

Biodegradace polymerních nanovláknenných materiálů v půdě

Bc. Klára Klofáčová

Diplomová práce
2021



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Klára Klofáčová
Osobní číslo: T19397
Studijní program: N0712A030001 Environmentální inženýrství
Studijní obor: Environmentální inženýrství
Forma studia: Prezenční
Téma práce: Biodegradace polymerních nanovláknenných materiálů v půdě

Zásady pro vypracování

1. Provést literární rešerši na dané téma. Zaměřit se na charakteristiku, vlastnosti a degradabilitu vybraných nanovláknenných materiálů.
2. Připravit biodegradační experiment.
3. Měřit mineralizaci vybraných nanovláknenných materiálů pomocí hmotnostního analyzátoru plynů.
4. Sledovat změny na povrchu vzorků během biodegradace pomocí mikroskopických metod.
5. Provést molekulárně-biologickou analýzu mikrobiálních konsorcií v jednotlivých inkubacích.
6. Vyhodnotit výsledky.
7. Výsledky přehledně zpracovat do formy DP.

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

Glaser, John. (2019). Biological Degradation of Polymers in the Environment. 10.5772/intechopen.85124.
Wierckx, Nick & Narancic, Tanja & Eberlein, Christian & Wei, Ren & Drzyzga, Oliver & Magnin, Audrey & Ballerstedt, Hendrik & Kenny, Shane & Pollet, Eric & Avérous, Luc & O Connor, Kevin & Zimmermann, Wolfgang & Heipieper, Hermann & Prieto, Auxi & Jimenez, Jose & Blank, Lars. (2018). Plastic Biodegradation: Challenges and Opportunities. 10.1007/978-3-319-44535-9_23-1.
Llorens, Elena & Armelin, Elaine & Pérez-Madrigal, Maria & Del Valle, Luis & Alemán, Carlos & Puiggali, Jordi. (2013). Nanomembranes and Nanofibers from Biodegradable Conducting Polymers. *Polymers*. 5. 1115-1157. 10.3390/polym5031115.
Chmelar, Josef & Mrazek, Jiri & Hermannová, Martina & Kubala, Lukas & Ambrozova, Gabriela & Kocurková, Anna & Dmota, Tomáš & Nesporova, Kristina & Grusová, Ludmila & Velebný, Vladimír. (2019). Biodegradable free-standing films from lauroyl derivatives of hyaluronan. *Carbohydrate Polymers*. 224. 115162. 10.1016/j.carbpol.2019.115162.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Jana Šerá, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce: **31. prosince 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta: Bc. Klára Klofáčová

.....
podpis studenta

a)

ABSTRAKT

Kyselina hyaluronová je čím dál více využívána nejen v medicíně, ale i v kosmetickém průmyslu a biotechnologiích díky jejímu velice pozitivnímu vlivu na eukaryotické buňky.

Experimentální část se zabývala přípravou, analýzou a následnou biodegradací vzorků derivátů kyseliny hyaluronové, konkrétně se jednalo o lauroyl hyaluronan a furanyl hyaluronan. Vlákná derivátů kyseliny hyaluronové byla připravena metodou elektrospinning. Tato metoda je komerčně zajímavá poměrně jednoduchým a rychlým způsobem výroby nanovláken. Pomocí elektrospinningu byly připraveny nanovláknenné vrstvy o velikosti 100 – 200 μm . Velikost samotných vláken byla stanovena na rastovacím elektronovém mikroskopu (SEM). Byly provedeny mechanické testy a také testy bobtnavosti. Následně proběhla biodegradace materiálů v půdě, která byla měřena sledováním mineralizace – měřením produkce CO_2 . Mikroorganismy na povrchu materiálů byly pozorovány na fluorescenčním mikroskopu pomocí metody LIVE/DEAD. Byla také izolována DNA a změřena její koncentrace.

Klíčová slova: biodegradace, kyselina hyaluronová, elektrospinning, nanovlákná

ABSTRACT

Hyaluronic acid is used not only in medicine, but also in the cosmetics industry and biotechnology for its very positive influence to eukaryotic cells.

The experimental part dealt with the preparation, analysis and subsequent biodegradation of samples of hyaluronic acid derivatives, specifically lauroyl hyaluronan and furanyl hyaluronan. Hyaluronic acid derivatives were prepared by electrospinning. This method is commercially interesting thanks to simple and fast way of nanofiber production. Nanofiber layers with a size of 100 – 200 μm were prepared. The size of the fibres themselves was determined using scanning electron microscope (SEM). Mechanical tests and swelling tests were performed. The materials were biodegraded in the soil, biodegradation was measured by monitoring mineralization – measuring CO_2 production. Microorganisms on the surface

of the materials were also observed using fluorescence microscope with LIVE/DEAD method. DNA was isolated and its concentration measured.

Keywords: biodegradation, hyaluronic acid, electrospinning, nanofibres

Na tomto místě bych chtěla poděkovat paní Ing. Janě Šeré, Ph.D. za odborné vedení mé práce, za její čas, cenné poznámky a možnosti častých konzultací. Dále bych tímto textem chtěla vyjádřit vděk Ing. Adéle Kotzianové, Ph.D. a celé společnosti Contipro a.s. za jejich přínos pro praktickou část této diplomové práce. V neposlední řadě obrovské poděkování patří také mé rodině, bez které bych tuto práci nedokončila.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 POLYMERNÍ VLÁKNA	12
1.1 DEFINICE NANOVLÁKEN	12
1.2 ROZDĚLENÍ NANOVLÁKEN.....	12
1.2.1 Zvlákňování foukáním roztoku či taveniny	13
1.2.2 Tažení z roztoků a tavenin	15
1.2.3 Fyzikální dloužení	16
1.2.4 Odstředivé zvlákňování.....	16
1.2.5 Zvlákňování centrifugací	18
1.3 VÝROBA VLÁKEN POMOCÍ ELEKTROSPINNINGU.....	20
1.3.1 Princip elektrospinningu	20
1.3.2 Řízení elektrospinningu	23
VYBRANÉ POLYMERY VYUŽÍVANÉ PRO VÝROBU VLÁKEN A JEJICH CHARAKTERISTIKA	25
1.4 25	
1.4.1 Polyethylenglykol	25
1.4.2 Kyselina hyaluronová.....	25
1.4.3 Deriváty kyseliny hyaluronové	26
2 DEGRADACE POLYMERŮ	29
2.1 ABIOTICKÁ DEGRADACE POLYMERŮ	29
2.1.1 Mechanická degradace	29
2.1.2 Fotodegradace	29
2.1.3 Termální degradace	30
2.1.4 Abiotická hydrolýza	30
2.2 BIODEGRADACE POLYMERŮ	31
2.2.1 Biodeteriorace	32
2.2.2 Depolymerizace.....	32
2.2.3 Asimilace.....	33
2.2.4 Mineralizace	33
2.3 BIODEGRADACE POLYETHYLENGLYKOLU	33
2.4 BIODEGRADACE KYSELINY HYALURONOVÉ.....	34
2.5 BIODEGRADACE PHB	34
II PRAKTICKÁ ČÁST	35
3 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, ROZTOKY, POMŮCKY A PŘÍSTROJE	36
3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	36
3.2 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	37
4 METODIKA	38

4.2	TESTOVÁNÍ NANOVLÁKENÝCH VRSTEV.....	40
4.2.1	Stanovení hmotnosti.....	40
4.2.2	Stanovení tloušťky	40
4.2.3	Stanovení bobtnavosti	40
4.2.4	Rastovací elektronová mikroskopie	41
4.2.5	Stanovení průměru vláken.....	41
4.3	PŘÍPRAVA BIODEGRADAČNÍHO EXPERIMENTU	41
4.3.1	Příprava minerálního média	41
4.3.2	Příprava inkubací	42
4.3.3	Stanovení sušiny půdy.....	43
4.4.1	Měření mineralizace vzorků.....	44
4.4.2	Vyhodnocení naměřených dat	44
4.4.3	Izolace DNA.....	46
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	49
5.1	VÝROBA NANOVLÁKEN	49
5.1.1	Výroba nanovláken vzorku LHA	49
5.1.2	Výroba nanovláken vzorku FHA	49
5.1.3	Výroba nanovláken vzorku LHA:FHA 70:20.....	50
5.1.4	Výroba nanovláken vzorku LHA:FHA 45:45.....	50
5.1.5	Výroba nanovláken vzorku LHA:FHA 20:70.....	50
5.1.6	Výroba nanovláken vzorku PEG.....	51
5.2	VÝSLEDKY ANALÝZY NANOVLÁKEN	51
5.2.1	Stanovení hmotnosti.....	51
5.2.2	Stanovení tloušťky nanovláčenné vrstvy a průměru vláken	51
5.2.3	Výsledky mikroskopické analýzy připravených nanovláken.....	52
5.3	BIODEGRADACE NANOVLÁKEN	57
5.3.1	Výsledky mineralizace	57
5.3.2	Výsledky izolace DNA	59
5.3.3	Výsledky fluorescenční mikroskopie.....	60
	ZÁVĚR	64
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	66
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	73
	SEZNAM OBRÁZKŮ	74
	SEZNAM TABULEK.....	76

ÚVOD

Polymery jsou klíčovým materiálem v moderní společnosti. Jsou univerzální, lehké a lze je vyrobit za relativně nízkou cenu. V současné době je pouze asi 1% polymerů a plastových výrobků na globálním trhu považováno za kompostovatelné a / nebo biologicky odbouratelné (QAZI, 2020). Právě výroba materiálů z obnovitelných zdrojů je velkým trendem spolu se snahou odstranit vzniklé materiály pomocí biodegradace. Polymery jsou také vhodným materiálem pro výrobu nanovláken. V posledních dvou desetiletích se díky svým vynikajícím fyzikálně-chemickým vlastnostem stala nanovláknina často využívaným materiálem pro průmysl či lékařské aplikace. Mezi jejich vlastnosti patří například vysoká pórovitost a malá velikost pórů, velký měrný povrch nebo výborné mechanické vlastnosti v poměru k jejich váze. Jelikož struktura nanovláknenné textilie je velmi podobná struktuře mezibuněčné hmoty lidské tkáně, mají široké využití v medicíně, například ve tkáňovém inženýrství nebo jako krycí obvazový materiál. Jedním z bio polymerů, ze kterých jsou vyráběna nanovláknina je kyselina hyaluronová. Ta je v posledních letech často využívána v medicíně, biotechnologiích či kosmetickém průmyslu. Je tomu tak díky její biokompatibilitě a biodegradabilitě. Má také velmi pozitivní vliv na eukaryotické buňky. Studií, které by se věnovaly biodegradaci kyseliny hyaluronové či jejich derivátů v životním prostředí, ale mnoho není.

Cílem této práce bylo připravit nanovláknenné vrstvy derivátů kyseliny hyaluronové a jejich vzájemné kombinace metodou elektrospinning. Dále byla zkoumána samotná biodegradace těchto vzorků v půdě.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 POLYMERNÍ VLÁKNA

Vlákna se vyskytují buď ve formě „nekonečných“ nebo podlouhlých. Již více než 140 milionů let se pavouci spoléhali na sítě ze svých vláken, aby zachytili kořist. Pásky vláken jsou konstruovány např. z hedvábných vláken s průměry v rozmezí 2 až 5 μm . Bourec morušový je také známý svou pozoruhodnou schopností vyrábět hedvábná vlákna pro konstrukci kokonů. Tyto zmíněné a mnoho dalších přírodních systémů sloužilo jako důležitý zdroj inspirace pro vývoj umělých vláken (GRIMA, 2000).

Ve skutečnosti jsou vlákna již od úsvitu civilizace základní součástí lidského života. Historie výroby vláken lidmi lze sledovat od pravěku. Byly vykopány fragmenty bavlněných výrobků z období 5 000 nebo 2 700 př. n. l. Kolem roku 1 300 př. n. l. bylo vynalezeno vřetení k výrobě vláken z vlny a bavlny, což sloužilo k výrobě tkanin a oděvů. To postupně vedlo až ke vzniku textilního průmyslu v 80. letech 20. století. Rayon, který je vyrobený z bavlněných nebo celulózních vláken, se považuje za první umělou textilií. Vyroben byl v roce 1891. Do komerčního prodeje byl zaveden až roku 1911. O půlstoletí později byla syntetická vlákna produkována zároveň s vývojem chemie a nauce o polymerech. Jako první komerční syntetické vlákno byl představen nylon v roce 1938. Poté bylo vyvinuto mnoho dalších typů polyesterů a syntetických polymerů pro výrobu syntetických vláken. Syntetická vlákna významně snižují poptávku veřejnosti po přírodních vláknech a zároveň značně rozšiřují oblast použití (GRIMA, 2000; Narayan, 1993).

1.1 Definice nanovláken

V literatuře není definice nanovláken jednoznačná. Jejich definice se na základě průměru vláken mění podle autorů. Největší průměry nanovláken se však definují jako menší než 1 μm . Nejmenší teoretická hranice pro vlákna je až kolem 0,4 nm, což je desetkrát větší hodnota, než je poloměr atomu vodíku. Hlavní charakteristický znak nanovláken je jejich vysoká hodnota poměru povrchu k objemu. Nejčastěji jsou za nanovlákna považována vlákna o průměru cca 500 nm a menší (PLISKO, 2004).

1.2 Rozdělení nanovláken

Polymerní nanovlákna se rozdělují především podle technologie jejich přípravy. V závislosti na zvolené technologii se poté liší také jejich vlastnosti. Zařízení pro tvorbu nanovláken jsou založené na metodách:

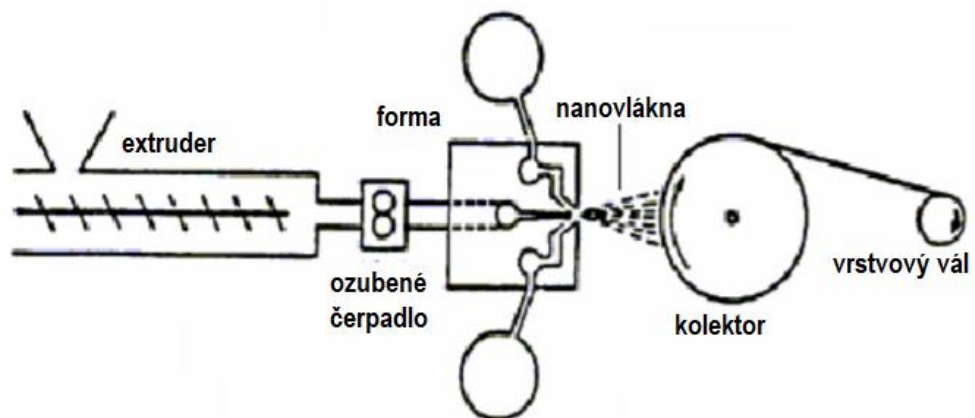
Tab. 1: Dělení nanovláken podle technologie jejich výroby (SODOMKA, 2004)

Technologie přípravy	Princip	Rozsah velikosti
Elektrospinning	Natahování roztoku v elektrickém poli	1 nm až jednotky μm
Foukání taveniny či roztoku	Dloužení taveniny v proudu horkého vzduchu	> 800 nm
Zvlákňování vzněcováním	Zahřívání na polymerní tekutinu	> 200 nm
Samosběr	Samovolné uspořádání molekul v roztoku	> 100 nm
Fyzikální dloužení	Fyzikální dloužení roztoku	> 50 nm
Odstředivé zvlákňování	Zvlákňování pomocí odstředivé síly	> 100 nm
Hydrotermální proces	Formování vlákna v hydrotermálním roztoku	Rozmezí 50 – 150 nm
Fázové dělení	Tvarování vláken umělým fázovým roztokem	Rozmezí 50 – 500 nm
Fyzikální tažení	Protažení kapičky roztoku	> 50 nm

Úplně nejrozšířenější je metoda elektrospinningu, která byla použita i v praktické části diplomové práce a bude detailněji popsána níže (SODOMKA, 2004).

1.2.1 Zvlákňování foukáním roztoku či taveniny

Bylo zjištěno, že elektrospinning závisí převážně na elektrických vlastnostech materiálu. Zvlákňování foukáním se od elektrospinningu liší použitím působení proudícího vzduchu o vysoké teplotě. Rozfoukávací technologie jsou prezentovány níže ve dvou variantách na Obrázcích 1 a 2. Na Obrázku 2 je vidět roztavený polymer, jenž je čerp ozubeným čerpadlem do středu trysky. Materiál je následně ve zvlákňovací trysce strháván horkým vzduchem. V ní následně dochází ke vzniku nanovláken (HUERTA-ÁNGELES, 2004).



Obr. 1: Schéma zvlákňování foukáním (SODOMKA, 2004)

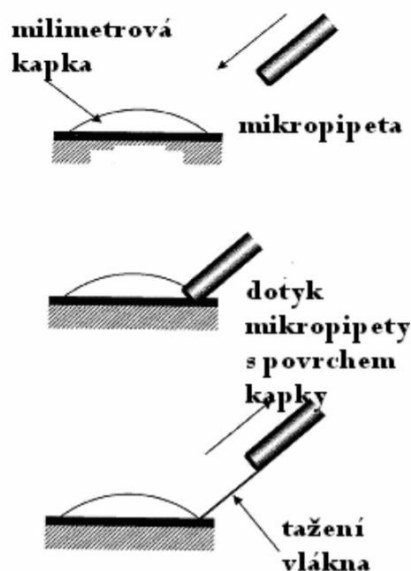


Obr. 2: Linka pro výrobu nanovláken
rozfoukavacím postupem (SODOMKA, 2004)

V obou zmíněných případech je elektrovlákňování při působení vysokého napětí nahrazeno proudem vzduchu o vysoké teplotě velkou rychlostí. Tato metoda je v praxi využívána, jelikož přináší daleko větší množství vyrobených nanovláken a roun (SODOMKA, 2004).

1.2.2 Tažení z roztoků a tavenin

Příprava nanovláken technologií tažení je postavena na principu zobrazeném na Obrázku 3. Do taveniny nebo roztoku zvlákňovaného materiálu se vloží trubičky či tyčinky v takovém množství, kolik je pro výrobu nanovláken třeba. Ta jsou připravena na desce a jsou vytahována z taveniny či roztoku rychlostí, kterou určuje viskozita tekutého zvlákňovaného materiálu. Tímto způsobem je možné vyrobit takový počet nanovláken, jenž je shodný s hroty zasaženými v desce. Jestliže se použijí kruhové desky s určitým počtem hrotů, lze po otáčení desky a protažení vláken vytvořit nanovláčennou přízi. Při užití rovinové desky poté lze získat i nanovláčenné „kablíky“. Tažení je možné kombinovat také s elektrospinningem. Do lázně zvlákňovaného materiálu se zasune deska zvlákňovaného materiálu. Se shodným rozmístěním hrotů se následně umístí deska naproti hrotům v tekutině. Vlákna se přitáhnou při přiloženém napětí do 1 kV vlivem napětí zesíleného elektropole. Jelikož jsou vlákna nabitá stejným nábojem, odpuzují se (PLISKO, 2004).



Obr. 3: Schéma fyzikálního tažení (SODOMKA, 2004)

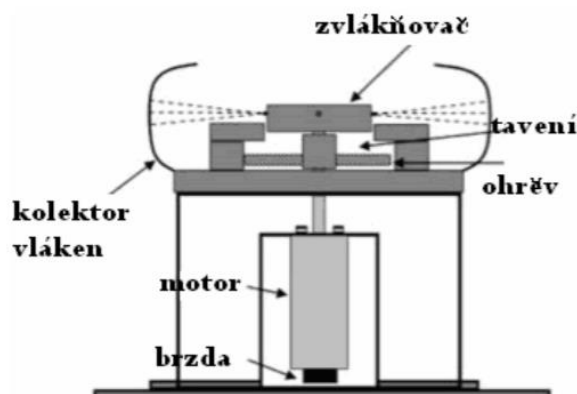
1.2.3 Fyzikální dloužení

Další možností, jak připravit nanovlákná je tažení již existujících makrovláken, což je především efektivní u kovových a polymerních materiálů. Velmi obtížný či úplně nemožný je tento postup u vláken keramických a uhlíkových. Při užití této technologie se připevní určité množství makrovláken do desek, které jsou umístěny naproti sobě. Ty jsou následně vloženy do čelisti dynamometru, vlákna jsou ohřívána pod bod měknutí a natahována do potřebných průměrů. Proces se poté opakuje a je možné tímto způsobem získat vlákna o průměru až 100 nm. Tato technologie je mimo jiné vhodná pro získávání malého počtu nanovláken například pro výzkumné účely (HUERTA-ÁNGELES, 2018; Rotkin, 2003; Sodomka, 2004).

1.2.4 Odstředivé zvlákňování

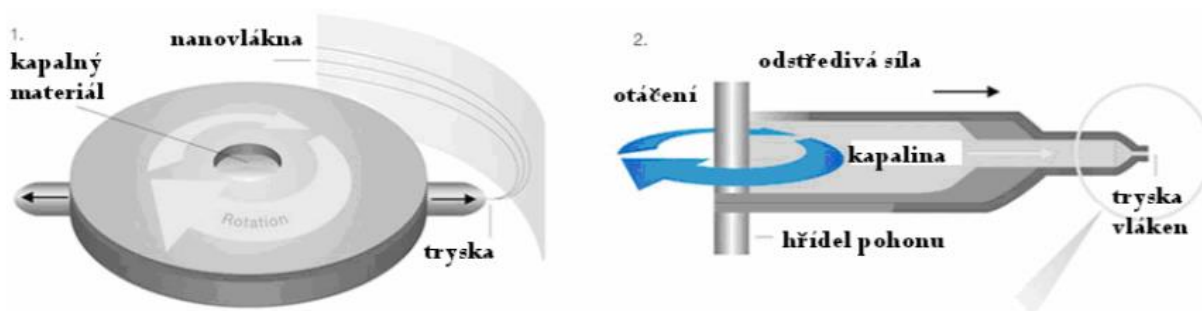
Počátky techniky odstředivého zvlákňování (OZ) sahají do roku 2006. I přes fakt, že je technologie relativně mladá, patří mezi velmi efektivní. Zařízení užívající tuto technologii jsou vyráběna společností Fiberio. Cílem celého procesu bylo vytvořit daleko efektivnější a univerzálnější technologii zvlákňování oproti elektrospinningu s definovanými vlastnostmi nanovláken. Nakonec se to podařilo za použití nanovlákných odstředivek typu cyklon L-1000. Tato počítačem řízená zařízení dokáží vyrábět nanovlákná o průměrech 4,5 – 500 nm ve spojitém režimu, a to o stejnoměrnosti $\pm 35\%$ pro 300 nm se stejnoměrným rozložením (NAYAK, 2012; PERSANO, 2013; Sodomka, 2004).

Touto metodou se prakticky mohou zpracovávat veškeré druhy vláken, a to jak z taveniny, tak i z roztoku. Jelikož jsou vyráběna množství ve vřetenech, jsou připravena pro libovolný způsob dalšího textilního zpracování. Do smyslu funkce dávají nahlédnout schémata na Obrázcích 4, 5 a 6 (MELLADO, 2011; SARKAR, 2010).

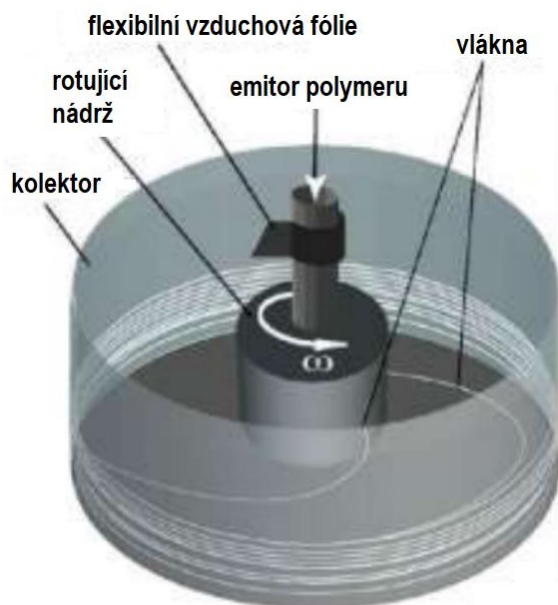


Obr. 4: Celkové funkční schéma odstředivého

zvlákňování (SARKAR, 2010)



Obr. 5: Detaily rotoru a celkový pohled na nanovláknennou odstředivku (MELLADO, 2011)



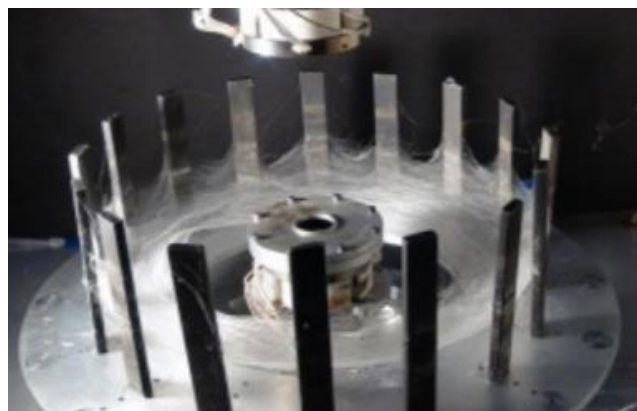
Obr. 6: Schéma komory OZ (MELLADO, 2011)

Zařízení pro zvlákňování odstředivou technologií disponuje komorou se dvěma tryskami. Materiál nanovláken v tekutém stavu je jimi vytlačován odstředivou silou do okolí OZ. Po výstupu je materiál strháván proudícím vzduchem a uložený na okolní válcový kolektor v podobě vláken. Rozdělení proudu v nanovlákná je zabezpečeno elektrostatickým odpuzováním a prouděním vzduchu. Elektrostatické pole následně vznikne díky triboelektrickému náboji vytvořenému třením v trysce s okolním vzduchem. Uzpůsobení této OZ linky pro malokapacitní výrobu je zobrazeno na Obrázku 7. Způsob ukládání

vláken na kolektoru OZ, které tvoří vřeteno, je ukázáno na Obrázku 8 (MELLADO, 2011; PERSANO, 2013; Plisko, 2021).



Obr. 7: Zařízení pro odstředivé zvlákňování od společnosti Fiberio
(BLAŽKOVÁ, 2014)

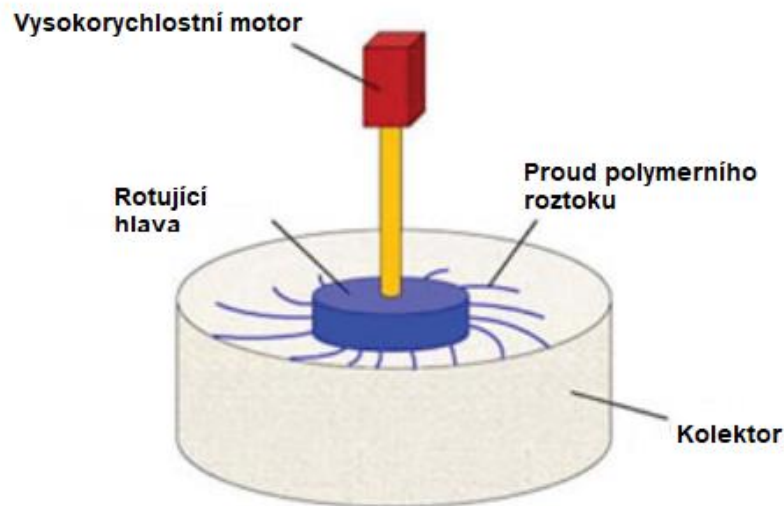


Obr. 8: Ukládání vláken na kolektoru OZ
(MELLADO, 2011)

1.2.5 Zvlákňování centrifugací

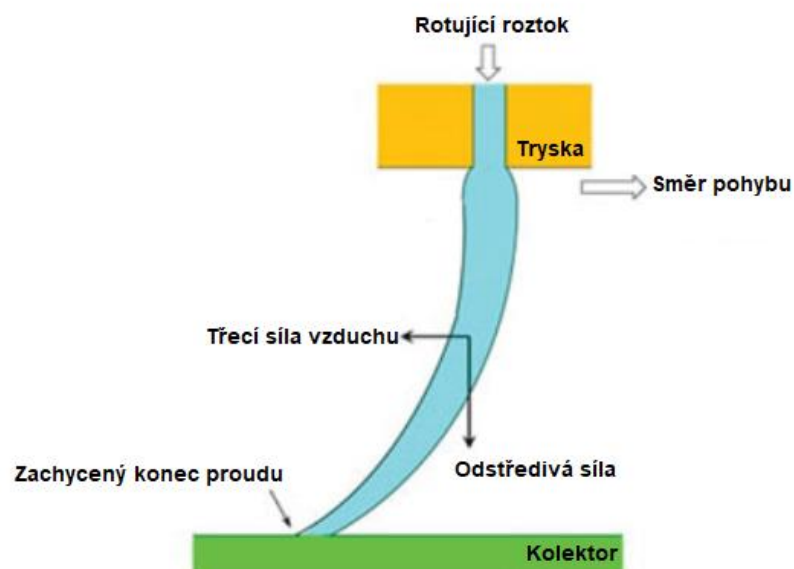
Tato metoda je v posledních letech velmi rozšířená. V průběhu formování vláken je zvlákňovaný roztok umístěn do rotujícího zvlákňovacího emitoru, který má několik trysek kolem boční stěny. V momentě, kdy rychlost otáčení dosáhne kritické hodnoty, odstředivá síla překoná povrchové napětí zvlákňovací kapaliny a začnou se tvořit proudy polymerního roztoku. To vše je znázorněno na Obrázku 9. Obrázek 10 pak ukazuje dráhu proudu

polymerního roztoku po jeho vystřelení z emitoru. Odstředivá síla spolu s třecí silou vzduchu prodlužuje proud a vede k tvorbě nanovláken. Na proces tvorby nanovláken mohou ještě působit další síly, například gravitační síla a povrchové napětí (ZHANG & LU, 2014).



Obr. 9: Schéma zvlákňování centrifugací

(ZHANG & LU, 2014)



Obr. 10: Dráha proudu polymerního roztoku

z trysky během zvlákňování (ZHANG & LU, 2014)

1.3 Výroba vláken pomocí elektrospinningu

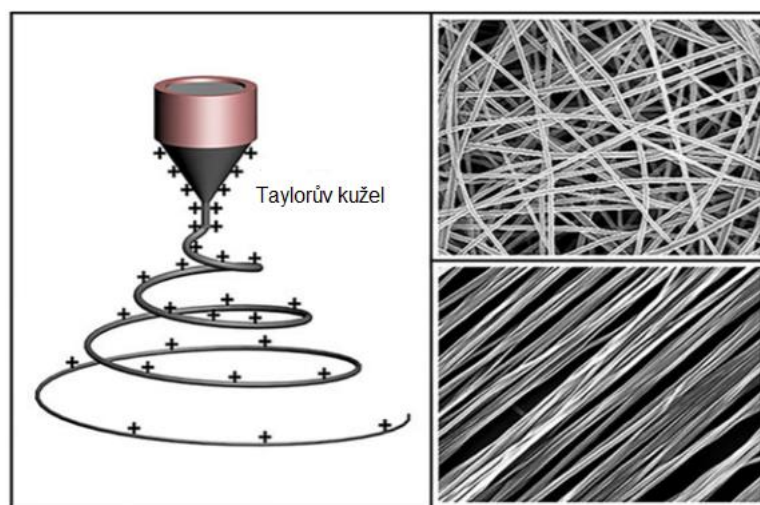
Pro výrobu vláken ze syntetických polymerů bylo vyvinuto mnoho metod, zejména takové, které jsou založeny na mokřím, suchém, gelovém zvlákňování nebo z taveniny. Mokré zvlákňování zahrnuje zvlákňovací emitor ponořený do chemické lázně. Zvlákňování nastává ve chvíli, kdy se roztok polymeru vytlačí emitorem do chemické lázně a dochází zde ke srážení polymeru kvůli ředicímu účinku nebo chemické reakci, tím dojde ke vzniku vláken tuhnutím. Při použití suché metody se polymerní roztok vytlačuje do vzduchu skrz emitor a vlákna se získávají v důsledku odpaření rozpouštědla z trysek pomocí proudu horkého vzduchu. Při zvlákňování z taveniny se polymerní tavenina vytlačuje z emitoru. Při ochlazení se vytvoří vlákna. Gelové zvlákňování se používá k výrobě vláken s vysokou mechanickou pevností nebo jiných speciálních vlastností. Dochází k odstředování polymeru v „gelovém“ stavu, následně se suší na vzduchu a poté nastává ochlazení v kapalně lázni. Během těchto zvlákňovacích procesů se vlákna vytvářejí převážně při vnějších střižných silách nebo mechanickém tažení při průchodu emitory a vlákna se vytvářejí po ztuhnutí v důsledku srážení nebo sušení. Vznikající vlákna jsou natahována pouze v omezeném rozsahu. Z tohoto důvodu vznikají vlákna s průměrem v rozsahu 10 až 100 μm . Jednou z metod výroby vláken je také elektrospinning (GUPTA, 1997; LUO, 2012; Woodings, 2003). Zvlákňování pomocí elektrospinningu je univerzální široce používaná technologie pro výrobu elektrostatických ultratenkých vláken. K výrobě polymerních vláken s průměrem od 2 nm do několika mikrometrů se využívá elektrická síla a vlákna vznikají z polymerních roztoků (AHN, 2006; XUE, 2019).

1.3.1 Princip elektrospinningu

Elektrospinning zahrnuje elektrohydrodynamický proces, při kterém se kapička roztoku elektrifikuje za vzniku paprsku. Poté následuje natažení a prodloužení za vzniku vlákna. Obr. 12 ukazuje základní nastavení pro elektrospinning, které je poměrně jednoduché. Mezi hlavní součásti patří vysokonapěťové napájení, injekční pumpa, emitor a vodivý kolektor. Zdrojem napájení může být stejnosměrný nebo střídavý proud. Během elektrospinningu je kapalina vytlačována z emitoru za vzniku protáhlé kapičky v důsledku povrchového napětí. Po elektrifikaci dochází k elektrostatickému odpuzování mezi povrchovými náboji, které mají stejné znaménko, deformuje kapičku na Taylorův kužel (Obrázek 11), ze kterého je vypuzován nabitý paprsek. Proud polymerního roztoku se zpočátku rozprostírá v přímé linii a poté podstupuje prudké bičovací pohyby kvůli nestabilitě v ohybu. Jakmile je proud

natažen do jemnějších průměrů, rychle tuhne, což vede k ukládání pevných vláken na uzemněný kolektor. Obecně lze proces elektrospinningu rozdělit do čtyř po sobě jdoucích kroků: (OHKAWA, 2004).

- Nabití kapičky kapaliny a vytvoření Taylorova kužele
- Prodloužení nabitého proudu podél přímky
- Ztenčení paprsku v přítomnosti elektrického pole a nárůst nestability elektrického ohybu
- Ztuhnutí a shromáždění paprsku jako pevného vlákna na uzemněném kolektoru



Obr. 11: Vznik Taylorova kužele (XUE, 2019)

Vznik Taylorova kužele po nabití kapičky kapaliny

Během elektrospinningu je kapalina obvykle přiváděna emitorem konstantní a regulovatelnou rychlostí pomocí stříkačky. S postupným zvyšováním napětí se bude hromadit více nábojů, což zvyšuje hustotu povrchových nábojů na kapičce. Zatímco povrchové napětí upřednostňuje sférický tvar, aby se minimalizovala celková povrchová volná energie kapičky, elektrostatický odpor má tendenci deformovat tvar kapičky, takže se jeho povrchová plocha zvětšuje, aby potlačila odpuzování (XUE, 2019).

Protážení nabitého proudu polymerního roztoku

Z vrcholu Taylorova kužele je elektricky nabitý paprsek vytlačen a poté zrychlen elektrickým polem. Proud se rozšiřuje ve směru elektrického pole při pohybu směrem ke kolektoru. Na základě experimentálních pozorování a elektrohydrodynamických teorií byly vyvinuty různé modely popisující chování nabitého paprsku. V jednom modelu byl proud považován za řetězec spojených viskoelastických činek. S použitím lineární Maxwellovy

rovnice byla vypočtena trojrozměrná trajektorie pro proud. Výsledky výpočtu byly v souladu s experimentálním pozorováním (XUE, 2019).

Ztenčování proudu polymerního roztoku

Když proud zrychlí, má tvar přímky a její povrchové napětí a viskoelastická síla v proudu mají tendenci zabránit tomu, aby se pohybovala vpřed. Proto je nutné rychlost tlumit. Mezitím se průměr trysky zmenšuje (XUE, 2019).

V oblasti vzdáleného pole mohou na elektricky nabitý paprsek působit tři vlivy, které mohou způsobit nestabilitu. První typ vlivu je osově symetrický, také nazýván Rayleighova nestabilita. Může vést k rozbití proudu na kapičky. Může být potlačen silným elektrickým polem. Druhý typ je také osově symetrický a dochází k němu při silnějším elektrickém poli než u prvního typu. Třetí typ se nazývá nestabilita bičování nebo ohybu. Je nesymetrický. Popisuje dlouhodobé odchyly, které jsou způsobeny aerodynamickou nestabilitou (XUE, 2019).

Nestabilita bičování způsobuje podstatné zmenšení průměru proudu polymerního roztoku velkým zvětšením délky dráhy, po které je proud urychlen a natažen před ztuhnutím nebo nanesením na kolektor. Během procesu bičování může být délka trysky prodloužena až 10 000krát v období 0,05 s nebo méně. Výsledkem je snížení průměru paprsku o několik řádů, a to nakonec vede k tvorbě vláken s průměry několik mikrometrů až nanometrů (XUE, 2019).

Solidifikace proudu

Při prodlužování proudu polymerní roztok tuhne na vlákna. To je způsobeno buď odpařením rozpouštědla, nebo ochlazením taveniny. Pokud je proces tuhnutí pomalý, může prodloužení nabitého paprsku trvat delší dobu, aby se vytvořila vlákna s menším průměrem (XUE, 2019).

Zachytávání vláken

Posledním krokem elektrosponingu je nanášení vzniklých vláken na uzemněný kolektor. Morfologie vláken jsou určovány hlavně fází ohybové nestability, ve které jsou vlákna ukládána. Je poměrně snadné shromažďovat vlákna v oblasti smyčky první ohybové nestability jako netkanou textilii na stacionárním nebo pohyblivém kolektoru. Vlákna v malé stočené oblasti druhé a třetí nestability v ohybu mohou mít složitý vzor. Po uložení je většina nábojů na vláknech rychle rozptýlena uzemněným kolektorem (XUE, 2019).

1.3.2 Řízení elektrospinningu

Tvorba elektrostaticky zvlákněných vláken a kontrola jejich průměru jsou určovány parametry zpracování, včetně aplikovaného napětí, průtoku kapaliny a vzdálenosti mezi špičkou emitoru a kolektoru (XUE, 2019).

Statické stejnosměrné vysoké napětí je obvykle aplikováno na emitor pro generování elektrického pole. Polarita napětí může být buď kladná, nebo záporná, což ovlivňuje distribuci nabitých molekul v kapalině, a tím i typ nábojů akumulovaných na povrchu trysky. U některých materiálů, zejména elektrolytů, jsou jejich kapacity pro elektrospinning závislé na polaritě aplikovaného napětí. Aplikované napětí přímo určuje množství nábojů nesených proudem a velikost elektrostatického odpuzování mezi náboji, jako i síla interakcí mezi tryskou a vnějším elektrickým polem. Vyšší napětí obvykle podporuje vytváření tenčích vláken. Na Obrázku 12 je vidět přístroj, který byl využit pro výrobu nanovláken v této diplomové práci („Electrospinning device for preparing nanofiber layers - 4SPIN“; XUE, 2019).



Obr. 12: Zařízení použité při výrobě nanovláken 4Spin („Electrospinning device for preparing nanofiber layers - 4SPIN“)

- 1 – Ovládací monitor
- 2 – Vodivý kolektor
- 3 - Emitter
- 4 – Vysokonapěťové napájení
- 5 – Dávkováčka

1.4 Vybrané polymery využívané pro výrobu vláken a jejich charakteristika

1.4.1 Polyethylenglykol

Polyethylenglykol (PEG) je také známý pod názvem polyethylenoxid (PEO) a polyoxyetylen (POE). Komerčně jej můžeme označit jako nejvýznamnější typ polyetheru. PEG, PEO nebo POE označuje oligomer nebo polymer ethylenoxidu. Všechny tři názvy jsou z chemického hlediska synonymní, avšak PEG se historicky vztahoval k oligomerům a polymerům s molekulovou hmotností nižší než 20 000 g/mol, PEO k polymerům s molekulovou hmotností nad 20 000 g/mol a POE k polymerům s jakoukoli molekulovou hmotností (HESS, 2002).

Polyethylenglykol se připravuje polymerací ethylenoxidu a komerčně je dostupný v širokém rozmezí molekulových hmotností od 300 g/mol do 10 000 000 g/mol. Fyzikální vlastnosti se liší v závislosti na délce řetězce. Délka řetězce však nemá vliv na chemické vlastnosti. Různé skupiny PEG se také liší v závislosti na iniciátoru použitém při polymeračním procesu. Jako nejběžnější z nich lze uvést monofunkční methylether polyethylenglykol, který se zkracuje mPEG (KRAUSE & BITTNER, 1990).

PEG byl schválen americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv pro vnitřní spotřebu. Imunitní systém jej snadno nerozpozná, jelikož je velmi dobře rozpustný ve vodě a mnoha organických rozpouštědlech. Může být tak snadno vylučován z těla tělesnými tekutinami (KRAUSE & BITTNER, 1990).

1.4.2 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová (HA) je přirozeně se vyskytující glykosaminglykan, neboli lineární polysacharid s vysokou molekulovou hmotností. V organismech se většinou vyskytuje ve formě solí. Z tohoto důvodu je přesnější označení hyaluronát nebo hyaluronan. Skládá se z opakujících se disacharidových jednotek. Každá z těchto jednotek obsahuje N-acetylglukosamin a kyselinu D-glukuronovou. Ze skupiny glykosaminoglykanů je jediná nesulfátová sloučenina vyskytující se přirozeně ve všech živých organismech. Je jednou z hlavních složek mezibuněčné hmoty a je součástí pojivových, epiteliálních a nervových tkání. Pokud se neváže na jiné molekuly, váže se na vodu, díky které získává vlastnosti kvalitou připomínající gel (BHATT, 2021; NECAS, 2008).

Je velice rozšířeně využívána v plastické chirurgii a oftalmologii, kde se užívá k dočasnému vyplnění prostoru oční přední komory a ochraně očních tkání před poškozením při

nitroočních operacích, jako jsou implantace čočky či operace šedého zákalu. V plastické chirurgii se používá na potíže s osteoartrózou (LO, 2003; SALWOWSKA, 2016).

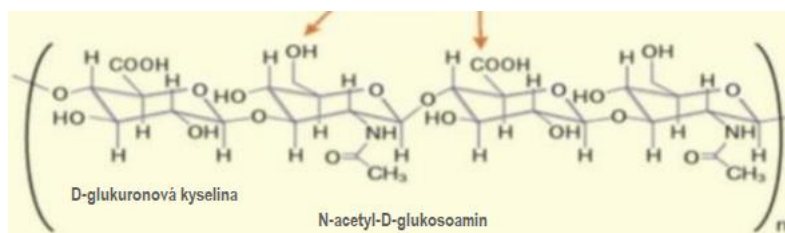
Kyselina hyaluronová se vyrábí produkcí geneticky změněnými kmeny bakterie *Escherichia coli* nebo například fermentací z buněčných stěn bakterií druhu *Streptococcus zooepidemicus*. Druhý zmíněný způsob užívá i firma Contipro (YU & STEPHANOPOULOS, 2008).

Streptococcus zooepidemicus se prokázal jako nejvýhodnější kmen pro produkci kyseliny hyaluronové. Jeho produkční potenciál velmi závisí na dostupnosti organického dusíku a také na některých vitamínech a minerálech. Právě pro dostatek organického dusíku se do kultivačního média přidává pepton nebo kvasničný extrakt. Literatura uvádí, že tato bakterie potřebuje pro produkci kyseliny hyaluronové velmi vysoké koncentrace (až 20 g/l) peptonu či kvasničného extraktu. Tyto látky značně zvyšují cenu produkce. Amado a spol. při svém experimentu prokázali, že mléčná syrovátka a kukuřičný výluh jsou vhodným alternativním zdrojem organického dusíku pro výrobu HA. Jako další vhodná náhrada byly prokázány proteinové hydrolyzáty z rybího odpadu (AMADO, 2016; Arslan & Aydogan, 2021a, , 2021b).

1.4.3 Deriváty kyseliny hyaluronové

Přírodní hyaluronan má nedostatky co se fyzikálně-biologických vlastností týče, a proto se používají chemicky modifikované hyaluronany. Výsledné vlastnosti derivátu mohou být výrazně odlišné od přírodního polymeru. Většina derivátů si však zachovává biologickou kompatibilitu a biologickou rozložitelnost přírodní hyaluronové molekuly (COLLINS & BIRKINSHAW, 2013; HUERTA ÁNGELES & NEŠPOROVÁ, 2021).

Pro chemické (kovalentní) modifikace se nejčastěji používají dvě místa v chemické struktuře HA. Jsou to místa karboxylové skupiny glukuronových kyselin a hydroxylové skupiny na uhlíku C-6. Hydroxylová skupina může být zesíťována prostřednictvím etherové vazby a karboxylové skupiny mohou být modifikovány prostřednictvím esterové vazby. Primární místa vhodná pro chemickou modifikaci jsou vyobrazeny na Obrázku 13 (COLLINS & BIRKINSHAW, 2013).



Obr. 13: Opakující se disacharidové jednotky HA, červené šipky značí primární místa vhodná pro chemickou modifikaci

(COLLINS & BIRKINSHAW, 2013)

Modifikace karboxylové skupiny

Karboxylové skupiny hyaluronové kyseliny (hyaluronic acid, HA) jsou běžně modifikovány reakcemi zprostředkovanými karbodiimidem, esterifikací a oxidací jodistanem (COLLINS & BIRKINSHAW, 2013; HUERTA ÁNGELES & NEŠPOROVÁ, 2021).

Tvorba hydrazidů HA

Hydrazidová modifikace HA je jednou z nejvíce zkoumaných modifikací. Dosahuje se jí konjugací pomocí karbodiimidové vazby a byla hodnocena pro různé aplikace biokonjugace, jako například konjugace léčiv nebo peptidů za použití hydrazinových vazeb (COLLINS & BIRKINSHAW, 2013).

Tvorba thiolů

Thioly se obecně připravují konjugací s molekulami obsahující disulfid, jako například cystamin nebo dihydrazid kyseliny 3,3'-dithiopropionové. Ten je poté kondenzován s HA. Redukcí disulfidových vazeb dithiothreitem se získá požadovaný thilový derivát. Thiolové deriváty se hojně používají k vývoji hydrogelů i přesto, že mají nevýhodu v pomalé kinetice zesítnění (COLLINS & BIRKINSHAW, 2013).

Aldehydy HA

Tvorba aldehydových derivátů má široké uplatnění při selektivní konjugaci N-koncových peptidů a jiných nukleofilů. Nejčastější metodou, která se používá pro přípravu této modifikace, je částečná oxidace hlavního řetězce sacharidu HA s použitím jodistanu sodného. Oxidace se snadno provádí za neutrálních podmínek nebo ve vodném prostředí. Je však nutné počítat se snížením molekulové hmotnosti a otevřením sacharidového kruhu. To může být škodlivé pro jeho buněčné rozpoznávací vlastnosti a narušuje biologickou funkci molekuly (COLLINS & BIRKINSHAW, 2013).

Esterifikace

Esterifikace zahrnuje tři typy reakcí- akrylaci, alkylaci a Huisgenovu cykloadiční reakci. Při akrylaci se nejčastěji provádí tzv. metakrylace ve vodě s pH 6,5 za použití dvou molárních

ekvivalentů EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid) a N-(3-aminopropyl)methakrylamidu. Alkylace může být použita pro přípravu amfifilních derivátů HA. Může se provádět za použití alkylhalogenidů, jako například alkyljodidy nebo brominy v organickém rozpouštědle. Huisgenová cykloadiční reakce azidů s alkyne za vzniku triazolů se používá k výrobě hydrogelů HA a také k zapouzdření kvasnicových buněk během zesíťování. Při této metodě jsou funkční skupiny azidu a alkyne zabudovány na HA za použití EDC chemie (COLLINS & BIRKINSHAW, 2013; HUERTA ÁNGELES & NEŠPOROVÁ, 2021).

Modifikace hydroxylové skupiny

Esterifikace se běžně používá pro modifikace hydroxylové skupiny zesíťováním divinylsulfonem, esterifikací a bis-epoxidovým zesíťováním (COLLINS & BIRKINSHAW, 2013).

Tvorba etherů za použití epoxidů

Epoxid je běžným zesíťovadlem pro přípravu HA hydrogelů. Pro síťování se používá BDDE (1,4-butandiol diglycidylether) pro většinu současně dostupných zesíťovaných HA hydrogelů. Reakce spočívá v otevření epoxidového kruhu za vzniku etherových vazeb s hydroxylovými skupinami HA (COLLINS & BIRKINSHAW, 2013).

Tvorba etherů za použití divinylsulfonu

Divinylsulfon také patří mezi běžné síťovadla hydrogelů HA. K provedení reakce je zapotřebí vysoká hodnota pH. Tento způsob zesíťování má výhodu, že probíhá za pokojové teploty, což snižuje degradaci HA při alkalickém pH, ke kterému obvykle dochází při vyšších teplotách. Zajímavostí je, že i když výchozí divinylsulfon je vysoce reaktivní a toxická látka, hydrogely jsou biokompatibilní (COLLINS & BIRKINSHAW, 2013).

Tvorba hemiacetalů pomocí glutaraldehydu

Toto zesíťování musí být provedeno za kyselých podmínek. Tyto podmínky jsou nutné k získání acetalového zesíťovaného produktu. Pro získání acetalového hydrogelu je nutná neutralizace, jelikož v kyselém prostředí je reakce reverzibilní. Tyto modifikace nemohou být použity v biomedicíně, jelikož glutaraldehyd je toxický (COLLINS & BIRKINSHAW, 2013).

2 DEGRADACE POLYMERŮ

Degradace je nevratný rozkladný proces, který způsobí změny struktury materiálu. Polymery jsou vystaveny dvěma degradačním etapám. První etapa nastává již při výrobě a zpracování. Tavenina polymeru je vystavena mechanickému namáhání a zároveň vysoké teplotě. Právě proto může zpracování taveniny velmi ovlivnit dlouhodobou stabilitu materiálu v pevném stavu. Druhou degradační etapou je myšlen průběh života polymeru, jelikož je vystaven několika vnějším vlivům, které působí na jeho strukturu (DUCHACEK, 2006).

2.1 Abiotická degradace polymerů

Abiotickou degradaci způsobují abiotické faktory, které jsou velmi důležité pro první fázi degradace. Mohou přispívat k biodegradaci nebo přímo zahajují štěpení polymerního řetězce. Abiotickou degradaci můžeme rozdělit na mechanickou degradaci, fotodegradaci, termální degradaci a hydrolýzu (KYRIKOU & BRIASSOULIS, 2007).

2.1.1 Mechanická degradace

Mechanické degradaci rozumíme jako procesu, kdy dochází k rozpadu řetězce polymeru a jeho zkracování pomocí mechanických vlivů. Polymery mohou být degradovány např. v rámci jejich recyklace. Degradace může probíhat např. pomocí ultrazvuku nebo obráběcím způsobem. Jako obráběcí způsob se nejčastěji uvádí válcování, hnětení a mletí (drcení). Rychlost mechanické degradace je závislá převážně na frekvenci pohybu, teplotě, složení a struktuře polymeru (DUCHACEK, 2006).

V životním prostředí dochází k mechanické degradaci polymerů např. působením makroedafonu (žížaly, chvostoskoci) nebo působením deště či sněhu. Dochází tak ke fragmentaci plastů na menší části (DUCHACEK, 2006).

2.1.2 Fotodegradace

Fotodegradace je oxidační destrukcí, jež je aktivována zářením. Nejčastěji jde pak o záření ultrafialové (290 – 400 nm). Toto záření může být odraženo, rozptýleno, absorbováno nebo propuštěno, a to dopadem záření na povrch polymeru. Fotochemické změny probíhají za situace, kdy je absorbováno světelné záření o konkrétní vlnové délce. Touto absorpcí se zvětšuje energie makromolekuly, jež dosahuje vyššího energetického stavu. Největší množství absorbované energie je spotřebováno na převod elektronového systému do vyššího kvantového stavu. Zbývá energie je využita pro tvorbu volných radikálů. Tímto způsobem

vzniklé radikály zapříčiňují následné reakce, při nichž se tvoří další radikály. Veškeré radikály se mohou nadále rekombinovat a rozpadat. Následkem fotodegradace dochází většinou k síťování nebo k degradaci a poklesu molekulové hmotnosti polymeru. Síťování proces degradace spíše zpomaluje, jelikož zde dochází ke vzniku gelovité struktury, která je vůči degradaci poměrně odolná. Karbonylové skupiny ve struktuře polymeru fotooxidaci urychlují, neboť silně absorbují záření o vlnových délkách 280 – 320 nm. Působí tedy jako fotosenzibilátory (HERMAN, 2014; KIJHAVENGKUL, 2010).

2.1.3 Termální degradace

Obecně platí, že polymery jsou náchylné k degradaci působením tepla, což je zapříčiněno malou pevností kovalentních vazeb, jež tvoří polymerní strukturu. Působení vysokých teplot se může u polymerů projevit dvěma způsoby. V prvním z nich polymer změkne, jelikož se teplem zvýší kinetická energie makromolekulárního řetězce natolik, že se polymer začne chovat jako kapalina. V případě druhém pak dochází u polymeru ke změně struktury. Některé druhy polymerů se dokonce štěpí na nízkomolekulární produkty či dokonce monomery. To vše za situace, kdy se nemění jejich chemické složení. Taková degradace probíhá u některých polymerů tzv. zipovým mechanismem. Jde o situaci, kdy se z konců polymerních řetězců odštěpují monomerní jednotky, což můžeme vidět například u polystyrenu. Jiné polymery se naopak vlivem tepla štěpí a reagují s ostatními (DUCHACEK, 2006; HERMAN, 2014). Působení vyšší teploty je využíváno např. při kompostování kompostovatelných polymerů. U průmyslového kompostování je dosahováno průměrné teploty 58 °C. Vyšší teplota spolu s mikroorganismy, přítomnými v kompostu, vede k degradaci některých polymerů. Teplotní podmínky půdního prostředí pak ovlivňují také složení mikrobiálního konsorcia, jeho diverzitu a množství mikroorganismů (FUKUSHIMA, 2012).

2.1.4 Abiotická hydrolýza

Abiotická hydrolýza patří do skupiny solvolytických reakcí. Solvolýza znamená rozkladná reakce, přičemž částice rozpouštědla reagují s částicemi rozpuštěné látky. Podle druhu rozpouštědla rozdělujeme solvolýzu na několik druhů. Je-li rozpouštědlem voda, jedná se o hydrolýzu, nebo při reakci s alkoholem nastává alkoholýza. Abiotická hydrolýza probíhá za absence mikroorganismů. K potlačení jejich růstu se v laboratorním prostředí nejčastěji využívá azid sodný (PROIKAKIS, 2006).

K abiotické hydrolyze dochází pomocí náhodného štěpení řetězců polymerních látek. Tímto způsobem dochází k pozvolné redukci molekulové hmotnosti degradované látky. Při abiotické hydrolyze polyesterů nastává rozklad dané látky na chemicky jednodušší sloučeniny, například alkoholy a kyseliny.

Abiotická hydrolyza může probíhat v kyselém, bazickém nebo neutrálním prostředí.

Abiotickou hydrolyzu ovlivňuje řada vlastností samotného polymeru. Řadí se mezi ně:

- a) rozměry vzorku polymeru
- b) krystalický podíl polymeru ve vzorku
- c) molekulová hmotnost polymeru
- d) polarita polymerní látky
- e) teplota v průběhu hydrolyzy
- f) chemická struktura polymeru
- g) pórovitost polymeru
- h) hydrofilita/hydrofobita polymeru a rychlost absorpce vody.

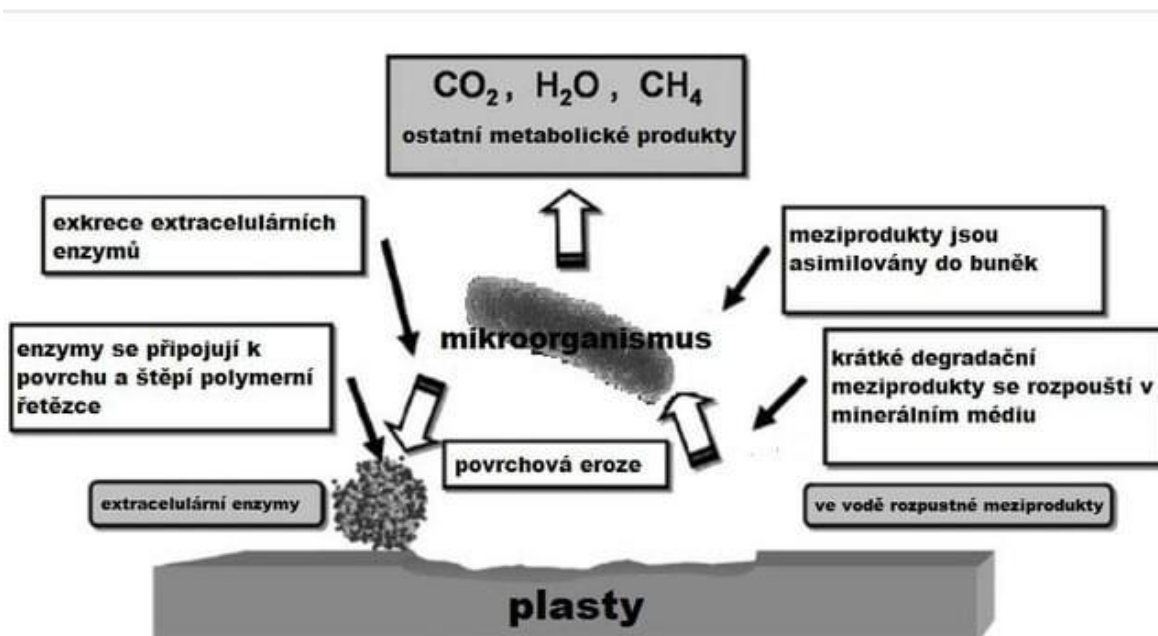
Abiotická hydrolyza je velmi důležitým mechanismem degradace polymerů. Může iniciovat a podpořit jejich biodegradaci (MUTHURAJ, 2014).

2.2 Biodegradace polymerů

Biodegradace je proces, při kterém dochází k biochemickému rozkladu organických látek pomocí přirozeně se vyskytujících bakterií a mikroskopických hub na jednodušší produkty. Polymerní materiály jsou tvořeny z velkých a ve vodě nerozpustných molekul, tudíž nemohou pronikat do mikrobiálních buněk. Je proto nutné, aby se přeměnily na frakce o nižší molekulové hmotnosti. Tento proces se nazývá depolymerizace, kdy přeměna nastává za přítomnosti extracelulárních enzymů, které vylučují mikroorganismy nebo působením některého z abiotických faktorů a probíhá mimo mikrobiální buňky. Poté dochází k asimilaci, což znamená, že se nízkomolekulární frakce začlení do mikrobiálních cyklů. Po asimilaci následuje mineralizace na oxid uhličitý, vodu a novou biomasu (MUELLER, 2006; SHAH, 2008).

V souladu s mezinárodní organizací pro normalizaci (ISO) a Evropský výbor pro normalizaci (CEN) zní definice pojmu biodegradace: biodegradace je degradace způsobená

biologickou aktivitou, zejména enzymatickou činností, což vede k výrazné změně chemické struktury materiálu. Dochází k produkci např. oxidu uhličitého, vody, minerálních solí a nové mikrobiální biomasy. Biodegradace představuje komplex pochodů, mezi které patří biodeteriorace, depolymerizace, asimilace a mineralizace. V přírodě pak biotické a abiotické faktory působí při rozkladu společně (SHAH, 2008).



Obr. 14: Schéma biodegradace polymerů, upraveno dle (RYDZ, 2015)

2.2.1 Biodeteriorace

Biodeteriorací se rozumí proces, při kterém dochází k rozkladu materiálů podléhajících biodegradaci. Dochází při tom k rozkladu materiálů o vysoké molekulové hmotnosti na menší fragmenty. Rychlost rozkladu závisí na složení a vlastnostech polymerního materiálu. Na biodeterioraci se podílí mikroorganismy, jako jsou bakterie, prvoci, řasy i mikroskopické houby. Dále také makroedafon, jako žížaly či chvostokoci. (GU, 2003; LUGAUSKAS, 2003; WALLSTRÖM, 2005).

2.2.2 Depolymerizace

Depolymerizace je proces, při kterém nastává výrazný úbytek molekulové hmotnosti materiálu a dochází k postupnému štěpení polymerního řetězce. Výsledkem jsou poté monomery, dimery a oligomery. Děj probíhá pomocí extracelulárních enzymů vylučovaných mikroorganismy, anebo vlivem některého z abiotických faktorů, jako například foto a termooxidace nebo abiotická hydrolyza. Enzymy, které se mohou podílet

na depolymerizaci, nesou obecný název depolymerázy. Název takovýchto enzymů se doplňuje předponou příslušné zkratky polymeru (MUELLER, 2006; ZHAO, 2005).

Při biodegradaci dochází k ataku enzymu na konkrétní místo v polymerním řetězci. Některé degradační enzymy (především hydrolázy) disponují tzv. katalytickou triádou. Jedná se o tři aminokyselinové zbytky – histidin, serin a aspartát. Histidin interaguje se serinem za vzniku vodíkové vazby. Poté následuje deprotonizace serinu a vzniká nukleofilní alkoxidová skupina O⁻, která napadá esterovou vazbu. Vzniká alkoholová skupina a acyl-enzym. Na závěr voda napadá vazbu v acyl-enzymu a vzniká koncová karboxylová skupina spolu s volným enzymem (DEVILLE, 2010; LUCAS, 2008; PROIKAKIS, 2006)

2.2.3 Asimilace

V průběhu asimilace dochází k začlenění nízkomolekulárních fragmentů do metabolických drah mikroorganismů. Principem je penetrace ve vodě rozpustných oligomerních a monomerních molekul přes buněčnou cytoplazmatickou membránu, kdy mikroorganismy získávají nezbytný zdroj energie k tvorbě nové biomasy (LEJA & LEWANDOWICZ, 2010; PILLA, 2011).

2.2.4 Mineralizace

Organické látky se rozkládají na jednodušší anorganické sloučeniny, které mohou být vylučovány do okolního prostředí. Mezi jednoduché metabolity můžeme zařadit oxid uhličitý, methan, dusík nebo vodu. Podstatou tohoto procesu je oxidace intracelulárních metabolitů a jejich uvolnění do okolního prostředí (PILLA, 2011).

2.3 Biodegradace polyethylenglykolu

Polyethylenglykoly (PEG) s molekulovou hmotností vyšší než 1 000 Da byly dlouho považovány za biorezistentní. Později se polyethylenglykoly s molekulovou hmotností až do 20 000 Da se ukázaly jako biologicky rozložitelné (KAWAI, 2001).

Kawai a kolektiv studovali rozklad polyethylenglykolu, kde využili již izolované kultury PEG-utilizujících bakterií. Jedná se o kmen K1 a kmen N6. Identifikovali, že tyto kultury patří do rodu *Sphingomonas*. (KAWAI, 2001).

Wagener a Schinkt zkoumali rozklad polyethylenglykolu fermentací na methan a oxid uhličitý v kulturách naočkovaných anoxickým kalem z městské čistírny odpadních vod. Zkoumali dva kmeny bakterií – KoB35 a KoB58. Kmen KoB58 je homoacetogenní bakterie,

kteřá oxiduje acetaldehyd na acetát a tvoří poté octan až na závěr CO₂. Kmen KoB35 dokázala nízkomolekulární PEG také dobře rozložit. Doporučuje se však tento kmen použít v kombinaci s jinými bakteriemi, nikoliv samotný (WAGENER & SCHINKT, 1988).

Studie, která sledovala biodegradaci ¹⁴C značeného PEG v tropické půdě došla k závěru, že je PEG v tomto prostředí mineralizován velmi pomalu. Nejprve došlo k poměrně rychlé fázi degradace, která ale po 21 dnech zpomalila (ABDALLA, 2005).

2.4 Biodegradace kyseliny hyaluronové

Biodegradace kyseliny hyaluronové byla zkoumána především pro medicínské využití. Například Zhao a kolektiv zkoumali stabilitu a biodegradaci kyseliny hyaluronové v kombinaci s hedvábným proteinem. Uvádí, že kyselina hyaluronová je velmi atraktivní pro využití v lékařství, díky své biokompatibilitě a biodegradabilitě. Je klíčovou součástí biomateriálů k inhibici jizev při opravě nervů především díky její hydrofilitě a adhezi na buňky. Ve studii zkoumali morfologii, strukturní analýzu a hmotnostní úbytek před a po biodegradaci v proteáze XIV. Biokompatibilita byla testována buněčnou kulturou myších embryonálních kmenových buněk in vitro. Dokázali, že kombinace kyseliny hyaluronové a hedvábného proteinu vykazuje vyšší odolnost vůči degradaci (ZHAO, 2005).

2.5 Biodegradace PHB

Polyhydroxybutyrát (PHB) byl poprvé objeven jako vůbec první polyester v roce 1920. Jedná se o semikrystalický izotaktický homopolymer. Je produkován mikroorganismy, například bakterií *Bacillus megaterium*. Kromě jeho bakteriální produkce bylo vyvinuto i několik syntetických způsobů, i když je syntetická výroba obtížná. Důvodem je, že teplota rozkladu PHB je totožná, jako jeho teplota tání – 160-180 °C. Je často zpracováván do různých výrobků, jako například filmy, vlákna či fólie. V praktické části této diplomové práce byl využit ve formě prášku (HIRAISHI, 2006).

PHB je degradován v různých prostředích, jako například v půdě či kompostu. PHB je rozložitelný také v mořské vodě. Mikroorganismy schopné rozkládat PHB disponují PHB depolymerázou, která byla objevena u gram pozitivních (G⁺) i gram negativních (G⁻) bakterií (JENDROSSEK, 1998).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, ROZTOKY, POMŮCKY A PŘÍSTROJE

3.1 Použité chemikálie

C_3H_8O	Isopropylalkohol
C_2H_6O	Ethanol
$NaCl$	Chlorid sodný
CH_3OH	Methanol
KH_2PO_4	dihydrogen fosforečnan draselný
$Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$	hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát
$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	chlorid vápenatý dihydrát
$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6 H_2O$	síran amonno-železnatý hexahydrát
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	síran manganatý heptahydrát
NH_4Cl	chlorid amonný
$MnSO_4 \cdot 5 H_2O$	síran manganatý pentahydrát
H_3BO_3	kyselina boritá
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	síran zinečnatý heptahydrát
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4 H_2O$	molybdenan amonný tetrahydrát
$Co(NO_3)_2 \cdot 6 H_2O$	dusičnan kobaltnatý hexahydrát
$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	síran měďnatý pentahydrát
HCl	kyselina chlorovodíková
$KHCO_3$	hydrogenuhličitan draselný
$[C_4H_6O_2]_n$	polyhydroxybutyrát

Veškeré použité chemikálie byly v čistotě p.a. dodány společnostmi Sigma Aldrich, Penta a Lachema.

3.2 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy Kern 770, Německo;
- Automatické pipety, Nippipet (Eppendorf AG);
 - (2, 10, 20, 100, 200, 500, 1000 a 5000 μ l);
- Laboratorní předvážky KERN 440-47;
- Sterilní špičky různých velikostí, Bioplastic;
- Trouba Mora 524;
- Chladnička Whirlpool kombi WBE 34162;
- Laboratorní autokláv Varioklav 75S, H+P;
- Sušárna Memmert UFB 400;
- Hmotnostní analyzátor plynů UGA 300;
- Fluorescenční mikroskop BX53M;
- Spetrofometr Infinite 200 PRO, Tecan;
- 4SPIN, Contipro;
- Analytické váhy XSR205, Mettler Toledo;
- Magnetická míchačka MR Hei-Standard, Heidolph;
- UV Crosslinker UVP CL-1000, Fisher Scientific;
- Naprašovačka EM ACE600, Leica;
- Rastovací elektronový mikroskop SEM, Zeiss;
- Digitální tloušťkoměr VL-50-B, Litematic;
- běžné laboratorní sklo a pomůcky.

4 METODIKA

4.1 Výroba a testování nanovláken

Nanovláknina zkoumaných derivátů kyseliny hyaluronové byla vyrobena na přístroji 4SPIN ve společnosti Contipro a.s. Princip je takový, že byl předem připravený roztok polymeru převeden do injekční stříkačky o objemu 10 ml, která byla následně umístěna do přístroje, a nastavily se parametry pro danou látku. Mezi parametry patřila vlhkost vzduchu, teplota, substrát, na který se poté zachycovala nanovláknina, vzdálenost mezi emitorem a kolektorem, doba vláknění, dávkování roztoku a použité napětí. Bylo nutné také zvolit vhodný typ emitoru a kolektoru.

Po ustálení vhodné vlhkosti vzduchu se zapnulo dávkování roztoku a napětí. V tento moment začaly nabitě kapičky roztoku vzlétat nahoru směrem k uzemněnému kolektoru ve formě tenkých vláken, aby se zde vybily. Kolektor se neustále otáčel a navíjel tak vlákna.

Vláknění probíhalo po dobu, dokud se nezvláknilo určité množství roztoku dané látky. Poté byl proces zastaven a byla vyjmuta dávkovačka. Z kolektoru se odebral substrát s nanovláknennou vrstvou, ze které se poté vyrobily čtverečky o rozměru 2x2 cm.

Nanovláknina derivátů kyseliny hyaluronové lauroyl hyaluronan (LHA) a furanyl hyaluronan (FHA) byla vyrobena na přístroji 4SPIN ve společnosti Contipro a.s. Byly vyrobeny vzorky čistých derivátů a následně jejich kombinace v poměrech LHA:FHA 70:20, LHA:FHA 45:45 a LHA:FHA 20:70. Dále bych připraven vzorek čistého polyethylenglykolu (PEG), který byl v předchozích vzorcích obsažen vždy ve zbylých 10 %.

4.1.1 Příprava vzorku LHA

Před zvláknění byl předem připravený roztok převeden do injekční stříkačky o objemu 10 ml, která byla následně umístěna do přístroje, a byly nastaveny parametry vláknění. Pro zvláknění vzorku LHA bylo použito napětí 56 kV, dávkováno bylo 350 μ l/min, vzdálenost mezi emitorem a kolektorem byla nastavena na 22 cm. Teplota vzduchu byla 21 °C a vlhkost vzduchu v přístroji byla udržována v rozmezí 12 – 22 %. Jako emitor byl zvolen typ E5, který měl 16 výstupů pro únik vzniklých vláken a kolektor typ C3, který byl největší ze všech typů v nabídce. Bylo nutné použít tyto typy kolektoru a emitoru, jelikož bylo potřeba vyrobit velké množství nanovláknenných vrstev. Zvláknilo se 30 ml roztoku vzorku, aby byla vrstva vláken dostatečně silná. Vláknění takového množství trvalo cca 240 minut.

4.1.2 Příprava vzorku FHA

Předem připravený roztok byl převeden do injekční stříkačky o objemu 10 ml, která byla následně umístěna do přístroje, a byly nastaveny parametry vláknnění. Výroba vzorku FHA byla značně náročnější, než derivátu LHA. Pro zvláknnění vzorku FHA bylo použito napětí 60 kV, dávkováno bylo 130 $\mu\text{l}/\text{min}$, vzdálenost mezi emitorem a kolektorem byla nastavena na 15 cm. Teplota vzduchu byla 24 °C a vlhkost vzduchu v přístroji byla udržována v rozmezí 5 – 10 %, jelikož při vyšší vlhkosti se nedařilo vlákna vyrobit. Jako emitor byl zvolen typ E5 a kolektor C3. Zvláknilo se 30 ml roztoku vzorku. Vláknnění takového množství trvalo 810 minut. Vzorek FHA velmi špatně zvlákňoval, vlákna nevznikala celistvě, trysky emitoru se průběžně střídaly. Bylo obtížné najít optimální podmínky pro vznik nanovláken, největší problém představovala vzdušná vlhkost, která v místnosti dosahovala až 50 %, avšak v přístroji bylo nutné udržovat vlhkost téměř desetkrát nižší pomocí foukání suchého vzduchu. Problém s vlhkostí mohlo také způsobovat samotné rozpouštědlo zvlákňovaného roztoku, jelikož se jednalo o čistou destilovanou vodu.

4.1.3 Příprava vzorku LHA:FHA 70:20

Jelikož ve vzorku převažovalo množství derivátu LHA, daný vzorek se choval velmi podobně jako čistý derivát. Z toho důvodu byly nastaveny podobné podmínky, které byly vyhovující, a nebylo nutné je dále příliš upravovat. Bylo nastaveno napětí 56 kV a dávkování 350 $\mu\text{l}/\text{min}$. Vzdálenost mezi emitorem E5 a kolektorem C3 byla také 22 cm. Teplota vzduchu byla 23 °C a vzdušná vlhkost byla udržována v rozmezí 11 – 18 %. 30 ml roztoku bylo zvláknněno za dobu 300 minut.

4.1.4 Příprava vzorku LHA:FHA 45:45

Druhá kombinace derivátů se také chovala velmi podobně jako derivát LHA a měl také podobné podmínky vláknnění. Napětí bylo nastaveno na 56 kV a dávkování na 350 $\mu\text{l}/\text{min}$. I vzdálenost mezi emitorem E5 a kolektorem C3 byla stejná, tedy 22 cm. Teplota vzduchu byla 23 °C a vzdušná vlhkost byla udržována mezi 14 až 18 %. Zvláknnit 30 ml vzorku se povedlo během 270 minut.

4.1.5 Příprava vzorku LHA:FHA 20:70

Třetí kombinace derivátů byla podobná čistému derivátu FHA, co se vláknnění týče, podmínky však byly zvoleny tak, aby odpovídaly spíše druhému derivátu. Důvodem byl rozpouštědlový systém, kde byla použita kombinace isopropylalkoholu s destilovanou

vodou. Bylo opět nastaveno 56 kV a dávkování 350 $\mu\text{l}/\text{min}$. Emitor E5 a kolektor C3 byly od sebe vzdáleny 22 cm. Teplota byla 23 $^{\circ}\text{C}$ a vzdušná vlhkost se udržovala při 15 – 23 %. 30 ml roztoku bylo zvlákněno za 240 minut, avšak vzorek stejně jako čistý derivát FHA nevláknil celistvě, trysky emitoru se střídaly. Tento problém nebyl tak patrný jako u čistého derivátu, z toho důvodu vláknění netrvalo tak dlouho.

4.1.6 Příprava vzorku PEG

Vzorek PEG byl zvlákněn odlišným způsobem od ostatních vzorků. Byly použity dvě injekční stříkačky o objemu 5 ml. Dále byl použit emitore E6. Jednalo se o dvě jehly typu G19 na pojízdném jezdcí. Bylo nastaveno napětí 24 kV a dávkovalo se 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Vzdálenost mezi emitorem E6 a kolektorem C3 byla 20 cm. Teplota vzduchu byla 23 $^{\circ}\text{C}$ a vzdušná vlhkost stačila být udržována v rozmezí 27 až 33 %. Doba vláknění byla 330 minut.

4.2 Testování nanovlákněných vrstev

Připravené vzorky nanovlákněných vrstev byly podrobeny následující analýze.

4.2.1 Stanovení hmotnosti

Byla stanovena hmotnost 21 čtverečků (pro vzorek PEG 14) o rozměrech 2x2 cm na analytických vahách XSR205 s přesností na 5 desetinných míst od společnosti Mettler Toledo. Ze získaných hodnot byla určena průměrná hmotnost a stanovena gramáž vláken na 1 m^2 .

4.2.2 Stanovení tloušťky

Tloušťka byla měřena na tloušťkoměru VL-50-B od společnosti Litematic pro 21 čtverečků daného vzorku (pro PEG 14) a byla stanovena průměrná tloušťka dané nanovlákněné vrstvy. Tloušťka každého čtverečku byla vždy změřena na pěti místech a výsledek byl poté zprůměrován. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 3. Pro ověření správnosti měření byla také vypočtena směrodatná odchylka a střední chyba průměru.

4.2.3 Stanovení bobtnavosti

Byla zkoumána bobtnavost jednotlivých vzorků. Testy byly provedeny na čtverečcích o rozměrech 2x2 cm po dobu 1, 3, 5, 8, 24, 48 a 72 hodin. Vzorky o známé hmotnosti byly zality pitnou vodou a nechaly se bobtnat při teplotě 36 $^{\circ}\text{C}$ po určitou dobu. Po uplynutí dané

doby byly vzorky vyjmuty, zbavily přebytečné vody odsátím, zvažily na analytických vahách a byla změřena jejich tloušťka.

4.2.4 Rastovací elektronová mikroskopie

Pro analýzu povrchu vzorků byl využit rastovací elektronový mikroskop SEM od společnosti Zeiss. Vzorky byly zkoumány při různém zvětšení a před samotnou analýzou je bylo nutné pokovit tenkou vodivou vrstvou zlata a palladia. Pokovení bylo prováděno kvůli odrazu elektronů při mikroskopování, povrch samotných polymerů není vodivý. Princip rastovacího elektronového mikroskopu je takový, že na vzorek dopadají paprsky elektronů, které následně putují po vzorku, a tím vzniká výsledný obraz, který je přenášen do počítače.

4.2.5 Stanovení průměru vláken

Použitím rastovacího elektronového mikroskopu od společnosti Zeiss byly zkoumány průměry vláken daných vzorků. Stanovení bylo prováděno na třiceti místech vzorku a poté byl vypočten průměr daných hodnot.

4.3 Příprava biodegradačního experimentu

4.3.1 Příprava minerálního média

Při inkubaci slouží minerální médium jako zdroj prvků důležitých pro mikroorganismy, nikoliv však jako zdroj energie.

Minerální médium bylo připraveno z následujících roztoků:

- KH_2PO_4 - dihydrogenfosforečnan draselný o koncentraci 9,07 g/l,
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát o koncentraci 23,90 g/l,
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - chlorid vápenatý dihydrát o koncentraci 1 g/l,
- $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - síran amonno-železnatý hexahydrát o koncentraci 3 g/l,
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - síran manganatý heptahydrát o koncentraci 10 g/l,
- NaCl - chlorid sodný o koncentraci 50 g/l,
- NH_4Cl - chlorid amonný o koncentraci 30 g/l,
- Roztok stopových prvků:

- $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - síran manganatý pentahydrát o koncentraci 0,043 g/l,
- H_3BO_3 - kyselina boritá o koncentraci 0,057 g/l,
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - síran zinečnatý heptahydrát o koncentraci 0,043 g/l,
- $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - molybdenan amonný tetrahydrát o koncentraci 0,037 g/l,
- $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - dusičnan kobaltnatý hexahydrát o koncentraci 0,025 g/l,
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - síran měďnatý pentahydrát o koncentraci 0,040 g/l.

Složení minerálního média:

Složení minerálního média bylo následující:

- | | |
|---|--------|
| • KH_2PO_4 | 20 ml |
| • $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ | 80 ml |
| • $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 10 ml |
| • $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 10 ml |
| • $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 10 ml |
| • NaCl | 10 ml |
| • NH_4Cl | 10 ml |
| • Roztok stopových prvků | 2,4 ml |

Veškeré uvedené roztoky bylo smícháno v odměrné baňce a doplněno destilovanou vodou na objem 1000 ml. Vzniklé minerální médium bylo poté sterilizováno v autoklávu při teplotě 125 °C po dobu 30 minut. Skladováno bylo v chladnici při teplotě 4 °C.

4.3.2 Příprava inkubací

Byly připraveny lahve o objemu 500 ml. Lahve byly předem sterilizovány v autoklávu při teplotě 125 °C po dobu 30 minut. Do lahví bylo následně připraveno:

- 15 g sušiny půdy
- 5 g perlitu
- 11,4 ml minerálního média

- 50 mg vzorku

Perlit se při inkubaci využívá k udržování vlhkosti a pro lepší přístup vzduchu v celém objemu půdy. Bylo nutné jej dvakrát promýt vodou z vodovodu a poté jedenkrát vodou destilovanou, následně byl vysušen v troubě při teplotě 105 °C.

Byla použita půda, která byla přeseťá přes síto s velikostí ok 2 mm a poté byla stanovena její sušina.

Inkubace byly připraveny třikrát vedle sebe pro každý zkoumaný vzorek, 3 paralelní lahve s práškovým PHB jako pozitivní kontrola a čtyři lahve jako slepý pokus, pro sledování respirační aktivity samotné půdy. Zkoumané vzorky byly nastříhány na čtverečky o rozměrech 0,5 x 0,5 cm. Lahve se nechaly inkubovat bez přístupu světla při teplotě 25 °C. Mineralizace vzorku LHA:FHA 20:70 nebyla sledována z důvodu nedodání materiálu.

4.3.3 Stanovení sušiny půdy

Bylo naváženo 10 g půdy na suchou, čistou předem zváženou Petriho misku, která byla převedena do elektrické trouby, kde byla půda sušena při teplotě 105 °C do konstantní hmotnosti. Poté byla miska vložena do exsikátoru, kde vychladla. Po vychladnutí byla stanovena sušina, pomocí které byl vypočítán přídavek minerálního média do inkubačních lahví. Stanovení bylo provedeno dvakrát vedle sebe.

$$S = \frac{m_{mp} - m_m}{m_{mpv} - m_m}$$

Kde:

- | | | |
|-------------|---|-----|
| - S | hodnota sušiny půdy | [%] |
| - m_m | hmotnost prázdné Petriho misky | [g] |
| - m_{mp} | hmotnost Petriho misky s půdou před sušením | [g] |
| - m_{mpv} | hmotnost Petriho misky s půdou po sušení | [g] |

4.4 Stanovení biodegradace

Vyhodnocení rozkladu vzorků bylo provedeno pomocí analyzátoru plynů UGA 300, který detekuje molekuly do 300 amu (atomic mass units). Byla sledována produkce oxidu uhličitého, který vzniká jako produkt aerobní biodegradace, jako standard byl použit argon.

4.4.1 Měření mineralizace vzorků

Nejprve byla provedena kalibrace samotného analyzátoru. Zde se využívá reakce kyseliny chlorovodíkové a hydrogenuhličitanu draselného. Na analytických vahách bylo s přesností na čtyři desetinná místa naváženo 1,1 g hydrogenuhličitanu. Navážka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 100 ml, kde byla rozpuštěna v destilované vodě, a roztok byl doplněn po rysku. Určité množství roztoku bylo pomocí automatické pipety převedeno do inkubačních lahví o objemu 500 ml. Stanovovaly se koncentrace 0,00; 0,20; 0,45; 1,00; 1,50; 2,00; 3,00 a 8,00 % KHCO_3 . K uhličitanu byla přidána zkumavka s 10 ml kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 1 mol/l. Po úplném uzavření lahve byly roztoky smíchány. I přestože se jedná o rychlou reakci, je vhodnější nechat kalibrační lahve odstát po dobu minimálně jedné hodiny, z důvodu lepšího rozptýlení vzniklého CO_2 po celém objemu lahve.

Před začátkem měření byl vyměněn mikrofiltr s porozitou 0,45 μm . Plyn z inkubačních lahví byl analyzován přes septum, do kterého byla vložena kapilární jehla, která zde byla ponechána po dobu několika sekund. Tato doba byla nutná pro ustálení měření koncentrace daných plynů. Naměřené koncentrace byly zobrazovány v počítači v programu UGA.

Po analýze byly lahve provzdušňovány přečištěným vzduchem, který se do lahví vhněl silikonovými trubičkami a ty byly připojeny k čerpadlům. Provzdušnění probíhalo po dobu minimálně dvou minut. Následně byly na lahve vráceny uzávěry se septy a vše bylo vráceno do termostatu.

4.4.2 Vyhodnocení naměřených dat

1. Denní produkce uhlíku vyjádřená ve formě oxidu uhličitého

$$m_C = \frac{M_C \cdot p}{R \cdot T} \cdot \frac{V_L}{1000} \cdot w(\text{CO}_2) \cdot \frac{V_{st}}{S_{st}} \cdot \frac{S_{vz}}{V_{vz}}$$

Kde:

m_C množství vyprodukovaného uhlíku ve formě CO_2 [mg]

M_C molární hmotnost uhlíku [g/mol]

p	atmosférický tlak v době provzdušňování	[kPa]
R	molární plynová konstanta	$\left[\frac{\text{J}}{\text{mol}\cdot\text{K}}\right]$
T	termodynamická teplota v době provzdušňování	[K]
V_L	plynný objem biometrické lahve	[ml]
$w(\text{CO}_2)$	množství oxidu uhličitého v kalibračním plynu	[%]
V_{st}	dávkový objem plynné fáze standardu	[μl]
S_{st}	signál detektoru pro standard	[$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]
V_{vz}	dávkový objem plynné fáze vzorku	[μl]
S_{vz}	signál detektoru pro vzorek	[$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]

2. Kumulativní produkce uhlíku vyjádřená ve formě oxidu uhličitého

$$m_{(k)C}(2) = m_{(k)C}(1) + m_C(2)$$

Kde:

$m_{(k)C}(2)$	kumulativní produkce uhlíku z aktuálního měření	[mg]
$m_{(k)C}(1)$	kumulativní produkce uhlíku z předchozího měření	[mg]
$m_C(2)$	denní produkce uhlíku z aktuálního měření	[mg]

3. Substrátová produkce uhlíku vyjádřená jako kumulativní produkce oxidu uhličitého v inkubačních lahvích se vzorky snižená o produkci oxidu uhličitého ze slepých vzorků

$$m_{(s)} = m_C - \emptyset m_C$$

Kde:

$m_{(s)}$	substrátová produkce uhlíku vyjádřená jako CO_2	[mg]
m_C	denní produkce uhlíku vyjádřená jako CO_2	[mg]
$\emptyset m_C$	průměrná denní produkce uhlíku vyjádřená jako CO_2	[mg]

4. Procentuální mineralizace uhlíku z hlediska produkce oxidu uhličitého

$$D_C = \frac{m_{(s)C}}{m_m \cdot TC}$$

Kde:

D_C	procentuální mineralizace uhlíku z hlediska produkce CO ₂ [%]	
$m_{(s)C}$	substrátová produkce uhlíku ve formě CO ₂	[mg]
m_m	hmotnost testovaného materiálu	[mg]
TC	obsah celkového uhlíku v testovaném materiálu	[%]

4.4.3 Izolace DNA

Izolace bylo provedena pomocí - komerčního kitu PowerSoil DNA Isolation Kit. Byly zkoumány vzorky po 7 dnech inkubace. Bakteriální biomasa o hmotnosti 0,5 g byla přidána do PowerBead zkumavky. Obsah byl lehce promíchán na vortexu. P K promíchané směsi bylo automatickou pipetou nadávkováno 60 µl roztoku C1. Zkumavka byla promíchána krátce obracením dnem vzhůru ručně a poté byl použit vortex na maximální rychlost po dobu 10 minut. Z vortexu byly zkumavky převedeny na centrifugu, kde probíhalo odstředění při maximální rychlosti 14 500 rpm po dobu 30 sekund. Po skončení centrifugy byl veškerý supernatant přemístěn do nové čisté zkumavky a bylo přidáno 250 µl roztoku C2. Obsah byl krátce promíchán na vortexu a zkumavky byly inkubovány při teplotě 4 °C po dobu 5 minut. Následně byla použita centrifuga při maximální rychlosti po dobu jedné minuty a poté byl opět odsán supernatant do nové čisté zkumavky, ke kterému bylo přidáno 200 µl roztoku C3. Zkumavky byly krátce promíchány na vortexu a nechaly se inkubovat při 4 °C po dobu 5 minut. Po 5 minutách byly zkumavky převedeny na centrifugu, která byla opět zapnuta na maximální rychlost na 1 minutu. 750 µl supernatantu bylo převedeno do čisté nové zkumavky. Zde bylo přidáno 1 000 µl protřepaného roztoku C4 a zkumavky byly dány na 5 sekund na vortex. Nyní se supernatant postupně převáděl skrz filtrační zkumavky. Nejprve byla převedena část supernatantu a zkumavka se zcentrifugovala na maximální rychlost po dobu 1 minuty. Poté byl odstraněn zfiltrovaný supernatant. Tento postup byl opakován, dokud nebyl zfiltrován celý obsah zkumavky. Do filtrační zkumavky bylo přidáno 500 µl roztoku C5 a zkumavka byla centrifugována po dobu 30 sekund na maximální rychlost. Byl odstraněn supernatant a byla provedena centrifugace ještě jednou při maximální rychlosti po dobu 5 minut. Filtrační zkumavka byla přesunuta do nové čisté zkumavky, do které bylo

přidáno 50 µl roztoku C6. Zkumavky byly inkubovány při 37 °C, poté centrifugovaly na maximální rychlost po dobu 30 sekund a byla odstraněna filtrační zkumavka. Ve zkumavce se nacházela izolovaná DNA.

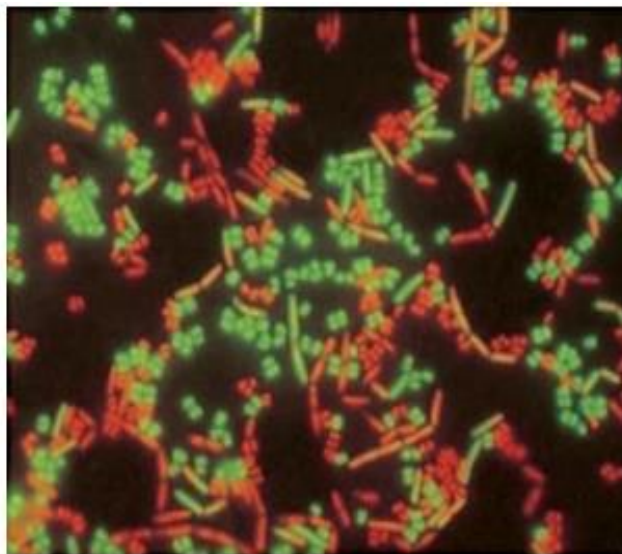
4.4.4 Měření koncentrace DNA

Koncentrace DNA byla měřena na spektrofotometru Infinite 200 PRO od společnosti Tecan dle přiloženého návodu, kdy bylo na mikrotitrační destičku automatickou pipetou nadávkováno určité množství daného vzorku. Ten byl poté umístěn do přístroje a následovalo měření.

4.4.5 Identifikace buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu

Na fluorescenčním mikroskopu BX53M byly detekovány živé a mrtvé buňky pomocí laboratorního kitu LIVE/DEAD[®] BacLight Bacterial Viability Kit od společnosti Molecular Probes. Kit obsahuje barvivo SYTO[®] 9, které slouží ke vstupu do bakteriální buňky porušenými i neporušenými membránami (mikroorganismy vidíme pod příslušným filtrem zbarvené zeleně) a barvivo propidium jodid (mikroorganismy vidíme pod příslušným filtrem zbarvené červeně), který prostupuje pouze poškozenými membránami. Tato barviva patří mezi tzv. fluorochromy, které se vážou na příslušné buněčné struktury, v tomto případě DNA. Fluorochromy jsou především organické látky, a nejčastěji heterocyklické aromatické sloučeniny (LIVE/DEAD[™] Light[™] Bacterial Viability Kit, for Microscopy, n.d.).

V 1 ml destilované vody bylo rozmícháno 1,5 µl každého barviva (viz kap 4.1.6). Zkoumaný vzorek byl převeden na podložní sklíčko a přidala se kapka roztoku s barvivou. Roztok byl ponechán působit po dobu asi 10 sekund a poté byl odsát. Ke vzorku byla nanесena kapka destilované vody a vše bylo přiklopeno krycím sklíčkem. Připravený vzorek byl umístěn pod mikroskop a následovalo pozorování. Na Obrázku 15 je zobrazen příklad výsledku pozorování bakteriálního konsorcia.



Obr. 15: Vizualizace živých a mrtvých bakterií
(LIVE/DEADTMLightTM Bacterial Viability Kit, for Microscopy, n.d.)

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Výroba nanovláken

Byly připraveny nanovláčenné vrstvy všech vzorků dle pokynů. Podrobný postup pro jednotlivé vzorky je popsán v následujících kapitolách.

5.1.1 Výroba nanovláken vzorku LHA

Byl připraven roztok lauroyl hyaluronanu o koncentraci 3 hm. % v poměru 90 % lauroyl hyaluronanu s 10 % polyethylenglykolu. Navážky byly rozpuštěny v isopropylalkoholu s destilovanou vodou v poměru 60:40. Nejprve byl isopropylalkohol smíchán s destilovanou vodou a vzniklé rozpouštědlo bylo mícháno po dobu třiceti minut. Poté byly za stálého míchání do rozpouštědla přidány lauroyl hyaluronan a polyethylenglykol. Roztok byl míchán, případně třepán do úplného rozpuštění a poté byl uzávěr lahve překryt parafilmem a uchováván v lednici.

Vzorek lauroyl hyaluronanu se zvlákněval velice dobře a rychle. Byly také snadno nalezeny optimální podmínky pro jeho zvláknění. Po ukončení vláknění bylo znát, že bude mít vzorek nižší tloušťku, než například furanyl hyaluronan.

5.1.2 Výroba nanovláken vzorku FHA

Byl připraven roztok furanyl hyaluronanu o koncentraci 6 hm. % v poměru 90 % lauroyl hyaluronanu s 10 % polyethylenglykolu. Jako rozpouštědlo byla pro tento vzorek použita destilovaná voda, kdy byly za stálého míchání do rozpouštědla přidány furanyl hyaluronan a polyethylenglykol. Roztok byl míchán, případně třepán do úplného rozpuštění a poté byl uzávěr lahve překryt parafilmem a uchováván v lednici.

Zvláknění furanyl hyaluronanu bylo nejvíce komplikované. Vzorek vyžadoval velmi nízkou vlhkost v průběhu zvláknění, což komplikovalo odpařující se rozpouštědlo. Jelikož pro přípravu tohoto vzorku byla použita pouze destilovaná voda, vlhkost vzduchu v přístroji značně zvyšovala.

Při stříhání vzorku na čtverečky o rozměru 2x2 cm se s vzorkem dobře manipulovalo díky jeho vysoké tloušťce.

5.1.3 Výroba nanovláken vzorku LHA:FHA 70:20

Byl připraven roztok první kombinace lauroyl a furanyl hyaluronanu o koncentraci 3 hm. % v poměru 70 % lauroyl hyaluronanu, 20 % furanyl hyaluronanu a 10 % polyethylenglykolu. Navážky byly rozpuštěny v isopropylalkoholu s destilovanou vodou v poměru 50:50. Nejprve byl isopropylalkohol smíchán s destilovanou vodou a vzniklé rozpouštědlo bylo mícháno po dobu jedné hodiny. Poté byly za stálého míchání do rozpouštědla postupně přidány polyethylenglykol, lauroyl hyaluronan a furanyl hyaluronan. Roztok byl míchán, případně třepán do úplného rozpuštění a poté byl uzávěr lahve překryt parafilmem a uchováván v lednici.

Vzorek se díky nadbytku lauroyl hyaluronanu choval při zvláknování velice podobně jako čistý derivát. Výroba měla totožné podmínky a zvláknění také probíhalo rychle.

5.1.4 Výroba nanovláken vzorku LHA:FHA 45:45

Byl připraven roztok druhé kombinace lauroyl a furanyl hyaluronanu o koncentraci 3 hm. % v poměru 45 % furanyl hyaluronanu, 45 % lauroyl hyaluronanu a 10 % polyethylenglykolu. Navážky byly rozpuštěny v isopropylalkoholu s destilovanou vodou v poměru 50:50. Nejprve byl isopropylalkohol smíchán s destilovanou vodou a vzniklé rozpouštědlo bylo mícháno po dobu jedné hodiny. Poté byly za stálého míchání do rozpouštědla postupně přidány polyethylenglykol, lauroyl hyaluronan a furanyl hyaluronan. Roztok byl míchán, případně třepán do úplného rozpuštění a poté byl uzávěr lahve překryt parafilmem a uchováván v lednici.

Tato kombinace derivátů se také zvláknovala snadno, za stejných podmínek jako čistý lauroyl hyaluronan a vzorek s jeho nadbytkem.

5.1.5 Výroba nanovláken vzorku LHA:FHA 20:70

Byl připraven roztok třetí kombinace vzorků lauroyl a furanyl hyaluronanu o koncentraci 3 hm. % v poměru 70 % furanyl hyaluronanu, 20 % lauroyl hyaluronanu a 10 % polyethylenglykolu. Navážky byly rozpuštěny v isopropylalkoholu s destilovanou vodou v poměru 50:50. Nejprve byl isopropylalkohol smíchán s destilovanou vodou a vzniklé rozpouštědlo bylo mícháno po dobu jedné hodiny. Poté byly za stálého míchání do rozpouštědla postupně přidány polyethylenglykol, lauroyl hyaluronan a furanyl hyaluronan. Roztok byl míchán, případně třepán do úplného rozpuštění všech složek a poté byl uzávěr lahve překryt parafilmem a uchováván v lednici.

I přes fakt, že ve vzorku byl nadbytek furanyl hyaluronanu, který se zvlákněval hůře, měl i tento vzorek podmínky zvláknění podobné lauroyl hyaluronanu. Důvodem mohl být rozpouštědlový systém, kde byla použita kombinace isopropylalkoholu s destilovanou vodou.

5.1.6 Výroba nanovláken vzorku PEG

Byl připraven roztok polyethylenglykolu o koncentraci 5 hm. %. Navážka byly rozpuštěna za stálého míchání v destilované vodě. Roztok byl míchán do úplného rozpuštění a poté byl uzávěr lahve překryt parafilmem a uchováván v lednici.

Jak již bylo zmíněno v kap. 4.6, postup vláknění byl zde odlišný, avšak optimální podmínky nebylo obtížné nalézt a proces byl poměrně rychlý.

5.2 Výsledky analýzy nanovláken

5.2.1 Stanovení hmotnosti

Tabulka 2 ukazuje naměřené hodnoty hmotnosti pro jednotlivé vzorky i jejich gramáž na 1 m². Z hyaluronanů měl nejnižší gramáž vzorek LHA, který, jak ukazuje následující Tabulka 3, měl také nejmenší tloušťku. Celkově při porovnání těchto dvou tabulek můžeme říci, že hmotnost daných vzorků odpovídá jejich navlákněné tloušťce.

Tab. 2: Průměrná gramáž a plocha jednotlivých vzorků

Označení vzorku	Hmotnost (g)	Délka (cm)	Šířka (cm)	Plocha (cm ²)	Plocha (g/m ²)
LHA	0,00670	2	2	4	16,75
FHA	0,00912	2	2	4	22,80
LHA:FHA 70:20	0,00815	2	2	4	20,37
LHA:FHA 45:45	0,00928	2	2	4	23,20
LHA:FHA 20:70	0,00816	2	2	4	20,41
PEG	0,00513	2	2	4	12,83

5.2.2 Stanovení tloušťky nanovlákněné vrstvy a průměru vláken

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, průměrná tloušťka vzorků odpovídá jejich hmotnosti. Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 3.

Měření průměru vláken jednotlivých vzorků je uvedeno v Tabulce 4. Například vzorek LHA měl největší průměr vláken, měl však nejmenší hustotu vláken, což ukazuje Obrázek 16 (kap. 7.2.3).

Tab. 3: Stanovení tloušťky nanovláčkových vrstev

Označení vzorku	Průměrná tloušťka (μm)	Směrodatná odchylka:	Střední chyba průměru:
LHA	114,79	25,20	7,97
FHA	187,84	19,73	6,24
LHA_FHA 70:20	146,51	15,49	4,90
LHA_FHA 45:45	164,85	22,20	7,02
LHA_FHA 20:70	119,22	11,60	3,67
PEG	67,44	10,44	3,30

Tab. 4: Stanovení průměru vláken daných nanovláčkových vrstev

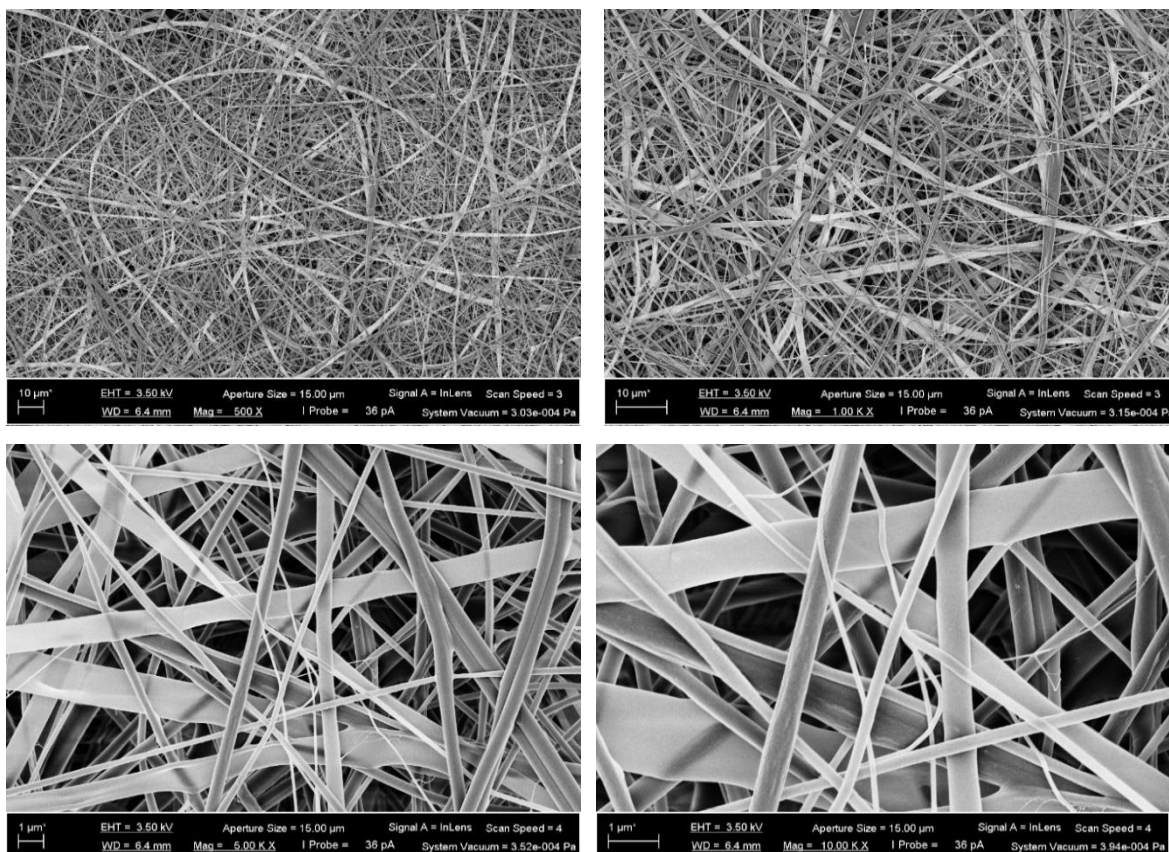
Označení vzorku	Průměrná tloušťka (nm)	Směrodatná odchylka:	Střední chyba průměru:
LHA	279,82	67,41	12,30
FHA	131,22	27,88	5,09
LHA_FHA 70:20	189,49	39,10	7,14
LHA_FHA 45:45	238,41	38,66	7,06
LHA_FHA 20:70	175,29	39,96	7,29
PEG	231,41	31,83	5,81

5.2.3 Výsledky mikroskopické analýzy připravených nanovláken

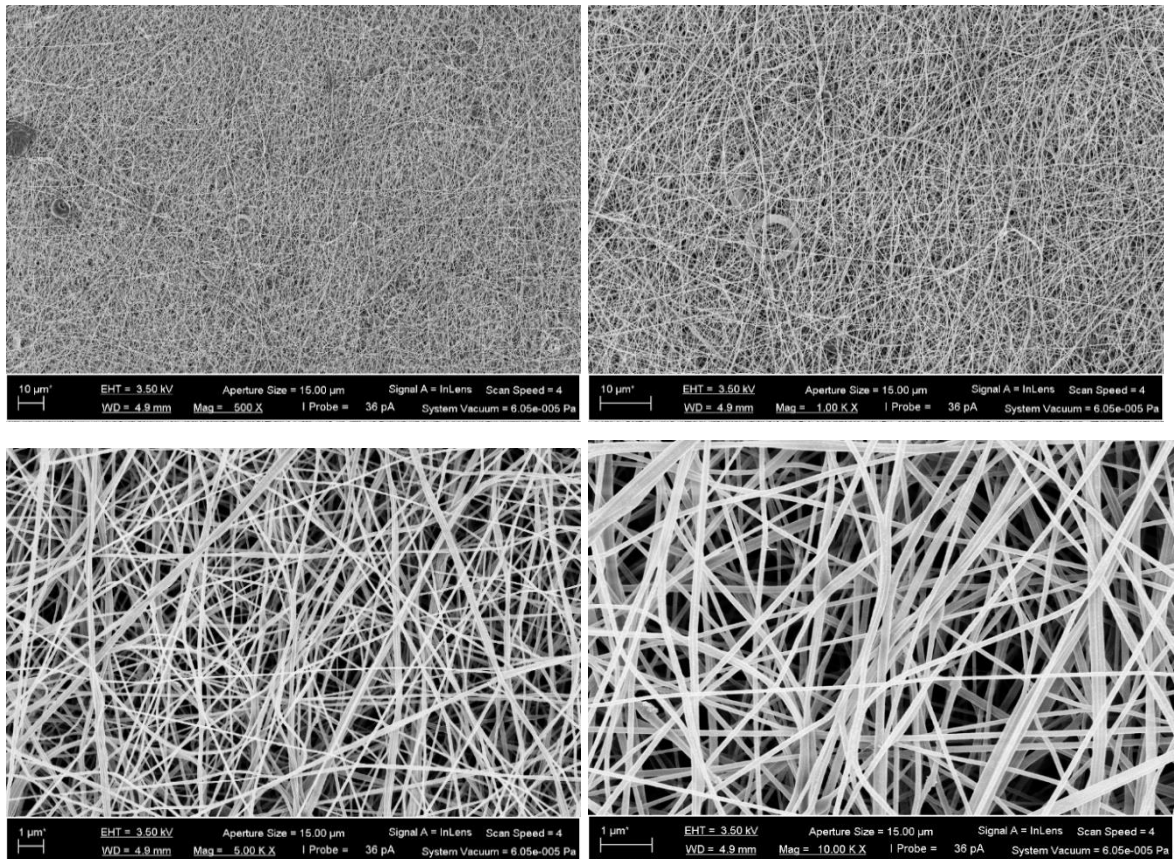
Na Obrázku 16 byly pořízeny fotky z rastrovacího elektronového mikroskopu vzorku LHA při zvětšení 500x, 1 000x, 5 000x a 10 000x. Obrázek potvrzuje výsledky uvedené v Tabulce 4, která uvádí, že vzorek LHA měl průměr vláken nejvyšší, a to průměrně 279,82 nm. Tato hodnota neměla vliv na tloušťku samotných vrstev. Hustota vláken nebyla tolik vysoká, jako tomu bylo u jiných vzorků.

Na Obrázku 17 byly vyobrazeny snímky vzorku FHA při zvětšení 500x, 1 000x, 5 000x a 10 000x. Oproti vzorku LHA (Obrázek 16) je vidět značný rozdíl v průměru vláken. Již od pohledu je znát, že jsou vlákna asi poloviční šířky, to potvrzuje Tabulka 4, která uvádí průměrnou hodnotu 131,22 nm. Hustota vláken byla vyšší než u vzorku LHA.

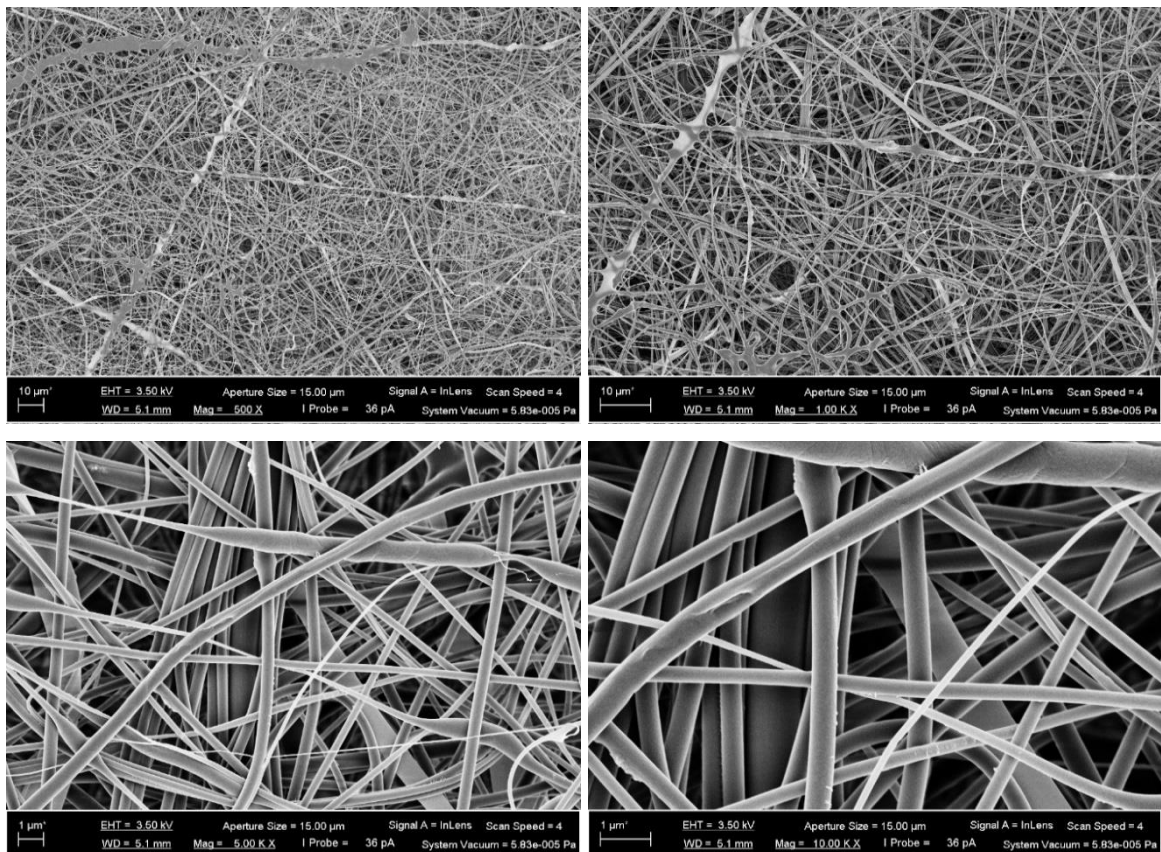
Na Obrázku 18 byly pořízeny snímky vzorku LHA:FHA 70:20. Průměrná šířka vláken tohoto vzorku byla 189,49 nm. Hustota vláken byla z kombinovaných vzorků nejnižší. Důvodem může být vyšší obsah vzorku LHA, tudíž vzorek by měl mít podobné vlastnosti. Snímky vzorku LHA:FHA 45:45 jsou vyobrazeny na Obrázku 19. Z kombinovaných vzorků měl tento největší průměr vláken. Hustota vláken a zakroucení připomínala pavučinu. Snímky posledního kombinovaného vzorku LHA:FHA 20:70 byly lze pozorovat na Obrázku 20. Snímky velmi připomínají vzorek čistého furanyl hyaluronanu z Obrázku 17, který byl v tomto vzorku obsažen ve vyšší míře. Při testech bobtnavosti se oba vzorky chovaly prakticky totožně. Snímky na Obrázku 21 patřily vzorku polyethylenglykolu. Při nejmenším zvětšení 500x vlákna vzorku působí tence. Při maximálním zvětšení 10 000x je však patrné, že opak je pravdou. Důvodem může být opravdu velká hustota vláken.



Obr. 16: Snímky vzorku LHA pořízené na SEM při zvětšení 500x, 1 000x, 5 000x a 10 000x

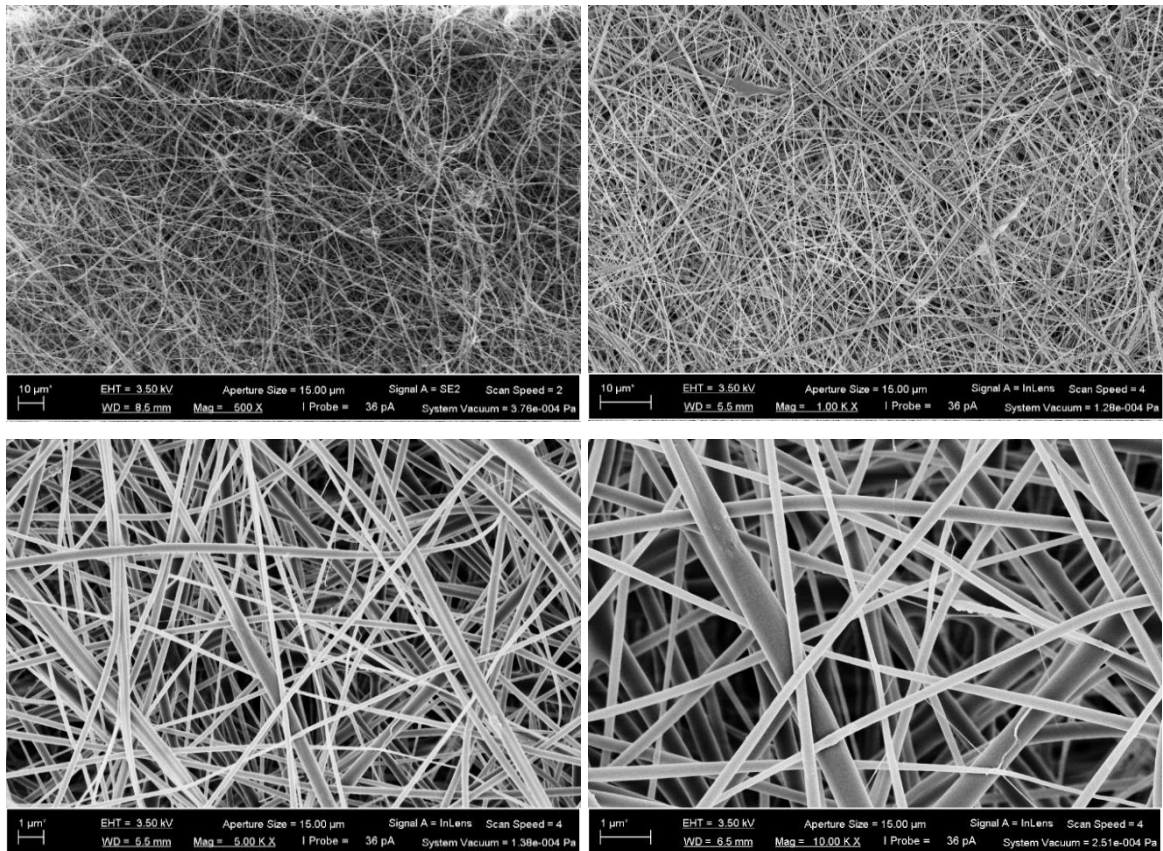


Obr. 17: Snímky vzorku FHA pořízené na SEM při zvětšení 500x, 1 000x, 5 000x a 10 000x

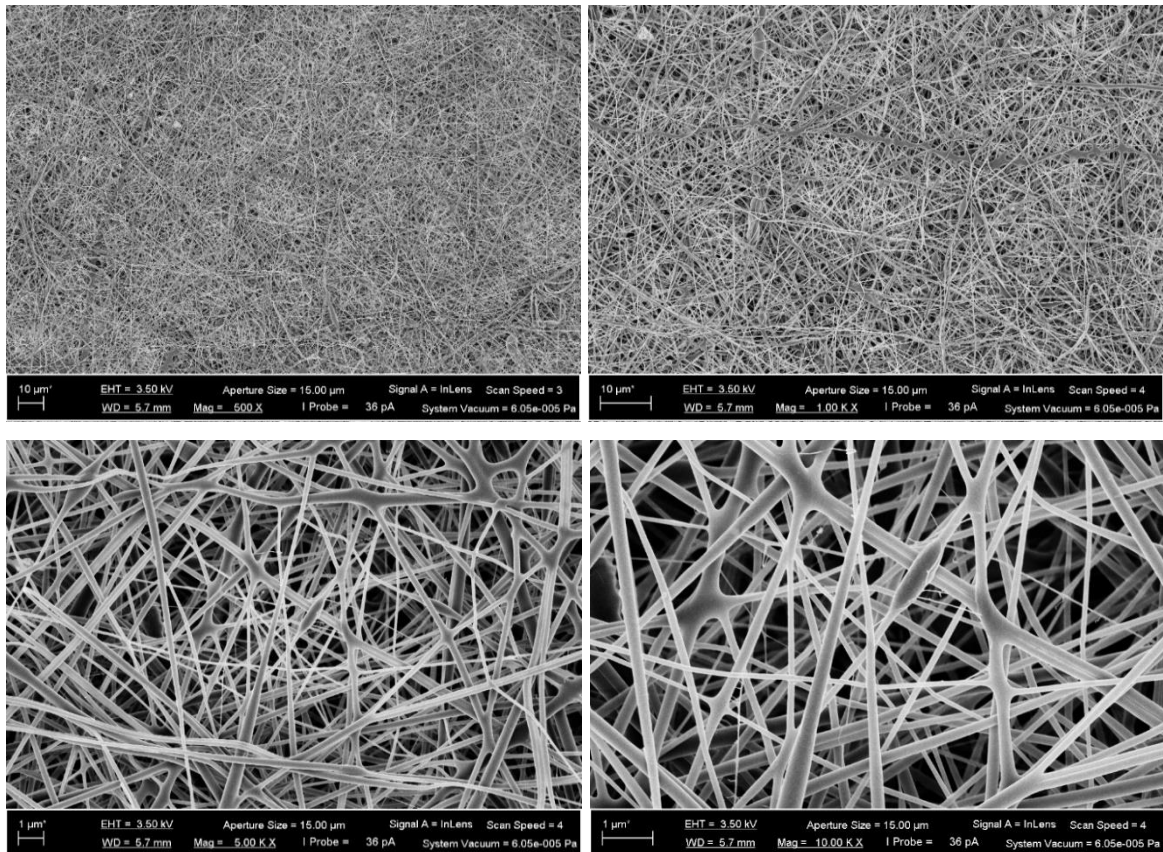


Obr. 18: Snímky vzorku LHA:FHA 70:20 pořízené na SEM při zvětšení 500x, 1 000x,

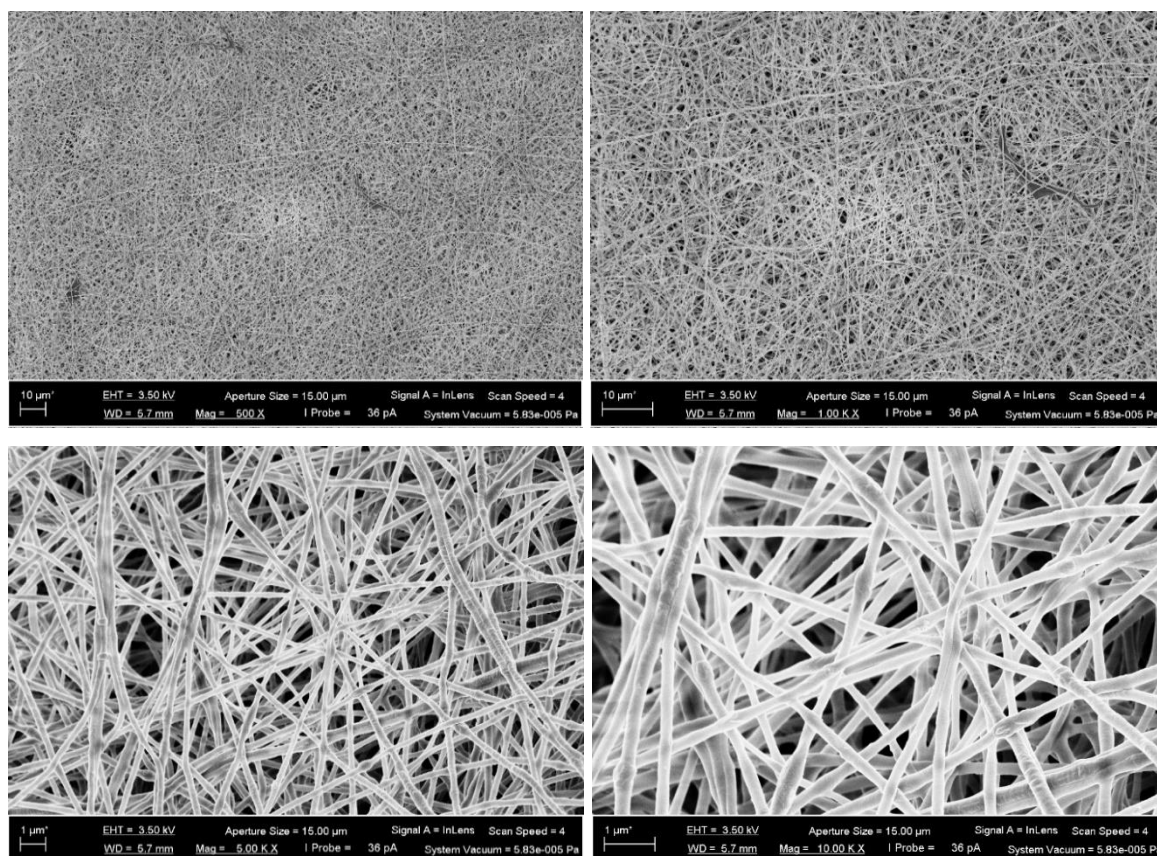
5 000x a 10 000x



Obr. 19: Snímky vzorku LHA:FHA 45:45 pořízené na SEM při zvětšení 500x, 1 000x, 5 000x a 10 000x



Obr. 20: Snímky vzorku LHA:FHA 20:70 pořízené na SEM při zvětšení 500x, 1 000x, 5 000x a 10 000x



Obr. 21: Snímky vzorku PEG pořízené na SEM při zvětšení 500x, 1 000x, 5 000x a 10 000x

5.3 Biodegradace nanovláken

5.3.1 Výsledky mineralizace

Byla zkoumána mineralizace vzorků LHA, FHA, LHA:FHA 70:20, LHA:FHA 45:45, PEG a PHB jako kontrola po dobu 75 dnů při teplotě 25 °C. Rozklad probíhal poměrně rychle. Z toho důvodu bylo nutné téměř po každém měření lahve se vzorky provzdušnit, aby bylo mikroorganismům dodán kyslík. Celkový průběh mineralizace vyobrazuje Obrázek 22.

Mineralizace vzorku lauroyl hyaluronanu probíhala v prvním měsíci experimentu poměrně lineárně a již po 29 dnech přesáhla 50 %. Po čtyřiceti dnech od zahájení pokusu rozklad mírně zpomalil. I přes tento fakt byl tento vzorek rozložen nejvíce ze všech. Na konci experimentu bylo dosaženo rozkladu z 83 %. Na rychlost biodegradace mohla mít vliv nižší hustota vláken vzorku. LHA byl pravděpodobně zcela degradován, jelikož degradace dosáhla 84 %, ve vzorku se nacházelo 90 % LHA a 10 % PEG.

U vzorku furanyl hyaluronanu byl počátek mineralizace nejvíce prudký. Již po šesti dnech byl zmineralizován z 33 %. Poté byl rozklad již pozvolný, došlo k poklesu nárůstu procent mineralizace. Od devatenáctého dne byl růst mineralizace již nízký s konečnou hodnotou

58 %. Tento derivát nebyl tedy na konci experimentu zcela degradován. Na začátku byly pravděpodobně degradovány části řetězce, které lépe podléhaly abiotické hydrolyze a biodegradaci. Část řetězce FHA byla zřejmě v daném časovém intervalu rozložena (STLOUKAL, 2015).

Mineralizace prvního kombinovaného vzorku hyaluronanů v poměru LHA:FHA 70:20 byla také téměř lineární do až do 39. dne, kdy byl vzorek zmineralizován ze 46 %. Od tohoto dne již došlo k výraznému poklesu mineralizace s konečnou hodnotou 52 %. U tohoto vzorku došlo z neznámého důvodu k velkému rozptylu hodnot u jednotlivých měření. Jedno měření bylo nutné vyřadit z experimentu z důvodu značně odlišných hodnot.

Mineralizace druhého kombinovaného vzorku v poměru LHA:FHA 45:45 byla velmi podobná předchozímu vzorku. Průběh mineralizace byl téměř totožný a na konci experimentu byla dosažena hodnota mineralizace také 52 %.

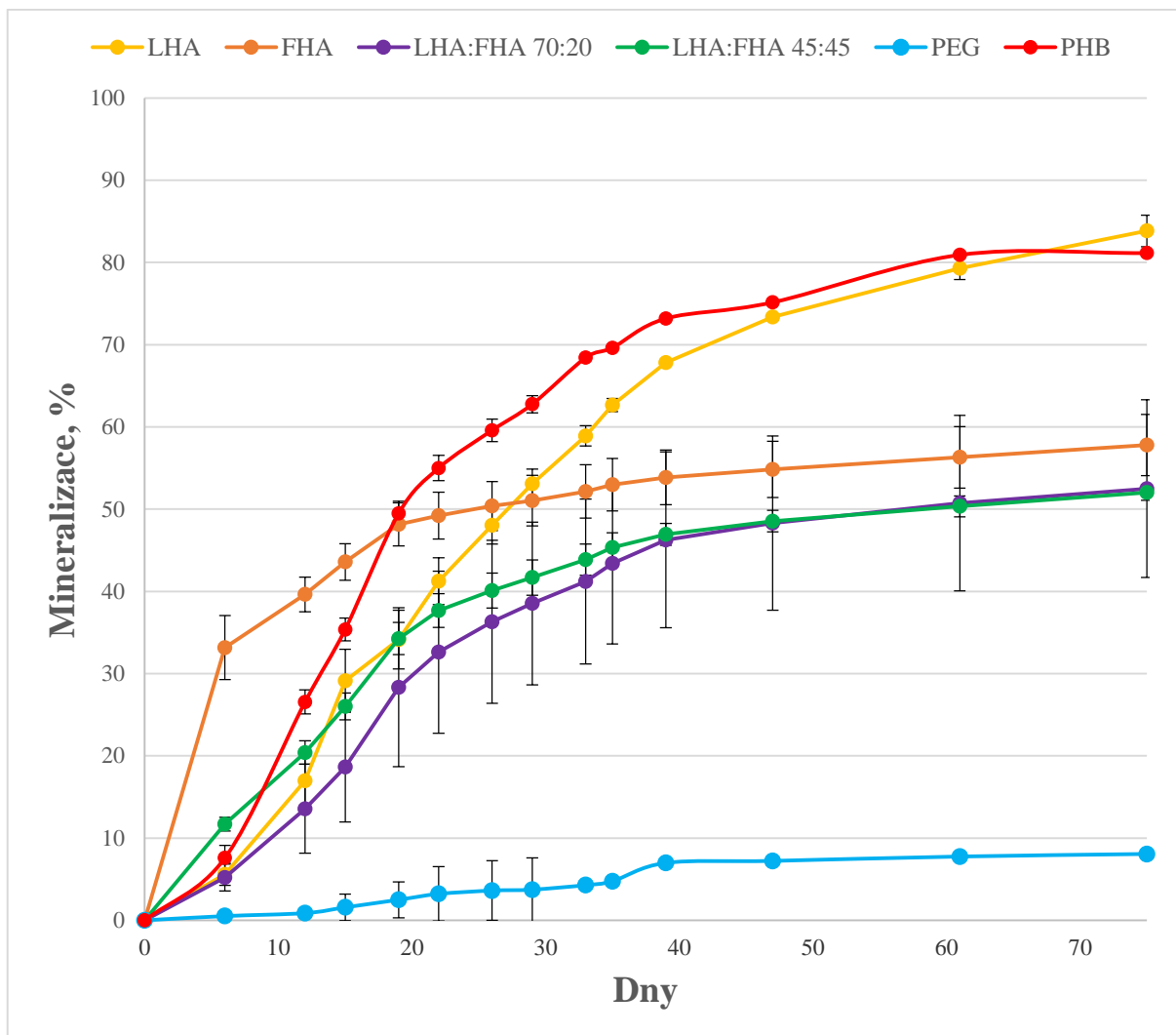
Zajímavým zjištěním je to, že nebyl pozorován pozitivní vliv většího přídavku LHA na rychlost biodegradace směsných vzorků LHA a FHA.

Mineralizace čistého polyethylenglykolu byla velmi pozvolná. Nejdříve došlo pravděpodobně k rozkladu nízkomolekulárních částí řetězce. Po 39 dnech byla už degradace materiálu minimální. Konečná hodnota mineralizace se zastavila na 8 %. Na biodegradaci PEG má značný vliv teplota. Vývoj mineralizace souhlasí např. se studií Abdalla a kol., kteří sledovali mineralizaci v tropické půdě při 25 °C. Nárůst mineralizace v této studii byl také pozorován na začátku inkubace a poté došlo k výraznému zpomalení (ABDALLA, 2005).

Kontrolní vzorek polyhydroxybutyrátu ve formě prášku měl průběh mineralizace podobný jako vzorek lauroyl hyaluronanu. Zakřivený přímky nastalo také 39. den pokusu. Na konci měření se hodnota zastavila na 81 % mineralizace.

Molekulová hmotnost má vliv na rychlost degradace hyaluronové kyseliny, proto lze předpokládat také vliv na rychlost degradace jejích derivátů (SNETKOV, 2020).

Z trendu křivek v grafu mineralizace lze předpokládat, že k rapidní biodegradaci derivátů HA došlo v prvních 40 dnech. Křivky kopírují trend vývoje mineralizace vzorku čistého PEG. Lze se proto domnívat, že PEG měl na rychlost biodegradace ve směsi s deriváty HA vliv.



Obr. 22: Průběh mineralizace analyzovaných vzorků

5.3.2 Výsledky izolace DNA

Po izolaci DNA ze vzorků byla stanovena její koncentrace po 7 dnech inkubace. Koncentrace byla stanovena především proto, aby bylo potvrzeno, že se ze vzorků a z půdy podařilo izolovat DNA. Izolovaná DNA bude použita pro další analýzu, která již není předmětem DP. Během izolace byla získána DNA od všech přítomných mikroorganismů – živých, mrtvých i subletálně poškozených. Výsledky stanovení jsou uvedeny v Tabulce 5. Nejvyšší hodnoty koncentrace mikrobiální DNA byly naměřeny ve vzorcích furanyl hyaluronanu a polyethylenglykolu, u nichž byl pro analýzu odebrán vzorek půdy o hmotnosti 0,5 g z inkubační lahve, jelikož nebylo možné odebrat samotný analyzovaný vzorek. Tyto vzorky byly totiž oba v půdě obtížně viditelné. Množství vzorku pro izolaci DNA tak bylo výrazně vyšší než při izolaci přímo z filmu.

Teoreticky platí, že čím vyšší je koncentrace DNA, tím více mikroorganismů se muselo vyskytovat ve vzorku. Rozdíly mezi jednotlivými vzorky byly velmi malé. Nelze tedy usoudit, zda se v inkubacích, ve kterých byly rychleji degradované materiály, vyskytovalo více mikroorganismů. Vzhledem k tomu, že vzorky bylo možno odebrat pouze v prvních dnech experimentu, nemusely být degradační mikroorganismy ještě pomnoženy a biodegradace mohla být způsobena spíše abiotickými faktory.

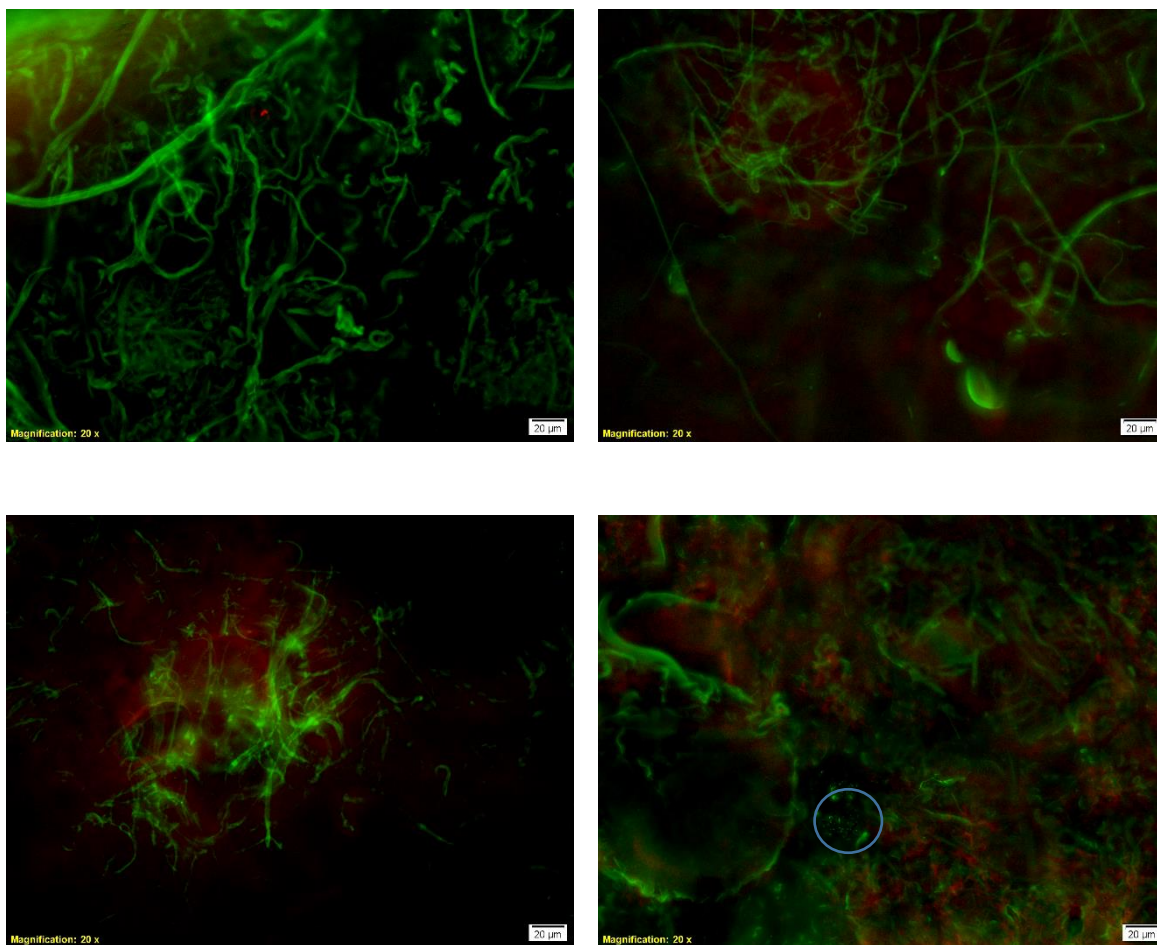
*Tab. 5: Koncentrace DNA mikroorganismů
obsažených v analyzovaných vzorcích*

Vzorek	Koncentrace DNA (ng/μl)
LHA	7,5
FHA	137,4
LHA:FHA 70:20	15,9
LHA:FHA 45:45	14,6
PEG	140,9

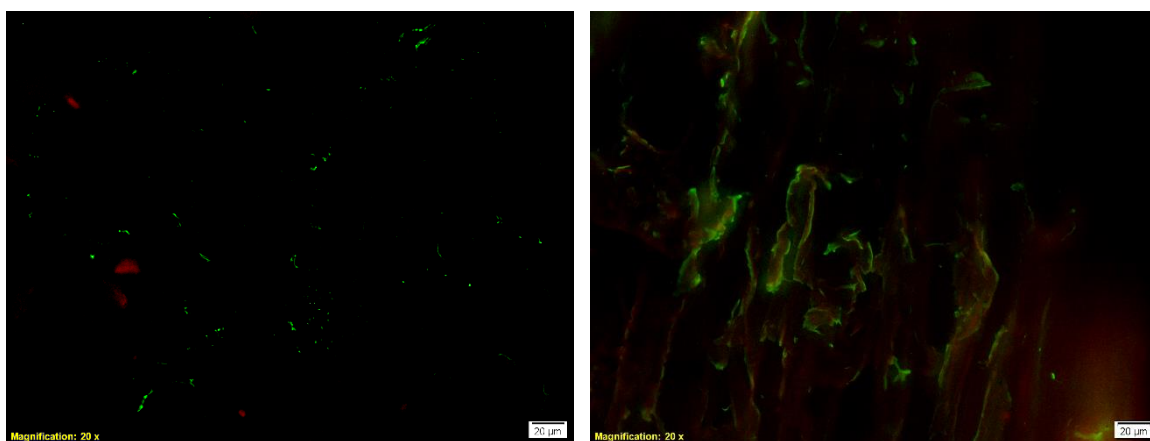
5.3.3 Výsledky fluorescenční mikroskopie

K identifikaci byl použit fluorescenční mikroskop typu BX53M od společnosti Olympus. S filmy se po vytažení z inkubačních lahví velmi špatně manipulovalo, jelikož byly obaleny půdou a měly tendenci se rozpadat při snaze o odstranění přebytečné půdy. Tímto bylo pozorování značně ztíženo. Vzorek FHA nebylo možno po více než 3 dnech z inkubací odebrat. Vzhledem k rychlosti degradace na počátku je pravděpodobné, že v prvních dnech probíhal rozklad především pomocí abiotické hydrolýzy. S tím souhlasí i výsledky pozorování pomocí fluorescenčního mikroskopu. Povrch vzorků nebyl pokryt mikrobiálním biofilmem, vyskytovaly se zde především jednotlivé bakteriální kolonie. Na povrchu, který obsahoval LHA:FHA v poměru 45:45 byl pozorován největší výskyt mikroorganismů. To mohlo být způsobeno tím, že povrch vzorku byl vhodný pro adhezi mikroorganismů. Vzorky FHA a PEG byly v půdě obtížně dohledatelné, ostatní vzorky v půdě značně zmenšily svou plochu a byly lehce obaleny půdou. Mikroorganismy jsou na obrázcích označeny modře. Zelené a červené skvrny byly způsobeny autofluorescencí vzorku. Barvivo mohlo být také absorbováno do prasklin a trhlin v materiálu (KIJCHAVENGKUL, 2010). Na obrázcích lze pozorovat nárůst množství mikroorganismů v průběhu inkubace.

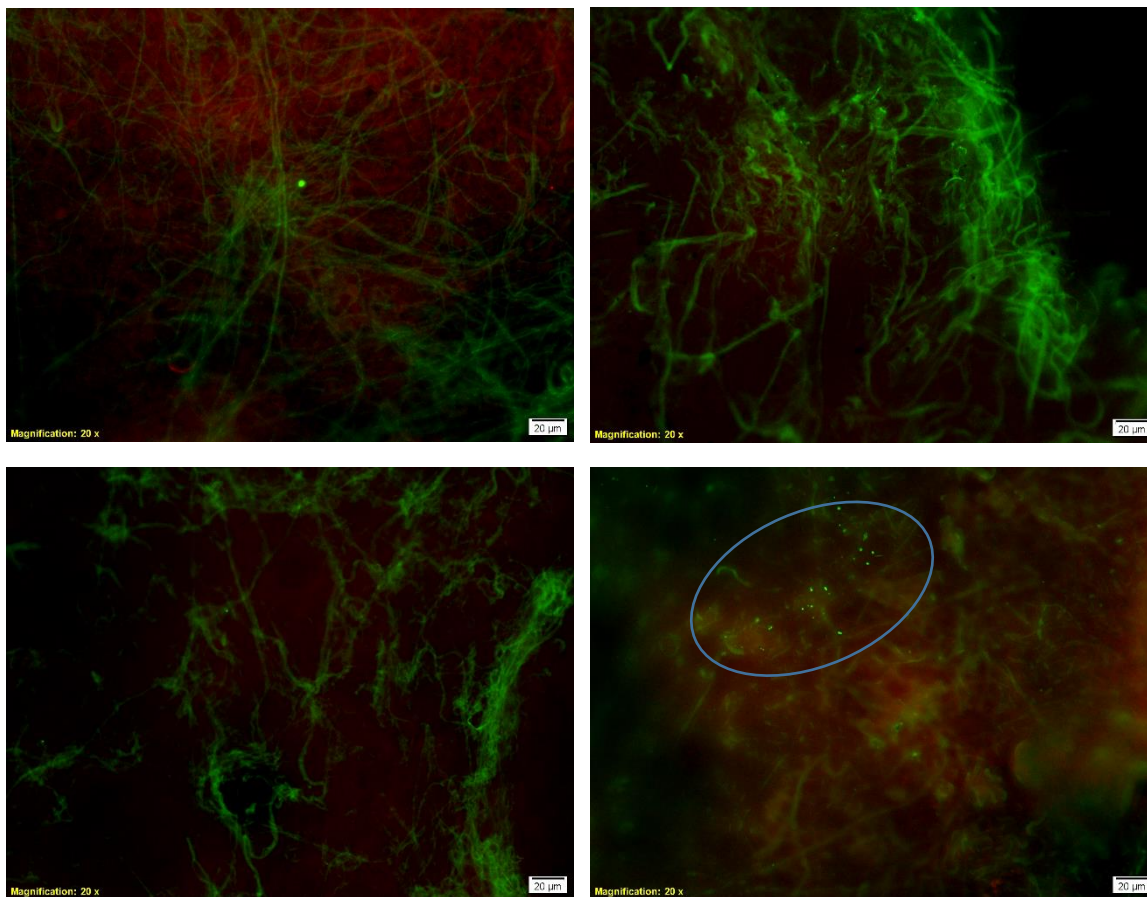
Výsledky pozorování jsou vyobrazeny na Obrázcích 23 – 26.



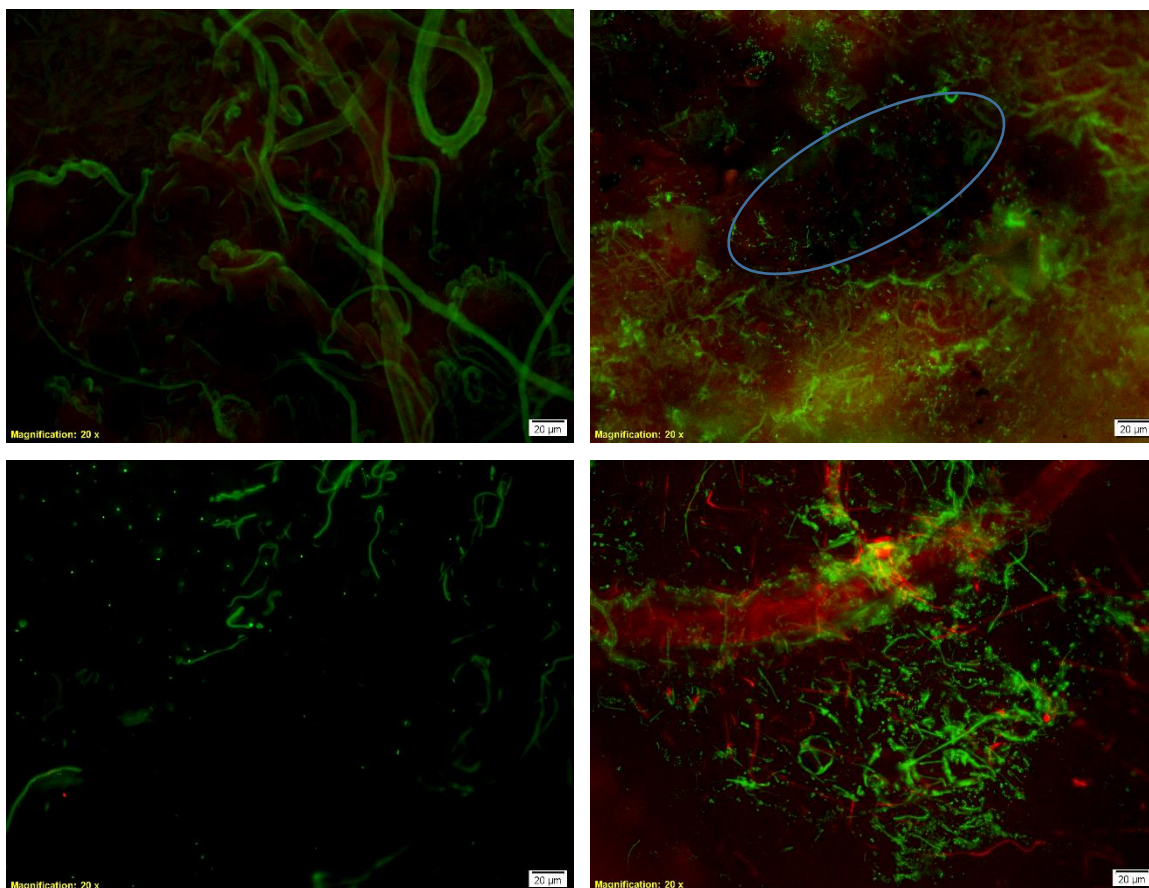
Obr. 23: Snímky vzorku LHA na fluorescenčním mikroskopu po 1, 3, 5 a 7 dnech mineralizace. Zvětšeno 200x.



Obr. 24: Snímky vzorku FHA na fluorescenčním mikroskopu po 1 a 3 dnech mineralizace



Obr. 25: Snímky vzorku LHA:FHA 70:20 na fluorescenčním mikroskopu po 1, 3, 5 a 7 dnech mineralizace



Obr. 26: Snímky vzorku LHA:FHA 45:45 na fluorescenčním mikroskopu po 1, 3, 5 a 7 dnech mineralizace. Zvětšení 200x. Mikroorganismy jsou patrné jako zelené řetízky (vlákna) a jednotlivé kolonie.

ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala přípravou nanovláknenných vrstev derivátů kyseliny hyaluronové metodou elektrospinning a následnou biodegradací těchto vzorků v půdě. Zvoleny byly deriváty lauroyl hyaluronan (LHA) a furanyl hyaluronan (FHA). Byly také zkoumány vzájemné kombinace těchto derivátů.

Byly připraveny polymerní roztoky vzorků rozpuštěním derivátů s polyethylenglykolem v rozpouštědle. Při samotném zvlákňování byly hledány vhodné podmínky procesu. Vzdušná vlhkost byla udržována v rozmezí od 5 % do 20 % v závislosti na daném vzorku. Při zvlákňování bylo také nutné vysoké napětí. To bylo nastaveno v rozmezí 56 – 60 kV. Vzdálenost mezi emitorem a kolektorem byla 15 – 22 cm a teplota v laboratoři byla do 25 °C.

Připravené nanovláknenné vrstvy se poté podrobily analýze. Byla zkoumána jejich tloušťka, gramáž, bobtnavost a průměry vláken. Tloušťka materiálů se pohybovala od 110 do 190 μm s gramáží od 16 do 24 g/m^2 . Tloušťka vláken byla od 130 do 280 nm.

Biodegradabilita vyrobených vzorků byla zkoumána v půdě při 25 °C. Vzorek LHA se ukázal jako velmi dobře rozložitelný. Na konci experimentu bylo u něj dosaženo rozkladu 83 %. Rozklad vzorku FHA probíhal první týden velmi prudce a poté proces zpomalil, až byl poté nárůst téměř minimální. Výsledně byl rozložen z 58 %. Mineralizace kombinovaného vzorku LHA:FHA 70:20 byla stejně jako čistého LHA z počátku téměř lineární. Byl však rozložen pouze z 52 %. Biodegradace druhého kombinovaného derivátu LHA:FHA 45:45 měla v podstatě totožný průběh, dokonce se stejným výsledkem. Použitý poměr LHA a FHA není pro rychlost biodegradace určující, smíchání derivátů značně snižuje rychlost biodegradace oproti čistému LHA. U vzorku polyethylenglykolu byla mineralizace velmi pozvolná. Důvodem mohou být alkoholové skupiny, které jsou distribuovány v makromolekulárním prostoru. Tato konformace může způsobovat potíže, když je na konce cílen enzymatický útok (KAWAI, 2001). Při ukončení experimentu byl rozložen z 8 %. Jako kontrola experimentu byl použit vzorek PHB, jehož průběh mineralizace byl velmi podobný vzorku LHA. Jeho hodnota mineralizace se zastavila na 81 %.

Vzorky byly také pozorovány pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu. Bylo zde vypořazováno, že vzorek LHA měl nejvyšší průměr vláken, ale malou hustotu. To může být jedním z důvodů jeho rychlého rozkladu. Rozklad ostatních vzorků (kromě PEG) byl přes

50 % a hustota všech byla značně vyšší, což by potvrzovalo domněnku, že má hustota vláken vliv na jejich rozklad.

K pozorování mikroorganismů byl použit fluorescenční mikroskop, pomocí kterého byly detekovány živé i mrtvé buňky na vzorcích v průběhu mineralizace. Vzorčky byly pravděpodobně v první fázi inkubace degradovány působením abiotických faktorů, jelikož na jejich povrchu byly v prvních dnech pozorovány pouze samostatné mikrobiální kolonie.

Byla také izolována DNA a změřena její koncentrace. DNA bude využita pro další analýzy.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ABDALLA, A. L. ; REGITANO, J. B. ; TORNISIELO, V. L. ; MARCHESE, L. ; PEÇANHA, M. R.S.R. ; VITTI, D. M.S.S. ; SMITH, T.: Biodegradation of polyethylene glycol (PEG) in three tropical soils using radio labelled PEG. In: *Animal Feed Science and Technology*. Bd. 122 : Elsevier, 2005, S. 187–193
- AHN, Y. C. ; PARK, S. K. ; KIM, G. T. ; HWANG, Y. J. ; LEE, C. G. ; SHIN, H. S. ; LEE, J. K.: Development of high efficiency nanofilters made of nanofibers. In: *Current Applied Physics* Bd. 6, Elsevier (2006), Nr. 6 SPEC. ISS., S. 1030–1035
- AMADO, ISABEL R. ; VÁZQUEZ, JOSÉ A. ; PASTRANA, LORENZO ; TEIXEIRA, JOSÉ A.: Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. In: *Food Chemistry* Bd. 198, Elsevier Ltd (2016), S. 54–61
- ARSLAN, NAZLI PINAR ; AYDOGAN, MEHMET NURI: Evaluation of Sheep Wool Protein Hydrolysate and Molasses as Low-Cost Fermentation Substrates for Hyaluronic Acid Production by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246. In: *Waste and Biomass Valorization* Bd. 12, Springer Science and Business Media B.V. (2021a), Nr. 2, S. 925–935
- ARSLAN, NAZLI PINAR ; AYDOGAN, MEHMET NURI: Evaluation of Sheep Wool Protein Hydrolysate and Molasses as Low-Cost Fermentation Substrates for Hyaluronic Acid Production by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246. In: *Waste and Biomass Valorization* Bd. 12, Springer Science and Business Media B.V. (2021b), Nr. 2, S. 925–935
- BHATT, PRIYANKA ; TREHAN, SONIA ; INAMDAR, NAZMA ; MOURYA, VISHNUKANT K. ; MISRA, AMBIKANANDAN: Polymers in Drug Delivery: An Update. In: *Applications of Polymers in Drug Delivery* : Elsevier, 2021, S. 1–42
- BLAŽKOVÁ, LENKA ; PILAŘOVÁ, KATEŘINA ; KUŽELOVÁ KOŠŤÁKOVÁ, EVA ; MORÁVKOVÁ, JAROSLAVA: *PRODUCTION OF SCAFFOLDS FOR ARTIFICIAL CARTILAGE BY CENTRIFUGAL SPINNING*, 2014
- COLLINS, MAURICE N. ; BIRKINSHAW, COLIN: Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering - A review. In: *Carbohydrate Polymers* Bd. 92, Carbohydr Polym (2013), Nr. 2
- DEVILLE, JAY P: *Inhibition of Hydrolytic Degradation in Ester-Based Invert Emulsion*

Drilling Fluids, 2010

DUCHACEK, VRATISLAV: *Polymery - výroba, vlastnosti, zpracování, použití (strana 001/280)*, 2006 — ISBN 80-7080-617-6

FUKUSHIMA, KIKKU ; WU, MENG HSIU ; BOCCHINI, SERGIO ; RASYIDA, AMALIYA ; YANG, MING CHIEN: PBAT based nanocomposites for medical and industrial applications. In: *Materials Science and Engineering C* Bd. 32, Mater Sci Eng C Mater Biol Appl (2012), Nr. 6, S. 1331–1351

GRIMA, SOPHIE ; BELLON-MAUREL, VÉRONIQUE ; FEUILLOLEY, PIERRE ; SILVESTRE, FRANÇOISE: *Aerobic Biodegradation of Polymers in Solid-State Conditions: A Review of Environmental and Physicochemical Parameter Settings in Laboratory Simulations*. Bd. 8, 2000

GU, JI DONG: Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: Recent research advances. In: *International Biodeterioration and Biodegradation* Bd. 52, Elsevier Ltd (2003), Nr. 2, S. 69–91

GUPTA, V. B.: Structural principles of polymeric fibres. In: *Manufactured Fibre Technology* : Springer Netherlands, 1997, S. 14–30

HERMAN, MARK: *Encyclopedia of Polymer Science and Technology, 15 Volume Set, 4th Edition* / Wiley, 2014 — ISBN 978-1-118-63389-2

HESS, M ; JONES, ; R G ; KRATOCHVÍL, ; P: *Associate Member from 1996, Titular Member from 1998, Chairman from 2000*); K. Horie (Japan, Associate Member from 1996. Bd. 74, 2002

HIRAIISHI, TOMOHIRO ; HIRAHARA, YOKO ; DOI, YOSHIHARU ; MAEDA, MIZUO ; TAGUCHI, SEIICHI: Effects of mutations in the substrate-binding domain of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] (PHB) depolymerase from *Ralstonia pickettii* T1 on PHB degradation. In: *Applied and Environmental Microbiology* Bd. 72, American Society for Microbiology (ASM) (2006), Nr. 11, S. 7331–7338

HUERTA-ÁNGELES, GLORIA ; KNOTKOVÁ, KATEŘINA ; KNOTEK, PETR ; ŽIDEK, ONDREJ ; BRANDEJSOVÁ, MARTINA ; POKORNÝ, MAREK ; VAGNEROVÁ, HANA ; ROY, IPSITA ; U. A.: Aligned nanofibres made of poly(3-hydroxybutyrate) grafted to hyaluronan for potential healthcare applications. In: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* Bd. 29, Springer New York LLC (2018), Nr. 3

- HUERTA ÁNGELES, GLORIA ; NEŠPOROVÁ, KRISTINA: Hyaluronan and its derivatives for ophthalmology: Recent advances and future perspectives. In: *Carbohydrate Polymers* Bd. 259, Elsevier Ltd (2021)
- JENDROSSEK, DIETER: Microbial degradation of polyesters: A review on extracellular poly(hydroxy alcanoic acid) depolymerases. In: *Polymer Degradation and Stability* Bd. 59, Elsevier Ltd (1998), Nr. 1–3
- KAWAI, FUSAKO: Biodegradation of Polyethers (Polyethylene Glycol, Polypropylene Glycol, Polytetramethylene glycol, and Others). In: MATSUMURA, S. ; STEINBÜCHEL, A. (Hrsg.): *Biopolymers Online* : Wiley, 2001
- KIJCHAVENGKUL, THITISILP ; AURAS, RAFAEL ; RUBINO, MARIA ; SELKE, SUSAN ; NGOUAJIO, MATHIEU ; FERNANDEZ, R. THOMAS: Biodegradation and hydrolysis rate of aliphatic aromatic polyester. In: *Polymer Degradation and Stability* Bd. 95 (2010), Nr. 12, S. 2641–2647
- KRAUSE, TODD L ; BITTNER, GEORGE D: *Rapid morphological fusion of severed myelinated axons by polyethylene glycol (nerve regeneration/axolemmal fusion/cytoplasmic repair/Lumbricus terrestris)*. Bd. 87, 1990
- KYRIKOU, IOANNA ; BRIASSOULIS, DEMETRES: Biodegradation of agricultural plastic films: A critical review. In: *Journal of Polymers and the Environment* Bd. 15, Springer (2007), Nr. 2
- LEJA, K. ; LEWANDOWICZ, G.: Polymer Biodegradation and Biodegradable Polymers - a Review. In: *undefined* (2010)
- LO, GRACE H. ; LAVALLEY, MICHAEL ; MCALINDON, TIMOTHY ; FELSON, DAVID T.: Intra-articular Hyaluronic Acid in Treatment of Knee Osteoarthritis: A Meta-analysis. In: *Journal of the American Medical Association* Bd. 290 (2003), Nr. 23
- LUCAS, NATHALIE ; BIENAIME, CHRISTOPHE ; BELLOY, CHRISTIAN ; QUENEUDEC, MICHÈLE ; SILVESTRE, FRANÇOISE ; NAVA-SAUCEDO, JOSÉ EDMUNDO: Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques - A review. In: *Chemosphere* Bd. 73, Chemosphere (2008), Nr. 4
- LUGAUSKAS, ALBINAS ; LEVINSKAITE, LORETA ; PEČIULYTE, DALIA: Micromycetes as deterioration agents of polymeric materials. In: *International Biodeterioration and Biodegradation* Bd. 52, Elsevier Ltd (2003), Nr. 4, S. 233–242

- LUO, C. J. ; STOYANOV, SIMEON D. ; STRIDE, E. ; PELAN, E. ; EDIRISINGHE, M.: Electrospinning versus fibre production methods: From specifics to technological convergence. In: *Chemical Society Reviews* Bd. 41, Chem Soc Rev (2012), Nr. 13, S. 4708–4735
- MELLADO, PAULA ; MCILWEE, HOLLY A. ; BADROSSAMAY, MOHAMMAD R. ; GOSS, JOSUE A. ; MAHADEVAN, L. ; KIT PARKER, KEVIN: A simple model for nanofiber formation by rotary jet-spinning. In: *Applied Physics Letters* Bd. 99, American Institute of Physics AIP (2011), Nr. 20, S. 203107
- MUELLER, ROLF JOACHIM: Biological degradation of synthetic polyesters-Enzymes as potential catalysts for polyester recycling. In: *Process Biochemistry* Bd. 41, Elsevier (2006), Nr. 10, S. 2124–2128
- MUTHURAJ, RAJENDRAN ; MISRA, MANJUSRI ; MOHANTY, AMAR KUMAR: Biodegradable Poly(butylene succinate) and Poly(butylene adipate-co-terephthalate) Blends: Reactive Extrusion and Performance Evaluation. In: *Journal of Polymers and the Environment* Bd. 22, Springer New York LLC (2014), Nr. 3, S. 336–349
- NARAYAN, R.: *Proceedings of the International Composting Research Symposium, Eds., H.A.J. Hoiting and H.M. Kenner, Renaissance Publications, Worthington, OH, USA, 1993* - Hledat Googlem. URL <https://www.google.com/search?q=R.+Narayan+in+Proceedings+of+the+International+Composting+Research+Symposium%2C+Eds.%2C+H.A.J.+Hoiting+and+H.M.+Kenner%2C+Renaissance+Publications%2C+Worthington%2C+OH%2C+USA%2C+1993&oq=R.+Narayan+in+Proceedings+of+the+Inte.> - abgerufen am 2021-03-15
- NAYAK, RAJKISHORE ; PADHYE, RAJIV ; KYRATZIS, ILLIAS LOUIS ; TRUONG, YEN BACH ; ARNOLD, LYNDON: Recent advances in nanofibre fabrication techniques. In: *Textile Research Journal* Bd. 82 (2012), Nr. 2, S. 129–147
- NECAS, JIRI ; BARTOSIKOVA, L. ; BRAUNER, P. ; KOLAR, J.: Hyaluronic acid (hyaluronan): A review. In: *Veterinarni Medicina* Bd. 53, Czech Academy of Agricultural Sciences (2008), Nr. 8, S. 397–411
- OHKAWA, KOUSAKU ; KIM, HAKYONG ; LEE, KEUNHYUNG: *Biodegradation of Electrospun Poly(*ε*-caprolactone) Non-woven Fabrics by Pure-Cultured Soil Filamentous Fungi*, 2004

- PERSANO, LUANA ; CAMPOSEO, ANDREA ; TEKMEŇ, CAGRI ; PISIGNANO, DARIO: Industrial upscaling of electrospinning and applications of polymer nanofibers: A review. In: *Macromolecular Materials and Engineering* Bd. 298 (2013), Nr. 5
- PILLA, SRIKANTH ; PILLA, S. (Hrsg.): *Handbook of Bioplastics and Biocomposites Engineering Applications*. Hoboken, NJ, USA : John Wiley & Sons, Inc., 2011 — ISBN 9781118203699
- PLISKO, TATIANA V. ; BILDYUKEVICH, ALEXANDR V. ; ZHAO, LIANG ; HUANG, WEIQING ; VOLKOV, VLADIMIR V. ; HUANG, ZUOHUA: Formation of Polysulfone Hollow Fiber Membranes Using the Systems with Lower Critical Solution Temperature. In: *Fibers* Bd. 9 (2021), Nr. 5, S. 28
- PROIKAKIS, C. S. ; MAMOUELOS, N. J. ; TARANTILI, P. A. ; ANDREOPOULOS, A. G.: Swelling and hydrolytic degradation of poly(D,L-lactic acid) in aqueous solutions. In: *Polymer Degradation and Stability*. Bd. 91, 2006, S. 614–619
- QAZI, RAINA AMAN ; KHAN, MOHAMMAD SALEEM ; SHAH, LUQMAN ALI ; ULLAH, RIZWAN ; KAUSAR, AYESHA ; KHATTAK, ROZINA: Eco-friendly electronics, based on nanocomposites of biopolyester reinforced with carbon nanotubes: a review. In: *Polymer-Plastics Technology and Materials* Bd. 59, Taylor and Francis Inc. (2020), Nr. 9
- ROTKIN, SLAVA V.: Theory of Nanotube Nanodevices. In: *Nanostructured Materials and Coatings for Biomedical and Sensor Applications* : Springer Netherlands, 2003, S. 257–277
- RYDZ, JOANNA ; SIKORSKA, WANDA ; KYULAVSKA, MARIYA ; CHRISTOVA, DARINKA: Polyester-based (bio)degradable polymers as environmentally friendly materials for sustainable development. In: *International Journal of Molecular Sciences* Bd. 16, MDPI AG (2015), Nr. 1, S. 564–596
- SALWOWSKA, NATALIA M. ; BEBENEK, KATARZYNA A. ; ŹADŁO, DOMINIKA A. ; WCISŁO-DZIADECKA, DOMINIKA L.: Physicochemical properties and application of hyaluronic acid: a systematic review. In: *Journal of Cosmetic Dermatology* Bd. 15, Blackwell Publishing Ltd (2016), Nr. 4
- SARKAR, KAMAL ; GOMEZ, CARLOS ; ZAMBRANO, STEVE ; RAMIREZ, MICHAEL ; DE HOYOS, EUGENIO ; VASQUEZ, HORACIO ; LOZANO, KAREN: Electrospinning to Forcespinning™.

- In: *Materials Today* Bd. 13, Elsevier (2010), Nr. 11, S. 12–14
- SHAH, AAMER ALI ; HASAN, FARIHA ; HAMEED, ABDUL ; AHMED, SAFIA: Biological degradation of plastics: A comprehensive review. In: *Biotechnology Advances* Bd. 26, *Biotechnol Adv* (2008), Nr. 3
- SNETKOV, PETR ; ZAKHAROVA, KSENIIA ; MOROZKINA, SVETLANA ; OLEKHNIVICH, ROMAN ; USPENSKAYA, MAYYA: Hyaluronic acid: The influence of molecular weight on structural, physical, physico-chemical, and degradable properties of biopolymer. In: *Polymers* Bd. 12, MDPI AG (2020), Nr. 8
- SODOMKA, LUBOMÍR: *Nanostruktury (Nanovlákná), materiály 21.století*, 2004
- STLOUKAL, PETR ; PEKAŘOVÁ, SILVIE ; KALENDOVA, ALENA ; MATTAUSCH, HANNELORE ; LASKE, STEPHAN ; HOLZER, CLEMENS ; CHITU, LIVIA ; BODNER, SABINE ; U. A.: Kinetics and mechanism of the biodegradation of PLA/clay nanocomposites during thermophilic phase of composting process. In: *Waste Management* Bd. 42, Elsevier Ltd (2015), S. 31–40
- WAGENER, STEFAN ; SCHINKT, BERNHARD: *Fermentative Degradation of Nonionic Surfactants and Polyethylene Glycol by Enrichment Cultures and by Pure Cultures of Homoacetogenic and Propionate-Forming Bacteria*, 1988
- WALLSTRÖM, S. ; STRÖMBERG, E. ; KARLSSON, S.: Microbiological growth testing of polymeric materials: An evaluation of new methods. In: *Polymer Testing* Bd. 24, Elsevier (2005), Nr. 5, S. 557–563
- WOODINGS, CALVIN: Fibers, Regenerated Cellulose. In: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. Hoboken, NJ, USA : John Wiley & Sons, Inc., 2003
- XUE, JIAJIA ; WU, TONG ; DAI, YUNQIAN ; XIA, YOUNAN: Electrospinning and electrospun nanofibers: Methods, materials, and applications. In: *Chemical Reviews* Bd. 119, American Chemical Society (2019), Nr. 8
- YU, HUIMIN ; STEPHANOPOULOS, GREGORY: Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. In: *Metabolic Engineering* Bd. 10, *Metab Eng* (2008), Nr. 1, S. 24–32
- ZHANG, XIANGWU ; LU, YAO: Centrifugal spinning: An alternative approach to fabricate nanofibers at high speed and low cost. In: *Polymer Reviews* Bd. 54, Taylor and Francis Inc. (2014), Nr. 4

ZHAO, JIAN-HAO ; WANG, XIAO-QING ; ZENG, JUN ; YANG, GUANG ; SHI, FENG-HUI ; YAN, QING: Biodegradation of poly(butylene succinate) in compost. In: *Journal of Applied Polymer Science* Bd. 97, John Wiley & Sons, Ltd (2005), Nr. 6, S. 2273–2278

Electrospinning device for preparing nanofiber layers - 4SPIN. URL <https://www.4spin.info/>. - abgerufen am 2021-05-06

LIVE/DEADTM BacLightTM Bacterial Viability Kit, for microscopy. URL <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/L7007#/L7007>. - abgerufen am 2021-05-09

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HA	Kyselina hyaluronová
LHA	Lauroyl hyaluronan
FHA	Furanyl hyaluronan
PEG	Polyethylenglykol
PEO	Polyethylenoxid
POE	Polyoxyethylen
PHB	Polyhydroxybutyrát
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
UV	ultrafialové záření
SEM	Rastovací elektronový mikroskop
OZ	Odstředivé zvlákňování nanovláken
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
BDDE	1,4-butandiol diglycidylether
mPEG	Methylether polyethylenglykol
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci
CEN	Evropský výbor pro normalizaci

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1: Schéma zvlákňování foukáním</i>	<i>15</i>
<i>Obr. 2: Linka pro výrobu nanovláken rozfukávacím postupem.....</i>	<i>15</i>
<i>Obr. 3: Schéma fyzikálního tažení</i>	<i>16</i>
<i>Obr. 4: Celkové funkční schéma odstředivého zvlákňování</i>	<i>17</i>
<i>Obr. 5: Detaily rotoru a celkový pohled na nanovláknennou odstředivku.....</i>	<i>18</i>
<i>Obr. 6: Schéma komory OZ.....</i>	<i>18</i>
<i>Obr. 7: Zařízení pro odstředivé zvlákňování od společnosti Fiberio.....</i>	<i>19</i>
<i>Obr. 8: Ukládání vláken na kolektoru OZ.....</i>	<i>19</i>
<i>Obr. 9: Schéma zvlákňování centrifugací.....</i>	<i>20</i>
<i>Obr. 10: Dráha proudu polymerního roztoku z trysky během zvlákňování.....</i>	<i>20</i>
<i>Obr. 11: Vznik Taylorova kužele</i>	<i>22</i>
<i>Obr. 12: Zařízení použité při výrobě nanovláken 4Spin.....</i>	<i>25</i>
<i>Obr. 13: Opakující se disacharidové jednotky HA, červené šipky značí primární místa vhodná pro chemickou modifikaci</i>	<i>27</i>
<i>Obr. 14: Schéma biodegradace polymerů</i>	<i>33</i>
<i>Obr. 15: Vizualizace živých a mrtvých bakterií.....</i>	<i>49</i>
<i>Obr. 16: Snímky vzorku LHA pořízené na SEM při zvětšení 500x, 1 000x, 5 000x a 10 000x</i>	<i>54</i>
<i>Obr. 17: Snímky vzorku FHA pořízené na SEM při zvětšení 500x, 1 000x, 5 000x a 10 000x</i>	<i>55</i>
<i>Obr. 18: Snímky vzorku LHA:FHA 70:20 pořízené na SEM při zvětšení 500x, 1 000x, 5 000x a 10 000x.....</i>	<i>55</i>
<i>Obr. 19: Snímky vzorku LHA:FHA 45:45 pořízené na SEM při zvětšení 500x, 1 000x, 5 000x a 10 000x.....</i>	<i>56</i>
<i>Obr. 20: Snímky vzorku LHA:FHA 20:70 pořízené na SEM při zvětšení 500x, 1 000x, 5 000x a 10 000x.....</i>	<i>57</i>

<i>Obr. 21: Snímky vzorku PEG pořízené na SEM při zvětšení 500x, 1 000x, 5 000x a 10 000x</i>	58
<i>Obr. 22: Průběh mineralizace analyzovaných vzorků.....</i>	60
<i>Obr. 23: Snímky vzorku LHA na fluorescenčním mikroskopu po 1, 3, 5 a 7 dnech mineralizace.....</i>	62
<i>Obr. 24: Snímky vzorku FHA na fluorescenčním mikroskopu po 1 a 3 dnech mineralizace</i>	62
<i>Obr. 25: Snímky vzorku LHA:FHA 70:20 na fluorescenčním mikroskopu po 1, 3, 5 a 7 dnech mineralizace.....</i>	63
<i>Obr. 26: Snímky vzorku LHA:FHA 45:45 na fluorescenčním mikroskopu po 1, 3, 5 a 7 dnech mineralizace.....</i>	64

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1: Dělení nanovláken podle technologie jejich výroby</i>	<i>14</i>
<i>Tab. 2: Průměrná gramáž jednotlivých vzorků.....</i>	<i>52</i>
<i>Tab. 3: Stanovení průměru vláken daných nanovláčenných vrstev.....</i>	<i>53</i>
<i>Tab. 4: Stanovení tloušťky nanovláčenných vrstev.....</i>	<i>53</i>
<i>Tab. 5: Koncentrace DNA mikroorganismů obsažených v analyzovaných vzorcích</i>	<i>61</i>