



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

POLYSACHARID-PROTEINOVÉ GELY

POLYSACCHARIDE-PROTEIN GELS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

PAVLA HÁJOVSKÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. MARTIN CHYTIL, Ph.D.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0810/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Pavla Hájovská	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806R002)	
Vedoucí práce	Ing. Martin Chytil, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Polysacharid-proteinové gely

Zadání bakalářské práce:

Literární rešerše na téma gelace proteinů.
Charakterizovat proces gelace vybraného proteinu.
Otestovat tvorbu směsných polysacharido-proteinových gelů
Reologické testování připravených gelů

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Pavla Hájovská
Student(ka)

Ing. Martin Chytil, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá studiem gelace roztoků albuminu a směsných roztoků albuminu a vysokomolekulové kyseliny hyaluronové vlivem zahřívání. Studium bylo realizováno měřením reologických vlastností roztoků, vzniklých gelů i průběhu gelace.

U proteinových vzorků ve vodě byl testován vliv koncentrace proteinu, vliv iontové síly a pH roztoku. U směsných roztoků byl testován vliv koncentrace a složení polymerní složky.

Se zvyšující koncentrací polymerní složky dochází k posunu bodu gelace směrem k nižším hodnotám teplot, při rozdílu koncentrace 2 % (w/v) až o 5°C. Vzniklé gely vykazují vyšší hodnoty viskózního i elastického modulu. Obdobné chování bylo pozorováno i vlivem iontové síly, jako důsledek ovlivnění elektrostatických interakcí mezi řetězci polymeru a jako důsledek změny náboje polymeru vlivem snížení pH pod hodnotu pI proteinu.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with gelation of albumin solutions and mixed solutions of albumin and the high molecular weight hyaluronic acid due to heating. Study was carried out by measuring rheological properties of the solutions, formed gels and gelation process.

For the protein samples in water, the effect of concentration, ionic strength and pH were tested. For mixed solutions, the effect of concentration and a composition of the polymeric component were tested.

With increasing concentration of the polymeric component, the gel point is shifted towards lower temperature values, with the concentration difference of 2 % (w/v) up to 5°C. The resulting gels exhibit higher values of loss and storage moduli. Similar behavior was observed also in the samples influenced by the ionic strength as, a result of alternation of the electrostatic interactions between the charged groups of the polymer chains and as a result of change of this charge due to the pH reduced below the pI value of the protein.

KLÍČOVÁ SLOVA

Albumin, kyselina hyaluronová, polysacharid-proteinové interakce, gely, reologie.

KEY WORDS

Albumin, hyaluronic acid, polysaccharide-protein interactions, gels, rheology.

HÁJOVSKÁ, P. *Polysacharid-proteinové gely*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 52 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Martin Chytil, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Ráda bych zde poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Martinu Chytilovi, Ph.D. za motivaci, cenné rady a připomínky v průběhu práce a hlavně za jeho ochotu, čas a trpělivost při konzultacích.

OBSAH

OBSAH	5
1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1 Polysacharidy	8
2.1.1 Kyselina hyaluronová.....	8
2.1.1.1 Úvod.....	8
2.1.1.2 Struktura a vlastnosti.....	8
2.1.1.3 Využití.....	10
2.2 Proteiny	11
2.2.1 Albumin.....	11
2.2.1.1 Úvod.....	11
2.2.1.2 Struktura a vlastnosti.....	11
2.2.1.3 Využití.....	12
2.3 Polysacharid-proteinové interakce	13
2.3.1 Úvod	13
2.3.2 Polysacharid-proteinové komplexy	13
2.3.2.1 Vznik.....	13
2.3.2.2 Vlastnosti	14
2.3.2.3 Využití.....	14
2.4 Gely	15
2.4.1 Úvod	15
2.4.2 Dělení gelů	15
2.4.3 Vliv podmínek na průběh gelace.....	16
2.4.4 Vlastnosti.....	17
2.4.5 Využití	17
2.5 Reologie	18
2.5.1 Úvod a historie	18
2.5.2 Základní definice.....	18
2.5.3 Reologické dělení látek	20
2.5.3.1 Newtonské kapaliny	20
2.5.3.2 Neneutonské kapaliny	20
2.5.3.2.1 Pseudoplastické	20
2.5.3.2.2 Dilatantní	21
2.5.3.2.3 Plastické.....	21

2.5.3.2.4	Tixotropie a reopexie.....	22
2.5.4	Reologie viskoelastických látek a gelů	22
2.5.5	Měřicí systémy	24
2.5.5.1	System deska-deska	24
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1	Použité chemikálie	26
3.2	Použité metody	26
3.2.1	Příprava roztoků	26
3.2.2	Reologické měření.....	27
3.2.3	Termogravimetrie a elektronová mikroskopie	28
3.2.4	Zpracování a vyhodnocení	29
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	29
4.1	Optimalizace měření	29
4.2	Proteinové vzorky	30
4.2.1	Vliv koncentrace BSA.....	30
4.2.2	Vliv pH a iontové síly	34
4.3	Polysacharid-proteinové vzorky.....	38
4.3.1	Vliv koncentrace polymerní složky.....	38
4.3.2	Vliv složení polymerní složky.....	39
5	ZÁVĚR.....	42
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	44
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	46
8	PŘÍLOHY.....	47

1 ÚVOD

Albumin a kyselina hyaluronová jsou biodegradabilní, tělu vlastní látky, což je činí atraktivními materiály pro vývoj biokompatibilních materiálů. Albumin je nejvíce zastoupeným proteinem krevní plazmy, je nezbytný například pro metabolismus lipidů a transport iontů kovů v krvi. Ve své struktuře obsahuje vazebná místa, ke kterým se mohou vázat nejrůznější léčiva. Studie distribuce albuminu v nádorových tkáních demonstrovaly, že až čtvrtina aplikované dávky proteinu se akumuluje v nádoru, proto je albumin slibným nosičem léčiv na cílenou léčbu rakoviny.

Kyselina hyaluronová byla poprvé izolována z kravského očního sklivce v roce 1934 Karlem Meyerem a jeho asistentem Johnem Palmerem. Nachází se v těle každého obratlovce, zabezpečuje například údržbu viskoelasticity pojivových tkání nebo kontrolu jejich hydratace. Hyaluronan nachází mnoho využití v lékařství, jako složka léků v oční chirurgii, při léčbě artritidy nebo v estetické chirurgii. Nejnovější studie naznačují, že by mohl najít využití při cíleném transportu léčiv do nádorových tkání, které na povrchu obsahují receptor CD-44, který specificky váže hyaluronan ze svého okolí.

Spojení těchto vlastností s fyzikální strukturou gelu, která je dobře cíleně ovlivnitelná změnami složení nebo změnou pH, může vést ke vzniku biologicky aktivních materiálů s uplatněním v medicíně.

Cílem této práce je prozkoumat proces gelace roztoků albuminu a následně směsných roztoků albuminu s hyaluronanem. K optimalizaci měření byly použity vzorky proteinu ve vodě. Cílem měření pak bylo při shodných podmínkách sledovat změny chování vzorků v průběhu gelace a změny reologických vlastností vzniklých gelů v závislosti od koncentrace a složení směsných gelů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Polysacharidy

2.1.1 Kyselina hyaluronová

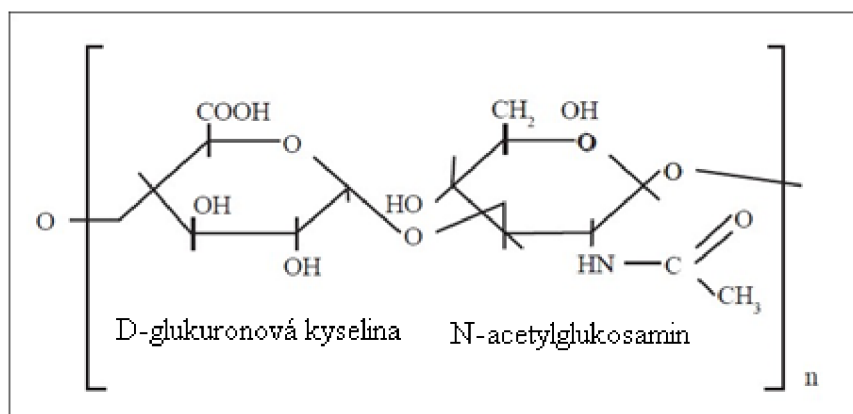
2.1.1.1 Úvod

V roce 1934, Karl Meyer a jeho kolega John Palmer poprvé izolovali doposud neznámou látku z kravského očního sklivce. Zjistili, že tato látka obsahovala dvě molekuly cukru, z kterých jedna byla uronová kyselina. Proto navrhli název hyaluronová kyselina, z řeckého „hyalos“, což znamená sklo + uronová kyselina. Poprvé byla izolována ve formě kyseliny, ale ve fyziologických podmínkách se chová jako sůl (hyaluronan sodný).

Hyaluronan (HA) je přirozeně syntetizován třídou integrálních proteinů (hyaluronan-syntetázy) a odbouráván skupinou enzymů (hyaluronidázy). Biologické funkce kyseliny hyaluronové zahrnují udržování viskoelasticity pojivových tkání, jako synoviální tekutiny kloubů a očního sklivce, kontrolu hydratace tkání a transportu vody, shromažďování proteoglykanů v extracelulární matrici, četné receptory-zprostředkované role v buněčném dělení, mitóze, migrace, vzniku tumorů, metastáz a zánětů. Jedinečné viskoelastické vlastnosti kyseliny hyaluronové spolu s biokompatibilitou a neimunogenicitou vedou k využití hned v několika medicínských aplikacích: nahrazení kloubové tekutiny při artritidě, využití v oční chirurgii, usnadnění hojení a regeneraci pooperačních ran. [1]

2.1.1.2 Struktura a vlastnosti

Hyaluronan je glykosaminoglykan složený z opakujících se disacharidových jednotek, kyseliny glukuronové a N-acetylglukosaminu, které jsou spojeny střídajícími se beta-1,4 a beta-1,3 glykozidickými vazbami (viz Obrázek 1). Oba cukry jsou odvozeny od glukózy, která v beta konfiguraci dovoluje všem větším skupinám (hydroxyly, karboxylová skupina a anomerní uhlík na přilehlém cukru) zaujímat stericky výhodnou ekvatoriální pozici, zatím co malé vodíkové atomy zaujímají stericky méně výhodnou axiální pozici. Tudíž je struktura disacharidu energeticky velmi stabilní. [1,2]



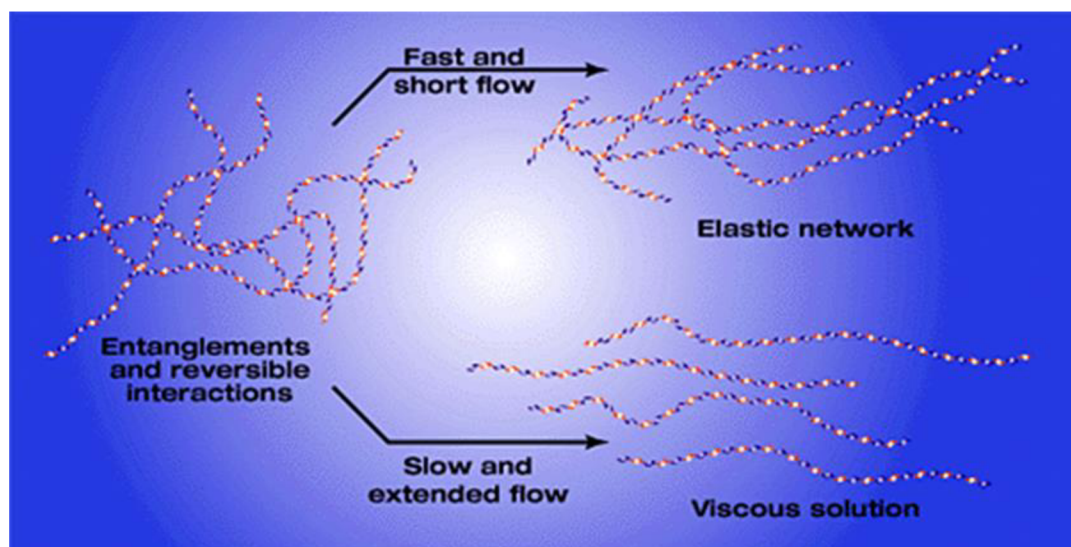
Obrázek 1 – struktura disacharidové jednotky kyseliny hyaluronové [23]

Řetězce molekuly HA obsahují dva druhy vazeb. První typ jsou vazby v molekule cukru, tvarově poměrně fixované. Mezi těmito opakujícími jednotkami se nachází glykosidické vazby pozůstávající z atomu kyslíku, který váže dohromady vždy dvě cukerné jednotky. Substituenty navázané na tyto vazby se mohou otáčet o 360° a vzhledem k velkému množství

těchto vazeb v molekule dostáváme enormně velký počet možností tvaru molekuly. První experimenty indikující, že se molekuly hyaluronanu přednostně formují jen do určitých tvarů byli založeny na rezistenci hyaluronanu (konkrétně glykolových skupin) vůči oxidaci jodistanem, i když stejné struktury v podobných polymerech byli jednoduše atakováni. Nukleární magnetická resonance potvrdila přítomnost struktury v roztoku, ve které je každá jednotka otočena o 180° vůči sousedícím jednotkám. Dvě otočení (celkově 360°) přivádí zpátky původní orientaci, co spolu se slabšími nevazebnými interakcemi (vodíkové můstky, hydrofobní interakce) dává molekule tvar šroubovice. [3] Axiální vodíkové atomy tvoří nepolární, relativně hydrofobní část, zatím co ekvatoriální vedlejší řetězce tvoří více polární hydrofilní část, tudíž je molekula amfifilní. [1]

Hyaluronan je ve vodě rozpustný při neutrálním pH ve formě své soli a v důsledku disociace většiny karboxylových skupin má molekula záporný náboj. [2] Z analýzy distribuce molekulové hmotnosti můžeme v kyselém prostředí (pH = 1,6) a bazickém (pH = 12,6) pozorovat lehkou degradaci. Reologické vlastnosti nejsou hodnotou pH roztoku významně ovlivňovány, kromě dvou případů: při pH = 2,5 je pozorována gelace roztoku, co se připisuje interakcím mezi řetězci v důsledku redukce náboje a případné protonace aminoskupin. Při pH větším jako 12 dochází v důsledku částečného rozpadu sítě vodíkových vazeb k snížení pevnosti kostry řetězce polymeru a tím k poklesu viskozity. [4]

Hyaluronan o vysoké molekulové hmotnosti v koncentrovaném roztoku (5 000 000 Da při koncentraci vyšší jako 0,1 mg/ml) může formovat propletené struktury připomínající molekulové sítě, k čemu může dojít, když hydrofobní část šroubovice reverzibilně interaguje s hydrofobní částí jiné molekuly HA nebo s hydrofobní částí té samé molekuly. Takto vytvořené sítě vykazují jiné vlastnosti než jak by vykazovaly izolované molekuly HA. Takto vzniklé struktury na krátkotrvající mechanický impuls odpovídají elastickou deformací. Na druhou stranu pomalý dlouhotrvající tok kapaliny přes síť může částečně separovat molekuly HA a tím povolit průtok kapaliny, co poukazuje na viskózní vlastnosti. (viz Obrázek 2). [2] Viskozita HA je tudíž závislá na působícím napětí, proto se roztoky HA o vysoké molekulové hmotnosti označují jako pseudoplastické (viz kapitola 2.5.3.2.1). [1]



Obrázek 2 – model demonstrující viskózní a elastické chování HA [2]

Jako velká molekula je HA náchylný k mechanické degradaci buď působením ultrazvuku, nebo termální degradaci při zvýšené teplotě. Fyziologicky může být HA degradován volnými radikály kyslíku nebo hyaluronidázami. Radikálová degradace způsobuje výrazný pokles viskozity a tím zhoršuje funkci synoviální tekutiny. Hyaluronidázy u savců jako konečný produkt degradace HA produkují zejména tetrasacharidy a hexasacharidy. [5]

2.1.1.3 Využití

Hyaluronan je atraktivním stavebním kamenem pro vývoj nových biokompatibilních a biodegradabilních polymerů, ale výroba těchto materiálů je současně vyloučena, kvůli ne příliš dobrým biomechanickým vlastnostem HA. Za účelem vytvoření mechanicky a chemicky dostatečně odolných materiálů bylo vyvinuto množství chemických modifikací nativního HA. Konečné deriváty mají fyzikálně-chemické vlastnosti, které se mohou výrazně lišit od samotného HA, ale udržují si biokompatibilitu a biodegradabilitu a v některých případech také farmakologické vlastnosti HA.

Za účelem získání materiálu kompatibilního s krví pro použití na povlaky lékařských zařízení byli vytvořeny postupy zahrnující sulfataci hydroxylových skupin v molekule HA. Povrchy potažené sulfonovaným HA vykazovaly výrazné snížení buněčného zachycování, znečištění a růstu bakterií. Tyto povlaky jsou také odolné vůči degradaci působením chondroitinázy a hyaluronidázy. [6]

Hylany (Biomatrix) jsou hydrogely nebo hydrosoly vytvořené zasíťováním HA obsahující residuální protein s formaldehydem v bazickém roztoku. Rozpustný hylan je vysokomolekulová forma HA (8 – 23 MDa), která vykazuje lepší reologické vlastnosti jako samotný HA. Využití hylanů je zkoumáno v řadě různých medicínských aplikací, jako léčba degenerativních kloubních onemocnění a revmatoidní artritidy, viskosuplementace při osteoartróze (Synvisc®), prevence proti pooperačním srůstům (Hylagel®) nebo jako nosiče léčiv začleněním terapeutické látky do hylanu. [6]

Pokrok ve výzkumu HA významně přispívá k řešení mnoha problémů v medicíně, avšak mnoho fyziologických funkcí HA zůstává neobjevených. Ve vědecké komunitě existují teorie, že se HA účastní patogeneze metastáz a revmatologických autoimunních onemocnění a výzkum bude směřovat také k terapeutickému využití HA v těchto onemocněních a také k vývoji biomateriálů na bázi hyaluronanu. [5]

2.2 Proteiny

2.2.1 Albumin

2.2.1.1 Úvod

Albumin je s molekulovou hmotností 66,5 kDa nejvíce zastoupeným proteinem v krevní plazmě. Jako většina proteinů krevní plazmy, stejně tak albumin je syntetizovaný v játrech, kde se vyrábí v množství přibližně 0,7 mg za hodinu (na jeden gram jater). Funkce albuminu a jeho vazební vlastnosti jsou hned několikanásobné. Působí jako solubilizační činidlo pro vyšší mastné kyseliny a je proto nezbytný pro metabolismus lipidů, váže bilirubin a velký počet terapeutických léčiv jako peniciliny, sulfonamidy, indolové sloučeniny nebo benzodiazepiny. Váže Cu^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} a Zn^{2+} a zabezpečuje transport těchto iontů kovů v krvi a je taky hlavním proteinem odpovědným za koloidní osmotický tlak krve. [7]

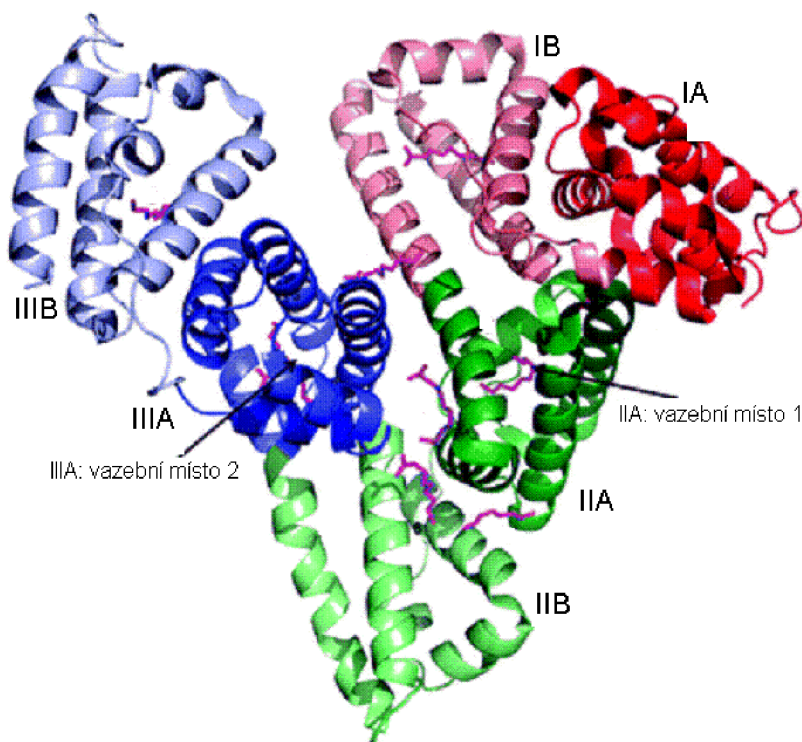
2.2.1.2 Struktura a vlastnosti

Albumin obsahuje 585 aminokyselinových jednotek a kvůli vysokému počtu kyselých a bazických jednotek je vysoce rozpustný ve vodném prostředí (>20% w/w). Všech 35 molekul cysteinu kromě jedné (Cys34) se podílejí na formaci 17 stabilizačních disulfidických můstků. [8]

Trojrozměrná struktura albuminu (viz Obrázek 3) byla krystalograficky zjištěná v několika laboratořích. Molekula obsahuje přibližně 67% α -helikálních struktur, ale již žádnou strukturu β -skládaného listu. Skládá se z tří homologických domén (I, II a III), které formují molekulu ve tvaru srdce. Každá doména se skládá ze dvou poddomén (A a B) poskládaných do vzoru šroubovice a spojených flexibilními částmi řetězce. [9]

Molekula albuminu obsahuje dvě stabilní vazebná místa s vysokou afinitou k většině léčiv v jejich terapeutických koncentracích. Vyšší koncentrace těchto ligandů může k navázání využívat také ostatní vazební části s nižší afinitou. Podle Sudlowovy nomenklatury se objemné heterocyklické anionty (bilirubin, antikoagulační látky jako warfarín, nesteroidová protizánětlivá léčiva jako fenylbutazon, salicylát) váží na Sudlowovo místo I (lokalizováno v poddoméně IIA) zatím co Sudlowovo místo II (lokalizováno v poddoméně IIIA) je upřednostňováno aromatickými karboxyláty (profeny – ibuprofen, fenoprofen, ketoprofen nebo benzodiazepiny jako diazepam). [10]

Albumin je protein stabilní v rozmezí pH 4-9, rozpustný v 40% ethanolu a může být zahříván na 60°C po dobu 10 hodin bez škodlivých účinků. [7] Molekuly albuminu netvoří gely, když jsou rozpuštěné ve vodě v neutrálním pH protože intermolekulární odpudivé síly (hlavně elektrostatické) dominují nad přitažlivými interakcemi (Van der Waalsove a hydrofobní). Roztok musí být zahřát na teplotu, při které dochází ke konformačním změnám globulárního proteinu, které vedou ke střetu reaktivních částí jako například částí hydrofobních nebo částí obsahujících thiolové skupiny. Vlivem vhodných podmínek dochází v roztoku ke zvýšení aktivity na povrchu proteinu, co vede k agregaci a formaci gelu. Povaha interakcí mezi molekulami podmiňuje strukturu sítě gelu, která následně ovlivňuje jeho fyzikálně-chemické vlastnosti. [12]



Obrázek 3 - struktura albuminu s barevně odlišenými doménami: červená = I, zelená=II, modrá=III, poddoménami odlišenými intenzitou barvy: tmavá=A, světlá=B a s vyznačenými vazebními místy [11]

2.2.1.3 Využití

Albumin je kvůli svým vlastnostem jako je biodegradabilita, netoxicitata nebo imunogenicitata ideálním kandidátem na transport léčiv. Už v polovině dvacátého století se objevily první studie, které demonstrovaly fakt, že nádory jsou schopné zachytávat proteiny z plazmy a využívat produkty jejich degradace na rychlé rozmnožování. Studie distribuce albuminu prokázaly, že 3 – 25 % aplikované dávky proteinu se akumuluje v nádoru, proto je albumin slibným přenašečem léčiv na cílenou léčbu rakoviny, jater nebo antirevmatických léčiv. [7]

Nanočástice na bázi albuminu představují atraktivní formu nosiče léčiv, jelikož do matrice částice může být začleněno značné množství léčiv a to v důsledku přítomnosti různých vazebných míst v molekule albuminu. Kromě toho albuminové nanočástice mohou být připraveny při nenáročných podmínkách koacervací, řízenou desolvatací nebo tvorbou emulze. V důsledku definované primární struktury albuminu, jeho nanočástice poskytují různé možnosti povrchové modifikace vzhledem k přítomnosti funkčních skupin (karboxylových a aminoskupin) na povrchu nanočástice. Konjugace ligandů na povrch albuminu je docílena kovalentním vázáním mezi ligandem a funkčními skupinami. V kombinaci albumin-ligand se protein chová jako biodegradabilní nosič léku a ligand je využíván na modifikaci farmakokinetických parametrů komplexu. [10]

Existuje několik zajímavých směrů pro lékařské použití albuminu, které nebyly zcela prozkoumány. Například jeho použití ve fotodynamické terapii¹, jako transportní protein pro kovové komplexy, léčiva s možným anti-HIV působením. Dále pak použití kationizovaného albuminu jako nosiče pro transport léčiv hematoencefalickou bariérou, jako genový vektor. Vývoj albuminových mikrobublin, které uvolňují léčiva po působení ultrazvuku, a nakonec také rozvoj podkožně a orálně aplikovatelných derivátů albuminu. [7]

¹ Fotodynamická terapie – forma terapie, která využívá netoxické světlocitlivé sloučeniny, které selektivně vystaví záření o určité vlnové délce, působením kterého tyto sloučeniny uvolní kyslík ve formě, která je schopná cíleně napadat a usmrctvat blízké buňky (využití při léčbě rakoviny) [24]

2.3 Polysacharid-proteinové interakce

2.3.1 Úvod

Proteiny a polysacharidy jsou přírodní polymery se širokým použitím jako funkční složky pro různé potravinové koloidy nebo emulze. V důsledku formace komplexů a vzniku nano- nebo mikrostruktur (agregace, gelace) se mění reologické vlastnosti těchto látek, což má za následek změnu struktury a stability produktu.

Proteiny, jako povrchově aktivní látky, mohou hrát důležitou úlohu při formaci a stabilizaci emulzí v přítomnosti polysacharidů, v důsledku působení elektrostatických nebo hydrofobních interakcí. Na druhou stranu polysacharidy jako hydrofilní látky zůstávají ve vodné fázi, tudíž ovlivňují reologii vodné fáze, podílejí se na zahušťování, ovlivňují proces gelace, působí jako stabilizační činidlo.

2.3.2 Polysacharid-proteinové komplexy

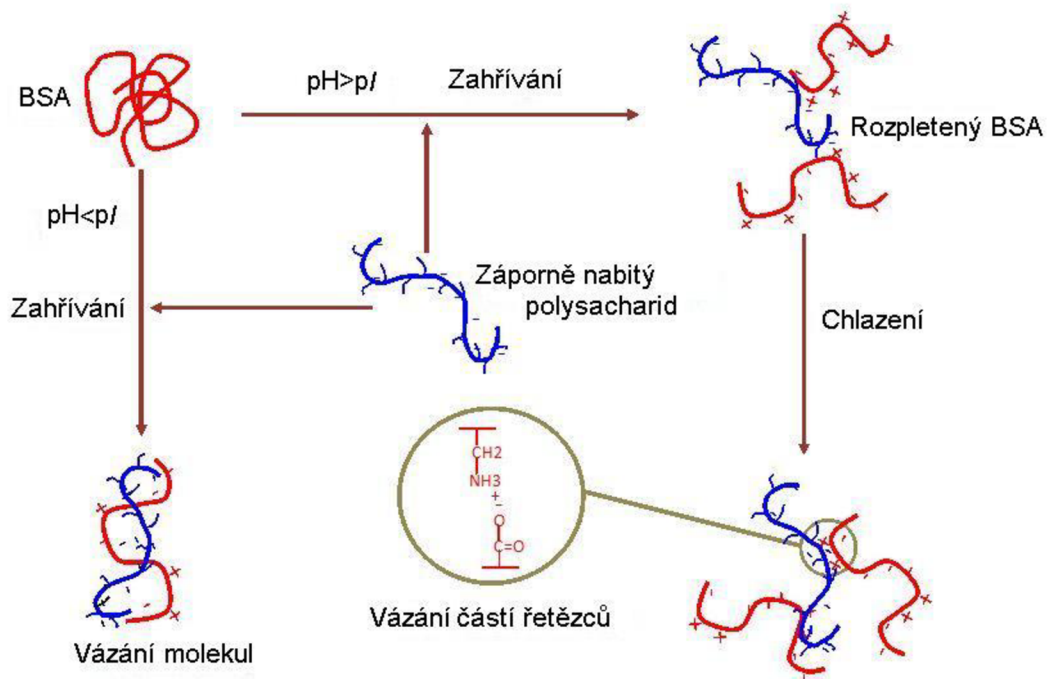
2.3.2.1 Vznik

Tvorba, deformace a rozpustnost polysacharid-proteinových komplexů závisí na různých faktorech, jako je povaha a náboj biopolymerů, pH, iontová síla, teplota a dokonce i přítomnost povrchově aktivních látek. Pokud je pH roztoku nižší než izoelektrický bod (pI) proteinu, bude mít protein kladný náboj a bude interagovat se záporně nabitým polysacharidem za vzniku elektrostaticky stabilního komplexu. Obdobně, když se pH roztoku zvýší nad hodnotu pI proteinu, náboj proteinu pak bude záporný a protein bude mít tendenci tvořit komplexy s kladně nabitým polysacharidem.

Obecně platí, že nejslabší komplex vzniká při pH roztoku blízkém pI proteinu, protože při těchto hodnotách pH se náboj proteinu blíží nulovým hodnotám. Avšak při vysokých hodnotách koncentrace se podobně nabitě biopolymery odpuzují, což dělá systém nestabilním a dochází k rozdělení na dvě odlišné fáze. Tento jev se nazývá termodynamická nekompatibilita. Vyskytuje se při pH vyšších než je pI a při vyšších hodnotách iontové síly. Tudíž je možné kontrolovat polysacharid-proteinové interakce změnami pH nebo iontové síly roztoku. Hnací silou těchto interakcí jsou právě elektrostatické síly, hydrofobní interakce, vznik vodíkových můstků, působení Van der Waalsových interakcí.

Ačkoli jsou elektrostatické interakce hlavní silou vedoucí ke vzniku polysacharid-proteinových agregátů, hydrofobní interakce a vodíkové můstky jsou sekundárně odpovědné za stabilitu těchto agregátů. Rozsah těchto interakcí je kromě jiného závislý hlavně na teplotě. Teplota je taky důležitým faktorem, co se týče konformace proteinu (zapletená, rozpletená struktura). V roce 2007, Pal (Mitra, Sinha & Pal, 2007) a kolektiv prezentovali, že lidský albumin (BSA) se zvyšující teplotou rozplétá svoji strukturu a dochází k reverzibilnímu přeskládání po ochlazení (do 60°C). Rozpletená struktura proteinu vystaví více reaktivních částí rozpouštědлу, tudíž poskytne polysacharidu více možností navázání (viz Obrázek 4).

Vázání záporně nabitého polysacharidu ($\text{pH} \approx \text{pK}_a$) na kladně nabitý protein ($\text{pH} < pI$) může vést ke vzniku rozpustných i nerozpustných agregátů. Počáteční vázání polysacharidu (aniontu) na protein (kation) způsobí neutralizaci náboje, co vede ke vzniku nerozpustného agregátu. Další vázání polysacharidu na tento neutrální agregát způsobí vznik záporného náboje a tím i vznik rozpustného komplexu. Znamé je také ale i vázání záporně nabitého polysacharidu k záporně nabitému proteinu, které je řízené interakcemi mezi zápornými částmi struktury polysacharidu a malými kladně nabitými částmi proteinu (viz Obrázek 4).



Obrázek 4 – schéma interakcí proteinu a polysacharidu při různých hodnotách pH [13]

2.3.2.2 Vlastnosti

Viskozita a průběh procesu gelace závisí zejména na molekulární charakteristice biopolymerů (molekulová hmotnost, tvar a flexibilita řetězců). Dalšími faktory jsou koncentrace, interakce mezi biopolymery a vodou, parametry roztoku jako pH, iontová síla, přítomnost dalších ligandů.

Reologické vlastnosti polysacharid-proteinových komplexů vedou k novému chování, odlišnému od chování jednotlivých biopolymerů. Asociace dvou biopolymerů může vést k zvýšení celkové viskozity systému jako důsledek vzniku větších struktur. Kromě vlastností samotných biopolymerů, mají na reologické vlastnosti systému vliv také vlastnosti roztoku a koncentrace biopolymerů.

Například koacerváty arabské gummy a proteinu měli v důsledku globulárního charakteru polysacharidu viskózní vlastnosti, zatím co komplexy stejného proteinu s lineárním polysacharidem pektinem měly charakter gelu. Také pH mělo nezanedbatelný vliv na viskozitu výše zmíněných koacervátů. Maximálních hodnot viskozity bylo dosaženo při $\text{pH} = 4$, kdy koncentrace arabské gummy a proteinu v koacervátu byla nejvyšší a také rozsah elektrostatických sil byl největší. To naznačuje, že právě elektrostatické interakce byly důvodem pro vysoce viskózní chování komplexu. Naproti tomu roztok o stejném složení, ale pH blízkém pI proteinu vykazoval víc elastické chování.

2.3.2.3 Využití

Cílená manipulace s polysacharid-proteinovými interakcemi může otevřít úplně nové možnosti v oblasti zdraví a výživy. Jelikož částice potravy přechází v procesu trávení oblastmi o různých pH, je navržen pH citlivého polysacharid-proteinového komplexu, výzvou pro odborníky. Avšak povaha a charakter polysacharid-proteinových interakcí nejsou stále uspokojivě vysvětleny, proto za účelem objevení jejich celkového potenciálu je do budoucna potřeba dalšího systematického výzkumu. [13]

2.4 Gely

2.4.1 Úvod

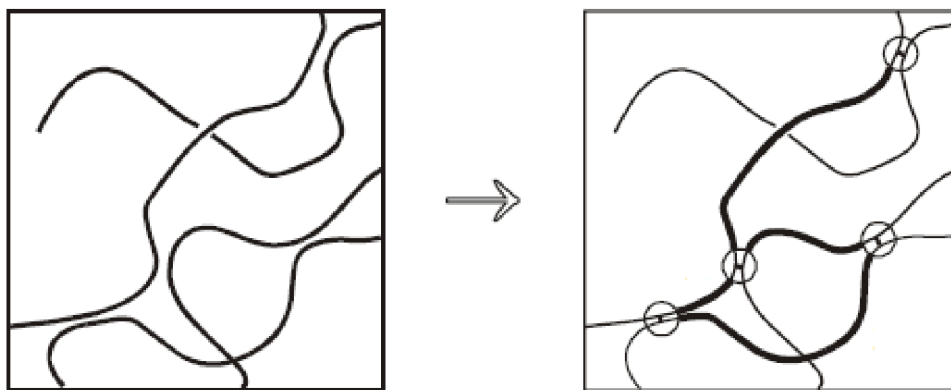
Některé koloidní disperze pevných látek v kapalinách, ať se jedná o roztoky makromolekul či lyofobní soly, mají schopnost vytvářet gely - gelatinizovat. Gely jsou systémy tvořené trojrozměrnou sítí, která vytváří souvislou strukturu prostupující celým disperzním prostředím. Spojité je tedy nejen disperzní prostředí, ale i disperzní podíl a disperzní částice nejsou schopné se nezávisle pohybovat disperzním prostředím. [14]

Hydrogely obsahují jako disperzní prostředí vodu, lyogely jinou kapalinu. Xerogel je název pro materiál, který vznikl z gelu odstraněním kapaliny například odpařováním. Xerogely nejsou tedy gely v tradičním chápání. Všechny gely obsahují polymer a kapalinu, které jsou více nebo méně kontinuálně rozdělovány. Polymery jsou zde většinou přítomny v malých koncentracích, což umožňuje pronikání jiných molekul do struktury, proto jsou taky preferovanou strukturou v přírodě (například kolagen a chrupavky). [15]

2.4.2 Dělení gelů

Gely mohou být rozděleny do dvou skupin podle způsobu vzniku: gely, které vznikají chemickou reakcí a gely, které vznikají agregací v důsledku vzniku vodíkových můstků nebo iontových interakcí a zaplétáním řetězců polymerů. Obecně, gely vzniklé formováním chemických vazeb nejsou schopné se znova rozpouštět, proto se nazývají také ireverzibilní. Na druhé straně fyzikální gely se tvoří reverzibilně, změnami teploty, složení rozpouštědla nebo pH a proto se nazývají reverzibilní gely. Mnohé z gelů polymerů vyskytující se v přírodě jsou právě ve formě fyzikálních gelů. [16]

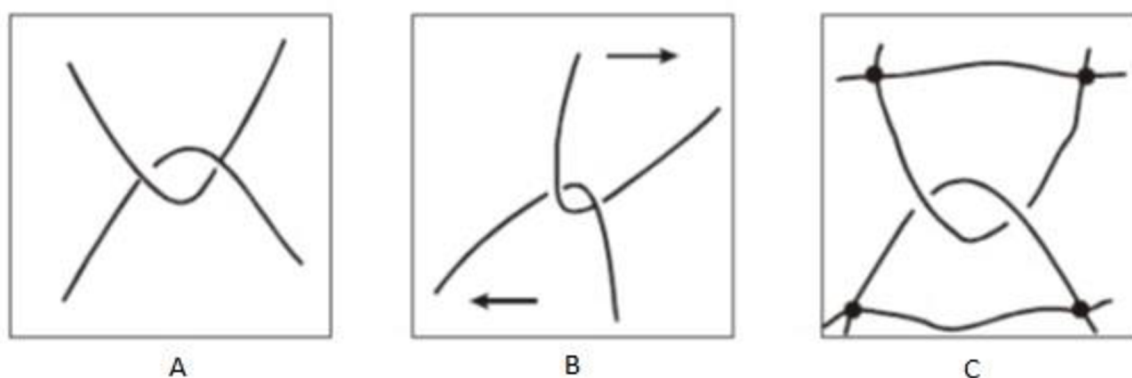
Kovalentně síťované gely (viz Obrázek 5) vznikají jako xerogely nebo lyogely podle toho, zda při jejich přípravě bylo přítomno kapalně disperzní prostředí. Kovalentní makromolekulární gel představuje nekonečnou trojrozměrnou síťovitou strukturu, tvořenou chemickými vazbami, která vzniká nelineární kondenzační nebo adiční polymerací monomerů, nebo z lineárních polymerů zesíťováním za přítomnosti vhodného síťovacího činidla. Struktura gelů s chemickými vazbami je velmi pevná. Xerogely, vznikající jejich vysušením v rozpouštědlech botnají, ale zpět na roztok by je bylo možno převést jedině odbouráním chemických vazeb, přičemž by se však nezrušily pouze ty vazby, které vznikly při gelaci. [14, 17]



Obrázek 5 – schéma vzniku struktury kovalentních gelů; v kroužku vyznačeny vzniklé vazby (spoje) [17]

Fyzikálně síťované gely vznikají z roztoků polymerů tak, že se úseky makromolekulárních řetězců sdružují působením fyzikálních sil do útvarů, které plní funkci uzlů. Takto vzniklé spoje jsou zpravidla v jednom nebo i ve třech rozměrech podstatně větší než kovalentní uzly; proto je lépe volit přesnější název uzlové nebo spojné oblasti. Makromolekuly se vzhledem ke své délce mohou začlenit do více než jedné uzlové oblasti, takže po délce řetězce se pak zapojené části střídají s volnými úseky, které si zachovávají ohebnost i tepelný pohyb.

Jako fyzikální uzly mohou někdy působit také zapleteniny (viz Obrázek 6). Ty nejsou projevem přitažlivých fyzikálních sil, ale důsledkem toho, že si řetězce vlivem svých poloh navzájem brání v nezávislém pohybu. [17]



Obrázek 6 - zapletenina (a) v klidu, (b) při deformaci smykem, (c) v permanentní síti [17]

2.4.3 Vliv podmínek na průběh gelace

Ke tvorbě gelu dochází, pouze když jsou splněny tři strukturální požadavky: i) řetězce polymerů musí být dostatečně dlouhé pro vznik stabilních spojů a komplexů; ii) molekula musí obsahovat také nepravidelné části aby se zabránilo případné krystalizaci, a iii) tyto části musí být flexibilní, aby mohlo dojít k botnání. [15]

Zvýšení teploty, pokud při něm v soustavě nedochází k nevratným chemickým změnám, obvykle brání vzniku gelu, neboť roste intenzita tepelného pohybu jednotlivých segmentů a v důsledku toho klesá počet i doba trvání vazeb mezi makromolekulami. Naopak snížení teploty zpravidla podporuje tvorbu gelu. [14]

I když ve většině případů vede snížení teploty k formaci gelu, neplatí to vždy. Některé polymery formují gely v důsledku zahřívání na určitou teplotu, jako například metylcelulóza nebo hydroxymethylcelulóza se rozpouštějí v studené vodě pouze za vzniku viskózního roztoku. Zvyšováním teploty dochází k zvyšování viskozity nebo gelaci těchto roztoků. Tento fenomén se nazývá termogelace. [18]

Gelaci roztoků vysokomolekulárních látek vždy napomáhá vzrůst koncentrace, neboť tím roste četnost srážek makromolekul nebo jejich částí a zvětšuje se počet vazeb, které se vytvářejí v jednotce objemu gelu. Na gelační schopnost vodných roztoků amfoterních vysokomolekulárních elektrolytů (např. bílkovin) má výrazný vliv i pH roztoku. Gelace probíhá nejlépe při hodnotě pH odpovídající izoelektrickému bodu. [14]

2.4.4 Vlastnosti

Životností (dobou trvání) a pevností uzlů se jednotlivé gely navzájem velice různí. Na těchto vlastnostech uzlů pak závisí chování gelů, především reologické. Silné gely mají pevné spoje, a proto jsou elastické podobně jako kovalentní gely. Uzly slabých gelů jsou málo trvanlivé, a proto se tyto sítě chovají elasticky jen při malých mechanických napětích. Účinkem větších napětí uzly zanikají, síť se rozpadá a tak mizí i elastická retrakční síla. Takové chování nazýváme plastické (viz kapitola 2.5.3.2.3). Některé gely s fyzikálními spoji mají zřetelné tixotropní vlastnosti (viz kapitola 2.5.3.2.4).

Je-li součin molární hmotnosti a koncentrace větší než určitá kritická hodnota, prostoupí síť zapletenin celý roztok. Systém se však chová elasticky jen krátkodobě; v delším čase se řetězce rozpletou, takže se mohou od sebe vzdálit. Elastická retrakční síla tak postupně vymizí, čili nastává relaxace. Při dynamické rovnováze, kdy neustále vznikají nové a zanikají staré zapleteniny, se roztok i malým napětím může deformovat trvale, i když pomalu, v závislosti na charakteristické době relaxace. Takové systémy nazýváme pseudogely. Přidáme-li přebytek disperzního prostředí, přejdou (na rozdíl od gelů) v konečné fázi na zředěný roztok. [17]

V momentě gelace jsou v systému nejpočetnější monomery, tudíž kondenzační reakce pokračují připojováním oligomerů k síti a tím se zvyšuje elastický modul pružnosti. Řídká síť gelu obsahuje mnoho flexibilních větví, mezi kterými může docházet ke vzniku nových vazeb. Formace nových vazeb mezi řetězci polymeru způsobuje kontrakci sítě a vytlačování kapaliny v procesu zvaném synereze. [19]

2.4.5 Využití

Gely a gelace mají velký význam v lékařství (např. srážlivost krve je způsobena zvýšením její viskozity v důsledku gelace), v biologii (organizmy živočichů a rostlin jsou tvořeny především gely) i v mnoha průmyslových odvětvích. Gelace je proces důležitý například při výrobě vláken, aplikaci lepidel, zpracování kůží, ve farmaceutickém průmyslu (příprava gelových kapslí), ve sklářském a keramickém průmyslu při přípravě specializovaných materiálů (vysoce kvalitních skel a keramiky pro kloubní náhrady). Rovněž řada pochodů v potravinářství je založena na tvorbě gelů. [14]

Anorganické gely jsou široce studovány pro použití v keramice, včetně porézních membrán, senzorů, tepelných izolací, hustých ochranných fólií a pasivních optických filmů, aktivních optických filmů. Anorganické gely jsou obvykle vyrobeny z molekulárních prekurzorů, jako například alkoxidů kovů nebo vodních roztoků solí. [19]

Několik složek tvořících gely je selektivně používáno pro generování potravinových gelů přijatelných vlastností. Želatinující látky, které jsou používány v těchto produktech, jsou často hydrokoloidy odvozené z přírodních zdrojů z oblasti proteinů a polysacharidů, které jsou v současné době používány v různých průmyslových odvětvích na vykonávání řady funkcí jako zahušťování a želatinaci vodních disperzí, stabilizaci pěny, emulzí a disperzí, inhibují nebo snižují synerzi. [10]

2.5 Reologie

2.5.1 Úvod a historie

Reologie je vědní obor zabývající se deformacemi a tokem látek. Je to odvětví fyziky a fyzikální chemie jelikož většina proměnných, které zde vystupují, pochází z mechaniky: síly, rychlosti, odchylky. Termín reologie pochází z řeckého „rein“ (téct) a „logos“ (věda), tudíž doslovný překlad tohoto spojení je „věda o toku“. Avšak reologické experimenty neposkytují pouze informace o toku kapalin, ale také informace o deformacích pevných látek.

Reologie nebyla klasifikována jako samostatná věda až do začátku dvacátého století, avšak vědci se už dlouho před tím zajímali o chování kapalin a pevných látek. Již Galileo Galilei formuloval hypotézy o elasticitě těles pozorováním ohýbajícího dřeva, také hypotézy o pohybu těles, snažil se definovat rychlost a zrychlení. Po něm dále teorie rozvíjeli Pascal, Hooke, Newton, po nich Young, Navier, Stokes a mnozí další. Termín reologie se do povědomí dostává na začátku 20. století, kdy ho v roce 1901 poprvé použil Forel. Později v roce 1929 Bingham založil první „Reologické společenství“ (Society of rheology, SOR) a v roce 1931 Marcus Reiner prezentoval první ucelenou klasifikaci možných reologických vlastností, podle které rozdělil látky do šesti skupin. [21]

2.5.2 Základní definice

Reologie popisuje deformace látek (těles) vlivem působení napětí. Látky v tomto kontextu mohou být pevné, kapalné i plynné. Ideální pevné látky se deformují elasticky. Energie potřebná na deformaci je úplně obnovena po skončení působení napětí. Ideální tekutiny se deformují nevratně – tečou. Energie potřebná k deformaci je rozptýlená v tekutině v podobě tepla. [22]

K popisu základních reologických parametrů se používá model s posuvnými deskami (viz Obrázek 7 A), kdy spodní deska je statická (rychlost $v = 0$). Horní deska o ploše A je uvedena do pohybu o rychlosti v , smykovou silou F . Mezi deskami je vzdálenost h , kde je v prostoru nadávkován měřený vzorek. Při měření se předpokládá adheze vzorku k oběma deskám a také laminární tok (může být ilustrován ve formě toku rovnoběžných vrstev – viz Obrázek 7 B). [21]

Smykové napětí τ je definováno jako síla působící na jednotku plochy potřebná na udržení konstantní rychlosti pohybu:

$$\tau = \frac{F}{A} [kg \cdot m^{-1} \cdot s^{-2}]. \quad (1)$$

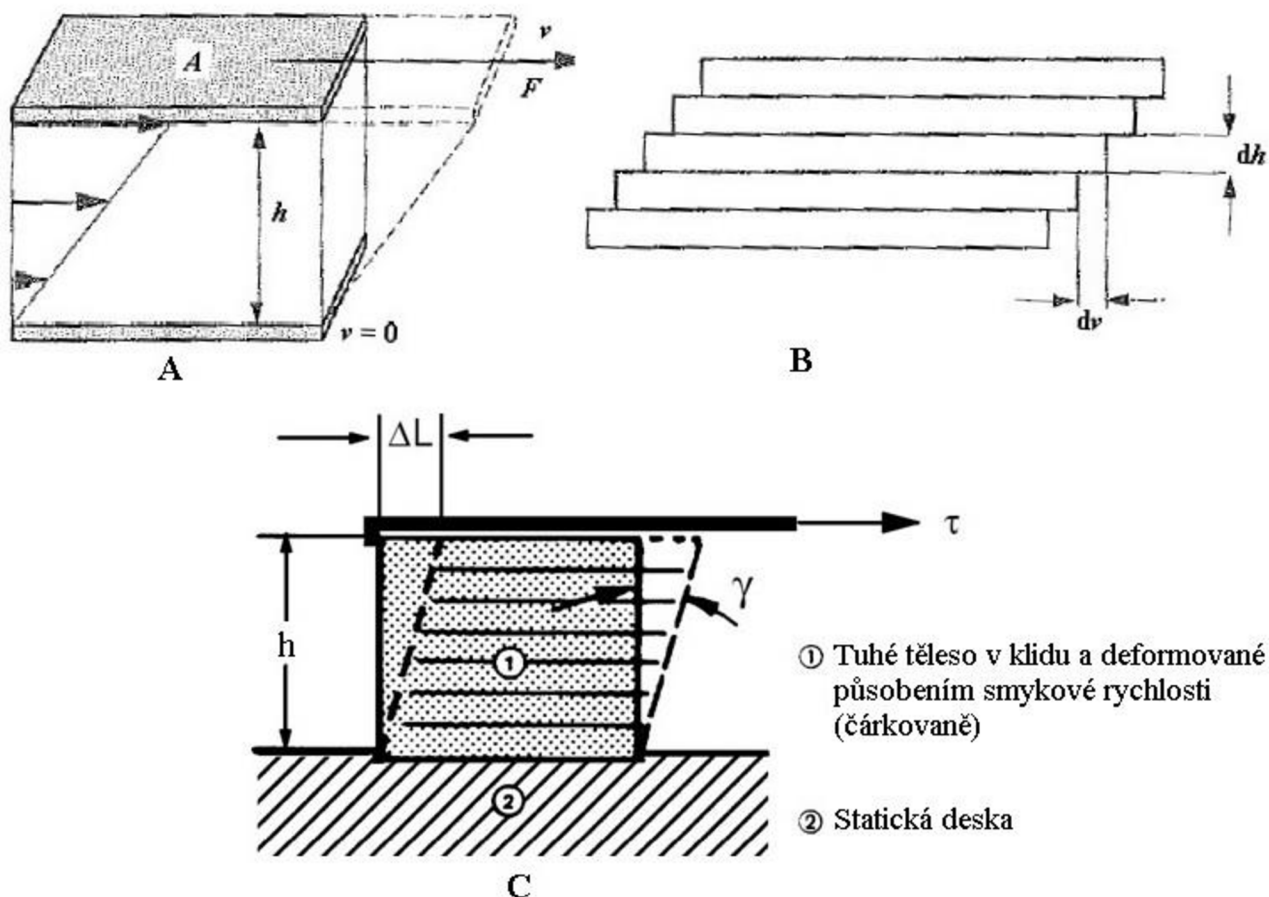
Odpovědí pevných látek na smykové napětí je deformace (viz Obrázek 7 C). Je to poměr změny délky nebo objemu k původní délce nebo objemu:

$$\gamma = \frac{dL}{h}, \quad (2)$$

kde dL = deformace v důsledku působení smykové rychlosti a h = výška tělesa.

Smyková rychlost $\dot{\gamma}$ je gradient rychlosti mezi deskami, kde dochází k laminárnímu toku kapaliny. Je definována jako poměr rychlosti v a vzdálenosti desek h : [21,22]

$$\dot{\gamma} = \frac{v}{h} [s^{-1}]. \quad (3)$$



Obrázek 7 - schéma modelu s posuvnými deskami (A), laminárního toku (B) [21] a deformace tuhého tělesa (C) [22]

Pro ideálně viskózní kapaliny měřeny za konstantní teploty je poměr smykového napětí a smykové rychlosti materiálovou konstantou, definicí dynamické viskozity η , a tento vztah se nazývá Newtonův zákon:

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} [Pa \cdot s]. \quad (4)$$

Obdobně pro ideálně elastická tělesa je definován vztah mezi smykovým napětím a jím způsobenou deformací tzv. Hookovým zákonem, který definuje modul pružnosti v tahu G_E vztahem:

$$G_E = \frac{\tau}{\gamma} [Pa]. \quad (5)$$

Mnoho reologických testování prokázalo, že při hodnotách $\eta \geq 10 \text{ kPa} \cdot \text{s}$, již nemožno zanedbávat elasticitu vzorku. Tyto vzorky tudíž nemohou být považovány za čistě viskózní, ale viskoelastické.

Hodnoty modulu pružnosti v tahu (G_E) pro ideálně elastická tělesa, stejně tak hodnoty viskozity (η) pro ideálně viskózní kapaliny, jsou nezávislé na stupni a délce působení smykového zatížení. [21]

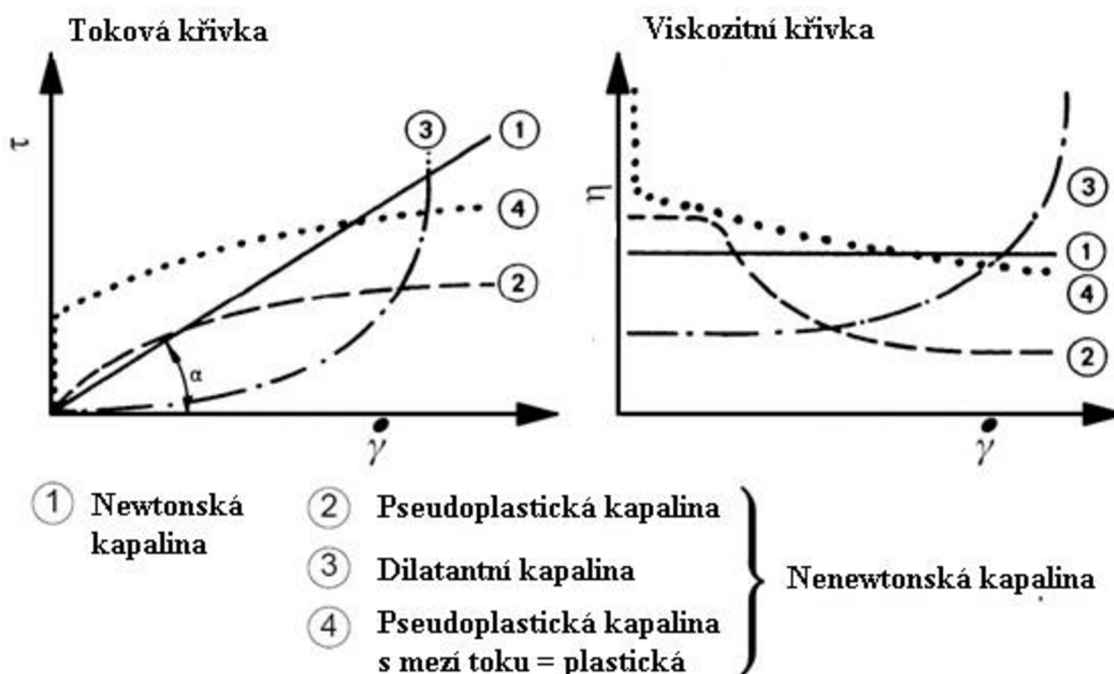
2.5.3 Reologické dělení látek

2.5.3.1 Newtonské kapaliny

Newton předpokládal, že grafickým vyjádřením jeho rovnice pro ideální kapaliny bude přímka s počátkem na začátku tokové křivky a bude stoupat pod úhlem α (viz Obrázek 8 – křivky 1). Kterýkoliv bod na této přímce pak definuje dvojici hodnot smykového napětí τ a smykové rychlosti $\dot{\gamma}$. Poměr těchto dvou hodnot pak udává hodnotu viskozity η . Tato hodnota může být také definována jako tangens úhlu α . Protože toková křivka newtonské kapaliny je přímka, poměr všech dvojic τ a $\dot{\gamma}$ ležících na této přímce je konstantní, což znamená, že η není ovlivněna hodnotou smykové rychlosti. Všechny kapaliny, pro které je toto tvrzení pravdivé se nazývají newtonské kapaliny.

2.5.3.2 Neneutronské kapaliny

Všechny ostatní kapaliny, které nevykazují tyto ideální tokové vlastnosti, se nazývají neneutronské kapaliny.



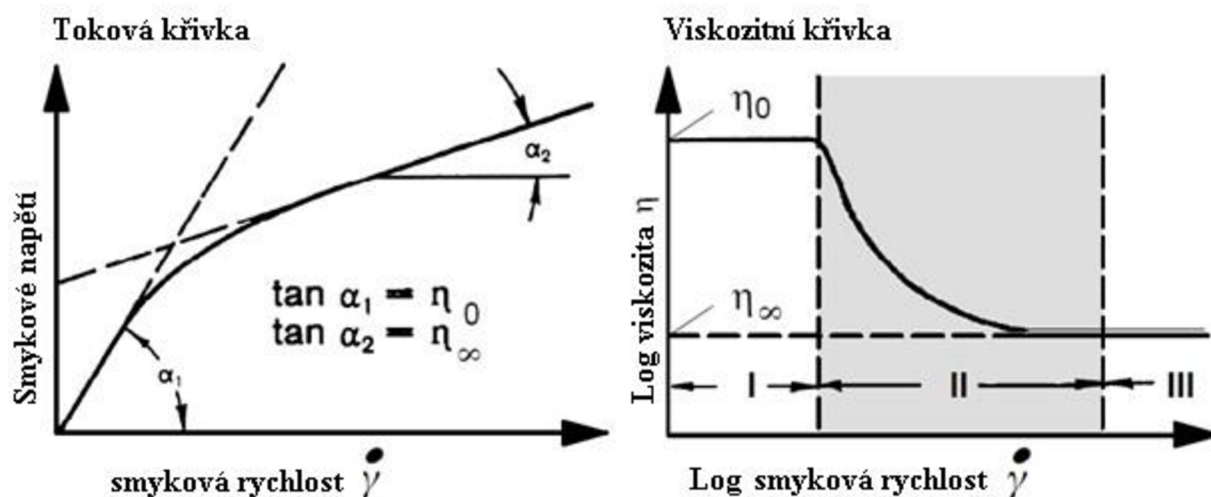
Obrázek 8 – tokové a viskozitní křivky pro různé druhy kapalin [29]

2.5.3.2.1 Pseudoplastické kapaliny

Mnoho kapalných produktů, které se navenek jeví homogenní, jsou ve skutečnosti složené z několika složek: částic nepravidelného tvaru, kapiček jedné kapaliny dispergovaných v jiné kapalině nebo dlouhých řetězců molekul (roztoky polymerů). V klidu si tyto kapaliny budou udržovat nepravidelnou vnitřní strukturu a v souvislosti s tím budou charakterizovány vnitřním odporem vůči toku, tj. vysokou viskozitou. Působením vyšší smykové rychlosti se částice orientují ve směru toku tak, aby byl jejich průchod vedle sebe jednodušší a kapalina tekla rychleji. Tekutiny, kterých viskozita klesá se zvyšující smykovou rychlostí, se nazývají pseudoplastické (viz Obrázek 8 – křivky 2).

Pro většinu kapalných látek je tento efekt reverzibilní, po nějakém čase kapaliny znova nabývají jejich původní vysoké hodnoty viskozity, když dochází ke snižování smykové rychlosti nebo jejímu úplnému vymizení. Řetězce molekul se znovu formují do původního náhodného stavu bez jakékoliv orientace, deformované kapky znova nabývají tvar koule a agregáty se rozpadají v důsledku Brownova pohybu.

Při nízkých a vysokých hodnotách smykové rychlosti, nazývané první a druhá newtonská oblast, je i viskozita nenewtonských kapalin nezávislá na smykové rychlosti (viz Obrázek 9). Při působení velmi malých smykových rychlostí se pseudoplastické kapaliny chovají podobně jako newtonské kapaliny. Mají definovanou hodnotu viskozity η_0 nezávislou na smykové rychlosti, která se často nazývá jako limitní (dolní) viskozita. Zvyšováním smykové rychlosti dochází k výraznému poklesu viskozity v důsledku snížení vlivu Brownova pohybu a orientování částic v směru toku. Po dosažení vysokých hodnot $\dot{\gamma}$, se viskozita asymptoticky blíží ke konečné konstantní hodnotě limitní (horní) viskozity η_∞ . Další zvyšování smykové rychlosti již nebude vést k poklesu viskozity, jelikož bylo dosaženo optimální orientace částic.



Obrázek 9 - toková a viskozitní křivka pseudoplastické kapaliny s vyznačenými oblastmi poklesu viskozity (II) a s newtonskými oblastmi konstantní viskozity (I a III) [22]

2.5.3.2.2 Dilatantní kapaliny

Dalším typem látek, které jsou charakterizovány závislostí viskozity na smykové rychlosti, jsou látky (nebo kapaliny) dilatantní (viz Obrázek 8 křivky 3). Tyto látky se zvyšující smykovou rychlostí zvyšují také svou viskozitu.

Toto chování je u kapalin spíše výjimečné, vyskytuje se u některých vysoce koncentrovaných suspenzí. Jelikož je toto chování často komplikací ve výrobních procesech, často se tyto procesy upravují tak, aby byl dilatantní tok kapalin redukován.

2.5.3.2.3 Plastické kapaliny

Pojem plastické kapaliny (viz Obrázek 8 – křivky 4) popisuje takové kapaliny, které mají mez toku (τ_0). Můžou být řazeny mezi pevné látky a současně mezi kapaliny. Jsou to většinou disperze, ve kterých v klidu dochází k vzniku inter/intramolekulárních interakcí. Tyto síly omezují poziční změny částic a mají za následek strukturní změny, kterých výsledkem je pevný charakter látky a teoreticky nekonečně velká viskozita. Pokud jsou vnější působící síly menší jako vnitřní síly, které tvoří síť, deformace látky bude elastická. Když vnější síly budou

silnější jako vnitřní, překonají hraniční smykové napětí, které se nazývá mez toku. Po překročení této hranice se látka jeví jako pevná a změní se na tekoucí kapalinu. Příkladem takovýchto kapalin jsou například olejové barvy nebo zubní pasta.

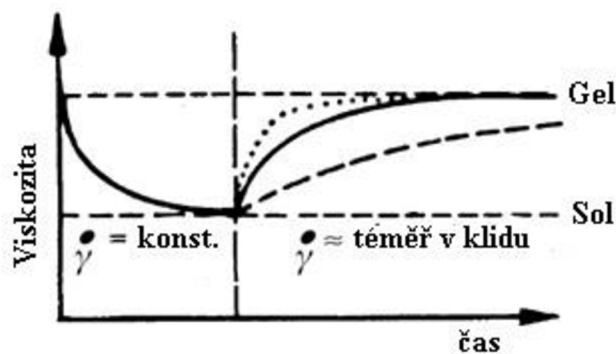
2.5.3.2.4 Tixotropie a reopexie

Tixotropie a reopexie jsou termíny popisující opačné chování toku kapalin, které kromě působící smykové rychlosti závisí také na čase.

Tixotropie je charakteristická pro mnohé disperze, které nevykazují pseudoplastické vlastnosti pouze v důsledku orientace částic, ale také v důsledku časově závislých molekulových interakcí. Většinou jsou to slabé vodíkové můstky nebo elektrostatické síly, které vedou ke vzniku trojrozměrné struktury, která se často nazývá gel. Tyto vazby jsou snadno narušitelné, dochází k rozpadu sítě a poklesu viskozity, až kým nedosáhne nejnižších možných hodnot. Tato hodnota viskozity pak popisuje stav solu disperze.

Tixotropické kapaliny jsou charakteristické svým potenciálem na obnovení své gelové struktury, když je kapalina ponechána v klidu po dostatečně dlouhý časový interval. Změna gelu na sol a solu zpátky na gel je tak reprodukovatelná.

Křivka závislosti viskozity na čase (viz Obrázek 10) pak má dvě charakteristické oblasti: gel se rychle mění na sol působením konstantní smykové rychlosti. V druhé části se pak sol mění zpátky na gel. Rychlost této transformace je pak závislá na povaze tixotropní kapaliny nebo teplotě a může trvat od několika minut do několika dní až měsíců.



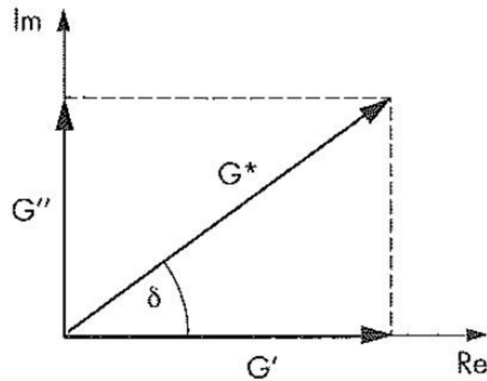
Obrázek 10 - graf závislosti viskozity na čase pro proměny tixotropní kapaliny [22]

Reopektické kapaliny jsou naopak charakteristické zvyšováním viskozity působením smykové rychlosti a následným nabýváním původně (nízké) viskozity, když jsou ponechány v klidu. Zatím co tixotropie je běžným chováním u mnohých kapalin, reopexie je velice vzácná. Tixotropie látek je hodně využívána v průmyslu například při barvách, složkách potravin, kosmetice nebo farmaceutických produktech. [22]

2.5.4 Reologie viskoelastických látek a gelů

Viskoelastické látky vždy vykazují viskózní i elastické vlastnosti současně. Viskózní část se chová podle Newtonova zákona, elastická část podle Hookova zákona. Viskoelastické materiály vykazují více či méně časově opožděnou reakci na aplikované napětí nebo deformaci, stejně tak jako na jejich odstranění. Na zkoumání vlastností různých viskoelastických látek od kapalin s nízkou viskozitou, roztoků polymerů, disperzí, gelů až po téměř tuhá tělesa, se používají zejména oscilační testy.

Měření viskoelastických látek provádíme řízeným nastavením smykové deformace jako funkce sinus: $\gamma(t) = \gamma_A \cdot \sin \omega t$ (nebo pak analogicky nastavením smykového napětí). Jako výsledek pak získáme křivku smykového napětí (nebo deformace) jako fázově posunutou funkci sinus: $\tau(t) = \tau_A \cdot \sin(\omega t + \delta)$, s úhlem fázového posunu δ [°], který se taky nazývá ztrátový úhel a jeho hodnoty se pohybují mezi 0° a 90°.



Obrázek 11 – vektorový diagram [21]

Tzv. elastický modul G' [Pa] je mírou deformační energie uložené ve vzorku v průběhu namáhání. Po odstranění zatížení, je tato energie k dispozici, teď v úloze hnací síly prosecu reformace, který částečně nebo úplně vykompenzuje způsobenou deformaci. Ztrátový (viskózní) modul G'' [Pa] je mírou deformační energie spotřebované vzorkem v průběhu namáhání. Materiály vykazující toto chování se deformují nevratně a po ukončení namáhání se jejich tvar definitivně změní v důsledků působících sil.

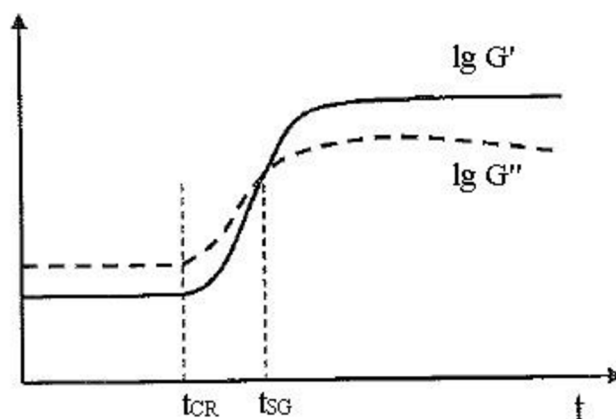
Jak již bylo zmíněno, viskoelastické materiály vykazují oba typy chování současně. To může být znázorněno vektorovým diagramem (viz Obrázek 11) s G' na ose x , a G'' na ose y , kde délka vektorů odpovídá velikosti jednotlivých modulů. Komplexní modul G^* je pak určen vektorovým součtem jednotlivých modulů, tudíž je celkovou charakteristikou chování viskoelastické látky (obsahuje viskózní i elastickou složku). Aplikací Pythagorovy věty ho pak můžeme definovat jako:

$$|G^*| = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2} \quad (6)$$

a ztrátový úhel je pak definován jako:

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'}. \quad (7)$$

Tento typ testů je využíván například na měření časových závislostí chování vzorků vykazujících vznik síťování v průběhu měření (viz Obrázek 12). Testy jsou prováděny za konstantního napětí z lineární oblasti viskoelasticity vzorku.



Obrázek 12 – časová závislost G' a G'' v průběhu síťování vzorku [21]

Časový bod t_{CR} je tzv. počátek gelace. V tomto bodě hodnoty G' a G'' začínají stoupat až dokud se asymptoticky nepřiblíží konstantní hodnotě. Před samotnou formací gelu platí $G' < G''$, vzorek vykazuje spíše viskózní chování, nachází se tedy ve stádiu solu. Od okamžiku, kdy jsou hodnoty elastického modulu vyšší jako hodnoty viskózního modulu se vzorek nachází v stádiu gelu. Časový bod t_{SG} , ležící na průsečíku křivek G' a G'' , indikuje bod přechodu mezi solem a gelem, také nazývaný bodem gelace. V tomto bode platí, že $G' = G''$, tudíž $\tan\delta = 1$.

Shrnutí jednotlivých charakteristik modulů a ztrátového úhlu pro jednotlivá stádia vzorku viz Tabulka 1 [21].

Tabulka 1 - přehled charakteristických hodnot pro jednotlivé typy materiálů [21]

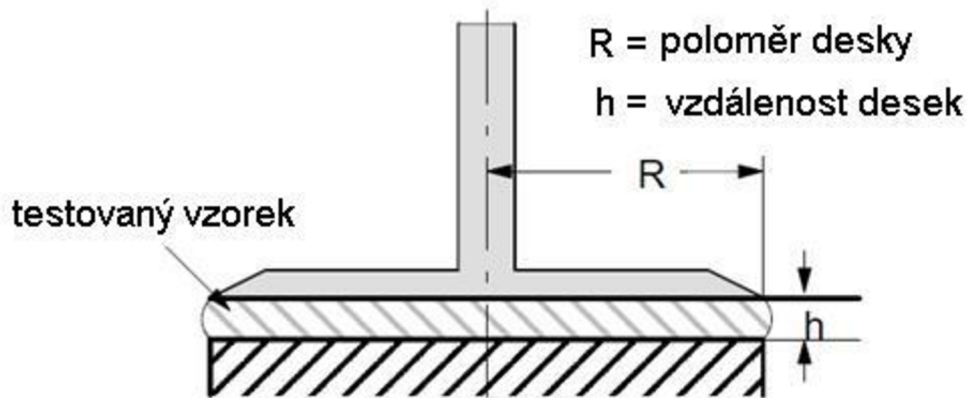
ideálně viskózní tok	viskoelastické kapaliny	bod gelace	viskoelastický gel nebo pevná látka	ideálně elastická deformace
$\delta = 90^\circ$	$90^\circ > \delta > 45^\circ$	$\delta = 45^\circ$	$45^\circ > \delta > 0^\circ$	$\delta = 0^\circ$
$\tan\delta \rightarrow \infty$	$\tan\delta > 1$	$\tan\delta = 1$	$\tan\delta < 1$	$\tan\delta \rightarrow 0$
$G' \rightarrow 0$	$G' < G''$	$G' = G''$	$G' > G''$	$G'' \rightarrow \infty$

2.5.5 Měřicí systémy

Měřicí technologie používána na získání reologických dat se nazývá reometrie. Důraz se zde klade na měřicí systémy, přístroje, testy a jejich analýzu. Obojí, jak kapaliny, tak i pevné látky, mohou být měřeny použitím rotačních a oscilačních reometrů. [21]

2.5.5.1 Systém deska-deska

Měřicí systém deska-deska (parallel plates, PP) se skládá ze dvou desek s rovným povrchem (viz Obrázek 13). Horní deska fungující jako rotor je obvykle vrchní částí měřicí geometrie a spodní deska je stacionární, připevněna k reometru. Rozměr vrchní desky je definován jejím průměrem R . Pro vzdálenost h mezi deskami platí $h \ll R$. [22]



Obrázek 13 – schéma měřicí geometrie deska-deska [22]

Výhodami tyto měřicí geometrie jsou možnost měření vzorků obsahujících relativně velké částice nebo prostorové struktury (gely, pasty, elastomery), při nastavení větší mezery vyžadují viskózní a viskoelastické vzorky méně času na přípravu samotného měření (dochází k nižšímu napětí při nadávkování vzorku tudíž čas relaxace může být kratší), čištění je velmi rychlé a jednoduché.

Nevýhodou je nekonstantní napětí, jelikož smyková rychlost se mění od nuly ve středu, po vyšší hodnoty při okraji, avšak tento fakt může být zanedbán u oscilačních testů při nízkých hodnotách deformace, která leží v lineární oblasti viskozity vzorku. [21]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

- Albumin, čistota $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
- Kyselina hyaluronová, $1500\text{-}1750\text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$, Tech. grade, ContiproPharma, a.s.
- Chlorid sodný p.a., Lach-Ner, s.r.o.
- Kyselina citronová monohydrát p.a., Penta
- Hydrogenfosforečnan disodný dihydrát p.a., Penta
- Mili-Q voda (MQ)

3.2 Použité metody

3.2.1 Příprava roztoků

Při přípravě roztoků albuminu (BSA) ve vodě se postupovalo následovným způsobem. Předem vypočítaná navážka albuminu se navázila na analytických vahách s přesností na čtyři desetinná místa. Roztok byl následně připraven střídavým přidáváním vody a pevného BSA za současného míchání na magnetické míchačce. Navážka BSA byla rozpuštěna v menším množství vody než byl požadovaný objem. Váženka byla znova zvážena na analytických vahách a z rozdílu hmotností byla určena skutečná hmotnost rozpuštěného BSA. Podle této hmotnosti byl propočítán potřebný objem vody s přesností na mikrolitry a požadovaný objem byl přidán k roztoku. Nádoba s roztokem byla uzavřena a obalena vrstvou parafilmu aby se zabránilo přístupu vzdušní vlhkosti k roztoku. Vzorek se ponechal po dobu alespoň 24 hodin míchat na magnetické míchačce při laboratorní teplotě, aby bylo dosaženo homogenního roztoku. Pro dosažení maximální homogenity, byl roztok po míchání ještě umístěn na dobu alespoň 30 minut do ultrazvuku. Stejným způsobem pak byly připraveny i vzorky albuminu v roztoku NaCl o koncentraci $0,15\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a v pufru o stejné koncentraci NaCl a pH 4.

Roztok NaCl byl připraven navážením přesného množství NaCl na analytických vahách a jeho kvantitativním převedením do odměrné baňky a doplněním vody na příslušný objem. Pufr o pH 4 byl připraven následujícím způsobem. Byly připravené zásobní roztoky kyseliny citronové a hydrogenfosforečnanu disodného s koncentrací NaCl $0,15\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a to výše popsaným postupem přípravy roztoku NaCl. Pufr byl pak připraven postupným přidáváním roztoku hydrogenfosforečnanu o koncentraci 0,1 M do 15 ml roztoku kyseliny citronové o koncentraci 0,05 M. Po každém přidání se roztok nechal míchat na magnetické míchačce aspoň minutu a pak bylo na pH-metru změřeno jeho pH. Po dosažení požadované hodnoty pH se ponechal roztok míchat po dobu 10 minut a bylo pH změřeno pro kontrolu ještě jednou. Roztok byl pak uzavřen, obalen vrstvou parafilmu a uchováván v chladu až do jeho dalšího použití.

Směsné roztoky albuminu a hyaluronanu (HA) byli připravené ve dvou krocích. V prvním kroku byl připraven roztok BSA o požadované koncentraci ve větším množství. Postup přípravy byl shodný s výše popsaným postupem. Ve druhém kroku bylo v roztoku BSA rozpuštěno potřebné množství hyaluronanu. Jelikož je HA hygroskopický, tomuto kroku předcházelo sušení práškového HA při teplotě 90°C po dobu 20 minut. Na analytických vahách pak bylo naváženo potřebné množství vysušeného HA a rozpuštěno již popsaným způsobem, jako BSA ve vodě. Roztok se znova nechal míchat na magnetické míchačce po dobu 24 hodin, aby bylo dosaženo homogenity vzorku. Na rozdíl od roztoků albuminu ve vodě již nebyl umístěn do ultrazvuku, vzhledem k náchylnosti HA degradovat v důsledku působení ultrazvuku.

Všechny připravované roztoky polymerů měli koncentraci v jednotkách $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Roztoky albuminu ve vodě byli připravené s koncentrací 12, 13 a 15 % (w/v) (koncentrace dále uváděna jen v %). Roztok o koncentraci 15 % byl připraven nejen ve vodě, ale i v roztoku NaCl o koncentraci 0,15 M a v pufru o pH 4 a stejné koncentraci NaCl. Směsné roztoky proteinu a polysacharidu se připravily ve dvou typech koncentračních řad. První koncentrační řada zahrnuje roztoky se stejným poměrem HA a BSA (1:12), ale s různou celkovou koncentrací polymeru v roztoku (12, 13 a 15 %). Druhá koncentrační řada zahrnuje roztoky o stejné celkové koncentraci polymeru (13 %), ale o různém poměru obsaženého množství HA a BSA (1:6, 1:12, 1:18, 1:24) pro lepší sledování vlivu polysacharidu na gelaci.

Samotné gely byly připraveny odebráním vzorku a jeho umístěním ve vodní lázni do sušárny vyhřáté na 80°C , kde byly ponechány po dobu alespoň 24 hodin. Po vytažení ze sušárny se před jakýmkoli dalším měřením nechaly volně vytemperovat na laboratorní teplotu.

3.2.2 Reologická měření

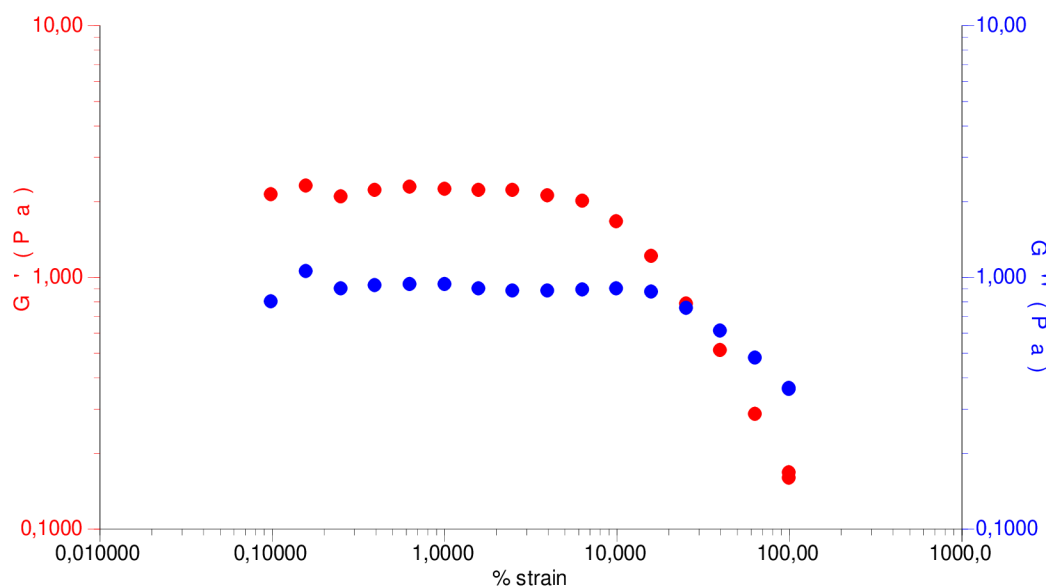
Všechna měření byla realizována použitím reometru AR-G2, od firmy TA Instruments. Na následné vyhodnocení získaných dat byl použit program TA Data Analysis od stejné firmy. Na všechna měření byla použita měřicí geometrie deska-deska (viz kapitola 2.5.5.1) o průměru 25 mm.

Před samotným měřením byla provedena kalibrace měřicí geometrie. Měření průběhu gelace probíhá při nekonstantní teplotě, tudíž dochází k zahřívání (chlazení) částí reometru, co má za následek změnu měřicí mezery (pro materiál použité geometrie je výrobcem specifikována roztažnost $0,5 \mu\text{m} / ^{\circ}\text{C}$). Při automatickém nastavení mezery dochází ke kompenzaci těchto změn tak, že při expanzi nebo kontrakci materiálu se automaticky upraví pozice geometrie, aby byla zachována konstantní měřicí mezera. Pro dosažení ještě přesnějších hodnot je možno provést kalibraci měřicího systému pro konkrétní rozsah teplot. Kalibrace teplotní roztažnosti byla provedena jednou pro použitou geometrii ještě před prvním měřením a to pro rozsah teplot $20 - 90^{\circ}\text{C}$. Po každém zapnutí přístroj pak bylo provedeno rotační mapování a nastavení nulové polohy geometrie.

Měřený vzorek byl nadávkován do středu statické desky. Méně viskózní vzorky BSA ve vodě byli dávkované pipetou, více viskózní vzorky směsných roztoků a gely byly dávkovány lžičkou. Rotující deska pak byla snižena do měřicí polohy $250 \mu\text{m}$ (pro měření více elastických gelů albuminu v roztoku NaCl a v pufru byla mezera $1000 \mu\text{m}$). Přebytek vzorku byl očištěn a kolem měřeného vzorku byla nanášena vrstva silikonového oleje, aby se zabránilo vysychání vzorku v průběhu měření. Každé měření pak začínalo relaxací a temperací vzorku při teplotě 25°C po dobu 5 minut. Všechna dále zmiňovaná měření byla prováděná alespoň dvakrát, vždy s nově nadávkovaným vzorkem, aby se zajistila reprodukovatelnost měření. Mezi každým měřením byly obě části měřicí geometrie očištěné destilovanou vodou a ethanolem.

U všech roztoků byl jako první test změřen tzv. *strain sweep test*, co je závislost modulů na deformaci (od 0,01 do 100%), při konstantní oscilační frekvenci 1 Hz (viz Obrázek 14). Měření bylo prováděno při konstantní teplotě 25°C . Z lineární oblasti závislosti pak byla vybrána hodnota deformace, která byla použita pro další měření. V našem případě byla tato hodnota stanovena na 2% u všech vzorků kromě 12% roztoku albuminu, u kterého činila tato hodnota 4%. Stejný test byl pak pro porovnání změřen aj u vzniklých gelů.

Dalším testem měřeným u všech roztoků i u všech gelů je tzv. *frequency sweep step*, což je měření závislosti modulů na úhlové rychlosti oscilace, při konstantní hodnotě deformace určené ze *strain sweep* testu. Test byl prováděn pro všechny vzorky pro rozsah hodnot úhlové rychlosti od 0,1 do 100 $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$ při konstantní teplotě 25°C.



Obrázek 14 - strain sweep test pro 13% roztok BSA ve vodě

Měření průběhu gelace bylo prováděno prostřednictvím několika testů. Rotační i oscilační testy teplotních závislostí probíhali podobným způsobem. Oscilační rampy, jak teplotní, tak i časové, probíhaly při konstantní frekvenci 1 Hz a při konstantní hodnotě deformace 2% (nebo 4% pro 12% roztok BSA ve vodě), rotační testy probíhaly při konstantní hodnotě smykové rychlosti 0,5 s^{-1} . Oba typy testů byli rozdělené do tří částí: v první části docházelo k ohřevu vzorku z 25°C na 80°C rychlostí 2°C za minutu. Pak následovala izoterma při teplotě 80°C po dobu 20 minut (pro 12% vzorek 40 minut). Poslední částí měření bylo zpětné snižování teploty z 80°C na 25°C a to rychlostí 1°C za minutu, aby se zabránilo nedostatečnému chlazení vzorku v celém jeho objemu.

Oscilační časové závislosti probíhaly při stejných konstantních hodnotách frekvence a deformace jako teplotní závislosti. Vzorek byl po nadávkování 5 minut temperován při 25°C jako u všech ostatních testů, pak byl skokově zahřát na teplotu 50°C, ponechán temperovat po dobu dvou minut a měřen při konstantní teplotě po dobu 45 minut. Stejným způsobem byl poté zahřát na 70 a 80°C. Použité teploty pro měření časových závislostí byly výsledkem měření teplotních závislostí, kde byly tyto hodnoty zvoleny na základě pozorovaných změn chování roztoku při dané teplotě. Cílem bylo zjištění reálné reakce vzorku na danou teplotu, jelikož teplotní závislosti poskytují pouze pohled na průběh gelace v důsledku změny teploty, nikoliv reálnou odezvu na změnu teploty v čase.

3.2.3 Termogravimetrie a elektronová mikroskopie

Jako doplňující měření byla provedena termogravimetrická analýza gelů vzniklých z 15% vzorku BSA ve vodě, v roztoku NaCl o koncentraci 0,15 M a ze směsného vzorku HA+BSA v poměru 1:12. Cílem bylo zjištění obsahu vody ve vzorku a hodnoty teploty, při které dochází k nejvýraznějšímu úbytku vody ze vzorku. Pro všechny vzorky byla tato teplota určena jako 65°C. Při této teplotě byly následně vzorky sušeny v sušárně po dobu jedné hodiny, aby bylo možné jejich mikroskopické pozorování.

3.2.4 Zpracování a vyhodnocení

Všechna naměřená data byla graficky zpracována v programu TA Data Analysis od firmy TA Instruments. U rotačních testů byla vynesena do grafu závislost viskozity na teplotě. U oscilačních testů byla do grafu vynesena závislost modulů, případně ztrátového úhlu, na příslušné veličině. Sledovaná pak byla změna těchto vlastností v průběhu gelace, vyhodnocení polohy bodu gelace ($\delta = 45^\circ$), porovnání vlastností roztoků a gelů. Porovnáním jednotlivých vzorků pak byl sledován vliv koncentrace, iontové síly, pH a složení polymerní složky.

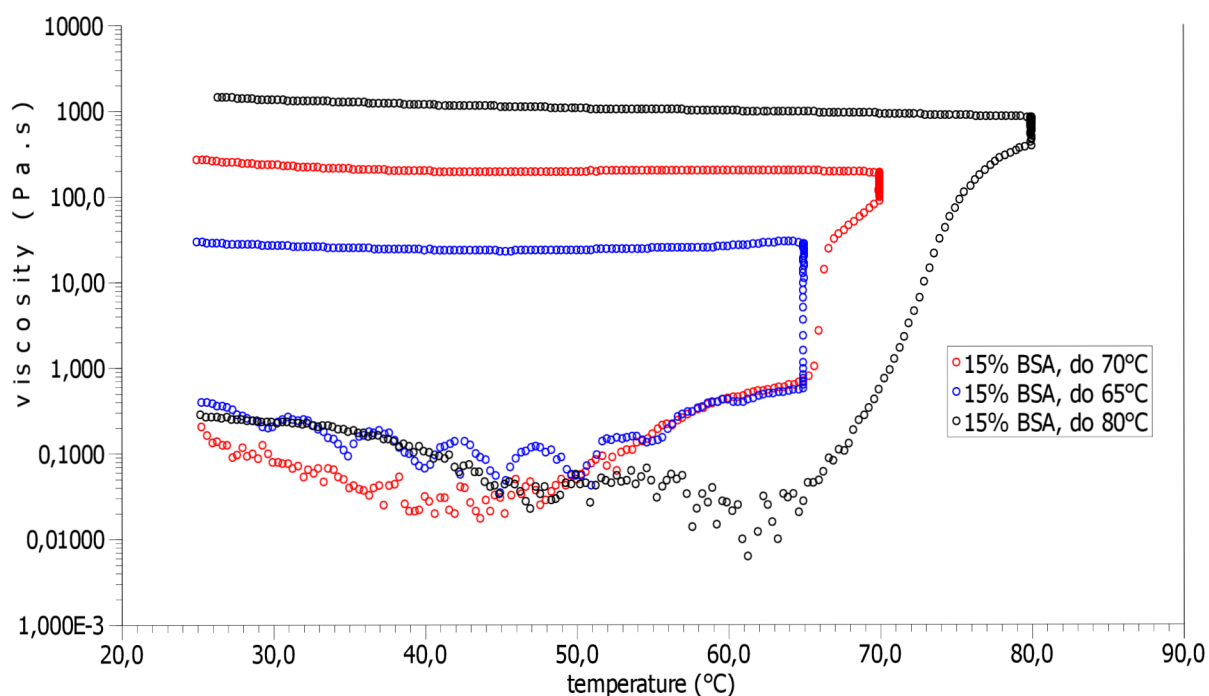
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

V následujících grafech jsou zpracovány výsledky získané výše popsanými reologickými měřeními roztoků, gelů a průběhů gelace pro vzorky BSA ve vodě, v roztoku NaCl, v pufru a směsných roztoků BSA a HA.

4.1 Optimalizace měření

Několik prvních měření mělo za cíl optimalizaci podmínek vhodných ke sledování procesu gelace tak, aby všechna další měření mohla probíhat za stejných vnějších podmínek a tudíž mohl být sledován vliv vnitřních změn roztoku (vliv koncentrace, vliv iontové síly, změna struktury vlivem teploty).

První série měření probíhala na vzorcích 12% a 15% BSA ve vodě za účelem zjištění horní hranice teploty také, aby docházelo ke gelaci vzorků, bod gelace byl co nejlépe stanovitelný i u nižších hodnot koncentrace, ale aby nedocházelo k odpařování rozpouštědla a tím k zakonzentrování vzorku. U obou vzorků byly změřeny teplotní rampy od 25°C do 65, 70 a 80°C. Roztok BSA o koncentraci 15% tvořil gely již od 65°C, ale se zvyšující teplotou se stejně zvyšovaly i hodnoty viskozity vznikajícího gelu (viz Obrázek 15) a při teplotě 80°C byl gel o dva řády viskóznější jako při 65°C. Roztok o koncentraci 12% tvořil gely pouze při teplotě 80°C, tudíž byla tato teplota dále používána pro všechna měření a přípravu gelů.



Obrázek 15 – graf závislosti smykové viskozity na teplotě pro 15% roztok BSA

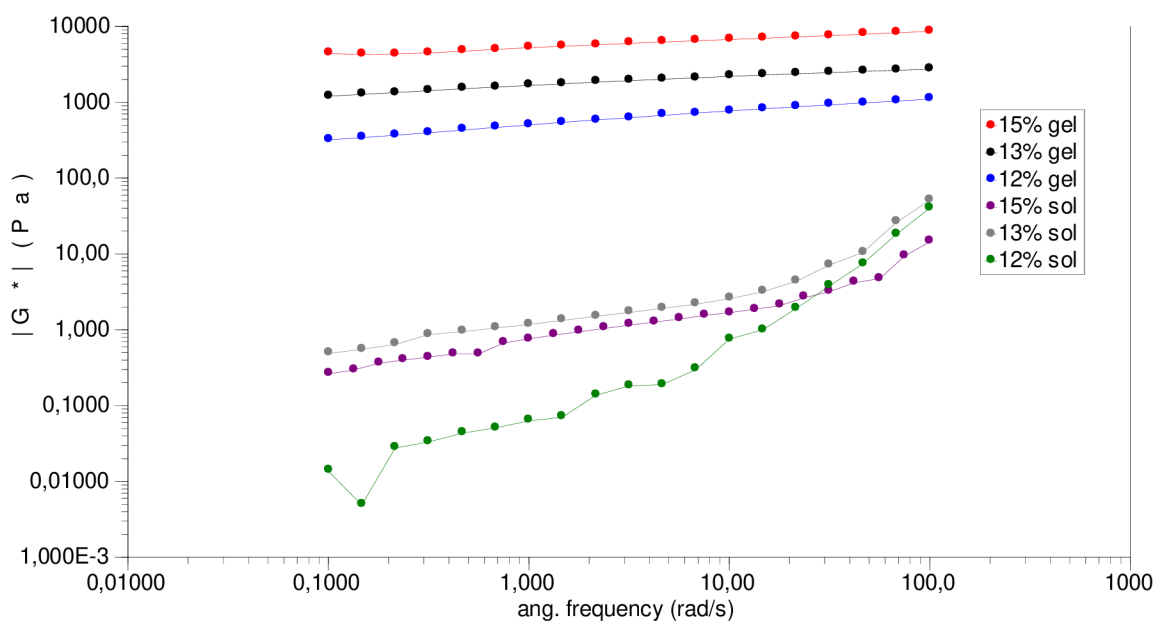
Další série měření probíhala u 15% roztoku BSA ve vodě a byl sledován vliv rychlosti ohřevu vzorku pro tři různé rychlosti, konkrétně 5, 2 a 0,5°C za minutu. Z výsledků bylo jasné, že rychlosti 0,5 a 2°C za minutu jsou obě vyhovující a průběh gelace je podobný. Rychlost 5°C za minutu byla moc vysoká, vzorek se nestíhal temperovat, proces gelace nebyl zřejmý, proběhl až po ustálení teploty na 80°C, tudíž byla tato rychlost nevyhovující. Z časových důvodů byla pro další měření používána rychlost 2°C za minutu jelikož za kratší čas poskytla porovnatelné výsledky jako rychlost 0,5°C za minutu.

4.2 Proteinové vzorky

4.2.1 Vliv koncentrace BSA

Dle předpokladu by měla mít zvyšující koncentrace BSA za následek vyšší viskozitu roztoku. To se v procesu gelace projeví dosažením vyšších hodnot viskózního i elastického modulu gelu. V průběhu zahřívání dochází k rozplétání molekul albuminu, co zvyšuje možnost intermolekulárních interakcí, hlavně vzniku disulfidických můstků mezi molekulami cysteinu, ale i jako důsledek působení Van der Waalsových sil. Všechny tyto reakce vedou k tvorbě fyzikálních vazeb, vzniku sítí a tím k formaci gelu. Čím víc řetězců se v roztoku potká, tím víc vazeb vznikne a síť je pevnější, lépe odolává deformacím, tudíž má větší elasticitu.

Všechna měření provedeny na připravených vzorcích BSA ve vodě tento předpoklad potvrdily. Vzniklé gely měly řádově vyšší hodnoty komplexního modulu, přičemž rozdíl řádu byl také mezi gely vzniklými z roztoků o různých koncentracích (viz Obrázek 16).



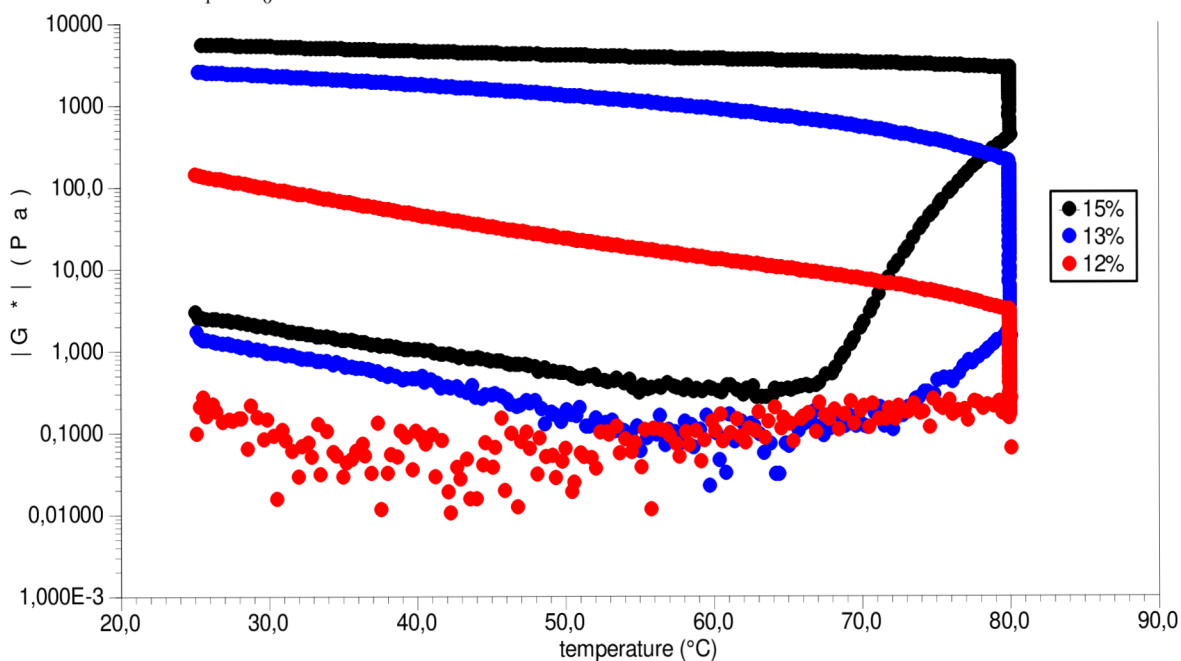
Obrázek 16 – graf závislosti komplexního modulu na uhlové rychlosti (vzorky BSA ve vodě)

Z porovnání závislosti komplexního modulu G^* na teplotě pro jednotlivé roztoky je zřejmé, že s rostoucí koncentrací BSA dochází k posunu počátku gelace směrem k nižším hodnotám teplot (viz Obrázek 17). Počátek gelace je charakterizován vznikem prvních interakcí vedoucích k formaci sítí, co se v grafu projeví jako nárůst hodnot komplexního modulu. Více koncentrované roztoky již při menším rozpletení řetězců zaujímají v prostoru dostatečný objem na to, aby došlo k jejich střetu a tím ke vzniku intermolekulárních interakcí.

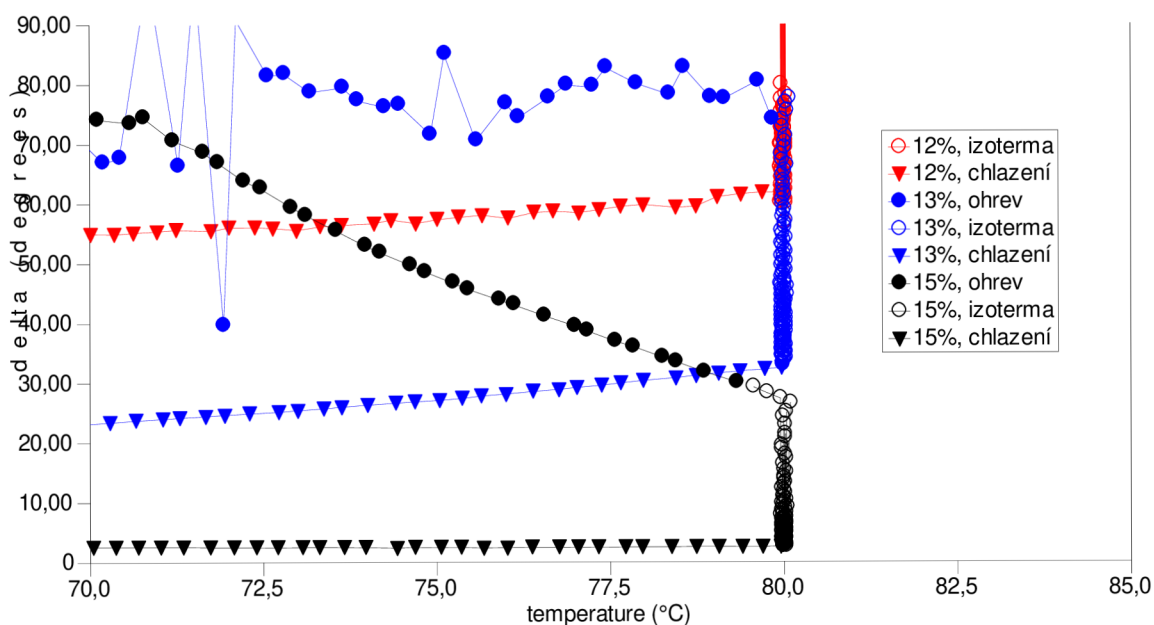
Obdobně se pak i samotný bod gelace se zvyšující koncentrací posouvá směrem k nižším hodnotám teplot. Nejvhodnější závislostí pro porovnání polohy bodu gelace je závislost

ztrátového úhlu (δ) na teplotě (viz Obrázek 18), jelikož je možné bod gelace charakterizovat přesnou číselnou hodnotou ($\delta = 45$). Z grafu je zřejmé, že ke gelaci 15% roztoku dochází již při ohřevu vzorku. Bod gelace 13% roztoku pozorujeme až po určitém čase při izotermě při 80°C. Konkrétní hodnotu teploty gelace 15% roztoku BSA určíme lineární interpolací z hodnot dvou nejbližších změřených bodů (označené indexem 0 a 1):

$$t = t_0 + (\delta - \delta_0) \cdot \frac{t_1 - t_0}{\delta_1 - \delta_0} = 75,4 + (45 - 45,7) \cdot \frac{75,9 - 75,4}{43,9 - 45,7} = 75,6^\circ\text{C}.$$



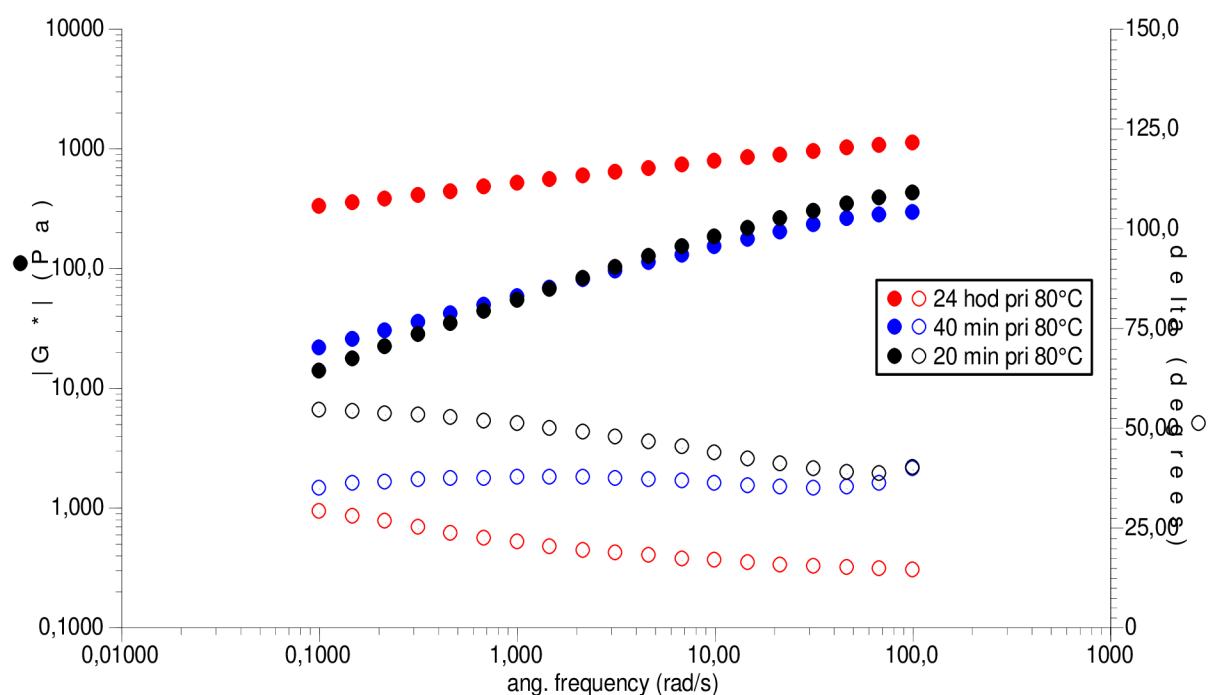
Obrázek 17 – závislost komplexního modulu na teplotě pro roztoky BSA ve vodě



Obrázek 18 – závislost ztrátového úhlu na teplotě pro různě koncentrované roztoky BSA ve vodě

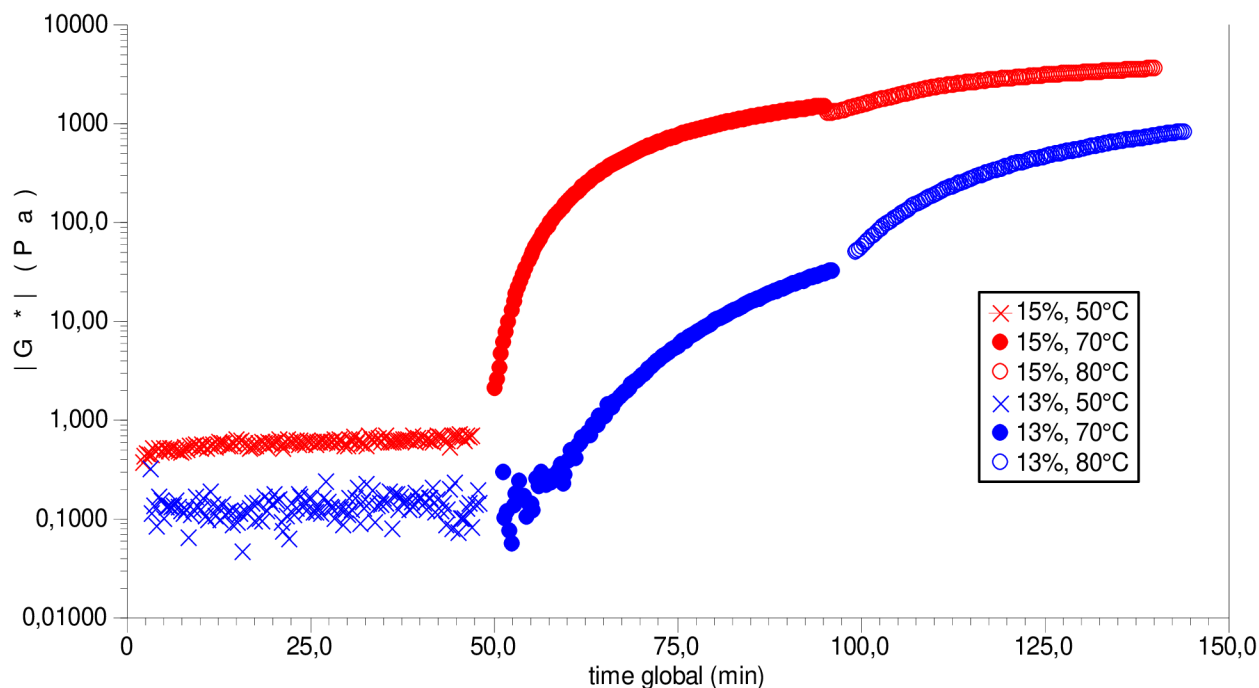
Jak je ze zobrazené závislosti (Obrázek 18) vidět, i když 12% roztok podléhá změnám ve své struktuře, interakce nejsou dostatečné na vznik gelu a hodnoty ztrátového úhlu neklesnou pod hodnotu 45 stupňů. Hodnoty ztrátového úhlu pro ohřev 12% roztoku nejsou v grafu zobrazeny, jelikož leží v několikařádkovém rozptylu hodnot, z větší části mimo zobrazovaný rozsah, tudíž jsou pro posuzování bodu gelace nevýznamné.

Jelikož ke gelaci 12% roztoku při izotermě o délce 20 minut nedošlo, byl tento vzorek testován také při izotermě o dvojnásobné délce (40 min). Při tomto testu již ke gelaci vzorku došlo, tudíž byl sledován nejen vliv teploty, ale také vliv délky ohřevu při stejné teplotě (viz Obrázek 19). Při kratší době ohřevu nedochází k dostatečnému rozpletení řetězců polymeru, tudíž nedojde k odhalení potřebného množství interakčních center, které jsou schopny vytvořit stabilní trojrozměrnou strukturu gelu. Při delším ohřevu se molekuly dále rozplétají, což má za následek vytvoření gelu, jehož elastický a viskózní modul se s rostoucí dobou ohřevu budou asymptoticky přibližovat maximální hodnotě.



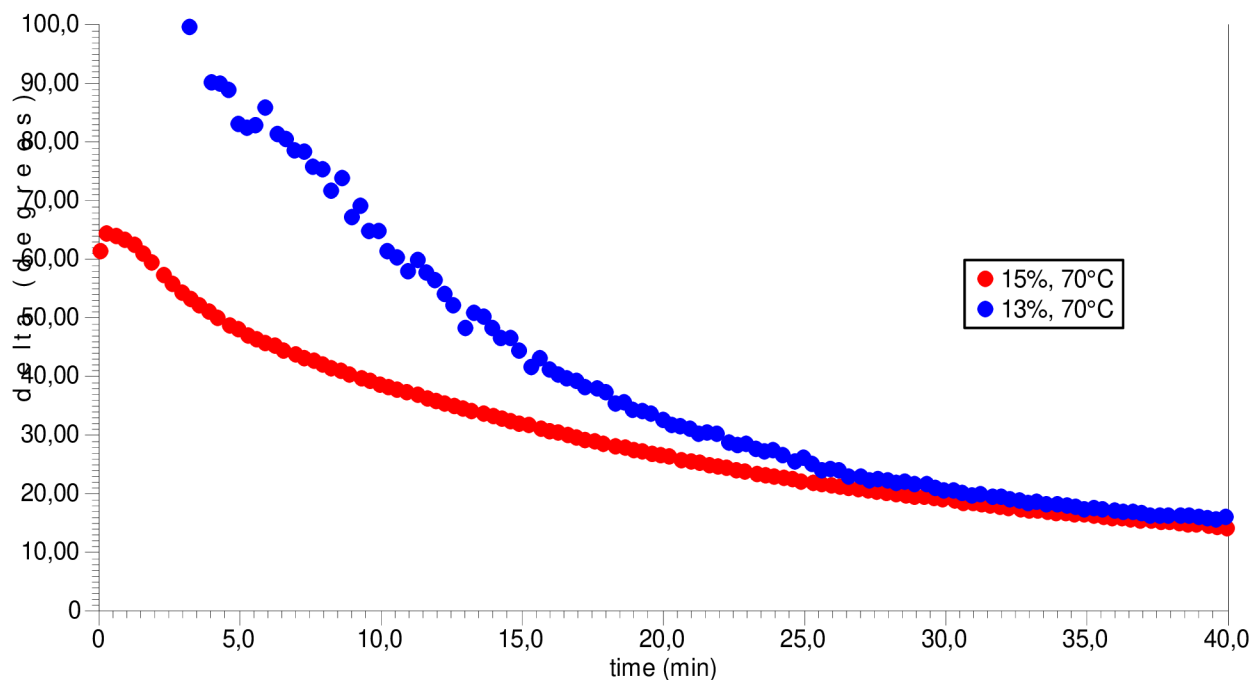
Obrázek 19 – závislost G^* a δ na úhlové rychlosti pro 12% BSA po různě dlouhých ohřevech

U 15% a 13% roztoku BSA byl vliv času a teploty pozorován prostřednictvím časových oscilačních testů (viz Obrázek 20). Jelikož by měly molekuly BSA odolávat ohřevu na 60°C bez jakýchkoliv škodlivých změn na struktuře, nepředpokládaly se při izotermě na 50°C výraznější změny dynamických modulů. Tento předpoklad byl potvrzen, jak u 15%, tak i u 13% vzorku BSA. Oba vzorky si během celé izotermy při teplotě 50°C zachovaly přibližně stejné hodnoty G^* . Změnám začaly podléhat až po ohřevu na 70°C, kdy došlo k nárůstu hodnot komplexního modulu. Vzhledem k vyšší koncentraci byl nárůst hodnot komplexního modulu u 15% roztoku rychlejší, ke gelaci došlo za kratší čas v porovnání s roztokem 13% (viz Obrázek 21).



Obrázek 20 – závislost komplexního modulu na čase pro tři různé teploty pro 15% a 13% roztok

Konkrétní hodnoty času gelace byly určeny ze závislosti ztrátového úhlu na čase již zmíněnou metodou lineární interpolace z hodnot dvou nejbližších bodů. Ke gelaci 15% roztoku došlo za dobu přibližně 6 minut, naproti tomu 13% roztok dosáhl bodu gelace až za 20 minut. Při teplotě 80°C již nedocházelo k významným změnám, pouze k nárůstu komplexního modulu v důsledku vzniku nových vazeb a interakcí a upevňování vzniklé sítě.

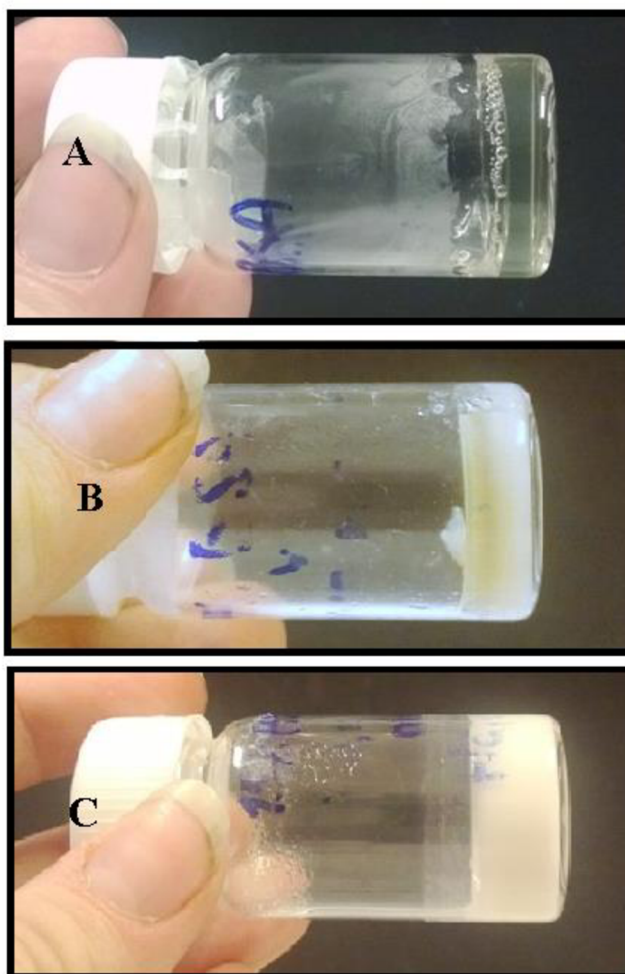


Obrázek 21 – závislost hodnot ztrátového úhlu na čase po ohřátí na 70°C pro 15% a 13% roztok

4.2.2 Vliv pH a iontové síly

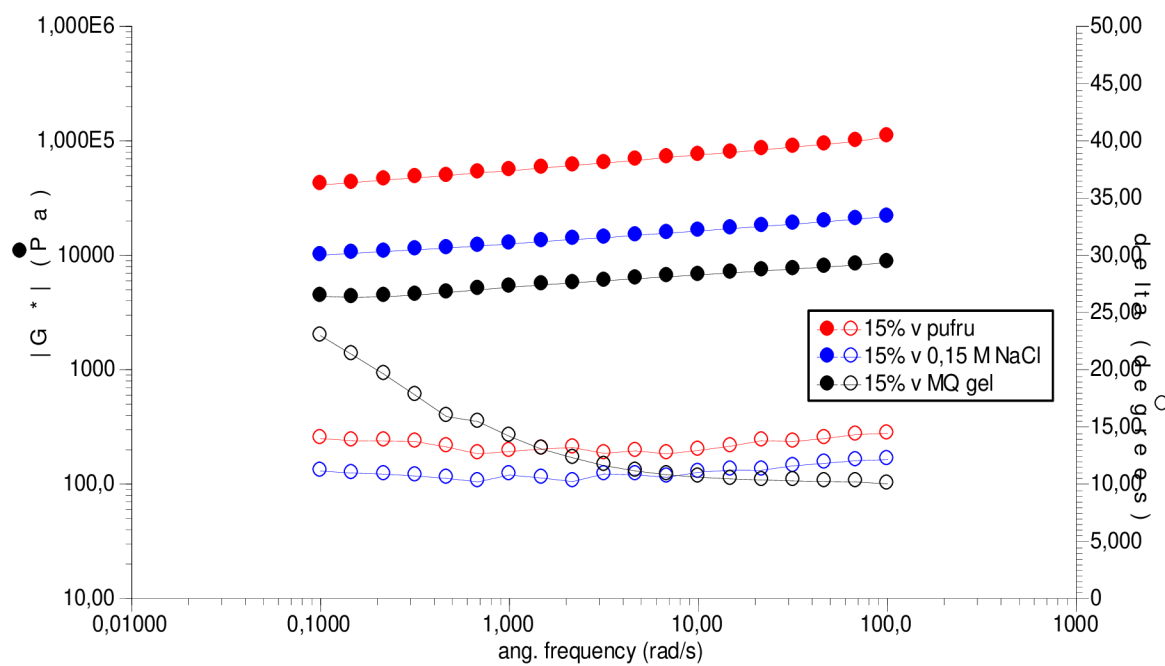
Vliv pH a iontové síly byl sledován na třech vzorcích, konkrétně to byly roztoky BSA ve vodě, v roztoku NaCl o koncentraci 0,15 M a v pufru o pH 4 a koncentraci NaCl 0,15 M. Dle předpokladu by mělo dojít k ovlivnění elektrostatických interakcí v důsledku přítomnosti sodných a chloridových iontů, což by se mělo projevit odlišným chováním vzorků v porovnání s roztokem BSA ve vodě. Při pH 4 dochází ke změně náboje BSA z původně záporného na kladný, jelikož je hodnota pH nižší než hodnota pI albuminu. Hustota náboje albuminu však bude nižší než v neutrálním vzorku protože hodnota $pH = 4$ je bližší hodnotě pI . To bude mít za následek snížení odpuzivých sil mezi řetězci a tím možnost lepšího přiblížení interagujících skupin (hydrofobní části, thiolové skupiny) Tento fakt spolu s přítomností Na^+ a Cl^- iontů bude mít za následek ovlivnění vlastností vzniklého gelu, jakož i samotného průběhu gelace.

Již samotný vzhled vzniklých gelů (viz Obrázek 22) naznačuje rozdílnost vzniklých struktur. Gel vzniklý z vodného roztoku BSA je transparentní, zatímco gel vzniklý z roztoku BSA v roztoku NaCl je mnohem víc zakalený, místy téměř neprůhledný s odstínem bílé. Gel vzniklý z tlumivého roztoku BSA je již úplně neprůhledný, bílý, tudíž lze předpokládat, že došlo k vzniku struktur, které rozptylují světlo a dopadající záření v rozpětí vlnových délek charakteristických pro viditelné světlo je odraženo.



Obrázek 22 – fotografie jednotlivých gelů: A – vzorek BSA ve vodě, B – vzorek BSA v roztoku NaCl, C – vzorek BSA v roztoku NaCl o pH 4

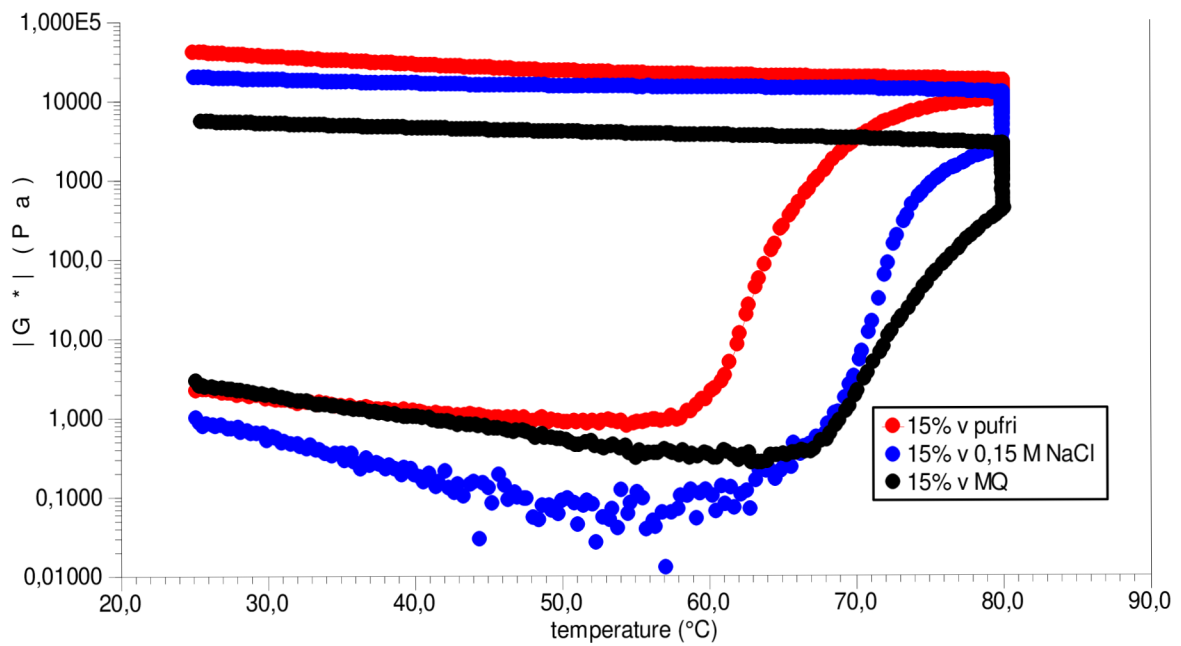
Z porovnání výsledků frekvenčních testů (viz Obrázek 23) je zřejmé, že gel vzniklý z roztoku BSA v roztoku NaCl dosahuje vyšších hodnot elastického i viskózního modulu než gel vzniklý z roztoku BSA ve vodě. Snížení pH pod hodnotu pI albuminu má za následek, že gel vzniklý z takto připraveného roztoku dosahuje hodnot G' a G'' ještě vyšších než gel připravený pouze v přítomnosti NaCl. V porovnání s gelem vzniklým z roztoku BSA v MQ je tento rozdíl dokonce řádový.



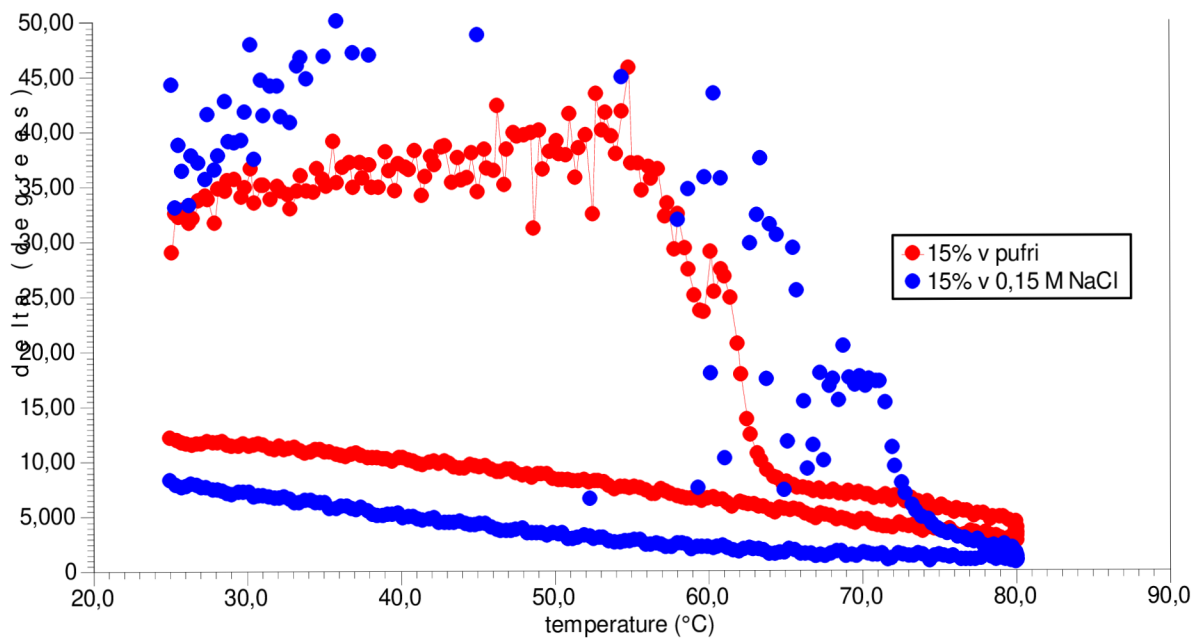
Obrázek 23 – graf závislosti komplexního modulu a delta na úhlové rychlosti pro 15% gely BSA s různou hodnotou pH a iontové síly

Z porovnání teplotních oscilačních ramp (viz Obrázek 24), konkrétně vynesemím závislosti komplexního modulu na teplotě, je zřejmé, že v důsledku změny náboje proteinu dochází k počátku gelace již při nižších teplotách. Roztoky, ve kterých měl protein záporný náboj, vykazují první změny chování až při teplotě blízké 70°C , naproti tomu vzorek BSA při pH 4 podléhá změnám již při teplotě o přibližně 10°C nižší, i když k počátku gelace roztoku BSA v 0,15 M NaCl dochází při porovnatelné teplotě jako u vzorku BSA ve vodě, při ohřevu na 80°C dochází u tohoto vzorku k výraznějšímu nárůstu hodnot komplexního modulu, v důsledku přítomnosti Na^+ a Cl^- iontů v roztoku.

Iontová síla a nižší hodnota pH mají za následek, že vzorky před ohřevem již vykazují vyšší podíl elastické složky deformace. Hodnoty elastického modulu jsou vyšší než hodnoty viskózního modulu v průběhu celého měření, tudíž není možné určit bod gelace jako bod, kdy $\delta = 45^\circ$. Jelikož není možné, určit konkrétní hodnotu teploty, byl určen pouze interval teplot, ve kterém dochází k nejvýraznějšímu poklesu hodnot ztrátového úhlu před jeho ustálením, protože lze soudit, že právě v tomto intervalu se nachází i samotný bod gelace. Pro roztok BSA v roztoku NaCl je má tento interval rozpětí $71 - 75^\circ\text{C}$, pro roztok BSA při pH 4 je to $61 - 65^\circ\text{C}$. Teplota bodu gelace roztoku BSA ve vodě byla určena lineární interpolací v předchozí kapitole jako $75,6^\circ\text{C}$. Z tohoto důvodu nejsou hodnoty ztrátového úhlu pro tento roztok zobrazeny v grafu (viz Obrázek 25).



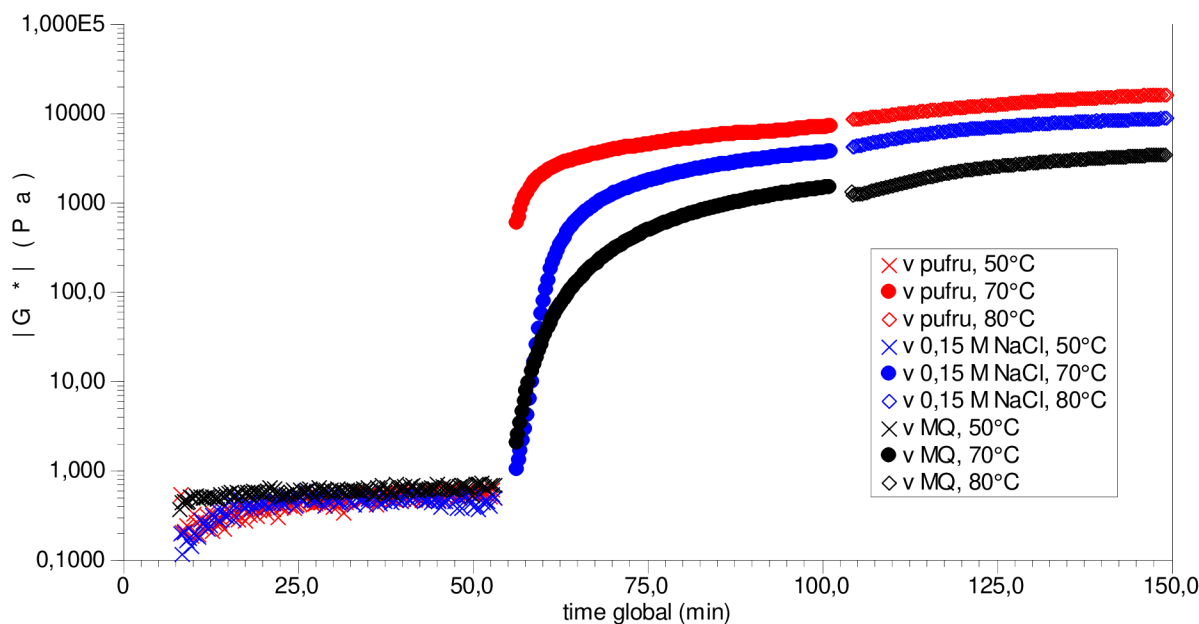
Obrázek 24 – graf závislosti komplexního modulu na teplotě pro jednotlivé vzorky BSA



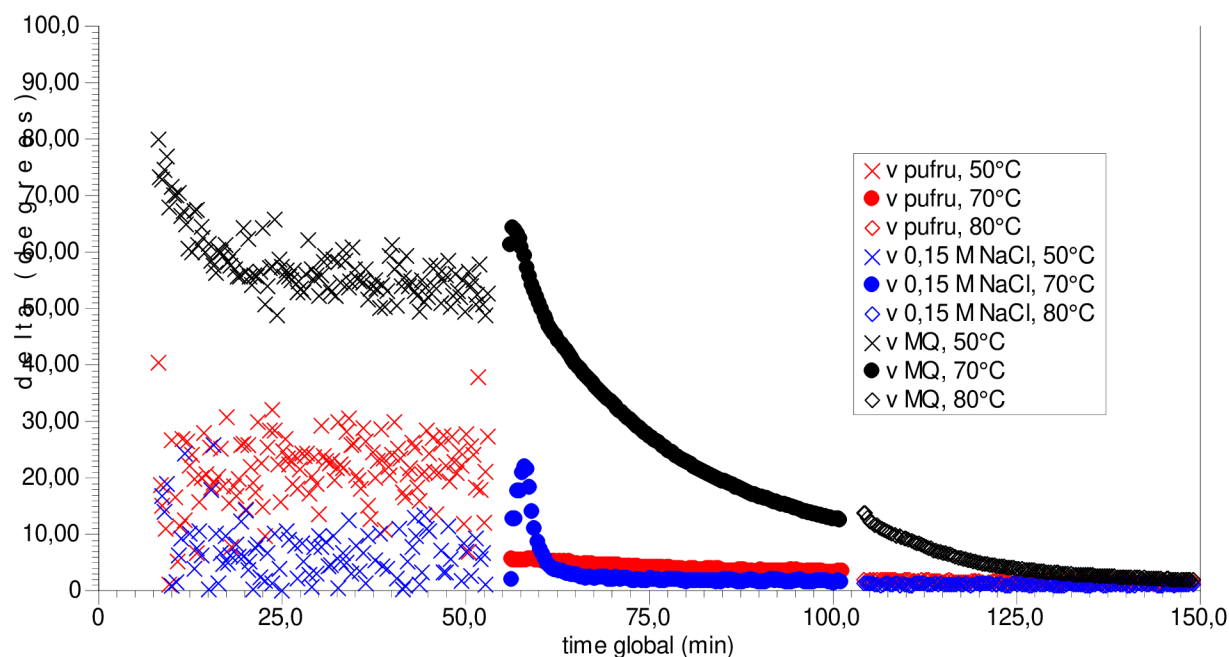
Obrázek 25 – graf závislosti ztrátového úhlu na teplotě pro vzorky BSA v roztoku NaCl

Časové oscilační testy (viz Obrázek 26) potvrdily chování vzorků pozorované u teplotních testů. Při teplotě 50 °C nedochází ke změnám ani u jednoho vzorku, z důvodu již zmiňované stability BSA do teploty 60 °C. Po zahřátí na 70 °C dochází u vzorku v BSA ve vodě a v roztoku NaCl k výraznému nárůstu hodnot komplexního modulu, přičemž vzorek BSA v NaCl podléhá výraznějším změnám. Roztok BSA při pH 4 podlehl nejvýraznější změně již v průběhu dvouminutové temperace, což odpovídá jeho výrazně odlišnému chování pozorovanému u teplotních závislostí, kdy k jeho prvním změnám docházelo při nižší teplotě než u zbývajících dvou vzorků. Při teplotě 80 °C dochází u všech vzorků pouze k mírnému nárůstu hodnot komplexního modulu a žádné výrazné změny již nejsou pozorovány.

Jak již bylo zmíněno, hodnoty δ vzorků BSA v přítomnosti NaCl dosahovaly hodnot nižších než 45° , tudíž ani z časových oscilačních testů (viz Obrázek 27), nelze určit čas gelace, kdy $\delta = 45^\circ$. Je však zřejmé, že vzorek BSA při pH 4 skutečně podlehl nejvýraznější změně již při teplotě, protože jak je vidět, při teplotě 70°C si tento vzorek zachovává téměř konstantní hodnoty δ . Hodnoty δ pro vzorek BSA v 0,15 M roztoku NaCl krátce po zahřátí klesají a v krátkém času dosahují ustálených hodnot, tato změna je však v porovnání s roztokem BSA ve vodě zanedbatelná. Vzorek BSA ve vodě dosáhne porovnatelných hodnot ztrátového úhlu teprve po izotermě při teplotě 80°C .



Obrázek 26 – graf závislosti komplexního modulu na čase pro jednotlivé vzorky 15% BSA v různém prostředí, při různých režimech ohřevu



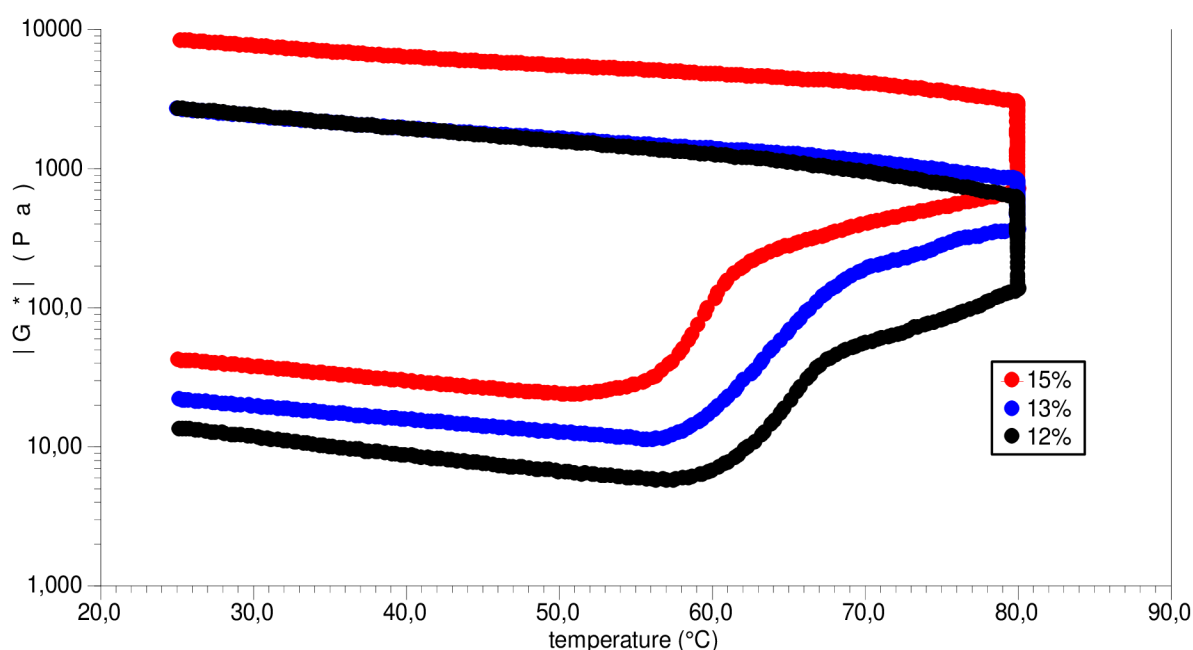
Obrázek 27 – graf závislosti ztrátového úhlu na čase pro jednotlivé vzorky 15% BSA v různém prostředí, při různých režimech ohřevu

4.3 Polysacharid-proteinové vzorky

4.3.1 Vliv koncentrace polymerní složky

Vliv koncentrace polymerní složky byl sledován na třech vzorcích směsných roztoků HA a BSA o koncentracích 12, 13 a 15 %, ve kterých byl hmotnostní poměr HA:BSA u všech vzorků zachován na hodnotě 1:12. Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.3.2.2, reologické chování směsných vzorků proteinů a polysacharidů je rozdílné od chování čistých roztoků jednotlivých složek, proto se předpokládají rozdíly ve vlastnostech gelů i v procesu gelace směsných roztoků oproti roztokům čistě proteinovým.

Z naměřených teplotních oscilačních ramp (Obrázek 28), je zřejmé, že přídavek HA ovlivnil již samotné hodnoty komplexního modulu roztoků, které se s rostoucí koncentrací zvyšují a naproti hodnotám čistě proteinových vzorků jsou téměř řádově větší. Stejně tak se zvyšující koncentrací dochází k posunu počátku gelace směrem k nižším hodnotám teplot.



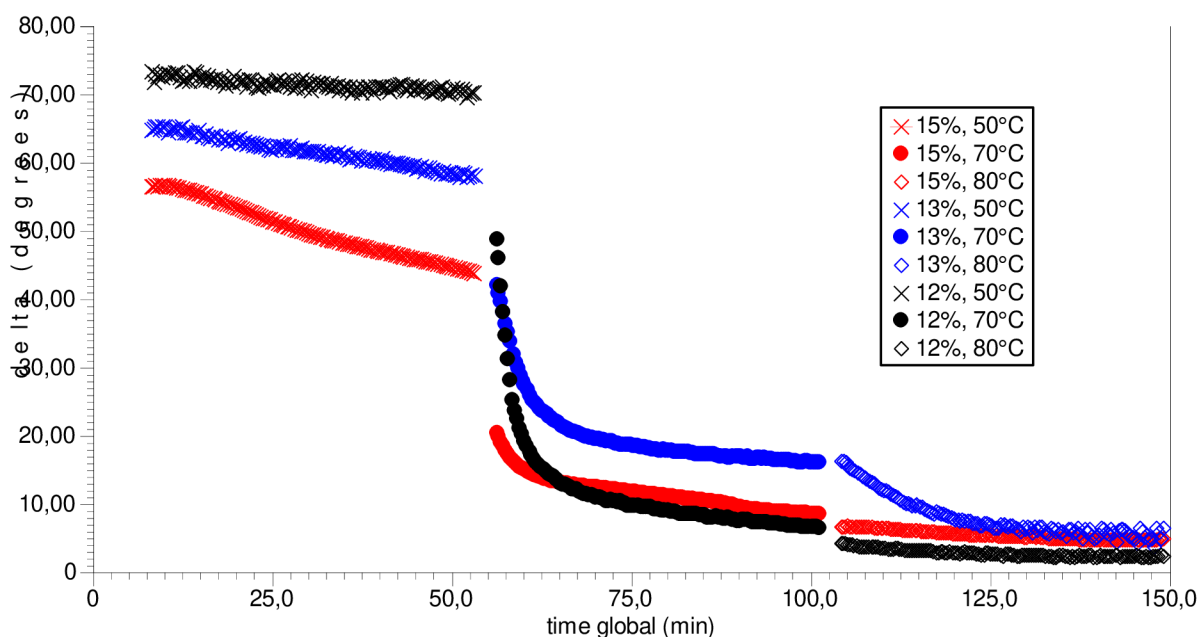
Obrázek 28 – graf závislosti komplexního modulu na teplotě pro různě koncentrované směsné roztoky se zachovaným hmotnostním poměrem HA:BSA = 1:12

Samotné hodnoty bodu gelace (viz Tabulka 2) byly určeny metodou lineární interpolace ze dvou nejbližších bodů k hodnotě $\delta = 45^\circ$ a potvrdily předpoklad, že s rostoucí koncentrací polymerní složky bude docházet k poklesu hodnot teploty gelace. Vlivem přítomnosti polysacharidu došlo také k posunu těchto hodnot oproti čistě proteinovým vzorkům, kdy ke gelaci 12% roztoku BSA nedošlo vůbec, bod gelace 13% roztoku byl 80°C a 15% roztoku 75,6°C.

Tabulka 2 – hodnoty teploty v bodě gelace pro směsné vzorky HA+BSA

koncentrace vzorku [%]	12	13	15
teplota bodu gelace [°C]	77,1	73,2	68

Porovnáním časových oscilačních testů (viz Obrázek 29) vidíme, že při delší době ohřevu je vliv přítomnosti polysacharidu zřetelnější. Ke gelaci 15% roztoku dochází již při izotermě o teplotě 50°C v čase 41,0 minut, což lze přisoudit přítomnosti HA ve vzorku, jelikož samotný BSA při této teplotě nepodléhá výrazným změnám. Čas gelace 13% vzorku nelze přímo určit, protože ke gelaci došlo v průběhu zahřívání vzorku na teplotu 70°C. V případě 12% roztoku ke gelaci došlo prakticky ihned po zahřátí a vytemperování na teplotu 70°C. V tomto případě je stejně jako u 15% roztoku zřetelný značný vliv HA, jelikož ke gelaci 12% roztoku BSA bez přítomnosti polysacharidu došlo až při 80°C, při izotermě o délce 40 minut.



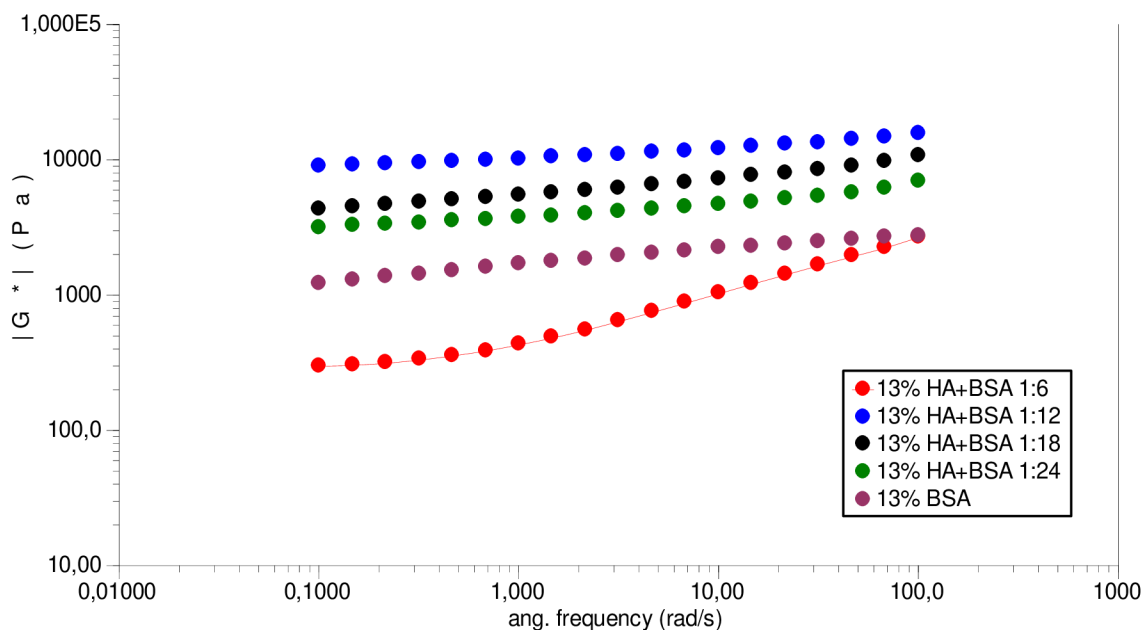
Obrázek 29 - závislost ztrátového úhlu na čase pro různě koncentrované vzorky HA+BSA se zachovaným hmotnostním poměrem 1:12 při různých režimech ohřevu

4.3.2 Vliv složení polymerní složky

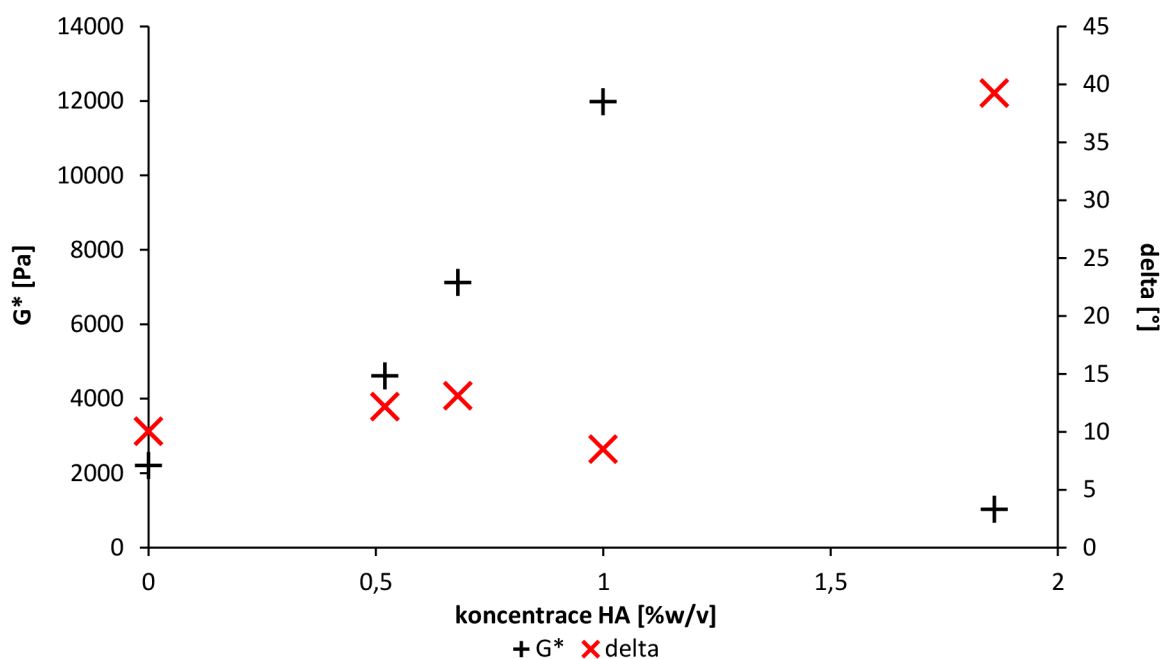
Jak již bylo zmíněno, u směsných vzorků HA a BSA má vedle koncentrace důležitý vliv na chování vzorku také složení polymerní složky. Tento vliv byl pozorován na řadě 4 vzorků s konstantní koncentrací polymeru 13 % a různém poměru HA:BSA, konkrétně 1:24, 1:18, 1:12 a 1:6.

Porovnáním *frequency sweep* testů hotových gelů (viz Obrázek 30) vidíme, že hodnoty komplexního modulu narůstají od vzorku s poměrem 1:24 (nejmenší obsah HA) po vzorek 1:12, který dosahuje nejvyšších hodnot. Naopak vzorek s nejvyšším obsahem HA (poměr 1:6) dosahuje nejnižších hodnot. To značí, že závislost velikosti jednotlivých modulů gelu na složení polymerní složky nebude lineárně růst se zvyšujícím obsahem HA, ale tato funkce by pravděpodobně dosahovala při určité koncentraci maxima po dosažení kterého hodnoty začínají prudce klesat (viz Obrázek 31).

Jak je zřejmé z teplotních oscilačních závislostí, dalším důležitým faktorem je čas ohřevu, jelikož při izotermě při teplotě 80°C o délce 20 minut dosahuje vzorek s poměrem 1:6 nejvyšších hodnot komplexního modulu. Toto si lze vysvětlit možnou degradací hyaluronanu při dlouhodobém zahřívání na 80°C a jelikož u tohoto vzorku tvoří HA výraznou část polymerní složky, jeho degradace se projeví na výsledných vlastnostech gelu.



Obrázek 30 – graf závislosti komplexního modulu na uhlové rychlosti pro směsné gely HA+BSA o různém složení a gel BSA o stejné koncentraci



Obrázek 31 – graf závislosti komplexního modulu a ztrátového úhlu (hodnoty při frekvenci $10 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$) na procentuálním zastoupení HA ve vzorku o koncentraci polymerní složky 13 %

Porovnáním průběhu gelace (viz Obrázek 32) vidíme, že složení vzorků nejvíce ovlivňuje vlastnosti samotných roztoků. Hodnoty komplexního modulu roztoků se zvyšujícím obsahem hyaluronanu rostou, avšak v průběhu gelace se tento rozdíl zmírňuje. Všechny vzorky bez ohledu na složení začínají podléhat změnám při podobných teplotách, hodnoty teploty v bodě gelace (viz Tabulka 3) jsou kromě vzorku s poměrem 1:6 porovnatelné. Tento vzorek, jelikož dosahoval již od začátku vysokých hodnot komplexního modulu, nemusel podlehnout natolik velkým změnám, aby dosáhl bodu gelace a dostačující bylo již zahřátí na $60,9^\circ\text{C}$.

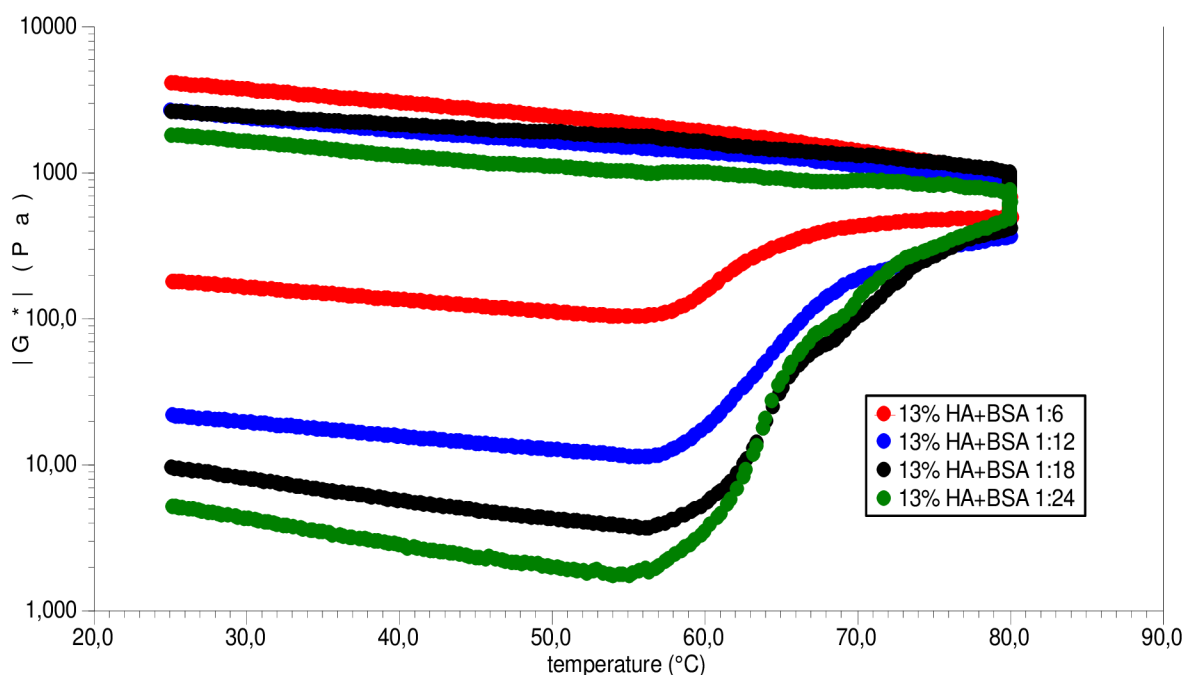
Po zpětném ochlazení na 25°C dosahují vzorky s vyšším obsahem HA vyšších hodnot komplexního modulu, ale původní rozdíl dvou řádů mezi vzorkami s nejvyšším a nejmenším obsahem HA se zmenší na rozdíl pouze třetiny řádu.

Tabulka 3 – teploty gelace pro jednotlivé vzorky HA+BSA o různém složení

vzorek [HA:BSA]	1:6	1:12	1:18	1:24
teplota gelace [°C]	60,9	73,2	71,1	70,0

Časové oscilační testy potvrdily chování vzorků, tak jak bylo pozorováno u teplotních závislostí. Při izotermě při 50°C si vzorky zachovávaly konstantní hodnotu komplexního modulu, přičemž velikost těchto hodnot stoupala s rostoucím zastoupením HA ve vzorku. Ke gelaci všech vzorků došlo v průběhu ohřevu na 70°C a hodnoty δ u všech vzorků začínaly již na hodnotě 43°. V průběhu izotermie došlo k vyrovnání hodnot komplexního modulu, které se již nijako výrazně nelišily. Stejně tomu bylo při 80°C, kdy už nedošlo k výraznějším změnám ani u jednoho vzorku.

Porovnáním naměřených hodnot těchto 4 vzorků s 13% vzorkem BSA (bez přítomnosti HA) je zřejmé, že samotná přítomnost polysacharidu značně ovlivňuje chování vzorku, posouvá bod gelace směrem k nižším teplotám. Avšak již samotné množství polysacharidu, tedy poměr proteinové a polysacharidové složky, výraznějším způsobem ovlivňuje hlavně vlastnosti samotného roztoku, průběh gelace není ovlivněn natolik výrazně.



Obrázek 32 – graf závislosti komplexního modulu na teplotě pro směsné vzorky HA+BSA

5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo prostudování průběhu gelace a vlastností vzniklých gelů z roztoků albuminu a směsných roztoků albuminu a hyaluronanu. Samotné měření bylo realizované prostřednictvím několika typů reologických testů se zaměřením na studium vlastností roztoků a gelů nebo na měření změny vlastností v průběhu samotného procesu gelace. U jednotlivých roztoků byl sledován vliv několika faktorů.

V průběhu optimalizace měření byl sledován zejména vliv teploty. Jak se ukázalo, se zvyšující teplotou se měřená viskozita gelů výrazně zvyšovala a to hned o několik řádu při rozdílu teploty o 15°C, tudíž pro další měření byla použita nejvyšší z testovaných teplot.

Předpoklady podle kterých má zvyšující koncentrace za následek posun bodu gelace směrem k nižším hodnotám teplot a vznik elastičtějších gelů se ověřili ve všech provedených měřeních. Průběh gelace odpovídal předpokládanému modelu, kdy ke gelaci 15% roztoku došlo dřív, než ke gelaci roztoků s nižší koncentrací. Stejně tak časové testy prokázaly, že při konstantní teplotě 70°C dojde ke gelaci 15% roztoku již za 6 minut, naproti tomu 13% roztok dosáhl bodu gelace až po 20 minutách.

Stejně tak pozorování vzorků BSA v prostředí o různé iontové síle a hodnotě pH potvrdilo předpoklady, na základě kterých se u jednotlivých vzorků očekávalo různé chování. V případě přítomnosti NaCl jde o ovlivnění elektrostatických interakcí a v případě pH 4 dokonce o změnu náboje BSA z původně záporného na kladný. Takto připravený vzorek vykazoval nejvyšší hodnoty komplexního modulu, v porovnání vzorkem BSA v MQ téměř řádově vyšší. Hodnoty ztrátového úhlu jsou naproti tomu porovnatelné pro všechny tři sledované vzorky a při frekvenci 10 rad·s⁻¹ jsou hodnoty delta jednotlivých gelů v rozsahu od 10 do 15 stupňů. Konkrétní hodnoty teploty gelace však nebyly určeny, jelikož hodnota ztrátového úhlu byla pro vzorky BSA v přítomnosti NaCl nižší než 45° v průběhu celého měření. Určený byl pouze interval, který odpovídal poklesu hodnot δ před jejich ustálením, což v grafu odpovídá i náhlému nárůstu hodnot komplexního modulu.

Vliv koncentrace polymerní složky u směsných vzorků byl stejný, jako u vzorků čistě proteinových. S rostoucí koncentrací polymeru došlo k posunu bodu gelace k nižší teplotě, vzniklé gely dosahovaly vyšších hodnot viskózního i elastického modulu. V porovnání s čistě proteinovými vzorky došlo k výraznému ovlivnění chování. U 15% směsného roztoku albuminu a hyaluronanu došlo jako u jediného z měřených vzorků ke gelaci již po 41 minutách při teplotě 50°C, co lze přisoudit přítomnosti většího množství hyaluronanu, jelikož sám albumin při této teplotě změnám nepodléhá. Stejně tak 12% směsný roztok vytvořil gel již při teplotě 77,1°C i když samotný roztok albuminu o této koncentraci vytvořil gel až po dlouhodobějším zahřívání při 80°C.

Na základě měření vzorků o koncentraci 13 % o různém složení byl pozorován vliv množství hyaluronanu ve vzorku. Z výsledků je zřejmé, že přítomnost polysacharidu výrazně ovlivňuje vlastnosti roztoku, ale rozdíly mezi jednotlivými vzorky se v průběhu gelace několikanásobně zmenší. Lze tudíž předpokládat, že samotné množství jednotlivých složek výrazně neovlivňuje samotnou tvorbu gelu, pouze jeho vlastnosti.

Porovnání gelů vzniklých ze směsných roztoků neodpovídalo přesně modelu, podle kterého s rostoucím množstvím hyaluronanu dochází k vzniku mechanicky odolnějších gelů. Směsný vzorek s poměrem HA:BSA 1:6 dosahoval nejnižších hodnot ze všech takto připravených gelů, i když obsahoval největší množství hyaluronanu, jelikož současně byla koncentrace BSA v tomto vzorku nejnižší. Lze proto předpokládat, že závislost komplexního modulu na množství hyaluronanu bude při určitém poměru dosahovat maxima a po překročení tohoto

hraničního poměru již budou hodnoty komplexního modulu vzniklého gelu klesat. Jelikož byl tento jev pozorován pouze u jednoho vzorku, nelze tento předpoklad dostatečně podložit a vyžadoval by další systematické prozkoumání.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] NECAS, BARTOSIKOVÁ, BRAUNER a KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*. 2008, č. 53, s. 397-411. Dostupné z: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/02029.pdf>
- [2] Hyaluronan: Structure and physical properties. In: *Glycoforum* [online]. [cit. 2014-08-18]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [3] SCOTT, John E. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution. Some biological consequences. In: *GlycoForum* [online]. [cit. 2014-10-27]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>
- [4] GATEJ, Iuliana, Marcel POPA a Marguerite RINAUDO. Role of the pH on Hyaluronan Behavior in Aqueous Solution. *Biomacromolecules*. 2005, vol. 6, issue 1, s. 61-67. DOI: 10.1021/bm040050m. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm040050m>
- [5] *Biopolymers: Polysaccharides I*. Weinheim: Wiley-VCH, 2002, 532 s. ISBN 35-273-0226-3.
- [6] PRESTWICH, Glenn D. Biomaterial from chemically-modified hyaluronan. In: *GlycoForum* [online]. [cit. 2014-10-27]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA18/HA18E.html>
- [7] KRATZ, Felix. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 2008, vol. 132, issue 3, s. 171-183. DOI: 10.1016/j.jconrel.2008.05.010. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365908002551>
- [8] KRAGH-HANSEN, Ulrich. Molecular and practical aspects of the enzymatic properties of human serum albumin and of albumin–ligand complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2013, vol. 1830, issue 12, s. 5535-5544. DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.03.015. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416513000937>
- [9] KRAGH-HANSEN, Ulrich, Lorenzo MINCHIOTTI, Monica GALLIANO a Theodore PETERS. Human serum albumin isoforms: Genetic and molecular aspects and functional consequences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2013, vol. 1830, issue 12, s. 5405-5417. DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.03.026.
- [10] ELZOGHBY, Ahmed O., Wael M. SAMY a Nazik A. ELGINDY. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 2012, vol. 157, issue 2, s. 168-182. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.07.031. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016836591100558X>
- [11] SARSAM, Susan W., David R. NUTT, Katja STROHFELDT a Kimberly A. WATSON. Titanocene anticancer complexes and their binding mode of action to human serum albumin: A computational study. *Metallomics*. 2011, vol. 3, issue 2, s. 152-. DOI: 10.1039/c0mt00041h. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c0mt00041h>
- [12] GAN, Chee-Yuen, Lai-Hoong CHENG, Eng-Tong PHUAH, Pei-Ni CHIN, Abbas F.M. ALKARKHI a Azhar Mat EASA. Combined cross-linking treatments of bovine serum albumin gel beadlets for controlled-delivery of caffeine. *Food Hydrocolloids*. 2009, vol. 23, issue 5, s. 1398-1405. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2008.09.009. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X08002221>

- [13] K., Amit a Prasun BANDYOPADHYAY. Polysaccharide-Protein Interactions and Their Relevance in Food Colloids. *The Complex World of Polysaccharides*. InTech, 2012-10-31. DOI: 10.5772/50561. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/the-complex-world-of-polysaccharides/polysaccharide-protein-interactions-and-their-relevance-in-food-colloids>
- [14] BARTOVSKÁ, Lidmila. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 5. přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005, 244 s. ISBN 80-708-0579-X.
- [15] ELIAS, Hans-Georg. *Macromolecules*. Weinheim: Wiley-VCH, c2008, xxxiv, 665 s. ISBN 978-352-7311-743.
- [16] OSADA, Yoshihito a Kanji KAJIWARA. *Gels handbook*. 5. přeprac. vyd. San Diego: Academic Press, c2001, 4 v. ISBN 01239496454.
- [17] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. 2. vyd. Praha: VŠCHT, 2001, 198 s. ISBN 80-708-0422-X.
- [18] PARK, Kinam. *Biodegradable hydrogels for drug delivery*. Technomic Publ.Comp., 1993. ISBN 978-1566760041.
- [19] SCHERER, George W. Structure and properties of gels. *Cement and Concrete Research*. 1999, vol. 29, issue 8, s. 1149-1157. DOI: 10.1016/S0008-8846(99)00003-4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008884699000034>
- [20] BANERJEE, Soumya, Suwendu BHATTACHARYA, Matthew LAWRENCE, Daniel CURTIS, Marc DAVIES a P. Rhodri WILLIAMS. Food Gels: Gelling Process and New Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2012, vol. 52, issue 4, s. 334-346. DOI: 10.1080/10408398.2010.500234. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2010.500234>
- [21] MEZGER, Thomas G. *The rheology handbook: for users of rotational and oscillatory rheometers*. 3rd rev. ed. Hanover, Germany: Vincentz Network, 2011. ISBN 978-386-6308-640.
- [22] SCHRAM, Gebhard Author. *A practical approach to rheology and rheometry*. Německo: Gebrueder HAAKE GmbH, 1994, 290 s.
- [23] KEDIGE, SureshD, Samir ANAND a Jyoti BANSAL. Hyaluronic acid: A promising mediator for periodontal regeneration. *Indian Journal of Dental Research*. 2010, vol. 21, issue 4, s. 575-. DOI: 10.4103/0970-9290.74232. Dostupné z: <http://www.ijdr.in/text.asp?2010/21/4/575/74232>
- [24] Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer* 2003; 3(5):380–387.

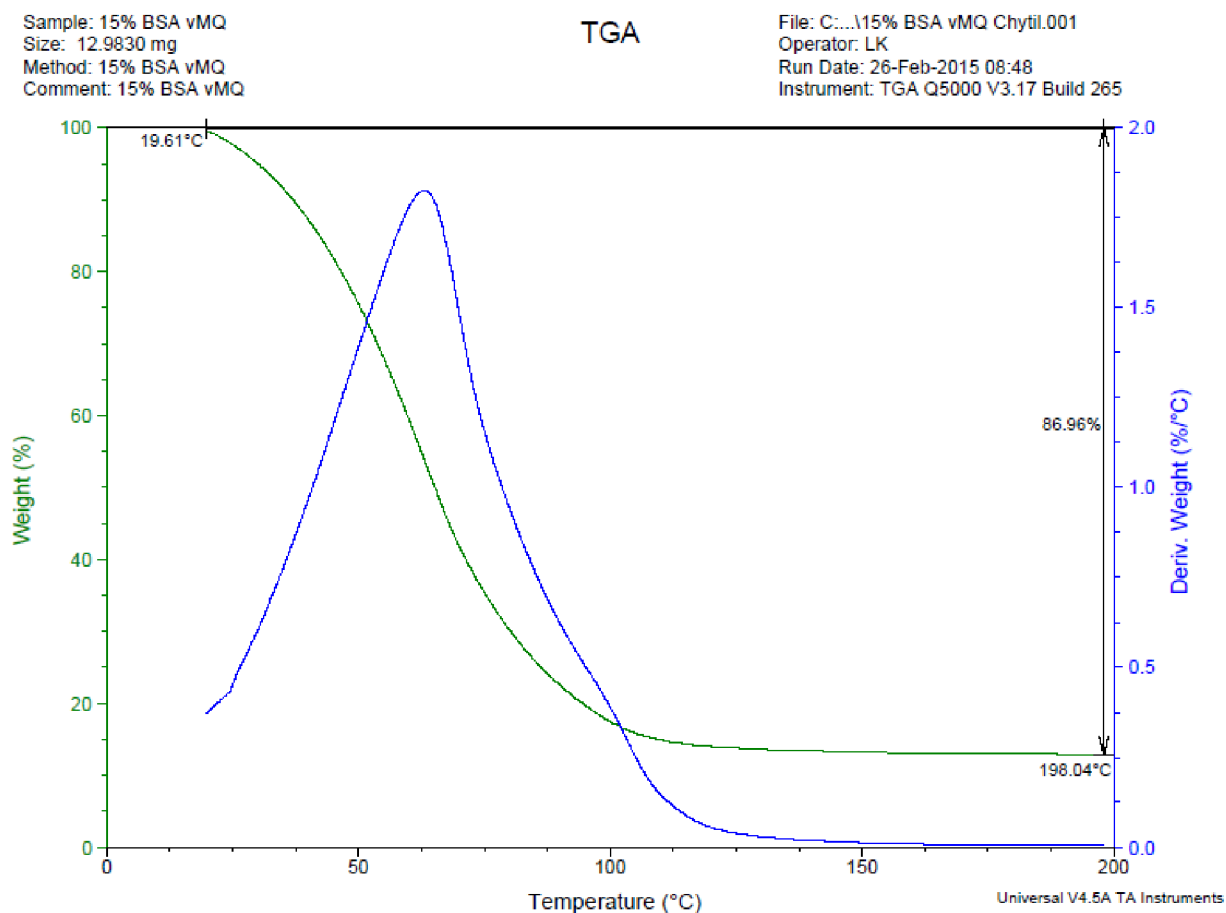
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

A	plocha
BSA	albumin
Cys	cystein
Da	Dalton; $1 \text{ Da} = 1,66 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$
dL	deformace v důsledku působení smykové rychlosti
F	smyková síla
G	modul pružnosti
G'	elastický modul
G''	ztrátový (viskózní) modul
G*	komplexní modul
h	vzdálenost desek
HA	hyaluronan
MQ	Mili-Q voda
pI	izoelektrický bod proteinu
pK _a	záporně vzatý dekadický logaritmus disociační konstaty
R	poloměr desky reometru
v	rychlost
γ	deformace
$\dot{\gamma}$	smyková rychlost
δ	ztrátový úhel
η	dynamická viskozita
η_0	limitní (dolní) viskozita
η_∞	limitní (asymptotická) viskozita
τ	smykové napětí
τ_0	mez toku

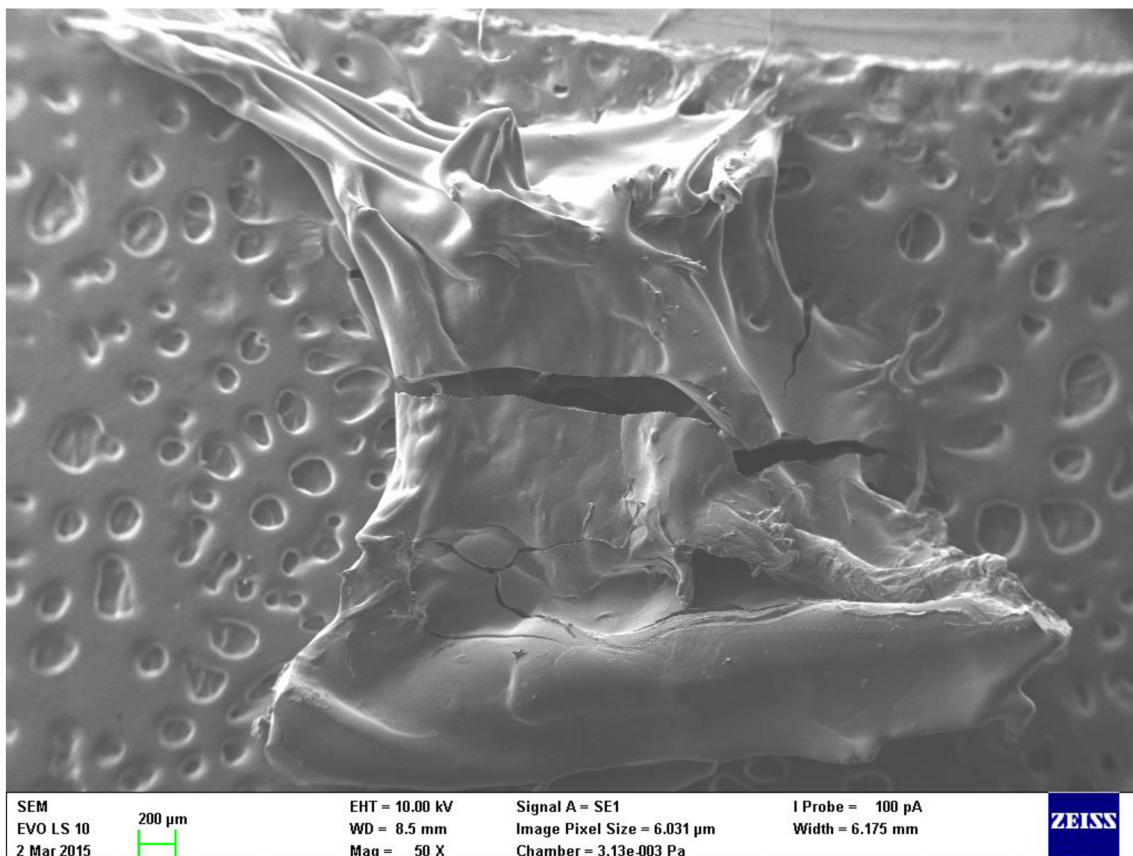
8 PŘÍLOHY

Tabulka 4 – obsah vody v gelech zjištěný termogravimetricky

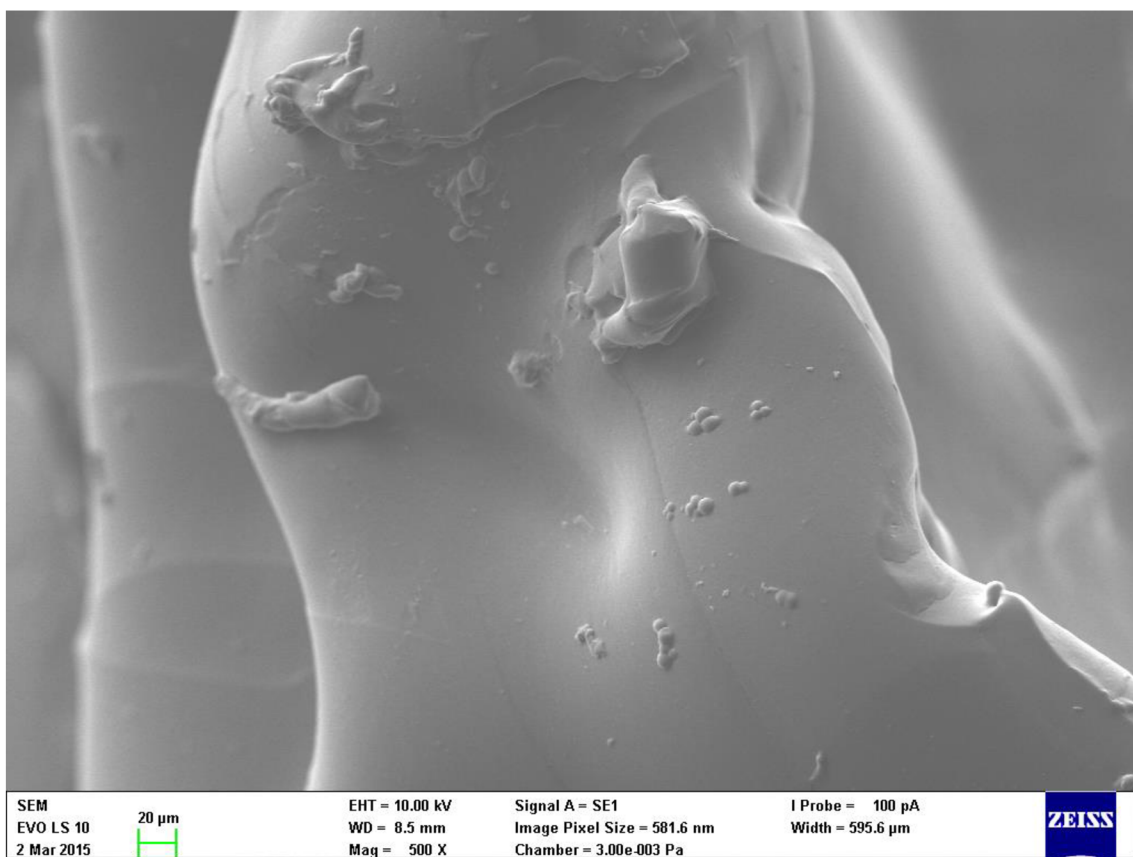
vzorek	obsah vody [%]
15% BSA v MQ	86,96
15% BSA v 0,15 M roztoku NaCl	83,28
15% HA+BSA v poměru 1:12 v MQ	86,42



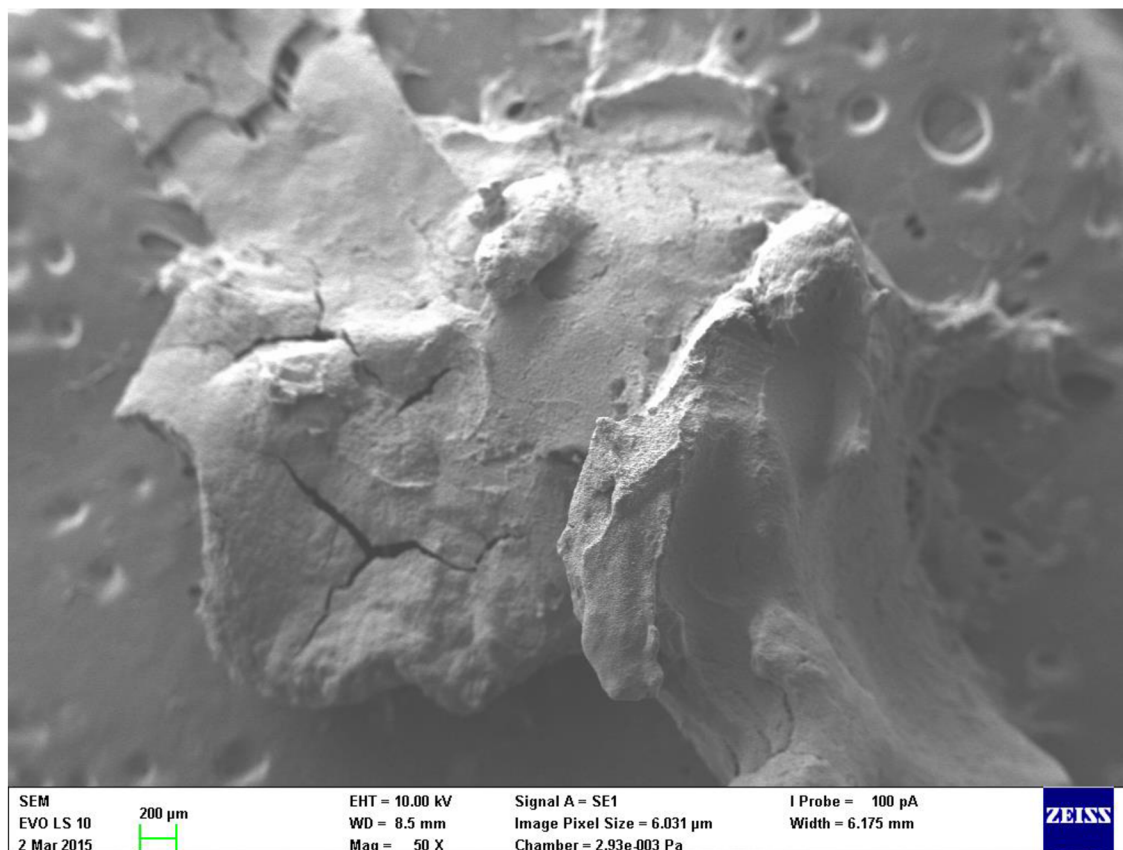
Obrázek 33 – výsledek termogravimetrické analýzy pro gel vzniklý z 15% roztoku BSA ve vodě



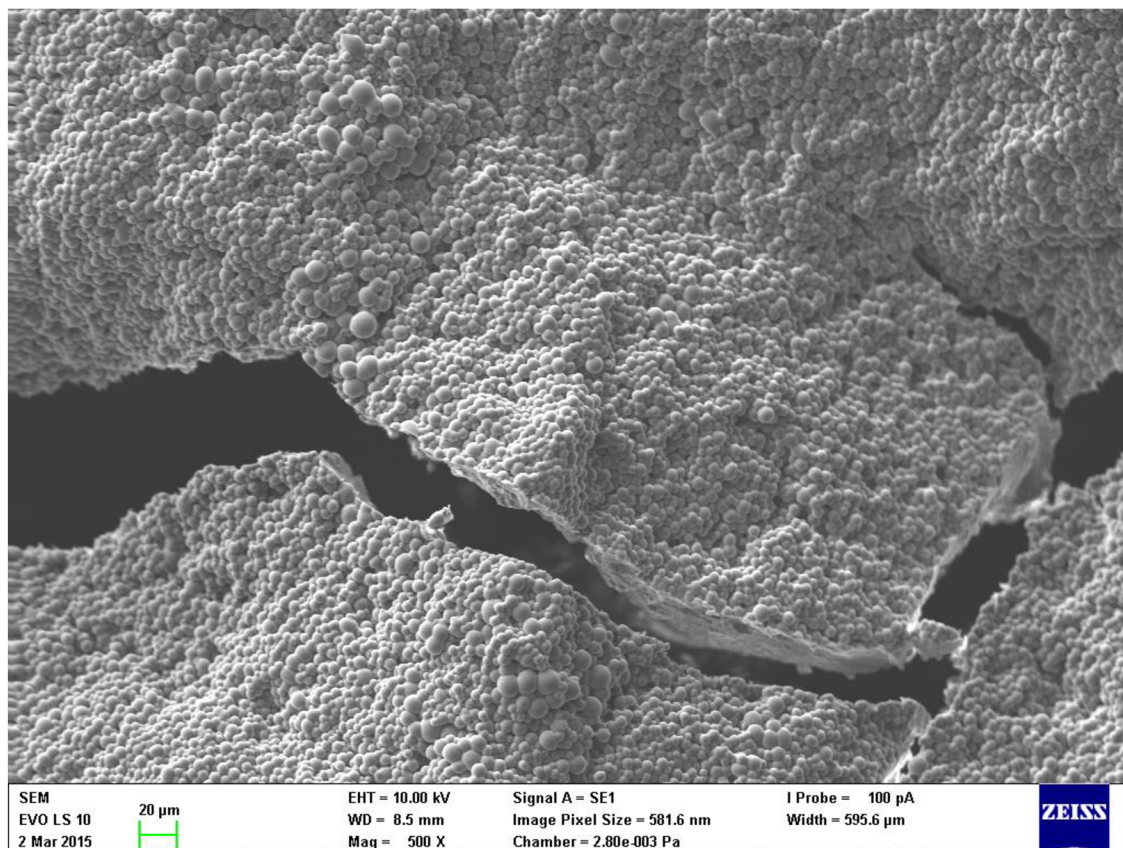
Obrázek 34 – fotografie gelu vzniklého z 15% BSA ve vodě, zvětšení 50x



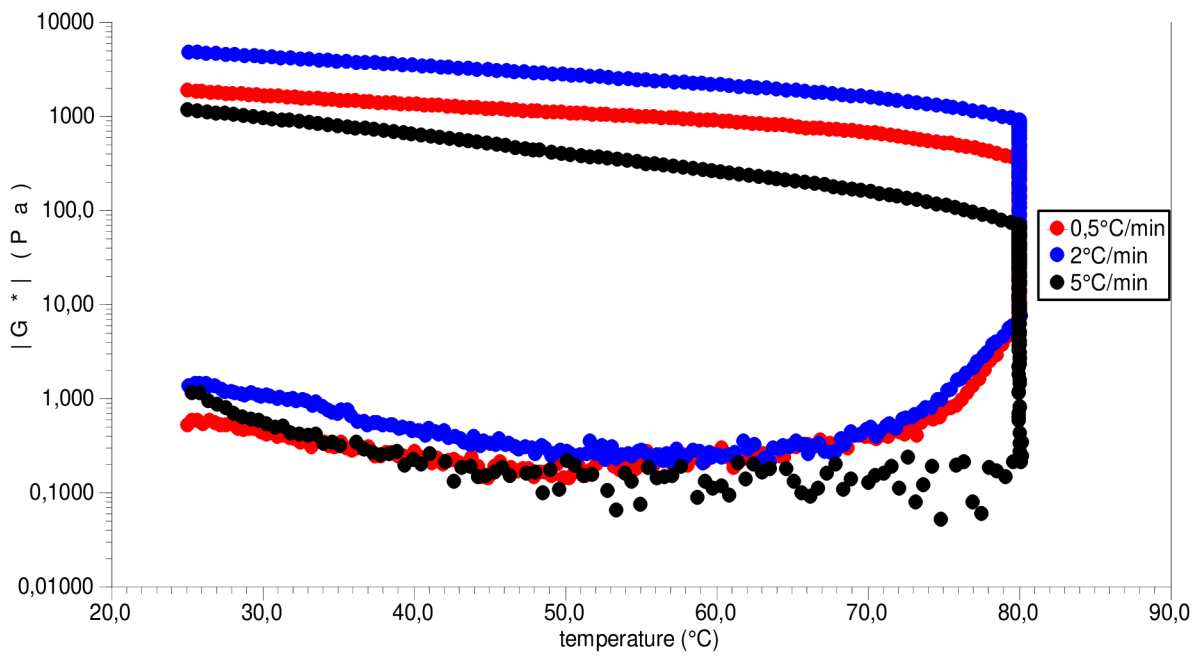
Obrázek 35 – fotografie gelu vzniklého z 15% BSA v 0,15 M NaCl, zvětšení 500x



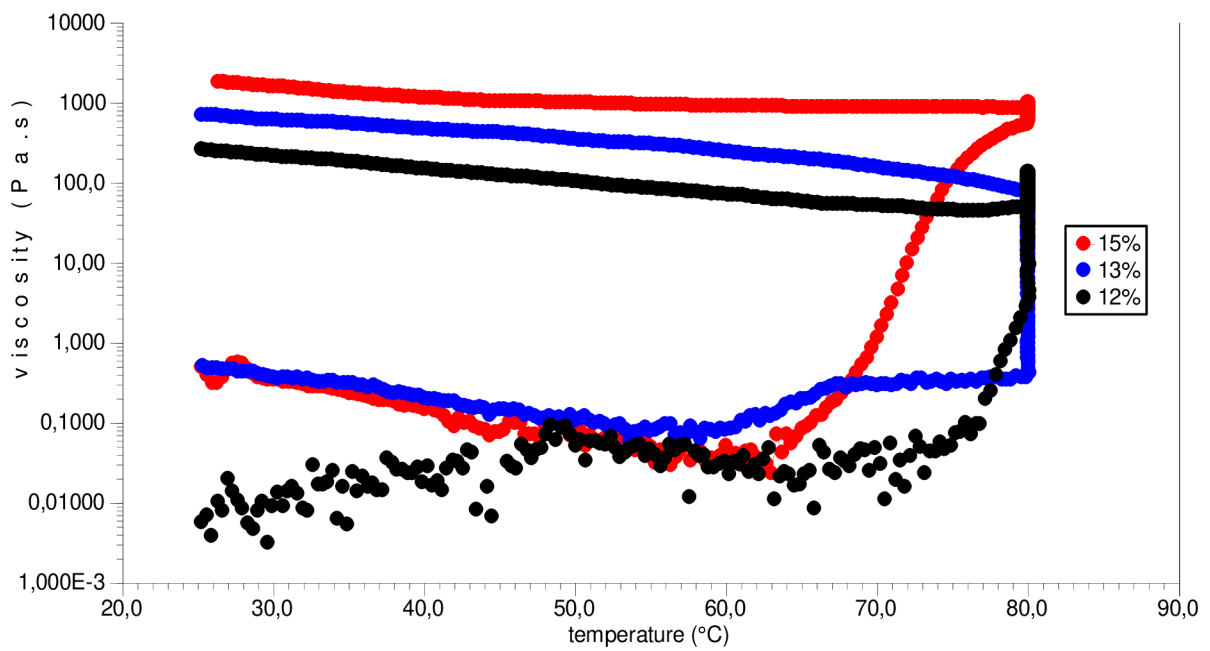
Obrázek 36 – fotografie gelu vzniklého se směsného roztoku HA a BSA, zvětšení 50x



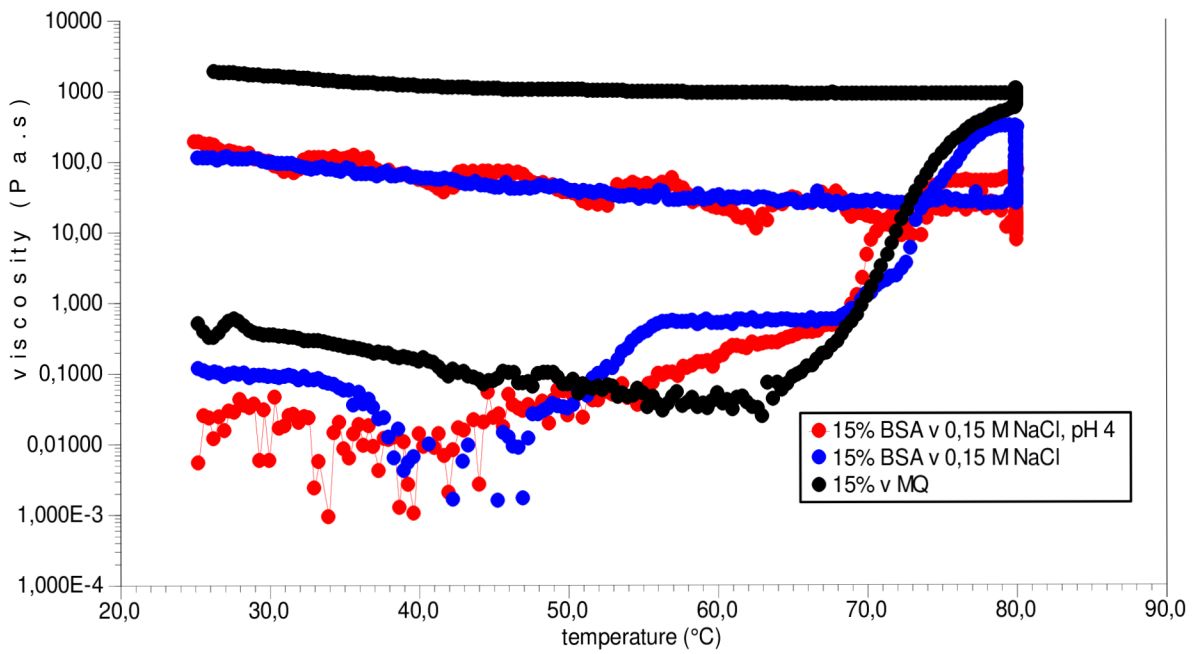
Obrázek 37 - fotografie gelu vzniklého se směsného roztoku HA a BSA, zvětšení 500x



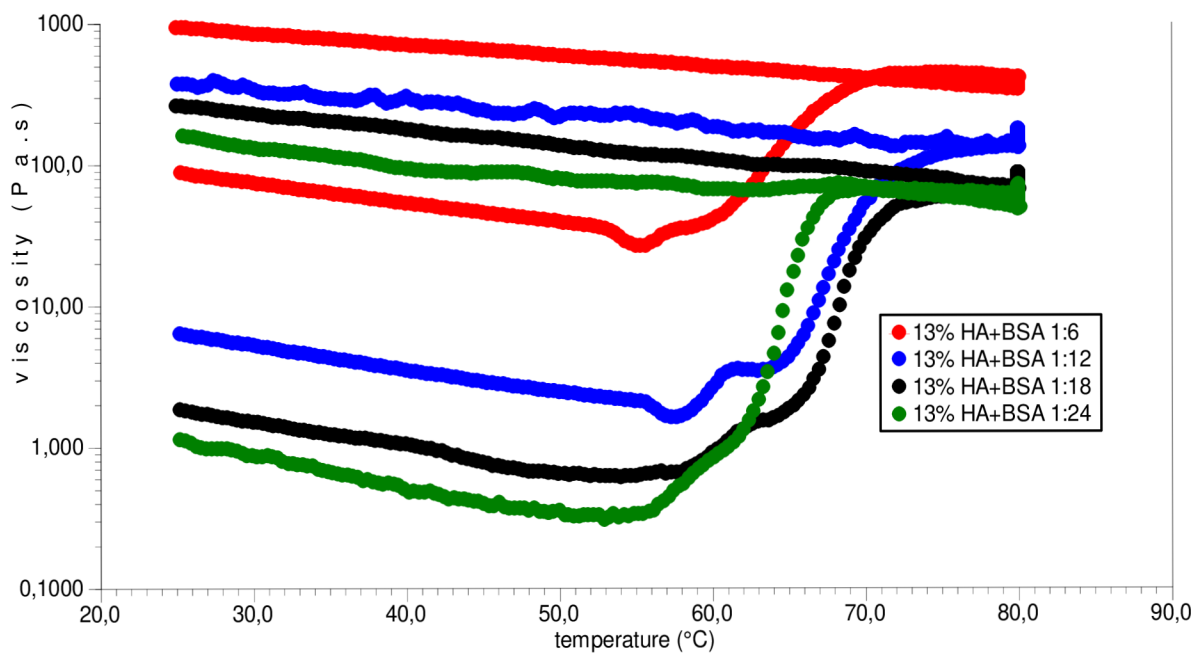
Obrázek 38 – porovnání rychlosti ohřevu pro 15% BSA ve vodě



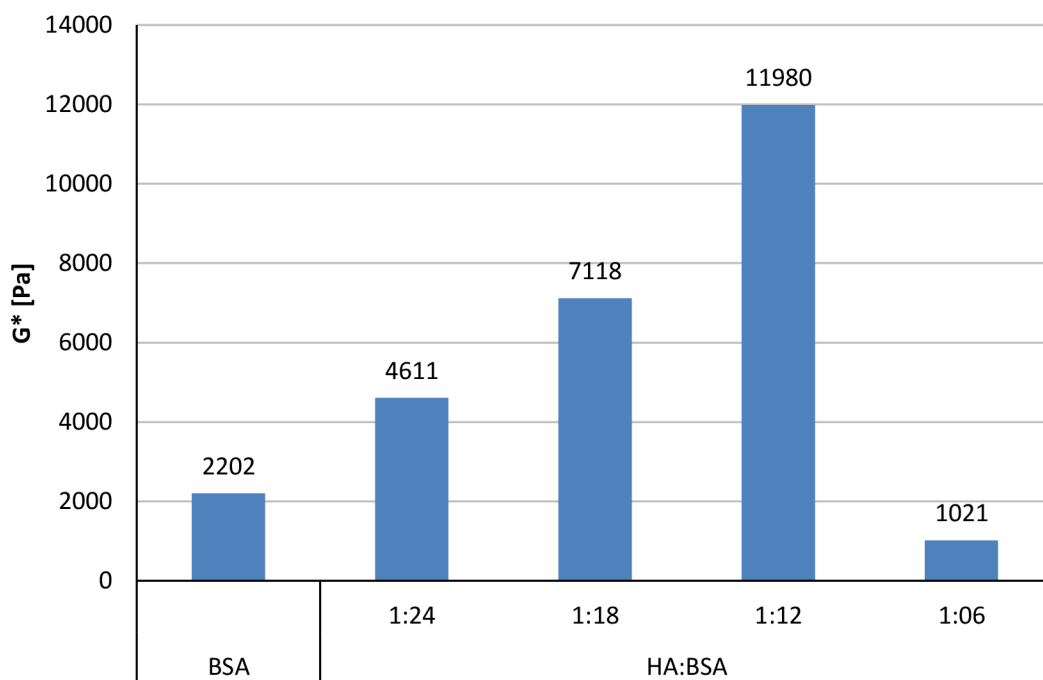
Obrázek 39 – graf závislosti smykové viskozity na teplotě pro různé koncentrované roztoky BSA ve vodě



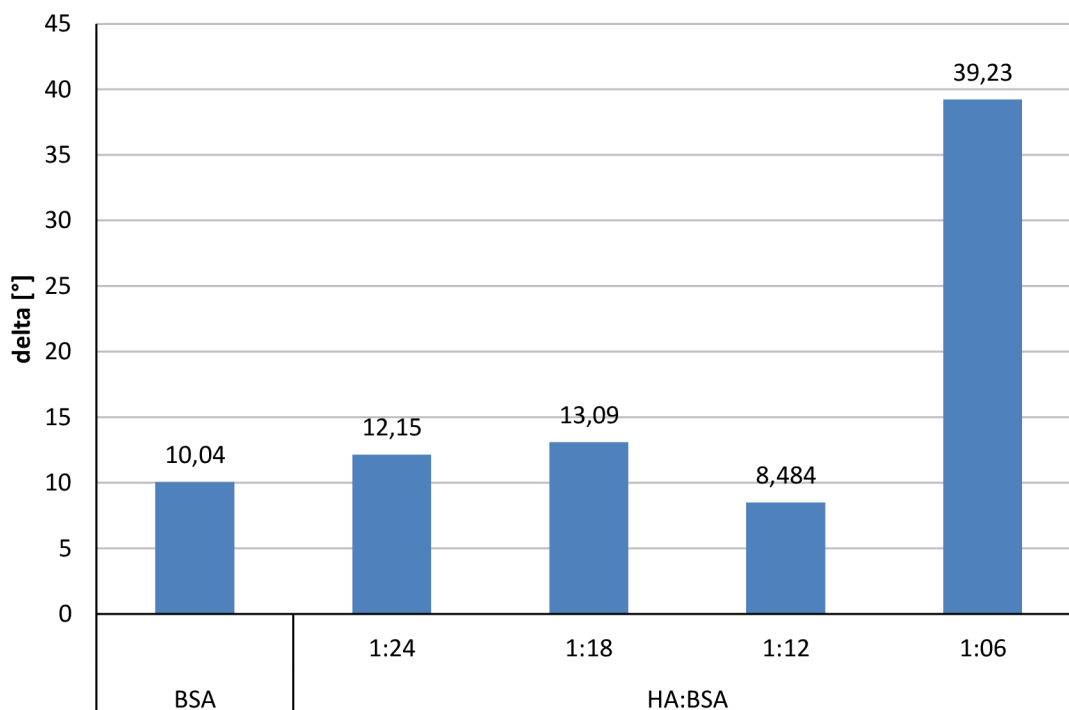
Obrázek 40 – graf závislosti smykové viskozity na teplotě pro 15% BSA při různém pH a iontové síle roztoku”



Obrázek 41 – graf závislosti smykové viskozity na teplotě pro 13% směsné vzorky HA a BSA o různém složení



Obrázek 42 – sloupcový graf zobrazující hodnoty komplexního modulu (při frekvenci $10 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$) pro 13% vzorky o různém složení



Obrázek 43 – sloupcový graf zobrazující hodnoty ztrátového úhlu (při frekvenci $10 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$) pro 13% vzorky o různém složení