



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

ALTERNATIVNÍ ZPŮSOBY SÍŤOVÁNÍ ALGINÁTU SODNÉHO VEDOUČÍ K HYDROGELŮM S VHODNÝMI APLIKAČNÍMI VLASTNOSTMI

ALTERNATIVE CROSSLINKING METHODS FOR SODIUM ALGINATE RESULTING IN HYDROGELS WITH
SUITABLE APPLICATION PROPERTIES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Ludmila

Kouřilová

VEDOUČÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.

BRNO 2024

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1946/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Ludmila Kouřilová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Procesy a materiály medicínských aplikací
Vedoucí práce: **Ing. Jiří Smilek, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Alternativní způsoby síťování alginátu sodného vedoucí k hydrogelům s vhodnými aplikačními vlastnostmi

Zadání diplomové práce:

1. Vypracovat literární rešerši zaměřenou na možnosti síťování polysacharidů (především alginát sodný).
2. Dle literární rešerše vybrat vhodné alternativní postupy síťování alginátu sodného a otestovat jejich použitelnost pro komerčně dostupné algináty sodné.
3. Připravit hydrogely na bázi alginátu sodného s možností ovlivnění jejich finálních aplikačních vlastností (transparentnost, synerize, viskoelastické vlastnosti, aj.) modifikací vybraných postupů přípravy.
4. Připravené hydrogely charakterizovat vhodnými instrumentálními technikami především s ohledem na mechanické vlastnosti vzniklých hydrogelů.
5. Diskutovat naměřené výsledky a vyvozovat z nich logické závěry.

Termín odevzdání diplomové práce: 29.4.2024:

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

Bc. Ludmila Kouřilová
studentka

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zaměřuje na přípravu alginátových gelů s možností ovlivnění jejich finálních aplikačních vlastností (transparentnost, synerese, viskoelastické vlastnosti, aj.). Na základě literární rešerše byly vybrány celkem tři gelační strategie vedoucí ke gelaci alginátu sodného, a to iontové síťování metodou vnější gelace, iontové síťování metodou vnitřní gelace a síťování alginátu kyselinou fytovou, která je schopná tvořit jak iontovou vazbu, tak intramolekulární vodíkové můstky. Následně byla provedena optimalizace přípravy alginátových gelů, charakterizace jejich mechanických vlastností a na závěr byl sledován vliv několika faktorů (koncentrace polymeru, množství síťovacího činidla, doba gelace, přídavek sacharózy, aj.) na výsledné vlastnosti připravených gelů. V rámci diplomové práce bylo prokázáno, že na výsledné vlastnosti gelů na bázi alginátu sodného má vliv nejen koncentrace polymeru, množství použitého síťovacího činidla, rychlost gelace či synerese, ale v případě iontového síťování metodou vnější gelace také například typ použitého aniontu. Zajímavou součástí diplomové práce je také optimalizace stanovení mechanických vlastností alginátových gelů kompresními testy. Během těchto testů dochází ke stlačení vzorku mezi dvěma senzory reometru a je měřena mechanická odezva vzorku na aplikovanou sílu. Jedná se o jeden z nejlépe představitelných reometrických testů.

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on the preparation of alginate gels with the potential to influence their final application properties (transparency, syneresis, viscoelastic properties, etc.). Based on literature review, a total of three gelation strategies leading to the gelation of sodium alginate were selected, namely ionotropic gelation by external gelation method, ionotropic gelation by internal gelation method, and alginate crosslinking with phytic acid, which is capable of forming both ionic bonds and intramolecular hydrogen bonds. Subsequently, the preparation of alginate gels was optimized, their mechanical properties were characterized, and finally, the influence of several factors (polymer concentration, amount of crosslinking agent, gelation time, addition of sucrose, etc.) on the resulting properties of the prepared gels was monitored. Within the scope of the thesis, it was demonstrated that the resulting properties of sodium alginate-based gels are influenced not only by the polymer concentration, the amount of crosslinking agent used, gelation rate, or syneresis, but in the case of ionotropic gelation by external gelation, for example, also by the type of anion used. An interesting part of the thesis is also the optimization of determining the mechanical properties of alginate gels through compression tests. During these tests, the sample is compressed between two rheometer sensors, and the mechanical response of sample to the applied force is measured. It is one of the most easily conceivable rheometric tests.

KLÍČOVÁ SLOVA

alginát sodný; polysacharidy, hydrogely; reologie; viskoelastické vlastnosti

KEY WORDS

sodium alginate; polysaccharides, hydrogels; rheology; viscoelastic properties

KOUŘILOVÁ, Ludmila. *Alternativní způsoby síťování alginátu sodného vedoucí k hydrogelům s vhodnými aplikačními vlastnostmi*. Brno, 2024. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156927>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Jiří Smilek.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
Bc. Ludmila Kouřilová

PODĚKOVÁNÍ:

Na tomto místě bych chtěla nesmírně poděkovat svému vedoucímu diplomové práce Ing. Jiřímu Smilkovi, Ph.D., a to nejen za neuvěřitelné množství věnovaného času, cenných rad, optimistický a přátelský přístup, který člověku při každé konzultaci zlepšil náladu, ale také za to, že bych se bez něj nikdy nerozhodla pokračovat v navazujícím magisterském studiu a nevěnovala bych se tomu, co mě teď tak nesmírně baví. Za tohle všechno mu patří mé velké díky! Poděkování patří také mému konzultantovi Ing. Martinovi Kadlecovi, který přispěchal na pomoc vždy, když v laboratoři nastal nějaký problém a který mi taktéž poskytl velké množství cenných rad a informací. Dále bych za celou řadu skvělých rad a připomínek chtěla poděkovat všem gelařům, především pak doc. Ing. Petrovi Sedláčkovi, Ph.D., Ing. Jiřímu Příbylovi a Ing. Martinovi Súkeníkovi. Za podporu během studia bych chtěla poděkovat také všem svým kolegům a přátelům, zejména svojí kamarádce Marice Kobylkové, která mi vždy byla velkou oporou. Největší poděkování však patří mojí rodině, která mě po celou dobu mého studia maximálně podporovala a bez které by pro mě studium na vysoké škole ani nebylo možné!

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Disperzní soustavy	9
2.1.1	Gely	9
2.2	Hydrogely	10
2.2.1	Dělení hydrogelů	10
2.2.2	Příprava hydrogelů	11
2.2.3	Vlastnosti hydrogelů	13
2.3	Rhizobakterie podporující růst rostlin	14
2.4	Alginát sodný	15
2.5	Viskoelastičita	16
2.6	Smyková reometrie	16
2.6.1	Rotační testy	16
2.6.2	Oscilační testy	17
2.7	Axiální reometrie	20
2.7.1	Oscilační testy	20
2.7.2	Kompresní testy	21
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	22
3.1	Možnosti síťování polysacharidů	22
3.2	Možnosti ovlivnění finálních aplikačních vlastností hydrogelů	24
3.3	Zhodnocení současného stavu řešené problematiky	26
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
4.1	Použité chemikálie	27
4.2	Použité přístroje	27
4.3	Použitý software	28
4.4	Příprava vzorků	28
4.5	Optimalizace smykových reometrických testů	28
4.5.1	Oscilační amplitudové testy	28
4.5.2	Oscilační časové testy	29
4.6	Optimalizace axiálních reometrických testů	29
4.6.1	Oscilační amplitudové testy	29
4.6.2	Kompresní testy	32

5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	38
5.1	Iontové síťování alginátu metodou vnější gelace	38
5.1.1	Výběr vhodných síťovacích činidel	38
5.1.2	Optimalizace přípravy alginátových gelů	41
5.1.3	Viskoelastické vlastnosti alginátových gelů	46
5.1.4	Shrnutí poznatků z iontového síťování alginátu metodou vnější gelace	52
5.2	Iontové síťování alginátu metodou vnitřní gelace	53
5.2.1	Shrnutí poznatků z iontového síťování alginátu metodou vnitřní gelace	56
5.3	Síťování alginátu kyselinou fytoovou.....	57
5.3.1	Shrnutí poznatků ze síťování alginátu kyselinou fytoovou	60
5.4	Ovlivnění finálních aplikačních vlastností gelů na bázi alginátu	60
5.4.1	Vliv přídavku sacharózy	61
5.4.2	Vliv přídavku fosforečnanů	64
5.4.3	Vliv přídavku kyseliny citronové.....	67
5.4.4	Shrnutí poznatků z kapitoly	69
5.5	Bakteriální alginát.....	69
6	ZÁVĚR.....	73
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	75
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	81
8.1	Použité zkratky	81
8.2	Použité symboly.....	81
9	PŘÍLOHY	82

1 ÚVOD

Nezaměnitelným průkopníkem v oblasti materiálového inženýrství, jehož unikátní schopnosti, jako jsou vysoká biokompatibilita, nízká toxicita, a především pak schopnost tvořit pevné, pružné gelové struktury s vynikající stabilitou, je alginát sodný, a právě tento polymer bude studován v rámci předložené diplomové práce. Jedná se o lineární, záporně nabitý, ve vodě rozpustný polysacharid, který nachází široké uplatnění například v medicínských aplikacích, v potravinářském průmyslu, kosmetice a v mnoha dalších odvětvích. Velké uplatnění poslední dobou nachází také v zemědělství, kde slouží k zadržování vody a živin v půdě. Ve většině případů se alginát využívá ve formě hydrogelu, trojrozměrné polymerní sítě prostupující celým disperzním prostředím schopné absorbovat velké množství vody (až několiknásobek své původní hmotnosti). Tento polymer se získává především extrakcí z hnědých mořských řas, ale může být produkován také některými bakteriemi, mezi které patří i vybrané kmeny bakterií podporujících růst rostlin (např. *Azotobacter vinelandii*). Jedná se o volně žijící mikroorganismy, které obývají kořeny rostlin a podporují nejen růst kořenového systému, ale také vývoj celé rostliny včetně nadzemní části. K jejich zavedení do půdy často slouží různé nosiče, kdy nejčastěji využívanou formou nosičů těchto bakterií jsou gelové kuličky, ve kterých mohou mikroorganismy přežívat dlouhou dobu a zároveň jsou tak chráněny před mechanickým namáháním či dehydratací.

Výhodou bakterií podporujících růst rostlin schopných produkovat alginát je možnost enkapsulace těchto mikroorganismů v alginátovém gelu, připraveném zesíťováním alginátu sodného produkovaného samotnými enkapsulovanými bakteriemi. Právě tímto tématem se zabývá projekt probíhající na Fakultě chemické VUT, jehož součástí je i předložená diplomová práce.

Teoretická část diplomové práce se zabývá uvedením do problematiky hydrogelových materiálů a reologie, včetně popisu vybraných reometrických testů, které budou využity v rámci experimentální části této práce. Na teoretickou část navazuje literární rešerše, která bude zaměřena na možnosti síťování polysacharidů (především alginátu sodného) a možnosti ovlivnění finálních aplikačních vlastností alginátových gelů.

Experimentální část je zaměřena na optimalizaci řady reometrických testů, výběr vhodných síťovacích činidel pro alginát sodný, optimalizaci přípravy alginátových gelů, popis jejich mechanických vlastností vhodnými reometrickými testy a také možnosti ovlivnění finálních aplikačních vlastností alginátových gelů (transparentnost, synereze, viskoelastické vlastnosti, aj.). Veškeré experimenty jsou prováděny na komerčně dostupných alginátech sodných a poznatky z experimentální části této diplomové práce budou následně aplikovány na bakteriální alginát připravovaný na pracovišti Fakulty chemické VUT.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Disperzní soustavy

Máme-li systém tvořený částicemi rozptýlenými ve spojitě fázi, mluvíme o tzv. disperzní soustavě. V takových soustavách rozptýlené částice představují disperzní podíl a spojitou fázi, ve které jsou rozptýleny, označujeme za disperzní prostředí. Na základě velikosti částic dělíme disperze do tří skupin, a to na hrubé disperze, s částicemi většími než 1 μm , analytické disperze, jejichž částice jsou menší než 1 nm a disperze s velikostí částic v rozmezí 1 nm až 1 μm označujeme jako koloidní [1].

U hrubých disperzí jsou rozptýlené částice viditelné okem a typickým příkladem těchto systémů je turecká káva (disperzní podíl – mletá zrnka kávy, disperzní prostředí – voda) či bylinkové máslo (disperzní podíl – kousky bylinek, disperzní prostředí – tuk). Částice koloidních disperzí sice nejsou viditelné okem, ale lze je pozorovat elektronovým mikroskopem, nebo můžeme k jejich pozorování využít laserového paprsku. Ten se na koloidních částicích rozptýlí a tím pádem můžeme vidět svazek paprsků tvořící světelný kužel. Tento jev se nazývá Tyndallův jev. Mezi koloidní systémy řadíme například krev (disperzní podíl – krevní buňky, disperzní prostředí – krevní plazma) nebo polymerní soly (disperzní podíl – polymerní řetězce, disperzní prostředí – rozpouštědlo). Příkladem analytických disperzí jsou pravé roztoky, jako například roztok chloridu sodného pod součinem rozpustnosti (disperzní podíl – pevné částice chloridu sodného, disperzní prostředí – voda) nebo roztoky léčiv (disperzní podíl – pevné částice daného léčiva, disperzní prostředí – rozpouštědlo) a u těchto systémů nejsou rozptýlené částice viditelné ani okem ani pod mikroskopem [1].

2.1.1 Gely

Mezi koloidní disperzní soustavy řadíme také tzv. gely. Jedná se o materiály tvořené trojrozměrnou polymerní sítí, která zadržuje velké množství kapaliny, díky čemuž gely získávají vlastnosti charakteristické pro pevné látky, ovšem z hlediska hmotnostního zastoupení jednotlivých složek se jedná spíše o kapaliny. Mluvíme o nich tedy jako o polotuhých materiálech [1]. Na základě přítomnosti či nepřítomnosti kapalné fáze dělíme gely na lyogely, xerogely a aerogely. Lyogel, je gel s kapalným disperzním prostředím, zatímco xerogel je gel, ze kterého byla odstraněna kapalná fáze [2]. V případě, že je xerogel schopen přecházet botnáním zpět do původního stavu, gel, ze kterého byl připraven, považujeme za reverzibilní. Naopak v případě, že po vysušení gelu vzniká xerogel, který botnáním není schopen přejít do původního stavu a absorbuje jen velmi malé množství vody, označujeme jej za ireverzibilní [1]. Lyogely můžeme dále rozdělit na organogely, kde je disperzní prostředí tvořeno organickým rozpouštědlem, minerálním olejem nebo rostlinným olejem a na hydrogely, které mají vodné disperzní prostředí.

Zvláštní skupinou gelů jsou aerogely, což jsou koloidní disperze, které mají disperzní prostředí v podobě plynu. K jejich vzniku dochází odstraněním rozpouštědla, a to za superkritických podmínek (sušení za teploty a tlaku, při kterých se rozpouštědlo nachází v kapalně i plynné fázi, přičemž v daném systému jsou tyto fáze od sebe nerozeznatelné – obě fáze se spojí do jediné fáze s hustotou kapaliny, která expanduje a naplní nádobu jako plyn), za kterých nedochází ke smrštění polymerní sítě, čímž vzniká vysoce porézní materiál [3].

2.2 Hydrogely

Hydrogely jsou ve vodě nerozpustné disperzní systémy tvořené trojrozměrnou polymerní sítí připravenou z hydrofilních polymerů představujících disperzní podíl a kapalného disperzního prostředí v podobě vody [4, 5]. Typicky disperzní podíl prostupuje celým disperzním prostředím, které je spojitě. Vodu absorbovanou hydrofilními funkčními skupinami polymerního řetězce označujeme za primárně vázanou [4, 6]. Botnáním těchto hydrofilních funkčních skupin dochází k obnažení hydrofobních částí polymerního řetězce, které jsou následně obklopeny dalšími molekulami vody a v tomto případě mluvíme o sekundárně vázané vodě. Kromě primárně a sekundárně vázané vody rozlišujeme i vodu volně vázanou, k jejíž absorpci dochází působením osmotických hnačích sil a která vyplňuje prostor mezi polymerními řetězci, většími póry a dutinami. Této absorpci však brání příčné vazby tvořící uzly trojrozměrné polymerní sítě, díky čemuž hydrogel časem dosáhne rovnovážného stavu botnání a další vodu už není schopen do své struktury pojmout [6].

Díky vysokému obsahu vody, poréznosti a měkké či polotuhé struktuře se hydrogely velmi podobají živé tkáni, a proto jsou často využívány v medicínských aplikacích, kde nacházejí uplatnění v tkáňovém inženýrství, při výrobě kontaktních čoček nebo například jako kryty ran. Často se používají také jako nosiče léčiv, kdy se po uvolnění léčivé látky původní trojrozměrná struktura rozloží na netoxické produkty (biodegradabilita), které jsou v těle následně odbourány nebo vyloučeny z těla ven [5, 7]. Velkou výhodou těchto materiálů jsou jejich laditelné mechanické a transportní vlastnosti, dobrá biologická rozložitelnost, biokompatibilita a nízká toxicita, díky čemuž nacházejí uplatnění nejen v medicíně, ale také například v kosmetice, potravinářském průmyslu, zemědělství, při čištění odpadních vod a v mnoha dalších odvětvích [5, 8].

2.2.1 Dělení hydrogelů

Hydrogely lze klasifikovat na základě několika kritérií. Podle zdroje použitého polymeru dělíme hydrogely na přírodní a syntetické. Mezi přírodní polymery zahrnujeme například polysacharidy jako je alginát [9], agaróza [10], chitosan [11], či hyaluronan [12] a dále pak proteiny, z nichž můžeme zmínit třeba kolagen [13], elastin [14] a želatinu [15]. Naopak mezi syntetické polymery řadíme polyethylenglykol [16], polyvinylalkohol [17], nebo například polyakrylamid [18]. Výhodou přírodních hydrogelů je jejich biokompatibilita a biodegradabilita, ale oproti syntetickým hydrogelům mají relativně nízkou mechanickou pevnost. Na druhou stranu syntetické hydrogely jsou pevné, ovšem jejich příprava ve většině případů vyžaduje použití toxických síťovacích činidel (např. glutaraldehydu či formaldehydu) [4, 6, 19]. Biokompatibilitu lze v některých případech zvýšit například

opakovaným proplachováním hydrogelu čistou vodou či ethanolem, čímž dojde k odstranění přebytečného síťovacího činidla a popřípadě i nežádoucích produktů produkovaných vedlejšími reakcemi [6, 20]. Aby bylo u výsledného hydrogelového materiálu dosaženo co nejlepších vlastností, používá se pro jeho přípravu často kombinace přírodních a syntetických polymerů anebo mohou být přírodní polymery chemicky modifikovány [4, 19]. Příkladem takové modifikace může být karboxylace [21], alkylace [22], acylace [23], esterifikace [24], sulfonace [25] nebo fosforylace [26].

Podle struktury můžeme hydrogely rozdělit na amorfní, semikrystalické a krystalické, přičemž amorfní hydrogely mají náhodné a nepravidelné uspořádání, struktura krystalických hydrogelů je pravidelně uspořádána a u semikrystalických hydrogelů se střídají amorfní a krystalické oblasti [19].

Dle způsobu přípravy hydrogely dělíme na homopolymerní, kopolymerní, hydrogely se semi-interpenetrující sítí (semi-IPN) a hydrogely s interpenetrující sítí (IPN). Homopolymery, jsou odvozeny od jednoho druhu monomeru a kopolymery jsou složeny z dvou a více monomerů, přičemž homopolymerní i kopolymerní hydrogely obsahují jeden typ polymerního řetězce [19]. Příkladem homopolymeru může být poly(vinyl chlorid), který se skládá z několika monomerních jednotek vinyl chloridu a příkladem kopolymeru může být poly(ethylen-vinylacetát), skládající se z monomerních jednotek ethylenu a vinylacetátu [27, 28]. Naproti tomu semi-IPN a IPN hydrogely jsou tvořeny dvěma a více typy polymerních řetězců. Zatímco u semi-IPN hydrogelů jsou řetězce jednoho lineárního polymeru rozptýleny do sítě jiného polymeru, IPN hydrogely vznikají spojením dvou polymerů, přičemž oba polymery tvoří trojrozměrnou síť [29, 30]. Jako příklad semi-IPN hydrogelu lze uvést kombinaci karboxymethylchitosanu, alginátu sodného a genipinu jakožto přírodního síťovacího činidla [31]. V tomto případě genipin reaguje s volnými aminoskupinami karboxymethylchitosanu za vzniku síťové struktury a řetězce alginátu sodného jsou touto sítí propleteny bez toho, aniž by byly kovalentně či nekovalentně síťovány. Naopak příkladem IPN hydrogelu může být kombinace alginátu sodného a polyvinylalkoholu síťovaných glutaraldehydem, jehož aldehydové skupiny tvoří s hydroxylovými skupinami alginátu sodného a polyvinylalkoholu acetalové a etherové vazby, které vedou k tvorbě trojrozměrné polymerní sítě [31].

Dále pak můžeme hydrogely rozdělit například podle způsobu síťování, a to na fyzikálně síťované a chemicky síťované [32].

2.2.2 Příprava hydrogelů

Ke vzniku hydrogelu dochází tzv. sol-gel fázovým přechodem, kdy je koloidní sol přeměněn na gel, a to v reakci na určité fyzikální či chemické podněty. Mezi fyzikální podněty řadíme například teplotu, elektrické pole, magnetické pole, intenzitu světla, charakter rozpouštědla a tlak, zatímco mezi chemické podněty zahrnujeme nejrozličnější typy síťovacích činidel. Sol-gel fázový přechod je však ve většině případů reverzibilní, díky čemuž se hydrogely mohou po odstranění působícího podnětu vrátit do původního stavu [29].

Chemicky síťované hydrogely

Trojrozměrná struktura chemicky síťovaných gelů je tvořena kovalentními vazbami mezi dvěma funkčními skupinami polymeru. Kovalentní vazby mohou být tvořeny za využití různých síťovacích činidel, mezi které řadíme například malé molekuly jako jsou formaldehyd, glutaraldehyd nebo genipin [30].

K síťování může docházet také radikálovou polymerací monomerů s nízkou molekulovou hmotností v přítomnosti síťovacího činidla, kdy iniciátorem reakce může být například peroxodisíran draselný, peroxodisíran amonný, síran železnato-amonný nebo třeba benzoylperoxid [30]. Chemické hydrogely mohou vznikat také enzymatickým zesíťováním, kdy se používá vhodný enzym katalyzující specifické chemické reakce vedoucí ke vzniku kovalentních vazeb mezi polymerními řetězci [33].

Dalším způsobem chemického síťování polymerů je tzv. radiační síťování, kde není zapotřebí žádných síťovacích činidel ani chemických iniciátorů. Ke vzniku polymerní sítě dochází vlivem působení ionizujícího záření, jako je gama záření, rentgenové záření nebo elektronový paprsek, přičemž toto záření má dostatek energie potřebné k ionizaci jednoduchých molekul ve vzduchu či ve vodě. V koloidním solu se pak vytváří podél polymerních vláken reaktivní místa a kombinací těchto volných radikálů vznikají kovalentní vazby tvořící polymerní síť [33–35].

Podobně jako u radiačního síťování je možné koloidní sol ozářit také ultrafialovým, infračerveným nebo viditelným světlem a v tomto případě mluvíme o tzv. fotopolymerizaci [34, 35]. K chemickému síťování polymerů však může dojít také například za využití Diels-alderovy reakce, Schiffových bází nebo třeba Michaelovou adicí [33].

Fyzikálně síťované hydrogely

K fyzikálnímu síťování polymerů dochází prostřednictvím slabých nekovalentních interakcí, které se většinou tvoří v reakci na změnu podmínek prostředí, jako je teplota, iontová síla, nebo pH. Díky těmto interakcím vznikají slabé vazby mezi polymerními řetězci vedoucí k vytvoření trojrozměrné sítě a řadíme mezi ně například elektrostatické interakce, van der Waalsovy síly, vodíkové vazby a hydrofobní efekty [34, 35]. Vzhledem ke skutečnosti, že se jedná o reverzibilní interakce, mohou být fyzikální vazby narušeny změnami fyzikálních podmínek nebo působením napětí [35].

Hydrogely tvořené na základě hydrofobního efektu vznikají především kopolymerací hydrofilního monomeru s malým množstvím hydrofobních koncových skupin či postranních řetězců. Ve vodném prostředí pak hydrofobní části polymerních řetězců agregují ve snaze minimalizovat kontakt s vodou, což vede ke vzniku fyzikálních příčných vazeb [35, 36].

Biopolymery, v jejichž struktuře se nachází disociovatelné skupiny, jako jsou karboxylové nebo aminové, mohou podléhat elektrostatickým interakcím. Takové polymery mohou ve vodě disociovat, čímž získají určitý náboj, díky kterému mohou interagovat s opačně nabitými protionyty a tvořit tak trojrozměrnou síť. Stejně jako u hydrogelů založených na jiných nekovalentních interakcích než elektrostatických, záleží i u tohoto typu síťování na faktorech jako je pH a teplota, a to především proto, že pH i teplota ovlivňují stupeň ionizace funkčních

skupin a sílu interakce mezi nimi [37]. Tvorba gelu však záleží také na faktorech, jako jsou iontová síla, typ protiiontu nebo hustota náboje [38].

Typickým příkladem iontového síťování polymerů je síťování alginátu kovovými ionty, nejčastěji vápenatými, kdy dochází k interakci mezi kladně nabitými vápenatými ionty a záporně nabitými karboxylovými skupinami vyskytujícími se v polymerním řetězci alginátu sodného [39]. Jeden vápenatý iont se selektivně váže na čtyři jednotky kyseliny guluronové (viz 2.4) a tvoří tak hexagonální mřížku [40]. Díky reverzibilní povaze iontové vazby můžeme alginátové gely rozpustit uvolněním vícemocných kationtů prostřednictvím iontové výměnné reakce s jednomocnými kationty či komplexními anionty s vysokou afinitou k vápenatým iontům, jako jsou například fosforečnan, citrát nebo laktát [41].

2.2.3 Vlastnosti hydrogelů

Struktura hydrogelu, včetně složení, orientace vláken, hustoty zesíťování, obsahu vody a pevnosti chemických vazeb, ovlivňuje jeho výsledné vlastnosti jako jsou viskozita, elasticita, botnání, tuhost či mechanická pevnost. Strukturální vlastnosti materiálu můžeme stanovit například pomocí elektronové, konfokální a optické mikroskopie, mikroskopie atomárních sil nebo pomocí takzvaných rozptylových technik, které využívají rozptyl světla, rozptyl neutronů či rentgenové záření. Kromě informací o struktuře však můžeme rozptylovými technikami určit také velikost ok a hustotu zesíťování [6].

Botnání

Díky hydrofilním skupinám zabudovaným v polymerním řetězci mají hydrogely schopnost vázat velké množství vody. Tomuto jevu říkáme botnání, přičemž u těchto materiálů jde o velice důležitou vlastnost, protože právě botnáním a difúzí přes polymerní síť dochází k uvolňování léčiva z hydrogelového systému [4]. Botnání můžeme ovlivnit například poměrem molů síťovacího činidla a molů opakujících se polymerních jednotek. Čím vyšší je tento poměr, tím více síťovacího činidla proniká do struktury hydrogelu, vznikají tak vysoce zesíťované hydrogely a botnání je v takovém případě omezeno. Na druhou stranu nižší poměr molů síťovacího činidla a molů opakujících se polymerních jednotek vede k méně zesíťovaným hydrogelům a botnací vlastnosti jsou lepší. To můžeme vysvětlit tím, že hustší polymerní síť brání pohyblivosti polymerních řetězců, ty se nejsou schopné více roztáhnout a tím pádem nemohou pory pojmout větší množství vody [6].

Mechanické vlastnosti

Obecně jsou chemické hydrogely pevnější než fyzikální hydrogely, což je způsobeno tím, že fyzikální síť je tvořena slabými nekovalentními interakcemi (vodíkovými vazbami, elektrostatickými interakcemi, van der Waalsovými silami, aj.), zatímco chemická síť je tvořena pevnými kovalentními vazbami [6].

Mechanické vlastnosti, jako jsou pevnost a viskoelasticita, můžeme stanovit například reologickými a mechanickými testy a tyto vlastnosti jsou závislé na složení polymeru, obsahu vody nebo na hustotě a typu zesílení, které současně ovlivňují také propustnost a degradaci materiálu [6]. Zvýšená hustota zesílení a s tím spojený nižší obsah vody vedou k tvorbě mechanicky pevnějších gelů se sníženou propustností [42].

Zajímavou vlastností gelů je schopnost odolávat tečnému napětí, a to až do okamžiku, kdy napětí dosáhne určité hodnoty, pod kterou se gel chová jako elastické tuhé těleso, ale při vyšších napětích již dochází k deformaci materiálu. Tato hodnota závisí na koncentraci uzlů a na jejich pevnosti [1].

Stárnutí gelů

Čerstvě připravené gely podléhají řadě samovolných dějů, během kterých dochází k přeskupování polymerních řetězců a gel se zatím nenachází v termodynamické rovnováze. Během tohoto přeskupování postupně roste počet styčných bodů, vzniká tak hustší polymerní síť, a to vede k vytlačování disperzního prostředí, které se již do sítě nevejde. Tento jev se nazývá synergeze a je podporován například zvýšením teploty [1].

Transportní vlastnosti

Řízení transportních vlastností hydrogelů je důležité při posouzení použitelnosti těchto materiálů pro konkrétní aplikaci. Například v případě, že bude hydrogel využit jako médium pro kultivaci buněk, musí mít dobré transportní vlastnosti, aby byl zajištěn nepřetržitý přístup k živinám. Naopak pokud použijeme hydrogel pro transport léčiv, omezená schopnost pohybu makromolekul povede k postupnému uvolňování léčiva, což může být výhodou [43].

K transportu rozpuštěných látek uvnitř hydrogelu může docházet difúzí v tekutině, ke které dochází působením koncentračního gradientu, nebo konvekcí s tekutinou, poháněnou tlakovým gradientem. Zatímco mobilita rozpuštěných látek během difúze je definována tzv. difúzním koeficientem, mobilita látek prouděním je vyjádřena hydraulickou permeabilitou – poměrem mezi vnitřní permeabilitou materiálu a dynamickou viskozitou tekutiny. Obecně platí, že konvekce i difúze v porézních materiálech rostou s velikostí pórů a klesají s délkou transportních drah [43].

2.3 Rhizobakterie podporující růst rostlin

Vzhledem k rostoucí lidské populaci a ubývajícímu množství zemědělské půdy v důsledku její degradace jsou čím dál více využívána chemická hnojiva a pesticidy, což má negativní dopad na životní prostředí. Možnou alternativou pro zvýšení úrodnosti půdy by mohlo být využití rhizobakterií podporujících růst rostlin (PGPR = *plant growth-promoting bacteria*) jako biohnojiv [44, 45].

Rhizobakterie podporující růst rostlin jsou volně žijící bakterie, které obývají kořeny rostlin a podporují jejich růst a vývoj [46]. Růst rostlin může být ovlivněn několika stresovými faktory, které dělíme na biotické (rostlinné patogeny a škůdci, jako jsou viry, bakterie, houby, háďátka, hmyz) a abiotické (přítomnost těžkých kovů, sucho, nedostatek živin, slanost, teplota) [47]. PGPR nejen že chrání rostliny před škůdci a patogeny, ale zároveň podporují růst rostlin

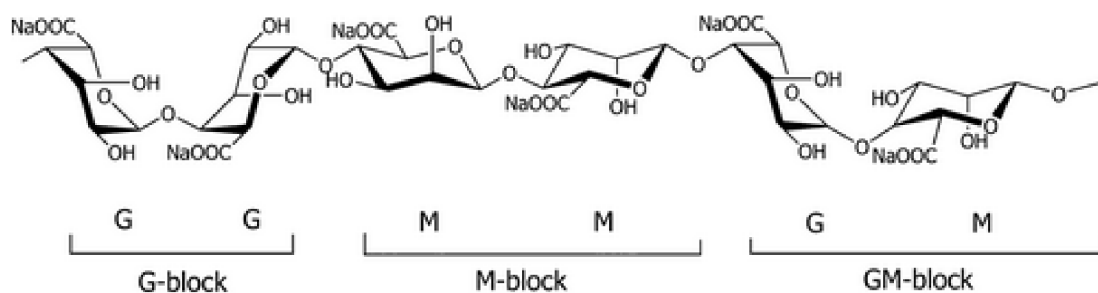
i za výše zmíněných abiotických stresových podmínek [47, 48]. Kromě toho díky své schopnosti vázat dusík, rozpouštět minerály a produkovat fytohormony mohou tyto bakterie u rostlin zlepšovat jejich příjem živin a vody, regulují koloběh živin a zlepšují kvalitu půdy [48].

Přímé zavedení bakterií do půdy však může způsobit náhlý pokles populace PGPR v rhizosféře kvůli konkurenci s původní mikroflórou. Z tohoto důvodu se ve většině případů využívají různé nosiče, ve kterých jsou bakterie imobilizovány a následně transportovány do půdy [48]. Nosičem mohou být některé anorganické materiály (jíl, mastek), organické materiály (rašelina, dřevěné uhlí) nebo polymery (škrob, chitosan, želatina), přičemž jako velmi slibný materiál vhodný pro enkapsulaci a následný transport PGPR do půdy se ukazuje alginát sodný. Tento polysacharid je levný, dobře dostupný, biologicky odbouratelný, šetrný k životnímu prostředí, podporuje adhezi a kolonizaci mikroorganismů, a kromě toho jej lze velmi snadno zesíťovat pomocí vápenatých iontů [37, 48]. Pomalá degradace alginátu pak umožňuje řízené uvolňování PGPR do půdního prostředí, což usnadňuje kolonizaci mikroorganismů [48]. Pro tento účel se alginátové nosiče nejčastěji připravují ve formě hydratovaných hydrogelových makrokuliček nebo sušených mikrokuliček, ve kterých zapouzdřené mikroorganismy mohou přežívat dlouhou dobu a zároveň jsou tak chráněny před mechanickým namáháním [45, 48].

2.4 Alginát sodný

Alginát je netoxický, biologicky odbouratelný, levný, snadno dostupný a biokompatibilní biopolymer. Ačkoliv se získává především extrakcí z hnědých mořských řas, může být také produkován některými bakteriemi [37]. Příkladem bakterií produkujících alginát je *Azotobacter vinelandii*, patřící mezi výše zmíněné rhizobakterie podporující růst rostlin [49].

Z hlediska struktury se jedná o lineární, záporně nabitý, ve vodě rozpustný polysacharid skládající se z kyseliny β -D-mannuronové (jednotka M) a kyseliny α -L-guluronové (jednotka G) spojených β -1,4-glykosidickou vazbou [39, 41]. Jedná se tedy o kopolymer sestávající ze zbytků jednotek M a jednotek G, proložených sekvencemi sestávajícími z obou těchto jednotek, přičemž složení a sekvence zbytků G a M závisí na zdroji, ze kterého byl alginát získán a ovlivňuje výsledné vlastnosti tohoto polymeru [38, 41]. Gely připravené z alginátu s vysokým obsahem G sekvencí jsou poměrně tuhé, křehké, porézní a omezují transport rozpuštěných látek. Na druhou stranu alginát s vysokým obsahem M sekvencí tvoří elastičtější a slabší gely [41]. To můžeme vysvětlit omezenou rotací šestičlenných cukernatých kruhů kolem glykosidických vazeb a elektrostatickým odpuzováním mezi nabitými skupinami polymerního řetězce [50].



Obrázek 1: Chemická struktura alginátu sodného [51].

Hydrogely na bázi tohoto polymeru lze připravit několika způsoby, a to například kovalentním síťováním, polymerací volnými radikály nebo fázovým přechodem v reakci na změnu teploty. Nejčastěji je však alginát síťován kovovými kationty, kdy dochází ke vzniku iontových vazeb mezi kovovým kationtem a karboxylovými skupinami vyskytujícími se v polymerním řetězci. Výhodou tohoto způsobu síťování je, že není nutné použití toxických rozpouštědel a hydrogel může být vytvořen za velmi mírných podmínek [39].

2.5 Viskoelasticita

Podle chování během deformace můžeme materiály rozdělit na viskózní (tekuté vzorky), elastické (pružina) a viskoelastické (většina materiálů). V případě, že je materiál schopen veškerou deformační energii uložit a zpětně ji využít pro obnovení své původní struktury, mluvíme o něm jako o elastickém. Naproti tomu u viskózních materiálů je veškerá deformační energie rozptýlena tokem a dochází k trvalé deformaci, která po odstranění působící síly přetrvává. Žádné reálné materiály však nevykazují ideálně viskózní ani ideálně elastické chování (jedná se pouze o modelové případy) a většina materiálů vykazuje částečně viskózní a částečně elastické chování. Proto je označujeme za viskoelastické [1].

Viskoelastické vlastnosti materiálů lze stanovit pomocí vědního oboru zvaného reologie. Ta se zabývá tokovým chováním a deformací celé řady materiálů v reakci na působení vnějších mechanických sil [52]. Jedním z odvětví reologie, sloužící k popisu reologických vlastností materiálů, je tzv. reometrie. Existuje celá řada reometrických testů od relaxačních, přes tahové, stlačovací, ohybové či smykové až po creepové testy, ovšem mezi nejčastěji využívané reometrické testy patří jednoznačně testy tokové a oscilační. Zatímco tokové testy slouží především k popisu látek, u kterých převažuje viskózní povaha, oscilační testy využíváme pro charakterizaci viskoelastických materiálů [53].

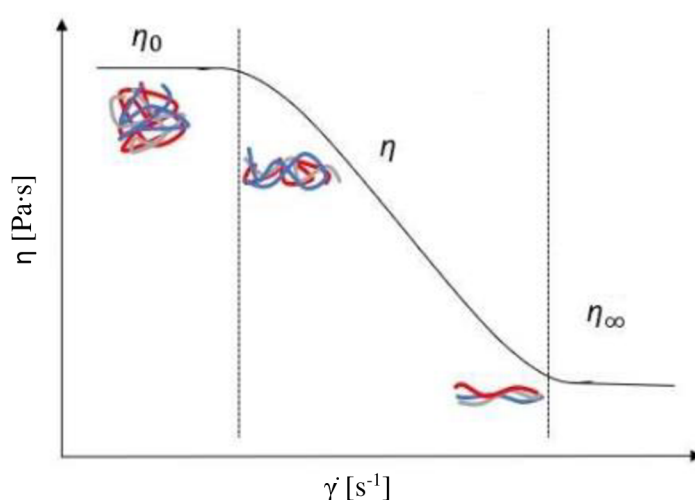
2.6 Smyková reometrie

2.6.1 Rotační testy

Rotační testy lze provádět ve dvou různých režimech. V prvním z nich dochází k rotaci s řízenou smykovou rychlostí (nebo rychlostí otáčení) a simuluje procesy závislé na rychlosti proudění či objemovém průtoku, jako je nanášení nátěrů štětcem nebo proudění trubici. Ve druhém z nich je přednastaveno smykové napětí (nebo točivý moment) a tyto testy simulují aplikace závislé na síle, jako je síla potřebná k vytlačení pasty z tuby nebo síla potřebná k uvedení materiálu do pohybu z klidového stavu [54].

Tokové testy

Typickým příkladem rotačních testů jsou tokové testy, při kterých dochází k postupnému zvyšování smykové rychlosti a je zaznamenáváno smykové napětí či dynamická viskozita. Výsledkem měření je buď tzv. toková křivka, což je závislost smykového napětí na smykové rychlosti, nebo tzv. viskozitní křivka, která se vyjadřuje jako závislost dynamické viskozity na smykové rychlosti. Tokové testy prováděné při nízkých hodnotách smykové rychlosti testují viskozitu vzorku při velmi malém namáhání, například vlivem gravitační síly, kdy je systém v klidu (při skladování v láhvi), zatímco při vysokých smykových rychlostech sledujeme viskozitu materiálu v pohybu (nátěr barvy na stěnu, protřepávání vzorku, aj.) [54].



Obrázek 2: Závislost viskozity na smykové rychlosti – tzv. viskozitní křivka [55].

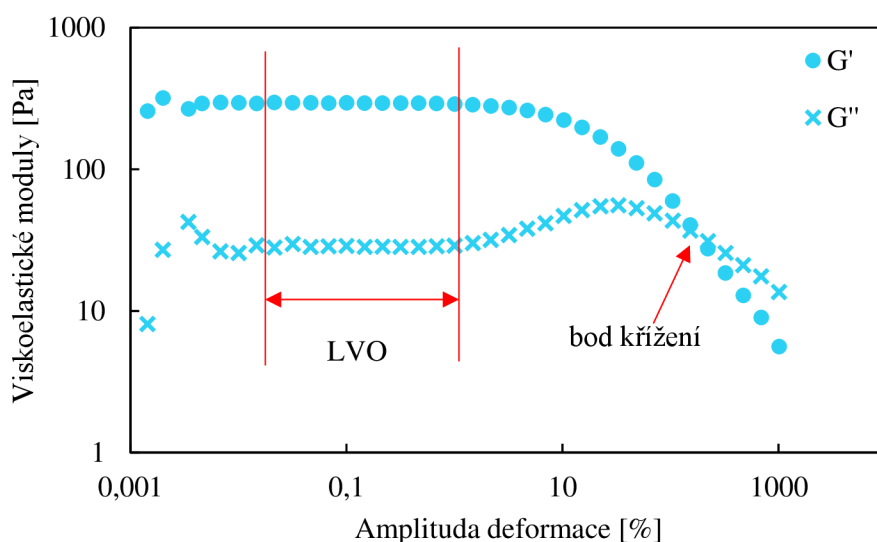
2.6.2 Oscilační testy

Během oscilačních testů je vzorek dávkován mezi dva sensory reometru (mezi nejběžnější uspořádání patří deska-deska, kužel-deska a válec-válec), přičemž horní senzor je schopný oscilace a dolní senzor je statický [52, 56]. Poté je vzorek vystaven kontinuálnímu sinusovému namáhání v podobě deformace či smykového napětí a je měřena mechanická odezva materiálu [56]. Sledovanými veličinami jsou viskoelastické moduly, kdy paměťový modul (G') slouží k popisu elastické složky materiálu a ztrátový modul (G'') charakterizuje viskózní složku materiálu [57].

V závislosti na typu vzorku bude mezi aplikovaným sinusovým napětím a odezvou vzorku (v podobě deformace) fázový posun pohybující se mezi 0° a 90° . Pokud fázový posun odpovídá 0° , znamená to, že vzorek nevykazuje žádnou viskózní odezvu a je považován za čistě elastický. Budící moment a odezva vzorku jsou tedy ve fázi. Naopak fázový posun odpovídající 90° vypovídá o tom, že se jedná o čistě viskózní materiál bez elastické odezvy. Jak už bylo řečeno, většina reálných materiálů však nevykazuje čistě elastické či čistě viskózní chování, jedná se tedy o viskoelastické materiály a jejich hodnota fázového posunu bude v rozmezí 0° až 90° [56].

Amplitudové testy

Amplitudové oscilační testy popisují chování materiálu při konstantní frekvenci oscilace a měnící se amplitudě deformace. Měření lze provádět ve dvou různých uspořádáních. Prvním z nich je tzv. *strain sweep*, při kterém probíhá měření za řízené smykové deformace a druhým je *stress sweep*, který je měřen při řízeném smykovém napětí. Výsledkem měření je závislost viskoelastických modulů na napětí či amplitudě deformace a obě osy jsou vynášeny v logaritmickém měřítku [52].



Obrázek 3: Příklad amplitudového deformačního testu alginátového hydrogelu.

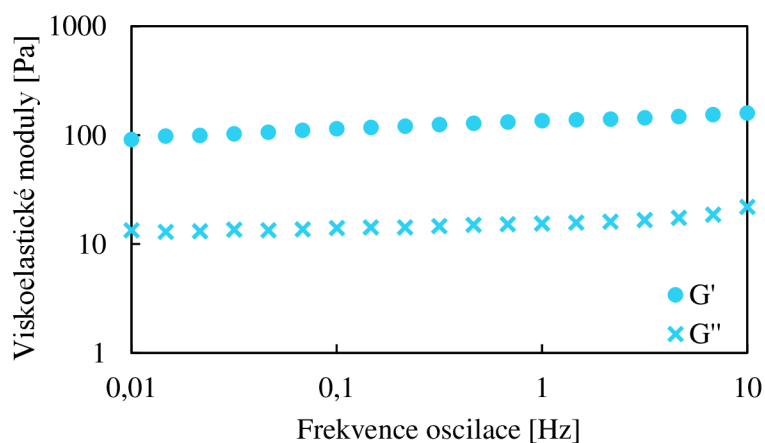
Tento typ testů se používá především k určení lineární viskoelastické oblasti, ale lze jimi popsat také odolnost daného materiálu vůči deformaci. Lineární viskoelastickou oblast označujeme zkratkou LVO a udává rozsah amplitudy deformace (nebo napětí), při které nedochází k narušení struktury měřeného vzorku. Čím delší je lineární viskoelastická oblast, tím je materiál odolnější vůči deformaci. Po překročení amplitudy deformace ležící v LVO postupně dochází k narušení struktury měřeného materiálu, a to až do hodnoty amplitudy deformace odpovídající bodu křížení, označovaného také jako *cross over point*. V tomto bodě dochází k úplné deformaci vzorku a ten ztrácí své původní vlastnosti [52].

Vzhledem ke skutečnosti, že u hydrogelových materiálů převažuje elastické chování nad viskózním, paměťový modul nabývá vyšších hodnot než modul ztrátový. Se zvyšující se amplitudou deformace však začínou postupně zanikat vazby držící polymerní síť pohromadě a při amplitudě deformace odpovídající bodu křížení je struktura gelu natolik zdeformována, že se hydrogel chová spíše jako kapalina než jako pevná látka a začne převažovat ztrátový modul [58].

Frekvenční testy

Stejně jako u amplitudových testů mají i frekvenční testy dva režimy. V prvním případě probíhá měření za řízené amplitudy deformace a ve druhém případě za řízené hodnoty napětí. V obou režimech však musí měření probíhat za konstantní amplitudy deformace (nebo napětí) ležící v lineární viskoelastické oblasti (stanovené amplitudovým testem) a měnící se frekvence oscilace. Zda použijeme vysoké či nízké frekvence oscilace závisí na vlastnostech sledovaného materiálu a na cílech, které si experiment klade. Zatímco při vysokých frekvencích simulujeme rychlý pohyb v krátkých časových úsecích a materiál nemá dostatek času na regeneraci, nízké frekvence simulují pomalý pohyb v klidu v delších časových úsecích a materiál má dostatek času na regeneraci [52].

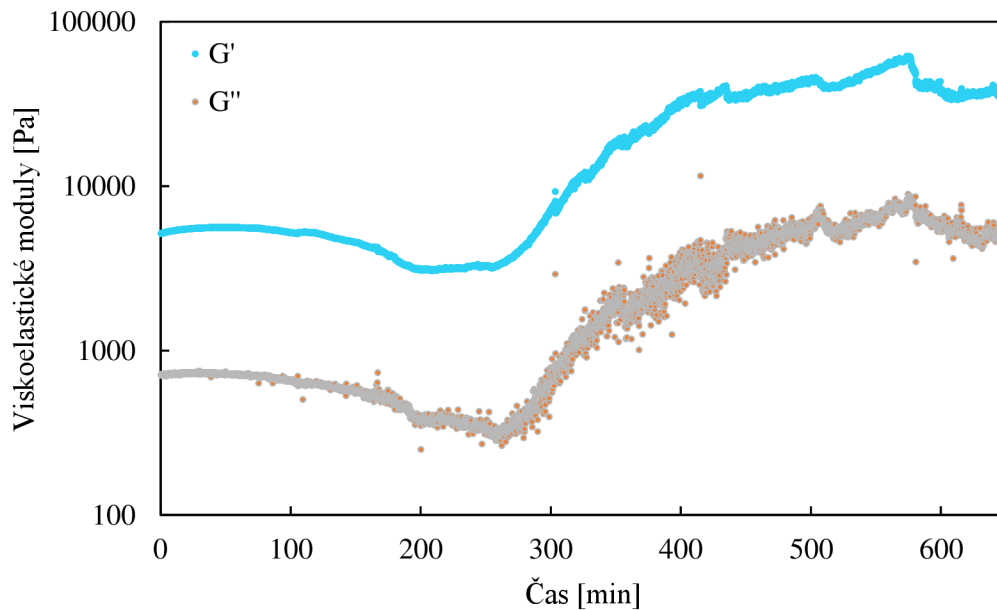
V praxi se frekvenční testy nejčastěji používají pro popis chování a vnitřní struktury měřeného vzorku a výsledkem měření je závislost viskoelastických modulů na frekvenci oscilace [52].



Obrázek 4: Příklad frekvenčního oscilačního testu alginátového hydrogelu.

Časové testy

Časové oscilační testy probíhají za konstantní amplitudy deformace (nebo napětí) a zároveň při konstantní frekvenci oscilace. Tento typ testu slouží k popisu změn reologických vlastností materiálu v čase během vytvrzování, gelace, sušení, relaxace nebo při zkoumání strukturálních změn během stárnutí vzorku. Výsledkem měření je závislost viskoelastických modulů na čase [52].

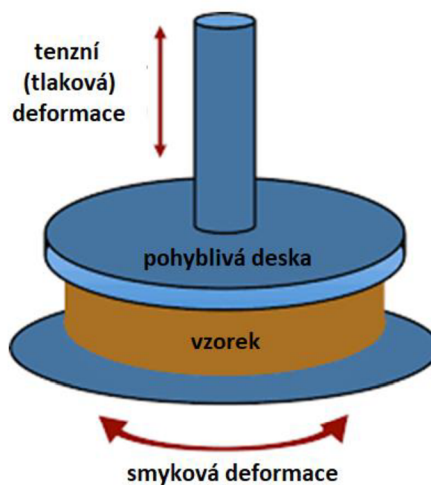


Obrázek 5: Závislost viskoelastických modulů na čase pro agarózový gel (koncentrace agarózy odpovídající 1 hm. %).

2.7 Axiální reometrie

2.7.1 Oscilační testy

Stejně jako u oscilačních testů prováděných při deformaci ve smyku dochází i u oscilačních testů s deformací v tlaku k dávkování vzorku mezi dva senzory reometru, přičemž horní senzor je pohyblivý a dolní nikoliv. Opět je vzorek vystaven určitému sinusovému napětí či deformaci a poté je měřena odezva materiálu na tuto aplikovanou deformační sílu. Hlavním rozdílem mezi oběma druhy oscilačních testů je směr pohybu horního senzoru reometru (viz obrázek 6). Během měření se analyzují viskoelastické vlastnosti materiálu vyjádřené viskoelastickými moduly, které jsou na rozdíl od modulů v oscilační reologii značeny písmenem E. Paměťový modul tedy označujeme jako E' a ztrátový modul je vyjádřen symbolem E'' [59].

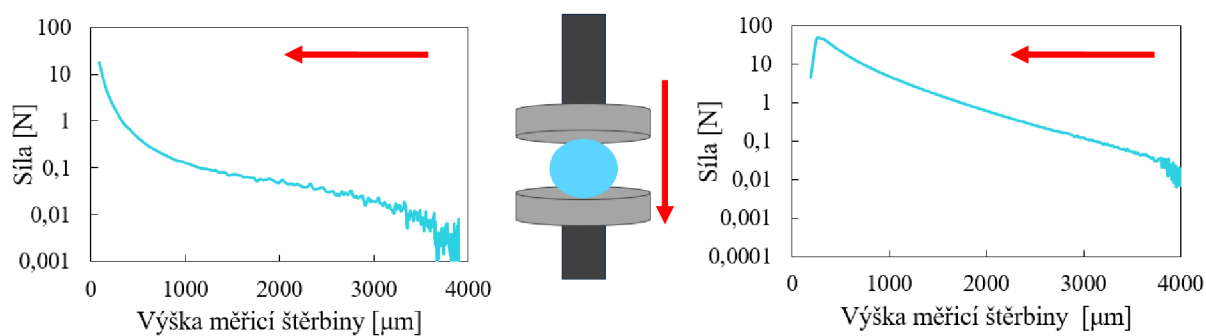


Obrázek 6: Směr pohybu horní desky reometru při oscilačních testech s deformací ve smyku (smyková reologie) a oscilačních testech s deformací v tlaku (axiální reologie) [60].

K určení lineární viskoelastické oblasti se stejně jako v oscilační reometrii využívají *amplitudové testy*, které umožňují provádění dalších testů (frekvenčních, časových) při takové amplitudě deformace, při které nedochází k narušení struktury vzorku [59].

2.7.2 Kompresní testy

Během kompresních testů (*squeeze testů*) dochází k dávkování vzorku mezi dvě desky reometru. Následně je nastavena rychlost, kterou se horní pohyblivá deska reometru pohybuje dolů a snižuje tak šířku měřicí štěrbin (*gap*), čímž postupně dochází k deformaci vzorku ze své původní výšky na novou zmenšenou výšku [61, 62]. Během měření je zaznamenávána normálová síla, kterou vzorek na horní desku reometru působí. Tento typ testu nachází uplatnění například při popisu vlastností materiálu při namáhání tlakem. Pro pochopení vývoje struktury vzorku je chování materiálu v reakci na tlak stejně důležité, jako chování v reakci na tah, smykovou deformaci či smykové napětí [61].



Obrázek 7: Příklad *squeeze testu* alginátové kuličky zesíťované v celém objemu (vlevo) a alginátové kuličky, která není zesíťovaná v celém objemu (vpravo).

Na obrázku 7 můžeme vidět příklad *squeeze testu* alginátových kuliček, kdy na obrázku vlevo vidíme, jak takový test probíhá v případě, že je kulička zesíťovaná v celém objemu. Naproti tomu obrázek vpravo ukazuje průběh *squeeze testu* prováděného na alginátové kuličce, která v celém objemu zesíťovaná nebyla a během měření došlo k jejímu prasknutí. To bylo indikováno náhlým poklesem normálové síly při nízkých hodnotách šířky měřicí štěrbin. Červené šipky uvádí směr, kterým měření probíhá.

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Možnosti síťování polysacharidů

Polysacharidem studovaným v této diplomové práci je alginát sodný, který je možné připravit v několika různých formách. Prášková forma alginátu je například používána v potravinářském průmyslu jako zahušťovadlo a emulgátor [63] a ve farmacii může být složkou tablet či obalových materiálů [64]. V potravinářství se alginát uplatňuje také například ve formě tenkého filmu, označovaného jako potravinářská fólie a v této formě slouží k balení potravin [65]. Ve formě mikrokuliček slouží jako transportní systém pro léky, růstové faktory nebo například buňky [66] a alginátová vlákna jsou široce využívána při výrobě obvazů na rány [67]. Nejčastěji připravovanou formou jsou však alginátové hydrogely.

Alginát lze síťovat několika způsoby, přičemž nejpoužívanější je síťování pomocí iontů. Struktura alginátu totiž umožňuje navázání různých dvojmocných iontů, které se vážou s různou afinitou rostoucí v následujícím pořadí: Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} a Pb^{2+} . Síťování je možné provést také pomocí trojmocných iontů v podobě Al^{3+} a Fe^{3+} , které se mohou vázat na tři karboxylové skupiny alginátového řetězce. Nejpoužívanějším iontem pro síťování alginátu je vápenatý iont [50].

K iontovému síťování může docházet dvěma různými mechanismy známými jako vnější a vnitřní gelace, které se liší v tom, jak jsou kationty dodávány a zaváděny do alginátu. Vnější gelace je založena na difúzi vápenatých iontů ze síťovacího činidla do alginátového solu, zatímco vnitřní gelace je založena na smíchání neaktivní vápenaté soli (např. $CaCO_3$, $CaSO_4$) s organickou kyselinou (kyselina octová) nebo s laktonem, kdy nejpoužívanějším z nich je D-glukono- δ -lakton (GDL) [40]. Principem této oddálené gelace je pomalá hydrolýza GDL na kyselinu glukonovou, která postupně okyseluje alginát, ve kterém jsou rozptýleny částice vápenaté soli a z té se postupným snižováním pH začnou uvolňovat vápenaté ionty. Dochází tak k rovnoměrnému síťování alginátu v celém objemu, díky čemuž vzniká homogenní gel [68].

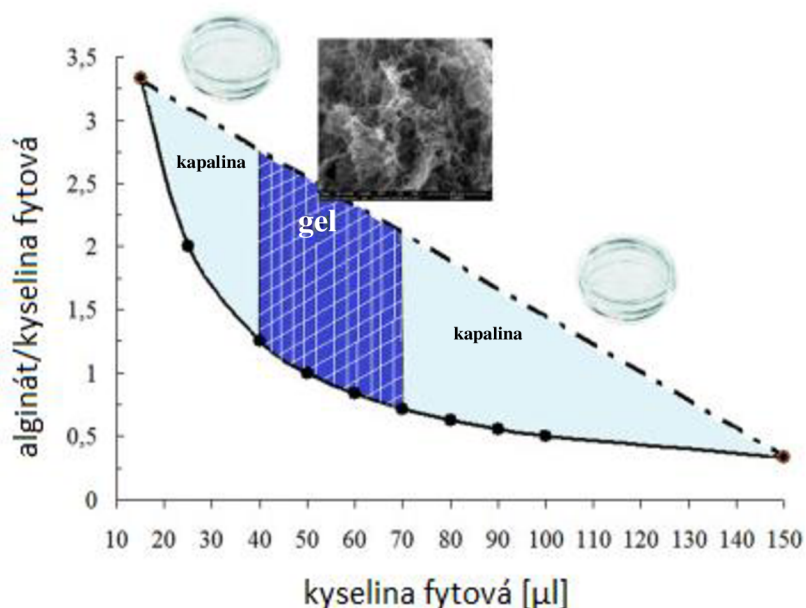
Autoři článku [69] se rozhodli dokázat, že je alginát možné síťovat také hořečnatými ionty, které byly v případě tohoto polymeru dosud považovány za negelující. Bylo zjištěno, že gelace u tohoto systému nastává při přibližně 5–10 krát vyšší koncentraci iontů než u gelů na bázi vápníku. Zároveň autoři článku ukázali, že síťování alginátu hořečnatými ionty je silně závislé na chemickém složení alginátu, jelikož vyšší obsah guluronových jednotek umožňuje rychlejší gelaci. Byly zkoumány alginátové prášky ze tří různých zdrojů, přičemž všechny tři algináty měly přibližně stejnou molekulovou hmotnost, ale rozdílný obsah guluronových a mannuronových jednotek. Alginát s nejvyšším obsahem guluronových jednotek tvořil gel nejlépe, zatímco u alginátu s nízkým obsahem guluronových jednotek ke gelaci vůbec nedošlo.

O síťování alginátu sodného pomocí uhličitanu vápenatého v kombinaci s GDL se pokusili Catherine K. Kuo a Peter X Ma [70], jejichž cílem bylo dosáhnout kontrolované rychlosti gelace pomocí systémů $\text{CaCO}_3\text{-GDL}$ a $\text{CaSO}_4\text{-CaCO}_3\text{-GDL}$. I přes nízkou rozpustnost obou použitých vápenatých solí docházelo v případě $\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ stále k poměrně rychlé gelaci, což vedlo ke vzniku hrudkovitých gelů s heterogenní strukturou. Naproti tomu systém $\text{CaCO}_3\text{-GDL}$ produkoval homogenní gely a proces gelace v tomto případě trval déle. Z tohoto důvodu autoři článku vyvinuli gelační systém $\text{CaSO}_4\text{-CaCO}_3\text{-GDL}$, který umožňuje řídit homogenitu, mechanické vlastnosti a rychlost gelace alginátu úpravou molárního poměru $\text{CaCO}_3 : \text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, množstvím použitého vápníku, koncentrací polymeru a teplotou, při které gelace probíhá. Rychlost gelace se zvyšovala s rostoucím množstvím vápenatých iontů, klesající koncentrací alginátu a vyšší teplotou.

Oddálenou gelací alginátu pomocí vápenatých solí v kombinaci s GDL se pokusili provést také Claire Pelaez a Marcus Karel [71]. Ti se rozhodli použít tři různé systémy, kdy prvním z nich byla kombinace 5 g alginátu sodného s 2 g citrátu vápenatého a 200 ml vody. V tomto případě byl alginát rozpuštěn ve 150 ml vody, citrát vápenatý byl suspendován ve zbylých 50 ml vody a poté byla suspenze citrátu zamíchána do alginátu, směs byla nalita do forem, zakryta a ochlazená. Druhý systém tvořilo 5 g alginátu sodného; 2,44 g dihydrátu hydrogenfosforečnanu vápenatého; 5,04 g GDL a 200 ml vody. Alginát byl opět rozpuštěn ve 150 ml vody a ve zbylých 50 ml vody byl rozpuštěn GDL, ke kterému byl přidán hydrogenfosforečnan. Obě složky byly zamíchány do sebe, směs byla nalita do forem, zakryta a ochlazená. Poslední systém se skládal z 5 g alginátu sodného; 1,4 g bezvodého hydrogenfosforečnanu vápenatého; 2 g kyseliny adipové a 200 ml vody. V tomto případě byl alginát a hydrogenfosforečnan rozmíchán ve 150 ml vody a po rozpuštění alginátu byla ke směsi vmíchána kyselina adipová rozpuštěná ve zbylých 50 ml vody. Gelace opět probíhala ve formách. Nevýhodou připravených gelů bylo, že u nich velmi rychle docházelo k synerezi, což vede ke zmenšení objemu gelu, které podporuje síťování řetězců alginátu díky blízkému kontaktu polymerních řetězců. Vznikají tak tvrdší a křehčí gely, protože se zmenšuje prostor mezi řetězci, který je běžně naplněný vodou. Autorům článku se podařilo synerezi výsledných gelů zpomalit přidávkem sacharózy.

Loredana Elena Nita a kol. [72] pro přípravu alginátových gelů použili kyselinu fytovou, která je hlavní složkou rostlinných semen, má antioxidační a protirakovinné účinky a může být vhodnou alternativou k dalším drahým přírodním síťovacím činidlům, jako je genipin. Tato kyselina má ve své struktuře velký počet aniontů schopných tvořit s kationty iontové vazby, ale zároveň má velké množství hydroxylových skupin, které umožňují tvorbu vodíkových můstků. Hydrogely v této studii byly připraveny za použití různých poměrů alginátu a kyseliny fytové, kdy bylo za stálého míchání k alginátu (0,05 g alginátového prášku rozpuštěného v 5 g vody) po kapkách přidáno specifické množství zmiňované kyseliny (koncentrace 50 hm. % ve vodě) a směs byla míchána přes noc za vzniku homogenního roztoku, který během 24 hodin vytvořil hydrogel. Výsledky infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací potvrdily přítomnost intramolekulárních vodíkových vazeb mezi alginátem a kyselinou fytovou.

Zároveň autoři článku dokázali, že má na tvorbu gelu zásadní vliv poměr alginátu a kyseliny fytové. Ideální podmínky pro sol-gel fázový přechod byly pozorovány při poměru alginát : kyselina fytová v rozmezí 2–3,5 (autoři článku však neuvádí o jaký poměr se konkrétně jedná – hmotnostní či objemový poměr). Nad a pod tímto rozmezím byly získány pouze čiré roztoky, u kterých k žádné gelaci nedošlo. Dle tabulky uvedené v článku, zobrazující chemické složení gelů, odpovídá výsledná koncentrace kyseliny fytové v alginátových gelech 0,00028–0,00050 hm. %. Na obrázku 8 můžeme vidět fázový diagram komplexu alginát – kyselina fytová [72].



Obrázek 8: Fázový diagram komplexu alginát – kyselina fytová [72].

Práce [73] se zabývá alginátem chemicky modifikovaným methakrylátovými skupinami, který byl síťován působením ultrafialového (UV) záření v přítomnosti fotoiniciátoru. Tvorba gelu byla monitorována pomocí reometru a byl vyhodnocen bod gelace. Dynamika síťování a hodnoty viskoelastických modulů byly ovlivněny intenzitou UV záření ($3\text{--}15 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) a stupněm methakrylace (5–25 %). Bylo zjištěno, že snížení intenzity UV záření snižuje počet volných radikálů tvořených fotoiniciátorem, a to vede ke zpomalení rychlosti síťování. Nižší počet volných radikálů zároveň vede k nižšímu stupni zesíťování a tím pádem také k nižším hodnotám viskoelastických modulů. Zároveň bylo prokázáno, že vyšší stupeň methakrylace vede k pevnějším gelům s vyššími viskoelastickými moduly, zatímco nižší stupeň methakrylace vede k méně pevným gelům s nižšími viskoelastickými moduly.

3.2 Možnosti ovlivnění finálních aplikačních vlastností hydrogelů

Požadavky na výsledné vlastnosti hydrogelových materiálů se pro každou aplikaci liší. Zatímco měkčí hydrogely nachází uplatnění například v kosmetice či při výrobě kontaktních čoček, pevnější hydrogely slouží k výrobě implantátů, zubních náhrad nebo v robotice. S pevností materiálu úzce souvisí rychlost gelace, která může ovlivnit výsledné mechanické vlastnosti gelu a tím i omezit aplikovatelnost daného materiálu. Dalším parametrem rozhodujícím

o využitelnosti hydrogelu může být také čírost, která je důležitá především při výrobě kontaktních čoček. Důležitou roli hraje také jev zvaný synereze, který je ve většině případů nežádoucí a jehož zpomalení může výrazně přispět k použitelnosti hydrogelů v některých aplikačních oblastech. Hydrogely mají oproti jiným materiálům velkou výhodu v podobě jejich laditelných vlastností, které si můžeme upravit podle toho, jakým způsobem má být v budoucnu hydrogel využit.

Například Katsuyoshi Nishinari a Yapeng Fang [74] poskytli přehled o uvolňování sacharózy a dalších cukrů z agarových gelů. Autoři článku uvádí, že přidavek sacharózy do agarových roztoků vede ke snížení synereze výsledných gelů, přičemž průběh synereze je diskutován jak v klidovém stavu, tak při uvolňování tekutiny, které je vyvolané kompresí. Měřením absorbance bylo zjištěno, že přidavek sacharózy snižuje zákal agarových gelů a gely jsou tedy čířejší. Kromě snížení synereze a zákalu hydrogelů přidavek sacharózy také zvyšuje viskoelastické moduly. Možným vysvětlením těchto zjištění může být fakt, že s přidavkem sacharózy dochází ke zmenšování velikosti ok, a to znemožňuje difúzi v gelu, a tedy i uvolňování sacharózy [74]. Isamu Kaneda [75] vysvětluje toto chování tak, že u rozpouštědla, ke kterému byla přidána sacharóza, došlo ke snížení rychlosti toku v porézní agaróze síti, protože přidavkem sacharózy došlo ke změnám viskozity rozpouštědla obsahujícího sacharózu a také ke změně v mikroskopické struktuře agarózových gelů. Dosud však nebyl zjištěn přesný mechanismus ovlivnění synereze přidavkem sacharózy.

Výsledné vlastnosti alginátových hydrogelů lze ovlivnit koncentrací alginátu a vápenatých iontů. Se zvyšující se koncentrací alginátu obecně roste síla gelové struktury, ovšem nadměrná koncentrace alginátu může snížit schopnost difúze vápenatých iontů maticí, a to vede ke snížení možnosti síťování polymerních řetězců. Pro rozsah koncentrací alginátu 1,3–1,7 hm. % však nebyly pozorovány žádné významné odchylky ve struktuře gelu [39].

Cílem autorů článku [39] bylo optimalizovat postup přípravy alginátového hydrogelu s odpovídajícími mechanickými vlastnostmi. Pro tyto účely použili ve své studii koncentraci alginátu v rozmezí 0,1–2,9 hm. %, zatímco koncentrace vápenatých iontů byla analyzována v rozmezí 0,4–4,6 hm. %. Nejlepší schopnost zadržovat vodu měl alginátový hydrogel připravený z alginátu o koncentraci 2,7 hm. % a chloridu vápenatého o koncentraci 0,9 hm. %, přičemž tento gel byl schopen zadržet asi 76 % vody.

Významný vliv na výsledné vlastnosti hydrogelů může mít také pH. Studie [9] zkoumala sílu gelu a synerezi kvádrových alginátových gelů ($2 \times 2 \times 1,4$ cm) v závislosti na době gelace, koncentraci roztoku chloridu vápenatého ($0,05 \text{ mol/dm}^3$ – $0,20 \text{ mol/dm}^3$) a pH (4–11) metodou vnější gelace. Roztoky chloridu vápenatého byly připraveny o koncentraci 0,05, 0,10, 0,15 a $0,20 \text{ mol/dm}^3$ a pH bylo upraveno kyselinou octovou nebo hydroxidem sodným. Poté byly do jednotlivých jamek 3D tištěné akrylonitrilbutadienstyrenové čtvercové formy (2 cm dlouhé, 2 cm široké a 4 cm vysoké) přidány 4 g alginátového solu o koncentraci 2 hm. %, ke kterému byl přidán roztok chloridu vápenatého o určité koncentraci, pH a hmotnosti. Forma byla zakryta a skladována při pokojové teplotě a po gelaci bylo nutné gely ponořit do roztoku chloridu vápenatého kvůli vytvrzení. Takto připravené gely mohly být analyzovány.

Síla gelu rostla se zvyšujícím se množstvím dostupných vápenatých iontů, a to až do určité hodnoty, po jejímž dosažení se ustálila. To autoři článku vysvětlují tím, že nad určitou koncentrací chloridu vápenatého gely dosáhly osmotické rovnováhy, kdy dochází k rovnováze mezi synerezí a reabsorpcí vody. Zároveň bylo zjištěno, že difúzí vápenatých iontů z vnějšku do vnitřku alginátového solu došlo ke vzniku gelových zón s vyšší koncentrací na vnějším povrchu a nízkou koncentrací v jádru gelů. Výsledky také ukazují, že pevnost gelu roste se zvyšující se dobou gelace, ovšem opět jen do určité doby a poté pevnost poklesne nebo se ustálí. To autoři článku vysvětlují tím, že již byla vyčerpána všechna místa alginátu schopná vázat vápenaté ionty a další síťování již není možné [9].

Vlastnosti alginátu výrazně ovlivnilo také pH, kdy od pH 4 s jeho nárůstem rostla viskozita alginátu a maximální viskozity bylo dosaženo při pH 6–7. Následně se viskozita začala snižovat. To je způsobeno tím, že při kyselém pH jsou karboxylové skupiny protonizovány, což vede ke snížení odpudivé síly mezi těmito skupinami a synereze je tedy dominantnější než resorpce vody, díky čemuž dochází ke smrštění struktury gelu. Na druhou stranu při alkalickém pH se karboxylové skupiny disociují, získávají záporný náboj a působí mezi nimi odpudivé síly, které vedou k tvorbě dutin, takže gely mají tendenci absorbovat vodu, aby zaplnily prázdný prostor ve své struktuře [9].

Autoři článku [76] zkoumali chování alginátových hydrogelů v tahu v závislosti na volbě alginátového polymeru a způsobu jeho zpracování, kdy hydrogely byly připraveny síťováním 2% alginátu síranem vápenatým. Alginát s vysokým obsahem kyseliny guluronové vedl ke vzniku silnějších gelů než alginát s vysokým obsahem kyseliny mannuronové. To můžeme vysvětlit tím, že kyselina guluronové díky své struktuře lépe váže vápenaté ionty a může tak tvořit polymerní síť. Zároveň byl zkoumán vliv fosforečnanů, kdy jejich zvýšená koncentrace vedla nejen ke snížení modulů v tahu, ale také prodloužila dobu gelace alginátu. Fosforečnanové ionty totiž přechodně vážou vápenaté ionty, což nejprve snižuje celkový počet iontů dostupných pro síťování alginátu, ale časem fosforečnan působí jako systém pomalého uvolňování dalších iontů.

3.3 Zhodnocení současného stavu řešené problematiky

Provedená literární rešerše poukazuje na několik způsobů síťování alginátu zahrnující jak vnější, tak vnitřní gelaci a poukazuje na řadu faktorů, které mohou ovlivnit výsledné vlastnosti alginátových hydrogelů, a tedy i použitelnost daného materiálu pro konkrétní aplikaci. V literární rešerši bylo prokázáno, že významný vliv na vlastnosti alginátových gelů má koncentrace alginátu sodného i síťovacího činidla, poměr G a M bloků v alginátu, pH a rychlost gelace. Vlastnosti gelů na bázi polysacharidů ovlivňuje také například koncentrace fosforečnanů a přísad sacharózy.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

- alginát sodný, čistota neuvedena (ROTH)
- alginát sodný, čistota neuvedena (Thermo Fisher Scientific)
- chlorid vápenatý, p.a. (Lach-Ner)
- chlorid zinečnatý, čistota $\geq 98 \%$ (Lach-Ner)
- tetrahydrát dusičnanu vápenatého, p.a. (Sigma-Aldrich)
- hydrát octanu vápenatého, čistota $\geq 99 \%$ (Sigma-Aldrich)
- hydrát laktátu vápenatého, $\geq 98 \%$ (Sigma-Aldrich)
- heptahydrát síranu železnatého, p.a. (Lach-Ner)
- síran hořečnatý, p.a. (Penta)
- hexahydrát chloridu hořečnatého, p.a. (Penta)
- kyselina fytová, 50 % (Sigma-Aldrich)
- amoniak, 25–29 %, p.a. (Penta)
- chlorid amonný, p.a. (Penta)
- uhličitan sodný, p.a. (Fluka)
- hydrogenuhličitan sodný, p.a. (Penta)
- uhličitan vápenatý, čistota $\geq 98 \%$ (Lach-Ner)
- glukono-delta-lakton, čistota $\geq 99 \%$ (Sigma-Aldrich)
- kyselina citronová, p.a. (Penta)
- hydrogenufosforečnan draselný, p.a. (Penta)
- dihydrogenufosforečnan draselný, p.a. (Penta)
- sacharóza, p.a. (Penta)
- ultračistá voda (Milli-Q)

4.2 Použité přístroje

- reometr (Discovery HR-2, TA Instruments)
- senzory
 - deska se zdrsňeným povrchem o průměru 20 mm (sériové číslo: 115802)
 - deska s hladkým povrchem o průměru 25 mm (sériové číslo: 547229.001)
 - deska s pískovaným povrchem o průměru 8 mm (sériové číslo: 109411)
 - soustředěné válce (sériové číslo: 989938)
- vícemístná magnetická míchačka (Variomag poly)
- analytické váhy (Denver Instruments S-603)
- analytické váhy (Denver Instruments 224A)
- přístroj pro přípravu ultračisté vody (Purelab Classic – 091083-GBR-001)
- průtokový termostat (Solid State, TCube edge)
- pH metr (Mettler toledo)
- vícerychlostní injekční pumpa R99-E (Razel scientific instruments)
- hustoměr DMA 4500 (Anton Paar, sériové číslo: 80398455)

4.3 Použitý software

- TRIOS (TA Instruments)
- MS Excel (Microsoft)

4.4 Příprava vzorků

Nejprve byl připraven roztok alginátu sodného (ROTH) o požadované koncentraci. K navážce alginátu sodného v pevné formě byla přidána ultračistá voda (například při přípravě alginátu o koncentraci 1 hm. % byl na 100 ml alginátového solu navážen 1 g alginátu sodného a objem byl na požadovaných 100 ml doplněn ultračistou vodou) a suspenze byla následně míchána na magnetické míchačce (150 RPM, laboratorní teplota), a to až do úplného rozpuštění alginátu, které bylo indikováno vznikem solu bez okem detekovatelného pevného podílu (přibližně 6 hodin).

Připravený sol byl ponechán 24 hodin v lednici a poté z něj byly do jamek kultivační desky připraveny alginátové hydrogely (průměr jedné jamky, a tedy i gelu odpovídal 22 mm) přikapáním vhodného síťovacího činidla k určitému objemu alginátového solu. Gely byly 24 hodin ponechány v exsikátoru s vodou a následně mohly být podrobeny reologickým experimentům. Podrobný popis přípravy jednotlivých gelů bude popsán ve výsledcích a diskuzi v kapitole 5.

4.5 Optimalizace smykových reometrických testů

4.5.1 Oscilační amplitudové testy

Stanovení viskoelastických vlastností alginátových hydrogelů amplitudovými testy s deformací ve smyku bylo provedeno pomocí reometru Discovery HR-2 (TA Instruments) s uspořádáním senzorů deska/deska o průměru 20 mm. Aby bylo zabráněno prokluzování vzorku mezi deskami reometru, byla použita vroubkovaná geometrie se zdrsněním 0,2 mm (viz příloha 2). Každý typ gelu byl podroben dvěma amplitudovým testům (parametry nastavení ukazuje tabulka 1), ze kterých byly vypočteny průměrné hodnoty viskoelastických modulů včetně směrodatné odchylky. Amplitudové testy s deformací ve smyku byly provedeny při parametrech nastavení běžně využívaných pro hydrogelové vzorky podobného charakteru, tudíž v tomto případě nebylo nutné provádět žádnou optimalizaci měření. Pouze bylo ověřeno, že jsou tyto parametry vhodné i pro měření alginátových hydrogelů.

Tabulka 1: Parametry nastavení amplitudových testů s deformací ve smyku.

teplota	25 °C
čas relaxace a temperace	120 s
výška měřicí štěrbin	1000 μ m
axiální síla	$\leq 0,3$ N
frekvence oscilace	1 Hz
rozsah amplitudy deformace	0,001–1000 %
počet bodů na dekádu	8

4.5.2 Oscilační časové testy

Časové testy byly taktéž prováděny pomocí reometru Discovery HR-2 (*TA Instruments*), ovšem v tomto případě bylo použito uspořádání senzorů válec/válec (viz příloha 3). Na začátku experimentu musel být nejprve proveden amplitudový test s deformací ve smyku, na základě kterého byla pro daný vzorek vybrána hodnota amplitudy deformace ležící v LVO a ta byla použita při provedení časového testu. Měření bylo prováděno při teplotě 25 °C a běžně využívané frekvenci oscilace odpovídající 1 Hz.

Jediným vzorkem, který byl v rámci předložené diplomové práce podroben časovému testu, byl alginát o koncentraci 1 hm. % síťovaný uhličitánem vápenatým v kombinaci s GDL, kdy hmotnostní poměr CaCO₃ : GDL odpovídal 1:45. Na základě provedeného amplitudového testu byla pro časový test vybrána amplituda deformace 0,05 %.

Tabulka 2: Parametry nastavení časových testů.

teplota	25 °C
frekvence oscilace	1 Hz
amplituda deformace	0,05 %

4.6 Optimalizace axiálních reometrických testů

4.6.1 Oscilační amplitudové testy

Amplitudové testy s deformací v tlaku byly stejně jako amplitudové testy s deformací ve smyku provedeny pomocí reometru Discovery HR-2 (*TA Instruments*) s uspořádáním senzorů deska/deska se zdrsňeným povrchem (zdrsnění 0,2 mm) o průměru 20 mm. I v tomto případě byl každý typ gelu podroben celkem dvěma amplitudovým testům, ze kterých byly vypočteny průměrné hodnoty viskoelastických modulů včetně směrodatné odchylky. Jelikož tato metoda na rozdíl od amplitudových testů s deformací ve smyku není na fakultě tolik prostudovaná, bylo nutné provést optimalizaci nastavení. Rozsah amplitudy deformace byl nastaven v maximálním možném rozmezí, a to 0,001–10 % a pro lepší vizualizaci naměřených dat byl počet bodů na dekádu zvýšen na 15. V následujících kapitolách bude provedena optimalizace nastavení vhodné výšky měřicí štěrbiny a frekvence oscilace.

Výběr výšky měřicí štěrbiny

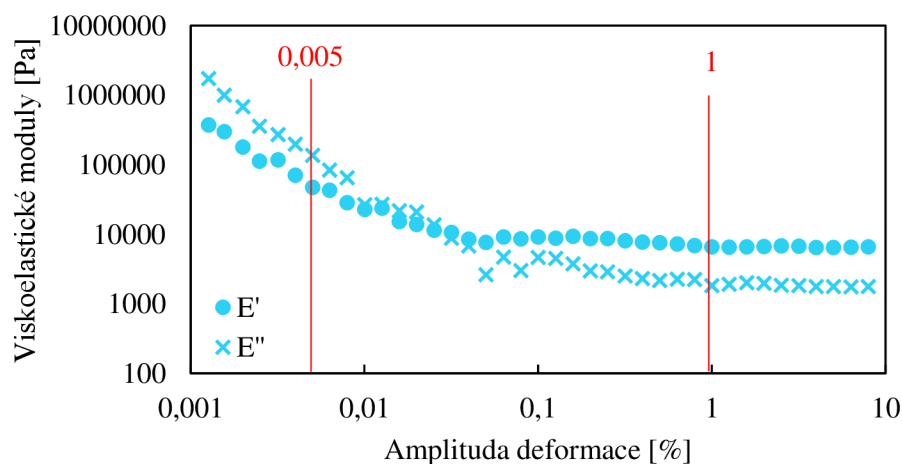
K 4,5 ml 1% alginátu (ROTH) bylo za stálého míchání postupně přikapáno 1,25 ml chloridu vápenatého o koncentraci 0,1 mol/dm³, čímž vznikl alginátový hydrogel o objemu 4,5 ml a zůstalo 1,25 ml nezreagované směsi. Výsledná koncentrace alginátu v připraveném gelu tedy odpovídala 1 hm. % (po přidání ethanolu k nezreagované směsi nedošlo ke vzniku sraženiny, tudíž můžeme říct, že v nezreagované směsi žádný alginát nezůstal) a koncentrace chloridu vápenatého v gelu odpovídala 0,308 hm. % (za předpokladu, že se veškeré síťovací činidlo naváže na alginát a nezreagovaných 1,25 ml je pouze vyloučené disperzní prostředí, které se již do síťovité struktury gelu nevešlo). Na šesti takto připravených gelech byly po 24 hodinách od přípravy provedeny amplitudové testy při teplotě 25 °C, axiální síle 0,3 N, frekvenci oscilací 1 Hz, rozsahu amplitudy deformace 0,001–10 %, 15 bodech na dekádu a s výškou měřicí

štěrbiny 0,5; 1; 2; 3; 4 nebo 5 μm . Nejspolehlivější výsledky byly naměřeny při šířce měřicí štěrbiny odpovídající 2 μm , a proto byla pro všechny další experimenty použita právě tato hodnota.

Výběr frekvence oscilace

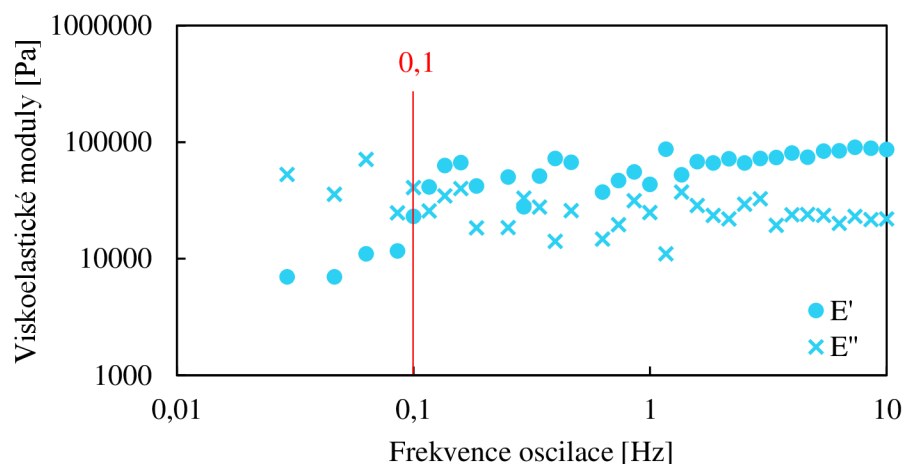
Pro výběr vhodné frekvence oscilace bylo použito dalších sedm alginátových gelů, připravených smícháním 4,5 ml 1% alginátu (ROTH) s 1,25 ml chloridu vápenatého o koncentraci 0,1 mol/dm³. Tyto gely byly podrobeny amplitudovým testům s deformací v tlaku při teplotě 25 °C, axiální síle 0,3 N, šířce měřicí štěrbiny 2 μm , rozsahu amplitudy deformace 0,001–10 %, 15 bodech na dekádu a s frekvencí oscilací 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 1; 1,5 a 2 Hz. Nejspolehlivější výsledky byly naměřeny při frekvenci oscilací 1,5 Hz, a právě proto byla tato hodnota použita u všech dalších experimentů. Vzhledem ke skutečnosti, že byly v rozsahu amplitudy deformace 0,001–0,01 % naměřeny nepřesné výsledky a jednotlivé body v grafu byly nepravidelně rozptýleny (při takto nízkých amplitudách deformace tedy nebylo možné zaručit spolehlivost získaných výsledků), byl v dalších experimentech rozsah amplitudy deformace snížen na 0,01–10 %.

Zajímavé výsledky měření však byly pozorovány také při frekvenci oscilací 0,1 Hz. Jak můžeme vidět na obrázku 9, při amplitudách deformace ležících v rozsahu 0,001–0,01 % byl ztrátový modul vyšší než modul paměťový, následně se moduly začaly postupně vyrovnávat a až od amplitudy deformace odpovídající přibližně 0,05 % začal paměťový modul převyšovat modul ztrátový. Experiment byl celkem 5x zopakován, ale závislost viskoelastických modulů na amplitudě deformace měla vždy stejný průběh, jako vidíme na obrázku 9.

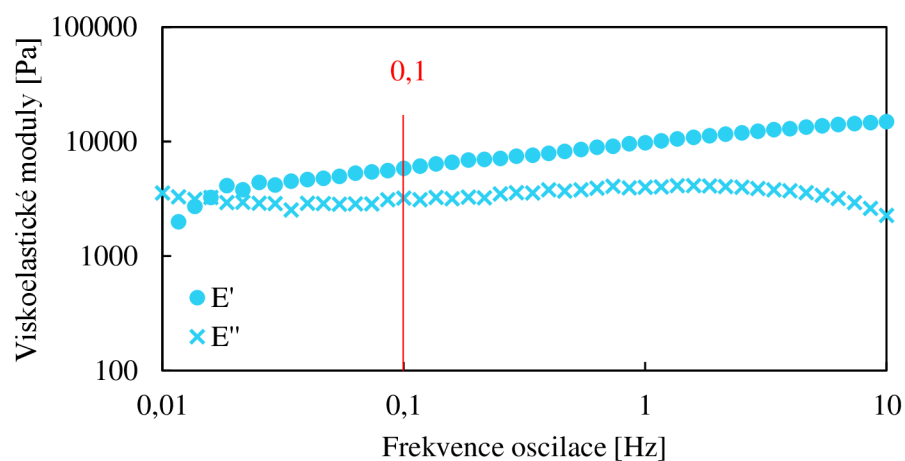


Obrázek 9: Amplitudový test s deformací v tlaku – frekvence 0,1 Hz.

Pro ověření pravdivosti výsledků měření byly provedeny dva frekvenční testy při amplitudě deformace 0,005 % a 1 %. Měření bylo stejně jako u amplitudových testů provedeno při teplotě 25 °C, axiální síle 0,3 N, šířce měřicí štěrbiny 2 μm a 15 bodech na dekádu. Rozsah frekvence oscilace odpovídal 0,01–10 Hz.



Obrázek 10: Frekvenční test s deformací v tlaku – amplituda deformace 0,005 %.



Obrázek 11: Frekvenční test s deformací v tlaku – amplituda deformace 1 %.

Jak můžeme vidět na obrázku 10, při frekvenci oscilací 0,1 Hz a amplitudě deformace 0,005 % byl stejně jako u amplitudového testu na obrázku 9 ztrátový modul vyšší než modul paměťový. Stejně tak frekvenční test při amplitudě deformace 1 % zobrazený na obrázku 11 odpovídá výsledkům amplitudového testu na obrázku 9, kde je paměťový modul vyšší než modul ztrátový.

Vzhledem k tomu, že daná problematika nebyla předmětem výzkumu této diplomové práce, jejíž obsah je i tak poměrně rozsáhlý, mohlo by být dané téma podrobněji prozkoumáno v rámci dalšího výzkumu, například v budoucích závěrečných pracích.

Závěry z optimalizace

Na základě provedené optimalizace byly všechny amplitudové testy s deformací v tlaku provedeny při nastavení, které uvádí tabulka 3.

Tabulka 3: Parametry nastavení amplitudových testů s deformací v tlaku.

teplota	25 °C
čas relaxace a temperace	120 s
gap	2000 μm
axiální síla	≤ 0,3 N
frekvence oscilace	1,5 Hz
rozsah amplitudy deformace	0,01–10 %
počet bodů na dekádu	15

4.6.2 Kompresní testy

Příprava alginátových kuliček

Kompresní testy (tzv. *squeeze testy*) byly provedeny na alginátových kuličkách, přičemž cílem experimentů bylo nejen charakterizovat mechanické vlastnosti alginátových kuliček, ale také zjistit, zda jsou kuličky zesíťované v celém objemu či nikoliv. Aby bylo možné provést optimalizaci měření těchto testů, bylo nutné připravit kuličky o stejné velikosti. K tomuto účelu byla použita automatická pumpa s injekční stříkačkou naplněnou alginátem (ROTH) o koncentraci 1 hm. % (viz obrázek 12), pod kterou byla vložena magnetická míchačka a skleněná miska se síťovacím činidlem (chloridem vápenatým o koncentraci 0,1 mol/dm³), do které bylo vloženo magnetické míchadlo. Díky tomu, že tlačila pumpa na píst stříkačky stále stejnou rychlostí, kapaly do misky se síťovacím činidlem stejně velké kapky alginátu a tím pádem vznikaly stejně velké alginátové kuličky. Síťovací činidlo bylo nutné neustále míchat na magnetické míchačce, aby kapky alginátu nekapaly stále na stejné místo a neklesala tak v jejich okolí koncentrace síťovacího činidla.

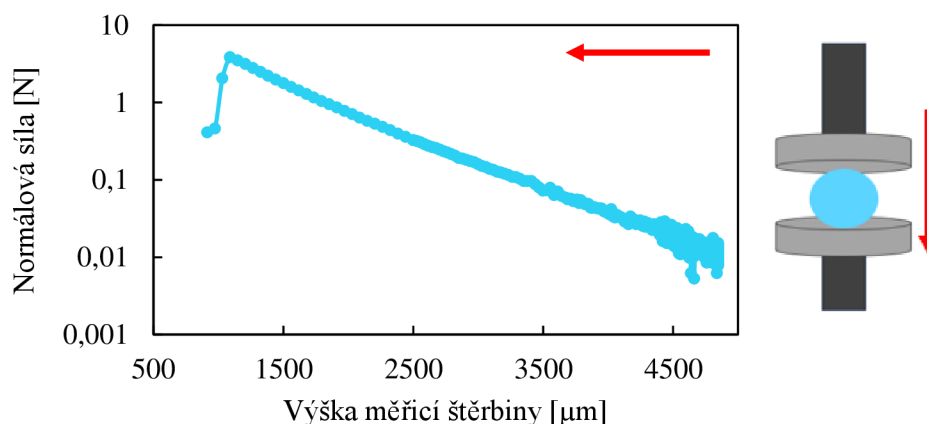


Obrázek 12: Automatická pumpa.

Výběr měřící geometrie

Squeeze testy byly provedeny pomocí reometru Discovery HR-2 (TA Instruments) s uspořádáním senzorů deska/deska. Jelikož by vroubkovaná geometrie mohla alginátové kuličky poškodit a zároveň by kuličky mohly zalézat mezi vroubky, byla během *squeeze testů* použita geometrie s hladkým povrchem. Alginátová kulička byla vložena mezi senzory reometru a horní senzor byl nastaven do takové polohy, aby se kuličky lehce dotýkal, ale netlačil na ni.

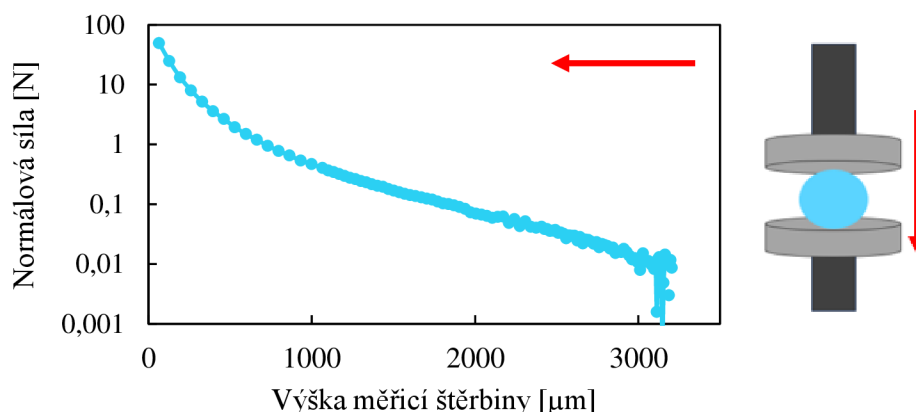
Pro první *squeeze test* byly připraveny alginátové kuličky, které byly ponechány v síťovacím čínidle po dobu 2 minut, poté byly propláchnuty vodou a několik kuliček bylo zváženo. Hmotnost kuliček odpovídala $0,080 \pm 0,001$ g. Experiment byl proveden s rychlostí stlačení vzorku odpovídající $8 \mu\text{m/s}$ a vzhledem k tomu, že měly kuličky průměr 5–6 mm, byla použita geometrie o průměru 8 mm.



Obrázek 13: Squeeze test s měřicí geometrií o průměru 8 μm.

Jak ukazuje obrázek 13, nejprve docházelo k nárůstu normálové síly a při šířce měřicí štěrby odpovídající přibližně 1 030 μm najednou došlo k jejímu poklesu. Ten byl způsoben tím, že kulička během stlačení začala prokluzovat mezi deskami reometru, až úplně vyklouzla z měřicí štěrby, horní senzor již na kuličku netlačil, a proto byl pozorován prudký pokles normálové síly. Na konci experimentu byla kulička zvážena (včetně disperzního prostředí, které bylo během stlačování vzorku vytlačeno z polymerní sítě) a její hmotnost byla porovnána s počáteční hmotností kuličky na začátku experimentu. Bylo zjištěno, že došlo k poklesu hmotnosti kuličky z původních 0,080 g na 0,070 g, což mohlo být částečně způsobeno odpařením vytlačeného disperzního prostředí, ale jelikož byl při vážení zbylých alginátových kuliček taktéž zaznamenán výrazný pokles hmotnosti a v následujících hodinách hmotnost dále klesala (přestože byly kuličky uloženy v exsikátoru s vodou), nemůžeme pokles hmotnosti kuličky během experimentu přiřazovat pouze tomu, že bylo odpařeno disperzní prostředí. Pokles hmotnosti u všech alginátových kuliček mohl být způsoben také tím, že u čerstvě připravených kuliček ještě docházelo k menšímu přeskupování polymerních řetězců a s přibývajícím množstvím spojů v síťovité struktuře postupně docházelo k vytlačování disperzního prostředí, které se již do struktury nevešlo (jev zvaný synereze).

Proto byl experiment zopakován, ovšem tentokrát byly kuličky po přípravě 24 hodin uchovány v plastovém kelímku přikrytém dvojitou vrstvou parafilmu (aby nedocházelo k jejich vysychání) a zároveň byla použita geometrie o průměru 25 mm, aby kulička během stlačování nemohla tak snadno vyklouznout z měřicí štěrby.

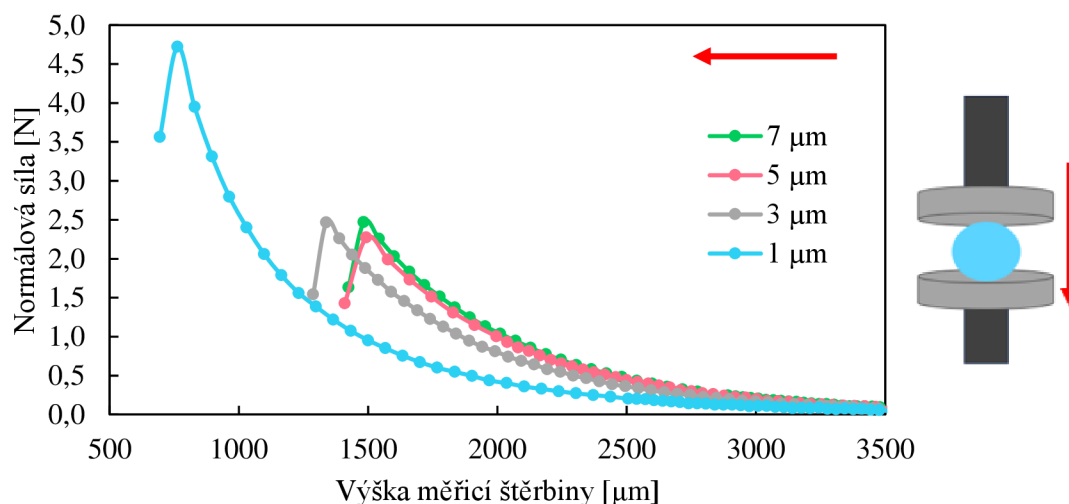


Obrázek 14: Squeeze test s měřicí geometrií o průměru 25 mm.

Jak můžeme vidět na obrázku 14, v tomto případě již k poklesu normálové síly nedošlo. Kulička nevyklouzla z měřicí štěrbině a zároveň během stlačování ani nedošlo k jejímu prasknutí (které by taktéž vedlo k poklesu normálové síly), což znamená, že kulička byla zesíťovaná v celém svém objemu. Během vážení bylo zjištěno, že hmotnost všech připravených kuliček byla na počátku experimentu stejná, jako hmotnost kuliček zaznamenaná o 4 hodiny později, takže můžeme říct, že se již kuličky nacházely v termodynamické rovnováze, nedocházelo k dalšímu přeskupování polymerních řetězců a kuličky neztrácely disperzní prostředí tak rychle, jako u prvního experimentu. K menšímu poklesu hmotnosti došlo akorát u měřené kuličky, jejíž hmotnost během měření klesla z původních 0,118 g na 0,114 g, což mohlo být způsobeno odpařením menšího množství disperzního prostředí, které bylo během stlačování kuličky vytlačeno na spodní desku reometru vyhřátou na 25 °C.

Výběr rychlosti stlačení vzorku

Pro výběr vhodné rychlosti stlačení vzorku byly provedeny 4 *squeeze testy* s využitím horního senzoru reometru o průměru 25 mm s hladkým povrchem a s alginátovými kuličkami připravenými 24 hodin předem. Kuličky byly záměrně připraveny tak, aby nebyly zesíťovány v celém svém objemu (byly ponechány v síťovacím činidle pouze 60 s), díky čemuž mohl být sledován vliv rychlosti stlačení vzorku na to, při jaké normálové síle a šířce měřicí štěrbině dojde k prasknutí kuličky. Rychlost stlačení vzorku byla nastavena na 1; 3; 5 nebo 7 $\mu\text{m/s}$.



Obrázek 15: Squeeze testy – optimalizace rychlosti stlačení vzorku.

Jak můžeme vidět na obrázku 15, výsledky měření při rychlosti stlačení vzorku odpovídající 3, 5 a 7 $\mu\text{m/s}$ se nijak výrazně neliší a kuličky praskly přibližně při stejné šířce měřicí štěrbině a při stejné normálové síle. Kuličky měřené při rychlosti stlačení vzorku odpovídající 1 $\mu\text{m/s}$ však vykazovaly odlišné chování. K jejich prasknutí došlo při téměř dvakrát tak velké normálové síle a při poloviční šířce měřicí štěrbině než u zbylých třech kuliček měřených při vyšších rychlostech deformace. To by mohlo být způsobeno tím, že při rychlosti stlačení vzorku odpovídající 1 $\mu\text{m/s}$ docházelo k deformaci velmi pomalu a gelové kuličky měly dostatek času na obnovu své poškozené struktury. Zatímco test provedený při stlačování vzorku rychlostí 7 $\mu\text{m/s}$ trval necelých 11 minut, při stlačování vzorku rychlostí 1 $\mu\text{m/s}$ test trval hodinu a čtvrt.

Zda použijeme větší či menší rychlost stlačení vzorku závisí na vlastnostech sledovaného materiálu a na cílech, které si experiment klade. Zatímco rychlost stlačení vzorku odpovídající 1 $\mu\text{m/s}$ můžeme použít v případě, že chceme sledovat vliv menšího namáhání vzorku na jeho deformaci v delším časovém úseku, vyšší rychlosti stlačení vzorku použijeme v případě, že chceme sledovat vliv většího namáhání vzorku na jeho deformaci v kratším časovém úseku. V případě, že chceme pouze porovnávat chování několika odlišných vzorků během deformace anebo chceme zjistit, zda je kulička zesíťovaná v celém svém objemu či nikoliv, můžeme v rámci úspory času použít rychlost stlačení vzorku odpovídající 7 $\mu\text{m/s}$.

Závěry z optimalizace

Jednou z reologických metod, kterými lze charakterizovat mechanické vlastnosti hydrogelových materiálů jsou tzv. *squeeze testy*. Ty však nebyly předmětem výzkumu této diplomové práce, a proto nebudou v práci dále diskutovány. Optimalizace měření tohoto druhu kompresních testů a poznatky z optimalizace budou využity v dalších závěrečných pracích prováděných na Fakultě chemické VUT. Na základě provedené optimalizace je pro budoucí testy doporučeno měření *squeeze testů* s využitím geometrie deska-deska s hladkým povrchem a průměrem horní desky odpovídajícím 25 mm, alginátovými kuličkami připravenými 24 hodin předem a při parametrech nastavení uvedených v tabulce 4.

Tabulka 4: Parametry nastavení squeeze testů.

teplota	25 °C
rychlost stlačení vzorku	7 $\mu\text{m/s}$
šířka měřicí štěrbin	3000–4000 μm (podle velikosti kuličky)

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato diplomová práce byla zpracovávána v rámci základního výzkumu GAČR realizovaného na Fakultě chemické VUT, jehož náplní byla příprava bioinokulantů, založená na enkapsulaci PGPR v alginátovém gelu, tvořeném zesíťováním alginátu sodného produkovaného přímo enkapsulovanými bakteriemi. Vzhledem ke skutečnosti, že bakterie produkují alginát o poměrně nízké koncentraci (méně než 0,4 hm. %), bylo nutné najít vhodná síťovací činidla, kterými by bylo možné takto zředěný alginát zesíťovat. Cílem diplomové práce tedy bylo najít vhodná síťovací činidla pro síťování alginátu sodného (v ideálním případě o takto nízkých koncentracích) a následně optimalizovat přípravu alginátových gelů, a to s ohledem na jejich finální aplikační vlastnosti (transparentnost, synereze, viskoelastické vlastnosti, aj.).

5.1 Iontové síťování alginátu metodou vnější gelace

Jedním z nejběžnějších postupů síťování alginátu sodného je iontové síťování metodou vnější gelace, založené na difúzi iontů (nejčastěji vápenatých) ze síťovacího činidla do alginátového solu. Tato kapitola se bude zabývat výběrem vhodných síťovacích činidel vedoucích k vnější gelaci alginátu, optimalizací přípravy alginátových gelů a charakterizací jejich mechanických vlastností vybranými reometrickými testy.

5.1.1 Výběr vhodných síťovacích činidel

Z alginátu sodného (ROTH) o koncentraci 1 hm. % byla postupným ředěním připravena koncentrační řada tohoto biopolymeru, a to o koncentracích 0,50; 0,25; 0,15; 0,10 a 0,05 hm. %. Následně bylo odpipetováno 5 ml alginátu o koncentraci 1,00 hm. % a k němu bylo za stálého míchání (150 RPM, laboratorní teplota) přikapáváno vybrané síťovací činidlo. V případě, že došlo ke vzniku gelu, byl experiment zopakován i s alginátem o nižší koncentraci (0,50 hm. %). Tímto způsobem byl experiment opakován až do chvíle, kdy k síťování alginátu nedošlo. V tu chvíli byla zaznamenána nejnižší koncentrace alginátu, při které tento polymer s daným síťovacím činidlem ještě tvořil gel. Výsledky síťování a seznam použitých síťovacích činidel uvádí tabulka 5, přičemž koncentrace síťovacích činidel jsou přepočteny na bezvodý stav.

Tabulka 5: Síťovací činidla použita při vnější gelaci alginátu.

síťovací činidlo	c činidla [mol/dm^3]	w alginátu [hm. %]
chlorid vápenatý	0,1	$\geq 0,15$
chlorid zinečnatý	0,1	$\geq 0,15$
chlorid měďnatý	0,1	$\geq 0,10$
chlorid hořečnatý	0,1	-
síran hořečnatý	0,1	-
síran železnatý	0,1	-
dusičnan vápenatý	0,1	$\geq 0,10$
octan vápenatý	0,1	$\geq 0,10$
laktát vápenatý	0,1	$\geq 0,15$

Vidíme, že alginát nejlépe tvořil gely s chloridem měďnatým, dusičnanem vápenatým a octanem vápenatým, kterými se podařilo zesíťovat alginát o koncentraci 0,10 hm. % a vyšší. Alginát o koncentraci 0,15 hm. % a vyšší se podařilo úspěšně zesíťovat také chloridem zinečnatým, chloridem vápenatým a laktátem vápenatým. Naopak síranem železnatým se alginát nepodařilo zesíťovat vůbec, stejně jako hořečnatými solemi v podobě síranu hořečnatého a chloridu hořečnatého. Jak již bylo řečeno v kapitole 3.1, Fuat Topuz a spol. [69] prokázali, že je síťování alginátu možné provést chloridem hořečnatým o koncentraci 0,1 mol/dm³, přičemž gelace nastává při přibližně 5–10 krát vyšší koncentraci iontů než u gelů na bázi vápníku. To, zda k síťování alginátu opravdu dojde či nikoliv závisí na poměru jednotek kyseliny α -L-guluronové (G blok) a jednotek kyseliny β -D-mannuronové (M blok) v jeho struktuře. Autoři článku zkoušeli síťovat tři různé algináty sodné s různými poměry G a M bloků, přičemž alginát s nejvyšším obsahem G bloků se autorům článku podařilo zesíťovat i při koncentraci polymeru odpovídající 2 hm. %, zatímco alginát s nejnižším obsahem G bloků tvořil gely pouze při koncentraci 4 hm. % a vyšší.

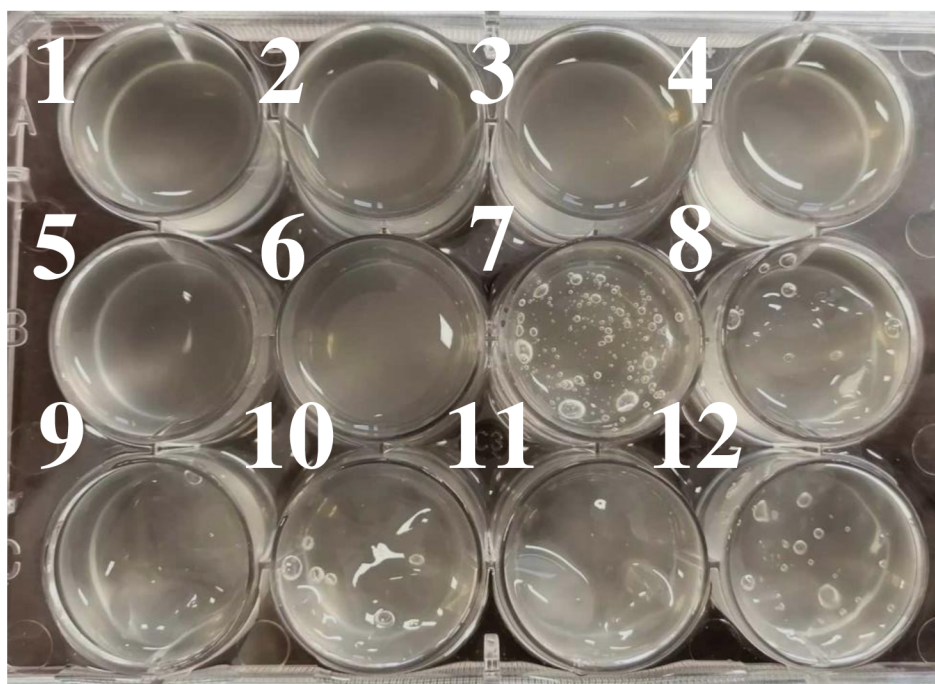
Jelikož se alginát od firmy ROTH (M \approx 259 kDa) o koncentraci 1 hm. % nepodařilo zesíťovat, byl experiment zopakován s alginátem o vyšší molekulové hmotnosti (\approx 372 kDa), jehož dodavatelem je firma Thermo Fisher Scientific. Během provedené optimalizace přípravy alginátových gelů, která bude diskutována v následující kapitole (5.1.2), bylo zjištěno, že na přípravu homogenního gelu připraveného z 4,5 ml alginátu o koncentraci 1 hm. % je nutné použít minimálně 1,25 ml chloridu vápenatého o koncentraci 0,1 mol/dm³. Jelikož je na zesíťování alginátu zapotřebí 5–10 krát více hořečnatých iontů než iontů vápenatých, na 4,5 ml alginátu o koncentraci 1 hm. % bylo použito 6,25–12,5 ml hořečnaté soli o koncentraci 0,1 mol/dm³. Typy síťovacích činidel a jejich objemy ukazuje tabulka 6.

Tabulka 6: Objemy použitých hořečnatých solí na 1,8 ml alginátu.

síran hořečnatý (c = 0,1 mol/dm ³)		chlorid hořečnatý (c = 0,1 mol/dm ³)	
číslo jamky	V činidla [ml]	číslo jamky	V činidla [ml]
1	2,5	7	2,5
2	3,0	8	3,0
3	3,5	9	3,5
4	4,0	10	4,0
5	4,5	11	4,5
6	5,0	12	5,0

Ani v jednom případě však ke vzniku gelu nedošlo, a to ani po 24 hodinách. Jak již bylo řečeno na úvodu kapitoly 5, bakterie produkují alginát sodný o koncentraci menší než 0,4 hm. %. Jelikož se hořečnatými ionty nepodařilo zesíťovat ani alginát o koncentraci 1 hm. %, bylo vzhledem k cílům předložené diplomové práce zbytečné snažit se o stanovení minimální koncentrace alginátu sodného, při které bude tento polymer s hořečnatými ionty ještě tvořit gel. Bylo tedy pouze ověřeno, zda je opravdu možné zesíťovat alginát hořečnatými ionty a zda bude mít na síťování vliv typ použitého aniontu hořečnaté soli.

Experiment byl tedy zopakován s alginátem o koncentraci 5 hm. % (při této koncentraci se autorům článku podařilo zesíťovat všechny zkoumané algináty sodné), a to jak s alginátem o molekulové hmotnosti 372 kDa (Thermo Fisher Scientific), tak s alginátem o molekulové hmotnosti 259 kDa (ROTH). Jak můžeme vidět na obrázku 16, síranem hořečnatým se alginát od výrobce ROTH zesíťovat nepodařilo, zatímco chlorid hořečnatý přibližně po 3–4 hodinách vytvořil alginátové gely. Stejné výsledky byly pozorovány také u alginátu od společnosti Thermo Fisher Scientific.



Obrázek 16: Výsledky síťování 5% alginátu sodného (ROTH) síranem hořečnatým (jamky 1-6) a chloridem hořečnatým (jamky 7-12).

Hořečnatými ionty se tedy podařilo zesíťovat oba typy alginátu sodného (ROTH; Thermo Fisher Scientific), ovšem pouze o koncentraci 5 hm. % a pouze chloridem hořečnatým. Alginát o koncentraci 1 hm. % se ani v jednom případě zesíťovat nepodařilo, a to ani autorům výše zmíněného článku [69].

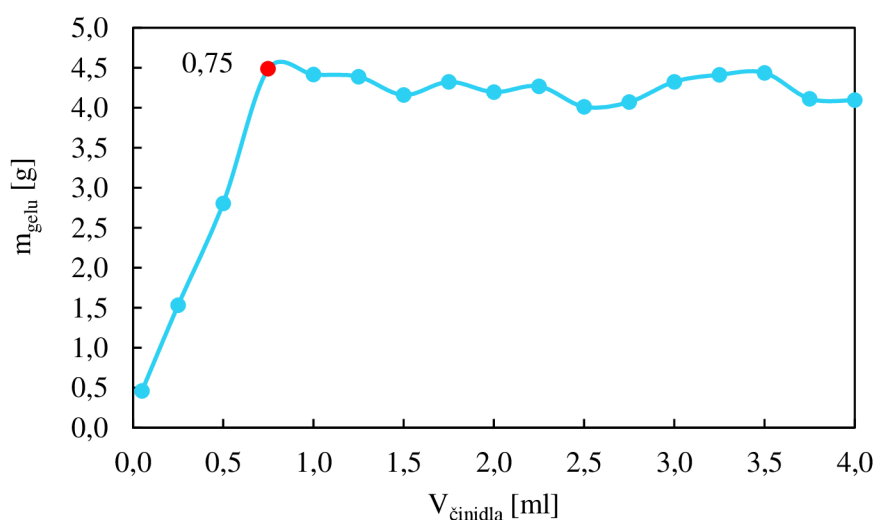
Finální výběr vhodných síťovacích činidel

Existuje řada studií, která potvrzuje, že na iontové síťování alginátu sodného má vliv typ použitého kationtu [50], ovšem výsledky síťování alginátu hořečnatými ionty ukázaly, že má pravděpodobně na tvorbu gelů vliv také typ aniontu. Zatímco chlorid hořečnatý o koncentraci 0,1 mol/dm³ s alginátem tvořil gely, u síranu hořečnatého o koncentraci 0,1 mol/dm³ ke gelaci nedošlo. Zároveň se alginát nepodařilo zesíťovat ani síranem železnatým, přestože železnaté soli tento polymer obvykle síťují velmi dobře [50].

Právě z toho důvodu, že je vliv kationtů na iontové síťování alginátu sodného dobře prozkoumán, zatímco vliv aniontů nikoliv, byla pro další experimenty použita síťovací činidla s rozdílnými anionty a společným kationtem, a to konkrétně chlorid vápenatý, laktát vápenatý, dusičnan vápenatý a octan vápenatý.

5.1.2 Optimalizace přípravy alginátových gelů

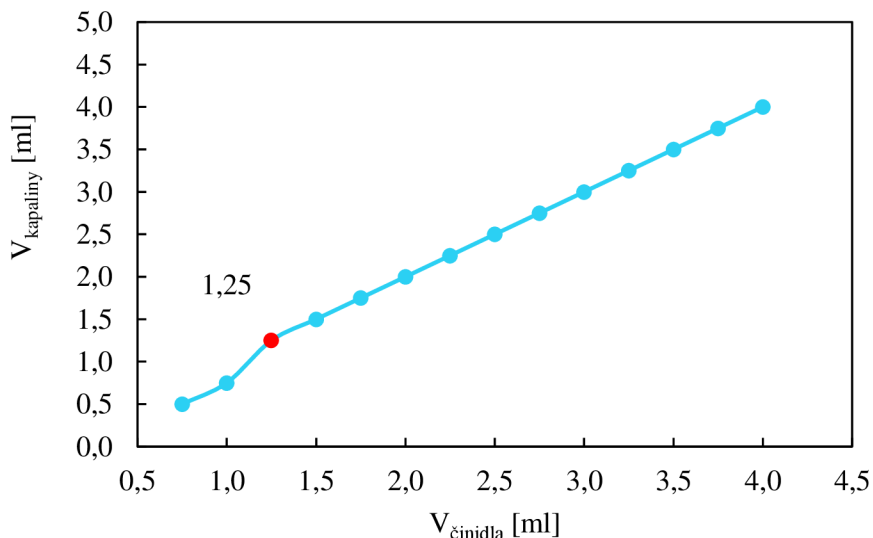
Veškeré experimenty uvedené v této kapitole byly provedeny na alginátu od dodavatele ROTH. Ke 4,5 ml alginátu sodného o koncentraci 1 hm. % bylo za stálého míchání (150 RPM, laboratorní teplota) postupně přikapáno požadované množství síťovacího činidla a poté byla zaznamenána hmotnost vzniklého gelu a objem nezreagované směsi. Obrázek 17 ukazuje závislost hmotnosti gelu na objemu použitého síťovacího činidla (CaCl_2). Můžeme vidět, že nejprve dochází s přidávkem chloridu vápenatého k nárůstu hmotnosti gelů a od přidávku odpovídajícímu 0,75 ml se hmotnost gelů relativně ustálí (drobná odchylka mezi hmotnostmi gelů je způsobena viskózní povahou alginátu, která znemožňuje přesné odpipetování 4,5 ml tohoto polymeru). Právě při přidávku 0,75 ml síťovacího činidla dojde k zesíťování veškerého alginátu sodného o čemž vypovídá nejen následné ustálení hmotnosti gelů, která přibližně odpovídá i hmotnosti odpipetovaných 4,5 ml alginátu, ale zároveň bylo toto tvrzení ověřeno přidávkem dvojnásobného množství ethanolu k nezreagované směsi. Přídavek ethanolu by měl v případě přítomnosti nezesíťovaného alginátu vést k jeho vysrážení. K vysrážení však nedošlo, takže při přidávku 0,75 ml chloridu vápenatého opravdu došlo k zesíťování veškerého alginátu sodného.



Obrázek 17: Závislost hmotnosti gelu na objemu použitého síťovacího činidla (CaCl_2).

Po přidávku 0,75 ml chloridu vápenatého ke 4,5 ml alginátu sodného sice došlo k zesíťování veškerého polymeru, ale vznikl na omak velmi měkký, ne zcela homogenní gel. S dalším přidávkem síťovacího činidla rostla pevnost i homogenita vzniklých gelů, a to až do okamžiku, kdy objem použitého chloridu vápenatého odpovídal 1,25 ml. Od tohoto přidávku se již vzhled alginátových gelů nijak neměnil a jednalo se o homogenní gely (nejen po vizuální stránce, jak ukazuje obrázek 19, ale homogenita byla ověřena i reometrickými experimenty, které budou diskutovány v následující kapitole). Při pohledu na obrázek 18, který znázorňuje závislost objemu nezreagované směsi na objemu použitého síťovacího činidla, můžeme vidět, že od přidávku 1,25 ml chloridu vápenatého zároveň došlo k většímu nárůstu objemu nezreagované směsi než v případě všech ostatních přidávků síťovacího činidla. Tento nárůst by mohl být způsoben tím, že již došlo k úplnému zesíťování alginátových řetězců obsazením všech míst schopných vázat vápenaté ionty, čímž vznikla rigidní polymerní síť, která již nebyla

schopná více kapaliny pojmout a část kapaliny tedy byla vytlačena ven z polymerní sítě. Na druhou stranu při menších přídavicích chloridu vápenatého byl nižší stupeň zesítnění, trojrozměrná polymerní síť tedy byla více flexibilní, mohla se lépe roztáhnout a tím pádem také pojmout více kapaliny.



Obrázek 18: Závislost objemu nezreagované směsi na objemu použitého síťovacího činidla (CaCl_2).



Obrázek 19: Alginát o koncentraci 1 hm. % s přídávkem 0,75 ml chloridu vápenatého o koncentraci $0,1 \text{ mol/dm}^3$ (vlevo) a alginát s přídávkem 1,25 ml chloridu vápenatého o koncentraci $0,1 \text{ mol/dm}^3$ (vpravo).

Stanovení minimálního množství síťovacího činidla potřebného pro zesíťování veškerého alginátu sodného obsaženého ve 4,5 ml 1% solu tohoto polymeru ($V_{\text{min.}}$) a množství síťovacího činidla potřebného pro zesíťování alginátu, od jehož přídávku vzniká homogenní gel (V_{H}), bylo stejným způsobem jako u chloridu vápenatého provedeno také u dusičnanu vápenatého, octanu vápenatého a laktátu vápenatého. Výsledky experimentů jsou shrnuty v tabulce 7.

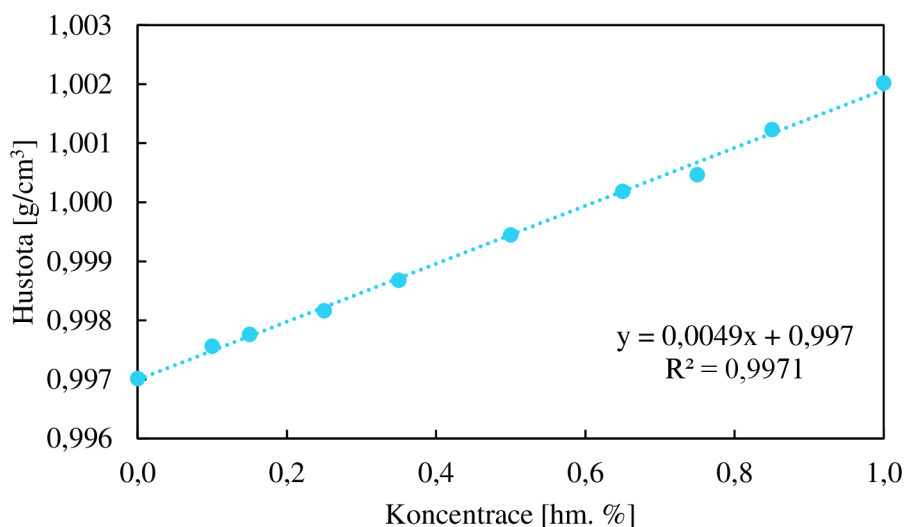
Tabulka 7: Objemy síťovacích činidel vhodné pro síťování alginátu sodného o koncentraci 1 hm. %.

síťovací činidlo	V _{min.} [ml]	poměr (V _{alginátu} : V _{činidla})	V _H [ml]	poměr (V _{alginátu} : V _{činidla})
chlorid vápenatý (0,1 mol/dm ³)	0,75	6,0 : 1	1,25	3,6 : 1
dusičnan vápenatý (0,1 mol/dm ³)	1,00	4,5 : 1	2,00	4,5 : 2
octan vápenatý (0,1 mol/dm ³)	0,75	6,0 : 1	1,50	3,0 : 1
laktát vápenatý (0,1 mol/dm ³)	0,75	6,0 : 1	1,25	3,6 : 1

Jak můžeme vidět, nejmenší množství síťovacího činidla potřebného pro vznik homogenních alginátových gelů bylo použito u chloridu vápenatého a laktátu vápenatého, zatímco octanu vápenatého bylo zapotřebí 1,2krát více a dusičnanu vápenatého 1,6krát více než předchozích dvou vápenatých solí.

Během optimalizace přípravy alginátových gelů bylo také zjištěno, že kromě množství použitého síťovacího činidla mají na homogenitu výsledného gelu vliv další dva faktory. Prvním z nich je rychlost otáček nastavená na magnetické míchače během přikapávání síťovacího činidla. Ta musí být co nejnižší (150 RPM), protože v opačném případě se v kádince s alginátem vytvoří vír, přikapávané síťovací činidlo se začne hromadit ve středu kádinky u magnetického míchadélka a tím pádem vznikne gel, který je uprostřed velmi pevný a na okrajích mazlavý. Zároveň může při vyšších rychlostech otáček míchadélko rozbít okraje gelu a ten se následně začne trhat na menší kousky. Druhým faktorem ovlivňujícím homogenitu gelu je také způsob přikapávání síťovacího činidla. To nesmí být přikapáváno příliš rychle (opět by vznikla místa s větší hustotou zesílení a místa s menší hustotou zesílení) a musí být přikapáváno na okraj kádinky. V opačném případě by došlo ke stejnému problému jako při vyšší rychlosti otáček – veškeré síťovací činidlo by se hromadilo ve středu kádinky a vznikl by tak nehomogenní gel.

Jak již bylo řečeno výše, problém byl také s pipetováním alginátu. Kvůli jeho viskózní povaze nebylo možné přesně odpipetovat jeho požadované množství a mezi hmotnostmi připravených gelů byla jistá odchylka (kolem 0,12 %). Z tohoto důvodu byl zvolen nový způsob odměřování požadovaného množství alginátového solu potřebného k přípravě gelu, a to za pomoci vážení. Aby bylo možné navážit 4,5 ml alginátu, bylo nejprve nutné zjistit, jakou má alginát hustotu. Jelikož byl v rámci diplomové práce používán alginát o různých koncentracích, byla sestavena kalibrační křivka udávající závislost hustoty alginátu na jeho koncentraci. Pro tento účel byla připravena koncentrační řada alginátu (0,00; 0,10; 0,15; 0,25; 0,35; 0,50; 0,65; 0,75; 0,85 a 1 hm. %) a poté byla pomocí hustoměru DMA 4500 (Anton Paar) u každého připraveného solu změřena jeho hustota. Měření bylo provedeno ve třech opakováních, ze kterých byl vypočítán průměr. Nakonec byl sestaven graf závislosti hustoty alginátu na jeho koncentraci, jednotlivé body grafu byly proloženy lineární regresí a z rovnice kalibrační přímky mohla být dopočítána hustota pro jakoukoliv koncentraci alginátového solu.



Obrázek 20: Závislost hustoty alginátu na jeho koncentraci ve vodném roztoku.

Hmotnost 4,5 ml alginátu se pohybovala od 4,49 do 4,51 g v závislosti na koncentraci polymeru. Jelikož šlo alginátový sol navážít s přesností na 2 desetinná místa jen obtížně, bylo vždy navažováno 4,5 g alginátu bez ohledu na jeho koncentraci.

Nižší koncentrace alginátu

Jak už bylo řečeno na úvodu kapitoly 5, bakterie podporující růst rostlin (*Azotobacter vinelandii*), se kterými se pracuje na Fakultě chemické VUT, jsou schopny produkovat alginát o maximální koncentraci 0,4 hm. %. Nejčastěji je však produkován alginát o koncentraci 0,2 hm. %. Z tohoto důvodu bylo provedeno také stanovení minimálního množství síťovacího činidla potřebného pro zesíťování veškerého alginátu sodného (ROTH) obsaženého ve 4,5 ml 0,4% a 0,2% solu tohoto polymeru ($V_{\min.}$) a množství síťovacího činidla potřebného pro zesíťování alginátu, od jehož přídavku vzniká homogenní gel (V_H). Toto stanovení bylo provedeno stejným způsobem, jako u alginátu o koncentraci 1 hm. % (viz začátek kapitoly 5.1.2). Výsledky experimentů shrnuje tabulka 8.

Tabulka 8: Objemy síťovacích činidel vhodné pro síťování alginátu o koncentraci 0,4 a 0,2 hm. %.

chlorid vápenatý ($c = 0,1 \text{ mol/dm}^3$)		
$w_{\text{alg.}}$ [hm. %]	$V_{\min.}$ [ml]	V_H [ml]
1,00	0,75	1,25
0,40	0,75	1,25
0,20	0,75	1,50
dusičnan vápenatý ($c = 0,1 \text{ mol/dm}^3$)		
$w_{\text{alg.}}$ [hm. %]	$V_{\min.}$ [ml]	V_H [ml]
1,00	1,00	2,00
0,40	1,00	2,00
0,20	1,00	2,00

Experiment byl proveden se síťovacími činidly v podobě chloridu vápenatého o koncentraci $0,1 \text{ mol/dm}^3$ a dusičnanu vápenatého o koncentraci $0,1 \text{ mol/dm}^3$. Výsledky síťování alginátu o koncentraci 0,4 hm. % a 0,2 hm. % se shodovaly s výsledky síťování alginátu o koncentraci 1 hm. % (jediný rozdíl byl v mechanické pevnosti výsledných gelů, kdy bylo vizuálně i na omak patrné, že s nižší koncentrací alginátu pevnost gelů klesala). Mechanické vlastnosti alginátových gelů připravených z alginátu sodného o koncentraci 1 hm. % budou charakterizovány v kapitole 5.1.3.

Ačkoliv je zajímavé, že je na zesíťování stejného množství alginátu o třech různých koncentracích zapotřebí stejné množství síťovacího činidla, vzhledem k rozsahu této práce nebylo dále zkoumáno, proč tomu tak je. Daná problematika by však mohla být zajímavým tématem pro případné budoucí závěrečné práce.

Závěry z optimalizace

V této kapitole byla provedena optimalizace přípravy alginátových gelů, připravených iontovým síťováním alginátu metodou vnější gelace. Během optimalizace bylo zjištěno, že má na výslednou homogenitu gelů výrazný vliv to, do jakého místa přikapáváme síťovací činidlo a důležitou roli hraje i rychlost míchání směsi a rychlost, jakou je činidlo přikapáváno. Výsledné vlastnosti gelů lze ovlivnit také množstvím použitého síťovacího činidla. Od určitého přídavku síťovacího činidla (V_{min}) dochází k zesíťování veškerého alginátu přítomného ve směsi, ale vzniklý gel není homogenní. S dalším přídavkem činidla homogenita gelů roste, a to až do přídavku označovaného jako V_{H} , od kterého již vzniká homogenní gel. Objemy jednotlivých síťovacích činidel vhodné pro síťování alginátu sodného uvádí tabulka 7, přičemž bylo dokázáno, že tyto přídavky síťovacích činidel lze použít nejen pro síťování alginátu o koncentraci 1 hm. %, ale také při nižších koncentracích tohoto polymeru.

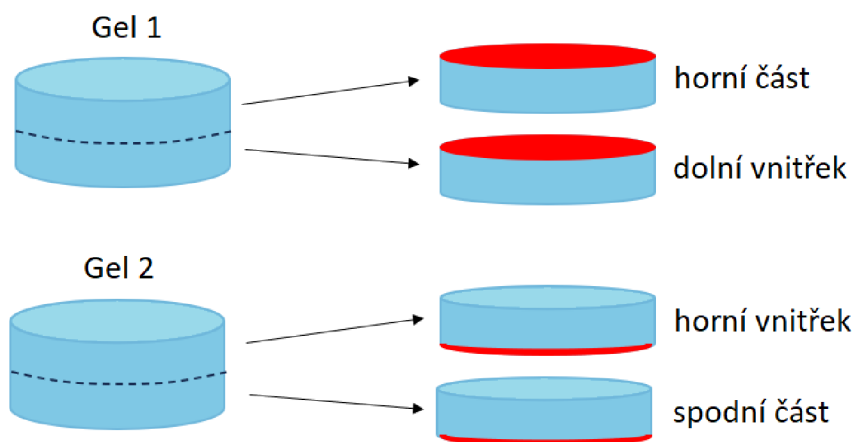
Na základě poznatků z provedené optimalizace byl navržen následující postup přípravy alginátových gelů. Do kádinky bylo naváženo 4,5 g alginátu, k těm bylo vloženo magnetické míchadélko a kádinka byla umístěna na magnetickou míchačku. Rychlost míchání byla nastavena na 150 RPM, přičemž míchání bylo prováděno za laboratorní teploty. Poté bylo k alginátovému solu pomalu přikapáváno síťovací činidlo (koncentrace $0,1 \text{ mol/dm}^3$), které bylo nutné přikapávat na okraj kádinky (aby se nehromadilo na středu a nevznikl tak nehomogenní gel). Doporučené objemy síťovacích činidel potřebné pro zesíťování alginátu uvádí tabulka 7, přičemž pro vznik homogenního gelu je nutné přidat minimálně takový objem síťovacího činidla, který je v tabulce označován jako V_{H} . Poté byl gel vyjmut z kádinky a 24 hodin ponechán v exsikátoru s vodou, aby bylo před jeho dalším využitím dosaženo stavu termodynamické rovnováhy. Gely připravovány v rámci této diplomové práce byly v exsikátoru uchovávány v jamkách kultivační desky, protože jich bylo připravováno velké množství a kultivační deska o 12 jamkách nezabírá tolik místa, jako 12 kádinek.

5.1.3 Viskoelastické vlastnosti alginátových gelů

V rámci této kapitoly bude prokázáno, že od přidavku určitého množství síťovacího činidla (viz tabulka 7, kde je objem síťovacího činidla potřebný pro přípravu homogenních alginátových gelů označen jako V_H) dochází ke vzniku homogenních gelů, a to nejen z vizuálního hlediska, ale také z hlediska mechanických vlastností. Zároveň bude sledován vliv aniontů na mechanické vlastnosti alginátových gelů připravených síťováním alginátu sodného o koncentraci 1 hm. %. Mechanické vlastnosti gelů byly stanoveny amplitudovými testy s deformací ve smyku a amplitudovými testy s deformací v tlaku.

Amplitudové testy s deformací ve smyku

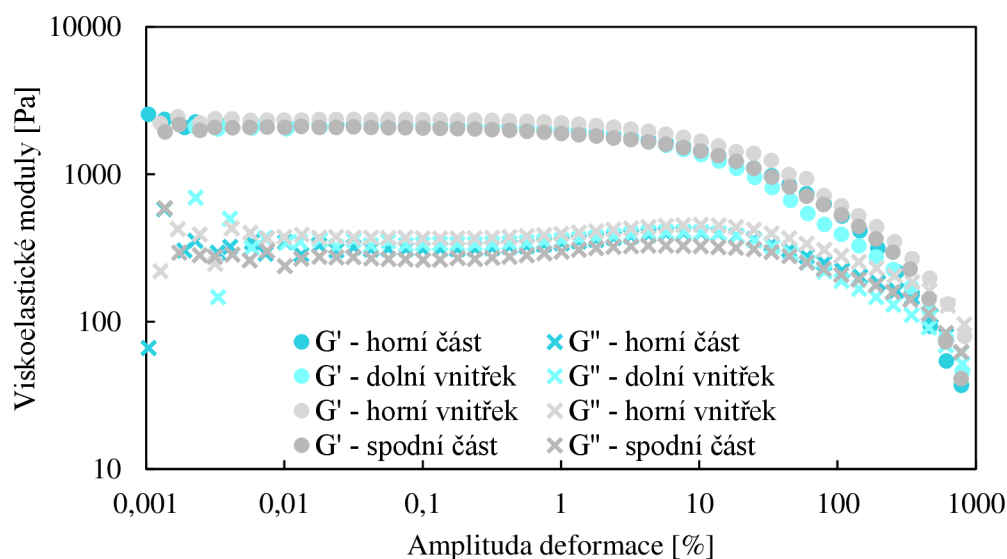
Nejprve byla studována homogenita připravených alginátových gelů. Pro každý typ síťovacího činidla (octan, dusičnan, chlorid a laktát vápenatý) byly připraveny dva gely, dle postupu na konci kapitoly 5.1.2 a po 24 hodinách od přípravy byl každý gel horizontálně rozříznut na dvě poloviny. Pro jedno síťovací činidlo tedy vznikly 4 kousky gelu a ty byly označeny jako horní část, dolní vnitřek, horní vnitřek a spodní část (viz obrázek 21). Poté byl každý kousek gelu podroben amplitudovému testu o parametrech nastavení uvedených v experimentální části – konkrétně v tabulce 1. Daný kousek gelu byl dávkován mezi senzory reometru takovým způsobem, aby jeho červeně označená část na obrázku 21 směřovala směrem k horní desce reometru.



Obrázek 21: Značení jednotlivých kousků gelů.

Výsledky amplitudových testů s deformací ve smyku pro alginát síťovaný chloridem vápenatým ukazuje obrázek 22. Můžeme vidět, že všechny čtyři kousky gelu vykazovaly shodné viskoelastické vlastnosti. Stejně výsledky měření byly pozorovány také u 1% alginátu síťovaného dalšími třemi síťovacími činidly – octanem vápenatým, dusičnanem vápenatým a laktátem vápenatým.

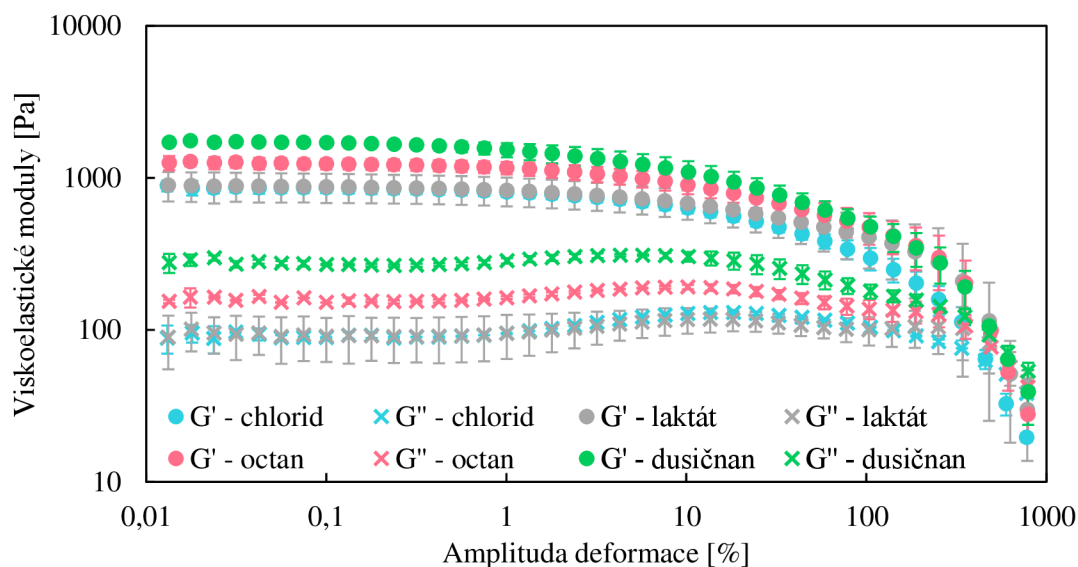
Z výsledků tedy jasně vyplývá, že po přidavku síťovacího činidla označovaného jako V_H (chlorid vápenatý – 1,25 ml; laktát vápenatý – 1,25 ml; octan vápenatý – 1,50 ml a dusičnan vápenatý – 2,00 ml) ke 4,5 g alginátu dochází ke vzniku homogenních gelů, a to nejen z vizuálního hlediska, ale také z hlediska mechanických vlastností.



Obrázek 22: Výsledky amplitudových testů s deformací ve smyku pro alginát o koncentraci 1 hm. % síťovaný chloridem vápenatým o koncentraci 0,1 mol/dm³.

V dalším kroku byl sledován vliv aniontů na gelaci alginátu sodného a zároveň bylo cílem ověřit, zda po přidavku síťovacího činidla odpovídajícímu V_H (viz tabulka 7) dojde opravdu v polymerních řetězcích k obsazení všech míst schopných vázat vápenaté ionty (což by vysvětlovalo náhlý nárůst objemu nezreagované směsi na obrázku 18). V takovém případě by se s dalším přidavkem síťovacího činidla neměly měnit mechanické vlastnosti vzniklých gelů (byla by obsazena všechna místa schopná vázat vápenaté ionty, tudíž další přidavek síťovacího činidla by nemohl vést k dalšímu síťování alginátu a tím pádem by se nezměnily ani mechanické vlastnosti).

Nejprve byly pro každý typ síťovacího činidla připraveny dva gely, přičemž objem síťovacích činidel potřebný pro zesíťování 4,5 g alginátu o koncentraci 1 hm. % odpovídal objemu označovanému jako V_H (viz tabulka 7). Po 24 hodinách od přípravy byl každý gel podroben amplitudovému testu s deformací ve smyku o parametrech nastavení uvedených v experimentální části – konkrétně v tabulce 1. U každého typu síťovacího činidla tedy byla provedena 2 měření, ze kterých byl vypočítán průměr včetně směrodatné odchylky.

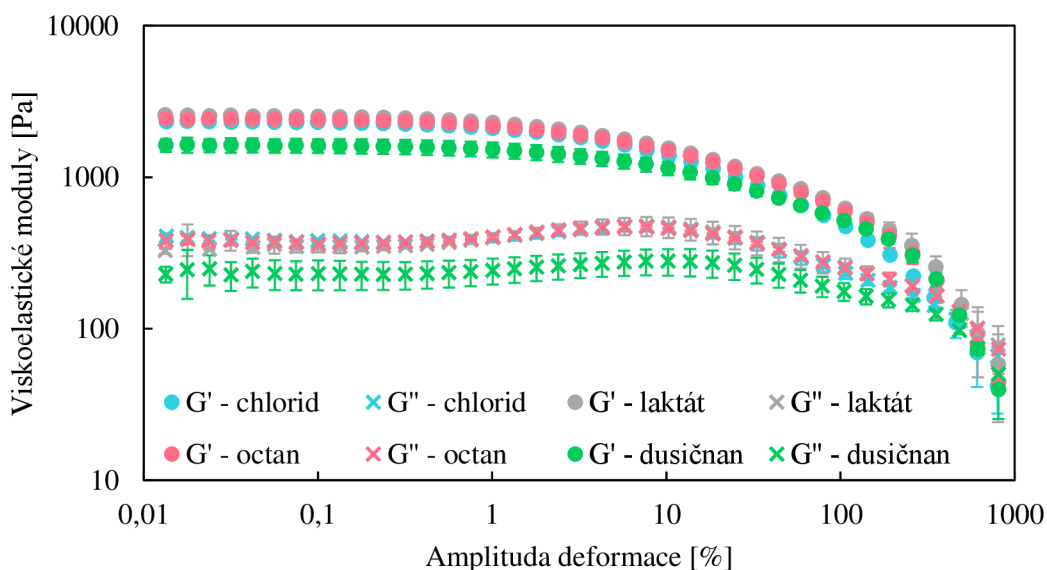


Obrázek 23: Výsledky amplitudových testů s deformací ve smyku – optimalizovaný objem síťovacích činidel (V_H).

Jak můžeme vidět na obrázku 23, síťováním alginátu sodného dusičnanem vápenatým vznikly gely s pevnějšími uzly, což se projevilo nárůstem viskoelastických modulů (v porovnání s ostatními síťovacími činidly). Nejméně pevné byly gely připravené síťováním alginátu chloridem vápenatým a laktátem vápenatým, jejichž viskoelastické moduly byly nejnižší.

Viskoelastické moduly alginátu zesíťovaného octanem vápenatým byly přibližně $1,5\times$ vyšší než u alginátu síťovaného laktátem a chloridem vápenatým, ale asi $1,5\times$ nižší než viskoelastické moduly alginátu síťovaného dusičnanem vápenatým. Na mechanické vlastnosti jednotlivých gelů však nemusel mít vliv typ aniontu. Můžeme si všimnout, že nejvyšší viskoelastické moduly měl sice alginát síťovaný dusičnanem vápenatým, ale na jeho přípravu také bylo použito největší množství síťovacího činidla (2,00 ml). Druhý nejpevnější gel byl z alginátu síťovaného octanem vápenatým, na jehož přípravu bylo zapotřebí 1,50 ml této soli. Nejméně pevné gely byly připraveny síťováním alginátu chloridem vápenatým a laktátem vápenatým, na jejichž přípravu bylo použito 1,25 ml síťovacího činidla. Rozdíl mezi mechanickými vlastnostmi jednotlivých gelů tedy mohl být způsoben tím, že byl na zesíťování alginátu použit u každého síťovacího činidla odlišný objem.

Současně s gely na jejichž přípravu bylo použito optimalizované množství síťovacího činidla, potřebné pro vznik homogenních gelů (V_H), byla připravena také várka gelů, na jejichž přípravu bylo použito stejné množství síťovacího činidla bez ohledu na typ použité vápenaté soli. Ke 4,5 g alginátu o koncentraci 1 hm. % tedy byly vždy přikapány 2 ml síťovacího činidla (jelikož mají všechna použitá síťovací činidla koncentraci $0,1 \text{ mol/dm}^3$, koncentrace vápníku by měla být ve všech gelech stejná). Každý typ gelu byl opět připraven dvakrát a z výsledků měření byl vypočítán průměr včetně směrodatné odchylky. Po 24 hodinách od přípravy byly gely podrobeny amplitudovým testům s deformací ve smyku o parametrech nastavení uvedených v experimentální části – konkrétně v tabulce 1.



Obrázek 24: Výsledky amplitudových testů s deformací ve smyku – 2 ml síťovacích činidel.

Při pohledu na obrázek 24 si můžeme všimnout, že v tomto případě měly gely připravené zesíťováním alginátu sodného chloridem vápenatým, octanem vápenatým a laktátem vápenatým srovnatelné viskoelastické vlastnosti, zatímco alginát zesíťovaný dusičnanem vápenatým byl méně pevný, což se projevilo nižšími hodnotami viskoelastických modulů. Tabulka 9 udává průměrné hodnoty paměťových modulů ležících v LVO pro jednotlivé typy gelů (jelikož byl u ztrátových modulů pozorován stejný trend jako u modulů paměťových, nebyly dále diskutovány).

Tabulka 9: Průměrné hodnoty paměťových modulů ležících v LVO pro jednotlivé typy gelů.

síťovací činidlo	pH [-]	V činidla [ml]	G' [Pa]	V činidla [ml]	G' [Pa]
chlorid vápenatý	7,2	1,25	861±71	2,00	2 313±123
laktát vápenatý	7,2	1,25	873±190	2,00	2 550±76
octan vápenatý	7,2	1,50	1 251±106	2,00	2 423±42
dusičnan vápenatý	6,2	2,00	1 717±36	2,00	1 626±175

Z provedených amplitudových testů s deformací ve smyku jasně vyplývá, že od přidavku síťovacího činidla potřebného pro přípravu homogenních gelů (V_H) sice vzniká homogenní gel, ale s dalším přidavkem síťovacího činidla se nadále mění jeho mechanické vlastnosti. To by znamenalo, že objem síťovacího činidla potřebný pro přípravu homogenních gelů (V_H) není roven objemu síťovacího činidla, od jehož přidavku jsou obsazena všechna místa v polymerním řetězci, která jsou schopná vázat vápenaté ionty. Je tedy otázkou, čím je způsobený náhlý nárůst objemu nezreagované směsi na obrázku 18, ale při přidavku síťovacího činidla, při kterém k tomuto nárůstu dojde, vzniká homogenní gel.

Dalším zajímavým zjištěním je, že při přidavku stejného množství síťovacího činidla (2 ml) o stejné molární koncentraci ($0,1 \text{ mol/dm}^3$) mají alginátové gely na bázi dusičnanu vápenatého nižší viskoelastické moduly než gely připravené pomocí zbylých třech síťovacích činidel. Když se podíváme na tabulku 9, vidíme, že zatímco pH chloridu vápenatého, laktátu vápenatého a octanu vápenatého odpovídalo 7,2, pH dusičnanu vápenatého bylo 6,2. Jak již

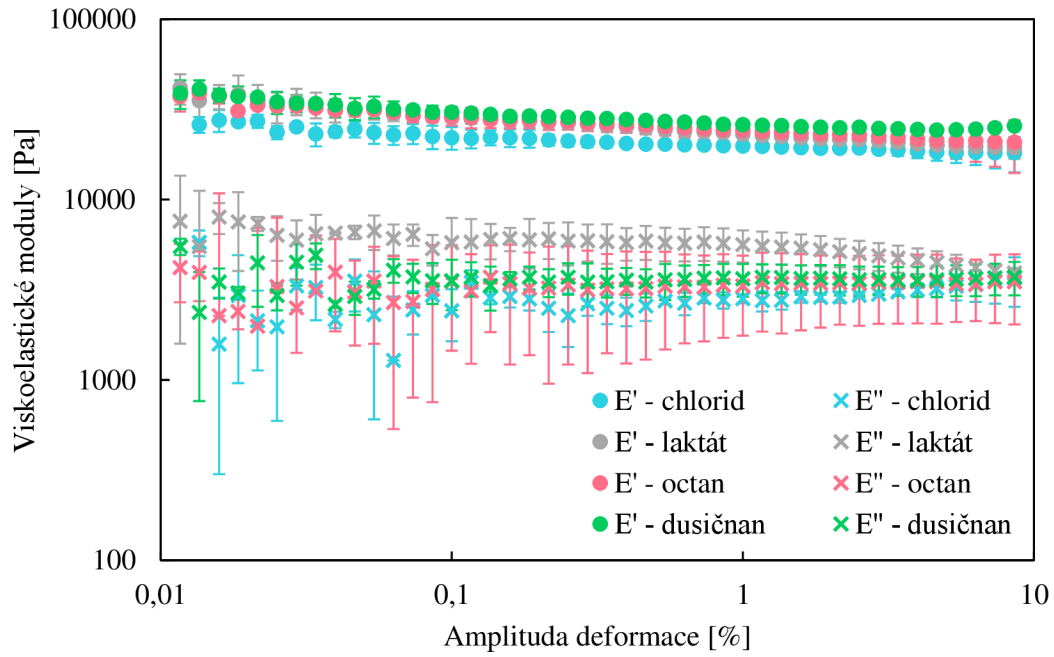
bylo řečeno v kapitole 3.2, Tezar Ramdham a kol. [9] prokázali, že na výsledné vlastnosti alginátových gelů má výrazný vliv právě pH, kdy kyselější pH vede k protonizaci karboxylových skupin v alginátovém řetězci, čímž se sníží odpudivé síly mezi těmito skupinami, dochází ke smrštění struktury gelu a tím pádem jsou gely mechanicky pevnější. Naopak při zásaditějším pH karboxylové skupiny disociují, získávají záporný náboj, působí mezi nimi odpudivé síly a ty vedou k tvorbě dutin, takže gely mají tendenci absorbovat více vody, čímž se stávají elastičtější a méně mechanicky pevné. Jelikož má dusičnan vápenatý nižší pH než zbylé tři vápenaté soli, měl by vést ke vzniku gelů s vyššími mechanickými vlastnostmi. Výsledky měření však ukázaly pravý opak. Můžeme tedy předpokládat, že za rozdíl mezi mechanickými vlastnostmi alginátových gelů na bázi dusičnanu vápenatého a alginátových gelů na bázi zbylých vápenatých solí nemůže rozdílné pH, ale pravděpodobně má v některých případech na síťování alginátu vliv typ použitého aniontu.

Toto tvrzení potvrzují také výsledky síťování alginátu chloridem hořečnatým a síranem hořečnatým, mezi kterými žádný výrazný rozdíl v pH nebyl. Zatímco pH chloridu hořečnatého odpovídalo 6,0 a touto solí se alginát zesíťovat podařilo, síranem hořečnatým se alginát zesíťovat nepodařilo a jeho pH bylo 6,3. Stejně jako síranem hořečnatým se nepodařilo alginát zesíťovat ani síranem železnatým, jehož pH se pohybuje kolem 2,0.

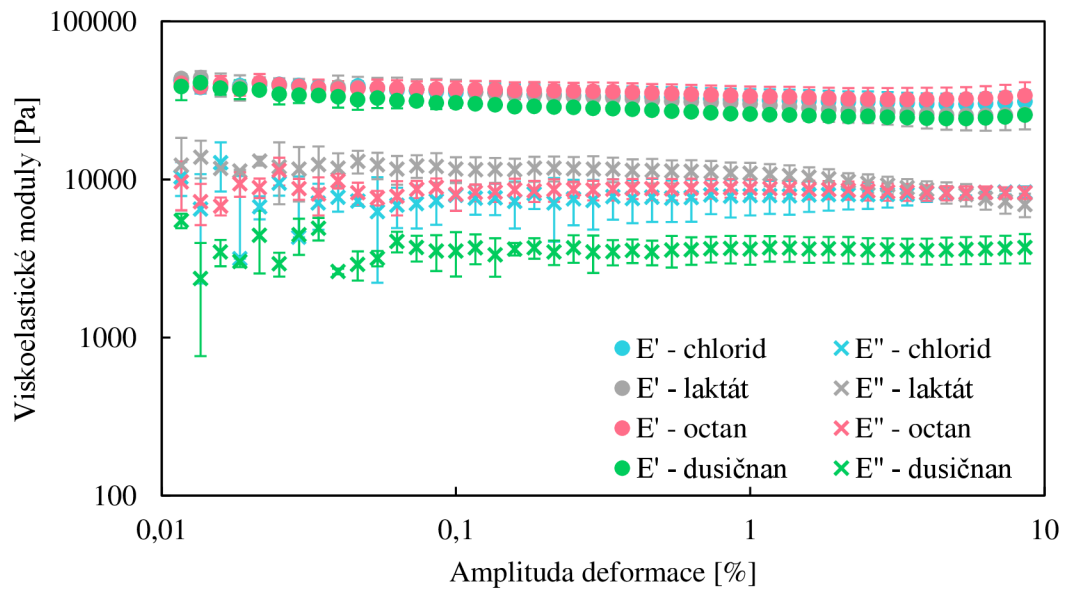
Amplitudové testy s deformací v tlaku

To, zda má na síťování alginátu sodného vliv typ použitého aniontu vápenaté soli, bylo ověřeno také pomocí amplitudových testů s deformací v tlaku. Opět byl každý typ alginátového gelu připraven ve dvojím provedení (jak s optimalizovaným množstvím síťovacího činidla vedoucím ke vzniku homogenních gelů – V_H , tak objemem síťovacího činidla odpovídajícím 2 ml bez ohledu na typu použité vápenaté soli). Po 24 hodinách od přípravy byl každý gel podroben amplitudovému testu s deformací v tlaku o parametrech nastavení uvedených v experimentální části – konkrétně v tabulce 3. Následně byl pro každý typ gelu vypočítán průměr ze dvou provedených měření včetně směrodatné odchylky a byl vynesena graf závislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformace.

Jak vidíme na obrázku 25 a na obrázku 26, u amplitudových testů s deformací v tlaku byl pozorován stejný trend jako u výsledků amplitudových testů s deformací ve smyku. V případě použití optimalizovaného množství síťovacího činidla potřebného pro vznik homogenních gelů, si opět můžeme všimnout toho, že nejvyšší hodnoty viskoelastických modulů byly naměřeny u alginátu připraveného síťováním dusičnanem vápenatým. Naopak nejnižší hodnoty viskoelastických modulů byly naměřeny u alginátu zesíťovaného chloridem vápenatým a laktátem vápenatým. Viskoelastické moduly alginátu zesíťovaného octanem vápenatým byly vyšší než u alginátu síťovaného laktátem a chloridem vápenatým, ale nižší než viskoelastické moduly alginátu síťovaného dusičnanem vápenatým. Při zvýšení množství použitého síťovacího činidla na 2 ml došlo stejně jako u amplitudových testů s deformací ve smyku i u amplitudových testů s deformací v tlaku k nárůstu viskoelastických modulů u alginátu síťovaného chloridem, laktátem a octanem vápenatým. Po přidavku 2 ml síťovacích činidel byly tedy viskoelastické moduly alginátu síťovaného dusičnanem vápenatým menší než viskoelastické moduly alginátu síťovaného zbylými třemi vápenatými solemi.



Obrázek 25: Výsledky amplitudových testů s deformací v tlaku – optimalizovaný objem síťovacích činidel (V_H).



Obrázek 26: Výsledky amplitudových testů s deformací v tlaku – 2 ml síťovacích činidel.

5.1.4 Shrnutí poznatků z iontového síťování alginátu metodou vnější gelace

V rámci této kapitoly se podařilo zesíťovat alginát sodný o koncentraci 0,10 hm. % a víc, a to chloridem měďnatým, dusičnanem vápenatým a octanem vápenatým. Chloridem vápenatým, chloridem zinečnatým a laktátem vápenatým se pak podařilo zesíťovat také alginát o koncentraci 0,15 hm. % a víc. Jelikož se koncentrace bakteriálního alginátu pohybuje kolem 0,40 hm. % a míň, přičemž nejčastěji vzniká alginát o koncentraci 0,20 hm. %, všechna zmíněná síťovací činidla by měla být schopná bakteriální alginát zesíťovat. Ke vzniku gelu došlo také síťováním alginátu chloridem hořečnatým, ovšem v tomto případě se podařilo zesíťovat alginát o koncentraci 5 hm. % a při koncentraci alginátu odpovídající 1 hm. % ke vzniku gelu nedošlo. Pro síťování bakteriálního alginátu tedy není chlorid hořečnatý příliš vhodným síťovacím činidlem. Jelikož bylo dalším cílem této kapitoly sledovat vliv aniontů na mechanické vlastnosti připravených gelů, v dalších experimentech byl alginát síťován pouze síťovacími činidly se stejným kationtem (Ca^{2+}) a lišícím se aniontem. Konkrétně se jednalo o chlorid vápenatý, laktát vápenatý, octan vápenatý a dusičnan vápenatý.

Dále byla provedena optimalizace přípravy alginátových gelů iontovým síťováním metodou vnější gelace. Ze závislosti hmotnosti vzniklého gelu na množství použitého síťovacího činidla bylo stanoveno minimální množství síťovacího činidla, potřebné pro zesíťování veškerého alginátu přítomného v daném odpipetovaném objemu alginátového solu ($V_{\text{min.}}$). Poté byl ze závislosti objemu nezreagované směsi (alginátu a síťovacího činidla) na objemu použité vápenaté soli stanoven objem síťovacího činidla potřebný pro přípravu homogenních alginátových gelů (V_{H}). Výsledky těchto experimentů ukazuje tabulka 7. Bylo zjištěno, že stanovené objemy označené jako $V_{\text{min.}}$ a V_{H} jsou stejné pro alginát o koncentraci 1 hm. % a zároveň i pro alginát o nižších koncentracích, což je poměrně zajímavé zjištění. Následně byl na základě provedené optimalizace přípravy alginátových gelů navržen vhodný postup síťování studovaného polymeru. Do kádinky bylo naváženo 4,5 g alginátu, k těm bylo vloženo magnetické míchadélko a kádinka byla umístěna na magnetickou míchačku. Míchání bylo prováděno při laboratorní teplotě s rychlostí otáček odpovídající 150 RPM. Poté bylo k alginátovému solu pomalu přikapáváno síťovací činidlo (na přípravu homogenního gelu musel objem použitého síťovacího činidla přesáhnout stanovenou hodnotu V_{H} a s dalším přídavkem byla zvyšována mechanická pevnost alginátového gelu). Aby bylo zabráněno vzniku nehomogenního gelu, bylo nutné přikapávat síťovací činidlo na okraj kádinky. Nakonec byl gel z kádinky vyjmut a 24 hodin ponechán v exsikátoru s vodou, aby před jeho dalším využitím bylo dosaženo stavu termodynamické rovnováhy.

Na závěr byla provedena charakterizace mechanických vlastností připravených alginátových gelů. Během té bylo zjištěno, že od přídavku síťovacího činidla označovaného jako V_{H} vznikají homogenní gely, a to nejen z vizuálního hlediska, ale také z hlediska mechanických vlastností. Zároveň bylo zjištěno, že objem síťovacího činidla potřebný pro přípravu homogenních gelů (V_{H}) není roven objemu síťovacího činidla, od jehož přídavku jsou obsazena všechna místa v polymerním řetězci, která jsou schopná vázat vápenaté ionty. S dalším přídavkem tedy rostla mechanická pevnost alginátových gelů. V případě, že byl u všech typů síťovacích činidel (o shodné molární koncentraci) použit stejný objem dané vápenaté soli, měl alginát zesíťovaný chloridem vápenatým, laktátem vápenatým a octanem vápenatým stejné mechanické vlastnosti.

Na druhou stranu alginát zesíťovaný dusičnanem vápenatým měl o něco nižší mechanickou pevnost. Rozdíl v mechanických vlastnostech jednotlivých gelů byl pravděpodobně způsoben rozdílnými typy aniontů použitých vápenatých solí, o čemž svědčí nejen rozdíl v mechanických vlastnostech, ale také skutečnost, že se alginát nepodařilo zesíťovat ani jednou solí ze skupiny síranů.

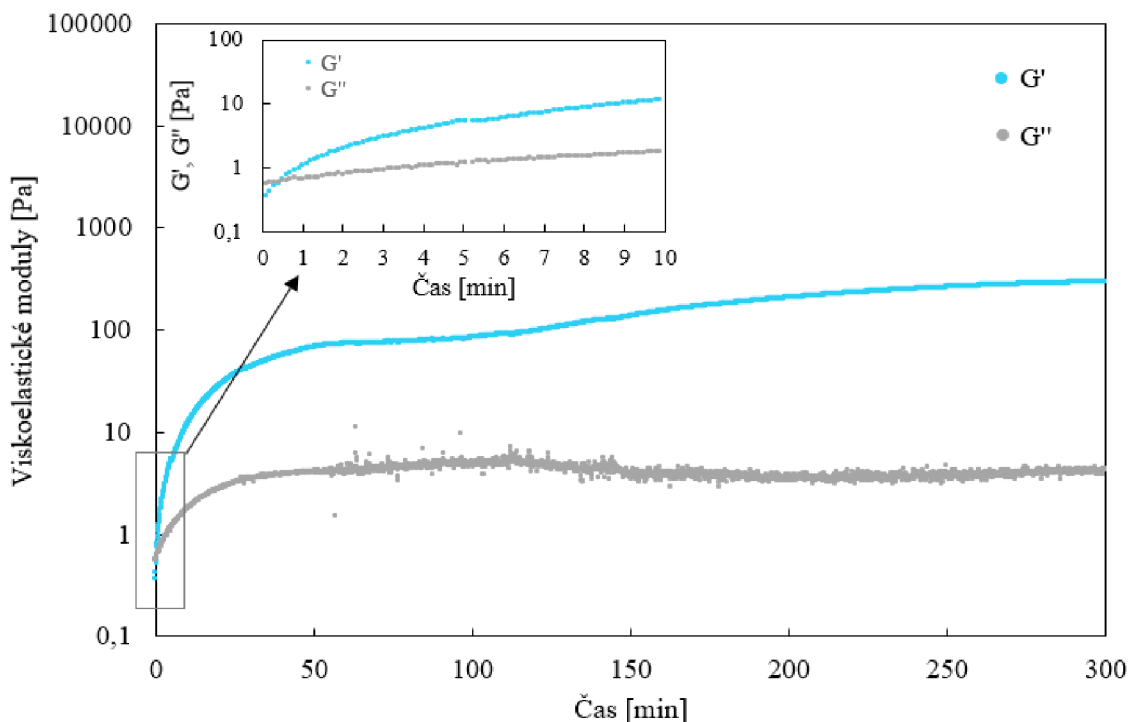
5.2 Iontové síťování alginátu metodou vnitřní gelace

Dalším běžně využívaným způsobem síťování alginátu sodného je iontové síťování metodou vnitřní gelace. V tomto případě dochází ke smíchání omezeně rozpustné vápenaté soli (např. CaCO_3 , CaSO_4) s organickou kyselinou (např. CH_3COOH) nebo s laktonem (nepoužívanější z nich je D-glukono- δ -lakton). Tímto způsobem dochází k oddálené gelaci, která začíná pomalou hydrolyzou D-glukono- δ -laktonu (GDL), během které vzniká kyselina glukonová a ta postupně okyseluje alginát, ve kterém jsou rozptýleny částice vápenaté soli. Postupným snižováním pH se začne příslušná omezeně rozpustná sůl rozpouštět a tím pádem disociovat, což vede k uvolňování vápenatých iontů schopných tvořit s alginátem trojrozměrnou polymerní síť. Dochází tak k rovnoměrnému síťování alginátu v celém objemu, díky čemuž vzniká homogenní gel.

V rámci diplomové práce Jany Krýslové [77], prováděné na Fakultě chemické VUT, byla uskutečněna optimalizace vhodného poměru GDL a uhličitanu vápenatého pro síťování alginátu sodného. Jelikož bakterie produkují alginát s obsahem uhličitanu vápenatého odpovídajícím koncentraci 1 g/l, byla v práci používána právě tato koncentrace zmíněné vápenaté soli. Jako ideální poměr GDL a uhličitanu vápenatého se ukázal poměr 8 ml alginátu s obsahem uhličitanu vápenatého odpovídajícím koncentraci 1 g/l (tedy 0,008 g uhličitanu) ku 2 ml GDL o koncentraci 1 mol/dm³ (0,35628 g GDL). Hmotnostní poměr CaCO_3 : GDL tedy odpovídal 1:45.

Na základě těchto informací byl nejprve připraven alginátový gel s výše uvedeným poměrem použitých látek a ten byl podroben časovému testu, aby bylo ověřeno, zda opravdu dochází při výše zmíněném poměru CaCO_3 a GDL k oddálené gelaci alginátu. Do 12,5 g alginátu o koncentraci 1 hm. % bylo přimícháno 0,0125 g uhličitanu vápenatého a směs byla nadávkována do spodního válce reometru. Poté bylo ke směsi přidáno 3,125 ml GDL o koncentraci 1 mol/dm³, směs byla lehce promíchána (v rámci 3 sekund) a ihned poté byl spuštěn časový test o parametrech nastavení uvedených v experimentální části – konkrétně v tabulce 2.

Jak můžeme vidět na obrázku 27, po přibližně 25 sekundách došlo u viskoelastických modulů k bodu křížení, což znamená, že právě v tomto okamžiku začala probíhat gelace. Následně začaly viskoelastické moduly postupně růst a po přibližně 30 minutách došlo k jejich postupnému ustalování. To vypovídá o tom, že gelace probíhala přibližně prvních 30 minut a poté už docházelo jen k menšímu dotváření polymerní sítě a přeskupování polymerních řetězců. Celý průběh časového testu je uveden v příloze 5.

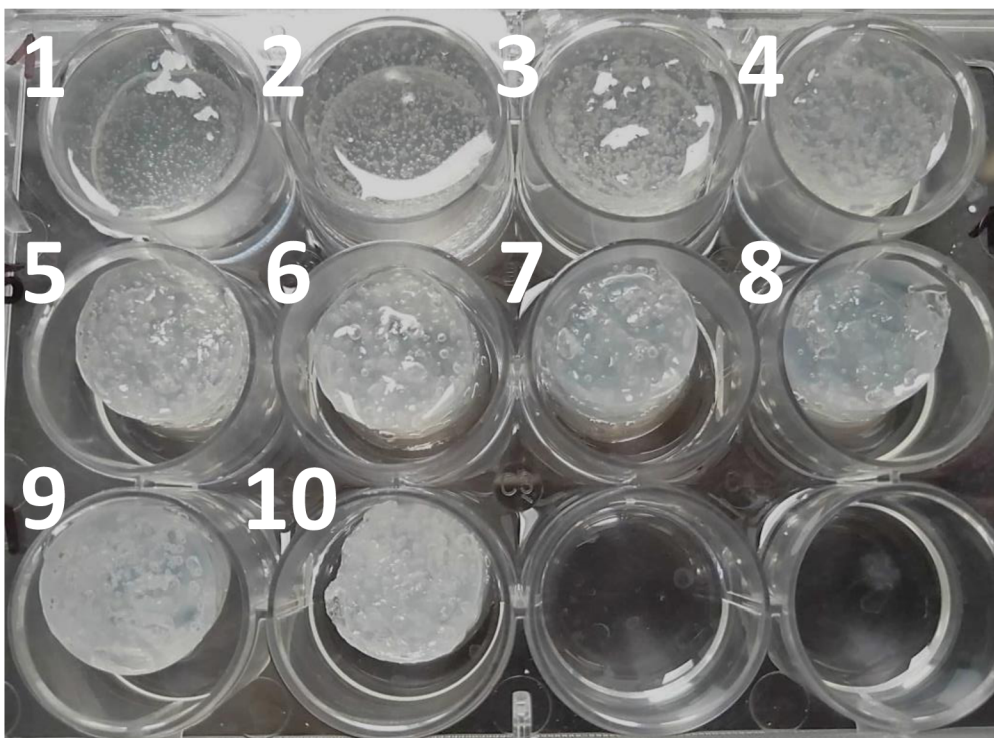


Obrázek 27: Časový test 1% alginátu síťovaného uhličitanem vápenatým v kombinaci s GDL.

Gely připravené výše zmíněným postupem však nebyly příliš pevné, a proto byl dále sledován vliv přidavku uhličitanu vápenatého, který by měl vést ke vzniku pevnějších gelů. Do každé jamky kultivační desky byly naváženy 4 g alginátu o koncentraci 1,25 hm. % a k těm byl přimíchán 1 ml směsi uhličitanu vápenatého a ultračisté vody (smícháním požadovaného objemu suspenze uhličitanu vápenatého o koncentraci 5 hm. % a doplněním ultračistou vodou na požadovaný objem 1 ml – viz tabulka 10). Tímto způsobem vznikl alginát o koncentraci 1 hm. % s požadovaným obsahem uhličitanu vápenatého. Nakonec bylo k alginátu v jednotlivých jamkách kultivační desky vždy přimícháno 1,25 ml GDL o koncentraci 1 mol/dm³.

Tabulka 10: Příprava gelů – síťování 1% alginátu uhličitanem vápenatým v kombinaci s GDL.

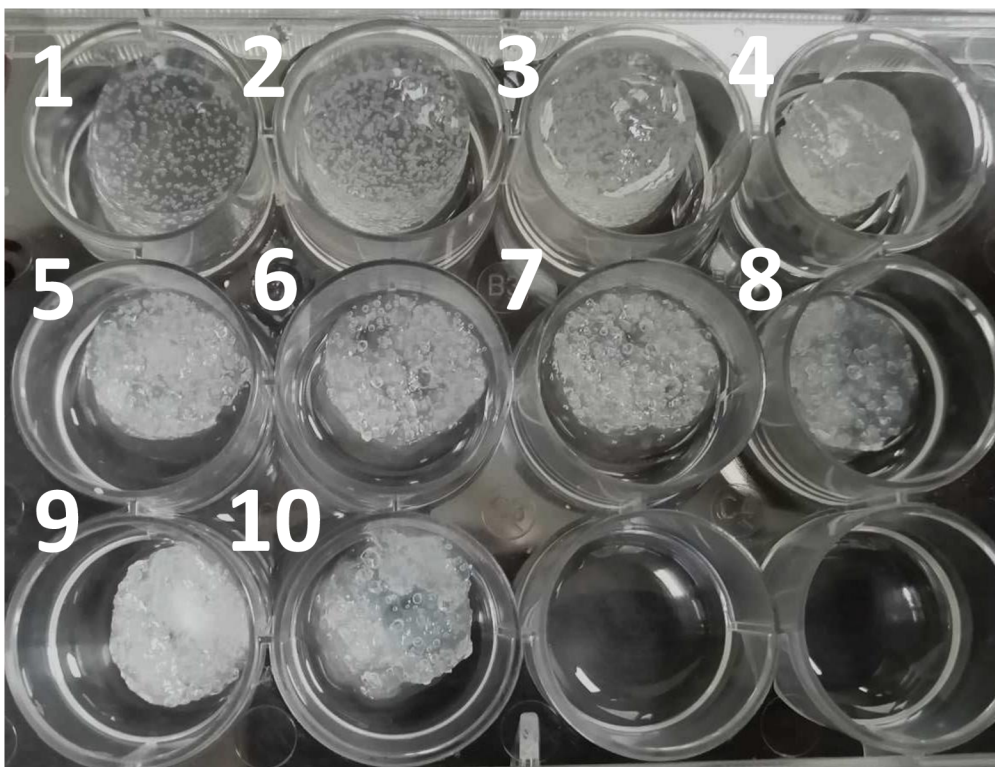
obsah uhličitanu		koncentrace a objemy použitých látek						
číslo gelu	m CaCO ₃ [g]	W alg. [hm. %]	V alg. [ml]	W CaCO ₃ [g/100ml]	V CaCO ₃ [ml]	V vody [ml]	c GDL [mol/dm ³]	V GDL [ml]
1	0,005	1,25	4	5	0,1	0,9	1	1,25
2	0,010	1,25	4	5	0,2	0,8	1	1,25
3	0,015	1,25	4	5	0,3	0,7	1	1,25
4	0,020	1,25	4	5	0,4	0,6	1	1,25
5	0,025	1,25	4	5	0,5	0,5	1	1,25
6	0,030	1,25	4	5	0,6	0,4	1	1,25
7	0,035	1,25	4	5	0,7	0,3	1	1,25
8	0,040	1,25	4	5	0,8	0,2	1	1,25
9	0,045	1,25	4	5	0,9	0,1	1	1,25
10	0,050	1,25	4	5	1,0	0,0	1	1,25



Obrázek 28: Vliv přídavku uhličitanu vápenatého na výsledné vlastnosti gelů, připravených síťováním alginátu o koncentraci 1 hm. % uhličitanem vápenatým v kombinaci s GDL.

Na obrázku 28 můžeme vidět, jak gely vypadaly po 24 hodinách od přípravy. Prvním rozdílem mezi připravenými gely, kterého si můžeme všimnout, je jejich rozdílná velikost, a to i přes to, že byl použit stejný objem finální směsi. S přídavkem uhličitanu vápenatého docházelo ke vzniku čím dál menších gelů. To lze vysvětlit tím, že čím více uhličitanu bylo k alginátu přidáno, tím více se ve směsi nacházelo vápenatých iontů schopných tvořit s alginátovými řetězci trojrozměrnou polymerní síť a tím vyšší také byla hustota síťování. Hustá polymerní síť způsobila vytlačování disperzního prostředí, které se již do polymerní sítě nevešlo, a to vedlo nejen ke vzniku menších gelů, ale také pevnějších a méně elastických gelů. U posledních gelů si také můžeme všimnout mírného zákalu. Ten byl způsobeno tím, že se již ve směsi vyskytovalo příliš mnoho uhličitanu a nedošlo tedy k jeho úplnému rozpuštění.

Experiment byl zopakován také s alginátem o koncentraci 0,4 hm. %, přičemž postup přípravy gelů, včetně objemů a koncentrací použitých látek, byl stejný jako u 1% alginátu. Rozdíl byl pouze v koncentraci tohoto polymeru, kdy na přípravu 5 ml alginátu o koncentraci 0,4 hm. % s požadovaným obsahem uhličitanu vápenatého byly použity 4 ml alginátu o koncentraci 0,5 hm. % a k těm byl přidán 1 ml suspenze uhličitanu ve vodě (viz tabulka 10).



Obrázek 29: Vliv přidavku uhličitanu vápenatého na výsledné vlastnosti gelů, připravených síťováním alginátu o koncentraci 0,4 hm. % uhličitanem vápenatým v kombinaci s GDL.

Jak můžeme vidět na obrázku 29, stejně jako u alginátu o koncentraci 1 hm. % docházelo i v tomto případě s přidavkem uhličitanu vápenatého ke vzniku pevnějších gelů o menším objemu a čím dál více se projevovala synergie alginátových gelů.

5.2.1 Shrnutí poznatků z iontového síťování alginátu metodou vnitřní gelace

V této kapitole bylo prováděno iontové síťování alginátu sodného metodou vnitřní gelace. Jelikož koncentrace uhličitanu vápenatého obsaženého v bakteriálním alginátu odpovídá 1 g/l, byly připravovány gely právě o této koncentraci zmíněné vápenaté soli. Na základě optimalizace vhodného poměru uhličitanu vápenatého a GDL, provedeného v rámci diplomové práce Jany Krýslové [77], byl na přípravu alginátových gelů používán uhličitan vápenatý a GDL v hmotnostním poměru 1:45. Přibližně po 25 sekundách od smíchání všech složek potřebných pro přípravu alginátového gelu došlo ke gelaci alginátu, která trvala přibližně 30 minut. Systém se však nenacházel v termodynamické rovnováze (nadále docházelo k přeskupování řetězců v polymerní síti) a proto byly gely před dalším využitím ponechány 24 hodin v exsikátoru s vodou. Tímto způsobem vznikaly elastické gely s poměrně nízkou mechanickou pevností. Bylo však prokázáno, že právě mechanickou pevnost alginátových gelů lze zvýšit přidavkem uhličitanu vápenatého. V rámci kapitoly 5.4 budou zkoumány další možnosti ovlivnění finálních aplikačních vlastností alginátových gelů připravených iontovým síťováním alginátu metodou vnitřní gelace.

5.3 Síťování alginátu kyselinou fytoovou

Mezi síťovací činidla vedoucí ke vzniku alginátových gelů řadíme nejen soli, ale také řadu kyselin. Příkladem může být kyselina fytoová (KF). Jedná se o přírodní antioxidant, který je hlavní složkou rostlinných semen, ale nachází se také například v obilovinách či luštěninách.

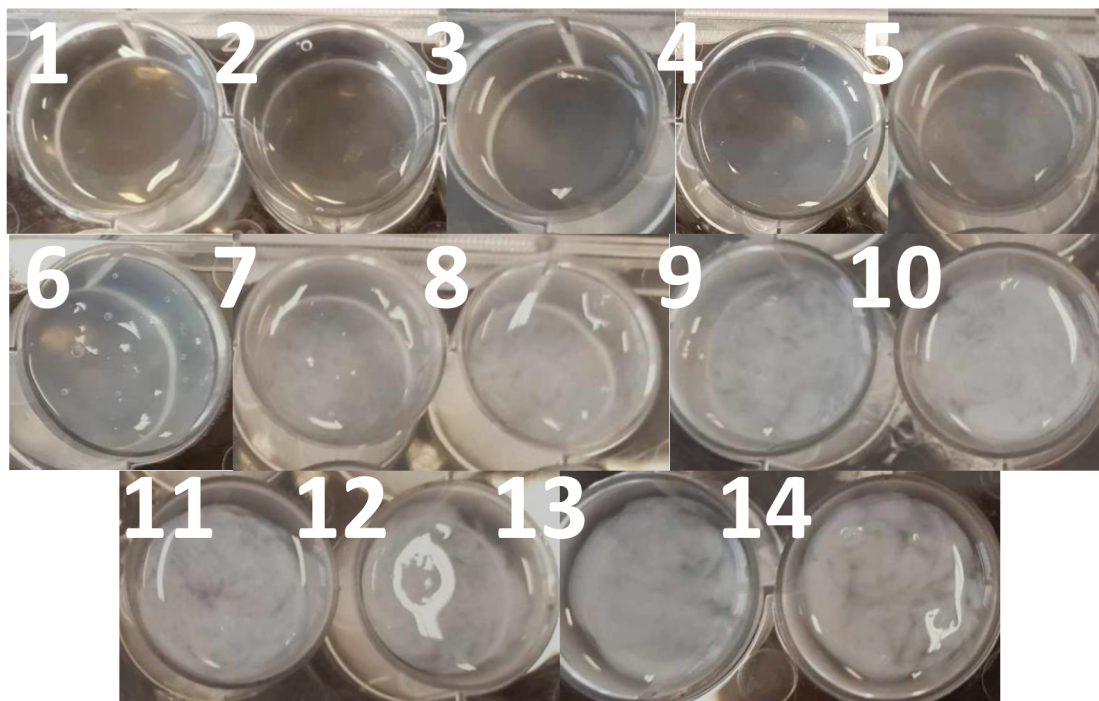
O síťování alginátu kyselinou fytoovou se pokusili Loredana Elena Nita a kol. [72]. V této studii bylo na přípravu alginátových gelů použito 5 ml alginátu o koncentraci odpovídající 1 hm. % (0,05 g alginátu bylo rozpuštěno v 5 g vody) a k těm bylo za stálého míchání postupně přikapáváno požadované množství (15–150 μ l) kyseliny fytoové o koncentraci 50 hm. % ve vodě. Jak ukazuje obrázek 8 (viz kapitola 3.1), ke vzniku gelu došlo při přidavku kyseliny fytoové odpovídajícím 40–70 μ l.

Nejprve tedy bylo vyzkoušeno síťování alginátu kyselinou fytoovou dle autorů článku. K 5 ml alginátu o koncentraci 1 hm. % byla postupně přikapávána kyselina fytoová o koncentraci 50 hm. %. Tímto způsobem však vznikaly spíše nehomogenní gelové agregáty než gely a z tohoto důvodu byl postup přípravy alginátových gelů na bázi kyseliny fytoové upraven, a to následujícím způsobem. Do každé ze 14 jamek kultivační desky byly naváženy 4 g alginátu o koncentraci 1,25 hm. % a k těm byl přimíchán 1 ml ultračisté vody smíchané s určitým objemem 50% kyseliny fytoové (viz tabulka 11). Tímto způsobem vznikl alginát o koncentraci 1 hm. % s požadovaným obsahem kyseliny fytoové.

Tabulka 11: Přidávky KF včetně hmotnostního obsahu kyseliny a alginátu ve směsi (nikoliv v gelu).

číslo gelu	pH gelu [-]	V _{KF} [μ l]	m _{KF} [mg]	W _{KF} [hm. %]	W _{alg.} [hm. %]	W _{alg./W_{KF}} [-]
1	4,04	5	2,5	0,05	1,00	20,00
2	3,78	10	5	0,10	1,00	10,00
3	3,55	15	7,5	0,15	1,00	6,67
4	3,27	20	10	0,20	0,99	5,00
5	3,17	25	12,5	0,25	0,99	4,00
6	2,98	30	15	0,30	0,99	3,33
7	2,59	40	20	0,40	0,99	2,50
8	2,37	50	25	0,49	0,99	2,00
9	2,20	60	30	0,59	0,98	1,67
10	2,12	70	35	0,69	0,98	1,43
11	2,05	80	40	0,78	0,98	1,25
12	1,90	90	45	0,88	0,97	1,11
13	1,87	100	50	0,97	0,97	1,00
14	1,70	150	75	1,44	0,96	0,67

Jak můžeme vidět na obrázku 30, při přidavku kyseliny fytoové odpovídajícím 5–15 μ l ke vzniku gelu nedošlo. Malé množství gelu vzniklo při přidavku 20 a 25 μ l kyseliny fytoové a při přidavku 30 μ l došlo k zesíťování alginátu v celém objemu za vzniku homogenního gelu. S dalšími přidávkami síťovacího činidla nadále vznikaly alginátové gely, ovšem ty nebyly tak homogenní jako alginát s přidavkem 30 μ l kyseliny fytoové. Experiment byl proveden ve dvou duplikátech, přičemž výsledky síťování byly v obou případech totožné.



Obrázek 30: Výsledky síťování alginátu kyselinou fytoovou.

Tyto výsledky síťování neodpovídají výsledkům uvedeným ve výše zmíněném článku [72]. Zatímco autoři článku uvádí, že ke gelaci alginátu došlo pouze při přidavku kyseliny fytoové odpovídajícím 40–70 μl , v rámci této diplomové práce se podařilo alginát zesíťovat při přidavku 20–150 μl kyseliny fytoové. Možným vysvětlením této odchylky ve výsledcích by mohla být rozdílná molekulová hmotnost použitých alginátů. Zatímco v rámci této práci byl použit alginát o molekulové hmotnosti 259 kDa, autoři článku použili alginát o výrazně nižší molekulové hmotnosti (uvedená molekulová hmotnost alginátu odpovídala 90 Da, ovšem zároveň autoři práce odkazují na článek, v němž se molekulová hmotnost alginátu pohybovala kolem 90 kDa \rightarrow pravděpodobně se tedy jedná o překlep a molekulová hmotnost alginátu používaného v rámci článku zabývajícího se síťováním alginátu kyselinou fytoovou odpovídala 90 kDa). Síťování alginátu s vyšší molekulovou hmotností by mělo být snadnější, a proto se v této práci podařilo vytvořit alginátové gely na bázi kyseliny fytoové při větším rozpětí dávek síťovacího činidla.

Při pohledu na tabulku 11 si můžeme všimnout, že síťováním alginátu kyselinou fytoovou vznikají gely s poměrně nízkým pH (1,70–3,27 v závislosti na objemu použitého síťovacího činidla). To by u bakteriálního alginátu mohlo představovat poměrně velký problém, protože by při tak kyselém pH bakterie enkapsulované v alginátovém gelu dlouho nepřežily. Z tohoto důvodu bylo nutné pH alginátových gelů zneutralizovat.

První pokus o zvýšení pH alginátu síťovaného kyselinou fytoovou spočíval v promývání gelu ultračistou vodou. Ke 4 ml alginátu o koncentraci 1,25 hm. % byl přidán 1 ml ultračisté vody smíchané se 150 μl kyseliny fytoové. Směs byla promíchána a vzniklý gel byl vložen do litrové láhve s ultračistou vodou. Dvakrát denně byla voda v láhvi vyměněna a bylo změřeno pH alginátu. Zatímco počáteční pH gelu odpovídalo 1,70, po třech dnech promývání se pH gelu zvýšilo na 5,30 a dále se nijak neměnilo. Gel však během promývání výrazně nabobtnal

a jakákoliv další manipulace s ním byla téměř nemožná (při dotyku se gel začal rozpadat na menší kousky). Promýváním gelu ultračistou vodou tedy sice došlo ke zvýšení jeho pH, a to bez toho, aniž by se síť rozpadla a gel se rozpustil, ale nabobtnání gelu znemožnilo jeho jakékoliv další využití.

Bylo tedy vyzkoušeno, zda by bylo možné připravit gely s vyšším pH pufrováním alginátu. Pro tento účel byl připraven amoniakální, uhličitánový a fosfátový pufr a v těch byl alginát rozpuštěn. Použité chemikálie včetně jejich množství uvádí tabulka 12.

Tabulka 12: Chemikálie potřebné na přípravu pufrů a jejich výsledné pH.

amoniakální pufr (doplněn vodou na 150 ml)	NH ₃	NH ₄ Cl	pH
	94,5 ml	10,125 g	10,35
uhličitánový pufr (doplněn vodou na 150 ml)	NaHCO ₃	Na ₂ CO ₃	pH
	11,468 g	1,431 g	9,05
fosfátový pufr	1M K ₂ HPO ₄	1M KH ₂ PO ₄	pH
	141,0 ml	9,0 ml	8,00

Navážka 1,25 g alginátu vždy byla rozpuštěna v takovém množství pufru, aby výsledný objem směsi odpovídal 100 ml. Alginát byl 24 hodin míchán na magnetické míchačce (150 RPM, laboratorní teplota) a poté bylo provedeno síťování kyselinou fytoovou, a to stejným způsobem, jako u alginátu rozpuštěného ve vodě (ke 4 ml alginátu o koncentraci 1,25 hm. % byl přidán 1 ml pufru s požadovaným přídatkem kyseliny fytoové a směs byla důkladně promíchána). Objemy přídatků kyseliny fytoové uvádí tabulka 11. V případě amoniakálního a fosfátového pufru však ani v jednom případě ke vzniku gelu nedošlo. Po přidavku kyseliny fytoové k alginátu v uhličitánovém pufru začalo docházet ke vzniku bublin (rozklad uhličitánu na H₂O a CO₂) a vzniklo malé množství gelu, ovšem jak můžeme vidět na obrázku 31, do druhého dne došlo k jeho úplnému rozpuštění. Ani u jednoho pufrovaného alginátu tedy nedošlo ke vzniku gelů.



Obrázek 31: Alginát v uhličitánovém pufru s přídatkem kyseliny fytoové odpovídajícím 80; 90; 100 a 150 µl v den přípravy (nahore) a 24 hodin od přípravy (dole).

5.3.1 Shrnutí poznatků ze síťování alginátu kyselinou fytoovou

Tato kapitola se zabývala síťováním alginátu sodného kyselinou fytoovou. Bylo zjištěno, že na síťování 5 ml alginátu o koncentraci 1 hm. % je zapotřebí 20–150 μ l kyseliny fytoové (poměr w_{alg}/w_{KF} ve směsi tedy odpovídal 0,67–5,00). Tímto způsobem však vznikají gely o příliš nízkém pH, což může být pro enkapsulaci PGPR do alginátových gelů připravených z alginátu produkovaného přímo samotnými bakteriemi poměrně velký problém. Při tak nízkém pH totiž bakterie v gelu dlouho nepřežijí. Výsledné pH alginátových gelů se podařilo zvýšit promýváním v ultračisté vodě, ovšem během promývání gel výrazně nabobtná a při jakémkoliv dotyku se začne lámat na menší kousky. Bylo tedy vyzkoušeno také zvýšení pH pufováním alginátu za pomoci amoniakálního, uhličitanového a fosfátového pufru. Ani v jednom případě však po přidavku kyseliny fytoové nedošlo ke vzniku gelů. V rámci diplomové práce se tedy bohužel nepodařilo optimalizovat přípravu alginátových gelů na bázi kyseliny fytoové, které by měly optimální pH. Možným řešením by mohlo být využití výše uvedených pufrů s nižší iontovou silou. Obecně je známo, že iontová síla negativním způsobem ovlivňuje proces gelace. V navazující práci bych tedy doporučovala, aby bylo vyzkoušeno síťování alginátu kyselinou fytoovou v pufovaných systémech s nižší iontovou silou.

5.4 Ovlivnění finálních aplikačních vlastností gelů na bázi alginátu

Pro každou aplikaci hydrogelů jsou vyžadovány specifické aplikační vlastnosti, jako jsou mechanická pevnost, čírost nebo například biokompatibilita. Proto je důležité, umět tyto vlastnosti upravovat dle potřeb dané aplikace. Jak již bylo prokázáno v předchozích kapitolách, jedním z faktorů ovlivňujících vlastnosti výsledných hydrogelů je koncentrace polymeru. Čím nižší je koncentrace alginátu, tím nižší je mechanická pevnost výsledného gelu, vyjádřená hodnotami viskoelastických modulů, zatímco například čírost gelů s nižší koncentrací polymeru roste. Dalším důležitým faktorem je množství použitého síťovacího činidla, s jehož přidavkem roste stupeň zesítení a tím pádem roste také mechanická pevnost alginátového gelu.

Výsledné vlastnosti hydrogelů lze ovlivnit také rychlostí zesítení, která má vliv například na jeho homogenitu. S vyšší rychlostí zesítení vznikají méně homogenní gely, zatímco při nižší rychlosti zesítení vznikají více homogenní gely. Velkým problémem při přípravě hydrogelových materiálů je také jev zvaný synerese. Tato kapitola se bude zabývat ovlivněním finálních vlastností alginátových hydrogelů, a to především se zaměřením na řízení rychlosti zesítení alginátu a zpomalení synerese. Synerese je nežádoucí především z toho důvodu, že vede ke zmenšení objemu gelu, což může mít negativní dopad na jeho funkci, a to zejména pokud je využíván jako nosič léčiv. V tomto případě totiž může ztráta disperzního prostředí z hydrogelové matrice vést k nekontrolovanému uvolňování léčivých látek. Zároveň synerese ovlivňuje mechanické vlastnosti hydrogelu, kdy může tento jev vést k oslabení hydrogelové struktury a zhoršení jeho schopnosti udržet tvar nebo odolávat mechanickému zatížení.

5.4.1 Vliv přídavku sacharózy

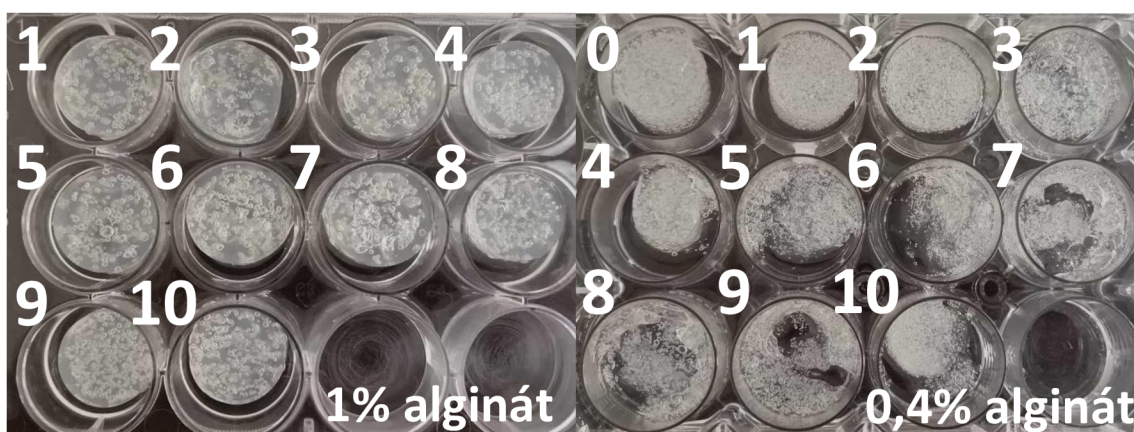
Katsuyoshi Nishinari a Yapeng Fang [74] ve své práci uvedli, že u agarových gelů lze synerezi zpomalit přídavkem sacharózy. Právě z tohoto důvodu bude v této kapitole sledován vliv přídavku sacharózy na synerezi alginátových gelů.

Do každé jamky kultivační desky byly naváženy 4 g alginátu o koncentraci 1,25 hm. %, ve kterých bylo rozpuštěno požadované množství sacharózy (viz tabulka 13). Poté byl ke směsi přimíchán 1 ml suspenze uhličitanu vápenatého ve vodě o koncentraci 5 g/l (což odpovídá přídavku 0,005 g uhličitanu), čímž vznikl alginát o koncentraci 1 hm. % s požadovaným obsahem uhličitanu vápenatého. Nakonec bylo přidáno 1,25 ml GDL o koncentraci 1 mol/dm³ (hmotnostní poměr CaCO₃ : GDL tedy odpovídal 1:45). Takto připravené gely byly 24 hodin ponechány v exsikátoru s vodou. S přídavkem sacharózy však ke zpomalení synereze nedošlo a všechny gely vyloučily přibližně stejné množství disperzního prostředí.

Zajímavé je, že když byl experiment zopakován také s alginátem o koncentraci 0,5 hm. % (po přídavku 1 ml suspenze uhličitanu vápenatého ve vodě vznikl alginát o koncentraci 0,4 hm. % s požadovaným obsahem uhličitanu), byl pozorován naprosto odlišný výsledek. V tomto případě bylo po 24 hodinách od přípravy gelů s přídavkem sacharózy pozorováno urychlení synereze a rozpad jednotlivých gelů. Výsledky obou provedených experimentů můžeme vidět na obrázku 32. Oba experimenty byly provedeny ve dvou duplikátech, a to s totožnými výsledky. Proč došlo u 0,4% alginátu s přídavkem sacharózy k urychlení synereze a rozpadu gelů však v této diplomové práci nebylo z časových důvodů dále zkoumáno, čímž vznikl další zajímavý námět pro budoucí závěrečné práce.

Tabulka 13: Obsah sacharózy ve směsi při přípravě jednotlivých gelů.

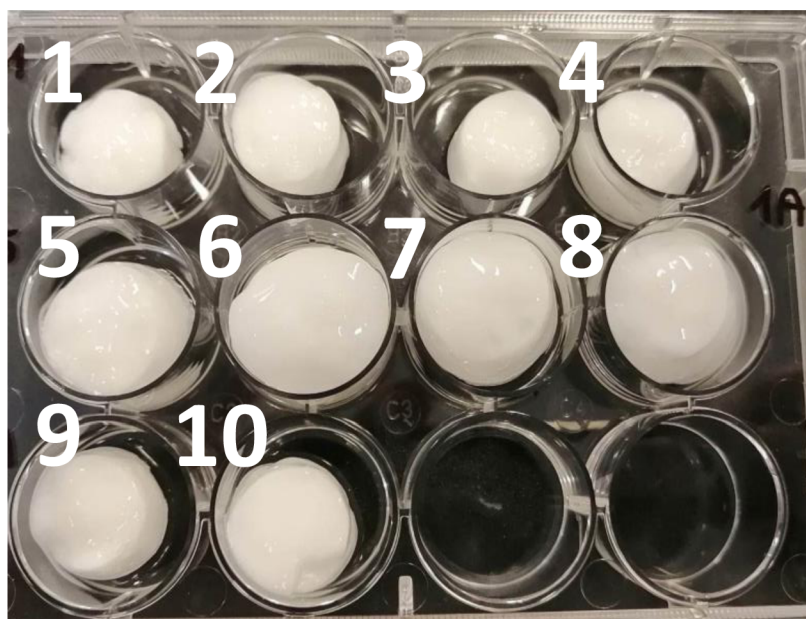
číslo gelu	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
m sacharózy [g]	0,00	0,07	0,14	0,21	0,28	0,35	0,42	0,49	0,56	0,63	0,70
W sacharózy [hm. %]	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10



Obrázek 32: Vliv přídavku sacharózy na vlastnosti alginátových gelů (referenční vzorek = alginát s nulovým obsahem sacharózy) s hmotnostním poměrem CaCO₃ : GDL odpovídajícím 1:45.

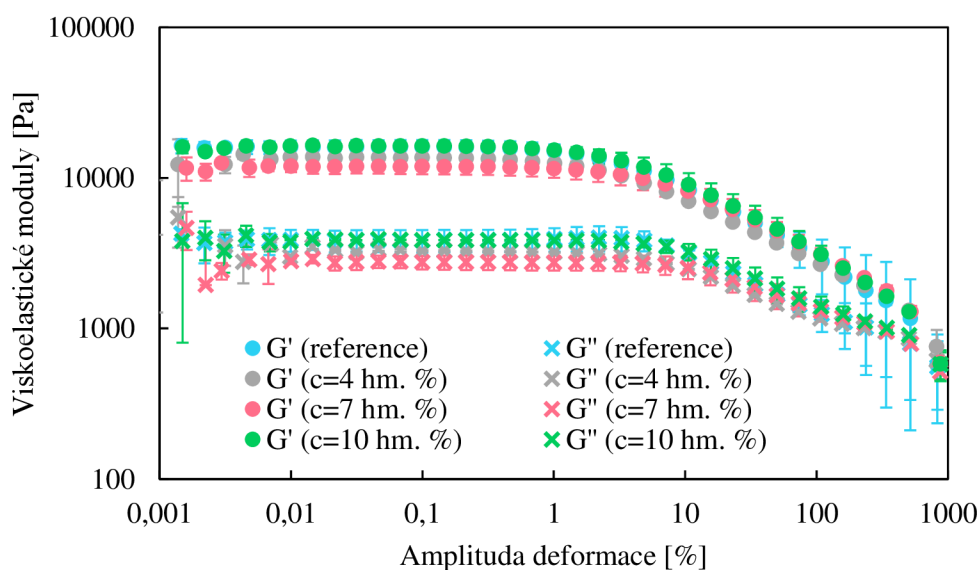
Při posledním pokusu o zpomalení synereze alginátových gelů bylo sníženo množství GDL, čímž bylo dosaženo zpomalení gelace, a naopak bylo zvýšeno množství přidaného uhličitanu vápenatého, které by mělo vést k vyšší hustotě zesílení, a tedy i k výraznějšímu projevu synereze. Na přípravu alginátových gelů bylo použito 5 ml alginátu o koncentraci 0,5 hm. % s obsahem uhličitanu odpovídajícím 0,058 g, požadované množství sacharózy (viz tabulka 13) a 1,25 ml GDL o koncentraci 0,7859 mol/dm³ (což odpovídá přídavku 0,175 g GDL). Hmotnostní poměr CaCO₃: GDL tedy odpovídal 1:3. Důvodem ke změně hmotnostního poměru CaCO₃: GDL byl fakt, že jsme chtěli ověřit, zda snížení množství GDL povede k ověření vlivu sacharózy na zpomalení synereze (viz výše).

Jak můžeme vidět na obrázku 33, v tomto případě docházelo s přídavkem sacharózy nejprve ke zpomalení synereze, ovšem od přídavku odpovídajícímu 0,49 g se synereze postupně začala opět projevovat čím dál více. Jak uvedl ve svém článku Isamu Kaneda [75], zpomalení synereze by mohlo být způsobeno tím, že u rozpouštědla (v našem případě voda), ke kterému byla přidána sacharóza, došlo ke snížení rychlosti toku v porézní polymerní síti v důsledku zvýšení jeho viskozity. Od přídavku sacharózy odpovídajícímu 0,49 g však mohla začít převyšovat hygroskopická povaha tohoto sacharidu, čímž došlo k postupnému ředění rozpouštědla obsahujícího sacharózu vodou a synereze se opět začala projevovat čím dál výrazněji. Tento experiment byl proveden celkem třikrát a ve všech případech byly pozorovány stejné výsledky.



Obrázek 33: Vliv přídavku sacharózy na vlastnosti alginátových gelů s hmotnostním poměrem CaCO₃: GDL odpovídajícím 1:3.

Vliv sacharózy na rychlost synereze byl prokázán také pomocí reologických experimentů, konkrétně s využitím oscilačních amplitudových testů s deformací ve smyku. Pro tento účel byly opět připraveny alginátové gely s hmotnostním poměrem CaCO_3 : GDL odpovídajícím 1:3 a s obsahem sacharózy 4, 7 a 10 hm. %, přičemž každý tento gel byl připraven dvakrát. Zároveň byly připraveny také dva referenční vzorky bez přítomnosti sacharózy. Všechny připravené gely byly podrobeny amplitudovým testům s deformací ve smyku o parametrech nastavení uvedených v experimentální části – konkrétně v tabulce 1. Výsledky měření ukazuje obrázek 34.



Obrázek 34: Výsledky amplitudových testů s deformací ve smyku – vliv přidavku sacharózy.

Tabulka 14: Průměrné hodnoty viskoelastických modulů alginátových gelů s přidavkem sacharózy.

c sacharózy [hm. %]	G' [Pa]	odchylka [Pa]	G'' [Pa]	odchylka [Pa]
0	15 967	1 800	3 864	638
4	13 566	96	3 298	50
7	11 806	620	2 751	64
10	16 176	1 332	3 855	296

Z průměrných hodnot viskoelastických modulů ležících v LVO, uvedených v tabulce 14, můžeme vidět, že s přidavkem sacharózy nejprve docházelo nejen ke zpomalení synereze, ale také ke snížení hodnot viskoelastických modulů. U přidavku sacharózy odpovídajícím 0,70 g však došlo k náhlému nárůstu viskoelastických modulů, což odpovídá také zvýšenému projevu synereze. Zpomalení synereze způsobené přidavkem sacharózy totiž vede ke vzniku gelů s vyšším obsahem vody a s nižší mechanickou pevností. Od přidavku sacharózy odpovídajícímu 0,49 g se však synereze začne postupně projevovat čím dál výrazněji, z polymerní sítě je tedy vytlačováno více kapaliny, a to vede ke vzniku menších gelů s nižším obsahem vody a vyšší mechanickou pevností. To vysvětluje prvotní pokles viskoelastických modulů a jejich nárůst u přidavku 0,70 g sacharózy.

5.4.2 Vliv přidavku fosforečnanů

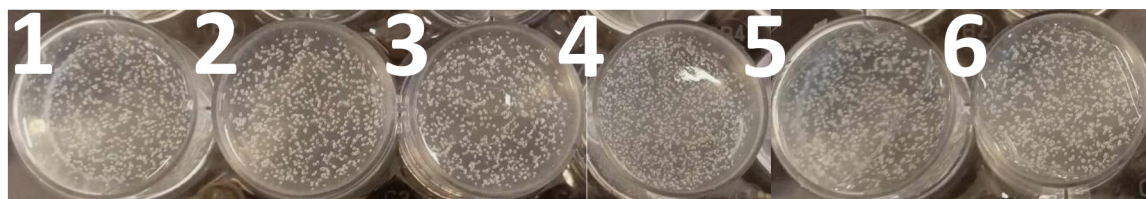
Jak již bylo řečeno, na výsledné vlastnosti alginátových gelů má také výrazný vliv rychlost gelace, kdy s nižší rychlostí dochází ke vzniku více homogenních gelů. Hydrogely s oddálenou gelací jsou často využívány v oblasti regenerativní medicíny a tkáňového inženýrství, kdy dochází k injekční aplikaci polymerního solu na požadované místo a až poté dochází ke gelaci daného polymeru vlivem externího stimulu (např. tepelná změna, ultrazvuková vlna, atd.).

Jak ve své práci uvádí Jeanie L. Drury a kol. [76], dobu gelace lze prodloužit například přidávkem fosforečnanových iontů, které přechodně vážou vápenaté ionty, což v úvodní fázi gelace snižuje celkový počet iontů dostupných pro síťování alginátu. Časem však fosforečnan působí jako systém pomalého uvolňování dalších vápenatých iontů, což vede k pomalejší a postupné gelaci vedoucí ke vzniku homogenních gelů.

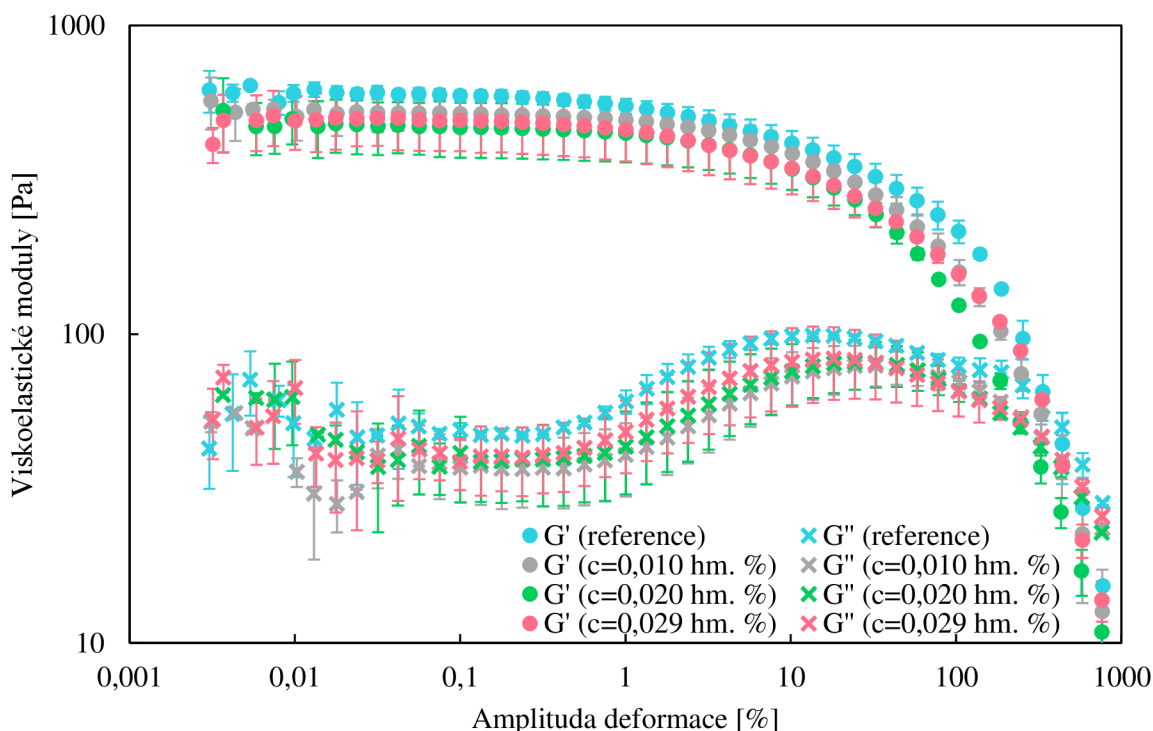
Byl tedy připraven roztok hydrogenfosforečnanu draselného o koncentraci $0,2871 \text{ mol/dm}^3$ ($\text{pH}=8,98$). Poté byly do jamek kultivační desky naváženy 4 g alginátu o koncentraci 1,25 hm. % a k těm byl přimíchán 1 ml suspenze uhličitanu vápenatého ve vodě o koncentraci 5 g/l (přídavek 0,005 g uhličitanu). Tímto způsobem vznikl alginát o koncentraci 1 hm. % s požadovaným obsahem uhličitanu vápenatého. Do každé jamky bylo následně napipetováno požadované množství fosforečnanu (viz tabulka 15) a nakonec bylo ke směsi přimícháno 1,25 ml GDL o koncentraci 1 mol/dm^3 . Takto připravené gely byly 24 hodin ponechány v exsikátoru s vodou a poté byly podrobeny amplitudovým testům s deformací ve smyku o parametrech nastavení uvedených v experimentální části – konkrétně v tabulce 1. Experiment byl proveden dvakrát, přičemž výsledky byly v obou případech shodné.

Tabulka 15: Obsah hydrogenfosforečnanu ve směsi při přípravě jednotlivých gelů.

číslo gelu	V K_2HPO_4 [ml]	C K_2HPO_4 [hm. %]	pH gelu [-]
1	0,0	0,000	2,92
2	0,1	0,010	2,94
3	0,2	0,020	2,94
4	0,3	0,029	2,96
5	0,4	0,038	2,95
6	0,5	0,047	2,97



Obrázek 35: Síťování alginátu uhličitanem vápenatým v kombinaci s GDL – vliv přidavku hydrogenfosforečnanu draselného.



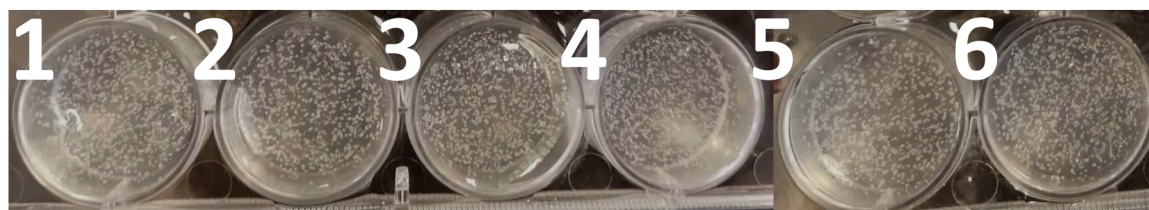
Obrázek 36: Výsledky amplitudových testů s deformací ve smyku – zesíťovaný alginát s přidavkem hydrogenfosforečnanu draselného.

S přidavkem hydrogenfosforečnanu bylo při přípravě jednotlivých gelů pozorováno (vizuálně) prodloužení doby gelace a mírné zpomalení synereze, což bylo potvrzeno také reometrickými experimenty. Při pohledu na obrázek 36 můžeme vidět, že s přidavkem hydrogenfosforečnanu draselného došlo k mírnému poklesu viskoelastických modulů, který se však mezi jednotlivými přidavky nijak výrazně nelišil. Výše uvedený pokles viskoelastických modulů je v rámci chyby měření vyjádřené pomocí směrodatné odchylky. Právě z tohoto důvodu již nebyly proměřeny poslední dva připravené gely (s obsahem hydrogenfosforečnanu odpovídajícím 0,038 a 0,047 hm. %). Pokles viskoelastických modulů mohl být způsoben vyšším stupněm hydratace jednotlivých gelů, který byl způsoben prodlouženou dobou gelace a zpomalením synereze. Není však vyloučeno, že za pokles viskoelastických modulů také částečně může to, že fosforečnanové ionty přechodně vážou vápenaté ionty ve směsi.

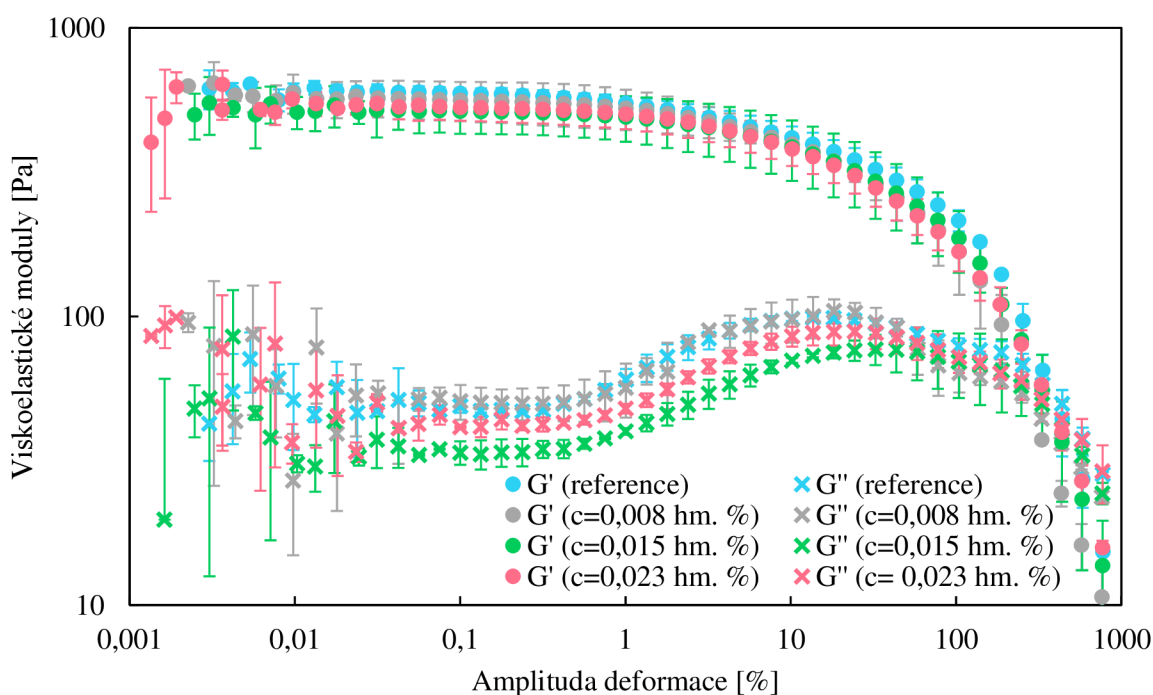
Aby bylo ověřeno, zda má na gelaci alginátu vliv pouze přítomnost fosforečnanů nebo zda hraje roli také pH, byl experiment zopakován s dihydrogenfosforečnanem draselným o stejné molární koncentraci, jež byla použita v případě hydrogenfosforečnanu ($0,2871 \text{ mol/dm}^3$). Postup přípravy gelů byl taktéž totožný. Zatímco pH hydrogenfosforečnanu o koncentraci $0,2871 \text{ mol/dm}^3$ odpovídá 8,98, pH dihydrogenfosforečnanu o stejné koncentraci odpovídá 4,49. Přidavky dihydrogenfosforečnanu včetně jeho hmotnostní koncentrace ve směsi uvádí tabulka 16.

Tabulka 16: Obsah dihydrogenfosforečnanu ve směsi při přípravě jednotlivých gelů.

číslo gelu	$V_{\text{KH}_2\text{PO}_4}$ [ml]	$c_{\text{KH}_2\text{PO}_4}$ [hm. %]	pH _{gelu} [-]
1	0,0	0,000	2,93
2	0,1	0,008	2,93
3	0,2	0,015	2,92
4	0,3	0,023	2,92
5	0,4	0,030	2,91
6	0,5	0,037	2,92



Obrázek 37: Sítování alginátu uhličitánem vápenatým v kombinaci s GDL – vliv přidavku dihydrogenfosforečnanu draselného.



Obrázek 38: Výsledky amplitudových testů s deformací ve smyku – zesíťovaný alginát s přidavkem dihydrogenfosforečnanu draselného.

Při pohledu na obrázek 38 můžeme vidět, že gely s přidavkem dihydrogenfosforečnanu draselného vykazovaly totožné chování jako gely s přidavkem hydrogenfosforečnanu draselného. To, zda na prodloužení doby gelace použijeme hydrogenfosforečnan či dihydrogenfosforečnan tedy nemá při tak malých přidavcích žádný vliv, a to ani vzhledem k rozdílnému pH obou solí.

Jelikož se amplitudovými testy s deformací ve smyku nepodařilo prokázat vliv přidavku fosforečnanů na viskoelastické vlastnosti alginátových gelů, byla v rámci diplomové práce provedena také série amplitudových testů s deformací v tlaku o parametrech nastavení uvedených v experimentální části – konkrétně v tabulce 3. Cílem těchto provedených experimentů bylo prokázat, zda má přídavek fosforečnanů vliv na výsledné mechanické vlastnosti alginátových gelů. I když bylo měření několikrát opakováno, vliv přidavku fosforečnanů nebyl v tomto případě pozorován, a proto tyto závislosti nejsou v práci uvedeny.

Je tedy otázkou, zda s přidavkem fosforečnanů opravdu u amplitudových testů s deformací ve smyku docházelo k poklesu viskoelastických modulů, nebo je tento pokles zanedbatelný v rámci směrodatné odchylky měření. V každém případě po vizuální stránce bylo patrné, že s přidavkem fosforečnanů byla prodloužena doba gelace a ze struktury gelu bylo do druhého dne vyloučeno menší množství disperzního prostředí než u bez přítomnosti fosforečnanů.

5.4.3 Vliv přidavku kyseliny citronové

Jak již bylo několikrát zmíněno, na výsledné vlastnosti alginátových gelů může mít kromě jiného také vliv doba gelace. Jelikož při pomalejší gelaci vznikají více homogenní gely, je ve většině případů vhodnější gelaci spíše zpomalit než zrychlit. Jsou však případy, kdy může urychlení gelace hrát v náš prospěch. Jedním ze způsobů, jak urychlit gelaci alginátu síťovaného uhličitanem vápenatým v kombinaci s GDL je okyselení směsi, čímž je urychleno uvolňování vápenatých iontů z uhličitanu. Toho můžeme dosáhnout například vyšším přidavkem GDL či přidavkem libovolné kyseliny. V této kapitole bude sledován vliv přidavku kyseliny citronové (která sama o sobě částečně síťuje alginát sodný) na průběh gelace a výsledné vlastnosti alginátových gelů.

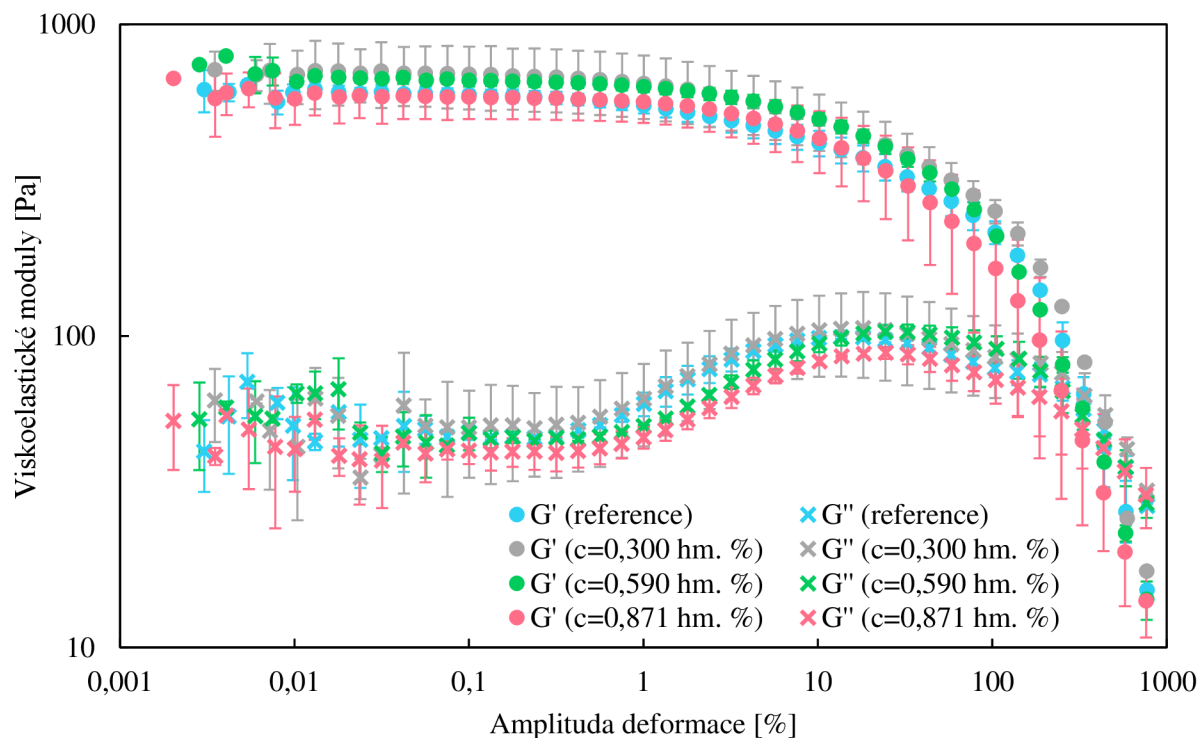
Příprava gelů byla provedena stejným způsobem, jako v předchozí kapitole, s tím rozdílem, že místo fosforečnanu byl přidán stejný objem kyseliny citronové o koncentraci 1 mol/dm³ (pH=1,38). Každý gel byl opět připraven dvakrát a poté byly všechny gely podrobeny amplitudovému testu s deformací ve smyku o parametrech nastavení uvedených v experimentální části – konkrétně v tabulce 1.

Tabulka 17: Množství kyseliny citronové ve směsi při přípravě jednotlivých gelů.

číslo gelu	V _{k.citronové} [ml]	c _{k.citronové} [hm. %]	pH _{gelu} [-]
1	0,0	0,000	2,94
2	0,1	0,300	2,84
3	0,2	0,590	2,78
4	0,3	0,871	2,71
5	0,4	1,142	2,66
6	0,5	1,405	2,58



Obrázek 39: Šířování alginátu uhličitánem vápenatým v kombinaci s GDL – vliv přidavku kyseliny citronové.



Obrázek 40: Výsledky amplitudových testů s deformací ve smyku – zesíťovaný alginát s přidavkem kyseliny citronové.

S přidavkem kyseliny citronové docházelo nejen k urychlení gelace (po vizuální stránce), ale jak můžeme vidět na obrázku 39, byla pozorována intenzivnější synerize (vznikaly objemově menší gely, z jejichž struktury bylo vyloučeno více disperzního prostředí). Ta se však nijak výrazně nepodepsala na mechanických vlastnostech alginátových gelů. Na obrázku 40 vidíme, že s přidavkem kyseliny citronové u jednotlivých gelů sice mírně vzrostly viskoelastické moduly, ale vzhledem k odchylkám měření se viskoelastické vlastnosti gelů nijak zvlášť nelišily. Můžeme tedy říct, že s přidavkem kyseliny citronové sice vznikaly gely o menším objemu, které by tedy měly být mechanicky pevnější (díky nižšímu obsahu disperzního prostředí), ovšem jak již bylo řečeno v kapitole 2.2.2, citrát (sůl kyseliny citronové) váže vápenaté ionty, čímž ve směsi klesne počet vápenatých iontů schopných tvořit polymerní síť a dochází tak k destabilizaci gelu. V tomto případě však pravděpodobně došlo k vyrovnání tohoto destabilizačního jevu ztrátou disperzního prostředí a viskoelastické vlastnosti výsledných gelů se tedy s přidavkem kyseliny citronové nijak zvlášť neměnily.

Vliv přidavku kyseliny citronové byl stejně jako vliv přidavku fosforečnanů sledován také amplitudovými testy s deformací v tlaku o parametrech nastavení uvedených v experimentální části – konkrétně v tabulce 3, avšak ani v tomto případě nebyl ve výsledcích měření pozorován žádný trend, a proto nebyly v práci uvedeny.

5.4.4 Shrnutí poznatků z kapitoly

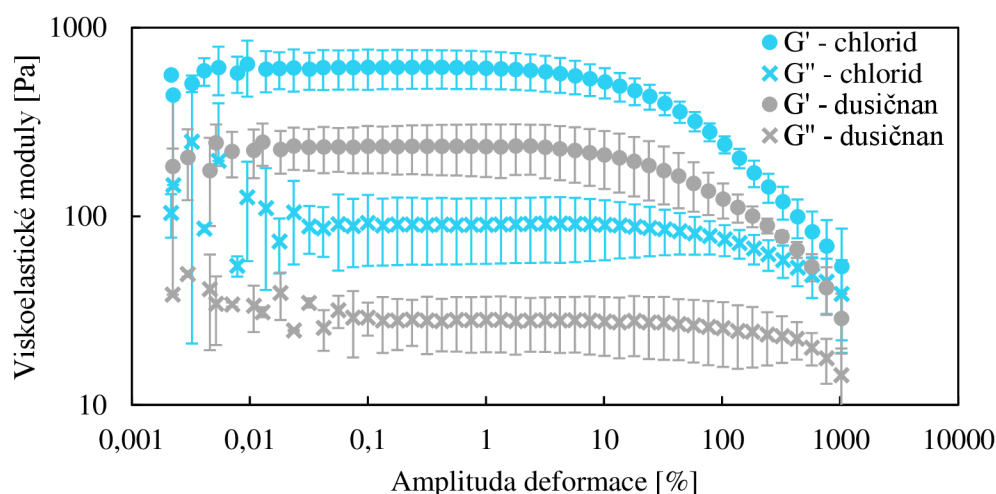
V předchozích kapitolách bylo prokázáno, že na výsledné vlastnosti alginátových gelů má vliv například koncentrace polymeru (čím nižší je koncentrace alginátu, tím nižší je mechanická pevnost výsledného gelu, zatímco například čírost gelů s nižší koncentrací polymeru roste), ale také množství použitého síťovacího činidla, s jehož přidavkem roste stupeň zesítení a tím pádem roste také mechanická pevnost gelů. Výsledné vlastnosti gelů lze však ovlivnit také například rychlostí gelace a důležitou roli hraje jev zvaný synereze, který vede ke vzniku gelů s nižším podílem disperzního prostředí a vyššími hodnotami viskoelastických modulů. To může být v určitém ohledu prospěšné, ale většinou je tento jev nežádoucí. V některých případech jej lze zpomalit přidavkem sacharózy, což se v této práci podařilo pouze u alginátu síťovaného uhličitanem vápenatým v kombinaci s GDL, jejichž hmotnostní poměr odpovídal 1:3 (CaCO_3 : GDL). Ke zpomalení synereze docházelo až do přidavku 0,49 g sacharózy (jejíž koncentrace ve finální gelové kompozici odpovídala 7 hm. %) a poté se začala synereze projevat zase čím dál více a tím pádem byla přítomnost sacharózy spíše kontraproduktivní. To by mohlo být způsobeno tím, že se od přidavku 0,49 g sacharózy začala projevat hygroskopická povaha tohoto disacharidu, což vedlo k ředění disperzního prostředí, které pak snadněji mohlo vytékat ven z polymerní sítě. Výsledky pozorování byly potvrzeny také reologickými experimenty.

V rámci této kapitoly byl sledován také vliv doby gelace. Ta byla prodloužena pomocí přidavku fosforečnanů (K_2HPO_4 či KH_2PO_4) a naopak zkrácena přidavkem $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, přičemž s jednotlivými přidavky fosforečnanů či kyseliny citronové nedocházelo k nijak výrazným změnám ve viskoelastických vlastnostech jednotlivých gelů.

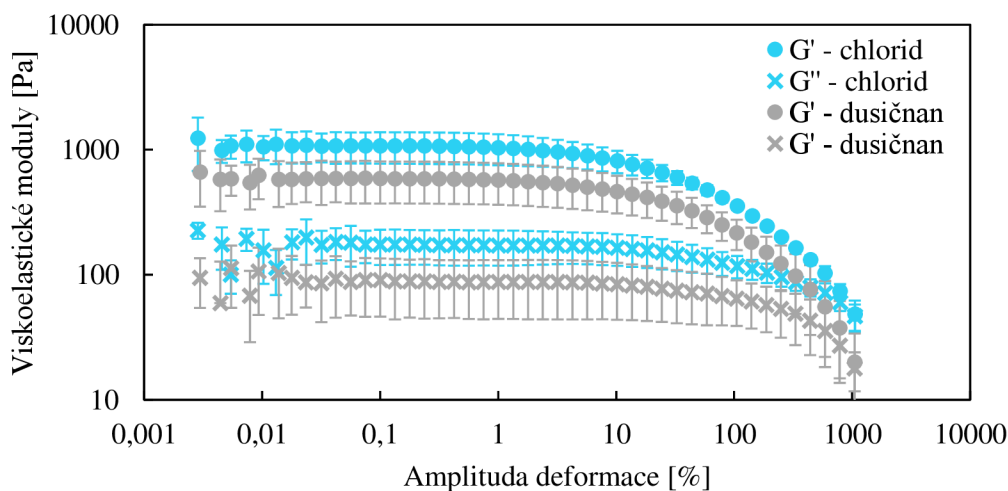
5.5 Bakteriální alginát

Výše zmíněné kapitoly se věnovaly výběru vhodných síťovacích činidel a optimalizací přípravy alginátových gelů, a to vše s ohledem na vlastnosti alginátu produkovaného bakteriemi (*Azotobacter vinelandii*), kterým je věnován projekt probíhající na Fakultě chemické VUT, v rámci kterého je předložená diplomová práce zpracovávána (viz začátek kapitoly 5). Byla tedy vybrána síťovací činidla s jejichž využitím nevznikaly gely o příliš nízkém pH (které by mohlo vést k úmrtí bakterií) a kterými bylo možné zesíťovat alginát o koncentraci menší než 0,4 hm. %. Poznatky z předchozích kapitol byly na závěr diplomové práce aplikovány na samotný alginát produkovaný bakteriemi, kdy bylo provedeno iontové síťování metodou vnitřní a vnější gelace. Kyselina fytová byla vynechána kvůli jejímu příliš nízkému pH. Zároveň bylo vyzkoušeno, zda bude i u bakteriálního alginátu pozorován rozdíl ve viskoelastických vlastnostech při použití rozdílných aniontů během iontového síťování metodou vnější gelace.

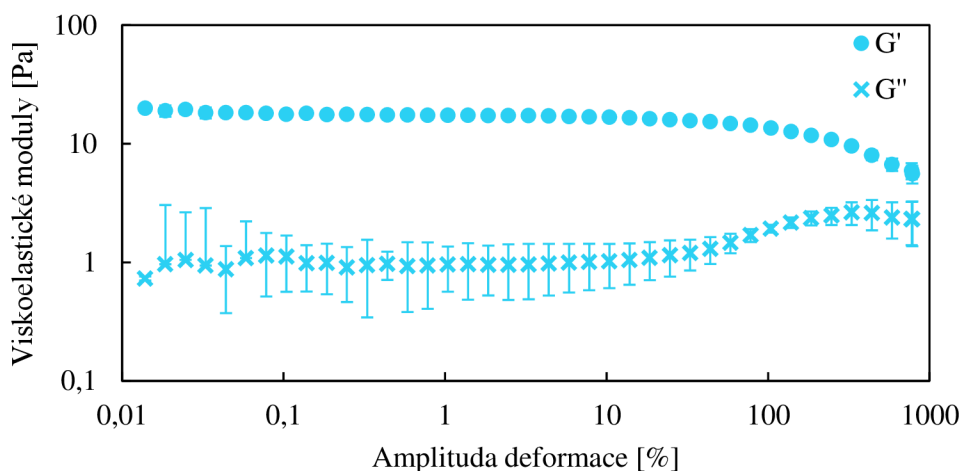
Byly tedy připraveny gely z bakteriálního alginátu síťovaného chloridem vápenatým, dusičnanem vápenatým a uhličitanem vápenatým v kombinaci s GDL. Do 8 jamek kultivační desky bylo naváženo 4,5 g alginátu a k těm byly přidány 2 ml dusičnanu nebo chloridu vápenatého. Do dalších 4 jamek kultivační desky bylo naváženo 5 g alginátu a k těm bylo přimícháno 1,25 ml GDL o koncentraci 1 mol/dm³ (v tomto případě nebylo nutné přidávat uhličitan vápenatý, protože byl již obsažen v kultivačním médiu s alginátem). Hmotnostní poměr CaCO₃ : GDL tedy odpovídal 1:45. Pro každý typ síťovacího činidla tedy byly připraveny celkem 4 gely, které byly následně podrobeny amplitudovému testu s deformací ve smyku o parametrech nastavení uvedených v experimentální části – konkrétně v tabulce 1.



Obrázek 41: Výsledky amplitudových testů bakteriálního alginátu síťovaného chloridem vápenatým a dusičnanem vápenatým – hodinu po přípravě.



Obrázek 42: Výsledky amplitudových testů bakteriálního alginátu síťovaného chloridem vápenatým a dusičnanem vápenatým – den po přípravě.



Obrázek 43: Výsledky amplitudových testů bakteriálního alginátu síťovaného uhličitanem vápenatým v kombinaci s GDL – den po přípravě.



Obrázek 44: Bakteriální alginát síťovaný dusičnanem vápenatým (gel 1), chloridem vápenatým (gel 2) a uhličitanem vápenatým v kombinaci s GDL (gel 3).

Jelikož u gelů dochází ještě několik hodin od zesíťování k dotváření trojrozměrné polymerní sítě a přeskupování polymerních řetězců, byly v předchozích kapitolách všechny gely měřeny až 24 hodin po přípravě a do té doby byly uchovávány v exsikátoru s vodou. Jelikož vlivem metabolických procesů bakterií obsažených v alginátu postupně dochází k jeho rozkladu, byly v tomto případě od každého typu síťovacího činidla dva gely proměřeny hodinu po přípravě (viz obrázek 41) a dva gely den po přípravě (viz obrázek 42). U první várky gelů tedy sice nebylo z hlediska procesu gelace dosaženo termodynamické rovnováhy, ale zároveň bakterie nezačaly rozkládat alginát, zatímco u druhé várky naopak byla dokončena gelace, ale bakterie mohly způsobit štěpení řetězců alginátu na menší fragmenty. Výjimkou byl alginát síťovaný uhličitanem vápenatým v kombinaci s GDL, u kterého docházelo k oddálené gelaci, a tudíž jej nebylo možné změřit v den přípravy, ale pouze den po přípravě (viz obrázek 43).

Tabulka 18 shrnuje výsledky všech provedených amplitudových testů, konkrétně průměrné hodnoty viskoelastických modulů ležících v LVO a pH připravených gelů. Můžeme vidět, že při iontovém síťování metodou vnější gelace byl i u bakteriálního alginátu pozorován vliv typu aniontu na výsledné mechanické vlastnosti připravených gelů. Při použití stejného objemu chloridu a dusičnanu vápenatého o stejných molárních koncentracích docházelo v případě chloridu vápenatého ke vzniku mechanicky pevnějších gelů než v případě alginátu síťovaného dusičnanem vápenatým. Tento trend byl pozorován jak u gelů měřených hodinu po přípravě, tak u gelů měřených den po přípravě.

Při síťování bakteriálního alginátu uhličitanem vápenatým (přítomným v kultivačním médiu) v kombinaci s GDL docházelo k pomalé gelaci a vznikaly rosolovité gely s nízkou mechanickou pevností, o čemž svědčí nízké hodnoty viskoelastických modulů. Do budoucna by tedy bylo vhodné před samotným síťováním alginátu produkovaného bakteriemi zvýšit koncentraci uhličitanu vápenatého ve směsi.

Tabulka 18: Průměr viskoelastických modulů ležících v LVO u bakteriálního alginátu.

síťovací činitlo	hodinu po přípravě			den po přípravě		
	G' [Pa]	G'' [Pa]	pH _{gelu} [-]	G' [Pa]	G'' [Pa]	pH _{gelu} [-]
CaCl ₂	614±143	91±35	6,35	1 074±300	178±56	6,89
Ca(NO ₃) ₂	234±67	28±8	6,44	586±216	90±44	6,60
CaCO ₃ + GDL	-	-	-	18±10	1±0,6	3,06

Jelikož je koncentrace alginátu produkovaného bakteriemi variabilní a není přesně známá (odhaduje se někde v rozmezí 0,25–0,35 hm. %), nebylo možné porovnat výsledky síťování alginátu produkovaného bakteriemi s výsledky síťování komerčního alginátu. Cílem této kapitoly bylo ověřit, zda je možné bakteriální alginát zesíťovat optimalizovanými postupy převzatými z předchozích kapitol předložené diplomové práce. Ukázalo se, že všechny gelační postupy, jejichž optimalizace byla v rámci této práce provedena na komerčních alginátech (s výjimkou síťování alginátu kyselinou fytovou, která má příliš nízké pH a není tedy pro přípravu gelů z bakteriálního alginátu vhodná), byly aplikovatelné také na bakteriální alginát.

6 ZÁVĚR

Hlavním cílem předložené diplomové práce byla optimalizace přípravy alginátových gelů s možností ovlivnění jejich finálních aplikačních vlastností (transparentnost, synereze, viskoelastické vlastnosti, aj.). Prvním a také nejdůležitějším krokem byl výběr vhodných síťovacích činidel, vedoucích k zesíťování alginátu sodného. Následovala optimalizace přípravy alginátových gelů vybranými gelačními postupy, jejich charakterizace vhodnými instrumentálními technikami především s ohledem na mechanické vlastnosti a na závěr diplomové práce byl sledován vliv nejrůznějších faktorů na výsledné aplikační vlastnosti alginátových gelů (koncentrace polymeru, množství použitého síťovacího činidla, rychlost gelace, rychlost míchání směsi, aj.).

Literární rešerše se zaměřovala na výběr vhodných gelačních postupů vedoucích ke gelaci alginátu. Byly tedy vybrány celkem tři gelační postupy, a to iontové síťování metodou vnější gelace, iontové síťování metodou vnitřní gelace a síťování alginátu kyselinou fytoovou, která je schopná tvořit jak vodíkové můstky, tak iontovou vazbu. Aby bylo možné po přípravě gelů provést charakterizaci jejich viskoelastických vlastností, bylo nejprve nutné provést optimalizaci měření vybraných reometrických testů. V rámci experimentální části tedy byla provedena optimalizace oscilačních amplitudových testů s deformací v tlaku a zároveň bylo ověřeno, zda bude nastavení oscilačních amplitudových testů s deformací ve smyku běžně používané u gelových vzorků podobného charakteru přenosné také na alginátové gely. Zajímavou součástí experimentální části byla také optimalizace kompresních testů, jež byla provedena na alginátových kuličkách a jejíž poznatky sice nebyly využity v rámci této diplomové práce, ale byly aplikovány v dalších závěrečných pracích prováděných na Fakultě chemické VUT.

Při výběru vhodných síťovacích činidel bylo nutné vzít v úvahu, že bakterie produkující alginát, jimž je na pracovišti Fakulty chemické VUT v současnosti věnována velká pozornost a jimž se věnuje projekt základního výzkumu v rámci kterého je tato práce zpracovávána, produkují tento biopolymer pouze o poměrně nízké koncentraci (méně než 0,4 hm. %). Bylo tedy nutné najít síťovací činidla, která dokážou alginát o tak nízké koncentraci zesíťovat. Veškeré experimenty prováděné v rámci této diplomové práce byly provedeny na komerčně dostupných alginátech a poznatky z těchto experimentů byly následně aplikovány na alginát získaný bakteriální produkcí. Jelikož je cílem zmíněného projektu enkapsulace bakterií v gelu z alginátu produkovaného samotnými bakteriemi, bylo nutné vzít v potaz také výsledné pH připravených gelů. To nesmí být příliš nízké ani příliš vysoké, jinak by došlo k usmrcení bakterií.

I když se v rámci iontového síťování alginátu metodou vnější gelace podařilo najít hned několik vhodných síťovacích činidel, nakonec byly vybrány pouze čtyři vápenaté soli (chlorid, laktát, octan a dusičnan), na kterých byl současně s optimalizací přípravy alginátových gelů také zkoumán vliv aniontů na výsledné mechanické vlastnosti těchto gelů. Důvodem, proč byl zkoumán vliv aniontů na gelaci alginátu byl ten, že se v rámci výběru vhodných síťovacích činidel pro síťování alginátu nepodařilo tento biopolymer zesíťovat žádným ze síranů nezávisle na kationtu. Bylo prokázáno, že typ použitého aniontu má v některých případech opravdu vliv na gelaci a mechanické vlastnosti alginátových gelů. Nejen že se při výběru vhodných síťovacích činidel nepodařilo zesíťovat alginát ani jednou solí ze skupiny síranů, ale výsledky

reometrických experimentů také ukázaly, že síťováním alginátu dusičnanem vápenatým vznikají gely s nižší mechanickou pevností než v případě zbylých třech vápenatých solí. Toto tvrzení bylo podpořeno také výsledky síťování bakteriálního alginátu, kde taktéž docházelo v případě síťování alginátu chloridem vápenatým ke vzniku mechanicky pevnějších gelů než v případě síťování alginátu dusičnanem vápenatým.

Iontové síťování alginátu metodou vnitřní gelace bylo v rámci této práce provedeno pomocí uhličitanu vápenatého (jež je obsažen v kultivačním médiu používaném při kultivaci bakterií produkujících alginát sodný) v kombinaci s D-glukono- δ -laktonem. U tohoto typu gelů byly zkoumány nejen jejich mechanické vlastnosti, ale také průběh a doba gelace.

Posledním provedeným gelačním postupem v této práci bylo síťování alginátu kyselinou fytovou, ovšem tímto způsobem vznikaly gely s příliš nízkým pH. Pufrováním celé kompozice při gelaci alginátu sice došlo ke zvýšení pH, ovšem po přidavku kyseliny fytové nedošlo ke vzniku gelů. Sice se pH alginátových gelů na bázi kyseliny fytové podařilo zvýšit promýváním v ultračisté vodě, ovšem gely natolik nabobtnaly, že jakékoliv následná manipulace s nimi téměř nebyla možná. Zároveň se přijutím disperzního prostředí zásadním způsobem změnilo viskoelastické vlastnosti připravených gelů.

Další kapitola praktické části předložené diplomové práce byla zaměřena na ovlivnění finálních aplikačních vlastností alginátových gelů. V rámci této kapitoly bylo prokázáno, že na výsledné vlastnosti gelů má vliv například doba gelace a důležitou roli hraje také jev zvaný synereze, který je ve většině případů nežádoucí (například použijeme-li alginátový gel jako nosič léčiv, může vlivem synereze docházet k nekontrolovatelnému uvolňování léčivé látky z gelové matrice). Ten lze v některých případech zpomalit přidavkem sacharózy, což se v této diplomové práci podařilo pouze u alginátu zesíťovaného uhličitanem vápenatým v kombinaci s GDL o hmotnostním poměru 1:3 (CaCO_3 : GDL).

Doba gelace byla řízena přidavkem fosforečnanů či kyseliny citronové. Zatímco přítomnost fosforečnanů vedla k prodloužení doby gelace a ke vzniku gelů s vyšším obsahem disperzního prostředí, přidavkem kyseliny citronové došlo k urychlení gelace a ke vzniku menších (z hlediska objemu) gelů s nižším obsahem disperzního prostředí. Výsledky experimentů prováděných v předchozích kapitolách však ukázaly, že lze výsledné vlastnosti alginátových gelů řídit také například koncentrací polymeru. Čím nižší je koncentrace alginátu, tím nižší je mechanická pevnost výsledného gelu, zatímco například čirost gelů s nižší koncentrací polymeru roste. Důležitou roli má také množství použitého síťovacího činidla, s jehož přidavkem roste stupeň zesíťování a tím pádem roste také mechanická pevnost gelů. Ovlivnit můžeme také například homogenitu výsledného gelu, a to nejen rychlostí gelace, kdy pomalejší gelace vede ke vzniku více homogenních gelů než rychlejší gelace, ale také způsobem přikapávání síťovacího činidla (rychlostí přikapávání, rychlostí míchání směsi, aj.). Na závěr diplomové bylo provedeno také síťování samotného bakteriálního alginátu a charakterizace mechanických vlastností připravených gelů.

Kromě řady optimalizovaných gelačních postupů či reometrických testů diplomová práce nabízí také mnoho námětů pro možné budoucí závěrečné práce. Ty by se mohly zaměřit například na síťování bakteriálního alginátu o variabilních koncentracích či molekulových hmotnostech, kde by mohly být aplikovány optimalizované gelační postupy předložené v této diplomové práci.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005.
- [2] OKADA, Kiyoshi. Xerogels: Preparation and Characterization. *Encyclopedia of Surface and Colloid Science, Third Edition*. 2015, 2015-12-04, 7707-7718.
- [3] BANERJEE, Soumya a Suvendu BHATTACHARYA. Food Gels: Gelling Process and New Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2012, **52**(4), 334-346.
- [4] CHAMKOURI, Hossein. *A Review of Hydrogels, Their Properties and Applications in Medicine*. 2021, 2021-2-3, **11**(6), 485-493.
- [5] CHEN, Yu. Properties and development of hydrogels. *Hydrogels Based on Natural Polymers*. Elsevier, 2020, 3-16.
- [6] PATEL, Panchami a Prachi THAREJA. Hydrogels differentiated by length scales: A review of biopolymer-based hydrogel preparation methods, characterization techniques, and targeted applications. *European Polymer Journal*. 2022, **163**.
- [7] HO, Tzu-Chuan, Chin-Chuan CHANG, Hung-Pin CHAN, et al. Hydrogels: Properties and Applications in Biomedicine. *Molecules*. 2022, **27**(9).
- [8] SAVIĆ GAJIĆ, Ivana M., Ivan M. SAVIĆ a Zorica SVIRČEV. Preparation and Characterization of Alginate Hydrogels with High Water-Retaining Capacity. *Polymers*. 2023, **15**(12).
- [9] RAMDHAN, Tezar, Su Hung CHING, Sangeeta PRAKASH a Bhesh BHANDARI. Time dependent gelling properties of cuboid alginate gels made by external gelation method: Effects of alginate-CaCl₂ solution ratios and pH. *Food Hydrocolloids*. 2019, **90**, 232-240.
- [10] ED-DAOUI, Abderrahim a Patrick SNABRE. Poroviscoelasticity and compression-softening of agarose hydrogels. *Rheologica Acta*. 2021, **60**(6-7), 327-351.
- [11] PAN, Peng, Jian WANG, Xi WANG, Ye KANG, Xinding YU, Tiantian CHEN, Yulin HAO a Wentao LIU. Physically cross-linked chitosan gel with tunable mechanics and biodegradability for tissue engineering scaffold. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024, **257**.
- [12] QIAO, Pu, Kaiyuan SHI, Yanlong WANG, Bo LI, Lei SU, Ke ZHANG, Katsuyoshi NISHINARI a Guoqiang YANG. Ultrafast gelation of hyaluronan hydrogels via alternate compression-decompression. *Food Hydrocolloids*. 2023, **141**.
- [13] WANG, Jiawei, Weili QIN, Yanping ZHONG, et al. Injectable collagen hydrogel combines human umbilical cord mesenchymal stem cells to promote endometrial regeneration in rats with thin endometrium. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024, **254**.

- [14] ANNABI, Nasim, Suzanne M. MITHIEUX, Elizabeth A. BOUGHTON, Andrew J. RUYS, Anthony S. WEISS a Fariba DEHGHANI. Synthesis of highly porous crosslinked elastin hydrogels and their interaction with fibroblasts in vitro. *Biomaterials*. 2009, **30**(27), 4550-4557.
- [15] YIN, Rui, Chen ZHANG, Youyou CHEN, et al. Transient, printable and recyclable gelatin hydrogels with enhanced mechanical sensing and electromagnetic shielding performance by incorporation of reduced graphene oxide. *Chemical Engineering Journal*. 2023, **475**.
- [16] FATTAHI, Niloufar, Jeffrey REED, Evan HERONEMUS, Priyasha FERNANDO, Ryan HANSEN a Prathap PARAMESWARAN. Polyethylene glycol hydrogel coatings for protection of electroactive bacteria against chemical shocks. *Bioelectrochemistry*. 2024, **156**.
- [17] XIANG, Chenxing, Ling LEI, Huiming NING, et al. A self-reinforced tough and multifunctional polyvinyl alcohol fabric composite hydrogel. *Composites Science and Technology*. 2023, **243**.
- [18] DEHKORDI, Narges Karimzadeh, Shahrokh SHOJAEI, Azadeh ASEFNEJAD, Kamran HASSANI a Soheila Zamanlui BENISI. Investigation of mechanical properties and the effect of volume fraction of polyacrylamide hydrogel with molecular dynamics simulation. *Results in Physics*. 2024, **57**.
- [19] HO, Tzu-Chuan, Chin-Chuan CHANG, Hung-Pin CHAN, et al. Hydrogels: Properties and Applications in Biomedicine. *Molecules*. 2022, **27**(9).
- [20] ALI, Fayaz, Imran KHAN, Jianmin CHEN, Kalsoom AKHTAR, Esraa M. BAKHSH a Sher Bahadar KHAN. Emerging Fabrication Strategies of Hydrogels and Its Applications. *Gels*. 2022, **8**(4).
- [21] YIXUE, Su, Chu BIN, Gao YUAN, Wu CHAOXI, Zhang LINGMIN, Chen PENG, Wang XIAOYING a Tang SHUNQING. Modification of agarose with carboxylation and grafting dopamine for promotion of its cell-adhesiveness. *Carbohydrate Polymers*. 2013, **92**(2), 2245-2251.
- [22] CHEN, Zihao, Xinpei YAO, Lu LIU, et al. Blood coagulation evaluation of N -alkylated chitosan. *Carbohydrate Polymers*. 2017, **173**, 259-268.
- [23] LIU, Changkun, Yiguang WU, Liyan ZHAO a Xinzheng HUANG. Preparation of acetylsalicylic acid-acylated chitosan as a novel polymeric drug for drug controlled release. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015, **78**, 189-194.
- [24] ZHAO, Di, JianFeng XU, Lu WANG, JianJia DU, KeDong DONG, CaiFei WANG a XiangDong LIU. Study of two chitosan derivatives phosphorylated at hydroxyl or amino groups for application as flocculants. *Journal of Applied Polymer Science*. 2012, 2012-09-25, **125**(S2).
- [25] DIMASSI, Syrine, Nicolas TABARY, Feng CHAI, Nicolas BLANCHEMAIN a Bernard MARTEL. Sulfonated and sulfated chitosan derivatives for biomedical applications: A review. *Carbohydrate Polymers*. 2018, **202**, 382-396.

- [26] ROL, Fleur, Cécile SILLARD, Michel BARDET, et al. Cellulose phosphorylation comparison and analysis of phosphate position on cellulose fibers. *Carbohydrate Polymers*. 2020, **229**.
- [27] SAUNDERS, K. J. Poly(vinyl chloride) and related polymers. *Organic Polymer Chemistry*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1973, 84-103.
- [28] HE, Yuhang, Hua KE a Yangcheng LU. Alcoholysis of ethylene-vinyl acetate copolymer catalyzed by alkaline: A kinetic study based on in situ FTIR spectroscopy. *Chemical Engineering Journal*. 2023, **464**.
- [29] BAHRAM, Morteza, Naimeh MOHSENI a Mehdi MOGHTADER. An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications. *Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels*. InTech, 2016, 2016-08-24.
- [30] BASHIR, Shahid, Maryam HINA, Javed IQBAL, et al. Fundamental Concepts of Hydrogels: Synthesis, Properties, and Their Applications. *Polymers*. 2020, **12**(11).
- [31] MUKHERJEE, Kaushik, Pallobi DUTTA, Arpita SAHA, Sourav DEY, Vivek SAHU, Hemant BADWAIK a Tapan Kumar GIRI. Alginate based semi-IPN and IPN hydrogel for drug delivery and regenerative medicine. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2024, **92**.
- [32] KHAN, Faisal, Mohd. ATIF, Mohd HASEEN, Shahid KAMAL, Mohd Shoeb KHAN, Shumaila SHAHID a Shahab A. A. NAMI. Synthesis, classification and properties of hydrogels: their applications in drug delivery and agriculture. *Journal of Materials Chemistry B*. 2022, 2022-01-05, **10**(2), 170-203.
- [33] SÁNCHEZ-CID, Pablo, Mercedes JIMÉNEZ-ROSADO, Alberto ROMERO a Víctor PÉREZ-PUYANA. Novel Trends in Hydrogel Development for Biomedical Applications: A Review. *Polymers*. 2022, **14**(15).
- [34] SONG, Mengshan, Jingfeng WANG, Jiabei HE, Dongxiao KAN, Kaiyun CHEN a Jialu LU. Synthesis of Hydrogels and Their Progress in Environmental Remediation and Antimicrobial Application. *Gels*. 2023, **9**(1).
- [35] RANGANATHAN, Nalini, R. JOSEPH BENSINGH, M. ABDUL KADER a Sanjay K. NAYAK. Synthesis and Properties of Hydrogels Prepared by Various Polymerization Reaction Systems. *Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels*. Cham: Springer International Publishing, 2019, 487-511. *Polymers and Polymeric Composites: A Reference Series*.
- [36] HU, Weikang, Zijian WANG, Yu XIAO, Shengmin ZHANG a Jianglin WANG. Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels. *Biomaterials Science*. 2019, 2019-02-26, **7**(3), 843-855.
- [37] PAIVA, Mayara T. P., João Otávio F. KISHIMA, Jaquellyne B. M. D. SILVA, Janaina MANTOVAN, Franciely G. COLODI a Suzana MALI. *Crosslinking Methods in Polysaccharide-Based Hydrogels for Drug Delivery Systems*.

- [38] TANG, Shuxian, Lin ZHAO, Jingjing YUAN, Yu CHEN a Yilin LENG. Physical hydrogels based on natural polymers. *Hydrogels Based on Natural Polymers*. Elsevier, 2020, 51-89.
- [39] SAVIĆ GAJIĆ, Ivana M., Ivan M. SAVIĆ a Zorica SVIRČEV. Preparation and Characterization of Alginate Hydrogels with High Water-Retaining Capacity. *Polymers*. 2023, **15**(12).
- [40] RAMDHAN, Tezar, Su Hung CHING, Sangeeta PRAKASH a Bhesh BHANDARI. *Physical and mechanical properties of alginate based composite gels*. 2020, **106**, 150-159.
- [41] PAQUES, Jerome P., Erik VAN DER LINDEN, Cees J.M. VAN RIJN a Leonard M.C. SAGIS. Preparation methods of alginate nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2014, **209**, 163-171.
- [42] SAINI, K. Preparation method, Properties and Crosslinking of hydrogel: a review. *PharmaTutor*. 2017, (5(1), 27-36.
- [43] OFFEDDU, G. S., E. AXPE, B. A. C. HARLEY a M. L. OYEN. Relationship between permeability and diffusivity in polyethylene glycol hydrogels. *AIP Advances*. 2018, 2018-10-01, **8**(10).
- [44] DE ANDRADE, Luana Alves, Carlos Henrique Barbosa SANTOS, Edvan Teciano FREZARIN, Luziane Ramos SALES a Everlon Cid RIGOBELLO. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria for Sustainable Agricultural Production. *Microorganisms*. 2023, **11**(4).
- [45] PEREIRA, Jéssica F., André Luiz M. OLIVEIRA, Daniele SARTORI, Fabio YAMASHITA a Suzana MALI. Perspectives on the Use of Biopolymeric Matrices as Carriers for Plant-Growth Promoting Bacteria in Agricultural Systems. *Microorganisms*. 2023, **11**(2).
- [46] NAGRALE, D. T., A. CHAURASIA, S. KUMAR, et al. PGPR: the treasure of multifarious beneficial microorganisms for nutrient mobilization, pest biocontrol and plant growth promotion in field crops. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2023, **39**(4).
- [47] VEJAN, Pravin, Rosazlin ABDULLAH, Tumirah KHADIRAN, Salmah ISMAIL a Amru NASRULHAQ BOYCE. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review. *Molecules*. 2016, **21**(5).
- [48] SZOPA, Daniel, Małgorzata MIELCZAREK, Dawid SKRZYPCZAK, Grzegorz IZYDORCZYK, Katarzyna MIKULA, Katarzyna CHOJNACKA a Anna WITEK-KROWIAK. Encapsulation efficiency and survival of plant growth-promoting microorganisms in an alginate-based matrix – A systematic review and protocol for a practical approach. *Industrial Crops and Products*. 2022, **181**.
- [49] VAN DOMMELEN, Anne a Jos VANDERLEYDEN. Associative Nitrogen Fixation. *Biology of the Nitrogen Cycle*. Elsevier, 2007, 179-192.
- [50] ZHANG, Hengtong, Junqiu CHENG a Qiang AO. Preparation of Alginate-Based Biomaterials and Their Applications in Biomedicine. *Marine Drugs*. 2021, **19**(5).

- [51] RYCHEN, Guido, Gabriele AQUILINA, Giovanna AZIMONTI, et al. Safety and efficacy of sodium and potassium alginate for pets, other non food-producing animals and fish. *EFSA Journal*. 2017, **15**(7).
- [52] MEZGER, Thomas. *Applied rheology: with Joe Flow on rheology road*. 5th edition. Graz: Anton Paar, 2015.
- [53] 3. Rotational tests. *The Rheology Handbook*. Vincentz Network, 2019, 2019-12-31, 33-88.
- [54] ANTON PAAR. *Basics of rheology*. Dostupné z: <https://wiki.anton-paar.com/en/basics-of-rheology/#rotational-tests-and-viscosity>
- [55] KOL, Rita, Tobias DE SOMER, Dagmar R. D'HOOGHE, Fabian KNAPPICH, Kim RAGAERT, Dimitris S. ACHILIAS a Steven DE MEESTER. State-Of-The-Art Quantification of Polymer Solution Viscosity for Plastic Waste Recycling. *ChemSusChem*. 2021, 2021-10-05, **14**(19), 4071-4102.
- [56] HYUN, Kyu, Manfred WILHELM, Christopher O. KLEIN, et al. A review of nonlinear oscillatory shear tests: Analysis and application of large amplitude oscillatory shear (LAOS). *Progress in Polymer Science*. 2011, **36**(12), 1697-1753.
- [57] RIEDEL, Clement, Angel ALEGRIA, Juan COLMENERO a Phillipe TORDJEM. Polymer Rheology by Dielectric Spectroscopy. *Rheology*. InTech, 2012, 2012-03-07.
- [58] MATRICARDI, Pietro, Franco ALHAIQUE a Tommasina COVIELLO. *Polysaccharide Hydrogels: Characterization and Biomedical Applications*. 2016.
- [59] Basics of Dynamic Mechanical Analysis (DMA). *Anton Paar*. Dostupné z: <https://wiki.anton-paar.com/en/basics-of-dynamic-mechanical-analysis-dma/>
- [60] PERPELYUK, Maryna, LiKang CHIN, Xuan CAO, Anne VAN OOSTEN, Vivek B. SHENOY, Paul A. JANMEY, Rebecca G. WELLS a Sanjay KUMAR. Normal and Fibrotic Rat Livers Demonstrate Shear Strain Softening and Compression Stiffening: A Model for Soft Tissue Mechanics. *PLOS ONE*. 2016, 2016-1-6, **11**(1).
- [61] Hong Son Pham, Xuan Hung Vu a Van Tien Phan. *Squeeze Flow of a Newtonian Fluid under Different Test Speeds*. **2020**.
- [62] LEE, Donghee, Haipeng ZHANG a Sangjin RYU. Elastic Modulus Measurement of Hydrogels. *Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels*. Cham: Springer International Publishing, 2019, 865-884. *Polymers and Polymeric Composites: A Reference Series*.
- [63] QIN, Yimin, Jinju JIANG, Lili ZHAO, Jian ZHANG a Fahe WANG. Applications of Alginate as a Functional Food Ingredient. *Biopolymers for Food Design*. Elsevier, 2018, 409-429.
- [64] BERARDI, Alberto, Sonja BAUHUBER, Obada SAWAFTA a Gernot WARNKE. *Alginates as tablet disintegrants: Understanding disintegration mechanisms and defining ranges of applications*.
- [65] SENTURK PARREIDT, Tugce, Kajetan MÜLLER a Markus SCHMID. Alginate-Based Edible Films and Coatings for Food Packaging Applications. *Foods*. 2018, **7**(10).

- [66] LEE, Kuen Yong a David J. MOONEY. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 2012, **37**(1), 106-126.
- [67] ADERIBIGBE, Blessing a Buhle BUYANA. Alginate in Wound Dressings. *Pharmaceutics*. 2018, **10**(2).
- [68] LIU, Guiting, Hongxun ZHOU, Hong WU, Rong CHEN a Shaoyun GUO. Preparation of alginate hydrogels through solution extrusion and the release behavior of different drugs. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2016, 2016-12-11, **27**(18), 1808-1823.
- [69] TOPUZ, Fuat, Artur HENKE, Walter RICHTERING a Jürgen GROLL. Magnesium ions and alginate do form hydrogels: a rheological study. *Soft Matter*. 2012, **8**(18).
- [70] KUO, Catherine K a Peter X MA. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials*. 2001, **22**(6), 511-521.
- [71] PELAEZ, CLAIRE a MARCUS KAREL. IMPROVED METHOD FOR PREPARATION OF FRUIT-SIMULATING ALGINATE GELS. *Journal of Food Processing and Preservation*. 1981, **5**(2), 63-81.
- [72] NITA, Loredana Elena, Aurica P. CHIRIAC, Alina GHILAN, Alina Gabriela RUSU, Nita TUDORACHI a Daniel TIMPU. Alginate enriched with phytic acid for hydrogels preparation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021, **181**, 561-571.
- [73] BONINO, Christopher A., Julia E. SAMOREZOV, Oju JEON, Eben ALSBERG a Saad A. KHAN. Real-time in situ rheology of alginate hydrogel photocrosslinking. *Soft Matter*. 2011, **7**(24).
- [74] NISHINARI, Katsuyoshi a Yapeng FANG. *Sucrose release from polysaccharide gels*. 2016, **7**(5), 2130-2146.
- [75] KANEDA, Isamu. Effect of Sweeteners on the Solvent Transport Behaviour of Mechanically-Constrained Agarose Gels. *Gels*. 2018, **4**(1).
- [76] DRURY, Jeanie L., Robert G. DENNIS a David J. MOONEY. The tensile properties of alginate hydrogels. *Biomaterials*. 2004, **25**(16), 3187-3199.
- [77] KRÝSLOVÁ, Jana. *Využití různých gelačních strategií při vývoji nové generace bioinokulantů*. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/148674>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petr Sedláček.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 Použité zkratky

semi-IPN	semi-interpenetrující polymerní síť (<i>semi-interpenetrating polymer network</i>)
IPN	interpenetrující polymerní síť (<i>interpenetrating polymer network</i>)
PGPR	rhizobakterie podporující růst rostlin (<i>plant growth-promoting bacteria</i>)
LVO	lineární viskoelastická oblast
GDL	D-glukono- δ -lakton
UV	ultrafialová (<i>ultraviolet</i>)
GAČR	Grantová agentura České republiky
RPM	počet otáček za minutu (<i>round per minute</i>)
KF	kyselina fytová

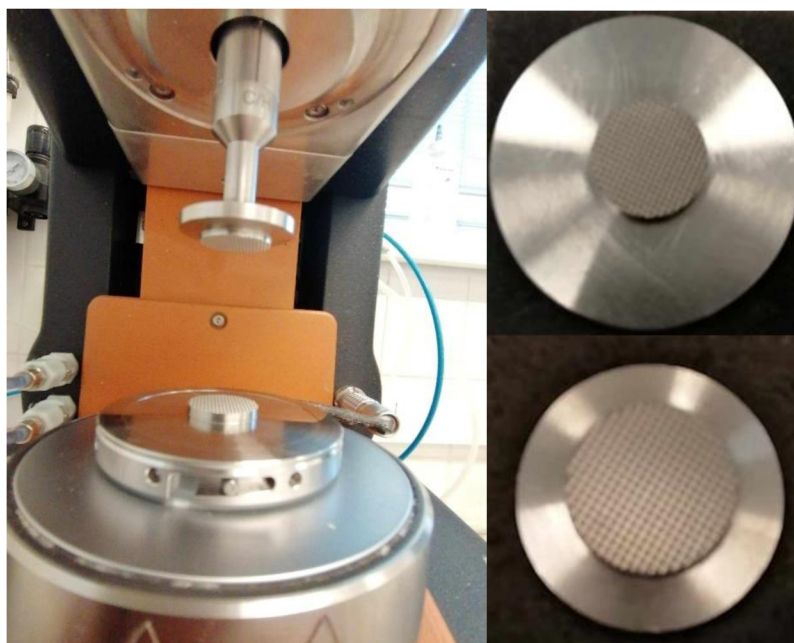
8.2 Použité symboly

G'	paměťový modul (deformace ve smyku)	Pa
G''	ztrátový modul (deformace ve smyku)	Pa
E'	paměťový modul (deformace v tlaku)	Pa
E''	ztrátový modul (deformace v tlaku)	Pa
η	dynamická viskozita	Pa·s
$\dot{\gamma}$	smyková rychlost	s ⁻¹
V	objem	ml
m	hmotnost	g
w	hmotnostní koncentrace	hm. %
c	molární koncentrace	mol/dm ³
M	molární hmotnost	g/mol

9 PŘÍLOHY



Příloha 1: Reometr Discovery HR-2 (TA Instruments).



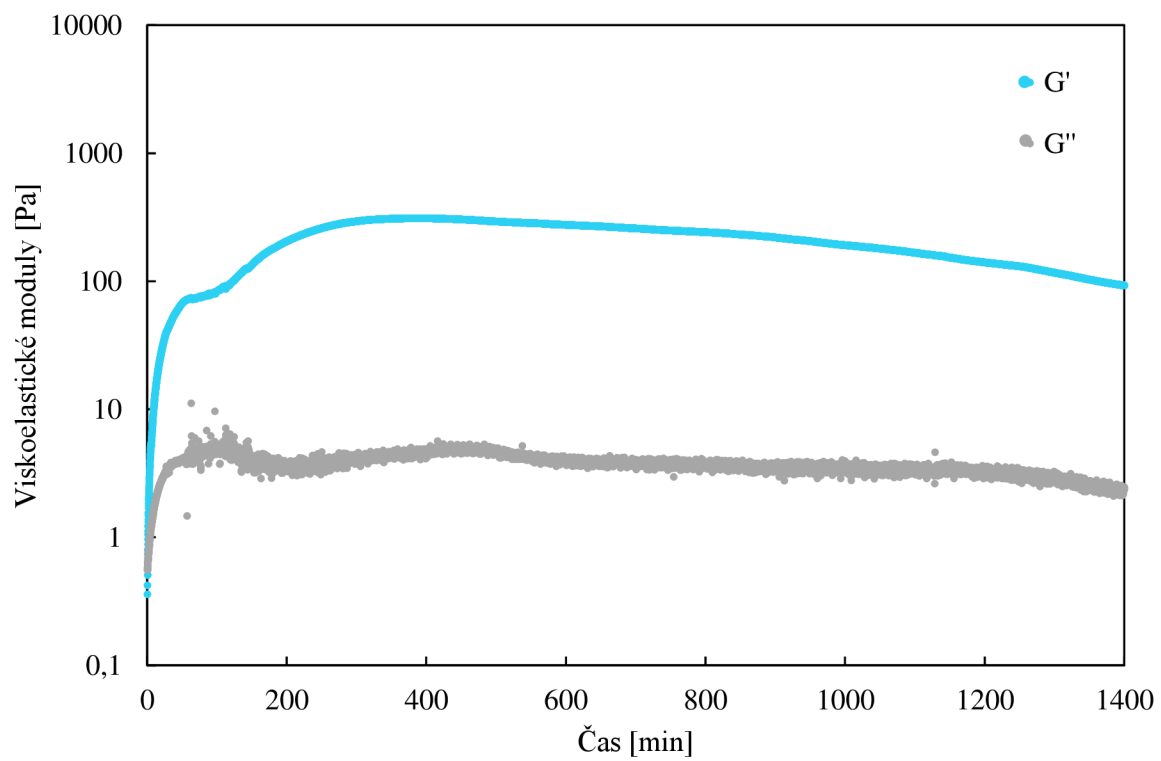
Příloha 2: Měřicí geometrie se zdrsňným povrchem.



Příloha 3: Měřicí geometrie válec-válec.



Příloha 4: Hustoměr DMA 4500 (Anton Paar).



Příloha 5: Kompletní průběh časového testu 1% alginátu síťovaného uhličitanem vápenatým v kombinaci s GDL.