



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VYUŽITÍ METOD FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ A STRUKTURNÍ ANALÝZY PŘI CHARAKTERIZACI BIOSURFAKTANTŮ

UTILIZATION OF METHODS OF PHYSICOCHEMICAL AND STRUCTURAL ANALYSIS IN
CHARACTERIZATION OF BIOSURFACTANTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Tomáš Nešpor

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1396/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Tomáš Nešpor**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Využití metod fyzikálně–chemické a strukturní analýzy při charakterizaci biosurfaktantů

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracovat literární rešerši na téma bakalářské práce.
2. Na základě literární rešerše vybrat metody fyzikálněchemické a strukturní analýzy v dispozici pracoviště vhodné pro studium biosurfaktantů.
3. Na různých typech biosurfaktantů otestovat a diskutovat využitelnost navržených metod.

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

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

Tomáš Nešpor
student(ka)

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá velmi aktuálním tématem biosurfaktantů. V teoretické části práce byla provedena literární rešerše na toto téma a na základě této rešerše byly vybrány techniky fyzikálně – chemické a strukturní analýzy vhodné k testování těchto látek. V praktické části byly nejprve modelové biosurfaktanty podrobeny charakterizaci standardními metodami využívanými ke studiu těchto látek. Jako standardní technika strukturní analýzy byla zvolena infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací. Jako příklad univerzální techniky pro studium agregačního chování byla využita tenziometrie. V další části práce byly navrženy a optimalizovány alternativní techniky využitelné pro rychlou a finančně nenáročnou fyzikálně - chemickou analýzu těchto látek. Jednalo se především o mikrodestičkový test a jeho upravené alternativy. Tudiž metody výhodné z hlediska spotřeby vzorku, ale zároveň účinné na potvrzení přítomnosti případně rámcové stanovení obsahu biosurfaktantu v roztoku. Výsledkem této práce je několik jednoduchých metod, které byly prokázány jako účinné při studiu biosurfaktantů.

Abstract

This bachelor thesis deals with the very actual topic of biosurfactants. In the theoretical part of the thesis, a literature review on this topic was carried out and on the basis of this research, physicochemical and structural analysis techniques suitable for testing these substances were selected. In the practical part, the model biosurfactants were first characterized by standard methods used to study these compounds. Fourier transform infrared spectrometry was chosen as a standard technique of structural analysis. As an example of a universal technique for the study of aggregation behavior was used tensiometry. In the next part of the thesis there were designed and optimized alternative techniques usable for fast and inexpensive physicochemical analysis of these substances. It was mainly a microplate assay and its modified alternatives. Thus, the methods of low sample consumption, but also effective in confirming the presence and a possible amount determination of the biosurfactant content in the solution. The result of this work is a few simple methods that have been proven effective in studying biosurfactants.

Klíčová slova

Biosurfaktant, Rhamnolipid, Sophorolipid, Fyzikálně – chemická analýza, Strukturní analýza, Kritická micelární koncentrace, Povrchové napětí

Keywords

Biosurfactant, Rhamnolipid, Sophorolipid, Physical chemistry analysis, structural analysis, Critical micelle concentration, Surface tension

NEŠPOR, Tomáš. *Využití metod fyzikálně-chemické a strukturní analýzy při charakterizaci biosurfaktantů*. Brno, 2019. Bakalářská práce, 50 s. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ing. Petr Sedláček Ph. D.

Prohlášení

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

.....

Tomáš Nešpor

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucímu práce Ing. Petru Sedláčkovi Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost, vstřícnost a především čas, který mi věnoval. Dále bych rád poděkoval Ing. Jitce Krouské Ph.D. za její ochotu a pomoc především při tenziometrických měřeních.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Biosurfaktanty	8
2.2	Rozdíly ve vlastnostech syntetických surfaktantů a biosurfaktantů	8
2.3	Struktura biosurfaktantů	8
2.3.1	Glykolipidy	9
2.3.2	Fosfolipidy a mastné kyseliny	10
2.3.3	Lipopeptidy	10
2.4	Agregáty amfifilních molekul – micely	11
2.5	Základní vlastnosti fázových rozhraní	12
2.5.1	Povrchové napětí	12
2.5.2	Smáčení a kontaktní úhel	12
2.6	Metody fyzikálně chemické a strukturní analýzy využitelné při studiu biosurfaktantů	13
2.6.1	Metoda Wilhelmyho destičky	13
2.6.2	Du Noüy kroužková tenziometrie	13
2.6.3	Blízká infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací	13
2.6.4	Analýza tvaru kapky	14
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	15
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	18
4.1	Použité přístroje a chemikálie	18
4.2	Metody strukturní analýzy	18
4.2.1	FT-IR spektrometrie	18
4.2.2	Termogravimetrická analýza	18
4.3	Stanovení CMC a povrchového napětí pomocí Du Noüy kroužkové tenziometrie	18
4.4	Stanovení kinetiky sorpce biosurfaktantu na rozhraní pomocí bublinového tenziometru	19
4.5	Analýza tvaru kapky	19
4.6	Vizuální metody	20
4.6.1	Výběr vhodného substrátu pro vizuální metody	20
4.6.2	Metoda rozlévání kapky	22
4.6.3	Mikrodestičkový test	22
4.6.4	Metody založené na pozorování optických vlastností kapky	22
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	23
5.1	Metody strukturní analýzy	23
5.1.1	FT-IR spektrometrie	23
5.1.2	Termogravimetrická analýza	24
5.2	Kroužkový tenziometr	26
5.3	Bublinový tenziometr	28

5.4	Analýza tvaru kapky	30
5.4.1	Orientační měření.....	30
5.4.2	Měření v okolí CMC	33
5.5	Metoda rozlévání kapky	34
5.6	Mikrodestičkový test	36
5.7	Navržené metody založené na pozorování optických vlastností kapky	37
5.7.1	Využití polyesterového archu NeverTear	40
6	ZÁVĚR.....	43
7	BIBLIOGRAFIE	44
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	48
9	PŘÍLOHY	49

1 ÚVOD

S postupným vývojem lidské společnosti narůstají celkové nároky na komerčně dostupné prostředky typu pracích prášků, mýdel či průmyslově využívaných emulgátorů. Tyto prostředky jsou dnes ve velké míře získávány chemickou produkcí.

Zvyšují se však ekologické požadavky na výrobu těchto látek a to jak ze strany jednotlivých firem, tak široké veřejnosti. Trendem je v dnešní době šetrnost k životnímu prostředí, tudíž je vyžadována ideálně kompletní biodegradabilita těchto látek v co nejkratším časovém rozmezí. U syntetických látek je tohoto ovšem velmi náročné dosáhnout a je nutné hledat stejně účinné, za to však lépe biodegradabilní alternativy. Vhodné se proto jeví látky získané přírodní cestou.

Takovéto povrchově aktivní látky přírodního původu se obecně dají nazvat jako biosurfaktanty. Jedná se o látky amfifilní povahy produkované různými druhy bakterií, které mají schopnost snižovat povrchové napětí látek a zároveň jsou díky své amfifilní povaze schopné tvořit micely. Jsou schopné sloužit jako emulgátory a zároveň by měly být naprosto ekologicky nezávadné.

Využití těchto látek ovšem nekončí pouze u klasických emulgátorů. Uvažuje se jejich komerční využívání například v kosmetice, farmacii, zemědělství či potravinářství.

Tato práce je zaměřená na vymezení fyzikálněchemických metod a metod strukturní analýzy vhodných pro charakterizaci těchto látek. Pomocí těchto metod by poté mělo být možné stanovit účinky jednotlivých druhů biosurfaktantů a jejich ideální využití. Kromě standardních analytických metod, které poskytují komplexní charakterizaci biosurfaktantů (ovšem za cenu větších instrumentálních nároků, které jsou spojeny s nižší dostupností), se práce ve své experimentální části zaměřuje na jednoduché laboratorní testy, které by mohly sloužit jako levná a univerzálně dostupná alternativa pro rutinní analýzy, zaměřené primárně na potvrzení přítomnosti biosurfaktantu, případně na semi-kvantitativní stanovení jeho obsahu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Biosurfaktanty

Biosurfaktanty jsou látky amfifilní povahy, to znamená, že ve své struktuře obsahují jak hydrofilní část (část schopná vázat vodu), tak hydrofobní část (část odpuzující vodu). Jedná se o látky produkované různými druhy mikroorganismů. Díky jejich přírodnímu původu jsou také dobře odbouratelné a většinou nejsou schopné se kumulovat v prostředí. To výrazně snižuje ekologickou zátěž při používání těchto látek. Jejich hlavním úkolem v komerčním použití je snižování povrchového napětí, k čemuž využívají mechanismy obdobné chemicky syntetizovaným surfaktantům.

Mikroorganismy produkují tyto látky především kvůli jejich schopnosti snižovat povrchové napětí vodných roztoků. To jim pomáhá při růstu v prostředí s podmínkami mimo optimum daného organismu. Zároveň jim tyto látky umožňují získávat živiny z tohoto prostředí, právě díky solubilizačním schopnostem amfifilních molekul biosurfaktantů. V neposlední řadě pomáhají při adhezenci jednotlivých buněčných struktur [1].

Dalším důvodem produkce těchto látek je jejich antimikrobiální aktivita vůči jiným druhům mikroorganismů, které nejsou schopny tyto látky účinně odbourávat. Principem antimikrobiální aktivity látek na bázi cyklických lipopeptidů je jejich schopnost kumulace na povrchu mikrobiální buňky. Po dosažení určité koncentrace biosurfaktantu na povrchu buňky dojde k rozrušení membrány a její desintegraci. Látky na bázi rhamnolipidů jsou poté schopny, díky svým detergentním vlastnostem, ovlivňovat strukturu a propustnost fosfolipidové membrány. To má za následek pozměněný průtok živin a metabolismů skrz membránu [2].

2.2 Rozdíly ve vlastnostech syntetických surfaktantů a biosurfaktantů

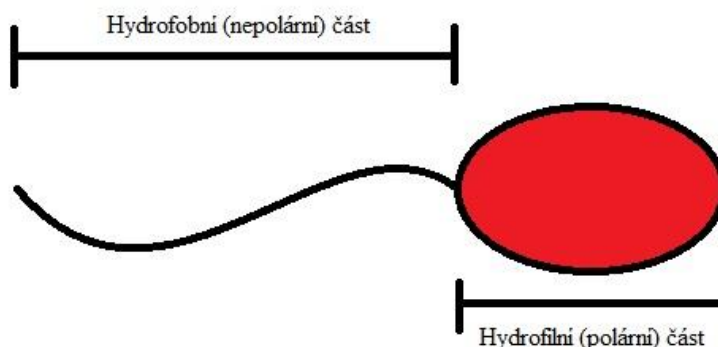
Základním rozdílem mezi synteticky vytvářenými surfaktanty a mikrobiálně produkovanými biosurfaktanty je v jejich degradabilitě. Na rozdíl od syntetických látek jsou biosurfaktanty v přírodě přirozeně odbouratelné a nejsou tedy nebezpečné pro životní prostředí. Kultivace mikroorganismů produkujících tyto látky je většinou poměrně levná z důvodu dobře dostupných kultivačních medií. Některé druhy biosurfaktantů vykazují také značnou odolnost vůči zhoršeným podmínkám prostředí. Snášejí například relativně vysoké teploty či pH. Zároveň však vykazují obdobné fyzikálněchemické vlastnosti jako jejich syntetické analogy, například vykazují obdobnou schopnost snižování povrchového napětí vody [1].

2.3 Struktura biosurfaktantů

Naprostá většina biosurfaktantů má molekulovou hmotnost v rozmezí 500 – 1500 Daltonů. Společně mají své amfifilní vlastnosti – všechny obsahují polární hydrofilní hlavičku a nepolární (uhlovodíkový) zbytek, který je hydrofobní (*Obrázek 1*). Největší zastoupení mají biosurfaktanty neutrální, případně anionové povahy. Kationové sloučeniny tohoto typu se v přírodě téměř nenachází, pravděpodobně z důvodu jejich antimikrobiální povahy [3].

Hydrofobní část se standardně skládá z nasycených či nenasycených mastných kyselin, hydroxylových mastných kyselin, mastných alkoholů, případně ze struktur podobných isoprenoidům. Délka uhlovodíkového řetězce se ve většině případů pohybuje mezi 8 a 18

atomy uhlíku. Hydrofilní část se poté skládá z esterů, hydroxylů, fosfátů, ale také sacharidů, peptidů či bílkovin [4].



Obrázek 1 - Struktura amfifilní molekuly

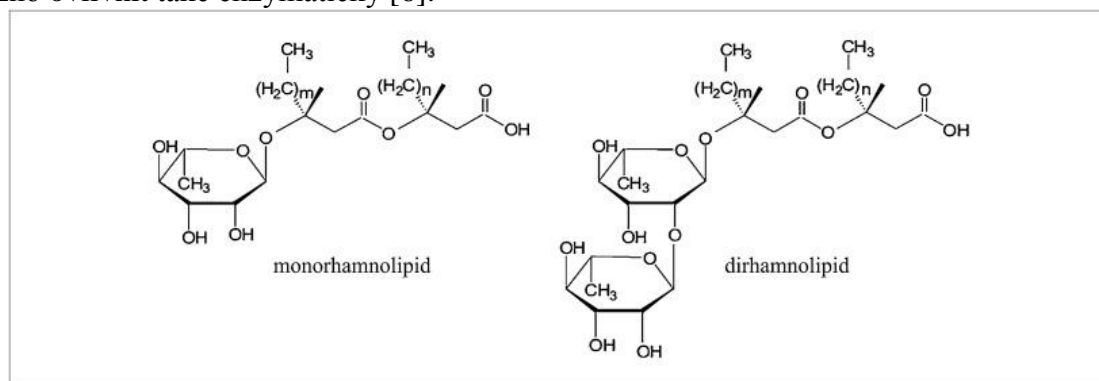
2.3.1 Glykolipidy

Jedná se o nejrozšířenější skupinu biosurfaktantů. Strukturně obsahují mastnou kyselinu a cukernou složku. Podle této cukerné složky se poté dělí do podskupin, jako jsou například rhamnolipidy, sophorolipidy, trehalolipidy a jiné. Glykolipidy se vyznačují svými zajímavými vlastnostmi, jako je například schopnost snášet extrémní podmínky pH, teploty či salinity.

Jelikož se jedná o velmi obsáhlou skupinu, využívají se tyto látky v různých odvětvích. Využití nacházejí například v těžkém průmyslu, díky jejich schopnosti odstraňovat ropné zbytky z prostředí. Díky jejich antimikrobiálním a teoreticky antikarcinogenním vlastnostem se diskutuje jejich využití v biomedicíně. V neposlední řadě je možné je využít v zemědělství jako pesticidy, případně v potravinářském průmyslu jako konzervanty [5].

2.3.1.1 Rhamnolipidy

Rhamnolipidy jsou v dnešní době pravděpodobně nejpoužívanější biosurfaktanty, především díky jejich široké škále využití. Základní strukturou rhamnolipidů je β -hydroxy mastná kyselina, která je svým karboxylovým koncem připojena k cukernaté molekule rhamnosy. V přírodě se nacházejí buď ve formě monorhamnolipidu nebo dirhamnolipidu (Obrázek 2). Typ produkovaného rhamnolipidu závisí na jednotlivých mikroorganismech, některé jsou schopné produkovat pouze jeden typ a jiné oba zároveň. Typ produkovaného rhamnolipidu je možno ovlivnit také enzymaticky [6].



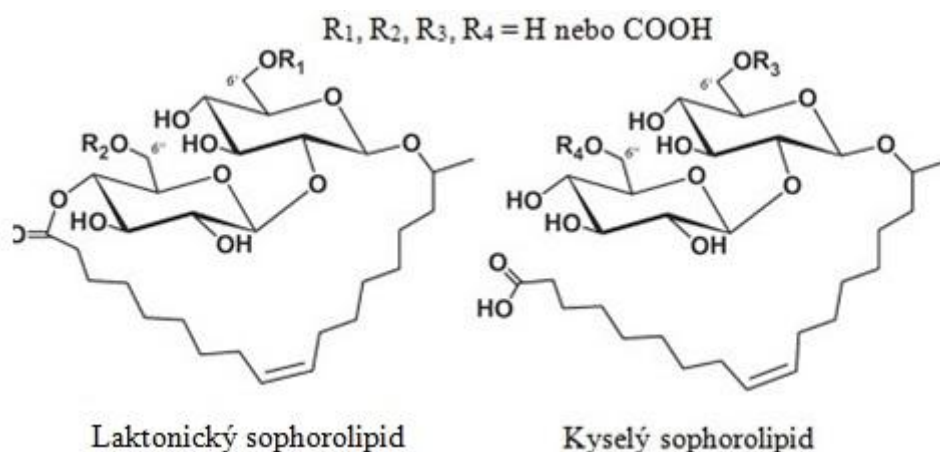
Obrázek 2- Struktura monorhamnolipidu a dirhamnolipidu [7]

2.3.1.2 Sophorolipidy

Sophorolipidy jsou látky složené ze dvou molekul sophorosa navázaných na jeden dlouhý řetězec karboxylové kyseliny. Délka a případně i stavba karboxylové kyseliny často záleží na médiu použitém při kultivaci sophorolipidy produkujících organismů. Běžná délka karboxylové kyseliny je řádově 16 – 18 uhlíků.

Sophorolipidy se nacházejí ve dvou různých konformacích, mohou být kyselé nebo laktonické (Obrázek 3). Tyto dvě struktury se nijak zásadně neliší svými fyzikálněchemickými vlastnostmi – obě například stejnou mírou ovlivňují mezifázové napětí, ale pouze laktonická forma inhibuje růst některých mikroorganismů.

Kyselá struktura se označuje jako otevřená a je vytvořena navázáním karboxylové kyseliny přes hydroxylovou skupinu k molekule sophorosa. Laktonická forma je navázána obdobně, ale volná karboxylová skupina je vázána na cukernatou složku za vytvoření cyklické struktury [8].



Obrázek 3 - Struktura laktonického a kyselého sophorolipidu [7]

2.3.2 Fosfolipidy a mastné kyseliny

Pokud mikroorganismy rostou na určitých médiích, jsou schopné extracelulárně produkovat látky, které se běžně v extracelulární formě nenachází – jako například fosfolipidy. Fosfolipidy jsou hlavní složkou buněčných membrán a pomáhají v buňce udržovat homeostázu. Molekuly fosfolipidů jsou schopné produkovat například bakterie rodu *Acinetobacter* či *Aspergillus* při růstu na médiu s obsahem hexadekanu.

Mastné kyseliny jsou v mikroorganismech produkovány oxidací alkanů. Největší vliv na změnu povrchové napětí mají mastné kyseliny, které obsahují řetězce složené z 12 až 14 uhlíkových atomů [4].

2.3.3 Lipopeptidy

Tyto molekuly se skládají z hydrofilní peptidové části a z hydrofobní lipidické části. Lipidická část se skládá z 15 až 17 uhlíkatých mastných kyselin. Jednotlivé lipopeptidy se mohou lišit jak strukturou, tak velikostí peptidické části.

Nejrozšířenějším lipopeptidickým biosurfaktanem je surfactin. Jedná se o cyklickou molekulu. Je hojně diskutován díky svému výraznému vlivu jak na snižování povrchového

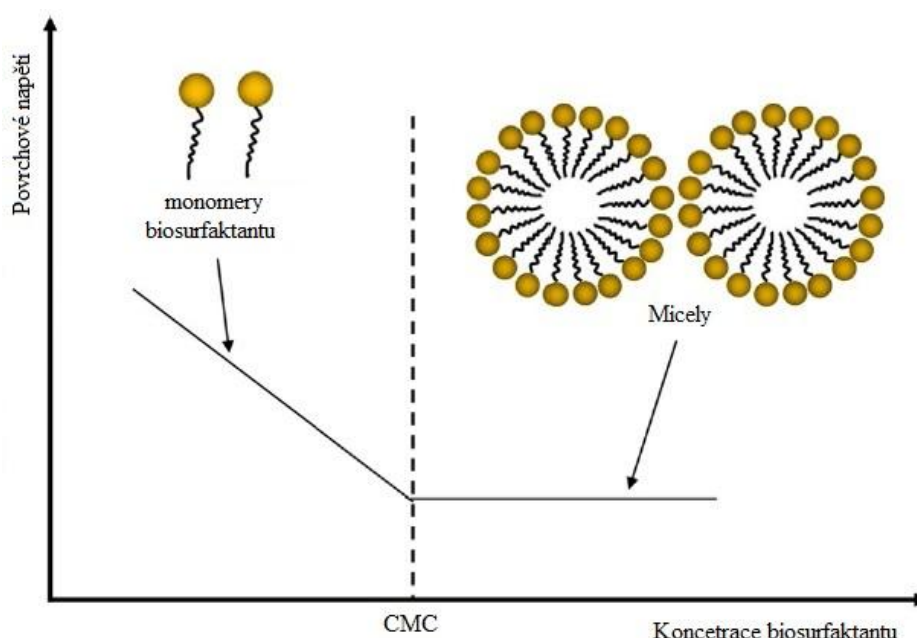
napětí, tak jako antivirotické, antibakteriální a antitumorální činidlo. Vysoký vědecký zájem je o něj především v oborech biotechnologických a medicínských [9].

2.4 Agregáty amfifilních molekul – micely

Povrchově aktivní látky se v roztoku primárně chovají jako asociační koloidy, to znamená, že při vyšších koncentracích mají tendenci vytvářet agregáty koloidních rozměrů, které se nazývají micely. Tyto struktury jsou udržovány v rovnováze s ionty či molekulami ze kterých jsou vytvořeny.

Micely mají velmi výrazný vliv na chování roztoku povrchově aktivní látky. Na stupnici koncentrací se nachází poměrně malé rozmezí koncentrací, pod jehož hranicí se v roztoku nenacházejí téměř žádné micely a po překročení této koncentrační hranice, každá další molekula v roztoku agreguje s ostatními a vytváří micelu (Obrázek 4).

Vlastnosti roztoku se poté mění v závislosti na koncentraci povrchově aktivní látky a jejich změna je vázaná především na toto malé rozmezí koncentrací, jež se nazývá jako kritická micelární koncentrace (případně kritická micelizací koncentrace) ve zkratce CMC [11].



Obrázek 4 - Tvorba micel v závislosti na koncentraci [10]

Reverzní micela (případně inverzní) je útvar, ve kterém se hydrofobní část amfifilní molekuly natáčí směrem ven z micely, zatímco hydrofilní část se natáčí směrem dovnitř. K tvorbě takovéto micely dochází v nepolárních rozpouštědlech. Efekt kritické micelární koncentrace není v takových případech pozorován.

Pokud se v roztoku nachází molekuly látky opačné polaroty, dochází k zakomponování této molekuly do micely. U standardních micel poté tedy bude nepolární látka solubilizována uvnitř micely, obklopena hydrofobními částmi amfifilních molekul tvořících micelu [11].

2.5 Základní vlastnosti fázových rozhraní

2.5.1 Povrchové napětí

Povrchové napětí vyjadřuje tendenci kapaliny zůstat v energeticky nejvýhodnějším stavu o nejmenším povrchu, tudíž v kapce tvaru koule. Koule má vždy oproti tělesu se stejným objemem menší povrch.

Pro molekuly kapaliny je energeticky nejvýhodnější být v obklopení ostatních molekul této kapaliny. Molekuly na povrchu kapaliny jsou však obklopeny pouze částečně. Při snaze dostat molekulu z energeticky výhodného stavu (tj. ze středu kapaliny) do povrchové vrstvy je tak potřeba dodat energii. Tato energie se nazývá jako povrchová energie [12].

Dle Laplaceovy rovnice je dodatkový tlak působící na povrch kapaliny z jejího objemu ovlivněn zakřivením povrchu kapaliny a jejím povrchovým napětím. Společně s gravitační silou a vazebnými podmínkami tvoří tato rovnice základ pro určení typu mezifázových rozhraní. Podle této vlastnosti je poté možné zjistit velikost povrchového (případně mezifázového) napětí. Stálé rozhraní se většinou používá k přímým stanovením povrchového napětí z důvodu jejich přesnějších a jednodušejší získatelných výsledků než u nepřímého stanovení, jako je například měření kontaktního úhlu kapky. Kapilární metody zkoumající maximální tlak uvnitř bubliny se využívají k měření dynamiky reakcí roztoků na změnu mezifázového povrchu.

Surfaktanty snižují hodnotu povrchového napětí díky jejich zvyšující se koncentraci na mezifázovém rozhraní, a to v závislosti na rychlosti jejich molekulární difuze. S rostoucí velikostí mezifázového rozhraní se plošná koncentrace surfaktantu snižuje. Smykové napětí způsobené prouděním kapaliny v roztoku může být zodpovědné za zvyšování koncentrace molekul surfaktantu a tím pádem snižovat povrchové napětí a zároveň působit proti tomuto proudění. Tento negativní gradient je základem takzvaného Marangoniho efektu, který spolu s mechanickou bariérou tvořenou vrstvou molekul surfaktantu odpovídá za stálost emulzí a pěn.

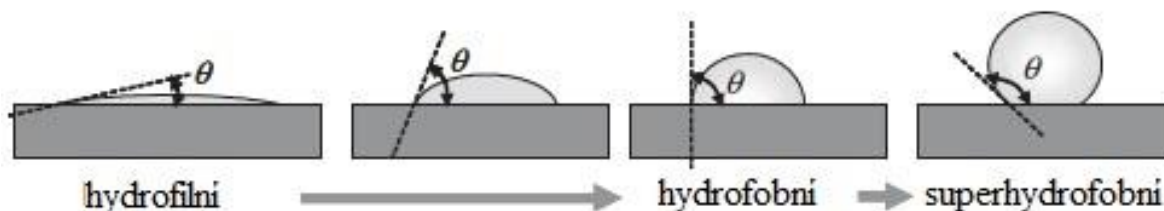
Jelikož povrchové napětí ovlivňuje tvar a pohyb mezifázových rozhraní, hrají významnou roli při přelévání tekutin a tvorbě kapek či bublin. Tohoto vlivu se využívá například při extrakci ropných produktů a případně jejich vymývání z vodných prostředí. Nízká povrchová napětí jsou poté využívána při terciární ropné extrakci, u které se využívá přídavek detergentu k zisku ropy z pevných povrchů a jejího převedení do čerpatelného roztoku [13].

2.5.2 Smáčení a kontaktní úhel

Smáčení je jev, při kterém dochází ke kontaktu mezi kapalinou a pevnou látkou. Tento jev je ovlivněn vnitřní energií a povrchovým napětím zúčastněných látek a je výsledkem snahy jednotlivých rozhraní o zisk minimální potenciální energie. Stupeň smáčení je definován pomocí kontaktního úhlu.

Kontaktní úhel je úhel, pod kterým dochází ke styku mezi povrchem kapaliny a pevné látky. Jedná se o specifický úhel, který je jedinečný pro daný systém za daných vnějších podmínek (teploty a tlaku). Vliv na něj mají jak jednotlivé látky, které se účastní smáčení tak jejich vzájemné interakce. Je dán reakcemi mezi třemi rozhraními – pevná látka/kapalina, pevná látka/plyn, kapalina/plyn.

Pro stanovení kontaktního úhlu se využívá rovných povrchů, na kterých je kapka kapaliny. Pokud se kapka rozlévá po povrchu, jedná se o velmi smáčivou látku. Takovéto chování může vykazovat například voda na hydrofilním povrchu. Pro hydrofobnější povrch je kontaktní úhel mezi kapalinou a pevným povrchem do 90° , a nad 90° pro silně hydrofobní. Povrchy, které mají s kapalinou smáčecí úhel větší než 150° se označují jako superhydrofobní (Obrázek 5). Pro výpočet kontaktního úhlu je také možné využít Youngovu rovnici [14].



Obrázek 5 - Typy povrchů a jejich kontaktní úhly [14]

2.6 Metody fyzikálně chemické a strukturní analýzy využitelné při studiu biosurfaktantů

Na následujících řádcích budou popsány standardní metody fyzikálněchemické a strukturní analýzy používané při charakterizaci biosurfaktantů. Tyto metody jsou využívány především pro zjištění chemické struktury daných látek, ale také k ověření jejich solubilizačních vlastností. Jedná se o metody kvantitativního i kvalitativního charakteru.

2.6.1 Metoda Wilhelmyho destičky

Obecně je považována za jednu z nejefektivnějších a nejméně náročných metod pro měření povrchového napětí. Využívá lehkého platinového plíšku (případně skleněného či z filtračního papíru), který je ponořen do roztoku a následně je přístrojem pomalu vytahován ven. Přesné váhy v přístroji jsou poté schopny určit sílu, kterou působí roztok na plíšek a převést tuto sílu na povrchové napětí [12].

2.6.2 Du Noüy kroužková tenziometrie

Jedná se o obdobnou metodu jako je metoda Wilhelmyho plíšku pro měření povrchového napětí. Jak již název této techniky napovídá, pro stanovení povrchového napětí roztoku se využívá kroužek, nejčastěji platinový, který je zavěšen na přístroji s mikrováhami. Z předem definovaných vlastností kroužku (váha, poloměr a jiné) a používaného roztoku (viskozita apod.) je poté přístroj schopen převést sílu potřebnou k průchodu skrz povrch roztoku na povrchové napětí tohoto roztoku [15].

2.6.3 Blízká infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací

Metoda je založena na interakci elektromagnetického záření se vzorkem. Slouží především ke kvalitativnímu stanovení struktury studované látky, ale využití má také jako kvantitativní metoda. V závislosti na energii záření procházejícího vzorkem se dělí na blízkou, střední a vzdálenou infračervenou spektrometrii. Při průchodu energie vzorkem dochází v molekule k různým druhům energetických přechodů (elektronový, vibrační a rotační). Pro infračervenou spektrometrii jsou však využitelné pouze vibrační a rotační energetický přechod [16].

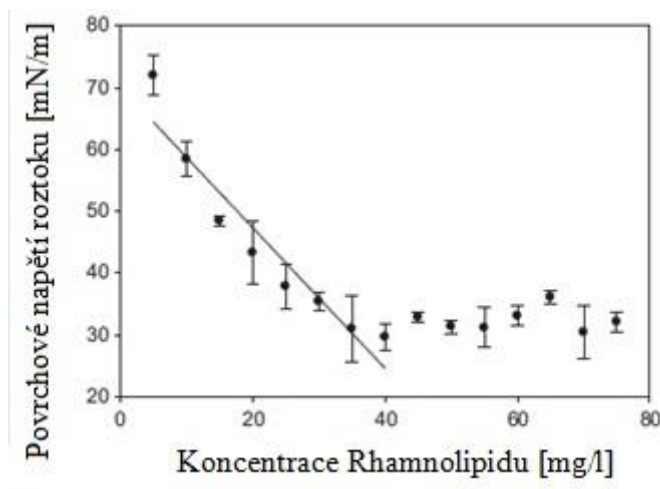
2.6.4 Analýza tvaru kapky

Jedná se o metodu, která se využívá především pro stanovení povrchového napětí a kontaktního úhlu na rozhraní kapalina – pevná látka z tvaru osově symetrické kapky. Tato kapka v závislosti na nastavení metody může být buď přisedlá na pevném povrchu, nebo zavěšená. Pokud je tato kapka tvarem odpovídající Laplaceově rovnici a zároveň osově symetrická dochází k počítačovému dokreslení této kapky podle obrazu reálné kapky na povrchu. Z této teoretické kapky je poté možné získat údaje jako je výška kapky, objem, povrchové napětí a kontaktní úhel. Principem metody je snaha o dosazení tvaru experimentální kapky do tvaru teoretické kapky odpovídající Laplaceově rovnici o kapilárních jevech, přičemž se povrchové napětí takovéto kapky využívá jako proměnný parametr. Po nalezení nejvhodnější shody je poté počítačový software schopen dopočítat přesné hodnoty povrchového napětí a smáčecího úhlu [17].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Stanovení povrchového napětí a hodnoty kritické micelární koncentrace jsou nejvýznamnějšími ukazateli kvality biosurfaktantu. Standardní metody, jako například tenziometrie, jsou metody relativně jednoduché, ovšem vyžadují specializované přístroje.

Pro stanovení kritické micelární koncentrace a povrchového napětí roztoku biosurfaktantu je možné použít tenziometrická měření. Pomocí tenziometrie je možné stanovit kritickou micelární koncentraci i povrchové napětí roztoku a porovnat tyto hodnoty s čistým rozpouštědlem – nejčastěji vodou. Například roztok rhamnolipidu, který použil Tyler Renfro a jeho tým byl schopný snížit povrchové napětí vody o 40 mN/m. Pro destilovanou vodu je hodnota povrchového napětí při 20°C rovna 72,75 mN/m. Výsledný roztok biosurfaktantu měl po překročení CMC povrchové napětí kolem 32 mN/m (Obrázek 6) [18].



Obrázek 6 - Stanovení vlivu koncentrace rhamnolipidu na povrchové napětí vody [18]

Tuto metodu lze samozřejmě využít také pro charakterizaci jiných biosurfaktantů. Byla využita ve výzkumu *Xiaojing Ma a spol* ke stanovení povrchového napětí a kritické micelární koncentrace sophorolipidů produkovaných kvasinkou druhu *Wickerhamiella domercqiae*. Jednalo se jak o laktonické formy, tak o kyselé formy těchto molekul. Ke stanovení povrchového napětí tým autorů použil vodné roztoky zmíněných látek v různých koncentracích do 500 mg/l. Všechny roztoky s rostoucí koncentrací výrazně snižovaly povrchové napětí vody až na hodnoty v rozmezí 32 – 43 mN/m. Jako nejlepší biosurfaktant se poté jevil sophorolipid v kyselé formě, který při nejnižší hodnotě kritické micelární koncentrace (20 mg/l) nejvýrazněji snižoval povrchové napětí. Laktonická forma poté vykazovala CMC v okolí hodnoty 90 mg/l a nepřečištěný sophorolipid až při 130 mg/l [19].

Mezi kvalitativní metody používané k charakterizaci roztoků obsahujících biosurfaktanty patří tzv. *Drop Collapse* metoda. Touto metodou je možné stanovit obsah biosurfaktantů v roztoku, nejčastěji se jedná o supernatant živného média určeného pro pěstování daného typu bakterií. Využívá se především jako orientační metoda před složitějšími metodami jako je například tenziometrie. Výhodou této metody je totiž potřeba velmi malého množství vzorku a relativně malá časová náročnost. Obecný princip je založen na interakci hydrofobního povrchu (nejčastěji olejová vrstva) a vodného roztoku. Pokud je vzorkem čistá voda, případně roztok biosurfaktantu o nízké koncentraci dochází k nízké smáčivosti a kapka zůstane na povrchu. Při vyšších koncentracích se kapka rozlévá po olejové vrstvě a následně

se zhroutí. Využívá se také hydrofobních materiálů mikrotitračních destiček (např. polystyren). Tým *Tugrul Tugba a spol* využili této metody k určení rhamnolipid produkujících bakterií. V polystyrenových mikrotitračních destičkách lze dobře pozorovat rozdíly mezi reálnými a kontrolními vzorky v podobě destilované vody [20].

Obdobnou metodou je tzv. mikrodestičkový test. Metoda se provádí opět nejčastěji ze supernatantu vzorku po kultivaci a slouží ke stanovení obsahu biosurfaktantu ve vzorku. Jedná se o rychlou a jednoduchou metodu vyžadující malé množství vzorku. Pokud je v hydrofobní mikrotitrační destičce přítomen vodný roztok, zůstává povrch kapaliny rovný. V přítomnosti látky ovlivňující povrchové napětí dochází ke smáčení okrajů destičky a změně optických vlastností. Pro vyhodnocení se poté využívá optické zakřivení milimetrové mřížky, která je položena pod destičkou [21].

Využívá se také schopnost biosurfaktantů vytvářet emulze. Při této metodě dochází ke smíchání roztoku biosurfaktantu a hydrofobního rozpouštědla, nejčastěji n-hexadekanu. Výsledkem je prostá výška zpěněné emulzní vrstvy porovnaná s kontrolními vzorky. Silně koncentrované roztoky jsou schopné vytvořit velmi stálou emulzní vrstvu, která vydrží až několik hodin [22].

V neposlední řadě lze použít jako jednoduchou kvalitativní metodu tzv. *oil spreading*. Při této metodě se využívá tvorby olejové vrstvy ve vodném prostředí. Po přidání malého množství roztoku biosurfaktantu, který vykazuje solubilizační vlastnosti, začne po chvíli docházet k vytlačování olejové vrstvy a vzniká čistící zóna. Efektivita biosurfaktantu se poté stanoví podle velikosti čistící zóny [23].

Využitelné jsou však i jiné metody a vhodnost jejich použití se liší pro různé typy biosurfaktantů. V následující tabulce jsou uvedeny nejčastější metody, které jsou využitelné pro jednotlivé typy biosurfaktantů (*Tabulka 1*).

Tabulka 1 - Přehled využívaných metod k charakterizaci jednotlivých biosurfaktantů

produkující kmen	zdroj	typ biosurfaktantu	využité metody k charakterizaci						zdroj
<i>Bacillus subtilis</i>	mořská voda	Surfactin	kroužková tenziometrie	drop collapse	rozšiřování oleje	emulzifikační test			[24]
<i>Klebsella sp.</i>	půda u ropných zdrojů	fosfolipid	kroužková tenziometrie	drop collapse	emulzifikační test	množství biomasy			[25]
<i>Burkholderia cepacia</i>	ropou znečištěná půda	lipopeptid	kroužková tenziometrie	emulzifikační test	množství biomasy	plynová chromatografie	sandpack test		[26]
<i>C. glabrata</i>	půda Caatinga	anionový	kroužková tenziometrie	emulzifikační test	tenkovrstvá chromatografie	plynová chromatografie	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací	rozšiřování oleje	[27]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ropou znečištěná půda	mono-; di-rhamnolipid	tenziometrie	drop collapse	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací	kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem	emulzifikační test		[28]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	půda u ropných zdrojů	rhamnolipid	tenziometrie	tenkovrstvá chromatografie	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací	kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem	hemolytická aktivita		[29]
<i>Bacillus flexus</i>	půda u ropných zdrojů	lipopeptid	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací	emulzifikační test	gravimetrická analýza				[30]

4 Experimentální část

4.1 Použité přístroje a chemikálie

- Analyzátor smáčecího úhlu OCA 20 + SCA 20 software - DataPhysics Instruments
- Tenziometr Sigma 701 – KSV Instruments
- Tenziometr BPA – 800P – KSV Instruments
- FT-IR spektrometr Nicolet iS50 – Nicolet CZ
- Termogravimetrický analyzátor TGA Q5000 – TA Instruments
- Analytické váhy
- Mikropipeta 10 – 100 μ l
- standardy hydrofilních barviv (Methylenová modř, Sigma Aldrich; Rhodamin 6G, Sigma Aldrich)
- standardy biosurfaktantů (Rhamnolipid, AGAE Technologies; Sophorolipid lactonic, Carbosynth Ltd.; Sophorolipid acidic, Carbosynth Ltd.)
- vybrané hydrofobní substráty (Suchý teflon ve spreji, MOTIP Dupli; Teflonová páska; Parafilm; Xerox NeverTear)
- Běžné laboratorní sklo

4.2 Metody strukturní analýzy

4.2.1 FT-IR spektrometrie

Standardní metodou pro stanovení molekulární struktury látek je infračervená spektrometrie. Měření bylo provedeno na FT-IR spektrometru Nicolet iS50. Pro měření bylo odebráno malé množství vzorku a přeneseno na měřící krystal. Pomocí systémového softwaru bylo získáno spektrum, které následně bylo zpracováno pomocí programu MS office Excel.

4.2.2 Termogravimetrická analýza

Termogravimetrická analýza byla využita jako další metoda pro stanovení struktury zkoumaných látek. Malé množství vzorku bylo podrobeno postupnému zahřívání a současnému měření úbytku hmotnosti tohoto vzorku. Tato metoda byla provedena v klasické vzduchové atmosféře a následně v inertní dusíkové atmosféře.

4.3 Stanovení CMC a povrchového napětí pomocí Du Noüy kroužkové tenziometrie

Jelikož je základním faktorem pro určení kvality biosurfaktantu jeho vliv na povrchové napětí roztoku a koncentrace při které nastává největší vliv na tuto veličinu, bylo provedeno měření právě této vlastnosti. Pro stanovení kritické micelární koncentrace a její závislosti na povrchové napětí byla využita standardní metoda kroužkové tenziometrie. Pro měření byl využit tenziometr Sigma 701 od firmy Biolin Scientific (*Obrázek 7*). Měření bylo prováděno ve snížených kádinkách o celkovém objemu 25 ml. Množství použitého roztoku však bylo 10 ml. Pro stanovení CMC byly připraveny roztoky jednotlivých standardů biosurfaktantů (rhamnolipidy, kyselé a laktonické sophorolipidy) v ultračisté vodě v koncentracích 0 – 100 mg/l s krokem po 10 mg/l. Po stanovení kritické micelární koncentrace byly

připraveny roztoky v koncentracích okolo CMC a byl sledován vliv koncentrace na hodnotu povrchového napětí. Před samotným měřením roztoků biosurfaktantů bylo provedeno kontrolní měření povrchového napětí rozpouštědla – ultračisté vody. Nastavení a ovládání přístroje bylo provedeno pomocí příslušného softwaru (KSV Research Lab). Měření jednoho vzorku trvalo přibližně 10 minut, mezi jednotlivými roztoky byl platinový kroužek opláchnut v destilované vodě a ožehnut nad kahanem z důvodu udržení čistoty jednotlivých roztoků v koncentrační řadě.



Obrázek 7 - Tenziometr Sigma 701

4.4 Stanovení kinetiky sorpce biosurfaktantu na rozhraní pomocí bublinového tenziometru

Následující měření již nebylo zaměřeno čistě na stanovení micelární koncentrace či rovnovážné hodnoty povrchového napětí, ale především na rychlost sorpce jednotlivých molekul biosurfaktantu na nově vznikající povrch. Tato rychlost byla stanovena pomocí bublinového tenziometru BPA – 800P – KSV Instruments. Pro stanovení kinetiky reakce byly využity stejné roztoky jako při kroužkové tenziometrii. Byla provedena opět dvě měření, jedno v rozmezí koncentrací 0 - 100 mg/l a poté v blízkém okolí CMC (stanovené pomocí Du Noüy kroužkové tenziometrie).

4.5 Analýza tvaru kapky

Pro stanovení smáčecích schopností jednotlivých roztoků byla využita metoda založená na měření kontaktních úhlů. Měření probíhalo na přístroji OCA – 20 od firmy Dataphysics (*Obrázek 8*). K vyhodnocení výsledků byl poté použit přidružený program (SCA 20).

Pro tuto metodu byly nejdříve využity roztoky biosurfaktantu v ultračisté vodě v koncentracích 0; 100; 1000 mg/l. Tyto koncentrace byly proměřeny v různých časech po nakápnutí na substrát, aby mohla být proměřena časová závislost tvaru kapky.

Po tomto měření bylo provedeno měření druhé, ve kterém byly obdobně měřeny roztoky v okolí kritické micelární koncentrace. V tomto měření byl také pozorován vliv hydrofobnosti povrchu, na kterém byly jednotlivé kapky proměřovány. Pro tato měření byl využit parafilm, teflonová páska a polyesterový papír potisknutý milimetrovou mřížkou.



Obrázek 8 – Analyzátor tvaru kapky OCA 20

4.6 Vizuální metody

Po úvodních přístrojově náročnějších měřeních bylo provedeno navržení a optimalizace několika jednodušších metod, sloužících pro orientační potvrzení přítomnosti, případně semi-kvantitativní stanovení obsahu biosurfaktantu. Tyto metody jsou založené především na vizuálním hodnocení smáčení vhodného substrátu analyzovaným roztokem. V první řadě se jednalo o Drop collapse metodu a následně o její různě modifikované formy pro co nejjednodušší stanovení obsahu biosurfaktantu v roztoku a v ideálním případě i následné stanovení jeho přibližné koncentrace. Z důvodu lepší vizualizace byly pro tyto metody připraveny roztoky hydrofilních barviv (Methylenová modř a Rhodamin G6) v koncentraci 1 g/l. Do roztoků biosurfaktantů byla poté pomocí kapátka přidána vždy 1 kapka tohoto barviva. Při pokusech byl poté pozorován také vliv barviva na solubilizační vlastnosti roztoku.

4.6.1 Výběr vhodného substrátu pro vizuální metody

Základním cílem optimalizace těchto metod bylo najít vhodný povrch, který by měl dostatečně hydrofobní vlastnosti k možnosti vizuálního stanovení rozdílů jednotlivých kapek u různě koncentrovaných roztoků. Dalším kritériem pro výběr tohoto povrchu byla jeho snadná aplikace a opakovatelnost přípravy vrstvy s vhodnou tloušťkou a homogenitou. Na základě literární inspirace byly za tímto účelem navrženy následující substráty: olejový povrch, tenká vrstva z parafínu (parafilm), teflonu (páska a kroužek) a dále případně některé hydrofobní plasty, například polystyren a polyester.

4.6.1.1 Olej

Jako první testovaný hydrofobní povrch byl vzat v úvahu olej. Pro experimenty bylo použito několik typů olejů, které byly postupně nanášeny do mikrotitračních destiček, na krycí a podložní sklička a následně také do petriho misek v malých vrstvách. Veškeré podklady byly před aplikací tenké olejové vrstvy několikrát omyty vodou a ethanolem a poté řádně osušeny.

4.6.1.2 Parafilm

Pro vytvoření souvislé tenké vrstvy (z důvodu dalších plánovaných experimentů pokud možno průhledné) bylo použito několik postupů. Všechny však byly založeny na dobré tavitelnosti parafilmu již při relativně nízkých teplotách (60°C). Po roztavení parafilmu byla snaha o přilnutí co nejtenčí vrstvy k podkladu.

Nejdříve byl proveden experiment s odmaštěným podložním skličkem, na které bylo přeneseno malé množství parafilmu nejdříve ve formě kuličky a následně ve formě tenké vrstvy (cílem bylo především přilnutí k podkladu). Poté bylo skličko položeno na vařič. Po zahřátí sklička a roztečení parafilmu bylo skličko sundáno z vařiče a použito pro další experimenty. Obdobně byly provedeny pokusy také s krycím skličkem z důvodu menší tloušťky podkladu a tudíž jednoduššího využití při vizuálních metodách.

4.6.1.3 Teflon

Z důvodu silně hydrofobních vlastností byl využit k experimentům také teflon, a to hned v několika formách. Nejdříve byly použity vzorky objemového teflonu (hladké soustružené objemové kroužky). Ty byly před experimenty omyty destilovanou vodou, vyčištěny ethanolem a následně opět omyty destilovanou vodou. Experiment byl proveden také s teflonovou páskou. Ta byla natažena na čisté podložní skličko a vyhlazena tlakem (přitisknutím druhého podložního sklička).

Jako další forma teflonu byl využit tzv. suchý teflon ve spreji. Tato varianta byla využita především z důvodu neprůhlednosti předchozích dvou forem teflonu. Opět byla využita odmaštěná podložní a krycí sklička, na která byl z různých vzdáleností a v několika vrstvách nástřikem nanášen suchý teflon. Tato forma teflonu byla využita také pro pokrytí polystyrenových mikrotitračních destiček hydrofobnější tenkou vrstvou. Nejprve byly prováděny pokusy s mikrotitračními destičkami a následně pouze s jejich víčky z důvodu menší hloubky a s tím spojenou větší homogenitou nástřiku suchého teflonu.

4.6.1.4 Polyesterový arch NeverTear

Tento materiál byl pro experimenty využit především díky možnosti okamžitého použití bez předešlé úpravy povrchu, ale také možnosti vytvořit na něm potisk. Experimenty byly prováděny tedy jak na čistém archu, tak na vytisknuté milimetrové mřížce. Jako další byl využit potisk soustavou soustředných kruhů o přesně daném poloměru. Nejmenší kruh měl průměr 1 mm.

4.6.2 Metoda rozlévání kapky

Jak je popsáno v kapitole Současný stav řešené problematiky jedná se pravděpodobně o nejjednodušší metodu pro potvrzení obsahu, případně orientačního stanovení koncentrace biosurfaktantu. Tato metoda byla realizována postupně s využitím povrchů popsaných výše.

Na jednotlivé povrchy byla pomocí mikropipety vytvořena kapka o objemu 30; 40 a 50 μl . Při dalších pokusech byly používány již pouze kapky o objemu 30 μl , který se z hlediska vizuálního pozorování rozdílů ve tvaru kapky jevil jako optimální. Tyto kapky poté byly vizuálně hodnoceny ihned po vytvoření a následně také po 5 minutách od vytvoření. Jednotlivé roztoky o různých koncentracích byly pro lepší vizuální hodnocení kapány vedle sebe a zároveň byly nabarveny nejdříve Methylenovou Modří a ve druhé sadě Rhodaminem 6G. Při použití barviva byl sledován také jeho vliv na solubilizační vlastnosti roztoku v porovnání s čistým roztokem o stejné koncentraci.

4.6.3 Mikrodestičkový test

Nejdříve byl proveden mikrodestičkový test s tenkou vrstvou oleje na dně destičky. Pro lepší vizualizaci byl však při dalších pokusech používán spíše suchý teflon. Roztoky o různých koncentracích biosurfaktantu byly opět mikropipetou nanášeny do jednotlivých jamek destiček. Byly vytvářeny malé kapky o objemu 30 μl , které byly pozorovány ihned po vytvoření a poté znovu po uplynutí 5 minut.

4.6.4 Metody založené na pozorování optických vlastností kapky

Cílem těchto metod bylo zjednodušit mikrodestičkový test tak, aby bylo potřeba co nejmenší množství vzorku a zároveň bylo dobře rozeznatelné v jaké koncentraci se biosurfaktant v roztoku nachází. Bylo provedeno několik experimentů založených na rozdílných optických vlastnostech různě koncentrovaných roztoků.

Nejdříve byly provedeny pokusy nanesením kapek různě koncentrovaných roztoků na výše popsané povrchy, pod které byla vložena milimetrová mřížka. Byl pozorován tvar kapky jako takové, její smáčivost jednotlivých povrchů, ale zároveň také jeho optické vlastnosti – což se projevilo zakřivením čar milimetrové mřížky a zároveň počtem obsažených čtverců.

Další modifikací mikrodestičkového testu byl polyesterový arch NeverTear potisknutý soustřednými kruhy o přesně daném poloměru – nejmenší kruh měl průměr 1 mm. Na takto potisknutý arch byl vždy do středu soustředných kruhů nanášen mikropipetou roztok biosurfaktantu v různých koncentracích. Následně byla pozorována smáčivá schopnost roztoku v závislosti na počtu „překonaných“ kruhů.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Základem experimentální části bylo ověření využitelnosti standardních metod pro strukturní a fyzikálně – chemickou analýzu při charakterizaci biosurfaktantů. Cílem této části bylo zhodnotit, jaké konkrétní informace tyto techniky při analýze biosurfaktantů poskytují, a dále také zmapovat agregační chování vybraných standardních biosurfaktantů. Pro potřeby základní strukturní charakterizace byla aplikována metoda infračervené spektroskopie, agregační chování bylo analyzováno tenziometricky s využitím metody Du Noüy a metody maximálního tlaku v bublině. Po vyhodnocení využitelnosti těchto metod byly v hlavní části experimentální náplně práce navrženy a optimalizovány alternativní techniky posouzení povrchové aktivity biosurfaktantů, přičemž snaha byla především o jejich maximální jednoduchost, pokud možno se zachováním schopnosti nejen potvrdit přítomnost biosurfaktantu ve vzorku, ale zároveň též orientačně stanovit (resp. rozlišit různou) koncentraci. Motivací této práce bylo vytvoření metod přístrojově, časově a především na množství vzorku nenáročných, které by mohly doplnit případně částečně nahradit standardní metody pro charakterizaci biosurfaktantů. Právě množství spotřebovaného vzorku může být u biologicky produkovaných látek klíčové.

5.1 Metody strukturní analýzy

5.1.1 FT-IR spektrometrie

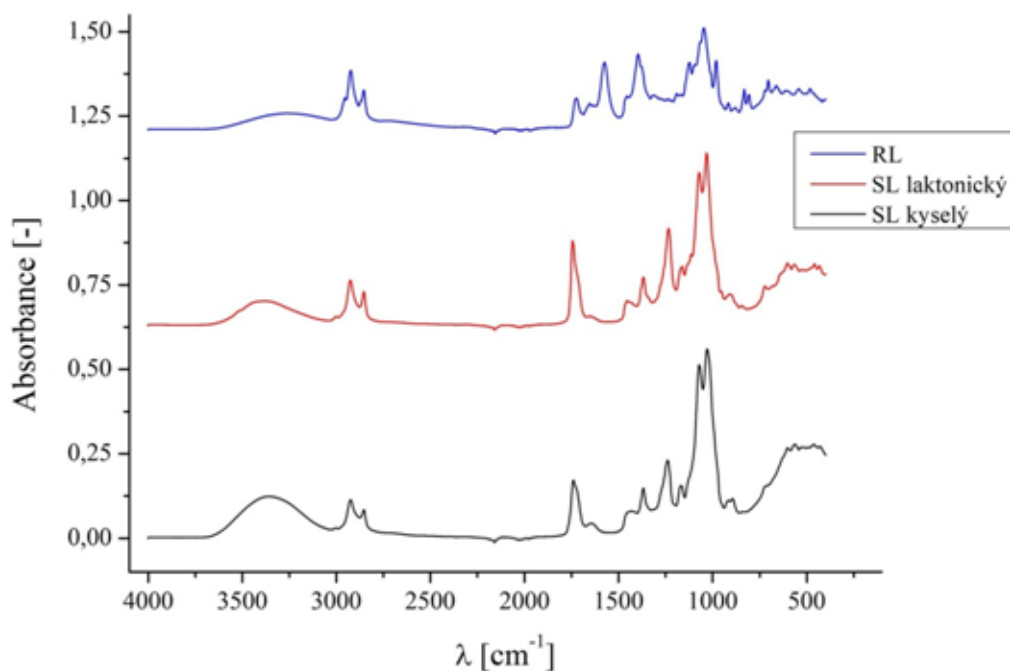
Pomocí infračervené spektrometrie byla stanovena chemická struktura zkoumaných látek. Jelikož se jedná o stejnou skupinu látek – biosurfaktantů, bylo možné předpokládat, že struktura těchto látek bude v základu velice podobná. Aby bylo možné látku zařadit do skupiny biosurfaktantů, je nutné, aby byla schopná snižovat povrchové napětí. Toho jsou schopné molekuly, které mají amfifilní vlastnosti – tudíž mají hydrofilní a hydrofobní část.

Hydrofobní část je u většiny takovýchto látek dlouhý uhlíkatý řetězec. Ve všech zkoumaných látkách se tento dlouhý uhlovodíkový řetězec nachází, jak je možné vidět v grafu IČ spekter. Jedná se o píky okolo 2700 cm^{-1} .

Hydrofilní částí je u zkoumaných látek cukernatá složka. V cyklické struktuře cukru jsou poté výrazné hydroxylové funkční skupiny, viditelné okolo 1000 cm^{-1} .

Všechny zkoumané látky v sobě mají do jisté míry vázanou vodu či vzdušnou vlhkost, jejíž přítomnost se projevuje táhlým píkem začínajícím na 3000 cm^{-1} . V tomto píku se však projevují také již zmíněné hydroxylové skupiny z cukerné části zkoumaných biosurfaktantů.

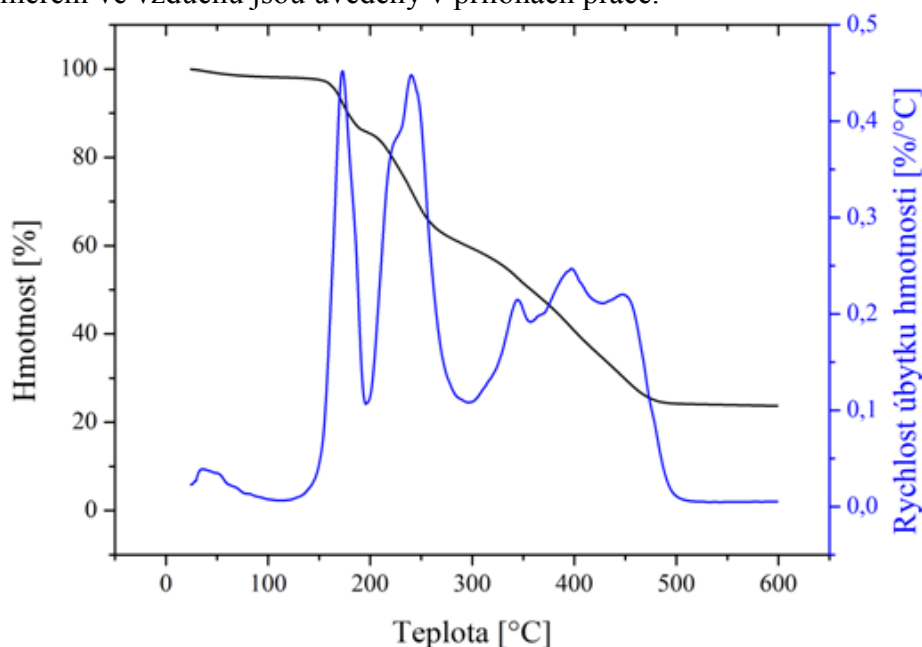
V okolí 1700 cm^{-1} je zřetelný pík karbonylové skupiny. Ten je primárně vidět u sophorolipidů. Laktonický sophorolipid má tento pík posunutý k vyšším vlnovým délkám se strmějším stoupáním, jedná se o esterickou skupinu. Naopak kyselý sophorolipid má tento pík rozsáhlejší a začíná již při nižších vlnových délkách, jedná se o karboxylovou skupinu. Mezi těmito dvěma strukturami však může docházet k částečnému přechodu z jedné formy na druhou (*Obrázek 9*).



Obrázek 9 – FT-IR spektra biosurfaktantů

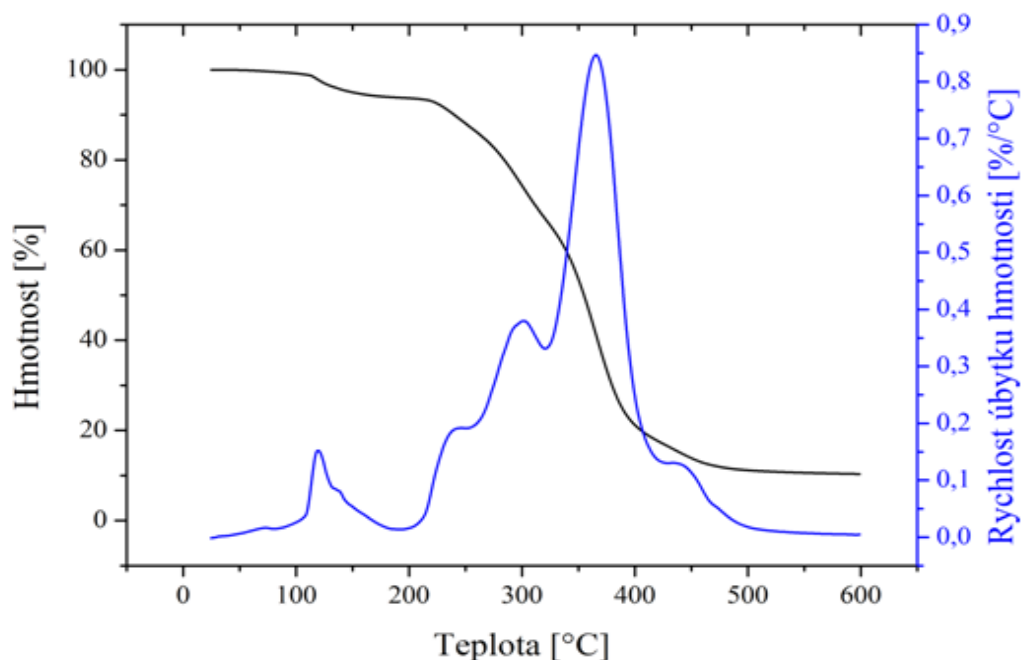
5.1.2 Termogravimetrická analýza

Termogravimetrická analýza byla provedena především ke stanovení navázané vlhkosti ve strukturách jednotlivých látek a tudíž doplnění infračervené spektrometrie – rozlišení vlhkosti od hydroxylových skupin v cukerné složce zkoumaných biosurfaktantů. Ztráta vlhkosti se projevuje při teplotách nad 100 °C. Výsledky jsou uvedeny pro dusíkovou inertní atmosféru, výsledky měření ve vzduchu jsou uvedeny v přílohách práce.



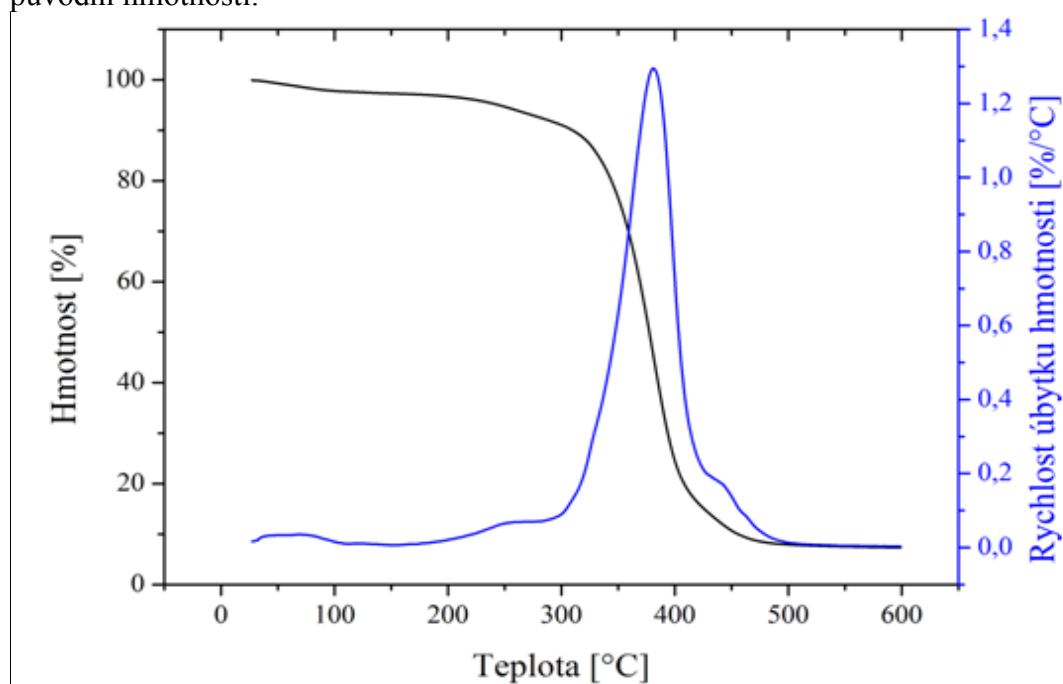
Obrázek 10 - TGA rhamnolipidu v dusíku

Rhamnolipid obsahoval relativně velké množství vázané vlhkosti. Značná část molekuly je silně termostabilní. Celkový zbytek při maximální teplotě činil přibližně 25% původní hmotnosti.



Obrázek 11 - TGA kyselého sophorolipidu v dusíku

Vzorek kyselého sophorolipidu byl ve formě silně viskózní tekutiny. V této struktuře byla ve značné míře zadržována vlhkost. Při vysokých teplotách docházelo k většímu rozložení molekuly než u rhamnolipidu. Celkový zbytek při maximální teplotě činil přibližně 15% původní hmotnosti.

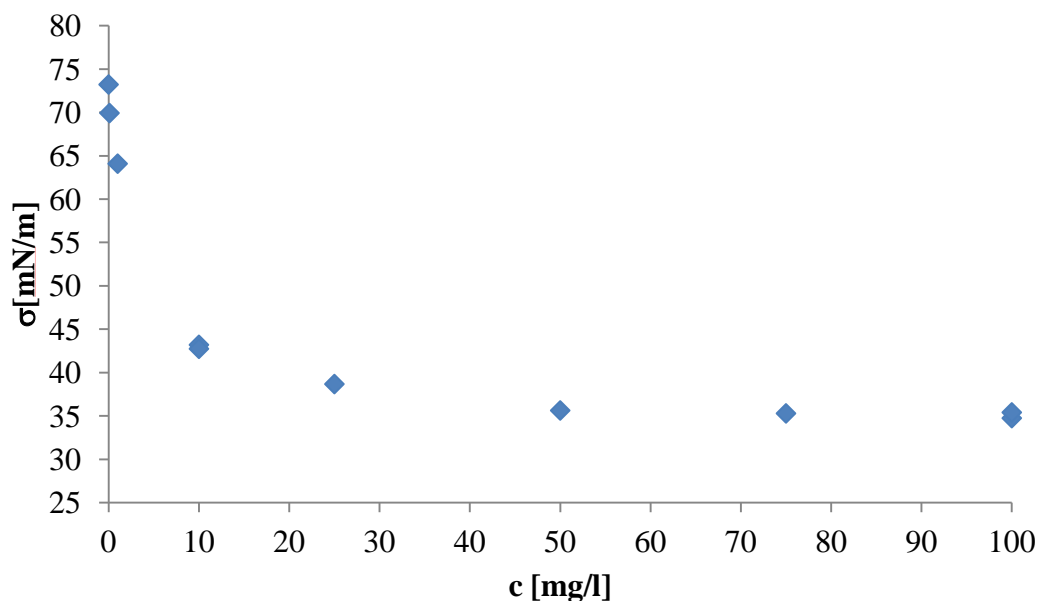


Obrázek 12 - TGA laktonického sophorolipidu v dusíku

Laktonický sophorolipid má oproti své kyselé formě silněji vázanou vnitřní strukturu molekuly. K výrazné ztrátě hmotnosti dochází až od teplot nad 300°C. Naopak je však méně termostabilní při vysokých teplotách a dochází k jeho téměř naprosté degradaci. Celkový zbytek při maximální teplotě činil přibližně 10% původní hmotnosti.

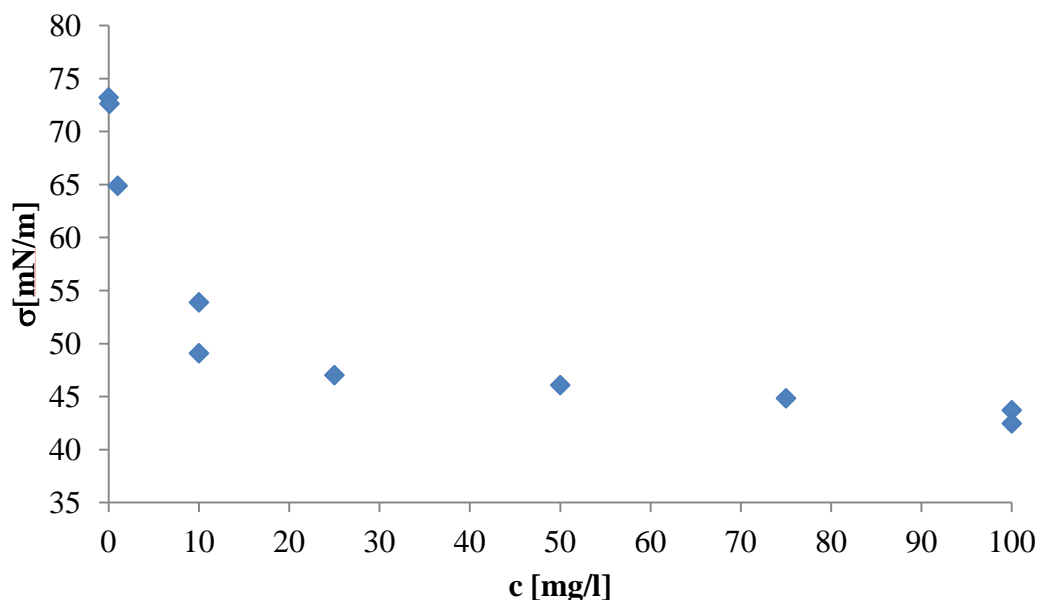
5.2 Kroužkový tenziometr

Pomocí kroužkové tenziometrie byla stanovena kritická micelární koncentrace zkoumaných látek. Z jednotlivých grafů vyplývá, že se jedná o látky silně ovlivňující povrchové napětí již v malých koncentracích.



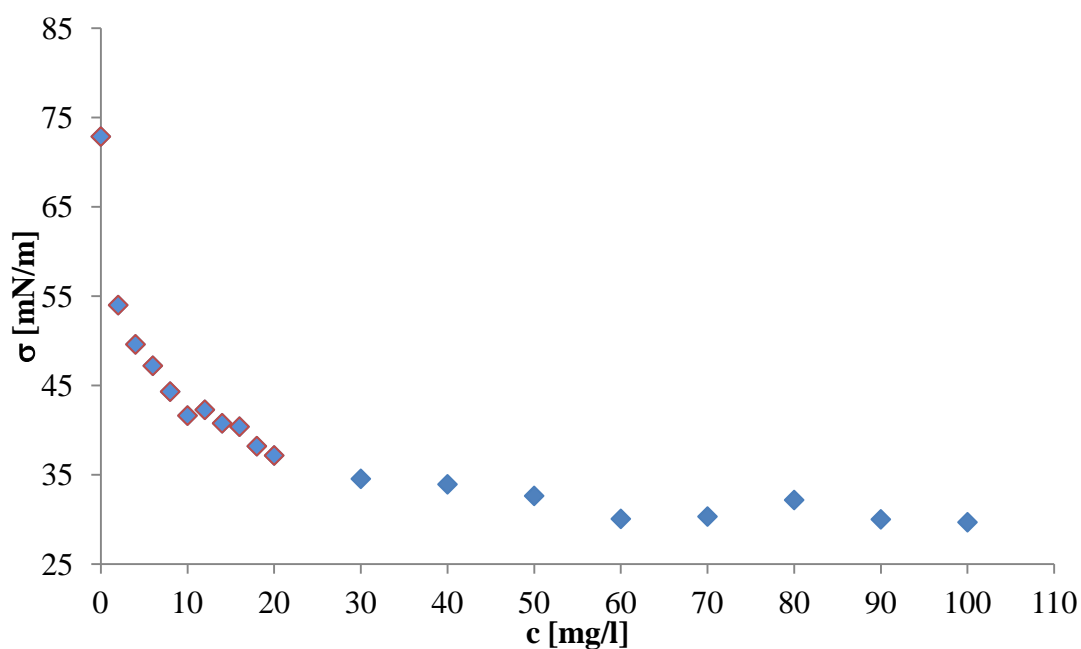
Obrázek 13 - Orientační stanovení CMC kyselého sophorolipidu

Z obrázku 13 vyplývá, že kritická micelární koncentrace vzorku kyselého sophorolipidu se pohybuje v okolí 10 mg/l, při hodnotě povrchového napětí cca 40 mN/m.



Obrázek 14 - Orientační stanovení CMC laktonického sophorolipidu

Z obrázku 14 vyplývá, že kritická micelární koncentrace vzorku laktonického sophorolipidu je v okolí 10 mg/l, při hodnotě povrchového napětí 50 mN/m. Výsledky potvrzují, že povrchová aktivita obou strukturálních forem sophorolipidů se zásadním způsobem neliší.



Obrázek 15 - Stanovení CMC rhamnolipidu

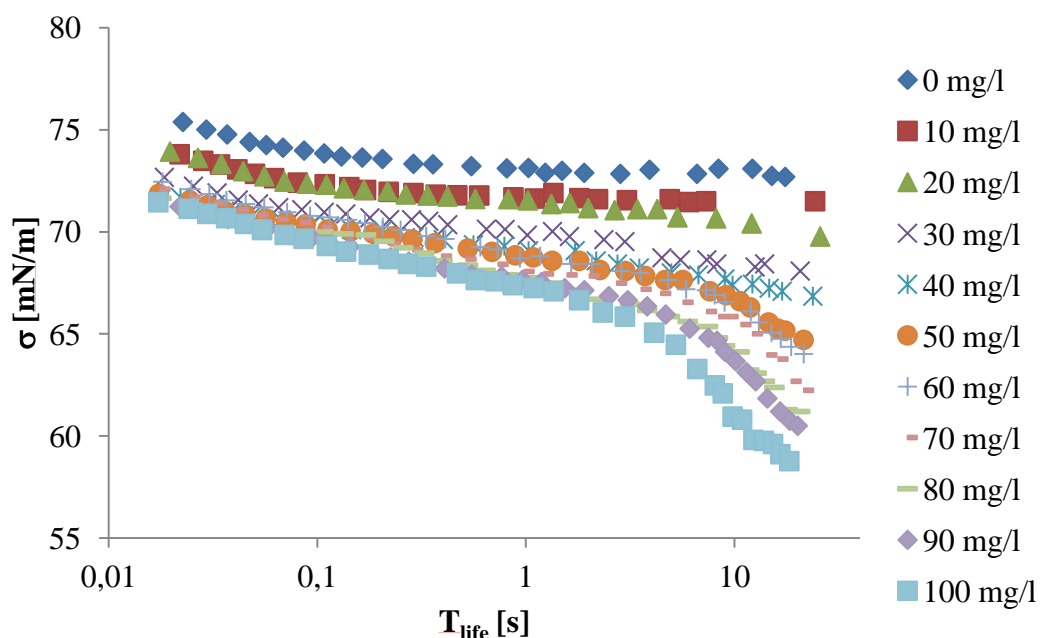
Z obrázku 15 vyplývá, že první kritická micelární koncentrace vzorku rhamnolipidu se pohybuje opět v okolí 10 mg/l, kdy se povrchové napětí roztoku ustálí hodnotě kolem 40 mN/m. Po této hodnotě však dochází ještě k jednomu výraznějšímu poklesu povrchového napětí, a to v rozmezí koncentrací cca 15 – 30 mg/l, načež dojde k ustálení hodnoty povrchového napětí kolem 35 mN/m. Byla provedena 2 měření tohoto vzorku, první orientační pro koncentrace 0 – 100 mg/l s krokem 10 mg/l a druhé v okolí nalezené CMC.

Tenziometrická měření posloužila k charakterizaci biosurfaktantů z hlediska stanovení jejich kritické micelární koncentrace a zároveň také jejich povrchové aktivity. Jako nejefektivnější se jeví vzorek rhamnolipidu, který byl schopen ve vyšších koncentracích snížit povrchové napětí vody až pod 30 mN/m. Nejméně efektivní se jevil vzorek laktonického sophorolipidu, který snižoval povrchové napětí vody na hodnotu 45 mN/m. Kritická micelární koncentrace jednotlivých vzorků se jevila řádově stejná, v rozmezí koncentrací 10 – 20 mg/l. Z tohoto hlediska se jednalo o velmi dobré biosurfaktanty, jelikož některé vzorky mají kritickou micelární koncentraci až v řádech stovek mg/l. Zkoumaný rhamnolipid jevil obdobné vlastnosti jako již výše zmíněný rhamnolipid zkoumaný týmem *Renfro a spol* [18] jehož kritická micelární koncentrace byla 35 mg/l a byl schopen snižovat povrchové napětí na hodnotu 32 mN/m. Z důvodu vysoké povrchové aktivity a zároveň nejlepší dostupnosti byl Rhamnolipid vybrán jako modelový biosurfaktant pro následující experimentální práci.

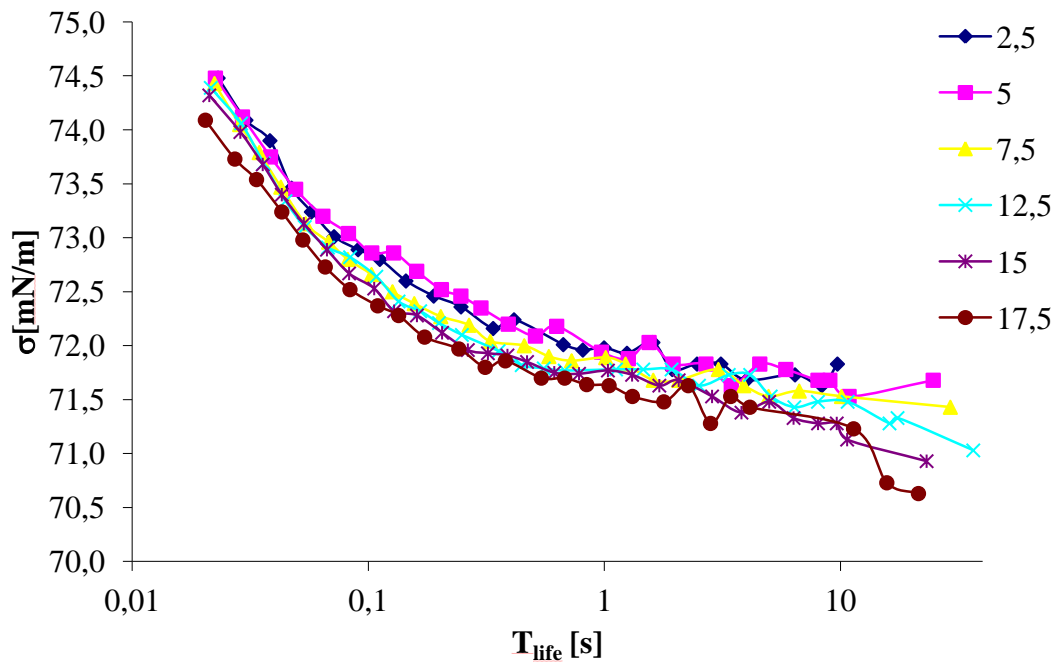
Pro přesné stanovení kritické micelární koncentrace a povrchového napětí je tenziometrie nejvhodnější metodou. Problémem této metody je ovšem potřeba specializovaného přístroje, spotřeba relativně velkého množství vzorku a poměrně dlouhá doba měření jednotlivých vzorků.

5.3 Bublinový tenziometr

Pomocí bublinového tenziometru byla stanovena kinetika sorpce rhamnolipidů (jednotlivých molekul popřípadě jejich agregátů přítomných v roztoku) na nově vznikající povrch bubliny. Sorpce biosurfaktantů, případně jejich agregátů se projevuje snížením povrchového napětí roztoků. Při orientačním měření v širokém rozmezí koncentrací byl pozorován zajímavý trend, kdy pro vysoké koncentrace (nad 50 mg/l) došlo při delších dobách života kapky (cca 7 sekund) k náhlé změně trendu časové závislosti povrchového napětí. Tyto výsledky naznačují, že v těchto roztocích (o koncentracích nad CMC) jsou přítomné agregáty různé velikosti, přičemž při sorpci větších agregátů, které pomaleji difundují k povrchu kapky, dochází k výraznějšímu poklesu povrchového napětí oproti sorpci izolovaných molekul resp. menších agregátů biosurfaktantu. Tyto agregáty se mohou na povrchu kapky otevírat ze své např. kulové formy, a vzniká tak lineární řada molekul, která nasedá na povrch bubliny (Obrázek 16).



Obrázek 16 - Závislost povrchového napětí na době života bubliny



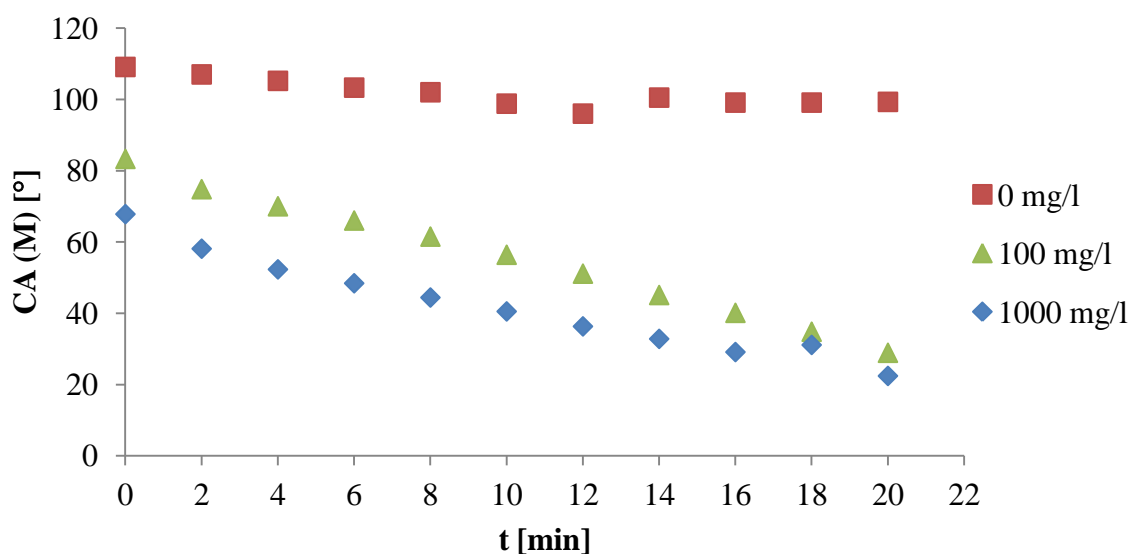
Obrázek 17 - Závislost povrchového napětí na době života kapky v okolí CMC

Tato metoda se ukázala jako nevhodná pro stanovení CMC, jelikož není schopná rozlišit jednotlivé koncentrace nacházející se v okolí CMC. To může být způsobeno přibližně stejnou kinetikou reakce (tzn. jednotlivé molekuly se na nově vznikající povrch sorbují stejně rychle jako malé agregáty nad CMC). (Obrázek 17).

5.4 Analýza tvaru kapky

Metoda založená na měření smáčecího úhlu kapek jednotlivých různě koncentrovaných roztoků byla využita především pro stanovení vlastností vhodných povrchů pro vizuální metody. Pro prvotní měření byly využity povrchy parafilmu, teflonové pásky a polyesterového archu NeverTear, pro detailnější měření v okolí CMC již pouze teflonová páska a polyesterový arch. Tato měření byla prováděna pouze pro vzorek rhamnolipidu. Rhamnolipid byl zvolen jako modelový biosurfaktant z důvodu jeho lepší dostupnosti, a zároveň však zastupoval skupinu látek vykazující obdobné fyzikálně – chemické vlastnosti (což bylo ověřeno standardními charakterizačními metodami).

5.4.1 Orientační měření



Obrázek 18 - Závislost smáčecího úhlu na čase - parafilm

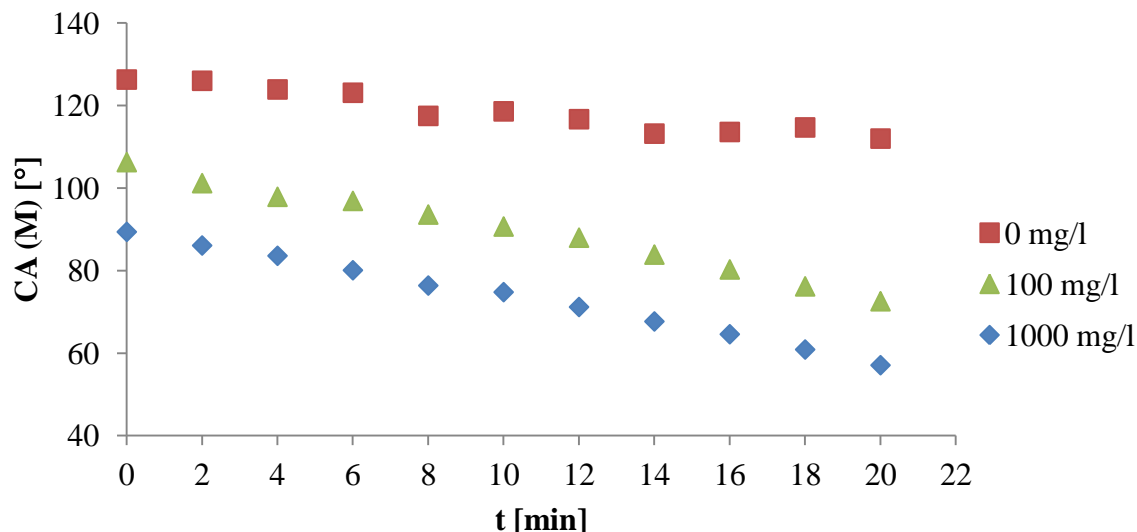
Z obrázku 18 vyplývá závislost smáčecího úhlu na době života kapky na povrchu tvořeném parafilmem. Závislosti pro jednotlivé testované koncentrace se dají považovat za téměř lineární a s rostoucí koncentrací s časem výrazněji klesá smáčecí úhel. To bylo způsobeno právě přidavkem biosurfaktantu, který snižoval povrchové napětí roztoku a zvyšoval tak smáčivost hydrofobního povrchu.



Obrázek 19 - Tvar kapky v čase - parafilm

Obrázek 19 ukazuje tvary jednotlivých kapek výše popsaného měření. Zatímco kapka čistě vody zůstávala v téměř kulatém tvaru, kapky s přidavkem biosurfaktantu výrazně měnily svůj tvar s rostoucím časem.

Parafilm je vhodný pro tato měření z hlediska svých hydrofobních vlastností. Je dostatečně hydrofobní, aby byl měřitelný i smáčecí úhel kapky o koncentraci biosurfaktantu 1000 mg/l. Největším problémem je však tvorba rovného povrchu. U tohoto konkrétního měření nebyla potřeba velkého povrchu, z důvodu měření pouze tří koncentrací. Pro ověření většího množství koncentrací však schopnost vytvoření dostatečně velkého homogenního povrchu může představovat zásadní limitaci jeho použití.



Obrázek 20 - Závislost smáčecího úhlu na čase - teflonová páska

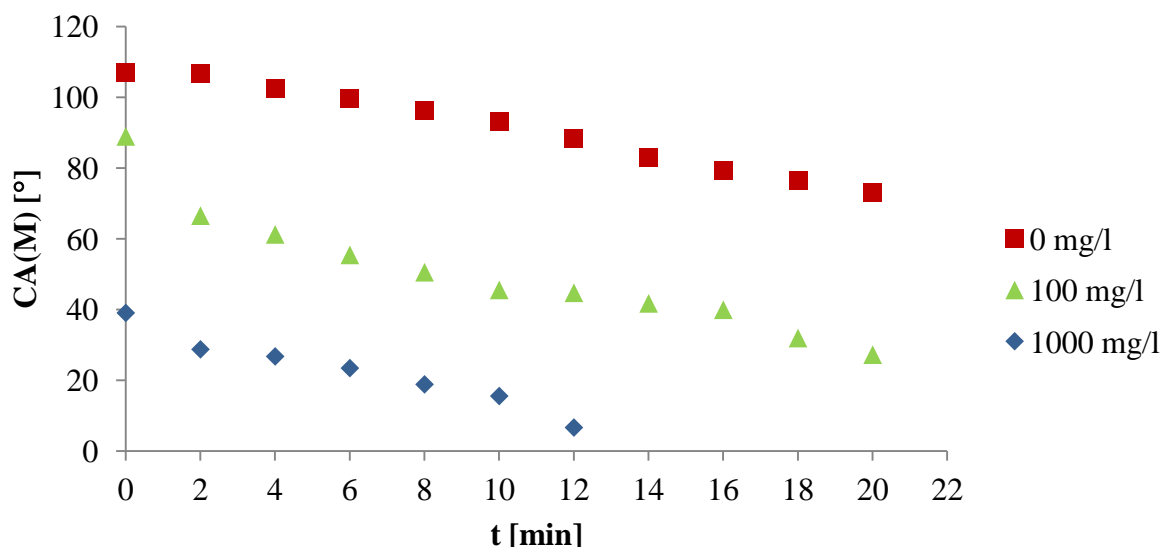
Na obrázku 20 je možné pozorovat obdobné lineární závislosti smáčecího úhlu na čase na povrchu z teflonové pásky. Již z prvotního měření čisté vody bylo patrné, že teflonová páska je hydrofobnější než parafilm (smáčecí úhel je vyšší).



Obrázek 21 - Tvar kapky v čase - teflonová páska

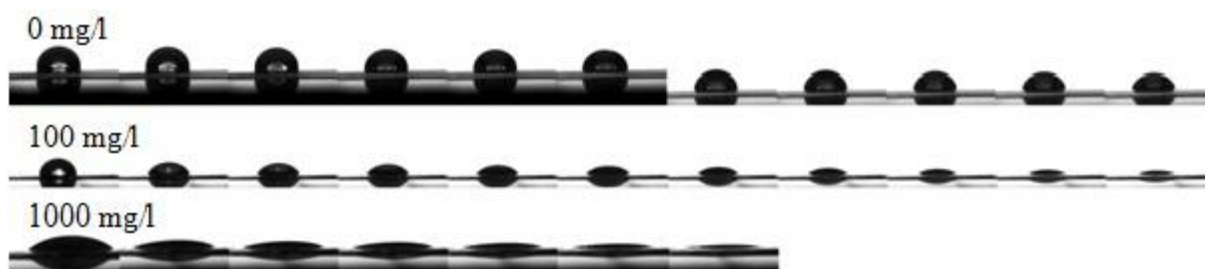
Na obrázku 21 je poté opět možné pozorovat vizuální výsledky z tohoto měření. Je patrné, že kapky zachovávají kulatější tvar než při použití parafilmu jako hydrofobního povrchu.

Teflonová páska je opět velmi silně hydrofobní, což je zřejmé především u silně koncentrovaných roztoků. Problémem opět byla tvorba rovného homogenního povrchu. Dokonalé natažení teflonové pásky na podložní skličko bylo velmi složité a nebylo možné zaručit opakovatelnost tvorby tohoto povrchu.



Obrázek 22 - Závislost smáčecího úhlu na čase - NeverTear

Na obrázku 22 je možné pozorovat obdobné lineární závislosti smáčecího úhlu na čase na polyesterovém archu NeverTear. Tento povrch je znatelně méně hydrofobní, což lze opět pozorovat již na počátečním smáčecím úhlu čisté vody. Pro koncentrovaný roztok biosurfaktantu již nebylo ani možné proměřit smáčecí úhly po dvanácté minutě měření, jelikož se kapka naprosto roztekla.



Obrázek 23 - Tvar kapky v čase – NeverTear

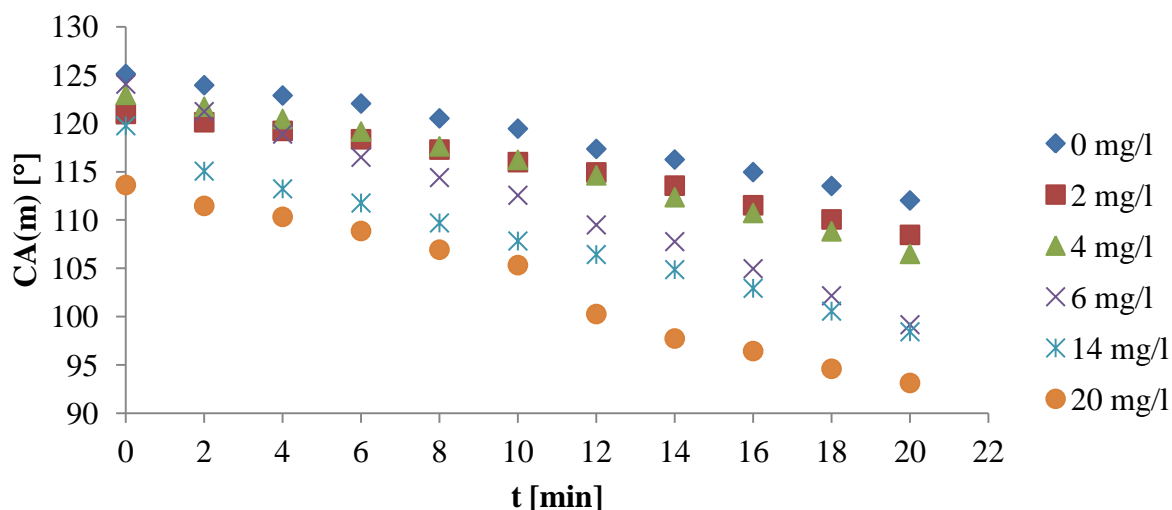
Na obrázku 23 je opět možné pozorovat vizuální výsledky z tohoto měření. Je patrné, že kapky nemají tak kulatý tvar jako na předchozích druzích povrchů, je to způsobeno méně hydrofobními vlastnostmi polyesterového archu.

Polyesterový arch je hydrofobní, ovšem ne dostatečně pro udržení kulatého tvaru kapky u koncentrovanějších roztoků. Naopak výhodou tohoto povrchu je jeho velká homogenita, bez nutnosti jakékoliv úpravy povrchu před jeho použitím. Pro nižší koncentrace se tudíž jevil jako optimální volba.

Obecně je automatizovaná analýza tvaru kapky výhodná z důvodu relativně nízké spotřeby vzorku. U opakovaných měření je ovšem problém s možným ulpěním biosurfaktantů na stěnách stříkačky, případně nanášecí jehly. U vyšších koncentrací byl také problém s odtržením kapky z hrotu jehly a jejím přilnutím na hydrofobní povrch. Tento problém byl výraznější u hydrofobnějších povrchů (teflonová páska). U roztoků s vyšší koncentrací biosurfaktantu zároveň také docházelo ke vzniku vzduchových bublin na povrchu kapky.

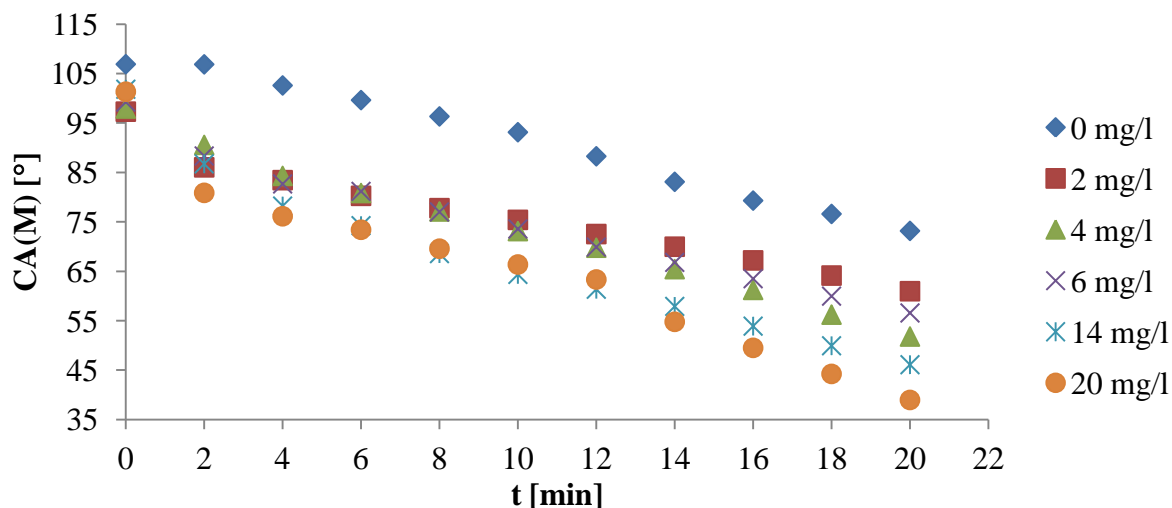
5.4.2 Měření v okolí CMC

Tato měření byla provedena již pouze na teflonové pásce a na polyesterovém archu z důvodu jejich lepší využitelnosti při vizuálních metodách.



Obrázek 24 - Závislost smáčecího úhlu na čase v okolí CMC - teflonová páska

Na obrázku 24 lze pozorovat závislost velikosti smáčecího úhlu na čase při koncentracích v okolí CMC rhamnolipidu na teflonové pásce. Výrazný rozdíl byl pozorován mezi 4 mg/l a 6 mg/l, kapka roztoku o koncentraci 6 mg/l však měla větší i počáteční smáčecí úhel a jednalo se tudíž pravděpodobně o chybu měření. Další skok byl mezi koncentracemi 14 mg/l a 20 mg/l, který pravděpodobně značí kritickou micelární koncentraci roztoku.

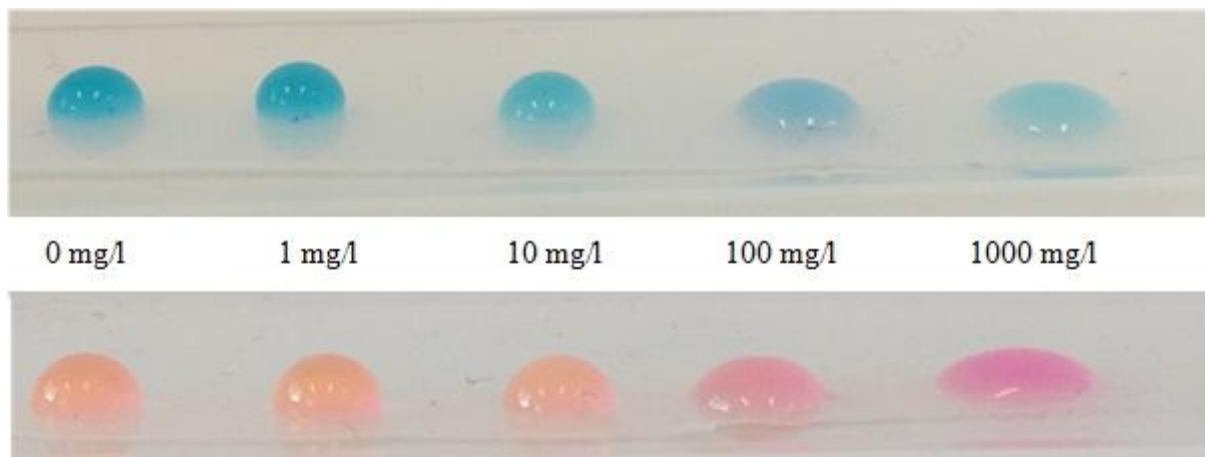


Obrázek 25 - Závislost smáčecího úhlu na čase v okolí CMC - NeverTear

Na obrázku 25 lze pozorovat závislost velikosti smáčecího úhlu na čase při koncentracích v okolí CMC rhamnolipidu na polyesterovém archu. Při těchto měřeních byl problém s počátečními kapkami (ihned po nanesení), které vykazovali značně jiné smáčecí úhly, než v následujících časech. To může být způsobeno například větší porozitou papíru oproti ostatním substrátům. Dochází tak k rychlejšímu poklesu smáčecího úhlu při zaplnění těchto pórů, na což je třeba brát zřetel při případném použití tohoto povrchu při vizuálních metodách.

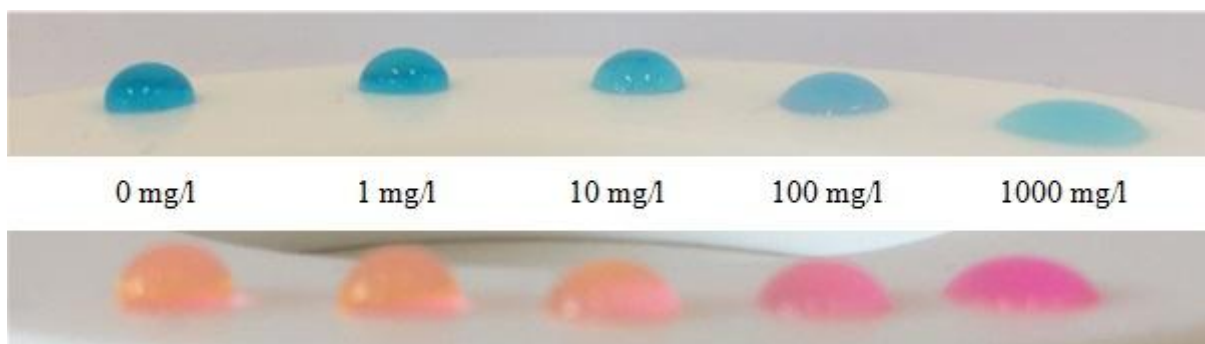
5.5 Metoda rozlévání kapky

Jedná se o první z použitých vizuálních metod. Principem je orientační stanovení koncentrace biosurfaktantu podle vizuálního zhodnocení smáčecího úhlu na silně hydrofobním povrchu. Metoda souvisí tedy s metodou předchozí, ovšem je založena na vizuálním pozorování tvaru kapky bez specializované infrastruktury pro kvantitativní měření smáčecích úhlů. Z důvodu komplementarity k předchozí metodě byly také v tomto experimentu využity stejné materiály substrátu a jako modelový biosurfaktant byl opět použit standardní rhamnolipid.



Obrázek 26 - Tvar různě koncentrovaných nabarvených kapek na parafilmu

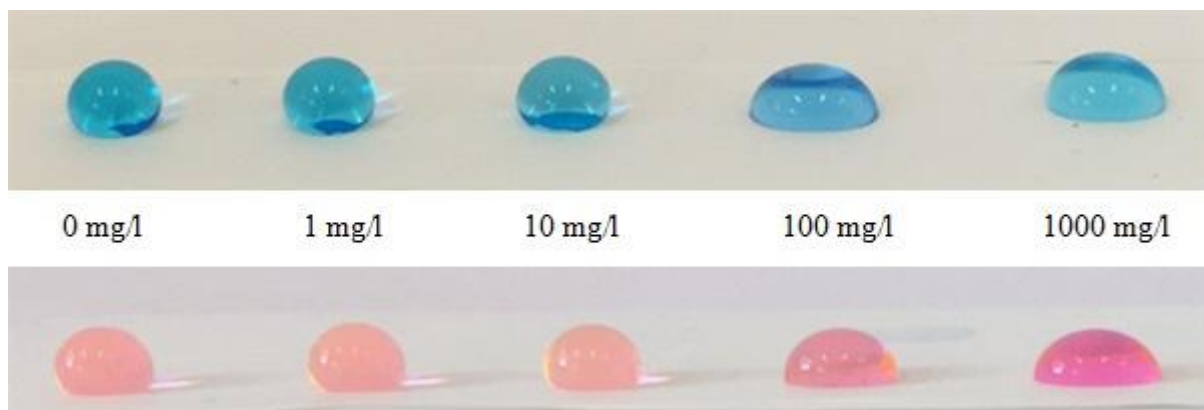
Na obrázku 26 jsou zobrazeny kapky na parafilmovém povrchu. Jak již bylo zmíněno výše tento povrch je relativně hydrofobní, ale problém s jeho použitím je v jeho nehomogenní vrstvě. Roztoky byly také obarveny hydrofilními barvivy. Ty neměly žádný zjevný vliv na změnu povrchového napětí či solubilizačních vlastností roztoku (hodnoceno na základě porovnání tvaru kapky nebarveného a barveného roztoku). Byl ovšem pozorován vliv koncentrace surfaktantu na zbarvení roztoku. U vyšších koncentrací došlo ke světlejšímu zbarvení roztoku methylenovou modří a naopak k výraznějšímu zbarvení Rhodaminem. Zde se zřejmě projevují rozdíly v agregaci barviv způsobené přítomností agregátů biosurfaktantu. Tohoto jevu lze teoreticky také využít k řádovému stanovení koncentrace biosurfaktantu v roztoku. Vliv biosurfaktantu byl pozorován již u koncentrace 10 mg/l, tudíž v okolí CMC rhamnolipidu.



Obrázek 27 - Tvar různě koncentrovaných nabarvených kapek na teflonovém kroužku

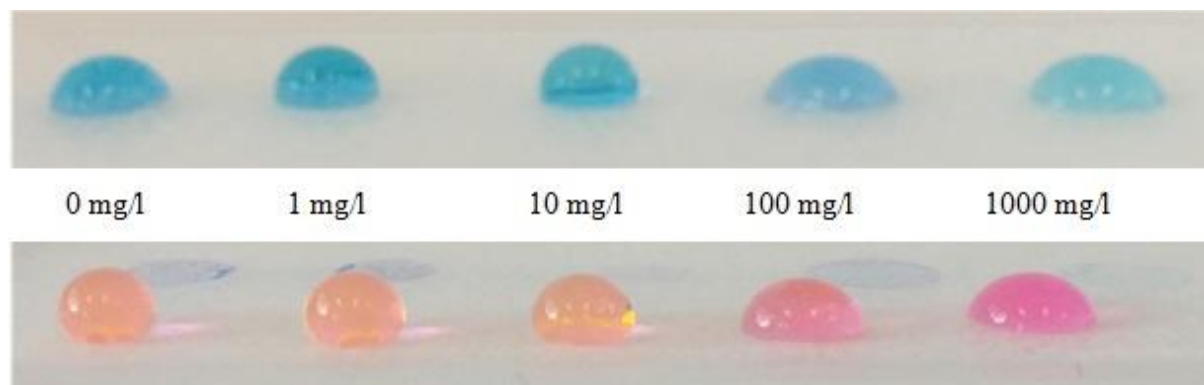
Na obrázku 27 je vidět stejnou metodu stanovení koncentrace biosurfaktantu, ovšem s použitím povrchu z teflonového kroužku. Jedná se o pevný povrch, tudíž odpadá problém

s jeho přípravou. Problémem ovšem je jeho pórovitost, která ovlivňuje tvar nanesených kapek. Jedná se přibližně o stejně hydrofobní povrch jako je parafilm. Při experimentu opět nebyl pozorován žádný vliv přídavku barviva na chování kapky. Vliv biosurfaktantu byl výrazně pozorovatelný až od koncentrace 100 mg/l.



Obrázek 28 - Tvar různě koncentrovaných nabarvených kapek na teflonové pásce

Použití teflonové pásky pro drop collapse metodu je zobrazeno na obrázku 28. Tento povrch vyniká výbornými hydrofobními vlastnostmi. Jak již bylo popsáno u drop shape analýzy, problémem byla tvorba rovného povrchu a možnost jeho opakovatelnosti. Teoreticky lze teflonovou pásku otřít (ani roztoky s barvivem na ní nezanechaly výrazné stopy), ale časem docházelo k podřetí a rozrušení povrchu, který poté měl negativní vliv na tvar kapky. Z důvodu silně hydrofobních vlastností byl pozorovatelný přídavek biosurfaktantu až ve vyšších koncentracích.



Obrázek 29 - Tvar různě koncentrovaných nabarvených kapek na suchém teflonu

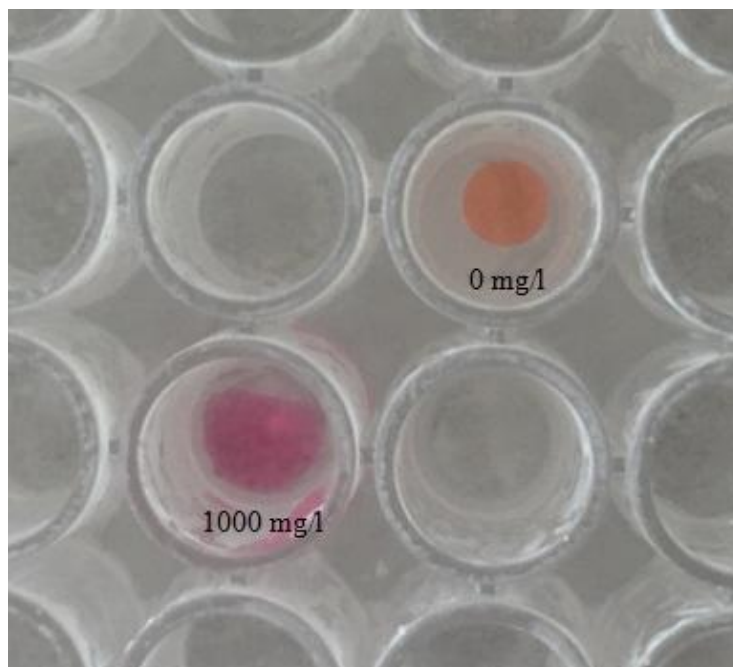
Posledním povrchem použitým pro drop collapse metodu byl tzv. suchý teflon. Jedná se o formu teflonu ve spreji, který po odpaření rozpouštědla zanechává silně hydrofobní vrstvu. Hydrofobní vlastnosti má srovnatelné s teflonovou páskou. Složitější je ovšem jeho nanášení na podložní sklíčko. Vliv na podobu výsledné vrstvy má mnoho faktorů – například vzdálenost nástřiku, počet vrstev (jeden nástřik většinou nestačil k vytvoření souvislé vrstvy), ale také úhel, pod kterým byl nástřik prováděn. Vliv přídavku biosurfaktantu byl opět pozorován až ve vyšších koncentracích.

Každý z použitých povrchů je dostatečně hydrofobní a je možné ho využít na orientační stanovení obsahu biosurfaktantu. V kombinaci s dalšími metodami je však důležitá

homogenita tohoto povrchu, jeho dobrá reprodukovatelnost a výhodou je také jeho průhlednost. Jako nejvýhodnější se tudíž jeví suchý teflon, který tvoří relativně souvislou vrstvu, je průhledný a silně hydrofobní. Alternativou je poté teflonová páska, která má také dostatečně homogenní povrch a je obdobně hydrofobní. Problémem je však její neprůhlednost. U parafilmu je nejvýraznějším problémem tvorba homogenní vrstvy, a její reprodukovatelnost, u teflonového kroužku poté jeho porozita.

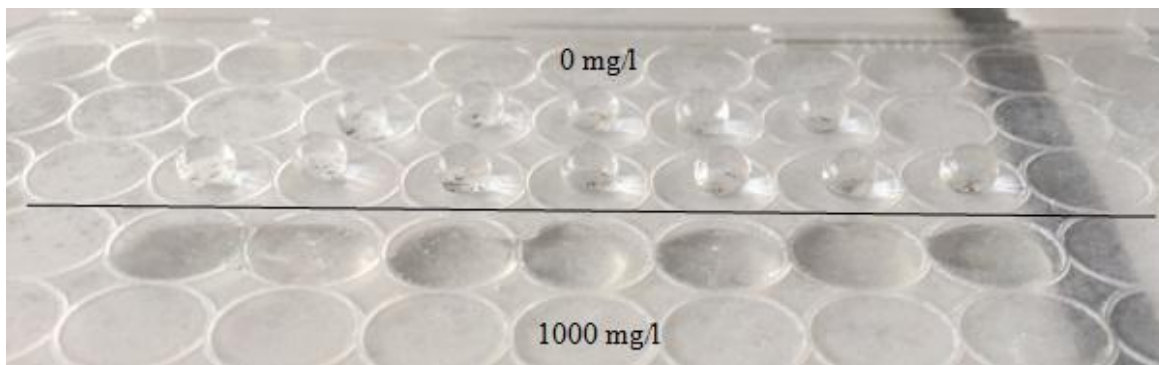
5.6 Mikrodestičkový test

Mikrodestičkový test je další z jednoduchých vizuálních metod určených ke stanovení obsahu biosurfaktantu ve vzorku. Standardně je jako hydrofobní povrch využívána vrstva oleje, při experimentech byla ovšem využita vrstva suchého teflonu z důvodu neúspěšných předběžných experimentů s tenkou olejovou vrstvou. Docházelo při nich k velmi rychlému rozlévání kapky na olejové vrstvě. U větších vrstev také k ponoření kapky do této vrstvy a zdeformování jejího tvaru.



Obrázek 30 - Polystyrenová mikrotitrační destička se suchým teflonem

Na obrázku 30 je zobrazen výsledek mikrodestičkového testu. V případě čisté vody byla pozorována standardní kulatá kapka, která zachovala svůj tvar i po pěti minutách. Naopak u roztoku s přídavkem biosurfaktantu došlo ihned po nanesení k rozliti kapky. Vrstva suchého teflonu zastávala velmi dobře svou funkci hydrofobního povrchu. Využité mikrotitrační destičky však byly poměrně hluboké, což zhoršovalo možnost rovnoměrného a účinného nástřiku suchého teflonu. Proto bylo pro další měření využito víčko mikrotitrační destičky.



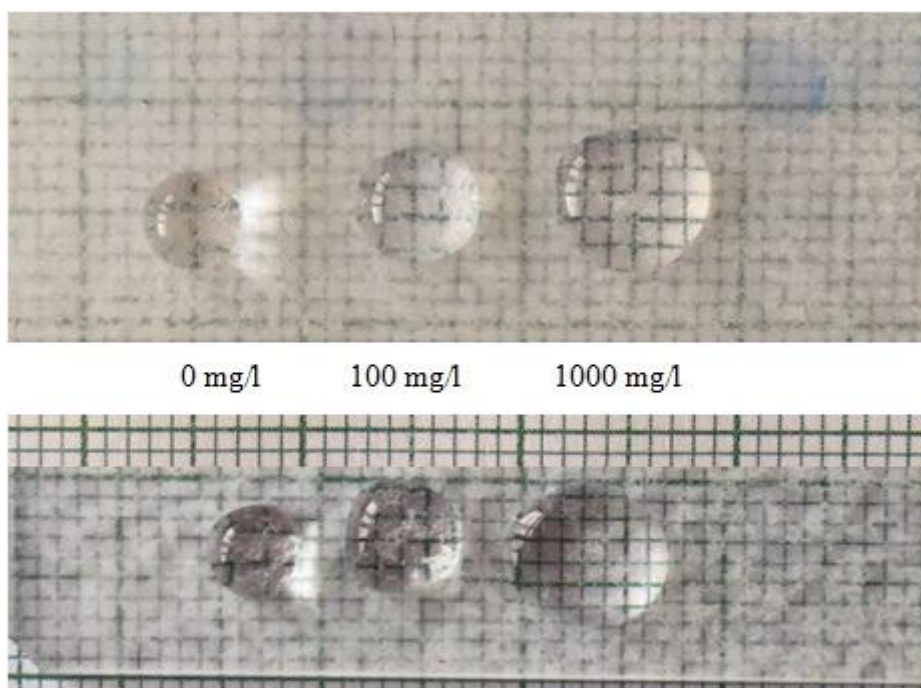
Obrázek 31 - Víčko mikrotitrační destičky se suchým teflonem

Obrázek 31 zobrazuje využití víčka destičky k provedení mikrodestičkového testu. Víčko kombinuje výhody mikrotitrační destičky, jelikož jsou jednotlivé kapky roztoků odděleny zvýšeným povrchem a zároveň umožňuje lepší nástřik suchého teflonu. Po vytvoření kapek bylo pozorováno okamžité spadnutí kapek s přidávkou biosurfaktantu oproti kapkám tvořených čistou vodou, které zachovávaly svůj tvar ještě velmi dlouhou dobu po nanesení.

5.7 Navržené metody založené na pozorování optických vlastností kapky

Pomocí standardního mikrodestičkového testu je možné nejen sledovat, ale i jednoduše kvantifikovat změny optických vlastností roztoku pomocí doplnění hydrofobního substrátu o podložku s milimetrovou mřížkou. Jednou z možností je sledování změn optických vlastností způsobených kapilárními jevy. K těm dochází při naplnění jamky mikrotitrační destičky roztokem a jeho interakci se stěnami jamky. Změny jsou způsobeny hydrofobním povrchem, ze kterého je destička vyrobena (nejčastěji polystyren). Polystyren však není dostatečně hydrofobní a pozorované změny nejsou příliš výrazné. Další možností je vytvoření průhledné hydrofobní vrstvy na dně destičky a následné sledování změn optických vlastností v závislosti na tvaru a velikosti nanesené kapky. Tato metoda byla také využita k testování zkoumaných roztoků z důvodu její větší variability a možnosti jejích úprav. Motivací pro tyto experimenty byla především snaha o vytvoření jednoduchých a přístrojově nenáročných metod, jejichž vyhodnocení by bylo možné provádět pohledem, a zároveň by bylo možné je využít jako semikvantitativní. U samotného mikrodestičkového testu však byl pozorován problém s úplným pokrytím jamek homogenním hydrofobním povrchem. Tento problém byl vyřešen použitím víčka mikrotitrační destičky, které kombinuje výhodu jednotlivých jamek (oddělení kapek), ale zároveň je mnohem lépe přístupnější nově vytvářenému hydrofobnímu povrchu. Stále se však jedná spíše o kvalitativní metodu.

Pro semikvantitativní stanovení koncentrace je třeba využít i dalších vlastností zkoumaných roztoků. Vhodnou vlastností pro toto stanovení je vliv biosurfaktantu na optické vlastnosti kapky. Kapka se chová jako čočka, čehož lze využít například podložním průhledným hydrofobním povrchem přesně definovanou milimetrovou mřížkou.

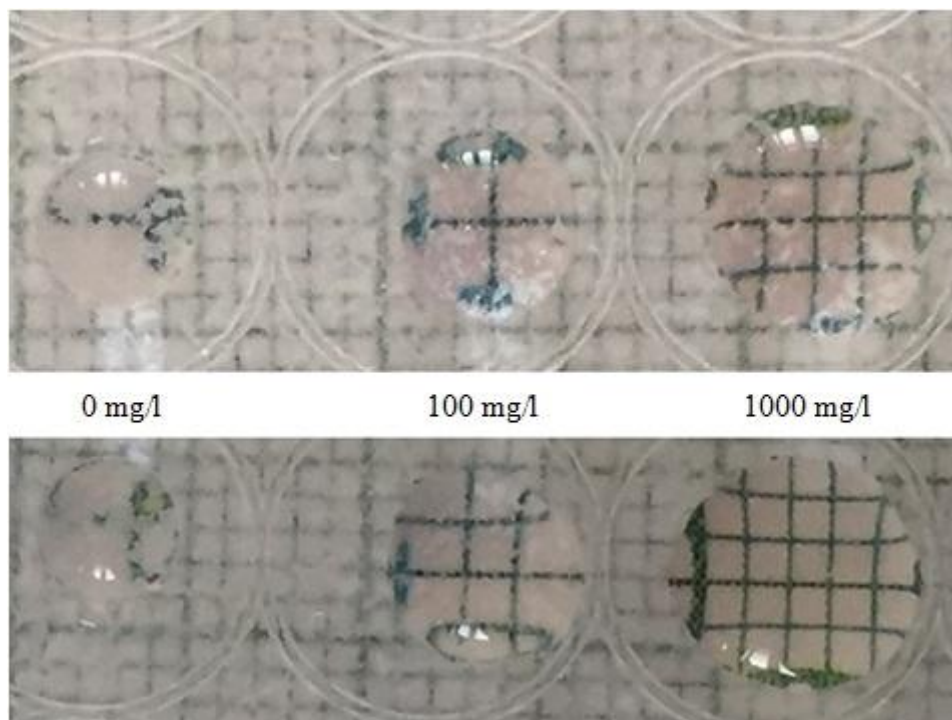


Obrázek 32 - Suchý teflon na podložním sklíčku s milimetrovou mřížkou

Na obrázku 32 jsou fotografie kapek na podložním sklíčku s nástřikem suchého teflonu. Obrázek ilustruje srovnání dvou testovaných teflonových sprejů (PTFE Dry, MOTIP Dupli, rozdílné šarže). První použitý teflon (dřívější datum výroby) tvořil souvislejší vrstvu, kterou ovšem bylo složitější vytvořit – bylo třeba několik opakovaných nástřiků. Druhý teflon (pozdější datum výroby) tvořil vrstvu znatelně jednodušeji, byla ovšem více mezerovitá, což mělo vliv na tvar kapek. Tento vliv je pozorovatelný například na kapce nejkoncentrovanějšího roztoku, u které došlo k výrazně většímu rozlití než na prvním teflonu.

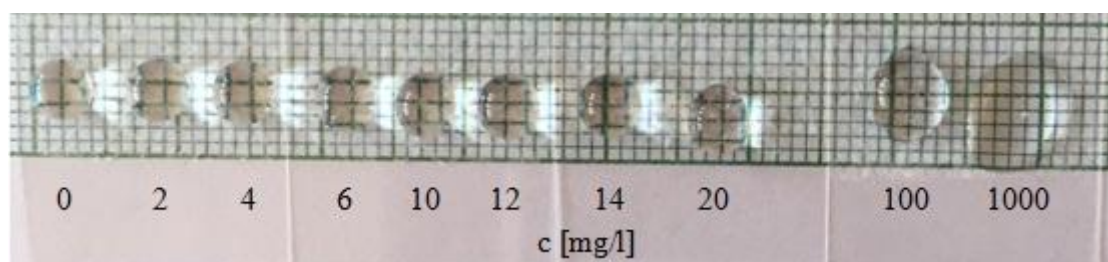
Nástřik povrchu ze suchého teflonu byl prováděn z obdobné vzdálenosti a rámcově ve stejném množství. Odchylka mezi jednotlivými spreji mohla být způsobena pravděpodobně v rozdílných vlastnostech rozpouštědla, souvisejících s rozdílným datem výroby – u staršího spreje mohlo dojít k jeho částečné degradaci.

U tohoto experimentu byl obecně sledován vliv obsahu biosurfaktantu na velikost a tvar kapky a s tím související změnu optických vlastností. Roztok vody například zvětšoval linky milimetrové mřížky (konvexní tvar povrchu kapky funguje jako čočka) a bylo v něm pozorovatelné menší množství čtverců (v důsledku menšího smáčeného povrchu). Čím koncentrovanější byl nanesený roztok, tím méně zvětšoval viditelné linky (méně konvexní zakřivení povrchu), ale o to více obsahoval čtverců (větší smáčená plocha). Tato metoda poté byla zkoumána na dalších druzích povrchů, především z důvodu lepší viditelnosti milimetrové mřížky.



Obrázek 33 - Víčko mikrotitrační destičky se suchým teflonem a milimetrovou mřížkou

Obrázek 33 ilustruje úpravu předchozího experimentu, a to použitím víčka mikrotitrační destičky namísto podložního sklíčka. Cílem bylo vytvoření obdobně hydrofobního povrchu, který by byl ovšem více transparentní. V horní řadě jsou zobrazeny kapky různě koncentrovaných roztoků, na kterých opět byl pozorován vliv biosurfaktantu na optické vlastnosti. Ve spodní řadě jsou tytéž kapky po pěti minutách. V čase docházelo k rozrušení povrchové vrstvy teflonu díky solubilizačním vlastnostem biosurfaktantů – po delším čase bylo možné lépe vidět milimetrovou mřížku. S větším nástřikem suchého teflonu však například u vzorku čisté vody nebylo možné pozorovat optické vlastnosti kapky. Došlo totiž k vytvoření natolik silné vrstvy, že se stala neprůhlednou. Roztoky s přidavkem biosurfaktantu byly schopné tuto vrstvu rozrušit díky svým solubilizačním vlastnostem.

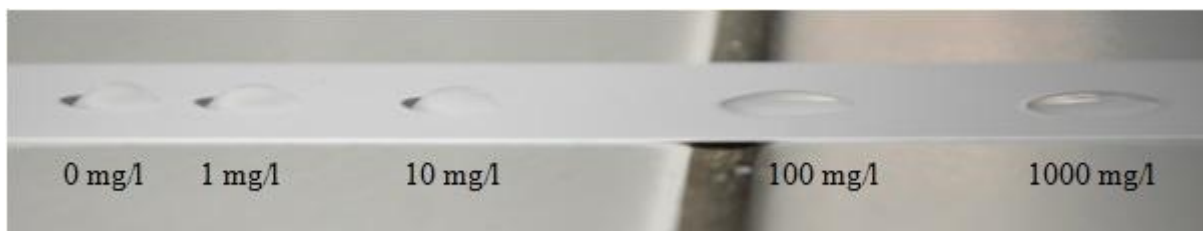


Obrázek 34 - Krycí sklíčko se suchým teflonem a milimetrovou mřížkou

Na obrázku 34 je opět prezentována modifikace předchozího experimentu. Tentokrát byla jako podklad použita krycí sklíčka, která jsou výrazně tenčí než dříve využitá podklady. Byl opět využit nástřik suchého teflonu a následně byly pozorovány optické vlastnosti jednotlivých kapek. Rozdíly mezi jednotlivými koncentracemi byly rozlišeny především díky jejich schopnosti zvětšovat linky milimetrové mřížky. Obyčejným pohledem se jevil tvar kapek jako stejný, až u vyšších koncentrací docházelo k rozlévání kapek.

5.7.1 Využití polyesterového archu NeverTear

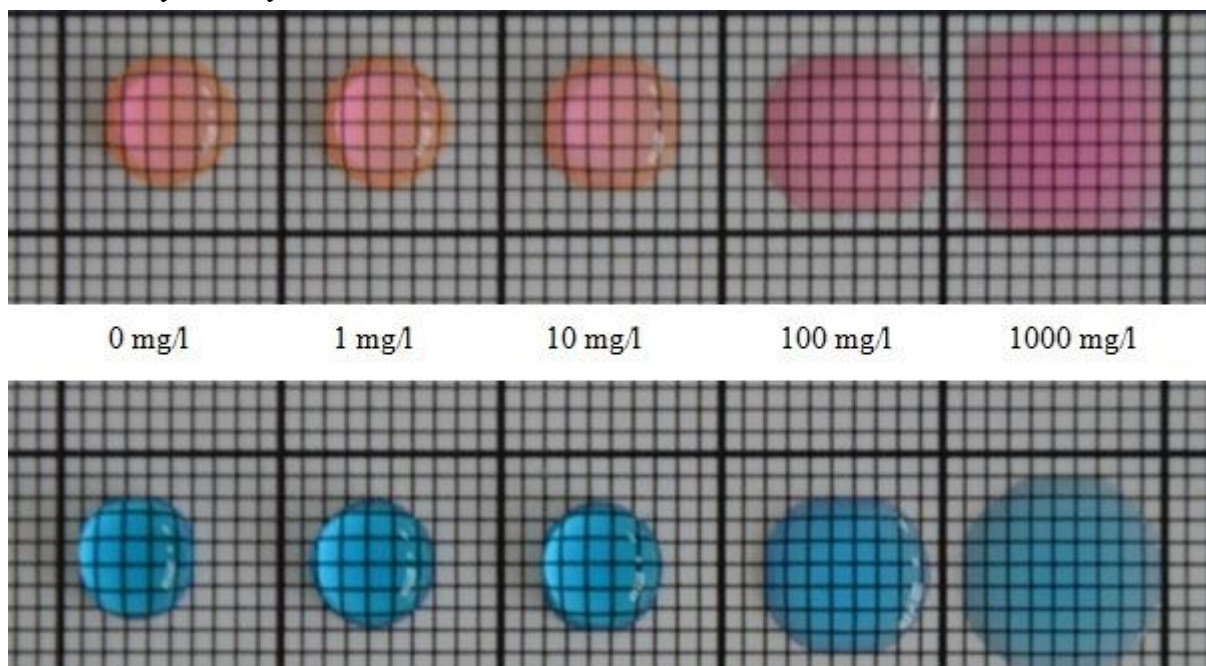
Polyesterový arch je vhodným povrchem z důvodu svých hydrofobních vlastností, ale zároveň, jak již bylo zmíněno výše, se jedná o rovný a homogenní povrch. Byl proto využit pro experimenty založené na mikrodestičkovém testu a drop collapse metodě.



Obrázek 35 - Polyesterový arch NeverTear čistý

Na obrázku 35 je možné vidět různě koncentrované roztoky na čistém polyesterovém archu. Samotný arch není výrazně hydrofobní a u vyšších koncentrací dochází k silnému rozlévání kapek.

5.7.1.1 Polyesterový arch s milimetrovou mřížkou



Obrázek 36 - Polyesterový arch NeverTear s milimetrovou mřížkou

Na obrázku 36 je stejný polyesterový arch, který je však přímo potisknut milimetrovou mřížkou. Tato mřížka vytváří velmi nízkou mechanickou bariéru, která je však dostatečně výrazná aby bránila přílišnému rozlévání kapek. Kapka se tak chová, jako by se nacházela na hydrofobnějším povrchu oproti nepotříštěnému papíru. Experiment byl opět proveden i s roztoky nabarvenými amfifilními barvivy a byl pozorován jejich vliv na tvar a optické vlastnosti kapky. Vliv přídavku biosurfaktantu byl pozorován již při koncentraci 10 mg/l, především množstvím čtverců milimetrové mřížky obsaženým v nejširším místě kapky. U vysokých koncentrací docházelo k výraznějšímu rozlévání kapek než na jiném druhu povrchu.

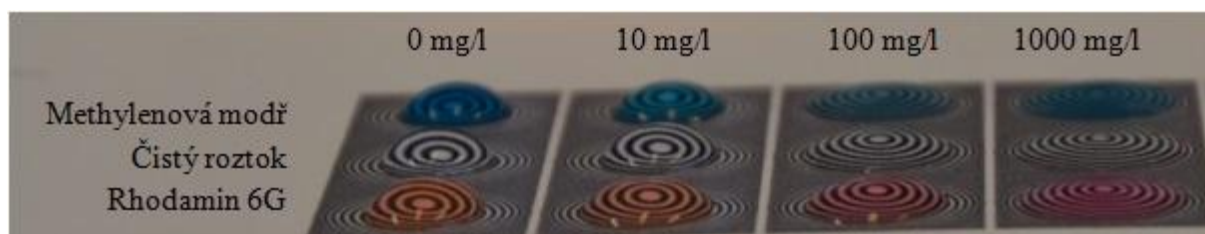
Tabulka 2 - Počet čtverců viditelných v kapce

	0 mg/l	1 mg/l	10 mg/l	100 mg/l	1000 mg/l
Rhodamin	16	16	20	42	64
Methylenová modř	12	12	16	30	56

V tabulce jsou uvedeny celkové počty čtverců viditelných v jednotlivých kapkách, různě koncentrovaných roztoků. U roztoků obarvených methylenovou modří docházelo k menšímu rozlévání kapek, tudíž v těchto kapkách bylo viditelné menší množství čtverců milimetrové mřížky. Pravděpodobně docházelo k interakci roztoku s potiskem papíru, jelikož u kruhových potisků je trend vlivu barviva zcela opačný.

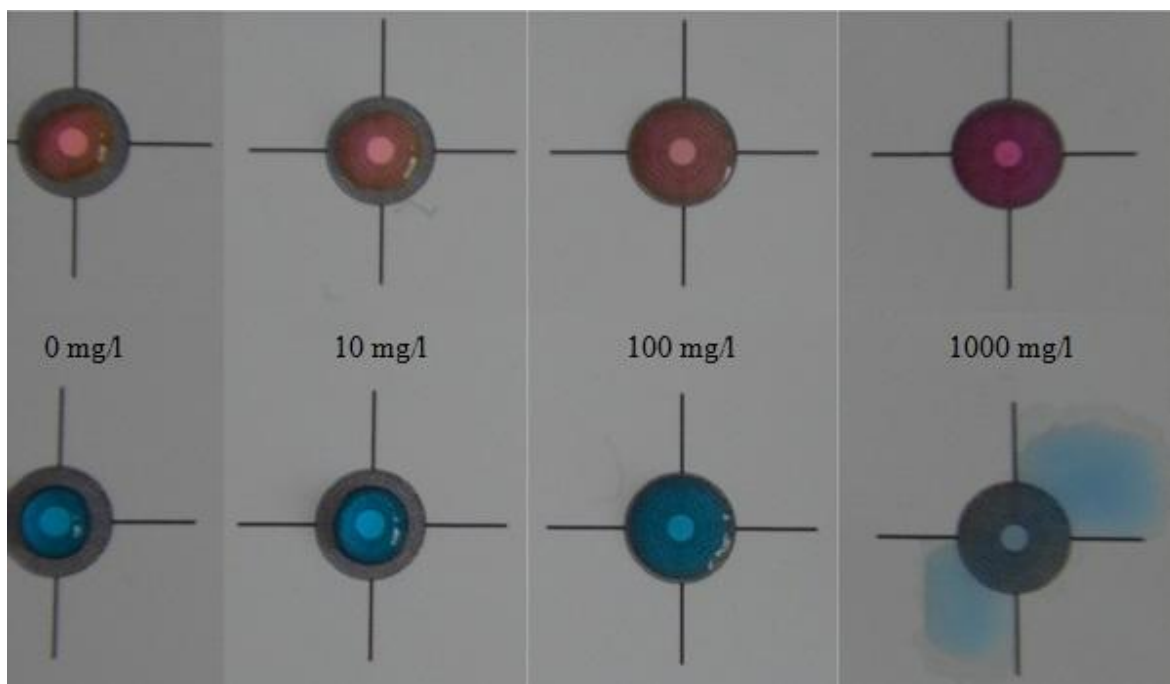
5.7.1.2 Polyesterový arch se soustřednými kruhy

Další alternativou k předchozí metodě byl vytvořen experiment, založený na stejném principu, ovšem místo milimetrové mřížky byly na polyesterový arch natisknuty soustředné kruhy o přesně definovaném poloměru.



Obrázek 37 - Kapky na soustředných kruzích

Na obrázku 37 je možné pozorovat výsledky experimentu, jehož cílem bylo stanovit jednak vliv koncentrace, ale také vliv barviva na schopnost roztoku překonávat jednotlivé mechanické bariéry v podobě kruhů. Z bočního pohledu bylo možné pozorovat výraznou změnu optických vlastností při nižších koncentracích, kdy si kapka zachovávala svůj kulatý tvar. Ve vyšších koncentracích docházelo k roztékání kapky a natisknuté kruhy se jevily jako nezdeformované.



Obrázek 38 - Kapky na soustředných kruzích

Obrázek 38 ukazuje předchozí metodu z horního pohledu a na hustěji naskládaných kruzích. Při tomto experimentu byl zjišťován počet kruhů, které kapka překoná při svém rozlévání. Výsledky tohoto experimentu jsou zobrazeny v následující tabulce. Roztoky s methylenovou modří měly větší tendenci se rozlékat. U nejkonzentrovanejšího roztoku došlo s přidavkem methylenové modří k úplnému rozlití kapky.

Tabulka 3 - Počet kruhů viditelných v kapce

	0 mg/l	10 mg/l	100 mg/l	1000 mg/l
Rhodamin	6	9	14	19
Methylenová modř	6	10	16	-

Využití polyesterového papíru se jeví jako levná, ale stejně kvalitní alternativa ostatních hydrofobních povrchů. Jeho výhodou je především homogenita povrchu, bez nutnosti úpravy před samotným měřením. Při použití potisku milimetrovou mřížkou jsou lépe pozorovatelné změny optických vlastností roztoku, díky výraznějšímu zakřivení jednotlivých čar. U kruhového potisku je naopak výhodou přesnější ohraničení kapky. Obě dvě varianty jsou využitelné k orientačnímu semikvantativnímu stanovení obsahu biosurfaktantu.

6 Závěr

Cílem této práce bylo na základě předchozí literární rešerše vytipovat vhodné metody využitelné pro charakterizaci biosurfaktantů. K této charakterizaci bylo přistupováno ze dvou hledisek. Prvním byla strukturní analýza, jejímž cílem bylo stanovení chemické struktury zkoumaných látek. Druhým poté byla fyzikálně – chemická analýza, jejímž cílem bylo stanovení solubilizačních vlastností roztoků, vliv obsahu biosurfaktantu na změnu povrchového napětí a schopnost vodných roztoků těchto látek smáčet hydrofobní povrchy.

Pro detailní strukturní analýzu je třeba využít specializovaných přístrojů. Standardní metodou je blízká infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací. Ta byla využita také pro charakterizaci zkoumaných vzorků a výsledkem bylo IČ spektrum. Z tohoto spektra vyplývá, že zkoumané biosurfaktanty mají obdobnou vnitřní strukturu. Jedná se totiž o amfifilní molekuly, a tudíž se opakuje tendence tvorby hydrofilní části v podobě cukru a hydrofobní části v podobě dlouhého lipidického uhlovodíkového řetězce.

Fyzikálně – chemickou analýzu je možné provádět i metodami méně přístrojově náročnými. Pro stanovení přesné kritické micelární koncentrace a jejím vlivu na povrchové napětí byla využita klasická metoda kroužkové tenziometrie.

Dalším cílem bylo vytvoření metod fyzikálně – chemické analýzy, které budou v ideálním případě dávat obdobně přesné výsledky, ale zároveň se bude jednat o metody jak časově, tak na spotřebu vzorku nenáročné. Pro tato měření byla využita metoda založená na měření smáčecího úhlu, která je velmi dobře reprodukovatelná a dává relativně přesné výsledky za spotřeby malého množství vzorku, ale je jak časově, tak přístrojově náročná. Tato metoda tudíž byla převedena do jednodušší formy v podobě vizuálních metod. Tyto metody jsou založeny na mikrodestičkovém testu a jeho dalších alternativách, přičemž je sledována interakce mezi vodným roztokem biosurfaktantu a hydrofobním povrchem.

Pro čistě orientační stanovení obsahu biosurfaktantu v roztoku bylo vytvořeno hned několik metod. Jako nejjednodušší se jeví sledování optických vlastností roztoku na polyesterovém archu NeverTear, což není spojeno s nutností tvořit homogenní hydrofobní povrch. Pro detailnější analýzu je však vhodné přistoupit k této metodě za použití teflonové pásky, či suchého teflonu z důvodu jejich hydrofobnějších vlastností a tudíž lepšímu rozlišení vlastností jednotlivých kapek. Tyto metody jsou však spojené s nutností tvorby rovnoměrného povrchu, u čehož je problém s reprodukovatelností přípravy této vrstvy.

Závěrem je možné říci, že biosurfaktanty jsou z vědeckého hlediska velmi atraktivními látkami a jejich získání, analýza a využití budou pravděpodobně ještě hojně diskutovány.

7 Bibliografie

- [1] MD, Fakruddin. *Biosurfactant: Production and Application*. 2012, **03**(04). DOI: 10.4172/2157-7463.1000124. ISSN 21577463. Dostupné také z: <https://www.omicsonline.org/biosurfactant-production-and-application-2157-7463-3-124.php?aid=7497>
- [2] NDLOVU, Thando, Marina RAUTENBACH, Johann VOSLOO, Sehaam KHAN a Wesaal KHAN. Characterisation and antimicrobial activity of biosurfactant extracts produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a wastewater treatment plant. *AMB Express*. 2017, **7**(1). DOI: 10.1186/s13568-017-0363-8. ISSN 2191-0855. Dostupné také z: <http://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-017-0363-8>
- [3] SANTOS, Danyelle, Raquel RUFINO, Juliana LUNA, Valdemir SANTOS a Leonie SARUBBO. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016, **17**(3), 401-. DOI: 10.3390/ijms17030401. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/17/3/401>
- [4] KOSARIC, Naim a Fazilet VARDAR-SUKAN. *Biosurfactants: production and utilization--processes, technologies, and economics*. Boca Raton: CRC Press, 2015. ISBN 978-1-4665-9669-6.
- [5] MNIF, Inès, Semia ELLOUZ-CHAABOUNI a Dhouha GHRIBI. Glycolipid Biosurfactants, Main Classes, Functional Properties and Related Potential Applications in Environmental Biotechnology. *Journal of Polymers and the Environment*. 2018, **26**(5), 2192-2206. DOI: 10.1007/s10924-017-1076-4. ISSN 1566-2543. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10924-017-1076-4>
- [6] SEKHON RANDHAWA, Kamaljeet a Pattanathu RAHMAN. Rhamnolipid biosurfactants—past, present, and future scenario of global market. *Frontiers in Microbiology*. 2014, **5**. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00454. ISSN 1664-302X. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00454/abstract>
- [7] DOBLER, Leticia, Leonardo VILELA, Rodrigo ALMEIDA a Bianca NEVES. Rhamnolipids in perspective: gene regulatory pathways, metabolic engineering, production and technological forecasting. *New Biotechnology*. 2016, **33**(1), 123-135. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2016.07.089. ISSN 09277757. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775716306112>
- [8] CASAS, JoséA. a Félix GARCÍA-OCHOA. Sophorolipid production by *Candida bombicola*: Medium composition and culture methods. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 1999, **88**(5), 488-494. DOI: 10.1016/S1389-1723(00)87664-1. ISSN 13891723. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172300876641>
- [9] RAMKRISHNA, Sen, ed. *Biosurfactants*. Volume 672. New York: Springer-Verlag New York, 2010. ISBN 978-1-4419-5978-2.

- [10] AKBARI, Sweeta, Nour ABDURAHMAN, Rosli YUNUS, Fahim FAYAZ a Oluwaseun ALARA. Biosurfactants—a new frontier for social and environmental safety: a mini review. *Biotechnology Research and Innovation*. 2018, **2**(1), 81-90. DOI: 10.1016/j.biori.2018.09.001. ISSN 24520721. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452072118300182>
- [11] MCNAUGHT, Alan a Andrew WILKINSON. *Compendium of chemical terminology: IUPAC recommendations*. 2nd ed. Malden, MA, USA: Blackwell Science, 1997. ISBN 978-0865426849.
- [12] BUTT, Hans-Jürgen, Kh GRAF a Michael KAPPL. *Physics and chemistry of interfaces*. 2nd., rev. and enl. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2006. ISBN 978-352-7406-296.
- [13] HARTLAND, Stanley, ed. *Surface and Interfacial Tension: Measurement, Theory, and Applications*. Volume 119. New York: CRC Press Inc, 2004. ISBN 978-0-8247-5034-3.
- [14] FÖRCH, Renate, Holger SCHÖNHERR a A. JENKINS. *Surface design: applications in bioscience and nanotechnology*. Weinheim: Wiley-VCH, 2009. ISBN 978-3-527-40789-7.
- [15] DU NOUY, P., Hui LI a Xin SONG. AN INTERFACIAL TENSIOMETER FOR UNIVERSAL USE. *The Journal of General Physiology*. 1925, **7**(5), 625-631. DOI: 10.1016/j.jcis.2012.03.007. ISSN 00219797. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979712002494>
- [16] CIURCZAK, Emil a James DRENNEN. *Pharmaceutical and medical applications of near-infrared spectroscopy*. New York: Marcel Dekker, 2002. ISBN 08-247-9453-2.
- [17] KWOK, D.Y. a A.W. NEUMANN. Contact angle measurement and contact angle interpretation. *Advances in Colloid and Interface Science*. 1999, **81**(3), 167-249. DOI: 10.1016/S0001-8686(98)00087-6. ISSN 00018686. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868698000876>
- [18] RENFRO, Tyler, Weijie XIE, Guang YANG a Gang CHEN. Rhamnolipid surface thermodynamic properties and transport in agricultural soil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014, **115**, 317-322. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2013.12.021. ISSN 09277765. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776513007728>
- [19] MA, Xiaojing, Hui LI a Xin SONG. Surface and biological activity of sophorolipid molecules produced by *Wickerhamiella domercqiae* var. *sophorolipid* CGMCC 1576. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2012, **376**(1), 165-172. DOI: 10.1016/j.jcis.2012.03.007. ISSN 00219797. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979712002494>
- [20] SIDKEY, N, H MOHAMED a H ELKHOULY. Evaluation of Different Screening Methods for Biosurfactant Producers Isolated from Contaminated Egyptian Samples Grown on Industrial Olive Oil Processing Waste. *British Microbiology Research Journal*. New York, NY: Springer New York, 2016, **17**(4), 1-19. DOI: 10.1007/s11274-004-5958-y. ISSN 0959-3993. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-004-5958-y>

- [21] WALTER, Vanessa, Christoph SYLDATK a Rudolf HAUSMANN. Screening Concepts for the Isolation of Biosurfactant Producing Microorganisms. *Biosurfactants*. New York, NY: Springer New York, 2010, , 1-13. Advances in Experimental Medicine and Biology. DOI: 10.1007/978-1-4419-5979-9_1. ISBN 978-1-4419-5978-2. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-5979-9_1
- [22] CHEN, Chien-Yen, Simon BAKER a Richard DARTON. The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. *Journal of Microbiological Methods*. 2007, **70**(3), 503-510. DOI: 10.1016/j.mimet.2007.06.006. ISSN 01677012. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701207002151>
- [23] SIDKEY, N, H MOHAMED a H ELKHOULY. Evaluation of Different Screening Methods for Biosurfactant Producers Isolated from Contaminated Egyptian Samples Grown on Industrial Olive Oil Processing Waste. *British Microbiology Research Journal*. 2016, **17**(4), 1-19. DOI: 10.9734/BMRJ/2016/28437. ISSN 22310886. Dostupné také z: <http://www.sciencedomain.org/abstract/16702>
- [24] NAYARISSERI, Anuraj, Poonam SINGH a Sanjeev SINGH. Screening, isolation and characterization of biosurfactant producing *Bacillus subtilis* strain ANSKLAB03. *Bioinformation*. 2018, **14**(06), 304-314. DOI: 10.4172/2161-0525.1000528. ISSN 09738894. Dostupné také z: <http://www.bioinformation.net/014/97320630014304.htm>
- [25] AHMAD, Zulfqar, Muhammad ARSHAD, Hafiz ASGHAR, Munir SHEIKH a David CROWLEY. Isolation, Screening and Functional Characterization of Biosurfactant Producing Bacteria Isolated from Crude Oil Contaminated Site. *International Journal of Agriculture and Biology*. 2016, **18**(03), 542-548. DOI: 10.17957/IJAB/15.0126. ISSN 15608530. Dostupné také z: http://www.fspublishers.org/published_papers/81668_.pdf
- [26] ALMATAWAH, Qadreyah. *An Indigenous Biosurfactant Producing Burkholderia cepacia with High Emulsification Potential towards Crude Oil*. 2017, **07**(06). DOI: 10.4172/2161-0525.1000528. ISSN 21610525. Dostupné také z: <https://www.omicsonline.org/open-access/an-indigenous-biosurfactant-producing-burkholderia-cepacia-with-high-emulsification-potential-towards-crude-oil-2161-0525-1000528-95670.html>
- [27] ROBERTO, A., F. ROSILEIDE, M. DAYANA, W. HELVIA, P. VANESSA a M. GALBA. Production and characterization of biosurfactant isolated from *Candida glabrata* using renewable substrates. *African Journal of Microbiology Research*. 2017, **11**(6), 237-244. DOI: 10.5897/AJMR2016.8341. ISSN 1996-0808. Dostupné také z: <http://academicjournals.org/journal/AJMR/article-abstract/D111B5762750>
- [28] PATOWARY, Kaustuvmani, Rupshikha PATOWARY, Mohan KALITA a Suresh DEKA. Characterization of Biosurfactant Produced during Degradation of Hydrocarbons Using Crude Oil As Sole Source of Carbon. *Frontiers in Microbiology*. 2017, **8**. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00279. ISSN 1664-302X. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00279/full>
- [29] TIWARY, Meenakshi a Ashok DUBEY. Characterization of Biosurfactant Produced by a Novel Strain of *Pseudomonas aeruginosa* , Isolate ADMT1. *Journal of Surfactants and*

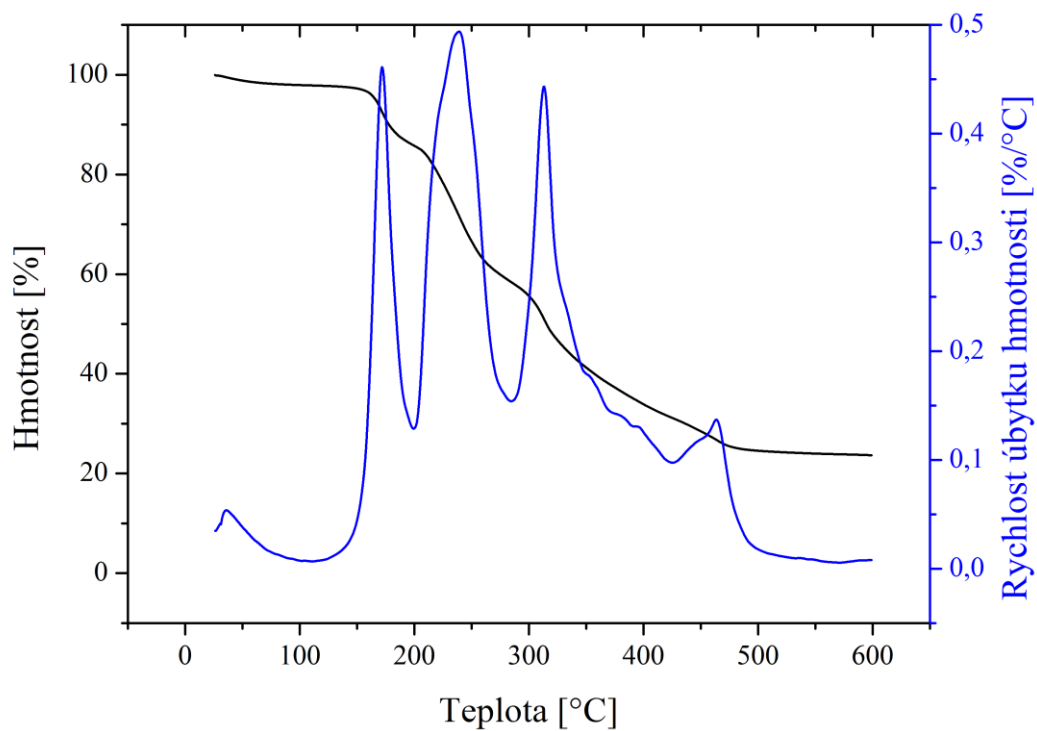
Detergents. 2018, **21**(1), 113-125. DOI: 10.1002/jsde.12021. ISSN 10973958. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsde.12021>

- [30] YADAV, Ankit, Suman MANNA, K. PANDIYAN, Arjun SINGH, Murugan KUMAR, Hillol CHAKDAR, Prem KASHYAP a Alok SRIVASTAVA. Isolation and characterization of biosurfactant producing *Bacillus* sp. from diesel fuel-contaminated site. *Microbiology*. 2016, **85**(1), 56-62. DOI: 10.1134/S0026261716010161. ISSN 0026-2617. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1134/S0026261716010161>

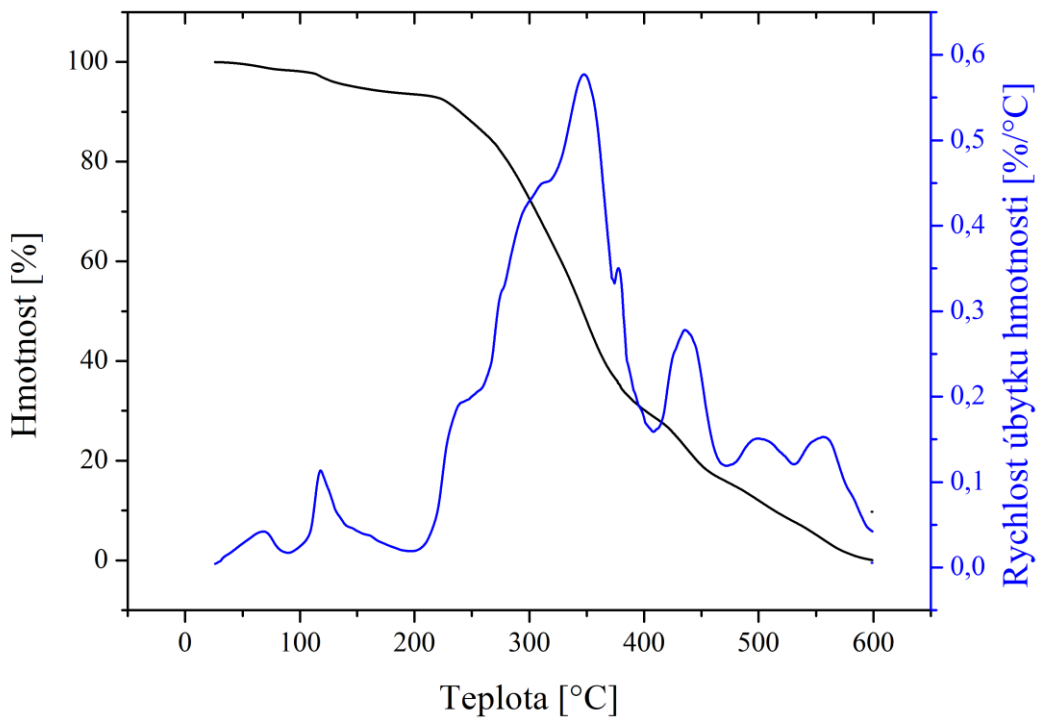
8 Seznam použitých zkratk a symbolů

CMC	kritická micelární koncentrace
PTFE	polytetrafluorethylen (teflon)
BPA	bublinová tenziometrie (bubble pressure analysis)
FTIR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
OCA	měření kontaktního úhlu (optical contact angle)
TGA	termogravimetrická analýza
CA [°]	kontaktní úhel (contact angle)
σ [mN/m]	povrchové napětí
c [mg/l]	koncentrace
t [min]	čas

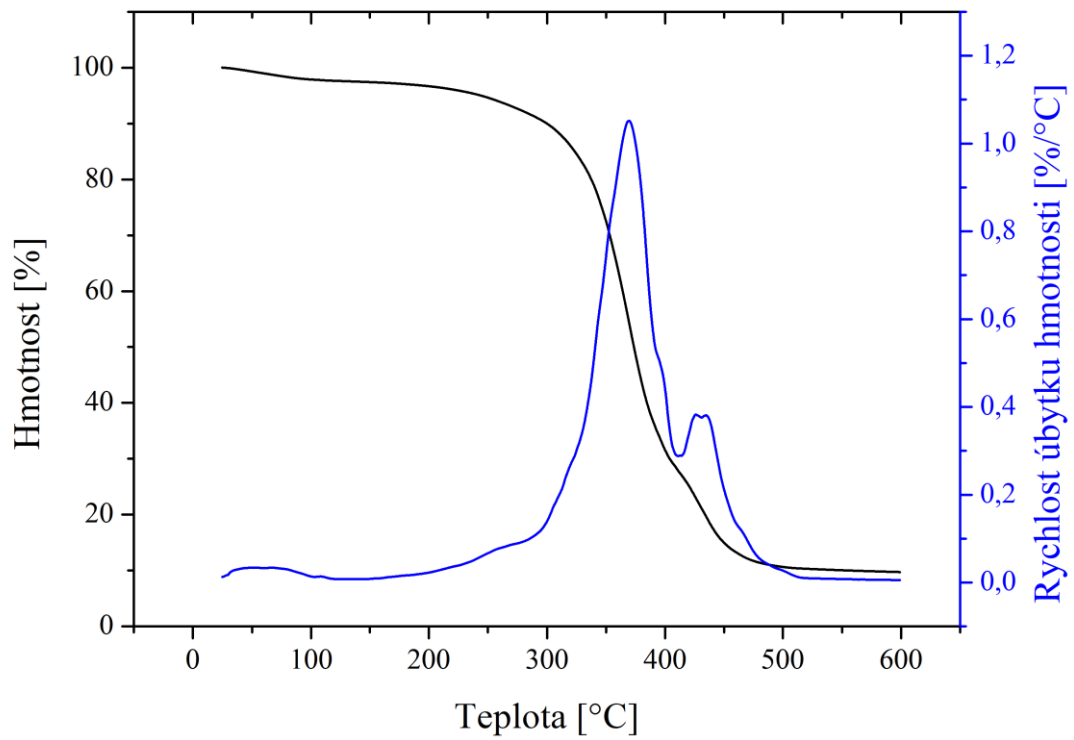
9 Přílohy



Obrázek 39 - TGA rhamnolipidu ve vzduchu



Obrázek 40 - TGA kyselého sophorolipidu ve vzduchu



Obrázek 41 - TGA laktonického sophorolipidu ve vzduchu