



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

**BIODEGRADACE IN VITRO BIOPOLYESTERŮ V
SYNTETICKÉ ŽALUDEČNÍ ŠTÁVĚ**

IN VITRO BIODEGRADATION OF BIOPOLYESTERS EXPOSED TO SYNTHETIC GASTRIC JUICE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Markéta Sobková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1542/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Markéta Sobková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Biodegradace in vitro biopolyesterů v syntetické žaludeční šťávě

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše zaměřená na dané téma.
2. Příprava filmů biopolyesterů rozpouštěním v chlorovaných rozpouštědlech.
3. In vitro biodegradace připravených filmů v syntetické žaludeční šťávě. Porovnání účinků syntetické žaludeční šťávy s fosfátovým pufrům s přidavkem enzymu.
4. Sledování biodegradace filmů gravimetricky, FTIR a změnami molekulové hmotnosti.
5. Vyhodnocení výsledků, jejich diskuze a závěr práce.

Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2020:

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

Markéta Sobková
student(ka)

doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá studiem *in vitro* biodegradace biopolyesterů v syntetické žaludeční šťávě a fyziologickém roztoku pufrovaném fosfáty s lipázou po dobu 81 dní. Teoretická část shrnuje základní poznatky o biologicky rozložitelných biopolyesterech, zabývá se jejich využitím a poukazuje na jejich možné aplikace v medicíně.

Experimentální část se zabývá samotnou biodegradací připravených biopolyesterových filmů. K experimentu byly využity následující biopolyestery: polykyselina mléčná, komerční poly(hydroxyalkanoát) amorfni, poly(3-hydroxybutyrát), poly(butylene adipát-*co*-tereftalát), poly(-3hydroxybutyrát-*co*-3-hydroxyvalerát), polyhydroxybutyrát polyhydroxyhexanoát kopolymer, filament polykyseliny mléčné a filament směsi polykyseliny mléčné a polyhydroxybutyrátu. Tenké filmy byly připraveny rozpouštěním polymeru v chloroformu, vylitím do formy a následným odpařením rozpouštědla. Dle typu polyesteru a jeho stupně krystalinity se měnily vlastnosti připravených filmů, jejich vzhled byl v škále od transparentních do mléčně zakalených a jejich mechanické vlastnosti se lišily hlavně v elasticitě. Během biodegradace docházelo k změně morfologie filmů a studované vzorky získávaly vyšší stupeň křehkosti a nižší kompatibilitu.

Samotná biodegradace byla sledována pomocí změn molekulové hmotnosti (pomocí SEC-MALLS), chemické struktury (pomocí FTIR) a úbytkem hmotnosti v čase (gravimetrie). Analyzované biopolyestery byly prokazatelně náchylné na biodegradaci v simulovaných tělních podmínkách. Stupeň biodegradace závisel na typu použitého biopolyesteru. Největší úbytek hmotnosti byl zaznamenán u vzorku amorfniho polyhydroxyalkanoátu, kdy ve fyziologickém roztoku pufrovaném fosfáty s lipázou došlo ke snížení původní hmotnosti o $84,28 \pm 0,03$ % po 81 dnech biodegradace.

KLÍČOVÁ SLOVA

polymerní filmy, biodegradace, biopolyestery, hydrolýza, polyhydroxyalkanoáty, kyselina polymléčná, PBAT

ABSTRACT

This bachelor's thesis is focused on the study of *in vitro* biodegradation of biopolyesters exposed synthetic gastric juice and phosphate buffer saline with lipase for 81 days. The theoretical part summarises the necessary information about characteristics of biodegradable biopolyesters, deals with their possible applications in medicine.

The experimental part deals with the biodegradation of prepared biopolyesters films. In this work, poly(lactic acid), amorphous poly(hydroxy alkanates), poly(3-hydroxybutyrate), poly(butylene adipate terephthalate), poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate), filament poly(lactic acid) and filament poly(lactic acid)/poly(hydroxybutyrate) were used for the experiment. The films were prepared by dissolving of the biopolyesters in hot chloroform. The dissolving agent was evaporated, and prepared films were dried. Prepared films had different properties depending on the used biopolyesters. Their appearance was formed transparent to milky cloudy. Also, they differed in their plasticity. During biodegradation, the morphology changed, and the samples gained higher fragility.

The effect of biodegradation was monitored by changes in 1) molecular weights (SEC-MALLS), 2) chemical structure (FTIR) and 3) weight loss changes (gravimetrically). The analysed biopolyesters were demonstrably susceptible to biodegradation in simulated body conditions. The degree of biodegradation depends on the type of biopolyester. The most significant weight loss was recorded for the sample of amorphous polyhydroxyalkanoate (PHA). The PHA's original weight was reduced about 84.28 ± 0.03 % after the 81 days of biodegradation in the phosphate-buffered saline with lipase.

KEYWORDS

polymer films, biodegradation, biopolyesters, hydrolysis, polyhydroxyalkanoates, poly(lactic acid), PBAT

SOBKOVÁ, Markéta. *Biodegradace in vitro biopolyesterů v syntetické žaludeční šťávě*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123923>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Adriána Kovalčík.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studentky

PODĚKOVÁNÍ

Moje poděkování patří doc. Ing. Adriáně Kovalčík, Ph.D., za veškerou pomoc, ochotu a čas, který mi během vypracování této práce poskytla. Za pomoc při provádění experimentu bych dále ráda poděkovala Ing. Vojtěchu Enevovi, Ph.D., Ing. Michalu Kalinovi, Ph.D. a Leoně Kubíkové.

Tato práce byla podpořena projektem SoMoPro (projekt č. 6SA18032). Projekt získal finanční prostředky z programu pro výzkum a inovace Horizont 2020 Evropská unie v rámci akcí Marie Skłodowska-Curie a je spolufinancován Jihomoravským krajem dle grantové dohody č. 665860. Poznámka: Tento materiál odráží pouze postoje autora a EU není zodpovědná za jakékoli použití prezentovaných informací.



Jihomoravský kraj



Jcmm

SO-MO-PRO-

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	BIOPLASTY	9
2.2	DEGRADAČNÍ PROCESY	9
2.3	BIODEGRADACE	9
2.3.1	<i>Biodegradace v různých prostředích</i>	10
2.3.2	<i>Enzymatická degradace v roztoku</i>	10
2.3.3	<i>Metodiky testující biodegradaci</i>	10
2.4	PŘÍRODNÍ BIODEGRADABILNÍ POLYMERY	11
2.4.1	<i>Škrob</i>	11
2.4.2	<i>Celulosa</i>	12
2.5	BIOLOGICKY ROZLOŽITELNÉ POLYESTERY	12
2.5.1	<i>Kyselina polymléčná</i>	12
2.5.2	<i>Poly(butylen adipát-co-tereftalát)</i>	13
2.5.3	<i>Polyhydroxyalkanoáty</i>	14
2.5.3.1	Struktura a vlastnosti PHA	14
2.5.3.2	Extrakce PHA z bakteriálních buněk	15
2.5.3.3	Využití PHA	16
2.5.3.4	Medicínské aplikace	16
2.6	BIODEGRADACE BIOPOLYESTERŮ	17
2.6.1	<i>Biodegradace v životním prostředí</i>	17
2.6.2	<i>Biodegradace v živých systémech</i>	18
2.7	BIODEGRADACE A MEDICÍNA.....	18
3	CÍL PRÁCE	21
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
4.1	POUŽITÉ PŘÍSTROJE	22
4.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	22
4.3	PŘÍPRAVA FILMŮ BIOPOLYESTERŮ	22
4.4	IN VITRO BIODEGRADACE	23
4.4.1	<i>Syntetická žaludeční šťáva</i>	25
4.4.2	<i>Fosfátový pufr s lipázou</i>	25
4.4.3	<i>Sledování biodegradace</i>	26
4.4.3.1	Analýza pomocí infračervené spektroskopie	26
4.4.3.2	Stanovení úbytku hmotnosti	26
4.4.3.3	Stanovení molekulové hmotnosti	26
4.4.3.4	Termální vlastnosti vybraných biopolyesterů před a po enzymatické hydrolýze	26
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	28
5.1	ANALÝZA POMOCÍ INFRAČERVENÉ SPEKTROSKOPIE	28

5.2	STANOVENÍ MOLEKULOVÉ HMOTNOSTI	32
5.3	STANOVENÍ ÚBYTKU HMOTNOSTI	36
5.4	TERMÁLNÍ VLASTNOSTI VYBRANÝCH BIOPOLYESTERŮ PŘED A PO ENZYMATICKÉ HYDROLÝZE.....	40
6	ZÁVĚR.....	42
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	43
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	50
9	SEZNAM PŘÍLOH	51
10	PŘÍLOHY	52

1 ÚVOD

Mezi celosvětově nepoužívanější materiály patří plasty, se kterými se setkáváme v běžném životě takřka neustále. Jako plasty označujeme řadu syntetických polymerů. Používané plasty jsou vyráběny primárně z petrochemických produktů. Tyto polymery představují mimořádně stabilní a všestranné materiály, které se vyznačují svou pevností, nepropustností, pružností, nízkou hustotou a pomalým stárnutím. Vzhledem k jejich širokému využití v různých oblastech patří plasty k velmi důležitým materiálům dnešní doby [1].

Mnoho z nich je však využíváno pro krátkodobé aplikace, především jako obalový materiál. Jejich všestranné a časté využití má za důsledek hromadění plastového odpadu, který lidstvo není schopno šetrně zpracovávat [1]. Ekologické důsledky jsou patrné na stále se zvyšujícím objemu použitého nezpracovaného plastu, který zamořuje jak na souš, tak i oceány. Příprava plastů pro samotnou recyklaci je nákladná a časově náročná, vyžaduje velké množství energie a často vede k výrobě ne příliš kvalitních recyklovaných polymerů. Dalším problémem je, že současné technologie recyklace nelze aplikovat na všechny typy používaných plastů [2, 3].

Kvůli škodám na životním prostředí roste poptávka po biopolymerech, které budou poskytovat požadované fyzikálně-chemické vlastnosti, a které zároveň budou získávány z obnovitelných zdrojů a budou plně biologicky rozložitelné, tudíž šetrné k životnímu prostředí [2, 3].

Budování trhu biopolymerů vede k úvahám využívat tyto materiály nejen jako náhradu petrochemických polymerů pro průmyslové aplikace. Řada výzkumů jasně prokázala, že jsou tyto materiály velmi vhodným kandidátem pro aplikace biomedicínské. Tradičně využívané materiály pro lékařské implantáty, jako jsou kovy, keramika nebo syntetické polymery, mohou v těle interagovat a projevit se negativními imunologickými reakcemi. Často je nutné podstoupit druhou operaci pro jejich odstranění z těla. Biopolymery v organismu nezpůsobují imunologické reakce, nejsou cytotoxické. Dále podléhají biodegradaci, při níž dochází k rozkladu na tělu vlastní látky, které jsou v organismu dále metabolizovány, tudíž zde není nutnost podstoupit další operaci pro odstranění materiálu z těla po zotavení pacienta. Biopolymery můžeme rozdělit na tři nejrozšířenější skupiny: polysacharidy, proteiny a polyestery. Vysoká variabilita mechanických vlastností, chemických struktur, i možnost volbou materiálu ovlivnit rychlost biodegradace, předurčuje biopolymery k široké škále uplatnění v medicíně a farmacii [4, 5, 6].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 BIOPLASTY

Pojmem bioplasty není myšlen pouze jeden druh materiálu. Bioplasty zahrnují širokou škálu látek s rozličnými vlastnostmi a aplikacemi. Obecným termínem bioplasty bývají označovány jak polymery biologicky rozložitelné, tak i ty, které pocházejí z obnovitelných zdrojů, popřípadě materiály, které splňují oba tyto parametry zároveň [7, 8].

Bioplasty pocházející z obnovitelných zdrojů jsou myšleny materiály či produkty, které jsou minimálně z 50 % syntetizovány z biomasy, jako je například škrob, cukrová třtina nebo celulóza [7, 8].

Biodegradací je myšlen proces, při kterém je daný materiál činností různých mikroorganismů rozložen na přírodní látky jako je voda, oxid uhličitý a methan. Samotný proces biodegradace závisí na podmínkách rozkladu, typu mikroorganismů a typu materiálu. Rozlišujeme aerobní a anaerobní podmínky. Mezi nejvýznamnější biodegradace v přírodě patří degradace v půdě a ve sladké, nebo mořské vodě. Biodegradabilní plasty nemusí být vždy vyrobeny z biomasy, naopak mnoho plastů, které jsou vyrobeny z petrochemických produktů, mohou být v přírodě rozložitelné [7, 8].

2.2 DEGRADAČNÍ PROCESY

Degradace je proces, při kterém dochází ke strukturním a vlastnostním změnám materiálu. V makromolekulárních látkách, mezi které patří materiály získané z přírodních zdrojů i chemicky syntetizované, dochází při degradačních procesech až ke štěpení polymerní vazby. Tyto změny v daných makromolekulách mohou být vyvolány fyzikálními, biologickými i chemickými vlivy [9].

Při chemodegradaci jsou makromolekuly degradovány účinkem chemických látek. Tento proces je účinný především u plastových materiálů, které ve svém řetězci obsahují labilní funkční skupiny. Obecně můžeme říct, že čím více bude na makromolekule labilních funkčních skupin, tím snadněji bude jejich chemodegradace probíhat [9, 10].

Působením tepelné energie dochází ke štěpení chemických vazeb a také ke konformačním změnám makromolekul. K roztržení molekuly dochází v místech, kde se nacházejí nejslabší vazby. Termodegradační procesy probíhají nejčastěji v inertní atmosféře nebo přímo ve vakuu. Jejich průběh charakterizuje vznik těkavých produktů různého chemického složení a uhlovodíkového zbytku [9, 10].

Spouštěčem fotodegradace je sluneční záření o dané vlnové délce, které působí na určité typy vazeb nacházejících se v dané plastické makromolekule. Vlnová délka musí mít ve většině případů charakter ultrafialového záření [9, 10].

2.3 BIODEGRADACE

Speciálním případem degradace je proces, při němž dochází k přeměně polymerů na jednodušší sloučeniny, jako je oxid uhličitý, methan, voda, anorganické sloučeniny nebo biomasa. Za vhodných podmínek vede biodegradace k rozkladu plastů beze zbytků, které by mohly být toxické nebo škodlivé pro životní prostředí [1, 2, 11].

Biodegradaci výrazně ovlivňuje řada faktorů. Jedním z nich je teplota, která dokáže výrazně ovlivnit činnost mikroorganismů. Nastavením teploty, která je optimální pro růst daného mikroorganismu, můžeme značně ovlivnit rychlost celého procesu biodegradace. Pro správnou funkci mikroorganismů je dále zapotřebí určitá vlhkosti půdy, která se udává v rozmezí od 50 do 70 %. Jak již bylo zmíněno výše, významným faktorem je také dostatečný přístup kyslíku (u aerobních procesů) nebo naopak jeho úplná absence (anaerobní procesy). Dále jsou tyto procesy ovlivněny hodnotou pH daného prostředí, která významně ovlivňuje biologickou aktivitu jednotlivých mikroorganismů [12].

2.3.1 Biodegradace v různých prostředích

Obrovské množství plastových odpadů se likviduje hromaděním na skládkách nebo spalováním, což vede ke vzniku skleníkových plynů. Bylo provedeno mnoho studií zaměřených na zkoumání biologické rozložitelnosti v různých prostředích, jako je kompost, půda, mořské a jiné vodní prostředí. Nejčastěji byla volena půda nebo kompost z důvodu vysoké přirozené mikrobiální rozmanitosti [13].

Při kompostování je organická hmota přeměňována na oxid uhličitý a půdní materiál (humus) pomocí mikroorganismů. V průběhu posledního desetiletí byly provedeny rozsáhlé studie využití kompostu pro biologický rozklad plastů. Bioplasty na bázi biomasy i na bázi ropy jsou citlivé na biodegradaci v kompostu za specifických podmínek jako je teplota, pH a obsah vlhkosti. Schopnost biodegradace může být urychlena pomocí různých, snadno degradovatelných příměsí jako jsou cukry, kukuřice nebo vlákna z drůbežího peří, a to proto, že se mikroorganismy díky nim mohou snadněji a rychleji rozmnožovat [13].

2.3.2 Enzymatická degradace v roztoku

Nejčastěji probíhá degradace v roztoku hydrolyzou pomocí enzymů. Tato reakce má dva stěžejní kroky, při prvním dochází ke specifické vazbě enzym-substrát a následně je katalyzováno hydrolytické štěpení. V procesu depolymerace, extracelulární enzymy štěpí během degradace dlouhé řetězce makromolekul na menší molekuly, které následně jsou vstřebávány skrz semipermeabilní membránu dovnitř buňky. Navazující část biodegradace se nazývá mineralizace, při ní dochází ke zpracování krátkých řetězců původního polymeru až na malé molekuly jako je voda, oxid uhličitý nebo methan. Tyto produkty potom bakterie využívají jako zdroj uhlíku a energie [14].

2.3.3 Metodiky testující biodegradaci

Biologická rozložitelnost je testována pomocí metod, které stimulují reálné podmínky prostředí. Pro srovnání výsledků různých studií je potřeba používat mezinárodně schválené standardy, které stanovují podmínky pro daný experiment [14, 15].

Účinky biodegradace jsou popisovány zdrsněním povrchu, tvorbou otvorů nebo trhlin, rozpadem polymerů na menší fragmenty, změnou barvy nebo tvorbou biofilmů na povrchu. Z těchto informací je patrné, že biologický rozpad zkoumaných látek jsme schopni částečně potvrdit vizuálním pozorováním povrchu plastů [14, 15].

Široce používanou jednoduchou metodou při testování biodegradace je stanovení úbytku hmotnosti daného vzorku polymeru. Nicméně tato metoda může být značně nepřesná,

protože není získán žádný přímý důkaz biologického rozkladu, proto je vhodné tuto metodu doplnit další analýzou, například stanovením molekulové hmotnosti polymeru [14, 15].

Nejčastěji se výzkum zaměřuje na organickou recyklaci (kompostování). V laboratoři je stimulován proces kompostování za využití vyšších teplot (okolo 37 °C nebo 58 °C). Po minimálně třech měsících se stupeň rozpadu stanoví prosetím získaného kompostu. Pokud daný polymer degradoval, jeho částice projdou sítím společně s kompostem a nebudou se od něj výrazně odlišovat. Touto metodou je možno zjistit, zda daný materiál biologicky degraduje po fyzikální stránce, tedy zda dochází k jeho rozpadu. Nicméně již nedokáže odhalit, zda budou dané fragmenty dále biodegradovat na oxid uhličitý, vodu a biomasu, nebo přetrvají v nezměněném stavu v kompostu. Tento problém může být vyřešen další zkušební metodou, která je založena na stanovení čistého vývoje oxidu uhličitého. Nutností je měření vývoje oxidu uhličitého také v kompostu, který neobsahuje rozkládaný polymer. Výslednou hodnotou je potom rozdíl těchto objemů [14, 15].

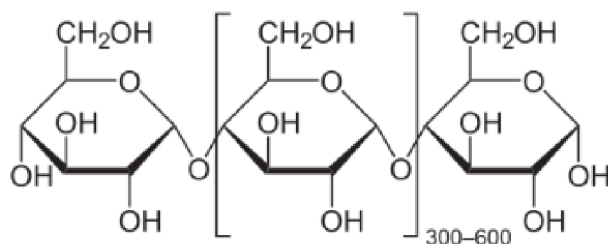
Dále bývají zkoumány změny mechanických vlastností a změny molekulové hmotnosti pozorovaného vzorku. Pomocí těchto metod může být biologický rozklad potvrzen přímo [14, 15].

2.4 PŘÍRODNÍ BIODEGRADABILNÍ POLYMERY

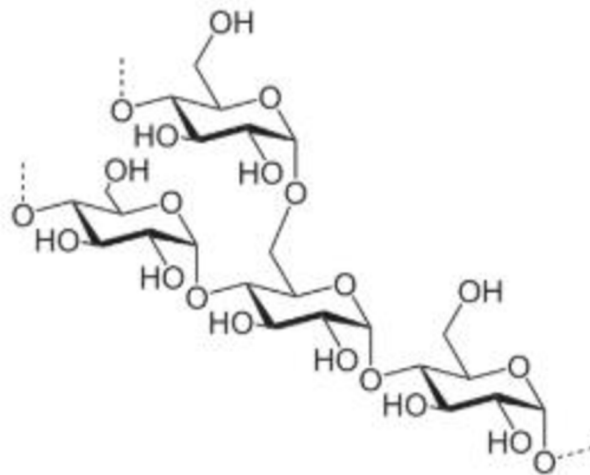
V posledních letech byla syntetizována řada biologicky rozložitelných přírodních polymerů. Do skupiny přírodních polymerů řadíme hlavně škrob, celulosu, polyhydroxyalkanoáty nebo polykyselinu mléčnou. V současné době lze uvažovat tři základní způsoby výroby těchto materiálů. Prvním z nich je modifikace biopolymerů (např. škrobové polymery), dále mohou být polymerizovány biogenní polymery (např. kyselina polymléčná) a třetím způsobem je syntéza pomocí mikroorganismů, které tento materiál přímo produkují (např. polyhydroxyalkanoáty) [11, 16, 17].

2.4.1 Škrob

Škrob, který vzniká při procesu fotosyntézy, je ukládán ve formě polysacharidu v rostlinách. Tento biologicky rozložitelný polymer je snadno dostupný, nachází se v plodinách jako jsou brambory, kukuřice nebo rýže, a jeho získání není příliš finančně náročné. Škrob se skládá ze dvou stavebních jednotek – amylosy (lineární polymer molekul D-glukosy spojených α -1,4-glykosidickou vazbou) a amylopektinu (vysoce rozvětvený polymer molekul D-glukosy). Obrázek 1 a obrázek 2 vyobrazuje strukturu těchto dvou zmiňovaných polysacharidů. Škrob jako takový nemá potřebné mechanické vlastnosti, a proto často dochází k jeho mísení se syntetickými plasty, které ale zhoršují jeho biodegradabilitu [11, 16, 19].



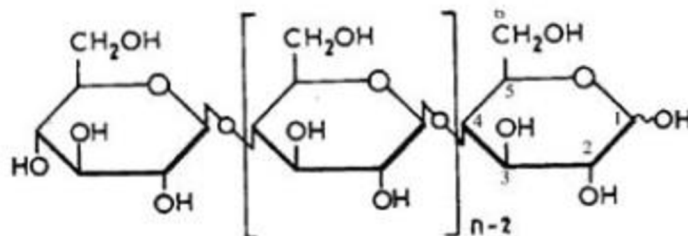
Obrázek 1: Molekulová struktura polysacharidu amylosa [18]



Obrázek 2: Molekulová struktura polysacharidu amylopektin [18]

2.4.2 Celulosa

Nejrozšířenějším přírodním polymerem je celulóza, která má krystalickou strukturu a je hydrofilní. Molekulová struktura je vyobrazena na obrázku 3. Zásadní nevýhodou tohoto materiálu je, že není termoplastický, nelze jej rozpustit ani tavit. Plásticky zpracovávat lze pouze deriváty celulózy, které mohou mít požadované mechanické vlastnosti, nicméně pravidelnému využití tohoto materiálu brání velmi vysoké výrobní náklady [16, 20].



Obrázek 3: Molekulová struktura celulózy [18]

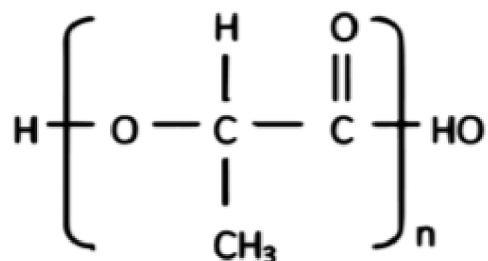
2.5 BIOLOGICKY ROZLOŽITELNÉ POLYESTERY

Biopolyestery patří k nejslibnějším biologicky rozložitelným materiálům vůbec. Jednotlivé monomery jsou vázány esterovou vazbou, která může podléhat hydrolýze. Mezi biodegradabilní polyestery patří především polyestery alifatické – polyglykolid, polykyselina mléčná nebo polyhydroxyalkanoáty. Tyto materiály prokazatelně podléhají hydrolýze a (bio)degradaci, avšak jejich fyzikálně-mechanické vlastnosti často nedosahují kvalit petrochemických polymerů. Mezi slibné materiály se řadí aromatický polyester poly(butylénadipát tereftalát), který vykazuje vynikající fyzikálně-mechanické vlastnosti a zároveň je (bio)degradovatelný [21, 22].

2.5.1 Kyselina polyléčná

Kyselina polyléčná (PLA) představuje jeden z nejrozšířenějších biologicky rozložitelných materiálů, který je obnovitelný a biokompatibilní. PLA se získává přímou kondenzací kyseliny

mléčné. Ta je syntetizována mikroorganismy, které jako zdroj uhlíku používají hlavně glukosu získanou z kukuřičného škrobu a cukrové třtiny. Tento polyester je považován za jeden z nejslibnějších biologicky rozložitelných polymerů. Molekulová struktura kyseliny polymléčné je zobrazena na obrázku 4 [1, 21, 23].



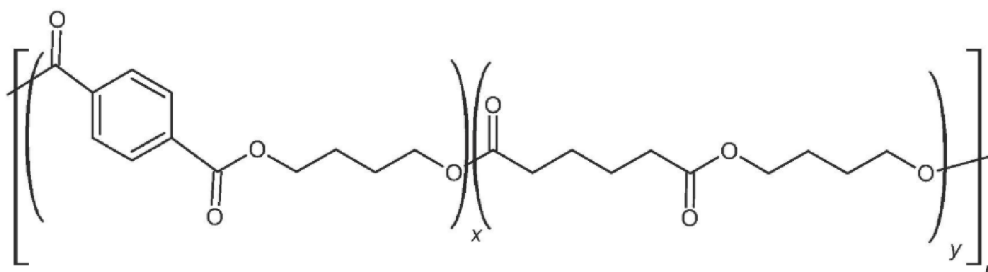
Obrázek 4: Molekulová struktura kyseliny polymléčné [17]

PLA se již používá v biomedicínských aplikacích (systémy pro řízené podávání léčiv, stehy nebo jako materiál pro fixaci kostí), mimo biomedicínské aplikace je PLA také využívána jako obalový materiál. Tento polymer má dobrou pevnost v tahu, ale nízkou tepelnou stabilitu a rázovou houževnatost, proto je jeho využití v oblasti plastických materiálů značně omezeno. Za účelem zlepšení vlastností je snaha PLA různě modifikovat. Důležitým aspektem těchto modifikací je ale potřeba zachování biologické rozložitelnosti daného materiálu [21, 23, 24].

2.5.2 Poly(butylén adipát-co-tereftalát)

Poly(butylén adipát-co-tereftalát) (PBAT) je v dnešní době jedním z nejvýznamnějších biologicky rozložitelných kopolyesterů vyrobených z fosilních zdrojů. Ve snaze podpořit hydrolytickou degradaci polybutylen tereftalátu (PBT), který má skvělé mechanické i tepelné vlastnosti, ale není schopen biologické degradace, bývají do řetězce přidávány alifatické měkké segmenty adipátu, které zachovávají původní mechanické i tepelné vlastnosti PBT a zároveň podporují biologickou rozložitelnost [21].

PBAT je tedy získáván polykondenzací butandiolu, kyseliny adipové a kyseliny tereftalové, výsledná struktura tohoto polyesteru je vyobrazena na obrázku 5. PBAT kombinuje výhody aromatických i alifatických jednotek ve svém řetězci. Ve výsledku je tento polyester biologicky rozložitelný s potřebnými mechanickými vlastnostmi, které jsou velmi podobné vlastnostem polyesteru s nízkou hustotou [21, 25].



Obrázek 5: Molekulová struktura PBAT [21]

V dnešních dnech PBAT již nachází své využití především jako obalový materiál nebo jako náhražka jednorázových nákupních tašek. Dalším slibným odvětvím je využití v zemědělství,

kdy lze nahradit mulčovací fólie z polyethylenu. Své uplatnění může najít také v biomedicínských aplikacích například při rekonstrukci kostí [25, 26].

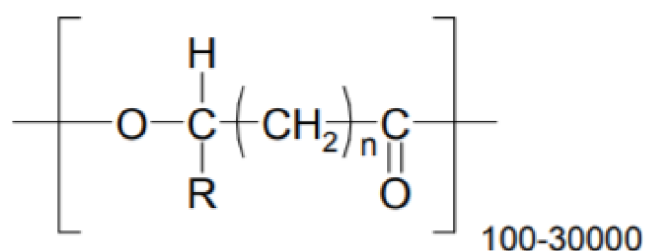
Jednou z mála nevýhod PBAT je jeho vysoká cena v porovnání s jinými, běžně využívanými komoditními plasty. Slibnou alternativou, která bude nákladově výhodnější, je smíchání PBAT s jinými biologicky rozložitelnými polymery, jako je například škrob nebo PLA [25].

2.5.3 Polyhydroxyalkanoáty

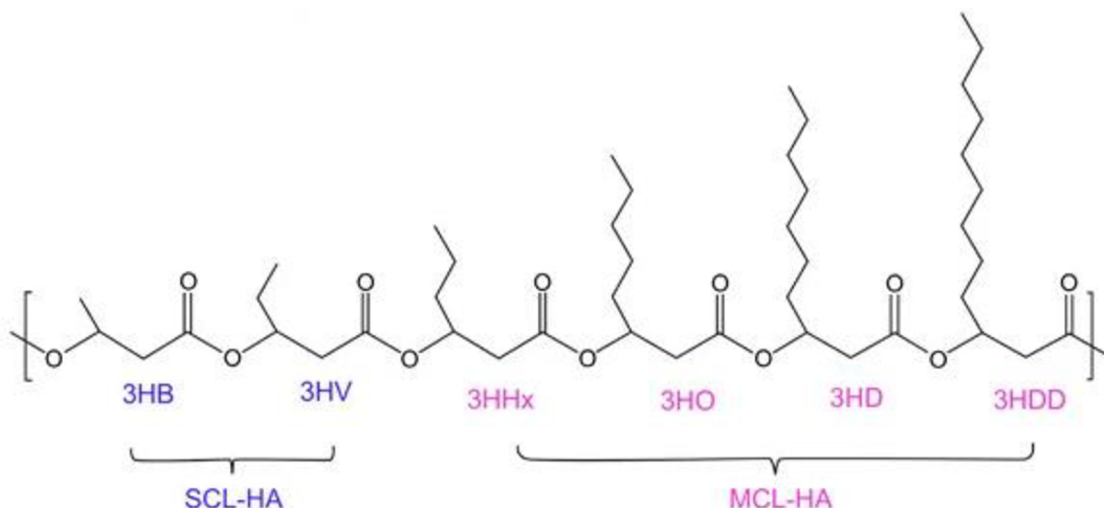
Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou biologické polyestery syntetizované mikroorganismy jako zásobní zdroj energie a uhlíku. Bylo identifikováno více než 250 druhů bakterií, které polyhydroxyalkanoáty produkují. PHA po extrakci z bakteriálních buněk vykazují krystalické, pružné, elastické a termoplastické vlastnosti. Mohou být syntetizovány z obnovitelných zdrojů uhlíku, a tudíž tak nevedou k vyčerpání omezených neobnovitelných zdrojů. Rostoucí obavy o znečištění životního prostředí vyvolávají vysoký zájem o tyto struktury, které mohou být plně biodegradovány. Polyhydroxyalkanoáty charakterizujeme jako netoxické, biokompatibilní a biodegradovatelné polymery, které lze získat z obnovitelných zdrojů [27], [28], [29].

2.5.3.1 Struktura a vlastnosti PHA

Dosud identifikované PHA zahrnují poměrně širokou skupinu alifatických hydroxylových mastných kyselin. V těchto polymerech tvoří karboxylová skupina jednoho monomeru esterovou vazbu s hydroxylovou skupinou sousedního monomeru (viz obrázek 6). Na základě délky uhlovodíkového zbytku se PHA dělí do tří skupin: monomery s krátkým řetězcem (SCL-PHA) obsahující 3–5 atomů uhlíku, monomery se středně dlouhým řetězcem (MCL-PHA) s 6–15 atomy uhlíku a poslední skupinou jsou monomery s dlouhým řetězcem (LCL-PHA), které mají ve svém uhlovodíkovém zbytku více než 15 atomů uhlíku. Tento rozdíl je způsoben především substrátovou specifičností PHA syntézy jednotlivých bakterií. Některé běžně syntetizované PHA uvádí obrázek 7. Nejčastěji charakterizovanými PHA jsou poly-3-hydroxybutyrát (P3HB), polyhydroxyvalerát (PHV), polyhydroxyhexanoát (PHH), polyhydroxyoktanoát (PHO) a jejich kopolymery, jako je například poly-3-hydroxybutyrát-hydroxyvalerát (PHBHV) [28, 30, 31, 32].



Obrázek 6: Obecná struktura polyhydroxyalkanoátu [33].



Obrázek 7: Některé běžně syntetizované monomery SCL-PHA a MCL-PHA. 3HB: 3-hydroxybutyrát, 3HV: 3-hydroxyvalerát, 3HHx: 3-hydroxyhexanoát, 3HO: 3-hydroxyoktanoát, 3HD: 3-hydroxydekanóat, 3HDD: 3-hydroxydodekanoát [33].

V buňce existují PHA jako pevné inkluze amorfního charakteru. Po extrakci organickými rozpouštědly z buňky se však PHA stávají vysoce krystalickou látkou, která vykazuje materiálové vlastnosti podobné běžně užívaným petrochemickým plastům, jako je polypropylen, polyethylen nebo polystyren. Vlastnosti polyhydroxyalkanoátů lze regulovat změnou molekulárních struktur, díky tomu může být daný polymer tvrdý a krystalický nebo naopak velmi elastický. Ku příkladu může sloužit PHB, který je sám o sobě křehký a tuhý. Po přidání monomerů jako je například 3-hydroxyvalerát nebo 3-hydroxyhexanoát dochází ke zlepšení materiálových vlastností. Dle požadavků na vlastnosti pro různé aplikace lze PHA různě míchat nejen mezi sebou, ale i s jinými polymery, enzymy nebo i anorganickými materiály. V závislosti na složení výsledného kopolymery mohou PHA vykazovat diametrálně odlišné materiálové vlastnosti [28, 29, 30, 34, 35].

Polyhydroxyalkanoáty mají vysoký stupeň polymerizace (až 30 000 monomerů), což potvrzují vysoké molekulové hmotnosti, které tyto polymery obvykle mají. V závislosti na použitém mikrobiálním druhu a různých kultivačních podmínkách, jako je pH, typ a koncentrace uhlíku či způsob kultivace, se molekulová hmotnost těchto látek pohybuje od $2 \cdot 10^5$ až $3 \cdot 10^5$ Da [36].

PHA jsou rozpustné v chloroformu a dalších chlorovaných rozpouštědlech jako je například 1,2-methylenchlorid. Jejich teplota skelného přechodu se pohybuje od -50 do 4 °C, teplota tání od 40 do 180 °C. Teplota termodegradace, pevnosti v tahu a Youngův modul pružnosti v tahu (poměr napětí a jím vyvolané deformace) se mění v závislosti na typu a složení daného polyhydroxyalkanoátu [30].

2.5.3.2 Extrakce PHA z bakteriálních buněk

Získání biopolymeru je složité a nákladné vzhledem k tomu, že PHA je uloženo v živých buňkách. Existují různé metody pro extrakci a následné zpracování PHA, každá z těchto metod je spojena s určitými výhodami i nevýhodami. Díky své jednoduchosti se nejčastěji využívá metoda extrakcí rozpouštědly. Tato metoda zahrnuje mechanické roztržení buněk biomasy pro snadnou

přístupnost k PHA granulím, ty se rozpouští ve vhodném organickém rozpouštědle a následně se vysrážejí, nejčastěji v ethanolu.

Flotační metoda je modifikací již zmíněné extrakce rozpouštědly, při které se používá rozpouštědlo, nejčastěji chloroform, využívá i jako prostředí pro samotnou flotaci buněčného odpadu.

Metoda enzymatické degradace je alternativou k extrakci rozpouštědlem. Tento proces zahrnuje trávicí mechanismus samotného mikroorganismu pro uvolňování PHA.

Extrakce superkritickou tekutinou je nejnovější proces pro získání polyhydroxyalkanoátů. Tato metoda je účinným extrakčním procesem pro produkci PHA bez obsahu nečistot, které jsou vhodné pro medicínské aplikace.

Z výše uvedených metod je nejšetrnější metoda principiálně opačná k těm předchozím, kdy bylo rozpouštěno PHA. Tentokrát dochází k rozpuštění ostatních částí buněk a k zachování PHA ve fázi pevné. Nejčastěji se k rozpuštění používají chlornany, anionické tenzidy. Dále v této metodě nachází využití enzymy, které vykazují selektivitu vůči buněčným složkám, jež mají být rozpuštěny [30, 37].

2.5.3.3 Využití PHA

S ohledem na specifické a různorodé vlastnosti, nacházejí tyto polymery širokou škálu využití v různých oblastech jako jsou obalové, biomedicínské a zemědělské aplikace. Na přelomu tisíciletí byly tyto materiály využívány pro výrobu lahví určených pro kosmetické přípravky nebo jako suroviny pro výrobu latexových barev. V zemědělství jsou PHA využívány jako nosiče pro dlouhodobé uvolňování herbicidů či insekticidů [31, 38].

2.5.3.4 Medicínské aplikace

Rozmanitost struktur, které vykazují různé vlastnosti, podmiňuje široké využití těchto materiálů v medicínských aplikacích. Využití nacházejí v nápravách kardiovaskulárních systémů, v oblasti řízeného a cílového uvolňování léčiv, hojení a šití ran, v ortopedii nebo v tkáňovém inženýrství. PHA s krátkým řetězcem vykazují vlastnosti jako je tvrdost a křehkost. Tyto vlastnosti mohou nalézt využití v oblasti inženýrství tvrdých tkání. SCL-PHA oproti tomu vykazují daleko vyšší elasticitu, která je žádána při tkáňovém inženýrství měkkých tkání, hojení ran nebo při řízeném podávání léčiv [39].

V tkáňovém inženýrství nachází uplatnění zejména P3HB, P3HB-3HV, P4HB, P3HO-3HH, které mohou být využity jako kostní destičky, osteosyntetické materiály nebo chirurgické stehy. Své uplatnění mohou nalézt i při pomalém uvolňování léků a hormonů. Použití samotného P3HB je však omezeno jeho vysokou křehkostí a nízkou mírou biodegradace v živých tkáních [29, 40].

PHA je možno také různě modifikovat. V případě začlenění hydroxyapatitu vzniká bioaktivní a zároveň biologicky rozložitelný materiál, který je možno využít při regeneraci tvrdých tkání. Kombinací hydroxyapatitu s P3HB nebo P3HB-3HV jsou získány kompozity, které mají podobnou mechanickou pevnost jako lidské kosti a lze je použít jako lešení pro regeneraci tkání (tzv. skafoldy) [29, 38].

Bylo prokázáno, že směs P3HO a P3HB v poměru 25:75 může sloužit jako základní materiál vhodný pro regeneraci nervů. Směs těchto polymerů odpovídala mechanickým vlastnostem

periferních nervů a zároveň v porovnání s jinými poměrovými kombinacemi podporovala buněčný růst [29, 38].

2.6 BIODEGRADACE BIOPOLYESTERŮ

Biologicky rozložitelné biopolyestery se v dnešní době jeví jako jedny z nejvhodnějších materiálů v otázce environmentální problematiky. Nejdůležitějším mechanismem degradace je hydrolýza, která štěpí esterové vazby mezi jednotlivými mery (monomerními jednotkami polymeru) [21].

Typy polymerů se liší rychlostí biodegradace. Biodegradace PHA je mnohem pomalejší ve srovnání s degradací PLA za stejných podmínek. V oblasti medicíny jsou tedy PHA vhodnější pro aplikace vyžadující pomalejší *in vivo* degradaci [41].

Důležitou roli při rychlosti biodegradace hraje povrchová morfologie sledovaného vzorku. Vzorky, které měly před zahájením degradace porézní povrch, degradovaly rychleji než vzorky, jejichž povrch byl při zahájení experimentu hladký [42].

Nejdůležitějším aspektem, který určuje rychlost biodegradace, je prostředí, ve kterém se daný polymer nachází. Všechny provedené studie se shodují v myšlence, že za vyšších teplot probíhá biodegradace rychleji. Také přítomnost mikroorganismů a jejich enzymatická aktivita způsobuje rychlejší průběh biodegradace. Vzorek polymeru bude degradovat rychleji v přítomnosti mnoha enzymů a neustále se měnícího prostředí než stejný vzorek v mořské vodě, ve které není tak vysoká mikrobiální rozličnost. Mořská voda není pro biopolyestery příliš vhodné prostředí pro degradaci především díky své nižší teplotě, v níž biodegradace probíhá daleko pomaleji. Na základě studie, která stanovila průměrnou míru degradace PHA v mořském prostředí, bylo odhadnuto, že PHA láhev by v moři kompletně zdegradovala během tří let. Hodnota pH také hraje svou roli. V prostředí bez přítomnosti mikroorganismů degradiují vzorky rychleji při nižším pH, v tomto případě dochází ke kyselé hydrolýze. Pokud jsou ale v prostředí přítomny mikroorganismy, které by mohly vyvolat rychlejší enzymatickou hydrolýzu, je nutné zvolit pH v oblastech, kde je daný enzym aktivní [43, 44].

Polyhydroxyalkanoáty mohou být biodegradovány jak v aerobním, tak i v anaerobním prostředí a zároveň nedochází ke vzniku žádných toxických produktů. Za aerobních podmínek by výsledkem biologického rozkladu měla být voda, oxid uhličitý a biomasa, zatímco za anaerobních podmínek vzniká navíc ještě methan. V biologickém systému jsou PHA degradovány pomocí mikrobiálních depolymeráz. Proces rozkladu probíhá na povrchu PHA, kde bakterie či houby vylučují specifický enzym, extracelulární depolymerasu, která rozkládá makromolekulu na monomery. Produkty degradace jsou pak absorbovány a následně metabolizovány. Dále mohou být polyhydroxyalkanoáty degradovány enzymatickou i neenzymatickou hydrolýzou v tkáních. Tato schopnost jim předurčuje možné využití v již zmiňovaných medicínských aplikacích [29, 30, 31, 43].

2.6.1 Biodegradace v životním prostředí

V životním prostředí dochází k intracelulární či extracelulární degradaci pomocí mikroorganismů. Obecný mechanismus biodegradace v životním prostředí byl již popsán v kapitole 2.3.2.

Po nastínění mechanismu intracelulární degradace byl vybrán P3HB, který je depolymerázou v buňce rozštěpen za vzniku kyseliny 3-hydroxybutyrové. Dehydrogenázou je kyselina následně oxidována na acetylacetát, který je pomocí β -ketothiolasy rozložen na acetyl-CoA. Ten při aerobních podmínkách vstupuje do citrátového cyklu, kde je oxidován na oxid uhličitý.

Přímo v životním prostředí mohou být polyhydroxyalkanoáty degradovány extracelulárními depolymerázami, které začnou štěpit polymer na povrchu mimo samotnou buňku. Již kratší řetězce polymeru, oligomery, jsou absorbovány přes buněčnou membránu dovnitř organismu, kde jsou dále zpracovány a využity ve prospěch mikroorganismu [29].

2.6.2 Biodegradace v živých systémech

Struktura polyhydroxyalkanoátu určuje schopnost a rychlost biodegradace. V závislosti na provedených studiích, se vědecká komunita domnívá, že biodegradace v živých systémech je vícestupňová. Zpočátku dochází k náhodnému štěpení, po určité době dochází k narušení polymerních řetězců a dochází ke vzniku monomerů a dimerů. Tutu fázi je možno sledovat pomocí analýzy molekulové hmotnosti, která se snižuje. Až v dalším kroku dochází k váhovému úbytku až k úplnému rozkladu původního polymeru [29].

V medicínských aplikacích by v ideálním případě měl být čas rozkladu polymeru shodný s délkou regenerace cílené tkáně. Degradace PHA v živých systémech je testována nejčastěji *in vitro* v modelových systémech, které simulují prostředí v organismu [29].

2.7 BIODEGRADACE A MEDICÍNA

Tradičně se v medicíně pro implantáty, náhrady, šití apod. využívají materiály jako jsou kovy, keramika nebo syntetické polymery. Použití těchto materiálů však není bez rizika. V organismu po implantaci cizího materiálu může docházet k imunologickému odmítnutí a tvorbě zánětů. Při fixaci tkání je po regeneraci nutno ránu opět otevřít a cizí nápravný materiál z organismu vyjmout. Z těchto důvodů jsou biopolyestery jako PLA nebo PHA v dnešní době velkým tématem. Díky svým specifickým vlastnostem jsou tyto biopolymery slibnými materiály v medicínských aplikacích. Jsou totiž biokompatibilní a necytotoxické, což vylučuje například negativní imunitní odezvy v organismu. Především jsou tyto materiály biodegradabilní a po určité době se rozloží na látky, které jsou organismu vlastní, a které dovede svými metabolickými dráhami zpracovat. Díky tomu odpadá nutnost tyto materiály z organismu cíleně opět vyjmout. V tabulce 1 je uveden přehled studií, které se zabývaly degradací biopolyesterů, především PLA, PHA a PBAT, pro medicínské aplikace [6, 45].

Tabulka 1: Výstupy provedených studií biodegradace

název	prostředí degradace	ztráta hmotnosti	ref.
PLA	PBS (pH 7), 37 °C	25 %, 180 dní	[21]
PLA	KBM (pH 7,4), 37 °C	1,15 %, 30 dní	[46]
Mg/PLA	KBM (pH 7,4), 37 °C	1,45 %, 30 dní	[46]
PLA	roztok lipázy, 37 °C	48 %, 9 dní	[47]
PLA amorfní	<i>in vivo</i> (-)	100 %, 3 měsíce	[48]
P3HB	PBS (pH 7,4), 37 °C	0 %, 180 dní	[21]
P3HB	<i>in vivo</i> (srdeční chlopeč ovce)	100 %, 2 roky	[48]
P3HB-4HV	PBS (pH 7,4), 37 °C	1,5 %, 95 dní	[21]
P3HB-3HV	PBS + lipáza (pH 7,4), 37 °C	5 %, 240 dní	[40]
P3HB-3HV	<i>in vivo</i> (implantace do hřbetu králíků)	85 %, 180 dní	[40]
PHB-HV	syntetická žaludeční šťáva + pepsin (pH 0,8), 37 °C	hmotností úbytek nebyl stanoven, 30 dní	[49]
PHB-HB	Hankův pufr (pH 7,4), 37 °C	-, 30 dní	[49]
PHB-HB	NCS	-, 30 dní	[49]
P3HB-3HHx	lipáza, 37 °C	5,1 %, 30 dní	[50]
P3HB-3HHx (12% HHx)	PBS + lipáza (pH 7,4), 37 °C	7 %, 50 dní	[42]
P3HB-3HHx (12% HHx)	SBF (pH 7,4), 37 °C	2 %, 15 týdnů	[51]
P3HB-3HHx (5% HHx)	PBS + lipáza (pH 7,4), 37 °C	3 %, 50 dní	[42]
P3HB-3HHx (20% HHx)	PBS + lipáza (pH 7,4), 37 °C	3 %, 50 dní	[42]
P4HB	<i>in vivo</i> (-)	100 %, 6–18 měsíců	[21]
P3HO	acetátový pufr (pH 6,8), 37 °C	3,3 %, 31 dní	[21]
PBAT	PBS (pH 7,4), 25 °C	50 %, 300 dní	[21]

PBS – fosfátový pufr, KBM – Kirklandovo biokorozní médium, NCS – Newborn calf serum, SBM – simulovaná tělní tekutina.

PLA byla jedním z prvních biopolymerů, která se začala využívat v medicíně jako biologicky vstřebatelný materiál. Samotná, s ničím nemodifikovaná PLA nemá zrovna ideální mechanické vlastnosti a při degradaci může docházet k uvolňování produktů, které způsobují zánětlivé nebo alergické odezvy v organismu. Tyto nedostatky se v posledních letech řeší různou modifikací, nejčastěji přidáváním částic hořčíku. Studie dokazují, že přidáním Mg do PLA, dochází k účinné neutralizaci kyselého prostředí, které vzniká při degradaci samotné PLA. Mimo jiné tato modifikace zlepšuje mechanické vlastnosti polymeru a podporuje obnovu tkání [46, 52].

Nedávné studie však zjistily výbornou biologickou kompatibilitu u biodegradabilních PHA. Tyto polyestery degradují o něco pomaleji než zmíněné PLA, nicméně je lze snadněji

modifikovat za účelem vylepšení požadovaných vlastností či upravení rychlosti biodegradace. Méně kyselý charakter vedlejších produktů při degradaci ve srovnání s PLA, z nich navíc činí zajímavé kandidáty pro aplikace tkáňového inženýrství. Z provedených studií nebyly prokázány žádné zánětlivé odezvy v organismu [21, 53].

3 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce byla příprava filmů biopolyesterů, u kterých byla následně sledována míra biodegradace v syntetické žaludeční šťávě a ve fosfátovém pufru s lipázou.

V rámci této bakalářské práce byly plněny následující cíle:

1. Literární rešerše zaměřená na dané téma.
2. Příprava filmů biopolyesterů rozpouštěním v chlorovaných rozpouštědlech.
3. *In vitro* biodegradace připravených filmů v syntetické žaludeční šťávě. Porovnání účinků syntetické žaludeční šťávy s fosfátovým pufrem s přídavkem enzymu.
4. Sledování biodegradace filmů gravimetricky, FTIR a změnami molekulové hmotnosti.
5. Vyhodnocení výsledků, jejich diskuze a závěr práce.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE

Spektrofotometr Nicolet iS50 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

DSC Q 2000 (T.A. Instruments, USA)

SEC, Infinity 1260 (Agilent Technologies, USA); MALLS, Dawn Heleos II (Wyatt Technology, USA); dRI, Optilab T-rEX (Wyatt Technology, USA)

4.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

Biopolyestery (seznam je uveden v následující tabulce 2)

Dihydrogenfosforečnan draselný, Lach-ner, Česká republika

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrátu p.a., Lach-ner, Česká republika

Chlorid draselný p.a., Lach-ner, Česká republika

Chlorid sodný p.a., Lach-ner, Česká republika

Chloroform čistý stabilizovaný amylenem p.a., Lach-ner, Česká republika

Kyselina chlorovodíková 35% p.a., Lach-ner, Česká republika

Lipáza, Merck KGaA, Německo

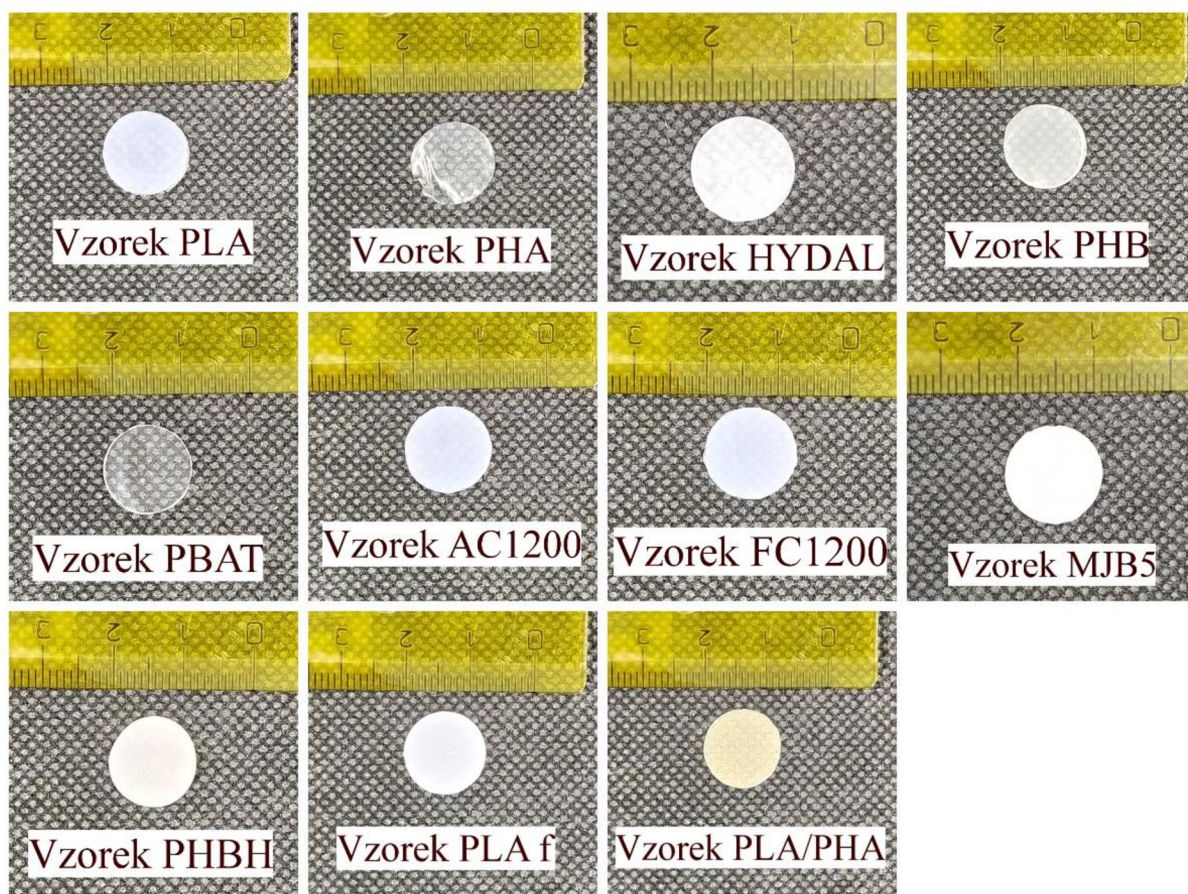
Pepsin, Merck KGaA, Německo

4.3 PŘÍPRAVA FILMŮ BIOPOLYESTERŮ

Pro experiment byly prvně připraveny filmy jednotlivých testovaných biopolyesterů. Samotný biopolyester byl rozpuštěn jako 2 hm. % v 50 ml chloroformu za intenzivního míchání po dobu 2 hodin při teplotě 60 °C. Následně byl roztok nalit na Petriho misku. Miska byla ponechána v digestoři a bylo umožněno odpařování chloroformu při laboratorní teplotě 21 °C a vlhkosti 18 %. Odpařování rozpouštědla vedlo k tvorbě tenkých filmů. Vysušené filmy byly uchovávány v exsikátoru.

Byly připraveny folie těchto biopolyesterů: komerční poly(hydroxyalkanoát) (PHA, Mirel Metabolix, USA) amorfni, polykyselina mléčná 2003D (PLA, NatureWorks, USA), poly(3-hydroxybutyrát) – HYDAL (PHB, Nafigate, ČR), poly(3-hydroxybutyrát) (TU Graz, AT), poly(butylen adipát-co-tereftalát) (PBAT, BASF, Germany), poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) (Ústav chemie potravin a biotechnologií, FCH VUT v Brně), polyhydroxybutyrát polyhydroxyhexanoát kopolymer (PHBH, Kanaeka, Japan), filament PLA (Prusa Research, ČR), filament směsi PLA/PHA (Prusa Research, ČR).

Kompletní seznam všech využitých biopolyesterů je uveden v tabulce 2. Z každého připraveného filmu byly testovány tři vyseknuté vzorky o průměru 10,25 mm, které byly degradovány odděleně. Vzorky použitých biopolyesterů jsou vyobrazeny na obrázku 8.



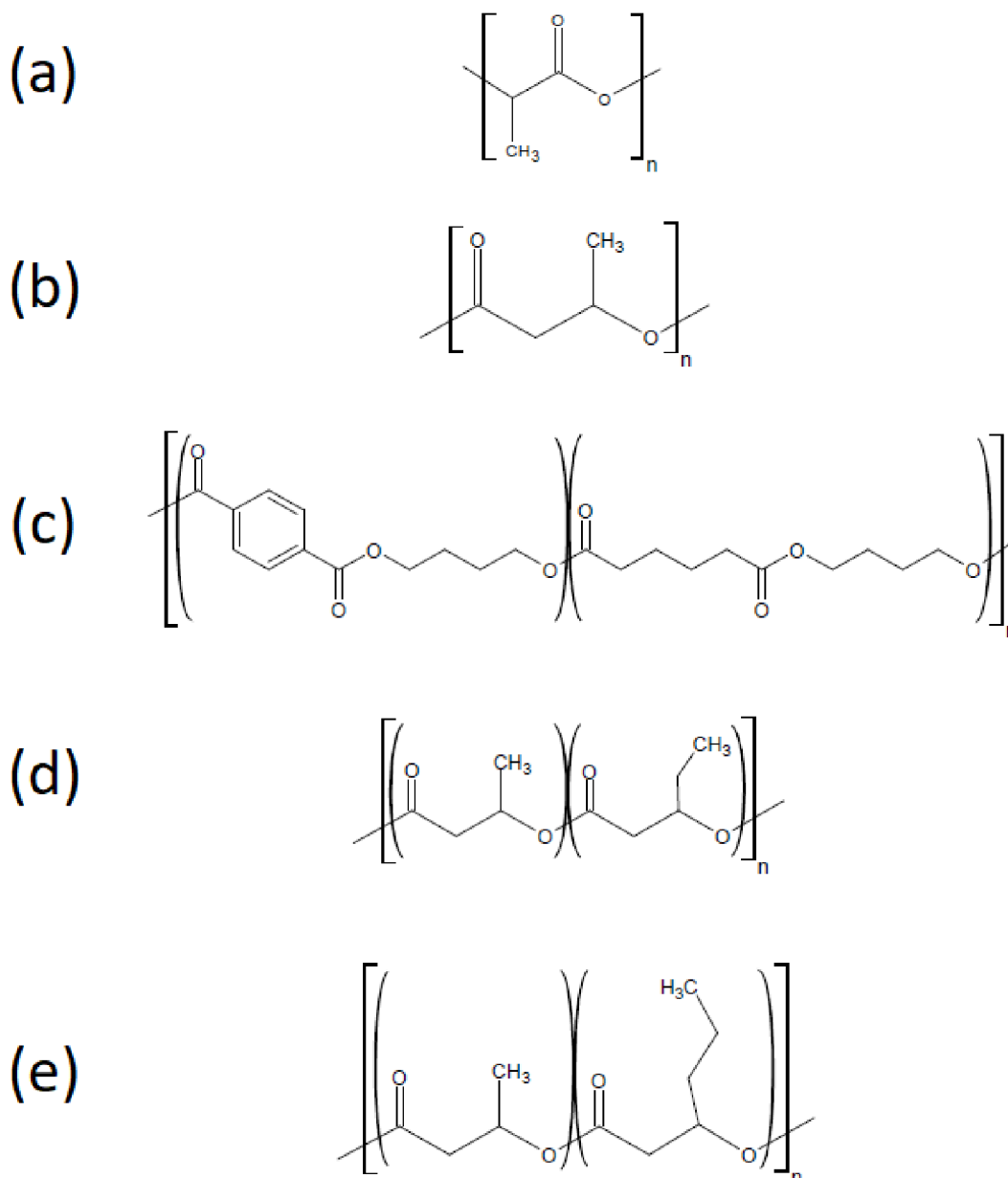
Obrázek 8: Vzorky použité pro samotný experiment

4.4 IN VITRO BIODEGRADACE

In vitro biodegradace biopolyesterových filmů probíhala kyselou hydrolýzou v prostředí syntetické žaludeční šťávy a hydrolýzou enzymatickou ve fyziologickém roztoku pufrovaném fosfáty s lipázou. Experiment byl proveden s 11 vzorky, které jsou uvedeny v tabulce 2. Struktury použitých biopolymerů jsou zobrazeny na obrázku 9.

Tabulka 2: Přehled využitých biopolyesterů v experimentu

číslo	biopolyester	používaná zkratka	tloušťka filmu [mm]
1	polykyselina mléčná 2003D (NatureWorks, USA)	PLA	0,08
2	komerční poly(hydroxyalkanoát) amorfni (Mirel Metabolix, USA)	PHA	0,10
3	poly(3-hydroxybutyrát) – HYDAL (Nafigate, ČR)	HYDAL	0,15
4	poly(3-hydroxybutyrát) (TU Graz, AT)	PHB	0,16
5	poly(butylen adipát-co-tereftalát) (BASF, Germany)	PBAT	0,09
6	poly(butylen adipát-co-tereftalát) (BASF, Germany)	AC1200	0,10
7	poly(butylen adipát-co-tereftalát) (BASF, Germany)	FC1200	0,10
9	poly(-3hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) (Ústav chemie potravin a biotechnologií, FCH VUT v Brně)	MJB5	0,11
10	polyhydroxybutyrát polyhydroxyhexanoát kopolymer (Kanaeka, Japan),	PHBH	0,15
11	polykyselina mléčná – filament (Prusa Research, ČR)	PLA f	0,10
12	polykyselina mléčná/polyhydroxybutyrát filament (Prusa Research, ČR)	PLA/PHB	0,10



Obrázek 9: Struktura biopolyesterů: (a) – PLA, (b) – P3HB, (c) – PBAT, (d) – PHBV, (e) – PHBH

4.4.1 Syntetická žaludeční šťáva

Syntetická žaludeční šťáva (SGJ) byla připravena podle referátu Vraníkové a kol. [59]. Obsahovala 2 g chloridu sodného, 3,2 g práškového pepsinu (pepsin z vepřové žaludeční sliznice, $0,7 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$) a 80 ml 1M kyseliny chlorovodíkové doplněných vodou na 1 000 ml roztoku. Výsledné pH tohoto média bylo 1,2.

4.4.2 Fosfátový pufr s lipázou

Fyziologický roztok pufrovaný fosfáty (PBS) obsahoval 8 g chloridu sodného, 0,2 g chloridu draselného, 0,24 g dihydrogenfosforečnanu draselného, 1,44 g hydrogenfosforečnanu sodného a 100 mg lipázy (lipáza z *Rhizopus arrhizus*, $8,6 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$) na 1 000 ml roztoku [42]. Výsledné pH tohoto média bylo 7,54.

4.4.3 Sledování biodegradace

Vzorek byl umístěn do 20 ml daného roztoku a byl inkubován *in vitro* při teplotě 37 °C. Experiment byl proveden vždy ve třech paralelních vzorcích na jeden připravený materiál. Oba roztoky byly průběžně měněny každé tři týdny. Vzorek byl pravidelně odebírán k provedení analýzy, před níž byl vždy vysušen.

4.4.3.1 Analýza pomocí infračervené spektroskopie

Funkční skupiny přítomny v jednotlivých vzorcích byly analyzovány před zahájením a po ukončení experimentu pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR). Spektra FTIR byla zaznamenána pomocí přístroje Nicolet iS50 (Thermo Fisher Scientific, Inc) s technikou zeslabeného úplného odrazu (ATR) v rozmezí vlnočtů 4 000–400 cm⁻¹ se spektrálním rozlišením 4 cm⁻¹ a s celkovým počtem akumulovaných scanů 128.

Byla proměřena spektra všech jedenácti původních filmů a poté vzorků, které byly vystaveny působení PBS nebo SJG po 81 dnech experimentu.

4.4.3.2 Stanovení úbytku hmotnosti

Byl sledován vliv vybraných simulovaných tělních tekutin (syntetická žaludeční šťáva a fyziologický roztok pufovaný fosfáty s lipázou) na hmotnost testovaných biopolyesterů v čase. Jednotlivé vzorky byly vysušeny a zváženy v čase dle stanoveného harmonogramu.

Experiment trval 81 dní a vzorky byly zváženy 0., 21., 40. a 81. den. Ztráta hmotnosti byla vypočtena dle následující rovnice:

$$\text{hmotnostní ztráta [\%]} = \frac{(m_0 - m_x)}{m_0} \cdot 100,$$

kde m_0 je hmotnost vzorku před degradací (0. den) a m_x značí hmotnost vzorku po odběru (den 21., 40. a 81.).

4.4.3.3 Stanovení molekulové hmotnosti

Hodnoty hmotnostně střední molekulové hmotnosti (M_w), hodnoty číselně střední molekulové hmotnosti (M_n) a hodnoty polydisperzity (\mathcal{D}) jednotlivých vzorků byly stanovovány pomocí metody SEC-MALLS. Měření bylo provedeno za použití SEC-MALLS (GPC-MALLS) systému – dRI s kolonou PL gel mixed-C. Mobilní fáze byla tvořena chloroformem s průtokem 0,3 ml/min. Nástřík vzorku byl 100 ml. Vzorky byly přefiltrovány přes filtr 0,45 μm. Koncentrace vzorku byla 4 mg/1 ml.

Pro analýzu bylo z analyzovaného vzorku odebráno přibližně 8 mg ve stejných intervalech jako probíhalo vážení, tj. 0., 21., 40. a 81. den.

4.4.3.4 Termální vlastnosti vybraných biopolyesterů před a po enzymatické hydrolýze

Tepelné vlastnosti vybraných vzorků biopolyesterů byly stanoveny pomocí diferenční skenovací kalorimetrie (DSC). DSC byla provedena na přístroji DSC Q 2000 (T.A. Instruments, USA) v dusíkové atmosféře. Přibližně 5 mg vzorku bylo hermeticky uzavřeno do hliníkových pánviček. Teplotní rozsahy měření pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Podmínky pro měření tepelných vlastností vybraných biopolyesterů

vzorek	1. krok	2. krok	3. krok	4. krok	5. krok
PLA	zahřívání z 25 na 180 °C / 10 °C·min ⁻¹	udržování 1 min při 180 °C	chlazení z 180 na -60 °C / 10 °C·min ⁻¹	udržování 1 min při -60 °C	zahřívání z -60 na 180 °C / 10 °C·min ⁻¹
HYDAL	zahřívání z 25 na 190 °C / 10 °C·min ⁻¹	udržování 1 min při 190 °C	chlazení z 190 na -60 °C při 10 °C·min ⁻¹	udržování 1 min při -60 °C	zahřívání z -60 na 190 °C / 10 °C·min ⁻¹
AC1200	zahřívání z 25 na 200 °C / 10 °C·min ⁻¹	udržování 1 min při 200 °C	chlazení z 200 na -60 °C při 10 °C·min ⁻¹	udržování 1 min při -60 °C	zahřívání z -60 na 200 °C / 10 °C·min ⁻¹
MJB5	zahřívání z 25 na 190 °C / 10 °C·min ⁻¹	udržování 1 min při 190 °C	chlazení z 190 na -60 °C při 10 °C·min ⁻¹	udržování 1 min při -60 °C	zahřívání z -60 na 190 °C / 10 °C·min ⁻¹
PHBH	zahřívání z 25 na 165 °C / 10 °C·min ⁻¹	udržování 1 min při 165 °C	chlazení z 165 na -20 °C / 10 °C·min ⁻¹	udržování 1 min při -20 °C	zahřívání z -20 na 165 °C / 10 °C·min ⁻¹

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 ANALÝZA POMOCÍ INFRAČERVENÉ SPEKTROSKOPIE

Byla provedena analýza vzorků pomocí FTIR před zahájením a po ukončení biodegradace. Veškerá naměřená infračervená (IČ) spektra příslušných vzorků jsou obsažena v příloze. V následující tabulce 4 jsou uvedeny charakteristické vibrace vybraných skupin pro biopolyestery a jejich přiřazení k jednotlivým absorpčním pásům původních připravených filmů biopolyesterů. Grafická znázornění všech IČ spekter jsou přiložena v příloze. Pro vyhodnocení spekter byl využit text VŠCHT [63]. Většina pásů v IČ spektru polymerů je propojena jak s krystalickou, tak s amorfni oblastí. Pokud dojde ke změně krystalinity, bude docházet také ke změně intenzity a frekvence některých absorpčních pásů [60].

V případě IČ spektra PLA absorpční pás $3\ 413\ \text{cm}^{-1}$ vypovídá o přítomnosti valenční vibrace -OH skupiny. Přítomnost CH_3 a CH_2 skupin prokazují absorpční pásy jejich valenčních vibrací s maximy $2\ 958$ a $2\ 873\ \text{cm}^{-1}$ a pásy deformačních vibrací s maximy $1\ 458$ a $1\ 389\ \text{cm}^{-1}$. Absorpční pás s vlnočtem $1\ 709$ je potvrzením valenční vibrace skupiny -CO-O-, esterovou vazbu dále potvrzuje také valenční vibrace s maximem v $1\ 265\ \text{cm}^{-1}$. Po degradaci v PBS a SJG nedošlo k žádným kvalitativním změnám v IČ spektru PLA.

V IČ spektrum amorfniho PHA je potvrzen pás vibrací $3\ 448\ \text{cm}^{-1}$, který dokazuje přítomnost valenční vibrace polymerní -OH skupiny. Absorpční pásy s maximy $2\ 978$ a $2\ 939\ \text{cm}^{-1}$ jsou důkazem přítomnosti antisymetrické valenční vibrace CH_3 a CH_2 . Tyto funkční skupiny dále potvrzuje přítomnost absorpčních pásů s vlnočtem $1\ 454$ a $1\ 381\ \text{cm}^{-1}$ představující deformační vibrace CH_3 a CH_2 . Esterová vazba je prokázána valenčními vibracemi s maximy $1\ 724$ a $1\ 169\ \text{cm}^{-1}$. Po vystavení amorfniho PHA roztoku SJG nedochází ke kvalitativním změnám v IČ spektru. V IČ spektru amorfniho PHA, které bylo vystaveno působení PBS, dochází k několika změnám. Maximum valenční vibrace pro polymerní -OH skupinu migruje z $3\ 448$ na $3\ 286\ \text{cm}^{-1}$, zároveň dochází k výraznému rozšíření tohoto absorpčního pásu. Nově vznikají absorpční pásy s vlnočtem $1\ 651$, $1\ 547$ a $1\ 539\ \text{cm}^{-1}$. K migraci absorpčního pásu dochází také v oblasti otisku prstu, a to z hodnoty $1\ 300$ na $1\ 277\ \text{cm}^{-1}$.

V původním IČ spektru HYDALu je rozeznatelný absorpční pás v poloze $3\ 437\ \text{cm}^{-1}$, který představuje valenční vibraci polymerní -OH skupiny. Maxima v hodnotách $2\ 978$ a $2\ 939\ \text{cm}^{-1}$ potvrzují přítomnost antisymetrické valenční vibrace CH_3 a CH_2 . Dominantním znakem spektra je velmi intenzivní absorpční pár s maximem $1\ 720\ \text{cm}^{-1}$, který potvrzuje přítomnost skupiny -CO-O-. Po degradaci v PBS a SJG dochází shodně k migraci absorpčního pásu, který je charakteristický pro deformační valenční vibraci CH_2 z $1\ 381\ \text{cm}^{-1}$ na hodnotu $1\ 378\ \text{cm}^{-1}$. Při pohledu na absorpční pásy okolo $1\ 270$ a $1\ 045\ \text{cm}^{-1}$ je patrné, že dochází ke změnám krystalinity po degradaci oproti původnímu vzorku.

IČ spektrum PHB se od IČ spektra HYDALu liší pouze migrací antisymetrické valenční vibrace a deformační vibrace CH_2 na hodnotu $2\ 931$ a $1\ 377\ \text{cm}^{-1}$. Dále také antisymetrická valenční vibrace -CO-O- má své maximum v hodnotě $1\ 273\ \text{cm}^{-1}$. Odlišnost této hodnoty od PHB od HYDALu je dána pravděpodobně jinou krystalinitou vzorku. Po degradaci není patrný vznik ani zánik nových absorpčních pásů.

V IČ spektru PBAT před degradací jsou viditelné tyto informace: přítomnost CH_2 prokazují absorpční pásy antisymetrické valenční vibrace s maximem v 29467 cm^{-1} a deformačních vibrací s maximy v 1454 a 1381 cm^{-1} . Pás s vlnočtem 1747 a 1180 cm^{-1} potvrzuje přítomnost valenční vibrace, která je charakteristická pro skupinu $-\text{CO}-\text{O}-$. Přítomnost benzenového jádra prokazuje valenční vibrace s maximem v hodnotě 1450 cm^{-1} . Absorpční pás poukazující na přítomnost esterové vazby, která je navázána na benzenové jádro, je dán vlnočtem 1265 cm^{-1} . Pás vibrací s vlnočtem 867 cm^{-1} potvrzuje přítomnosti mimorovinné vibrace CH , která je charakteristická pro přítomnost 1,4- substituovaného benzenového jádra. Po degradaci nedochází ke vzniku ani zániku nových absorpčních pásů. Dochází však v migraci některých absorpčních pásů. Shodně, po vystavení PBAT účinku PBS i SJG, migrují pásy charakteristické pro deformační vibraci 1,4- substituovaného benzenového jádra z hodnoty 868 na 872 cm^{-1} , pásy pro antisymetrickou valenční vibraci pro skupinu $-\text{CO}-\text{O}-$ z 1265 na 1261 cm^{-1} , pro deformační vibraci charakterizující skupinu CH_2 z hodnoty 1381 na 1385 cm^{-1} a pro valenční vibraci funkční skupiny $\text{Ar}-\text{CO}-\text{O}-$ z 1747 na 1751 cm^{-1} . Změna nastala také u antisymetrické valenční vibrace CH_2 , kdy došlo k migraci po degradaci v PBS z hodnoty 2947 na 2962 cm^{-1} , v případě vystavení SJG k žádné změně nedochází.

IČ spektra FC1200 a AC1200 jsou charakterizována stejně jako IČ spektrum vzorku PBAT, z tabulky 4 je možno vyčíst hodnoty absorpčních pásů pro charakteristické vibrace funkčních skupin. Po expozici těchto filmů simulovaným tělním tekutinám (SJG a PBS) nedochází ke vzniku ani zániků žádných absorpčních pásů.

IČ spektrum vzorku AC1200 se po vystavení působení PBS a SJG kvalitativně nezměnilo. V případě vzorku FC1200, který byl vytaven působení SJG dochází k migraci deformační vibrace charakterizující skupinu 1,4- substituovaného benzenového jádra z hodnoty 810 na 802 cm^{-1} . K další změně dochází u absorpčního pásu valenční vibrace pro vazbu $\text{Ar}-\text{CO}-\text{O}-$, kdy dochází k migraci hodnoty 1265 na 1254 cm^{-1} . V případě vystavení působení PBS nedochází v IČ spektru FC1200 k žádným kvalitativním změnám.

Při pohledu na IČ spektrum vzorku MJB5 jsou patrné absorpční pásy těchto funkčních skupin: přítomnost CH_3 je prokázána absorpčním pásem antisymetrickou valenční vibrací s maximem 2974 cm^{-1} a deformační vibrací s maximem 1454 cm^{-1} ; funkční skupinu CH_2 potvrzuje absorpční pásy antisymetrické valenční vibrace s vlnočtem 2931 cm^{-1} a deformační vibrace s maximem 1377 cm^{-1} . Absorpční pásy s maximy 1720 a 1261 cm^{-1} potvrzují přítomnost esterové vazby. Během degradace nedochází ke vzniku ani zániku nových absorpčních pásů. Z grafu je však patrné, že dochází ke změnám krystalinity, a to v pásech okolo hodnot 1265 a 1045 cm^{-1} .

Pro vzorek PHBH byla identifikována tato absorpční spektra: antisymetrická valenční vibrace CH_3 u 2978 cm^{-1} , deformační vibrace CH_3 u 1454 cm^{-1} , antisymetrická valenční vibrace CH_2 u 2935 cm^{-1} a deformační vibrace CH_2 u 1381 cm^{-1} , esterová vazba byla potvrzena valenční vibrací 1720 cm^{-1} a antisymetrickou valenční vibrací s maximem 1273 cm^{-1} . V případě vystavení tohoto vzorku působení PBS dochází k migraci absorpčních pásů antisymetrické valenční vibrace CH_3 z hodnoty 2978 na 2973 cm^{-1} , z antisymetrické valenční vibrace $\text{R}-\text{CO}-\text{O}-\text{R}$ z hodnoty 1381 na 1377 cm^{-1} . Po působení SJG dochází k migraci

antisymetrické valenční vibrace CH_2 z hodnoty $2\,935$ na $2\,924\text{ cm}^{-1}$, k další migraci absorpčního pásu dochází u antisymetrické valenční vibrace CH_3 z $2\,978$ na $2\,974\text{ cm}^{-1}$.

Co se týče vzorku filamentu PLA/PHA, v IČ spektru lze vidět tyto informace: $3\,498\text{ cm}^{-1}$ představuje valenční vibraci polymerní $-\text{OH}$, $2\,997\text{ cm}^{-1}$ představuje antisymetrickou valenční vibraci CH_3 , $2\,947\text{ cm}^{-1}$ představuje antisymetrickou valenční vibraci CH_2 , $1\,747\text{ cm}^{-1}$ a $1\,180\text{ cm}^{-1}$ představuje valenční vibraci esterové vazby, $1\,454\text{ cm}^{-1}$ představuje deformační vibraci CH_3 , $1\,381\text{ cm}^{-1}$ představuje deformační vibraci CH_2 . Po vystavení působení PBS a SJG nedochází ke vzniku ani zániku nových absorpčních pásů. V případě valenční vibrace pro esterovou vazbu dochází shodně k migraci absorpčního pásu z hodnoty $1\,747\text{ cm}^{-1}$ na $1\,751\text{ cm}^{-1}$.

IČ spektrum filamentu PLA před degradací je charakterizováno těmito absorpčními pásy: $3\,502\text{ cm}^{-1}$ potvrzuje přítomnost valenční vibrace pro polymerní $-\text{OH}$ skupinu, $2\,997\text{ cm}^{-1}$ představuje antisymetrickou valenční vibraci CH_3 , deformační vibrace pro CH_3 má maximum v $1\,454\text{ cm}^{-1}$, $2\,947\text{ cm}^{-1}$ představuje antisymetrickou valenční vibraci CH_2 , která je dále potvrzena deformační vibrací CH_2 v $1\,381\text{ cm}^{-1}$, $1\,747$ a $1\,180\text{ cm}^{-1}$ představují valenční vibraci esterové skupiny. Po vystavení působení PBS dochází k migraci některých charakteristických absorpčních pásů – antisymetrická valenční vibrace migruje z hodnoty $1\,265$ na $1\,261\text{ cm}^{-1}$ a maximum absorpčního pásu deformační migrace CH_2 migruje z $1\,381$ na $1\,385\text{ cm}^{-1}$. V oblasti otisku prstu, přesněji v oblasti o vlnové délce $1\,038\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ dochází k výrazným změnám IČ spektra. V případě vystavení tohoto filmu působení SJG nedochází ke kvalitativním změnám v IČ spektru.

Tabulka 4: Charakteristické vibrace vybraných skupin a jejich přiřazení u původních filmů před degradací

	$\nu(\text{OH})$	$\nu(\text{CH}_3)$	$\nu(\text{CH}_2)$	$\nu(\text{CH}_2)$	$\nu(\text{C}=\text{O})$	$\delta(\text{CH}_3)$	$\delta(\text{CH}_2)$	$\nu(\text{C}=\text{C})$	$\delta(\text{CH}_2)$	$\nu(\text{COC})$	$\nu(\text{COC})$	$\gamma(\text{CH})$
funkční skupina	-OH, polymerní	-CH ₃	-CH ₂ -	-CH ₂ -	-CO-O-estery	-CH ₃	-CH ₂ -	Ar	-CH ₂ -	Ar-CO-O-	-CO-O-	Ar, subst. 1,4-
vlnočet [cm ⁻¹]	3550–3320	2995–2940	2995–2915	2880–2830	1750–1705	1480–1440	1470–1440	1465–1415	1445–1385	1330–1150	1300–1150	860–800
PLA	3413,39	2958,27	–	2873,42	1708,62	1457,92	–	–	1388,50	–	1265,07	–
PHA	3448,10	2977,85	2938,98	–	1724,05	1454,06	–	–	1380,78	–	1168,65	–
HYDAL	3436,53	2977,55	2935,12	–	1720,19	1454,06	–	–	1380,78	–	1261,22	–
PHB	3436,53	2977,55	2931,27	–	1720,19	1454,06	–	–	1376,93	–	1272,79	–
PBAT	3502,10	–	2946,70	2850,27	1747,19	–	1454,06	1450,21	1380,78	1265,07	1180,22	867,81
AC1200	3413,39	–	2958,27	2869,56	1708,62	–	1457,92	1411,64	1388,50	1265,07	1164,79	809,96
FC1200	3413,39	–	2958,27	2873,42	1708,62	–	1457,92	1411,64	1388,50	1265,07	1164,79	809,96
MJB5	3436,53	2973,70	2931,27	–	1720,19	1454,06	–	–	1376,93	–	1261,22	–
PHBH	3436,53	2977,55	2935,13	–	1720,19	1454,06	–	–	1380,78	–	1272,79	–
PLA f	3502,10	2996,84	2946,70	–	1747,19	1454,06	–	–	1380,78	–	1180,22	–
PLA/PHA	3498,24	2996,84	2946,70	–	1747,19	1454,06	–	–	1380,78	–	1180,22	–

5.2 STANOVENÍ MOLEKULOVÉ HMOTNOSTI

Molekulová hmotnost biopolyesterů byla stanovena pomocí SEC-MALS. V analýze byla stanovena hmotnostně střední molární hmotnost (M_w), početně střední molární hmotnost (M_n) a koeficient polydisperzity (\mathcal{D}), který je podílem hmotnostně a početně střední molární hmotnosti.

Analyzované hodnoty M_w , M_n a \mathcal{D} jsou shrnuty v tabulce 5 a tabulce 6, ze kterých lze jasně vidět, že postupem času dochází ke snižování molární hmotnosti jednotlivých testovaných vzorků. Pokles je způsoben náhodným štěpením polymeru s dlouhým řetězcem na menší fragmenty.

Největší úbytek hmotnostně střední molekulové hmotnosti můžeme vidět u vzorku filamentu PHA/PLA, který byl vystaven působení SJG, kdy došlo ke snížení hmotnostně střední molekulové hmotnosti o 82,5 % oproti původní hodnotě. Nejmenší náchylnost ke snižování molekulové hmotnosti vykazoval vzorek AC1200, který byl vystaven působení PBS, kdy došlo k úbytku hmotnostně střední molekulové hmotnosti o 17,9 % oproti původní hodnotě.

Tabulka 5: Naměřené hodnoty M_n , M_w , a PDI pomocí SEC-MALS I.

	čas [den]	PBS			SGJ		
		M_n [kDa]	M_w [kDa]	\mathcal{D} [-]	M_n [kDa]	M_w [kDa]	\mathcal{D} [-]
PHA amorf.	0	113,35	142,27	1,26	113,35	142,27	1,26
	21	76,07	102,11	1,34	68,12	89,98	1,32
	40	60,54	92,45	1,53	26,72	37,11	1,40
	81	59,44	80,68	1,36	23,82	29,39	1,25
HYDAL	0	320,08	480,10	1,50	320,08	480,10	1,50
	21	279,92	346,79	1,29	263,93	344,34	1,32
	40	271,37	323,05	1,19	218,10	284,92	1,31
	81	244,79	270,32	1,19	187,53	232,29	1,24
PHB	0	205,05	291,26	1,42	205,05	291,26	1,42
	21	161,25	250,26	1,56	144,13	226,22	1,58
	40	111,56	184,08	1,71	128,21	193,29	1,51
	81	97,57	124,18	1,51	96,58	119,90	1,54
MJBS	0	486,96	516,75	1,06	486,96	516,75	1,06
	21	403,17	469,97	1,17	383,90	453,18	1,18
	40	331,88	399,29	1,20	292,62	371,20	1,27
	81	278,12	338,64	1,22	279,14	325,49	1,17
PHBH	0	150,49	197,22	1,32	150,49	197,22	1,32
	21	142,81	173,72	1,22	134,20	164,03	1,22
	40	126,54	152,57	1,21	123,03	147,11	1,20
	81	113,18	137,06	1,21	111,10	113,72	1,19

Tabulka 6: Naměřené hodnoty M_n , M_w , a PDI pomocí SEC-MALS II.

	čas [den]	PBS			SJG		
		M_n [kDa]	M_w [kDa]	\bar{D} [-]	M_n [kDa]	M_w [kDa]	\bar{D} [-]
PLA	0	151,73	213,78	1,41	151,73	213,78	1,41
	21	134,73	192,18	1,44	123,62	180,13	1,45
	40	131,82	185,82	1,41	120,07	163,89	1,36
	81	125,61	165,07	1,31	92,36	116,79	1,27
PLA f	0	91,95	111,30	1,21	91,95	111,30	1,21
	21	74,71	89,78	1,21	76,05	94,36	1,25
	40	77,80	83,12	1,07	84,54	87,93	1,04
	81	57,08	63,56	1,12	57,37	66,67	1,16
PLA/PHA filament	0	133,62	155,10	1,16	133,62	155,10	1,16
	21	65,78	72,34	1,10	52,94	62,00	1,17
	40	37,45	44,06	1,18	35,54	41,19	1,16
	81	27,27	32,25	1,19	24,68	27,21	1,10
PBAT	0	52,46	63,78	1,22	52,46	63,78	1,22
	21	39,86	51,59	1,29	39,09	49,64	1,28
	40	38,57	42,24	1,10	33,53	37,03	1,11
	81	32,88	35,72	1,09	29,94	33,28	1,11
AC1200	0	108,07	150,79	1,40	108,07	150,79	1,40
	21	109,22	149,03	1,36	112,97	144,92	1,28
	40	101,01	138,62	1,37	95,91	127,47	1,33
	81	93,86	123,81	1,32	77,24	98,45	1,28
FC1200	0	95,68	129,01	1,35	95,68	129,01	1,35
	21	88,46	116,56	1,32	80,50	101,48	1,26
	40	78,06	107,14	1,37	67,70	88,30	1,30
	81	76,13	97,08	1,28	60,78	75,37	1,24

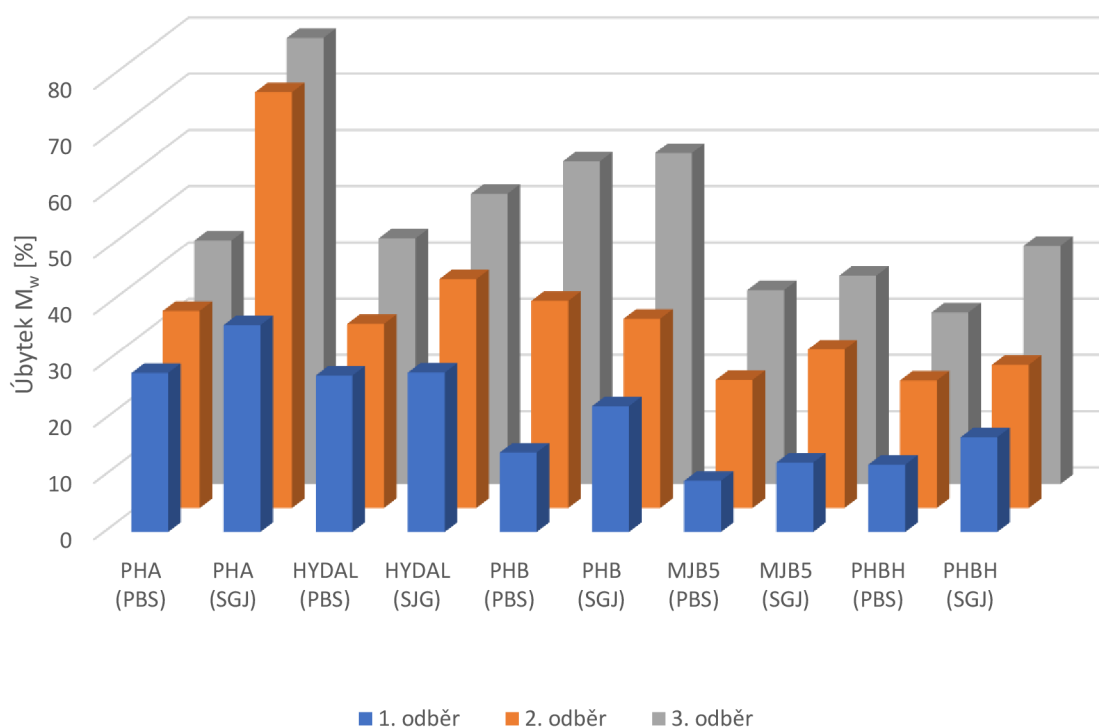
Na následujících obrázcích 10, 11 a 12 lze vidět grafické znázornění procentuálního úbytku M_w u jednotlivých vzorků.

V případě vzorků polyhydroxyalkanoátů (obrázek 10) můžeme vidět, že v nejvyšší míře se snížila molekulová hmotnost u vzorku amorfního PHA v SJG, kdy došlo k úbytku M_w na konci biodegradace až o 79,3 %. Nejméně se snížila molekulová hmotnost u vzorku PHBH, který byl vystaven působení PBS. Došlo ke snížení hmotnostně střední molární hmotnosti o 30,5 % oproti původní hodnotě.

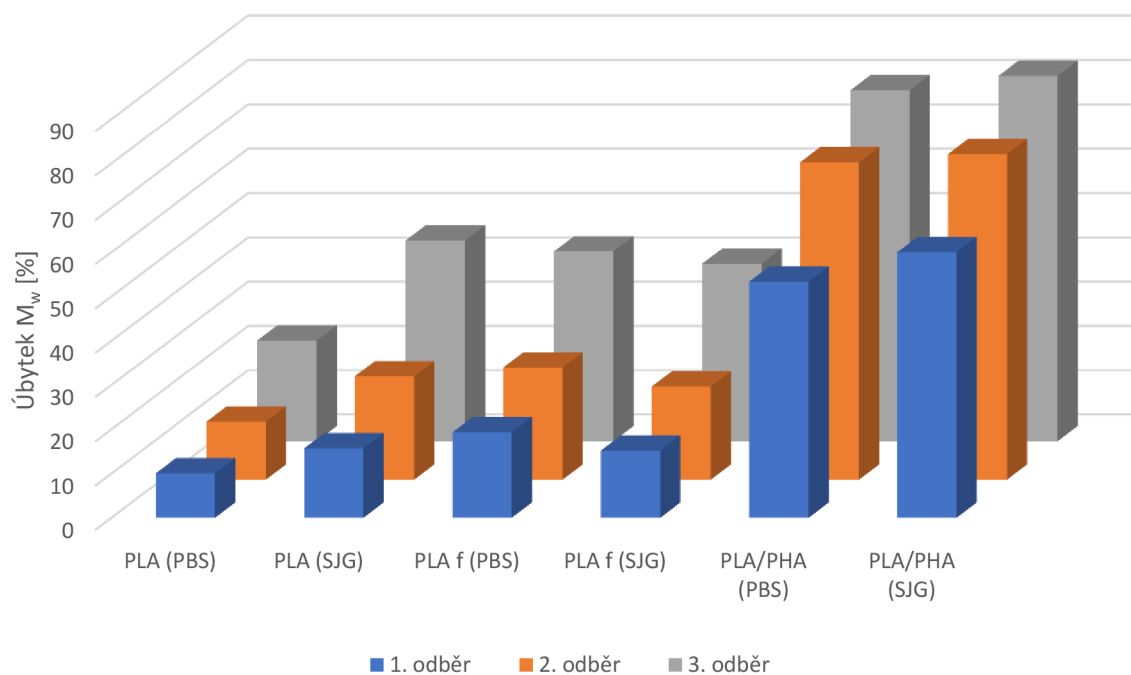
V případě vzorků obsahující polykyselinu mléčnou (obrázek 11) je patrné, že k největšímu úbytku molekulové hmotnosti dochází u filamentu PHA/PLA. Vzorek se štěpí rychleji v roztoku SJG. Opačný trend sledujeme u vzorku filamentu PLA, kdy k většímu úbytku hmotnosti dochází u vzorku, který byl vystaven působení PBS.

Poslední graf na obrázku 12 porovnává 3 vzorky PBAT, a to vzorky PBAT, FC1200 a AC1200. Počáteční hodnoty molekulové hmotnosti se vzájemně liší: PBAT ($M_w = 63,78$) <

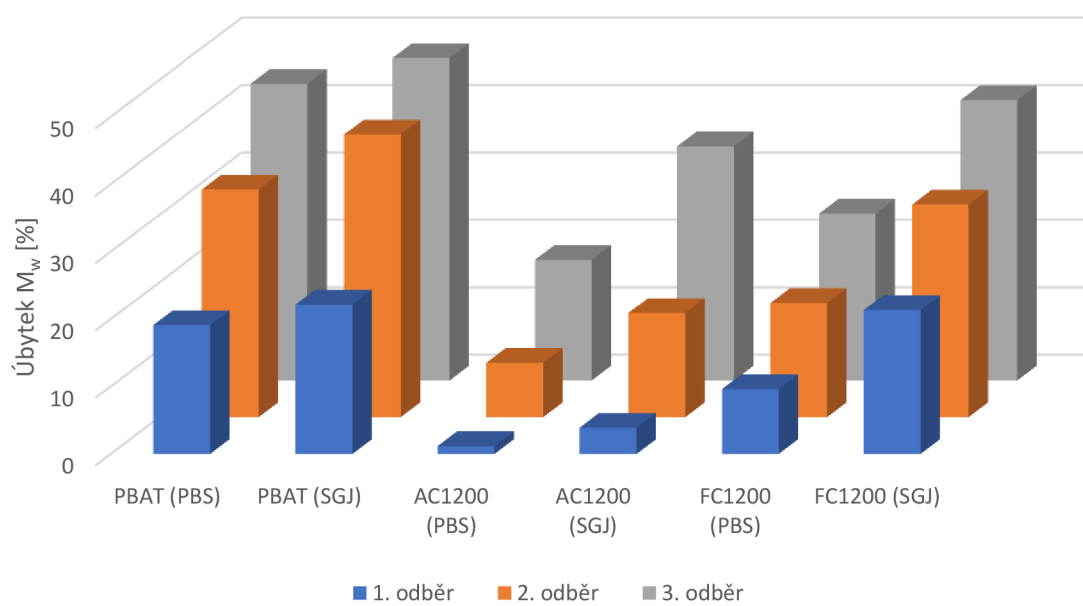
FC1200 ($M_w = 129,01$) < AC1200 ($M_w = 150,79$), lze tedy předpokládat odlišné chování v průběhu degradace. V tomto případě nejvýrazněji poklesla molekulová hmotnost u vzorku PBAT v SJG. Nejméně poklesla molekulová hmotnost u AC1200, kdy došlo ke snížení hmotnostně střední molekulové hmotnosti o 17,9 % oproti původní hodnotě. Rozdílný procentuální úbytek je dán odlišnou počáteční molekulovou hmotností a složením jednotlivých vzorků, které mohly obsahovat jiné množství aditiv, anebo jiné poměry monomerů v struktuře kopolymeru (výrobce je ale neuvádí a v rámci práce jejich složení nebylo stanovováno).



Obrázek 10: Grafické znázornění procentuálního úbytku M_w u vzorků amorfního PHA, HYDALu, PHB, MJB5 a PHBH



Obrázek 11: Grafické znázornění procentuálního úbytku M_w u vzorků PLA, filamentu PLA a filamentu PLA/PHA



Obrázek 12: Grafické znázornění procentuálního úbytku M_w u vzorků PBAT, AC1200 a FC1200

5.3 STANOVENÍ ÚBYTKU HMOTNOSTI

V rámci experimentu byla prováděna hydrolytická degradace filmů připravených z několika druhů biopolyesterů ve dvou různých prostředích. Obrázek 13 a obrázek 14 ukazuje procentuální úbytek hmotnosti jednotlivých filmů. Jak je patrné, hydrolytická degradace biopolyesterů probíhá. Rychlost průběhu však záleží na zvoleném materiálu.

V souladu s literaturou bylo potvrzeno, že rychlost degradace je závislá na krystalinitě vzorků. Polymery, které budou mít větší poměr amorfni fáze než krystalické, budou k degradaci náchylnější [61]. K degradaci dochází prvně v amorfni oblasti za současného úbytku molekulové hmotnosti, který je prezentován v předchozí kapitole 5.2. Pouhým okem lze sledovat, že povrch filmu se během degradace mění a stává se drsnějším. V tuto chvíli dochází k uvolňování malých fragmentů a ke zvyšování drsnosti povrchu, který je přístupnější a samotná degradace probíhá rychleji. Mimo jiné je v průběhu biodegradace pozorovatelná větší křehkost jednotlivých filmů.

Z níže uvedených grafů vyplývá, že biodegradace probíhá rychleji v PBS. Lze tedy říct, že biopolyestery podléhají snáze a rychleji enzymatické hydrolýze než hydrolýze kyselé. V největší míře podlehl degradaci amorfni PHA, kdy v PBS došlo v 81. dni k $(84,28 \pm 0,03)\%$ hmotnostní ztrátě. Vysoký stupeň degradace byl dán vysokým podílem amorfni fáze. Poměrně dobře taky degradoval vzorek PBAT v PBS, po 81 dnech bylo možno sledovat úbytek hmotnosti o $(24,5 \pm 1,1) \%$. Vyšší míra degradace tohoto vzorku, na rozdíl od vzorku AC1200 a FC1200, které byly taktéž tvořeny polybutylenadipát-*co*-tereftalátem, byla způsobena takřka poloviční původní molekulovou hmotností.

Z grafu je patrné, že filament PLA degraduje lépe než PLA (2003D). Do filamentu PLA jsou přidávány anorganické částice za účelem zpevnění materiálu a zvýšení tepelné odolnosti. Tyto anorganické částice pravděpodobně podporují biodegradaci. Pro vylepšení mechanických vlastností PLA dochází často ke kombinaci s jinými materiály. V tomto experimentu byl použit filament PLA/PHA, který vykazoval lepší biodegradabilitu než ostatní dva vzorky PLA. Větší míra biodegradace u vzorků s polykyselinou mléčnou byla prokázána v PBS než v SJG.

Co se týče vzorků polyhydroxy-3-butyrate (HYDAL a PHB) dochází jako u jediných testovaných vzorků k vyššímu rozkladu po vystavení působení SJG. Konečný úbytek hmotnosti v SJG byl shodně o 0,3 % vyšší než hmotnostní úbytek vzorků vystavených působení PBS.

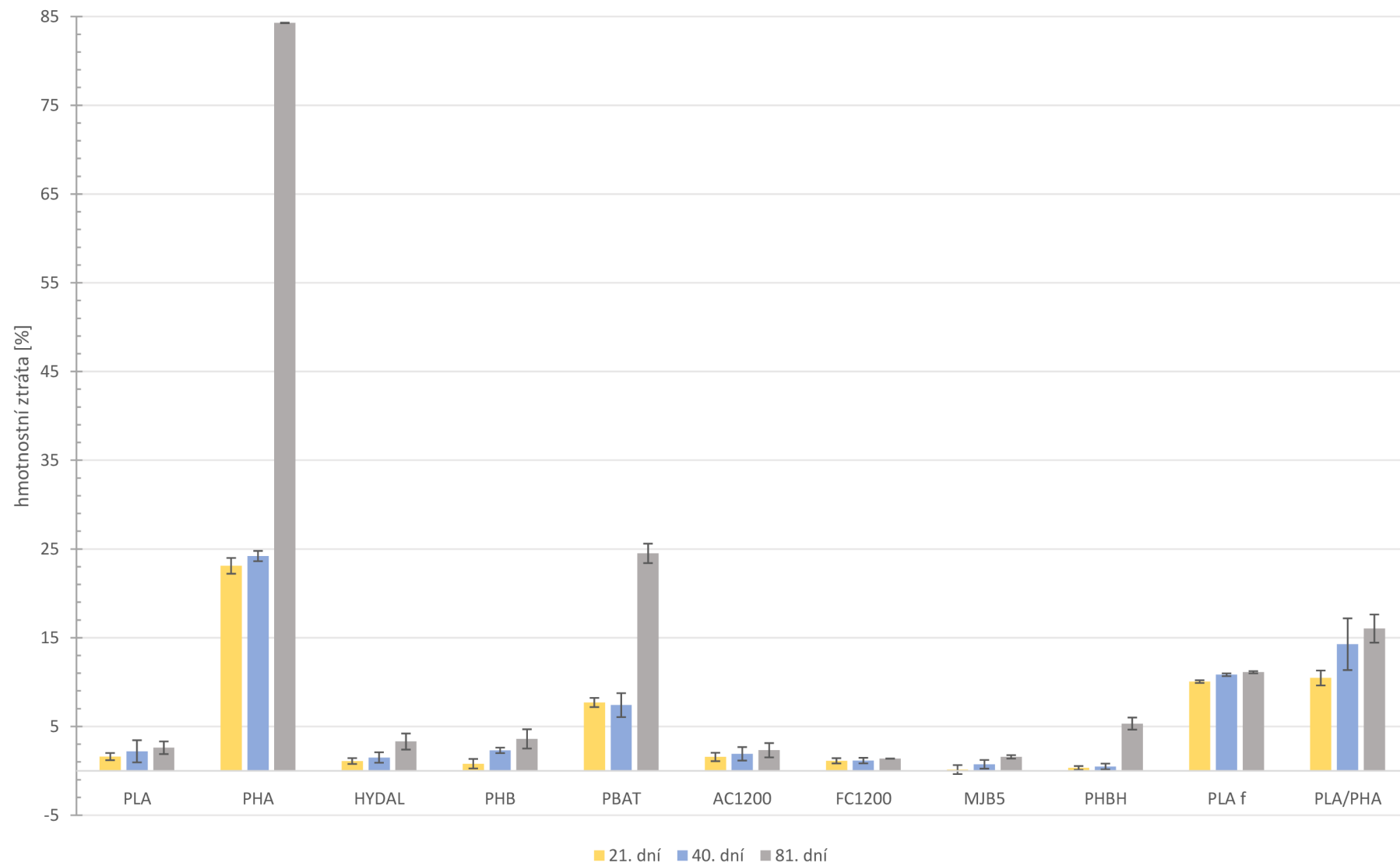
Zapojení hydroxyvalerátu (HV) do struktury polymeru P3HB by mělo snižovat jeho krystalinitu a zlepšovat jeho biologickou rozložitelnost [21]. Naměřené výsledky o této souvislosti nevypovídají. Vzorek MJB5 ve sledovaném časovém rozmezí degradoval pomaleji než vzorky HYDAL a PHB. Pomalejší degradace vzorku MJB5 byla pravděpodobně způsobena vyšší počáteční molekulovou hmotností a vyšším obsahem krystalické fáze.

Ačkoliv film PHBV (vzorek MJB5) nevykazoval při testování *in vitro* příliš vysokou míru degradace, z výzkumu provedeného Han et al. vyplývá, že při testování *in vivo* implantací do dorzálního podkoží králíka, se tyto materiály chovají odlišně a při degradaci dochází k úbytku 84,2 % původní hmotnosti po 180 dnech [40].

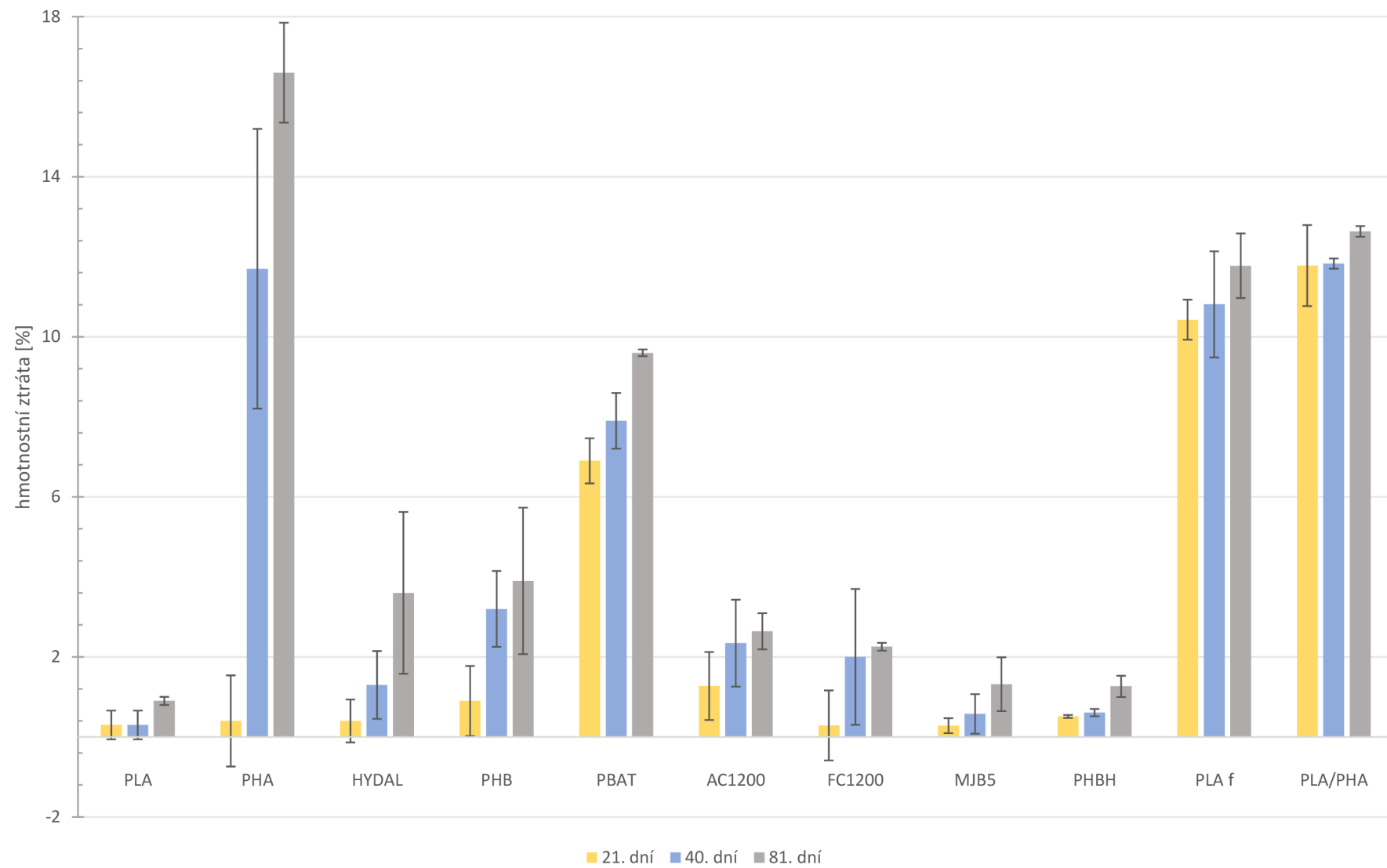
Z výzkumu Wang et al. vyplývá, že degradace PHBH závisí na procentuálním obsahu hydroxyhexanoátu v molekule, na množství krystalické fáze a také na povrchové morfologii

vzorku [42]. Ve srovnání s ostatními vzorky polyhydroxyalkanoátů degradoval PHBH v PBS rychleji než vzorky HYDAL, PHB a MJB5. Důležitou roli při biodegradaci hraje také morfologie, velikost a tloušťka testovaného vzorku. Srovnání se nabízí s experimentem A. Kovalcik a kol. [62], kdy bylo pracováno se shodným výchozím materiálem. Pro experiment nebyl použit film lité v chloroformu, ale strukturovaná matrice vytlačována na 3D tiskárně, která byla výrazně masivnější. Při srovnání rychlosti degradace v SJG po 40 dnech došlo v případě filmů k větší míře ztrátě původní hmotnosti (hmotnost klesla o $0,6 \pm 0,1$ %), u matrice byl pokles hmotnosti nižší ($0,08 \pm 0,03$ %).

Biodegradace PBAT je relativně snadno regulovatelná. Její rychlost totiž závisí na procentuálním obsahu aromatické složky v polymeru. Čím je obsah aromatické složky větší, tím pomaleji tento biopolyester degrduje. PBAT vykazuje dobrou biologickou rozložitelnost, pokud je koncentrace aromatické složky udržována pod 55 mol. % [21]. Odlišná míra biodegradace mezi jednotlivými testovanými vzorky PBAT (PBAT, AC1200 a FC1200) je dána odlišností v počáteční molekulové hmotnosti, procentuálním zastoupením k. tereftalové a rozdílem v krystalinitě jednotlivých vzorků. Nejvyšší molekulovou hmotnost měl vzorek AC1200 a na druhé straně měl nejnižší molekulovou hmotnost vzorek PBAT, která byla takřka o polovinu nižší než u vzorku AC1200. Nejvyšší míru degradace vykazuje dle očekávání podle původní molekulové hmotnosti vzorek PBAT v PBS. Z následujících grafů je patrné, že vzorek PBAT podléhá snadnější biodegradaci v PBS než v SJG. Vzorky AC1200 a FC1200 dosáhly vyšší míry rozkladu v SJG.



Obrázek 13: Hmotnostní úbytek v PBS



Obrázek 14: Hmotnostní úbytek v SGJ

5.4 TERMÁLNÍ VLASTNOSTI VYBRANÝCH BIOPOLYESTERŮ PŘED A PO ENZYMATICKÉ HYDROLÝZE

Vybrané vzorky biopolyesterů (PLA, HYDAL, AC1200, MJB5 a PHBH) byly podrobeny analýze pomocí diferenční skenovací kalorimetrie (DSC). Byla stanovena teplota tání (T_m), entalpie tání (ΔH_m), teplota krystalizace (T_c) a entalpie krystalizace (ΔH_c). Teplota skelného přechodu (T_g) nebyla stanovována, jelikož použitý DSC přístroj nebyl dostatečně citlivý na její stanovení u polymerů s takto vysokým stupněm krystalinity. Testovány byly vzorky připravených filmů před samotnou degradací a zároveň byla sledována změna vzorků po ukončení experimentu v roztoku PBS. Získaná data jsou uvedena v tabulce 7.

Výsledky DSC poukazují, že množství krystalické fáze má vliv na průběh a rychlost degradace polymerů. Předpokládá se, že biopolyester s vyšším obsahem krystalické fáze bude degradovat pomaleji než biopolyester s vyšším obsahem amorfni fáze, což bylo výsledkem měření i potvrzeno.

U vzorku PLA nejdřív dochází k odbourání amorfni části. Teplota tání ani stupeň krystalizace se po degradaci nezměnil. Po degradaci ale dochází ke změně kinetiky krystalizace, kdy ke krystalizaci dochází během chladicího cyklu dříve u vzorků po biodegradaci. V 2. ohřívacím cyklu vzniká u vzorku po degradaci dvojitý pík tání, který poukazuje na dva typy krystalů ve struktuře, a stupeň krystalizace se snižuje na o 56,6 %.

Oba vzorky HYDAL i MJB5 měly v 1. ohřívacím cyklu dvojitý pík teploty tání. Dvojitý pík tání ukazuje na dva druhy krystalů, které jsou přítomny v matici polymeru. Změny entalpie tání ukazují na změny v stupni krystalinity daného polymeru. Hodnota entalpie tání u vzorku MJB5 klesla v PBS o 5,3 % na rozdíl od HYDALu, který v PBS nevykazoval žádné změny.

U vzorku AC1200 dochází ke snížení krystalinity, dále k mírnému posunu T_c do vyšších teplot v chladicím cykle naznačuje, že polymer rychleji krystalizuje.

U vzorku PHBH vznikl dvojitý pík v 1. i v 2. ohřívacím cyklu. Hodnota entalpie tání se podstatně zvýšila přibližně dvojnásobně, čímž poukazuje na nárůst krystalinity vzorku. V chladicím cyklu dochází ke krystalizaci daleko dříve, již při 95 °C oproti původních 64 °C a ve větším rozsahu (ΔH_c stoupla oproti původní hodnotě trojnásobně). Je tedy jasné, že se změnila kinetika krystalizace.

Je nutno podotknout, že DSC je pouze doplňková metoda při posuzování biodegradace, která nám indukuje změny v semikrystalickém charakteru polymerů vzhledem na proces biodegradace nebo degradace.

Celkově je možno konstatovat, že u většiny polymerů docházelo po biodegradaci v PBS s lipázou ke změně kinetiky krystalizace, která závisela na jejich původní hodnotě stupně krystalinity a také na hodnotě molekulové hmotnosti.

Tabulka 7: Naměřená data z analýzy DSC

název	označení	1. ohřívací cyklus			chladicí cyklus		2. ohřívací cyklus		
		T_{m1} [°C]	T_{m2} [°C]	ΔH_{m1} [J·g ⁻¹]	T_c [°C]	ΔH_c [J·g ⁻¹]	T_{m3} [°C]	T_{m2} [°C]	ΔH_{m2} [J·g ⁻¹]
PLA	C.1.0	127,4	–	17	64,4	17,1	–	123,3	17,5
po degradaci	C.1.A	127,6	–	15,4	82,5	17,5	85,0	127,8	7,6
HYDAL	C.3.0	157,6	173,6	79,2	104,6	74,7	168,5	–	77,8
po degradaci	C.3.A	159,1	174,0	79,4	98,7	71,8	168,2	–	79,3
AC1200	C.6.0	126,3	–	13,9	64,3	19,0	124,7	–	19,2
po degradaci	C.6.A	127,8	–	8,9	67,3	20,4	126,1	–	29,4
MJB5	C.9.0	160,6	173,8	83,2	85,0	61,7	167,6	–	76,7
po degradaci	C.9.A	163,0	175,7	78,8	94,1	59,5	170,5	–	73,3
PHBH	C.10.0	127,7	–	19,0	64,9	16,8	123,7	–	15,0
po degradaci	C.10.A	131,7	142,1	40,2	95,0	51,7	132,2	143,7	42,2

6 ZÁVĚR

Biologicky rozložitelné biopolyestery se v dnešní době jeví jako jedny z nejvhodnějších materiálů nejen v otázce enviromentální problematiky. Díky své biokompatibilitě a dalším specifickým vlastnostem se tyto materiály jeví jako velmi slibné materiály v biomedicínských aplikacích.

Tato bakalářská práce je zaměřena na biodegradaci biopolyesterů v simulovaných tělních tekutinách. Pro samotný experiment bylo vybráno jedenáct biopolyesterů, které byly ve formě tenkých filmů vystaveny působení syntetické žaludeční šťávy a fyziologickému roztoku pufrovaném fosfáty s lipázou. Míra biodegradace byla stanovena na základě změn molekulové hmotnosti a na základě hmotnostního úbytku. Dále byla provedena FTIR analýza a u vybraných vzorků byla provedena analýza pomocí DSC.

Pomocí FTIR byla změřena spektra testovaných biopolyesterů před a po biodegradaci. Souhrnně lze říct, že během degradace nedochází k výrazným kvantitativním změnám spekter jednotlivých biopolyesterů.

Pomocí SEC-MALLS bylo potvrzeno snižování molekulové hmotnosti během biodegradace v modelových tekutinách. Docházelo převážně ke štěpení řetězců vlivem hydrolýzy (degradace v SGJ) a vlivem enzymatické hydrolýzy (degradace v PBS s lipázou). U všech vzorků docházelo k výraznému snižování molekulové hmotnosti. Největší procentuální úbytek byl zaznamenán u vzorku filamentu směsi PLA a PHA v SJG po 81 dnech, kdy došlo k 82,5% úbytku hmotnostně střední molární hmotnosti oproti původní hodnotě. Obecně k většímu úbytku molekulové hmotnosti docházelo u vzorků, které byly vystaveny působení SJG.

Stěžejní výsledky této práce jsou uvedeny v kapitole 5.3, která ukazuje, že v průběhu času dochází k úbytku hmotnosti všech vzorků. Je nutné zdůraznit, že při degradaci hraje důležitou roli nejen krystalinita, původní molekulová hmotnost, ale také povrchová morfologie a tloušťka filmů.

Z uvedených výsledků je patrné, že biodegradace *in vitro* u testovaných polyesterů opravdu probíhá a lze je tedy předpokládat jejich využití při široké škále aplikací, kde je jejich rozklad žádoucí. Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.7, měla by rychlost biodegradace v ideálním případě probíhat stejně rychle jako regenerace cílené tkáně. Z provedených experimentů je patrné, že biodegradace biopolyesterů je závislá na mnoha proměnných faktorech a je tedy možné rychlost biodegradace určitými způsoby korigovat a měnit.

Dle dostupných informací, *in vivo* degradace probíhá rychleji než *in vitro* [21, 40, 48]. Lze tedy u těchto testovaných materiálů předpokládat širokou škálu využití v biomedicínských aplikacích, při kterých je potřebná biodegradace použitého materiálu v čase. Je ale nutný další výzkum pro konkrétní aplikace.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] IWATA, Tadahisa. Biodegradable and Bio-Based Polymers: Future Prospects of Eco-Friendly Plastics. *Angewandte Chemie International Edition*. 2015, **54**(11), 3210-3215. DOI: 10.1002/anie.201410770. ISSN 14337851. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.201410770>
- [2] RHIM, Jong-Whan, Hwan-Man PARK a Chang-Sik HA. Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Progress in Polymer Science*. 2013, **38**(10-11), 1629-1652. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2013.05.008. ISSN 00796700. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S007967001300049X>
- [3] GARCIA, Jeannette M. a Megan L. ROBERTSON. The future of plastics recycling. *Science*. 2017, **358**(6365), 870-872. DOI: 10.1126/science.aaq0324. ISSN 0036-8075. Dostupné také z: <http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aaq0324>
- [4] PARK, Sung-Bin, Eugene LIH, Kwang-Sook PARK, Yoon Ki JOUNG, Dong Keun HAN a Alberto FIGOLI. Biopolymer-based functional composites for medical applications. *Progress in Polymer Science*. 2017, **68**, 77-105. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2016.12.003. ISSN 00796700. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670016301137>
- [5] GALIANO, Francesco, Kelly BRICEÑO, Tiziana MARINO, Antonio MOLINO, Knud Villy CHRISTENSEN a Alberto FIGOLI. Advances in biopolymer-based membrane preparation and applications. *Journal of Membrane Science*. 2018, **564**, 562-586. DOI: 10.1016/j.memsci.2018.07.059. ISSN 03767388. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738818313097>
- [6] REBELO, Rita, Margarida FERNANDES a Raul FANGUEIRO. Biopolymers in Medical Implants: A Brief Review. *Procedia Engineering*. 2017, **200**, 236-243. DOI: 10.1016/j.proeng.2017.07.034. ISSN 18777058. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877705817328679>
- [7] KAWAI, Fusako. Breakdown of plastics and polymers by microorganisms. *Advances in biochemical engineering*. 52. Berlin: Springer-Verlag, 1995, s. 151-194.
- [8] What are bioplastics? *European bioplastics* [online]. [cit. 2019-04-08]. Dostupné z: <https://www.european-bioplastics.org/bioplastics/>
- [9] HONZÍK, Roman: *Plasty se zkrácenou životností a způsoby jejich degradace*. *Biom.cz* [online]. 2004-08-18 [cit. 2019-04-10]. ISSN: 1801-2655. Dostupné z: <https://biom.cz/cz/odborne-clanky/plasty-se-zkracenou-zivotnosti-a-zpusoby-jejich-degradace>.
- [10] HAGEN, Vladislav. *Únava a stárnutí materiálu*. Brno, 1981.
- [11] CHANDRA, R. Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*. **23**(7), 1273-1335. DOI: 10.1016/S0079-6700(97)00039-7. ISSN 00796700. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670097000397>

- [12] ČERVENÁ, Kristýna, Barbora LYČKOVÁ, Lucie KUČEROVÁ, Markéta BOUCHALOVÁ a Taťána BARABÁŠOVÁ. Faktory ovlivňující biodegradaci. *Biologické metody zpracování odpadů* [online]. VŠB – TU Ostrava [cit. 2019-04-26]. Dostupné z: http://hgf10.vsb.cz/546/bmzo/pages/Faktory_ovlivnujici_biodegradaci.html
- [13] EMADIAN, S. Mehdi, Turgut T. ONAY a Burak DEMIREL. Biodegradation of bioplastics in natural environments. *Waste Management*. 2017, **59**, 526-536. DOI: 10.1016/j.wasman.2016.10.006. ISSN 0956053X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956053X1630561X>
- [14] SHAH, Aamer Ali, Fariha HASAN, Abdul HAMEED a Safia AHMED. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*. 2008, **26**(3), 246-265. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.12.005. ISSN 07349750. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975008000141>
- [15] TOSIN, Maurizio, Miriam WEBER, Michela SIOTTO, Christian LOTT a Francesco DEGLI INNOCENTI. Laboratory Test Methods to Determine the Degradation of Plastics in Marine Environmental Conditions. *Frontiers in Microbiology*. 2012, **3**. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00225. ISSN 1664-302X. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00225/abstract>
- [16] SLAVÍKOVÁ, Halka. *Biodegradabilní plasty a jejich využití*. Praha: PCHE – PetroChemEng, 2008, 3150-3157. ISBN 978-80-02-02011-0.
- [17] RUDNIK, Ewa. *Compostable polymer materials*. Boston: Elsevier, c2008. ISBN 0080453716.
- [18] Biochemie – polysacharidy [online]. [cit. 2019-04-12]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1662&typ=html
- [19] HUMPHREYS, Robert. Thermoplastic Starch: A Renewable, Biodegradable Bioplastic. *Polymer Innovation Blog* [online]. [cit. 2019-04-12]. Dostupné z: <https://polymerinnovationblog.com/thermoplastic-starch-a-renewable-biodegradable-bioplastic/>
- [20] DUCHÁČEK, Vratislav. *Polymery: výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2006. ISBN 80-708-0617-6.
- [21] LARRAÑAGA, Aitor, Erlantz LIZUNDIA a Raul FANGUEIRO. A review on the thermomechanical properties and biodegradation behaviour of polyesters: A Brief Review. *European Polymer Journal*. 2019, **121**, 236-243. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2019.109296. ISSN 00143057. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305719311978>
- [22] PAN, Pengju, Yoshio INOUE, Kwang-Sook PARK, Yoon Ki JOUNG, Dong Keun HAN a Alberto FIGOLI. Polymorphism and isomorphism in biodegradable polyesters. *Progress in Polymer Science*. 2009, **34**(7), 605-640. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2009.01.003. ISSN 00796700. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670009000197>

- [23] REDDY, Murali M., Singaravelu VIVEKANANDHAN, Manjusri MISRA, Sujata K. BHATIA a Amar K. MOHANTY. Biobased plastics and bionanocomposites: Current status and future opportunities. *Progress in Polymer Science*. 2013, **38**(10-11), 1653-1689. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2013.05.006. ISSN 00796700. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670013000476>
- [24] BURZIC, Ivana, Claudia PRETSCHUH, Dominik KAINEDER, Gerhard EDER, Jiří SMILEK, Jiří MÁŠILKO a Wöss KATERYNA. Impact modification of PLA using biobased biodegradable PHA biopolymers. *European Polymer Journal*. 2019, **114**, 32-38. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2019.01.060. ISSN 00143057. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305718318688>
- [25] JIAN, Jiao, Zeng XIANGBIN a Huang XIANBO. An overview on synthesis, properties and applications of poly(butylene-adipate-co-terephthalate)–PBAT. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*. 2020, **3**(1), 19-26. DOI: 10.1016/j.aiepr.2020.01.001. ISSN 25425048. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2542504820300014>
- [26] HERNÁNDEZ-LÓPEZ, Mónica, Zormy Nacary CORREA-PACHECO, Silvia BAUTISTA-BAÑOS, Leonor ZAVALA-AVEJAR, José Jesús BENÍTEZ-JIMÉNEZ, Marcos Antonio SABINO-GUTIÉRREZ a Pedro ORTEGA-GUDIÑO. Bio-based composite fibers from pine essential oil and PLA/PBAT polymer blend. Morphological, physicochemical, thermal and mechanical characterization. *Materials Chemistry and Physics*. 2019, **234**(1), 345-353. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2019.01.034. ISSN 02540584. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0254058419300380>
- [27] POLI, Annarita, Paola Di DONATO, Gennaro Roberto ABBAMONDI, Barbara NICOLAUS. Synthesis, Production, and Biotechnological Applications of Exopolysaccharides and Polyhydroxyalkanoates by *Archea*. *Archea*., **2011**. DOI: 10.1155/2011/693253. ISSN 1472-3646. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/archaea/2011/693253/>
- [28] MUHAMMADI, SHABINA, Muhammad AFZAL a Shalqat HAMEED. Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chemistry Letters and Reviews*. 2015, **8**(3-4), 56-77. DOI: 10.1080/17518253.2015.1109715. ISSN 1751-8253. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17518253.2015.1109715>
- [29] PHILIP, S., T. KESHAVARZ a I. ROY. *Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications*. 2007, **82**(3), 233-247. DOI: 10.1002/jctb.1667. ISSN 02682575. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.1667>
- [30] RAZA, Zulfiqar Ali, Sharjeel ABID a Ibrahim M. BANAT. *Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications*. 2018, **126**, 45-56. DOI:

- 10.1016/j.ibiod.2017.10.001. ISSN 09648305. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830517300276>
- [31] ALBUQUERQUE, Priscilla B.S. a Carolina B. MALAFAIA. Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, **107**, 615-625. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.09.026. ISSN 01418130. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017330453>
- [32] TSANG, Yiu Fai, Vanish KUMAR, Pallabi SAMADAR, et al. Production of bioplastic through food waste valorization. *Environment International*. 2019, **127**, 625-644. DOI: 10.1016/j.envint.2019.03.076. ISSN 01604120. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0160412019301357>
- [33] LI, Zibiao, Jing YANG a Xian Jun LOH. Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future. *NPG Asia Materials*. 2016, **8**(4), e265-e265. DOI: 10.1038/am.2016.48. ISSN 1884-4049. Dostupné také z:
<http://www.nature.com/articles/am201648>
- [34] SUDESH, K, H ABE a Y DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. 2000, **25**(10), 1503-1555. DOI: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6. ISSN 00796700. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670000000356>
- [35] CHEN, Guo-Qiang, Qiong WU, Bronwyn LAYCOCK, Steven PRATT, Frederik R. WURM a Guo-Qiang CHEN. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials: A meta-study. *Biomaterials*. 2005, **26**(33), 6565-6578. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.036. ISSN 01429612. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961205003510>
- [36] COSTA, Samantha Serra, Andréa Lobo MIRANDA, Michele Greque DE MORAIS, Jorge Alberto Vieira COSTA a Janice Izabel DRUZIAN. Microalgae as source of polyhydroxyalkanoates (PHAs) — A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019, **131**, 536-547. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.099. ISSN 01418130. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813019311869>
- [37] ZAPLETAL, Martin a Jiří TREJBAL. Izolace polyhydroxyalkanoátů z mikrobiální biomasy. *Chemické listy*. 2016, **110**, 860-867.
- [38] MOŽEJKO-CIESIELSKA, Justyna a Robert KIEWISZ. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research*. 2016, **192**, 271-282. DOI: 10.1016/j.micres.2016.07.010. ISSN 09445013. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S094450131630043X>
- [39] RAI, R., T. KESHAVARZ, J.A. ROETHER, A.R. BOCCACCINI a I. ROY. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. *Materials Science and Engineering: R: Reports*. 2011, **72**(3), 29-47. DOI: 10.1016/j.mser.2010.11.002. ISSN 0927796X. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927796X10001671>

- [40] HAN, Jing, Lin-Ping WU, Xiao-Bin LIU, et al. Biodegradation and biocompatibility of haloarchaea-produced poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymers: Fabrication, characterization, in vitro degradation, and in vitro biocompatibility. *Biomaterials*. 2017, **139**(11), 172-186. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.06.006. ISSN 01429612. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961217303988>
- [41] ZHANG, Junyu, Ekaterina I. SHISHATSKAYA, Tatiana G. VOLOVA, Luiziana Ferreira DA SILVA a Guo-Qiang CHEN. Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications. *Materials Science and Engineering: C*. 2018, **86**, 144-150. DOI: 10.1016/j.msec.2017.12.035. ISSN 09284931. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493117333325>
- [42] WANG, Ya-Wu, Weike MO, Huilan YAO, Qiong WU, Jinchun CHEN a Guo-Qiang CHEN. Biodegradation studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Polymer Degradation and Stability*. 2004, **85**(2), 815-821. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2004.02.010. ISSN 01413910. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391004000825>
- [43] DILKES-HOFFMAN, Leela Sarena, Paul Andrew LANT, Bronwyn LAYCOCK a Steven PRATT. The rate of biodegradation of PHA bioplastics in the marine environment: A meta-study. *Marine Pollution Bulletin*. 2019, **142**, 15-24. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2019.03.020. ISSN 0025326X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025326X19302048>
- [44] HAIDER, Tobias P., Carolin VÖLKER, Johanna KRAMM, Katharina LANDFESTER, Frederik R. WURM a Guo-Qiang CHEN. Plastics of the Future? The Impact of Biodegradable Polymers on the Environment and on Society. *Angewandte Chemie International Edition*. 2019, **58**(1), 50-62. DOI: 10.1002/anie.201805766. ISSN 14337851. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.201805766>
- [45] PATTANASHETTI, Nandini A., Geetha B. HEGGANAVAR a Mahadevappa Y. KARIDURAGANAVAR. Smart Biopolymers and their Biomedical Applications. *Procedia Manufacturing*. 2017, **12**, 263-279. DOI: 10.1016/j.promfg.2017.08.030. ISSN 23519789. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2351978917306194>
- [46] LI, Xuan, Chenglin CHU, Yalin WEI, et al. In vitro degradation kinetics of pure PLA and Mg/PLA composite: Effects of immersion temperature and compression stress. *Acta Biomaterialia*. 2017, **48**, 468-478. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.11.001. ISSN 17427061. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706116305876>
- [47] KUMAR, Sunil, Shikha SINGH, Sudipta SENAPATI, et al. Controlled drug release through regulated biodegradation of poly(lactic acid) using inorganic salts: Effects of immersion temperature and compression stress. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017, **104**, 487-497. DOI:

- 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.033. ISSN 01418130. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017311479>
- [48] MARTIN, David P., Simon F. WILLIAMS, Jian LI, et al. Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial. *Biochemical Engineering Journal*. 2003, **16**(2), 97-105. DOI: 10.1016/S1369-703X(03)00040-8. ISSN 1369703X. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X03000408>
- [49] ATKINS, T.W. a S.J. PEACOCK. In vitro biodegradation of polyhydroxybutyratehydroxyvalerate microcapsules exposed to Hank's buffer, newborn calf serum, pancreatin and synthetic gastric juice. *Journal of Microencapsulation*. Birmingham, 1997, **14**(no), 35-49.
- [50] REBIA, Rina Afiani, Sélène ROZET, Yasushi TAMADA, et al. Biodegradable PHBH/PVA blend nanofibers: Fabrication, characterization, in vitro degradation, and in vitro biocompatibility. *Polymer Degradation and Stability*. 2018, **154**(2), 124-136. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2018.05.018. ISSN 01413910. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014139101830171X>
- [51] SHANGGUAN, Ying-Ying, Ya-Wu WANG, Qiong WU, et al. The mechanical properties and in vitro biodegradation and biocompatibility of UV-treated poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate): Fabrication, characterization, in vitro degradation, and in vitro biocompatibility. *Biomaterials*. 2006, **27**(11), 2349-2357. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.11.024. ISSN 01429612. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961205010525>
- [52] WAN, Peng, Chen YUAN, LiLi TAN, et al. Fabrication and evaluation of bioresorbable PLLA/magnesium and PLLA/magnesium fluoride hybrid composites for orthopedic implants: Effects of immersion temperature and compression stress. *Composites Science and Technology*. 2014, **98**, 36-43. DOI: 10.1016/j.compscitech.2014.04.011. ISSN 02663538. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0266353814001286>
- [53] LIM, Janice, Mingliang YOU, Jian LI, et al. Emerging bone tissue engineering via Polyhydroxyalkanoate (PHA)-based scaffolds: Effects of immersion temperature and compression stress. *Materials Science and Engineering: C*. 2017, **79**, 917-929. DOI: 10.1016/j.msec.2017.05.132. ISSN 09284931. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493117315357>
- [54] KMETTY, Ákos a Katalin LITAUSZKI. Development of Poly (Lactide Acid) Foams with Thermally Expandable Microspheres. *Polymers*. 2020, **12**(2), 463. DOI: 10.3390/polym12020463.
- [55] KUČERA, František, Josef PETRUŠ a Josef JANČÁŘ. The structure-hydrolysis relationship of poly(3-hydroxybutyrate). *Polymer Testing* [online]. 2019, **80** [cit. 2020-04-06]. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2019.106095. ISSN 01429418. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142941819309237>
- [56] BRAUNEGG, G. a M. KOLLER. Production and Use of Polyhydroxyalkanoats. *Plastice* [online]. Graz, Austria: Graz University id

- technology, 2014 [cit. 2020-04-06]. Dostupné z:
http://www.plastice.org/fileadmin/files/FC_Braunegg.pdf
- [57] BASTARRACHEA, Luis, Sumeet DHAWAN, Shyam S. SABLANI, Jae-Hyung MAH, Dong-Hyun KANG, Jinwen ZHANG a Juming TANG. Biodegradable Poly(butylene adipate-co-terephthalate) Films Incorporated with Nisin: Characterization and Effectiveness against *Listeria innocua*. *Journal of Food Science*. 2010, **75**(4), E215-E224. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01591.x. ISSN 00221147. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2010.01591.x>
- [58] YAN, Libo, Bohumil KASAL, Liang HUANG, Jae-Hyung MAH, Dong-Hyun KANG, Jinwen ZHANG a Juming TANG. A review of recent research on the use of cellulosic fibres, their fibre fabric reinforced cementitious, geo-polymer and polymer composites in civil engineering: Characterization and Effectiveness against *Listeria innocua*. *Composites Part B: Engineering*. 2016, **92**(4), 94-132. DOI: 10.1016/j.compositesb.2016.02.002. ISSN 13598368. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359836816001025>
- [59] VRANÍKOVÁ, Barbora, Aleš FRANC, Jan GAJDZIOK a David VETCHÝ. Biorelevantní disoluční media simulující podmínky trávícího traktu. *Chemické listy*. Brno, 2016, (110), 126–132.
- [60] BAYARI, Sevgi a Feride SEVERCAN. FTIR study of biodegradable biopolymers: P(3HB), P(3HB-co-4HB) and P(3HB-co-3HV). *Journal of Molecular Structure*. 2005, **744-747**, 529-534. DOI: 10.1016/j.molstruc.2004.12.029. ISSN 00222860. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022286004010257>
- [61] MARCHESSAULT, R.H., C.J. MONASTERIOS, J.J. JESUDASON, B. RAMSAY, I. SARACOVAN, J. RAMSAY a T. SAITO. Chemical, enzymatic and microbial degradation of bacterial and synthetic poly- β -hydroxyalkanoates. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 1994, **45**(2), 187-196 [cit. 2020-04-06]. DOI: 10.1016/0141-3910(94)90136-8. ISSN 01413910. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0141391094901368>
- [62] KOVALCIK, Adriana, Leire SANGRONIZ, Michal KALINA, Katerina SKOPALOVA, Petr HUMPOLÍČEK, Maria OMASTOVA, Norbert MUNDIGLER a Alejandro J. MÜLLER. Properties of scaffolds prepared by fused deposition modeling of poly(hydroxyalkanoates). *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020, **161**, 364-376. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.022. ISSN 01418130. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813020334590>
- [63] KANIA, Patrik. *Infračervená spektrometrie* [online]. [cit. 2020-07-16]. Dostupné z: <https://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Infra%C4%8Derven%C3%A1+spektrometrie.pdf?redirected>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

DSC – diferenciální skenovací kalorimetrie

FTIR-ATR – infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací s technikou zeslabeného odrazu

IČ – infračervený

KBM – Kirklandovo biokorozní médium

LCL-PHA – polyhydroxyalkanoát s dlouhým řetězcem

MCL-PHA – polyhydroxyalkanoát se středně dlouhým řetězcem

NCS – newborn calf serum

PBAT – poly(butylen adipát-*co*-tereftalát)

PBS – fyziologický roztok pufovaný fosfáty

PHA – polyhydroxyalkanoát

PHBHH – poly(3-hydroxybutyrát-*co*-hydrohexanoát)

PHBHV – poly(3-hydroxybutyrát-*co*-hydroxyvalerát)

PHH – poly(hydroxyhexanoát)

PHO – poly(hydroxyoktanoát)

PHV – poly(hydroxyvalerát)

PLA – kyselina polymléčná

P3HB – poly(3-hydroxyburityát)

P3HH – poly(3-hydroxyhexanoát)

P3HV – poly(3-hydroxyvalerát)

P4HB – poly(4-hydroxybutyrát)

SBM – simulovaná tělní tekutina

SCL-PHA – polyhydroxyalkanoát s krátkým řetězcem

SJG – syntetická žaludeční šťáva

9 SEZNAM PŘÍLOH

Obrázek P1: FTIR spektrum PLA – před degradací a po degradaci v PBS a SJG

Obrázek P2: FTIR spektrum amorfního PHA – před degradací a po degradaci v PBS a SJG

Obrázek P3: FTIR spektrum HYDALu – před degradací a po degradaci v PBS a SJG

Obrázek P4: FTIR spektra PHB – před degradací a po degradaci v PBS a SJG

Obrázek P5: FTIR spektra PBAT – před degradací a po degradaci v PBS a SJG

Obrázek P6: FTIR spektra AC1200 – před degradací a po degradaci v PBS a SJG

Obrázek P7: FTIR spektra FC1200 před degradací a po degradaci v PBS a SJG

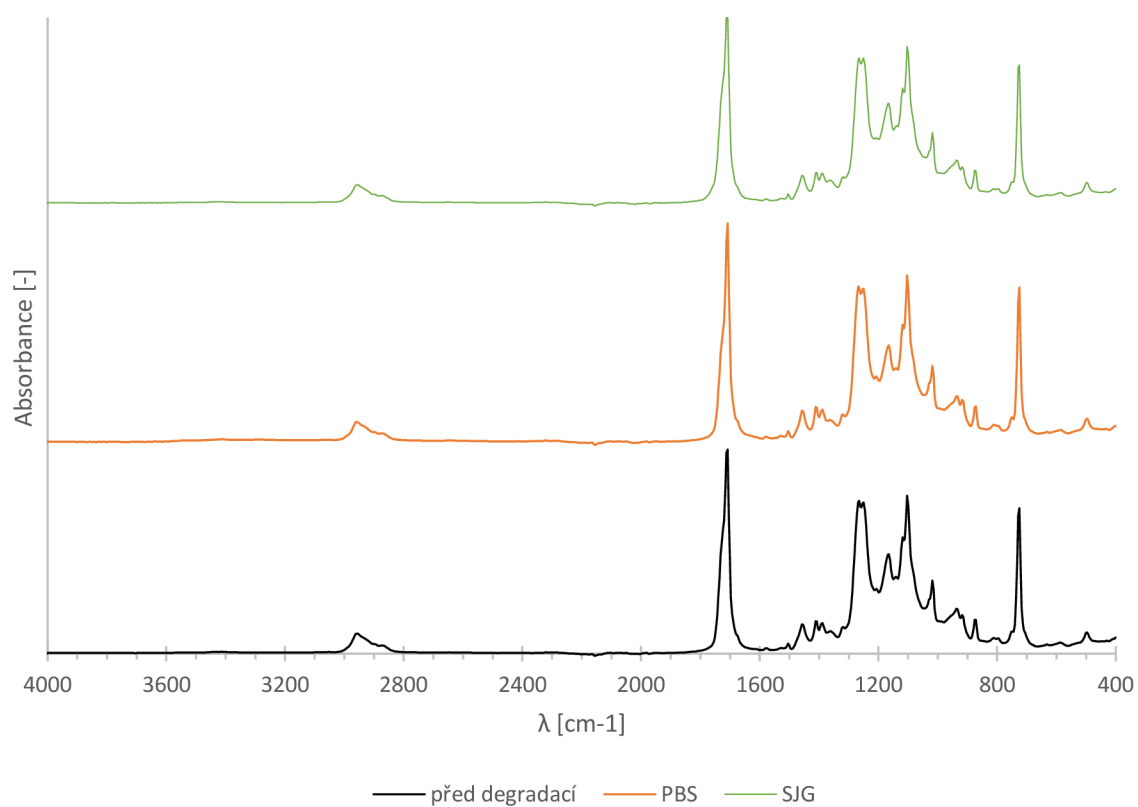
Obrázek P8: FTIR spektra MJB5 – před degradací a po degradaci v PBS a SJG

Obrázek P9: FTIR spektra PHBH – před degradací a po degradaci v PBS a SJG

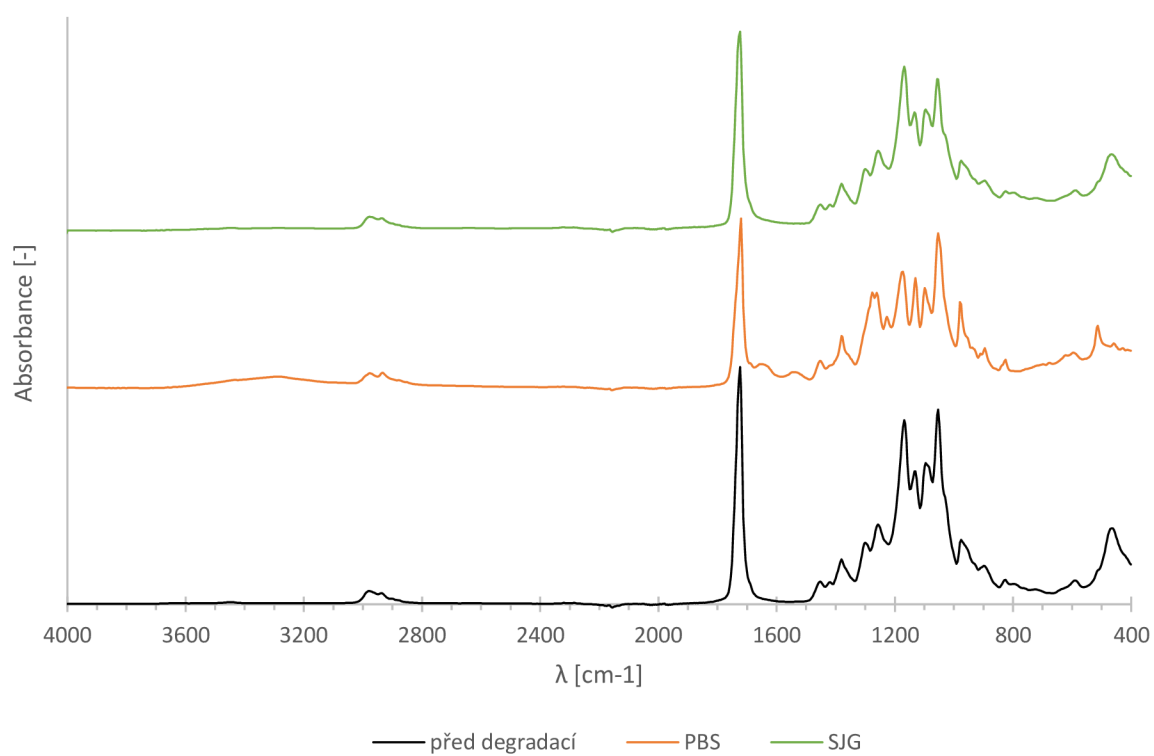
Obrázek P10: FTIR spektra filamentu PLA – před degradací a po degradaci v PBS a SJG

Obrázek P11: FTIR spektra filamentu PLA/PHA – před degradací a po degradaci v PBS a SJG

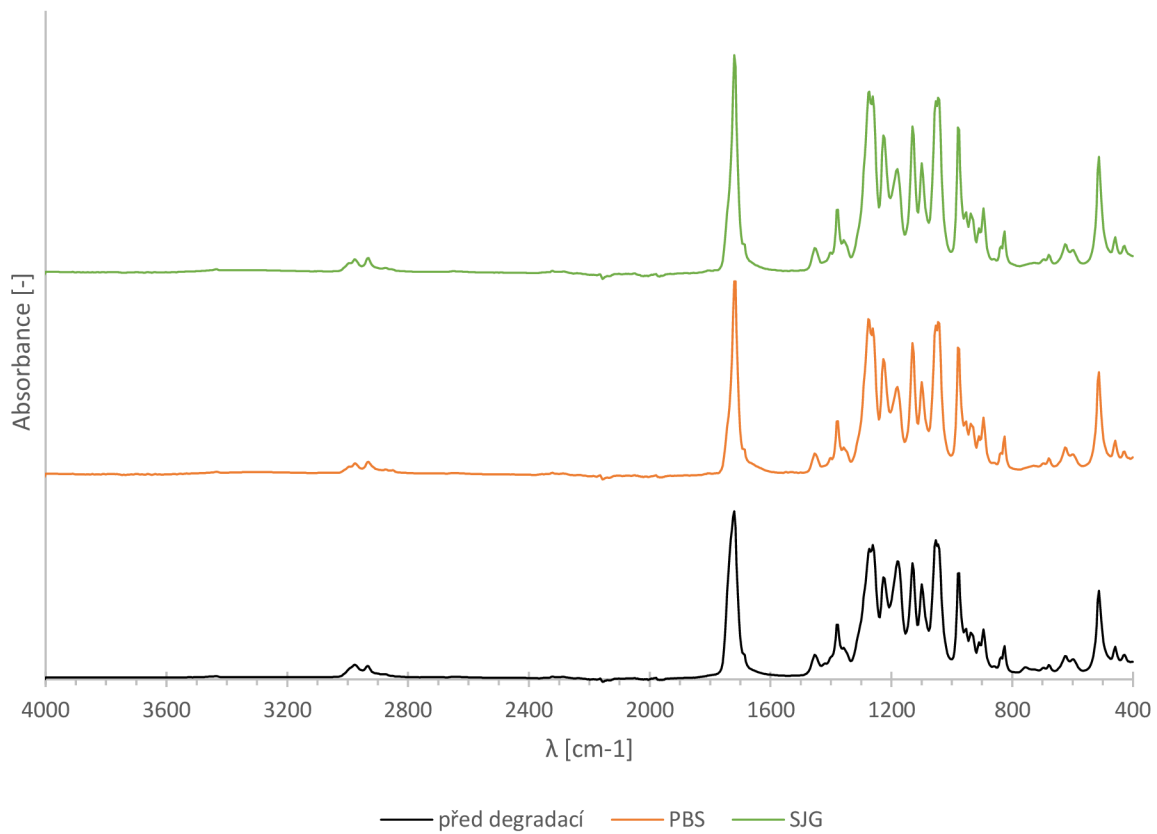
10 PŘÍLOHY



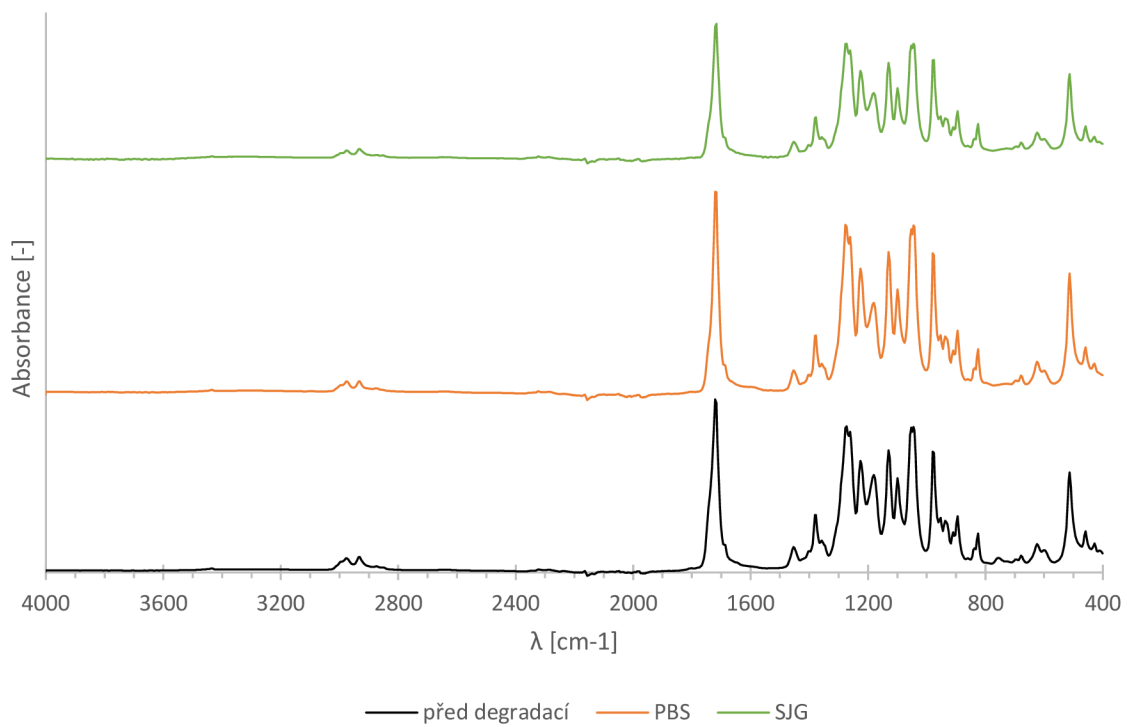
Obrázek P1: FTIR spektrum PLA – před degradací a po degradaci v PBS a SJG



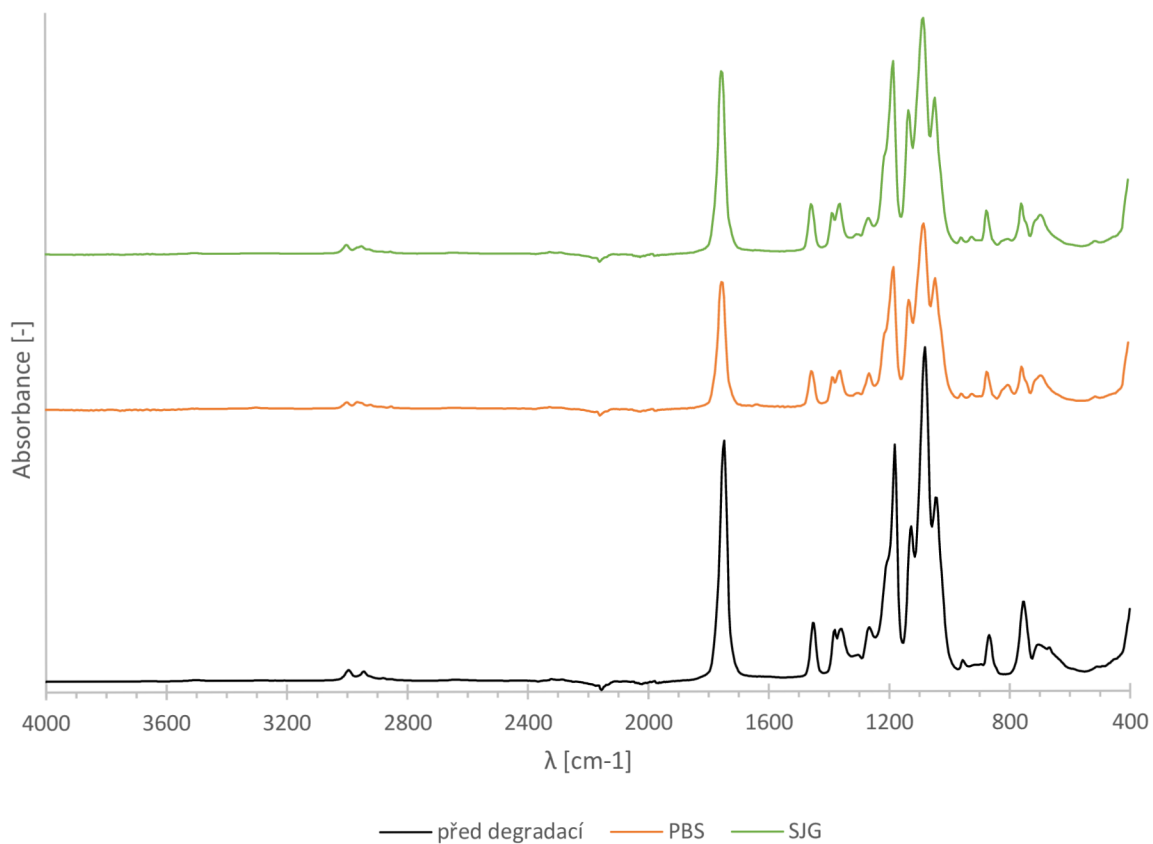
Obrázek P2: FTIR spektrum amorfního PHA – před degradací a po degradaci v PBS a SJG



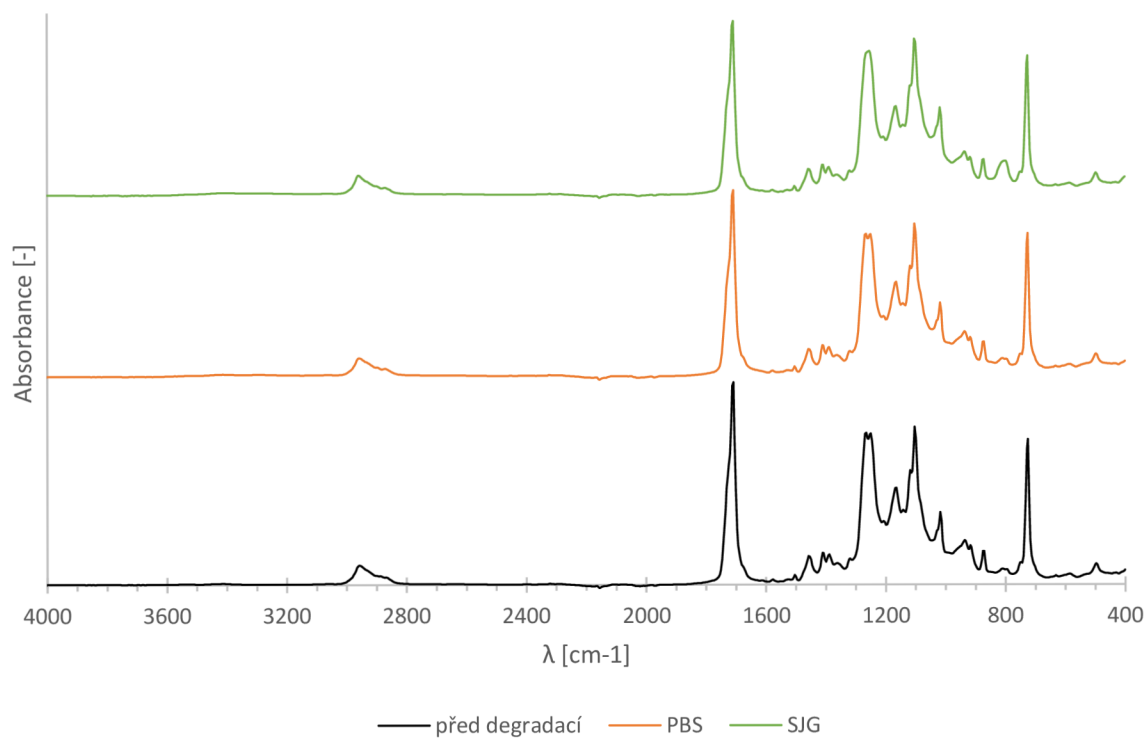
Obrázek P3: FTIR spektrum HYDALu – před degradací a po degradaci v PBS a SJG



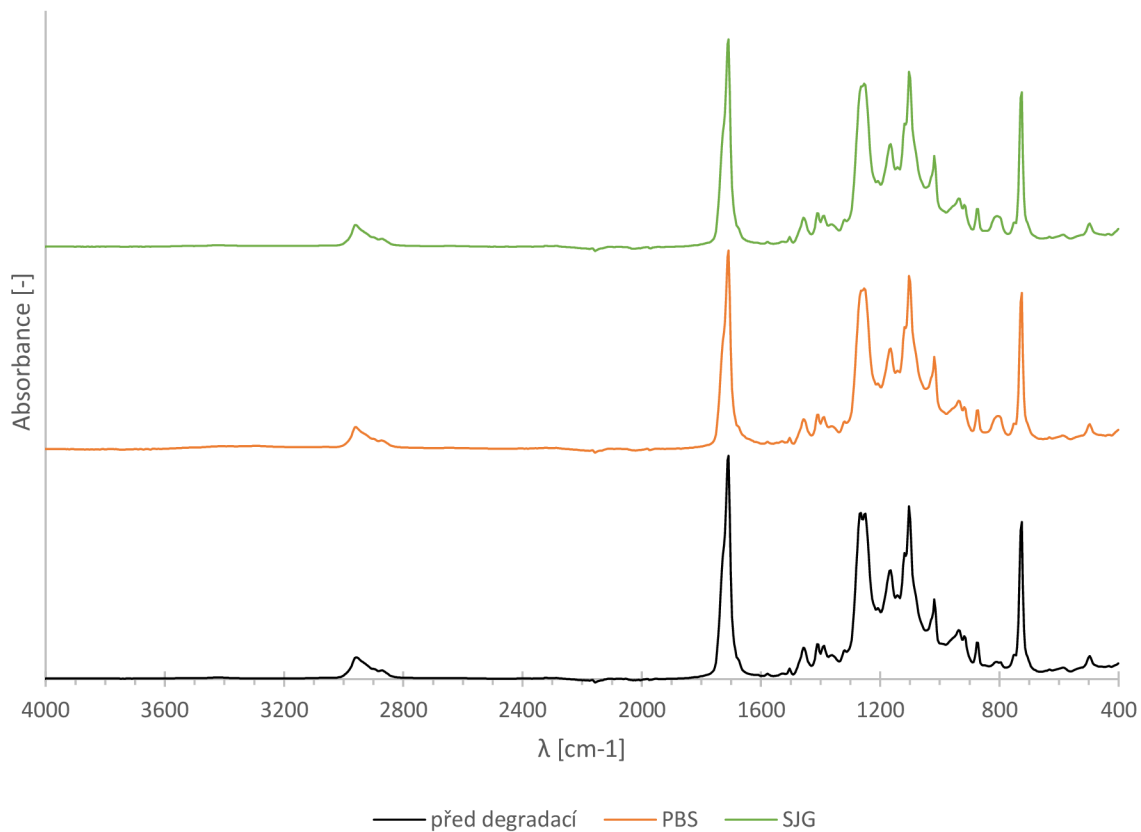
Obrázek P4: FTIR spektra PHB – před degradací a po degradaci v PBS a SJG



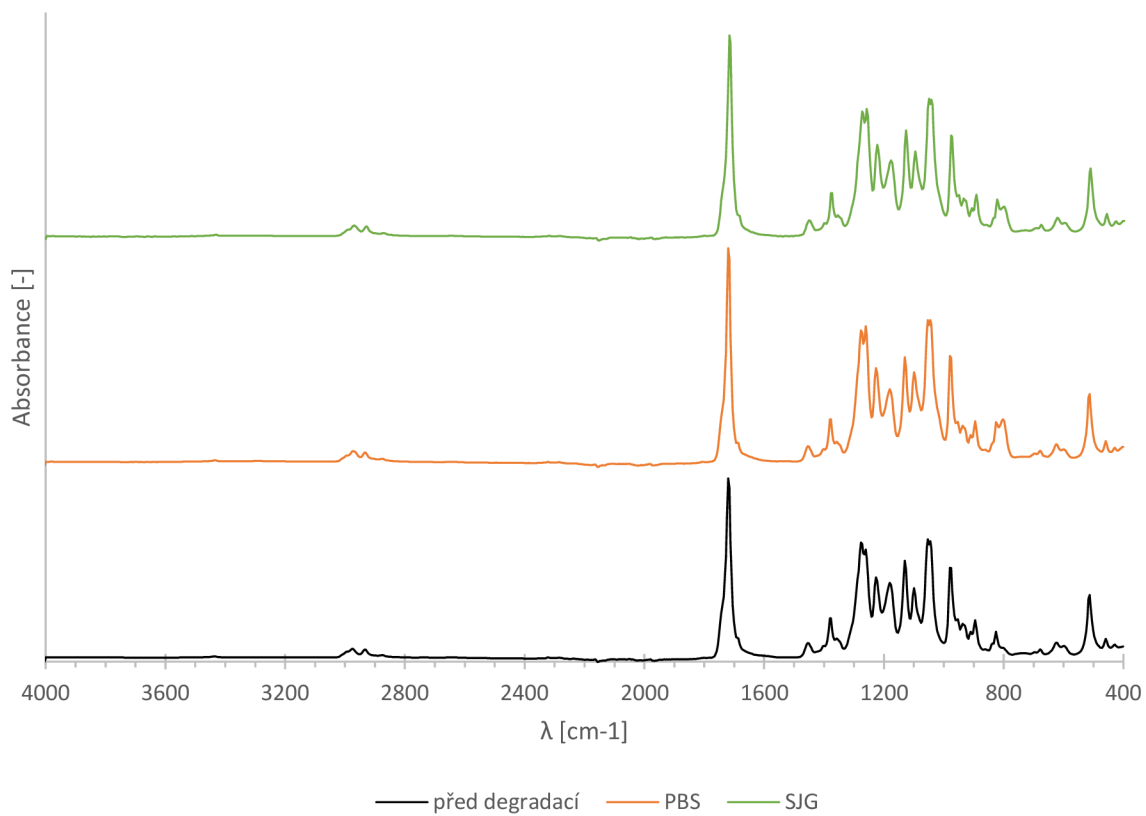
Obrázek P5: FTIR spektra PBAT – před degradací a po degradaci v PBS a SJG



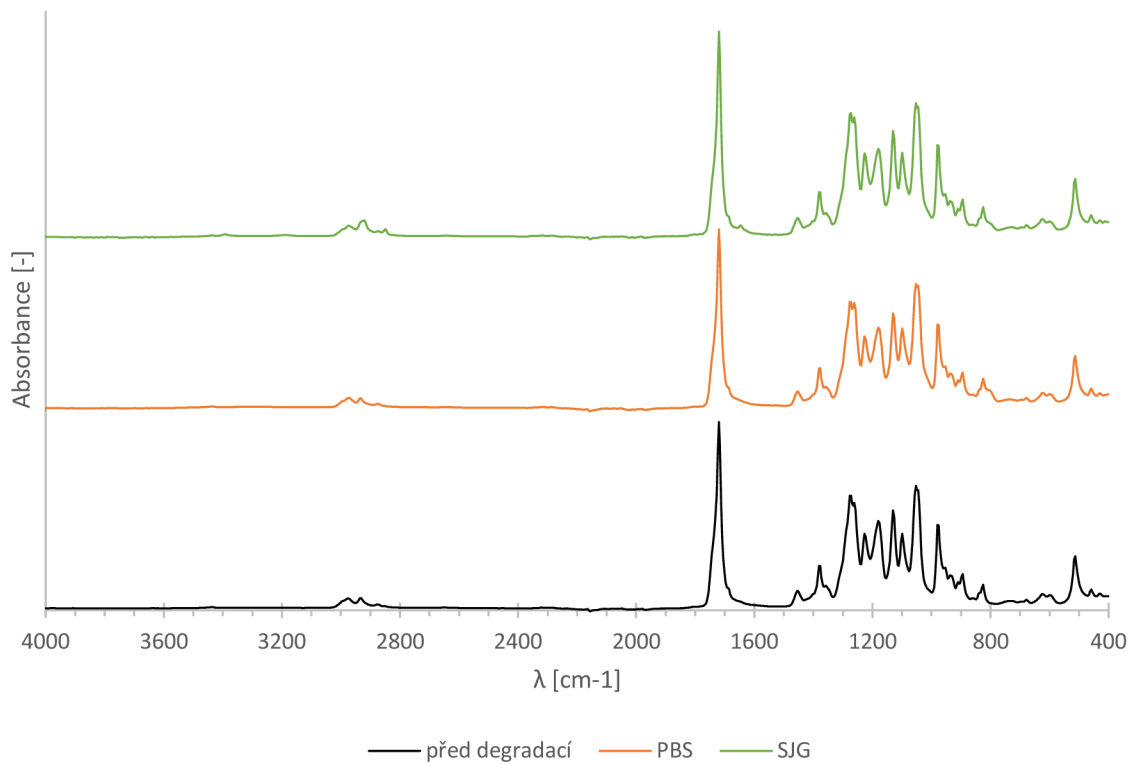
Obrázek P6: FTIR spektra AC1200 – před degradací a po degradaci v PBS a SJG



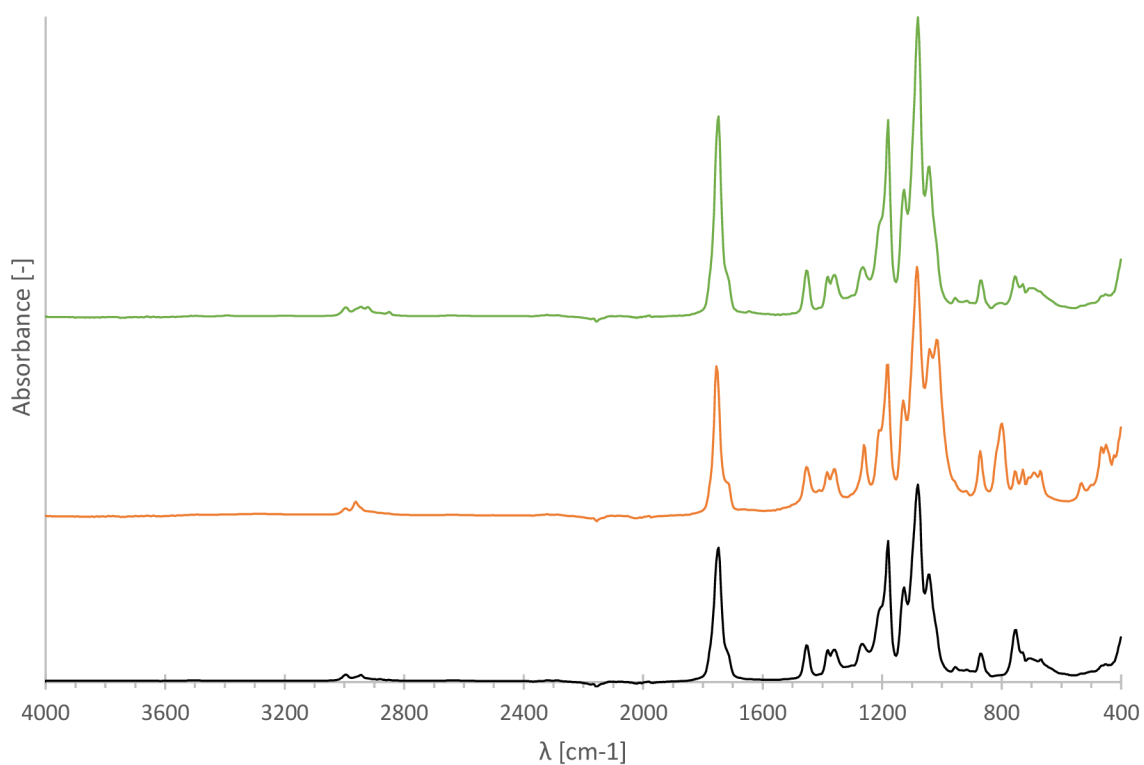
Obrázek P7: FTIR spektra FC1200 před degradací a po degradaci v PBS a SJG



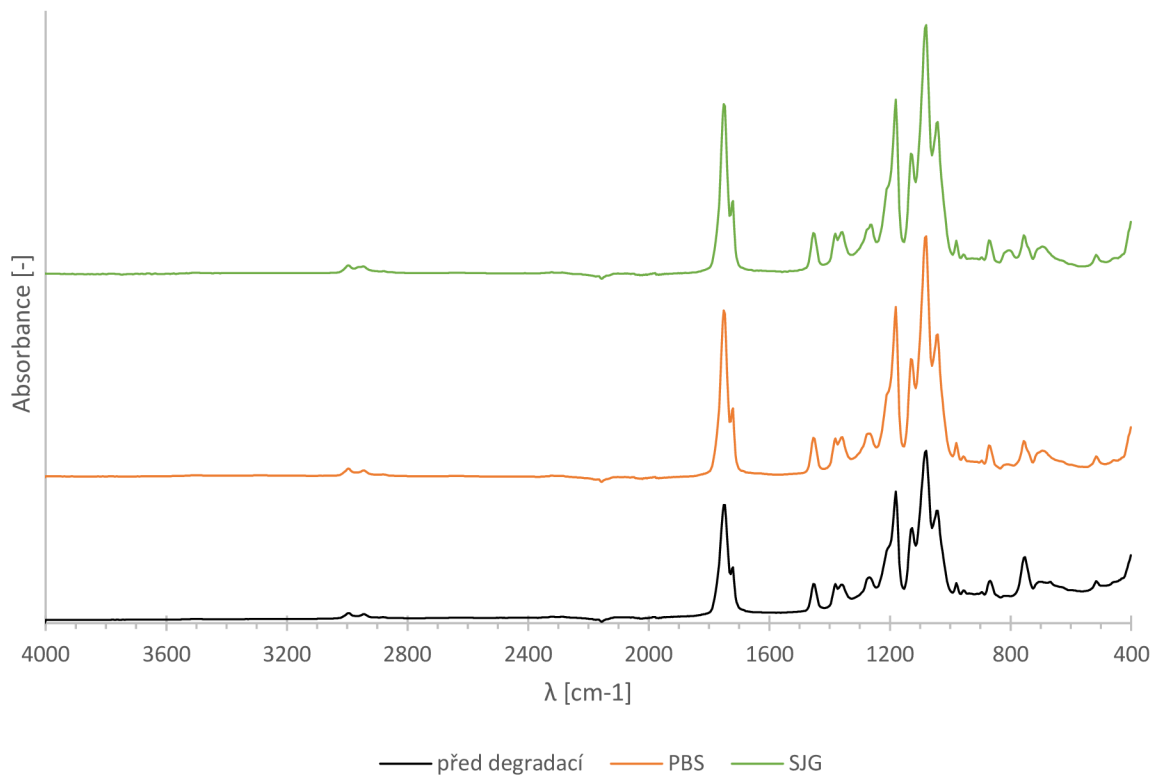
Obrázek P8: FTIR spektra MJB5 – před degradací a po degradaci v PBS a SJG



Obrázek P9: FTIR spektra PHBH – před degradací a po degradaci v PBS a SJG



Obrázek P10: FTIR spektra filamentu PLA – před degradací a po degradaci v PBS a SJG



Obrázek P11: FTIR spektra filamentu PLA/PHA – před degradací a po degradaci v PBS a SJG