

Biosurfaktanty ze skupiny glykolipidů a jejich interakce s polymery

Bc. Kateřina Müllerová

Diplomová práce
2025



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Kateřina Müllerová
Osobní číslo: T23245
Studijní program: N0711A130011 Biomateriály a kosmetika
Forma studia: Prezenční
Téma práce: Biosurfaktanty ze skupiny glykolipidů a jejich interakce s polymery

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část:

V rámci literární rešerše charakterizujte a klasifikujte biosurfaktanty, především zástupce ze skupiny glykolipidů, získávané z kvasinek.

Zhodnoťte možnosti interakcí těchto amfifilních biomolekul s polysacharidy s ohledem na potenciální využití pro biomedicínské a kosmetické aplikace.

II. Praktická část:

V praktické části charakterizujte povrchovou aktivitu vzorků biosurfaktantů.

Připravte komplexy na bázi polymeru chitosanu a amfifilních glykolipidů a studujte jejich fyzikálně chemické charakteristiky pomocí dostupných experimentálních metod.

Dosažené výsledky přehledně zpracujte a shrňte závěry.

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

- [1] Messaoud, G. B., Promeneur, L. a kol. Complex coacervation of natural sophorolipid bolaamphiphile micelles with cationic polyelectrolytes. *Green Chemistry* 2018, 20, 3371-3385.
- [2] Kaga, H., Orita, M. a kol. Interaction between sophorolipids and β -glucan in aqueous solutions. *Journal of Oleo Science* 2024, 73, 169-176.
- [3] Kakizawa, Y., Miyake, M. Creation of new functions by combination of surfactant and polymer – complex coacervation with oppositely charged polymer and surfactant for shampoo and body wash. *Journal of Oleo Science* 2019, 68, 525-539.
- [4] Guzmán, E., Maestro, A. a kol. Association of oppositely charged polyelectrolyte and surfactant in solution: equilibrium and nonequilibrium features. *Journal of Physics: Condensed Matter* 2023, 35, 323001.
- [5] Kulkarni, A. D., Vanjari, Y. H. a kol. Polyelectrolyte complexes: mechanisms, critical experimental aspects, and applications. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 2016, 44, 1615-1625.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Jana Sedlářiková, Ph.D.**
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce: **10. února 2025**
Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že

- odevzdáním diplomové práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb., v platném znění bez ohledu na výsledek obhajoby;
- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a bude dostupná k nahlédnutí;
- jedno vyhotovení diplomové práce v listinné podobě bude ponecháno Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně k uložení;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou práci – nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá; neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji, že

- jsem na diplomové práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem řádně citoval(a); v případě publikace výsledků budu uveden(a) jako spoluautor;
- odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne

.....
podpis autora

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá biosurfaktanty ze skupiny glykolipidů a jejich interakcemi s biopolymerem chitosanem. Úvodní část teoretické práce obsahuje klasifikaci biosurfaktantů podle jejich chemické struktury, následovanou kapitolou o konkrétní skupině soforolipidů. Praktická část je zaměřena na charakterizaci povrchových vlastností vzorků soforolipidů, a dále pak na studium potenciálních interakcí s biopolymerem chitosanem. Cílem práce bylo zjistit, za jakých podmínek k interakcím mezi těmito přírodními látkami dochází, a zda by mohly být využitelné pro praktické aplikace, jako je například stabilizace emulzí.

Klíčová slova: Biosurfaktanty, chitosan, soforolipidy, polymery, interakce, stabilita emulze

ABSTRACT

This diploma thesis focuses on biosurfactants from the glycolipid group and their interactions with the biopolymer chitosan. The introductory part of the theoretical section includes a classification of biosurfactants based on their chemical structure, followed by a chapter dedicated to the specific group of sophorolipids. The experimental part is focused on characterizing the surface properties of sophorolipid samples and investigating potential interactions with the biopolymer chitosan. The aim of the thesis was to determine under which conditions interactions between these natural substances occur and whether they could be utilized for practical applications, such as emulsion stabilization.

Keywords: Biosurfactants, chitosan, sophorolipids, polymers, interactions, emulsion stability

Tímto bych ráda poděkovala paní doc. Ing. Janě Sedlaříkové, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a podporu při zpracování diplomové práce. Dále děkuji panu Ing. Ondřeji Rudolfovi, Ph.D., za pomoc při provedení měření pěnivosti. Poděkování patří také Ing. Pavlu Plevovi, Ph.D. za poskytnutou pomoc a konzultace při práci v mikrobiologické laboratoři.

V neposlední řadě bych chtěla vyjádřit velké poděkování paní Ing. Michaelae Montalbano, Ph.D. z firmy EPS Biotechnology, s.r.o. za poskytnutí vzorků, ochotu a čas, který mi během mé návštěvy v jejich laboratoři věnovala.

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 BIOSURFAKTANTY	13
1.1 KLASIFIKACE BIOSURFAKTANTŮ	13
1.1.1 Glykolipidy	13
1.1.2 Lipopeptidy, lipoproteiny.....	14
1.1.3 Mastné kyseliny a fosfolipidy	15
1.1.4 Polymerní biosurfaktanty	16
2 SOFOROLIPIDY	17
2.1 STRUKTURA	17
2.2 PRODUKCE SOFOROLIPIDŮ	18
2.3 METODY PŘEČIŠTĚNÍ SUROVÝCH SOFOROLIPIDŮ	20
2.4 VLASTNOSTI A VYUŽITÍ SOFOROLIPIDŮ	22
3 INTERAKCE SURFAKTANTŮ S POLYMERY	25
3.1 MECHANISMY INTERAKCÍ.....	25
3.2 POLYMER-SURFAKTANT KOMPLEXY	29
4 BIOSURFAKTANTY A POLYMERY	31
5 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	35
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	40
6 CÍLE PRÁCE	41
7 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A POSTUPY	42
7.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	42
7.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY	42
8 METODIKA	43
8.1 VÝROBA SOFOROLIPIDŮ	43
8.2 STABILITNÍ STUDIE VZORKŮ SOFOROLIPIDŮ	43
8.3 TESTOVÁNÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY	44
8.4 CHARAKTERIZACE ROZTOKŮ SOFOROLIPIDŮ SL.....	45
8.4.1 Příprava pufrů.....	45
8.4.2 Příprava zásobních roztoků soforolipidů	45
8.4.3 Příprava pracovních roztoků soforolipidů.....	46
8.4.4 Měření povrchového napětí.....	46
8.4.5 Konduktometrie.....	47
8.4.6 Měření stability pěny.....	48
8.5 CHARAKTERIZACE VZORKŮ CHITOSANU SE SOFOROLIPIDY CH/SL	49
8.5.1 Příprava roztoků chitosanu.....	49

8.5.2	Příprava vzorků chitosan/soforolipid CH/SL	50
8.5.3	Sledování interakcí CH/SL.....	50
8.5.4	Měření zeta potenciálu	50
8.5.5	Turbidimetrické měření	50
8.5.6	Antibakteriální aktivita.....	51
8.6	STABILITA EMULZÍ.....	51
8.6.1	Příprava emulzí.....	51
8.6.2	Měření velikosti částic a zeta potenciálu.....	51
8.6.3	Turbidimetrické měření	51
8.6.4	Index krémování.....	51
9	VÝSLEDKY A DISKUZE	52
9.1.1	Stabilitní studie vzorků soforolipidů	52
9.1.2	Testování antimikrobiální aktivity SL.....	54
9.2	CHARAKTERIZACE ROZTOKŮ SOFOROLIPIDŮ SL	55
9.2.1	Tenziometrické měření roztoků SL	55
9.2.2	Stanovení povrchového tlaku	57
9.2.3	Konduktometrické měření roztoků SL	59
9.2.4	Měření pěnivosti.....	60
	Ross-Milesova metoda	60
	Krüss metoda	62
9.3	CHARAKTERIZACE VZORKŮ CHITOSANU SE SOFOROLIPIDY CH/SL	66
9.3.1	Tenziometrické měření CH/SL	66
9.3.2	Konduktometrické měření CH/SL.....	67
9.3.3	Měření turbidity CH/SL	69
9.3.4	Viskozitní měření CH/SL.....	72
9.3.5	Antimikrobiální aktivita	74
9.4	STABILITA EMULZÍ.....	74
9.4.1	Vizuální hodnocení.....	74
9.4.2	Měření velikosti částic emulzí.....	77
9.4.3	Měření zeta potenciálu emulzí	78
9.4.4	Měření turbidity emulzí.....	80
9.4.5	Index krémování emulzí.....	81
9.4.6	Mikrostruktura emulzí.....	81
	ZÁVĚR.....	83
	SEZNAM OBRÁZKŮ	96
	SEZNAM TABULEK.....	98
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	99

ÚVOD

Biosurfaktanty jsou přírodní povrchově aktivní látky pocházející z mikroorganismů, které vykazují řadu unikátních vlastností, což je v současnosti činí vhodnou alternativou jejich syntetických protějšků. Zajímavou skupinou biosurfaktantů jsou soforolipidy, získávané především z nepatogenních kvasinek, jako je *Candida bombicola*, které jsou vysoce biodegradabilní a šetrné k životnímu prostředí. Navíc vykazují antibakteriální, antifungální, antivirové a cytotoxické vlastnosti, díky čemuž je jim v posledních letech věnována čím dál větší pozornost.

Jsou studovány také možnosti jejich kombinací s polymery, jelikož interakce mezi těmito látkami mohou vést k výrazným změnám povrchových a fyzikálně-chemických vlastností systémů, což může významně ovlivnit jejich finální využití. Vzájemné interakce mezi povrchově aktivními látkami a polymery závisí na povaze konkrétních složek a vlastnostech prostředí. K velmi silným interakcím dochází mezi polyelektrolyty a surfaktanty opačného náboje. Výsledné komplexy lze využít např. jako stabilizátory emulzí či modifikátory viskozity, což hraje důležitou roli především v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu.

Cílem této diplomové práce bylo sledování potenciálních interakcí mezi biosurfaktanty soforolipidy a přírodním polymerem chitosanem, prostřednictvím testování změn ve fyzikálně-chemických vlastnostech, jako jsou povrchové napětí, viskozita, vodivost či jiné. Získané poznatky mohou přispět k lepšímu porozumění chování těchto látek ve směsích a díky tomu nalézt nové možnosti jejich využití v praxi.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOSURFAKTANTY

Biotenzidy nebo také biosurfaktanty (BS) jsou povrchově aktivní sloučeniny produkované mikroorganismy, jako jsou bakterie či kvasinky. Významné jsou především pro své příznivé vlastnosti, zahrnující schopnost biologické degradace, nízkou toxicitu, nebo dobrou snášenlivost s životním prostředím. Díky tomu mohou být tyto látky využívány v mnohých oblastech průmyslu od potravinářství, farmacie až po kosmetické aplikace. Jejich struktura je amfifilní, což jim dodává schopnost snižovat mezifázové a povrchové napětí, a současně možnost vzniku micel. Proto vykazují velký aplikační potenciál pro produkty typu emulgátorů, pěnidel, smáčedel anebo detergentů [1].

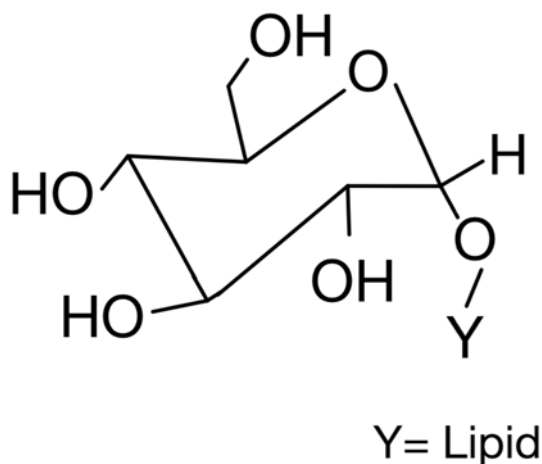
1.1 Klasifikace biosurfaktantů

Biotenzidy lze klasifikovat dle jejich vlastností, podle povahy hydrofilní hlavičky, chemického složení a kmene mikrobiálního zdroje. Nejjednodušším způsobem je rozdělení na nízkomolekulární a vysokomolekulární biosurfaktanty. Do kategorie nízkomolekulárních typů lze zařadit glykolipidy a lipoproteiny, do vysokomolekulárních pak polysacharidy a lipoproteiny [2]. Biotenzidy jsou amfipatické molekuly, což znamená, že obsahují jak hydrofilní skupinu, tak hydrofobní řetězec. Díky této struktuře mají schopnost snižovat povrchové a mezifázové napětí, což je klíčové pro jejich využití v různých průmyslových aplikacích. Kromě tohoto jejich vlastnosti ovlivňují faktory jako koncentrace, teplota, salinita a pH prostředí. Například bylo zjištěno, že některé biotenzidy si zachovávají stabilitu i při extrémních hodnotách pH nebo koncentracích solí, což rozšiřuje jejich praktické využití. Vzhledem k rozmanitosti biotenzidů a jejich specifickým vlastnostem je důležité je systematicky klasifikovat, což nám umožňuje lépe porozumět jejich funkcím a potenciálním aplikacím [3].

1.1.1 Glykolipidy

Glykolipidy patří v dnešní době mezi jednu z nejpoužívanějších skupin biosurfaktantů, které se skládají z hydrofilní sacharidové části (například glukózy, manózy a dalších) a hydrofobního mastného kyselinového řetězce, jenž je k sacharidu připojen prostřednictvím alfa-1glykosidické vazby (Obr. 1). Zdrojem mohou být kromě průmyslově vyrobených mastných kyselin i různé typy průmyslových odpadů, např. ze smažených olejů. Glykolipidy lze dále rozdělit do podskupin, zahrnujících rhamnolipidy a soforolipidy. Rhamnolipidy se skládají ze dvou nebo více rhamnosových cukrů spojených glykosidickou vazbou.

Hydrofobní část je obvykle zastoupena řetězcí beta-hydroxymastných kyselin s různým počtem uhlíků. Typickým zdrojem je bakterie *Pseudomonas aeruginosa* [1][2]. Druhé zmíněné podskupině, soforolipidům, budou věnovány následující kapitoly.

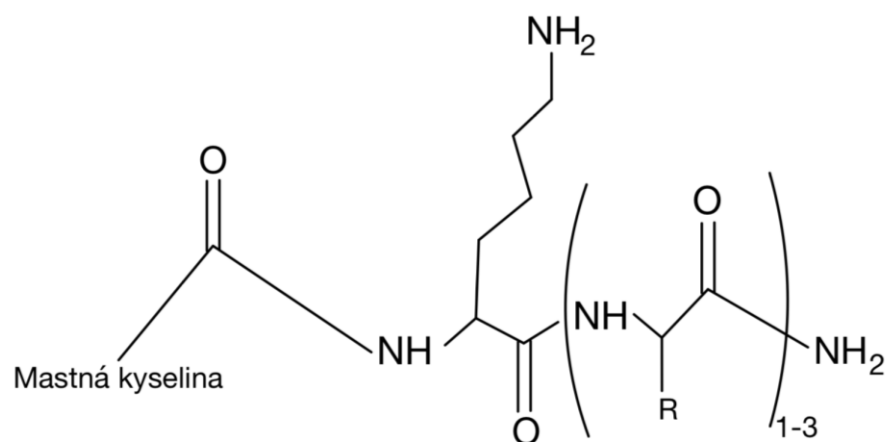


Obrázek 1 Obecná struktura glykolipidů

(zdroj: vlastní)

1.1.2 Lipopeptidy, lipoproteiny

Jedná se o amfifilní cyklické peptidy složené z deseti nebo sedmi aminokyselin, které jsou spojeny beta-hydroxykyselinami (Obr. 2) [4]. U těchto cyklických sloučenin produkovaných bakteriemi rodu *Bacillus brevis* a *Bacillus polymyxa* byly prokázány pozoruhodné povrchově aktivní vlastnosti [5]. Kromě zmíněných rodů mohou být lipopeptidy produkovány např. *Bacillus subtilis*, který je známý jako první zdroj surfaktinu, lipopeptidu, jenž byl využit ve farmaceutických aplikacích. *Bacillus subtilis* je přitom jedním z nejekonomičtějších zdrojů produkujících lipopeptidy a to s využitím škrobového substrátu [4].

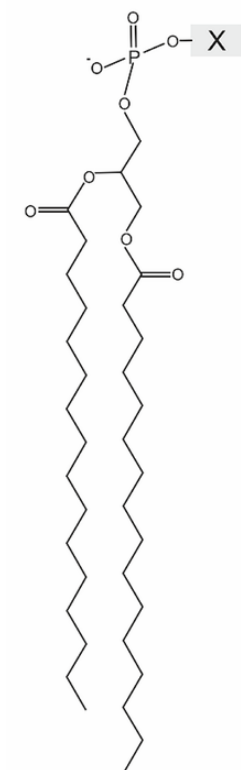


Obrázek 2 Obecná struktura lipopeptidů

(zdroj: vlastní)

1.1.3 Mastné kyseliny a fosfolipidy

Některé bakterie a kvasinky během růstu na n-alkanovém substrátu produkují značné množství mastných kyselin a povrchově aktivních látek, zejména fosfolipidů, jejichž obecná struktura je znázorněna na Obr. 3. Mastné kyseliny pak vznikají jako výsledek mikrobiální oxidace alkanů. Kromě těchto nasycených kyselin produkují mikroorganismy také složitější mastné kyseliny obsahující hydroxylové skupiny a alkylové větve [5].



Obrázek 3 Obecná struktura fosfolipidů

(zdroj:[6])

1.1.4 Polymerní biosurfaktanty

Polymerní mikrobiální povrchově aktivní látky jsou většinou heterosacharidy, které obsahují proteiny. Nejlépe prostudovanými polymerními biosurfaktanty jsou emulsan, liposan, mannoprotein a polysacharidové-proteinové komplexy [5].

2 SOFOROLIPIDY

Jedná se o extracelulární BS produkované nejčastěji nepatogenní kvasinkou *Staromarella bombicola*, ovšem nejznámějším studovaným zdrojem je nepatogenní kvasinka *Candida bombicola*. Díky svým výjimečným vlastnostem, jako je vysoká snášenlivost s prostředím, strukturní variabilita a možnost využití v různých průmyslových oblastech, jsou soforolipidy (SL) v současnosti velmi perspektivním typem přírodních BS.

SL disponují výraznými antimikrobiálními vlastnostmi a jsou účinné jak proti gram–pozitivním, tak gram–negativním mikroorganismům. Kromě toho slouží jako solubilizační a smáčecí činidla a zvyšují schopnost tvorby pěny [1].

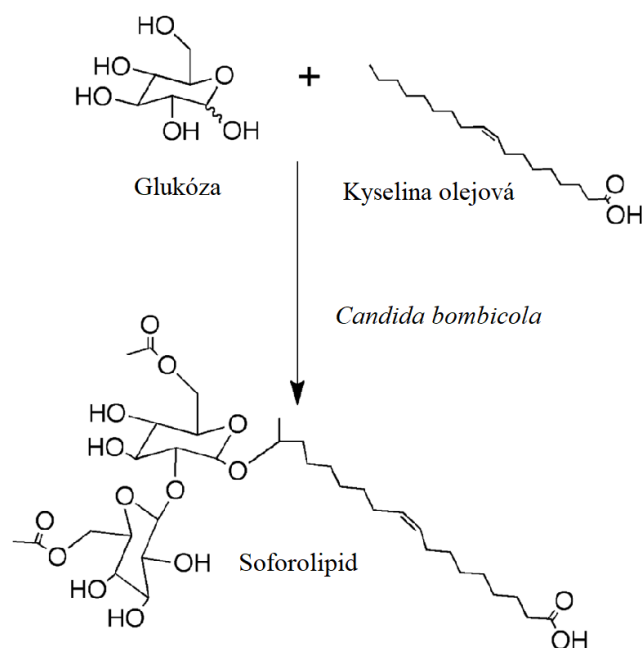
2.1 Struktura

Uvedené unikátní vlastnosti soforolipidů jsou připisovány jejich molekulární struktuře (Obr. 4). Ta je tvořena hydrofilní soforózou a hydrofobním řetězcem mastné kyseliny (s obsahem 16–18 atomů uhlíku) spojených glykosidickou vazbou. Glykosidická β vazba vzniká mezi anomerním uhlíkem soforosové části a terminálním nebo subterminálním uhlíkem hydroxylovaného řetězce mastné kyseliny. Surový soforolipid je tvořen částí jak laktonickou tak kyselou, které se strukturně liší především různými délkami řetězců mastných kyselin, stupněm nasycení a typem acetylce. Kyselé formy soforolipidů obvykle obsahují volné karboxylové skupiny mastných kyselin, které jsou spojeny se soforosovou částí pomocí glykosidické vazby, a vykazují lepší rozpustnost. Laktonické soforolipidy jsou tvořeny soforosovou částí připojenou k dlouhému řetězci mastné kyseliny, jejíž karboxylové skupiny jsou esterifikovány ve 4' anebo 6' poloze soforózy. Ve vzácných případech může dojít ke vzniku uzavřeného kruhu v případě esterifikace na pozici 6''. Jak již bylo zmíněno, rozdílné strukturní vlastnosti, délka řetězce, stupeň nasycení a acetylce, vedou k odlišné biologické aktivitě a různým fyzikálně – chemickým vlastnostem. Emulgační schopnost a povrchová aktivita sofolipidů se zvyšuje s rostoucí délkou uhlíkového řetězce. U laktonických soforolipidů byla prokázána nižší rozpustnost v porovnání s kyselými soforolipidy. Esterifikované sofolipidy vykazují lepší emulgační vlastnosti v systému olej-voda ve srovnání s neionickými povrchově aktivními látkami, jako je Triton X-100 [1].

acetyltransferízy, která přesouvá acetylovou skupinu z acetyl-koenzymu A (CoA) na 6- nebo 6'' - pozici soforózy. Laktonové soforolipidy vznikají esterifikací karboxylové skupiny mastných kyselin s hydroxylovou skupinou soforózové části. Esterifikační reakce často probíhají na 4''- pozici soforózy, někdy však také na 6'- nebo 6''- pozici soforózy. Na základě Van Bogaerta a kol. [8] schopnost buněčných lipáz tvořit esterovou vazbu na 6'- nebo 6''- pozici umožňuje tvorbu laktonových soforolipidů i bez účasti laktonesterázy. Laktonesteráza se však obvykle podílí na esterifikaci karboxylových skupin na 4''- pozici při tvorbě laktonových soforolipidů. Roelants a kol. [1] prokázali, že nadměrná exprese genu pro laktonesterázu u soforolipidů vedla k relativně vyššímu množství vytvořených produktů ve srovnání se soforolipidy divokého typu. Téměř všechny produkované soforolipidy jsou laktonové formy, pokud ale dojde k nadměrné expresi genu, vzniká přibližně 3 % kyselých soforolipidů. Naopak pokud je laktonesteráza u divokého kmene kvasinek *S. bombicola* vyřazena, budou se za podobných podmínek tvořit pouze soforolipidy kyselé, nikoli laktonické, které obvykle syntetizují oba typy soforolipidů během produkčního procesu.

V literatuře lze nalézt také další zdroje soforolipidů, jako je například kvasinka *Starmerella bombicola*. Jak už bylo zmíněno výše, jednou z variant, jak zlepšit výtěžnost SL, je genová modifikace kvasinek. Liu a kol. [9] využili genového inženýrství k optimalizaci jak katabolismu substrátu v médiu, tak produkce soforolipidů. Zabývali se studiem transkripčních faktorů (TF) a genů spojených s biosyntézou soforolipidů a připravili kmeny s různými kombinacemi proteinu Rim9 – like (Rlp) a transkripčních faktorů (ztf1, leu3 a gcl). Použitím proteinu došlo k výraznému zvýšení výtěžku soforolipidů, a to až o 50,51 %, v porovnání s divokým typem tohoto mikroorganismu. Kromě samotného zvýšení výtěžnosti byly u různých kmenů pozorovány pozitivní změny v syntéze soforolipidů, včetně vyšší aktivity hydroláz [10]. V současnosti se na (semi-)průmyslové úrovni vyrábějí pouze dvě až tři molekuly SL, které jsou potenciálně připraveny k použití v komerčních produktech. Konkrétními producenty jsou společnosti Evonik (Německo), Locus (USA), Holiferm (Velká Británie) a další. Možnosti snížení výrobních nákladů jsou ovšem stálou výzvou, se kterou se výrobci potýkají. Purifikované množství biosurfaktantů v jednotkách mg lze pořídit za několik set dolarů, zatímco suroviny zakoupené přímo od výrobce lze získat za nižší ceny (desítky dolarů za kilogram). Je však nutno si uvědomit, že surové směsi obsahují komplexní směs kongenerů, spolu se zbytkovými MK. Není neobvyklé, že výrobci prodávají buď hydrolyzované šarže, v případě SL za účelem snížení

molekulární složitosti, nebo neutralizované šarže, aby se zlepšila jejich rozpustnost ve vodě, jak je tomu u rhamnolipidů. Genetické inženýrství a následné separační procesy mají rovněž zásadní význam. V současné době je možné získat sloučeniny, jako deacetylované kyselé SL, které bývají kontaminovány zbytkovými MK. Stále jsou ovšem hledány možnosti, jak výrobní proces optimalizovat [11].



Obrázek 5 Kyselé forma soforolipidů získaná z kvasinky *Candida bombicola* (Přeloženo z AJ)

(zdroj:[12])

2.3 Metody přečištění surových soforolipidů

V posledních letech bylo vyvinuto několik přístupů k efektivnímu získávání volných kyselých a esterifikovaných forem soforolipidů. Selektivní výroba specifických typů SL je možná díky geneticky modifikovaným kmenům, ovšem přesto jsou stále vyžadovány postupy k zajištění vyšší čistoty. SL-ester lze oddělit od surových SL krystalizací v ethanolu při nízkých teplotách, což ovšem vede pouze k omezeným výtěžkům tohoto esteru, a to kvůli jeho vysoké rozpustnosti v ethanolu. Pro esterifikované typy byl také vyvinut přístup za použití fosfátových pufrů, přičemž čistota získaných derivátů byla velmi vysoká, a to až 99 %. Tato metoda však vyžaduje poměrně vysokou počáteční koncentraci SL-esteru, zatímco množství produktu v kyselé volné formě je zanedbatelné, jelikož vyšší koncentrace

významně brání přečištění a lepší výtěžnosti. Pro zvýšení výtěžnosti lze použít řadu metod, od ultrafiltrace, frakcionace pěnou, adsorpce na aktivním uhlí či extrakce rozpouštědlem. Z uvedených metod se hojně využívá právě extrakce rozpouštědlem, a to za použití ethylacetátu. Laktonová a kyselá forma SL vykazuje rozdílné fyzikálně – chemické vlastnosti, z toho důvodu je jejich přečištění a separace důležitá pro komerční využití těchto látek. Pro tyto účely lze využít různé postupy, jako např. krystalizaci pomocí vodného pufru a organických rozpouštědel, jako je ethanol. Pro purifikaci složek SL lze použít konvenční metody, jako je kolonová chromatografie na bázi silikagelu. Nevýhodou této metody ovšem je nutnost využití velkého množství rozpouštědel. Laktonické formy SL jsou schopny snižovat povrchové napětí, zatímco kyselé formy mají lepší pěnivost i rozpustnost. Rozpustnost je ovlivněna přítomností acetylových skupin, větší počet skupin vede k menší rozpustnosti, ale naopak zvyšuje antivirové a cytokinové účinky. Stupeň laktonizace či kyselosti molekuly může být ovlivněna různými podmínkami, jako je množství dusíku, kyslíku či volba lipidového substrátu [13].

Rau a kol. [14][15] popisují výrobu kyselých SL bez acetylových skupin prostřednictvím chemických transformací a následné extrakce rozpouštědlem. Podrobnosti o účinnosti separace nebo čistotě produktu ovšem nebyly uvedeny. Efektivní produkce a izolace čistých SL zůstává proto i nadále výzvou pro mnohé odborníky zabývající se danou problematikou.

Pro přečištění surových soforolipidů existuje řada metod, z nichž jednou z možností je chemická modifikace za použití série extrakcí. Ve studii autorů Tang a kol. byl surový SL-COOH nejdříve rozpuštěn v deionizované vodě, přičemž pH bylo upraveno pomocí přídavku koncentrované HCl. Následně byla přidána rozpouštědla, konkrétně cyklohexan, ethylacetát a voda v poměru 1:3:2 (v/v/v). Takto připravený dvoufázový roztok byl vortexován a poté několikanásobně odstředěn při 10 000 otáčkách/ min. Následně odebraná vodná fáze byla doplněna dichlormetanem v poměru 1:2 (v/v). Po dalším promíchání je bezbarvá vodná fáze odebrána a zkoncentrována za sníženého tlaku, což vede k získání SL-COOH ve formě bezbarvého pevného produktu [16].

V další studii byla využita purifikace prostřednictvím smíchání surových soforolipidů s pufrů o různém pH (v rozmezí od pH 4 až pH 8) a následná homogenizace. Poté byly směsi ponechány při teplotě 25 °C přes noc a následně odstředěny. Odebraný supernatant byl poté analyzován, za účelem zjištění vlivu pH na rozpustnost soforolipidů [17].

2.4 Vlastnosti a využití soforolipidů

V praxi je běžně v jednom produktu kombinováno více typů povrchově aktivních látek, a to kvůli jejich potenciálnímu synergickému efektu. Přírodní SL v podstatě představují specifickou strukturu, která současně zahrnuje laktonovou část jako zástupce neionické PAL, a mastnou kyselinu, jako zástupce anionické složky. Tato unikátní kombinace jim poskytuje významné vlastnosti a rozmanité možnosti použití [18]. Soforolipidy nacházejí uplatnění například v potravinářském průmyslu, kde je lze díky jejich antimikrobiálním vlastnostem využít jako konzervanty. Dle prováděných průzkumů stále častěji dochází ke kontaminaci potravin patogeny, jako je např. *E. coli* či *Salmonella enterica serovars*. Právě použití SL v praxi může pozitivně ovlivnit bezpečnost potravin a zabránit kontaminaci jmenovanými patogeny. Antimikrobiální účinky proti konkrétním typům patogenů jsou významně závislé na specifické molekulární struktuře. Bylo například prokázáno, že laktonové soforolipidy ze *S. bombicola* vykazovaly významné snížení růstu populace *E. coli* ve srovnání s odpovídajícími kyselými typy. Bylo také zjištěno, že soforolipidy vykazují dobrou účinnost při inhibici růstu plísní přenášených potravinami, jako je *F. oxysporum*, prostřednictvím destabilizace jejich membrán.

Soforolipidy představují velký potenciál pro využití v kosmetickém průmyslu. Biosurfaktanty se ukázaly jako unikátní přírodní sloučeniny užitečné pro kosmetické formulace, díky své biologické odbouratelnosti a pozitivnímu vlivu na zdraví pleti. Snaha o komercializaci různých typů glykolipidů a lipopeptidových biosurfaktantů roste, což ukazuje na rostoucí zájem o tyto přírodní alternativy, které se snaží nahradit chemicky syntetizované povrchově aktivní látky. Biosurfaktanty také vykazují lepší biologickou odbouratelnost. Díky jejich biologickému původu biosurfaktanty obsahují MK a glykoly, což umožňuje lepší interakci s kožními proteiny a lipidy, ve srovnání s chemickými povrchově aktivními látkami získanými z ropy. To propůjčuje BS nižší alergenicitu a celkově nižší toxicitu, jak ukazují studie hodnotící iritační a toleranční potenciál vůči pokožce. Glykolipidové BS navíc nabízejí strukturální rozmanitost a multifunkčnost, což je činí atraktivními pro aplikace v kosmetickém průmyslu. Nedávné studie se zabývaly BS a chitosanem jako přírodní alternativou k sodium lauryl sulfátu v receptech zubní pasty. Bylo zjištěno, že biosurfaktanty produkované *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus methylotrophicus* a *Candida bombicola* v kombinaci s chitosanem vykazují antimikrobiální aktivitu proti *Streptococcus mutans*, současně bez prokázané cytotoxicity. Tyto kombinace biosurfaktantů a chitosanu inhibovaly životaschopnost biofilmu *Streptococcus mutans*

podobně jako komerční fluoridová zubní pasta. Využití synergických účinků biosurfaktantů a chitosanu může nabídnout slibný udržitelný přístup k vývoji účinných zubních past bez syntetických povrchově aktivních látek. Přestože bude nutno v budoucnu provést další klinické testy, byl prokázán velký potenciál rhamnolipidových biosurfaktantů pro využití ve formě biokompatibilních detergentů a pěnotvorných činidel v přípravcích pro ústní hygienu [19].

Další studie ukázaly, že soforolipidy zvyšují elasticitu, redukují vrásky, zlepšují vzhled pleti a celkově pozitivně působí proti projevům stárnutí. Významným omezením v oblasti aplikací SL pro péči o pokožku však zůstává nedostatečná čistota a chybějící přesnější specifikace těchto látek. Dle evropské legislativy je pro použití nutné jasně definovat čistotu, molekulovou hmotnost a fyzikálně-biochemické vlastnosti. Kromě již zmíněných omezení, které brání snadnému zavedení těchto látek do běžně používané skupiny surovin pro výrobu kosmetiky, jsou dalším problémem nedostačující 2D in-vitro testy [20]. Vzhledem k jejich silné aktivitě proti fytopatogenům, bakteriím a houbám představují soforolipidy potenciál i v zemědělství pro výrobu přírodních pesticidů. Bylo zjištěno, že soforolipidy mají inhibiční účinky na rostlinné patogeny, jako je *Pythium ultimum* a *Moesziomyces sp.* Některé studie se také věnují aplikaci soforolipidů v oblasti biokonverze z potravinového odpadu, například odpadní glycerol lze použít jako fermentační surovinu pro výrobu soforolipidů různými druhy kvasinek, jako je *Candida floricola* [1].

SL se mohou formovat do vezikulárních agregátů a sloužit jako nosiče dalších aktivních látek, což může být velmi užitečné pro farmaceutické aplikace. Soforolipidy lze ale také díky jejich antimikrobiálním účinkům využít jako aktivní látky samotné, například proti bakteriím (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* nebo *Escherichia coli*), nebo proti kvasinkám (např. proti *Candida albicans*)[1]. Antimikrobiální vlastnosti soforolipidů je možné využít i v oblasti textilního průmyslu. Patogeny jsou schopny na oblečení přežít i několik dní, a následně tak pro nositele představují zdroj různých onemocnění. Řešením by mohla být funkcionalizace materiálu, z něž je oblečení vyrobeno, pomocí inkorporace antimikrobiálních aktivních sloučenin. Za účelem výroby antimikrobiálních textilií byly zkoumány různé přírodní i syntetické biocidy, jako například chitosan, bioaktivní peptidy, či triklosan. V mnoha případech byly ovšem zaznamenány problémy, zahrnující potenciální toxicitu, senzibilizaci nebo nepříznivé dopady na životní prostředí. Perspektivní variantou by mohly v budoucnu být právě soforolipidy, avšak výzkumu jejich použití v textilním průmyslu bude nutno věnovat další pozornost [7].

Soforolipidy představují perspektivní sloučeniny i z důvodu prokázaných antivirových a spermicidních účinků, srovnatelných s komerčně využívanými látkami, jako je například Nonoxynol-9. Bylo prokázáno, že acetylace hydrofilních soforosových skupin a esterifikace karboxylových skupin mastných kyselin mají obdobný vliv na specifickou aktivitu. Jako nejúčinnější spermicidní a protivirové činidlo se prokázal diacetylovaný ethylester SL, dále pak monoacetylované a neacetylované deriváty. Bylo také zjištěno, že vliv délky uhlíkového řetězce mastných kyselin na spermicidní či virucidní účinky není jednotný. Kratší řetězce zvyšují virucidní účinnost, ale snižují spermicidní aktivitu, zatímco deriváty s delšími řetězci mají vyšší spermicidní účinnost a nižší virucidní aktivitu. Kyselé formy SL vykazovaly slabé spermicidní účinky, ale dobrý antivirový účinek proti HIV a byly nejméně cytotoxické ze všech testovaných analogů. Na druhou stranu, laktonové formy SL vykazovaly vysokou spermicidní, cytotoxickou a protizánětlivou aktivitu, avšak nízkou virucidní aktivitu.

Soforolipidy se také projeví jako účinné vůči viru Herpes simplex (HSV), který může způsobit velké množství infekcí jak v orofaciální, tak v genitální oblasti. Přírodní směsi laktonových, nelaktonových, ethyl i methylesterů a diacetylovaných ethylesterů SL produkovaných kvasinkou *Candida bombicola* mohou působit jako účinný prostředek proti HSV. Z pěti testovaných sloučenin vykazoval nejlepší aktivitu ethyl 17-L-[(2'-O-β-D-glukopyranosyl-β-D-glukopyranosyl)-oxy]-cis-9-octadecenoát.

Využití by SL mohly nalézt u pacientů se sepsí způsobenou gramnegativními bakteriemi, kdy jsou za hlavní příčinné faktory považovány bakteriální komponenty, včetně DNA, endotoxinů a konkrétně liposacharidů buněčné stěny. Podání SL po vyvolání intraabdominální sepse významně snížilo mortalitu během testů na potkanech. Důvodem může být snížení počtu makrofágů, produkce oxidu dusného a protizánětlivých cytokinů. Vzhledem k tomu, že použitý model sepse byl vyvolán bakteriemi, je možné, že SL snižuje sepsi díky svým antimikrobiálním vlastnostem. Kromě toho SL vykazují protizánětlivé účinky i u jiných onemocnění a mohou i nadále snižovat mortalitu související se sepsí pomocí různých nosičů a transportních systémů [21].

3 INTERAKCE SURFAKTANTŮ S POLYMERY

Polymery společně se surfaktanty jsou dnes běžnou součástí mnoha komerčních výrobků, jelikož jejich kombinováním lze optimalizovat vlastnosti daného produktu. Studium jejich vzájemných interakcí hraje proto velmi důležitou roli [1]. Tyto systémy nacházejí uplatnění v kosmetice, při výrobě farmaceutik nebo v těžebním průmyslu [22].

3.1 Mechanismy interakcí

Je známo, že v případě surfaktantů v roztocích hraje klíčovou roli oblast kritické micelární koncentrace (CMC). Při postupném přidávání surfaktantu do vodného prostředí dochází k významnému poklesu povrchového napětí vody, přičemž povrchově aktivní látka se vyskytuje v roztoku ve formě jednotlivých molekul. Při dosažení CMC se křivka povrchového napětí roztoku víceméně stabilizuje, k dalšímu poklesu již nedochází.

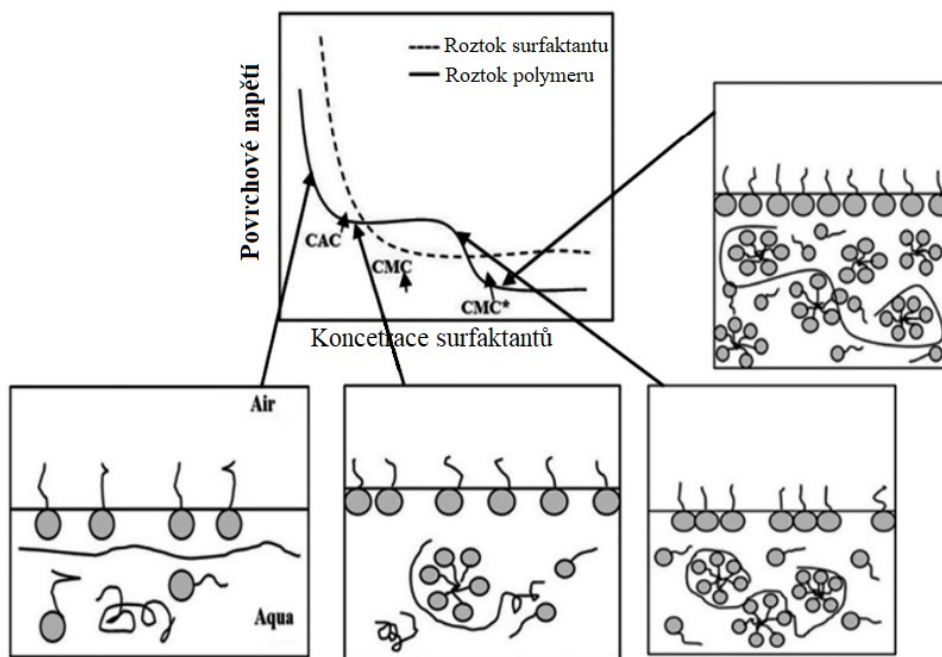
Začlenění polymeru do roztoku významně mění profil povrchového napětí. Zpočátku dochází k poklesu povrchového napětí roztoku polymeru s přidávkou surfaktantu. S rostoucí koncentrací povrchově aktivní látky se však objevuje bod inflexe, který odpovídá kritické agregační koncentraci (CAC). V tomto bodě se molekuly povrchově aktivní látky začnou asociovat s polymerem v roztoku. Kritická agregační koncentrace je vždy nižší než kritická micelární koncentrace. Při dalším zvyšování koncentrace surfaktantu v roztoku již dále nebude docházet k výrazným změnám hodnot povrchového napětí, což je způsobeno tím, že surfaktant se nadále adsorbuje na polymer, je tudíž odstraněn z vodné fáze a nemůže jakkoli měnit hodnotu povrchového napětí. V okamžiku nasycení polymeru povrchově aktivní látkou dochází k opětovnému poklesu povrchového napětí až do oblasti, kdy se tvoří volné micely (hodnota CMC* v Obr. 6).

Mechanismy interakcí mezi polymery a surfaktanty závisí na konkrétním typu a polaritě obou složek. Obzvláště silná interakce je pozorována u směsí polyelektrolytů s opačně nabitými surfaktanty, kde k vazbě přispívá jak elektrostatická přitažlivost, tak kooperativní hydrofobní efekt. Tato silná interakce často vede k výraznému zvýšení viskozity, a dokonce ke vzniku gelových struktur. V případě kombinace ionické povrchově aktivní látky a neionického polymeru může proces probíhat jedním z následujících způsobů: (a) redistribuce molekul surfaktantu na rozhraní roztoku a částí polymerního řetězce, přičemž molekuly surfaktantu jsou vázány jednotlivě podél polymerového řetězce; (c) molekuly surfaktantu se shlukují kolem hydrofobních míst na polymeru; (d) molekuly polymeru se obtácejí kolem micel surfaktantů tak, že segmenty polymeru částečně pronikají

a obklopují polární oblasti micel. Důležitou roli hrají také elektrostatické interakce mezi polymerem a polárními skupinami surfaktantů. Ve všech případech by adsorpce komplexních struktur polymerů/surfaktantů na rozhraní vzduch/roztok měla mít výrazný vliv na pěnivost systému [23].

Důležitým faktorem jsou hydrofobní skupiny ve struktuře polymeru, které jeho interakci se surfaktanty podporují. I poměrně malé hydrofobní skupiny (například metylové skupiny) mohou výrazně zvýšit reaktivitu polymeru, což usnadňuje interakci i s některými neionickými surfaktanty, které byly dříve považovány za inertní. Právě tvorba micel je jednou z možností, jak surfaktant izoluje své hydrofobní skupiny při kontaktu s vodou. Další možností, jak povrchově aktivní látka může izolovat své hydrofobní skupiny od vodné fáze, je vazba s hydrofobními částmi na polymeru. Obecně se anionické povrchově aktivní látky vážou silněji na neionické polymery než látky kationické nebo neionické povahy, přičemž tento rozdíl může být způsoben odlišnými hydratačními vlastnostmi jejich hydrofilních skupin. Asociace povrchově aktivní látky a polymeru může také vést ke změně reologických vlastností celého systému. Adsorpce povrchově aktivní látky podél polymerního řetězce může způsobit konformační změny tohoto polymeru a také trojrozměrné propojení [24].

Existují dva hlavní mechanismy tvorby komplexů mezi polymerem a surfaktantem. První zahrnuje asociaci surfaktantu s polymerem ve formě jednotlivých molekul, druhý pak zahrnuje tvorbu micel surfaktantu na polymerním řetězci nebo v jeho blízkosti. U polymerů s hydrofobními skupinami převládá první možnost interakce, zatímco u hydrofilních polymerů je pravděpodobnější vznik micel. Hnací silou interakce mezi polymerem a povrchově aktivní micelou je stabilizovat rozhraní mezi hydrofobním jádrem micely a vodnou fází [25].



Obrázek 6 Závislost povrchového napětí na koncentraci surfaktantu a jeho CMC
(přeloženo z AJ)

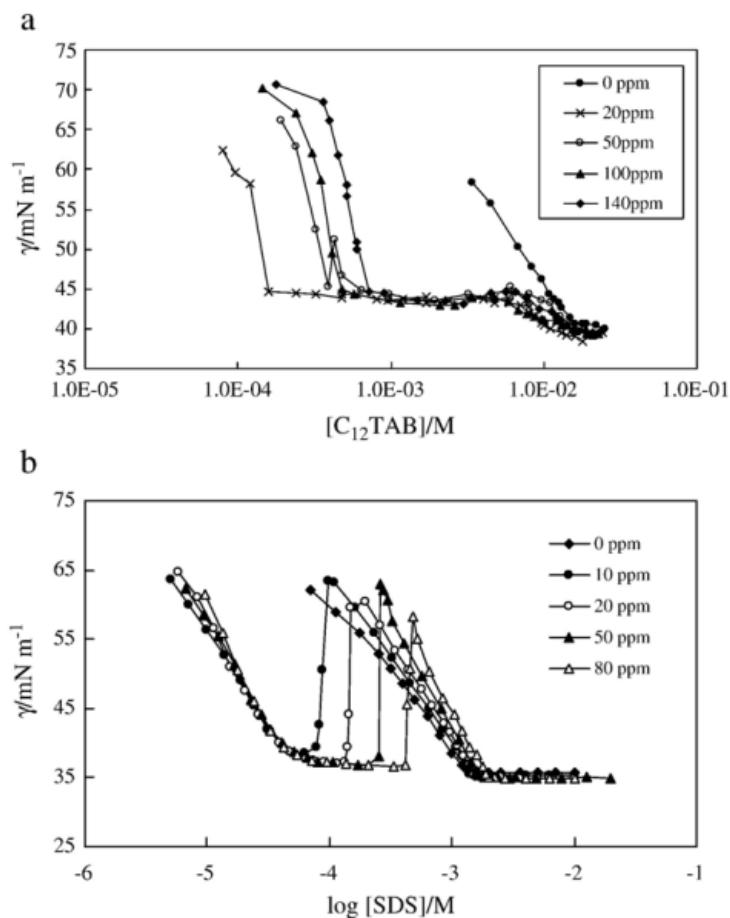
(zdroj: [26])

Interakce mezi surfaktanty a polymery jsou ovlivněny řadou faktorů, včetně povrchového napětí, elektrostatických sil a přítomností dalších složek v roztoku. Vzájemné chování a případné interakce polymerů a surfaktantů lze sledovat pomocí různých experimentálních technik. V posledních letech se kromě klasického měření povrchového napětí začaly využívat i další metody, jako je elipsometrie, neutronová a rentgenová reflexe, nebo mikroskopie atomárních sil. Pro analýzu interakce polyelektrolytů a ionických surfaktantů na rozhraní vzduch-roztok byla s úspěchem využita kombinace měření povrchového napětí a neutronového rozptylu, která umožňuje získat informace o povrchovém složení, množství adsorbovaných látek a struktuře adsorbované vrstvy. Tuto metodu využil Staples a kol. [27] a Taylor a kol. [28] při studiu dvou odlišných typů směsí, které představují extrémy v povrchovém chování. Konkrétně se zaměřili na kationický polyelektrolyt poly(dimethyl-diallyl amonium chlorid) (polyDMDAAC) s anionickým surfaktantem sodium dodecyl sulfátem (SDS), a na anionický polyelektrolyt poly(styren sulfonát) (PSS) s kationickým surfaktantem dodecyl trimethyl amonium bromidem ($C_{12}TAB$). Rozdílné chování obou systémů je vidět na Obrázku 7. Lze si všimnout, že v případě směsi kationické PAL s polymerem (Obr. 7 a) dochází k výraznému poklesu povrchového napětí, v závislosti na koncentraci surfaktantu, po čemž následuje ustálení hodnot, před finálním dosažením CMC. Na základě dat z neutronového rozptylu lze

konstatovat, že v počáteční fázi dochází k tvorbě komplexu na rozhraní mezi oběma složkami.

Obr. 7 b) znázorňuje chování polyDMDAAC a SDS, kde dochází při nízkých koncentracích k prudkému poklesu povrchového napětí, který je nezávislý na koncentraci polymeru. Při vyšších koncentracích SDS lze pozorovat pík na křivce povrchového napětí, který odpovídá částečnému úbytku komplexu z povrchu, kdy dochází k preferenční tvorbě micelárních komplexů v roztoku. Na základě měření lze konstatovat, že adsorpce probíhá ve formě monovrstvy polymer-surfaktantového komplexu, přičemž na povrchu dochází při nízkých koncentracích SDS k zesílené adsorpci surfaktantu.

Staples a kol. také zkoumali vliv neionického kosurfaktantu, hexaethylenglykol mnododecyletheru ($C_{12}E_6$), na chování povrchového napětí ve směsích SDS a polyDMDAAC. Přidání neionického surfaktantu má za účel oslabit elektrostatické interakce mezi polymerem a surfaktantem. S jeho rostoucím zastoupením ve směsi se detekovatelný pík povrchového napětí v systému SDS a polyDMDAAC systematicky snížil [27].



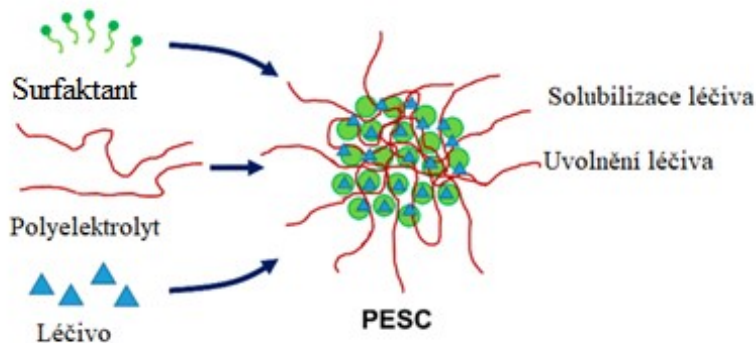
Obrázek 7 Změny povrchového napětí v závislosti na koncentraci povrchově aktivní látky pro různé systémy a) PSS a C_{12}TAB b) SDS a polyDMAAC

(zdroj: [27])

3.2 Polymer-surfaktant komplexy

Obecně směsi polymerů a surfaktantů velmi často vedou k tvorbě komplexů, které jsou řízeny elektrostatickými, hydrofobními nebo Van der Walsovými, případně vodíkovými interakcemi. Zvláště silné interakce mohou nastat při smíchání opačně nabitých polyelektrolytů a surfaktantu ve vodném roztoku, což vede ke vzniku polyelektrolyt-surfaktantových komplexů (PESCs), které lze využít pro výrobu farmaceutických transportních systémů aktivních látek (Obr. 8). Nejjednodušší variantou je kombinace PESCs s homopolyelektrolytem, kdy nosičem aktivní látky je právě komplex, v některém případě může samotná povrchově aktivní látka hrát roli léčiva. Bohužel i v případě využití PESCs existují problémy, které mohou ovlivnit efektivní dodání léčiv. Jedním z nich je nízká solubilizační kapacita, ta je často důsledkem výběru povrchově aktivní látky. Jelikož může

být obtížné dosáhnout vysoké solubilizační kapacity stabilním termodynamickým způsobem, využívají se mikroemulze [29].



Obrázek 8 Komplexy surfaktantu a polyelektrolytu a jejich možné využití pro dodání léčiv (přeloženo z AJ)

(zdroj: [29])

Komplexy polymer a povrchově aktivní látka lze uplatnit v průmyslu i jako stabilizátory emulzí, případně modifikátory viskozity. V takovém případě jsou stejné hydrofobní interakce, které jsou zodpovědné za povrchovou aktivitu a micelizační chování, také příčinou zvýšené viskozity [30]. Při míchání glykolipidového biosurfaktantu s biopolymerem, jako je želatina, alginát nebo chitosan, lze vytvořit hydrogely s modifikovatelnými mechanickými vlastnostmi. V závislosti na pH glykolipid vytváří micelární agregáty (vysoké pH) nebo větší vezikuly (nízké pH). V neutrální až alkalické oblasti (v přítomnosti vápníku) může tvořit samoorganizovaná vlákna. Zatímco micelární a vezikulární agregáty snižují elastické vlastnosti hydrogelů, vlákna zvyšují mechanickou pevnost a viskozitu [31].

4 BIOSURFAKTANTY A POLYMERY

Kombinace biosurfaktantů s různými přírodními nebo syntetickými polymery představují unikátní systém, jenž by mohl nalézt uplatnění v různých průmyslových oblastech.

Jako příklad lze uvést farmaceutický průmysl, kde biosurfaktanty mohou sloužit přímo jako aktivní látky a polymery se využívají jako jejich nosiče, například jsou studovány různé typy hydrogelů a scaffoldů. Výrazným současným problémem je stále častější rezistence mikroorganismů vůči klasické antibiotické léčbě. Dle odhadů by tento problém do roku 2050 mohl znamenat razantní zvýšení úmrtnosti. Častými původci bakteriálních infekcí převážně v nemocničních zařízeních, kteří jsou rezistentní vůči klasické léčbě, jsou stafylokoky a enterobakterie. Obvyklými cestami, kterými se tyto bakterie dostávají do organismu, jsou kožní, respirační nebo genitourinální infekce, spolu s kontaminovanými zdravotnickými prostředky. Biosurfaktanty tedy představují perspektivní možnost, jak výše uvedeným problémům zabránit. Struktura biosurfaktantů je velmi složitá, často jsou součástí různé typy kongenerů, které ovlivňují rozpustnost a tvorbu micel. Proto je důležité vyhodnotit optimální vlastnosti pro předpokládané komerční aplikace těchto látek. Možným řešením jsou jednak různé genetické modifikace kvasinek nebo separace jednotlivých kongenerů prostřednictvím přečištění [2].

V posledních letech jsou studovány kombinace biosurfaktantů a přírodního polymeru chitosanu, který sám o sobě vykazuje antimikrobiální vlastnosti. Chitosan narušuje buněčný obal prostřednictvím interakcí s polyanionty přítomnými v buněčné stěně a s aniontovými fosfolipidy buněčné membrány. V přírodě se tento polymer vyskytuje především v buněčných stěnách hub. Pro komerční využití je extrahován chemickou nebo enzymatickou deacetylací chitinu. Vzhledem k dobré biokompatibilitě a nízké toxicitě, jak pro člověka, tak pro zvířata a životní prostředí, je chitosan aplikován v mnoha oblastech, jako je kosmetický, či farmaceutický průmysl. Mimo to má také vysokou biologickou aktivitu, selektivní propustnost, širokospektrální mikrobiální aktivitu schopnost tvořit gely či filmy, což ho předurčuje právě k využití hlavně v medicínských aplikacích [33]. Mnoho studií se zabývá reologickými vlastnostmi chitosanu, přičemž bylo prokázáno, že s rostoucí koncentrací tohoto přírodního polymeru dochází ke zvyšování jeho viskozity. Tento jev může být důsledkem většího zauzlení molekulárních řetězců, kdy s vyšší koncentrací chitosanu v roztoku se snižuje pohyblivost těchto řetězců. Při vyšších koncentracích roztok ztrácí své Newtonovské vlastnosti. Chitosan je přirozeně nerozpustný ve vodě, při přípravě roztoku chitosanu s ledovou kyselinou octovou ale dochází k reakcím mezi ionty H^+ kyseliny

octové a NH_2 skupiny chitosanu za tvorby NH_3^+ . Mezi nabitými skupinami NH_3^+ vzniká odpuzivá elektrostatická síla, což vede k botnání molekul [33].

Přidání soli může toto elektrostatické odpuzování mezi molekulami snížit, což může vést ke gelování polyelektrolytových řetězců. Lze předpokládat, že chitosan by mohl být využit i k regulaci reologických vlastností soforolipidů v důsledku pozitivních interakcí mezi opačnými náboji, což ve výsledku může vést k tvorbě homogenní synergické sítě. Touto problematikou se zabýval Pingali a kol., jejichž cílem bylo sledovat reologické vlastnosti soforolipidu po přidavku polymeru chitosanu, stejně jako reakci tohoto systému na ionizaci či přidavek elektrolytů. Výsledkem jejich zkoumání výrazné zvýšení viskozity systému po přidání tohoto biopolymeru, v důsledku jeho vzájemných interakcí se soforolipidy a vzniku sítě. Podobné interakce byly v minulosti pozorovány v případě kombinace chitosanu a syntetického anionického surfaktantu [34].

Zajímavou možností je využití chitosanu v rámci přípravy nanočástic, které by potenciálně mohly sloužit jako nosiče pro dodávání biosurfaktantů jako aktivních látek. To bylo potvrzeno studií autorů Bettencourta kol.[35], kde byly připraveny a charakterizovány nanočástice chitosanu, a to iontovou gelací za použití tripolyfosforečnanu sodného (TPP) jako síťovacího činidla, s enkapsulovanými soforolipidy a rhamnolipidy. Bylo prokázáno, že připravené částice chitosanu s rhamolipidy vykazují antimikrobiální aktivitu proti *S. aureus* s minimální inhibiční koncentrací 130 $\mu\text{g/ml}$ a prevenci tvorby biofilmu 99 %. Získané nanočástice také prokázaly přiměřenou cytokompatibilitu při testování na lidských fibroblastických buněčných kulturách.

Chitosanovými nanočásticemi s rhamnolipidy se zabývá Marangon a kol. [32]. Pro charakterizaci částic byly využity různé metody, např. dynamický rozptyl světla, měření zeta potenciálu a polydisperzity. Přídavek rhamnolipidu vedl ke snížení velikosti a PDI chitosanových nanočástic, v souvislosti s vyšší povrchovou energií a stabilitou. Tato změna souvisí se zvýšenou povrchovou energií systému a lepší stabilitou vzniklých částic. Stabilita byla potvrzena i časovým sledováním – nanočástice uchovávané při 4 °C si po dobu 33 dní uchovaly relativně konstantní velikost, PDI i zeta potenciál, což svědčí o jejich dlouhodobé stabilitě. Chemické složení a interakce mezi složkami byly dále analyzovány pomocí FTIR spektroskopie, kdy byly jednotlivé vzorky (samostatný chitosan, rhamnolipid i směsné nanočástice) zpracovány různými způsoby – odléváním filmů, nanesením na křemíkové destičky nebo lisováním do KBr tablet z lyofilizovaných vzorků. Spektra byla měřena v rozsahu 4000–400 cm^{-1} s rozlišením 4 cm^{-1} . Studie se rovněž věnovala vlivu pH na

velikost a zeta potenciál nanočástic. Pro ověření schopnosti nanočástic uvolňovat aktivní látky v biologickém prostředí byla provedena in-vitro studie kinetiky uvolňování chitosanu a rhamnolipidů a to pomocí dialyzačních sáčků s mezní molekulovou hmotností 1000 Da. Výsledky ukázaly postupné a řízené uvolňování obou aktivních látek, přičemž nanočástice s rhamnolipidem vykazovaly pomalejší a stabilnější profil uvolňování díky silnějším interakcím mezi oběma složkami. Tento řízený release profil je zásadní pro terapeutické využití, protože umožňuje udržení efektivní koncentrace látek v místě aplikace po delší dobu. Nanočástice byly také podrobeny morfologické analýze, které odhalila jejich sférický tvar. Na tyto výsledky navazovalo testování buněčné kompatibility a biologické aktivity. V experimentálním modelu byly použity lidské kožní buňky – fibroblasty a keratinocyty. Cytotoxicita byla hodnocena pomocí standardních viabilitních testů (např. MTT nebo alamarBlue) a výsledky ukázaly, že nanočástice, včetně těch s rhamnolipidem, nevykazovaly signifikantní toxické účinky při aplikovaných koncentracích. Z hlediska potenciálu k doručování účinných látek je navíc důležitý pozorovaný řízený uvolňovací profil a schopnost nanočástic interagovat s buněčným povrchem bez jeho narušení. To činí tyto systémy vhodnými nejen pro antibakteriální aplikace, ale i pro širší použití v oblasti cílené terapie, regenerativní medicíny či dermálních formulací. Výsledné nanočástice také prokázaly vynikající antimikrobiální aktivitu vůči stafylokokům, která byla v porovnání se samostatnými chitosanovými částicemi vyšší, a to jak v případě planktonních buněk, tak i biofilmu. Antibakteriální účinek je přičítán synergickému působení obou složek – chitosanu a rhamnolipidu – a jejich cílenému působení na buněčnou membránu bakterie. Vyšší lokální koncentrace aktivních látek v důsledku pozitivního zeta potenciálu ($> +40$ mV) vedla k silné interakci s negativně nabitým povrchem bakteriálních buněk a následnému narušení membránové integrity. Kromě antimikrobiálního účinku byl u C/RL-NPs rovněž potvrzen příznivý profil cytotoxicity – v testech na lidských kožních buňkách nevykazovaly tyto nanočástice signifikantní toxické účinky. Antimikrobiální účinek byl také zlepšen vůči přisedlým bakteriím a nanočástice vykazovaly nízkou toxicitu v modelu lidských buněk.

Další studie provedená Mendesem a kol. [36] popisuje použití nanovláken složených z BS a polymeru pro transdermální podání léčiv. Začlenění fosfolipidů zvýšilo rozpustnost chitosanu a usnadnilo zapouzdření bioaktivní látky uvnitř molekul, což zajistilo řízené uvolňování bioaktivních látek a díky biokompatibilitě vláken i možnost transdermálního podání.

Rhamnolipidy, které společně se soforolipidy řadíme do skupiny glykolipidů, byly také kombinovány s různými polymery za účelem přípravy různých struktur, jako jsou hydrogely a nanočástice. Czaplicka a kol. [37] popsali vliv přidání rhamnolipidů na mechanické vlastnosti alginátových hydrogelů, kdy klíčovým faktorem se prokázala koncentrace rhamnolipidů. Lepších výsledků bylo dosaženo u hydrogelů s koncentrací rhamnolipidů (RL) převyšující kritickou micelární koncentraci (CMC). Mezi molekulami RL a řetězcí alginátu dochází k hydrofobním interakcím, přičemž karboxylové skupiny RL fungují jako dodatečné pasti pro ionty vápníku. Marangon a kol. [32] se zabývali syntézou kompozitních nanočástic na bázi chitosanu a RL, zesíťovaných pomocí tripolyfosforečnanu sodného. Tyto RL-chitosanové částice vykazovaly menší velikost, monodisperzní a stabilnější. Bylo prokázáno, že jejich přípravu ovlivňují elektrostatické interakce mezi karboxylovými skupinami RL a aminoskupinami chitosanu, stejně jako vodíkové vazby mezi jejich –OH skupinami.

Další studovanou kombinací je systém na bázi polymer-surfaktin. Lewinska a kol. ve studii z r. 2022 [38] popsali vylepšenou metodu syntézy nanočástic poly(DL-laktidu) s využitím surfaktinu jako stabilizátoru, prostřednictvím techniky technika nanoprecipitace, což vedlo ke vzniku sférických nanočástic. Ve studii Kundu a kol.[39], zaměřené na výrobu nanokompozitů na bázi polystyrenu a anorganických plniv, využili autoři surfaktin, známý pro své amfifilní vlastnosti, k dosažení rovnoměrné disperze plniva v polystyrenové matici. Přítomnost tohoto biosurfaktantu významně ovlivnila velikost a morfologii nanokompozitů. Zároveň vedla k výraznému zlepšení jejich tepelných a mechanických vlastností. Kromě toho kompozity vykazovaly zvýšenou biologickou rozložitelnost polymeru, což dále zvyšuje jejich atraktivitu a potenciální využití [2].

5 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Následující text obsahuje poznatky získané z aktuálních publikací zabývajících se interakcemi mezi polymery a glykolipidickými mikrobiálními povrchově aktivními látkami, s důrazem na soforolipidy, a také studiem přípravy a významu komplexů na bázi těchto složek. Jak je patrné ze souhrnné Tabulky 1, je v současné době studiu kombinací polymerů, a to jak syntetického, tak přírodního původu, s biosurfaktanty ze skupiny glykolipidů věnována značná pozornost [2].

Tabulka 1 Vybrané studie věnované interakcím mezi glykolipidy a polymery

BS	Polymer	Forma	Interakce	Potenciální aplikace
Soforolipid kyseliny laurové	Hedvábný fibroin	Hydrogel	Hydrofobní interakce mezi proteinem a MK soforolipidu	Ekologičtější alternativa k hydrogelům s chemickými surfaktanty pro tkáňové inženýrství [40]
Soforolipid kyseliny olejové a stearové	Hedvábný fibroin	Propletená síť	Interakce SL agregátů s fibroinem, absence hydrofobních interakcí mezi fibroinem a SL	Inteligentní fibroinové hydrogely [41]
Sophorolipid kyseliny olejové	Chitosan	Hydrogel	Elektrostatické interakce mezi COO ⁻ skupinami v SL a NH ₃ ⁺ skupinami chitosanu	Vývoj formulací na bázi chitosanu (potraviný, kosmetika atd.) [34]

Tabulka 1 pokračování

Glukolipid kyseliny olejové	Alginát, chitosan, želatina	Propletený hydrogel	Samoorganizova ná fibrilární síť glukolipidu kyseliny olejové propletená s biopolymerní sítí prostřednictvím nekovalentních interakcí	Responzivní hydrogely – pH, teplota [31][42]
Soforolipid kyseliny olejové, fosfolipid	Poly (kyselina mléčná-ko- glykolová), DSPE- PEG	Multifunkční nanočásticový systém	Vnitřní jádro na bázi PLGA a laktonové formy SL s kurkuminem stabilizované vnější vrstvou SL	Perorální formulace pro inhibici metastáz rakoviny prsu [9]
Soforolipid kyseliny olejová	Alginát, karboxymethylcelulóz a, zein	Nanočástice	Vznik ternárních nanočástic na bázi hydrofobních, vodíkových vazeb a elektrostatických interakcí	Transportní systém pro potravinářství [43]
Kyselý sophorolipid	Kyselina hyaluronová	Kondicionační a čisticí formulace	-	Účinný kondicionér bez sulfátů a silikonů [44]

Mezi přírodní polymery lze řadit hedvábný fibroin, chitosan, alginát nebo želatinu. Ze syntetických polymerů lze uvést např. kyselinu polyglykolovou nebo polyethylen glykol. Zmíněné systémy mají velký potenciál ve farmacii nebo biomedicině, a to jako hydrogely pro tkáňové inženýrství nebo nosiče léčiv. Hydrogely lze připravit smícháním přírodních polymerů s glykolipidy za stanovených optimálních podmínek. Tvorba gelu a následná kinetika uvolňování je výrazně ovlivněna zvoleným typem a koncentrací biosurfaktantů, koncentrací polymerního roztoku, přidavkem soli nebo úpravou pH [2].

Studium interakcí mezi biosurfaktanty a polysacharidy hraje významnou roli i v oblasti léčby některých kožních onemocnění, jako je *acne vulgaris*, atopická dermatitida nebo *rosacea*. Ke vzniku všech zmíněných onemocnění výrazně přispívá tvorba biofilmu, což je společenství mikroorganismů tvořené extracelulární polymerní substancí (EPS). Hlavními složkami EPS jsou polysacharidy, proteiny, nukleové kyseliny a lipidy, přičemž právě polysacharidy mohou přispívat k mechanické stabilitě biofilmů. Stabilita biofilmů díky polysacharidům je výsledkem jakési polymerní hydratované sítě, kterou polysacharidy vytváří, kromě toho jsou také zdroje živin či brání buňku před vysycháním [45]. K léčbě výše uvedených onemocnění se často používají antimikrobiální přípravky, avšak přítomnost biofilmů interferuje s léčbou a může výrazně snížit její účinnost, například z důvodu různých stresových reakcí, změn mikroprostředí, nebo tvorby perzistujících buněk. Kromě toho mohou k léčbě využívaná antibiotika v nízkých koncentracích tvorbu biofilmu spíše indukovat než potlačovat.

Zajímavou studií je práce autorů Kaga a kol. [46] jejímž cílem bylo sledovat interakce soforolipidu a β -glukanu jako modelového polysacharidu a významné složky EPS, a to pomocí měření dynamického rozptylu světla, povrchového napětí a izotermické titrační kalorimetrie (ITC). Bylo prokázáno, že přítomnost soforolipidů inhibovala agregaci β -glukanu, zatímco SDS, který byl použit jako referenční povrchově aktivní látka, agregaci β -glukanu ve vodném roztoku zvyšoval. Zvyšující se koncentrace soforolipidů navíc vedla k rozptýlení β -glukanu v roztoku. Tenziometrickým měřením bylo prokázáno, že soforolipidy interagují s β -glukanem spíše v objemu roztoku než na rozhraní vzduch/kapalina. Kromě toho byla pozorována výraznější změna povrchového napětí než v případě přidavku SDS do roztoku β -glukanu, což naznačuje silnější interakci právě mezi soforolipidy a β -glukanem. Dále bylo zjištěno, že k interakci mezi soforolipidy a β -glukanem dochází během demicelizace za významného podílu hydrofobních vazeb.

Současně bylo prokázáno, že vlivem interakce nedochází ke změnám konformace struktury β -glukanu.

Studie autorů Lassenbergera a kol. [41] potvrdila antimikrobiální vlastnosti hydrogelů na bázi hedvábného fibroinu a SL odvozených z kyseliny olejové a stearové. Autoři popsali vznik interpenetrující gelové sítě, kde gelace hedvábného fibroinu byla výrazně urychlena přidáním SL. Vyšší účinnost prokázal soforolipid s nenasyceným C18:1 řetězcem ve srovnání se SL s nasyceným řetězcem na bázi kyseliny stearové. Bylo tedy prokázáno, že stupeň nenasycenosti mastné kyseliny ovlivňuje kinetiku gelace. Využitím spektroskopických metod byla potvrzena změna konformace fibroinu z náhodného klubka na strukturu beta-skládaného listu, což přispělo ke stabilitě výsledného filmu. Výsledkem byly hydrogely s antimikrobiální aktivitou a biokompatibilitou. Dále byly testovány systémy na bázi sericinu, nebo ligninu a SL s potenciálem pro hojení ran, které vykazovaly vynikající antibakteriální aktivitu a podporovaly růst fibroblastů. Rozsáhlý výzkum biologických vlastností těchto systémů potvrzuje potenciální využití v biomedicínských aplikacích pro regeneraci tkání i v dalších oblastech, včetně zemědělství a kosmetiky [2].

Interakcím mezi soforolipidy a chitosanem se věnuje Pingali a kol. [34], která poukazuje na zásadní roli pH a přítomnost elektrolytů při tvorbě a stabilitě komplexů. Výsledky ukazují, že elektrostatické interakce mezi kationickým chitosanem a anionickými soforolipidy vedou k tvorbě stabilních agregátů a výrazné změně reologických vlastností. Systémy s vyššími hodnotami pH vykazovaly silnější interakce díky vyšší ionizaci karboxylových skupin soforolipidů, což přispívalo k lepší kompatibilitě s chitosanem a ke vzniku homogennějších gelových struktur. Z hlediska aplikací tyto chitosan-soforolipidové systémy vykazují nejen stabilní fyzikálně-chemické vlastnosti, ale rovněž výborný biologický profil, čímž se zařazují mezi kandidáty pro vývoj moderních bioaktivních hydrogelů. Takové materiály mohou být využity například při hojení ran, jako nosiče léčiv nebo v oblasti tkáňového inženýrství. Oproti klasickým syntetickým systémům nabízí navíc výhodu biologické rozložitelnosti, netoxicity a udržitelnosti.

Další zajímavou publikací je studie Narciso a kol [47], ve které byla využita 3D tištěná síťovina na bázi chitosanu a biosurfaktantů (konkrétně soforolipidů a surfaktinu), jako antibakteriální povlak pro silikonové zdravotnické součásti, které jsou vysoce náchylné k mikrobiální kontaminaci a infekci. Z testovaných BS byly výrazně lepší antibakteriální a antibiofilmové vlastnosti prokázány u systému se soforolipidy, při zachování vysoké cytokompatibility. Ve studii autorů Bettencourt a kol. [35] autoři připravili chitosanové

nanočástice, inkorporující jak soforolipidy tak rhamnolipidy, a to metodou iontové gelace. Pomocí FTIR-ATR (Fourierova transformovaná infračervená spektroskopie se zeslabeným odrazem) a transmisní elektronové mikroskopie (TEM) byla potvrzena integrita micelární struktury SL uvnitř chitosanové matrice. Antimikrobiální testy prokázaly, že částice chitosanu s rhamnolipidy (RL-CS) inhibovaly růst *S. aureus* s minimální inhibiční koncentrací 130 µg/ml a dokázaly redukovat tvorbu biofilmu o 99 %, přičemž byla zachována cytokompatibilita vůči lidským fibroblastům.

Další studie [48] se zabývá interakcí kyselé formy soforolipidu (SL) s modelovými membránami tvořenými fosfatidylcholinem, což je klíčový lipid buněčných membrán savců. Pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC), rentgenové rozptylové metody (SAXS a WAXS) a infračervené spektroskopie (FTIR), byla analyzována termotropní a strukturální odezva modelových membrán 1,2-dipalmitoy-sn-glycero-3-fosfocholinu (DPPC) a 1-palmitoy-2-oleoy-sn-glycero-3-fosfocholinu (POPC) na přítomnost SL. DPPC byl vybrán kvůli své přesně definované fázové přeměně při 41 °C, zatímco POPC umožňuje studium membránové permeability při pokojové teplotě. Výsledky prokázaly, že SL ovlivňuje termotropní a strukturní vlastnosti fosfatidylcholinových membrán, což naznačuje jeho možný biologický účinek na eukaryotické buňky.

V publikaci autorů Niki Bacille a kol. [49] byla pro stabilizaci emulzí (O/W) využita kyselé forma soforolipidů v kombinaci s chitosanem získaným z krevetích schránek. Ze záporně nabitých micel SL a kladně nabitého chitosanu byly vytvořeny stabilní komplexní koacerváty koloidních rozměrů. Bylo prokázáno, že tyto komplexy difundují jak na rozhraní vzduch – voda, tak olej – voda, a fungují jako koloidní emulgátory prostřednictvím tzv. Pickeringova efektu, což je mechanismus stabilizace pomocí pevných, polopevných nebo měkkých částic. Tato technologie byla testována na systému dodekan-voda, přičemž výsledné emulze vykazovaly dlouhodobou stabilitu (v řádu měsíců). Emulze připravené v poměru 70 % tukové složky a 30 % vodného roztoku koacervátu by dle autorů studie mohly nalézt uplatnění v kosmetických aplikacích.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍLE PRÁCE

- Charakterizace povrchových a stabilitních vlastností vzorků soforolipidů
- Studium interakcí mezi soforolipidy (SL) a polysacharidem chitosanem (CH)
- Příprava a charakterizace komplexů na bázi chitosanu a soforolipidu
- Využití komplexů CH/SL pro emulzifikaci

7 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A POSTUPY

7.1 Použité chemikálie

Soforolipidy (EPS Biotechnology)

Nízkomolekulární chitosan (Sigma-aldrich)

Kyselina octová ledová p.a. (iplub Uherský Brod)

Bezvodý octan sodný (Penta s.r.o)

Slunečnicový olej (Majola)

7.2 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy (VERKON)

pH metr (CPH 51 s kombinovanou pH elektrodou HC 103)

Magnetické míchadla (Heidolph, LAVAT)

Konduktometr (inoLab Cond 7110)

Tenziometr (EasyDyne Krüs)

Viskozimetr (Brookfield dv-iii ultra)

Zetasizer Nano series

Spektrofotometr (Jasco V-750)

Dynamický analyzátor pěn (Krüss DFA100)

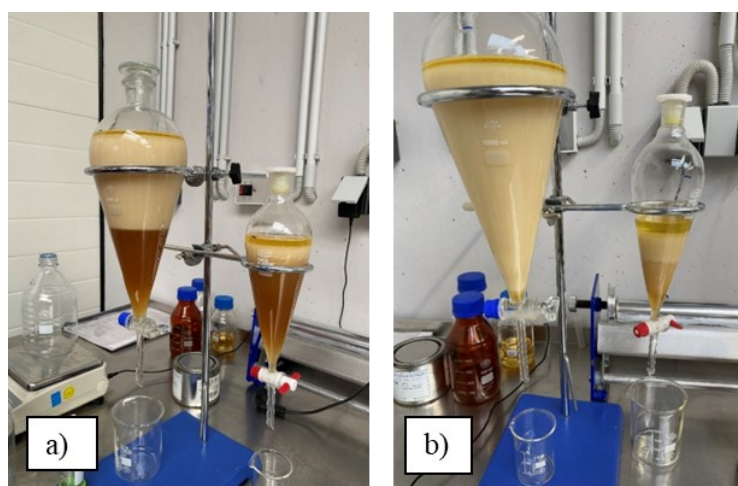
Mikropipety (Eppendorf)

Laboratorní sklo (pipety, odměrné baňky, lžičky, kádinky, odměrné válce, nálevky)

8 METODIKA

8.1 Výroba soforolipidů

Výroba soforolipidů probíhala ve firmě EPS biotechnology, s.r.o., a to ve 2 L bioreaktorech po dobu 7 dní. Zdrojovým mikroorganismem byla kvasinka *Candida bombicola*. Po sběru surových soforolipidů (Obr. 9) byla provedena alkalická hydrolýza. V 0,5 l láhvích Duran bylo ke 100 ml surových soforolipidů přidáno 200 ml 4M NaOH (0,5 l zásobního roztoku připraveno smícháním 160 ml 50 % NaOH s 340 ml vody). Směs byla zahřívána ve vodní lázni na 90 °C po dobu 10 minut. Poté byla směs uložena do skleněných lahví Duran, z nichž byly následně odebírány vzorky pro další měření.



Obrázek 9 a) Separace a sběr surových soforolipidů b) Zbylé fermentační médium

(zdroj: vlastní)

8.2 Stabilitní studie vzorků soforolipidů

Stabilita vzorků alkalických soforolipidů uložených při teplotě 25 ± 3 °C a 4 ± 3 °C byla sledována v čase prostřednictvím vizuálního hodnocení a měření vybraných fyzikálně-chemických parametrů (pH, viskozita, povrchové napětí) v pravidelných časových intervalech. Viskozita byla měřena pomocí viskozimetru Brookfield dv-iii ultra za použití spindlu C4-18 při otáčkách 200 rpm a laboratorní teplotě 25 ± 3 °C (Obr. 10). Povrchové napětí bylo měřeno pomocí tenziometru EasyDyne Krüs za využití metody Wilhelmyho destičky (viz postup v kapitole 8.4.4)



Obrázek 10 Viskozimetr Brookfield dv-iii ultra

(zdroj: vlastní)

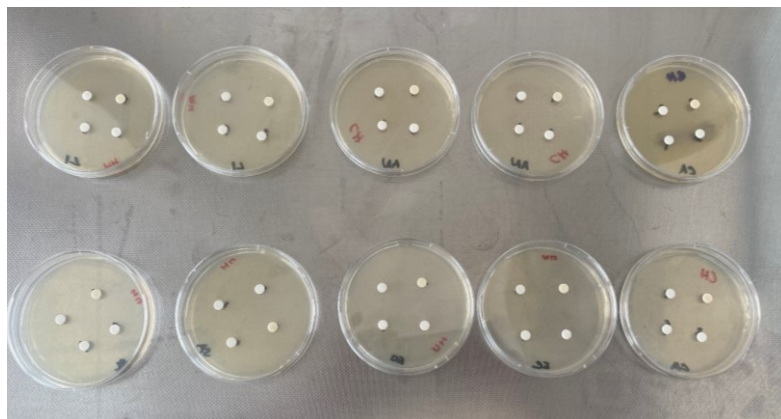
8.3 Testování antimikrobiální aktivity

U připravených soforolipidů (SL) byla testována jejich antimikrobiální aktivita pomocí diskové difuzní metody (Obr. 11). Použity byly mikroorganismy, které jsou součástí sbírky mikroorganismů ÚIOŽP FT UTB ve Zlíně. Suspenze o zákalu 0,5 McF byly následně inokulovány na Petriho misky s Mueller Hinton agarem (HiMedia Laboratoires, Indie). Po zaschnutí mikrobiální suspenze byly na povrch misek umístěny sterilní papírové disky o průměru 6 mm, přičemž na každý disk bylo nadávkováno 10 μ l testovaného vzorku. Takto připravené Petriho misky byly inkubovány při optimální teplotě (Tab. 2). Po inkubační době byly hodnoceny inhibiční zóny kolem disků.

Tabulka 2 Použité mikroorganismy pro testování antimikrobiální aktivity

MO	T _{inkubace} [°C]
<i>Escherichia coli</i>	37
<i>Listeria ivanovii</i>	37
<i>Staphylococcus aureus</i>	37
<i>Candida albicans</i>	25
<i>Aspergillus niger</i>	25

(zdroj: vlastní)



Obrázek 11 Připravené Petriho misky pro diskovou metodu před kultivací

(zdroj: vlastní)

8.4 Charakterizace roztoků soforolipidů SL

8.4.1 Příprava pufrů

Pro jednotlivá měření byly připraveny acetátové pufrы o pH 3,5, 4,5 a 5,5 smícháním daného množství ledové kyseliny octové s octanem sodným a doplněním potřebného množství vody. Přídavky jednotlivých složek jsou uvedeny v Tabulce 3. U připravených roztoků pufrů bylo kontrolováno pH pomocí bateriového pH metru, který byl kalibrován fosfátovým a ftalátovým pufrem.

Tabulka 3 Poměry pro přípravu acetátových pufrů

pH	kyselina octová [ml]	octan sodný [g]
3,5	5,4	0,395
4,5	3,2	3,692
5,5	0,5	7,355

(zdroj: vlastní)

8.4.2 Příprava zásobních roztoků soforolipidů

Byly připraveny zásobní roztoky SL (o koncentraci 1 mg/ml) v prostředí příslušného pufru, nebo destilované vody, a to navážením 1 g soforolipidů do 100 ml odměrné baňky a doplněním po rysku příslušným roztokem.

8.4.3 Příprava pracovních roztoků soforolipidů

Ze zásobního roztoku (kapitola 8.4.2.) bylo připraveno 12 vzorků o koncentracích v rozmezí od 0,01 mg/ml do 2 mg/ml do 50 ml odměrných baněk pipetované objemy byly vypočítány dle rovnice (1)

$$c_1 V_1 = c_2 V_2 \quad (1)$$

Kde V_1 odpovídá pipetovanému množství látky ze zásobního roztoku [ml], c_1 výchozí koncentraci roztoku [mg/ml], V_2 objem výsledného roztoku [ml] a c_2 požadované koncentraci výsledného roztoku [mg/ml].

8.4.4 Měření povrchového napětí

Měření bylo provedeno na tenziometru EasyDyne Krüs (Obr. 12) metodou Wilhelmyho destičky při laboratorní teplotě 25 ± 3 °C. Výsledná hodnota měření byla automaticky přístrojem vyhodnocena jako průměr z 5 měření, přičemž každá sada pracovních roztoků (připravených v kapitole 8.4.3.) byla proměřena dvakrát. Micelární parametry byly vypočítány z tenziometrických dat podle následujících vztahů dle rovnice Gibbsovy adsorpční izotermy (2) a rovnice pro výpočet plochy, kterou jedna molekula surfaktantu zaujímá na rozhraní (3):

$$\Gamma = -\frac{1}{RT} \left(\frac{d\gamma}{d \ln C} \right)_T \quad (2)$$

$$a = \frac{1}{N_A \Gamma} \quad (3)$$

Kde Γ [mol/m²] je povrchová koncentrace molekul na rozhraní, R je univerzální plynová konstanta 8,314 J·mol⁻¹·K⁻¹, T je teplota 298 K, $d\gamma/d \ln C$ je směrnice přímky získané z grafu závislosti $\gamma = f(\ln C)$, a [nm²] je plocha jedné molekuly při rozhraní, N_A je Avogadrova konstanta $6,023 \cdot 10^{23}$

Na základě tenziometrie byl stanoven také povrchový tlak, dle Rovnice (4).

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (4)$$

Kde γ_0 odpovídá naměřenému povrchovému napětí destilované vody [mN/m] a γ odpovídá naměřenému povrchovému napětí vzorku [mN/m].



Obrázek 12 Tenziometr EasyDyne Krüss

(zdroj: vlastní)

8.4.5 Konduktometrie

Vodivostní měření bylo prováděno pomocí konduktometru inoLAB Cond 7110 (Obr. 13) při laboratorní teplotě. Byly proměřeny sady pracovních roztoků SL s odpovídajícím pufrem a také roztoky SL ve vodě. Výsledky byly vyjádřeny jako průměr ze dvou stanovení.



Obrázek 13 Konduktometr inoLab Cond 7110

(zdroj: vlastní)

8.4.6 Měření stability pěny

Pro měření stability pěny byly připraveny čtyři roztoky SL ve vodě a odpovídajících pufrech, a to ředěním ze zásobního roztoku SL dle rovnice (5), na výslednou koncentraci 7 mg/ml. Pro stanovení pěnivosti byly využity dvě metody, a to Ross-Millesova metoda a měření pomocí dynamického analyzátoru pěny Krüss DFA 100.

$$c_1 V_1 = c_2 V_2 \quad (5)$$

Kde V_1 odpovídá pipetovanému množství látky ze zásobního roztoku [ml], c_1 výchozí koncentraci roztoku [mg/ml], V_2 objem výsledného roztoku [ml], a c_2 požadované koncentraci výsledného roztoku [mg/ml].

Metoda Ross-Milles

Do čistého odměrného válce o objemu 50 ml bylo pomocí pipety nadávkováno 15 ml roztoku. Stejně množství daného roztoku bylo nabráno do pipety, která byla umístěna vertikálně v definované výšce nad válec. Následně se roztok nechal volně stékat z pipety do odměrného válce. Bezprostředně poté byla změřena výška vzniklé pěny. Měření bylo poté provedeno ještě v čase, konkrétně po 30 a 60 minutách. Celý experiment byl zopakován dvakrát.

Metoda pomocí přístroje Krüss DFA 100

Z každého roztoku bylo odebráno 50 ml do skleněné trubice, která byla následně umístěna do přístroje pro dynamickou analýzu pěny. Po nastavení požadovaných parametrů (průtok 0,2 L/min, výška prosvícení 12 %) bylo zahájeno měření. Následně byla monitorována počáteční pěna a její pokles během celkové doby 600 s. Každý vzorek byl analyzován dvakrát.

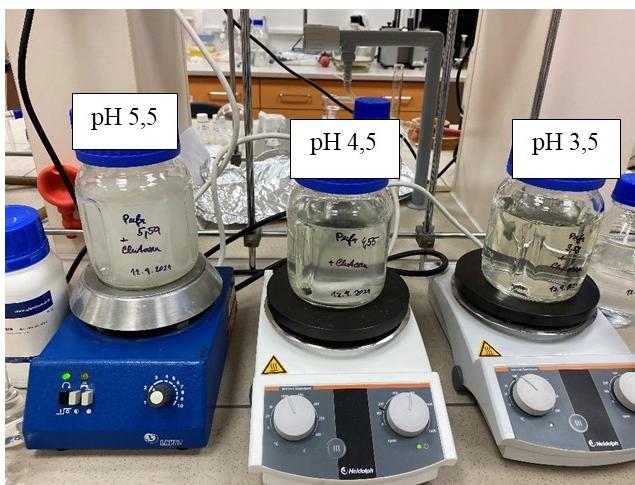
8.5 Charakterizace vzorků chitosanu se soforolipidy CH/SL

8.5.1 Příprava roztoků chitosanu

Byly připraveny roztoky chitosanu o objemu 500 ml a koncentraci 10 mg/ml v prostředí pufrů pH 3,5 a pH 4,5, v případě pH 5,5 byl z důvodu omezené rozpustnosti připraven roztok o koncentraci poloviční, tj. 5 mg/ml. Vypočítané množství dle rovnice (6) bylo naváženo s přesností na 0,0001 g a následně homogenizováno na magnetickém míchadle při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin (Obr.14).

$$m_1 = V_1 \cdot c_1 \quad (6)$$

Kde m_1 odpovídá hmotnosti chitosanu [mg], c_1 odpovídá požadované koncentraci resveratrolu [mg/ml], V_1 požadovanému objemu roztoku [500 ml].



Obrázek 14 Příprava roztoků chitosanu

(zdroj: vlastní)

8.5.2 Příprava vzorků chitosan/soforolipid CH/SL

Pro přípravu vzorků CH/SL byl napipetován odpovídající objem ze zásobního roztoku soforolipidů, k němuž bylo přidáno 20 ml roztoku chitosanu, doplněno odpovídajícím pufrům po rysku do 50 ml odměrné baňky (resp. do 25 ml odměrné baňky v případě pH 5,5, u něhož bylo nutno zásobní roztok chitosanu připravit o nižší koncentraci kvůli horší rozpustnosti). Po přidání všech složek byly směsi homogenizovány na magnetickém míchadle po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Koncentrace chitosanu ve výsledných roztocích byla konstantně 4 mg/ml a koncentrace SL se pohybovala v rozmezí od 0,01 mg/ml do 2 mg/ml.

8.5.3 Sledování interakcí CH/SL

Hodnocení interakcí mezi chitosanem a soforolipidy probíhalo při laboratorní teplotě pomocí měření povrchového napětí (kapitola 8.4.4), vodivosti (kapitola 8.4.5) a viskozity (kapitola 8.2) prostřednictvím viskozimetru Brookfield dv-iii ultra. Výsledky byly průměrem minimálně ze dvou stanovení.

8.5.4 Měření zeta potenciálu

Měření zeta potenciálu bylo provedeno u všech sad vzorků chitosanu se SL (v rozmezí koncentrací od 0,01 mg/ml do 2 mg/ml) v odpovídajícím pufru na přístroji Zetasizer. Po důkladném promíchání bylo 10 μ l vzorku napipetováno do kádinky a důkladně promícháno s 3 ml pufru o odpovídajícím pH, který byl přefiltrován přes stříkačkový filtr VWR. Takto připravený vzorek byl naplněn do kyvety a měřen při laboratorní teplotě 25 ± 3 °C.

8.5.5 Turbidimetrické měření

U připravených sad vzorků byla proměřena jejich absorbance na UV-VIS spektrofotometru při fixní vlnové délce 400 nm. Každá koncentrace byla proměřena dvakrát. Takto získané hodnoty byly následně využity pro výpočet transmittance dle rovnice (7) a turbidity dle rovnice (8), kde A odpovídá naměřené absorbanci vzorku.

$$\text{Transmittance} = 10^{-A} \quad (7)$$

$$\text{Turbidita} = 100 - \text{Transmittance} (\%) \quad (8)$$

8.5.6 Antibakteriální aktivita

Testování bylo provedeno pomocí diskové difuzní metody (viz Kapitola 8.3) na vybraných vzorcích chitosanu s 2 mg/ ml SL v odpovídajícím pufru o všech pH (3,5; 4,5; 5,5).

8.6 Stabilita emulzí

8.6.1 Příprava emulzí

Každá emulze obsahovala 6 g slunečnicového oleje a 14 g vodné fáze na bázi směsi chitosanu a soforolipidů v daném pH o koncentraci 4 mg/ml polymeru a 5 mg/ml biosurfaktantu. Jako kontrolní vzorek byla připravena emulze obsahující pouze směs oleje a vody ve stejném poměru, tj. 6 g a 14 g. Po navážení složek v daném poměru byly emulze homogenizovány pomocí Ultraturraxu, a to po dobu 1 minuty při otáčkách 13 000 rpm. Následně bylo provedeno vizuální hodnocení (ihned a v čase po uložení vzorků při laboratorní teplotě) a charakterizace pomocí měření velikosti částic a zeta potenciálu.

8.6.2 Měření velikosti částic a zeta potenciálu

U připravených emulzí byla také měřena velikost částic pomocí přístroje Zetasizer. Z každé připravené emulze bylo odebráno 0,5 ml a doplněno 1 ml přefiltrovaného pufru (pomocí stříkačkového filtru VWR o velikosti pórů 0,2 μm). Následně byl takto připravený vzorek přeměřen na velikost částic při laboratorní teplotě 25±3 °C. U emulzí byl také měřen zeta potenciál, a to dle podmínek uvedených v Kapitole 8.5.4.

8.6.3 Turbidimetrické měření

Absorbance byla u připravených emulzí měřena při fixní vlnové délce 400 nm na UV-VIS spektrofotometru a přepočítána na hodnoty turbidimetrie (dle postupu viz Kapitola 8.5.5).

8.6.4 Index krémování

Na základě indexu krémování lze posoudit, zda je daná emulze stabilní či nikoli. U připravených vzorků emulzí byl vypočítán index krémování dle rovnice 9.

$$CI = \frac{H_c}{H_t} \cdot 100\% \quad (9)$$

kde H_c odpovídá výšce krémové vrstvy [mm] a H_t celkové výšce emulze [mm].

9 VÝSLEDKY A DISKUZE

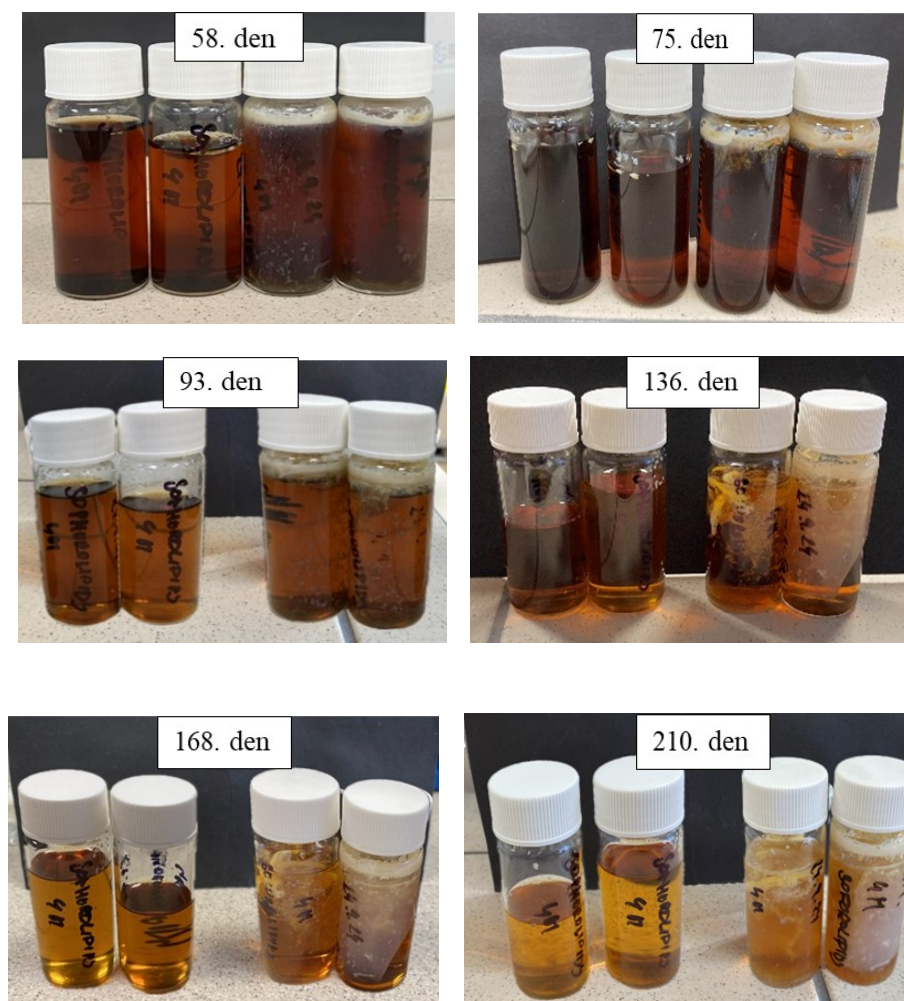
9.1.1 Stabilitní studie vzorků soforolipidů

Vzorky soforolipidů byly sledovány po dobu 8 měsíců ve dvou režimech skladování – při laboratorní teplotě (25 ± 3 °C) a v lednici (4 ± 3 °C). Je patrné, že u vzorků uložených v lednici se objevují známky sraženiny, které z povrchové části se během času postupně vyskytují v celém objemu vzorku. V horní části vzorků lze pozorovat nažloutlou „krémovou“ vrstvu (Obr. 15–16). Na druhou stranu vzorky skladované při laboratorní teplotě zůstaly poměrně stabilní po celou dobu testu, pouze s mírnou změnou barvy na světlejší. Tento rozdíl lze vysvětlit teplotně závislou rozpustností a micelizací soforolipidů v zásaditém prostředí. Při 4 ± 3 °C klesá kinetická energie molekul a narůstá tendence k agregaci, vznikají nerozpustné částice, které rychle sedimentují. Naopak při vyšší teplotě jsou micely dynamičtější, udržují disperzi lipidové fáze a srážení probíhá pomaleji [50]. Studie [51] zkoumá chování soforolipidů ve vodných roztocích pomocí řady různých metod jako je např. rentgenová difrakce. Výsledky ukázaly, že soforolipidy mohou tvořit kubické fáze kapalných krystalů, což je důležité pro pochopení jejich „samoorganizačních“ vlastností a potenciálních aplikací. Ve studii není uvedeno, při jaké teplotě krystaly vznikaly, ale uvádí ji jako faktor ovlivňující vznik.



Obrázek 15 Vzorky SL 2. den od výroby ($T=25$ °C)

(zdroj: vlastní)



Obrázek 16 Vzorky SL v různých časech od výroby: levá dvojice skladována při $25\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, pravá dvojice při $4\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

(zdroj: vlastní)

V tabulce 4 jsou zaznamenány naměřené hodnoty povrchového napětí, viskozity a pH u vzorků skladovaných při teplotě $25 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $4 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ v průběhu času. Je zřejmé, že během sledované doby nedošlo k výrazným změnám sledovaných parametrů. U vzorků skladovaných při $25 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ bylo pozorováno pouze mírné zvyšování povrchového napětí (γ), které se stabilizovalo na hodnotách kolem 35 mN/m , zatímco vzorky skladované při nižší teplotě si zachovaly víceméně stabilní povrchovou aktivitu. Viskozita vzorků uložených v laboratoři byla dle předpokladu nižší, v rozsahu mezi $4,1$ a $4,8\text{ mPa}\cdot\text{s}$, v porovnání s roztoky skladovanými při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, kde byl zaznamenán i větší rozptyl hodnot během času. Všechny vzorky vykazovaly vyšší hodnoty pH, což lze po úpravě SL alkalickou hydrolyzou přepokládat.

Tabulka 4 Souhrn výsledků pro měření stability u vzorků soforolipidů

	Teplota skladování					
	25±3 °C			4±3 °C		
Den od výroby	γ (mN/m)	η (mPa·s)	pH	γ (mN/m)	η (mPa·s)	pH
2	30,4±0,4	4,5± 0,0	13,4	-	-	-
				-	-	-
58	33, 5 ± 0,9	4,8± 0,2	12,5±0,0	36,7± 0,0	5,5±1,1	12,6±0,0
75	33, 6 ± 0,4	4,3±0,2	13,0±0,0	34,5 ± 0,3	5,7±1,4	13,0±0,1
93	34,0± 0,1	4,5±0,0	12,6±0,1	35,8 ± 0,6	5,5±1,3	12,5±0,1
136	34,5±0,1	4,6±0,0	12,8±0,1	36,1±0,6	6,4±0,3	12,5±0,0
163	35,3±0,6	4,3±0,1	11,5±0,0	35,5±0,1	6,1±0,9	11,5±0,0
168	34,0±0,1	4,1±0,0	14,0±0,0	35,0±0,0	4,4±0,1	14,1±0,0
210	35,1±0,4	4,3±0,0	12,4±0,0	36,0±0,4	6,3±0,8	12,3±0,0

(zdroj: vlastní)

9.1.2 Testování antimikrobiální aktivity SL

Výsledky agar difúzního testu surového SL a vzorku SL po alkalické hydrolýze jsou shrnuty v Tabulce 5. Je zřejmé, že vzorek surového SL z kvasinky *Candida bombicola* (100 %) prokázal vysokou antimikrobiální aktivitu proti *Staphylococcus aureus*, *Listeria ivanovii* a *Aspergillus brasiliensis*. Nejvyšší citlivost vykazovala *Listeria ivanovii* (inhibiční zóna 15 mm). Naopak žádná inhibiční zóna nebyla zaznamenána v případě *Escherichia coli* a *Candida albicans*. V případě alkalického SL lze pozorovat antimikrobiální účinky proti všem testovaným mikroorganismům, což potvrzuje příznivý vliv alkalizace proti kvasinkovým infekcím.

Tabulka 5 Inhibiční zóny testovaných vzorků (včetně disku 6 mm)

Vzorek	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria ivanovii</i>	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	<i>Candida albicans</i>
Surový SL z <i>C. bombicola</i> . (100 %)	N	12	15	14	N
Alkalický SL (33,3 %)	9	8	9	13	15

(zdroj: vlastní)

* N – žádná inhibiční zóna.

V publikaci [52] byly hodnoceny antibakteriální účinky čistých laktonických soforolipidů (LSL) proti grampozitivním bakteriím *Staphylococcus aureus* a *Lactobacillus* sp. a gramnegativním *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*. Po inkubaci vzorků byly měřeny inhibiční zóny, jejichž velikost se výrazně lišila v závislosti na použitém mikroorganismu. Nejvyšší účinnost LSL byla zaznamenána proti *S. aureus*, u kterého při koncentraci 0,50 mg/ml dosahovala inhibiční zóna průměru 11,25 mm. Při zvýšení koncentrace na 3,13 mg/ml se inhibiční účinek projevil také vůči *P. aeruginosa*, kde průměr zóny činil přibližně 7,30 mm. U *Lactobacillus* sp. a *E. coli* se inhibiční zóna neobjevila ani při nejvyšší testované koncentraci 25,00 mg/ml. Na rozdíl od dřívější studie autorů Shaha a kol. [53] tyto výsledky ukázaly, že LSL nevykazuje konzistentní antibakteriální účinek proti grampozitivním, ani proti gramnegativním bakteriím.

9.2 Charakterizace roztoků soforolipidů SL

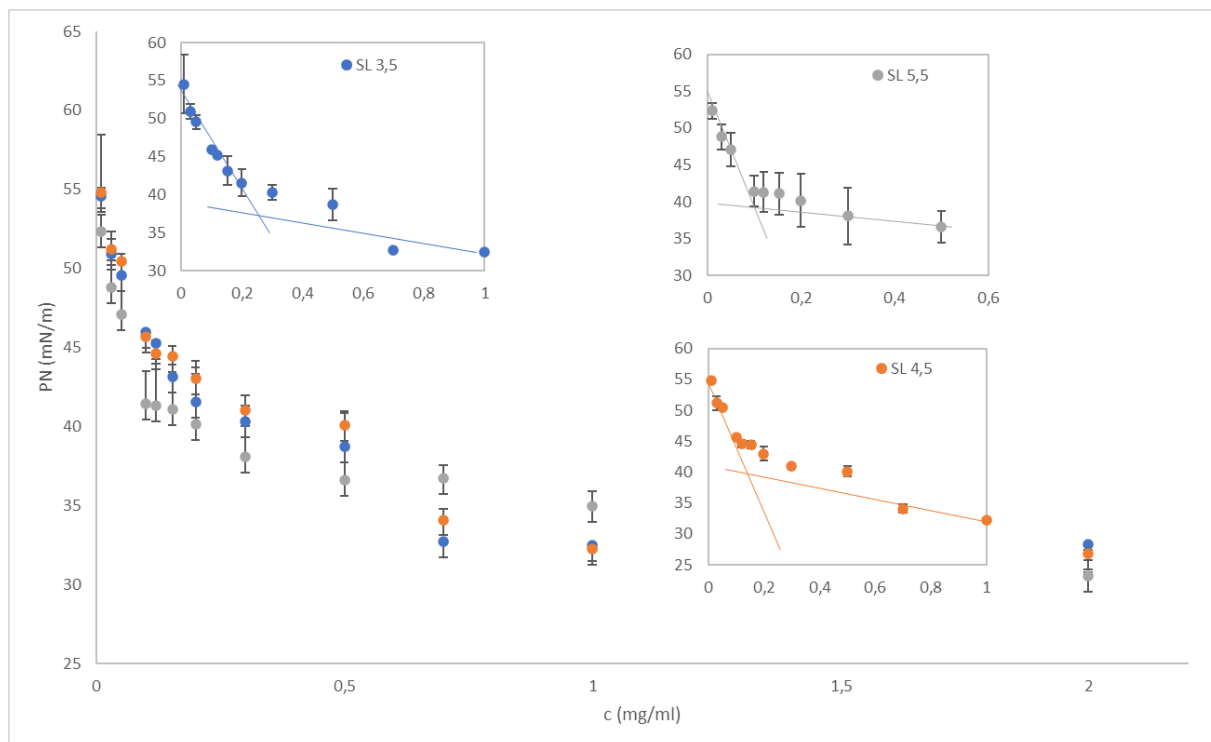
9.2.1 Tenziometrické měření roztoků SL

U připravených roztoků soforolipidů byla stanovena kritická micelární koncentrace (CMC), a to pomocí měření hodnot povrchového napětí, které byly vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci surfaktantu, z nichž byly následně hodnoty CMC stanoveny jako průsečíky klesající a ustálené části křivky (Obr. 17). Získané hodnoty CMC společně s dalšími micelárními parametry, získanými z tenziometrického měření, jsou shrnuty v Tabulce 6. Na základě získaných dat lze potvrdit mírný vliv pH na povrchovou aktivitu vzorků, přičemž

hodnoty CMC se pohybují v rozmezí od 0,15 – 0,28 mg/ml s nejnižší hodnotou u nejvyššího testovaného pH 5,5. Co se týká dalších micelárních parametrů, jako je Gibbsova micelární energie, adsorpce na rozhraní a plocha, kterou na rozhraní zaujímá jedna adsorbovaná molekula, lze konstatovat, že ve všech případech dochází ke spontánní tvorbě micel s nejtěsnějším uspořádáním molekul na rozhraní u vzorku v pH 4,5.

Je zřejmé, že povrchová aktivita může být ovlivněna různými faktory, přičemž iontová síla a pH mají velký význam zejména u ionických sloučenin v roztocích. Zejména u kyselé formy SL může pH výrazně ovlivnit ionizační stav karboxylové skupiny. Při nižším pH je tato skupina neionizovaná, což zvyšuje hydrofobicitu molekul a může tak přispět k jejich vyšší tendenci tvořit micely [54]. Zároveň může pH ovlivňovat poměr laktonové a kyselé formy SL, přičemž laktonové SL jsou považovány za povrchově aktivnější [8].

Autoři studie Li a kol. [55] uvádějí, že laktonové SL vykazují v porovnání s kyselou formou nižší hodnoty jak povrchového napětí, tak CMC. Konkrétně byly při pH 7 získány hodnoty CMC pro surové, kyselé a laktonové SL 80, 30 a 15 mg/l. Odpovídající hodnoty γ_{CMC} (povrchové napětí při dosažení kritické micelární koncentrace) činily 32, 40 a 34 mN/m. Vyšší povrchová aktivita laktonové formy SL může být způsobena její vyšší hydrofobicitou. Výsledné CMC může být také ovlivněno koncentrací soli, což se následně projeví na dalších micelárních parametrech jako je minimální povrchová plocha na molekulu (A_{min}) či maximální adsorpční kapacita (Γ).



Obrázek 17 Graf závislosti povrchového napětí na koncentraci roztoků SL

(zdroj: vlastní)

Tabulka 6 Micelární parametry

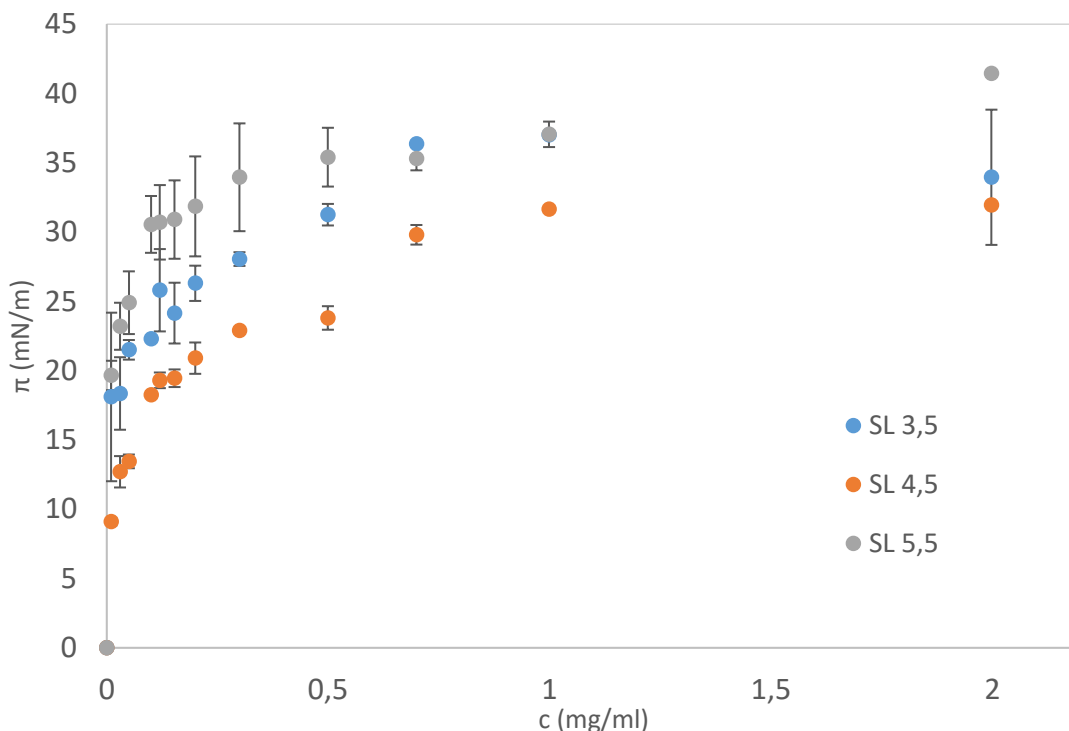
Vzorek	CMC [mg/ml]	CMC [$\cdot 10^{-3}$ mol/l]	$\gamma_{\min}$ [mN/m]	Γ [$\cdot 10^{-6}$ mol/m ²]	G [kJ/mol]	A [nm ²]
SL/ 3,5	0,26 $\pm$ 0,03	0,37 $\pm$ 0,0	32,6 $\pm$ 0,0	1,68 $\pm$ 0,18	-19,58 $\pm$ 0,30	9,9 $\pm$ 0,0
SL/ 4,5	0,28 $\pm$ 0,02	0,39 $\pm$ 0,0	36,4 $\pm$ 0,85	1,93 $\pm$ 0,69	-19,44 $\pm$ 0,13	8,6 $\pm$ 0,0
SL/ 5,5	0,15 $\pm$ 0,06	0,35 $\pm$ 0,1	30,4 $\pm$ 0,21	1,78 $\pm$ 0,32	-19,71 $\pm$ 0,59	9,3 $\pm$ 0,0

(zdroj: vlastní)

9.2.2 Stanovení povrchového tlaku

Na základě tenziometrického měření byl vyhodnocen i povrchový tlak (viz rovnice 4), který vypovídá o hustotě molekul na rozhraní a umožňuje detailněji pochopit chování látek na fázovém rozhraní (zejména kapalina–plyn) a adsorpční mechanismy. Rychlost dosažení rovnovážného povrchového tlaku závisí na typu povrchově aktivní sloučeniny a složení systému. Autoři studie Holm a kol. [56] prokázali, že například směsi s nižším obsahem dipalmitoylfosfatidylcholinu (DPPC) 40 % dosahují vysokého povrchového tlaku (46 mN/m) podstatně rychleji (během 3 minut) než systémy s vyšším podílem DPPC (60–80 %),

u kterých je proces pomalejší (až 15 minut). Tento jev může souviset se strukturou a mobilitou molekul na rozhraní a jejich schopností reorganizace.



Obrázek 18 Závislost povrchového tlaku na koncentraci roztoků SL

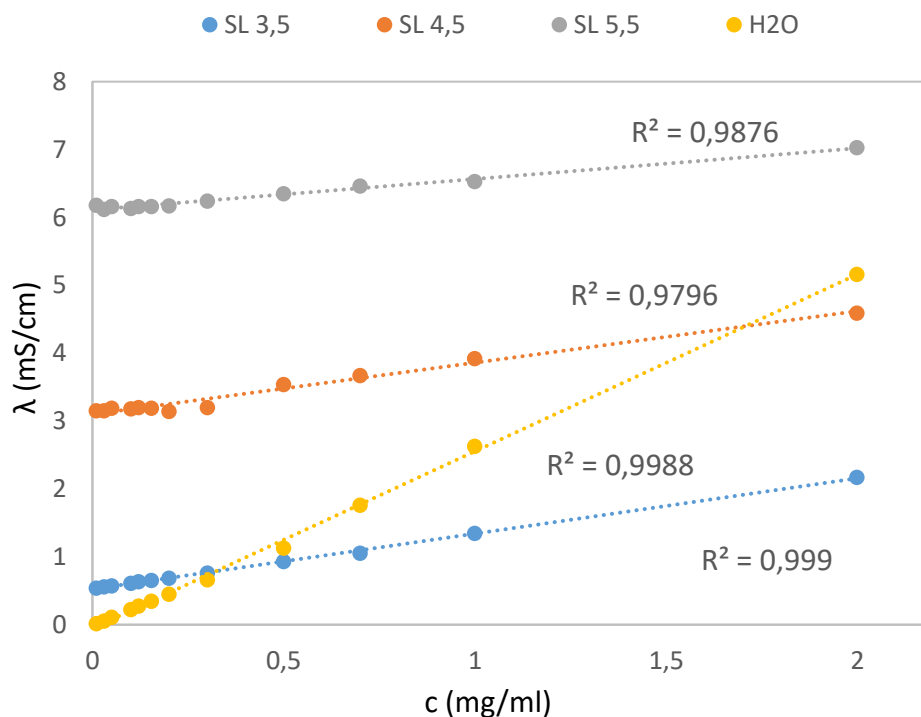
(zdroj: vlastní)

Jak je patrné z Obr. 18, závislost rovnovážného povrchového tlaku na koncentraci SL vykazuje u všech vzorků obdobný průběh. Trend křivek povrchového tlaku je v případě vzorků SL v pH 3,5 a 4,5 srovnatelný, dosažení konstantního tlaku nastává okolo koncentrace SL 0,6 mg/ml. U systému v pH 5,5 je nárůst tlaku v počáteční fázi strmější a k dosažení rovnováhy dochází při nižších koncentracích SL (0,2 až 0,3 mg/ml), což jsou hodnoty o něco vyšší, v porovnání s výsledky CMC, kdy očekáváme nasycení rozhraní a v další fázi tvorbu micel. Průběh křivky může být ovlivněn celou řadou faktorů, například pH nebo možnou agregací/micelizací molekul, které nepřispívají k dalšímu snižování povrchového napětí. V takovém případě je potřeba vyšší koncentrace k dosažení rovnovážného tlaku.

9.2.3 Konduktometrické měření roztoků SL

Měření vodivosti roztoků surfaktantů umožňuje stanovení kritické micelární koncentrace (CMC). Před dosažením CMC vodivost roste lineárně s koncentrací surfaktantu; po překročení CMC dochází ke změně sklonu závislosti, neboť tvorba micel váže část iontů a tím omezuje další růst vodivosti. Metoda vyžaduje přítomnost iontů, je tedy vhodná pro charakterizaci micelárních parametrů ionických povrchově aktivních látek [57][58].

Získané hodnoty vodivosti byly vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci SL v roztoku (Obr. 19). Jak je patrné, na křivkách nelze pozorovat charakteristické zlomy a jednoznačně tak stanovit hodnoty CMC. Za účelem srovnání samotných SL roztoků se systémy s chitosanem byly křivky v celém rozsahu koncentrací proloženy lineární funkcí. Lze vidět, že korelační koeficienty jsou v případě samotných SL roztoků vyšší, zatímco u systémů CH/SL, zejména při pH 3,5, došlo k poklesu hodnoty koeficientu determinace, což poukazuje na nelineární chování systému (Obr. 30). Tento efekt lze přičíst interakcím mezi chitosanem a molekulami soforolipidů, které mohou vést k tvorbě agregátů nebo komplexů, což ovlivňuje pohyblivost iontů a tím i výslednou vodivost. Nelineární zakřivení získaných závislostí tak indikuje změnu mechanismu chování roztoku v přítomnosti polymeru.



Obrázek 19 Graf závislosti vodivosti roztoků SL na jejich koncentraci

(zdroj: vlastní)

9.2.4 Měření pěnivosti

Pěna vznikající u roztoků surfaktantů je klíčovým parametrem v řadě průmyslových aplikací. Ovlivňuje zde nejen stabilitu, ale také texturu či separační vlastnosti produktů. Proto je měření stability a kapacity pěny důležité pro případné zlepšení složení, či podmínek formulací.

Ross-Milesova metoda

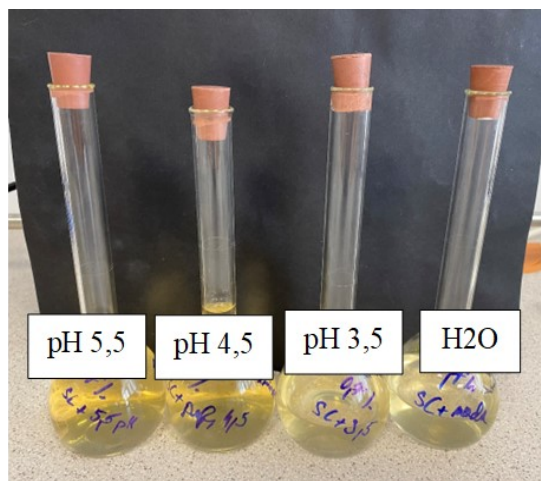
Tato metoda je běžně využívána pro hodnocení pěnivosti, zejména z důvodu jednoduchosti provedení a ekonomické výhodnosti. Pěna byla hodnocena u roztoků SL ve všech připravených pufrech (Obr. 20 až 23). Jak je patrné z Tabulky 7, počáteční pěna dosahuje výšky od 16,5 do 20 mm, v závislosti na daném pH. Lze pozorovat rostoucí trend výšky pěny se zvyšujícím se pH roztoku. Po 30 minutách došlo k předpokládanému poklesu pěny, který byl nejvýraznější v případě vzorku voda/SL. Po hodině byla výška pěny víceméně zanedbatelná s nejnižší hodnotou u vzorku v pH 3,5. Dané výsledky jsou doloženy i na Obrázcích 21 až 23.

Autoři Hollenbach a kol. [59] porovnávali pěnivost různých typů biosurfaktantů, konkrétně rhamnolipidů, soforolipidů, mikrobiálních glykolipidů a enzymaticky syntetizovaných glykolipidů, s anionickým SDS. Pěna byla sledována v definovaných intervalech: ihned, následně po 5 a 60 minutách. Pro generování pěny byl použit plyn (dusík, vzduch nebo oxid uhličitý) s průtokem 60 ml/min přes nálevku. Měření pěnivosti a stabilita pěny byla prováděna na základě výšky pěny, přičemž byla zaznamenána výška při 5 minutách (r_5) a 60 minutách (r_{60}). Pro sledování velikosti bublin byla využita optická mikroskopie. Výsledky ukazují, že enzymaticky syntetizované glykolipidy a rhamnolipidy typu R3 vykázaly ve srovnání se soforolipidy lepší schopnost stabilizovat vytvořenou pěnu.

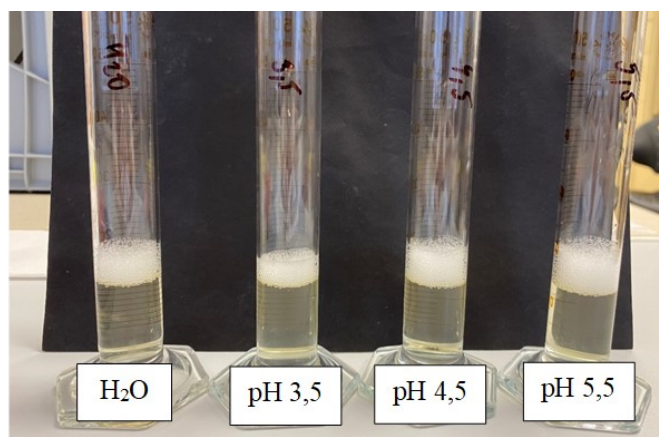
Tabulka 7 Výška pěny roztoků SL naměřená metodou Ross-Miles

Vzorek	Výška pěny (mm)		
	ihned	po 30 min	po 60 min
SL/voda	20,0±0,0	5,0±0,0	3,5±0,7
SL 3,5	16,5±2,1	4,0±1,4	1,0±0,0
SL 4,5	17,5±3,5	10,0±0,0	2,5±0,7
SL 5,5	21,0±1,4	12,5±10,6	3,0±1,4

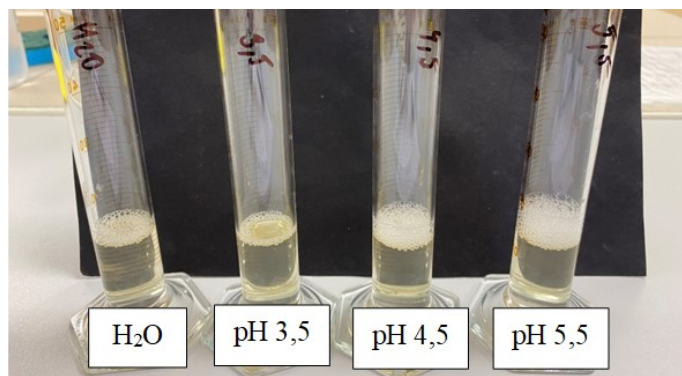
(zdroj: vlastní)



Obrázek 20 Připravené roztoky SL pro měření pěnivosti

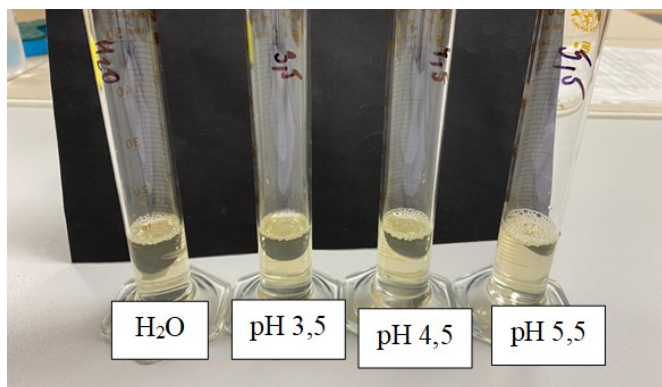
(zdroj: vlastní)

Obrázek 21 Výška pěny vzorků SL ihned

(zdroj: vlastní)

Obrázek 22 Výška pěny po 30 minutách

(zdroj: vlastní)



Obrázek 23 Výška pěny po 60 minutách

(zdroj: vlastní)

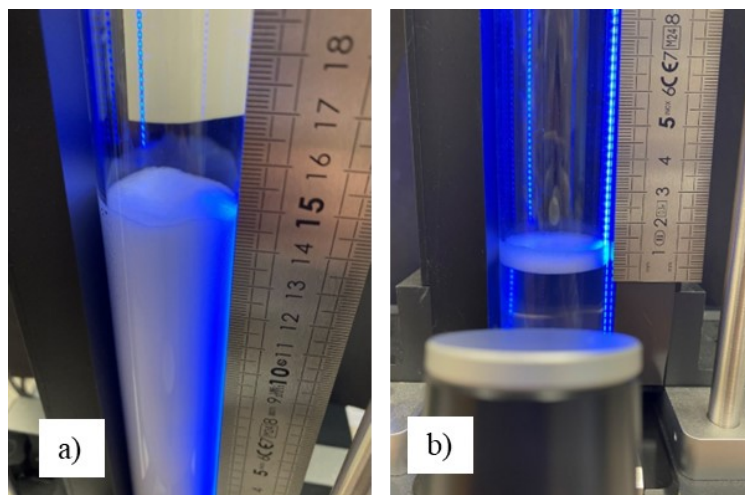
Krüss metoda

Výsledky měření počáteční a konečné pěny (po 600 s) jsou shrnuty v následující Tabulce 8 a na Obrázcích 24 až 27. Počáteční výška pěny dosahovala okolo 180 mm, bez větších rozdílů mezi jednotlivými roztoky. Ve sledovaném čase došlo k výraznému poklesu pěny (výška dosahovala od 6 do 11 mm). Časový průběh samotného měření získaný z přístroje je znázorněn na Obr. 28. Z modré křivky je patrné, že průběh poklesu výšky pěny se zrychluje s rostoucím pH.

Tabulka 8 Výška pěny roztoků SL naměřená metodou Krüss

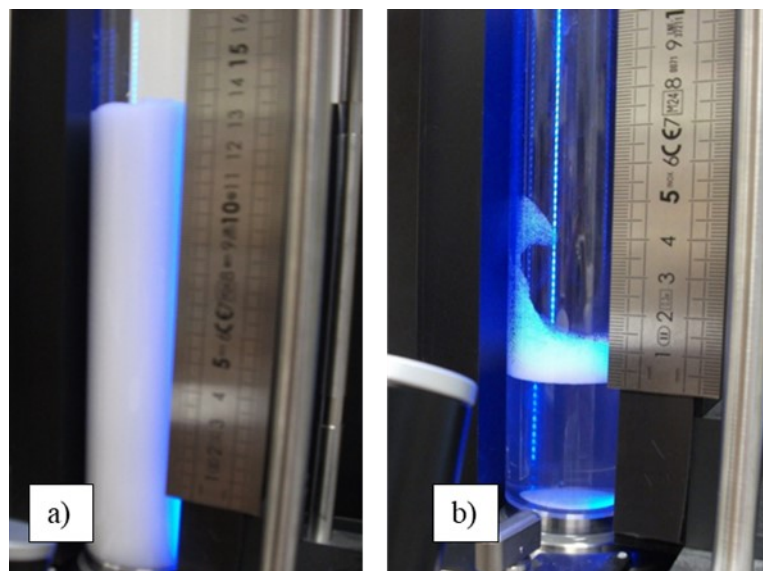
Vzorek	Výška pěny (mm)	
	Počáteční	Konečná (po 600 s)
SL/voda	179±1	6± 1
SL/ 3,5	181±1	8±2
SL/ 4,5	180±5	9±2
SL/ 5,5	179±3	11 ±1

(zdroj: vlastní)



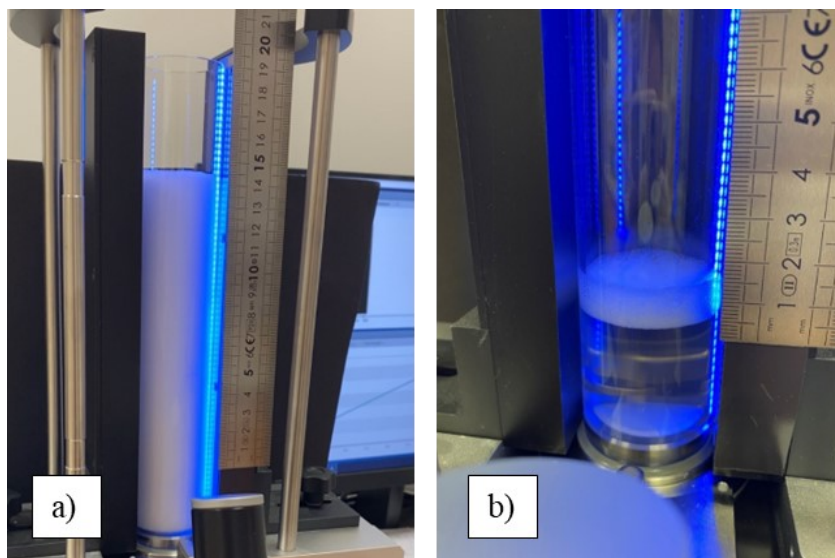
Obrázek 24 Výška pěny vzorku SL ve vodě: a) počáteční, b) po 600 s

(zdroj: vlastní)



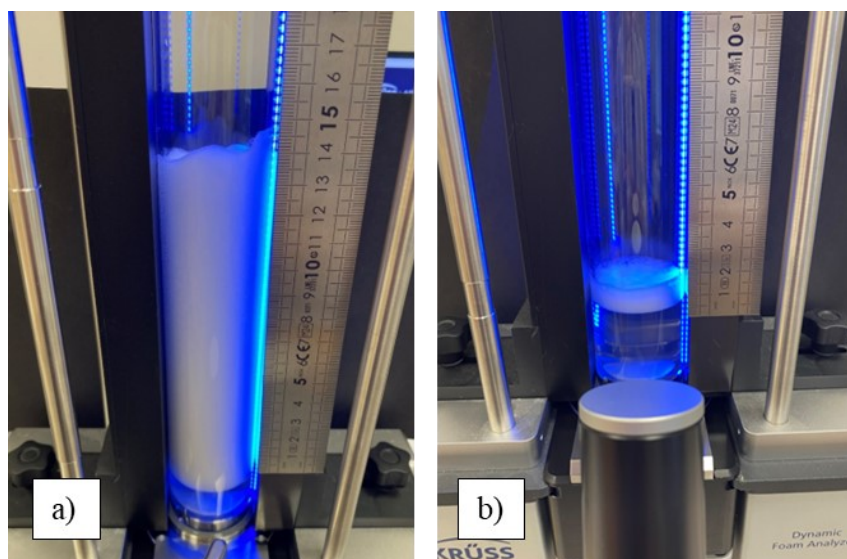
Obrázek 25 Výška pěny vzorku SL pH 3,5 a) počáteční b) po 600 s

(zdroj: vlastní)



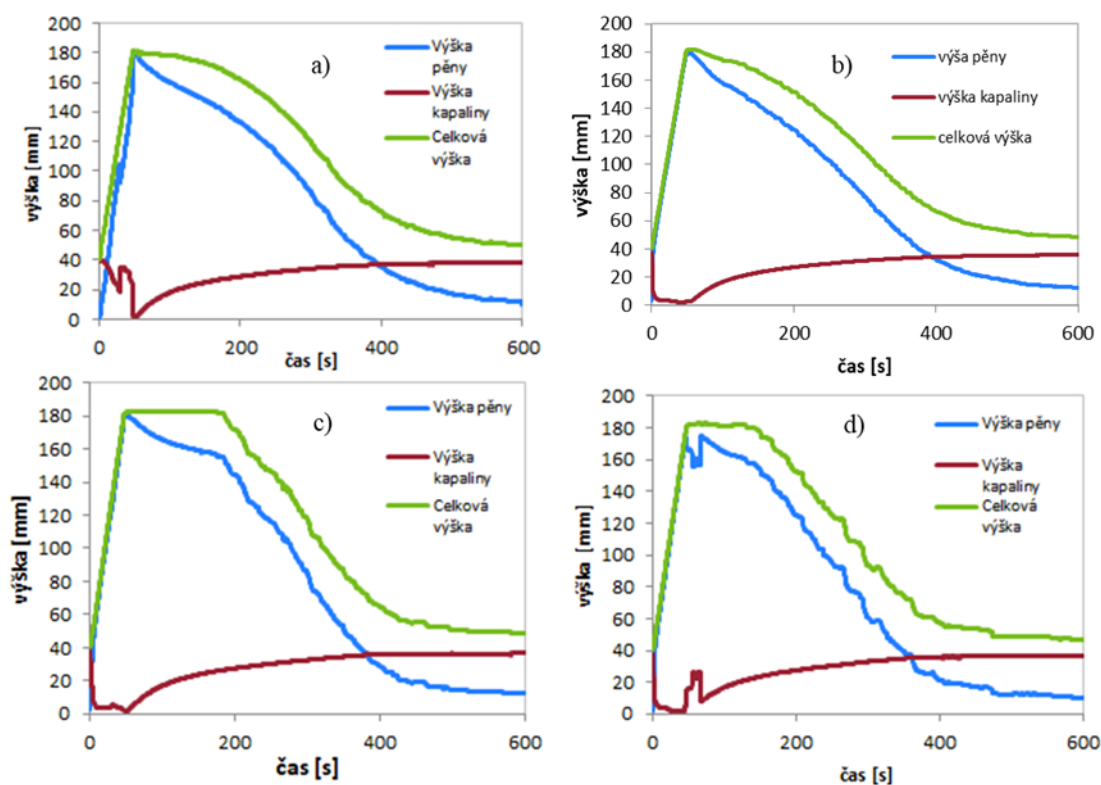
Obrázek 26 Výška pěny vzorku SL pH 4,5 a) počáteční b) po 600 s

(zdroj: vlastní)



Obrázek 27 Výška pěny vzorku SL pH 5,5 a) počáteční b) po 600 s

(zdroj: vlastní)



Obrázek 28 Pěnivost roztoků SL v čase a) ve vodě, b) pH 3,5, c) pH 4,5, d) pH 5,5

(zdroj: vlastní)

9.3 Charakterizace vzorků chitosanu se soforolipidy CH/SL

Sledování potenciálních interakcí probíhalo pomocí tenziometrických, konduktometrických a viskozitních měření.

9.3.1 Tenziometrické měření CH/SL

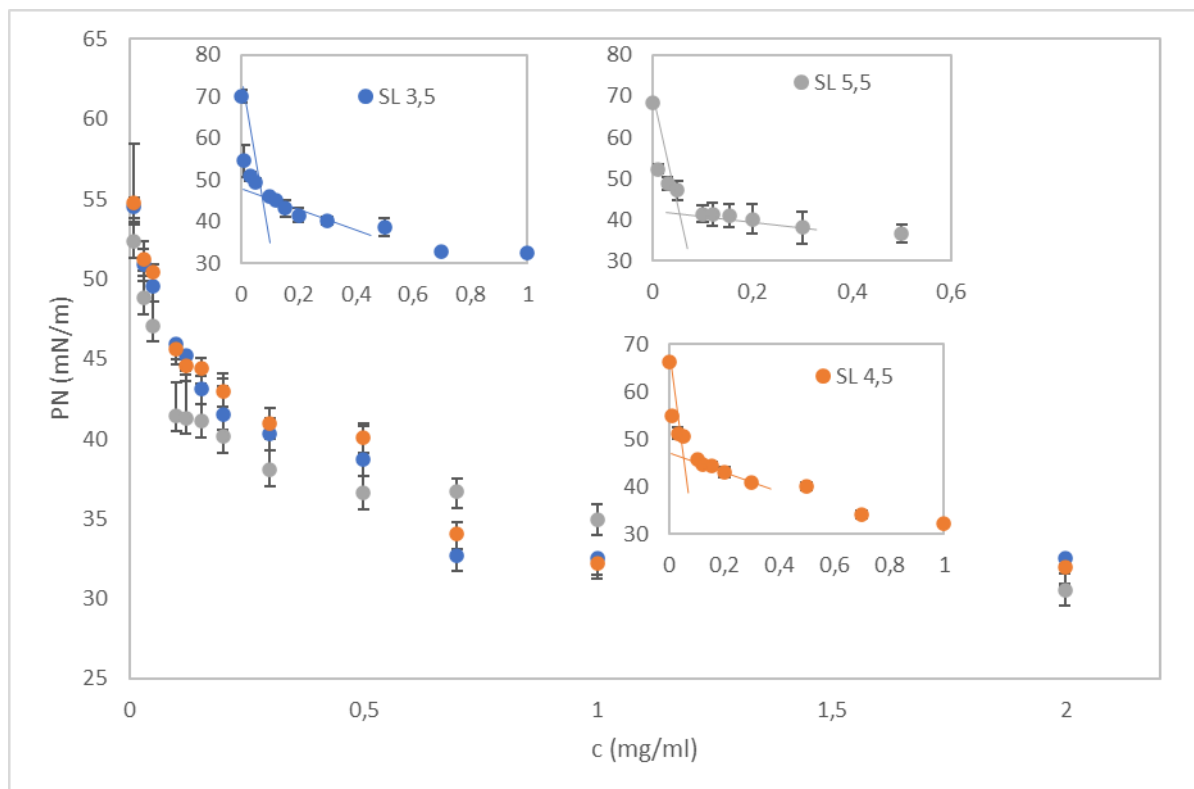
Na Obrázku 29 je znázorněna závislost povrchového napětí systému CH/SL v různých pH (3,5; 4,5 a 5,5) v závislosti na rostoucí koncentraci SL. Z průběhu křivek lze získat důležité informace o povrchové aktivitě systémů a potenciálních interakcích mezi složkami polymeru a surfaktantu. Z prvního zlomu na křivkách lze odhadovat kritickou agregační koncentraci (CAC) (Tab. 9) indikující počátek tvorby agregátů na řetězci polymeru.

Z průběhů získaných křivek (Obr. 29) lze usuzovat, že CAC (kritická agregační koncentrace) se pohybuje v rozmezí od 0,11 do 0,18 mg/ml (Tab. 9). Nejnižší hodnotu CAC vykazuje systém CH/SL v pH 5,5, který se tak jeví jako nejvíce povrchově aktivní. Tento jev lze spojit s rostoucí deprotonací aminoskupin chitosanu při vyšším pH, což snižuje jeho kladný náboj a tím podporuje elektrostatickou interakci s biosurfaktantem [60]. Pokud srovnáme hodnoty CMC samotných SL (Tab. 6) s CAC hodnotami v systémech obsahujících chitosan (Tab. 9), je patrné, že k micelizaci v přítomnosti chitosanu dochází dříve, což podporuje existenci interakcí mezi danými složkami.

Tabulka 9 Hodnoty CAC pro vzorky CH/SL

Vzorek	CAC [mg/ml]
CH/SL 3,5	0,13±0,04
CH/SL 4,5	0,18±0,04
CH/SL 5,5	0,11±0,01

(zdroj: vlastní)



Obrázek 29 Graf závislosti povrchového napětí na koncentraci roztoků CH/SL

(zdroj: vlastní)

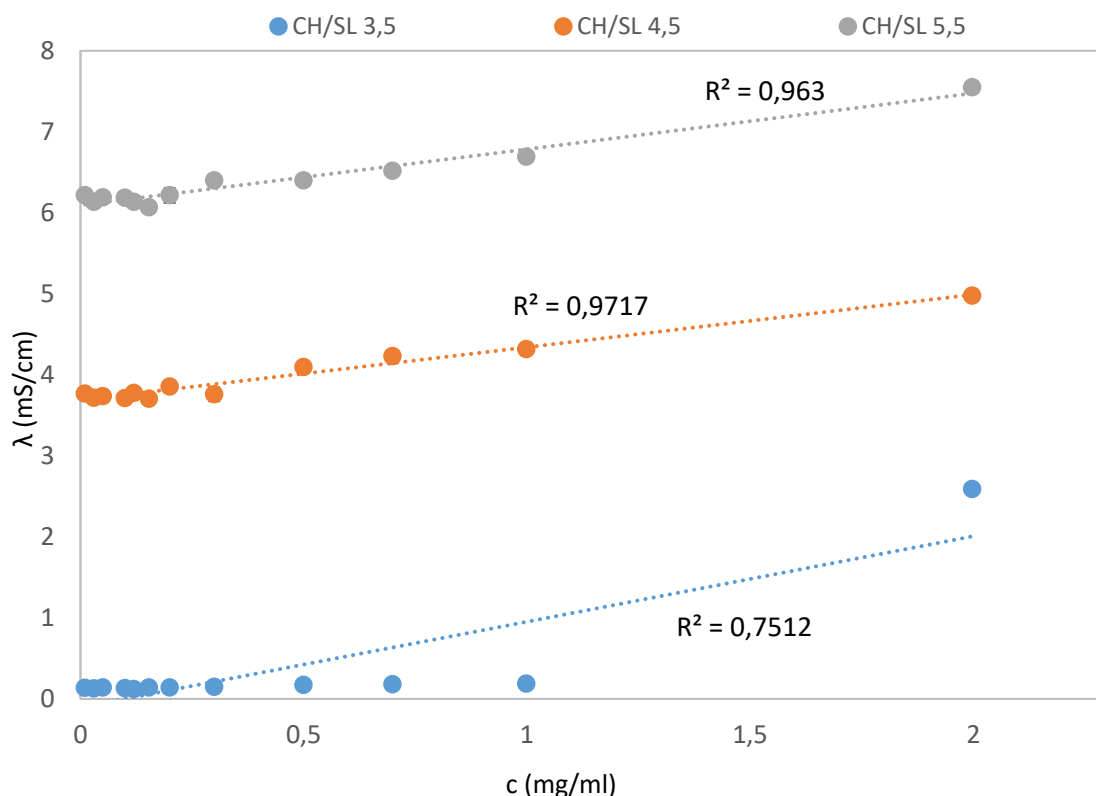
Ve studii [61] byla sledována závislost povrchového napětí na koncentraci tenzidu SDS (sodium dodecyl sulfát) samotného a poté s přidavkem PEG (polyethylenglykolu). Pro samotný SDS ve vodě byla CMC stanovena na přibližně 8,0 mM, což je hodnota, která je v souladu s literaturou, potvrzující standardní chování SDS v tomto prostředí. Kritická agregační koncentrace indikující počátek interakce SDS s polymerem se pohybovala v nižších koncentracích, přibližně kolem 1–2 mM, v závislosti na typu a koncentraci PEG.

9.3.2 Konduktometrické měření CH/SL

Měření vodivosti roztoků polymerů se surfaktanty může také poskytnout informace o případných vzájemných interakcích daných složek. Podobně jako v případě samotných roztoků povrchově aktivních látek, je zde ovšem důležitá přítomnost iontů. Biosurfaktanty mají obecně vliv na elektrickou vodivost roztoků, jak uvádí studie [62], kde tyto látky významně snížily elektrickou vodivost roztoků obsahujících těžké kovy. Klíčová je samozřejmě konkrétní molekulární struktura a podmínky prostředí (pH, iontová síla, případně teplota).

Na Obr. 30 lze sledovat závislost vodivosti na koncentraci SL pro všechny tři pufrací systémy. Nejvyšší hodnoty vodivosti dosahuje systém CH/SL 5,5, což může být dáno vyšší mírou ionizace nebo stabilnějším chováním při daném pH. Za účelem porovnání systému bez a s polymerem byly křivky proloženy lineární funkcí. Je patrné, že koeficienty determinace (R^2) jsou nižší, než u samotných roztoků SL (konkrétně pro pH 3,5, $R^2 = 0,7512$, pH 4,5, $R^2 = 0,9717$; pH 5,5, $R^2 = 0,963$). Tento jev dokládá větší odchylky od lineárního trendu křivky, což může naznačovat změny chování a uspořádání iontů ve směsi, a případné interakce mezi chitosanem a biosurfaktantem. Tato pozorování potvrzují, že vodivost systému CH/SL a její závislost na koncentraci surfaktantu se liší v závislosti na pH prostředí, což může být výsledkem různého stupně ionizace chitosanu i samotných biosurfaktantů. Je ale také nutno konstatovat, že konduktometrické měření se neprokázalo jako dostatečně citlivá a vypovídající metoda pro hodnocení micelárních parametrů a potenciálních interakcí.

Měření vodivosti bylo využito i ve studii [63], a to pro stanovení potenciálních interakcí mezi chitosanem a anionickým surfaktantem SDS (sodium decylsulfát). V závislosti na rostoucí koncentraci SDS došlo ke změně sklonu křivky vodivosti, bod zlomu byl pak interpretován jako CAC (kritická agregační koncentrace), která se pohybovala okolo $9,4 \cdot 10^{-4}$ až $9,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. CAC signalizuje začátek tvorby polymer-tenzidových komplexů, které vykazují významně vylepšené povrchově aktivní a viskoelastické vlastnosti již při velmi nízkých koncentracích tenzidu. Zatímco v dané studii bylo dosaženo ostře ohraničené oblasti, z které bylo možné určit CAC, v případě našeho měření vzorků CH/SL není možné hodnotu CAC jednoznačně určit.



Obrázek 30 Závislost naměřené vodivosti na koncentraci roztoků CH/SL

(zdroj: vlastní)

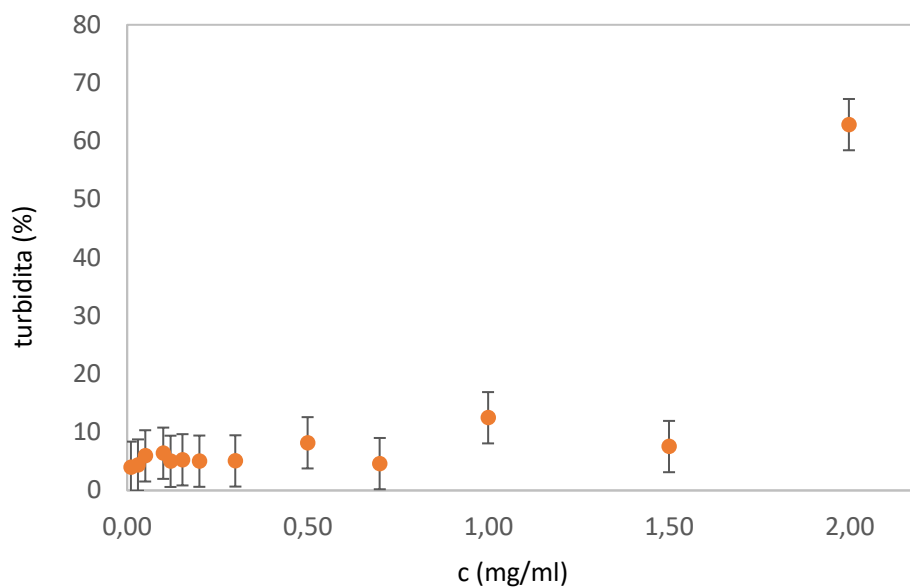
9.3.3 Měření turbidity CH/SL

Měření turbidity je využíváno ke stanovení optických vlastností roztoků. Díky naměřeným hodnotám je možno posoudit míru zákalu u jednotlivých koncentrací připravených roztoků CH/SL a porovnat jejich chování. Rozdíly v naměřené turbiditě lze vidět na grafech (Obr. 31, 33, 35).

Z naměřených hodnot je patrné, že při nižších koncentracích SL je turbidita udržována na minimálních hodnotách (většinou do 10 %) a výraznější zvýšení (na cca 60 %) je zaznamenáno až u koncentrace 2 mg/ml. Výjimkou je systém při pH 5,5, kde jsou výraznější výkyvy pozorovány již při nižších koncentracích soforolipidu a maximální turbidita dosahuje hodnot 80 až 90 % (Obr. 35). Vliv pH a koncentrace SL v roztocích lze pozorovat i na Obrázcích 32, 34 a 36.

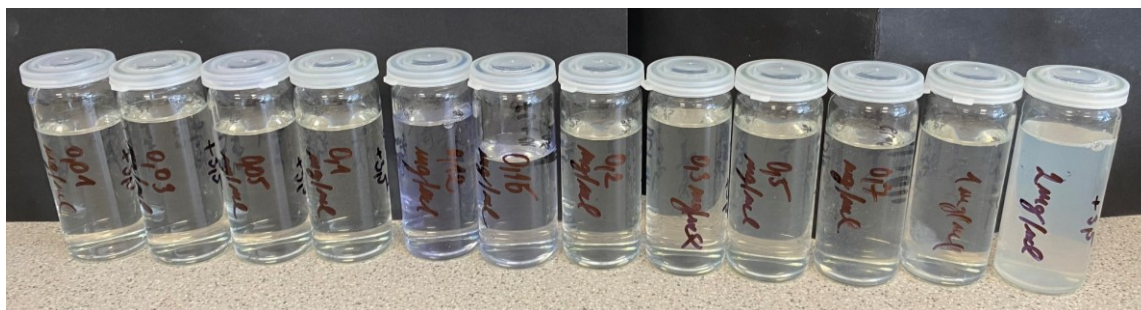
Je potvrzeno, že chitosan je ovlivňován pH prostředí, neboť při vyšších hodnotách pH je zaznamenáno snížení jeho rozpustnosti a zároveň je zvýšena jeho tendence k agregaci [60]. Vytváření těchto shluků je spojeno se zvýšením zákalu a tím i celkové turbidity systému. V případě systému CH/SL 5,5 může docházet ke kooperativnímu chování mezi

těmito dvěma složkami, což je následně spojeno se zvýšenou agregací nebo fázovou separací, která se projevuje výrazným zákalem roztoku.



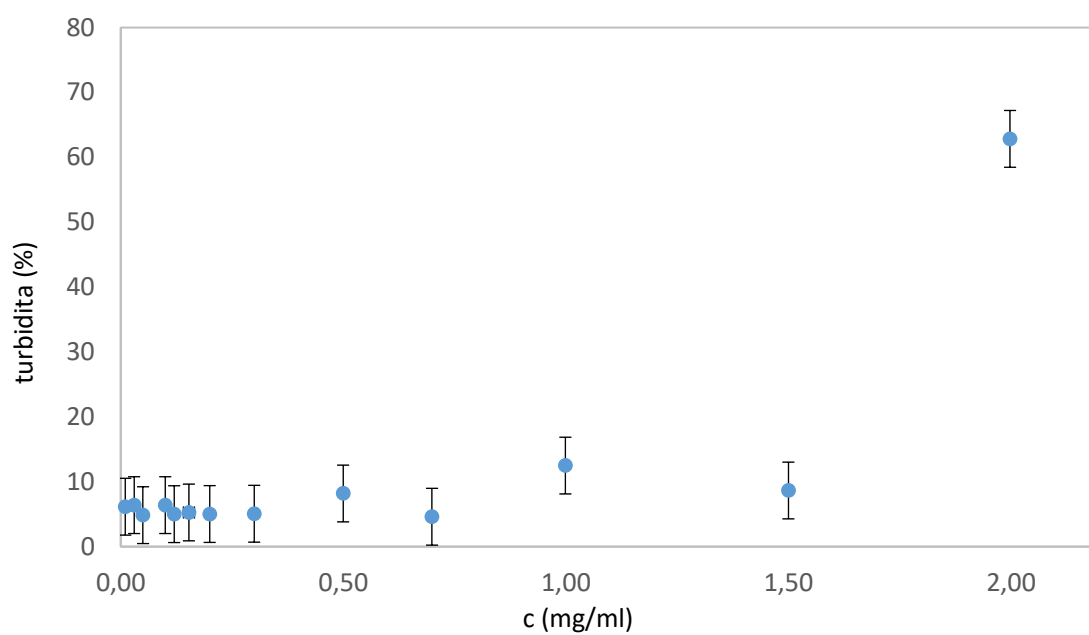
Obrázek 31 Turbidita roztoků CH/SL 3,5 v závislosti na koncentraci SL

(zdroj: vlastní)

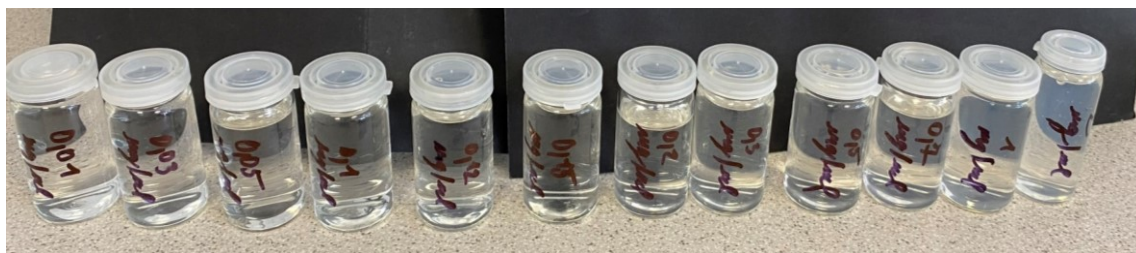


Obrázek 32 Roztoky CH/SL 3,5 s koncentrací SL od 0,01 mg/ml do 2 mg/ml

(zdroj: vlastní)

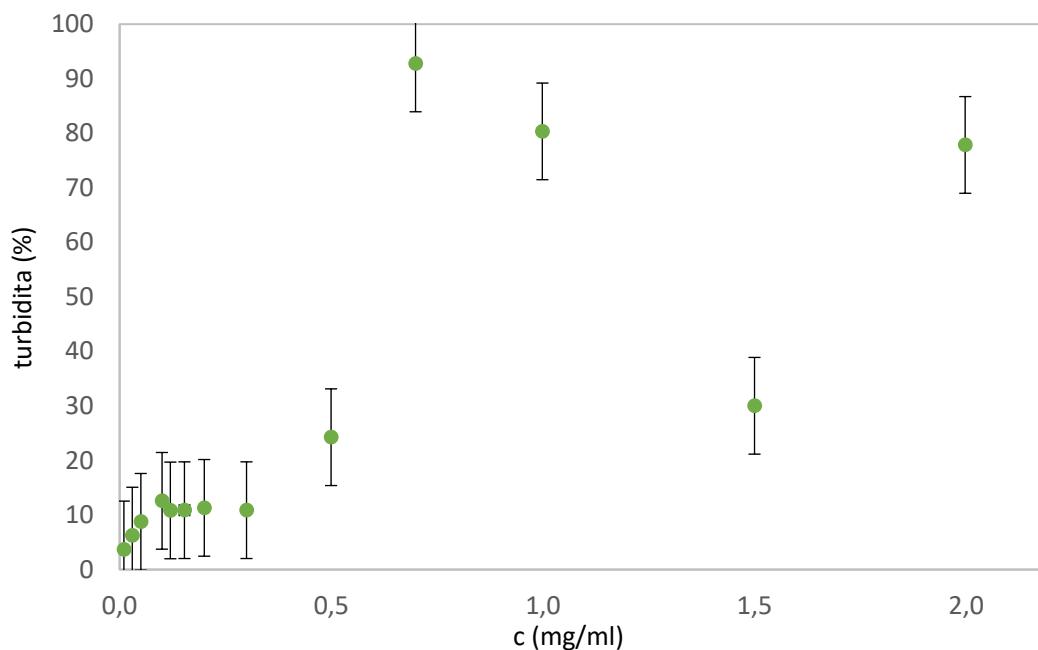


Obrázek 33 Turbidita roztoků CH/SL 4,5 v závislosti na koncentraci SL

(zdroj: vlastní)

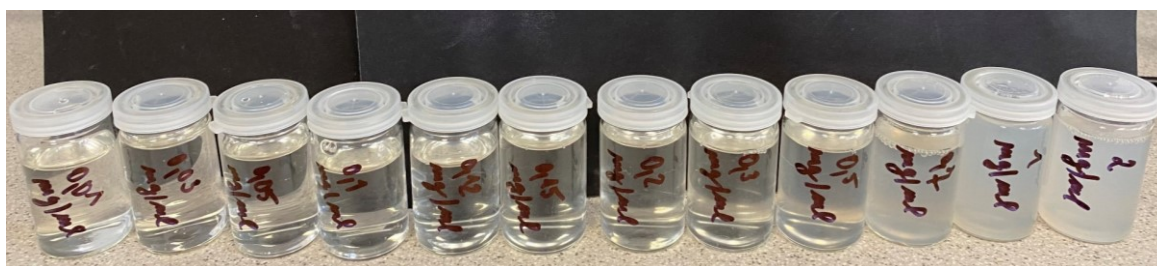
Obrázek 34 Roztoky CH/SL 4,5 s koncentrací SL od 0,01 mg/ml do 2 mg/ml

(zdroj: vlastní)



Obrázek 35 Turbidita roztoků CH/SL 5,5 v závislosti na koncentraci SL

(zdroj: vlastní)



Obrázek 36 Roztoky CH/SL 5,5 s koncentrací SL od 0,01 mg/ml do 2 mg/ml

(zdroj: vlastní)

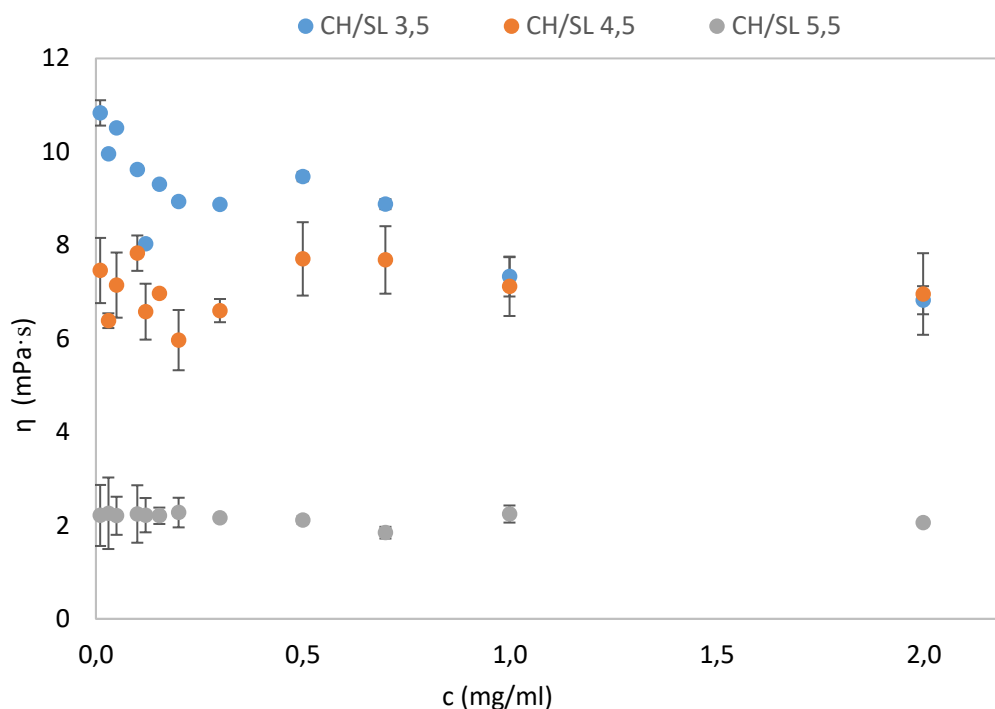
9.3.4 Viskozitní měření CH/SL

Měření viskozity představuje důležitý nástroj pro studium interakcí mezi polymery a surfaktanty, protože změny reologických vlastností mohou indikovat tvorbu komplexů, síťování nebo změnu struktury systému. Tyto interakce ovlivňují vnitřní odpor roztoků vůči proudění, který úzce souvisí s jejich molekulární strukturou a mezimolekulárními silami. V oblasti nižších koncentrací surfaktantu může docházet k poklesu viskozity až do dosažené lokálního minima, které může souviset s nasycením polymerního řetězce molekulami surfaktantu. Po tomto bodě viskozita opět mírně roste, což může být spojeno se vznikem micelárních agregátů v roztoku.

Na Obr. 37 si lze všimnout, že u vzorků CH/SL dochází k výkyvům hodnot viskozity s rostoucí koncentrací SL ve směsi. V případě systému CH/SL 3,5 dochází nejprve k poklesu viskozity do koncentrace zhruba 0,3 mg/ml, od níž viskozita začíná opět růst, což může poukazovat na probíhající interakce mezi SL a chitosanem. V případě CH/SL 4,5 lze první viskozitní minimum pozorovat v oblasti koncentrace SL 0,2 mg/ml. U sady CH/SL 5,5 nejsou změny reologických vlastností tak patrné, což by mohlo značit slabší interakce. Tento fakt ovšem není ve shodě s výsledky tenziometrického stanovení (viz Tab. 10).

Na základě studie autorů Pingali a kol. [34] dochází při nárůstu koncentrace chitosanu v roztoku ztrátě Newtonovských vlastností, jelikož se zvyšuje množství polymerních klubek, což zvyšuje smykové napětí a viskozitu. V dané publikaci byl zkoumán vliv chitosanu na reologické vlastnosti soforolipidů při jejich konstantní koncentraci (12 hm. %) a proměnlivé koncentraci chitosanu (0,5–1 hm. %). Z výsledků vyplývá, že samotné soforolipidy mají nízkou viskozitu a vykazují Newtonovské chování. Naproti tomu samotný chitosan při koncentraci 0,5 hm. % vykazuje výrazně vyšší viskozitu, a to díky vzájemnému proplétání řetězců (entanglementu) a botnání, které je způsobeno repulzními interakcemi. V případě kombinace chitosanu se soforolipidy dochází k nárůstu objemové viskozity směsi. Tento jev je vysvětlován elektrostatickou vazbou mezi mírně anionickými molekulami soforolipidů a kationickými skupinami chitosanu. Výsledkem těchto interakcí může být tvorba gelovité sítě (polyelektrolytového komplexu), která přispívá ke zvýšení viskozity systému.

V případě našeho měření byla koncentrace chitosanu konstantní, takže mírnější výkyvy viskozity lze přisuzovat koncentraci soforolipidu, vlivu pH a změnám rozpustnosti, k nimž může docházet v důsledku probíhajících interakcí mezi polymerem a povrchově aktivní látkou. Navíc je třeba zdůraznit, že hodnoty viskozity naměřené v citované studii jsou obecně vyšší než námi získané výsledky, což může souviset s odlišným složením vzorků, a především rozdílnou koncentrací chitosanu.



Obrázek 37 Viskozita roztoků CH/SL v závislosti na koncentraci SL

(zdroj: vlastní)

9.3.5 Antimikrobiální aktivita

U vybraných vzorků, konkrétně vzorků CH/SL o koncentraci 2 mg/ml připravených v pH 3,5; 4,5 a 5,5 byla testována antimikrobiální aktivita pomocí diskové difúzní metody (viz kapitola 8.3). Navíc byl znova opakován test alkalického vzorku SL (konkrétně po 182 dnech od přípravy). Bohužel na konci testu nebyly pozorovány žádné inhibiční zóny, což by mohlo být způsobeno výrazně nižší koncentrací v porovnání s původně testovaným roztokem. Ovšem ani u opakování testu více koncentrovaného alkalického SL nebylo dosaženo významné inhibice, bylo pouze pozorováno jemné prosvětlení okolo disku. Tento výsledek však nelze považovat za jednoznačný projev antimikrobiální aktivity, která ve sledovaném čase výrazně klesla.

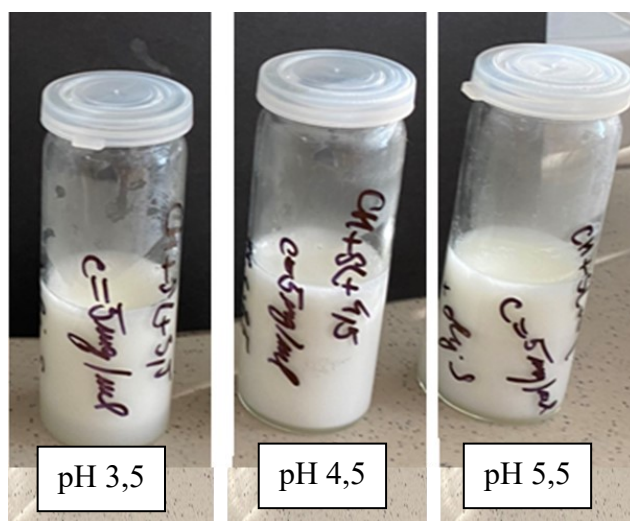
9.4 Stabilita emulzí

9.4.1 Vizuální hodnocení

U připravených emulzí na bázi slunečnicového oleje a vodné fáze tvořené komplexy CH/SL byla hodnocena stabilita pomocí měření velikosti částic, náboje a vizuálního pozorování. Na základě získaných výsledků lze potvrdit vliv pH na fyzikální stabilitu emulzí (Obr. 38 až 41). Jako nejstabilnější se jevila emulze připravená v pH 5,5, u níž byl nástup separace fází

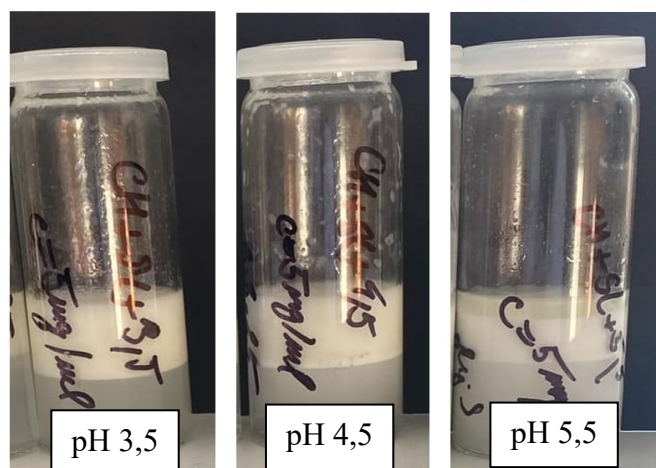
nejpomalejší. Již první den od přípravy byla pozorovatelná fázová separace u všech připravených emulzí nezohledně na použitý pufr. Tento vývoj lze přičíst pravděpodobné nedostatečné stabilizaci rozhraní mezi olejovou a vodnou fází, která je klíčovým faktorem pro vytvoření stabilní emulze. Nestabilita může být způsobena nízkou interakcí mezi biosurfaktantem a fázovým rozhráním, případně nevhodnými podmínkami (např. pH nebo koncentrace emulgátoru), které ovlivňují účinnost adsorpce soforolipidů.

Ve publikaci autorů Baccile a kol. [49] byly studovány komplexy chitosanu se soforolipidy pro stabilizaci emulzí s využitím různých typů složek olejové fáze. Nejvyšší stabilitu, a to až po dobu 28 dnů, prokázaly emulze na bázi alkanů o různé délce řetězce, jako například isodekan, isohexadekan nebo oktyl dodekanol. Na stabilitu emulzí stabilizovaných pomocí polyelektrolytívých komplexů má významný vliv iontová síla a pH, které bylo v této studii okolo 5,8 až 6.



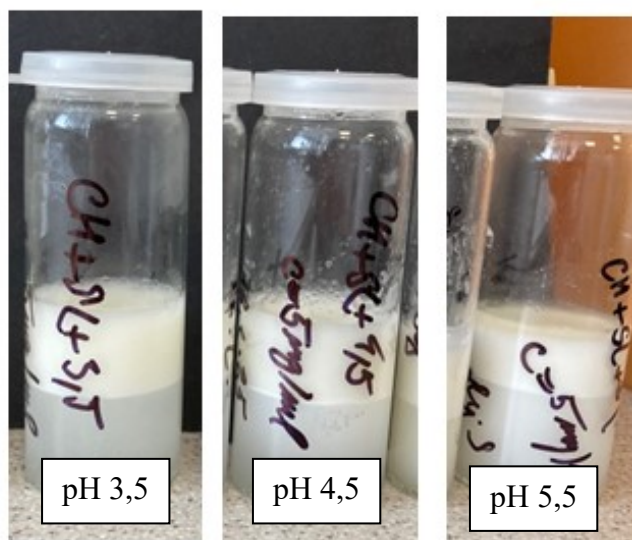
Obrázek 38 Připravené emulze ihned po přípravě

(zdroj: vlastní)



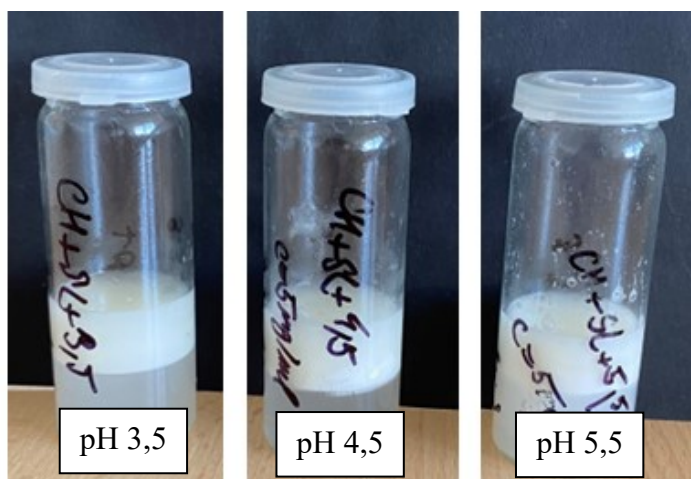
Obrázek 39 Připravené emulze 1 den po přípravě

(zdroj: vlastní)



Obrázek 40 Připravené emulze 20 dní po přípravě

(zdroj: vlastní)



Obrázek 41 Připravené emulze 34 dní po přípravě

(zdroj: vlastní)

9.4.2 Měření velikosti částic emulzí

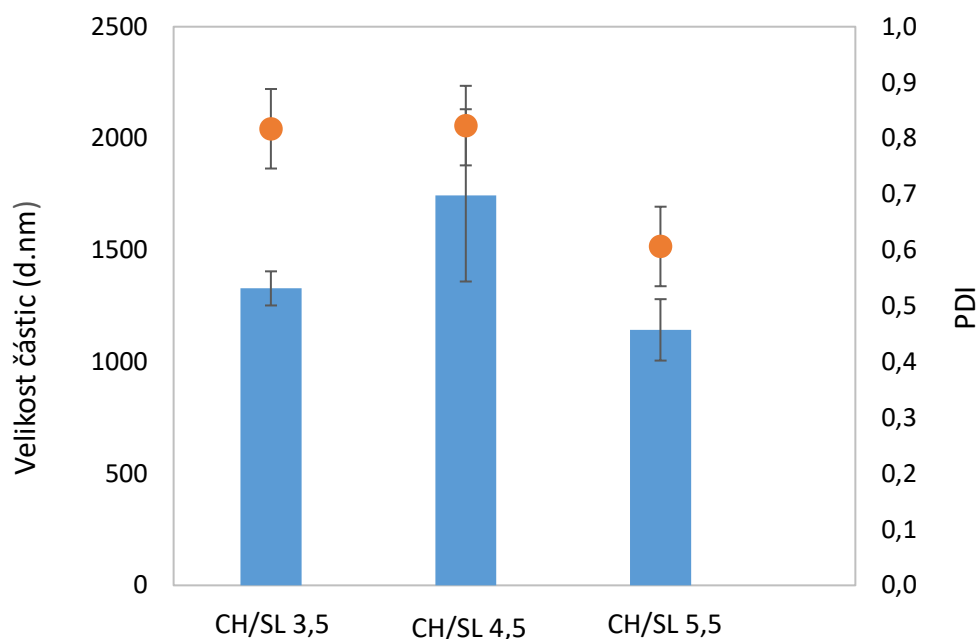
Za účelem charakterizace připravených emulzí byla měřena velikost dispergovaných částic metodou dynamického rozptylu světla (DLS), a to bezprostředně po přípravě vzorků. Velikost částic v emulzi poskytuje cenné informace o její fyzikální stabilitě. Je obecně známo, že emulze s menšími dispergovanými částicemi jsou stabilnější.

Výsledky jsou shrnuty na Obr. 42. Je patrné, že všechny emulze vykazovaly částice větší než 1 μm , přičemž nejvyšší hodnoty (1745 nm) bylo dosaženo u systému CH/SL 4,5. Je však důležité poznamenat, že DLS měření může být ovlivněno několika faktory, včetně koncentrace vzorku, přítomnosti agregátů a podmínek ředění. Hodnoty PDI (index polydisperzity) se pohybují v rozmezí 0,6 až 0,8, což naznačuje širší distribuci velikosti částic a potenciální tendenci ke koalescenci nebo agregaci v průběhu času. Nejnižší index polydisperzity byl zaznamenán u emulze s nejvyšší hodnotou pH.

Role chitosanu pro stabilizaci emulzí byla potvrzena několika studiemi [64], přičemž důležitým aspektem je koncentrace polymeru. Například při nízkých koncentracích chitosanu není jeho množství dostatečné k úplnému pokrytí povrchu emulzních kapek, a výsledná emulze je proto nestabilní vůči flokulaci způsobené přemostňováním. Podobně může při překročení určité kritické koncentrace chitosanu docházet k agregaci kapek. Přesto má chitosan důležitou roli při zlepšování stability potravinových emulzí prostřednictvím elektrosterické stabilizace.

Z výše uvedených důvodů mají komplexy na bázi chitosanu s různými surfaktanty pro stabilizaci disperzních soustav velký význam. Autoři Mun a kol. [65] se zabývali

přípravou emulzí typu olej ve vodě, s využitím stabilizační vrstvy na bázi chitosanu a surfaktantu dodecyl sulfátu sodného. Bylo zjištěno, že přidání chitosanu do emulze vede ke zvýšení zeta potenciálu (přibližně +50 mV), což má za následek lepší elektrostatickou stabilitu emulze. Příznivě se projevila také kombinace chitosanu s emulzí stabilizovanou neionickým surfaktantem (Tween 20). Výsledky studie prokázaly zásadní vliv velikosti kapek pro stabilitu emulze. Menší kapky ($d_{32} \approx 0,3 \mu\text{m}$) byly stabilní a tvořily homogenní emulze, zatímco větší kapky (při nízkých koncentracích chitosanu) vedly k agregaci a destabilizaci emulze.



Obrázek 42 Velikost částic emulzí CH/SL

(zdroj: vlastní)

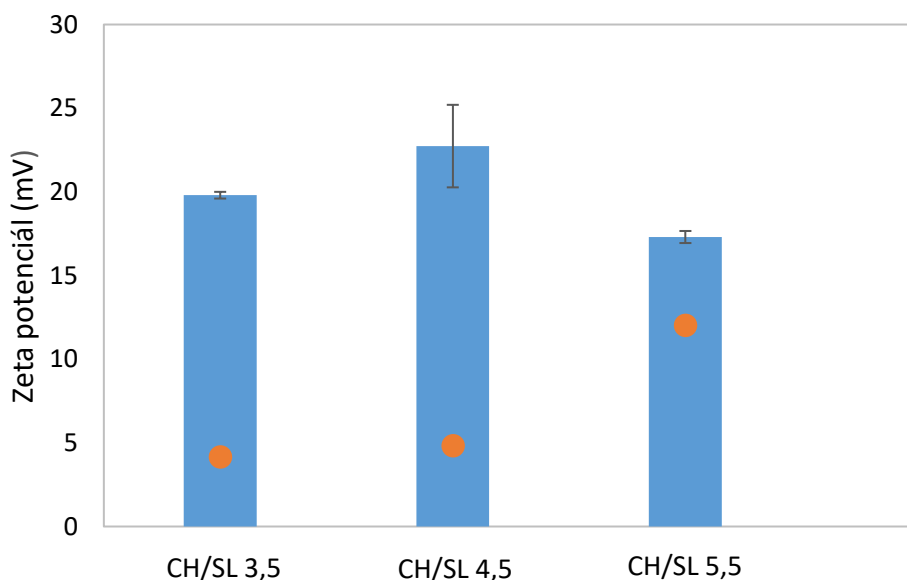
9.4.3 Měření zeta potenciálu emulzí

Měření zeta potenciálu je důležité pro posouzení stability systému, kdy emulze s nábojem nižším než -30 mV a vyšším než $+30 \text{ mV}$ lze označit za elektrostaticky stabilní. Pokud se však hodnoty zeta potenciálu blíží k nule, může docházet k agregátní nestabilitě.

Na základě našich výsledků (Obr. 43) lze konstatovat, že zeta potenciál připravených emulzí se pohybuje v kladných hodnotách, a to v průměru okolo $+20 \text{ mV}$ bez ohledu na použitý pufr. Za předpokladu, že chitosan v kyselém prostředí vykazuje zeta potenciál vyšší, lze předpokládat částečnou neutralizaci nábojem vlivem přítomnosti SL. Přesto lze potvrdit dominantní roli tohoto polymeru pro výsledný náboj. Na základě dostupných studií

věnovaných potenciálu BS pro stabilizaci emulzních disperzních systémů, lze konstatovat, že výsledný náboj kapek je výrazně ovlivněn konkrétním typem a složením komplexu. Studie [66] se zabývala možností využití surfaktinu získaného z *Bacillus subtilis* pro stabilizaci potravinářských emulzí O/V. U výsledných systémů byly zaznamenány hodnoty zeta potenciálu přesahující -100 mV při neutrálním až alkalickém pH, konkrétně až $-108,58 \pm 0,25$ mV při pH 9. Tyto výrazně záporné hodnoty indikují výjimečnou elektrostatickou stabilitu emulzí v daném pH rozmezí.

Studie [67] se zaměřila na interakce mezi saponiny a chitosanem a jejich vliv na povrchové vlastnosti směsí. Výzkum kombinoval metody jako vibrační sum-frekvenční generaci (SFG) spektroskopii, měření povrchového napětí a dilatační reologie. Měření zeta potenciálu ukázala, že samotné saponiny mají negativní zeta potenciál (-16,9 mV), ale přidáním chitosanu došlo k obrácení náboje až na +70 mV při koncentraci chitosanu 0,5 g/L. Výsledky studie naznačují, že kombinace saponinů a chitosanu může vést k tvorbě stabilních, povrchově aktivních komplexů, které mají potenciál pro aplikace v kosmetice, farmacii a potravinářství, zejména tam, kde je požadována stabilita pěn a emulzí.



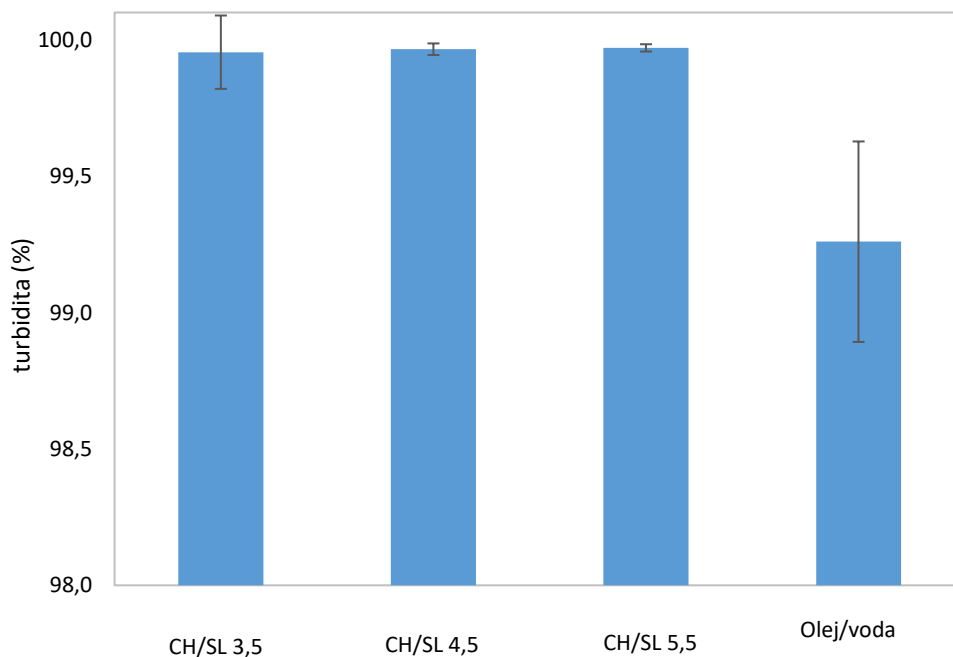
Obrázek 43 Zeta potenciál emulzí CH/SL

(zdroj: vlastní)

9.4.4 Měření turbidity emulzí

Na základě měření turbidity (absorbance) jednotlivých emulzí lze sledovat jejich stabilitu, především z hlediska výskytu jevů, jako je sedimentace nebo koalescence kapek. Zároveň lze pomocí turbidimetrie získat orientační informace o velikosti dispergovaných částic – menší částice rozptylují světlo efektivněji, což vede k vyšší hodnotě turbidity. Platí tedy, že turbidita je přímo úměrná koncentraci částic [68].

Výsledky turbidimetrického měření emulzí lze vidět na Obrázku 44. Je patrné, že ve všech prostředích bylo dosaženo vysokých hodnot (téměř 100 %), s nepatrně vyšším výsledkem u emulze CH/SL 5,5. Vyšší turbidita může být způsobena větším počtem částic či velikostí částic, je, ale důležité brát v potaz další parametry naměřené např. mikroskopie, pro posouzení stability emulze. Na druhou stranu, směs oleje a vody bez přídavku komplexu CH/SL vykázala hodnotu nižší. Větší vliv pH na turbiditu, potažmo stabilitu emulzí byl prokázána ve studii [69], kde byly emulze stabilizovány pomocí pektin-zeinových komplexů, a to ve dvou prostředích (pH 4 a pH 7). Emulze připravené při pH 4 měly menší velikost, vyšší viskozitu a byly stabilnější než emulze připravené při pH 7. Změny pH mohou měnit ionizační stav funkčních skupin emulgátorů, což následně ovlivňuje jejich schopnost snižovat povrchové napětí a stabilizovat emulzi.



Obrázek 44 Turbidita vzorků emulzí

(zdroj: vlastní)

Autoři Senra a kol. [70] prokázali pozitivní vliv komplexu na bázi kvaternizovaného chitosanu a sodné soli 1-dekansulfonátu na stabilizaci emulzí prostřednictvím turbidimetrického měření. Nejvyšší hodnoty absorbance byly naměřeny u systémů stabilizovaného pomocí komplexu kvaternizovaného chitosanu a decansulfonátu, v porovnání s emulzemi, v nichž byla přítomna pouze jedna ze složek.

9.4.5 Index krémování emulzí

Index krémování vypovídá o stabilitě emulzí, kdy jako ideální hodnota CI pro stabilní emulzi je 100 % [71]. Z výsledků uvedených v Tabulce 10 vyplývá, že index krémování připravených emulzí se pohyboval v rozmezí 36–67 % a nejvyšší kinetickou stabilitu a odolnost proti fázové separaci prokázala emulze připravená v pH 5,5.

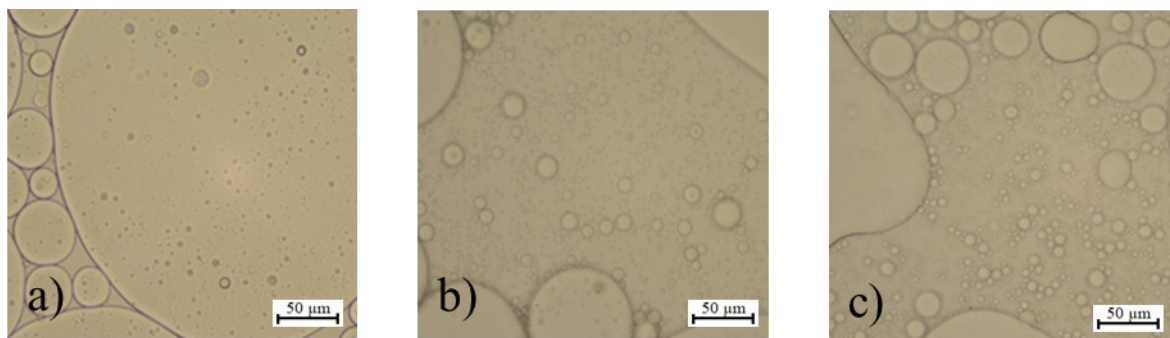
Tabulka 10 Index krémování emulzí (po 15 min od přípravy)

Vzorek	H (cm)	H_c (cm)	CI (%)
CH/SL 3,5	1,2	3,3	36,4
CH/SL 4,5	1,4	3,2	43,8
CH/SL 5,5	2,2	3,3	66,7

(zdroj: vlastní)

9.4.6 Mikrostruktura emulzí

Mikroskopická analýza je důležitým nástrojem, který umožňuje hodnotit morfologii a stabilitu emulzí. Na základě mikroskopických snímků lze porovnat rozdíly mezi jednotlivými vzorky emulzí připravenými za různých podmínek. Výsledky mikroskopického pozorování lze vidět na Obr. 45. Na Lze pozorovat různé velikosti kapek většinou sférického tvaru v nepravidelných uspořádáních s tendencí k agregaci. Emulze vykazovaly poměrně širokou distribuci kapek, která se snižovala s rostoucí hodnotou pH. Tento fakt byl potvrzen i měřením velikosti částic na zetasizeru (Obr. 42) a hodnocením indexu krémování (kapitola 9.4.5).



Obrázek 45 Mikroskopické snímky emulzí CH/SL a) pH 3,5 b) pH 4,5 c) pH 5,5

(zdroj: vlastní)

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo charakterizovat vzorky biosurfaktantů, konkrétně soforolipidů získaných z kvasinky *Candida bombicola*, a prostudovat jejich potenciální interakce s polymerem chitosanem. Byly sledovány vlastnosti jako povrchové napětí, pH, viskozita či vodivost. Následně byly komplexy chitosan/soforolipid využity pro přípravu emulzí, za účelem zhodnocení jejich potenciálu pro stabilizaci těchto heterogenních soustav.

V první části práce byla provedena stabilitní studie vzorků SL, v rámci, níž byly měřeny parametry jako povrchové napětí, viskozita či pH po dobu 8 měsíců od výroby. Výsledky prokázaly minimální změny ve fyzikálních vlastnostech vzorků, které byly uloženy při dvou teplotách, a to laboratorní teplotě (25 ± 3 °C) a v lednici (4 ± 3 °C). Nejvýraznějším rozdílem byly vizuální změny u vzorků uložených v lednici, které se projeví výraznou nehomogenitou a vznikem sraženin. Disková difúzní metoda prokázala antimikrobiální aktivitu vzorků SL, která ovšem v čase výrazně klesla.

Na základě tenziometrického měření byly charakterizovány povrchové a micelární parametry. Kritická micelární koncentrace byla naměřena v rozsahu od 0,15 do 0,3 mg/ml s nejnižší hodnotou u vzorků v pH 5,5. Hodnoty Gibbsovy energie prokázaly spontánní agregaci do micel roztoků soforolipidů ve všech testovaných pufrch.

U roztoků SL byla také hodnocena schopnost tvorby pěny, a to prostřednictvím Ross-Milles metody a s využitím dynamického analyzátoru tvorby pěny Krüss DFA 100. Mezi jednotlivými vzorky nebyly zjištěny významné rozdíly. Maximální výška pěny pomocí Ross-Milles metody byla naměřena u pH 5,5 (21 mm). Měření pomocí dynamického analyzátoru pěny umožnilo detailnější sledování časového průběhu pěnotvorných účinků za definovaných podmínek. Bez ohledu na pH byla počáteční pěna vysoká (okolo 180 mm), ovšem v čase došlo k výraznému poklesu. Za účelem zajištění stabilnější pěny by bylo pravděpodobně žádoucí přidat do finálního produktu další surfaktant či stabilizátor pěny.

V další části práce byly sledovány systémy na bázi přírodního polymeru chitosanu a soforolipidu. Na základě povrchového napětí byly stanoveny CAC hodnoty v rozmezí 0,11 až 0,18 mg/ml, indikující mírnou interakci mezi složkami. Konduktometrické měření prokázalo vliv pH na hodnoty vodivosti, ovšem metoda se neprokázala jako dostatečně citlivá pro sledování potenciálních interakcí.

Na závěr byly připraveny emulze O/V s vodnou fází na bázi komplexu CH/SL, za účelem zhodnocení možného vlivu na stabilizaci fázového rozhraní mezi kapkami.

Připravené emulze byly charakterizovány pomocí vizuálního hodnocení, měření velikosti částic a zeta potenciálu. Všechny emulze obsahovaly částice o velikosti nad 1 μm s nejvyšší hodnotou (1745 nm) u systému CH/SL 4,5. Bez ohledu na použitý pufr byl u částic prokázán kladný náboj (okolo +20 mV), indikující primární roli chitosanu, který je v daném spíše kyslejší prostředí kladně nabitý. Index krémování odhalil největší stabilitu emulze CH/SL 5,5. Mikroskopické pozorování prokázalo přítomnost převážně sférických kapek s poměrně širokou distribucí velikostí v závislosti na pH.

Závěrem lze shrnout, že výsledky měření prokázaly dostatečnou povrchovou aktivitu studovaných vzorků soforolipidů, která nebyla výrazně ovlivněna daným pH prostředí. V kombinaci s biopolymerem chitosanem docházelo ke slabým interakcím, které by mohly být podpořeny další úpravou vnějších faktorů. Je zřejmé, že se jedná o zajímavý systém na bázi přírodních složek, nabízející udržitelnou alternativu k běžně využívaným stabilizátorům emulzí, či nosičům aktivních látek.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Cho, W.Y.; Ng, J.F.; Yap, W.H.; Goh, B.H. Sophorolipids—Bio-Based Antimicrobial Formulating Agents for Applications in Food and Health. *Molecules* 2022, 27, 5556. <https://doi.org/10.3390/molecules27175556>
- [2] ABHYANKAR, Isha; HIRLEKAR, Swarali; PRABHUNE, Asmita a NISAL, Anuya. Bridging the gap: An investigation of biosurfactants-polymer systems. Online. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2024, roč. 72. ISSN 13590294. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2024.101806>. [cit. 2024-09-22].
- [3] AZEVEDO, Maria A.; TEIXEIRA, José A.; PASTRANA, Lorenzo a CERQUEIRA, Miguel A. Rhamnolipids: A biosurfactant for the development of lipid-based nanosystems for food applications. Online. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2024, roč. 23, č. 1. ISSN 1541-4337. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13252>. [cit. 2025-04-01].
- [4] VARVARESOU, A. a IAKOVOU, K. Biosurfactants in cosmetics and biopharmaceuticals. Online. *Letters in Applied Microbiology*. 2015, roč. 61, č. 3, s. 214-223. ISSN 02668254. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/lam.12440>. [cit. 2024-12-29].
- [5] SHAH, Nikhil; NIKAM, Rohit; GAIKWAD, Shikha; SAPRE, Vaijayanti a KAUR, Jaspal. Biosurfactant: Types, Detection Methods, Importance and Applications. Online. *Indian Journal of Microbiology Research*. 2016, roč. 3, č. 1. ISSN 2394-546X. Dostupné z: <https://doi.org/10.5958/2394-5478.2016.00002.9>. [cit. 2024-12-29].
- [6] AKTAS, Meriyem; DANNE, Linna; MÄLLER, Philip a NARBERHAUS, Franz. Membrane lipids in *Agrobacterium tumefaciens*: biosynthetic pathways and importance for pathogenesis. Online. *Frontiers in Plant Science*. 2014, roč. 5. ISSN 1664-462X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00109>. [cit. 2025-03-23].
- [7] HUANG, Cheng; HU, Chunyan; SUN, Gang; JI, Bolin a YAN, Kelu. Antimicrobial finish of cotton fabrics treated by sophorolipids combined with 1,2,3,4-butanetetracarboxylic acid. Online. *Cellulose*. 2020, roč. 27, č. 5, s. 2859-2872. ISSN

- 0969-0239. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02925-9>. [cit. 2024-12-29].
- [8] VAN BOGAERT, Inge N. A.; SAERENS, Karen; DE MUYNCK, Cassandra; DEVELTER, Dirk; SOETAERT, Wim et al. Microbial production and application of sophorolipids. Online. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007, roč. 76, č. 1, s. 23-34. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0988-7>. [cit. 2025-04-14].
- [9] LIU, Zhi; ZHANG, Weixing; ZHANG, Yongzhi; CHEN, Tianjin; SHAO, Shengzhi et al. Assuring food safety and traceability of polished rice from different production regions in China and Southeast Asia using chemometric models. Online. *Food Control*. 2019, roč. 99, s. 1-10. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.12.011>. [cit. 2025-04-01].
- [10] WONGSIRICHOT, Phavit a WINTERBURN, James. Recent advances in sophorolipid production: From laboratory to pilot scale and beyond. Online. *Journal of Cleaner Production*. 2025, roč. 492. ISSN 09596526. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2025.144898>. [cit. 2025-04-01].
- [11] BACCILE, Niki a KLEINEN, Jochen. Biosurfactants and bioamphiphiles, survey, perspectives and applicative potential from a colloid science point of view. Online. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2025, roč. 75. ISSN 13590294. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2024.101891>. [cit. 2025-04-01].
- [12] SINGH, Pooja; JOSHI, Kasturi; GUIN, Debanjan a PRABHUNE, Asmita A. Chemically conjugated sophorolipids on CdTe QDs: a biocompatible photoluminescence nanocomposite for theranostic applications. Online. *RSC Advances*. 2013, roč. 3, č. 44. ISSN 2046
- [13] [SAMTANI, Pinky; JADHAV, Jagruti; KALE, Sandeep a PRATAP, Amit P. Fermentative Production of Sophorolipid and Purification by Adsorption Chromatography. Online. *Tenside Surfactants Detergents*. 2018, roč. 55, č. 6, s. 467-476. ISSN
- [14] RAU, Udo; HECKMANN, Rolf; WRAY, Victor a LANG, Siegmund. Online. *Biotechnology Letters*. Roč. 21, č. 11, s. 973-977. ISSN 01415492. Dostupné z: <https://doi.org/10.1023/A:1005665222976>. [cit. 2025-04-03].

- [15] BACCILE, Niki; CUVIER, Anne-Sophie; VALOTTEAU, Claire a VAN BOGAERT, Inge N. A. Practical methods to reduce impurities for gram-scale amounts of acidic sophorolipid biosurfactants. Online. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2013, roč. 115, č. 12, s. 1404-1412. ISSN 1438-7697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ejlt.201300131>. [cit. 2025-04-03].
- [16] TANG, Yujing; MA, Qianqian; DU, Yulu; REN, Lu; VAN ZYL, Leonardo J. et al. Efficient purification of sophorolipids via chemical modifications coupled with extractions and their potential applications as antibacterial agents. Online. *Separation and Purification Technology*. 2020, roč. 245. ISSN 13835866. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.116897>. [cit. 2024-12-29].
- [17] HU, Yongmei a JU, Lu-Kwang. Purification of lactonic sophorolipids by crystallization. Online. *Journal of Biotechnology*. 2001, roč. 87, č. 3, s. 263-272. ISSN 01681656. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00248-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00248-6). [cit. 2024-12-29].
- [18] HIRATA, Yoshihiko; RYU, Mizuyuki; IGARASHI, Keisuke; NAGATSUKA, Asami; FURUTA, Taro et al. Natural Synergism of Acid and Lactone Type Mixed Sophorolipids in Interfacial Activities and Cytotoxicities. Online. *Journal of Oleo Science*. 2009, roč. 58, č. 11, s. 565-572. ISSN 1345-8957. Dostupné z: <https://doi.org/10.5650/jos.58.565>. [cit. 2024-12-29].
- [19] NASSER, Makary; SHARMA, Malvika a KAUR, Guneet. Advances in the production of biosurfactants as green ingredients in home and personal care products. Online. *Frontiers in Chemistry*. 2024, roč. 12. ISSN 2296-2646. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fchem.2024.1382547>. [cit. 2025-04-01].
- [20] ADU, Simms A.; TWIGG, Matthew S.; NAUGHTON, Patrick J.; MARCHANT, Roger a BANAT, Ibrahim M. Purified Acidic Sophorolipid Biosurfactants in Skincare Applications: An Assessment of Cytotoxic Effects in Comparison with Synthetic Surfactants Using a 3D In Vitro Human Skin Model. Online. *Fermentation*. 2023, roč. 9, č. 11. ISSN 2311-5637. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/fermentation9110985>. [cit. 2024-12-29].
- [21] OLIVEIRA, Marcos Roberto de, Agnes MAGRI, Cristiani BALDO, Doumit CAMILIOS-NETO, Tamires MINUCCELLI a Maria Antonia Pedrine Colabone CELLIGOI. Review: Sophorolipids – A Promising Biosurfactant and its

- Applications. International Journal of Advanced Biotechnology and Research [online]. 2015, roč. 6, č. 2, s. 161–174 [cit. 2025-03-23]. Dostupné z: <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=eccd77e5f4d9b4a108c001c38c511746882fb09b>
- [22] TAYLOR, D.J.F.; THOMAS, R.K. a PENFOLD, J. Polymer/surfactant interactions at the air/water interface. Online. Advances in Colloid and Interface Science. 2007, roč. 132, č. 2, s. 69-110. ISSN 00018686. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2007.01.002>. [cit. 2025-03-23].
- [23] DJUVE, J; PUGH, R.J a SJOBLÖM, J. Foaming and dynamic surface tension of aqueous polymer/surfactants solutions 1: ethyl(hydroxyethyl) cellulose and sodium dodecyl sulphate. Online. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2001, roč. 186, č. 3, s. 189-202. ISSN 09277757. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(00\)00787-1](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(00)00787-1). [cit. 2025-04-01].
- [24] GODDARD, E. D. a GRUBER, James V. (ed.). Principles of polymer science and technology in cosmetics and personal care. Cosmetic science and technology. New York: Marcel Dekker, [1999]. ISBN 0-8247-1923-9.
- [25] Higgins, M. (2004, March). Polymer-Surfactant Interactions: Modes of Association and Methods of Analysis. Ink World. https://www.inkworldmagazine.com/issues/2004-03/view_features/polymer-surfactant-interactions-modes-of-asso/
- [26] SEWERYN, Artur. Interactions between surfactants and the skin – Theory and practice. Online. Advances in Colloid and Interface Science. 2018, roč. 256, s. 242-255. ISSN 00018686. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.04.002>. [cit. 2025-03-23].
- [27] STAPLES, E.; TUCKER, I.; PENFOLD, J.; WARREN, N.; THOMAS, R. K. et al. Organization of Polymer–Surfactant Mixtures at the Air–Water Interface: Sodium Dodecyl Sulfate and Poly(dimethyldiallylammonium chloride). Online. Langmuir. 2002, roč. 18, č. 13, s. 5147-5153. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/la020034f>. [cit. 2025-04-01].
- [28] TAYLOR, D. J. F.; THOMAS, R. K. a PENFOLD, J. The Adsorption of Oppositely Charged Polyelectrolyte/Surfactant Mixtures: Neutron Reflection from Dodecyl Trimethylammonium Bromide and Sodium Poly(styrene sulfonate) at the

- Air/Water Interface. Online. *Langmuir*. 2002, roč. 18, č. 12, s. 4748-4757. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/la011716q>. [cit. 2025-04-01].
- [29] GRADZIELSKI, Michael. Polyelectrolyte–Surfactant Complexes As a Formulation Tool for Drug Delivery. Online. *Langmuir*. 2022, roč. 38, č. 44, s. 13330-13343. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c02166>. [cit. 2025-03-23].
- [30] RAFFA, Patrizio; WEVER, Diego Armando Zakarias; PICCHIONI, Francesco a BROEKHUIS, Antonius A. Polymeric Surfactants: Synthesis, Properties, and Links to Applications. Online. *Chemical Reviews*. 2015, roč. 115, č. 16, s. 8504-8563. ISSN 0009-2665. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/cr500129h>. [cit. 2025-03-25].
- [31] SEYRIG, Chloé; POIRIER, Alexandre; PEREZ, Javier; BIZIEN, Thomas a BACCILE, Niki. Interpenetrated Biosurfactant–Biopolymer Orthogonal Hydrogels: The Biosurfactant's Phase Controls the Hydrogel's Mechanics. Online. *Biomacromolecules*. 2023, roč. 24, č. 1, s. 33-42. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.2c00319>. [cit. 2025-04-01].
- [32] MARANGON, Crisiane A.; MARTINS, Virginia C. A.; LING, Ma H.; MELO, Cristiane C.; PLEPIS, Ana Maria G. et al. Combination of Rhamnolipid and Chitosan in Nanoparticles Boosts Their Antimicrobial Efficacy. Online. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2020, roč. 12, č. 5, s. 5488-5499. ISSN 1944-8244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsami.9b19253>. [cit. 2025-03-23].
- [33] FARIAS, Juliana M.; STAMFORD, Thayza Christina M.; RESENDE, Ana Helena M.; AGUIAR, Jaciana S.; RUFINO, Raquel D. et al. Mouthwash containing a biosurfactant and chitosan: An eco-sustainable option for the control of cariogenic microorganisms. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019, roč. 129, s. 853-860. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.090>. [cit. 2025-04-02].
- [34] PINGALI, S.; BENHUR, A. M. a AMIN, S. Engineering rheological response in chitosan–sophorolipid systems through controlled interactions. Online. *International Journal of Cosmetic Science*. 2020, roč. 42, č. 4, s. 407-414. ISSN 0142-5463. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/ics.12640>. [cit. 2024-11-24].

- [35] BETTENCOURT, Ana F.; TOMÉ, Carolina; OLIVEIRA, Tânia; MARTIN, Victor; SANTOS, Catarina et al. Exploring the potential of chitosan-based particles as delivery-carriers for promising antimicrobial glycolipid biosurfactants. Online. *Carbohydrate Polymers*. 2021, roč. 254. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117433>. [cit. 2025-04-01].
- [36] MENDES, Ana C.; GORZELANNY, Christian; HALTER, Natalia; SCHNEIDER, Stefan W. a CHRONAKIS, Ioannis S. Hybrid electrospun chitosan-phospholipids nanofibers for transdermal drug delivery. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016, roč. 510, č. 1, s. 48-56. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.06.016>. [cit. 2025-04-01].
- [37] CZAPLICKA, Natalia; MANIA, Szymon a KONOPACKA-ŁYSKAWA, Donata. Influence of Rhamnolipids and Ionic Cross-Linking Conditions on the Mechanical Properties of Alginate Hydrogels as a Model Bacterial Biofilm. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, roč. 22, č. 13. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22136840>. [cit. 2025-04-02].
- [38] LEWIŃSKA, Agnieszka; DOMŻAŁ-KĘDZIA, Marta; WÓJTOWICZ, Karolina a BAZYLIŃSKA, Urszula. Surfactin-stabilized poly(D,L-lactide) nanoparticles for potential skin application. Online. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2022, roč. 648. ISSN 09277757. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.129216>. [cit. 2025-04-02].
- [39] KUNDU, Debasree; HAZRA, Chinmay; CHATTERJEE, Aniruddha; CHAUDHARI, Ambalal a MISHRA, Satyendra. Biopolymer and biosurfactant-graft-calcium sulfate/polystyrene nanocomposites: Thermophysical, mechanical and biodegradation studies. Online. *Polymer Degradation and Stability*. 2014, roč. 107, s. 37-52. ISSN 01413910. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2014.05.001>. [cit. 2025-04-02].
- [40] HIRLEKAR, Swarali; RAY, Debes; ASWAL, Vinod K.; PRABHUNE, Asmita A a NISAL, Anuya. Lauric Acid Sophorolipid: Accelerating the Gelation of Silk Fibroin. Online. *ACS Omega*. 2020, roč. 5, č. 44, s. 28571-28578. ISSN 2470-1343. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03411>. [cit. 2025-04-09].
- [41] LASSENBERGER, Andrea; MARTEL, Anne; PORCAR, Lionel a BACCILE, Niki. Interpenetrated biosurfactant-silk fibroin networks – a SANS study.

- Online. *Soft Matter*. 2021, roč. 17, č. 8, s. 2302-2314. ISSN 1744-683X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D0SM01869D>. [cit. 2025-04-09].
- [42] SEYRIG, Chloé; POIRIER, Alexandre; BIZIEN, Thomas a BACCILE, Niki. In Situ Stimulation of Self-Assembly Tunes the Elastic Properties of Interpenetrated Biosurfactant–Biopolymer Hydrogels. Online. *Biomacromolecules*. 2023, roč. 24, č. 1, s. 19-32. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.2c01062>. [cit. 2025-04-09].
- [43] CHEN, Yufeng; PENG, Jingchong; WANG, Yueqi; WADHAWAN, Daniel; WU, Lijun et al. Development, Characterization, Stability and Bioaccessibility Improvement of 7,8-Dihydroxyflavone Loaded Zein/Sophorolipid/Polysaccharide Ternary Nanoparticles: Comparison of Sodium Alginate and Sodium Carboxymethyl Cellulose. Online. *Foods*. 2021, roč. 10, č. 11. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods10112629>. [cit. 2025-04-09].
- [44] YORKE, Kelly a AMIN, Samiul. High Performance Conditioning Shampoo with Hyaluronic Acid and Sustainable Surfactants. Online. *Cosmetics*. 2021, roč. 8, č. 3. ISSN 2079-9284. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cosmetics8030071>. [cit. 2025-04-09].
- [45] BALDUCCI, Evita; PAPI, Francesco; CAPIALBI, Daniela Eloisa a DEL BINO, Linda. Polysaccharides' Structures and Functions in Biofilm Architecture of Antimicrobial-Resistant (AMR) Pathogens. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023, roč. 24, č. 4. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms24044030>. [cit. 2025-02-25].
- [46] KAGA, Hiroaki; ORITA, Masanori; ENDO, Koji; AKAMATSU, Masaaki; SAKAI, Kenichi et al. Interaction between Sophorolipids and β -glucan in Aqueous Solutions. Online. *Journal of Oleo Science*. 2024, roč. 73, č. 2, s. 169-176. ISSN 1345-8957. Dostupné z: <https://doi.org/10.5650/jos.ess23189>. [cit. 2024-12-29].
- [47] NARCISO, Francisco; CARDOSO, Sara; MONGE, Nuno; LOURENÇO, Madalena; MARTIN, Victor et al. 3D-printed biosurfactant-chitosan antibacterial coating for the prevention of silicone-based associated infections. Online. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2023, roč. 230. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113486>. [cit. 2025-04-24].

- [48] FRANCO MARCELINO, Paulo Ricardo; ORTIZ, Julia; DA SILVA, Silvio Silvério a ORTIZ, Antonio. Interaction of an acidic sophorolipid biosurfactant with phosphatidylcholine model membranes. Online. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2021, roč. 207. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112029>. [cit. 2025-04-03].
- [49] BACILLE, Niki, SEYRIG, Chloé, CHAPUIS, Pauline a Abdellah YOUSFI. Development of sophorolipid-chitosan pickering O/W emulsion formulations. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2023, 226, 113304. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2023.113304
- [50] KLEINEN, Jochen; LANGWALD, Jan; VENZMER, Joachim a YALCINKAYA, Hacer. Microrheology to Understand the Viscosity Behavior of a Sophorolipid Biosurfactant. Online. *Colloids and Interfaces*. 2022, roč. 6, č. 1. ISSN 2504-5377. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/colloids6010003>. [cit. 2025-05-06].
- [51] SUN, Xinyu; QIAN, Yuzhen; WANG, Guozhen; WANG, Zeyi a HAO, Jingcheng. Liquid Crystal Cubic Phases Constructed from Sophorolipids Micelles. Online. *Langmuir*. 2025, roč. 41, č. 17, s. 10931-10939. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5c00298>. [cit. 2025-05-06].
- [52] MA, Xiao-jing; WANG, Tong; ZHANG, Hui-min; SHAO, Jun-qian; JIANG, Mei et al. Comparison of inhibitory effects and mechanisms of lactonic sophorolipid on different pathogenic bacteria. Online. *Frontiers in Microbiology*. 2022, roč. 13. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.929932>. [cit. 2025-04-17].
- [53] SHAH, Vishal; BADIA, Daniel a RATSEP, Peter. Sophorolipids Having Enhanced Antibacterial Activity. Online. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007, roč. 51, č. 1, s. 397-400. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/AAC.01118-06>. [cit. 2025-04-17].
- [54] SATPUTE, Surekha K.; BANAT, Ibrahim M.; DHAKEPHALKAR, Prashant K.; BANPURKAR, Arun G. a CHOPADE, Balu A. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. Online. *Biotechnology Advances*. 2010, roč. 28, č. 4, s. 436-450. ISSN 07349750. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.006>. [cit. 2025-04-24].

- [55] LI, Guofeng; YI, Xiangyi; JIANG, Jitao; ZHANG, Yu a LI, Yueli. Dynamic surface properties and dilational rheology of acidic and lactonic sophorolipids at the air-water interface. Online. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2020, roč. 195. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111248>. [cit. 2025-04-23].
- [56] HOLM, Bruce A; WANG, Zhengdong; EGAN, Edmund A a NOTTER, Robert H. Content of Dipalmitoyl Phosphatidylcholine in Lung Surfactant: Ramifications for Surface Activity. Online. Pediatric Research. 1996, roč. 39, č. 5, s. 805-811. ISSN 0031-3998. Dostupné z: <https://doi.org/10.1203/00006450-199605000-00010>. [cit. 2025-04-28].
- [57] ZAMAN, Md Imraj. Method for Measurement of Critical Micelle Concentration. Nadia, West Bengal, India: Dept. of Entomology, Bidhan Chandra Krishi Viswavidyalaya, [není uveden rok]. ARTICLE ID: 32.
- [58] ALFA CHEMISTRY. Methods to Determine Critical Micelle Concentration (CMC) [online]. Nadja, West Bengal, India: Alfa Chemistry, 2024 [cit. 2025-04-17]. Dostupné z: <https://surfactant.alfa-chemistry.com/methods-to-determine-critical-micelle-concentration-cmc.html>
- [59] HOLLENBACH, Rebecca; OEPPLING, Sophie; DELAVAUULT, André; VÖLP, Annika R.; WILLENBACHER, Norbert et al. Comparative study on interfacial and foaming properties of glycolipids in relation to the gas applied for foam generation. Online. RSC Advances. 2021, roč. 11, č. 54, s. 34235-34244. ISSN 2046-2069. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D1RA06190A>. [cit. 2025-04-15].
- [60] RINAUDO, Marguerite. Chitin and chitosan: Properties and applications. Online. Progress in Polymer Science. 2006, roč. 31, č. 7, s. 603-632. ISSN 00796700. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>. [cit. 2025-04-28].
- [61] TOUHAMI, Y.; RANA, D.; NEALE, G. H. a HORNOF, V. Study of polymer-surfactant interactions via surface tension measurements. Online. Colloid & Polymer Science. 2001, roč. 279, č. 3, s. 297-300. ISSN 0303-402X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s003960000455>. [cit. 2025-04-28].
- [62] MULLIGAN, Catherine N., RONGCHANG, Wang a GEORGE, Webber. Removal of lead from contaminated water and clay soil using a biosurfactant. Journal

- of Hazardous Materials, 2001, B87(1-3), 59–71. DOI: 10.1016/S0304-3894(01)00283-6
- [63] DESBRIÈRES, J., AÏDER, M. a DUFRESNE, A. Chitosan-based biopolymer blends: Physico-chemical properties and applications. *Cellulose Chemistry and Technology*. 2010, roč. 44, č. 9, s. 395–406. Dostupné z: [https://www.cellulosechemtechnol.ro/pdf/CCT9\(2010\)/p.395-406.pdf](https://www.cellulosechemtechnol.ro/pdf/CCT9(2010)/p.395-406.pdf).
- [64] KLINKESORN, Uta. The Role of Chitosan in Emulsion Formation and Stabilization. Online. *Food Reviews International*. 2013, roč. 29, č. 4, s. 371–393. ISSN 8755-9129. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/87559129.2013.818013>. [cit. 2025-05-04].
- [65] GOUIN, S. a M. CHOUNARD. Influence of Droplet Characteristics on the Formation of Oil-in-Water Emulsions Stabilized by Surfactant–Chitosan Layers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2015, roč. 484, s. 202–210. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2015.05.014.
- [66] HOFFMANN, Mareen; MÜCK, Denise; GROSSMANN, Lutz; GREINER, Lena; KLAUSMANN, Peter et al. Surfactin from *Bacillus subtilis* displays promising characteristics as O/W-emulsifier for food formulations. Online. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2021, roč. 203. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111749>. [cit. 2025-04-22].
- [67] KRZAN, Marcel; REY, Natalia García; JAREK, Ewelina; CZAKAJ, Agnieszka; SANTINI, Eva et al. Surface Properties of Saponin—Chitosan Mixtures. Online. *Molecules*. 2022, roč. 27, č. 21. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules27217505>. [cit. 2025-05-07].
- [68] REDDY, S.R a FOGLER, H.S. Emulsion stability: Determination from turbidity. Online. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1981, roč. 79, č. 1, s. 101–104. ISSN 00219797. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(81\)90052-7](https://doi.org/10.1016/0021-9797(81)90052-7). [cit. 2025-04-22].
- [69] JUTTULAPA, Maneerat; PIRIYAPRASARTH, Suchada a SRIAMORNSAK, Pornsak. Effect of pH on Stability of Oil-in-Water Emulsions Stabilized by Pectin-Zein Complexes. Online. *Advanced Materials Research*. 2013, roč. 747, s. 127–130. ISSN 1662-8985. Dostupné z: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.747.127>. [cit. 2025-04-22].

- [70] SENRA, Tonimar D.A.; CAMPANA-FILHO, Sergio P. a DESBRIÈRES, Jacques. Surfactant-polysaccharide complexes based on quaternized chitosan. Characterization and application to emulsion stability. Online. *European Polymer Journal*. 2018, roč. 104, s. 128-135. ISSN 00143057. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.05.002>. [cit. 2025-05-06].
- [71] URBÁNKOVÁ, Lucie; KAŠPÁRKOVÁ, Věra; EGNER, Pavlína; RUDOLF, Ondřej a KORÁBKOVÁ, Eva. Caseinate-Stabilized Emulsions of Black Cumin and Tamanu Oils: Preparation, Characterization and Antibacterial Activity. Online. *Polymers*. 2019, roč. 11, č. 12. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym11121951>. [cit. 2025-05-06].

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Obecná struktura glykolipidů	14
Obrázek 2 Obecná struktura lipopeptidů	15
Obrázek 3 Obecná struktura fosfolipidů	16
Obrázek 4 Struktura soforolipidů (Přeloženo z AJ).....	18
Obrázek 5 Kyselé forma soforolipidů získaná z kvasinky <i>Candida bombicola</i> (Přeloženo z AJ)	20
Obrázek 6 Závislost povrchového napětí na koncentraci surfaktantu a jeho CMC (přeloženo z AJ)	27
Obrázek 7 Změny povrchového napětí v závislosti na koncentraci povrchově aktivní látky pro různé systémy a) PSS a C ₁₂ TAB b) SDS a polyDMDAAC	29
Obrázek 8 Komplexy surfaktantu a polyelektrolytu a jejich možné využití pro dodání léčiv (přeloženo z AJ)	30
Obrázek 9 a) Separace a sběr surových soforolipidů b) Zbylé fermentační médium	43
Obrázek 10 Viskozimetr Brookfield dv-iii ultra	44
Obrázek 11 Připravené Petriho misky pro diskovou metodu před kultivací	45
Obrázek 12 Tenziometr EasyDyne Krüs	47
Obrázek 13 Konduktometr inoLab Cond 7110.....	48
Obrázek 14 Příprava roztoků chitosanu	49
Obrázek 15 Vzorky SL 2. den od výroby (T=25 °C).....	52
Obrázek 16 Vzorky SL v různých časech od výroby: levá dvojice skladována při 25±3 °C, pravá dvojice při 4±3 °C.	53
Obrázek 17 Graf závislosti povrchového napětí na koncentraci roztoků SL.....	57
Obrázek 18 Závislost povrchového tlaku na koncentraci roztoků SL	58
Obrázek 19 Graf závislosti vodivosti roztoků SL na jejich koncentraci.....	59
Obrázek 20 Připravené roztoky SL pro měření pěnivosti.....	61
Obrázek 21 Výška pěny vzorků SL ihned	61
Obrázek 22 Výška pěny po 30 minutách	61
Obrázek 23 Výška pěny po 60 minutách	62
Obrázek 24 Výška pěny vzorku SL ve vodě: a) počáteční, b) po 600 s	63
Obrázek 25 Výška pěny vzorku SL pH 3,5 a) počáteční b) po 600 s	63
Obrázek 26 Výška pěny vzorku SL pH 4,5 a) počáteční b) po 600 s	64
Obrázek 27 Výška pěny vzorku SL pH 5,5 a) počáteční b) po 600 s	64
Obrázek 28 Pěnivost roztoků SL v čase a) ve vodě, b) pH 3,5, c) pH 4,5, d) pH 5,5	65
Obrázek 29 Graf závislosti povrchového napětí na koncentraci roztoků CH/SL	67
Obrázek 30 Závislost naměřené vodivosti na koncentraci roztoků CH/SL	69

Obrázek 31 Turbidita roztoků CH/SL 3,5 v závislosti na koncentraci SL	70
Obrázek 32 Roztoky CH/SL 3,5 s koncentrací SL od 0,01 mg/ml do 2 mg/ml	70
Obrázek 33 Turbidita roztoků CH/SL 4,5 v závislosti na koncentraci SL	71
Obrázek 34 Roztoky CH/SL 4,5 s koncentrací SL od 0,01 mg/ml do 2 mg/ml	71
Obrázek 35 Turbidita roztoků CH/SL 5,5 v závislosti na koncentraci SL	72
Obrázek 36 Roztoky CH/SL 5,5 s koncentrací SL od 0,01 mg/ml do 2 mg/ml	72
Obrázek 37 Viskozita roztoků CH/SL v závislosti na koncentraci SL	74
Obrázek 38 Připravené emulze ihned po přípravě	75
Obrázek 39 Připravené emulze 1 den po přípravě	76
Obrázek 40 Připravené emulze 20 dní po přípravě	76
Obrázek 41 Připravené emulze 34 dní po přípravě	77
Obrázek 42 Velikost částic emulzí CH/SL	78
Obrázek 43 Zeta potenciál emulzí CH/SL	79
Obrázek 44 Turbidita vzorků emulzí	80
Obrázek 45 Mikroskopické snímky emulzí CH/SL a) pH 3,5 b) pH 4,5 c) pH 5,5	82

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Vybrané studie věnované interakcím mezi glykolipidy a polymery	35
Tabulka 2 Použité mikroorganismy pro testování antimikrobiální aktivity	44
Tabulka 3 Poměry pro přípravu acetátových pufrů	45
Tabulka 4 Souhrn výsledků pro měření stability u vzorků soforolipidů.....	54
Tabulka 5 Inhibiční zóny testovaných vzorků (včetně disku 6 mm)	55
Tabulka 6 Micelární parametry.....	57
Tabulka 7 Výška pěny roztoků SL naměřená metodou Ross-Miles.....	60
Tabulka 8 Výška pěny roztoků SL naměřená metodou Krüss.....	62
Tabulka 9 Hodnoty CAC pro vzorky CH/SL.....	66
Tabulka 10 Index krémování emulzí (po 15 min od přípravy)	81

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BS	Biosurfaktanty
C ₁₂ E ₆	hexaethylenglykol monododecylether
C ₁₂ TAB	dodecyl trimethyl amonium bromid
CABS	buněčně vázaný surfaktant
CAC	kritická agregační koncentrace
CI	index krémování
CMC	kritická micelární koncentrace
CoA	acetyl koenzym A
DPPC	1,2-dipalmitoy-sn-glycero-3-phosphocholine
DSC	diferenciální skenovací kalorimetrie
EPS	(extracellular polymeric substances) extracelulární polymerní látka
FTIR	infračervená spektroskopie
FTIR-ATIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
Glc	transkripční faktory
HCl	Kyselina chlorovodíková
HSV	Virus herpes simplex
ITC	Izotermická titrační kalorimetrie
LB agar	Luria-Bertani agar
Leu3	transkripční faktor
LSL	čisté laktonové soforolipidy
MK	Mastná kyselina
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotidfosfát
O/W	emulze olej ve vodě
OASL	sforolipid s nenasyceným C18:1 řetězcem
PESCs	polyelektrolyt-surfaktantový komplex

polyDMAAC poly(dimethyl-diallyl amonium chlorid)

POPC 1-palmitoy-2-oleoy-sn-glycero-3-phosphocholine

PSS poly(styren sulfonát)

RL rhamnolipidy

RL-CS částice chitosanu s rhamnolipidy

Rlp protein Rim9-like

SAX a WAXS rentgenové rozptylové metody

SDS sodium dodecyl sulfát

SL Soforolipidy

SL-COOH kyselý typ soforolipidů

TEM transmisní elektronová mikroskopie

TF transkripční faktory

TPP tripolyfosforečnan sodný

Ztf1 transkripční faktor

