetoacetyl-CoA. Prostredníctvom NADPH-dependetnej acetoacetyl-CoA-reduktázy (PhaB) je acetoacetyl-CoA následne redukovaný na (*R*)-3-hydroxybutyryl-CoA. V konečnom kroku tejto syntézy dochádza k polymerizácii monomérov (*R*)-3-HB na PHB, ktorá je katalyzovaná PHA syntázou (PhaC) [1, 2, 12, 13].

Ďalšia možnosť syntézy je dráha II, v ktorej substráty pochádzajú z  $\beta$ -oxidačnej dráhy mastných kyselín, ktoré predstavujú zdroj uhlíka pre PHA produkciu (vid' Obrázok 2). Acyl-CoA vzniknutý po  $\beta$ -oxidácii sa prevedie na 3-hydroxyacyl-CoA, ktorý je za účasti enzýmov (3-ketoacyl-CoA reduktáza, epimeráza a (*R*)-enoyl-CoA hydratáza/enoyl-CoA hydratáza I) a PHA syntázy schopný polymerizačnou reakciou tvoriť PHA. Táto syntetická dráha bola rozsiahlo študovaná prostredníctvom rôznych mikroorganizmov, pričom len nedávno bola

stanovená kryštalová štruktúra kľúčových enzýmov PhaA, PhaB a PhaC pomocou *C. necator*, čo významne prispelo k pochopeniu mechanizmov syntézy PHA [1, 2, 12-14].

V rámci dráhy III sa zúčastňuje enzým 3-hydroxyacyl-ACP-CoA transferáza a malonyl-CoA-ACP transacyláza (viď Obrázok 2). Medziprodukty získané z jednoduchých zdrojov uhlíka (glukóza, sacharóza), sú konverziou prevedené z ich acylovej formy na CoA formu. Dochádza k tvorbe 3-hydroxyacyl-ACP, ktorý v ďalšom kroku je schopný tvoriť 3-hydroxyacyl-CoA ako prekursor PHA. Mimo tieto tri základné syntetické dráhy PHA existujú aj ďalšie zložitejšie dráhy biosyntézy rôznych kopolymérov PHA (napr. poly(glykolát-*co*-3-hydroxybutyrát), poly(3-hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyvalerát), ktorých sa zúčastňuje široké spektrum enzýmov (napr. PhaC<sub>AR</sub> syntáza) [1, 2, 12, 13].



Obrázok 2: Biosyntetické dráhy výroby PHA [1]

Kľúčovým prvkom syntézy sú PHA syntázy, ktoré katalyzujú polymerizačné reakcie hydroxyacyl-CoA na PHA a voľný CoA. Syntázy je možné klasifikovať do štyroch hlavných tried, na základe ich primárnych sekvencií, substrátovej špecifickosti a zloženia podjednotiek [12]. I. trieda predstavuje PHA syntázy zložené iba z jednej podjednotky PhaC, teda tvoria homodimér a syntetizujú PHA zložené z monomérov s krátkym reťazcom. Do II. triedy patria enzýmy pozostávajúce z dvoch syntáz PhaC1 a PhaC2, rovnako ako syntázy I. triedy tvoria homodimér a prevažne syntetizujú PHA so stredným reťazcom [12]. Medzi syntázy III. a IV. triedy patria enzýmy zložené z PhaC-PhaE a PhaC-PhaR, ktoré rovnako ako syntázy I. triedy uprednostňujú syntézu PHA s krátkym reťazcom. Počas syntézy sa PHA skladajú do tvaru granule, pričom hydrofóbne reťazce sú orientované smerom k jadru, zatiaľ čo enzými phasíny

a ďalšie proteíny sú naviazané na povrchu granule. Prehľad jednotlivých enzýmov spojených s metabolickými dráhami syntézy PHA a ich funkcie sú popísané v Tabuľka 1 [1, 2, 12, 13].

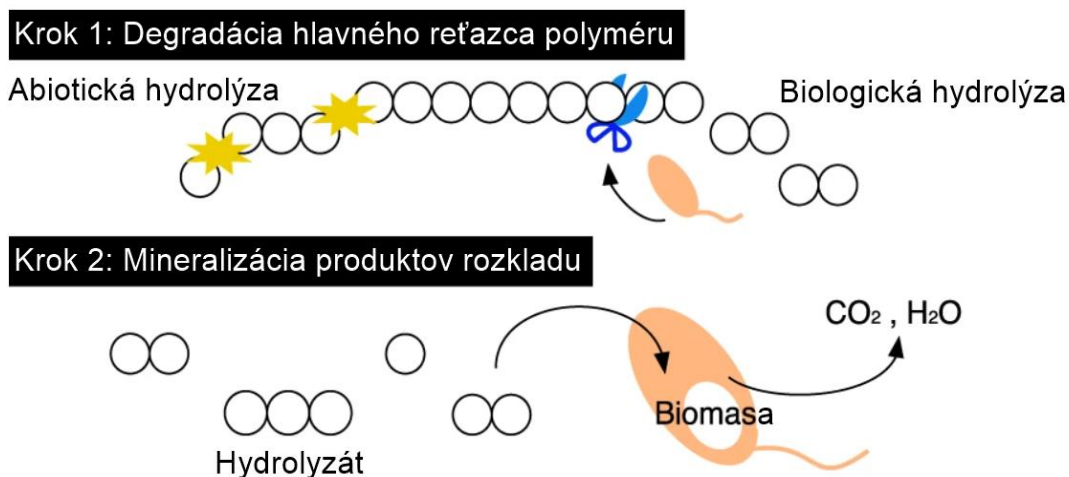
*Tabuľka 1: Enzými spojené so syntézou PHA a ich funkcie [14]*

Enzým	Funkcia
PhaA	Acetyl-CoA acetyltransferáza ( $\beta$ -ketotioláza)
PhaB	Acetoacetyl-CoA reduktáza
PhaC	PHA syntáza
PhaE	PHA syntáza (podjednotka PHA syntázy triedy III)
PhaR	PHA syntáza (podjednotka PHA syntázy triedy IV)
PhaZ	PHA depolymeráza
PhaP	kontroluje veľkosť a počet granúl PHA, reguluje transkripciu phaC, podporuje syntézu PHA
PhaF	úloha pri intracelulárnom umiestnení a segregácii granúl PHA počas bunkového delenia, reguluje transkripciu phaC
PhaI	vplyv na biosyntézu PHA (neznáma konkrétna funkcia)

#### 2.1.4 Biodegradácia PHA

S biosyntézou PHA veľmi úzko súvisí aj biodegradácia, nakoľko tieto dva procesy prebiehajú v bunke súbežne. Ako už bolo zmienené vyššie, jednou z najvýznamnejších vlastností PHA polymérov je ich biologická odbúrateľnosť. Pod pojmom degradácia sa v tomto prípade rozumie konverzia organických látok na anorganické pôsobením špecifických enzýmov. Degradácia môže prebiehať buď pomocou intracelulárnych PHA depolymeráz, ktoré rozkladajú iba PHA granule v natívnej forme, alebo prostredníctvom extracelulárnych PHA depolymeráz, ktoré sú schopné degradovať kryštalické PHA uvoľnené do prostredia [15]. V dôsledku rozdielnej štruktúry intracelulárnych natívnych granúl a extracelulárneho denaturovaného PHA, intracelulárne depolymerázy nie sú schopné hydrolyzovať extracelulárne PHA a naopak [15, 16].

Proces degradácie PHA prebieha v dvoch krokoch (viď Obrázok 3). V prvom kroku dochádza k degradácii hlavného reťazca na 3-hydroxyalkánovú kyselinu, monoméry a diméry alebo zmes oligomérov prostredníctvom PHA depolymerázy. Hydrolýza reťazca môže prebiehať biologicky, pôsobením mikrobiálnych hydrolytických enzýmov, alebo abioticky, pôsobením žiarenia, tepelnou degradáciou alebo chemickou hydrolýzou. V druhom kroku oligomér-hydroláza štiepi oligoméry na monoméry a dochádza k premene produktov bunkového metabolizmu na oxid uhličitý a vodu (v aeróbných podmienkach) alebo na oxid uhličitý, vodu a metán (v anaeróbných podmienkach) [16]. V konkrétnom prípade vnútrobunkovej degradácie PHB dochádza k uvoľneniu kyseliny 3-hydroxymaslovej, ktorá sa potom oxiduje dehydrogenázou na acetoacetylCoA, ktorý je nakoniec pomocou  $\beta$ -ketotiolázy premenený na acetyl-CoA [15-17].



Obrázok 3: Dvojkrovový proces degradácie PHA [16]

Rýchlosť degradácie môže byť ovplyvnená druhom mikroorganizmu, typom PHA (či sa jedná o homopolymér alebo kopolymér), typom prostredia či rôznymi fyzikálnymi faktormi. Vo všeobecnosti sú PHA dobre rozložiteľné ako v pôde, tak aj vo vodnom prostredí. Veľkou výhodou PHA oproti iným bioplastom (napr. poly(butylénsukcinát-*co*-adipát), poly(butylénadipát-*co*-tereftalát)) je ich vysoká odbúrateľnosť v morskej vode, pričom práve morský ekosystém je najviac poškodený nerozložiteľnými petrochemickými plastmi [15-17].

## 2.2 Kopolyméry na báze PHA

Aplikácia PHA homopolymérov je značne ovplyvnená ich mechanickými (vysoká kryštalinita) a tepelnými vlastnosťami (nízka tepelná stabilita), čím sa ich využitie pomerne obmedzuje. Za účelom zlepšenia týchto vlastností pre využitie materiálu v širšej škále odvetví, boli vyvinuté stratégie modifikácie polymérov. Najbežnejšou metódou modifikácie sa stala kopolymerizácia, počas ktorej dochádza k vytvoreniu kopolymérov. Kopolyméry obsahujú dve alebo viac typov monomérnych jednotiek, ktoré sú navzájom viazané kovalentnými väzbami. U výsledného kopolyméru sa prejaví vplyv každého druhu monoméru, pričom je možné jednoducho regulovať pomer jednotlivých monomérov zmenou množstva substrátov, v závislosti na požadovaných finálnych vlastnostiach [18, 19].

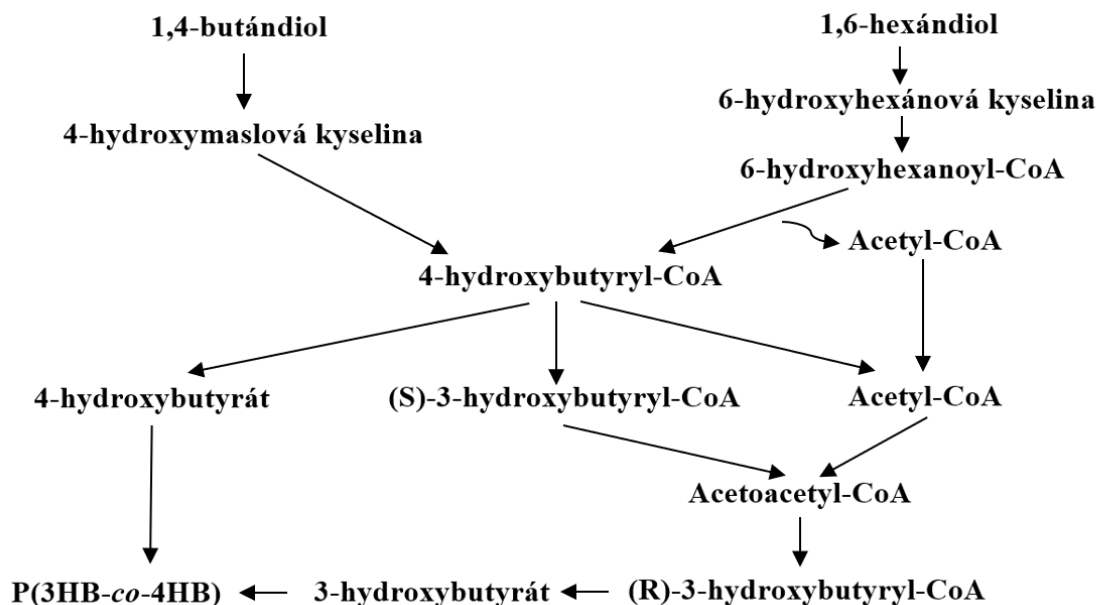
### 2.2.1 Syntéza kopolymérov PHA

Syntézu kopolymérov na báze PHA je možné previesť dvoma hlavnými spôsobmi. Prvým spôsobom je bakteriálna metóda, teda syntéza pomocou mikrobiálnej fermentácie. Druhým prístupom vo výrobe kopolymérov je syntéza pomocou rôznych chemických metód.

#### 2.2.1.1 Bakteriálna fermentácia

Ako už bolo zmienené vyššie, kopolyméry PHA je možné syntetizovať mikrobiálne. Zloženie určitého kopolyméru potom závisí na použítom bakteriálnom kmeni, spôsobe kultivácie, dĺžke inkubačného času a zmene zdroju uhlíka. Príkladom je poly(3-hydroxybutyrát-*co*-4-hydroxybutyrát) [P(3HB-*co*-4HB)], ktorý je možné získať hlavne mikrobiálnou fermentáciou. Je známe, že P(3HB-*co*-4HB) je syntetizovaný radom baktérií, ako napríklad *Cupriavidus*

*necator* H16, *Azohydromonas lata*, *Comamonas testosteronii* [18]. Frakciu 4-hydroxybutyrátu (4HB) je možné zvýšiť pridaním substrátov, ktoré štruktúrne súvisia so 4HB ako kyselina 4-hydroxymaslová, 1,4-butándiol, 1,6-hexándiol a  $\gamma$ -butyrolaktón [21]. Metabolickú dráhu intracelulárnej syntézy P(3HB-co-4HB) z prekursorov 1,4-butándiol, 1,6-hexándiol znázorňuje Obrázok 4 [18-23].



Obrázok 4: Intracelulárna syntéza P(3HB-co-4HB) [23]

### 2.2.1.2 Chemické metódy

Ďalším spôsobom syntézy kopolymérov PHA sú chemické metódy. Rôzne možnosti chemickej syntézy môžu značne znížiť vysoké finančné náklady na prípravu, čo predstavuje najväčšie obmedzenie pri náhrade klasických plastov za bioplasty. Nenasýtené bočné reťazce PHA môžu podstupovať rade chemických reakcií ako napríklad oxidácia na karboxylovú kyselinu alebo alkohol, či epoxidácia pomocou kyseliny m-chlórperbenzoovej (MCPBA) [18]. Kopolyméry môžu byť syntetizované cez oligoméry s karboxylovými alebo hydroxylovými koncami, ktoré sa čiastočne depolymerizujú za priebehu určitej tepelnej alebo chemickej reakcie. Jednotlivé oligoméry ďalej môžu byť spojené polykondenzáciou cez rôzne „spojky“, ktoré predstavujú činidlá ako acylchlorid, tereftaloylchlorid, 1,6-hexametyléndiizokyanát (HDI) [18]. Ďalšími chemickými spôsobmi prípravy kopolymérov sú transesterifikačná reakcia, chemické a radiačné štiepenie alebo polymerizácia otvorením kruhu [18, 24].

### 2.2.2 Fyzikálne vlastnosti kopolymérov PHA

V podkapitole 2.1.2, boli vo všeobecnosti popísané základné charakteristiky a fyzikálne vlastnosti PHA, prevažne zamerané na homopolyméry PHA. Vzhľadom na zameranie tejto diplomovej práce sú nasledujúce kapitoly zamerané konkrétne na kopolyméry PHA a na to, ako monomérmne zloženie ovplyvňuje vlastnosti výsledného polyméru.

Vlastnosti PHA závisia na type prítomných monomérnych jednotiek a ich obsahu, preto kopolymerizáciou rôznych monomérov v definovanom pomere je možné získať kopolymér

s požadovanými vlastnosťami. Ako už bolo zmienené vyššie, najväčšou nevýhodou homopolyméru PHB je jeho vysoký stupeň kryštalinity, spôsobený krátkymi reťazcami s malým počtom atómov uhlíka, čo výrazne obmedzuje jeho využitie v baliacich materiáloch či v biomedicíne. Modifikáciou polyméru je možné výrazne zlepšiť jeho mechanické vlastnosti [25].

Napríklad kopolymér poly(3-hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyvalerát) [P(3HB-*co*-3HV)] je známy svojimi vynikajúcimi mechanickými vlastnosťami s Youngovým modulom približne 1–5 GPa, je semikryštalický, pevnejší a flexibilnejší [25]. S nárastom obsahu 3HV nastáva pokles  $T_m$  (viď Tabuľka 2), vďaka čomu je možné pripraviť filmy o rôznej elasticite. Podobne u kopolyméru P(3HB-*co*-4HB) mechanické vlastnosti prevažne závisia na množstve 4HB jednotiek. Uvádza sa, že bakteriálnou kultiváciou *Comamonas acidovorans* na zmesi substrátov glukózy a 1,4-butándiolu je možné pripraviť kopolymér obsahujúci 0–96 mol. % 4HB [26]. S nárastom frakcie 4HB klesá stupeň kryštalinity, čím sa zvyšuje pevnosť v ťahu (viď Tabuľka 2), a tým je kopolymér pevnejší a elastickejší [27]. Ďalším príkladom je poly(3-hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyhexanoát) [PHBHHx] so zvýšeným obsahom frakcie 3HB, má mechanické vlastnosti podobné vysoko hustotnému polyetylénu (PE) a polypropylénu (PP) (pevnosť a elasticita) [18]. Kryštalinita u kopolyméru PHBHHx klesá so zvyšujúcim sa obsahom frakcie 3-hydroxyhexanoátu (HHx) a v porovnaní s homopolymérom PHB vykazuje lepšie elastoméne vlastnosti (viď Tabuľka 2) [18, 24-27].

Tabuľka 2: Tepelné a mechanické vlastnosti rôznych PHA polymérov a kopolymérov [24]

Polymér	Zloženie kopolyméru	Youngov modul [GPa]	Pevnosť v ťahu [MPa]	Predĺženie pri pretrhnutí [%]	Teplota topenia $T_m$ [°C]	Teplota skleneného prechodu $T_g$ [°C]
PHB		3,5–4	40	3–8	173–180	5–9
P(4HB)		149	104	1000	53	-50
P(3HB- <i>co</i> -3HV)	3 mol. % 3HV	2,9	38	N/A*	170	N/A*
	14 mol. % 3HV	1,5	35	N/A*	150	N/A*
	25 mol. % 3HV	0,7	30	N/A*	137	N/A*
P(3HB- <i>co</i> -4HB)	10 mol. % 4HB	N/A*	24	242	159	N/A*
	64 mol. % 4HB	30	17	591	50	-35
	90 mol. % 4HB	100	65	1080	50	-42

\*N/A - hodnoty nie sú dostupné

Aplikácie homopolymérnych PHA sú obmedzené úzkym rozsahom tepelného spracovania kvôli ich nízkej tepelnej stabilite. Kopolymerizáciou je možné pripraviť materiály o vyššej tepelnej stabilite, čím sa ich využitie výrazne rozširuje. Zmenou obsahu jednotlivých monomérnych frakcií dochádza k zvýšeniu/zníženiu  $T_g$ ,  $T_m$  či k zmene celkovej tepelnej degradácie ( $T_{max}$ ). Tabuľka 2 znázorňuje zmeny tepelných a fyzikálnych vlastností v závislosti na zložení kopolymérov. Teplota degradácie je zvyčajne v blízkosti teploty topenia. Pri jej

dosiahnutí spôsobuje výrazné zníženie molekulovej hmotnosti, farebnú zmenu a stratu reologických či mechanických vlastností. Ďalšou možnosťou vylepšenia fyzikálnych vlastností (okrem zmeny primárnej štruktúry polymérneho reťazca) je miešanie polyméru s ďalšími zložkami v polymérnych zmesiach alebo kompozitoch. Najlepšia tepelná stabilita pri spracovaní za vysokých teplôt sa preukázala u kopolymérov na báze PHA/škrob, PHA/poly(butylénadipát-co-tereftalát) [PHA/PBAT] a za prídavku sieťovacích činidiel (dikumylperoxid, triallyl izokyanurát) [25].

### 2.2.3 Poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát)

P(3HB-co-4-HB) patrí medzi najznámejšie kopolyméry skupiny polyhydroalkanoátov, ktorý je syntetizovaný radom baktérií (napr. *Cupriavidus necator*, *Rhodococcus ruber*, *Alcaligenes latus*, *Comamonas acidovorans*) v podobe vnútrobunkových inklúzií [28]. Prvýkrát bol objavený u bakteriálneho kmeňa *Cupriavidus necator* v roku 1988 [21]. Pre svoj vysoký potenciál vo využití, z dôvodu jeho priaznivých mechanických vlastností a pre PHA tradičnej netoxicity či biokompatibility, sa stal predmetom záujmu hneď niekoľkých spoločností ako napríklad Green Bioscience (Čína), Bio-On (Taliansko), PHB industrial (Brazília), Meredian (USA) či Metabolix (USA), čím sa na trh uviedla aj jeho komerčne vyrábaná forma [30]. Vzhľadom na jeho priaznivé vlastnosti nachádza široké aplikačné využitie v rôznych priemyselných odvetviach (biomedicína, spotrebná chémia, obalové materiály, atď.) [21, 28-30].

Oproti PHB je P(3HB-co-4-HB) známy svojou vysokou flexibilitou, húževnatosťou a predovšetkým dobrou spracovateľnosťou, za čo je zodpovedný prítomný 4HB monomér. Keď dochádza ku kryštalizácii kopolyméru, monoméry 4HB sú vylúčené z kryštalovej mriežky, čím sa znižuje schopnosť kryštalizácie PHB [31]. Všetky tieto vlastnosti polyméru je možné regulovať obsahom 4HB frakcie. S jej zvýšením dochádza poklesu Youngovho modulu,  $T_m$ ,  $T_g$  a zvyšuje sa predĺženie pri pretrhnutí a teplota tepelnej degradácie (viď Tabuľka 2) [31]. Ako termoplastický materiál je možné polymér spracovať metódami ako extrúzia, vstrekovanie, lisovanie alebo v poslednej dobe aj 3D tlač [31, 32].

Zlé reologické vlastnosti, postupná zmena fyzikálnych vlastností s časom, či nedostatočná tepelná stabilita sú vážnym problémom P(3HB-co-4HB) pri jeho komerčnom využití. Modifikáciou kopolyméru P(3HB-co-4HB) zmiešaním s inými polymérmi, ako sú napríklad polylaktid, poly(butylénsukcinát), či s ďalšími sieťovacími činidlami, predstavuje sľubnú cestu k výrobe materiálov s ešte priaznivejšími vlastnosťami, a tým sa zvýši aj ich využiteľnosť v rôznych odvetviach priemyslu [33].

### 2.2.4 Poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)

Ďalším známym zástupcom z rady kopolymérov PHA je Poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) [P(3HB-co-3HV)]. Medzi mikroorganizmy schopné produkcie P(3HB-co-3HV) patria bakteriálne kmene ako rekombinatná *Escherichia coli* a *Cupriavidus necator* [34]. Vďaka jeho vynikajúcim biokompatibilným a biodegradabilným vlastnostiam má veľký potenciál v náhrade za petrochemické plasty. Aplikáciu nachádza predovšetkým v biomedicíne, kde je využívaný ako nosičový systém na uvoľňovanie liečiv, nakoľko v biologickom médiu



degraduje pomalšie ako napríklad PHB [35]. Ďalej sa využíva na prípravu chirurgických šijacích materiálov, tkanivových náplastí či implantátov [36]. Okrem toho tento materiál nachádza použitie aj v iných priemyselných odvetviach, kedy je používaný napríklad k príprave obalových materiálov (tašky, nádoby), v elektronike či automobilovom priemysle [34-37].

Ako už bolo zmienené vyššie, v porovnaní spracovateľnosti PHB a P(3HB-co-3HV), termoplastický kopolymér P(3HB-co-3HV) vykazuje výrazne lepšie mechanické vlastnosti. Ako je možné vidieť v Tabuľke 2, teplota topenia P(3HB-co-3HV) je nižšia ako PHB a s rastúcim obsahom monoméru HV klesá. Hodnoty Youngovho modulu (2,9-0,7 GPa) sú celkovo nižšie ako u homopolyméru PHB a klesajú so zvyšujúcim sa obsahom HV, čím dochádza k vzniku menej pevného materiálu. Stupeň kryštalinity závisí na pomere monomérnych jednotiek v kopolyméri. Monomér HV spôsobuje defekt kryštálov PHB lamiel, čo vedie k narušeniu kryštalinity PHB [2]. Miera kryštalinity taktiež ovplyvňuje aj transportné vlastnosti. S rastúcim obsahom frakcie HV, teda dochádza k vzniku amorfnejšej štruktúry, cez ktorú môžu molekuly aktívnych látok difundovať jednoduchšie [35]. Všeobecne sa okrem toho vyznačuje priaznivými vlastnosťami kyslíkovej bariéry, vysokou viskozitou v kvapalnom stave či odolnosťou voči UV žiareniu [2, 35-37].

## 2.3 Modelové mikroorganizmy produkujúce PHA

Široké využívanie komerčne vyrábaných plastov na báze PHA je vo veľkej miere obmedzené vysokými nákladmi na produkciu. Preto sa na syntézu PHA čím ďalej tým viac využívajú mikroorganizmy, ktoré produkujú PHA procesom mikrobiálnej fermentácie. Veľké množstvo bakteriálnych kmeňov prirodzene produkuje PHA ako vnútrobunkové inklúzie. Nakoľko je bakteriálna produkcia PHA podporená za určitej substrátovej limitácie, teda nie sú potrebné veľké koncentrácie uhlíkových či dusíkových zdrojov v médiu, je možné náklady na prípravu znížiť. Rôzne štúdie ukázali, že mikroorganizmy dokážu využívať aj lacné obnoviteľné uhlíkové substráty, ako sú rastlinné a živočíšne oleje či použité odpadové oleje, čo významne prispieva k zníženiu výrobných nákladov. Tieto zdroje uhlíka sa dokonca ukázali ako veľmi výhodné pre bakteriálnu fermentáciu, nakoľko získaná biomasa obsahovala vysoké výťažky PHA. Medzi mikroorganizmy produkujúce PHA patria bakteriálne kmene ako *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter sp.*, *Aneurinibacillus sp.*, *Aeromonas hydrophila*, *Halomonas boliviensis* a mnohé ďalšie [38-41].

### 2.3.1 Bakteriálny kmeň *Cupriavidus necator* H16

Medzi najznámejších a najviac študovaných producentov PHA patrí bakteriálny kmeň *Cupriavidus necator* H16. Jedná sa o pôdny mikroorganizmus patriaci do skupiny gramnegatívnych baktérií. Na bakteriálnu produkciu PHA je využívaný najmä vďaka jeho vysokej akumulácii polyméru, a to až do 90 hm. % zo suchej biomasy. Počas fermentácie je schopný využívať lacnejšie zdroje uhlíka ako sú organické zvyšky, odpadová voda či použité rastlinné oleje [42, 43].

Všestrannosť využitia *C. necator* H16 spočíva aj v jeho schopnosti syntézy rôznych kopolymérov, kedy výberom vhodných prekursorov je možné zakorporovať do PHB reťazca monomérne jednotky napríklad 4-hydroxybutyrátu, 3-hydroxyvalerátu alebo

3-hydroxyhexanoátu. Prekurzory pre bakteriálnu syntézu poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyhexanoátu) [PHBHHx] môžu byť napríklad rastlinné oleje (palmový, avokádový olej), namiesto drahých zlúčenín ako napríklad hexanoát sodný [44]. Relatívne vysoký obsah HHx (18 mol. %) v kopolyméri PHBHHx vyprodukovaného *C. necator* H16, sa podarilo získať za použitia palmového oleja, ako jediného zdroja uhlíka počas kultivácie. V ďalšej štúdií z roku 2021, bol vyprodukovaný kopolymér so 17 mol. % HHx s využitím uhlíkových zdrojov fruktózy a repkového oleja [45]. Ako prekurzory pre začlenenie 4HB monomérov do PHB reťazca sú často využívané substráty ako 1,4-butándiol,  $\epsilon$ -kaprolaktón či 1,6-hexándiol. Z uvedených prekurzorov viedol k najvyššiemu obsahu 4HB (68,89 mol. %)  $\epsilon$ -kaprolaktón, no výťažok biomasy bol pomerne nízky (0,22 g/l). Najefektívnejšie sa ukázal 1,6-hexándiol, kedy bol stanovený obsah 4HB na 34,35 mol. %, pričom obsah biomasy bol 2,64 g/l [46]. V danej štúdií sa pomocou *C. necator* H16 taktiež podarilo syntetizovať terpolymér s obsahom jednotiek 3HB, 4HB a 3HV, pričom ako prekurzor pre 3HV bola použitá kyselina propiónová a valérová [44-46].

### 2.3.2 Bakteriálny kmeň *Aneurinibacillus* sp. H1

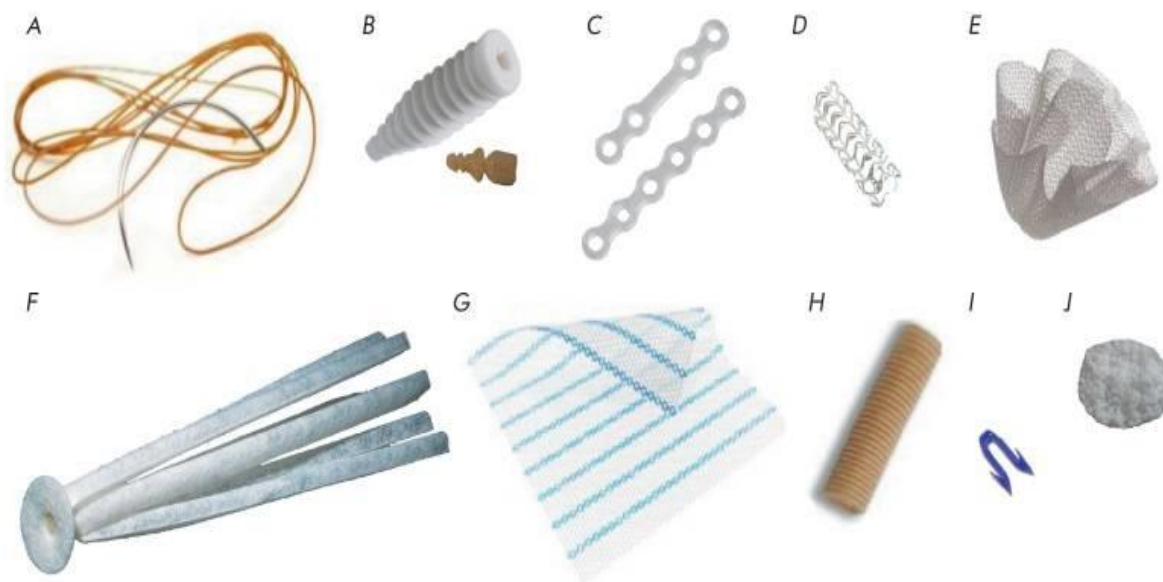
Ďalším PHA-syntetizujúcim bakteriálnym kmeňom je *Aneurinibacillus* sp. H1. Jedná sa o pomerne nový mikroorganizmus, čo sa týka jeho biotechnologického využitia pri produkcii PHA. *Aneurinibacillus* sp. H1 patrí medzi zástupcov termofilných grampozitívnych baktérií, s optimálnym rastom pri 50 °C, nakoľko sa jedná o termofilný mikroorganizmus. Počas kultivácie *Aneurinibacillus* sp. H1, sú využívané rôzne zdroje uhlíka ako glycerol, glukóza, fruktóza či galaktóza. Jeho vysoký potenciál v produkcii PHA spočíva predovšetkým v jeho schopnosti syntetizovať rôzne kopolyméry či terpolyméry na báze PHA [47-49].

Podľa zvoleného prekurzoru je bakteriálny kmeň schopný syntetizovať kopolyméry obsahujúce monomérmne jednotky 3-hydroxybutyrátu, 4-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu. Bolo zistené, že zmenou množstva pridaného prekurzoru je možné regulovať monomérmne zloženie kopolyméru, a tým ovplyvniť jeho štruktúrne a fyzikálne vlastnosti [47]. Ako prekurzory pre syntézu monomérov 3HV sa zvyčajne používajú látky ako kyselina levulová, kyselina propiónová, n-propanol a valerát. V štúdií z roku 2020, kde boli baktérie *Aneurinibacillus* sp. H1. kultivované za použitia týchto substrátov, sa z daných prekurzorov najlepšie ukázal valerát, kedy pri jeho použití bol pripravený kopolymér P(3HB-co-3HV) s pomerne vysokým obsahom 3HV, a to 66,62 mol. % [48]. Prekurzory pre syntézu kopolyméru s obsahom monomérov 4HB sú zvyčajne 1,6-hexándiol,  $\gamma$ -butyrolakton a 1,4-butándiol, s použitím ktorých boli pripravené kopolyméry s obsahom 4HB 63,35 mol. % ( $\gamma$ -butyrolakton) a 79,91 mol % (1,4-butándiol) [47-50].

## 2.4 Aplikácia polyhydroxyalkanoátov v medicínskom priemysle

Biologicky odbúrateľné PHA materiály sa v medicínskom sektore začali využívať už v 70. rokoch 20. storočia, kedy sa v roku 1974 prvýkrát na trhu objavil chirurgický šijací materiál Vicryl vyrobený z biopolymérov. Od tej doby sa využitie PHA v medicíne rozrástlo takým spôsobom, že v súčasnosti je možné nájsť na trhu radu rôznych produktov vyrobených z PHA ako napríklad chirurgické svorky, skrutky, šijací materiál, obvazy, náplasti, vaskulárne protetické implantáty, chirurgické sieťkové endoprotézy, umelé srdcové chlopne, nosičové

systemy pre uvoľňovanie liečiv a iné. Obrázok 5 zobrazuje rôzne bioresorbovateľné zdravotnícke pomôcky, na ktorých výrobu boli použité materiály na báze PHA polymérov [51].



Obrázok 5: Bioresorbovateľné zdravotnícke pomôcky vyrobené z PHA materiálov: A) stehy, B) skrutky na fixáciu kostí, C) dlahy na fixáciu kostí, D) koronárny stent, E) tkaná endoprotéza pre hernioplastiku, F) fistulová endoprotéza koloproktologické aplikácie, G) sieťovaná endoprotéza pre hernioplastiku, H) svorka na svorkovanie kože, I) svorka na svorkovanie kože, J) membrána na opravu defektov mäkkých tkanív [51]

Vysoký potenciál PHA materiálov v medicíne spočíva predovšetkým v ich dvoch popredných vlastnostiach, ktoré sú biokompatibilita a biodegradabilita. Biokompatibilita je jedným z najdôležitejších parametrov materiálu, keďže medicínske pomôcky nesmú predstavovať žiadne riziko pre organizmus, musia byť netoxické a nemôžu spôsobovať žiadne závažné imunitné reakcie. Ďalšou poprednou vlastnosťou je ich stopercentná biologická odbúrateľnosť, vďaka ktorej v organizme ani v prírode nezostávajú žiadne toxické produkty rozkladu, na rozdiel od syntetických plastov [51, 52].

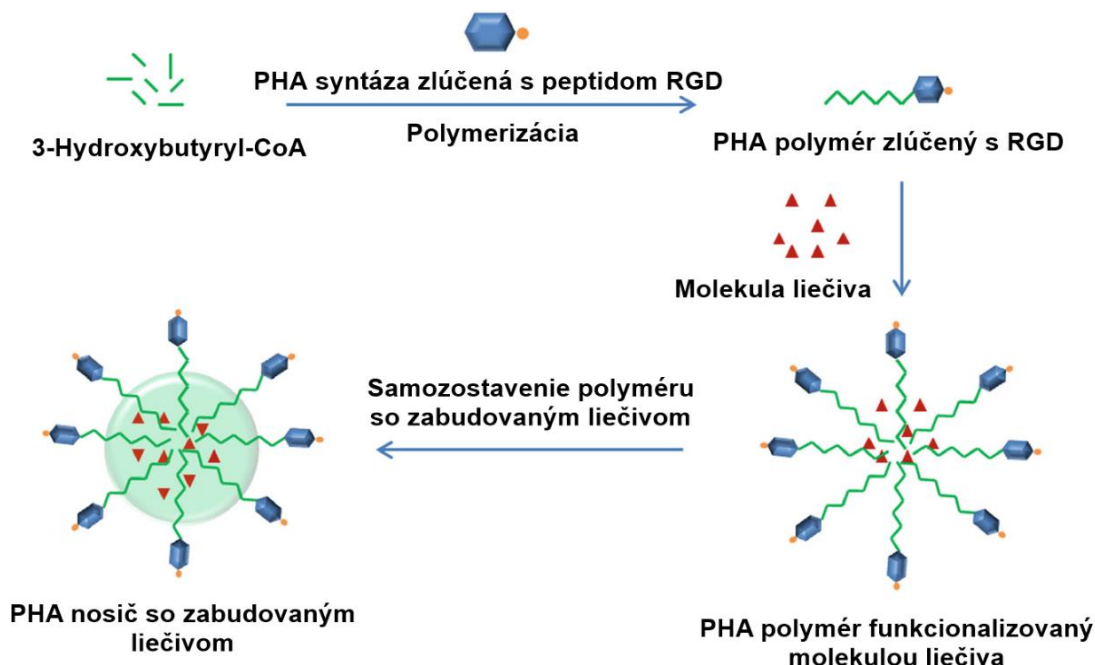
#### 2.4.1 Nosičové systémy pre uvoľňovanie liečiv

Kinetika degradácie umožňuje využitie polymérov aj ako nosičové systémy s riadeným uvoľňovaním liečiv ako antibiotiká, analgetiká, protinádorové liečivá a pod. PHA je možné spracovať do podoby micel, mikrokapsúl, nanočastíc, filmov, hydrogélův a poréznych matric (viď Obrázok 6), do ktorých je následne inkorporovaná liečivá látka [52].



*Образок 6: Приклады spracovania PHA matric pre nosičové systémy [52]*

Aktívna látka je inkorporovaná do PHA matrice, ktorá sa po určitom čase degraduje a pôsobí ako dávkovač aktívnej látky v cieľovom mieste. Boli opísané rôzne metódy enkapsulácie, pričom výber danej metódy závisí na povahe aktívnej molekuly, vlastnostiach polymérneho materiálu a dĺžke či type liečby [53]. Proces enkapsulácie liečiva do PHA matrice znázorňuje Obrázok 7, kde dochádza k naviazaniu molekuly liečivej látky na PHA polymér fúzovaný RGD peptidom (najbežnejšia aminokyselinová sekvencia zodpovedná za bunkovú adhéziu k extracelulárnej matrici) a následnému zapuzdrovaniu vytvorením micely. Na enkapsuláciu hydrofilných molekúl sa typicky využíva metóda dvojitej emulzie voda/olej/voda (W/O/W), nasledovaná extrakciou a odparením rozpúšťadla. Hydrofóbne látky sú naopak zapuzdrené do hydrofóbnych micel spôsobom emulzie olej/voda (O/W), kedy liečivo je zriedené roztokom organického rozpúšťadla a hydrofóbneho polyméru, pričom je organické rozpúšťadlo následne odparené [52, 53].



Obrázok 7: Proces enkapsulácie liečiva do PHA matrice [54]

Amfifilné nanočastice blokových kopolymérov PHA môžu dodávať presnú dávku aktívnej látky na špecifické miesto (napr. nádor) po trvalé časové obdobie, čím sa eliminujú vedľajšie účinky spojené s viacnásobným dávkovaním liečiva do organizmu. V dôsledku defektnej a presakujúcej štruktúry ciev nádoru, môžu polymérne nanočastice ľahko difundovať do nádorových tkanív. Rýchlosť difúzie však závisí na molekulovej hmotnosti. Čím sú častice väčšie a ťažšie, tým horšie budú prestupovať membránami, čo môže spôsobiť neefektívnu terapeutickú liečbu. Pre účinnejšie uvoľňovanie liečiv, je preto vhodné používať nanočastice s menším priemerom pripravené z nízko molekulárnych PHA polymérov [55].

Uvoľňovanie liečiv z PHA matric bolo študované *in vitro* pomocou rôznych typov liečiv ako napríklad tetracyklín (širokospektrálne antibiotikum), rifampicin (antituberkulotikum), gentamicin (širokospektrálne antibiotikum), sulperazon (širokospektrálne antibiotikum), rubomycin (protinádorové liečivo) a tramadol (opioidné analgetikum). Kinetika uvoľňovania sa najčastejšie analyzuje inkorporovaním farbív ako rhodamín B izotiokyanát, metylenová modrá alebo nílka červená, do štruktúry nanočastice a následným pozorovaním uvoľnenia konkrétneho farbiva do prostredia/roztoku [52].

PHB sa ukázal ako veľmi nádejný vo vývoji materiálov na prípravu nosičov, nakoľko jeho degradácia vedie k tvorbe monoméru kyseliny D-(-)-3-hydroxymaslovej, ktorá sa prirodzene vyskytuje v krvi [53]. Napriek jeho výhodným vlastnostiam je však využitie PHB značne obmedzené kvôli jeho vysokej tuhosti a kryštalinite. Riešením tohto problému, ako už bolo spomenuté vyššie, sa stali práve kopolyméry na báze PHA, vďaka svojim vylepšeným biofyzikálnym vlastnostiam. Na prípravu nosičových systémov boli použité dvojblokové kopolyméry ako poly(hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyvalerát), poly(3-hydroxybutyrát-*co*-4-hydroxybutyrát), poly(3-hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyoktanoát) a poly(3-hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyhexanoát) [52-56].

## 2.4.2 Biomateriály v tkanivovom inžinierstve

Biomateriály, tiež známe ako „*scaffoldy*“ pripravené z PHA biodegradabilných materiálov, sa využívajú v inžinierstve mäkkých (koža, šľachy, krvné cievy) aj tvrdých tkanív (kosti, chrupavky). Biofyzikálne a mechanické vlastnosti PHA lešenia prispievajú k oprave tkanivových defektov a napomáhajú ich regenerácii [52].

U tvrdých tkanív bolo zistené, že faktor napomáhajúci oprave defektu, je kryštalinita polyméru, ktorá sa prejavuje pri interakciách PHA s chondrocytmi chrupavky, pričom maturačná diferenciácia chondrocytov je priamo ovplyvnená množstvom PHB [52]. V mieste defektu PHB priamo napomáha k tvorbe kostnej chrasty, ktorá sa vyformuje do nového kostného tkaniva a následne dôjde k jej spojeniu s okolitým pôvodným tkanivom. Samotné PHB však nemá dostatočné osteogénne vlastnosti, preto je potrebné začlenenie špecifických anorganických/organických zlúčenín, ako hydroxyapatit (HA), bioaktívne sklo (BG) a alginát (ALG) [57]. Bolo zistené, že zmes P(HB-*co*-8%HV)/HA (30% hm./hm.) má pevnosť tlaku totožnú s pevnosťou ľudskej kosti (62 MPa), nevyvoláva zápalovú odpoveď a podporuje mineralizáciu tkaniva [58]. Elektricky zvlákňované skelety z P(3HB-*co*-4HB) s vynikajúcou biokompatibilitou, podporujú bunkovú adhéziu a proliferáciu bez cytotoxicity a v štúdiách *in vivo* bolo zistené, že napomáhajú oprave calvariálnych defektov u potkanov [52, 57-59].

Všeobecne najúčinnším spôsobom ako urýchliť hojenie povrchových rán je použitie obväzových materiálov či biomedicínskych *scaffoldov*. Lešenia pripravené tkanivovým inžinierstvom podporujú proliferáciu a diferenciáciu buniek a napomáhajú k oprave kožného defektu [57]. Konkrétne vláknité membrány z P(3HB-*co*-4HB) pripravené elektrostatickým zvlákňovaním, sa ukázali ako vhodné obväzové materiály, nakoľko dochádzalo k podporeniu angiogenézy a zníženiu zápalu v mieste defektu, čím sa podporilo hojenie rany [57]. V ďalšej štúdii z roku 2016 sa skúmalo aj začlenenie kolagénových peptidov do membrán P(3HB-*co*-4HB) pre zlepšenie zmáčavosti povrchu a rastu buniek. Kolagénové peptidy mali pozitívny vplyv na kontrakciu rany, čím došlo k jej rýchlejšiemu uzavretiu [57, 60].

## 2.5 Súčasný trendy vo využití PHA v biomedicíne

Ako už bolo zmienené vyššie, PHA materiály patria v dnešnej dobe k jedným z najviac skúmaných biopolymérov. Vzhľadom k téme tejto diplomovej práce, bola spracovaná literárna rešerš, v ktorej je uvedených niekoľko štúdií o aplikácií PHA v medicínskom odvetví.

*Faisalina a kol.* sa vo svojej práci zamerali na prípravu nanočastíc z kopolyméru P(3HB-*co*-4HB), do ktorých bolo nadávkované protirakovinové liečivo docetaxelom (DCX). V štúdií boli použité tri kopolyméry s rôznym obsahom frakcie 4HB (16; 30; 70 mol. %). Nanočastice boli pripravené pomocou metódy emulgácie a následného odparenia rozpúšťadla. Pripravené nosičové systémy vykazovali priemernú veľkosť častíc 140–180 nm a mali hladký povrch, na ktorom neboli pripojené žiadne voľné kryštály liečiva. Pri optimalizácii sa ukázali ako najúčinnšie nanočastice pripravené z kopolyméru P(3HB-*co*-70%4HB) s prídavkom stabilizátora polyvinylalkoholu (PVA). Účinnosť enkapsulácie u týchto nanočastíc bola až 50 % a nadávkovanie liečiva bez agregácie bolo možné do pomeru liečivo/polymér 30 %. Výsledky ukázali, že nízke pomery liečivo/polymér (30 %) vedú k predĺženiu uvoľňovania

v porovnaní s typickými nosičovými systémami, kedy po 7 dňoch došlo k uvoľneniu 60 % liečiva. Naopak u vysokých pomerov liečivo/polymér došlo k urýchleniu uvoľňovania, pričom k úplnému uvoľneniu došlo už po 48 hodinách [61].

Zatiaľ čo v štúdiu pod vedením *Bazzo a kol.* boli pripravené nosičové systémy v podobe mikrokapsúl na báze kopolyméru pozostávajúceho z P(3HB-*co*-3HV) a kyseliny polymliečnej (PLA). Do týchto nosičových systémov bol inkorporovaný ibuprofén, pričom sa sledovalo uvoľňovanie liečiva. Cieľom štúdie bolo predĺženie doby uvoľňovania liečiva v testoch *in vitro* a *in vivo*. Na prípravu mikrokapsúl bola použitá technika odparovania rozpúšťadla z emulzie O/W, pričom sa u kopolyméru menil pomer jednotlivých frakcií. V testoch *in vitro* sa na základe profilu rozpúšťania ukázalo, že najlepšie výsledky z hľadiska predĺženia uvoľňovania vykazoval kopolymér o zložení 30 mol. % P(3HB-*co*-3HV) a 70 mol. % PLA. V testoch *in vivo* u potkanov sa pri analýze krvi ukázalo, že koncentrácia ibuprofenu vo forme čistého liečiva dosiahla maximálnej hladiny po 1–2 hodinách od podania liečiva. Pri použití P(3HB-*co*-3HV)/PLA mikrokapsúl, došlo k uvoľneniu malého množstva počas prvých dvoch hodín a maximálna hladina sa dosiahla po 6 hodinách od podania [62].

Ďalšia štúdia zabývajúca sa uvoľňovaním liečiva, bolo prevedená *Sendil a kol.*, ktorí sledovali model uvoľňovania liečiva z nosičových systémov pripravených z mikrobiálneho kopolyméru P(3HB-*co*-3HV) s rôznym obsahom frakcie HV. Ako liečivo inkorporované do systému bol použitý tetracyklín. Jedná sa o širokospektrálne antibiotikum účinné proti mnohým mikroorganizmom, súvisiacich s parodontálnym ochorením. Pre charakterizáciu procesu uvoľňovania bola použitá jeho kyslá aj neutralizovaná forma. Mikrokapsule boli pripravené metódou emulzie W/O/W a následne boli pozorované ich vlastnosti ako účinnosť enkapsulácie, model uvoľňovania a morfológia. Bolo zistené, že účinnosť enkapsulácie bola značne vyššia u neutralizovanej formy (51,9–65,3 %) ako u kyslej (18,1–30,1 %), v dôsledku nerozpustnej formy liečiva, vďaka čomu je do systému možné nadávkovať väčšie množstvo aktívnej látky. Predĺženie uvoľňovania bolo pozorované u neutralizovanej formy, u ktorej profil uvoľňovania bol značne pomalší, pričom kinetika uvoľňovania nezodpovedala kinetike nultého rádu [63].

Okrem nosičových systémov sa nedávne štúdie v aplikácií kopolymérov PHA zamerali aj na obväzové materiály. *Volova a kol.* sa vo svojej práci zamerali na prípravu hybridných obväzov za použitia dvoch biomateriálov: bakteriálnej celulózy (BC) a P(3HB-*co*-4HB). Skonstruované membrány boli impregnované rôznymi liečivami, podporujúcimi hojenie rán. V testoch *in vitro* sa ako najefektívnejšia pre rast fibroblastov ukázala membrána BC/P(3HB-*co*-4HB) s inkorporovaným liečivom aktoveginom. V testoch *in vivo* boli skúmané 2 typy obväzov: BC/P(3HB-*co*-4HB)/aktovegin a BC/P(3HB-*co*-4HB)/fibroblasty. Proces hojenia rán bol sledovaný na laboratórnych zvieratách s modelovými popáleninami kože III. stupňa. Výsledky ukázali, že plocha rany uzavretej obväzom BC/P(3HB-*co*-4HB)/aktovegin sa po 14 dňoch zmenšila na 7,3 % z pôvodnej plochy a pri použití obväzu BC/P(3HB-*co*-4HB)/fibroblasty došlo k zmenšeniu na 9 % pôvodnej plochy. Obväzy z biomateriálov sa ukázali ako oveľa účinnejšie v podporovaní hojenia rán ako komerčné obväzy, nakoľko pri kontrolných testoch s komerčným obväzom VoskoPran, došlo po 14 dňoch k zmenšeniu rany len na 30,6 % pôvodnej plochy [64].

## 3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 3.1 Použité mikroorganizmy, chemikálie a prístroje

#### 3.1.1 Použité mikroorganizmy

Pri prevádzaní experimentálnych pokusov bol použitý bakteriálny kmeň *Aneurinibacillus* sp. H1, ktorý je patentovaný na Fakulte chemickej VUT a bakteriálny kmeň *Cupriavidus necator* H16 CCM 3726 získaný z Českej zbierky mikroorganizmov, Brno, Česká republika.

#### 3.1.2 Použité chemikálie

- Acetylsalicylová kyselina, Sigma Aldrich, DEU
- Acylpyrín, Herbacos Recordati s.r.o., CZE
- 1,4-Butándiol, Sigma Aldrich, DEU
- Citrát železito-amónny, Fluka, CHE
- Dihydrogénfosforečnan draselný, Lach-Ner, CZE
- Dodekahydrát hydrogénfosforečnanu sodného, Lach-Ner, CZE
- Dusičnan amónny, Lach-Ner, CZE
- Etanol 99,8%, Lach-Ner, CZE
- D-fruktóza, Lach-Ner, CZE
- Glycerol, Lach-Ner, CZE
- Heptahydrát síranu horečnatého, Lach-Ner
- Ibuprofén, Sigma Aldrich, DEU
- Izopropylalkohol, Lach-Ner, CZE
- Chlorid vápenatý, Lach-Ner, CZE
- Chloroform, Lach-Ner, CZE
- Nutrient Broth, HiMedia, IND
- Síran amónny, Lach-Ner, CZE
- Trypton, Sigma Aldrich, DEU

#### 3.1.3 Použité prístroje

- Analytické váhy, Ohaus Pioneer PA224C
- ATR-FTIR, Thermo Scientific, Waltham iS50
- Centrifúga, Sartorius Sigma 1-14
- Centrifúga, Hettich EBA 200
- Laminárny box Aura mini, BioAir Instruments - Euroclone
- Magnetická miešačka bez ohrevu, Biosan MMS-3000
- Nanofotometer, Implen P300
- Plynový chromatograf s FID, Thermo Scientific, Trace 1300; kolóna: DB-WAX 30 m by 0,25 mm
- SEC chromatograf s kolónou PLgel mixed-C 5  $\mu$ m, 300 by 7,5 mm, Agilent Technologies; detektory: MALS – DAWN HELEOS II, diferenčný refraktometer OPTILAB T-REX, Wyatt Technology
- Spektrometer Nicolet iS50 FTIR, Thermo Scientific
- Soxtherm, Gerhard



- Temperovaná trepačka, Heidolph, Inkubator 1000
- Termoblok, Stuart, SBH130D
- Termogravimetrický (TGA) analyzátor Q5000, TA Instruments
- Váhy, Kern EW 620-3NM
- Vortex, Benchmark, BenchMixer
- Bežné laboratórne sklo a vybavenie

## 3.2 Kultivácia mikroorganizmov

### 3.2.1 Príprava komplexných inokúl

Ako inokulum pre bakteriálny kmeň *Aneurinibacillus* sp. H1 bolo pripravené komplexné inokulum Nutrient Broth o koncentrácii 25 g/l. Nakoľko sa experiment prevádzal vo veľkom množstve (60–100 baniek), bola kultivácia v komplexnom inokule rozdelená do dvoch krokov: kultivácia v malom inokule o objeme 50 ml v 100 ml bankách (24 h) a následná kultivácia vo veľkom inokule o objeme 100 ml v 250 ml bankách (ďalších 24 h).

Zloženie Nutrient Broth:

- |               |                      |
|---------------|----------------------|
| • Beefextract | 10 g·l <sup>-1</sup> |
| • Pepton      | 10 g·l <sup>-1</sup> |
| • NaCl        | 5 g·l <sup>-1</sup>  |
| • Agar        | 20 g·l <sup>-1</sup> |

Nutrient Broth bol navážený na analytických váhach a následne rozpustený v destilovanej vode za súčasného miešania na magnetickej miešačke. Banky s inokulom boli sterilizované v tlakovom hrnci so zavretým ventilom po dobu 30 min pri teplote 220 °C. Vysterilizované média boli ochladené na laboratórnu teplotu. V sterilnom laminárnom boxe boli malé inokulá zaočkované 350 µl bakteriálnej kultúry z kryokúmvavky. Zaočkované inokulá boli kultivované na temperovanej trepačke po dobu 24 hodín pri teplote 50°C a 150 rpm. Po 24 hodinách bolo odobratých 10 ml kultúry, s ktorými boli zaočkované veľké média, ktoré boli ponechané ďalších 24 hodín na trepačke.

### 3.2.2 Kultivácia *Aneurinibacillus* sp. H1 v produkčnom médiu

Bakteriálna kultúra z inokula, bola preočkovaná 10 obj. % do produkčného média s rôznym obsahom substrátov: glycerol a 1,4-butándiol. Dané substráty boli zvolené za účelom bakteriálnej produkcie kopolyméru P(3HB-co-4HB). Pri kultivácii boli testované rôzne pomery substrátov, v snahe nájsť taký pomer, pri ktorom bude percentuálny obsah frakcie 4HB čo najvyšší. Média boli pripravované do Erlenmayerových baniek o objeme 250 ml so 100 ml média.

Zloženie produkčného média:

- |   |        |
|---|--------|
| • Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O | 9,00 g |
| • KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 1,50 g |
| • NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                       | 1,00 g |
| • Trypton   | 0,50 g |

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,20 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,02 g
- $\text{FeNH}_4$  – citrát 0,0012 g
- destilovaná voda 1 000 ml
- roztok TES\* 1 ml/l

Samostatne bol pripravený zásobný roztok stopových prvkov TES.

\*Zloženie roztoku TES:

- EDTA 50 g
- $\text{FeCl}_3$  8,30 g
- $\text{ZnCl}_2$  0,84 g
- $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  0,13 g
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  0,10 g
- $\text{MnCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  0,016 g
- $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,10 g

K minerálnemu médiu boli následne pridané substráty glycerol a 1,4-butándiol v niekoľkých koncentračných pomeroch, aby sa dosiahlo rôzne zloženie kopolyméru P(3HB-co-4HB) v biomase. Jednotlivé substráty boli navážené a pridané do média v nasledovnom množstve, vid' Tabuľka 3.

Tabuľka 3: Koncentrácie substrátov v produkčných médiách

Glycerol [g/l]	1,4-Butándiol [g/l]
2	4
4	4
6	4
8	4

Rovnako ako pri príprave inokula, boli jednotlivé navážky rozpustené v destilovanej vode za súčasného miešania na magnetickej miešačke. Jednotlivé substráty boli taktiež navážené a pridané do média. Banky s médiom boli sterilizované v tlakovom hrnci so zatvoreným ventilom po dobu 30 min. Vysterilizované produkčné média boli ochladené na laboratórnu teplotu. V sterilnom laminárnom boxe bol do médií pridaný roztok TES a 10 obj. % kultúry (z veľkého inokula). Zaočkované média boli kultivované na temperovanej trepačke po dobu 48 hodín pri teplote 50 °C a 150 rpm.

### 3.2.3 Kultivácia *Cupriavidus necator* H16

Pre porovnanie vlastností homopolymérnych a kopolymérnych vyizolovaných filmov, bola uskutočnená aj kultivácia bakteriálneho kmeňa *Cupriavidus necator* H16, produkujúceho PHB. Komplexné inokulum bolo pripravené rovnako ako u bakteriálneho kmeňa *Aneurinibacillus* sp. H1 (vid' kapitola 3.2.1), s tým rozdielom, že bolo prevádzané len v jednom kroku (iba malé

inokulá). Produkčné médium bolo pripravené do Erlenmayerových baniek o objeme 250 ml so 100 ml média.

Zloženie produkčného média (na 1 000 ml) :

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,00 g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,02 g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  11,10 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,20 g
- destilovaná voda 1 000 ml
- roztok MES\* 1 ml/l
- fruktóza 50 ml/l

Samostatne boli pripravené zásobné roztoky fruktózy o koncentrácii 400 g/l a stopových prvkov MES.

\*Zloženie roztoku MES:

- $\text{FeCl}_3$  9,70 g
- $\text{CaCl}_2$  7,80 g
- $\text{CuSO}_4$  0,156 g
- $\text{CoCl}_2$  0,119 g
- $\text{NiCl}_2$  0,118 g
- $\text{CrCl}_2$  0,062 g
- 0,1 mol/l HCl 1 000 ml

Jednotlivé navážky boli rozpustené v destilovanej vode za súčasného miešania na magnetickej miešačke. Banky s médiom boli sterilizované v tlakovom hrnci so zatvoreným ventilom po dobu 30 min. Roztok fruktózy bol sterilizovaný pri otvorenom ventile. Do vysterilizovaných produkčných médií boli pridané roztoky fruktózy (5 ml) a stopových prvkov MES (0,1 ml) a následne boli zaočkované 10 obj. % kultúry z inokula. Zaočkované média boli kultivované na temperovanej trepačke po dobu 48 hodín pri teplote 30 °C a 150 rpm.

### **3.3 Stanovenie obsahu biomasy**

#### **3.3.1 Spektrofotometrické stanovenie obsahu biomasy**

Koncentrácia buniek v produkčnom médiu bola stanovovaná pomocou merania optickej hustoty pri vlnovej dĺžke 630 nm oproti destilovanej vode. Z baniek bola odobratá vzorka kultúry, ktorá bola pred meraním 10krát zriedená v kyvete destilovanou vodou na celkový objem 1 ml. Meranie vzorky bolo opakované vždy 2krát.

#### **3.3.2 Gravimetrické stanovenie obsahu biomasy**

Pre gravimetrické stanovenie obsahu biomasy bolo z média odobratých 10 ml kultúry do centrifugačnej skúmavky vždy v dvoch paralelných prevedeniach. Vzorky kultúry boli odstredené v centrifúge pri 6 000 rpm po dobu 5 minút. Po centrifugácii bol supernatant zliaty a sediment bol premytý 10 ml destilovanej vody. Po dispergácii zmesi na vortexe boli vzorky

druhýkrát odstredené v centrifúge. Supernatant bol opäť zliaty a skúmavky so sedimentom boli usušené v sušiarňi pri 70 °C po dobu minimálne 24 hodín, dokým vzorky nedosiahli konštantnú hmotnosť. Po vysušení peletu boli jednotlivé vzorky zvážené na analytických váhach, na základe čoho bol stanovený obsah biomasy.

### **3.4 Stanovenie obsahu PHB v biomase pomocou GC-FID**

Obsah PHB vo vzorkách vysušenej biomasy bol stanovený s použitím plynovej chromatografie s plameňovou ionizačnou detekciou (FID). Samotnému meraniu vzoriek predchádzala príprava štandardných roztokov pre stanovenie kalibračnej krivky. K rôznym navážkam (2–11 mg) polyméru PHB bol pridaný 1 ml chloroformu a 0,8 ml vnútorného štandardu (15% kyselina sírová v metanole a 5 mg/ml ISTD, kyselina benzoová), takto pripravené vialky boli ďalej zakrimpované a uložené do termobloku k trojhodinovej esterifikácii pri 90 °C. Po vychladení boli extrahované 50 mmol/l roztokom NaOH. Do vialiek s 900 µl izopropylalkoholu bolo pridaných 50 µl spodnej fázy zmesi. Takto pripravené štandardné roztoky boli analyzované na plynovom chromatografe GC-FID a na základe výsledkov bola zhotovená kalibračná závislosť pomeru plochy píku na koncentrácii polyméru.

Rovnakým spôsobom boli pripravené aj vzorky biomasy. Z vysušenej biomasy (príprava vid' kapitola 3.3.2) bolo navážených približne 8–11 mg vzorky do krimpovacích vialiek a nasledovný postup bol rovnaký ako u prípravy štandardov. Pripravené vzorky boli spoločne so štandardmi analyzované na plynovom chromatografe.

### **3.5 Extrakcia polyméru pomocou prístroja Soxtherm**

Zo vzoriek vysušenej biomasy (príprava vid' kapitola 3.3.2) bolo do extrakčnej patróny navážených približne 0,8 g, ktoré boli následne zatlačené vatou. Patróna bola vložená do nádoby s varným kamienkom, do ktorej bolo pridaných 150 ml chloroformu stabilizovaného etanolom. Nádoby boli vložené do prístroja a následne bol spustený program, vhodný pre použitie chloroformového rozpúšťadla. Celková doba extrakcie bola približne 2 hodiny. Po skončení extrakcie boli vzorky vyliate na Petriho misku v digestóriu, až kým sa neodparil prebytočný chloroform a nedošlo k vzniku polymérneho filmu.

### **3.6 Stanovenie molekulovej hmotnosti polymérnych filmov**

Na stanovenie molekulovej hmotnosti polymérnych filmov bola použitá vylučovacia chromatografia s detektorom statického rozptylu svetla vo viacerých uhloch (SEC-MALS). Bolo navážených cca 3 mg vyextrahovaného PHA filmu, ku ktorým bol následne pridaný chloroform o objeme 1,5 ml. Vzorky boli vložené na približne 10 min do termobloku pri 70 °C pre lepšie rozpustenie filmu. Roztok bol ďalej prefiltrovaný pomocou striekačky a nylonového filtra s veľkosti pórov 0,45 µm. Takto pripravené vzorky boli následne podrobené analýze na prístroji SEC-MALS-dRI s prietokom 0,6 ml/min chloroformu na PL gel mixed-C kolóne.

### **3.7 Inkorporácia liečiva do PHA filmu**

V rámci experimentálnej práce boli prevedené uvoľňovacie experimenty, ktorých základom bola inkorporácia liečiva, v tomto prípade acylpyrínu/kyseliny acetylsalicylovej a ibuprofenu, do PHA filmov, ktoré zohrávali rolu nosičového systému.

### 3.7.1 Inkorporácia acylpyrínu a kyseliny acetylsalicylovej

Ako prvé liečivo na uvoľňovací experiment bol použitý acylpyrín (ACYL) a čistá kyselina acetylsalicylová (ASA). V optimalizačnom experimente bol použitý komerčný acylpyrín kvôli aktuálnej nedostupnosti čistej látky. Boli otestované koncentrácie acylpyrínu: 5; 2; 0,5 mg/ml, kedy bol najprv pripravený zásobný roztok o koncentrácii 500 mg/100 ml, rozdrvením a rozpustením 1 tablety acylpyrínu (500 mg) v 100 ml chloroformu, ktorý bol následne zriedený na koncentrácie 2 a 0,5 mg/ml. Na základe optimalizácie bola vybratá vhodná koncentrácia pre uvoľňovací experiment, ktorý bol prevádzaný už s čistou kyselinou acetylsalicylovou.

V dôsledku šetrenia materiálu a lepšej manipulácie s roztokom bol pripravený 2% roztok P(3HB-*co*-4HB)/PHB v chloroforme s aktívnou látkou. Do vialiek bolo navážených 0,03 g PHA filmu, ku ktorým bol následne pridaný 1 ml roztoku liečiva v chloroforme. Vialky boli na krátku dobu zahriate v termobloku, dokým sa acylpyrín/kyselina acetylsalicylová úplne nerozpustil/a. Následne bol obsah vialky vyliaty na malé Petriho misky a ponechané v digestóriu do úplného odparenia rozpúšťadla.

### 3.7.2 Inkorporácia ibuprofenu

Na experiment využitia PHA filmov ako nosičových systémov s postupným uvoľňovaním aktívnej látky, bolo vybraté ďalšie liečivo ibuprofén (IBU). V snahe nájsť optimálnu koncentráciu inkorporovaného liečiva za súčasného udržania prirodzených vlastností polymérneho filmu, bola prevedená optimalizácia experimentu. V rámci optimalizácie boli vyskúšané rôzne koncentrácie ibuprofenu vzhľadom na celkový objem rozpúšťadla (chloroform). Celkovo boli otestované koncentrácie: 10 g; 5g; 2 g; 0,2 g; 0,02 g/100 g rozpúšťadla. V prepočte na celkový objem roztoku (chloroform/PHA) išlo o koncentrácie 150; 75; 30; 3; 0,3 mg/ml.

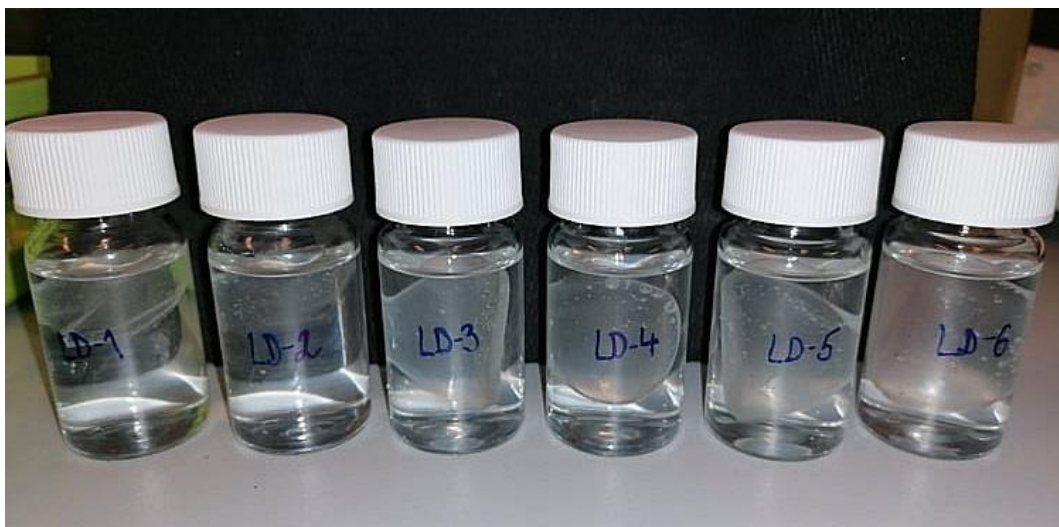
Bol pripravený 4% roztok polyméru v chloroforme, pričom bol použitý ako kopolymér P(3HB-*co*-4HB), tak aj homopolymér PHB pre porovnanie vlastností. Navážka PHA filmu bola rozpustená v adekvátnom objeme chloroformu za súčasného miešania pri teplote cca 50 °C do úplného rozpustenia filmu. Do vialiek boli navážené jednotlivé navážky ibuprofenu, do ktorých bol následne pridaný 1 ml 4% roztoku P(3HB-*co*-4HB)/PHB v chloroforme. Vialky boli na krátku dobu zahriate v termobloku, dokým sa ibuprofén úplne nerozpustil. Následne bol obsah vialky vyliaty na malé Petriho misky a ponechané v digestóriu do úplného odparenia rozpúšťadla.

## 3.8 Sledovanie uvoľňovania liečiva pomocou spektrofotometrickej metódy

Pre výber vhodnej koncentrácie liečiva bola najprv prevedená optimalizácia metódy, v ktorej bolo otestovaných niekoľko rôznych koncentrácií. Na sledovanie uvoľňovania liečiva bola použitá spektrofotometrická metóda merania absorbancie v UV oblasti. V prípade ibuprofenu bola odčítaná absorbancia pri 223 nm a u acylpyrínu a kyseliny acetylsalicylovej pri 230 nm. Filmy s inkorporovaným liečivom boli opláchnuté roztokom a vložené do šroubovacej vialky s 20 ml fyziologického roztoku (viď Obrázok 8), v tomto prípade sa jednalo o fosfátový tlmivý roztok (50 mM, pH 7,4).

Zloženie fyziologického roztoku:

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  13,864 g
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1,761 g
- destilovaná voda 1000 ml



Obrázok 8: Príprava filmov s inkorporovaným liečivom pre uvoľňovací experiment

Vzorky s inkorporovaným liečivom boli zriedené (pri vyšších koncentráciách IBU 100krát, pri vyšších koncentráciách ACYL/ASA 20 alebo 10krát) fyziologickým roztokom a bolo zmerané celé spektrum od 200 do 800 nm (oproti fyziologickému roztoku). Prvý deň sa meranie uskutočnilo počas prvej hodiny každých 5/10 minút a potom po každej hodine. V druhý deň bolo spektrum zmerané vždy po 3 hodinách a nasledované dni bolo zmerané len raz denne.

### 3.8.1 Stanovenie kalibračných kriviek pre aktívne látky

Aby bolo možné určiť koncentráciu uvoľnených aktívnych látok do roztoku, boli pripravené kalibračné roztoky ibuprofenu a kyseliny acetylsalicylovej na stanovenie kalibračných kriviek. Nakoľko obe látky sú málo rozpustné vo vode, boli pripravené zásobné roztoky liečiv v etanole, aby sa podporila ich rozpustnosť. Bol pripravený zásobný roztok o koncentrácii 10 mg (IBU/ASA) na 1 ml etanolu, ktorý bol následne zriedený fyziologickým roztokom na koncentráciu 0,1 mg/ml. Takto pripravený zásobný roztok bol následne zriedený v rôznych pomeroch, čím sa pripravili kalibračné roztoky o známej koncentrácii liečiva. Bola zmeraná absorbanca roztokov pri 223 nm (IBU) a 230 nm (ASA) oproti fyziologickému roztoku.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

### 4.1 Kultivácia bakteriálnych kmeňov *Aneurinibacillus* sp. H1 a *C. necator* H16

Cieľom experimentálnej časti bola príprava kopolyméru P(3HB-co-4HB) s rôznym percentuálnym zastúpením frakcie 4HB, čo bolo dosiahnuté pridaním rôzneho množstva substrátov (glycerol, 1,4-butándiol). Počas kultivácie *Aneurinibacillus* sp. H1 boli odskúšané celkom 4 pomery substrátov. Kultivácia bola prevedená vždy v troch opakovaniach, 2krát vo veľkom objeme (cca 6–10 litrov produkčného média) a raz v malom (400 ml média, pre stanovenie obsahu biomasy a PHA pre všetky pomery substrátov v rámci rovnakých kultivačných podmienok), príprava vid' kapitola 3.2. Pre porovnanie vlastností kopolyméru P(3HB-co-4HB) a homopolyméru PHB bola prevedená kultivácia bakteriálneho kmeňa *Cupriavidus necator* H16.

#### 4.1.1 Stanovenie obsahu biomasy

Na stanovenie obsahu biomasy bola použitá gravimetrická metóda, kedy bolo odobratých vždy 10 ml kultúry, ktoré bolo následne použité na analýzu ako stanovenia obsahu biomasy, tak aj stanovenia obsahu PHB (príprava vid' kapitola 3.3). Ďalej bola použitá spektrofotometrická metóda merania optickej hustoty pri 630 nm. Vzorky boli pred samotným meraním zriedené 10krát.

Tabuľka 4: Hodnoty obsahu biomasy a optickej hustoty jednotlivých kultivácií

Bakteriálny kmeň	Pomer substrátov (gly:but)	$\phi C_{biomasa}$ [g/l]	$\phi OD_{630}$ [-]
<i>Aneurinibacillus</i> sp. H1	2:4	1,5 ± 0,2	3,60 ± 0,76
	4:4	1,4 ± 0,1	2,76 ± 0,39
	6:4	1,3 ± 0,2	3,34 ± 0,11
	8:4	1,2 ± 0,1	3,48 ± 0,77
<i>Cupriavidus necator</i> H16		7,4 ± 0,1	7,61 ± 1,84

Nakoľko počas kultivácie neboli bakteriálne kmene vystavené žiadnemu stresu, nepredpokladal sa žiadny výrazný rozdiel v obsahu biomasy. Spektrofotometrické stanovenie bolo viac-menej iba orientačné a poskytlo len základný skrining obsahu biomasy v médiu. Najväčší obsah biomasy u kmeňa *Aneurinibacillus* sp. H1 bol zaznamenaný u pomere 2:4 (3,60 ± 0,76). Pre potvrdenie a overenie výsledkov bola prevedená presnejšia gravimetrická analýza, ktorá takisto ukázala najvyšší obsah biomasy u pomere 2:4 (1,5 ± 0,2 g/l). U ostatných pomerov sa obsah biomasy líšil len nepatrne. Pre porovnanie, v publikácii od *Pernicovej a kol.* (2020), kde boli testované rovnaké pomery substrátov, bol získaný najväčší výt'azok suchej biomasy u pomere 4:4, a to 2,79 g/l, pričom u všetkých pomerov substrátov sa obsah biomasy pohyboval v rozmedzí od 2,28–2,79 g/l [48]. Oproti týmto hodnotám, boli výt'azky suchej biomasy získané v rámci tejto diplomovej práce pomerne nižšie, čo mohlo byť spôsobené rozličnými podmienkami kultivácie (napr. malými odchýlkami v skutočnej koncentrácii substrátov) alebo

zmenou fyziologického stavu mikroorganizmov v dôsledku jeho dlhodobého uchovávaní v kryokonzerve. Z druhej kultivácie kmeňa *C. necator* H16, bol stanovený obsah biomasy výrazne vyšší ako u kmeňa u *Aneurinibacillus* sp. H1, kde bol získaný výťažok suchej biomasy až  $7,4 \pm 0,1$  g/l. Všetky výsledky z gravimetrického a spektrofotometrického stanovenia obsahu biomasy sú znázornené v Tabuľke 4.

## 4.2 Charakterizácia PHA filmov

### 4.2.1 Stanovenie obsahu PHA v biomase a vo vyextrahovaných filmoch

Pomocou stanovenia obsahu PHA v biomase, bolo sledované ako jednotlivé pomery substrátov, menia zloženie kopolyméru. Hlavným cieľom bola príprava kopolyméru s čo najvyšším obsahom monoméru 4HB, nakoľko tento monomér zlepšuje mechanické a tepelné vlastnosti kopolyméru. Predpokladá sa, že množstvo substrátu 1,4-butándiolu priamo úmerne súvisí so zatupením monoméru 4HB, z čoho vyplýva, že čím je vyššia koncentrácia 1,4-butándiolu oproti glycerolu, tým bude vyššie percentuálne zastúpenie 4HB. Stanovenie obsahu PHA bolo uskutočnené pomocou plynovej chromatografie s plameňovo ionizačným detektorom (GC-FID). Výsledné hodnoty obsahu PHB boli dopočítané na základe kalibračnej krivky pre 3HB (viď príloha kapitola 8.1). Pomocou GC-FID boli premerané ako vzorky biomasy tak vzorky vyextrahovaných filmov, pre potvrdenie hodnôt obsahu PHA (príprava viď kapitola 3.4).

Tabuľka 5: Obsah PHA v biomase a vo filmoch u jednotlivých kultivácií

Bakteriálny kmeň	Pomer substrátov (gly:but)	$\phi$ PHA [hm. %]	$\phi$ 3HB [hm. %]	$\phi$ 4HB [hm. %]	max 4HB [hm. %]
<i>Aneurinibacillus</i> sp. H1	2:4	$42,7 \pm 2,8$	$39,65 \pm 5,78$	$60,35 \pm 5,78$	65,25
	4:4	$39,7 \pm 0,7$	$61,18 \pm 0,98$	$38,82 \pm 0,98$	39,05
	6:4	$43,9 \pm 5,9$	$58,02 \pm 2,31$	$41,98 \pm 2,31$	43,61
	8:4	$36,7 \pm 2,6$	$99,09 \pm 0,12$	$0,91 \pm 0,12$	1,17
<i>Cupriavidus necator</i> H16		$85,2 \pm 1,8$	$100,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	

Na základe výsledkov je možné usúdiť, že rôzne pomery substrátov nemali veľký vplyv na celkové množstvo PHA v biomase, pričom obsah PHA sa pohyboval od 36–43 hm. %. Rôzne pomery substrátov ale rozhodne mali vplyv na monomérené zloženie kopolyméru, ako je možné vidieť v Tabuľke 5. Ako bolo predpokladané, najvyšší obsah monoméru 4HB bol zaznamenaný u pomeru 2:4 (gly:but), kde priemerná hodnota bola  $60,35 \pm 5,78$  hm. % 4HB, pričom maximálne detegované množstvo 4HB u jednej kultivácie bolo 65,25 hm. %. Postupné zvyšovanie množstva glycerolu v médiu malo podľa očakávania viesť k zvýšeniu obsahu monoméru 3HB. Tento predpoklad nebol úplne naplnený u pomeroch 4:4 a 6:4, keďže pri pomere 4:4 bol stanovený priemerný obsah 4HB nižší ako u pomeru 6:4. To mohlo byť spôsobené napríklad pridaním nepresného množstva jednotlivých substrátov, v dôsledku ich viskozity. Najnižší obsah 4HB bol zaznamenaný u pomeru 8:4, kde bolo stanovené zastúpenie 4HB len na  $0,91 \pm 0,12$  hm. %.

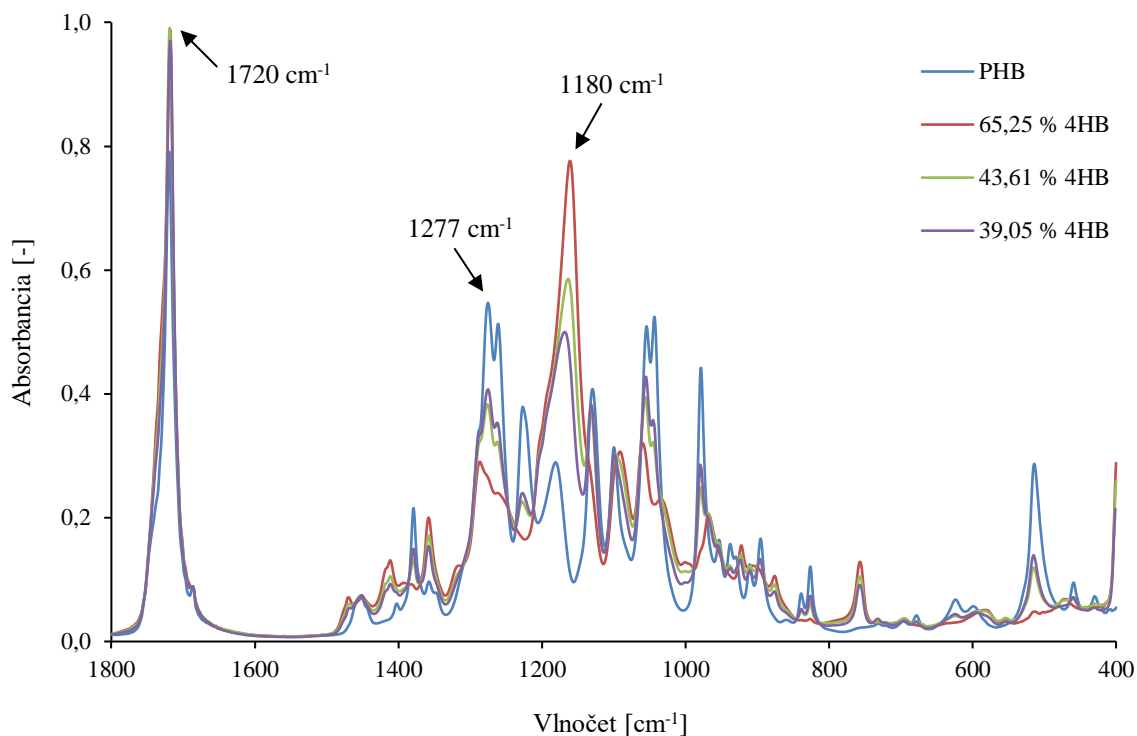


So zmenou množstva monoméru 4HB bolo u vyextrahovaných PHA filmov možné pozorovať aj viditeľne rozdielne mechanické vlastnosti. Filmy s vysokým obsahom 4HB boli pevnejšie a predovšetkým elastickejšie, čo bolo rozhodne výhodné pre ďalšiu manipuláciu s filmami. Z vizuálneho hľadiska boli filmy hladké, takmer číre a vzhľadom pripomínali klasické syntetické fólie. Čím mali filmy nižší obsah 4HB, tým boli krehkejšie a ich elasticita výrazne klesala. PHA filmy s pomerom 8:4, teda s minimálnym obsahom 4HB, boli bieleho zafarbenia s neuceleným povrchom a celková štruktúra polyméru pripomínala šupiny. Manipulácia s týmto filmom bola veľmi obťažná, preto ho nebolo možné analyzovať pomocou niektorých techník.

Pre uvoľňovacie experimenty boli vybrané filmy s pomerom substrátov 2:4 a 6:4 z kultivácie s najvyšším dosiahnutým obsahom 4HB, a to 65,25 hm. % 4HB (2:4) a 43,61 hm. % (6:4). Na optimalizačné experimenty bol použitý kopolymérny film s obsahom 4HB 50,63 hm. % (z ďalšej kultivácie 2:4), v zámere šetrenia materiálu.

#### **4.2.2 Charakterizácia chemickej štruktúry PHA filmov pomocou FTIR**

Na analýzu štruktúry PHA filmov, bola použitá metóda infračervenej spektroskopie s Fourierovou transformáciou (FTIR). Boli premerané kopolymérne filmy s pomerom substrátov 2:4, 4:4, 6:4, pričom bol vybraný film z tej kultivácie, v ktorej bol stanovený najvyšší obsah 4HB. Nakoľko kopolymérny film s pomerom substrátov 8:4 bol veľmi krehký a nebolo ho možné poriadne oddeliť od Petriho misky, nebol pomocou tejto metódy premeraný. Preštudované boli teda filmy s obsahom 65,25; 39,04; 43,61 hm. % 4HB a homopolymérny PHB film. Filmy boli analyzované pomocou metódy FTIR na analyzátoře Nicolet iS50 (Thermo Scientific) meracou technikou zoslabeného úplného odrazu (ATR) s použitím diamantového kryštálu. FTIR spektrá boli zmerané ako priemer 32 skenov v spektrálnom rozsahu  $4\ 000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$  s rozlíšením  $2\text{ cm}^{-1}$ . Celé spektrá jednotlivých PHA filmov sú uvedené v prílohe v podkapitole 8.2.1.



Obrázok 9: FTIR spektrá vyextrahovaných PHA filmov

Vyhodnotenie FTIR spektier PHA filmov, bolo založené na charakteristických vibračných pásoch, ktoré poskytujú informácie o chemických väzbách, a teda o chemickej štruktúre látky. Pík s najvyššou intenzitou v oblasti okolo  $1720\text{ cm}^{-1}$  reprezentuje karbonylovú skupinu, konkrétne esterovú väzbu cez ktorú sú medzi sebou viazané monoméry 3HB resp. 4HB. V oblasti  $1400\text{--}800\text{ cm}^{-1}$  je možné pozorovať viacero intenzívnych pík, ktoré vypovedajú o chemickej štruktúre a usporiadaní PHA filmov. Zvýšená intenzita, ktorú je možné pozorovať v oblasti vlnčtu  $1180\text{ cm}^{-1}$ , vypovedá o amorfности látky [47]. Na Obrázku 9 je zreteľne viditeľné, že so zvyšujúcim sa obsahom 4HB v polymérnom filme, sa zvyšuje aj amorfny stav látky. Najväčšiu intenzitu v tejto oblasti mal film P(3HB-co-65,25%4HB), zatiaľ čo najnižšia intenzita bola zaznamenaná u PHB filmu. Pík vyskytujúci sa pri hodnote  $1277\text{ cm}^{-1}$  je charakteristický pre vyššiu kryštalinitu, preto je možné pozorovať najvyššiu intenzitu signálu u PHB filmu, ktorý sa vyznačuje svojou kryštalickou povahou. Mierne zvýšenú intenzitu signálu je taktiež možné pozorovať u kopolymérnych filmov s nižším obsahom 4HB (43,61 a 39,05 %). Pre rozlíšenie monoméneho zloženia polymérov boli ďalej sledované pomery ďalších špecifických pík pri vlnčtoch [ $\text{cm}^{-1}$ ]:  $1130$  (3HB) vs  $1160$  (4HB);  $1378$  (3HB) vs  $1358$  (4HB);  $978$  (3HB) vs  $966$  (4HB);  $756$  (len u 4HB).

#### 4.2.3 Stanovenie molekulovej hmotnosti PHA filmov pomocou SEC-MALS

Na analýzu SEC-MALS boli vybraté len tie polymérne filmy, ktoré boli ďalej využívané v uvoľňovacích experimentoch. Jednalo sa o kopolymérne P(3HB-co-4HB) filmy s obsahom 65,25 a 43,61 hm. % 4HB a homopolymérny PHB film. Pomocou spomínanej analýzy bolo pozorované, ako obsah 4HB ovplyvňuje strednú molekulovú hmotnosť ( $M_w$ ) a polydisperzitu polyméru (PDI).

Tabuľka 6: Vlastnosti PHA filmov

Bakteriálny kmeň	Pomer substrátov (gly:but)	φ3HB [hm. %]	φ4HB [hm. %]	$M_w$ [kDa]	PDI [ $M_w/M_n$ ]
<i>Aneurinibacillus</i> sp. H1	2:4	34,75	65,25	140,58 ± 0,40	1,33 ± 0,02
	6:4	56,39	43,61	76,03 ± 1,93	1,52 ± 0,09
<i>Cupriavidus necator</i> H16		100,00	0,00	634,45 ± 2,90	1,25 ± 0,07

Z výsledkov v Tabuľke 6, je možné pozorovať, že obsah 4HB v polyméri znižuje jeho molekulovú hmotnosť, kedy oproti PHB, bola u kopolyméru so 65,25 hm. % 4HB približne 4krát menšia a u kopolyméru so 43,61 hm. % 4HB až 8krát menšia. Na základe toho je možné usúdiť, že PHB vyprodukovaný *C. necator* H16, obsahoval dlhšie reťazce polyméru. V porovnaní kopolymérnych filmov medzi sebou, je viditeľné, že čím je vyšší percentuálny obsah 4HB v kopolyméri, tým je molekulová hmotnosť vyššia. Index polydisperzity sa pohyboval v rámci jednotlivých vzoriek v hodnotách od 1,25–1,52.

### 4.3 Uvoľňovacie experimenty aktívnych látok z PHA filmov

Jedným z viacerých využití polyhydroxyalkanoátov v biomedicíne sú obväzové a krycie materiály. Aby došlo k urýchleniu hojenia rany, sú do týchto materiálov inkorporované liečivé látky, ktoré pôsobia priamo v mieste poškodenia. Cieľom tejto diplomovej práce bola príprava PHA filmov s inkorporovanou aktívnou látkou a otestovať jej uvoľňovanie do prostredia. Ako matrice pre liečivo boli použité vyextrahované polyméry PHB a P(3HB-co-4HB) o rôznych monomérnych zloženiach (65,25 a 43,61 hm. % 4HB), aby sa zistilo, aký vplyv má toto zloženie na kinetiku uvoľňovania liečiva. Ako liečivé látky pre uvoľňovacie experimenty, boli zvolené liečivá kyselina acetylsalicylová a ibuprofén. Liečivé látky boli zvolené na základe cenovej dostupnosti a charakteru látky, nakoľko sa jedná o liečivá patriace do skupín analgetík a antiflogistík, teda liečiv pôsobiacich proti bolesti a zápalu. Inkorporáciou do matrice môžu byť transportované do cieľového miesta a tým môžu urýchliť hojenie priamo v mieste rany.

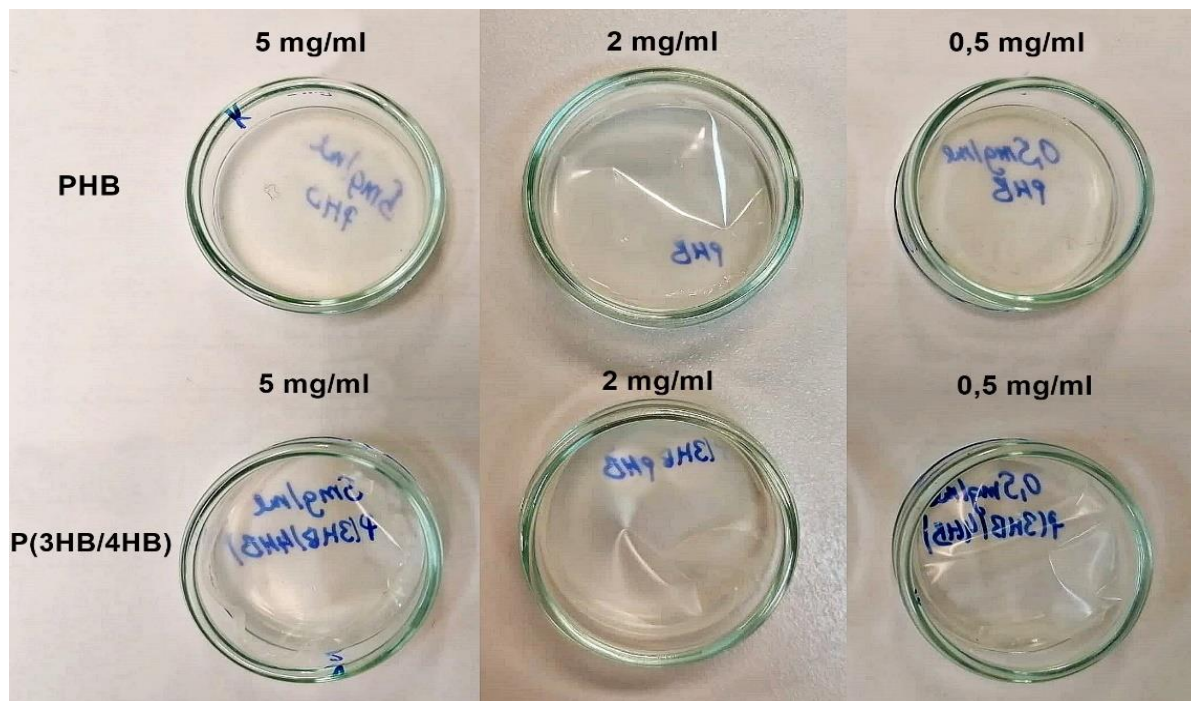
#### 4.3.1 Štúdium uvoľňovania acylpyrínu a kyseliny acetylsalicylovej

Ako prvé bolo pre štúdium uvoľňovania zvolené liečivo acylpyrín (ACYL), ktoré bolo následne nahradené čistou kyselinou acetylsalicylovou (ASA). Na optimalizačný experiment bolo použité komerčné liečivo acylpyrín, kvôli šetreniu čistej látky a ako matrice boli použité filmy z PHB a z kopolyméru obsahujúceho 50,63 hm. % 4HB. Dané liečivo obsahuje okrem samotnej kyseliny acetylsalicylovej aj prídavné látky ako zemiakový škrob a talk (mastenec). Na hlavný uvoľňovací experiment už bola použitá čistá 99% kyselina acetylsalicylová. Ako nosiče boli v hlavnom experimente použité filmy z kopolymérov P(3HB-co-65,25%4HB) a P(3HB-co-43,61%4HB) a z homopolyméru PHB, príprava vid' podkapitola 3.7.1. Uvoľňovanie aktívnej látky bolo prevádzané do neutrálneho fyziologického roztoku pri telesnej teplote 37,2 °C a bolo sledované pomocou UV-VIS spektrofotometrickej metódy (postup vid' kapitola 3.8). Samotnému experimentu predchádzala optimalizácia metódy, ktorej hlavným

cieľom bolo nájsť optimálnu koncentráciu kyseliny acetylsalicylovej a časového rámca potrebného pre monitorovanie kinetiky uvoľňovania liečiva.

#### 4.3.1.1 Optimalizácia metódy

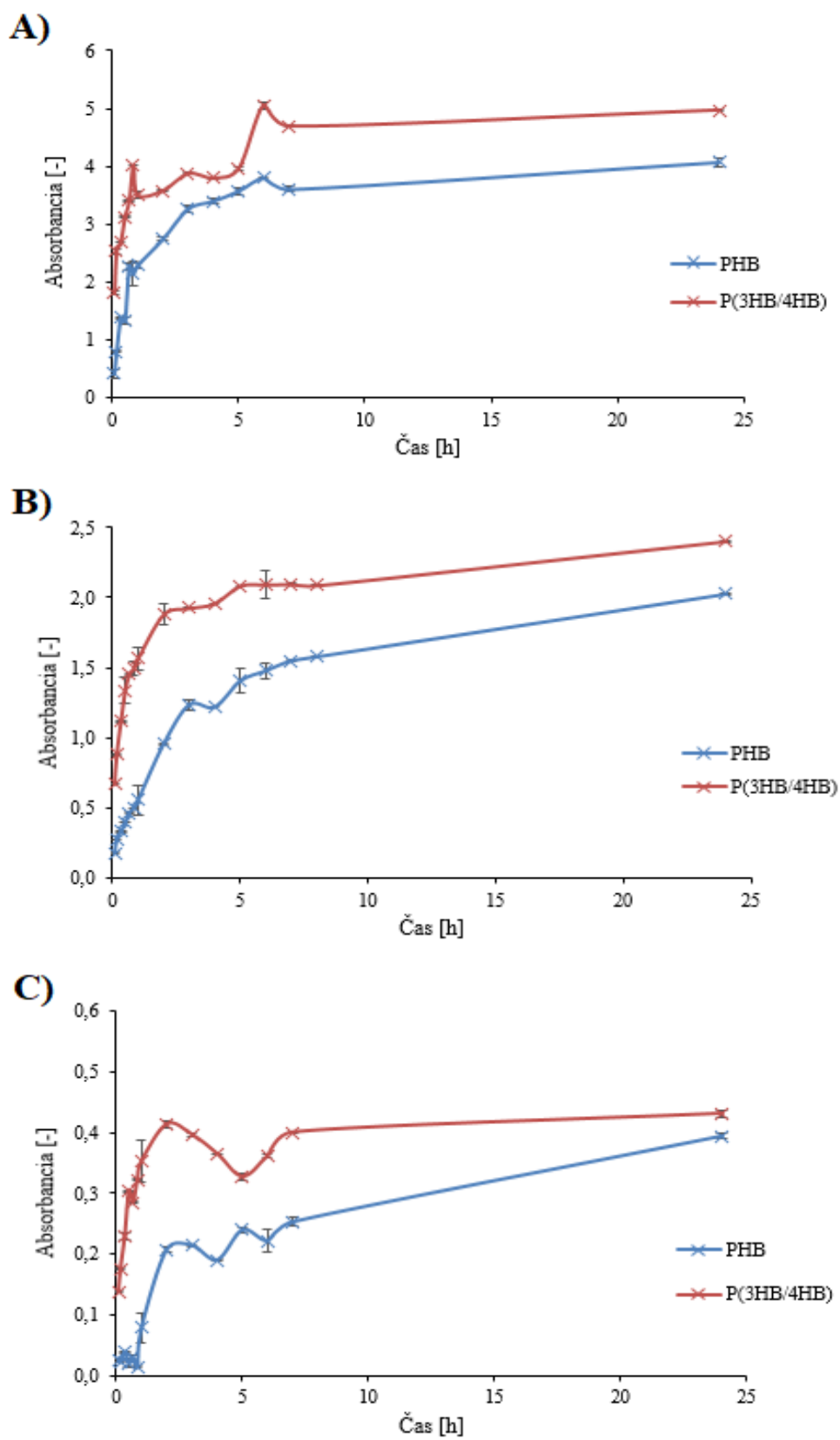
Optimalizácia experimentu bola zrealizovaná, nakoľko neboli nájdené žiadne predchádzajúce publikácie k téme inkorporácia kyseliny acetylsalicylovej (ASA) do PHA filmov. Preto bolo potrebné nájsť jej optimálnu koncentráciu, ktorú je možné inkorporovať do filmu, tak aby sa zachovali jeho pôvodné vlastnosti. Pre optimalizáciu bol použitý acylpyrín vo zvolených koncentráciách 5; 2; 0,5 mg na 1 ml chloroformu (príprava vid' podkapitola 3.7.1).



Obrázok 10: PHA filmy s inkorporovaným acylpyrínom

Ako je možné vidieť na Obrázku 10, všetky tri koncentrácie acylpyrínu sa úspešne zakorporovali do PHA filmov. U koncentrácie 5 mg/ml boli vidieť miniatúrne biele kryštalické miesta, kedy sa acylpyrín úplne nerozpustil a tým sa stopercentne neinkorporoval do filmu, preto sa pre hlavný uvoľňovací experiment preferovalo použitie nižšej koncentrácie. Pre potvrdenie inkorporácie boli filmy premerané pomocou metódy FTIR (spektrá vid' príloha 8.2.2), kde vo výsledných spektrách je možné pozorovať píky odpovedajúce ASA v oblasti od 750–500  $\text{cm}^{-1}$ . Koncentrácia ASA vo filme bola ale pomerne nízka, na to aby sa výraznejšie prejavila vo FTIR spektre, ktoré je tvorené predovšetkým signálom majoritnej zložky polyméru.

Filmy s inkorporovaným liečivom, boli vložené do fyziologického roztoku, pričom bolo sledované či dochádza k zmene absorbancie roztoku s časom, ktorá by značila postupné uvoľňovanie aktívnej látky z PHA filmu. Meranie bolo uskutočnené po dobu 24 hodín. Pred samotným meraním absorbancie pri 230 nm, boli vzorky s vyššou koncentráciou liečivej látky zriedené fyziologickým roztokom.

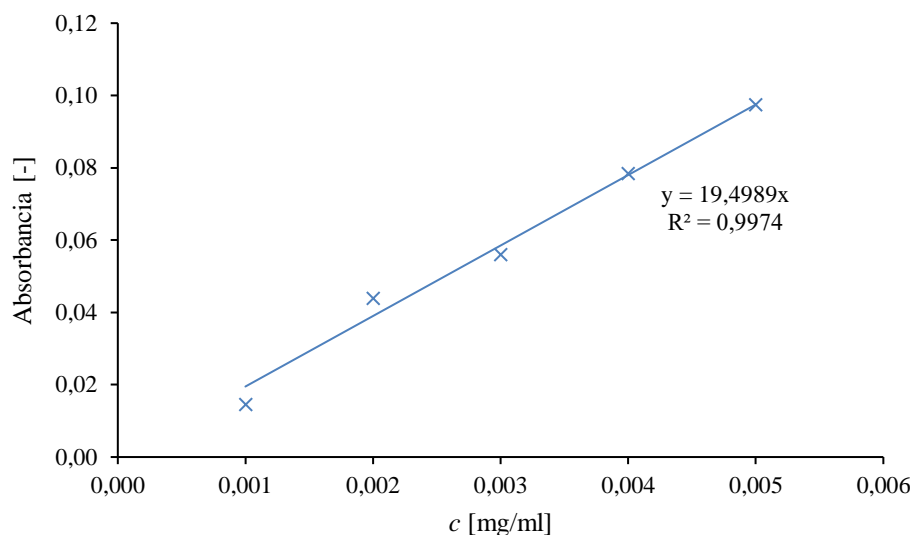


Obrázok 11: Závislosť absorbancie na čase pre koncentrácie acylpyrínú: A) 5 mg/ml; B) 2 mg/ml; C) 0,5 mg/ml

Na základe grafickej závislosti absorbancie na čase pre jednotlivé filmy (vid' Obrázok 11), je možné pozorovať zmenu absorbancie, čím sa preukázalo uvoľňovanie acylpyrínu z PHA filmov do fyziologického roztoku. Je viditeľné, že z oboch filmov, PHB a P(3HB/4HB), došlo k ustáleniu uvoľňovania približne v siedmej hodine od začiatku experimentu. Na konci experimentu, teda po 24 hodinách, došlo k nepatrnému zvýšeniu absorbancie, na základe čoho je možné predpokladať, že nedošlo k úplnému uvoľneniu aktívnej látky z filmov.

Čo sa týka efektivity uvoľňovania, teda rýchlosti a množstva uvoľnenej látky, je možné dedukovať, že k efektívnejšiemu uvoľňovaniu dochádzalo z kopolymérneho P(3HB/4HB) filmu než z PHB filmu. Väčšej efektivity napovedá strmosť kriviek na začiatku experimentu, ktorá naznačuje rýchlejšiu počiatočnú difúziu acylpyrínu do roztoku. Taktiež finálne hodnoty absorbancie u kopolymérnych filmov zodpovedajú väčšiemu uvoľnenému množstvu aktívnej látky v priebehu experimentu.

Z optimalizácie metódy bola pre hlavný experiment vybraná koncentrácia 2 mg/ml acylpyrínu, respektíve už čistej kyseliny acetylsalicylovej. Tento výber koncentrácie bol odôvodnený jednoduchším meraním absorbancie, kedy nebolo potrebné riedenie roztoku (čím nedochádzalo k stratám prijímacieho média v uvoľňovacom experimente) a šetrením množstva aktívnej látky. Z optimalizačného experimentu bolo taktiež zistené, že pri inkorporácii nižších koncentrácií aktívnej látky, bolo uvoľňovanie rýchlejšie a do roztoku sa difundovalo väčšie množstvo acylpyrínu ako pri použití vyšších koncentrácií.

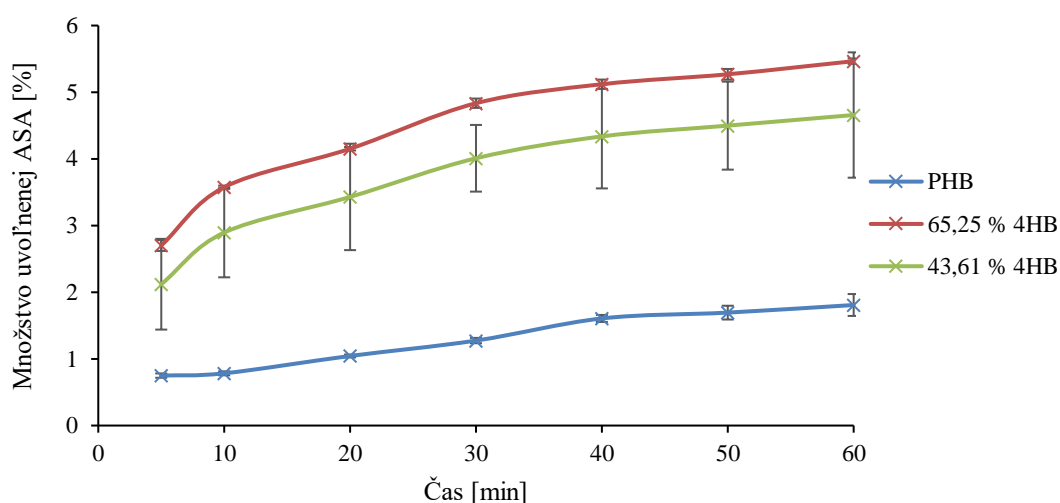


Obrázok 12: Kalibračná krivka pre kyselinu acetylsalicylovú vo fyziologickom roztoku

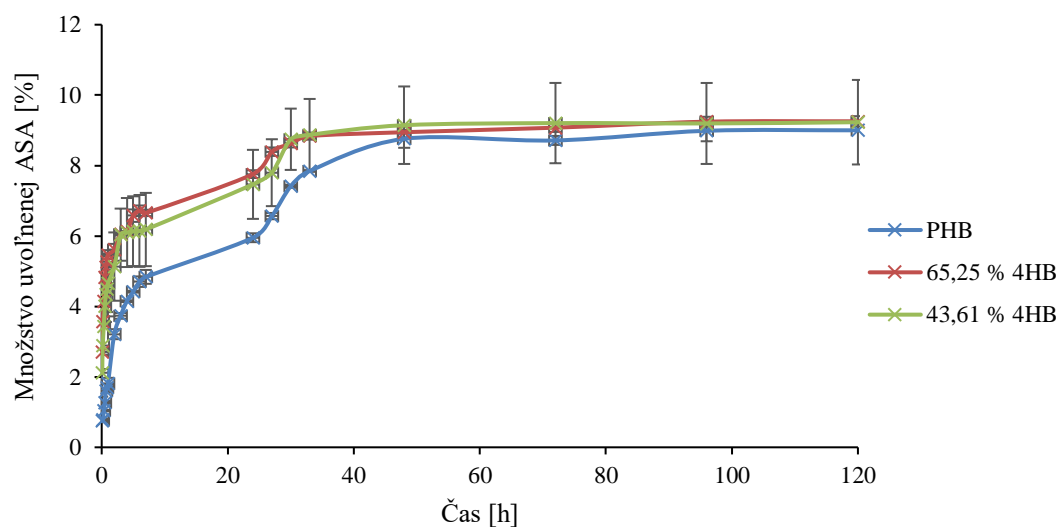
Aby bolo možné dopočítať koncentráciu kyseliny acetylsalicylovej v roztoku, bola premeraná kalibračná krivka (vid' Obrázok 12) pri 230 nm, príprava vid' podkapitola 3.8.1. Pomocou rovnice regresnej priamky bolo následne vypočítané množstvo uvoľnenej kyseliny acetylsalicylovej do fyziologického roztoku v priebehu uvoľňovacieho experimentu.

### 4.3.1.2 Hlavný uvoľňovací experiment

Po optimalizácii metódy nasledoval hlavný uvoľňovací experiment, kde sa na základe predchádzajúcej optimalizácie pracovalo s koncentráciou kyseliny acetylsalicylovej 2 mg/ml. Počas experimentu bolo pozorované uvoľňovanie liečiva z filmov na báze PHB (0 hm. % 4HB), P(3HB-co-65,25%4HB) a P(3HB-co-43,61%4HB). Cieľom uvoľňovacieho experimentu, bolo sledovanie, aký vplyv má monoméne zloženie filmu na kinetiku uvoľňovania aktívnej látky. Celý experiment trval po dobu 5 dní, pričom prvé 2 dni prebiehalo meranie v častejších intervaloch. Konkrétne bola absorbancia roztoku meraná prvú hodinu každých 10 minút, aby sa zistila aká rýchla bola počiatočná difúzia (viď Obrázok 13). Pomocou kalibračnej krivky (viď Obrázok 12) bola následne vypočítaná koncentrácia uvoľnenej kyseliny acetylsalicylovej do roztoku (% vyjadrujú relatívny podiel z celkového množstva inkorporovanej látky).



Obrázok 13: Zmena uvoľneného množstva kyseliny acetylsalicylovej počas prvej hodiny



Obrázok 14: Zmena uvoľneného množstva kyseliny acetylsalicylovej počas celého experimentu

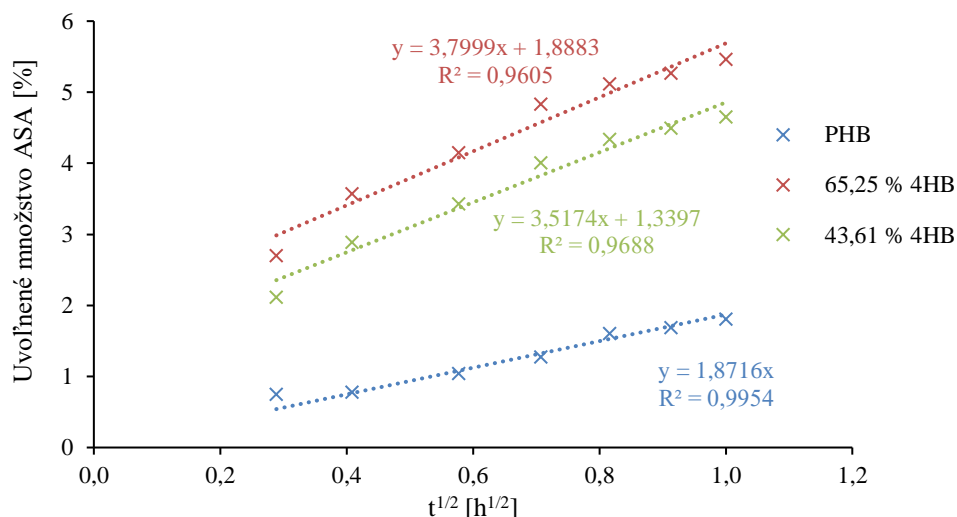
Na základe výslednej časovej závislosti uvoľneného množstva kyseliny acetylsalicylovej z PHA filmu, je možné usúdiť, že existuje určitý vzťah medzi monomérom zložením polymérneho nosiča a kinetikou uvoľňovania. Monomérom zložením malo výrazný vplyv na uvoľňovanie ASA predovšetkým v priebehu prvej hodiny. Na Obrázku 13 je viditeľné, že počas prvej hodiny bolo uvoľnené pomerne väčšie množstvo ASA z kopolymérnych filmov, než z PHB filmu. Pri porovnaní kopolymérnych filmov medzi sebou navzájom, bolo zistené, že väčšie množstvo sa uvoľnilo s kopolymérom s vyšším obsahom 4HB. Po 60 minútach sa z P(3HB-co-65,25%4HB) filmu uvoľnilo 5,47 % z celkového množstva ASA, čo bolo o 0,81 % viac ako z P(3HB-co-43,61%4HB) filmu a o 3,66 % viac ako z PHB filmu. Väčšia strmosť kriviek kopolymérnych filmov naznačuje aj o rýchlejšej počiatočnej difúzii ASA do roztoku.

Na Obrázku 14 je možné pozorovať, že koncentrácia uvoľnenej ASA úmerne rástla s časom do 48. hodiny od začiatku experimentu, po čom sa následne uvoľňovanie ustálilo. Do tohto momentu bolo možné pozorovať aj rozdiely medzi uvoľneným množstvom ASA z kopolymérnych filmov a z PHB filmu, kedy sa z P(3HB/4HB) filmov uvoľnili väčšie koncentrácie. V 48. hodine však došlo k takmer úplnému vyrovnaniu uvoľneného množstva v prípade všetkých použitých filmov a až do konca experimentu nedošlo k takmer žiadnym zmenám. Po 5 dňoch sa najviac % ASA uvoľnilo z kopolymérneho filmu P(3HB-co-65,25%4HB), čo bolo 9,26 % ASA, no oproti PHB filmu to bolo len o 0,26 % viac (viď Tabuľka 7).

Tabuľka 7: Charakteristiky PHA filmov s inkorporovanou kyselinou acetylsalicylovou

Polymér	Obsah 4HB [%]	$c_{ASA}$ [mg/ml]	$m_{PHA}$ [mg]	Max. uvoľnené množ. ASA [%]	Smernica závislosti na $\sqrt{t}$
PHB	0,00	2	28,0 ± 0,2	9,00	3,7999
2:4 P(3HB/4HB)	65,25	2	29,7 ± 0,1	9,26	3,5174
6:4 P(3HB/4HB)	43,61	2	29,1 ± 0,2	9,23	1,8716





Obrázok 15: Závislosť uvoľneného množstva kyseliny acetylsalicylovej na odmocnine z času

Aby sa posúdila rýchlosť počiatočnej difúzie ASA, boli vynesené grafické závislosti uvoľnené množstvo ASA na odmocnine z času, pre lineárnu oblasť kriviek. Závislosť bola preložená regresnou priamkou, ktorej smernica priamo koreluje s difúznym koeficientom. Výskyt lineárnej oblasti v grafe značí o tom, že uvoľňovanie aktívnej látky z filmu primárne riadené difúziou látky do roztoku v smere koncentračného gradientu. Uvoľňovanie aktívnej látky teda nie je významne ovplyvnené interakciou nosiča s prijímacím roztokom (napr. expanzia filmu a zmena jeho transportných vlastností v dôsledku botnania), čo by sa prejavilo zmenou exponentu závislosti uvoľneného množstva na čase (pre voľnú difúziu je tento exponent rovný 0,5).

Na základe rôznej strmosti kriviek uvedených na Obrázku 15, a tým aj rôznych smerníc, je možné usúdiť, že štruktúra a monomérené zloženie polymérnych filmov, malo istý vplyv na rýchlosť uvoľňovania. Táto smernica je priamo úmerná difúznemu koeficientu aktívnej látky v polyméru. Nebolo snahou z tejto smernice difúzny koeficient priamo vypočítať, a to z dôvodu toho, že nebola presne stanovená rada parametrov k tomu nevyhnutných (presná celková plocha kontaktu filmu s roztokom, presné maximálne množstvo látky, ktoré možné z filmu uvoľniť), a taktiež bolo obťažne zaistiť experimentálne podmienky tak, aby splňovali požiadavky konkrétneho difúzneho modelu k výpočtu použiteľného (napr. konštantná koncentrácia uvoľnenej aktívnej látky v celom objeme prijímacieho roztoku). Avšak samotná hodnota smernice z Obrázku 15, môže byť použitá ako vhodný parameter pre kvantitatívne odlišenie rýchlosti difúzie liečiva v jednotlivých filmoch.

Smernice, respektíve difúzne koeficienty, oboch kopolymérnych filmov sú väčšie, ako smernica u PHB filmu, z čoho vyplýva, že rýchlosť difúzie ASA bola vyššia z filmov na báze kopolyméru. Za rýchlejšie uvoľňovanie je pravdepodobne zodpovedný obsah 4HB monoméru, ktorý má za následok zníženie kryštalinity polyméru (zníženie kryštalinity polyméru s rastúcim obsahom 4HB bolo publikované v štúdií od *Sedláček a kol.* (2020) a potvrdené v tejto práci výsledkami z FTIR analýzy, viď podkapitola 4.2.2). Predpokladá sa, že u polymérov s nižším stupňom kryštalinity bude rýchlosť uvoľňovania aktívnej látky z matrice rýchlejšia, v dôsledku

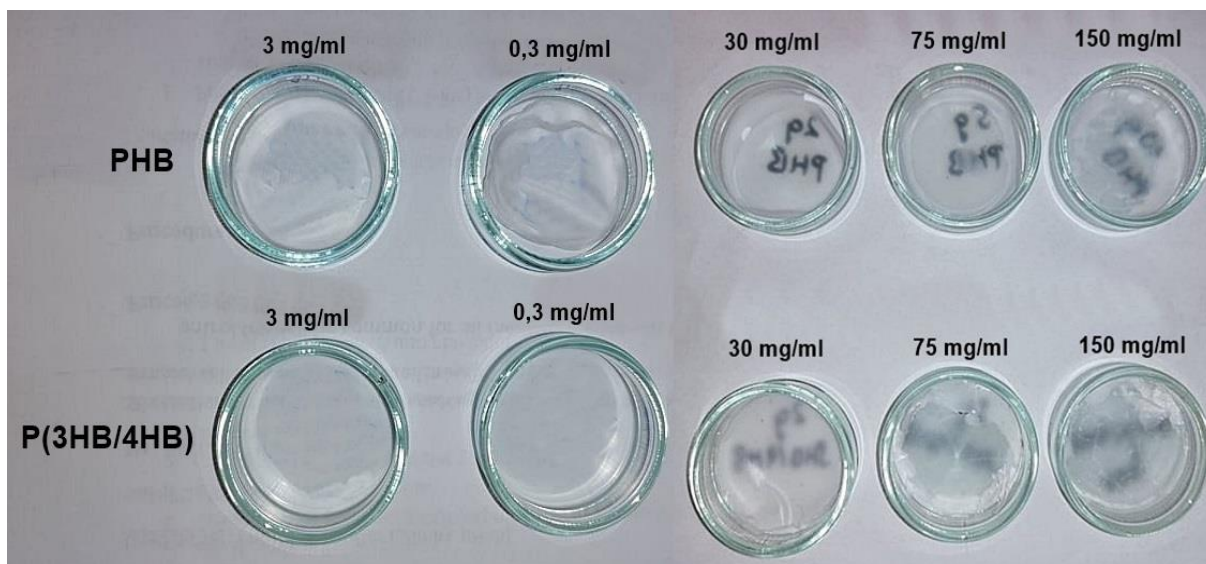
pohyblivosti makromolekulárnych reťazcov v amorfnom stave, cez ktoré dochádza k jednoduchšiemu prenikaniu vody a tým aj liečiva. Tento predpoklad bol naplnený, keďže difúzny koeficient P(3HB-co-65,25%4HB) filmu bol väčší ako koeficient P(3HB-co-43,61%4HB) filmu (viď Tabuľka 7). Predpokladom difúzie by bolo, ak by jednotlivé body smerovali z hodnoty (0, 0) v grafe. Tento predpoklad bol potvrdený pre homopolymér PHB. Nulová hodnota uvoľneného množstva odpovedajúca času 0, značí že rýchlosť difúzie sa od počiatku experimentu nemení. Záporná hodnota extrapolovaného množstva látky uvoľnenej v čase 0 je typická pre systémy, kde je uvoľňovanie najprv aktivované (napr. zvýšením mobility aktívnej látky v nosiči v dôsledku jeho nabitia prijímacím roztokom), čo sa prejaví určitým časovým oneskorením v uvoľňovacej krivke (tzv. *time lag*). Oproti tomu, ako je viditeľné na Obrázku 15, uvoľňovanie ASA z kopolymérnych filmov je spojené s kladnou extrapolovanou hodnotou uvoľnenej látky v čase 0. To mohlo byť spôsobené nedostatočným opláchnutím filmov pred začiatkom uvoľňovacieho experimentu, čím sa v momente vloženia filmu do fyziologického roztoku uvoľnilo nenaviazané množstvo ibuprofenu na povrchu filmu. Ďalšie možné vysvetlenie je, že časový úsek zvolený pre lineárnu regresiu dát (viď Obrázok 15) bol príliš dlhý a v najvyšších časoch už dochádzalo k ohýbaniu lineárnej závislosti v dôsledku znižovania rýchlosti difúzie (to naznačuje aj konkrétny tvar závislosti pre oba kopolyméry),

#### **4.3.2 Štúdium uvoľňovania ibuprofenu**

Ako ďalšia aktívna látka pre štúdium uvoľňovania liečiv bol zvolený ibuprofén (IBU), ktorého uvoľňovanie sa sledovalo ako z kopolymérneho, tak aj z homopolymérneho PHB filmu. Aj u tejto látky bol na optimalizačný experiment použitý kopolymér s 50,63 hm. % 4HB s cieľom nájdenia optimálnej koncentrácie ibuprofenu a uistenia sa o funkčnosť experimentu. Na hlavný experiment boli použité filmy z kopolymérov P(3HB-co-65,25%4HB) a P(3HB-co-43,61%4HB), príprava viď podkapitola 3.7.2. Uvoľňovanie aktívnej látky bolo prevádzané do neutrálneho fyziologického roztoku pri telesnej teplote 37,2 °C a bolo sledované pomocou UV-VIS spektrofotometrickej metódy (postup viď kapitola 3.8).

##### **4.3.2.1 Optimalizácia metódy**

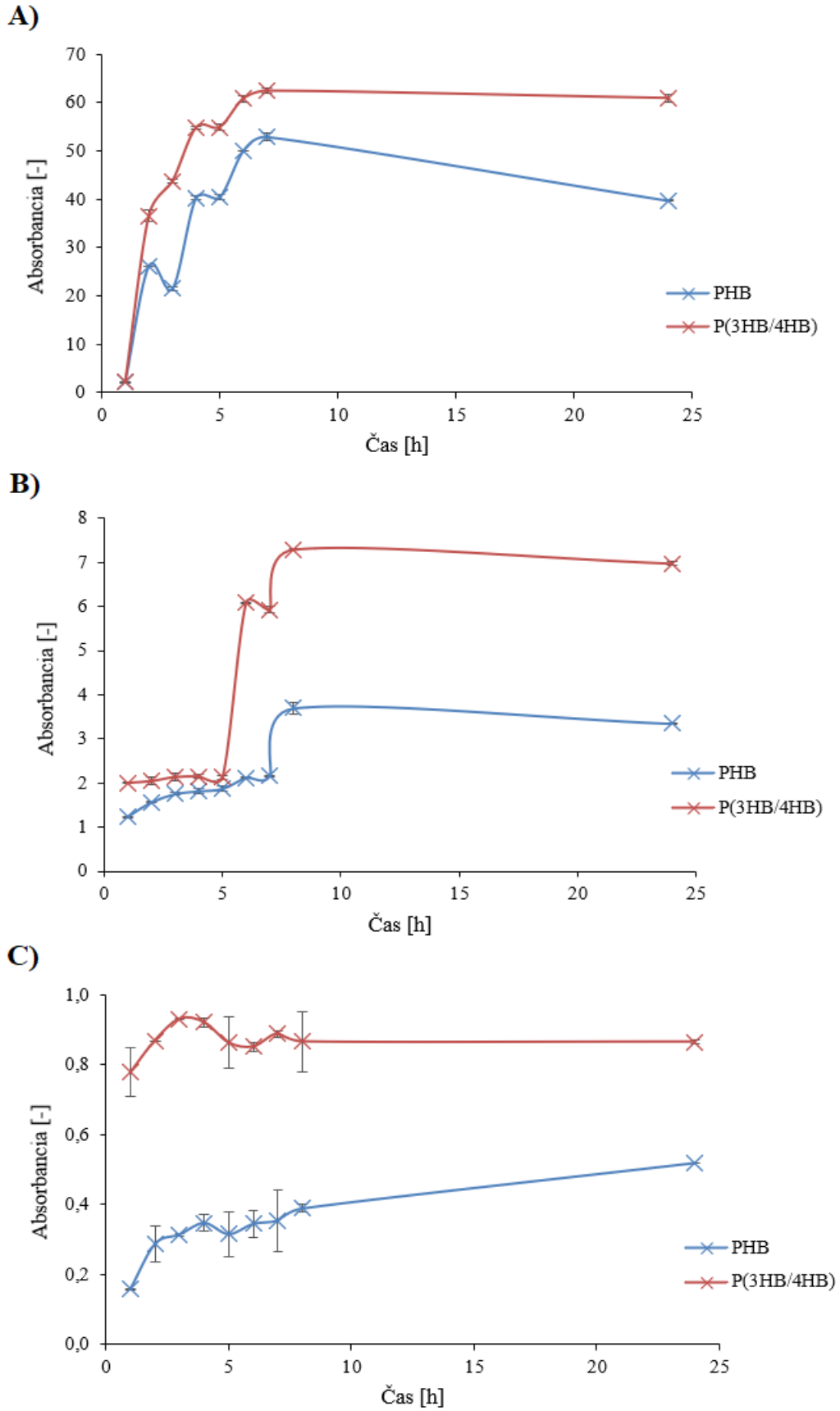
Nakoľko neboli nájdené žiadne publikácie s témou inkorporácie ibuprofenu do PHA filmov, bolo potrebné nájsť optimálne množstvo ibuprofenu, ktoré je možné zakorporovať do PHA filmu za udržania jeho prirodzených vlastností. Pre optimalizáciu boli zvolené koncentrácie ibuprofenu na 1 ml 4% roztoku PHA v chloroforme: 150; 75; 30; 3; 0,3 mg/ml (príprava viď podkapitola 3.7.2).



Obrázok 16: PHA filmy s inkorporovaným ibuprofénom

Prvotne boli otestované koncentrácie 150; 75 a 30 mg/ml. Ako je možné vidieť na Obrázku 16, pri koncentráciách 150 a 75 mg/ml nedošlo k dostatočnej inkorporácii ibuprofenu do filmu. Na filmoch bolo jasne vidieť kryštalickú štruktúru na povrchu, pričom bol film natoľko krehký, že ho nebolo možné odlepiť od Petriho misky. Z troch odskúšaných koncentrácií sa najlepšie ukázala koncentrácia 30 mg/ml, kde došlo úplnému zakorporovaniu aktívnej látky do štruktúry a film bolo možné jednoducho odlepiť od Petriho misky. Táto koncentrácia bola zvolená ako maximálna a následne boli otestované aj koncentrácie 10krát a 100krát menšie, pre jednoduchšie meranie absorbancie. Pre potvrdenie inkorporácie boli filmy premerané pomocou metódy FTIR (spektrá vid' príloha 8.2.2). Koncentrácia inkorporovaného IBU vo filme bola ale natoľko nízka, že sa vo výsledných spektrách takmer neprejavila.

Pripravené filmy s inkorporovaným liečivom, boli vložené do fyziologického roztoku, pričom bolo sledované či dochádza k zmene absorbancie roztoku s časom, ktorá by značila postupné uvoľňovanie aktívnej látky z PHA filmu. Meranie bolo uskutočnené po dobu 24 hodín. Pred meraním boli vzorky s vyššou koncentraciou zriedené fyziologickým roztokom a bola meraná absorbancia pri 223 nm.

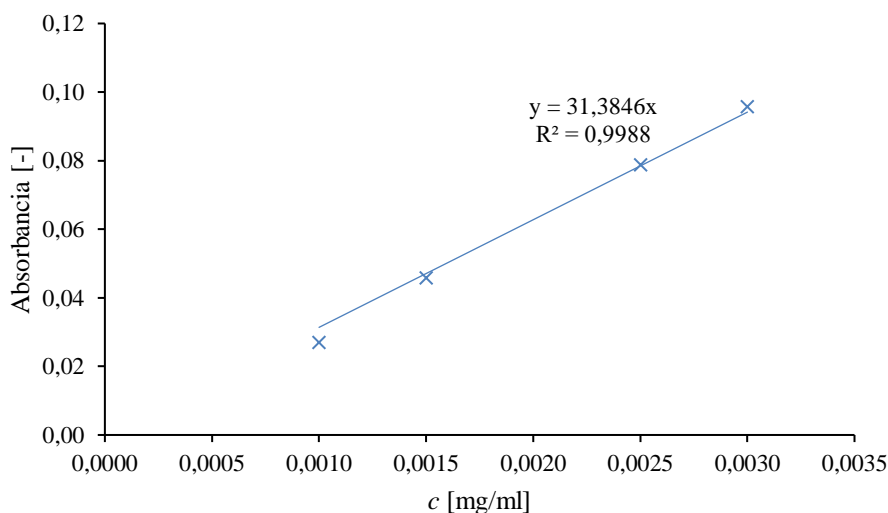


Obrázok 17: Závislosť absorbancie na čase pre koncentráciu ibuprofenu: **A)** 30 mg/ml; **B)** 3 mg/ml; **C)** 0,3 mg/ml

Z výsledných grafov je možné usúdiť, že bola pozorovaná zmena absorbancie s časom z čoho vyplýva, že úspešne dochádzalo k uvoľňovaniu u všetkých koncentrácií ibuprofenu z PHA filmov do fyziologického roztoku (viď Obrázok 17). Taktiež je možné pozorovať rozdiely v kinetike uvoľňovania z PHB a P(3HB/4HB) filmu. U všetkých koncentrácií prebiehalo uvoľňovanie látky približne do 7. hodiny od začiatku experimentu, kedy absorbancia úmerne rástla s časom. Po 7 hodinách sa uvoľňovanie ustáilo a po 24 hodinách nedošlo k takmer žiadnej zmene absorbancie, čím pravdepodobne došlo k maximálnemu uvoľneniu IBU z filmu.

U všetkých troch prevedení experimentu je možné pozorovať viditeľne efektívnejšie uvoľňovanie aktívnej látky z kopolymérneho filmu než z PHB filmu. Strmosť kriviek P(3HB/4HB) naznačuje rýchlejšiu počiatočnú difúziu ibuprofenu do roztoku. Celkovo vyššie namerané hodnoty absorbancie u P(3HB/4HB) filmu naznačujú, že dochádzalo k uvoľneniu vyšších koncentrácií IBU ako v porovnaní s PHB filmom, kde väčšina aktívnej látky ostala zakomponovaná vo filme.

Na základe výsledkov optimalizácie, bola pre hlavný experiment vybraná koncentrácia IBU 0,3 mg/ml. Výber koncentrácie bol zvolený na základe viacerých faktorov: jednoduchšie meranie absorbancie (nie je potrebné riedenie roztoku, čím nedochádza k stratám prijímacieho roztoku v priebehu experimentu), šetrenie množstva aktívnej látky, väčšie percento uvoľnenej látky pri použití nižších koncentrácií.



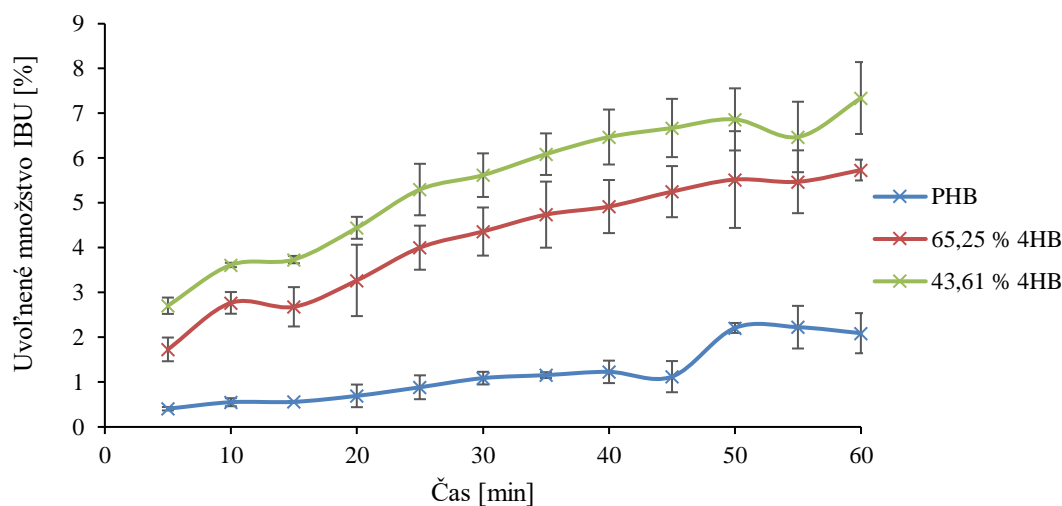
Obrázok 18: Kalibračná krivka pre ibuprofén vo fyziologickom roztoku

Pre dopočítanie koncentrácie ibuprofenu v roztoku, bola premeraná kalibračná krivka (viď Obrázok 18) pri 223 nm, príprava viď podkapitola 3.8.1. Pomocou rovnice regresnej priamky bolo následne vypočítané množstvo uvoľneného ibuprofenu do fyziologického roztoku.

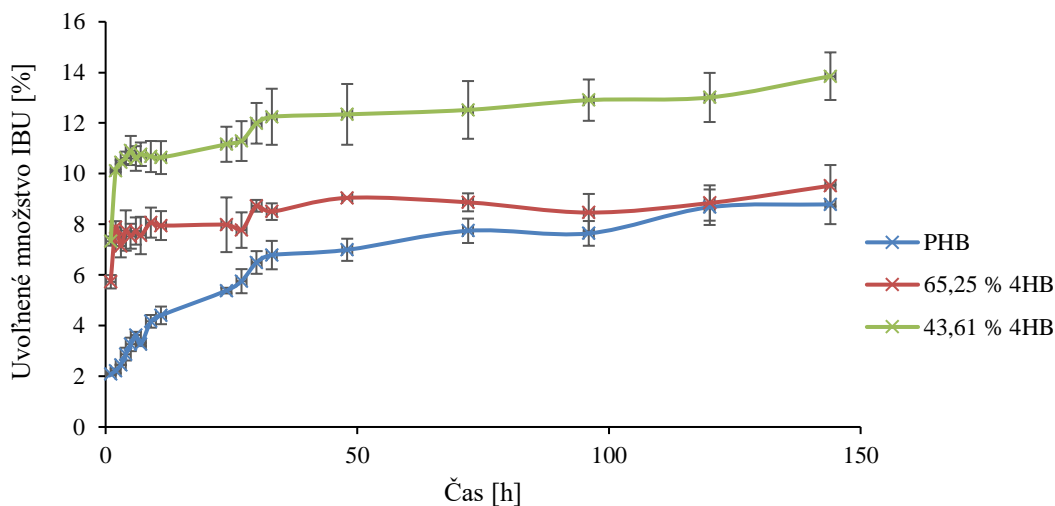
#### 4.3.2.2 Hlavný uvoľňovací experiment

Na základe výsledkov z predchádzajúcej kapitoly bola pre dlhodobý uvoľňovací experiment vybraná koncentrácia ibuprofenu 0,3 mg/ml (presné konečné koncentrácie inkorporovaného ibuprofenu viď Tabuľka 8). Počas experimentu bolo pozorované uvoľňovanie liečiva z filmov

z PHB (0 hm. % 4HB), P(3HB-co-65,25%4HB) a P(3HB-co-43,61%4HB). Konkrétne sa sledovalo, ako monomérmne zloženie PHA filmu, vplýva na kinetiku uvoľňovania aktívnej látky. Celý experiment trval po dobu 6 dní, pričom prvé 2 dni prebiehalo meranie v častejších intervaloch. Prvú hodinu bola meraná absorbancia roztoku až každých 5 minút, aby sa zistila aká rýchla bola počiatočná difúzia (Obrázok 19). Pomocou kalibračnej krivky (viď Obrázok 18) bolo následne vypočítané percentuálne množstvo uvoľneného ibuprofenu do roztoku.



Obrázok 19: Zmena uvoľneného množstva ibuprofenu počas prvej hodiny



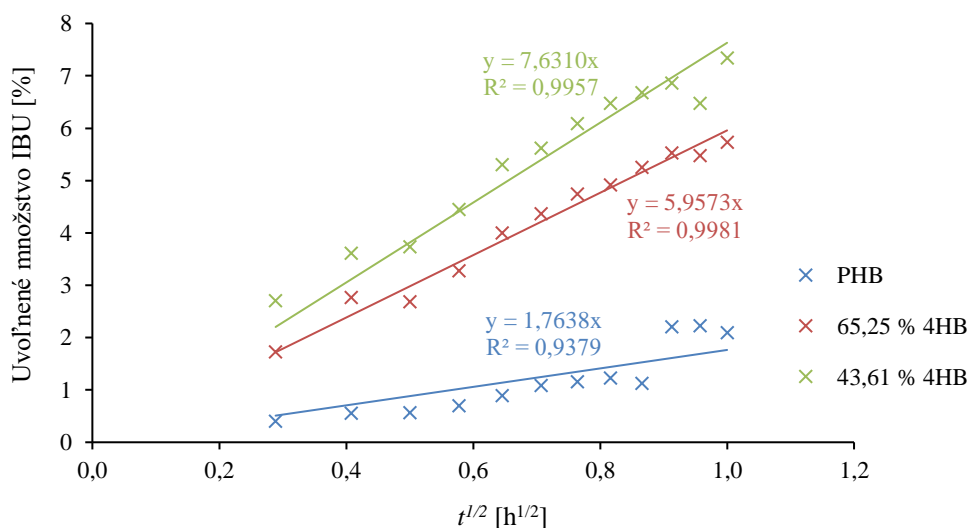
Obrázok 20: Zmena uvoľneného množstva ibuprofenu počas celého experimentu

V priebehu prvej hodiny bolo pozorované rýchlejšie počiatočné uvoľňovanie ibuprofenu z oboch kopolymérnych filmov v porovnaní s PHB (viď Obrázok 19). Z P(3HB-co-43,61%4HB) filmu sa po 60 minútach uvoľnilo 7,34 % z celkového množstva inkorporovaného IBU, zatiaľ čo z PHB filmu sa uvoľnilo len 2,09 %. Kinetika uvoľňovania sa u jednotlivých kopolymérov P(3HB/4HB) počas prvej hodiny až tak výrazne nelíšila.

Z celkovej časovej závislosti uvoľneného množstva ibuprofenu z PHA filmu do roztoku (viď Obrázok 20), je na prvý pohľad možné pozorovať, že monoméne zloženie filmu malo jednoznačne vplyv na kinetiku uvoľňovania. Koncentrácia uvoľneného ibuprofenu úmerne rástla s časom približne do 30. hodiny od začiatku experimentu, potom sa koncentrácia ustálila, respektíve rástla len nepatrne (viď Obrázok 20). Po 6 dňoch bol vidieť výrazný rozdiel v množstve uvoľneného IBU z P(3HB-co-43,61%4HB) a PHB filmu, kedy sa z kopolymérneho filmu uvoľnilo o 5,06 % viac IBU ako z PHB. Maximálne uvoľnené množstvo IBU z P(3HB-co-43,61%4HB) filmu bolo 13,85 % z celkového inkorporovaného množstva. Čo sa týka kopolymérneho filmu s obsahom 65,25 % 4HB, ten po ustálení uvoľňovania nevykazoval veľké rozdiely oproti filmu z PHB, kedy sa uvoľnené množstvo líšilo len o 0,74 % (viď Tabuľka 8).

Tabuľka 8: Charakteristiky PHA filmov s inkorporovaným ibuprofénom

Polymér	Obsah 4HB [%]	$c_{IBU}$ [mg/ml]	$m_{PHA}$ [mg]	Max. uvoľnené množ. IBU [%]	Smernica závislosti na $\sqrt{t}$
PHB	0,00	$0,20 \pm 0,02$	$42,5 \pm 3,5$	8,79	1,7638
2:4 P(3HB/4HB)	65,25	$0,26 \pm 0,01$	$57,5 \pm 0,7$	9,53	5,9573
6:4 P(3HB/4HB)	43,61	$0,26 \pm 0,05$	$57,5 \pm 2,1$	13,85	7,6310



Obrázok 21: Závislosť uvoľneného množstva ibuprofenu na odmocnине z času

Pre odvodenie difúzneho koeficientu bolo graficky vynesené uvoľnené množstvo ibuprofenu na odmocnине z času pre lineárnu oblasť kriviek. Lineárna oblasť kriviek opäť značí o difúzii aktívnej látky do roztoku v smere koncentračného gradientu. Závislosť bola preložená regresnou priamkou, ktorej smernica priamo koreluje s difúznym koeficientom. Na základe výsledných smerníc, respektíve difúzných koeficientov, je viditeľné, že štruktúra a monoméne zloženie polyméru, malo rozhodne vplyv na rýchlosť uvoľňovania (viď Obrázok 21).

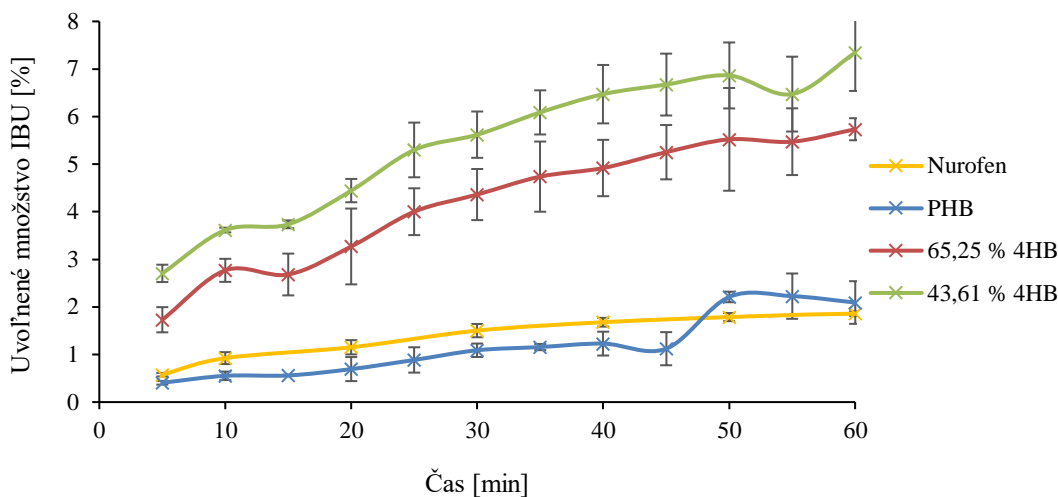
U kopolymérnych filmov majú smernice výrazne väčšie hodnoty (vid' Tabuľka 8), čo znamená, že transport látky do roztoku bol signifikantne rýchlejší ako z PHB filmu. Ako už bolo zmienené vyššie, za rýchlejšie uvoľňovanie bol pravdepodobne zodpovedný obsah 4HB monoméru, ktorý má za následok zníženie kryštalinity polyméru. Štruktúra polyméru tým prechádza viacej do amorfného stavu, z ktorého dochádza k jednoduchšiemu prenikaniu liečiva. Na základe toho by sa predpokladalo, že bude uvoľňovanie rýchlejšie z kopolyméru s vyšším obsahom 4HB, teda P(3HB-co-65,25%4HB), ako z P(3HB-co-43,61%4HB), tento predpoklad ale nebol naplnený, nakoľko difúzny koeficient u kopolyméru so 65,25 % 4HB bol mierne menší. To mohlo byť spôsobené napríklad tým, že kryštalinitu (resp. amorfnosť) látky neudáva len monomérene zloženie kopolyméru, ale aj usporiadanie týchto monomérov (či sú rovnaké monoméry pri sebe). Nakoľko sa jedná o PHA získané bakteriálnou produkciou, usporiadanie monomérnych jednotiek je viac-menej náhodné, čo sa mohlo do určitej miery prejavovať na štruktúre kopolyméru. Výsledky štúdia kryštalinity pomocou techniky DSC publikovanej v práci od *Sedláček a kol.* (2020) uvádzajú, že pri vyššom relatívnom obsahu 4HB v kopolyméri, sa trend klesajúcej kryštalinity obracia, čo je spôsobené vznikom kryštálov tvorených 4HB blokmi. V publikácii nie je experimentálne pokrytá oblasť medzi 50–70 % 4HB v reťazci, preto nie je možné usudzovať, či je to prípad aj tu skúmaných monomérnych zložení. V nadväzujúcej práci bolo preto vhodné doplniť podrobnejšie kalorimetrické štúdium závislosti kryštalinity polymérov na monomérnom zložení práve v tejto koncentračnej oblasti (technika DSC je citlivejšia k zmene kryštalinity ako analýzy FTIR).

Na Obrázku 21 je taktiež viditeľné, že extrapolované množstvo uvoľnenej látky pre čas 0 pre všetky študované filmy zodpovedá nule. To potvrdzuje nerušenú voľnú difúziu aktívnej látky zo všetkých testovaných filmov po celý časový interval použitý k lineárnej regresii.

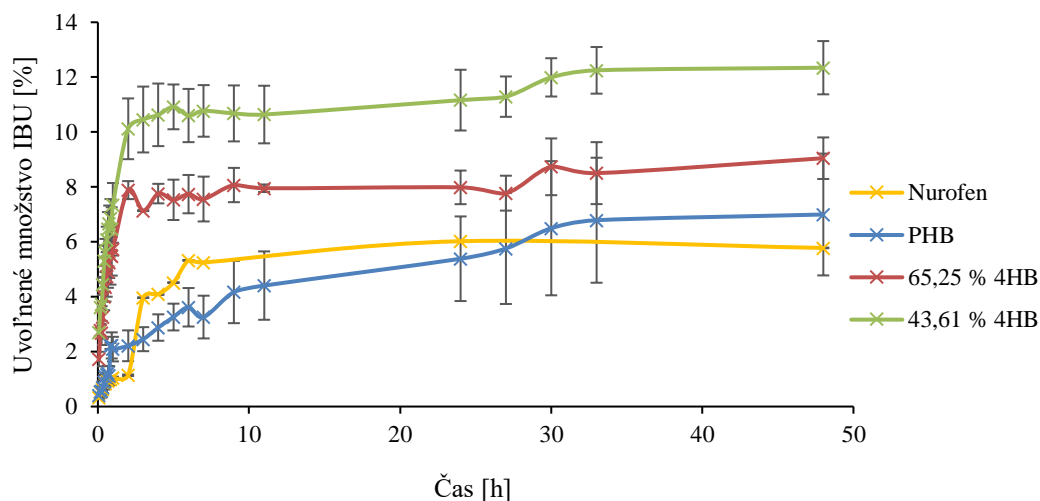
### **4.3.3 Porovnanie kinetiky uvoľňovania ibuprofenu z PHA filmov a z komerčnej náplasti Nurofen**

Pre posúdenie efektivity kopolymérnych PHA filmov v biomedicínskom využití, bol prevedený rovnaký uvoľňovací experiment za použitia komerčnej náplasti Nurofen s obsahom ibuprofenu 200 mg s postupným uvoľňovaním do 24 hodín, v snahe porovnať kinetiku uvoľňovania aktívnej látky. Predpokladalo sa, že aktívna látka je rovnomerne roznesená po celej náplasti, z ktorej bol spravený výrez 2×2 cm o predpokladanej koncentrácii 5,7 mg ibuprofenu. Výrez náplasti bol vložený do vialky s fyziologickým roztokom a následne bola meraná absorbancia pri 223 nm. Konkrétne bola absorbancia meraná prvú hodinu každých 10 minút, aby sa zistila aká rýchla bola počiatočná difúzia liečiva (vid' Obrázok 22). Po prvej hodine prebiehalo meranie už vo väčších intervaloch, pričom celý experiment prebiehal po dobu 48 hodín (vid' Obrázok 23).





Obrázok 22: Porovnanie kinetiky uvoľňovania ibuprofenu z PHA filmov a Nurofenovej náplasti počas prvej hodiny



Obrázok 23: Porovnanie kinetiky uvoľňovania ibuprofenu z PHA filmov a Nurofenovej náplasti počas celého experimentu

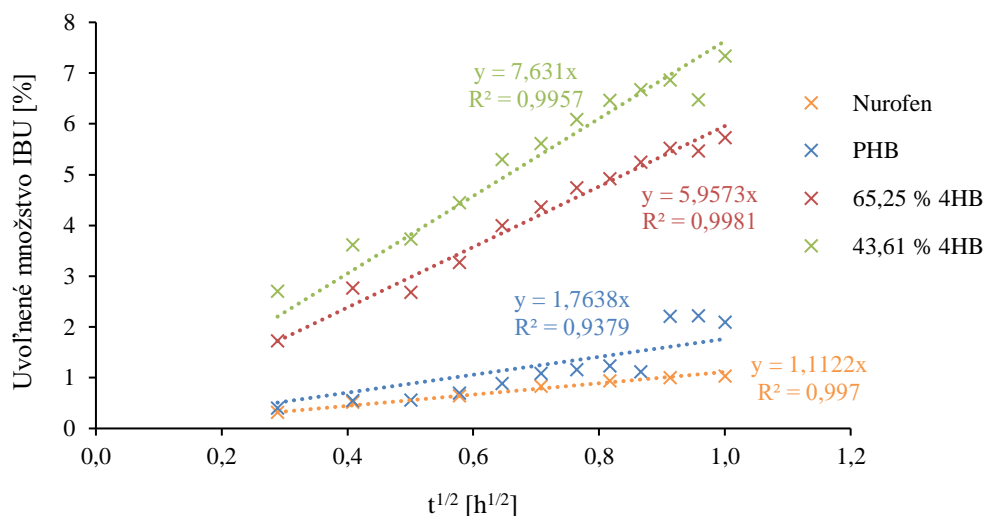
Experiment v rámci porovnania PHA filmov a komerčnej náplasti Nurofen ako nosičov pre postupné uvoľňovanie liečiva, priniesol pomerne prekvapivý výsledok. Už v priebehu prvej hodiny bolo možné pozorovať, že kopolymérnych filmov dochádzalo nie len k rýchlejšej difúzii látky do roztoku, ale aj k uvoľňovaniu oveľa väčšieho množstva ibuprofenu ako z Nurofen náplasti (viď Obrázok 22). Po 60 minútach sa z P(3HB-co-43,61%4HB) filmu uvoľnilo o 6,30 % viac ibuprofenu ako z Nurofen náplasti, z ktorej sa po hodine uvoľnilo len 1,04 % IBU.

Na Obrázku 23 je možné pozorovať, že uvoľňovanie z Nurofen náplasti sa ustálilo po 7. hodine od začiatku experimentu, pričom u PHA filmov došlo k ustáleniu až po približne 30. hodine. Na konci experimentu bolo pozorované, že zo všetkých PHA filmov sa uvoľnilo väčšie množstvo IBU ako z Nurofenu a predovšetkým z kopolymérnych filmov (viď Tabuľka 9). Uvoľnené množstvo z P(3HB-co-43,61%4HB) filmu, predstavovalo 12,34 % z celkového

množstva IBU, zatiaľ čo z Nurofen náplasti sa uvoľnilo len 5,78 %. Pri porovnaní PHB filmu a Nurofenu, bolo taktiež pozorované lepšie uvoľnenie z PHB filmu, z ktorého sa uvoľnilo o 1,22 % viac IBU ako z Nurofenu.

Tabuľka 9: Charakteristiky PHA filmov a Nurofen náplasti s inkorporovaným ibuprofénom

Nosič	Obsah 4HB [%]	$c_{IBU}$ [mg/ml]	Max. uvoľnené množ. IBU [%]	Smernica závislosti na $\sqrt{t}$
Nurofen	-	$5,70 \pm 0,01$	5,78	1,1122
PHB	0,00	$0,20 \pm 0,02$	7,00	1,7638
2:4 P(3HB/4HB)	65,25	$0,26 \pm 0,01$	9,05	5,9573
6:4 P(3HB/4HB)	43,61	$0,26 \pm 0,05$	12,34	7,6310



Obrázok 24: Závislosť uvoľneného množstva ibuprofenu z PHA filmov a z Nurofenu, na odmocnине z času

Na základe smerníc/difúzných koeficientov je možné usúdiť, že počiatočná rýchlosť difúzie ibuprofenu z Nurofen náplasti, prebiehala najpomalšie zo všetkých skúmaných nosičov (viď Obrázok 24). Jednoznačne väčšie difúzne koeficienty kopolymérnych filmov, naznačujú rýchlejšiu a efektívnejšiu difúziu aktívnej látky do roztoku, čím sa štruktúra P(3HB/4HB) ukázala ako vhodný nosič pre postupné uvoľňovanie liečiv.

Z vyššie uvedených výsledkov vyplýva, že PHA filmy sa preukázali ako rovnako účinné nosiče, dokonca efektívnejšie ako komerčné produkty. Bolo overené, že chemická štruktúra PHA predstavuje vhodnú maticu pre inkorporáciu liečivej látky a podporuje jej postupné uvoľňovanie do prostredia. Na rozdiel od komerčných produktov, ktoré nie vždy využívajú stopercentne biologicky pripravené materiály, majú PHA nosiče výhodu aj svojej biodegradability, čím by po ich použití nezaťažovali životné prostredie v takej miere ako produkty pripravené zo syntetických materiálov.

## 5 ZÁVER

Hlavným cieľom tejto diplomovej práce bola príprava a posúdenie aplikačného potenciálu biodegradabilných filmov na báze kopolyméru P(3HB-co-4HB) v biomedicínskom využití. Práca sa popri tom zaoberala problematikou monoméneho zloženia P(3HB-co-4HB) kopolyméru a vplyvom tohto zloženia na vlastnosti filmu.

Na prípravu kopolymérnych filmov bol použitý bakteriálny kmeň *Aneurinibacillus* sp. H1, ktorý sa vyznačuje prirodzenou akumuláciou intracelulárnych PHA granúl. Ako zdroje uhlíka boli počas kultivácie použité substráty glycerol a 1,4-butándiol, ktorých koncentračný pomer sa u jednotlivých kultivácií líšil, nakoľko bolo cieľom pripraviť kopolyméry P(3HB-co-4HB) o rôznych monoménych zloženiach. V experimente boli použité pomery substrátov 2:4; 4:4; 6:4 a 8:4 (glycerol:1,4-butándiol [g/l]). Z dôvodu pomerne nízkej produkcie biomasy daným bakteriálnym kmeňom a vzhľadom na množstvo materiálu potrebného na nasledujúce experimenty, bola kultivácia prevádzaná vo veľkých objemoch o cca 6–10 l média. Vlastnosti kopolymérnych filmov boli porovnávané s homopolymérom PHB, ktorý bol extrahovaný z biomasy bakteriálneho kmeňa *Cupriavidus necator* H16.

Získané biomasy z jednotlivých kultivácií boli podrobené gravimetrickej analýze a analýze GC-FID, pomocou ktorej bol stanovený obsah PHA v dané biomase. Z výsledkov bolo zrejmé, že čím bola použitá väčšia koncentrácia 1,4-butándiolu oproti glycerolu, tým vyšší bol stanovený obsah monoméru 4HB v kopolyméri. Najväčší obsah 4HB v biomase, bol stanovený v kultivácii s pomerom substrátov 2:4 (gly:but), kde kopolymér obsahoval 65,25 hm. % 4HB. Najnižší obsah 4HB bol naopak zaznamenaný v kultivácii s pomerom 8:4, kde bol priemerný obsah 4HB iba 0,91 hm. %. Zo získanej biomasy bol následne pomocou extrakcie na prístroji Soxtherm, vyizolovaný ako kopolymér P(3HB-co-4HB), tak aj polymér PHB, čím sa získali polymérne filmy o rôznych monoménych zloženiach.

Vyextrahované polymérne filmy boli charakterizované z hľadiska fyzikálnych vlastností s ohľadom na monoméneho zloženia týchto materiálov. Na charakterizáciu chemickej štruktúry polymérnych filmov bola použitá metóda FTIR, kde na základe nameraných spektier, bolo možné pozorovať, vplyv obsahu 4HB na chemickú štruktúru filmu. Čím bol obsah 4HB v kopolyméri vyšší, tým mal pík vypovedajúci o amorfnej štruktúre vyššiu intenzitu. Naopak filmy s nízkym obsahom 4HB sa prejavovali zvýšenou intenzitou píku vypovedajúcom o kryštalickej štruktúre. Vo všeobecnosti je teda možné skonštatovať, že zvýšením zastúpenia monoméru 4HB v kopolyméri P(3HB-co-4HB), sme schopní pripraviť polymérny film vyznačujúci sa nižšou kryštalinitou a zároveň s väčšou pevnosťou a elasticitou.

Pre posúdenie aplikačného potenciálu PHA kopolymérnych filmov, bol zvolený uvoľňovací experiment, v ktorom PHA film predstavoval nosičový systém s inkorporovaným liečivom, pričom bola sledovaná kinetika postupného uvoľňovania aktívnej látky z filmu do prostredia. Z ocharakterizovaných filmov boli vybraté dva kopolymérne filmy s obsahom 4HB 65,25 hm. %, 43,61 hm. % a PHB film. Pre uvoľňovacie experimenty boli ako modelové liečivá zvolené kyselina acetylsalicylová a ibuprofén. Samotným experimentom predchádzala

optimalizácia metódy, ktorej cieľom bolo nájsť optimálnu koncentráciu inkorporovaného liečiva a overenie funkčnosti experimentu.

V prvom uvoľňovacom experimente bolo študované uvoľňovanie kyseliny acetylsalicylovej z PHA filmov do fyziologického roztoku. Na základe optimalizácie, ktorá bola prevedená s komerčným liečivom acylpyrínom (kvôli šetreniu aktívnej látky), bola zvolená koncentrácia 2 mg/ml. V hlavnom experimente (už s kyselinou acetylsalicylovou) bolo sledované uvoľňovanie liečiva po dobu 5 dní, teda kým nedošlo k ustáleniu uvoľňovania. Z výsledkov bolo jasne viditeľné, že počiatočná difúzia liečiva bola rýchlejšia a efektívnejšia z kopolymérnych filmov, v porovnaní s uvoľňovaním ASA z PHB filmu. Avšak po ustálení uvoľňovania, bol zaznamenaný len minimálny rozdiel medzi uvoľneným množstvom z kopolymérnych filmov a homopolymérneho filmu, pričom maximálne uvoľnené množstvo ASA z P(3HB-co-65,25%4HB) filmu predstavovalo 9,26 %, pričom z PHB filmu sa uvoľnilo 9,00 %.

V ďalšom uvoľňovacom experimente bolo preštudované uvoľňovanie ibuprofenu z PHA filmov. Na základe optimalizácie metódy bola zo všetkých vyskúšaných koncentrácií zvolená koncentrácia 0,3 mg/ml. Uvoľňovanie IBU bolo počas hlavného experimentu pozorované po dobu 6 dní. Najväčšie rozdiely medzi jednotlivými filmami sa opäť preukázali v priebehu prvého dňa experimentu. Počiatočná difúzia IBU bola výrazne rýchlejšia a efektívnejšia z kopolymérnych filmov, pričom sa tento trend udržal po celú dobu experimentu. Na konci experimentu bolo stále vidieť výrazný rozdiel v množstve uvoľneného IBU medzi kopolymérnymi a homopolymérnym filmom. Maximálne uvoľnené množstvo IBU predstavovalo 13,85 %, ktoré bolo uvoľnené z P(3HB-co-43,61%4HB) filmu, pričom oproti homopolymérnemu PHB filmu bola táto hodnota vyššia o 5,06 %.

Súčasťou tohto experimentu bolo aj porovnanie uvoľňovania ibuprofenu z PHA filmov a z komerčnej náplasti Nurofen. Nakoľko náplasz udáva uvoľňovanie liečiva do cca 24 hodín od aplikácie, bol experiment prevádzaný po dobu 2 dní. Prekvapujúce výsledky ukázali výrazne efektívnejšiu počiatočnú difúziu liečiva do roztoku z kopolymérnych filmov, v porovnaní s Nurofen náplaszou, z ktorej sa v priebehu prvej hodiny uvoľnilo najmenšie množstvo IBU (1,04 %). Po ustálení uvoľňovania sa zo študovaných nosičov zase ukázala najmenej efektívne Nurofen náplasz, z ktorej maximálne uvoľnené množstvo IBU predstavovalo len 5,78 %, pričom z P(3HB-co-43,61%4HB) filmu sa uvoľnilo 12,34 %. Na základe týchto výsledkov je možné konštatovať, že PHA s inkorporovanou látkou predstavujú rovnako účinný nosič ako komerčná náplasz Nurofen.

Na základe uvedených výsledkov je možné posúdiť, že kopolyméry na báze PHA majú vysoký aplikačný potenciál, hodný širšieho využitia v biomedicínskom priemysle. Štruktúra PHA sa ukázala ako vhodná matrica pre inkorporáciu liečiva, čím sa potvrdilo, že PHA je rozhodne nádejným kandidátom pre vývoj biodegradabilných nosičových systémov s postupným uvoľňovaním liečiva. Nakoľko maximálne uvoľnené množstvo liečiva bolo stále pomerne nízke percento z celkového inkorporovaného množstva, je rozhodne ešte potrebné poriadne preštudovať túto problematiku a optimalizovať metódu prípravy, aby sa čo najviac zvýšila efektivita uvoľňovania.

## 6 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] BEHERA, Shivananda, Monika PRIYADARSHANEE, VANDANA a Surajit DAS, 2022. Polyhydroxyalkanoates, the bioplastics of microbial origin: Properties, biochemical synthesis, and their applications. *Chemosphere*. **294**. ISSN 00456535.
- [2] LAYCOCK, Bronwyn, Peter HALLEY, Steven PRATT, Alan WERKER a Paul LANT, 2013. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Progress in Polymer Science*. **38**(3-4), 536-583. ISSN 00796700.
- [3] MATO, Aranzazu, Francisco G. BLANCO, Beatriz MAESTRO, Jesús M. SANZ, Jesús PÉREZ-GIL, M. Auxiliadora PRIETO a Maia KIVISAAR, 2020. Dissecting the Polyhydroxyalkanoate-Binding Domain of the PhaF Phasin: Rational Design of a Minimized Affinity Tag. *Applied and Environmental Microbiology*. **86**(12), e00570-20. ISSN 0099-2240.
- [4] BASNETT, P., S. RAVI a I. ROY, 2017. Natural bacterial biodegradable medical polymers. *Science and Principles of Biodegradable and Bioresorbable Medical Polymers*. Elsevier, 2017, s. 257-277. ISBN 9780081003725.
- [5] LI, Zibiao, Jing YANG a Xian Jun LOH, 2016. Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future. *NPG Asia Materials*. **8**(4), e265-e265. ISSN 1884-4049.
- [6] SURENDRAN, Arthy, Manoj LAKSHMANAN, Jiun Yee CHEE, Azlinah Mohd SULAIMAN, Doan Van THUOC a Kumar SUDESH, 2020. Can Polyhydroxyalkanoates Be Produced Efficiently From Waste Plant and Animal Oils?. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. **8**. ISSN 2296-4185.
- [7] SAMUI, Asit Baran a Tapan KANAI, 2019. Polyhydroxyalkanoates based copolymers. *International Journal of Biological Macromolecules*. **140**, 522-537. ISSN 01418130.
- [8] RAZA, Zulfiqar Ali, Sharjeel ABID a Ibrahim M. BANAT, 2018. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 126, 45-56. ISSN 09648305.
- [9] SHARMA, Vibhuti, Rutika SEHGAL a Reena GUPTA, 2021. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Properties and Modifications. *Polymer*. **212**. ISSN 00323861.
- [10] SADI, Roberta K., Guilhermino J.M. FECHINE a Nicole R. DEMARQUETTE, 2010. Photodegradation of poly(3-hydroxybutyrate). *Polymer Degradation and Stability*. **95**(12), 2318-2327. ISSN 01413910.
- [11] LU, Jingnan, Ryan C. TAPPEL, Christopher T. NOMURA, Jesús M. SANZ, Jesús PÉREZ-GIL, M. Auxiliadora PRIETO a Maia KIVISAAR, 2009. Mini-Review: Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoates). *Polymer Reviews*. **49**(3), 226-248. ISSN 1558-3724.
- [12] CHEK, Min Fey, Sun-Yong KIM, Tomoyuki MORI, Hasni ARSAD, Mohammed Razip SAMIAN, Kumar SUDESH a Toshio HAKOSHIMA, 2017. Structure of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC from *Chromobacterium* sp. USM2, producing biodegradable plastics. *Scientific Reports*. **7**(1). ISSN 2045-2322.
- [13] SHARMA, Neha, 2019. Polyhydroxybutyrate (PHB) Production by Bacteria and its Application as Biodegradable Plastic in Various Industries. *Academic Journal of Polymer Science*. **2**(3). ISSN 26418282.

- [14] SAGONG, Hye-Young, Hyeoncheol Francis SON, So Young CHOI, Sang Yup LEE, Kyung-Jin KIM, M. Auxiliadora PRIETO a Maia KIVISAAR, 2018. Structural Insights into Polyhydroxyalkanoates Biosynthesis: Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoates). *Trends in Biochemical Sciences*. **43**(10), 790-805. ISSN 09680004.
- [15] LEE, Sang Yup a Jong-il CHOI, 1999. Production and degradation of polyhydroxyalkanoates in waste environment. *Waste Management*. **19**(2), 133-139. ISSN 0956053X.
- [16] SUZUKI, Miwa, Yuya TACHIBANA a Ken-ichi KASUYA, 2021. Biodegradability of poly(3-hydroxyalkanoate) and poly( $\epsilon$ -caprolactone) via biological carbon cycles in marine environments. *Polymer Journal*. **53**(1), 47-66. ISSN 0032-3896.
- [17] ONG, Su Yean, Jiun Yee CHEE, Kumar SUDESH, Sang Yup LEE, Kyung-Jin KIM, M. Auxiliadora PRIETO a Maia KIVISAAR, 2017. Degradation of Polyhydroxyalkanoate (PHA): a Review. *Journal of Siberian Federal University. Biology*. **10**(2), 21-225. ISSN 19971389.
- [18] SAMUI, Asit Baran a Tapan KANAI, 2019. Polyhydroxyalkanoates based copolymers. *International Journal of Biological Macromolecules*. **140**, 522-537. ISSN 01418130.
- [19] PEDERSON, Erik N., Christopher W. J. MCCHALICHER a Friedrich SRIENC, 2006. Bacterial Synthesis of PHA Block Copolymers. *Biomacromolecules*. **7**(6), 1904-1911. ISSN 1525-7797.
- [20] VIGNESWARI, S., S. VIJAYA, M. I. A. MAJID, K. SUDESH, C. S. SIPAUT, M. N. M. AZIZAN a A. A. AMIRUL, 2009. Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer with manipulated variables and its properties. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **36**(4), 547-556. ISSN 1367-5435.
- [21] KIM, Jin Seol, Bong Hee LEE a Beom Soo KIM, 2005. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha*. *Biochemical Engineering Journal*. **23**(2), 169-174. ISSN 1369703X.
- [22] DAI, Yu, Lynette LAMBERT, Zhiguo YUAN a Jurg KELLER, 2008. Microstructure of copolymers of polyhydroxyalkanoates produced by glycogen accumulating organisms with acetate as the sole carbon source. *Process Biochemistry*. **43**(9), 968-977. ISSN 13595113.
- [23] CHAI, Jun Meng, Tan Suet May AMELIA, Govindan Kothandaraman MOURIYA, Kesaven BHUBALAN, Al-Ashraf Abdullah AMIRUL, Sevakumaran VIGNESWARI a Seeram RAMAKRISHNA, 2021. Surface-Modified Highly Biocompatible Bacterial-poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate): A Review on the Promising Next-Generation Biomaterial. *Polymers*. **13**(1), 21-225. ISSN 2073-4360.
- [24] ANJUM, Anbreen, Mohammad ZUBER, Khalid Mahmood ZIA, Aqdas NOREEN, Muhammad Naveed ANJUM a Shazia TABASUM, 2016. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*. **89**, 161-174. ISSN 01418130.
- [25] KUMAR, Vasant, Rutika SEHGAL a Reena GUPTA, 2021. Blends and composites of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and their applications. *European Polymer Journal*. **161**. ISSN 00143057.

- [26] LEE, Wing-Hin, Mohd N.M. AZIZAN a Kumar SUDESH, 2004. Effects of culture conditions on the composition of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Comamonas acidovorans*. *Polymer Degradation and Stability*. **84**(1), 129-134. ISSN 01413910.
- [27] BAYARI, Sevgi a Feride SEVERCAN, 2005. FTIR study of biodegradable biopolymers: P(3HB), P(3HB-co-4HB) and P(3HB-co-3HV). *Journal of Molecular Structure*. **744-747**, 529-534. ISSN 00222860.
- [28] CHANG, H.M., Z.H. WANG, H.N. LUO, et al., 2014. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)-based scaffolds for tissue engineering. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **47**(7), 533-539. ISSN 1414-431X.
- [29] RAO, Urmila, R. SRIDHAR a P.K. SEHGAL, 2010. Biosynthesis and biocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* from spent palm oil. *Biochemical Engineering Journal*. **49**(1), 13-20. ISSN 1369703X.
- [30] CARPINE, Roberta, Giuseppe OLIVIERI, Klaas J. HELLINGWERF, Antonino POLLIO, Antonio MARZOCHELLA, Sevakumaran VIGNESWARI a Seeram RAMAKRISHNA, 2020. Industrial Production of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate from CO<sub>2</sub>: Can Cyanobacteria Meet this Challenge?. *Processes*. **8**(3), 21-225. ISSN 2227-9717.
- [31] LI, Yi, Yutong LEI, Shilong YAO, Changyu HAN, Yancun YU a Liguang XIAO, 2020. Miscibility, crystallization, rheological and mechanical properties of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)/poly(vinyl acetate) blends. *Thermochimica Acta*. **693**. ISSN 00406031.
- [32] KOVALCIK, Adriana, Jiri SMILEK, Michal MACHOVSKY, et al., 2021. Properties and structure of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) filaments for fused deposition modelling. *International Journal of Biological Macromolecules*. **183**, 880-889. ISSN 01418130.
- [33] YU, Yancun, Yi LI, Changyu HAN a Liguang XIAO, 2019. Enhancement of the properties of biosourced poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by the incorporation of natural orotic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*. **136**, 764-773. ISSN 01418130.
- [34] POLICASTRO, Grazia, Antonio PANICO, Massimiliano FABBRICINO, Antonino POLLIO, Antonio MARZOCHELLA, Sevakumaran VIGNESWARI a Seeram RAMAKRISHNA, 2021. Improving biological production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) co-polymer: a critical review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. **20**(2), 479-513. ISSN 1569-1705.
- [35] TEBALDI, Marli Luiza, Ana Luiza Chaves MAIA, Fernanda POLETTO, Fabricio Vieira DE ANDRADE, Daniel Cristian Ferreira SOARES, Sevakumaran VIGNESWARI a Seeram RAMAKRISHNA, 2019. Poly(-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV): Current advances in synthesis methodologies, antitumor applications and biocompatibility. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. **51**(2), 115-126. ISSN 17732247.
- [36] RIVERA-BRISO, Ariagna, Ángel SERRANO-AROCA, Fernanda POLETTO, Fabricio Vieira DE ANDRADE, Daniel Cristian Ferreira SOARES, Sevakumaran VIGNESWARI a Seeram RAMAKRISHNA, 2018. Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate):

- Enhancement Strategies for Advanced Applications. *Polymers*. **10**(7), 115-126. ISSN 2073-4360.
- [37] IBRAHIM, Mohammad I., Diya ALSAFADI, Khalid A. ALAMRY, Mahmoud A. HUSSEIN, Daniel Cristian Ferreira SOARES, Sevakumaran VIGNESWARI a Seeram RAMAKRISHNA, 2021. Properties and Applications of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Biocomposites: Enhancement Strategies for Advanced Applications. *Journal of Polymers and the Environment*. **29**(4), 1010-1030. ISSN 1566-2543.
- [38] SURENDRAN, Arthy, Manoj LAKSHMANAN, Jiun Yee CHEE, Azlinah Mohd SULAIMAN, Doan Van THUOC, Kumar SUDESH a Seeram RAMAKRISHNA, 2020. Can Polyhydroxyalkanoates Be Produced Efficiently From Waste Plant and Animal Oils?: Current advances in synthesis methodologies, antitumor applications and biocompatibility. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. **8**(4), 1010-1030. ISSN 2296-4185.
- [39] NDUKO, John Masani a Seiichi TAGUCHI, 2021. Microbial Production of Biodegradable Lactate-Based Polymers and Oligomeric Building Blocks From Renewable and Waste Resources. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. **8**. ISSN 2296-4185.
- [40] RAY, Subhasree a Vipin Chandra KALIA, 2017. Microbial Cometabolism and Polyhydroxyalkanoate Co-polymers. *Indian Journal of Microbiology*. **57**(1), 39-47. ISSN 0046-8991.
- [41] VERLINDEN, R.A.J., D.J. HILL, M.A. KENWARD, C.D. WILLIAMS a I. RADECKA, 2007. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*. **102**(6), 1437-1449. ISSN 1364-5072.
- [42] FLORES-SÁNCHEZ, Araceli, Ma. del Rocío LÓPEZ-CUELLAR, Fermín PÉREZ-GUEVARA, Ulises FIGUEROA LÓPEZ, José Mauricio MARTÍN-BUFÁJER a Berenice VERGARA-PORRAS, 2017. Synthesis of Poly-(R-hydroxyalkanoates) by *Cupriavidus necator* ATCC 17699 Using Mexican Avocado (*Persea americana*) Oil as a Carbon Source. *International Journal of Polymer Science*. **2017**(6), 1-10. ISSN 1687-9422.
- [43] NOVACKOVA, Ivana, Vendula HRABALOVA, Eva SLANINOVA, et al., 2022. The role of polyhydroxyalkanoates in adaptation of *Cupriavidus necator* to osmotic pressure and high concentration of copper ions. *International Journal of Biological Macromolecules*. **206**, 977-989. ISSN 01418130.
- [44] TAN, Hua Tiang, Min Fey CHEK, Manoj LAKSHMANAN, et al., 2020. Evaluation of BP-M-CPF4 polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from plant oil using *Cupriavidus necator* transformants. *International Journal of Biological Macromolecules*. **159**, 250-257. ISSN 01418130.
- [45] SANTOLIN, Lara, Saskia WALDBURGER, Peter NEUBAUER, et al., 2021. Substrate-Flexible Two-Stage Fed-Batch Cultivations for the Production of the PHA Copolymer P(HB-co-HHx) With *Cupriavidus necator* Re2058/pCB113. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. **9**, 250-257. ISSN 2296-4185.



- [46] KUCERA, Dan, Ivana NOVACKOVA, Iva PERNICOVA, et al., 2019. Biotechnological Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-4-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) Terpolymer by *Cupriavidus* sp. DSM 19379. *Bioengineering*. **6**(3). ISSN 2306-5354.
- [47] SEDLACEK, Petr, Iva PERNICOVA, Ivana NOVACKOVA, et al., 2020. Introducing the Newly Isolated Bacterium *Aneurinibacillus* sp. H1 as an Auspicious Thermophilic Producer of Various Polyhydroxyalkanoates (PHA) Copolymers–2. Material Study on the Produced Copolymers. *Polymers*. **12**(6). ISSN 2073-4360.
- [48] PERNICOVA, Iva, Ivana NOVACKOVA, Petr SEDLACEK, et al., 2020. Introducing the Newly Isolated Bacterium *Aneurinibacillus* sp. H1 as an Auspicious Thermophilic Producer of Various Polyhydroxyalkanoates (PHA) Copolymers–1. Isolation and Characterization of the Bacterium. *Polymers*. **12**(6). ISSN 2073-4360.
- [49] PERNICOVA, Iva, Ivana NOVACKOVA, Petr SEDLACEK, et al., 2020. Application of osmotic challenge for enrichment of microbial consortia in polyhydroxyalkanoates producing thermophilic and thermotolerant bacteria and their subsequent isolation. *International Journal of Biological Macromolecules*. **144**(6), 698-704. ISSN 01418130.
- [50] CHAVAN, Shraddha, Bhoomika YADAV, R.D. TYAGI, et al., 2021. A review on production of polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters by thermophilic microbes using waste feedstocks. *Bioresource Technology*. **341**(6), 698-704. ISSN 09608524.
- [51] BONARTSEV, A. P., G. A. BONARTSEVA, I. V. RESHETOV, K. V. SHAITAN a M. P. KIRPICHNIKOV, 2019. Application of Polyhydroxyalkanoates in Medicine and the Biological Activity of Natural Poly(3-Hydroxybutyrate). *Acta Naturae*. **11**(2), 4-16. ISSN 2075-8251.
- [52] BRIGHAM a SINSKEY, 2012. Applications of Polyhydroxyalkanoates in the Medical Industry. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*. ISSN 19273037.
- [53] PAPANEOPHYTOU, Christos, George KATSIPIIS, Eleftherios HALEVAS a Anastasia A. PANTAZAKI, 2019. Polyhydroxyalkanoates Applications in Drug Carriers. KALIA, Vipin Chandra, ed. *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates*. Singapore: Springer Singapore, 2019-01-25, s. 77-124. ISBN 978-981-13-3758-1.
- [54] BHATIA, Shashi Kant, Puneet WADHWA, Ravi Kant BHATIA, Sanjay Kumar Singh PATEL a Yung-Hun YANG, 2019. Strategy for Biosynthesis of Polyhydroxyalkonates Polymers/Copolymers and Their Application in Drug Delivery. KALIA, Vipin Chandra, ed. *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates*. Singapore: Springer Singapore, 2019-01-25, s. 13-34. ISBN 978-981-13-3758-1.
- [55] SHAH, Mohsin, Muhammad Imran NASEER, Mun Hwan CHOI, Myeong Ok KIM a Sung Chul YOON, 2010. Amphiphilic PHA–mPEG copolymeric nanocontainers for drug delivery: Preparation, characterization and in vitro evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*. **400**(1-2), 165-175. ISSN 03785173.
- [56] BALOGUN-AGBAJE, Olalekan, Olubusola A. ODENIYI, Michael ODENIYI, 2019. Applications of Polyhydroxyalkanoates in Drug Delivery Applications of Polyhydroxyalkanoates in Drug Delivery. *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences*. **44**(2), 147-158.

- [57] GUO, Wentai, Keli YANG, Xiuse QIN, Rui LUO, Hui WANG a Rongkang HUANG, 2022. Polyhydroxyalkanoates in tissue repair and regeneration. *Engineered Regeneration*. **3**(1), 24-40. ISSN 26661381.
- [58] GALEGO, Norma, Chavati ROZSA, Rubén SÁNCHEZ, Juan FUNG, ANALÍA VÁZQUEZ a Julio SANTO TOMÁS, 2000. Characterization and application of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) family as composite biomaterials. *Polymer Testing*. **19**(5), 485-492. ISSN 01429418.
- [59] FU, Na, Zhaosong MENG, Tiejun JIAO, Xiaoding LUO, Zisheng TANG, Bofeng ZHU, Lei SUI a Xiaoxiao CAI, 2019. P34HB electrospun fibres promote bone regeneration in vivo. *Cell Proliferation*. **52**(3). ISSN 0960-7722.
- [60] VIGNESWARI, S., V. MURUGAIYAH, G. KAUR, H.P.S. ABDUL KHALIL a A.A. AMIRUL, 2016. Simultaneous dual syringe electrospinning system using benign solvent to fabricate nanofibrous P(3HB-co-4HB)/collagen peptides construct as potential leave-on wound dressing. *Materials Science and Engineering: C*. **66**, 147-155. ISSN 09284931.
- [61] FAISALINA, A.F., Fabio SONVICO, Paolo COLOMBO, A.A. AMIRUL, H.A. WAHAB a Mohamed Isa Abdul MAJID, 2020. Docetaxel-Loaded Poly(3HB-co-4HB) Biodegradable Nanoparticles: Impact of Copolymer Composition. *Nanomaterials*. **10**(11). ISSN 2079-4991.
- [62] BAZZO, Giovana Carolina, Aline Teixeira de MACEDO, Janine Paula CRENCA, Virgínia Emiliana SILVA, Eduardo Manoel PEREIRA, Melissa ZÉTOLA a Bianca Ramos PEZZINI, 2012. Microspheres prepared with biodegradable PHBV and PLA polymers as prolonged-release system for ibuprofen: in vitro drug release and in vivo evaluation. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. **48**(4), 773-780. ISSN 1984-8250.
- [63] SENDIL, Dilek, Ihsan GÜRSEL, Donald L. WISE a Vasif HASIRCI, 1999. Antibiotic release from biodegradable PHBV microparticles. *Journal of Controlled Release*. **59**(2), 207-217. ISSN 01683659.
- [64] VOLOVA, T.G., A.A. SHUMILOVA, E.D. NIKOLAEVA, A.K. KIRICHENKO a E.I. SHISHATSKAYA, 2019. Biotechnological wound dressings based on bacterial cellulose and degradable copolymer P(3HB/4HB). *International Journal of Biological Macromolecules*. **131**, 230-240. ISSN 01418130.

## 7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

3HB	3-hydroxybutyrát
4HB	4-hydroxybutyrát
ACYL	acylpyrín
ALG	alginát
ASA	kyselina acetylsalicylová
BG	bioaktívne sklo
but	1,4-butándiol
FTIR	infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou
GC-FID	plynová chromatografia s plameňovo ionizačným detektorom
gly	glycerol
HA	hydroxyapatit
HDI	1,6-hexametyléndiizokyanát
HHx	hydroxyhexanoát
HV	hydroxyvalerát
IBU	ibuprofén
ISTD	vnútorný štandard
lcl-PHA	PHA s dlhým reťazcom
mcl-PHA	PHA so stredným reťazcom
MCPBA	kyselina m-chlórperbenzoova
MES	roztok stopových prvkov
$M_n$	početne stredná molekulová hmotnosť
$M_w$	hmotnostne stredná molekulová hmotnosť
O/W	emulzia olej vo vode
P(3HB-co-4HB)	poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát)
P(3HB-co-3HV)	poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)
PDI	index polydisperzity
PHA	polyhydroxyalkonáty
PHA/PBAT	PHA/poly(butylénadipát-co-tereftalát)
PHB	poly(3-hydroxybutyrát)
PHBHHx	poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyhexanoát)
SEC-MALS	vylučovacia chromatografia s detektorom statického rozptylu svetla vo viacerých uhloch
scl-PHA	PHA s krátkym reťazcom
TES II	roztok stopových prvkov pre termofilné baktérie
$T_g$	teplota skleneného prechodu
$T_m$	teplota topenia
$T_{max}$	teplota tepelnej degradácie
UV	ultrafialové žiarenie
VIS	viditeľné svetlo
W/O/W	emulzia voda/olej/voda

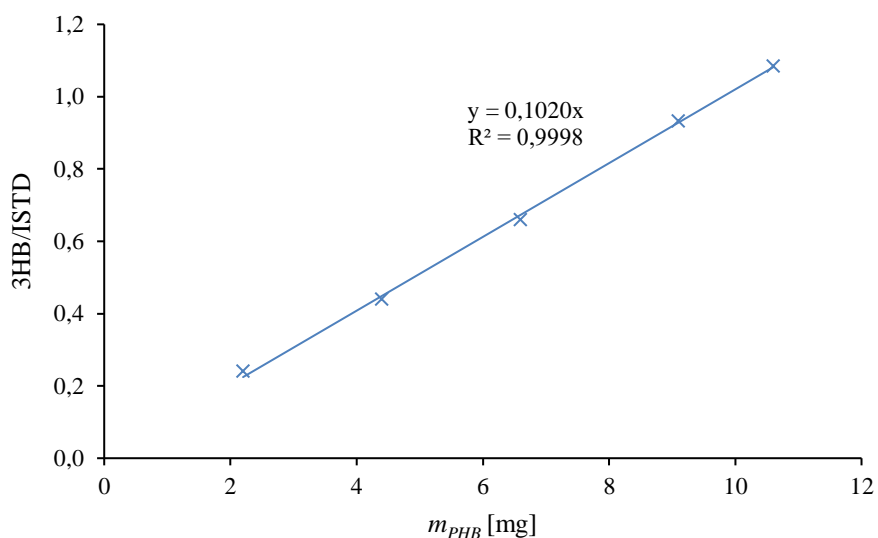
## 8 PRÍLOHY

### 8.1 Kalibračná krivka pre stanovenie obsahu 3HB v biomase

Kalibračná rada štandardných roztokov o známej koncentrácii polyméru PHB (príprava vid' kapitola) boli premerané na plynovom chromatografe GC-FID. Z výstupných chromatogramov boli zistené pomery plochy píkov látky (3HB) ku ploche píku vnútorného štandardu (ISTD), ktoré boli následne vynesené do závislosti na koncentrácii látky (vid' Obrázok 25). Na základe kalibračnej priamky bol stanovený obsah 3HB v biomase.

Tabuľka 10: Pomery plochy píkov pre jednotlivé navážky PHB

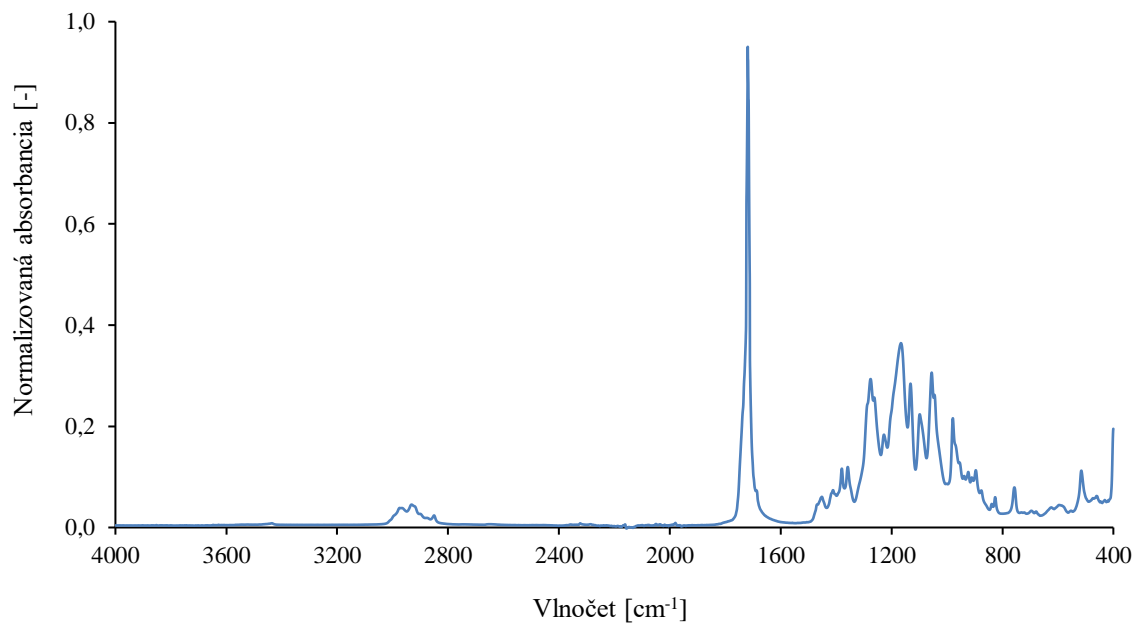
$m_{PHB}$ [mg]	pomer plôch píkov 3HB/ISTD
2,2	0,242
4,4	0,440
6,6	0,661
9,1	0,933
10,6	1,085



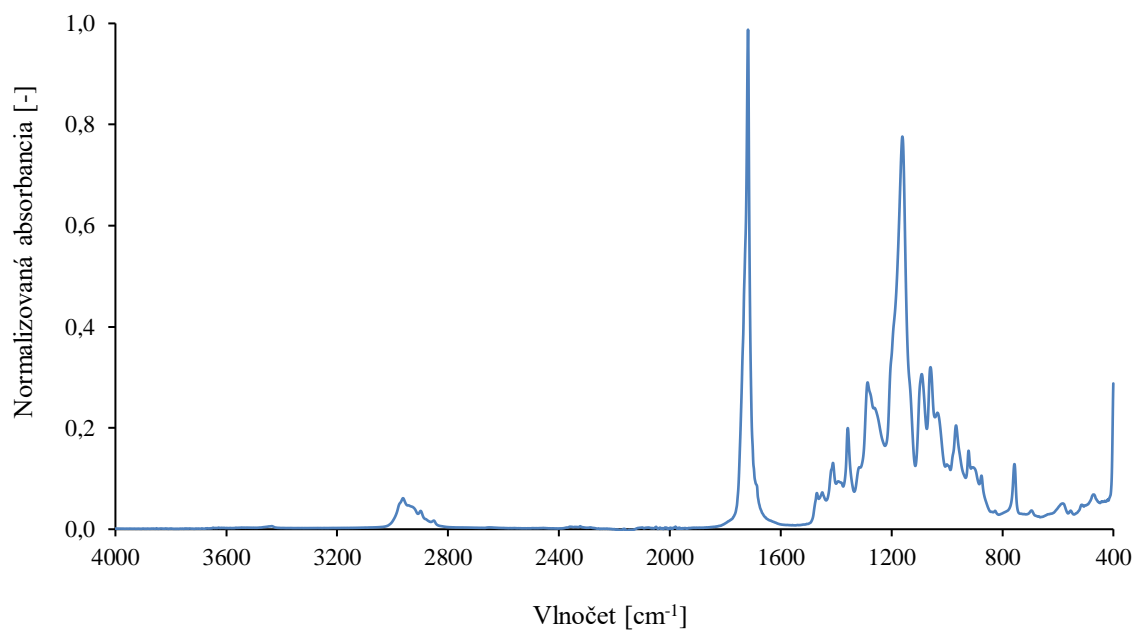
Obrázok 25: Kalibračná krivka pre stanovenie obsahu 3HB

## 8.2 Charakterizácia štruktúry PHA filmov pomocou FTIR

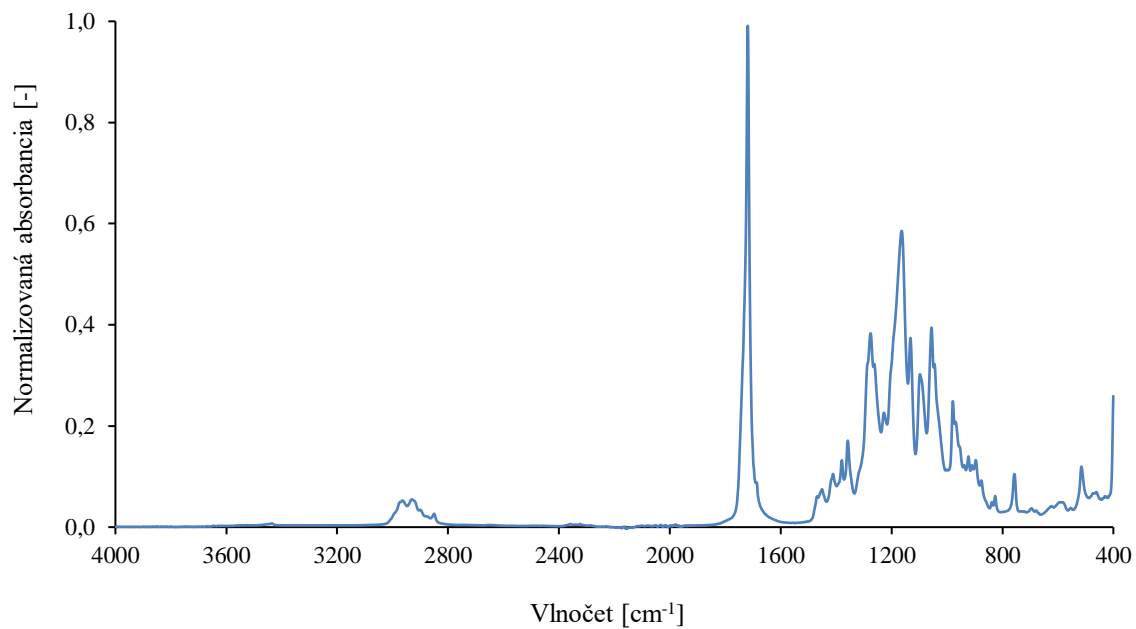
### 8.2.1 FTIR spektrá PHA filmov bez inkorporovaného liečiva



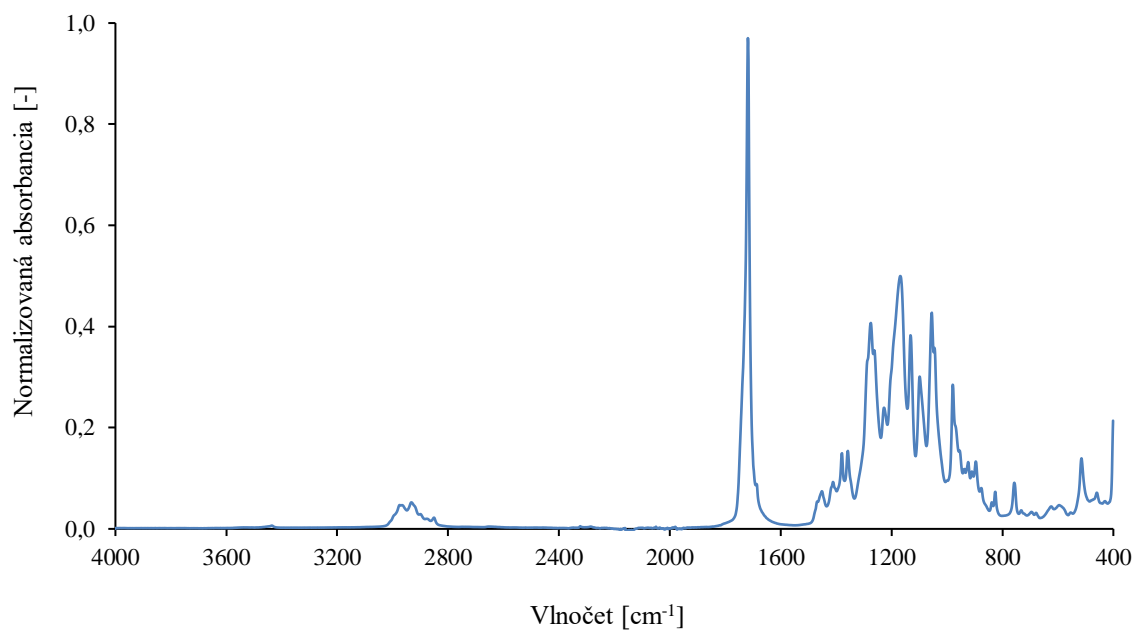
Obrázok 26: FTIR spektrum PHB filmu



Obrázok 27: FTIR spektrum P(3HB-co-65,25%4HB) filmu

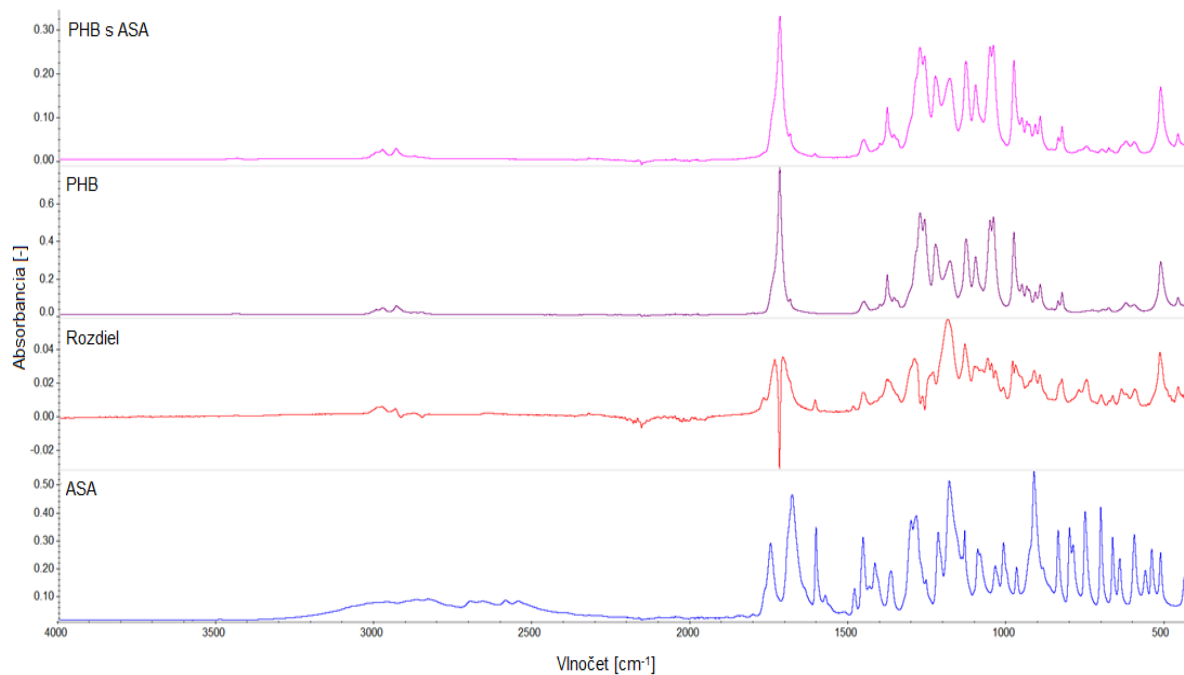


Obrázok 28: FTIR spektrum P(3HB-co-43,61%4HB) filmu

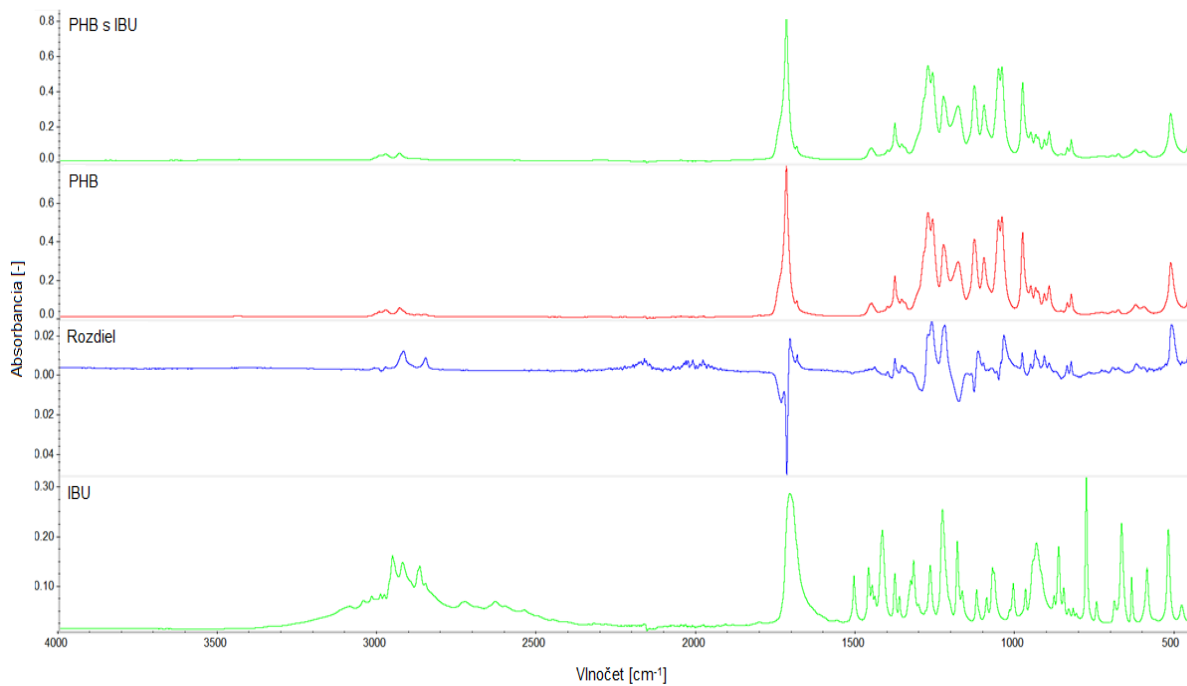


Obrázok 29: FTIR spektrum P(3HB-co-39,05%4HB) filmu

## 8.2.2 FTIR spektrá PHA filmov s inkorporovaným liečivom



Obrázok 30: Porovnanie FTIR spektier PHB čistého filmu a PHB filmu s inkorporovanou kyselinou acetylsalicylovou



Obrázok 31: Porovnanie FTIR spektier PHB čistého filmu a PHB filmu s inkorporovaným ibuprofénom