



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**ENKAPSULACE PŮDNÍCH BAKTERIÍ V
HYDROGELOVÝCH NOSIČÍCH**

ENCAPSULATION OF SOIL BACTERIA IN HYDROGEL CARRIERS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Sofia Orišková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1182/2017
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Sofia Orišková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název bakalářské práce:

Enkapsulace půdních bakterií v hydrogelových nosičích

Zadání bakalářské práce:

- 1) Zpracovat aktuální literární rešerši na zadané téma.
- 2) Na základě zpracované rešerše navrhnout postup přípravy modelových hydrogelových nosičů s obsahem enkapsulovaných bakterií.
- 3) Realizovat sérii experimentů zaměřených na přípravu a charakterizaci hydrogelů s enkapsulovanými bakteriemi.

Termín odevzdání bakalářské práce: 21.5.2018

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

Sofia Orišková
student(ka)

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Náplňou bakalárskej práce bolo vypracovať literárnu rešerš na tému inokulácie pôdnych baktérií, zhrnutím enkapsulačných techník a nosičových systémov vhodných pre poľnohospodárske účely. Na základe týchto údajov bol navrhnutý modelový systém enkapsulácie, ktorého optimalizáciou sa zaoberá experimentálna časť tejto práce. Enkapsulácia umožňuje postupné uvoľňovanie pôdnych baktérií, chráni a stabilizuje ich, čím zaručuje dlhšiu trvanlivosť.

Pre inokuláciu bola vybraná dusík fixujúca baktéria *Cupriavidus necator* H16, ktorá bola enkapsulovaná do alginátu, s ktorým tvorila agregátne mikrokapsule. Enkapsulácia prebiehala na základe iónovej gelácie, kedy alginát sodný reagoval so sieťovacím činidlom, chloridom vápenatým, za tvorby kapsúl.

Sledoval sa vplyv rôznych faktorov na kvalitu kapsúl. Zistilo sa, že molekulárna hmotnosť alginátu výrazne ovplyvňuje úspešnosť sieťovania. Alginát s vyššou strednou molekulárnou hmotnosťou sa vyhodnotil ako vhodnejší pre daný systém. Ako najvhodnejšie disperzné prostredie sa určila destilovaná voda, popri prípade tmivý roztok TRIS-HCl, ten bol však nevhodný v prípade potreby získania suchého produktu lyofilizáciou. Ďalej sa skúmala viabilita enkapsulovaných buniek. Zistilo sa, že bunky enkapsuláciu prežili a postupne sa z kapsúl uvoľňujú. Bolo overené, že pri vhodne zvolených podmienkach a zložení systému je možné baktériu *C. necator* H16 enkapsulovať do alginátových nosičov. Preukázala sa aj viabilita baktérií po enkapsulácii.

ABSTRACT

The goal of this bachelor thesis was both to review existing literature regarding the topic of inoculation of soil bacteria and test a relevant encapsulation method and optimize it. The evaluation process involved the study of various encapsulation techniques that involve hydrogel carriers suitable for agronomic purposes. Encapsulation allows controlled release of soil bacteria, and protects and stabilizes it, while ensuring longer shelf life.

For the practical testing, *Cupriavidus necator* H16 was chosen as a nitrogen fixing bacteria for the inoculation. Through an ionic gelation method, it was encapsulated into alginate carriers, forming matrix microcapsules. Sodium alginate reacts with the cross-linking agent calcium chloride to form the capsules.

The impact on the quality of the product was tested through several variables. What was revealed was that molecular weight of alginate was proven to have a significant impact. Alginate with higher molecular weight was shown to be suitable for the given system. The most desirable environment was distilled water or a TRIS-HCl buffer. However, the TRIS-HCl was unsuitable in cases of retrieving a dry product by lyophilization. Eventually, the viability of encapsulated cells was examined, and it was proven that encapsulated bacteria endure the process of encapsulation in the above-mentioned environment and they were gradually released from the carrier.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Enkapsulácia, alginát, pôdne baktérie

KEY WORDS

Encapsulation, alginate, soil bacteria

ORIŠKOVÁ, S. *Enkapsulace půdních bakterií v hydrogelových nosičích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 33 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D..

PREHLÁSENIE

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

.....
Sofia Orišková

PodĎakovanie

Týmto by som sa chcela poďakovať vedúcemu mojej bakalárskej práce Ing. Petrovi Sedláčkovi, Ph.D. za umožnenie spolupráce, za cenné rady a za jeho celkový prístup k vedeniu mojej práce. Ďalej patrí moje poďakovanie konzultantke Ing. Eve Fryšovej, Ing. Eve Slaninovej a kolegyni Mai Thuy Ha za cenné rady a pomoc pri realizácii meraní v laboratóriách.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORIETICKÁ ČASŤ	8
2.1	Enkapsulácia	8
2.1.1	Enkapsulačné techniky.....	9
	Emulgácia	9
	Fluidná vrstva	10
	Extrúzia	10
	Koacervácia	11
	Iónová gelácia.....	11
2.1.2	Výhody enkapsulácie pri vývoji nosičov buniek.....	12
2.2	Hydrogely ako nosiče enkapsulovaných častíc	12
2.2.1	Alginát.....	13
2.3	Ďalšie využité inštrumentálne techniky	14
2.3.1	Lyofilizácia	14
2.3.2	Mikrokalorimetria	14
3	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	15
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	17
4.1	Použité chemikálie	17
4.2	Použité prístroje.....	17
4.3	Príprava roztokov	17
4.4	Nastavenie enkapsulátoru	19
4.5	Metóda SEC-MALS-dVI-dRI na určenie molekulovej hmotnosti alginátov	20
4.6	Lyofilizácia	20
4.7	Izotermická mikrokalorimetria.....	21
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA	22
5.1	Vplyv druhu alginátu na vznik kapsúl	22
5.2	Vplyv disperzného prostredia	23
5.3	Vplyv ďalších faktorov na tvorbu kapsúl	25
5.4	Príprava suchej formy nosiča lyofilizáciou.....	26

5.5	Stanovenie viability buniek metódou izotermálnej mikrokalorimetrie.....	27
6	ZÁVER.....	29
7	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY.....	30
8	PRÍLOHY	33

1 ÚVOD

Fertilizácia rastlín je dôležitá téma v kontexte zvyšovania populácie, zvyšovania cien hnojív a nízkej účinnosť konvenčných minerálnych hnojív. V dnešnej dobe je tak vyvíjaný veľký tlak, aby každý kus zeme mal čo najvyššiu výnosnosť. Na druhej strane, čoraz viac spotrebiteľov podľa trendu návratu k prírode a tým pádom odmietajú chemicky ošetrované potraviny. Označenie „bio“ nadobudlo významné miesto pre marketing nejednej firmy.

Vedci teda pracujú na nových prístupoch a technikách, ako vyhovieť týmto dvom zdanlivo protichodným požiadavkám. Dobrým kompromisom by mohla byť biofertilizácia, čiže aplikácia mikrobiálnych inokulantov do pôdy pre zlepšenie výživy rastlín. Ide hlavne o dusík fixujúce pôdne baktérie, ktoré pomocou enzýmu nitrogenázy dokážu rozštiepiť trojitú väzbu vzdušného dusíku a následne ho transformovať na amónne ióny. Niekedy sa tieto baktérie nazývajú ako rast podporujúce baktérie označované skratkou PGPB (z anglického *plant growth promoting bacteria*). Dôležitým cieľom je doceliť prežitie buniek v dobe skladovania, ako aj v často nepriaznivých podmienkach v pôde. Zároveň je nevyhnutné, aby sa vyvinula formulácia, ktorá by zaručovala jednoduchú aplikáciu poľnohospodármi.

I keď enkapsulácia pôdných baktérií zatiaľ nie je technologicky využívaným procesom, hlavne kvôli problémom *scaling-upu*, považujem to za veľmi zaujímavú tému a vidím v nej veľký potenciál pre budúce generácie. Mojm cieľom práce je prvotné naštudovanie danej tematiky a spracovanie rešerše. Vychádzajúc z informácií, ktoré ponúkajú literárne zdroje, bude ďalším krokom návrh modelového systému hydrogélových nosičov s obsahom enkapsulovaných baktérií. Nasledujú optimalizačné kroky a sledovanie vplyvu rôznych faktorov na kvalitu vznikajúcich kapsúl a to objektívnym i subjektívnym ohodnotením. Hlavným cieľom je príprava agregátnych kapsúl guľového tvaru, ktoré by boli dostatočne stále a odolné voči mechanickému namáhaniu a tak chránili enkapsulované baktérie. Kľúčová je viabilita baktérií a potenciál postupného uvoľňovania z kapsúl, ktoré sa musia fyzikálne-chemickými metódami overiť.

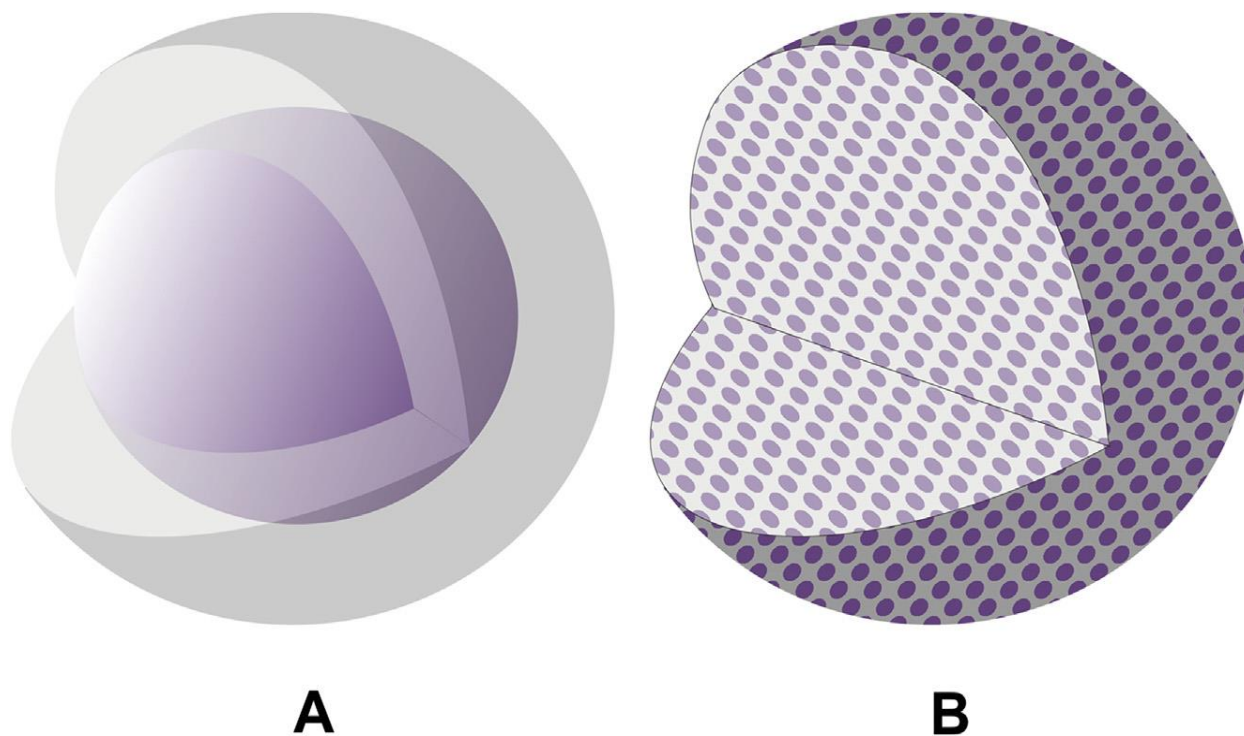
2 TEORIETICKÁ ČASŤ

2.1 Enkapsulácia

Enkapsuláciu možno definovať ako proces uzavretie aktívneho činidla do inej látky, ochranného obalu, za účelom separácie aktívnej fázy od vonkajšieho prostredia. Táto technika nachádza uplatnenie v rôznych odvetviach, ako napr. v potravinárstve, farmácii či kozmetike. Dôvody pre enkapsuláciu sú rôznorodé, najčastejšie ide o ochranu aktívnej zložky pred nepriaznivými podmienkami, o snahu o postupné uvoľňovanie či predĺženie novej doby skladovania [1].

Enkapsulovaná látka sa nazýva ako jadro, aktívna fáza, náplň či účinná látka. Môže sa jednať o enzýmy, liečivá, vitamíny, oleje či bunky. Stenu označujeme ako schránka, obal, puzdro, membrána, kapsula, nosný materiál či matrica. Medzi najčastejšie využívané patria hydrofilné či hydrofóbne polyméry, napr. želatína, alginát, etyl celulóza, chitín a iné [2].

Produktom procesu enkapsulácie sú kapsule rôznych rozmerov, ktoré majú sférický tvar. Typická kapsula má jadro (obsahujúce mikroorganizmus alebo inú aktívnu časť), ktoré je obklopené schránkou (krycí materiál) pre trvalú alebo dočasnú ochranu jadra od vonkajšej atmosféry. Najčastejšie typy kapslí sú *core shell* - mononukleárna, ktorá má jedno jadro zabalené do obalu, alebo *agregáty*, ktoré majú viac jadier dispergovaných v matrici [3]. Schéma kapsule je na Obr. 1.



Obr. 1: Schéma mononukleárnej (A) a agregátnej kapsule (B) [3].

Enkapsulácia mikrobiálnych inokulantov prebieha v troch etapách. Prvý krok spočíva v inkorporácii aktívnej zložky do matrice (pevnej/kvapalnej). Potom nasleduje mechanická operácia zahrňujúca prípravu disperzie alebo sprejovanie roztoku. Tretím krokom je stabilizácia kvapky vzniknutej v druhej fáze pomocou *chemického procesu* ako je polymerizácia, *fyzikálno-chemického procesu* – gelácia, koacervácia, alebo *fyzikálnym procesom* – odparenie alebo tuhnutie [2].

2.1.1 Enkapsulačné techniky

Väčšina enkapsulačných techník vychádza z tvorby kvapiek aktívnej látky, a to hlavne v kvapalnej forme. Kvapky aktívnej látky sú následne obklopené nosným materiálom (v plynnej či kvapalnej forme) pomocou fyzikálne-chemických procesov [4].

Enkapsulačné techniky založené na rôznych fyzikálnych či chemických procesoch sú uvedené v Tab. 1. Voľba správnej metódy závisí na aplikácii, fyzikálnych vlastnostiach, kompatibilite materiálu, a v neposlednom rade, na ekonomických faktoroch.

Tab. 1: Vybrané enkapsulačné techniky a podstata ich procesu

Názov techniky	Podstata procesu
Sprejové sušenie	Fyzikálna
Emulgácia	Fyzikálna
Fluidná vrstva	Fyzikálna
Extrúzia	Fyzikálna
Polymerizácia	Chemická
Koacervácia	Fyzikálne chemická
Iónová gelácia	Fyzikálne chemická

Sprejové sušenie

Sprejové sušenie pozostáva z disperzie bakteriálnej bunky v materiáli nosiča za vzniku emulzie či disperzie. Proces je nasledovaný homogenizáciou kvapaliny, atomizáciou (rozdelenie, roztriešenie na jemnejšie častice) a rozprášením zmesi na horúcu pec. Počas tohto procesu dochádza k tvorbe filmu na povrchu kvapiek [5].

Sprejové sušenie je komerčne využívaný proces pri veľkokapacitnej výrobe. S touto metódou sú spojené nízke operačné náklady, produkty vysokej kvality, rýchla rozpustnosť a vysoká stabilita kapsúl. Nevýhodou metódy je vysoká teplota, čo je obmedzujúcim faktorom pre enkapsuláciu mikroorganizmov citlivých na teplotu.[2].

Emulgácia

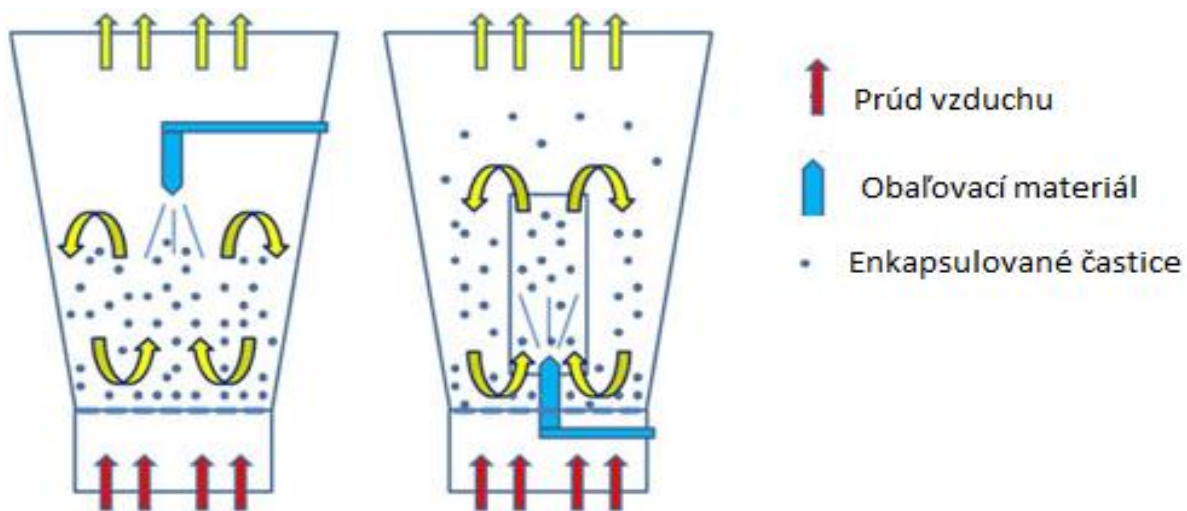
Ďalšou technikou je emulgácia. Vo väčšine prípadov ide o emulziu voda v oleji, kde malé množstvo vo vode rozpustného polyméru je pridané do veľkého objemu rastlinného oleja, ako napríklad sójový olej, slnečnicový olej či kukuričný olej. Zmes sa mechanicky homogenizuje pomocou mixérov, miešadiel alebo koloidného mlynu za tvorby emulzie voda v oleji (v/o) a polymér je zosieťovaný za prítomnosti malých gélových častíc v olejovej fáze. Veľkosť vznikajúcich častíc je 25 μm až 2 mm a je kontrolovaná rýchlosťou miešania [6]. Často sa pridávajú aj emulgátory a stabilizátory. Odstránenie oleja je obťažný proces. Najčastejšie sa za týmto účelom pridávajú iné chemikálie alebo sa využíva dekantácia, kedy sa vzniknuté enkapsulované častice prelejú do vody a potom dochádza k dekantácii. Nevýhodou je potenciálna toxicita organických rozpúšťadiel, preto sa ako alternatíva používajú oleje, ktoré sa však zložitejšie odstraňujú zo zmesí a sú aj ekonomicky nevýhodnejšie [2].

Fluidná vrstva

Táto technika je založená na tryske, ktorá sprejuje obalovací materiál do komory kde je fluidná vrstva aktívnej fázy.

Fluidná vrstva je proces, ktorý sa snaží predísť problémom techniky sprejového sušenia. Pri tomto procese sú častice fluidizované horúcim vzduchom v komore a následne je obalovací materiál sprejovaný cez trysku za vzniku filmu. Rozpúšťadlo je odparené pôsobením horúceho vzduchu.

Obalovací materiál môže byť sprejovaný rôznymi spôsobmi – zdola, odkiaľ sa púšťa vzduch alebo zhora, čiže v protismere oproti prúdiacemu vzduchu. Obe situácie sú zobrazené na Obr. 2. V niektorých prípadoch prichádza do úvahy aj tangenciálny či rotačný spôsob [6].



Obr. 2: Enkapsulácia metódou fluidnej vrstvy zdola

Extrúzia

Extrúzia je používaná pre získavanie granúl s kvapalnou aktívnou fázou, ako napríklad esenciálne oleje alebo príchuť v potravinárstve. Mnohokrát je táto požiadavka aj v agrochemickom či farmaceutickom priemysle[8].

Metóda pozostáva z kvapkania vodného roztoku polyméru a aktívnej látky do gelovacieho roztoku. Ako nástroj na kvapkanie sa môže použiť jednoducho pipeta, striekačka, vibračná tryska, sprejovacia tryska či atomačný disk [4].

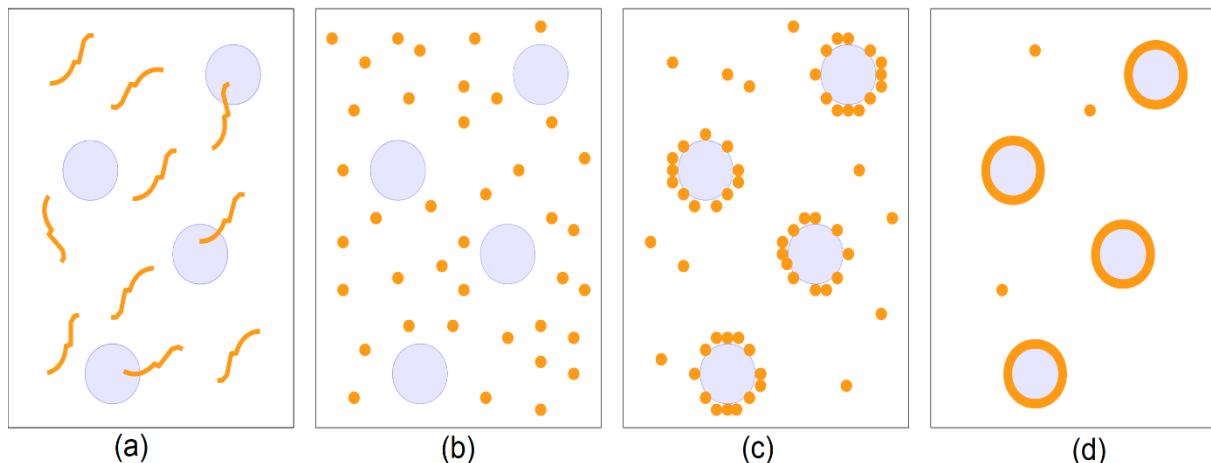
Najčastejšie ide o enkapsuláciu prchavých aromatických látok do sklovitých sacharidových obalov. Difúzia vzduchu hydrofilnou matricou je veľmi pomalá a tým pádom hydrofilný polymér plní ochrannú funkciu pre tieto prchavé aromatické látky náchylné k oxidácii. Výhoda tohto procesu je výborná skladovateľnosť produktu. Touto metódou bola dosiahnutá skladovateľnosť citrusového oleja po dobu 5 rokov, pričom sprejové sušenie zaručuje trvanlivosť do 1 roku a neenkapsulované častice sú stabilné len po dobu niekoľkých mesiacov [9][9].

Nevýhodou tejto metódy je vznik relatívne veľkých častíc (500–1 000 μm) či limitovaný počet použiteľných materiálov ako schránok. Najčastejšie používané obalové materiály sú sacharidy obdobné dextróze a škrob [9]. Dobrou alternatívou pre vznik menších častíc (50 μm) je elektrostatická extrúzia [4].

Koacervácia

Koacervácia bola prvá mikroenkapsulačná technika, vyvinutá v roku 1950 [10]. Tento proces zahŕňa vodnú fázu obsahujúcu jeden (jednoduchá koacervácia) alebo viac polymérov (komplexná koacervácia) – jeden so záporným nábojom (napr. arabská guma, karboxymetylcelulóza) a druhý s kladným nábojom (napr. želatína a iné bielkoviny, agar). Tieto dva polyméry sú dispergované vo vode, pričom je udržiavaná teplota nad bodom gelácie bielkoviny a pH nad hodnotou jej izoelektrického bodu. Nasleduje emulzifikácia/dispergácia hydrofóbného materiálu, ktorý má byť enkapsulovaný, vo vodnom roztoku polymérov. Emulzia je stabilizovaná dvoma polymérmi. Potom nastáva separácia dvoch kvapalných fáz účinkom zníženia pH pod izoelektrický bod bielkoviny, čím sa vyvolá príťažlivá elektrostatická interakcia medzi opačne nabitými polymérmi. Jedna zo vzniknutých fáz je bohatá na polymér a druhá je vodná fáza. Proces pokračuje geláciou. Tvorí sa stena okolo hydrofóbného materiálu vyvolaná kontrolovaným chladením pod teplotu gelácie. V poslednom kroku sa použije sieťovacie (tripolyfosfát, transglutamináza, genipin, glutaraldehyd) činidlo pre tvrdnutie stien mikrokapsúl a kapsule sa premyjú a usušia [11].

Metóda má svoje negatíva: je skôr vhodná pre hydrofóbné zlúčeniny ako stredový materiál a tým pádom je obťažné enkapsulovať hydrofilné zlúčeniny. Taktiež je finančne náročná [11].



Obr. 3: Proces koacervácia. (a) Kvapky aktívnej fázy sú rozptýlené v emulzii polymérneho roztoku, (b) Koacervačný roztok sa delí na koacervát a rozpúšťadlo, (c) Koacervát obklopuje aktívnu fázu, (d) Tvorí sa kontinuálna schránka tvorená zosieťovaným polymérom okolo jadra [13].

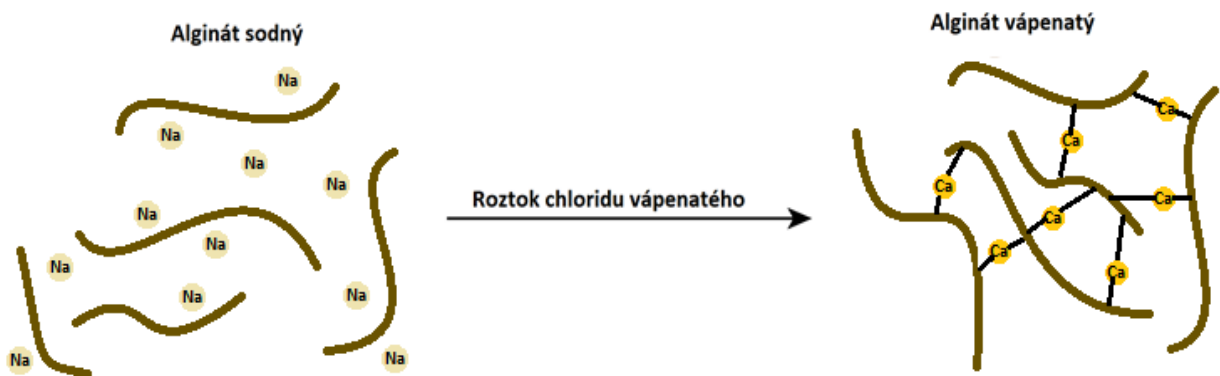
Iónová gelácia

Metóda spočíva v kvapkaní vodného roztoku alebo suspenzie obsahujúcej aktívny materiál a alginát sodný do roztoku chloridu vápenatého za tvorby kapsúl. Pri dopade kvapky sa okamžite vytvára membrána tvorená alginátom vápenatým, pričom sa zachováva pôvodný guľový tvar. Hlavná výhoda gélovej imobilizácie je bio kompatibilita [2].

Alginátové kapsule sú rozsiahlo používané pri mikroenkapsulácii, pretože ich príprava v laboratórnom merítku je jednoduchá, proces môže byť vykonaný v sterilných podmienkach a prakticky akýkoľvek materiál môže byť enkapsulovaný, či už hydrofóbný alebo hydrofilný, citlivý na teplotu, viskózný olej či tuhá látka [15].

I keď sa jedná o ľahko realizovateľný proces v laboratóriu, ťažkosť robí výroba vo veľkom merítku, keďže procesné náklady sú obrovským problémom. Ďalším negatívom môže byť fakt, že vznikajúce kapsule sú porézne a umožňujú rýchlu a jednoduchú difúziu vody a iných

tekutín do, resp. von z matrice. Táto vlastnosť je pozitívom pri enkapsulácii živých buniek a enzýmov, ktoré majú byť prístupné pre okolité prostredie, no veľkou nevýhodou ak ide o ochranu či izoláciu aktívnej látky napríklad pre zvýšenie trvanlivosti [2], [15].



Obr. 4: Sieťovanie alginátu sodného pôsobením CaCl_2

2.1.2 Výhody enkapsulácie pri vývoji nosičov buniek

Proces enkapsulácie je využívaný z rôznych dôvodov a má široké uplatnenia v mnohých odvetviach, ako napríklad vo farmaceutickom, textilnom, chemickom či potravinárskom priemysle.

Enkapsulácia má mnoho výhod, medzi ktoré patrí ochrana buniek ako pred mechanickým namáhaním, tak pred nepriaznivými podmienkami vonkajšieho prostredia. Matrica poskytuje definované, nemenné a ochranné mikroprostredie. Chráni pred zmenami pH okolitého prostredia, pred bakteriofágmi či pred vysušením. Bunky majú priaznivejšiu viabilitu, ich metabolická aktivita môže byť udržaná dlhšie. Ďalším pozitívom je možnosť kontrolovaného uvoľňovania buniek po ich aplikovaní do požadovaného prostredia [16].

Stupeň rozkladu matrice bude mať priamy súvis s biologickou aktivitou enkapsulovaných mikroorganizmov. Usušené kapsule môžu byť uchovávané pri izbovej teplote po dlhú dobu pričom zaručujú priaznivé prostredie pre prežitie baktérií. Inokulanty môžu byť vylepšené začlenením esenciálnych živín pre rast baktérií, čím sa z kapsule stáva bio reaktor, čoho výsledkom je zvýšený počet baktérií aplikovaných do pôdy [17].

Kapsula sa môže obnažiť na základe troch primárnych mechanizmov: difúzia, degradácia alebo bobtnanie a následná difúzia. Difúzia môže nastať v makroskopickom merítku, čiže cez póry v polymérnej matrici, alebo na molekulárnej úrovni, prechodom medzi polymérne reťazce [18].

2.2 Hydrogély ako nosiče enkapsulovaných častíc

Pri enkapsulácii existuje mnoho látok, ktoré môžu byť využité k zachyteniu a zabaleniu aktívnej zložky. Výber tej správnej závisí na tom, pre aké technologické odvetvie sa enkapsuluje. Hydrogély, založené či už na prírodných alebo syntetických polyméroch, sú záujmom pre enkapsuláciu baktérií a v ostatnom čase sa stávajú atraktívnymi aj v oblasti „tkanivového inžinierstva“ pre ich schopnosť regenerovať rôzne druhy orgánov a tkanív [19].

Hydrogély sú definované ako trojrozmerné sieťovité štruktúry, ktoré dokážu absorbovať veľké množstvo vody do svojej poréznej štruktúry. Sú to materiály, ktoré sa vytvárajú fyzikálnou interakciou alebo chemickým sieťovaním hydrofilného polymérneho reťazca. Molekuly vody prenikajú do intersticiálnych priestorov trojdimenzionálnej polymérnej siete,

čím hydrogél imituje biologické tkanivo. Množstvo absorbovanej vody závisí na porozite hydrogélu a na hydrofilitite funkčnej skupiny polyméru [20].

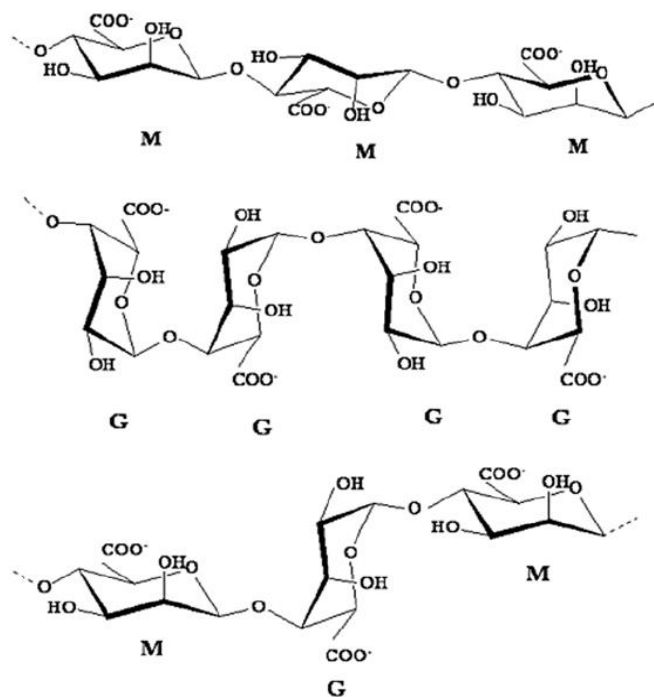
Kapacita hydrogélů zadržat vodu vzrastá najmä pre prítomnosť hydrofilných skupín, napr. amino, karboxylovej a hydroxylovej skupiny v polymérnom reťazci. Množstvo vody prítomnej v hydrogéli môže nadobúdať hodnoty od 10% po tisícnásobky váhy suchého polyméru. Čím viac má polymér hydrofilných skupín, tým viac vody je schopný zadržat [21].

Hydrogély možno klasifikovať do dvoch kategórií na základe podstaty sieťovania. Ak sieťovanie zahŕňa tvorbu kovalentných väzieb, hovoríme o permanentných či chemických hydrogélach. Ak sa hydrogély tvoria na základe slabých medzimolekulárných interakcií ako iónové interakcie či vodíkové mostíky, hovoríme o fyzikálnych hydrogélach [21].

2.2.1 Alginát

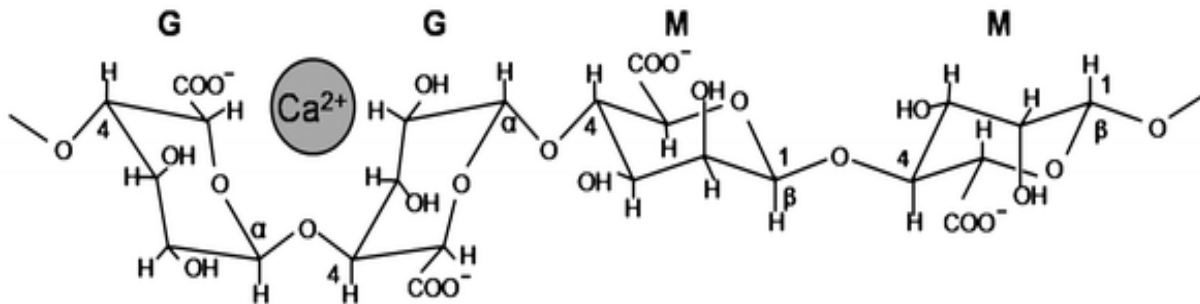
Komerčne dostupný alginát je obyčajne extrahovaný z hnedých rias (*Phaeophyceae*), reakciou s vodnými alkalickými roztokmi, typicky s hydroxidom sodným. Tieto riasy obsahujú alginát do 40 % suchej hmotnosti. Extrakt je filtrovaný a za účelom zrážania sa pridáva chlorid sodný či vápenatý. Pre premenu zo soli alginátu na kyselinu sa používa zriedená kyselina chlorovodíková. Nasleduje purifikácia, čoho výsledkom je vodorozpustný alginát sodný. Druhou cestou výroby je bakteriálna biosyntéza alginátu, čoho výsledkom je lepšie definovaná chemická štruktúra a fyzikálne vlastnosti produktu. Bakteriálny alginát produkuje *Azobacter* a *Pseudomonas* [23].

Alginát je blokový lineárny kopolymér, obsahujúci jednotky β -D-mannurónovej kyseliny (M) a α -L-gulurónovej kyseliny (G) viazané β -(1,4) glykosidovými väzbami. Bloky, zobrazené na Obr. 5, sú tvorené reťazcami obsahujúcimi iba G-zvyšky, iba M zvyšky alebo alternujúce bloky MG v rôznom pomere. Alginát extrahovaný z rôznych zdrojov sa líši v pomere M/G, takisto ako v dĺžke jednotlivých blokov. Molekulová hmotnosť leží v rozmedzí od 20 000 do 200 000 Da. Z toho vyplývajú rozdiely v rozpustnosti a sieťovaní s vápenatými iónmi [24].



Obr. 5: Štruktúra M a G bloku a alternujúceho GM bloku [24]

Rozličné katióny ukazujú rôznu afinitu k alginátu. Platí, že alginát s vyšším obsahom gulurónových jednotiek vytvára gély väčšej pevnosti v porovnaní s alginátom bohatým na mannuronové jednotky, keďže G zbytky preukazujú vyššiu afinitu pre dvojvalentné ióny ako M zbytky (viď Obr. 6).



Obr. 6: Pravdepodobný spôsob väzby vápenatého iónu a dvoch G jednotiek [22]

Kompozícia (pomer M/G), poradie, dĺžka G bloku, molekulová hmotnosť či použitý katión sú kritické faktory pre fyzikálne vlastnosti alginátu a jeho výsledného hydrogélu [25].

2.3 Ďalšie využité inštrumentálne techniky

2.3.1 Lyofilizácia

Lyofilizácia je metóda sušenia vlhkých materiálov. Slúži k odstráneniu častíc ľadu zmrazených komponentov materiálu na základe procesu sublimácie. Dochádza aj k odstráneniu naviazanej vody desorpciou. Slúži k uchovaniu materiálu citlivého na teplo, ako sú mikroorganizmy, bielkoviny alebo farmaceutiká.

Materiál, ktorý má byť lyofilizovaný, je najprv zamrazený v špeciálnej nádobe, potom je nádoba s materiálom pripevnený na lyofilizátor, kde je vystavená vákuu pod trojným bodom látky. Následne dochádza k samotnému sušeniu, kde vplyvom zvýšenej teploty dochádza k sublimácii [26].

2.3.2 Mikrokolorimetria

Mikrokolorimetria je termická analýza, ktorou možno sledovať v priebehu merania rôzne tepelné zmeny. Kolorimetrické experimenty prebiehajú za presne daných podmienok, za konštantnej teploty alebo objemu [37]. Jedná sa o metódu, ktorou možno sledovať rast buniek, ich metabolickú aktivitu alebo môže slúžiť k rozlíšeniu mikrobiálnych druhov.

Multikanálový mikrokolorimeter sa využíva pri experimentoch ako izotermická titračná kalorimetria, stanovenie rozpúšťacieho tepla, vplyv vlhkosti na chovanie vzoriek alebo sledovanie zmien pri raste a metabolizme mikroorganizmov vo vzorke. Pomocou tohto prístroja je možno určiť rozpúšťacie tepla, entalpiu micelizácie pri titračných experimentoch, stanoviť starnutie materiálu na základe zvyšovania koncentrácie mikroorganizmov vo vzorke či analyzovať tepelnú stabilitu materiálov v čase [38]. Táto metóda nachádza uplatnenie v medicíne, kde dokáže napríklad detekovať bakteriálnu kontamináciu darovanej krvi či zistiť bakteriálnu infekciu [39].

Základom mikrokolorimetru je termostat s citlivosťou 0,0001°C, ktorý môže pracovať v izotermickom, krokovo izotermickom alebo teplotne skenovacom režime. Ďalšou dôležitou súčasťou je súbor 4 rôznych kalorimetrov s rozdielnymi objemom meracej cely a rôznym použitím. Všetky kalorimetre sa dajú používať súčasne pre rôzne typy experimentov, no obmedzením je nutnosť nastavenia rovnakého teplotného režimu pre všetky súčasne používané kalorimetre [38].

3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

Termín biohnojivá zvyčajne označuje produkt, ktorý obsahuje pôdne mikroorganizmy aplikované pre podporu rastu rastlín. Vessey definoval biohnojivá ako „materiál, ktorý obsahuje živé mikroorganizmy, ktoré pri aplikácii k semenám, na povrch rastliny alebo do pôdy kolonizuje rizosféru alebo vnútro rastliny a podporuje rast zvýšením prísunu či prístupu základných živín hostujúcej rastliny [27].

Mikroorganizmus, ktorý biohnojivo obsahuje sa označuje ako *rast podporujúca rizobaktéria* (*plant growth promoting rhizobacteria* – PGPR). Výsledkom aplikácie sú benefity pre rastlinu. Inokulácia poskytuje udržateľný prístup k zvýšeniu úrody. PGPR ovplyvňuje rast a vývin umožnením príjmu živín na povrchu koreňov. Hlavným faktorom je ich schopnosť viazať atmosférický dusík. Taktiež znižujú škodlivé účinky patogénov v pôde [28].

Inokulácia rastlín mikroorganizmami za účelom zlepšenia úrody sa využíva už desaťročia [30]. Hlavné problémy, ktoré sa s inokuláciou viažu, sú efektivita použitej baktérie a technológia aplikácie. Technológia enkapsulácie mikroorganizmov je v oblasti poľnohospodárstva zatiaľ iba experimentálna, komerčne enkapsulované produkty v tejto oblasti teda momentálne neexistujú [31].

Ak sa suspenzia baktérií inokuluje do pôdy bez akéhokoľvek nosiča, populácia väčšiny druhov PGPR baktérií sa rapídne zníži. Tento trend, spolu so slabou produkciou bakteriálnej biomasy, s ťažkosťami zachovania aktivity v rizosfére a fyziologickým stavom baktérie v čase aplikácie, môže brániť nárastu dostatočne veľkej PGPR populácie. Takto nechránená inokulovaná baktéria musí často konkurovať pôvodnej, lepšie adaptovanej mikroflóre [32].

Prvým cieľom je nájsť najlepší kmeň baktérií pre žiadaný efekt a pre cieľovú plodinu. V praxi je najvýhodnejšie, ak jeden kmeň baktérie možno aplikovať na čo najviac druhov plodín. Inokulant musí byť kompatibilný s úkonmi ako dezinfekcia semien alebo použitie bežných pesticídov. Medzi najdôležitejšie vlastnosti patrí jednoduchosť aplikácie pre poľnohospodárov, prežitie skladovacej doby, správne fungovanie v rôznych typoch pôdy a iné [32].

Ďalším krokom je návrh špecifickej formulácie inokulantu a metódy praktickej aplikácie, berúc do úvahy všetky obmedzenia. Spôsobov akými dostať baktérie do pôdy je niekoľko a tieto inokulanty zhrňuje Obr. 7.

Prvou možnosťou je aplikácia baktérií bez akéhokoľvek nosiča, čiže prosté vnesenie do pôdy v kultivačnom médiu, často zriedenom vodou. I keď je ide o náročný proces, lebo ho treba vykonávať pod prísnymi podmienkami, boli dosiahnuté pozitívne výsledky. Táto metóda však nie je praktická pre bežných pestovateľov a problémy by robil aj *scaling-up*; veľké objemy kvapaliny, potreba inkubácie a chladenia pre zachovanie média [32].

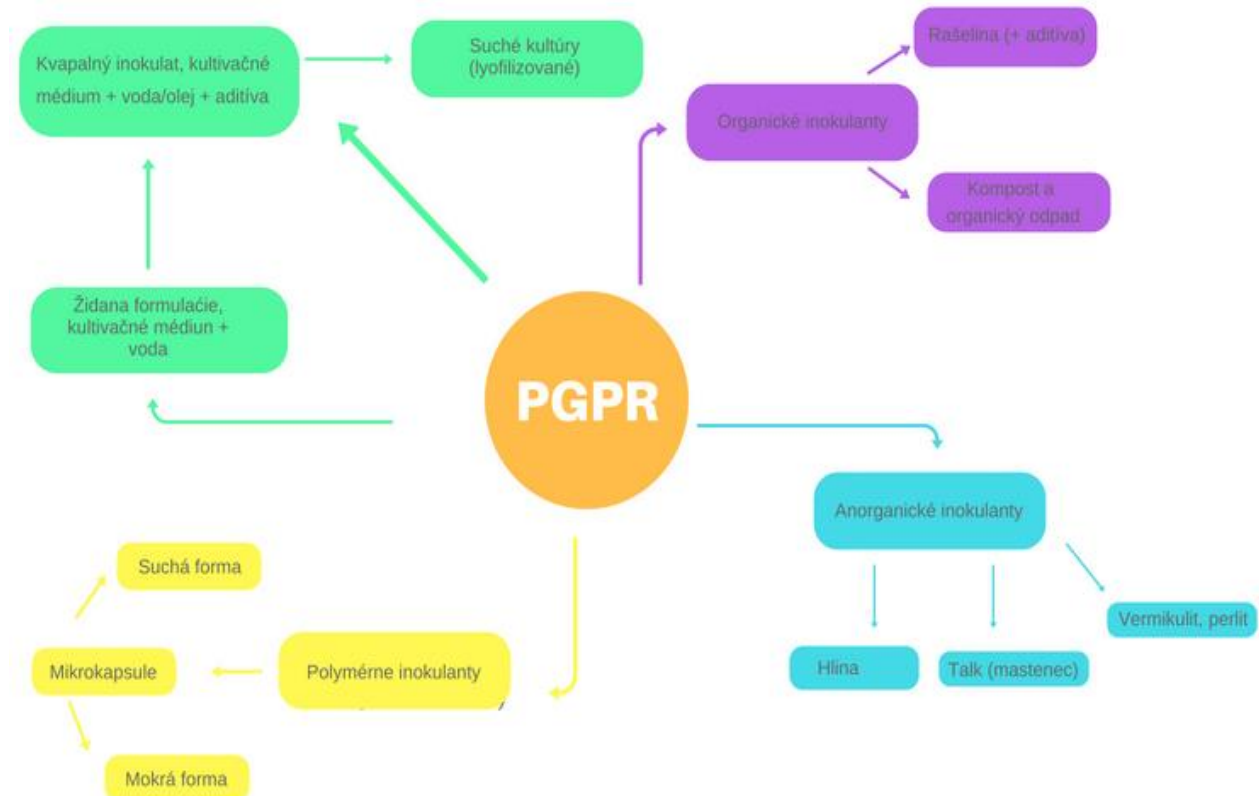
Ďalšou kvapalnou formuláciou by bol systém kultivačné médium + voda/olej + rozpustné aditíva (napr. sacharóza, glycerol, karboxymetyl celulóza, arabská guma a. i.) pre zlepšenie istých parametrov ako lepivosť, stabilita, povrchovú aktivitu či disperzné vlastnosti. Výhodou oproti pevným inokulantom je dlhšia trvanlivosť (2 roky oproti približne 6 mesiacom), avšak za presne danej teploty. Takto inokulované baktérie sa väčšinou aplikujú na semená sprejovaním pred zasiatím [33].

Organické nosiče patria medzi najviac predávané vo veľkých objemoch. Najdôležitejší inokulant tejto skupiny je rašelina, ktorá môže byť v pevnej forme ako prášok či granule, alebo v kvapalnej forme ako kašovitá suspenzia. Voľba správnej formy závisí na vlhkosti pôdy. Ďalším možným organickým nosičom je organický odpad či kompost z korku, bagasy

(šťaava z cukrovej trstiny), pilín alebo banánových listov. Nevýhodou je, že nemôžu tvoriť základ pre väčšiu výrobu, keďže zloženie várky je premenlivé [34].

Čo sa týka anorganických materiálov, najviac sa používa hlina zmiešaná s ryžovou šupkou, cukrom, vodou a kultivačným médiom s baktériami. Inokulanty založené na mastenci sa využívajú v Indii. Perlitové a vermikulitové nosiče sú tiež v oblasti záujmu, no kľúčovou je optimalizácia prípravy a sušiaceho procesu [35].

Najdynamickejšie rozvíjajúcou sa skupinou inokulantov sú polyméry, ktoré ponúkajú podstatné výhody oproti rašelina: dlhšiu trvanlivosť, prežitie dostatočného počtu baktérií v pôde, vhodnú hustotu buniek, jednoduchší výrobný proces a celkovo lepší výkon [32].



Obr. 7: Rozdelenie inokulantov pôdnych baktérií, upravené z [32]

Enkapsulačné technológie v oblasti poľnohospodárstva zaostávajú za pokrokom v oblasti farmácie či nanotechnológií. Hlavným cieľom enkapsulácie v agro oblasti je prispôbiť aktuálne techniky potrebám v poľnohospodárstve čo by viedlo k začleneniu tejto metódy do komerčných produktov pre poľnohospodárov[36].

Hlavným dôvodom, prečo je alginát v tejto oblasti najrozšírenejší je jeho netoxická povaha, biodegradabilita, dostupnosť a nízka cena. Takisto je výhodou pomalé uvoľňovanie zachytených mikroorganizmov do pôdy. Medzi nevýhody sa uvádza dodatočná úprava počas siatia a fakt, že uvoľnený mikroorganizmus musí migrovať cez pôdu k rastline. Pri tomto procese môže čeliť rôznej konkurencii či predátorom mikroflóry [36].

Za účelom predísť spomínaným problémom sa zrodil koncept mikrokapsúl veľkosti 50 až 200 μm. Myšlienka je, že kapsule sú dosť malé, ale stále schopné enkapsulácie dostatočného množstva baktérie. Ďalším krokom by bola možná tvorba práškovej hmoty, ktorá by sa predávala priamo so semenami ako „vylepšené semená“. Dnes sa bežne predávajú semená obalené hnojivom, fungicídmi či hormónmi [36].

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

Experimentálna časť tejto bakalárskej práce sa zaoberá optimalizáciou metódy enkapsulácie dusík fixujúcej baktérie *Cupriavidus necator* H16 (získané z Českej zbierky mikroorganizmov Masarykovej univerzity v Brne) a sledovaním vplyvov zmien podmienok enkapsulácie na subjektívne i objektívne hodnotenú kvalitu kapsúl.

4.1 Použité chemikálie

- Alginát sodný, Sigma Aldrich
- Alginát sodný, ROTH
- CaCl₂, Lachema N.P. Brno
- HCl, Lach-ner s.r.o.
- TRIS(hydroxymetyl)aminometán, Lach-ner s.r.o.
- NaH₂PO₄·2 H₂O, Lach-ner s.r.o.
- Na₂HPO₄·12 H₂O, Lach-ner s.r.o.

4.2 Použité prístroje

- Enkapsulátor BUCHI B-395
- Miešačka magnetická, IKA, Mini Mr Standard
- Analytické váhy DENVER 224A
- Spektrofotometer Hitachi
- SEC MALS systém (chromatografický systém Agilent Technologies, detektory Wyatt Technology)
- Mikrokolorimeter TAM II (TA Instruments)

4.3 Príprava roztokov

Ako sieťovacie činidlo sa použil 1 hm. % roztok CaCl₂. Zásobný roztok bol pripravený vo vode, v pufré TRIS-HCl alebo fosfátovom pufré (vždy v celkovom objeme 1 l).

Fosfátový tlmivý roztok sa pripravil do 1 l odmernej banky navážením 1,761 g NaH₂PO₄·2 H₂O a 13,860 g Na₂HPO₄·12 H₂O. Koncentrácia roztoku bola 50 mmol/l a pH 7,4.

TRIS-HCl tlmivý roztok sa pripraví do 1 l odmernej banky navážením 6,057 g TRIS(hydroxymetyl)aminometánu, doplnením banky asi do polovice a následným prikvapávaním 3 mol/l roztokom HCl, pričom sa kontrolovalo pH až po dosiahnutie hodnoty 7,5. Potom sa doplnila odmerná banka vodou po rysku.

Postup pri príprave roztokov alginátu bol taký, že najprv sa zohrialo rozpúšťadlo a postupne sa pridával po malých dávkach alginát za miešania pomocou magnetickej miešačky. Ako rozpúšťadlo sa použila voda, fosfátový a TRIS-HCl tlmivý roztok. Boli použité roztoky o koncentráciách 0,5, 1 a 2 hm. % vo všetkých rozpúšťadlách. Všetky roztoky boli pripravené z oboch druhov alginátu.

Baktérie v médiu boli kultivované kolegami z ústavu potravín nasledujúcim postupom: Na prípravu inokula pre baktériu *Cupriavidus necator* H16 bolo použité komerčne dostupné tekuté živé médium Nutrient Broth o zložení:

- | | |
|--------------------|----------|
| • Beef extract | 10 g |
| • Peptón | 10 g |
| • NaCl | 5 g |
| • Agar | 20 g |
| • Destilovaná voda | 1 000 ml |

Inokulum pre bakteriálnu kultiváciu bolo pripravené do 100 ml Erlenmeyerových baniek. Každá banka obsahovala 50 ml submerzného média Nutrient Broth. Po dokončení sterilizácie a ochladení média na izbovú teplotu bolo médium trikrát zaočkované bakteriologickou kľučkou z agarovej platne v sterilnom prostredí laminárneho boxu Aura mini. Takto pripravené inokulum bolo uchované 24 hodín na temperovanej trepačke pri frekvencii trepania 180 rpm a teplote 30°C.

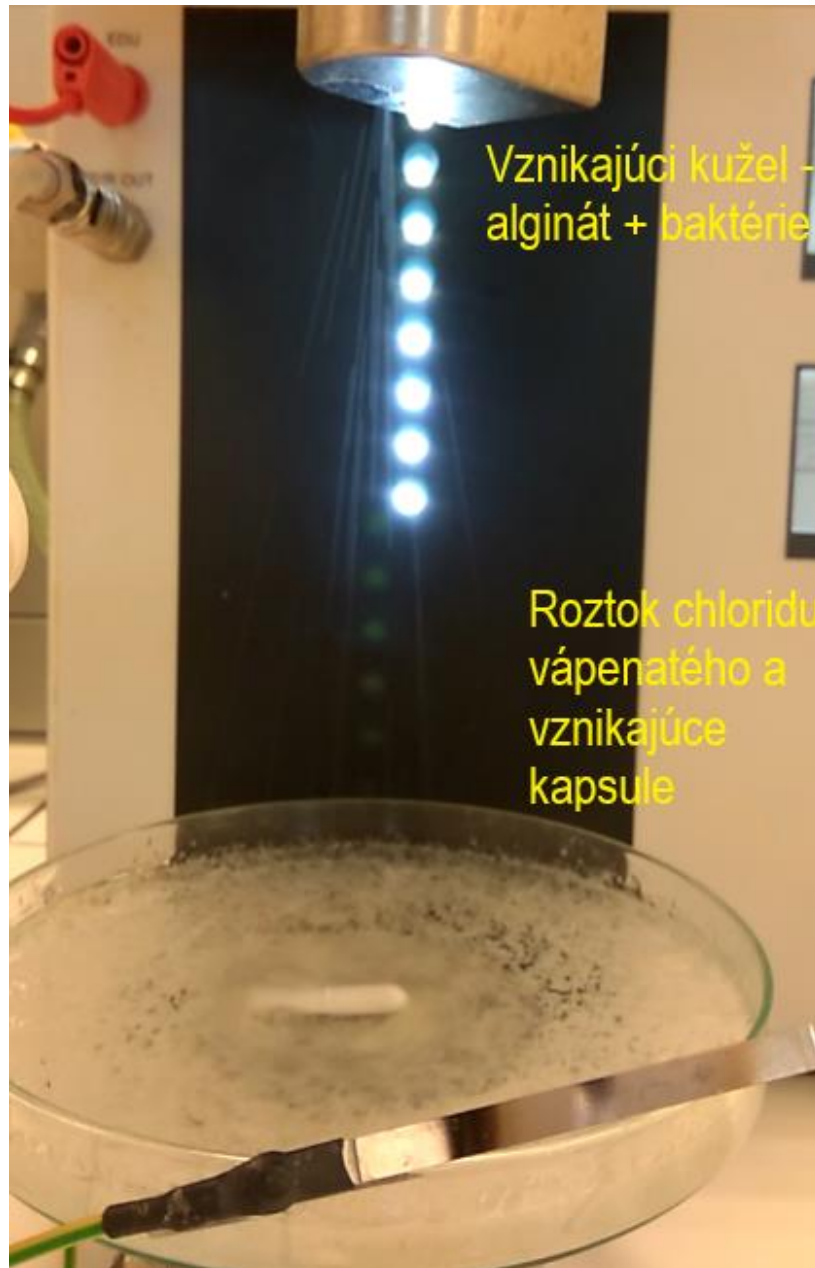
Na zaočkovanie produkčného minerálneho média bolo použitých 5 obj.% inokula, s ohľadom na celkový objem produkčných médií. Kultivácia produkčného média prebiehala po dobu 72 hodín, na temperovanej trepačke s rovnakými parametrami. Všetky médiá boli sterilizované v tlakovom hrnci s uzavretým ventilom po dobu 55 minút, pri teplote približne 120 °C.

Zloženie minerálneho média bolo nasledovné:

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g
- KH_2PO_4 1,02 g
- Na_2HPO_4 11,1 g
- MgSO_4 0,2 g
- Fruktóza 20 g
- Roztok stopových prvkov 1 ml
 - FeCl_3 9,7 g
 - CaCl_2 7,8 g
 - CuSO_4 0,156 g
 - CoCl_2 0,119 g
 - NiCl_2 0,118 g
 - CrCl_2 0,062 g
 - 0,1 mol/l HCl 1 000 ml
- Destilovaná voda 1 000 ml

4.4 Nastavenie enkapsulátoru

Nastavenie enkapsulátoru záviselo hlavne na použitej tryske, ale aj na druhu a koncentrácii použitého alginátu. Pri správnom nastavení by mal z trysky striekať kužel, ako je zobrazené na Obr. 8.



Obr. 8: Enkapsulácia - vznikajúci kužel alginátu + H16

Všeobecný postup pri enkapsulácii bol nasledovný: v reagenčnej fľaši sa zmiešalo 35 ml roztoku alginátu sodného o príslušnej koncentrácii, pridalo sa 10 ml destilovanej vody a 15 ml disperzie *C. necator* H16 v kultivačnom médiu. Do fľašky boli vedené dve hadice, jedna na prívod vzduchu (nebola ponorená do roztoku) a druhá na dávkovanie roztoku do enkapsulátoru. Najťažšou úlohou bolo nastavenie prívodu plynu, keďže sa dal regulovať na troch miestach (regulátor prívodu vzduchu na stole, vlastný regulátor vzduchu enkapsulátoru a škrtič na hadici). Cieľom bolo také nastavenie, aby bol prúd kvapaliny čo najtenší, no aby nedošlo k zásekom prúdu za tvorby veľkých kvapiek alebo k úplnému

zastaveniu toku. Počas nastavovania sa roztok jímaj zvlášť do Petriho misky a pri správnom nastavení sa tento obsah pridal späť k roztoku. Pod tryskou bol pripravený roztok sieťovacieho činidla – CaCl_2 v objeme 150 ml, kde súmerne padali kvapky roztoku z trysky za intenzívneho miešania magnetickou miešačkou. Následne sa roztok dal bokom a kapsule nechali v roztoku tvrdnúť dosieťovaním. Po uplynutí doby tvrdnutia sa roztok filtroval cez sieťku a kapsule boli odložené v roztoku do chladničky.

Rozsah použitých parametrov enkapsulátoru sa nachádza v Tab. 2.

Tab. 2: Parametre enkapsulátoru

Parameter	Hodnota
Frekvencia	500-800 Hz
Napätie	1 500 – 2 000 V
Tlak	120 – 280 mbar

4.5 Metóda SEC-MALS-dVI-dRI na určenie molekulovej hmotnosti alginátov

Molekulová hmotnosť použitých alginátov nebola udaná výrobcom, musela byť teda stanovená kolegami nasledujúcim postupom: MALS je detektorom pre stanovenie molekulovej hmotnosti na základe merania uhlovej závislosti rozptylu svetla. dVI je diferenčný viskozimetrický detektor zodpovedný za charakterizáciu konformácie a vetvenia molekuly a dRI je diferenčný refraktometer (koncentračný detektor). Chromatografická časť použitého prístroja bola dodaná firmou Agilent Technologies, ostatné detektory firmou Wyatt Technology. Pre SEC separáciu bola využitá kolóna typu PL aquagel-OH MIXED-H o rozmeroch 300x7,5 mm. Pre meranie bola použitá mobilná fáza NaNO_3 o koncentrácii 0,1 mol/l s prídavkom 3 mmol/l NaN_3 . Rýchlosť prietoku mobilnej fázy bola stanovená na 0,6 ml/min a objem nástreku jednej vzorky 100 μl . Pre meranie bola využitá hodnota inktermentu indexu lomu $dn/dc = 0,165 \text{ ml/g}$. Pred samotným meraním boli vzorky prefiltrované cez striekačkový filter o veľkosti pórov 0,45 μm .

4.6 Lyofilizácia

Lyofilizovali sa štyri vzorky, ktorých vlastnosti sú uvedené v Tab. 3. Enkapsulované častice mali veľkosť 450 μm a tvrdli v CaCl_2 približne 1 hodinu. Mimo týchto vzoriek sa lyofilizovali aj dve vzorky kapsúl z alginátu Sigma Aldrich, produkty však boli nevyhovujúce.

Tab. 3: Vlastnosti lyofilizovaných enkapsulovaných vzoriek

	Disperzné prostredie	Baktéria
1	Voda	bez H16
2	Voda	s H16
3	TRIS-HCl	bez H16
4	TRIS-HCl	s H16

4.7 Izotermická mikrokolorimetria

Disperzia baktérie *C. necator* H16 sa nariedila na optickú hustotu $A = 2$ pri 600 nm a rozdelila na dve časti. Prvá časť sa nemenila, do druhej várky sa pridal pepón v množstve 5 g/l ako zdroj výživové médium pre baktérie. Enkapsulovalo sa za použitia 2% alginátu vo vode a trysky 750 μm ; čas tvrdnutia bol 10 min. Pre každú vzorku sa navážilo do sklenenej mikrokolorimetrickej ampule (o celkovom objeme 4 ml) 0,5 g kapsúl a doplnilo vodou alebo vodným roztokom peptónu (5 g/l). Ampule sa hermeticky uzavreli a vložili do prístroja. Pripravili sa tri druhy vzoriek, vždy po dvoch kusoch, ktoré sú zobrazené v Tab. 4.

Tab. 4: Vzorky pripravené pre mikrokolorimetriu

	Enkapsulácia	Peptón
1	Nie	v disperznom prostredí
2	Nie	v disperznom prostredí
3	Áno	v disperznom prostredí
4	Áno	v disperznom prostredí
5	Áno	v disperznom prostredí aj v kapsule
6	Áno	v disperznom prostredí aj v kapsule

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 Vplyv druhu alginátu na vznik kapsúl

Pri experimentoch sa pracovalo s dvoma druhmi alginátu (od firmy Sigma Aldrich a ROTH), ktoré sa líšili už na prvý pohľad farbou (Obr. 9). Alginát od firmy ROTH je bledší a vznikajúci roztok bol viskóznejší. Pri rovnakom postupe, ale použití alginátov od rôznych firiem, boli výsledky enkapsulácie rozdielne.



Obr. 9: Alginát Sigma Aldrich vpravo, Alginát ROTH vľavo

Pri enkapsulácii za použitia alginátu od firmy Sigma Aldrich sieťovanie nebolo dostatočné, vznikajúce kapsule nemali požadovaný tvar a po filtrácii sieťovacieho činidla sa kapsule prilepili k sebe a už sa nedali oddeliť. Po uložení kapsúl do vody a do chladničky sa po dni roztok zakalil a kapsule sa rozpadali. Jedinou výhodou tohto alginátu bola lepšia rozpustnosť a tým pádom sa čas prípravy výrazne skrátil.

Enkapsulácia alginátom ROTH prebiehala bez problémov, i keď jeho rozpustenie bolo časovo náročnejšie. Alginát od firmy ROTH sa vyhodnotil ako lepší pre danú enkapsuláciu.

Pri rovnakom postupe, ale použití alginátov od rôznych firiem, boli výsledky veľmi odlišné. Keďže ani jeden z výrobcov neuvádza strednú molekulovú hmotnosť, bolo potrebné ju zmerať u oboch alginátov metódou SEC-MALS-dVI-dRI, aby sa zistilo, či je tento faktor zodpovedný za nízku kvalitu enkapsulácie alginátom dodávaným firmou Sigma Aldrich.

Po analýze molekulovej hmotnosti sa zistilo, že alginát Sigma Aldrich má výrazne nižšiu molekulovú hmotnosť ako alginát ROTH (viď Tab. 5). Tým sa potvrdila všeobecná informácia z kapitoly 2.2.1, kde sa hovorí o tom, že alginát z rôznych zdrojov má rôznu molekulovú hmotnosť a ako tento faktor môže ovplyvniť enkapsuláciu. Čím má alginát väčšiu molekulovú hmotnosť, tým je sieťovanie účinnejšie.

Tab. 5: Molekulové hmotnosti jednotlivých alginátov a ich odchýlka

Alginát	Mw (kDa)	Odchýlka (kDa)
Sigma Aldrich	37,61	4,31
ROTH	144,99	4,98

Alginát od firmy Sigma Aldrich sa vyhodnotil ako nevyhovujúci pre daný postup enkapsulácie a pri ďalších experimentoch sa s ním nepracovalo. Ďalej sa pracovalo výhradne s alginátom od firmy ROTH, ktorý má vďaka svojej vysokej strednej molekulovej hmotnosti lepšie sieťovacie vlastnosti s vápenatými iónmi.

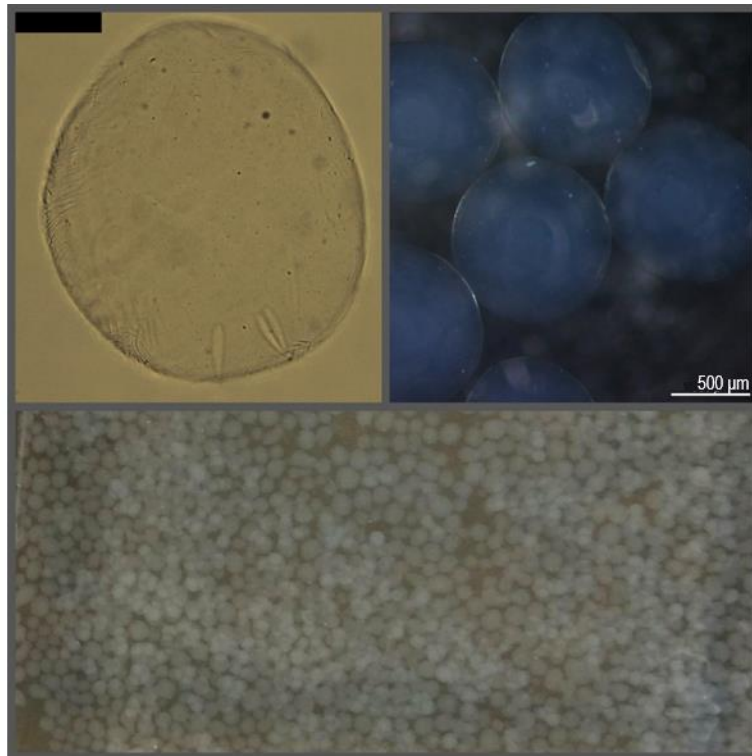
5.2 Vplyv disperzného prostredia

V bunkách dochádza k pasívnemu transportu nízkomolekulárnych látok na základe fyzikálne – chemických dejov ako osmóza a difúzia. Keďže bunky majú vyššiu koncentráciu osmoticky aktívnych častíc ako destilovaná voda, zvyšuje sa ich turgor a môžu prasknúť. Jedná sa o hypotonické prostredie. Opakom je hypertonické prostredie, pri ktorom dochádza k zmršteniu bunky. Ideálnym stavom pre bunky je izotonické prostredie, ktoré je charakterizované rovnakou osmotickou hodnotou ako bunka a tým pádom nedochádza k prúdeniu vody. Táto úvaha viedla k snahe enkapsulácie v tlmivom roztoku TRIS-HCl a fosfátovom tlmivom roztoku ako modeloch izotonických roztokov.

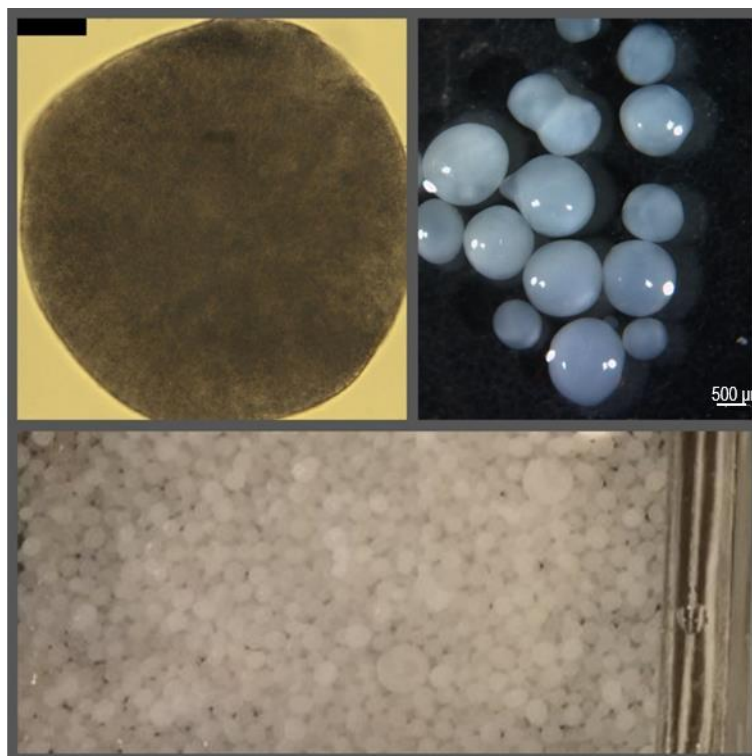
Pripravil sa roztok 2% alginátu v rôznych rozpúšťadlách: vo vode, vo fosfátovom pufru a v pufru TRIS-HCl. Pri použití alginátu vo fosfátovom pufru sa zdala reakcia sieťovania pomalšia, tvar výsledných kapsúl bol nedokonalý (Obr. 12 vľavo), pričom kapsule z alginátu vo vode a v TRIS-HCl mali guľový tvar. Enkapsulované baktérie v TRIS-HCl mali sýtejšiu bielu farbu (Obr. 12 vpravo). Na fotkách zo stereomikroskopu (Obr. 12) je vidieť, že vo fosfátovom tlmivom roztoku kapsule nedržia tvar. Pre porovnanie je priložená fotka z enkapsulácie bez baktérie (Obr. 10). Tieto kapsule sú bezfarebné.

Bola snaha pripraviť aj sieťovacie roztoky chloridu vápenatého v rôznych disperzných prostrediach, no CaCl_2 sa okrem vody v ničom z vyššie spomínaných úplne nerozpustil čiže enkapsulácia s použitím takýchto sieťovacích prostredí bola neúspešná.

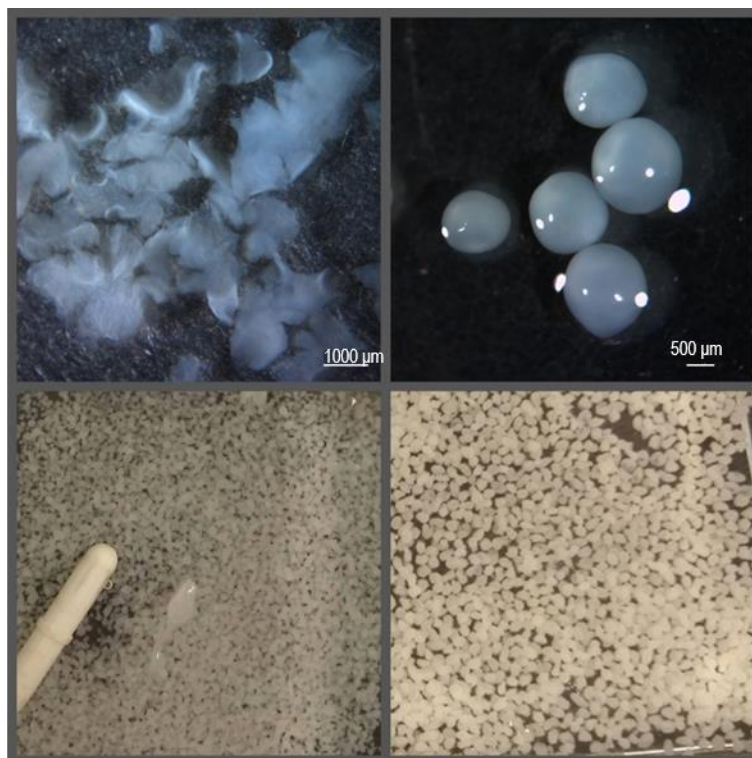
Ďalej sa skúšala stálosť už vzniknutých kapslí v disperzných prostrediach. Kapsule najviac držali tvar vo vode a najmenej vo fosfátovom pufru, kde sa rozrušilo sieťovanie alginátu a kapsle sa v podstate rozpustili.



Obr. 10: Enkapsulované kapsule, bez baktérie, disperzné prostredie: destilovaná voda, tryska 450 μm . Vľavo hore fotka z optického mikroskopu, vpravo hore fotka zo stereomikroskopu, dole fotka vyfotená fotoaparátom



Obr. 11: Enkapsulovaná baktéria, disperzné prostredie: destilovaná voda, tryska 450 μm , vľavo hore fotka optickým mikroskopom, vpravo hore fotka stereomikroskopom, dole fotka vyfotená mobilom



Obr. 12: Vľavo enkapsulované baktérie v prostredí fosfátového pufru, vpravo enkapsulované baktérie v tlmivom roztoku TRIS-HCl, tryska 450 μm , hore fotky vyfotené stereomikroskopom, dole fotoaparátom

Z dôvodu možných osmózných procesov, ktoré by mohli poškodiť bunky, sa navrhol systém s izotonickým disperzným prostredím namiesto prostredia destilovanej vody. Použili sa pufrы: TRIS-HCl a fosfátový tlmivý roztok. Pri použití TRIS-HCl boli výsledné kapsule v požadovanej kvalite. Fosfátový tlmivý roztok sa vyhodnotil ako nevyhovujúci. Dôvodom je pravdepodobne iónová sila pufru, ktorá potlačuje elektrostatické interakcie v systéme a tým pádom oslabuje sieťovanie alginátu chloridom vápenatým a spôsobuje rozpadanie kapsúl [40].

5.3 Vplyv ďalších faktorov na tvorbu kapsúl

Vplyv času tvrdnutia v CaCl_2

Skúšali rôzne časy tvrdnutia kapsúl v sieťovacom roztoku chloridu vápenatého. Kapsule tvrdli 30 min, 1 h, 5 h a 24 h. Po sfiltrovaní vzoriek sa nepozorovali žiadne vizuálne rozdiely.

Vplyv koncentrácie alginátu

Pripravili sa roztoky alginátu o koncentracii 2%, 1% a 0,5% vo vode ako aj v pufru TRIS-HCl. Alginát o koncentracii 2% vyhovoval najviac. Pri 1% bol problém pri použití TRIS-HCl, no pri zvýšení koncentrácie sieťovacie roztoku na 2% prebiehala enkapsulácia bez problémov. Použitie alginátu o koncentracii 0,5% sa vyhodnotilo ako nevyhovujúce. Vznikajúce kapsule nemali guľový tvar a po dni sa v roztoku rozpustili.

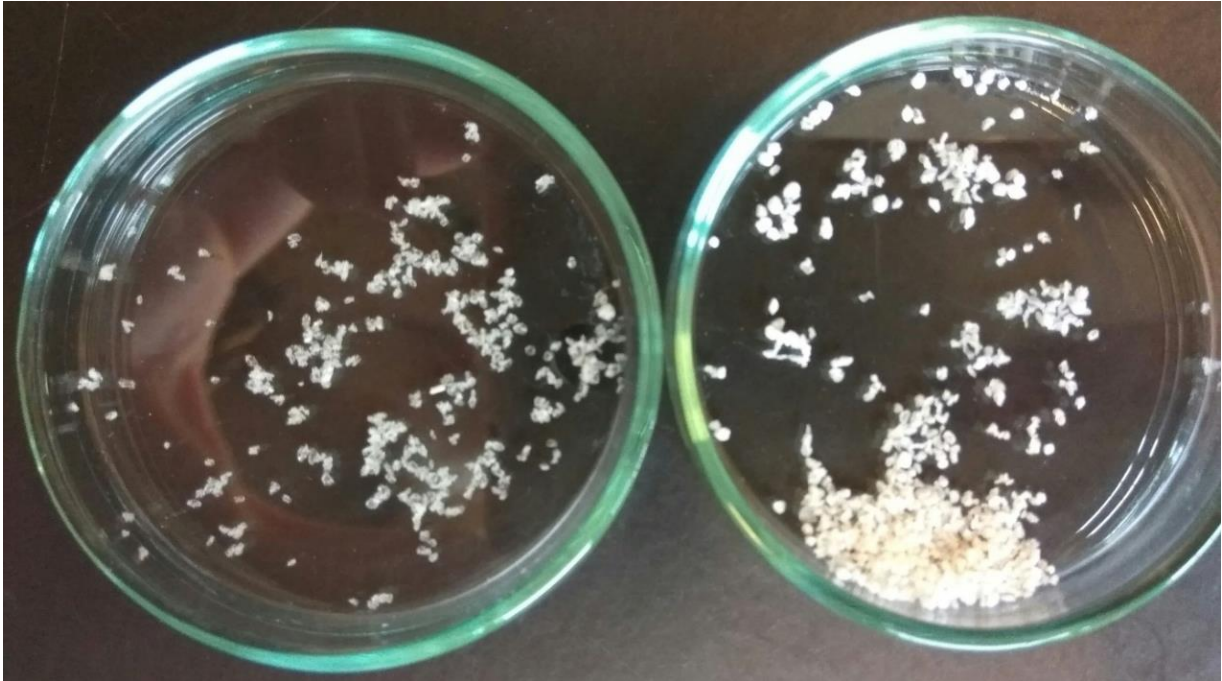
Optimalizácia veľkosti

Ďalším krokom po optimalizácii druhu a koncentrácie alginátu bolo testovanie trysiek veľkosti 200, 450 a 700 μm . Tryska o veľkosti 200 μm sa upchávala aj pri použití 1% alginátu, takže bola vyradená z ďalších experimentov. Trysky 450 a 700 μm fungovali dobre. Pomocou

stereo mikroskopu sa potvrdilo, že skutočná veľkosť vznikajúcich kapsúl je väčšia ako veľkosť použitej trysky (Obr. 10, Obr. 11, Obr. 12).

5.4 Príprava suchej formy nosiča lyofilizáciou

Za účelom prípravy suchej formy produktu sa lyofilizovali vzorky uvedené v Tab. 3. Pri porovnaní Obr. 13 a Obr. 14 je zrejmé, že lyofilizácia kapsúl z vody je priaznivejšia. Kapsule sa dajú jasne rozoznať a pri porovnaní enkapsulovanej baktérie a samotného alginátu je vidieť, že kapsule s baktériou sú biele. Pri lyofilizácii z pufru TRIS-HCl je ťažké rozoznať enkapsulované guľičky, keďže sú obklopené soľou.



Obr. 13: Lyofilizované kapsule vo vode, vľavo bez H16, vpravo s H16



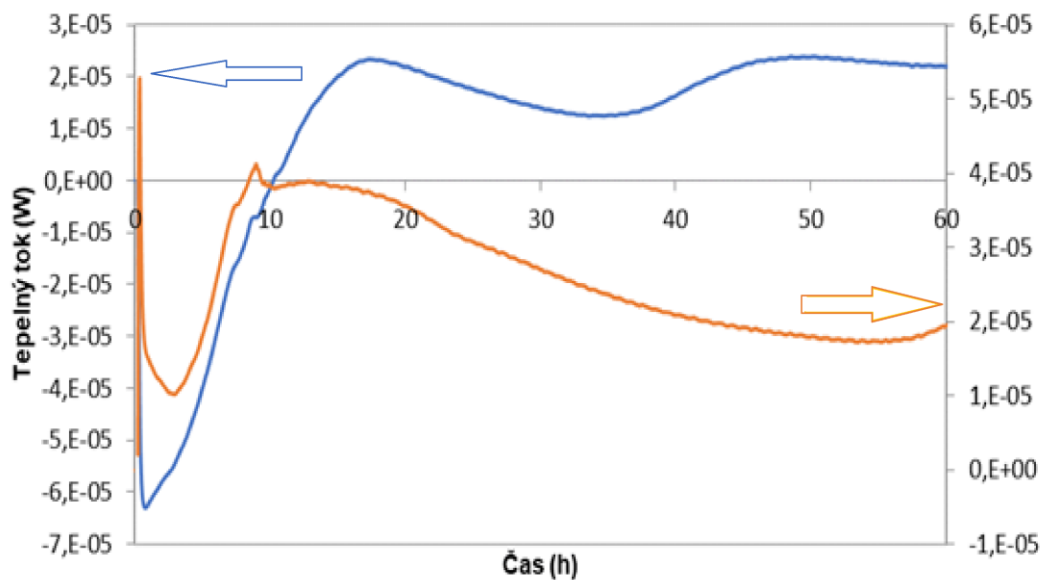
Obr. 14: Lyofilizované kapsule v TRIS-HCl, vľavo bez H16, vpravo s H16

5.5 Stanovenie viability buniek metódou izotermálnej mikrokolorimetrie

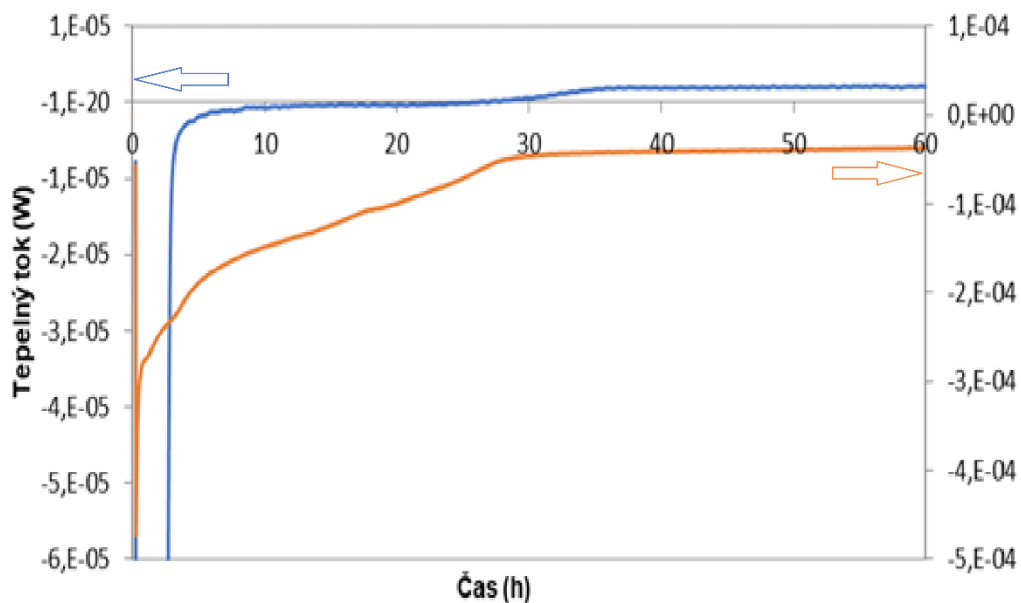
Aby sa zistilo či baktérie celý proces enkapsulácie prežili, skúmala sa ich viabilita v kapsulách. Využilo sa metódy izotermálnej mikrokolorimetrie, kde šlo o snahu zachytiť exotermný proces, ktorý by potvrdil, že bunky metabolizujú a teda sú živé.

Pre experimenty sa použili vzorky uvedené v Tab. 4. Šlo o porovnanie metabolickej aktivity neenkapsulovaných a enkapsulovaných buniek. Pre výživu sa pridal do roztoku či do kapsule peptón. Meralo sa vo dvoch opakovaníach.

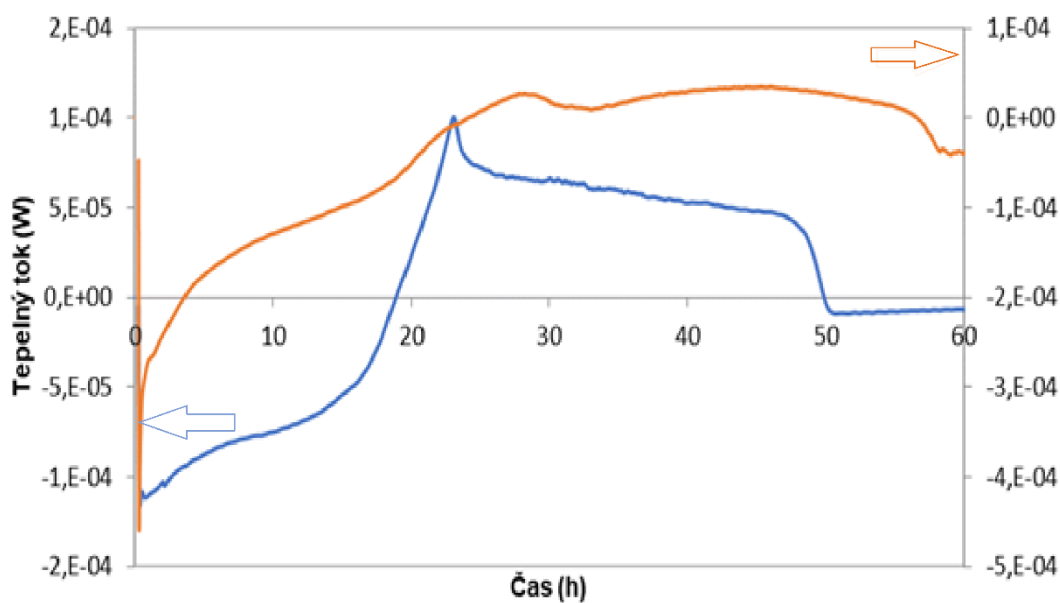
Ako vidieť na všetkých troch grafoch, po počiatočnom šume má krivka rastúcu tendenciu čo značí exotermickú reakciu metabolizmu baktérií. Najvyšší tepelný tok majú neenkapsulované baktérie, najmenej metabolizujú baktérie ktoré sú uzatvorené v kapsule bez peptónu. Pri porovnaní Obr. 15 a Obr. 17 je vidieť, že neenkapsulovaná baktéria dosahuje maximum svojej metabolickej aktivity pri asi 15 h pričom enkapsulované až okolo 23 h. To značí, že sa baktérie postupne uvoľňujú.



Obr. 15: Závislosť tepelného toku na čase, neenkapsulované médium *C. necator* H16, peptón v médiu, dve opakovania



Obr. 16: Závislosť tepelného toku na čase, enkapsulovaná *C. necator* H16, peptón vo vode, dve opakovania



Obr. 17: Závislosť tepelného toku na čase, enkapsulovaná *C. necator* H16, peptón vo vode aj v kapsule, dve opakovania

Metódou izotermálnej mikrokolorimetrie sa zistilo, že baktérie sú po enkapsulácii schopné metabolizovať, čím sa potvrdila ich viabilita.

6 ZÁVER

Táto bakalárska práca sa zaoberala návrhom modelov hydrogélových nosičových systémov pre agronomické využitie a ich prípravou pomocou metódy enkapsulácie. Bola spracovaná literárna rešerš na zadanú tému, v ktorej sa najviac pozornosti venovalo inokulácii, enkapsulačným technikám a hydrogélovým nosičovým systémom. Experimentálna časť práce nadväzovala na rešerš a bol vytvorený návrh experimentov.

Hlavnou náplňou experimentálnej časti bolo optimalizovať metódu práce s komerčným enkapsulátorom. Navrhol sa systém o nasledujúcom zložení: *Cupriavidus necator* H16 ako modelová pôdna baktérie, alginát ako hydrogélový nosič a chlorid vápenatý ako sieťovacie činidlo.

Skúmal sa vplyv rôznych faktorov na enkapsuláciu. Zistilo sa, že molekulová hmotnosť alginátu má výrazný vplyv na úspešnosť procesu. Pri použití alginátu o molekulovej hmotnosti asi 37 kDa bol proces neúspešný. Vznikajúce kapsule nemali požadovaný guľový tvar a rozpadali sa. Po sfiltrovaní sieťovacieho roztoku sa prilepili k sebe a už ich nebolo možné spätne oddeliť. Za použitia alginátu o vyššej molekulovej hmotnosti (asi 145 kDa) prebiehal proces enkapsulácie bez problémov. Ako limitná hodnota koncentrácie alginátu sa určilo 1%. Pri použití nižších koncentrácií nebola enkapsulácia možná. Najčastejšie sa pri ďalších experimentoch pracovalo s 1% a 2% alginátom.

Ďalej sa testoval vplyv disperzného prostredia, kde sa ako najvyhovujúcejšia ukázala destilovaná voda. Tlmivé roztoky sa použili za účelom vytvorenia izotonického prostredia pre bakteriálne bunky, no iónová sila fosfátového pufru rušila sieťovacia reakciu, preto ho nebolo možné ďalej používať. Tlmivý roztok TRIS-HCl sa ukázal ako nevhodný pri kroku lyofilizácie. Pri sledovaní viability sa zistilo, že bunky po enkapsulácii vo vodnom prostredí žijú, takže použitie destilovanej vody sa ukázalo ako neškodné pre baktérie.

Pri sledovaní vplyvu času tvrdnutia kapsúl v sieťovacom činidle, chloride vápenatom, sa nepozorovali žiadne vizuálne zmeny. Najmenšia tryska, ktorá sa používala bola veľkosti 450 μm , keďže pri 200 μm sa nedalo dosiahnuť kontinuálneho procesu pre neustále upchávanie trysky.

Po úspešnom pripravení hydratovaných produktov za použitia trysiek 450 a 750 μm bola snaha o ich prevedenie na suchú formu. Mokré vzorky sa lyofilizovali a z hľadiska suchej podoby kapsúl sa ako najvyhovujúcejšie disperzné prostredie pri ich príprave vyhodnotila destilovaná voda.

Posledným krokom bolo zistiť, či sú baktérie schopné proces enkapsulácie prežiť. Na to sa využila metóda izotermálnej mikrokolorimetrie, kde sa porovnávala metabolická aktivita neenkapsulovaných a enkapsulovaných baktérií. Zistilo sa, že bunky metabolizujú, no dosahujú maximum exotermného procesu približne o 10 hodín neskôr ako neenkapsulované baktérie. To vypovedá o postupnom uvoľňovaní z hydrogélového nosiču.

Prínos práce vidím hlavne v optimalizácii postupu metódy enkapsulácie ako aj v preukázaní viability enkapsulovaných baktérií. Ako ďalšie možné kroky v tomto výskume by som navrhovala prídavky ďalších agrochemických komponent (anorganické nutrienty, huminové látky a.i.). Čo sa týka materiálnej charakterizácie, bolo by prínosné zistiť obsah sušiny, posúdiť reverzibilitu/ireverzibilitu bobtnania suchej formy produktu či stanovenie distribúcie veľkosti kapsúl.

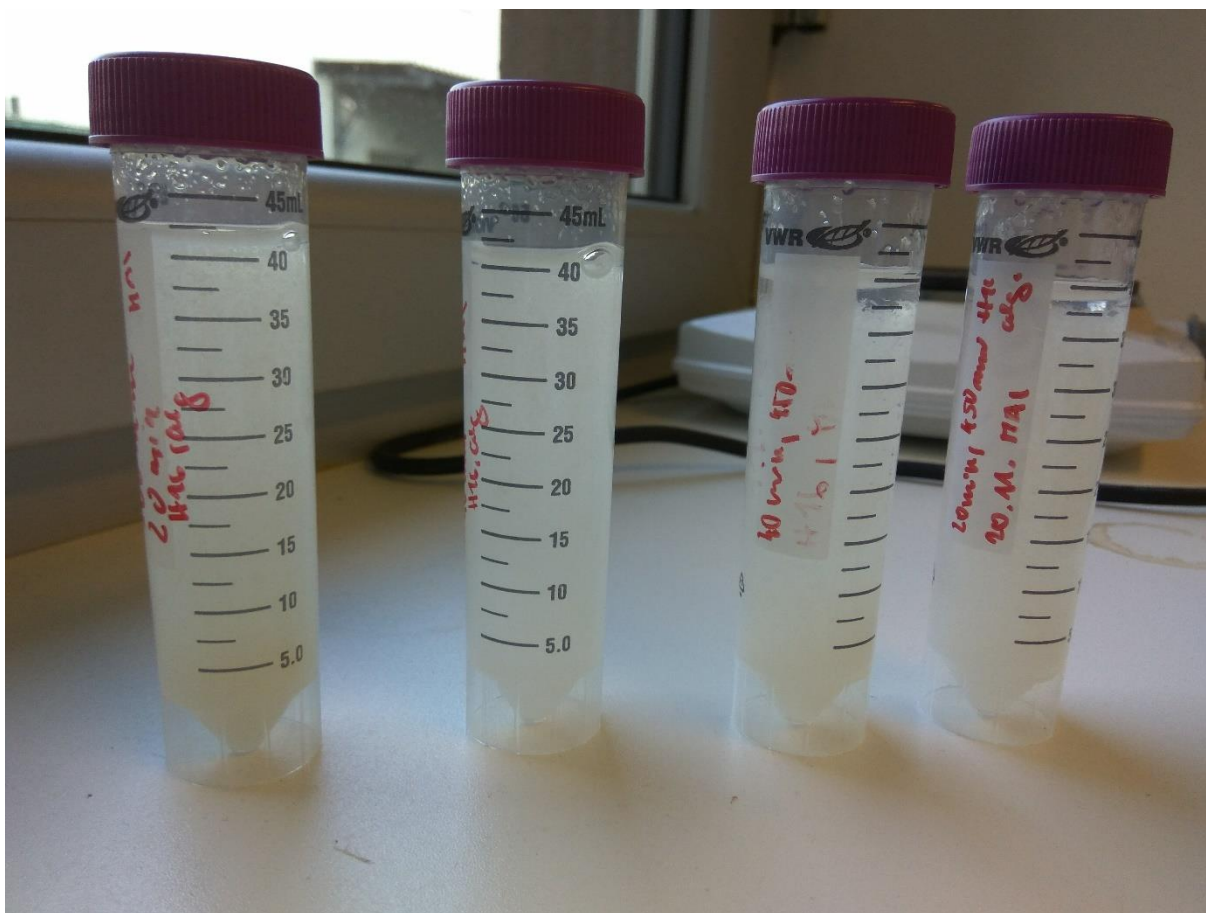
7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] JOHN, Rojan P., R.D. TYAGI, S.K. BRAR, R.Y. SURAMPALLI a Danielle PRÉVOST, *Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery* [online]. [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.3109/07388551.2010.513327. ISBN 10.3109/07388551.2010.513327.
- [2] SCHOEBITZ, Mauricio, Maria D. LÓPEZ a Antonio ROLDÁN, *Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil-plant fertilization. A review*. DOI: 10.1007/s13593-013-0142-0. ISBN 10.1007/s13593-013-0142-0.
- [3] CHOIŃSKA - PULIT, Anna, Pawel MITULA, Paulina ŚLIWKA, Wojciech LABA a Aneta SKARADZIŃSKA, 2015. Bacteriophage encapsulation: Trends and potential application. *Trends in Food Science & Technology* [online]. [cit. 2017-05-02].
- [4] NEDOVIC, Viktor, Ana KALUSEVIC, Verica MANOJLOVIC, Steva LEVIC a Branko BUGARSKI. *An overview of encapsulation technologies for food applications*. *Procedia Food* [online]. 2011, roč. 1, s. 1806-1815. ISSN 2211601x. DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.265.
- [5] DROSOU, Christina G., Magdalini K. KROKIDA a Costas G. BILIADERIS, Encapsulation of bioactive compounds through electrospraying/electrospraying and spray drying: A comparative assessment of food-related applications [online]. [cit. 2017-04-05]. DOI: 10.1080/07373937.2016.1162797. ISBN 10.1080/07373937.2016.1162797. ISSN 0737-3937.
- [6] KRASAEKOOPT, Wunwisa, Bhesh BHANDARI a Hilton DEETH, Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt [online]. [cit. 2018-04-21]. DOI: 10.1016/S0958-6946(02)00155-3. ISBN 10.1016/S0958-6946(02)00155-3.
- [7] JACQUOT, Muriel a Mimma PERNETTI, *Spray Coating and Drying Processes* [online]. 2004 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1007/978-94-017-1638-3_19. ISBN 10.1007/978-94-017-1638-3_19.
- [8] TACKENBERG, Markus a Peter KLEINEBUDDE, *Encapsulation of Liquids Via Extrusion - A Review* [online]. [cit. 2018-03-30]. DOI: 10.2174/1381612821666151008150142. ISBN 10.2174/1381612821666151008150142.
- [9] GOUIN, Sébastien, Ana KALUSEVIC, Verica MANOJLOVIC, Steva LEVIC a Branko BUGARSKI, *Microencapsulation* [online]. [cit. 2018-03-30]. DOI: 10.1016/j.tifs.2003.10.005. ISBN 10.1016/j.tifs.2003.10.005.
- [10] SRIVASTAVA, Yashi, Anil Dutt SEMWAL a Gopal Kumar SHARMA, *Application of Various Chemical and Mechanical Microencapsulation techniques in Food Sector-A Review* [online]. [cit. 2018-03-30]. DOI: 10.5958/j.2277-9396.3.1.001. ISBN 10.5958/j.2277-9396.3.1.001.
- [11] ĐORĐEVIĆ, Verica, Bojana BALANČ, Ana BELŠČAK-CVITANOVIĆ, et al., *Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds* [online]. [cit. 2018-03-30]. DOI: 10.1007/s12393-014-9106-7. ISBN 10.1007/s12393-014-9106-7.
- [12] XIAO, Zuobing, Wanlong LIU, Guangyong ZHU, Rujun ZHOU a Yunwei NIU, *A review of the preparation and application of flavour and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology* [online]. [cit. 2018-05-11]. DOI: 10.1002/jsfa.6491. ISBN 10.1002/jsfa.6491.
- [13] LIU, Eunice, 2015. Flavor-Changing Chewing Gum. In: *DiscoverMagazine.com* [online]. USA: Kalmbach Publishing, 7.7.2015 [cit. 2018-05-11].

- [14] LIM, F a A. SUN, *Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas* [online]. [cit. 2018-04-21]. DOI: 10.1126/science.6776628. ISBN 10.1126/science.6776628.
- [15] SÁNCHEZ, María Teresa, María Adolfin RUIZ, Agustín LASSERROT, Marta HORMIGO a María Encarnación MORALES, *An improved ionic gelation method to encapsulate Lactobacillus spp. bacteria: Protection, survival and stability study* [online]. [cit. 2018-04-21]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2017.01.019. ISBN 10.1016/j.foodhyd.2017.01.019.
- [16] CASSIDY, M B, H LEE a J T TREVORS, *Environmental applications of immobilized microbial cells: A review* [online]. [cit. 2018-03-17]. DOI: 10.1007/BF01570068. ISBN 10.1007/BF01570068.
- [17] DEAKER, R, *Legume seed inoculation technology? a review* [online]. [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1016/j.soilbio.2004.04.009. ISBN 10.1016/j.soilbio.2004.04.009.
- [18] BRANNON-PEPPAS, Lisa, *Polymers in controlled drug delivery. Medical Plastics and Biomaterials Magazine* [online]. 1997, **11** [cit. 2018-03-17].
- [19] HOFFMAN, Allan S., *Hydrogels for biomedical applications* [online]. [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.010. ISBN 10.1016/j.addr.2012.09.010.
- [20] BROWNSEY, Geoff J., *Thermoreversible gelation of polymers and biopolymers. By Jean-Michel Guenet , Academic Press, London 1992, 278 pp., hardback £ 40, ISBN 0-12-305380-5* [online]. [cit. 2018-04-01]. DOI: 10.1002/adma.19930050316. ISBN 10.1002/adma.19930050316.
- [21] PAL, K., A. K. BANTHIA a D. K. MAJUMDAR, *Polymeric Hydrogels: Characterization and Biomedical Applications* [online]. [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.1163/156855509X436030. ISBN 10.1163/156855509X436030.
- [22] CHENG, Yi, Xiaolong LUO, Gregory F. PAYNE a Gary W. RUBLOFF, *Biofabrication: programmable assembly of polysaccharide hydrogels in microfluidics as biocompatible scaffolds* [online]. [cit. 2018-05-11]. DOI: 10.1039/C2JM16215F. ISBN 10.1039/c2jm16215f.
- [23] RINAUDO, Marguerite, *Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials* [online]. [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1002/pi.2378. ISBN 10.1002/pi.2378.
- [24] TØNNESEN, Hanne Hjorth a Jan KARLSEN, *Alginate in Drug Delivery Systems* [online]. [cit. 2018-04-08]. DOI: 10.1081/DDC-120003853. ISBN 10.1081/DDC-120003853.
- [25] GEORGE, Meera a T. Emilia ABRAHAM, *Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs* [online]. [cit. 2018-04-08]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2006.04.017. ISBN 10.1016/j.jconrel.2006.04.017.
- [26] Basic Principles of Freeze Drying. SP Scientific [online]. [cit. 2017-02-27].
- [27] VESSEY, J. Kevin, 2003. *Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers* [online]. 02. 08. 2003, (255), 571-586 [cit. 2018-04-22].
- [28] ARORA, Naveen K., Ekta KHARE a Dinesh K. MAHESHWARI, *Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Constraints in Bioformulation, Commercialization, and Future Strategies* [online]. 2010-9-5 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1007/978-3-642-13612-2_5. ISBN 10.1007/978-3-642-13612-2_5.
- [29] HERRMANN, Laetitia a Didier LESUEUR, *Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation* [online]. [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1007/s00253-013-5228-8. ISBN 10.1007/s00253-013-5228-8.
- [30] DE-BASHAN, Luz E., Juan-Pablo HERNANDEZ a Yoav BASHAN, *The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation*

- *A comprehensive evaluation* [online]. [cit. 2018-04-23]. DOI: 10.1016/j.apsoil.2011.09.003. ISBN 10.1016/j.apsoil.2011.09.003.
- [31] NUSSINOVITCH, Amos, 2010. *Polymer Macro- and Micro-Gel Beads: Fundamentals and Applications*. 1. USA: Springer-Verlag New York. ISBN 9781441966186.
- [32] BASHAN, Yoav, Luz E. DE-BASHAN, S. R. PRABHU a Juan-Pablo HERNANDEZ, *Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013)* [online]. [cit. 2018-05-12]. DOI: 10.1007/s11104-013-1956-x. ISBN 10.1007/s11104-013-1956-x.
- [33] DAL BELLO, G.M., C.I. MÓNACO a M.R. SIMÓN. *Biological control of seedling blight of wheat caused by Fusarium graminearum with beneficial rhizosphere microorganisms*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. New York: Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, 2002, 18(7), 627-636 [cit. 2018-05-17]. DOI: 10.1023/A:1016898020810. ISSN 0959-3993.
- [34] CATROUX, Gérard, Alain HARTMANN a Cécile REVELLIN. Trends in rhizobial inoculant production and use. *Plant and Soil* [online]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001, 230(1), 21-30 [cit. 2018-05-17]. DOI: 10.1023/A:1004777115628. ISSN 0032-079X
- [35] THANH NGUYEN, HIEN & Deaker, Rosalind & Kennedy, Ivan & J. ROUGHLEY, R. (2003). The Positive Yield Response of Field-Grown Rice to Inoculation with a Multi-Strain Biofertiliser in the Hanoi Area, Vietnam. *Symbiosis*. 35.
- [36] Bashan, Yoav. (2016). Encapsulated formulations for microorganisms in agriculture and the environment. *Bioencapsulation Innovations*. 2016. 4-5.
- [37] HAINES, P. Principles of thermal analysis and calorimetry. Cambridge: Royal Society of Chemistry, c2002, xiii, 220 p. RSC paperbacks
- [38] KROUSKÁ, Jitka. *Využití kalorimetru při zkoumání termodynamiky chování kapalných, pevných i gelových vzorků*. Chempoint [online]. Brno: Fakulta chemická, 2012, 2015 [cit. 39 2015-12-16].
- [39] BRAISSANT, Olivier, Dieter WIRZ, Beat GÄMPFERT a Alma U. DANIELS, *Use of isothermal microcalorimetry to monitor microbial activities* [online]. [cit. 2018-05-17]. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2009.01819.x. ISBN 10.1111/j.1574-6968.2009.01819.x.
- [40] EVELINA IVANOVA, Valentina Chipeva. *ENCAPSULATION OF LACTIC ACID BACTERIA IN CALCIUM ALGINATE BEADS FOR BACTERIOCIN PRODUCTION*. *Journal of Culture Collections* [online]. National Bank for Industrial Microorganisms and Cell Cultures, 2003, 3(1) [cit. 2018-05-11]. ISSN 1310-8360

8 PRÍLOHY



Príloha: 1: Vzorky nevyhovujúcej kvality pripravené za použitia alginátu od firmy Sigma Aldrich