

Příprava stabilních mikroemulzí 1-monoacylglycerolů s antimikrobními účinky

Bc. Markéta Křížová

Diplomová práce
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav biochemie a analýzy potravin
akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Markéta KRÍŽOVÁ**
Osobní číslo: **T09658**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Příprava stabilních mikroemulzí
1-monoacylglycerolů s antimikrobními účinky**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. V teoretické části zpracujte literární rešerži, zaměřte se na popis emulzí a mikroemulzí, jejich rozdělení, vlastnosti, stabilitu a metody přípravy.
2. Věnujte se rovněž monoacylglycerolům a jejich antimikrobním vlastnostem.

II. Praktická část

1. V praktické části připravte mikroemulze s olejovou fází tvořenou 1-monoacylglyceroly odvozenými od mastných kyselin s různou délkou řetězce a v přítomnosti různých kosurfaktantů.
2. Mikroemulze zvolenými metodami charakterizujte.
3. Získané výsledky zpracujte, přehledně uspořádejte a diskutujte.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] McClements, D., J.: Food Emulsions. Principles, Practices, and Techniques. Second Edition. CRC Press, 2005. ISBN 0-8493-2023-2.

[2] Blažej, A. a kol.: Tenzidy, 1. vydání, SNTL, Bratislava 1997, ISBN 63-173-77.

[3] Velíšek J.: Chemie potravin I. OSSIS Tábor 1999. ISBN 8090239137.

[4] Zajíc, A., Bareš, M.: Chemie a technologie tuků, 1. vydání, VŠCHT, Praha 1987.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

25. února 2011

Termín odevzdání diplomové práce:

20. května 2011

Ve Zlíně dne 21. března 2011



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou 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 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou 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);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské 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.

Ve Zlíně

.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ 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, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ 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, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výtěžku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výtěžku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Práce je zaměřena na přípravu mikroemulzí s olejovou fází tvořenou 1-monoacylglyceroly odvozenými od mastných kyselin s různou délkou řetězce v přítomnosti alkoholů jako ko-surfaktantů. Teoretická část se zabývá emulzemi a mikroemulzemi, jejich charakteristikou, vlastnostmi a metodami přípravy. Rovněž je zaměřena na stručný popis monoacylglycerolů a jejich antimikrobních vlastností. Praktická část se věnuje přípravě stabilních mikroemulzí obsahujících 1-monoacylglyceroly a sleduje inhibiční účinky 1-monoacylglycerolů obsažených v mikroemulzích na vybrané potravinářsky významné bakterie.

Klíčová slova: mikroemulze, 1- monoacylglycerol, kosurfaktant, antimikrobní vlastnosti

ABSTRACT

The work is focused on the preparation of microemulsions with an oil phase composed of 1-monoacylglycerols derived from fatty acids with different chain lengths, in the presence of alcohols as co-surfactants. Theoretical part of the work is dealing with emulsions and microemulsions, their characteristics, properties and preparation. It is also focused on a brief description of monoacylglycerols and their antimicrobial properties. The experimental part is concentrated on preparation of stable microemulsion containing monoacylglycerols and determination of inhibitory effects of these microemulsions against selected food-borne bacteria.

Keywords: microemulsions, 1-monoacylglycerol, co-surfactant, antimicrobial properties

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí mé diplomové práce, kterou byla doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc. za odborné vedení, poskytnuté rady, čas a pozornost, které mi věnovala při vypracování mé diplomové práce. Další poděkování patří Mgr. Ivě Doležálkové PhD. za poskytnuté rady při vyhodnocování mikrobiologických dat.

Prohlášení

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 EMULZE	13
1.1 KLASIFIKACE EMULZÍ.....	13
1.1.2 Podle koncentrace disperzního podílu.....	13
1.1.3 Podle velikosti dispergovaných částic.....	15
1.2 SLOŽENÍ EMULZÍ	16
1.3 PŘÍPRAVA EMULZÍ	16
1.4 SURFAKTANTY	17
1.4.1 Rozdělení surfaktantů.....	17
1.4.1.1 Anionické surfaktanty.....	18
1.4.1.2 Kationické surfaktanty.....	19
1.4.1.3 Amfoterní surfaktanty.....	19
1.4.1.4 Neionické surfaktanty.....	20
1.4.2 Hydrofilně – lipofilní rovnováha (HLB).....	21
1.5 BIOSURFAKTANTY.....	22
1.6 KOSURFAKTANTY.....	22
1.7 MIKROEMULZE.....	22
1.7.1 Příprava mikroemulzí.....	23
1.7.2 Typy mikroemulzí.....	23
1.8 STABILITA EMULZÍ A MIKROEMULZÍ	24
2 MONOACYLGLYCEROLY	27
2.1 KLASIFIKACE MONOACYLGLYCEROLŮ	27
2.2 VLASTNOSTI MONOACYLGLYCEROLŮ.....	27
2.3 VÝROBA MONOACYLGLYCEROLŮ	28
2.3.1 Interesterifikace.....	28
2.3.1.1 Alkoholýza.....	29
2.3.1.2 Acidolýza.....	29
2.3.1.3 Transesterifikace.....	29
2.3.2 Parciální hydrolýza triacylglycerolů	30
2.3.3 Esterifikace vyšších mastných kyselin s glycerolem	30
2.3.4 Nukleofilní adice mastné kyseliny na oxiran-2-yl-metanol	31
2.4 PRŮMYSLOVÉ VYUŽITÍ MONOACYLGLYCEROLŮ	31
2.4.1 Monoacylglyceroly v potravinářství	31
2.4.2 Monoacylglyceroly v kosmetickém průmyslu	32
2.4.3 Monoacylglyceroly ve farmaceutickém průmyslu.....	33
2.4.4 Monoacylglyceroly v textilním, obuvnickém a plastikářském průmyslu.....	33
2.5 ANTIMIKROBIÁLNÍ PŮSOBENÍ MONOACYLGLYCEROLŮ	33
II PRAKTICKÁ ČÁST	36

3	MATERIÁLY A PŘÍSTROJE.....	37
3.1	POUŽITÉ MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE	37
	MONOACYLGLYCEROLY.....	37
	Kosurfaktanty	37
	Surfaktant	37
3.2	POUŽITÉ MIKROORGANISMY	38
3.3	POUŽITÉ PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY	38
3.4	DEKONTAMINACE POUŽITÉHO MATERIÁLU.....	39
3.5	METODIKA	39
3.5.1	Příprava mikroemulzí.....	39
3.5.2	Grafické znázornění soustav o třech složkách	40
3.5.2.1	Výpočet složení mikroemulzí/emulzí pro konstrukci fázových diagramů	41
3.5.3	Charakterizace mikroemulzí	42
3.5.3.1	Mikroskopie	42
3.5.3.2	Měření velikosti částic na přístroji Zeta Nano SZ	42
3.5.3.3	Kontrola přístroje Zeta Nano SZ	43
3.5.4	Mikrobiologické vlastnosti mikroemulzí	43
3.5.4.1	Příprava mikroemulzí pro mikrobiologickou analýzu	43
3.5.5	Kultivační médium - Masopeptonový bujón (MPB)	44
3.5.6	Příprava bakteriální suspenze.....	44
3.6	SLEDOVÁNÍ ÚČINKU MONOACYLGLYCEROLŮ V MIKROEMULZÍCH NA VYBRANÉ POTRAVINÁŘSKY VÝZNAMNÉ BAKTERIE.....	45
4	VÝSLEDKY	47
4.1	FÁZOVÉ DIAGRAMY - GRAFICKÉ ZNÁZORNĚNÍ SOUSTAV O TŘECH SLOŽKÁCH.....	47
4.1.1	Vliv typu alkoholu na fázové chování mikroemulzí.....	49
4.2	CHARAKTERIZACE MIKROEMULZÍ	49
4.3	VLIV MIKROEMULZÍ 1-MONOACYLGLYCEROLU NA RŮST BAKTERIÍ	51
4.3.1	Vliv monoacylglycerolu kyseliny kaprinové (MAG C _{10:0}) v mikroemulzi na růst grampozitivních bakterií	52
4.3.2	Vliv monoacylglycerolu kyseliny laurové (MAG C _{12:0}) v mikroemulzi na růst grampozitivních bakterií	53
4.3.3	Vliv monoacylglycerolu kyseliny myristové (MAG C _{14:0}) v mikroemulzi na růst grampozitivních bakterií	53
4.3.4	Vliv monoacylglycerolu kyseliny undekanové (MAG C _{11:0}) v mikroemulzi na růst grampozitivních bakterií	54
4.3.5	Vliv monoacylglycerolu kyseliny kaprinové (MAG C _{10:0}) v mikroemulzi na růst gramnegativních bakterií	55
4.3.6	Vliv monoacylglycerolu kyseliny laurové (MAG C _{12:0}) v mikroemulzi na růst gramnegativních bakterií.....	56
4.3.7	Vliv monoacylglycerolu kyseliny myristové (MAG C _{14:0}) v mikroemulzi na růst gramnegativních bakterií	56
	ZÁVĚR.....	58
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	60

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	66
SEZNAM OBRÁZKŮ	67
SEZNAM TABULEK.....	68
SEZNAM PŘÍLOH.....	69

ÚVOD

Emulze jsou koloidní systémy, skládající se z jedné fáze dispergované ve formě drobných částic ve fázi druhé za pomoci surfaktantu.

Mikroemulze, tedy emulze s velikostí částic v rozmezí 10 – 100 nm, tvoří přechod mezi emulzemi a micelárními koloidy. Vznikají spontánně při vysokých koncentracích surfaktantu a velkém obsahu solubilizátu v micelle za přítomnosti kosurfaktantu, např. alkoholu o krátké a střední délce řetězce, jehož přítomnost způsobuje snížení mezifázového napětí, což je pro tvorbu mikroemulze klíčový faktor. Mikroemulze vykazují řadu unikátních vlastností. Narozdíl od běžných emulzí, které jsou mléčně zbarvené a při jejich přípravě je nutné intenzivní míchání, jsou mikroemulze transparentní a vznikají spontánně. Vzhledem k separaci svých složek jsou navíc mikroemulze stabilní. S těmito vlastnosti jsou mikroemulze žádoucí v mnoha oblastech, jako např. v potravinářském průmyslu, v kosmetickém průmyslu a ve farmaceutickém průmyslu.

1-monoacylglyceroly jsou parciální estery trojsytného alkoholu glycerolu s vyššími mastnými kyselinami, které představují potravinářsky nejvýznamnější lipidy. 1-monoacylglyceroly mají široké využití v průmyslu potravinářském, především jako emulgátory, dále v kosmetickém, farmaceutickém a v mnoha jiných oblastech. Protože bylo prokázáno, že 1-monoacylglyceroly mají antimikrobní účinky, dá se očekávat, že antimikrobní aktivitu budou vykazovat i mikroemulze tvořené 1-monoacylglyceroly.

Tato práce se zabývá možnostmi přípravy takovýchto stabilních mikroemulzí 1-monoacylglycerolů a testováním jejich antimikrobní aktivity. Vliv studovaných mikroemulzní 1-monoacylglycerolů na inhibici růstu mikroorganismů byl sledován na vybraných potravinářsky významných zástupcích gram pozitivních a gram negativních bakterií.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 EMULZE

Emulze jsou koloidní systémy, které jsou definovány jako disperze kapaliny v kapalném disperzním prostředí. Pro jejich tvorbu platí následující obecná pravidla. Kapaliny, které spolu vytvářejí emulzi, musí být navzájem nemísitelné, nebo omezeně mísitelné a v soustavě mohou být přítomny látky, které jsou schopné zabránit slévání částic dispergované fáze, tzv. koalescenci. Velikost částic u emulzí často přesahuje koloidní rozměry, ovšem filmy mezi částicemi mohou být koloidních rozměrů [1].

S emulzemi se setkáváme v potravinářském průmyslu, v průmyslu plastických hmot, v kosmetickém průmyslu, ve farmacii, zemědělství a v mnoha jiných oborech. V některých průmyslových odvětvích mohou být emulze nevídaným jevem (např. při zpracování ropy), neboť znesnadňují dělení kapalných fází a snadno zvyšují viskozitu [2].

1.1 Klasifikace emulzí

Emulzní systémy lze klasifikovat podle různých hledisek.

1.1.1 Podle polaritý disperzního podílu a prostředí se emulze rozdělují do dvou skupin

Emulze přímé – označované jako O/V (olej ve vodě), ve kterých je disperzním prostředím polárnější kapalina. Tento typ emulze představuje např. mléko nebo latex [3].

Emulze obrácené – označované jako V/O (voda v oleji), jejichž disperzním prostředím je nepolární kapalina. K tomuto typu emulze je možné zařadit např. máslo nebo emulgované tuky [3, 4].

Typ emulze je možno určit pomocí následujících postupů:

- Prostřednictvím měření elektrické vodivosti, která je dána vodivostí jejího disperzního prostředí. Emulze O/V jsou proto mnohem vodivější než emulze V/O.
- Pomocí schopnosti rozpouštět polární nebo nepolární barviva.
- Podle její schopnosti mísit se s polárními nebo nepolárními rozpouštědly [2]

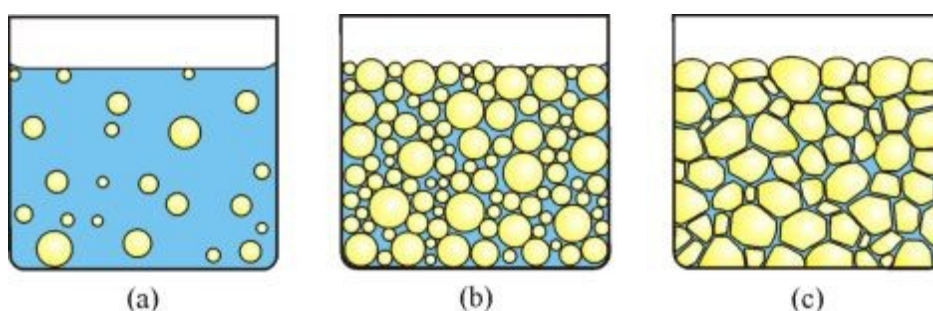
1.1.2 Podle koncentrace disperzního podílu

Podle tohoto kriteria lze rozlišit:

Emulze zředěné – kde dispergovaná fáze zaujímá maximálně 2 % celkového objemu. Průměr částic je obvykle řádově 10^{-7} m, tedy blízký rozměru koloidních částic.

Emulze koncentrované – s nedeformovanými sférickými částicemi, které s monodisperzních systémech mohou dosáhnout koncentrace disperzního podílu až 74 obj. %, což odpovídá nejtěsnějšímu geometrickému uspořádání kulovitých částic. Polydisperzní emulze lze připravit také koncentrovanější, protože malé částice mohou vyplnit prostory mezi velkými.

Emulze vysoce koncentrované, gelovité – jsou tvořeny částicemi disperzního podílu uloženými tak těsně, že se vzájemně deformují. Jsou od sebe odděleny tenkými filmy koloidních rozměrů, tenkými vrstvami disperzního prostředí a emulgátoru [3].



Obrázek 1. Různé typy emulzí a) zředěné, b) koncentrované, c) gelovité [4]

Můžeme se také setkat se zvláštními typy emulzí, kterými jsou **kritické emulze** a **dvojitě emulze**.

Kritické emulze jsou soustavy tvořené dvěma omezeně mísitelnými kapalinami při teplotě blízké kritické teplotě rozpouštěcí, kdy mezifázové napětí na rozhraní fází je velmi malé (10^{-5} N.m⁻¹) a k dispergování jedné kapaliny druhou stačí jen tepelný pohyb molekul. Kritická emulze může existovat jen ve velmi úzkém teplotním intervalu a vyznačuje se nestálostí disperzního podílu [5].

Další skupinou emulzí jsou dvojitě emulze (např. O/V/O nebo V/O/V). Emulze typu V/O/V je tvořena dispergovanými částicemi vody ve větších částicích oleje, které jsou samy dispergovány v kontinuální vodné fázi [4].

Tyto emulze jsou obvykle připravovány dispergací ve dvou krocích a za použití dvou typů emulgátorů (hydrofilního a hydrofobního), popř. mohou vznikat v důsledku nerovnoměrného rozdělení emulgátoru v různých mikroskopických oblastech soustavy při inverzi fází. Vzhledem k velké ploše fázového rozhraní je stabilita těchto systémů menší, než u jednoduchých emulzí [1].

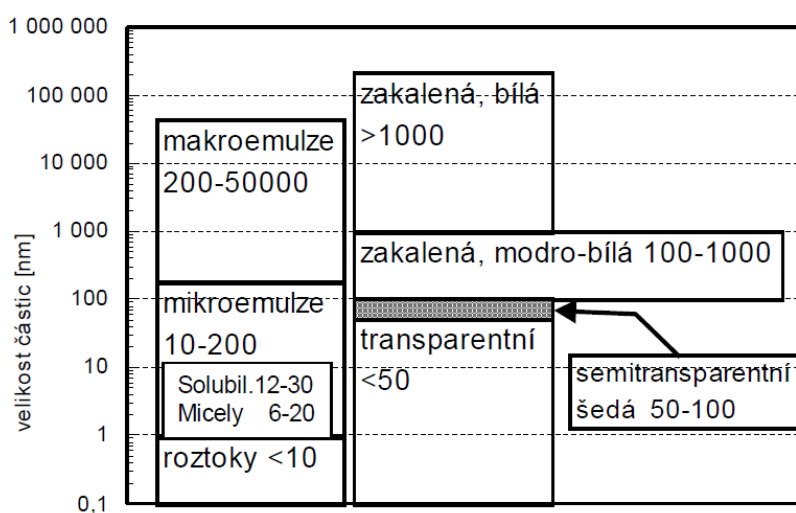
1.1.3 Podle velikosti dispergovaných částic

Mikroemulze – s velikostí částic obvykle v rozsahu 10-100 nm. Jsou to čiré a termodynamicky stabilní disperze [5].

Nanoemulze – jejich velikost částic leží obvykle v rozsahu 50-200 nm, jsou průsvitné a kineticky stabilní. Některé literární zdroje blíže specifikují také miniemulze s velikostí rozptýlených částic 80-150 nm [6, 8].

Makroemulze – jsou systémy s velikostí dispergovaného podílu zpravidla v rozsahu 100-1000 nm. Jsou mléčně zbarvené a termodynamicky nestabilní. Nestálé jsou proto, že disperzní podíl má tendenci ke koalescenci, tedy shlukování dispergovaných částic ve větší, případně až ve spojitou fázi. Z potravinářského hlediska jsou nejvýznamnější právě makroemulze [5].

Typy emulzí jsou schematicky znázorněny na Obrázku 2.



Obrázek 2. Rozdělení emulzí a vzhled systému v závislosti na velikosti částic [7]

1.2 Složení emulzí

Většina emulzí se skládá ze tří různých oblastí, které mají odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti, a to jsou:

- dispergované částice
- disperzní prostředí
- rozhraní.

Molekuly v emulzi se na tyto tři oblasti rozdělí podle jejich koncentrace a polarity. Nepolární molekuly mají tendenci být umístěny převážně v olejové fázi, molekuly polární ve vodné fázi a amfifilní molekuly na rozhraní. Také v rovnováze neustále probíhají výměny molekul mezi jednotlivými oblastmi, k nimž dochází v míře, která závisí na hmotnosti přepravovaných molekul skrz různé oblasti v systému [4].

1.3 Příprava emulzí

Emulze se obvykle připravují procesem emulzifikace. Emulzifikace spočívá v mechanické dispergaci disperzního podílu v disperzním prostředí za přítomnosti příslušného emulgátoru neboli surfaktantu. Dispergované kapaliny se intenzivně promíchávají, protřepávají, podrobují se vibracím pomocí míchadel, speciálních emulgátorů, koloidních mlýnů nebo ultrazvuku. Někdy se získané polydisperzní emulze ještě dodatečně homogenizují ve speciálních homogenizátorech. Homogenizací značně stoupne stálost emulze. Dalším možným postupem přípravy emulzí jsou kondenzační metody, které jsou však používány zřídka. Zde zahrnujeme postupy jako např. snížení rozpustnosti vysokomolekulárních látek, přidávek špatného rozpouštědla, kterými je možné získat vodné emulze organických látek o velké disperzitě.

Při emulzifikaci je mechanická práce přeměňována v mezifázovou energii rozhraní O/V. Vedle stabilizačního účinku, emulgátory snižují mezifázovou energii a tím tento proces usnadňují. Emulzifikace probíhá poměrně snadno, poklesne-li mezifázové napětí pod 10 mN/m. Některé surfaktanty s rozvětveným řetězcem dokonce snižují mezifázovou energii pod 1 mN/m. Pak stačí k dispergování velmi malé síly a dochází k tzv. spontánní emulzifikaci. Samovolné emulgování má významnou úlohu v procesech spojených s trávením a vstřebáváním potravy v organizmech [1].

1.4 Surfaktanty

Surfaktanty jsou povrchově aktivní látky. Pro povrchově aktivní látky se také někdy používá výraz tenzidy. Označení surfaktanty je převzaté z angličtiny, zatímco tenzidy do češtiny proniklo z němčiny [9].

Tyto látky mají schopnost snižovat povrchovou či mezifázovou energii na rozhraní kapaliny a plynu nebo vody a oleje, protože se samovolně koncentrují na fázovém rozhraní mezi vodnou a olejovou fází. Tím snižují povrchové napětí a usnadňují tak emulzifikaci.

Podmínkou pro to, aby látka fungovala jako surfaktant, je charakteristické uspořádání atomů v její molekule. Většinou jsou to delší molekuly, v nichž na jednom konci je uskupení atomů, které činí tuto část molekuly lyofilní a na opačném konci pak uskupení atomů, které činí tuto část molekuly lyofobní. Jejich molekula má tedy amfifilní charakter. Pokud se tyto látky využívají v soustavách obsahujících vodu, obsahují hydrofilní část (je přítomna polární funkční skupina, např. $-\text{COOH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$) a hydrofobní část (uhlíkatý řetězec o vhodné délce) [10, 11].

1.4.1 Rozdělení surfaktantů

Nejobvyklejší způsob dělení surfaktantů vychází ze základní chemické povahy těchto látek. Dělí se na anorganické, organické a organosilikátové. Vzhledem k aplikačnímu významu jsou dále blíže charakterizovány organické surfaktanty. Tato skupina se dělí podle struktury molekul a možnosti disociace ve vodné fázi na dvě základní podskupiny:

- *surfaktanty ionické*
- *surfaktanty neionické.*

U surfaktantů disociujících ve vodě na ionty dále záleží na tom, který z těchto iontů způsobuje povrchové efekty, který z nich je povrchově aktivní. Proto je možné dále ionické surfaktanty dělit na:

- *surfaktanty anionické*
- *surfaktanty kationické*
- *surfaktanty amfoterní* [14]

1.4.1.1 Anionické surfaktanty

Tato skupina surfaktantů je charakteristická tím, že v roztoku jejich molekuly disociují za vzniku organického aniontu, který je nositelem povrchové aktivity. Kationtem je obvykle některý z alkalických kovů či amonný kation [12].

Nejznámějším příkladem anionického surfaktantu jsou mýdla, alkalické soli vyšších mastných kyselin [10]. Anionické surfaktanty lze dále dělit do následujících podskupin.

a) *soli karboxylových kyselin=mýdla*, $RCOO^-Me^+$ jsou nejdéle používanou skupinu surfaktantů. Uhlovodíkový řetězec má obvykle délku 8-20 uhlíků. Jedná se o surfaktanty se středně vysokou povrchovou aktivitou, které špatně pracují v kyselém prostředí, kdy dochází k potlačení disociace organické kyseliny; a v silně tvrdé vodě (vznikají nerozpustné vápenaté soli) [12].

b) *alkylarylsulfonany*, $RArSO_3^-Me^+$ představují nejvíce průmyslově využívanou skupinu anionických surfaktantů. Díky své jednoduché výrobě jsou velmi levné a na rozdíl od mýdel mají vysokou povrchovou aktivitu i v kyselém prostředí. Největší problém tak představuje jejich nízká biologická odbouratelnost [12].

c) *alkylsulfáty*, $ROSO_3^-Me^+$ jsou estery kyseliny sírové. Díky tomu mají vysokou povrchovou aktivitu i v kyselém prostředí a na rozdíl od předchozí skupiny jsou i šetrnější vůči životnímu prostředí. Jsou ovšem výrobně nákladnější. Do této skupiny patří jeden z nejznámějších surfaktantů - dodecylsírán sodný. Obvyklá délka uhlovodíkového řetězce se v této skupině pohybuje od 10 do 18 uhlíků [12].

d) *alkylsulfonany*, $RSO_3^-Me^+$ mají obdobně dobrou biologickou odbouratelnost jako alkylsulfáty, ale jsou ještě nákladnější na výrobu [12].

e) *fosfáty a estery kyseliny fosforečné* mají hlavní význam v pracích prostředcích, protože nejsou tak citlivé, jako předchozí skupiny na tvrdou vodu. Díky obsahu fosforu však jsou biologicky závadné, protože zvyšují eutrofizaci vod, a proto se od jejich použití v pracích prostředcích ustupuje [12].

1.4.1.2 Kationické surfaktanty

Nejběžnějšími kationickými surfaktanty jsou alkylaminy s délkou řetězce 8-18 atomů uhlíku. Vyskytují se ve formě primárních až kvartérních aminů. Kvartérní aminy jsou vzhledem k silné ionizaci nejvýznamější [15].

Cena kationických surfaktantů je vysoká, a proto se používají na specifické účely jako např. inhibitory koroze, v dezinfekčních prostředcích, avivážích nebo kondicionérech v kosmetice. Mezi kationické surfaktanty řadíme následující skupiny:

a) *alkylaminy*, RNH_2 tvoří skupinu surfaktantů s nízkou povrchovou aktivitou, se silně omezenou aktivitou v alkalickém prostředí (nízká disociace aminoskupiny) [12].

b) *solí kvartérních amoniových zásad*, $(RNR_3')^+X^-$ tvoří nejpoužívanější skupinu těchto surfaktantů, hlavní uhlovodíkový řetězec obsahuje 12 až 18 uhlíků. Jako anion se zde uplatňuje obvykle halogenidový anion. Nejznámější surfaktant této skupiny představuje cetyltrimethylammonium bromid [12].

c) *solí pyridiniových zásad*, $(RCHR')C_5H_5N^+X^-$ obdobně jako předchozí skupina vykazují dostatečně vysokou povrchovou aktivitu i v alkalickém prostředí a navíc při vhodné délce uhlovodíkového řetězce mohou mít i baktericidní účinky [12].

1.4.1.3 Amfoterní surfaktanty

Molekuly těchto látek obsahují jak bazickou, tak i kyselou funkční skupinu, takže podle pH prostředí může být nabita kladně či záporně. Typickým příkladem takových molekul a současně i povrchově aktivních látek jsou aminokyseliny, které se používají jako surfaktanty a jsou, buď získávány z přírodních materiálů, nebo uměle syntetizovány. Jako surfaktanty tohoto typu účinkují i bílkoviny a z dalších přírodních molekul betainy. Vzhledem k jejich vysoké výrobní ceně jsou používány prakticky výhradně v kosmetice, například v šamponech, tekutých mýdlech a pěnách do koupele [12].

1.4.1.4 Neionické surfaktanty

Hydrofilní část těchto látek není schopna disociace a na její polaritě závisí, jestli je-li daný surfaktant rozpustný ve vodě nebo v olejové fázi. Chemicky se jedná o látky, z nichž jsou nejběžnější alkyl polyoxyetylenetery, estery mastných kyselin a vícesytných alkoholů (monoacylglyceroly a jejich deriváty) a substituované étery sacharidů [15].

Tyto látky jsou dnes nejrozšířenější skupinou surfaktantů a jsou představovány širokou škálou sloučenin, z nichž historicky nejstarší představují adiční produkty ethylenoxidu na různé organické molekuly (alifatické alkoholy, alkylfenoly, estery mastných kyselin či polymery). Dále je dělíme do následujících podskupin.

a) *oxyethylenáty vyšších (mastných) alkoholů*, $RO(CH_2CH_2O)_nH$ představují jedny z prvních neionických surfaktantů používaných v praxi, jejich problémem je vysoká cena a špatná biologická odbouratelnost [12].

b) *oxyethylenáty esterů mastných kyselin*, $RCOO(CH_2CH_2O)_nH$ mají podobné aplikační možnosti i nevýhody jako předchozí skupina [12].

c) *oxyethylenáty alkylfenolů*, $RC_6H_4O(CH_2CH_2O)_nH$ se staly díky své ceně nejrozšířenějšími průmyslovými surfaktanty, ovšem obdobně jako předchozí skupiny mají špatnou biologickou odbouratelnost. Označení těchto surfaktatů je Triton [12].

d) *kopolymery ethylenoxidu a propylenoxidu* umožňují změnou poměru obou stavebních jednotek regulovat povrchovou aktivitu [12].

e) *oxyethylenáty sorbitolových esterů s mastnými kyselinami* představují další velkou skupinu průmyslově využívaných surfaktantů s vlastnostmi řízenými počtem oxyethylenových jednotek v molekule – mezi nejznámější surfaktanty z této skupiny patří Tweeny [12].

f) *alkylpolyglykosidy* představují nejprudčeji se rozvíjející skupinu surfaktantů díky jejich příznivým povrchově aktivním i biologickým vlastnostem a v neposlední řadě i výrobní ceně, neboť jsou vyráběny z přírodního materiálu nepříliš složitými postupy [12].

g) *přírodní molekuly* – *glyceridy, glykosidy, sacharidy* jsou často využívány i přes svou vyšší cenu díky svým příznivým vlastnostem hlavně v kosmetice [12].

1.4.2 Hydrofilně – lipofilní rovnováha (HLB)

Surfaktanty jsou charakterizovány především vzájemným poměrem hydrofóbních a hydrofilních funkčních skupin, který se vyjadřuje pomocí hodnoty tzv. hydrofilně-lipofilní balance (HLB) [26].

Pro zjištění hodnoty HLB lze použít různé metody:

- a) výpočet na základě složení
- b) odhad podle vlastností směsi surfaktantu s vodou
- c) porovnání vlastností emulzí
- d) analytické metody na principu papírové a plynové chromatografie [27]

Hodnota HLB pro neionogenní surfaktanty, které jsou používány v této diplomové práci, leží v intervalu 0 – 20. Podle hodnoty HLB mají surfaktanty při 3 – 6 účinek emulgátorů V/O, při 7 – 9 smáčedel, při 8 – 18 emulgátorů O/V, při 13 – 15 detergentů a při 15 – 18 solubilizátorů [14].

Vysoké hodnoty mají hydrofilní surfaktanty s velkou rozpustností ve vodě, které obvykle dobře stabilizují emulze O/V, zatímco surfaktanty s nízkou hodnotou HLB jsou málo rozpustné ve vodě a dobře stabilizují emulze typu V/O [1]. Vztah mezi hodnotou HLB a rozpustností emulgátorů ve vodě je znázorněn v Tabulce 1.

Tabulka 1. Vztah mezi hodnotou HLB a rozpustností emulgátorů [72]

Hodnota HLB	Rozpustnost emulgátorů ve vodě
1 - 4	Velmi obtížně dispergovatelné
3 - 6	Obtížně dispergovatelné
6 - 8	Mléčná disperze po míchání
8 - 10	Stabilní mléčná disperze
10 - 13	Poločirá disperze
13 a vyšší	Čirý roztok

1.5 Biosurfaktanty

Surfaktanty tohoto typu jsou produkovány biologickou cestou, tedy i různými organismy. Mnohé z nich jsou předmětem zájmu odborníků, kteří v nich vidí možnou náhradu syntetických preparátů. Takovými biosurfaktanty jsou např. rhamnolipidy, produkové gram-negativní bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. Většina známých druhů této bakterie produkuje rhamnolipidy v množství kolem 20 mg/litr kultivačního média, ale byl popsán i nový bakteriální kmen (NY3), který produkuje až 12 g/litr. Tento kmen bakterie byl izolován z půdy nasáklé ropou a bylo zjištěno, že ji úspěšně rozkládá, včetně polycyklických aromatických uhlovodíků. Kmen NY3 se vyznačuje mimořádnou schopností produkovat množství strukturálně odlišných rhamnolipidů. Až dosud jich bylo nalezeno 25 a mezi nimi i takové, které nebyly dosud známy [10, 11].

1.6 Kosurfaktanty

Jsou povrchově aktivní látky, jejichž uhlovodíkový řetězec není dost dlouhý na to, aby mohly samostatně asociovat v micely, ale mohou vstupovat do struktury micel asociativních koloidů. Povrchové napětí systému se tím dále snižuje. Příkladem mohou být alkoholy o střední délce řetězce (např. hexanol) [13].

1.7 Mikroemulze

Jsou spontánně vytvořené, čiré, termodynamicky stabilní homogenní disperze dvou nemísitelných kapalin, které obsahují příslušné množství surfaktantů a kosurfaktantů. Mezifázové napětí mikroemulzí je ultranízké (cca 10^{-2} mN/m), ale není nikdy nulové [23].

Někteří vědci zabývající se zkoumáním mikroemulzí nesouhlasí s označením 'termodynamicky stabilní' a upřednostňují pouze označení 'spontánně vytvořené'. Dle publikace [23] jsou mikroemulze definovány jako systémy skládající se z olejových, a nebo vodných nanooblastí, společně existujících v termodynamické rovnováze. Jakýkoli jiný pokus označit systémy, které nejsou termodynamicky stabilní (ale spíše kineticky stabilní), jako mikroemulze je zavádějící. Pro skutečné mikroemulze je charakteristická nízká viskozita, jsou newtonské, a velikost částic jejich dispergované fáze leží mezi 10 a 100 nm [23].

Mikroemulze tvoří přechod mezi emulzemi a micelárními koloidy. Vznikají spontánně při vysokých koncentracích surfaktantu a velkém obsahu solubilizátu v micle za přítomnosti kosurfaktantu, např. alkoholu o střední délce řetězce, jehož přítomnost způsobuje další

snížení mezifázového napětí. Hranice mezi velikostí micely a částice mikroemulze leží v oblasti 30 nm [16].

1.7.1 Příprava mikroemulzí

Směsi vytvářející izotropní oblasti s mikroemulzními strukturami byly poprvé popsány za použití fázových diagramů tří hlavních složek (emulgátor, olej a voda), které byly vytvořeny na základě titrace směsí surfaktantu a olejové fáze vodou. Tato metoda vedla k vytvoření izotropních, homogenních oblastí vzniklých za přítomnosti velkého nadbytku surfaktantu. Další možností přípravy mikroemulze je postup, kdy je dvousložkový systém oleje a vody titrován nadbytkem surfaktantové fáze. Surfaktant byl přidáván dokud se nedocílilo čirého roztoku. Oba tyto koncepty se zakládaly na předpokladu, že mikroemulze představují částice o velmi malém průměru s velmi vysokou plochou povrchu, které budou vyžadovat velké množství surfaktantu. Teoreticky je možné vypočítat, kolik surfaktantu je potřeba pro každou částici a pro jejich celkový počet. Tyto výpočty vedly k závěru, že mikroemulze jsou systémy vždy bohaté na surfaktantové fáze [23].

Mikroemulze je možné připravit kontrolovaným přidáním nižších alkoholů (butanol, pentanol a hexanol) do klasických mléčných emulzí voda v oleji (V/O) nebo olej ve vodě (O/V). Přídavek nižších alkoholů snižuje povrchové napětí mezi olejovou a vodnou fází tak, že je dostatečně nízké pro téměř spontánní tvorbu tzv. mikroheterogenních systémů. Mísitelnost oleje, vody a surfaktantu/kosurfaktantu závisí na celkovém složení, které je specifické pro daný systém [24].

1.7.2 Typy mikroemulzí

Během výzkumu mikroemulzí byly systematizovány ternární a kvartérní fázové diagramy znázorňující chování olejové fáze, vodné fáze, surfaktantu a kosurfaktantu. Mikroemulze olejové fáze uzavřené do vodné fáze byly označeny jako L_1 izotropní fáze, čili mikroemulze olej ve vodě (O/V). Tyto systémy jsou v zásadě micely zbobtnalé v oleji. Podobně pokud byla v jádru micel uzavřena vodná fáze, byla získána L_2 fáze, označovaná jako mikroemulze voda v oleji (V/O). Mikroemulzní oblast L_2 je izotropní a reprezentuje složení tří složek, které vytvoří mikroemulzi spontánně a ta zůstane čirá a termodynamicky stabilní [23]. Pro nízké až střední koncentrace surfaktantu jsou definovány následující typy mikroemulzí označované jako Winsor.

- *Mikroemulze typu I* (Winsor I), dvoufázový systém, spodní část jsou nabídnuté micely - mikroemulze (O/V) obklopené micelami surfaktantu rozpustného ve vodě koexistující s přebytkem olejem.
- *Mikroemulze typu II* (Winsor II), dvoufázový systém, horní část jsou nabídnuté reverzní micely – mikroemulze (V/O) obklopené olejem, kde reverzní micely koexistují s nadbytkem vody.
- *Mikroemulze typu III* – třífázový systém, skládá se z oleje, vody a bikontinuální mikroemulzní fáze (V/O plus O/V), které koexistují v rovnováze.
- *Mikroemulze typu IV* je definována jako jednofázový mikroemulzní systém, kde olej i voda jsou zcela solubilizovány v surfaktantové mikroemulzní fázi [23].

Přeměň jednotlivých typů mikroemulzí může být dosaženo několika způsoby v závislosti na typu použitých surfaktantů. Např. u ionických surfaktantů dojde k přeměně typu I-II-III, je-li zvýšena koncentrace elektrolytu, zatímco změny teploty v přítomnosti neionických surfaktantů mohou změnit jeho hydrofilitu a mohou rovněž umožnit podobné přechody. Za ideální je považována mikroemulze typu III, která obsahuje stejné množství oleje a vody [23].

Při přípravě mikroemulzí je cílem zvětšit jednofázovou oblast představující homogenní oblast a rozšířit ji tak, aby její příprava vyžadovala minimální množství surfaktantů.

V potravinářském průmyslu při výrobě potravin, jako jsou pomazánky nebo margaríny, které vyžadují mikroemulze V/O, je důležité, aby bylo maximalizováno množství vody dispergované v rámci olejové fáze obsahující surfaktant, zatímco pokud se systém skládá z vodné kontinuální fáze (tedy O/V), jako např. některé nápoje, je důležité dispergovat maximální množství olejové fáze ve směsích vody a surfaktantu. V obou případech je to možné docílit s minimem použitých surfaktantů. U některých nových výrobků je však nutné připravit tzv. olejový koncentrát (olej a surfaktant), který lze zředit vodnou fází, a tak je možné docílit postupné přeměny typu mikroemulze Winsor I na Winsor IV [23].

1.8 Stabilita emulzí a mikroemulzí

Významným parametrem emulzí je jejich stabilita, která je definována jako jejich schopnost setrvání ve stavu, v němž se výrazně nemění jejich původní vlastnosti. Stabilitu emulze lze posuzovat z termodynamického a kinetického hlediska. Termodynamická stabilita

emulze je v přímé souvislosti s pravděpodobností, že rozpad emulze proběhne, zatímco kinetická stabilita je vyjadřována rychlostí rozpadu dané emulze [15, 25].

Emulze jsou jako všechny koloidní a mikroheterogenní soustavy agregátně nestálé, protože mají přebytek volné energie na fázovém rozhraní. Agregátní nestálost emulzí se projevuje samovolnou tvorbou agregátů s jejich možným následujícím vzájemným spojováním (koalescencí) [26].

U emulzí je možné sledovat tři hlavní formy nestability, které spolu vzájemně souvisí:

1. *Sedimentace (krémování)* – proces, který je závislý na rozdílu hustot obou fází a při němž kapalina o vyšší hustotě menší nebo větší rychlostí sedimentuje nebo se hromadí na povrchu emulze [25].

2. *Flokulace* – aglomerace částic ve formě volných nepravidelných seskupení. Flokulaci obvykle ovlivňují elektrolyty a vysvětlení jeví se ve změně elektrické dvojvrstvy na fázové rozhraní olej – voda [25].

3. *Koalescence* – Je konečným stavem nestability emulze po flokulaci. Je v zásadě nevratná. Tento proces probíhá především v koncentrovaných emulzích a je zde hlavním faktorem, který určuje dobu jejich životnosti. Energetická bariéra stabilizující koalescenci je určena adsorpcí surfaktantu na fázovém rozhraní. Koalescence je tedy výsledkem tvorby vodíkových můstků mezi molekulami dispergovaných částic [1, 25].

Aby byla zajištěna dostatečná životnost emulze, je zapotřebí systém stabilizovat. Ke stabilizaci lze použít níže uvedené postupy.

A) Stabilizace elektrickou dvojvrstvou

Stabilizace elektrickou dvojvrstvou se využívá pouze u zředěných emulzí s nízkou frekvencí srážek. Rozpustnost kationtů a aniontů je různá ve vodné a olejové fázi. Obvykle jsou anionty více rozpustné v olejové a kationty více ve vodné fázi. Odpudivé síly mezi částicemi emulze brání koalescenci tím lépe, čím větší je tloušťka dvojvrstvy a čím větší je náboj částice. Vliv koncentrace elektrolytů na tyto dvě veličiny je však opačný, náboj částice roste s koncentrací elektrolytu, zatímco tloušťka dvojvrstvy s rostoucí koncentrací elektrolytu klesá [1].

B) Stabilizace surfaktantem

V koncentrovaných emulzích, kde stabilizace částic pouhým elektrickým nábojem nepostačuje, je třeba stabilitu emulzí zajistit přidávkem vhodné třetí složky, kterou je surfaktant. Surfaktant vytváří na povrchu částic ochrannou vrstvu, která při srážce dvou částic zabrání jejich koalescenci. Musí proto splňovat tyto požadavky:

- hromadit se na rozhraní obou fází
- vytvářet na rozhraní kompaktní, pružný film, který však nevykazuje adhezi k filmům vytvořeným okolo dalších částic [1]

Stabilita emulzí je i v přítomnosti surfaktantů omezená. Často se k nim proto přidávají stabilizátory emulzí, např. nízkomolekulární hydrofilní látky jako glycerol nebo hydrofilní koloidy (bílkoviny jako je želatina a polysacharidy jako je pektin, rostlinné gummy nebo modifikované celulózy), které jednak zvyšují viskozitu emulzí, jednak interagují s částicemi hydrofobních koloidů a tím umožňují jejich asociaci s vodou [5].

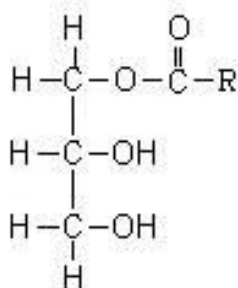
Na vlastnosti a stabilitu emulzí působí různé faktory a to např. celkové složení emulze, způsob přípravy nebo teplota skladování. Nejdůležitější je vliv použitých emulgačních činidel, jejich kvalita a koncentrace. Výběr vhodného surfaktantu má velký význam, protože je nejen stabilizátorem emulzí, ale určuje také typ vytvořené emulze, působí na stupeň disperzity a na fyzikální vlastnosti emulze [27].

2 MONOACYLGLYCEROLY

Estery glycerolu představují potravinářsky nejvýznamnější lipidy. Monoacylglyceroly (MAG) jsou parciální estery trojsytného alkoholu glycerolu s vyššími mastnými kyselinami. Vznikají substitucí vodíku hydroxylové skupiny zbytkem mastné kyseliny (MK), (acylem) [18, 19].

2.1 Klasifikace monoacylglycerolů

Monoacylglyceroly lze v závislosti na poloze esterických vazeb v glycerové části obecně rozdělit do dvou skupin, na 1-monoacylglyceroly a 2-monoacylglyceroly. Poměr obou isomerů v přírodních materiálech záleží na stereospecifitě přítomných lipáz. V potravinách převažují stabilnější 1-monoacylglyceroly. Reakcí vodíků dalších kyselin s OH – skupinami glycerolu vznikají diacylglyceroly (DAG) nebo triacylglyceroly (TAG) [19, 20, 21].



Obrázek 3. 1-monoacylglycerol

2.2 Vlastnosti monoacylglycerolů

Většinu fyzikálních i chemických vlastností monoacylglycerolů určuje především typ a poloha mastných kyselin, které jsou ve formě acylu vázány na glycerol [19].

Povaha uhlíkatého řetězce má vliv na teplotu tání monoacylglycerolů. Bod tání stoupá s rostoucím počtem atomů uhlíku v molekule mastné kyseliny, přírůstek je tím menší, čím je větší počet atomů uhlíku. Se zvyšující se nenasyceností mastných kyselin bod tání klesá. Teplota tání monoacylglycerolů je velmi blízká teplotě tání příslušné mastné kyseliny. Teplota tuhnutí příslušných monoacylglycerolů je vyšší než teplota tání, obvykle o 5 – 15 °C. Hustota acylglycerolů klesá s rostoucí délkou řetězce mastných kyselin a s klesajícím

stupněm nenasycenosti. Přítomnost kyslíkatých funkčních skupin hustotu zvyšuje. Index lomu roste u monoacylglycerolů s rostoucí délkou uhlíkatého řetězce, podobně jako u nasyčených mastných kyselin. Monoacylglyceroly se dobře rozpouštějí v alkoholech a jen velmi málo v petroleteru [5, 21].

Monoacylglyceroly jsou povrchově aktivní látky, které jsou tvořeny hydrofilní a hydrofobní částí. Tvoří monomolekulární nebo více molekulární film, který usnadňuje dispergaci a stabilizaci. Na rozhraní fází v disperzích se molekuly orientují tak, že hydrofobní konce molekul, tvořené hlavně mastnou kyselinou, směřují do hydrofobní fáze a hydrofilní části směřují do fáze hydrofilní.

Emulgační schopnost MAG závisí na druhu mastné kyseliny, jejíž zbytek je přítomen v esteru a na druhu kapaliny na dotykové ploše, jejíž povrchové napětí se má snížit [21, 22].

Protože jsou MAG poměrně málo polární, zvyšuje se jejich emulgační účinnost často přidáním fosfolipidů nebo bílkovin (např. kaseinátů). Obecně se méně polární emulgátory hodí pro přípravu emulzí typu voda v oleji (V/O), zatímco polárnější pro emulze typu olej ve vodě (O/V). Emulgační schopnost pro řadu účelů se zlepší, jestliže se MAG esterifikují různými kyselinami, např. kyselinou mléčnou, citrónovou nebo vinnou. MAG obsahující nenasycené mastné kyseliny musí být chráněny antioxidanty proti oxidačním reakcím [21].

2.3 Výroba monoacylglycerolů

Monoacylglyceroly jsou v současné době vyráběny několika způsoby a to [30]:

- Interesterifikací (alkoholýzou, acidolýzou, transesterifikací)
- Parciální hydrolýzou triacylglycerolů
- Esterifikací vyšších mastných kyselin s glycerolem
- Nukleofilní adicí mastné kyseliny na oxiran-2yl-metanol

2.3.1 Interesterifikace

Interesterifikační reakce zahrnují tři hlavní typy reakcí – alkoholýzu, acidolýzu a transesterifikaci.

2.3.1.1 *Alkoholýza*

Z hlediska technického je pro výrobu MAG nejdůležitější reakcí alkoholýza, při které dochází k výměně alkoholové složky esteru. Reakce probíhá pomalu, acylglyceroly se v alkoholické fázi rozpouští jen částečně. Reakce může probíhat za přítomnosti alkalických nebo kyselých katalyzátorů. V případě alkalických katalyzátorů probíhá reakce při pokojové teplotě, v přítomnosti kyselých katalyzátorů při teplotě cca 100 °C a bez použití katalyzátoru je nutná vyšší teplota cca 250 °C [30].

Pro průmyslovou výrobu MAG se využívá alkoholýza tuků za použití glycerolu, glycerolýza. Reakce se provádí při vyšších teplotách, nejčastěji při teplotě 170 – 240 °C, protože TAG a glycerol jsou za nižších teplot vzájemně málo rozpustné. Tato metoda je energeticky náročná a další nevýhodou je poměrně nízká výtěžnost (50 – 55 % MAG) [29, 30].

Pro výrobu MAG glycerolýzou jsou vhodné katalyzátory: 0.1 – 0.2% hydroxid sodný nebo draselný, methylát a ethylát sodný, uhličitan sodný a hydroxid vápenatý. Dále v některých případech byly použity i kovy, např. sodík nebo draslík ve formě prášku [22, 31].

2.3.1.2 *Acidolýza*

Acidolýza je reakce, při které dochází k výměně kyselinové složky esteru. Karboxylová skupina volné kyseliny reaguje s esterem, přičemž vzniká meziproduct, z kterého se uvolní kyselina dříve vázaná na ester za vzniku nového esteru [5].

Při acidolýze se acylový zbytek mastné kyseliny vymění za jiný kyselinový zbytek za vzniku TAG. Acidolýza probíhá samovolně při 250 °C, v přítomnosti katalyzátoru (kyseliny sírové) při 158 °C. Následně je nutné provést hydrolýzu, která ze vzniklých triacylglycerolů vytvoří monoacylglyceroly. Velkou nevýhodou hydrolýzy je neselektivita reakce [30].

2.3.1.3 *Transesterifikace*

Během transesterifikace reaguje ester s esterem a dochází ke vzájemné výměně acylových zbytků. Během reakce dochází k vzájemné mezimolekulární výměně acylové nebo alkoholové skupiny jednoho esteru za acylovou nebo alkoholovou skupinu esteru jiného. Jde o iontovou reakci katalyzovanou vodíkovými nebo hydroxylovými ionty. Reakční rychlost

závisí na struktuře alkoholu a rozvětvenosti mastné kyseliny. Dále reakční rychlost klesá s rostoucí molekulovou hmotností [32, 33, 34].

Jedním z hlavních faktorů ovlivňujících transesterifikaci je poměr alkoholu k oleji. Přebytek alkoholu podporuje tvorbu produktů, nadměrné množství však ztěžuje využití glycerolu, proto se tento poměr stanovuje empiricky [35].

2.3.2 Parciální hydrolýza triacylglycerolů

Tuky a oleje jsou tvořeny estery vyšších mastných kyselin a glycerolu, které hydrolyzují. Pomocí vody se štěpí na své původní složky. Reakce probíhá stupňovitě přes vznik diacylglycerolu k monoacylglycerolu, až po vznik mastných kyselin a glycerolu. Reakce probíhá za vysokých teplot a pod tlakem. Jako katalyzátory se používají oxidy nebo hydroxidy kovů II. skupiny (mangan, zinek, olovo). V současné době se této reakce používá k výrobě mastných kyselin. Monoacylglyceroly jsou vedlejšími produkty, proto je nutné je ze směsi izolovat [30].

Další možnou výrobou MAG je enzymatická hydrolýza za účasti lipáz. Výhodou této reakce je, že probíhá za pokojové teploty a je šetrná k životnímu prostředí. Nevýhodou je problém s výběrem vhodného enzymu, jehož volba závisí na typu acylu. Další nevýhodou je relativně nízká výtěžnost a poměrně dlouhá doba (1 – 2 dny), striktní dodržování reakčních podmínek (teploty, obsahu vody, poměru reaktantů) a jejich vysoká cena. Z důvodu vysokých nákladů na enzymy se enzymatická hydrolýza využívá pouze pro specifické aplikace, zejména pro syntézu 2-monoacylglycerolů [29, 30].

2.3.3 Esterifikace vyšších mastných kyselin s glycerolem

Opakem hydrolýzy je esterifikace. Jde o iontovou reakci, která je katalyzována vodíkovými nebo hydroxylovými ionty [36]. Reakční rychlost závisí na struktuře alkoholu a rozvětvení MK. S rostoucí molekulovou hmotností tato rychlost klesá. Při této reakci se nejprve vytvoří MAG, z nichž další reakcí vznikají DAG až TAG. Reakce může být urychlena přítomností kyselých nebo zásaditých katalyzátorů. Z alkalických katalyzátorů se nejčastěji používají alkalické kovy, hydroxidy nebo alkoholáty. Z kyselých katalyzátorů se nejčastěji používá kyselina sírová, fosforečná, různé sulfonové kyseliny nebo fluorid boritý [29, 30, 37, 38].

2.3.4 Nukleofilní adice mastné kyseliny na oxiran-2-yl-metanol

Mezi nejnovější způsoby syntézy MAG patří otevření epoxidového kruhu glycidolu s následnou nukleofilní adicí MK. Jako katalyzátory jsou využívány terciární aminy, amoniové soli a komplexy tranzitních kovů (titan, kobalt, chrom, zirkon) a lanthanoidů (samarium, ytrium, europium) [39, 40, 41].

Mezi největší výhody tohoto způsobu výroby MAG patří univerzálnost reakce, snadná příprava katalyzátoru, vysoká konverze (95 % a více), rychlost reakce (probíhá v 90 minutách), nízká reakční teplota (90 °C) a žádné vedlejší reakční produkty. Nevýhodou je, že výsledný produkt obsahuje také jisté množství nežádoucích reziduí katalyzátoru a jedovatý glycidol. Proto se musí pro potravinářské a farmaceutické účely tyto produkty čistit [29, 42, 43].

2.4 Průmyslové využití monoacylglycerolů

Monoacylglyceroly jsou v posledních letech studovány z hlediska přípravy, vlastností a aplikací. MAG mají široké využití v průmyslu potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém, dále plastikářském a textilním a v nemalé míře jsou využívány také pro výrobu krmiv [29].

2.4.1 Monoacylglyceroly v potravinářství

Estery MAG a DAG s octovou kyselinou se používají jako látky, které zamezují krystalizaci tuků, estery s jantarovou kyselinou jako kondicionéry mouky, estery s citronovou kyselinou převážně jako emulgátory, rozpouštědla antioxidantů a náhrada tuku v některých potravinách [44].

MAG nenasycených mastných kyselin jsou velmi dobrými surfaktanty při výrobě margarínů s vyšším obsahem vodné fáze [25]. Dále jsou využívány při výrobě pečiva, zmrzlin, šlehaných krémů, tavených sýrů nebo kondenzovaného mléka. V poslední době jsou také využívány při výrobě nízkotučných výrobků a instantních pokrmů [45].

Široké využití nacházejí MAG také v mlýnsko-pekárenském průmyslu. MAG zlepšují reologické vlastnosti všech výrobků obsahujících amylozu. MAG vyšších mastných kyselin (laurové, myristové, palmitové a stearové) tvoří s amylozou, která je ve škrobu obsažena komplexy. Na rozdíl od samotné amylozy jsou tyto komplexy ve vodě nerozpustné a mají

příznivý účinek na stárnutí pečiva. MAG mají také velký vliv na zlepšení pekařské vlastnosti mouky. Dále zlepšují fermentační stabilitu těst, to znamená, že po vykynutí je těsto odolnější proti kolapsu způsobeném mechanickým zásahem [25, 30, 46]. Při výrobě dehydratované bramborové kaše zlepšuje přídavek MAG jakost hotové kaše, dává jí správnou strukturu a potlačuje její lepivost, kterou může způsobovat amyulóza uvolněná z rozrušených škrobových zrn [30].

V cukrovinkářském průmyslu jsou MAG schopny snižovat lepivost produktů, zvětšovat jejich objem a zvyšovat stabilitu vytvořené struktury. Používají se pro zlepšení konzistence žvýkaček a k omezení lepivosti karamelových bonbonů. Dále se MAG na bázi kyseliny palmitové a stearové v poměru 30:70 přidávají do čokolád a polev, jelikož zabraňují vystávání tuku na povrch [30, 47].

Také v mlékárenském průmyslu nacházejí MAG své uplatnění. Během studie emulgátorů při výrobě tavených sýrů [71] bylo zjištěno, že monoacylglyceroly s nižším počtem uhlíků v esterově vázané mastné kyselině (MAG C_{8:0} monokaprylin a MAG C_{10:0} monokaprin) zvýší tuhost a sníží roztíratelnost tavených sýrů méně než monoacylglyceroly, které obsahují delší řetězec mastné kyseliny (MAG C_{12:0} monolaurin a MAG C_{16:0} monopalmitin). Také při výrobě mražených krémů se využívá monoacylglycerolových emulgátorů. Usnadňují zašlehání vzduchu, zjemňují a zpevňují strukturu. V konečném výrobku MAG zajišťují dispergaci tukových částic a brání nadměrné aglomeraci a následnému rozpadu disperze [30, 59].

V masném průmyslu jsou využívány estery MAG s kyselinou citronovou a s kyselinou mléčnou. Mimo emulgačních schopností, také zvyšují vaznost jednotlivých výrobků, čehož je využíváno např. při výrobě salámů. Dále jsou MAG s kyselinou citronovou aplikovány nástřikem na drůbež, maso, čerstvé ovoce a zeleninu, kde pomáhají udržovat vlhkost [25, 29].

2.4.2 Monoacylglyceroly v kosmetickém průmyslu

V kosmetickém průmyslu se využívají MAG obsahující nasycené mastné kyseliny. Jsou využívány především pro svou stabilitu, chemickou netečnost v přítomnosti bioaktivních látek, pro dobrou snášenlivost pokožkou a sliznicí, pro schopnost penetrace a také proto, že jsou to látky bezbarvé a stabilní vůči oxidaci. Dále mají dobré změkčující a emulgační vlastnosti. Uplatňují se také v prostředcích proti pocení, kdy se monolaurin přidává do

deodorantů společně s jeho diacetátem jako omezovač pocení. Přídavek MAG do mýdel zase zvyšuje odolnost proti jejich popraskání [29, 48, 49].

2.4.3 Monoacylglyceroly ve farmaceutickém průmyslu

Ve farmacii se MAG uplatňují jako součásti transportních gelů farmak do organismu a pro úpravu rozpustnosti lékových forem. V závislosti na koncentraci mohou stimulovat nebo inhibovat růst mikroorganismů. Využívají se především MAG obsahující nenasycené mastné kyseliny, nejčastěji kyselinu olejovou a linolenovou, nebo mastné kyseliny obsahující středně dlouhý uhlíkatý řetězec (8 – 10 uhlíků), které zlepšují resorpci léčiv ve tkáních [29, 50, 51, 52].

Farmaceutické preparáty s obsahem mikrobicidních lipidů jsou využívány k léčbě diagnostikovaných slizničních a kožních infekcí a dále jsou také testovány jako přípravky zabraňující přenos patogenních mikroorganismů na sliznicích [53, 54].

2.4.4 Monoacylglyceroly v textilním, obuvnickém a plastikářském průmyslu

V textilním průmyslu jsou MAG využívány především pro jejich antistatické účinky především při výrobě polyolefinových vláken a pro zvýšení odolnosti vůči vodě. Zároveň se zlepšuje také jejich barevná stálost. V obuvnickém průmyslu se MAG mohou využívat jako antimikrobní prostředky sloužící k úpravě stélkových a podšívkových materiálů. Při výrobě a zpracování plastů se MAG přidávají pro zlepšení antistatických a lubrikačních vlastností a dále se uplatňují jako změkčovadla [55, 56, 57].

2.5 Antimikrobiální působení monoacylglycerolů

Problematika údržnosti potravin a potravinových surovin je v současné době v popředí zájmu. Pomocí intenzivního výzkumu je snahou hledat neustále nové prostředky, které by napomohly k potlačení růstu nežádoucích mikroorganismů v potravinách. Jsou vyhledávány látky, které by mohly inhibičně působit na mikroorganismy. Příkladem takových látek jsou monoacylglyceroly. MAG působí proti růstu a množení některých nežádoucích bakterií. Toho je využíváno nejen v potravinářském průmyslu, ale také ve farmacii a medicíně [60].

Inhibiční účinky MAG souvisí s vlastnostmi bakteriální buněčné stěny, na kterou působí. Grampozitivní bakterie (G^+) jsou vůči MAG více senzitivní, než gramnegativní bakterie (G^-). Důvodem je, že gramnegativní bakterie mají tzv. vnější membránu bohatou na lipopolysacharidy, která je chrání proti účinkům povrchově aktivních látek. Antimikrobiální aktivita MAG a mastných kyselin závisí na počtu atomů uhlíku a na přítomnosti dvojných vazeb v řetězci mastných kyselin. Tyto látky mohou inhibovat růst vegetativních forem patogenních i sporulujících bakterií, virů nebo kvasinek [62, 66, 67].

Ačkoliv přesný mechanismus inhibičního působení MAG není dosud přesně prozkoumán, navržená teorie předpokládá, že působí prostřednictvím svých mastných kyselin. Mastné kyseliny a jejich estery mají, na rozdíl od antibiotik, několik nescifických mechanismů působení. Primárním cílem jejich ataku je cytoplazmatická membrána buněk. Začleněním do struktury membrány způsobují deformace buněčné membrány, čímž porušují její vlastnosti polopropustné bariéry. Další z hypotéz se opírá o průnik mastných kyselin s krátkým a středně dlouhým řetězcem do bakteriálních buněk v nedisociované formě a jejich disociaci ve vnitřním prostředí, což následně způsobí okyselení buněčného obsahu. Snížení vnitrobuněčného pH tak může vést k inaktivaci intracelulárních enzymů. Bylo zjištěno, že působením teploty, kyselin nebo chelatačních činidel může být inhibiční aktivita MAG zvýšena [60 - 65].

Inhibičním působením MAG se zabývá studie [62], kde Bergsson a kol. studovali inhibiční účinky nasycených a nenasycených MK a jejich monoacylglycerolů na grampozitivní a gramnegativní bakterie. Výsledkem studia vlivu těchto látek na stafylokoky a streptokoky skupiny A a B bylo zjištění, že MAG a mastné kyseliny inhibují také sporulující bakterie. Testované grampozitivní bakterie byly citlivé nejvíce k monoacylglycerolům obsahujícím v řetězci nasycené mastné kyseliny s 10 až 14 uhlíky. Nejlepší účinky vůči G^+ bakteriím vykazovala z nasycených kyselin kyselina laurová ($C_{12:0}$), z mononenasycených mastných kyselin kyselina palmitolejová ($C_{16:1}$) a z polynenasycených mastných kyselin kyselina linolenová ($C_{18:2}$). Největší inhibiční účinky byly zjištěny u monoacylglycerolu kyseliny laurové [62, 68].

Během studia inhibiční aktivity MAG na gramnegativní bakterie [62], bylo zjištěno, že MAG vykazují velmi malou nebo žádnou inhibiční aktivitu. Použité MAG působily pouze v nejvyšších aplikovaných koncentracích (1500 mg/l) na testované gramnegativní bakterie.

Mastné kyseliny, s výjimkou kyselin s velmi krátkým řetězcem (6 uhlíků a méně), vykazovaly rovněž nízkou aktivitu vůči gramnegativním bakteriím [60, 62].

V publikaci [73] bylo testováno působení MAG kyseliny kaprinové a laurové na kvasinky a plísň. U MAG kyseliny kaprinové byla inhibiční aktivita vůči těmto mikroorganismům pozorována, avšak k MAG kyseliny laurové byly všechny testované mikroorganismy rezistentní [68].

Kromě inhibiční aktivity MAG a mastných kyselin na bakterie, kvasinky a plísň bylo prokázáno také jejich antivirové působení. Publikované studie prokázaly, že nasycené mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem inaktivují obalené viry a nasycené MK s dlouhým řetězcem mají taktéž inhibiční účinky na viry, přičemž se zvyšujícím se počtem dvojných vazeb jejich inhibiční aktivita stoupá. U monoacylglycerolů byly zjištěny antivirové účinky v koncentracích 5 – 10 krát nižších než u příslušných MK [62, 68].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE

3.1 Použité materiály a chemikálie

Monoacylglyceroly

Monoacylglyceroly (MAG) byly vyrobeny adicí příslušné mastné kyseliny na glycidol za katalytického působení chromitých iontů (chromium III acetát hydroxid) dle postupu publikovaného v práci [42]. Výroba proběhla na pracovišti Fakulty technologické, ÚTTTK a deklarovaná čistota připravených MAG byla p.a. [42].

Pro práci byly vybrány následující MAG:

- Monoacylglycerol kyseliny kaprinové (MAG C_{10:0})
- Monoacylglycerol kyseliny laurové (MAG C_{12:0})
- Monoacylglycerol kyseliny undekanové (MAG C_{11:0})
- Monoacylglycerol kyseliny undecenové (MAG C_{11:1})
- Monoacylglycerol kyseliny myristové (MAG C_{14:0})

Kosurfaktanty

- Etanol absolutní (C₂H₆O), Penta – Chrudim
- Propanol (propan-1-ol) (C₃H₈O), Ing. Petr Lukeš - Uherský Brod
- Butanol (terc-butylalkohol) (C₄H₁₀O), Ing. Petr Lukeš - Uherský Brod
- Pentanol (n-amylalkohol) (C₅H₁₂O), Ing. Petr Lukeš - Uherský Brod

Surfaktant

- Tween 80 (sorbitan monooleat), neionický surfaktant, HLB 15, Sigma-Aldrich

Masopeptonový bujón (MPB)

- NaCl (HiMedia)
- BE - beef extract (HiMedia)
- Pepton (Lach-Ner)

3.2 Použité mikroorganismy

Pro stanovení antimikrobní aktivity připravených monocylglycerolů byly použity následující bakterie, které byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM).

- *Bacillus cereus* CCM 2010
- *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* CCM 2216
- *Citrobacter freundii* CCM 7187
- *Enterococcus faecalis* CCM 4224
- *Escherichia coli* CCM 3954
- *Micrococcus luteus* CCM 732
- *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420
- *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303
- *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953

Všechny používané bakteriální kmeny byly uchovávány na masopeptonovém agaru (MPA) na Petriho miskách při teplotě 4 ± 2 °C.

3.3 Použité přístroje, zařízení a pomůcky

- Digitální váhy OHAUS, Švýcarsko
- Vortex (Heidolph REAX top), Německo
- Biohazard box EUROFLOW (Clean Air), Holandsko
- Mikroskop - OLYMPUS C x 41, Japonsko
- Počítač s programem - Quick PHOTO PRO 2.0
- Fotoaparát – OLYMPUS, Japonsko
- Zetasizer nano SZ (Malvern Instruments, Ltd.), Velká Británie
- Microplate reader Benchmark (Bio-Rad)

- Autokláv Varioklav H+P, Německo
- Biologický termostat BT 120, Česká republika
- Automatické mikropipety Biohit (100 – 1000 μ l) a Nichipet ex (0,5 – 10 μ l)
- Laboratorní sklo (kádinky, byrety, pipety, zkumavky)
- Laboratorní plasty (špičky pro automatické mikropipety, mikrotitrační destičky, očkovací kličky, zkumavky, stříkačky)
- Stříkačkové filtry o velikosti pórů 0,22 μ m (Millipore -Velká Británie)
- Ostatní běžné laboratorní pomůcky a vybavení

3.4 Dekontaminace použitého materiálu

Veškerý materiál, který byl při experimentu používán (sklo, plasty, mikrotitrační destičky, kultivační médium, špičky, aj.) byl dekontaminován v autoklávu při 132 °C po dobu 20 minut.

3.5 Metodika

3.5.1 Příprava mikroemulzí

Pro diplomovou práci byly připravovány mikroemulze obsahující monoacylglyceroly a alkoholy (kosurfaktanty) uvedené v části 3.1 této práce. Jako surfaktant byl použit Tween 80 (HLB 15), který je vhodný pro systémy tvořící emulze olej ve vodě O/V. Pro to, aby mohlo být určeno vhodné složení mikroemulzí pro sledování jejich antimikrobní aktivity, byly nejprve sestrojeny fázové digramy tříložkového systému voda-olej-surfaktant, kde olejovou fází tvořil vždy příslušný MAG rozpuštěný v alkoholu. Monoacylglycerol a alkohol byly připraveny v poměru 1:2 (w/w). Nejdříve bylo naváženo 5 g monoacylglycerolu a 10 g alkoholu. Některé monoacylglyceroly byly hůře rozpustné, proto byly při rozpouštění zahřívány ve vodní lázni a následně ochlazeny na laboratorní teplotu. Z takto připravené směsi monoacylglycerou s alkoholem bylo naváženo 9 vzorků a ke každému ze vzorků byl přidán surfaktant tak, aby poměr monoacylglycerol v alkoholu ku surfaktantu činil 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1. Navážky jsou uvedeny v Tabulce 3. Následně byla směs promíchána na třepačce tak, aby vznikl homogenní roztok. K tomuto roztoku byla pomocí byrety přidávána po kapkách destilovaná voda do doby, než se roztok zakalil. Po

každém přídatku byla provedena důkladná homogenizace (vortex). Tímto způsobem byly studovány systémy se složením olejové fáze uvedeném v Tabulce 2. Titrace byla prováděna při laboratorní teplotě.

Tabulka 2. Složení olejové fáze pro konstrukci fázových diagramů

MAG	kosurfaktant
MAG C _{10:0}	etanol
	propanol
	butanol
	pentanol
MAG C _{12:0}	etanol
	propanol
	butanol
	pentanol
MAG C _{14:0}	etanol
	propanol
	butanol
	pentanol

Tabulka 3. Teoretická vypočtená množství složek použitých pro přípravu mikroemulzí

Vzorek	Poměr (MAG/alkohol: Tween 80)	MAG + al- kohol [g]	Tween 80 [g]
1	1 : 9	0.25	2.25
2	2 : 8	0.50	2.00
3	3 : 7	0.75	1.75
4	4 : 6	1.00	1.50
5	5 : 5	1.25	1.25
6	6 : 4	1.50	1.00
7	7 : 3	1.75	0.75
8	8 : 2	2.00	0.50
9	9 : 1	2.25	0.25

3.5.2 Grafické znázornění soustav o třech složkách

Složení soustav o třech složkách bývá často znázorněno v tzv. trojúhelníkových diagramech, které využívají toho, že jen dva ze tří koncentračních údajů (molární nebo hmotnostní procenta) jsou nezávisle proměnné a mohou být vynášeny na dvě osy, které svírají úhel 90° nebo 60° [58].

Na strany pravoúhlého nebo rovnostranného trojúhelníku jsou vynášena procenta složek tak, že jejich hodnoty vzrůstají směrem k vrcholům. Tyto vrcholy představují čisté složky. Strany trojúhelníku znázorňují složení binárních soustav. Body uvnitř trojúhelníku udávají složení tříložkové soustavy [58].

Studované mikroemulze jsou tvořeny kapalnými fázemi o třech omezeně mísitelných složkách (MAG v alkoholu, Tween 80, voda). Byly sestrojeny fázové diagramy, které jsou rozděleny binodální křivkou na dvě oblasti – homogenní, jednofázovou, ve které byla přítomna mikroemulze a heterogenní, vizuálně zakalenou, která představovala běžnou emulzi. Fázové diagramy byly vytvořeny pomocí počítačového programu OrginPro8.

3.5.2.1 Výpočet složení mikroemulzí/emulzí pro konstrukci fázových diagramů

Složení mikroemulzí/emulzí pro konstrukci fázových diagramů bylo vypočítáno podle vztahu (1) – (4):

$$W_A = \frac{m_A}{m_A + m_B + m_C} \quad (1)$$

$$W_B = \frac{m_B}{m_A + m_B + m_C} \quad (2)$$

$$W_C = \frac{m_C}{m_A + m_B + m_C} \quad (3)$$

$$W_A + W_B + W_C = 1 \quad (4)$$

Kde W_A , W_B a W_C jsou hmotnostní zlomky jednotlivých složek mikroemulze,

m_A = hmotnost MAGu s alkoholem

m_B = hmotnost Tweenu 80

m_C = hmotnost destilované vody

3.5.3 Charakterizace mikroemulzí

Připravené mikroemulze a emulze byly hodnoceny vizuálně, mikroskopicky (emulze) a byla měřena velikost jejich částic pomocí fotonové korelační spektroskopie na přístroji Zeta Nano SZ (mikroemulze).

3.5.3.1 Mikroskopie

Emulze, které byly připraveny pro konstrukci fázových diagramů, a velikost jejich částic byla dostatečná, byly pozorovány mikroskopicky běžným laboratorním mikroskopem značky OLYMPUS Cx41 vybaveným fotoaparátem OLYMPUS, který byl propojen s počítačem. Pomocí programu Quick PHOTO PRO 2.0 byly získány fotografické záznamy. Před vlastním měřením byla vždy každá emulze nejprve protřepána. Poté bylo na podložní sklíčko nanášeno plastovou Pasteuerovou pipetou malé množství vzorku emulze ze zkumavky. Následně bylo na podložní sklo se vzorkem emulze přiloženo krycí sklíčko, na které byl nanášen imerzní (cedrový) olej. Vzorek byl mikroskopován za použití imerzního objektivu (zvětšení 10 x 100). Emulze byla mikroskopována ihned po výrobě a současně byly zhotoveny příslušné fotografie.

3.5.3.2 Měření velikosti částic na přístroji Zeta Nano SZ

Velikosti částic mikroemulzí byla stanovena fotonovou korelační spektroskopií. Pro měření velikosti částic byl zvolen následující postup. Do kyvety byl pomocí automatické pipety nadávkován 1 ml vzorku neředěné mikroemulze. Před každým dávkováním byla vždy mikroemulze manuálním protřepáním homogenizována. Kyveta byla zakryta víčkem, které zajistilo teplotní stabilitu vzorku a byla vložena do přístroje. Měření bylo prováděno při teplotě 25 °C a byly použity následující vstupní údaje potřebné pro výpočet velikosti částic: viskozita disperzního média 0.887 cP, index lomu disperzního média 1.33 a index lomu dispergovaného podílu 1.41. Vyhodnocení měření bylo prováděno přímo přístrojem Zeta Nano ZS.

Pro každou emulzi, bylo měření velikosti částic prováděno před filtrací a po filtraci přes 0.22 µm filtr.

3.5.3.3 *Kontrola přístroje Zeta Nano SZ*

Přesnost měření velikosti částic byla ověřena pomocí analýzy suspenze monodisperzního standardu polystyrénového latexu o nominálním průměru částic 60 nm. K tomuto účelu byl jako dispersní médium použit roztok NaCl o koncentraci 9 mg/ml, který byl zbaven prachových částic dvojnásobnou filtrací přes 0.22 μm filtr. Pro měření byl použit 1 ml roztoku NaCl a 5 μl standardu. Výsledky analýzy prokázaly, že získané hodnoty velikosti částic polystyrénového latexu ležely v intervalu 59 ± 2.1 nm, udávaném pro tuto nominální velikost standardu dodavatelem.

3.5.4 **Mikrobiologické vlastnosti mikroemulzí**

Další část diplomové práce se zabývá mikrobiologickými vlastnostmi mikroemulzí monoacylglycerolů. Nejdříve bylo nutné připravit vhodnou mikroemulzi s dostatečnou stabilitou, dále vybrat vhodné kultivační médium a v neposlední řadě zvolit mikroorganismy, na nichž bude antimikrobní účinnost mikroemulzí testována.

3.5.4.1 *Příprava mikroemulzí pro mikrobiologickou analýzu*

Mikroemulze byly připraveny dle následujícího postupu. Do odměrné baňky byl připraven 1 mol roztok příslušného monoacylglycerolu v alkoholu. Následně bylo odměřeno 250 μl tohoto zásobního roztoku do plastové zkumavky a k tomu bylo přidáno 2.25 g surfaktantu (Tweenu 80), 20 ml destilované vody a vše bylo protřepáno za vzniku homogenní mikroemulze. Takto byly připraveny mikroemulze obsahující MAG C_{10:0}, MAG C_{11:0}, MAG C_{11:1}, MAG C_{12:0}, MAG C_{14:0}, kde kosurfaktant tvořil vždy buď etanol nebo butanol. K vlastnímu testování antimikrobní účinnosti byly z důvodu limitovaného času použity pouze mikroemulze s etanolem. Koncentrace monoacylglycerolů v mikroemulzích pro antimikrobní zkoušky jsou uvedeny v Tabulce 4.

Takto připravené mikroemulze byly sterilně přefiltrovány přes stříkačkový filtr s velikostí pórů 0.22 μm pro odstranění potenciální mikrobiologické kontaminace.

Tabulka 4. Koncentrace MAG v mikroemulzi

MAG v mikroemulzi	Koncentrace MAG v mikroemulzi [mg/l]				
	Výchozí emulze	1:1 ^{a)}	1:2 ^{a)}	1:3 ^{a)}	1:7 ^{a)}
MAG C _{10:0}	3070	1535	768	384	96
MAG C _{11:0}	3055	1528	764	382	95
MAG C _{11:1}	3225	1613	806	403	101
MAG C _{12:0}	3425	1713	856	428	107
MAG C _{14:0}	3790	1895	948	474	118

a) ředění mikroemulzí masopeptonovým bujónem (mikroemulze:MPB)

Připravena byla také mikroemulze tzv. slepého pokusu, která neobsahovala monoacylglycerol, ale pouze 250 µl alkoholu, 2.25 g surfaktantu a 20 ml vody.

3.5.5 Kultivační médium - Masopeptonový bujón (MPB)

Pro přípravu inokula buněk pro vlastní experimenty byl použit masopeptonový bujón (MPB) ve složení:

- NaCl 1.2 g
- BE (beef extract) 1.2 g
- Pepton 2.0 g
- Deionizovaná voda 400 ml

Připravený bujón byl následně sterilizován v autoklávu při 132 °C po dobu 20 minut.

3.5.6 Příprava bakteriální suspenze

Bakteriální suspenze byly připraveny zaočkováním a následnou kultivací příslušných pěti gram pozitivních a pěti gram negativních bakterií v 5 ml MPB ve zkumavkách. Inokulum pocházelo z bakteriálních kultur uchovávaných na Petriho miskách. Kultivace bakterií v tekutém médiu probíhala v termostatu při 30 °C po dobu 24 hodin.

3.6 Sledování účinku monoacylglycerolů v mikroemulzích na vybrané potravinářsky významné bakterie

Mikroemulze byly v příslušném množství přímo dávkovány do zkumavek s odpovídajícím množstvím sterilního MPB do celkového objemu 4 ml a to v poměru (1:1, 1:3, 1:7, 1:15 a 1:31). Bližší popis objemů ředění je uveden v Tabulce 5. Takto připravená kultivační média s různou koncentrací monoacylglycerolů (koncentrace jsou zaznamenány v Tabulce 4) byla pipetována v množství 200 μ l do jamek mikrotitrační destičky a zaočkována 5 μ l suspenze bakterií. Destička byla přichystána tak, že byly vedle sebe umístěny dvě stejné koncentrace pro jednu bakteriální suspenzi. To umožnilo, aby každá hodnota byla měřena dvakrát. Stejně tak byla provedena i pozitivní a negativní kontrola. Jako pozitivní kontrola sloužil čistý MPB, ve kterém nebyly mikroemulze obsahující MAG. Tento čistý MPB byl pouze zaočkován bakteriální suspenzí a nepředpokládá se u něj žádný inhibiční účinek na růst bakterií. Negativní kontrola byla tvořena pouze připraveným MPB s mikroemulzemi obsahujícími MAG, avšak bez bakteriální suspenze. Zde nebyl očekáván žádný růst bakterií. Testované bakterie byly kultivovány při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin, přičemž byla ve 30-ti minutových intervalech měřena hodnota optické hustoty při 655 nm (OD_{655}). Před každým měřením byly vzorky 20 sekund protřepány. Pro každou koncentraci mikroemulze byl růst sledován minimálně ve dvou jamkách mikrotitrační destičky.

Měření zákalu suspenze probíhalo na přístroji Microplate reader Benchmark (Bio-Rad) a měřicí přístroj byl řízen softwarem Microplate Manager (Bio-Rad). Z naměřených údajů byly vypočítány průměry hodnot a byly sestrojeny růstové křivky. Rozdíly v růstu bakterií v čistém médiu a v médiu s příslušnou koncentrací mikroemulze byly hodnoceny jako index růstu (IR) po 15 hodinách kultivace. Index růstu byl vypočítán podle vztahu (5) [98]:

$$IR (\%) = \frac{(OD_{655} - OD_{NK})}{OD_{PK}} * 100 \quad (5)$$

Kde je:

IR.....index růstu

OD_{655}hodnota zákalu suspenze testované kultury v médiu s příslušnou koncentrací mikroemulze

OD_{NK}hodnota zákalu negativní kontroly pro příslušnou koncentraci mikroemulze

OD_{PK}hodnota zákalu pozitivní kontroly

Tabulka 5. Poměr množství mikroemulze (ME) ku bujónu (MPB) pro mikrobiologickou analýzu

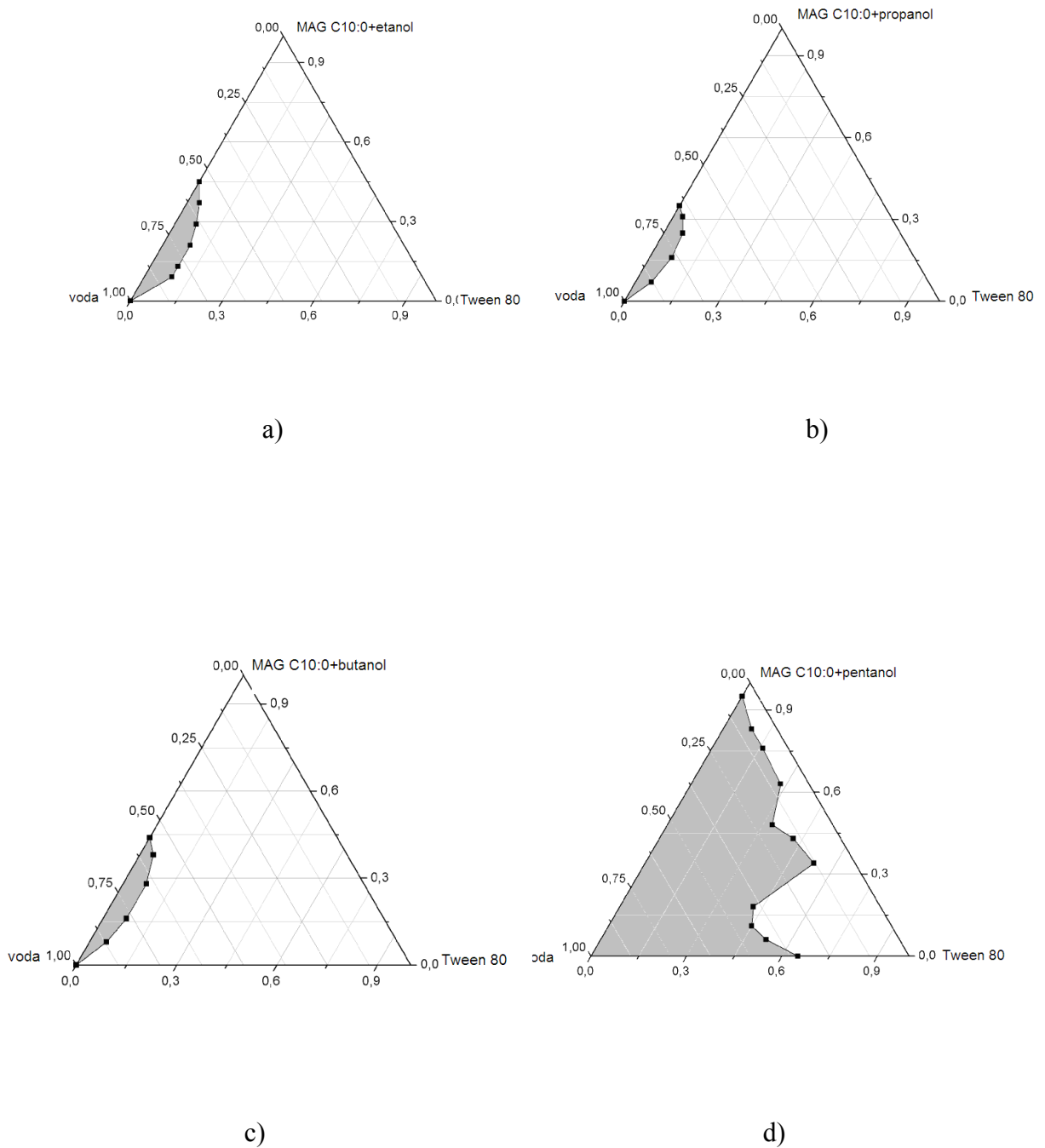
Poměr ME:MPB	Množství mikroemulze [ml]	Množství bujónu [ml]
slepý pokus 1:1	2.0	2.0
slepý pokus 1:3	1.0	3.0
mikroemulze 1:1	2.0	2.0
mikroemulze 1:3	1.0	3.0
mikroemulze 1:7	0.5	3.5
mikroemulze 1:15	0.25	3.75
mikroemulze 1:31	0.125	3.875

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Fázové diagramy - grafické znázornění soustav o třech složkách

Chování mikroemulzí sledovaných MAG bylo studováno pomocí fázových diagramů. Mikroemulze byly připraveny míšením třech omezeně mísitelných složek: oleje (roztok MAG v alkoholu), surfaktantu (Tween 80) a vody. Volba Tweenu 80 jako surfaktantu byla motivována jeho bezpečností a běžným používáním jako aditiva a emulgátoru v potravinářském průmyslu. Jako kosurfaktanty, byly vybrány alkoholy etanol, 1-propanol, 1-butanol a pentanol a z monoacylglycerolů byly použity MAG C_{10:0}, MAG C_{12:0} a MAG C_{14:0}. Pomocí postupu popsaného v části 3.5.1 diplomové práce byly sestrojeny fázové diagramy (Obrázek 4), které jsou rozděleny binodální křivkou na dvě oblasti – homogenní (označená bíle) a heterogenní (označená šedě). Z trojúhelníkových fázových diagramů je přítomnost těchto dvou oblastí dobře patrná. Heterogenní oblast je charakteristická omezenou mísitelností jednotlivých složek a přítomností běžné emulze. Pro oblast homogenní (jednofázovou) je typické, že jsou v ní složky neomezeně mísitelné a představuje výskyt mikroemulze. Vrcholy trojúhelníku představují čisté složky. Strany trojúhelníku znázorňují složení binárních soustav. Body uvnitř trojúhelníku udávají složení tříložkové soustavy.

Fázové diagramy tříložkového systému voda-olej-surfaktant jsou uvedeny na Obrázku 4 a) až 4 d), kde je představen systém, ve kterém byla olejová fáze tvořena roztokem MAG C_{10:0} v alkoholu, kterým je v případě 4 a) etanol, 4 b) propanol, 4 c) butanol a 4 d) pentanol. Další složku tvořil surfaktant (Tween 80) a třetí složkou byla voda. Fázové diagramy pro další studované systémy s MAG C_{12:0} a MAG C_{14:0} jsou shrnuty v příloze PI na Obrázcích 13 - 22.



Obrázek 4. Fázové diagramy tříložkového systému voda-olej-surfaktant, kde je olejová fáze tvořena a) MAG C_{10:0}+etanol, b), MAG C_{10:0}+propanol, c) MAG C_{10:0}+butanol d) MAG C_{10:0}+pentanol

4.1.1 Vliv typu alkoholu na fázové chování mikroemulzí

Fázové diagramy, kde olejovou fází tvořily MAG C_{10:0} s etanolem, propanolem, butanolem a pentanolem jasně ukazovaly rozdíly ve velikostech homogenní a heterogenní fázové oblasti v závislosti na použitém kosurfaktantu. Obrázek 4 a) až d), kde jsou tyto fázové diagramy srovnány jasně ukazuje, že největší oblast omezené mísitelnosti, tedy heterogenní oblast (šedě označená), byla pozorována v případě, kdy kosurfaktantem byl pentanol. Pro systémy, kde byly kosurfaktanty etanol, butanol a propanol je charakteristické zmenšení oblasti omezené mísitelnosti ve srovnání s pentanolem, kde oblast omezené mísitelnosti zaujímala v trojúhelníkovém diagramu větší plochu než oblast mísitelnosti neomezené. Z fázových diagramů je patrné, že se oblast omezené mísitelnosti pro daný MAG zvětšuje se vzrůstající délkou řetězce použitého alkoholu. Výjimku z tohoto trendu tvoří propanol, v jehož přítomnosti byla oblast omezené mísitelnosti nejmenší. Toto zajímavé zjištění je v souladu s výsledky studií publikovaných v [74], kde bylo rovněž pozorováno, že použitím propanolu místo etanolu došlo ke zmenšení oblasti s omezenou mísitelností. Obdobné chování lze pozorovat i u mikroemulzí tvořených MAG C_{12:0} s etanolem, propanolem, butanolem a pentanolem, které jsou uvedeny v příloze PI na Obrázcích 17 – 20.

Pro olejovou fází MAG C_{14:0} s etanolem a butanolem platí, že v případě použití etanolu jako kosurfaktantu je oblast omezené mísitelnosti menší, než v případě, kdy byl použitý butanol jako kosurfaktant. Z důvodu špatné rozpustnosti MAG C_{14:0} v pentanolu a propanolu nebylo možné fázové diagramy s těmito kosurfaktanty (pentanolem a propanolem) sestavit.

Fázové diagramy byly následně využity pro stanovení vhodného složení mikroemulzí s obsahem monoacylglycerolů, které byly použity při testování antimikrobních vlastností.

4.2 Charakterizace mikroemulzí

Velikost částic mikroemulzí byla stanovena fotonovou korelační spektroskopií. Cílem tohoto měření bylo jednak stanovit velikost částic dispergovaného podílu v mikroemulzi a jednak ověřit, že se velikost částic mikroemulze výrazně nemění po filtraci přes filtr s velikostí pórů 0.22 μm , který byl použit pro jejich sterilní filtraci. Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 6. Z tabulky je zřejmé, že velikost částic MAG mikroemulzí ležela v rozmezí 12 až 24 nm. Obdobná velikost, tedy 11 – 20 nm, byla zjištěna i pro mikroemulze slepého pokusu, kde nebyly přítomny monoacylglyceroly. Filtrace mikroemulzí změnila

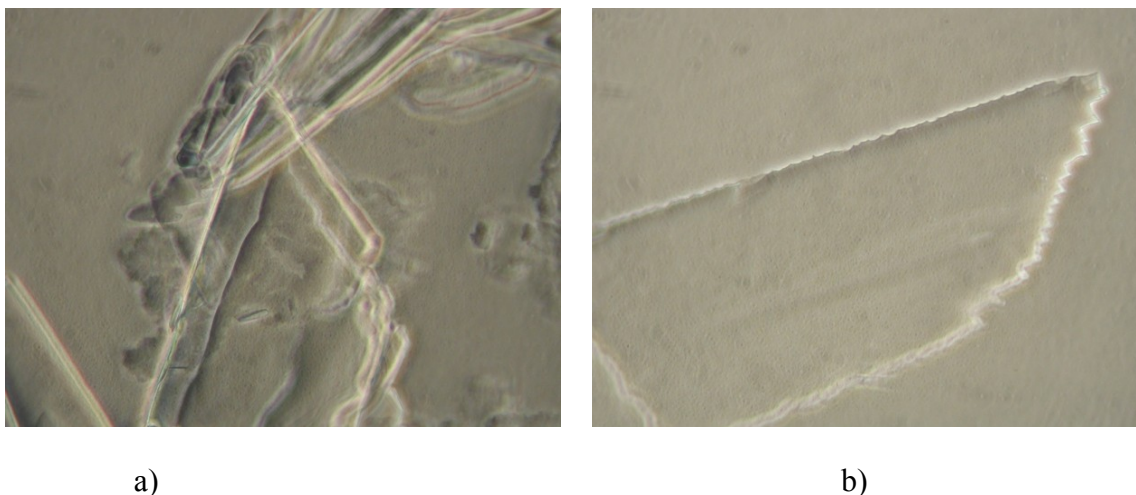
jejich velikost jen nevýznamně a v těchto změnách nelze nalézt žádný systém. V některých případech totiž velikost částic v emulzích po filtraci mírně vzrostla a u jiných mikroemulzí naopak klesla. Tyto změny je možno přičíst spíše nepřesnosti v použité metodě než výraznými změnami emulze.

Tabulka 6. Velikost částic studovaných mikroemulzí stanovená fotonovou korelační spektroskopií

Složení olejové fáze mikroemulzí		Z-průměr velikosti částic [nm]
Slepý pokus (etanol)	nefiltrovaný	14
	filtrovaný	15
Slepý pokus (butanol)	nefiltrovaný	20
	filtrovaný	11
MAG C _{10:0} + etanol	nefiltrovaný	19
	filtrovaný	23
MAG C _{10:0} + butanol	nefiltrovaný	12
	filtrovaný	19
MAG C _{11:0} + etanol	nefiltrovaný	13
	filtrovaný	15
MAG C _{11:0} + butanol	nefiltrovaný	21
	filtrovaný	19
MAG C _{11:1} + etanol	nefiltrovaný	14
	filtrovaný	12
MAG C _{11:1} + butanol	nefiltrovaný	18
	filtrovaný	12
MAG C _{12:0} + etanol	nefiltrovaný	24
	filtrovaný	13
MAG C _{12:0} + butanol	nefiltrovaný	12
	filtrovaný	12
MAG C _{14:0} + etanol	nefiltrovaný	14
	filtrovaný	19
MAG C _{14:0} + butanol	nefiltrovaný	Nestanoveno
	filtrovaný	14

Vizuální posouzení ukázalo, že všechny mikroemulze určené pro mikrobiologickou analýzu byly transparentní. Emulze viditelně zakalené, které byly připraveny během konstrukce fázových diagramů pro zjištění vhodného složení cílových mikroemulzí byly mléčné, nebo gelovité, v závislosti na poměru jednotlivých složek v emulzích.

Současně s vizuálním pozorováním bylo u nehomogenních emulzí, které byly připraveny pro konstrukci fázových diagramů provedeno i mikroskopické pozorování. Vybrané fotografie emulzí, které tvořily gelovitou strukturu jsou znázorněny na Obrázcích 5 a) a b).



Obrázek 5. Fotografie emulzí při zvětšení (10x100)

a) Složení: MAG C₁₂+ butanol, tween 80, voda

b) Složení: MAG C₁₂+ etanol, tween 80, voda

4.3 Vliv mikroemulzí 1-monoacylglycerolu na růst bakterií

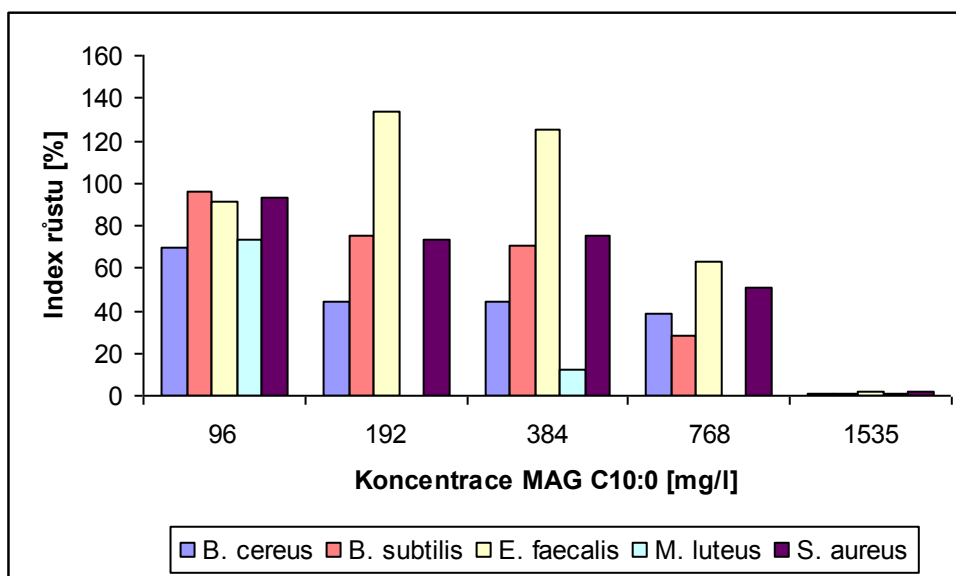
V rámci diplomové práce byly testovány mikroemulze MAG kyseliny kaprinové - MAG C_{10:0}, MAG kyseliny laurové - MAG C_{12:0}, MAG kyseliny myristové - MAG C_{14:0}, MAG kyseliny undekanové - MAG C_{11:0} a MAG kyseliny undecenové - MAG C_{11:1}. Tyto mikroemulze byly testovány v koncentrační řadě uvedené v Tabulce 4 a byly získány ředěním masopeptonovým bujonem v poměru 1:1, 1:3, 1:7, 1:15, 1:31.

Vliv přídavku MAG do mikroemulze byl testován na pěti grampozitivních bakteriích (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*) a pěti gramnegativních bakteriích (*Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens*). Růst bakterií byl hodnocen v tekutém médiu jako změna optické hustoty suspenze buněk měřená spektrofotometricky při 655 nm. Z naměřených údajů byly vypočítány průměrné hodnoty a byly sestrojeny růstové křivky. Rozdíly v růstu bakterií v čistém médiu a v médiu s příslušnou koncent-

rací mikroemulze byly hodnoceny jako index růstu (IR) za 15 hodin. Všechny růstové křivky jsou znázorněny v přílohovém materiálu PII a PIII. Antimikrobní účinky jednotlivých MAG byly vyjádřeny jako index růstu a tyto výsledky byly graficky zpracovány.

4.3.1 Vliv monoacylglycerolu kyseliny kaprinové (MAG C_{10:0}) v mikroemulzi na růst grampozitivních bakterií

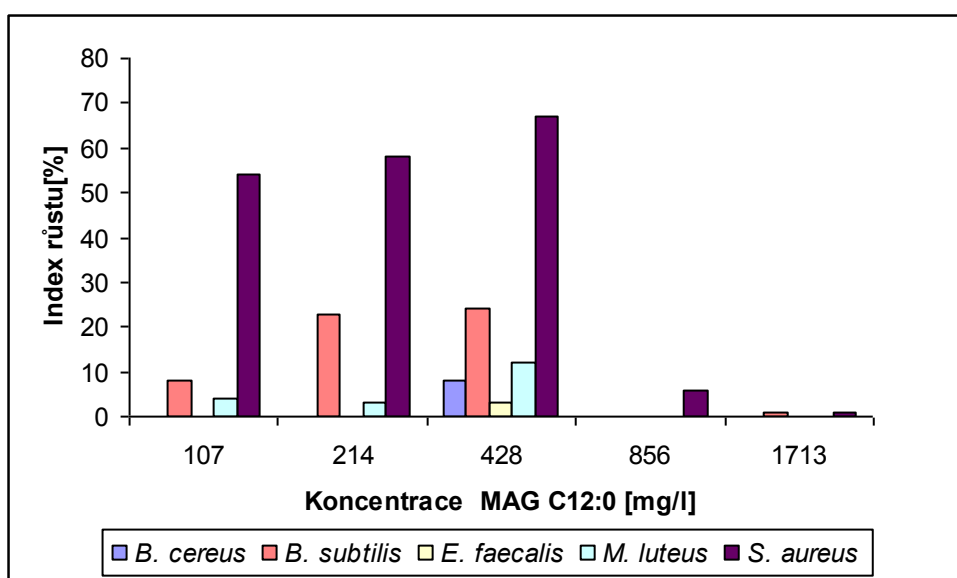
Vliv monoacylglycerolu kyseliny kaprinové na růst grampozitivních bakterií byl testován v koncentracích 96, 192, 384, 768, 1535 mg/l MAG C_{10:0}. Nárůst hodnoty indexu růstu bakterií byl zaznamenán se snižující se koncentrací testovaného MAG C_{10:0}. Při nejvyšší testované koncentraci 1535 mg/l je patrné, že růst žádných grampozitivních bakterií neprobíhá. Inhibiční účinek je u této koncentrace velký. MAG C_{10:0} má nejvyšší inhibiční účinek na bakterii *Micococcus luteus* ve všech koncentracích kromě koncentrace nejnižší (96mg/l), kde došlo pouze k 30 % inhibici růstu této bakterie (IR = 70 %). Nejnižší inhibiční účinek je patrný u bakterie *Enterococcus faecalis*, kde je při nejnižších koncentracích 384 mg/l a 192 mg/l index růstu téměř 120 %. Index růstu bakterií při sledovaných koncentracích MAG C_{10:0} je znázorněn na Obrázku 6.



Obrázek 6. Vliv MAG C_{10:0} v mikroemulzi na růst grampozitivních bakterií

4.3.2 Vliv monoacylglycerolu kyseliny laurové (MAG C_{12:0}) v mikroemulzi na růst grampozitivních bakterií

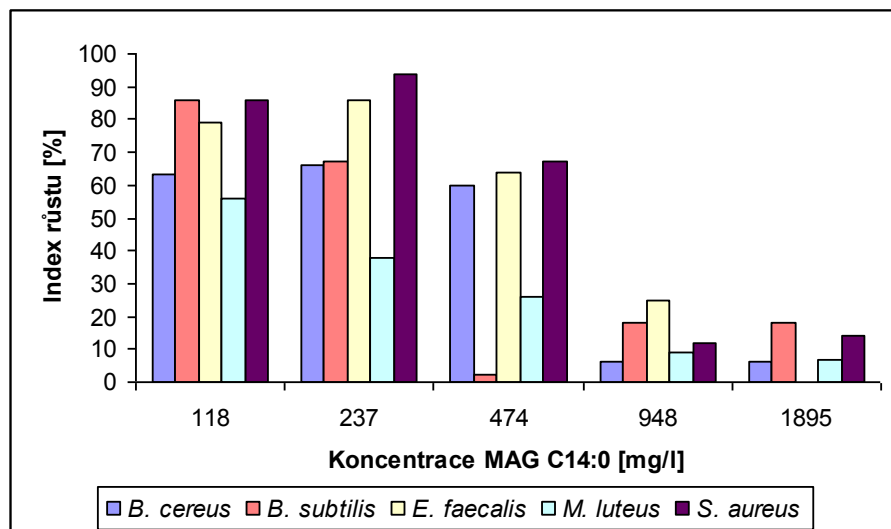
Vliv monoacylglycerolu kyseliny laurové na růst grampozitivních bakterií byl testován v koncentracích 1713, 856, 428, 214, 107 mg/l MAG C_{12:0} a výsledky ukázaly velmi uspokojivý inhibiční účinek MAG C_{12:0} vůči všem testovaným grampozitivním bakteriím. Jedinou výjimkou byla bakterie *Staphylococcus aureus*, kde byl zaznamenán růst při koncentracích MAG 428, 214 a 108 mg/l. Index růstu bakterií při sledovaných koncentracích MAG C_{12:0} je znázorněn na Obrázku 7.



Obrázek 7. Vliv MAG C_{12:0} v mikroemulzi na růst grampozitivních bakterií

4.3.3 Vliv monoacylglycerolu kyseliny myristové (MAG C_{14:0}) v mikroemulzi na růst grampozitivních bakterií

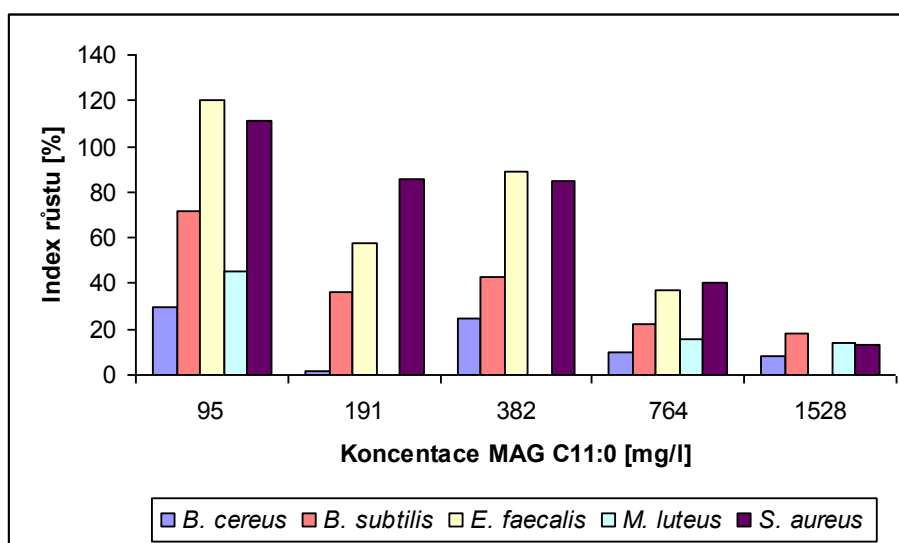
Vliv monoacylglycerolu kyseliny myristové na růst grampozitivních bakterií byl testován v koncentracích 118, 237, 474, 948, 1895 mg/l MAG C_{14:0}. Při vyšších koncentracích MAG C_{14:0} je patrné, že hodnota indexu růstu leží okolo 20 %. Při nižších koncentracích MAG se hodnota indexu růstu bakterií zvyšuje až na 60 – 90 %, tedy klesá schopnost mikroemulze inhibovat růst sledovaných bakterií. Nejvyšší inhibiční účinek je zaznamenán vůči bakterii *Enetococcus faecalis* při koncentraci MAG 1895 mg/l a bakterii *Bacillus subtilis* při koncentraci 474 mg/l. Index růstu bakterií při různých koncentracích MAG C_{14:0} je znázorněn na Obrázku 8.



Obrázek 8. Vliv MAG C_{14:0} v mikroemulzi na růst grampozitivních bakterií

4.3.4 Vliv monoacylglycerolu kyseliny undekanové (MAG C_{11:0}) v mikroemulzi na růst grampozitivních bakterií

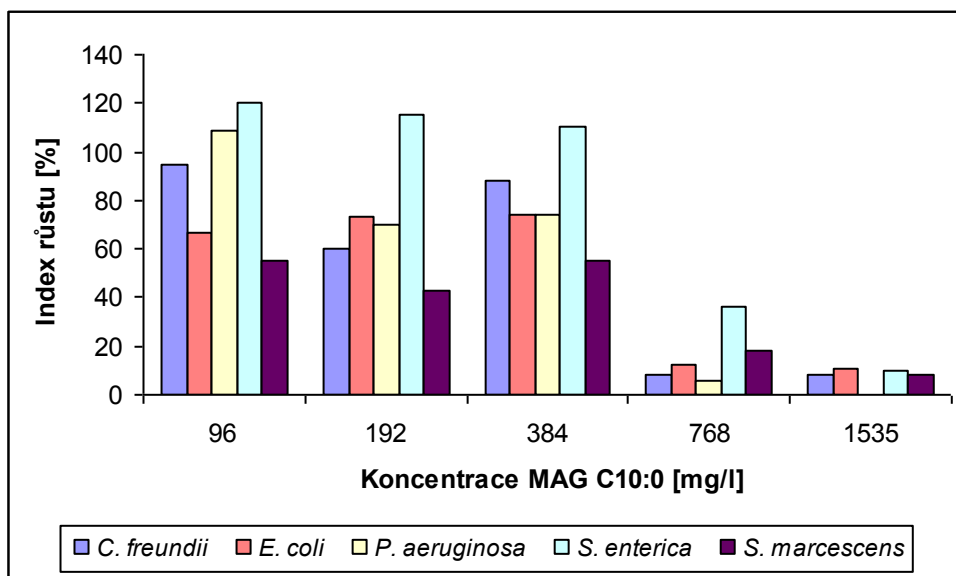
Vliv monoacylglycerolu kyseliny undekanové na růst grampozitivních bakterií byl testován v koncentracích 95, 191, 382, 764, 1528 mg/l MAG C_{11:0}. Z hodnot indexu růstu je patrné, že nejvyšší inhibiční účinek má MAG C_{11:0} na bakterii *Bacillus cereus*, jehož růst byl ze 70 % inhibován i nejnižší použitou koncentrací 95 mg/l. Naopak nejnižší inhibiční účinek má mikroemulze tohoto MAG na bakterie *Enterococcus faecalis* a *Staphylococcus aureus* a to při koncentracích 382, 191 a 95 mg/l. Růst bakterií při různých koncentracích MAG C_{11:0} je znázorněn na Obrázku 9.



Obrázek 9. Vliv MAG C_{11:0} v mikroemulzi na růst grampozitivních bakterií

4.3.5 Vliv monoacylglycerolu kyseliny kaprinové (MAG C_{10:0}) v mikroemulzi na růst gramnegativních bakterií

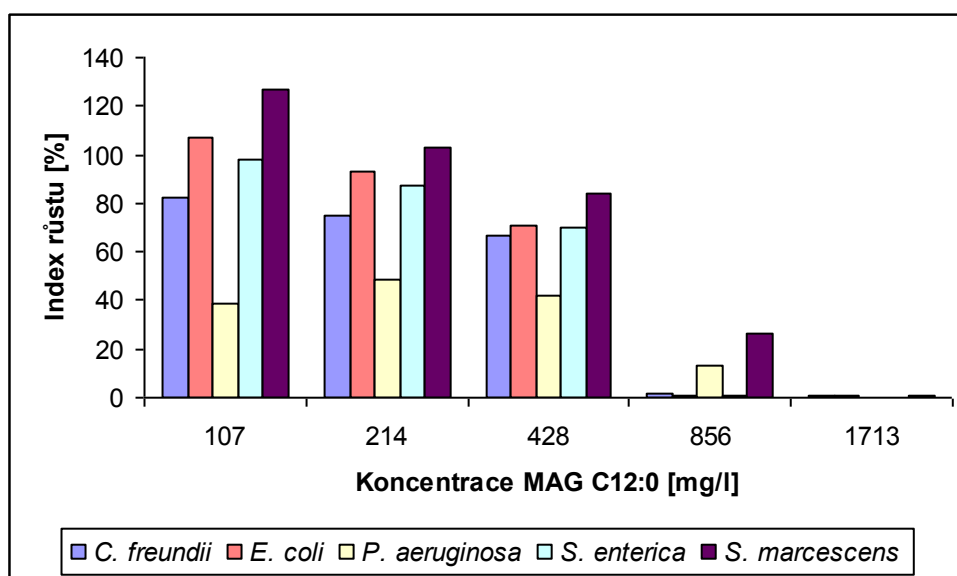
Vliv monoacylglycerolu kyseliny kaprinové na růst gramnegativních bakterií byl testován, obdobně jako u grampozitivních bakterií, v koncentracích 96, 192, 384, 768, 1535 mg/l MAG C_{10:0}. Z vypočtených hodnot indexu růstu je patrné, že i při vyšších koncentracích MAG C_{10:0} nedochází ke kompletní inhibici růstu bakterií. Pouze u bakterie *Pseudomonas aeruginosa* bylo inhibiční působení MAG C_{10:0} patrné a při koncentraci MAG 1535 mg/l nebyl zaznamenán žádný růst této bakterie. Naopak u bakterie *Salmonella enterica* byly hodnoty indexu růstu při koncentracích 384, 192 a 96 mg/l vyšší než 100 %, což je dokonce zvýšení této hodnoty oproti kontrolnímu vzorku. Z toho je možno usuzovat, že přítomnost MAG kyselin s 10 uhlíky v nižších koncentracích může růst gramnegativních bakterií spíše podporovat než inhibovat. Se zvýšením hodnoty indexu růstu oproti kontrole pak následně souvisí i zvyšování maximální dosažené hodnoty růstu, případně i dosažená maximální růstová rychlost. Podobný stimulační efekt nízkých koncentrací MAG a mastných kyselin byl již v literatuře popsán a autoři publikace [70] se domnívají, že tento jev může být způsoben zvýšením permeability cytoplazmatické membrány s následným zrychlením výměny látek a živin mezi vnějším prostředím a bakteriální buňkou. Růst gramnegativních bakterií při různých koncentracích MAG C_{10:0} je znázorněn na obrázku 10.



Obrázek 10. Vliv MAG C_{10:0} v mikroemulzi na růst gramnegativních bakterií

4.3.6 Vliv monoacylglycerolu kyseliny laurové (MAG C_{12:0}) v mikroemulzi na růst gramnegativních bakterií

Vliv monoacylglycerolu kyseliny laurové na růst gramnegativních bakterií byl testován v koncentracích 107, 214, 428, 856, 1713 mg/l MAG C_{12:0}. Inhibiční účinek MAG C_{12:0} je největší při koncentraci 1713 mg/l, při které nebyl zaznamenán téměř žádný růst sledovaných gramnegativních bakterií. Také při koncentraci 856 mg/l byl zaznamenán velmi dobrý inhibiční účinek MAG vůči bakteriím *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* a *Salmonella enterica*. Poměrně dobré inhibiční účinky má tento MAG i vůči bakterii *Pseudomonas aeruginosa*, kde byla i při nejnižší koncentraci 107 mg/l zaznamenána 50% inhibice, tedy index růstu 50 %. U řady testovaných koncentrací 428, 214, 107 mg/l MAG byl s jejich poklesem zaznamenán pravidelný nárůst hodnot IR u bakterií *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* a *Serratia marcescens*. Růst gramnegativních bakterií při sledovaných koncentracích MAG C_{12:0} je znázorněn na Obrázku 11.

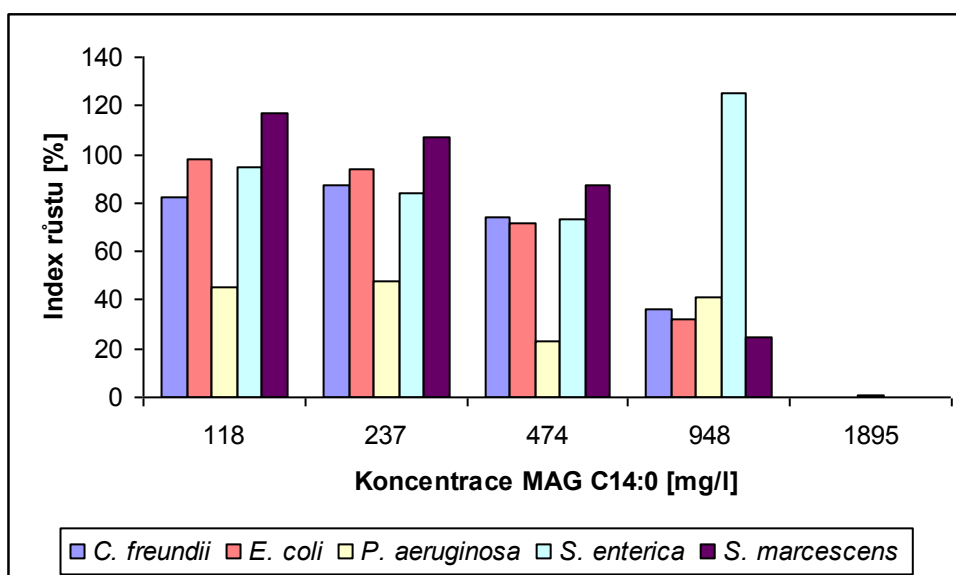


Obrázek 11. Vliv MAG C_{12:0} v mikroemulzi na růst gramnegativních bakterií

4.3.7 Vliv monoacylglycerolu kyseliny myristové (MAG C_{14:0}) v mikroemulzi na růst gramnegativních bakterií

Vliv monoacylglycerolu kyseliny myristové na růst gramnegativních bakterií byl testován v koncentracích 118, 237, 474, 948, 1895 mg/l MAG C_{14:0}. Inhibiční účinek MAG C_{14:0} byl, obdobně jako u výše diskutovaných MAG, největší při koncentraci 1895 mg/l, při které nebyl zaznamenán téměř žádný růst gramnegativních bakterií. Dobré inhibiční účinky

při všech testovaných koncentracích má MAG C_{14:0} na bakterii *Pseudomonas aeruginosa*, kde dochází k 50 – 70% inhibici (hodnota IR od 30 do 50 %). Zajímavý je vliv MAG C_{14:0} na růst bakterie *Salmonella enterica*, kde při koncentraci 1895 mg/l je inhibiční účinek 100 % a bakterie neroste, avšak při koncentraci MAG 948 mg/l je inhibiční účinek nulový a hodnota IR je dokonce vyšší než pro kontrolní vzorek. Vzhledem k tomu, že test nebyl opakován, není možno konstatovat, jestli je tento trend reprodukovatelný, nebo jestli se jedná o chybu ve stanovení. Při nižších koncentracích byl totiž už pozorován očekávaný průběh, tedy s postupně se snižující koncentrací MAG docházelo ke zvýšení indexu růstu této bakterie. Růst gramnegativních bakterií při různých koncentracích MAG C_{14:0} je znázorněn na obrázku 12.



Obrázek 12. Vliv MAG C_{14:0} v mikroemulzi na růst gramnegativních bakterií

Z výše uvedených výsledků je zřejmé, že antimikrobní aktivita studovaných MAG je závislá na počtu atomů uhlíku v řetězci mastné kyseliny. Rovněž se potvrdilo, že bakterie s buněčnou stěnou grampozitivního typu jsou vůči MAG mikroemulzím citlivější, než bakterie s buněčnou stěnou gramnegativního typu, což souvisí s přítomností lipopolysacharidů v buněčné stěně G⁻ bakterií [68].

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo připravit stabilní mikroemulze 1-monoacylglycerolů s antimikrobními účinky. Pro to, aby mohlo být určeno vhodné složení mikroemulzí, byly nejprve sestrojeny fázové digramy tříložkového systému voda-olej-surfaktant, kde olejovou fází tvořil vždy příslušný 1-monoacylglycerol rozpuštěný v alkoholu. Z monoacylglycerolů byly vybrány MAG C_{10:0} (monokaprylin), MAG C_{12:0} (monolaurin) a MAG C_{14:0} (monomyristin). Jako kosurfaktanty byly vybrány alkoholy s krátkou a střední délkou řetězce etanol, propanol, butanol a pentanol. Surfaktantem byl Tween 80.

U připravených mikroemulzí byla stanovena velikost jejich částic pomocí fotonové korelační spektroskopie a vybrané emulze, připravené během studia fázového chování výše uvedených systémů, byly hodnoceny vizuálně a mikroskopicky.

Na základě sestrojených fázových diagramů byly vyrobeny mikroemulze se složením zajišťujícím dostatečnou stabilitu, u kterých byla testována antimikrobiální účinnost. Vliv přídavku MAG do mikroemulze na inhibici mikroorganismů byl ověřen na pěti grampozitivních bakteriích (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*) a pěti gramnegativních bakteriích (*Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens*).

Na základě získaných výsledků lze shrnout, že připravené mikroemulze byly stabilní a vykazovaly následující antimikrobiální účinky:

- U všech mikroemulzí obsahujících studované monoacylglyceroly byl zaznamenán pokles hodnoty indexu růstu se stoupající koncentrací přídavku monoacylglycerolu do mikroemulze.
- Nejlepší antimikrobiální účinky vůči grampozitivním bakteriím vykazovaly mikroemulze s přídavkem MAG C_{12:0}.
- Nejvíce citlivou bakterií vůči testovaným mikroemulzím s přídavkem monoacylglycerolů byl *Micrococcus luteus*, jehož růst byl nejvíce potlačen mikromulzemi s přídavkem MAG C_{10:0} a MAG C_{12:0}.
- Nejméně citlivou bakterií vůči testovaným mikroemulzím s přídavkem monoacylglycerolů byla *Salmonella enterica*, která nebyla inhibována vůbec.
- Grampozitivní bakterie byly vůči testovaným mikroemulzím více citlivé, než bakterie gramnegativní.

Výsledky práce ukázaly, že 1-monoacylglyceroly, jejichž antimikrobní účinek byl již dříve prokázán při aplikaci ve formě roztoků, mohou být úspěšně použity i jako aktivní antimikrobní složky v mikroemulzích. Mikroemulze s obsahem monoacylglycerolů představují systém vhodný pro vybrané potravinářské aplikace.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BÁRTOVSKÁ, L., *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 1. vyd. Praha: 2002. 192 s. ISBN 80-7080-475-0
- [2] NOVÁK, P. *Fyzikální chemie II*. 1., vyd. Praha: 2001. 319 s. ISBN 80-7080-436.
- [3] VACÍK, J., BARTHOVÁ, J., PACÁK, J., STRAUCH, B., SVOBODOVÁ, M., ZEMÁNEK, F. *Přehled středoškolské chemie*. 1. vyd. Praha: 1996. 368 s. ISBN 80-85937-08-5
- [4] McCLEMENTS, D. J. *Food emulsions*. 2nd Edition, Boca Raton, CRC Press, 2005, 609 p. ISBN 0-8493-2023-2
- [5] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2.*, 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902391-4-5
- [6] BINKS, B. P. *Modern aspects of emulsion science*, Royal Society of Chemistry, Cambridge 1998
- [7] Internetové stránky. [on-line]. [cit. 2010-11-12]. Dostupné z WWW:
<http://www.kosmetologie.cz/Archiv_97_seminar_Praha_Srobarova/Mikroemulze_presentace.pdf>
- [8] HIEMENZ P. C., RAJAGOPALAN, R. *Principles of Colloid and Surface Chemistry*. 3rd. Edition, Boca Raton FL, Taylor and Francis, 1997. 650 p. ISBN 0-8247-9397-8.
- [9] Internetové stránky. [on-line]. [cit. 2010-11-12]. Dostupné z WWW:
<http://www.cistaveda.cz/surfaktanty>
- [10] MANRESA, MA., BASTIDA, J., MERCADÉ, ME., ROBERT, M., de ANDRÉS, C., ESPUNY, MJ., GUINEA, J. *Kinetic studies on surfactant production by Pseudomonas aeruginosa 44T1*. *J Indust Microbiol Biotechnol* 1991. 8: 133-136.
- [11] NIE, M., YIN, X., REN, C., WANG, Y., SHEN, Q. *Novel rhamnolipid biosurfactants produced by a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium Pseudomonas aeruginosa strain NY3*. *Biotechnol Adv. Article in Press*, 2010.

- [12] Internetové stránky. [on-line]. [cit. 2010-11-12]. Dostupné z WWW:
<http://chemikalie.upol.cz/skripta/hs/hs.pdf>
- [13] Internetové stránky. [on-line]. [cit. 2010-11-12]. Dostupné z WWW:
http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/ko-surfaktant.html
- [14] PICHLER, J., *Technologie základních organických látek, tenzidy, barviva a pigmenty*, 1. vyd. Brno: UJEP, 1988. 81 s. ISBN 55-005-88
- [15] UTB ve Zlíně. *Fyzikální, chemické a technické vlastnosti povrchově aktivních látek*. Vzdělávací portál [on-line]. [cit. 2010-10-19]. Dostupné z WWW:
<http://utb.cepac.cz/screens/default.aspx>
- [16] Internetové stránky. [on-line]. [cit. 2010-11-12]. Dostupné z WWW:
http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/mikroemulze.html
- [17] Internetové stránky. [on-line]. [cit. 2010-11-12]. Dostupné z WWW:
http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/emulze.html
- [18] HOZA, I. a kol., *Potravinářská biochemie 1*, 1. vyd. UTB Zlín: 2006. 52 s. ISBN 80-7318-495-8
- [19] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 1*, 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999. 92 s. ISBN 80-902391-3-7
- [20] *Monoglyceride* [online]. [cit. 2010-10-19]. Dostupný z WWW:
<http://en.wikipedia.org/wiki/Monoacylglycerol>
- [21] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J. *Chemie potravin*, 1. vyd. Praha: SNTL, 1983. ISBN 04-815-83
- [22] ULLRICH, L. *Chémia a technológia jedlých tukov a olejov*, 1. vyd. Bratislava: SVTL, 1990. 436 s.
- [23] GARTI, N., YULI-AMAR, I. *Micro- and nano-emulsions for delivery of functional food ingredients*. Ed.: Garti, N. Delivery and controlled release of bioactives in foods and nutraceuticals 2008 Taylor and Francis, Inc. 384 s. ISBN 978-14-2007-4369

- [24] PAUL, BK. MOULIK, SP. *Uses and applications of microemulsions*, CURRENT SCIENCE Volume: 80 Issue: 8 Pages: 990-1001 2001
- [25] ZAJÍC, J., BAREŠ, M., *Chemie a technologie tuků*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1987. 169 – 173 s.
- [26] VOLUCKIJ SERGEJEVIČ, S., *Kurz koloidní chemie*, 2. vyd. Praha: SNTL, 1984. 297 s. ISBN 04-620-84
- [27] BLAŽEJ, A. a kol. *Tenzidy*, 1. vyd. Praha: SNTL, 1977. ISBN 63-173-77
- [28] Internetové stránky. [on-line]. [cit. 2010-11-12]. Dostupné z WWW: http://www.soudom.cz/Ucebnice/Materialy/Treti_rocnik/DISPERZNI_SOUSTAVY.pdf
- [29] MOULOUGUI Z., RAKOTONDRAZAFY V., PEYROU G., GACHEN C., EYCHENNE V. *Pure α – monoglycerides for industrial applications. Agro Food Industry*. Hi – Tech 1998, s. 10-14
- [30] POKORNÝ, J. a kol, *Technologie tuků*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1986. 452 s.
- [31] SONNTAG, N., O. V. *Glycerolysis of Fats and Methyl Esters – Statut, Reviw and Critique, J. Am. Oli Chem. Soc.*, 10, 1982, 795 A
- [32] WEISSERMEL, K., ARPE, H. – J. *Industrial Organic Chemistry*, VCH Verlagsgesellschaft, 1993. p. 396.
- [33] WRIGHT, H.J., SEGUR, J.B., CLARK, H. V., COBURN, S. K., LANGDON, E. E., DUPUIS, E. N. *Oil & Soap*, 1944, 145p.
- [34] FREEDMAN, B., BUTTERFIELD, R. O., PRYDE. E. H. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 63. 1986, 1375 p.
- [35] STOFFEL, W., CHU. F., AHRENS, E. H. *Analytical Chemistry*, 31, 1959, 307 p.
- [36] ČERVINKA, D., DĚDEK, V., FERLES, M., *Organická chemie*. 3. vyd. 1982, s. 392 – 396
- [37] BARTHET, V.J., GORDON, V., DAUN, J.K. *Evaluation of a colorimetric method for measuring the content of FFA in marine and vegetable oils. Food Chem.* 2008, 1064-1068.
- [38] DARNOKO, D., CHERYAN, M. *Kinetics of palm oil transesterification in batch reactor. J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2000, 1263-1267.

- [39] TRUBNIKOVA, N. A., KUZKINA, L.I.: *Deposited document cited in Chem. Abstr.*, 91, 1979, 192785 h.
- [40] LOK, C.M., MANK, A.P.J., WARD, J.P.: *Synthesis of glycidol esters and mono/diacylglycerols from glycidol. Chemistry and Physics of Lipids*, 36, 1956, 329-334
- [41] CARON, M., SHARPLESS, K.B.: *Ti(O-i-Pr)₄ – Mediated nucleophilic openings of 2,3-epoxy alcohols. A mild procedure for regioselective ring-opening. J.Org.Chem.*, 50, 1958, 1557-1560
- [42] JANIŠ, R., KREJČÍ, J., KLÁSEK, A., *Preparation of 1-monoacylglycerols from glycidol and fatty acid catalyzed by the chromium(III)-fatty acid system, Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2000, vol. 102, p. 351-354
- [43] BURNSIDE B. A., MATTES, C. E., MCGUINNESS, C. M., RUDNIC, E. M., BELENDUIK, G. W.: *Oral insulin delivery. U. S. Patent*. 1996, Vol. 95.
- [44] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999. 194 s. ISBN 80-902391-5-3
- [45] NINO ROGRÍGUEZ M.R., PATINO RODRÍGUEZ J.M., SÁNCHEZ CARERA C.: *Relaxation phenomena in Monoglyceride films at the air–water interface, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 1999, Vol. 12, s. 175–192.
- [46] MOONEN, H., BAS, H. *Mono- and diglycerides. In Whitehurst, R.J. (ed.) Emulsifiers in Food Technology*. 2004. 40 – 57. Blackwell Publishing.
- [47] HOKUZO, K. *Trends in Food Science And Technology*, 7, 1996, p.205
- [48] KABARA, J. J. *Kosmetic Science Technology Ser.* 72, 1991. p. 311-344.
- [49] BAREL, A. O., PAYE, M., MAIBACH, H.I. *Handbook of cosmetic science and technology. Marcel Dekker, Inc.*, New York, 2001. 886 s.
- [50] CHANG, C.-M., BODMEIER, R. *Binding of drugs to monoglyceride-based drug delivery systems. Int. J. Pharm.*, 1997. 147: 135-142.
- [51] CHANG, C.-M., BODMEIER, R. *Effect of dissolution media and additives on the drug release from cubic phase delivery systems. J. Control. Release*, 1997. 46: 215-222.

- [52] FLISZAR, K. A., WUELFING, W. P., LI, Z., REED, R. A. *Profiling of medium chain glycerides used in pharmaceutical formulation development by reversed-phase HPLC*. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2006. 40: 896-900.
- [53] KRISTMUNDSDÓTTIR, T., ÁRNADÓTTIR, S.G., BERGSON, G., THORMAR, H. *Development and evaluation of microbicidal hydrogels containing monoglyceride as the active ingredient*. *J. Pharm. Sci.*, 1999. 88: 1011-1015
- [54] THORGEIRSDOTTIR, T. O., THORMAR, H., KRISTMUNDSDOTTIR, J. The influence of formulation variables on stability and mikrobicidal activity of monoglyceride monocaprin. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 2005. 15: 233-236.
- [55] BLAŽEJ a kol. *Špeciálne chemické úpravy textilií*. 1. vyd. Bratislava: Alfa. 1986. 118 – 119 s. ISBN 63-261-86
- [56] VLTAVSKÁ, P. *Antimikrobiální úpravy obuvnických materiálů*. Dizertační práce. FT UTB ve Zlíně. 2007. 108 s.
- [57] LANGMAIER, F. a kol. *Pomocné látky kožedělného průmyslu*, 1. vyd. Praha: SNTL. 456 s.
- [58] ŠIMEK, L., HRNČIŘÍK, J. *Fyzikální chemie I*. UTB Zlín, 112-113 s. ISBN 80-7318-324-2
- [59] BUŇKA F., BUŇKOVÁ L., KRÁČMAR S.: *Monoacylglyceroly jako významné emulgátory v potravinářském průmyslu*. *Acta fytotechnica et zootechnica*, Nitra, 2009
- [60] *Potravinářská Revue* 7, 2010, č. 1, s. 82-85
- [61] DUFOUR, M., MANSON, J.M., BREMER, P.J., DUFOUR, J.-P., COOK, G.M., SIMMONDS, R.S. Characterization of monolaurin resistance in *Enterococcus faecalis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, 73: 5507-5515.
- [62] THORMAR, H., BERGSSON, G. *Antimicrobial effects of lipids*. *Recent Devel. Antiviral Res.*, 2001, 1: 157-173.
- [63] NAIR, M.K.M., JOY, J., VASUDEVAN, P., HINCKLEI, L., HOAGLAND, T.A., VENKITANARAYANAN, K.S. *Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin on major bacterial mastitis pathogens*. *J. Dairy Sci.*, 2005, 88: 3488-3495.

- [64] ROBACH, M.C., HICKEY, C., TO, E.C. *Comparison of antimicrobial actions of monolaurin and sorbic acid. J. Food Saf.*, 1981, 3: 89-98.
- [65] BRANEN, J., DAVIDSON, P.M. *Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. Int. J. Food Microbiol.*, 2004, 90: 63-74.
- [66] CONLEY, A. J., KABARA, J. J. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 4, 1973, p. 501 – 506.
- [67] SHEU, A. A. FREESE, E. J. *Lipopolysaccharide Layer Protection of Gram-Negative Bacteria Against Inhibition by Long-Chain Fatty Acids. Journal of Bacteriology*. 115. 1973, p. 869 – 875.
- [68] BUŇKOVÁ, L. *Účinky přídatných látek používaných v potravinářství a kosmetice na růst vybraných bakterií*, rigorózní práce, Brno, 2008
- [69] BLASZYK, M., HOLLEY, R.A. (1998). Interaction of monolaurin, eugenol and sodium citrate on growth of common meat spoilage and pathogenic organisms. *Int. J. Food Microbiol.* 39:175-183.
- [70] ALTIERI, C., BEVILACQUA, A., CARDILLO, D., SINIGAGLIA, D. Effectiveness of fatty acids and their monoglycerides against gram-negative pathogens. *International Journal of Food Science and Technology*, 2009. 44: 359-366.
- [71] BUŇKA F. a kol., Effect of 1-monoglycerides on viscoelastic properties of processed cheeses. *International Journal of Food Properties*, 10, 2007. 819 – 828.
- [72] Internetové stránky. [on-line]. [cit. 2010-04-13]. Dostupné z WWW:
http://www.soudom.cz/Ucebnice/Materialy/Treti_rocnik/DISPERZNI_SOUSTAVY.pdf
- [73] RUŽIČKA J. a kol., (2003). Antimicrobial effects of 1-monoacylglycerols prepared by catalytic reaction of glycidol with fatty acids. *Eur. Food Res. Technol.* 2003. 217: 329-331.
- [74] ZHANG, H. ET AL.: Formulation of food-grade microemulsions with glycerol monolaurate: effect of short-chain alcohols, polyols, salts and nonionic surfactants. *Eur. Food Res. Technol.* 2008, 226, s. 613 - 619

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

O/V	Olej ve vodě
V/O	Voda v oleji
APG	Alkypolyglykosidy
HLB	Hydrofilně-lipofilní rovnováha
G ⁺	Grampozitivní bakterie
G ⁻	Gramnegativní bakterie
MAG	Monoacylglycerol
DAG	Diacylglycerol
TAG	Triacylglycerol
MK	Mastná kyselina
MAG C _{8:0}	Monoacylglycerol kyseliny kaprylové
MAG C _{10:0}	Monoacylglycerol kyseliny kaprinové
MAG C _{11:0}	Monoacylglycerol kyseliny undekanové
MAG C _{11:1}	Monoacylglycerol kyseliny undecenové
MAG C _{12:0}	Monoacylglycerol kyseliny laurové
MAG C _{14:0}	Monoacylglycerol kyseliny myristové
MAG C _{16:0}	Monoacylglycerol kyseliny palmitové
BE	Beef extract
MPA	Masopeptonový agar
MPB	Masopeptonový bujón
IR	Index růstu

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Různé typy emulzí a) zředěné, b) koncentrované, c) gelovité.....	14
Obrázek 2. Rozdělení emulzí a vzhled systému v závislosti na velikosti částic.....	15
Obrázek 13. 1-monoacylglycerol.....	28
Obrázek 14. Fázové diagramy tříložkového systému voda-olej-surfaktant, kde je olejová fáze tvořena a) MAG C _{10:0} +etanol, b) MAG C _{10:0} +pentanol, c) MAG C _{10:0} +propanol, d) MAG C _{10:0} +butanol.....	47
Obrázek 15. Fotografie emulzí při zvětšení (10x100).....	49
Obrázek 16. Vliv MAG C _{10:0} v mikroemulzi na růst grampozitivních bakterií.....	50
Obrázek 17. Vliv MAG C _{12:0} v mikroemulzi na růst grampozitivních bakterií.....	51
Obrázek 18. Vliv MAG C _{14:0} v mikroemulzi na růst grampozitivních bakterií.....	52
Obrázek 19. Vliv MAG C _{11:0} v mikroemulzi na růst grampozitivních bakterií.....	52
Obrázek 20. Vliv MAG C _{10:0} v mikroemulzi na růst gramnegativních bakterií.....	53
Obrázek 21. Vliv MAG C _{12:0} v mikroemulzi na růst gramnegativních bakterií.....	54
Obrázek 22. Vliv MAG C _{14:0} v mikroemulzi na růst gramnegativních bakterií.....	55

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Vztah mezi hodnotou HLB a rozpustností emulgátorů.....	21
Tabulka 2. Složení olejové fáze pro konstrukci fázových diagramů.....	40
Tabulka 3. Teoretická vypočtená množství složek použitých pro přípravu mikroemulzí...40	
Tabulka 4. Koncentrace MAG v mikroemulzi.....	43
Tabulka 5. Poměr množství mikroemulze ku bujonu na mikrobiologickou analýzu.....	45
Tabulka 7. Velikost částic studovaných mikroemulzí stanovená fotonovou korelační spektroskopii.....	49

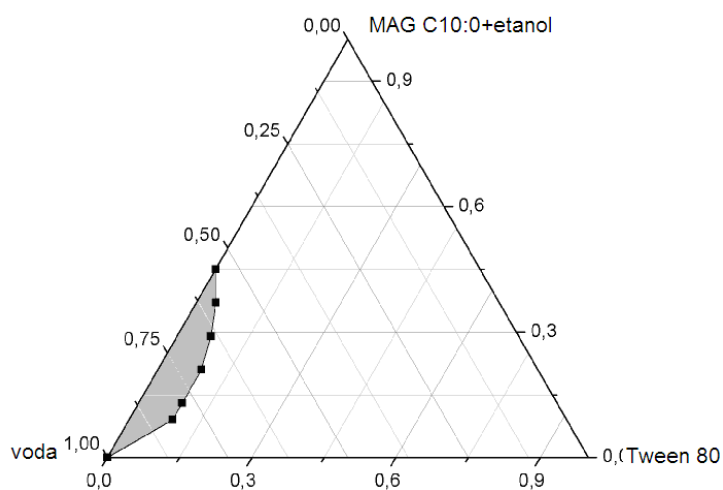
SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA PI: Fázové diagramy o třech složkách obsahující olej (roztok 1-monoacylglycerolu v alkoholu), surfaktant (Tween 80) a vodu

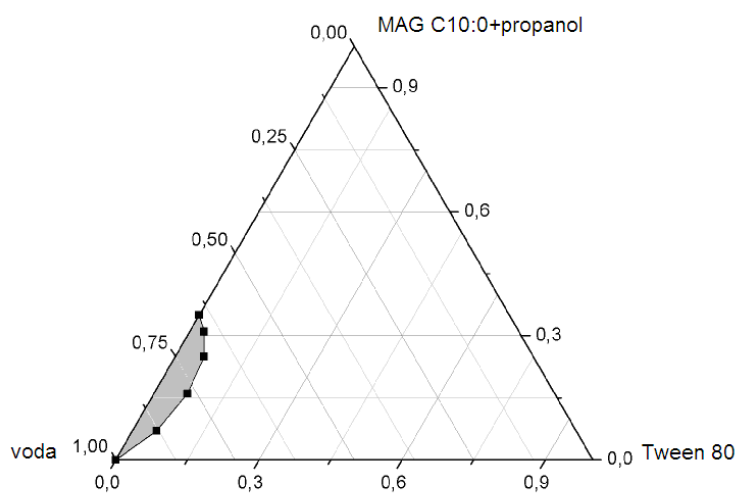
PŘÍLOHA PII: Vliv mikroemulzí monoacylglycerolů na růst grampozitivních bakterií

PŘÍLOHA PIII: Vliv mikroemulzí monoacylglycerolů na růst gramnegativních bakterií

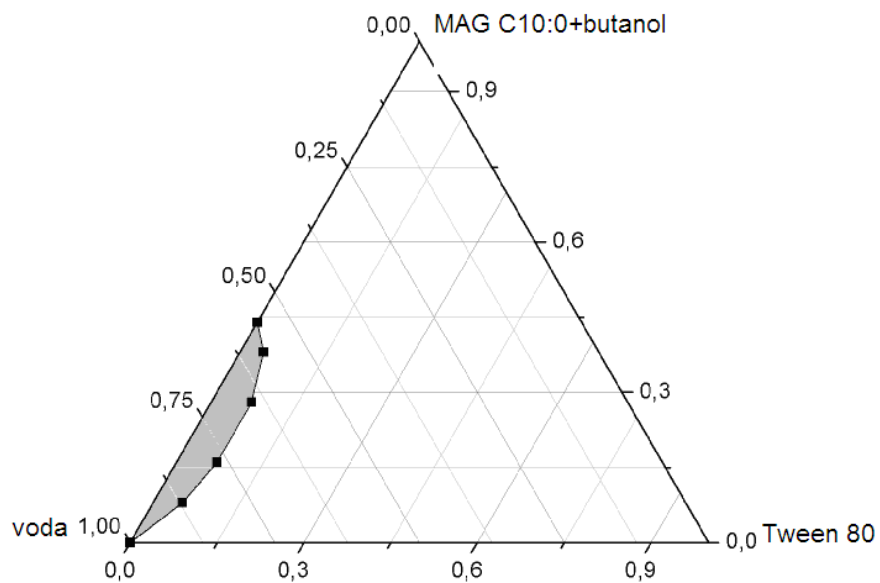
PŘÍLOHA PI: Fázové diagramy o třech složkách obsahující olej (roztok 1-monoacylglycerolu v alkoholu), surfaktant (Tween 80) a vodu



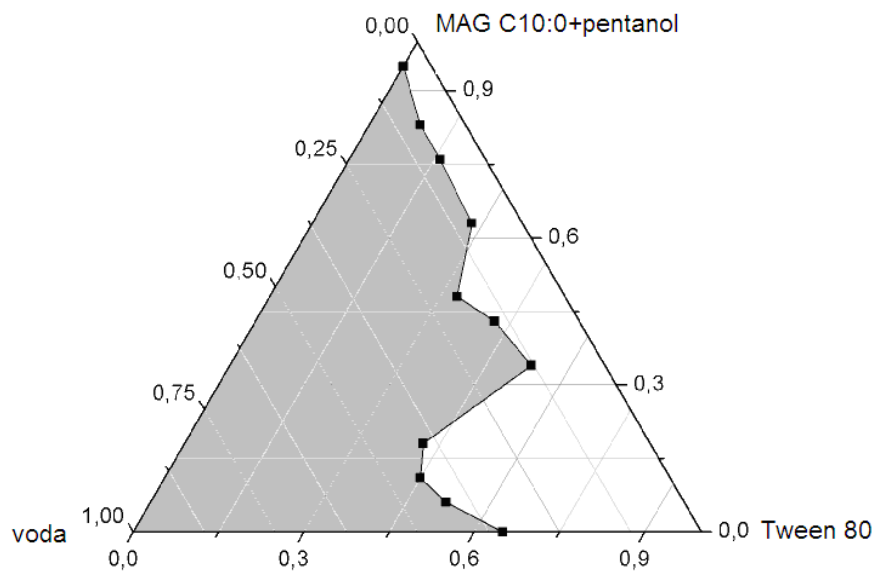
Obrázek P1 13. MAG C_{10:0}+etanol, Tween 80 a voda



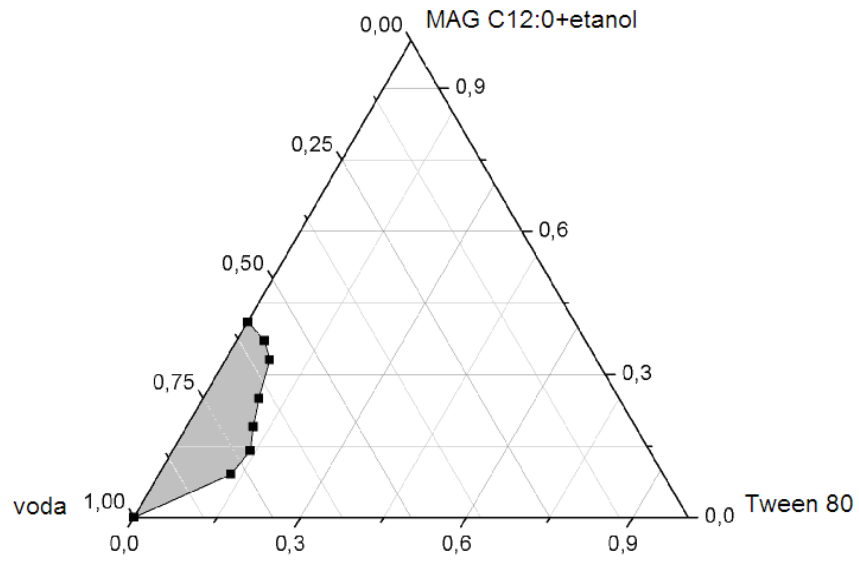
Obrázek P1 14. MAG C_{10:0}+propanol, Tween 80 a voda



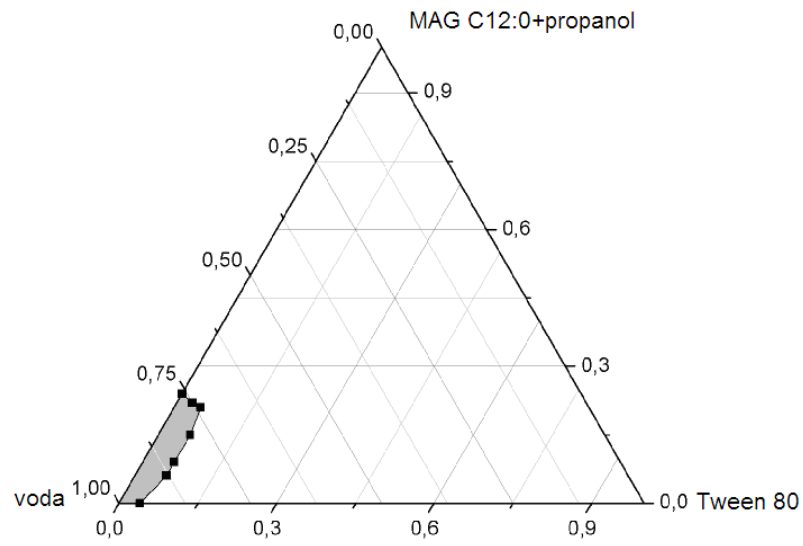
Obrázek P1 15. MAG C_{10:0}+butanol, Tween 80 a voda



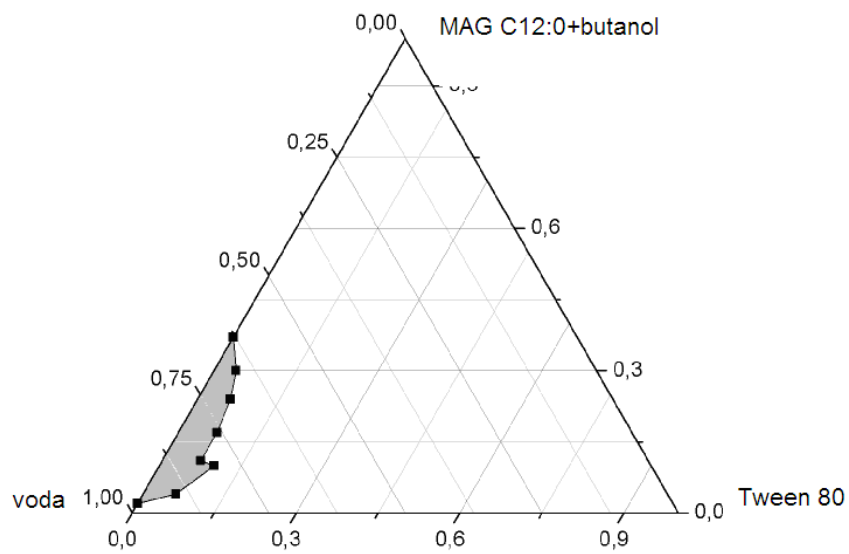
Obrázek P1 16. MAG C_{10:0}+pentanol, Tween 80 a voda



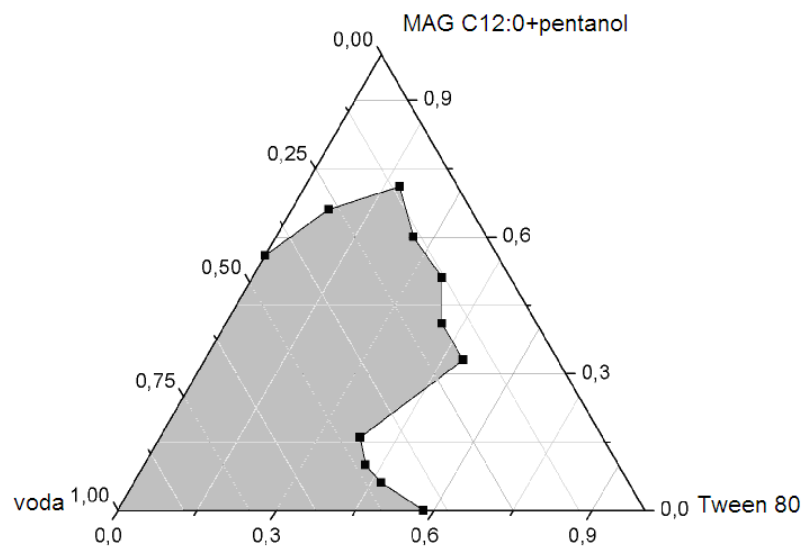
Obrázek P1 17. MAG C_{12:0}+etanol, Tween 80 a voda



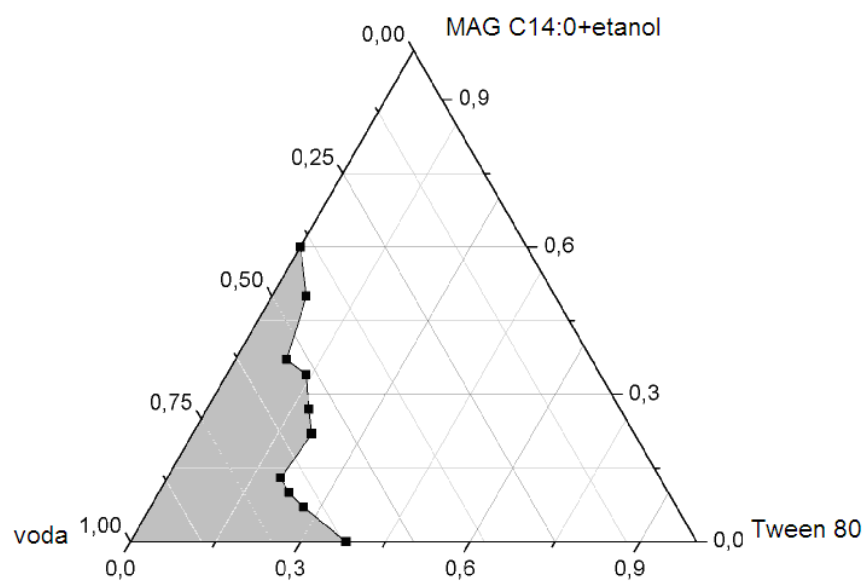
Obrázek P1 18. MAG C_{12:0}+propanol, Tween 80 a voda



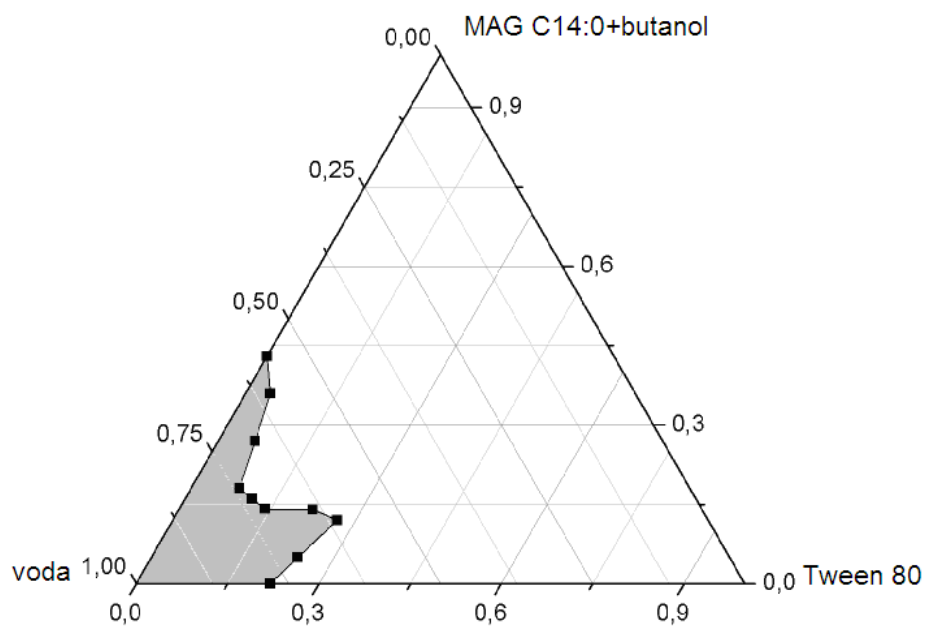
Obrázek P1 19. MAG C_{12:0}+butanol, Tween 80 a voda



Obrázek P1 20. MAG C_{12:0}+pentanol, Tween 80 a voda

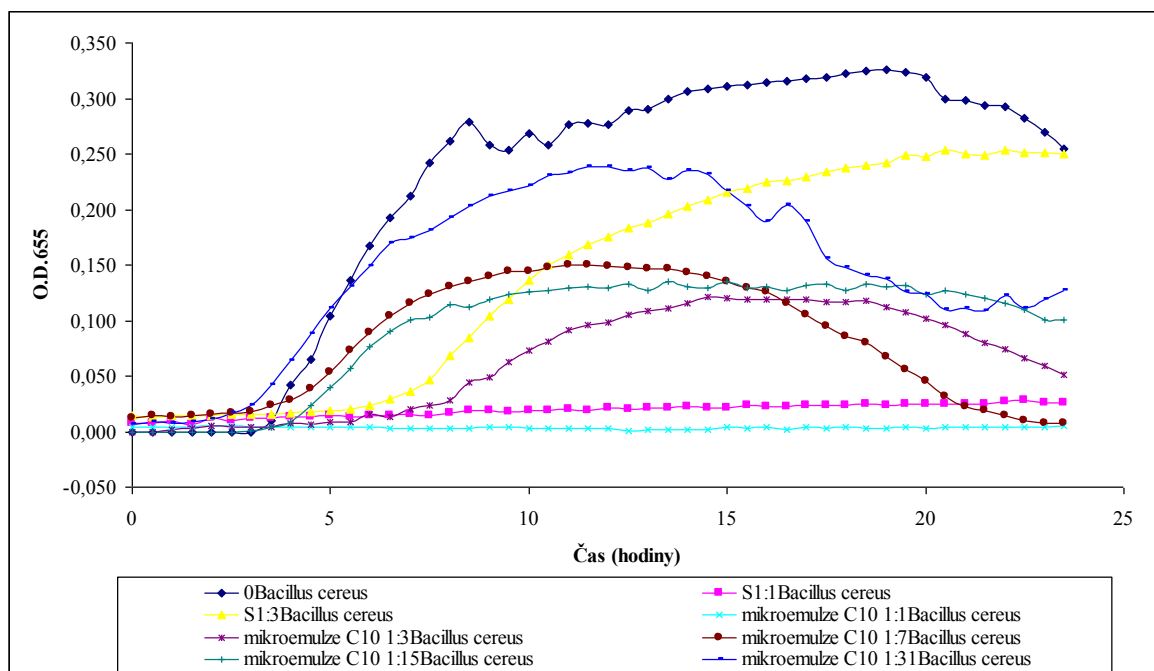


Obrázek PI 21. MAG C_{14:0}+etanol, Tween 80 a voda

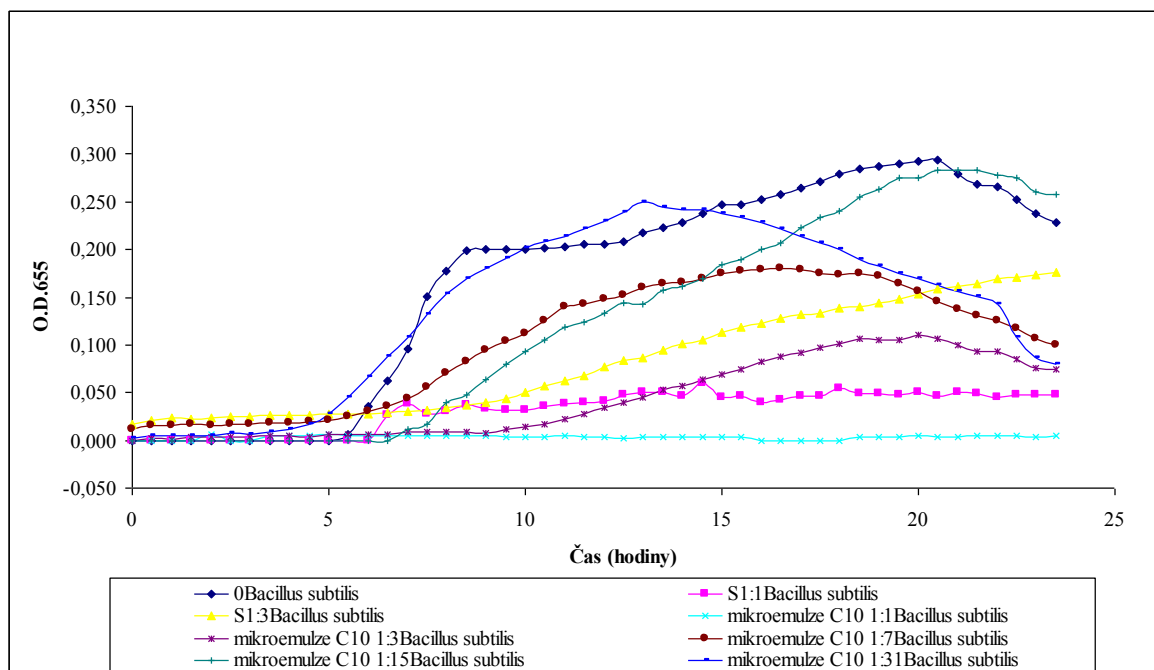


Obrázek PI 22. MAG C_{14:0}+butanol, Tween 80 a voda

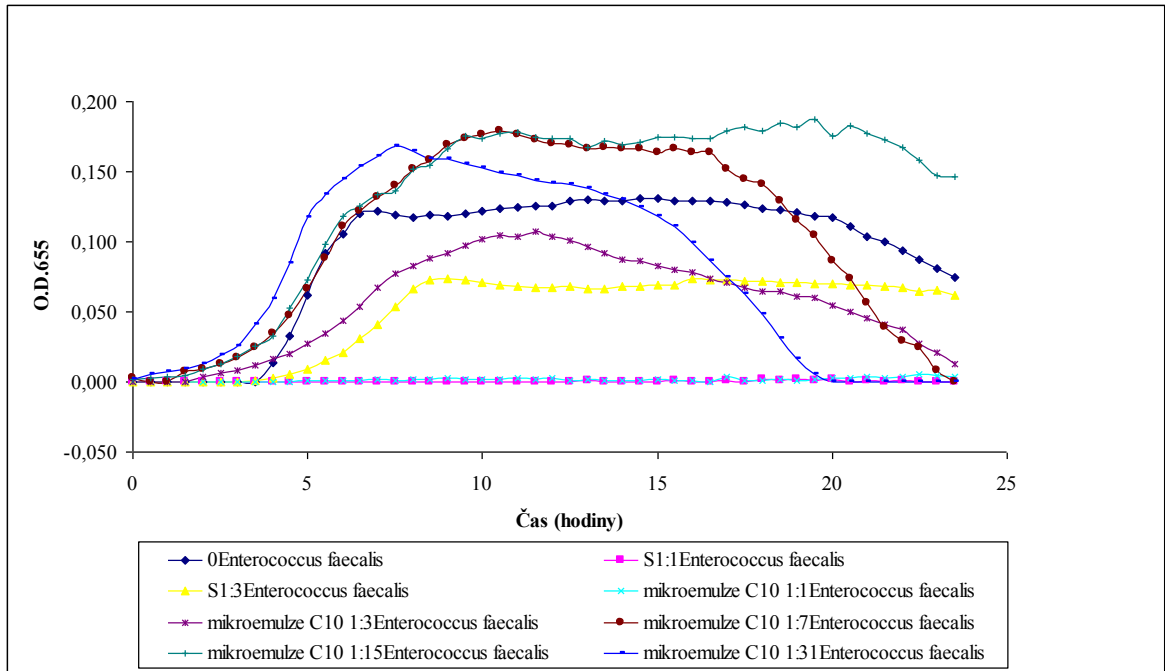
PŘÍLOHA PII: Vliv mikroemulzí monoacylglycerolů na růst grampozitivních bakterií



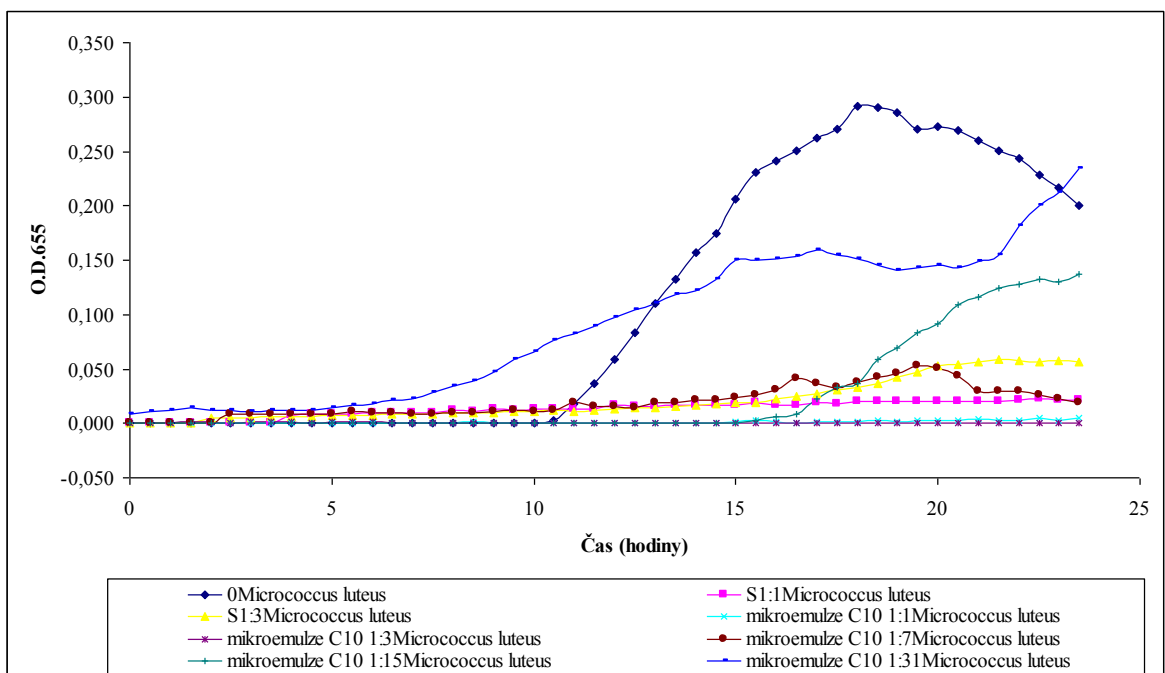
Obrázek PII 23. Vliv mikroemulze s MAG $C_{10:0}$ na růst *Bacillus cereus*



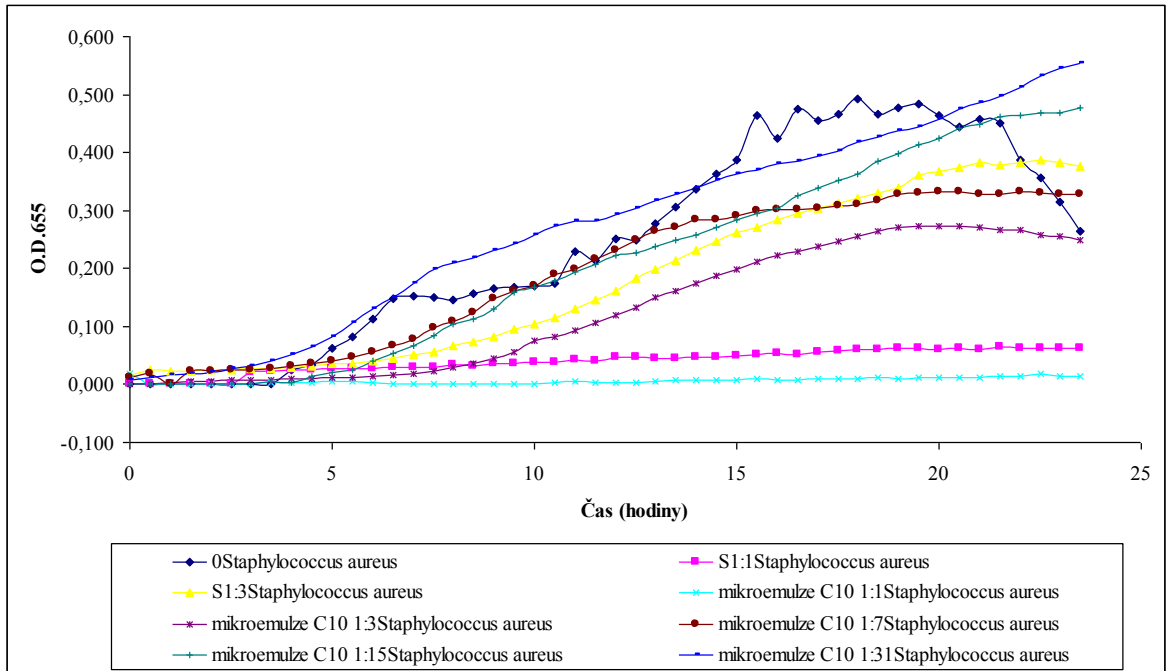
Obrázek PII 24. Vliv mikroemulze s MAG $C_{10:0}$ na růst *Bacillus subtilis*



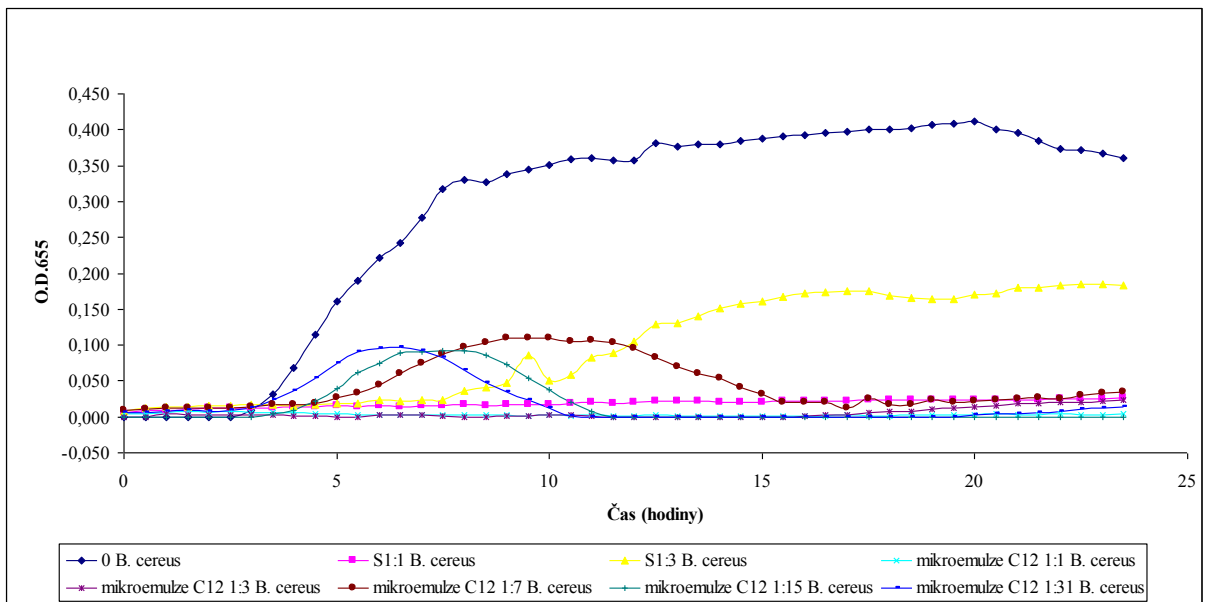
Obrázek PII 25. Vliv mikroemulze s MAG $C_{10:0}$ na růst *Enterococcus faecalis*



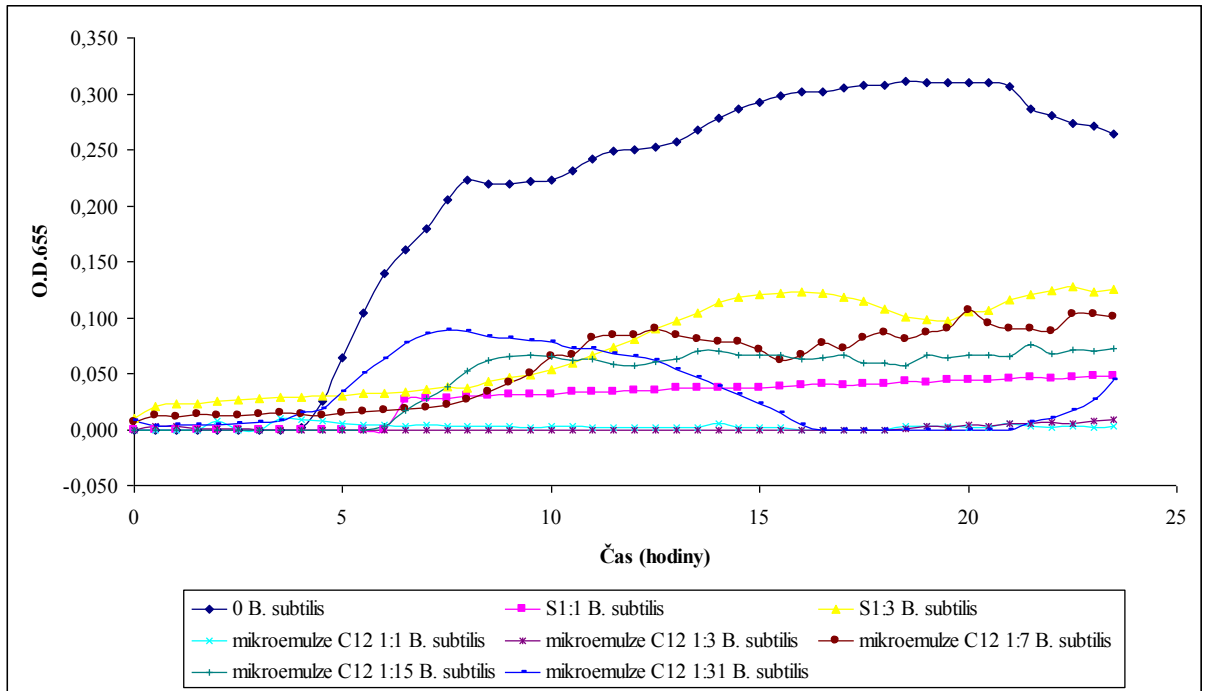
Obrázek PII 26. Vliv mikroemulze s MAG $C_{10:0}$ na růst *Micrococcus luteus*



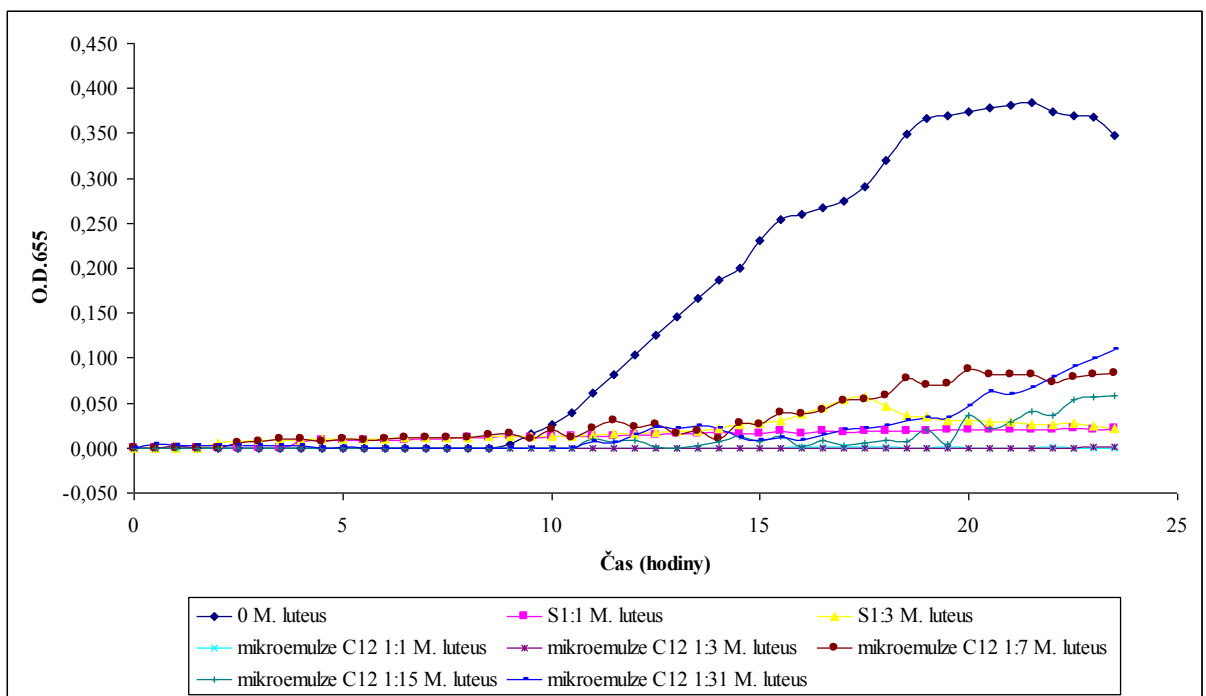
Obrázek PII 27. Vliv mikroemulze s MAG $C_{12:0}$ na růst *Staphylococcus aureus*



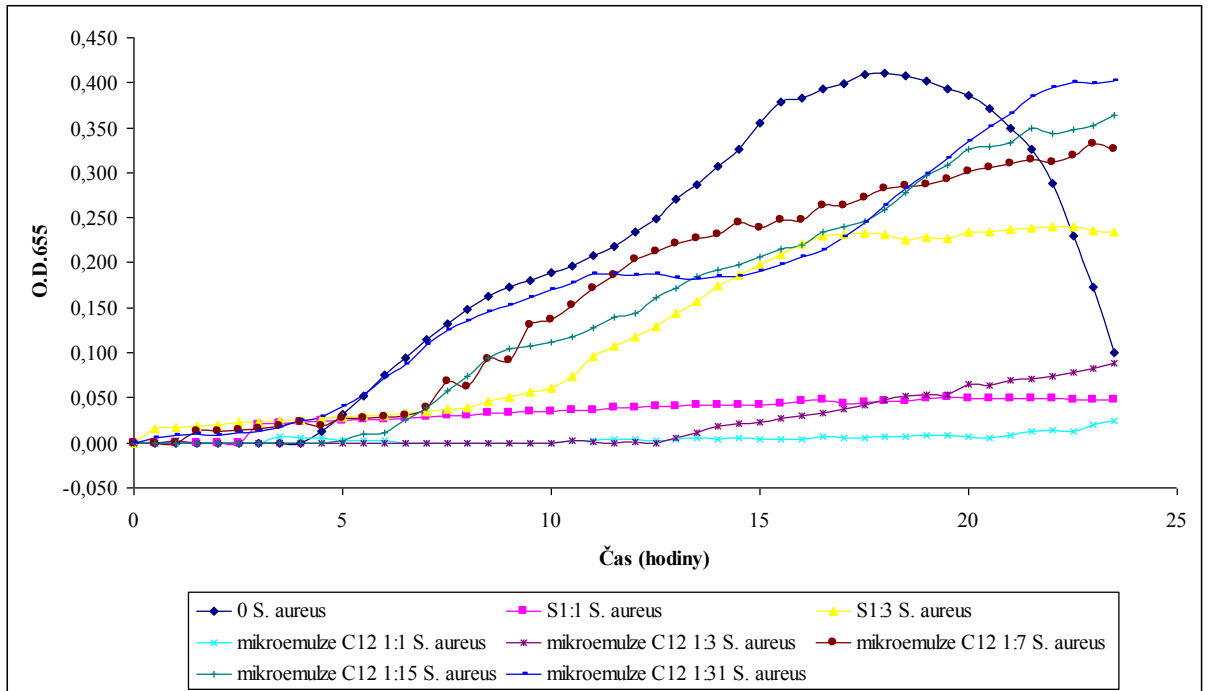
Obrázek PII 28. Vliv mikroemulze s MAG $C_{12:0}$ na růst *Bacillus cereus*



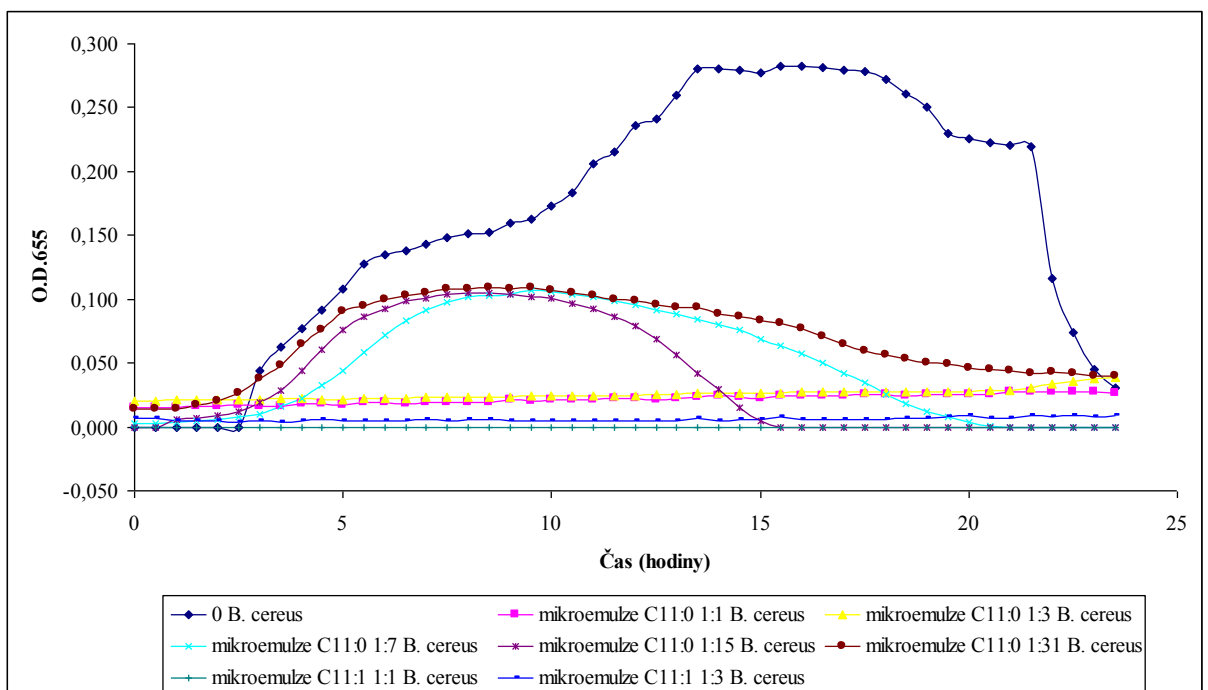
Obrázek PII 29. Vliv mikroemulze s MAG $C_{12:0}$ na růst *Bacillus subtilis*



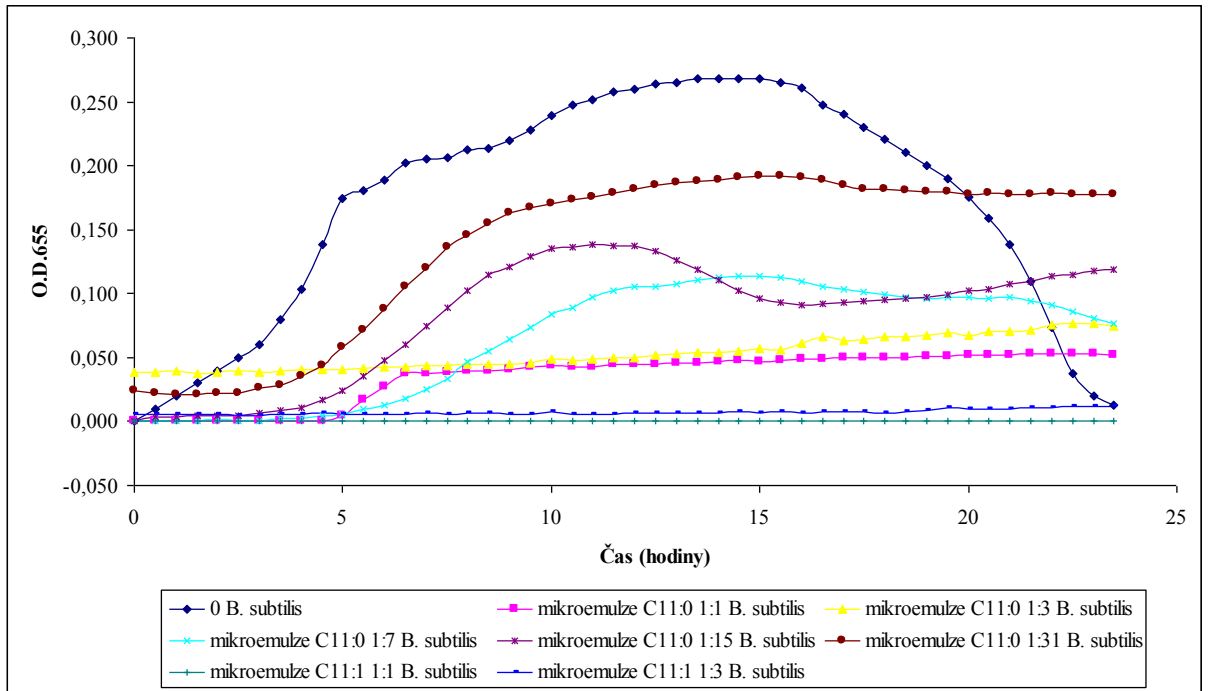
Obrázek PII 30. Vliv mikroemulze s MAG $C_{12:0}$ na růst *Micrococcus luteus*



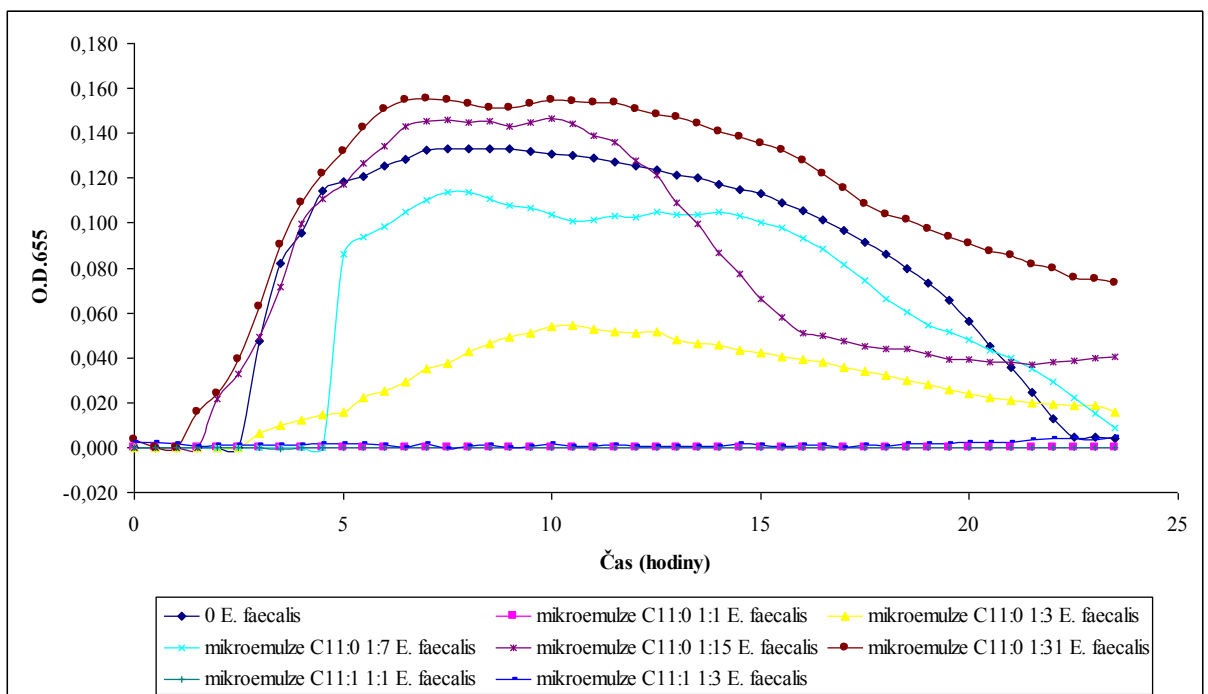
Obrázek PII 31. Vliv mikroemulze s MAG C_{12:0} na růst *Staphylococcus aureus*



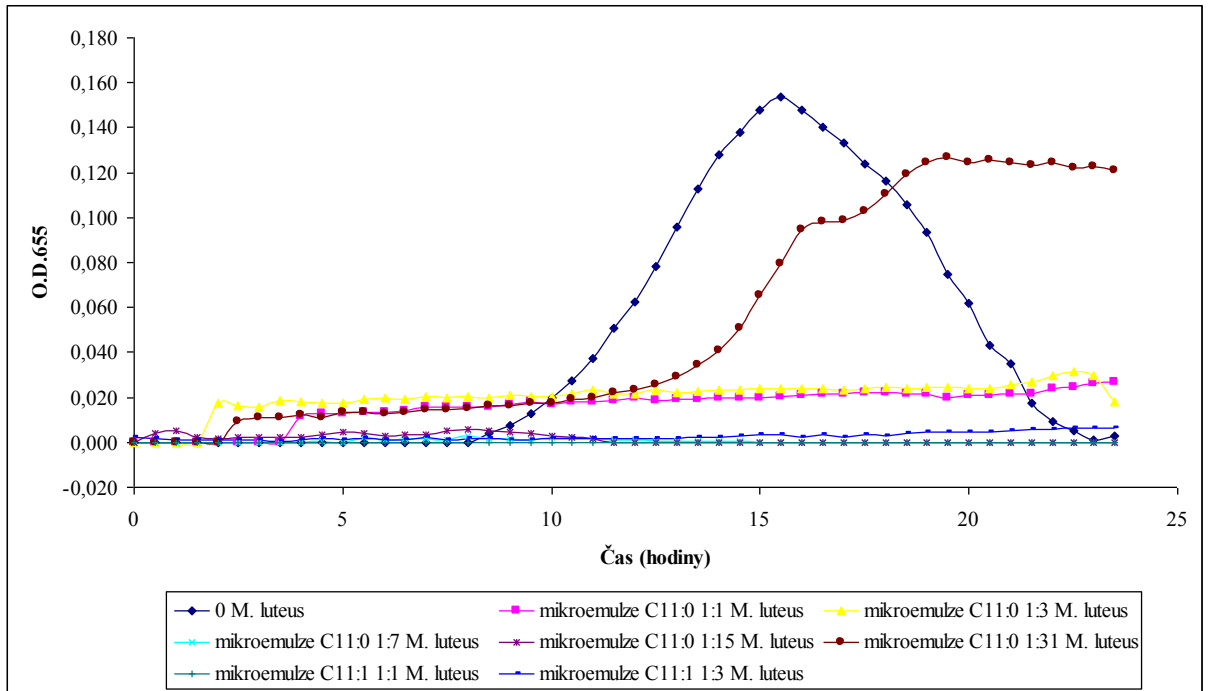
Obrázek PII 32. Vliv mikroemulze s MAG C_{11:0} a MAG C_{11:1} na růst *Bacillus cereus*



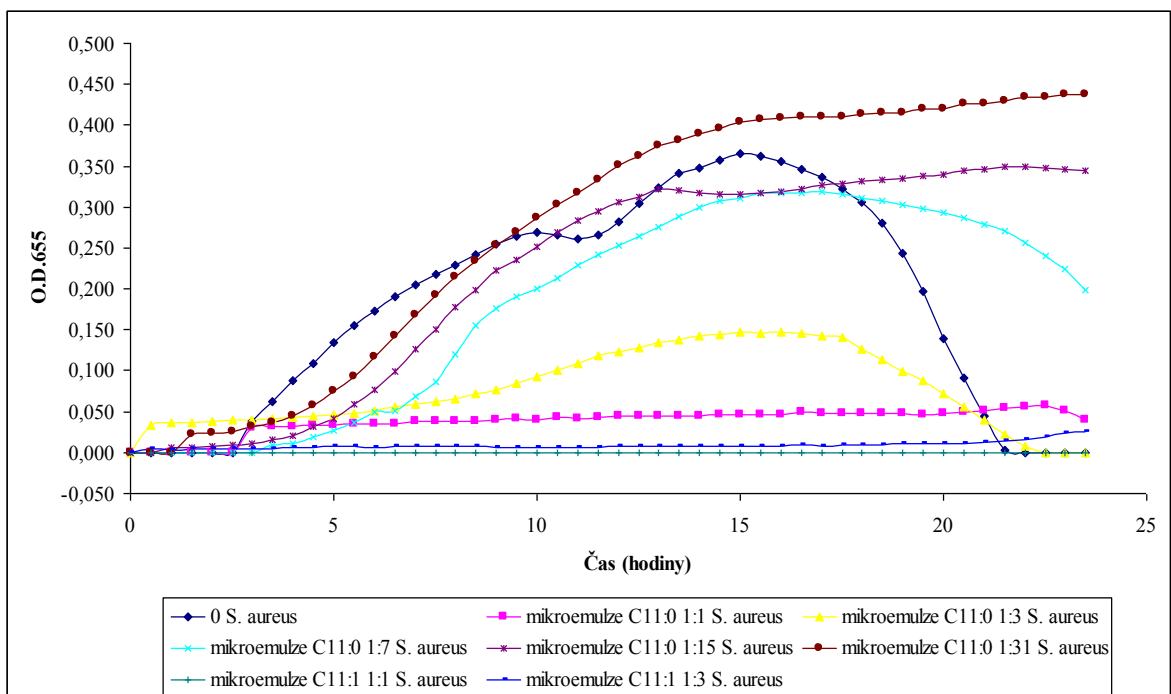
Obrázek PII 33. Vliv mikroemulze s MAG C_{11:0} a MAG C_{11:1} na růst *Bacillus subtilis*



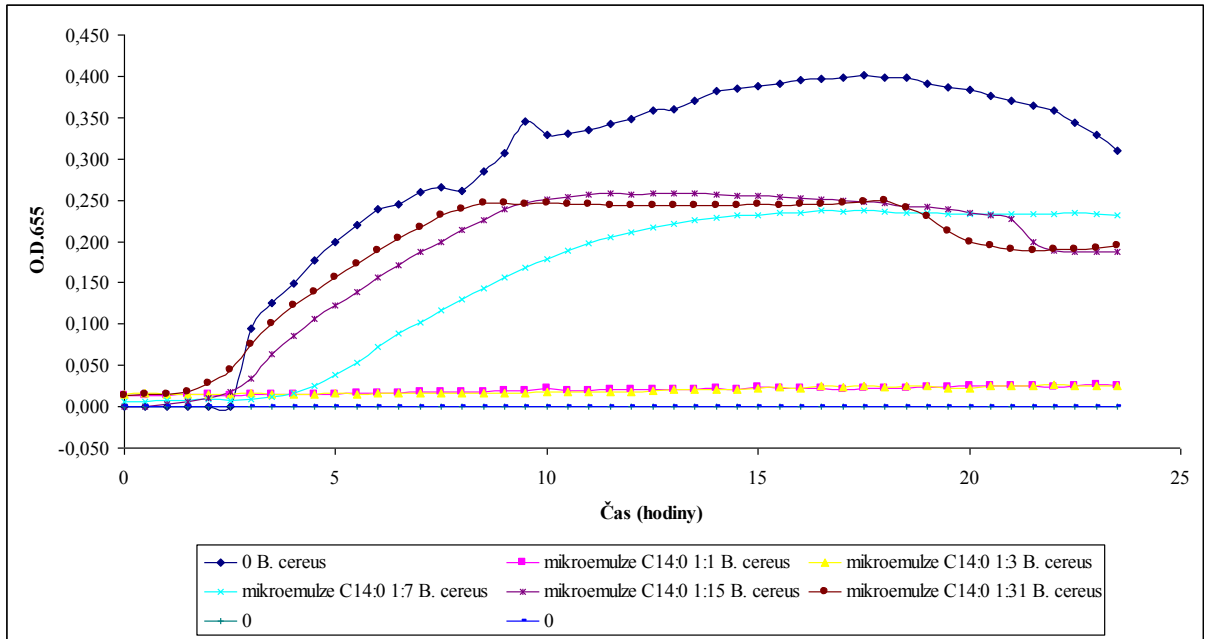
Obrázek PII 34. Vliv mikroemulze s MAG C_{11:0} a MAG C_{11:1} na růst *Enterococcus faecalis*



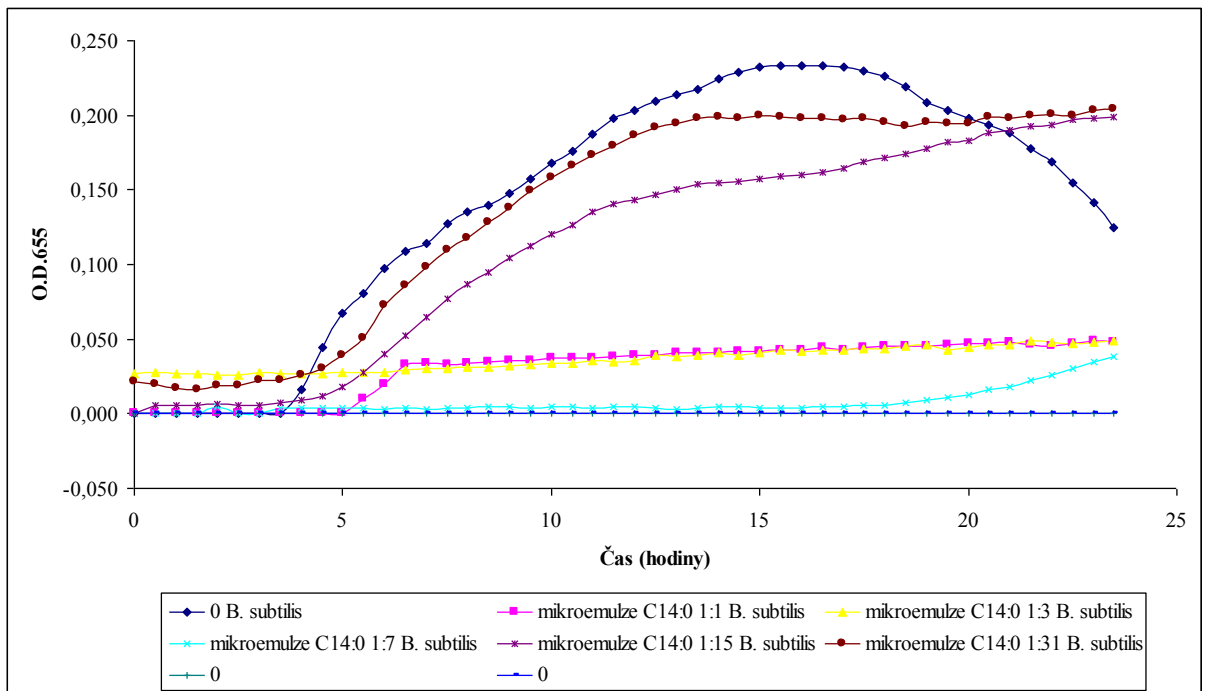
Obrázek PII 35. Vliv mikroemulze s MAG $C_{11:0}$ a MAG $C_{11:1}$ na růst *Micrococcus luteus*



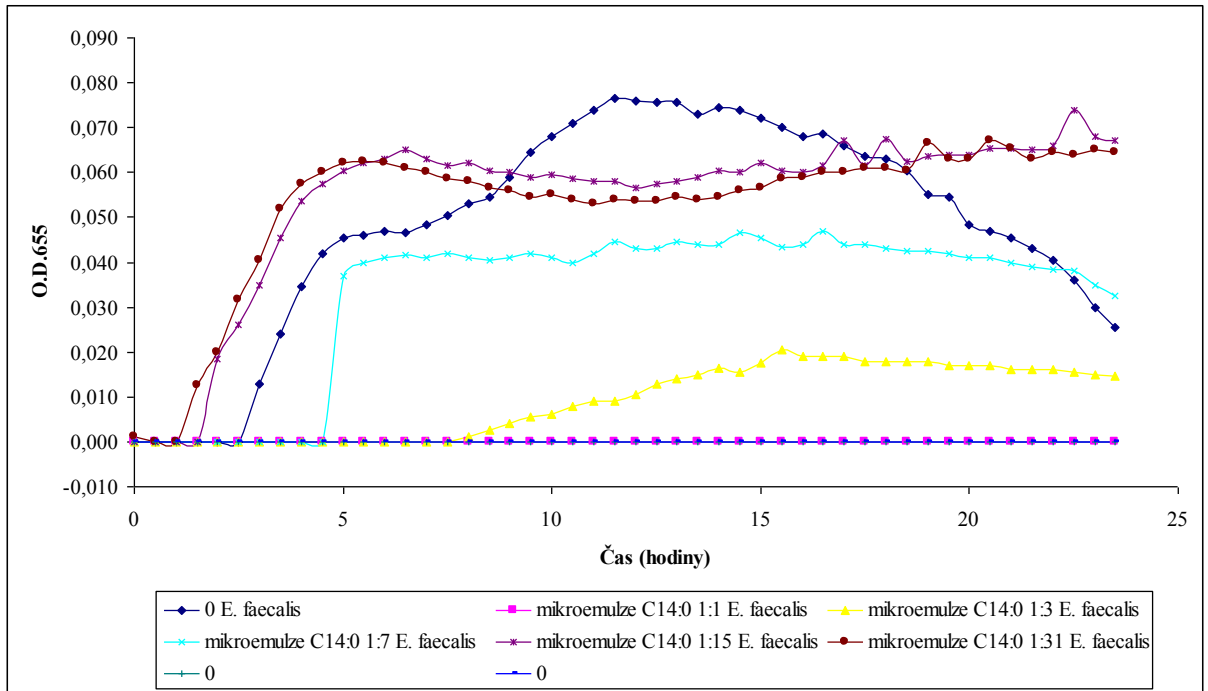
Obrázek PII 36. Vliv mikroemulze s MAG $C_{11:0}$ a MAG $C_{11:1}$ na růst *Staphylococcus aureus*



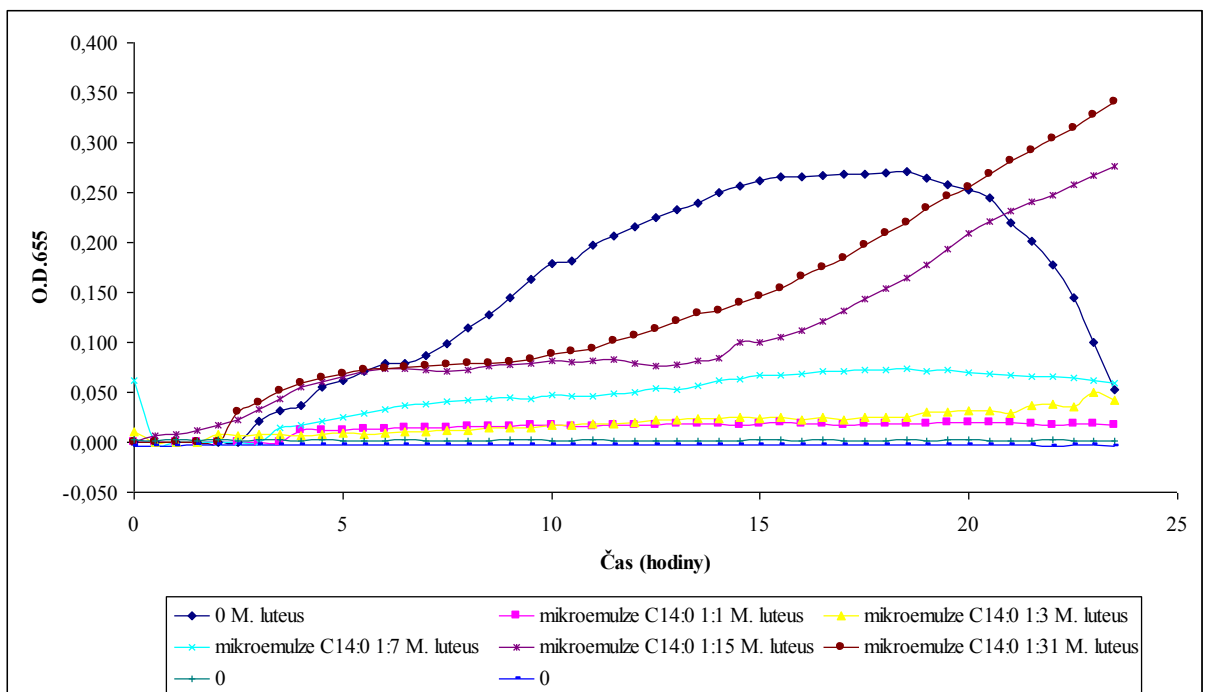
Obrázek PII 37. Vliv mikroemulze s MAG $C_{14:0}$ na růst *Bacillus cereus*



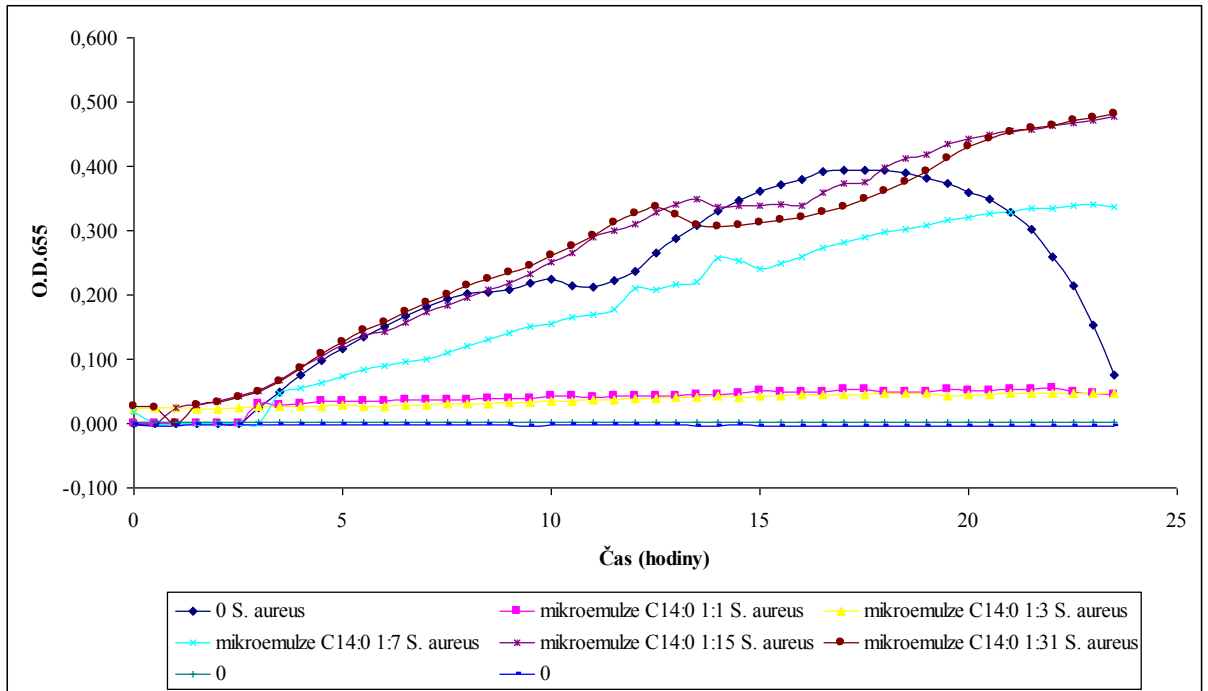
Obrázek PII 38. Vliv mikroemulze s MAG $C_{14:0}$ na růst *Bacillus subtilis*



Obrázek PII 39. Vliv mikroemulze s MAG C_{14:0} na růst *Enterococcus faecalis*

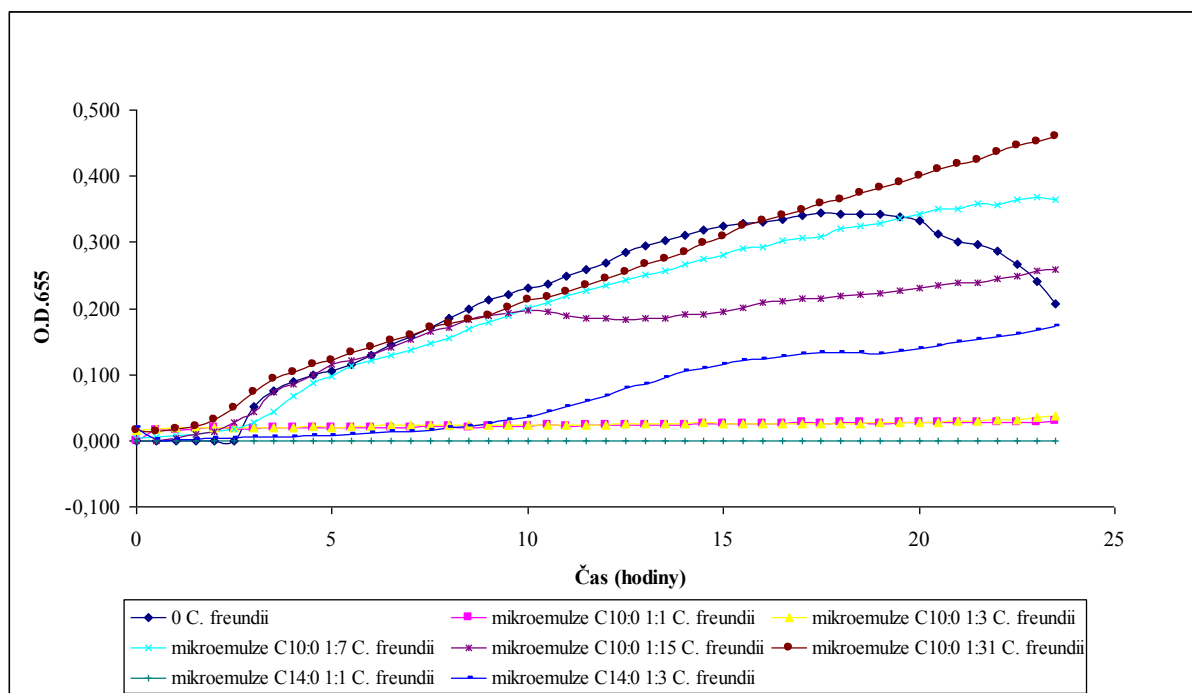


Obrázek PII 40. Vliv mikroemulze s MAG C_{14:0} na růst *Micrococcus luteus*

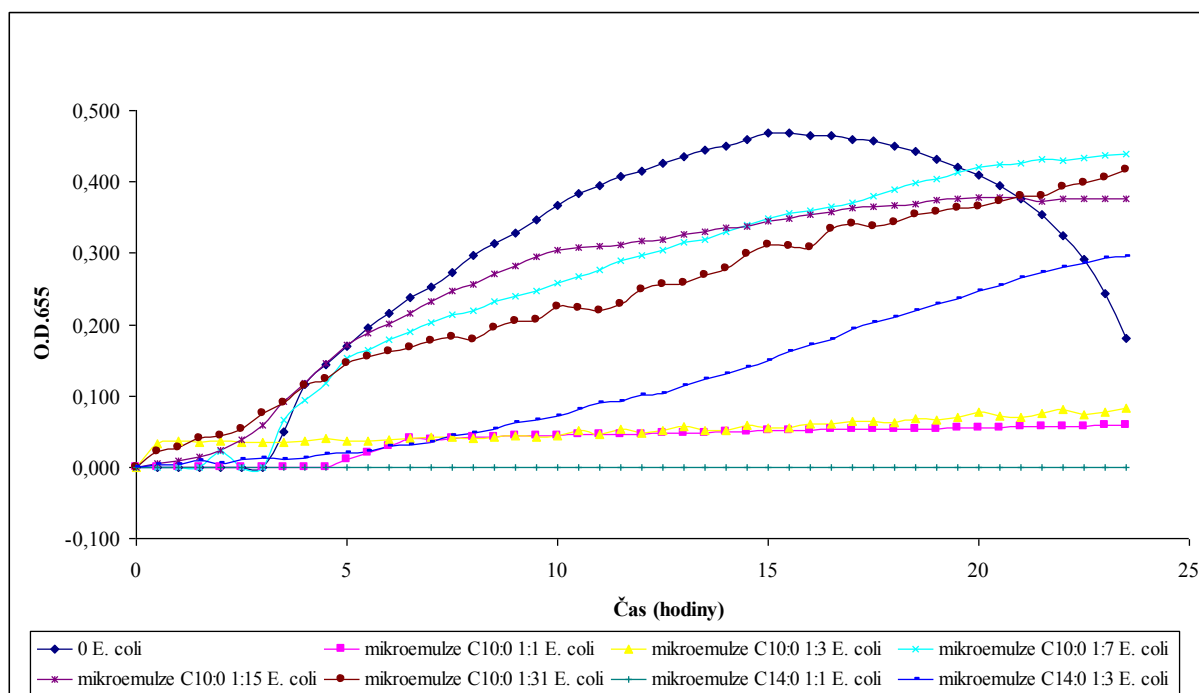


Obrázek PII 41. Vliv mikroemulze s MAG $C_{14:0}$ na růst *Staphylococcus aureus*

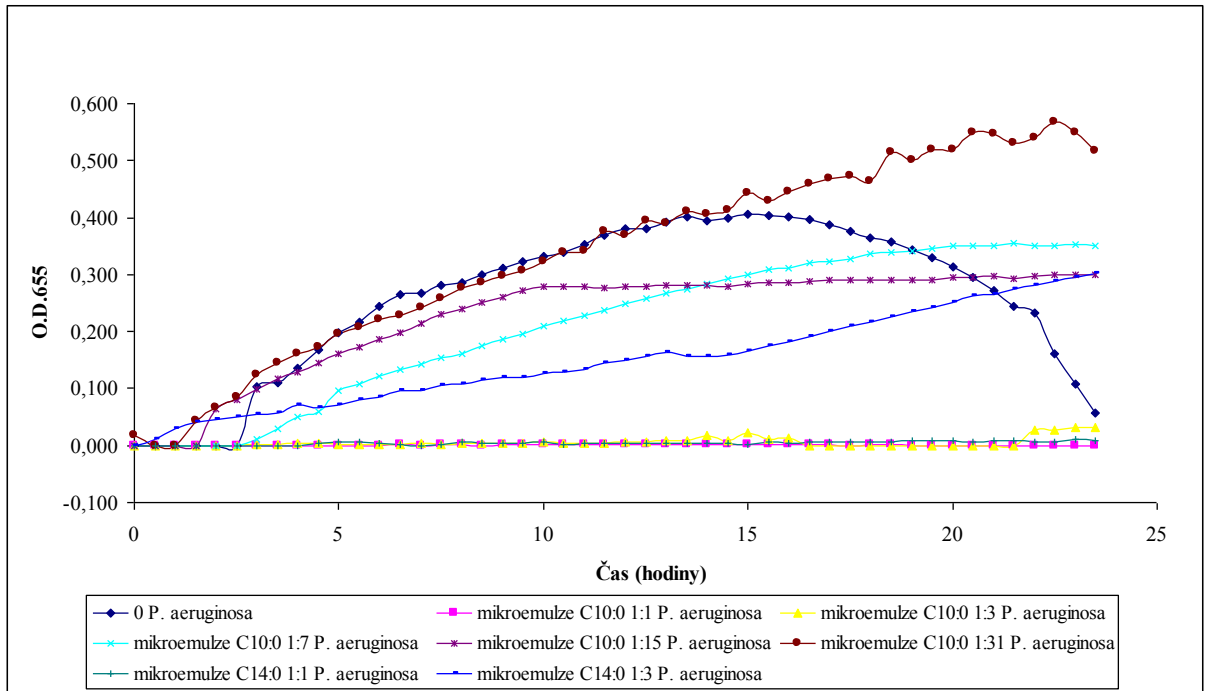
PŘÍLOHA PIII: Vliv mikroemulze monoacylglycerolů na růst gramnegativních bakterií



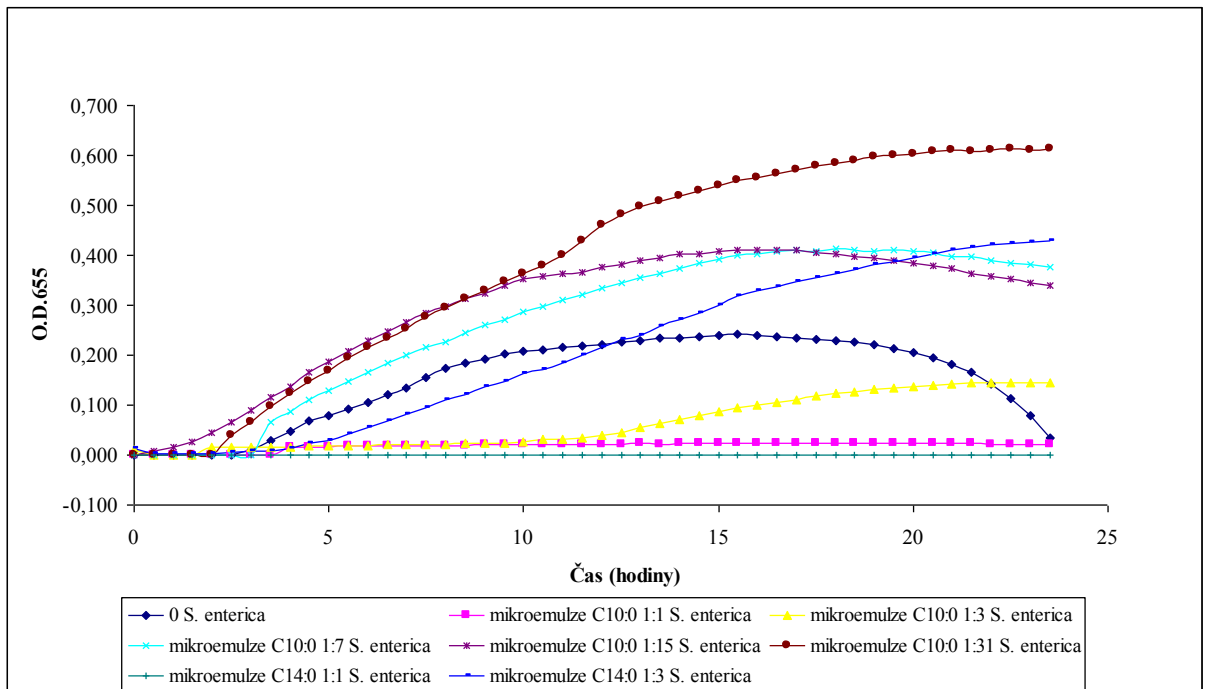
Obrázek PIII 42. Vliv mikroemulze s MAG $C_{10:0}$ a MAG $C_{14:0}$ na růst *Citrobacter freundii*



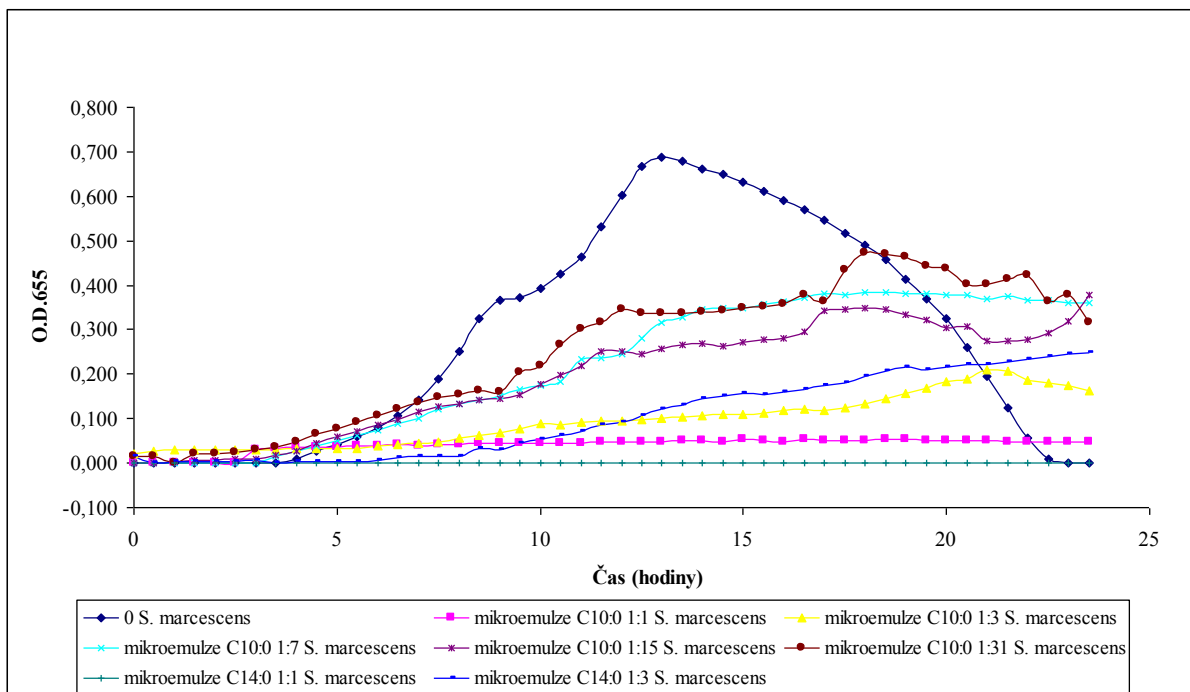
Obrázek PIII 43. Vliv mikroemulze s MAG $C_{10:0}$ a MAG $C_{14:0}$ na růst *Escherichia coli*



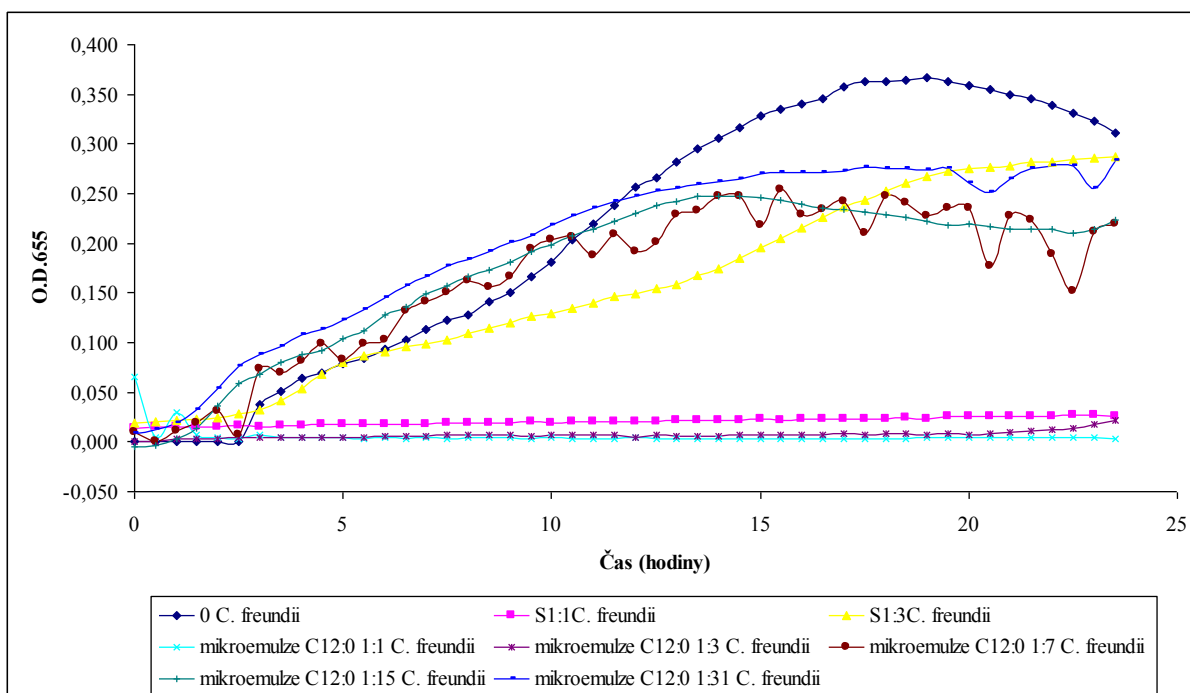
Obrázek PIII 44. Vliv mikroemulze s MAG C_{10:0} a MAG C_{14:0} na růst *Pseudomonas aeruginosa*



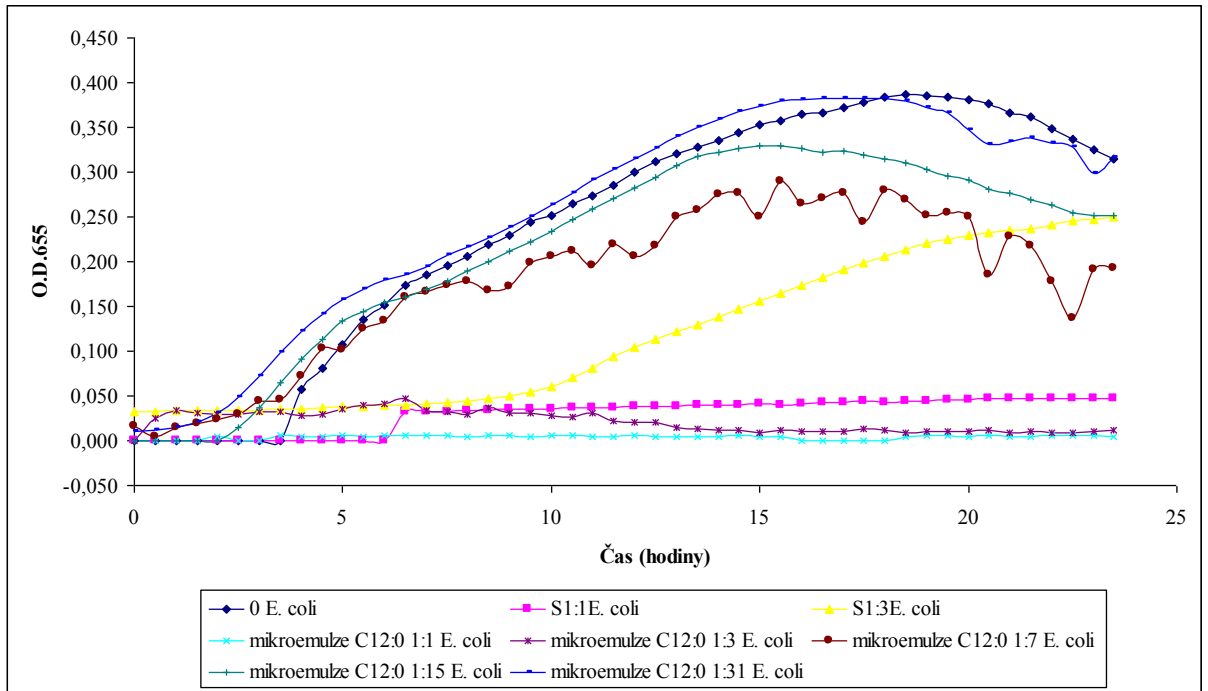
Obrázek PIII 45. Vliv mikroemulze s MAG C_{10:0} a MAG C_{14:0} na růst *Salmonella enterica*



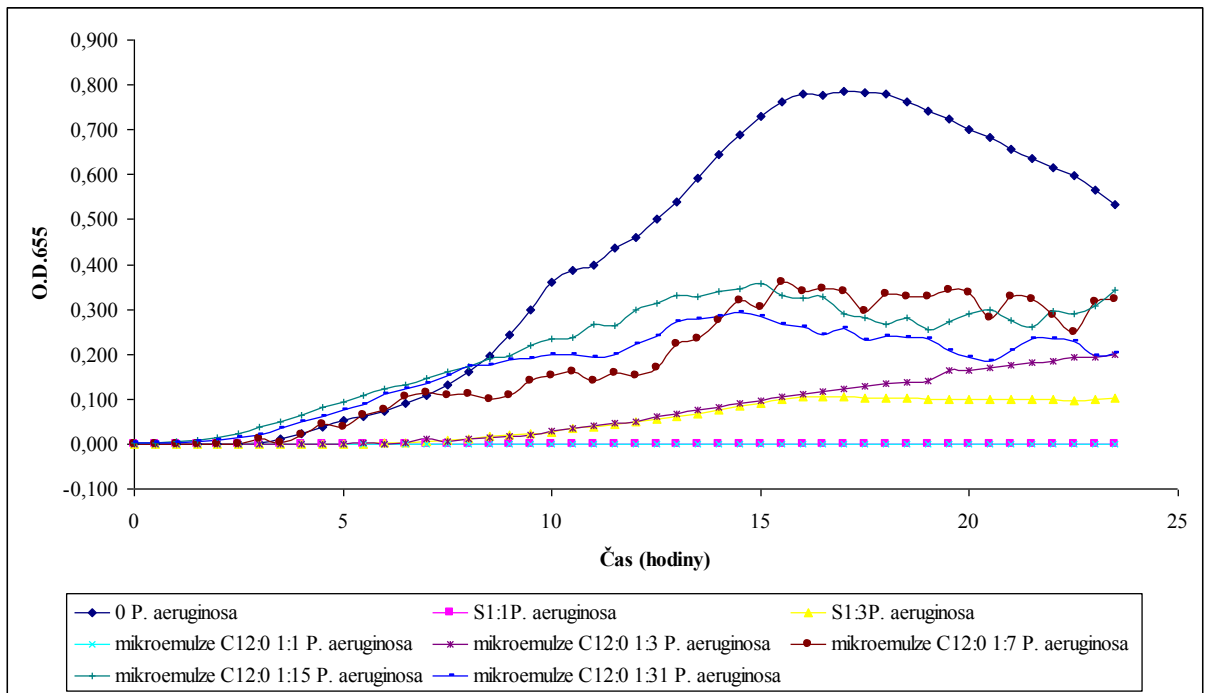
Obrázek PIII 46. Vliv mikroemulze s MAG C_{10:0} a MAG C_{14:0} na růst *Serratia marcescens*



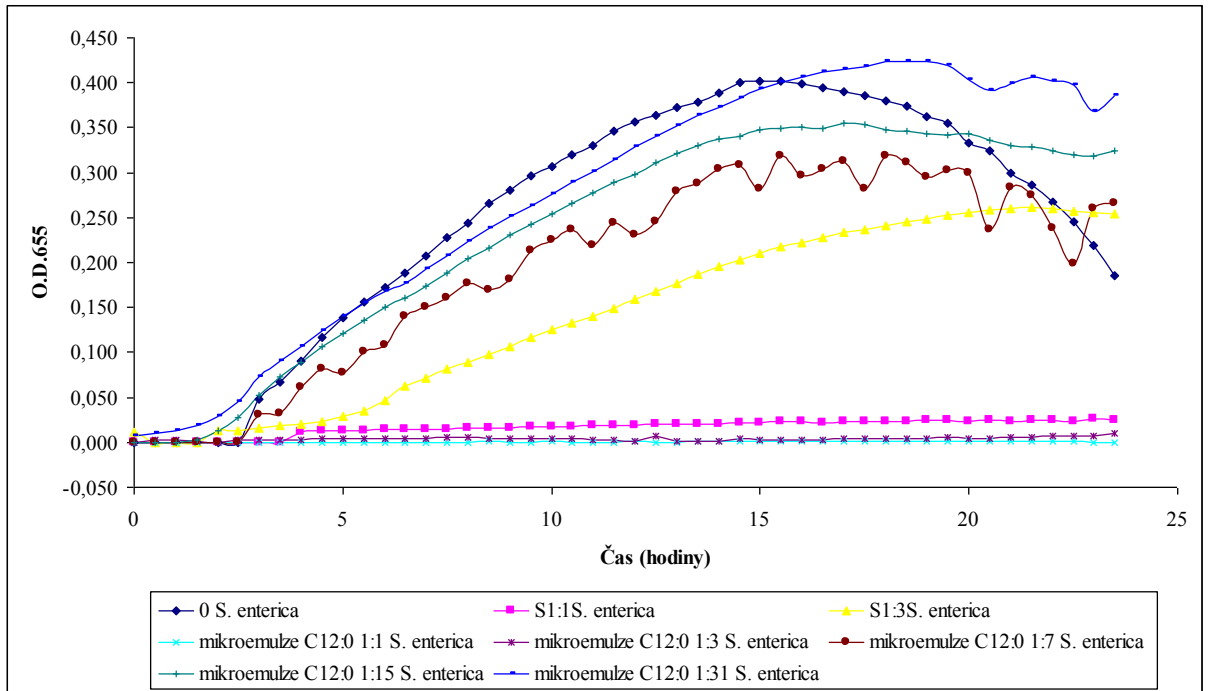
Obrázek PIII 47. Vliv mikroemulze s MAG C_{12:0} na růst *Citrobacter freundii*



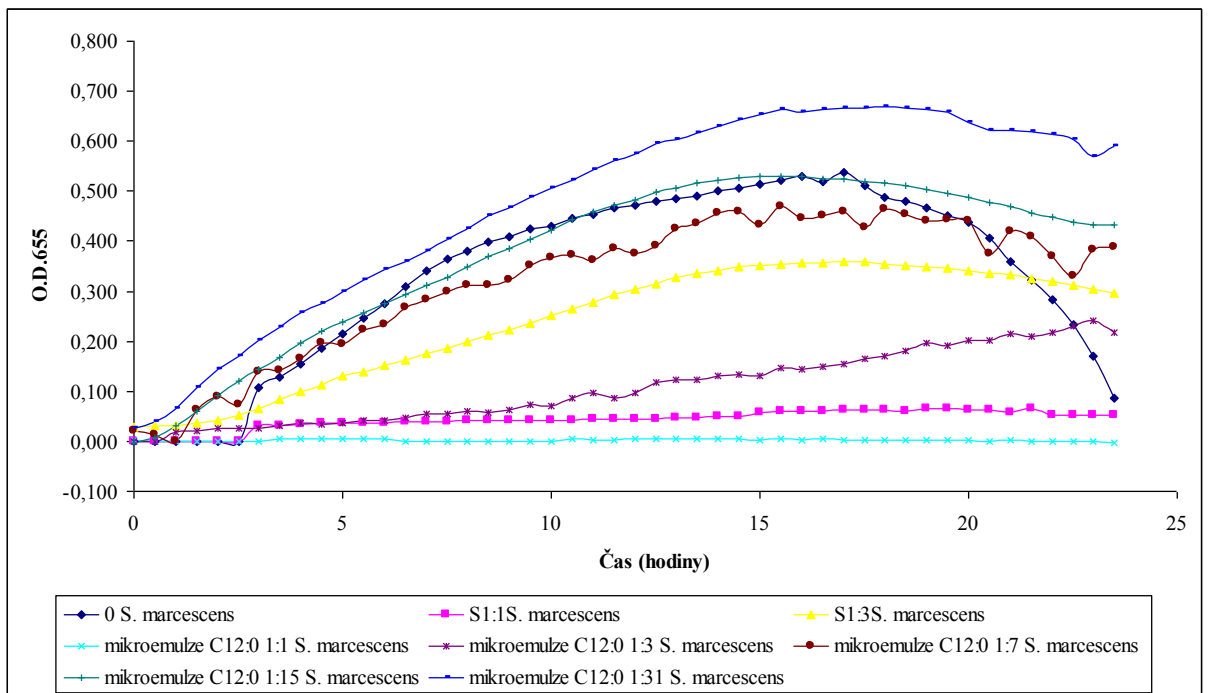
Obrázek PIII 48. Vliv mikroemulze s MAG $C_{12:0}$ na růst *Escherichia coli*



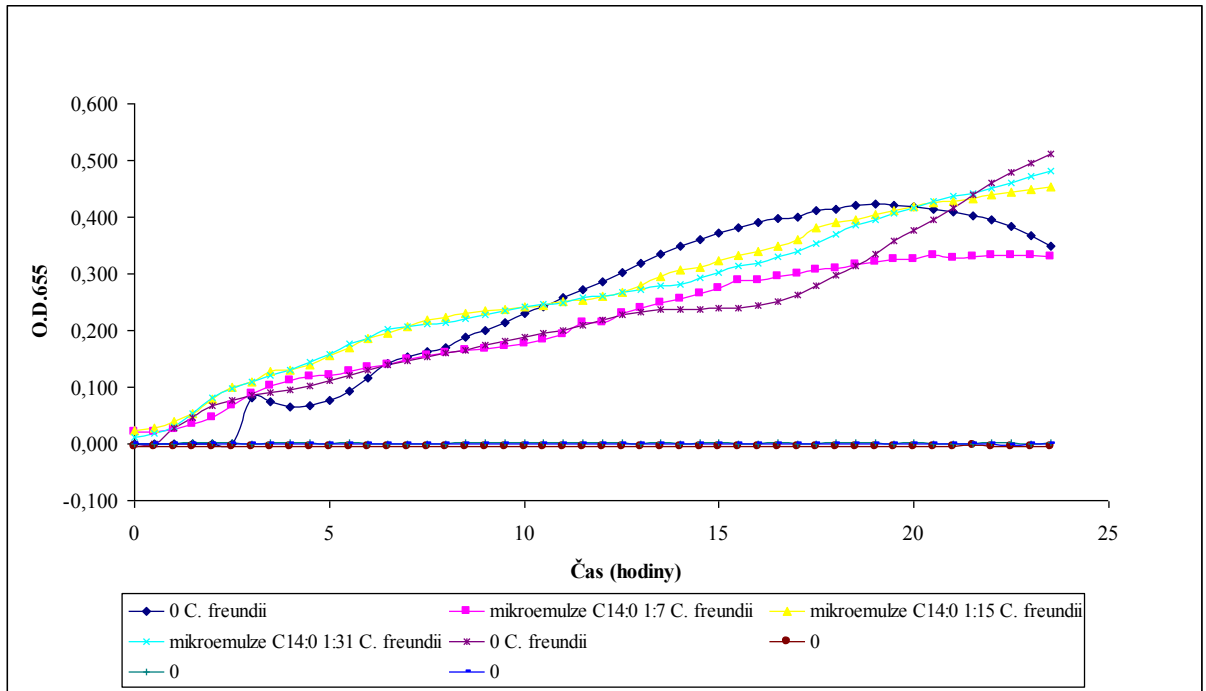
Obrázek PIII 49. Vliv mikroemulze s MAG $C_{12:0}$ na růst *Pseudomonas aeruginosa*



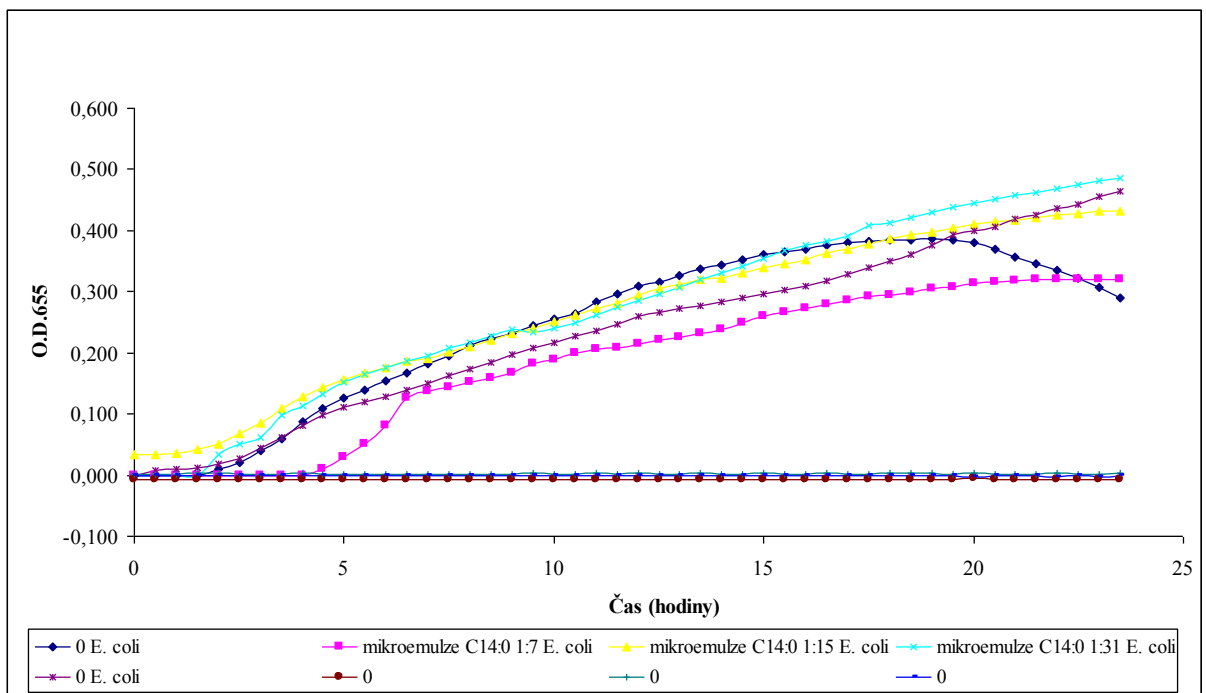
Obrázek PIII 50. Vliv mikroemulze s MAG $C_{12:0}$ na růst *Salmonella enterica*



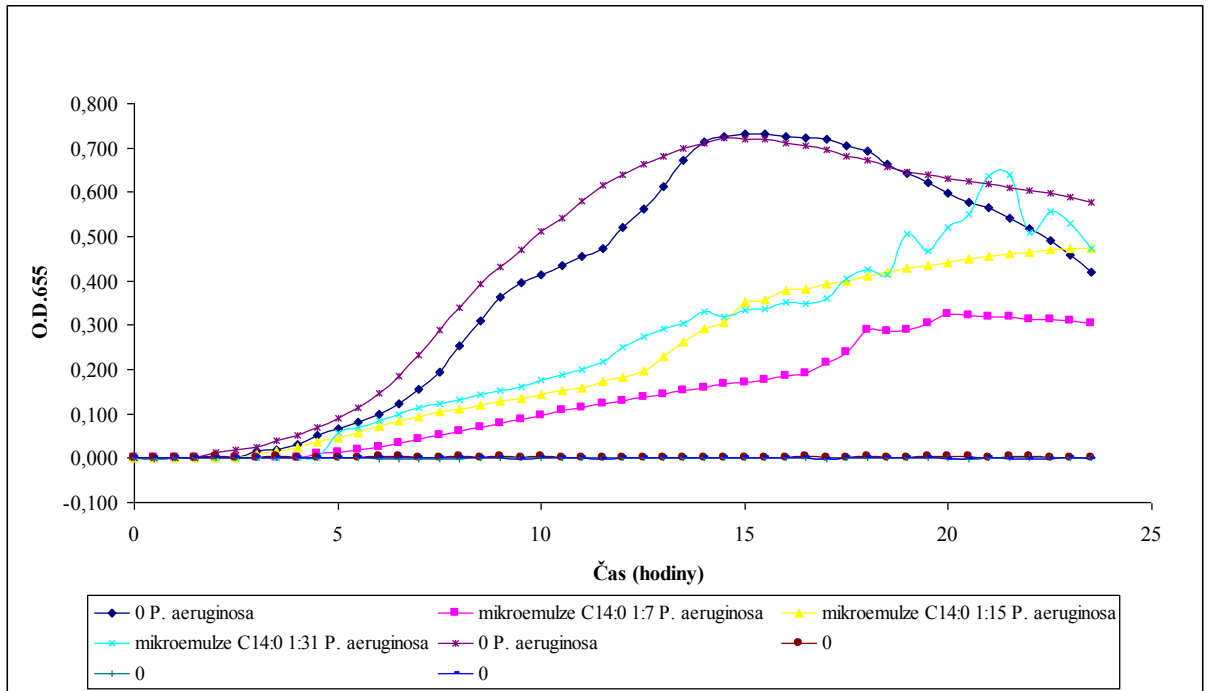
Obrázek PIII 51. Vliv mikroemulze s MAG $C_{12:0}$ na růst *Serratia marcescens*



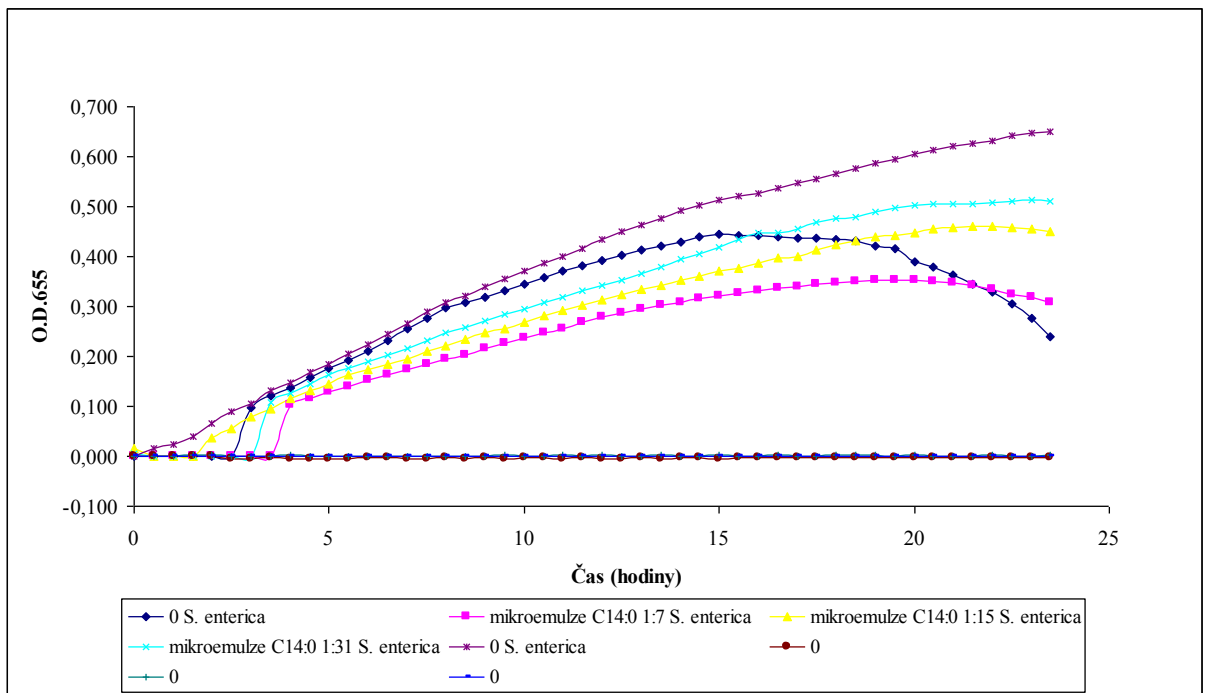
Obrázek PIII 52. Vliv mikroemulze s MAG $C_{14:0}$ na růst *Citrobacter freundii*



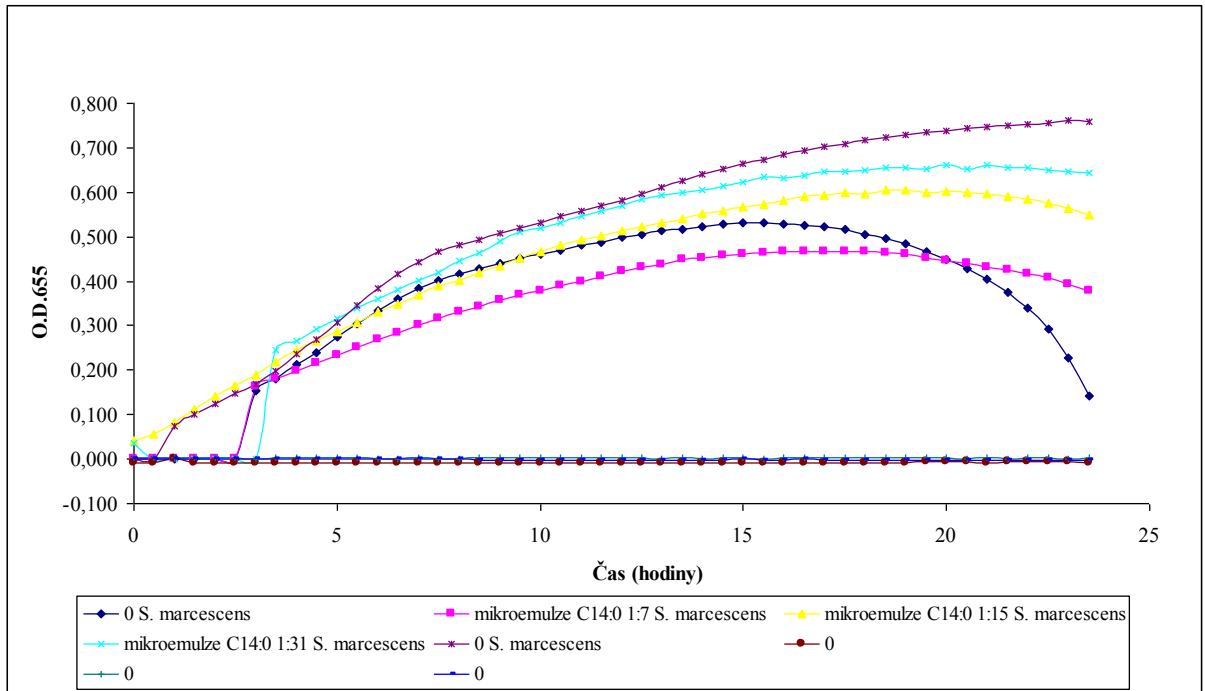
Obrázek PIII 53. Vliv mikroemulze s MAG $C_{14:0}$ na růst *Escherichia coli*



Obrázek PIII 54. Vliv mikroemulze s MAG C_{14:0} na růst *Pseudomonas aeruginosa*



Obrázek PIII 55. Vliv mikroemulze s MAG C_{14:0} na růst *Salmonella enterica*



Obrázek PIII 56. Vliv mikroemulze s MAG C_{14:0} na růst *Serratia marcescens*