

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituut

Etanooli ja glükoosi difusioon F127 dimetakrülaadi hüdrogeelis

Bakalaureusetöö (6 EAP)

Füüsika, keemia ja materjaliteadus

Iris Robyn Talgre

Juhendajad: Hans Priks, M.Sc.

Tarmo Tamm, Ph.D.

Tartu 2022

Etanooli ja glükoosi difusioon F127 dimetakrülaadi hüdrogeelis

Biotehnoloogia üheks uueks arengusuunaks on elusmaterjalid. Elusmaterjalid koosnevad elusrakkudest, mis on maatriksisse immobiliseeritud. F127 DMA on amfiifiline polümeer, mille hüdrogeeli omadused on sobivad elusmaterjali valmistamiseks. F127 DMA hüdrogeelil esineb mittelineaarne massi temperatuurisõltuvus. Käesoleva töö eesmärgiks oli karakteriseerida etanooli ja glükoosi difusiooni antud maatriksis ning kuidas omapärane temperatuurisõltuvus seda mõjutab.

Töös leiti etanooli ja glükoosi difusioonikoefitsiendid polümeriseeritud F127 DMA hüdrogeelis. Töö tulemusena selgus, et F127 DMA hüdrogeeli mittelineaarne temperatuurisõltuvus mõjutab seal toimuvat difusiooni. F127 DMA on mitmest aspektist sobiv ja paljulubav materjal elusmaterjalide maatriksiks tänu selle erilistele füüsikalis-keemilistele omadustele.

Märksõnad: Difusioonikoefitsient; Elusmaterjalid; 3D-printimine; Hüdrogeelid; Bioreaktor

CERCS: T150 Materjalitehnoloogia; T152 Komposiitmaterjalid; T390 Polümeeride tehnoloogia, biopolümeerid.

Diffusion of ethanol and glucose in F127 dimethacrylate hydrogel

The study of living materials is a new emerging trend in the biotechnology field. Living materials are composites consisting of living cells that reside within a matrix. F127 DMA is an amphiphilic polymer. The properties of F127 DMA hydrogel are suitable for use as the scaffold of a living material. The hydrogel has a nonlinear mass temperature dependence. The aim of this work was to characterize the diffusion of ethanol and glucose in the given matrix and see whether the nonlinear temperature dependence has an effect on it.

The diffusion coefficients of ethanol and glucose in the polymerized F127 DMA hydrogel were found. As a result of this work, it was found that the non-linear temperature dependence of the F127 DMA hydrogel influences the diffusion in it. F127 DMA is in many respects a suitable and promising material for the matrix of living materials due to its special physicochemical properties.

Keywords: Diffusion coefficient; Living materials; 3D-printing; Hydrogels; Bioreactor

CERCS: T150 Material technology; T152 Composite materials; T390 Polymer technology, biopolymers

Sisukord

Sissejuhatus.....	5
1. Kirjanduse ülevaade.....	7
1.1 Mikroorganismid tööstuses.....	7
1.2 Elusmaterjalid.....	8
1.3 F127 DMA polümeer.....	9
1.4 3D-printimine.....	12
1.5 Difusioon.....	12
1.5.1 Difusiooni koefitsient.....	12
1.5.2 Erinevad meetodid difusiooni koefitsiendi määramiseks.....	13
1.5.3 Valitud meetod.....	14
2. Töö eesmärk.....	15
3. Metoodika.....	16
3.1 Membraanide printimine.....	16
3.1.1 Tindi valmistamine.....	16
3.1.2 Printimine.....	16
3.2 Katseseadme kirjeldus.....	17
3.3 Meetodi väljatöötamine.....	18
3.4 Katse ettevalmistus.....	19
3.5 Katse läbiviimine.....	19
4. Tulemused ja analüüs.....	21
4.1 Difusioonikoefitsiendi arvutamine.....	21
4.2 Tulemused.....	21
Kokkuvõte.....	25
Kasutatud kirjandus.....	26

Lühendite loetelu

DMA – dimetakrülaat

PPO – polüpropüleenoksiid

PEO – polüetüleenoksiid

CAD – raalprojekteerimine (*computer aided design*)

HPLC – kõrgrõhuedelikkromatograafia (*high-performance liquid chromatography*)

Sissejuhatus

Mikrobioloogia kiire areng on võimaldanud olulisi arenguhüppeid inimkonna ajaloos, nagu antibiootikumide ja vaktsiinide kasutuselevõtt. Tänapäevaks kasutatakse mikroobe paljudes erinevates tööstusvaldkondades. Üheks oluliseks valdkonnaks, kus mikroorganisme rakendatakse, on biosüntees. Biosünteesi puhul kasutatakse ära mikroorganismi võimet toota oma elutegevuse käigus tööstuses vajalikke ühendeid. Nii on muudetud tootmisprotsesse lihtsamaks (nt enam ei pea insuliini tootma lehmade ja sigade pankreasest) või ka loodussõbralikumaks (nt bioväetised). Samas kaasnevad elusrakkude tööstuses kasutamisega omad väljakutsed. Kuna mikroorganismid paljunevad sobivates tingimustes kiiresti ja nende hulk suureneb eksponentsiaalselt, siis vajaliku sünteesi jaoks õigete tingimuste ja steriilsuse säilitamine (et vältida teiste organismide kasvu, kellele need samad tingimused hästi sobivad) on keeruline. Tulevikus võiks lahendada neid probleeme järgnevalt kirjeldatav elusmaterjal. [1]

Elusmaterjalideks nimetatakse enamasti komposiite, mis koosnevad inimloodud maatriksisse integreeritud elusrakkudest. Elusmaterjalide valmistamine, iseloomustamine ja kasutamine on interdistsiplinaarne uurimisvaldkond, mis ühendab materjaliteaduse ja bioloogia. Selliste elusmaterjalide maatriks võib olla valmistatud polümeeridest, keraamikast, metallidest või nende komposiitidest. Elusmaterjali integreeritud elusrakkudeks võivad olla nii eel- kui päristuumsed rakud. Rikkalikust komponentide valikust tulenevalt on valmistatud elusmaterjalid väga erinevad, kuid antud töös keskendutakse sellistele, mis sobivad bioreaktorites kasutamiseks. [2]

Bioreaktoris elutegevuse ootuspäraseks toimumiseks, peab elusmaterjal olema piisavalt hõre, et toitained pääseksid sisse ja jääkained välja, samas piisavalt tihe, et elusorganismid materjalist ei lahkuks. Üheks huvitavaks lahenduseks on vees punduvad hüdrofiilsetest polümeeridest koosnevad hüdrogeelid. Siiani on valdavalt bioreaktorite maatriksiks kasutatud pruunvetikatest sünteesitud kaltsiumalginaadist hüdrogeeli, mis on biosobiv ja biolagunev. Seda kasutatakse raalprojekteeritud mudeli põhjal elusmaterjalist bioreaktori 3D-printimisel. Nii on võimalik täielikult kontrollida bioreaktori suurust, struktuuri ja kuju hoides seejuures kokku materjalikuludelt. Laialdaselt kasutataval alginaadi biotindil on puuduseks madal viskoossus, mistõttu on seda keeruline 3D-printida. Lisaks on sellest printitud

kaltsiumalginaadi hüdrogeeli mehaanilised omadused ebasobivad bioreaktori valmistamiseks ja see kipub lagunema. [3, 4]

Käesolevas töös uuritakse orgaaniliste molekulide difusiooni kaltsiumalginaadi alternatiivi – amfiifilse F127 dimetakrülaadi – baasil loodud hüdrogeelis. F127 DMA on kolme-plokiline kopolümeer, mille koostis on polü(etüleenoksiid)-plokk-polü(propüleenoksiid)-plokk-polü(etüleenoksiid). Vees moodustab F127 DMA geelistumistemperatuuri juures mitsellid, nii on võimalik sellest teha laia varieeruvusega – 25-40 massiprotsendilise polümeeri sisaldusega hüdrogeele. [5] Sellistel kolloidlahustel toimub ligikaudu 16°C juures geelistumine, madalamal temperatuuril on need vedelad. Lisaks on need hüdrogeelid nihke-vedelduvad ja nihkejõu eemaldumisel tarduvad. [6] See võimaldab lihtsat elusrakkude ja fotoinitsiaatori sisestust allpool geelistumistemperatuuri ja mugavat printimist toatemperatuuril. [5] Pärast printimist dimetakrülaadi rühmad polümeriseeritakse UV-kiirguse abil ja fikseeritakse sel teel bioreaktor.

Varasemates uuringutes on näidatud F127 DMA sobivust bioreaktori maatriksiks. [6] Edasistes uuringutes on aga oluline teada, kuidas toimib toit- ja jääkainete difusioon selles materjalis. Käesolevas töös uuritakse F127 DMAst tehtud hüdrogeelides etanooli ja glükoosi difusiooni kuuel erineval temperatuuril, et näha kas materjali struktuuri ja omaduste temperatuurisõltuvus mõjutab uuritavate ainete difusiooni materjalis.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Mikroorganismid tööstuses

Mikroobid on mikroskoopilise suurusega organismid, mis võivad eksisteerida nii üksiku rakuna kui ka kolooniatena. Mikroorganismide alla kuuluvad bakterid, arhed, mikroseed (hallitusseed) ja algloomad/protistid. viide

Inimesed on mikroorganisme enda tarbeks kasutanud aastatuhandeid, veel enne kui mikroobid 17. sajandil avastati [7]. Erineva toidu hapendamise tegeleti juba 7000 eKr. Suuremahulist veini tootmist alustati 5000 eKr. Tehnoloogiline mikrobioloogia sai alguse aga esimesest maailmasõjast, kui oli vaja suuri koguseid glütserooli lõhkeainete tootmiseks. Seda tehti sellel ajal pärmiga. Hoogu andis juurde teine maailmasõda, mil avastati ja hakati suuremahuliselt tootma penitsilliini, esimest antibiootikumi, mida saadi samanimelisest hallitusest. [1, 8] Täna kasutatakse mikroorganisme pea igas valdkonnas, mõneks näiteks on:

1. toidutööstuses – erinev käärivamine [9] ;
2. mahepõllunduses – kahjuritõrje [10], väetise [11], silo tootmine;
3. keskkonnakaitstes – heitvee puhastamine ja reostuse likvideerimine [12];
4. meditsiinis – haiguste diagnoosimine, ravimite valmistamine [9];
5. tekstiilitööstuses – värvainete ja kunstnaha tootmine [13];
6. metallitööstuses – maagi puhastamine [14];
7. keemiatööstuses – rasvade, valkude, suhkrute ja ensüümide sünteesimine [9].

Biotehnoloogia on kiirelt kasvav tehnoloogiavaldkond. Samas ei ole valdkonna arendamine lihtne, sest kasutatavatele mikroorganismidele on vaja luua eluks, paljunemiseks ning nende elutegevuse tulemusena tekkivate saaduste sünteesiks optimaalsed tingimused. Viimased vajavad aga palju täpsemat reguleerimist võrreldes tavaliste keemiliste tootmisprotsessidega. Et saada reprodutseeritavaid tulemusi, vajavad elusorganismid väga hästi kontrollitud tingimusi. [15],[16]

Mikroobide puhaskultuuride kasutamine tööstuses nõuab ranget steriilsuse kontrolli nii protsessi vältel kui iga tootmistsükli lõpus, mil produkt mikroobidest puhastatakse ja uut tsükli alustatakse. Kuna mikroobid ümbritsevad meid igal pool, ohustab protsessi alati saastumine konkureerivate mikroobidega. Sellist probleemi võiks aidata vältida elusmaterjalid, kus

elusrakud on immobiliseeritud polümeermaatriksisse, millesse teised mikroobid ei pääse tagades nii funktsionaalsete elusrakkude kultuuri puhtuse.

1.2 Elusmaterjalid

Elusmaterjalideks nimetatakse komposiitmaterjale, mis koosnevad maatriksisse seotud elusrakkudest [2]. Selliste materjalide oluline tunnus on, et nende funktsionaalsus tuleneb rakkudest.

Elusmaterjale on võimalik luua nii eeltuomsete kui päristuumsete rakkudega. Enim on uuritud eeltuomsete rakkudega elusmaterjale. Bakteriaalsete komposiitide uuringud moodustavad 50% ja rahedega vaid 3,2%. Päristuumsete rakkudega elusmaterjalide uuringud, mis keskenduvad peamiselt koetehnoloogiale ja pehmele robotikale, moodustavad 30,9%. 4,3% uuringutest on sünteetiliste rakkudega elusmaterjalide kohta ja 11,7% kirjutavad domeenidevahelistest elusmaterjalidest, kus päristuumset rakud ja bakterid elavad sümbioosis. [2] Üheks tuntud elusmaterjaliks on probiootikumide toidulisandid, kus mikroobid võivad olla kapseldatud polüsahhariididesse, lipiididesse või polümeeride komposiitidesse [17]. Antud töös uuritakse polümeeri, mida on kasutatud eelkõige mikroorganismidega elusmaterjalide loomiseks.

Elusmaterjale arendatakse täna sellistes valdkondades nagu biotehnoloogia, biotootmine, koetehnoloogia, targad pinnad ja struktuurid, biorobotika ja energia tootmine [2]. Käesolevas töös keskendutakse biotootmisele.

Märkimisväärset eelist elusmaterjalide karkassina pakuvad eelkõige hüdrogeelid. Hüdrogeel on hüdrofiilsetest polümeeriahelatest moodustunud kolmemõõtmeline võrgustik, mis on sidunud suure hulga vett pundmise käigus [18]. Polümeerne struktuur imab endasse vett ja moodustab paisunud geeli, mis ristseotud süsteemide puhul enam ei lahustu [19]. Neis loodav rakuline keskkond sarnaneb enim looduslikule biokilele [6]. Rakkudega täidetud hüdrogeele on valmistatud nii pärmi, bakterite kui vetikatega, et luua metaboolselt aktiivseid konstruktsioone toiduainete, biokütuste, keemiliste ühendite ja ravimite tootmiseks. Sellised immobiliseeritud rakkudega bioreaktorid pakuvad mitmeid eeliseid nagu lihtsus produkti eraldamisel, reaktori seisakuaja lühendamise ja suurenenud tootlikus. [6]

Elusrakkudega komposiitide loomiseks kasutatavale materjalile on mitmeid erilisi nõudeid. Materjal ei tohi olla rakkudele toksiline, samas ei tohi olla neile ka söödav. Lisaks peab kasutatav materjal olema piisavalt tihe, et hoida rakke sees, samas võimaldama seal neile

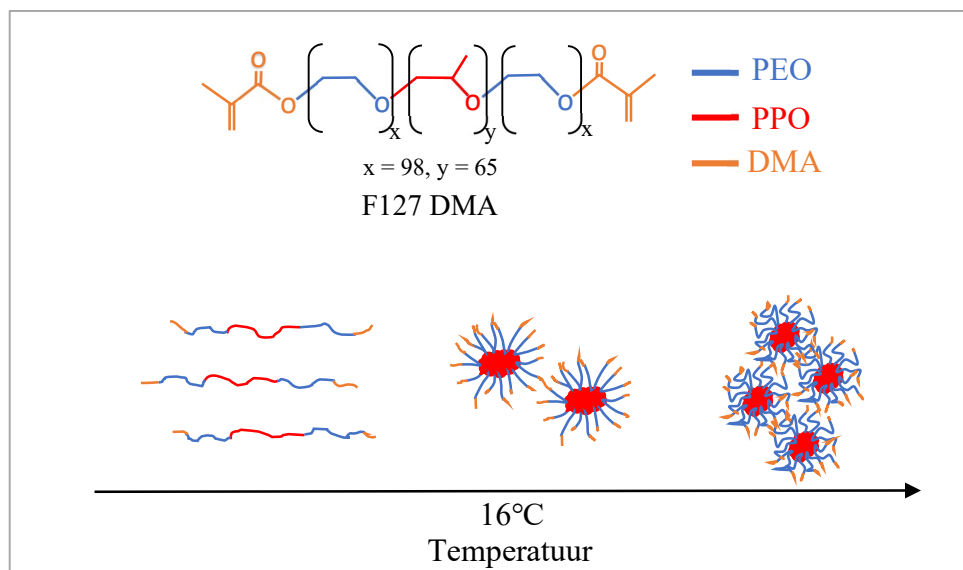
piisavalt ruumi, et paljuneda ning laskma läbi ka substraadi ja produkti. Oluline on ka, et materjal oleks piisavalt elastne ja tugev, et elusrakkude kolooniad saaksid kasvada ning materjal selle käigus ei laguneks.

Kaltsiumalginaadi hüdrogeel on üks kõige sagedamini kasutatavatest materjalidest mikroobide kapseldamiseks. See on aga iooniliselt ristseotud ja seetõttu laguneb aja jooksul, kui kaltsiumiioonide kontsentratsiooni lahuses pidevalt ei täiendata. [6] Lisaks pärsib kaltsiumalginaadi iooniline struktuur ionide difusiooni materjalis. Perspektiivikas alternatiiv kaltsiumalginaadile on F127 DMA polümeer, mis on kovalentselt ristseotud ja mitte-iooniline. [20]

Nii kaltsiumalginaadi kui F127 hüdrogeelid võimaldavad luua elusrakkudega biotinti, millest saab kihtlisamiseetodil ehk 3D-printides valmistada keeruka struktuuriga bioreaktoreid.

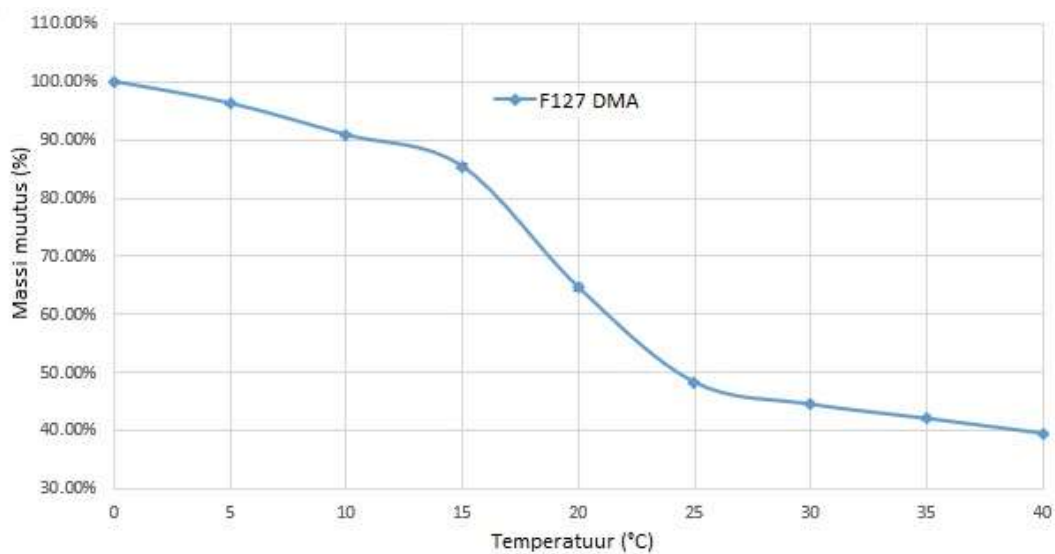
1.3 F127 DMA polümeer

F127 dimetakrülaat on plokk-kopolümeer, millel on PEO-PPO-PEO triplokk-struktuur. PEO plokid on hüdrofiilsed, samas kui keskne PPO plokk on hüdrofoobne. Sellise amfiifilsuse tõttu agregeeruvad F127 DMA ahelad vesilahustes kriitilise temperatuuri ja kontsentratsiooni juures, moodustades hüdrofoobsete PPO tuumadega sfäärilisi mitselle, mida ümbritsevad hüdrofiilsed PEO ahelate osad. [20]



Joonis 1. F127 DMA temperatuurisõltuvus

Mitsellide moodustumisest tulenevalt geelistub F127 DMA vesilahus ~ 16°C juures. Geelistumisprotsess on pöörduv, kui polümeeriahelaid ei ristseota ja jahutades alla 16°C mitsellid lagunevad. 3D-prinditavate elusmaterjalide maatriksi jaoks on selline temperatuurisõltuvus sobivaim. Vedel faas võimaldab biotindi valmistamiseks rakke lihtsalt sisse segada. Geelistumine aitab vältida rakkude väljasadenemist toatemperatuuril ja võimaldab mugavat 3D-printimist. Biotinti lisatakse ka fotoinitsiaatorit, mille abil objekt vahetult peale printimist UV-kiirguse abil ristseotakse. Ristsidumiseks kasutatakse madalaenergilist UV-A kiirgust lühikese aja vältel, mis rakke ei kahjusta.



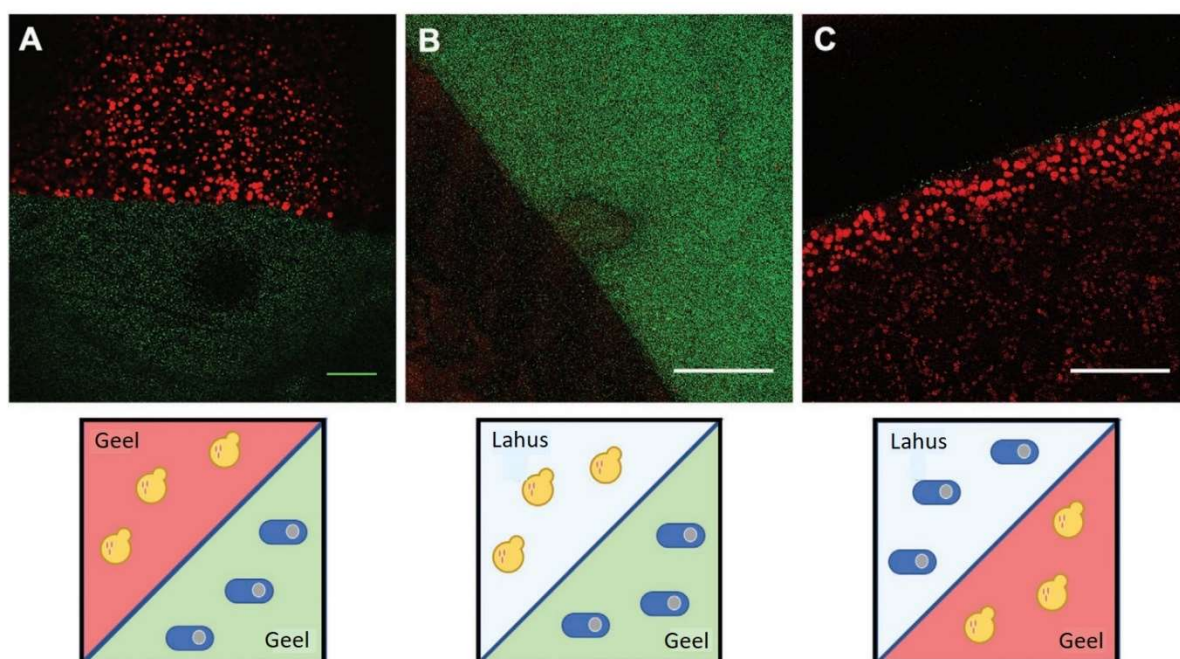
Joonis 2. F-127 DMA hüdrogeeli massi temperatuurisõltuvus – TÜ IMS labor, publitseerimata andmed.

Joonisel 2 on näha F127 DMA vesilahusega tasakaalustunud hüdrogeeli massi sõltuvus temperatuurist. Hüdrogeel tekib lahustunud polümeerist mitsellaarse võrkstruktuuri moodustumisel. Kui võtta 0°C juures mõõdetud ristseotud geeli mass algseks massiks, on toatemperatuuril näha massikadu poole võrra. Temperatuuri tõustes sellise võrkstruktuuri pundumise määr kahaneb, ehk osa vett surutakse välja. Kui üldiselt võib näha 10 protsendilist massikadu iga 10°C kohta, siis 15°C ja 25°C vahel ilmneb iseäralik hüpe, ligi 40 protsendilise kaoga. Seetõttu on töös valitud uuritavateks temperatuurideks 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C ning 37°C. Viimane temperatuur valiti, kuna see on mikrobioloogias üks laialdaselt kasutatav temperatuur.

Prinditud bioreaktor muutub temperatuuri tõustes pundumise määra vähenemise tõttu tihedamaks. Jahutades bioreaktor pundub taas. Võimalik, et temperatuuri tõustes on difusioon pärsitud tulenevalt tiheduse suurenemisest. Bioreaktoril võiks sellisel juhul olla optimaalne

töötemperatuuri vahemik, mis võtab arvesse nii ainete difusiooni kui ka mikroorganismi elutegevuseks sobivat temperatuuri vahemikku.

Varasemalt on näidatud, et F127 polümeeris kõrvuti prinditud kultuurid üksteise elualale ei tungi ja ka ümbritsevad mikroobid materjali sisse ei lähe. [5] Materjali seest murravad mikroobid siiski aja jooksul välja [5], kuid see ei pruugi enamuste rakenduste jaoks probleemiks olla, kuna materjalis olev kultuur on ikka saastumata ja seda on võimalik uuesti kasutada. Siiski on see potentsiaalne koht materjali täiustamiseks.



Joonis 3. 7 päeva koos elanud roheliselt fluorestseeruv pärm ja punaselt fluorestseeruv bakter. Pildid tehtud 100 μm sügavusest ristlõikest konfokaalse mikroskoobiga. A – Pärm ja bakter hüdrogeelis. B – Bakter hüdrogeelis pärmisuspensioonis. C - Pärm hüdrogeelis bakterisuspensioonis. Skaalarivad 100 μm . [5]

Lisaks sobivatele füüsikalise-keemilistele omadustele, ei ole F127 rakkudele toksiline. F127 DMA bioreaktoris pärmirakkudega on kääritatud õlut, mille käigus nähti suuremat etanooli tootlikkust kui suspensioonis. [21] Rakkude toitaineteks olid erinevad suhkrud ja produktiks etanool. Suurem etanooli sisaldus võib tuleneda rakkude immobiliseeritusest tingitud kasvupiirangust, tänu millele rakkude energia koondub paljunemise asemel produktide tootmisele. [21] Saavutatav tootlikkus sõltub aga lähteainete kättesaadavusest ja produktide eemaldamisest, mistõttu on oluline teada nende difusiooni antud materjalis.

1.4 3D-printimine

3D-printimine ehk kihtlisamismeetod on protsess, mille käigus valmistatakse raalprojekteeritud (*computer-aided design* - CAD) mudelist kolmemõõtmelisi objekte.

3D-prinditud objekti loomine saavutatakse kihtlisamisprotsessi abil. Lisamisprotsessi käigus luuakse objekt järjestikuste materjalikihtide ladumisega. Kõiki neid kihte võib vaadelda objekti õhukeselt viilutatud ristlõikenähtena.

Materjali lisav tootmine on vastand materjali lahutavale tootmisele, mis seisneb metalli- või plastitüki väljalõikamises/õõnestamises näiteks freesiga. Selliste rakenduste asendamine 3D-printimisega aitab oluliselt kokku hoida materjalikuludelt.

Lisaks on 3D-printimisega võimalik lihtsalt luua keerukaid struktuure ning viia sisse disainimuudatusi. Samas võrreldes survevalutootmisega on 3D-printimine aeglane, sest võimaldab valmistada vaid ühte objekti korraga, kusjuures prinditud kihid peavad tahenema enne järgmise lisamist tehes 3D-printimise ka tehniliselt keerukamaks.

Kuigi survevalutootmisel on objekt ka üldiselt tugevam ja siledama pinnaga tänu materjali ühtlasele jaotumisele vormi, mis eemaldab võimalikud lõhed või muud nõrgad kohad, on 3D-printimisel võimalik objekti tugevdada eriliste sisestruktuuridega. Lisaks on 3D-printimisel võrreldes survevalutootmisega oluliselt madalamad seadmete ja tarvikute seonduvad kulud.

Niisiis kuigi survevalutootmine on masstoodangu jaoks efektiivsem, on 3D-printimine toote disaini arendustöös ning unikaalsete objektide valmistamisel asendamatu. Täna leiavad 3D-printimise tehnoloogiad laia kasutust sellistes valdkondades nagu elektroonika, autotööstus, modulaarne disain, toiduainetööstus, kunst, meditsiin ja biotehnoloogia.

Elusmaterjalidest bioreaktorite tootmiseks eelistatakse 3D-printimist, sest lisaks mugavusele võimaldab 3D-printimine luua väikseid bioreaktoreid suure eripinnaga.

1.5 Difusioon

1.5.1 Difusiooni koefitsient

Difusioon on soojusliikumisest tulenev loomulikult kulgev protsess, mille käigus osakesed liiguvad kõrgema kontsentratsiooniga alalt madalama kontsentratsiooniga alale. Liikumine toimub vastavalt teisele termodünaamika seadusele entroopia kasvu suunas ja on seega pöördumatu protsess.

Molekulaarne difusioon on võtmeptsessiks paljudes looduslikes ja tehnilistes süsteemides. Sageli on see reaktsioonikiirust piirav tegur bioloogilistes või keemilistes reaktsioonides. Üldjuhul on see ülim mehhanism, mille abil ainete kontsentratsioon ühtlustub ja seega toimub nende segunemine ja lahjenemine. [22]

Ainete omadifusioon on mikroskoopiline protsess, mille korral toimub osakeste spontaanne segunemine molekulide Browni liikumise tõttu. See toimub ka kontsentratsiooni (või keemilise potentsiaali) gradiendi puudumisel.

Keemiline difusioon on makroskoopiline protsess, mille korral toimub lähteainete segunemine ehk ühe aine molekulide tungimine teise aine molekulide vahele. Protsess on alati mittetasakaaluline ning liigub kogu süsteemi entroopia kasvu ja kontsentratsioonide ühtlustumise suunas.

Sellist protsessi kirjeldab Ficki esimene seadus, mis ütleb, et difusioonis osalevate osakeste voog läbi pinnauhiku on võrdeline kontsentratsiooni gradiendiga:

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x}, \quad (1)$$

kus konstant D on difusiooni koefitsient, J – difusiooni voog, $\frac{\partial c}{\partial x}$ – kontsentratsiooni gradient ja miinusmärk viitab massi liikumisele kõrgema kontsentratsiooniga aladelt madalama kontsentratsiooniga alale. [22]

Et kirjeldada aine difusiooni, segunemist ja reaktsioone on oluline teada selle aine difusiooni koefitsienti vastavatel tingimustel.

1.5.2 Erinevad meetodid difusiooni koefitsiendi määramiseks

Difusiooni koefitsiendi leidmiseks ei ole ühest väljakujunenud ja universaalselt rakendatavat meetodit. Erinevaid eksperimentaalseid meetodeid klassifitseeritakse otsesteks ja kaudseteks.

Kaudsed meetodid mõõdavad süsteemi difusiooni voost sõltuvat parameetrit. Selleks võib olla näiteks lahuse mahu muutumine ajas, gaasi-vedeliku piirpinna liikumine, rõhulanguse kiirus suletud kambris, gaasi sissevoolu kiirus konstantse rõhu ja lahuse mahuga kambrisse, analüüs kompuutertomograafia abil. Kaudsete meetodite eeliseks on, et nende korral ei ole vaja määrata koostise muutust. [23]

Otseste meetodite puhul mõõdetakse difundeeruva aine kontsentratsiooni muutust sisenemise sügavuse funktsioonina. Sellised meetodid on üldiselt usaldusväärsemad ja kasutavad

erinevaid füüsikalis-keemilisi meetodeid nagu spektrofotomeetria, massispektroskoopia või radioaktiivne märgistus. Otseste meetodite puhul analüüsitakse koostise muutust ajas. Puudusteks on aja- ja ressursikulu ning enamasti eeldavad regulaarset proovide välja võtmist. Üheks levinumaks otseseks meetodiks on diafragma raku meetod, mille mudelit kasutati ka antud töös. [23]

1.5.3 Valitud meetod

Diafragma raku meetod kasutab ära Fick'i esimest seadust, et hinnata difusioonikoefitsiente vedelikke sisaldavas süsteemis. Selline süsteem koosneb kahest kambrist, mis on eraldatud poorse diafragma. Eksperimendi alguses on kambrites erinevad uuritava aine kontsentratsioonid, et toimuks difusioon läbi diafragma. Mõõdetakse uuritavate ainete kontsentratsioonimuutu ajas. Meetod valiti, sest on otse ülevõetav hüdrogeelist membraanis toimuva difusiooni mõõtmiseks.

2. Töö eesmärk

Töö eesmärgiks on määrata etanooli ja glükoosi difusioonikoefitsiendid F127 DMA hüdrogeelis erinevatel temperatuuridel.

Uurimisküsimused:

- 1) Milline on etanooli ja glükoosi difusioon F127 DMA hüdrogeelis?
- 2) Kuidas sõltub etanooli ja glükoosi difusioon temperatuurist, arvestades, et F127 DMA hüdrogeeli tihedus ja struktuur sõltuvad temperatuurist mittelineaarselt?

3. Metoodika

3.1 Membraanide printimine

3.1.1 Tindi valmistamine

30% F-127 DMA hüdrogeeli valmistamiseks kaaluti kõigepealt 3 grammi polümeeri 10 milliliitrisesse klaasviaali. Seejärel täideti viaal umbes 7 ml fosfaatpuhvri lahusega, nii, et kaalunäit oleks 10 g. Enne viaali sulgemist lisati sinna etanooliga steriliseeritud ja MilliQ veega puhastatud magnetsegaja pulk. Valguse eest kaitsmiseks mähiti viaal alumiiniumfooliumisse. Seejärel pandi lahus jäävanni segunema.

Kui polümeer oli lahustunud lisati fotoinitsiaatorit 2-hüdroksü-2-metüülpropiofenoon (>97%, Sigma-Aldrich) 2µl/g ehk 20 µl. Segamist viidi läbi veel 0,5 tunni jooksul.

Tindi valmimisel valati see printimissüstlasse.

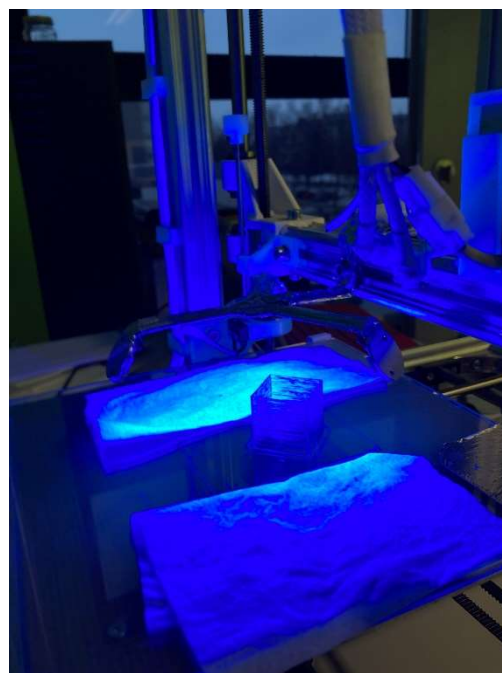
3.1.2 Printimine

Printimisele eelnevalt steriliseeriti printeri tööpind 70% etanooliga ja puhastati MilliQ veega. Prooviprintimisel tehti kindlaks vajalik printimise kiirus ja süstlale avaldatav rõhk, et saavutada piisav membraani paksus.

Arvutipõhised disainimudelid valmistati programmiga SolidWorks, printerit juhiti programmiga Repetier-Host (Hot-World, Saksamaa) ja G-kood genereeriti 3D-printimise tööriista Slic3r abil. Mudeli mõõtmed olid 20 × 20 × 20 mm (X, Y, Z), viilutatud ühe välisperimeetriga ja trükkimine viidi läbi vaasirežiimis printimiskiirusega 20 mm/s. Vahetult pärast printimist UV-ristseoti hüdrogeel 60 sekundi vältel nelja valgusdioodiga (CUN66A1B, Seoul Viosys, Korea Vabariik), mis kiirgasid lainepikkusel 365–367 nm.



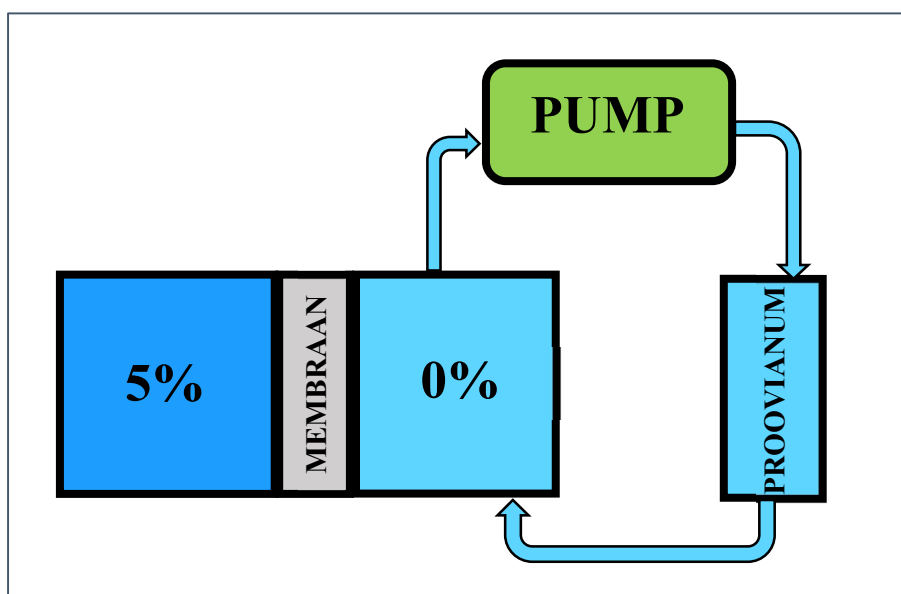
Pilt 1 Membraanide 3D-printimine



Pilt 2 Membraanide UV-kõvendamine

3.2 Katseseadme kirjeldus

Katseseade oli üles ehitatud diafragma raku meetodi nõutele vastavalt. Etanooli ja glükoosi difusioonikoefitsiendi leidmiseks F127 DMA membraanis oli ühel pool membraani kontsentreeritud etanooli ja glükoosi lahus, teisel pool null-lahus. Null-lahuse stabiilne ringlus tagati peristaltilise pumba abil. Etanooli ja glükoosi kontsentratsiooni muutust null-lahuses tuvastati regulaarselt võetavate kontrollproovide abil.

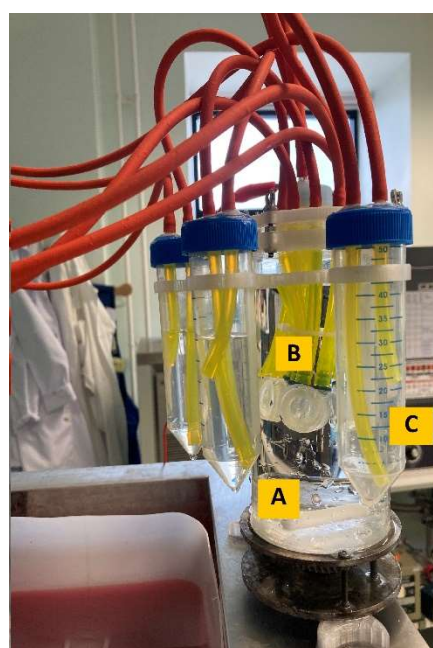


Joonis 4 Põhimõtteline skeem katseseadme ehitusest

Katseseade koosnes suurest reaktorist, väikestest või minireaktoritest, voolikutest, tsentrifuugitopsidest, peristaltilisest pumbast, krüostaadist, magnetsegajast ja toiteallikast. Minireaktoril oli aken, millele pandi ette uuritav membraan. Nii moodustasid minireaktorid voolikutest tsentrifuugitopsidega kinnise süsteemi, mille ainsus ava oli membraaniga kaetud. Membraaniga minireaktorid olid asetatud suurde reaktorisse, mis oli täidetud kontsentreeritud lahusega. Tsentrifuugitopsides oli null-lahus. Peristaltiline pump pumpas vedelikku minivoolikute ja tsentrifuugitopsidega vooluringis kiirusega 10 ml/min. Magnetsegaja segas suures reaktoris lahust. Suur reaktor ja tsentrifuugitopsid asetsesid krüostaadis veevannis. Etteantud temperatuuri hoidmiseks kasutati krüostaati LAUDA Proline1845.



Pilt 1 Katseseade töös. A – voolikute abil katseseadmega ühendatud peristaltiline pump, B – magnetsegaja toiteallikas, C – katseseade veevanniga krüostaadis



Pilt 2 Katseseade töös. A – suur reaktor kontsentreeritud lahusega. B – minireaktorid hüdrogeeli membraaniga, C – proovianumad null-lahusega.

3.3 Meetodi väljatöötamine

Kontsentreeritud lahuse ja proovilahuse homogeensuse tagamiseks tehti erinevaid kontrollkatseid. Veega täidetud kontsentreeritud lahuse anumasse lisati paar tilka metüülisinit samal ajal magnetsegajaga segades. Katse näitas, et sekundite jooksul ühtlustus metüülisinisest tingitud värvus kogu lahuse ruumala ulatuses. Proovilahuse anumate uurimiseks jäeti minireaktor ilma membraanita ning käivitati pump. Katse jooksul selgus, et proovianuma sisse-

ja väljavoolu voolikud tuli vahetada nii, et lühem voolik oleks kasutusel sissevoolu ja pikem väljavoolu jaoks. Vastupidisel ühendusel oli näha selget gradienti lahuses.

3.4 Katse ettevalmistus

Päev enne katset katseseade steriliseeriti 70% etanooliga laminaarkapis. Suure reaktori sisemust, katseseadme hoidmiseks kasutatud anumad ja selle kaant kiiritati 3 minutit UV-C-kiirgusega, seejärel pandi seade kokku, asetati anumasse ja kaeti kaanega. Katseseadme täitmine lahustega ja membraanide ettepanek minireaktorite akendele toimus desinfitseeritud pinnal piirituslambi all.

Lahuste valmistamiseks kasutati 10x fosfaatpuhvrit, 37% formaldehüüdi (Carl Roth, $\geq 37\%$), 96% etanooli ja veevaba glükoosi (Sigma-Aldrich, $\geq 99.5\%$). Lahustesse lisati formaldehüüdi, et peatada elusorganismide kasvu, mis võiksid proovitulemusi mõjutada. Kontsentreeritud lahuse (PBS, 5% EtOH, 5% glükoos, 0,5% formaldehüüd) jaoks mõõdeti liitrisesse autoklaavitud pudelisse 100 ml fosfaatpuhvri kontsentrati, 50 g glükoosi, 63,5 ml etanooli, 13,5 ml formaldehüüdi ning täideti MilliQ Biopak veega. Null-lahuse (PBS, 0,5% formaldehüüd) puhul glükoosi ja etanooli ei lisatud. Valmistatud lahused filtreeriti täiendavalt 500 milliliitri, 0,22 μm poorisuuruse pudelipealse filtri ja vaakumpumba abil autoklaavitud pudelisse ja suleti piirituslambi all.

Membraanid viidi eelnevalt uuritava temperatuuri juurde ja seejärel mõõdeti nende paksus.

3.5 Katse läbiviimine

Peale katseseadme kokkupanekut asetati see vesivannis eelnevalt vajalikule temperatuurile viidud krüostaati ning ühendati peristaltilise pumbaga ja käivitati vooluallika abil magnetsegaja. Esimene proov võeti 10 minutit pärast pumba tööle panekut, et steriliseerimisest jäänud võimalikud etanooli jäägid oleksid voolikutest läbi pestud. Seda proovi kasutati null-nivoo määramiseks. Katse kestis 5 tundi, iga tunni järel võeti 1 ml proov uuritava materjali proovianumast. Kontsentreeritud lahuse anumast võeti proov katse alguses ja lõpus.

Peale katset loputati kogu süsteem MilliQ veega.

Automaatpipetiga võeti 1 ml proovi, mis filtreeriti 0,2 μm filtriga puhtasse eppendorfi. Kontsentreeritud lahuse anumast võeti proove süstlaga. Proove säilitati enne mõõtmisesse viimist sügavkülmikus (-18°C).

HPLC mõõtmine teostati tehniku Christina Mürgi poolt Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudi GasFermTEC laboris Shimadzu Prominence-i LC-2030C Plus 3D masinaga, 00H-0130-K0 kolonniga. Selleks valmistasin proovid ette sulatades, tsentrifuugides ja pipeteerides vajalikesse viaalidesse, kusjuures kontsentreeritud proove lahjendasin 2 korda MilliQ veega tulenevalt HPLC kalibreerimisgraafiku piiridest (0,039 – 20,000 g/L).

Peamiseks probleemiks katse läbiviimisel kujunes lekkimine. Lekkimist tuvastati kas tänu nähtavale puhta lahuse joale suures reaktoris või proovianumas oleva lahuse ruumala järgi. Lekkimise korral vähenes proovianumas oleva lahuse ruumala oluliselt rohkem kui võetud proovide võrra. Usaldusväärsete tulemuste saamiseks korrati lekete korral katset.

4. Tulemused ja analüüs

4.1 Difusioonikoefitsiendi arvutamine

Difusioonikoefitsiendid arvutati Fick'i esimese seaduse järgi, mis ütleb, et difusioonis osalevate osakeste voog läbi pinnaühiku on võrdeline kontsentratsiooni gradiendiga.

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad (1)$$

Valemist [1] avaldati difusioonikoefitsient:

$$D = -J \frac{\partial x}{\partial c}, \quad (2)$$

kus x – teepikkus, ehk membraani paksus, c – lahuste kontsentratsioonide vahe.

Osakeste voog läbi pinnaühiku arvutati vastavalt katses saadud andmete järgi:

$$J = \frac{dQ}{A \cdot dt}, \quad (3)$$

kus dQ - membraani läbinud ainehulk, A – membraani avatud pindala, dt – vaadeldav ajahulk.

4.2 Tulemused

Tehtud kuuteistkümnest katses saadi vähemalt kümme tulemust iga temperatuuri kohta.

Siin on toodud saadud tulemuste aritmeetilised keskmised.

Tabel 1 Etanooli difusioonikoefitsiendid eritemperatuuridel F127 DMA hüdrogeelis

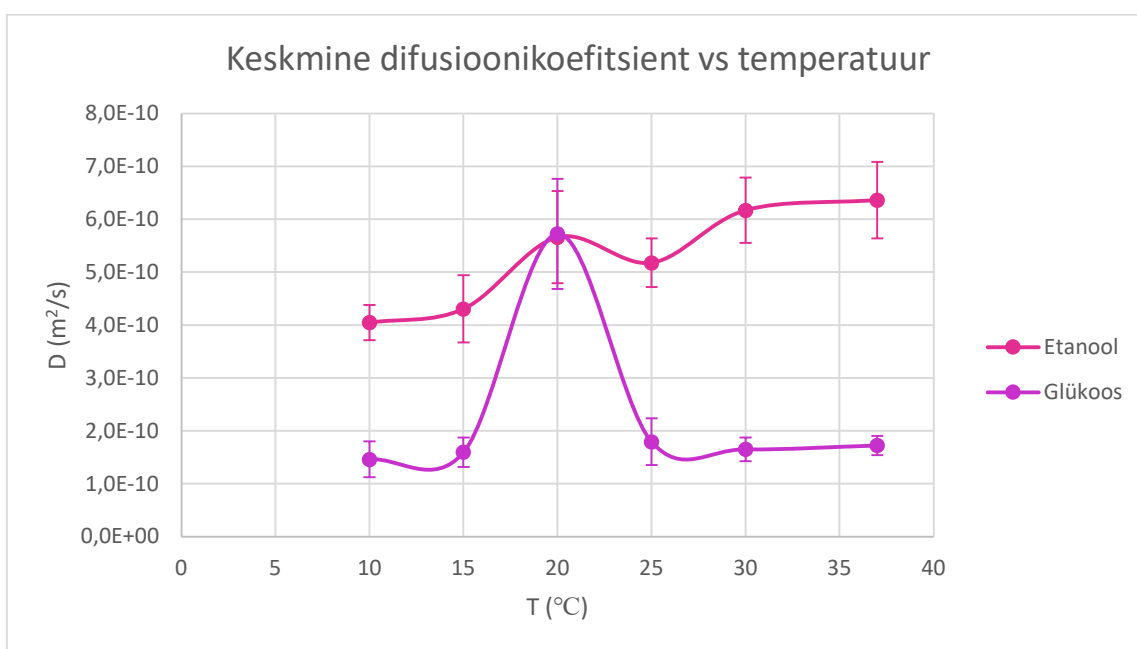
ETANOOL

T (°C)	Difusioonikoefitsient (m ² /s)	Standardhälve
10	4,0*10 ⁻¹⁰	3*10 ⁻¹¹
15	4,3*10 ⁻¹⁰	6*10 ⁻¹¹
20	5,7*10 ⁻¹⁰	9*10 ⁻¹¹
25	5,2*10 ⁻¹⁰	5*10 ⁻¹¹
30	6,2*10 ⁻¹⁰	6*10 ⁻¹¹
37	6,4*10 ⁻¹⁰	7*10 ⁻¹¹

Tabel 2 Glükoosi difusioonikoefitsiendid eritemperatuuridel F127 DMA hüdrogeelis

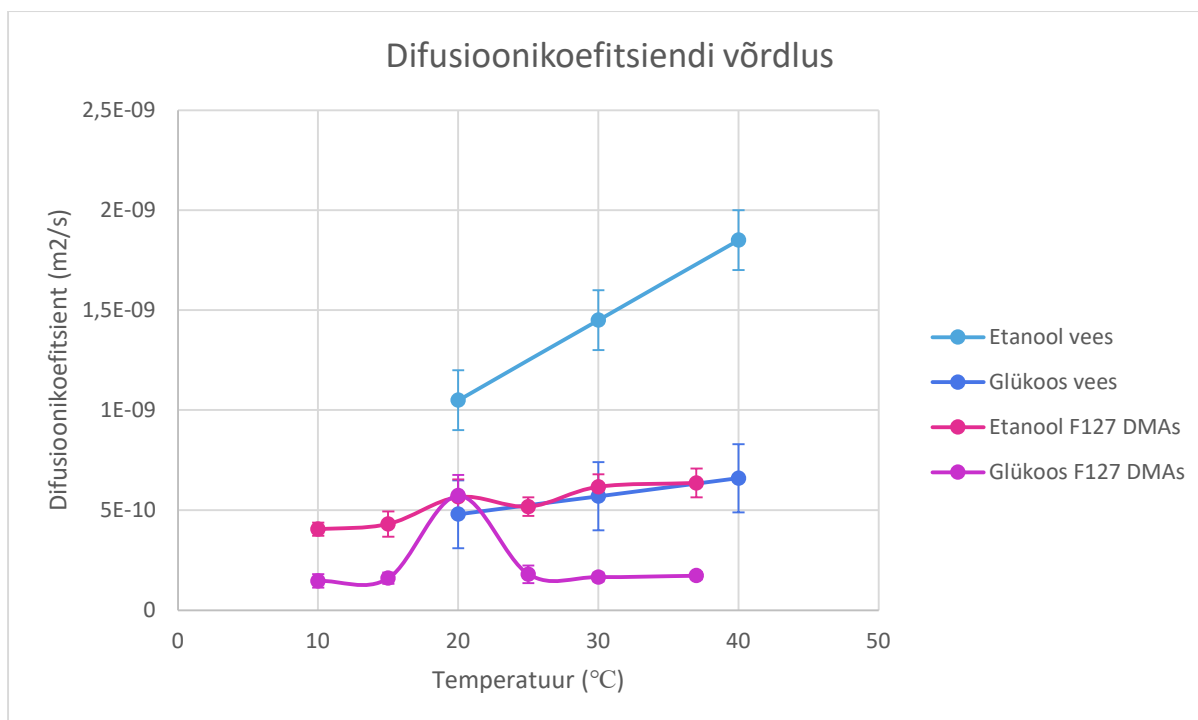
GLÜKOOS

T (°C)	Difusioonikoefitsient (m ² /s)	Standardhälve
10	1,5*10 ⁻¹⁰	3*10 ⁻¹¹
15	1,6*10 ⁻¹⁰	3*10 ⁻¹¹
20	5,7*10 ⁻¹⁰	1*10 ⁻¹⁰
25	1,8*10 ⁻¹⁰	4*10 ⁻¹¹
30	1,7*10 ⁻¹⁰	2*10 ⁻¹¹
37	1,7*10 ⁻¹⁰	2*10 ⁻¹¹



Joonis 5 Etanooli ja glükoosi aritmeetiliste keskmiste difusioonikoefitsientide F127 DMAs sõltuvus temperatuurist

Joonis 5 on näha difusioonikoefitsientide hüpet 20°C juures. Varasemalt välja toodud Joonis 2 võis 20°C juures näha hüppelist massikadu. Kuigi etanooli difusioon on kasvavas trendis ka kõrgemal temperatuuril kui 20°C, siis glükoosi difusioon on selgelt pärssitud. Potentsiaalne selgitus võiks olla molekulide erinev suurus ($M_{\text{etanool}} = 46,069$ g/mol, $M_{\text{glükoos}} = 180,156$ g/mol).



Joonis 6 Difusioonikoefitsientide võrdlus F127 DMA hüdrogeelis ja vees [24]

Joonis 6 on näha leitud difusioonikoefitsiendid F127 DMAs võrdluses kirjanduses toodud difusioonikoefitsientidega vees. Vees on nii etanooli kui glükoosi difusioon oluliselt parem, aga ka lineaarse temperatuurisõltuvusega. Kuigi etanooli difusioon võib olla ka F127 DMAs difusioonikoefitsientide standardhälbeid arvestades tegelikult lineaarne, siis glükoosi difusioon on selge maksimumiga 20°C ümbruses, olles võrreldav difusiooniga vees.

Varasemalt on leitud 2% kaltsiumalginaadi hüdrogeelis etanooli ja glükoosi difusioonikoefitsiendid 30°C juures, milleks on vastavalt $1,0 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ ja $6,1 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$. [25] Kui etanooli difusiooni koefitsient 2% kaltsiumalginaadis on ligi poole suurem 30% F127 DMAs difusiooni koefitsiendist, siis glükoosi oma on 3,7x suurem. Arvestades polümeeri massiprotsenti on suurem difusioonikoefitsient loogiline. Huvitava tähelepanekuna glükoosi difusiooni koefitsient 2% kaltsiumalginaadi hüdrogeelis peaaegu kattub etanooli difusioonikoefitsiendiga F127 DMAs.

Lisaks on leitud piroksikaami difusioonikoefitsiendid 20%, 25% ja 30% massiprotsendiga F127 hüdrogeelis 26°C, milleks on vastavalt $6,7 \cdot 10^{-11}$; $5,4 \cdot 10^{-11}$; $4,3 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$. [26] Piroksikaami difusioonikoefitsiendid on ligikaudu 10x väiksemad kui etanooli või glükoosi omad, mis on oodatav kõrvaltades piroksikaami molekulmassi – 331,348 g/mol – glükoosi või etanooli omaga.

Kuna glükoosi difusioon on 37°C juures pärsitud, samas 20°C juures sama hea kui vees, peaks seda arvesse võtma bioreaktori arendamisel. Kuigi 37°C on enamuste mikroobide elutegevuseks sobivaim temperatuur, võib sellel temperatuuril elutegevust pärssida toitainete puudus. 20°C juures seda probleemi ei esine. Lähemalt tuleks aga uurida, millest selline nähtus tekib. Märkimist väärrib, et difusioonimaksimumi temperatuur langeb peaaegu kokku membraani printimise temperatuuriga, milleks oli $\sim 22^{\circ}\text{C}$. On võimalik, et difusioonimaksimumi temperatuur on seotud ristsidumise temperatuuriga, andes optimumi just nendes tingimustes.

Kokkuvõte

Käesolevas töös leiti etanooli ja glükoosi difusioonikoefitsiendid elusmaterjali maatriksiks kasutatava 30% F127 DMA polümeeri hüdrogeelis kuuel erineval temperatuuril. Polümeeri hüdrogeelil on varem leitud mittelineaarne massi temperatuurisõltuvus hüppega 15°C ja 20°C vahel. Et uurida, kas selline anomaalia mõjutab ka difusiooni leiti difusioonikoefitsiendid 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 37°C juures. 37°C tehti täiendav hulk korduskatseid, sest see on mikrobioloogias laialdaselt kasutatav temperatuur. Glükoos ja etanool valiti uuritavateks aineteks kui lihtsa struktuuriga toit- ja jääkained.

Töö tulemusena selgus, et F127 DMA hüdrogeeli mittelineaarne temperatuurisõltuvus mõjutab seal toimuvat difusiooni. F127 DMA on mitmest aspektist sobiv ja paljulubav materjal elusmaterjalidest bioreaktorite maatriksiks tänu selle füüsikaliste omaduste erilisele temperatuurisõltuvusele. Substraadi ja produkti difusiooni F127 DMA-s tuleb veel uurida ja leitud andmed võiksid olla sisendiks edasiste uuringutele.

Kasutatud kirjandus

- [1] L. C. Vitorino ja L. A. Bessa, „Technological Microbiology: Development and Applications“, *Front. Microbiol.*, kd 8, 2017, Vaadatud: 28. mai 2022. [Online]. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00827>
- [2] A. D. Lantada, J. G. Korvink, ja M. Islam, „Taxonomy for engineered living materials“, *Cell Rep. Phys. Sci.*, kd 3, nr 4, lk 100807, apr 2022, doi: 10.1016/j.xcrp.2022.100807.
- [3] S. Balasubramanian, K. Yu, A. S. Meyer, E. Karana, ja M. Aubin-Tam, „Bioprinting of Regenerative Photosynthetic Living Materials“, *Adv. Funct. Mater.*, kd 31, nr 31, lk 2011162, aug 2021, doi: 10.1002/adfm.202011162.
- [4] T. Gonzalez-Fernandez, A. J. Tenorio, K. T. Campbell, E. A. Silva, ja J. K. Leach, „Evaluation of Alginate-Based Bioinks for 3D Bioprinting, Mesenchymal Stromal Cell Osteogenesis, and Application for Patient-Specific Bone Grafts“. bioRxiv, lk 2020.08.09.242131, 10. august 2020. doi: 10.1101/2020.08.09.242131.
- [5] T. G. Johnston *et al.*, „Cell-Laden Hydrogels for Multikingdom 3D Printing“, *Macromol. Biosci.*, kd 20, nr 8, lk 2000121, aug 2020, doi: 10.1002/mabi.202000121.
- [6] A. Saha *et al.*, „Additive Manufacturing of Catalytically Active Living Materials“, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, kd 10, nr 16, lk 13373–13380, apr 2018, doi: 10.1021/acsami.8b02719.
- [7] H. Gest, „The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni van Leeuwenhoek, Fellows of The Royal Society“, *Notes Rec. R. Soc. Lond.*, mai 2004, doi: 10.1098/rsnr.2004.0055.
- [8] Z.-X. Wang, J. Zhuge, H. Fang, ja B. A. Prior, „Glycerol production by microbial fermentation: A review“, *Biotechnol. Adv.*, lk 23, 2001.
- [9] G. D. Najafpour, „CHAPTER 1 - Industrial Microbiology“, *Biochemical Engineering and Biotechnology*, G. D. Najafpour, Toim Amsterdam: Elsevier, 2007, lk 1–13. doi: 10.1016/B978-044452845-2/50001-X.
- [10] F. Francis, H. Jacquemyn, F. Delvigne, ja B. Lievens, „From Diverse Origins to Specific Targets: Role of Microorganisms in Indirect Pest Biological Control“, *Insects*, kd 11, nr 8, lk 533, aug 2020, doi: 10.3390/insects11080533.
- [11] M. Maćik, A. Gryta, ja M. Frąc, „Biofertilizers in agriculture: An overview on concepts, strategies and effects on soil microorganisms“, *Advances in Agronomy*, kd 162, Elsevier, 2020, lk 31–87. doi: 10.1016/bs.agron.2020.02.001.
- [12] N. Rani, P. Sangwan, M. Joshi, A. Sagar, ja K. Bala, „Microbes“, *Microbial Wastewater Treatment*, Elsevier, 2019, lk 83–102. doi: 10.1016/B978-0-12-816809-7.00005-1.
- [13] „Microbial Leather – materiability“. <https://materiability.com/microbial-leather/> (vaadatud 17. mai 2022).
- [14] C. A. Jerez, „3.60 - Bioleaching and Biomining for the Industrial Recovery of Metals“, *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, M. Moo-Young, Toim Burlington: Academic Press, 2011, lk 717–729. doi: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00234-8.
- [15] C. Aguilar *et al.*, „Microbial Technology: Advances and Challenges“, 2019, lk 3–24. doi: 10.1201/9780429331817-1.
- [16] G.-Q. Chen, „New challenges and opportunities for industrial biotechnology“, *Microb. Cell Factories*, kd 11, nr 1, lk 111, aug 2012, doi: 10.1186/1475-2859-11-111.
- [17] A. Rodrigo-Navarro, S. Sankaran, M. J. Dalby, A. del Campo, ja M. Salmeron-Sanchez, „Engineered living biomaterials“, *Nat. Rev. Mater.*, kd 6, nr 12, lk 1175–1190, dets 2021, doi: 10.1038/s41578-021-00350-8.
- [18] M. Bahram, N. Mohseni, ja M. Moghtader, *An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications*. IntechOpen, 2016. doi: 10.5772/64301.

- [19] S. W. Kim, Y. H. Bae, ja T. Okano, „Hydrogels: Swelling, Drug Loading, and Release“, *Pharm. Res.*, kd 9, nr 3, lk 283–290, märts 1992, doi: 10.1023/A:1015887213431.
- [20] H. Priks *et al.*, „Physical Confinement Impacts Cellular Phenotypes within Living Materials“, *ACS Appl. Bio Mater.*, kd 3, nr 7, lk 4273–4281, juuli 2020, doi: 10.1021/acsabm.0c00335.
- [21] T. Butelmann *et al.*, „Metabolism Control in 3D-Printed Living Materials Improves Fermentation“, *ACS Appl. Bio Mater.*, kd 4, nr 9, lk 7195–7203, sept 2021, doi: 10.1021/acsabm.1c00754.
- [22] M. Hamada ja P. de Anna, „A Method to Measure the Diffusion Coefficient in Liquids“, *Transp. Porous Media*, okt 2021, doi: 10.1007/s11242-021-01704-0.
- [23] B. bob, „Diffusion Coefficient Measurement Techniques | Fundamentals of Fluid Flow in Porous Media“, *Special Core Analysis & EOR Laboratory | PERM Inc.* <https://perminc.com/resources/fundamentals-of-fluid-flow-in-porous-media/chapter-3-molecular-diffusion/diffusion-coefficient/measurement-techniques/> (vaadatud 29. mai 2022).
- [24] H. Yamashita, N. Kakuta, D. Kawashima, ja Y. Yamada, „Measurement of temperature-dependent diffusion coefficients of aqueous solutions by near-infrared simultaneous imaging of temperature and concentration“, *Biomed. Phys. Eng. Express*, kd 4, nr 3, lk 035030, apr 2018, doi: 10.1088/2057-1976/aab645.
- [25] B. J. M. Hannoun ja G. Stephanopoulos, „Diffusion coefficients of glucose and ethanol in cell-free and cell-occupied calcium alginate membranes“, *Biotechnol. Bioeng.*, kd 28, nr 6, lk 829–835, 1986, doi: 10.1002/bit.260280609.
- [26] F. Ye, A. Yagmur, H. Jensen, S. W. Larsen, C. Larsen, ja J. Østergaard, „Real-time UV imaging of drug diffusion and release from Pluronic F127 hydrogels“, *Eur. J. Pharm. Sci.*, kd 43, nr 4, lk 236–243, juuli 2011, doi: 10.1016/j.ejps.2011.04.015.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Iris Robyn Talgre

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

„Etanooli ja glükoosi difusioon F127 dimetakrülaadi hüdrogeelis“,

mille juhendajad on Hans Priks M.Sc ja Tarmo Tamm Ph.D

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **31.05.2024** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Iris Robyn Talgre

01.06.2022