



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

NÁVRH SYSTÉMOV PRO CÍLENÝ TRANSPORT ZLÚČENÍN SO SLADKOU CHUŤOU

PROPOSAL OF SYSTEMS FOR TARGETED TRANSPORT OF COMPOUNDS OF SWEET
TASTE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

RADOSLAVA DEMOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

prof. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

| | | |
|-------------------------|---|----------------------------------|
| Číslo bakalářské práce: | FCH-BAK0926/2014 | Akademický rok: 2014/2015 |
| Ústav: | Ústav fyzikální a spotřební chemie | |
| Student(ka): | Radoslava Demová | |
| Studijní program: | Chemie a chemické technologie (B2801) | |
| Studijní obor: | Chemie pro medicínské aplikace (2808R031) | |
| Vedoucí práce | prof. RNDr. Ivana Márová, CSc. | |
| Konzultanti: | Ing. Petra Matoušková | |

Název bakalářské práce:

Návrh systémů pro cílený transport sloučenin se sladkou chutí

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše - přehled látek se sladkou chutí, využití. Přehled aplikačních forem a dávkování.
2. Optimalizace potřebných metod.
3. Vazba vybraných sladidel na nosiče, stabilita vytvořených systémů.
4. Vyhodnocení výsledků a diskuse.

Termín odevzdání bakalářské práce: **22.5.2015**

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Radoslava Demová
Student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Táto bakalárska práca je zameraná na možnosť imobilizácie sladidiel na vybraný nosičový systém. Teoretická časť práce bola venovaná informáciám o sladidlách, nosičových systémoch a možnosti imobilizačnej techniky. V experimentálnej časti bola optimalizovaná príprava častíc z polyhydroxybutyrátu (PHB). Pripravené PHB častice boli charakterizované metódou dynamického rozptylu svetla (DLS). Povrch PHB častíc bol aktivovaný pomocou plazmy. Takto aktivovaný povrch PHB častíc bol charakterizovaný pomocou infračervenej a Ramanovej spektroskopie. Imobilizované boli látky so sladkou chuťou: glukóza, fruktóza, sacharóza, mannitol, sorbitol a erytritol. Na PHB častice sa z testovaných látok podarilo naviazať iba sacharózu. Imobilizované častice boli vystavené účinkom umelej žalúdočnej, pankreatickej a žlčovej šťavy a bolo sledované množstvo uvoľnenej sacharózy. Ďalej bola sledovaná dlhodobá stabilita častíc a takisto množstvo uvoľnenej sacharózy.

ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on possibility of immobilization sweeteners on polymeric system. In the theoretical part information about sweeteners, carrier systems and the possibility of immobilization technique were reviewed. In the experimental part preparation of nanoparticles of polyhydroxybutyrate (PHB) was optimized. The PHB particles were characterized by dynamic light scattering (DLS). PHB particles were activated by plasma treatment. The surface morphology was studied using infrared and Raman spectroscopy. Immobilization of following substances with a sweet taste was tested: glucose, fructose, sucrose, mannitol, sorbitol and erythritol. From these compounds only sucrose was immobilized on PHB particles successfully. Prepared immobilized particles were exposed to the artificial stomach juice, intestinal juices and bile acids and amount of released sucrose was monitored. Finally, long-term stability prepared particles was measured and also the amount of sucrose released was determined.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: Sladidlá, sacharóza, polyhydroxybutyrát, imobilizácia

KEYWORDS: Sweeteners, sucrose, polyhydroxybutyrate, immobilization

DEMOVÁ, R. *Návrh systémov pre cieleň transport zlučenín so sladkou chuťou*. Brno: Vysoké učené technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 56 s. Vedúca bakalárskej práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PREHLÁSENIE

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

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Na tomto mieste by som chcela poďakovať svojej vedúcej bakalárskej práce, prof. RNDr. Ivane Márovej, CSc., za odborné vedenie a Ing. Petre Matouškovej za pomoc, trpezlivosť, cenné rady a pripomienky, ktoré mi poskytla pri spracovaní danej bakalárskej práce.

OBSAH

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | ÚVOD | 8 |
| 2 | TEORETICKÁ ČASŤ | 9 |
| 2.1 | Prehľad látok so sladkou chuťou | 9 |
| 2.2 | Sacharidy | 9 |
| 2.2.1 | Monosacharidy | 9 |
| 2.2.2 | Disacharidy | 10 |
| 2.3 | Sladidlá | 11 |
| 2.3.1 | Energetické sladidlá | 12 |
| 2.3.2 | Neenergetické sladidlá | 16 |
| 2.3.3 | Náhradné sladidlá povolené na území EU a ostatných | 19 |
| 2.4 | Nosičové systémy | 21 |
| 2.4.1 | Celulóza | 21 |
| 2.4.2 | Hemicelulóza | 21 |
| 2.4.3 | Pektíny | 21 |
| 2.4.4 | Hydrokoloidy | 21 |
| 2.4.5 | β -glukány | 22 |
| 2.4.6 | Syntetické polysacharidy | 22 |
| 2.4.7 | Ďalšie materiály | 22 |
| 2.5 | Bioaktívne nosičové systémy | 23 |
| 2.5.1 | Pohyblivé bioaktívne polyméry | 24 |
| 2.5.2 | Nepohyblivé bioaktívne polyméry | 24 |
| 2.6 | Návrh nosičových systémov v potravinárstve | 25 |
| 2.6.1 | Top-down metódy | 25 |
| 2.6.2 | Bottom-up metódy | 26 |
| 3 | CIEĽ PRÁCE | 28 |
| 4 | EXPERIMENTÁLNA ČASŤ | 29 |
| 4.1 | Použité chemikálie, prístroje a pomôcky | 29 |
| 4.1.1 | Chemikálie | 29 |
| 4.1.2 | Prístroje a pomôcky | 29 |
| 4.2 | Stanovenie sladidiel metódou HPLC s UV-VIS a RI detekciou | 29 |
| 4.3 | Metódy prípravy PHB častíc | 30 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.3.1 | Príprava častíc pomocou ultrazvuku | 30 |
| 4.3.2 | Metóda odparovania na tenkej vrstve (thin layer evaporation) – TLC | 30 |
| 4.3.3 | Metóda odparovania z tenkej vrstvy na reverznej fáze (reverse phase – thin layer evaporation) – RP-TLC | 30 |
| 4.4 | Stanovenie veľkosti častíc metódou dynamického rozptylu svetla | 30 |
| 4.5 | Stanovenie stability vytvorených častíc pomocou zeta potenciálu | 30 |
| 4.6 | Plazmová aktivácia povrchu PHB častíc | 31 |
| 4.7 | Infračervená a Ramanová spektroskopia | 31 |
| 4.8 | Imobilizácia sladidiel na aktivové PHB častice | 31 |
| 4.9 | Stabilita častíc v modelovom fyziologickom prostredí | 31 |
| 4.9.1 | Žalúdočná šťava | 31 |
| 4.9.2 | Pankreatická šťava | 31 |
| 4.9.3 | Žlčová šťava | 32 |
| 4.10 | Dlhodobá stabilita | 32 |
| 5 | VÝSLEDKY A DISKUSIA | 33 |
| 5.1 | Optimalizácia metódy stanovenia sladidiel | 33 |
| 5.2 | Optimalizácia metód prípravy PHB častíc | 35 |
| 5.2.1 | Vizualizácia veľkostí častíc pod mikroskopom | 35 |
| 5.2.2 | Stanovenie veľkosti častíc metódou dynamického rozptylu svetla | 35 |
| 5.2.3 | Stanovenie stability vytvorených častíc analýzou zeta potenciálu | 37 |
| 5.3 | Optimalizácia prípravy PHB častíc pomocou ultrazvuku | 37 |
| 5.3.1 | Porovnanie veľkosti častíc metódou dynamického rozptylu svetla | 37 |
| 5.3.2 | Porovnanie stability častíc pomocou zeta potenciálu | 39 |
| 5.3.3 | Vizualizácia častíc pod mikroskopom | 41 |
| 5.4 | Imobilizácia sladidiel na vytvorené častice | 42 |
| 5.5 | Infračervená spektrometria s Fourierovou transformáciou | 43 |
| 5.6 | Ramanova spektrometria | 44 |
| 5.7 | Dlhodobá stabilita sacharózy | 45 |
| 5.8 | Stabilita imobilizovaného sladidla v modelovom fyziologickom prostredí | 46 |
| 6 | ZÁVER | 47 |
| 7 | LITERATÚRA | 48 |
| 8 | ZOZNAM SKRATIEK | 51 |
| 9 | PRÍLOHY | 52 |

| | | |
|-----|---|----|
| 9.1 | Príloha 1. Kalibračné krivky sladidiel | 52 |
| 9.2 | Príloha 2. Záznamy stanovenia veľkosti častíc metódou DLS | 54 |

1 ÚVOD

Celosvetový dopyt po prírodných zdrojoch nekalorických sladidiel sa v poslednom desaťročí výrazne zvýšil. Publicistika čoraz častejšie ukazuje verejnosti zdravotné dopady príjmu jednoduchých cukrov na zdravie, čím odrádza spotrebiteľov od kalorických cukrov a dáva do popredia prírodné nízkokalorické alebo nekalorické alternatívy – sladidlá [1].

Sladidlá sú látky, ktoré udeľujú potravinu sladkú chuť a neprispievajú k celkovému príjmu kalórií. Potraviny a nápoje so zníženým obsahom cukru sú celosvetovo veľmi populárne a ich konzumácia je považovaná za dôležitú v boji proti metabolickým ochoreniam ako je obezita, dyslipidémia, ischemická choroba srdca, hypertenzia, steatóza pečene, mozgová cievna ochorenia, diabetes druhého typu, ktorý sa vyznačuje vysokou hladinou glukózy v krvi a inzulínovej rezistencie [2]. Dôvodom použitia náhradných sladidiel je fakt, že tieto látky sa nezúčastňujú biochemických pochodov v organizme tým istým spôsobom ako cukry a neposkytujú organizmu žiadnu alebo len veľmi malú energiu.

Prvým umelo vytvoreným sladidlom bol sacharín. Bol objavený náhodne vedcami C. Fahlbergom a I. Remsenom v roku 1879, počas študovania oxidácie o-toulénu-sulfónamidu [3]. Druhým v poradí bol cyklamát. V roku 1937 chemik M. Sveda objavil cyklamát pri vývoji antipyretík [4]. Rovnako ako predchádzajúce sladidlá, bol náhodne objavený aj aspartám v roku 1965 chemikom J. M. Schlatterom, ktorý pripravoval peptidický hormón – gastrín, ako liek proti žalúdočným vredom [5]. Ďalším v poradí bol náhodne objavený acesulfám K v roku 1967 vo farmaceutickej firme vedcami Karlom Claussom a Haraldom Jensenom počas ich experimentoch pri vývoji nových materiálov [6]. Sukralóza, nekalorické sladidlo, bolo objavené v 1976 vo firme Tate & Lyle v spolupráci s výskumníkmi z Kings College London [7].

S. Schiffman vo svojej práci uvádza, že niektoré z týchto sladidiel negatívne vplyvajú na ľudské zdravie. Príkladom je výskum metabolizmu sukralózy. Podľa informácií potvrdených FDA, sukralóza sa vylučuje v nezmenenej forme stolicou [8]. Avšak, chromatogramy stolice z TLC po perorálnom podaní ^{14}C -sukralózy potkanom [9] a ľuďom [10], tento záver nepodporujú. Chromatogramy ukazovali aspoň dve rádioaktívne látky, ktoré boli obsiahnuté v stolici.

Predložená bakalárska práca bola zameraná na imobilizáciu látok so sladkou chuťou na nosičový systém, ktorý má vlastnosti vlákny. Bola študovaná stabilita vytvorených systémov vo fyziologickom prostredí. Hlavným cieľom bolo zabezpečiť, aby sa imobilizovaná látka z vhodného nosiča neuvolnila do prostredia, ale aby sa vylúčila v nezmenenej imobilizovanej forme. Tým by sa dalo zamedziť nedostatkom, na ktoré poukazujú vo svojich prácach J. Sims [9] a A. Roberts [10] pri metabolizme sukralózy.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Prehľad látok so sladkou chuťou

Látky so sladkou chuťou môžeme rozdeliť na sacharidy a sladidlá. Sacharidy sú ďalej delené na monosacharidy a disachridy. Sladidlá môžeme rozdeliť podľa pôvodu na prírodné a umelé alebo podľa nutričnej hodnoty na energetické a neenergetické.

2.2 Sacharidy

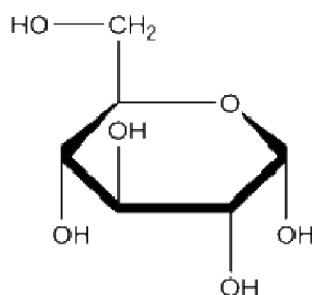
Sacharidy sú základnou zložkou všetkých živých organizmov a zároveň najrozšírenejšou skupinou organických látok. Poznanie štruktúry a vlastností sacharidov je nevyhnuté k porozumeniu ich úlohy v organizme. Sacharidy sú významným a najrýchlejším zdrojom energie. Denný príjem sacharidov potravou je u ľudí 300-500 g, ktoré organizmus dostáva najmä vo forme polysacharidov, akým je napríklad škrob, disacharidov, sacharózou a ostatnými monosacharidmi. Po chemickej stránke sú sacharidy polyhydroxyaldehydy, polyhydroxyketóny a polyhydroxyalkoholy, ktoré sa rozdeľujú na monosacharidy, oligosacharidy a polysacharidy [11].

2.2.1 Monosacharidy

Monosacharidy sú základnými stavebnými jednotkami všetkých zložitejších oligosacharidov a polysacharidov. Väčšinu monosacharidov označujeme ako cukry, kvôli ich sladkej chuti. Po chemickej stránke sú monosacharidy polyhydroxyaldehydy, nazývané aldózy, pretože obsahujú aldehydickú skupinu a polyhydroxyketóny, nazývané ketózy vďaka jej ketoskupine. Podľa počtu uhlíkov v reťazci delíme monosacharidy na triózy, tetrózy, pentózy, hexózy a heptózy [12].

2.2.1.1 Glukóza

Glukóza je zo skupiny aldohexóz. V čistom stave je glukóza biela, kryštalická látka sladkej chuti. Bežnou konformáciou v prírode je D-glukóza, ktorá stáča polarizované svetlo doprava, odtiaľ pochádza jej starý názov dextróza [13].



Obrázok č. 1: Glukóza

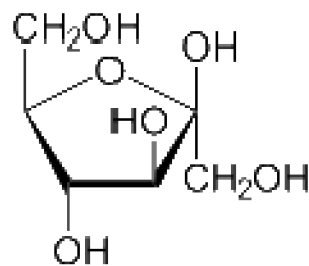
Čistá D-glukóza sa nachádza v rastlinách ako jeden z produktov fotosyntézy a predstavuje energetický zdroj pre rastliny. Hromadí sa predovšetkým v plodoch. Glukóza je podjednotkou rady prírodných oligosacharidov, akými sú maltóza, sacharóza, laktóza a iné, a polysacharidov, napríklad škrob a glykogén. D-glukóza je nevyhnutná pre ľudské telo. Je základným a najrýchlejším zdrojom energie pre všetky telesné tkanivá. Využitelná energia na 100 g glukózy činí 1 670 kJ. Koncentrácia D-glukózy v krvi sa nazýva glykémia [14].

D-glukóza sa pripravuje kryštalizáciou z rastlinných štiav, hlavne z viniča hroznorodého, avšak hlavnou metódou výroby je kyslá alebo enzýmová hydrolýza rastlinného škrobu. Taktiež sa z nej enzymaticky vyrába omnoho sladší monosacharid fruktóza, ktorá sa používa v potravinárskom priemysle [13].

2.2.1.2 Fruktóza

Fruktóza, tiež označená ako ovocný cukor, patrí do skupiny ketóz. Používajú sa tri hlavné formy produktov:

- kryštalická prášková fruktóza vysokej čistoty
- fruktózový sirup (HFCS – high-fructose corn syrup), je zmesou glukózy a fruktózy
- sacharóza, kde jeden monosacharid fruktózy je kovalentne viazaný na glukózu



Obrázok č. 2: Fruktóza

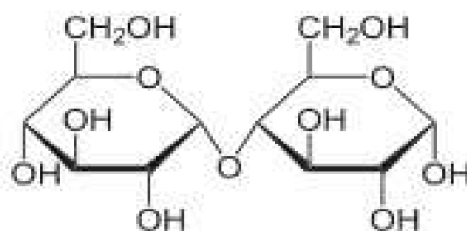
Fruktóza bola objavená ako štiepny produkt sacharózy a pretože stáča rovinu polarizovaného svetla doľava, bola kedysi nazývaná levulóza. Fruktóza sa používa v potravinárskom priemysle ako doplnok alebo substituent cukru (sacharózy), prípadne tiež alternatíva k sladidlám, napríklad aspartám alebo acesulfám [13].

2.2.2 Disacharidy

Disacharidy sú tvorené 2 jednotkami monosacharidov, ktoré sú navzájom spojené glykozidickou väzbou. Podľa typu glykozidickej väzby sa disacharidy ďalej delia na redukujúce a neredukujúce. Redukujúce disacharidy sú spojené glykozidickými väzbami na 1,4 a 1,6 koncoch. Majú redukčné účinky, a preto sa dajú dokázať Tollenovým a Fehlingovým činidlom, patria sem napríklad maltóza a laktóza. Neredukujúce disacharidy sú spojené glykozidickými väzbami na 1,1 a 1,2 koncoch. Na tvorbe týchto väzieb sa podieľajú obe poloacetálové skupiny, a preto nemajú redukčné účinky. K neredukujúcim cukrom patrí sacharóza [13].

2.2.2.1 Maltóza

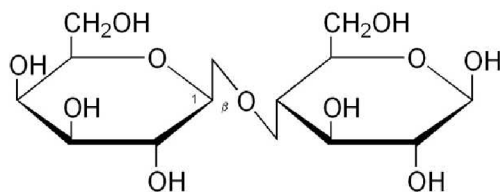
Maltóza, nazývaná tiež sladový cukor, je disacharid, ktorý je tvorený dvomi molekulami D-glukózy spojenými $\alpha(1\rightarrow4)$ väzbou. Uvoľňuje sa zo škrobu pri klíčení jačmeňa. Vzniká ako produkt pri rozklade škrobu amylázou pri trávení potravy v ústach [13].



Obrázok č. 3: Maltóza

2.2.2.2 Laktóza

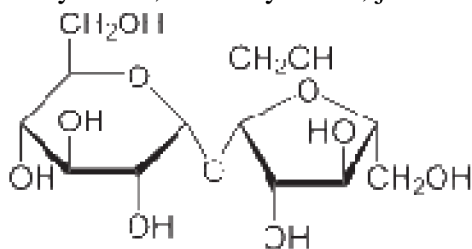
Laktóza, tiež nazývaná mliečny cukor, je disacharid tvorený z galaktózy a glukózy spojenými $\beta(1\rightarrow4)$ glykozidickou väzbou. Laktóza je obsiahnutá v mlieku cicavcov (kravskom – 4,8%, ľudskom – 6%). Laktóza je ľahko stráviteľná a je výborným zdrojom energie, ktorá je potrebná pre rast a normálne fungovanie organizmu [13].



Obrázok č. 4: Laktóza

2.2.2.3 Sacharóza

Sacharóza, tiež nazývaná ako repný cukor, je disacharid zložený z molekuly glukózy a fruktózy spojenými glykozidickou väzbou. Sacharóza v čistom stave je biela kryštalická látka sladkej chuti a dobre rozpustná vo vode. Rovinu polarizovaného svetla stáča doprava. Má výraznú sladkú chuť, a preto sa používa ako najbežnejšie sladidlo a taktiež slúži ako štandard na určenie relatívnej sladkosti [13]. Metabolickým spracovaním 1 gramu sacharózy sa uvoľní 16,7 kJ energie. Nadmerná konzumácia sacharózy je príčinou mnoho zdravotných problémov. Má vysoký glykemický index a má vplyv na sekréciu inzulínu, preto je veľmi nevhodná ako sladidlo pre diabetikov. Produkty sacharózy ktoré sa bežne používajú sú: hnedý cukor, kryštálový cukor, práškový cukor, kockový cukor, javorový sirup [15].



Obrázok č. 5: Sacharóza

2.3 Sladidlá

Sladidlá sa rozdeľujú podľa ich rôznych vlastností. Najviac používané a tiež praktické rozdelenie je podľa nutričnej hodnoty, ďalšie sú podľa pôvodu alebo chemickej štruktúry.

1. Podľa nutričnej hodnoty
 - Energetické – polyalkoholy, okrem erytritolu
 - Neenergetické – synteticky vyrobené
2. Podľa pôvodu
 - Prírodné – thaumatin, steviosid
 - Synteticky identické s prírodnými – polyalkoholy
 - Syntetické – sacharín, cyklamát
3. Podľa chemickej štruktúry
 - Proteíny, peptidy – thaumatin, aspartam
 - Halogénové disacharidy – sukralóza
 - Terpény – steviosid
 - Chalkóny – neohesperidín DC [16]

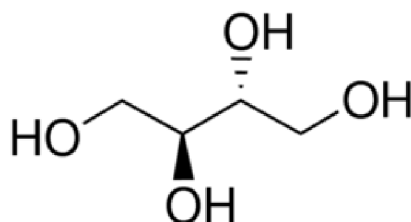
2.3.1 Energetické sladidlá

Cukrové alkoholy (polyoly alebo polyhydrické alkoholy) sú nízko stráviteľné sacharidy, ktoré sú získané substitúciou aldehydovej skupiny za hydroxylovú. Tiež nazývané alditoly, pretože sú produkované z ich odpovedajúcich aldózových cukrov. Spomedzi cukrových alkoholov, môžu byť spomenuté hydrogenizované monosacharidy (sorbitol, mannitol), hydrogenizované disacharidy (isomalt, maltitol, laktitol) a zmes hydrogenizovaných monosacharidov, disacharidov a oligosacharidov. Cukrové alkoholy sú zvyčajne označované za objemné sladidlá. Sú často kombinované s inými sladidlami kvôli dosiahnutiu požadovanej úrovne sladkosti a chuti. Podobne ako sacharidy, nie sú zodpovedné len za sladkú chuť, ale tiež za vzhľad produktu, zadržanie vlhkosti a chladivý účinok v ústach. Tieto zlúčeniny majú nižšiu nutričnú hodnotu ako cukry, v dôsledku pomalšej a neúplnej absorpcie z čreva. Konzumácia produktov, ktoré obsahujú polyoly, nespôsobuje zvýšenie glukózy v krvi a tiež vylúčenie inzulínu, z toho dôvodu sú odporúčané ľuďom s diabetom. Polyoly tiež pôsobia ako prebiotiká a nemajú kariogénne vlastnosti [17].

2.3.1.1 Erytritol

2.3.1.1.1 Vlastnosti

Systematický názov erytritolu je (2R,3S)-butan-1,2,3,4-tetraol. V malých množstvách sa nachádza v zelenine, ovocí, hubách, fermentovaných potravinách ako víno, pivo [18]. Erytritol sa vyznačuje minimálnou hygroskopicitou, termostabilitou a stabilitou v kyslom a zásaditom prostredí, nezúčastňuje sa Maillardových reakcií [19]. Dnes sa využíva v produktoch ako sú zmrzlina, nízkokalorické nápoje, žuvačky, pretože nemajú kariogénne vlastnosti. Erytritol inhibuje rast baktérie *Streptococcus mutans*, ktorá sa v ústnej dutine prichytáva na zuboch a vylučuje žieravú kyselinu. Toto prichytenie umožňuje sacharidový polymér, ktorý tvorí hlavnú súčasť zubného povlaku. Runnel a spol. počas troch rokov štúdie zistili, že spotreba cukríkov, ktoré obsahovali erytritol u detí od 7 do 8 rokov, malo za následok zníženie rastu zubného povlaku a nízku úroveň kyseliny octovej a propiónovej [20].



Obrázok č.6: Chemická štruktúra erytritolu

2.3.1.1.2 Metabolizmus

Podľa klinických štúdií, erytritol je dobre a rýchlo absorbovaný v tenkom čreve a následne vylúčený močom do 24 hodín. Vedľajšie účinky boli pozorované pri vysokej konzumácii erytritolu, a to viac ako 1000 mg/kg. Podľa smerníc Európskej únie je denná dávka stanovená na 2,4 kcal/g [21].

2.3.1.1.3 Produkcia

Erytritol nie je produkovaný priamou katalytickou dehydrogenáciou vzhľadom k vysokým nákladom na požadovaný substrát, erytrózu, v porovnaní s ostatnými polyolmi. Priemyselná výroba je založená na fermentačnom procese osmofilných kvasiniek *Moniliella pollinis* alebo *Trichosporonoides megachiliensis* [22].

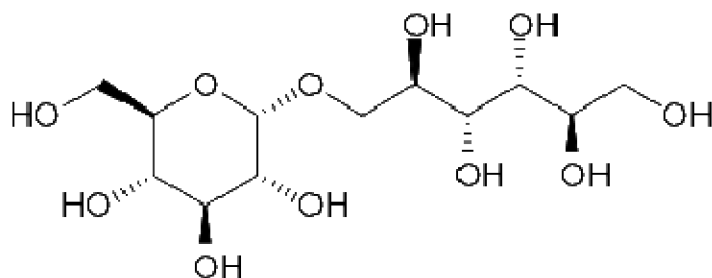
Tiež niektoré druhy baktérií mliečného kvasenia, napríklad *Oenococcus oeni*, *Leuconostoc mesenteroides* a *Lactobacillus sanfranciscensis* sú schopné tejto fermentácie [23]. Erytritol môže byť tiež produkovaný z glycerolu pomocou kmeňu *Yarrowia lipolytica* MK1 [24].

2.3.1.2 Isomalt

2.3.1.2.1 Vlastnosti

Isomalt je zmes dvoch disacharidových alkoholov: gluko-mannitolu (α -D-gluko-pyranosyl-1-6-mannitol) a gluko-sorbitolu (α -D-gluko-pyranosyl-1-6-sorbitol).

Isomalt je odolný voči strate sladkosti počas zahrievania, a tým môže byť použitý v produktoch, ktoré sú vystavené vysokým teplotám. Okrem toho, že vzhľadom pripomína cukor (biely, kryštalický, bez zápachu), je tiež mierne hygroskopický. V porovnaní s ostatnými polyolmi, nezanecháva chladivý účinok v ústach [25]. Taktiež nemá kariogénne vlastnosti a nezvyšuje hladinu glukózy v krvi. Podobne ako iné polyoly, produkty s isomaltom sú šetrné k zubom, a čo viac, zubné pasty obsahujúce isomalt zvyšujú remineralizáciu zubov [26].



Obrázok č. 7: Chemická štruktúra isomaltu

2.3.1.2.2 Metabolizmus

Absorpcia isomaltu je približne 10%. Zvyšná časť, 90 % sa fermentuje. Produkty bakteriálnej fermentácie sú mastné kyseliny s krátkym reťazcom, CO₂, CH₄ a H₂. Dodáva len polovičnú kalorickú hodnotu v porovnaní so sacharózou, a to vzhľadom k jeho čiastočnému tráveniu v črevách. Štúdie in vitro demonštrujú, že isomalt je vhodný zdroj butyrátu a zvyšuje rast bifidobaktérií, ktoré sú zodpovedné za prebiotický efekt.

2.3.1.2.3 Produkcia

Isomalt sa produkuje zo sacharózy v dvoch krokoch, ktoré spôsobia že je chemicky a enzymaticky stabilnejší ako sacharóza. Začína enzymatickou transglukozidáciou cukru na maltulózu, ktorá je následne hydrogenovaná na isomalt [27].

2.3.1.3 Laktitol

2.3.1.3.1 Vlastnosti

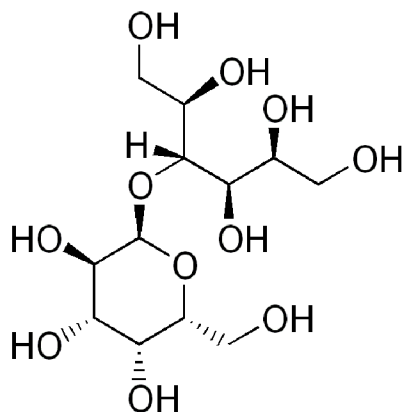
Laktitol charakterizuje čistá sladká chuť a sladivosť voči sacharóze je 40 %. Vyznačuje sa dobrou rozpustnosťou aj pri nízkych teplotách, nezúčastňuje sa Maillardovej reakcie a môže byť skladovaný dlhšiu dobu. Sladivosť laktitolu sa zvyšuje s jeho koncentráciou, avšak zanecháva chladivý účinok. Laktitol nie je hygroskopický, je stály za vysokých teplôt, ako aj v kyslých a zásaditých podmienkach. Laktitol má zanedbateľný efekt na hladinu glukózy v krvi. Podobne ako aj ostatné polyoly, laktitol pôsobí ako prebiotikum a podporuje rast prospešných baktérií, *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, v hrubom čreve [28].

2.3.1.3.2 Metabolizmus

Napriek tomu že je produkovaný z laktózy, nie je hydrolyzovaný laktázou, ale sa vyčlení z črevnej mikroflóry. Laktitol je metabolizovaný baktériou v hrubom čreve, kde je premenený na biomasu, CO₂, malé množstvá H₂ a organických kyselín.

2.3.1.3.3 Produkcia

Laktitol bol objavený v roku 1920 francúzskym chemikom, ale komerčne využívaným sa stal až v roku 1980. Laktitol je disacharid, ktorý je tvorený zo sorbitolu a galaktózy. Produkuje sa katalytickou hydrogenáciou z laktózy za použitia Raneyho niklu ako katalyzátora [28].

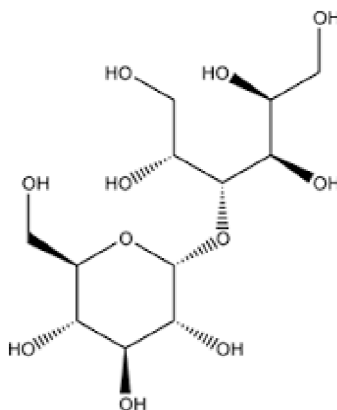


Obrázok č. 8: Chemická štruktúra laktitolu

2.3.1.4 Maltitol

2.3.1.4.1 Vlastnosti

Spomedzi polyolov, maltitol je najviac podobný sacharóze. Sladivosť voči sacharóze je 90 %. Maltitol taktiež nemá kariogénne vlastnosť. Nepodlieha karamelizácii a Maillardovej reakcii, chladivý účinok je zanedbateľný v porovnaní s ostatnými polyolmi. Vzhľadom k jeho nízkej hygroskopickite a stabilite vo vysokých teplotách sa používa v mnohých pekárenských výrobkoch [29].



Obrázok č. 9: Chemická štruktúra maltitolu

2.3.1.4.2 Metabolizmus

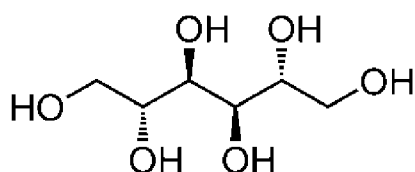
Absorpcia maltitolu je v rozmedzí od 5 do 80 %, ale musí predchádzať hydrolýze, ktorá vedie k vzniku glukózy a sorbitolu. Štiepi sa pomaly v tenkom čreve a neabsorbovaná časť prechádza hrubým črevom, kde podlieha bakteriálnej fermentácii.

2.3.1.4.3 Produkcia

Systematický názov maltitolu je 4-O- α -D-glukopyranosyl-D-glucitol. Maltitol je disacharid, ktorý pozostáva z glukózy a sorbitolu. Získava sa zo škrobu hydrogenáciou maltózy [29].

2.3.1.5 Mannitol

Mannitol je izomér sorbitolu. Je charakterizovaný sladivosťou 50 % voči sacharóze, má príjemnú chuť, je stabilný aj vo vysokých teplotách a je nehygroskopický. Často sa využíva vo farmaceutickom priemysle, taktiež v potravinárskom priemysle. Je známym antioxidantom, navyše pohlcuje hydroxylové radikály a tvrdí sa, že pôsobí proti vzniku rakoviny hrubého čreva. Vdychovanie mannitolu pomáha proti hlienom a na astmatický kašeľ [30].



Obrázok č. 10: Chemická štruktúra mannitolu

2.3.1.5.1 Metabolizmus

Mannitol nepodlieha metabolizmu u ľudí, nevyvoláva hyperglykémiu a glykemický a inzulínový index je nulový.

2.3.1.5.2 Produkcia

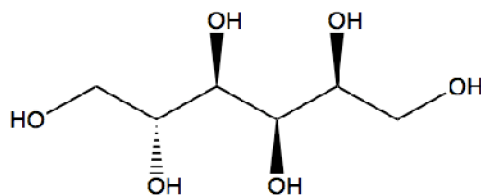
Produkcia je založená na katalytickej hydrogenácií zmesi glukózy, fruktózy v pomere 1:1, obdĺžanej z cukru alebo škrobu, za vysokej teploty a tlaku [30].

2.3.1.6 Sorbitol

2.3.1.6.1 Vlastnosti

Sladidlo bolo objavené v roku 1872 francúzskym chemikom v plodoch jaseňa. Po stránke chemickej, ide o alkohol nazývaný D-glucitol. Vyskytuje sa pod názvami ako sorbitol, sorbit či sorbitolový sirup.

Sladivosť sorbitolu voči sacharóze je 60 %. Podobne ako xylitol a erytritol, sorbitol zanecháva chladivý účinok v ústach. Napriek tomu že sa využíva ako sladidlo, je tiež vynikajúci zvlhčovač, zmäkčovadlo a proti kryštalizujúce činidlo. Má veľkú nevýhodu, je vysoko hygroskopický. Tento polyol je chemicky inertný a stabilný aj vo vysokých teplotách a nepodlieha Maillardovej reakcii. Tiež je známy vďaka tomu, že nemá kariogénne vlastnosti. Svoje uplatnenie nachádza aj vo farmaceutickom a kozmetickom priemysle. Sorbitol je tiež prekurzorom produkcie vitamínu C [31].



Obrázok č. 11: Chemická štruktúra sorbitolu

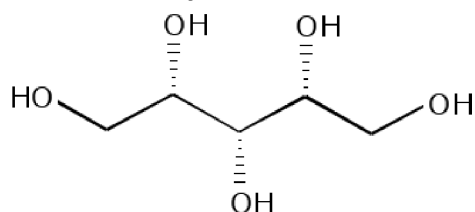
2.3.1.6.2 Produkcia

Sorbitol sa produkuje katalytickou hydorgenáciou glukózy alebo sacharózy, za použitia Raneyho niklu ako katalyzátora. Napriek tomu, že je známych niekoľko premyslených procesov na výrobu sorbitolu, len pár mikroorganizmov zahrňujúcich tri kmene kvasiniek a baktérií, ako *Zymomonas mobilis* a *Candida boidini*, je potenciálnych na výrobu sorbitolu [31].

2.3.1.7 Xylitol

2.3.1.7.1 Vlastnosti

Xylitol je najsladší spomedzi ostatných cukrových alkoholov. Má rovnakú sladivosť aj objemnosť ako sacharóza. Xylitol je veľmi často využívaný v biomedicínskych aplikáciách. Hrá významnú rolu pri znížení tvorby zubných povlakov a inhibuje rast a metabolizmus baktérií *Streptococcus mutans* a *Streptococcus sorbinus*, ktoré sú zodpovedné za vznik zubného kazu. Existuje niekoľko klinických štúdií, podľa ktorých denné užívanie malého množstva xylitolu významne znižuje tvorbu zubného kazu [32]. Xylitol zvyšuje v ústach hodnotu pH, tým sa komplexuje s vápenatým iónom, ktorý hrá významnú úlohu pri zubnej remineralizácii. Xylitol sa tiež správa ako statherin, čo je polypeptid, ktorý poskytuje ochranné a stabilizované prostredie v ústnej dutine.



Obrázok č. 12: Chemická štruktúra xylitolu

2.3.1.7.2 Metabolizmus

Xylitol je približne 50 % absorbovaný v malých množstvách. Môže byť metabolizovaný priamo v pečeni alebo nepriamo fermentáciou črevnou flórou. Tolerancia xylitolu je 100 g/deň.

2.3.1.7.3 Produkcia

Hlavným produktom na produkciu je xylan, ktorý sa najčastejšie získava z brezy. Podobne ako ostatné cukrové alkoholy, xylitol je produkovaný katalytickou hydrogenáciou odpovedajúceho cukru [32].

2.3.2 Neenergetické sladidlá

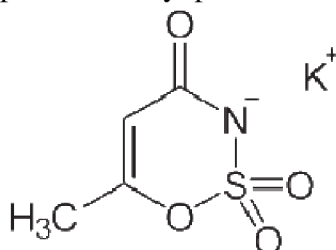
Neenergetické sladidlá sú potravinárske prídavné látky, ktoré dodávajú potravine veľmi malé množstvo energie alebo žiadne. Do tejto skupiny radíme látky synteticky vyrobené, ale aj látky prírodné, ku ktorým patria steviosid, thaumatín, tagatóza, trehalóza. Rovnako ako energetické sladidlá, cukrové alkoholy, nemajú kariogénnu vlastnosť. Sú to látky s horkou chuťou, avšak táto nevýhoda sa potláča kombináciou s niektorým energetickým sladidlom [33].

2.3.2.1 Acesulfám K

2.3.2.1.1 Vlastnosti

Acesulfám K bol objavený v roku 1967 vo firme Hoechst (teraz Nutrinova) [6]. Je to draselná soľ 6-methyl-1,2,3-axathiazin-4(3H)-on 2,2dioxidu.

Sladidlo je biely, kryštalický prášok, približne 120krát sladšie ako sacharóza a s vyššou rozpustnosťou. Acesulfám K je tepelne stabilný, preto sa často využíva vo varení a pečení.



Obrázok č. 13: Chemická štruktúra acesulfámu K

2.3.2.1.2 Metabolizmus

Acesulfám K nie je metabolizovaný v ľudskom tele, čo neposkytuje žiadne kalórie a draslík obsiahnutý v sladidle nemá žiadny vplyv. Jeden produkt získaný rozpadom acesulfámu K je acetoacetamid, ktorý je známy ako toxický, pokiaľ sa konzumuje vo veľkých množstvách [34].

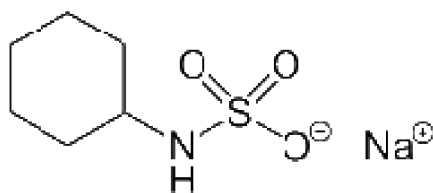
2.3.2.1.3 Syntéza

Prvé metódy na syntézu acesulfámu K využívali chlorosulfonyl alebo fluorosulfonyl izokyanát s propínom a acetónom a s ďalšími chemikáliami, ktoré cyklizovali hydroxidom draselným za vzniku acesulfámu K. Alternatívne metódy zahŕňali úpravu acetoacetamidom s menej dvomi ekvivalentmi oxidu sírového. To malo za následok tvorbu N-sulfoacetoacetamidu, ktorý bol potom dehydratovaný oxidom sírovým a neutralizovaný s hydroxidom draselným za vzniku acesulfámu K [34].

2.3.2.2 Cyklamát

2.3.2.2.1 Vlastnosti

Cyklamát bol objavený v roku 1937 [4]. Je to soľ cyklohexylsulfámovej kyseliny. Sladivosť má 30 krát vyššiu voči sacharóze, má horkú chuť, avšak sa dobre kombinuje so sacharínom. Je dobre rozpustný vo vode a rozpustnosť sa zvyšuje prípravou sodnej alebo vápenatej soli.



Obrázok č. 14: Chemická štruktúra cyklamátu sodného

2.3.2.2.2 Metabolizmus

Cyklamát vykazuje veľmi nízku toxicitu avšak je metabolizovaný črevnými baktériami na cyklohexanylamín, ktorý vykazuje vyššiu toxicitu. Vedecký výskum metabolizmu cyklamátu stále prebieha. Nedávne štúdie poskytli nové informácie o rozsahu, v akom jednotlivci prevádzajú cyklamát na cyklohexylamín počas dlhodobej spotreby [33].

2.3.2.2.3 Syntéza

Proces začína s rafináciou trisacharidov, pokračuje následnou chloráciou za vzniku tetrachlororafinózy (TTR). TTR podlieha enzymatickému štiepeniu galaktozidázou na 6-chloro-6-deoxygalaktozylóvané podiely a následne sa získava cyklamát. Existujú ďalšie dve metódy na syntézu sacharínu, sú to bioorganické syntézy a regioselektívne deacylácie [33].

2.3.2.3 Sacharín

2.3.2.3.1 Vlastnosti

Sacharín bol objavený Remsonom a Fahlbergom v roku 1878 [3]. Je to nekalorické sladidlo so systematickým názvom 1,2-benzoisothiazol-3-(2H)on 1,1-dioxid. Sacharín má nepríjemnú horkú alebo kovovú chuť. Ako ostatné sladidlá z tejto skupiny, aj sacharín je málo rozpustný vo vode, ako sladidlo sa väčšinou používa sodná alebo vápenatá soľ. Obidve soli sú veľmi rozpustné vo vode. Sladivosť má 300krát vyššiu v porovnaní so sacharózou [33].



Obrázok č. 15: Chemická štruktúra sacharínu

2.3.2.3.2 Metabolizmus

FDA sa snažila v roku 1977 sacharín zakázať, pretože výskumy na zvieratách ukázali, že spôsobuje najmä rakovinu močového mechúra u myší. Od vtedy bolo vykonaných mnoho štúdií. Avšak žiadna štúdia nedokázala jasnú súvislosť medzi sacharínom a potenciálnym zdravotným rizikom. Sacharín je v súčasnej dobe povolený, avšak sa požaduje, aby produkt mal uvedené množstvo použitého sacharínu [33].

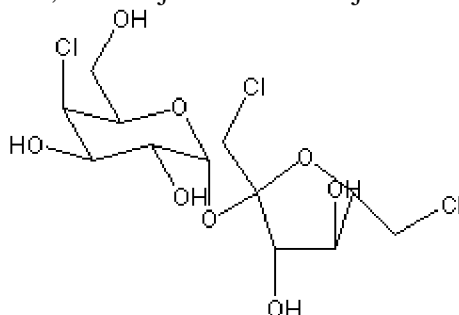
2.3.2.3.3 Syntéza

Chemická syntéza sacharínu zahŕňa oxidáciu o-toulénsulfonamidu s činidlami ako manganistan draselný, elektrochemicky s chrómovou kyselinou na odpovedajúcu karboxylovú kyselinu. Orto- izomér je následne dehydratovaný za vzniku sacharínu. Ďalší proces zahŕňa diazotáciu methylantranilátu a následné pôsobenie diazóniovou soľou s oxidom siričitým a Cl₂ za vzniku sulfonylchloridu, ktorý je potom spracovávaný s amoniakom za vzniku sacharínu [33].

2.3.2.4 Sukralóza

2.3.2.4.1 Vlastnosti

Sukralóza bola objavená v roku 1976 [7]. Sladivosť je 450-650krát vyššia oproti sacharóze. Vyznačuje sa vysokou rozpustnosťou vo vode a je stabilná v širokej oblasti pH a teploty. Ak je skladovaná pri vysokej teplote, uvoľňuje HCl a sfarbuje sa.



Obrázok č. 16: Chemická štruktúra sukralózy

2.3.2.4.2 Metabolizmus

Napriek tomu že je sukralóza vyrábaná z cukru, ľudské telo by ju nemalo rozpoznávať ako cukor a metabolizovať ju. Avšak, ako bolo už zmienené, niektoré práce uvádzajú opak [9, 10].

2.3.2.4.3 Syntéza

Syntéza sukralózy zahŕňa niekoľko selektívnych ochranných krokov, takže štvrtá hydroxylová skupina je pretvorená na atóm chlóru s inverziou konfigurácie. Voľné hydroxylové skupiny sú upravené sulfurylchloridom za vzniku trichlorodisacharidu, následne prebieha odstránenie ochranných skupín a vzniká sukralóza [33].

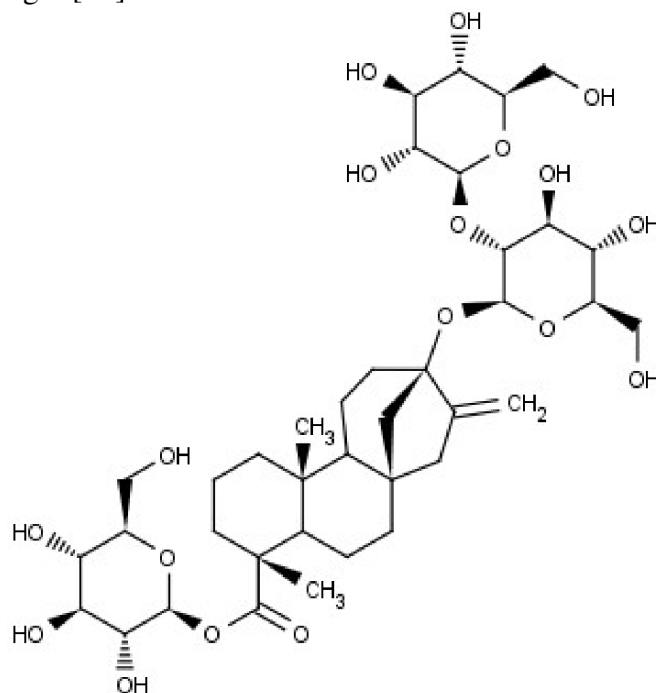
2.3.2.5 Steviosid

2.3.2.5.1 Vlastnosti

Sladidlo je získavané z lístkov *Stevia rebaudiana*. V roku 1931 francúzski chemici izolovali stéviové glykozidy, ktoré sú stabilné ako pri vysokej teplote tak pri zmene pH, čím ju robia vhodnou na pečenie a varenie. Sladivosť voči sacharóze ma 20-300krát vyššiu.

2.3.2.5.2 Metabolizmus

V ľudskom tele neprebieha metabolizmus týchto sladkých glykozidov, tým nedodáva do organizmu žiadnu energiu [33].



Obrázok č. 17: Chemická štruktúra seviosidu

2.3.3 Náhradné sladidlá povolené na území EU a ostatných

Celosvetová spotreba náhradných sladidiel stúpa (tabuľka 1). Európska únia povoľuje a reguluje obsah náhradných sladidiel v potravinách. V súčasnej dobe je medzi prídavnými látkami registrovaných 16 náhradných sladidiel (tabuľka 2 a 3). Rada sladidiel bežne používaných na iných územiach doposiaľ nieje pre európske trhy povolená. Medzi nimi patria napríklad, rebaudiozid A, tagatóza (NutraLose), trehalóza, alitman, brazeín, glycyrrhizín alebo mogrozidy (Luo Han Guo, Nectresse) [34].

Tabuľka č. 1: Celosvetová spotreba nízkokalorických sladidiel

| Sladidlo | Spotreba vyjadrená ako náhrada sacharózy (mil. t) | | |
|----------|---|------|------|
| | 1985 | 1995 | 2005 |
| Sacharín | 5,3 | 8,1 | 11 |
| Aspartám | 1,2 | 2,2 | 4,1 |
| Cyklamát | 0,5 | 0,5 | 1,3 |
| Ostatné | 0,005 | 0,3 | 0,5 |

Tabuľka č. 2: Nízkokalorické sladidlá povolené v EU

| Sladidlo | Obchodný názov | Sladivosť ² v porovnaní so sacharózou | ADI ¹ |
|--------------------|--|--|------------------|
| Acesulfám K | Sunett, Sweet One | 200 | 9 |
| Aspartám | Nutrasweet, Equal | 180-200 | 40 |
| Cyklamát | Clio, Kandisin | 30 | 7 |
| Sacharín | Dukaril, Spolarin Sweet 'n low, Sweet twin | 300-500 | 5 |
| Sukralóza | Splenda | 600 | 15 |
| Thaumatín | Talin | 2000-3000 | nestanovené |
| Steviol-glykosid | | 200-300 | 4 |
| Neotam | | 7000-13000 | 2 |
| Aspartám-acesulfám | Twinsweet | 350 | 9 |

¹mg/den kg telesnej hmotnosti

Tabuľka č. 3: Objemové sladidlá povolené v EU

| Sladidlo | Obchodný názov | Sladivosť ² v porovnaní so sacharózou |
|--|---------------------|--|
| Sorbitol a sorbitolový sirup | Glucitol, Dulcin | 0,5-1 |
| Mannitol | | 0,5-0,7 |
| Isomalt | Palatinit | 0,5 |
| Maltitol a maltitolový sirup | | 0,9-1 |
| Laktitol | Galaktosyl-glucitol | 0,5 |
| Xylitol | Birch sugar | 1 |
| Erythritol | | 0,6-0,8 |
| Kukuričný sirup s vysokým obsahom fruktózy | HFSC | 1 |

2.4 Nosičové systémy

Nosičové systémy volíme podľa požiadavkou na spôsob uvoľňovania aktívnej látky, stabilitu, cenu a aplikáciu. Vhodnými nosičovými systémami pre sladidlá sú sacharidy, ktoré sú nestráviteľné. Medzi takéto látky radíme polyméry, ktoré sa správajú ako potravinová vlákna. Pojem potravinová vlákna sa začal používať od roku 1953 a zahŕňal celulózu, hemicelulózu a lignín.

Vlákna je významnou zložkou potravy, pretože je odolná voči hydrolýze tráviacimi šťavami a absorpcii v ľudskom tenkom čreve a kompletnej alebo čiastočnej fermentácii v hrubom čreve. Na ľudský organizmus teda pôsobí veľmi priaznivo.

V porovnaní s nosičovými systémami volenými na aplikáciu vo farmácii, potravinársky priemysel kladie na materiály vyššie požiadavky. Použiteľné sú len materiály, ktoré nesú označenie GRAS – všeobecne považované za bezpečné („Generally Recognized As Safe“), Technologický proces musí spĺňať požiadavky EFSA (Európsky úrad pre bezpečnosť potravín, European Food Safety Authority) alebo FDA (Úrad pre kontrolu potravín a liečiv, Food Drug Administration), ktoré platia v EU alebo USA [45].

2.4.1 Celulóza

Celulóza je najviac vyskytujúci sa polysacharid v prírode. Je hlavnou zložkou bunkových stien mnoho rastlín, a preto je súčasťou ovocia, zeleniny a obilia. Celulóza je lineárny nerozvetvený polysacharid, pozostávajúci z viac ako 10 000 D-anhydro-glukopyranózových stavebných jednotiek viazaných β -(1 \rightarrow 4)-glukozidickými väzbami. Ide o spojenie C1 uhlíka predchádzajúcej jednotky s C4 uhlíkom nasledujúcej, prostredníctvom kyslíkového atómu. Lineárne molekuly sú usporiadané tesne vedľa seba, čím vytvárajú dlhé vlákno, ktoré je nerozpustné vo vode a je odolné voči tráveniu [35].

2.4.2 Hemicelulóza

Podobne ako celulóza, hemicelulóza je tiež súčasťou polysacharidu, ktorý je hlavnou zložkou rastlinných bunkových stien. Avšak na rozdiel od celulózy, hemicelulóza má monoméru jednotku inú ako je glukóza. Hemicelulóza je lineárna, rozvetvená molekula, menšia ako celulóza, všeobecne obsahuje 50-200 pentózových jednotiek (xylózu a arabinózu) a hexózových jednotiek (glukózu, galaktózu, mannózu, rhamnózu, glukurónovú a galakturónovú kyselinu). Názov hemicelulóza preto popisuje heterogénnu skupinu chemických štruktúr [35].

2.4.3 Pektíny

Pektíny sú polysacharidy, ktoré sa nachádzajú v stenách rastlinných buniek, tiež vo vrchnej časti kože a v kôre ovocia a zeleniny. Pektíny sú z väčšej časti tvorené z reťazcov galakturónovej kyseliny, ktorá sa s trieda s jednotkami rhamnózy a sú vetvené pentózovými a hexózovými jednotkami. Pektíny sú rozpustné v horúcej vode za vzniku gélov. Pektín má vlastnosť znižovať cholesterol, vďaka jeho schopnosti tvoriť gél [35].

2.4.4 Hydrokoloidy

Hydrokoloidy sú zmesi viskózných polysacharidov. Používajú sa ako gélová hmota, zahusťovadlo, stabilizátor a emulgátor v potravinárskych výrobkoch. Hydrokoloidy sú podobne ako pektíny látky znižujúce hladinu cholesterolu [35].

2.4.5 β -glukány

β -glukány sú polyméry glukózy. Sú hlavnou zložkou bunkových stien v ovse, jačmenných zrnách. Sú významným zdrojom rozpustnej vlákniny, vďaka ich pozitívnemu efektu na zníženie inzulínu, glukózy a cholesterolu v krvi [35].

2.4.6 Syntetické polysacharidy

Do tejto skupiny patria nestráviteľné zlúčeniny ako napríklad metylcelulóza (MC) a hydroxypropylmetylcelulóza (HPMC). Polydextróza je nestráviteľný polymér, ktorý je syntetizovaný z glukózy a sorbitolu, za použitia organickej kyseliny (kyseliny citrónovej) ako katalyzátora. Tieto dextríny majú potvrdený prebiotický efekt [35].

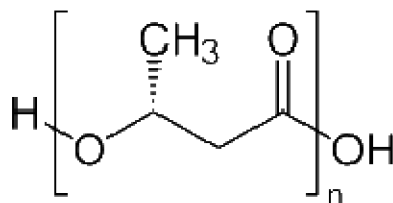
2.4.7 Ďalšie materiály

2.4.7.1 PHB – polyhydroxybutyrát

Poly(3-hydroxybutyrát) (PHB) bol prvým objaveným a zároveň najjednoduchším polyhydroxyalkanoátom (PHA). Polyhydroxybutyrát bol objavený Lemoignonom v rokoch 1923-1927 ako produkt biosyntézy určitých druhov baktérií (*Bacillus magaterium*, *Alcaligenes eutrophus*, *Pseudomonas oleovorans*).

Vysokomolekulový PHB je lineárny polyester, ktorého makromolekula je tvorená opticky aktívnymi jednotkami kyseliny D(-)-3-hydroxybutánovej. Vyskytuje sa v závitnicovej konformácii. Vzhľadom na semikryštalický charakter a podobnosť mechanických vlastností je biologicky syntetizovaný PHB najčastejšie porovnávaný so syntetickým izotaktickým polypropylénom (iPP).

Z dôvodu vysokej biokompatibility materiálov na báze PHB je ich možné využitie zamerané predovšetkým do oblasti humánnej medicíny a farmakológie. Používa sa ako materiál na imobilizáciu zlúčenín, pretože tieto zlúčeniny pôsobia v matrici trvalo a ich uvoľňovanie je možné regulovať [36].



Obrázok č. 18: Chemická štruktúra PHB

2.4.7.2 Alginát

Alginát je označenie pre soľ kyseliny alginovej. Zdrojom týchto látok sú morské hnedé riasy čeľade *Phaeophyceae*. Medzi hlavné zdroje patria *Macrocystis pyrifera* alebo *Laminaria hyperborea*. Alginát sa však dá získať aj mikrobiálnou cestou. Z produkčných mikroorganizmov sú to *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescenc* a *Azotobacter vinelandii* [37].

Alginát predstavuje nevetvený lineárny kopolymér zložený z β -D-manurónovej kyseliny a α -L-glukorónovej kyseliny. Spomínané jednotky sú spojené glykozidickými väzbami β (1 \rightarrow 4). Obe kyseliny sú v reťazci usporiadané v jednotlivých blokoch a pomer týchto kyselín determinuje jeho technologické vlastnosti. Algináty alkalických kovov, rovnako ako amonné soli sú rozpustné, vápenaté však nerozpustné nie sú.

Alginát sa využíva v potravinárstve ako emulgátor, stabilizátor a zahusťovadlo. Ako želírovacie činidlo sa používajú pri výrobe pudingov a želé [37].

2.4.7.3 Chitosan

Chitosan je hlavnou stavebnou zložkou polysacharidových schránok hmyzu, kôrovcov a stavovcov. Tiež sa vyskytuje v hubách, riasach, baktériách a kvasinkách [38].

Chitosan je kladne nabitý polysacharid, ktorý vzniká deacetyláciou chitínu. Chitosan je po chemickej stránke kopolymér N-acetylglukozamínových a glukozamínových jednotiek viazaných β -(1 \rightarrow 4) glykozidickými väzbami. Chitosan je nerozpustný v organických zlúčeninách a v kyselinách, naopak sa rozpúšťa v alkalickom a neutrálnom roztoku. Molekuly chitosanu obsahujú kladné náboje a v prítomnosti záporných nábojov dochádza ku koagulácií. V prítomnosti kovov dochádza k tvorbe komplexov.

Pre človeka je chitosan nestráviteľný, výrazne znižuje hladinu cholesterolu a tukov v pečeni a v krvnom sére. Je veľmi využívaný vo farmácii, ale tiež pre svoje vlastnosti ako emulgátor, stabilizátor, zahusťovadlo a želujúci prostriedok [38].

2.4.7.4 Škrob

Škrob predstavuje hlavného zástupcu polysacharidov rastlín. Po chemickej stránke sa škrob skladá z dvoch hlavných jednotiek homopolysacharidov – vetveného amylopektínu a lineárnej amylozy. V amyloze sú jednotky glukózy viazané pomocou α -(1 \rightarrow 6) väzby. Molekulová hmotnosť škrobu závisí na stupni polymerizácie a pohybuje sa u amylozy medzi 200-1 000 kDa a 10-200 MDa u amylopektínu.

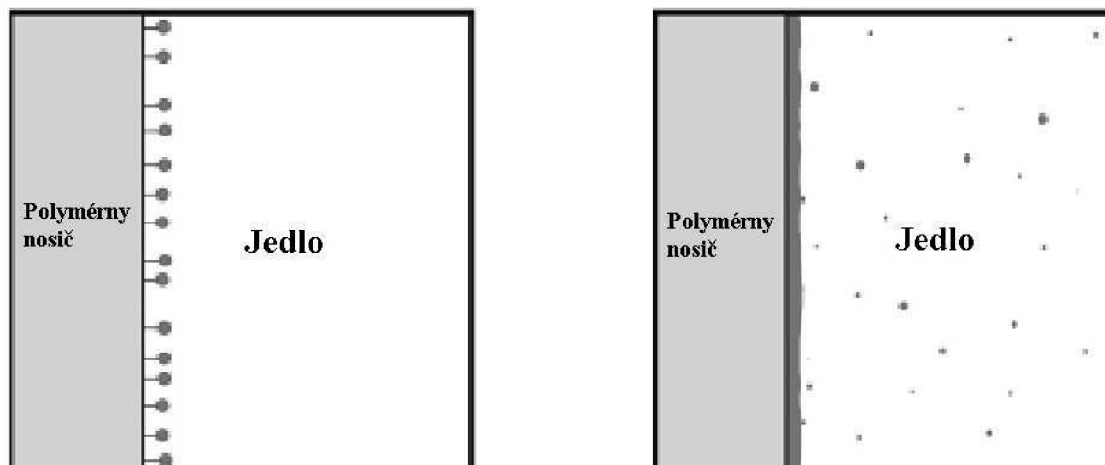
Zdrojom škrobu sú obilniny, zemiaky, strukoviny. Škrob sa z nich získava rozomletím a premývaním. Škrob je súčasťou potravín, či už vo svojej pôvodnej forme alebo modifikovanej. Medzi jeho vlastnosti patrí želírovanie, stabilita [39].

2.5 Bioaktívne nosičové systémy

V posledných rokoch stále rastie záujem o nové biomateriály, kvôli ich novým biologickým vlastnostiam. Bioaktívne polyméry sú materiály zložené zo syntetických alebo prírodných polymérov so zabudovanou bioaktívnou látkou, ktorá vyvolá špecifickú odpoveď.

Bioaktívne polymérne systémy delíme na:

- Pohyblivé bioaktívne polyméry
- Nepohyblivé bioaktívne polyméry [40]



Obrázok č. 19: Návrh nepohyblivých a pohyblivých aktívnych polymérov [40]

2.5.1 Pohyblivé bioaktívne polyméry

V tomto type nosičových systémov sa bioaktívna látka uvoľňuje z polymérnej látky. Priama inkorporácia umožňuje migráciu bioaktívnych látok z nosiča. Najčastejšie sa tieto systémy používajú vo farmaceutickom priemysle, pri cielej distribúcii a uvoľňovaní liečiv.

2.5.2 Nepohyblivé bioaktívne polyméry

Nepohyblivé nosičové systémy sú definované ako polyméry s bioaktívnou zložkou, ktorá je pevne naviazaná na polymérny reťazec. Tým sa aktívna zložka stáva imobilnou. V potravinárstve nachádzajú tieto nosičové systémy jedinečné výhody:

- Nepohyblivé systémy vyžadujú len veľmi malé množstvá aktívnych látok
- Môžu sa kombinovať s aktívnymi látkami, ktoré nie sú povolené ako potravinárske prídavné látky, vďaka ich neschopnosti uvoľniť sa z nosiča
- Tento systém je vhodný pre tekuté potraviny

Nosičové systémy delíme na dve skupiny

- Inherentné bioaktívne polyméry
- Polyméry s imobilizovanými bioaktívnymi látkami [40].

2.5.2.1 Inherentné bioaktívne polyméry

Polyméry, ktoré patria do tejto skupiny sú prírodné a aktívne bez pridania ďalších látok. Množstvo polymérov vykazuje antimikrobiálne vlastnosti. Túto skupinu polymérov zastupujú chitosan a polyamid upravený UV žiarením [40].

2.5.2.2 Imobilizácia bioaktívnych látok

Podľa IUPAC je imobilizácia technika používaná na fyzikálnu alebo chemickú fixáciu buniek, organel, enzýmov, makromolekúl (sacharidy, peptidy) na pevný povrch, alebo sú látky zadržané membránou za účelom zvýšenia ich stability a umožnenia ich opakovaného alebo kontinuálneho používania.

Kovalentná imobilizácia zohráva významnú úlohu pri poskytovaní stabilnej väzby medzi bioaktívnou látkou a povrchom polyméru. Takto vytvorený nosičový systém neuvolní aktívnu látku do potravín, a tým táto látka nevyžaduje schválenie ako potravinová prídavná látka [40].

V niektorých prípadoch je však nutná aktivácia polyméru, kvôli vytvoreniu reaktívnych funkčných skupín, ktoré poskytnú reakčné centrá. Jedna z možností aktivácie polyméru je

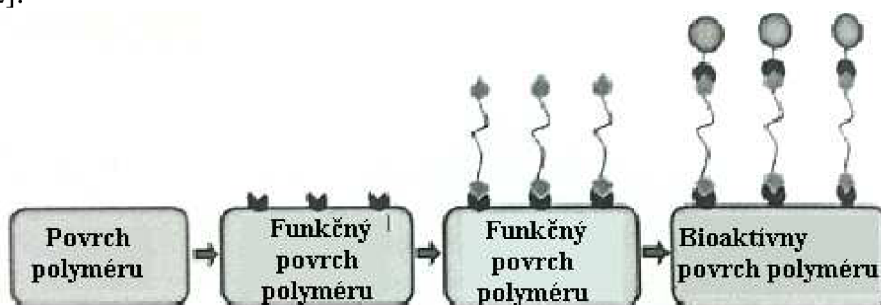
funkcionalizácia povrchu polyméru (chemická úprava, fyzikálna úprava, úprava povrchu plazmou) [41].

2.5.2.2.1 Funkcionalizácia polyméru

Inertné polyméry vyžadujú funkcionalizáciu povrchu, aby dokázali na seba fixovať bioaktívnu látku. Literatúra o spracovaní polymérov uvádza len niekoľko príkladov. Jednou z najjednoduchších metód je chemická oxidácia povrchu polyméru. Príkladom je použitie koncentrovanej kyseliny chrómovej v prostredí kyseliny sírovej, ďalej použitie chlórnanu draselného v koncentrovanej kyseline sírovej. Chemická oxidácia predstavuje modifikáciu rôznych karbonylových skupín, prevažne sú modifikované karboxylové kyseliny, aldehydy, ketóny [27].

Chemické modifikácie majú početné problémy v oblasti bezpečnosti a ochrany životného prostredia, ktoré obmedzujú ich komerčné používanie. Viac využívanými technikami sú preto fyzikálne modifikácie ako modifikácia plameňom alebo korónový výboj (niekedy tiež vzdušné plazma).

Na korónový výboj je potrebná aplikácia vysokého napätia (10-40 kV) na vysokej frekvencii (1-4 kHz), medzi elektródou, ktorá spôsobí výboj a uzemneného nosiča polyméru. Tieto metódy vyžadujú špecializované prístroje. Nevýhodami týchto metód je nepresnosť vytvorenia reakčných centier na povrchu polyméru a tiež požiadavky na špecializované prístroje [42].



Obrázok č. 20: Funkcionalizácia povrchu polyméru [42]

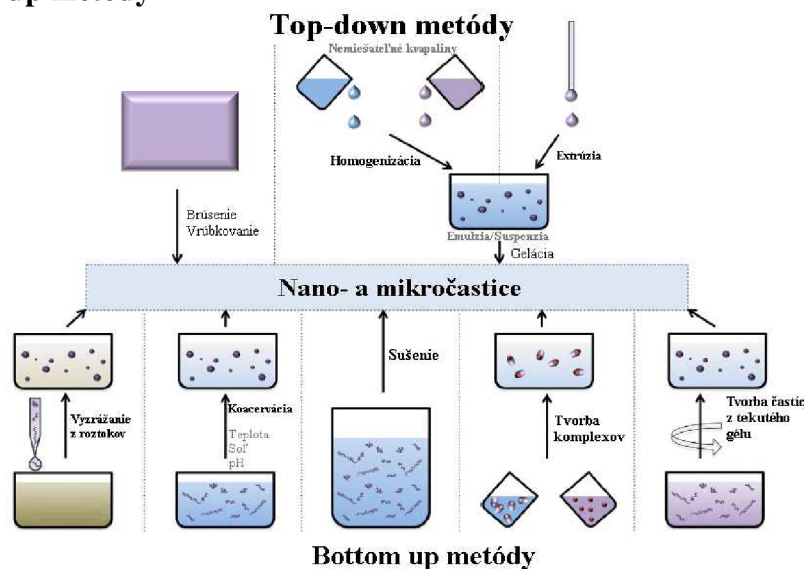
2.6 Návrh nosičových systémov v potravinárstve

Nanoštruktúrne systémy môžu byť v princípe vyrábané dvomi spôsobmi, postupom označovaným „top-down“ (zhora dole), alebo opačným postupom, „bottom-up“ (zdola hore). Prvý spôsob sa označuje ako fyzikálny alebo rozkladný, druhý postup býva označený ako chemický alebo syntetický. Spoločnou snahou oboch postupov je kontrolovane vytvárať nanočastice a nanoštruktúry rovnakého tvaru a veľkosti [43].

2.6.1 Top-down metódy

V prípade výrobného postupu „top-down“ do nanosveta prenikáme z makrosveta. Bežne používanými postupmi techniky „top-down“ sú vrúbkovanie, homogenizácia, ktoré zahŕňajú rozbitie objemných pevných látok alebo tekutín na malé častice. Tieto postupy závisia od rušivých síl: ťah, zrážka, stláčanie. Metódy, ako sú brúsenie a vrúbkovanie, nie sú vhodné pre citlivé bioaktívne látky, pretože vyžadujú veľké množstvá materiálu a môžu degradovať pôsobením vysokého tlaku. Iná, často využívaná metóda je extrúzia, kde sa častice tvoria injektovaním roztoku biopolyméru do prostredia gélu [43].

2.6.2 Bottom-up metódy



Obrázok č. 21: Top-down a bottom-up metódy prípravy nanočastíc [42]

Druhý výrobný postup, „bottom-up“, sa začína stavbou funkčného nanoštruktúrneho celku u najmenších častíc hmoty, tj. u jednotlivých atómov a molekúl, ktoré tvoria ďalší komplikovanejší systém. Bottom-up metódy využívajú kontrolované chemické reakcie, a to zmenami pH, iónovej sily, teploty, koncentrácií. Príkladmi sú vyzrážanie častíc z roztokov, koacervácia, komplexácia, tvorba tekutého gélu. Často sa tiež využíva prirodzená schopnosť jednotlivých zložiek vzájomne sa rozpoznávať, štruktúrovať, zostavovať sa a samoorganizovať [43].

2.6.2.1 Koacervácia

Táto metóda využíva biodegradateľné hydrofilné polyméry (napríklad, chitosan, alginát sodný, želatína). Je založená na schopnosti zosietenia polyelektrolytov v prítomnosti záporne nabitého činidla za vzniku nanočastíc. Táto metóda tiež zahŕňa reakciu buď kladne alebo záporne nabitého polyméru za prídavku polykatiónu, napríklad CaCl_2 alebo polyaniónového roztoku, napr. tripolyfosfátu sodného. Následne je pridaný druhý polymér, ktorý podporuje polyelektrolytovú komplexáciu na báze elektrostatických interakcií. Bioaktívna zložka je zachytená na povrchu prvého polyméru a stabilizovaná druhým polymérom. Polyelektrolytový roztok a bioaktívna zložka sú pridávané po kvapkách do roztoku buď polykatiónu alebo polyaniónu, za miešania na magnetickom miešadle [44].

2.6.2.2 Polymerizácia

Medzi hlavné metódy prípravy nanočastíc pomocou polymerizácie patria klasická polymerizácia alebo polyreakcia, emulzná polymerizácia a disperzná polymerizácia.

Emulzná polymerizácia zahŕňa emulzifikáciu hydrofóbného polyméru vo vode, na základe emulzie olej-voda. Takto vzniká veľké rozhranie olej-voda a vytvoria sa jadrá nanočastíc. Na zabránenie agregácie (zhlukovaniu) nanočastíc sa používajú PAL (povrchovo aktívne látky) alebo ochranné rozpustné polyméry. Získané nanočastice sa separujú pomocou centrifúgy alebo filtráciou a následne sú premyté vodou a organickými rozpúšťadlami.

Disperzná polymerizácia je definovaná ako polymerizácia zrážaním, pretože monomér sa polyméruje v prítomnosti polymérneho stabilizátora rozpustného v reakčnej zmesi. Podmienkou je dobrá rozpustnosť prítomného monoméru a príslušného polyméru v reakčnej zmesi. Disperzná polymerizácia spočíva v homogénnom roztoku monomérov s iniciátorom a s disperzným médiom, pričom sa vytvoria nanočastice vyzrážaním polyméru [44].

2.6.2.3 Disperzia vopred pripravenými polymérmi

Nanočastice sú vytvorené z vopred pripravených syntetických, polysyntetických alebo prírodných polymérov. Metódy založené na vopred pripravených polyméroch sú popísané nižšie.

2.6.2.4 Metódy založené na nanozrážkach

Tiež nazývaná metóda premiestnenia rozpúšťadla využíva tri časti: polymér, napríklad PLGA, PLA, PLC, PHB, organické rozpúšťadlo ako je acetón, ethanol, hexán a nerozpustnú fázu, akou je voda. Táto metóda je založená na vyzrážaní polyméru z organického rozpúšťadla a následnej difúzii rozpúšťadla vo vode. Bioaktívna zložka je rozpustená v organickej fáze (môže byť použitý PAL). Je dôležitý výber vhodného rozpúšťadla a nerozpustnej fázy, pretože sú rozličné pre každú bioaktívnu zložku. Veľkosť obdržaných nanočastíc sa pohybuje okolo 100 nm a vykazujú dobrú stabilitu [44].

2.6.2.5 Samoorganizácia (self-assembly)

Tento proces využíva polyméry s veľkou kapacitou za vzniku spontánnej tvorby stabilných nanočastíc. Hlavnou hnacou silou na zostavenie je amfifilný charakter a slabé interakcie ako sú van der Waalsové sily, kapilarita, π - π interakcie a vodíkové mostíky. Táto metóda spočíva v samoorganizácii polymérov bez vonkajších zásahov, napríklad činidiel. Príkladnými polymérmi pre takéto vytvorenie nanočastíc sú PLA, kaseín, chitosan. Veľkosť obdržaných častíc sa pohybuje v rozmedzí 50-100 nm. Potravinársky priemysel využíva tento proces zostavenia nanočastíc v prípade enkapsulácie D3 vitamínu [44].

2.6.2.6 Vysol'ovanie

Vysol'ovanie je modifikovaná metóda na báze emulzie, ktorá nepoužíva organické rozpúšťadla, ktoré môžu byť nebezpečné pre prírodné prostredie ako aj pre fyziologický systém (pre telo). Nanočastice sú tvorené bez pridanej PAL alebo chlórovaného rozpúšťadla. Vysol'ovanie vyžaduje prítomnosť polyméru, organického rozpúšťadla, úplne miešateľného s vodou (napríklad acetón) a vysol'ovacie činidlo (chlorid horečnatý, chlorid vápenatý, octan horečnatý). Polymér a bioaktívna látka sú rozpustené v organickom rozpúšťadle a potom je pridaná vysoká koncentrácia činidla, za intenzívneho miešania, kvôli čo najvýraznejšiemu vysol'ovaciemu efektu z vodnej fázy. Tento proces tvorí emulziu olej-voda, ktorá je nerozpustná vo vode, čo spôsobí vyzrážanie vo vode nerozpustného polyméru [44].

3 CIEĽ PRÁCE

Cieľom predloženej bakalárskej práce bolo riešenie nasledujúcich častí:

- Spracovanie rešerše na prehľad látok so sladkou chuťou
- Optimalizácia potrebných metód
- Imobilizácia vybraných sladidiel na nosič a štúdium dlhodobej stability a stability vytvorených systémov v modelovom fyziologickom prostredí.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité chemikálie, prístroje a pomôcky

4.1.1 Chemikálie

Polyhydroxybutyrát (PHB) – Biomer (SRN)

Sacharóza– Vitrum-LachNer (ČR)

Fruktóza– Vitrum-LachNer (ČR)

Glukóza– Vitrum-LachNer (ČR)

Mannitol– Sigma-Aldrich (SRN)

Sorbitol– Sigma-Aldrich (SRN)

Erytritol– Sigma-Aldrich (SRN)

Chloroform– VWR Chemicals BDH PROLABO (UK)

Acetonitril pre HPLC, Gradient Grade – Sigma-Aldrich (SRN)

Kyselina chlorovodíková, 35 % – Vitrum-LachNer (ČR)

Pankreatín z bravčového pankreasu – Sigma-Aldrich (SRN)

Pepsín – Sigma-Aldrich (SRN)

Zmes kyseliny chólovej a deoxychólovej – Sigma-Aldrich (SRN)

Hydrogenuhličitan sodný – Vitrum-LachNer (ČR)

4.1.2 Prístroje a pomôcky

Zostava HPLC/PDA/RI ThermoFisher Scientific (USA):

- Programátor gradientu –UltiMate 3000
- Fotometrický detektor –UltiMate 3000 DAD
- Refraktometrický detektor –RefractoMax 520
- Pumpa – LPG-3400SD
- Kolóna –Luna 10u NH2 100A 250 x 4,6 mm
- Vyhodnocovací software –Chromeleon 7

Zostava pre použitie plazmy

Dynamický rozptýľ svetla – Zetasizer Nano ZS–Malvern (UK)

Ultrazvukový homogenizátor – Bandelin Sonoplus- Sonorex Technik (SRN)

Ultrazvuk – PS02000 Ultrasonic Compact Cleaner 1,25L, PowerSonic (SRN)

FTIR spektrometr – Nicolet iS50 ThermoFisher Scientific (USA)

Vákuová rotačná odparka – IKA Werke R V06-ML (SRN)

Optický mikroskop– Intraco Micro LM 666 PV/∞ LED (ČR)

Software Dino –Capture 2.0 (ČR)

Mikrocentrifuga Sartorius – Sigma (SRN)

Analytické váhy – Boeco (SRN)

Automatické pipety v rôznom rozsahu objemu – Discovery (SRN) a Biohit (SRN)

4.2 Stanovenie sladidiel metódou HPLC s UV-VIS a RI detekciou

Vzorky sladidiel boli na kolónu aplikované nástrekom pomocou dávkovacieho ventilu o objemu slučky 20 μ l. Chromatografia prebiehala na kolóne Luna – model NH2 (250 \times 4,6 mm) naplnenou reverznou fázou C 18 (μ m) pri 35 °C. Elúcia prebiehala izokraticky pri prietoku mobilnej fáze 1,0 ml·min⁻¹.

Ako mobilná fáza bol použitý acetonitril:voda v pomere 75:25. Vzorky boli detegované spektrofometrickým detektorom pri vlnovej dĺžke 290 nm a refraktometrickým detektorom pri 35 °C. Z chromatogramov o rôznych koncentráciách sladidiel boli zistené plochy píkov a zostavená externá kalibračná krivka na kvantitatívne stanovenie koncentrácie sladidiel.

4.3 Metódy prípravy PHB častíc

4.3.1 Príprava častíc pomocou ultrazvuku

Rôzne hmotnostné koncentrácie PHB v rozmedzí 1-5%, boli rozpustené vo vode. Roztok bol ultrazvukovaný po dobu 1 minúty. Ďalej boli rôzne hmotnostné koncentrácie PHB (1-3 %) rozpustené v rôznych pomeroch chloroformu: 0,5 ml, 0,75 ml, 1 ml, 2 ml, 4 ml chloroformu. K roztokom bola pridaná voda (10 ml). Takto pripravený roztok bol ultrazvukovaný po dobu 1 minúty. Na záver pomocou magnetickej miešačky bol pri 50°C z roztoku odparený chloroform. Pripravené častice boli použité na stanovenie veľkosti a stability.

4.3.2 Metóda odparovania na tenkej vrstve (thin layer evaporation) – TLC

2 % PHB bolo rozpustené v 1 ml chloroformu. Roztok bol preliaty do odparovacej banky a na vákuovej rotačnej odparke bol odparený do sucha. K odparke bolo pridaných 10 ml vody. Zmes bola striedavo miešaná na vortexe a ultrazvukovaná, pokiaľ nedošlo k úplnej homogenizácii. Pripravená vzorka bola použitá na stanovenie veľkosti a stability vytvorených častíc.

4.3.3 Metóda odparovania z tenkej vrstvy na reverznej fáze (reverse phase – thin layer evaporation) – RP-TLC

2 % PHB bolo rozpustené v 1 ml chloroformu. Roztok bol preliaty do odparovacej banky a na vákuovej rotačnej odparke bol odparený do sucha. Vytvorený PHB film bol rozpustený v 8 ml éteru. K tomuto roztoku bolo pridaných 2 ml vody a zmes bola s prestávkami ultrazvukovaná asi 1 minútu, pokiaľ sa nevytvorila emulzia. Z tejto emulzie, za laboratórnej teploty, bol na vákuovej odparke odparený éter a výsledná zmes prešla na vodnú suspenziu. Suspenzia bola doplnená vodou na výsledný objem 10 ml.

4.4 Stanovenie veľkosti častíc metódou dynamického rozptylu svetla

Veľkosť častíc bola stanovená na prístroji Zetasizer Nanoseries, ktorý využíva dynamického rozptylu svetla. Meria sa časová závislosť kolísania intenzity rozptýleného svetla daným Brownovým pohybom častíc. Analýza intenzity rozptýleného svetla umožňuje určiť difúzny koeficient častíc a vypočítať distribúciu veľkosti častíc v danej vzorke. Pripravené častice boli vhodne zriedené vodou a analyzované.

4.5 Stanovenie stability vytvorených častíc pomocou zeta potenciálu

Meranie zeta potenciálu bolo realizované na prístroji Zetasizer Nanoseries. Meranie je založené na technike „Laser Doppler Velocimetry“, tj. ako rýchlo sa pohybujú častice v kvapaline za pôsobenia elektrického poľa. Zeta potenciál je rozdiel potenciálov na pohybovom rozhraní, ktorý sa ustáli pri relatívnom pohybe tuhej fázy s elektrickou dvojvrstvou voči roztoku. Znamienko je opačné ako znamienko iónov vonkajšej vrstvy elektrickej dvojvrstvy.

4.6 Plazmová aktivácia povrchu PHB častíc

Pre aktiváciu povrchu boli použité lyofilizované častice pripravené podľa optimalizovanej metódy, pričom na ich povrchovú aktiváciu bola využitá studená plazma. Pri interakciách studenej plazmy s upravovaným povrchom nedochádza k výraznému ohrevu materiálu. Technika je preto vhodná na úpravu povrchu PHB, pretože za použitia vysokých teplôt by mohlo dôjsť k degradácii polyméru. 4,0 g PHB častíc bolo nasypaných do vákuovej komory (tlak: 13 Pa). Dávkovacím plynom bol vzduch a výkon bol 25W. Čas trvania aplikácie plazmy bol 1 minúta a 54 sekúnd (1:54:36).

4.7 Infračervená a Ramanová spektroskopia

FT-IR meranie prebiehalo na FTIR spektrometri Nicolet IS50. Zo začiatku bolo zmerané pozadie. Meranie prebiehalo s jednodrazovým diamantovým ATR nadstavcom. Ako pozadie bol využitý okolitý vzduch v laboratóriu. Po zmeraní pozadia bolo na ATR diamantový kryštál nanosené malé množstvo skúmanej vzorky. Meranie prebiehalo za pomoci 64 skenov s rozlíšením 8. Následne prebiehalo meranie aj za pomoci zabudovaného Ramanovho modulu za použitia laseru 1064 nm s intenzitou 0,5 mW a počet skenov bol 128.

4.8 Imobilizácia sladidiel na aktívne PHB častice

Boli pripravené štandardné roztoky vybraných šiestich sladidiel- glukózy, fruktózy, sacharózy, erytritolu, manitolu, sorbitolu. Koncentrácia roztoku glukózy bola 378,85 mg/ml, fruktózy 98,52 mg/ml, sacharózy 420,00 mg/ml, erytritolu 20,89 mg/ml, manitolu 182,49 mg/ml a sorbitolu 228,50 mg/ml. Samotná imobilizácia spočívala v inkubácii aktivovaného PHB s roztokmi sladidiel pri laboratórnej teplote. Z takto pripravených imobilizovaných sladidiel na PHB častice boli odobraté vzorky v časových intervaloch po 0 hodinách, 1,5 hodinách, 3,5 hodinách, 6,5 hodinách, 24 hodinách a bolo pozorované množstvo naviazanej zložky.

4.9 Stabilita častíc v modelovom fyziologickom prostredí

4.9.1 Žalúdočná šťava

Žalúdočná šťava bola pripravená z 0,25 g pepsínu, ktorý bol rozpustený v 100 ml destilovanej vody. Následne bolo pridaných 0,84 ml 35% HCl. Hodnota pH bola upravená na 0,9. Vzorky na sledovanie stability častíc boli pripravené v pomere 1:1 (žalúdočná šťava:častice s imobilizovanými sladidlami). Bola stanovená koncentrácia sladidiel v čase nula, a potom po 20 minútach pôsobenia umelej žalúdočnej šťavy, pričom boli vzorky inkubované pri 37°C. Z rozdielov koncentrácií bolo vypočítané uvoľnené množstvo sladidiel z častíc pôsobením žalúdočnej šťavy.

4.9.2 Pankreatická šťava

Pankreatická šťava bola pripravená z 0,25 g pankreatínu a 1,5 g NaHCO₃, ktoré boli rozpustené v 100 ml destilovanej vody, pH bolo upravené na hodnotu 8,9. Vzorky na pozorovanie stability boli pripravené v pomere 1:1 (pankreatická šťava:častice s imobilizovanými sladidlami). Bola stanovená koncentrácia sladidiel v čase nula a po 20 minútach pôsobenia umelej pankreatickej šťavy, pričom boli vzorky inkubované pri 37°C. Z rozdielov koncentrácií bolo vypočítané uvoľnené množstvo sladidiel z častíc pôsobením pankreatickej šťavy.

4.9.3 Žlčová šťava

Žlčová šťava bola pripravená pridaním 0,8 g žlčových solí do 200 ml pufru pH 8. Vzorky na pozorovanie stability boli pripravené v pomere 1:1 (žlčová šťava:častice s imobilizovanými sladidlami). Bola stanovená koncentrácia sladidiel v čase nula a po 45 minútach pôsobenia umelej žlčovej šťavy, pričom boli vzorky inkubované pri 37°C. Z rozdielov koncentrácií bolo vypočítané uvoľnené množstvo sladidiel z častíc pôsobením žlčovej šťavy.

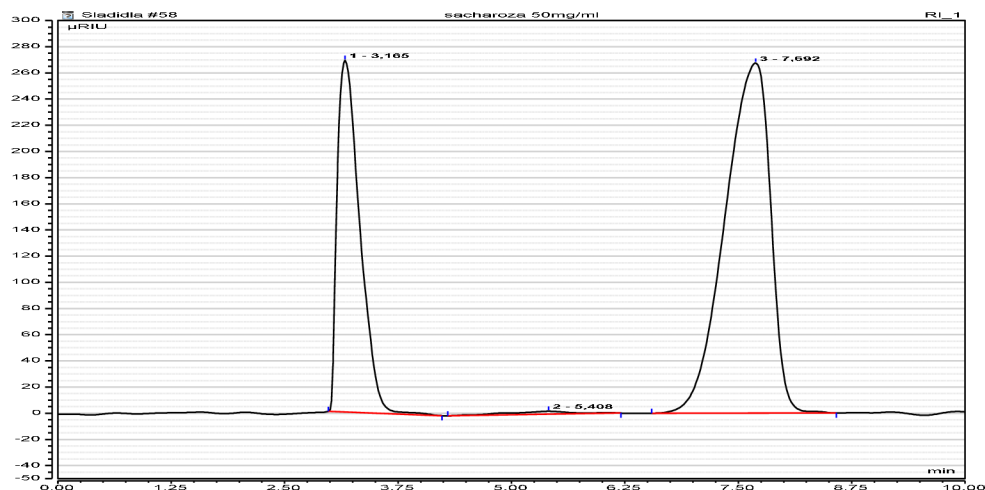
4.10 Dlhodobá stabilita

Vzorky imobilizovanej sacharózy boli pridané do vodného prostredia, o pomocou meraní na HPLC bolo v daných intervaloch sledované uvoľnené množstvo sacharózy z častíc. Stabilita bola sledovaná v čase 0, po 1 hodine, ďalej po 3, 7, 14, a 21 dňoch.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

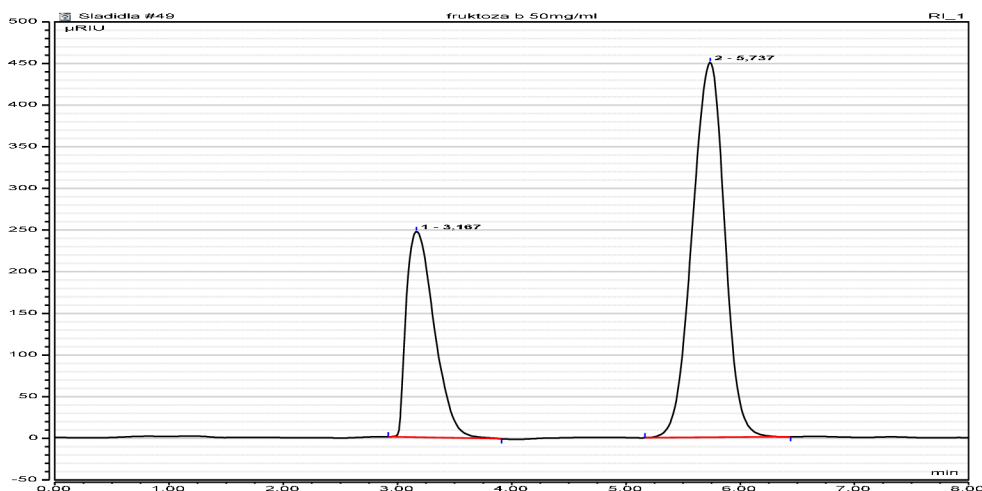
5.1 Optimalizácia metódy stanovenia sladidiel

Stanovenie množstiev sladidiel bolo realizované podľa postupu v metódach (kap. 4.2). Všetky údaje boli zmerané dvakrát a z nameraných hodnôt bol vypočítaný priemer. Jednotlivé grafy kalibračných kriviek sú uvedené v prílohe č. 1.



Obrázok č. 22: Chromatogram sacharózy

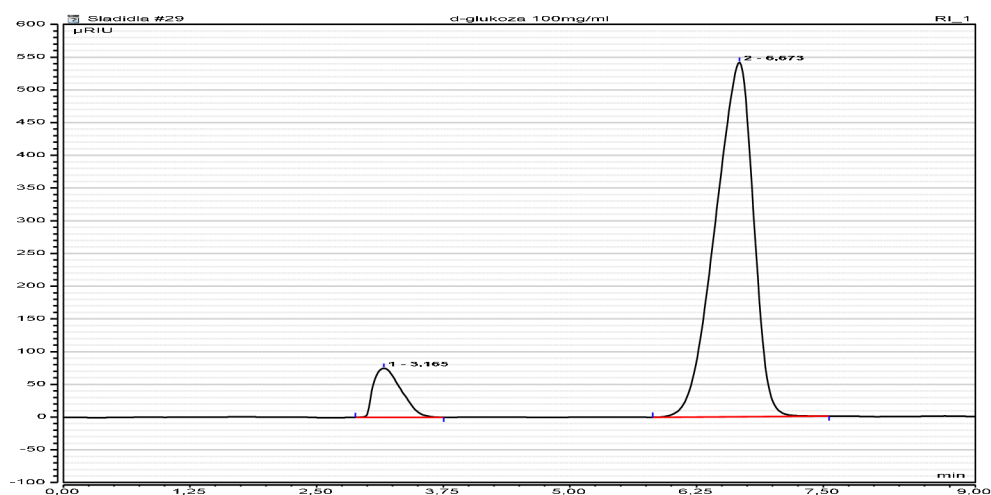
Retenčný čas sacharózy je 7,692 minút. Rovnica kalibračnej krivky na kvantitatívne stanovenie sacharózy je $y = 3,131x + 2,201$.



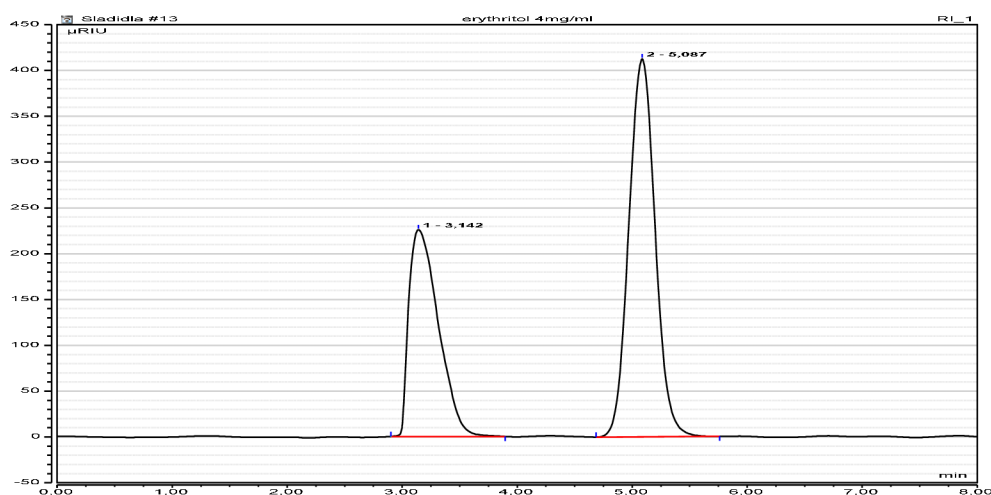
Obrázok č. 23: Chromatogram fruktózy

Obrázok č. 23 zobrazuje záznam stanovenia fruktózy, ktorej retenčný čas bol 6,787 minút. Rovnica kalibračnej krivky na kvantitatívne stanovenie fruktózy je $y = 2,890x + 1,434$.

Nasledujúci obrázok č. 24 ukazuje záznam zo stanovenia glukózy. Retenčný čas glukózy je 6,673 minút. Rovnica kalibračnej krivky na kvantitatívne stanovenie glukózy je $y = 5,552x + 0,054$.

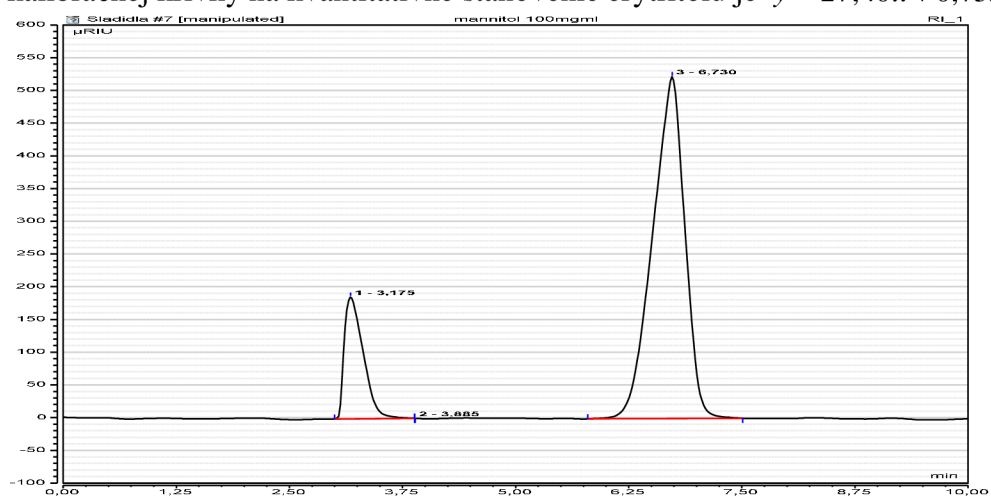


Obrázok č. 24: Chromatogram glukózy



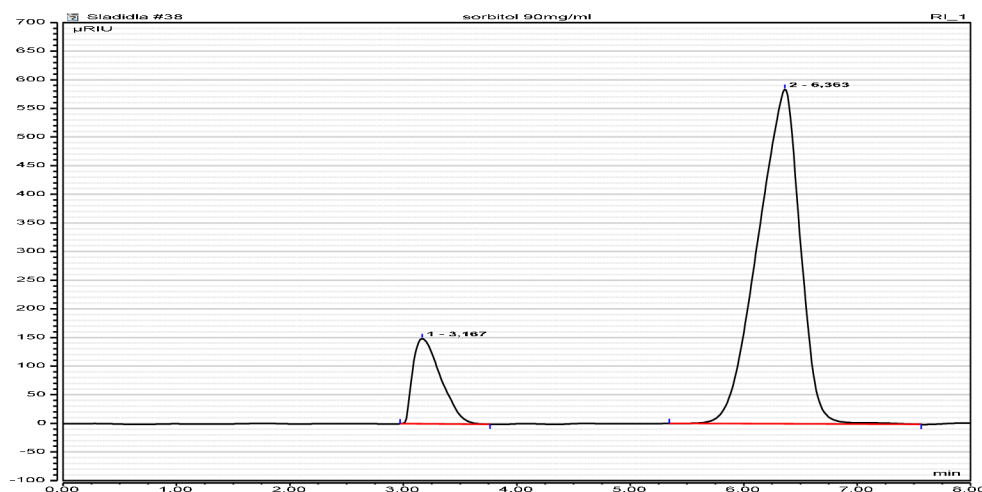
Obrázok č. 25: Chromatogram erytritolu

Obrázok č. 25 predkladá záznam stanovenia erytritolu s retenčným časom 5,087 minút. Rovnica kalibračnej krivky na kvantitatívne stanovenie erytritolu je $y = 27,40x + 0,752$.



Obrázok č. 26: Chromatogram manitolu

Obrázok č. 26 podáva záznam zo stanovenia mannitolu s retenčným časom 6,730 minút. Rovnica kalibračnej krivky na kvantitatívne stanovenie mannitolu je $y = 2,979x + 3,843$.



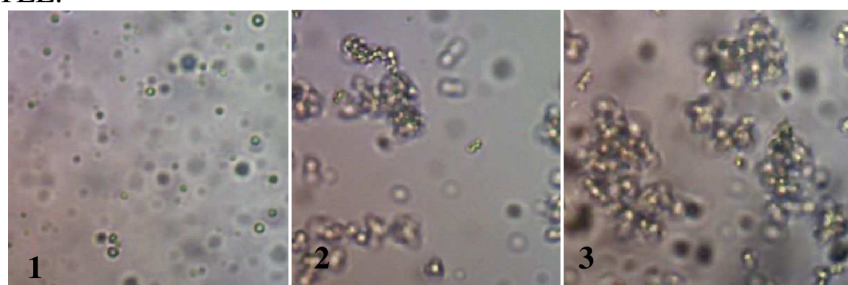
Obrázok č. 27: Chromatogram sorbitolu

Obrázok č. 27 predkladá záznam zo stanovenia sorbitolu s retenčným časom 6,363 minút. Rovnica kalibračnej krivky na kvantitatívne stanovenie sorbitolu je $y = 2,787x + 0,745$.

5.2 Optimalizácia metód prípravy PHB častíc

5.2.1 Vizualizácia veľkostí častíc pod mikroskopom

PHB častice boli pripravené rozdielnymi metódami a vizualizované pod svetelným mikroskopom s kamerou. Mikroskopické pozorovanie prebiehalo pri zväčšení 640×. Na obrázku č. 28 sa dajú pozorovať PHB častice pripravené pomocou ultrazvuku, metódou TLE a metódou RP-TLE.



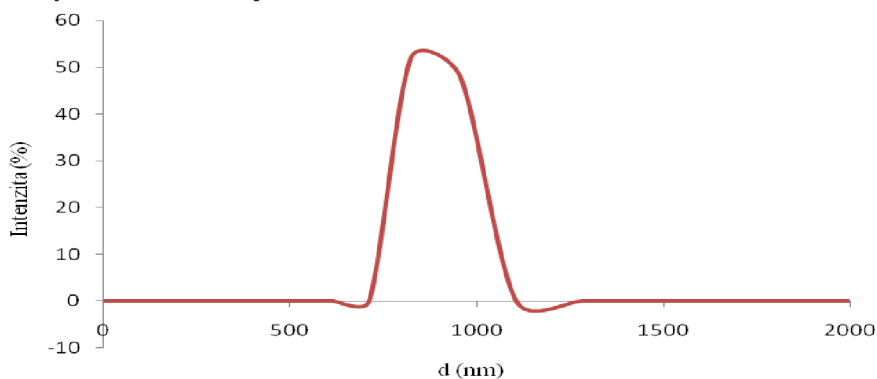
Obrázok č. 28: Porovnanie častíc: Metóda ultrazvuk , Metóda TLE, Metóda RP-TLE

Z obrázkov sa dá spozorovať, že príprava častíc pomocou ultrazvuku bola najefektívnejšia na veľkosť, tvar a distribúciu. Vzorky pripravené metódou TLE a RP-TLE obsahovali okrem častíc PHB aj filmy a agregáty, vznikali tak polydisperzné roztoky, ktoré nie sú vhodné na prípravu nosičových systémov. Vhodnou metódou na prípravu nosičových systémov sú častice vytvorené pomocou ultrazvuku.

5.2.2 Stanovenie veľkosti častíc metódou dynamického rozptylu svetla

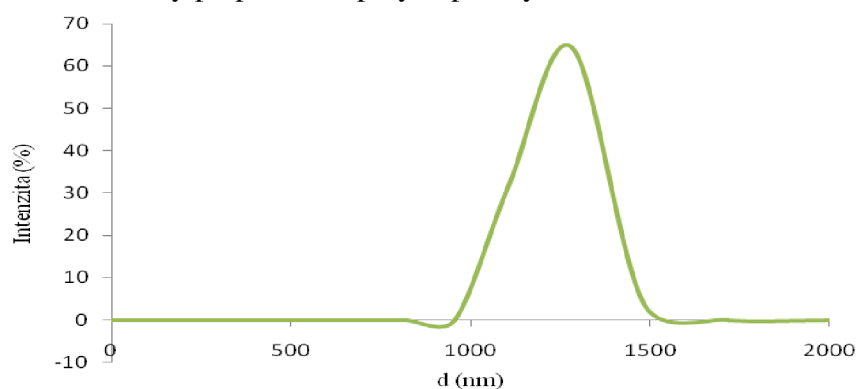
Analýza veľkosti a distribúcie vytvorených častíc bola realizovaná na koloidnom analyzátore metódou dynamického rozptylu svetla a boli premerané vzorky všetkých modelových metód prípravy častíc. Postup analýzy je popísaný v kapitole 4.4.

Veľkosť častíc pripravených metódou TLC sa pohybovala v rozmedzí od 650 – 1250 nm (graf č. 1). Ako bolo vidieť pod svetelným mikroskopom, roztok okrem častíc obsahoval aj agregáty, ktoré výsledok skresľujú.



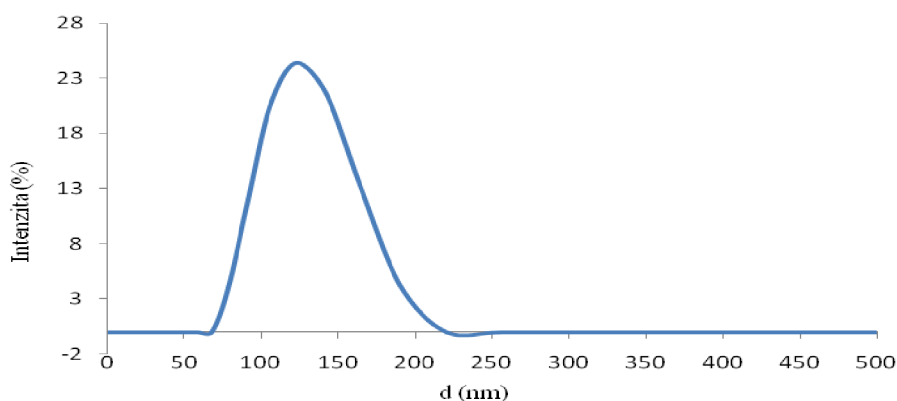
Graf č. 1: Veľkosť a distribúcia častíc metódou TLE

Častice pripravené metódou RP-TLE dosahovali veľkosťou od 800 do 1650 nm. Ako sme mohli vidieť pod svetelným mikroskopom, PHB častice pripravené touto metódou neboli dokonalé, pretože vzniknutý preparát bol polydisperzný.



Graf č. 2: Veľkosť a distribúcia častíc metódou RP-TLE

Častice pripravené pomocou ultrazvuku sa pohybovali v rozmedzí od 50 do 250 nm. Ako sme mohli vizualizovať pod svetelným mikroskopom, vytvorené častice boli v radoch nanometroch a roztok neobsahoval žiadne agregáty.



Graf č. 3: Veľkosť a distribúcia častíc pomocou ultrazvuku

5.2.3 Stanovenie stability vytvorených častíc analýzou zeta potenciálu

Interval nestability častíc zeta potenciálov je od -30 mV do 30 mV [46]. Hodnoty zeta potenciálov vytvorených PHB častíc rôznymi metódami boli rôzne. Najstabilnejšie častice boli pripravené pomocou ultrazvuku. Častice vytvorené pomocou TLE a RP-TLE, podľa ukazujúceho zeta potenciálu, sú nestabilné.

Tabuľka č.4: Zeta potenciál vytvorených častíc rôznymi metódami

| Preparáty | Vytvorené častice |
|-----------|-------------------|
| | ZP (mV) |
| TLE | -29,9 |
| RP-TLE | -25,37 |
| Ultrazvuk | -62,87 |

Najlepšou metódou prípravy nosičových systémov sú častice pripravené pomocou ultrazvuku.

5.3 Optimalizácia prípravy PHB častíc pomocou ultrazvuku

Častice boli pripravené postupom uvedeným v kapitole 4.3.1. Tieto častice boli ďalej študované metódou dynamického rozptylu svetla, zeta potenciálu a boli pozorované pod svetelným mikroskopom. Zo získaných výsledkov sme tak mohli stanoviť optimálny postup prípravy PHB častíc.

5.3.1 Porovnanie veľkosti častíc metódou dynamického rozptylu svetla

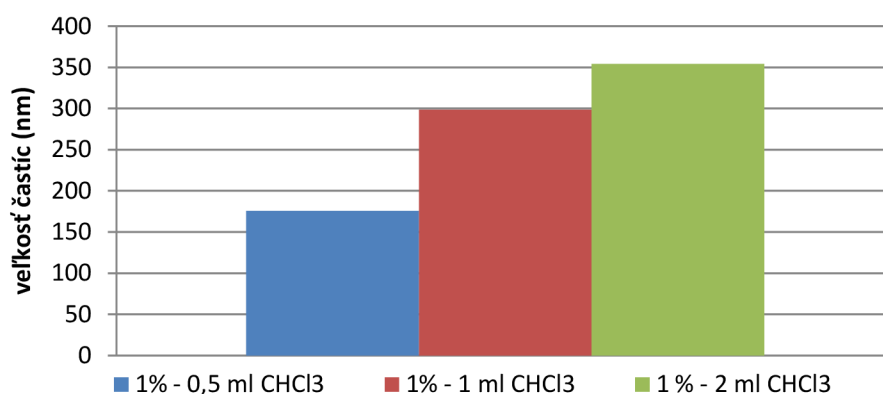
Pripravené vzorky bolistanovené na prístroji Zetasizer. Postup analýzy je popísaný v kapitole 4.4. Záznamy stanovenia veľkosti častíc metódou DLS sa nachádzajú v prílohe č. 2. Priemerné veľkosti všetkých pripravených častíc sú uvedené v tabuľke č. 5.

Tabuľka č. 5: Veľkosť častíc pripravených vzoriek pomocou DLS

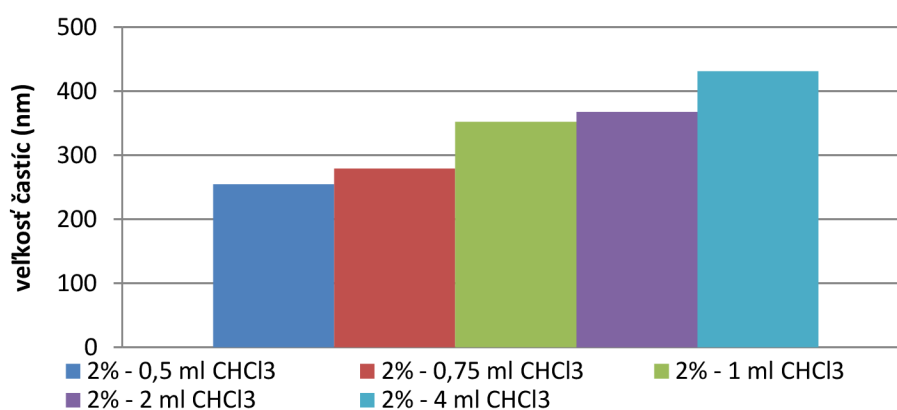
| | PHB | Chloroform (ml) | Voda (ml) | Priemerná veľkosť (nm) |
|-----------|-------|-----------------|-----------|------------------------|
| Vzorka 1 | 1% | 0,5 | 10 | 175,6 |
| Vzorka 2 | 1% | 1,0 | 10 | 298,6 |
| Vzorka 3 | 1% | 2,0 | 10 | 354,3 |
| Vzorka 4 | 2% | 0,5 | 10 | 254,5 |
| Vzorka 5 | 2% | 0,75 | 10 | 278,8 |
| Vzorka 6 | 2% | 1,0 | 10 | 352,1 |
| Vzorka 7 | 2% | 2,0 | 10 | 367,5 |
| Vzorka 8 | 2% | 4,0 | 10 | 431,2 |
| Vzorka 9 | 3% | 1,0 | 10 | 362,5 |
| Vzorka 10 | 10 mg | 0,0 | 10 | 5224,0 |
| Vzorka 11 | 20 mg | 0,0 | 10 | 2449,0 |
| Vzorka 12 | 40 mg | 0,0 | 10 | 3120,0 |
| Vzorka 13 | 60 mg | 0,0 | 10 | 3054,5 |
| Vzorka 14 | 80 mg | 0,0 | 10 | 3455,5 |

Veľkosť nanočastíc u 1 % PHB bola rôzna, za použitia rôzneho prídavku chloroformu. Ako je vidieť v grafe č. 4, veľkosť častíc sa pohybovala od 175 nm do 354 nm, pričom veľkosť častíc rastie s vyšším prídavkom chloroformu.

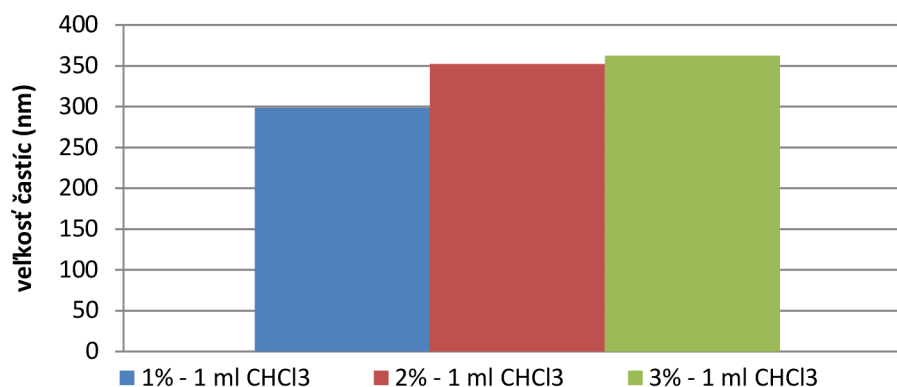
Veľkosť nanočastíc u 2 % PHB sa pohybovali v rozmedzí od 254 nm do 431 nm, ako je vidieť v grafe č. 5 veľkosť opäť rastie s vyšším prídavkom chloroformu. Rovnako veľkosť častíc rástla i s hmotnostnou koncentráciou PHB pri rovnakom prídavku chloroformu (grafe č. 6). Naopak metóda príprava častíc len za použitia vodnej fázy nie je vhodná, pretože roztok bol polydisperzný, vznikali agregáty a distribúcia veľkosti častíc sa pohybuje v radoch mikrometrov (graf 7).



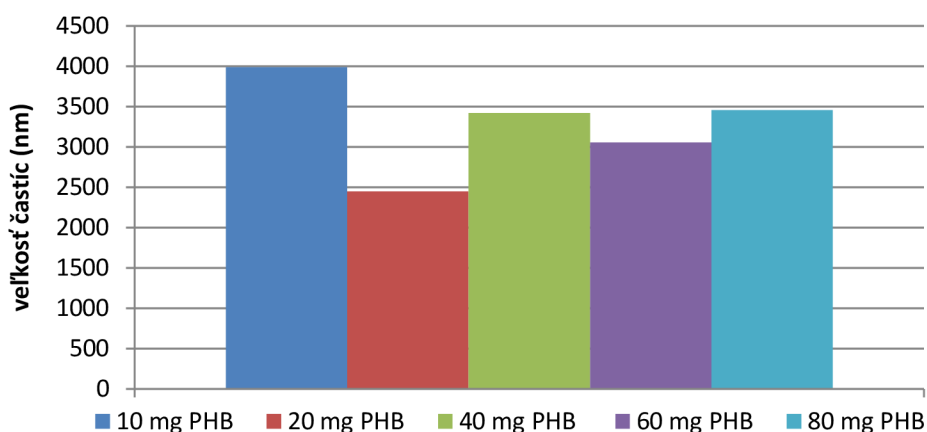
Graf č. 4: Pozorovanie veľkosti 1% PHB častíc za prídania rôzneho množstva chloroformu



Graf č. 5: Pozorovanie veľkosti 2% PHB častíc za prídania rôzneho množstva chloroformu



Graf č. 6: Porovnanie veľkosti častíc u 1%, 2%, 3% PHB častíc s 1 ml chloroformu



Graf č. 7: Porovnanie veľkosti častíc s rôznou koncentráciou PHB bez chloroformu

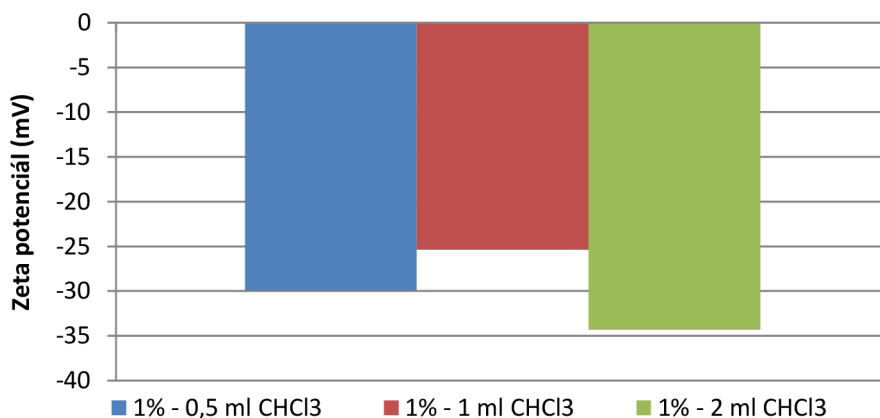
5.3.2 Porovnanie stability častíc pomocou zeta potenciálu

Zeta potenciál je rozhodujúcim parametrom stability či koagulácie koloidného roztoku. Interval nestability častíc zeta potenciálov je od -30 mV do 30 mV. Princíp merania zeta potenciálu je uvedený v kapitole 4.5. V tabuľke č. 6 sú uvedené jednotlivé zeta potenciály v jednotkách mV pre rôzne častice PHB.

Tabuľka č. 6: Stabilita vytvorených častíc pripravených vzoriek

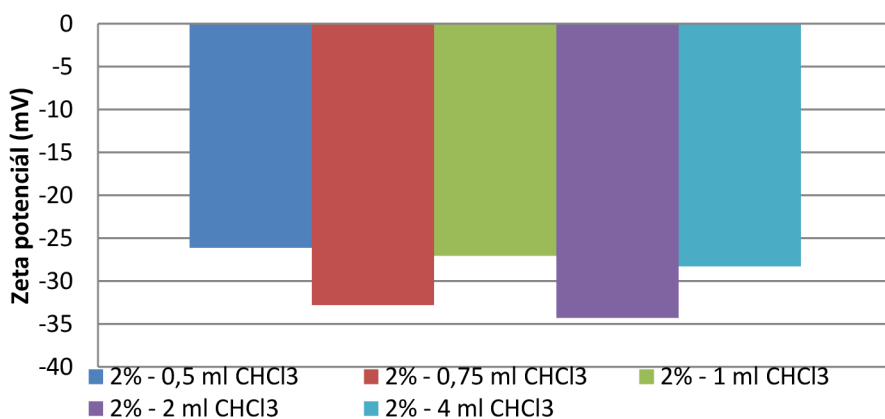
| | PHB | Chloroform (ml) | Voda (ml) | Zeta potenciál (mV) |
|-----------|-------|-----------------|-----------|---------------------|
| Vzorka 1 | 1% | 0,5 | 10 | -29,90 |
| Vzorka 2 | 1% | 1,0 | 10 | -25,37 |
| Vzorka 3 | 1% | 2,0 | 10 | -34,30 |
| Vzorka 4 | 2% | 0,5 | 10 | -26,13 |
| Vzorka 5 | 2% | 0,75 | 10 | -32,80 |
| Vzorka 6 | 2% | 1,0 | 10 | -35,54 |
| Vzorka 7 | 2% | 2,0 | 10 | -34,30 |
| Vzorka 8 | 2% | 4,0 | 10 | -28,30 |
| Vzorka 9 | 3% | 1,0 | 10 | -62,87 |
| Vzorka 10 | 10 mg | 0,0 | 10 | -0,93 |
| Vzorka 11 | 20 mg | 0,0 | 10 | -2,30 |
| Vzorka 12 | 40 mg | 0,0 | 10 | -1,42 |
| Vzorka 13 | 60 mg | 0,0 | 10 | -2,41 |
| Vzorka 14 | 80 mg | 0,0 | 10 | -7,93 |

Hodnota zeta potenciálu u 1 % PHB častíc sa pohybuje v rozmedzí od -34,30 do -25,37 mV. Podľa nameraných výsledkov častice nevykazujú príliš dobrú stabilitu. Iba vzorka 3, kde bolo najvyššie množstvo pridaného chloroformu, bola stabilná (graf č. 8). Stabilita častíc vytvorených bez použitia chloroformu sa nachádza v intervale od -0,93 mV do -7,93 mV, tieto častice teda stabilné nie sú.

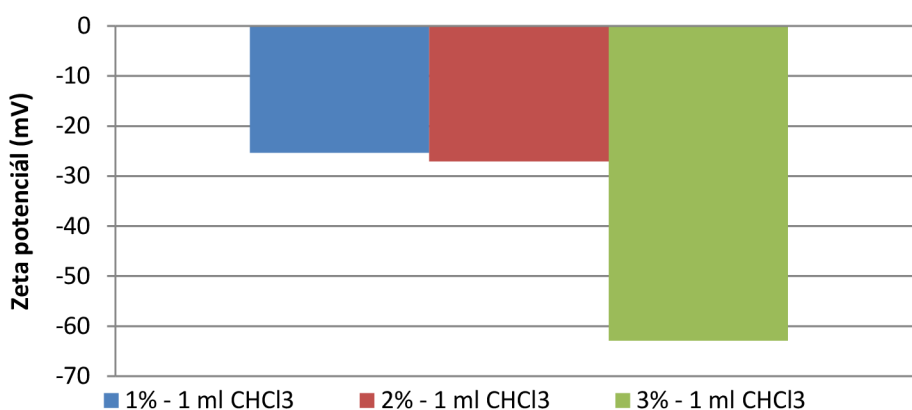


Graf č. 8: Stabilita 1% PHB častíc s rôznym prídavkom chloroformu

V prípade 2 % PHB častíc sa hodnota zeta potenciálu pohybuje v rozmedzí od -35,54 do -26,13 mV. Stabilné boli vzorky 5, 6 a 7. Jednotlivé stability týchto častíc sú porovnané v grafe č. 9.

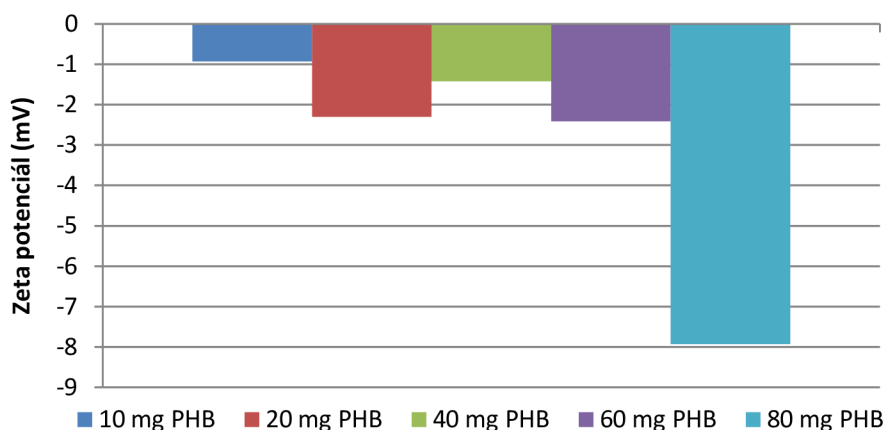


Graf č. 9: Stabilita 2% PHB častíc s rôznym prídavkom chloroformu



Graf č. 10: Porovnanie stability 1%, 2%, 3% PHB častíc s pridaním 1 ml chloroformu

U častíc s rôznymi hmotnostnými koncentraciami sa pohybovala v rozmedzí od -62,87 do -25,37 mV (graf 10). Pričom podľa nameraného zeta potenciálu s rastúcou koncentráciou rastie aj stabilita. 3 % PHB častice vykazujú preto najlepšiu stabilitu.



Graf č. 11: Porovnanie stability vytvorených PHB častíc bez chloroformu

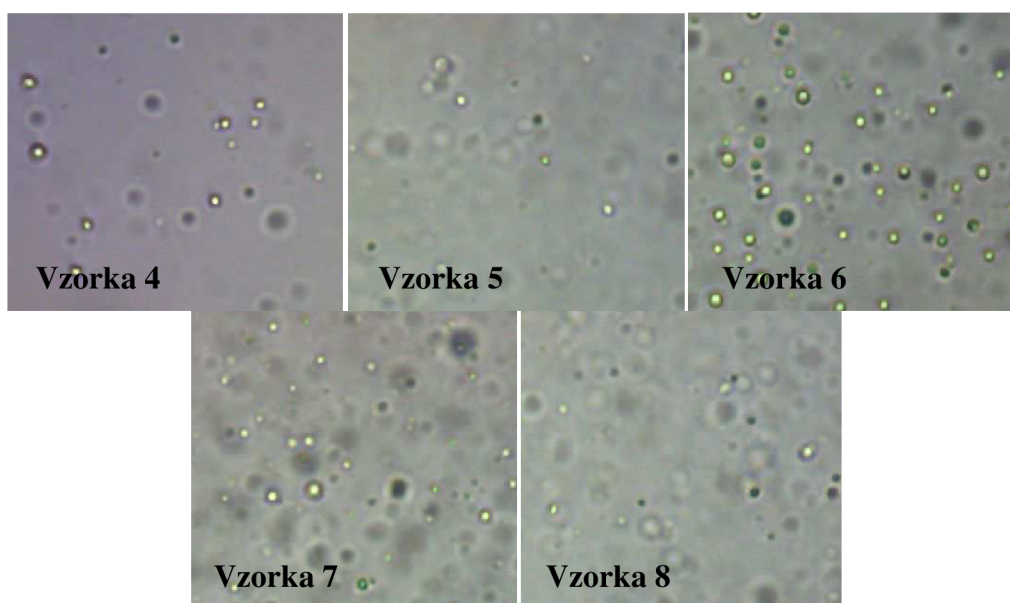
Hodnoty zeta potenciálov vytvorených častíc potvrdzujú to, že metóda prípravy PHB častíc bez pridania organickej fázy nie je vhodná.

5.3.3 Vizualizácia častíc pod mikroskopom

PHB častice o rôznych koncentráciách, uvedené v tabuľke č. 6, boli vizualizované pod svetelným mikroskopom. Mikroskopické pozorovanie prebiehalo pri zväčšení 640 \times .



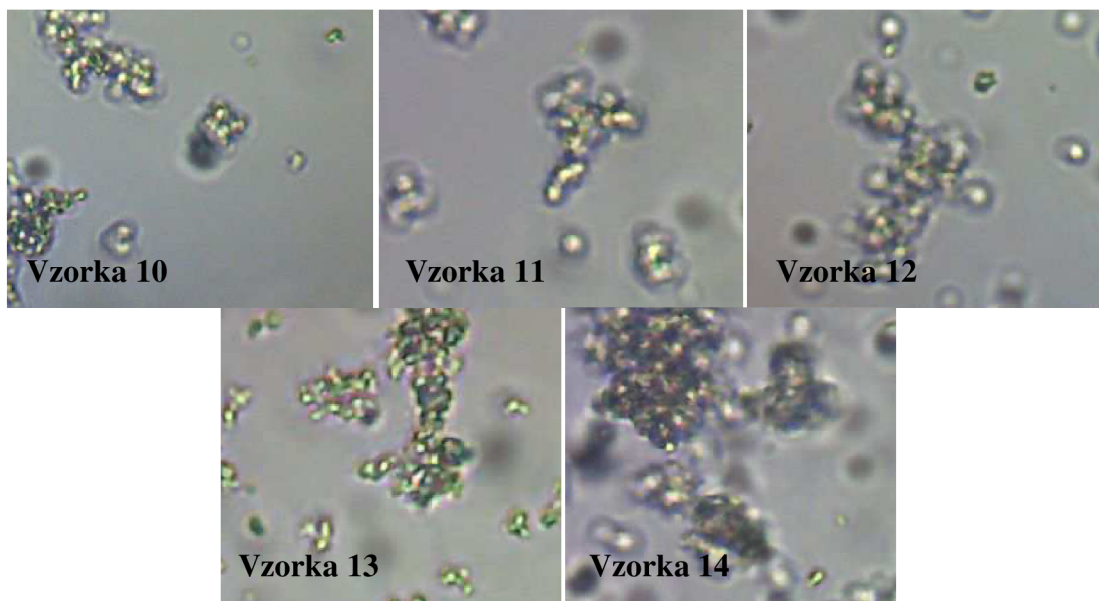
Obrázok č. 29: Porovnanie pripravených častíc 1% PHB (zloženie sa nachádza v tabuľka č. 6)



Obrázok č. 30: Porovnanie pripravených častíc 2% PHB (zloženie sa nachádza v tabuľka č. 6)



Obrázok č. 31: Porovnanie pripravených častíc 3% PHB (zloženie sa nachádza v tabuľka č. 6)



Obrázok č. 32: Porovnanie pripravených častíc PHB bez použitia chloroformu (zloženie sa nachádza v tabuľka č. 6)

Pripravené 1% PHB častice sú nedokonalé kvôli ich nízkej koncentrácii. U 3% PHB častíc nebola zaznamenaná žiadna zmena pridaním vyššej koncentrácie v porovnaní s 2%. V prípade 2% PHB bol dosiahnutý najlepší výsledok vzhľadom na koncentráciu aj veľkosť častíc. Za najlepšiu z testovaných častíc bola vyhodnotená vzorka 6. Vzorka 6 vyhovovala nielen koncentráciou a veľkosťou častíc, ale aj ich stabilitou. Častice bez prídavku chloroformu, ako sa dá spozorovať z obrázka 32, predstavovali vzorky polydisperzný roztok s výraznou agregáciou. Takto pripravené častice nie sú vhodné na ďalšie použitie.

5.4 Imobilizácia sladidiel na vytvorené častice

Po optimalizácii prípravy častíc, kde boli ako najvhodnejšie vyhodnotené 2% PHB častice, pripravené pomocou ultrazvuku s pomerom 1:10 organická:vodná fáza, boli pripravené tieto častice vo väčšom množstve. Pokračovala lyofilizácia a aktivácia povrchu plazmou podľa návodu uvedeného v kap. 4.8. Množstvo 0,5 g takto aktivovaných častíc bolo jednotlivo pridané do roztokov sladidiel. Použité roztoky a ich koncentrácie sú uvedené v tabuľke č. 7 ako koncentrácie pred imobilizáciou. Tabuľka č. 7 takisto znázorňuje, aká koncentrácia sladidiel bola či nebola naviazaná na PHB častice. Stanovenie bolo merané pomocou HPLC, kde bol vo voľnom roztoku v priebehu imobilizácie sledovaný úbytok imobilizovanej zložky.

Častice boli po skončení imobilizácie trojnásobne premyté. Z rozdielu konečnej a počiatočnej koncentrácie bolo vypočítané naviazané množstvo.

Tabuľka č. 7: Prehľad imobilizácie sladidiel na PHB častice

| koncentrácia (mg/ml) | doba imobilizácie | Fruktóza | Glukóza | Sacharóza | Erythritol | Mannitol | Sorbitol |
|-----------------------------|--------------------------|-----------------|----------------|------------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| Počiatočná koncentrácia | 0 | 395,7 | 95,5 | 437,6 | 21,0 | 200,9 | 218,6 |
| po imobilizácií | 0,5 h | 368,1 | 83,3 | 389,1 | 18,8 | 179,5 | 204,6 |
| po premytí | | 25,6 | 12,2 | 27,4 | 1,7 | 21,4 | 14,0 |
| Spolu | | 393,7 | 95,4 | 416,5 | 20,6 | 200,9 | 218,6 |
| Naviazané množstvo | | 2,0 | 0,0 | 21,0 | 0,4 | 0,0 | 0,0 |
| po imobilizácií | 1,5 h | 348,3 | 91,7 | 366,1 | 18,4 | 181,4 | 204,1 |
| po premytí | | 46,6 | 4,9 | 35,7 | 1,8 | 16,8 | 13,1 |
| Spolu | | 394,8 | 96,6 | 401,8 | 20,1 | 198,2 | 217,2 |
| Naviazané množstvo | | 0,9 | -1,2 | 35,8 | 0,8 | 2,7 | 1,4 |
| po imobilizácií | 3,5 h | 360,2 | 86,5 | 358,3 | 20,6 | 184,1 | 196,9 |
| po premytí | | 36,6 | 7,6 | 38,5 | 0,6 | 15,1 | 20,5 |
| Spolu | | 396,7 | 94,1 | 396,8 | 21,1 | 199,2 | 217,4 |
| Naviazané množstvo | | -1,0 | 1,4 | 40,8 | -0,2 | 1,8 | 1,2 |
| po imobilizácií | 6,5 h | 368,0 | 81,5 | 348,6 | 19,2 | 181,8 | 204,6 |
| po premytí | | 27,5 | 12,0 | 29,7 | 1,8 | 12,1 | 14,2 |
| Spolu | | 395,5 | 93,5 | 378,3 | 21,0 | 193,9 | 218,8 |
| Naviazané množstvo | | 0,2 | 2,0 | 59,3 | 0,0 | 7,0 | -0,2 |
| po imobilizácií | 24 h | 359,5 | 79,8 | 256,3 | 19,1 | 174,4 | 191,3 |
| po premytí | | 36,3 | 15,5 | 31,1 | 1,0 | 25,9 | 26,9 |
| Spolu | | 395,8 | 95,4 | 287,4 | 20,1 | 200,3 | 218,3 |
| Naviazané množstvo | | -0,1 | 0,1 | 150,2 | 0,9 | 0,6 | 0,3 |

Tabuľka č. 7 nám ukazuje, že len jedno sladidlo, presnejšie len sacharóza, bola naviazaná na pripravené PHB častice, pričom s dobou imobilizácie rástlo aj množstvo naviazanej zložky. Najvyššie množstvo naviazanej sacharózy bolo stanovené po 24 hodinách, kde bolo na častice naviazaných 34 % pôvodného množstva.

U týchto PHB častíc s naviazanou sacharózou bola ďalej sledovaná ich dlhodobá stabilita vo vodnom prostredí a ich stabilita v modelovom fyziologickom prostredí.

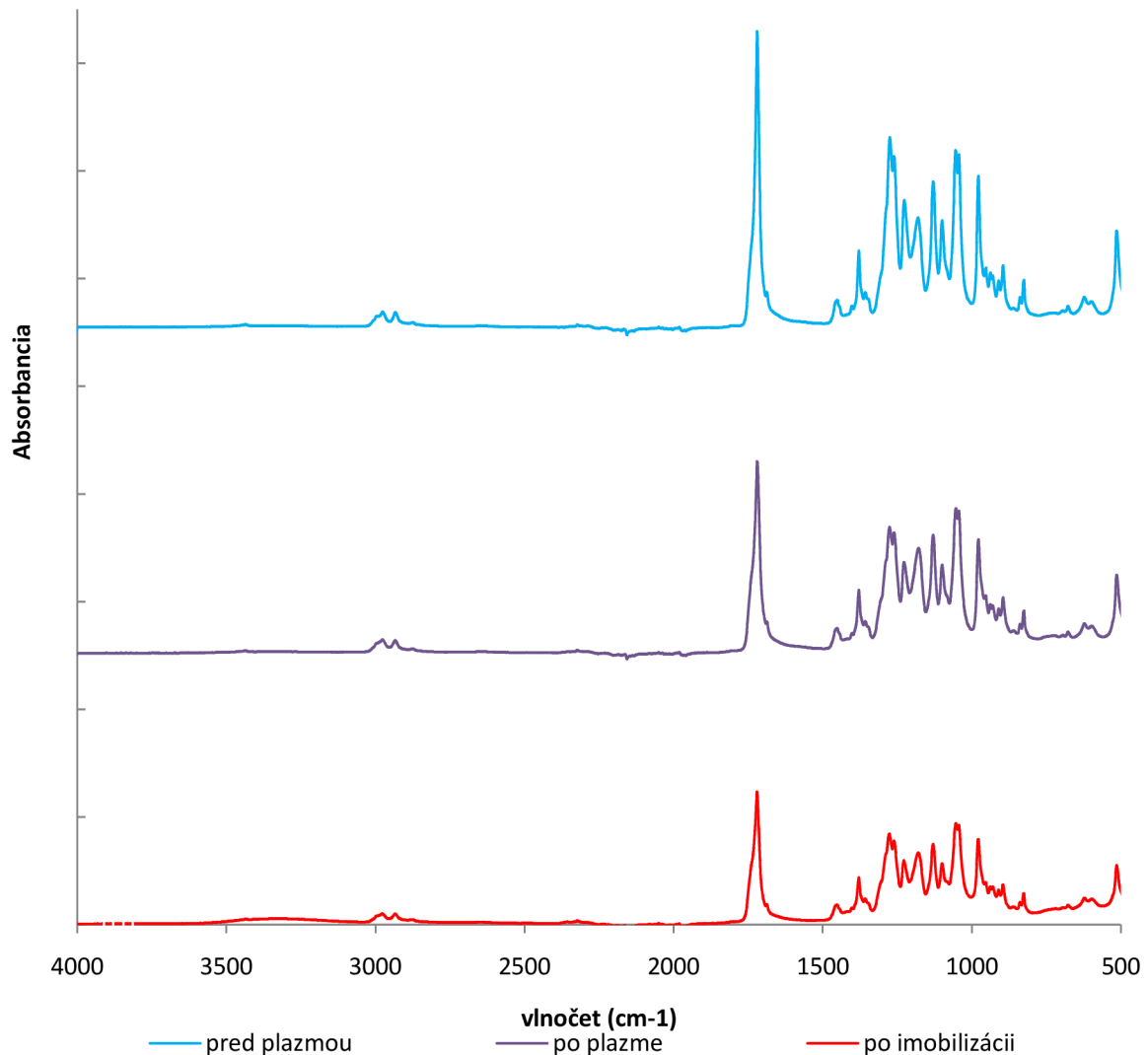
5.5 Infračervená spektrometria s Fourierovou transformáciou

Pomocou infračervenej spektrometrie bol sledovaný vplyv pôsobenia plazmy na pripravené PHB častice.

Graf 12 znázorňuje FT-IR spektra čistého PHB, PHB po aktivácii plazmou a aktivovaného PHB po imobilizácii sacharózy. Z IR spektra sú zreteľné totožné píky u všetkých vzoriek

PHB, predovšetkým píky pri 1180-1280 cm^{-1} charakteristické pre COC väzbu, pri 1382 cm^{-1} kde sa nachádza väzba CH₃, ďalej pík v 1729 cm^{-1} značí väzbu C=O a píky v oblasti 2870-3010 cm^{-1} je charakteristický pre väzby CH.

Touto metódou neboli viditeľné žiadne zmeny polyméru. Môže to byť zapríčinené vznikom len drobných povrchových zmien, ktoré sú ťažké detegovateľné.



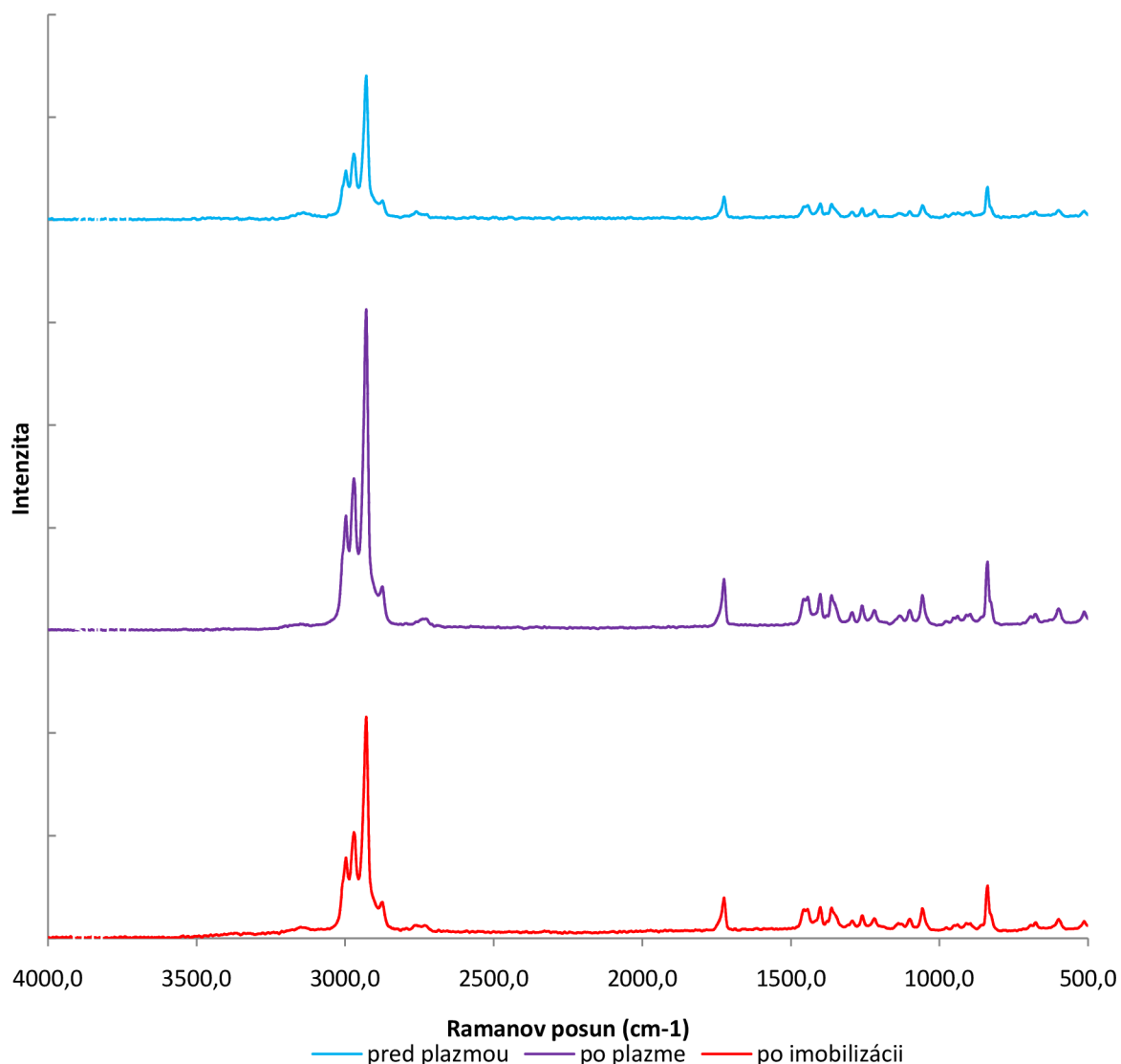
Graf č. 12: záznam FT-IR analýzy s ATR nástavcom

5.6 Ramanova spektrometria

Pomocou Ramanovej spektrometrie bol pozorovaný vplyv plazmy na PHB častice. Touto metódou neboli rovnako ako v predchádzajúcom prípade u FT-IR viditeľné žiadne zmeny polyméru.

Graf 13 znázorňuje FT-Ramanové spektra čistého PHB, PHB po aktivácii plazmou a aktivovaného PHB po imobilizácii sacharózou. Z Ramanových spektier sú u všetkých vzoriek PHB totožné píky. Predovšetkým sa tu nachádzajú píky pri 1100-1300 cm^{-1} charakteristické pre COC väzbu, pri 1290-1370 cm^{-1} kde sa nachádza väzba CH, ďalej pík v 1730 cm^{-1} značí väzby C=O a píky v oblasti 2930-3010 cm^{-1} väzby CH₃.

Pôsobením plazmy na PHB častice teda nedošlo k žiadnym viditeľným zmenám v štruktúre polyméru, len mohlo dôjsť k ovplyvneniu povrchu. Tieto zmeny však neboli detegovateľné.



Graf č. 13: Záznam Ramanovej analýzy

5.7 Dlhodobá stabilita sacharózy

S časticami s naviazanou sacharózou boli realizované testy stability, kde bolo sledované množstvo uvoľnenej sacharózy počas dlhodobého uchovávaní vo vodnom prostredí.

Zo vzorky č. 1 a č. 2 sa celá koncentrácia sacharózy uvoľnila okamžite po pridaní do roztoku. Zo vzorky č. 3 sa počas jednej hodiny uvoľnila do prostredia koncentrácia sacharózy 0,56 mg/ml. Zvyšná, naviazaná koncentrácia sacharózy na PHB bola 40,19 mg/ml. S touto vzorkou boli realizované experimenty zamerané na inkubáciu v prostredí tráviacich štiav. Zo vzorky č. 4 a 5 sa počas testu postupne uvoľnilo malé množstvo sacharózy do prostredia. Na štrnásty deň bola zo vzorky č. 4 uvoľnená celá koncentrácia sacharózy. Avšak, vo vzorke č. 5 zostala naviazaná koncentrácia sacharózy 26,7 mg/ml. S touto vzorkou bola nameraná stabilita po dvadsiatom prvom dni, kedy sa uvoľnila už celá koncentrácia do vodného prostredia. Záverom možno povedať, že doba imobilizácie sacharózy na PHB, či množstvo naviazaného množstva sacharózy má veľký vplyv na jej uvoľnenie sa do prostredia.

Tabuľka č. 11: Prehľad rôznych dôb uvoľňovania sacharózy z PHB do vodného prostredia

| | Vzorka č. 1 $c_{0,5h}$ | Vzorka č. 2 $c_{1,5}$ | Vzorka č. 3 $c_{3,5}$ | Vzorka č. 4 $c_{6,5}$ | Vzorka č. 5 c_{24} |
|----------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Naviazané množstvo (mg/ml) | 21,02 | 35,77 | 40,75 | 59,27 | 150,18 |
| Doba uvoľnenia | | | | | |
| 0 hodín | 19,11 | 34,73 | 0,32 | 0,28 | 0,29 |
| 1 hodina | 0,88 | 0,58 | 0,24 | 0,13 | 0,0 |
| 3 deň | | | | 22,74 | 45,41 |
| 7 deň | | | | 11,55 | 27,39 |
| 14 deň | | | | 24,44 | 50,92 |
| 21 deň | | | | | 25,84 |
| Spolu | 19,99 | 35,31 | 0,56 | 59,14 | 149,85 |

5.8 Stabilita imobilizovaného sladidla v modelovom fyziologickom prostredí

U naviazanej vzorky sacharózy bola sledovaná zmena množstva uvoľnenej koncentrácie z pripravených častíc pôsobením umelých tráviacich štiav. Koncentrácia naviazanej sacharózy po trojnásobnom premytí a následnej detekcií, bola stanovená na 21 mg/ml. Vzorka bola vystavená modelovej žalúdočnej, pankreatickej a žlčovej šťave a bolo sledované množstvo uvoľnenej sacharózy počas trávenia. Presný postup je uvedený v kap. 4.9.

Tabuľka č. 12: Uvoľnené množstvo sacharózy po pridaní modelových tráviacich štiav

| Čas 0 (mg/ml) | Po skončení trávení (mg/ml) | Uvoľnené v % |
|---------------|-----------------------------|--------------|
| 1,842 | × | 8,77 |
| 7,22 | × | 34,38 |
| 18,91 | 2,08 | 99,95 |

Zo vzorky sa pôsobením žalúdočnej šťavy uvoľnilo 8,77 % naviazaného množstva sacharózy. Tato koncentrácia sa však uvoľnila ihneď po pridaní šťavy k časticiam. Pri pôsobení pankreatickej šťavy sa takisto uvoľnilo veľké množstvo sacharózy ihneď po pridaní šťavy k časticiam, došlo tu k uvoľneniu 34,38% naviazanej koncentrácie. Po pridaní žlčovej šťavy sa zo vzorky uvoľnilo 99,95 %, pričom najväčšie množstvo sa uvoľnilo ihneď po pridaní šťavy.

6 ZÁVER

Predložená bakalárska práca bola zameraná na štúdium možnosti imobilizácie sladidiel na PHB častice. V teoretickej časti boli popísané objemové a nízkokalorické sladidlá, ich vlastnosti, metabolizmus a produkcia, ďalej vhodné nosičové systémy, ktoré sa využívajú v potravinárstve a možné spôsoby imobilizácie.

V experimentálnej časti bola optimalizovaná metóda prípravy PHB častíc. Častice boli pripravené tromi rôznymi metódami, a to metódou odparovania na tenkej vrstve, metódou odparovania z tenkej vrstvy na reverznej fáze a pomocou ultrazvuku. Ako najvhodnejšia metóda prípravy PHB častíc bol overený ultrazvuk. Na základe výberu vhodnej metódy bola ďalej optimalizovaná príprava PHB častíc pomocou ultrazvuku, a to buď s rôznym prídavkom alebo bez prídavku organickej fázy. U všetkých pripravených vzoriek bola zmeraná aj veľkosť častíc metódou dynamického rozptylu svetla. Takisto bol u všetkých pripravených vzoriek zmeraný zeta potenciál. Z výsledkov bol určený najvhodnejší postup prípravy častíc. Zvolený bol postup, kde bol použitý 2% roztok PHB v 1 ml chloroformu. Tieto častice vykazovali najlepšiu stabilitu, veľkosť aj koncentráciu.

Ďalej bola testovaná možnosť imobilizácie vybraných sladidiel na pripravené lyofilizované častice. Imobilizované boli glukóza, fruktóza, sacharóza, erytritol, mannitol a sorbitol. Samotná imobilizácia spočívala v inkubácii aktivovaných častíc s roztokmi sladidiel pri laboratórnej teplote. Aktivácia PHB častíc bola uskutočnená studenou plazmou. Stanovenie množstva sladidiel a sacharidov bolo realizované pomocou HPLC, kde bol v priebehu imobilizácie sledovaný úbytok naviazanej zložky. Častice boli po skončení imobilizácie trojnásobne premyté. Z rozdielu konečnej a počiatočnej koncentrácie bolo vypočítané naviazané množstvo. Doby imobilizácie boli 1,5 hodiny, 3,5 hodiny, 6,5 hodiny, 24 hodín. Z testovaných látok sa podarilo naviazať len sacharózu na plazmaticky upravené PHB častice. S dobou imobilizácie pritom rástlo aj množstvo naviazanej zložky. Najvyššie množstvo naviazanej sacharózy bolo tak stanovené po 24 hodinách, kde bolo imobilizovaných 34 % pôvodného množstva.

U častíc s naviazanou sacharózou bola ďalej sledovaná ich dlhodobá stabilita vo vodnom prostredí. Tu bolo celé naviazané množstvo sacharózy uvoľnené z najlepšej vzorky PHB častíc až po dvadsiatom prvom dni inkubácie. Stabilita častíc bola zmeraná aj v modelovom fyziologickom prostredí, a to v umelej žalúdočnej, pankreatickej a žlčovej šťave. V modelovom fyziologickom prostredí, kde bolo sledované modelové trávenie, došlo k najväčšiemu uvoľneniu sacharózy z pripravených častíc v prostredí črevnej šťavy, pričom najväčšie množstvo sa uvoľnilo po pridaní šťavy, teda ihneď po začiatku trávenia.

FT-IR analýzou a za použitia Ramanovej spektrometrie bol pozorovaný vplyv plazmy na PHB častice. Z výsledkov vyplýva, že pôsobením plazmy na PHB častice nedošlo k žiadnym viditeľným zmenám polyméru, mohlo však dôjsť k drobnému ovplyvneniu povrchu, pričom tieto zmeny sú ťažko detegovateľné.

Zhrnutím dosiahnutých výsledkov sa dá konštatovať, že boli pripravené PHB častice s naviazanou sacharózou. Bolo overené, že dĺžka periódy imobilizácie má veľký vplyv na množstvo naviazanej sacharózy a taktiež má vplyv aj na dlhodobú stabilitu častíc a teda na rýchlosť uvoľnenia sacharózy z PHB častíc do prostredia.

7 LITERATÚRA

- [1] Philippe, R. N, Mey, M. D., Anderson, J., Ajikumar, P. K., Fry, J. C., Nikoleli, G. P., Nikolelis, D., Hough, L.: Biotechnological Production of Natural Zero-Calorie Sweeteners. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, vol. 26, pp. 138-164. DOI: 10.1007/978-1-4615-3114-2_7.
- [2] Roberts, Jason R.: The Paradox of Artificial Sweeteners in Managing Obesity. *Current Gastroenterology Reports*, 2015, vol. 17. DOI: 10.1007/s11894-014-0423-z.
- [3] Fahlberg, C., Remnsen, I.: Ueber die Oxydation des Orthotoluolsulfamids. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 1879, vol. 12, pp. 469-473. DOI: 10.1002/cber.187901201135.
- [4] Sveda, M., Rosin, J., Landolt, RG., Kross, RD.: On Cyclamates. *Chemical & Engineering news*, 1969, vol. 47, pp. 6-&.
- [5] Mazur, R. H., Schlatter, J.M., Goldkamp, A.H.: Structure-Taste Relationships of Some Dipeptides. *Journal of the American Chemical Society*, 1969, vol. 91, pp. 2684-2691. DOI: 10.1021/ja01038a046.
- [6] Shallenberger, R. S., Bährle-rapp, M.: Acesulfame-K. *Appetite*, 1992, vol. 19, pp. 442-442. DOI: 10.1007/978-3-540-71095-0_8253.
- [7] Temizkan, S., Deyneli, O.: Sucralose Enhances GLP-1 Release and Lowers Blood Glucose in the Presence of Carbohydrate in Healthy Subjects but not in Patients with Type 2 Diabetes. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2015, vol. 69, pp. 162-166.
- [8] United States Food and Drug Administration (US FDA). 1998. Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption; Scuralose. 21CFR . Part 172 [Docket No. 87F0086]. Fed Regist. 63(64): 16417 16433. Available form: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/040398a.pdf>
- [9] Sims, J., Roberts, A., Daniel, J.W., Renwick, A.G.: The Metabolic Fate of Sucralose in Rats. *Food and Chemical Toxicology*, 2000, vol. 38, pp. 115-121. DOI: 10.1016/s0278-6915(00)00034-x.
- [10] Roberts, A., Renwick, A.G., Sims, J., Snodin, D.J.: Sucralose Metabolism and Pharmacokinetics in Man. *Food and Chemical Toxicology*, 2000, vol. 38, pp. 31-41. DOI: 10.1016/s0278-6915(00)00026-0.
- [11] Horton, D.: Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry PREFACE. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 2014, vol: 74. ISSN 0065-2318.
- [12] Pigman, W. W.: Chapter 4: Mutarotations and Actions of Acids and Bases. In Pigman and Horton. *The Carbohydrates: Chemistry and Biochemistry Vol 1A*. 2nd ed. San Diego: Academic Press., 1972. pp. 165–194.
- [13] Salway, J., Greenstein, B.: Medical Biochemistry at a Glance. 2nd ed. Malden, Mass: Blackwell Pub., 2006. 144 p. ISBN 14-051-1322-7.
- [14] Fairclough, S. H., Houston, K.: A Metabolic Measure of Mental Effort. *Biological Psychology*, 2004, vol. 66, pp. 177-190. DOI: 10.1016/j.biopsycho.2003.10.001.
- [15] Hynes, R. C., Le Page, Y.: Sucrose, a Convenient Test Crystal for Absolute Structures. *Journal of Applied Crystallography*. vol. 24, pp. 352-354. DOI: 10.1107/S0021889891002492.

- [16] Račická, E.: Náhradní sladidla, jejich místo v současné diabetologii. *Inerní Medicína pro Praxi*, 2012, vol. 14, pp. 331-335.
- [17] Grembecka, M.: Sugar Alcohols—their Role in the Modern World of Sweeteners: a review. *European Food Research and Technology*. DOI: 10.1007/s00217-015-2437-7. ISSN 1438-2377.
- [18] Munro: Erythritol: an Interpretive Summary of Biochemical, Metabolic, Toxicological and Clinical Data. *Food and Chemical Toxicology*. vol: 36.
- [19] Cock, P.: Erythritol. In: O'Donnell K, Kearsley MW. Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology, 2012, Wiley-Blackwell, West Sussex
- [20] Runnel, R., Mäkinen, KK., Honkola, S.: Effect of Three-Year Consumption of Erythritol, Xylitol and Sorbitol Eur Food Res Technol 13 Candies on Various Plaque and Salivary Caries-Related Variables. *J Dent*, 2013, vol. 41, pp. 1236-1244.
- [21] Bernt, W.O., Borzelleca, J.F., Flamm, G., Munro, I.C.: Erythritol: a Review of Biological and Toxicological Studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1996, vol: 24, pp.191-197. DOI: 10.1006/rtph.1996.0098.
- [22] Chattopadhyay, S., Raychaudhuri, U., Chakraborty, R.: Artificial Sweeteners – a Review. *Journal of Food Science and Technology*, 2011, vol. 51, pp. 611-621. DOI: 10.1007/s13197-011-0571-1.
- [23] Richter, H., Vlad, D., Unden, G.: Significance of Pantothenate for Glucose Fermentation by *Oenococcus Oeni* and for Suppression of the Erythritol and Acetate Production. *Archives of Microbiology*, 2001, vol: 175, pp. 26-31. DOI: 10.1007/s002030000233
- [24] Tomaszewska, L., Rywińska, A., Rymowicz, W.: High Selectivity of Erythritol Production from Glycerol by *Yarrowia Lipolytica*. *Biomass and Bioenergy*, 2014, vol. 64, pp. 309-320. DOI: 10.1016/j.biombioe.2014.03.005.
- [25] Kalamaras, P.M., Kraly, P.T.: *Sugar and Sweeteners: Trends and Developments in Foods and Beverages*. Norwalk, CT: Business Communications Co., 2003, xxx, 191 p., [2]. ISBN 15-696-5144-2.
- [26] Takatsuka, T., Exterkate, R., Cate, J.M: Effects of Isomalt on Enamel de- and Remineralization, a Combined in Vitro pH-Cycling Model and in situ Study. *Clinical Oral Investigations*, 2007, vol. 12, pp. 173-177. DOI: 10.1007/s00784-007-0155-7.
- [27] Gostner, A., Blaut, M., Schäffer, V., Kozianowski, G., et al.: Effect of Isomalt Consumption on Faecal Microflora and Colonic Metabolism in Healthy Volunteers. *British Journal of Nutrition*, 2006, vol. 95. DOI: 10.1079/bjn20051589.
- [28] Cho, S., Finocchiaro, E.: *Handbook of prebiotics and probiotics ingredients: health benefits and food applications*. Boca Raton: CRC Press, 2010, xvii, 435 p. ISBN 14-200-6213-1.
- [29] Kearsley, M., Boghani, N., Deis, R., Heume, M., Rapaille, A.: New Form of Maltitol. *Trends in Food Science*, 1997, vol. 8, pp. 85-108. DOI: 10.1007/978-1-4613-1229-1_5.
- [30] Ghoreishi, S.M., Shahrestano, R.G., et al.: Innovative Strategies for Engineering Mannitol Production. *Trends in Food Science*, 2009, vol. 20, pp. 289-295. DOI: 10.3920/978-90-8686-726-4_46.

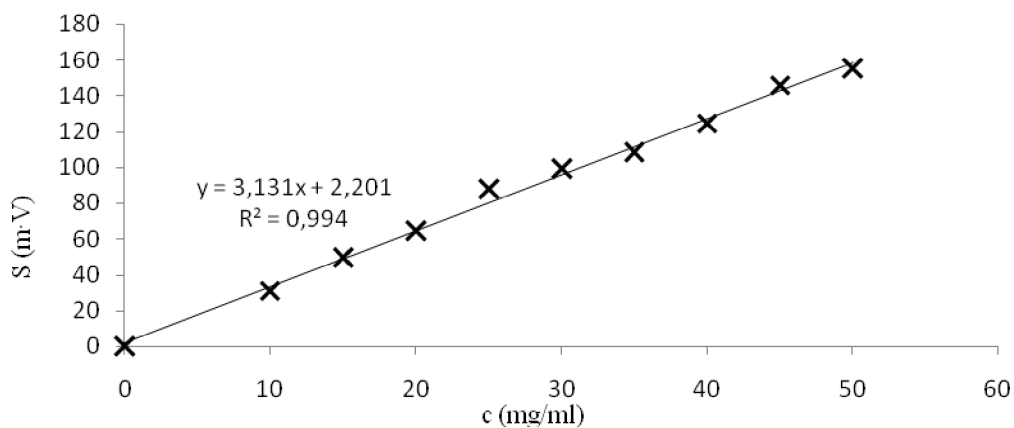
- [31] Ortiz, M. E., Bleckwedel, J., Raya, R.R., Mozzi, F.: Biotechnological and in situ Food Production of Polyols by Lactic Acid Bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, vol. 97, pp. 4713-4726. DOI: 10.1007/s00253-013-4884-z.
- [32] Nigam, P.: Processes for Fermentative Production of Xylitol -- a Sugar Substitute. *Process Biochemistry*, 1995, vol. 30, pp. 117-124.
- [33] Chattopadhyay, S., Raychaudhuri, U., Chakraborty, R.: Artificial Sweeteners – a Review. *Journal of Food Science and Technology*, 2014, vol. 51, pp. 611-621.
- [34] Čopíková, J., Moravcová, J.: Náhradní sladidla. *Chem. Listy*, 2013, vol. 107, pp. 867–874.
- [35] Mudgil, D., Barak, S., Gao, Y., Yue, J.: Composition, Properties and Health Benefits of Indigestible Carbohydrate Polymers as Dietary Fiber: A Review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, vol. 61, pp. 261-271.
- [36] Miková, G., Chodák, I.: Vlastnosti a modifikácia poly(3-hydroxybutyrátu). *Chem. Listy*, 2006, vol. 100, pp. 1075-1083.
- [37] Velíšek, J.: *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009 ISBN 978-80-86659-17-6.
- [38] Sinha, V.R., Kumria, R.: Polysaccharides in Colon-Specific Drug Delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, vol. 224, pp. 19-38.
- [39] González, R.M., Villanueva, M.P.: Starch-Based Polymers for Food Packaging. *Multifunctional and Nanoreinforced Polymers for Food Packaging*. Elsevier, 2011, vol.: 527. DOI: 10.1533/9780857092786.4.527. ISBN 9781845697389.
- [40] Cooper, N.F., TAKEMOTO, K. et al.: Bioactive Polymeric Systems. *Biochemical Education*, 1986, vol. 14, pp. 143-150. DOI: 10.1007/978-1-4757-0405-1_6.
- [41] Goddard, J.M., Hotchkiss, M.P.: Starch-Based Polymers for Food Packaging. *Progress in Polymer Science*. Elsevier, 2007, vol. 32, pp. 527. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2007.04.002. ISBN 9781845697389. ISSN 00796700.
- [42] De Geyter, N., Mornet, R.: Cold Plasma Surface Modification of Biodegradable Polymer Biomaterials. *Biomaterials for Bone Regeneration*. Elsevier, 2014, vol. 32, pp. 202. DOI: 10.1533/9780857098104.2.202. ISBN 9780857098047.
- [43] Kim, Y. H.: Top-down, Bottom-up, or Both? Toward an Integrative Perspective on Operations Strategy Formation. *Journal of Operations Management*. Elsevier, 2014, vol. 32, pp. 462-474. DOI: 10.1016/j.jom.2014.09.005.
- [44] Cerqueira, M. A., Pinheiro, A.C., Silva, H.D., et al.: Design of Bio-Nanosystems for Oral Delivery of Functional Compounds. *Food Engineering Reviews*. Elsevier, 2014, vol. 6, pp. 1-19. DOI: 10.1007/s12393-013-9074-3. ISBN 9780857098047. ISSN 1866-7910.
- [45] United States Food and Drug Administration (US FDA). 2015. GRAS Substances (SCOGS) Database. Available from: <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/SCOGS/default.htm>
- [46] Schmidt, M.: *Ultra-high performance concrete and nanotechnology in construction: proceedings of Hipermat 2012, 3rd International Symposium on UHPC and Nanotechnology for High Performance Construction Materials, Kassel, March 7 - 9, 2012*. Kassel: Kassel Univ. Press, 2012. ISBN 978-386-2192-656.

8 ZOZNAM SKRATIEK

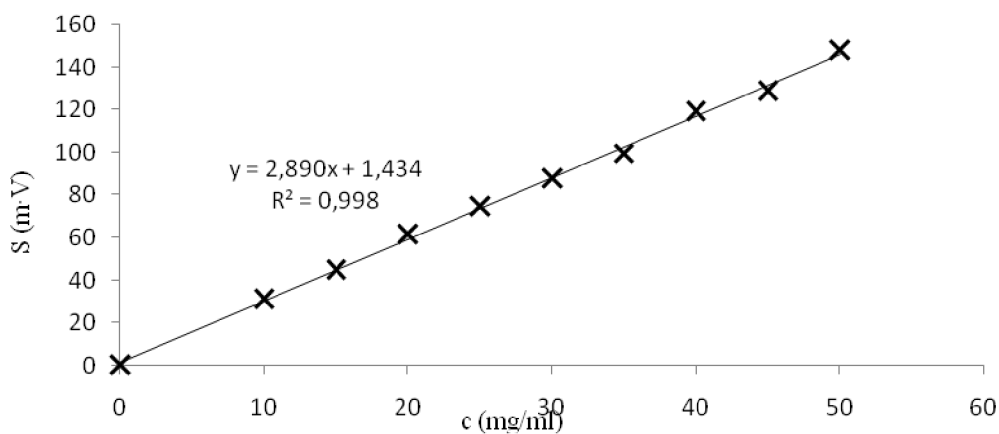
| | |
|--------|---|
| PHB | polyhydroxybutyrát |
| DLS | dynamický rozptyl svetla |
| TLE | odparovanie na tenkej vrstve |
| RP-TLE | odparovanie z tenkej vrstvy na reverznej fáze |
| c | koncentrácia |
| FT-IR | Infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou |
| ATR | zoslabená úplná reflexia (Attenuated Total Reflectance) |

9 PRÍLOHY

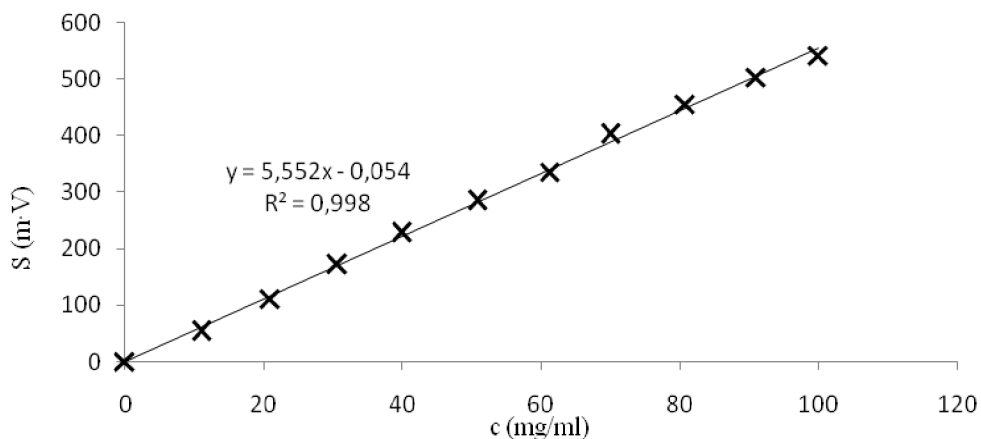
9.1 Príloha 1. Kalibračné krivky sladidiel



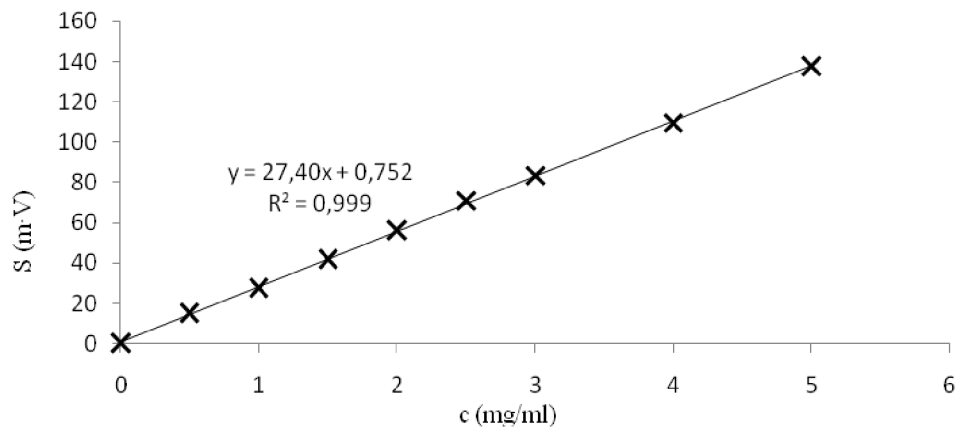
Graf 1: Kalibračná krivka na kvantitatívne stanovenie sacharózy



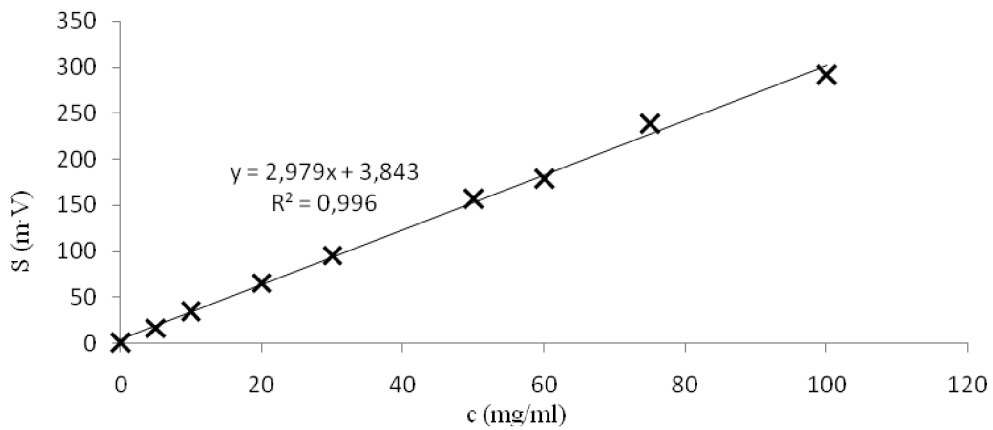
Graf 2: Kalibračná krivka na kvantitatívne stanovenie fruktózy



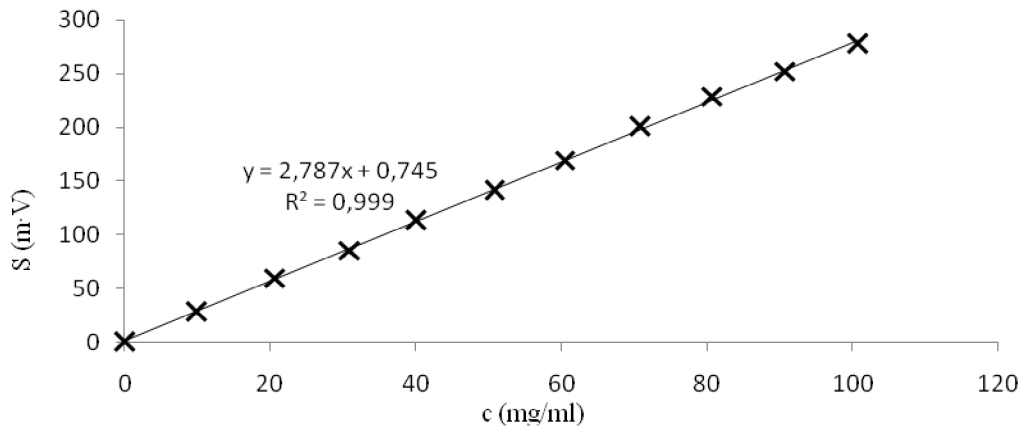
Graf 3: Kalibračná krivka na kvantitatívne stanovenie glukózy



Graf 4: Kalibračná krivka na kvantitatívne stanovenie erytritolu

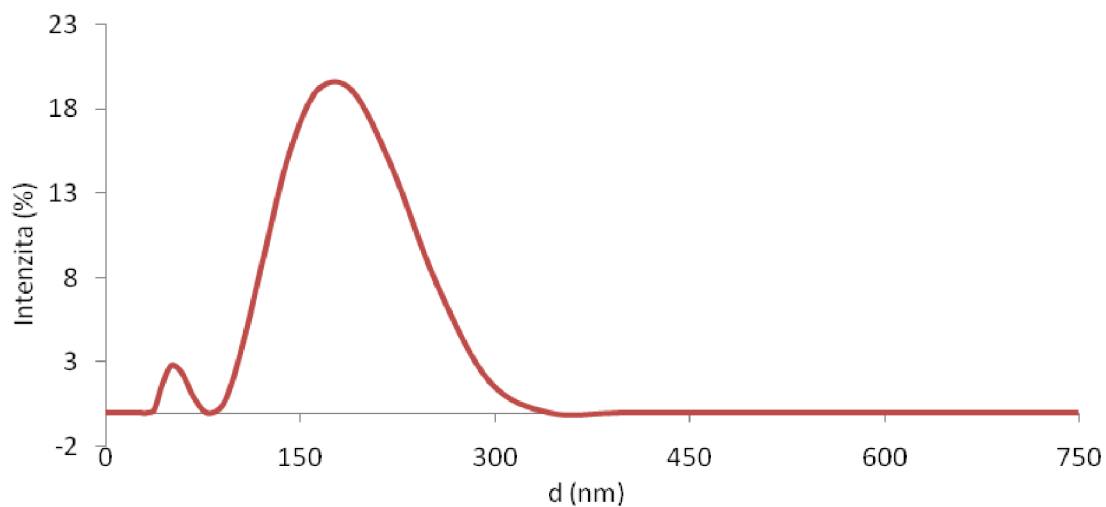


Graf 5: Kalibračná krivka na kvantitatívne stanovenie manitolu

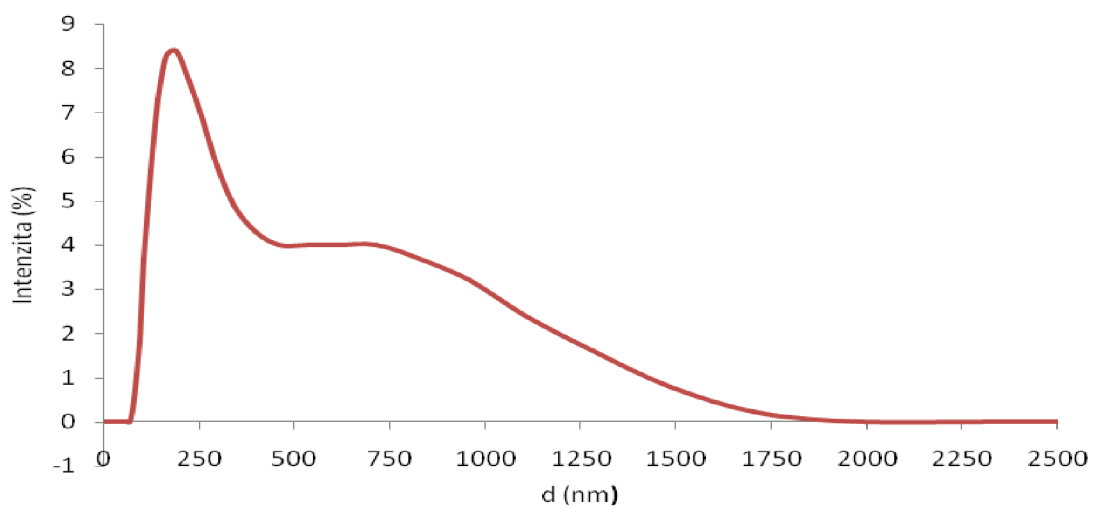


Graf 6: Kalibračná krivka na kvantitatívne stanovenie sorbitolu

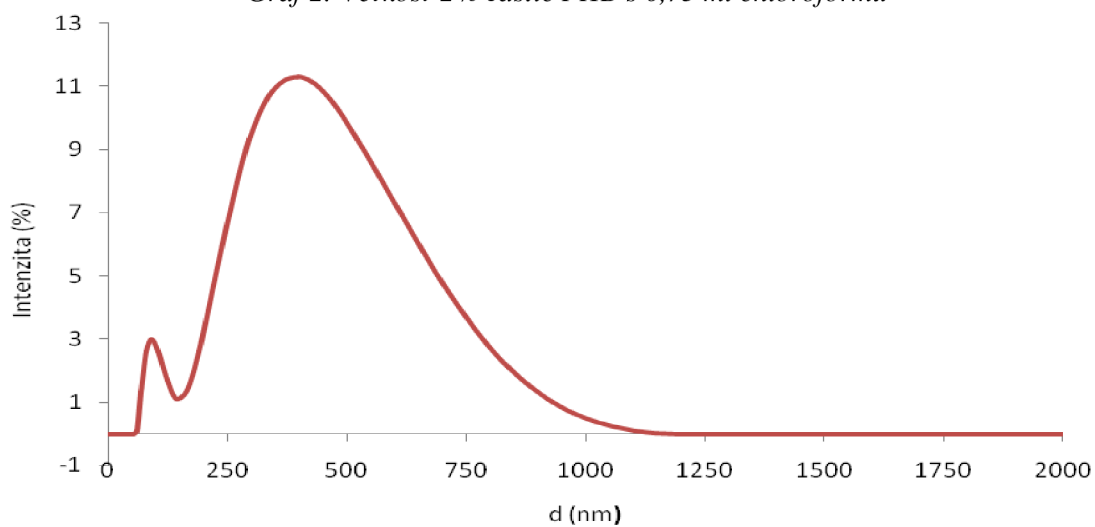
9.2 Príloha 2. Záznamy stanovenia veľkosti častíc metódou DLS



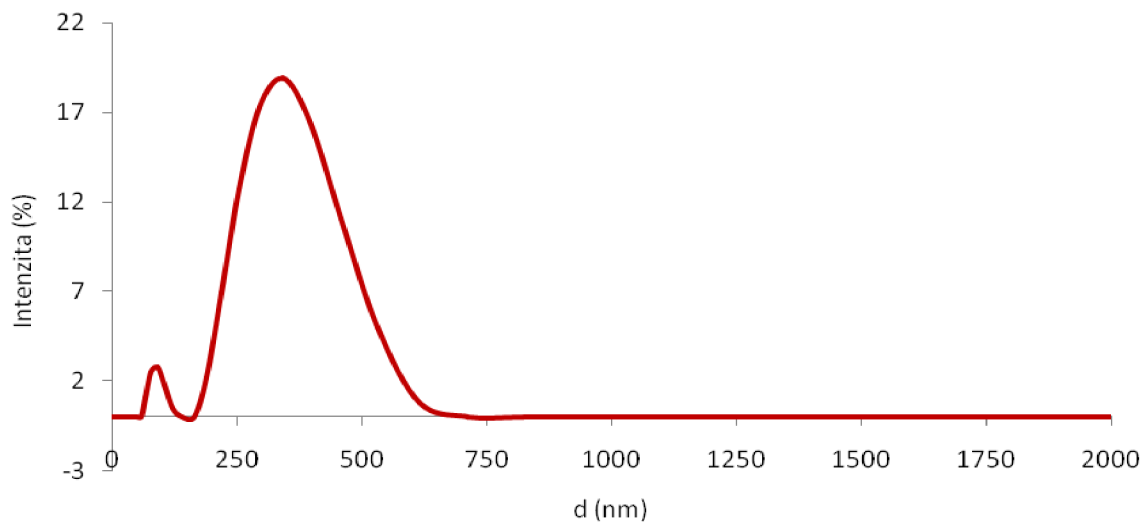
Graf 1: Veľkosť 2% častíc PHB s 0,5 ml chloroformu



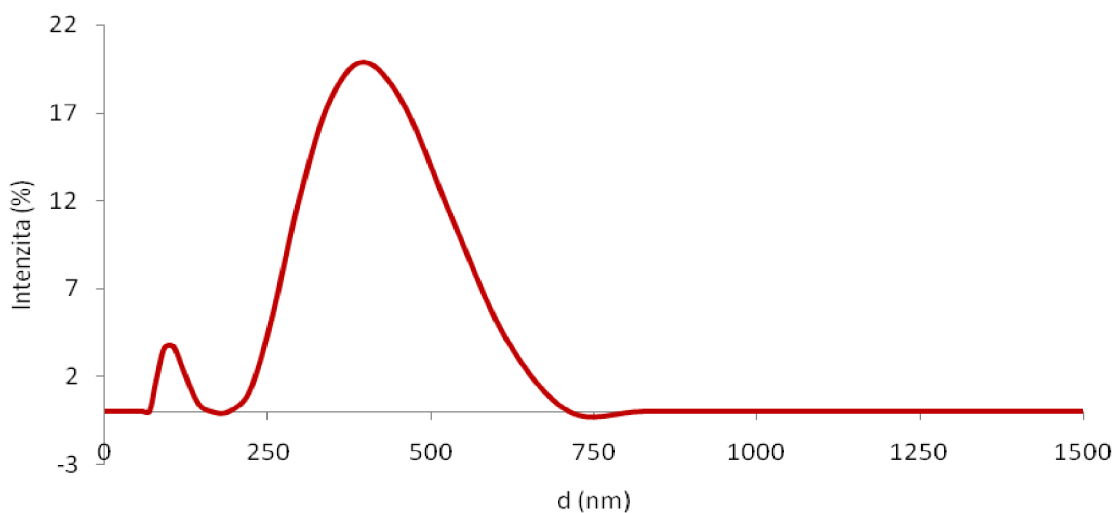
Graf 2: Veľkosť 2% častíc PHB s 0,75 ml chloroformu



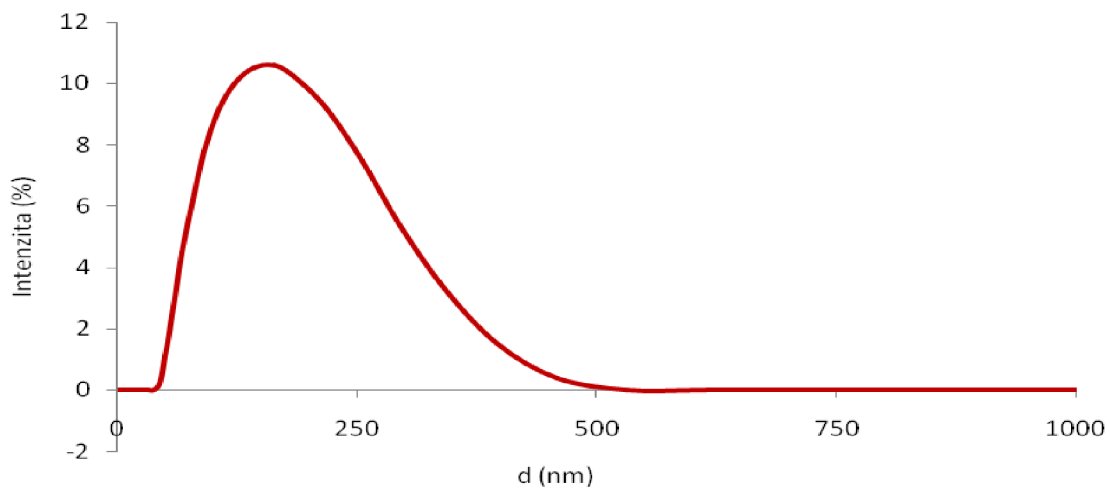
Graf 3: Veľkosť 2% častíc PHB s 1 ml chloroformu



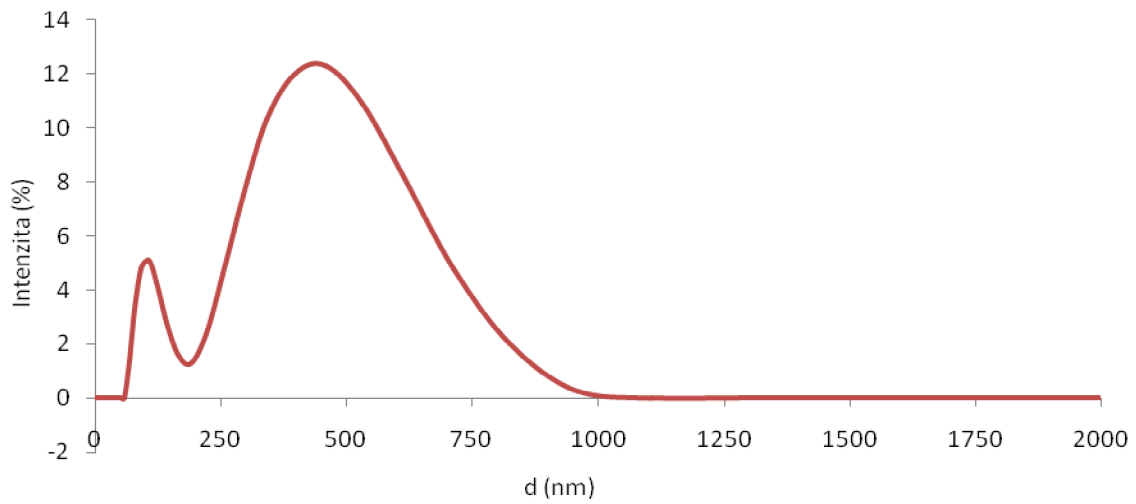
Graf 4: Velkost' 2% částic PHB s 2 ml chloroformu



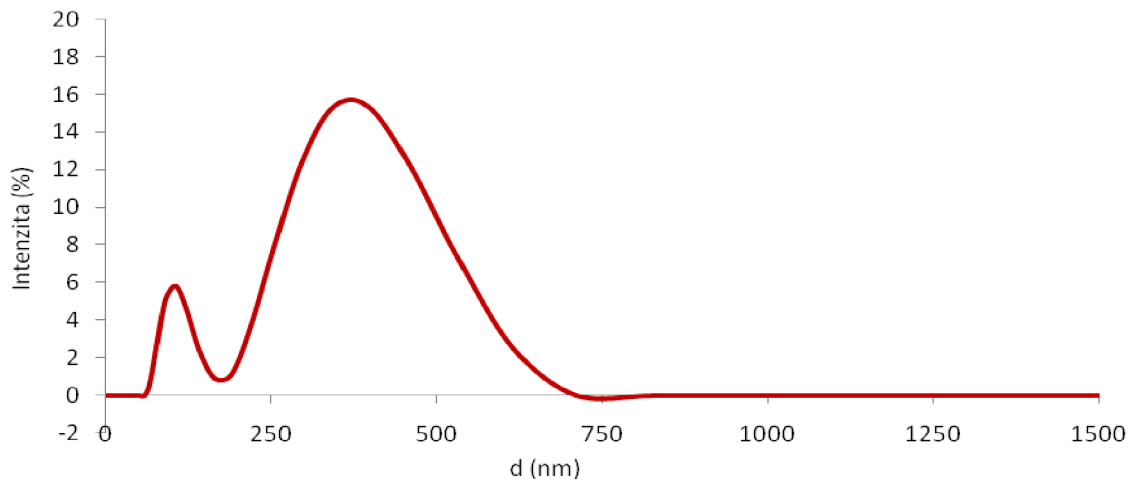
Graf 5: Velkost' 2% částic PHB s 4 ml chloroformu



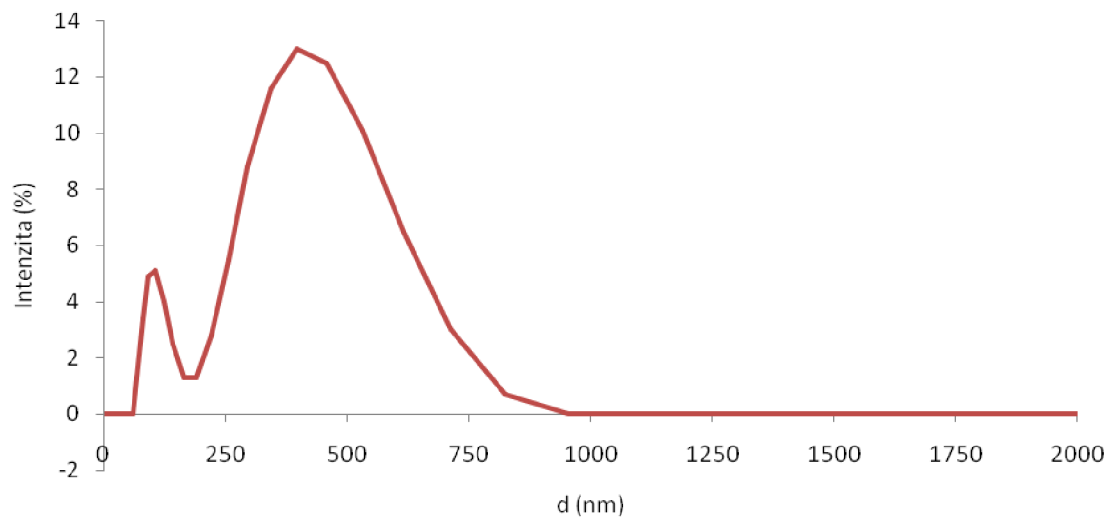
Graf 6: Velkost' 1% částic PHB s 0,5 ml chloroformu



Graf 7: Velkosť 1% častíc PHB s 1 ml chloroformu



Graf 8: Velkosť 1% častíc PHB s 2 ml chloroformu



Graf 9: Velkosť 3% častíc PHB s 2 ml chloroformu