

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

FAKULTA CHEMICKÁ

MATERIÁLY NA BÁZI POLY(3-HYDROXYBUTYRÁTU)

HABILITAČNÍ PRÁCE

V OBORU CHEMIE, TECHNOLOGIE A VLASTNOSTI MATERIÁLŮ

MGR. RADEK PŘIKRYL, PH.D.

BRNO 2023

ABSTRAKT

Bakteriální biopolymer poly(3-hydroxybutyrát) (PHB) je pro svůj původ z obnovitelných zdrojů a svoji biodegradabilitu a biokompatibilitu zajímavým kandidátem pro některé moderní aplikace. Sám o sobě však při zpracování v tavenině vykazuje termickou nestabilitu a následnou křehkost. Tato práce se zabývá zpracováním PHB do funkčních materiálů pro 3 klíčové aplikace. V první části prezentuje vybrané výsledky v oblasti výzkumu biokompozitních materiálů pro 3D tisknutelné resorbovatelné náhrady kostní tkáně a dává do souvislosti materiálové složení, strukturu, morfologii povrchu se speciálními vlastnostmi a chováním v simulované tělesné tekutině. Ve druhé části jsou uvedeny poznatky z oblasti technologií výroby vláken metodami odstředivého zvláknění a možnosti řízení vlastností takto vyráběné netkané textilie pro medicínské aplikace. Třetí část se zabývá technologiemi výroby povlakovaných hnojiv se zpomaleným uvolněním pro moderní agronomii a prezentuje dosažené výsledky vyvíjeného konceptu z nádobových a maloparcelních pokusů.

ABSTRACT

The bacterial biopolymer poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) is an interesting candidate for some modern applications due to its origin from renewable sources and its biodegradability and biocompatibility. However, it exhibits thermal instability in melt processing and following brittleness. This work deals with processing PHB into functional materials for three key applications. The first part presents selected results in the field of research on biocomposite materials for 3D printable resorbable bone tissue substitutes and relates the material composition, structure, and surface morphology to special properties and behaviour in a simulated body fluid. In the second part, findings from the field of fibre production technologies using centrifugal spinning methods and the possibility of controlling the properties of the nonwoven fabric produced in this way for medical applications are presented. The third part deals with the production technologies of coated fertilizers with slow release for modern agronomy and presents the achieved results of the developed concept from the greenhouse pot and small-plot field experiments.

KLÍČOVÁ SLOVA

poly(3-hydroxybutyrát) (PHB), cirkulární ekonomika, bioplast, biokompozit, FDM 3D tisk, resorbovatelná náhrada kostní tkáně, netkaná textilie, buněčný skafold, kryty ran, hnojivo se zpomaleným a řízeným uvolňováním (CRF, SRF)

KEYWORDS

poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), circular economy, bioplastic, biocomposite, FDM 3D printing, resorbable bone tissue replacement, nonwoven fabric, cellular scaffold, wound dressings, slow-release and controlled-release fertilizer (CRF, SRF)

PODĚKOVÁNÍ

Vědecko-výzkumná činnost je pro mne symbolem týmové práce. Dnešní doba přináší zajímavé výzvy a témata často na pomezí mnoha vědních oborů, kde je výzkum bez spolupráce nemyslitelný. I výsledků této práce bylo dosaženo intenzivní spoluprací s mnoha pro mne důležitými osobami, týmy a institucemi. Nelze zde vyjmenovat všechny, dovolím si zde alespoň zmínit osoby, které významně ovlivnily moje směřování při cestě ke zde prezentovaným výsledkům za posledních 10 let, za což jim patří moje upřímné díky.

Děkuji tímto prof. Ivaně Márové a prof. Stanislavu Obručovi za možnost nahlédnout do biotechnologie výroby PHB a vůbec za téma PHB, které umožnilo vznik Laboratoře bioplastů, jež svým aplikačním výzkumem navazuje na technologii výroby PHB. Dlouhodobá spolupráce s PhDr. Lenkou Mynářovou a celým týmem společnosti Nafigate byla klíčovým prvkem pro směřování aplikačního výzkumu i zajištění projektového i smluvního financování výzkumných prací a vnímání strategie a legislativy EU. Doc. Jiřímu Tocháčkovi vděčí náš tým za praktické základy zpracování polymerů a přístup ke zpracovatelským strojům na CEITEC. Bez osudového setkání s prof. Pavlem Alexym a jeho týmem si nedokáži představit více jak polovinu realizovaných výstupů, neboť dal šlechetně k dispozici veškeré technologie zpracování termoplastů a vždy ochotně přidal cennou odbornou radu. V oblasti výsledků s přesahem do medicíny děkuji doc. Lucy Vojtové za cenné konzultace a možnost zapojení se do jejich synergických projektů na CEITEC. Velké díky za spolupráci v oblasti povlaků hnojiv patří také doc. Petru Škarpovi z MENDELU, v oblasti biologických testů doktorce Michale Klusáček Rampichové z ÚEM AV ČR a v oblasti zpracování plastů doc. Tomáši Sedláčkovi z UTB.

Neméně důležité je pochopitelně poděkování celému mému týmu, který vždy loajálně a ochotně přijímal všechny výzvy, které nám umožnily další rozvoj a financování celé skupiny. Bez tohoto fungujícího a rozvíjejícího se týmu a ochoty si kdykoliv vzájemně pomoci by tyto výsledky ani předložená práce nevznikly.

Děkuji tímto také za podporu vedení FCH VUT a všem provozním oddělením. Jsem si vědom občas náročných a komplikovaných požadavků z mojí strany vyvolaných potřebami akutního řešení často vzniklých nestandardních situací při řešení mnoha projektů a zakázek smluvního výzkumu.

A konečně velké poděkování patří mojí rodině, která dlouhá léta musí respektovat někdy až poněkud přehnané časové pracovní vytížení a z toho plynoucí častý nedostatek energie pro aktivní rodinný život. I proto je pro mne moment odevzdání předložené práce jakýmsi pomyslným ohlédnutím za tím, co jsem se svým týmem dokázal, ale také motivací k optimalizaci životních priorit.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	PODNĚTY K VÝZKUMU	8
2.1	LEGISLATIVA	8
2.1.1	<i>Legislativa na evropské úrovni</i>	8
2.1.2	<i>Legislativa na národní úrovni</i>	8
2.2	BIOPLASTY	9
2.2.1	<i>Nová generace základních typů bioplastů</i>	10
3	POLY-3-HYDROXYBUTYRÁT	11
3.1	VLASTNOSTI PHB.....	11
3.2	BIOSYNTÉZA PHB.....	12
3.3	EXTRAKCE PHA Z MIKROBIÁLNÍ BIOMASY	12
4	TERMOPLASTY NA BÁZI PHB PRO 3D TISK	14
4.1	MOTIVACE	14
4.2	METODY A ÚSKALÍ ZPRACOVÁNÍ PHB	14
4.2.1	<i>Krystalizace</i>	15
4.2.2	<i>Distribuce molekulové hmotnosti</i>	16
4.2.3	<i>Procesní stabilizace</i>	16
4.2.4	<i>Plastifikace změkčovadly</i>	16
4.2.5	<i>Mísení s dalšími polymery</i>	17
4.2.6	<i>Kompozity na bázi PHB</i>	19
4.3	PHA MATERIÁLY PRO 3D TISK.....	19
4.4	BIODEGRADABILITA FINÁLNÍCH PHA BIOPLASTŮ A BOKOMPOZITŮ	21
4.5	CÍLE.....	22
4.6	DOSAŽENÉ VÝSLEDKY.....	23
4.6.1	<i>Zpracovatelnost a stabilizace PHB</i>	23
4.6.2	<i>Mísení s ostatními polymery</i>	27
4.6.3	<i>Aditivace změkčovadly</i>	28
4.6.4	<i>Nukleace</i>	30
4.6.5	<i>Stabilizace PHB/PLA směsí</i>	31
4.6.6	<i>End of life PHB/PLA směsí</i>	32
4.6.7	<i>FDM 3D tisk PHB kompozitů</i>	33
4.7	PŘÍNOS	39
5	KOMPOZITY PRO FDM 3D TISK NA BÁZI PHB PRO MEDICÍNU	40
5.1	MOTIVACE.....	40
5.2	SOUČASNÝ STAV.....	40

5.3	CÍLE.....	42
5.4	DOSAŽENÉ VÝSLEDKY.....	42
5.4.1	<i>Směsi PHB/PLA.....</i>	42
5.4.2	<i>Směsi PHB/PCL.....</i>	45
5.4.3	<i>Povrchové vlastnosti 3D tištěných skafoldů.....</i>	46
5.4.4	<i>Optimalizace složení směsí PHB/PLA/SN/TCP.....</i>	48
5.4.5	<i>Skafold pro náhradu segmentu femuru.....</i>	51
5.5	PŘÍNOS	54
6	NETKANÉ MIKROVLÁKENNÉ TEXTILIE NA BÁZI PHB PRO MEDICÍNU	55
6.1	MOTIVACE.....	56
6.2	SOUČASNÝ STAV	56
6.2.1	<i>Antimikrobiální aditiva</i>	57
6.3	CÍLE.....	59
6.4	DOSAŽENÉ VÝSLEDKY.....	60
6.5	PŘÍNOS	66
7	AGROCHEMICKÉ APLIKACE PHB	67
7.1	MOTIVACE.....	67
7.2	SOUČASNÝ STAV	68
7.3	CÍLE.....	71
7.4	DOSAŽENÉ VÝSLEDKY.....	71
7.4.1	<i>Testy ve vodním prostředí.....</i>	73
7.4.2	<i>Vegetační nádobové testy</i>	74
7.4.3	<i>Čtvrtprovozní příprava povlakovaných hnojiv.....</i>	76
7.4.4	<i>Polní testy</i>	76
7.4.5	<i>Optimalizace složení</i>	77
7.4.6	<i>Syntéza biomateriálů pro povlaky</i>	80
7.5	PŘÍNOS	80
8	ZÁVĚR.....	81
9	REFERENCE	83
10	SEZNAM VÝSTUPŮ AUTORA NA TÉMA PRÁCE.....	104
10.1	PUBLIKACE	104
10.2	OSTATNÍ VÝSTUPY	106
10.3	VEDENÉ PRÁCE NA RELEVANTNÍ TÉMA.....	107
11	PROJEKTY ŘEŠENÉ AUTOREM	108

1 ÚVOD

Tato práce je kombinací komentovaného souhrnu publikovaných prací a některých původních výsledků, které nebyly týmem autora doposud publikovány. Představuje tak zaměření autora v posledních deseti letech působení na FCH VUT na pozici odborného asistenta a výzkumného pracovníka v rámci desítky získaných dotačních projektů. Společným prvkem těchto vybraných témat je biopolymer poly(3-hydroxybutyrát) (PHB) z rodiny polyhydroxyalkanoátů (PHA). Inovativní biotechnologii výroby tohoto biopolymeru a tím i celé téma přinesl na FCH VUT tým prof. Ivany Márové spolu s prof. Stanislavem Obručou. Patentem této technologie pak položili oficiálně pomyslný základní kámen výzkumnému směru PHA biopolymerů na FCH VUT, který byl motivací i pro další fakultní výzkumné skupiny. V návaznosti na výzkum technologie výroby PHA vznikly požadavky na vývoj finálních aplikací ze strany průmyslových partnerů a příležitost ke vzniku nové výzkumné skupiny v rámci Centra materiálového výzkumu FCH VUT orientované na vývoj zpracovatelských technologií PHA.

Pod autorovým vedením tak byla založena Laboratoř bioplastů s cílem hledat a vyvíjet aplikace PHB. Materiál byl testován z počátku v technologiích zpracování termoplastů a kompozitů. Následně i na základě strategie EU, která začala bioplastové aplikace spíše potlačovat, a na základě poptávky z průmyslu, bylo portfolio testovaných technologií rozšířeno. Protože je PHB spolu s ostatními kopolymery PHA vhodným kandidátem pro využití v medicíně, byla logická následná orientace týmu na materiálové technologie pro tyto aplikace. Ve spojení s 3D tiskovými technologiemi biokompozitů totiž PHB poskytuje zajímavý směr využití materiálu jako náhrady tkání ve tvaru přizpůsobeném pacientu na míru. Vlákenné membrány z těchto biomateriálů pak mohou být funkčním stavebním prvkem vrstevnaté struktury krytů ran nebo nosičem s vnitřní 3D vlákennou strukturou pro kultivaci buněk tkání. Poměrně snadná rozložitelnost PHB v podmínkách čističky odpadních vod, půdy, slané i sladké vody pak vybízela k tématům směřujícím k náhradě nebiodegradabilních materiálů v kosmetice a povlaků v agrochemických aplikacích.

Každé z výše uvedených témat má svá specifika, stanovené cíle a také jiné dosažené výsledky, které jsou snad přínosem pro poznání v oblasti zpracování biopolymeru PHA. Proto byla práce rozdělena do samostatných kapitol a ke každé jsou tyto informace uvedeny zvlášť.

Osobní motivací ke zde prezentovaným výsledkům práce byl respekt k živé i neživé přírodě a přirozeným procesům v ní, k životu jako takovému a k lidskému zdraví. S vizí bezpečného a udržitelného využívání přírodních surovin a jejich zpracování do formy funkčních materiálů a výrobků z nich, které po ukončení doby svého života nezatíží příliš životní prostředí a ideálně se stanou zdrojem pro proces dalšího využití. Ač se tato výzva zdá být neřešitelná, lze pomocí nástrojů vědy a výzkumu hledat řešení, která se alespoň tomuto ideálu budou blížit [1]. V poslední době je proto kladen čím dál větší důraz na eliminaci negativních dopadů lidské činnosti. Jedním z nosných pilířů pozitivní změny je přechod z lineární ekonomiky na cirkulární (CE). Ta se stává stále více důležitou v globálním měřítku. V posledních letech přijaly kromě Evropy i země jako Čína a Japonsko plány na podporu CE, které mají za cíl podpořit přechod na ekonomiku, která minimalizuje odpad a využívá zdroje efektivněji. A právě k tomuto záměru má přispět svým zaměřením výzkumná skupina Laboratoře bioplastů se svými výsledky, které sumarizuje předložená habilitační práce.

2 PODNĚTY K VÝZKUMU

2.1 Legislativa

2.1.1 Legislativa na evropské úrovni

Největším legislativním „balíkem“ změn v rámci EU je Zelená dohoda pro Evropu (GD) a cirkulární ekonomika (CE) je jeho základním pilířem, který se projevuje ve všech nařízeních a směrnicích. GD vytváří i rámec pro bioplasty a jejich uplatnění na trhu [2], [3].

Explicitně jsou pak cíle Zelené dohody pro EU v oblasti CE a obsaženy ve strategii Akční plán pro CE, aktuální verze vyšla v březnu 2020. Akční plán pro CE formuluje iniciativy v rámci celého životního cyklu výrobků; jeho cílem je snížit dopad spotřeby EU a do r. 2030 zdvojnásobit míru oběhového využívání materiálů v EU. Je zaměřen na způsob navrhování výrobků, podporuje procesy oběhového hospodářství, udržitelnou spotřebu a snaží se zajistit předcházení vzniku odpadu a udržení používaných zdrojů v ekonomických cyklech v EU co nejdéle [4]. Akční plán k cirkulární ekonomice směřuje k transformaci všech sektorů. Evropská komise (EK) pokračuje v plastikářské strategii z r. 2018, zaměřené, mimo jiné, na opatření, jak uchopit problém úmyslně přidávaných mikroplastů a neúmyslně uvolněných plastů, například z textilu či při opotřebovávání pneumatik [5]. Evropská komise také rozvíjí požadavky k zajištění toho, aby všechny obaly zboží na trhu EU byly do r. 2030 znovu použitelné nebo recyklovatelné ekonomicky smysluplným a prokazatelným způsobem. Do celkové strategie proto zahrнула regulatorní rámec pro bio-rozložitelné a bio-based plasty a aplikace z nich [6].

2.1.2 Legislativa na národní úrovni

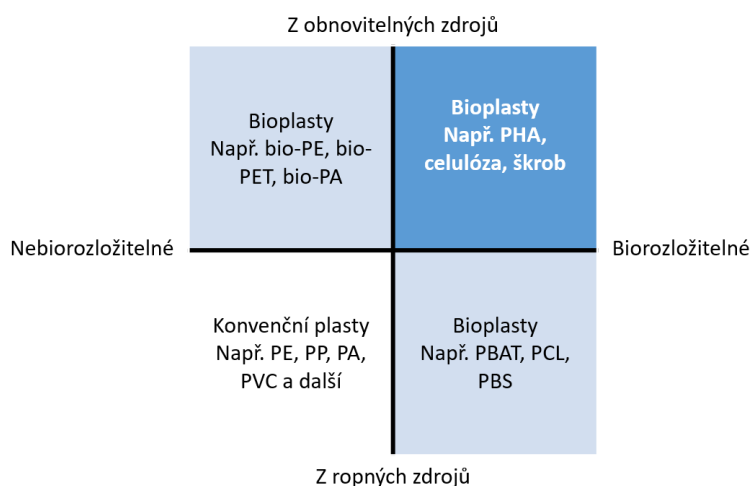
Na národní úrovni ČR byla na konci r. 2021 představena komplexní strategie pod názvem Cirkulární Česko 2040. Strategie Cirkulární Česko 2040 reflektuje nezbytnost prosazení principů oběhového hospodářství v ČR a řadí CE mezi její priority. Klade si za cíl udržet hodnotu výrobků, materiálů a zdrojů v ekonomickém cyklu tak dlouho, jak je to jen možné, a vrátit je do výrobního cyklu na konci jejich používání, přičemž se minimalizuje tvorba odpadu. Důraz je kladen na recyklaci (podporou recyklačních technologií) a na opětovné použití, zlepšením zejména v oblasti bioodpadu, textilního, stavebního a potravinového odpadu, obalů a dosloužilé elektroniky [7].

Pro průmysl, stavebnictví a energetiku je prioritou využívat druhotné suroviny. Stát ve veřejných zakázkách podpoří ty podniky, které používají výrobky s obsahem druhotných surovin a recyklátů. V oblasti produktu a designu by firmy měly zavádět v maximální možné míře nové výrobní metody využívající nejmodernější technologie k dosažení cirkulárních produktů jako např. využívání druhotných recyklovaných materiálů a předcházení vzniku odpadu při výrobě. V oblasti bioekonomiky a potravin půjde o snížení množství potravinových obalů a zefektivnění práce s bioodpadem, např. kompostováním biologicky rozložitelných odpadů nebo jejich materiálové využití. V oblasti spotřeby by měly být výrobky opětovně využívány a dostávat tak „druhý“ život. Omezit by se mělo využívání jednorázových výrobků. Největší změna je očekávaná v oblasti chování výrobců a zákazníků, tak aby byly více využívány v minulosti použité materiály či výrobky a zákazník informovaně volil, jak s nimi naloží až doslouží.

Věda a výzkum bude finančně motivována prostřednictvím projektů zabývajících se CE např. zřízením specializovaného inovačního fondu pro oběhové hospodářství, nebo zavedení inovačních voucherů pro technologie zaměřené na oběhové hospodářství. Vzdělávání v oblasti cirkulární ekonomiky poběží na všech úrovních, od těch nejnižších stupňů. [8] Využití polymerních materiálů z obnovitelných zdrojů, použití biologicky rozložitelných plastů ve smysluplných aplikacích a jejich výroba z odpadních surovin je jedním z mnoha směrů naplnění této strategie.

2.2 Bioplasty

Zájem o bioplasty v posledních letech rostl společně s uvědoměním, že nerostné suroviny nejsou nevyčerpatelné a s vizí, že je možné využít uhlík z atmosféry skrze fotosyntézy u rostlin. Nicméně předpona „bio-“ nezaručuje bezpodmínečnou udržitelnost daného materiálu. Podle stále platné definice se jedná o skupiny polymerů, které mají původ v přírodních materiálech (bio-based) NEBO jsou biodegradabilní (případně nesou obě dvě tyto vlastnosti), jak je vidět na Obr. 1. Bioplasty jsou tedy širokou skupinou materiálů a mohou být vyrobeny z různých zdrojů – kukuřice, cukrová třtina, bavlna, dřevo, houby, řasy. Některé jsou biodegradabilní jako např. polyhydroxyalkanoáty (PHA). Mezi bioplasty ale patří také bio-polypropylen a bio-PET vyrobené z rostlinných materiálů, ale shodující se chemickým složením s klasickými plasty, tedy nerozložitelné.



Obr. 1: Matice plastů podle surovinového zdroje a rozložitelnosti. Zpracováno dle [9]

Současná věda má k dispozici poznatky z téměř 200 let vývoje a využití bioplastů, jelikož první komerčně využívané plasty byly v podstatě bioplasty a začaly být využívány v průmyslovém měřítku již v polovině devatenáctého století (linoleum, ebonit, gutaperča, latex, viskóza, apod.) [10].

Kombinací fenolů a formaldehydu byl v r. 1907 vytvořen bakelit, první z řady syntetických plastů, které postupně vytlačily díky lepším materiálovým vlastnostem a nízké ceně původní bioplasty. Druhá světová válka urychlila rozvoj petrochemického průmyslu a orientaci na plasty vyrobené z ropy. Ve válečných letech byla ještě více akcentována nevýhoda bioplastů, které konkurovaly výrobě potravin.

V roce 2020 bylo celosvětově vyrobeno téměř 370 milionů tun plastů, jejich výroba vyžaduje asi 4 % fosilních zdrojů ročně. Společnost bojuje s neblahými následky znečištění životního prostředí plasty a jejich výrobou, a dle některých vědeckých týmů jsou bioplasty jednou z možností, jak tuto zátěž alespoň nějak snížit. Pozornost je soustředěna zejména na materiály vyrobitelné z odpadů a hlavním kritériem pro jejich výrobu a uplatnění na trhu je udržitelnost a environmentální stopa [11].

2.2.1 Nová generace základních typů bioplastů

Nové typy biopolymerů pro bioplasty, které se začaly vyrábět relativně nedávno v průmyslovém měřítku, jsou většinou vyrobeny z celulózy, škrobu nebo rostlinného cukru. V současnosti jsou nejvíce využívány [12]:

- Acetát celulózy (CA) - vyrábí se z bavlny, dřeva nebo jiných rostlinných materiálů a má dobré izolační vlastnosti. Používá se především pro výrobu filtrů a textilních vláken [13].
- Polylaktid (PLA) - objeven ve dvacátých letech minulého století. V r. 1989 Patrick R. Gruber zjistil, jak vyrábět PLA z kukuřice. To umožnilo firmě Novamont vývoj bioplastů pod komerční značkou MATER-BI. V r. 1997 přišla s výrobou PLA z kukuřice také firma Cargill and Dow Chemicals, a od r. 2005 tato firma funguje pod značkou NatureWorks a je jedním z hlavních výrobců PLA [14].
- Polyhydroxyalkanoáty (PHA) - tato skupina zahrnuje celou řadu polymerů, které se vyrábějí pomocí mikroorganismů, v nichž polymer vzniká jako zásobní látka. PHA biopolymery jsou biologicky odbouratelné a mají široké možnosti využití - od obalů po medicínské implantáty [15].
- Polybutylensukcinát (PBS) – může být produkován jak polymerací monomerů z petrochemických procesů tak i získaných cestou bakteriální fermentace. Vyrábí BioAmber Inc. od r. 2010 a Novamont S.p.A od r. 2016 [16].
- Termoplastický škrob (TPS) - vyrábí se z kukuřičného nebo bramborového škrobu a plastifikátoru (zejména glycerolu). Má dobré vlastnosti pro výrobu tenkostěnných obalů a tašek [17].
- Polykaprolakton (PCL) je biodegradabilní polyester (PCL) - má nízkou teplotu tání a používá se především pro výrobu medicínských implantátů, nosičů léčiv, tkáňovém inženýrství, ale také v oblasti 3D tisku výroby prototypů a jejich forem apod. [18].
- Biodegradabilní polyamid (PA) - vyrábí se z obnovitelných zdrojů, jako jsou rostlinné oleje a používá se převážně pro výrobu textilních vláken a obalů (například PA11 Rislán®) [19], [20].

Z historie bioplastů lze snadno vyvodit, že předpona bio- nezajišťuje ekologický produkt. Udržitelný bioplast by měl v rámci svého životního cyklu splňovat tyto požadavky:

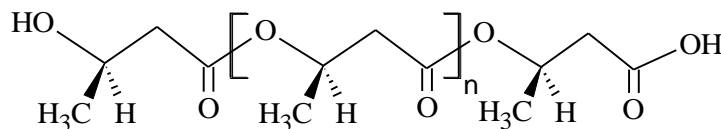
- Vstupní surovina by neměla pocházet z masivní těžby nerostných zdrojů nebo být příčinou deforestace pralesů. Neměla by využívat zdrojů konkurenčních s výrobou potravin a krmiv.
- Produkce bioplastů probíhá na bázi Green Chemistry, tzn. nepoužívá nebezpečných chemických látek, která jsou zdravotním rizikem pro pracovníky a zároveň rizikem kontaminace životního prostředí zejména v místě zpracování.
- Kvalita materiálu a design řešení musí přinášet řešení pro výrobky s vícenásobným použitím, protože nízká životnost produktu zvyšuje jeho environmentální stopu.
- Je nutné navrhnout a zajistit vhodný konec života výrobků (tzv. End of Life) [21]. Preferovaným a cirkulárním řešením před likvidací v kompostárně je materiálová recyklace. V případě biodegradabilních bioplastů, které je nutno likvidovat biologicky, je nutné zajistit podmínky a infrastrukturu pro ideální degradaci, a to v souladu s platnou legislativou.

Současný výzkum a vývoj se zaměřuje především na materiály z nepotravinových, obnovitelných nebo lépe odpadních zdrojů [22], jako je odpadní škrob a cukr, proteiny, odpadní celulózy, ligno-celulózy, houby a řasy [11]. Příkladem je biotechnologie výroby PHA na principu CE, která může za určitých okolností na trh přinést právě takový biomateriál s velmi širokým využitím a s důkazy o jeho environmentální stopě v podobě LCA [23].

3 POLY-3-HYDROXYBUTYRÁT

Za polyhydroxyalkanoáty (PHA) je označována široká skupina biopolymerů - bakteriálních polyesterů. Jde jak o homopolymery, tak o statistické kopolymery 3-hydroxybutanové kyseliny (3HB), 4-hydroxybutanové kyseliny (4HB), 3-hydroxyhexanové (3HHx), 3-hydroxyvalerátu (3HV), 3-hydroxyoktanoátu (3HO) a mnoha dalších monomerů [24]. V posledních letech značně vzrostl počet typů PHA biotechnologicky produkovaných jak přirozenými kmeny, tak geneticky upravenými organismy, jako např. kopolymery P(3HB-co-4HB-co3HHx) [25], P(3HB/4HB/3HV/3HHx) [26], či acetoxyderiváty [27].

Tato práce je zaměřena primárně na poly[(R)-3-hydroxybutyrát] (PHB), lineární alifatický termoplastický polyester složený z *R* jednotek kyseliny 3-hydroxybutanové (Obr. 2). Tento polymer je známý od r. 1926, kdy jej objevil francouzský vědec Maurice Lemoigne při práci s bakteriemi rodu *Bacillus*. V buňkách existuje v amorfním stavu ve formě hydrofobních polymerních granulí (obvykle o velikosti 0,2–0,5 μm) [28]. Zde plní úlohu zásobního uhlíku a energie. Některé publikace potvrzují, že přítomnost PHA granulí v prokaryotických buňkách zvyšuje odolnost vůči stresovým faktorům, jako je vysoká nebo nízká teplota, mrazení, oxidační a osmotický tlak [29].



Obr. 2: Chemická struktura PHB

Lemoignův objev měl dlouhou cestu na trh. V r. 1983 byla založena firma Malborough Biopolymers, která nabídla PHB pod obchodním názvem Biopol [30]. V současnosti jsou největší výrobní kapacity budovány v Číně a USA, Evropa zaostává. TianAn Biologic Materials Co. Ltd. je čínský výrobce zaměřený na výrobu poly (3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerátu) (PHBV) [31], CJ BIO zahájila výrobu P3,4HB v závodě v Pasuruanu v Indonésii [32], Danimer Scientific, se sídlem v Bainbridge (USA) vlastní patent na výrobu Nodax™ mcl-PHA [33]. Italská firma Bio-on produkující materiál MINERV-PHA™ je v současnosti v úpadku [34], avšak díky MAIP Group má novou šanci [35].

3.1 Vlastnosti PHB

Z pohledu Strategie udržitelnosti chemických látek EU má PHB tyto klíčové vlastnosti: biodegradabilita, biokompatibilita a netoxičnost. Právě ty umožňují náhradu řady látek v aplikacích, ve kterých jsou postupně zakazovány nebo omezovány – např. konvenční polymery ve formě primárních mikroplastů v kosmetice, ve formě povlaků hnojiv, jednorázových obalů ovoce a zeleniny apod.

Bakterie jsou schopné PHB produkovat s molekulovou hmotností v rozmezí od 200–3 000 kDa s polydisperzitou 2–3, v závislosti na mikroorganismu a podmínkách biotechnologického procesu [36]. Procesem extrakce se však zpravidla distribuce molekulových hmotností posunuje směrem k nižším hmotnostem. PHB je díky svojí optické čistotě vysoce krystalický, dosahuje krystalinity 55–80 %. Jeho teplota tání se pohybuje v rozmezí 170–180 °C a teplota skelného přechodu leží v intervalu 0–5 °C. Maximální rychlost krystalizace z taveniny leží v teplotním rozmezí 50–60 °C [37], [38]. Mechanické vlastnosti, jako je Youngův modul pružnosti a pevnost v tahu, se blíží vlastnostem polypropylenu (PP), deformace při porušení je však výrazně nižší než u PP. Křehkost je jednou z hlavních nevýhod PHB. Důvodem je nízká hustota nukleace a pomalá rychlost krystalizace, která

vede k tvorbě velkých sférolitů s mezitrhlinami. Další křehnutí je způsobeno sekundární krystalizací, ke které dochází během skladování při teplotě nad T_g [39]. Dalším omezením použití PHB je tepelná degradace, ke které dochází už mírně nad teplotou tání. Degradace vede ke snížení molekulové hmotnosti v důsledku štěpení řetězce podle mechanismu eliminace α -vodíku [40], [41], [42].

3.2 Biosyntéza PHB

Biosyntéza PHB v živých organismech spočívá v několika základních krocích: Prvním krokem je tvorba acetoacetyl-CoA ze dvou molekul acetyl-CoA, která je katalyzována enzymem β -ketothiolázou. Poté se acetoacetyl-CoA transformuje na (R)-3-hydroxybutyryl-CoA acetoacetyl-CoA. Třetím a posledním krokem je polymerační reakce katalyzovaná PHB syntázou vedoucí k tvorbě PHB [43].

Biotechnologická produkce PHB, respektive obecně PHA, umožňuje využívat velmi širokou základnu surovin - od levných odpadních látek, odpadních vod, řepné nebo třtinové melasy, až po rostlinné oleje a jejich mastné kyseliny, alkany a jednoduché uhlohydráty. Právě zde vznikl jeden ze strategických výzkumných záměrů Centra materiálového výzkumu FCH VUT. Myšlenka využít odpadní kuchyňský olej jako zdroj uhlíku pro biotechnologickou produkci PHB vzešla z týmu prof. Márové a prof. Obruči. Vzniklý laboratorní koncept technologie byl patentován (V1). Výstupní materiál byl zde charakterizován metodami termické analýzy, předmětem zájmu byla v tomto případě zejména termická stabilita stanovována nejprve na TGA, následně cyklickým měřením na DSC, kde byl vyhodnocován posun teploty tání a krystalizace. V r. 2013 již probíhaly ve výše zmíněném týmu výzkumné práce zaměřené na využití dalších typů odpadních materiálů. Protože bylo v té době záměrem využít PHA materiály i pro výrobu plastů, vznikla pod autorovým vedením Laboratoř bioplastů Centra materiálového výzkumu FCH VUT, která dále prováděla podporu materiálové charakterizace týmu biotechnologů a začala pracovat na vývoji aplikací z tohoto materiálu. Vznikla tak společná publikace **Pub 1** věnující se možnosti výroby PHA z hydrolyzovaného kávového odpadu.

3.3 Extrakce PHA z mikrobiální biomasy

K biotechnologickému kroku výroby PHA (často nazývaný up-stream) neodmyslitelně patří i následný proces extrakce (down-stream). Řízená biosyntéza v prvním procesu určuje chemickou strukturu PHA a to se všemi možnostmi, které kombinace zvoleného organismu, případně jeho genetické úpravy a chemické struktury zdroje uhlíku jako prekursoru biochemické syntézy, nabízí. Lze také do jisté míry řídit finální distribuci molekulové hmotnosti v organismech, zejména zastavením biotechnologického procesu ve vhodný okamžik tak, aby syntetizující mikroorganismy nezačaly vzniklé PHA opět spotřebovávat. Klíčovým parametrem hodnotící úspěch tohoto kroku je však finální PHA výtěžek v procesu, tedy obsah PHA v bakteriální biomase.

Izolační proces má za úkol získat vzniklý polymer z biomasy v co nejvyšší čistotě a ideálně bez většího porušení molekulární struktury. Existují dva základní přístupy [44]:

- Rozpouštědlová extrakce za použití vhodných organických rozpouštědel
- Digesční metody narušující buněčnou membránu, ať už chemicky, enzymaticky nebo fyzikálně

Studované metody izolace PHA jsou v různém stupni TRL (Technology Readiness Level, Úroveň technologické připravenosti) [45]. Metody využívající organická rozpouštědla jsou z pohledu zachování distribuce molekulární hmotnosti a dosažené čistoty výhodnější [46]. V případě PHB je však skupina vhodných rozpouštědel poměrně malá, obsahující zejména halogenovaná rozpouštědla.

V laboratorních procesech izolace pro výzkumné účely se nejčastěji využívá referenční extrakce v chloroformu. Z pohledu legislativy je však ve velkém průmyslovém měřítku v podstatě nemožné v budoucnu takový proces extrakce využívat. Je proto zvýšený zájem o druhou skupinu izolačních metod, kde je fyzikálně chemickým způsobem rozložena buněčná stěna organismů tak, aby bylo možné nativní částice PHA od zbytků buněčných stěn následně odseparovat [47], [48]. Časté je využití NaOH [49], jeho kombinace s chlorovanými sloučeninami jako chlornan sodný [50], využití amoniaku [51], nebo surfaktantů.

Dle autorů lze využít synergii NaOH se surfaktantem Lysol (alkylbenzene sulfonate) při izolaci poly(3-hydroxybutyrátu-co-4-hydroxybutyrátu) (P3,4HB). Autoři dosáhli čistoty nad 93 % a výtěžku 94 % a to bez dramatického poklesu molekulové hmotnosti oproti referenční izolaci chloroformem a uvádějí, že lze tuto extrakční metodu použít pro výrobu vysoce čistého PHA pro biomedicínské aplikace [52]. Ze získaných zkušeností Laboratoře bioplastů se zpracováním PHB blendů však vyplývá, že čistota pod 97% je již velmi nevhodná pro termální zpracování. Množství zbylé biomasy způsobuje akceleraci termické degradace, což bylo viditelné na TGA i cyklických záznamech DSC. Navíc docházelo ke shlukování biomasy v polymerní tavenině a tvoření defektů způsobujících často nemožnost zpracování například do podoby rozfukované fólie nebo vláken.

Všechny izolační metody jsou optimalizovány na tři parametry – výtěžek, čistota a výsledná střední molekulová hmotnost polymeru. Je zřejmé, že zlepšením dvou libovolných parametrů je zpravidla zhoršen ten třetí a je proto třeba najít optimum pro konkrétní aplikaci. Všechny izolační metody produkují pochopitelně odpad, který je třeba v průmyslovém procesu likvidovat. Koncentrace surfaktantů, solí a organických látek včetně zbytků buněčných stěn (biomasy) je často kritickým parametrem při up-scale zkoumané technologie izolace PHA.

Protože byl tým Laboratoře bioplastů závislý na kvalitě PHB, bylo rozšířeno portfolio řešených témat i o tuto problematiku. V rámci úspěšně obhájené disertační práce Ing. Anety Pospíšilové, Ph.D. bylo jedním z cílů využít digesční metodu izolace PHB za použití mýdla. Toto mýdlo bylo připraveno zmýdelněním odpadního kuchyňského oleje, který se využívá právě jako zdroj uhlíku pro fermentační proces. V procesu výroby PHB z kuchyňského oleje byla tedy část vstupního materiálu odkloněna a využita na výrobu surfaktantu pro izolaci PHB. Po jeho využití v procesu izolace bylo mýdlo spolu s neoddelitelnými zbytky buněčných stěn vysráženo, převedeno zpět do formy mastných kyselin a využito jako zdroj uhlíku pro další fermentační proces. Tato unikátní metoda byla publikována v **Pub 2**. Optimalizací procesu izolace z pohledu koncentrace mýdla a využití proteázy bylo dosaženo při poměru hmotnosti mýdla na suchou buněčnou biomasu o hodnotě 0,125 čistoty vyšší než 95 %.

Tato metoda pak byla srovnávána s vyvíjenou a optimalizovanou alkalickou a kyselou digescí a chloroformovou extrakcí. Cílem bylo nalézt podmínky pro dosažení polymeru s dostatečnou čistotou pro kosmetické aplikace nebo dostatečnou molekulovou hmotností a čistotou pro zpracování do podoby plastu například pro 3D tisk. Vzorky PHB získané za působení alkalických činidel měly extrémně nízkou tepelnou stabilitu a teploty tání se během experimentů DSC významně snížily. GPC vzorků po izotermické degradaci potvrdilo výrazný pokles molekulové hmotnosti. Pro eliminaci hydrolyzy PHB v zásaditém prostředí byl testován přídatný krok kyselého promytí extrahovaného PHB a přidavek anhydridu kyseliny jantarové při jeho zpracování v tavenině. Molekulová hmotnost se tak snížila mnohem méně než bez této stabilizace a PHB bylo možné zpracovat v typické referenční receptuře pro výrobu struny pro 3D tisk. Výsledky byly publikovány v **Pub 3**.

4 TERMOPLASTY NA BÁZI PHB PRO 3D TISK

3D tiskem je zde v textu míněna metoda aditivní výroby třídimenzionálních předmětů. Přestože nejde formálně o tisk, termín je takto používán mezi odbornou i laickou veřejností. FDM (Fused Deposition Modeling) a FFF (Fused Filament Fabrication) pak značí tisk z polymerní taveniny, zpravidla vzniklé roztavením kalibrované tiskové struny v tiskovém extruderu.

Za datum vzniku techniky FDM je považován rok 1989 díky S. Scott Crumpovi. Pojmy 3D tisk a 3D tiskárna se však i díky dalším aditivním technologiím začaly objevovat až v druhé polovině 90. let. Roku 2004 Adrian Bowyer založil projekt RepRap (Replicating Rapid Prototyper), který zpřístupnil možnost 3D tisku běžné veřejnosti. V lednu r. 2009 byla dostupná první 3D tiskárna BfBRapMan 3D ke komerčnímu prodeji ve formě kitu. Poté v dubnu byla uvedena na trh další tiskárna společnosti MakerBot, která také stojí za online knihovnou 3D modelů Thingiverse. Firmu MakerBot koupila roku 2013 za zhruba 400 milionů dolarů společnost s názvem Stratasys [53].

Od r. 2009 dochází k prudkému rozvoji FDM 3D tisku. Ve stejném r. zahájil svoji činnost Josef Průša, který následně svými tiskárnami pro širokou veřejnost dokázal vybudovat úspěšný byznys. 3D tisk plastových výrobků v dnešní době využívají firmy nejen ve výzkumu a vývoji, při prototypování, ale také úspěšně ve výrobních procesech [54].

4.1 Motivace

S prudkým rozvojem FDM 3D tisku logicky nastal také rozvoj v oblasti materiálů pro tuto technologii. A zde vznikla příležitost hledat nová řešení pro nově vznikající segment trhu. Poptávka od spotřebitelů z průmyslové sféry i od domácích uživatelů je diametrálně jiná. Zatím co průmysl si žádal řešení s mechanickou a teplotní a chemickou odolností, domácí uživatel vyhledával často materiál s pěkným designem, snadnou tisknutelností, přírodního původu nebo materiál „se zajímavým příběhem“. V poslední době uživatele upřednostňují materiály, které při tisku neuvolňují nepříjemné emise a zajímají se o ekologické aspekty spojené s použitím tiskového materiálu. PHB vyráběné zamýšlenou a optimalizovanou technologií Hydal z odpadního kuchyňského oleje má díky využití odpadu nízkou uhlíkovou stopu a tím i svůj pozitivní příběh pro spotřebitele. Oproti ABS nezapáchá styrenem a oproti PLA nabízí díky své krystalinitě vyšší teplotní stabilitu. V neposlední řadě bylo jasné, že zvládnutí technologie 3D tisku na bázi PHA otevře dveře do velmi zajímavých a atraktivních aplikací v medicíně [55]. Společně s nadšením pro automatizaci, robotizaci, nové technologie byla vize zvládnout celý proces vývoje od surového materiálu PHB po zdařilý výtisk obrovskou výzvou.

Tomu všemu však musela zákonitě předcházet snaha zvládnout proces zpracování PHB z technologie Hydal, jeho charakterizace za účelem vstupní kontroly, aditivace z důvodu procesní stabilizace, modifikace a řízení mechanických vlastností přídavkem změkčovadel, vytváření vhodných kompozitních materiálů a sledování biodegradability a možností recyklace. Podstatné výsledky z těchto prací jsou se stručným komentářem zahrnuty do následující kapitoly.

4.2 Metody a úskalí zpracování PHB

V době vzniku záměru týmu Laboratoře bioplastů (2013) vyvinout plastový materiál na bázi PHB pocházejícího z technologie Hydal (se svými specifiky) bylo k dispozici jen několik málo publikací

s informacemi o reálném chování PHB v procesech průmyslové kompaundace. Bylo to zřejmě dáno i nedostupností dostatečného množství kvalitního PHB použitelného pro zpracování v tavenině. Většina publikací se tak z počátku opírala zejména o studium chování PHB a jeho kopolymerů připraveného do podoby fólie z roztoku chloroformu nebo lisováním materiálu ve vyhřívaných lisech.

Vlastnosti PHB a jeho kopolymerů byly zkoumány už v 70. letech 20. století. Například v publikaci z r. 1963 byla popisována molekulová hmotnost a intristická viskozita, stereoregularita i struktura krystalů PHB [56]. V r. 1971 vyšla publikace srovnávající bakteriální PHB se synteticky připraveným PHB z beta-butyrolaktonu [57] a v r. 1984 trojice publikací popisující mechanismus termální degradace PHB jak z pohledu produktů reakce [40], dopadu na molekulovou hmotnost [41] a reakčního mechanismu [42]. V publikaci [58] z r. 1994 jsou sledovány mechanické vlastnosti PHB a PHBV v závislosti na jeho tepelném zatížení (180 a 190 °C, 0–10 min) a dáváno do souvislosti s měřenou molekulovou hmotností. V komunitě vědců zabývajících se tímto materiálem bylo v tu dobu zřejmé, že PHB i PHBV jsou proti konvenčním plastům velmi citlivé na parametry zpracování.

4.2.1 Krystalizace

Čisté PHB má velmi nízkou nukleační hustotu [59]. To má za následek tvorbu velkých krystalových struktur, na jejichž převážné části se tvoří mikrotrhliny, což zhoršuje mechanickou odezvu PHB [60]. Použití nukleačních činidel podporuje tvorbu menších sférolitů a konzistentnějších krystalických struktur, aby se zabránilo poruchám a jevu rekrystalizace v PHB a zajistilo se konzistentní mechanické chování PHB v čase. Z efektivně fungujících nukleantů pro PHB je znám nitrid boru [60], sacharin [59], TiO₂ [61], orotová kyselina a mastek [62]. Mastek je díky svým OH skupinám schopen v tavenině polyesteru transesterifikační reakce. Vznikne tak produkt, který působí jako nukleant [63]. Testován byl i nukleační účinek záměrně přidávaného nízkomolekulárního PHB, dle autorů vzrostla rázová houževnatost, nicméně ani v těchto materiálech se nepodařilo dosáhnout vyšší tažnosti než 8 % [64].

Jak bylo zmíněno výše, skelný přechod PHB je kolem 0 °C, proto při laboratorní teplotě mají amorfní řetězce PHB dostatečnou pohyblivost, aby pokračovaly v krystalizaci, což má neblahý vliv na mechanické vlastnosti. Bylo zjištěno, že žíhání při teplotách 120 °C nebo vyšších vede ke zlepšení jak kritického faktoru intenzity napětí, tak rychlosti uvolňování deformační energie lomové houževnatosti, která je do značné míry zachována při opětovném stárnutí [65]. Navazující práce zjistily a potvrdily, že PHB podléhá krystalizaci fyzikálním stárnutím, což způsobí zkřehnutí materiálu a omezí jeho možnosti použití, a že žíhání ovlivňuje chování PHB při lomu [66] [67] [68]. Zatím co při fyzikálním stárnutí dochází k dokonalé krystalizaci, která neposkytuje dost volného prostoru molekulám podléhat plastické deformaci, v případě vyžíhání a zchlazení vzniká nedokonalá krystalická struktura, která plastickou deformaci molekul na rozhraní umožní. Autoři také upozorňují na fakt, že teplota tání této krystalické fáze se nachází již v rozmezí od 80 do 165 °C [69] [70]. Využitím v té době poměrně nové metody modulovaného DSC bylo zjištěno, že sekundární krystalizace dále znamená také vitrifikaci části amorfních řetězců spojených s krystaly za vzniku tuhé amorfní frakce (RAF). Diskutován je také vliv RAF na krystalizaci PHB, protože jeho vitrifikace během krystalizace může bránit nebo dokonce zastavit další růst krystalů [71] [72]. Difúzní aktivační energie obou procesů krystalizace (v tavenině a ve skelném stavu) jsou srovnatelné, s tím rozdílem, že krystalizace z taveniny je difúzně řízená a probíhá 1D růstem sférolitů za konstantní nukleační rychlosti se systematictější orientovanou strukturou než v případě 2D krystalizací sférolitů za skelného stavu. [73]

4.2.2 Distribuce molekulové hmotnosti

Mechanické vlastnosti polymerního materiálu jsou pochopitelně závislé na jeho distribuci molekulové hmotnosti. Ne vždy autoři udávají molekulovou hmotnost (M_w) PHA před a po jeho zpracování. Jiné práce se vztahu procesních podmínek a změny M_w přímo věnují. Poznatky ze skutečného zpracování PHBV do podoby rozfukované fólie jsou diskutovány například v publikaci [74]. Výsledné fólie mají poměrně vysokou pevnost, ale nízkou tažnost (2-6 %), která je závislá na molekulové hmotnosti polymeru. Ta klesá jak s rostoucí teplotou zpracování, tak s rychlostí otáček šneku.

V publikaci [75] byly údaje o molární hmotnosti získané pomocí SEC před zpracováním použity k odhadu snížení molární hmotnosti v důsledku tepelné degradace polymeru a porovnány s experimentálními hodnotami získanými z PHB po extruzi a po extruzi s následným vstřikováním. Výsledky ukázaly, že redukce polymerního řetězce po zpracování byla vyšší, než se očekávalo, což naznačuje, že tepelná degradace nebyla hlavní příčinou poklesu M_w . V podmínkách studovaných v této práci se stříh polymerního řetězce existující v procesech vytlačování a/nebo vstřikování jevil jako důležitý faktor, který je třeba vzít v úvahu při řešení velkých/průmyslových aplikací PHB.

4.2.3 Procesní stabilizace

Logickým důsledkem tohoto poznání je snaha výzkumných týmů potlačit nebo kompenzovat pokles M_w při termickém zpracování v tavenině. Vzhledem ke známému mechanismu tepelně indukovaného stříhu řetězce PHB je zřejmé, že potlačení tohoto jevu lze realizovat pouze snížením procesní teploty a doby pobytu polymeru v těchto podmínkách. Z tohoto pohledu je výhodnější využít kopolymery PHA, které mají nižší teplotu tání a tím širší zpracovatelské okno. Jak bylo zmíněno výše, jednou z cest je i snížení interakcí molekul pomocí lubrikantu a tím snížení smykového namáhání v tavenině. I přes to, že nebyla prokázána role oxidačních reakcí při degradaci PHB, se v některých nových pracích stále objevuje přídavek konvenčních fenolických antioxidačních stabilizátorů [76], [77], [78] a [79].

Prokazatelný stabilizační účinek na M_w a vývoj elastického modulu pružnosti PHB po kompaundaci a vstřikování byl pozorován u přídavku výtažku z vinných pokrutin [80]. 15% přídavek zároveň snížil T_g a pevnost v tahu a zvýšil tažnost PHB, takže se aditivum zachovalo i jako plastifikátor [81]. Podobně byla testována kyselina třísllová, u které nebyl vliv na M_w prokázán [82].

Dalším způsobem změny degradačního chování polymeru je možné dosáhnout změnou chemické struktury. V publikaci [83] autoři provedli maleaci PHB v pěti stupních roubování 0,21 – 1,18 %. Teplota 5% hmotnostního úbytku se dle TGA sice posunula k vyšším hodnotám, ale maleace byla také provázena dramatickým poklesem M_w (až na desetinu pův. hodnoty u nejvyššího stupně maleace).

4.2.4 Plastifikace změkčovadly

Snaha zlepšit křehké chování PHB vedla také spoustu týmů k jeho změkčování pomocí plastifikátorů. Výběr změkčovadla zahrnuje několik důležitých kritérií. Je to například vysoký stupeň kompatibility s polymerní maticí, který je odpovědný za jeho snadnou rozpustnost a jeho schopnost fungovat jak v krystalických, tak v amorfních oblastech. Plastifikátory snižují T_g a modul pružnosti a zvyšují tažnost. Důležitá je molekulová hmotnost a chemická struktura změkčovadla, včetně polarity, tvaru a velikosti molekuly. Zásadní je také nežádoucí migrace změkčovadla. Čím větší je molekula změkčovadla, tím nižší je jeho tlak par a tím větší je jeho stálost uvnitř polymeru. Velice rozsáhlá rešerše [84] prezentuje seznam 25 testovaných změkčovadel v PHB. Většina změkčovadel dosahuje nízkých hodnot tažnosti PHB pod 15 %. To je případ často používaného acetyltributylcitrátu (ATBC), který

dosáhl tažnosti pod 10 % a to i přesto, že je reportován posuv PHB T_g až na $-30,7^\circ\text{C}$ [84] [85] [86] [77]. Hranici tažnosti nad 15 % pak přesahuje dnes již velmi často používaný tributylcitrát a trietylitrát [84]. Dle tažnosti vynikají svojí hodnotou nad 15 % také aditiva: decylester, 2-butyloctylester a hexylester kyseliny acetylsalicylové a etyl2-(3-benzoylphenyl)propanoát. Zde je nutno uvést, že materiály byly připraveny roztokově do podoby fólie a neprošly tedy zpracovatelským cyklem. Dle autorů testované deriváty s krátkým řetězcem se rychle vypařovaly a uvolňovaly ve vodném prostředí, zatímco sloučeniny s dlouhým řetězcem měly tendenci krystalizovat. V obou případech však PHB filmy během krátké doby zkrchly. Decylester kyseliny salicylové a 2-butyloctylester kyseliny salicylové byly tak autory považovány za změkčovadla vhodná pro PHB v lékařských aplikacích [87].

Publikace [88] zkoumá plastifikační účinek aditiv na bázi esterů kyseliny ferulové (esterifikováno butandiolem, pentandiolem a glycerolem). Přídavkem 30 % aditiv bylo možné dosáhnout tažnosti 250 %, ale v průběhu několika hodin docházelo ke křehnutí a snížení tažnosti na velmi malé hodnoty.

4.2.5 Mísení s dalšími polymery

Z informací výše vyplývá, že samotné PHB je klasickými postupy aditivace stabilizátory a plastifikátory jen velmi těžce zpracovatelné a výsledné mechanické vlastnosti nejsou akceptovatelné pro mnohé aplikace. Výzkumné týmy se tak velmi brzy začaly ubírat cestou vytváření směsí, a to i s výše popisovanými přísadami (např. plastifikátory, nukleačními činidly, lubrikanty, stabilizátory) na zpracovatelný termoplast s akceptovatelnými mechanickými vlastnostmi [89] [90]. PHB dodává často výslednému materiálu zajímavé vlastnosti, jako je jeho biorozložitelnost a biokompatibilita. K dispozici jsou kvalitně zpracované rozsáhlé rešerše [84], [89], [90] zahrnující přes 500 zdrojů.

Polymerní termoplastická aditiva využívaná ve směsích s PHB jsou dle původu uhlíku polymery z obnovitelných zdrojů a to buď syntetické (PLA, PBS [91], biopolymery (sem patří celá skupina PHA, termoplastický škrob), nebo polymery z fosilních zdrojů (PBAT [92], PVAc, PVA, PCL, PEG, PPG [93]. Popis aktuálního stavu z tohoto pohledu již překračuje možnosti této práce a budou zde uvedeny jen kombinace používané ve výzkumu publikovaném týmem Laboratoře bioplastů.

4.2.5.1 PHB/PVAC

Blends s PVAc byly jedny z prvních úspěšných řešení nedostatků PHB [94]. Přestože mísením biopolymeru se syntetickým polymerem z fosilních zdrojů finální směs ztrácí jednu ze svých klíčových výhod (materiál z plně obnovitelných zdrojů), tato směs nabízela akceptovatelné mechanické vlastnosti pro řadu aplikací. PVAc je plně mísitelné s PHBV (12% HV), což dokazuje lineární závislost T_g na mísícím poměru [95]. Podobný trend byl pozorován u PHB. Analýza dle modelu Avrami ukázala, že přidání PVAc do PHB má za následek snížení celkové rychlosti krystalizace fáze PHB, ale neovlivňuje mechanismus nukleace PHB a geometrii růstu krystalů [96].

Citlivost PHB při zpracování se podařilo snížit přídavkem PVAc společně se změkčovadlem (např. ATBC), lubrikantem (glycerol monostearát) a nukleačním činidlem (sacharin). Z časové závislosti viskozity taveniny při zpracovatelské teplotě 185°C je viditelná lepší stabilita blendu proti PHB [97].

4.2.5.2 PHB/PLA

Polylaktid (PLA) je biologicky odbouratelný termoplastický polymer patřící chemicky do skupiny polyesterů. Chirální atom uhlíku v monomerní jednotce kyseliny mléčné činí strukturu opticky aktivní. Proto existují dva stereoizomery mléčné kyseliny a výsledný polymer PLA je komerčně dostupný v mnoha typech lišících se poměrem L a D formy, který definuje jeho vlastnosti [98]: L-poly(kyselina

mléčná) (PLLA) a D-poly(kyselina mléčná) (PDLLA). PLLA je semikrystalický polymer s krystalinitou kolem 37 %, teplotou tání 170–180 °C a teplotou skelného přechodu v oblasti 60–67 °C, což přispívá ke křehkosti materiálu při teplotě okolí. PDLLA je amorfní polymer, který má teplotu skelného přechodu mezi 50–60 °C [37]. Stejně tak jsou na trhu typy lišící se distribucí M_w vhodné svým indexem toku pro vytlačování, vstřikování i vláknařské aplikace [89]. PLA má některé významné nedostatky, jako je nízká pevnost taveniny, pomalá rychlost krystalizace, špatná zpracovatelnost, vysoká křehkost, nízká houževnatost a nízká provozní teplota, které omezují jeho použití. Proto je i v jeho případě hledána možnost jeho mísení s dalšími polymery. [99]

V roztoku vysokomolekulární PLA obecně nemísitelné s vysokomolekulárním PHB, jak je vidět ze studia izotermické krystalizace, kdy při 150 a 155 °C dochází k separaci fází PHB a PLA [100]. Naproti tomu, nízkomolekulární PLA je mísitelné s vysokomolekulárním PHB a naopak [90]. V tavenině je pak za vhodných podmínek PLA s PHB mísitelné a směsi vykazují synergický efekt [101]. PLA je efektivně nukleováno PHB a přítomnost PLA stabilizuje PHB. Zejména, když je použito změkčovadlo funkční pro oba polymery, dosahují plasty na bázi těchto směsí vhodných mechanických vlastností [98].

Při smíchání v poměru 1:1 mění PLLA mechanismus krystalizace PHB a snižuje jeho teplotu krystalizace (T_c). V mísitelných směsích PHB a PLLA s nízkou M_w je při 110 °C zapotřebí 8 hodin k dokončení ko-krystalizace. V nemísitelných směsích vykazoval PLLA sníženou rychlost krystalizace způsobenou efektem zředění taveniny PHB, zatímco T_g zůstalo nezměněno [102]. Přidání PLLA k matici PHB vede ke zvýšení T_g a T_c a poklesu T_m spolu s rozšířením píku tání, což lze vysvětlit rekrytalizací a/nebo ztlustěním lamel. Kromě toho se sníží krystalinita a počet velkých sférolitů a sníží se rychlost krystalizace PHB. V případě amorfní PDLLA sférolity PHB objemově vyplňují PDLLA inkorporovanou v intersférolitických oblastech [103].

Kompatibilita směsí PHB/PDLLA se dá zlepšit částečným zesíťováním za použití DCP. PHB tak díky zesíťení vykazovalo zhoršení krystalizační schopnosti a směs vykazovala sníženou teplotu krystalizace a nižší krystalinitu, naopak došlo ke snížení teploty tání. Mechanické vlastnosti, zejména pevnost v tahu a ohybu a rázová houževnatost směsí, a také reologické vlastnosti taveniny se zlepšily [104].

4.2.5.3 PHB/PCL

PCL je biologicky odbouratelným semikrystalickým polymerem z rodiny syntetických alifatických polyesterů, který je v omezeném množství mísitelný s PHB, při vyšší koncentraci vytváří PCL domény.

V práci [105] byla vyvíjena nová biologicky odbouratelná změkčovadla na bázi kopolymeru P(3HB-co-PCL) pro zlepšení fyzikálně-chemických vlastností směsí PHB a PCL. Přidáním změkčovadel do směsí PHB/PCL se cca 4–6 zvýšila tažnost směsi PHB/PCL 50/50 ve srovnání s čistým PHB. Přídavek také snížil teplotu tání a krystalizace směsi, což umožnilo bezpečnější zpracování, přičemž nebyl pozorován žádný nepříznivý dopad na pevnost v tahu a modul pružnosti směsí.

PCL v kombinaci s PHB může zvýšit tuhost i elasticitu směsi, pokud je kompaundace provedena reaktivně za přítomnosti peroxidu [106]. Podobně je tomu u směsí PCL s PHBV, biopolymerem příbuzným PHB. Směs PHBV/PCL připravená pomocí reakčního vstřikování s přídavkem dikumylperoxidu vykazuje vlastnosti lišící se od velmi pružných až po houževnaté materiály [107]. Reaktivní extruzí směsí PHBV/PCL v přítomnosti 1% síťovacího činidla 1,3,5-tri-2-propenyl-1,3,5-triazin-2,4,6-(1H,3H,5H)-trion (TAIC) a peroxidu bylo dosaženo zvýšení tažnosti ze 6,7 % na 25 %. Zlepšená mezifázová kompatibilita také přispívá ke zlepšení houževnatosti směsi [108].

4.2.6 Kompozity na bázi PHB

Termoplastické kompozitní materiály představují pomyslný vrchol v konstrukci funkčních materiálů. Potkává se zde know-how z mnoha oblastí diskutovaných výše: zpracování termoplastických polymerů, řízení reologie při zpracování taveniny, problematika lubrikace, stabilizace, nukleace vhodnými aditivami a změkčování pomocí kompatibilních změkčovadel, případně reaktivní procesy modifikující celý materiálový systém. K tomu všemu však přibývá znalost vlastností výztuže, její kompatibilita z hlediska povrchové energie a funkčních skupin, kompatibilizace před zpracováním nebo v průběhu zpracování a zabezpečení dispergace plniva nebo výztuže ve finálním materiálu.

V případě termoplastické matrice na bázi PHA je logicky předmětem zájmu zachování biodegradability celého systému a využití přírodních obnovitelných zdrojů. Většinová část prací je tak zaměřena na obecně lignocelulózová plniva a rostlinné vláknenné výztuže. Z pochopitelných důvodů je zájem cílen hlavně na odpadní materiály, které snižují environmentální stopu vzniklého materiálu. Tuto problematiku shrnul autorský kolektiv v r. 2021 do přehledného 15 stránkového review s téměř 100 odkazy. V textu jsou uvedeny jednotlivé strategie při zpracování kompozitů [109].

Využití lignocelulózy jako plniva není v cílech ani prezentovaných výsledcích této práce, proto budou podrobněji komentovány jen zdroje zaměřující se přímo na 3D tiskové aplikace pomocí metody FDM v kapitole 4.6.7. Druhou obrovskou skupinu materiálů tvoří PHA kompozity na bázi anorganické výztuže. Díky biokompatibilitě PHA polymerů je pozornost ve výzkumu těchto kompozitů věnována jejich potenciálu využití v medicíně [110].

Širokou paletu kompozitních materiálů na bázi PLA/PHB a jejich vlastností shrnuje obsáhlé review [89]. Jsou zde představeny různé konstrukce materiálového složení blendů a kompozitů na bázi PLA/PHB a různých výztuží. Při bližším studiu dosažených hodnot materiálových vlastností uvedených v této publikaci se ukázalo, že jde bohužel v podstatě o neporovnatelné výsledky dosažené různými způsoby přípravy i charakterizačními technikami. A právě této oblasti částicových anorganických kompozitů pro FDM 3D tisk zamýšlených pro medicínské aplikace je věnována kapitola 5.

4.3 PHA materiály pro 3D tisk

Pro úplnost je také třeba poznamenat, že materiály na bázi PHA je možné tisknout i jinými technologiemi než FDM [111]. Tato práce však bude dále pojednávat pouze o FDM metodě tisku PHA materiálů, která byla využita ve výzkumu Laboratoře bioplastů. Materiály na bázi PHA mají díky svým vlastnostem potenciál zejména v medicíně [112] a právě tam je mířena velká část dnešních výzkumných prací [113]. Aktuální stav tohoto úzce specializovaného výzkumu je součástí kapitoly 5.2 zaměřené pouze na FDM 3D tisk PHA materiálů pro medicínu.

K dnešnímu dni existuje mnoho komerčně dostupných materiálů pro FDM 3D tisk od čistých termoplastů po kompozity, bioplasty a biokompozity z bioplastů. Do kompozitních tiskových materiálů jsou použity různé typy plniva a výztuže, typicky mikročástice, nanočástice, ale i některá krátká vlákna, aby se zlepšily vlastnosti výsledných vytištěných dílů [114].

První pokusy testovat PHB v 3D tisku metodou FDM byly nalezeny v publikaci z r. 2016 [115]. Experimenty zahrnuté v této práci ukazují, že pomocí extruderu EX2 Filabot lze polymer PHA vytlačit do konzistentního vlákna při 170 °C a rychlostí šneku 15 otáček za minutu. Vlákno bylo po průchodu vodní lázní navíjeno pomocí automatického navíjecího zařízení řízeného platformou na bázi Arduino. Jak sám autor uvádí, testy reálné tisknutelnosti však víceméně selhaly.

Lze předpokládat, že z informací o vlastnostech PHB uvedených výše bylo usouzeno, že čistý polymer PHB není vhodným materiálem pro 3D tisk. Výzkum se tak ubíral podobně jako v případě ostatních metod zpracování cestou mísení polymerů, vytváření kompozitů nebo využití kopolymerů PHA. To vše za použití vhodných změkčovadel případně reaktivních činidel. Plastický a houževnatý polymer PBS ve směsi PBS/PHB zlepšil tepelné zpracování a reologické vlastnosti [116]. Podobnou strategii zvolili v práci, kdy za účelem kompatibility špatně mísitelných PHB/PCL směsí byl použit dikumylperoxid (DCP) [117]. Výsledné materiály PHB/PCL-DCP vykazovaly mírné zvýšení prodloužení při přetržení a významné zlepšení rázové houževnatosti ($7,2 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$) ve srovnání s PHB. Dalšího snížení Youngova modulu a zlepšení rázové houževnatosti ($15 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$) bylo dosaženo začleněním nízkomolekulárního polyethylenglykolu jako změkčovadla. Tažnost však zůstala pod 10 %.

Podobný problém se špatnou mísitelností a tím i zpracovatelností do podoby tiskové struny byl řešen v případě PHBV/PLA kompatibilizací za pomoci styren-akrylátového kopolymeru s oxiranovými skupinami - známého aditiva (chain extenderu - CE) Joncryl ADR-4368. Reologická analýza prokázala zlepšení tisknutelnosti směsi PHBV:PLA:CE umožněním vyšší teploty tisku ($220 \text{ }^\circ\text{C}$) a dostatečné rychlosti tisku ($45 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$). Práce ukázala, jak procesní parametry (teplota a rychlost tisku, tloušťka vrstvy a teplota tiskové podložky) mohou ovlivnit mechanické vlastnosti 3D výtisku. Optimalizované vzorky tisku vykazovaly vyšší modul pružnosti, pevnost i houževnatost. Tažnost nicméně opět nepřesáhla 10 %. Autoři došli k závěru, že dobrá tvorba vazby mezi jednotlivými vrstvami při tisku byla rozhodující pro zlepšení mechanických vlastností. [118].

Vliv parametrů tisku sleduje i následující publikace na materiálu PHBHx [119]. Zde je diskutována zejména problematika adheze první vrstvy k tiskové podložce a krystalizační smrštění, které má negativní efekt na warping a tím zhoršuje tisknutelnost.

Směs P3,4HB (10 mol% 4HB)/PLA byla zkoumána kolegy z FCH VUT. Reologické a mechanické vlastnosti kopolymeru byly modifikovány přidáním změkčovadel (acetyltributylcitrát) nebo smícháním s PLA. Použit je také CE Joncryl ADR4468 a fenolický antioxidant Irganox 1010. P3,4HB mírně potlačovalo tepelnou degradaci, ale nejlepší stabilizační účinek byl zjištěn v případě kopolymeru ve směsi s PLA. Dle těchto vlastností autoři konstatují, že měkčený P(3HB-co-4HB) je potenciálním kandidátem biodegradabilního polymeru pro procesy FDM [79].

V poslední době se těší zájmu přidávání přírodních plniv do biologicky odbouratelných polymerů kvůli zvýšené poptávce po biologicky odbouratelných kompozitních materiálech [120]. Výzkum se zaměřil na vývoj biokompozitního vlákna na bázi PHB/PLA, částicové výztuže 10, 20 a 30 % hydroxyapatitu (HA) a polypropylenglykolu (PPG) jako změkčovadla [121]. Přidání PPG zlepšilo zpracovatelnost během výroby filamentu a 3D tisku. Biokompozit s 10 % HA a 10 % PPG vykazoval vynikající 3D tisknutelnost. Zmíněný kompozit má vynikající mechanické vlastnosti - rázovou houževnatost $1,85 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$, modul pružnosti v ohybu 3,2 GPa a napětí v ohybu při 2% deformaci 42,5 MPa. Autoři také uvádějí prodloužení při přetržení (6 %), které je vyšší než u komerčního PLA (4 %).

Přidání lignocelulózových vláken do polymerní matrice je jednou z cest, jak nahradit například skleněná vlákna v biokompozitech. Zajímavou prací je využití odpadního ligninu z borového dřeva jako vedlejšího produktu biorafinerie. Přídavek ligninu v PHB v množství 20 % w/w zlepšuje adhezi vrstvy během 3D tisku a zvyšuje kontaktní úhel vody. Navíc zřetelně snižuje warping. Zkoušky 3D tisku byly provedeny pomocí tiskárny MakerGear™ V2 vybavené poměrně velkou tryskou 0,75 mm. Výška vrstvy byla nastavena na poměrně velkých 0,3 mm, rychlost tisku byla 1500 mm/min. Tryska

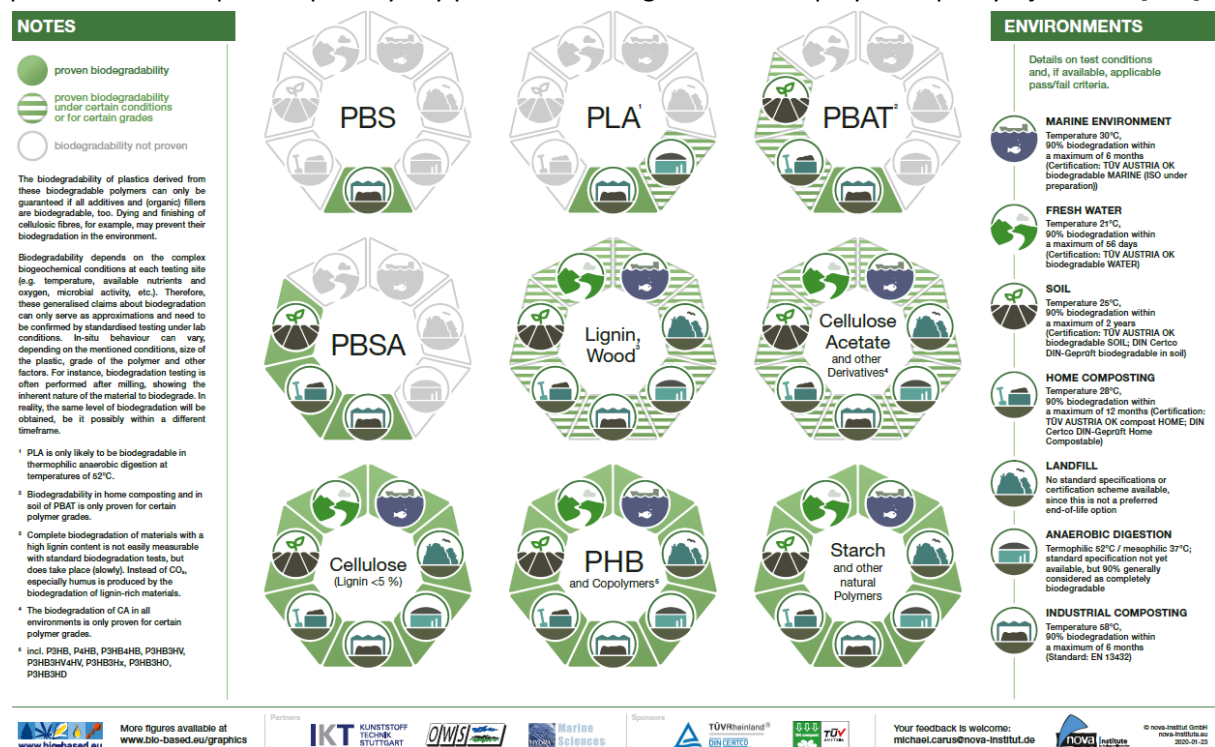
byla temperována na 190 °C a skleněná tisková podložka potažená PVA lepidlem byla vyhřívána na 40 °C [122]. Do PHA (blíže nespecifikováno, T_m 145 °C) byla také přidávána dřevní moučka (střední velikost částic 75 μ m). Vzhledem k tomu, že nebyla přidávána žádná kompatibilizace ani plastifikace, výsledný materiál se choval křehce [123]. Jednou z možností je použití buničinných vláken z celulózového a papírenského průmyslu [124]. V této práci byly připraveny biokompozity z PLA, PHA a vláken sulfátové buničiny za účelem nalezení vhodného složení filamentů pro 3D tisk. Přidání 30 % sulfátových vláken k PHB/PLA nevedlo ke zlepšení mechanických vlastností. Tisknutelnost složitých geometrií byla dobrá.

PHB bylo také míseno s víceštěnými uhlíkovými nanotrubičkami (MWCNT) v množství od 0,25 do 5 % pro dosažení elektrické vodivosti biomateriálu [125]. U kompozitů byla pozorována dobrá dispergace v makro- a mikroměřítku. Přidání MWCNT mělo za následek zvýšení Youngova modulu pružnosti a snížení napětí při přetržení. Materiály úspěšně prošly test biokompatibility s buňkami MRC. Výsledky ukazují potenciál pro použití v biomedicínských elektronických zařízeních.

4.4 Biodegradabilita finálních PHA bioplastů a biokompozitů

Biodegradace je proces, při kterém se rozkládá molekulární struktura organické látky působením mikroorganismů za přítomnosti kyslíku (aerobní) na oxid uhličitý, vodu, minerální soli a novou biomasu, nebo za anaerobních podmínek za vzniku metanu. Kromě prostředí závisí biodegradace na mnoha materiálových faktorech (chemická struktura, morfologie, M_w , krystalinita, a další).

Očekávání vědců i politiků od bioplastů nyní naráží na realitu a potřebu cirkulárního přístupu. Biodegradabilita znamená ztrátu hodnoty materiálů. Proto tuto vlastnost doporučuje EK využívat pouze tam, kde je to žádoucí - např. jako bariérový povlak nebo nosič hnojiva a dalších agrochemikálií, obaly na čajové sáčky, na bioodpad, nebo materiál pro náhradu syntetických primárních mikroplastů apod. Rychlý přehled o biodegradabilitě biopolymerů poskytuje Obr. 3 [126].



Obr. 3: Biodegradabilní polymery a jejich vlastnosti v různých prostředích [126]

Aerobní degradace je pokryta zkušebními metodami ASTM D5988 [127] a D5338 [128]. Oba standardy popisují měření vývoje CO₂ s ohledem na mezofilní nebo termofilní teploty. Podle normy ASTM D5988 by biodegradace měla dosáhnout 70 % do 45 dnů a její hranice by měla být dosažena za méně než šest měsíců, aby byla považována za platnou [57]. Standard ASTM G160 [129] popisuje proces biodegradace pomocí měření úbytku hmotnosti. Anaerobní degradace je dokumentována v normách ASTM D5511 [130] a D5526 [131], které se podobají prostředí biologicky aktivních skládek. Kromě toho je cyklus následné degradace na skládce tvořený aerobní degradací následovanou anaerobní degradací diskutován v normě ASTM D7475 [132], [109].

Už v r. 1992 vyšla publikace [133] ukazující vliv teploty prostředí na rychlost biodegradace PHB a PHBV a to v prostředí půdy za laboratorních podmínek, ve vodním prostředí a kompostu. Vstříkované zkušební vzorky z PHB ve tvaru dogbone ztratily po 200 dnech při 28 °C v půdě 74–93 % původní hmotnosti. V univerzitním sladkovodním rybníku polymery degradovaly velmi pomalu; po půl roce ponoru byl zaznamenán pouze 4–7% úbytek hmotnosti. V lokální kanalizaci bylo dosaženo podobných procent úbytku hmotnosti, ale po pouhých 2 měsících. V mořské vodě docházelo k rychlé degradaci: po půl roce zůstalo 61–71 % původní hmotnosti. Rychlost degradace PHA je obtížné předpovědět, a to i při kontrole teploty, pH a obsahu vody.

Ve směsi PHB s PHBV (22% HV) s větší koncentrací PHBV klesá krystalinita a roste rychlost hydrolytického rozkladu ve fosfátovém pufru s pH 7,4 [134]. Výrazně rychlejší biodegradace PHBV než PHB byla prokázána i v kompostu [135].

Tenké filmy připravené litím z roztoku chloroformu byly podrobeny degradaci jak v pufru, tak v přítomnosti extracelulární PHB depolymerázy. Rychlost enzymatické degradace byla mnohem rychlejší než rychlost jednoduché hydrolytické degradace. K enzymatické degradaci došlo povrchovou erozí. Hmotnost a tloušťka filmu s časem klesala, zatímco M_w polyesterových filmů zůstala během enzymatické degradace téměř nezměněna. Rychlost eroze polyesteru depolymerázou klesala v řádu P3,4HB > PHB > PHBV. Rychlá eroze P3,4HB filmu PHB depolymerázou může být způsobena snadnějším atakem molekuly enzymu směrem k esterovým skupinám kopolyesterových řetězců, protože sterické bránění jednotek 4HB je menší než u jednotky 3HB nebo 3HV [136]. V případě biodegradace PHA v mořské vodě je mechanismem degradace také povrchová eroze a nejdůležitějším parametrem je teplota prostředí [137].

I vysoce krystalické PHB tedy podléhá biologickému rozkladu. Konstrukce výrobku na jeho bázi však vyžaduje často přídavek jiného polymeru, použití procesních aditiv a reakčních činidel, případně plniva a výztuže. Navíc při termické degradaci v rámci procesu zpracování PHB vznikají krotónové konce. Je tedy otázkou, jak ovlivní složení plastu a jeho zpracování finální biodegradabilitu.

4.5 Cíle

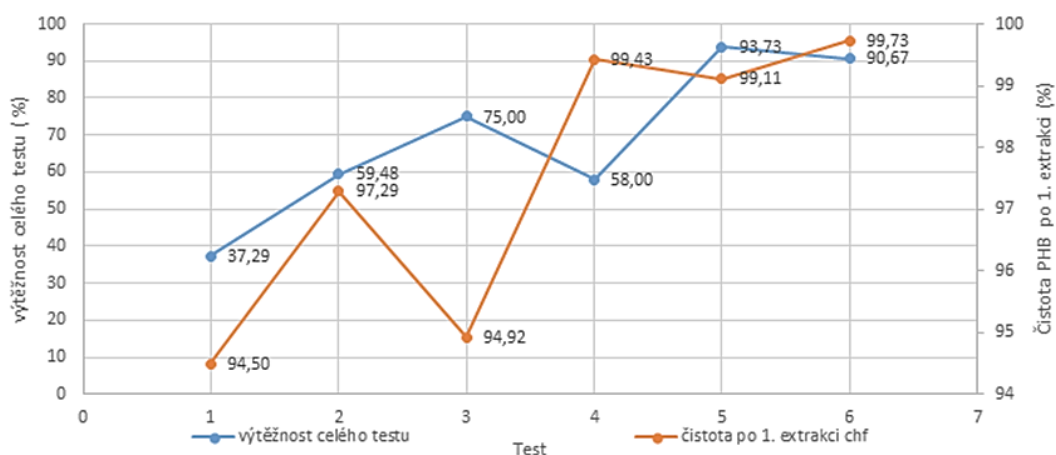
Postupně zlepšující se dostupnost a kvalita PHB HYDAL a PHB TianAn byla motivací k vytýčení v té době poměrně odvážného cíle – vyvinout a optimalizovat PHB materiál s řízenými vlastnostmi pro 3D tisk metodou FDM. Tento cíl byl také deklarován v projektové žádosti posléze úspěšně realizovaného projektu **PR 4**. Tomuto cíli však předcházela mnohem důležitější dílčí cíl - nalézt zpracovatelské postupy pro experimentální materiál PHB HYDAL a PHB TianAn do formy funkčního recyklovatelného termoplastu. A jak ukazuje výše uvedená rešerše, z pohledu dnešních publikovaných informací to byl nelehký úkol s ambiciózním cílem.

4.6 Dosažené výsledky

Tato kapitola je průvodcem vybraných výsledků publikovaných v 11 publikacích týmu Laboratoře bioplastů za posledních 10 let (Pub. 4–14) a je záměrně doplněná o některé nepublikované výsledky. K některým výsledkům jsou také uvedeny komentáře z dnešního pohledu a ve světle nově publikovaných informací z literatury.

4.6.1 Zpracovatelnost a stabilizace PHB

Práce probíhaly s experimentálním materiálem Hydal, jehož produkci zajišťovala společnost Nafigate. Vývoj procesu výroby zahrnoval jak optimalizaci upstreamu tak downstreamu, což mělo za následek proměnnou a až na výjimky zpravidla zlepšující se kvalitu produkovaného materiálu (Obr. 4). Jako zdroj uhlíku pro bakterie byl při procesu fermentace využíván použitý kuchyňský olej, který měl kolísavou kvalitu a složení. Biotechnologický proces nebyl na tyto změny citlivý, ale nevyužité látky z fermentace přecházely do druhého kroku extrakce. Obsah zbytkového oleje byl monitorován a předpokládalo se, že bude v procesu izolace odstraněn. Extrakce probíhala v chloroformovém roztoku, kdy se sedimentací oddělený polymerní roztok nástříkával do horké vody srážecí smyčky (V2). Vysrážený polymer se jímal ve formě „vloček“, které se následně sušily. V případě neoptimálně provedeném izolačním procesu však přecházely estery mastných kyselin spolu s dalšími látkami do polymeru. Podobně snižovaly čistotu finálního polymeru i zbytky buněčných stěn.



Obr. 4: Vývoj kvality PHB Hydal z pohledu čistoty a dosaženého výtěžku

Tyto zbytkové látky se pak projevovaly při zpracování v tavenině jako prodegradační činidla, která urychlovala termický rozklad, drasticky snižovala střední molekulovou hmotnost, tím i viskozitu a zpracování klasickou extruzí tak v podstatě znemožňovala. I malé množství nečistoty kolem 1 % způsobuje chování viz Obr. 5. Bylo nezbytné sledovat čistotu, distribuci molekulové hmotnosti a reologické chování taveniny. Čistota materiálu byla sledována metodou GC-FID (chromatografické stanovení zastoupení esterů 3HB), ale chyba měření této metody při reálných čistotách nad 99 % byla kolem 1 %. PHB však bylo na svoji čistotu při zpracování v extruderu mnohem citlivější. Projev byl zaznamenán zejména v barevnosti (žlutosti) po přetavení v definovaných podmínkách a ve vývoji posunu barevnosti s teplotou. Vznikl proto jednoduchý vzorník zohledňující žlutost vs. čistotu, dle kterého bylo možné se jednoduše orientovat.

Distribuce molekulových hmotností byla sledována pomocí GPC. Díky častým poruchám tohoto zařízení na FCH VUT bylo z počátku měření prováděno i na dalších dvou pracovištích, výsledky však nebyly zcela souměřitelné. Hodnoty M_w se pohybovaly mezi 400–600 kDa. Důležitějším ukazatelem

kvality polymeru však byla stabilita M_w při procesu zpracování v tavenině. Protože M_w ovlivňuje reologické chování, bylo logické sledovat reologickou stabilitu při teplotě zpracování. První pokusy na rotačním reometru ARG-2 však dopadly nevalně. Metoda musí obsahovat krok, při kterém se PHB mezi deskami reometru roztaví, což je vzhledem ke konstrukci tohoto reometru a vysoké krystalinitě časově náročné a dochází k degradaci PHB už v tomto kroku. Při měření pak dochází k takovém poklesu viskozity, že tavenina odtéká z měřících ploch a měření je zkresleno (a navíc pokaždé jinak). Ze stejného důvodu selhávalo i měření MFI. Ve spolupráci se Slovenskou technickou univerzitou v Bratislavě (STUBA) tak vznikla metodika sledování komplexní viskozity a relativní viskozity v čase při teplotách 170, 180 a 190 °C na gumárenském reometru, který disponuje zavřenou komorou. Ten navíc dokáže simulovat i vyšší smykové namáhání podobné tomu ve dvojnokovém extruderu. Z rychlosti poklesu viskozit byla usuzována stabilita a tím i kvalita PHB. Tato metoda se používá s úspěchem do dnes.

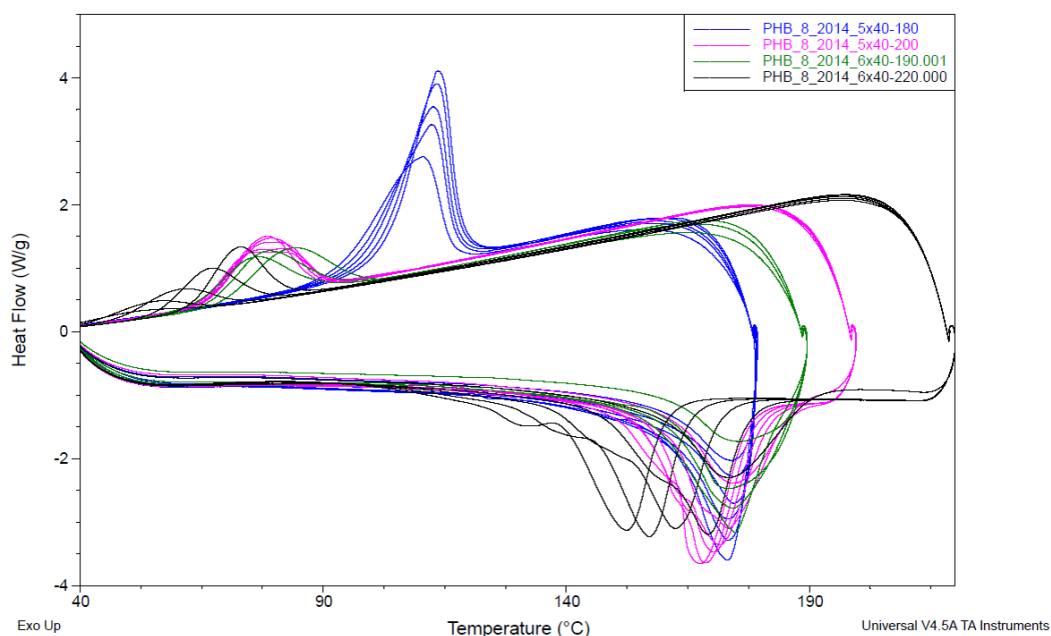


Obr. 5: Když PHB nedosahuje základních zpracovatelských parametrů...

Stabilitu materiálu bylo možné sledovat také vytvořenou metodou cyklického DSC. Vzorek je při této metodě vystaven opakujícím se cyklům ohřevu na zpracovatelskou teplotu, isothermní výdrži a následnému chlazení na 40 °C, kdy již neprobíhá krystalizace. Z rozdílů záznamu jednotlivých cyklů lze usuzovat míra stability PHB. Obr. 6 ukazuje citlivost materiálu na zpracovatelskou teplotu. Při 180 °C nedojde v DSC k úplnému roztavení materiálu. Polymer zůstává nukleován zbytky krystalické fáze a velmi rychle (při teplotách nad 110 °C) začíná při chlazení krystalizovat. Teplota tání i krystalizace se mění jen velmi málo. Už při ohřevu na 190 °C dochází k heterogenní nukleaci až při teplotách pod 90 °C. Při měření s maximem v 200 °C jsou již pozorovatelné změny v teplotě tání a při maximu v 220 °C lze již vidět prudký pokles teplot tání a krystalizace související s degradačními procesy.

Paralelně s testováním PHB Hydal a poskytování zpětné vazby k optimalizaci procesu výroby zejména v rámci projektu **PR3** probíhal výzkum v rámci **PR1** a **PR2** i na komerčních materiálech PHB. Jedním z nich bylo PHB od společnosti TianAn, který byl přepracováván v německém Biomeru pod stejnou obchodní značkou. Surový (TianAn ENMAT) i kompaundovaný polymer s 5% tributylcitrátem a nukleanty (směs BN a neznámé organické látky) byly používány pro vývoj receptur. Vycházelo se ze zkušeností se zpracováním konvenčních plastů, a proto byly nejprve testovány přísady změkčovadel, nukleantů, lubrikantů a stabilizátorů. Testy byly prováděny na hnětiči Brabender a výsledný kompaund byl přelísován na vyhřívaném lisu do podoby zpravidla 0,5 mm tlusté fólie. Z ní byla

vyseknuta testovací tělesa ve tvaru malého dogbone 5B. Z testovaných variant materiálových složení zahrnujícího celkem 103 kombinací 40 vybraných aditiv nedosáhla žádná zásadní změny v mechanických vlastnostech. Všechny vzorky se po několika dnech za pokojové teploty chovaly křehce s tažností do 10 procent. Pozorovatelné byly změny reologie a stability materiálu při použití některých změkčovadel a stabilizátoru na bázi karbodiimidových nebo epoxidových skupin. V rámci bakalářské práce **VSKP1** byly také testovány možnosti změny struktury roubováním chlóru a flóru.



Obr. 6: Hodnocení stability PHB pomocí cyklického DSC, vliv maxima teploty při ohřevu

Z dnešního pohledu je zřejmé, že žádná zásadní změna v mechanice nastat ani nemohla. Jak vyplynulo z rešerše výše uvedené, přidavek aditiv k čistému PHB obecně neposkytuje zlepšení mechanických vlastností vlivem fyzikálního stárnutí PHB spočívajícího v dokrystalizaci amorfní fáze. Navíc, jak bylo posléze zjištěno, experimenty byly zatíženy dvěma negativními skutečnostmi. Teplota hnětiče byla řízena termostátovanou olejovou lázní. Skutečná teplota hnětiče však kolísala někdy až 20 °C pod nastavenou hodnotou (zjištěno po dvou letech po zprovoznění měření přímo v komoře). Proto byla teplota nevhodně zvedána k 190 °C, což způsobovalo degradaci některých vzorků. Druhým problémem je samotná charakterizace vzorků z rozlisované fólie. Tato metoda byla využívána z důvodu nedostatku materiálu pro vstřikování a jak se ukázalo, i jinak funkční matriály na bázi PHA zpracované touto metodou nevykazovaly valné výsledky. Charakterizace vzorků fólií připravených z roztoku chloroformu, která se objevuje v mnohých publikacích, byla kvůli zkreslení zavržena.

Množství materiálu dostupné pro experimenty v případě PHB Hydal umožňovalo od r. 2018 navrhovat experimenty s maximální hmotností zpracovaného materiálu kolem 300 g. To umožňovalo průchod materiálu menším jednošnekovým extruderem (Haake 19 mm, L/D 25) ze ziskem cca 200 g granulátu. Záludnost zpracování PHB Hydal však navíc spočívala v jeho fyzikální formě. Díky srážení chloroformového roztoku do horké vody vznikaly 5–15 mm velké nepravidelné a velmi členité lehké útvary, které byly pracovními nazvány vločky (Obr. 7). Tyto vločky nebyl schopen dávkovat žádný z konvenčních testovaných systémů, neboť při tlaku tvořily relativně spojenou hmotu podobnou plsti. Protože byly vločky velmi měkké, nebylo je možné ani efektivně mlít na dávkovatelný prášek. Vznikla tak myšlenka pomlet tento materiál na nožovém mixeru s velmi ostrými planžetovými čepelemi. Modifikací 20L nerezového drtiče ovoce tak v laboratoři vznikl stroj, který umožnil předzpracování

tohoto problematického materiálu. Sypnost se tím zlepšila natolik, že na míru vyrobený dávkovač se spirálovým šnekem byl schopen dávkovat materiál do násypky a bylo možné jej v jednošnekovém extruderu granulovat pro následné použití v konvenčních zpracovatelských strojích.



Obr. 7: Zleva: PHB před zpracováním, drtič na ovoce, PHB po zpracování

Protože i tak bylo množství výsledného materiálu nedostatečné pro vstřikování, pro základní orientační testy mechanických vlastností byla využívána struna získaná z extruderu. Charakterizace v tahu byla prováděna s vědomím, že je ve struně materiál částečně zorientován a nelze tak vlastnosti přirovnávat ke zkušebním vstřikovaným tělesům. Nicméně se tento typ vzorku ukázal být proti těm vyseknutým z lisovaných fólií mnohem více vypovídající.

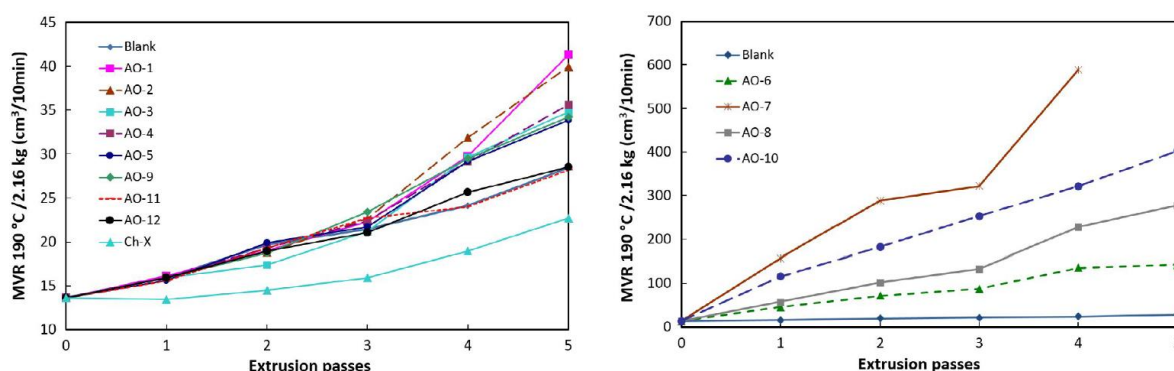
Problémem byl i proces chlazení taveniny ve formě struny, který neodpovídá teplotní historii vzorku připraveného vstřikováním, což se projeví v jeho odlišné krystalické struktuře a tím na jeho vlastnostech. Běžně používaný proces chlazení struny do záměrně dochlazované vody lze teplotním profilem přirovnat spíše k technologii výroby chill-roll fólie. Za těchto podmínek je však PHB přechlazeno ve smyslu neproběhlé krystalizace, a zůstává měkké, velmi lepkavé a tedy nezpracovatelné. Při odtahu struny totiž nemá potřebnou pevnost a granulace ve střížném granulátoru zcela selhává. Z tohoto důvodu byla navržena modifikace procesu extruze a chladicí lázeň byla vybavena ohříváčem nastaveným na teplotu 60 °C. PHB tak bylo ochlazováno ze zpracovatelské teploty pomaleji a docházelo k dostatečné krystalizaci tak, aby byla možná výroba struny i granulí. A teplotním profilem se vzorky struny přiblížily vzorkům vstřikovaným.

Jednou z logických otázek při zpracování PHB byla jeho procesní stabilizace. V tu dobu se autoři článků orientovali na využití antioxidantů (často právě Irganox 1010) a to bez vysvětlení důvodu použití. To vedlo k systematickému výzkumu vlivu používaných antioxidačních stabilizátorů (tabulka 1) na reologické vlastnosti PHB v průběhu vícenásobné extruze (Obr. 8). Záměrně byl přidán jeden zástupce chain extenderu, který se jevil při prvotních testech jako slibný stabilizátor reologických vlastností taveniny. Výsledky této práce byly publikovány (byť mnohem později, než reálně vznikly) v **Pub 4**.

Bylo potvrzeno, že běžné primární a sekundární antioxidanty, stejně jako multifunkční HALS, jsou v PHB neúčinné. Kromě toho, přítomnost běžných antioxidantů v matrici PHB prokázala zcela nepříznivý účinek, který zvýšil rychlost tepelného rozkladu. Prodegradační efekt struktur obsahujících atomy fosforu a dusíku s asymetrickými volnými elektronovými páry byl dokonce dramatický. Žádná z běžně používaných struktur stabilizátorů nevykazovala schopnost chránit PHB během zpracování. Smysl má pouze použití chain-extenderů, přestože nemají skutečnou schopnost polymer chránit, ale pouze kompenzovat účinky degradace.

Tabulka 1: Složení jednotlivých testovaných materiálů (Pub 4)

Blank	Base	None
AO-1	Base + 0.5 % BHT	Low-molecular phenol, 2,6-di-t-Bu substituted
AO-2	Base + 0.5% Irganox1010	High-molecular phenol, 2,6-di-t-Bu substituted
AO-3	Base + 0.5% Cyanox AO 1790	High-molecular phenol, 2-methyl-6-t-Bu substituted
AO-4	Base + 0.5% Irgafos168	Phosphite, non-hydrolyzable
AO-5	Base + 0.5% Irganox B225	Phenol-phosphite synergy blend (1:1)
AO-6	Base + 0.5% Ultranox 626	Phosphite, partially hydrolyzed
AO-7	Base + 0.5% Genox EP	Amine oxide
AO-8	Base + 0.5% Irgastab FS042	Hydroxylamine
AO-9	Base + 0.5% Irganox HP136	Lactone, benzofuranone
AO-10	Base + 0.5% Uvinul4050H	HALS, low-molecular
AO-11	Base + 0.5% Ronotec201	Vitamin E, 2,6-dimethyl substituted phenol
AO-12	Base + 0.5% natural curcuma	Low-molecular phenol, 2-methoxy substituted
Ch-X	Base + 0.5% Raschig 9000	Carbodiimide chain extender



Obr. 8: Vývoj indexu toku při vícenásobné extruzi jednotlivých vzorků se stabilizátory

4.6.2 Mísení s ostatními polymery

V rámci řešení projektů bylo cílem vyvinout materiál vhodný ke vstřikování (projekt **PR1**, výstup **V4**) a k výrobě biodegradabilních fólií pro agronomické aplikace (projekt **PR2**, výstup **V5**). Na základě negativní zkušenosti s pouhou aditivací PHB bylo hledáno řešení v podobě polymerní směsi. Na základě rešerše byly vybrány polymery PLA, PBAT, PBS, PVAc a P3,4HB jako vhodní kandidáti na další testy pro cílené aplikace. Bohužel PBS ani P3,4HB nebylo v té době dostupné v dostatečném množství a kvalitě a nebyly nakonec testovány. Dnes je již známo, že P3,4HB s vysokým podílem 4HB funguje výborně jako vysokomolekulární změkčovadlo, modifikátor houževnatosti i jako procesní stabilizátor.

PLA spolu s PVAc (v několika stupních deacylace) bylo testováno s přidávkem od 5 do 20 %. Spolu s přidávaným změkčovadlem na bázi esteru citronové kyseliny bylo možné nastavit výsledné vlastnosti z hlediska reologie a tažnosti v poměrně širokém rozsahu (5–250 %). I přes pokles tažnosti po několika dnech za laboratorní teploty vykazovaly nejtažnější vzorky 50 %. Z těchto kompaundů bylo možné připravit vzorky injekčním vstřikováním i fólie rozfukováním. Koncentrací PVAc bylo možné efektivně řídit (přesněji snižovat) rozložitelnost v laboratorním kompostu.

Vybrané receptury byly na základě požadavků agronomů obarveny modrým koncentrátem a přidávkem mletého vápence byla záměrně snížena průsvitnost fólie. Takto připravený materiál byl použit k výrobě modelových zemědělských fólií, které byly následně testovány ve dvou sezonách na záhonech s jahodami ve Výzkumném a šlechtitelském ústavu ovocnářském Holovousy s.r.o (výstup **V4**). Zde se však po dvou letech ukázalo několik zásadních problémů:

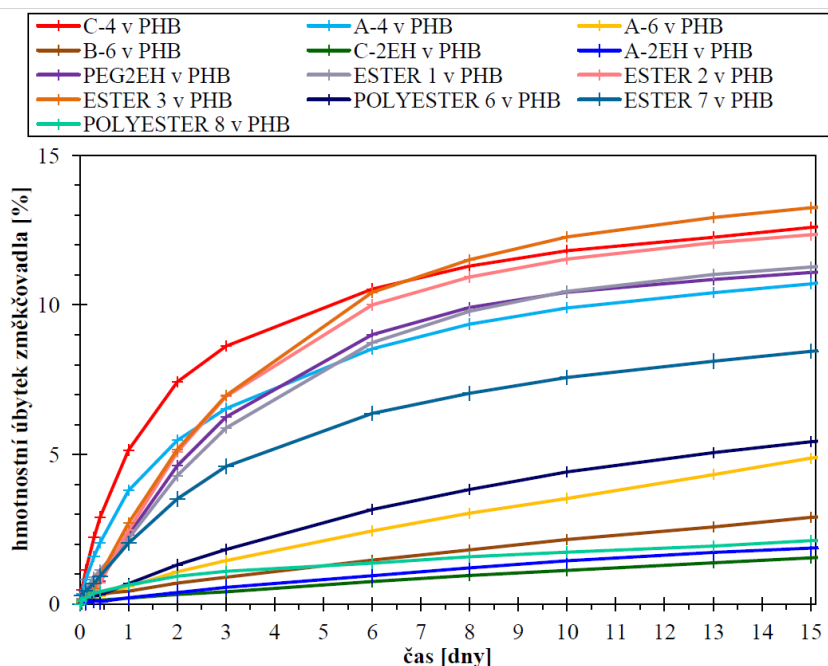
- I v kompostu nejrychleji biorozložitelné fólie nevykazovaly na reálném záhoně žádný rozklad.
- I fólie s nejvyšší tažností se v druhém roce začaly křehce drolit a generovat mikroplasty.
- Odstranění fólie ze záhonů bylo doprovázeno tvorbou mikročástic v půdě.

Synergický efekt použití stabilizátoru (Rashig 9000) byl pozorován i v těchto směsích. Směsi byly pro ověření zpracovatelnosti zkušebně kompaundovány na čtvrtprovozní lince (PIB Brno) a testovány ve vstřikovně (Plastyko Kobylí) na reálných výrobcích. Testy byly úspěšné a směs se ukázala zpracovatelná ve vstřikolislu bez jakýchkoliv problémů. Materiály bez PVAc, tedy směsi na bázi PHB/semikrystalické PLA/změkčovadlo, neposkytovaly potřebný rozsah vlastností. Vznikla hypotéza, že vyšší tažnost a houževnatost poskytuje materiálu právě přidání ryze amorfního polymeru PVAc, což doposud používané semikrystalické PLA nenabízelo. Výměnou PLLA za PDLLA bylo dosaženo potřebných vlastností i bez PVAc, čímž se zvýšila schopnost biodegradace výsledného materiálu. PVAc tak bylo vyřazeno z dalších experimentů.

4.6.3 Aditivace změkčovadly

Vlastní křehnutí bylo však nadále pozorováno na fóliích i na vstřikovaných tělesech. Aby bylo možné efektivně testovat dopad materiálových změn v receptuře a podmínek zpracování na tento proces křehnutí, byly zkoušky prováděny akcelerované – při zvýšené teplotě (110 °C). Z provedených experimentů vyplynulo, že za krátkodobé křehnutí je zodpovědné již popsané fyzikální stárnutí a za dlouhodobé pak migrace použitých nízkomolekulárních změkčovadel. Byl pozorován úbytek hmotnosti fólií i vstřikovaných dílů při vyšší teplotě, který odpovídal hmotnosti změkčovadla.

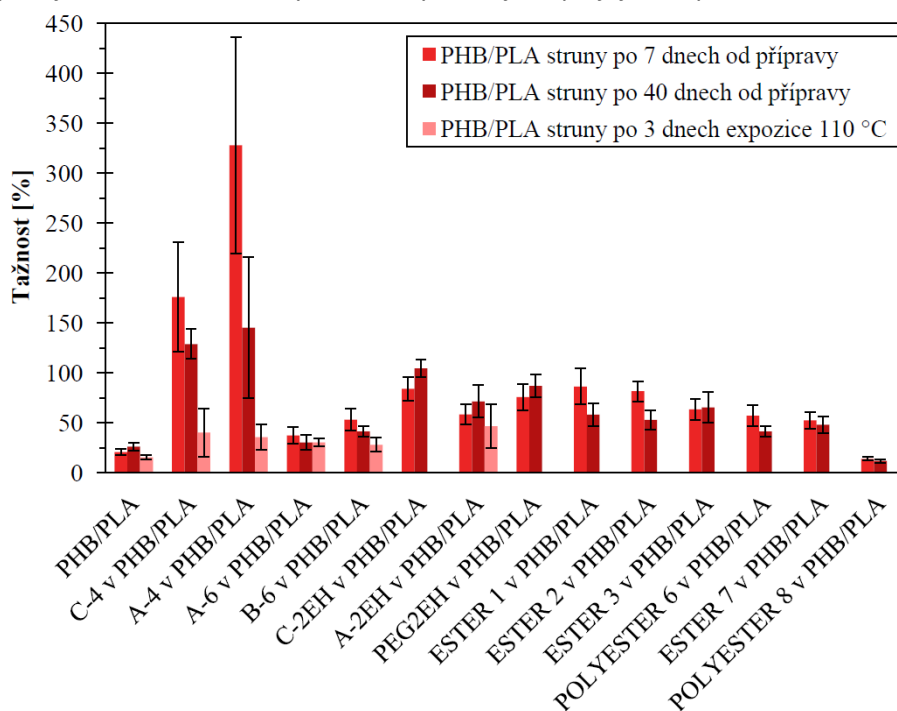
Z těchto výsledků vyplynula výzva hledat změkčovadla s větší molekulou a nižší schopností migrace na povrch, která budou mít dostatečně změkčující efekt. Byly vytipovány další komerčně dostupné estery kyseliny citronové: butyltrihexyl citrát a acetyltrihexyl citrát (Citroflex B6 a A6), PEG a jeho 2etylhexyl derivát, oligomerní adipát a další laboratorně syntetizované molekuly. Studium efektu změkčení a rychlosti migrace změkčovadla za různých podmínek se zabývala diplomová práce **VSKP2** a v případě vláken diplomová práce **VSKP3**. Nejdůležitější výsledky ukazují Obr. 9 a Obr. 10.



Obr. 9: Úbytek změkčovadla ze vzorků při teplotě 110 °C

Sledování hmotnosti extrudovaných strun s přidavkem 15 % změkčovadla vykazovalo obrovské rozdíly v rychlosti jeho migrace. Testem difúze změkčovadel provedeným při 110 °C v laboratorní sušárně bylo zjištěno, že komerční tributylcitrát byl nejvíce difundujícím změkčovadlem z PLA, PHB i z jejich směsi. Naopak nejméně difundujícím komerčním změkčovadlem z PLA, PHB i ze směsi PHB/PLA byl acetyltris(2-ethylhexyl)citrát. Po 15 dnech z PHB/PLA vydifundovalo jen 2,4 hm. % oproti tributylcitrátu, kterého vydifundovalo z PHB/PLA 14,3 % z dávkovaných 15 hm. %. Acetylce, butyrylace i přidavek ethylové postranní skupiny na hlavních řetězcích napomohly k zpomalení difúze změkčovadla na bázi esteru kyseliny citronové. Ze syntetizovaných změkčovadel se stalo nejméně difundujícím z PHB i PHB/PLA změkčovadlo na bázi polyesteru kyseliny mléčné s řetězci zakončenými 2-ethylhexylovými skupinami. Z PHB/PLA po 15 dnech expozice 110 °C tohoto změkčovadla vydifundovalo jen necelé 2 hm. % z předpokládaných 15 hm. %. V PLA toto změkčovadlo zkoušeno nebylo. Tam byl nejpomaleji difundujícím ze syntetizovaných změkčovadel tris(2-ethylhexyl)citrát. Naopak nejrychleji difundujícími syntetizovanými změkčovadly z PLA, PHB i PHB/PLA se stala změkčovadla na bázi esteru kyseliny 2-ethylhexanové s PEG. Některé jeho estery vydifundovaly po 15 dnech expozice při 110 °C z PHB a PHB/PLA ve stejném množství jako tributylcitrát.

Nicméně po 3 dnech expozice 110 °C směsi PHB/PLA jak s ATBC, tributylcitrátem a komerčním polyethylenglykol bis(2-ethylhexanoátem), tak se všemi testovanými syntetizovanými změkčovadly zaznamenaly rapidní zhoršení mechanických vlastností. Po 40 dnech směsi s ATBC a tributylcitrátem opět ztratily svoji houževnatost, i když ne tak výrazně jako po jejich expozici 110 °C.



Obr. 10: Tažnost strun připravených s různým změkčovadlem

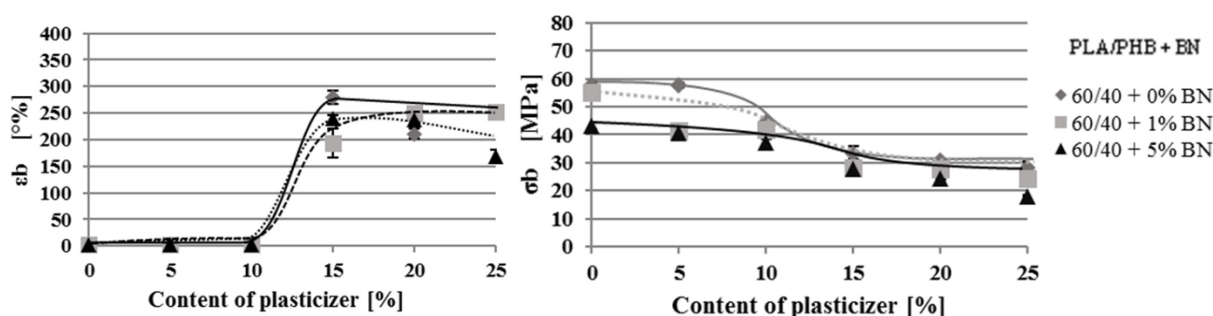
V této práci nebylo nalezeno vhodné změkčovadlo pro polymerní směs PHB/PLA, které by způsobilo vhodné mechanické vlastnosti a zároveň by jeho difúze za zvýšené teploty byla dostatečně pomalá. Některá změkčovadla se stala z hlediska mechanických vlastností účinnými změkčovadly v polymerní směsi, jako například komerční ATBC (zde A-4). Jejich difúze z plastu však byla za zvýšené teploty příliš rychlá. Na druhé straně byla nalezena změkčovadla, která z polymerní směsi za zvýšené teploty difundovala velmi pomalu, jako například syntetizované změkčovadlo na bázi polyesteru

kyseliny mléčné s řetězci zakončenými 2-ethylhexylovými skupinami, kterého po 15 dnech expozice 110 °C difundovalo z PHB/PLA směsi nejmenší množství ze všech zkoušených změkčovadel. Nicméně toto změkčovadlo způsobilo zhoršení mechanických vlastností oproti směsi neměkčené. Další práce by se proto mohly zaměřit na změkčování PHB/PLA směsi kombinací obou typů změkčovadel.

Účinnost změkčovadel lze určit také z posunu hodnoty T_g polymeru. Změkčovadla označovaná jako primární by měla T_g polymeru snížit v důsledku zvýšení pohyblivosti polymerních řetězců amorfni fáze. Stanovení je však komplikováno faktem, že PHB obsahuje jen malé množství pohyblivé amorfni fáze. Z tohoto důvodu je celková změna tepelné kapacity pomocí DSC obtížně detekovatelná.

4.6.4 Nukleace

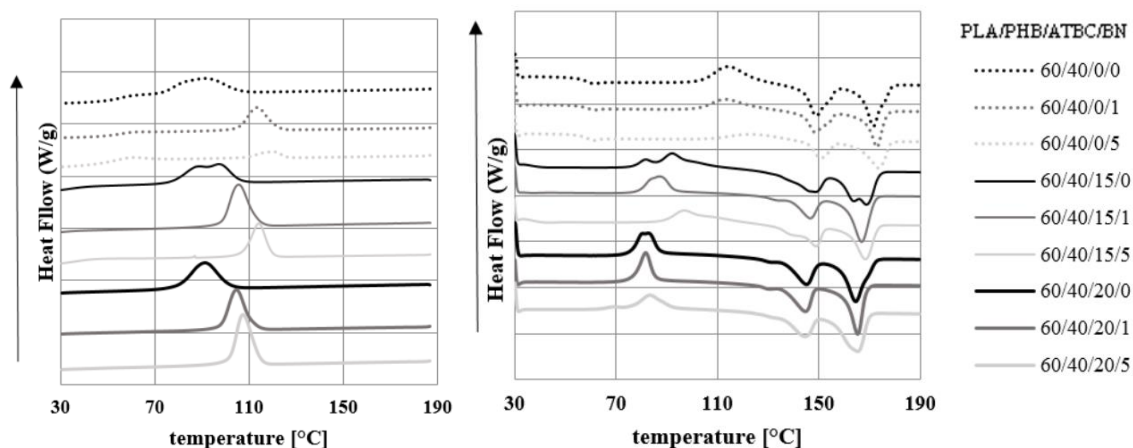
Změkčení pomocí přísavky vhodného organického změkčovadla probíhá v amorfni fázi, je však třeba řídit i strukturu krystalické fáze PHB kinetikou krystalizace. Společný záměr Laboratoře bioplastů a pracoviště prof. Alexyho na STUBA porozumět vlivu aditivace na krystalinitu a kinetiku krystalizace směsí PLA/PHB vyústil v první společnou publikaci **Pub 5 (2017)**. Vzhledem k předešlému zaměření slovenského týmu na blendy s majoritním podílem PLA aditivované krystalickým PHB, byly kompaundovány směsi semikrystalického PLA/PHB v poměru 60/40. Byl variován přísavka změkčovadla ATBC v rozmezí 0–25 % a přísavka nitridu boritého (BN) jako nukleačního činidla v dávkách 0–5 %. Sledována byla zpracovatelská stabilita směsí kompaundovaných na dvoušnekovém extruderu pomocí vyhodnocení viskozity na oscilačním reometru RPA 2000 se zavřenou komorou. Mechanické vlastnosti byly testovány na fóliích vyrobených technologií chill-roll. Pomocí DSC byla sledována krystalizace.



Obr. 11: Vliv koncentrace změkčovadla ATBC ve směsi PLA/PHB na mechanické vlastnosti a role nukleantu

Překvapivým výsledkem byla závislost tažnosti a pevnosti fólií na množství změkčovadla na Obr. 11. I z dříve provedených experimentů na směsi PHB/PVAc/PLA bylo zřejmé, že pro materiály na výrobu fólie je třeba cca 15 % změkčovadla a pro vstřikování je třeba minimálně cca 10 %. Vyšší množství změkčovadla než 15 % vedlo zpravidla k jeho velmi rychlé difúzi z tuhacího materiálu. V případě majority semikrystalického PLA s PHB je dle výsledků závislost koncentrace změkčovadla na pevnost a tažnost ještě ostřejší.

Jak bylo již uvedeno v rešeršní části, vysokomolekulární PLA a PHB jsou zejména v poměru blízkém 1:1 nemísitelné. Ukázaly to i výsledky v této práci, kdy jsou jasně viditelné dva píky tání (140 a 170 °C) příslušející krystalickým doménám PLA a PHB. Přísavka BN zvýšil dle předpokladu teplotu krystalizace ve všech vzorcích nezávisle na množství změkčovadla. Zvýšení koncentrace změkčovadla posouvalo s klesajícím T_g studenou krystalizaci k nižším teplotám i v případě účinné nukleace (Obr. 12).

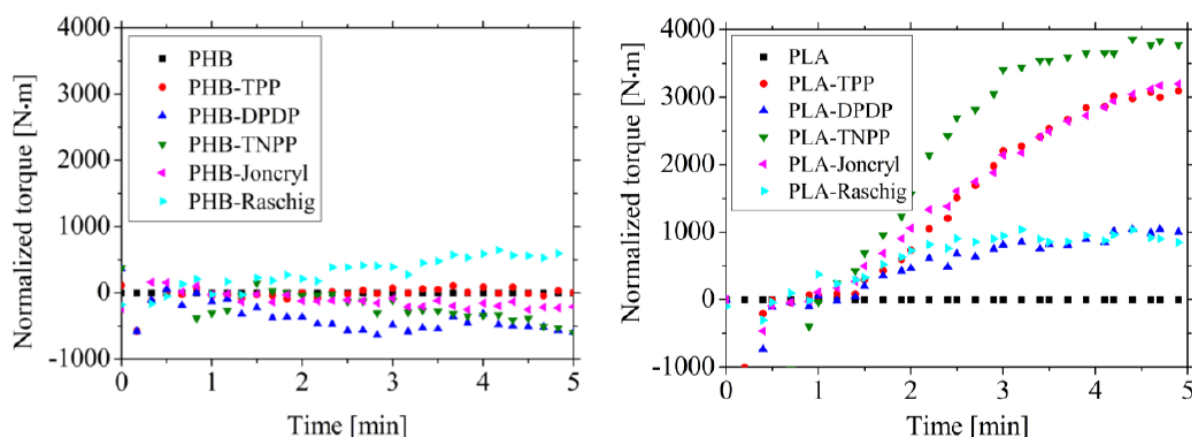


Obr. 12: Vliv přidavku ATBC na krystalizační chování PLA/PHB směsi

4.6.5 Stabilizace PHB/PLA směsí

Přestože byly omezeně mísitelné směsi PHB/PDLLA poměrně dobře zpracovatelné, bylo snahou řešit jejich stabilizaci a kompatibilizaci. Výsledky byly publikovány v **Pub 6 (2018)**. Protože se vybrané stabilizátory chovají v obou polymerech odlišně, byl navržen experiment sledující chování taveniny v přítomnosti vybraných stabilizátorů na trifenyfosfit (TPP), tris(nonylfenyl)fosfit (TNPP) a difenyliisodecylfosfit (DPDP) a chain extenderů na bázi poly-(1,3,5-triisopropylfenylen-2,4-carbodiimidu) (Raschig 9000), a polymerní epoxy-styren-akrylát (Joncryl ADR-4368). Účinnost stabilizace byla sledována pomocí kroutícího momentu hnětáku PLA i PHB a jejich hodnoty kroutícího momentu po odečtení referenčního materiálu byly vyneseny v čase.

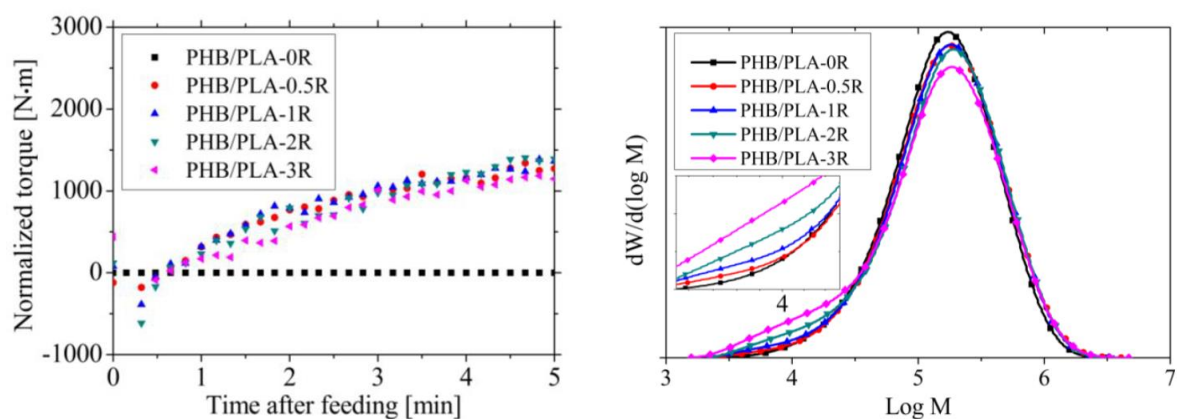
Z grafů na obrázku Obr. 13 je zřejmé, že pozitivní dopad na PHB měl pouze Rashig, což bylo v souladu s výsledkem zjištěným v předchozí práci. DPDP měl negativní dopad na viskozitu, TNPP a Joncryl také mírně negativní dopad, přídavek TPP bez měřitelného efektu. Naopak, v PLA se pozitivně projevil přídavek všech těchto aditiv. TPP a Rashig by tak mohly být vhodné kandidáty pro stabilizaci blendu. Pro optimalizaci dávky Rashig byly provedeny experimenty na blendu PHB/PLA (70/30).



Obr. 13: Vliv aditivace na reologii PHB a PLA

Jak je zřejmé z Obr. 14, už samotný 0,5% přídavek Rashigu se pozitivně projevil ve schopnosti stabilizovat reologii taveniny a jeho vyšší přídavek neměl již další vliv. Dle výsledků z GPC se při vyšší dávce než 0,5% v tavenině hromadí nezreagovaný Rashig a ovlivňuje tak parametry vypočtené

z distribuce M_w , zejména snížení číselně střední M_w . Výsledky jsou v souladu s navazující prací jiného kolektivu [138] (2021), kde testovali přídavek polykarbodiimidu v PLA kompozitu a prokázali úspěšnou reakci prodlužování řetězce mezi karbodiimidovou skupinou a karboxylovou skupinou PLA. Optimální obsah PCDI pro nejvyšší pevnost taveniny, stabilitu filmu při vyfukování a mechanické vlastnosti byl 0,25 % aditiva. V rešeršní části review [90] (2021) je dosažený výsledek citován a zmíněn jako využitelná metoda stabilizace reologie materiálů na bázi PHB.



Obr. 14: Efekt množství přidaného aditiva Rashig na reologii a molekulovou hmotnost

4.6.6 End of life PHB/PLA směsí

4.6.6.1 Recyklace PLA/PHB směsí

Recyklace konvenčních plastů je díky legislativním změnám a tlaku uvědomělých spotřebitelů jedno z velmi diskutovaných témat. V případě bioplastů a biokompozitů je situace složitější, protože neexistuje zavedený postup separace těchto materiálů v třídících linkách. Zřejmě nejrozumnější je zpětný odběr těchto materiálů k výrobci, který zná složení a chování materiálů a je tak schopen recyklaci efektivně zabezpečit. Laboratoř bioplastů si dala za cíl vyvíjet materiály recyklovatelné z materiálového pohledu, k čemuž je nutná znalost reologického chování při násobném zpracování.

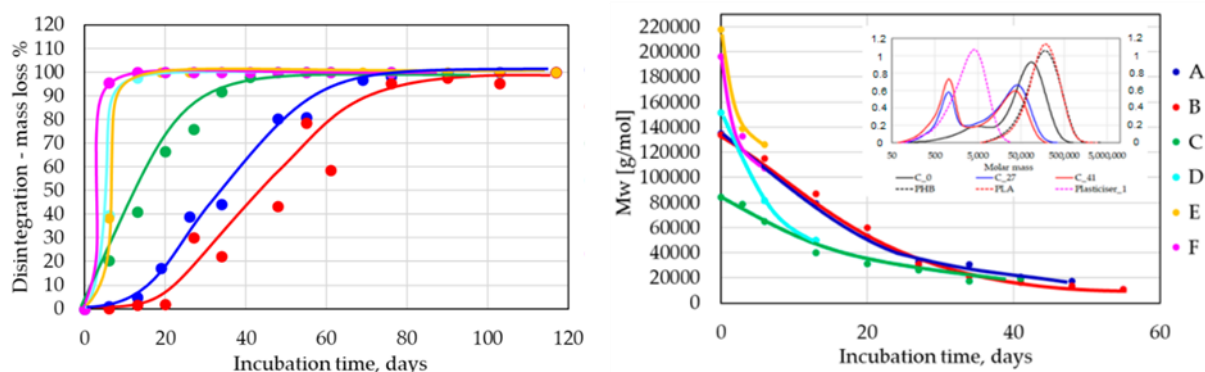
I z toho důvodu vznikla další společná práce s pracovištěm prof. Alexyho následně publikovaná v **Pub 7 (2020)**. Testována byla směs PHB/PLA (55/45) s aditivou kombinovanými na míru pro injekční vstřikování. Tento blend byl od STUBA převzat partnerskou komerční společností PANARA Ltd. Nitra a dodáván pod obchodním označením NONOILEN®IM 3056-2. Materiál byl podroben vícenásobné extruzi na 19 mm jednošnekovém extruderu Brabender Plasticorder s retenčním časem cca 1 min. Pomocí reometru RPA 2000 byla sledována komplexní viskozita, tahovou zkouškou byly charakterizovány mechanické vlastnosti strun, pomocí DSC byly měřeny termické parametry a GPC bylo využito pro sledování distribuce M_w . Určována byla také odchylka barevnosti.

Celková chromatická odchylka rostla s počtem cyklů a tím s dobou setrvání v extruderu. Materiál postupně jemně tmavnul. Napětí při přetržení se pohybovalo v rozmezí 23–35 MPa a nemělo zásadní klesající tendenci. Tažnost se po prvních dvou cyklech držela na hodnotě nad 17 % a po 5 cyklech byl zaznamenán pokles na cca 5 %. Teplota tání ani skelného přechodu nevykazovaly žádnou zásadní změnu. Hmotnostně střední M_w klesala společně s klesající viskozitou, nicméně na hodnoty, které stále umožňovaly zpracování materiálu a výrobu testovacích těles vstřikováním. Lze tak tvrdit, že tyto materiály jsou z hlediska recyklovatelnosti srovnatelné s dalšími konvenčně používanými polyestery. Je nutno podotknout, že materiály neobsahovaly chain extender, zde je tedy prostor pro zlepšení.

4.6.6.2 Biodegradabilita směsí PHB/PLA

Jednou z velmi diskutovaných metod likvidace výrobků na bázi PHB po ukončení života je jeho kompostování, případně jiný způsob biodegradace. Přestože legislativa řadí biologickou likvidaci těchto materiálů v kompostárně až na poslední z možností, je snahou zachovat tuto přirozenou schopnost PHB i ve vyvíjených materiálech na jeho bázi. Toto úsilí je hnáno zkušeností se zacházením s plasty zejména v rozvojových zemích a dopadem v podobě znečištění, kterému čelí celé lidstvo.

Práce poměrně širokého týmu na toto téma započala v r. 2019 a byla v r. 2022 publikována (**Pub 8**). Pro tuto studii byly vybrány materiály zahrnující 5 odlišných receptur na bázi PLA/PHB/TPS a 3 reálných způsobů zpracování (vstřikování IM, rozfukování fólie FB, termoforming TF). Vzorky byly vystaveny účinkům biodegradace *in vitro* dle přizpůsobené metody ISO14855, dále v průmyslové kompostárně a v laboratorním komposteru při 58 °C a 28 °C simulující průmyslový a domácí kompost.



Obr. 15: Vývoj ztráty hmotnosti vzorků v čase v laboratorním komposteru a jejich molekulové hmotnosti.

A – bikomponentní vstřikovaný kelímek tl. 4 mm z materiálu s TPS (vnější část) a bez TPS (vnitřní část);
B a C – vstřikovaný kelímek tl. 1 mm z materiálu bez TPS a s TPS; D – fólie pro termoforming 0,35 mm bez TPS,
E a F – vyfukovaná fólie tl. 0,04 mm bez a s TPS

Všechny vzorky prokázaly v laboratorním komposteru (65 °C) schopnost desintegrace na částice pod 2 mm. Všechny tři fólie se takto rozpadly do 20 dní, nejrychlejší průběh měl materiál F (s přidaným TPS). Dále následoval vstřikovaný kelímek s TPS, bikomponentní kelímek a nejpomalejší byl kelímek bez přídavku TPS (Obr. 15). Vývoj M_w klesal u fólií (D, E, F) poměrně strmě, což je zřejmě dáno i tloušťkou materiálu. U tlustostěnných vstřikovaných vzorků je směrnice poklesu menší a začíná od nižších hodnot. Vstřikování díky své zadrži v barelu zřejmě způsobilo pokles M_w už při zpracování. Vzorek C (pouze z materiálu s přidaným TPS) měl nejmenší M_w a pokles jeho rychlosti odpovídal spíše rychlosti ostatních vstřikovaných vzorků po 20 dnech. Všechny vstřikované vzorky bylo možné zachytit v pevném stavu při M_w nad 20 kDa, nižší hodnoty M_w měly už části, které nebylo možné v kompostu identifikovat.

Desintegrace je pouze orientačním měřením rozkladu materiálu v biologicky aktivním prostředí, nedává informaci o reálné přeměně plastu na CO_2 a biomasu. Z toho důvodu byla provedena měření biorozkladu v *in vitro* testu s měřením množství vygenerovaného CO_2 .

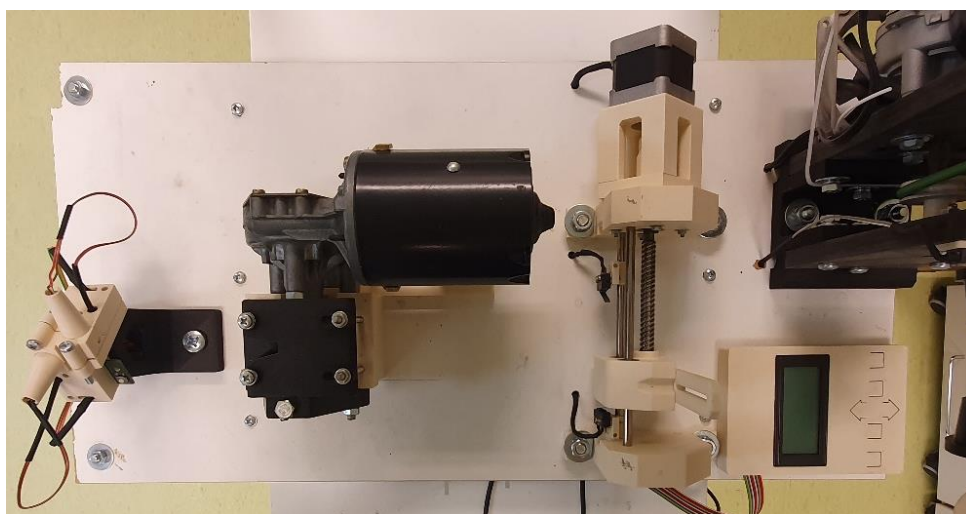
4.6.7 FDM 3D tisk PHB kompozitů

Při FDM tisku je třeba materiál dávkovat do tiskárny ve formě tiskové struny, která má předepsaný průměr a toleranci průměru i její ovality. V průmyslové praxi se dnes již běžně pro výrobu tiskové struny využívá jednošnekový extruder s kruhovou tryskou. Tok polymerní taveniny je pak dotvarován v kalibru a filament je následně chlazen ve vodní lázni nebo kaskádě temperované v případě

některých materiálů často i na teploty 50–60 °C umožňující krystalizaci materiálu. Tisková struna prochází laserovým měřidlem průměru měřicího zpravidla ve dvou na sebe kolmých osách. Na základě odchylek proti předepsanému průměru v obou těchto osách je řízena rychlost navíjení filamentu, na základě stability hodnot v čase obsluha zasahuje do teplotního profilu extruderu. Například pro nejběžnější typ struny průměru 1,75 je stanovena tolerance $1,75 \pm 0,05$ mm.

V laboratorním měřítku lze využít k výrobě tiskové struny i malý laboratorní jednošnekový extruder, při vhodném chování taveniny (stabilní tok) lze tiskový filament připravit i přímo na dvoušnekovém extruderu. Důležitým prvkem však zůstává systém měření průměru struny v obou rozměrech a říditelný odtah struny ideálně s možností navíjení. S rozvojem FDM tisku odstartoval v r. 2016 v USA uvedením na trh malého extruderu s odtahem a navíjením pro výrobu 3D tiskových filamentů Filabot, byl však pro Laboratoř bioplastů cenově nedostupný. Dnes má společnost Filabot produkty pro jednoduchou výrobu tiskové struny pro domácí uživatele i firmy včetně mnohého zajímavého příslušenství [139]. Proto byl v Laboratoři bioplastů navržen, vyroben a naprogramován systém dvouosého měření průměru struny, jejího odtahu a navíjení na tiskovou cívku tak, aby společně s jednošnekovým extruderem umožnil výrobu tiskové struny s akceptovatelnou přesností, viz Obr. 16.

Tento systém je založen na optickém snímači (lineárním diodovém poli) detekujícího šířku stínu vytvářeného osvětleným filamentem. Speciálně naprogramovaný jednočipový mikropočítač zpracovává naměřená data a ta převádí pomocí matematického modelu na průměr filamentu s přesností 10 μ m a hardwarově na napětí na svém analogovém výstupu [140]. Využitím dvou těchto poupravených snímačů a řídicí jednotky na platformě Arduino, která signál ze senzorů zpracovává, vznikl základ měřicí a řídicí jednotky celého systému. Pohon odtahu struny a pohon cívky byl realizován stejnými motory se šnekovými převodovkami a rastrovací vedení struny pomocí šroubovice a krokového motoru. Byla vyvinuta řídicí aplikace ovládající všechny tyto komponenty a zajišťující komunikaci s PC. To díky naprogramované aplikaci znázorňuje graficky naměřené hodnoty průměru struny. Obsluha tak může zasahovat do procesu extruze filamentu a řízením otáček extruderu a otáček odtahu nastavit proces extruze tak, aby finální filament dosahoval požadovaných parametrů. Tento systém umožnil laboratorně vyrábět relativně přesné tiskové struny, které bylo možné použít pro přesný tisk a charakterizaci tiskového materiálu.



Obr. 16: Systém pro měření průměru filamentu (vstup filamentu zleva)

Vyvíjené materiály na bázi PHB tak bylo možno testovat na zakoupených 3D tiskárnách Průša, které umožňují nastavení širokého rozsahu tiskových podmínek. Zejména v rámci přiděleného projektu **PR 4** pak bylo snahou optimalizovat vlastnosti těchto materiálů pro FDM 3D tisk. V publikaci **Pub 9** byly prezentovány první výsledky vlastností PHB kompozitních materiálů na bázi kaolinu a vápence. Zde byl řešen problém vyhodnocení negativního efektu teplotního smrštění během tisku (warping) a navržena metoda jeho měření. Protože vápenec byl prodegradační zejména pro PLA obsažené v polymerní matrici, byl dále využíván pouze kaolín. Následná práce, která probíhala i v rámci řešení diplomové práce **VSKP4**, byla publikována v **Pub 10**. Optimalizace složení směsi byla založena na tříparametrovém pětiúrovňovém plánovaném experimentu (Design of Experiment - DoE), kde byly použity tyto rozsahy:

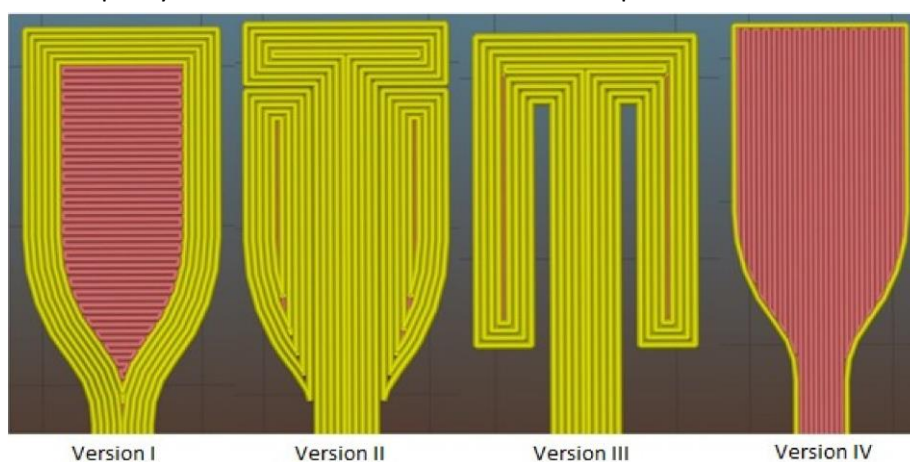
- 1) Obsah PHB v polymerní matrici (60 - 95 %)
- 2) Obsah změkčovadla 8 - 15 % (podíl hmotnosti změkčovadla ku polymerní matrici (PLA + PHB))
- 3) Obsah plniva kaolinu 5 - 20% (podíl hmotnosti kaolinu ku polymerní matrici (PLA + PHB))

Limity rozsahů odpovídaly kódovaným hladinám -1.682 and 1.682, střední hodnota pak kódované hladině 0. V experimentu byly sledovány základní materiálové vlastnosti jako Youngův modul pružnosti v tahu, pevnost v tahu, rázová a vrubová houževnatost, teplota měknutí při ohybovém zatížení (HDT) a koeficientu deformace při tisku (warping koeficient). Ze stanovených závislostí na výše uvedených parametrech (kódovaných hladinách) byly navrženy optimální receptury, první pro dosažení maximální hodnoty HDT a druhá pro zabezpečení minimálního koeficientu deformace při tisku. Tyto vybrané optimalizované receptury byly pro ověření reálně připraveny a charakterizovány za stejných podmínek. Výsledky ukázaly, že bylo možné touto optimalizací úspěšně dosáhnout vytýčených hodnot. Výsledek byl pak prezentován ve formě prototypu **V5**.

Využití plastifikátorů je v případě PHB směsí nepostradatelným nástrojem modifikace mechanických vlastností. Příklad plastifikátoru ovlivňuje reologické chování taveniny, termickou stabilitu polymeru, biokompatibilitu, biodegradabilitu apod. Proto byla problematice změkčení PHB směsí pro 3D tiskové materiály věnována pozornost v experimentech, jejichž výsledky byly publikovány v úspěšném článku **Pub 11**. Jedním z cílů bylo nalézt komerční změkčovadlo vhodné pro tyto směsi. Sledován byl efekt přídatku 15 % změkčovadla na dosažené mechanické vlastnosti, ty však byly sledovány v čase a dávány do souvislostí s měřenou migrací změkčovadla z materiálu. Materiál byl testován jak ve formě tiskové struny, tak na finálním výtisku ve tvaru dogbone 5A.

Příprava testovacích těles technologií 3D tisku je pro účely charakterizace materiálu ve své podstatě nevhodná. 3D tisk vnáší do objemu materiálu defekty a i při snaze vytisknout 100% plné těleso jsou v materiálu přítomny póry. Rozhraní mezi jednotlivými liniemi není zpravidla tak pevné, jako samotný materiál. Navíc snaha o výtisk 100% plného tělesa naráží také na problém deformace tělesa při tisku, tento efekt se s požadovaným množstvím výplně zvyšuje. Na druhou stranu 3D tiskové technologie jsou uznávány jako výrobní metoda prototypů a dnes už i funkčních dílů [141]. I ty musejí splňovat specifikace výrobku z pohledu mechanických vlastností a je třeba je nějakým způsobem reprodukovatelně měřit. O co nabízí 3D tisk větší možnosti designu výrobků z pohledu tvaru, dutin, směrovosti a tvaru vnitřní výplně, nebo dokonce i výtisku ze dvou či více materiálů, o to je komplikovanější pohled na jeho chování při zatížení. To pak souvisí s parametry tiskového procesu, orientací výrobku při tisku na podložce a samozřejmě vlastností samotného tiskového materiálu.

I přes obrovský rozvoj této úspěšné technologie výroby neexistoval v r. 2017 žádný standard pro měření charakteristik 3D tištěného tělesa z termoplastů. Snahou této studie tak bylo nalézt vhodné testovací těleso pro tahovou zkoušku, které bude při tahovém namáhání co nejvíce reflektovat chování samotného materiálu. Bylo tak postupně testováno několik variant designu tělesa ve tvaru dogbone s planparalelní částí tvořenou liniemi pouze ve směru hlavní osy. Problematická se ukázala místa uchycení tělesa do čelistí a místa napojení zaoblení lopatek na planparalelní testovací část. Postupnou eliminací míst, kde vznikala nežádoucí koncentrace napětí, byl odladěn návrh spočívající ve střídání dvou vzorů (I a IV Obr. 17), který umožnil díky vzájemné orientaci linií v lopatkách dosáhnout dostatečné pevnosti k tomu, aby deformace materiálu testovacího tělesa nastávala pouze v planparalelní části. Podmínkou je dosažení dostatečné soudržnosti tiskových linií, která je nejen funkcí parametrů tisku (zejména teploty a rychlosti tisku), ale také chemické struktury materiálu. Stejně tak je třeba opticky nebo vážkově monitorovat úroveň zaplnění tělesa materiálem [141].



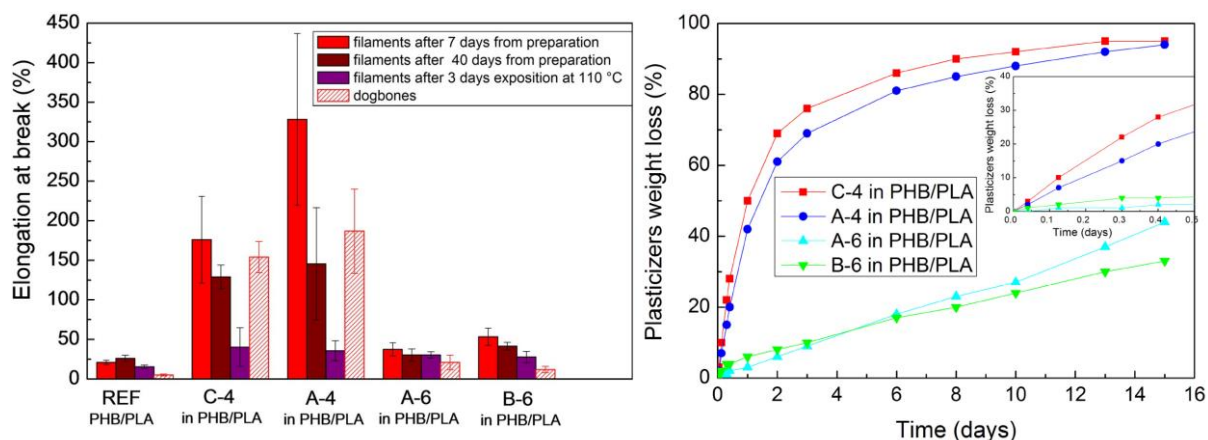
Obr. 17: Varianty návrhů lopatek testovacího tělesa ve tvaru dogbone

Dnes již existují, nebo jsou v přípravě normy, které budou snad brzy pomocníkem při sjednocení testovacích metod pro tyto složité systémy:

- ISO/ASTM 52900:2015 Additive manufacturing — General principles — Terminology
- ISO/DIS 27548 Additive manufacturing of plastics — Environment, health, and safety — Test method for determination of particle and chemical emission rates from desktop material extrusion 3D printer
- ISO/ASTM 52903:2020 Additive manufacturing — Material extrusion-based additive manufacturing of plastic materials

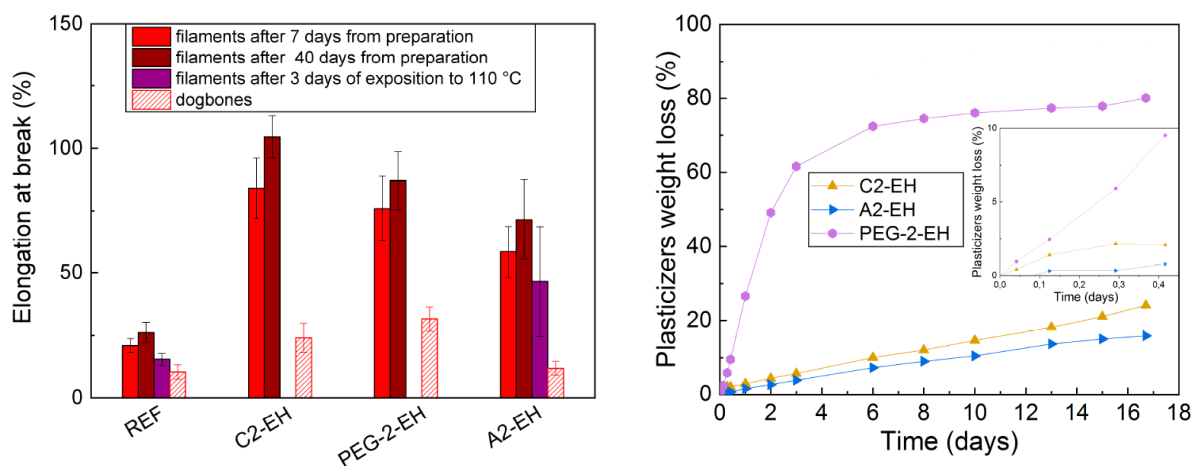
V hojně citované studii **Pub 11** byly použity čtyři komerční nízkomolekulární plastifikátory na bázi esterů kyseliny citrónové a všechny tvořili dobře mísitelnou směs PHB/PLA/změkčovadlo v poměru 60/25/15. Jejich významný změkčovací účinek a vliv na strukturu byly potvrzeny tahovými zkouškami a měřením na DSC. Zejména plastifikátory acetyltributylcitrát (A-4) a tributylcitrát (C-4) zlepšily prodloužení při přetržení o 308 % a 155 %, ve srovnání s neměkčenými směsmi. Významný plastifikační účinek potvrdily i tahové zkoušky na těchto 3D tištěných vzorcích, i když hodnoty tažnosti byly nižší než u vzorků měřených ve formě tiskového filamentu (Obr. 18a). Změkčovadla butyryltrihexylcitrát (B-6) a acetyltrihexylcitrát (A-6) zlepšila prodloužení při přetržení o 32 %, respektive o 16 %. DSC potvrdilo, že zavedení nízkomolekulárního změkčovadla do směsi PHB/PLA způsobilo větší mobilitu makromolekulárních řetězců. V důsledku toho se teploty krystalizace a tání posunuly k nižším hodnotám. Butylestery kyseliny citrónové způsobily pokles PLA T_g o 35 °C pro C-4

a o 33 °C pro A-4. Větší délka alkylových řetězců vázaných na kyselinu citrónovou naopak vykazovala horší plastifikační účinek a vedla k vyššímu PLA T_g . Z migračních testů na Obr. 18b je zřejmé, že rychlost difúze je silně závislá na velikosti molekuly změkčovadla. I z toho důvodu byly hledány další změkčovadla s vyšší molekulovou hmotností.



Obr. 18: a) Dosažené hodnoty tažnosti, b) Vývoj úniku změkčovadla z testovaného materiálu při 100 °C

V navazující práci **Pub 12** byl výběr změkčovadel postaven na etylhexyl derivátech kyseliny citronové a polyetylenglykolu s molekulovou hmotností 528–570 g·mol⁻¹. V orientačních screeningových testech totiž vycházely tyto deriváty také velmi slibně. Metodika testů byla velmi podobná jako v předešlé studii, ale byla doplněna o sledování reologické stability, měření rázové houževnatosti. Celá optimalizace tiskových parametrů byla založena na již propracované metodice hodnocení warpingu a vyhodnocení vytištěných speciálních geometrických prvků. Ty byly usazeny do obvodových stěn tělesa a následně navrženy opakovaně nad sebe. Každé patro takto vzniklé věže je pak tištěno nižší teplotou. Příliš vysoká nebo i nízká teplota se projeví nedokonalostmi v provedení detailů těchto prvků. Lze tak vizuálně vyhodnotit optimální rozsah teploty tisku a případně otestovat při tisku mezi tiskaři uznávaného standardního tělesa lodičky Benchie.

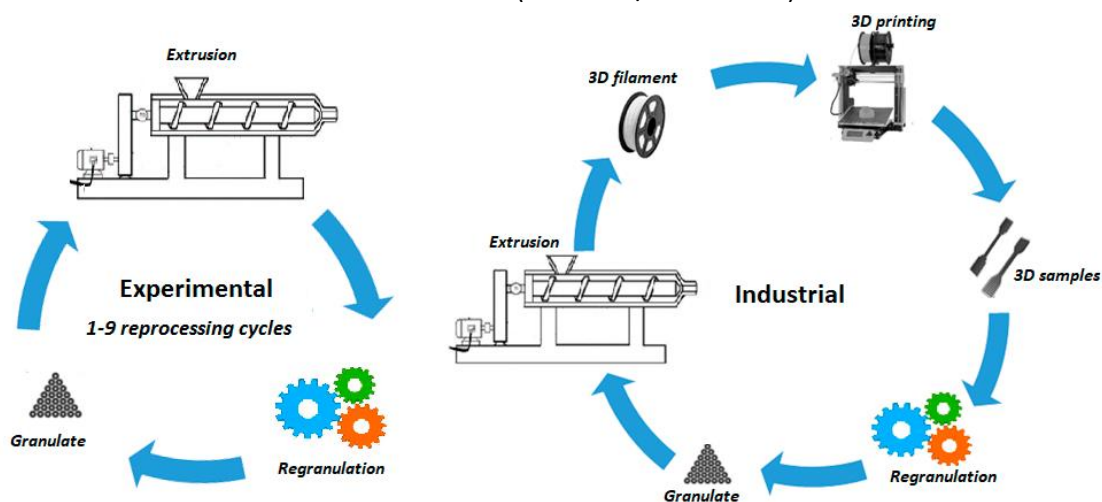


Obr. 19: a) Dosažené hodnoty tažnosti, b) Vývoj úniku změkčovadla z testovaného materiálu při 100 °C

Všechna 3 změkčovadla byla dobře mísitelná s matricí PHB-PLA, avšak tisk s PEG-2-EH vykazoval neuspokojivou kvalitu výtisků. Plastifikační účinek změkčovadel nebyl tak výrazný jako u předtím použitých citrátů (Obr. 19a) a byl potvrzen také pomocí DSC, kdy přídavek způsobil snížení T_g PLA amorfní fáze o 6 °C (C2-EH) a o 4 °C (A2-EH). Změkčovadlo PEG-2-EH překvapivě způsobilo snížení PLA T_g o 37 °C. Dále bylo provedeno měření stability viskozity pomocí oscilační reometrie a distribuce molekulové hmotnosti. Výsledky ukázaly na prodegradační chování PEG-2-EH v PHB/PLA směsích.

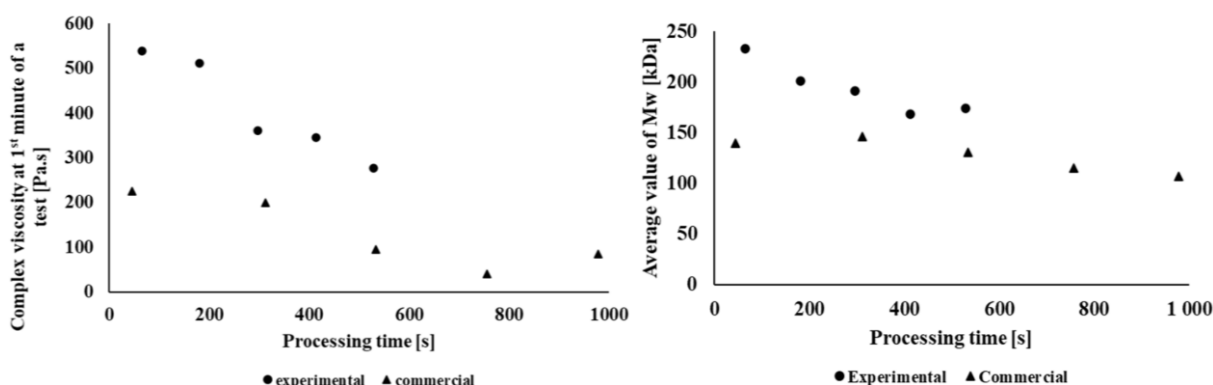
Plastifikátor PEG-2-EH také vykazoval na migračních testech poměrně velkou migraci. Tavenina s estery kyseliny citrónové (C2-EH a A2-EH) vykazovala dobrou stabilitu a změkčovadla měla nízkou tendenci migrovat ze vzorku i za poměrně nepříznivých podmínek 110 °C (Obr. 19b).

Materiály pro 3D tisk jsou často kritizovány z pohledu možností jejich recyklace. Zejména 3D tisk prototypů a často nepovedených výtisků vybízí k zamyšlení nad strategií recyklace materiálu zpět do podoby tiskové struny. Proto bylo cílem ověřit chování materiálu při klasické materiálové jednodruhové 100% recyklaci (viz **Pub 13**). Byly provedeny 2 experimenty, kde byl materiál NONOILEN® 3D 3056-2 podroben zátěži násobného procesu extruze tiskové struny (experimental) a kombinaci extruze a 3D tisku reálného vzorku (industrial/commercial) viz Obr. 20.



Obr. 20: Navržené a testované způsoby recyklace 3D tiskového materiálu na bázi PHB

Materiály byly v každém cyklu sledovány měřeními následujících parametrů: komplexní viskozita taveniny pomocí reometrie, distribuce molekulových hmotností pomocí GPC, mechanické vlastnosti v tahu a ohybu na tištěných vzorcích a změna jejich barevnosti. Z výsledků lze konstatovat, že materiál dle předpokladů podléhal termické degradaci a snižovala se molekulová hmotnost a tím i viskozita taveniny (Obr. 21). I přes to, že se pohybovala i pod 100 Pa·s však bylo možné vyrobit tiskovou strunu a z ní 3D tiskem testovací vzorek.



Obr. 21: Pokles viskozity a hmotnostně střední molekulové hmotnosti během recyklačních cyklů

Se zpracovatelskou dobou také mírně rostla barevná odchylka od původní barvy referenčního vzorku a vzorek mírně tmavnul, což bylo pozorováno i u vstřikovacího typu v **Pub 7**. Napětí na mezi kluzu i napětí při porušení klesly o cca 20 % na celém rozsahu měřené doby zpracování. Tažnost

měřená na strunách už z původně nízkých hodnot cca 10 % dále nijak výrazně neklesala. U 3D tištěných těles byl po prvním cyklu zaznamenán velký pokles, nicméně materiál byl stále schopen 3D tisku. Je tedy možné tvrdit, že recyklace tohoto materiálu umožňuje jeho využití v 3D tisku v minimálně dvou cyklech, než dojde k vyššímu poklesu viskozity taveniny.

4.7 Přínos

V r. 2016 vznikl záměr vyvinout 3D tiskový materiál na bázi biodegradabilního a biokompatibilního PHB, který se opíral o do té doby získané zkušenosti se zpracováním PHB. Záměr byl od r. 2017 řešen v rámci získaného projektu PR4. V té době nebyly na VUT v Brně k dispozici laboratorní zařízení na výrobu kalibrované struny a nebyla k dispozici jednotná metodika charakterizace těles z 3D tištěných termoplastových materiálů. Ve stejném roce se také objevuje teprve první publikace na téma PHA pro FDM 3D tisk [115]. Po posledních deseti letech prudkého nárůstu publikací zabývajících se zpracováním PHA a jeho 3D tiskem mohou některé výsledky získané na začátku tohoto poměrně krátkého období působit z dnešního pohledu možná až naivně. Je však satisfakcí, že jsou klíčové publikace týmu Laboratoře bioplastů na téma 3D tisku PHB, zejm. **Pub 12** (2018 - 59 citací) a **Pub 13** (2020 - 29 citací), od r. 2019 citovány v obdobně zaměřených článcích a review (např. [142], [143], [113] a další).

Jak ukazuje i rešerše [144] vydaná r. 2018, FDM tisk materiálů na bázi PHB byl v tom roce na svém úplném počátku. Přínosem z tohoto pohledu jsou proto v tu dobu prezentované výsledky Laboratoře bioplastů s dosaženými vlastnostmi vyvíjených materiálů. Výsledky ukázaly, že je možné dosáhnout hodnot tažnosti materiálu s majoritou PHB i přes 150 %, kdy po akcelerované migraci změkčovadla dosahovaly tažnosti nad 25 %, což byla v literatuře zpravidla nedosažená hodnota (u vzorků zpracovaných v tavenině). Výtisky testovacích těles dokonce vykazovaly hodnoty tažnosti nad 100 % i po 7 dnech po vytištění.

Díky optimalizaci výroby kalibrované struny pomocí sestaveného odtahového zařízení a vyvinuté metodice optimalizace tiskových parametrů a charakterizace 3D tištěného materiálu bylo možné dosáhnout velmi dobré kvality výtisků z těchto materiálů. Celému týmu tyto zásadní zkušenosti navíc umožnily následnou orientaci na vývoj medicínských aplikací, o kterých pojednává následující samostatná kapitola.

5 KOMPOZITY PRO FDM 3D TISK NA BÁZI PHB PRO MEDICÍNU

5.1 Motivace

Lidské zdraví je nenahraditelnou devizou člověka. Přestože má lidský organismus až neuvěřitelnou schopnost regenerace, nastávají situace, kdy je zásah do procesu hojení nezbytným krokem k záchraně zdraví anebo alespoň k minimalizaci negativních dopadů onemocnění nebo zranění. Moderní medicína se v poslední době zaměřuje na aplikace přizpůsobené přímo na míru pacienta a to nejen z pohledu vlastního farmaceutika, ale v případě, kde je to relevantní, také z pohledu tvaru aplikovaného materiálu. (protetika, dentální medicína, ortopedie, chirurgie apod.). Jednou ze slibných technologií výroby takových unikátních finálních výrobků na míru je 3D tisk. Poškození kostí je jeden z nejčastějších zdravotních problémů. I přes značnou regenerační schopnost kostní tkáně je v některých případech (například osteoporóza, tumor, infekce a další objemné defekty) nutný zásah moderní medicíny [145].

5.2 Současný stav

Jeden z nejmodernějších přístupů, které současná regenerativní medicína využívá, je tkáňové inženýrství. V tomto multidisciplinárním oboru se využívá nosiče neboli skafoldu (z anglického scaffold) jako podpůrného materiálu, který se následně osadí buňkami a/nebo případně dalšími podpůrnými látkami (růstovými faktory, léčivý atd.). Osazený skafold se použije se jako implantát k regeneraci poškozené tkáně a během hojení se zcela vstřebá. Nároky kladené na materiál skafoldu jsou vysoké, základním požadavkem je vhodná buněčná odpověď, neméně důležité jsou mechanické a povrchové vlastnosti či struktura [146]. V případě kostní tkáně musí být materiál navíc osteokonduktivní, tzn. stimulující růst kostní tkáně v místě implantátu, a osteoinduktivní neboli vyvolávající osteogenní diferenciací místních kmenových buněk [147], [148], [149].

Pro přípravu skafoldů určených pro náhrady kostní tkáně se využívá celá řada materiálů [150], [151], [152] včetně polymerů přírodního (kolagen, kyselina hyaluronová, PHA nebo celulóza) i syntetického původu (polylaktid, poly(ϵ -kaprolakton), poly(butylen sukcinát), a další) [153]. Velmi důležitou roli hraje i bioaktivní keramika, která se používá jak samostatně, tak pro přípravu polymerních kompozitů [154], [150], [155]. Nejčastěji využívaná jsou bioaktivní skla a vápenato-fosfátová keramika (obecně označovaná CaP), mezi kterými se využívá hlavně fosforečnan vápenatý (TCP, tricalcium phosphate) a hydroxyapatit (HA) [156]. CaP napodobují minerál přirozeně se vyskytující v kosti, jsou biokompatibilní, resorbovatelné a osteokonduktivní, jelikož vážou protein fibronektin, který poskytuje matici pro usazení buněk [150].

Aby mohly buňky prorůst skrz celý objem skafoldu a vytvořit tak novou tkáň, musí mít skafold vhodnou 3D strukturu [157]. Existují různé techniky k vytvoření porézní struktury, jako například odlévání roztoku nebo taveniny do forem, lyofilizace, napěňování, vymývání rozpustných částic smíšených se základní maticí, nebo různými technikami zvláknování [153], [158], [159]. Ty mají značné nevýhody – nepravidelnost struktury, póry, které nejsou otevřené, nesnadná výroba pórů v oblasti 200-500 μm apod. V současné době se s úspěchem využívá metoda 3D tisku neboli aditivní výroby, při které se výrobek vytváří podle přesného digitálního 3D modelu a umožňuje vyrobit časově a finančně efektivně komplexní tvary včetně porézní vnitřní struktury [160], [161], [162].

Nejmasověji využívaná technika 3D tisku je FDM tisk představený v předchozí kapitole. Komerční materiály pro FDM 3D tisk zahrnují dnes celou škálu materiálů včetně: ABS, PA, PETG, PLA, PP, nebo flexibilní materiály jako TPU, či TPE. V poslední době se objevují i biodegradabilní materiály a biopolymery [144], [163], [164], [165], [166].

Pro 3D tisk skafoldů pro náhrady kostní tkáně metodou FDM tisku začal nejprve využívat poly(ϵ -kaprolakton (PCL). V r. 2001 publikoval Hutmacher a kol. 3D tištěná tělesa z PCL se strukturou pláství (honeycomb) a skládaných linií v různých úhlech pokládky (lay-down pattern). Pro skafold tištěný v úhlech 0/60/120° reportoval tuhost měřenou v tlaku 42 MPa. Připravené skafoldy byly osazeny lidskými fibroblasty a osteoprogenitorovými buňkami, oba typy buněk vykazovaly vhodnou adhezi a proliferaci ke skafoldu [167]. Ve stejné době, jako se začaly objevovat první výtisky z PCL, byly publikovány i výsledky tisku skafoldů pro náhradu kostí FDM 3D tiskem z polylaktidu (PLA). PLA má oproti PCL výhodu vhodnějších mechanických vlastností a lepší tisknutelnosti, je to ostatně globálně nejpoužívanější materiál pro 3D tisk. Xiong a kol. vytvořili v r. 2001 jednoduchý mřížkový skafold z PLA pelet s pevností měřenou v tlaku 8 MPa [168].

Vzhledem ke komplexním požadavkům kladeným na skafoldy je neustálá snaha jejich vlastnosti vylepšovat, a to: povrchovými úpravami; optimalizací 3D tištěné struktury; přidavkem bioaktivního plniva; nebo použitím směsí biopolymerů. Z toho důvodu lze pro každý potenciální materiál pro kostní náhrady v literatuře nalézt celou řadu dílčích studií zabývajících se buď optimalizací 3D tisku tohoto materiálu, nebo jednou z výše uvedených metod úpravy jeho výsledných vlastností (například PCL [169], [170], [171], [172], [173], kompozit PCL s TCP [174], [175], [176] nebo PCL s bioaktivním sklem [177]). Kompozitní materiál PCL/TCP byl testován dokonce *in vivo*, v r. 2010 skafold osazený lidskými mesenchymálními kmenovými buňkami (hMSC) na modelu kritického defektu stehenní kosti krysa [174], 2015 na modelu prasečí dolní čelisti [175]. V současné době je PCL/TCP materiál schválený pro použití v kraniofaciální oblasti u lidí [178] a je dostupný i komerčně [179].

Vývoj 3D tisku PLA na poli kostních náhrad pomocí všech metod tisku je v review [180]. Pro skafoldy z PLA byla pozorována vhodná životaschopnost a růst osteosarkomových buněk [181] a u osteoblastů dokonce vyšší viabilita než na titanu [182]. Co se týče struktury skafoldu, v současné době se jako nejvhodnější zdá gyroidní struktura poprvé popsána NASA r. 1970, která je optimalizovaná pro nejvyšší specifickou pevnost (vztaženou na hmotnost) [183]. V r. 2018 byly úspěšně vytisknuty gyroidní skafoldy z PLA za pomoci ve vodě rozpustitelných podpor z polyvinylalkoholu [184]. Důkladně je prostudována i mechanická odezva gyroidu [185]. Eryildiz publikoval třístupňové skafoldy se zvyšující se porozitou směrem do středu, avšak vytisklé vzorky se svou strukturou značně lišily oproti modelu ve slicovacím programu [186]. Dobré výsledky dosahuje i PLA plněná bioaktivním TCP [187], [188], [189], bioaktivním 45S5 sklem [190] a nejčastěji HA [187], [191], [192], [193], nano HA [194], [195], [196]. Pro kompozit krystalické PLLA s 50 hm. % hydroxyapatitu bylo na dvou pacientech s poraněním dolní čelisti pozorováno lepší hojení kosti než s titanem [191].

První výsledky 3D tisku polymerů ze skupiny PHA se objevují později a s použitím metody práškového spékání (Selective Laser Sintering, SLS), nejprve pro kopolymer PHBV a jeho kompozit s fosforečnanem vápenatým [197], poté v r. 2012 z PHB [198]. Pro porézní těleso za optimalizovaných podmínek byl reportován modul měřený v tlaku 23 MPa a pevnost 1,7 MPa [199]. Další studie na 3D tisk PHB metodou SLS se objevuje až v r. 2018 [200], Diermann a kol. se mezitím intenzivně věnoval

SLS 3D tisku PHBV [201], [202], [203]. V r. 2014 byly také úspěšně vytisknuty skafoldy z kompozitní pasty PHBH/biosklo ve směsi chloroformu a dimethyl sulfoxidu [204].

Termická nestabilita a komplikovaná zpracovatelnost PHA popsaná v předchozích kapitolách představuje pro 3D tisk FDM metodou velký problém. Až v r. 2016 bylo ke 3D tisku použito PHB, které prošlo maleací a bylo s přídavkem uhlíkových nanotrubek, čímž byla posunuta teplota počátku degradace [205]. Na poli materiálů pro tkáňové inženýrství se PHA z počátku objevují jako druhý polymer ve směsi s PCL [206] nebo PLA [207], [208], [209]. Například v komerčním filamentu od firmy ColorFabb obsahující 88 % PLA doplněný o PHBV [210].

Ve stejné době (2018 – 2020) naše laboratorní skupina vyvíjela směsi pro FDM 3D tisk s majoritou PHB, výsledky těchto prací jsou prezentovány v kapitole výše. Metodou FDM byly v r. 2020 vytištěny také skafoldy z PHBH, které jsou biokompatibilní s myšimi 3T3 buňkami a rozložitelné v syntetické žaludeční šťávě [211] a PHBH kompozitem s acetylovanou nanocelulózou [212]. O rok později byly publikovány skafoldy z PHBV/45S5 bioskla [213]. V nedávné době se počet studií na FDM 3D tisk PHA, jejich směsí a kompozitů zvyšuje a dostává se jim více a více pozornosti [214], [215], [216], [217], [218], avšak ne všichni autoři své výsledky zakončují biologickými testy, které jsou v tomto poli nezbytné [218], [121], [119], [219].

Co se týče PHB, jako přírodní materiál nabízí v poli tkáňového inženýrství kostí přirozenou biokompatibilitu a bioresorbovatelnost. Degradční produkty PHB jsou tělu vlastní a nezpůsobují zánětlivou reakci [220]. Navíc, PHB disponuje mechanickými vlastnostmi, které jsou pro přípravu náhrad tuhých tkání vhodnější než u jiných používaných polymerů, jako kolagen, kopolymer PLA s glykolidem (PLGA), nebo PCL [221], [222], [223].

5.3 Cíle

Cílem práce je vyvinout materiál na bázi PHB vhodný pro výrobu filamentu pro FDM 3D tisk a pro použití v regenerativní medicíně, konkrétně jako skafold pro náhradu a regeneraci kostní tkáně. K dosažení cíle je nutná kombinace několika znalostí z různých oborů, a to konkrétně (i) znalosti zpracování PHB a kompaundace polymerů obecně, (ii) technologie a správné nastavení podmínek 3D tisku bioplastů, (iii) znalost odpovídajících testovacích metod pro splnění požadavků na mechanické, povrchové a biologické vlastnosti skafoldů. Podle toho se hlavní cíl výzkumu dělí na jednotlivé dílčí cíle. První dílčí cíl je navrhnout a případně optimalizovat nový biomateriál, který bude disponovat vhodnými termickými, reologickými a mechanickými vlastnostmi pro zpracování do formy 3D tiskové struny, a jeho vlastnosti charakterizovat. Druhý dílčí cíl je nalézt správné 3D tiskové podmínky pro daný materiál s pomocí know-how nově vyvinutých metod charakterizace tisknutelnosti a vlastní příprava testovacích těles pro charakterizaci. Tímto bude obohacena dosavadní materiálová základna pro FDM 3D tisk, kde se biopolymery s výjimkou PLA začínají teprve objevovat. Třetí dílčí cíl je otestovat biokompatibilitu materiálů a reakci buněk, jejich proliferaci, viabilitu, a příp. osteogenní diferenciaci, po osazení na nosiče připravené z navrhnutých materiálů.

5.4 Dosažené výsledky

5.4.1 Směsi PHB/PLA

První screeningové směsi na bázi směsi PHB/PLA vycházely z předchozích experimentů, kdy se poměr PHB/amorfní PLA 70/30 jevil jako optimální z hlediska zpracovatelnosti a výsledných mechanických

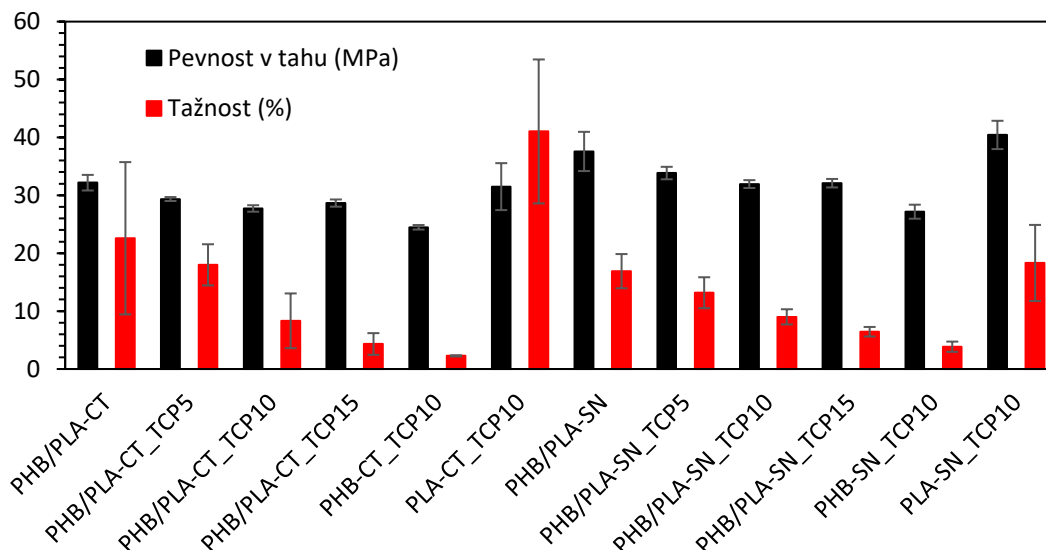
vlastností. Do směsi byl přidán plastifikátor v obsahu 12 hm%. Testovány byly dva typy změkčovadel, které se prokázaly jako netoxické, nízkomolekulární derivát kyseliny citronové Citroflex® B-6 (butyl trihexyl citrát, CT) a oligomerní adipát Syncroflex 3114 (SN). Pro zlepšení buněčné odpovědi bylo do směsi přidáváno i biokeramické plnivo, a to směs minerálů hydroxyapatitu a trikalcium fosfátu HA/TCP (D_{50} 10,8 μ m, TCP směs α TCP a β TCP v poměru α/β 7/93, výrobce CN Lab Nutrition).

Celkem bylo připraveno dvanáct vzorků, šest s obsahem CT a šest s obsahem SN. U každé série byl připraven jeden neplněný vzorek obsahující oba polymery a změkčovadlo a tři plněné vzorky, viz tabulka 2. Další dva vzorky obsahovaly jen jeden z polymerů, změkčovadlo a 10 hm. % HAp/TCP.

Tabulka 2: Připravené směsi na bázi PHB/PLA

	PHB (%)	PLA (%)	Citroflex B6 (%)	TCP (%)		PHB (%)	PLA (%)	Syncroflex 3114 (%)	TCP (%)
PHB/PLA-CT	62	26	12	-	PHB/PLA-SN	62	26	12	-
PHB/PLA-CT_TCP5	59	25	11	5	PHB/PLA-SN_TCP5	59	25	11	5
PHB/PLA-CT_TCP10	56	24	11	9	PHB/PLA-SN_TCP10	56	24	11	9
PHB/PLA-CT_TCP15	54	23	10	13	PHB/PLA-SN_TCP15	54	23	10	13
PHB-CT_TCP10	80	-	11	9	PHB-SN_TCP10	80	-	11	9
PLA-CT_TCP10	-	80	11	9	PLA-SN_TCP10	-	80	11	9

Práce s těmito vzorky byla předmětem bakalářské práce Kateřiny Chaloupkové, za svobodna Svoradové, kde je možné dohledat další detaily (VSKP5). U připravených materiálů byly charakterizovány tepelné vlastnosti pomocí TGA a DSC, kde byl pozorován lepší změkčovací efekt aditiv Citroflex na polymerní směs oproti Syncroflex. Ze všech vzorků ve formě granulátu byly vytvořeny filameny na 3D tisk s průměrem 1,75 mm. U vzorků byly nalezeny optimální tiskové podmínky – teplota trysky a množství extruze tzv. flow a následně mohly být vytisknuty testovací tělesa pro tahovou zkoušku, jejíž výsledky jsou na obrázku Obr. 22.



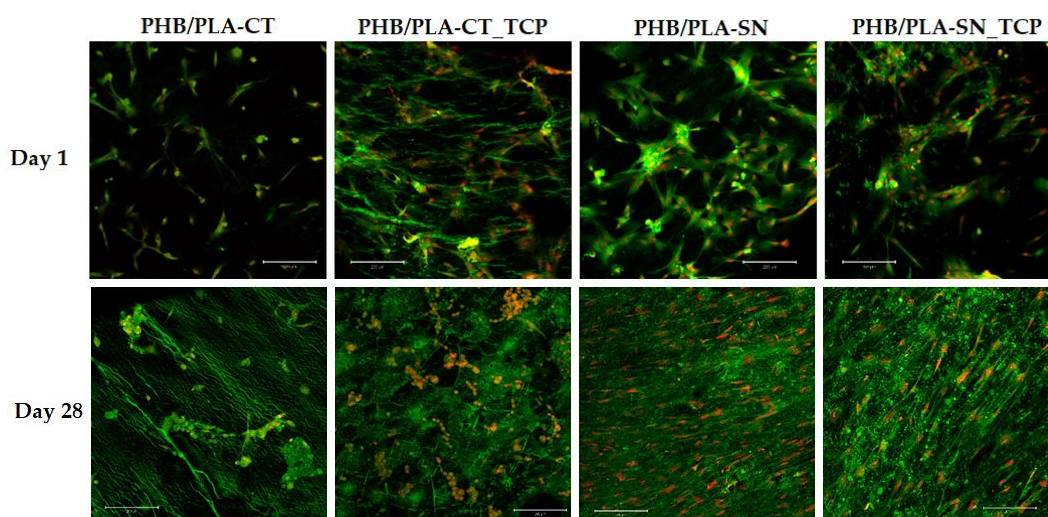
Obr. 22: Výsledné mechanické vlastnosti přepravených kompozitů

Modul pružnosti byl naměřen v rozmezí 2,2–2,6 GPa s výjimkou vzorků PLA bez přídavku PHB, kdy vzorek PLA-CT_TCP10 dosahoval až 3,3 GPa. Přídavek TCP zvýšil modul velmi málo, současně snížil pevnost i tažnost směsí. Nejvyšší pevnosti byly dosaženy u vzorků bez TCP a u vzorků PLA, a to cca 32 MPa pro vzorky změkčené Citroflexem a 38-40 MPa pro vzorky změkčené Syncroflexem.

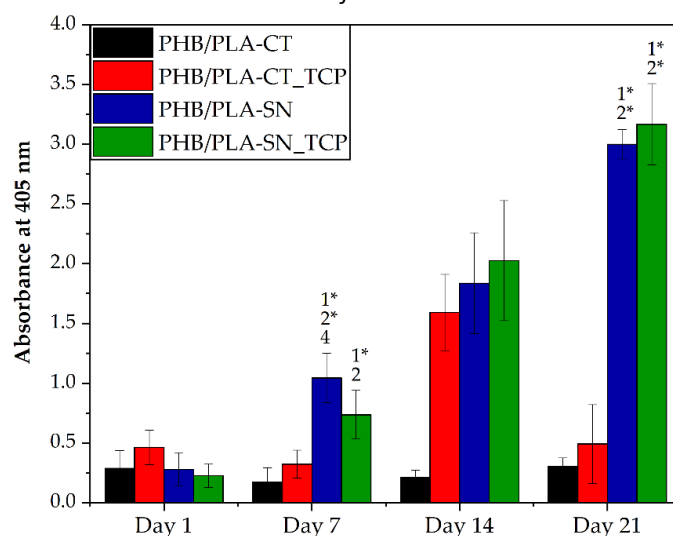
Mechanické vlastnosti kosti se v závislosti na typu kosti, věku pacienta a dalším liší. U kompaktní kosti v podélném směru je modul pružnosti v tahu kolem 18 GPa a pevnost v tahu 135 MPa, což je stále několikanásobně vyš, než bylo dosaženo [224].

Výsledky testů neplněných vzorků PHB/PLA s oběma změkčovadly a odpovídající vzorky s maximálním plněním TCP, tedy PHB/PLA-CT, PHB/PLA-CT_TCP15, PHB/PLA-SN a PHB/PLA-SN_TCP15 byly publikované v **Pub 14 (2020)**. U těchto vzorků byla kromě PHB/PLA-CT_TCP15 zjištěna nižší míra warpingu při 3D tisku než u komerčního PLA Průša filamentu. Také byly zjišťovány ohybové vlastnosti důležité vzhledem k častému porušení kosti ohybovou deformací. U vzorků se SN byl z výsledků patrný žádoucí nárůst ohybového modulu i pevnosti v ohybu s rostoucím přídavkem TCP.

V neposlední řadě byla na Ústavu experimentální medicíny AVČR provedena řada biologických testů na jednoduchých skafoldech (kolečka o průměru 5 /6 mm vyražená z lisované desky o tloušťce 1 mm). Skafoldy byly sterilizovány ethylen dioxidem a osazeny lidskými mezenchymálními kmenovými buňkami (hMSC, Sciencell). Na obrázku (Obr. 23) jsou vidět fotografie z konfokální mikroskopie na začátku a konci testu, Obr. 24 prezentuje výsledky ALP testu.



Obr. 23: Vizualizace buněk na skafoldech na začátku a na konci testu



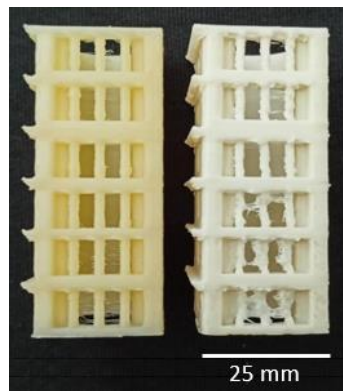
Obr. 24: Test aktivity alkalické fosfatázy

Z fotografií je vidět mnohem větší množství buněk u vzorků obsahujících adipátové změkčovadlo Syncroflex. Kromě počtu jsou také buňky rovnoměrnější rozprostřeny a mají protáhlý tvar, což

naznačuje jejich dobrou kondici. Naopak u vzorků s Citroflesem se hlavně v pozdějších stádiích testu nachází ve shlucích a neporůstají povrch skafoldu. Testy osteogenní diference navíc jednoznačně potvrdily, že vzorky obsahující Syncroflex jsou pro materiál kostních náhrad vhodnější než vzorky s citrátovým změkčovadlem. U ALP testu je 21. den vidět násobně vyšší míra osteogenní diference vzorků PHB/PLA-SN a PHB/PLA-SN-TCP15. Tyto dva vzorky tedy nejen že jsou vhodné pro 3D tisk metodou FDM, ale mají i potenciál pro použití jako bioaktivní materiál pro tkáňové inženýrství kostí.

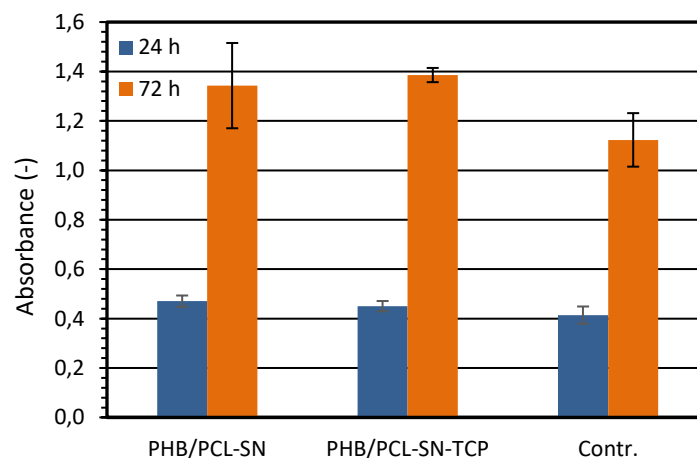
5.4.2 Směsi PHB/PCL

Na základě těchto výsledků byly studovány v rámci diplomové práce **VSKP9** i směsi obsahující místo PLA polykaprolakton, polymer tradičně využívaný pro tkáňové inženýrství kostí, jak bylo popsáno na začátku kapitoly. Byly tedy připraveny dva vzorky analogické ke dvěma neúspěšnějším vzorkům z předchozí studie, a to PHB/PCL-SN (62 % PHB, 26 % PLA a 12 % syncroflex 3114) a PHB/PCL-SN_TCP (54 % PHB, 23 % PLA, 10 % Syncroflex 3114 a 13 % TCP). Tyto výsledky byly publikovány v **Pub 15 (2023)**. Vzhledem k rozdílné teplotě tání obou polymerů je stěžejní najít vhodnou teplotu tisku. PCL má při teplotě tání PHB nízkou viskozitu taveniny, což vede k nadbytečné extruzi materiálu a snížení geometrické přesnosti výtisku, jak je vidět na obrázku níže (Obr. 25).



Obr. 25: Teplotní věž vytištěná ze směsi PHB/PLA (vlevo) a PHB/PCL (vpravo)

Na těchto materiálech byl proveden test biokompatibility výluhů s myšimi 3T3 fibroblasty, podobně jako v předchozí kapitole. Na obrázku Obr. 26 jsou uvedeny výsledky MTS testu po 24 a 72 h, kdy je vidět vynikající viabilita buněk, která je dokonce vyšší než v případě kontrolního vzorku.



Obr. 26: Výsledek cytotoxicity výluhů pro vzorky na bázi PHB/PCL

Vhodná teplota tisku je v tomto případě mnohem nižší než u směsí s PLA, a to 175 °C pro neplněný vzorek a 165 °C pro vzorek s TCP. Při těchto teplotách směsi s PCL vykazují nejnižší míru warpingu

s warping koeficientem 1,3 a 1,5 pro neplněný a kompozitní vzorek. To je nižší hodnota než pro odpovídající směsi s PLA. Hodnoty pevnosti a modulu pružnosti jsou nižší, než v případě odpovídajících analogů s PLA, což je očekávané vzhledem k mechanickým vlastnostem čistého PCL. Modul naměřený v tlaku byl 0,3 GPa pro PHB/PCL-SN a 0,4 GPa pro PHB/PCL-SN_TCP, pevnost v tlaku 15 MPa a 18 MPa ve stejném pořadí. Pevnost kompaktní kosti v tlaku je kolem 200 MPa [224].

5.4.3 Povrchové vlastnosti 3D tištěných skafoldů

Bez ohledu na materiál skafoldu, první věcí, která přichází do kontaktu s hostitelským prostředím, je jeho povrch. Během biologických testů bylo pozorováno, že povrch vylisovaných skafoldů není pro použité hMSC buňky ideální, protože z něj vrstva buněk snadno sklouzla. Proto byly dále studovány povrchové vlastnosti, které řídí adsorpci proteinů a tím pak i interakci buněk [225], [226], a to volná povrchová energie (SFE), smáčitelnost vodou – kontaktní úhel vody (WCA) a drsnost.

Největší míra adsorpce fibronektinu a albuminu je dle literatury na povrchy s WCA 40-80° [227] pro hovězí sérový albumin, fibrinogen a lidské proteiny FXII pro povrchy s WCA > 60–65° (SFE pod 36,4 mN·m⁻¹) [228]. Co se týče povrchové energie, podle rozsáhlých studií Lima a kol. lidské fetální osteoblastické buňky (hFOB) preferují pro středně dlouhou dobu interakce hydrofilní povrchy charakterizované SFE nad 40 mN·m⁻¹ a WCA pod 60° [229], [230].

Výsledky naměřených kontaktních úhlů a vypočtené SFE směsí PHB/PLA a PHB/PCL ve formě vylisovaných desek jsou uvedeny v tabulce 3. Voda vykazuje největší kontaktní úhel ze všech testovaných kapalin, 72–74°, kromě vzorku PHB/PLA-SN_TCP, kde je to 61°. Pro všechny materiály je WCA pod 90°, což naznačuje jejich hydrofilní povahu. Podobně pro všechny vzorky kromě PHB/PLA-SN_TCP je naměřen nejnižší kontaktní úhel s diiodmetanem - nejméně polární testovanou kapalinou.

Přidání fosfátové keramiky do směsi na bázi PHB/PLA snížilo kontaktní úhel vody o 17 % a s diethylenglykolu o 9 %, zvýšila se tedy hydrofilita materiálu. Tento jev byl popsán pro čisté PHB [231]. V případě PHB/PCL se interakce s vodou a diethylenglykolem po přidavku TCP nezměnila.

Tabulka 3: Výsledné hodnoty měřené povrchové energie

		PHB/PLA-SN	PHB/PLA-SN_TCP	PHB/PCL-SN* ¹	PHB/PCL-SN_TCP* ¹			
Kontaktní úhel ± SD (°)	Voda	74,2 ± 1,0	61,4 ± 3,4	72,7 ± 3,5	72,1 ± 4,2			
	Dijodmetan	38,1 ± 1,9	40,2 ± 2,3	22,9 ± 1,4	35,1 ± 2,2			
	Formamid	48,0 ± 1,9	36,8 ± 2,8	55,5 ± 1,8	47,7 ± 2,7			
	Diethylenglykol	42,5 ± 2,7	38,7 ± 1,5	42,2 ± 1,6	43,3 ± 0,9	PHB* ²	PLA* ²	PCL* ³
Celková povrchová energie γ_s (mN·m ⁻¹)		40	45	40	41	40,5	33,9	30,8
Disperzní část γ_s^d (mN·m ⁻¹)		31	27	30	30	36,5	30,9	26,1
Polární část γ_s^p (mN·m ⁻¹)		9	18	10	11	4	3	4,7

*¹ Pub 15; *² [232]; *³ [233]

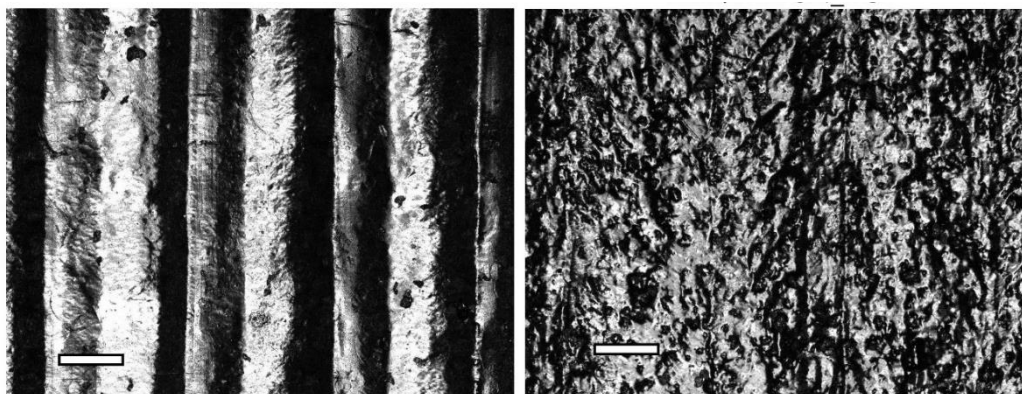
Co se týče volné povrchové energie, z připravených směsí vybočuje pouze PHB/PLA-SN_TCP, zbylé směsi dosahují přibližně 40 mN·m⁻¹, což je podobné jako u čistého PHB, s disperzní složkou okolo 30 mN·m⁻¹ a polární složkou okolo 10 mN·m⁻¹. Přídavkem změkčovadla a dalších polymerů jsme tedy

schopni zvýšit polární složku SFE a zvýšit hydrofilitu materiálu. SFE a její části pro materiály na bázi PCL a PHB/PLA-SN jsou srovnatelné s polyetheruretanem [234] nebo Nylonem 6-6 [235].

S přidáním TCP keramiky do měkčené biopolymerní směsi PHB/PLA se povrchová energie zvýšila o 13 %, na $45 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Současně se u vzorku PHB/PLA-SN_TCP zdvojnásobila polární složka oproti vzorku bez plniva, zatímco disperzní složka se snížila o 13 %. Taková hodnota SFE polární složky je podobná jako u používaného polystyrenu nebo proteinem potažených povrchů pro tkáňové kultury [234]. Tento materiál se z tohoto pohledu jeví pro adhezi kostních buněk jako velmi vhodný.

Dalším důležitým parametrem povrchu je jeho drsnost, protože kostní buňky mají vyšší preferenci k drsnějším povrchům [236], [237], [238]. Podle studie Kunzler a kol. krysí osteoblasty na povrchu s drsností od 1 do 6 μm preferují drsnější část [239]. Drsnost 3D tištěných vzorků byla studována na materiálech PHB/PLA-SN a PHB/PLA-SN-TCP15 s použitím základního nastavení – teplota trysky 195 $^{\circ}\text{C}$, flow 100 %, povrch složený z paralelních linií, a to tryskou 0,4 a 0,25 mm. Vyhodnocena je drsnost podél tiskové linie a napříč tiskovými liniemi pomocí konfokální mikroskopie. Výsledky jsou v tabulce 4, zatímco vizualizace povrchů je na obrázku Obr. 27.

U vzorku PHB/PLA-SF jsou dobře patrné jednotlivé řádky tiskárny. Na druhou stranu vzorek s bioaktivním fosforečnanem vápenatým má rovnoměrnější povrch, kde v případě trysky 0,4 mm není jednoznačný směr tisku a převažuje tak vliv plniva na topografii. Celkově má vzorek PHB/PLA-SN přibližně dvakrát nižší hodnoty podélné drsnosti než jeho kompozitní analog, a to z důvodu přítomnosti částic TCP. S tryskou 0,4 mm vykazoval vzorek PHB/PLA-SN drsnost jednotlivých tiskových linií 6,7 μm , což by mělo být pro růst osteoblastu dle Kunzlera vhodné.



Obr. 27: Konfokální mikroskopie povrchů 3D tištěných vzorků PHB/PLA-SN (vlevo) a PHB/PLA-SN-TCP15 (vpravo) tryskou 0,4 mm, značka měřítka symbolizuje 160 μm

Je třeba poznamenat, že tyto materiály vykazují vyšší drsnost povrchu než 3D tištěné objekty uváděné v literatuře. U čistého PLA a trysky 0,25 μm byla pomocí AFM naměřena paralelní drsnost R_q 1,2 nm (27,6 nm po ošetření plazmou), což je o 3–4 magnitudy nižší, než bylo pozorováno u našich vzorků [240]. Při použití tiskové trysky 0,4 μm bylo pomocí AFM naměřeno R_q 92 nm [241] a 367,5 nm bylo získáno z mikroskopie SEM [242].

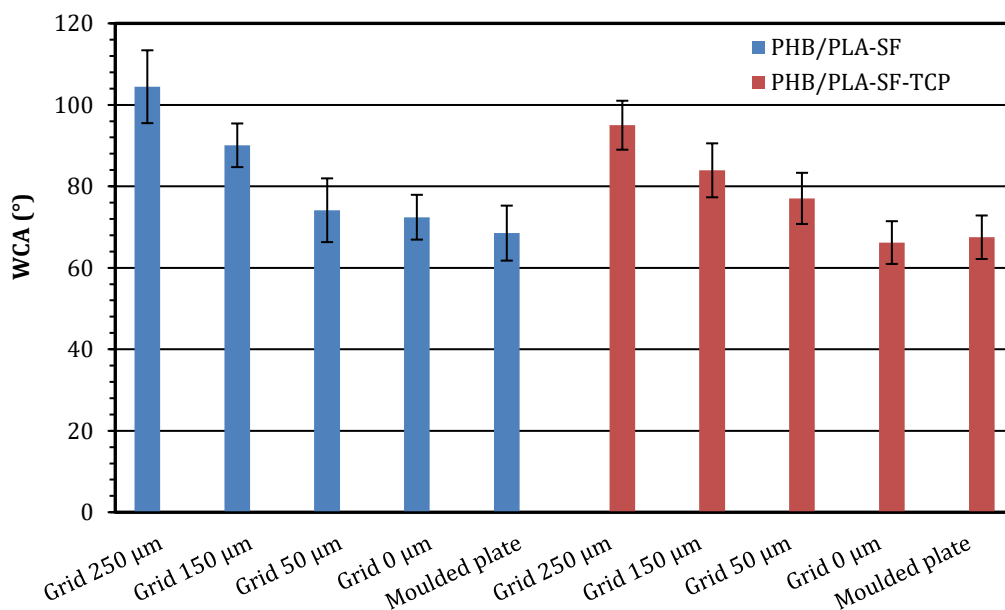
Tabulka 4: Drsnost povrchu 3D tištěných vzorků

Tryska (mm)	Podélná drsnost R_a (μm)		Příčná drsnost R_a (μm)	
	0,25	0,4	0,25	0,4
PHB/PLA-SN	$2,1 \pm 0,3$	$6,7 \pm 2,5$	$20,7 \pm 3,2$	$12,8 \pm 1,0$
PHB/PLA-SN_TCP	$4,7 \pm 0,6$	$12,4 \pm 2,9$	$33,3 \pm 3,4$	$12,2 \pm 2,4$

Příčná drsnost kolmo na směr tiskových linií je obecně vyšší než podélná (pro odpovídající materiál a průměr trysky), protože zohledňuje nejen vliv materiálového složení, ale také vliv topografie vytvořené 3D tiskem. Jedinou výjimkou je biokompozitní vzorek PHB/PLA-SN_TCP s tryskou 0,4 mm; obě hodnoty jsou srovnatelné kolem 12 μm . To potvrzuje jednotný povrch pozorovaný mikroskopem.

Při trysce 0,25 mm je příčná drsnost vyšší u vzorku PHB/PLA-SN_TCP než u směsi bez biokeramického přídavku, podobně jako v případě paralelní drsnosti. Na druhou stranu u povrchů potištěných tryskou 0,4 mm je drsnost mezi 12,2–12,8 μm pro oba materiály. V tomto případě je drsnost povrchu spíše řízena strukturou než materiálem.

U vzorků s výraznou povrchovou strukturou je ovlivněna i smáčivost vodou. Pro 3D tištěné vzorky se strukturou tvořenou paralelními liniemi a mřížkou s různou velikostí oka (50, 100, 150, a 250 μm) imitující 3D strukturu skafoldu byl změřen WCA a výsledky jsou uvedeny v grafu níže (Obr. 28). Nejnižší hodnoty WCA, kolem 70°, bylo dosaženo u lisovaných desek. 3D tištěný vzorek s plnou vrchní vrstvou (mřížka 0 μm) dosahuje WCA srovnatelného s vylisovaným vzorkem v rámci chyby měření. S výskytem mřížky na povrchu se WCA lineárně zvyšuje díky tzv. efektu lotosového květu [243]. Směrnice nárůstu je vyšší u vzorku PHB/PLA-SN, který má nižší polární složku SFE. Povrch s velikostí oka mřížky 250 μm dosáhl WCA 105° pro PHB/PLA-SN a 95° pro PHB/PLA-SN_TCP, což je 52% a 41% nárůst ve srovnání s lisovaným vzorkem. Vzhledem k výsledkům z literatury by měl být pro adhezi proteinů z testovaných povrchů nejvhodnější povrch tvořený mřížkou o velikosti oka 50–100 μm .



Obr. 28: Kontaktní úhel vody na 3D tištěných površích

5.4.4 Optimalizace složení směsi PHB/PLA/SN/TCP

V kapitole 5.4.1 byly představeny první slibné směsi pro materiály kostních náhrad. Nedosahovaly však optimálních mechanických vlastností, proto byla provedena optimalizace metodou třífaktorového pětiúrovňového plánovaného experimentu. Výsledky jsou součástí diplomové práce **VSKP7**. Byly zvoleny následujícími faktory:

- 1) Faktor 1 = PLA/PHB
- 2) Faktor 2 = bioaktivní plnivo/(PHB+PLA)
- 3) Faktor 3 = změkčovaadlo/(PHB+PLA+plnivo)

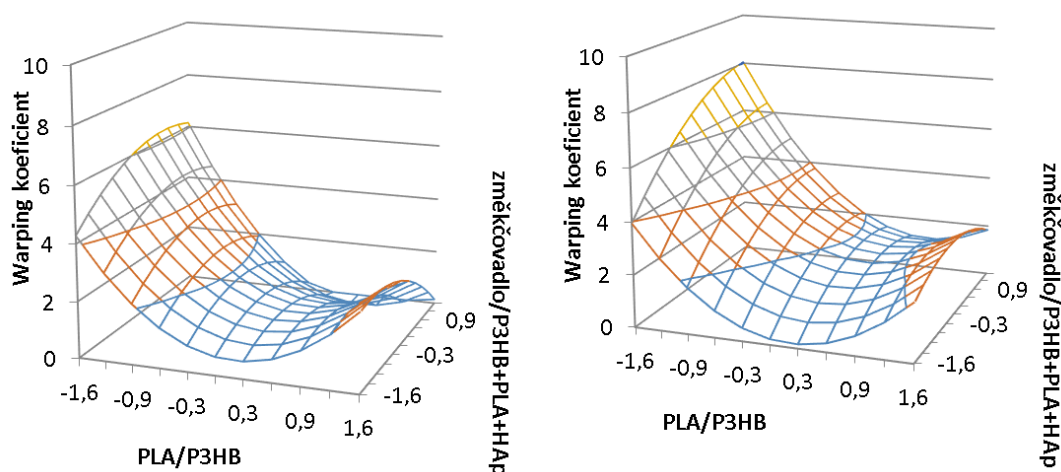
Prvním faktorem je poměr PLA/PHB v rozsahu hmotnostních poměrů 50/50–95/5 tak, aby ve směsi byla vždy majorita PHB. Ve druhém faktoru je poměr bioaktivního plniva/(PHB+PLA) v rozsahu hmotnostních poměrů 5/95–30/70, vzhledem k očekávanému limitu zpracovatelnosti při vysokém plnění. Třetí faktor byl zvolen jako změkčovaadlo/(PHB+PLA+plnivo) proto, že změkčovaadlo interaguje se všemi třemi složkami systému. Množství změkčovaadla se z předchozích experimentů osvědčilo v rozmezí 7–11 %. Aby bylo toto rozmezí pokryto, bylo zvoleno rozmezí poměrů 5,6/94,4–12,4/87,6.

V rámci experimentu bylo připraveno celkem 20 vzorků (Tab. 5). Jako změkčovaadlo byl použit osvědčený Syncroflex 3114 (SN). Bioaktivní minerál byl zakoupen od firmy Alchimika a obsahoval směs HA a TCP, označován je jako HA. Vzorky jsou uvedeny v tabulce. Jako označení vzorku bylo zvoleno zkrácené složení vzorku udávající poměr PHB/PLA, následně množství HA a poslední číslo názvu udává množství změkčovaadla. Vzorky s číselným označením 9–14 mají ve svém složení vždy jeden faktor v krajní mezi experimentu. Vzorky s číselným označením 15–20 mají shodné složení a byly připraveny za účelem stanovení experimentální chyby.

Tabulka 5: Složení vzorků PHB/PLA/SN/HA pro plánovaný experiment

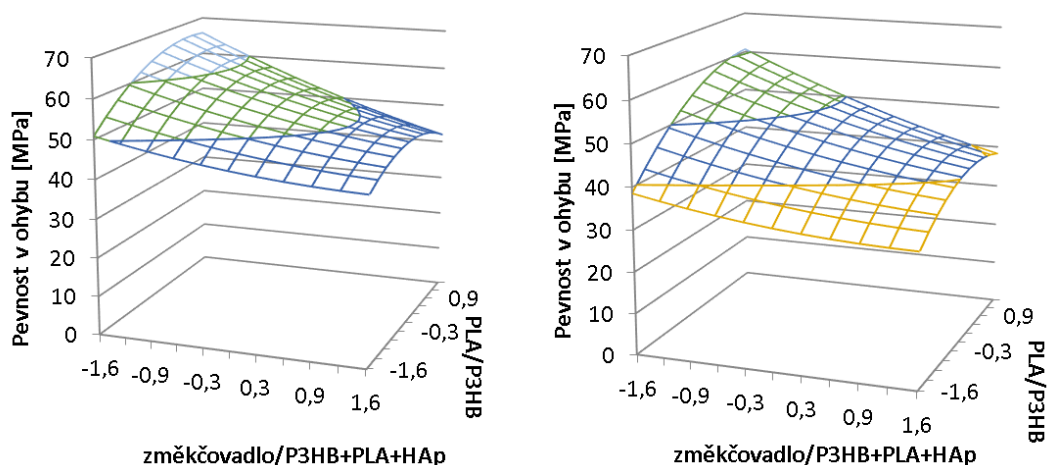
	Označení	PHB (%)	PLA (%)	SN (%)	HA (%)		Označení	PHB (%)	PLA (%)	SN (%)	HA (%)
1	80/20-11-7	66	16	7	11	11	66/34-5-9	57	30	9	5
2	55/45-11-7	46	37	7	11	12	66/34-27-9	42	22	9	27
3	80/20-24-7	55	14	7	24	13	66/34-18-6	50	26	6	18
4	55/45-24-7	38	31	7	24	14	66/34-17-12	46	24	12	17
5	80/20-10-11	63	15	11	10	15	66/34-18-9_1	48	25	9	18
6	55/45-10-11	44	35	11	10	16	66/34-18-9_2	48	25	9	18
7	80/20-23-11	53	13	11	23	17	66/34-18-9_3	48	25	9	18
8	55/45-23-11	36	29	11	23	18	66/34-18-9_4	48	25	9	18
9	95/5-18-9	70	4	9	18	19	66/34-18-9_5	48	25	9	18
10	50/50-18-9	37	37	9	18	20	66/34-18-9_6	48	25	9	18

Směsi byly kompaundovány dvoušnekového extrudéru značky LabTech (průměr šneků 16 mm, L/D 40) a 3D tiskové struny byly připraveny na jednošnekovém extrudéru HAAKE Rheomex OS (Haake Technik GmbH (průměr šneku 19 mm, L/D 30). Optimalizace 3D tiskových podmínek byla provedena metodou teplotních věží a následným měřením warping koeficientu.



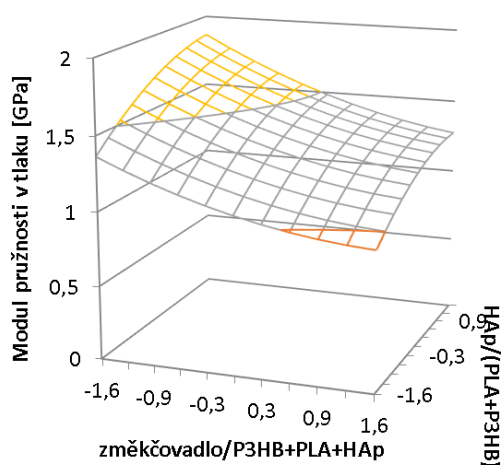
Obr. 29: Warping koeficient při nejnižším (vlevo) a nejvyšším testovaném množství HA (vpravo)

Statistickým zpracováním bylo zjištěno, že největší vliv na warping (přibližně 2–3× větší než ostatní) má faktor 1, tedy poměr polymerů PLA/ PHB. Uplatňuje se zde kombinace lineárního a kvadratického příspěvku. To je patrné na obrázku níže (Obr. 29), kde jsou znázorněny dvě plochy závislosti warping koeficientu na faktoru 1 (poměr PLA/PHA) a faktoru 3 (množství SN ve směsi) se zafixovanou hodnotou faktoru 2 (množství HA). Vlevo je plocha pro nejnižší testované množství HA, a vpravo je plocha pro nejvyšší testované množství HA. Přídavek PLA do směsi PHB/PLA snižuje warping koeficient. Zároveň vlivem kvadratického koeficientu existuje v závislosti minimum, kterého je žádoucí dosáhnout. Pro srovnání, hodnota warping koeficientu pro komerčně dostupný filament PLA (Prusa Research, Prague, Czech Republic) je $2,9 \pm 0,1$. Nejvhůře tisknutelný je materiál s označením 95/5-18-9, který obsahuje nejvyšší obsah PHB z testovaných vzorků a je velmi křehký.



Obr. 30: Plocha pevnosti v ohybu při nejvyšším (vlevo) a nejnižším (vpravo) testovaném množství HA

U všech materiálů byly testovány mechanické vlastnosti při namáhání v ohybu a tlaku, které simulují napětí přirozeně působící na kosti. Modul pružnosti měřený v ohybu se u všech vzorků pohybuje v rozmezí 2,3–3,7 GPa. Největší vliv na něj má dle statistického vyhodnocení obsah změkčovadla, čím větší obsah, tím nižší modul. Pozitivní vliv má naopak přídavek PLA a HA, efekt je však 1–2x slabší. Závislost pevnosti v ohybu na faktoru 1, PLA/PHB, a faktoru 3 poměru změkčovadla ku zbylým složkám směsi je vidět v následujícím obrázku (Obr. 30). Stejně jako v případě modulu, faktor 1 má největší vliv a pevnost snižuje.



Obr. 31: Plocha modulu pružnosti v tlaku při středním poměru PHB/PLA

Ze zkoušky v tlaku byl vyhodnocen modul z lineární oblasti deformace (1,25–1,5 %), který se pohybuje v rozmezí 0,9–1,8 GPa, tedy o zhruba polovinu než při namáhání v ohybu Obr. 31. Vliv na

modul má pouze obsah HA, jehož přídavek modul zvyšuje, a změkčovadlo, které modul snižuje, jak je vidět v grafickém znázornění dole. Vzorky byly měřeny do 10% deformace a do této hodnoty nedocházelo k porušení a u některých vzorků ani ke kluzu, proto pevnost nebyla vyhodnocována.

Z výsledků je možné najít složení směsi, která bude mít ideální vlastnosti pro tkáňové inženýrství kostí v dosažitelném rozsahu, a to: minimální warping, maximální ohybová pevnost a maximální tlakový modul. Složení receptury, která dosahuje tyto požadavky je: 35,2 % PHB, 30,8 % PLA, 28,3 % HA a 5,6 % SN. Teoretické a dosažené vlastnosti této směsi jsou uvedeny v tabulce 6. Připravená optimalizovaná směs dosahovala o polovinu nižšího modulu v tlaku, než byla teoretická hodnota, zatímco modul naměřený v ohybu byl predikován přesně. Naměřená hodnota pevnosti v ohybu je o 18 % nižší než teoretická hodnota. Připravená směs také vykazovala mez kluzu při namáhání v tlaku kolem 9 % relativní deformace, a to s maximem $54,6 \pm 1,3$ MPa. Udávaná pevnost v tlaku kompaktní kosti je 205 ± 17 MPa, dosahujeme tedy přibližně čtvrtiny [224].

Tabulka 6: Teoretické a naměřené vlastnosti optimalizované směsi

	Warping koeficient (-)	Modul měřený v ohybu (GPa)	Pevnost v ohybu (MPa)	Modul měřený v tlaku (GPa)	Pevnost v tlaku (MPa)
Predikované	1,0	3,3	59,7	2,3	-
Změřené	$2,54 \pm 0,08$	$3,2 \pm 0,1$	$48,8 \pm 0,6$	$1,2 \pm 0,1$	$54,6 \pm 1,3$

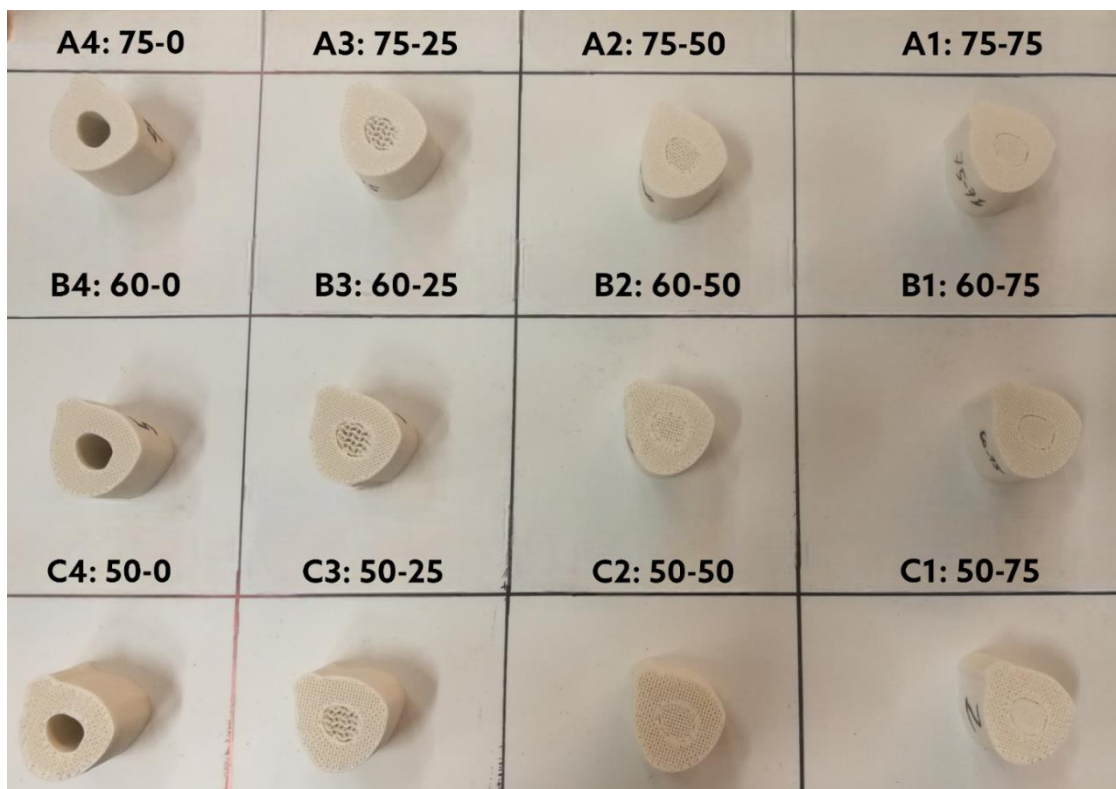
5.4.5 Skafold pro náhradu segmentu femuru

Optimalizovaná receptura PHB/PLA/TCP/HA byla využita pro návrh, výrobu a mechanickou charakterizaci anatomického modelu segmentu diafýzy femuru vytvořeného podle CT obrazů femuru skutečného pacienta v rámci diplomové práce **VS KP10**. V místě kompakty a spongiózy reálné kosti byly v 3D modelu variovány parametry výplně gyroidní struktury pomocí programu Rhinoceros 3D.

Tabulka 7: Maximální tlaková síla způsobující porušení vnitřní struktury PHB/PLA/TCP/HA anatomického modelu segmentu femuru u zvolených 12 variant vnitřní struktury ($n = 10$)

Varianta hustoty výplně gyroidu	A (kompakta 75 %) [kN]	B (kompakta 60 %) [kN]	C (kompakta 50 %) [kN]
1 (spongióza 75 %)	$22,2 \pm 0,5$	$15,8 \pm 1,2$	$12,5 \pm 0,8$
2 (spongióza 50 %)	$19,1 \pm 1,1$	$14,5 \pm 1,0$	$12,0 \pm 0,5$
3 (spongióza 25 %)	$18,3 \pm 0,3$	$13,0 \pm 0,6$	$13,3 \pm 1,0$
4 (spongióza 0 %)	$18,0 \pm 0,5$	$12,8 \pm 0,3$	$10,1 \pm 0,4$

Byla stanovena únosnost v tlaku dvanácti variant vytištěných 3D modelů segmentu femuru s různou procentuální hustotou jejich vnitřní gyroidní výplně (viz obr. 32) s výsledky uvedenými v tabulce 7. Nejvyšší síla na mezi únosnosti segmentu femuru byla dosažena se 75% výplní v místě kompakty i spongiózy (varianta A1), a to $22,20 \pm 0,50$ kN. Se snižující se hustotou vnitřní výplně při zachování vnější struktury únosnost klesá až na $18,00 \pm 0,50$ kN pro těleso varianty A4, které vnitřní část neobsahuje. Stejný trend lze pozorovat i u varianty B s vnější výplní 60 % a C s vnější výplní 50 %. Rostoucí únosnost v tlaku v závislosti na rostoucím množství materiálu je výsledek očekávaný. Přínosem jsou však reálné hodnoty únosnosti v tlaku v porovnání s porozitou materiálu, která je klíčová pro proliferaci buněk a vlastní přestavbu materiálu v kostní tkáň. Nejnižší dosažená únosnost (vzorek C4, 50% vnější výplň, bez vnitřní výplně) je 10,1 kN je v přepočtu 1030 kg, což je téměř 15 krát více než je průměrná váha člověka.



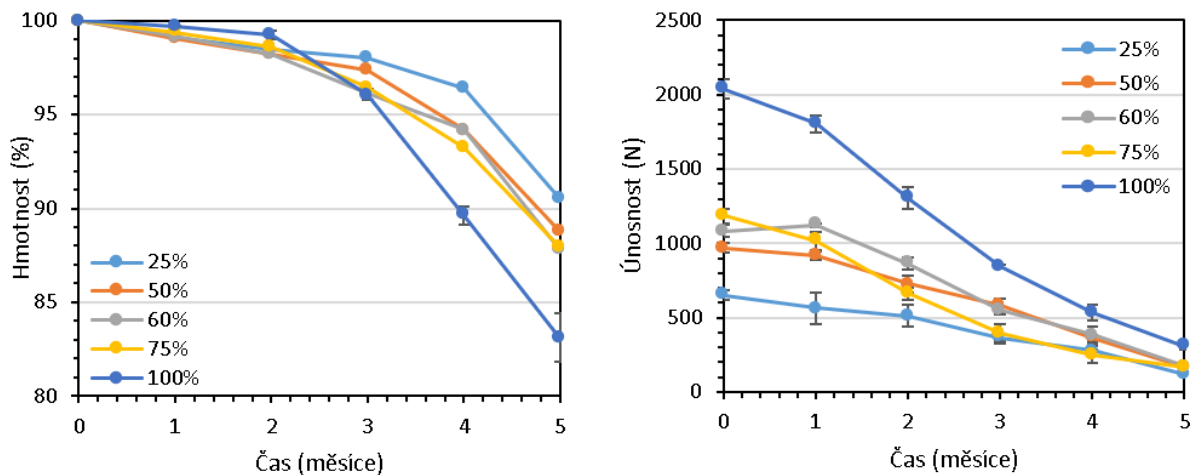
Obr. 32: Vytiskované 3D modely segmentu diafýzy femuru s různou procentuální vnitřní výplní gyroidem v místě kompaktní a spongiózní kosti

Následně byla studována možnost predikce únosnosti v tlaku nově vyvinutého anatomického modelu segmentu femuru pomocí počítačové simulace s využitím numerického modelu v programu ANSYS. Mezi naměřenými hodnotami a predikovanými byly zjištěny rozdíly v hodnotách únosnosti v tlaku. Ty byly přisouzeny odlišnostem mezi reálnou a navrženou strukturou gyroidní výplně. Tyto odlišnosti jsou způsobeny nedokonalou technikou 3D tisku v případě takto jemné struktury. Na mikroskopii byly prokázány defekty v rovinách kolmých k rovině pohybu trysky při tisku. Jde o známý problém nedokonalého spojování jednotlivých vrstev tisku, který při složitější struktuře vytváří defekty [184]. Předností gyroidní struktury je spojitost stěn, která je však díky těmto defektům narušena. Stejně tak byly pozorovány odchylky v tloušťce stěny gyroidní struktury oproti modelu.

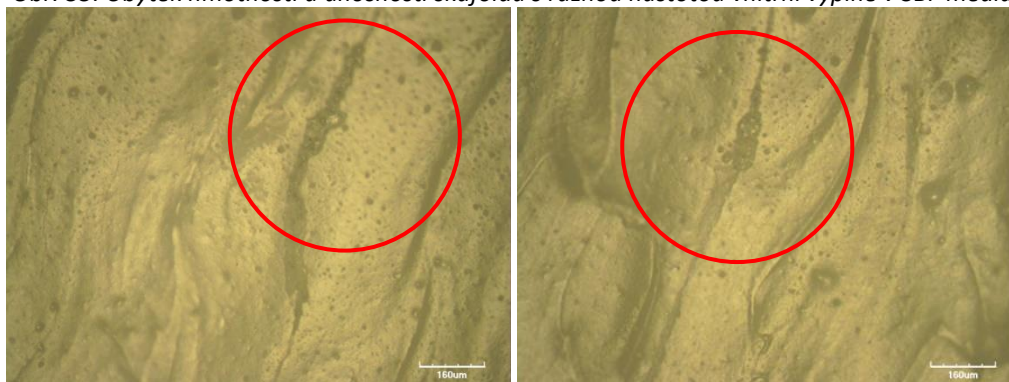
Modul pružnosti v tlaku byl zaznamenán v rozsahu 0,8–1,2 GPa se srovnatelným trendem jako v případě únosnosti v tlaku v závislosti na druhu výplně spongiózy a kompakty. Jak již bylo zmíněno, modul pružnosti kompaktní části kosti je okolo 18 ± 4 GPa, u porézní kosti v oblasti femuru je to $0,4 \pm 0,3$ GPa [224]. Značný rozptyl u spongiózní kosti je dán různým obsahem minerálních látek v kosti pacienta, kdy se pro krček stehenní kosti udává rozptyl modulu od 50 do 600 MPa [244]. I jiné práce publikují střední hodnotu modulu spongiózy v tlaku kolem 100–600 MPa [245], [245], [246].

V případě implementace skafoldu do těla je nutná dodatečná fixace, takže od samotného skafoldu není vyžadováno nést celou váhu pacienta. Pro úspěšnou náhradu původního materiálu kosti je i tak výhodné se co možná nejvíce přiblížit struktuře a mechanickým vlastnostem původní kosti. Zde tedy záleží na tom, zda se nahrazuje (i) segment kosti zasahující i do kompaktní i spongiózní části; nebo (ii) pouze houbovitá část, která je náchylnější k onemocnění. Pro oba případy je možné vybrat vhodnou kombinaci struktur, případně zvolit materiál s jinou mechanickou odezvou, viz předchozí kapitola.

Nakonec byla testována hydrolytická degradace 3D tištěných struktur v médiu simulujícím složení krevní plazmy (simulated body fluid, SBF) připraveného dle Kubobo a Takadama [247]. Vytištěná byla normovaná tělesa na zkoušku v tlaku s různou hustotou vnitřní výplně tvořené gyroidem, podobně jako v případě tištěných segmentů femuru (25, 50, 60, 75 a 100 %). V grafech níže je vidět úbytek hmotnosti a únosnosti v tlaku vytištěných těles v průběhu 5 měsíců (Obr. 33).



Obr. 33: Úbytek hmotnosti a únosnosti skafoldů s různou hustotou vnitřní výplně v SBF médiu



Obr. 34: Tvorba hydroxyapatitu na povrchu tištěných struktur po 2 měsících v SBF

Nejvyšší stupeň hydrolyzy viditelný jak úbytkem hmotnosti (83 % původní hmotnosti po 5 měsících) tak na změně mechanických vlastností (15 % původní únosnosti na konci testu) byl dosažen u tělesa se 100 % výplně. U těchto těles pravděpodobně probíhá autokatalýza kyselými produkty degradace, která byla popsána pro PLA [248]. Tělesa s 50, 60 a 75% výplně vykazují velmi podobný pokles hmotnosti i změnu únosnosti v tlaku. Přibližně poloviny své původní únosnosti dosahují tělesa s vnitřní výplně 25, 50 a 60 % po 3 měsících testu a tělesa s výplně 75 a 100 % již po dvou měsících. Na konci testu dosahují všechny struktury 83–91 % své původní hmotnosti a 14–18 % své původní únosnosti (v přepočtu 12–30 Kg). Při testu byl pozorován mechanismus degradace v objemu, takže se předpokládá razantní úbytek hmotnosti v dalších měsících, který je v souladu s požadavkem lékařů na plnou resorpci skafoldu během 9 měsíců. Po dvou měsících testu na testovacích skafoldech začal precipitovat hydroxyapatit z SBF media (Obr. 34). To naznačuje, že by se takové těleso v *in vivo* prostředí pokrylo bioaktivní vrstvou a bylo dobře přijato hostitelským prostředím [247].

5.5 Přínos

Navrhované řešení spočívá ve výrobě filamentu pro 3D tisk metodu FDM, který byl navržen z bioaktivního kompozitu s majoritní složkou poly(3-hydroxybutyrátu), přídavkem dalšího biopolymeru (polylaktid nebo poly(ϵ -kapolakton)), netoxického změkčovadla a biokeramického plniva. Složení výsledného materiálu bylo optimalizováno s ohledem na využití v tkáňovém inženýrství pro výrobu bioresorbovatelných kostních náhrad na míru pacienta.

Kostní defekty vznikají při zlomeninách, případně následkem chorob a při operacích a jsou velmi častým případem zdravotních problémů. Tyto defekty se dnes běžně léčí implantováním kostních štěpů, ideálně přímo z těla pacienta, případně od dárce, a to stejného i jiného živočišného druhu. Tyto metody však mají několik úskalí, jako možnost přenosu nemocí, omezenou dostupnost materiálu štěpu, případně odmítnutí tělem hostitele. Výzkum v oblasti hojení kostí je proto velmi důležitým a pro lidstvo potřebným směrem, a neočekává se, že by zájem o něj v blízké době opadl. Tkáňové inženýrství a vývoj speciálních materiálů pro tyto aplikace je přístup, který překonává všechny výše zmíněné nevýhody a v současné době se značně rozvíjí ruku v ruce se speciálními technologiemi zpracování. Metoda FDM 3D tisku je jednou z nich - nabízí obrovské možnosti při navrhování tvaru výsledného kostního implantátu – skafoldu. Na rozdíl od dalších způsobů výroby je tak touto metodou možné připravit implantát pacientovi na míru přímo podle defektu kosti.

Použitý materiál PHB je dle výsledků biokompatibilní, bioresorbovatelný a má mechanické vlastnosti, které ho předurčují k použití pro náhrady tvrdých tkání, jako např. kostí. Navíc, je možné jej zpracovat jako termoplast, takže je vhodný i pro 3D tisk metodou FDM. PHB je také možné jednoduše mísit s dalšími biopolymery, případně plnivy, k další optimalizaci jeho vlastností. Tento záměr tedy nově spojuje biomateriál s obrovským aplikačním potenciálem, nejmodernější přístupy regenerativní medicíny a navíc vysoce efektivní způsob zpracování - FDM 3D tisk. Dosažené výsledky jsou velmi slibné z pohledu procesu zpracování materiálu, biokompatibility i mechanických vlastností. Dosavadní práce ukazuje, že je možné řídit materiálové vlastnosti výsledného štěpu kostní tkáně jak materiálovými vlastnostmi kompozitu (a ty jeho složením), tak volbou vnitřní struktury 3D tištěného finálního štěpu. Výsledky chování materiálu v simulované tělní tekutině ukazují postupný rozklad materiálu v rychlostech, které jsou zřejmě adekvátní pro využití tohoto materiálu v případě reálné náhrady resorbovatelné kostní tkáně. Nicméně doposud prováděné testy v SBF jsou sice důležitým, ale jen orientačním testem, který nezodpoví reálnou rychlost resorpce v těle pacienta a nemůže nahradit *in vitro* experimenty. Z toho to důvodu bude výzkumná činnost v tomto tématu pokračovat s vhodným partnerem (Ceitec, VFU Brno apod.) na charakterizaci materiálu *in vivo* v modelových organismech.

6 NETKANÉ MIKROVLÁKENNÉ TEXTILIE NA BÁZI PHB PRO MEDICÍNU

Netkané textilie jsou druhem textilií, které se vyrábějí bez tradičního procesu tkaní nebo pletení vláken. Spojování vláken do soudržné podoby se v principu realizuje pomocí chemických procesů (např. síťování gelů), tepelných procesů (např. meltblown, spunbond) nebo mechanických procesů (např. vibrační výroba plsti apod.). Zvláknovací metody polymerních netkaných textilií využívají různé způsoby tvorby samotného polymerního vlákna. Odlišují se zejména formou, ve které polymer vstupuje do zvláknovací hlavy, principem zvláknění, tedy v podstatě silou (typem interakce), kterou je vstupní materiál formován do podoby vlákna a způsobem záchytu vlákna do finální podoby textilie.

Polymery mohou být zvlákněny z taveniny nebo z roztoku o vhodné viskozitě, která je kromě molekulové hmotnosti vstupního polymeru, případně vhodných aditiv, následně v procesu zvláknění řízená teplotou taveniny nebo koncentrací roztoku. Hnací silou procesu formování polymeru do podoby vlákna může být odstředivá síla na rotační hlavě trysek, gravitační, nebo odtahová síla vlákna, síly vznikající při interakci s rychle proudícím plynem, nebo elektrostatická síla. Vytvořené vlákno je pak zachytáváno buď na tzv. kolektory nebo mřížky anebo na nosnou vrstvu často v podobě kovového nebo polymerního pásu, jiné netkané textilie, papíru apod. Síly, které přitlačí vlákno do vznikající struktury netkané textilie mohou být odstředivé, elektrostatické, magnetické nebo může být vlákno unášeno proudem vzduchu vedeným skrze prodyšnou nosnou vrstvu [249]. Mnohé metody využívají kombinaci více těchto jednotlivých principů [250]. Při některých metodách se využívá finální fixace vláken do vzniklé struktury netkané textilie kalandrováním.

Netkané textilie mají mnoho výhod a nacházejí široké uplatnění v medicíně v oblasti tkáňového inženýrství. Zde se v kontaktu s tkání používají nejčastěji buď jako prodyšné krycí membrány, nebo jako nosiče buněčných kultur, na kterých mohou buňky adherovat a růst. V druhém případě netkané textilie poskytují strukturální podporu novým buňkám tkání a umožňují difuzi živin a odpadních látek mezi buňkami a okolím. Tento proces je důležitý například při vytváření tkání a orgánů *in vitro*, které se pak mohou použít k léčbě nebo nahrazení poškozených tkání a orgánů v lidském těle.

Netkané textilie lze připravit s vlastnostmi na míru aplikaci. Jejich tloušťku, porozitu, velikost vláken a hustotu sítě lze řídit procesem výroby. Biokompatibilitu textilie a nízké toxicity lze dosáhnout vhodným výběrem materiálu. Kombinací parametrů výrobního procesu, výběrem materiálu a případně aditiv lze pak nastavit mechanické vlastnosti. Umožňuje to dosáhnout flexibilních textilií, které mohou být tvarovány do různých forem, což umožňuje jejich použití pro různé typy tkání a orgánů. V případě, že je použit materiál schopný resorpce v organismu, může se tato netkaná textilie postupně rozkládat v těle a přetvářet na novou tkáň bez negativní reakce imunitního systému. Netkané textilie lze také modifikovat za účelem schopnosti uvolňovat účinné/léčivé látky inkorporované do materiálu resorbujících vláken. Do materiálu vláken lze také zabudovat vhodná aditiva, která ovlivňují diferenciaci buněk [251].

Polyhydroxyalkanoáty, na které je tato práce zaměřena, trpí nestabilitou svojí chemické struktury při procesech zpracování v tavenině. Viskozita taveniny, která je nutná pro zavedené průmyslové procesy výroby netkaných textilií Meltblown a Spunbond, musí být poměrně nízká z důvodu toku taveniny úzkými tryskami a nutného dloužení rozfukem vzduchu. Požadované hodnoty MFI se pohybuje v rozmezí 30–1500 g·10 minut⁻¹ [252].

Tato spodní hranice je však v technologické praxi požadována často mnohem vyšší. Viskozita PHB je poměrně strmě závislá na teplotě taveniny, ale teplota potřebná k dosažení takových hodnot viskozity přesahuje použitelný teplotní rozsah zpracování PHB [39]. Dochází tak k tepelné degradaci, tedy štěpení řetězců, snižování celé distribuce molekulové hmotnosti za tvorby krotonových a karboxylových konců. V případě nedokonale čištěného PHB, a tedy přítomnosti zbytkových proteinů a buněčných stěn, dochází navíc k napalování degradačních produktů těchto látek na stěny trysky a jejich zalepování, což působí v procesu zvláknění komplikace. Tyto zkušenosti získané při vývoji blendů pro zvláknování PHB v tavenině byly jedním z impulsů k rozšíření portfolia zkoumaných technologií o roztokové metody.

6.1 Motivace

Biokompatibilita PHB, jeho prokázaná resorbovatelnost v lidském těle rozkladem na produkty tělu vlastní (hydroxymáselná kyselina), s jeho přírodním původem, a tím i biodegradovatelností v přírodních podmínkách, jsou důvodem velkého zájmu o tento materiál i v medicínských aplikacích [253]. Zejména ve vláknenné formě, která eliminuje křehkost, jako jednu ze slabých stránek PHB, lze dosáhnout materiálů flexibilních a poddajných, a to bez chemické modifikace PHB. Klasické zvláknovací techniky termoplastických materiálů z taveniny mohou sice produkovat kvalitní vlákno na bázi PHB, jde však z výše zmíněných procesních důvodů zpravidla o blend s dalšími polymery, aditivami a stabilizátory, což je v případě využití pro tkáňové inženýrství zdrojem komplikací z pohledu biokompatibility a toxicity. Navíc, při zpracování termoplastů na bázi PHB v tavenině není možné se vyhnout termické degradaci polymerního řetězce a vzniku nežádoucích produktů těchto degradačních reakcí. Naopak v případě využití zvláknovacích technik z roztoku je možné zachovat strukturní vlastnosti PHB (jeho molekulovou hmotnost, optickou i chemickou čistotu) a za předpokladu kompletního odstranění rozpouštědla z finálního produktu je výsledným materiálem čisté, termicky nedegradované PHB. Pochopitelným předpokladem pro tento výsledek je vhodně izolovaný a dostatečně čistý materiál již na vstupu. Vhodnou volbou parametrů technologie zvláknění z roztoku lze dosáhnout netkaných textilií s širokým rozmezím distribuce průměrů vláken, jejich orientace [254], [255] a stejně tak i široké škály velikosti prostoru mezi vlákny (porozity), což umožňuje nastavit jejich prodyšnost a případně i filtrační schopnosti. Proto tyto netkané textilie nabízejí poměrně velký potenciál ve využití jako kryty ran. Technologicky navíc dávala smysl návaznost na procesy extrakce PH3B, které v té době probíhaly v chloroformu, a byl tak přímo k dispozici vhodný roztok jako vstupní produkt do technologie odstředivého zvláknování. Extrakce v chloroformu byla posléze z důvodu negativního environmentálního dopadu odsunuta do pozadí a nahrazena procesy využívajícími detergenty. Záměrem mnohých technologů i výzkumníků zabývajících se extrakcí PHA a jejich zvláknováním z roztoku je nahradit chloroform za rozpouštědlo šetrnější k strojům, lidskému zdraví i životnímu prostředí [256].

6.2 Současný stav

Odstředivé zvláknování polymerů do podoby mikro a nanovláknů je proces známý už od devadesátých let 20. století, kdy se objevují první patenty [257]. Je zde prezentováno technické řešení základních typů rotačních zvláknovacích hlav s tryskami. Práce [258] shrnuje předpokládané vztahy mezi procesními parametry (viskozita zvláknovaného média, povrchové napětí, rotační rychlost hlavy, vzdálenost trysky od osy rotace, průměr trysky a vzdálenost sběrných kolektorů od

trysky) a finální tloušťkou vlákna. Stejně tak autoři v publikaci [259] ukazují možnost využít Berryho číslo (Be) jako procesní faktor, který lze podobně jako při elektrospinningu použít k popisu vlivu interakcí polymerních řetězců na vlákna o výsledném průměru. Obecně platí, že pro výrobu nanovláken pomocí odstředivého zvláknování by Be mělo překročit kritickou hodnotu Be^* , při které jsou koncentrace a viskozita adekvátně vysoké a polymerní řetězce jsou dostatečně propletené. Naopak, je-li Be nižší než Be^* , neadekvátní interakce řetězců bude mít za následek špatnou tvorbu vláken [259].

Podobně je teorie procesních parametrů CFS diskutována v publikaci [260]. Dle autorů je při procesu výroby nanovláken třeba vzít v úvahu tři významné materiálové parametry, kterými jsou povrchové napětí, viskozita a rychlost odpařování rozpouštědla. Kromě toho pak do výsledku vstupují další procesní parametry, jako je rotační rychlost zvláknovací trysky, její průměr a vzdálenost od kolektorů. Ostatní parametry nemají tak významný vliv [261]. I v mnoha dalších publikacích je snahou autorů popsat vlivy procesních parametrů na výslednou strukturu vláken i za pomoci složitějších modelů [261], [262], [263], [264], [265], [266], [267].

Vlastnosti CFS vláken i vliv reologických vlastností roztoku použitých polymerů na tyto výsledné vlastnosti vlákna jsou velmi často porovnávány s ES technologií [268], [269]. Dle publikace se ze stejného roztoku etylcelulózy s polyvinylpyrrolidonem (PVP) ve směsi etanol s vodou metodou CFS vytváří při určitých poměrech porézní strukturu vlákna, zatímco vlákna z ES nevykazovala žádnou porozitu [270]. Podobně vlákna z PCL vyrobená pomocí CFS (zde jako *Rotary Jet Spinning* RJS) vykazovala vyšší drsnost oproti vláknům z ES [271]. Přesto, že jsou distribuce průměru vláken, morfologie jejich povrchu i porozita netkané textilie často poměrně odlišné i za použití stejného polymeru, tvorba vlákna je vždy řízena zejména interakcí molekul v rozpouštědle. Publikace [272] porovnává tyto procesy na polyvinylalkoholových a PVP vláknech. Zatímco ES poskytlo rovinné 2D vrstvy vláken, CFS poskytlo objemné 3D struktury, podobné vatě. Společným znakem procesů bylo, že střední průměr vlákna se zvyšoval se zvyšující se koncentrací polymeru v roztoku (což přímo souvisí se zvyšující se viskozitou roztoků) a vlákna z odstředivého zvláknování měla větší střední průměr. Bylo však zjištěno, že korelace mezi průměry vláken a viskozitami roztoku byly významně silnější pro vlákna z CFS ve srovnání s vlákny z ES technologie. Nicméně elektrostatické zvláknování dokázalo vyrobit vlákna z relativně zředěných roztoků (10 hm. % polymerů), zatímco odstředivé zvláknování bylo schopno získat vlákna z velmi viskózních roztoků, kde elektrostatické zvláknování již nevytvářelo žádná vlákna.

6.2.1 Antimikrobiální aditiva

Možnost mísit polymerní roztok s funkčními aditivami s antimikrobiálním účinkem a z něj následně vyrábět vlákenné netkané textilie podněcuje výzkum mířící k medicínským aplikacím, k antimikrobiálním obalům potravin, k vývoji filtračních materiálů a bioelektronických senzorů pro "smart textiles" [273]. Využívají se jak anorganické látky (např. jod v PVP/vinyl-acetátových vláknech [274], tak nanočástice z dusičnanu stříbrného v teplotně zesíťovaném gelu [275] nebo v polyvinylalkohol-co-vinylacetátu [276], nanočástice stříbra v PLA vláknech pro obaly potravin [277], v celulosových vláknech [278], nanočástice mědi v matricích z PVP a polyethylenoxidu (PEO) z roztoků PVP/ethanol a PEO/voda [279], oxid zinečnatý a hydroxyapatit v PLA [280]. Objevují se i aplikace aditiv organických látek často na přírodní bázi jako karboxymetylchitosan v polyethylenoxidových vláknech [281], virgin kokosový olej [282], kyselina třísllová s pullulanem v chitosanových vláknech

[283] a ve vláknech z chitosan/polyvinylalkoholu [284], česnekový extrakt v polyvinylpyrrolidonových vláknech [285], tymiánový esenciální olej v polyakrylonitrilových vláknech [286], cinamaldehyd v chitosanových vláknech [287] a nebo syntetické antibiotikum ciprofloxacin v PLA/želatina [288].

I přes to, že materiály PHA i metoda odstředivého zvláknění jsou známé poměrně dlouho, publikací na téma odstředivě zvlákněného PHA nebylo do dnešní doby nijak mnoho publikováno. Nejstarší dohledanou publikací na toto téma je dvojice navázaných prací týmu autora L. J. R. Fostera z r. 2001 [289] a 2003 [290]. Práce se zaměřuje na charakterizaci připravených PHB vláken z pohledu morfologie, termických vlastností a interakce s vybranými kmeny buněk. Diskutovaná je problematika nedostatečné adheze buněk na vlákna PHB a možnosti úpravy povrchu vláken hydrolyzou povrchu v alkalickém a kyselém prostředí. Prezentovány jsou výsledky *in vitro* degradace vláken v kyselém i alkalickém prostředí a pomocí SEM, DSC a FTIR je vysvětlován mechanismus rozpadu vláken. Obě práce také ukazují souvislosti a vliv použitého rozpouštědla (chloroform vs. dichlormetan), čistotu PHB (technická čistota v.s. dodatečně přečištěné) a použitá aditiva (pektin a alginát sodný) na dosaženou strukturou netkané textilie a morfologii vlákna. Publikované výsledky ukazují potenciál PHB pro aplikace v oblasti hojení ran a vyzdvihují možnost použití technologie odstředivého zvláknění PHB pro výrobu netkaných textilií se zabudovanými, s roztokem PHB nemísitelnými, účinnými látkami do vlákna.

Zajímavou možnost s antimikrobiálními vlastnostmi nabízí hypericin izolovaný například z *Hypericum perforatum* (třezalky tečkované). Přestože je v klasické farmacii používán zejména pro léčbu depresí a úzkostných stavů, v novodobých publikacích je prezentován i jako zajímavý přírodní fotosenzibilizátor. Má široké spektrum absorpce s maximy při 545 a 595 nm a širokým rozsahem emisních vlnových délek s maximem při 594 a 640 nm a je tedy vhodný pro fotokatalýzu iniciovanou viditelným světlem [291]. Tuto účinnou látku zabudoval do PHB odstředivě zvlákněných netkaných textilií tým pana M. Berana [292]. V této práci byla využita modifikovaná metoda odstředivého zvláknění s rotačními kolektory. Do 2% roztoku PHB v chloroformu byl přidán 14,8% extrakt z třezalky v rozpouštědle methanol:aceton (2:1, w:w) tak, aby byla finální koncentrace 0,3 % ve výsledném zvlákněném roztoku. Článek nebyl zaměřen na charakterizaci fyzikálních vlastností vláken, úsilí bylo věnováno měření kvantifikace singletového kyslíku a antibakteriálních vlastností vláken v případě *Escherichia coli* při expozici viditelným světlem. Ten byl úspěšně prokázán, což otevírá možnosti využít materiál v mnoha oblastech tkáňového inženýrství tam, kde je třeba posílit boj proti gramnegativním bakteriím.

Na záměr netkané textilie s antimikrobiálním povrchem navazuje práce publikovaná v r. 2018, která se zabývá využitím šťávy z kyselých pomerančů (sour orange juice – SOJ) jako přírodního aditiva na povrchu PHB vláken vyrobených odstředivým zvlákněním [293]. Účinky tohoto komplexního přírodního aditiva byly popsány v několika dalších publikacích [294], [295]. Byla hodnocena antibakteriální aktivita proti běžným grampozitivním a gramnegativním bakteriím (*Staphylococcus aureus*, resp. *Escherichia coli*) a také buněčná adheze a životaschopnost 3T3 myších fibroblastů. Scaffolds PHB/SOJ vytvořené ponořením PHB netkané textilie vyrobené odstředivým zvlákněním do pomerančové šťávy vykazovaly antibakteriální aktivitu. Testy na buňkách ukázaly vhodné prostředí pro buněčný růst a uchycení buněk. Výsledky této studie otevírají nové možnosti pro výrobu vláknitých materiálů pro biomedicínské aplikace s multifunkčními vlastnostmi za použití přírodních látek.

Jedním z dalších přístupů vytvoření antimikrobiálního materiálu na bázi PHA je modifikace povrchu vláken v plazmatu, vakuovým naprašováním atomů kovu nebo roztokovým pokovením povrchu částicemi stříbra [296]. Tyto úpravy jsou funkční, jejich toxikologická ne/závadnost je dnes často diskutována. Úpravy povrchu mají také zásadní vliv na výslednou povrchovou energii a tím na smáčivost. Zatím co samotná úprava plazmatickým výbojem dle předpokladu zvýšila povrchovou energii a to zejména její polární složku a tím snížila kontaktní úhel vody, depozice kovových vrstev na povrch PHB kontaktní úhel vody zvýšila a to v závislosti na tloušťce kovové vrstvy.

Na mikrovlákna z PHB vyrobená metodou CFS imobilizoval tým z Prahy Endoinulinázu z *Aspergillus niger* Inulinase® Novozym 960 [297]. Vyvinuli tak biokatalyzátor pro výrobu probiotického oligosacharidu a inulooligosacharidu. Vlákná ve formě vaty o tloušťkách v rozsahu 1–3 μm byla vyrobena z 5% roztoku PHB v chloroformu na zařízení s rotační polyamidovou nádobou zvonovitého tvaru. Vlákná byla nabotnána v bezvodém etanolu, následně byl přebytek ethanolu odstraněn a vlákná byla důkladně promyta demineralizovanou vodou. Promytá vlákná byla inkubována v 50 ml kapaliny Inulinase® Novozym 960. Nakonec byla vlákná důkladně promyta demineralizovanou vodou, vysušena při pokojové teplotě a zvážena hydrofobními interakcemi.

Nejnovější publikací na téma CFS PHA materiálů je studie belgického kolektivu autorů [298]. Zabývá se zvlákněním kopolymeru P3HBcoHHx s molární koncentrací 10,55 % hydroxyhexanoátu v roztocích chloroformu s proměnnou koncentrací polymeru. Viskozita roztoku řízená koncentrací polymeru byla považována za nezávislou proměnnou ve vztahu k měřeným veličinám popisující vytvořená vlákná. Charakterizována byla tloušťka vláken a jejich morfologie, termické vlastnosti (krystalinita a teplota tání) a mechanické vlastnosti v tahu. Autoři uvádí kritickou koncentraci, kdy dochází k úspěšnému zvláknění do formy netkané textilie bez vysokého zastoupení kapek. Tu stanovují na základě měřené závislosti Zero-shear viskozity na koncentraci polymeru v roztoku a korelují se získanými vlákny. Zvláknění probíhalo na laboratorně vytvořeném systému rotační dvouramennou hlavou osazenou tryskami 0,6 mm [261]. Autoři upozorňují na složitost porovnání mechanických vlastností vlákenné struktury netkané textilie. Mechanická odezva těchto materiálů v tahu je silně závislá na distribuci tloušťky vláken a jejich orientaci v textili. Tyto vlastnosti jsou dány procesními parametry technologie, které se mezi autory velmi výrazně liší.

6.3 Cíle

Všechny tyto výše popsané podněty a fakta vedly zejména v rámci projektu **PR 9** a **PR 12** v týmu Laboratoře bioplastů k vědecko-výzkumné činnosti zaměřující se na procesy zpracování PHB do formy funkčních netkaných textilií pro medicínské aplikace metodou odstředivého zvláknování. Cílem bylo a stále je připravit netkanou textilií na bázi PHA s říditelnými vlastnostmi (mechanické vlastnosti, morfologie, interakce s kapalinami a buňkami). Předpokladem je možnost ovlivnit tyto parametry aditivou na základě analogie se zpracováním v tavenině. Využití mísení kopolymerů PHA s různými vlastnostmi, přídavek jiného biopolymeru nebo přídavek změkčovadla byly materiálové a procesní možnosti, které v případě odstředivého zvláknění PHA nebyly zatím publikovány.

Z pohledu budoucí možné aplikace je dlouhodobým cílem tyto netkané textilie otestovat ve třech případech využití:

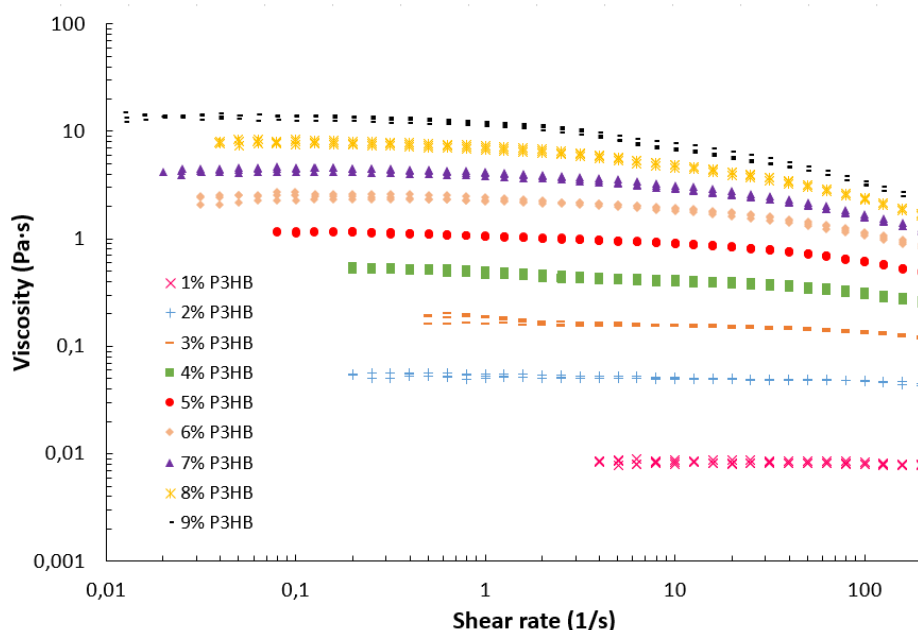
- kryty ran, v budoucnu s antimikrobiálními vlastnostmi s možnostmi pomalého nebo lépe řízeného uvolňování účinné látky (**PR 9**),

- funkčního substrátu pro kultivaci buněk s prostorovou strukturou imitující přirozené prostředí buňky (PR 9),
- filtračního materiálu pro osobní ochranu dýchacích cest před viry a bakteriemi. Zde se nabízelo využití přírodních aditiv na bázi fenolických pryskyřic s antibakteriálním a antivirotickým účinkem. Tento záměr vznikl a byl rozvíjen v rámci projektu PR 11 řešeného na CEITEC VUT pod vedením doc. Lucy Vojtové.

Ve všech případech je záměrem otestovat výrobu navržených řešení v průmyslovém měřítku technologie odstředivého zvláknování u průmyslového partnera.

6.4 Dosažené výsledky

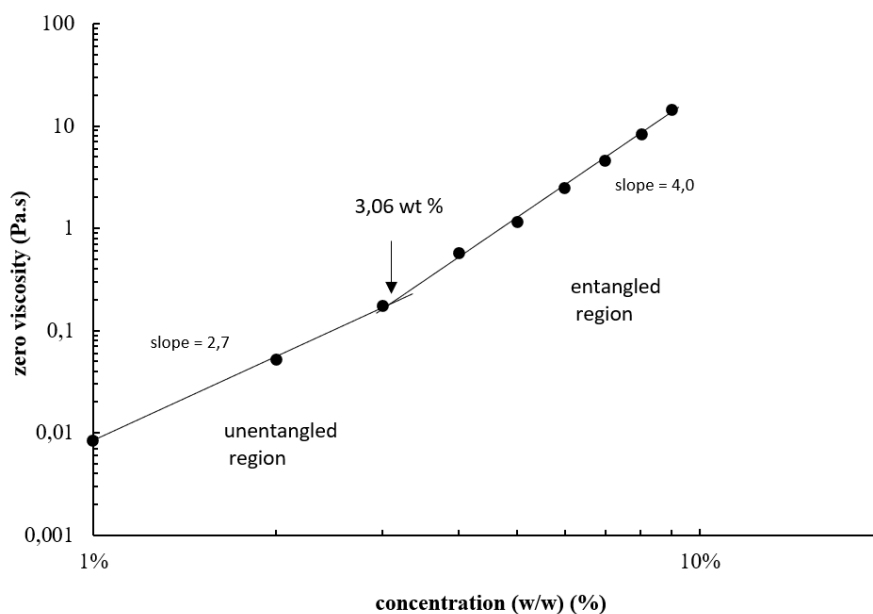
Klíčovými vlastnostmi pro úspěšné zvláknění čistého polymeru odstředivým zvlákněním z roztoku je bezesporu viskozita polymerního roztoku řízená interakcí rozpouštědla a polymeru, jeho koncentrací a distribucí jeho molekulové hmotnosti. Jak popisují publikace [299], [300], [301], existují intervaly koncentrace roztoku, kdy je závislost logaritmu intrinstické viskozity na logaritmu jeho koncentrace lineární, avšak s jinou konstantou. V těchto intervalech dochází v roztoku k odlišné interakci řetězců polymeru s rozpouštědlem, což se projeví jiným chováním při elektrospiningu (ES) i odstředivém zvláknování (CS). Podobnost chování roztoku v procesech CS a ES je běžně využívána. U PHB jsou pozorovány dva intervaly oddělené kritickou viskozitou. Pod touto viskozitou dochází k tvorbě kapiček, nad kritickou viskozitou k tvorbě vláken. U některých polymerů byly pozorovány 3 rozhraní, které ukazují na schopnost tvořit kapky, tvořit kapky s vlákny a v posledním intervalu tvořit pouze vlákna. Zřejmě díky širší distribuci molekulových hmotností PHB jsou pozorovatelné jen tyto dva ne zcela ostré intervaly. Obrázek níže (Obr. 35) ukazuje tokové křivky PHB v závislosti na smykové rychlosti při různých koncentracích PHB v chloroformu.



Obr. 35: Reologické chování roztoku PHB v chloroformu v závislosti na jeho koncentraci

Z těchto křivek byly určeny zero-shear viskozity a ty vyneseny v závislosti na koncentraci roztoku. Průsečíkem přímkových závislostí v grafu na Obr. 36 níže byla vyhodnocena kritická viskozita 3 %. Ta by měla vyústit v tvorbu vláken a omezit vznik kapek. Stanovená hodnota je v souladu s experimentálně pozorovaným chováním při přípravě vláken v rámci diplomové práce VSKP6.

3% roztok tvořil při 4000 ot/min spolu s vlákny i kapky, na vláknech z 5% roztoku již kapky pozorovány nebyly. V případě 8000 ot/min byly kapky pozorovány i z 5% roztoku, ze 7% roztoku se pak vytvářela vlákna bez kapek. Výsledek je také ve shodě s publikací [301], kde byla stanovena kritická viskozita na hodnotě cca 3,5 %.



Obr. 36: Závislost zero shear viskozity na koncentraci PHB v roztoku chloroform

Podobně byly získány hodnoty kritické viskozity pro směsi PHB s kopolymerem 15 % P3,4HB a směsí PHB s 10 % změkčovadla Syncroflex. Hodnota kritické viskozity u směsi s P3,4HB byla stanovena na hodnotu 2,5 %, použití aditiva Syncroflex naopak umožnilo zvláknovat roztoky vyšších koncentrací, což zvýšilo i produkční rychlost.

Během práce s roztoky PHA v chloroformu stabilizovaného etanolem byl pozorován již publikovaný jev snížení viskozity v čase skladování roztoku. Pokles je způsoben poklesem molekulových hmotností polymeru hydrolýzou v kyselém prostředí HCL vzniklé oxidací chloroformu [300]. Zajímavým zjištěním byla také zrychlená degradace polymerních řetězců v prostředí chloroformu stabilizovaného amylenem na denním světle. Proto nebylo možné tento chloroform jako rozpouštědlo využívat, neboť zvláknění z těchto roztoků o rychle klesající viskozitě nebylo možné.

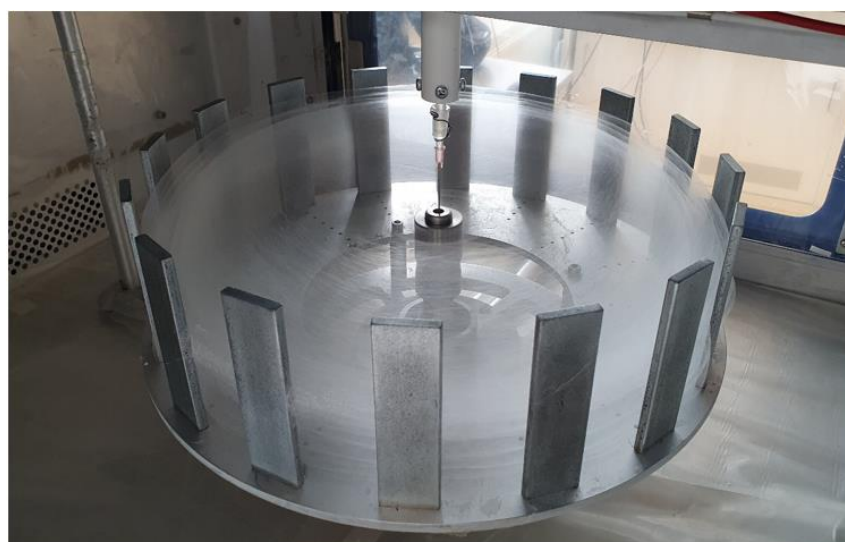
Během dvou let vývoje těchto PHB vláknenných textilií byly v rámci dvou diplomových prací (**VSKP6** a **VSKP8**) testovány příměsi 3 změkčovadel - acetyltributylcitrát (Citroflex A4), polyadipát (Syncroflex 3114-LQ) a komerční plně biobased polyester EMERY MC2192 (dnes pod značkou EDENOL2192). Podobně byly roztoky PHB modifikovány přidávkem pomocných polymerů (amorfní PDLLA, PCL a PEG 1000 a P3,4HB). Všechny binární směsi kromě PEG, který byl s PHB nedostatečně mísitelný, se podařilo úspěšně zvláknit a modifikovat tak výsledné vlastnosti vláken.

Zvláknování probíhalo technologií odstředivého zvláknování na přístroji FibeRio CycloneL1000. Přístroj je nastaven k produkci vláken z 2 ml zásobníku v rotační hlavě. Aby byla produkce vláken kontinuální a bylo lépe řízeno dávkování, byla provedena úprava a použita injekční stříkačka naplněná roztokem polymeru napojená na injekční pumpu (LAMBDA VIT-FIT (HP)). Rostok polymeru byl dávkován touto pumpou hadičkou až do zvláknovací hlavy skrze dávkovací jehlu 18G o vnějším průměru 1,2 mm. Na Obr. 37 je zobrazena zvláknovací hlava s upraveným kontinuálním dávkováním.



Obr. 37: Přístroj FibeRio CycloneL1000 s upraveným kontinuálním dávkováním

Na rotační hlavě jsou upevněny dvě výměnné zvlákňovací jehly se standardním bajonetovým uchycením. Nejlepších výsledků bylo dosaženo použitím zvlákňovacích jehel 30 G. Jsou to jehly s vnějším průměrem 0,3 mm a zkosením 11°. Dávkování roztoků bylo po optimalizaci zvoleno konstantní o rychlosti cca 2,5 ml/min. K získání kokonů vláken o přibližně stejné hmotnosti bylo trvání jednoho zvlákňovacího cyklu 2 min pro 7% roztoky a 2,5 min pro 5% roztoky polymerů. Vzdálenost kolektorů byla také neměnná a to 130 mm od zvlákňovací hlavy. Rozložení 16 kolektorů o rozměrech 115 × 32 × 7 mm bylo rovnoměrné po celém obvodu. Nejčastěji měnicím se procesním parametrem byla rychlost otáčení zvlákňovací hlavy. Ta byla nastavena tak, aby probíhala stabilní tvorba mikrovláken do formy tzv. kokonu viz Obr. 38. Pro většinu vzorků byla ideální rychlost zvlákňování 10 tis. ot/min.

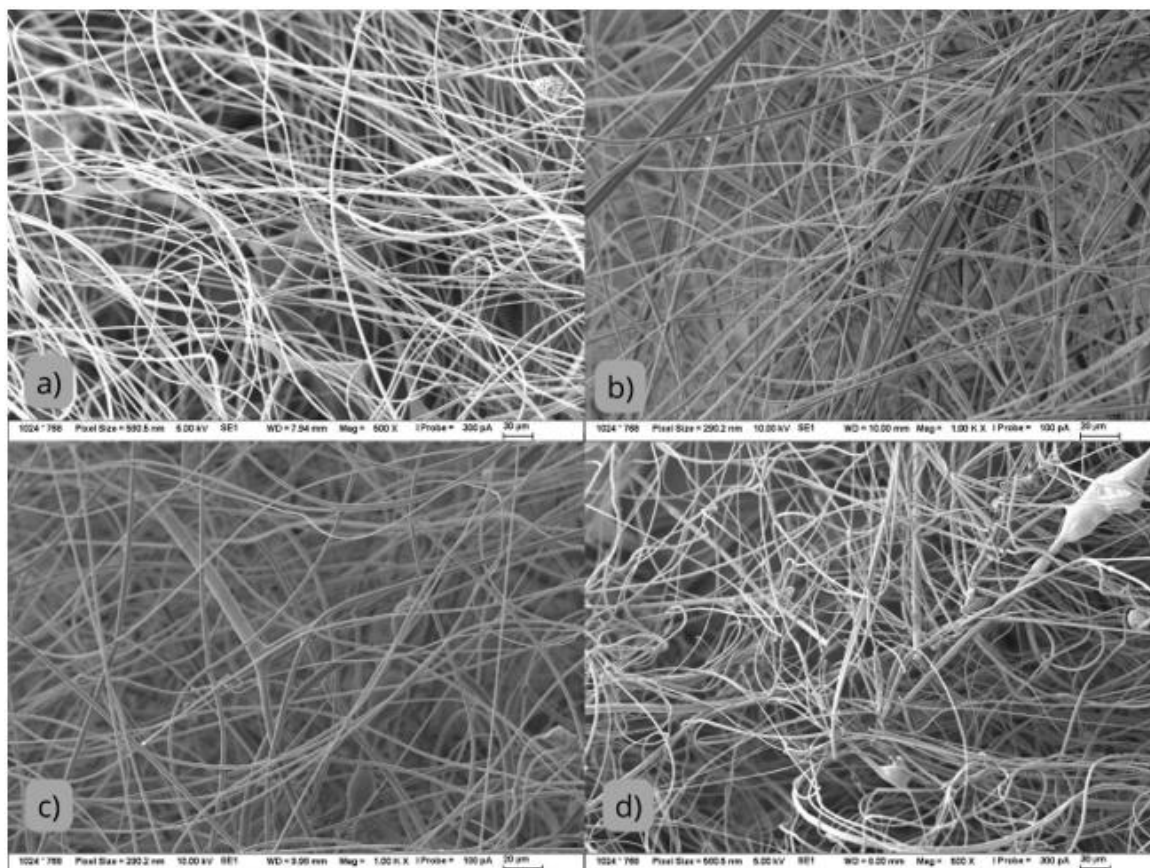


Obr. 38: Ukázka úspěšně zvlákněného polymerního roztoku do objemného „kokonu“

Paralelně byly vybrané úspěšné roztoky testovány na průmyslovém zvlákňovacím zařízení ve společnosti NanoSpace Technology. Tato technologie přizpůsobená výrobě planárních vzorků v metráži neposkytuje již objemné vláknenné struktury ve formě vaty, ale plošnou formu náhodně orientovaných vláken s gramáží 2-20 g/m² na pomocné nosné textilii. Vzhledem k odlišné konstrukci zvlákňovací hlavy a využití odlišných směsných rozpouštědel není výsledek srovnatelný. Proto byly vybrané materiály testované v obou formách – planárních membránách z průmyslu a vaty

z laboratorního zvláknění. Tyto testy poskytly důležitou informaci o použitelnosti navržených materiálů v průmyslové praxi.

Jeden vybraný příklad možnosti, kde se přidavkem pomocného polymeru podařilo zlepšit stabilitu procesu zvláknění i kvalitu samotných vláken je na Obr. 39. Jak bylo patrné již při samotném procesu zvláknění, přidavek 15 % P3,4HB do PHB umožnil velmi stabilním procesem vytvořit nadýchaný kokon vláken, který na rozdíl od čistého PHB neobsahoval tolik splených vláken. Vyšší přidavek P3,4HB než 15 % pak vedl k již nehomogenní struktuře vláken. Podobného efektu bylo dosaženo přidavkem 10 % změkčovadla Syncroflex, výroba na laboratorním stroji byla stabilnější a výkon výrobní průmyslové linky byl také prokazatelně vyšší a zlepšila se i kvalita vláken v membráně.

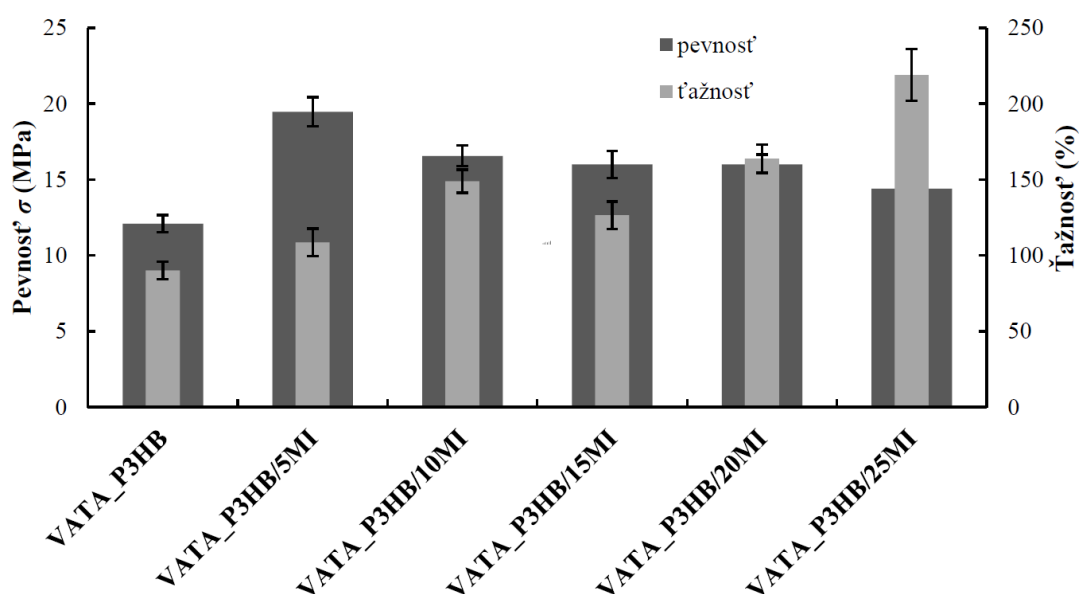


Obr. 39: SEM snímky laboratorně připravených vláken z a) PHB, b) PHB+15%P3,4HB, c) PHB+20 % P3,4HB (zvětšení 1000 \times) a d) PHB+25 % P3,4HB (zvětšení 500 \times)

Předmětem výzkumu byl dopad přidavku aditiv na mechanické vlastnosti a tedy možnost jejich řízení. Pro jednoduchou charakterizaci odpovídající procesu manipulace s planárními membránami i vlákny ve formě vaty byla zvolena tahová zkouška. Z planárních membrán byly vyseknuty vzorky tvaru dogbone. Z laboratorně připravených vláken ve formě vaty byly z kokonu, vždy ve stejném směru s ohledem na orientaci kokonu při výrobě, vystřiženy svazky, které byly uchyceny do čelistí. Vzorky byly podrobeny základní tahové zkoušce při deformační rychlosti 10 mm/min. Stanoveny byly hodnoty maximální síly a napětí a maximální deformace při porušení (poklesu síly pod 20 % z naměřeného maxima). Napětí bylo vypočteno jako poměr síly a efektivní plochy, která byla odvozena ze známé hmotnosti vzorku a hustoty polymeru. Sledován byl zejména vliv přidavku aditiv na mechanickou odezvu v tahu (Obr. 40). Přestože je měření takto subtilních vzorků zatíženo významnou chybou, vliv přidavku změkčovadla ve všech variantách byl prokazatelný a zvyšoval maximální deformaci. U formy vata byla tažnost PHB s přidavkem 10 % změkčovadla Syncroflex

135 % oproti referenčnímu PHB (90 %), u planárních membrán byla tažnost celkově nižší, účinek (cca 150 % původní hodnoty) změkčení však stejný (z 10 na 15 %).

Přídavek kopolymeru P3,4HB také způsobil zvýšení tažnosti netkaných textilií a to až na 220 % při 25% zastoupení P3,4HB v polymerní směsi. Nutno podotknout, že tato vlákna nebyla z hlediska morfologie příliš homogenní. Jako optimální se při výrobě i z hlediska morfologie jevil přídavek 15 % P3,4HB. V tomto případě z cca 90% tažnosti bylo dosaženo 125 %, v případě pevnosti z 12 MPa zvýšení na 16 MPa. Tyto změny jsou dány nejen rozdílným složením polymerní směsi, ale také zřejmě jinou strukturou sítě vláken a jejich vazbou způsobenou jinou viskozitou roztoku a afinitou vznikajících vláken dopadajících na ta ostatní. Testy zvláknění čistého P3,4HB vedly sice po optimalizaci také k tvorbě vláken na kolektorech, ale nebylo možné je z nich sejmut. Vlákna byla příliš měkká a lepkavá a při dotyku se shlukla do jednoho celku. I malé množství P3,4HB ve směsi tak zřejmě působí pozitivně na pevnost sítě, protože zpevňuje spojení vláken v místě jejich dotyku. Jeho vyšší koncentrace vede ke změkčení samotného vlákna. Tuto teorii by bylo vhodné ověřit přípravou samotného vlákna a měřením jeho vlastností.



Obr. 40: Vliv přídavku P3,4HB (MI) na mechanické vlastnosti netkaných textilií připravených ve formě vaty.

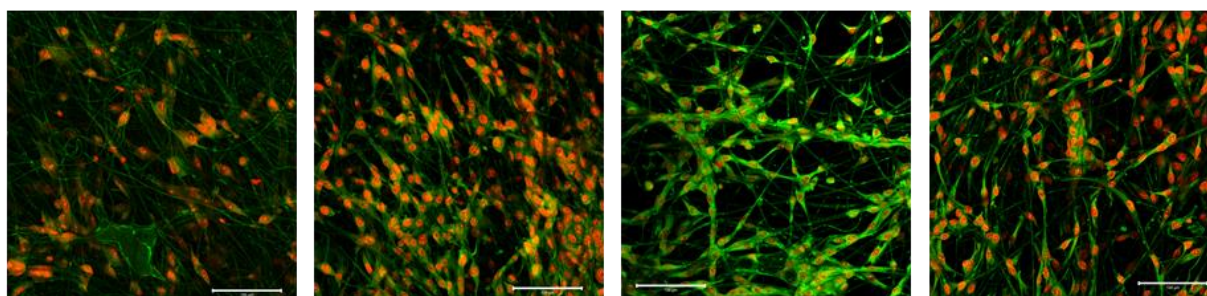
Z důvodu uvažované aplikace do tkáňového inženýrství byla otestována mechanická odezva v tahu za sucha i v prostředí vody. PHB s přídavkem P3,4HB i změkčovadla se chovají v obou prostředích v podstatě srovnatelně.

Pro obě aplikace kryty ran i 3D substráty pro buňky je důležitá interakce povrchu s vodou. Kryty ran mohou využít hydrofilní i hydrofobní povahu materiálu. Vhodným vrstvením těchto rozdílných textilií lze řídit difuzi exsudátu, propustnost pro plyny a vodní páru, sorpci a sorpční kapacitu exsudátu apod. Při aplikaci textilie do živného roztoku v testovacích jamkách (wellplate) je třeba spíše hydrofilního charakteru povrchu. Byla proto u připravených materiálů testována i volná povrchová energie a interakce s vodou. Kontaktní úhel vody na těchto materiálech se pohyboval kolem 110° což je obecně považováno za nesmáčivý materiál. Díky této povaze nebyl materiál ani nijak savý.

Dosáhnout lepší smáčivosti těchto materiálů lze obecně několika způsoby. Chemická či plazmochemická modifikace povrchu oxidací i chemická modifikace roubováním vhodných molekul/skupin na povrch tenkých vláken je pro biomateriály bez funkčních skupin zpravidla spojena s procesem degradace. Proto byl hledán méně drastický způsob. Jednou z cest je enzymatická úprava

povrchu, kdy působením enzymu dojde k modifikaci povrchu vlákna enzymatickým štěpením molekul na povrchu nebo navázáním enzymu na upravovaný povrch. Proto byla otestována interakce lipázy s referenčními PHB vlákna a to ve dvou koncentracích lipázy ve vodném roztoku, který na PHB vlákna působil 24 hod. Výsledný kontaktní úhel po vyprání v destilované vodě a vysušení dosahoval cca 25°, což bylo provázeno také naměřenou změnou nasákavosti upravených textilií. XPS analýza povrchu ukázala přítomnost cca 3,5 at. % uhlíku, který zřejmě pocházel z lipázy navázané na povrch textilie.

Z planárních vzorků zamýšlených pro kryty ran i z textilií ve formě vaty pro využití jako 3D nosiče buněk byly výsekem připraveny kruhové vzorky průměru 6 mm do 96 jamkových wellplate. Výška objemovaného vzorku tvořící tvar čočky byla cca 2 mm. Série takto připravených vzorků byla podrobena testům hodnocení cytotoxicity na myších 3T3 fibroblastech. Hodnocena byla metabolická aktivita, proliferace buněk a penetrace buněk do 3D substrátů.



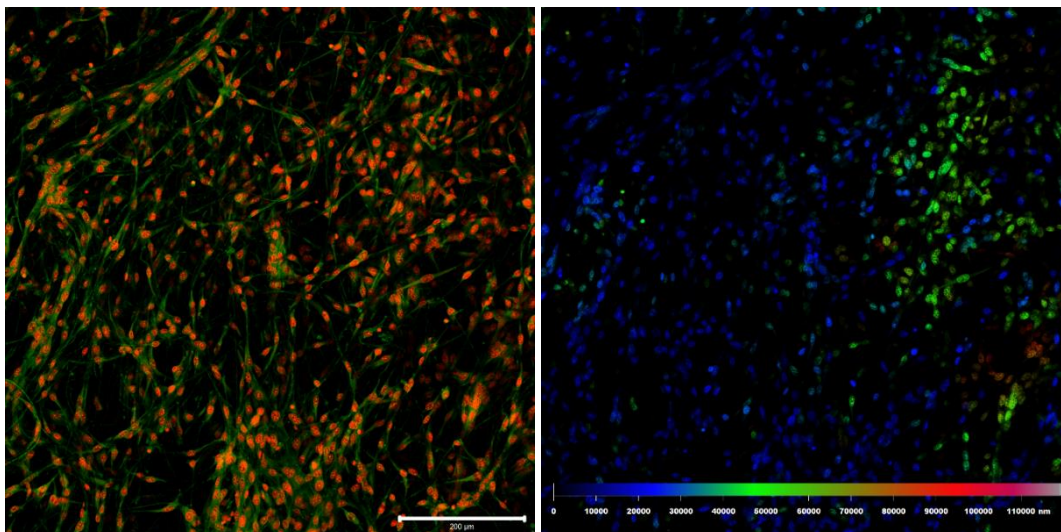
Obr. 41: Příklad buněčné distribuce ve vlákenných laboratorně připravených nosičích z PHB + 15 % P3,4HB v 1., 7., 14. a 12. den. Buněčná jádra byla obarvena propidium jodidem (červeně), intracelulární membrány pomocí DiOC6(3) (zeleně), měřítko 100 μ m.

Výsledky tří setů vzorků různého složení prokázaly, že všechny PHB vlákenné nosiče i s výše uvedenými zvolenými aditivami nevykazovaly toxicitu vůči 3T3 buňkám a ochotně adherovaly na vlákna (Obr. 41). Dle metabolické aktivity měřené pomocí MTS testu dosáhly buňky na laboratorně připravených nosičích s přidavkem P3,4HB po fázi rychlého růstu po 14 dnech konfluence. Vysokých hodnot metabolické aktivity pak dosahovaly planární vzorky z průmyslové linky a vlákna upravená lipázou.

Buněčná proliferace na vlákenných nosičích byla měřena pomocí kvantifikace buněčné DNA. Rychlost nárůstu počtu buněk se zvětšovala s přidavkem P3,4HB, což také korelovalo s rostoucím množstvím kapiček a defektů vláken. Jak bylo pozorováno z mikroskopických snímků, buňkám se daří právě na těchto místech adherovat. Stejný výsledek (množství defektů a na nich buňky) byl pozorován u vláken z čistého PHB.

Proliferace buněk a jejich penetrace do hloubky porézní vlákenné struktury byly pozorovány pomocí konfokálního mikroskopu ve čtyřech časových intervalech. Z obrázků z kanálu propidium jodidu (buněčná jádra), byly následně připraveny hloubkové projekce (příklad na Obr. 42). Pro tento účel je softwarově určité hloubce z nosiče přiřazena barva na barevné škále. Je tak zobrazeno, do jaké hloubky nosiče buňky penetrovaly. Je však nutné brát v úvahu, zda jde o skutečnou penetraci buněk, kdy v jedné oblasti je možné vidět buňky z různých vrstev, nebo zda jde o lokální nerovnost vzorku. Metoda má tedy svá omezení a je jen orientační. Z výsledků lze vyčíst, že v poréznějších laboratorně připravených strukturách byly nalezeny buňky i v hloubce 130 μ m, zatímco v planárních vlákenných nosičích z průmyslové linky pouze v cca 50 μ m. Vzhledem k tomu, že byly v těchto hloubkách nalezeny buňky již v prvním intervalu odběru, je pravděpodobné, že tyto buňky „propadly“ do této hloubky již při osazení a dále se v těchto vrstvách rozmnožovaly. Nejde tedy o penetraci buněk

z vrstvy do vrstvy. Fibroblasty mají tendenci růst po vlákne, které je však v těchto substrátech preferenčně orientováno v planární rovině s minimem vláken v rovině kolmé. Z tohoto důvodu byl zahájen test konceptu přípravy kruhových nosičů s preferenční orientací vláken v kolmém směru, který bude poskytovat zcela odlišnou možnost proliferace buněk skrze nosič.



Obr. 42: Zobrazení buněk na nosiči s 15 % P3,4HB 21. den (měřítko 200 μm) a jejich hloubková barevná projekce (barevná škála odpovídá 0–110 μm)

V rámci projektu Techbikom (PR 12) pod vedením doc. Ing. Lucy Vojtové, Ph.D. byly vyvíjeny textilie s přidavkem extraktů s antimikrobiálním účinkem. Extrakty byly připraveny zahraničním partnerem projektu z kůry odpadního smrkového dřeva a následně přidávány do zvláknovacího roztoku. Po optimalizaci viskozity a procesních podmínek byla úspěšně připravena netkaná textilie, která byla podrobena charakterizaci antimikrobiálního účinku, který se úspěšně prokázal jak proti gramnegativním tak grampozitivním mikroorganismům. Tyto vzorky byly také podrobeny měření cytotoxicity a biokompatibility na 3T3 fibroblastech a byly zhodnocené jako biokompatibilní. To otevírá další možnosti pro budoucí témata výzkumu směrem k medicínským aplikacím.

6.5 Přínos

Práce v této oblasti ukázaly, že PHB lze zpracovat bez tepelného namáhání roztokově do formy vláknenné netkané textilie a její vlastnosti lze řídit přidavkem aditiv podobně jako v případě zpracování v tavenině. Přidavek změkčovadla adipátového typu i kopolymeru P3,4HB umožnil změnit odezvu textilie na mechanické namáhání v tahu. Podařilo se zvýšit deformovatelnost textilie bez jejího porušení, což usnadnilo manipulovatelnost s touto subtilní membránou například v případě využití v oblasti krytů ran. V obou testovaných případech byly výsledné materiály biokompatibilní s použitými 3T3 fibroblasty. Využitá technologie odstředivého zvláknění je přenositelná do průmyslového měřítka. Testovaná roll-to-roll technologie produkuje z hlediska porozity odlišnou textilií vhodnou například k výrobě plně biodegradabilních membrán s filtrační účinností vhodnou i pro ochranné osobní prostředky. Byl také laboratorně úspěšně ověřen koncept výroby biokompatibilní membrány s antimikrobiálním účinkem indukovaným přidavkem extraktu fenolických látek získaných z odpadní kůry dřevozpracovatelského průmyslu. Tyto výsledky z doby posledních 2,5 let jsou nyní se zúčastněnými týmy dalších organizací zpracovávány do dvou publikací. Získané poznatky budou nyní uplatněny při konstrukci kompozitních materiálů hydrogel-vláknem pro kryty ran.

7 AGROCHEMICKÉ APLIKACE PHB

PHB je se svými vlastnostmi danými plně přírodním původem velmi zajímavý kandidát na využití v agrochemických aplikacích, a to jako bariérová biologicky rozložitelná vrstva s definovanou propustností pro dusíkaté nutrienty, fungicidy, herbicidy apod.

7.1 Motivace

Zemědělství jako jeden z nejdůležitějších segmentů naší společnosti musí díky populačnímu růstu vyprodukovat více potravin, krmiva pro zvířata, surovin pro rostoucí trh biopaliv a dalších látek z biologických zdrojů, a to v rámci udržitelného hospodářství i v době klimatické krize. Bez použití hnojiv by bylo potřeba čtyřikrát více půdy pro zajištění celosvětové sklizně a obdělávaná plocha by musela zabírat téměř polovinu všech bezledových kontinentů, na rozdíl od 15 % z celkového počtu plochy půdy, potřebné již v r. 2000 [302].

Význam hnojiv pro lidskou populaci je neoddiskutovatelný. Bez Haber-Boschovy syntézy amoniaku (komercializované v r. 1913) a následných syntetických sloučenin dusíku a jejich aplikací bychom nebyli schopni vyprodukovat více než polovinu dnešních světových potravin [302]. V příštích 80 letech je předpokládán prudký nárůst populace o 2-3 miliardy lidí. Bude tudíž kladen ještě větší důraz na produkci plodin, čímž se rapidně zvýší i potřeba hnojiv [303], [304]. Hnojiva poskytují rostlinám základní makroživiny (dusík/fosfor/draslík), kde je hlavně dusík nezbytný a rozhodující pro růst rostlin [305]. Avšak špatná absorpce živin z hnojiv a související ztráty dusíku v půdě, vodě a vzduchu způsobují kaskádu ekologických problémů [306]. Navzdory skutečnosti, že používání dusíkatých hnojiv hraje zásadní roli při uspokojování poptávky po rostlinné produkci, je účinnost využití dusíku, vzhledem k jejich nadměrnému používání, relativně nízká (obecně mezi 25–50 %) a často vede ke ztrátám nadbytečného dusíku z agroekosystému [307]. Mezi environmentální problémy s tím souvisejícími patří migrace dusičnanů do řek, jezer, rybníků a podzemních vod, v důsledku čehož dochází k eutrofizaci a rozšiřování mrtvých zón i ve vodách pobřežních oceánů. Atmosférická depozice čpavku a dusičnanů také ovlivňuje přírodní ekosystémy; dochází k vyšším emisím oxidu dusného (N_2O), který je nyní třetím nejvýznamnějším skleníkovým plynem po CO_2 a CH_4 [302]. Nadměrné používání hnojiv může způsobit okyselení půdy, vyčerpání půdních kationtů a snížení příjmu uhlíku a kontaminaci půdy těžkými kovy. To vše negativně ovlivňuje zdraví zvířat a lidí, životní prostředí, biodiverzitu a klima [308], [309]. Ještě výraznější ztráty dusíku v životním prostředí, ke kterým bude docházet s rostoucí populací, by bylo možné snížit střídmejší konzumací masa, nízko-bílkovinným krmivem zvířat, lepším agronomickým hospodařením, portfoliem zahrnujícím dělené aplikace a vyvážené používání hnojiv, cílené zemědělství, optimalizované střídání plodin a použití hnojivových sloučenin s pomalým uvolňováním [302].

Hnojiva s řízeným a s pomalým uvolňováním (controlled-release fertilizers - CRF a slow-release fertilizers - SRF) poskytují účinnější, ekonomičtější a bezpečnější způsob dodávání živin rostlinám. Jsou schopny udržet živiny v půdě po delší dobu, a ty jsou tak rostlinám k dispozici v požadované koncentraci. Efektivita využití živin (Nitrogen Use Efficiency - NUE) se tedy zlepšuje díky méně častému dávkování a sníženému odstraňování živin z půdy deštěm nebo zavlažováním, což také snižuje rizika pro životní prostředí [305], [310], [311], [312]. Hnojiva s pomalým nebo řízeným

uvolňováním jsou dobrou alternativou ke konvenčním minerálním hnojivům a jejich použití umožňuje snížit dávku hnojiva dokonce až o 20 % nebo 30 % doporučené hodnoty pro dosažení stejného výnosu [313].

Dle Nařízení evropského parlamentu a rady (EU) 2019/1009 [314], odstavce KSM 9, může Hnojivový výrobek EU obsahovat polymery jiné než polymery s živinami pouze v případech, kdy je účelem polymeru:

- a) regulovat pronikání vody do částic živin, a tedy uvolňování živin (v tom případě se polymer obvykle označuje jako „povrchově aktivní látka“),
- b) zvýšit schopnost hnojivového výrobku EU zadržet vodu nebo jeho smáčitelnost, nebo
- c) spojovat materiál ve hnojivovém výrobku EU náležejícím do KfV 4.

Ode dne 16. července 2026 musí tyto polymery uvedené v bodě a) a b) splňovat kritéria biologické rozložitelnosti stanovená akty v přenesené pravomoci uvedenými v čl. 42 odst. 5. Nejsou-li taková kritéria stanovena, nesmějí být v žádném hnojivovém produktu EU uvedeném na trh po daném datu takové polymery obsaženy.

Pokud jde o polymery uvedené v bodě 1 písm. a) a b), za rozumně předvídatelných podmínek použití hnojivového výrobku EU nesmí ani polymer, ani vedlejší produkty vznikající při jeho rozkladu vykazovat žádný celkově nepříznivý účinek na zdraví zvířat či rostlin nebo na životní prostředí. Polymer musí obstát ve zkoušce akutní toxicity pro růst rostlin, zkoušce akutní toxicity pro žížaly a ve zkoušce inhibice nitrifikace půdními mikroorganismy.

Kritériem pro SRF hnojivo je dle normy EN 13266/2009 zpomalené uvolnění živin tak, aby se za 24 hodin ve vodě uvolnilo max. 15 % živin a za 28 dní max 75 %, přičemž nejméně 75 % hmotnostního podílu živin musí být uvolněno v určeném čase uvolnění [315]. Norma popisuje i způsob měření kinetiky uvolnění živin ve vodním prostředí.

V souladu s Evropskou zelenou dohodou (European Green Deal) – část Farm to Fork, nařízení EU o hnojivech (Fertilizing Products Regulation FPR) a akčním plánem oběhového hospodářství (Circular Economy Action Plan) tak čelí výrobci významným výzvám. Budou muset přizpůsobit své současné postupy novým požadavkům FPR, včetně kritérií biologické rozložitelnosti materiálů pro polymerní povlaky hnojiv s řízeným uvolňováním [305], [316]. Farm to Fork pak definuje jako jeden z cílů snížení spotřeby agrochemikálií až o 50 % do r. 2030. Další regulací v této oblasti přináší EU Sustainable Chemistry Strategy. Je proto nezbytný vývoj hnojiv s řízeným uvolňováním založených na ekologicky šetrných a bezpečných netoxických materiálech s biologicky odbouratelnými povlaky. Jedním z mála dostupných alternativ ke stávajícím řešením je využití vlastností polyhydroxyalkanoátů (PHA) – konkrétně PHB.

7.2 Současný stav

Hnojiva s pomalým uvolňováním jsou obvykle popisována jako „sloučeniny s nízkou rozpustností s komplexní/vysokomolekulární chemickou strukturou, které uvolňují živiny prostřednictvím mikrobiálního nebo chemického rozkladu této sloučeniny“ [305], [317]. Hnojiva s řízeným uvolňováním (CRF) lze popsat jako „produkty obsahující zdroje ve vodě rozpustných živin, jejichž uvolňování do půdy je řízeno povlakem naneseným na hnojivo“ [305], [313]. SRF se obvykle dělí na „kondenzační produkty močovinových aldehydů, hnojiva s fyzikální bariérou (potažená nebo zabudovaná do matrice) a super granule. CRF je podmožinou SRF, která spadá do kategorie hnojiv

s fyzickou bariérou“ [305]. Současné komerční CRF s polymerním povlakem jsou často vyrobeny z termoplastického materiálu, jako jsou polyolefiny, polyvinylidenchloridy a kopolymerů, které se nemohou snadno rozkládat v půdě a v průběhu času se v půdě hromadí. Obecně platí, že CRF obsahující syntetické, biologicky neobdouratelné polymery se po uvolnění živin akumulují v půdě (až 50 kg/ha za rok), kde zbytkové polymery zůstávají a způsobují tzv. bílé znečištění [305], [318].

Celý proces uvolňování CRF probíhá ve třech hlavních fázích: pronikání vody (nebo vodní páry) do systému CRF, rozpouštění živin a uvolňování živin systémem CRF. Rychlost a účinnost každého stupně závisí na mnoha faktorech, které ovlivňují celkový profil uvolňování CRF. Tyto faktory lze klasifikovat následovně: faktory závislé na povlaku, faktory závislé na tvaru a velikosti hnojiv a faktory dané půdou a její mikrobiální aktivitou [319].

PHA našly uplatnění v nejrůznějších oblastech díky jejich biokompatibilitě, biodegradabilitě a (u některých semikrystalických typů) nízké propustnosti pro malé molekuly plynů jako H_2O , CO_2 a O_2 , což je velmi podstatná vlastnost pro použití v hnojivech s pomalým uvolňováním. Pro dosažení ještě lepších bariérových vlastností je třeba prostup malých molekul skrze amorfní část povlaku zpomalit prodloužením jejich difúzních cest. To lze podpořit využitím částicových plniv nebo nanoplniv, aditiv, jako jsou nukleační činidla, změkčovadla nebo také mísením s jinými biodegradovatelnými polymery [320].

Metody přípravy systémů SRF na bázi PHA lze dle aktuálně dostupných literárních zdrojů rozdělit na 3 skupiny, které využívají NPK, KNO_3 , NH_4NO_3 nebo močovinu:

- granule nebo fólie z termoplastických kompozitních materiálů na bázi PHA připravených v tavenině, kde je zpravidla přítomno další pomocné organické nebo anorganické plnivo, které pomáhá zpomalit uvolnění živin
- emulzně připravené mikročástice obsahující anorganický nosič s navázanou dusíkatou látkou
- peleta, tableta nebo granule dusíkaté sloučeniny s případným obsahem organického nebo anorganického plniva povlakované tenkou vrstvou PHA

SRF hnojiva na bázi kompozitu připraveného kompaundací PHB a modifikovaného bentonitu a NPK byly testovány v rámci publikace [321]. Účinnost hnojiva byla testována na rostlinách salátu setém v nádobových pokusech, v testu však nebyla zahrnuta pozitivní reference nepovlakovaného hnojiva o stejné dávce. Kinetika uvolňování živin splňovala normou daná kritéria pro SRF, kompozice však obsahovala jen 5 % NPK. To bylo zlepšeno na hodnotu 20 % v návazné práci stejných autorů [322]. Výsledkem bylo hnojivo, ze kterého se však dle autorů uvolní jen 37 % živin. Podobně byly vyvíjeny kompozity na bázi PHB, škrobu, glycerolu a montmorillonitu s obsahem 10 % NPK nebo KNO_3 [323] a v návazné práci stejného týmu s až 50% živin [324]. První práce zahrnuje popis dle Fickova zákona, k charakterizaci využívá konduktometrické měření koncentrace iontů nutrientů. Dle uvedených výsledků je po 60 hodinách uvolněno 100 % KNO_3 a 60 % NPK. Není však jasné, zda je v případě NPK měřen jen dusík nebo i ostatní nutrienty. V případě druhé publikace je měřeno uvolnění jen po dobu 25 hodin, kdy obě varianty s 50 % hnojiva přesáhly hranici dovoleného maxima 15 % vyloužených živin na 40 %.

V tavenině PHB byly společně s nutrienty zapracovány také plniva na bázi celulózy. 50 % KNO_3 v PHB a vlákny z bagasy byly míseny v hnětiči a následně podrobeny testu uvolnění živin. Bagasa zde zpomalovala uvolňování KNO_3 . K charakterizaci byly nasazeny modely Korsmeyer–Peppas, Peppas–Sahlin, Higuchi. Nicméně dle grafů je jasné, že po 200 hod. byly vyplaveny všechny nutrienty [325].

V případě publikace popisující charakterizaci extrudovaných profilů z PHBV, celulózových vláken z olejových palem a KNO_3 je uvedena jen biodegradabilita jako úbytek celkové hmotnosti pelety (dle obrázku průměru 25 mm). Dle autorů se peleta rozloží do 16 týdnů. Kinetika uvolnění dusíku není prezentována [326]. Kompozice PHB, TPS a celulózy s 50 % KNO_3 byla připravena kombinací roztokové a extruzní techniky [327]. Po 24 hodinách testu ve vodě však bylo všechno KNO_3 uvolněno.

18 gramové pelety z PHBHx s vlákny z palmy (v poměru 70/30) a 15 % NPK byly testovány při růstu mladých palem olejných. Kinetika uvolňování byla sledována konduktometricky, ale nebyla přepočtena na procentuální hodnotu výluhu z celkové dávky hnojiva. Výsledky ukázaly, že PHA-CRF podporoval růst rostlin i půdní mikroflóru. Začlenění rostlinných vláken (surových nebo mletých) do PHA-CRF usnadnilo počáteční uvolňování některých hnojiv z PHA-CRF pravděpodobně kvůli absorpci vody. Další uvolňování hnojiv z PHA-CRF bylo podpořeno degradací PHA půdními mikroorganismy, což následně vedlo ke zvýšení prospěšných mikrobů v rhizosféře a ke zvýšení růstu rostlin [328].

V publikacích [329] a [330] je prezentována formulace močoviny postupně uvolňovaného z matrice PHB vyplněné přírodním nanočásticovým montmorilonitem. Mikrokapsule byly připraveny roztokovou metodou z chloroformového roztoku PHB a pomocných látek (PVAc, škrob). Je uvedeno, že dle normy měřená biodegradace připravených mikrokapsulí probíhá téměř lineárně po dobu 120 dní, nicméně zde chybí informace o uvolnění močoviny. Příprava probíhala pouze na laboratorní úrovni, navíc s malým obsahem močoviny (max. 20 %) v poměru k celkové formulaci.

Skupina prof. Volové na Sibiřské federální univerzitě v Krasnojarsku vyvinula a v laboratorních podmínkách testovala formulace pesticidů a hnojiv s prodlouženým účinkem založené na PHB. Testovanými formami byly filmy, granule nebo pelety PHB a pelety pak doplněné o výplň z přírodních materiálů (rašelina, dřevo, jíl), nesoucí agrochemikálie. Výzkumné práce shrnují informace o interakci PHB a použitých chemikálií, závislosti účinnosti na tvaru nosiče, strukturní, fyzikální a mechanické vlastnosti vyvinutých formulací, data o kinetice uvolňování chemikálií z matrice do půdy v laboratorních podmínkách a zhodnocení efektivity systému s postupným uvolňováním oproti komerčním formulacím. Dále se skupina věnovala hodnocení biodegradability a vlivu na složení půdních mikroorganismů. Na základě vstupních parametrů byly pro experimenty vybrány herbicid metribuzin, fungicid tebuconazol a hnojiva močovina a dusičnan amonný. Použití výplňového materiálu (rašelina, dřevo, jíl) umožnilo zpravidla urychlení biodegradace nosné matrice a zlevnění formulace, zatímco obalení (coating) pelet vrstvou polymeru degradaci jádra pelety zpomaluje. Použitím různých poměrů vstupních surovin, velikostí a tvaru pelet lze nastavit kinetiku uvolňování hnojiva. Vliv má samozřejmě také rozpustnost a další fyzikální vlastnosti použitého pesticidu nebo hnojiva. Jednotlivé formulace byly testované v laboratoři v půdních mikroekosystémech a jsou připravené jako prototypy pro další testování v reálných podmínkách [331], [332], [333]. Využití PHB pro uvolňování herbicidů a fungicidů je vedle CRF jedním z velmi zajímavých směrů s velkým potenciálem a je v plánu tento směr rozvíjet, nicméně zde nyní nebude dále komentován.

Povlakovaná hnojiva na bázi směsi PHBHx, PCL a dusičnanu amonného a technologie jejich laboratorní přípravy prezentoval tým z Japonska [334]. Kuličky ledku obalené ručně pásky z fólie připravené z roztoku chloroformu byly následně v lisu zahřáty tak, aby došlo k zatavení fólie do celistvého obalu. Připravené SRF bylo testováno ve vodním prostředí a v půdě. Výsledky ukazují, že povlak z čistého PHBHx má velmi malou propustnost pro vodu a tím i pro dusíkaté ionty. Příklad PCL urychluje uvolňování nutrientů, poměr PHBHx/PCL 80/20 vyhovuje požadavkům na SRF. Po

14 týdnech ve vodě se uvolnilo cca 40 % NO_3^- . Autoři jsou si vědomi poněkud komplikovaného upscale této technologie. Přesto, že použili chloroform při laboratorní přípravě fólií, odkazují na možnost výroby fólií z PHB vyfukováním nebo technologií chill-roll. Uvádějí, že organická rozpouštědla jsou drahá a jejich uvolňování během kroku sušení může mít negativní dopady na životní prostředí. Potahování ve vodě rozpustnými polymery mělo potenciál zmírnit problémy s náklady a znečištěním, ale uvolňování živin je zpravidla příliš rychlé, aby splnilo kritéria SRF.

7.3 Cíle

Cílem výzkumu v této oblasti bylo využít vlastnosti přírodního biodegradabilního polymeru PHB ke konstrukci hnojiv s pomalým uvolňováním. V době sestavování projektu byla známá a předpokládaná následující fakta:

- PHB bude v technologii Hydal dostupné za cenu cca 4 €/kg
- PHB bude v technologii Hydal extrahováno chloroformem, ve výrobní technologii tak bude k dispozici 5% roztok PHB v chloroformu, který lze na výrobu hnojiva případně využít.
- Močovina je výborným dusíkatým hnojivem, její použití bez inhibitoru ureázy nebude možné, pokud nebude povolna uvolňována SRF hnojivem.
- Ledek amonný je výborným zdrojem dusíku pro rostliny, jeho zpracování je však problematické z pohledu bezpečnostních rizik
- Z procesu výroby po extrakci PHB vystupuje odpadní biomasa ve formě prášku a obsahuje fosfor a dusík
- Fosfor z biomasy lze vysrážet do formy struvitu, který je možné použít taktéž k hnojení.

7.4 Dosažené výsledky

Na základě výše uvedených faktů a informací z literární rešerše byly stanoveny koncepty možného řešení. Strategii bylo vytvořit jádro z rozpustného hnojiva a to opatřit povlakem na bázi PHB s řízenou tloušťkou, která bude definovat rychlost difuze. Povlak by měl navíc díky mikrobiální aktivitě degradovat a skrze póry jeho narušené struktury by se mělo postupně uvolňovat hnojivo. Základem proto byly nejdříve lisované pelety dusíkatého hnojiva opatřené přísadkou PHB prášku a případně dalších přísad jako je struvit a biomasa. Tyto pelety byly následně roztokovou metodou opatřeny povlakem na bázi PHB.

V průběhu řešení projektu došlo k několika zásadním změnám. Technologie Hydal začala využívat bezchloroformovou izolaci, chloroform spolu s mnoha VOC (volatile organic compounds) byly považovány z hlediska ekologie za nepřijatelné v procesu izolace a podobně i v procesu výroby hnojiv. To vedlo výzkumný tým k přehodnocení způsobu roztokové přípravy povlaků, podařila se najít alternativa vhodného rozpouštědla k tomuto účelu alespoň ve smyslu snížení zdravotních rizik. Chloroform byl nahrazen „zeleným rozpouštědlem“ dioxolanem, který je netoxický, nekarcinogenní a šetrnější k životnímu prostředí [335].

Přestože je PHB považováno obecně za biodegradabilní a legislativa jej uvádí jako jeden z referenčních biodegradabilních polymerů, je třeba monitorovat reálné chování těchto materiálů v půdě za běžných podmínek a popsat jeho vliv na chování půdních mikroorganismů. K tomu jsou třeba citlivé analytické metody, které by měly umět poskytnout hodnoty koncentrace měřeného polymeru v půdě s dostatečnou přesností a citlivostí. Vzhledem k termické nestabilitě PHB a jeho

degradačním reakcím na kyselinu krotonovou není možné spoléhat se pouze na detekci 3HB kyseliny nebo jejich esterů. Situaci také komplikuje fakt, že PHB je nativně obsaženo v půdních bakteriích. Problematika je popsána v review o těchto metodách v **Pub 17**.

Pelety vyvíjeného hnojivového systému byly z velké části připravovány precizně na laboratorním ručním lisu a manuálně povlakovány (tzv. dip coating). Pro ověření možnosti zavedení do výroby byl koncept pelet o vybraném složení otestován v technologii průmyslové peletizace. Následně na těchto průmyslově připravených peletách bylo provedeno povlakování v průmyslu dostupnou technologií dražování v dražovacím bubnu.

Složení směsí pro přípravu pelet bylo navrženo na základě zkušeností popsanych v literatuře. Navíc, jak bylo při vývoji zjištěno, PHB v peletách neplní roli jen jako zpomalovač rychlosti uvolňování, ale z hlediska technologie povlakování jako modifikátor povrchu pelety a adhezni můstek k povlaku. Močovina i ledek jsou materiály velmi polární a z důvodu jejich rozdílné povrchové energie oproti PHB v chloroformovém roztoku nebylo možné čisté hnojivové pelety (100 % hnojiva v peletách) roztokem PHB v chloroformu v dražovacím bubnu povlakovat. Takto vytvořený povlak totiž ulpíval přednostně na stěnách dražovacího bubnu a díky nedostatečné adhezi byl velmi defektní. V případě mísení PHB do matrice hnojiva bylo tímto možno dosáhnout dostatečné adheze povlaku k peletě.

Preciznější optimalizace procesu s použitím roztoku na bázi dioxolanu, který měl i vhodnější viskozitu k povlakování než v případě chloroformu (v rámci projektu **PR 5**) a pozdější optimalizace rychlosti dávkování roztoku do dražovacího bubnu v rámci bakalářské práce **VSKP11** ukázala, že je možné realizovat povlak i na pelety čisté močoviny bez adhezniho můstku. Variace obsahu PHB v peletě však prokázala, že malé množství PHB v peletě zlepšuje kvalitu povlaku z pohledu kinetiky uvolňování hnojiva ve vodném i půdním prostředí. Práce také ukázala důležitou roli čistoty rozpouštědla dioxolanu. V případě využití levnějšího dioxolanu o 90% čistotě oproti 99% standartně používanému, docházelo k formování velmi nedokonalého a defektního povlaku.

Tab 8: Složení laboratorně připravených pelet na hydraulickém lisu

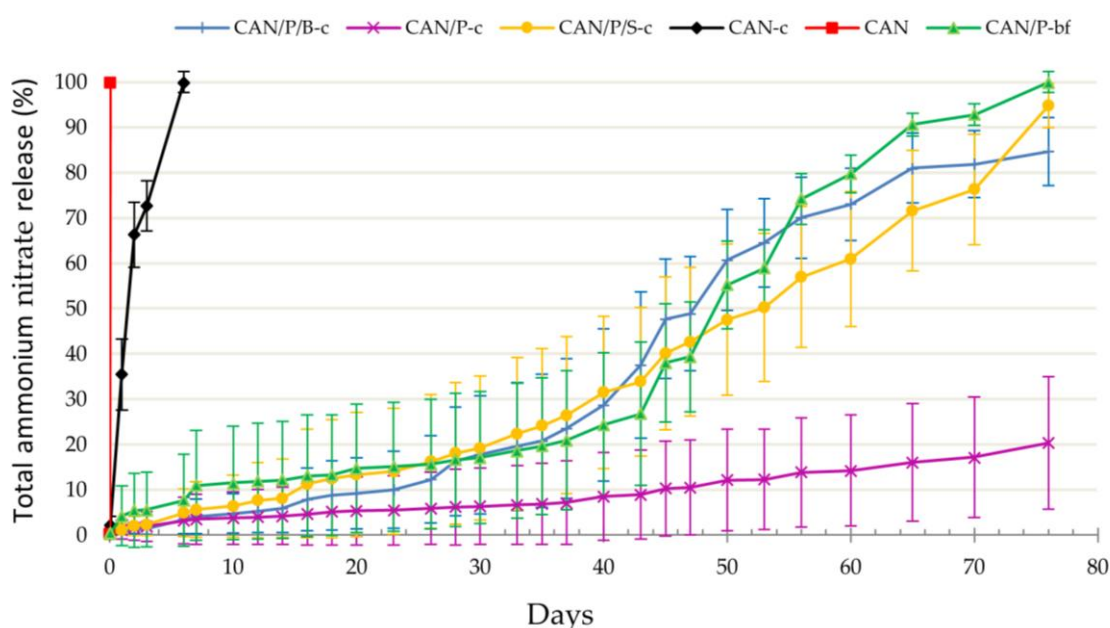
Composition of 6-Fold Manually Coated Fertilizer Pellets	
CAN/P/B-C	50% CAN + 50% biomass + coating P3HB in dioxolane
CAN/P-C	50% CAN + 50% P3HB + coating P3HB in dioxolane
CAN/P/S-C	50% CAN + 25% P3HB + 25% struvite + coating P3HB in dioxolane
CAN-c	100% CAN + coating P3HB in dioxolane
CAN	100% CAN (positive reference)
CAN/P-bf	50% CAN + 50% P3HB + biodegradable polymeric film (encapsulation)

Vlastnosti vybraných povlakovaných pelet byly charakterizovány ve vodném prostředí destilované vody a v rámci spolupráce s MENDELU byla účinnost hnojiv sledována ve vegetačních nádobových experimentech a následně i v rámci testu na polních parcelách. Výsledky z první části experimentu a řešení projektu **PR 5** byly publikovány v **Pub 18**. Zde byl využit dusičnan amonný (AN) v komerční kompozici (Calcium Amonium Nitrate – CAN), který obsahuje 27 % dusíku a 21 % dolomitu. Pomleté práškové hnojivo bylo homogenizováno s práškovým PHB, či struvitem nebo sušenou biomasou z výroby PHB (Nafigate). Sušená biomasa obsahovala cca. 60 % PHB. Práškové materiály hnojiva a aditiv byly poté manuálně stlačeny pomocí hydraulického lisu do formy tablety o hmotnosti 0,5 g, výšce 4 mm a průměru 10 mm. Tabulka 8 ukazuje sérii připravených pelet.

Testy povlakování dip-coatingem byly provedeny v roztoku PHB v chloroformu (7%) a v dioxolanu (6%). Vrstvy z roztoku v dioxolanu byly uniformní a roztok byl dostatečně filmtvorný.

7.4.1 Testy ve vodním prostředí

Vyrobené pelety byly podrobeny testu uvolňování dusíkatých iontů ve vodním prostředí. Toto poskytuje obraz o kvalitě povlaku a jeho stabilitě ve vodě. Rychlost prostupu dusíkatého hnojiva ideální nedefektní membránou na bázi PHB je velmi malá a řízená difúzí touto membránou. Přestup hnojiva do vodního prostředí skrze tento povlak je proto zpravidla řízen zejména přítomností defektů nebo rychlostí jejich vzniku. Příkladem typického vzniku nových defektů je difuze vody do pelety, její bobtnání a díky mechanickému napětí v povlaku pak vznik pórů a trhlin. V tomto testu při použití destilované vody se neuvažuje biologická degradace povlaku. Pro stanovení úbytku ledku z pelety byla využita vážková a konduktometrická metoda.



Obr. 43: Úbytek dusičnanu amonného z připravených pelet ve vodním prostředí.

Jak lze vidět z Obr. 43, v případě potahovaných pelet obsahujících 100% CAN bylo naměřeno velmi rychlé uvolňování. Polovina AN se z těchto pelet uvolnilo přibližně po 1,5 dnech a vše během 6 dnů. Přílnavost povlaku pravděpodobně nebyla dostatečná a vrstva byla defektní. Uvolňování dusičnanu amonného z potahovaných pelet obsahujících struvit, biomasu a pelety potažené fólií na bázi PHB vykazovalo podobný sigmoidní průběh uvolňování hnojiva. Polovina dusičnanu amonného byla uvolněna z pelet obsahujících struvit 53. den, u pelet obsahujících biomasu přibližně 48. den a u pelet s fólií přibližně 49. den. Na konci měření (76. den) se z fólií potažených pelet uvolnil všechen dusičnan amonný, z pelet obsahujících struvit 95 % AN a z pelet obsahující biomasu 85 % AN. Významně nejméně AN se uvolnilo z potahovaných pelet obsahujících 50 % CAN a 50 % PHB - pouze 20 %, což byl skvělý výsledek. Křivka uvolňování dusíku z amonného hnojiva má v tomto intervalu téměř lineární průběh, což svědčí o velmi kvalitně provedeném povlaku srovnatelným s povlakem ze syntetických polymerů [305]. Tento zřejmě bezdefektní povlak mohl vzniknout díky zlepšené adhezi povlaku PHB (rozpuštěného v dioxolanu) k peletám tohoto složení, obsahující PHB i v peletě. Výsledky těchto testů tak ukazují, že tyto pelety mají potenciál pro postupné uvolňování dusíku i v půdním prostředí.

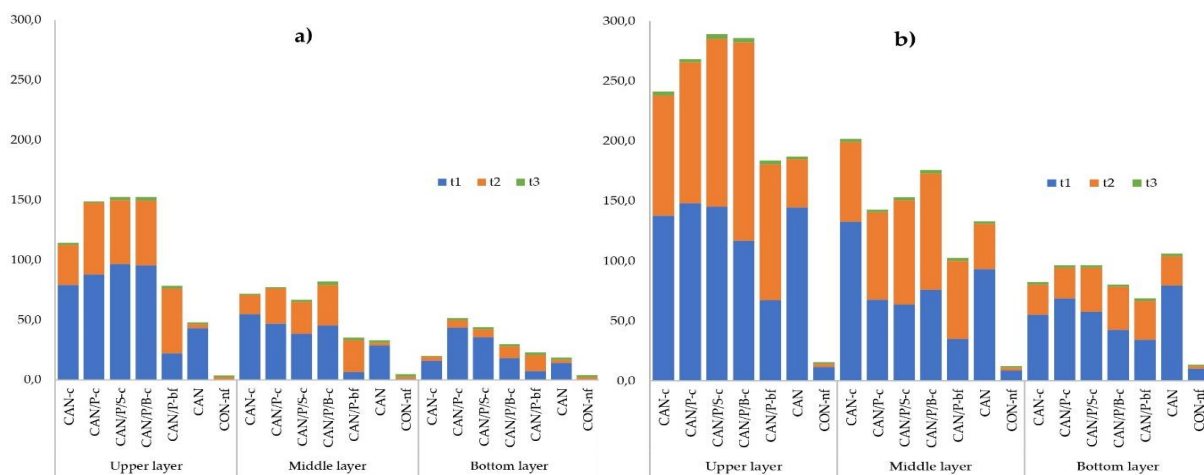
Boyandin a kol. [333] zkoumali uvolňování dusičnanu amonného ve vodném prostředí v peletách s šestinásobným povlakem PHB v chloroformu. Jejich pelety obsahovaly pouze 25 % dusičnanu amonného a zbytek tvořil PHB nebo jiné přísady (dřevěná moučka). Testování ve vodě v této studii trvalo pouze sedm dní. Z obalovaných pelet obsahujících dusičnan amonný a PHB se po sedmi dnech uvolnilo ($18,3 \pm 7,9$) % hnojiva a z obalovaných pelet obsahujících rovněž dřevnou moučku se uvolnilo ($13,4 \pm 7,9$) % hnojiva. Naše obalované pelety obsahující hnojivo s 50 % PHB nebo struvitu nebo biomasy měly po sedmi dnech pouze 3,5-5,7 % uvolněného dusičnanu amonného. Pelety ve fóliích uvolnily 11,5 % dusičnanu amonného.

7.4.2 Vegetační nádobové testy

Reálné chování hnojiva se zpomaleným uvolňováním lze nasimulovat v laboratorních podmínkách bez přirozené půdy jen velmi těžko. Do procesu uvolňování hnojiva z testovaných pelet nezasahují v reálných podmínkách jen fyzikální parametry (teplota, vlhkost a jejich průběh v čase, pH), ale zejména biologické procesy v půdním okolí pelety, které jsou navíc samy na těchto fyzikálních veličinách závislé. Pro úplnost je třeba zmínit i dopad mechanické manipulace s peletami při procesu výroby, skladu, aplikace apod. Vegetační nádobové a zejména polní testy jsou tedy klíčové pro pozorování reálného efektu navržených hnojiv. I ty polní však budou ovlivněny skutečnými sezónními podmínkami v dané lokalitě (parametry půdy a aktuálního počasí). Proto byly na Mendelově univerzitě v Brně provedeny nádobové testy ve vegetační hale s kontrolovanou teplotou a zálivkou. Cílem nádobového vegetačního pokusu bylo ověření účinku aplikace coatovaných hnojiv na vývoj a růst kukuřice SY Orpheus (Oseva, a.s., Bzenec, ČR) a na dynamiku uvolnění dusíku v půdě. Pokus probíhal v Mitscherlichových vegetačních nádobách (na 6,5 kg půdy). Během vegetace byly prováděny tyto půdní analýzy a analýzy rostlin ve třech termínech:

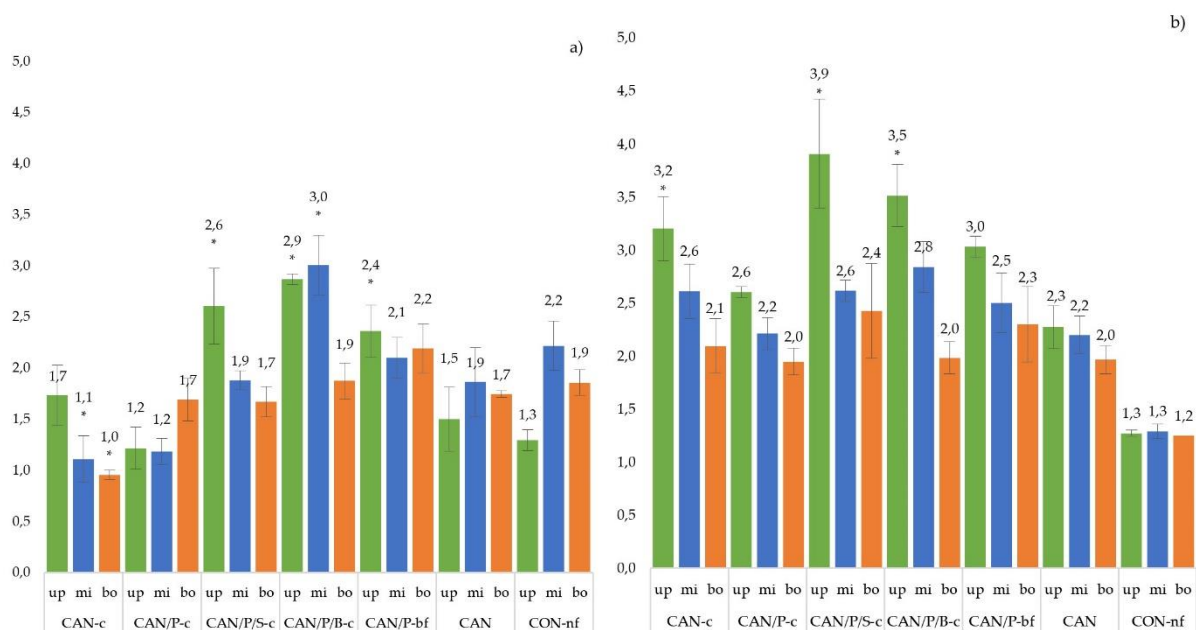
- odběr půdy ze 3 hloubek půdního profilu (v každém termínu vždy ze 4 nádob). Stanovení obsahu N_{\min} (amonného (NH_4^+) a nitrátového dusíku (NO_3^-) v půdě – ve všech termínech
- hmotnost sušiny nadzemní části rostlin – ve všech termínech
- obsah N v nadzemní hmotě rostlin – ve všech termínech
- další analýzy jako stanovení chlorofylu v listu, vegetačního indexu, kořenové kapacity – na konci experimentu

Rozebory půdy a rostlin byly zhodnoceny statistickými metodami (program STATISTICA 12) metodou analýzy variance s následným testováním dle Tukeye, při 95 % hladině významnosti ($P \leq 0,05$). Statisticky průkazné rozdíly u sledovaných veličin (v grafech označeny *) jsou vztaženy vždy k necoatovaným produktům stejného typu hnojiva. Výsledky pokusů v nádobách prokázaly, že testovaná potahovaná hnojiva CAN je možno použít ke zlepšení účinnosti využití živin (nutrient use efficiency), snížení ztrát dusíku a minimalizaci znečištění životního prostředí díky postupnému dodávání dusíku rostlinám během vegetace. Uvolňování dusíku z obalovaných CAN hnojiv ovlivnilo dynamické změny obsahu minerálního dusíku v půdě během vegetace kukuřice. Obsahy N_{\min} a jeho iontových forem (NO_3^- , NH_4^+) byly v půdě stanoveny ve třech termínech (t_1 – t_3). Dynamika uvolňování sledovaných forem minerálního dusíku z hnojiv je uvedena na Obr. 44. Je zřejmé, že coatovaná hnojiva mají tendenci zadržovat dusík v půdě (v půdním profilu), přispívají k eliminaci jeho ztrát vyplavováním a tím zvyšují účinnost hnojení.



Obr. 44: Dynamika uvolňování a) amonné a b) dusičnanové formy dusíku (mg/kg půdy) testovaných variant s negativní referencí bez hnojiva CON-nf

V půdních rozbořech provedených v 9. týdnu po zasetí je evidentní, že rostliny vyčerpaly minerální dusík z půdy. Svědčí o tom velmi nízké obsahy amonných a dusičnanových forem dusíku ve všech půdních vrstvách (Obr. 45). Avšak i v tomto termínu u obou forem dusíku existují zjevné rozdíly mezi použitými variantami hnojiv. Významně nejvyšší zásoby NH_4^+ a NO_3^- byly zjištěny u variant hnojených coatovanými hnojivy (zejména CAN/P/S-c, CAN/P/B-c) a zapouzdřeným hnojivem CAN/P-B-f.



Obr. 45: Obsah a) amonné a b) dusičnanové formy dusíku na konci testu v jednotlivých hloubkových profilech půdy.

Ačkoli dostatek dostupného dusíku může být nezbytný pro přímou spotřebu rostlin, nadměrný obsah může zvýšit jeho ztráty v půdě. Jedním z důležitých aspektů obalovaných hnojiv je proto uvolňování živin optimální rychlostí vhodnou pro příjem rostlinami. Aplikace těchto potahovaných hnojiv CAN prokázala pozitivní vliv na průběh uvolňování N_{min} (NO_3^- , NH_4^+) a pozitivní dopad na další měřené parametry podrobně prezentované v Pub 18 se svými grafickými přílohami.

7.4.3 Čtvrtprovozní příprava povlakovaných hnojiv

V rámci projektu PR 5 byla také testována technologie strojní výroby povlakovaných pelet. Pomocí peletizačního stroje bylo na Výzkumném ústavě chemické technologie (VÚCHT) připraveno přibližně 22 kg válcovitých peletek obsahujících dusíkaté hnojivo a PHB. Z bezpečnostních důvodů byla pro tento typ pelet vybrána na prášek mletá močovina, neboť ledek amonný není možné bezpečně zpracovávat v přítomnosti dalšího organického uhlíku (plánovaného přídatku PHB). Močovina je nejkoncentrovanějším tuhým dusíkatým hnojivem (46 % dusíku N). Po aplikaci probíhá v půdě rozklad močoviny na amonný a nitrátový dusík. Rozsah použití močoviny jako půdního hnojiva je velmi široký a zahrnuje prakticky všechny plodiny. Může být použita jak před zasetím, tak i v průběhu vegetace. Účinnost použití močoviny jako zdroje dusíku na velmi kyselých, silně alkalických půdách nebo těsně po vápnění může být výrazně nižší než u srovnatelných oblastí s pH neutrálními půdami. Močovina je vhodná pro hnojení polních plodin náročných na dusík (kukuřice, okopaniny, řepka).

Pelety byly v prvních verzích vyrobeny peletizací zhomogenizované práškové směsi močoviny a PHB v poměru 1:1. 7% roztok PHB v dioxolanu pro coating byl připravován pod zpětným chladičem a později pak v autoklávu (95 °C, tlak cca 1,25 bar). Tímto způsobem byl, za stálého míchání 600 ot./min, roztok PHB připraven již za 20–25 minut. Povlakování probíhalo dávkováním roztoku do dražovacího bubnu, kde se promíchávaly připravené pelety. Byly tak úspěšně nanесeny souvislé vrstvy povlaku na peletkách bez viditelných defektů. Byla hledána optimální tloušťka povlaku změnou objemu aplikovaného roztoku. Po optimalizaci bylo na jednu várku hnojivových peletek (900 g) v dražovacím bubnu aplikováno cca. 2000 ml 7,4–7,9% roztoku PHB v 1,3-dioxolanu. Tyto pelety byly dále testovány ve vodním a půdním prostředí formou polních testů na parcelách.

7.4.4 Polní testy

Polní testy probíhaly na Školním zemědělském podniku Mendelovy univerzity u obce Žabčice, 25 km jižně od Brna. Tato oblast se nachází v nadmořské výšce 179 m, v jihomoravské suché oblasti s typickým vnitrozemským klimatem a jedná se o jednu z nejteplejších oblastí v České republice. Před aplikací hnojiv a zasetím kukuřice byla provedena klimatická a půdní charakteristika, ze které se vycházelo při vyhodnocování experimentu. Půda v předchozích nádobových testech byla stejná jako z této parcely. Pokus byl založen pro čtyři varianty: kontrola – negativní reference (bez hnojiva), pozitivní reference (močovina bez povlaku) a pelety připravené na peletizéru 50:50 (močovina:PHB) povlakované roztokem připravovaným pod zpětným chladičem a v autoklávu. Každá varianta byla založena ve čtyřech opakováních/parcelách o ploše 15 m².

K experimentu byla opět použita zrna kukuřice odrůdy SY Orpheus. Setba kukuřice a aplikace hnojiv byly provedeny 16. 4. 2021 a 27. 5. 2021 byl aplikován herbicid MAISTER POWER od společnosti Bayer S.A.S. (Lyon, Francie), v množství 1,5 l/ha. Dne 21. 10. 2021 proběhla sklizeň. Poté byl zjištěn výnos zrna kukuřice a hmotnost tisíce semen (HTS). Tato data byla vyhodnocena metodou jednofaktorové analýzy variance v programu STATISTICA 12 (s následným testováním dle Fischera, při 95% hladině významnosti). Z hodnot výnosu zrna a hmotnost tisíce semen (HTS) nejsou patrné statisticky významné rozdíly mezi výnosy při aplikaci 100% nepovlakované močoviny a povlakovaných variant hnojiv. Výsledky studia kvality kukuřice, konkrétně obsah N a škrobu a produkce bílkovin a škrobu jsou teprve zpracovávány.

7.4.5 Optimalizace složení

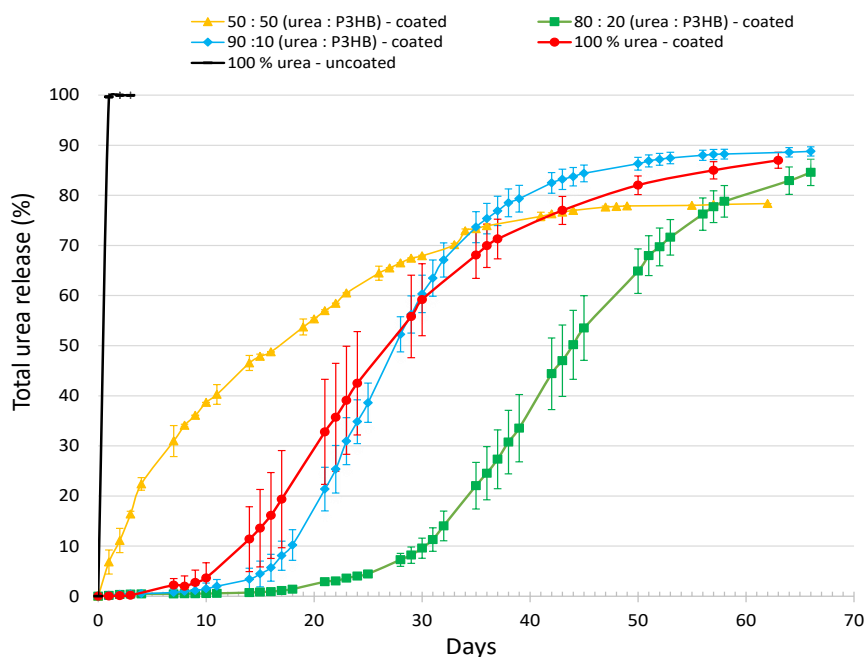
Z těchto prvních polních testů je patrné, že přítomnost poměrně vysokého množství PHB nemá negativní vliv na růst rostlin při tomto způsobu hnojení. Na základě těchto výsledků testů byla provedena optimalizace složení hnojivových formulací se záměrem snížit obsah PHB ve finálním produktu. Po optimalizaci procesních podmínek byla provedena peletizace směsi močoviny:PHB v poměrech 50:50 (kontrolní série pro porovnání s prvními výsledky), 80:20, 90:10 a 100:0. Pelety byly následně povlakovány dle postupu výše v dražovacím bubnu roztokem 7% PHB v dioxolanu připraveného v autoklávu. Plánovaná hmotnost PHB povlaku byla navržena na 20 % hmotnosti povlakované pelety. Stanovení hmotnosti pelet před a po povlakování včetně dvoudenní doby sušení však ukázalo na významnou odchylku od zamýšlené hodnoty. Zejména pelety o poměru močovina:PHB 80:20 a 90:10 vykazovaly 35–40% nárůst hmotnosti, což bylo způsobeno neoptimalizovanou rychlostí a způsobem dávkování roztoku do pelet v rotačním bubnu. Při rychlejším průtoku se nestačil dostatečně dioxolan odpařovat a zůstával částečně absorbovaný do pelety a částečně v povlaku. Sušení při vyšších teplotách nebylo možné, protože způsobovalo popraskání povlaku. Defektní byly povlaky pelet v poměru 50:50, které sice vykazovaly téměř správnou hodnotu přírůstku hmotnosti PHB, ale zřejmě vlivem přítomnosti většího množství dioxolanu nabotnaly, popraskaly a díky tomu se také následně lépe odpařil dioxolan. V podstatě správnou hodnotu přírůstku hmotnosti (18 %) vykazovaly jen pelety z čisté močoviny, které neměly možnost absorbovat dioxolan do pelety. Snížená hmotnost je dána ztrátami ulpíváním PHB na povrchu rotačního bubnu při povlakování.

Tyto pelety byly poté testovány ve vodném prostředí a vegetačních nádobových testech. Výsledky uvolňování močoviny ve vodním prostředí jsou patrné z Obr. 46. Až na sérii 50:50, která, jak bylo zmíněno, měla defektní povlak, nebylo z coatovaných pelet během prvních deseti dní uvolněno téměř žádné hnojivo a křivky vykazují správný esovitý průběh v souladu s teorií popsanou výše.

Délka lag fáze se zvyšuje s množstvím PHB v peletě. I zde se tedy potvrdil předpoklad, že obsah PHB v peletě umožňuje připravit odolnější povlak. Pelety se 100 % močoviny mají až na kratší lag fázi velmi podobný průběh uvolňování, k uvolnění 50 % hnojiva došlo po třech týdnech a 80 % po šesti týdnech. Tyto výsledky jsou velmi pozitivní, jelikož bylo možné připravit funkční povlak i bez PHB v peletě. Bylo to zřejmě způsobeno pomalejší rychlostí dávkování coatovacího roztoku oproti prvním experimentům. V půdním prostředí je však očekáván příspěvek mikrobiální aktivity k tvorbě defektů a tím zrychlení uvolnění živin z pelety. U pelet 80:20 byl průběh uvolňování močoviny první čtyři týdny velmi mírný, bylo uvolněno pouze 7 % hnojiva. Poté začala močovina difundovat do vody rychleji. Po více než šesti týdnech byla uvolněna pouze polovina dávky dusíkatého hnojiva. K uvolnění 80 % došlo až po více než 60 dnech. Tato varianta se díky vysokému zastoupení hnojiva v matici a zároveň jeho značně zpomalenému uvolňování jeví jako neoptimálnější.

Pro srovnání účinnosti tohoto povlaku je možné uvést příklady prezentované v některých publikacích. Např. u pelet 100% močoviny povlakovaných roztokem polystyrenu (PS) došlo k uvolnění 80 % hnojiva po cca 28 dnech, přičemž zastoupení povlaku PS na peletách tvořilo zhruba 10 % [336]. Zde vyvíjená hnojiva s PHB jakožto zcela biodegradabilním přírodním povlakem tedy dosahují ve vodním prostředí dokonce i lepších výsledků, než syntetický nerozložitelný PS. Z ostatních biopolymerů je díky své nízké ceně často studován také škrob, avšak samotný jej nelze použít.

U škrobu, v podobě akrylamidového hydrogelu vyztuženého nanočásticemi přírodního uhlí, bylo dosaženo uvolnění 70 % živin během 21 dní [337].

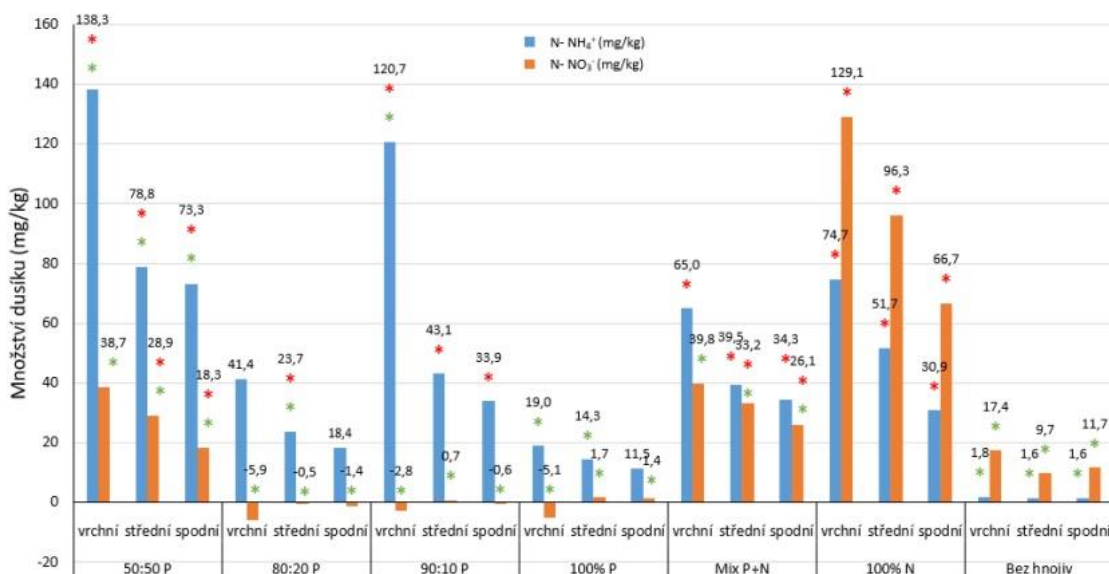


Obr. 46: Průběh uvolňování močoviny ve vodě ze strojně připravených pelet

Při nádobových testech vedených byly pelety sledovány i z pohledu jejich soudržnosti. Po dvou týdnech v půdním prostředí držely povlakované pelety všech variant svůj tvar, ale u části pelet došlo k částečnému porušení povlaku a absorpci vody. Po čtyřech týdnech se defektní pelety 50:50 již rozpadaly, byly nasáklé vodou a drolily se, u některých se již objevila plíseň. Pelety 80:20 a 90:10 držely svůj tvar lépe, nicméně u některých pelet byl povlak také porušen. K narušení povlaku docházelo zejména na koncích pelet. Povlakované pelety se 100 % močoviny byly už zcela vyprázdněné. Po šesti týdnech v půdě se pelety všech variant při vyjímání z půdy rozpadaly.

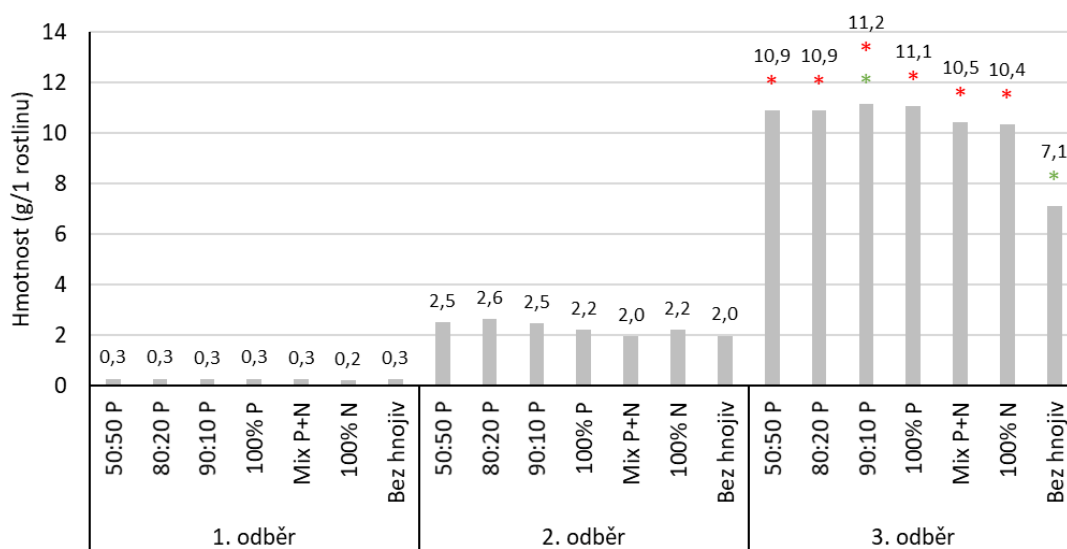
Z výsledků v době sepisování práce byly k dispozici pouze výsledky stanovení NH_4^+ a NO_3^- v půdě z prvního odběru. Hodnoty koncentrací byly vztaženy k negativní referenci (variantě bez hnojiva), jelikož určité množství minerálního dusíku se v půdě nachází i přirozeně. Významná je koncentrace především ve vrchní vrstvě, u které vysoké množství NH_4^+ indikuje riziko volatilizace, a ve spodní vrstvě, ze které je při vysokém obsahu NO_3^- usuzováno, že nedochází ke zpomalenému uvolňování kvůli rychlé nitrifikaci.

Po prvních dvou týdnech se hnojivo dle očekávání nejrychleji uvolnilo u pozitivní reference (100% nepovlakovaná močovina), u které je nejvyšší hodnota obsahu NO_3^- ve všech vrstvách, jelikož došlo k velmi rychlému uvolnění hnojiva a nitrifikaci NH_4^+ (Obr. 47). Je patrný rozdíl oproti ostatním povlakovaným peletám, u kterých byl prokázán zpomalující účinek díky povlaku a zabránění vyplavování NO_3^- iontů do spodních vrstev již v prvním termínu. K rychlému uvolnění močoviny došlo také u povlakovaných pelet 50:50, které mají vysoké hodnoty obsahu NH_4^+ . Díky povlakové vrstvě však nedošlo k tak rychlé nitrifikaci. Uvolnění močoviny ale proběhlo rychleji, než u ostatních povlakovaných variant. I v půdním prostředí tedy bylo potvrzeno, že povlaková vrstva je u této varianty defektní. U varianty (mix 1/3 100% nepovlakovaná močovina + 2/3 80:20 povlakovaná) došlo k rozpuštění nepovlakované močoviny a jsou zde tedy také vyšší hodnoty obsahu NH_4^+ i NO_3^- .



Obr. 47: Obsah amonné a dusičnanové formy dusíku při prvním odběru (* statisticky významný rozdíl od negativní reference; * statisticky významný rozdíl od pozitivní reference; P - povlakované; N - nepovlakované)

U povlakovaných pelet 80:20 bylo uvolňování močoviny pomalejší, což dokazují nižší hodnoty NH₄⁺. Hodnoty NO₃⁻ vyšly záporně, jedná se však pouze o odchylky při odečtu přirozeného dusíku v půdě. Půda hnojená povlakovanými peletami 90:10 vykázala vysoký obsah NH₄⁺ ve vrchní vrstvě, u kterých tedy hrozí volatilizace. Obsah NO₃⁻ ale zaznamenán nebyl. Nízké hodnoty byly naměřeny také u povlakované 100% močoviny, nicméně je předpoklad, že vzhledem k absenci PHB v matrici, a tedy horší adhezi povlaku k peletám, došlo v dalším odběru ke skokovému nárůstu uvolněného množství.



Obr. 48: Vývoj hmotnosti sušiny nadzemní části rostlin pro jednotlivé varianty čtvrtprovozních pelet s různým obsahem močoviny : PHB (* statisticky významný rozdíl od negativní reference; * statisticky významný rozdíl od pozitivní reference; P - povlakované; N - nepovlakované)

V rámci tohoto nádobového testu pak byly týmem na MENDELU opět měřeny další parametry půdy a rostlin, které jsou již k dispozici pro všechny tři termíny odběrů. U vývoje hmotnosti sušiny nadzemní části rostlin (znázorněn na Obr. 48) nebyly po prvním ani po druhém odběru zaznamenány

mezi hmotnostmi statisticky významné rozdíly. Po třetím odběru, tedy po šesti týdnech, již byly patrné rozdíly mezi variantami s povlakovanými a nepovlakovanými hnojivy a u všech hnojených variant byly naměřeny výrazně vyšší hodnoty než u negativní reference (variantě bez hnojiva). U varianty 90:10 byly dokonce naměřeny statisticky významné hodnoty oproti pozitivní referenci (100% nepovlakovaná urea). Podobně byla naměřena statisticky významná odchylka u obsahu chlorofylu u varianty 80:20. Byl tedy pozorován pozitivní vliv povlakovaných hnojiv na růst nadzemních částí rostlin. Výsledky jsou nyní zpracovávány do formy článku.

7.4.6 Syntéza biomateriálů pro povlaky

Jedním ze směrů využití PHB je příprava reaktivních polyesterů. Vhodnou depolymerací například odpadního nebo nekvalitního PHA lze připravit oligomerní PHA. Ty lze pak využít pro biosource vytvrditelné povlaky. I v souvislosti s výzkumem materiálů pro povlakování hnojiv byla tomuto tématu věnována pozornost. Například při alkoholýze katalyzované paratoluensulfonovou kyselinou byly laboratorně připraveny metyl- a etylestery 3HB. Tato reakce byla vedena v mikrovlnném poli, což ji oproti klasické reakci za zvýšené teploty značně urychlilo a umožnilo její průběh za teploty, kdy je konkurenční degradační reakce na krotónový konec ještě násobně pomalejší. Získané alkylestery 3HB byly pak funkcionalizovány akrylovou kyselinou při reakci s anhydridem akrylové kyseliny za katalýzy 2-ethylhexanoátem draselným. Kinetika reakcí a jejich výtěžky byly popsány v **Pub 19**.

7.5 Přínos

Jak dokazují dosavadní vědecké práce, PHB je bezesporu slibným kandidátem pro výrobu hnojiv se zpomaleným uvolňováním z pohledu jeho bariérových vlastností a biodegradability. Z rešerše však vyplývá, že je obtížné dodržet limit maximální rychlosti uvolňování a to zejména, pokud má formulace vyšší obsah hnojiva než 50 %. Formulace založené na v tavenině zpracovaných "kompozitech" autorům publikací uvedených výše v tomto směru selhávaly. Pro tým Laboratoře bioplastů byl motivací úspěch týmu prof. Volové s peletami povlakovanými roztokem PHB v chloroformu, ale jimi dosažená maximální hranice 50% obsahu živin v peletě byla námi stanovena jako akceptovatelné minimum s cílem přiblížit se k 80 %. Legislativní změny také přispěly k náhradě chloroformu a volbě dioxolanu jako rozpouštědla pro povlakovací roztok. Výhodou jsou nižší zdravotní rizika při práci s dioxolanem. Nevýhodou je jeho hořlavost a vysoká cena na evropském trhu. Momentálně je ale možné zakoupit dioxolan na čínském trhu, který je 9krát levnější a cena je téměř na úrovni běžných rozpouštědel, jako např. aceton (cca 3,5 USD/1 kg dioxolanu).

V rámci projektu **PR 5** se podařilo naplnit výše uvedené cíle a prokázat, že lze tyto formulace vyrábět i strojně, byť z pohledu objemu stále v laboratorním měřítku. Vyvinuté formulace byly testovány nejen v nádobových experimentech, ale také v jedné sezóně v maloparcelních testech na kukuřici. Tento (z pohledu statistiky v agronomii stále nevýznamný) test ukázal, že je možné PHB technologicky zpracovat ve formě bariérového obalu do funkčního systému dusíkatého hnojiva, který splňuje základní parametry hnojiva se zpomaleným uvolňováním. Výsledky zaujaly Lovochemii a.s., která projevila zájem o spolupráci v rámci připravovaného a dnes již realizovaného projektu Národního centra kompetence materiálů pro 21. století - dílčího projektu Biopolymery pro agrochemické aplikace. Na základě výsledků publikovaných v článku **Pub 18** byl tým laboratoře Bioplastů osloven při přípravě evropského projektu HORIZON-JU-CBE-2023-IA-02 Production of safe, sustainable, and efficient bio-based fertilisers to improve soil health and quality.

8 ZÁVĚR

Tato práce prezentuje záměry a výsledky autora a jeho týmu v oblasti zpracování biopolymeru PHB do podoby vybraných aplikací. Jak je v textu postupně ukázáno, PHB z nynějšího pohledu a zkušeností bude mít vždy spoustu limitů zejména v případě klasických termoplastových aplikací. Jeho křehnutí spojené s jeho vysokou krystalinitou a fyzikálním stárnutím nad jeho teplotou skelného přechodu 0 °C lze jen velmi těžko potlačit bez zásahu do chemické struktury tohoto polymeru. To umožňuje například proces reaktivní kompaundace s vhodnými síťovacími činidly, chainextendery a dalšími polymery. Při vhodně zvolené stabilizaci a kompatibilizaci těchto často omezeně mísitelných komponent může vzniknout materiál s akceptovatelnými vlastnostmi pro vybrané aplikace. V případě aplikace v medicíně je však tato metoda problematická z pohledu zajištění biokompatibility a cytotoxicity. V ostatních aplikacích vyvstává otázka ceny za takový materiál, jehož mechanické vlastnosti nepřevyšují i levné konvenční plasty, zejména v době, kdy biodegradabilita není (až na několik málo jmenovaných aplikací) ani legislativou pro většinu plastových aplikací uznávána za výhodu a kdy recyklaci těchto materiálů komplikuje pochopitelná nepřipravenost třídících systémů na tyto materiály.

V mnoha zde citovaných publikacích se objevuje šlechetný záměr nahradit alespoň část plastových výrobků materiály z obnovitelných zdrojů za účelem snížení uhlíkové stopy. To je ve světle faktu, že jen 4 % fosilních zdrojů jsou použity k výrobě plastů, cíl s poměrně malým dopadem. Chybí také zpravidla LCA analýza dokládající, že je tento záměr vůbec teoreticky uskutečnitelný.

Laboratoř bioplastů si začala tato fakta před 5 lety uvědomovat. Po pochopení problémů a limitů spojených se zpracováním a vlastnostmi PHB a seznámení se se záměrem legislativy EU se proto orientovala jen na aplikace PHB, u kterých má smysl využít jeho vlastnosti biodegradability a biokompatibility jako přidané hodnoty. Získané dovednosti, znalosti i zkušenosti z výše popsané experimentální práce a vývoje s průmyslovými partnery tak byly dále využity pro vývoj materiálu na bázi PHB pro medicínu a její 3D tištěné aplikace, kosmetiku, agronomii a termoplastové speciality, které vytyčila stávající legislativa jako vhodné pro výrobu z bioplastů.

Jedním ze zásadních výsledků bylo nalezení funkční a poměrně atypické kombinace PHB a amorfního PLDLA. Spolu s vhodným změkčovadlem vybraným na základě poměrně širokého screeningu a hodnocení kinetiky jeho migrace z polymerní směsi byly vyvinuty funkční a zpracovatelné termoplastické směsi s majoritou PHB. Ty byly mimo jiné optimalizovány i pro 3D tisk z taveniny metodou FDM. Technologie výroby kompaundu i struny a vlastnosti při tisku byly ověřeny v průmyslovém výrobním procesu společnosti Fillamentum. I dle aktualizované rešerše to byl první reálně výrobitelný a tisknutelný materiál s majoritou P3HB. Tyto úspěšné směsi byly také základem pro následný vývoj termoplastů a jejich kompozitů pro resorbovatelné náhrady kostní tkáně. Tištěné struktury z těchto materiálů byly sledovány z pohledu mechanických vlastností, kinetiky poklesu hmotnosti a molekulové hmotnosti v prostředí simulované tělní tekutiny, z pohledu biokompatibility a diferenciací mezenchymálních buněk a z pohledu role morfologie povrchu při jejich proliferaci. Výsledky byly využity pro modelový návrh náhrady segmentu femuru stehenní kosti, který byl v několika variantách vyroben 3D tiskem a testován s vizí budoucích *in vivo* experimentů.

PHB bylo testováno i v procesech roztokového zpracování do formy vláken a funkčních bariérových povlaků. Z chloroformového roztoku PHB s vybranými aditivami byly metodou odstředivého zvláknění z roztoku připravovány vláknenné struktury netkaných textilií s řízenými mechanickými vlastnostmi. Bylo zjištěno, že přírůstek P3,4HB nebo adipátového změkčovadla efektivně modifikuje nejen mechanickou odezvu výsledné textilie, ale také stabilizuje vlastnosti a kvalitu vláken a zvyšuje výkon laboratorní i poloproduční linky, která využívá odlišný netoxický rozpouštědlový systém. Všechny varianty netkaných textilií byly biokompatibilní a netoxické pro 3T3 fibroblasty. U vysoce porézní struktury laboratorně připravených vzorků byla konfokálním mikroskopem prokázána požadovaná proliferace buněk do vláknenné struktury. Optimalizace porozity a monitoring buněk v řezu scaffoldu bude předmětem navazující práce.

Vynikajících výsledků bylo také dosaženo aplikací povlaku PHB připraveného z roztoku dioxolanu na dusíkaté hnojivo. Takto vytvořené hnojivo splňovalo kritéria aktuální legislativy na hnojiva se zpomaleným uvolňováním a biodegradabilitu jeho povlaku. Ve srovnání s aktuálně publikovanými výsledky bylo dosaženo velmi pomalého uvolňování s možností jeho řízení na míru pěstované vegetaci v poměrně širokém rozsahu. Koncept byl ověřen na technologiích existujících v průmyslu. Výsledný produkt byl úspěšně testován ve vegetačních nádobových experimentech i na maloparcelních testech.

Výsledky tak dokazují, že PHB má i přes jeho některé negativní vlastnosti obrovský potenciál v aplikacích, které mohou přispět ke snížení zátěže způsobené lidskou činností. Vzhledem ke stále se rozvíjejícím způsobům výroby různých PHA biopolymerů, a s tím spojenou problematikou kvality produktu a jejich stability, bude stále třeba hledat způsoby efektivního zpracování těchto zajímavých materiálů. Nutností pak bude začlenění těchto materiálů do procesů a principů cirkulární ekonomiky tak, aby benefity jeho využití převládaly nad nevýhodami, které jako i každý jiný materiál s sebou také přináší.

Ve všech zde prezentovaných řešených záměrech a projektech byla moje hlavní role zejména vedoucího výzkumné skupiny, školitele 4 doktorských studentů a vedoucího několika závěrečných prací. V pozici manažera projektů, které zajišťovaly financování celé skupiny o cca 9 osobách. Osobním přínosem pro řešenou problematiku a vznik výsledků byly i tyto konkrétní činnosti:

- Optimalizace dávkování PHB Hydral do technologií zpracování
- Provedení širokého screeningu aditiv pro PHB a jejich testování
- Zavedení výzkumu a vývoje biomateriálů na bázi PHB pro FDM 3D tiskové procesy
- Vývoj a výroba biodegradabilních fólií pro agromonii
- Návrh a realizace technologie laboratorní výroby 3D tiskové struny
- Návrh laboratorního systému dloužení polymerních pásek a vláken
- Optimalizace procesů odstředivého zvláknění roztoků PHB s aditivami
- Návrh laboratorní technologie výroby biodegradovatelných abrazivních částic pro kosmetiku
- Návrh záměru bezodpadové extrakce PHB využitím surfaktantů ze vstupní suroviny pro fermentaci

9 REFERENCE

- [1] *Science to Protect Public Health and the Environment: EPA Research Program Overview 2016–2019*. s. 1-35. Dostupné z: https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-10/documents/strap_2016_overview_508.pdf
- [2] Zelená dohoda pro Evropu. *Evropská rada*. Dostupné z: <https://www.consilium.europa.eu/cs/policies/green-deal/>
- [3] *SDĚLENÍ KOMISE EVROPSKÉMU PARLAMENTU, RADĚ, EVROPSKÉMU HOSPODÁŘSKÉMU A SOCIÁLNÍMU VÝBORU A VÝBORU REGIONŮ: Nový akční plán pro oběhové hospodářství, Čistší a konkurenceschopnější Evropa*. Brusel, 2020, ročník 2020. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/HTML/?uri=CELEX:52020DC0098>
- [4] Circular economy action plan: The EU's new circular action plan paves the way for a cleaner and more competitive Europe. *An official website of the European Union*. Dostupné z: https://environment.ec.europa.eu/strategy/circular-economy-action-plan_en
- [5] *Microplastics: The EU aims to address the growing volume of microplastics in the environment*. Dostupné z: https://environment.ec.europa.eu/topics/plastics/microplastics_en
- [6] *Plastics strategy: The EU's plastics strategy aims to transform the way plastic products are designed, produced, used and recycled in the EU*. Dostupné z: https://environment.ec.europa.eu/strategy/plastics-strategy_en
- [7] Cirkulárnímu Česku jsme o krok blíž. Vláda schválila první Akční plán pro cirkulární ekonomiku do roku 2027. Ministerstvo životního prostředí. Dostupné z: https://www.mzp.cz/cz/news_20230621_Cirkularnimu-Cesku-jsme-o-krok-bliz-Vlada-schvalila-prvni-Akcni-plan-pro-cirkularni-ekonomiku-do-roku-2027
- [8] *Akční plán Cirkulární Česko 2040 pro období 2022-2027*. s. 1-112. Dostupné z: [https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/news_20230621_Cirkularnimu-Cesku-jsme-o-krok-bliz-Vlada-schvalila-prvni-Akcni-plan-pro-cirkularni-ekonomiku-do-roku-2027/\\$FILE/AP_C%4%8C_2040.pdf](https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/news_20230621_Cirkularnimu-Cesku-jsme-o-krok-bliz-Vlada-schvalila-prvni-Akcni-plan-pro-cirkularni-ekonomiku-do-roku-2027/$FILE/AP_C%4%8C_2040.pdf)
- [9] GOEL, Vishal, Priyanka LUTHRA, Gurpreet KAPUR a S. RAMAKUMAR. Biodegradable/Bio-plastics: Myths and Realities. *Journal of Polymers and the Environment*. 2021, 29(10), 3079-3104. ISSN 1566-2543. DOI: 10.1007/s10924-021-02099-1
- [10] ALTMAN, Rebecca. The myth of historical bio-based plastics. *Science*. 2021, 373(6550), 47-49. ISSN 0036-8075. DOI: 10.1126/science.abj1003
- [11] CHOUDHARY, Priyavart, Amritanshu PATHAK, Pankaj KUMAR, Chetana S a Nishesh SHARMA. Commercial production of bioplastic from organic waste-derived biopolymers viz-a-viz waste treatment: A minireview. *Biomass Conversion and Biorefinery*. ISSN 2190-6815. DOI: 10.1007/s13399-022-03145-1
- [12] ROSENBOOM, Jan-Georg, Robert LANGER a Giovanni TRAVERSO. Bioplastics for a circular economy. *Nature Reviews Materials*. 2022, 7(2), 117-137. ISSN 2058-8437. DOI: 10.1038/s41578-021-00407-8
- [13] ROHMAWATI, Baiti, Fatin ATIKAH NATA SYA'IDAH, Rhismayanti RHISMAYANTI, Dante ALIGHIRI a Willy TIRZA EDEN. Synthesis of Bioplastic-based Renewable Cellulose Acetate from Teak Wood (*Tectona grandis*) Biowaste Using Glycerol-Chitosan Plasticizer. *Oriental Journal of Chemistry*. 2018, 34(4), 1810-1816. ISSN 0970020X. DOI: 10.13005/ojc/3404014
- [14] MADHAVAN NAMPOOTHIRI, K., Nimisha NAIR a Rojan JOHN. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresource Technology*. 2010, 101(22), 8493-8501. ISSN 09608524. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.05.092
- [15] KESSLER, B., R. WEUSTHUIS, B. WITHOLT a G. EGGINK. Production of Microbial Polyesters: Fermentation and Downstream Processes. BABEL, Wolfgang a Alexander STEINBÜCHEL, ed., Wolfgang BABEL, Alexander STEINBÜCHEL. *Biopolyesters*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001, s. 159-182. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. ISBN 978-3-540-41141-3. DOI: 10.1007/3-540-40021-4_5
- [16] ALIOTTA, Laura, Maurizia SEGGIANI, Andrea LAZZERI, Vito GIGANTE a Patrizia CINELLI. A Brief Review of Poly (Butylene Succinate) (PBS) and Its Main Copolymers: Synthesis, Blends, Composites, Biodegradability, and Applications. *Polymers*. 2022, 14(4). ISSN 2073-4360. DOI: 10.3390/polym14040844

- [17] SIROHI, Ranjna, Shikhangi SINGH, Ayon TARAFDAR et al. Thermoplastic starch. *Biomass, Biofuels, Biochemicals*. Elsevier, 2021, s. 31-49. ISBN 9780128218884. DOI: 10.1016/B978-0-12-821888-4.00011-3
- [18] LABET, Marianne a Wim THIELEMANS. Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chemical Society Reviews*. 2009, 38(12). ISSN 0306-0012. DOI: 10.1039/b820162p
- [19] SACCHI, Maria, João MARCICANO a Fernando VASCONCELOS. Biodegradable Polyamide 6.6 for Textile Application. *Journal of Management and Sustainability*. 2021, 11(2). ISSN 1925-4733. DOI: 10.5539/jms.v11n2p100
- [20] YAMANO, Naoko, Norioki KAWASAKI, Sayuri IDA a Atsuyoshi NAKAYAMA. Biodegradation of *polyamide 4 in seawater*. *Polymer Degradation and Stability*. 2019, 166, 230-236. ISSN 01413910. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2019.05.032
- [21] FREDI, Giulia a Andrea DORIGATO. Recycling of bioplastic waste: A review. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*. 2021, 4(3), 159-177. ISSN 25425048. DOI: 10.1016/j.aiepr.2021.06.006
- [22] FAHIM, I.S., H. CHBIB a Hamada MAHMOUD. The synthesis, production & *economic feasibility of manufacturing PLA from agricultural waste*. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2019, 12. ISSN 23525541. DOI: 10.1016/j.scp.2019.100142
- [23] NARODOSLAWSKY, M. LCA of PHA Production – Identifying the Ecological Potential of Bio-plastic. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. 2015, 29(2), 299-305. ISSN 03529568. DOI: 10.15255/CABEQ.2014.2262
- [24] REHAKOVA, Veronika, Iva PERNICOVA, Xenie KOURILOVA et al. Biosynthesis of versatile PHA copolymers by thermophilic members of the genus *Aneurinibacillus*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023, 225, 1588-1598. ISSN 01418130. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.11.215
- [25] LIU, Qian a Guo-Qiang CHEN. *In vitro* biocompatibility and degradation of terpolyester 3HB-co-4HB-co-3HHx, consisting of 3-hydroxybutyrate, 4-hydroxybutyrate and 3-hydroxyhexanoate. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2012, 19(11), 1521-1533. ISSN 0920-5063. DOI: 10.1163/156856208786140391
- [26] VOLOVA, Tatiana, Olga VINOGRADOVA, Natalia ZHILA, Ivan PETERSON, Evgeniy KISELEV, Alexander VASILIEV, Aleksey SUKOVATYIY a Ekaterina SHISHATSKAYA. Properties of a novel quaterpolymer P(3HB/4HB/3HV/3HHx). *Polymer*. 2016, 101, 67-74. ISSN 00323861. DOI: 10.1016/j.polymer.2016.08.048
- [27] JUNG, Kuno, Roland HANY, Daniel RENTSCH, Tazio STORNI, Thomas EGLI a Bernard WITHOLT. Characterization of New Bacterial Copolyesters Containing *3-Hydroxyoxoalkanoates* and Acetoxy-3-hydroxyalkanoates. *Macromolecules*. 2000, 33(23), 8571-8575. ISSN 0024-9297. DOI: 10.1021/ma000829y
- [28] LAUZIER, C., R.H. MARCHESSAULT, P. SMITH a H. CHANZY. Structural study of isolated poly(β -hydroxybutyrate) granules. *Polymer*. 1992, 33(4), 823-827. ISSN 00323861. DOI: 10.1016/0032-3861(92)90343-U
- [29] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Eva SLANINOVA, Ines FRITZ, Christina DAFFERT, Katharina MEIXNER, Zuzana SEDRLOVA a Martin KOLLER. *Novel* unexpected functions of PHA granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020, 104(11), 4795-4810. ISSN 0175-7598. DOI: 10.1007/s00253-020-10568-1
- [30] PALMEIRO-SÁNCHEZ, Tania, Vincent O'FLAHERTY a Piet LENS. Polyhydroxyalkanoate bio-production and its rise as biomaterial of the future. *Journal of Biotechnology*. 2022, 348, 10-25. ISSN 01681656. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2022.03.001
- [31] *TianAn Biologic Materials Co., Ltd...* Dostupné z: <http://www.tianan-enmat.com/>
- [32] *CJ BIO inaugurates 5,000 tonne PHA facility.* Dostupné z: <https://www.bioplasticsmagazine.com/en/news/meldungen/20220502-PHA.php>
- [33] *Nodax® is 100% renewable* and is produced from readily available feedstocks: Danimer Scientific Uses Proprietary Processing to Produce Environmentally Responsible PHA.. Dostupné z: <https://danimerscientific.com/pha-beginning-of-life/>
- [34] *NOTA STAMPA BIO-ON: Bio-on news..* Dostupné z: <http://www.bio-on.it/news.php>
- [35] *Bio-On is back, saved by the Maip group.* *Bioplastic Magazine*. Dostupné z: https://www.bioplasticsmagazine.com/en/news/meldungen/20230313_bio-on_maip.php
- [36] KHANNA, Shilpi a Ashok SRIVASTAVA. Recent *advances* in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*. 2005, 40(2), 607-619. ISSN 13595113. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.01.053

- [37] STEINBÜCHEL, A. a M. HOFRICHTER. *Biopolymers*. Chichester: Wiley-VCH, 2003. ISBN 35-273-0230-1.
- [38] DOS SANTOS, Antonio, Luiz OLIVEIRA DALLA VALENTINA, Andrey HIDALGO SCHULZ a Márcia TOMAZ DUARTE. From Obtaining to Degradation of PHB: Material Properties. Part I. *Ingeniería y Ciencia*. 2017, 13(26), 269-298. ISSN 17949165. DOI: 10.17230/ingciencia.13.26.10
- [39] HÄNGGI, Urs J. Virgin PHB has thermoplastic properties, but is not a thermoplast. s. 1-9. Dostupné z: <https://www.biomer.de/K%C3%96LN2018.pdf>
- [40] GRASSIE, N., E.J. MURRAY a P.A. HOLMES. The thermal degradation of poly(-d)- β -hydroxybutyric acid): Part 1—Identification and quantitative analysis of products. *Polymer Degradation and Stability*. 1984, 6(1), 47-61. ISSN 01413910. DOI: 10.1016/0141-3910(84)90016-8
- [41] GRASSIE, N., E.J. MURRAY a P.A. HOLMES. The thermal degradation of poly(-d)- β -hydroxybutyric acid): Part 2—Changes in molecular weight. *Polymer Degradation and Stability*. 1984, 6(2), 95-103. ISSN 01413910. DOI: 10.1016/0141-3910(84)90075-2
- [42] GRASSIE, N., E.J. MURRAY a P.A. HOLMES. The thermal degradation of poly(-d)- β -hydroxybutyric acid): Part 3—The reaction mechanism. *Polymer Degradation and Stability*. 1984, 6(3), 127-134. ISSN 01413910. DOI: 10.1016/0141-3910(84)90032-6
- [43] ALVES, Mariane, Karine MACAGNAN, Amanda RODRIGUES et al. Poly(3-hydroxybutyrate)-P(3HB): Review of Production Process Technology. *Industrial Biotechnology*. 2017, 13(4), 192-208. ISSN 1550-9087. DOI: 10.1089/ind.2017.0013
- [44] ZAPLETAL, M a J TREJBAL. Izolace polyhydroxyalkanoátů z mikrobiální biomasy. *Chemické Listy*. 110(12), 860–867. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/120>
- [45] SAAVEDRA DEL OSO, M., M. MAURICIO-IGLESIAS a A. HOSPIDO. Evaluation and optimization of the environmental performance of PHA downstream processing. *Chemical Engineering Journal*. 2021, 412. ISSN 13858947. DOI: 10.1016/j.cej.2020.127687
- [46] KOLLER, Martin, Lukáš MARŠÁLEK, Miguel DE SOUSA DIAS a Gerhart BRAUNEGG. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New Biotechnology*. 2017, 37, 24-38. ISSN 18716784. DOI: 10.1016/j.nbt.2016.05.001
- [47] KOLLER, Martin. Established and advanced approaches for recovery of microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters from surrounding microbial biomass. *The EuroBiotech Journal*. 2020, 4(3), 113-126. ISSN 2564-615X. DOI: 10.2478/ebtj-2020-0013
- [48] MADKOUR, Mohamed, Daniel HEINRICH, Mansour ALGHAMDI, Ibraheem SHABBAJ a Alexander STEINBÜCHEL. PHA Recovery from Biomass. *Biomacromolecules*. 2013, 14(9), 2963-2972. ISSN 1525-7797. DOI: 10.1021/bm4010244
- [49] MOHAMMADI, Mitra, Mohd HASSAN, Yoshihito SHIRAI et al. Separation and Purification of Polyhydroxyalkanoates from Newly Isolated Comamonas sp. EB172 by Simple Digestion with Sodium Hydroxide. *Separation Science and Technology*. 2012, 47(3), 534-541. ISSN 0149-6395. DOI: 10.1080/01496395.2011.615788
- [50] RODRIGUES, Ana, Rita FRANCA, Madalena DIONÍSIO, Chantal SEVRIN, Christian GRANDFILS, Maria REIS a Nídia LOURENÇO. Polyhydroxyalkanoates from a Mixed Microbial Culture: *Extraction Optimization and Polymer Characterization*. *Polymers*. 2022, 14(11). ISSN 2073-4360. DOI: 10.3390/polym14112155
- [51] BURNIOL-FIGOLS, Anna, Ioannis SKIADAS, Anders DAUGAARD a Hariklia GAVALA. Polyhydroxyalkanoate (PHA) purification through dilute aqueous ammonia digestion at elevated temperatures. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2020, 95(5), 1519-1532. ISSN 0268-2575. DOI: 10.1002/jctb.6345
- [52] IRDAHAYU, Nik, Kannusamy SHANTINI, Kai-Hee HUONG, Sevakumaran VIGNESWARI, Nursolehah AZIZ, Mohd. AZIZAN a Al-Ashraf AMIRUL. En route to economical eco-friendly solvent system in enhancing sustainable recovery of poly(3-hydroxybutyrate- co -4-hydroxybutyrate) copolymer. *Engineering in Life Sciences*. 2017, 17(9), 1050-1059. ISSN 16180240. DOI: 10.1002/elsc.201600217
- [53] První zmínky o 3D tisku. 3d-tiskni.cz. Zlín, 2020. Dostupné z: <https://3d-tiskni.cz/prvni-zminky-o-3d-tisku/>
- [54] Náš příběh. Prusa Research. Praha: Prusa Research, 2022. Dostupné z: https://www.prusa3d.com/cs/stranka/nas-pribeh_875/
- [55] BUJ-CORRAL, Irene, Aitor TEJO-OTERO a Felip FENOLLOSA-ARTÉS. Use of FDM Technology in Healthcare Applications: Recent Advances. DAVE, Harshit K. a J. Paulo DAVIM, ed., Harshit DAVE, J. DAVIM. *Fused Deposition Modeling Based 3D Printing*. Cham: Springer International Publishing, 2021, s. 277-297.

- Materials Forming, Machining and Tribology. ISBN 978-3-030-68023-7. DOI: 10.1007/978-3-030-68024-4_15
- [56] ALPER, R., D. LUNDGREN, R. MARCHESSAULT a W. COTE. Properties of poly-3-hydroxybutyrate. *I. General considerations concerning the naturally occurring polymer*. Biopolymers. 1963, 1(6), 545-556. ISSN 0006-3525. DOI: 10.1002/bip.360010605
- [57] SHELTON, J., Jerome LANDO a Dennis AGOSTINI. Synthesis and characterization of poly(β -hydroxybutyrate). Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters. 1971, 9(3), 173-178. ISSN 04492986. DOI: 10.1002/pol.1971.110090303
- [58] HOFFMANN, A., S. KREUZBERGER a G. HINRICHSEN. Influence of thermal *degradation* on tensile strength and Young's modulus of poly(hydroxybutyrate). Polymer Bulletin. 1994, 33(3), 355-359. ISSN 0170-0839. DOI: 10.1007/BF00314274
- [59] EL-HADI, A, R SCHNABEL, E STRAUBE, G MÜLLER a S HENNING. Correlation between degree of *crystallinity, morphology*, glass temperature, mechanical properties and biodegradation of poly (3-hydroxyalkanoate) PHAs and their blends. Polymer Testing. 2002, 21(6), 665-674. ISSN 01429418. DOI: 10.1016/S0142-9418(01)00142-8
- [60] PUENTE, Jorge, Antonella ESPOSITO, Frédéric CHIVRAC a Eric DARGENT. Effect of boron nitride as a nucleating agent on *the crystallization of bacterial poly(3-hydroxybutyrate)*. Journal of Applied Polymer Science. 2013, 128(5), 2586-2594. ISSN 00218995. DOI: 10.1002/app.38182
- [61] JAQUES, Nichollas, Ingridy SILVA, Manoel BARBOSA NETO, Andreas RIES, Eduardo CANEDO a Renate WELLEN. Effect of heat cycling on melting *and crystallization of PHB/TiO₂* compounds. Polímeros. 2018, 28(2), 161-168. ISSN 1678-5169. DOI: 10.1590/0104-1428.12416
- [62] JACQUEL, Nicolas, Koichirou TAJIMA, Nobuo NAKAMURA, Hideo KAWACHI, Pengju PAN a Yoshio INOUE. Nucleation mechanism of polyhydroxybutyrate and poly(hydroxybutyrate- co -hydroxyhexanoate) crystallized by orotic acid as a nucleating agent. Journal of Applied Polymer Science. 2010, 115(2), 709-715. ISSN 00218995. DOI: 10.1002/app.30873
- [63] KAI, Weihua, Yong HE a Yoshio INOUE. Fast crystallization of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with talc and boron nitride as nucleating *agents*. Polymer International. 2005, 54(5), 780-789. ISSN 0959-8103. DOI: 10.1002/pi.1758
- [64] CAL, Andrew, Brian GRUBBS, Lennard TORRES, Timothy RIFF, Rena KIBBLEWHITE, William ORTS a Charles LEE. Nucleation and plasticization with recycled low-molecular-weight poly-3-hydroxybutyrate toughens virgin poly-3-hydroxybutyrate. Journal of Applied Polymer Science. 2019, 136(17). ISSN 0021-8995. DOI: 10.1002/app.47432
- [65] HOBBS, J. K. The fracture of poly(hydroxybutyrate)Part I Fracture mechanics study during ageing. *Journal of Materials Science*. 1998, 33(10), 2509-2514. ISSN 0022-2461. DOI: 10.1023/A:1004384631218
- [66] HOBBS, J. a P. BARHAM. The fracture of poly(hydroxybutyrate)Part II Fracture mechanics study after annealing. *Journal of Materials Science*. 1998, 33(10), 2515-2518. ISSN 0022-2461. DOI: 10.1023/A:1004336715288
- [67] HOBBS, J. a P. BARHAM. The fracture of poly(hydroxybutyrate) Part III Fracture morphology in thin films and bulk systems. *Journal of Materials Science*. 1999, 34(19), 4831-4844. ISSN 00222461. DOI: 10.1023/A:1004659726586
- [68] DE KONING, G. J. M. Embrittlement and Rejuvenation of Bacterial Poly[(R)-3-hydroxybutyrate]. FISHMAN, Marshall L., Robert B. FRIEDMAN a Samuel J. HUANG, ed., Marshall FISHMAN, Robert FRIEDMAN, Samuel HUANG. Polymers from Agricultural Coproducts. Washington, DC: American Chemical Society, 1994, s. 188-201. ACS Symposium Series. ISBN 9780841230415. DOI: 10.1021/bk-1994-0575.ch013
- [69] DE KONING, G.J.M. a P.J. LEMSTRA. Crystallization phenomena in bacterial poly[(R)-3-hydroxybutyrate]: 2. Embrittlement and rejuvenation. *Polymer*. 1993, 34(19), 4089-4094. ISSN 00323861. DOI: 10.1016/0032-3861(93)90671-V
- [70] DE KONING, G.J.M., A.H.C. SCHEEREN, P.J. LEMSTRA, M. PEETERS a H. REYNAERS. Crystallization phenomena in bacterial poly[(R)-3-hydroxybutyrate]: 3. Toughening via *texture changes*. *Polymer*. 1994, 35(21), 4598-4605. ISSN 00323861. DOI: 10.1016/0032-3861(94)90809-5
- [71] CESÀRO, Attilio, Luciano NAVARINI a Renzo PEPI. A modulated DSC analysis of microbial biocompatible polyesters. *Thermoch. Acta*. 1993, 227, 157-166. ISSN 00406031. DOI: 10.1016/0040-6031(93)80259-D

- [72] DI LORENZO, Maria a René ANDROSCH. Crystallization of Poly[(R)-3-hydroxybutyrate]. DI LORENZO, Maria Laura a René ANDROSCH, ed., Maria DI LORENZO, René ANDROSCH. *Thermal Properties of Bio-based Polymers. Cham: Springer International Publishing, 2019, s. 119-142. Advances in Polymer Science. ISBN 978-3-030-39961-0. DOI: 10.1007/12_2019_50*
- [73] YUXIAN, An, Li LIXIA, Dong LISONG, Mo ZHISHEN a Feng ZHILIU. Nonisothermal Crystallization and Melting Behavior of Poly(b-hydroxybutyrate)-Poly(vinyl-acetate) Blends. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics. 1999, 37(5), 443-450. ISSN 0887-6266. DOI: 10.1002/(SICI)1099-0488(19990301)37:5<443::AID-POLB4>3.0.CO;2-Bopen_in_newISSN*
- [74] RENSTAD, Rasmus, Sigbritt KARLSSON a Ann-Christine ALBERTSSON. Influence of processing parameters on the molecular weight and mechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Polymer Degradation and Stability. 1997, 57(3), 331-338. ISSN 01413910. DOI: 10.1016/S0141-3910(97)00028-1*
- [75] PACHEKOSKI, Wagner, Carla DALMOLIN a José AGNELLI. The influence of the industrial processing on the degradation of poly(hidroxybutyrate) - PHB. *Materials Research. 2013, 16(2), 237-332. ISSN 1980-5373. DOI: 10.1590/S1516-14392012005000180*
- [76] QUISPE, Mayte, Olivia LÓPEZ a Marcelo VILLAR. Antioxidant Efficiency of Irganox® 1010 on Processing and Properties of Plasticized Poly(3-Hydroxybutyrate) Films. *Journal of Composites and Biodegradable Polymers. 2021, 9, 7-16. ISSN 2311-8717. DOI: 10.12974/2311-8717.2021.09.02*
- [77] WANG, Liang, Wenfu ZHU, Xiaojuan WANG, Xianyu CHEN, Guo-Qiang CHEN a Kaitian XU. Processability modifications of poly(3-hydroxybutyrate) by plasticizing, blending, and stabilizing. *Journal of Applied Polymer Science. 2008, 107(1), 166-173. ISSN 00218995. DOI: 10.1002/app.27004*
- [78] BOTANA, Adrian, Mariana MOLLO, Patricia EISENBERG a Rosa TORRES SANCHEZ. Effect of modified montmorillonite on biodegradable PHB nanocomposites. *Applied Clay Science. 2010, 47(3-4), 263-270. ISSN 01691317. DOI: 10.1016/j.clay.2009.11.001*
- [79] KOVALCIK, Adriana, Jiri SMILEK, Michal MACHOVSKY et al. Properties and structure of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) filaments for fused deposition modelling. *International Journal of Biological Macromolecules. 2021, 183, 880-889. ISSN 01418130. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.04.183*
- [80] ANGELINI, Stefania, Pierfrancesco CERRUTI, Barbara IMMIRZI, Merima POSKOVIC, Gabriella SANTAGATA, Gennaro SCARINZI a Mario MALINCONICO. From Microbial Biopolymers to Bioplastics: Sustainable Additives for PHB Processing and Stabilization. KALIA, Vipin Chandra, ed., Vipin KALIA. *Microbial Factories. New Delhi: Springer India, 2015, s. 139-160. ISBN 978-81-322-2594-2. DOI: 10.1007/978-81-322-2595-9_10*
- [81] PERSICO, Paola, Veronica AMBROGI, Antonio BARONI, Gabriella SANTAGATA, Cosimo CARFAGNA, Mario MALINCONICO a Pierfrancesco CERRUTI. Enhancement of poly(3-hydroxybutyrate) thermal and processing stability using a bio-waste derived additive. *International Journal of Biological Macromolecules. 2012, 51(5), 1151-1158. ISSN 01418130. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2012.08.036*
- [82] AURIEMMA, Maria, Amodio PISCITELLI, Rossana PASQUINO, Pierfrancesco CERRUTI, Mario MALINCONICO a Nino GRIZZUTI. Blending poly(3-hydroxybutyrate) with tannic acid: Influence of a polyphenolic natural additive on the rheological and thermal behavior. *European Polymer Journal. 2015, 63, 123-131. ISSN 00143057. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2014.12.021*
- [83] CHEN, Cheng, Bin FEI, Shuwen PENG, Yugang ZHUANG, Lisong DONG a Zhiliu FENG. The kinetics of the thermal decomposition of poly(3-hydroxybutyrate) and maleated poly(3-hydroxybutyrate). *Journal of Applied Polymer Science. 2002, 84(9), 1789-1796. ISSN 0021-8995. DOI: 10.1002/app.10463*
- [84] TURCO, Rosa, Gabriella SANTAGATA, Iolanda CORRADO, Cinzia PEZZELLA a Martino DI SERIO. *In vivo* and Post-synthesis Strategies to Enhance the Properties of PHB-Based Materials: A Review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2021, 8. ISSN 2296-4185. DOI: 10.3389/fbioe.2020.619266*
- [85] PANAITESCU, Denis, Cristian NICOLAE, Adriana FRONE, Ioana CHIULAN, Paul STANESCU, Constantin DRAGHICI, Michaela IORGA a Mona MIHAILESCU. Plasticized poly(3-hydroxybutyrate) with improved melt processing and balanced properties. *Journal of Applied Polymer Science. 2017, 134(19). ISSN 00218995. DOI: 10.1002/app.44810*
- [86] ERCEG, Matko, Tonka KOVAČIĆ a Ivka KLARIĆ. Thermal degradation of poly(3-hydroxybutyrate) plasticized with acetyl tributyl citrate. *Polymer Degradation and Stability. 2005, 90(2), 313-318. ISSN 01413910. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2005.04.048*

- [87] KUNZE, Carmen, Thomas FREIER, Sven KRAMER a Klaus-Peter SCHMITZ. Anti-inflammatory prodrugs as plasticizers for biodegradable implant materials based on poly(3-hydroxybutyrate). *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2002, 13(11), 1051-1055. ISSN 09574530. DOI: 10.1023/A:1020392606225
- [88] LONGÉ, Lionel, Laurent MICHELY, Antoine GALLOS et al. Improved Processability and Antioxidant Behavior of Poly(3-hydroxybutyrate) in Presence of Ferulic Acid-Based Additives. *Bioengineering*. 2022, 9(3). ISSN 2306-5354. DOI: 10.3390/bioengineering9030100
- [89] NASER, Ahmed, Ibrahim DEIAB, Fantahun DEFERSHA a Sheng YANG. Expanding Poly(lactic acid) (PLA) and Polyhydroxyalkanoates (PHAs) Applications: A Review on Modifications and Effects. *Polymers*. 2021, 13(23). ISSN 2073-4360. DOI: 10.3390/polym13234271
- [90] BRIASSOULIS, Demetres, Philippos Tserotas a Ioanna-Georgia ATHANASOULIA. Alternative optimization routes for improving the performance of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) based plastics. *Journal of Cleaner Production*. 2021, 318. ISSN 09596526. DOI: 10.1016/j.jclepro.2021.128555
- [91] PHUA, Y., A. PEGORETTI, T. ARAUJO a Z. ISHAK. Mechanical and thermal properties of poly(butylene succinate)/poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) biodegradable blends. *Journal of Applied Polymer Science*. 2015, 132(47), -. ISSN 00218995. DOI: 10.1002/app.42815
- [92] DE MATOS COSTA, Anna, Raquel SANTOS, Edson ITO, Laura DE CARVALHO a Eduardo CANEDO. Melt and cold crystallization in a poly(3-hydroxybutyrate) poly(butylene adipate-co-terephthalate) blend. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2019, 137(4), 1341-1346. ISSN 1388-6150. DOI: 10.1007/s10973-019-08027-9
- [93] CYRAS, V., A. VÁZQUES, Ch. ROZSA, N. GALEGO FERNÁNDEZ, L. TORRE a J. KENNY. Thermal stability of P(HB-co-HV) and its blends with polyalcohols. *Journal of Applied Polymer Science*. 2000, 77(13), 2889-2900. DOI: 10.1002/1097-4628(20000923)77:13<2889::AID-APP11>3.0.CO;2-O
- [94] GRECO, Pietro a Ezio MARTUSCELLI. Crystallization and thermal behaviour of poly(d(-)-3-hydroxybutyrate)-based blends. *Polymer*. 1989, 30(8), 1475-1483. ISSN 00323861. DOI: 10.1016/0032-3861(89)90219-X
- [95] CHANG, Ling, Yin-Hsuan CHOU a Eamor WOO. Effects of amorphous poly(vinyl acetate) on crystalline morphology of poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid). *Colloid and Polymer Science*. 2011, 289(2), 199-211. ISSN 0303-402X. DOI: 10.1007/s00396-010-2330-7
- [96] AN, Yuxian, Lisong DONG, Lixia LI, Zhishen MO a Zhiliu FENG. Isothermal crystallization kinetics and melting behavior of poly(β -hydroxybutyrate)/poly(vinyl acetate) blends. *European Polymer Journal*. 1999, 35(3), 365-369. ISSN 00143057. DOI: 10.1016/S0014-3057(98)00145-1
- [97] AHMED EL-HADI, RAINER SCHNABEL, EKKEHARD STRAUBE, GERT MÜLLER, M. RIEMSCHEIDER. Effect of Melt Processing on Crystallization Behavior and Rheology of Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) and its Blends. *Macromolecular Materials and Engineering*. 2002, 287(5), 363-372. ISSN 1438-7492. DOI: 10.1002/1439-2054(20020501)287:5<363::AID-MAME363>3.0.CO;2-D
- [98] ABDELWAHAB, Mohamed, Allison FLYNN, Bor-Sen CHIOU, Syed IMAM, William ORTS a Emo CHIELLINI. Thermal, mechanical and morphological characterization of plasticized PLA-PHB blends. *Polymer Degradation and Stability*. 2012, 97(9), 1822-1828. ISSN 01413910. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2012.05.036
- [99] NOFAR, Mohammadreza, Dilara SACLIGIL, Pierre CARREAU, Musa KAMAL a Marie-Claude HEUZEY. Poly(lactic acid) blends: Processing, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019, 125, 307-360. ISSN 01418130. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.002
- [100] LU, Huiqiang, Sergei KAZARIAN a Harumi SATO. Simultaneous Visualization of Phase Separation and Crystallization in PHB/PLLA Blends with In Situ ATR-FTIR Spectroscopic Imaging. *Macromolecules*. 2020, 53(20), 9074-9085. ISSN 0024-9297. DOI: 10.1021/acs.macromol.0c00713
- [101] OLEJNIK, Olga, Anna MASEK a Jakub ZAWADZIŃO. Processability and Mechanical Properties of Thermoplastic Polylactide/Polyhydroxybutyrate (PLA/PHB) Bioblends. *Materials*. 2021, 14(4). ISSN 1996-1944. DOI: 10.3390/ma14040898
- [102] ZHANG, Jianming, Harumi SATO, Tsuyoshi FURUKAWA, Hideto TSUJI, Isao NODA a Yukihiro OZAKI. Crystallization Behaviors of Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(L-lactic acid) in Their Immiscible and Miscible Blends. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006, 110(48), 24463-24471. ISSN 1520-6106. DOI: 10.1021/jp065233c

- [103] GUNARATNE, L.M. a R.A. SHANKS. Miscibility, melting, and crystallization behavior of poly(hydroxybutyrate) and poly(D,L-lactic acid) blends. *Polymer Engineering & Science*. 2008, 48(9), 1683-1692. ISSN 00323888. DOI: 10.1002/pen.21051
- [104] DONG, Weifu, Piming MA, Shifeng WANG, Mingqing CHEN, Xiaoxia CAI a Yong ZHANG. Effect of partial crosslinking on morphology and properties of the poly(β -hydroxybutyrate)/poly(D,L-lactic acid) blends. *Polymer Degradation and Stability*. 2013, 98(9), 1549-1555. ISSN 01413910. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2013.06.033
- [105] CHEN, Haiying, Farshad OVEISSI, Sean DALY, Zahra SHAHRBABAKI, Sina NAFICY a Fariba DEGHANI. A green and biodegradable plasticizer from copolymers of poly(β -hydroxybutyrate-co- ϵ -caprolactone). *Journal of Applied Polymer Science*. 2022, 139(22). ISSN 0021-8995. DOI: 10.1002/app.52240
- [106] GARCIA-GARCIA, D., E. RAYÓN, A. CARBONELL-VERDU, J. LOPEZ-MARTINEZ a R. BALART. Improvement of the compatibility between poly(3-hydroxybutyrate) and poly(ϵ -caprolactone) by reactive extrusion with dicumyl peroxide. *European Polymer Journal*. 2017, 86, 41-57. ISSN 00143057. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2016.11.018
- [107] GRIMALDI, M., B. IMMIRZI, M. MALINCONICO, E. MARTUSCELLI, G. ORSELLO, A. RIZZO a M. VOLPE. Reactive processing — property relationships in *biodegradable* blends useful for prosthesis application. *Journal of Materials Science*. 1996, 31(23), 6155-6162. ISSN 0022-2461. DOI: 10.1007/BF00354432
- [108] ZYTNER, Peter, Feng WU, Manjusri MISRA a Amar MOHANTY. Toughening of Biodegradable Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/Poly(ϵ -caprolactone) Blends by In Situ Reactive Compatibilization. *ACS Omega*. 2020, 5(25), 14900-14910. ISSN 2470-1343. DOI: 10.1021/acsomega.9b04379
- [109] ROBLEDO-ORTÍZ, Jorge, Martín GONZÁLEZ-LÓPEZ, Alan MARTÍN DEL CAMPO a Aida PÉREZ-FONSECA. Lignocellulosic Materials as Reinforcement of Polyhydroxybutyrate and its Copolymer with Hydroxyvalerate: A Review. *Journal of Polymers and the Environment*. 2021, 29(5), 1350-1364. ISSN 1566-2543. DOI: 10.1007/s10924-020-01979-2
- [110] MISRA, Superb, Sabeel VALAPPIL, Ipsita ROY a Aldo BOCCACCINI. Polyhydroxyalkanoate (PHA)/Inorganic Phase Composites for Tissue Engineering Applications. *Biomacromolecules*. 2006, 7(8), 2249-2258. ISSN 1525-7797. DOI: 10.1021/bm060317c
- [111] CHIULAN, Ioana, Adriana FRONE, Călin BRANDABUR a Denis PANAITESCU. Recent Advances in 3D Printing of Aliphatic Polyesters. *Bioengineering*. 2018, 5(1). ISSN 2306-5354. DOI: 10.3390/bioengineering5010002
- [112] FAIDALLAH, Rawabe, Muammel HANON, Zoltán SZAKÁL a István OLDAL. Biodegradable Materials Used in FDM 3D Printing Technology: A Critical Review. *Journal of Modern Mechanical Engineering and Technology*. 2022, 9, 90-105. ISSN 2409-9848. DOI: 10.31875/2409-9848.2022.09.11
- [113] MEHRPOUYA, Mehrshad, Henri VAHABI, Massimiliano BARLETTA, Pascal LAHEURTE a Valérie LANGLOIS. Additive manufacturing of polyhydroxyalkanoates (PHAs) biopolymers: Materials, printing techniques, and applications. *Materials Science and Engineering: C*. 2021, 127. ISSN 09284931. DOI: 10.1016/j.msec.2021.112216
- [114] DEY, Arup, Isnala ROAN EAGLE a Nita YODO. A Review on Filament Materials for Fused Filament Fabrication. *Journal of Manufacturing and Materials Processing*. 2021, 5(3). ISSN 2504-4494. DOI: 10.3390/jmmp5030069
- [115] WOUTER DECONINCK. Extrusion of Polyhydroxyalkanoate Filament For Use in 3D Printers. Virginia, 2016. Bakalárska práca. College of William & Mary.
- [116] SABALINA, Alisa, Sergejs GAIDUKOVs, Maksims JURINOVs, Liga GRASE a Oskars PLATNIEKS. Fabrication of poly(lactic acid), poly(butylene succinate), and poly(hydroxybutyrate) bio-based and biodegradable blends for application in fused filament fabrication-based 3D printing. *Journal of Applied Polymer Science*. 2023, 140(28). ISSN 0021-8995. DOI: 10.1002/app.54031
- [117] LAOUTID, Fouad, Hadrien LENOIR, Adriana MOLINS SANTAEULARIA, Antoniya TONCHEVA, Tim SCHOUW a Philippe DUBOIS. Impact-Resistant Poly(3-Hydroxybutyrate)/Poly(ϵ -Caprolactone)-Based Materials, through Reactive Melt Processing, for Compression-Molding and 3D-Printing Applications. *Materials*. 2022, 15(22). ISSN 1996-1944. DOI: 10.3390/ma15228233
- [118] VIGIL FUENTES, Miguel, Suman THAKUR, Feng WU, Manjusri MISRA, Stefano GREGORI a Amar MOHANTY. Study on the 3D printability of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/poly(lactic acid) blends

- with chain extender using fused *filament* fabrication. *Scientific Reports*. 2020, 10(1). ISSN 2045-2322. DOI: 10.1038/s41598-020-68331-5
- [119] IVORRA-MARTINEZ, Juan, Miguel PEYDRO, Jaume GOMEZ-CATURLA, Lourdes SANCHEZ-NACHER, Teodomiro BORONAT a Rafael BALART. The effects of processing parameters on mechanical properties of 3D-printed polyhydroxyalkanoates parts. *Virtual and Physical Prototyping*. 2023, 18(1). ISSN 1745-2759. DOI: 10.1080/17452759.2022.2164734
- [120] RAJAN, Kumaresan, Mahendran SAMYKANO, Kumaran KADIRGAMA, Wan HARUN a Md. RAHMAN. Fused deposition modeling: process, materials, parameters, properties, and applications. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*. 2022, 120(3-4), 1531-1570. ISSN 0268-3768. DOI: 10.1007/s00170-022-08860-7
- [121] KANABENJA, Warrayut, Kunanon PASSARAPARK, Thanaporn SUBCHOKPOOL, Nithiwach NAWAAUKKARATHARNANT, Allen ROMÁN, Tim OSSWALD, Chuanchom AUMNATE a Pranut POTIYARAJ. 3D printing filaments from plasticized *Polyhydroxybutyrate/Poly(lactic acid) blends reinforced with hydroxyapatite*. *Additive Manufacturing*. 2022, 59. ISSN 22148604. DOI: 10.1016/j.addma.2022.103130
- [122] VAIDYA, Alankar, Christophe COLLET, Marc GAUGLER a Gareth LLOYD-JONES. Integrating softwood biorefinery lignin into polyhydroxybutyrate composites and application in 3D printing. *Materials Today Communications*. 2019, 19, 286-296. ISSN 23524928. DOI: 10.1016/j.mtcomm.2019.02.008
- [123] TIAN, Jing, Run ZHANG, Yihui WU a Ping XUE. Additive manufacturing of wood flour/polyhydroxyalkanoates (PHA) fully bio-based composites based on *micro-screw extrusion* system. *Materials & Design*. 2021, 199. ISSN 02641275. DOI: 10.1016/j.matdes.2020.109418
- [124] RODRÍGUEZ-FABIÀ, Sandra a Gary CHINGA-CARRASCO. Effects of a poly(hydroxyalkanoate) elastomer and kraft pulp fibres on biocomposite properties and three-dimensional (3D) printability of filaments for *fused deposition modelling*. *Journal of Bioresources and Bioproducts*. 2022, 7(3), 161-172. ISSN 23699698. DOI: 10.1016/j.jobab.2022.03.002
- [125] DAN, Li, Qiuli CHENG, Ravin NARAIN, Beate KRAUSE, Petra PÖTSCHKE a Anastasia ELIAS. Three-Dimensional Printed and Biocompatible Conductive Composites Comprised of Polyhydroxybutyrate and Multiwalled Carbon Nanotubes. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2021, 60(2), 885-897. ISSN 0888-5885. DOI: 10.1021/acs.iecr.0c04753
- [126] Biodegradable Polymers in Various Environments According to Established Standards and Certification Schemes: New updated version of the poster. *Renewable Carbon Publications*. Dostupné z: <https://renewable-carbon.eu/publications/product/biodegradable-polymers-in-various-environments-according-to-established-standards-and-certification-schemes-graphic-pdf/>
- [127] ASTM D5988-18: Standard Test Method for Determining Aerobic Biodegradation of Plastic Materials in Soil. West Conshohocken, US: ASTM International, 2018, 6 s. ASTM D5988-18.
- [128] ASTM D5338-15(2021): *Standard Test Method for Determining Aerobic Biodegradation of Plastic Materials Under Controlled Composting Conditions, Incorporating Thermophilic Temperatures*. West Conshohocken, US: ASTM International, 2021.
- [129] ASTM G160 – 12: *Standard Practice for Evaluating Microbial Susceptibility of Nonmetallic Materials By Laboratory Soil Burial*. West Conshohocken, US: ASTM International, 2019.
- [130] ASTM D5511 – 18: *Standard Test Method for Determining Anaerobic Biodegradation of Plastic Materials Under High-Solids Anaerobic-Digestion Conditions*. West Conshohocken, US: ASTM International, 2018.
- [131] ASTM D5526 – 18: *Standard Test Method for Determining Anaerobic Biodegradation of Plastic Materials Under Accelerated Landfill Conditions*. West Conshohocken, US: ASTM International, 2018.
- [132] ASTM D 7475 – 20: *Standard Test Method for Determining the Aerobic Degradation and Anaerobic Biodegradation of Plastic Materials under Accelerated Bioreactor Landfill Conditions*. West Conshohocken, US: ASTM International, 2020.
- [133] MERGAERT, J., C. ANDERSON, A. WOUTERS, J. SWINGS a K. KERSTERS. *Biodegradation of polyhydroxyalkanoates*. *FEMS Microbiology Letters*. 1992, 103(2-4), 317-321. ISSN 03781097. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1992.tb05853.x
- [134] SATOH, Hidenori, Naoko YOSHIE a Yoshio INOUE. Hydrolytic degradation of blends of poly(3-hydroxybutyrate) with poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Polymer*. 1994, 35(2), 286-290. ISSN 00323861. DOI: 10.1016/0032-3861(94)90692-0

- [135] YUE, C.L., R.A. GROSS a S.P. MCCARTHY. Composting studies of poly (β -hydroxybutyrate-co-/gb-hydroxyvalerate). *Polymer Degradation and Stability*. 1996, 51(2), 205-210. ISSN 01413910. DOI: 10.1016/0141-3910(95)00201-4
- [136] DOI, Yoshiharu, Youko KANESAWA, Masao KUNIOKA a Terumi SAITO. Biodegradation of microbial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Macromolecules*. 1990, 23(1), 26-31. ISSN 0024-9297. DOI: 10.1021/ma00203a006
- [137] DOI, Yoshiharu, Youko KANESAWA, Naoki TANAHASHI a Yoshiharu KUMAGAI. Biodegradation of microbial polyesters in the marine environment. *Polymer Degradation and Stability*. 1992, 36(2), 173-177. ISSN 01413910. DOI: 10.1016/0141-3910(92)90154-W
- [138] AKARADECHAKUL, Kornchanok, Peerapong CHANTHOT, Noppadon KERDDONFAG a Cattaleeya PATTAMAPROM. The effect of polycarbodiimide chain extender on thermal stability and mechanical properties of biobased poly(lactic acid)/natural rubber blown films. *Journal of Plastic Film & Sheeting*. 2022, 38(3), 396-415. ISSN 8756-0879. DOI: 10.1177/87560879211058679
- [139] Filabot. USA: Filabot. Dostupné z: <https://www.filabot.com/>
- [140] *Filament Width Sensor Prototype Version 3*. Ultimaker Thingiverse. MakerBot Industries, 2023. Dostupné z: <https://www.thingiverse.com/thing:454584>
- [141] DIZON, John, Alejandro ESPERA, Qiyi CHEN a Rigoberto ADVINCULA. Mechanical characterization of 3D-printed polymers. *Additive Manufacturing*. 2018, 20, 44-67. ISSN 22148604. DOI: 10.1016/j.addma.2017.12.002
- [142] PUPPI, Dario, Gianni PECORINI a Federica CHIPELLINI. Biomedical Processing of Polyhydroxyalkanoates. *Bioengineering*. 2019, 6(4). ISSN 2306-5354. DOI: 10.3390/bioengineering6040108
- [143] HAN, Syaza, Mastura TAHA, Muhd MANSOR a Muhamad RAHMAN. Investigation of *tensile* and flexural properties of kenaf fiber-reinforced acrylonitrile butadiene styrene composites fabricated by fused deposition modeling. *Journal of Engineering and Applied Science*. 2022, 69(1). ISSN 1110-1903. DOI: 10.1186/s44147-022-00109-0
- [144] CHIULAN, Ioana, Adriana FRONE, Călin BRANDABUR a Denis PANAITESCU. Recent Advances in 3D Printing of Aliphatic Polyesters. *Bioengineering*. 2018, 5(1). ISSN 2306-5354. DOI: 10.3390/bioengineering5010002
- [145] DIMITRIOU, Rozalia, Elena JONES, Dennis MCGONAGLE a Peter GIANNOUDIS. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicine*. 2011, 9(1). ISSN 1741-7015. DOI: 10.1186/1741-7015-9-66
- [146] BROWN, Justin, Sangamesh KUMBAR a Cato LAURENCIN. *Bone Tissue Engineering*. Biomaterials Science. Elsevier, 2013, s. 1194-1214. ISBN 9780123746269. DOI: 10.1016/B978-0-08-087780-8.00113-3
- [147] TOKTAM GHASSEMI AT ALL. Current Concepts in Scaffolding for Bone Tissue Engineering. *The Archives of Bone and Joint Surgery*. 2018, 6(2), 90-99. DOI: 10.22038/abjs.2018.26340.1713
- [148] ZENG, Jian-Hua, Shi-Wei LIU, Long XIONG et al. Scaffolds for the *repair of bone defects in clinical studies*: a systematic review. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 2018, 13(1). ISSN 1749-799X. DOI: 10.1186/s13018-018-0724-2
- [149] FATTAHIAN, Hamidreza, Kimia MANSOURI a Nikta MANSOURI. Biomaterials, substitutes, and tissue engineering in bone repair: current and future concepts. *Comparative Clinical Pathology*. 2019, 28(4), 879-891. ISSN 1618-5641. DOI: 10.1007/s00580-017-2507-2
- [150] GARCÍA-GARETA, Elena, Melanie COATHUP a Gordon BLUNN. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone*. 2015, 81, 112-121. ISSN 87563282. DOI: 10.1016/j.bone.2015.07.007
- [151] SHEIKH, Zeeshan, Shariq NAJEEB, Zohaib KHURSHID, Vivek VERMA, Haroon RASHID a Michael GLOGAUER. Biodegradable Materials for *Bone Repair and Tissue Engineering Applications*. *Materials*. 2015, 8(9), 5744-5794. ISSN 1996-1944. DOI: 10.3390/ma8095273
- [152] QU, Huawei, Hongya FU, Zhenyu HAN a Yang SUN. Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: a review. *RSC Advances*. 2019, 9(45), 26252-26262. ISSN 2046-2069. DOI: 10.1039/C9RA05214C
- [153] PUPPI, D., F. CHIPELLINI, A.M. PIRAS a E. CHIPELLINI. Polymeric materials for bone and cartilage *repair*. *Progress in Polymer Science*. 2010, 35(4), 403-440. ISSN 00796700. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2010.01.006

- [154] LU, Haiping, Yinghong ZHOU, Yaping MA, Lan XIAO, Wenjun JI, Yi ZHANG a Xin WANG. Current Application of *Beta-Tricalcium Phosphate* in Bone Repair and Its Mechanism to Regulate Osteogenesis. *Frontiers in Materials*. 2021, 8. ISSN 2296-8016. DOI: 10.3389/fmats.2021.698915
- [155] FILIP, Diana, Vasile-Adrian SURDU, Andrei PADURARU a Ecaterina ANDRONESCU. Current Development in Biomaterials—Hydroxyapatite and Bioglass for Applications in Biomedical Field: A Review. *Journal of Functional Biomaterials*. 2022, 13(4). ISSN 2079-4983. DOI: 10.3390/jfb13040248
- [156] SAMAVEDI, Satyavrata, Abby WHITTINGTON a Aaron GOLDSTEIN. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomaterialia*. 2013, 9(9), 8037-8045. ISSN 17427061. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.06.014
- [157] ABBASI, Naghmeh, Stephen HAMLET, Robert LOVE a Nam-Trung NGUYEN. Porous scaffolds for bone regeneration. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*. 2020, 5(1), 1-9. ISSN 24682179. DOI: 10.1016/j.jsamd.2020.01.007
- [158] RAEISDASTEH HOKMABAD, Vahideh, Soodabeh DAVARAN, Ali RAMAZANI a Roya SALEHI. Design and fabrication of porous *biodegradable scaffolds: a strategy for tissue engineering*. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2017, 28(16), 1797-1825. ISSN 0920-5063. DOI: 10.1080/09205063.2017.1354674
- [159] CHOCHOLATA, Petra, Vlastimil KULDA a Vaclav BABUSKA. Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration. *Materials*. 2019, 12(4). ISSN 1996-1944. DOI: 10.3390/ma12040568
- [160] NGO, Tuan, Alireza KASHANI, Gabriele IMBALZANO, Kate NGUYEN a David HUI. Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges. *Composites Part B: Engineering*. 2018, 143, 172-196. ISSN 13598368. DOI: 10.1016/j.compositesb.2018.02.012
- [161] ZHANG, Qiliang, Jian ZHOU, Peixuan ZHI, Leixin LIU, Chaozong LIU, Ao FANG a Qidong ZHANG. 3D printing method for bone tissue engineering scaffold. *Medicine in Novel Technology and Devices*. 2023, 17. ISSN 25900935. DOI: 10.1016/j.medntd.2022.100205
- [162] BOSE, Susmita, Sahar VAHABZADEH a Amit BANDYOPADHYAY. Bone tissue engineering using 3D printing. *Materials Today*. 2013, 16(12), 496-504. ISSN 13697021. DOI: 10.1016/j.mattod.2013.11.017
- [163] SHUNMUGASUNDARAM, M., Ahmed MAUGHAL a M. AJAY KUMAR. A review of bio-degradable materials for fused deposition modeling machine. *Materials Today: Proceedings*. 2020, 27, 1596-1600. ISSN 22147853. DOI: 10.1016/j.matpr.2020.03.267
- [164] MANOJ, Aluri a Ramesh PANDA. Biodegradable Filament for 3D Printing Process: A Review. *Engineered Science*. 2022, 18, 11-19. ISSN 2576988X. DOI: 10.30919/es8d616
- [165] RIGOTTI, Daniele a Alessandro PEGORETTI. Additive manufacturing with biodegradable polymers. *Biodegradable Polymers, Blends and Composites*. Amsterdam: Elsevier, 2022, s. 611-679. ISBN 9780128237915. DOI: 10.1016/B978-0-12-823791-5.00026-0
- [166] KOVALCIK, Adriana. Recent Advances in 3D Printing of Polyhydroxyalkanoates: A Review. *The EuroBiotech Journal*. 2021, 5(1), 48-55. ISSN 2564-615X. DOI: 10.2478/ebtj-2021-0008
- [167] DIETMAR W. HUTMACHER A KOL. Mechanical properties and cell cultural response of *polycaprolactone scaffolds designed* and fabricated via fused deposition modeling. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2001, 55(2), 203-216. DOI: 10.1002/1097-4636(200105)55:2<203::AID-JBM1007>3.0.CO;2-7
- [168] XIONG, Zhuo, Yongnian YAN, Renji ZHANG a Lei SUN. Fabrication of porous poly(l-lactic acid) scaffolds for bone tissue engineering *via precise extrusion*. *Scripta Materialia*. 2001, 45(7), 773-779. ISSN 13596462. DOI: 10.1016/S1359-6462(01)01094-6
- [169] ZEIN, Iwan, Dietmar HUTMACHER, Kim TAN a Swee TEOH. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2002, 23(4), 1169-1185. ISSN 01429612. DOI: 10.1016/S0142-9612(01)00232-0
- [170] RAI, B. The effect of rhBMP-2 on canine osteoblasts seeded onto 3D bioactive polycaprolactone scaffolds. *Biomaterials*. 2004, 25(24), 5499-5506. ISSN 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.01.007
- [171] TEO, Erin, Shin-Yeu ONG, Mark KHOON CHONG, Zhiyong ZHANG, Jia LU, Shabbir MOOCHHALA, Bow HO a Swee-Hin TEOH. Polycaprolactone-based fused deposition modeled mesh for delivery of antibacterial agents to infected wounds. *Biomaterials*. 2011, 32(1), 279-287. ISSN 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.08.089
- [172] DOMINGOS, M., F. CHIPELLINI, A. GLORIA, L. AMBROSIO, P. BARTOLO a E. CHIPELLINI. Effect of process

- parameters on the morphological and mechanical properties of 3D Bioextruded poly(ϵ -caprolactone) scaffolds. *Rapid Prototyping Journal*. 2012, 18(1), 56-67. ISSN 1355-2546. DOI: 10.1108/13552541211193502
- [173] PARK, SuA, GeunHyung KIM, Yong JEON, YoungHo KOH a WanDoo KIM. 3D polycaprolactone scaffolds with controlled pore structure using a *rapid* prototyping system. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2009, 20(1), 229-234. ISSN 0957-4530. DOI: 10.1007/s10856-008-3573-4
- [174] RAI, Bina, Jane LIN, Zophia LIM, Robert GULDBERG, Dietmar HUTMACHER a Simon COOL. Differences between *in vitro* viability and differentiation and *in vivo* bone-forming efficacy of *human mesenchymal* stem cells cultured on PCL–TCP scaffolds. *Biomaterials*. 2010, 31(31), 7960-7970. ISSN 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.001
- [175] KONOPNICKI, Sandra, Basel SHARAF, Cory RESNICK, Adam PATENAUE, Tracy POGAL-SUSSMAN, Kyung-Gyun HWANG, Harutsugi ABUKAWA a Maria TROULIS. Tissue-Engineered Bone With 3-Dimensionally Printed β -Tricalcium Phosphate and Polycaprolactone Scaffolds and Early Implantation: An *In Vivo* Pilot Study in a Porcine Mandible Model. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2015, 73(5), 10161-101611. ISSN 02782391. DOI: 10.1016/j.joms.2015.01.021
- [176] DÁVILA, J., M. FREITAS, P. INFORÇATTI NETO, Z. SILVEIRA, J. SILVA a M. D'ÁVILA. Fabrication of PCL/ β -TCP scaffolds by 3D mini-screw *extrusion printing*. *Journal of Applied Polymer Science*. 2016, 133(15), -. ISSN 00218995. DOI: 10.1002/app.43031
- [177] KORPELA, Jyrki, Anne KOKKARI, Harri KORHONEN, Minna MALIN, Timo NÄRHI a Jukka SEPPÄLÄ. Biodegradable and bioactive porous scaffold structures prepared using fused deposition modeling. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2013, 101(4), 610-619. ISSN 15524973. DOI: 10.1002/jbm.b.32863
- [178] SPARKS, David, Jay WIPER, Thomas LLOYD et al. Protocol for the BONE-RECON trial: *a single-arm* feasibility trial for critical sized lower limb BONE defect RECONstruction using the mPCL-TCP scaffold system with autologous vascularised corticoperiosteal tissue transfer. *BMJ Open*. 2023, 13(5). ISSN 2044-6055. DOI: 10.1136/bmjopen-2021-056440
- [179] Biomendex. Tampere: Biomendex, 2023. Dostupné z: <https://biomendex.com/>
- [180] CHEN, Xibao, Gang CHEN, Gang WANG, Peizhi ZHU a Chunxia GAO. Recent Progress on 3D-Printed Polylactic Acid and Its Applications in Bone Repair. *Advanced Engineering Materials*. 2020, 22(4). ISSN 1438-1656. DOI: 10.1002/adem.201901065
- [181] GREGOR, Aleš, Eva FILOVÁ, Martin NOVÁK et al. Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer. *Journal of Biological Engineering*. 2017, 11(1). ISSN 1754-1611. DOI: 10.1186/s13036-017-0074-3
- [182] WURM, Matthias, Tobias MÖST, Bastian BERGAUER, Dominik RIETZEL, Friedrich NEUKAM, Sandra CIFUENTES a Cornelius WILMOWSKY. In-vitro evaluation of Polylactic acid (PLA) manufactured by fused deposition modeling. *Journal of Biological Engineering*. 2017, 11(1). ISSN 1754-1611. DOI: 10.1186/s13036-017-0073-4
- [183] SCHOEN, Alan. INFINITE PERIODIC MINIMAL SURFACES WITHOUT SELF-INTERSECTIONS. Washington, D. C, 1970. NATIONAL AERONAUTICS AND SPACE ADMINISTRATION.
- [184] GERMAIN, Loïc, Carlos FUENTES, Aart VAN VUURE, Anne DES RIEUX a Christine DUPONT-GILLAIN. 3D-printed biodegradable gyroid scaffolds for tissue engineering applications. *Materials & Design*. 2018, 151, 113-122. ISSN 02641275. DOI: 10.1016/j.matdes.2018.04.037
- [185] ALIZADEH-OSGOUEI, Mona, Yuncang LI, Alireza VAHID, Arash ATAEE a Cuie WEN. High strength porous PLA gyroid scaffolds manufactured via fused deposition modeling for tissue-engineering applications. *Smart Materials in Medicine*. 2021, 2, 15-25. ISSN 25901834. DOI: 10.1016/j.smaim.2020.10.003
- [186] ERYILDIZ, Meltem. Fabrication of Drug-Loaded 3D-Printed Bone Scaffolds with Radial Gradient Porosity. *Journal of Materials Engineering and Performance*. 2023, 32(9), 4249-4257. ISSN 1059-9495. DOI: 10.1007/s11665-022-07490-0
- [187] XIONG, Z. Fabrication of porous scaffolds for bone tissue engineering via low-temperature deposition. *Scripta Materialia*. 2002, 46(11), 771-776. ISSN 13596462. DOI: 10.1016/S1359-6462(02)00071-4
- [188] DRUMMER, Dietmar, Sandra CIFUENTES-CUÉLLAR a Dominik RIETZEL. Suitability of PLA/TCP for fused deposition modeling. *Rapid Prototyping Journal*. 2012, 18(6), 500-507. ISSN 1355-2546. DOI: 10.1108/13552541211272045

- [189] ELHATTAB, Karim, Sarit BHADURI a Prabaha SIKDER. Influence of Fused Deposition Modelling Nozzle Temperature on the Rheology and Mechanical Properties of 3D Printed β -Tricalcium Phosphate (TCP)/Polylactic Acid (PLA) Composite. *Polymers*. 2022, **14**(6). ISSN 2073-4360. DOI: 10.3390/polym14061222
- [190] DISTLER, Thomas, Niklas FOURNIER, Alina GRÜNEWALD, Christian POLLEY, Hermann SEITZ, Rainer DETSCH a Aldo BOCCACCINI. Polymer-Bioactive Glass Composite Filaments for 3D Scaffold Manufacturing by Fused Deposition Modeling: Fabrication and Characterization. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020, **8**. ISSN 2296-4185. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00552
- [191] MATSUO, Akira, Hiroshige CHIBA, Hidetoshi TAKAHASHI, Jun TOYODA a Harutsugi ABUKAWA. Clinical application of a custom-made bioresorbable raw particulate hydroxyapatite/poly-l-lactide mesh tray for mandibular reconstruction. *Odontology*. 2010, **98**(1), 85-88. ISSN 1618-1247. DOI: 10.1007/s10266-009-0111-x
- [192] ESPOSITO CORCIONE, Carola, Francesca GERVASO, Francesca SCALERA, Francesco MONTAGNA, Alessandro SANNINO a Alfonso MAFFEZZOLI. The feasibility of printing polylactic acid-nanohydroxyapatite composites using a low-cost *fused deposition modeling* 3D printer. *Journal of Applied Polymer Science*. 2017, **134**(13). ISSN 00218995. DOI: 10.1002/app.44656
- [193] SENATOV, F.S., K.V. NIAZA, A.A. STEPASHKIN a S.D. KALOSHKIN. Low-cycle fatigue behavior of 3d-printed PLA-based porous scaffolds. *Composites Part B: Engineering*. 2016, **97**, 193-200. ISSN 13598368. DOI: 10.1016/j.compositesb.2016.04.067
- [194] ESMAEILI, Saeid, Hossein AKBARI AGHDAM, Mehdi MOTIFIFARD, Saeed SABER-SAMANDARI, Amir MONTAZERAN, Mohammad BIGONAH, Erfan SHEIKHBAHAELI a Amirsalar KHANDAN. A porous polymeric-hydroxyapatite scaffold used for femur fractures *treatment: fabrication, analysis, and simulation*. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*. 2020, **30**(1), 123-131. ISSN 1633-8065. DOI: 10.1007/s00590-019-02530-3
- [195] DUBINENKO, Gleb, *Aleksey ZINOVIEV, Evgeny BOLBASOV, Anna KOZELSKAYA, Evgeniy SHESTERIKOV, Victor NOVIKOV a Sergei TVERDOKHLEBOV*. Highly filled poly(l-lactic acid)/hydroxyapatite composite for 3D printing of personalized bone *tissue engineering scaffolds*. *Journal of Applied Polymer Science*. 2021, **138**(2). ISSN 0021-8995. DOI: 10.1002/app.49662
- [196] ESPOSITO CORCIONE, Carola, Francesca SCALERA, Francesca GERVASO, Francesco MONTAGNA, Alessandro SANNINO a Alfonso MAFFEZZOLI. One-step solvent-free process for the fabrication of *high loaded PLA/HA* composite filament for 3D printing. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2018, **134**(1), 575-582. ISSN 1388-6150. DOI: 10.1007/s10973-018-7155-5
- [197] DUAN, Bin, Wai CHEUNG a Min WANG. Optimized fabrication of Ca-P/PHBV nanocomposite scaffolds via selective laser sintering for bone tissue engineering. *Biofabrication*. 2011, **3**(1). ISSN 1758-5082. DOI: 10.1088/1758-5082/3/1/015001
- [198] PEREIRA, Tatiana, Marcelo OLIVEIRA, Izaque MAIA, Jorge SILVA, Marysilvia COSTA a *Rossana THIRÉ*. *3D Printing of Poly(3-hydroxybutyrate) Porous Structures Using Selective Laser Sintering*. *Macromolecular Symposia*. 2012, **319**(1), 64-73. ISSN 10221360. DOI: 10.1002/masy.201100237
- [199] PEREIRA, T.F., M.A.C. SILVA, M.F. OLIVEIRA, I.A. MAIA, J.V.L. SILVA, M.F. COSTA a R.M.S.M. *THIRÉ*. *Effect of process parameters on the properties of selective laser sintered Poly(3-hydroxybutyrate) scaffolds for bone tissue engineering*. *Virtual and Physical Prototyping*. 2012, **7**(4), 275-285. ISSN 1745-2759. DOI: 10.1080/17452759.2012.738551
- [200] SASKA, Sybele, Luana PIRES, Mariana COMINOTTE et al. Three-dimensional printing and *in vitro* evaluation of poly(3-hydroxybutyrate) scaffolds functionalized with osteogenic growth peptide for tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*. 2018, **89**, 265-273. ISSN 09284931. DOI: 10.1016/j.msec.2018.04.016
- [201] DIERMANN, Sven, Mingyuan LU, Yitian ZHAO, Luigi-Jules VANDI, Matthew DARGUSCH a Han HUANG. Synthesis, microstructure, and mechanical behaviour of a unique porous PHBV scaffold manufactured using selective laser sintering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2018, **84**, 151-160. ISSN 17516161. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2018.05.007
- [202] DIERMANN, Sven, Mingyuan LU, Grant EDWARDS, Matthew DARGUSCH a Han HUANG. *In vitro* degradation of a unique porous PHBV scaffold manufactured using selective laser sintering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2019, **107**(1), 154-162. ISSN 15493296. DOI: 10.1002/jbm.a.36543

- [203] DIERMANN, Sven, Mingyuan LU, Matthew DARGUSCH, Lisbeth GRØNDAHL a Han HUANG. Akermanite reinforced PHBV scaffolds manufactured using selective laser sintering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2019, 107(8), 2596-2610. ISSN 1552-4973. DOI: 10.1002/jbm.b.34349
- [204] ZHAO, Shichang, Min ZHU, Jianhua ZHANG, Yadong ZHANG, Zhongtang LIU, Yufang ZHU a Changqing ZHANG. Three dimensionally printed mesoporous bioactive glass and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) composite scaffolds for bone regeneration. *Journal of Materials Chemistry B*. 2014, 2(36). ISSN 2050-750X. DOI: 10.1039/C4TB00838C
- [205] WU, C. a H. LIAO. Interface design of environmentally friendly carbon nanotube-filled polyester composites: Fabrication, characterisation, functionality and application. *Express Polymer Letters*. 2017, 11(3), 187-198. ISSN 1788618X. DOI: 10.3144/expresspolymlett.2017.20
- [206] KOSORN, Wasana, Morakot SAKULSUMBAT, Paweena UPPANAN, Pakkanun KAEWKONG, Surapol CHANTAWEROD, Jaturong JITSAARD, Kriskrai SITTHISERIPRATIP a Wanida JANVIKUL. PCL/PHBV blended three dimensional scaffolds fabricated by fused deposition modeling and responses of chondrocytes to the scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2017, 105(5), 1141-1150. ISSN 15524973. DOI: 10.1002/jbm.b.33658
- [207] FINDRIK BALOGOVIĆ, Alena, Radovan HUDÁK, Teodor TÓTH, Marek SCHNITZER, Jozef FERANC, Dušan BAKOŠ a Jozef ŽIVČÁK. Determination of geometrical and viscoelastic properties of PLA/PHB samples made by additive manufacturing for urethral substitution. *Journal of Biotechnology*. 2018, 284, 123-130. ISSN 01681656. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2018.08.019
- [208] ECKER, Josef, Ivana BURZIC, Andreas HAIDER, Sabine HILD a Harald RENNHOFFER. "Improving the impact strength of PLA and its blends with PHA in fused layer modelling ". *Polymer Testing*. 2019, 78. ISSN 01429418. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2019.105929
- [209] RYDZ, Joanna, Jakub WŁODARCZYK, Jennifer GONZALEZ AUSEJO et al. Three-Dimensional Printed PLA and PLA/PHA Dumbbell-Shaped Specimens: Material Defects and Their Impact on Degradation Behavior. *Materials*. 2020, 13(8). ISSN 1996-1944. DOI: 10.3390/ma13082005
- [210] GONZALEZ AUSEJO, Jennifer, Joanna RYDZ, Marta MUSIOŁ et al. A comparative study of three-dimensional printing directions: The degradation and toxicological profile of a PLA/PHA blend. *Polymer Degradation and Stability*. 2018, 152, 191-207. ISSN 01413910. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2018.04.024
- [211] KOVALCIK, Adriana, Leire SANGRONIZ, Michal KALINA, Katerina SKOPALOVA, Petr HUMPOLÍČEK, Maria OMASTOVA, Norbert MUNDIGLER a Alejandro MÜLLER. Properties of scaffolds prepared by fused deposition modeling of poly(hydroxyalkanoates). *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020, 161, 364-376. ISSN 01418130. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.022
- [212] GIUBILINI, Alberto, Gilberto SIQUEIRA, Frank CLEMENS, Corrado SCIANCALEPORE, Massimo MESSORI, Gustav NYSTRÖM a Federica BONDIOLI. 3D-Printing Nanocellulose-Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) Biodegradable Composites by Fused Deposition Modeling. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2020, 8(27), 10292-10302. ISSN 2168-0485. DOI: 10.1021/acssuschemeng.0c03385
- [213] ARÁOZ, Beatriz, Emine KARAKAYA, Ana GONZÁLEZ WUSENER, Rainer DETSCH, Juan BIZZOTTO, Geraldine GUERON, Aldo BOCCACCINI a Élide HERMIDA. 3D printed poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)—45S5 bioactive glass composite resorbable scaffolds suitable for bone regeneration. *Journal of Materials Research*. 2021, 36(19), 4000-4012. ISSN 0884-2914. DOI: 10.1557/s43578-021-00272-9
- [214] FINDRIK BALOGOVIĆ, Alena, Marianna TREBUŇOVÁ, Gabriela IŽARÍKOVÁ et al. *In Vitro* Degradation of Specimens Produced from PLA/PHB by Additive Manufacturing in Simulated Conditions. *Polymers*. 2021, 13(10). ISSN 2073-4360. DOI: 10.3390/polym13101542
- [215] VOLPINI, Valentina, Alberto GIUBILINI, Lorenzo CORSI, Andrea NOBILI a Federica BONDIOLI. Characterization of biocompatible scaffolds manufactured by fused filament fabrication of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Royal Society Open Science*. 2022, 9(4). ISSN 2054-5703. DOI: 10.1098/rsos.211485
- [216] KOHAN, Miroslav, Samuel LANCOŠ, Marek SCHNITZER, Jozef ŽIVČÁK a Radovan HUDÁK. Analysis of PLA/PHB Biopolymer Material with Admixture of Hydroxyapatite and Tricalcium Phosphate for Clinical Use. *Polymers*. 2022, 14(24). ISSN 2073-4360. DOI: 10.3390/polym14245357
- [217] YE, Xiangling, Yongqiang ZHANG, Tao LIU et al. Beta-tricalcium phosphate enhanced mechanical and

- biological properties of 3D-printed polyhydroxyalkanoates scaffold for bone *tissue engineering*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022, 209, 1553-1561. ISSN 01418130. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.04.056
- [218] DONG, Xue, Ishani PREMARATNE, Kemal SARIIBRAHIMOGLU et al. 3D-printed poly-4-hydroxybutyrate bioabsorbable scaffolds for nipple reconstruction. *Acta Biomaterialia*. 2022, 143, 333-343. ISSN 17427061. DOI: 10.1016/j.actbio.2022.02.040
- [219] GIELISCH, Matthias, Diana HEIMES, Daniel G. E. THIEM, C. BOESING, M. KRUMPHOLTZ, B. AL-NAWAS a Peer W. KÄMMERER. Steam-sterilized and degradable fused filament fabrication-printed polylactide/polyhydroxyalkanoate surgical guides for dental implants: *Are they accurate enough for static navigation?*. *International Journal of Bioprinting*. 2022, 9(2). ISSN 2424-8002. DOI: 10.18063/ijb.v9i2.655
- [220] CHEN, Guo-Qiang a Qiong WU. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*. 2005, 26(33), 6565-6578. ISSN 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.036
- [221] LIM, Janice, Mingliang YOU, Jian LI a Zibiao LI. Emerging bone tissue engineering via Polyhydroxyalkanoate (PHA)-based scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*. 2017, 79, 917-929. ISSN 09284931. DOI: 10.1016/j.msec.2017.05.132
- [222] BUTT, Fatima, Nawshad MUHAMMAD, Almas HAMID, Muhammad MONIRUZZAMAN a Faiza SHARIF. Recent progress in the utilization of biosynthesized polyhydroxyalkanoates for biomedical applications – Review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, 120, 1294-1305. ISSN 01418130. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.002
- [223] GREGORY, David, Caroline TAYLOR, Annabelle FRICKER, Emmanuel ASARE, Santosh TETALI, John HAYCOCK a Ipsita ROY. Polyhydroxyalkanoates and their advances for biomedical applications. *Trends in Molecular Medicine*. 2022, 28(4), 331-342. ISSN 14714914. DOI: 10.1016/j.molmed.2022.01.007
- [224] WANG, Xiaojian, Shanqing XU, Shiwei ZHOU et al. Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: A review. *Biomaterials*. 2016, 83, 127-141. ISSN 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.012
- [225] NEDĚLA, Oldřich, Petr SLEPIČKA a Václav ŠVORČÍK. Surface Modification of Polymer Substrates for Biomedical Applications. *Materials*. 2017, 10(10). ISSN 1996-1944. DOI: 10.3390/ma10101115
- [226] CAI, Shuxiang, Chuanxiang WU, Wenguang YANG, Wenfeng LIANG, Haibo YU a Lianqing LIU. Recent advance in surface modification for regulating cell adhesion and behaviors. *Nanotechnology Reviews*. 2020, 9(1), 971-989. ISSN 2191-9097. DOI: 10.1515/ntrev-2020-0076
- [227] WEI, Jianhua, Toshio IGARASHI, Naoto OKUMORI, Takayasu IGARASHI, Takashi MAETANI, Baolin LIU a Masao YOSHINARI. Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial *attachment of osteoblasts*. *Biomedical Materials*. 2009, 4(4). ISSN 1748-6041. DOI: 10.1088/1748-6041/4/4/045002
- [228] XU, Li-Chong a Christopher SIEDLECKI. Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials*. 2007, 28(22), 3273-3283. ISSN 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.03.032
- [229] LIM, Jung, Xiaomei LIU, Erwin VOGLER a Henry DONAHUE. Systematic variation in osteoblast adhesion and phenotype with substratum surface characteristics. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2004, 68(3), 504-512. ISSN 0021-9304. DOI: 10.1002/jbm.a.20087
- [230] LIM, Jung, Michael SHAUGHNESSY, Zhiyi ZHOU, Hyeran NOH, Erwin VOGLER a Henry DONAHUE. Surface energy *effects* on osteoblast spatial growth and mineralization. *Biomaterials*. 2008, 29(12), 1776-1784. ISSN 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.12.026
- [231] SHISHATSKAYA, E., I. KHLUSOV a T. VOLOVA. A hybrid PHB–hydroxyapatite composite for biomedical application: production, *in vitro* and *in vivo* investigation. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2012, 17(5), 481-498. ISSN 0920-5063. DOI: 10.1163/156856206776986242
- [232] SMITH, R. a R. PITROLA. Influence of casting substrate on the surface free energy of various polyesters. *Journal of Applied Polymer Science*. 2002, 83(5), 997-1008. ISSN 0021-8995. DOI: 10.1002/app.2280
- [233] LINS, Luanda, Valeria BUGATTI, Sébastien LIVI a Giuliana GORRASI. Ionic Liquid as Surfactant Agent of Hydroxycalcite: Influence on the *Final Properties of Polycaprolactone Matrix*. *Polymers*. 2018, 10(1). ISSN 2073-4360. DOI: 10.3390/polym10010044
- [234] VAN DER VALK, P., A. VAN PELT, H. BUSSCHER, H. DE JONG, Ch. WILDEVUUR a J. ARENDS. Interaction of

- fibroblasts and *polymer surfaces: relationship between* surface free energy and fibroblast spreading. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1983, **17**(5), 807-817. ISSN 0021-9304. DOI: 10.1002/jbm.820170508
- [235] OWENS, D. a R. WENDT. Estimation of the surface free energy of polymers. *Journal of Applied Polymer Science*. 1969, **13**(8), 1741-1747. ISSN 00218995. DOI: 10.1002/app.1969.070130815
- [236] MARCHISIO, Marco, Maristella DI CARMINE, Rita PAGONE, Adriano PIATTELLI a Sebastiano MISCIA. Implant surface roughness influences osteoclast proliferation and differentiation. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2005, **75**(2), 251-256. ISSN 1552-4973. DOI: 10.1002/jbm.b.30287
- [237] MUSTAFA, Kamal, Joanna WROBLEWSKI, Blanca LOPEZ, Ann WENNERBERG, Kjell HULTENBY a Kristina ARVIDSON. Determining *optimal* surface roughness of TiO₂ blasted titanium implant material for attachment, *proliferation* and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. *Clinical Oral Implants Research*. 2001, **12**(5), 515-525. ISSN 09057161. DOI: 10.1034/j.1600-0501.2001.120513.x
- [238] DELIGIANNI, Despina, Nikoleta KATSALA, Petros KOUTSOUKOS a Yiannis MISSIRLIS. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment *strength*. *Biomaterials*. 2000, **22**(1), 87-96. ISSN 01429612. DOI: 10.1016/S0142-9612(00)00174-5
- [239] KUNZLER, Tobias, Tanja DROBEK, Martin SCHULER a Nicholas SPENCER. Systematic study of osteoblast and fibroblast response to roughness by means of surface-morphology gradients. *Biomaterials*. 2007, **28**(13), 2175-2182. ISSN 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.01.019
- [240] WANG, Mian, Pelagie FAVI, Xiaoqian CHENG, Negar GOLSHAN, Katherine ZIEMER, Michael KEIDAR a Thomas WEBSTER. Cold *atmospheric* plasma (CAP) surface nanomodified 3D printed polylactic acid (PLA) scaffolds for bone regeneration. *Acta Biomaterialia*. 2016, **46**, 256-265. ISSN 17427061. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.09.030
- [241] JAIDEV, L.R. a Kaushik CHATTERJEE. Surface functionalization of 3D printed polymer scaffolds to augment stem cell response. *Materials & Design*. 2019, **161**, 44-54. ISSN 02641275. DOI: 10.1016/j.matdes.2018.11.018
- [242] FENG, Kuan-Che, Adriana PINKAS-SARAFOVA, Vincent RICOTTA et al. The influence of roughness on stem cell differentiation using 3D printed polylactic acid scaffolds. *Soft Matter*. 2018, **14**(48), 9838-9846. ISSN 1744-683X. DOI: 10.1039/C8SM01797B
- [243] GENTLEMAN, Molly a Eileen GENTLEMAN. The role of surface free energy in osteoblast–biomaterial interactions. *International Materials Reviews*. 2014, **59**(8), 417-429. ISSN 0950-6608. DOI: 10.1179/1743280414Y.0000000038
- [244] HABA, Yvonne, Ralf SKRIPITZ, Tobias LINDNER, Martin KÖCKERLING, Andreas FRITSCHKE, Wolfram MITTELMEIER a Rainer BADER. Bone *Mineral Densities and Mechanical Properties* of Retrieved Femoral Bone Samples in relation to Bone Mineral Densities Measured in the Respective Patients. *The Scientific World Journal*. 2012, **2012**, 1-7. ISSN 1537-744X. DOI: 10.1100/2012/242403
- [245] ROHLMANN, Antonius, Hans ZILCH, Georg BERGMANN a Reinhard KOLBEL. Material properties of femoral cancellous bone in axial loading. *Archives of Orthopaedic and Traumatic Surgery*. 1980, **97**(2), 95-102. ISSN 0344-8444. DOI: 10.1007/BF00450930
- [246] UCHIYAMA, T., T. TANIZAWA, H. MURAMATSU, N. ENDO, H.E. TAKAHASHI a T. HARA. Three-dimensional microstructural analysis of human trabecular bone in relation to its mechanical properties. *Bone*. 1999, **25**(4), 487-491. ISSN 87563282. DOI: 10.1016/S8756-3282(99)00188-X
- [247] KOKUBO, Tadashi a Hiroaki TAKADAMA. How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity?. *Biomaterials*. 2006, **27**(15), 2907-2915. ISSN 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.017
- [248] ELSAWY, Moataz, Ki-Hyun KIM, Jae-Woo PARK a Akash DEEP. Hydrolytic degradation of polylactic acid (PLA) and its composites. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2017, **79**, 1346-1352. ISSN 13640321. DOI: 10.1016/j.rser.2017.05.143
- [249] SKRIVANEK, Josef, Pavel HOLEC, Ondrej BATKA, Martin BILEK a Pavel POKORNY. Optimization of the Spinneret Rotation Speed and Airflow Parameters for the Nozzleless Forc spinning of a Polymer Solution. *Polymers*. 2022, **14**(5). ISSN 2073-4360. DOI: 10.3390/polym14051042
- [250] CHANG, Wei-Min, Cheng-Chien WANG a Chuh-Yung CHEN. The combination of electrospinning and

- forcespinning: Effects on a viscoelastic jet and a single nanofiber. *Chemical Engineering Journal*. 2014, 244, 540-551. ISSN 13858947. DOI: 10.1016/j.cej.2014.02.001
- [251] DOS SANTOS, Danilo, Daniel CORREA, Eliton MEDEIROS, Juliano OLIVEIRA a Luiz MATTOSO. Advances in Functional Polymer Nanofibers: From Spinning Fabrication Techniques to Recent Biomedical Applications. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2020, 12(41), 45673-45701. ISSN 1944-8244. DOI: 10.1021/acsami.0c12410
- [252] DRABEK, Jiri a Martin ZATLOUKAL. Meltblown technology for production of polymeric microfibers/nanofibers: A review. *Physics of Fluids*. 2019, 31(9). ISSN 1070-6631. DOI: 10.1063/1.5116336
- [253] PULINGAM, Thiruchelvi, Jimmy APPATURI, Thaigarajan PARUMASIVAM, Azura AHMAD a Kumar SUDESH. Biomedical Applications of Polyhydroxyalkanoate in Tissue Engineering. *Polymers*. 2022, 14(11). ISSN 2073-4360. DOI: 10.3390/polym14112141
- [254] LOORDHUSWAMY, Amalorpava, Venkat KRISHNASWAMY, Purna KORRAPATI, Senthilram THINAKARAN a Giri RENGASWAMI. Fabrication of highly *aligned fibrous scaffolds* for tissue regeneration by centrifugal spinning technology. *Materials Science and Engineering: C*. 2014, 42, 799-807. ISSN 09284931. DOI: 10.1016/j.msec.2014.06.011
- [255] BADROSSAMAY, Mohammad, Kartik BALACHANDRAN, Andrew CAPULLI et al. Engineering hybrid polymer-protein super-aligned nanofibers via rotary jet spinning. *Biomaterials*. 2014, 35(10), 3188-3197. ISSN 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.12.072
- [256] PHA biosynthesis, recovery, and application. Delft, 2022. Disertační práce. Delft University of Technology.
- [257] VOELKER, H., H. ZETTLER, W. FATH a K. BERBNER. PRODUCTION OF FIBERS BY CENTRIFUGAL SPINNING. US. 5,494,616.
- [258] STOJANOVSKA, Elena, Emine CANBAY, Esra PAMPAL et al. A review on non-electro nanofibre spinning techniques. *RSC Advances*. 2016, 6(87), 83783-83801. ISSN 2046-2069. DOI: 10.1039/C6RA16986D
- [259] ZHANG, Xiangwu a Yao LU. Centrifugal Spinning: An Alternative Approach to Fabricate Nanofibers at High Speed and Low Cost. *Polymer Reviews*. 2014, 54(4), 677-701. ISSN 1558-3724. DOI: 10.1080/15583724.2014.935858
- [260] ZHANG, Zhiming, Jun SUN, H.L. YUAN, R.K. AGARWAL, P. TANDON a E.X. WANG. Research on the development of the centrifugal spinning. *MATEC Web of Conferences*. 2017, 95. ISSN 2261-236X. DOI: 10.1051/mateconf/20179507003
- [261] MERCHIERI, Jorgo, Carina MARTÍNEZ NARVÁEZ, Cheryl SLYKAS, Naveen REDDY a Vivek SHARMA. Evaporation and Rheology Chart the Processability Map for Centrifugal Force *Spinning*. *Macromolecules*. 2021, 54(23), 11061-11073. ISSN 0024-9297. DOI: 10.1021/acs.macromol.1c01799
- [262] LU, Yao, Ying LI, Shu ZHANG, Guanjie XU, Kun FU, Hun LEE a Xiangwu ZHANG. Parameter study and characterization for polyacrylonitrile nanofibers fabricated via centrifugal *spinning process*. *European Polymer Journal*. 2013, 49(12), 3834-3845. ISSN 00143057. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2013.09.017
- [263] DIVVELA, Mounica, An-Cheng RUO, Yevgen ZHMAYEV a Yong JOO. Discretized modeling for centrifugal spinning of *viscoelastic liquids*. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*. 2017, 247, 62-77. ISSN 03770257. DOI: 10.1016/j.jnnfm.2017.06.005
- [264] ZHMAYEV, Yevgen, Mounica DIVVELA, An-Cheng RUO, Tao HUANG a Yong JOO. The jetting behavior of viscoelastic Boger fluids during centrifugal spinning. *Physics of Fluids*. 2015, 27(12). ISSN 1070-6631. DOI: 10.1063/1.4936391
- [265] NOROOZI, S., W. ARNE, R.G. LARSON a S.M. TAGHAVI. Centrifugal spinning of viscoelastic nanofibres. *Journal of Fluid Mechanics*. 2022, 934. ISSN 0022-1120. DOI: 10.1017/jfm.2021.1135
- [266] NOROOZI, S., H. HASSANZADEH, W. ARNE, R.G. LARSON a S.M. TAGHAVI. Centrifugal spinning of polymeric solutions: Experiments and modelling. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*. 2023, 313. ISSN 03770257. DOI: 10.1016/j.jnnfm.2022.104971
- [267] RIAHI, Daniel N. On Strain Hardening of Nonlinear Polymeric Jets During Forcespinning. *International Journal of Applied and Computational Mathematics*. 2018, 4(1). ISSN 2349-5103. DOI: 10.1007/s40819-017-0448-8
- [268] XU, Huaizhong, Shinichi YAGI, Sherry ASHOUR, Lei DU, Md HOQUE a Lin TAN. A Review on Current

- Nanofiber Technologies: *Electrospinning, Centrifugal Spinning, and Electro-Centrifugal Spinning. Macromolecular Materials and Engineering*. 2023, 308(3). ISSN 1438-7492. DOI: 10.1002/mame.202200502
- [269] HLAVATÁ, J., T. SUCHÝ, M. ŠUPOVÁ, M. POKORNÝ a E. KOŠTÁKOVÁ. A comparison of the centrifugal **force** spinning and electrospinning of collagen under different conditions: international conference, NANOCON. Brno: Tanger, 2018. ISBN 9788087294710.
- [270] HOU, Teng, Xianglong LI, Yishen LU a Bin YANG. Highly porous fibers prepared by centrifugal spinning. *Materials & Design*. 2017, 114, 303-311. ISSN 02641275. DOI: 10.1016/j.matdes.2016.11.019
- [271] MACHADO-PAULA, M.M., M.A.F. CORAT, M. LANCELLOTTI et al. A comparison between electrospinning and rotary-jet spinning to produce PCL fibers with low bacteria colonization. *Materials Science and Engineering: C*. 2020, 111. ISSN 09284931. DOI: 10.1016/j.msec.2020.110706
- [272] RIHOVA, Martina, Ahmet INCE, Veronika CICMANCOVA, Ludek HROMADKO, Klara CASTKOVA, David PAVLINAK, Lucy VOJTOVA a Jan MACAK. Water-born 3D nanofiber mats *using* cost-effective centrifugal spinning: comparison with electrospinning process. *Journal of Applied Polymer Science*. 2021, 138(5). ISSN 0021-8995. DOI: 10.1002/app.49975
- [273] SHAH, Mudasir, Bilal PIRZADA, Gareth PRICE, Abel SHIBIRU a Ahsanulhaq QURASHI. Applications of nanotechnology in smart textile industry: A critical review. *Journal of Advanced Research*. 2022, 38, 55-75. ISSN 20901232. DOI: 10.1016/j.jare.2022.01.008
- [274] SEBE, István, Barnabás SZABÓ, Zsombor NAGY, Dóra SZABÓ, László ZSIDAI, Béla KOCSIS a Romána ZELKÓ. *Polymer structure and antimicrobial activity of polyvinylpyrrolidone-based iodine nanofibers prepared with high-speed rotary spinning technique*. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013, 458(1), 99-103. ISSN 03785173. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.10.011
- [275] GUNGOR, Melike, Merve SAGIRLI, Mehmet CALISIR, Sule SELCUK a Ali KILIC. Developing centrifugal spun thermally cross-linked gelatin based fibrous biomats for *antibacterial wound* dressing applications. *Polymer Engineering & Science*. 2021, 61(9), 2311-2322. ISSN 0032-3888. DOI: 10.1002/pen.25759
- [276] RZAYEV, Zakir, Demet ERDÖNMEZ, Kübra ERKAN, Murat ŞİMŞEK a Ulviye BUNYATOVA. Functional Copolymer/Organo-MMT Nanoarchitectures. XXII. *Fabrication and Characterization of Antifungal and Antibacterial Poly (Vinyl Alcohol-co-Vinyl Acetate/ODA-MMT/AgNPs Nanofibers and Nanocoatings by e-Spinning and c-Spinning Methods*. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2014, 64(5), 267-278. ISSN 0091-4037. DOI: 10.1080/00914037.2014.936599
- [277] MARTÍN-ALONSO, María, Valentina SALARIS, Adrián LEONÉS et al. Centrifugal Force-Spinning to Obtain Multifunctional Fibers of PLA Reinforced with Functionalized Silver Nanoparticles. *Polymers*. 2023, 15(5). ISSN 2073-4360. DOI: 10.3390/polym15051240
- [278] XU, Fenghua, Baicheng WENG, Luis MATERON, Anxiu KUANG, Jorge TRUJILLO a Karen LOZANO. *Fabrication of cellulose fine fiber based membranes embedded with silver nanoparticles via Forcespinning*. *Journal of Polymer Engineering*. 2016, 36(3), 269-278. ISSN 2191-0340. DOI: 10.1515/polyeng-2015-0092
- [279] HASAN, Md, Ramiro GONZALEZ, Ari MUNOZ, Luis MATERON, Jason PARSONS a Mataz ALCOUTLABI. Forcespun polyvinylpyrrolidone/copper and polyethylene oxide/copper composite fibers and their use as antibacterial agents. *Journal of Applied Polymer Science*. 2022, 139(11). ISSN 0021-8995. DOI: 10.1002/app.51773
- [280] PADILLA-GAINZA, Victoria, Heriberto RODRÍGUEZ-TOBÍAS, Graciela MORALES et al. Development of zinc oxide/hydroxyapatite/poly(*D,L-lactic acid*) fibrous scaffold for tissue engineering applications. *Biomaterials Advances*. 2022, 133. ISSN 27729508. DOI: 10.1016/j.msec.2021.112594
- [281] LI, Chen, Yu HUANG, Renhao LI et al. Fabrication and properties of carboxymethyl chitosan/polyethylene oxide composite *nonwoven mats* by centrifugal spinning. *Carbohydrate Polymers*. 2021, 251. ISSN 01448617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.117037
- [282] PRIYANTO, Aan, Dian HAPIDIN a Khairurrijal KHAIRURRIJAL. Potential Loading of Virgin Coconut Oil into Centrifugally-Spun Nanofibers for Biomedical Applications. *ChemBioEng Reviews*. 2022, 9(4), 393-408. ISSN 2196-9744. DOI: 10.1002/cben.202100043
- [283] XU, Fenghua, Baicheng WENG, Robert GILKERSON, Luis MATERON a Karen LOZANO. Development of tannic acid/chitosan/pullulan composite nanofibers from aqueous solution for potential applications as wound dressing. *Carbohydrate Polymers*. 2015, 115, 16-24. ISSN 01448617. DOI:

10.1016/j.carbpol.2014.08.081

- [284] XU, Fenghua, Baicheng WENG, Luis MATERON, Robert GILKERSON a Karen LOZANO. Large-scale production of a ternary composite nanofiber membrane for wound dressing *applications*. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 2014, 29(6), 646-660. ISSN 0883-9115. DOI: 10.1177/0883911514556959
- [285] ZAHRA, Fathiyah, Ahmad FAUZI, Muhammad MIFTAHUL MUNIR a Khairurrijal KHAIRURRIJAL. Synthesis and Characterization of Rotary Forcespun Polyvinylpyrrolidone Fibers Loaded by Garlic (*Allium sativum*) Extract. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2019, 515. ISSN 1757-899X. DOI: 10.1088/1757-899X/515/1/012005
- [286] SALUSSOGLIA, Ana, Clovis DE SOUZA, Eduardo TANABE a Mônica LOPES AGUIAR. Evaluation of filter media covered with spun fibres and containing thyme essential oil with antimicrobial properties. *Environmental Technology*. 2022, 43(2), 301-310. ISSN 0959-3330. DOI: 10.1080/09593330.2020.1786167
- [287] CREMAR, L., J. GUTIERREZ, J. MARTINEZ, L. MATERON, R. GILKERSON, F. XU a K. LOZANO. Development of antimicrobial chitosan based nanofiber dressings for wound healing applications. *Nanomedicine Journal*. 2018, 5(1), 6-14. DOI: 10.22038/nmj.2018.05.002
- [288] XIA, Lei, Linlin LU, Yuxia LIANG a Bowen CHENG. Fabrication of centrifugally spun prepared poly(lactic acid)/gelatin/ciprofloxacin nanofibers for *antimicrobial* wound dressing. *RSC Advances*. 2019, 9(61), 35328-35335. ISSN 2046-2069. DOI: 10.1039/C9RA07826F
- [289] FOSTER, L., S. DAVIES a B. TIGHE. Centrifugally-spun polyhydroxybutyrate fibres: Effect of process solvent on structure, morphology and cell response. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2012, 12(3), 317-336. ISSN 0920-5063. DOI: 10.1163/156856201750180843
- [290] FOSTER, L.J.R. a B.J. TIGHE. Centrifugally spun polyhydroxybutyrate fibres: accelerated hydrolytic degradation studies. *Polymer Degradation and Stability*. 2005, 87(1), 1-10. ISSN 01413910. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2003.11.012
- [291] SAW, Constance, Paul HENG a Malini OLIVO. Potentiation of the Photodynamic Action of Hypericin. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*. 2008, 27(1), 23-33. ISSN 0731-8898. DOI: 10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.v27.i1.30
- [292] BERAN, Milos, Ales HORNA, Viktor VORISEK, Eliska BERKOVA, Radka KORINKOVA, Vojtech TROUSIL a Marketa HRUBANOVA. Antimicrobial polyhydroxybutyrate submicron fiber mat loaded *with extract* of *Hypericum perforatum*. *Journal of Plant Biotechnology*. 2022, 49(3), 257-270. ISSN 1229-2818. DOI: 10.5010/JPB.2022.49.3.257
- [293] AKIA, Mandana, Nataly SALINAS, Cristobal RODRIGUEZ, Robert GILKERSON, Luis MATERON a Karen LOZANO. Texas Sour Orange Juice Used in *Scaffolds for* Tissue Engineering. *Membranes*. 2018, 8(3). ISSN 2077-0375. DOI: 10.3390/membranes8030038
- [294] HERATH, H., M. CHAMIKARA, D. DISSANAYAKE, M. DISSANAYAKE, M. ISHAN, S. RAJAPAKSE a S. SOORIYAPATHIRANA. A Comparative Assessment of the Antibacterial Activity in Fruit *Juice of* Sri Lankan Sweet Orange Cultivars vis a vis Sour Orange. *Journal of Agricultural Sciences – Sri Lanka*. 2016, 11(1), 13-23. ISSN 2386-1363. DOI: 10.4038/jas.v11i1.8076
- [295] AKIA, Mandana, Cristobal RODRIGUEZ, Luis MATERON, Robert GILKERSON a Karen LOZANO. Antibacterial activity of polymeric nanofiber membranes impregnated with Texas sour orange juice. *European Polymer Journal*. 2019, 115, 1-5. ISSN 00143057. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2019.03.019
- [296] SLEPIČKA, P., Z. MALÁ, S. RIMPELOVÁ a V. ŠVORČÍK. Antibacterial properties of modified biodegradable PHB non-woven fabric. *Materials Science and Engineering: C*. 2016, 65, 364-368. ISSN 09284931. DOI: 10.1016/j.msec.2016.04.052
- [297] BERAN, Milos, Jitka PINKROVÁ, Marian URBAN a Josef DRAHORÁD. Immobilisation of endoinulinase on polyhydroxybutyrate microfibers. *Czech Journal of Food Sciences*. 2016, 34(6), 541-546. ISSN 12121800. DOI: 10.17221/72/2016-CJFS
- [298] VANHEUSDEN, Chris, Jan VANMINSEL, Naveen REDDY, Pieter SAMYN, Jan D'HAEN, Roos PEETERS, Anitha ETHIRAJAN a Mieke BUNTINX. Fabrication of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) Fibers Using Centrifugal Fiber Spinning: Structure, Properties and Application Potential. *Polymers*. 2023, 15(5). ISSN 2073-4360. DOI: 10.3390/polym15051181
- [299] WANG, Chi, Chia-Hung HSU a I.-Hwe HWANG. Scaling laws and internal structure for characterizing electrospun poly[(R)-3-hydroxybutyrate] fibers. *Polymer*. 2008, 49(19), 4188-4195. ISSN 00323861. DOI:

10.1016/j.polymer.2008.07.033

- [300] OL'KHOV, A. A., O. V. STAROVEROVA, M. A. GOL'DSHTRAKH, A. V. KHVATOV, K. Z. GUMARGALIEVA a A. L. IORDANSKII. Electrospinning of biodegradable poly-3-hydroxybutyrate. Effect of the characteristics of the polymer solution. *Russian Journal of Physical Chemistry B*. 2016, **10**(5), 830-838. ISSN 1990-7931. DOI: 10.1134/S1990793116050213
- [301] BYCHUK, M. A., N. R. KIL'DEEVA, M. A. KURINOVA, N. V. BOGDANOV, M. V. KALININ, A. V. NOVIKOV a G. A. VIKHOREVA. Electrospinning of Biodegradable Polymer Scaffolds. *Fibre Chemistry*. 2015, **46**(6), 345-348. ISSN 0015-0541. DOI: 10.1007/s10692-015-9618-9
- [302] SMIL, V. Nitrogen Cycle and World Food Production. *World Agriculture*. 2011, **2**, 9-13.
- [303] World Population Prospects 2019: Highlights (ST/ESA/SER.A/423). 1. New York: United Nations, 2019. ISBN 978-92-1-148316-1.
- [304] ADAM, David. How far will global population rise? Researchers can't agree. *Nature*. 2021, 597(7877), 462-465. ISSN 0028-0836. DOI: 10.1038/d41586-021-02522-6
- [305] LAWRENCIA, Dora, See WONG, Darren LOW et al. Controlled Release Fertilizers: A Review on Coating Materials and Mechanism of Release. *Plants*. 2021, **10**(2). ISSN 2223-7747. DOI: 10.3390/plants10020238
- [306] GALLOWAY, James, Alan TOWNSEND, Jan ERISMAN et al. Transformation of the Nitrogen Cycle: Recent Trends, Questions, and Potential Solutions. *Science*. 2008, **320**(5878), **889-892**. ISSN 0036-8075. DOI: 10.1126/science.1136674
- [307] ZHANG, Xin, Eric DAVIDSON, Denise MAUZERALL, Timothy SEARCHINGER, Patrice DUMAS a Ye SHEN. Managing nitrogen for sustainable development. *Nature*. 2015, **528**(7580), 51-59. ISSN 0028-0836. DOI: 10.1038/nature15743
- [308] BISHT, Nikita a Puneet SINGH CHAUHAN. Excessive and Disproportionate Use of Chemicals Cause Soil Contamination and Nutritional Stress. L. LARRAMENDY, Marcelo a Sonia SOLONESKI, ed., Marcelo L. LARRAMENDY, Sonia SOLONESKI. *Soil Contamination - Threats and Sustainable Solutions*. IntechOpen, 2021. ISBN 978-1-83880-753-5. DOI: 10.5772/intechopen.94593
- [309] FAN, Liang-tseng a Satish SINGH. *Controlled Release*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1989. ISBN 978-3-642-74509-6. DOI: 10.1007/978-3-642-74507-2
- [310] GIL-ORTIZ, Ricardo, Miguel NARANJO, Antonio RUIZ-NAVARRO, Sergio ATARES, Carlos GARCÍA, Lincoln ZOTARELLI, Alberto SAN BAUTISTA a Oscar VICENTE. Enhanced Agronomic Efficiency Using a New Controlled-Released, Polymeric-Coated Nitrogen Fertilizer in Rice. *Plants*. 2020, **9**(9). ISSN 2223-7747. DOI: 10.3390/plants9091183
- [311] COLE, Janet, Michael SMITH, Chad PENN, Becky CHEARY a Kelley CONAGHAN. Nitrogen, phosphorus, calcium, and magnesium applied individually or as a slow release or controlled release fertilizer increase growth and yield and affect macronutrient and micronutrient concentration and content of field-grown tomato plants. *Scientia Horticulturae*. 2016, **211**, 420-430. ISSN 03044238. DOI: 10.1016/j.scienta.2016.09.028
- [312] CONG, Zhao, Shen YAZHEN, Du CHANGWEN, Zhou JIANMIN, Wang HUOYAN a Chen XIAOQIN. Evaluation of Waterborne Coating for Controlled-Release Fertilizer Using Wurster Fluidized Bed. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2010, **49**(20), 9644-9647. ISSN 0888-5885. DOI: 10.1021/ie101239m
- [313] M.E. TRENKEL. *Slow- and Controlled-Release and Stabilized Fertilizers: An Option for Enhancing Nutrient Use Efficiency in Agriculture*. 2. Paris, France: IFA, 2010. ISBN 978-2-9523139-7-1.
- [314] NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (EU) 2019/1009 ze dne 5. června 2019. 2019, ročník 2019, číslo 1009. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/HTML/?uri=CELEX:32019R1009&qid=1692348367505>
- [315] ČSN EN 13266. *Pozvolně působící hnojiva - Stanovení uvolňování živin - Metoda pro povrchově upravená hnojiva*. 2009.
- [316] JACOB HANSEN AT ALL. *Fertilizers Europe 2019/20 OVERVIEW*. 1-32. Dostupné z: https://www.fertilizerseurope.com/wp-content/uploads/2020/07/AR-2019_20_32-pager-screen.pdf
- [317] SHAVIV, Avi. *Controlled Release Fertilizers*. Frankfurt, Germany: In Proceedings of the IFA International Workshop on Enhanced-Efficiency Fertilizers, 2005.
- [318] LUBKOWSKI, Krzysztof, Aleksandra SMOROWSKA, Barbara GRZMIL a Agnieszka KOZIOWSKA. *Controlled-Release Fertilizer Prepared Using a Biodegradable Aliphatic Copolyester of Poly(butylene succinate) and*

- Dimerized Fatty Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015, **63**(10), 2597-2605. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b00518
- [319] GANETRI, Ikram, Youness ESSAMLALI, Othmane AMADINE, Karim DANOUN, Soumia ABLOUHROUZ a Mohamed ZAHOUILY. Controlling factors of slow or controlled-release fertilizers. *Controlled Release Fertilizers for Sustainable Agriculture*. Elsevier, 2021, s. 111-129. ISBN 9780128195550. DOI: 10.1016/B978-0-12-819555-0.00007-8
- [320] SIRACUSA, Valentina a Nadia LOTTI. Biobased Plastics for Food Packaging. *Reference Module in Food Science*. Elsevier, 2018. ISBN 9780081005965. DOI: 10.1016/B978-0-08-100596-5.22413-X
- [321] DAITX, Tales, Vanessa LIMA, Marcelo GRYCZAK, Cesar PETZHOLD, Larissa CARLI a Raquel MAULER. *Poly(hydroxybutyrate)-based systems behavior on the controlled release of NPK fertilizers*. *Polymers for Advanced Technologies*. 2020, **31**(11), 2579-2587. ISSN 1042-7147. DOI: 10.1002/pat.4985
- [322] DAITX, Tales, Marcelo GIOVANELA, Larissa CARLI a Raquel MAULER. *Biodegradable polymer/clay systems for highly controlled release of NPK fertilizer*. *Polymers for Advanced Technologies*. 2019, **30**(3), 631-639. ISSN 10427147. DOI: 10.1002/pat.4499
- [323] SOUZA, Josiane, Camila CHIAREGATO a Roselena FAEZ. *Green Composite Based on PHB and Montmorillonite for KNO₃ and NPK Delivery System*. *Journal of Polymers and the Environment*. 2018, **26**(2), 670-679. ISSN 1566-2543. DOI: 10.1007/s10924-017-0979-4
- [324] SOUZA, Josiane, Adriana DE CAMPOS, Débora FRANÇA a Roselena FAEZ. *PHB and Montmorillonite Clay Composites as KNO₃ and NPK Support for a Controlled Release*. *Journal of Polymers and the Environment*. 2019, **27**(9), 2089-2097. ISSN 1566-2543. DOI: 10.1007/s10924-019-01498-9
- [325] CHIAREGATO, Camila, Claudinei SOUZA a Roselena FAEZ. *The fertilizer release into water and soil as the biodegradation process in the sustainable material enhancing the fertilizer efficiency*. *Environmental Technology & Innovation*. 2021, **22**. ISSN 23521864. DOI: 10.1016/j.eti.2021.101417
- [326] HARMAEN, A., A. KHALINA, H. ALI a I. AZOWA. *Thermal, Morphological, and Biodegradability Properties of Bioplastic Fertilizer Composites Made of Oil Palm Biomass, Fertilizer, and Poly(hydroxybutyrate-co-valerate)*. *International Journal of Polymer Science*. 2016, **2016**, 1-8. ISSN 1687-9422. DOI: 10.1155/2016/3230109
- [327] FRANÇA, Débora, Luciana ANGELO, Claudinei SOUZA a Roselena FAEZ. *Biobased Poly(3-hydroxybutyrate)/Starch/Cellulose Nanofibrils for Nutrients Coatings*. *ACS Applied Polymer Materials*. 2021, **3**(6), 3227-3237. ISSN 2637-6105. DOI: 10.1021/acsapm.1c00418
- [328] MURUGAN, Paramasivam, Su ONG, Rokiah HASHIM, Akihiko KOSUGI, Takamitsu ARAI a Kumar SUDESH. *Development and evaluation of controlled release fertilizer using P(3HB-co-3HHx) on oil palm plants (nursery stage) and soil microbes*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2020, **28**. ISSN 18788181. DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101710
- [329] ARJONA, J., F. VALENZUELA-DIAZ, H. WIEBECK, S. WANG a M. SILVA-VALENZUELA. *Evaluation of Urea Encapsulation by Microcapsules of PHB/MMT and PHB/OMMT Nanocomposites*. *LI, Bowen, Jian LI, Shadia IKHMAYIES et al. Characterization of Minerals, Metals, and Materials 2018*. Cham: Springer International Publishing, 2018, s. 365-372. *The Minerals, Metals & Materials Series*. ISBN 978-3-319-72483-6. DOI: 10.1007/978-3-319-72484-3_39
- [330] DE CARVALHO ARJONA, Jessica, Maria DAS GRAÇAS SILVA-VALENZUELA, Shu-Hui WANG a Francisco VALENZUELA-DIAZ. *Biodegradable Nanocomposite Microcapsules for Controlled Release of Urea*. *Polymers*. 2021, **13**(5). ISSN 2073-4360. DOI: 10.3390/polym13050722
- [331] VOLOVA, T., Ekaterina SHISHATSKAYA, Natalia ZHILA, Svetlana PRUDNIKOVA a Anatoly BOYANDIN. *New generation formulations of agrochemicals: current trends and future priorities*. *Palm Bay, Florida: Apple Academic Press*, 2019. ISBN 9781771887496.
- [332] VOLOVA, Tatiana, Svetlana PRUDNIKOVA a Anatoly BOYANDIN. *Biodegradable poly-3-hydroxybutyrate as a fertiliser carrier*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2016, **96**(12), 4183-4193. ISSN 00225142. DOI: 10.1002/jsfa.7621
- [333] BOYANDIN, Anatoly, Eugenia KAZANTSEVA, Daria VARYGINA a Tatiana VOLOVA. *Constructing Slow-Release Formulations of Ammonium Nitrate Fertilizer Based on Degradable Poly(3-hydroxybutyrate)*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017, **65**(32), 6745-6752. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b01217
- [334] EZEMA, Chinonso, Toshihiko OOI a Ken'ichiro MATSUMOTO. *Heat-Press Technique for Coating*

- Ammonium Nitrate Granules with Biodegradable Hydrophobic Polymer Blend of Poly(3-hydroxybutyrate-co -3-hydroxyhexanoate) and Poly(ϵ -caprolactone). *ACS Agricultural Science & Technology*. 2022, 2(6), 1179-1186. ISSN 2692-1952. DOI: 10.1021/acsagscitech.2c00061
- [335] YABUENG, Nuttipon a Suchada NAPATHORN. Toward non-toxic and simple recovery process of poly(3-hydroxybutyrate) using the green solvent 1,3-dioxolane. *Process Biochemistry*. 2018, **69**, 197-207. ISSN 13595113. DOI: 10.1016/j.procbio.2018.02.025
- [336] YANG, Yue-chao, Min ZHANG, Yuncong LI, Xiao-hui FAN a Yu-qing GENG. Improving the Quality of Polymer-Coated Urea with Recycled Plastic, Proper Additives, and Large Tablets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012, **60**(45), 11229-11237. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/jf302813g
- [337] SALIMI, Mehri, Elaheh MOTAMEDI, Babak MOTESHAREZEDEH, Hossein HOSSEINI a Hossein ALIKHANI. Starch-g-poly(acrylic acid-co-acrylamide) composites reinforced with natural char nanoparticles toward environmentally benign slow-release urea fertilizers. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2020, **8**(3). ISSN 22133437. DOI: 10.1016/j.jece.2020.103765

10 SEZNAM VÝSTUPŮ AUTORA NA TÉMA PRÁCE

10.1 Publikace

Biopolymer PHB

- Pub 1.** OBRUCA, Stanislav, Pavla BENESOVA, Sinisa PETRIK, Jana OBORNA, **Radek PŘIKRYL** and Ivana MAROVA, 2014. Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolysate of spent coffee grounds. September 2014. B.m.: Elsevier BV. Available at: DOI: 10.1016/j.procbio.2014.05.013
- Pub 2.** POSPISILOVA, Aneta, Ivana NOVACKOVA and **Radek PŘIKRYL**, 2021. Isolation of poly(3-hydroxybutyrate) from bacterial biomass using soap made of waste cooking oil. April 2021. B.m.: Elsevier BV. Available at: DOI: 10.1016/j.biortech.2021.124683
- Pub 3.** POSPISILOVA, Aneta, Veronika MELCOVA, Silvestr FIGALLA, Premysl MENCIK and **Radek PŘIKRYL**, 2021. Techniques for increasing the thermal stability of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] recovered by digestion methods. November 2021. B.m.: Elsevier BV. Available at: DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2021.109727

Bioplasty na bázi PHB

- Pub 4.** TOCHÁČEK, Jiří, **Radek PŘIKRYL**, Přemysl MENČÍK, Veronika MELČOVÁ and Silvestr FIGALLA, 2021. The chances of thermooxidation stabilization of poly(3-hydroxybutyrate) during processing—A critical evaluation. 26. February 2021. B.m.: Wiley. Available at: DOI: 10.1002/app.50647
- Pub 5.** PERD'ŮCHOVÁ, D, K TOMANOVÁ, P ALEXY, J BOČKAJ, J FERANC, R PLAVEC, L OMANÍKOVÁ, P JURKOVIČ and **R PŘIKRYL**, 2017. The influence of additives on crystallization of blends based on polylactid acid. November 2017. B.m.: IOP Publishing. Available at: DOI: 10.1088/1757-899x/266/1/012014
- Pub 6.** MELCOVA, Veronika, **Radek PŘIKRYL**, Premysl MENCIK and Jiří TOCHACEK, 2019. Processing Stabilization of Poly(3-Hydroxybutyrate)/Poly(Lactic Acid) Blends with Oligomeric Carbodiimide. May 2019. B.m.: Trans Tech Publications, Ltd. Available at: DOI: 10.4028/www.scientific.net/msf.955.7
- Pub 7.** PLAVEC, Roderik, Slávka HLAVÁČIKOVÁ, Leona OMANÍKOVÁ, Jozef FERANC, Zuzana VANOVCANOVÁ, Katarína TOMANOVÁ, Ján BOČKAJ, Ján KRUŽELÁK, Elena MEDLENOVÁ, Ivana GÁLISOVÁ, Lucia DANIŠOVÁ, **Radek PŘIKRYL**, Silvestr FIGALLA, Veronika MELČOVÁ and Pavol ALEXY, 2020. Recycling possibilities of bioplastics based on PLA/PHB blends. December 2020. B.m.: Elsevier BV. Available at: DOI: 10.1016/j.polymertesting.2020.106880
- Pub 8.** FOGAŠOVÁ, Mária, Silvestr FIGALLA, Lucia DANIŠOVÁ, Elena MEDLENOVÁ, Slávka HLAVÁČIKOVÁ, Zuzana VANOVCANOVÁ, Leona OMANÍKOVÁ, Andrej BACO, Vojtech HORVÁTH, Mária MIKOLAJOVÁ, Jozef FERANC, Ján BOČKAJ, Roderik PLAVEC, Pavol ALEXY, Martina REPISKÁ, **Radek PŘIKRYL**, Soňa KONTÁROVÁ, Anna BÁREKOVÁ, Martina SLÁVIKOVÁ, Marek KOUTNÝ, Ahmad FAYYAZBAKSH and Markéta KADLEČKOVÁ, 2022. PLA/PHB-Based Materials Fully Biodegradable under Both Industrial and Home-Composting Conditions. 30. September 2022. B.m.: MDPI AG. Available at: DOI: 10.3390/polym14194113

Biokompozity pro FDM 3D tisk na bázi PHB

- Pub 9.** MENCIK, Premysl, Veronika MELCOVA, Sona KONTAROVA, **Radek PŘIKRYL**, Dagmara PERDOCHOVA and Martina REPISKA, 2019. Biodegradable Composite Materials Based on Poly(3-Hydroxybutyrate)

for 3D Printing Applications. May 2019. B.m.: Trans Tech Publications, Ltd. Available at: DOI: 10.4028/www.scientific.net/msf.955.56

- Pub 10.** MENČÍK, Přemysl, **Radek PŘIKRYL**, Štěpán KROBOT, Veronika MELČOVÁ, Soňa KONTÁROVÁ, Roderik PLAVEC, Jan BOČKAJ, Vojtech HORVÁTH and Pavol ALEXEY, 2022. Evaluation of the Properties of PHB Composite Filled with Kaolin Particles for 3D Printing Applications Using the Design of Experiment. 19. November 2022. B.m.: MDPI AG. Available at: DOI: 10.3390/ijms232214409
- Pub 11.** MENČÍK, Přemysl, **Radek PŘIKRYL**, Ivana STEHNOVÁ, Veronika MELČOVÁ, Soňa KONTÁROVÁ, Silvestr FIGALLA, Pavol ALEXEY and Ján BOČKAJ, 2018. Effect of Selected Commercial Plasticizers on Mechanical, Thermal, and Morphological Properties of Poly(3-hydroxybutyrate)/Poly(lactic acid)/Plasticizer Biodegradable Blends for Three-Dimensional (3D) Print. 3. October 2018. B.m.: MDPI AG. Available at: DOI: 10.3390/ma11101893
- Pub 12.** KONTÁROVÁ, Soňa, **Radek PŘIKRYL**, Veronika MELČOVÁ, Přemysl MENČÍK, Matyáš HORÁLEK, Silvestr FIGALLA, Roderik PLAVEC, Jozef FERANC, Jiří SADÍLEK and Aneta POSPÍŠILOVÁ, 2020. Printability, Mechanical and Thermal Properties of Poly(3-Hydroxybutyrate)-Poly(Lactic Acid)-Plasticizer Blends for Three-Dimensional (3D) Printing. 23. October 2020. B.m.: MDPI AG. Available at: DOI: 10.3390/ma13214736
- Pub 13.** PLAVEC, Roderik, Vojtech HORVÁTH, Slávka HLAVÁČIKOVÁ, Leona OMANÍKOVÁ, Martina REPISKÁ, Elena MEDLENOVÁ, Jozef FERANC, Ján KRUŽELÁK, **Radek PŘIKRYL**, Silvestr FIGALLA, Soňa KONTÁROVÁ, Andrej BACO, Lucia DANIŠOVÁ, Zuzana VANOČANOVÁ and Pavol ALEXEY, 2022. Influence of Multiple Thermomechanical Processing of 3D Filaments Based on Polylactic Acid and Polyhydroxybutyrate on Their Rheological and Utility Properties. 11. May 2022. B.m.: MDPI AG. Available at: DOI: 10.3390/polym14101947

3D tisknutelné kompozity na bázi PHB pro medicínu

- Pub 14.** MELČOVÁ, Veronika, Kateřina SVORADOVÁ, Přemysl MENČÍK, Soňa KONTÁROVÁ, Michala RAMPICHOVÁ, Věra HEDVIČÁKOVÁ, Věra SOVKOVÁ, **Radek PŘIKRYL** and Lucy VOJTOVÁ, 2020. FDM 3D Printed Composites for Bone Tissue Engineering Based on Plasticized Poly(3-hydroxybutyrate)/poly(d,l-lactide) Blends. 27. November 2020. B.m.: MDPI AG. Available at: DOI: 10.3390/polym12122806
- Pub 15.** KROBOT, Štěpán, Veronika MELČOVÁ, Přemysl MENČÍK, Soňa KONTÁROVÁ, Michala RAMPICHOVÁ, Věra HEDVIČÁKOVÁ, Ema MOJŽIŠOVÁ, Andrej BACO and **Radek PŘIKRYL**, 2023. Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) and Polycaprolactone (PCL) Based Blends for Tissue Engineering and Bone Medical Applications Processed by FDM 3D Printing. 22. May 2023. B.m.: MDPI AG. Available at: DOI: 10.3390/polym15102404

Netkané mikrovláknenné textilie na bázi PHB pro medicínu

- Pub 16.** ABDEL-MOHSEN, A.M., R.M. ABDEL-RAHMAN, I. KUBENA, L. KOBERA, Z. SPOTZ, M. ZBONCAK, **R. PŘIKRYL**, J. BRUS and J. JANCAR, 2020. Chitosan-glucan complex hollow fibers reinforced collagen wound dressing embedded with aloe vera. Part I: Preparation and characterization. February 2020. B.m.: Elsevier BV. Available at: DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115708

Agrochemické aplikace PHB

- Pub 17.** FOJT, Jakub, Jan DAVID, **Radek PŘIKRYL**, Veronika ŘEZÁČOVÁ and Jiří KUČERÍK, 2020. A critical review of the overlooked challenge of determining micro-bioplastics in soil. November 2020. B.m.: Elsevier BV. Available at: DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.140975

- Pub 18.** KONTÁROVÁ, Soňa, **Radek PŘIKRYL**, Petr ŠKARPA, Tomáš KRIŠKA, Jiří ANTOŠOVSKÝ, Zuzana GREGUŠKOVÁ, Silvestr FIGALLA, Vojtěch JAŠEK, Marek SEDLMAJER, Přemysl MENČÍK and Mária MIKOLAJOVÁ, 2022. Slow-Release Nitrogen Fertilizers with Biodegradable Poly(3-hydroxybutyrate) Coating: Their Effect on the Growth of Maize and the Dynamics of N Release in Soil. 14. October 2022. B.m.: MDPI AG. Available at: DOI: 10.3390/polym14204323
- Pub 19.** JAŠEK, Vojtěch, Jan FUČÍK, Lucia IVANOVÁ, Dominik VESELÝ, Silvestr FIGALLA, Ludmila MRAVCOVA, Petr SEDLACEK, Jozef KRAJČOVIČ and **Radek PŘIKRYL**, 2022. High-Pressure Depolymerization of Poly(lactic acid) (PLA) and Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) Using Bio-Based Solvents: A Way to Produce Alkyl Esters Which Can Be Modified to Polymerizable Monomers. 1. December 2022. B.m.: MDPI AG. Available at: DOI: 10.3390/polym14235236

10.2 Ostatní výstupy

10.2.1 Patent

- V1** MÁROVÁ, I.; OBRUČA, S.; PŘIKRYL, R.; VUT v Brně: Způsob produkce polyhydroxyalkanoátů (PHA) na olejovém substrátu. 304183, patent. (2013) (8%)

10.2.2 Poloprovoz

- V2** PŘIKRYL, R.; MELČOVÁ, V.; MENČÍK, P.; POHLUDKA, D.; PACÁKOVÁ, Z.; BOLYÓ, J.: DELTA-01; Funkční zařízení na srážení. Nafigate Corporation a.s., Prosek, Praha. (16 %)

10.2.3 Ověřená technologie

- V3** PŘIKRYL, R.; MENČÍK, P.; MELČOVÁ, V.; KONTÁROVÁ, S.; FIGALLA, S.; POSPÍŠILOVÁ, A.: 3D tisková struna KOMP 5-5; Technologie výroby polymerní směsi s majoritním obsahem poly-3-hydroxybutyrátu (PHB) pro výrobu 3D tiskových strun. FCH VUT v Brně. (ověřená technologie)

10.2.4 Prototyp

- V4** PŘIKRYL, R.; MENČÍK, P.; TOCHÁČEK, J.; POHLUDKA, D.: HYDAL-F; Biodegradabilní fólie na bázi polyhydroxybutyrátu. Výzkumný ústav ovocnářský, Holovousy - fólie v reálných podmínkách FCH VUT - vzorky fólie. (20 %)
- V5** PŘIKRYL, R.; MELČOVÁ, V.; KONTÁROVÁ, S.; FIGALLA, S.; POSPÍŠILOVÁ, A.; MENČÍK, P.: Fialment KOMP 5-5; Prototyp tiskové struny na bázi PHB. FCH VUT v Brně. (16 %)

10.2.5 Funkční vzorek

- V6** PŘIKRYL, R.; PALOUŠEK, D.; MENČÍK, P.; VESPALEC, A.; KRČMA, M.; ŠKAROUPKA, D.: Design obličejové polomasky pro výrobu termoformíngem 01; Obličejová polomaska realizovaná pomocí termoformíngu. FCH VUT v Brně, Purkyňova 464/118, Brno 612 00. URL: <http://intranet.ustavkonstruovani.cz/project-documentations/edit/399>. (30 %)
- V7** PŘIKRYL, R.; BÁLKOVÁ, R.; TOCHÁČEK, J.; MENČÍK, P.; KUČERA, F.; PETRŮJ, J.: Hydal I; Plast pro injekční vstříkávání na bázi poly-3-hydroxybutyrátu HYDAL-Powder. FCH VUT v Brně, Nafigate corporation. (30 %)

10.3 Vedené práce na relevantní téma

- VSKP1** Melčová Veronika, PhD.: Modifikace polyhydroxybutyrátu roubováním funkčních skupin, 2015
- VSKP2** Stehnová Ivana, Ing.: Vliv chemické struktury změkčovadla na vlastnosti bioplastu na bázi polyhydroxybutyrátu, diplomová práce, 2018
- VSKP3** Štulrajterová Lujza, Ing.: Vlastnosti vláken na bázi polyhydroxybutyrátu, diplomová práce, 2018
- VSKP4** Horálek Matyáš, Ing.: Biokompozity na bázi polyhydroxybutyrátu pro 3D tisk, diplomová práce, 2019
- VSKP5** Chaloupková Kateřina, Ing.: Biokompozitní materiál pro 3D tisk v regenerativní medicíně, bakalářská práce, 2020
- VSKP6** Gregušková Zuzana, Ing.: Mikrovlákna na bázi polyhydroxybutyrátu pro medicínské aplikace, diplomová práce, 2021
- VSKP7** Chaloupková Kateřina, Ing.: Optimalizace biokompozitu na bázi poly(3-hydroxybutyrátu) s ohledem na tisknutelnost a mechanické vlastnosti, diplomová práce, 2022
- VSKP8** Kecíková Alžběta, Ing.: Příprava mikrovláknenných struktur na bázi kopolymeru PHB, diplomová práce, 2022
- VSKP9** Krobot Štěpán, Ing.: Materiály na bázi PHB pro 3D tisk medicínských aplikací, diplomová práce, 2022
- VSKP10** Nečas Aleš, Ing.: Vliv vnitřní struktury na mechanické vlastnosti 3D tištěného segmentu femuru z nového optimalizovaného biokompozitu, diplomová práce, 2023
- VSKP11** Bobková Magdalena, Bc.: Povlakovaná hnojiva se zpomaleným uvolňováním na bázi PHB, bakalářská práce, 2022, vedoucí Ing. Soňa Kontárová, Ph.D.

11 PROJEKTY ŘEŠENÉ AUTOREM

- PR 1.** TAČR GAMA, TG01010054-1, **Průmyslová receptura na vstřikování z biopolymeru PHA**, zahájení: 01.10.2014, ukončení: 30.09.2016, řešitel dílčího projektu
- PR 2.** TAČR EPSILON, TH01011353, **Vývoj nového výrobního postupu pro biotechnologii Hydal**, zahájení: 01.02.2015, ukončení: 31.05.2016, řešitel za organizaci
- PR 3.** TAČR DELTA, TF02000062, **Transfer biotechnologie Hydal do Číny**, zahájení: 01.02.2016, ukončení: 31.12.2018, vedoucí výzkumné skupiny
- PR 4.** MPO TRIO, FV20480, **Vytvoření nové materiálové základny pro 3D printing z Hydal PHA**, zahájení: 01.06.2017, ukončení: 31.12.2019 řešitel za organizaci
- PR 5.** MPO TRIO, FV40095, **Smart Fertilizers**, zahájení: 01.04.2019, ukončení: 31.12.2021, řešitel za organizaci
- PR 6.** MPO TRIO, FV40094, **Vývoj nové materiálové základny na základě Hydal PHA pro náhradu mikroplastů**, zahájení: 01.04.2019, ukončení: 31.12.2021, vedoucí výzkumné skupiny
- PR 7.** Eurostars, 7D19010, RIMPLAN, zahájení: 2019, ukončení: 2022, (v rámci Nafigate)
- PR 8.** TAČR TREND, FW01010513, **Vývoj produkčního systému velkoformátové aditivní výroby vysoce plněných odpadních termoplastů**, zahájení: 01.02.2020, ukončení: 31.12.2023, vědecký pracovník
- PR 9.** OP PIK Aplikace 8, EG20_321/0024676, **Nové cirkulární biotechnologie a biomedicínské aplikace**, zahájení: 1.12.2020, ukončení: 31.5.2023, řešitel za organizaci
- PR 10.** H2020-BBI-JTI-2020, BioSupPack - **Demonstrative process for the production and chemical recycling of environmentally safe, superior bio-based packaging by plasma integration in the value chain**, zahájení: 01.05.2021, ukončení: 31.10.2024, vedoucí výzkumné skupiny
- PR 11.** TAČR Kappa, TO01000309, ProfiBone - **Low-temperature 3D Printing of Bio-Functionalized Ceramic Bone Implants with Adjustable Mechanical Properties**, zahájení 1.1.2021, ukončení 31.12.2023, vědecký pracovník (Ceitec)
- PR 12.** Interreg, ATCZ287, **Technologie na zpracování odpadní biomasy lesního průmyslu pro pokročilé polymerní kompozity**, zahájení 01.01.2022 , ukončení 31.12.2022, výzkumný pracovník (Ceitec)
- PR 13.** TAČR NCK, TN02000051/009, **Technologie zpracování odpadních kalů z recyklace plastů**, zahájení 1.3.2023, ukončení 31.12.2024, řešitel dílčího projektu za organizaci
- PR 14.** TAČR NCK, TN02000051/012, **Bioplasty pro agrochemické aplikace**, zahájení 1.6.2023, ukončení 31.5.2026, řešitel dílčího projektu za organizaci