



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

HYDROGELY S INKORPOROVANÝMI PROTEINY

HYDROGELS WITH INCORPORATED PROTEINS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Alžbeta Uhrínová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Tereza Venerová, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1686/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Alžbeta Uhrínová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Tereza Venerová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Hydrogely s inkorporovanými proteiny

Zadání bakalářské práce:

1. Provést rešerši na téma inkorporace proteinů do hydrogelových struktur, se zaměřením na asociativní proteiny.
2. Na základě rešerše vybrat vhodné proteiny (peptidy) a provést experimenty vedoucí k vytvoření hydrogelového systému obsahujícího daný protein a jeho charakterizaci.
3. Zhodnotit výsledky práce a použitelnost daných systémů pro možné budoucí využití v medicínských aplikacích.

Termín odevzdání bakalářské práce: 27.5.2022:

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

Alžbeta Uhrínová
studentka

Ing. Tereza Venerová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Táto práca sa zaoberá asociatívnymi peptidmi. Cieľom bolo charakterizovať daný asociatívny proteín a previesť experimenty vedúce k vytvoreniu hydrogélového systému obsahujúceho vybraný proteín. Na začiatku boli pripravené roztoky kazeínu, pomocou ktorých sa stanovila micelárna koncentrácia (CMC) za použitia fluorescenčnej sondy pyrénu. Následne boli micely charakterizované pomocou dynamického rozptylu svetla (DLS) a bola stanovená ich veľkosť, zeta potenciál a tiež vplyv teploty na tieto vlastnosti. Na základe charakterizácie častíc pri teplote boli vybrané vhodné gély, do ktorých boli proteínové častice následne inkorporované.

ABSTRACT

This work deals with associative peptides. The aim was to characterize a given associative protein and perform experiments leading to the creation of a hydrogel system containing the selected protein. Casein solutions were initially prepared to determine micellar concentration (CMC) using a pyrene fluorescence probe. Subsequently, the micelles were characterized by dynamic light scattering (DLS) and their size, zeta potential and also the effect of temperature on these properties were determined. Based on the characterization of the particles at temperature, suitable gels were selected into which the protein particles were subsequently incorporated.

KLÚČOVÉ SLOVÁ:

Kazeínové micely, pyrén, guarová guma, gelan, fluorescencia, dynamický rozptyl svetla, zeta potenciál

KEY WORDS:

Casein micelles, pyrene, guar gum, gellan, fluorescence, dynamic light scattering, zeta potential

UHRÍNOVÁ, Alžbeta. *Hydrogely s inkorporovanými proteiny* [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-19]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138986>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Tereza Venerová.

PREHLÁSENIE

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

.....
podpis studenta

Podakovanie:

Na tomto mieste by som rada poďakovala vedúcej mojej bakalárskej práce Ing. Tereze Venerovej, Ph.D. za jej čas, ochotu a cenné rady, ktoré mi venovala pri vypracovávaní tejto bakalárskej práce. Ďalej by som chcela poďakovať celej rodine, partnerovi a priateľom za ich trpezlivosť a podporu, najväčšie poďakovanie patrí mojim rodičom za ich podporu počas môjho celého štúdia.

OBSAH

1	ÚVOD.....	7
2	TEORETICKÁ ČASŤ.....	8
2.1	Peptidy	8
2.2	Bielkoviny.....	8
2.2.1	Kazeín	9
2.3	Disperzná sústava	9
2.3.1	Definícia disperznej sústavy	9
2.3.2	Prehľad disperzných systémov	9
2.4	Koloidné disperzné systémy	10
2.5	Tenzidy a tvorba micel	10
2.5.1	Micely kazeínu.....	11
2.6	Hydrogély	11
2.7	Fluorescencia	11
2.7.1	Fluorescenčná sonda – pyrén	13
2.8	Dynamický rozptyl svetla	13
2.8.1	Veľkosť	13
2.8.2	Zeta potenciál.....	13
3	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY.....	15
3.1	Hydrofilné hydrogély.....	15
3.2	Gelácia proteínov	15
3.2.1	Fyzikálne vyvolané gélovanie.....	15
3.2.2	Chemicky vyvolané gélovanie	16
3.2.3	Bioaktívne zložky v hydrogélach	18
4	CIELE PRÁCE.....	20
5	MATERIÁLY A METÓDY.....	21
5.1	Materiály	21
5.2	Príprava zásobných roztokov	21
5.3	Príprava vzoriek.....	21
5.3.1	Práca s fluorescenčnou sondou	21
5.3.2	Koncentračná rada.....	21
5.4	Metódy	21
5.4.1	Meranie fluorescence sondou	21
5.4.2	Postup a princípy zisťovania kazeínových častíc	22
5.4.3	Príprava gélov	23
6	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	24
6.1	Stanovenie CMC kazeínu	24
6.2	Charakterizácia kazeínových agregátov	27
6.2.1	Stanovenie veľkosti kazeínových častíc	27
6.2.2	Určenie zeta potenciálu kazeínových častíc.....	29

6.2.3	Charakteristika kazeínových častíc na základe teploty.....	30
6.3	Inkorporácia kazeínových častíc do gélu.....	31
6.4	Difúzia sudánovej červene do hydrogélu.....	32
7	ZÁVER.....	35
8	LITERATÚRA.....	37
9	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	41
9.1	Zoznam skratiek.....	41
9.2	Zoznam symbolov.....	41

1 ÚVOD

V bakalárskej práci sa budeme zaoberať hydrogélmi s inkorporovanými proteínmi. Práca je zložená z troch hlavných častí, a to z teoretickej časti, súčasného stavu riešenej problematiky a experimentálnej časti. V teoretickej časti sa budeme zaoberať peptidmi, proteínmi, disperznými sústavami, tenzidmi, hydrogélmi a metódami, ktoré budeme používať pri meraniach. Peptidy vznikajú z aminokyselín a po spojení viacerých peptidov sa tvoria bielkoviny. Bielkoviny sú jednou zo základných stavebných zložiek živých organizmov. Terciárna štruktúra jednotlivých peptidov ako aj sieť bielkovín sa vytvára prostredníctvom nekovalentnej krížovej väzby a menej často kovalentnými interakciami. Každý typ tejto väzby má určitý prínos do gélovej siete a líši sa podľa vlastností bielkovín a environmentálnych podmienok. Pri štúdií gélov sa najprv pozrieme na disperzné sústavy. Disperzná sústava je tvorená disperzným podielom, rozptýleným vo forme častíc v spojitom prostredí. Tenzid je povrchovo aktívna látka, ktorá znižuje napätie na fázovom rozhraní a je zložený z hydrofilnej a hydrofóbnej časti. Látky, ktoré sú súčasťou hydrogéllov sú schopné naviazať na seba väčšie množstvo vody. V rámci používaných metód popisujeme fluorescenciu a dynamický rozptyl svetla (DLS).

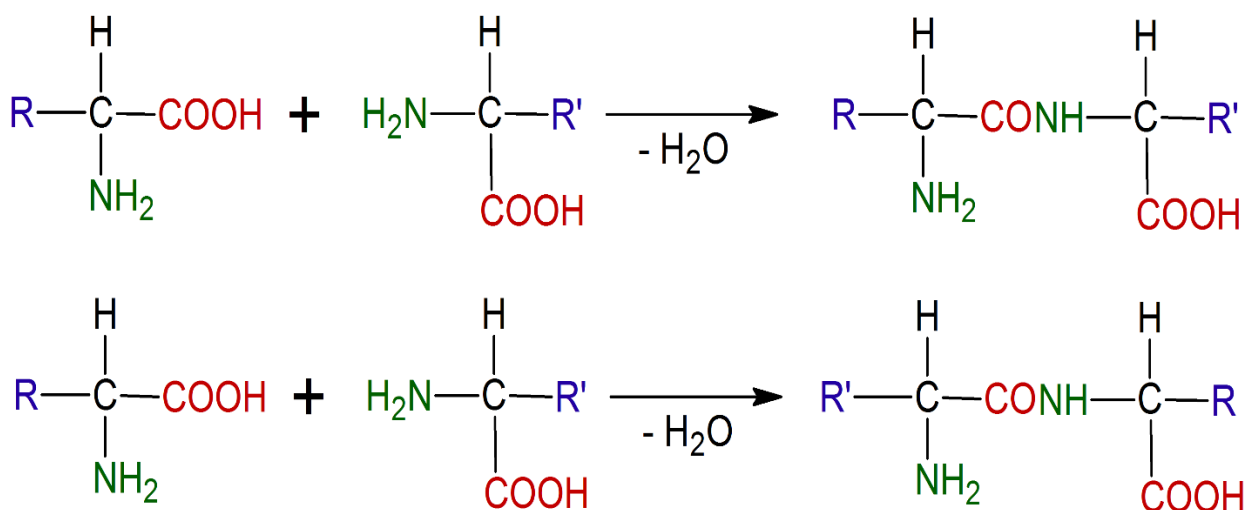
V súčasnom stave riešenej problematiky sa hlavne zameriame na tvorbu gélov pri zmene rôznych podmienok ako je napríklad teplota, tlak, vplyv iónov. Tiež sa zameriavame na inkorporáciu bioaktívnych látok do gélu a ako tieto látky ovplyvnia gél.

V experimentálnej časti sa charakterizovali častice vybraného amfifilného peptidu. Bol vybraný kazeínový proteín, ktorý sa nachádza v mlieku a tvorí micely pri laboratórnej teplote. Tieto častice boli zmerané na DLS, kde sa zmerala ich veľkosť a stanovil sa ich zeta potenciál. Bol sledovaný vplyv teploty na častice. Na základe tohto merania boli zvolené vhodné hydrogély, do ktorých boli inkorporované proteínové častice. Robil sa aj pokus difundácie zafarbených častíc hydrofóbnym farbivom do zvolených gélov.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Peptidy

Kondenzáciou aminokyselín vznikajú peptidy až bielkoviny. Podľa počtu spojených aminokyselín rozlišujeme oligopeptidy (2 – 10), polypeptidy (10 – 100) a bielkoviny (100 a viac). Peptidy môžeme ďalej deliť na dipeptidy (2 AK), tripeptidy (3 AK), tetrapeptidy (4 AK) atď. Kondenzácia prebieha spojením karboxylovej skupiny jednej aminozlúčeniny s inou aminovou skupinou za súčasného odštiepenia molekuly vody ako vedľajšieho produktu. Obidve aminokyseliny sú pevne viazané peptidovou väzbou -CO-NH-, ktorá je kovalentná a rigidná [1]. Vznik peptidovej väzby môžeme vidieť na **Obr. 1**.



Obr. 1: Vznik peptidovej väzby [1]

Z uvedených rovníc je zrejmé, že kondenzáciou dvoch odlišných aminokyselín môžu vzniknúť dva rôzne dipeptidy. Kombináciou 21 proteinogénnych aminokyselín môže vzniknúť nepreberné množstvo bielkovín, ktoré sa vyznačujú svojimi jedinečnými vlastnosťami [1].

2.2 Bielkoviny

Proteíny sú makromolekulárne látky s osobitným postavením v živých organizmoch. Predstavujú štruktúru, ktorá podmieňuje základné prejavy života organizmov. Bielkoviny môžu svoje funkcie vykonávať len vtedy, keď sú zbalené do patričného tvaru, tzv. priestorovej konformácie [2].

Sieť bielkovín, ako aj terciárna štruktúra jednotlivých polypeptidov, sa všeobecne vytvára prostredníctvom nekovalentnej krížovej väzby ako napríklad hydrofóbne interakcie, vodíkové mostíky alebo elektrostatické interakcie a menej často kovalentnými interakciami ako sú disulfidické mostíky.

Relatívny prínos každého typu väzby do gélovej siete sa líši podľa vlastností bielkovín a environmentálnych podmienok. Fyzická integrita gélu je udržiavaná vyvážením príťažlivých a odporových síl medzi molekulami a gélový mechanizmus je určený touto rovnováhou a interakciami bielkovina – rozpúšťadlo. Interakcie bielkovina – bielkovina a bielkovina – rozpúšťadlo sú ovplyvňované faktormi, ktoré pôsobia na proteínovú geláciu, ako aj na typ a vlastnosti gélov [3].

2.2.1 Kazeín

Kazeíny sú prevládajúcimi mliečnymi bielkovinami takmer všetkých druhov cicavcov. Tvoria heterogénnu skupinu fosfoproteínov prítomných ako stabilné proteínové komplexy fosforečnanu vápenatého nazývané micely. Biologická funkcia kazeínov je poskytnúť potomstvu zdroj fosfátu a vápnika pre proces mineralizácie vápenatých tkanív, ako aj aminokyseliny a biologicky aktívne peptidy [4].

Je zodpovedný za nepriehľadný, biely vzhľad kravského mlieka. Je neoddeliteľnou súčasťou mnohých mliečnych výrobkov, ako je zmrzlina a syr. Kazeínové proteíny môžu byť oddelené od mlieka a použité nezávisle ako doplnok alebo prísada na zahustenie, textúrovanie a stabilizáciu rôznych potravinových produktov [5].

Sodná soľ kazeínu z hovädzieho mlieka je fosfoproteín. Existujú štyri hlavné typy kazeínu, ktoré tvoria približne 80 % celkového proteínu v kravskom mlieku: α -s1 kazeín, α -s2 kazeín, β -kazeín a κ -kazeín [6].

2.3 Disperzná sústava

2.3.1 Definícia disperznej sústavy

Disperzná sústava je tvorená disperzným podielom, rozptýleným vo forme častíc v spojitom disperznom prostredí. Disperzný podiel môže a nemusí predstavovať samostatnú fázu a svojim chemickým zložením sa môže, ale nemusí vždy líšiť od disperzného prostredia.

Povahu disperzného systému ovplyvňuje rada faktorov. Predovšetkým je to veľkosť disperzných častíc a počet fáz v systéme, ďalej tvar častíc, interakcie medzi časticami a disperzným prostredím a vzájomné interakcie medzi časticami, povrchové a elektrické vlastnosti častíc, skupenstvo disperzného prostredia a disperzného podielu [7].

2.3.2 Prehľad disperzných systémov

Na základe porovnania charakteristických vlastností sú disperzie rozdeľované podľa veľkosti častíc na tri typy. Medzi jednotlivými typmi je plynulý prechod, nejedná sa o ostro oddelené skupiny.

Systémy s najmenšími časticami (do 1 nm) sú označované ako analyticky disperzné systémy. Sú to roztoky nízkomolekulárnych látok, v ktorých sú disperzné častice – molekuly alebo ióny, poprípade útvary, ktoré vznikajú dočasnou asociáciou niekoľkých málo molekúl – čo do veľkosti porovnateľnej s molekulami disperzného prostredia. Obsahujú dva alebo viac druhov hmoty a sú preukázateľné iba chemickou analýzou a ich disperzné častice nie sú viditeľné pod elektrónovým mikroskopom.

Systémy s veľkými časticami, ktoré obsahujú značný počet molekúl, sú označované ako systémy hrubo disperzné. Ak sú ich častice rozoznateľné iba okom (väčšie ako 50 μ m) označujú sa ako makrodisperzné, ale ak sú viditeľné až optickým mikroskopom (do veľkosti asi 1 μ m), hovoríme o mikrodisperznom systéme.

Medzi týmito dvoma skupinami leží oblasť koloidných disperzných systémov. Horná a dolná hranica veľkosti koloidných častíc nebyva udávaná jednotne: za dolnú hranicu je požadovaný rozmer častíc 1 až 5 nm a za hornú hranicu je považovaný rozmer častíc odpovedajúci rozlišovacej schopnosti najlepších optických mikroskopov, približne 1 μ m [7].

2.4 Koloidné disperzné systémy

Vzhľadom k veľkej rozmanitosti je účelné rozdeľovať koloidné disperzné sústavy do troch skupín:

- *Lyofóbná disperzia* (koloidná disperzia) – heterogénne systémy, v ktorých disperzný podiel a disperzné prostredie predstavuje dve rôzne fázy. Aby mohol byť disperzný podiel považovaný za samostatnú fázu, musí disperzná častica obsahovať toľko molekúl, aby bolo možné rozlíšiť povrchovú vrstvu častíc od jej vnútornej časti.
- *Lyofilné koloidy* (koloidné roztoky) sú homogénne koloidné systémy, v ktorých disperzný podiel tvorí s disperzným prostredím jednu fázu. Sú to pravé roztoky makromolekúl, ktoré vznikajú samovoľným rozpustením a sú stále. Samovoľný vznik je podmienený afinitou makromolekúl k disperznému prostrediu.
- *Asociatívne* (micelárne) *koloidy*, ktoré vznikajú samovoľnou reverzibilnou asociáciou nízkomolekulárnych látok s amfifílnou štruktúrou v pravom roztoku. Medzi molekulami v roztoku a vzniknutými asociátmi sa ustanovuje rovnováha.

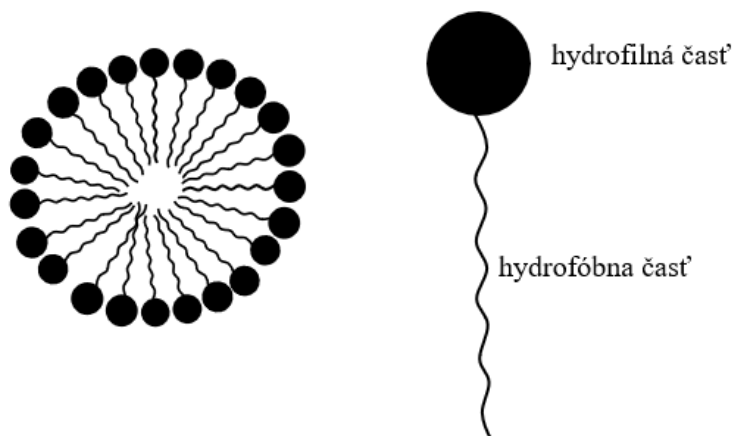
Charakteristickou vlastnosťou koloidných systémov je schopnosť tvoriť gély – systémy, v ktorých je spojené nielen disperzné prostredie, ale aj disperzný podiel – trojrozmerná sieť, postupujúca disperzným prostredím [7].

2.5 Tenzidy a tvorba micel

Tenzidy alebo povrchové aktívne látky sú organické zlúčeniny, ktoré sa už pri nízkej koncentrácii hromadia na medzifázovom rozhraní a týmto spôsobom znižujú voľnú medzifázovú energiu sústavy.

Molekula tenzidov sa skladá z dvoch častí. Hydrofilná časť má veľkú afinitu k vode a hydrofóbná časť má naopak veľkú afinitu k nepolárnym rozpúšťadlám. Hydrofóbná časť molekuly tenzidu je najčastejšie tvorená alkylom alebo alkylarylom. Alkyl môže byť rozvetvený alebo nerozvetvený. Hydrofóbná časť môže obsahovať 8 až 22 uhlíkových atómov, bežne sa však počet atómov uhlíkov pohybuje v užšom intervale, 12 až 18.

Pri zvyšujúcej sa koncentrácii sa dosiahne postupne stav, kedy je fázové rozhranie molekulami tenzidu úplne obsadené. Koncentrácia tenzidu v objemovej fáze je tak veľká, že vzájomná príťažlivosť hydrofóbných častí molekuly tenzidu je silnejšia ako odpudivosť hydrofilov. Vznikajú útvary, ktoré majú uprostred hydrofóbnu časť molekuly tenzidov a na povrchu, teda na rozhraní s vodou, majú hydrofilné skupiny. Tieto útvary sa nazývajú micely. Koncentrácia, pri ktorej sa začínajú tvoriť micely, sa nazýva kritická micelárna koncentrácia (CMC). Pre každý tenzid má určitú charakteristickú hodnotu [8].



Obr. 2: Zjednodušená grafická schéma micely a tenzidu

2.5.1 Micely kazeínu

Kazeínové micely sú koloidy fosfoproteínov, ktoré sú zaujímavé pre ich schopnosť udržiavať fosforečnany vápenaté v rozpustnom a biologicky dostupnom stave a tým umožňujú transport vápnika. Charakteristickým znakom kazeínov je vysoký obsah fosforylovaných serínových zvyškov, ktoré sú nevyhnutné pre interakciu s anorganickým fosforečnanom vápenatým. Kazeínové micely sú extrémne zložité štruktúry takmer guľového tvaru s veľkosťou od 20 do 600 nm [4].

V mlieku kazeíny tvoria polydisperznú distribúciu koloidných častíc. Jednotlivá micela je chemicky heterogénna, pretože kazeíny držia pohromade fosforečnan vápenatý, ktorý tvorí približne 7 % suchej hmoty micely [9].

Veľkosti kazeínových micel v mliekach od jednotlivých kráv sa môže značne líšiť od 150 do 230 nm. Hrajú dôležitú úlohu pri spracovaní mlieka a jeho premene na rôzne mliečne výrobky. Kazeíny existujú ako koloidné micely, ktorých hlavnou funkciou je transport proteínov, vápnika a fosfátu vo vysokých koncentráciách, ktoré by inak neboli rozpustné vo vode [10].

2.6 Hydrogély

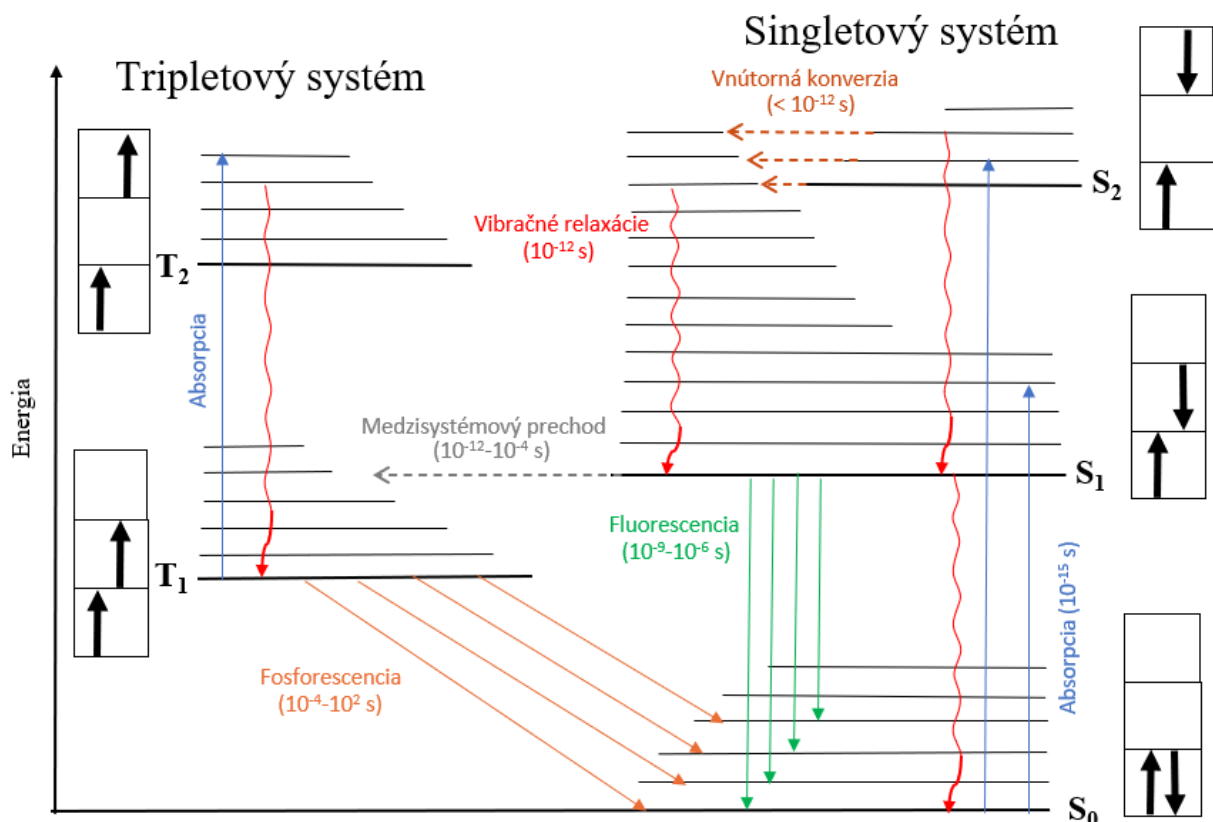
Hydrogély sú trojrozmerné siete vo vode rozpustných polymérov, ktoré majú vo svojich štruktúrach zachytené veľké množstvo vody. Vlastnosti hydrogélu závisia od koncentrácie polyméru, úrovne zosieťovania, teploty, pH, starnutia a koncentrácie solí. Pórovité štruktúry hydrogélův z nich robia silných kandidátov na ochranu a transport bioaktívnych zlúčenín. Hydrogély môžu byť formulované s použitím širokého spektra polymérov, vrátane polymérov potravinového pôvodu. Medzi výhody hydrogélův vyrobených z biopolymérov potravinárskej kvality patrí bezpečnosť, nízka cena a komerčná dostupnosť [11].

2.7 Fluorescencia

Fluorescencná spektroskopia je citlivá, rýchla a neinvazívna analytická metóda, ktorá poskytuje informácie o prítomnosti fluorescencných molekúl a ich prostredí v biologických vzorkách [12].

Fluorescencia je fotoluminiscenčný proces, pri ktorom sú atómy alebo molekuly excitované absorpciou elektromagnetického žiarenia a excitované častice následne relaxujú do základného stavu a zbavujú sa prebytočnej energie v podobe fotónov [13].

Počas fluorescencie dochádza k zmenám energetických stavov molekuly (elektrónových a vibračných) bez toho, že dôjde k zmene spinu elektrónov. Molekula zostáva neustále v singletovom stave. Tieto prechody sú z kvantovo mechanického hľadiska dovolené, preto sú aj rýchle a fluorescencia má krátky dosvit, tzv., vyhasína krátko po excitácii. Fotoluminiscencia je výsledkom trojstupňového procesu, ktorého jednotlivé prechody zobrazuje Jabloňského diagram. Prvým krokom je excitácia molekúl, ktoré sú za normálnych podmienok v základnom elektrónovom (S_0) a základnom vibračnom stave, do niektorej z vyšších vibračných hladín excitovaného singletového elektrónového stavu S_1 alebo S_2 . Nasleduje vyhasínanie excitovaného stavu nežiarivými procesmi, počas ktorých dochádza k prenosu vibračnej energie na okolité molekuly a výsledkom je prechod na základnú vibračnú hladinu stavu S_1 . Pokiaľ došlo k excitácii až na singletový stav S_2 , dochádza väčšinou k prechodu z S_2 na S_1 tzv. vnútorná konverzia a následne vibračná relaxácia až na základnú vibračnú hladinu stavu S_1 . U niektorých molekúl, hlavne obsahujúcich ťažké prvky jód a bróm, však môže molekula v excitovanom stave zmeniť spin elektrónu a prejsť na tripletový stav T_1 . Tento prechod sa nazýva interkombinačná konverzia (niekedy tiež medzisystémový prechod). K deexcitácii a návratu molekuly do niektorej z vibračných hladín základného elektrónového stavu S_0 môže dôjsť buď nežiarivo (vibračná relaxácia predaním kinetickej energie okoliu) alebo emisným žiarením - fluorescenciou zo stavu singletového či fosforescenciou zo stavu tripletového [14].



Obr. 3: Jabloňského diagram

2.7.1 Fluorescenčná sonda – pyrén

Fotostabilné fluorofory sú jadrom širokej škály základných prístupov ku značeniu, diagnostike a mikroskopii, ktoré pomáhajú odhaliť dôležité detaily v analytickej chémii, vede o biomateriáloch, biológii a atď. Fluorescenčné emisné spektrá pyrénového monoméru vykazujú päť hlavných dobre rozlíšiteľných vibračných pásov medzi 370 a 430 nm. Vzhľadom k tomu, že elektronické a vibronické stavy sú sprážené, prvé vibračné pásmo (373 nm) vykazuje zvýšenú intenzitu emisie so zvyšujúcou sa polaritou rozpúšťadla v porovnaní s tretím pásmom (383 nm). Pomer intenzity medzi pásmami jeden a tri je citlivý na polaritu v mikroprostredí sondy [15]. Pyrén je známy svojou tvorbou excimérov. Pri vysokých koncentráciách jeho kvantový výťažok obvykle klesá, zatiaľ čo možnosť tvorby excimérov rastie. Emisia pyrénových excimérov je veľmi citlivá na miestne prostredie, tak sa pyrén často používa ako sonda pre štúdium tvorby micel. Keď sú pyrény zapuzdrené v micelách majú väčšiu šancu tvoriť exciméry. V porovnaní s emisiou neagregovaných farbív emisia excimérov obvykle vykazuje veľký Stokesov posun k dlhším vlnovým dĺžkam. Prísne vzaté, exciméry, ktoré sú skôr stabilné, sú produktom fotochemickej reakcie medzi excitovanými a základnými molekulami (monomérm). Fluorescenčné emisie značne závisia na koncentrácií excimérov. Preto relatívne dlhá životnosť excitovaných monomérov, vysoký difúzny koeficient a koncentrácia nad kritickou hodnotou sú predpokladmi pre tvorbu excimérov [16].

2.8 Dynamický rozptyl svetla

Dynamický rozptyl svetla (DLS) je jednou z najpopulárnejších techník rozptylu svetla, pretože umožňuje stanoviť veľkosť častíc až do priemeru 1 nm. Typickými aplikáciami sú emulzie, micely, polyméry, proteíny, nanočastice a koloidy. Pri meraní získavame veličinu, ktorá sa nazýva hydrodynamický priemer častice. Táto veličina odpovedá priemeru gule, ktorá by mala za rovnakých podmienok difúzny koeficient rovnaký ako bol nameraný pre analyzovanú časticu [17].

2.8.1 Veľkosť

Častice sa neustále pohybujú v dôsledku Brownovho pohybu. Brownov pohyb je pohyb častíc v dôsledku náhodnej zrážky s molekulami kvapaliny, ktorá obklopuje časticu. Dôležitou črtou Brownovho pohybu je, že malé častice sa pohybujú rýchlo a veľké častice sa pohybujú pomalšie [18]. Rozptyl laserového svetla s rôznou intenzitou spôsobuje Brownov pohyb častíc alebo molekúl v suspenzii. Analýza týchto fluktuácií intenzity poskytuje rýchlosť Brownovho pohybu a teda veľkosť častíc pomocou Stokes – Einsteinovho vzťahu [19]:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R}, \quad (1)$$

kde: k_B je Boltzmannova konštanta, T je teplota a η je viskozita [20].

2.8.2 Zeta potenciál

Prítomnosť častíc disperznej fázy a široko rozvinutého fázového rozhrania v disperzných sústavách podmieňuje zvláštny ráz ich elektrických vlastností a predovšetkým vznik tzv. elektrokinetických javov. Podobne ako malý jednoduchý ión okolo seba vytvára iónovú atmosféru protiiónov, tak sa aj okolo nabitej koloidnej častice zoskupujú malé ióny opačného

znamienka, takže na povrchu tejto častice vznikajú dve nabité vrstvy, tzv. elektrická dvojvrstva [21].

Zeta potenciál je mierou veľkosti elektrostatického alebo nábojového odpudzovania/ priťahovania medzi časticami a je jedným zo základných parametrov, o ktorých je známe, že ovplyvňujú stabilitu. Jeho meranie prináša detailný pohľad na príčiny disperzie, agregácie alebo flokulácie a je možné ho použiť pre zlepšenie formulácie disperzií, emulzií a suspenzií [22]. Pokiaľ má systém dostatočne kladný alebo dostatočne záporný zeta potenciál je potom elektrostaticky stabilný (častice, ktoré majú dostatočne veľký náboj sa k sebe nemôžu priblížiť, aby agregovali). Z toho vyplýva, že stabilný systém je v intervale $(\infty, 30)$ mV alebo naopak $(30, \infty)$ mV a nestabilný systém je v intervale $(-30, 30)$ mV [23].

3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

3.1 Hydrofilné hydrogély

V posledných rokoch syntéza polymerických gélov na hydrofilné hydrogély zohrávala dôležitú úlohu v mnohých rôznych aplikáciách, vďaka ich niekoľkým žiadúcim vlastnostiam ako napríklad: kontrolovateľné rozmery, siete absorbujú a zachovávajú veľké množstvo vody, veľká povrchová plocha a krátkodobá časová odozva. Hydrogély môžu meniť svoj tvar a niektoré vlastnosti ako odozvu na prostredie (napríklad teplota, magnetické pole, pH, elektrina). Vzhľadom na vlastnosti týchto materiálov nachádzajú široké uplatnenie v rozličných technologických oblastiach ako napríklad balenie potravín, šošovky, kontrolované uvoľňovanie bielkovín, uvoľňovanie liečiva, mikroreaktory a odstraňovanie farbív [24].

3.2 Gelácia proteínov

Jednoduchá definícia by mohla byť, že gélovanie proteínov je agregácia z denaturovanej molekuly s určitým stupňom postupnosti, čo má za následok vznik spojenej siete. Gélovanie je obyčajne dvojkrokový proces: denaturácia a agregácia [3].

3.2.1 Fyzikálne vyvolané gélovanie

3.2.1.1 Zahrievanie

Gelácia vyvolaná zahriatím je najbežnejšie skúmaný fenomén vo vede o potravinách hlavne preto, že je zodpovedná za štruktúru prítomnú v mnohých každodenných tepelne upravených potravinách. Proteínové gélovanie môže mať dvojkrokový postup: po prvé rozklad alebo disociácia proteínových molekúl vyvolaná zahriatím, po ktorej nasleduje druhá časť, v ktorej asociačné a agregáčne reakcie vyústia do gélového systému. Takýmto spôsobom sa môžu formovať iba v prítomnosti primeraných podmienok prostredia. Po zahriatí môže dôjsť k výraznému zvýšeniu účinnej hydrofóbnosti indikáciou vývoja proteínu a keď je vystavených príliš veľa hydrofóbných miest, potom sú nevyhnutné interakcie medzi exponovanými hydrofóbnymi miestami, ktoré spôsobujú agregáciu bielkovinových molekúl. Nadmerné zahrievanie bielkovinového sólu na oveľa vyšší stupeň, než je potrebné na denaturáciu, vedie k skupenstvu metasolu, ktorý sa po ochladení nestane gélom [3].

Gélovanie kazeínových micel vo vodnej suspenzii sa venovali *Nicolai T., Chassenieux Ch.* [25] a zistili, že ju je možné vyvolať pomocou zahrievania na teplotu pod 90 °C, keď je pH znížené na menej ako pH 6,4 až po pH mlieka (6,7) po pridaní CaCl₂. Gelácia sa vyskytuje nad kritickou teplotou, ktorá klesá s klesajúcim pH a rastie koncentrácia kazeínu. Modul pružnosti gélov sa zvyšuje so zvyšujúcou sa koncentráciou kazeínu, ale zistilo sa, že je závislý na pH a na teplote zahrievania, pokiaľ nie sú blízke kritickej teplote, pri ktorej je gél nižší, pretože nie všetky micely sú začlenené do siete.

Guldiken B. a spol. skúmali vplyv solí (0,5 M NaCl alebo 0,25 M CaCl₂) a koncentrácie bielkovín (7,5 – 15 %) na gélotvorné schopnosti šošovice, žltého hrášku a faba fazúl tvarovaním bielkovinových koncentrátov pri pH 7. Prítomnosť solí znížila najmenej gélotvornú koncentráciu. Sila siete sa stala silnejšia so zvyšujúcou sa koncentráciou bielkovín alebo

v prítomnosti NaCl alebo CaCl₂. Röntgenové mikroskopické tomografické snímky ukázali, že CaCl₂ vytvoril silnejšie gély v porovnaní s inými roztokmi [26].

3.2.1.2 Mrazenie

Rozpustnosť myofibrilárnych proteínov je dôležitou vlastnosťou gélu, ktorou je indikácia denaturácie a agregácie proteínov. Predĺženie času zmrazenia myofibrilárnych proteínov vykazuje, že rozpustnosť gélu z kontrolnej a ISP (štruktúrovanie proteínu ľadom) skupiny významne klesá ($P < 0,05$). Najnižšia rozpustnosť je v kontrolnej skupine po 180 dňoch zmrazenia, ktorá sa významne znížila z 49,5 % na 25,7 % ($P < 0,05$). Rozpustnosť proteínov Rohu vykazuje klesajúci trend počas celej doby mrazenia. Zmena môže byť spôsobená denaturáciou proteínu, ktorá bola výsledkom tvorby rastu ľadových kryštálov a narušila celistvosť proteínu počas mrazenia. Okrem toho môže agregácia proteínov v dôsledku tvorby intermolekulárnych interakčných síl (disulfidické, vodíkové a hydrofóbne väzby) ovplyvniť proteínovú konformáciu, čo vedie k nerozpustnosti myofibrilárnych proteínov počas mrazenia [27].

3.2.1.3 Vysoký tlak

Vysoký tlak spôsobuje konformačné zmeny v potravinových proteínoch a produkuje denaturáciu alebo agregáciu v závislosti na proteínovom systéme a podmienkach, za ktorých sa tlak aplikuje. Denaturácia vyvolaná tlakom vedie k veľmi odlišným géloom od gélov produkovaných teplom, čo je výsledkom vytvárania štruktúr, ktoré zahŕňajú hlavne vodíkové väzby, hoci disulfidické väzby sú prítomné pri vyšších tlakoch. Gély vyvolané tlakom sú mäkšie, ale odolné proti rozbitiu a poskytujú ďalšie prostriedky na modifikáciu textúry jedla. Vysoké a nízke koncentrácie solí na aktomyozínové gély vyvolané vysokým tlakom môžu produkovať vynikajúce gély vyvolané teplom. Kombinácia oboch parametrov poskytuje strednú štruktúru. Významné rozdiely vo vzhľade a textúrnych vlastnostiach medzi gélmí vyvolanými tlakom a teplom sú, že vysoký tlak viedol k zvýšeniu tvrdosti a zníženiu lepivosti, na rozdiel od gélov vyvolaných teplom. Sila gélu sa zvýšila ako funkcia koncentrácie proteínu s výrazne vyššími hodnotami pri danej koncentrácii pri tepelnom vytvrdení v porovnaní s vysokotlakovými gélmí.

Aplikovaná energia však nie je jediným parametrom, ktorý je potrebné zohľadniť. Narušenie hydrofóbných a elektrostatických interakcií, ktoré spôsobujú disociáciu a vývoj bielkovín pri relatívne nízkych tlakoch, je pravdepodobne vyvolané premenou voľnej vody na kompaktnejšiu vodnú väzbu s ďalším povrchom bielkovín. Avšak pri vyšších hladinách tlaku (> 150 MPa) by sa mohla agregácia proteínov v dôsledku rozvinutia zvýšiť kvôli vyššej stlačiteľnosti a menšiemu objemu voľnej vody v porovnaní s objemom vody viazanej na proteín, čo malo za následok kompaktnosť matrice [3].

3.2.2 Chemicky vyvolané gélovatenie

3.2.2.1 Ionizácia

Pridanie iónov do proteínového roztoku znižuje odpudivé sily a dochádza k asociácii bielkovín s proteínmi, ktoré vytvárajú samonosný gél. Všeobecne sa uvádza, že srvátkové proteíny tvoria gély bez zahrievania po pridaní chloridu vápenatého alebo sodného.

Elektrostatická odpudivosť sa výrazne stavia proti interakciám proteín – proteín, ktoré bránia tvorbe gélu. Keď sa roztok ochladí na teplotu miestnosti a zmieša sa so soľou, elektrostatické náboje sa zakryjú a vytvorí sa gél [3].

Gélovatenie alginátu môže byť vyvolané prítomnosťou jednomocných, dvojmocných a trojmocných katiónov (H^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+}). Alginátové gély indukované iónmi sa tvoria hlavne elektrostatickými interakciami medzi negatívne nabitými karboxylovými skupinami v molekulách alginátu a pozitívne nabitými katiónmi k tvorbe polyelektrolytových komplexov. Schopnosť vytvárať gély (polyelektrolytové komplexy) zvyšuje potenciál alginátu ako hydrogélovej zložky. Rôzne alginátové gély indukované iónmi môžu mať odlišné vlastnosti a vlastnosti gélovatenia [28].

Ionizácia jednomocným katiómom H^+

Mechanizmus gélovatenia alginátu indukovaného H^+ spočíva v protonácii karboxylových skupín alginátu. Keď hodnota pH klesá, intermolekulárne spletenia a vodíkové väzby medzi hydroxylovými a karboxylovými skupinami susedných zvyškov G sa zvyšujú. To vedie k tvorbe alginátového gélu typu H^+ .

Na výrobu kyselinou indukovaného alginátového hydrogélu sa zvyčajne používajú dva spôsoby. Prvým je prídanie hydrolyzovaných laktónov, ako je D-glukono-5-laktón (GDL), do roztoku alginátu za vzniku alginátového gélu typu H^+ . Druhým je ponorenie protónovej membrány, ktorá plní vopred pripravený alginátový gél do kyslého roztoku. Výmena medzi voľným H^+ a katiónmi karboxylového alginátu indukuje tvorbu alginátového gélu typu H^+ . Vytvorený gél je mäkký a je rozpustný v alkalickom roztoku [28].

Ionizácia dvojmocným katiómom Ca^{2+}

Najčastejšie študovaným dvojmocným katiómom, ktorý môže indukovať gélovatenie alginátu, je Ca^{2+} . Ako prvý bol navrhnutý väzbový mechanizmus medzi Ca^{2+} a alginátom ako párovanie po sebe nasledujúcich G blokov, vytvárajúce dvojité štruktúry s dutinami, ktoré držia Ca^{2+} v chelátovej väzbe. Gélovatenie Ca-alginátu prebieha v troch krokoch. Prvým je interakcia Ca^{2+} s jednou jednotkou guluronátu za vzniku monokomplexov. Druhým je tvorba dimérov vaječných boxov párovaním monokomplexov a tretím je bočné spojenie dimérov vaječného boxu za vzniku multikomplexov.

Ca – alginátové gély je možné pripraviť dvoma spôsobmi. Prvým je exogénna metóda, v ktorej sa roztok alginátu nakvapká do kúpeľa $CaCl_2$, aby sa vytvorila gélová častica Ca – alginát. Vytvorená gélová častica má hrúbkový koncentračný gradient Ca^{2+} v dôsledku rýchleho gélovatenia, čo vedie k nehomogénnej gélovej štruktúre. Druhým je endogénna metóda, pri ktorej sa riadený spúšťač (GDL) pridáva do roztoku alginátu obsahujúceho zdroj vápnika (napr. $CaCO_3$), čím sa dosahuje pomalé uvoľňovanie a difúzia Ca^{2+} , čo vedie k tvorbe Ca – alginátového gélu [28].

Ionizácia trojmocným katiómom Fe^{3+}

Z trojmocných katiónov je najznámejší Fe^{3+} , ktorý môže produkovať špirálovú štruktúru vaječného boxu prostredníctvom silnej elektrostatickej interakcie s karboxylátovými skupinami alginátu a tým vytvárať stabilnú trojrozmernú vzájomne prepojenú gélovú štruktúru.

Ďalej sa Fe^{3+} môže viazať na deprotonované karboxylové skupiny alginátu oveľa silnejšie ako protonované karboxylové skupiny. Keď Fe^{3+} príde do styku s molekulami alginátu, produkujú sa koordinačné väzby s tromi koncovými karboxylovými skupinami alginátu, čím urýchľujú zosieťovanie a predlžujú alginátové reťazce. So zvyšujúcou sa koncentráciou Fe^{3+} dochádza ku koordinácii medzi Fe^{3+} a terminálnymi karboxylovými formami, vďaka čomu sú alginátové reťazce viac zoskupené a stočené. Takýto koordinačný režim ďalej indukuje tvorbu slizkej a homogénnej gélovej štruktúry.

Je dobre známe, že Fe^{3+} sa ľahko deoxidujú. Zistilo sa, že siet'ovanie Fe^{3+} s alginátom prešlo ľahkou fotoredukciou na Fe^{2+} v prítomnosti laktátu sodného. Okrem toho môže elektrochemická oxidácia homogénneho roztoku alginátu Fe (II) tvoriť hydrogély Fe (III) alginátu. Fe^{2+} má zníženú schopnosť koordinácie s alginátovými reťazcami, čo vedie k rozpusteniu hydrogélu a tvorbe homogénneho roztoku. Okrem toho sa Fe^{3+} viaže na karboxylátové skupiny alginátových reťazcov významne silnejšie ako Fe^{2+} . Možno vyvodit' záver, že Fe^{3+} má vyššiu schopnosť zosieťovania s alginátovými reťazcami ako Fe^{2+} [28].

3.2.3 Bioaktívne zložky v hydrogélach

Niektoré bioaktívne zložky v potravinách sú nestabilné a ľahko sa rozkladajú počas spracovania, skladovania a trávenia. Na zvýšenie stability a biologickej dostupnosti boli vyvinuté niektoré potravinové hydrogély na zapuzdrenie týchto nestabilných zlúčenín. Hydrogély majú schopnosť kontrolovať uvoľňovanie a zvyšovať biologickú dostupnosť bioaktívnych zložiek [29].

Hydrogél indukovaný etanolom bol pripravený pomocou dvoch jedlých biopolymérov: propylénglykol alginát a zeín. *Fuguo Liu a spol.* skúmali vplyv pH a rôznych hmotnostných pomerov propylénglykolu alginátu a zeínu na vlastnosti kompozitného hydrogélu. Propylénglykol alginát a zeín mohli tvoriť gél indukovaný etanolom pri $\text{pH} \geq 3,5$, stabilita, pružnosť, tvrdosť a kapacita zadržiavania vody sa znížili z pH 3,5 na 5,0 [30].

Zeínovými nanočasticami s obsahom kurkumínu, ktoré majú stabilizovanú štruktúru dvojitého povlaku v kombinácii s kazeinátom sodným a alginátom sodným sa zaoberal *Qingguan Liu a spol.* Nanočastice zeínu stabilizované kazeinátom sodným s alginátom sodným sú účinné na zlepšenie rozpustnosti vo vode, fotochemickej stability a antioxidačnej aktivity kurkumínu a očakáva sa, že pripravené kompozitné nanočastice budú použité ako nosič pre chemicky nestabilné hydrofóbne aktívne zlúčeniny v potravinárskom a farmaceutickom priemysle [31].

3.2.3.1 Kazeínové častice v hydrogélach

Kompozitný hydrogél z kazeínového roztoku úpravou pH na 8 a zmiešaním s oxidovanou kyselinou hyalurónovou obsahujúcou aldehydové skupiny. Tento proces uľahčil tvorbu kompozitného hydrogélu bez cudzích siet'ovacích činidiel. Bolo potvrdené, že vytvorený kompozitný hydrogél je netoxický a biokompatibilný, čo demonštruje jeho možné farmaceutické aplikácie. Bol tiež popísaný vývoj kazeínových hydrogélom pomocou enzymatického siet'ovania. V tomto ohľade sa mikrobiálna transglutamináza javila ako veľmi účinná pri navodení rýchleho gélovatenia kazeínu.

Kazeín má reomorfnú štruktúru s vysokým stupňom molekulárnej flexibility a veľkým počtom polárnych skupín, z ktorých všetky poskytujú dobré vlastnosti. Z týchto dôvodov je kazeín považovaný za vynikajúceho kandidáta pre radu aplikácií, ako sú nátery papieru, lepidlá a materiály pre balenie potravín [32].

Kruif C.G. a spol. skúmali schopnosť kazeínových gélov zadržiavať vodu. Táto schopnosť bola meraná bobtnaním a bobtnaním za rôznych podmienok teploty a koncentrácie soli. Transglutaminázou zosieťované sodné kazeínové (15 % w/w) gély bobtnajú v dobrých rozpúšťadlách alebo sa zmršťujú v zlých rozpúšťadlách, pokiaľ nie je dosiahnutá rovnovážna objemová frakcia kazeínu, čo je určené hustotou zosieťovania. Naproti tomu vysokoobjemné frakčné kazeínové gély (48 % w/w) majú tendenciu bobtnať v NaCl a CaCl₂. Experimenty na kazeínových micelách, ktoré je možné považovať za nanogély, vykazujú rovnaké chovanie a trendy. Fyzikálne zosieťované gély, ako je vysoko koncentrovaný syridlový kazeínový gél a kazeínové micely, vykazujú rovnaké (de-) bobtnanie. Zosieťované kazeínové gély (15 % w/w) majú menšiu tendenciu bobtnať v dôsledku nižšej objemovej frakcie kazeínu. Fyzikálne zosieťované gély sa nakoniec úplne rozpustia v dobrom rozpúšťadle [33].

Yin W. a spol. popísali proteín – polysacharidový hydrogél ako biokompatibilný, biologicky odbúrateľný a netoxický materiál, ktorý mal biomedicínske aplikácie, ako je napríklad podávanie liekov. Hydrogél, zložený z 10 % kazeínu a 1 % konjac glukomananu, bol vytvorený s 0,4 % hmot. transglutaminázy ako sieťovacieho činidla. Výsledky testu stability preukázali, že hydrogél s konjac glukomananom mal zjavne zlepšenú stabilitu. Rýchlosť jeho degradácie sa na konci testu tiež znížila zo 100 % na menej ako 60 % v porovnaní s hydrogélom bez konjac glukomananu. Výsledky testu bobtnacieho pomeru ukázali, že prídanie konjac glukomananu obmedzilo pohyblivosť reťazcov a znížilo bobtnací pomer hydrogélu [34].

4 CIELE PRÁCE

Hlavným cieľom práce bolo nájsť vhodné bielkoviny (peptidy), ktoré sú samovoľne schopné agregovať, charakterizovať ich a inkorporovať do gélu, kde by sa tieto agregáty využili ako biokompatibilné nosiče hydrofóbných liečiv.

Na začiatku sme sa zamerali na články s témou inkorporácie proteínov do hydrogélových štruktúr so zameraním na asociatívne peptidy. Na základe rešerše boli vybrané vhodné proteíny, charakterizovaný vybraný proteín. Pre túto prácu bol zvolený kazeinát, ktorý tvorí agregáty pri laboratórnej teplote vo vodnom roztoku. Agregáty boli charakterizované na základe veľkosti a zeta potenciálu a tiež pomocou farbiva, ktoré je rozpustné iba v hydrofóbných roztokoch. Tiež sme sa pokúsili zistiť tepelnú stabilitu daných agregátov do teploty 70 °C. Boli urobené experimenty vedúce k vytvoreniu hydrogélového systému, ktorý obsahoval daný proteín a následne sa overilo, či sa častice inkorporovali.

5 MATERIÁLY A METÓDY

5.1 Materiály

Ako amfifilná látka bol použitý kazeinát sodný (CAS: 9005-46-3, Sigma-Aldrich, š. BCCG7619). Ako fluorescenčná látka bol použitý pyrén (CAS: 129-00-0, Fluka, š. 4306611). Ako hydrofóbná látka bola použitá súdánová červeň G (CAS: 1229-55-6, Fluka, š. 401930/1). Všetky zásobné roztoky a vzorky vo vodnom prostredí boli pripravené za použitia deionizovanej vody (Miliphore: Mili-Q; Purelab: ELGA). Ako gély boli použité guarová guma (CAS: 9000-30-0, Sigma-Aldrich, š. SLCL2534) a gelan (CAS: 71010-52-1, Sigma-Aldrich, š. SLCJ0154).

5.2 Príprava zásobných roztokov

Zásobné roztoky boli vždy pripravené o koncentracii 1 g/l a 5 g/l kazeínu v deionizovanej vode s objemom 100 ml. Zásobný roztok sa miešal na magnetickej miešačke aspoň 2 hodiny. Následne bol zásobný roztok skladovaný v chladničke. Roztok v chladničke vydržal približne dva týždne, po dvoch týždňoch sa začal zrážať a bol nepoužiteľný.

5.3 Príprava vzoriek

5.3.1 Práca s fluorescenčnou sondou

Pri práci s fluorescenčnou sondou bol použitý základný princíp prípravy vzoriek, ktorý odpovedá použitiu zásobného roztoku fluorescenčnej sondy pyrénu v prchavej zložke. Tento zásobný roztok fluorescenčnej sondy bol pripravený v acetóne a do čistých vialiek bol pipetovaný požadovaný objem, tak aby v konečnej vzorke bola požadovaná koncentrácia fluorescenčnej sondy. Ak nie je uvedené inak, tak koncentrácia sondy je 10^{-6} mol.dm⁻³.

Prchavé rozpúšťadlo bolo odparené za zníženého tlaku a do takto pripravených vialiek so sondou boli pipetované roztoky o požadovanej koncentrácii jednotlivých komponentov v požadovanom prostredí. Všetky vzorky boli ponechané na trepačke pri laboratórnej teplote minimálne 4 hodiny.

5.3.2 Koncentračná rada

Prvá orientačná koncentračná rada bola od 0,001 do 1 g/l kazeínu vo vode. Po vyhodnotení dát bola zvolená užšia koncentračná rada pre presnejšie stanovenie CMC. Daná koncentračná rada sa pohybovala medzi koncentráciami 0,01 až 1 g/l kazeínu vo vode. Ďalšia koncentračná rada sa pohybovala od 0,003 do 5 g/l kazeínu vo vode.

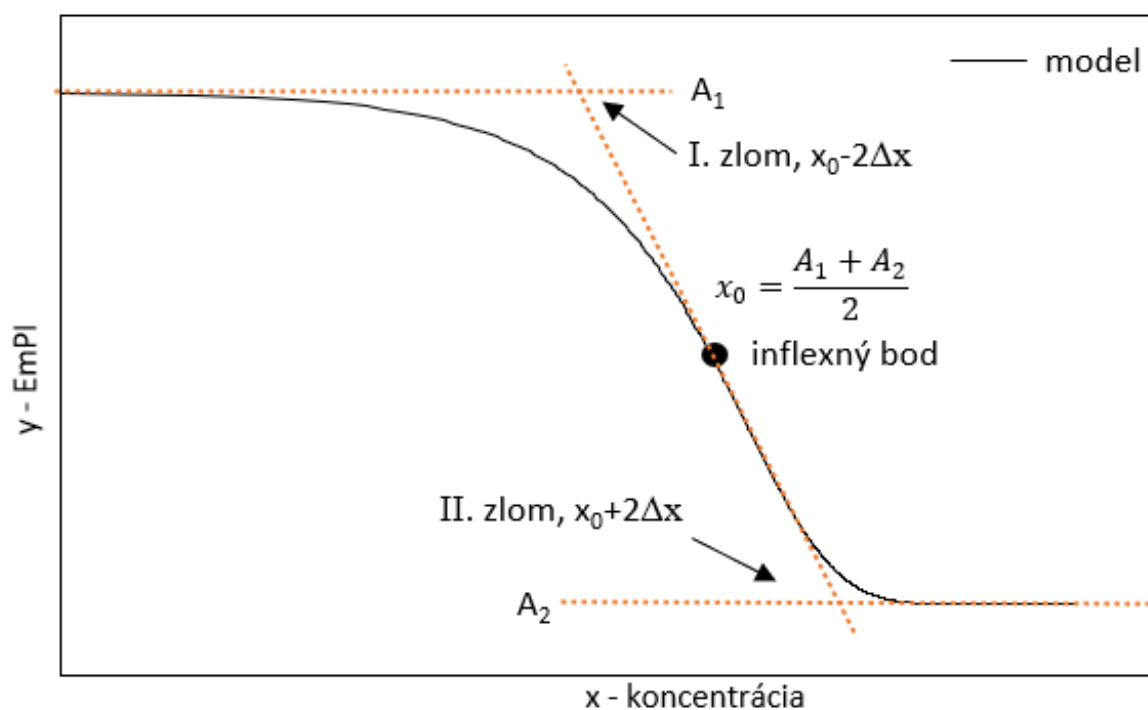
5.4 Metódy

5.4.1 Meranie fluorescenčnou sondou

Fluorescenčné spektrá pyrénu boli merané na fluorimetri EDINBURGH INSTRUMENTS FS5. Pri meraní emisných spektier bol excitačný monochromátor nastavený na 336 nm. Emisné spektrum bolo merané od 360 nm do 540 nm. V tomto spektre sa sledovala intenzita prvého (373 nm) a tretieho (382 nm) maxima. Ich pomer je jedným z vyhodnocovacích parametrov

reagujúcich na polaritu a bude ďalej označovaný ako EmPI (emisný polaritný index) [35]. Bol tiež pozorovaný excimér, ktorého maximum je pri 470 nm.

Na krivke sa nachádza iba jeden zlom, čo znamená, že závislosť EmPI na koncentracii tenzidu vykazuje u bežných tenzidov vo vode jednoduchý sigmoidný charakter [36]. Táto závislosť je štandardne prekladaná pomocou Boltzmannovho modelu, ktorý môžeme vidieť na **Obr. 4**. Namerané závislosti boli vyhodnocované v Microsoft Excel prostredníctvom Riešiteľa, pomocou ktorého boli vypočítané parametre Boltzmannovho modelu.



Obr. 4: Boltzmannova závislosť a jej charakteristické parametre

Parametre, ktoré získame pre daný model sú inflexný bod x_0 , ktorého súradnica na ose x sa vyhodnotí ako hodnota CMC, I. a II. zlom charakterizuje začiatok a koniec agregácie a hodnoty A_1 a A_2 vyjadrujú hornú a spodnú limitu daného modelu. Spomenuté dve posledné hodnoty hovoria o vlastnostiach systému pred a po agregácii. Hlavne ide o minimum A_2 , z ktorého je možné usudzovať polaritu hydrofóbných jadier vzniknutých a ustálených agregátov. Posledným parametrom je Δx , táto hodnota charakterizuje ako strmý je pokles v klesajúcej časti krivky a vypovedá tak o priebehu samotnej agregácie [36]. Rovnica Boltzmannovej krivky je daná ako:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x - x_0}{\Delta x}}} + A_2, \quad (2)$$

kde: premenná y odpovedá EmPI a nezávislá premenná x označuje celkovú koncentráciu tenzidu, A_1 a A_2 je horná a spodná limita sigmoidnej krivky.

5.4.2 Postup a princípy zisťovania kazeínových častíc

Charakterizácia kazeínových častíc bola stanovená na základe veľkosti častíc, ich zeta potenciálu a tiež sme sa pokúsili zistiť vplyv teploty na stabilitu a veľkosť kazeínových častíc, všetky merania prebehli na prístroji ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments).

Veľkosť častíc sme určili pomocou dynamického rozptylu svetla. Meranie prebiehalo v sklenených kyvetách pri 25 °C, doba kalibrácie bola nastavená na 15 sekúnd z toho dôvodu, že naše roztoky boli skladované a pripravované pri laboratórnej teplote. Poloha v kyvete, pri ktorej laser snímal rozptyl častíc vo vzorke, bola nastavená na fixnú hodnotu 1,00. Každá vzorka bola premeraná najmenej trikrát a z týchto meraní bol urobený priemer. Výsledkom bola nameraná závislosť intenzity rozptýleného svetla ku veľkosti častíc.

Zeta potenciál bol určený pomocou metódy elektroforetického rozptylu svetla. Meranie prebiehalo pri teplote 25 °C pomocou dip cell elektródy, pričom doba inkubácie bola 10 sekúnd. Zeta potenciál bol hneď zmeraný po stanovení veľkosti častíc a výsledná hodnota bola získaná z priemeru piatich hodnôt.

Stabilizácia kazeínových častíc bola zmeraná ako pri veľkosti častíc tak aj pri zeta potenciáli. Východzia teplota pre meranie veľkosti častíc bola 20 °C a konečná teplota bola 60 °C, pričom krok bol 10 °C a inkubácia na danú teplotu prebiehala 60 sekúnd. Každé meranie bolo zmerané najmenej trikrát v sklenenej kyvete a pre udržanie konštantnej teploty bol daný ochranný kryt. Zeta potenciál sa meral obdobne ako veľkosť častíc, len s tým rozdielom, že opakovanie bolo päťkrát a meranie prebehlo pomocou dip cell elektródy. Nebolo nutné použiť ochranný kryt pre udržanie konštantnej teploty. Všetky merania boli merané trikrát a boli z nich urobené priemery a smerodajné odchýlky.

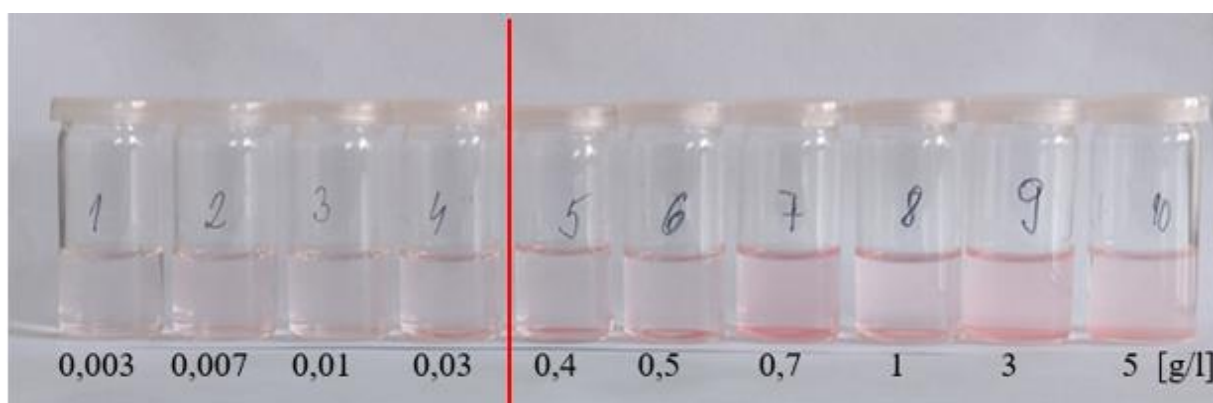
5.4.3 Príprava gélov

Boli pripravené gély guarovej gummy a gelanu o koncentrácii 1,5 % vo vodnom a micelárnom prostredí. Micelárne prostredie kazeínových častíc vo vodnom prostredí malo koncentráciu 0,7 g/l. Následné miešanie gélov bolo prevedené do vodného kúpeľa, ktorý mal maximálnu teplotu 27 °C a zmesi boli miešané do úplného rozpustenia. Pripravené gély boli centrifugované pri 4000 otáčkach za minútu po dobu 15 minút, aby sa odstránili prípadné bubliny, ktoré vznikli miešaním.

6 VÝSLEDKY A DISKUSIA

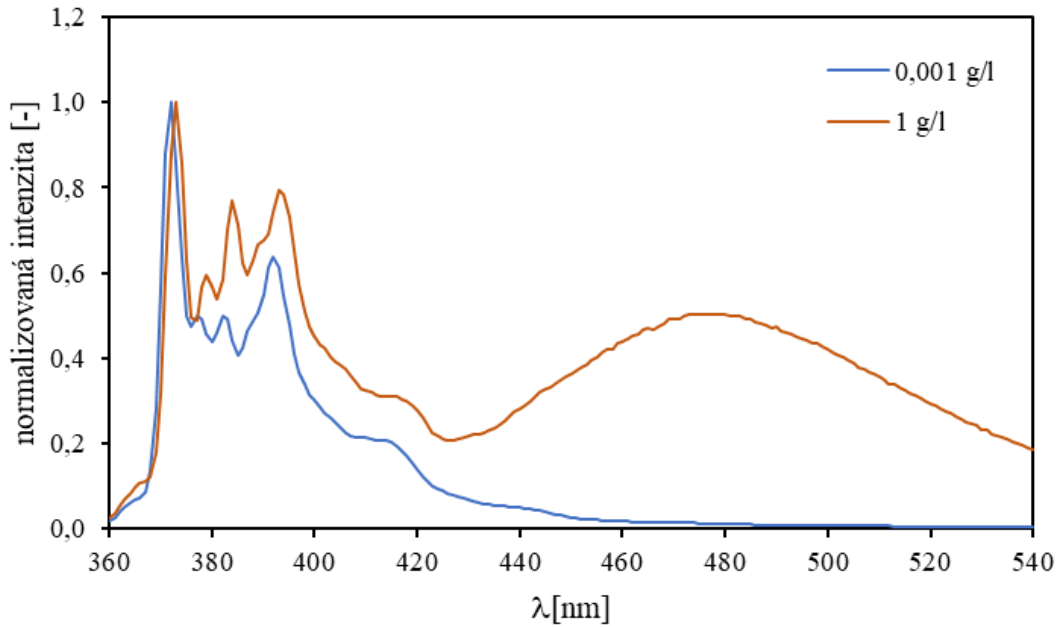
6.1 Stanovenie CMC kazeínu

Prvým krokom výskumu bolo potrebné určiť CMC kazeínu sodného. Najprv určité koncentrácie kazeínu vo vode sme zafarbili hydrofóbnym farbivom sudánovou červeňou, aby sme mohli vizuálne určiť približnú hodnotu CMC kazeínu. Keďže micely majú uprostred hydrofóbný charakter, tak je zrejmé, že s ich väčším výskytom sa bude hydrofóbné farbivo rozpúšťať. Kde je koncentrácia kazeínu veľmi malá a výskyt micel je málo pravdepodobný, tak sa farbivo nerozpustí. Z **Obr. 5** je značne viditeľné, že sme prekročili CMC od roztoku 5 s koncentráciou 0,4 g/l kazeínu vo vode.

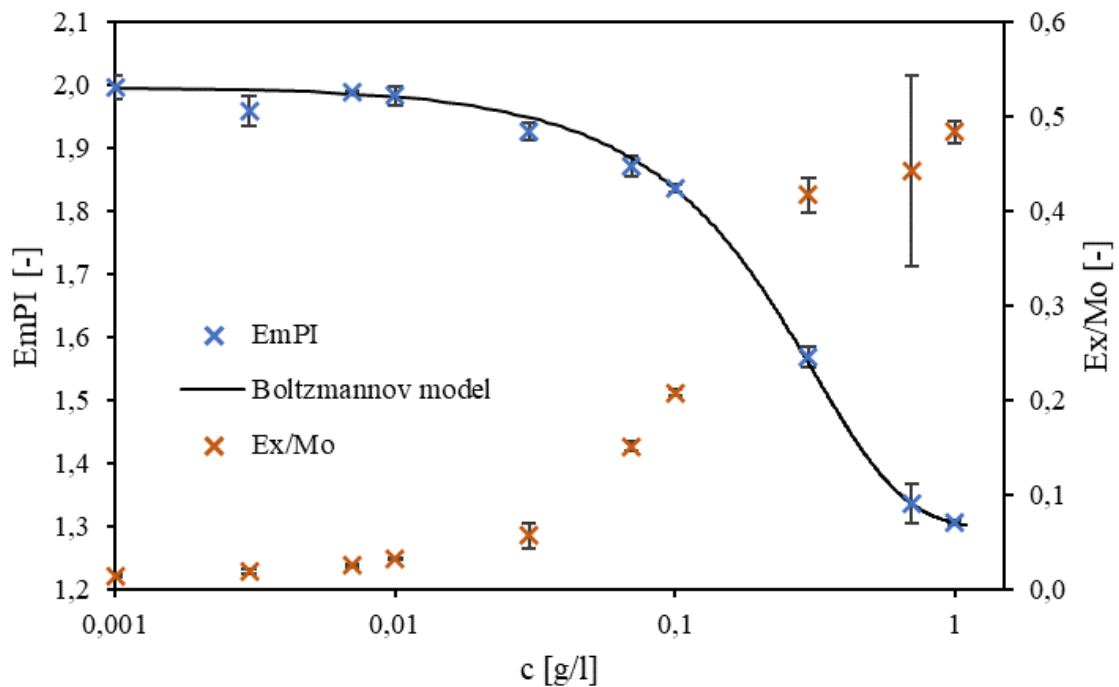


Obr. 5: Stúpajúca koncentrácia kazeínu vo vode od 0,003 do 5 g/l

Na základe **Obr. 5** bola zostavená širšia koncentračná rada, ktorá obsahovala koncentrácie kazeínu vo vode od 0,001 do 1 g/l. Na **Obr. 6** môžeme pozorovať emisné spektrum pyrénu v roztoku kazeínu vo vode o koncentráciách 0,001 g/l a 1 g/l, ktoré je pri dvoch hraničných hodnotách. Z obrázku je možné vyčítať, že pri koncentracii 0,001 g/l kazeínu vo vode sa sonda nachádza ešte v hydrofilnom prostredí, tento rozdiel si môžeme všimnúť už pri treťom maxime pyrénu. Taktiež môžeme vidieť tvorbu exciméru, jeho emisné spektrum už nie je rozlíšené, lebo stráca svoje emisné rozlíšenie a stáva sa z neho klasický pík pri maxime 470 nm, na základe, ktorého môžeme tvrdiť, že sme prekročili CMC.



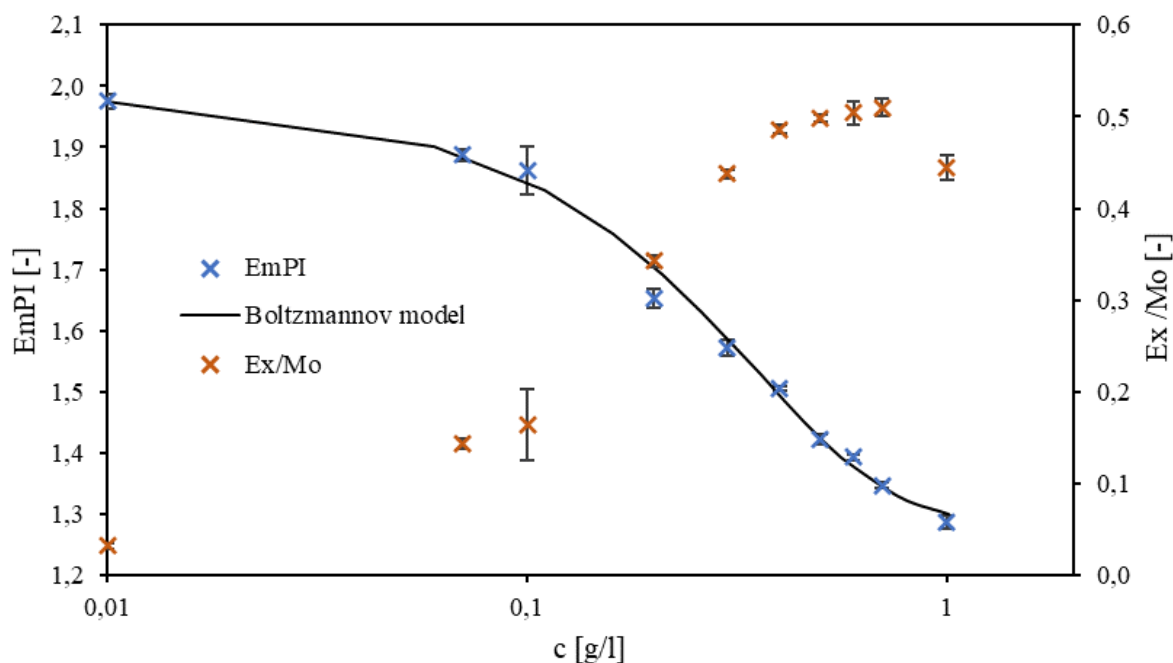
Obr. 6: Normalizované emisné spektrum pyrénu pri koncentracii kazeínu vo vode 0,001 a 1 g/l



Obr. 7: Závislosť $EmPI$ a pomer intenzity pásu monoméru k pásu exciméru (Ex/Mo) na koncentracii kazeínu vo vodnom prostredí, širšia rada

Pre lepšie stanovenie CMC bolo zvolená širšia koncentračná rada, až cez tri rády. Na **Obr. 7** môžeme vidieť, že CMC je za 0,1 g/l kazeínu vo vode. Pre presné vyhodnotenie CMC nemáme dostatok bodov v oblasti, kde sa vytvárajú micely a preto bola zvolená ešte užšia rada, ktorá nám pomohla lepšie preskúmať oblasť micelizácie. Pri vizuálnom vyhodnotení nám pomohli dáta Ex/Mo , ktoré nám niečo povedali o micelizácii. Aj excimér má svoje maximum, ale z **Obr. 7** to nemôžeme presne určiť, keďže bod o koncentracii kazeínu vo vode 0,7 g/l má veľkú

chybovú úsečku. Nevieime presne určiť, kde leží bod a nevieme s istotou povedať, či sme prekročili alebo neprekročili jeho maximum. Excimér sa začne tvoriť po presiahnutí CMC a to z toho dôvodu, že sa pyrén lokálne zakoncentrováva v micelách, keďže je micel nedostatok. Ale ako náhle začne micel viac pribúdať, tak tvorba exciméru začne klesať. Takže aj keď máme jednu sondu, máme dva ukazovatele, podľa ktorých môžeme vyhodnotiť dáta. Pre presné vyhodnotenie CMC, bola použitá užšia koncentračná rada, ktorá bola od 0,01 do 1 g/l kazeínu vo vode. Ako môžeme pozorovať na **Obr. 8**, tak prvé tri hodnoty nachádzajúce sa pred CMC boli ponechané z dôvodu vyhodnotenia dát, aby sme získali dáta na hornom ramene Boltzmannovho modelu.



Obr. 8: Závislosť $EmPI$ a $Ex:Mo$ na koncentrácii kazeínu vo vodnom prostredí

Z tohto obrázku môžeme lepšie odčítať CMC. Je zrejmé, že CMC sa orientačne nachádza v bode štyri, ktorý má koncentráciu 0,2 g/l kazeínu vo vode, presnú hodnotu stanovíme iba vďaka preloženiu. Ďalej je možné povedať, že excimér má svoje maximum v bode deväť s koncentráciou 0,7 g/l kazeínu vo vode. Z **Obr. 8** je tiež možné vyčítať, že micelizácia kazeínu prebieha od 0,1 do 1 g/l koncentrácie kazeínu vo vode, čo je v rozmedzí jedného koncentračného rádu. Tu môžeme vidieť rozdiel medzi agregáciou jednoduchých tenzidov ako je napríklad trimetylamonium bromid (CTAB) a dodecylsulfát sodný (SDS), ktoré agregujú vo výrazne užšom koncentračnom rozmedzí. A je to pravdepodobne dôsledok toho, že kazeín je proteín a nemá jednoduchú štruktúru. Kazeínové častice sme ničím nestabilizovali.

Tab. 1: Stanovená CMC a namerané parametre Boltzmannových modelov

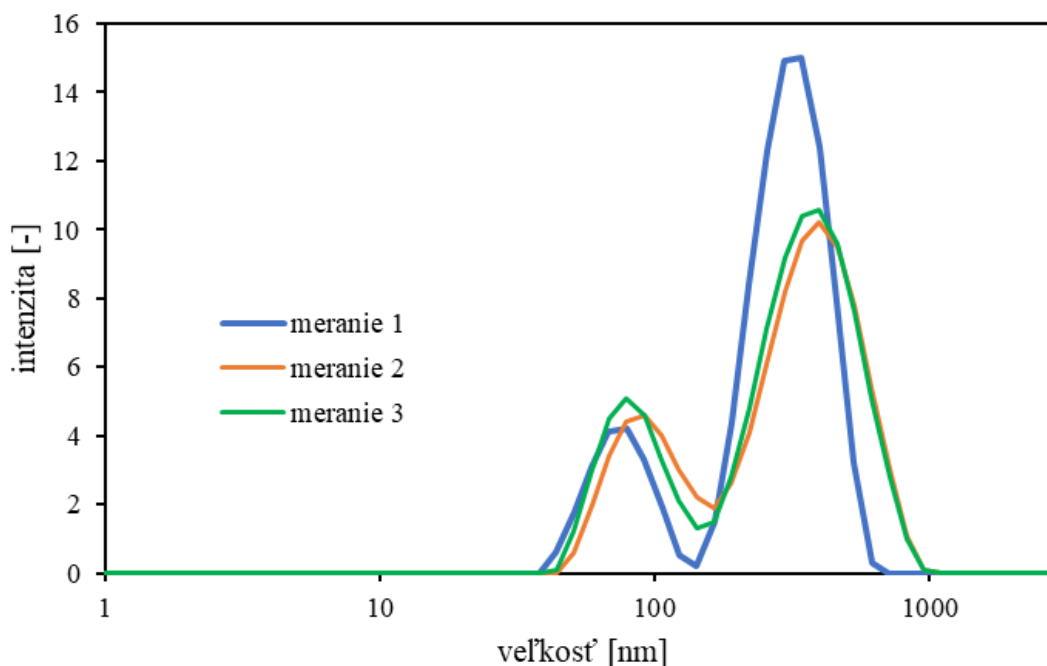
	širšia koncentračná rada	užšia koncentračná rada
A_1	$2,51 \pm 0,17$	$2,55 \pm 0,14$
A_2	$1,30 \pm 0,00$	$1,29 \pm 0,01$
Δx	$0,06 \pm 0,06$	$0,05 \pm 0,05$
x_0 [g/l]	$0,19 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,01$

Na základe týchto meraní sme boli schopní stanoviť hodnoty A_1 , A_2 , Δx a x_0 , kde x_0 je inflexný bod a hovorí nám, že v danom bode sa nachádza micelárna koncentrácia, ktorá je pre nás zo všetkých týchto hodnôt najpodstatnejšia. Aj keď hodnoty sú z dvoch rôznych rád, kde v prvej rade bolo menej bodov v oblasti micelizácie, tak dané merania sa od seba veľmi nelíšia, odpovedajú si. Pre naše ďalšie merania je podstatný inflexný bod, aby sme vedeli od akej koncentrácie kazeínu vo vode pracujeme s micelami. Aj keď tieto dáta na seba sedia berieme hodnotu CMC z užšej koncentračnej rady, ktorá je presnejšia a hodnota CMC odpovedá koncentrácii 0,2 g/l kazeínu vo vode.

6.2 Charakterizácia kazeínových agregátov

Koncentračná rada kazeínu vo vode vznikla zmiešaním širšej a užšej koncentračnej rady a to v rozmedzí od 0,003 do 5 g/l. Na tejto koncentračnej rade sa premerala veľkosť a zeta potenciál pomocou dynamického rozptylu svetla.

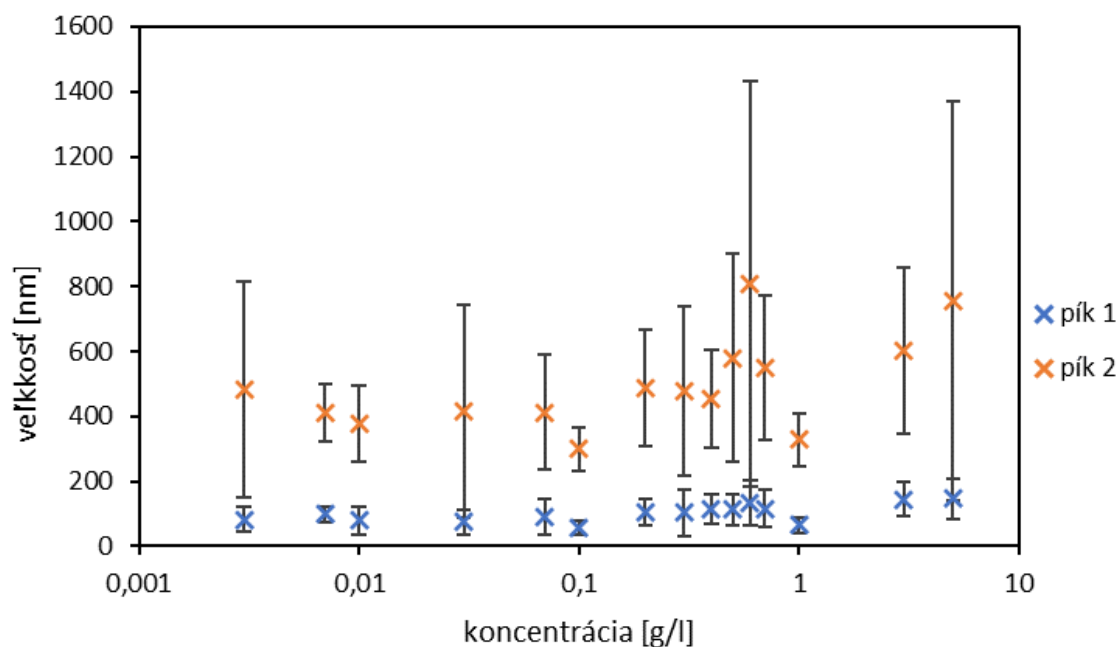
6.2.1 Stanovenie veľkosti kazeínových častíc



Obr. 9: Rozloženie veľkosti častíc kazeínu vo vodnom prostredí o koncentrácii 0,4 g/l

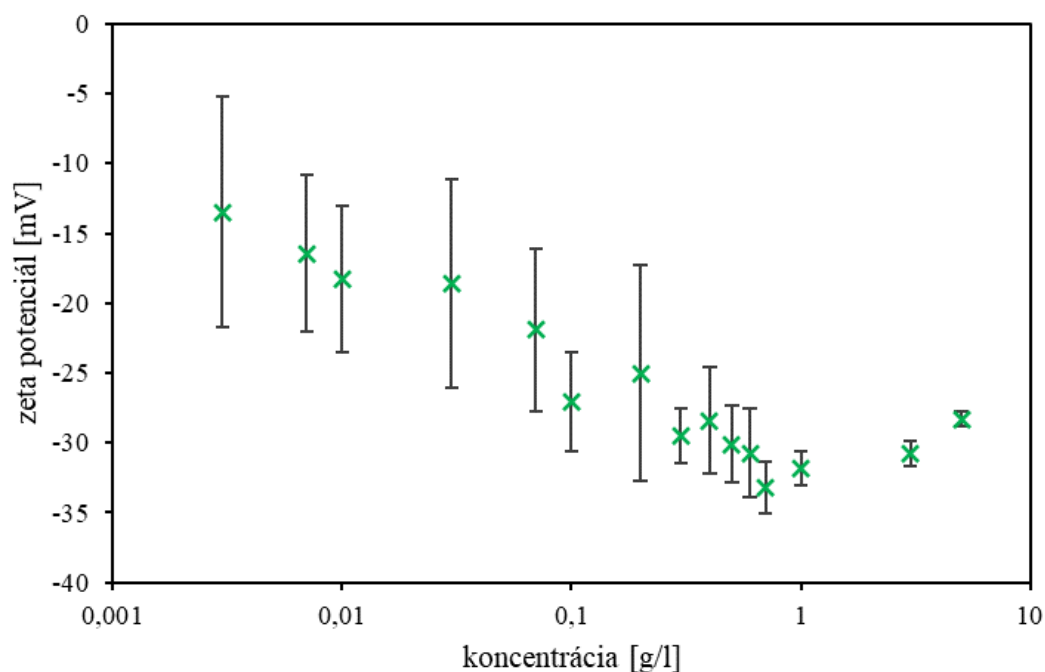
Z Obr. 9 je zrejmé, že v roztokoch kazeínu vo vodnom prostredí boli detegované dve rôzne veľkosti častíc. Aj keď na obrázku vyzerá systém veľmi stabilne a veľkosti sa zhodujú, tak

veľkosti častíc sa dosť menia. Z toho vyplýva, že kazeínové micely sa preskupujú a nie je to veľmi stabilný systém. Z **Obr. 10** plynie, že častice majú dve veľkosti. Veľkosť prvého píku sa pohybuje do 200 nm a veľkosť druhého sa pohybuje od 300 do 800 nm. Na základe tohto môžeme povedať, že sa nejedná o nanočastice, tie sú charakterizované od 10 do 100 nm. Z chybových úsečiek pri prvom píku vyplýva, že sa jedná o jednoduché kazeínové micely. Pri druhom píku pozorujeme väčšie chybové úsečky, čo môže znamenať, že pozorujeme agregáty micel, ktorým by väčšie chybové úsečky odpovedali. Kazeínové častice neboli žiadnou látkou stabilizované a nemali žiadnu špeciálnu úpravu. Micelárne roztoky boli iba rozmiešané a trepané na trepačke.



Obr. 10: Závislosť veľkosti maxím na koncentrácii kazeínu vo vodnom prostredí

6.2.2 Určenie zeta potenciálu kazeínových častíc

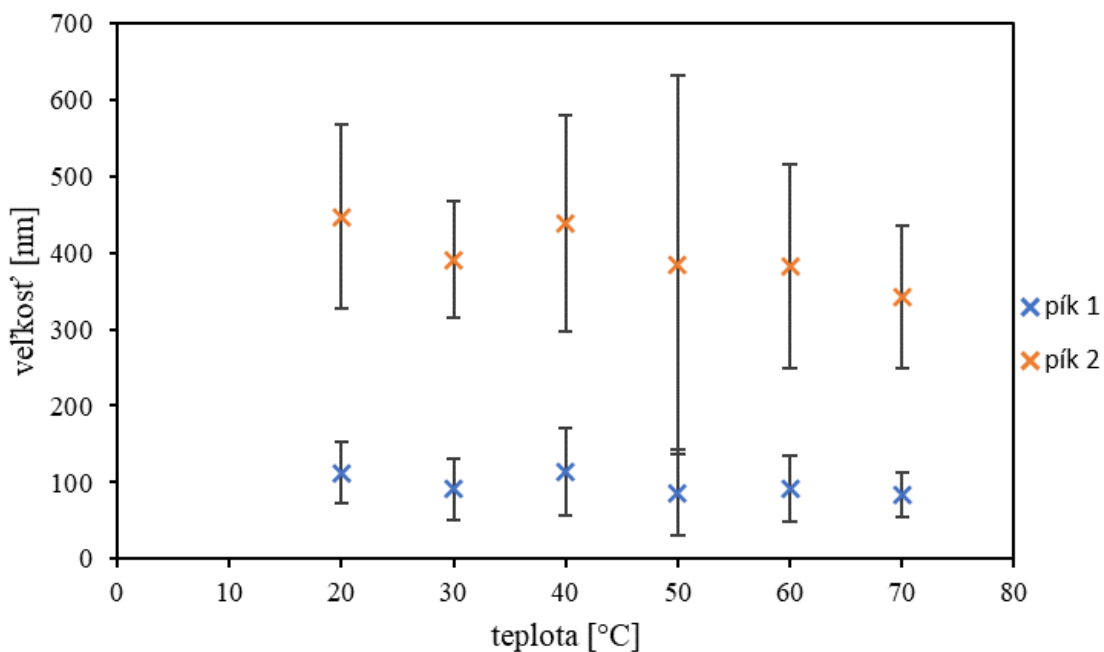


Obr. 11: Závislosť zeta potenciálu na koncentrácii kazeínu vo vodnom prostredí

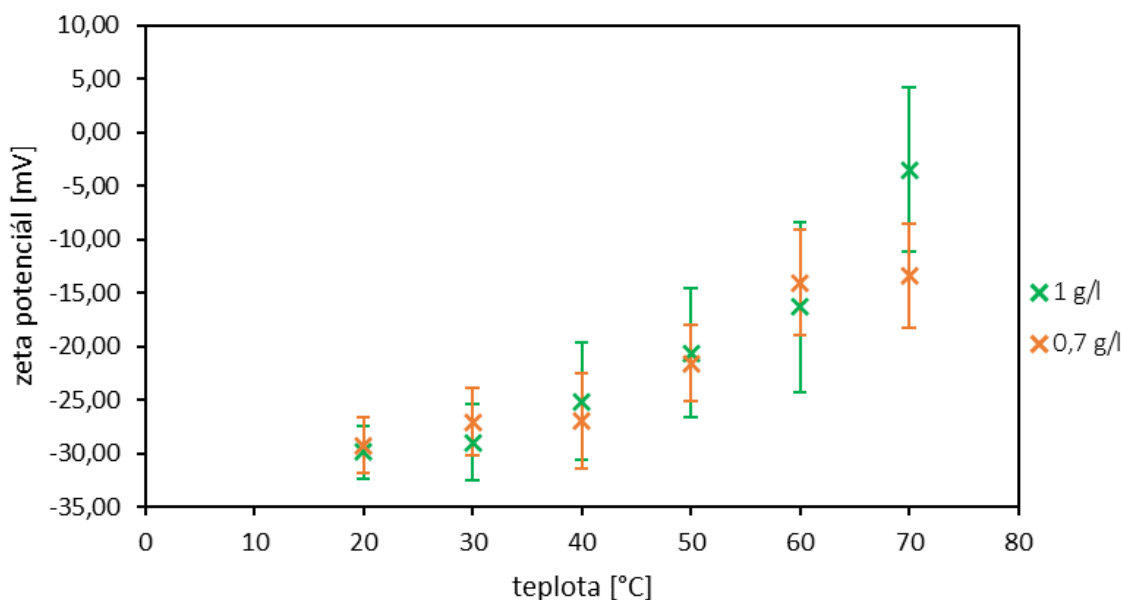
Zeta potenciál so zvyšujúcou sa koncentráciou klesá do koncentrácie 0,7 g/l, potom nastáva zlom a zeta potenciál začína rásť. To znamená, že micely kazeínu sa stávajú stabilnejšími, keďže považujeme stabilný systém od -30 mV. Ale tento jav môžeme pozorovať iba pri dvoch koncentráciách kazeínu vo vode a potom zas začína zeta potenciál stúpať a systém sa stáva znova nestabilným. Z hľadiska opakovateľnosti, ktorú charakterizujú chybové úsečky, je vidieť do koncentrácie 0,7 g/l, že sa zeta potenciál pri jednotlivých opakovaníach opakuje vo väčšom rozsahu ako od koncentrácie 0,7 g/l, kde sú chybové úsečky menšie.

Aj keď je CMC pri koncentrácii 0,2 g/l kazeínu vo vode, tak z daných meraní plynie, že systém je za hranicou stability iba pri dvoch koncentráciách a to 0,7 g/l a 1 g/l. Zeta potenciál pri koncentrácii 0,7 g/l nadobúda hodnotu $-33,2 \pm 1,9$ mV a zeta potenciál pri koncentrácii 1 g/l má hodnotu $-31,8 \pm 1,2$ mV. Hodnoty zeta potenciálu sa síce nachádzajú za hraničnou hodnotou pre stabilné častice, ale uvedomujeme si, že sa nachádzajú takmer na hrane. Ak predpokladáme, že zeta potenciál je závislý na viskozite, potom nám samotná inkorporácia častíc do hydrogélu pomôže vyriešiť tento problém, pretože vyššia viskozita gélu bude kazeínové častice stabilizovať. Na základe týchto meraní boli pre ďalšie experimenty mapujúce vplyv teploty vybrané práve tieto dve koncentrácie.

6.2.3 Charakteristika kazeinových častíc na základe teploty



Obr. 12: Závislosť veľkosti maxim kazeinových micel vo vode o koncentrácii 1 g/l na teplote



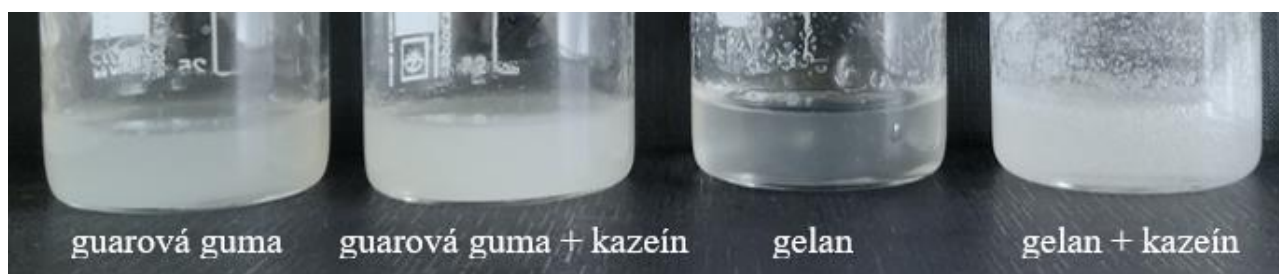
Obr. 13: Závislosť zeta potenciálu kazeinových micel vo vode na teplote

Z Obr. 13 vyplýva, že systém kazeinových častíc je najstabilnejší pri teplote 20 °C. Zeta potenciál pri koncentrácii 0,7 g/l pri teplote 20 °C nadobúda hodnotu $-29,84 \pm 2,47$ mV a pri koncentrácii 1 g/l pri 20 °C dosahuje hodnoty $-29,25 \pm 2,63$ mV. So zvyšujúcou teplotou rastie hodnota zeta potenciálu a nadobúda vyšších hodnôt, ktoré sa vzdávajú od hranice stability, ktorá je -30 mV. Na základe Obr. 12 sa veľkosť častíc nemení, veľkosť prvého píku sa pohybuje okolo 150 nm a veľkosť druhého píku sa pohybuje pri hodnote 400 nm. Chybové úsečky pri prvom píku nám naznačujú, že sa v roztoku nachádzajú jednoduché kazeinové

častice a pri druhej veľkosti píku pozorujeme väčšie chybové úsečky, z čoho vyplýva, že kazeínové častice nám agregovali a tvoria zhluky, ktorým odpovedajú aj väčšie chybové úsečky. Na základe stanovenia kazeínových častíc zeta potenciálu pri teplote sa vybrala vhodná teplota pre ich inkorporáciu do gélu. Následne sme museli vybrať polysacharidy gelan a guarovú gumu, ktoré sú schopné tvoriť gél bez nutnosti zahrievania. Museli sme vynechať inkorporáciu do agarózy, ktorá sa musí zahriať minimálne na 70 °C, aby začala tvoriť gél, pretože naše kazeínové častice pri teplote 70 °C sú nestabilné a nedosahujú hranicu stability systému.

6.3 Inkorporácia kazeínových častíc do gélu

Boli pripravené štyri rôzne gély. Prvý gél obsahoval guarovú gumu s koncentráciou 1,5 %, druhý gél obsahoval guarovú gumu s koncentráciou 1,5 %, do ktorého boli inkorporované kazeínové častice o koncentrácii 0,7 g/l. Tretí gél bol pripravený z gelanu a jeho koncentrácia bola 1,5 % a štvrtý gél obsahoval gelan o koncentrácii 1,5 % a kazeínové častice o koncentrácii 0,7 g/l.



Obr. 14: Pripravené gély, ktoré obsahujú častice kazeínu

Na **Obr. 14** môžeme pozorovať rozdiely medzi jednotlivými gélmi. Obidva gély guarovej gumy majú mliečne zakalený vzhľad, či už sa jedná o gél s kazeínovými časticami alebo čistý gél. Rozdiel pozorujeme medzi gélmi, ktoré obsahujú gelan. Gél, ktorý obsahuje samotný gelan je číry a gél s gelanom a kazeínovými časticami je mliečne zakalený. Tento zákal môže byť spôsobený buď inkorporáciou kazeínových častíc do gélu alebo tvorbou bublín, ktoré vznikli pri miešaní gélu. Z tohto dôvodu bola určitá časť z každého gélu odobraná do centrifugačnej skúmavky a všetky štyri gély boli odstredené.

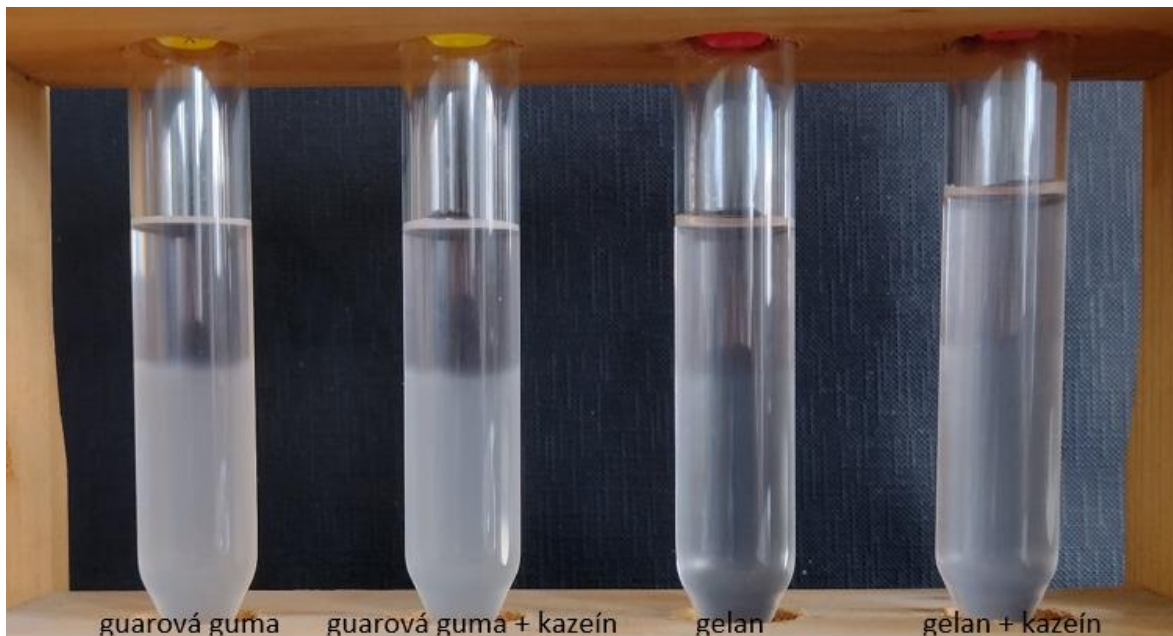


Obr. 15: Gély po centrifugácii

Po centrifugácii vidno, že mliečne zakalenie u gelanu, ktorý obsahuje kazeínové častice, bolo spôsobené bublinkami, ktoré boli centrifugáciou odstránené. Gély boli tiež podrobené jednoduchému experimentu v gravitačnom poli. Zmesi boli rôzne v kadičkách a skúmavkách rôzne ponakláňané, aby sme zistili, či inkorporácia častíc má vplyv na pohyb gélu v gravitačnom poli. Rozdiel tečenia medzi gélom a gélom s kazeínovými časticami nebol viditeľne pozorovateľný. Pre lepšiu charakterizáciu daných gélov by bolo potrebné použiť reologické meranie, ktoré môžu byť ďalším podnetom pre diplomovú prácu.

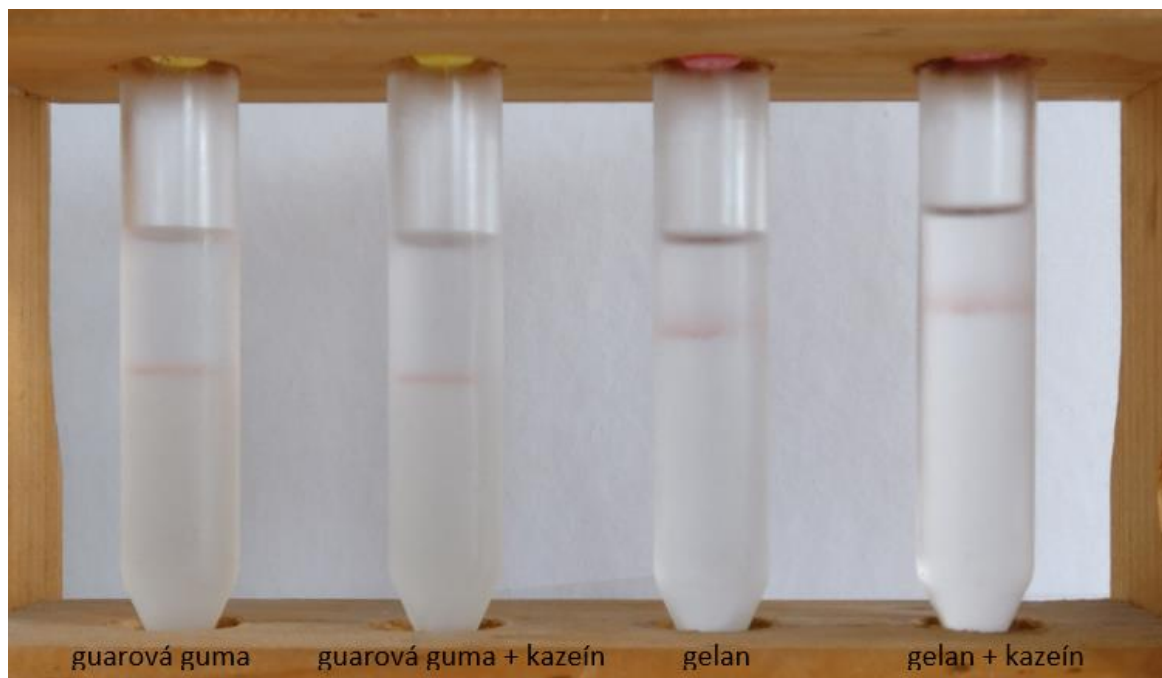
6.4 Difúzia sudánovej červene do hydrogélů

Bol pripravený zásobný roztok kazeínu vo vode o koncentrácii 1 g/l. Do tohto roztoku bola inkorporovaná sudánová čereň, ktorá sa rozpustila v micelách, ktoré sú vo vnútri hydrofóbneho charakteru. Daný roztok s kazeínovými časticami a sudánovou čereňou bol opatrne, po stene skúmaviek, napipetovaný na vrstvu gélu. Následne bola pozorovaná difúzia daného roztoku do gélu po dobu piatich dní.



Obr. 16: Gély s roztokom sudánovej červene a kazeínovými časticami vo vode o koncentrácii 1 g/l, 1. deň pokusu

Na **Obr. 16** sú gély po napipetovaní ofarbeného roztoku kazeínových micel a na **Obr. 17** sú tieto vzorky kazeínových micel po piatich dňoch. Rozdiel, ktorý bol pozorovaný medzi prvým a piatym dňom, bola sedimentácia sudánovej červene na fázovom rozhraní gélu a roztoku. Taktiež došlo k nabobtnaniu gelanu, ktorý pohltil do seba vodu z roztoku, ale nevieme presne povedať, či aj s časticami, keďže roztok kazeínových častíc nebol dostatočne zafarbený sudánovou červeňou. Z tohto jednoduchého experimentu nie je možné presne povedať, či difúzia častíc do jedného z gélov prebehla alebo nie. Pre ďalšie podrobnejšie meranie by bolo potrebné vykonať experimenty pomocou špecializovaných difúzných cel, čo by mohlo byť podnetom diplomovej práce.



Obr. 17: Gély s roztokom sudánovej červene a kazeínovými časticami vo vode o koncentracii 1 g/l, 5. deň pokusu

7 ZÁVER

Najprv sme sa zamerali na články s témou inkorporácie proteínov do hydrogélových štruktúr so zameraním na asociatívne peptidy. Na základe týchto článkov bol zvolený kazeinát sodný, ktorý sa vyskytuje bežne v mlieku a tvorí agregáty pri laboratórnej teplote vo vodnom roztoku. Daný proteín bol charakterizovaný a boli urobené experimenty, ktoré viedli k vytvoreniu hydrogélového systému, ktorý obsahoval daný proteín. Následne boli zhodnotené všetky výsledky práce a použiteľnosť daných systémov pre možné budúce využitie v medicínskych aplikáciách.

Zaoberali sme sa materiálmi a prípravami, ktoré boli použité v danej práci. Zistili sme, že zásobný roztok kazeínu je potrebné skladovať v chlade, pri laboratórnej teplote sa rýchlo kazí. Pomocou sudánovej červene, sme orientačne stanovili CMC. Pre presné stanovenie sme použili fluorescenčnú sodnu pyrén, ktorá reaguje na polaritu roztoku. Pre stanovenie CMC sa použili dve koncentračné rady. Prvá bola širšia a bola cez tri koncentračné rady, druhá bola užšia a poslúžila nám k presnejšiemu stanoveniu CMC, ktoré sme stanovili pri koncentrácii $0,21 \pm 0,01$ g/l kazeínu vo vode.

Ďalej boli kazeínové častice charakterizované pomocou DLS. Merala sa veľkosť častíc, zeta potenciál a aj vplyv teploty na tieto vlastnosti. Pri charakterizácii kazeínových častíc na základe veľkosti boli zmerané dve rôzne veľkosti pík. Prvá hodnota píku sa pohybovala do 200 nm a druhá hodnota píku bola v rozmedzí od 300 do 800 nm. Z tohto môžeme tvrdiť, že kazeínové častice nespádajú do nanočastíc.

Zeta potenciál so zvyšujúcou sa koncentráciou klesal do koncentrácie 0,7 g/l, potom nastal zlom a zeta potenciál začal znova stúpať. To znamenalo, že so zvyšujúcou koncentráciou sa stávajú micely kazeínu stabilnejšími. Ale stabilný systém sa považuje, ak hodnota zeta potenciálu prekročí hodnotu -30 mV a tento jav sme pozorovali iba u dvoch koncentráciách 0,7 g/l a 1 g/l. Tieto dve koncentrácie boli použité pre ďalšie meranie. Pre inkorporáciu do hydrogélou sme použili iba jednu.

Pri charakteristike kazeínových častíc na základe teploty sme zistili, že so zvyšujúcou teplotou sa veľkosť častíc nemení. Z chybových úsečiek pri veľkosti môžeme tvrdiť, že pri veľkosti prvého píku sa jedná o jednoduché kazeínové micely a pri druhom píku kazeínové micely agregovali, čo odpovedá väčším chybovým úsečkám. Zeta potenciál so zvyšujúcou teplotou rastie a nadobúda kladných hodnôt, ale tieto hodnoty sa vzdávajú od hranice stability častíc, keďže za hranicu stability považujeme -30 mV. Z toho vyplýva, že pre inkorporáciu bola zvolená teplota 20 °C, kde je systém kazeínových častíc najstabilnejší. Na základe tohto merania boli vybrané gély, ktoré agregujú už pri laboratórnej teplote na základe svojej koncentrácie. Aj keď hodnota zeta potenciálu pri teplote 20 °C je na hranici stability častíc, tak predpokladáme, že zeta potenciál je závislý na viskozite. To znamená, že so zvyšujúcou sa viskozitou budú častice stabilnejšie ako vo vodnom prostredí, keďže gél má oveľa väčšiu viskozitu.

Na základe teploty stability kazeínových častíc boli zvolené polysacharidové hydrogély guarová guma a gelan. Ich gély sa pripravili o koncentrácii 1,5 %. Do týchto gélov boli inkorporované kazeínové častice o koncentrácii 0,7 g/l. Tieto kazeínové gély boli porovnané s gélom gelanu a guarovej gummy. Pozorovali sa zmeny tečenia gélu v gravitačnom poli, zmeny zakalenia gélu, voľným okom neboli pozorované žiadne zmeny a pre lepšiu charakterizáciu by

bolo vhodné dané gély podrobiť reologickým meraniam. Bol pozorovaný difúzny dej počas piatich dní. Zásobný roztok kazeínu o koncentrácii 1 g/l, ktorý bol zafarbený hydrofóbnym farbivom sudánovej červene, bol opatrne napipetovaný na vrstvu gélu a bola pozorovaná difúzia. Rozdiel medzi prvým a piatym dňom bol v gelane, ktorý po čase nabobtnal. Inkorporácia zafarbených častíc do gélov nebola pozorovateľná, roztok bol málo zafarbený. Došlo k sedimentácii sudánovej červene na rozhraní gélu a roztoku. Pre lepšiu charakterizáciu a potvrdenie difúzie kazeínových častíc do gélov by bolo vhodné dané gély podrobiť reologickým meraniam, čo by mohlo byť predmetom diplomovej práce. Na základe difúznej reologickej charakterizácie by sa určila schopnosť difúzie liečiv v daných systémoch, či je daný systém pre distribúciu liečiv vhodný.

8 LITERATÚRA

- [1] E-ChemBook: Bílkoviny. E-ChemBook: Bílkoviny [online]. [cit. 2021-5-14]. Dostupné z: <http://e-chembook.eu/bilkoviny>
- [2] Biopedia: Bielkoviny. Biopedia: Bielkoviny [online]. [cit. 2021-5-15]. Dostupné z: <https://biopedia.sk/biomolekuly/bielkoviny>
- [3] TOTOSAUS, Alfonso, Jose G. MONTEJANO, Juan A. SALAZAR, Isabel GUERRERO, J.K THOMSEN, N.C NIELSEN, H.J JAKOBSEN a T.E PETERSEN. A review of physical and chemical protein-gel induction: A mini-review. *International Journal of Food Science and Technology*. 2002, 1999, 37(6), 589-601. ISSN 0950-5423. doi:10.1046/j.1365-2621.2002.00623.x
- [4] RASMUSSEN, L.K, L.B JOHNSEN, A TSIORA, E.S SØRENSEN, J.K THOMSEN, N.C NIELSEN, H.J JAKOBSEN a T.E PETERSEN. Disulphide-linked caseins and casein micelles: A mini-review. *International Dairy Journal*. 1999, 1999, 9(3-6), 215-218. ISSN 09586946. doi:10.1016/S0958-6946(99)00063-1
- [5] Healthline: Casein Allergy [online]. [cit. 2021-12-28]. Dostupné z: <https://www.healthline.com/health/allergies/casein>
- [6] Casein sodium salt from bovine milk: Description [online]. [cit. 2021-12-28]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sigma/c8654>
- [7] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav. Vyd. 6., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010. ISBN 978-80-7080-745-3.
- [8] ŠMIDRKAL, Jan. Tenzidy. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2020. ISBN 978-80-7592-056-0. Dostupné z: https://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/publikace?uid=uid_isbn-978-80-7592-056-0
- [9] SMYTH, Edward, Roger A CLEGG, Carl HOLT, M.A. AUGUSTIN a Antonio Fernandes de CARVALHO. A biological perspective on the structure and function of caseins and casein micelles: A mini-review. *International Journal of Dairy Technology*. 2004, 1999, 57(2-3), 121-126. ISSN 1364-727X. doi:10.1111/j.1471-0307.2004.00141.x
- [10] DAY, L., R.P.W. WILLIAMS, D. OTTER, M.A. AUGUSTIN a Antonio Fernandes de CARVALHO. Casein polymorphism heterogeneity influences casein micelle size in milk of individual cows: A mini-review. *Journal of Dairy Science*. 2015, 1999, 314(10), 2056-2062. ISSN 00220302. doi:10.3168/jds.2014-9285
- [11] NASCIMENTO, Luis Gustavo Lima, Federico CASANOVA, Naaman Francisco Nogueira SILVA, Alvaro Vianna Novaes de Carvalho TEIXEIRA a Antonio Fernandes de CARVALHO. Casein-based hydrogels: A mini-review. *Food*

Chemistry. 2020, 1999, 314(10), 2056-2062. ISSN 03088146.
doi:10.1016/j.foodchem.2019.126063

- [12] HERBERT, S., A. RIAUBLANC, B. BOUCHET, D.J. GALLANT a E. DUFOUR. Fluorescence Spectroscopy Investigation of Acid-or Rennet-Induced Coagulation of Milk: Wavelength selective fluorescence approach to monitor pyrene localizations in the membrane. *Journal of Dairy Science*. 1999, 1999, 82(10), 2056-2062. ISSN 00220302. doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75446-9
- [13] SKOOG, Douglas A., Donald M. WEST, F. James HOLLER a Stanley R. CROUCH. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019. ISBN 978-80-7592-043-0.
- [14] ZÁRUBA, Kamil. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-951-8 , s. 87-88. ISBN 978-80-7080-951-8, tiež dostupné z : https://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/publikace?uid=uid_isbn-978-80-7080-951-8
- [15] MAZOR, Shirley, Sharon VANOUNOU a Itzhak FISHOV. Pyrene as a membrane depth gauge: Wavelength selective fluorescence approach to monitor pyrene localizations in the membrane. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2012, 1999, 165(1), 125-131. ISSN 00093084. doi:10.1016/j.chemphyslip.2011.11.009
- [16] ZHAO, Yuhan, Pan XU, Kaicheng ZHANG, Holger SCHÖNHERR a Bo SONG. Strong emission of excimers realized by dense packing of pyrenes in tailored bola-amphiphile nano assemblies: Wavelength selective fluorescence approach to monitor pyrene localizations in the membrane. *Cell Reports Physical Science*. 2022, 1999, 3(2), 125-131. ISSN 26663864. doi:10.1016/j.xcrp.2021.100734
- [17] Dynamický rozptyl světla. *Technický týdeník* [online]. 2015 [cit. 2022-04-11]. Dostupné z: https://www.technickytydenik.cz/rubriky/archiv-medicinska-technika/dynamicky-rozptyl-svetla_30935.html
- [18] Zetasizer nano series: User manual [online]. In: . 2013, s. 216 [cit. 2022-04-11]. Dostupné z: <https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Malvern%20Zetasizer%20ZS%20DLS%20user%20manual.pdf>
- [19] Dynamic Light Scattering (DLS). Malvern Panalytical [online]. Veľká británia: Malvern Panalytical, 2022 [cit. 2022-04-11]. Dostupné z: <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/light-scattering/dynamic-light-scattering>
- [20] Dynamic Light Scattering (DLS): Introduction. LS Instrument [online]. LS Instrument, 2020 [cit. 2022-04-11]. Dostupné z: <https://lsinstruments.ch/en/theory/dynamic-light-scattering-dls/introduction>

- [21] Optické vlastnosti koloidních soustav: fyzikální princip metody měření velikosti částic a zeta potenciálu. Krystalografická společnost [online]. 2008 [cit. 2022-04-11]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/texty-ulohy-uvod.htm>
- [22] Zeta potential. Malvern Panalytical [online]. Velká británie: Malvern Panalytical, 2022 [cit. 2022-04-11]. Dostupné z: <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/measurement-type/zeta-potential>
- [23] SMÍLEK, Jiří a Michal KALINA. Zeta potenciál. Praktický úvod do nanotechnologií: (Laboratorní úlohy). Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, s. 25.
- [24] ÖZENIR, Zeynep, Celile DEMIRBILEK, Cemile Özdemir DINÇ, Isabel GUERRERO, J.K THOMSEN, N.C NIELSEN, H.J JAKOBSEN a T.E PETERSEN. Design, synthesis and characterization of a pH-sensitive DS/GM hydrogel: A mini-review. *Macromolecular Research*. 2015, 1999, 23(11), 1012-1017. ISSN 1598-5032. doi:10.1007/s13233-015-3144-8
- [25] NICOLAI, Taco, Christophe CHASSENIEUX, Cemile Özdemir DINÇ, Isabel GUERRERO, J.K THOMSEN, N.C NIELSEN, H.J JAKOBSEN a T.E PETERSEN. Heat-induced gelation of casein micelles: A mini-review. *Food Hydrocolloids*. 2021, 1999, 118(11), 1012-1017. ISSN 0268005X. doi:10.1016/j.foodhyd.2021.106755
- [26] GULDIKEN, Burcu, Jarvis STOBBS, Michael NICKERSON, Isabel GUERRERO, J.K THOMSEN, N.C NIELSEN, H.J JAKOBSEN a T.E PETERSEN. Heat induced gelation of pulse protein networks: A mini-review. *Food Chemistry*. 2021, 1999, 350(11), 1012-1017. ISSN 03088146. doi:10.1016/j.foodchem.2021.129158
- [27] LI, Fangfei, Xin DU, Bo WANG, Nan PAN, Xiufang XIA, Yihong BAO, H.J JAKOBSEN a T.E PETERSEN. Inhibiting effect of ice structuring protein on the decreased gelling properties of protein from quick-frozen pork patty subjected to frozen storage: A mini-review. *Food Chemistry*. 2021, 1999, 353(11), 1012-1017. ISSN 03088146. doi:10.1016/j.foodchem.2021.129104
- [28] HU, Chuhuan, Wei LU, Analucia MATA, Katsuyoshi NISHINARI, Yapeng FANG, Yihong BAO, H.J JAKOBSEN a T.E PETERSEN. Ions-induced gelation of alginate: Mechanisms and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021, 1999, 177(11), 578-588. ISSN 01418130. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.02.086
- [29] LIU, Kang, Ying-Ying CHEN, Xue-Qiang ZHA, Qiang-Ming LI, Li-Hua PAN, Jian-Ping LUO, H.J JAKOBSEN a T.E PETERSEN. Research progress on polysaccharide/protein hydrogels: Preparation method, functional property and application as delivery systems for bioactive ingredients. *Food Research International*. 2021, 1999, 147(11), 578-588. ISSN 09639969. doi:10.1016/j.foodres.2021.110542
- [30] LIU, Fuguo, Ruirui LI, Like MAO, Yanxiang GAO, Li-Hua PAN, Jian-Ping LUO, H.J JAKOBSEN a T.E PETERSEN. Ethanol-induced composite hydrogel based on

propylene glycol alginate and zein: Formation, characterization and application. *Food Chemistry*. 2018, 1999, 255(11), 390-398. ISSN 03088146. doi:10.1016/j.foodchem.2018.02.072

- [31] LIU, Qingguan, Yuequn JING, Cuiping HAN, Han ZHANG, Yumeng TIAN, Jian-Ping LUO, H.J JAKOBSEN a T.E PETERSEN. Encapsulation of curcumin in zein/caseinate/sodium alginate nanoparticles with improved physicochemical and controlled release properties: Formation, characterization and application. *Food Hydrocolloids*. 2019, 1999, 93(11), 432-442. ISSN 0268005X. doi:10.1016/j.foodhyd.2019.02.003
- [32] RANADHEERA, C.S., W.S. LIYANAARACHCHI, Jayani CHANDRAPALA, Muditha DISSANAYAKE, Todor VASILJEVIC, Jian-Ping LUO, H.J JAKOBSEN a T.E PETERSEN. Utilizing unique properties of caseins and the casein micelle for delivery of sensitive food ingredients and bioactives: Formation, characterization and application. *Food Hydrocolloids*. 2016, 1999, 57(11), 178-187. ISSN 09242244.: doi:10.1016/j.tifs.2016.10.005
- [33] KRUIF, C.G. (Kees) de, Skelte G. ANEMA, Changjun ZHU, Palatasa HAVEA, Christina COKER, Jian-Ping LUO, H.J JAKOBSEN a T.E PETERSEN. Water holding capacity and swelling of casein hydrogels: Formation, characterization and application. *Food Hydrocolloids*. 2015, 1999, 44(11), 372-379. ISSN 0268005X. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.10.007
- [34] YIN, Wenwen, Rongxin SU, Wei QI, Zhimin HE, Christina COKER, Jian-Ping LUO, H.J JAKOBSEN a T.E PETERSEN. A casein-polysaccharide hybrid hydrogel cross-linked by transglutaminase for drug delivery: Formation, characterization and application. *Journal of Materials Science*. 2012, 1999, 47(4), 2045-2055. ISSN 0022-2461. doi:10.1007/s10853-011-6005-7
- [35] KLÁN, Petr. *Organická fotochemie*. Brno: Masarykova univerzita, 2001. ISBN 80-210-2526-3.
- [36] Aguiar, J., Carpena, P., Molina-Bolívar, J.A., Ruiz, C.C. On the determination of the critical micelle concentration by the pyren 1:3 ratio method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2003, č. 258, s. 116–122

9 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

9.1 Zoznam skratiek

Skratka	Význam
CMC	kritická micelárna koncentrácia
CTAB	alkyltrimetylamonium bromid
DLS	dynamický rozptyl svetla
EmPI	emisný polaritný index
Ex/Mo	pomer intenzity pásu monoméru k pásu exciméru
excimér	excitovaný dimér
SDS	dodecylsulfát sodný

9.2 Zoznam symbolov

Symbol	Názov veličiny
A_1	horná limita Boltzmannovho modelu
A_2	spodná limita Boltzmannovho modelu
D	difúzny koeficient
k_B	Boltzmannova konštanta
R	hydrodynamický polomer častíc
S_0	základný stav molekuly
S_1	prvý excitovaný singletový stav molekuly
S_2	druhý excitovaný singletový stav molekuly
T	teplota
T_1	prvý excitovaný tripletový stav molekuly
T_2	druhý excitovaný tripletový stav molekuly
Δx	sklon Boltzmannovho modelu
x_0	inflexný bod Boltzmannovho modelu
λ	vlnová dĺžka
η	viskozita