



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 PŘÍRODNÍCH ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK A MOŽNOSTI JEJICH APLIKACE

USE AND APPLICATION OF NATURAL ANTIMICROBIAL SUBSTANCES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Lucia Dzurická

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1197/2017
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Lucia Dzurická**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název bakalářské práce:

Využití přírodních antimikrobiálních látek a možnosti jejich aplikace

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) příprava částic s obsahem rostlinných složek v kombinaci s bakteriociny
- 2) testování antimikrobiálního účinku zvolených složek ve volné a enkapsulované formě
- 3) návrh vhodné formy přídatku přírodních antimikrobiálních látek a jejich směsí pro potravinářské a kosmetické aplikace

Termín odevzdání bakalářské práce: 21.5.2018

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

Lucia Dzurická
student(ka)

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Táto bakalárska práca je zameraná na štúdium antimikrobiálneho účinku rastlinných zložiek v kombinácii s bakteriocínom a možnosťou vytvorenia enkapsulovaného preparátu použiteľného v potravinárskych a kozmetických výrobkoch. Bolo zvolených 5 rastlinných materiálov: acerola, škorica, klinček, pomarančová kôra a jakon. Ako vhodný bakteriocín bol vybraný nisin. Teoretická časť opisuje rastlinné zložky s antimikrobiálnym a antioxidačným účinkom, použité materiály rastlinného a živočíšneho pôvodu, možnosti zvýšenia antimikrobiálneho účinku a využitie prírodných antimikrobiálnych látok.

V praktickej časti práce boli najprv vodné extrakty vybraných prírodných materiálov spektrofotometricky charakterizované na obsah celkových polyfenolov, flavonoidov a antioxidačných látok. Zo zvolených látok boli pripravené lipozómy a následne optimalizovaná príprava liposómových častíc obalených vrstvou chitosanu. Častice boli testované z hľadiska veľkosti, krátkodobej a dlhodobej stability, enkapsulačnej účinnosti a antioxidačnej aktivity. V ďalšom kroku bola sledovaná antimikrobiálna aktivita vybraných zložiek vo voľnej a enkapsulovanej forme proti štyrom kmeňom mikroorganizmov (*Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens* a *Candida glabrata*). U extraktov v kombinácii s nisínom i u pripravených častíc bol pozorovaný predpokladaný synergizmus antimikrobiálnych aktivít.

Kľúčové slová

Rastlinné extrakty, nisin, enkapsulácia, lipozómy, chitosan, antimikrobiálna aktivita, synergizmus

Abstract

The presented bachelor thesis is focused on the study of antimicrobial activity of plant substances in combination with bacteriocins and the possibility of creating new encapsulated form of supplement which could be used in food and cosmetic products. 5 plant materials were selected: acerola, cinnamon, cloves, orange peel and yacon syrup. Nisin was chosen as the most suitable bacteriocin. In the theoretical part the components with antimicrobial and antioxidant activity are described, such as the materials of plants and animal origin used in this work. Also the possibility of increasing the antimicrobial effect and possible use of natural antimicrobial substances were described.

In experimental part, the aqueous extracts of selected plant materials were firstly spectrophotometrically characterized for the content of total polyphenols, flavonoids and antioxidants. Selected substances were encapsulated into liposomes and subsequently preparation of liposomes coated with chitosan was optimized. The particles were tested for size, short and long term stability, encapsulation efficiency and antioxidant activity. Furthermore, the antimicrobial activities of selected components in nonencapsulated and encapsulated form were observed against four strains of microorganisms (*Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens* and *Candida glabrata*). Also the expected synergisms of the antimicrobial effects of extracts in combination with nisin and prepared particles were observed.

Keywords

Plant extracts, nisin, encapsulation, liposomes, chitosan, antimicrobial activity, synergism

DZURICKÁ, L. *Využití přírodních antimikrobiálních látek a možnosti jejich aplikace*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 66 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Petra Matoušková, Ph.D..

Prehlásenie

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a všetky použité literárne zdroje som citovala správne a úplne. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

podpis študenta

PodĎakovanie

Rada by som poďakovala vedúcej mojej bakalárskej práce Ing. Petre Matouškovovej, Ph.D. za odborné vedenie a všestrannú pomoc pri riešení problémov. Moje poďakovanie patrí aj Ing. Júlii Hoovej za cenné rady, ochotu a pomoc pri spracovaní experimentálnej časti.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČASŤ.....	10
2.1	Rastlinné zložky s antimikrobiálnym a antioxidačným účinkom	10
2.1.1	Antimikrobiálny účinok.....	10
2.1.1.1	Polyfenoly.....	10
2.1.1.2	Alkaloidy	12
2.1.1.3	Terpény	12
2.1.2	Antioxidačný účinok.....	13
2.2	Vybrané druhy potravín	14
2.2.1	Acerola.....	14
2.2.2	Škorica	15
2.2.3	Pomarančová kôra	16
2.2.4	Klinček.....	16
2.2.5	Jakon.....	17
2.3	Bakteriocíny	17
2.3.1	Klasifikácia bakteriocínov	18
2.3.2	Nisín.....	19
2.4	Významné prírodné antimikrobiálne látky živočíšneho pôvodu	20
2.4.1	Lysozým	20
2.4.2	Chitosan	20
2.5	Možnosti zvýšenia antimikrobiálneho účinku	21
2.5.1	Synergický účinok	21
2.5.2	Enkapsulácia	21
2.5.2.1	Metódy enkapsulácie	22
2.5.2.2	Lipozómy	22
2.6	Využitie prírodných antimikrobiálnych látok	22
2.6.1	Rezistencia.....	22
2.6.1.1	Alternatíva k antibiotikám	23
2.6.2	Aplikácia antimikrobiálnych látok v potravinách	23
2.6.2.1	Biokonzervácia	23
2.6.3	Aplikácia antimikrobiálnych látok v kozmetike.....	24
2.6.3.1	Kozmetika.....	24
2.6.3.2	Konzervanty v kozmetike.....	24

2.6.3.3	Alternatívna liečba akné	25
3	CIEĽ PRÁCE	26
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	27
4.1	Použité chemikálie	27
4.1.1	Použité štandardné chemikálie	27
4.1.2	Chemikálie použité pri stanoveniach	27
4.1.3	Chemikálie použité na prípravu častíc	27
4.1.4	Chemikálie použité na prípravu živných médií	27
4.2	Prístroje a pomôcky	27
4.3	Použité mikroorganizmy	28
4.4	Vybrané prírodné materiály	28
4.5	Príprava extraktov	29
4.6	Charakterizácia vybraných prírodných materiálov	29
4.6.1	Stanovenie celkových polyfenolov	29
4.6.2	Stanovenie celkových flavonoidov	29
4.6.3	Stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity	29
4.6.4	Stanovenie celkových proteínov Hartree-Lowryho metódou	30
4.7	Stanovenie obsahu kyseliny askorbovej v extrakte aceroly	30
4.7.1	Štandardizácia odmerného roztoku	30
4.7.2	Príprava vzorku	30
4.8	Príprava častíc	30
4.8.1	Príprava lipozómov	30
4.8.2	Charakterizácia lipozómov	31
4.8.2.1	Stanovenie enkapsulačnej účinnosti polyfenolov	31
4.8.2.2	Stanovenie enkapsulačnej účinnosti nisinu	31
4.8.2.3	Optimalizácia prípravy nového typu častíc	31
4.8.2.4	Stanovenie veľkosti a stability častíc	31
4.8.2.5	Sledovanie dlhodobej stability	32
4.9	Antimikrobiálne testy	32
4.9.1	Príprava médií	32
4.9.2	Kultivácia mikroorganizmov	32
4.9.3	Bujónová dilučná metóda	32
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA	33

5.1	Charakterizácia vybraných prírodných materiálov	33
5.1.1	Stanovenie celkových polyfenolov	33
5.1.2	Stanovenie celkových flavonoidov	34
5.1.3	Stanovenie antioxidačnej aktivity	35
5.2	Stanovenie pH testovaných extraktov	36
5.3	Stanovenie obsahu kyseliny askorbovej v extrakte aceroly	36
5.4	Stanovenie celkových proteínov Hartree-Lowryho metódou	37
5.5	Optimalizácia prípravy nového typu častíc a vizualizácia častíc	37
5.5.1	Stanovenie veľkosti lipozómov obalených chitosanom	38
5.5.2	Stanovenie stability lipozómov obalených chitosanom	39
5.6	Charakterizácia lipozómov	39
5.6.1	Stanovenie enkapsulačnej účinnosti polyfenolov	39
5.6.2	Stanovenie antioxidačnej aktivity lipozómov	40
5.6.3	Stanovenie dlhodobej stability lipozómov	41
5.7	Stanovenie veľkosti častíc s enkapsulovanými extraktmi a nisínom	41
5.8	Stanovenie stability enkapsulovaných extraktov a nisínu po pridaní chitosanu	42
5.9	Antimikrobiálne testy	43
5.9.1	Antimikrobiálne účinky nisínu	43
5.9.2	Antimikrobiálne účinky extraktov	44
5.9.3	Antimikrobiálny účinok kombinácie voľnej formy extraktov a nisínu	46
5.9.4	Antimikrobiálny účinok lipozómov	49
5.9.4.1	Synergický účinok enkapsulovaných látok	49
5.9.5	Antimikrobiálna aktivita chitosanom obalených častíc	50
5.9.5.1	Synergický účinok chitosanom obalených častíc	51
5.10	Návrh vhodnej formy prídavku pre potravinárske a kozmetické aplikácie	54
6	ZÁVER	56
7	POUŽITÁ LITERATÚRA	58
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	66

1 ÚVOD

Objavenie antibiotík a ich následný vývoj navždy zmenil vnímanie medicíny a vedy. Ľudia začali používať antibiotiká už len pri najmenšom náznaku choroby. Začali sa vo veľkej miere podávať i hospodárskym zvieratám a pridávali sa aj do potravín. Nikto sa ani nepozastavil nad problémami, ktoré by mohla spôsobiť antibiotická rezistencia mikroorganizmov v budúcnosti. Po objavení penicilínu už sám Sir Alexander Fleming upozornil na túto skutočnosť a vyslovil citát, ktorý je známy dodnes: „Nerozvážny človek, ktorý sa hrá s liečbou penicilínom, je morálne zodpovedný za smrť osoby, ktorá podľahne infekcii spôsobenej penicilín rezistentným organizmom.“ Účinnosť a dostupnosť antibiotík zvyšovala ich neustále používanie, čo len urýchlilo vznik antibiotickej rezistencie. Aby sa účinnosť týchto liečiv zachovala, bolo potrebné postupom času mnohonásobne navýšiť dávkovanie. V súčasnosti sa využívanie antibiotík pri boji s bežnými patogénmi stalo nerealizovateľné a bolo potrebné hľadať alternatívne látky antimikrobiálnej povahy, ktoré by mohli čiastočne alebo úplne nahradiť antibiotiká. Ideálnym riešením je využiť antimikrobiálne látky z prírodných zdrojov, ktoré sú telu prirodzené a zároveň obsahujú množstvo hodnotných živín.

Jedným z možných prístupov je využitie synergického alebo aditívneho účinku prírodných antimikrobiálnych látok v kombinácii s bakteriocínmi. Navyše synergický účinok býva častokrát silnejší ako samotný súčet antimikrobiálnych aktivít. Vďaka tejto skutočnosti by bolo možné použiť menšie množstvo antimikrobiálnych látok pri nezmenenej veľkosti účinku. Významný vplyv na zvýšenie účinku môže mať i využitie enkapsulačných techník.

Okrem najdôležitejšej časti práce, ktorá sa venuje kombinácii vybraných prírodných látok s bakteriocínom bude v tejto práci stanovené i množstvo celkových polyfenolov v prírodných materiáloch aj ich antioxidačná aktivita.

Súčasťou práce bude i navrhnutie vhodnej formy v akej by sa zmesi kombinovaných látok mohli pridávať do potravín alebo kozmetiky a nahradili by tak používanie antibiotík a chemických konzervantov.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Rastlinné zložky s antimikrobiálnym a antioxidačným účinkom

Rastliny sa využívajú na liečenie zdravotných ťažkostí u ľudí ako aj u zvierat už celé stáročia [1]. Vykazujú protizápalové, antioxidačné, antimikrobiálne, antikarcinogénne vlastnosti, pomáhajú predchádzať srdcovocievnyh chorobám a starnutiu [2]. Liečivé rastliny a priemyselné plodiny produkujú rozmanitú škálu bioaktívnych látok s farmaceutickým alebo toxickým účinkom [3].

Organické zlúčeniny produkované rastlinami sa delia na primárne (sacharidy, lipidy, bielkoviny) a sekundárne, z ktorých sa niektoré vyznačujú cenným špecifickým účinkom. Sekundárne organické zlúčeniny sa vytvárajú pri sekundárnej výmene látok a majú špecifickú úlohu pri niektorých funkciách bunky [4]. Väčšina týchto látok sa vyskytuje v zdravých rastlinách v biologicky aktívnej forme, kým niektoré vo forme prekurzorov, ktoré sa aktivujú ako odpoveď na výskyt patogénu alebo poškodenie tkaniva [3].

Sekundárne metabolity vo väčšine prípadov nemajú rozhodujúci význam pre život rastlinných organizmov, no môžu byť prospešné pri poruchách fyziologických procesov v ľudskom organizme [4]. Tieto sekundárne produkty účinkujú v ľudskom tele vďaka podobnosti s endogénnymi metabolitmi, ligandmi, hormónmi, signálnymi molekulami a neurotransmitermi [3].

K sekundárnym zlúčeninám radíme glykozidy, triesloviny, alkaloidy, éterické oleje, vitamíny, enzýmy, fytocídy a mikroelementy [4].

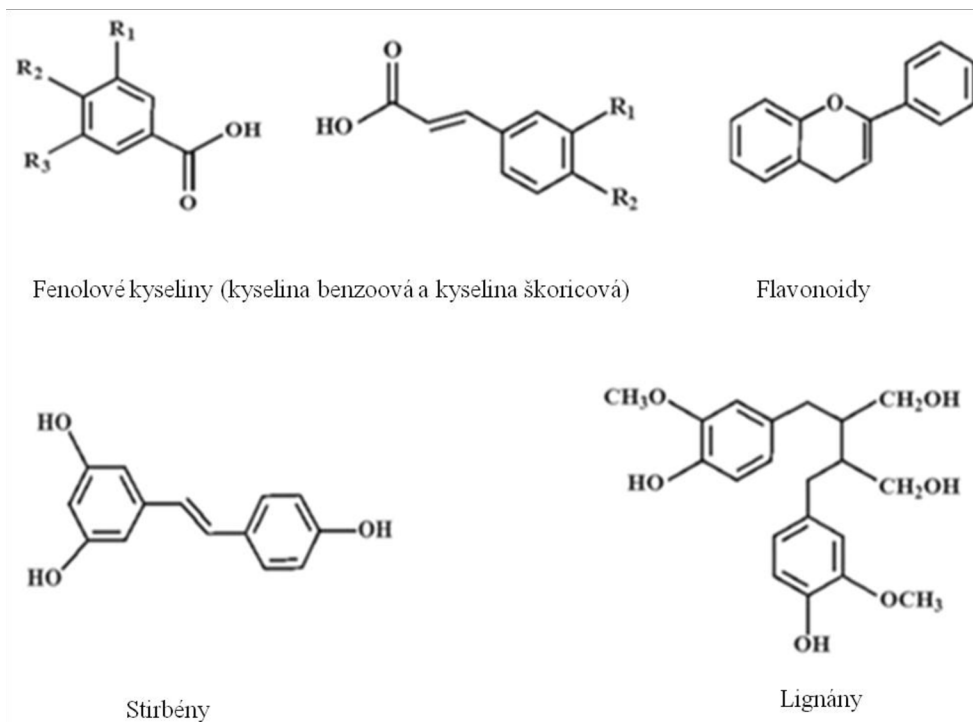
2.1.1 Antimikrobiálny účinok

Antimikrobiálne zlúčeniny získané z rastlín, sú prevažne sekundárne metabolity, takzvané fytocídy [5]. Fytocídy sú látky s rozličným chemickým zložením, ktoré majú schopnosť usmrcovať alebo inhibovať rast niektorých mikroorganizmov [4][6]. Medzi fytolátky radíme fenolické a polyfenolické látky, flavonoidy, alkaloidy a terpeny [4][5]. Druh a množstvo aktívnej zložky obsiahnutej v rastline ovplyvňuje druh rastliny, topografia a klíma miesta výskytu rastliny [5].

2.1.1.1 Polyfenoly

Polyfenoly sa vo väčšej miere vyskytujú v ovocí, zelenine, obilninách a bylinách. Hrozno, jablká, hrušky, čerešne a bobuľové plody obsahujú približne 200–300 miligramov polyfenolov na 100 miligramov váhy. Prirodzene i produkty vyrábané z tohto ovocia obsahujú pomerne vysoké množstvo polyfenolov. Tie sa v rastlinách podieľajú na obrane proti patogénom, voľným radikálom a UV žiareniu. Čiastočne zodpovedajú i za trpkosť, kyslosť, farbu, chuť, pach a oxidačnú stabilitu [7][8].

Bolo identifikovaných viac ako 8 000 polyfenolických zlúčenín z rôznych druhov rastlín. Všetky fenolické zlúčeniny sú syntetizované z fenylalanínu alebo kyseliny shikimovej. Primárne sa vyskytujú v konjugovanej forme, so zvyškami poly- alebo mono-sacharidov, viazanými cez hydroxylové skupiny alebo priamo na aromatickom kruhu. Bežne vytvárajú konjugované zlúčeniny i s karboxylovými kyselinami, amínmi, lipidmi a inými fenolmi. Polyfenoly môžeme rozdeliť do štyroch hlavných skupín: fenolové kyseliny, flavonoidy, stírbény a lignány [7].



Obrázok 1: Všeobecné schémy 4 základných skupín polyfenolov [7]

1) Fenolové kyseliny

Fenolové kyseliny pozostávajú len z jedného fenolického kruhu a delíme ich do dvoch základných skupín, na deriváty kyseliny benzoovej a kyseliny škoricovej. Zástupcami týchto skupín sú hydroxybenzoové a hydroxyškoricové kyseliny. Hydroxybenzoové kyseliny sa nachádzajú vo väčšine jedlých rastlín len v malom množstve, výnimku tvorí červené ovocie, reďkovka čierna a cibuľa. Hydroxyškoricové kyseliny sú rozšírenejšie a zaraďujeme k nim p-kumárovú, kávovú, ferulovú a sipanovú kyselinu.

2) Flavonoidy

Flavonoidy tiež nazývané bioflavonoidy sú fenolické zlúčeniny pozostávajúce z dvoch benzénových jadier spojených heterocyklickým pyranovým kruhom [5]. Podarilo sa identifikovať 4 000 rôznych flavonoidov [7]. Sú prítomné vo všetkých fotosyntetizujúcich bunkách. Bežne sa vyskytujú vo veľkom množstve v ovocí, zelenine, orechoch, semenách, stonkách, kvetoch, čaji, víne, propolise a v mede [5]. Väčšina z nich je zodpovedná za príznačné sfarbenia kvetov, ovocia a listov [7]. Na základe rozličnej pozície substituentov na troch kruhoch rozdeľujeme flavonoidy do 6 podtried: flavonoly, flavony, flavanony, katechiny, antokyaniny a isoflavonoidy. Najbežnejšími flavonoidmi sú napríklad quercetín, katechín, myrecetín [5][7].

Antimikrobiálne vlastnosti flavonoidov pochádzajú z dvoch mechanizmov účinku:

- Inhibícia aktivity DNA gyrázy, čo má za následok potlačenie syntézy nukleových kyselín u baktérií.
- Schopnosť vytvárať komplexy s extracelulárnymi proteínmi a bakteriálnymi membránami. Menia fluiditu membrány, čo zapríčiňuje únik cytoplazmy a intracelulárnych komponentov z bunky [5][3].

3) *Stirbény*

Stirbény obsahujú dva fenolické kruhy spojené etylenovým mostom. V rastlinách sa nachádzajú v malom množstve. Plnia úlohu antifungálnych fytoalexínov, ktoré sa začnú syntetizovať ako odpoveď na infekciu a poranenie rastliny. Jedným z najpreskúmanejších stirbénov je resveratrol, ktorý sa nachádza prevažne v hrozne [7].

4) *Lignány*

Lignány obsahujú 2,3-dibenzylbutánovú štruktúru, ktorá vznikla dimerizáciou dvoch zvyškov kyseliny škoricovej. Niekoľko lignánov je považovaných za fytoestrogény. Najbohatším zdrojom lignánov sú ľanové semená, ktoré obsahujú 3,7 g sekoisolaticiresinolu na kilogram sušiny [7].

2.1.1.2 *Alkaloidy*

Alkaloidy sú heterocyklické dusíkaté zlúčeniny, vyznačujúce sa alkalickými vlastnosťami. Všeobecne sú alkaloidy produkty rozkladu bielkovín a majú veľký význam pre život rastlín. Ich obsah v rastlinách sa pohybuje od stopových množstiev, po niekoľko percent a ich ukladanie nie je rovnomerné. Ópiové alkaloidy sú napríklad v najväčšom množstve uložené v mliečnej šťave zelených makovic. K najznámejším alkaloidom patrí morfín, kodeín, berberín [4][9].

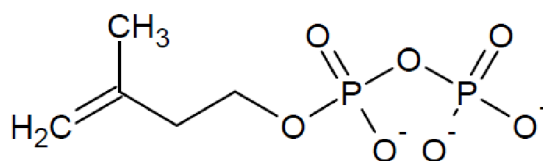
Okrem účinkov na nervovú sústavu živočíchov, vykazujú alkaloidy i antimikrobiálne a antidiuretické účinky. Antimikrobiálny mechanizmus u alkaloidov nie je jednotný. Aromatické planárne alkaloidy, ako napríklad berberín a harman, účinkujú ako interkalačné činidlá a inhibujú dýchanie bunky [3][9].

2.1.1.3 *Terpény*

Terpény tiež známe pod názvom isoprenoidy, so všeobecnou chemickou štruktúrou $C_{10}H_{16}$, predstavujú funkčne a štruktúrne najrozmanitejšiu skupinu metabolitov, s najmenej 50 000 rôznymi molekulami. Vyskytujú sa vo forme diterpénov (C_{20}), triterpénov (C_{30}), tetraterpénov (C_{40}), hemiterpénov (C_5), sesquiterpénov (C_{15}) a terpenoidov (deriváty). Všetky isoprenoidy sú syntetizované z izopentenylpyrofosfátového prekursoru [10][9].

V rastlinách plnia funkciu primárnych alebo sekundárnych metabolitov. Ako primárne zložky sa podieľajú na procesoch fotosyntézy, respirácie, regulácie rastu rastliny. Ako sekundárne metabolity sa zúčastňujú alelopatických a antimikrobiálnych reakcií, a tiež sú zodpovedné za vôňu a zafarbenie rastliny [10].

Mechanizmus antimikrobiálneho účinku terpénov nie je úplne prebádaný, ale predpokladá sa, že inhibujú bunky narušením bunkovej membrány [5].



Obrázok 2: Štruktúra izopentenylpyrofosfátu

2.1.2 Antioxidačný účinok

V aeróbných bunkách počas procesu dýchania vznikajú prirodzene i reaktívne formy kyslíka. Počas elektrónového transferu približne 1–2 % elektrónov vyklžne z komplexov I a III a reaguje s molekulami kyslíka za tvorby voľných radikálov: peroxidu vodíka (H_2O_2), superoxidového radikálu (O_2^{*-}), hydroperoxylového radikálu (HO_2^*), radikálu oxidu dusnatého (NO^*), hydroxylového radikálu (HO^*), peroxinitritového radikálu ($ONOO^*$) a lipid peroxylového radikálu (LOO^*). [11][12] Vďaka voľnému elektrónu sú radikály nestabilné a veľmi reaktívne. Môžu reagovať ako oxidačné alebo redukčné činidlá [13]. Za normálnych podmienok sú detoxikované antioxidačným systémom a v organizme je udržiavaná rovnováha medzi počtom vznikajúcich a zanikajúcich reaktívnych foriem kyslíka. Biotické a abiotické stresové podmienky, ako napríklad vysoká intenzita svetla, tepla, sucho, nedostatok kyslíka a výskyt patogénov u rastlín, spôsobuje 3 – 10 násobný nárast produkcie voľných radikálov [12]. Nadmerná produkcia voľných radikálov a nedostatočná antioxidačná obrana vedie k narušeniu rovnováhy a následne k oxidačnému stresu. Reaktívne formy kyslíka začnú oxidačne poškodzovať rôzne biomolekuly, vrátane proteínov, lipidov, lipoproteínov a nukleových kyselín, čo môže viesť k chronickým chorobám organizmu [11].

Antioxidačné látky, takzvané antioxidanty, sú látky schopné bojovať proti voľným radikálom a pomáhajú vyrovnávať nerovnováhu počas oxidačného stresu. Zohrávajú kľúčovú úlohu pri ochrane rastlín proti znečisteniu a prevenciu proti chorobám u rastlín ako aj živočíchov [11]. Organizmy produkujú enzymatické antioxidanty, ako napríklad superoxidismutázu a neenzymatické antioxidanty, ku ktorým zaradzujeme napríklad kyselinu askorbovú a tiež sekundárne metabolity [12]. Vo všeobecnosti sú antioxidanty rozdelené do piatich typov:

- Primárne antioxidanty – ukončujú reťazové reakcie voľných radikálov mechanizmom transferu vodíkového atómu alebo elektrónu. Radíme k nim napríklad fenolické látky, tokoferoly, terciálne amíny, flavonoidy.
- Zachytávače kyslíka – reagujú s kyslíkom a odstraňujú ho, napríklad kyselina askorbová a jej deriváty.
- Sekundárne antioxidanty – rozkladajú peroxidy lipidov na stabilné produkty, napríklad zlúčeniny síry a selénu.
- Enzymové antioxidanty – odstraňujú vysoko oxidatívne formy, radíme k nim superoxidismutázu, katalázy, glutatiónperoxázu.
- Chelátové činidlá – vytvárajú komplexy s kovovými iónmi, ktoré katalizujú reťazové reakcie voľných radikálov, ako napríklad meďnaté a železnaté ióny. Radíme k nim kyselinu citrónovú, kyselinu fytovú [14][15][16].

Kyselina askorbová

Táto antioxidačná látka, známa i pod názvom vitamín C, funguje v organizme ako tlmiteľ redoxnej aktivity, interaguje s početnými bunkovými komponentmi, ovplyvňuje rast a vývoj rastliny moduláciou procesov počas mitózy, predlžovania bunky, starnutia a smrti. Okrem toho môže ovplyvňovať génovú expresiu spojenú s obranou proti biotickému a abiotickému stresu. Vytvára sa počas aeróbného mechanizmu a okamžite reaguje dvoma spôsobmi: chemicky a enzymaticky. Chemicky reaguje so superoxidovým radikálom, singletovým kyslíkom a ozónom. Enzymaticky pomocou askorbovej peroxidázy neutralizuje efekt

peroxidu vodíka. Vitamín C tiež pomáha regenerovať antioxidantné pigmenty, karotenoidy (karoteny a xantofily) a vitamín E [12].

Vitamín E

Rastliny produkujú i tokoferol (vitamín E), ktorý funguje ako dôležitý redoxný tlmič, rozpustný v lipidoch. Je syntetizovaný v chloroplastoch a protoplastidách. Vyskytuje sa v membránach buniek. Táto zlúčenina je hlavným zachytávačom singletového kyslíka, a tak poskytuje ochranu voči lipidovej peroxidácii. Štúdie dokázali, že nedostatok vitamínu E spomaľuje rast rastlín a mení odpovede organizmu na abiotické stresové podmienky. Na druhej strane zvýšený obsah vitamínu E preukázal zníženie škodlivého účinku prostredia na rastlinu [12].

Fenolické látky

Fenolické zlúčeniny sú sekundárne metabolity so širokou škálou účinku. Okrem už spomínaných antimikrobiálnych vlastností disponujú i antioxidantnými účinkami [17]. Štúdie ukázali, že v experimentálnych podmienkach je antioxidantná aktivita rastlinných fenolov vždy spojená s tromi mechanizmami účinku: s elektrónovým transferom, redukciou sily a schopnosťou tvoriť komplexy s kovovými iónmi. Fenolické látky ponúkajú elektrón peroxidázam guajakolového typu, ktoré následne detoxikujú peroxidy vodíka. Taktiež poskytujú ochranu rastlinám pred UV žiarením vďaka ich schopnosti zachytávať voľné radikály [12]. Schopnosť fenolických látok zachytávať voľné radikály sa odvíja od počtu a usporiadania hydroxylových skupín a od rozsahu konjugácie štruktúry [8].

Flavonoidy sú syntetizované rastlinou vo väčšej miere ak je vystavená UV žiareniu, nízkym teplotám, nízkemu obsahu živín alebo pri toxikácii ťažkými kovmi. Dokážu absorbovať UV žiarenie, vytvárajú komplexy s iónmi kovov a zachytávajú voľné radikály. Flavonoidy majú vo všeobecnosti viac hydroxylových skupín ako iné fenolické látky, tým pádom majú i väčší antioxidantný potenciál. Taktiež elektrón-donorové a metoxylové skupiny flavonoidov zvyšujú stabilitu voľných radikálov [18].

Bolo zistené, že UV-B žiarenie ovplyvňuje i produkciu lignán a taninov [12].

2.2 Vybrané druhy potravín

2.2.1 Acerola

Malpighia emarginata je tropický ker rastúci na Karibských ostrovoch a v Južnej Amerike, USA a Indii. Jej červené jedlé čerešne pripomínajúce plody známe pod názvom acerola alebo barbadoská čerešňa. Plody aceroly sú známe hlavne kvôli vysokému obsahu vitamínu C [19]. Dozretý plod má najvyšší obsah vitamínu C zo všetkých druhov ovocia v rozsahu 1–2 mg na 100 g⁻¹[20]. Ovocie obsahuje makro a mikronutrienty: proteíny, tuky, karbohydráty, minerálne soli a vitamíny. Vysoké nutričné hodnoty tohto exotického ovocia sú dosiahnuté vďaka vysokému obsahu magnézia, horčíka, fosforu, medi, selénu, vápnika, sodíka, zinku, železa, vitamínu B₁, B₂, B₃, B₅, C a zdraviu prospešných látok ako antokyány, karotenoidy, fenolické kyseliny, rutín, vláknina [19][21][20].

Vďaka antioxidantným vlastnostiam je acerola využívaná pri liečbe chorôb spôsobených oxidantným stresom [21]. Tiež sú známe jej protizápalové a antimykotické účinky [20]. Kvôli vysokému obsahu minerálov, regeneračným a hydratačným účinkom je ako extrakt súčasťou niektorých produktov na pleť. V niektorých častiach zeme je acerolový extrakt podávaný

na liečbu horúčok, únavy a dyspepsie [19]. Najčastejšie sa pridáva do limonád pre zvýšenie obsahu vitamínu C [20].



Obrázok 3: Acerola [22]

2.2.2 Škorica

Cinnamomum ceylanicum (škoricovník cejlónsky) tiež známy ako *Cinnamomum verum*, alebo škoricovník pravý, je vždyzelený tropický strom rastúci v tropickom podnebí. Voľne rastúci škoricovník rastie do výšky 17 metrov. Škorica predstavuje vysušenú vnútornú kôru svetlohnedej farby. Väčšina komerčne zakúpeného korenia však obsahuje škoricovník čínsky (*Cinnamomum cassia*) alebo kombináciu škoricovníka pravého a čínskeho [23]. Škoricu tvoria z 2% esenciálne oleje, ktorých hlavným komponentom (60 – 80%) je cinnamaldehyd. V menšej miere sú v škoricí zastúpené i trans-škoricová kyselina, o-methoxycinnamaldehyd, eugenol a monoterpény [24].

Škorica je kvôli svojej intenzívnej vôni a chuti známa predovšetkým ako korenina. V tradičnej medicíne je však využívaná vo veľkej miere pri liečení rôznych ochorení, vrátane reumatizmu, liečby rán, tráviacich ťažkostí, bolesti hlavy a prechladnutia. Boli dokazené jej antioxidantné, antimikrobiálne, protizápalové, protinádorové a cholesterol znižujúce vlastnosti. Terapeutické účinky škorice umožňuje hlavne obsah esenciálnych olejov a fenolických látok (kyseliny galovej, kyseliny p-hydroxybenzoovej, kyseliny p-hydroxybenzaldehydovej, kyseliny protocatechovej, kyseliny salicylovej, kyseliny syringovej, kyseliny vanilovej, vanilínu, kyseliny kávovodíkovej, kvercetínu, kyseliny tanínovej, kyseliny chlorogénovej, kyseliny škoricovej, kyseliny sinapovej a eugenolu). V súčasnosti je využívaná i ako prírodný konzervant v potravinách [25][26][27].

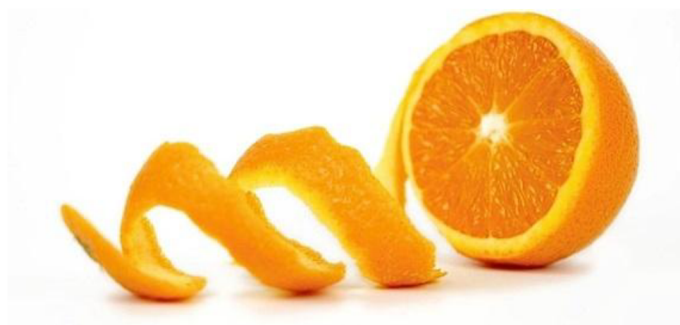


Obrázok 4: Škorica [28]

2.2.3 Pomarančová kôra

Citrus sinensis (citrónovník pomarančový alebo pomarančovník pravý) sa pestuje pre jeho chutné plody. Využíva sa predovšetkým dužina citrusových plodov, ale aj ich kôra, pre vysoký obsah esenciálnych olejov. Silice pomarančovej kôry sú zložené z veľkej časti z terpénov, ale tiež z alkoholov, aldehydov, ketónov, esterov a epoxidov. Hlavnou zložkou silíc je limonan, ktorý tvorí v priemere 71 – 95,1% esenciálnych olejov. Kôra sa skladá z dvoch častí, z vnútornej a vonkajšej. Vnútoraná biela časť je bohatým zdrojom pektínu. Kôra obsahuje i vitamín C, fenoly a flavonoidy. Boli dokázané jej antimikrobiálne a antioxidačné účinky [29][30].

Pomarančová kôra je využívaná ako dochucovadlo v potravinárstve, je pridávaná i do nápojov, parfumov a kozmetiky. V tradičnej medicíne je využívaná na liečbu nadúvania, dispepsie, je podávaná pri podráždení žalúdka a ako prevencia proti črevným parazitom [29][31].



Obrázok 5: Pomarač [32]

2.2.4 Klinček

Syzygium aromaticum (klinček voňavý) je pre jeho unikátnu vôňu a chuť jedným z najstarších korenín Orientu. Klinček je strom vysoký 10 – 20 metrov a môže sa dožívať 100 a viac rokov. Komerčne dostupné klinčeky sú vo forme sušených, neotvorených púčikov kvetov. Sušené púčiky obsahujú karbohydráty, pevné a prchavé oleje, živice, taníny, proteíny, celulózu, pentozany, minerály a vitamíny. Klinček je zložený z 61% z karbohydrátov, 20 % tvoria tuky a zvyšných 19% sekundárne metabolity, vitamíny a minerály. Sú výborným zdrojom mangánu, vlákniny, vitamínu C, vitamínu K, ω -3 mastných kyselín, vápnika a magnézia. Hlavným komponentom prchavých olejov je eugenol [33].



Obrázok 6: Klinček [34]

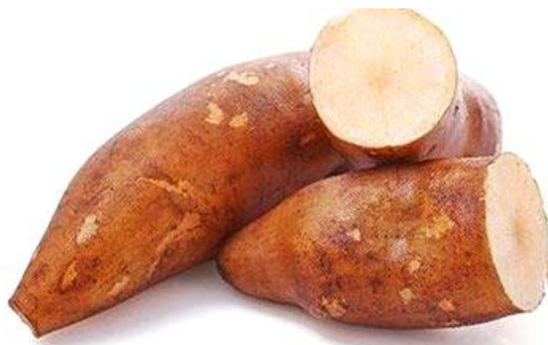
Klinček je predovšetkým využívaný ako korenie, ale je tiež súčasťou niektorých cigariet. Je známy pre jeho antiobakteriálne, antiseptické, antibiotické, anestetické, antispazmotické a karminálne vlastnosti. Klinčekový olej je podávaný ako prvá pomoc proti bolesti zubov

a hrdla. Je využívaný pri aromaterapiách, tiež ako karminačný a antiemetický prípravok. Klinčekový olej má široké priemyselné využitie. Je súčasťou parfumov, mydiel, čistiacich prostriedkov. Pridáva sa do niektorých zubných pást, ústnych vôd a žuvačiek. Jeho hlavná zložka eugenol sa využíva na prípravu syntetického vanilínu a isoeugenolu [33][24].

2.2.5 Jakon

Smallanthus tinctorius, tiež známy pod názvom jakon, je andská rastlina pestovaná pre chutné hľuzy. Dorastá do výšky 2 metrov a jeho najdôležitejšou časťou sú podlhovasté hľuzy pripomínajúce zemiaky. Nazýva sa aj „zemným jablkom“ kvôli neobvykle šťavnatým, krehkým a sladkým hľuzám. Je konzumovaný v surovom, varenom aj pečenom stave. Hlavnú zložku jakonu tvorí zo 70% voda. Jakon obsahuje približne 20 cenných aminokyselín, vápnik, draslík, horčík, železo, fosfor, vlákninu, vitamíny A, B1, B2, C a enzýmy. Hľuza obsahuje veľké množstvo fruktooligosacharidov. Dodávajú hľuze sladkú chuť a pôsobia ako prebiotiká. Obsahuje i fenolické látky, ktoré tvoria 0,79 – 3,08% sušiny. Z hľúz je vyrábaný i sirup, ktorý je výborným sladidlom, a pretože obsahuje hlavne fruktooligosacharidy, môže byť používaný diabetikmi a pri diétnej strave [35][36].

Konzumované sú aj listy a stonky jakonu, ktoré majú podobné zloženie ako hľuzy, avšak majú horkú chuť. Čaj z listov je využívaným prebiotikom a má antioxidantné účinky. Tiež sa využíva ako prírodný prostriedok proti cukrovke, pri zápaloch močových ciest, obličiek a pečene [35].



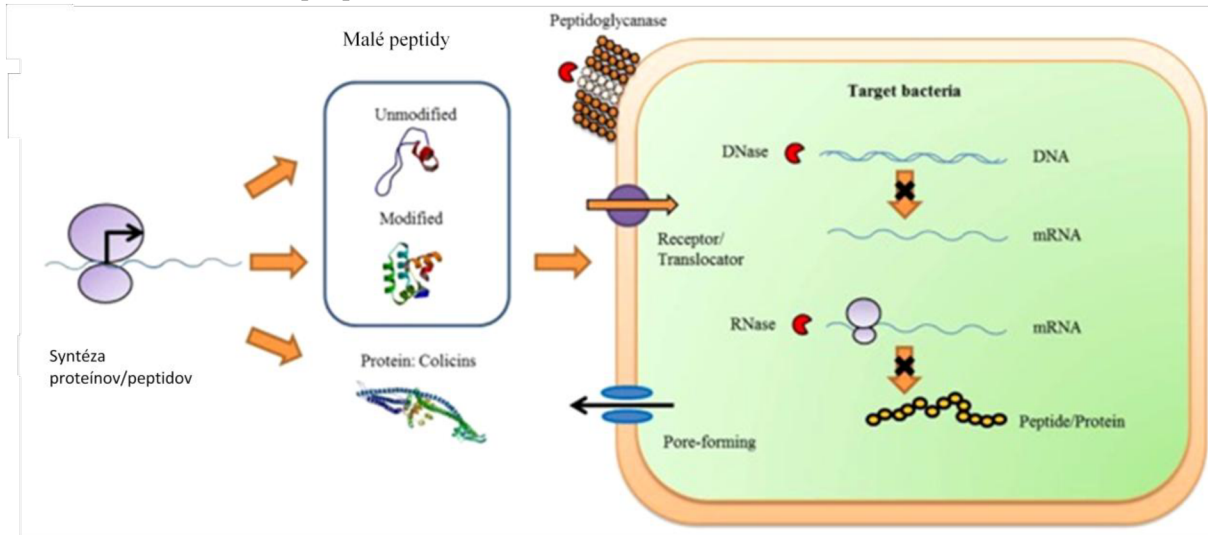
Obrázok 7: Jakon hľuza [37]

2.3 Bakteriocíny

Antibakteriálne peptidy sú krátke molekuly peptidickej povahy produkované takmer všetkými živými organizmami. Všetky antimikrobiálne peptidy sa vyznačujú rovnakými znakmi: malou veľkosťou, pozitívnym nábojom, lineárnou alebo cyklickou štruktúrou so zastúpením amfipatických sekvencií. Vďaka týmto vlastnostiam sú schopné interagovať s negatívne nabitými fosfolipidovými skupinami a hydrofóbnymi reťazcami mastných kyselín membrán mikroorganizmov a následným porušením membrány mikroorganizmy zahubiť. Opísaný spôsob interakcie je len jeden z mnohých mechanizmov účinku antimikrobiálnych peptidov [38][39].

Baktériami produkované antimikrobiálne peptidy sú nazývané bakteriocíny. Všeobecne sú bakteriocíny charakterizované ako zlúčeniny proteínovej povahy, tvorené krátkym reťazcom približne z 20 – 60 aminokyselinových zvyškov. Sú známe i bakteriocíny s dlhšími reťazcami radené medzi proteíny. Tieto zlúčeniny sú syntetizované ribozómami baktérií a ich úlohou je inhibovať rast podobného alebo rovnakého druhu baktérií. Avšak u väčšiny

charakterizovaných bakteriocínov bol zaznamenaný inhibičný účinok i na širšie spektrum druhov. Mechanizmus inhibičnej aktivity je rozhodujúcim faktorom, ktorý určuje spektrum účinku daných bakteriocínov. Antimikrobiálny účinok môže byť vyvolaný už spomínaným naviazaním bakteriocínu na receptory bunecnej membrány a následnou distribúciou daného receptoru medzi rôznymi druhmi baktérií, alebo inými mechanizmami, ktoré nevyžadujú naviazanie na membránu [40].



Obrázok 8: Proces produkcie a antimikrobiálnej funkcie bakteriocínu [41]

Viac ako 99% všetkých baktérií produkuje minimálne jeden bakteriocín. Baktérie využívajú bakteriocíny na udržanie populácie a zredukovanie počtu konkurentov, ktorý by ich oberali o živiny a životný priestor. Na rozdiel od väčšiny antibiotík, ktoré sú sekundárnymi metabolitmi, bakteriocíny sú syntetizované ribozómami, sú náchylné na proteázy, a vo všeobecnosti sú neškodné pre ľudské telo a okolité prostredie [41].

2.3.1 Klasifikácia bakteriocínov

Kvôli veľkej rôznorodosti je náročné bakteriocíny klasifikovať a v rôznych literatúrach sú triedené rozličným spôsobom.

- 1) Bakteriocíny produkované gram-negatívnymi baktériami delíme na základe veľkosti:
 - **Kolicíny**: vysokomolekulové proteíny (30 – 80 kDa)
 - **Mikrocíny**: nízkomolekulové látky (1 – 10 kDa) [42]
- 2) Bakteriocíny produkované gram-pozitívnymi baktériami: mliečne baktérie sú typickým zástupcom tejto skupiny, produkujú bakteriocíny rôznorodej veľkosti, štruktúry, fyzikálno-chemických vlastností a spektra účinku. Delíme ich do troch tried:

Trieda I. – lantabiotiká

- malé molekuly (rádovo v jednotkách kDa)
- obsahujú netypické aminokyseliny, ako napríklad lanthionin (Obrázok 1)
- termostabilné
- napríklad: nisín, subtilín, epidermín

Trieda II. – nízkomolekulárne peptidické bakteriocíny

- malé molekuly (do 10 kDa)
- neobsahujú žiadne modifikované aminokyseliny
- termostabilné, kation aktívne a hydrofóbne peptidy
- napríklad: pediocín PA-1, Lacticín F

Trieda III. – vysokomolekulárne proteínové bakteriocíny

- veľké molekuly (nad 30 kDa)
- termolabilné
- napríklad: helveticín, casicín 80

Trieda IV. – komplexné bakteriocíny

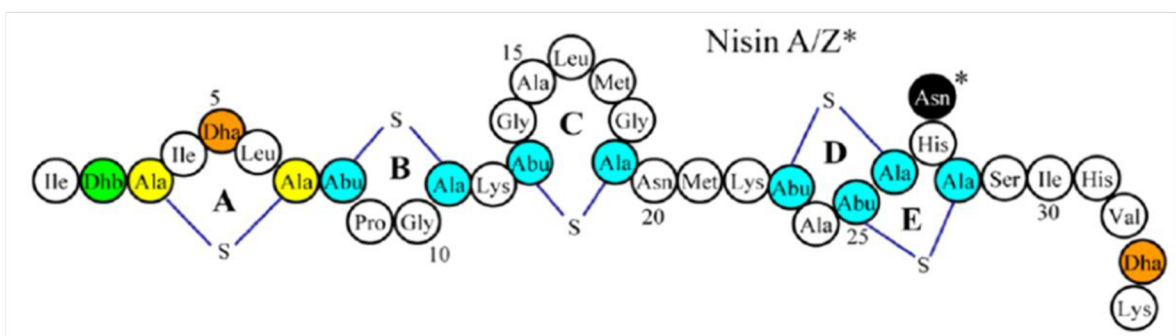
- veľké komplexné molekuly
- zložené z proteínovej a neproteínovej časti (napríklad lipidickej, sacharidovej)
- napríklad: lactocín 27, plantaricín S [41]

2.3.2 Nisín

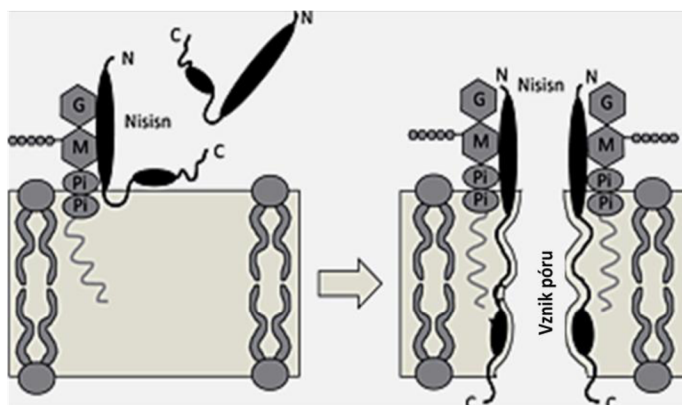
Nisín je polypeptid o veľkosti 3,5 kDa, patriaci k lantibiotikám s antibakteriálnymi a bakteriostatickými vlastnosťami voči gram-pozitívnym baktériám a spóram. Proti gram-negatívnym baktériám, kvasinkám a plesniam však preukazuje len slabý účinok [43].

Je produkovaný mliečnymi baktériami rodu *Lactococcus lactis*. Bol objavený v roku 1928, v Anglicku počas výroby syra. Po kontaminácii mlieka baktériami rodu *L. lactis* subsp. *lactis* bol pôsobením nisínu inhibovaný rast sýrnej kultúry [43].

Voľne v prírode sa vyskytuje v dvoch formách: nisín A a nisín Z. Obe varianty disponujú antimikrobiálnym charakterom a líšia sa štruktúrne jednou aminokyselinou (27.) vid' Obrázok 9 [44]. Nisín sa skladá z 34 aminokyselín, obsahuje päť vnútorných disulfidických mostíkov a tri nezvyčajné aminokyseliny: dehydroalanín, lanthionín, β -methyl-lanthionín [44][43].



Obrázok 9: Štruktúra nisínu A/nisínu Z [45]



Obrázok 10: Mechanizmus narušenia bunkovej membrány nisinom (vytváranie pórov)[46]

Antimikrobiálny účinok nisinu závisí na koncentrácii aplikovaného nisinu a od množstva prítomných spór a buniek, ktoré je potrebné inhibovať alebo zničiť. Nisín pôsobí na membrány cieľových buniek. Naviaže sa na lipid II a následne sa vmedzerí do membrány, čím vytvorí póry, cez ktoré uniká cytoplazma buniek a tým ich zahubí, vid' Obrázok 10. Gram-negatívne baktérie chráni pred nisinom vonkajšia bunková stena, ktorá funguje ako nepriepustná bariéra pre molekuly nisinu. V prípade čiastočného alebo úplného narušenia bunkovej steny sa i gram-negatívne baktérie stávajú na nisin náchylné [43].

V súčasnosti je nisín najviac preskúmaný a charakterizovaný bakteriocín. A ako jediný bakteriocín je celosvetovo využívaný ako konzervant v potravinách, je schválený ako netoxický, prírodný prípravok [40][46].

2.4 Významné prírodné antimikrobiálne látky živočíšneho pôvodu

Rastliny, suchozemské a morské živočíchy, huby a baktérie sú producentmi prírodných látok s významným antibakteriálnym účinkom. Antimikrobiálne látky sú živočíchmi produkované za účelom obrany proti infekciám [47].

2.4.1 Lysozým

Lysozým bol prvý peptid so zisteným antimikrobiálnym charakterom. Bol objavený v roku 1922 Alexandrom Flemingom. Jedná sa o enzým patriaci do skupiny hydroláz. Je súčasťou telových tekutín a tkanív organizmov a zabezpečuje imunitnú odpoveď organizmu. Mechanizmus jeho účinku spočíva v hydrolýze β -1,4-glykozidickej väzby medzi N-acetylmuranovou kyselinou a N-acetylglukosaminom peptidoglikanu, ktorý je súčasťou bunkových stien baktérií. Antibakteriálna aktivita lysozýnu je však obmedzená len na gram-pozitívne baktérie. Účinok voči gram-negatívnym baktériám je kvôli rozdielnemu zloženiu bunkovej steny veľmi malý [48][49][50].

2.4.2 Chitosan

Chitosan (poly- β -1,4-glukozamín) je prírodný polysacharid o veľkosti do 1 MDa. Je pripravovaný alkalickou deacetáciou chitínu, ktorý sa vyskytuje v organizme mnohých bezstavovcov, morských živočíchov, húb a rias. Je využívaný v rozličných biologických a biomedicínskych aplikáciách vďaka svojim unikátnym vlastnostiam: biokompatibilite, biodegradabilite, je antialergénny a netoxický. Zároveň boli zistené antioxidantné a silné antimikrobiálne vlastnosti chitosanu voči baktériám, kvasinkám a plesniam. Presný

mechanizmus antibakteriálneho účinku doposiaľ nebol zistený. Predpokladá sa, že preniká cez bunkovú stenu a naviazaním sa na DNA inhibuje transkripciu a transláciu [51][52].

2.5 Možnosti zvýšenia antimikrobiálneho účinku

2.5.1 Synergický účinok

Synergizmus opisuje interakciu látok a faktorov pri ktorej aktivita jednotlivých látok alebo faktorov po spoločnej aplikácii narastie [2]. Tento účinok býva častokrát silnejší ako len samotný súčet účinkov jednotlivo po ich samostatnej aplikácii [53].

Je známe, že rastliny produkujú veľké množstvo malých molekúl antimikrobiálnej povahy. Je zvláštne, že väčšina týchto molekúl vykazuje samostatne len slabú antibiotickú aktivitu. Napriek ich slabšiemu účinku, bojujú rastliny proti infekciám viac ako úspešne. Predpokladá sa, že rastliny sami využívajú určitý druh synergizmu na zvýšenie antimikrobiálneho účinku [54].

V súvislosti s tým čo synergizmus vytvára sa väčšina literatúry rozchádza. Existuje veľa experimentálnych techník na pozorovanie tohto účinku, avšak je len malé množstvo dôvodov, prečo k očakávanému efektu nedošlo. Taktiež hrá značnú rolu druh synergie, môže sa jednať o antibiotickú, konzervačnú alebo biocídnu synergiu [55]. Štúdie dokázali značnú antimikrobiálnu synergickú aktivitu medzi komponentami zmesí korenín a bylín, medzi antibiotikami navzájom, a taktiež medzi bakteriocínmi a rastlinnými komponentmi [2][54][56].

Celkové pochopenie mechanizmu synergie by mohlo byť kľúčovým faktorom v boji proti bakteriálnej rezistencii, a tiež by to umožňovalo zníženie potrebných dávok antibiotík pri zachovaní účinku a zníženom výskyte toxických prejavov [54][53].

2.5.2 Enkapsulácia

Enkapsulácia je technika uzatvárania materiálov pevnej, kvapalnej alebo plynnej povahy, do miniatúrnych kapsúl o veľkosti niekoľkých nanometrov, mikrometrov až milimetrov. Následne kapsule pri špecifických podmienkach uvoľňujú svoj obsah kontrolovanou rýchlosťou. Enkapsulácia sa v súčasnosti využíva v rôznych odvetviach priemyslu. Vo farmaceutickom, chemickom, kozmetickom, potravinárskom, tlačiarenskom, poľnohospodárskom priemysle... [57]

Technika je závislá na fyzikálnych a chemických vlastnostiach enkapsulovaného materiálu, ktorým sú napríklad rôzne dochucovadlá, antimikrobiálne a antioxidantné látky, liečivá, enzýmy, bunky a iné aktívne zložky. Dôvody enkapsulácie aktívnych látok:

- Inkorporácia aktívnych látok do kapslí umožňuje postupné a cielené uvoľňovanie zložky v presne stanovenom čase a na presne stanovenom mieste. Kontrolované uvoľňovanie tak zvyšuje účinnosť aktívnej látky i v malom množstve a zabezpečuje optimálne dávkovanie účinnej látky.
- Ochrana enkapsulovaných látok pred degradáciou pri kontakte s okolitým prostredím.
- Zabránenie nežiaducim reakciám enkapsulovaných látok s vonkajším prostredím.
- Spomalenie nechceného vyparovania alebo uvoľňovania aktívnych zložiek.

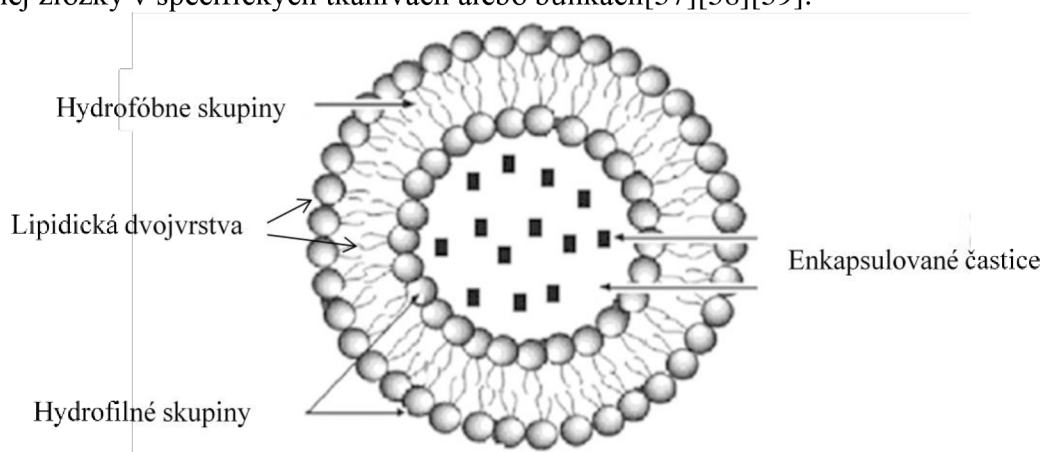
- Pozmeňuje fyzikálne vlastnosti enkapsulovaného materiálu a tým uľahčuje ich manipuláciu (napr. v prípade enkapsulácie kvapalín sa tekutiny transformujú na ľahko manipulovateľné tuhé zložky).
- Maskovanie pachu alebo vône inkorporovaných zložiek.
- Bezpečná manipulácia s toxickým materiálom [57].

2.5.2.1 Metódy enkapsulácie

Využívajú sa rôzne enkapsulačné techniky a obalové materiály so širokou škálou funkcií. Veľkosť a tvar kapsúl závisia na metóde ich prípravy. Najvyužívanejšie enkapsulačné metódy sú: metóda vibračnej trysky, centrifugačná extrúzia, koacervácia, emulzifikácia, fluidná vrstva, medzifázová polymerizácia, metóda hydrogénovej mikrosféry, lyofilizácia, fázová separácia, sprejové sušenie, sprejové chladenie, vyparovanie rozpúšťadla, enkapsulácia za pomoci superkritickej kvapaliny, vytlačanie taveniny, kokryštalizácia, enkapsulácia do lipozómov...[57]

2.5.2.2 Lipozómy

Lipozómy sú malé vezikuly tvorené z fosfolipidovej dvojvrstvy a cholesterolu, o veľkosti 25 nm až 10 μ m. Môžu byť unimembránové alebo multimembránové. Sú schopné vo svojom vnútri zachytiť hydrofilné aj hydrofóbne aktívne zložky. Sú biologicky inertné, úplne biokompatibilné a nespôsobujú toxické alebo alergické reakcie. Unikátnou vlastnosťou lipozómov je ciele uvoľňovanie inkorporovaných látok pri presne definovaných teplotách. Fosfolipidová dvojvrstva sa rozpadáva pri prechodnej teplote fosfolipidov, ktorá je väčšinou okolo 50 °C, avšak modifikáciou fosfolipidovej dvojvrstvy sa táto teplota môže meniť. Naviazaním cieľových ligandov na povrch lipozómov vieme zabezpečiť ciele uvoľňovanie aktívnej zložky v špecifických tkanivách alebo bunkách[57][58][59].



Obrázok 11: Model lipozómu [58]

2.6 Využitie prírodných antimikrobiálnych látok

2.6.1 Rezistencia

Objavenie antibiotík a ich následný vývoj navždy zmenil tvár modernej medicíny a vedy. Účinnosť a dostupnosť antibiotík viedla k nadmernému používaniu týchto liečiv u ľudí ako aj u hospodárskych zvierat. To zapríčinilo u mikroorganizmov rýchly vývoj antibiotickej rezistencie [60].

Mikroorganizmy si dokážu predávať antimikrobiálnu rezistenciu z generácie na generáciu prostredníctvom génov. U baktérií je prenos rezistencie možný i pomocou mobilných genetických elementov, takzvaných plazmidov v procese konjugácie. Tento proces umožňuje transfer antibiotickej rezistencie i medzi rozličnými kmeňmi baktérií. Rezistencia sa môže objaviť i spontánne, prostredníctvom mutácie [61].

Antibiotická rezistencia zapríčiňuje celosvetovo 700 000 úmrtí ročne a predpokladá sa, že v roku 2050 by to mohlo dosiahnuť počet 10 miliónov [6]. Nedávne štúdie dokázali, že v dnešnej dobe dokážu baktérie získať rezistenciu na antibiotiká, ktoré sú v tisícnásobne vyššej koncentrácii ako tie používané na natívne kmene baktérií. Z toho dôvodu sa používanie antibiotík ako antimikrobiálnych liečiv pri boji s bežnými patogénmi stalo nerealizovateľné a hľadajú sa nové alternatívne prístupy pri boji s mikroorganizmami [60].

2.6.1.1 Alternatíva k antibiotikám

Výskumy ukázali, že fauna a flóra disponuje veľkým množstvom látok antimikrobiálnej povahy, ktoré by mohli čiastočne alebo úplne nahradiť používanie antibiotík. Navyše pravý potenciál v tomto smere u tisícok prírodných zložiek ešte nebol plne prebádaný [62].

Ďalšou alternatívou v boji s antibiotickou rezistenciou by mohlo byť zavedenie kombinovaného efektu. Cieľom je dosiahnuť synergizmus alebo aditívnu interakciu dvoch zložiek antimikrobiálnej povahy. Prístupy ku kombinovanému efektu je možné rozdeliť na:

- kombinácia dvoch alebo viacerých antibiotík,
- kombinácia antibiotika a bakteriocínu,
- kombinácia dvoch alebo viacerých antimikrobiálnych látok rastlinnej povahy,
- kombinácia antimikrobiálnych látok rastlinnej a živočíšnej povahy,
- kombinácia antimikrobiálnej látky s neantibiotickým prípravkom ako napríklad EDTA [60][6].

2.6.2 Aplikácia antimikrobiálnych látok v potravinách

Potravinárske výrobky nie sú trvanlivé a prirodzene sa kazia nežiadúcou oxidáciou a pôsobením mikroorganizmov. Tie môžu vyvolať nechcené reakcie, ktoré vedú k zmene chuti, pachu, farby, a textúry potravín. Niektoré druhy mikroorganizmov produkujú i toxíny, ktoré môžu u človeka a zvierat pri požití spôsobiť alimentárne infekcie. Z toho dôvodu je potrebné zabezpečiť aby nedošlo k znehodnoteniu potravín mikroorganizmami počas prípravy, distribúcie a skladovania [63].

Aby sa predišlo kontaminácii mikroorganizmami bolo vyvinutých množstvo metód a technológií. Využívané sú metódy tepelného spracovania, pri ktorých sú potraviny po dobu niekoľkých sekúnd až minút vystavené teplote 60 – 100°C. Počas tohto procesu dochádza k prenosu veľkého množstva tepelnej energie, čo môže mať za následok zmenu vzhľadu, chuti a nutričných hodnôt potravín. Tiež sa využíva metóda konzervovania pomocou syntetických chemikálií ako sú napríklad nitráty, benzoáty, sulfidy, sorbáty, formaldehyd... Štúdie však dokázali, že tieto chemikálie majú škodlivé vedľajšie účinky [64].

2.6.2.1 Biokonzervácia

Moderná spoločnosť si začína stále viac a viac uvedomovať dôležitosť bezpečných potravín, preto sa v poslednej dobe rozširuje záujem o biokonzervovanie a bioprotekciu

potravín. Jedná sa o alternatívne metódy k tepelnému a chemickému spracovaniu. Využívajú antimikrobiálne látky z prírodných zdrojov, ktoré majú prospešné účinky na zdravie a pri procese nedochádza k znižovaniu kvality potravín [64][41].

Sekundárne metabolity antimikrobiálnej povahy sú získavané z ovocia, zeleniny, semien rastlín, liečivých bylín, korenia, mlieka, vajec, živočíšnych tkanív a mikroorganizmov (baktérie, huby). Konzervačné činidlá živočíšneho pôvodu ako napríklad kyselina mliečna alebo bakteriocíny, rovnako ako konzervačné činidlá rastlinného pôvodu, dokážu inhibovať oxidáciu lipidov, zabrániť vyblednutiu alebo zmenám farieb a predĺžiť trvanlivosť produktov. Nadmieru účinná sa ukázala biokonzervácia mäsa pri aplikácii extraktov z bylín, korenia, ovocia a zeleniny [64].

Rastlinné a živočíšne extrakty s antimikrobiálnymi vlastnosťami majú širokú škálu využitia v potravinárstve i vďaka ich prospešným antioxidačným, antidiabetickým a antikarcinogénnym vlastnostiam. Ich antioxidačná povaha umožňuje predchádzať oxidácii lipidov, a tak zabraňujú chemickému znehodnoteniu potraviny. Je možné ich využívať i ako prírodné farbivá a dochucovadlá [64][65].

2.6.3 Aplikácia antimikrobiálnych látok v kozmetike

2.6.3.1 Kozmetika

Kozmetika je definovaná ako akákoľvek látka alebo zmes, ktorá bola určená na styk s pokožkou ľudského tela, alebo so zubami a ústnou dutinou za účelom čistenia, ochrany, zmeny vzhľadu a maskovanie zápachu. Do kozmetiky je preto zahrnutá široká škála výrobkov: make-upy, púdre, toaletné mydlá, parfumy, sprchovacie prípravky, depilátory, dezodoranty, antiperspiranty, výrobky pre vonkajšiu intímnu hygienu, kožu, vlasy, ústnu dutinu a nechty. Táto definícia však nie je univerzálna a niektoré kozmetické prípravky už môžu spadať do kategórie liečiv [66].

2.6.3.2 Konzervanty v kozmetike

Mikrobiologická čistota je jedným z najzávažnejších problémov v kozmetickom priemysle. Kontaminácia produktov mikroorganizmami môže u používateľov viesť k vzniku infekcií a alergií. Prítomnosť a následné množenie mikroorganizmov môže spôsobiť i zmenu konzistencie, chute, vône, zapríčiniť separáciu fáz a vznik sedimentov v kozmetickom prípravku. Z toho dôvodu sa do kozmetiky pridávajú antimikrobiálne zložky, takzvané konzervanty, ktoré zabezpečujú aby nedošlo k znehodnoteniu prípravku počas výroby, balenia a celej doby používania [67][68].

Alergické reakcie sú najčastejšie spôsobované prítomnosťou syntetických konzervantov ako napríklad parabén, sulfáty, izotiazolíny... V priebehu posledných rokov sa alergie vyskytujú u používateľov čoraz častejšie, preto je kozmetický priemysel nútený hľadať alternatívne konzervačné látky prírodného pôvodu [68].

Výhodou antimikrobiálnych zložiek rastlinnej a živočíšnej povahy je, že sú získané z bezpečných a prírodných zdrojov. V kozmetike sa používajú s veľkou obľubou i vďaka širokej škále prospešných vlastností. Sú známe ich antimikrobiálne, antioxidačné, protizápalové, antikarcinogénne vlastnosti, spomaľujú i starnutie pleti a pôsobia proti akné. Sú do prípravkov pridávané ako konzervanty, zvlhčovače, stabilizátory [69][66].

2.6.3.3 Alternatívna liečba akné

Akné je porucha kože vyvolaná patogénmi, ktoré spôsobujú hypersekréciu mazu v deformovaných folikuloch kože. Rastlinné výťažky sa používajú na liečbu kožných chorôb od nepamäti. Vďaka ich karotenoickým, bakteriostatickým, antioxidačným, antimikotickým, protizápalovým (vďaka vysokému obsahu fytoicídov) vlastnostiam dokážu účinne bojovať s prejavmi akné. Do kozmetických prípravkov sa pridávajú napríklad bioaktívne látky z korenia alebo cibule. Využívajú sa i extrakty z Aloe vera, bazalky, ruží, rôzne druhy silíc...[70]

3 CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto práce je testovanie antimikrobiálnej aktivity vybraných prírodných extraktov v kombinácii s bakteriocínmi. Súčasťou práce je dosiahnutie nasledujúcich čiastkových cieľov:

1. Príprava častíc s obsahom rastlinných zložiek v kombinácii s bakteriocínmi.
2. Testovanie antimikrobiálneho účinku zvolených zložiek vo voľnej a enkapsulovanej forme.
3. Návrh vhodnej formy prídavku prírodných antimikrobiálnych látok a ich zmesí pre potravinárske a kozmetické aplikácie.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Použité štandardné chemikálie

- Nisín, Sigma-Andrich (Nemecko)
- Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Trolox, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Katechín, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Kyselina L-askorbová, Sigma-Aldrich (Nemecko)

4.1.2 Chemikálie použité pri stanoveniach

- ABTS, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Chlorid hlinitý, Lach-ner (Česká republika)
- Dusitan sodný, Lach-ner (Česká republika)
- Ethanol pre UV/VIS, Lach-ner (Česká republika)
- Folin-Cicalteauovo činidlo, Penta (česká republika)
- Hydroxid sodný, Lach-ner (Česká republika)
- Peroxosíran draselný, Lach-ner (Česká republika)
- Uhličitan sodný bezvodný, Lach-ner (Česká republika)
- Síran meďnatý . 5 H₂O, Lach-ner (Česká republika)
- Vínan sodno-draselný . 4 H₂O, Lach-ner (Česká republika)
- 2,6-dichloridofenol, Lach-ner (Česká republika)
- Kyselina chlorovodíková, Lach-ner (Česká republika)

4.1.3 Chemikálie použité na prípravu častíc

- Lecithin, Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Cholesterol, Sigma-Aldrich (Nemecko)

4.1.4 Chemikálie použité na prípravu živných médií

- D-glukóza bezvodná, Lachner (Česká republika)
- Nutrient Broth Medium, Himedia (India)
- Pepton aus Casein, Himedia (India)
- Yeast Extract Powder, Himedia (India)

4.2 Prístroje a pomôcky

- Analytické váhy, Boeco (Nemecko)
- Automatické pipety v rôznom rozsahu objemu – Discovery (Nemecko), Biohit (Nemecko)
- ELISA Reader BioTek ELx808, Biotek (Nemecko)
- DLS analyzátor Zetasizer Nano ZS, Malvern (UK)
- Mikrocentrifúga Mikro 120, Hettich Zentrifugen (Nemecko)
- Predvážky Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH (Nemecko)
- Spektrofotometer – Helios γ , Unicam (Veľká Británia)
- Temperovaná trepačka, Hiedolph Inkubator 1000 (Nemecko)

- Ultrazvokový homogénizátor/dispergátor – Bandelin Sonoplus HS3200 – Sonorex Technik (Nemecko)
- Vortex REax Top, Heidolph (Nemecko)
- Laminátový box Aura mini – Bioair, EuroClon (Taliansko)
- Optický mikroskop a software Dino Capture (Česká republika)

4.3 Použité mikroorganizmy

V tejto práci boli použité kultúry mikroorganizmov, ktoré pochádzajú z Českej zbierky mikroorganizmov Masarykovej univerzity v Brne:

- *Candida glabrata* (CCM 8270)
- *Escherichia coli* (CCM 7395)
- *Micrococcus luteus* (CCM 1569)
- *Serratia marcescens* (CCM 8587)

4.4 Vybrané prírodné materiály

Prírodné materiály použité v tejto práci: acerola, klinček, škorica, pomarančová kôra, jakon, boli vybrané na základe zistení predchádzajúcich prác ([71] [72]), kde u týchto látok bola stanovená najväčšia antimikrobiálna aktivita.

Škorica, acerola, pomarančová kôra boli v priebehu testovania používané v práškovej forme, jakon bolo možné zakúpiť jedine vo forme sirupu.

Zakúpené prírodné materiály (Obrázok 12):

- škorica – Vitana
- klinček – Vitana
- jakon sirup – Lifefood
- acerola – Grulich
- pomarančová kôra – Sonnentor



Obrázok 12: Materiály použité v práci

4.5 Príprava extraktov

Odmerané množstvo rastlinného materiálu bolo pridané do Erlenmeyerovej banky a zaliate destilovanou vodou (Tabuľka 1). Následne boli extrakty ponechané na temperovanej trepačke 20 minút pri 37 °C.

Tabuľka 1: Príprava extraktov

Rastlinný materiál	Príprava
acerola	2 g látky; 20 ml destilovanej vody
klinček	2 g látky; 20 ml destilovanej vody
škoricca	2 g látky; 20 ml destilovanej vody
pomarančová kôra	2 g látky; 20 ml destilovanej vody
jakon	2 ml látky; 18 ml destilovanej vody

4.6 Charakterizácia vybraných prírodných materiálov

4.6.1 Stanovenie celkových polyfenolov

Do skúmavky bol napipetovaný vždy 1 ml zriedeného vodného roztoku Folin-Ciocalauovho činidla v pomere 1:9, 1 ml destilovanej vody a 50 µl vodného extraktu vzorky. Vzorky boli premiešané a nechané stáť 5 minút. Následne bol pridaný 1 ml nasýteného roztoku uhličitanu sodného a opäť bol obsah skúmaviek premiešaný. Absorbancia bola odmeraná po 15-tich minútach, pri vlnovej dĺžke 750 nm.

Výsledná koncentrácia celkových polyfenolov bola vypočítaná z kalibračnej rovnice, ktorá bola zostrojená pre roztok kyseliny gallovej v koncentračnom rozmedzí 0,1 – 0,7 mg/ml.

4.6.2 Stanovenie celkových flavonoidov

Do skúmaviek bolo napipetovaných 0,5 ml vodného extraktu vzorky, 1,5 ml destilovanej vody a 0,2 ml 5% roztoku dusitanu sodného. Obsah skúmaviek bol premiešaný a ponechaný stáť 5 minút. Následne bol do skúmaviek pridaný 0,2 ml 10% roztoku chloridu hlinitého a opäť bol roztok premiešaný a ponechaný stáť 5 minút. Potom bolo pridaných 1,5 ml roztoku hydroxidu sodného o koncentrácii 1 mol/l a 1 ml destilovanej vody. Absorbancia bola odmeraná po 15-tich minútach, pri vlnovej dĺžke 510 nm.

Výsledná koncentrácia celkových flavonoidov bola vypočítaná po zostrojení kalibračnej krivky katechínu v koncentračnom rozmedzí 0,05 – 0,3 mg/ml.

4.6.3 Stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity

Antioxidačná aktivita bola stanovená za použitia metódy TEAC. Roztok ABTS^{•+} bol rozpustený v destilovanej vode na koncentráciu 7 mmol/ml a následne bolo pridané potrebné množstvo peroxosíranu draselného pre dosiahnutie koncentrácie 2,45 mmol/l. Roztok bol ponechaný stáť v tme pri izbovej teplote najmenej 12 hodín. Pred meraním bol roztok ABTS^{•+} zriedený etanolom pre UV/VIS na absorbanciu $0,70 \pm 0,02$ pri vlnovej dĺžke 734 nm a ďalej bol používaný len takto zriedený roztok.

Do kyvety bol napipetovaný 1 ml zriedeného roztoku ABTS^{•+} a okamžite bola odmeraná absorbancia v čase 0. Do druhej kyvety bol napipetovaný roztok ABTS^{•+} a 10 µl vodného extraktu a kyveta sa uložila do tmy. Po 10-tich minútach bola opäť odmeraná absorbancia.

Výsledná antioxidačná aktivitu bola zistená z kalibračnej rovnice, ktorá bola zostrojená pre roztok štandardu Troloxu, ktorý bol rozpustený v 60% etanole. Z tohto roztoku boli pripravené roztoky kalibračnej rady v koncentračnom rozmedzí 0,05 – 0,4 mg/ml.

4.6.4 Stanovenie celkových proteínov Hartree-Lowryho metódou

Bola pripravená koncentračná rada roztokov nisínu v rozmedzí 0,3 – 1,5 mg/ml. Do skúmaviek bol napipetovaný 1 ml roztoku nisínu a 0,9 ml činidla A. Potom bola skúmavka inkubovaná 10 minút vo vodnom kúpeli pri 50 °C. Po 10-tich minútach boli skúmavky ochladené na laboratórnu teplotu, do každej bolo pridaných 0,1 ml činidla B, obsah skúmaviek bol premiešaný a ponechaný stáť 10 minút pri laboratórnej teplote. Následne boli pridané 3 ml činidla C. Skúmavky boli opäť premiešané a inkubované 10 minút vo vodnom kúpeli pri 50 °C. Po ochladení bola odmeraná absorbanca vzoriek pri vlnovej dĺžke 650 nm.

Činidlo A: 50 ml hydroxidu sodného o koncentrácii 1 mol/l, 10 g uhličitanu sodného, 1 g tetrahydrátu vlnanu sodno-draselného, destilovaná voda do 100 ml

Činidlo B: 10 ml hydroxidu sodného o koncentrácii 1 mol/l, 1 g pentahydrátu síranu meďnatého, 2 g tetrahydrátu vlnanu sodno-draselného, destilovaná voda do 100 ml

Činidlo C: zriedený Folin-Ciocalteuov roztok v pomere 1:15 (destilovanou vodou)

4.7 Stanovenie obsahu kyseliny askorbovej v extrakte aceroly

4.7.1 Štandardizácia odmerného roztoku

Navážka 10 mg kyseliny L-askorbovej bola rozpustená v malom množstve 2% HCl a následne bola kvantitatívne prevedená do 10 ml odmernej banky. Objem bol doplnený po rysku 2% HCl. Do titračnej banky bolo napipetovaných 10 ml 2% HCl a 1 ml štandardu. Takto pripravený roztok bol titrovaný odmerným roztokom 2,6-dichlorindofenolom do lososovo-ružového sfarbenia.

4.7.2 Príprava vzorku

Navážka vzorky aceroly bola rozpustená v malom množstve 2% HCl. Roztok bol kvantitatívne prevedený do odmernej banky o objeme 100 ml a doplnený po rysku 2% HCl. Z tohto roztoku bol prepipetovaný 1 ml roztoku do titračnej banky a doplnený na objem 25 ml 2% HCl. Roztok bol následne titrovaný odmerným roztokom 2,6-dichloridofenolu o koncentrácii 0,000 5 ml/dm³ do objavenia lososovo-ružového sfarbenia stáleho minimálne 15 sekúnd.

4.8 Príprava častíc

4.8.1 Príprava lipozómov

K 10 ml vodného extraktu bolo pridaných 180 mg lecitínu a 20 mg cholesterolu. Pripravená zmes bola následne ultrazvukovaná za použitia tyčového ultrazvuku, pri účinnosti 75 %, po dobu jednej minúty, za súčasného chladenia vo vodnom kúpeli (Obrázok 13).



Obrázok 13: Ukážka enkapsulovaných extraktov (1. pomarančová kôra, 2. klinček, 3. acerola, 4. škorica, 5. jakon)

4.8.2 Charakterizácia liposomov

4.8.2.1 Stanovenie enkapsulačnej účinnosti polyfenolov

Enkapsulačná účinnosť bola zistená na základe stanovenia obsahu celkových polyfenolov stanovených podľa postupu z kapitoly 4.6.1. Pre stanovenie enkapsulačnej účinnosti bola najprv odmeraná koncentrácia polyfenolov v roztoku pred enkapsuláciou a následne po enkapsulácii. Všetky extrakty boli po enkapsulácii centrifugované 60 minút pri 11 000 ot./min. Supernatant bol zliaty a bola v ňom stanovená koncentrácia polyfenolov. Z nameraných hodnôt bol vypočítaný celkový obsah polyfenolov pred a po enkapsulácii. Po odčítaní týchto dvoch hodnôt bolo zistené množstvo polyfenolov enkapsulovaných do častíc.

4.8.2.2 Stanovenie enkapsulačnej účinnosti nisinu

Enkapsulačná účinnosť bola zistená na základe stanovenia obsahu celkových proteínov, stanovených podľa postupu z kapitoly 4.6.4. Pre stanovenie enkapsulačnej účinnosti bola najprv odmeraná koncentrácia proteínov v roztoku pred enkapsuláciou a následne po enkapsulácii. Všetky vzorky boli po enkapsulácii centrifugované 60 minút pri 11 000 ot./min. Supernatant bol zliaty a bola v ňom stanovená koncentrácia proteínov. Z nameraných hodnôt bol vypočítaný celkový obsah proteínov pred a po enkapsulácii. Po odčítaní týchto dvoch hodnôt bolo zistené množstvo nisinu enkapsulovaného do častíc.

4.8.2.3 Optimalizácia prípravy nového typu častíc

Boli vytvorené lipozómové častice obalené vrstvou chitosanu. K pripraveným liposómom s enkapsulovaným extraktom bol pridaný roztok 1% alebo 2% chitosanu. Zmes bola potom miešaná do vzniku kombinovaných častíc. Následne sa porovnávala účinnosť obalenia lipozómových častíc chitosanom.

4.8.2.4 Stanovenie veľkosti a stability častíc

Roztoky obsahujúce lipozómy boli centrifugované po dobu 5 minút pri 6 000 ot./min. Supernatant bol odliaty a následne bol supernatant znovu centrifugovaný pri 11 000 ot./min po dobu 60 minút. Supernatant bol odliaty a usadené liposómy boli rozsuspendované v destilovanej vode.

Veľkosť častíc bola stanovovaná pomocou DLS, za použitia prístroja Zeta sizer. 100x zriedené roztoky častíc boli prenesené do kyvety a následne bola zistená distribúcia veľkosti, priemerná veľkosť a polydisperzita častíc.

Stabilita bola zisťovaná pomocou zeta potenciálu, opäť za použitia prístroja Zetasizer. Roztoky častíc boli taktiež 100x zriedené. Do kyvety sa premiestnil 1ml zriedeného roztoku a vložil sa elektródový nástavec, a následne prebehlo meranie. Z hodnôt zeta potenciálu bola potom odvodzovaná stabilita častíc. Častice s hodnotou zeta potenciálu nad ± 30 mV, sú považované za stabilné. [73]

4.8.2.5 Sledovanie dlhodobej stability

Vzorky boli uchovávané pri teplote 4 °C vo vodnom prostredí. Po 3 týždňoch bola premeraná stabilita pomocou stanovenia zeta potenciálu a množstvo uvoľnených enkapsulovaných zložiek.

4.9 Antimikrobiálne testy

Antimikrobiálna aktivita bola sledovaná na 4 kmeňoch mikroorganizmov. Na gram-pozitívnom kmeni *Micrococcus luteus*, gram-negatívnych kmeňoch: *Escherichia coli* a *Serratia marcescens* a na zástupcovi kvasiniek *Candida glabrata*.

4.9.1 Príprava médií

Tekuté médiá pre jednotlivé kmene mikroorganizmov, so zložením uvedenom v tabuľke (Tabuľka 2), boli rozmiešané v destilovanej vode a sterilizované v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom po dobu 30 minút pri teplote 100 °C.

Tabuľka 2: látky použité na prípravu média u jednotlivých mikroorganizmov

Mikroorganizmus	Médium
baktérie	Nutrient Broth – 25 mg/ml
kvasinka	Yeast extract powder – 10 mg/ml
	Pepton aus Casein – 20 mg/ml
	D-glucose anhydrous – 20 mg/ml

4.9.2 Kultivácia mikroorganizmov

Mikroorganizmy uchovávané pri teplote 4 °C na pevných agarových médiách boli pred každým testom preočkovávané do tekutého média o objeme 50 ml. Zaočkované médiá v Erlenmeyerovej banke boli následne premiestnené na temperovanú trepačku a ponechané kultivácií po dobu 24 hodín pri teplote 37 °C.

4.9.3 Bujónová dilučná metóda

Antimikrobiálna účinnosť testovaných extraktov bola meraná pomocou zákalu za použitia prístroja ELISA Reader BioTek ELx808. Pri meraní bola používaná 96 jamková mikrotitračná doštička. Do jamiek bolo napipetovaných 50 μ l extraktu a 150 μ l zriedeného tekutého média s nakultivovanými bunkami mikroorganizmov. Ako blank boli používané jamky naplnené sterilnou vodou namiesto extraktov. Zmena zákalu, ktorá zodpovedá rastu mikroorganizmov, bola zistená po zmeraní mikrotitračnej doštičky na „ELISA ready“ v čase 0 a po uplynutí 24 hodín.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

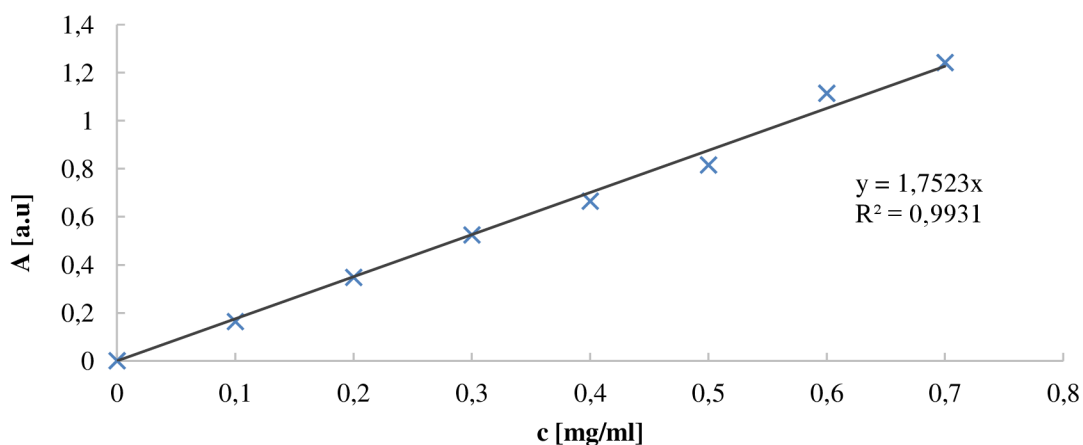
Predložená bakalárska práca bola zameraná na testovanie antimikrobiálneho účinku vodných extraktov vybraných prírodných látok v kombinácii s nisinom. U vybraných látok bol stanovený celkový obsah polyfenolov, flavonoidov, antioxidačná aktivita a ich antimikrobiálne aktivity. Následne sa zisťoval možný synergický účinok po pridaní vodného roztoku nisinu v ich voľnej forme. Ďalej bola uskutočnená enkapsulácia vybraných látok do lipozómov a následne bola optimalizovaná príprava lyozómov s vrstvou chitosanu. Bola pozorovaná antimikrobiálna aktivita enkapsulovaných extraktov a možný synergický účinok po pridaní enkapsulovaného bakteriocínu. Meranie bolo opakované s lyozómami obalenými chitosanom. Na záver boli spomenuté možné aplikácie pre potravinársky a kozmetický priemysel.

5.1 Charakterizácia vybraných prírodných materiálov

Vybrané vodné extrakty prírodných materiálov boli charakterizované z hľadiska obsahu celkových polyfenolov, flavonoidov a ich antioxidačnej aktivity. Vodné extrakty boli pripravené podľa postupu uvedeného v kapitole 0.

5.1.1 Stanovenie celkových polyfenolov

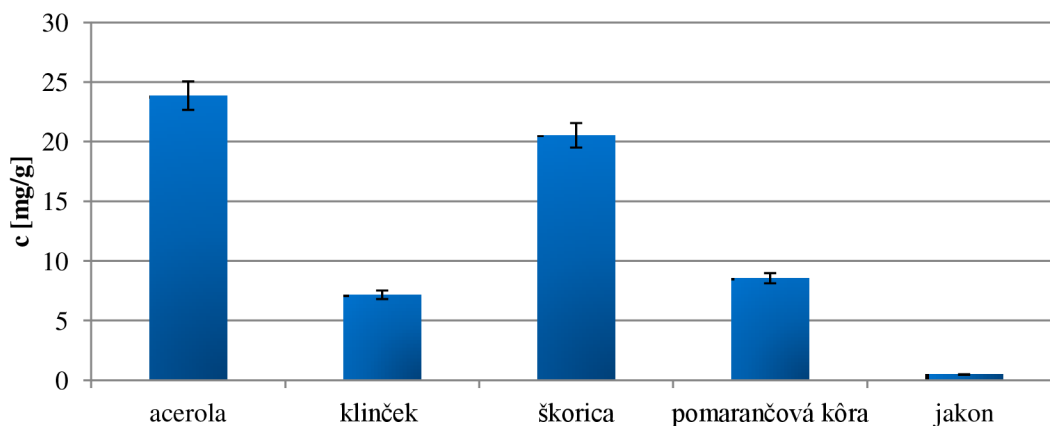
Obsah celkových polyfenolov v testovaných extraktoch, bol stanovený spektrofotometricky, podľa postupu opísaného v kapitole 4.6.1. Pomocou zostavenej kalibračnej krivky kyseliny gallovej (Obrázok 14) bola vypočítaná koncentrácia celkových polyfenolov v extraktoch. Všetky vzorky boli premerané trikrát a z nameraných hodnôt bol vypočítaný priemer a smerodatná odchýlka. Výsledky sú zobrazené v tabuľke (Tabuľka 3).



Obrázok 14: Kalibračná krivka pre stanovenie celkových polyfenolov – kyselina gallová

Tabuľka 3: Vypočítaný obsah polyfenolov v extraktoch

Extrakt	Obsah polyfenolov v roztoku [mg/g]
acerola	23,873 ± 0,874
klinček	7,172 ± 0,413
škorica	20,544 ± 1,569
pomarančová kôra	8,560 ± 0,000
jakon	0,480 ± 0,016

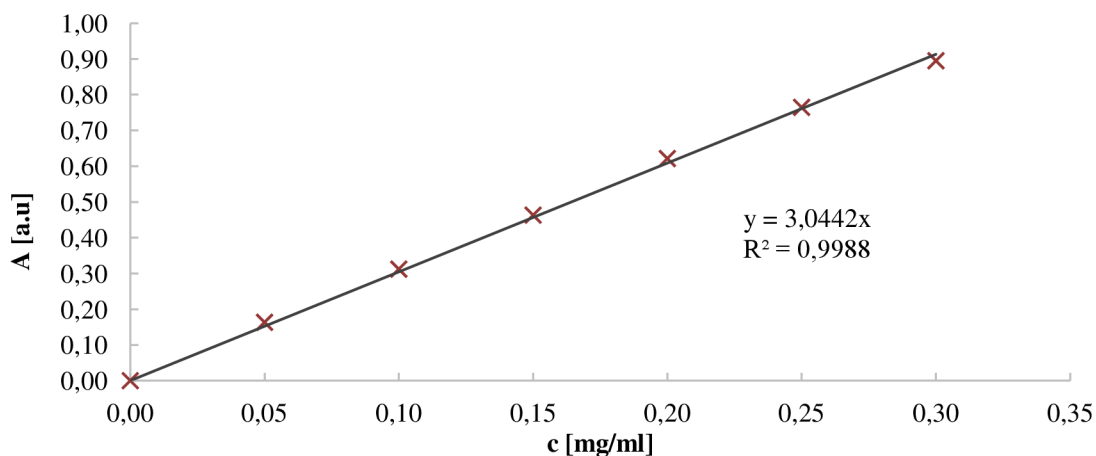


Obrázok 15: Obsah celkových polyfenolov v testovaných extraktoch

Z grafického zobrazenia obsahu celkových polyfenolov (Obrázok 15) je viditeľné, že najviac polyfenolov obsahuje extrakt aceroly, a to $23,873 \pm 0,874$ mg/g a extrakt škorice, $20,544 \pm 1,569$ mg/g. U jakonu je obsah polyfenolov oproti ostatným testovaným extraktom minimálny, $0,480 \pm 0,016$ mg/g.

5.1.2 Stanovenie celkových flavonoidov

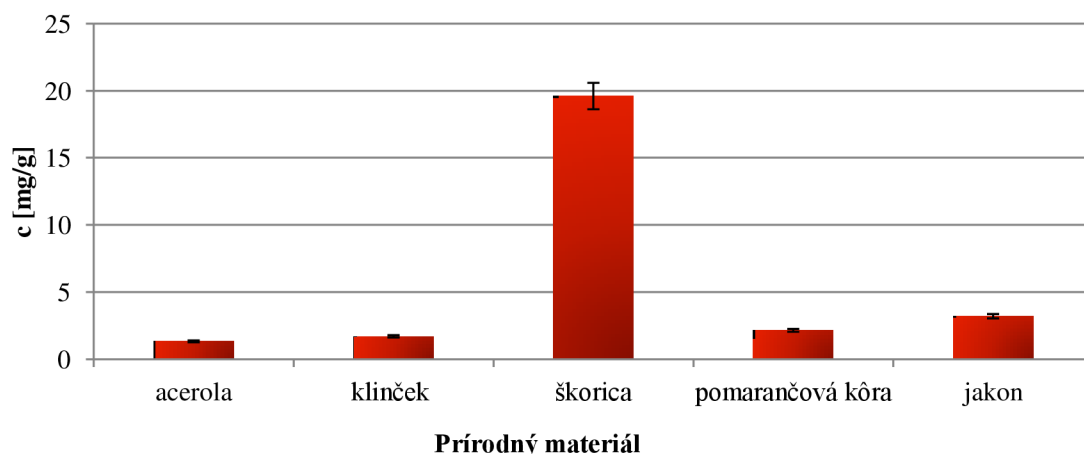
Obsah flavonoidov v jednotlivých vodných extraktoch bol zistený na základe pracovného postupu opísaného v kapitole 4.6.2. Koncentrácia celkových flavonoidov bola stanovená na základe kalibračnej rovnice katechínu (Obrázok 16). Každý extrakt bol analyzovaný v troch opakovaníach a priemerné hodnoty, prepočítané na mg/g suchého podielu, sú zaznamenané v tabuľke (Tabuľka 4).



Obrázok 16: Kalibračná krivka pre stanovenie celkových flavonoidov – katechín

Tabuľka 4: Vypočítaný obsah flavonoidov v extraktoch

Extrakt	Obsah flavonoidov v roztoku [mg/g]
acerola	$1,337 \pm 0,028$
klinček	$1,708 \pm 0,007$
škorica	$19,611 \pm 0,355$
pomarančová kôra	$2,157 \pm 0,050$
jakon	$3,208 \pm 0,082$

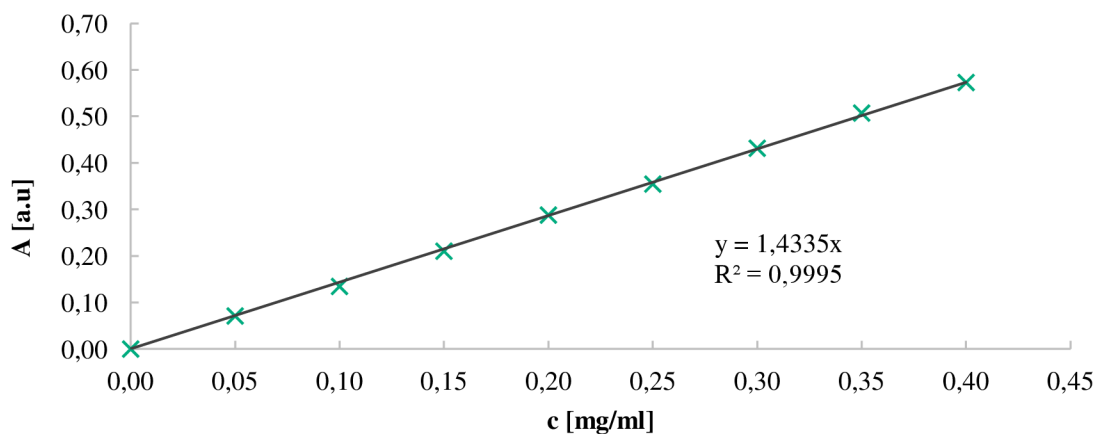


Obrázok 17: Obsah flavonidov v testovaných extraktoch

Z grafu (Obrázok 17) môžeme vidieť, že najvyšší obsah flavonidov obsahoval extrakt škoric, a to $19,611 \pm 0,355$ mg/g. Obsah flavonidov v extraktoch aceroly, klinčeka, pomarančovej kôry a jakonu je zanedbateľný.

5.1.3 Stanovenie antioxidačnej aktivity

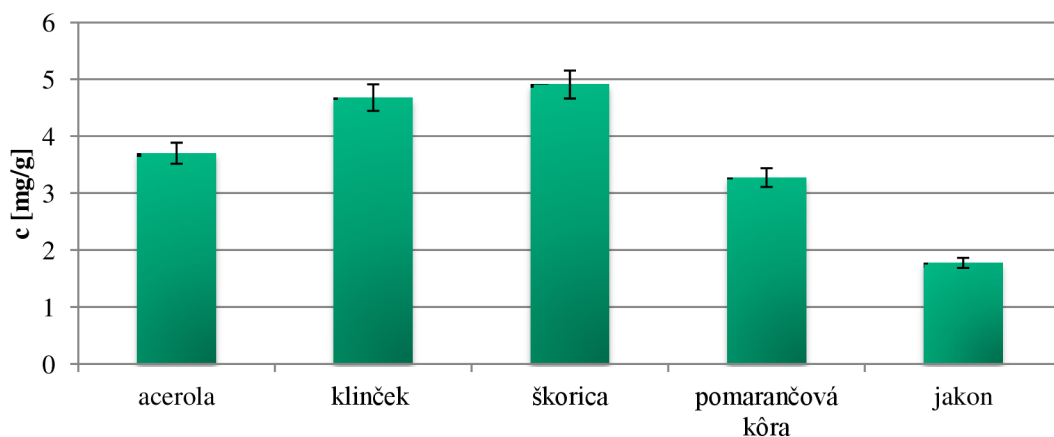
Podľa postupu uvedeného v kapitole 4.6.3 bola zistená antioxidačná aktivita testovaných extraktov. Pre výpočet celkovej antioxidačnej aktivity bola zostavená kalibračná krivka Troloxu (Obrázok 18). Všetky vzorky boli premerané trikrát a z nameraných hodnôt bol vypočítaný priemer a smerodatná odchylka. Výsledky sú zaznamenané v tabuľke (Tabuľka 5).



Obrázok 18: Kalibračná krivka pre stanovenie antioxidačnej aktivity – Trolox

Tabuľka 5: Vypočítaná antioxidačná aktivita extraktov

Vzorka	Antioxidačná aktivita [mg/g]
acerola	$3,7042 \pm 0,0005$
klinček	$4,6809 \pm 0,0005$
škorica	$4,9111 \pm 0,0005$
pomarančová kôra	$3,2764 \pm 0,0005$
jakon	$1,7778 \pm 0,0002$



Obrázok 19: Stanovená antioxidačná aktivita extraktov

Z grafického zobrazenia hodnôt (Obrázok 19) je viditeľné, že najvyššia antioxidačná aktivita bola nameraná u extraktu škoric, $4,9111 \pm 0,000$ mg/g. Vysoké hodnoty antioxidačnej aktivity u extraktov škoric a aceroly boli predpokladané, kvôli ich zistenému vyššiemu obsahu polyfenolov a flavonoidov oproti ostatným extraktom. Jakon sirup mal na druhej strane pri predošlých meraniach nízky obsah polyfenolov a flavonoidov (kapitoly 5.1.1 a 5.1.2), jeho antioxidačná aktivita bola následne pomerne vysoká, presnejšie $1,7778 \pm 0,0002$ mg/g.

5.2 Stanovenie pH testovaných extraktov

Pomocou pH metru bolo stanovené pH vodných extraktov (Tabuľka 6), keďže táto vlastnosť roztokov môže značne ovplyvniť antimikrobiálne účinky jednotlivých extraktov.

Tabuľka 6: Namerané pH vodných extraktov

Vzorka	pH
acerola	4,0
klinček	5,2
škorica	6,2
pomarančová kôra	6,3
jakon	6,1

Ako bolo predpokladané, najkyslejšie pH bolo namerané v extrakte aceroly, kvôli vysokému obsahu vitamínu C, vid'. kapitola 5.3. Z tohto dôvodu, a taktiež vďaka najvyššiemu obsahu polyfenolov je možné uvažovať o vyššom antimikrobiálnom účinku tohto extraktu.

Mierne kyslé pH mal taktiež extrakt klinčeka. U ostatných extraktov bolo zistené neutrálne pH.

5.3 Stanovenie obsahu kyseliny askorbovej v extrakte aceroly

Celkový obsah kyseliny L-askorbovej vo vodnom extrakte aceroly bol stanovený na základe postupu opísaného v kapitole 4.7. Všetky vzorky boli premerané trikrát a z nameraných hodnôt bol vypočítaný priemer a smerodatná odchylka. Výsledky sú zaznamenané v tabuľke (Tabuľka 7).

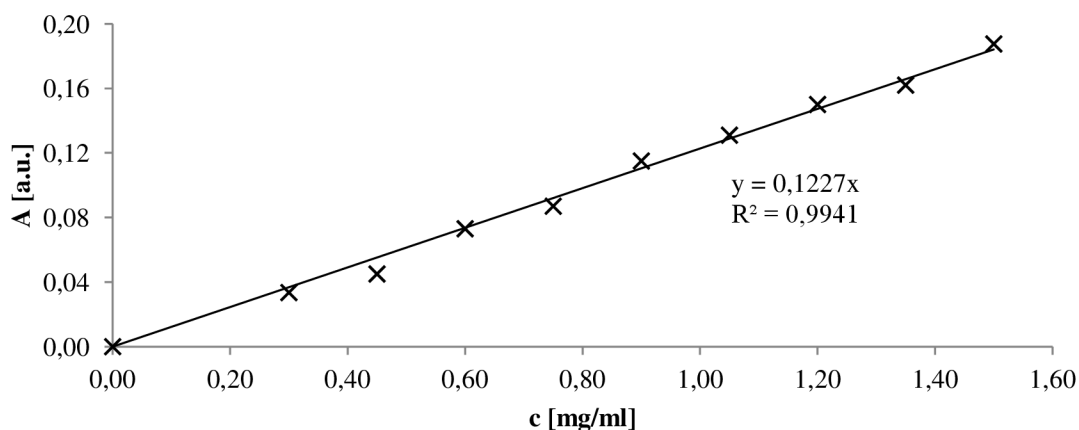
Tabuľka 7: Nameraný obsah kyseliny askorbovej vo vzorke aceroly

	Obsah vitamínu C [mg/g]
Deklarované výrobcom	163,600
Vzorka aceroly	200,000 ± 5,537

Zo zistených hodnôt vyplýva, že nami nameraný obsah vitamínu C vo vzorke je vyšší ako obsah deklarovaný výrobcom. Keďže ako testovaná vzorka bol použitý zakonzentrováný prášok, hodnota vitamínu C sa môže líšiť v závislosti na použitom ovocí, keďže zastúpenie látok v jednotlivých plodoch nie je zakaždým zhodné. Navyše bol potvrdený vysoký obsah vitamínu C v extrakte aceroly, ktorý ovplyvňuje výsledné pH vodného roztoku.

5.4 Stanovenie celkových proteínov Hartree-Lowryho metódou

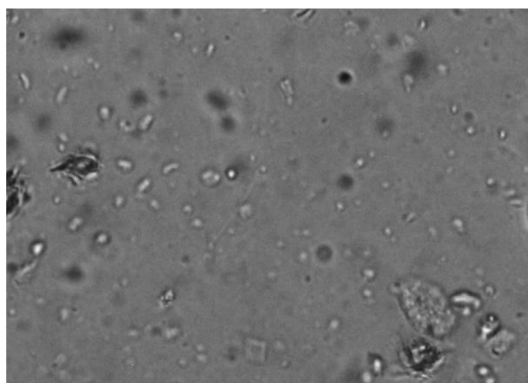
Podľa postupu opísaného v kapitole 4.6.4, bola zostrojená kalibračná krivka pre nisín (Obrázok 20) v koncentračnom rozmedzí 0,1 – 1,5 mg/ml. Kalibračná krivka koncentrácie nisínu bola následne použitá k stanoveniu enkapsulačnej účinnosti lipozómov, do ktorých bol enkapsulovaný nisín o zvolenej koncentrácii.



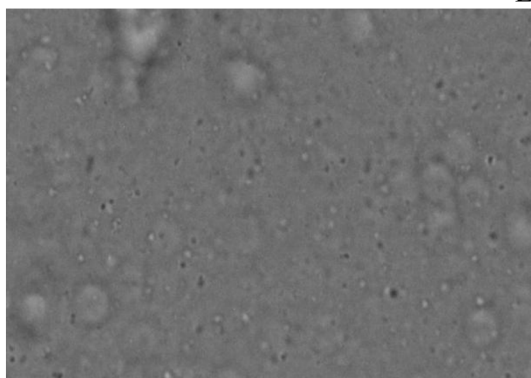
Obrázok 20: Kalibračná krivka nisínu

5.5 Optimalizácia prípravy nového typu častíc a vizualizácia častíc

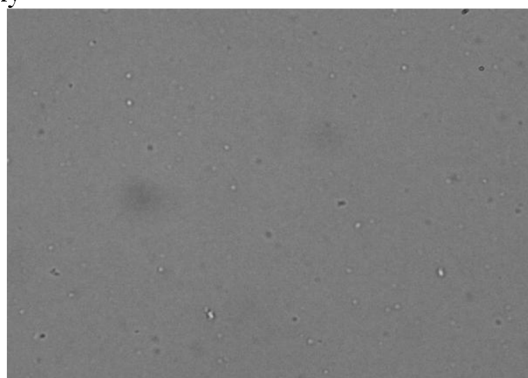
Podľa postupu uvedeného v kapitole 4.8.1 boli pripravené lipozómové častice. Následne k nim bol pridaný 1% a 2% chitosan, za účelom vytvorenia lipozómových častíc obalených chitosanom. Vytvorené častice boli vizualizované pod svetelným mikroskopom. Zo zachytených záberov (Obrázok 21) môžeme vidieť, že v roztoku prázdnych lipozónov sa vyskytuje veľké množstvo veľkých nepravidelných zhlukov, ktoré môžu predstavovať nerozpustený lecitín. Pri porovnaní snímok po pridaní 1% chitosanu, je pozorovateľná väčšia koncentrácia častíc, väčšie množstvo zhlukov a väčších častíc, než u snímky s pridaným 2% chitosanom. Roztoky boli opäť vizualizované po uplynutí 24 hodín. V prípade 1% chitosanu sa znížila koncentrácia častíc a zhlukov, lipozómy boli pomerne rovnomerne distribuované v roztoku. V prípade 2% chitosanu sa počet malých zhlukov navýšil.



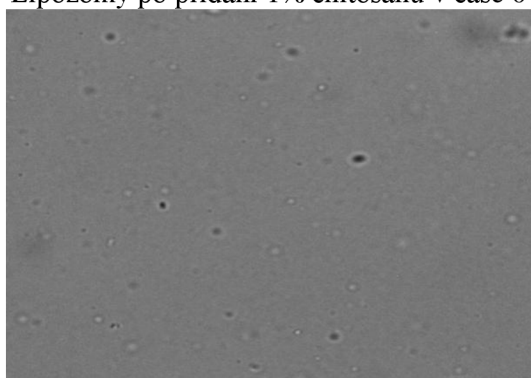
Lipozómy



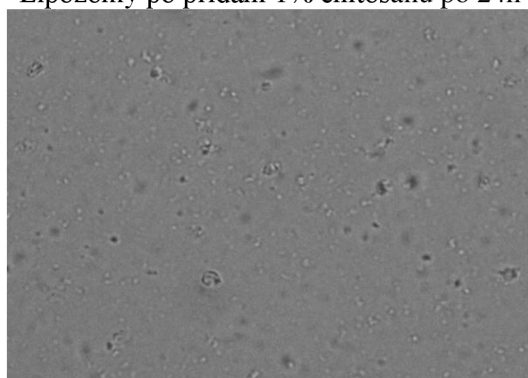
Lipozómy po pridaní 1% chitosanu v čase 0



Lipozómy po pridaní 1% chitosanu po 24h



Lipozómy po pridaní 2% chitosanu v čase 0



Lipozómy po pridaní 2% chitosanu po 24h

Obrázok 21: Lipozómy (zväčšenie 20 000x)

5.5.1 Stanovenie veľkosti lipozómov obalených chitosanom

Veľkosť vzoriek lipozómov bola stanovovaná na základe postupu uvedeného v kapitole 4.8.2.4. Merania prebehli v troch opakovaniach a z hodnôt bol vypočítaný priemer uvedený v tabuľke (Tabuľka 8).

Tabuľka 8: Porovnanie veľkosti častíc

Typ častíc	ΦVeľkosť [nm]	Polydismerzita
lipozómy	119,300	0,199
lipozómy obalené 2% chitosanom	416,733	0,280
lipozómy obalené 1% chitosanom	294,233	0,066

Merania ukázali, že po pridaní chitosanu došlo k zvýšeniu priemernej veľkosti častíc, čo môže byť spôsobené práve vznikom vrstvy chitosanu na porchu lipozómov. Po pridaní 1%

chitosanu došlo k dvojnásobnému zväčšeniu a po pridaní 2% chitosanu až k štvornásobnému zväčšeniu veľkosti častíc.

5.5.2 Stanovenie stability lipozómov obalených chitosanom

Stabilita častíc bola zistená pomocou prístroja Zetasizer, podľa postupu opísaného v kapitole 4.8.2.4. Všetky vzorky boli odmerané trikrát a z hodnôt bol vypočítaný priemer (Tabuľka 9).

Tabuľka 9: Porovnanie zeta potenciálu lipozómov a lipozómov obalených chitosanom

Typ častíc	Φ Zeta potenciál [mV]
lipozómy	-51,367
lipozómy obalené 2% chitosanom	35,367
lipozómy obalené 1% chitosanom	-28,567

Keďže chitosan má kladný náboj, predpokladalo sa navýšenie zeta potenciálu, k čomu aj došlo v oboch prípadoch. Po porovnaní zeta potenciálov bolo zistené, že stabilnejšie častice vznikli po pridaní 2% chitosanu. U lipozómov s 1% chitosanom došlo k miernemu navýšeniu zeta potenciálu. Môže to byť spôsobené vytvorením zvlášť lipozómových a chitosanových častíc alebo nedostatočným obalením lipozómov. Z toho dôvodu bolo ďalej pracované len s 2% chitosanom.

5.6 Charakterizácia lipozómov

Pripravené liposómy podľa postupu uvedeného v kapitole 4.8.1 boli charakterizované z hľadiska ich enkapsulačnej účinnosti, veľkosti a ich krátkodobej a dlhodobej stability.

5.6.1 Stanovenie enkapsulačnej účinnosti polyfenolov

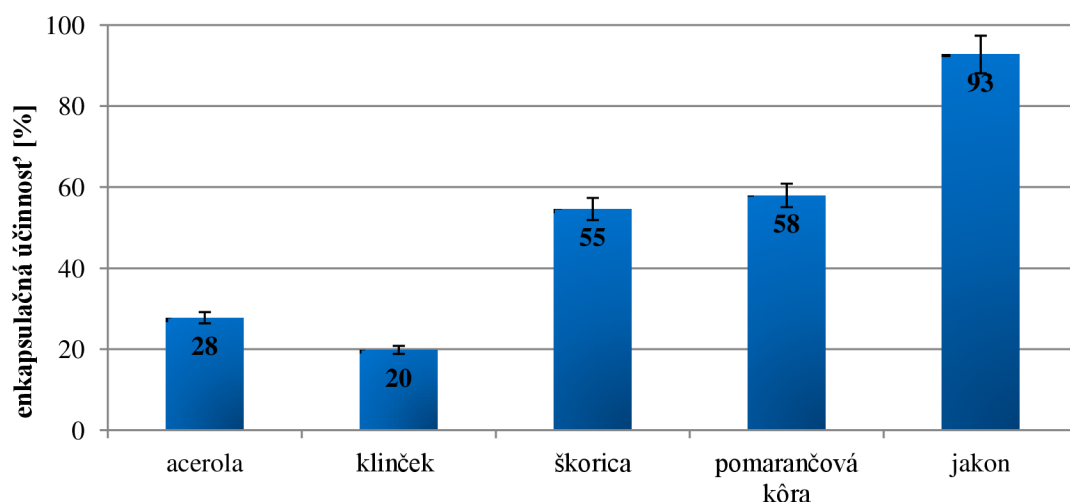
Enkapsulačná účinnosť bola stanovená na základe postupu opísaného v kapitole 4.8.2.1. Namerané hodnoty enkapsulovaného množstva polyfenolov boli premerané trikrát a z nameraných hodnôt bol vypočítaný priemer a smerodatná odchýlka. Výsledky sú zaznamenané v tabuľke (Tabuľka 10) a graficky (Obrázok 22).

Tabuľka 10: Vypočítané enkapsulované množstvo polyfenolov a enkapsulačná účinnosť

Extrakt	Obsah polyfenolov v roztoku [mg/g]		Enkapsulačná účinnosť [%]
	pred enkapsuláciou	po enkapsulácii	
Acerola	30,303 ± 0,323	21,886 ± 0,093	28
Klinček	20,145 ± 0,242	16,150 ± 0,000	20
Škorica	16,407 ± 0,363	7,447 ± 0,282	55
Pomarančová kôra	2,511 ± 0,807	1,056 ± 0,202	58
Jakon	29,854 ± 0,109	2,170 ± 0,090	93

Enkapsulačná účinnosť u extraktov škorice a pomarančovej kôry sa pohybovala nad 50%. Z uvedených hodnôt je viditeľné, že najlepšiu enkapsulačnú účinnosť sme dosiahli pri extrakte jakon sirupu, a to 92,731%, pravdepodobne vďaka tomu, že tento extrakt vykazoval najmenší nameraný obsah polyfenolov (kapitola 5.1.1). Na druhej strane najnižšia enkapsulačná účinnosť bola dosiahnutá pri extrakte klinčeka 19,830%.

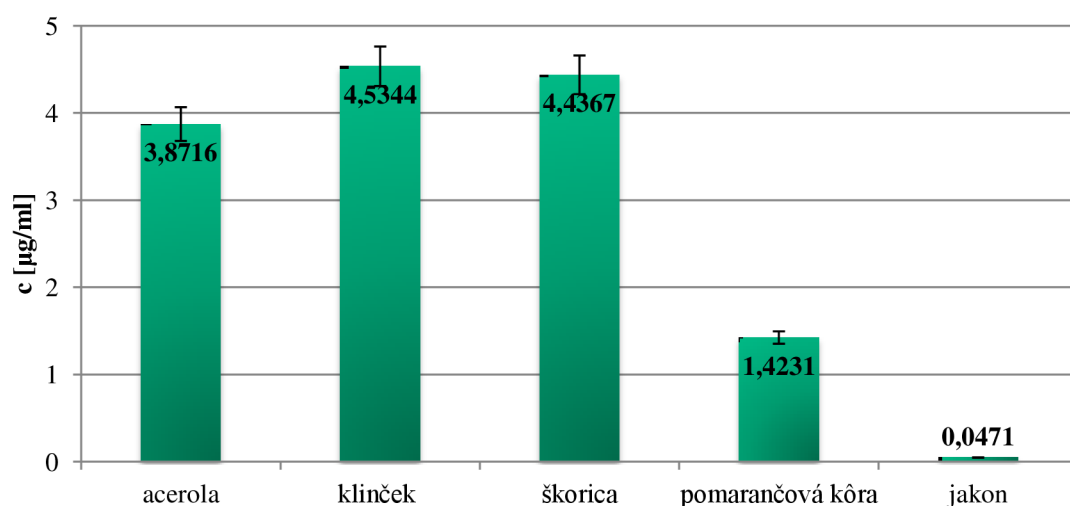
Enkapsulačná účinnosť do lipozómov bola ďalej sledovaná u enkapsulácie roztoku nísínu o koncentrácii 1 mg/ml, účinnosť enkapsulácie bola sledovaná na 28,3%.



Obrázok 22: Enkapsulačná účinnosť extraktov

5.6.2 Stanovenie antioxidačnej aktivity lipozómov

Testované extrakty boli enkapsulované na základe postupu opísaného v kapitole 4.8.1. Lipozómy boli potom centrifugované pri 6 000 ot./min po dobu 5 minút, supernatan bol odliaty a opäť centrifugovaný pri 11 000 ot./min po dobu jednej hodiny. Potom bol supernatant vyliaty a usadenina bola rozsuspendovaná v rovnakom objeme destilovanej vody. Takto upravené vzorky boli podrobené testu antioxidačnej aktivity, podľa postupu opísaného v kapitole 4.6.3. Všetky vzorky boli premerané trikrát a z nameraných hodnôt bol vypočítaný priemer a smerodatná odchýlka.



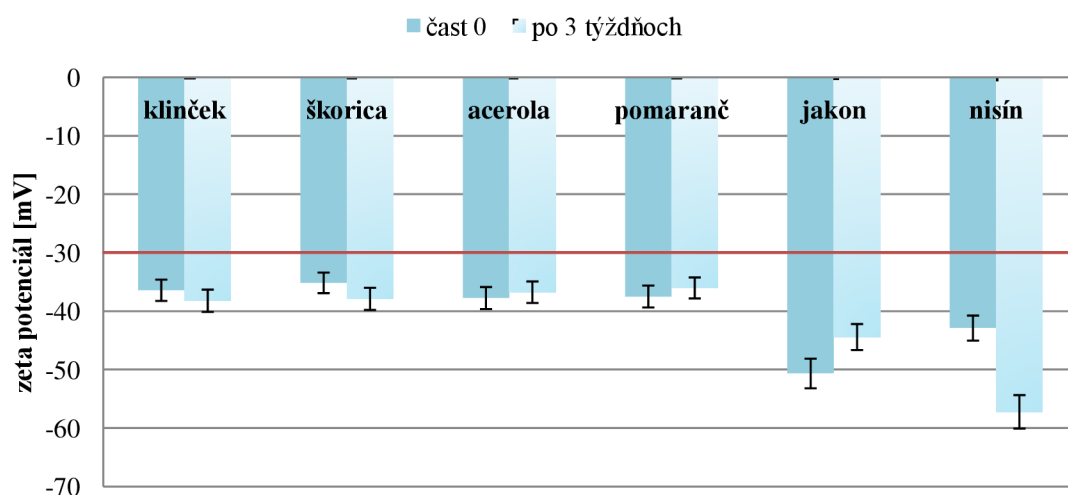
Obrázok 23: Antioxidačná aktivita enkapsulovaných extraktov

Bolo zistené, že i malé množstvo extraktu enkapsulovaného v lipozómoch vykazuje antioxidačnú aktivitu (Obrázok 23). Z grafického zobrazenia je viditeľné, že najvyššiu antioxidačnú aktivitu mali enkapsulované extrakty klinčeka (453,436 µg/ml) a škorice (443,669 µg/ml), naopak najnižšia antioxidačná aktivita bola pozorovaná u enkapsulovaného

extraktu jakonu, a to 10,464 $\mu\text{g/ml}$. Tieto zistenia sa zhodujú s výškami nameraných hodnôt antioxidačných aktivít stanovených u neenkapsulovaných vodných extraktoch pozorovaných látok (viď. kapitola 5.1.3).

5.6.3 Stanovenie dlhodobej stability lipozómov

Jednotlivé roztoky extraktov a nisínu boli enkapsulované podľa postupu spomínaného v kapitole 4.8.1. Stabilita pripravených častíc, nameraná na základe postupu uvedeného v kapitole 4.8.2.5, bola stanovená v čase 0 a po 3 týždňoch. Všetky vzorky boli premerané trikrát a z nameraných hodnôt bol vypočítaný priemer. Hodnoty boli následne navzájom porovnávané.



Obrázok 24: Stanovená stabilita enkapsulovaných extraktov a nisínu

Vzniknuté lipozómy s enkapsulovanými roztokmi sa vo všetkých prípadoch ukázali ako veľmi stabilné (Obrázok 24). Najvyššiu stabilitu vykazovali častice s enkapsulovaným jakonom, kde hodnota zeta potenciálu dosiahla $-50,633$ mV. Pokles stability vo vodnom prostredí nebol zaznamenaný ani pri opätovnom meraní po uplynutí troch týždňov. Obdobný výsledok bol dosiahnutý i pri meraní uvoľnených polyfenolov a nisínu, kde po troch týždňoch nebolo zaznamenané žiadne uvoľnené množstvo enkapsulovaných zložiek.

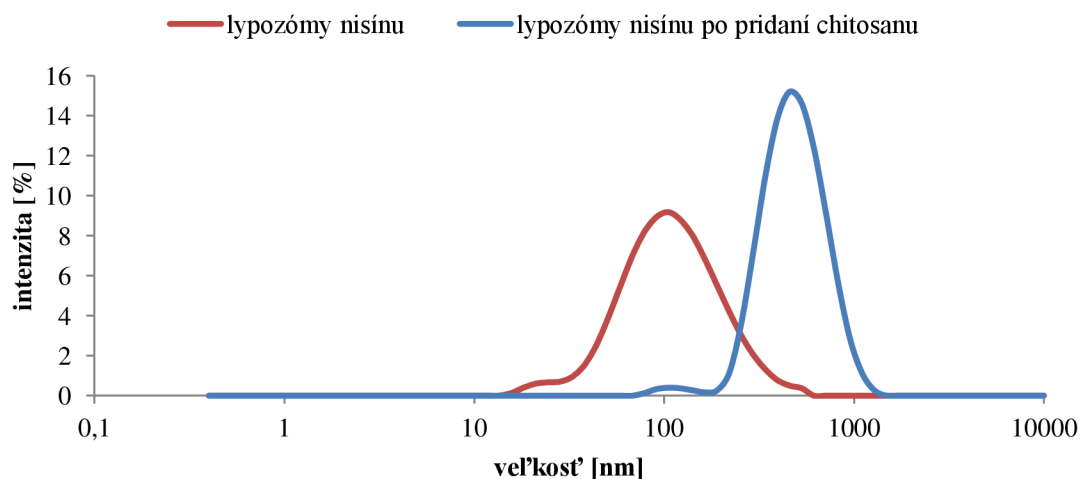
5.7 Stanovenie veľkosti častíc s enkapsulovanými extraktmi a nisínom

Častice boli pripravené na základe postupov uvedených v kapitolách 4.8.1. a 4.8.2.3. Ich veľkosť a stabilita bola nameraná podľa postupu opísaného v kapitole 4.8.2.4

Tabuľka 11: Priemerná veľkosť a polydisperzita lipozómov s enkapsulovanými extraktmi a nisínom

Vzorka	lipozomy		lipozomy po pridaní chitosanu	
	Φ Veľkosť [nm]	Polydisperzita	Φ Veľkosť [nm]	Polydisperzita
klinček	103,700	0,240	575,650	0,545
škoricca	104,600	0,197	570,033	0,504
acerola	130,800	0,284	492,367	0,243
pomarančová kôra	133,400	0,213	435,000	0,325
jakon	153,400	0,342	790,167	0,307
nisín	106,667	0,361	432,133	0,217

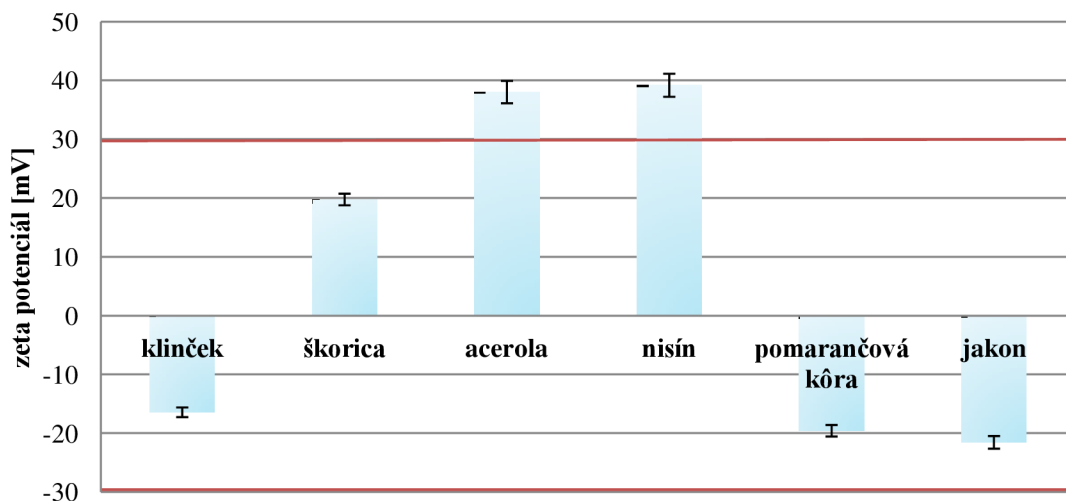
V tabuľke sú zhrnuté všetky namerané veľkosti samotných lipozómov a lipozómov obalených chitosanom s enkapsulovanými extraktmi a nisínom (Tabuľka 11). Z nameraných výsledkov môžeme konštatovať, že došlo k vytvoreniu lipozómov u všetkých extraktov a nisínu. Vo väčšine prípadov bolo namerané zväčšenie priemernej veľkosti častíc po pridaní chitosanu. Preto predpokladáme, že došlo k naviazaniu chitosanu na povrch lipozómov.



Obrázok 25: Stanovená veľkosť častíc u roztoku nisínu pred a po pridaní chitosanu

5.8 Stanovenie stability enkapsulovaných extraktov a nisínu po pridaní chitosanu

Chitosan bol k extraktom pridávaný podľa postupu opísaného v kapitole 4.8.2.3 Stabilita pripravených častíc bola stanovená pomocou postupu uvedeného v kapitole 4.8.2.4.



Obrázok 26: Výsledky stability enkapsulovaných extraktov s pridaným chitosanom

Po pridaní chitosanu sa ako veľmi stabilné so zeta potenciálom nad 30 mV, ukázali roztoky aceroly (38,033 mV) a nisínu (39,200 mV) a ako stabilný, so zeta potenciálom 20 mV, sa ukázal roztok škoric. Ich zeta potenciál má kladnú hodnotu a nachádza sa v stabilnej oblasti, preto predpokladáme, že došlo k obaleniu lipozómov chitosanom (Obrázok 26). Extrakty klinčeka, škoric, pomarančovej kôry a jakonu sa ukázali ako nevhodné pre vytvorenie chitosanom obalených lipozómov, pravdepodobne kvôli nožnej interakcii ich fytolátok s chitosanom a lipozómami, kvôli neúplnému obaleniu lipozómov alebo vzniku chitosanových častíc.

5.9 Antimikrobiálne testy

Antimikrobiálna aktivita extraktov bola meraná na základe zmeny zákalu. Bolo postupované podľa postupu, ktorý je opísaný v kapitole 4.9.3. Účinok bol testovaný na štyroch vybraných zástupcoch mikroorganizmov: *M. luteus*, *E. coli*, *S. marcescens* a *C. glabrata*. Bola testovaná antimikrobiálna aktivita jednotlivých extraktov a bakteriocínu, možný nárast účinku pri ich kombinovaní, a následne bola meraná antimikrobiálna aktivita po enkapsulácii. Vzorky boli merané trikrát a z nameraných hodnôt bol vypočítaný priemer.

Antimikrobiálny účinok je zobrazený v percentách. Nula percent predstavuje nulovú aktivitu, následne všetky kladné hodnoty predstavujú percentuálnu veľkosť antimikrobiálneho účinku danej látky.

5.9.1 Antimikrobiálne účinky nisínu

Pomocou bujónovej dilučnej metódy bola hľadaná minimálna inhibičná koncentrácia nisínu u všetkých štyroch kmeňov mikroorganizmov. Bola zostavená koncentračná rada nisínu v rozmedzí hodnôt 0,05 – 1 mg/ml. Výsledky sú zobrazené v Tabuľka 12: Antimikrobiálna aktivita nisínu. Z tabuľky je viditeľné, že minimálna inhibičná koncentrácia nisínu u *Micrococcus luteus* je 1 mg/ml, u kmeňov *Serratia marcescens*, *Candida glabrata* a *Escherichie coli* by bolo potrebné pre 100% inhibičný účinok použiť výrazne vyššie koncentrácie nisínu.

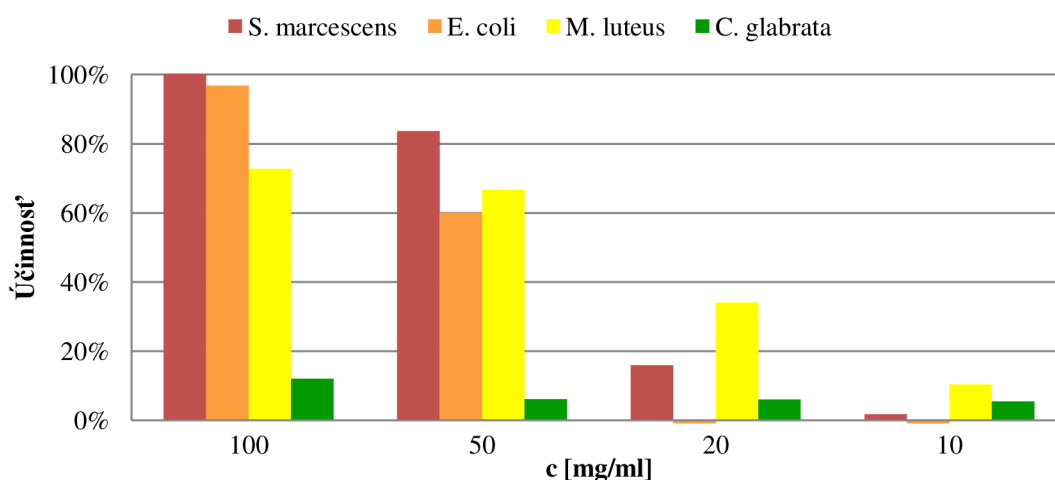
Tabuľka 12: Antimikrobiálna aktivita nisínu

	c [mg/ml]	Antimikrobiálny účinok		c [mg/ml]	Antimikrobiálny účinok
<i>M. luteus</i>	1	+++	<i>E. coli</i>	1	+
	0,5	++		0,5	-
	0,2	+		0,2	-
	0,1	-		0,1	-
<i>S. marcescens</i>	1	+	<i>C. glabrata</i>	1	+
	0,5	+		0,5	+
	0,2	+		0,2	+
	0,1	+		0,1	+
	0,05	-		0,05	-

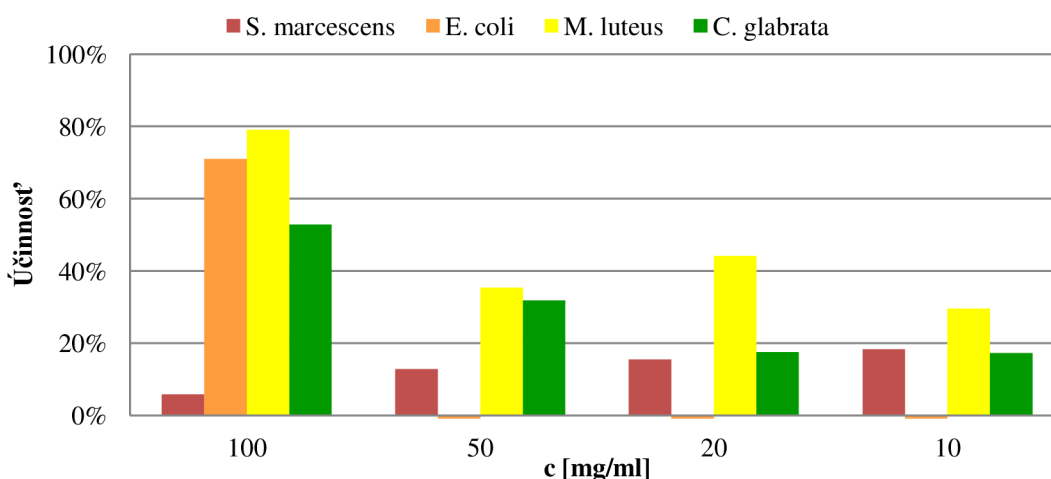
Antimikrobiálne aktivita: (-) -∞-0%; (+) 0-50%; (++) 50-80%; (+++) 80-100%

5.9.2 Antimikrobiálne účinky extraktov

Na grafe (Obrázok 27) je viditeľný antimikrobiálny účinok extraktu aceroly na všetky štyri kmene mikroorganizmov. Je pozorovaná klesajúca antimikrobiálna aktivita so znižujúcou sa koncentráciou extraktu. Najvyšší účinok bol pozorovaný na gram-negatívne baktérie.



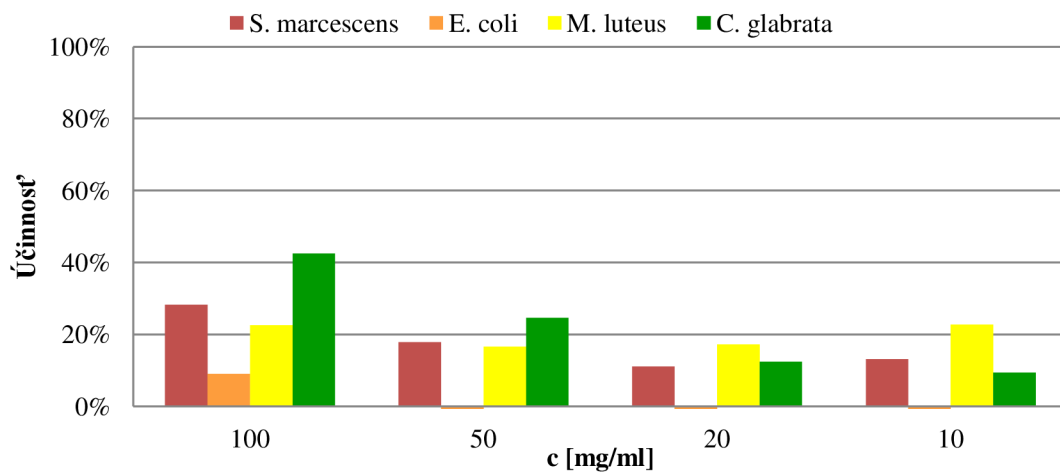
Obrázok 27: Antimikrobiálne účinky aceroly



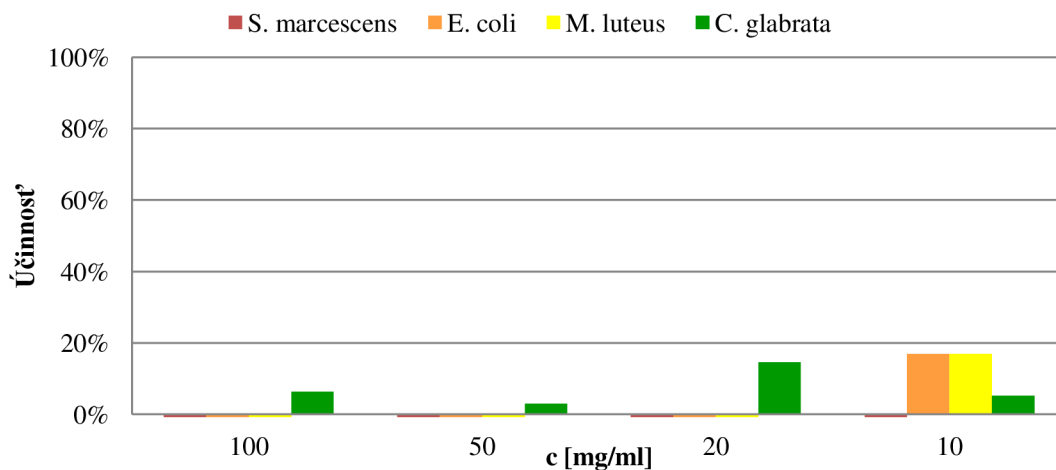
Obrázok 28: Antimikrobiálne účinky klinčeka

Bol odmeraný i koncentračný rad extraktu klinčeka (Obrázok 28). Najvyšší účinok bol pozorovaný u kmeňov *E. coli*, *M. luteus*. Extrakt vykazoval dobrú antimikrobiálnu aktivitu aj voči *C. glabrata*.

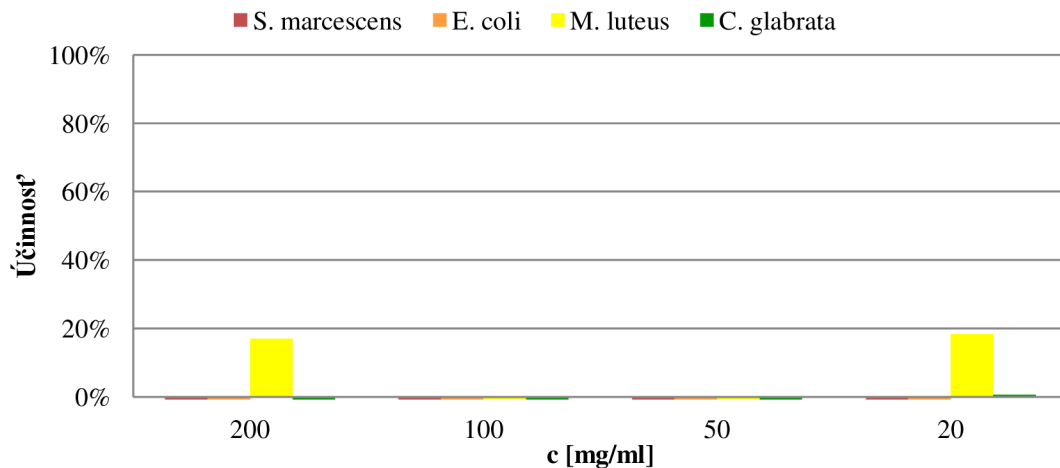
Rovnako bol pozorovaný aj inhibičný účinok škorice, viditeľný na grafe (Obrázok 29). Najvyšší účinok bol pozorovaný na kvasinkový kmeň *C. glabrata*. Nameraná najvyššia účinnosť škoriceového extraktu pri koncentrácii 100 mg/ml sa však pohybuje len okolo 40% i napriek zistenému vysokému obsahu polyfenolov a flavonoidov (kapitoly 5.1.1 a 5.1.2.)



Obrázok 29: Antimikrobiálne účinky škorice



Obrázok 30: Antimikrobiálny účinok škorice



Obrázok 31: Antimikrobiálne účinky jakon sirupu

U extraktov pomarančovej kôry a jakon sirupu je pozorovaná len minimálna antimikrobiálna aktivita (Obrázok 30 a Obrázok 31) aj napriek ich preukázanej antioxidačnej aktivite a obsahu polyfenolov a flavonoidov.

5.9.3 Antimikrobiálny účinok kombinácie voľnej formy extraktov a nisínu

V tabuľkách (Tabuľka 13 a Tabuľka 14) sú zhrnuté výsledky testov antimikrobiálnej účinnosti kombinácií jednotlivých extraktov s nisínom. U nisínu boli u každého kmeňa mikroorganizmov zvolené dve koncentrácie. Minimálna inhibičná koncentrácia 1 mg/ml a koncentrácia bez antimikrobiálnej aktivity 0,1 mg/ml. Na druhej strane boli u extraktov vybrané dve koncentrácie s najnižšou antimikrobiálnou aktivitou. Následne boli roztoky nisínu a extraktov medzi sebou kombinované v pomeroch: 1:1; 1:2 a 2:1. Cieľom testovania bolo zistiť, či dochádza k navýšeniu antimikrobiálnej aktivity dôsledkom synergizmu u koncentrácií nisínu a extraktov s minimálnou alebo žiadnou antimikrobiálnou aktivitou. Bol sledovaný nárast alebo pokles účinku po zmiešaní extraktu s bakterocínom. V tabuľke sú farebne zvýraznené kombinácie, u ktorých bol nameraný najväčší synergický účinok pre daný mikroorganizmus.

Tabuľka 13: Výsledky kombinácií nisínu a extraktov

	c [mg/ml]		pomer	acerola	klinček	škorica	p.kôra	jakon
	nisín	extrakt						
<i>E. coli</i>	1	50	1:1	+++	-	-	ND	ND
			1:2	+++	+	-	ND	ND
			2:1	+++	-	-	ND	ND
	1	100 (200 u jakonu)	1:1	+++	+	+	+	-
			1:2	+++	++	++	-	-
			2:1	+	-	-	-	-
	0,1	50	1:1	+	-	-	ND	ND
			1:2	+++	-	+	ND	ND
			2:1	+	-	-	ND	ND
	0,1	100 (200 u jakonu)	1:1	+++	-	+	-	-
			1:2	+++	++	++	-	-
			2:1	+	-	-	-	-
	c [mg/ml]		pomer	acerola	klinček	škorica	p.kôra	jakon
nisín	extrakt							
<i>S. marcescens</i>	1	10	1:1	-	-	-	ND	ND
			1:2	+	+	-	ND	ND
			2:1	-	+	-	ND	ND
	1	20 (100 u p. kôry) (200 u jakonu)	1:1	+	-	-	-	-
			1:2	+	-	-	-	+
			2:1	-	+	-	-	-
	0,1	10	1:1	-	+	-	ND	ND
			1:2	-	-	-	ND	ND
			2:1	-	+	-	ND	ND
	0,1	20 (100 u p kôry) (200 u jakonu)	1:1	-	-	-	-	+
			1:2	+	-	+	-	+
			2:1	-	+	-	-	-
	c [mg/ml]		pomer	acerola	klinček	škorica	p.kôra	jakon
nisín	extrakt							
<i>M. luteus</i>	1	10 (100 u jakonu a p. kôry)	1:1	+	+	+	ND	+
			1:2	+	+	+	ND	-
			2:1	+	+	+	ND	+
	1	20 (100 u p kôry) (200 u jakonu)	1:1	++	+	+	+	+
			1:2	++	+	+	+	+
			2:1	+	+	+	++	+
	0,1	10 (100 u jakonu a p. kôry)	1:1	+	+	+	ND	+
			1:2	+	+	+	ND	+
			2:1	+	+	+	ND	-
	0,1	20 (100 u p kôry) (200 u jakonu)	1:1	++	+	-	+	+
			1:2	+	+	+	+	+
			2:1	+	+	-	+	-

Antimikrobiálna aktivita: (-) 0 %; (+) 0-50 %; (++) 50-80 %; (+++) 80-100 %; (ND) netestované

Tabuľka 14: Výsledky kombinácii extraktov a nisínu

	c [mg/ml]		pomer	acerola	klinček	škorica	p.kôra	jakon
	nisín	extrakt						
<i>C. glabrata</i>	1	10	1:1	+	+	+	ND	ND
			1:2	+	+	+	ND	ND
			2:1	+	+	+	ND	ND
	1	20 (100 u p. kôry) (200 u jakonu)	1:1	+	+	+	+	-
			1:2	+	+	+	+	-
			2:1	+	+	+	+	-
	0,1	10	1:1	+	+	+	ND	ND
			1:2	+	+	+	ND	ND
			2:1	+	+	+	ND	ND
	0,1	20 (100 u p. kôry) (200 u jakonu)	1:1	+	+	+	+	-
			1:2	+	+	+	+	-
			2:1	+	+	+	+	-

Antimikrobiálna aktivita: (-) 0 %; (+) 0-50 %; (++) 50-80 %; (+++) 80-100 %; (ND) netestované

Vo väčšine prípadov kombinácií aceroly a nisínu bol pozorovaný nárast antimikrobiálnej aktivity. U *E. coli* došlo k takmer 100% nárastu účinnosti skoro u všetkých kombinácií. Najväčší synergický účinok bol nameraný u pomerov 1:1 a 1:2 koncentrácií 1 mg/ml nisínu a 50 mg/ml extraktu, a to v oboch prípadoch 97,37%. Nárast účinnosti bol zaznamenaný i u *M. luteus* a *C. glabrata*, hoci menej výrazný. Maximálny účinok na *M. luteus* bol pri pomere 1:1 (c = 1 a 20 mg/ml), a to 55,00%, na zástupcu kvasiniek najlepšie zaúčinkovala prvá kombinácia vo výške 32,25%. Naopak u *S. marcescens* došlo vo väčšine prípadov skôr k poklesu aktivity.

U kombinácií s klinčkovým extraktom je vidieť, že u *M. luteus* a *C. glabrata* došlo iba k nárastu účinnosti. Najvyšší synergický účinok bol však nameraný opäť u *E. coli* a to pri pomere 1:2, 55,56%. U *M. luteus* mala najvyššia antimikrobiálna aktivita hodnotu 29,65%. U *S. marcescens* a *C. glabrata* antimikrobiálna účinnosť neprekročila 10%.

Pri meraní kombinácií nisínu a extraktu škorice sa značný synergický účinok prejavil opäť u *E. coli*, kde došlo vhodnou kombináciou k navýšeniu účinku na 75,34%. K synergickému účinku došlo i u *C. glabrata*, kde bola nameraná účinnosť 36,63% pri zmiešaní (1:1). Antimikrobiálny účinok kombinácií na *M. luteus* bol prevažne kladný, avšak najvyššia nameraná hodnota bola len 16,05%. U *S. marcescens* nebolo namerané žiadne významné navýšenie antimikrobiálnej aktivity.

Pri použití pomarančovej kôry u *E. coli* došlo k navýšeniu aktivity len v jednom prípade, a to vo výške 22,22%. U *S. marcescens* sme pozorovali vo všetkých prípadoch len zníženie účinnosti. Značný synergický účinok bol nameraný u *M. luteus*. Antimikrobiálny účinok skoro vo všetkých prípadoch presiahol 30 % a najvyššiu hodnotu dosiahol pri pomere 2:1 (c = 1 mg/ml a 100 mg/ml), a to 56,5%. Nárast účinku bol pozorovaný vo všetkých prípadoch i u *C. glabrata*. Najvyššia aktivita bola nameraná pri pomere 1:1 (c = 0,1 mg/ml a 100 mg/ml), 18,69%.

U extraktu jakonu v kombinácii s nisínom sme na kmene *E. coli* a *C. glabrata* pozorovali vo všetkých prípadoch len zníženie účinnosti. Na druhej strane je pozorovaný synergický účinok na *S. marcescens* a *M. luteus*, avšak len do 20%.

5.9.4 Antimikrobiálny účinok lipozómov

Jednotlivé vodné extrakty látok a nisínu boli enkapsulované na základe postupu opísaného v kapitole 4.8.1. Následne bola zisťovaná antimikrobiálna aktivita enkapsulovaných látok. Pri každom meraní bola použitá najvyššia koncentrácia extraktov 100 mg/ml (u jakonu 200 mg/ml).

Namerané výsledky sú zaznamenané v Tabuľka 15. Z tabuľky je viditeľné, že u zástupcov gram-negatívnych baktérií, *S. marcescens* a *E. coli*, mal najvyšší antimikrobiálny účinok extrakt aceroly. U *E. coli* i enkapsulovaný extrakt jakon sirupu. Extrakt aceroly mal najväčší účinok i na kmeň *M. luteus*. U *C. glabrata* sa ako najúčinnější ukázal enkapsulovaný extrakt škoricice, ale tiež i aceroly a klinčeka, hoci ich účinok bol mierne nižší. U enkapsulovaného nisínu nebola zaznamenaná antimikrobiálna aktivita ani na jeden zo štyroch kmeňov.

Tabuľka 15: Antimikrobiálna aktivita enkapsulovaných extraktov

enkapsulovaná látka	<i>E.coli</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C.glabrata</i>
acerola	+++	+	+++	++
škoricica	–	–	–	+++
klinček	–	–	+	++
p. kôra	+	–	+	+
jakon	+	–	–	–
nisín	–	–	–	–

Antimikrobiálna aktivita: (–) –∞-0%; (+) 0-50%; (++) 50-80%; (+++) 80-100%

5.9.4.1 Synergický účinok enkapsulovaných látok

Jednotlivé látky boli enkapsulované na základe postupu opísaného v kapitole 4.8.1. Následne bol zisťovaný možný synergický účinok po pridaní enkapsulovaného nisínu. Pri každom meraní bola použitá koncentrácia nisínu 1 mg/ml a najvyššia koncentrácia extraktov 100 mg/ml (u jakonu 200 mg/ml). Bakteriocín a extrakty boli kombinované v pomere 1:1.

Najvyššie hodnoty synergického účinku pre daný kmeň mikroorganizmov sú v tabuľke označené modrou farbou (Tabuľka 16). Ako najúčinnější sa ukázala kombinácia enkapsulovaného nisínu s acerolou. U *E. coli* pozorujeme najvyšší synergický účinok nisínu práve u aceroly a jakon sirupu. Acerola sa ukázala ako účinná i u *S. marcescens* a *M. luteus*. Najlepší synergický účinok na zástupcu kvasiniek bol potom zaznamenaný pri kombinácii nisínu s extraktom škoricice, aceroly a klinčeka.

Tabuľka 16: Synergický účinok enkapsulovaných extraktov s nisínom

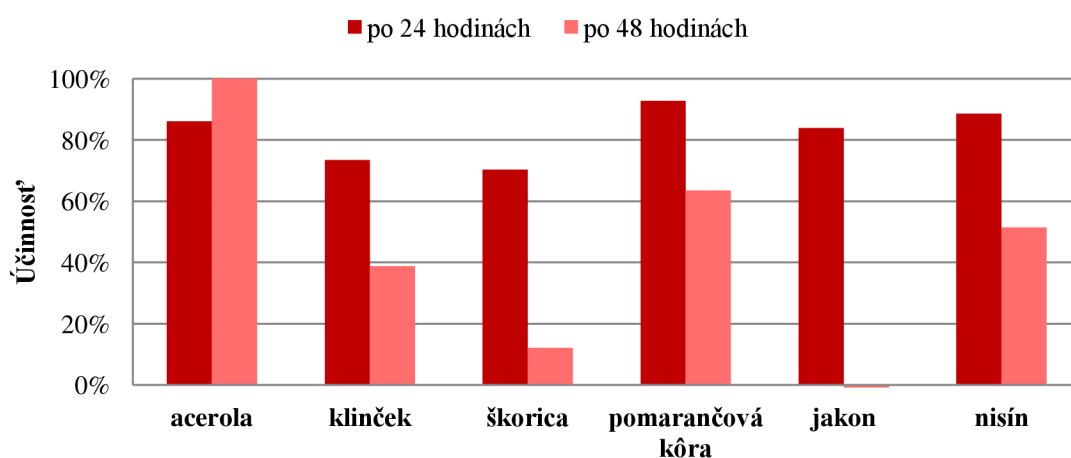
enkapsulovaná látka	<i>E.coli</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C.glabrata</i>
acerola + nisín	+++	+	+++	++
škoricica + nisín	–	–	–	+++
klinček + nisín	–	–	+	++
p. kôra + nisín	+	–	+	+
jakon + nisín	++	–	–	–

Antimikrobiálna aktivita: (–) –∞-0%; (+) 0-50%; (++) 50-80%; (+++) 80-100%

5.9.5 Antimikrobiálna aktivita chitosanom obalených častíc

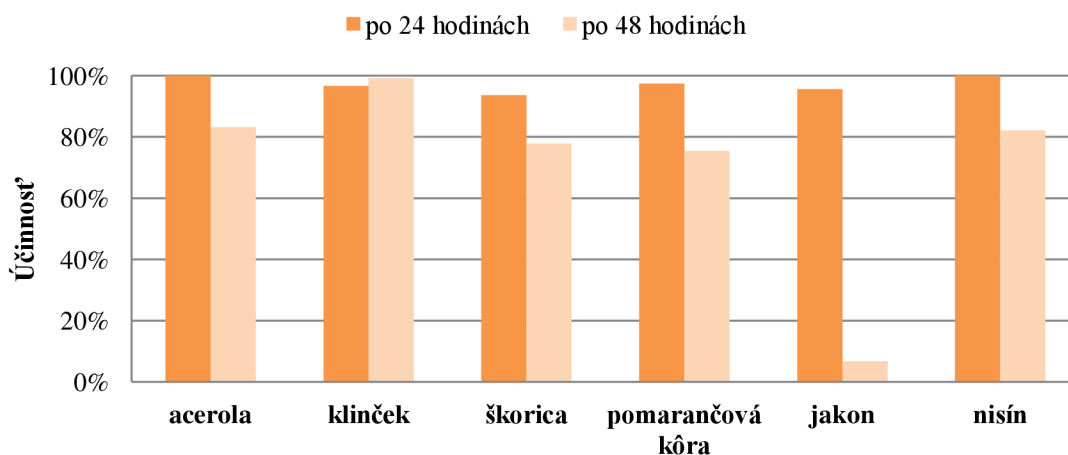
Lipozómové častice boli obalené vrstvou 2 % chitosanu na základe postupu opísaného v kapitole 4.8.2.3. Antimikrobiálna aktivita bola meraná po uplynutí 24 hodín a následne po uplynutí 48 hodín. Takto bolo postupované, pretože sa predpokladal dlhodobjší antimikrobiálny účinok týchto častíc. Enkapsulované boli extrakty o koncentrácii 100 mg/ml a nisín s koncentráciou 1 mg/ml. Na obrázkoch 32 – 35 sú graficky znázornené výsledky meraní.

Na grafe (Obrázok 32) je viditeľná antimikrobiálna aktivita extraktov a nisínu na *S. marcescens*. Po uplynutí 24 hodín bol antimikrobiálny účinok u všetkých častíc nad 70%. Po uplynutí 48 hodín dochádza u väčšiny látok k poklesu antimikrobiálnej aktivity. Okrem extraktu aceroly, kde je viditeľný nárast účinku. Najmenší účinok bol nameraný u enkapsulovaného jakonu.



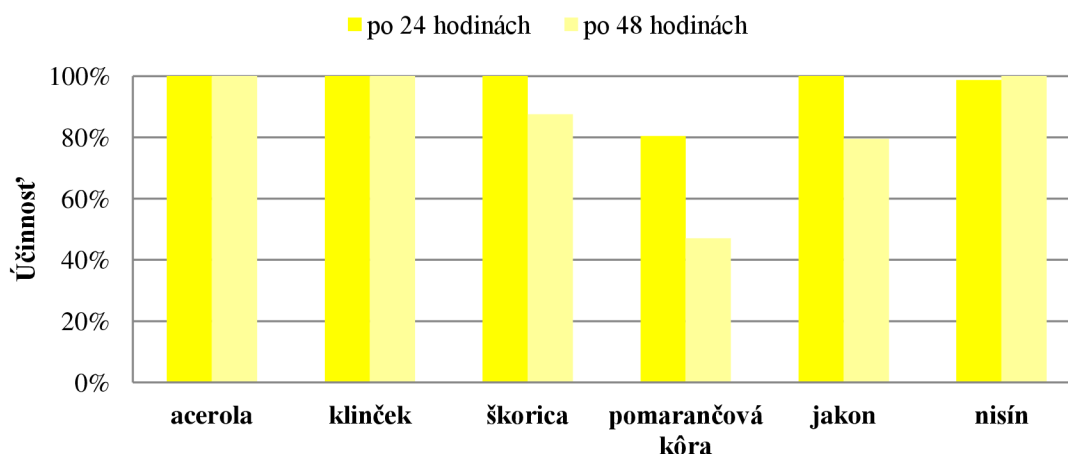
Obrázok 32: Antimikrobiálna aktivita enkapsulovaných látok obalených chitosanom na *S. marcescens*

Na grafe (Obrázok 33) je pozorovateľný antimikrobiálny účinok enkapsulovaných látok na kmeň *E. coli*. Po uplynutí 24 hodín bol inhibičný účinok u všetkých častíc nad 90%. Merania po 48 hodinách ukázali vo väčšine prípadov drobný pokles antimikrobiálnej aktivity. Mierny nárast účinku je viditeľný len u extraktu klinčeka. Najnižšia aktivita bola opäť pozorovaná u enkapsulovaného jakonu sirupu.



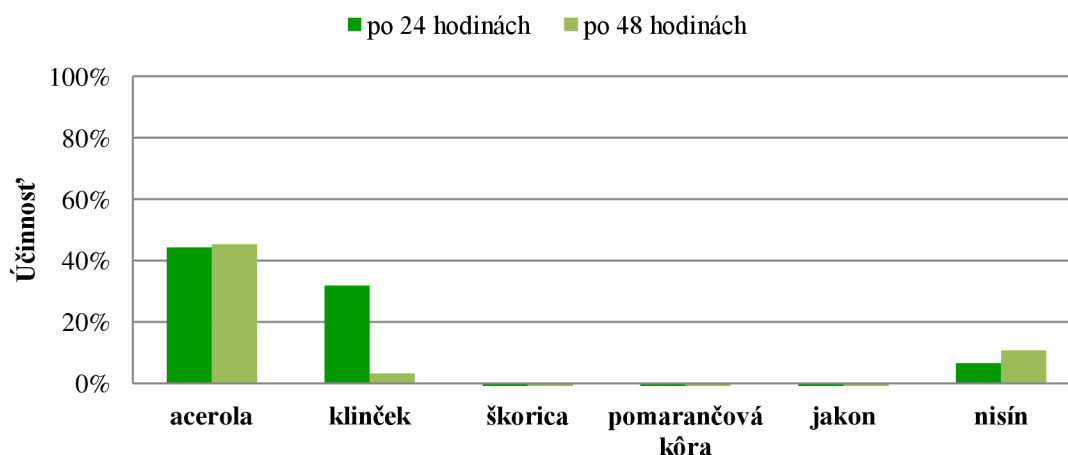
Obrázok 33: Antimikrobiálna aktivita enkapsulovaných látok obalených chitosanom na *E. coli*

Bol pozorovaný i účinok enkapsulovaných látok na kmeň *M. luteus*. Z grafického znázornenia výsledkov (Obrázok 34), môžeme vidieť, že 100% inhibičný účinok bol po 24 hodinách pozorovaný u všetkých častíc, okrem častíc s extraktom pomarančovej kôry. Po uplynutí 48 hodín bol 100% inhibičný účinok stále pozorovaný u častíc s obsahom aceroly, klinčeka a nisínu.



Obrázok 34: Antimikrobiálna aktivita enkapsulovaných látok obalených chitosanom na *M. luteus*

Antimikrobiálny účinok častíc na *C. glabrata* (Obrázok 35) bol po uplynutí 24 aj 48 hodín značne nižší ako antimikrobiálne aktivity namerané u baktérií. Po uplynutí 24 hodín bol nameraný antimikrobiálny účinok len u enkapsulovanej aceroly, klinčeka a nisínu. Nebolo tomu inak ani po uplynutí 48 hodín, najvyššia aktivita bola nameraná u enkapsulovaného roztoku aceroly, 45%.



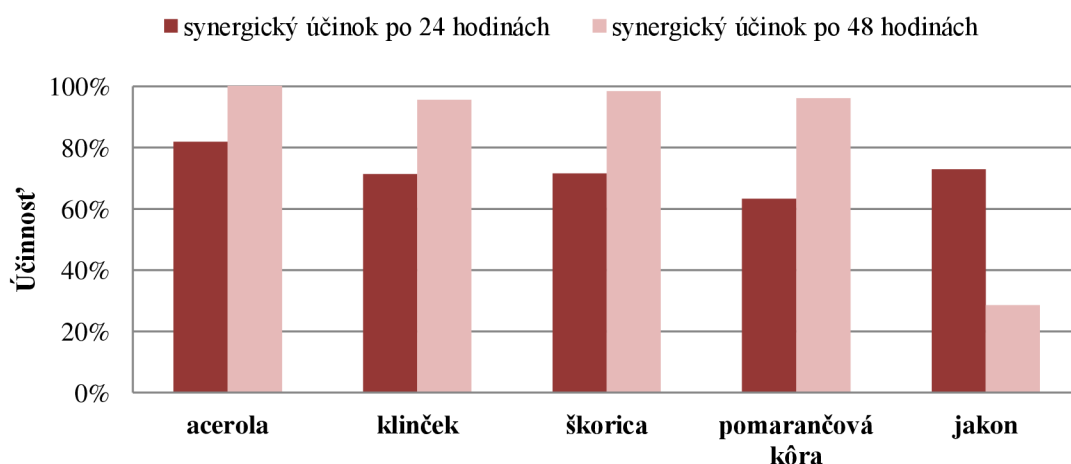
Obrázok 35: Antimikrobiálna aktivita enkapsulovaných látok obalených chitosanom na *C. glabrata*

5.9.5.1 Synergický účinok chitosanom obalených častíc

Následne boli lipozómy obalené chitosanom obsahujúce extrakty a bakteriocín kombinované v pomere 1:1. Na obrázkoch 36 – 39 sú graficky znázornené výsledky meraní synergického účinku.

Pri pozorovaní účinku na *S. marcescens* (Obrázok 36), je viditeľné, že po 48 hodinách pri kombinácii enkapsulovaného nisínu a extraktu vo všetkých prípadoch došlo k navýšeniu antimikrobiálnej aktivity, oproti 48 hodinovému meraniu jednotlivých enkapsulovaných látok.

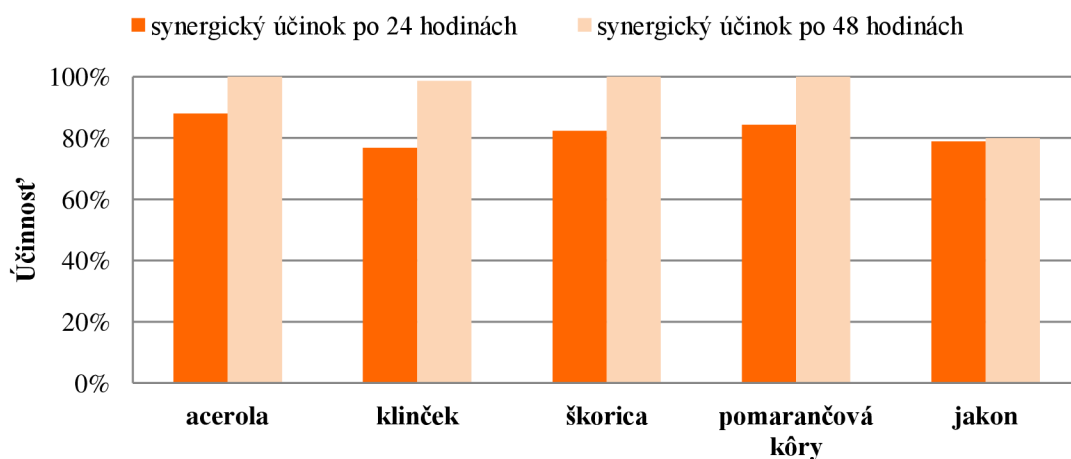
Po 48 hodinách bol nameraný synergický účinok nad 90% u kombinácií nisínu s acerolou, klinčekom, škoricou a pomarančovou kôrou. Najnižšie hodnoty synergického účinku boli namerané u kombinácie nisínu s jakon sirupom, 28,6%.



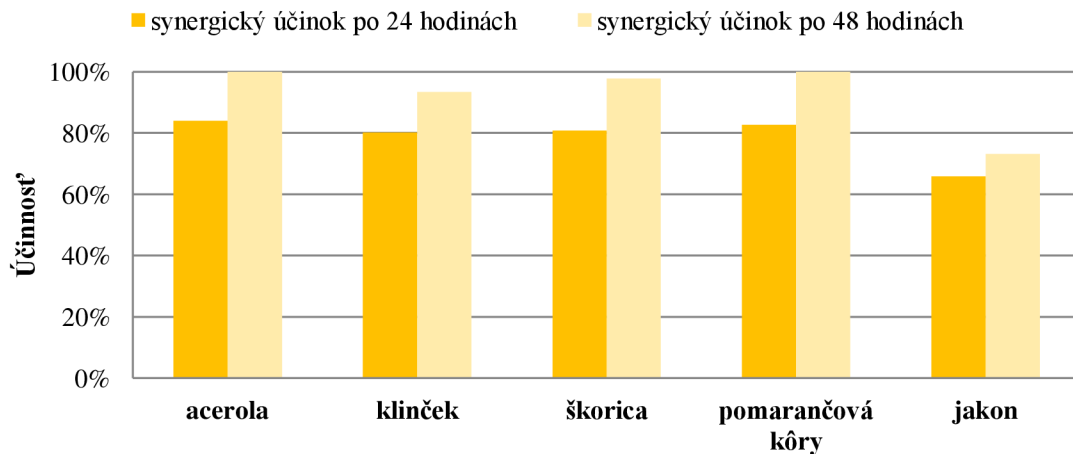
Obrázok 36: Synergický účinok u enkapsulovaných látok obalených chitosanom na kmeň *S. marcescens*

Na grafe (Obrázok 37) vidíme účinok na kmeň *E. coli*. Opäť pozorujeme, že hodnoty synergického účinku po 48 hodinách prekročili antimikrobiálnu aktivitu jednotlivých enkapsulovaných extraktov. Synergický účinok nameraný po 48 hodinách u všetkých extraktov prekročil 80%.

Synergický účinok nameraný po 48 hodinách na kmeň *M. luteus* (Obrázok 38), bol zhodný alebo prekročil antimikrobiálnu aktivitu samotného enkapsulovaného extraktu. Synergické účinky po 48 hodinách zakaždým presiahli 70%.

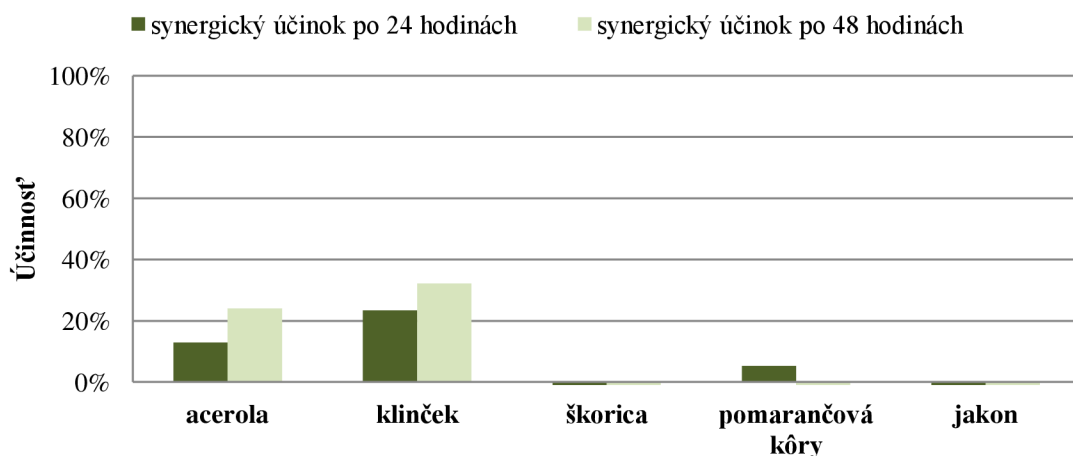


Obrázok 37: Synergický účinok u enkapsulovaných látok obalených chitosanom na kmeň *E. coli*



Obrázok 38: Synergický účinok u enkapsulovaných látok obalených chitosanom na kmeň *M. luteus*

Účinok na *C. glabrata* (Obrázok 39) bol nižší ako u zástupcov baktérií. Synergický účinok po uplynutí 48 hodín, bol nameraný len u kombinácie nisínu s extraktom aceroly, 24,06% a klinčeka, 32,24%.



Obrázok 39: Synergický účinok u enkapsulovaných látok obalených chitosanom na kmeň *C. glabrata*

Namerané výsledky z antimikrobiálnych testov lipozómov obalených chitosanom boli zhrnuté do prehľadnej tabuľky (Tabuľka 17).

Tabuľka 17: Zhrňujúca tabuľka antimikrobiálnych aktivít lipozómov obalených chitosanom

antimikrobiálna aktivita po 24 hodinách				
enkapsulovaná látka	<i>E.coli</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C.glabrata</i>
acerola	+++	+++	+++	+
škorica	+++	++	+++	–
klinček	+++	++	+++	+
p. kôra	+++	–	++	–
jakon	+++	+++	+++	–
nisín	+++	+++	+++	+
acerola + nisín	+++	+++	+++	+++
škorica + nisín	+++	++	++	+++
klinček + nisín	++	++	++	++
p. kôra + nisín	+++	++	+++	+++
jakon + nisín	++	++	++	+++
antimikrobiálna aktivita po 48 hodinách				
enkapsulovaná látka	<i>E.coli</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C.glabrata</i>
acerola	+++	+++	+++	+
škorica	++	+++	+++	–
klinček	+++	+	+++	+
p. kôra	++	++	+	–
jakon	+	–	++	–
nisín	+++	++	+++	+
acerola + nisín	+++	+++	+++	+
škorica + nisín	+++	+	+++	+
klinček + nisín	+++	+	+++	–
p. kôra + nisín	+++	++	+++	–
jakon + nisín	+++	–	++	–

Antimikrobiálna aktivita: (–) –∞-0 %; (+) 0-50 %; (++) 50-80 %; (+++) 80-100 %

5.10 Návrh vhodnej formy prídavku pre potravinárske a kozmetické aplikácie

V tomto prípade bolo potrebné zvoliť rozpúšťadlo, ktoré by pri použití nespôsobovalo žiadne komplikácie a nezapríčinilo by zmenu chute, vône ani farby potraviny, či kozmetiky. V priebehu testovania sa preto zvolila extrácia prírodných materiálov do destilovanej vody. Následne boli zvolené prírodné materiály s vysokou antimikrobiálnou aktivitou: škorica, klinček, acerola, pomarančová kôra a jakon. Bol stanovený celkový obsah polyfenolov, flavonoidov, ktoré môžu byť zodpovedné za antimikrobiálne účinky týchto extraktov, rovnako bola pozorovaná ich antioxidačná aktivita. Bolo zistené, že i vodné extrakty uzatvorené v lipozómoch vykazujú antioxidačné účinky. Vďaka týmto vlastnostiam sú použiteľné ako konzervanty do potravín ako aj kozmetiky. Pochádzajú z prírodných zdrojov, takže nemajú škodlivé vedľajšie účinky, ako niektoré chemické konzervanty. Ich protizápalový a antimikrobiálny účinok je možné využiť v kozmetickom prípravkoch proti akné. Antioxidačné účinky, zabezpečujú spomalenie oxidácie v produktoch. Zároveň

štúdie dokázali, že príjem antioxidantov v potrave znižuje vznik chorôb a spomaľuje starnutie pleti.[66][69]

Navyše majú i iné prospešné vlastnosti opísané v kapitole 2.2, ktoré sú taktiež dôvodom, prečo boli zvolené práve tieto materiály. Napríklad jakon koreň je využívaným prebiotikom a u aceroly bol preukázaný vysoký obsah vitamínu C (kapitola 4.7). Sú známe ich bakteriostatické, antioxidantné, antimykotické, protizápalové, antiseptické, antibiotické, anestetické účinky.

Ako bakteriocín v priebehu testovania bol zvolený nisín. Je schválený ako netoxický a prírodný prípravok, a ako jediný bakteriocín je celosvetovo využívaný ako potravinársky konzervant.

Meraniami opísanými v tejto práci bol dokázaný synergický účinok antimikrobiálnych vlastností pri skombinovaní nisínu a vybraných prírodných materiálov. Toto zistenie môže viesť k zníženiu dávky používaných konzervantov v potravinárskych a kozmetických produktoch.

Aby sa zabezpečilo dopravenie látky na miesto určenia, postupné uvoľňovanie a následne i najväčší účinok, jednotlivé zložky boli enkapsulované do lipozómov. Častice boli tiež obalené vrstvou chitosanu. Tá sa pridala, aby sa predĺžila životnosť lipozómov, a tiež aby sa zabránilo náhodnému predčasnému rozpadu lipozómov a predčasnému uvoľneniu látky. Ďalšou výhodou chitosanu je, že pôsobí ako doplnková antimikrobiálna látka. V Tabuľka 17 sú následne zhrnuté výsledky meraní.

Ako najvhodnejšia forma aplikácie do prípravkov bola stanovená zmes lipozomových častíc obalených chitosanom s obsahom rastlinných extraktov v kombinácii s časticami s enkapsulovaným nisínom. U týchto častíc by sa v prvom kroku prejavila antimikrobiálna aktivita chitosanovej vrstvy. V druhom kroku by sa po rozpade častíc uvoľnil ich obsah a došlo by k synergickému účinku enkapsulovaných antimikrobiálnych látok.

Tabuľka 18: Zhrnutie najlepších výsledkov meraní

Meranie	Hodnoty	Extrakt
obsah polyfenolov v roztoku [mg/ml]	23,873 ± 0,874	acerola
obsah flavoniodov v roztoku [mg/ml]	19,611 ± 0,355	škoricca
antioxidačná aktivita [mg/ml]	4,9111 ± 0,0005	škoricca
enkapsulačná účinnosť [%]	93	jakon
antioxidačná aktivita enkapsulovaných extraktov [µg/ml]	4,5344 ± 0,0001	klinček
Stabilita lipozómov [mV]	-50,633	jakon
Stabilita lipozómov obsalených chitosanom [mV]	38,033	acerola
Antibakteriálna aktivita extraktov [%]	70-100	acerola
Antimykotická aktivita extraktov [%]	53	klinček

6 ZÁVER

Predložená bakalárska práca sa zaoberá štúdiom antimikrobiálneho účinku rastlinných zložiek v kombinácii s bakteriocínom vo voľnej a enkapsulovanej forme. Ďalej sa zaoberá optimalizáciou formy, v ktorej by bolo možné enkapsulované látky úspešne používať v potravinárskych a kozmetických výrobkoch.

V praktickej časti práce bolo analyzovaných 5 prírodných materiálov: acerola, škorica, klinček, pomarančová kôra a jakon. Ako bakteriocín bol zvolený nisín.

Aktívne zložky boli z prírodných materiálov extrahované destilovanou vodou. Najprv bol sledovaný celkový obsah polyfenolov, flavonoidov a antioxidačných látok. Najvyšší obsah polyfenolov bol stanovený v extrakte aceroly ($23,873 \pm 0,874$ mg/g). Najvyšší obsah flavonoidov, a to vo výške $19,611 \pm 0,355$ mg/g, a antioxidačných látok, o hodnote $4,9111 \pm 0,0005$ mg/g, bolo nameraných v extrakte škorice. U jednotlivých extraktov bola sledovaná aj hodnota pH. Ako bolo predpokladané najkyslejšie pH bolo namerané v extrakte aceroly, kvôli vysokému obsahu vitamínu C. Z toho dôvodu bol stanovovaný aj celkový obsah kyseliny L-askorbovej v tomto extrakte ($200,000 \pm 4,867$ mg/g).

Za účelom navýšenia antimikrobiálneho účinku boli použité prírodné extrakty a bakteriocín enkapsulované do lipozómov. Veľkosť vytvorených lipozómov sa pohybovala v rozmedzí 103,700 – 530,800 nm a bola dosiahnutá enkapsulačná účinnosť v rozmedzí 27,778 – 92,731%, pričom jakon bol enkapsulovaný s najvyššou enkapsulačnou účinnosťou. Bola stanovená i antioxidačná aktivita enkapsulovaných extraktov, najvyššie hodnoty boli namerané u častíc s enkapsulovaným klinčekom ($453,436$ µg/ml). Ďalej bola sledovaná stabilita častíc. Lipozómy sa ukázali i po uplynutí 3 týždňov ako veľmi stabilné.

Vytvorené častice boli v ďalšom kroku obaľované vrstvou chitosanu. Chitosanová vrstva sa pridala za účelom ochrany, oddialenia degradácie lipozómov a s cieľom zvýšenia samotného antimikrobiálneho účinku. Prostredníctvom vizualizácie, sledovania veľkosti a zeta potenciálu častíc bol pre tento účel zvolený 2% chitosan. Po pridaní chitosanovej vrstvy sa ako stabilné ukázali častice s enkapsulovanou škoricou, acerolou a nisínom.

V ďalšej časti práce bol pomocou bujónovej dilučnej metódy pozorovaný antimikrobiálny účinok vybraných prírodných zložiek a nisínu proti štyrom kmeňom mikroorganizmov (*Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Candida glabrata*). Najprv bol pozorovaný antimikrobiálny charakter skúmaných látok vo voľnej forme a možný synergický účinok pri skombinovaní prírodných látok a nisínu. Následne bol pozorovaný antimikrobiálny účinok všetkých enkapsulovaných foriem látok a ich kombinácií.

Antimikrobiálny účinok extraktu aceroly bol pozorovaný na všetky štyri kmene mikroorganizmov, najvyšší účinok bol pozorovaný na gram-negatívne bakterie. U extraktu klinčeka bol najvyšší účinok pozorovaný u kmeňov *E. coli* a *M. luteus*. Extrakt vykazoval aj dobrú antimykotickú aktivitu voči *C. glabrata*. Rovnako ako extrakt škorice, kde bol najvyšší účinok pozorovaný na *C. glabrata*. U extraktov pomarančovej kôry a jakon sirupu bola pozorovaná len minimálna antimikrobiálna aktivita.

Synergický účinok antimikrobiálnej aktivity extraktov s nisínom bol pozorovaný u všetkých sledovaných prírodných materiáloch. Kombinácia bakteriocínu s extraktom

aceroly, klinčeka a škorice pôsobila najúčinnšie na kmeň *E.coli*. Najvyšší synergický účinok pri kombinovaní s extraktom pomarančovej kôry a jakonu bol nameraný na kmeň *M. luteus*.

Synergické účinky boli pozorované i pri kombinovaní enkapsulovaných foriem látok do lipozómov. Najlepšie účinky na kmene *M. luteus*, *E.coli* a *S. marcescens* boli zistené pri kombinácii enkapsulovaného nisinu s enkapsulovaným extraktom aceroly. Na zástupcu kvasiniek najlepšie zaúčinkovala kombinácia s enkapsulovaným extraktom škorice.

Veľmi výrazný nárast antimikrobiálnej aktivity bol pozorovaný u všetkých lipozómových častíc po obalení chitosanom. Pri skombinovaní týchto častíc s enkapsulovanými extraktmi a častíc s enkapsulovaným nisinom sa rovnako prejavil synergický účinok. Najlepšie výsledky boli dosiahnuté za použitia extraktov aceroly, škorice, klinčeka a pomarančovej kôry a to hlavne voči bakteriálnym kmeňom. Synergický účinok sa prejavil i na *C. glabrata*, ale len pri kombinácii nisinu s extraktmi aceroly a škorice.

Na záver je možné skonštatovať, že vybrané prírodné zložky v kombinácii s nisinom sú schopné zaistiť navýšenie antimikrobiálneho účinku, a to či už vo forme voľnej alebo enkapsulovanej. Predovšetkým vytvorené chitosanové častice z enkapsulovaných extraktov v kombinácii s chitosanovými časticami s nisinom je tak možné využiť ako alternatívny konzervačný prípravok do potravinárskych a kozmetických výrobkov.

7 POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] Voon H.C., Bhat, R. a Rusul, G. :Flower Extracts and Their Essential Oils as Potential Antimicrobial Agents for Food Uses and Pharmaceutical Applications, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [onlin], 2012, roč. 11, č. 1,[cit. 23.12. 2017]. Dostupný na www: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2011.00169.x>. doi: 10.1111/j.1541-4337.2011.00169.x
- [2] E. CEYLAN, E. a FUNG, D. Y. C. :ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SPICES, *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* [online]. 2004, roč. 12, č. 1, ,[cit. 23.12.2017]. Dostupný na www: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1745-4581.2004.tb00046.x> doi: 10.1111/j.1745-4581.2004.tb00046.x
- [3] Bilal, M., Rasheed, T., Iqbal, H. M. N., Hu, H., Wang, W. a Zhang, X.: Macromolecular agents with antimicrobial potentialities: A drive to combat antimicrobial resistance, *International Journal of Biological Macromolecules*. [online], 2017, roč. 103, [cit. 11.12.2017]. Dostupný na www: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813017307638>. DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2017.05.071. ISSN: 0141-8130.
- [4] PAMUKOVD, Dimiter a ACHTARDŽIEV, Christo. *Prírodná lekárň*. Bratislava: Príroda, 1986. ISBN 064-113-88.
- [5] Savoia, D.: Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics, *Future Microbiology*. [onlin], 2012, roč. 7, č. 8, [cit. 13.1.2018]. Dostupný na www.: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22913356>. doi: 10.2217/fmb.12.68. DOI: 10.2217/fmb.12.68, PMID: 22913356
- [6] Mundy, L., Pendry, B. a Rahman, M.: Antimicrobial resistance and synergy in herbal medicine, *Journal of Herbal Medicine*. [online], 2016, roč. 6, č. 2, [cit. 23.12.2017]. Dostupný na www.: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2006.00004.x>. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2006.00004.x
- [7] Pandey, K. B. a Rizvi, S.I.:Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*. [online], 2009, roč. 2, č. 5, [cit. 15.1.2018]. Dostupný na www: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2071691>. DOI: 10.4161/oxim.2.5.9498, ISSN: 1942-0994, PMID: 20716914
- [8] Gutiérrez-Larraínzar, M., Rúa, J., Caro, I, de Castro, C., de Arriaga, D., García-Armesto, M. R. a del Valle, P.: Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria, *Food Control*. [online], 2012, roč. 26, č. 2, [cit. 14.1.2018]. Dostupný na www.: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512001077>. DOI: 10.1016/J.FOODCONT.2012.02.025, ISSN: 0956-7135
- [9] Cowan, M. M.: Plant products as antimicrobial agents, *Clinical microbiology reviews*. [online], 1999, roč. 12, č. 4, [cit. 1.14.2018]. Dostupný na www: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC88925>. ISSN: 0893-8512, PMID: 10515903
- [10] Vranová, E., Coman, D. a Gruissem, W.: Structure and Dynamics of the Isoprenoid

- Pathway Network, *Molecular Plant*. [online], 2012, roč. 5, č. 2, [cit. 14.1.2018].
Dostupný na [www:
https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1674205214601210](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1674205214601210). DOI:
10.1093/mp/sss015, ISSN: 16742052
- [11] Coulibaly, Y. A., Hashim, R., Sulaiman, S. F., Sulaiman, O., Ang, L. Z. P. a Ooi, K. L.: Bioprospecting medicinal plants for antioxidant components, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. [online]. 2014, roč. 7, [cit. 15.1. 2018]. Dostupný na [www:
https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1995764514602893](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1995764514602893). DOI:
10.1016/S1995-7645(14)60289-3, ISSN: 1995-7645
- [12] Kasote, D. M., Katyare, S. S., Hegde, M. V. a Bae, H.: Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications, *International journal of biological sciences*. [online], 2015, roč. 11, č. 8, [cit. 1.15.2018]. Dostupný na [www:
http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4495415](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4495415). DOI:
10.7150/ijbs.12096, ISSN: 1449-2288, PMID: 26157352
- [13] Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. a Chandra, N.: Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health., *Pharmacognosy reviews*. [online], 2010, roč. 4, č. 8, [cit. 19.1.2018]. Dostupný na [www:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22228951](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22228951). DOI: 10.4103/0973-7847.70902, PMID: 22228951
- [14] Ito, N., Hirose, M. a Imaida, K.: Antioxidants: Carcinogenic and Chemopreventive Properties, v *Encyclopedia of Cancer* [online], 2002, Elsevier, [cit. 19.1.2018]. Dostupný na [www: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0122275551005025](http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0122275551005025). DOI: 10.1016/B0-12-227555-1/00502-5, ISBN: 9780122275555
- [15] SHAHIDI, Fereidoon.: *I – Antioxidants: Principles and applications*, v *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*, Elsevier, Woodhead publishing: 2015. DOI: 10.1016/B978-1-78242-089-7.00001-4, ISBN: 9781782420897
- [16] Shah, M. A., Bosco, S. J. D. a Mir, S.A.: Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products, *Meat Science*. [online], 2014, roč. 98, č. 1, [cit. 15.1.2018]. Dostupný na [www:
https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174014001089](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174014001089). DOI:
10.1016/J.MEATSCI.2014.03.020, ISSN: 0309-1740
- [17] Gutiérrez-Larraínzar, M., Rúa, J., Caro, I., de Castro, C., de Arriaga, D., García-Armesto, M. R. a del Valle, P.: Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria, *Food Control*. [online], 2012, roč. 26, č. 2, [cit. 1.15.2018]. Dostupný na [www:
https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174014001089](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174014001089). DOI:
10.1016/J.MEATSCI.2014.03.020, ISSN: 0309-1740
- [18] Ismail, A., Marjan, Z. M. a Foong, C. W.: Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables, *Food Chemistry*. [online], 2004, roč. 87, č. 4, [cit. 1.15.2018]. Dostupný na [www:
http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S03088146040003](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S03088146040003). DOI:
10.1016/J.FOODCHEM.2004.01.010, ISSN: 0308-8146

- [19] SIMON, Anne: *The Healing Power of Plants: Medical Plants from Abuta and Acerola to Yohimbe and Yucca: a Practical Selection*. Coburg: MayaMedia Verlag, 2013. ISBN: 3944488067
- [20] Leffa, D. D., da Silva, J., Petronilho, F. C., Biélla, M. S., Lopes, A., Binatti, A. R., Daumann, F., Schuck, P. F. a Andrade, V. M.: Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) juice intake protects against oxidative damage in mice fed by cafeteria diet, *Food Research International*. [online], 2015, roč. 77, [cit. 12.9.2017]. Dostupný na [www: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996915302167](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996915302167). DOI: 10.1016/J.FOODRES.2015.10.006
- [21] Klosterhoff, R. R., Bark, J. M., Glänzel, N. M., Iacomini, M., Martinez, G. R., Winnischofer, S. M. B. a Cordeiro, L. M. C.: Structure and intracellular antioxidant activity of pectic polysaccharide from acerola (*Malpighia emarginata*), *International Journal of Biological Macromolecules*. [online], 2018, roč. 106, s. 473–480, [cit. 9.12.2017]. Dostupný na [www: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014181301730675X](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014181301730675X). DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2017.08.032
- [22] Acerola Cherry Facts, Health Benefits and Nutritional Value. [online], [cit. 9.12.2017]. Dostupné na [www: https://www.healthbenefitstimes.com/acerola-cherry/](https://www.healthbenefitstimes.com/acerola-cherry/).
- [23] SMALL, Ernest: *Top 100 Food Plants*. Ontario, Canada: NRC Press, Ottawa, 2009. ISBN: 978-0-660-19858-3
- [24] DENYS, Charles J: *Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources*. New York: Springer, 2012. ISBN: 978-1-4614-4309-4
- [25] GULER, S. a SEKER, M.: THE EFFECT OF CINNAMON AND GUAR GUM ON *BACILLUS CEREUS* POPULATION IN MILK, *Journal of Food Processing and Preservation*. [online], 2009, roč. 33, č. 3, [cit. 10.1.2018]. Dostupný na [www: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1745-4549.2009.00417.x](http://doi.wiley.com/10.1111/j.1745-4549.2009.00417.x). DOI: 10.1111/j.1745-4549.2009.00417.x
- [26] Muhammad, D. R. A., Praseptiangga, D., Van de Walle, D. a Dewettinck, K.: Interaction between natural antioxidants derived from cinnamon and cocoa in binary and complex mixtures, *Food Chemistry*. [online], 2017, roč. 231, [cit. 11.12. 2017]. Dostupný na [www: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814617305265](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814617305265). DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2017.03.128
- [27] Rafehi, H., Ververis, K. a Karagiannis, T. C.: Controversies surrounding the clinical potential of cinnamon for the management of diabetes, *Diabetes, Obesity and Metabolism*. [online], 2012, roč. 14, č. 6, [cit. 10.1.2018]. Dostupný na [www: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1463-1326.2011.01538.x](http://doi.wiley.com/10.1111/j.1463-1326.2011.01538.x). DOI: 10.1111/j.1463-1326.2011.01538.x
- [28] Škorica nad zlato . [online], [Cit: 9.12.2017].n Dostupný na [www: https://fitastyl.sk/clanky/vyziva/skorica-nad-zlato](https://fitastyl.sk/clanky/vyziva/skorica-nad-zlato).
- [29] PREEDY, Victor R.: *Essential oils in food preservation, flavor and safety*. San Diogo: AP Academic, 2016. ISBN: 9780124166448 .

- [30] MAUPOEI, Fito P.: *Osmotic Dehydration and Vacuum Impregnation: Applications in Food Industries*. Lancaster, Pennsylvania: Technomic Publishing, 2001. ISBN: 1-58716-043-9
- [31] PANDA, H.: *Herbs Cultivation and Medicinal Uses*, Second edition. Delhi, India: National Institute Of Industrial Research, 2005. ISBN: 8186623469
- [32] orange peel – James McColly. [online], [Cit: 19.1.2018]. Dostupný na [www: http://jamesmccolly.com/tag/orange-peel/](http://jamesmccolly.com/tag/orange-peel/).
- [33] PARTHASRATHY, V. A., CHEMPAKAM Bhareerythy a ZACHARIAH ,John: *Chemistry of Spices*. India, Calicut, Kerala: CABI International, 2008. ISBN: 978 1 84593 405 7
- [34] Clove Seeds at Rs 850 /kilogram | Clove Seeds | ID: 15834246288. [online], [cit. 9.12.2017]. Dostupný na [www: https://www.indiamart.com/proddetail/clove-seeds-15834246288.html](https://www.indiamart.com/proddetail/clove-seeds-15834246288.html).
- [35] Herbář peruánských bylin a rostlin z And a Amazonie, Uncaria. [online]. 2018, [cit. 20.1.2018]. Dostupný na [www: http://www.herbarperuanskychbylin.cz/](http://www.herbarperuanskychbylin.cz/).
- [36] Caetano, B. F. R., de Moura, N A., Almeida, A.P.S., Dias, M.C. Sivieri, K. a Barbisan, L. F.: Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as a Food Supplement: Health-Promoting Benefits of Fructooligosaccharides, *Nutrients*. [online], 2016, roč. 8, č. 7, [cit. 20.1.2018]. Dostupný na [www: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4963912](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4963912). DOI: 10.3390/nu8070436, ISSN: 2072-6643, PMID: 27455312
- [37] Yacon ovocný výťažok, Yacon koreňový sirup prášok Dodávateľ, *Smallanthus Sonchifolius* výťažok, Yacon PE Výrobca. [online]. [cit 9.12.2017]. Dostupný [www: http://sk.gmp-factory.com/herbal-medicine/lowering-blood-pressure/yacon-fruit-extract-smallanthus-sonchifolius.html](http://sk.gmp-factory.com/herbal-medicine/lowering-blood-pressure/yacon-fruit-extract-smallanthus-sonchifolius.html).
- [38] Ageitos, J. M., Sánchez-Pérez, A., Calo-Mata, P. a Villa, T.G.: Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria, *Biochemical Pharmacology*. [online], 2017, roč. 133, [cit, 11.12.2017]. Dostupný na [www: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000629521630301X](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000629521630301X). DOI: 10.1016/J.BCP.2016.09.018
- [39] Takahashi, T. a Gallo, R. L.: The Critical and Multifunctional Roles of Antimicrobial Peptides in Dermatology, *Dermatologic Clinics*. [online], 2017, roč. 35, č. 1, [cit. 11.12.2017]. Dostupný na [www: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733863516300791](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733863516300791). DOI: 10.1016/J.DET.2016.07.006, ISBN: 9780323482592
- [40] Snyder, A. B. a Worobo, R. W.: Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety, *Journal of the Science of Food and Agriculture*. [online], 2014, roč. 94, č. 1, [cit. 10.12.2017]. Dostupný na [www: http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.6293](http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.6293). DOI: 10.1002/jsfa.6293
- [41] Yang, S. C., Lin, C. H., Sung, C. T. a Fang, J. Y.: Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals, *Frontiers in microbiology*.

- [online], 2014, roč. 5, [cit. 25.12. 2017]. Dostupný na [www: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24904554](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24904554), DOI: 10.3389/fmicb.2014.00241, PMID: 24904554
- [42] Rebuffat, S.: Bacteriocins from Gram-Negative Bacteria: A Classification?, v *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*. [online], 2011, New York, NY: Springer New York, [cit. 26.12.2017]. Dostupný na [www: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-7692-5_42011](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-7692-5_42011) DOI: 10.1007/978-1-4419-7692-5_4
- [43] Williams G. C. a Delves-Broughton, J.: NISIN, v *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. [online], 2003, Elsevier, [cit. 10.12.2017]. Dostupný na [www: https://www.researchgate.net/publication/288154181_Nisin](https://www.researchgate.net/publication/288154181_Nisin). DOI: 10.1016/B0-12-227055-X/00829-4, ISBN: 9780122270550 s. 4128–4135.
- [44] Lewies, A., Wentzel, J. F., Miller, H. C. a Du Plessis, L.H.: The antimicrobial peptide nisin Z induces selective toxicity and apoptotic cell death in cultured melanoma cells, *Biochimie*. [online], 2018, roč. 144, [cit. 26.12.2017]. Dostupný na [www: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908417302](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908417302). DOI: 10.1016/J.BIOCHI.2017.10.009
- [45] Field, D., Cotter, P.D., Hill, C. a Ross, R.P.: Bioengineering Lantibiotics for Therapeutic Success, *Frontiers in Microbiology*. [online], 2015, roč. 6, [cit. 26.12.2017]. Dostupný na [www: http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.01363/abstract](http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.01363/abstract). DOI: 10.3389/fmicb.2015.01363
- [46] Müller-Auffermann, K., Grijalva, F., Jacob, F. a Hutzler, M.: Nisin and its usage in breweries: a review and discussion, *Journal of the Institute of Brewing*. [online], 2015, roč. 121, č. 3, [cit. 27.12.2017]. Dostupný na [www: http://doi.wiley.com/10.1002/jib.233](http://doi.wiley.com/10.1002/jib.233). DOI: 10.1002/jib.233
- [47] Hayashi, M. A., Bizerra, F. C., Da Silva, P. I. a Jr.: Antimicrobial compounds from natural sources, *Frontiers in microbiology*. [online], 2013, roč. 4, [cit. 13.1.2018]. Dostupný na [www: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23874329](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23874329). DOI: 10.3389/fmicb.2013.00195, PMID: 23874329
- [48] Zhang, L. a Gallo, R. L.: Antimicrobial peptides, *Current Biology*. [online], 2016, roč. 26, č. 1, [cit. 11.12.2017]. Dostupný na [www: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982215014098](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982215014098). DOI: 10.1016/J.CUB.2015.11.017
- [49] Salton, M. R.: The properties of lysozyme and its action on microorganisms, *Bacteriological reviews*. [online], 1957, roč. 21, č. 2, [cit. 28.12.2017]. Dostupný na [www: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC180888](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC180888). ISSN: 0005-3678, PMID: 13436356
- [50] Kajla, M. K., Shi, L., Li, B., Luckhart, S., Li, J. a Paskewitz, S. M.: A new role for an old antimicrobial: lysozyme c-1 can function to protect malaria parasites in *Anopheles* mosquitoes., *PloS one*. [online], 2011, roč. 6, č. 5, [cit. 28.12.2017]. Dostupný na [www: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3). DOI: 10.1371/journal.pone.0019649, ISSN: 1932-6203, PMID: 21573077

- [51] Rhoades, J. a Roller, S.: Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods, *Applied and environmental microbiology*. [online], 2000, roč. 66, č. 1, [cit. 27.12.2017]. Dostupný na [www: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC91788](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC91788). ISSN: 0099-2240, PMID: 10618206
- [52] Raafat, D. a Sahl, H. G.: Chitosan and its antimicrobial potential--a critical literature survey, *Microbial biotechnology*. [online], 2009, roč. 2, č. 2, [cit. 27.12.20017]. Dostupný na [www: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21261913](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21261913). DOI: 10.1111/j.1751-7915.2008.00080.x, PMID: 21261913
- [53] MOKRÝ, J., PORVAZNÍK, I. a VÁŇA, J.: *Vybrané kapitoly z klinickej farmakológie Antimikrobiálne látky I. - farmakológia - PDF*, Prvé vydanie. Martin: Ústav farmakológie JLF UK v Martine, 2013. ISBN: 978-80-89544-48-6
- [54] Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A. K. a Doble, M.: Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases, *Phytomedicine*. [online], 2008, roč. 15, č. 8, [cit. 11.1.2018], Dostupný na [www: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711308001104](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711308001104). DOI: 10.1016/J.PHYMED.2008.06.008
- [55] Lambert, R. J.W., Johnston, M. D., Hanlon, G. W. a Denyer, S. P.: Theory of antimicrobial combinations: biocide mixtures - synergy or addition?, *Journal of Applied Microbiology*. [online], 2003, roč. 94, č. 4, [cit. 11.1.2018]. Dostupný na [www: http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2672.2003.01908.x](http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2672.2003.01908.x). DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.01908.x
- [56] Perez Espitia, J. P., de Fátima Ferreira Soares, D., dos Reis Coimbra, J. S., de Andrade, N.J., Souza Cruz, R. a Alves Medeiros, E. A.: Bioactive Peptides: Synthesis, Properties, and Applications in the Packaging and Preservation of Food, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. [online], 2012, roč. 11, č. 2, [cit. 11.1.2018]. Dostupný na [www: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2011.00179.x](http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2011.00179.x). DOI: 10.1111/j.1541-4337.2011.00179.x
- [57] M. Mishra, *Handbook of Encapsulation and Controlled Release*. Northwestern Washington: CRC Press, 2015. ISBN: 9781482232325
- [58] Muqbil, I., Masood, A., Sarkar, F. H., Mohammad, R. M. a Azmi, A. S.: Progress in Nanotechnology Based Approaches to Enhance the Potential of Chemopreventive Agents, *Cancers*. [online], 2011, roč. 3, č. 4, [cit. 12.1.2018]. Dostupný na [www: http://www.mdpi.com/2072-6694/3/1/428/](http://www.mdpi.com/2072-6694/3/1/428/). DOI: 10.3390/cancers3010428
- [59] GREGORIADIS, Gregory a PERRIE, Yvonne: *Liposomes in nanomedicine, v Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. Chichester: John Wiley & Sons, 2010. ISBN: 978-1-118-54915-5
- [60] Lewies, A., Wentzel, J. F., Jordaan, A., Bezuidenhout, C. a Du Plessis, L. H.: Interactions of the antimicrobial peptide nisin Z with conventional antibiotics and the use of nanostructured lipid carriers to enhance antimicrobial activity, *International Journal of Pharmaceutics*. [online], 2017, roč. 526, č. 1–2, [cit. 11.12.2017]. Dostupný na [www: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517317303824](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517317303824).

DOI: 10.1016/J.IJPHARM.2017.04.071

- [61] Ventola, C. L.: The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats, *P & T: a peer-reviewed journal for formulary management*. [online], 2015, roč. 40, č. 4, [cit. 13.1.2018]. Dostupný na [www: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4378521](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4378521). ISSN: 1052-1372, PMID: 25859123
- [62] Hayashi, M. A., Bizerra, F. C., Da Silva, P.I. a Jr: Antimicrobial compounds from natural sources, *Frontiers in microbiology*. [online], 20113, roč. 4, [cit. 13.1.2018]. Dostupný na [www: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23874329](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23874329). DOI: 10.3389/fmicb.2013.00195, PMID: 23874329
- [63] Lucera, A., Costa, C., Conte, A. a Del Nobile, M.A.: Food applications of natural antimicrobial compounds, *Frontiers in Microbiology*. [online], 2012, roč. 3, [cit. 13.1.2018]. Dostupný na [www: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23874329](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23874329). DOI: 10.3389/fmicb.2013.00195, PMID: 23874329
- [64] Pisoschi, A. M., Pop, A., Georgescu, C., Turcuş, V., Olah, N. K. a Mathe, E.: An overview of natural antimicrobials role in food, *European Journal of Medicinal Chemistry*. [online], 2018, roč. 143, [cit. 11.1.2018]. Dostupný na [www: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523417309984](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523417309984). DOI: 10.1016/J.EJMECH.2017.11.095, ISSN: 0223-5234
- [65] Tsao, R. “13 – Synergistic interactions between antioxidants used in food preservation”, v *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*, [online], 2015, s. 335–347, [cit. 19.1.2018]. DOI: 10.1016/B978-1-78242-089-7.00013-0, ISBN: 9781782420897
- [66] Costa, R. a Santos, L.: Delivery systems for cosmetics - From manufacturing to the skin of natural antioxidants, *Powder Technology*. [online], 2017, roč. 322, [cit. 14.1.2018]. Dostupný na [www: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032591017306320](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032591017306320). DOI: 10.1016/J.POWTEC.2017.07.086, ISSN: 0032-5910
- [67] Kunicka-Styczyńska, A., Sikora, M. a Kalemba, D.: Antimicrobial activity of lavender, tea tree and lemon oils in cosmetic preservative systems, *Journal of Applied Microbiology*. [online], 2009, roč. 107, č. 6, [cit. 14.1.2018], Dostupný na [www: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2009.04372.x](http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2009.04372.x). DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04372.x, ISSN: 13645072
- [68] [1] Voon H.C., Bhat, R. a Rusul, G. :Flower Extracts and Their Essential Oils as Potential Antimicrobial Agents for Food Uses and Pharmaceutical Applications, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [onlin], 2012, roč. 11, č. 1, [cit. 23.12. 2017]. Dostupný na [www: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2011.00169.x](http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2011.00169.x). doi: 10.1111/j.1541-4337.2011.00169.x
- [69] Kerdudo, A., Burger, P., Merck, F., Dingas, A., Rolland, Y., Michel, T. a Fernandez, X.: Development of a natural ingredient – Natural preservative: A case study, *Comptes Rendus Chimie*. [online], 2016, roč. 19, č. 9, [cit. 14.1.2018]. Dostupný na [www: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S163107481630162X](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S163107481630162X).

DOI: 10.1016/J.CRCI.2016.06.004, ISSN: 1631-0748

- [70] Kanlayavattanakul, M. a Lourith, N.: Therapeutic agents and herbs in topical application for acne treatment, *International Journal of Cosmetic Science*. [online], 2011, roč. 33, č. 4, [cit. 14.1.2018]. Dotupné na [www: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468-2494.2011.00647.x](http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468-2494.2011.00647.x). DOI: 10.1111/j.1468-2494.2011.00647.x, ISSN: 01425463
- [71] S. SOSKOVÁ, Příprava a charakterizace mikro- a nanočástic s obsahem vybraných léčiv, Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015.
- [72] M. VYSOKÁ, Vývoj energetických nápojů noevého typu s obsahem přírodních aktivních složek, Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017.
- [73] MALVERN INSTRUMENTS Ltd., *Manual: Zetasizer Nano user manual (Man0317-5.0) inc addendum*, United Kingdom, 2009

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

A	absorbancia
ABTS	2,2' - azino-bis-[3-etylbezo thiazolin-6-sulfonová kyselina]
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
DLS	Dynamic light scattering
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
p. kôra	pomarančová kôra
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
<i>S. marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>