

# **Emulze stabilizované komplexem protein – polysacharid**

Tereza Kunetková

---

Bakalářská práce  
2023



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

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

Akademický rok: 2022/2023

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Tereza Kunetková**  
Osobní číslo: **T200001**  
Studijní program: **B0711A130009 Materiály a technologie**  
Specializace: **Biomateriály a kosmetika**  
Forma studia: **Kombinovaná**  
Téma práce: **Emulze stabilizované komplexem protein-polysacharid**

### Zásady pro vypracování

#### I. Teoretická část

V teoretické části vypracujte literární rešerši, ve které se věnujete emulzím, jejich typickým vlastnostem a stabilitě. Popište možnosti tvorby emulzí a zaměřte se na jejich stabilizaci komplexem protein-polysacharid.

#### II. Praktická část

V praktické části připravte sérii komplexů kaseinátu s chitosanem o různém zastoupení těchto složek. Připravené komplexy charakterizujte pomocí dynamického rozptylu světla a zeta potenciálu. Komplexy s vhodnými vlastnostmi využijte při přípravě emulzí O/V. Emulze charakterizujte, získané výsledky zpracujte, přehledně uspořádejte a diskutujte.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] 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.
- [2] TADROS, T., Ed. Emulsion Science and Technology. Wiley-WCH. Weinheim, 2009. 326 p. ISBN 978-3-527-325-2.
- [3] KURUKJI, D., NORTON, I., SPYROPOULOS, F. Fabrication of sub-micron protein-chitosan electrostatic complexes for encapsulation and pH-modulated delivery of model hydrophilic active compounds. *Food Hydrocolloids*, 2016, vol. 53, 249-260.
- [4] ZINOVIADOU, K. G. et al. Properties of emulsions stabilised by sodium caseinate -chitosan complexes. *International Dairy Journal*. 2012, 26, 94-101.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.**  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce: **1. února 2023**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **19. května 2023**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.**  
ředitel ústavu

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji 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;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – 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);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

### **Prohlašuji,**

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## **ABSTRAKT**

Bakalářská práce se zabývá formulací a charakterizací emulzí stabilizovaných pomocí komplexu protein-polysacharid. Proteinovou složku v těchto komplexech tvoří kaseinát sodný a jako polysacharid byl zvolen chitosan. V teoretické části se pojednává obecně o emulzích, jejich stabilitě a o možnostech jejich stabilizace. Dále jsou rozebrány typy v hodných proteinů a polysacharidů. Konečná část literární rešerše je věnována použitým polymerům a popisu stabilizace emulzí pomocí komplexu protein-polysacharid. Část praktická se pak věnuje přípravě samotných roztoků polymerů, tvorbě jejich komplexů a v konečné fázi přípravě emulzí stabilizovaných vyhovujícími komplexy. Příprava emulzí byla provedena dvěma způsoby, a to za pomoci vysokorychlostního homogenizátoru a sonikátoru. U roztoků polymerů a komplexů byla měřena velikost částic a zeta potenciál. Emulze pak byly charakterizovány velikostí emulzních kapek.

Klíčová slova: emulze, stabilita, komplex, kaseinát sodný, chitosan

## **ABSTRACT**

The bachelor thesis deals with the formulation and characterization of emulsions stabilized with protein-polysaccharide complexes. In the complexes, sodium caseinate and chitosan were chosen as the protein and polysaccharide, respectively. The theoretical part of the work focuses on emulsions, their stability and the possibilities of their stabilization. It also describes the types of suitable proteins and polysaccharides for complex formation. Finally, the stabilization of emulsions using a protein-polysaccharide complex is described. The experimental part of the thesis describes the preparation of the caseinate and chitosan solutions, the formation of their complexes and, finally, the preparation of emulsions stabilized by suitable complexes. The emulsions were prepared using a high-speed homogenizer and a sonicator. Polymers and complexes were characterized by their particle sizes and zeta potentials. For the emulsions, the sizes of their droplets were also measured.

Keywords: emulsion, stability, complex, sodium caseinate, chitosan

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé bakalářské práce, paní doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc., za odborné vedení, pomoc v nesnadných situacích, předávání znalostí, ale především za čas a obrovskou trpělivost.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
<b>1 EMULZE</b> .....	<b>11</b>
1.1 KATEGORIZACE EMULZÍ .....	11
1.1.1 Podle polarity disperzního podílu a prostředí .....	11
1.1.2 Podle koncentrace disperzního podílu .....	11
1.1.3 Podle velikosti dispergovaných částic .....	12
1.2 STABILITA EMULZÍ .....	12
<b>2 STABILIZACE EMULZÍ</b> .....	<b>14</b>
2.1 EMULGÁTOR .....	14
2.2 SURFAKTANTY .....	14
2.2.1 Klasifikace surfaktantů.....	15
2.2.2 Tvorba micel .....	15
2.3 POLYMERY .....	16
2.4 ČÁSTICE .....	17
<b>3 KOMPLEX PROTEIN-POLYSACHARID</b> .....	<b>18</b>
3.1 TYPY VHODNÝCH PROTEINŮ A POLYSACHARIDŮ .....	18
3.1.1 Proteiny .....	19
3.1.2 Polysacharidy .....	20
3.2 PROTEIN A POLYSACHARID POUŽITÝ V PRÁCI.....	21
3.2.1 Kaseinát sodný .....	21
3.2.2 Chitosan.....	21
<b>4 EMULZE STABILIZOVANÉ KOMPLEXEM PROTEIN-POLYSACHARID</b> .....	<b>23</b>
<b>5 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE</b> .....	<b>24</b>
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>25</b>
<b>6 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE</b> .....	<b>26</b>
6.1 POUŽITÉ MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE .....	26
6.1.1 Protein .....	26
6.1.2 Polysacharid .....	26
6.1.3 Oleje .....	26
6.1.4 Ostatní chemikálie.....	26
6.2 POUŽITÉ POMŮCKY A PŘÍSTROJE.....	26
<b>7 METODIKA</b> .....	<b>28</b>
7.1 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ CHITOSANU .....	28
7.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ KASEINÁTU SODNÉHO .....	29
7.3 MĚŘENÍ A ADJUSTACE PH ROZTOKŮ CHITOSANU A KASEINÁTU SODNÉHO.....	29
7.4 CHARAKTERIZACE ROZTOKŮ CHITOSANU A KASEINÁTU SODNÉHO.....	29
7.4.1 Velikost částic .....	30
7.4.2 Zeta potenciál .....	31

7.5	TVORBA KOMPLEXŮ .....	31
7.6	CHARAKTERIZACE KOMPLEXŮ .....	31
7.6.1	Změna velikosti komplexu s teplotou .....	32
7.7	PŘÍPRAVA EMULZÍ .....	32
7.7.1	Homogenizace pomocí vysokorychlostního homogenizátoru .....	32
7.7.2	Homogenizace pomocí sonikátoru .....	32
7.8	CHARAKTERIZACE EMULZNÍCH SYSTÉMŮ .....	33
<b>8</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>34</b>
8.1	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ CHIT A NACAS .....	34
8.2	PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE KOMPLEXŮ .....	35
8.3	VLIV TEPLoty NA CHOVÁNÍ KOMPLEXU .....	38
8.4	PŘÍPRAVA EMULZÍ .....	39
8.4.1	Homogenizace pomocí vysokorychlostního homogenizátoru .....	39
8.4.2	Homogenizace pomocí sonikátoru .....	40
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>42</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>43</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>47</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>48</b>
	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>49</b>



## ÚVOD

Užití emulzních systémů v potravinářství, farmacii a především pak v kosmetickém průmyslu není dnes ničím výjimečným. Naopak, v kosmetice jsou emulze jedním z nejvíce používaných přípravků. Proto je stále věnována velká pozornost dalšímu výzkumu emulzních systémů, a to především v kontextu jejich lepší a účinnější stabilizace. S touto problematikou souvisí i snaha nahradit surfaktanty (PAL), které jsou sice poměrně levným a účinným stabilizátorem emulzí, ale vykazují často iritační účinky na kůži, jinými typy stabilizátorů. Hledání nových metod má také příčinu v rychlém technologickém rozvoji, který vede k novým postupům a metodám stabilizace emulzí, jež mimo stabilizační funkci s sebou nesou další přidaná pozitiva.

V posledních letech se ke stabilizaci emulzí začalo užívat jak samotných biopolymerů, tak i jejich kombinací, jako jsou např. komplexy protein-polysacharid. Tloušťka proteino-polysacharidové vrstvy, která se vytvoří okolo dispergovaných olejových kapek emulze, je větší, než například tloušťka filmu, který okolo dispergovaného podílu vytvoří asociativní (mice-lární) koloidy (PAL). Čím větší je tloušťka tohoto filmu, tím větší jsou odpudivé síly mezi molekulami působící proti van der Waalsovým přitažlivým silám, což vede ke zvýšení stability emulze.

V této práci byly k tvorbě komplexů a následné stabilizaci emulzí použity biopolymery kaseinát sodný a chitosan. Kaseinát sodný je v kosmetice hojně používán, jako přírodní emulgátor. Chitosan zatím tak často používán není, nicméně je to ekonomicky snadno dostupný polysacharid a v kosmetickém průmyslu je atraktivní především pro své antibakteriální a hydratační vlastnosti, biologickou rozložitelnost, biokompatibilitu a absenci toxicity.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 EMULZE

Emulze lze definovat jako disperze kapaliny v kapalném disperzním prostředí [1, s. 172]. Kapaliny, které spolu tvoří emulzi, musí být nemísitelné nebo jen omezeně mísitelné a v systému musí být přítomna povrchově aktivní látka (emulgátor). Čím menší je rozdíl v hustotě disperzního prostředí a dispergované fáze, tím jsou emulze odolnější vůči sedimentaci [2, s. 293].

### 1.1 Kategorizace emulzí

#### 1.1.1 Podle polaritý disperzního podílu a prostředí

- *Emulze přímé* (olej ve vodě O/V), ve kterých je disperzním prostředím polárnější kapalina.
- *Emulze obrácené* (voda v oleji V/O), jejichž disperzním prostředím je nepolární kapalina [1, s. 172].

Typ emulze je možno určit pomocí následujících jednoduchých testů

- Pomocí elektrické vodivosti emulze, která je dána vodivostí jejího disperzního prostředí. Emulze typu O/V vedou elektrický proud mnohem lépe.
- Podle schopnosti rozpouštět polární nebo nepolární barviva. Polární barviva zabarví emulzi typu O/V spojitě, zatímco druhý typ emulze zabarven nebude.
- Podle mísitelnosti s polárními nebo nepolárními rozpouštědly. Emulzi je možno ředit kapalinou, která se mísí s jejím disperzním prostředím.
- Podle smáčivosti. Emulze smáčí ten typ povrchu, který je smáčen jejím disperzním prostředím [1, s. 172].

#### 1.1.2 Podle koncentrace disperzního podílu

- *Zředěné* emulze, ve kterých dispergovaná fáze zaujímá nejvýše 2 % celkového objemu. Průměr kapiček je blízký rozměru koloidních částic.
- *Koncentrované* emulze s nedeformovanými kulovitými kapkami, které mohou v monodisperzních systémech dosahovat koncentrace disperzního podílu až 74 obj. %.
- *Vysoce koncentrované (gelové)* emulze s kapkami disperzního podílu uloženým tak těsně, že se vzájemně deformují. Jednotlivé kapky jsou ohraničeny tenkými filmy disperzního prostředí a emulgátoru s koloidními rozměry [1, s. 172].

### 1.1.3 Podle velikosti dispergovaných částic

- *Makroemulze* – velikost částic se pohybuje mezi 100-1000 nm. Jsou mléčně zbarvené a termodynamicky nestabilní.
- *Mikroemulze* – částice jsou veliké 10-100 nm. Jedná se o transparentní a termodynamicky stabilní emulze, jež vznikají pouhým smícháním vybraných komponent.
- *Nanoemulze* – s částicemi o velikosti 50-200 nm. Jsou to transparentní a stabilní emulze, na které je v posledních letech, s rozvojem nanotechnologií, soustředěna pozornost [3].

Setkat se lze také s takzvanými vícečetnými emulzemi (multiple emulsion, double emulsion) typu O/V/O či V/O/V. Jsou to složité disperzní systémy, při jejichž výrobě je zapotřebí použít dva typy emulgátorů. V případě emulze O/V/O jsou kapky oleje dispergovány do kapek vody, obklopených kontinuální olejovou fází. Tyto termodynamicky nestabilní emulze nachází široké uplatnění v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu [4].

Zvláštním druhem emulzí jsou tzv. *kritické emulze*, jež obvykle vznikají mísením dvou navzájem nemísitelných kapalin při teplotě blízké kritické teplotě rozpouštěcí. Tyto emulze jsou obecně velmi nestálé [1, s. 172].

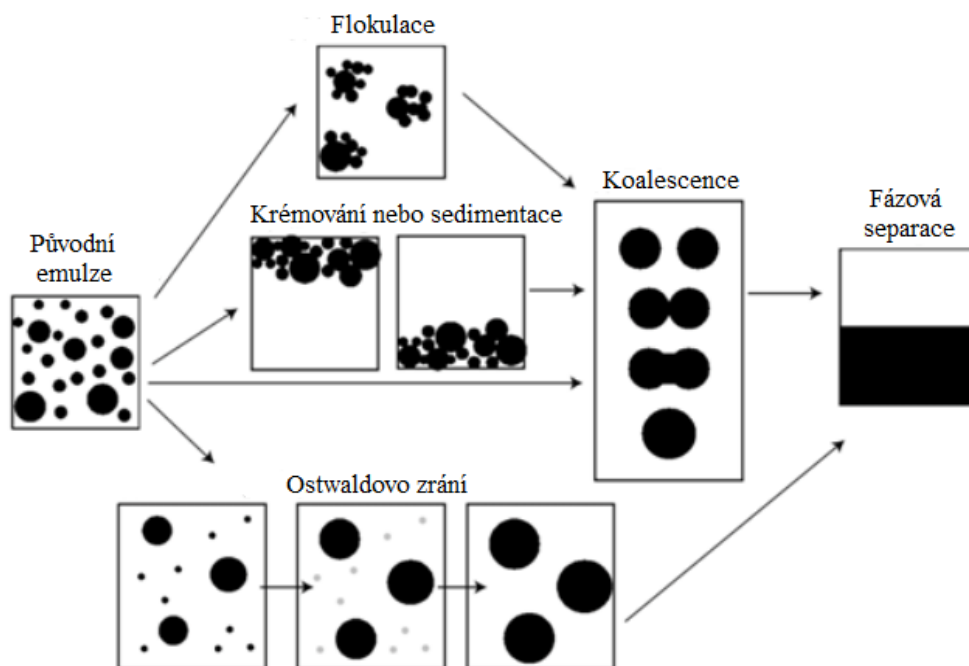
## 1.2 Stabilita emulzí

Emulze jsou obecně termodynamicky velmi nestabilní soustavy. Jejich stabilitu ovlivňuje řada fyzikálně-chemických faktorů, včetně gravitačního působení [5].

Faktory ovlivňující stabilitu emulze

- velikost částic a jejich distribuce
- rozdíl hustoty disperzní a dispergované kontinuální fáze
- Van der Waalsovy síly mezi molekulami
- rozpustnost disperzního podílu v kontinuální fázi
- stabilita kapalného filmu mezi kapkami
- inverze fází [6].

Vlivem těchto faktorů dochází v průběhu času k rozpadu emulze a separaci na vodnou a olejovou fázi. Možné mechanismy rozpadů emulze, znázorněné na Obr. 1. a jsou ovlivněny kinetickou a agregátní stabilitou systému.



Obrázek 1: Mechanismy rozpadu emulze. [35]

**Stabilita kinetická** je dána schopností systému, zachovat si koncentraci a rozdělení dispergovaných kapek v celém objemu emulze. Projevuje se krémováním a sedimentací.

**Stabilita agregátní** pak vychází ze schopnosti systému, zachovat si svůj stupeň disperzity. Zde jsou projevy nestability flokulace nebo koalescence [3].

## 2 STABILIZACE EMULZÍ

Vhodně zvolným způsobem stabilizace lze nežádoucí proces jejího rozpadu oddálit. Zředěné emulze lze stabilizovat elektrickou dvojrůstvou, která je důsledkem rozdílné rozpustnosti kladně a záporně nabitých iontů v olejové a vodné fázi. Koncentrovanější emulze je však potřeba stabilizovat přidáním další látky-emulgátoru [1, s. 173-174].

### 2.1 Emulgátor

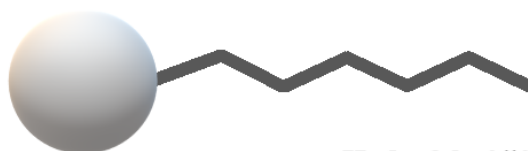
Emulgátor je látka, která umožňuje vznik emulzí. Její funkce spočívá v tom, že je buď schopná zmenšovat energii potřebnou ke tvorbě emulzních částic, nebo zabraňuje jejich zániku tím, že na fázovém rozhraní vytváří film nebo bariéru, která brání emulzním částicím ve flokulaci a koalescenci [1, s. 174]. Emulgátory lze rozdělit do následujících skupin

- asociativní (micelární) koloidy-surfaktanty
- makromolekulární koloidy-polymery
- práškové emulgátory-částice [1, s. 174].

### 2.2 Surfaktanty

Jedná se o povrchově aktivní látky (PAL), hromadící se na fázovém rozhraní. To je způsobeno jejich amfipatickou strukturou, kdy svou hydrofilní částí reagují s polární kapalinou a hydrofobní s nepolární kapalinou. Nepolární část je tvořena většinou alkylovým řetězcem a část polární obsahuje funkční skupinu. Surfaktanty v emulzních systémech snižují povrchové napětí obou fází a tím pomáhají ke vzniku těchto disperzních systému a k jejich stabilizaci [7].

Hydrofilní část



Hydrofobní část

Obrázek 2: Amfipatická struktura molekuly surfaktantu.

Hlavním principem stabilizace emulzí pomocí surfaktantů, je jejich schopnost tvořit micely, pro jejichž vznik je potřebná určitá koncentrace surfaktantu v systému [8].

### 2.2.1 Klasifikace surfaktantů

Surfaktanty lze klasifikovat různými způsoby, nejčastěji však dle povahy hydrofilní části molekuly.

#### Ionické

Rozpustnost je dána schopností molekuly disociovat ve vodném prostředí. Dle nesoucího náboje na funkční nedisociovatelné skupině se dále dělí na

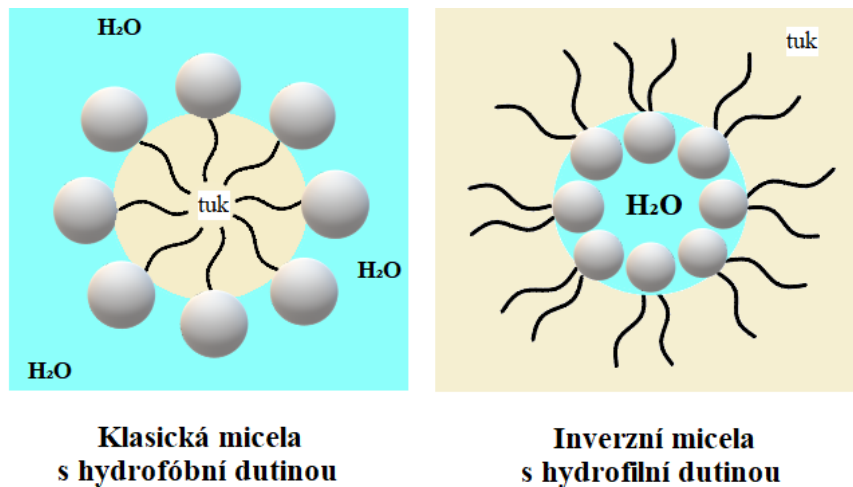
- **Anionické** – obsahující záporně nabitou funkční skupinu. Jedná se o karboxyláty ( $R-COO^- M^+$ ), sulfonáty ( $R-SO_3^- M^+$ ), sulfáty ( $R-OSO_3^- M^+$ ), nebo fosfáty ( $R-OPO_3^- M^+$ ). Nejznámějším anionickým surfaktantem je mýdlo, tedy sodná sůl vyšších alifatických karboxylových kyselin.
- **Kationické** – kde hydrofilní část nese kladný náboj. Patří sem kvartérní amonné soli ( $R_4-N^+ X^-$ ), kde čtyři R-alkylové řetězce, mohou, ale nemusí být všechny stejné. Tyto surfaktanty se používají především pro své mikrobiální účinky.
- **Amfoterní** (a zwitterionické) - molekula obsahuje jak negativní, tak kladný náboj. Základem těchto sloučenin je betain v kombinaci s jinou látkou, například alkylpolyglykolsulfátem [9, s. 34], [10].

#### Neionické

Hydrofilní část v tomto typu surfaktantů nemá náboj. Rozpustnost ve vodě je dána přítomností vysoce polárních skupin. Patří sem polyoxyethylenáty, polyhydroxysloučeniny nebo deriváty alkanolaminů a aminosydy. Výhodou oproti ionickým tenzidům, je jejich snížená citlivost na přítomnost elektrolytů v systému a jejich snížený vliv na pH roztoku [9, s. 34, 75], [10].

### 2.2.2 Tvorba micel

Při nízkých koncentracích surfaktantu v roztoku, se jeho molekuly vyskytují ve formě samostatných jednotek-monomerů. V případě, že jejich koncentrace v roztoku vzroste na tzv. kritickou micelární koncentraci (CMC), začnou povrchově aktivní molekuly tvořit micely [8].



*Obrázek 3: Micela v polárním a nepolárním prostředí.*

Hodnota kritické micelární koncentrace se mění v závislosti na typu použitého surfaktantu v systému. Je dále ovlivněna přítomností přidaného elektrolytu v roztoku, přítomností organických sloučenin nebo působící teplotou [11, s. 121].

V případě emulze typu O/V jsou hydrofobní řetězce shromažďovány uvnitř micely a hydrofilní hlavy zasahují do polární fáze. Tím je vytvořena elektrostaticky stabilizovaná ochranná vrstva kolem dispergovaného podílu. U emulzí typu V/O jsou molekuly orientovány opačně [8].

### 2.3 Polymery

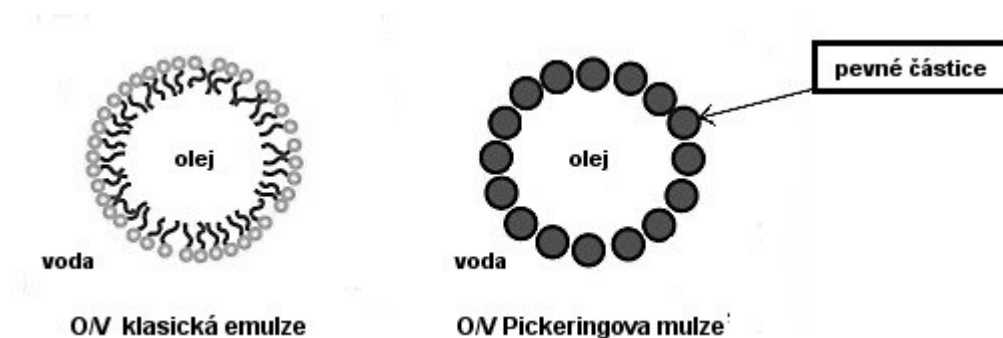
Uspokojivé stability koloidních disperzí je dosaženo pouze v případě, že proti přitažlivým van der Waalsovým silám působí dostatečně silné odpuzivé síly. Velikost a dosah přitažlivých van der Waalsových sil jsou proto rozhodujícím faktorem pro určení strategie vedoucí ke stabilizaci koloidních částic. Polymery s molekulovou hmotností větší než ca 10000 g/mol mají rozměry řetězce srovnatelné nebo větší, než je dosah výše zmíněných přitažlivých sil. Proto tedy tyto polymerní řetězce mohou působit odpuzování koloidních částic a lze je použít pro jejich stabilizaci. Stabilizace koloidů pomocí polymerů se může uskutečňovat dvěma mechanismy: stérickou stabilizací a depleční stabilizací. Sterické stabilizace pomocí polymerů je dosaženo připojením (roubováním nebo chemisorpcí) makromolekul na povrchu



emulzních částic. Depleční stabilizace se naopak dosáhne pomocí makromolekul, které jsou volně přítomné v disperzní fázi emulze [12].

## 2.4 Částice

Stejně jako v případě povrchově aktivních látek, je stabilizace emulze uskutečněna prostřednictvím adsorpce pevných částic anorganické, nebo organické povahy na povrchu dispergovaného podílu emulze. Mechanismus adsorpce částic je však velmi odlišný od adsorpce povrchově aktivních látek, neboť pevné částice nemusí mít amfifilní strukturu. Adsorpce pevných částic na mezifázovém rozhraní, je dána částečným smáčením povrchu částice oběma fázemi.



Obrázek 4: Rozdíl mechanismu stabilizace pomocí surfaktantu a částic [13].

Adsorpce částic kolem dispergovaných kapek vede ke vzniku stabilizující vrstvy, jejíž mechanické vlastnosti zabraňují koalescenci [13]. Z anorganických látek se používají např. částice upraveného oxidu křemičitého, jílu nebo kovů. V posledních letech došlo ke zvýšení zájmu o používání organických latexových částic, lipidových krystalů, nebo částic celulózy [14].

Takto stabilizované emulze se nazývají Pickeringovy emulze. Nalézt je lze také pod názvem „surfactant-free“, což je dělá atraktivními zejména v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu, neboť emulze stabilizované surfaktanty často vykazují iritační účinky [13].

### 3 KOMPLEX PROTEIN-POLYSACHARID

Komplexy mezi proteiny a polysacharidy patří mezi biopolymerní systémy, jež jsou v posledních letech stále více používány k enkapsulaci aktivních látek. Růst zájmu o tyto systémy je spojen s jejich výhodnými vlastnostmi, jako je univerzálnost a četné možnosti využití v oblastech potravin, farmacie, kosmetiky a zemědělství [15].

Vznik protein-polysacharidového komplexu je umožněn buď elektrostatickými interakcemi mezi těmito makromolekulami, nebo kovalentními vazbami vzniklými zahříváním (Maillardova reakce). V případě komplexu tvořeného opačně nabitými molekulami proteinu a polysacharidu vznikají komplexy prostřednictvím již zmíněných fyzikálních, elektrostatických nebo hydrofobních interakcí. Tyto komplexy pak mohou být rozpustné nebo nerozpustné. Rozpustné komplexy spolu následně agregují, což vede ke snížení volné energie v systému a solubilizaci. To se projeví rozdělením fází kapalina-kapalina a koacervací. V této souvislosti je vhodné připomenout, že podle IUPAC je koacervace definována, jako separace koloidního systému do dvou kapalných fází [15].

Tvorba komplexů je ovlivněna mnoha důležitými parametry, jako je například poměr proteinu a polysacharidu, pH jejich roztoků, iontová síla (koncentrace soli), celková koncentrace polymerů a molekulovou hmotností polysacharidu a proteinu. Na jejich vznik má vliv také flexibilita makromolekul, hustota jejich náboje a metoda přípravy (intenzita míchání, tlak a teplota) [15]. Jak již bylo zmíněno, důležitým faktorem ovlivňujícím tvorbu komplexu je pH. V případě, že se hodnota pH prostředí sníží pod hodnotu izoelektrického bodu proteinu, ten nese kladný náboj a bude interagovat s negativně nabitým polysacharidem za vzniku stabilního elektrostatického komplexu. Podobně, pokud bude pH roztoku proteinu vyšší, než je jeho izoelektrický bod, ponese protein záporný náboj a bude mít tendenci tvořit komplex s kladně nabitým polysacharidem. Je tedy zřejmé, že slabší komplexy budou vznikat v případech, kdy pH roztoku bude blízké izoelektrickému bodu proteinu a jeho náboj se bude blížit nule [16].

#### 3.1 Typy vhodných proteinů a polysacharidů

V literatuře byly publikovány studie využívající celou řadu proteinů a polysacharidů vhodných pro tvorbu komplexů. Pokud se jedná o proteiny, mohou být jak živočišného, tak rost-

linného původu. Nejčastěji používanými polysacharidy jsou pak vybrané druhy pektinu, algináty, karagenany, arabská guma, modifikované škroby a modifikované celulózy [17], [18], [19]. V následující části práce budou stručně představeni vybraní zástupci obou skupin.

### 3.1.1 Proteiny

Proteiny jsou polymery složené z aminokyselin kovalentně vázaných peptidovou vazbou.

**Mléčné proteiny:** Dělí se do dvou hlavních kategorií na kaseiny a syrovátkové bílkoviny. Obě tyto skupiny existují v mnoha různých formách. U kaseinů obecně platí, že molekuly tvoří v roztoku náhodné struktury a jejich funkční vlastnosti jsou dány také tím, že je lze nalézt jak v nepolární, tak polární podobě. V závislosti na způsobu jejich izolace pak hovoříme o kaseinátu sodném, kaseinátu vápenatém nebo o kyselém či sladkém kaseinu [20]. Emulze stabilizované kaseináty jsou odolnější vůči zahřívání, než emulze stabilizované syrovátkovým proteinem. Sirovátková bílkovina je složena z jednotlivých proteinů, nejčastěji z  $\beta$ -laktoglobulinu (~55%),  $\alpha$ -laktalbuminu (~24%), sérového albuminu (~ 5%) a imunoglobulinu (~ 15%). Emulze stabilizované tímto proteinem mají sklon k flokulaci při hodnotách pH ~4-5,5 v blízkosti izoelektrického bodu. Vlastnosti syrovátkového proteinu se liší šarže od šarže, což může být způsobeno přítomností nečistot a částečnou denaturací proteinů během izolace [20].

**Proteiny z masa a ryb** lze také použít jako stabilizátory emulzních systémů. Konkrétně se jedná o želatínu, myosin, aktomyosin, sarkoplazmatického proteiny a aktin. Tyto proteiny se vyznačují schopností zvyšovat viskozitu vodné fáze a schopností tvořit ve vodné fázi emulzí gel, což vede k zesílení stabilizace. Nejčastěji se používá želatína, která působí jednak jako látka zvyšující viskozitu vodné fáze emulzí a jednak jako emulgátor v emulzích přímého typu, tedy O / V [20], [34].

**Rostlinné proteiny:** Povrchově aktivní proteiny mohou být také extrahovány z různých rostlin, včetně luštěnin a obilovin. Jedním z nejvíce studovaných rostlinných proteinů je sójový protein, složený z mnoha proteinových podjednotek o různých funkčních vlastnostech. Díky vysokému sklonu k flokulaci emulzí stabilizovaných sójovým proteinem, je tento protein vhodný především do vysoce koncentrovaných emulzních systémů. Naopak velmi nevhodné je jeho použití ve zředěných systémech [20].

### 3.1.2 Polysacharidy

**Pektin** je anionický polysacharid obvykle izolovaný extrakcí ze slupky citrusových plodů. Svou funkci stabilizátoru plní nejlépe při pH ~3,5. Při pH nižším, než je tato hodnota začíná doházet k hydrolýze glykosidických a esterových vazeb v molekule. Stejně tak tomu je, nachází-li se ve vysoce alkalickém prostředí. Hydrolýza esterových vazeb způsobuje nestabilitu viskozity v produktech, kde je pektin použit [19].

**Alginát sodný**, tedy sodná sůl kyseliny alginové, je anionický, biologicky rozložitelný polysacharid, jež se získává z hnědých druhů řas a některých bakterií. Je rozpustný ve vodě a v praxi se velmi často využívá pro svou schopnost tvořit zesíťované struktury za přítomnosti kationtů dvojmocných kovů [19], [21].

**Karagenany** jsou anionické strukturní polysacharidy, izolované z červených mořských řas. Tento sulfátovaný polysacharid je složen z *D*-galaktosy a 3,6-anhydro-*D*-galaktos. Je známo nejméně sedm druhů karagenanů lišících se svou strukturou. Nejčastěji se lze setkat s kappa, iota a lambda karagenany. Stabilní jsou při pH 5-10, kdy se kromě gelačních a stabilizačních vlastností využívá jejich schopnosti tvořit komplexy s proteiny, které jsou pak vhodné pro enkapsulaci aktivních látek [19], [22, s.296-297].

**Arabská guma** je rostlinný exudát, vytékající z kůry akácií čeledi bobovitých. Skládá se ze směsi polysacharidů a obsahuje 90–99 % arabinogalaktan a 1 % glykoproteinů. Je snadno rozpustná a v komplexu spolu s navázanými proteiny dobře stabilizuje emulze typu O/V [18], [22, s.291-292].

**Karboxymethylcelulosa sodná** vzniká derivatizací ve vodě nerozpustné celulosy. Reakcí s kyselinou chloroctovou za přítomnosti NaOH vzniká její sodná sůl rozpustná ve vodě. Tento aniontový polysacharid se používá jako zahušťovadlo a solubilizátor vybraných proteinů [19], [22, s.274].

**Okt-1-enylsukcinátový škrob** se připravuje reakcí okt-1-enylsukcinanhydridem s vodným roztokem škrobu v neutrálním, až slabě zásaditém prostředí. Do emulzních systémů se přidává v nadbytku, z důvodu své nízké mezifázové aktivity. Takto stabilizované emulze jsou odolné vůči změně teploty, pH a iontové síly [20], [22, s.262].

## 3.2 Protein a polysacharid použitý v práci

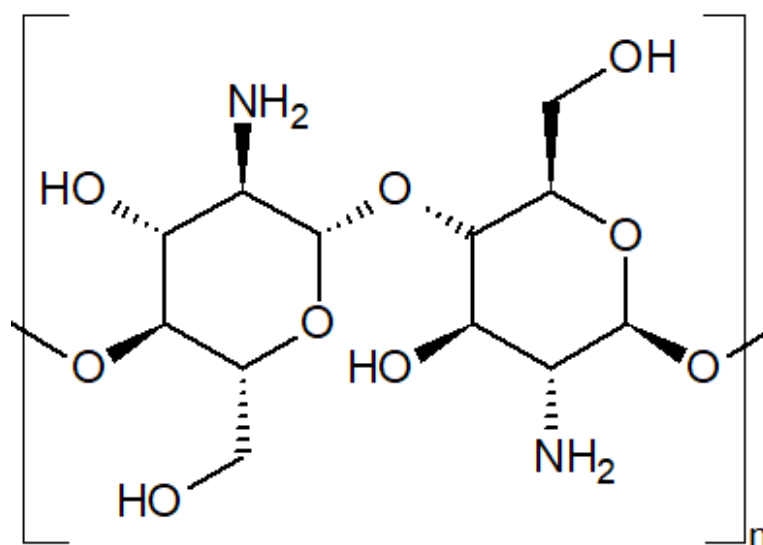
### 3.2.1 Kaseinát sodný

NaCAS je ve farmaceutickém, potravinářském a kosmetickém průmyslu široce používán, jako pěnotvorné činidlo a pro své stabilizující účinky v emulzních systémech [23].

Jak již bylo zmíněno, jedná se o mléčný protein, jež se získává z kyselého kaseinu, a to srážením kaseinových micel při pH 4,6 a následným promytím, za účelem odstranění fosforečnanu vápenatého. Nakonec je k roztoku přidán hydroxid sodný [24]. NaCAS je složen z  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$ ,  $\beta$ , a  $\kappa$  kaseinů ve stejném poměru, jako v kaseinových micelách. Rozdílem je absence fosforečnanu vápenatého, což umožňuje agregaci frakcí kaseinů do menších celků s velikostí přibližně 10 nm [25]. Tento makromolekulární emulgátor snadno adsorbuje na rozhraní dvou nemísitelných kapalin a pomocí elektrostatických a současně sterických interakcí stabilizuje emulzní systémy [26].

### 3.2.2 Chitosan

Tento biopolymer je tvořen *N*-acetyl-2-amino-2-deoxy- D-glukopyranosou a 2-amino-2-deoxy- D -glukopyranosou, které jsou spojeny (1,4) - $\beta$ -glykosidickou vazbou. Jedná se o kationický aminopolysacharid, jehož deriváty se vyskytují v nejrůznějších biologických strukturách. To je důvodem jeho atraktivity pro použití v biomedicínských a průmyslových aplikacích [27]. V přírodě se chitosan vyskytuje jen v malém množství, a to u vybraných hub rodu *Aspergillus* a *Mucoraceae*. Průmyslově se získává z chitinu alkalickou deacetylací varem v přítomnosti NaOH, nebo pomocí enzymů *N*-deacetylas [28]. Roční světová produkce chitinu činí několik miliónů tun, proto je tento zdroj pro výrobu chitosanu levný a snadno dostupný [27].



Obrázek 5: Struktura chitosanu.

V molekule chitosanu se nacházejí tři reaktivní centra. První dvě jsou tvořena primární a sekundární hydroxylovou skupinou a třetí je tvořeno primární aminoskupinou. Chitosan je bez modifikací sám o sobě nerozpustný při pH 7 [28]. Při nižších hodnotách pH jsou však amino skupiny protonizované, chitosan se tedy stává kladně nabitým polyelektrolytem a je možné jej rozpustit, např. ve zředěné kyselině octové. Se zvyšujícím se pH ( $\text{pH} > 7$ ) naopak dochází k deprotonaci aminoskupin, což vede ke ztrátě náboje a chitosan se tak stává nerozpustným [27]. Rozpustnost chitosanu ve vodě lze zvýšit kvarterizací aminoskupiny [28].

Použití chitosanu je různorodé. Vyznačuje svou netoxicitou, dobrou biokompatibilitou a biodegradabilitou. Dále se uplatňuje pro své antimikrobiální účinky proti řadě gramnegativních i grampozitivních bakterií a vyznačuje se i fungicidními účinky při pH nižším, než 6. Ve farmacii se uplatňuje jako vhodné vehikulum při transportu léčiv. Také se o něm mluví v souvislosti s účinky proti rakovině [28]. Používá se i při stabilizaci emulzí, k tvorbě iontových komplexů a k iontové želatinaci. V neposlední řadě se o něm hovoří v souvislosti s tvorbou polyelektrolytových komplexů, tedy komplexů vzniklých pomocí elektrostatických sil [27].

## 4 EMULZE STABILIZOVANÉ KOMPLEXEM PROTEIN-POLYSACHARID

Tyto emulze je možné připravit dvěma alternativními metodami. Při první metodě je vodný roztok obsahující již připravený protein-polysacharidový komplex přidán jako stabilizační činidlo k olejové fázi. Poté následuje běžná homogenizace. Druhá metoda staví na přidavku roztoku polysacharidu k primární emulzi, jež už je stabilizována vrstvou proteinu. Polysacharid reaguje s proteinem za vzniku dvojvrstvy [16]. Dalším sekvenčním přidavkem proteinu a polysacharidu pak lze vytvořit více těchto vrstev. Mimo emulze typu O/V, V/O se tímto postupem dají stabilizovat i vícečetné emulze (multiple emulsion, double emulsion) [29]. V této práci byla aplikována metoda první.

Stabilita takto připravených emulzí je dána především odolností proti Ostwaldovu zrání, ke kterému dochází z důvodu rozdílného chemického potenciálu menších a větších kapiček (koalescence) a dále odpudivými silami mezi dvěma těsně sousedícími kapičkami dispergované kapaliny. Čím větší je tloušťka tenkého filmu mezi emulzními kapkami, tím jsou odpudivé síly větší. V porovnání s filmy, které kolem dispergované fáze vytváří povrchově aktivní látky (surfaktanty), nebo například samotné proteiny (polymery), je tloušťka filmu tvořeného komplexem protein-polysacharid největší. Dá se tedy předpokládat, že takto stabilizované emulze budou odolnější vůči rozpadu [16].

## 5 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo v teoretické části vypracovat literární rešerši pojednávající o emulzích, jejich typických vlastnostech a především o jejich stabilitě. Dalším cílem bylo zaměřit se na emulze stabilizované komplexem protein-polysacharid.

V praktické části pak bylo úkolem připravit sérii komplexů sestávajících ze zvoleného proteinu a polysacharidu. Konkrétně se jednalo o komplexy kaseinátu s chitosanem o různém zastoupení těchto složek. Dále bylo úkolem připravené komplexy charakterizovat pomocí dynamického rozptylu světla a zeta potenciálu a komplexy s vhodnými vlastnostmi využít při přípravě emulzí typu O/V. Tyto emulze následně opět charakterizovat a získané výsledky zpracovat a diskutovat.



## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 6 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE

Pro přípravu emulzí stabilizovaných komplexem kaseinát sodný-chitosan byly použity následující materiály a chemikálie. Dále byly využity níže jmenované pomůcky a přístrojové vybavení.

### 6.1 Použité materiály a chemikálie

#### 6.1.1 Protein

- Kaseinát sodný (NaCAS) z kravského mléka, od spol. Sigma-Aldrich., CAS: 9005-46-3, C8654-500G, vyrobeno v Německu.

#### 6.1.2 Polysacharid

- Chitosan (CHIT) s nízkou molární hmotností (50 000-190 000 Da, vztaženo na viskozitu) a stupněm deacetylace 75-85% od spol. Sigma-Aldrich., CAS: 9012-76-4, C448869-250G, vyrobeno na Islandu.

#### 6.1.3 Oleje

- Dodecane  $\geq 99\%$  – Sigma-Aldrich, CAS: 112-40-3, D112204-500ML
- Trikaprylin/trikaprin – Tegosoft ®CT, Evonik Industries AG
- Slunečnicový olej – Vitae d'Oro
- Bio olej z černého kmínu – od spol. Hemani

#### 6.1.4 Ostatní chemikálie

Demineralizovaná voda, ethanol, hydroxid sodný, fosforečnan sodný, hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát, fosfátový pufr o pH 5,7, kyselina chlorovodíková, kyselina octová.

### 6.2 Použité pomůcky a přístroje

- digitální váhy KERN
- pH metr CPH 51 s magnetickým míchadlem HANNA, HI 190M
- magnetické míchadlo LAVAT CHOTUTICE
- automatické mikropipety Intech a Eppendorf Research plus
- Stříkačkové filtry VWR, materiál PES, s póry o velikosti 0,2 a 0,45  $\mu\text{m}$
- Zetasizer Nano-ZS90, Malvern Instruments Ltd.

- kyveta SARSTEDT, DTS0012 pro měření velikosti částic
- kyveta DTS1060 pro měření zeta potenciálu
- vysokorychlostní homogenizér IKA<sup>®</sup> T25, digital ULTRA TURRAX<sup>®</sup>
- sonikátor UP400S Hielscher, sonda H7
- ostatní běžné laboratorní pomůcky a vybavení (kádinky, odměrné baňky, pipety, odměrné válce, tyčinky, magnety, stojany, chladnička)

## 7 METODIKA

### 7.1 Příprava roztoků chitosanu

Pro experimentální část byly přichystány 2% zásobní roztoky chitosanu (CHIT), které byly připraveny navážením 10 g chitosanu a jeho rozpuštěním v 490 g 0,1M kyseliny octové (přesnost vážení na 0,001 g). Polymerní roztok byl rozpouštěn v kádince po dobu 5 hodin za stálého míchání na magnetickém míchadle. Po počátečním zvýšení teploty na ~ 50 °C, bylo rozpouštění prováděno při laboratorní teplotě. Pro odstranění případně nerozpuštěného polymeru, byl roztok chitosanu před použitím filtrován přes stříkačkový filtr s velikostí porů 0,45 μm. Z tohoto zásobního roztoku byly poté, dalším ředěním demineralizovanou vodou, která byla napřed filtrována přes stříkačkový filtr o velikosti porů 0,2 μm, připraveny roztoky CHIT o rozdílné koncentraci, uvedené v Tabulce 1.

*Tabulka 1: Množství 2% roztoku CHIT a demineralizované vody, použité na přípravu roztoků o celkové hmotnosti 50 g*

Konečná koncentrace [%]	Hmotnost 2% CHIT [g]	Hmotnost vody [g]
1,0	25,0	25,0
0,8	20,0	30,0
0,5	12,5	37,5
0,2	5,0	45,0
0,1	2,5	47,5
0,04	1,0	49,0

Pro výpočet jednotlivých navážek zásobního roztoku CHIT a demineralizované vody byl použit vztah (1):

$$m_1 \cdot w_1 + m_2 \cdot w_2 = m_3 \cdot w_3 \quad (1)$$

Kde:

$m_1, m_2$  – hmotnosti směřovaných roztoků [g]

$m_3$  – výsledná hmotnost konečného roztoku [g]

$w_1, w_2$  – hmotnostní zlomky rozpuštěných látek ve směřovaných roztocích [1]

$w_3$  – hmotnostní zlomek rozpuštěné látky v konečném roztoku [1]

## 7.2 Příprava roztoků kaseinátu sodného

Obdobným způsobem, jako u roztoků chitosanu, byly připraveny 2% zásobní roztoky NaCAS. Bylo naváženo 5 g NaCAS a smícháno s 245 g přefiltrované demineralizované vody. Roztok byl ponechán 24 h v ledničce bobtnat a poté byl po dobu 5 hodin míchán v kádince na magnetickém míchadle při laboratorní teplotě. Následným ředěním přefiltrovanou demineralizovanou vodou, byly připraveny roztoky s různým zastoupením NaCAS (Tabulka 2).

Tabulka 2: Množství 2% roztoku NaCAS a demineralizované vody, použité na přípravu roztoků o celkové hmotnosti 50 g.

Konečná koncentrace [%]	Hmotnost 2% NaCAS [g]	Hmotnost vody [g]
1,0	25,0	25,0
0,5	12,5	37,5
0,2	5,0	45,0

Pro jednotlivé výpočty byl opět uplatněn vztah (1).

Dále byl také připraven 2% roztok NaCAS v pufru, a to smícháním 4 g NaCAS s 200 ml pufru, připraveného z fosforečnanu sodného a hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrátu o pH 5,7. Část roztoku byla poté ještě jedenkrát zředěna puftrem na konečnou 1% koncentraci proteinu ve směsi.

## 7.3 Měření a adjustace pH roztoků chitosanu a kaseinátu sodného

Pomocí pH metru byla u všech připravených vzorků CHIT a NaCAS změřena míra kyselosti. Zpravidla pak bylo potřeba tuto hodnotu upravit na  $\text{pH} \approx 6$ . Roztoky CHIT byly adjustovány přidávkem 1M NaOH a roztoky NaCAS pomocí 0,5M HCl.

## 7.4 Charakterizace roztoků chitosanu a kaseinátu sodného

K charakterizaci připravených koloidních roztoků byly použity techniky, na základě jejichž výsledků lze určit budoucí stabilitu/nestabilitu emulzních systémů. To je důležité pro výrobu a jejich optimalizaci, klasifikaci a nakládání s konečnými výrobky. V této práci byl k charakterizaci použit přístroj Zetasizer Nano-ZS90, pomocí kterého lze stanovit velikost částic

emulzí, která má na stabilitu velký vliv a také jejich elektrický potenciál, rovněž působící na stabilitu/rozpad budoucí emulze.

#### 7.4.1 Velikost částic

Velikost částic byla stanovována pomocí dynamického rozptylu světla. Tato technika, známá také pod pojmem kvazi-elastický rozptyl světla, měří velikost částic na základě vyhodnocení jejich difuzního koeficientu  $D$ . Ze světelného zařízení dopadá na částice světlo. Částice, pohybující se Brownovým pohybem, jsou nestacionární a tím dochází k fluktuaci intenzity jimi rozptýleného světla. Z toho plyne přímá závislost rychlosti fluktuace intenzity rozptýleného světla, na pohybu molekul. Okamžitou hodnotu fluktuace v čase  $\tau$  určuje funkce  $g(\tau)$ , která je dána tzv. relaxačním časem  $\tau_c$ . To je čas, potřebný k návratu k průměrné hodnotě fluktuace. Relaxační čas je v úzkém vztahu s difuzním koeficientem  $D$ , a tak lze pomocí Stokes-Einstenovy rovnice (2) určit hydrodynamický průměr částic [30],[33].

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (2)$$

Kde:

$d(H)$  – hydrodynamický průměr částice

$k$  – Boltzmannova konstanta

$T$  – absolutní teplota

$\eta$  – viskozita disperzního prostředí

$D$  – translační difuzní koeficient

Pro účel měření byly připraveny vzorky a to odpipetováním 10  $\mu\text{l}$  měřeného roztoku chitosanu a 1 ml přefiltrované demineralizované vody do plastových kyvet s uzávěrem. Pro měření vzorku kaseinátu sodného, bylo opět odpipetováno 10  $\mu\text{l}$  měřeného roztoku NaCAS a smícháno s 1 ml demineralizované přefiltrované vody. Takto připravené vzorky byly vloženy do přístroje Zetasizer Nano-ZS90. Ten na základě nastavených parametrů vyhodnotil velikost částic. Pro měření byly zadány následující parametry: index lomu polysacharidu  $n=1,33$ ; index lomu proteinu  $n=1,45$ ; index lomu disperzního prostředí  $n=1,33$ . Měření probíhalo pod detekčním úhlem  $90^\circ$  a při teplotě  $25^\circ\text{C}$ .

### 7.4.2 Zeta potenciál

Jedná se o elektrokinetický potenciál v koloidních soustavách. Ten vzniká na pohybovém rozhraní tzv. Sternovy vrstvy a vrstvy difuzní v elektrické dvojvrstvě okolo nabitě koloidní částice [31]. U dostatečně malých částic s velkým zeta potenciálem pak dochází k vyššímu působení odpudivých sil mezi molekulami, což vede ke snížení sklonu k agregaci. Obecně platí, že je-li hodnota zeta potenciálu vyšší, než  $\pm 30$  mV, dochází k elektrické stabilizaci disperze [32].

Pro toto měření bylo do speciální kyvety odpipetováno po 1 ml dále neředěného měřeného roztoku CHIT nebo NaCAS. Kyveta byla umístěna do přístroje Zetasizer Nano-ZS90 a měření probíhalo opět za teploty 25 °C. Výsledkem byla průměrná hodnota zeta potenciálu stanovená ze tří po sobě jdoucích měření.

### 7.5 Tvorba komplexů

Do 50 ml kádinky na magnetickém míchadle bylo odpipetováno 10 ml NaCAS o zvolené koncentraci. Za stálého míchání při laboratorní teplotě bylo následně k proteinu pipetou přikapáváno 10 ml vybraného roztoku chitosanu, po dobu 10-15 min. Vzniklé komplexy se lišily celkovým množstvím polymeru v roztoku a také různým poměrem polysacharidu ku proteinu, které byly přítomné v komplexu. Dále byly komplexy rozdílné, co se týká pH disperzního prostředí, ve kterém vznikaly. To bylo ovlivněno různou pH hodnotou roztoků chitosanu a kaseinátu sodného užitých k jejich tvorbě. Komplexy byly do dalšího zpracování uchovávány v chladničce při teplotě 5–8 °C. Komplexy, které byly vybrány pro přípravu emulzí pomocí sonikátoru, byly před užitím ještě podrobeny krátké sonikaci.

### 7.6 Charakterizace komplexů

Připravené komplexy CAS a CHIT byly charakterizovány měřením jejich pH v disperzním prostředí pomocí pH metru. Velikost částic a zeta potenciál komplexů byly rovněž měřeny na přístroji Zetasizer Nano-ZS90. Pro účely měření velikosti bylo do kyvety odpipetováno 5  $\mu$ l vzorku komplexu a 1 ml přefiltrované demineralizované vody. Byly nastaveny následující parametry měření: index lomu dispergovaného podílu  $n = 1,45$ , index lomu disperzního prostředí (voda)  $n = 1,33$ . Zeta potenciál byl měřen na vzorcích připravených stejným způsobem při teplotě 25 °C. U komplexů, které byly vybrány na přípravu emulzí, byla měřena jejich velikost po smíchání roztoků NaCAS a CHIT a ještě znovu po sonikaci. Pro každý vzorek byla provedena 3 stanovení a finální výsledek byl vyjádřen jako jejich průměr.

### 7.6.1 Změna velikosti komplexu s teplotou

U dvou vybraných vzorků komplexů byla také stanovena závislost jejich velikosti na teplotě. Studované komplexy měly totožné složení a sestávaly ze 0,5 % NaCAS a 0,1 % CHIT ve směsi. Stejně tak se u obou komplexů pohybovala hodnota pH  $\approx$  6. Pro stanovení byly odebrány do kyvety 3  $\mu$ l komplexu a 1 ml přefiltrované demineralizované vody. Kyveta byla vložena do přístroje Zetasizer Nano-ZS90, kde bylo pro první měření nastaveno měření velikosti komplexu od počáteční teploty 20 do 85 °C s  $\Delta T = 1$  °C. Pro druhé měření byl nastaven rozsah teplot měření od 20 do 50 °C a posléze měření při poklesu teploty zpět na teplotu 20 °C. Teploty byly opět odčítány pro krocích  $\Delta T = 1$  °C.

## 7.7 Příprava emulzí

K přípravě emulzí typu O/V o poměru 10:90 byly použity 4 různé oleje, konkrétně dodekan, slunečnicový olej, bio olej z černého kmínu a trikaprylin/trikaprin Tegosoft. Jako vodná fáze pak byly použity disperse vyhovujících komplexů. Zvoleny byly také dva postupy homogenizace, a to pomocí vysokorychlostního homogenizátoru a sonikací.

### 7.7.1 Homogenizace pomocí vysokorychlostního homogenizátoru

V tomto případě byly do zkumavky odváženy vždy 2 g vybraného oleje, ke kterým bylo přidáno 18 g disperse komplexu. Směsi byly následně emulgovány 10-12 minut při 13 400 ot/min, pomocí vysokorychlostního homogenizátoru ULTRA TURRAX. Zkumavka s emulgovanou směsí byla po celou dobu homogenizace ponořena v nádobě s ledem. Tímto způsobem byla připravena série emulzí, za použití všech výše zmíněných olejů. Použité komplexy se lišily jak celkovým množstvím polymeru v komplexu, tak poměrem polysacharidu ku proteinu.

### 7.7.2 Homogenizace pomocí sonikátoru

Pro tento účel byly do zkumavky opět odváženy 2 g vybraného oleje a k němu bylo přidáno 18 g disperse vybraného komplexu, který byl před použitím podroben sonikaci a byla proměřena velikost jeho částic. Tyto vzorky byly následně podrobeny homogenizací na sonikátoru UP400S, po dobu 1 minuty a při 100% amplitudě. Tímto postupem byly připraveny pouze čtyři emulze. Použity zde byly dodekan a trikaprylin/trikaprin jako olejové fáze a komplexy o zastoupení polymerů v roztoku NaCAS 0,5% / 0,1% CHIT a NaCAS 0,1% / 0,05% CHIT.



## 7.8 Charakterizace emulzních systémů

Vzorky pro měření byly odebírány z vrchní vrstvy emulzí a byla stanovena pouze velikost emulzních kapek. Pipetou bylo do kyvety převedeno 250  $\mu\text{l}$  emulze a přidáno 750  $\mu\text{l}$  přefiltrované demineralizované vody. Měření opět probíhalo na přístroji Zetasizeru Nano-ZS90, s detekčním úhlem 90 ° a při teplotě 25 °C.

## 8 VÝSLEDKY A DISKUSE

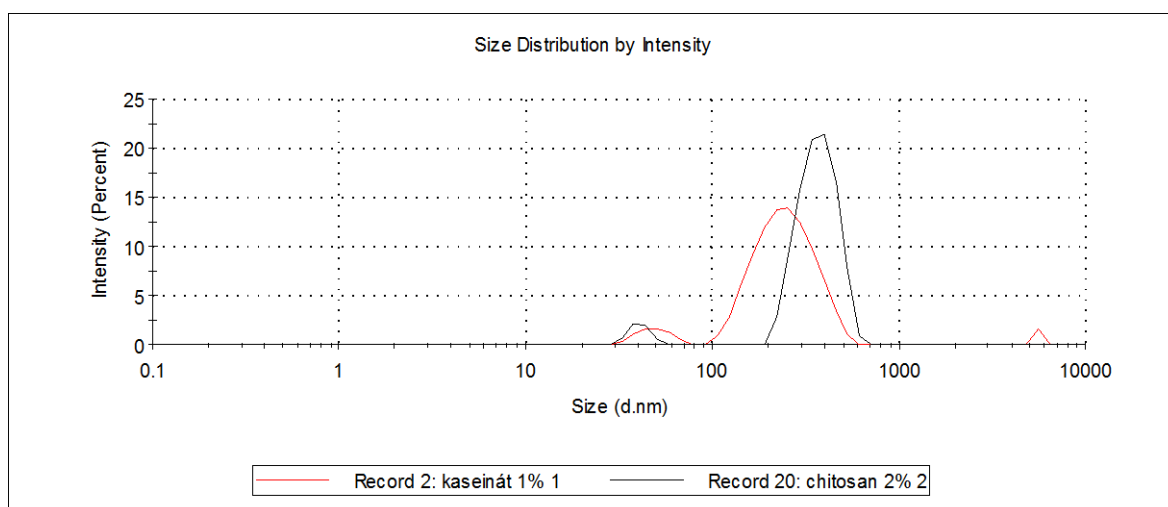
### 8.1 Příprava roztoků CHIT a NaCAS

Práškový chitosan byl rozpouštěn v 0,1M kyselině octové z toho důvodu, že od hodnoty pH 7 a více, je chitosan deprotonizovaný a nerozpustný. V kyselých roztocích naopak dojde k protonizaci, vzniku kladného náboje a chitosan lze rozpustit. Aby došlo k důkladnému rozpouštění, bylo potřeba roztok v kádince homogenizovat na magnetickém míchadle. Z 2% zásobního roztoku byly poté připraveny roztoky o nižší koncentraci chitosanu (Tabulka 1), kdy k ředění již stačila destilovaná voda. Příprava konečných roztoků chitosanu opět probíhala za pomoci magnetického míchadla, aby došlo k důkladné homogenizaci. Pro přípravu disperzí kaseinátu sodného bylo důležité sušený NaCAS nechat nabobtnat ve vodě o neutrálním pH, protože při tomto pH jsou kaseináty nejlépe rozpustné. Zároveň při pH vyšším, než je pH v blízkosti jejich izoelektrického bodu (4,6), nese kaseinát sodný záporný náboj, což je důležité pro interakci s kladně nabitým chitosanem, v pozdější fázi přípravy komplexů. Pro důkladné rozpouštění byl NaCAS ponechán 24 h v chladničce nabobtnat (hydratovat) v demineralizované vodě a roztok byl poté ještě důkladně homogenizován v kádince na magnetickém míchadle. Ředění 2% zásobních roztoků na výsledné koncentrace poté probíhalo také za homogenizace na magnetickém míchadle.

U všech připravených vzorků CHIT a NaCAS bylo změřeno pH, s výsledkem poukazujícím na skutečnost, že před adjustací se pH roztoků CHIT pohybovalo převážně okolo hodnoty 5,5-6, zatímco u NaCAS byly naměřeny hodnoty od 6 do 7. Na stabilitu výsledných emulzí má velký vliv velikost částic proteinu a polysacharidu a následně vzniklého komplexu. Ta je ovlivněna hodnotou pH roztoku, ve kterém se CHIT i CAS nacházejí, a tak bylo snahou zjistit, při kterém pH mají zmíněné polymery v roztocích nejmenší velikost částic. Nejmenší velikost měly částice NaCAS a CHIT při  $\text{pH} \approx 6$  (Tabulka 3) a tak bylo potřeba jejich roztoky na tuto hodnotu pH adjustovat, ještě před tvorbou komplexů. Snížení pH NaCAS roztoků na hodnotu 6, pomocí přídavku 0,5M HCl, probíhalo bez problémů. V případě CHIT byl použit 1M NaOH a při adjustaci docházelo v některých případech k tvorbě hydrogelu. Z Tabulky 3 je dále vidět, že při hodnotě  $\text{pH} \approx 6$  tvoří NaCAS menší částice než CHIT. Na Obrázku 6 je pak znázorněno srovnání distribucí velikosti částic roztoků obou polymerů uvedených v Tabulce 3, které rovněž potvrzuje, že v dané oblasti pH mají částice CHIT větší velikost.

Tabulka 3: Naměřené hodnoty velikosti částic a zeta potenciálu u adjustovaných zásobních roztoků NaCAS a CHIT. Průměrné hodnoty veličin a jejich směrodatné odchylky (SD)

vzorek	pH	Z-average $\pm$ SD [nm]	PDI $\pm$ SD	ZP $\pm$ SD [mV]
NaCAS	6,0	235 $\pm$ 8	0,413 $\pm$ 0,04	-27 $\pm$ 3
CHIT	5,8	669 $\pm$ 15	0,779 $\pm$ 0,09	66 $\pm$ 4



Obrázek 6: Distribuce velikosti částic zásobních roztoků NaCAS (červená čára) a CHIT (černá čára).

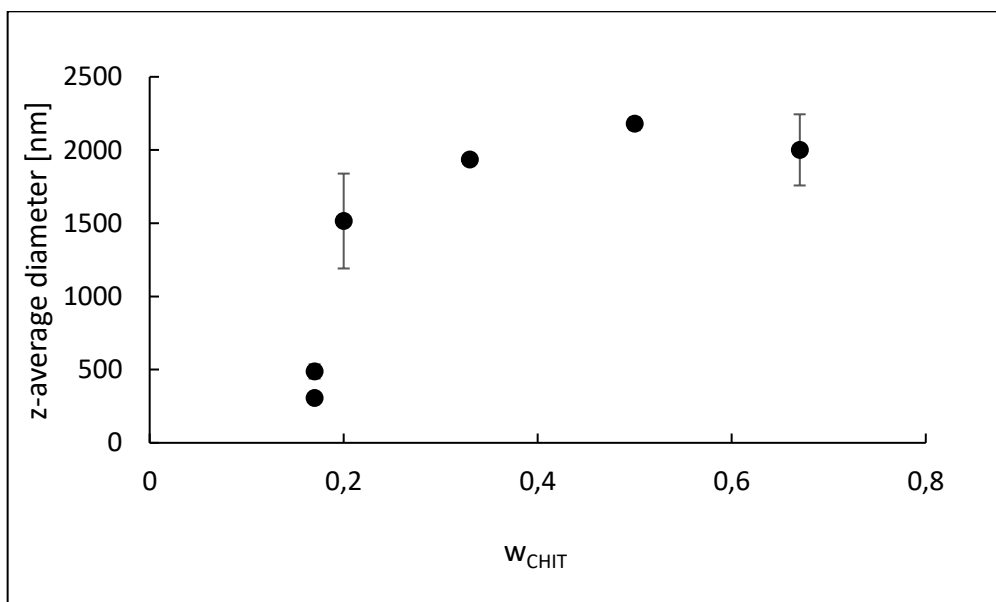
## 8.2 Příprava a charakterizace komplexů

Jak již bylo zmíněno v teoretické části, má na velikost částic komplexů vliv celkové množství polymerů v roztoku a dále také poměr jednoho z nich, k jejich celkovému množství. V Tabulce 4 jsou shrnuta data, na kterých lze vidět, jak se vzrůstajícím množstvím chitosanu, roste také velikost částic komplexu CAS/CHIT. Na Obrázku 7 je tato skutečnost znázorněna graficky.

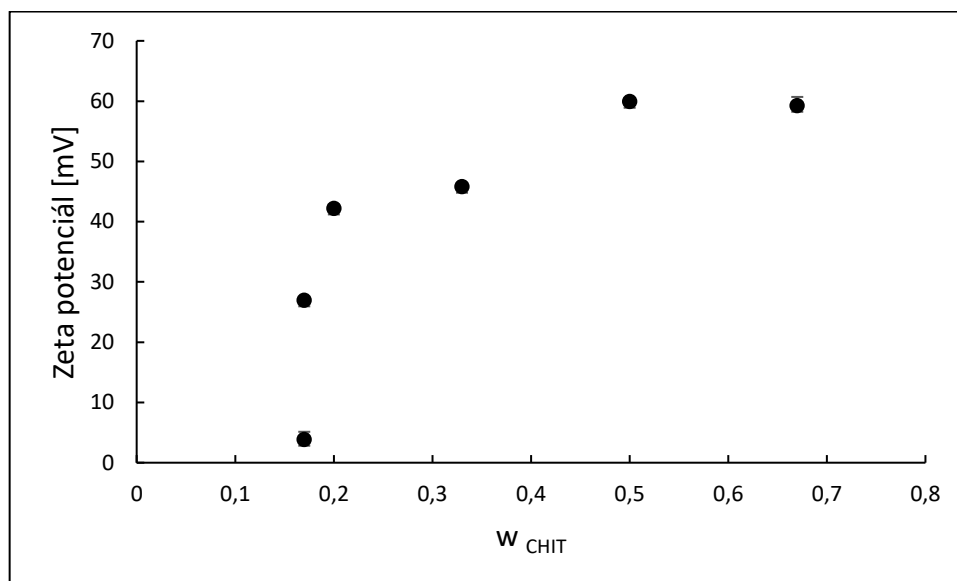
Množství jednotlivých polymerů v komplexu rovněž ovlivňuje hodnotu jeho zeta potenciálu. Jelikož má NaCAS při daném pH  $\approx$  6 záporný náboj a chitosan náboj kladný, má jejich vzájemný poměr vliv na výsledný zeta potenciál. To je znázorněno na Obrázku 8, ze kterého je vidět, že se vzrůstajícím množstvím CHIT v komplexu jeho zeta potenciál v kladných hodnotách roste.

Tabulka 4: Vliv množství CHIT v celkovém množství použitých polymerů (vyjádřeno hmotnostním zlomkem  $w_{CHIT}$ ) na velikost částic komplexů a zeta potenciál. Průměrné hodnoty veličin a jejich směrodatné odchylky (SD)

Obsah CHIT+NaCAS [%]	$w_{CHIT}$	z-average [nm]	PDI± SD	ZP± SD [mV]
0,6	0,17	488±49	0,64±0,06	27,0±0,2
0,6	0,17	306±10	0,35±0,07	3,8±1,3
1,25	0,20	1515±324	0,98±0,03	42,2±0,7
0,75	0,33	1936	0,90±0,17	45,8±0,7
1,0	0,50	2179±42	1,00±0	59,9±0,1
0,75	0,67	2001±243	1,00±0	59,2±1,5

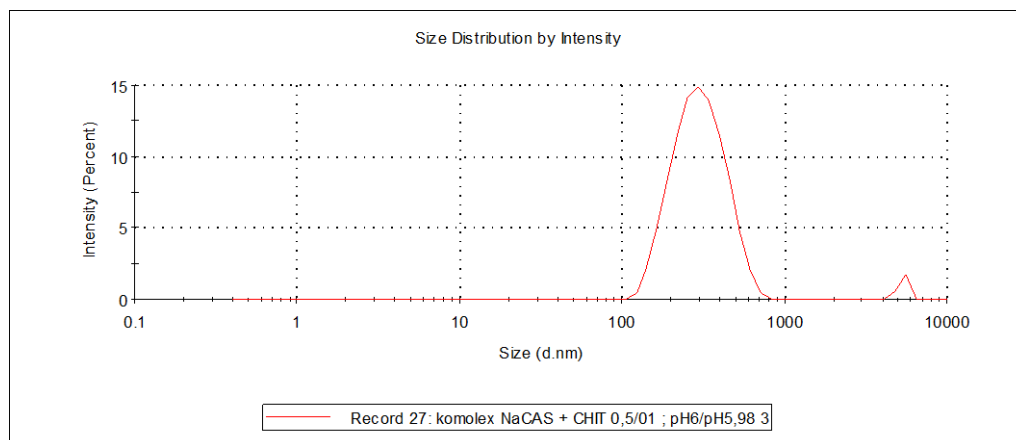


Obrázek 7: Vliv poměru CHIT k celkovému množství polymerů (vyjádřeno hmotnostním zlomkem  $w_{CHIT}$ ) na velikost částic komplexů.



Obrázek 8: Vliv poměru CHIT k celkovému množství polymerů (vyjádřeno hmotnostním zlomkem  $w_{CHIT}$ ) na zeta potenciál roztoku komplexu.

Ke stabilizaci olejové fáze v emulzích byly v této práci nejčastěji použity komplexy o složení: NaCAS/CHIT 0,5%/0,1%. Příklad distribuce jejich velikosti částic je znázorněn na Obrázku 9. Z obrázku je zřejmé, že v rozsahu měření přístroje Zetasizer nano je distribuce částic monomodální, avšak v oblasti velikostí nad 5  $\mu\text{m}$  lze na obrázku pozorovat počátek dalšího píku, který naznačuje, že ve vzorku se nacházejí i částice s velikostí  $> 5 \mu\text{m}$ , které nejsou použitou technikou detekovatelné. Při další práci bude proto potřeba použít k charakterizaci komplexů přístroje s větším měřicím rozsahem.

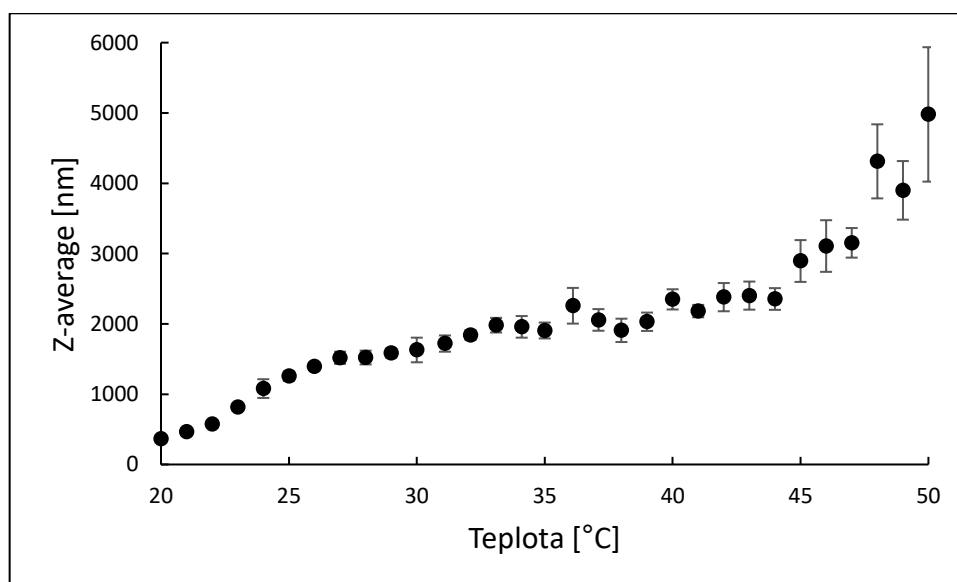


Obrázek 9: Příklad distribuce velikosti komplexu o zastoupení polymerů NaCAS/CHIT 0,5% / 0,1%.

Z důvodu zajištění konstantního pH (jež má vliv na velikost částic) při přípravě komplexů, byly připraveny 1% roztoky NaCAS ve fosfátovém pufru o pH 5,7. Po vytvoření komplexů však, vzhledem k přítomnosti solí v pufru, byly jejich částice velké, takže následně sedimentovaly. Proto v další práci již nebyly pufrované roztoky využívány.

### 8.3 Vliv teploty na chování komplexu

Pro stanovení chování komplexu při změně teploty byl vybrán komplex o zastoupení polymerů NaCAS/CHIT 0,5 %/0,1 % s celkovým pH  $\approx 6$ . Při měření se sledovala závislost změny velikosti částic na vzrůstající teplotě ( $\Delta T = 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Jak lze vidět na Obrázku č.10, kde je tato závislost graficky znázorněna, dochází se vzrůstem teploty k postupnému růstu velikosti částic. Při teplotě v blízkosti  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  lze v závislosti pozorovat zlom a velikost částic prudce stoupla. To bylo nejspíše zapříčiněno denaturací proteinové části komplexu. Tím došlo k reorganizaci struktury NaCAS a dalším konformačním změnám v molekule, které pak mohou vést ke zvětšování velikosti komplexů a tvorbě velkých agregátů. V blízkosti teploty  $54 \text{ }^\circ\text{C}$  došlo k sedimentaci částic a při teplotě  $59 \text{ }^\circ\text{C}$  přístroj předčasně ukončil měření, z důvodu absence měřitelných částic.



Obrázek 10: Závislost změny velikosti částic komplexu o složení NaCAS/CHIT 0,5 %/0,1 %, na vzrůstající teplotě.

Při opakovaném měření změny velikost částic komplexu v závislosti na vzrůstající teplotě byl nastaven rozsah teplot měření od 20 do 50 °C a posléze mělo měření probíhat při poklesu teploty zpět na teplotu 20 °C, jak již bylo popsáno v metodice. Bohužel při 28 °C, tedy ihned v začátku měření, došlo k neočekávané poruše přístroje Zetasizer Nano-ZS90 a měření bylo předčasně ukončeno.

## 8.4 Příprava emulzí

Cílem práce bylo připravit komplexy protein-polysacharid a vzorky s vhodnými vlastnostmi pak použít jako částicové stabilizátory při přípravě emulzí. Schopnost použitých komplexů stabilizovat emulze byla nejprve testována v krátké studii na všech testovaných olejích (část 6.1.3).

### 8.4.1 Homogenizace pomocí vysokorychlostního homogenizátoru

Touto technikou byly připraveny emulze O/V o poměru 10:90 za použití komplexů o procentuálním složení polymeru ve směsi NaCAS/CHIT 0,5/0,1; 0,5/0,25; 0,5/0,4; 0,5/0,5 a 0,1/0,05 s pH  $\approx$  6. Schopnost komplexů stabilizovat emulze byla testována na všech olejích, tedy dodekanu, slunečnicovém oleji, bio oleji z černého kmínu a trikaprylin/trikaprinu. Při použití bio oleje z černého kmínu bylo ihned po homogenizaci vysokorychlostním homogenizátorem Ultra Turrax možné sledovat rozpad emulze vedoucí k aglomeraci a sedimentaci emulzních kapek. Z tohoto důvodu již nebyl tento olej v dalších studiích používán. Obecně lze konstatovat, že emulze připravené touto homogenizační technikou vykazovaly velkou nestabilitu. U většiny z nich došlo k jejich rozpadu a tvorbě viditelných rozhraní mezi olejovou a vodnou fází. Vzhledem k rychlému rozpadu těchto systémů nebyla již dále měřena velikost jejich emulzních kapek.

Přes výše uvedené problémy a při použití dvou komplexů o složení NaCAS/CHT 0,5/0,1; 0,5/0,01 (vše v %) byly emulze pomocí homogenizátoru úspěšně připraveny. Velikosti emulzních kapek ve vzniklých emulzích se však stále pohybovaly v řádech mikrometrů (Tabulka 5) a emulze vykazovaly špatnou stabilitu. V této tabulce jsou také popsány použité komplexy. Výsledky proto poukazují na skutečnost, že tato metoda přípravy emulzí nebyla zcela úspěšná.

Tabulka 5: Charakteristika použitých komplexů a vzniklých emulzí připravených homogenizací Ultra Turraxem, průměrné hodnoty velikostí a jejich směrodatné odchylky

Použitý komplex		Emulze	
NaCAS/CHIT [%]	z-average [nm]	Olej	z-average [nm]
0,5/0,1	648±10	Dodekan	1200±510
0,5/0,1		Slunečnicový	3400±140
0,5/0,1		Trikaprylin/trikaprin	2500±560
0,1/0,05	447±24	Trikaprylin/trikaprin	3100±930

#### 8.4.2 Homogenizace pomocí sonikátoru

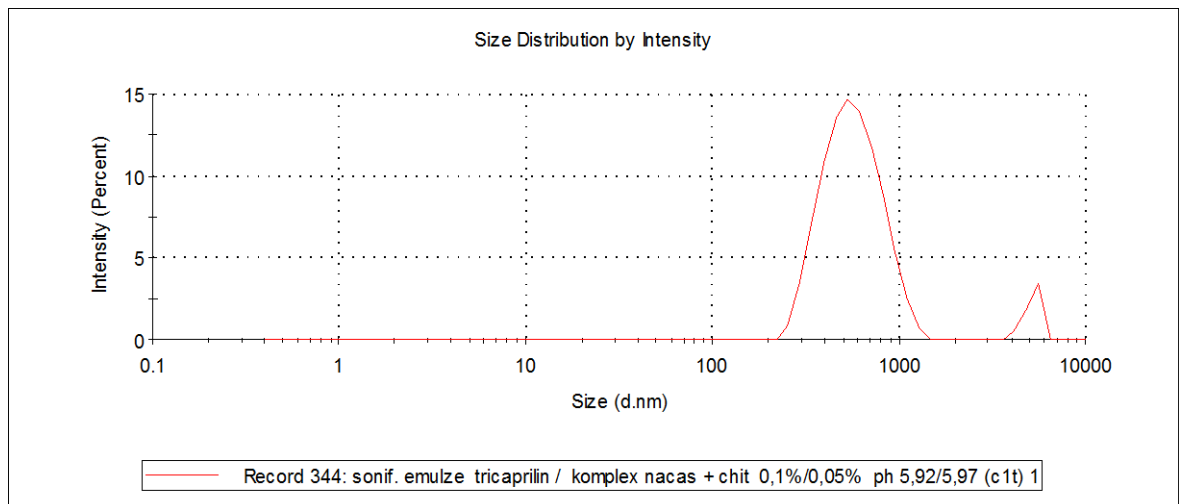
Pro přípravu emulzí O/V 10:90 za použití komplexů o procentuálním zastoupení polymerů ve směsi NaCAS/CHIT 0,5/0,1 a 0,1/0,05 (vše v %) byla rovněž použita sonikace. Na základě dat naměřených na emulzích připravených vysokorychlostním homogenizátorem, byly použity pouze oleje dodekan a trikaprylin/trikaprin. U komplexů byla před jejich použitím k emulgaci změřena velikost částic, následně byly sonikovány a opět podrobeny proměření velikosti částic. Výsledky měření poukázaly na skutečnost, že při sonikaci dochází k částečnému rozpadu komplexu na menší částice. V případě emulzí, při jejichž tvorbě byly oba výše zmíněné oleje stabilizovány komplexem o zastoupení polymerů v roztoku NaCAS/CHIT 0,5% / 0,1% , došlo ke značnému krémování, a proto tyto emulze nebyly dále charakterizovány.

V případě složení komplexu NaCAS/CHIT 0,1/0,05 (%) byly emulze pomocí sonikace úspěšně připraveny. Vlastnosti použitého komplexu a výsledné hodnoty velikostí emulzních kapek vzniklých sonikací jsou uvedeny v Tabulce 6. Velikost kapek emulzí je také znázorněna pomocí distribučních křivek na Obrázku 11 a 12, ze kterých je patrné, že distribuce byly v měřené oblasti monomodální, ale vzhledem k píku pozorovaném ve velikostní oblasti > 5 μm je ve vzorcích možné očekávat i přítomnost emulzních kapek výrazně větších, které ale nejsou přístrojem detekovány.

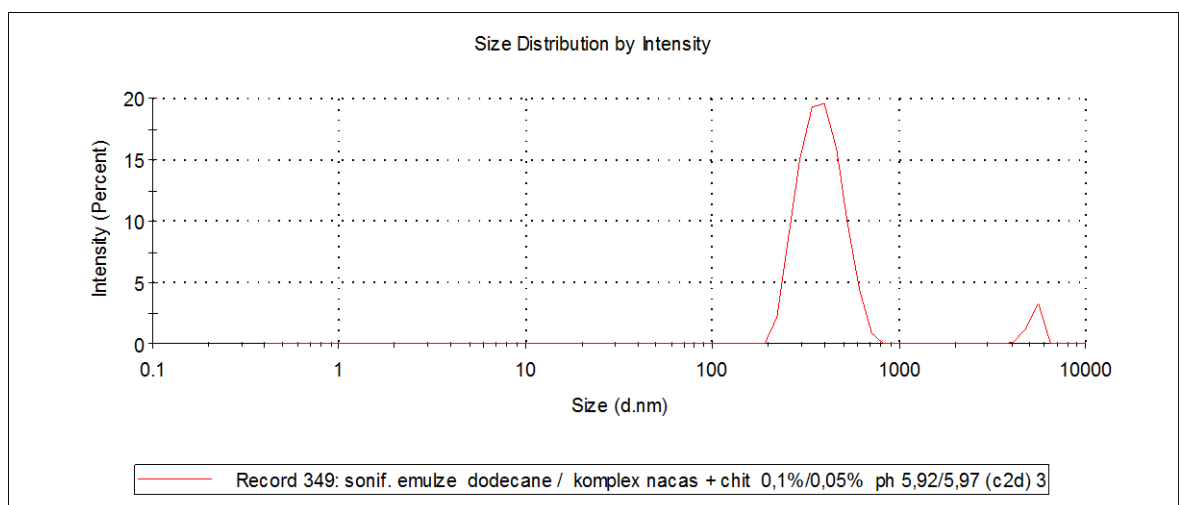


Tabulka 6: Charakteristika použitých sonikovaných komplexů a emulzí vzniklých sonikací, průměrné hodnoty veličin a jejich směrodatné odchylky (SD)

Použitý komplex		Emulze		
NaCAS/CHIT [%]	z-average ± SD [nm]	Olej	z-average ± SD [nm]	PDI± SD
0,1/0,05	268±17	Trikaprylin /trikaprin	630±23	0,38±0,07
0,1/0,05	344±35	Dodekan	463±6	0,32±0,02



Obrázek 11: Distribuční křivka velikostí emulzních kapek s obsahem Trikaprylinu/trikaprinu.



Obrázek 12: Distribuční křivka velikostí emulzních kapek s obsahem dodekanu.

## ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo formulovat emulze O/V s poměrem 10:90, ve kterých byla stabilizace olejové složky v disperzním prostředí provedena za pomoci komplexů dvou biopolymerů. Komplexy byly tvořeny kaseinát sodným (CAS), jakožto proteinovou složkou a chitosanem (CHIT), představujícím polysacharidovou složku komplexu. Nepochybně dispergovanou fází tvořily oleje dodekan, slunečnicový olej, bio olej z černého kmínu a trikaprylin/trikaprin. Zvoleny byly také dva emulgační procesy, a to homogenizace vysokorychlostním homogenizátorem a sonikace.

Z měření bylo zjištěno, že největší vliv na velikost částic komplexů a výsledný zeta potenciál, má jak celkové množství obou použitých polymerů, tak i jejich vzájemný poměr, vyjádřený množstvím CHIT v komplexu v poměru k celkovému množství CHIT a CAS. Se vzrůstajícím hmotnostním zlomkem CHIT ve směsi se úměrně zvětšovala i velikost částic vzniklých komplexů.

Podle naměřených dat velikosti částic komplexů byly pro následnou přípravu emulzí vybrány komplexy se složením NaCAS/CHIT 0,5/0,1 a 0,1/0,05 (vše v %).

Velikost kapek výsledných emulzí připravených pomocí homogenizátoru v přítomnosti uvedených komplexů se pohybovala v řádech mikrometrů a emulze byly velmi nestabilní. Tato studie však poskytla informaci, že nejlepší emulze lze připravit s olejovou fází tvořenou dodekanem a trikaprylinem/trikaprinem. Kvalitnější emulze pak byly připraveny pomocí sonikátoru, a za přítomnosti obou posledně jmenovaných olejů. I přes výrazně menší velikost emulzních kapek získaných sonikací (olej dodekan  $463 \pm 6$  nm, olej trikaprylin /trikaprin  $630 \pm 23$  nm) nebyla stabilita těchto emulzí uspokojivá a docházelo k jejich rozpadu krémováním.

Bakalářská práce prokázala, že vhodnou kombinací CAS a CHIT lze připravit jejich komplexy s příznivými vlastnostmi vhodnými pro stabilizaci emulzí. Vlastní příprava emulzí obsahujících jako olej dodekan i trikaprin/trikaprylin však nepřinesla očekávané výsledky. Sonikací byly sice emulze úspěšně připraveny, ale jejich stabilita byla nedostačující. Přesto lze z perspektivního hlediska považovat emulze stabilizované komplexy protein-polysacharid za slibné nosiče aktivních látek.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 807080579X.
- [2] VOJUCKIJ, Sergej Sergejevič. *Kurs koloidní chemie*. Přeložil Josef ŠOBR, přeložil Vladimír KARPENKO. Praha: SNTL, 1984.
- [3] EVERETT D.H., SANKEY O.F. *Basic Principles of Colloid Science (RSC PAPERBACKS)*, Royal Society of Chemistry, UK, 1988. ISBN-10: 0851864430
- [4] MUSCHIOLIK, Gerald. Multiple Emulsions for Food Use. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2007, vol. 12, no. 4, pp. 213-220. ISSN:1359-0294.
- [5] MCCLEMENTS, David Julian. Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2007, vol. 47, no. 7, pp. 611-649. ISSN:1040-8398.
- [6] TADROS, Tharwat F. *Emulsion science and technology*. Weinheim: Wiley-VCH, c2009. ISBN 9783527325252.
- [7] CONNELL, D. W. *Basic concepts of environmental chemistry*. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC/Taylor & Francis, 2005. ISBN 9781566706766.
- [8] STAROV, V., V. ZHDANOV a N.M. KOVALCHUK. Kinetic models of micelles formation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2010, vol. 354, no. 1-3, pp. 268-278 [cit. 2017-03-15]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2009.07.029. ISSN 09277757. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092777570900448>
- [9] MYERS, Drew. *Surfactant science and technology*. 3rd ed. Hoboken, N.J.: J. Wiley, c2006. ISBN 0471680249.
- [10] ŠMIDRKAL J.: Tenzidy a detergenty dnes. *Chemické listy*. 1999, roč. 93, s. 421 - 427.
- [11] ROSEN, Milton J. *Surfactants and interfacial phenomena*. 3rd ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, c2004. ISBN 0471478180.
- [12] NAPPER, Donald H. *Polymeric stabilization of colloidal dispersions*. London: Academic Press, 1983. ISBN 0125139802.
- [13] CHEVALIER, Y a MA BOLZINGER. Emulsions stabilized with solid nanoparticles. *Colloids and Surfaces A-physicochemical and Engineering Aspects* [online].

- Elsevier Science Bv, 2013, vol. 439, pp. 23-34 [cit. 2017-03-19]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2013.02.054. ISSN 09277757.
- [14] BRUGGER, Bastian a Walter RICHTERING. Magnetic, thermosensitive microgels as stimuli-responsive emulsifiers allowing for remote control of separability and stability of oil in water-emulsions. *Advanced Materials* [online]. Wiley-v C H Verlag, 2007, vol. 19, no. 19, pp. 2973-2978 [cit. 2017-03-20]. DOI: 10.1002/adma.200700487. ISSN 09359648.
- [15] DEVI, Nirmala; SARMAH, Mandip; KHATUN, Bably; MAJI, Tarun K. Encapsulation of Active Ingredients in Polysaccharide–protein Complex Coacervates. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2017, vol. 239 pp. 136-145. ISSN:0001-8686.
- [16] K. GHOSH, Amit a Prasun BANDYOPADHYAY. Polysaccharide-Protein Interactions and Their Relevance in Food Colloids. *The Complex World of Polysaccharides* [online]. InTech, 2012, 2012-10-31 [cit. 2017-03-19]. ISBN 978-953-51-0819-1. DOI:10.5772/50561
- [17] DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*. 2003, vol. 17, pp. 25-39.
- [18] GARTI, N., & REICHMAN, D. 1993. Hydrocolloids as food emulsifiers and stabilizers. *Food Microstructure*. 1993, vol. 12, pp. 411-426.
- [19] GODDARD, E. D. a James V. GRUBER. *Principles of polymer science and technology in cosmetics and personal care*. New York: Marcel Dekker, c1999. ISBN 9780824719234.
- [20] MCCLEMENTS, D. J. *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, c2005. ISBN 0849320232.
- [21] MISHRA, Munmaya K. *Handbook of encapsulation and controlled release*. CRC Press, 2015. ISBN 9781482232325.
- [22] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin 1*. Rozšíř. a přeprac 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 9788086659152.
- [23] CANDAL, CL PINTO-DE-OLIVEIRA a I LINARES-TORRIANI. New insights about flocculation process in sodium caseinate-stabilized emulsions. *Food Research International* [online]. Elsevier Science Bv, 2016, vol. 89, pp. 338-346 [cit. 2017-05-01]. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.08.026. ISSN 09639969.

- [24] THOMAR, P a T NICOLAI. Dissociation of native casein micelles induced by sodium caseinate. *Food Hydrocolloids* [online]. Elsevier Sci, 2015, vol. 49, pp. 224-231 [cit. 2017-05-01]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2015.03.016. ISSN 0268005X.
- [25] LIANG, YC, G GILLIE, L MATIA-MERINO, AG YE, H PATEL a M GOLDING. Structure and stability of sodium-caseinate-stabilized oil-in-water emulsions as influenced by heat treatment. *Food Hydrocolloids* [online]. Elsevier Sci, 2017, vol. 66, pp. 307-317 [cit. 2017-05-01]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2016.11.041. ISSN 0268005X.
- [26] ZINOVIADOU, K, E SCHOLTEN, T MOSCHAKIS a C.G BILIADERIS. Properties of emulsions stabilised by sodium caseinate–chitosan complexes. *International Dairy Journal* [online]. Elsevier Sci, 2012, vol. 26, no. 1, pp. 94-101 [cit. 2017-05-01]. DOI: 10.1016/j.idairyj.2012.01.007. ISSN 09586946.
- [27] DASH, M, E CHIELLINI, F CHIELLINI a R.M OTTENBRITE. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science* [online]. Elsevier, 2011, vol. 36, no. 8, pp. 981-1014 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001. ISSN 00796700.
- [28] VAVŘÍKOVÁ, E. a J. VINŠOVÁ. Chitosan a jeho farmaceutické aplikace. *Chemické listy*. 2009, vol. 103, pp. 56-65.
- [29] EVANS, M, I RATCLIFFE a P.A WILLIAMS. Emulsion stabilisation using polysaccharide-protein complexes. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* [online]. Elsevier Science London, 2013, vol. 18, no. 4, pp. 272-282 [cit. 2017-11-13]. DOI: 10.1016/j.cocis.2013.04.004. ISSN 13590294.
- [30] HAWE, Andrea, Wendy HULSE, Wim JISKOOT a Robert FORBES. Taylor Dispersion Analysis Compared to Dynamic Light Scattering for the Size Analysis of Therapeutic Peptides and Proteins and Their Aggregates. *Pharmaceutical Research* [online]. Springer US, 2011, vol. 28, no 9, pp. 2302-2310 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1007/s11095-011-0460-3. ISSN 07248741.
- [31] MALVERN INSTRUMENTS LTD. *Zeta potential – An introduction in 30 minutes*. Technical note. 2015, s. 15.
- [32] SILVA, Hélder, Miguel CERQUEIRA a António VICENTE. Nanoemulsions for Food Applications. *Food and Bioprocess Technology* [online]. Springer-Verlag,

- 2012, vol. 5, no. 3, pp. 854-867 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1007/s11947-011-0683-7. ISSN 19355130.
- [33] ŠEVČÍKOVÁ, Petra, Věra KAŠPÁRKOVÁ et al. Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. *Chemické listy*. 2014, vol. 108, pp. 479-482. ISSN 1213-7103
- [34] TAN, Huan, Guanqing SUN, Wei LIN, Changdao MU a Ngai TO. Gelatin Particle-Stabilized High Internal Phase Emulsions as Nutraceutical Containers. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2014, vol. 6, no. 16. DOI: 10.1021 / am503341j. ISSN 13977-13984.
- [35] BINKS, Bernard a Tommy HOROZOV. *Colloidal particles at liquid interfaces*. New York: Cambridge University Press, 2006, xiii, 503 p. [cit. 2023-05-09]. ISBN 10: 0521848466. Dostupné z: <https://isalama.files.wordpress.com/2011/05/image91.gif>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

CMC	kritická micelární koncentrace
CHIT	chitosan
HCl	kyselina chlorovodíková
max.	maximálně
NaCAS	kaseinát sodný
NaCAS/CHIT	komplex kaseinát sodný, chitosan
NaOH	hydroxid sodný
O/V	olej ve vodě
obj. %	objemových procent
PAL	povrchově aktivní látka
PDI	index polydisperzity
tzv.	tak zvané
V/O	voda v oleji
ZP	zeta potenciál

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

<i>Obrázek 1: Mechanismy rozpadu emulze. [35]</i> .....	13
<i>Obrázek 2: Amfipatická struktura molekuly surfaktantu.</i> .....	14
<i>Obrázek 3: Micela v polárním a nepolárním prostředí.</i> .....	16
<i>Obrázek 4: Rozdíl mechanismu stabilizace pomocí surfaktantu a částic [13].</i> .....	17
<i>Obrázek 5: Struktura chitosanu.</i> .....	22
<i>Obrázek 6: Distribuce velikosti částic zásobních roztoků NaCAS (červená čára) a CHIT (černá čára).</i> .....	35
<i>Obrázek 7: Vliv poměru CHIT k celkovému množství polymerů (vyjádřeno hmotnostním zlomkem <math>w_{CHIT}</math>) na velikost částic komplexů.</i> .....	36
<i>Obrázek 8: Vliv poměru CHIT k celkovému množství polymerů (vyjádřeno hmotnostním zlomkem <math>w_{CHIT}</math>) na zeta potenciál roztoku komplexu.</i> .....	37
<i>Obrázek 9: Příklad distribuce velikosti komplexu o zastoupení polymerů NaCAS/CHIT 0,5% / 0,1%.</i> .....	37
<i>Obrázek 10: Závislost změny velikosti částic komplexu o složení NaCAS/CHIT 0,5%/0,1 %, na vzrůstající teplotě.</i> .....	38
<i>Obrázek 11: Distribuční křivka velikostí emulzních kapek s obsahem Trikaprylinu/trikaprinu.</i> .....	41
<i>Obrázek 12: Distribuční křivka velikosti emulzních kapek s obsahem dodekanu.</i> .....	41



**SEZNAM TABULEK**

<i>Tabulka 1: Množství 2% roztoku CHIT a demineralizované vody, použité na přípravu roztoků o celkové hmotnosti 50 g .....</i>	<i>28</i>
<i>Tabulka 2: Množství 2% roztoku NaCAS a demineralizované vody, použité na přípravu roztoků o celkové hmotnosti 50 g. ....</i>	<i>29</i>
<i>Tabulka 3: Naměřené hodnoty velikosti částic a zeta potenciálu u adjustovaných zásobních roztoků NaCAS a CHIT. Průměrné hodnoty veličin a jejich směrodatné odchylky (SD).....</i>	<i>35</i>
<i>Tabulka 4: Vliv množství CHIT v celkovém množství použitých polymerů (vyjádřeno hmotnostním zlomkem <math>w_{CHIT}</math>) na velikost částic komplexů a zeta potenciál. Průměrné hodnoty veličin a jejich směrodatné odchylky (SD) .....</i>	<i>36</i>
<i>Tabulka 5: Charakteristika použitých komplexů a vzniklých emulzí připravených homogenizací Ultra Turraxem, průměrné hodnoty velikostí a jejich směrodatné odchylky.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabulka 6: Charakteristika použitých sonikovaných komplexů a emulzí vzniklých sonikací, průměrné hodnoty veličin a jejich směrodatné odchylky (SD) .....</i>	<i>41</i>