



Bakalářská práce

Studium bodu gelace pomocí metod dynamického rozptylu světla

Studijní program:

B0719A130001 Nanotechnologie

Autor práce:

Pavel Ivo Sedláček

Vedoucí práce:

Ing. Štěpán Kunc, Ph.D.

Katedra fyziky

Liberec 2024



Zadání bakalářské práce

Studium bodu gelace pomocí metod dynamického rozptylu světla

<i>Jméno a příjmení:</i>	Pavel Ivo Sedláček
<i>Osobní číslo:</i>	M21000084
<i>Studijní program:</i>	B0719A130001 Nanotechnologie
<i>Zadávací katedra:</i>	Katedra fyziky
<i>Akademický rok:</i>	2023/2024

Zásady pro vypracování:

1. Zpracovat literární rešerši se zaměřím na využití metod dynamického rozptylu světla (DLS, MSDWS a DWS) pro studium bodu gelace.
2. Na základě zpracované rešerše navrhnout vhodný postup měření bodu gelace pomocí metod dynamického rozptylu světla dostupných na KFY.
3. Na základě rešerše navrhnout vhodný polymerní systém pro ověření bodu gelace.
4. Ověřit aplikovatelnost zvolených metod pro studium sol-gel procesu vybraných materiálů.

Rozsah grafických prací: podle potřeby
Rozsah pracovní zprávy: 40-50 stran
Forma zpracování práce: tištěná/elektronická
Jazyk práce: čeština

Seznam odborné literatury:

1. Saleh, B. E. A. – Teich, M. C.: Základy fotoniky I,II,III,IV MATFYZPRESS, Praha 1994-95.
2. ØGENDAL, Lars.: Light Scattering Demystified Theory and Practice, University of Copenhagen, 2019
3. D. J. Pine; D. A. Weitz; P. M. Chaikin; E. Herbolzheimer (1988). "Diffusing wave spectroscopy". Physical Review Letters. 60 (12): 1134-1137.
4. F. Scheffold; et al. (2004). "New trends in optical microrheology of complex fluids and gels" (PDF). Progress in Colloid and Polymer Science. 123: 141-146.
5. D. A. Weitz; D. J. Pine (1993). "Diffusing-wave spectroscopy". In W. Brown (ed.). Dynamic Light Scattering. Clarendon Press. pp. 652-720.
6. M. Shibayama et al. (2002). Gel Formation Analyses by Dynamic Light Scattering, The Chem. Soc. of Japan, 75,641-659(2002)

Vedoucí práce: Ing. Štěpán Kunc, Ph.D.
Katedra fyziky

Datum zadání práce: 4. října 2023
Předpokládaný termín odevzdání: 14. května 2024

prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D.
děkan

L.S.

prof. Ing. Josef Šedlbauer, Ph.D.
garant studijního programu

V Liberci dne 4. října 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně jako původní dílo s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Jsem si vědom toho, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu Technické univerzity v Liberci.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti Technickou univerzitu v Liberci; v tomto případě má Technická univerzita v Liberci právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Současně čestně prohlašuji, že text elektronické podoby práce vložený do IS/STAG se shoduje s textem tištěné podoby práce.

Beru na vědomí, že má bakalářská práce bude zveřejněna Technickou univerzitou v Liberci v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů.

Jsem si vědom následků, které podle zákona o vysokých školách mohou vyplývat z porušení tohoto prohlášení.

Studium bodu gelace pomocí metod dynamického rozptylu světla

Abstrakt

Cílem této práce bylo vyzkoušet využití metod dynamického rozptylu světla k určení bodu gelace daného systému. Nejprve byly představeny teoretické základy, nezbytné pro pochopení využívaných metod. Zkoumaným systémem byla zvolena agaróza, kterou procházel laserový paprsek, jehož rozptyl byl zaznamenáván kamerou. Výsledné snímky specklového pole byly analyzovány třemi přístupy: prvním bylo určení viskozity a vyhodnocení její změny v závislosti na teplotě vzorku. Druhý přístup byl založen na směrodatných odchylkách intenzity specklových polí a jejich změny na teplotě. Třetí přístup měřil intenzitu světla procházející vzorkem. Výsledky byly vyhodnoceny a diskutovány.

Klíčová slova

rozptyl světla, DLS, multi speckle DLS (MSDLS), bod gelace, agaróza

Studying the gel point using dynamic light scattering methods

Abstract

The aim of this thesis was to determine the gel point of a given system using dynamic light scattering methods. Initially, the theoretical foundations necessary for understanding the methods used were presented. Agarose was chosen as the system under study, through which laser beam passed, and the scattering was captured on a camera. The resulting speckle field images were analyzed using three approaches: the first was to determine viscosity and evaluate its change depending on the temperature of the sample. The second approach was based on the standard deviations of the intensity of the speckle fields and their changes with temperature. The third approach measured the intensity of light passing through the sample. The results were evaluated and discussed.

Keywords

light scattering, DLS, multi speckle DLS (MSDLS), gel point, agarose

Poděkování

Chtěl bych poděkovat především vedoucímu práce Ing. Štěpánu Kuncovi, Ph.D., za jeho cenné rady a pomoc při vypracování této práce. Dále bych chtěl poděkovat své rodině a přátelům za neustálou podporu během mého studia a všem ostatním, kteří mi v průběhu studia pomáhali.

Deklarace využití technologie umělé inteligence

Při psaní této práce byl v určitých kapitolách využit generativní jazykový model GPT-4 od společnosti OpenAI, zejména pro vylepšení některých textových formulací.

Obsah

Úvod	16
Teoretická část.....	17
1 Světlo.....	17
1.1 Intenzita světla.....	19
1.2 Polarizace světla.....	21
1.3 Interference světla.....	22
1.4 Koherence světla.....	24
2 Rozptyl světla	26
3 Metody dynamického rozptylu světla	31
3.1 Metoda DLS.....	32
3.2 Metoda Multi Speckle DLS (MSDLS).....	34
3.3 Metoda DWS.....	37
3.4 Metoda Multi Speckle DWS.....	39
4 Gely a bod gelace	40
4.1 Gely.....	40
4.2 Bod gelace.....	40
4.3 Měření bodu gelace.....	42
4.3.1 Klasické metody.....	42
4.3.2 Měření pomocí rozptylu světla.....	43
5 Agaróza.....	45
5.1 Struktura agarózy.....	45
5.2 Vlastnosti agarózy.....	45
5.3 Praktické aplikace agarózy.....	46
6 Kolagen.....	48
6.1 Struktura kolagenu.....	48
6.2 Vlastnosti kolagenu.....	49
6.3 Praktické aplikace kolagenu.....	50
Praktická část.....	52
7 Měření bodu gelace.....	52
7.1 Příprava experimentu.....	52
7.1.1 Aparatura.....	52
7.1.2 Pracovní postup v krocích.....	54
7.2 Zpracování a vyhodnocování dat.....	55
7.2.1 První přístup přes hodnotu viskozity.....	56
7.2.2 Druhý přístup přes směrodatnou odchylku.....	61

7.2.3	Třetí přístup přes měření intenzity světla	62
7.3	Určení bodu gelace agarózy	64
7.3.1	Příprava vzorku	64
7.3.2	Měření	66
7.4	Výsledky měření bodu gelace agarózy	67
7.4.1	Výsledky první metody přes viskozitu	67
7.4.2	Výsledky druhé metody přes směrodatnou odchylku	73
7.4.3	Výsledky třetí metody přes intenzitu světla	77
7.5	Určení bodu gelace dalších systémů	78
7.5.1	Výsledky měření kolagenu	78
7.6	Diskuze k výsledkům měření bodu gelace agarózy	81
	Závěr	83
	Použitá literatura	84
	Přílohy	89
A	Příloha	89
8.1	Kódy z MATLABU	89

Seznam obrázků

Obrázek 1.1: Elektromagnetické spektrum viditelného světla	17
Obrázek 1.2: Šíření elektromagnetické vlny. Elektrické a magnetické vlny kolmé vůči sobě i vůči směru šíření. Intenzita elektrického pole E osciluje pouze v jedné ose, říkáme tedy, že se jedná o vertikální polarizaci, viz. kapitola 1.2. (Øgendal 2017).....	18
Obrázek 1.3: Druhy polarizace (Nave, R [b.r.])	21
Obrázek 1.4: Konstruktivní a destruktivní interference podle fázového rozdílu (Gao 2019).....	23
Obrázek 1.5: Specklové pole (Foto autora).....	24
Obrázek 2.1: Rozptyl světla způsoben tukovými a kaseinovými částicemi v mléku (Gastélum-Barrios et al. 2020).....	26
Obrázek 2.2: Pokud se molekula, která je podstatně menší než vlnová délka světla, setká se světlem polarizovaným v xz rovině, dojde k tomu, že elektrické pole tohoto světla indukuje oscilaci elektronů uvnitř molekuly. Tento jev přetváří molekulu v oscilující dipól, který následně emituje záření ve všech směrech. Intenzita tohoto emitovaného záření se liší v závislosti na úhlech ϕ a θ , které určují směr emise (Øgendal 2017).	27
Obrázek 2.3: Ilustrace elektrických dipólů (částic) mezi dvěma nabitými deskami, zobrazující vytvoření dipólového momentu (Øgendal 2017).....	28
Obrázek 2.4: Vlnové vektory k_{in} a k_{out} a jejich vztah k vektoru rozptylu q (Øgendal 2017).....	29
Obrázek 2.5: Výpočet délky rozptylového vektoru q (Øgendal 2017).....	30
Obrázek 3.1: Hypotetický příklad aplikace DLS na dvou vzorcích (Jones 2010).....	31
Obrázek 3.2: Schéma aparatury pro DWS (Scheffold et al. 2004).....	32
Obrázek 3.6: Uspořádání aparatury pro měření dynamického rozptylu světla (DLS). Detekce probíhá prostřednictvím několika pinholů, přičemž nejmenší z nich je umístěn nejbližše detektoru. Jejich průměr běžně činí 100 až 200 mikrometrů (Øgendal 2017)..	33
Obrázek 3.7: Schéma zobrazující postup určování difúzních koeficientů z autokorelačních funkcí (Norlab 2021).....	34
Obrázek 3.8: Princip MSDLS (Xu et al. 2015).....	35
Obrázek 3.9: Specklové pole (Foto autora).....	36
Obrázek 3.10: Uspořádání aparatury pro DWS (Kim a Pak 2010)	37
Obrázek 3.11: Dvoubuněčná metoda (Scheffold et al. 2004).....	38
Obrázek 3.12: Schéma Multi Speckle DWS (Brunel et al. 2006)	39
Obrázek 4.1: Fáze vzniku gelu (Shibayama a Norisuye 2002).....	40
Obrázek 4.2: Porovnání fyzikálního a chemického gelu (Aldaais 2023)	42
Obrázek 5.1: Strukturní vzorec podjednotky agarózy (Pérez et al. 1996).....	45
Obrázek 5.2: Jednoduché znázornění hystereze (Ramos et al. 2017).....	46
Obrázek 5.3: Princip elektroforézy (Berkley QB3 2024).....	47
Obrázek 6.1: TEM snímek kolagenu typu I (Howard 2006).....	49
Obrázek 6.2: Trojšroubovice kolagenu (Patel et al. 2022).....	49
Obrázek 6.3: Kolagenový gel při 20 °C a 37 °C. Zachyceno pomocí SEM. (Holder et al. 2018).....	50
Obrázek 7.1: Sestavená aparatura	53
Obrázek 7.2: Schéma aparatury	54
Obrázek 7.3: Autokorelační funkce na logaritmické ose pro glycerol	58
Obrázek 7.4: Autokorelační funkce převedena na logaritmické měřítko pro glycerol... ..	59
Obrázek 7.5: Oříznutá data pro glycerol.....	60

Obrázek 7.6: Fittování oříznutých dat glycerolu lineárním modelem	60
Obrázek 7.7: Laserové světlo procházející skrze vzorek 1 % čisté agarózy	65
Obrázek 7.8: Kamera snímající rozptýlené světlo ze vzorku	66

Seznam grafů

Graf 7.1: Autozkorelovaná data při teplotě 40 °C.	68
Graf 7.2: Oříznutá data při teplotě 40 °C.	68
Graf 7.3: Oříznutý ještě menší úsek při teplotě 40 °C.	69
Graf 7.4: Oříznutá data proložena lineární funkcí při teplotě 40 °C.	69
Graf 7.5: Závislost viskozity na teplotě roztoku 1 % čisté agarózy v různých měřítkách	71
Graf 7.6: Závislost viskozity na teplotě roztoku 1 % agarózy s nanočásticemi v různých měřítkách	72
Graf 7.7: Závislost směrodatné odchylky intenzity na teplotě roztoku 1 % agarózy	75
Graf 7.8: Závislost směrodatné odchylky normalizované intenzity na teplotě roztoku 1 % agarózy	75
Graf 7.9: Závislost směrodatné odchylky intenzity na teplotě roztoku 1 % agarózy s nanočásticemi	76
Graf 7.10: Závislost směrodatné odchylky normalizované intenzity na teplotě roztoku 1 % agarózy s nanočásticemi	76
Graf 7.11: Závislost intenzity světla na teplotě vzorku	77
Graf 7.7: Autozkorelovaná data měření kolagenu při teplotě 40 °C.	79
Graf 7.8: Oříznutá data měření kolagenu při teplotě 40 °C.	79
Graf 7.9: Oříznutý ještě menší úsek roztoku kolagenu při teplotě 40 °C.	79
Graf 7.10: Oříznutá data roztoku kolagenu proložena lineární funkcí při teplotě 40 °C.	80
Graf 7.11: Závislost viskozity na teplotě roztoku kolagenu.	80

Seznam tabulek

Tabulka 7.1: Příprava 1 % roztoku čisté agarózy	65
Tabulka 7.2: Příprava 1 % roztoku agarózy + 200nm PS nanočástice	65
Tabulka 7.3: Získané hodnoty viskozity agarózy v závislosti na teplotě	70
Tabulka 7.4: Hodnoty směrodatných odchylek intenzity v závislosti na teplotě	74

Seznam zdrojových kódů

Zdrojový kód 7.1: Vytvoření matice	56
Zdrojový kód 7.2: Načtení a zpracování snímku	57
Zdrojový kód 7.3: Výpočet autokorelace	57
Zdrojový kód 7.4: Vizualizace autokorelační funkce	58
Zdrojový kód 7.5: Oříznutí dat, fittování a výpočet viskozity	59
Zdrojový kód 7.6: Vytvoření matice	61
Zdrojový kód 7.7: Načtení a zpracování snímku	62
Zdrojový kód 7.8: Výpočet standardních odchylek	62
Zdrojový kód 7.9: Výpočet standardních odchylek	63
Zdrojový kód 7.10: Výpočet standardních odchylek	63
Zdrojový kód 7.10: Výpočet standardních odchylek	63
Zdrojový kód 7.10: Výpočet standardních odchylek	64
Zdrojový kód 8.1: Kód z MATLABu, první varianta zpracování	90
Zdrojový kód 8.2: Kód z MATLABu, druhá varianta zpracování	90
Zdrojový kód 8.3: Kód z MATLABu, třetí varianta zpracování	91

Seznam zkratek

\vec{E}	Intenzita elektrického pole [V/m]
\vec{B}	Magnetická indukce [T]
∇	Nabla operátor
\vec{H}	Intenzita magnetického pole [A/m]
\vec{j}	Proudová hustota [A/m ²]
ϵ_0	Permitivita vakua [F/m]
t	Čas [s]
ρ	Hustota náboje [C/m ³]
μ_0	Permeabilita [H/m]
\vec{M}	Magnetická polarizace [T]
Δ	Laplaceův operátor
u	Vlnová funkce
c	Rychlost světla [m/s]
c_0	Rychlost světla ve vakuu [m/s]
\vec{S}	Poyntingův vektor [W/m ²]
f	Frekvence [Hz]
I	Optická intenzita [W/m ²]
λ	Vlnová délka [m]
λ_0	Vlnová délka světla ve vakuu [m]
φ	Fáze [rad]
\vec{k}	Vlnový vektor
n	Index lomu
π	Konstanta pí
ω	Úhlová rychlost [rad/s]
\vec{r}	Polohový vektor
e	Eulerovo číslo
τ	Časový posun [s]
$\Delta\vec{r}$	Prostorový posun [m]
γ	Stupeň koherence paprsků
γ_t	Stupeň časové koherence

γ_s	Stupeň prostorové koherence
γ_p	Stupeň polarizační koherence
α	Polarizovatelnost [$C \cdot m^2/V$]
μ	Dipólový moment [$C \cdot m$]
Q	Náboj [C]
d	Délka [m]
n	Počet částic
M	Celková molekulová hmotnost [g/mol]
M_1	Hmotnost malé částice [g/mol]
\vec{q}	Vlnový vektor rozptylu
D	Difúzní koeficient [m^2/s]
r	Stokesův poloměr [m]
k_B	Boltzmannova konstanta [J/K]
T	Teplota [K]
η	Viskozita [$kg/m \cdot s$]
$g_2(\tau)$	Autokorelační funkce optické intenzity
$G'(\omega)$	Akumulovaný modul
$G''(\omega)$	Ztrátový modul
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DLS	Dynamický rozptyl světla
QELS	Kvazielastický rozptyl světla
PCS	Fotonová korelační spektroskopie
CCD	Charge-coupled device
DWS	Difúzní vlnová spektroskopie
MSDLS	Multi Speckle dynamický rozptyl světla
MSDWS	Multi Speckle difúzní vlnová spektroskopie
SLS	Statický rozptyl světla
PMT	Fotonásobič
RNA	Ribonukleová kyselina
ECM	Extracelulární matrix
PS	Polystyren

Úvod

Metody založené na měření dynamického rozptylu světla se již dlouho uplatňují v charakterizaci polymerních systémů, nejen pro určení velikostí částic, viskozity a difúzních koeficientů. Kromě těchto tradičních aplikací však mohou tyto metody také efektivně určit, kdy v materiálu dochází k jeho gelaci. Tyto metody poskytují alternativu k tradičním rheologickým měřením, což umožňuje analýzu bez přímého kontaktu s materiálem. Znalost bodu gelace je klíčová pro aplikace v průmyslových oblastech jako potravinářství, biomateriály, lékařství, elektronika a další.

Hlavním cílem této práce je sestavit vybrané metody dynamického rozptylu světla, použít je k analýze bodu gelace u polymerních materiálů a zjistit, zda jsou výsledky těchto měření relevantní a mohou být považovány za správné.

Teoretická část práce si klade za cíl poskytnout čtenáři ucelený úvod do metod dynamického rozptylu, vysvětlit základní optické jevy, principy rozptylu světla a teorii gelace. V závěru se tato část bude věnovat výběru vhodných polymerních systémů pro ověření funkčnosti metod.

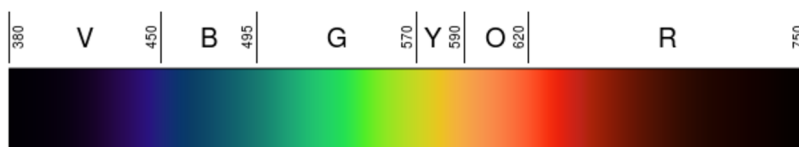
V praktické části byly na základě literární rešerše vybrány celkem tři metody měření, které byly aplikovány na zvolené polymerní systémy. Nejprve byla detailně popsána aparatura a obecný postup měření. Dále byla věnována pozornost popisu jednotlivých metod. První dvě metody jsou založeny na analýze fluktuací rozptylu světla ve vzorku, které byly zaznamenány pomocí kamery. Třetí metoda, byla založena pouze na měření intenzity světla procházejícího vzorkem. Byly představeny různé přístupy k vyhodnocení naměřených dat, včetně podrobného postupu analýzy dat v programu MATLAB, a byly ukázány dvě možné varianty zpracování dat.

V závěrečné části práce jsou diskutovány získané výsledky, které byly porovnány a vyhodnoceny s cílem zjistit, zda jsou vybrané metody dynamického rozptylu světla vhodné pro analýzu bodu gelace, a pokud ano, tak které konkrétně. Tato evaluace přispívá k lepšímu porozumění možnostem a omezením těchto technik.

Teoretická část

1 Světlo

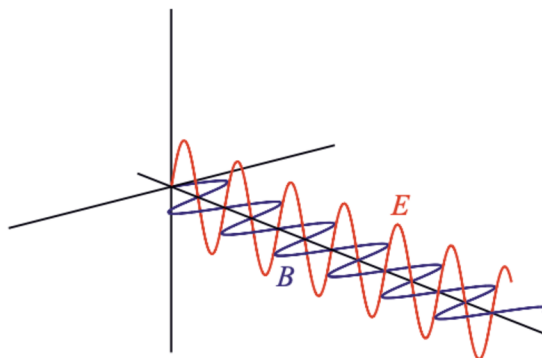
Elektromagnetické spektrum zahrnuje širokou škálu vlnových délek od rádiových vln až po gama záření. Viditelné světlo, malá část tohoto spektra, je jedinou částí, kterou může lidské oko vnímat. Jeho vlnová délka se pohybuje od 380 do 750 nm. Tento rozsah odpovídá barvám světla, které člověk vidí, od fialové po červenou (Zwinkels 2015).



Obrázek 1.1: Elektromagnetické spektrum viditelného světla

Schopnost vnímat viditelné světlo je výsledkem citlivosti oka na tento specifický rozsah elektromagnetického záření (Zwinkels 2015). Vlnová délka viditelného světla má zásadní význam pro různé aplikace, od biologických účinků různých vlnových délek na kůži a DNA až po vývoj technologií, jako jsou fotodetektory a solární články, které využívají viditelné světlo k přeměně energie (Liu et al. 2018; Bresolin et al. 2020).

Světlo je v kontextu klasické elektromagnetické teorie popsáno jako speciální případ elektromagnetického vlnění, charakterizovaného dvěma vzájemně propojenými vektorovými poli - intenzitou elektrického pole (\vec{E}) a magnetickou indukcí (\vec{B}), které jsou funkcemi polohy a času. Šíření světla jako elektromagnetického vlnění je klíčové pro pochopení mnoha jeho interakcí s hmotou, zejména v souvislosti s optickými jevy (Øgendal 2017).



Obrázek 1.2: Šíření elektromagnetické vlny. Elektrické a magnetické vlny kolmé vůči sobě i vůči směru šíření. Intenzita elektrického pole \vec{E} osciluje pouze v jedné ose, říkáme tedy, že se jedná o vertikální polarizaci, viz. kapitola 1.2. (Øgendal 2017)

Pro popis světla existuje celkem šest skalárních funkcí, které se řídí Maxwellovými rovnicemi. Tyto rovnice v zásadě definují, jak na sebe elektrická a magnetická pole vzájemně působí a jak se šíří světlo (Saleh a Teich 2019). Ve vakuu bez zdrojů mají Maxwellovy rovnice následující tvar:

$$\nabla \times \vec{H} = \vec{j} + \varepsilon_0 \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \quad (1.1)$$

První Maxwellova rovnice (zobecněný Ampérův zákon)

$$\nabla \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \quad (1.2)$$

Druhá Maxwellova rovnice (zákon elektromagnetické indukce)

$$\nabla \cdot \vec{E} = \frac{\rho}{\varepsilon_0} \quad (1.3)$$

Třetí Maxwellova rovnice (Gaussův zákon elektrostatiky)

$$\nabla \cdot \vec{B} = 0 \quad (1.4)$$

Čtvrtá Maxwellova rovnice (zákon spojitosti indukčního toku)

Kde \vec{E} je vektor intenzity elektrického pole, \vec{B} je vektor magnetické indukce, \vec{H} je vektor intenzity magnetického pole (definován vztahem $\vec{H} = \frac{\vec{B}}{\mu_0} - \vec{M}$), \vec{M} je vektor magnetické polarizace (ve vakuu $\vec{M} = 0$), \vec{j} je vektor proudové hustoty, ρ je hustota náboje a konstanty $\epsilon_0 \approx (1/36\pi) \cdot 10^{-9}$ F/m (permitivita vakua), $\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7}$ H/m (permeabilita vakua).

Zásadní roli v popisu šíření světla hraje vlnová rovnice, která plyne z Maxwellových rovnic (Saleh a Teich 2019).

$$\Delta u - \frac{1}{c_0^2} \frac{\partial^2 u}{\partial t^2} = 0 \quad (1.5)$$

Vlnová rovnice (ve vakuu)

Kde

$$c_0 = \frac{1}{\sqrt{\epsilon_0 \mu_0}} \approx 3 \cdot 10^8 \text{ m/s} \quad (1.6)$$

Rychlost šíření světla ve vakuu

1.1 Intenzita světla

Při měření pomocí metod dynamického rozptylu světla (DLS) je klíčovým parametrem intenzita rozptýleného světla. Ta se s časem mění a tuto změnu charakterizuje tzv. časová autokorelační funkce (viz. dále). Proto je důležité pochopit, jak je možné intenzitu světla popsat.

Pro popis intenzity světla se zavádí Poyntingův vektor \vec{S} . Je definován jako vektorový součin intenzity elektrického pole \vec{E} a intenzity magnetického pole \vec{H} (Saleh a Teich 2019):

$$\vec{S} = \vec{E} \times \vec{H} \quad (1.7)$$

Poyntingův vektor

Poyntingův vektor popisuje tok energie elektromagnetického pole, je kolmý k vektorům elektrického a magnetického pole a směr Poyntingova vektoru určuje směr pohybu toku energie. Optická intenzita $I(\mathbf{r}, t)$, která představuje tok energie jednotkou plochy kolmou na Poyntingův vektor, je rovna velikosti časově průměrovaného Poyntingova vektoru (Saleh a Teich 2019).

Monochromatické světlo (tj. má pouze jednu vlnovou délku λ), které je lineárně polarizované (polarizace vysvětlena v kapitole 1.2), lze popsat následující rovnicí (Øgendal 2017):

$$\vec{E}(x, t) = E_0 \cos(2\pi f(t - x/c) + \varphi) \quad (1.8)$$

kde f je frekvence světla, c je rychlost světla a E_0 je amplituda složky elektrického pole světla. Velikost φ je konstanta označující fázi v čase $t = 0$ a místě $x = 0$. Rovnici 1.8 dále můžeme zjednodušit zavedením vlnového vektoru \vec{k} , jehož orientace míří ve směru šíření a jehož velikost je (tamtéž):

$$|\vec{k}| = \frac{2\pi n}{\lambda_0} \quad (1.9)$$

kde λ_0 je vlnová délka světla ve vakuu a n je index lomu prostředí. Dále definujeme úhlovou rychlost ω

$$\omega = 2\pi f \quad (1.10)$$

Místo souřadnicové složky x zavedeme polohový vektor \vec{r} a rovnicí 1.8 můžeme přepsat do obecného tvaru:

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = E_0 \cos f(\omega t - \vec{k} \cdot \vec{r} + \varphi) \quad (1.11)$$

Intenzita světla je definována časovým průměrem čtverce elektrického pole (tamtéž):

$$I_0(x) = \varepsilon_0 c \langle \vec{E}^2(x, t) \rangle \quad (1.12)$$

kde ε_0 je permitivita vakua a c je rychlost světla.

Když do vztahu 1.12 vložíme vztah pro \vec{E} 1.11, dostaneme:

$$I_0(x) = \varepsilon_0 c E_0^2 \langle \cos^2(\omega t - \vec{k} \cdot \vec{r}) \rangle \quad (1.13)$$

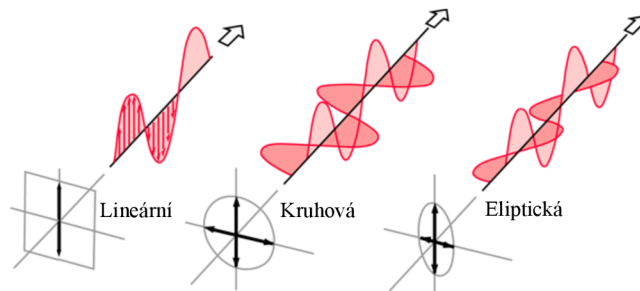
Průměrná hodnota $\cos^2(\omega t - \vec{k} \cdot \vec{r})$ vypočtená za jeden cyklus je rovna $\frac{1}{2}$ a pro typický HeNe laser je $\omega \approx 3 \cdot 10^{15}$ rad/s. Při použití velmi krátkého časového intervalu pro průměrování, například jedné nanosekundy, by v praxi zahrnovalo průměrování přes přibližně půl milionu cyklů. To znamená, že i když tento krátký interval nezahrnuje úplný počet cyklů, výsledná hodnota by se stále velmi blížila hodnotě $\frac{1}{2}$. Z toho vyplývá, že pro typický HeNe laser se vztah může upravit a následně bude vypadat takto (Øgendal 2017):

$$I_0(x) = \frac{1}{2} \varepsilon_0 c E_0^2 \quad (1.14)$$

1.2 Polarizace světla

Dále zavedeme pojem polarizace, neboť u metod DLS se jako zdroj používá polarizované světlo (laser), aby bylo možné analyzovat pohyb částic ve vzorku, a intenzita rozptýleného světla ve vzorku je polarizací zásadně ovlivněna.

Polarizace světla je jev, při kterém vektory intenzity elektrického pole \vec{E} ve světelném paprsku mají určitý preferovaný směr. Zatímco nepolarizované světlo má vektory \vec{E} orientované náhodně v různých směrech v rovině kolmé na Poyntingův vektor (směr šíření), polarizované světlo je charakterizováno tím, že tyto vektory mají v rovině protínající svazek světla konzistentní orientaci (Peatross a Ware 2023).



Obrázek 1.3: Druhy polarizace (Nave, R [b.r.]

Světlo může vykazovat různé formy polarizace. Pokud elektrické pole kmitá v rovině, říká se, že světlo je lineárně polarizované. Případně pokud se elektrické pole při šíření rovinné vlny spirálovitě stáčí, označuje se to jako kruhová nebo eliptická polarizace. Polarizaci světla mohou ovlivnit zařízení, jako jsou polarizátory a vlnové desky (Peatross a Ware 2023).

1.3 Interference světla

Při DLS pozorujeme tzv. specklové pole (viz. dále), které ukazuje, jak spolu světlo rozptýlené na jednotlivých částicích interferuje. V některých částech se světlo navzájem vyruší (vznikne tmavé místo ve specklovém poli), v jiných částech naopak vzniknou jasné části pole. To je způsobeno interferencí světla.

Pod pojmem interference rozumíme skládání jednotlivých vln světla. Když nastane situace, že se setkají dvě nebo více vln, které v případě dvou vln označíme jako $\vec{E}_1(\vec{r}, t)$ a $\vec{E}_2(\vec{r}, t)$, výsledná světelná vlna vznikne jako součet jednotlivých vln (Malý 2020):

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \vec{E}_1(\vec{r}, t) + \vec{E}_2(\vec{r}, t) \quad (1.15)$$

To je dáno principem superpozice, který vychází z linearit vlnové rovnice. Jako důsledek interference se ale princip superpozice nevztahuje na intenzitu světla (Saleh a Teich 2019):

$$I \neq I_1 + I_2 \quad (1.16)$$

Pokud budeme mít dvě monochromatické vlny, jejichž komplexní amplituda je $E_1(r)$ a $E_2(r)$, jejich složením dostaneme vztah 1.15 díky principu superpozice. Intenzity jednotlivých vln jsou určeny jako $I_1 = |E_1|^2$ a $I_2 = |E_2|^2$. Celková intenzita složeného vlnění je tedy (tamtéž):

$$I = |E|^2 = |E_1 + E_2|^2 = |E_1|^2 + |E_2|^2 + E_1^* E_2 + E_1 E_2^* \quad (1.17)$$

kde * značí komplexní sdružení. Do rovnice 1.17 vložíme substituci $E_1 = \sqrt{I_1} \cdot e^{i\varphi_1}$ a $E_2 = \sqrt{I_2} \cdot e^{i\varphi_2}$, kde φ_1 a φ_2 označují fázi vln.

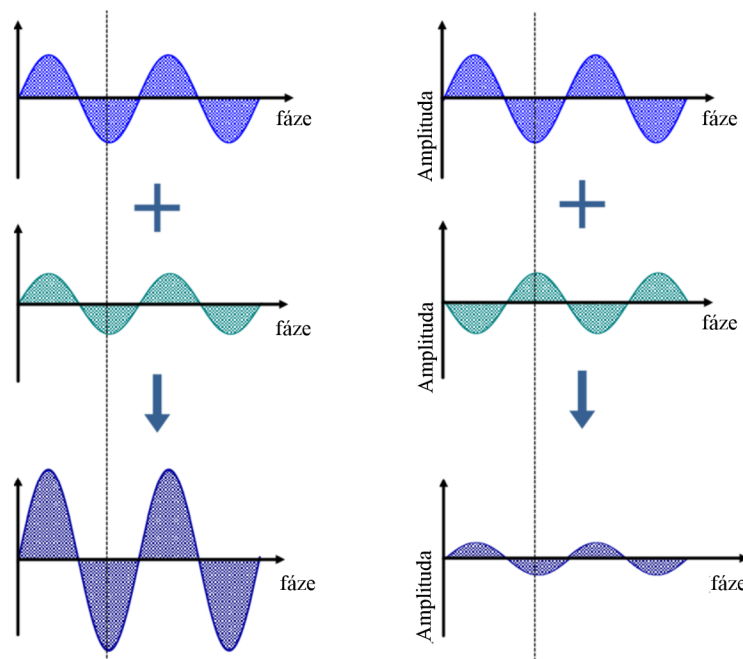
Dostaneme tzv. interferenční rovnici (tamtéž):

$$I = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos \varphi \quad (1.18)$$

kde

$$\varphi = \varphi_2 - \varphi_1 \quad (1.19)$$

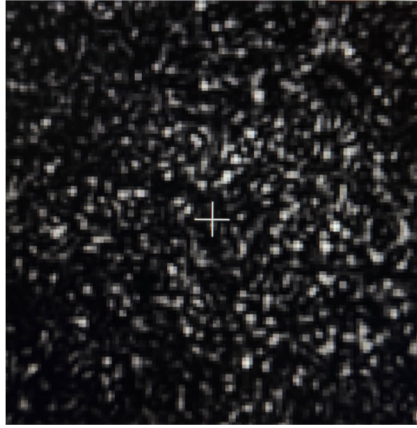
Podle fázového rozdílu φ může dojít ke konstruktivní nebo destruktivní interferenci:



Obrázek 1.4: Konstruktivní a destruktivní interference podle fázového rozdílu (Gao 2019)

V experimentech DLS pozorujeme tzv. specklové pole (viz. kapitola 3.3.). To vzniká jako interference mezi elektrickým polem rozptýleným částicemi. Elektrická pole částic, označených např. jako j a k , pozorovaná na detektoru, mají fáze φ_j a φ_k . V místech, kde jsou elektrická pole ve fázi, dochází k jejich konstruktivní interferenci, což vytváří jasné body nazývané speckly. Naopak, když jsou tato elektrická pole v protifázi, dochází k destruktivní interferenci, což má za následek tmavé oblasti pozorované mezi speckly (Øgendal 2017).

Specklové pole se v čase mění v důsledku Brownova pohybu částic, díky kterému se neustále mění rozdíly fází ($\varphi_j - \varphi_k$). Velikost specklů je nepřímo úměrná průměru použitého laserového paprsku v experimentu: menší průměr laserového paprsku vede k větším specklům (Øgendal 2017).



Obrázek 1.5: Specklové pole (Foto autora).

1.4 Koherence světla

Koherence světla se týká korelací existujících v různých částech světelných vln, tj. souvislost jejich fáze a amplitudy. Koherenci světla lze rozdělit na dva hlavní typy: časovou koherenci a prostorovou koherenci (Peatross a Ware 2023).

Časová koherence se týká korelace mezi časově posunutým vlněním, označovaným jako $\vec{E}(\vec{r}, t)$ a $\vec{E}(\vec{r}, t + \tau)$, kde τ představuje časový posun. Prostorová koherence se naproti tomu zabývá korelací prostorově posunutým vlněním, označovaným jako $\vec{E}(\vec{r}, t)$ a $\vec{E}(\vec{r} + \Delta\vec{r}, t)$ kde $\Delta\vec{r}$ představuje prostorový posun (tamtéž).

Protože v praxi jsou oscilace světla příliš rychlé na to, aby je bylo možné přímo změřit, optická koherence se často studuje pomocí interferenčních metod. Ty fungují na principu kombinace světla z různých částí světelného vlnění (časově nebo prostorově posunuté) za účelem pozorování interferenčních obrazců na detektoru. Pokud je interference konstantní a vlnění interferuje buď konstruktivně nebo destruktivně, říkáme, že má vlnění vysoký stupeň koherence (Peatross a Ware 2023). Mezi zdroje koherentního vlnění patří lasery a masery. Pokud naopak interference konstantní není a v čase se neustále mění, poté o vlnění můžeme tvrdit, že koherentní není (Deng a Chu 2017).

Mezi interferenční metody, ze kterých je možné určit časovou koherenci světla, patří Michelsonův interferometr. Prostorová koherence se dá určit z Youngova dvojštěrbínového experimentu (Peatross a Ware 2023).

Pokud bychom při měření metodami dynamického rozptylu světla používali nekoherentní záření, nemohlo by nikdy vzniknout specklové pole. To souvisí i s polarizací probíranou v kapitole 1.2., kdy pokud bychom měli světlo s navzájem kolnými polarizacemi, také by spolu nemohl interferovat a specklové pole by nevzniklo.

Když následně zahrneme do interferenční rovnice 1.18 koherenci, získáme interferenční rovnici pro výpočet intenzity světla dvou reálných paprsků:

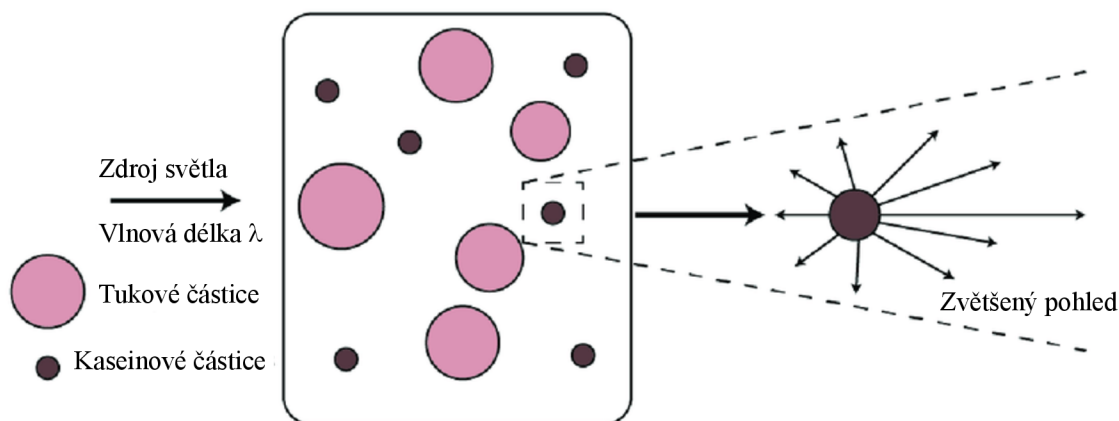
$$I = I_1 + I_2 + \gamma 2\sqrt{I_1 I_2} \cos \varphi \quad (1.20)$$

kde veličina γ představuje tzv. stupeň koherence paprsků a pohybuje se od $0 < \gamma < 1$. Je složen z dílčích stupňů jednotlivých koherencí $\gamma = \gamma_t \gamma_s \gamma_p$, kde γ_t značí stupeň časové koherence, γ_s stupeň prostorové koherence a γ_p značí stupeň polarizační koherence (Kuběna [b.r.]).

2 Rozptyl světla

Rozptyl světla je proces, ke kterému dochází při interakci světla s částicemi. Je to jev, který lze popsat pomocí částicového i vlnového modelu světla. K rozptylu může někdy dojít, aniž by se změnil směr světla, což zpochybňuje zjednodušenou představu, že světlo musí na částici "dopadnout" a pak se od ní "odrazit". Tato interakce tvoří základ různých technik rozptylu světla a má zásadní význam pro pochopení chování světla při jeho šíření různými médii (Øgendal 2017).

Využití světla jako nástroje pro zkoumání vlastností částic má bohatou historii, prvotním výzkumům v této oblasti se věnovali vědci jako Tyndall, Rayleigh a později Debye. Tyto rané studie položily základy toho, co se později stalo statickým rozptylem světla (SLS). SLS vychází z pozorování, že část světla se při průchodu roztokem obsahujícím částice rozptýlí do všech směrů. Podle druhu roztoku se množství rozptýleného světla liší. Např. u mléka je naprostá většina světla rozptýlena (nebo absorbována) tukovými kuličkami a kaseinovými micelami, a tudíž se mléko jeví jako neprůhledné. Naopak roztoky, u kterých většina světla projde skrz a jen malá část je rozptýlena, se jeví jako průhledné (Øgendal 2017).

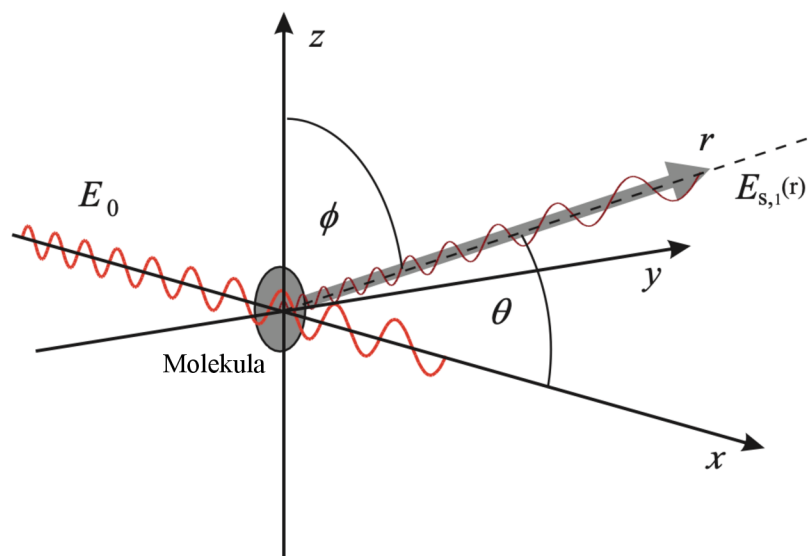


Obrázek 2.1: Rozptyl světla způsoben tukovými a kaseinovými částicemi v mléku (Gastélum-Barrios et al. 2020)

Rozptyl světla má rozsáhlé uplatnění v různých oblastech. V biologii se rozptyl světla běžně používá k měření velikosti a hustoty buněk v suspenzi. Měřením intenzity rozptýleného světla mohou vědci získat informace o průměrné velikosti a tvaru buněk

(Bronk et al. 1992). V materiálových vědách se rozptyl světla používá ke studiu optických vlastností materiálů, jako je jejich index lomu a drsnost povrchu (Chylek et al. 1983; Vorburger et al. 1984). Analýzou vzorců rozptylu světla mohou vědci získat poznatky o struktuře a složení materiálů (Vorburger et al. 1984). Rozptyl světla se využívá také v oblasti optiky, kde hraje klíčovou roli při návrhu a charakterizaci optických zařízení (Xu 2003). Pochopením toho, jak se světlo rozptyluje v různých prostředích, mohou výzkumníci optimalizovat výkon optických systémů a vyvíjet nové technologie (Øgendal 2017).

Vztah mezi intenzitou rozptýleného světla a molekulovou hmotností částic je klíčovým pojmem v rozptylu světla. U malých částic, kde jsou fázové rozdíly světla rozptýleného z různých částí částice zanedbatelné, je intenzita rozptýleného světla úměrná čtverci molekulové hmotnosti. K tomuto vztahu se můžeme dopracovat následujícím postupem (Øgendal 2017):



Obrázek 2.2: Pokud se molekula, která je podstatně menší než vlnová délka světla, setká se světlem polarizovaným v xz rovině, dojde k tomu, že elektrické pole tohoto světla indukuje oscilaci elektronů uvnitř molekuly. Tento jev přetváří molekulu v oscilující dipól, který následně emituje záření ve všech směrech. Intenzita tohoto emitovaného záření se liší v závislosti na úhlech ϕ a θ , které určují směr emise (Øgendal 2017).

Intenzita elektrického pole $\vec{E}_{s,1}(r)$ rozptýleného světla na jediné částici ve vzdálenosti r od molekuly je dle elektromagnetické teorie popsána jako (Øgendal 2017):

$$\vec{E}_{s,1}(r) = E_0 \cdot \left(\frac{\pi\alpha \sin \phi}{r\lambda^2} \right) \cos(\omega t - \vec{k}\vec{r}) \quad (2.1)$$

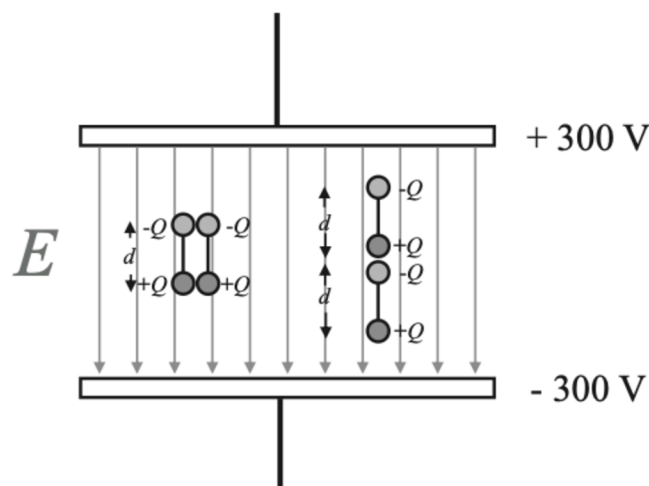
S využitím vztahu 1.12 získáme vztah pro intenzitu rozptýleného světla:

$$I_{s,1}(r) = \frac{1}{2} \epsilon_0 c E_0^2 \cdot \frac{\pi^2 \alpha^2 \sin^2 \phi}{r^2 \lambda^4} \quad (2.2)$$

Po aplikaci vztahu 1.16 a úvahou, že ve většině případů je detektor rozptýleného světla umístěn v rovině xy a tedy úhel $\phi = 90^\circ$, získáme:

$$I_{s,1}(r) = I_0 \cdot \frac{\pi^2 \alpha^2}{r^2 \lambda^4} \quad (2.3)$$

Ze vztahu vidíme, že intenzita rozptýleného světla je přímo úměrná intenzitě zdroje světla a nepřímo úměrná čtverci vzdálenosti od rozptylující částice. Veličina α značí tzv. polarizovatelnost částice nebo molekuly. Z obrázku 2.3 lze úvahou dojít k tomu, že α závisí na "velikosti" molekuly (tedy objemu nebo molekulové hmotnosti). Lze to demonstrovat pomocí dvou malých částic, kde každá má polarizovatelnost α_1 . Umístěním částic vedle sebe dosáhneme celkového dipólového momentu $\mu = (2Q) \cdot d$, zatímco jejich umístěním za sebou získáme dipólový moment $\mu = Q \cdot (2d)$. V obou případech je výsledný dipólový moment dvojnásobkem dipólového momentu jednotlivé částice. To je možné zobecnit i pro n částic umístěných vedle sebe, které budou mít dipólový moment $\mu = n \cdot \mu_1$, přičemž složená částice získá výslednou polarizovatelnost $\alpha = n\alpha_1$.



Obrázek 2.3: Ilustrace elektrických dipólů (částic) mezi dvěma nabitými deskami, zobrazující vytvoření dipólového momentu (Øgendal 2017).

Víme, že $n = \frac{M}{M_1}$, kde M je celková molekulová hmotnost a M_1 je hmotnost malé částice, získáme vztah pro polarizovatelnost $\alpha = \frac{\alpha_1}{M_1} \cdot M$. Když následně upravíme rovnici 2.3, dostaneme finální vztah (Øgendal 2017):

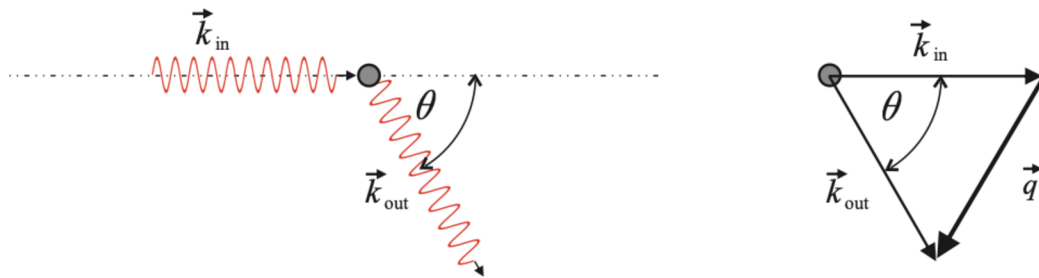
$$I_{s,1}(r) = I_0 \cdot \frac{\pi^2 \alpha_1^2}{r^2 \lambda^4 M_1^2} M^2 \quad (2.4)$$

Z tohoto vztahu je vidět, že intenzita rozptýleného světla $I_{s,1}(r)$ je úměrná čtverci molekulové hmotnosti M^2 . Tento vztah je základem pro pochopení toho, jak lze rozptýlení světla použít k měření velikosti a hmotnosti částic. Tento popis má ale omezení, přestává totiž platit v případě, kdy je velikost molekul výrazně převyšuje vlnovou délku světla, neboť takové molekuly nemají přesně definované stavy polarizace (tamtéž).

Při analýze dat o rozptýlení světla je vektor rozptýlu \vec{q} užitečnější veličinou než úhel rozptýlu. Tento vektor je odvozen z vlnového vektoru \vec{k} , který určuje směr šíření světla.

Velikost vlnového vektoru $|\vec{k}|$, neboli vlnové číslo, bylo již zavedena v rovnici 1.9. a odpovídá $|\vec{k}| = \frac{2\pi n}{\lambda_0}$.

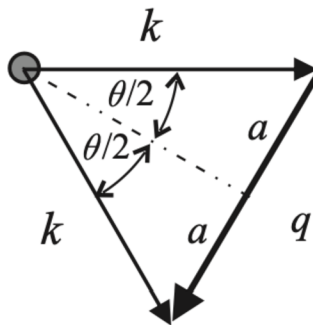
Když foton s vlnovým vektorem \vec{k}_{in} narazí na částici a je rozptýlen, vlnový vektor se změní na \vec{k}_{out} . Vektor rozptýlu je pak definován jako rozdíl $\vec{q} = \vec{k}_{out} - \vec{k}_{in}$ (Øgendal 2017).



Obrázek 2.4: Vlnové vektory \vec{k}_{in} a \vec{k}_{out} a jejich vztah k vektoru rozptýlu \vec{q} (Øgendal 2017).

Následně je možné vypočítat i velikost vektoru $|\vec{q}|$. Z obrázku 2.5 vidíme, že $q = 2a$, kde $a = k \cdot \sin \frac{\theta}{2}$ a vlnové číslo $k = \frac{2\pi n}{\lambda_0}$.

Velikost vektoru rozptylu se tedy rovná $q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2}$.

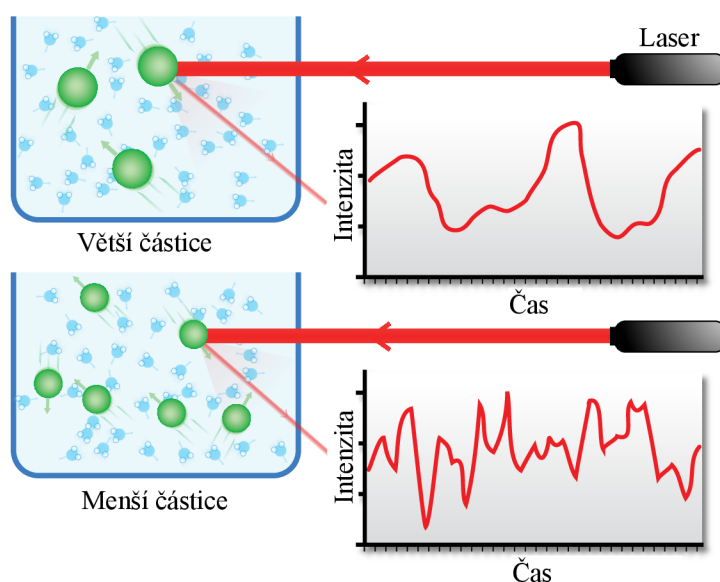


Obrázek 2.5: Výpočet délky rozptylového vektoru \vec{q} (Øgendal 2017).

Zkoumáním vektoru rozptylu mohou vědci získat informace o velikosti a struktuře rozptýlených částic, protože obsahuje informace o změnách směru a fáze rozptýleného světla (Øgendal 2017).

3 Metody dynamického rozptylu světla

Dynamický rozptyl světla (DLS), známý také jako kvazielastický rozptyl světla (QELS) nebo fotonová korelační spektroskopie (PCS), je technika, která vznikla v roce 1964. Od poloviny sedmdesátých let se stala stále populárnější, zejména díky technologickému pokroku. DLS vyžaduje vysoce monochromatický, intenzivní a koherentní zdroj světla, obvykle laser, který byl vynalezen v roce 1960. Detekční systém musí být dostatečně citlivý na detekci jednotlivých fotonů a dostatečně rychlý na zpracování signálů, což činí tuto technologii náročnější než statický rozptyl světla (Øgendal 2017).

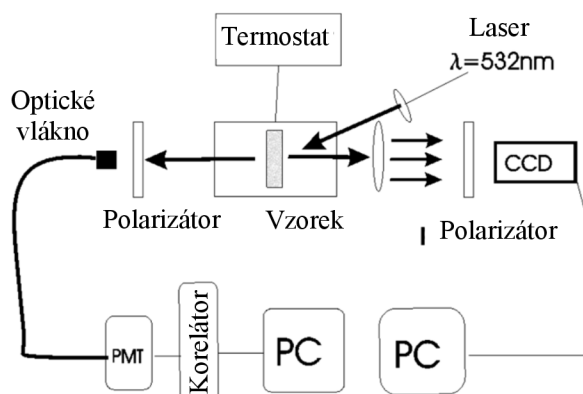


Obrázek 3.1: Hypotetický příklad aplikace DLS na dvou vzorcích (Jones 2010)

Existují různé metody dynamického rozptylu světla, které byly vyvinuty za účelem rozšíření jeho možností. Jednou z takových metod je DLS s CCD (Charge-coupled device) kamerou. Tato metoda využívá CCD kameru jako optický plošný detektor k pořizování snímků rozptýleného světla, což umožňuje podrobnější analýzu vzorů rozptylu. Metoda byla úspěšně použita v různých studiích, včetně stanovení velikosti nanočástic v koloidních roztocích a zobrazování submikroskopických pohybů v buňkách (Marakhova et al. 2016).

Další metodou je Multi Speckle Diffusing Wave Spectroscopy (DWS), což je varianta dynamického rozptylu světla, která dokáže měřit faktor dynamické struktury gelů

vzniklých agregací koloidů. Metoda je zvláště účinná při studiu pomalé relaxace a dynamiky závislé na čase. Poskytuje informace o dynamice rozptylujících částic a lze ji použít ke studiu široké škály systémů, včetně biologických vzorků (Viasnoff et al. 2002).



Obrázek 3.2: Schéma aparatury pro DWS (Scheffold et al. 2004)

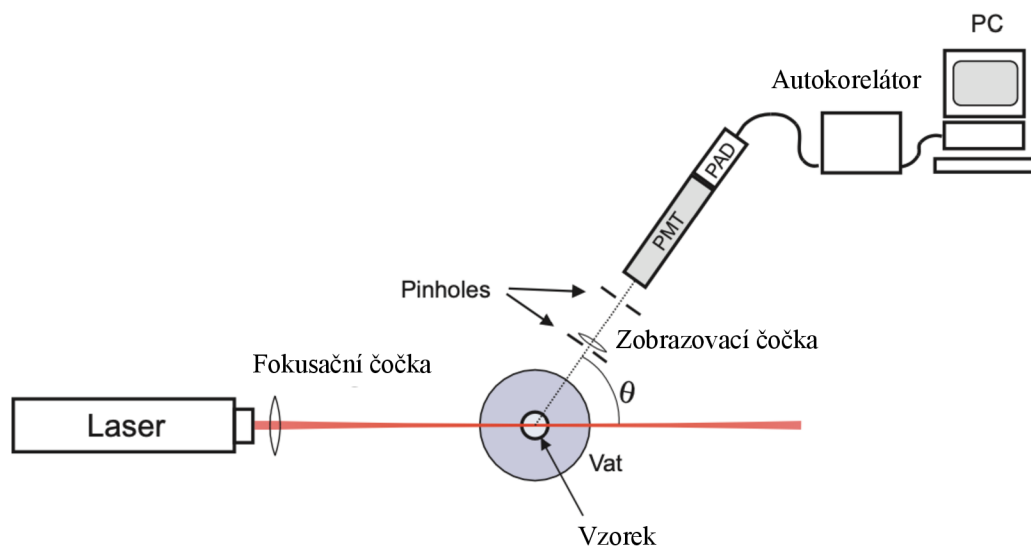
Celkově je dynamický rozptyl světla univerzální technikou, která umožňuje charakterizovat velikost a dynamiku částic v roztoku. Má využití v různých oblastech, včetně biomedicínských věd, materiálových věd, chemie a biologie. Různé metody dynamického rozptylu světla, jako je DLS s CCD kamerou a Multi Speckle DWS, nabízejí rozšířené možnosti pro podrobnější analýzu rozptylových vzorů a studium pomalé relaxace, respektive dynamiky závislé na čase.

3.1 Metoda DLS

Dynamický rozptyl světla (dále DLS) měří fluktuace intenzity rozptýleného světla způsobené Brownovým pohybem částic ve vzorku. Analýzou autokorelační funkce rozptýleného světla lze získat informace o velikosti a dynamice částic a běžně se používá ke stanovení distribuce velikosti malých částic v submikrometrové oblasti. (Stetefeld et al. 2016).

Uspořádání pro měření DLS se může podobat tomu u tzv. SLS (statický rozptyl světla), ale má několik zásadních rozdílů. Laserový paprsek je při DLS fokusován na průměr přibližně 1/10 mm a rozptýlené fotony jsou detekovány fotonásobičem (PMT). Tyto detektory jsou schopny zachytit nepatrné fluktuace intenzity rozptýleného světla, které jsou nezbytné pro stanovení difuzního koeficientu částic (Øgendal 2017).

Zatímco SLS měří intenzitu rozptýleného světla pod různými úhly, časově průměrovanou v délce přibližně 1 s a více, aby bylo možné získat informace o molekulové hmotnosti a velikosti, DLS měří dlouhé časové řady střední intenzity rozptýleného světla ve velmi krátkých intervalech (řádově 100 ns). To umožňuje DLS zachytit časové fluktuace intenzity rozptylu, což poskytuje informace o difuzním koeficientu nebo velikosti molekul (tamtéž).



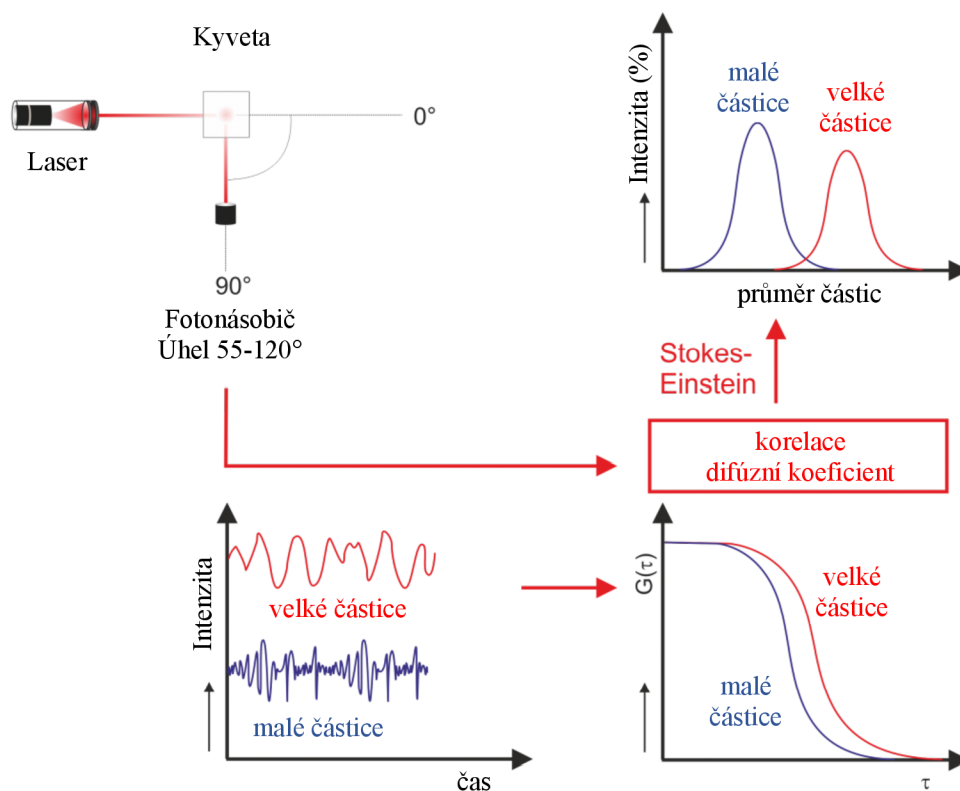
Obrázek 3.3: Uspořádání aparatury pro měření dynamického rozptylu světla (DLS). Detekce probíhá prostřednictvím několika pinholů, přičemž nejmenší z nich je umístěn nejbližší detektoru. Jejich průměr běžně činí 100 až 200 mikrometrů (Øgendal 2017).

Hlavním cílem experimentů DLS je změřit difuzní koeficient molekul v roztoku, který lze následně použít k nepřímému určení velikosti částic. Tuto velikost, tzv. Stokesův poloměr můžeme získat pomocí Stokes-Einsteinovy rovnice, která definuje vztah mezi difuzním koeficientem molekul D a jejich poloměrem r (Øgendal 2017):

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (3.1)$$

T je teplota suspenze, η je viskozita a $k_B = 1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$ je Boltzmannova konstanta. Změřením koeficientu difúze a použitím tohoto vztahu lze tedy vypočítat Stokesův poloměr částic (tamtéž).

Pokud se intenzita rozptýleného světla mění rychle, značí to velký difuzní koeficient (a tedy malé částice), naopak pomalu se měnící intenzita značí malý difuzní koeficient (tudíž velké částice).



Obrázek 3.4: Schéma zobrazující postup určování difúzních koeficientů z autokorelačních funkcí (Norlab 2021)

V praxi vyžadují měření pomocí DLS a příbuzných metod pečlivou přípravu vzorku. Prach a agregovaný materiál mohou významně ovlivnit výsledek měření, a proto je třeba být u přípravy vzorků pečlivý, abychom ho nekontaminovali. Jen tak je možné získat přesná měření (tamtéž).

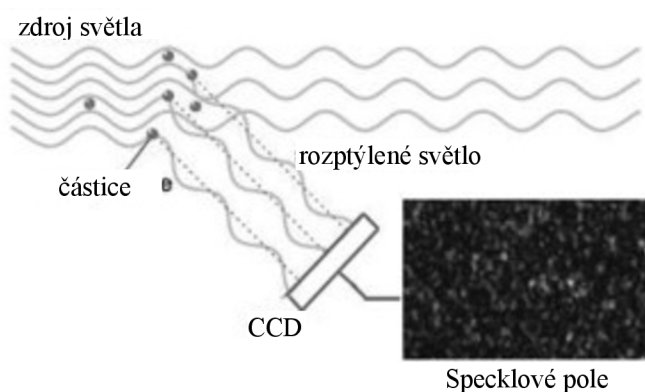
3.2 Metoda Multi Speckle DLS (MSDLS)

Metoda DLS, probíraná v kapitole 3.1, je široce používaná technika pro studium dynamiky a distribuce velikosti částic v roztoku. Tradičně se měření DLS provádějí pomocí fotonásobiče (PMT) jako detektoru. Pro získání co nejpřesnějších výsledků je u klasického DLS nutné časově průměrovat výstupy z autokorelátoru (Cipelletti a Weitz 1999). Uvádí se, že časové průměrování by mělo být 1 až 10 000 krát delší, než je samotný časový interval měření. To by však znamenalo, že u vzorků, které mají časový interval v řádu jednotek až desítek sekund, by měření muselo trvat několik hodin až dní, aby bylo

možné získat dostatečné časové průměrování autokorelační funkce a tím dobrou statistickou přesnost. Kvůli těmto dlouhým časům je běžnou DLS možné měřit pouze statické vzorky které jsou v rovnováze a jejich dynamika musí být dostatečně rychlá na to, abychom měření mohli v rozumném čase provést. (Wong a Wiltzius 1993).

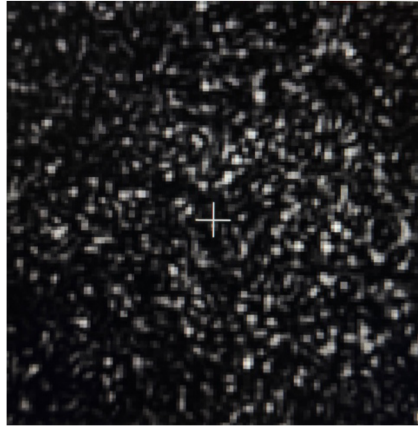
Tento běžný způsob měření tedy není z důvodu časové náročnosti možný u tzv. neergodických vzorků, u kterých neplatí rovnost mezi průměrováním autokorelační funkce v čase a průměrováním souboru více autokorelačních funkcí (ensemble averaging). To platí i pro systémy vzorků, které vykazují pomalou dynamiku a u kterých je časový interval pro průměrování příliš dlouhý. Jako příklad takových systémů jsou koloidní skla nebo polymerní a koloidní gely (Cipelletti a Weitz 1999).

Nedávný technologický pokrok však umožnil používat v experimentech MSDLS jako detektory CCD kamery s nábojovou vazbou. CCD kamery mají při měření DLS oproti PMT několik výhod. Jednou z výhod je jejich schopnost měřit současně rozptyl světla při více úhlech rozptylu, což umožňuje komplexnější analýzu vzorku. U problematických vzorků, kde by bylo časové průměrování běžným DLS příliš dlouhé, se přidáním CCD kamery umožnilo tyto časy zkrátit. Vzhledem k tomu, že je možné měřit rozptyl při více úhlech simultánně a tyto měření jsou mezi sebou statisticky nezávislé, výrazně se zlepšuje statistická přesnost a snižuje celkový čas potřebný pro experiment. Zároveň MSDLS umožňuje přímé souborové (ensemble) průměrování, a tedy možnost zkoumání neergodických vzorků. Kromě toho mají CCD kamery ve srovnání s PMT širší dynamický rozsah, což umožňuje detekci slabých i silných signálů rozptylu. CCD kamery mají také vyšší prostorové rozlišení, což může být výhodné pro zobrazovací aplikace (tamtéž)



Obrázek 3.5: Princip MSDLS (Xu et al. 2015).

Při použití CCD kamery v experimentech MSDLS pozorujeme skvrnitý obrazec, který vzniká osvětlením vzorku laserovým paprskem – tzv. specklové pole. Rozptýlené světlo je pak zachyceno CCD kamerou, která zaznamenává kolísání intenzity specklového obrazce v čase. Tyto fluktuace intenzity se pak analyzují, aby se získaly informace o velikosti a dynamice částic ve vzorku (Cipelletti a Weitz 1999)



Obrázek 3.6: Specklové pole (Foto autora).

Intenzita rozptýleného světla v specklovém poli se měří jako funkce času $I = (\vec{q}, t)$ pro jeden pixel, kde je vlnový vektor rozptylu \vec{q} následně využitý k výpočtu časové autokorelační funkce optické intenzity (Wong a Wiltzius 1993):

$$g_2(q, \tau) = \langle I(q, t)I(q, t + \tau) \rangle \quad (3.2)$$

kde $q = |\vec{q}| = \frac{4\pi n}{\lambda} \cdot \sin \frac{\theta}{2}$ značí rozptylový vlnový vektor, n je index lomu prostředí, λ vlnová délka světla a θ úhel mezi dopadajícím a rozptýleným světlem. Wong a Wiltzius měřili intenzitu $I = (\vec{q}, t)$ pro více vlnových vektorů rozptylu \vec{q} současně, v pozdějších studiích se už tento princip nevyužíval a tak v našem experimentu naopak světlo úzce omezíme a budeme měřit pouze pro jeden vlnový vektor rozptylu \vec{q} .

Tento inovativní přístup s metodou MSDLS může sloužit k mnoha aplikacím zahrnující měření s nízkou intenzitou, jako např. rentgenová korelační spektroskopie (Wong a Wiltzius 1993).

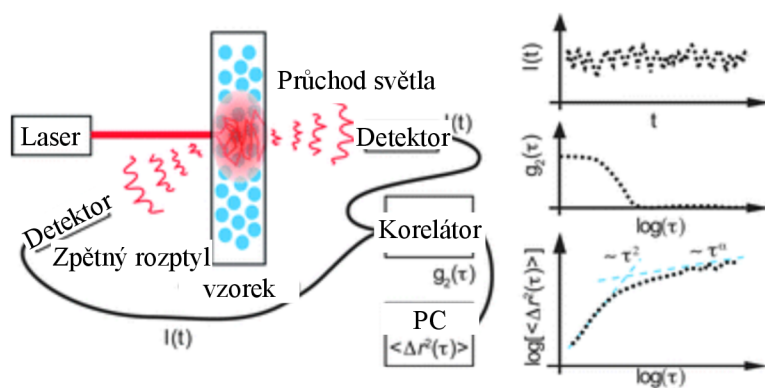
3.3 Metoda DWS

DWS (Diffusing Wave Spectroscopy) je optická metoda, která rozšiřuje standardní metodu DLS. Zatímco u běžného DLS je nutné, aby byly vzorky pro světlo téměř průhledné a tím pádem i rozředěné, DWS zvládne měřit i vzorky se silným vícenásobným rozptylem a velmi koncentrované (Scheffold et al. 2004).

Dochází zde totiž ke dvěma základním aproximacím. První se týká samotného průchodu světla skrze vzorek. V situacích, kdy se každý foton mnohonásobně rozptýlí, připomíná jeho trajektorie tzv. náhodnou procházku. Nejjednodušší způsob, jak tento děj popsat, je prostřednictvím difuzní aproximace. U této aproximace se přehlíží interference světla, protože se z pozorování předpokládá že rozptyl světla není dostatečně intenzivní, aby došlo k lokalizaci světla z náhodného rozptylu. Místo toho se na děj díváme tak, že u intenzity rozptýleného světla dochází k difúzi (Weitz a Pine 1993).

Druhá aproximace se týká toho, jak dynamika rozptylujících částic ovlivňuje fázi světla. Vzhledem k tomu, že každý foton se ve vzorku mnohonásobně rozptýlí, jednotlivé rozptyly světla nejsou tak důležité. Místo toho je každý jednotlivý rozptyl světla považován za průměr všech rozptylů světla, přičemž z difuzní aproximace získáme celkovou dráhu trajektorie, ze které zjistíme právě počet těchto průměrných rozptylů světla, které ovlivňují jednotlivé trajektorie. Díky těmto dvěma aproximacím můžeme pro DWS snadněji výpočítat autokorelační funkci (Weitz a Pine 1993).

Tato metoda je zvláště užitečná pro zkoumání vlastností tekutých a pevných médií, včetně široké škály materiálů od gelů částic a biopolymerů až po koncentrované roztoky povrchově aktivních látek (Scheffold et al. 2004).



Obrázek 3.7: Uspořádání aparatury pro DWS (Kim a Pak 2010)

Podobně jako u DLS se u DWS měří intenzita pomocí autokorelační funkce. Z konceptu difúzního transportu světla získáme autokorelační funkce, které jsou závislé na experimentální geometrii (Pine et al. 1988):

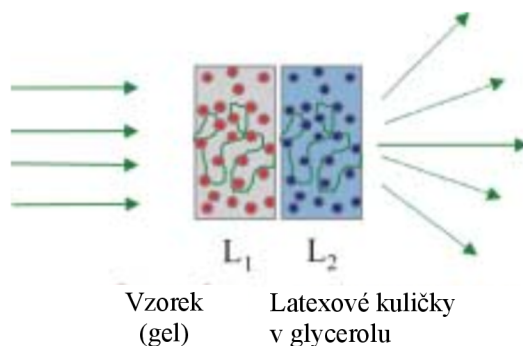
$$g_2(\tau) - 1 = \langle I(t)I(t + \tau) \rangle / \langle I \rangle^2 - 1 \quad (3.3)$$

Odtud lze vyjádřit střední kvadratickou fluktuaci (mean square displacement) částice. Celý vztah poté vypadá takto (Scheffold et al. 2004):

$$g_2(\tau) - 1 = \left[\int_0^\infty ds P(s) \exp(-(s/l^*)k^2 \langle \Delta r^2(\tau) \rangle) \right]^2 \quad (3.4)$$

kde $k = \frac{2\pi n}{\lambda}$ je vlnové číslo světla v prostředí a indexu lomu n . $P(s)$ označuje pravděpodobnost, že světlo ve vzorku urazí dráhu o délce s a spočítá se pomocí difúzních modelů a experimentálně změřené geometrie. l^* označuje průměrnou délku jednoho kroku trajektorie náhodné procházky fotonu, která se zjistí pomocí rozptylových vlastností jednotlivých částic a jejich koncentraci (Scheffold et al. 2004)

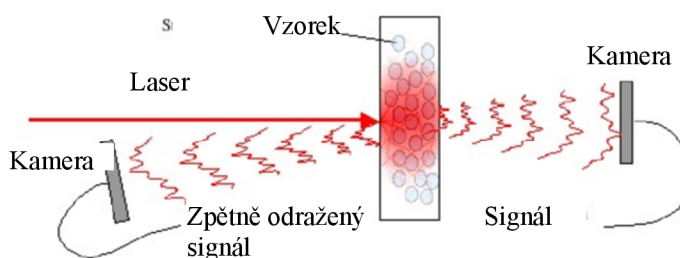
Novým přístupem v DWS je tzv. dvoubuněčná metoda, která na rozdíl od DLS umožňuje studium neergodických systémů. Uspořádání aparatury u měření vypadá tak, že se použijí dvě oddělené kyvety umístěné u sebe, kde první kyveta obsahuje samotný vzorek (který může být ergodický nebo neergodický gel) a druhá kyveta obsahuje ergodický systém s pomalou vnitřní dynamikou, a slouží k tomu, aby u vzorku proběhlo správné průměrování signálu intenzity (tamtéž).



Obrázek 3.8: Dvoubuněčná metoda (Scheffold et al. 2004).

3.4 Metoda Multi Speckle DWS

Stejně jako DLS, tak i metodu DWS je možné rozšířit využitím CCD kamery. Ta se nazývá Multi Speckle DWS (MSDWS) To umožňuje sledovat časové fluktuace intenzity rozptýleného světla na velké ploše, nikoliv pouze jeden specklový bod. Díky tomu se výrazně zkracuje doba sběru dat, protože v principu probíhá více DWS měření současně. U běžného DWS je doba potřebná k shromáždění dat výrazně delší, než typická relaxační doba autokorelační funkce. Toto přestává platit, pokud se měří s CCD kamerou (Scheffold et al. 2004).



Obrázek 3.9: Schéma Multi Speckle DWS (Brunel et al. 2006)

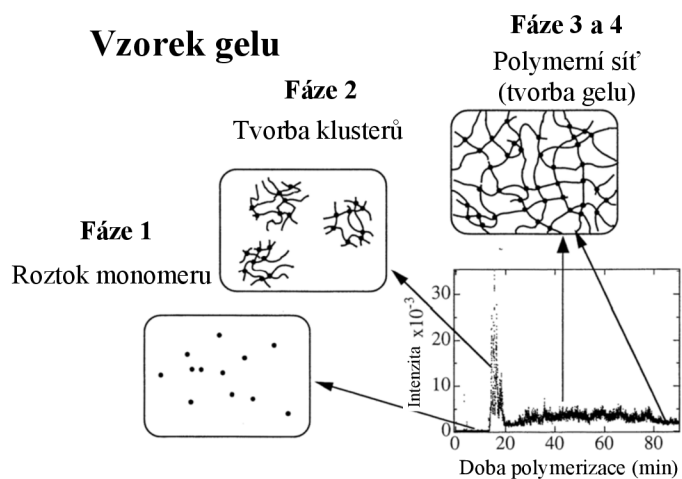
Hlavní omezení MSDWS spočívá v relativně nízkém časovém rozlišení, které CCD kamery nabízejí. Obvykle umožňují zkoumání korelačních časů, τ , do přibližně 10 ms. Naproti tomu PMT dokážou měřit korelační čas do 10 ns, což činí CCD kamery nevhodnou volbou pro analýzu rychlých procesů často pozorovaných v experimentech DWS. Když se ale zkombinuje výše popsaná dvojbuněčná technika a MSDWS, je možné většinu těchto omezení překonat (Scheffold et al. 2004).

4 Gely a bod gelace

4.1 Gely

Gely jako materiál jsou lidstvem využívány již po stovky let. Ať už se jedná o želatinu, vaječné bílky nebo přírodní biopolymery, jako např. agaróza nebo amyulóza, s gely se setkáváme téměř každý den. Shibamaya uvádí příklad, že si gel můžeme představit jako "nádobu bez stěn", protože dokáže udržet velké množství tekutiny s malým množstvím částic zodpovědných za tvorbu spojitě sítě. Gely nacházejí nové uplatnění, např. jako absorbanty vody, chemické reaktory a aktuátory atd. (Shibayama a Norisuye 2002).

Gely jsou vytvářeny chemickými nebo fyzikálními mechanismy roztoků molekul, polymerů nebo koloidů, které mohou být reverzibilní nebo ireverzibilní. Podle vazeb dělíme gely na chemické a fyzikální. Pokud dojde k narušení takového roztoku, dojde k jeho destabilizaci, což vede k agregaci, tvorbě klusterů, polymerní sítě a gelaci (Scheffold et al. 2004).



Obrázek 4.1: Fáze vzniku gelu (Shibayama a Norisuye 2002)

4.2 Bod gelace

Bod gelace označuje změnu u amorfních materiálů z kapalného do pevného stavu (sol-gel přechod). Tato změna je vyvolána vznikem spojitě sítě makromolekulárních řetězců. Když se materiál blíží k bodu gelace, vnitřní distribuce velikostí částic se rozšiřuje. Před dosažením bodu gelace je materiál schopný toku a relaxace, jakmile dojde ke gelaci,

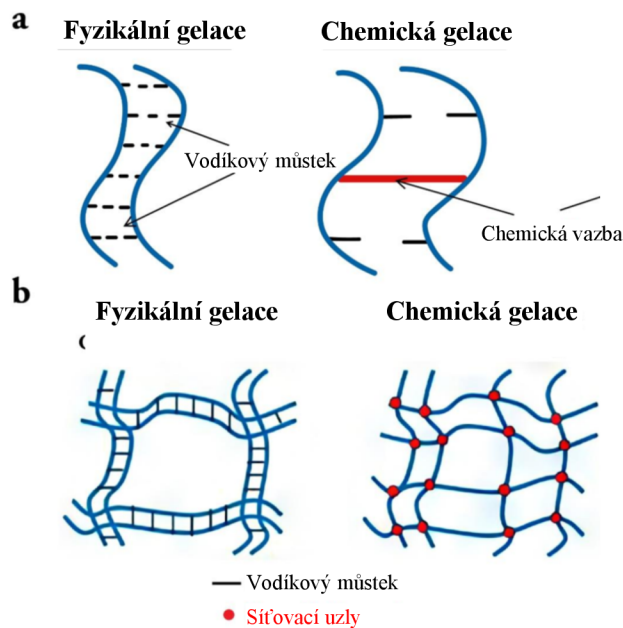
pohyb je možný pouze tehdy, když napětí nebo deformace přesáhnou určitou kritickou hodnotu (Winter 2016).

Hlavní rozdíl mezi chemickými a fyzikálními gely vyplývá z vazeb polymerní sítě. U chemických gelů jsou kovalentní vazby považovány za trvalé, s výjimkou gelů, které podléhají významným reverzním reakcím. U fyzikálních gelů je polymerní síť spojena pomocí fyzikálních sil (van der Waalsových, polárních sil, vodíkových vazeb), které naopak trvalé nejsou (tamtéž).

Chemicky zesíťované polymery se dostanou do bodu gelace, když se molekuly zesíťují do velkých klastrů prostřednictvím kovalentních vazeb. Před dosažením bodu gelace je polymer v tekutém stavu a je rozpustný v dobrých rozpouštědlech (taková rozpouštědla, která mají rozpustnostní parametry blízké parametrům polymerů. V takovém rozpouštědle jsou přitažlivé síly mezi segmenty polymerového řetězce slabší než síly interakce mezi polymerem a rozpouštědlem). Po překročení bodu gelace je polymer v pevném stavu nerozpustný, pouze nepřípojené molekuly polymeru je stále možné extrahovat (tamtéž).

Na rozdíl od chemických gelů jsou fyzikální gely definovány růstem fyzikálně spojených agregátů, přičemž bodu gelace je dosaženo, když se korelační délka molekulárního pohybu diverguje do nekonečna. Fyzikální gely a příslušné vazby v polymerní síti jsou ovlivněny faktory, jako je pH, hustota náboje, přítomnost krystalických částí atd. Gely, jsou ovlivněny i změnou teploty jsou označovány jako termoreverzibilní (tamtéž).

Znalost toho, kdy dochází u dané látky k sol-gel přechodu a tedy bodu gelace, je klíčová v mnoha aplikacích. Buď se mu díky tomu můžeme při práci s polymerem zcela vyhnout, nebo naopak využít vlastnosti, které se v okolí bodu gelace projevují. Mezi praktické aplikace patří zpracování gelů, reaktivní zpracování (s využitím gelu jako intermediárního stavu) a při tvorbě nových polymerních látek, jako jsou lepidla, absorbenty, porézní katalyzátory, materiály tlumící vibrace, membrány a koloidní skla. Mimo oblast polymerů hraje gelace klíčovou roli v průmyslu, jako je technologie potravin, biomateriály, lékařský průmysl, výroba elektroniky a různé spotřební zboží (Winter 2016).



Obrázek 4.2: Porovnání fyzikálního a chemického gelu (Aldaais 2023)

4.3 Měření bodu gelace

4.3.1 Klasické metody

Je více možností, jak přistupovat k měření bodu gelace. Jedním z nejjedodušších způsobů k jeho identifikace je měření viskozity, neboli chování toku. Tam mohou patřit metody jako je technika nakloněné trubice a měření pádu kuličky, které se opírají o pozorování rozdílů v charakteristice toku v solu a následně v gelu. Tyto metody však bývají méně přesné při zacházení s viskóznějšími vzorky. Přesnější určení prahu gelace lze dosáhnout pomocí viskoelastických měření. Obecně můžeme mluvit o reologických měřeních. (Shibayama a Norisuye 2002).

Reologie zkoumá, jak se materiály deformují a tečou v reakci na aplikované vnější síly. Materiály lze na základě jejich mechanických charakteristik klasifikovat do tří skupin: ideální nevazký plyn, nestlačitelná vazká (newtonská) kapalina a izotropně elastické (hookovské) těleso. Viskozita je v reologii klíčovým pojmem, jelikož přímo charakterizuje chování tekutin a tedy i bod gelace. Kapaliny, u kterých je viskozita určena Newtonovým zákonem jako konstantní poměr mezi tečným napětím a gradientem rychlosti, jsou označovány jako newtonské. Newtonův zákon je definován takto (Barnes et al. 1989):

$$\tau = -\eta \frac{du}{dx} = -\eta D \quad (4.1)$$

kde τ je tečné napětí tekutiny, η dynamická viskozita, du změna rychlosti toku, dx změna polohy tečném k směru proudění a D gradient rychlosti (rychlost deformace) (Barnes et al. 1989).

Kapaliny, které se neřídí tímto vztahem, označujeme jako neneutronovské. Patří sem například roztoky a taveniny polymerů nebo suspenze. Newtonův zákon pro ně můžeme zavést jako (tamtéž):

$$\tau = -\eta_{zd} D \quad (4.2)$$

kde η_{zd} značí tzv. zdánlivou viskozitu (ta je závislá na tečném napětí nebo rychlosti deformace).

Winter a kolegové představili inovativní přístup k identifikaci bodu gelace pomocí oscilačních smykových experimentů. V bodě gelace se akumulovaný modul $G'(\omega)$ a ztrátový modul $G''(\omega)$ začnou rovnat a rostou až k bodu ω^u , což znamená (Chambon a Winter 1985):

$$G'(\omega) = G''(\omega) \sim \omega^u \quad (4.3)$$

kde ω je úhlová frekvence a u je viskoelastický exponent. V současnosti je tato metoda široce využívána (Shibayama a Norisuye 2002).

4.3.2 Měření pomocí rozptylu světla

Oproti reologickým metodám bylo v minulosti považováno za obtížné měřit bod gelace v reálném čase. S průběhem času se však vyvinuly nové metody, a jedna z nejideálnějších se začaly jevit právě měření pomocí dynamického rozptylu světla (Shibayama a Norisuye 2002).

Dynamický rozptyl světla je nedestruktivní metoda měření bodu gelace, což znamená, že měřený vzorek není poškozen a je možné provádět experiment s jedním vzorkem

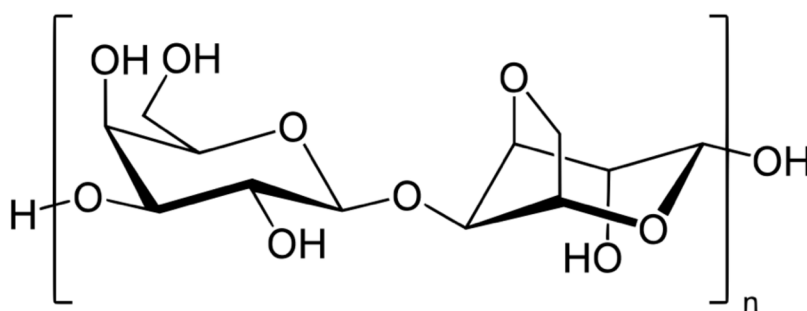
opakovaně. Zároveň umožňuje měření dynamiky v okolí bodu gelace v reálném čase v chemických i fyzikálních gelech (Winter 2016).

Na základě měření intenzity rozptýleného světla v snímaném specklovém poli z časové autokorelační funkce můžeme určit difúzní koeficient, a z jeho závislosti na teplotě tak nalézt samotný bod gelace. Podrobnosti o měření pomocí metod DLS, MSDLS, DWS a MSDWS byly již uvedeny v kapitole 3, proto se zde již neuvádí.

5 Agaróza

5.1 Struktura agarózy

Pro náš výzkum aplikovatelnosti metod dynamického rozptylu světla byl jako ideální materiál zvolena agaróza, a to zejména kvůli jejímu dobrému teoretickému popisu, jednoduchosti přípravy a termoreverzibilním vlastnostem. Agaróza je přírodní lineární polysacharid složený z opakujících se jednotek agarobiosy, což je disacharid tvořený alternujícími β -D-galaktózou a 3,6-anhydro- α -L-galaktózou přes 1-4 vazbu. Podjednotky agarobiosy jsou spojené glykosidickými vazbami. Toto molekulární uspořádání agaróze dává její charakteristickou šroubovicovou strukturu, která hraje klíčovou roli v jejích vlastnostech gelace (Pérez et al. 1996).



Obrázek 5.1: Strukturální vzorec podjednotky agarózy (Pérez et al. 1996)

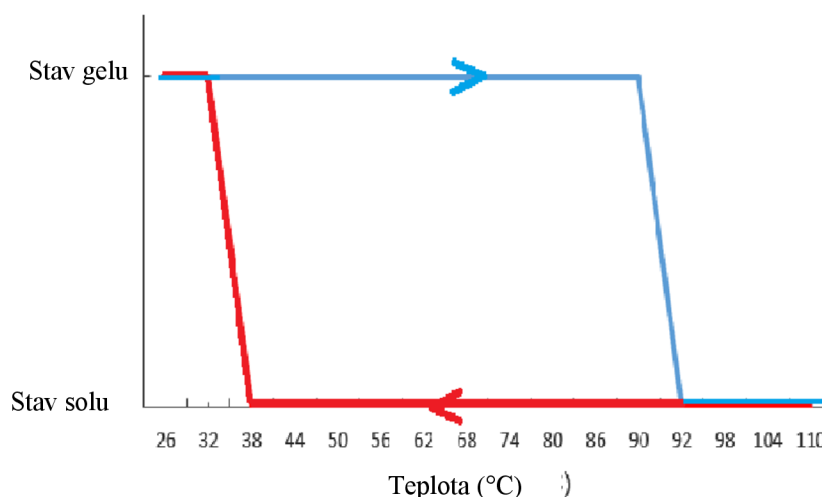
Agaróza, společně s agaropektinem, tvoří základní složky agaru - přírodního polysacharidu, získávaného z buněčných stěn určitých mořských řas, jako jsou rody *Gelidium* a *Gracilaria*, kde plní strukturální funkci. Agaróza je ve své čisté formě polymerní látka bez elektrického náboje, ale přesto může obsahovat příměsi nabitých skupin, jako jsou sulfátové a pyruvátové skupiny (Cammack et al. 2006).

5.2 Vlastnosti agarózy

Agaróza se obvykle nachází ve formě bílého prášku a skladuje se při pokojové teplotě. Za běžné teploty není rozpustná ve vodě, teprve při zahřátí nad určitou teplotu dochází k rozvolnění řetězců agarózy, což má za následek její rozpustnost. Tato teplota, při které se

agaróza začíná rozpouštět, se liší v závislosti na jejím typu, konkrétní výrobní šarži a množství agarózy přítomné v roztoku (Cammack et al. 2006).

Dle různých zdrojů se teplota tání agarózy typicky pohybuje od 85 °C do 95 °C. Oproti tomu teplota tuhnutí (bod gelace) je mnohem nižší, většinou mezi 35 °C až 42 °C. Když je dosaženo teploty tuhnutí, dochází k přechodu z náhodného klubka na uspořádanou šroubovici, a agaróza se přemění ze stavu solu na termoreverzibilní gel. Termoreverzibilita označuje vlastnost gelu, kdy se po ohřátí nad specifickou teplotu (nad teplotu tání) může znovu přeměnit zpět na sol. Tento gel vzniká díky vytváření nekonečné trojrozměrné sítě z agarózových vláken, které se skládají z agarózových šroubovic. Jevu, kdy teplota tuhnutí a teplota tání není stejná, se říká hystereze. U agarózy je pozorovaná hystereze přičtena shlukování šroubovic (Normand et al. 2000).



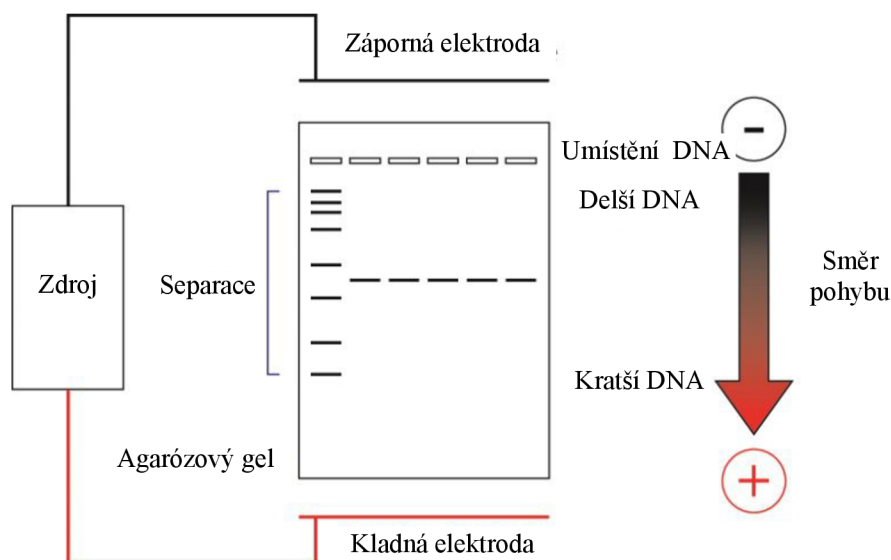
Obrázek 5.2: Jednoduché znázornění hystereze (Ramos et al. 2017)

Hodnota relativní molekulové hmotnosti agarózy se pohybuje od 80 000 do 140 000, v závislosti na tom, zda se jedná o variantu s nízkou nebo vysokou molekulovou hmotností (Rochas a Lahaye 1989).

5.3 Praktické aplikace agarózy

Agaróza se využívá napříč širokým spektrem vědeckých oborů a průmyslových odvětví, včetně potravinářství a biochemických laboratoří, kde slouží pro kultivaci buněk a různé separační metody (Le Goff et al. 2015).

Jedno z hlavních využití agarózy je u gelové elektroforézy, která se v molekulární biologii často využívá k rozdělování velkých biomolekul, zejména DNA a RNA. Tato technika se rozlišuje na varianty vertikální a horizontální (Rinaudo 2008). Vzorek nese záporný elektrický náboj, přičemž hlavním zdrojem tohoto náboje jsou fosfátové skupiny, a proto se aplikuje blíže ke katodě. Když se zapne elektrické pole, fragmenty vzorku se pohybují směrem k anodě, což vede k jejich separaci. Toto rozdělení probíhá v rámci pórů gelu a závisí na molekulové hmotnosti biomolekul. Velikost pórů v agarózovém gelu je přímo ovlivněna jeho koncentrací, s rostoucí koncentrací agarózy se velikost pórů snižuje (Serwer 1983).



Obrázek 5.3: Princip elektroforézy (Berkley QB3 2024)

V oblasti potravinářství se agaróza uplatňuje jako agent pro zahuštění a želírování, čímž se řadí mezi aditiva, která jsou do potravin přidávána za účelem zlepšení jejich trvanlivosti, barvy, chuti a celkového vzhledu. Pro tento typ využití se obvykle preferují nižší koncentrace agarózy (Mai et al. 2016). Agarózové gely najdou své uplatnění i v biochemických laboratořích pro pěstování mikroorganismů, kde poskytují ideální pevné prostředí pro jejich rozmnožování. Do těchto gelů je možné přidávat i další látky, jako jsou například antibiotika, což umožňuje studovat rezistenci mikroorganismů vůči těmto substancím (Borst 2005).

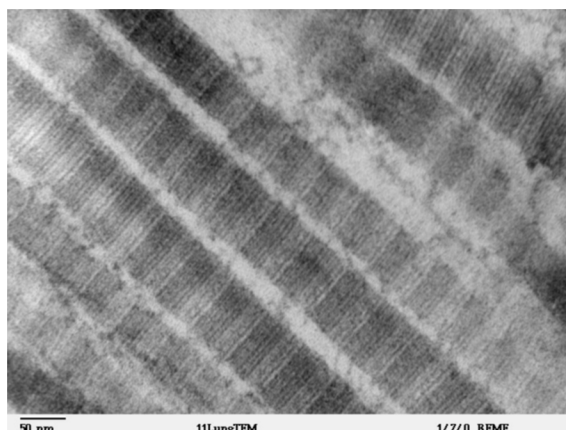
6 Kolagen

6.1 Struktura kolagenu

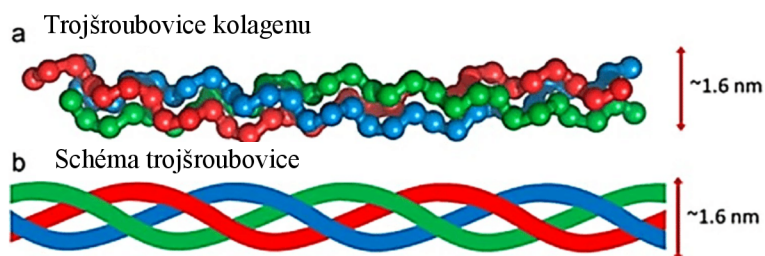
Kolagen je primární strukturální protein a je dominantním prvkem extracelulárního matrixu (ECM). Tvoří největší část proteinů u savců, přičemž jeho podíl na celkovém obsahu proteinů v lidském těle činí 25 % až 35 %. Ve skupině obratlovců bylo rozpoznáno dohromady 28 typů kolagenu, které se skládají z nejméně 46 různých polypeptidů, a řada dalších proteinů obsahuje části s kolagenovou strukturou. Kolagen se dělí na fibrilární a nefibrilární. (Shoulders a Raines 2009).

V lidském těle je až 90 % zastoupeno pouze jedním druhem, a to fibrilárním kolagenem typu I. Nachází se v kůži, v kostech, v orgánech nebo ve šlachách. Ten má klíčovou úlohu v udržování integrity mnoha tkání prostřednictvím jeho interakcí s povrchy buněk a dalšími molekulami extracelulárního matrixu. Dohromady bylo identifikováno téměř 50 molekul, které s kolagenem typu I interagují a u přibližně poloviny z nich byla objasněna konkrétní místa vazby s tímto kolagenem. Samotný kolagen typu I navíc existuje ve 300 různých mutacích, které jsou spojeny s poruchami pojivové tkáně v lidském těle (Di Lullo et al. 2002).

Kolagen se skládá z pravotočivého svazku tří paralelních levotočivých šroubovic typu polyprolin II. Aby byla udržena stabilita této struktury, zásadní význam hrají stereoel-ektronické efekty a tzv. předorganizace. Díky vědeckému pokroku ve vývoji umělých kolagenových vláken (které si zachovávají základní vlastnosti přírodního kolagenu), prostřednictvím chemické syntézy, se začíná testovat jejich využití v biomedicíně a nanotechnologiích (Shoulders a Raines 2009). Z hlediska molekulární struktury je kolagen složen z aminokyselin, a to hlavně z glycinu (Gly), ten představuje zhruba 35% všech aminokyselinových zbytků, prolinu (Pro) s podílem 12 %, a dále z hydroxyprolinu (Hyp) a hydroxylysinu (Hyl) (Owczarzy et al. 2020).



Obrázek 6.1: TEM snímek kolagenu typu I (Howard 2006)



Obrázek 6.2: Trojšroubovice kolagenu (Patel et al. 2022)

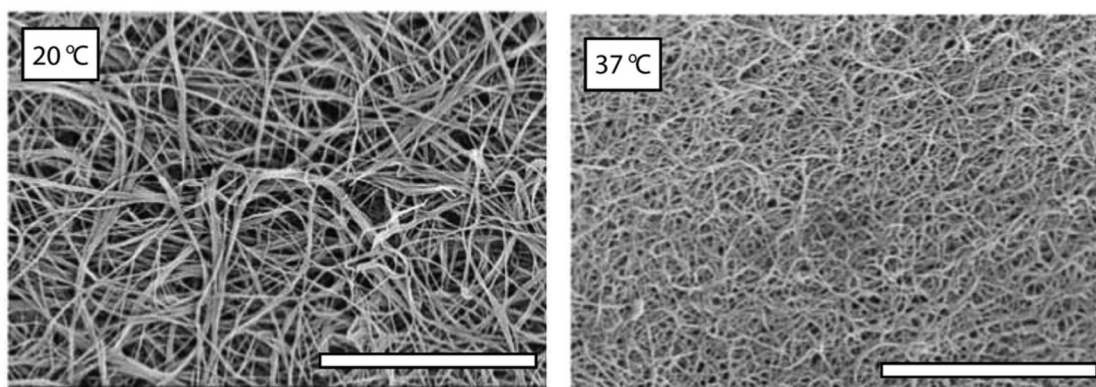
6.2 Vlastnosti kolagenu

Hodnota relativní molekulové hmotnosti se liší dle konkrétního typu, ale dle zdrojů se pohybuje kolem hodnoty 300 000 g/mol (Petruska a Hodge 1964). Kolagen slouží jako surovina pro výrobu želatiny, ta je vyráběna procesem zahrnujícím denaturaci a rozpouštění. Gelace kolagenu může být vyvolána změnou podmínek a to konkrétně změnou teploty, pH a iontové síly. Při intenzivním zahřívání roztoků kolagenu dochází k rozpadu vazeb stabilizujících kolagenové šroubovice a molekuly přecházejí do neuspořádané konformace. Teplota, při níž dochází k denaturaci kolagenu, se dle některých zdrojů pohybuje mezi 53 °C a 63 °C, a pravděpodobně při ní dochází nejprve k rozpadu vodíkových vazeb a následné ztrátě fibrilární struktury. Nad teplotou denaturace se vlákna zkracují na jednu čtvrtinu své původní délky, což kolagenu dodává vyšší

elasticitu a vede k tvorbě gelové sítě s vysokou schopností absorbovat vodu (Maximo a Cunha 2010).

Jiný zdroj uvádí, že teplota, při které dochází k denaturaci kolagenů, se liší v závislosti na jejich původu - či se jedná o kolagenní proteiny pocházející od savců nebo z ryb. Zatímco u kolagenů savců se tzv. teplota smrštění udržuje na stabilní úrovni okolo 65 - 67 °C, u ryb a bezobratlých se tato hodnota významně liší, nabývají na škále od 35 do 55 °C. Denaturace kolagenových molekul rozpuštěných ve vodném roztoku se pro savce pohybuje kolem teploty 39 - 40 °C, zatímco u ryb se hodnoty pohybují od 5 °C do 30 °C. Je pozoruhodné, že rozdíl mezi teplotou smrštění (T_S) a denurací molekuly v roztoku (T_D) je u většiny druhů udržován na konstantní úrovni přibližně 27 °C. To naznačuje, že teplota, při níž dochází k denaturaci kolagenových molekul, se obvykle nachází jen o 1 až 2 °C výše než je teplota okolního prostředí (Miles a Bailey 1999).

Při gelaci kolagenu dochází k tvorbě rozvětvené sítě vláken, jejíž podoba závisí na tom, při jaké teplotě ke gelaci dojde. Gelace při nižších teplotách kolem 20 °C vytváří sítě s vysokým stupněm svazkování vláken a velkými póry, naopak gelace při teplotě 37 °C (fyziologická teplota těla) produkuje sítě s malými velikostmi pórů a minimálním svazkováním vláken (Holder et al. 2018).



Obrázek 6.3: Kolagenový gel při 20 °C a 37 °C. Zachyceno pomocí SEM. (Holder et al. 2018)

6.3 Praktické aplikace kolagenu

Kolagen a z něj odvozené biomateriály mají velký potenciál v oblasti tkáňového inženýrství, ve kterém je cíl vytvořit funkční materiály pro regenerativní medicínu, aby se daly efektivně používat při léčbě tkání (Parenteau-Bareil et al. 2010). Již vyzkoušené

aplikace při léčbě infekcí tkání byly například infikované rohovkové tkáně nebo rakovina jater. Zároveň kolagen nachází využití i v drug-delivery systémech jako nosič antibiotik, např. tetracyklinu (Khan a Khan 2013).

V kosmetickém průmyslu je kolagen oblíbenou složkou různých produktů pro péči o pleť, jejichž cílem je boj proti předčasnému stárnutí a podpora zdraví pokožky. Navíc je přítomnost kolagenu v kosmetickém průmyslu motivována jeho potenciálem chránit pokožku před oxidačním stresem a předcházet předčasnému stárnutí kůže. (Avila Rodríguez et al. 2018)

Želatina, která je odvozena z kolagenu, je široce používána v potravinářském průmyslu díky svým funkčním a bioaktivním vlastnostem. Želatina slouží v potravinářských produktech k různým účelům, jako jsou emulgátory, pěnidla, stabilizátory, materiál pro tvorbu biologicky rozložitelných filmů a mikroenkapsulační činidla. (Gómez-Guillén et al. 2011)

Praktická část

7 Měření bodu gelace

Praktická část této práce se zaměřuje na určování bodu gelace s použitím metod dynamického rozptylu světla. Cílem experimentů bylo ověření jejich využitelnosti pro studium sol-gel procesu vybraných materiálů a vyhodnocení, zda je tento způsob možné aplikovat i v praxi. Na základě teoretické rešerše byl navrhnout vhodný postup měření a jako hlavní zkoumaný materiál byla vybrána agaróza.

Experimentální aparatura a její jednotlivé komponenty byly podrobně popsány, stejně jako postup přípravy vzorků, průběh měření a metodika zpracování dat získaných z kamery pomocí softwaru MATLAB. Výsledky experimentů následně umožnily vyhodnotit účinnost navržených metod pro stanovení bodu gelace agarózy a diskutovat o nich v kontextu teoretických předpokladů a využitelnosti v praxi.

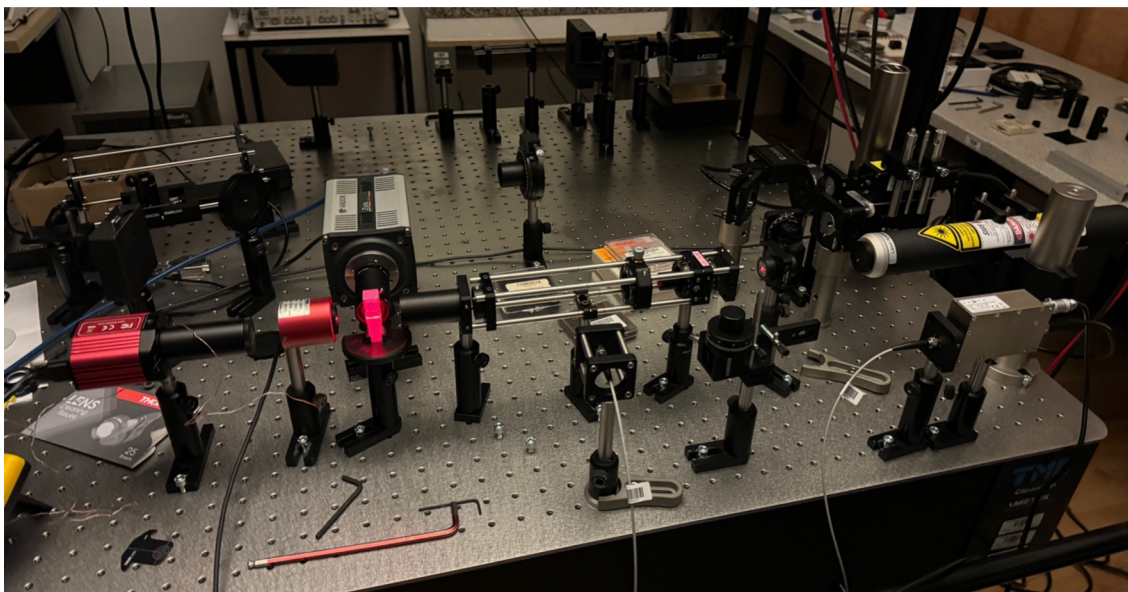
7.1 Příprava experimentu

K měření bodu gelace byla na základě teorie zvolena metoda MSDLS, neboť metoda využívá kameru pro zachycení signálu rozptýleného světla, což umožňuje sledovat dynamiku procesu v reálném čase. K měření byly vybrány dva typy biopolymerů: agaróza a kolagen.

Všechny experimenty probíhaly v optické laboratoři Katedry Fyziky na Technické univerzitě v Liberci. Toto prostředí poskytlo potřebné technické vybavení a podmínky pro přesné a spolehlivé měření dynamiky gelace vybraných vzorků.

7.1.1 Aparatura

V optické laboratoři Katedry fyziky je umístěn speciálně upravený optický stůl, který díky své modulovatelné konstrukci umožňuje flexibilní sestavení aparatury potřebné pro naše experimenty. Tento stůl je navíc izolován proti vnějším jevům a otřesům, což zaručuje stabilitu a přesnost během měření.

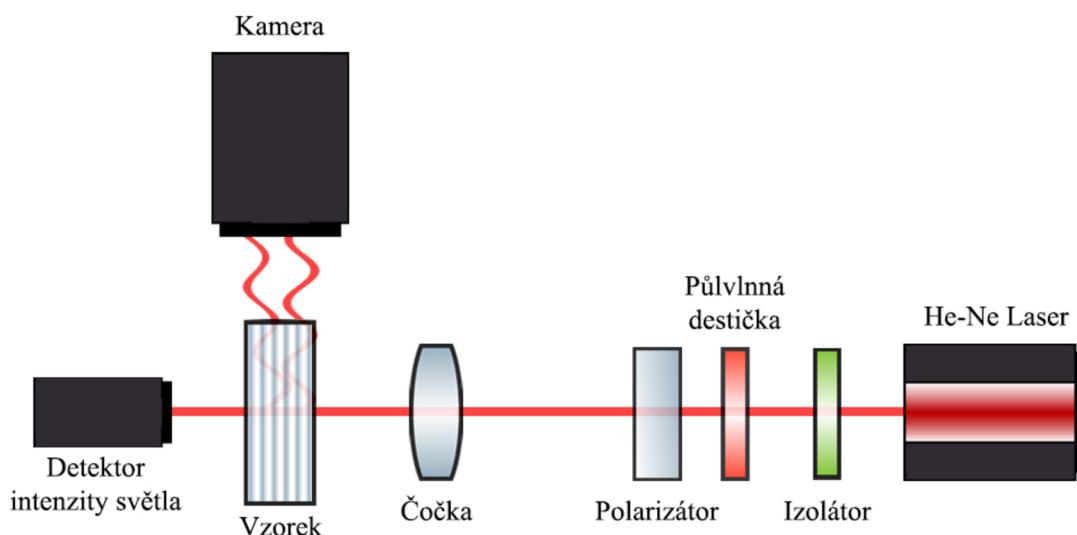


Obrázek 7.1: Sestavená aparatura

Základem experimentální sestavy je He-Ne laser výrobce Sios, model SL-04. Tento laser je charakteristický svou vlnovou délkou 632,8 nm. Jeho hlavními přednostmi jsou vysoká frekvenční a amplitudová stabilita a vysoká koherenci, což jsou klíčové atributy pro metodu MSDLS.

V konfiguraci aparatury následuje za laserem izolátor, který brání nežádoucímu zpětnému rozptylu světla, půlvlnná destička a polarizátor sloužící k úpravě polarizace světla a k nastavení intenzity. Systém doplňuje spojná čočka, která směřuje laserový paprsek přesně do vzorku umístěného v kyvetě. Laserové světlo prochází kyvetou a na straně pod úhlem 90° k paprsku je umístěna kamera Andor Zyla sCMOS, jež zachytává rozptýlené světlo.

Za kyvetou je instalován detektor intenzity světla, model Thorlabs S302C Thermal Power Sensor Head. Tento detektor umožňuje monitorovat množství světla procházejícího vzorkem, což slouží jako indikátor gelace, jelikož během gelace dochází k zesílení rozptylu světla a tedy k úbytku světla dopadajícího na detektor.



Obrázek 7.2: Schéma aparatury

Teplota během experimentů je monitorována pomocí teploměru Greisinger GMH 3200. Správné měření teploty je nezbytné pro měření gelace agarózy, aby bylo možné určit, kdy dojde k sol-gel přechodu.

7.1.2 Pracovní postup v krocích

Na základě teorie a výsledků prvních měření jsme ustanovili následující postup pro měření:

1. **Příprava vzorku agarózy a jeho umístění do kyvety** - Vzorek 1 % agarózy (nejprve bez nanočástic a poté s naničásticemi) byl připraven v požadované koncentraci, byl zahříván na teplotu 95 °C a následně umístěn do speciální kyvety, která byla vložena do měřicí aparatury.
2. **Nastavení vhodné intenzity světla z He-Ne laseru**
3. **Konfigurace parametrů kamery v programu Andor Solis** - Na kameře byla nastavena délka expozice a vzorkovací frekvence tak, aby specklový obrazec nebyl přexponovaný. Dále byl nastaven počet snímků na experiment - typicky 600 nebo 1200, v závislosti na specifických potřebách měření. Rozlišení zaznamenané oblasti bylo stanoveno na 512x512 pixelů s Pixel Binningem 4x4, což znamená, že bloky 4x4 pixelů byly sjednoceny do jednoho pixelu pro lepší zpracování obrazu a možnost dosáhnout potřebných vzorkovacích frekvencí.

4. **Záznam intenzity rozptýleného světla** - Kamera Andor Zyla, umístěná pod úhlem 90° k směru dopadajícího laserového paprsku, zaznamenávala intenzitu rozptýleného světla od vzorku.
5. **Měření při různých teplotách** - Vzorek agarózy postupně chladnul z počátečních $50-60^\circ\text{C}$ na cca 30°C . S blížícím se bodem gelace byl teplotní krok zjemněn na $1-2^\circ\text{C}$, aby bylo možné přesněji určit bod, kdy dochází k gelaci.
6. **Vyhodnocení dat v MATLABu** - Získaná data byla analyzována v programu MATLAB.

7.2 Zpracování a vyhodnocování dat

Proces zpracování dat získaných během měření bodu gelace byl klíčovou součástí experimentální práce. Ovládání sCMOS kamery Andor Zyla a nastavování jejích parametrů probíhalo prostřednictvím počítačové aplikace Andor Solis. Tato aplikace umožňovala nastavení klíčových parametrů, jako jsou délka expozice, vzorkovací frekvence (frame rate), počet zachycených snímků a rozlišení kamery. Během jednoho měření bylo obvykle zaznamenáno 200 až 1200 snímků, které byly uloženy ve formátu .tif a zachytávaly specklové pole.

Pro analýzu získaných snímků byl vybrán software MATLAB, díky jeho schopnosti zpracovat velké objemy dat a poskytnout nástroje pro jejich důkladnou analýzu a grafické zobrazení.

Pro zpracování a vyhodnocení experimentálních dat byly aplikovány tři rozdílné přístupy. První přístup se opíral o analýzu změn viskozity. V tomto případě bylo sledováno, jak se viskozita vzorku mění s teplotou a jak tyto změny korelují s procesem gelace. Pro demonstraci jednotlivých kroků zpracování dat z CCD kamery byla použita jako ukázková data z měření glycerolu s 200 nm polystyrenovými nanočásticemi.

Druhý přístup využíval metodu stanovování změn pomocí směrodatné odchylky v krátkých časových úsecích, kterou ke zpracování využili Devi, Chandran a Vasu v článku o měření viskoelasticity tkání pomocí metod dynamického rozptylu světla (Devi et al. 2007). Tato statistická metoda umožnila hodnotit variabilitu rozptýleného světla,

což bylo využito k detekci fluktuací v intenzitě světla, které jsou spojeny s pohybem částic a jejich velikostním rozložením v roztoku. V tomto případě změny ve směrodatné odchylce poskytly informaci, v jakém bodě ke gelaci došlo. Třetí přístup byl nejjednodušší, neboť sledoval pouze závislost intenzity světla, které prošlo vzorkem v závislosti na teplotě

Cílem bylo tyto tři přístupy porovnat, a zjistit který funguje lépe, případně zda se dají použít všechny.

7.2.1 První přístup přes hodnotu viskozity

V rámci tohoto zpracování byla data nejprve vizualizována v několika typech grafů: grafy dat z autokorelační funkce, ořízlá data a klíčové grafy zobrazující závislost viskozity na teplotě. Právě posledně jmenovaný graf byl nejdůležitější, neboť na základě změn viskozity s teplotou bylo možné určit bod gelace zkoumaného materiálu. Tato metodika umožnila stanovení rozmezí teplot, při které dochází k gelaci agarózy.

Postup zpracování dat z metody MSDLS přes hodnotu viskozity byl otestován na glycerolu s 200 nm polystyrenovými (dále PS) nanočásticemi ve spolupráci se Zorou Krykorkovou, která se ve své diplomové práci věnuje analýze viskozity glycerolu pomocí MSDLS. Tento otestovaný postup byl poté použit k určení bodu gelace

Nejprve byla nasnímána data z kamery. Jejich zpracování v jednotlivých krocích je pak následující:

1. **Vytvoření matice:** Nejprve se vytvoří nulová matice „sigma“ s 600 řádky (odpovídá počtu snímků) a 16384 sloupci (počet odpovídá celkovému počtu pixelů snímku o rozlišení 128 x 128 px). Tato matice bude využita k uchování upravených hodnot intenzity obrazu po jejich načtení a zpracování.

```
sigma = zeros(600,16384);
```

Zdrojový kód 7.1: Vytvoření matice

2. **Načtení a zpracování snímků:** Následně se načtou všechny naměřené snímky specklových polí ve formátu .tif. Pomocí for cyklu se všechny obrázky daného

názvu načtou převedou se jejich hodnoty pixelů na datový typ double. Dále se vypočítá průměrná intenzita celého obrázku a od každé hodnoty intenzity odečte tuto průměrnou hodnotu. Upravená data jsou převedena do vektorového formátu a uložena do příslušného řádku v matici „sigma“.

```
for i = 1 : 600
    Filename = strcat('NP40st_X', num2str(i), '.tif'); %najde
    obrázek
    imageData = imread(Filename); %matice hodnot intenzity obrázku
    DATA = double(imageData);
    val = mean(DATA(:)); %průměrná intenzit
    odecet2 = DATA - val;
    B = reshape(odecet2, [16384,1]); %předělení na vektor
    sigma(i,:) = B; % do matice
end
```

Zdrojový kód 7.2: Načtení a zpracování snímků

3. **Výpočet autokorelace:** Pro autokorelaci dat volíme autokorelační funkci $g_2(\tau)$ která je korelační funkcí optické intenzity \vec{I} . Funkce je vypočítána pro každý řádek v matici sigma s výjimkou prvního. Pro každé j od 2 až do počtu snímků (např. 600) se vypočítá průměrný součin prvků mezi prvním snímkem j -tým snímkem. Výsledek je uložen do vektoru „Rval“, který obsahuje hodnoty autokorelace pro každé zpoždění τ .

```
for j = 2:600
    Rval(j-1) = mean((sigma(1,:).*sigma((j),:)));
end
```

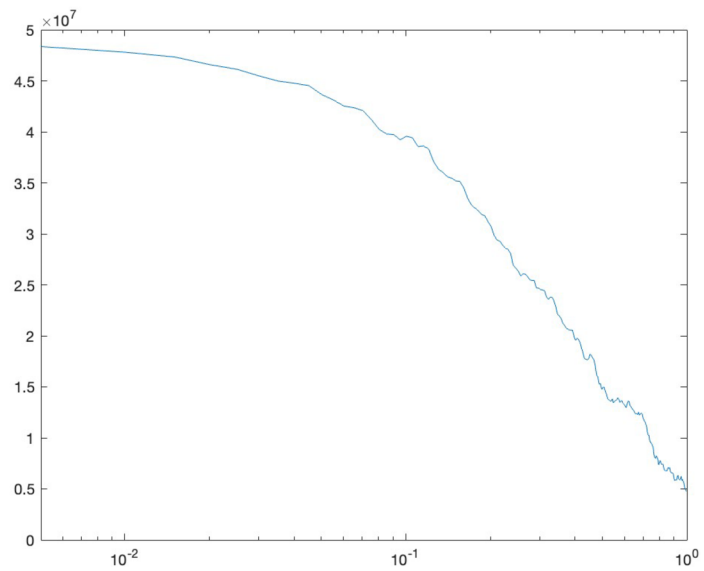
Zdrojový kód 7.3: Výpočet autokorelace

4. **Vizualizace autokorelační funkce:** Dále je nutné nastavit vzorkovací frekvenci, která byla při měření použita. Její inverzní hodnotou bude perioda mezi jednotlivými snímky. Časová osa je definována pomocí vektoru „t1“, který je lineárně rozložen podle počtu snímků. Při zachycení 600 snímků jde od 0 až do $599 \cdot$ (perioda). Autokorelační funkce je následně vykreslena na logaritmické ose x , což umožňuje lepší vizualizaci exponenciálního poklesu. Dále je tato funkce

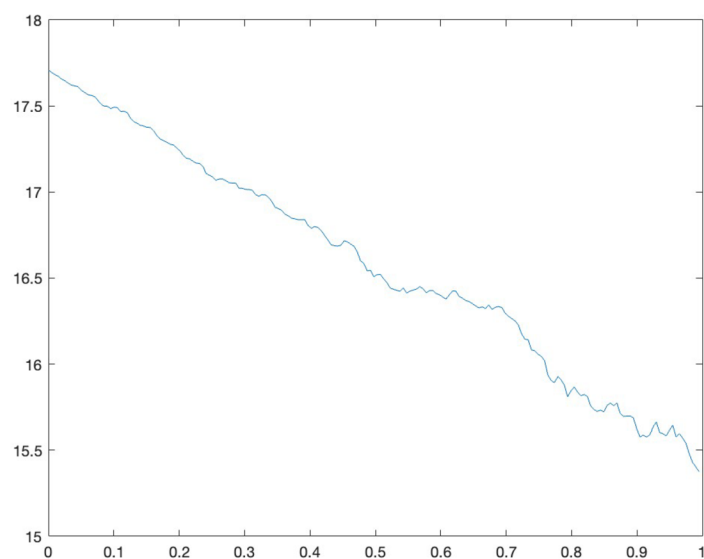
převedena na logaritmické měřítko a znovu vykreslena, což usnadňuje identifikaci a analýzu exponenciálních závislostí.

```
vz = 200;  
fz = 1/vz;  
t1 = linspace(0, (599*fz), 599);  
  
figure()  
semilogx(t1, Rval)  
  
Gln = log(Rval);  
figure()  
plot(t1, Gln)
```

Zdrojový kód 7.4: Vizualizace autokorelační funkce



Obrázek 7.3: Autokorelační funkce na logaritmické ose pro glycerol



Obrázek 7.4: Autokorelační funkce převedena na logaritmické měřítko pro glycerol

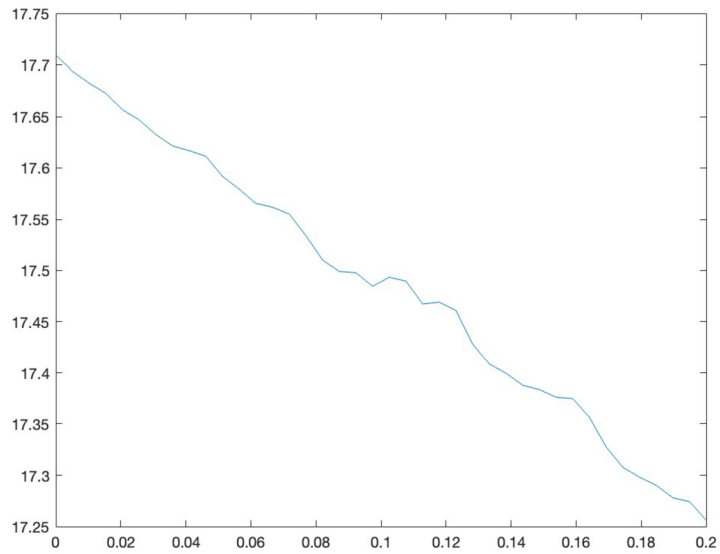
5. **Oříznutí dat, fittování a výpočet viskozity:** Data jsou oříznuta pouze na nejrelevantnější časový úsek a jsou znovu vizualizována pro lepší přehled. Připravená data jsou použita pro fittování lineárním modelem, což umožňuje určit klíčové parametry potřebné pro následný výpočet difuzního koeficientu a viskozity vzorku.

```
t2 = linspace(0, (40*fz), 40);
Gcut = Gln(1:40);
figure()
plot(t2, Gcut)

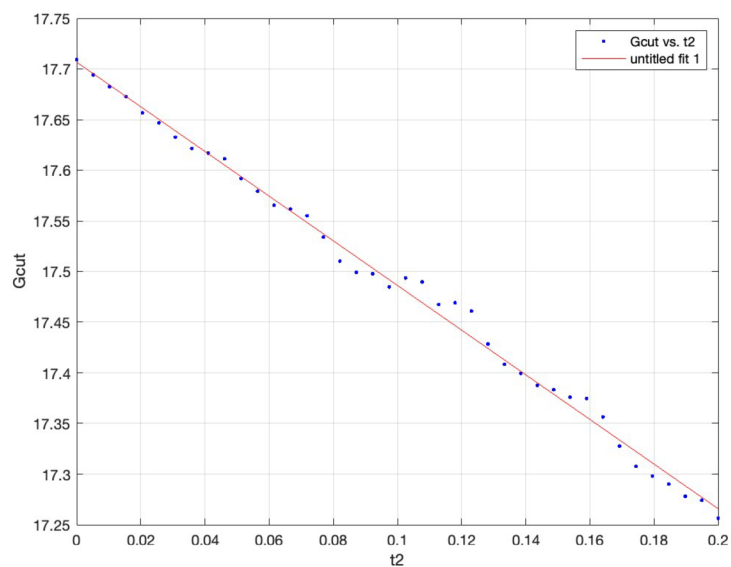
[xData, yData] = prepareCurveData( t2, Gcut );
ft = fitype( 'poly1' );
[fitresult, gof] = fit( xData, yData, ft );
h = plot( fitresult, xData, yData );
grid on

TT = - fitresult.p1
n = 1.3356;
la = 632.8*(10^-9);
T = 303;
k = 1.380649*10^-23;
fi = ((pi)*1)/2;
q = ((4*pi*n*sin(fi/2)))/la;
r = 2.000e-07;
D = TT/(q^2);
es = (k*T)/(3*pi*r*D)
```

Zdrojový kód 7.5: Oříznutí dat, fittování a výpočet viskozity



Obrázek 7.5: Oříznutá data pro glycerol



Obrázek 7.6: Fittování oříznutých dat glycerolu lineárním modelem

Z fittování dat získáme číselnou hodnotu parametru TT , který spojuje metodu měření s teoretickým výpočtem a na základě něho je možné určit difúzní koeficient pro výpočet viskozity.

Kompletní MATLAB kód použitý pro zpracování experimentálních dat z údajů o viskozitě je uveden v příloze A.

7.2.2 Druhý přístup přes směrodatnou odchylku

Pro další část našeho vyhodnocení jsme se rozhodli implementovat a porovnat alternativní přístup, který se zaměřuje na zpracování získání hodnoty směrodatné odchylky intenzity a normalizované intenzity pro každou teplotu agarózy, a na základě její změny v závislosti na teplotě, můžeme sledovat bod, kdy dojde ke gelaci.

Postup zpracování je kratší než u první metody, protože vůbec nepracujeme s autokorelační funkcí. Jednotlivé kroky zpracování naměřených dat jsou následující:

1. **Vytvoření matice:** Tento krok je stejný, jako u první metody. Zahrnuje však definici konstanty N , která specifikuje počet zpracovávaných obrazů. Díky tomu se dá rychle změnit kód v případě, že budeme mít odlišný počet snímků. Je vytvořena nulová matice „sigma“ s N řádky a 16384 sloupci. Matice sigma bude sloužit k uchování dat z obrazů ve formě jednorozměrných vektorů po jejich zpracování.

```
N = 600
sigma = zeros(N,16384);
```

Zdrojový kód 7.6: Vytvoření matice

2. **Načtení a zpracování snímků:** Následně se načtou všechny naměřené snímky specklových polí ve formátu .tif. To probíhá stejně, jako v minulé metodě. Dále se vypočítá průměrná intenzita celého obrázku. První výpočet určuje průměrnou intenzitu celého obrázku a ukládá ji do vektoru *val*. Poté se provádí normalizace intenzit obrázku tak, že se od každé hodnoty odečte minimální hodnota a výsledek se vydělí rozdílem maximální a minimální hodnoty, což zajišťuje, že všechny hodnoty jsou mezi 0 a 1. Průměrná hodnota těchto normalizovaných intenzit se ukládá do vektoru *valn*.

```
for i = 1 : N
    Filename = strcat('NP40st_X', num2str(i), '.tif'); %najde
    obrázek
    imageData = imread(Filename); %matice hodnot intenzity obrázku
    DATA = double(imageData);
```

```

val(i) = mean(DATA(:)); %průměrná intenzit
nn = (DATA-min(DATA))./(max(DATA)-min(DATA));
valn(i) = mean(nn(:));

```

end

Zdrojový kód 7.7: Načtení a zpracování snímků

3. **Výpočet standardní odchylky:** Nakonec se vypočítají standardní odchylky průměrných hodnot intenzit a jejich normalizovaných hodnot získaných z obrazových dat pro danou teplotu. Tyto hodnoty, *stdval* a *stdvaln*, poskytují kvantitativní míru variability intenzit mezi zpracovanými obrazy v jednom měření pro jednu teplotu. Ze změny vypočítaných standardních odchylek vůči teplotě je následně možné určit bod gelace. Na vyhodnocení zůstává, jestli je lepší zvolit průměrné hodnoty intenzity před normalizací nebo po normalizaci.

```

stdval = std(val)
stdvaln = std(valn)

```

Zdrojový kód 7.8: Výpočet standardních odchylek

Kompletní MATLAB kód použitý pro zpracování experimentálních dat přes směrodatnou odchylku je uveden v příloze A.

7.2.3 Třetí přístup přes měření intenzity světla

Třetím přístupem bylo zvoleno přímé měření intenzity světla, které projde vzorkem v závislosti na teplotě. Tato metoda slouží primárně k porovnání s metodou založenou na dynamickém rozptylu světla s využitím kamery. Klíčovým aspektem tohoto měření je sledování závislosti intenzity světla na teplotě vzorku v čase. V okamžiku, kdy vzorek dosáhne bodu gelace a začne tuhnout, dojde k výraznému snížení průchodu světla vzorkem, což vede k nižší intenzitě světla detekovaného na výstupu. Tento jev nám umožňuje určit bod gelace z měřené závislosti intenzity světla na teplotě. Výsledky tohoto přístupu budou následně porovnány s daty získanými z předchozích metod, aby bylo možné posoudit jejich přesnost.

Měření je velice jednoduché, měříme intenzitu světla detektorem a teplotu v časových krocích po 1s. Takto získaná data jsou zpracována opět v MATLABu následujícím způsobem:

1. **Načtení dat:** Data jsou načítána z externích souborů. **A** obsahuje data teploty a času z textového souboru, zatímco **B** obsahuje data intenzity světla a času z Excelového souboru.

```
A = readmatrix('teplota.txt');  
B = readmatrix('intenzita.xlsx');
```

Zdrojový kód 7.9: Výpočet standardních odchylek

2. **Extrakce dat:** Z načtených matic **A** a **B** se extrahují sloupce do 4 proměnných - čas pro teplotní data, hodnoty teploty, intenzity světla, čas pro hodnoty intenzity:

```
tT = A(:, 1);  
Temp = A(:, 2);  
I = B(:, 1);  
tI = B(:, 2);
```

Zdrojový kód 7.10: Výpočet standardních odchylek

3. **Převzorkování dat:** V tomto cyklu se provádí převzorkování teplotních dat tak, aby odpovídala časovému intervalu, ve kterém se měřila intenzita světla. Protože se teplota měřila v intervalech po 0,25 s, ale intenzita světla v intervalech po 1 s, každá čtvrtá hodnota je přiřazena novému vektoru, aby byl časový krok stejný.

```
for i = 1:4110  
    NexTem(i) = Temp(i*4);  
end
```

Zdrojový kód 7.11: Výpočet standardních odchylek

4. **Vynesení do grafů:** Hodnoty intenzity jsou oříznuty na čas od 1 s - 4110 s. Vektor je transponován pro konzistenci s ostatními daty. Na závěr je vyneseno graf zobrazující vztah mezi teplotou a intenzitou světla, které prošlo vzorkem.

```
NewI = I(1:4110);  
NexTem = transpose(NexTem);
```

```
figure()  
plot(NexTem,NewI)
```

Zdrojový kód 7.12: Výpočet standardních odchylek

Kompletní MATLAB kód použitý pro zpracování experimentálních dat přes měření intenzity světla je uveden v příloze A.

7.3 Určení bodu gelace agarózy

Jako primární materiál k ověření metod MSDLS byla zvolena agaróza (viz. kapitola 5), což je biopolymer, jehož příprava je obecně považována za relativně jednoduchou. Přestože je příprava agarózy obvykle bezproblémová, zpočátku jsme při přípravě roztoku o požadované koncentraci narazili na obtíže. Při prvních pokusech byla agaróza zahřívána na příliš nízkou teplotu, což mělo za následek, že se nerozpustila úplně a v roztoku zůstávaly nerozpuštěné částice. Tento problém byl vyřešen optimalizací teplotního režimu, kdy bylo zjištěno, že pro úplné rozpuštění agarózy je nutné dosáhnout vyšší teploty. V rámci experimentů byly připraveny vzorky jak čisté agarózy, tak vzorky agarózy s přidanými PS nanočásticemi o velikosti 200 nm, které měly zapříčinit lepší zachycení rozptylu světla kamerou.

7.3.1 Příprava vzorku

Příprava vzorků agarózy byla klíčovou fází pro měření bodu gelace. Iniciálně jsme experimentovali s koncentrací 0,1 %, která se ukázala být příliš nízká, jelikož roztok nezgelovatěl. Po této zkušenosti jsme zvolili jako optimální koncentraci pro pozorování gelace hodnotu přibližně 1 hm. %.

Celkový objem kyvety, který jsme používali pro měření, byl okolo 3 ml. Abychom však měli dostatek roztoku pro opakovaná měření, cílili jsme na přípravu 10-20 ml 1% roztoku agarózy. Roztok jsme nejprve míchali a zahřívali na magnetickém míchadle na teplotu kolem 80 °C. Tato teplota se však ukázala být nedostatečná pro úplné rozpuštění agarózy, což mělo za následek nekonzistentní data.

Abychom zlepšili rozpustnost agarózy, upravili jsme postup tak, že po navážení agarózy a přidání destilované vody jsme roztok zahřívali ve vodní lázni po dobu 20-30

minut na teplotu 96 °C. Tento způsob přípravy se osvědčil pro úplné rozpuštění agarózy a zajištění homogenního roztoku.

Celkem jsme připravili dva 1% roztoky agarózy. První obsahoval čistou agarózu, zatímco do druhého roztoku jsme přidali malé množství 1% 200 nm PS nanočástic, které sloužily k zlepšení zobrazení rozptylu světla díky jejich schopnosti modifikovat optické vlastnosti roztoku. Přítomnost nanočástic byla zamýšlena jako prostředek pro detailnější vizualizaci změn během gelace agarózy.

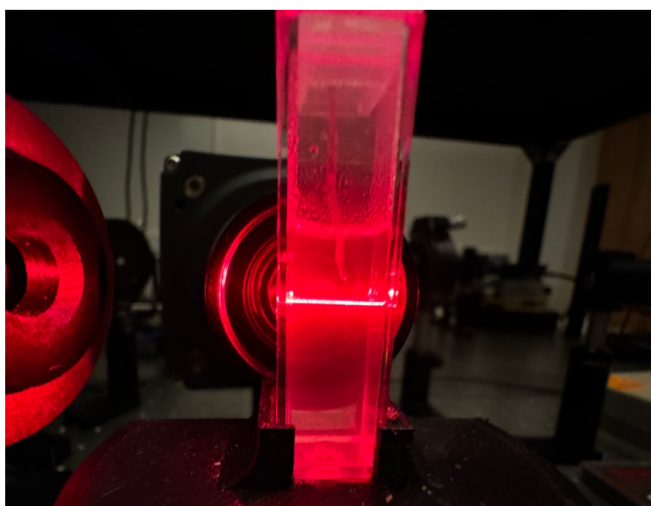
Agaróza [g]	dH ₂ O [g]	Koncentrace [hm. %]
0,2401	24,0320	1,00 %

Tabulka 7.1: Příprava 1 % roztoku čisté agarózy

Agaróza [g]	dH ₂ O [g]	1% 200nm PS nanočástic [g]	Koncentrace [hm. %]
0,1390	13,7556	0,1140	1,00 %

Tabulka 7.2: Příprava 1 % roztoku agarózy + 200nm PS nanočástice

Po přípravě roztoků jsme vzorky přelili do kyvet, do kterých jsme zavedli teploměr pro monitorování teploty. Kyvety byly po jednom následně umístěny do aparatury a začali jsme kamerou zaznamenávat specklové obrazce s postupně klesající teplotou.



Obrázek 7.7: Laserové světlo procházející skrze vzorek 1 % čisté agarózy



Obrázek 7.8: Kamera snímající rozptýlené světlo ze vzorku

7.3.2 Měření

Měření bodu gelace agarózy bylo provedeno nejprve s 1 % roztokem čisté agarózy bez přídavku nanočástic. Vzorek byl postupně ochlazován z počáteční teploty 60 °C až na konečných 30 °C. Pro detailní sledování změn bylo měření rozděleno do několika fází: nejprve byly teplotní kroky nastaveny na 5 °C, což umožňovalo rychlou orientaci v chování vzorku. Od teploty 42 °C pak byly kroky zjemněny na 2 °C, aby bylo možné detailněji sledovat průběh gelace v kritické oblasti blízké předpokládanému bodu gelace. Parametry snímání se měnily v průběhu měření podle toho, jak to vyžadovaly podmínky během experimentu:

- **Počet snímků:** Pro každé měření bylo zaznamenáno 1200 snímků.
- **Expoziční čas:** Byl nastaven na 0,0025 sekundy pro teplotní rozmezí 60°C až 36°C, což bylo ideální pro zachycení rychlejších změn v rozptylu světla. Pro teploty 34 °C až 32 °C byl expoziční čas prodloužen na 0,005 sekundy, a pro 30 °C byl nastaven čas 0,01 sekundy.
- **Vzorkovací frekvence:** Začátkem experimentu byla frekvence nastavena na 400 Hz, která byla snížena na 200 Hz v rozmezí 34 °C až 32 °C a na 100 Hz na teplotě 30 °C, kdy bylo zaznamenáno zpomalení dynamiky procesu v důsledku zgelování vzorku.
- **Rozlišení a Pixel Binning:** Rozlišení zaznamenávané oblasti bylo nastaveno na 512x512 pixelů s nastavením Pixel Binning 4x4.

V druhém měření byl použit vzorek 1% roztoku agarózy s přidanými 200 nm PS nanočásticemi, u nichž bylo předpokládáno, že umožní lepší a detailnější sledování rozptylu světla během gelace na specklových obrazcích. Tento vzorek byl podroben měření v rozsahu teplot od 65 °C až k 30 °C. Měření bylo opět rozděleno do několika fází: počáteční měření od 65 °C do 45 °C bylo provedeno v krocích po 5 °C.

Od teploty 45 °C do 38 °C byly teplotní kroky zjemněny na 2 °C, aby bylo možné detailněji zaznamenat začínající fáze gelace. V kritickém rozmezí od 38 °C do 34 °C byly teplotní kroky ještě více zjemněny na 1 °C, což reflektovalo potřebu zachytit mikrostrukturální změny v blízkosti očekávaného bodu gelace. Po dosažení 34 °C bylo měření opět prováděno v krocích po 2 °C, dokud nebyla dosažena konečná teplota 30 °C.

Kamera byla při tomto měření nastavena následovně:

- **Počet snímků** byl nastaven na 600
- **Expoziční čas** byl jednotně nastaven na 0,005 s pro celé měření
- **Vzorkovací frekvence** byla nastavena na 200 Hz, což umožnilo adekvátně zaznamenávat dynamiku procesu v různých teplotních fázích.
- **Rozlišení a Pixel Binning**: Rozlišení zaznamenávané oblasti bylo nastaveno na 512x512 pixelů s nastavením Pixel Binning 4x4.

Následně byla data získaná z měření zpracována v programu MATLAB, jak je detailně popsáno v kapitole 7.1.2. Tento proces zahrnoval komplexní analýzu získaných specklových obrazců a jejich vyhodnocení, což umožnilo přesně určit bod gelace agarózy.

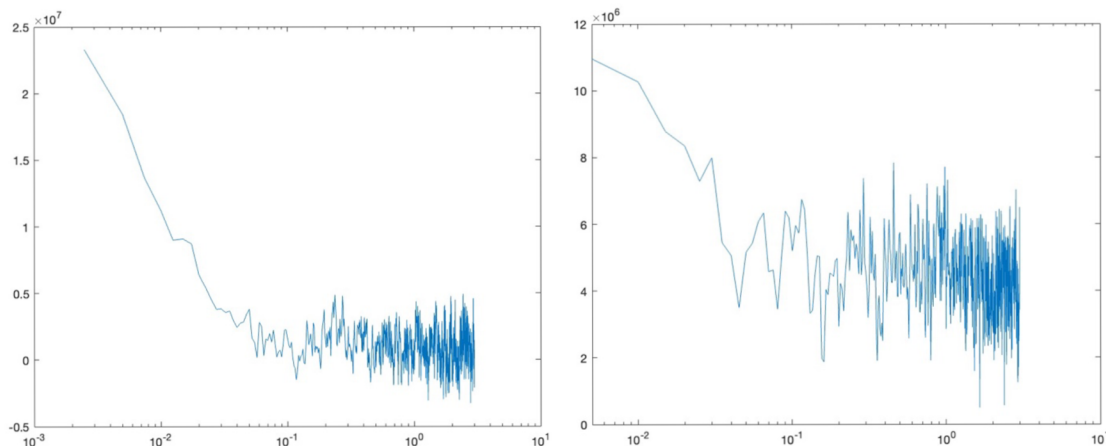
7.4 Výsledky měření bodu gelace agarózy

Na základě výše vysvětlených metod zpracování v kapitolách 7.2.1. – 7.2.3. bylo provedeno zpracování dat. Na závěr práce pak dochází k vyhodnocení výsledků a určení, který z přístupů zpracování může být pro určení bodu gelace nejrelevantnější.

7.4.1 Výsledky první metody přes viskozitu

Nejdříve byla naměřená data zpracována v programu MATLAB pomocí prvního přístupu přes viskozitu, popsaném podrobně v kapitole 7.2.1.

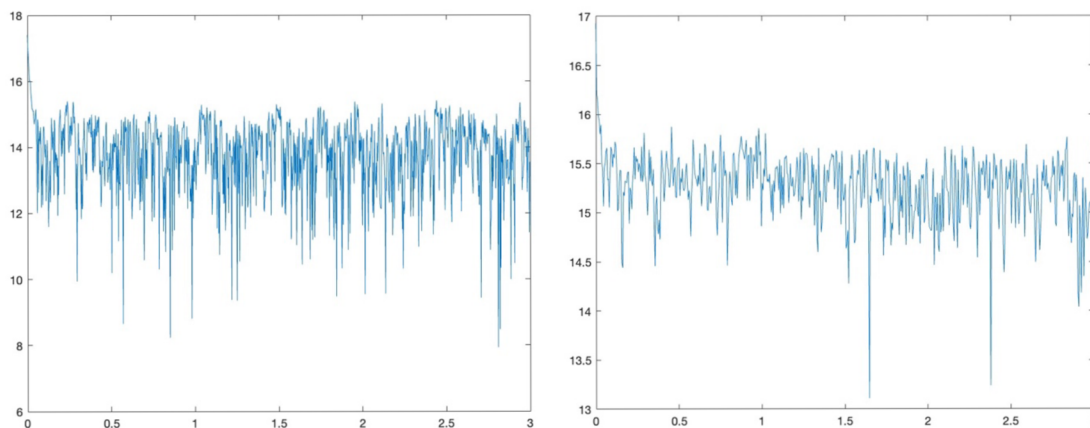
Nejprve byla data pro každou teplotu autozkorelována a zobrazena v logaritmickém měřítku. V grafech jsou pro ukázkou vyneseny vždy data pro vzorky s teplotou 40 °C, analýza pro ostatní teploty vypadá obdobně:



Graf 7.1: Autozkorelovaná data při teplotě 40 °C.

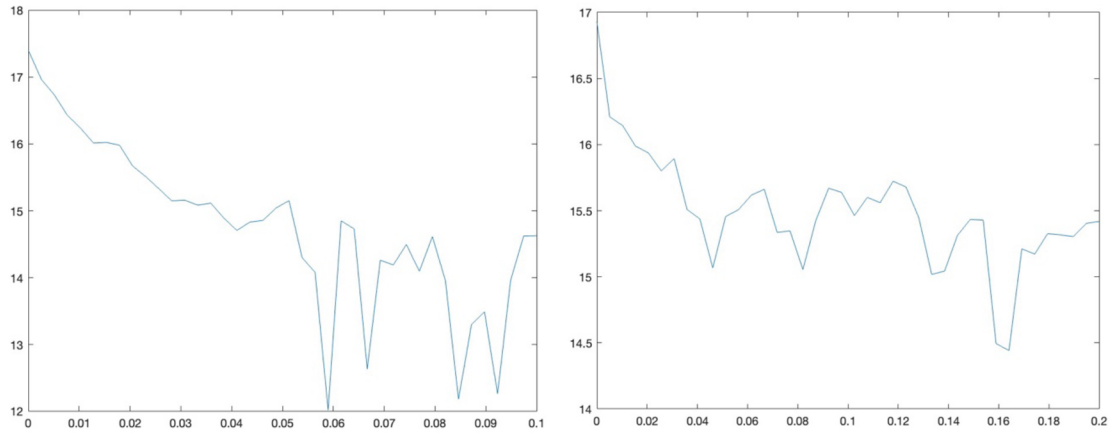
Vlevo 1 % roztok čisté agarózy. Vpravo 1 % roztok agarózy + 200nm PS nanočástice

Relevantní úsek dat byl oříznut, aby se zaměřil pouze na důležité části spektra, a nakonec byla data proložena lineární funkcí pro kvantitativní vyhodnocení změn v závislosti na teplotě a identifikaci bodu gelace.

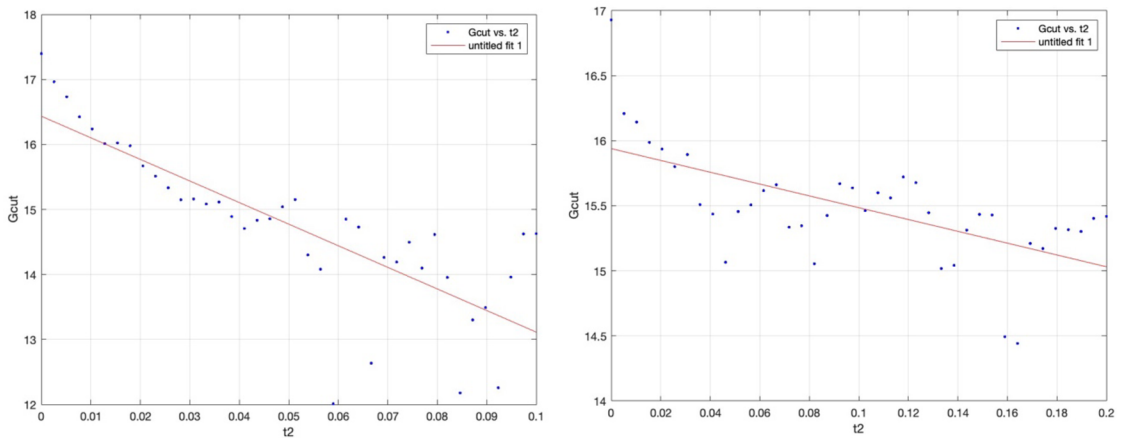


Graf 7.2: Oříznutá data při teplotě 40 °C.

Vlevo 1 % roztok čisté agarózy. Vpravo 1 % roztok agarózy + 200nm PS nanočástice



Graf 7.3: Oříznutý ještě menší úsek při teplotě 40 °C.
 Vlevo 1 % roztok čisté agarózy. Vpravo 1 % roztok agarózy + 200nm PS nanočástice



Graf 7.4: Oříznutá data proložena lineární funkcí při teplotě 40 °C.
 Vlevo 1 % roztok čisté agarózy. Vpravo 1 % roztok agarózy + 200nm PS nanočástice

Z této analýzy dat jsme byli schopni zjistit hodnoty viskozity vzorku pro všechny měřené teploty:

1 % Agaróza		1 % Agaróza + 200 nm PS Nanočástice	
Teplota [°C]	Viskozita [kg/m·s]	Teplota [°C]	Viskozita [kg/m·s]
-	-	65	0,3472
60	0,1045	60	0,6409
55	0,0901	55	0,6191
50	0,1078	50	0,1842
45	0,0642	45	0,4227
-	-	43	0,1961
42	0,0184	42	0,3859
40	0,0243	40	0,1776
38	0,0441	38	0,7123
-	-	37	0,6282
36	0,1024	36	0,9307
-	-	35	1,0973
34	2,0639	34	4,4429
32	1079,8	32	43,0682
30	-118,38	30	67,371

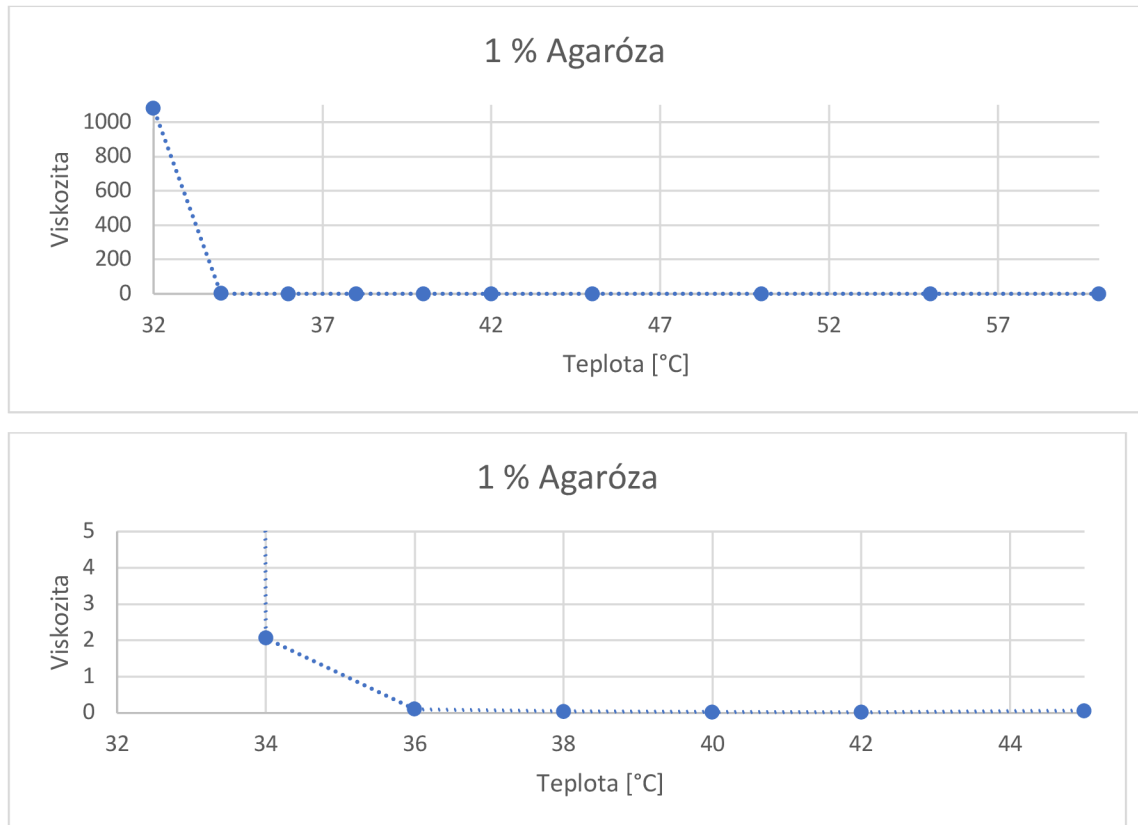
Tabulka 7.3: Získané hodnoty viskozity agarózy v závislosti na teplotě

Je však třeba podotknout, že hodnoty viskozity, které byly získány tímto zpracováním dat, nemusí odpovídat reálným hodnotám viskozity pro agarózu. V kontextu naší metody však konkrétní numerické hodnoty viskozity nejsou používány jako přímý ukazatel fyzikálních vlastností materiálu. Technika je založena primárně na pozorování změny viskozity v závislosti na teplotě, a ne na absolutních hodnotách viskozity. Důraz je kladen na identifikaci bodu, kde dochází ke změnám těchto hodnot, což je využíváno pro stanovení bodu gelace. To znamená, že i když naměřené hodnoty nemohou být interpretovány jako přesné údaje o viskozitě, ukazují relativní změny v ochlazujícím se vzorku agarózy. Pro jednoduchou orientaci čtenáře v textu se však nadále bude používat pojmenování tohoto parametru jako viskozita. V průběhu experimentu se hodnoty viskozity u obou

vzorků nejprve měnily jen mírně, což svědčí o stabilní fázi před začátkem gelace. Avšak při teplotách mezi 34 - 36 °C, došlo k prudké změně těchto hodnot, což indikuje začátek přechodu agarózy do gelového stavu. Tento bod, kde dochází k náhlému nárůstu viskozity, lze tedy označit jako bod, kdy začíná docházet ke gelaci jednotlivých vzorků agarózy.

U vzorku čisté agarózy byla při teplotě 30 °C vypočítána záporná hodnota viskozity. To může být vysvětleno technickými omezeními měřicí aparatury. Je to pravděpodobně způsobeno tím, že když dojde k úplné gelaci, pohyblivost částic v agaróze se rapidně snižuje a může dosáhnout bodu, kde je pohyb tak malý, že kamerou by byl detekovatelný pouze v dlouhém časovém úseku. V důsledku toho se může zdát, že viskozita klesá až do negativních hodnot, což ukazuje na limitaci metody, kdy přestává být možné po zgelování materiálu zaznamenat relevantní data. Do grafů proto tato poslední hodnota nebyla zahrnuta.

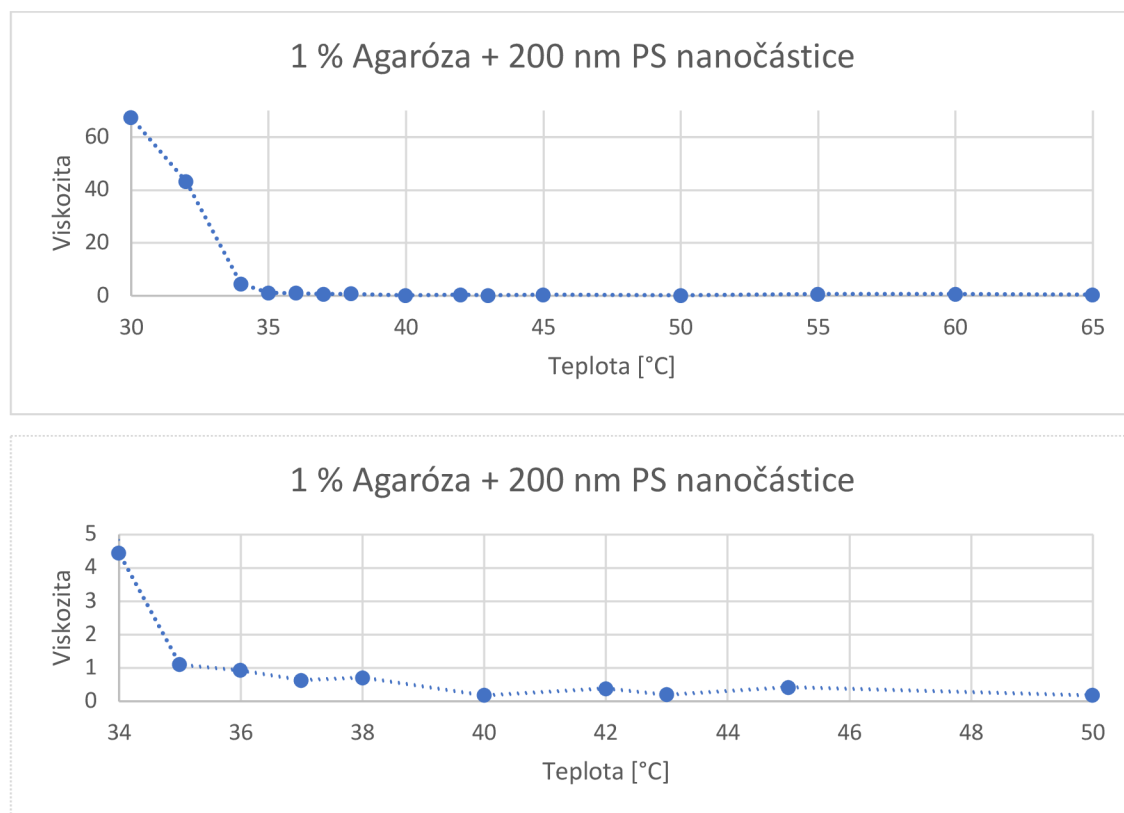
Pro lepší vizualizaci a srovnání obou vzorků – čisté agarózy a agarózy s nanočásticemi – byla závislost viskozity na teplotě vynesena do grafů. Tyto grafy jasně ukazují, jak viskozita vzrůstá v blízkosti teploty gelace:



Graf 7.5: Závislost viskozity na teplotě roztoku 1 % čisté agarózy ve 2 různých měřítkách

Na přiložených grafech je zřetelně vidět, jak se viskozita vzorků agarózy měnila v závislosti na teplotě. Do teploty 38 °C viskozita téměř nevykazovala žádné změny, což svědčí o stabilním stavu roztoku. Při 36 °C došlo k mírnému nárůstu viskozity, což může naznačovat začínající mikrostrukturální změny v agaróze. Výrazný skok v hodnotách viskozity byl zaznamenán při 34 °C, což jednoznačně signalizuje probíhající gelaci. Při dalším snižování teploty na 32 °C byla viskozita již enormně vysoká, což ukazuje na úplnou gelaci agarózy.

Zde následují grafy závislosti viskozity na teplotě u roztoku agarózy obsahující nanočástice ve 2 různých měřítcích:



Graf 7.6: Závislost viskozity na teplotě roztoku 1 % agarózy s nanočásticemi ve 2 různých měřítcích

Na grafech zobrazujících měření agarózy s přidávanými 200 nm polystyrenovými nanočásticemi lze pozorovat podobnou závislost viskozity, jako u vzorku bez nanočástic. Do teploty 40 °C jsou hodnoty viskozity téměř neměnné. Od teploty 38 °C však začíná mírný nárůst viskozity, který pokračuje velmi pozvolna až do 35 °C. Při 34 °C dochází k výraznému nárůstu viskozity, což signalizuje, že v této fázi již začala gelace agarózy.

Viskozita při 32 °C a 30 °C nadále narůstá a zůstává již velmi vysoká, což potvrzuje, že agaróza s nanočásticemi úplně zgelovatěla.

Na rozdíl od vzorku bez nanočástic však u vzorku s nanočásticemi nedošlo k poklesu hodnot viskozity do záporných čísel. To potvrzuje předpoklad, že nanočástice dobře rozptylují světlo a díky tomu dokáže kamera lépe zachytit jeho fluktuace.

Z analýzy obou vzorků – čisté agarózy i agarózy s přidanými nanočásticemi, byla teplota gelace agarózy určena v rozmezí **32 - 35 °C**. Toto rozmezí bylo určeno na základě výsledků a pozorování, že proces gelace začíná přibližně u 35 °C a agaróza dosahuje plné gelace kolem teploty 32 °C. Přesnost tohoto měření by mohla být dále zvýšena, pokud by byly teplotní kroky během experimentu nastaveny ještě nižší. Menší teplotní kroky by umožnily detailnější sledování změn ve viskozitě a specklových obrazcích, což by přispělo k lepší lokalizaci přesného bodu gelace.

Další nepřesnosti můžou být způsobeny měřením teploty uvnitř kyvety, jelikož není možné umístit teploměr přímo do místa, kudy prochází laserový paprsek. To by totiž narušilo výsledné specklové pole. V důsledku toho může docházet k mírným odchylkám v teplotě, protože teploměr registruje teplotu v jiné části kyvety než je oblast, kterou analyzujeme. Tato skutečnost může vést k drobným nepřesnostem ve výsledcích, což je důležité brát v úvahu při interpretaci měřených dat. Ideální by bylo umístit celý systém do kontrolovaného prostředí a teplotu přesně řídit.

7.4.2 Výsledky druhé metody přes směrodatnou odchylku

Dále byla data vyhodnocena pomocí druhého přístupu přes směrodatnou odchylku, který byl popsán v kapitole 7.2.2.

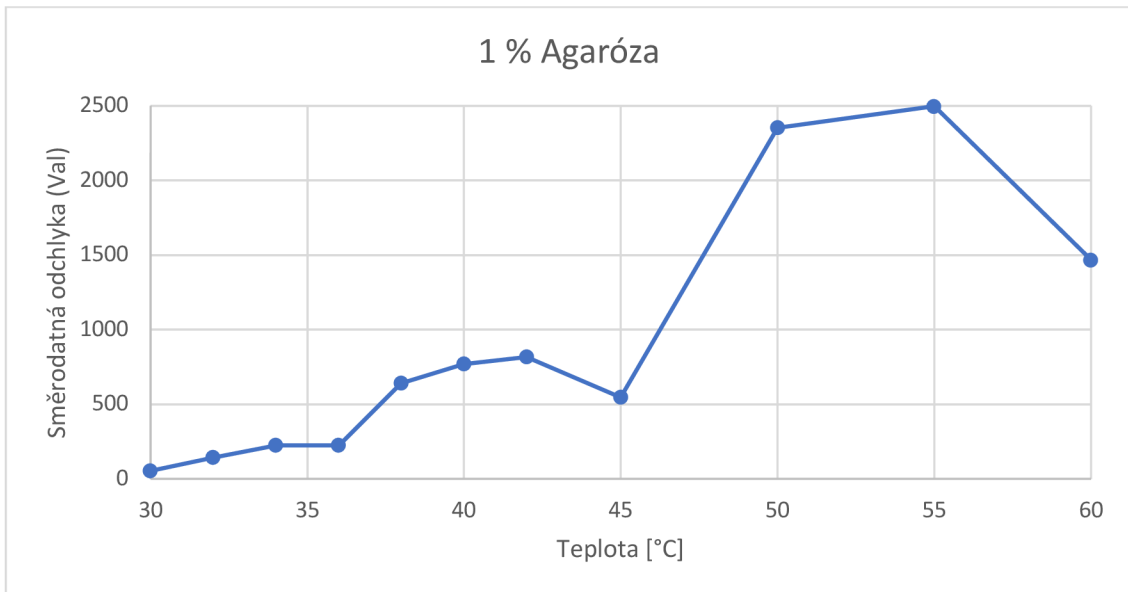
Jako výsledek zpracování snímků jsme získali standardní odchylky z dvou parametrů: **val** a **valn**. Směrodatná odchylka **val** reprezentuje rozptyl průměrné intenzity zaznamenané v každém snímku. Směrodatná odchylka **valn** představuje rozptyl normalizovaných intenzit snímků, kde každá hodnota intenzity je v rozsahu od 0 do 1.

Výsledky pro vzorek čisté agarózy a agarózy s přidáním 200nm PS nanočásticemi jsou shrnuty v následující tabulce:

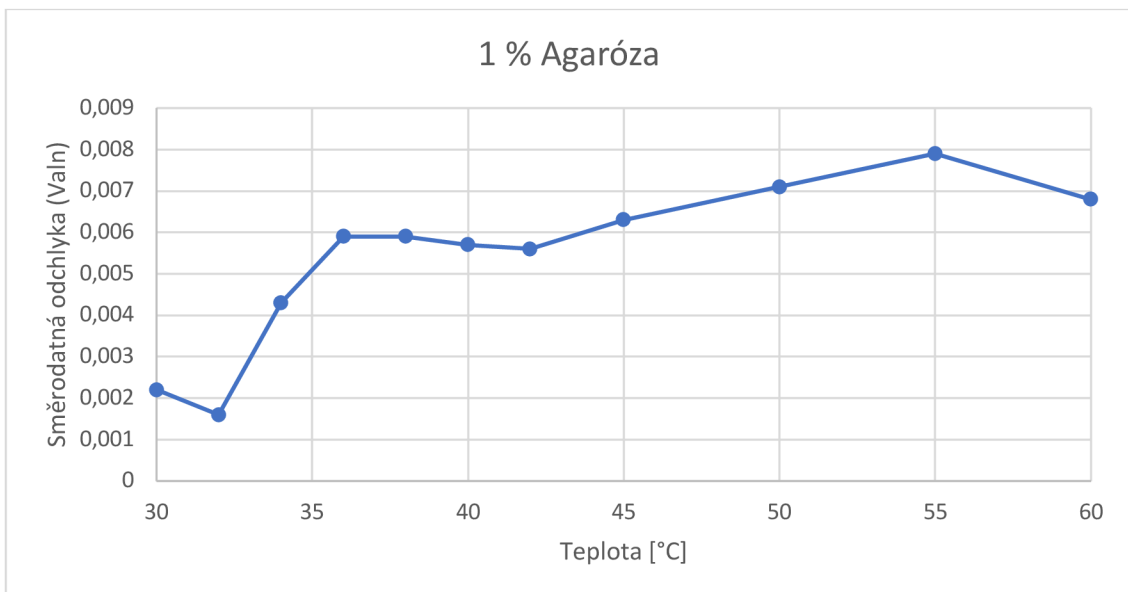
1 % Agaróza			1 % Agaróza + 200 nm PS Nanočástice		
Teplota [°C]	Směr. odch. (val)	Směr. odch. (valn)	Teplota [°C]	Směr. odch. (val)	Směr. odch. (valn)
-	-	-	65	977	0,0069
60	1467	0,0068	60	707	0,0058
55	2498	0,0079	55	332	0,0061
50	2354	0,0071	50	214	0,0057
45	546	0,0063	45	282	0,0054
-	-	-	43	225	0,0054
42	818	0,0056	42	241	0,0052
40	771	0,0057	40	297	0,0054
38	641	0,0059	38	261	0,0053
-	-	-	37	221	0,005
36	226	0,0059	36	153	0,0047
-	-	-	35	140	0,0038
34	225	0,0043	34	80	0,0024
32	143	0,0016	32	15	0,0026
30	53	0,0022	30	16	0,0008

Tabulka 7.4: Hodnoty směrodatných odchylek intenzity v závislosti na teplotě

Níže jsou pak grafy zobrazující závislost obou směrodatných odchylek na teplotě pro oba typy vzorků:



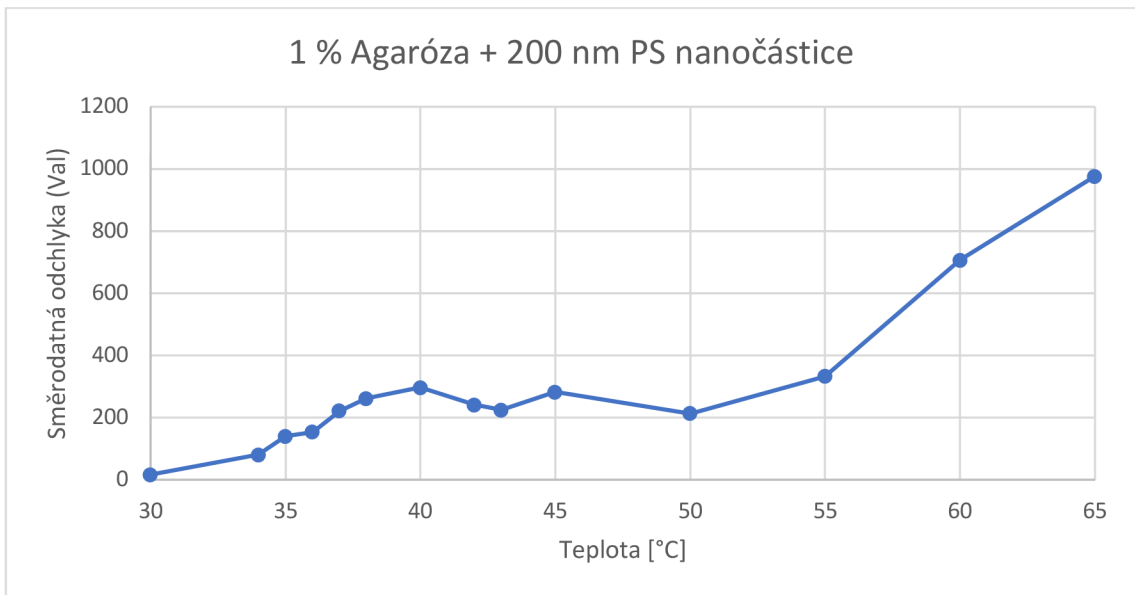
Graf 7.7: Závislost směrodatné odchylky intenzity na teplotě roztoku 1 % agarózy



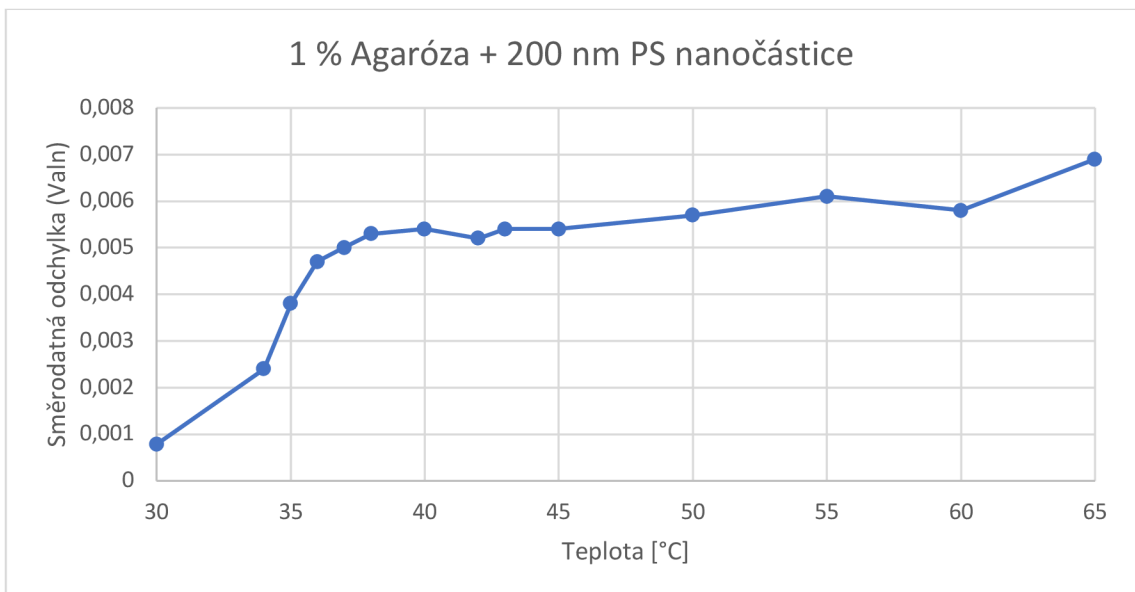
Graf 7.8: Závislost směrodatné odchylky normalizované intenzity na teplotě roztoku 1 % agarózy

Na výsledném grafu směrodatné odchylky intenzity v závislosti na teplotě byl zaznamenán její prudký pokles mezi 50 a 45°C, který ale neodpovídá datům získaným z předchozího přístupu měření přes viskozitu. Zatímco podle prvního přístupu byl bod gelace určen mezi 35-32 °C, v této oblasti nedochází k žádné zjevné změně ve směrodatné odchylce intenzity.

V případě směrodatné odchylky z normalizované intenzity je však situace jiná. Zde je pozorován stabilnější trend, kde hodnota zůstává relativně konstantní až do 36 °C, kdy začíná docházet k poklesu, což signalizuje začátek gelace. Vzestup hodnoty směrodatné odchylky na konci grafu je důsledkem limitace metody, který už byl uváděn výše - vlivem gelace je pohyb tak malý, že kamerou by byl detekovatelný pouze v dlouhém časovém úseku. Data jsou tedy v tomto rozsahu již nerelevantní.



Graf 7.9: Závislost směrodatné odchylky intenzity na teplotě roztoku 1 % agarózy s nanočásticemi



Graf 7.10: Závislost směrodatné odchylky normalizované intenzity na teplotě roztoku 1 % agarózy s nanočásticemi

V případě 1 % agarózy s 200 nm PS nanočásticemi se při analýze závislosti směrodatné odchylky intenzity na teplotě neobjevuje prudký výkyv, jak bylo pozorováno u čisté agarózy, ale ani nebyl zaznamenán výraznější pokles v očekávaném rozmezí teplot, kde by mělo dojít k gelaci.

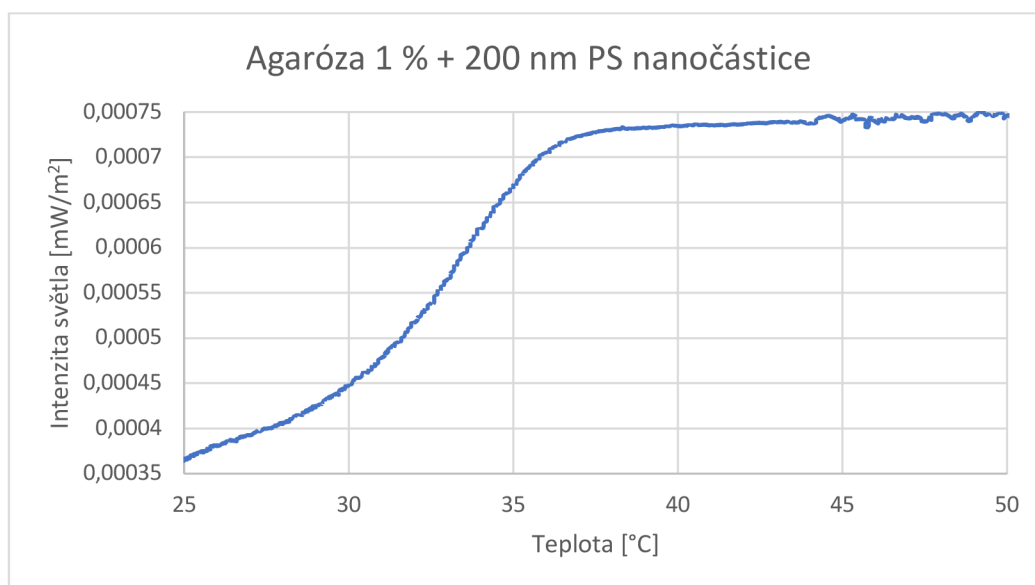
U směrodatné odchylky normalizované intenzity u stejného vzorku byl pozorován pokles, který začínal pozvolna již u 38 °C a výraznější pokles nastal od 36 °C, což koresponduje s očekávaným teplotním rozmezím, kdy u agarózy začíná docházet ke gelaci.

Celkově lze zhodnotit, že směrodatná odchylka normalizované intenzity v obou případech (čistá agaróza a agaróza s nanočásticemi) lépe vypovídá o bodu gelace než směrodatná odchylka intenzity.

7.4.3 Výsledky třetí metody přes intenzitu světla

Dále byla naměřena a vyhodnocena data pomocí třetího přístupu přes měření intenzity světla, který byl popsán v kapitole 7.2.3.

Výsledkem byl tento graf, zobrazující intenzitu světla, které prošlo vzorkem agarózy, v závislosti na teplotě:



Graf 7.11: Závislost intenzity světla na teplotě vzorku

Na základě závislosti intenzity světla na teplotě lze určit, že k prvnímu výraznějšímu poklesu intenzity začíná docházet při teplotě 37 °C. Intenzita nejvíce klesá při teplotě kolem 33 °C, následně se tempo poklesu zpomaluje. Lze se tedy domnívat, že při teplotě 33 °C probíhá gelace agarózy v plném rozsahu, což vede k tomu, že většina vzorku se již bude nacházet v gelovém stavu.

Tato zjištění jsou v souladu s teplotním rozmezím bodu gelace 36 °C - 32 °C, které bylo určeno z předchozích dvou přístupů analýzy dynamického rozptylu světla. Skutečnost, že bod gelace identifikovaný prostřednictvím změn intenzity leží v rámci tohoto rozmezí, poskytuje další potvrzení o správnosti a přesnosti metod použitých pro jeho stanovení.

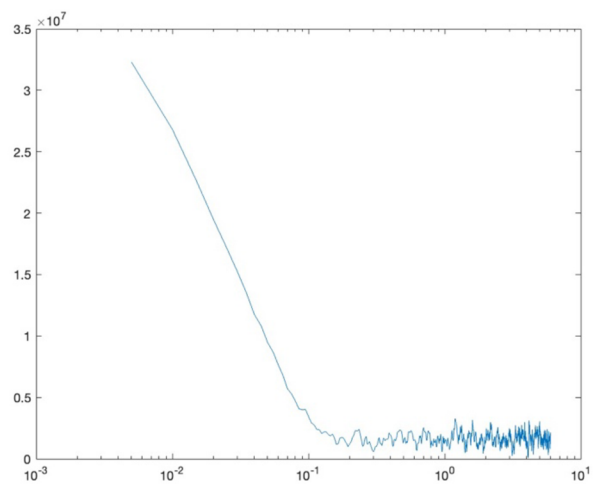
7.5 Určení bodu gelace dalších systémů

V rámci praktické části jsme se rozhodli ověřit aplikovatelnost metod dynamického rozptylu světla na stanovení bodu gelace nejen u agarózy, ale také na jiných systémech, konkrétně na kolagenu. Tento krok byl motivován snahou rozšířit spektrum materiálů, na kterých jsou naše metody schopny měřit

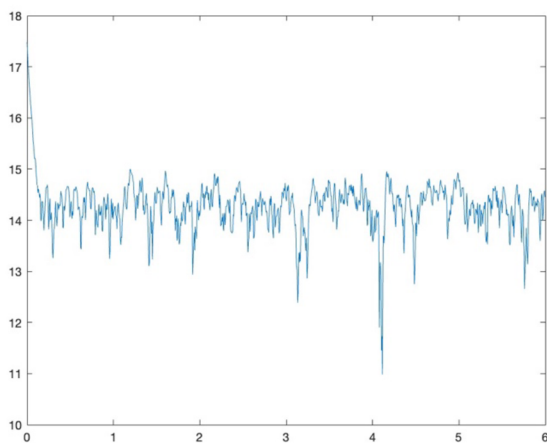
Kolagen, jako biopolymer s významnými strukturními a funkčními vlastnostmi, měl ale zásadní rozdíl oproti agaróze. Oproti agaróze, kde gelace probíhá reverzibilně, kolagen podléhá nevratné gelaci, která je spojena s denaturací. Tento proces zahrnuje rozpad trojšroubovicové struktury kolagenu, což může mít za následek ztrátu jeho původních vlastností a komplikace v přípravě stabilních vzorků pro měření rozptylu světla.

7.5.1 Výsledky měření kolagenu

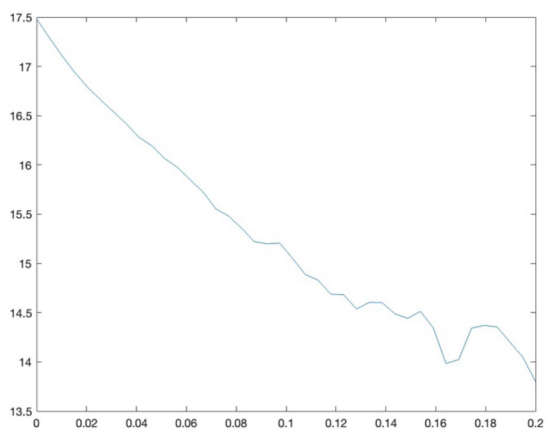
Bohužel, výsledná data získaná z měření na kolagenu se ukázala jako nevěrohodná a neumožnila spolehlivě určit bod gelace. Neúspěch je přímo spojen s výzvami spojenými s přípravou vzorku, zvláště s problémy nevratné gelace a potenciální denaturací kolagenu během experimentálních postupů a zahřívání vzorků. Výrazné strukturní změny, které kolagen podstupuje, zřejmě ovlivnily optické vlastnosti materiálu a tím i možnost jeho analýzy pomocí zvolených metod dynamického rozptylu světla.



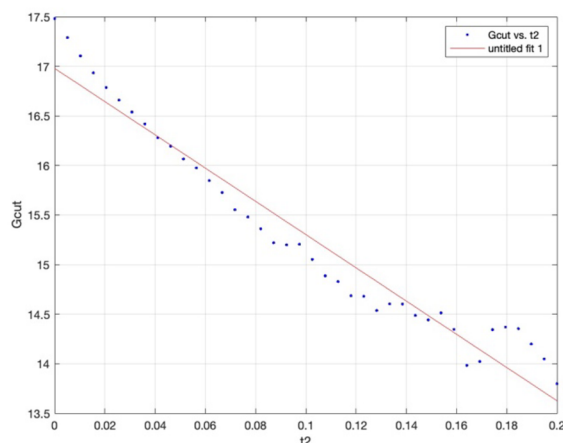
Graf 7.12: Autozkorelovaná data měření kolagenu při teplotě 40 °C.



Graf 7.13: Oříznutá data měření kolagenu při teplotě 40 °C.

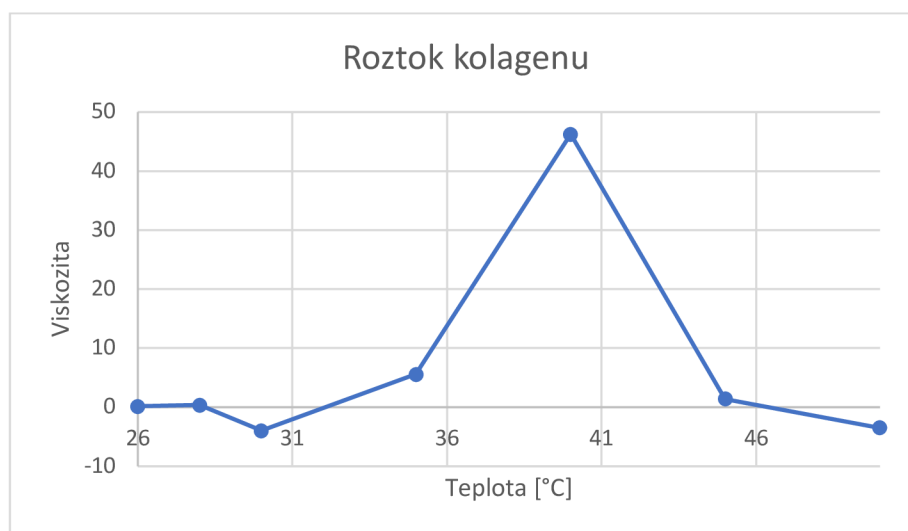


Graf 7.14: Oříznutý ještě menší úsek roztoku kolagenu při teplotě 40 °C.



Graf 7.15: Oříznutá data roztoku kolagenu proložena lineární funkcí při teplotě 40 °C.

Z následného grafu závislosti viskozity na teplotě je patrné, že data fluktuují dost náhodně a nevyukazují nikde žádnou jasnou změnu:



Graf 7.16: Závislost viskozity na teplotě roztoku kolagenu.

Přestože výsledky pro kolagen nebyly úspěšné, studium tohoto materiálu pomocí metod dynamického rozptylu světla nabízí zajímavé možnosti pro další práci. Vzhledem k významu kolagenu v biomedicínských aplikacích a materiálových vědách, pokračování v experimentech s kolagenem může mít potenciál zjistit, zda je možné bod gelace těmito metodami spolehlivě změřit. Úspěšné stanovení bodu gelace kolagenu by pak mohlo být využito v širokém spektru aplikací, což by přineslo nové poznatky o dynamice gelace a denaturaci kolagenu, a tím lepší porozumění jeho vlastností a možnostem využití.

7.6 Diskuze k výsledkům měření bodu gelace agarózy

Určení bodu gelace agarózy bylo provedeno třemi různými metodami. První dvě metody byly založeny na měření dynamického rozptylu světla ve vzorku pomocí kamery, která zaznamenávala snímky specklového pole. V prvním přístupu byla ze zpracovaných specklových polí získána hodnota viskozity, přičemž byla sledována její změna s teplotou. Druhý přístup byl založen na statistickém zpracování specklových polí a zjištění závislosti změny směrodatných odchylek intenzity a normalizované intenzity na teplotě. Třetí přístup, nejjednodušší, spočíval v přímém měření intenzity světla, které prošlo vzorkem agarózy, a následném vyjádření závislosti intenzity na teplotě vzorku.

Pro první dvě metody byly porovnány dva vzorky: první obsahoval 1 % čistou agarózu, druhý vzorek obsahoval 1 % agarózu s přidanými 200 nm PS nanočásticemi, kde se předpokládala lepší viditelnost fluktuací rozptylu světla pomocí kamery.

Z výsledků prvních dvou metod bylo určeno, že pro měření je vhodnější používat vzorek s přidanými nanočásticemi. V momentu, kdy došlo ve vzorku k gelaci, kamera v čistém vzorku již nedokázala zaznamenávat fluktuace rozptylu světla, což vedlo k tomu, že naměřené hodnoty viskozity u nejnižší teploty dosahovaly až záporných hodnot, což pro výsledky nemohlo být relevantní. Z toho bylo vyvozeno, že agaróza s přidanými nanočásticemi se jeví jako lepší vzorek pro pozorování.

Z prvního přístupu přes viskozitu bylo určeno rozmezí gelace agarózy mezi **32 - 35 °C**. U druhého přístupu přes směrodatné odchylky bylo zjištěno, že relevantní závislost poskytuje pouze směrodatná odchylka normalizované intenzity. Z té bylo určeno, že k výraznější změně a tedy zahájení gelace dochází při 36°C, zde bylo tedy určeno rozmezí **34 - 36 °C**. U posledního přístupu přes měření intenzity světla, které sloužilo jako ověření předchozích metod, bylo vyvozeno, že ke gelaci začíná docházet mezi **33 - 36 °C**. Všechny tři metody byly schopny určit víceméně stejnou teplotní oblast, kde k bodu gelace dochází.

Díky porovnání prvních dvou přístupů zpracování specklových polí a následnému ověření třetí metodou bylo zjištěno, že k určení bodu gelace není potřeba zpracovávat specklová pole tak, aby byla získána výsledná hodnota viskozity, ale je možné provést

statistické zpracování přes směrodatnou odchylku normalizované intenzity, z čehož se povedlo určit bod gelace také. Z toho bylo usouzeno, že pokud je cílem pouze určit bod gelace a ne hodnoty jiných parametrů, může být vhodnější využívat zpracování dat přes směrodatnou odchylku.

Určené teplotní rozmezí bodu gelace agarózy bylo shledáno v souladu s údaji, které poskytli výrobci pro specifické typy agarózy. Výrobce Thermo Fisher Scientific uvádí pro agarózu „UltraPure™ Agarose“ bod gelace mezi 34,5 a 37 °C. Dále výrobce Sigma Aldrich specifikuje pro agarózu typu A2790 teplotu bodu gelace menší nebo rovnou 35 °C. Tato shoda ukazuje, že získané výsledky jsou relevantní a odpovídají rozmezí uvedenému pro obecné typy agarózy, což potvrzují i údaje od výrobců.

Závěr

Hlavním cílem této práce bylo ověřit možnosti aplikace metod dynamického rozptylu světla k určení bodu gelace u vybraných polymerních materiálů. Na základě provedené literární rešerše byly vybrány celkem tři způsoby měření, založené na metodě MSDLS, a hlavním studovaným materiálem byla zvolena agaróza.

V teoretické části byl poskytnut ucelený úvod do problematiky dynamického rozptylu světla. Byly popsány základní optické jevy, principy rozptylu světla, jednotlivé metody dynamického rozptylu světla, základy teorie gelace a také byla popsána agaróza a kolagen. Záměrem bylo poskytnout čtenáři komplexní základ pro pochopení metod a aplikací v oblasti rozptylu světla.

K určení bodu gelace agarózy byly použity celkem tři různé metody. První dva způsoby využívaly metodu MSDLS a rozdíl spočíval ve zpracování naměřených dat. První přístup se opíral o analýzu změn viskozity, kde bylo sledováno, jak se viskozita vzorku agarózy mění s teplotou. Druhý přístup využíval sledování změny směrodatných odchylek intenzity a normalizované intenzity specklových polí v závislosti na teplotě vzorku. Třetí metoda byla nejjednodušší, neboť sledovala pouze závislost intenzity světla, které prošlo vzorkem agarózy v závislosti na teplotě.

Na základě provedených měření, zpracování dat a porovnání výsledků z jednotlivých metod, byl bod gelace agarózy určen rozsahem teploty 32 - 36 °C. To odpovídá teplotě, která je uváděna výrobcí.

Vedle agarózy byla metoda MSDLS otestována i na vzorku kolagenu. Toto měření však nebylo úspěšné a neposkytlo relevantní výsledky, zejména z důvodu náročné přípravy vzorku. Vzhledem k významu kolagenu v biomedicínských aplikacích a materiálových vědách může být využití metod dynamického rozptylu světla k analýze kolagenu zajímavou oblastí dalšího zkoumání v budoucnu.

Použitá literatura

ALDAAIS, Ebtisam Abdullatif, 2023. *Meta-Analysis of Polyethylene Glycol and Cellulose-based Polymers in Vaccine and Drug Delivery: A Comprehensive Review* [online]. preprint. B.m.: Engineering [vid. 2024-03-24]. Dostupné z: doi:10.20944/preprints202308.0228.v1

AVILA RODRÍGUEZ, María Isabela, Laura G RODRÍGUEZ BARROSO a Mirna Lorena SÁNCHEZ, 2018. Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. *Journal of Cosmetic Dermatology* [online]. **17**(1), 20–26. ISSN 1473-2130, 1473-2165. Dostupné z: doi:10.1111/jocd.12450

BARNES, Howard A., John Fletcher HUTTON a Kenneth WALTERS, 1989. *An introduction to rheology*. Amsterdam New York: Elsevier Distributors for the U.S. and Canada, Elsevier Science Pub. Co. Rheology series, vol. 3. ISBN 978-0-444-87469-6.

BERKLEY QB3, 2024. Agarose Gel Electrophoresis. *Berkley QB3* [online] [vid. 2024-03-22]. Dostupné z: <https://qb3.berkeley.edu/education/lab-fundamentals-bootcamp/manual/cloning/gel-electrophoresis/>

BORST, Piet, 2005. Ethidium DNA agarose gel electrophoresis: How it started. *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)* [online]. **57**(11), 745–747. ISSN 1521-6543, 1521-6551. Dostupné z: doi:10.1080/15216540500380855

BRESOLIN, Bianca-Maria, Carsten GÜNNEMANN, Detlef W. BAHNEMANN a Mika SILLANPÄÄ, 2020. Pb-Free Cs₃Bi₂I₉ Perovskite as a Visible-Light-Active Photocatalyst for Organic Pollutant Degradation. *Nanomaterials* [online]. Dostupné z: doi:10.3390/nano10040763

BRONK, Burt V., WILLEM P. VAN DE MERWE a Marc STANLEY, 1992. In Vivo Measure of Average Bacterial Cell Size From a Polarized Light Scattering Function. *Cytometry Part A* [online]. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.990130208

BRUNEL, Laurent, Alice BRUN a Patrick SNABRE, 2006. Microstructure movements study by dynamic speckle analysis. In: Pierre SLANGEN a Christine CERRUTI, ed. *Speckle06: Speckles, From Grains to Flowers* [online]. s. 634127 [vid. 2024-03-04]. Dostupné z: doi:10.1117/12.695493

CAMMACK, Richard, Teresa ATWOOD, Peter CAMPBELL, Howard PARISH, Anthony SMITH, Frank VELLA a John STIRLING, ed., 2006. *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2. vyd. B.m.: Oxford University Press [vid. 2024-03-22]. ISBN 978-0-19-852917-0. Dostupné z: doi:10.1093/acref/9780198529170.001.0001

CIPELLETTI, Luca a David A. WEITZ, 1999. Ultralow-Angle Dynamic Light Scattering With a Charge Coupled Device Camera Based Multispeckle, Multitau Correlator. *Review of Scientific Instruments* [online]. Dostupné z: doi:10.1063/1.1149894

DENG, Yuanbo a Daping CHU, 2017. Coherence properties of different light sources and their effect on the image sharpness and speckle of holographic displays. *Scientific Reports* [online]. **7**(1), 5893. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-06215-x

DEVI, C. Usha, R. Sreekumari BHARAT CHANDRAN, R. Mohan VASU a Ajay K. SOOD, 2007. Measurement of visco-elastic properties of breast-tissue mimicking materials using diffusing wave spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics* [online]. **12**(3), 034035. ISSN 10833668. Dostupné z: doi:10.1117/1.2743081

DI LULLO, Gloria A., Shawn M. SWEENEY, Jarmo KÖRKKÖ, Leena ALA-KOKKO a James D. SAN ANTONIO, 2002. Mapping the Ligand-binding Sites and Disease-associated Mutations on the Most Abundant Protein in the Human, Type I Collagen. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **277**(6), 4223–4231. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M110709200

GAO, Shuai, 2019. *A combined theoretical and experimental analysis on performance and functionality of printed dielectric mirrors*. B.m. PhD Thesis. b.n.

GASTÉLUM-BARRIOS, Abraham, Genaro M. SOTO-ZARAZÚA, Axel ESCAMILLA-GARCÍA, Manuel TOLEDANO-AYALA, Gonzalo MACÍAS-BOBADILLA a Daniel JAUREGUI-VAZQUEZ, 2020. Optical Methods Based on Ultraviolet, Visible, and Near-Infrared Spectra to Estimate Fat and Protein in Raw Milk: A Review. *Sensors* [online]. **20**(12), 3356. ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s20123356

GÓMEZ-GUILLÉN, M.C., B. GIMÉNEZ, M.E. LÓPEZ-CABALLERO a M.P. MONTERO, 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids* [online]. **25**(8), 1813–1827. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2011.02.007

GRINGER, 2008. Linear visible spectrum. *Wikimedia Commons* [online]. Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4639774>

HOLDER, A. J., N. BADIEI, K. HAWKINS, C. WRIGHT, P. R. WILLIAMS a D. J. CURTIS, 2018. Control of collagen gel mechanical properties through manipulation of gelation conditions near the sol–gel transition. *Soft Matter* [online]. **14**(4), 574–580. ISSN 1744-683X, 1744-6848. Dostupné z: doi:10.1039/C7SM01933E

HOWARD, Louisa, 2006. *Fibers of Collagen Type I - TEM* [online]. 2006. Dostupné z: <http://remf.dartmouth.edu/imagesindex.html>

CHAMBON, Francois a H.Henning WINTER, 1985. Stopping of crosslinking reaction in a PDMS polymer at the gel point. *Polymer Bulletin* [online]. **13**(6) [vid. 2024-03-24]. ISSN 0170-0839, 1436-2449. Dostupné z: doi:10.1007/BF00263470

CHYLEK, Petr, V. RAMASWAMY, A. ASHKIN a J. M. DZIEDZIC, 1983. Simultaneous determination of refractive index and size of spherical dielectric particles from light scattering data. *Applied Optics* [online]. **22**(15), 2302. ISSN 0003-6935, 1539-4522. Dostupné z: doi:10.1364/AO.22.002302

JONES, Mike, 2010. *DLS* [online]. 2010. Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=10502233>

KHAN, Ruby a MohdHaroon KHAN, 2013. Use of collagen as a biomaterial: An update. *Journal of Indian Society of Periodontology* [online]. **17**(4), 539. ISSN 0972-124X. Dostupné z: doi:10.4103/0972-124X.118333

KIM, Kipom a Hyuk Kyu PAK, 2010. Diffusing-wave spectroscopy study of microscopic dynamics of three-dimensional granular systems. *Soft Matter* [online]. **6**(13), 2894. ISSN 1744-683X, 1744-6848. Dostupné z: doi:10.1039/b926799a

KUBĚNA, Josef, [b.r.]. *Aplikovaná optika I*. [online]. Dostupné z: <https://monoceros.physics.muni.cz/~kubena/PDF/ao1v55.pdf>

LE GOFF, Kevin J., Cedric GAILLARD, William HELBERT, Catherine GARNIER a Thierry AUBRY, 2015. Rheological study of reinforcement of agarose hydrogels by cellulose nanowhiskers. *Carbohydrate Polymers* [online]. **116**, 117–123. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2014.04.085

LIU, Daiming, Qingkang WANG a Qing WANG, 2018. Near-Infrared Light Harvesting of Upconverting NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺-based Amorphous Silicon Solar Cells Investigated by an Optical Filter. *Beilstein Journal of Nanotechnology* [online]. Dostupné z: doi:10.3762/bjnano.9.260

MAI, Zhimao, Hongfei SU a Si ZHANG, 2016. Isolation and Characterization of a Glycosyl Hydrolase Family 16 β -Agarase from a Mangrove Soil Metagenomic Library. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **17**(8), 1360. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms17081360

MALÝ, Petr, 2020. *Optika*. Vydání druhé, přepracované. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum. ISBN 978-80-246-2793-9.

MARAKHOVA, A., V. ZHILKINA, E. V. BLYNSKAYA, K. V. ALEKSEEV a Ya. M. STANISHEVSKIY, 2016. Determination of Nanoparticle Size in Colloidal Solutions by Dynamic Light Scattering. *Nanoindustry Russia* [online]. Dostupné z: doi:10.22184/1993-8578.2016.63.1.88.93

MAXIMO, G.J. a R.L. CUNHA, 2010. MECHANICAL PROPERTIES OF COLLAGEN FIBER AND POWDER GELS. *Journal of Texture Studies* [online]. **41**(6), 842–862. ISSN 0022-4901, 1745-4603. Dostupné z: doi:10.1111/j.1745-4603.2010.00258.x

MILES, Christopher A a Allen J BAILEY, 1999. Thermal denaturation of collagen revisited. *Proceedings / Indian Academy of Sciences* [online]. **111**(1), 71–80. ISSN 0253-4134. Dostupné z: doi:10.1007/BF02869897

NAVE, R, [b.r.]. *Classification of Polarization* [online]. Dostupné z: <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/phyopt/polclas.html>

NORLAB, 2021. *Measurement principle DLS* [online]. 2021. Dostupné z: <https://www.norlab.com/library/overview-article/13196>

NORMAND, Valéry, Didier L. LOOTENS, Eleonora AMICI, Kevin P. PLUCKNETT a Pierre AYMARD, 2000. New Insight into Agarose Gel Mechanical Properties. *Biomacromolecules* [online]. **1**(4), 730–738. ISSN 1525-7797, 1526-4602. Dostupné z: doi:10.1021/bm005583j

ØGENDAL, Lars Holm, 2017. *Light Scattering Demystified: Theory and Practice*. 12. září 2017. University of Copenhagen.

OWCZARZY, Aleksandra, Robert KURASIŃSKI, Karolina KULIG, Wojciech ROGÓŻ, Agnieszka SZKUDLAREK a Małgorzata MACIĄŻEK-JURCZYK, 2020. Collagen - structure, properties and application [online]. [vid. 2024-03-23]. Dostupné z: doi:10.34821/ENG.BIOMAT.156.2020.17-23

PARENTEAU-BAREIL, Rémi, Robert GAUVIN a François BERTHOD, 2010. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials* [online]. **3**(3), 1863–1887. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma3031863

PATEL, Kaivalya, Dureem MUNIR a Rafael M. SANTOS, 2022. Beneficial use of animal hides for abattoir and tannery waste management: a review of unconventional, innovative, and sustainable approaches. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. **29**(2), 1807–1823. ISSN 0944-1344, 1614-7499. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-021-17101-5

PEATROSS, Justin a Michael WARE, 2023. *Physics of light and optics*. 2015 edition, February 3, 2023. Provo, Utah: Brigham Young University, Department of Physics. ISBN 978-1-312-92927-2.

PÉREZ, Serge, Milou KOUWIJZER, Karim MAZEAU a Søren Balling ENGELSEN, 1996. Modeling polysaccharides: Present status and challenges. *Journal of Molecular Graphics* [online]. **14**(6), 307–321. ISSN 02637855. Dostupné z: doi:10.1016/S0263-7855(97)00011-8

PETRUSKA, John A. a Alan J. HODGE, 1964. A SUBUNIT MODEL FOR THE TROPICOLLAGEN MACROMOLECULE. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **51**(5), 871–876. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.51.5.871

PINE, D. J., D. A. WEITZ, P. M. CHAIKIN a E. HERBOLZHEIMER, 1988. Diffusing wave spectroscopy. *Physical Review Letters* [online]. **60**(12), 1134–1137. ISSN 0031-9007. Dostupné z: doi:10.1103/PhysRevLett.60.1134

- RAMOS, Jorgelina, Stephen LYNCH, David JONES a Hans DEGENS, 2017. Hysteresis in Muscle. *International Journal of Bifurcation and Chaos* [online]. **27**(01), 1730003. ISSN 0218-1274, 1793-6551. Dostupné z: doi:10.1142/S0218127417300038
- RINAUDO, Marguerite, 2008. Main properties and current applications of some polysaccharides as bio-materials. *Polymer International* [online]. **57**(3), 397–430. ISSN 0959-8103, 1097-0126. Dostupné z: doi:10.1002/pi.2378
- ROCHAS, Cyrille a Marc LAHAYE, 1989. Average molecular weight and molecular weight distribution of agarose and agarose-type polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* [online]. **10**(4), 289–298. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/0144-8617(89)90068-4
- SALEH, Bahaa E. A. a Malvin Carl TEICH, 2019. *Fundamentals of photonics*. Third edition. Hoboken, NJ: Wiley. Wiley series in pure and applied optics. ISBN 978-1-119-50687-4.
- SERWER, Philip, 1983. Agarose gels: Properties and use for electrophoresis. *ELECTROPHORESIS* [online]. **4**(6), 375–382. ISSN 0173-0835, 1522-2683. Dostupné z: doi:10.1002/elps.1150040602
- SHIBAYAMA, Mitsuhiro a Tomohisa NORISUYE, 2002. Gel Formation Analyses by Dynamic Light Scattering. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* [online]. **75**(4), 641–659. ISSN 0009-2673, 1348-0634. Dostupné z: doi:10.1246/bcsj.75.641
- SHOULDERS, Matthew D. a Ronald T. RAINES, 2009. Collagen Structure and Stability. *Annual Review of Biochemistry* [online]. **78**(1), 929–958. ISSN 0066-4154, 1545-4509. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.bi-ochem.77.032207.120833
- SCHEFFOLD, F., S. ROMER, F. CARDINAUX, H. BISSIG, A. STRADNER, L. F. ROJAS-OCHOA, V. TRAPPE, C. URBAN, S. E. SKIPETROV, L. CIPELETTI a P. SCHURTENBERGER, 2004. New trends in optical microrheology of complex fluids and gels. In: M. MIGUEL a H. D. BURROWS, ed. *Trends in Colloid and Interface Science XVI* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, s. 141–146 [vid. 2023-11-05]. ISBN 978-3-540-00553-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-540-36462-7_32
- STETEFELD, Jörg, Sean A. MCKENNA a Trushar R. PATEL, 2016. Dynamic Light Scattering: A Practical Guide and Applications in Biomedical Sciences. *Biophysical Reviews* [online]. Dostupné z: doi:10.1007/s12551-016-0218-6
- VIASNOFF, Virgile, François LEQUEUX a David J. PINE, 2002. Multispeckle Diffusing-Wave Spectroscopy: A Tool to Study Slow Relaxation and Time-Dependent Dynamics. *Review of Scientific Instruments* [online]. Dostupné z: doi:10.1063/1.1476699
- VORBURGER, Theodore V., E. C. TEAGUE, Fredric SCIRE, M. J. MCLAY a David E. GILSINN, 1984. Surface Roughness Studies With DALLAS-Detector Array for Laser Light Angular Scattering. *Journal of Research of the National Bureau of Standards* [online]. Dostupné z: doi:10.6028/jres.089.002
- WEITZ, D. a David PINE, 1993. Diffusing-wave spectroscopy. In: W. BROWN, ed. *Dynamic light scattering*. B.m.: Oxford University Press, Monographs on the Physics and Chemistry of Material, s. 652–720.
- WINTER, H. Henning, 2016. Gel Point. In: Herman F. MARK, ed. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology* [online]. 3. vyd. B.m.: Wiley, s. 1–15 [vid. 2024-03-24]. ISBN 978-1-118-63389-2. Dostupné z: doi:10.1002/0471440264.pst476.pub2
- WONG, Apollo P. Y. a P. WILTZIUS, 1993. Dynamic light scattering with a CCD camera. *Review of Scientific Instruments* [online]. **64**(9), 2547–2549. ISSN 0034-6748, 1089-7623. Dostupné z: doi:10.1063/1.1143864
- XU, Chengze, Xiaoshu CAI, Jie ZHANG a Lili LIU, 2015. Fast nanoparticle sizing by image dynamic light scattering. *Particuology* [online]. **19**, 82–85. ISSN 16742001. Dostupné z: doi:10.1016/j.partic.2014.04.014

XU, Min, 2003. Light Extinction and Absorption by Arbitrarily Oriented Finite Circular Cylinders by Use of Geometrical Path Statistics of Rays. *Applied Optics* [online]. Dostupné z: doi:10.1364/ao.42.006710

ZWINKELS, Joanne C., 2015. Light, Electromagnetic Spectrum [online]. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-27851-8_204-1

Přílohy

A Příloha

8.1 Kódy z MATLABU

První přístup přes viskozitu

```
sigma = zeros(600,16384);
for i = 1 : 600

    Filename = strcat('NP40st_X', num2str(i), '.tif'); %najde obrázek
    imageData = imread(Filename); %matice hodnot intenzity obrázku
    DATA = double(imageData);

    % figure ()
    % surf(DATA)
    % s.EdgeColor = 'none';

    val = mean(DATA(:)); %průměrná intenzit
    odecet2 = DATA - val;

    % figure ()
    % surf(odecet2)

    B = reshape(odecet2,[16384,1]); %předělání na vektor

    sigma(i,:) = B; % do matice
end

for j = 2:600
Rval(j-1) = mean((sigma(1,:).*sigma((j),:)));
end

vz = 200;
fz = 1/vz;
t1 = linspace(0,(599*fz),599);

figure()
semilogx(t1,Rval)

Gln = log(Rval);
figure()
plot(t1,Gln)

t2 = linspace(0,(40*fz),40);
Gcut = Gln(1:40);
figure()
plot(t2,Gcut)

[xData, yData] = prepareCurveData( t2, Gcut );
```

```

% Set up fittype and options.
ft = fittype( 'poly1' );

% Fit model to data.
[fitresult, gof] = fit( xData, yData, ft );

% Plot fit with data.
figure( 'Name', 'untitled fit 1' );
h = plot( fitresult, xData, yData );
legend( h, 'Gcut vs. t2', 'untitled fit 1', 'Location', 'NorthEast',
'Interpreter', 'none' );
% Label axes
xlabel( 't2', 'Interpreter', 'none' );
ylabel( 'Gcut', 'Interpreter', 'none' );
grid on

TT = - fitresult.p1
n = 1.3356;
la = 632.8*(10^-9);
T = 303;
k = 1.380649*10^-23;
fi = ((pi)*1)/2;
q = ((4*pi*n*sin(fi/2)))/la;
r = 2.000e-07;
D = TT/(q^2);
%es = 0.905
es = (k*T)/(3*pi*r*D)

```

Zdrojový kód 8.1: Kód z MATLABu, první varianta zpracování

Druhý přístup přes směrodatnou odchylku

```

N = 600

sigma = zeros(N,16384);

for i = 1 : N

    Filename = strcat('NP30st_X', num2str(i), '.tif'); %najde obrázek
    imageData = imread(Filename); %matice hodnot intenzity obrázku
    DATA = double(imageData);

    val(i) = mean(DATA(:)); %průměrná intenzit
    nn = (DATA-min(DATA))./(max(DATA)-min(DATA));
    valn(i) = mean(nn(:));

end

stdval = std(val)
stdvaln = std(valn)

```

Zdrojový kód 8.2: Kód z MATLABu, druhá varianta zpracování

Třetí přístup přes intenzitu

```
A = readmatrix('teplota.txt');
B = readmatrix('intenzita.xlsx');

tT = A(:, 1);
Temp = A(:, 2);
I = B(:, 1);
tI = B(:, 2);

for i = 1:4110
    NexTem(i) = Temp(i*4);
end

NewI = I(1:4110);

NexTem = transpose(NexTem);

figure()
plot(NexTem,NewI)
```

Zdrojový kód 8.3: Kód z MATLABu, třetí varianta zpracování