

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTIDY A MOŽNOSTI JEJICH APLIKACE DO
POTRAVIN

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

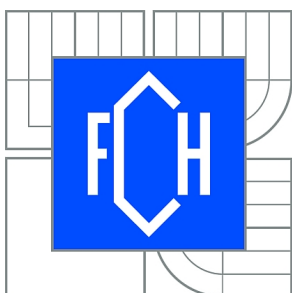
FILIP JANHUBA

BRNO 2012



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTIDY A MOŽNOSTI JEJICH APLIKACE DO POTRAVIN

ANTIMICROBIAL PEPTIDES AND THEIR APPLICATION INTO FOODS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

FILIP JANHUBA

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2012



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0648/2011	Akademický rok: 2011/2012
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Filip Janhuba	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Biotechnologie (2810R001)	
Vedoucí práce	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti:	Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.	

Název bakalářské práce:

Antimikrobiální peptidy a možnosti jejich aplikace do potravin

Zadání bakalářské práce:

1. Přehled antimikrobiálních peptidů používaných v potravinářství a forma jejich aplikace - rešerše.
2. Optimalizace metod stanovení koncentrace a antimikrobiální aktivity nisinu a lysozymu
3. Enkapsulace nisinu a lysozymu a studium stability částic v různých podmínkách.
4. Aplikace enkapsulovaných peptidů do modelových potravin.

Termín odevzdání bakalářské práce: 4.5.2012

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Filip Janhuba
Student(ka)

doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Předložená bakalářská práce je zaměřená na studium antimikrobiálních peptidů a možnosti jejich aplikace do potravin. Pozornost byla zaměřena zejména na bakteriocin nisin a antimikrobiální enzym lysozym. V teoretické části byla zpracována literární rešerše zaměřená na přehled antimikrobiálních peptidů používaných v potravinářství. V rámci experimentální části práce byla provedena optimalizace metod stanovení koncentrace antimikrobiálních látek. Byly vyzkoušeny jak spektrofotometrické metody kvantitativní analýzy celkových proteinů, tak rovněž stanovení metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Pro určení molekulové hmotnosti a čistoty byla použita modifikovaná SDS-PAGE s přidavkem močoviny a tricínového pufru.

Dále byly testovány možnosti enkapsulace nisinu do liposomů. Enkapsulované částice byly připraveny pomocí tří postupů: ultrazvuku, etanolového vstříkávání a metody TLE. Částice byly podrobeny studiu stability a distribuce velikosti částic metodou dynamického rozptylu světla. Dále byla sledována i stabilita enkapsulovaných peptidů v modelových podmínkách a potravinách.

Nakonec byly u vybraných peptidů studovány antibakteriální vlastnosti s použitím kultur bakterie *Bacillus subtilis*, kde zejména nisin vykázal antimikrobiální efekt již v nízkých koncentracích - okolo 1 $\mu\text{g/ml}$. Inhibiční efekt nisinu byl patrný především v tekutých kulturách.

ABSTRACT

The presented thesis is focused on a study of antimicrobial peptides and their potential applications into foods. Two types of antimicrobial peptides were studied in detail - bacteriocin nisin and antimicrobial enzyme lysozyme. In theoretical part an overview of antimicrobial peptides used in food industry was introduced. The experimental part of this work was focused on optimization of methods for the determination of antimicrobial peptides concentration. Commonly used spectrophotometric methods for quantitative analysis of total proteins as well as high performance liquid chromatography were tested. To determine the molecular weight and purity a modified SDS-PAGE with the addition of urea and tricine buffer was performed.

Further, encapsulation of nisin into liposome was tested. Encapsulated particles were prepared by three different procedures: by ultrasonication, ethanol injection and TLE. Particles stability, distribution and size were studied by dynamic light scattering. Stability of encapsulated peptides in model conditions and model foods was studied too.

Finally, antibacterial properties of the selected peptides using test system *Bacillus subtilis* were studied. Nisin already showed antimicrobial effect at low concentrations - about 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. The inhibitory effect of nisin was more evident in liquid cultures.

Klíčová slova:

Nisin, lysozym, *Lactococcus Lactis*, *Bacillus subtilis*, Tricine-SDS-PAGE, HPLC, DLS, enkapsulace, liposomy

Keywords:

Nisin, lysozyme, *Bacillus subtilis*, Tricine-SDS-PAGE, HPLC, DLS, encapsulation, liposomes

JANHUBA, F. *Antimikrobiální peptidy a možnosti jejich aplikace do potravin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 69 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc..

Prohlášení

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

.....
podpis studenta

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat vedoucí mé práce doc. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za vstřícný a lidský přístup, nadhled a inspiraci. Dále také Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D za cenné rady při práci v laboratoři a v neposlední řadě Ing. Petře Matouškové za celkovou nápomoc při měření.

OBSAH

Obsah	9
1 Úvod.....	11
2 Teoretická část	12
2.1 Bakteriociny	12
2.1.1 Dělení bakteriocinů	12
2.2 Nisin	12
2.2.1 Struktura.....	13
2.2.2 Vlastnosti nisinu.....	15
2.2.3 Význam nisinu	15
2.2.4 Biosyntéza.....	15
2.2.5 Využití v potravinách.....	15
2.3 Lysozym	16
2.3.1 Struktura lysozymu	16
2.3.2 Vlastnosti lysozymu.....	17
2.3.3 Funkce v živých systémech	17
2.4 Kultivace mikroorganismů.....	18
2.4.1 Rozdělení mikrobů.....	18
2.4.2 Charakteristika testovacích bakterií druhu <i>Bacillus subtilis</i>	18
2.4.3 Živná média	18
2.4.4 Kultivační metody.....	19
2.4.5 Látky potlačující růst	19
2.4.6 Využití mikrobiálních systémů při některých analytických stanoveních	19
2.5 Vybrané metody analýzy a charakterizace peptidů a bílkovin.....	20
2.5.1 Absorpční spektrofotometrie	20
2.5.2 Gelová elektroforéza.....	22
2.5.3 Využití chromatografie v analýze proteinů.....	24
2.6 Metody enkapsulace peptidů a analýzy enkapsulovaných částic.....	26
2.6.1 Liposomy	26
2.6.2 Enkapsulace látek do liposomů.....	27
2.6.3 Možnosti aplikace a stabilizace antimikrobiálních látek v potravinách	28
2.6.4 Charakterizace částic metodou DLS	28
3 Cíl práce	30
4 Experimentální část.....	31
4.1 Použité mikroorganismy	31
4.2 Použité standardní chemikálie.....	31
4.2.1 Chemikálie použité na spektrofotometrické stanovení.....	31
4.2.2 Chemikálie použité na elektroforézu	31
4.2.3 Chemikálie použité na HPLC	31
4.2.4 Chemikálie použité na kultivaci <i>Bacillus subtilis</i>	32
4.3 Přístroje a pomůcky.....	32
4.4 Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinů a peptidů	32
4.4.1 Biuretová metoda	32
4.4.2 Metoda Hartree-Lowry	33
4.4.3 Metoda dle Bradfordové	33

4.4.4	Bicinchoninová metoda	34
4.4.5	Stanovení absorpčního spektra v UV oblasti	34
4.5	SDS-PAGE.....	34
4.5.1	Laemmli-SDS-PAGE.....	34
4.5.2	Tricine-SDS-PAGE.....	35
4.6	Stanovení koncentrace nisinu metodou HPLC.....	35
4.6.1	Volba stacionární fáze (kolony).....	35
4.6.2	Volba mobilní fáze.....	35
4.7	Antimikrobiální test.....	35
4.7.1	Kultivace <i>Bacillus subtilis</i>	35
4.7.2	Testy antimikrobiální aktivity.....	36
4.7.3	Stanovení koncentrace biomasy testovacího kmene – stanovení antimikrobiální aktivity v tekutém médiu	37
4.8	Enkapsulace.....	37
4.8.1	Příprava liposomů	37
4.8.2	Stanovení enkapsulační účinnosti	38
4.8.3	DLS měření parametrů liposomů.....	39
4.8.4	Studium stability enkapsulovaných částic v modelových podmínkách.....	39
4.8.5	Aplikace enkapsulovaných částic do modelových potravin	39
5	Výsledky a diskuse	40
5.1	Optimalizace metod stanovení koncentrace peptidů konvenčními metodami	40
5.1.1	Kalibrační křivky	40
5.1.2	Stanovení absorpčního spektra	44
5.2	Optimalizace stanovení koncentrace peptidů pomocí HPLC.....	46
5.3	Identifikace proteinů pomocí SDS-PAGE	46
5.3.1	Laemmli-SDS-PAGE.....	47
5.3.2	Tricine-SDS-PAGE.....	48
5.4	Testy antimikrobiálních vlastností	48
5.4.1	Tekutá média.....	48
5.5	Enkapsulace.....	51
5.5.1	Enkapsulační účinnost	51
5.5.2	Analýza částic s enkapsulovaným nisinem a lysozymem.....	51
5.5.3	Studium stability částic v různých modelových podmínkách.....	55
5.5.4	Aplikace do modelových potravin	57
5.5.5	Testování antimikrobiální aktivity na tuhých médiích	60
6	Závěry	62
7	Literatura.....	64
8	Seznam použitých zkratk	69

1 ÚVOD

Hlavní náplní práce je studium antimikrobiální aktivity nejznámějšího z řad bakteriocinů nisinu. Jde o velmi malý antimikrobiální peptid, který obsahuje pouze třicet čtyři aminokyselin. Je produkován některými bakteriemi mléčného kvašení, především druhu *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nebo *Streptococcus lactis*. V současné době je velmi diskutována účinnost a následná možnost aplikace proti jednomu z největších potravinových patogenů *Listeria monocytogenes* a proti obtížně léčitelným infekcím způsobeným methicilin-rezistentním zlatým stafylokokem (MRSA), což je rezistentní variace běžného druhu *Staphylococcus aureus*.

Nisin je přírodní látka, toxikologicky bezpečná, široce využívaná jako antibakteriální přísada do potravin. Nisin vykazuje antimikrobiální efekt vůči řadě gram pozitivních bakterií, velmi účinný je vůči spórám. Naopak nízkou nebo vůbec žádnou aktivitu nevykazuje vůči gramnegativním bakteriím, kvasinkám a plísním. V roce 1969 byl nisin schválen komisí expertů FAO/WHO jako antimikrobiální látka použitelná do potravin a dostal označení E234. Je povolen k použití ve více než 50 zemích světa. Je povolen jako přídatek např. do zmrzlinových produktů v koncentraci maximálně $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, do pečených moučných výrobků do $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, v sýrech a sýrových produktech, olejových emulzích, rajčatových produktech kolem pH 4,5, v pivu a podobných nápojích, produktech s tekutými žloutky, mléčných výrobcích, dezertech, omáčkách, majonéze, dresinku a dalších výrobcích v souladu s pravidly správné potravinářské praxe (HACAP). Široké možnosti využití nisinu jsou podmíněny jeho základními charakteristikami: je netoxický; přirozený producent *L.lactis* je považován za bezpečný kmen (food-grade); není používán v klinické praxi, a tudíž nevykazuje zkříženou rezistenci s antibiotiky využívanými k léčbě infekcí a také je rychle zpracován v trávicím traktu. Od roku 1953 je nisin známý pod komerčním názvem Nisaplin, což je produkt obsahující asi 2,5% nisinu v mléčném základě potřebném pro růst a fermentační aktivitu *L.lactis*. Produkt je standardizován na aktivitu 1 mil. UI na gram.

Bakteriociny v podobě antimikrobiálních peptidů, jakožto produkty bakterií ničící jiné bakterie, jsou nadějnou alternativou současně používaných více či méně toxičtějších konzervačních prostředků v potravinářství. Jsou pro člověka netoxické, jsou téměř bez chuti a zápachu a jejich aplikace je vhodná především v perspektivní enkapsulované formě, tedy uzavřené do stravitelných obalů. Pro své antimikrobiální účinky se také nabízí použití v kosmetice při léčbě problematických infekcí kůže, jako např. infekce způsobené MRSA.

Enkapsulace je velmi perspektivní odvětví a v současné době je tomuto tématu věnována velká pozornost. Umožňuje zvýšení stability aktivních látek a jejich cílené a regulované uvolňování v místě účinku.

V předložené práci byl studován bakteriocin nisin ve volné i enkapsulované formě. Byly zavedeny metody pro stanovení koncentrace tohoto obtížně analyzovatelného peptidu s využitím moderních elektromigračních i chromatografických technik. Účinek nisinu byl srovnán s dalším široce používaným antimikrobiálním přírodním polypeptidem lysozymem. Dále byly testovány možnosti enkapsulace nisinu a lysozymu do liposomů, následně byla studována stabilita těchto částic v různých podmínkách a byla též provedena aplikace do modelových potravin. Antimikrobiální aktivita byla sledována na kulturách *Bacillus subtilis* a byla provedena jak s čistou, tak s enkapsulovanou formou.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Bakteriociny

Bakteriociny jsou peptidy produkované bakteriemi, které vykazují antimikrobiální vlastnosti. Jde obvykle o kratší peptidy, např. nisin se skládá ze 34 aminokyselin. Všechny bakteriociny jsou aktivní zejména ke grampozitivním bakteriím, jelikož gramnegativní bakterie mají odolnější buněčnou stěnu, která jim poskytuje dostatečnou ochranu. Název bakteriocin pochází z roku 1953 a dělí se na dvě skupiny, na lantibiotika obsahující lanthionin a nelantibiotika, které jej neobsahují [1].

2.1.1 Dělení bakteriocinů

Dle velikosti jsou bakteriociny rozdělovány do čtyř skupin. Nejvýznamnější třídou je třída I a k nejvýznamnějším antimikrobiálním peptidům vůbec, patří právě nisin [2;3;4;5].

Třída I – lantibiotika

- malé molekuly (řádově v jednotkách kDa)
- obsahující netypické aminokyseliny, např. lanthionin (Obr. 1)
- termostabilní
- např. nisin, subtilin, epidermin

Třída II – nízkomolekulární peptidické bakteriociny

- malé molekuly (do 10 kDa)
- neobsahují žádné modifikované aminokyseliny
- termostabilní, kationaktivní a hydrofobní peptidy
- např. pediocin PA-1, Lacticin F, Plantaricin A

Třída III – vysokomolekulární proteinové bakteriociny

- velké molekuly (nad 30 kDa)
- termolabilní
- např. helveticin, casicin 80

Třída IV – komplexní bakteriociny

- velké komplexní molekuly
- složené z proteinové a neproteinové části (např. lipidické, sacharidové)
- např. lactocin 27, plantaricin S

2.2 Nisin

Nisin patří mezi nejvíce probádaná a nejvíce používaná lantibiotika. V odborné literatuře jde také o první známé lantibiotikum [6]. Nisin byl poprvé objeven v roce 1928, kdy bylo zjištěno, že bakterie *Streptococcus lactis* inhibovaly růst kolonií *Lactobacillus delbruckii* subsp. *bulgaricus* a název nisin byl odvozen z podstaty jeho účinku „N inhibitory substance“. První studie jeho terapeutického využití zahrnovali testování léčby mastitidy dojníc [7]. V roce 1969 byl WHO uznán jako netoxický a povolen jako konzervační aditivum do potravin, v roce 1983 byl začleněn do seznamu potravinářských aditiv EEC a bylo mu přiděleno označení E234, v roce 1988 byl dle US Food and Drug Agency shledán jako

GRAS (generally recognized as safe; obecně shledáno jako bezpečné) a konečně v roce 1996 byl povolen ve více než 50 zemích, včetně Evropské unie jako bezpečné konzervační potravinářské aditivum [8]. V poslední době se však objevují ohlasy, že nisin může způsobit rezistenci na ostatní antibiotika. Pro člověka je neškodný, toxicita se dá přirovnat ke kuchyňské soli, tzn. při perorálním podání u krys je LD₅₀ 7 g/kg tělesné váhy [9].

Vyskytuje se přirozeně v přírodě, resp. je přirozeně syntetizován některými bakteriemi mléčného kvašení, především bakterií *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, případně *Streptococcus lactis* [10].

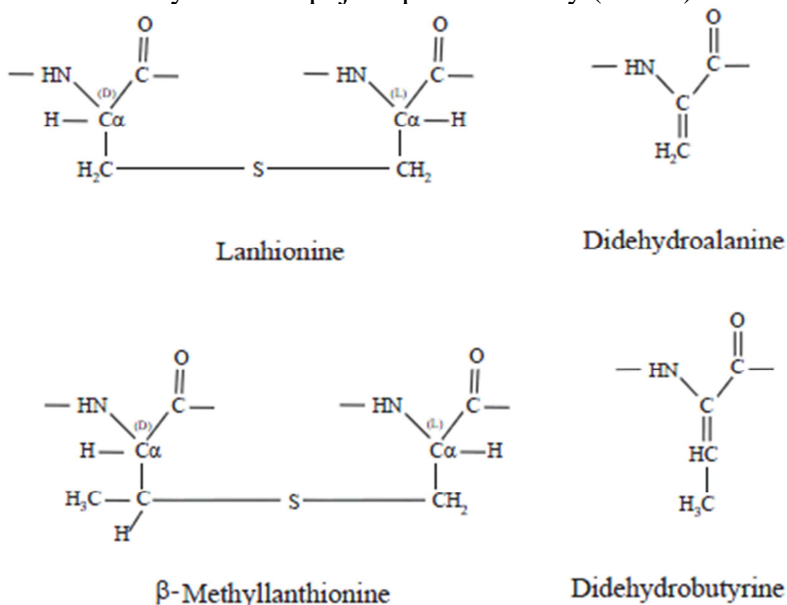
Tab. 1: Obecné informace o Nisinu A [9].

C.A.S.:	1414-45-5
Molekulová hmotnost:	3354,07 g·mol ⁻¹ (3,35 kDa)
Sumární vzorec:	C ₁₄₃ H ₂₃₀ N ₄₂ O ₃₇ S ₇
Alternativní názvy:	E234; Nisaplin TM ; Nisitrol; Novasin TM
Rozpustnost ve vodě:	57 mg·ml ⁻¹
Toxicita (LD ₅₀ , perorálně, krysa):	7 g·kg ⁻¹

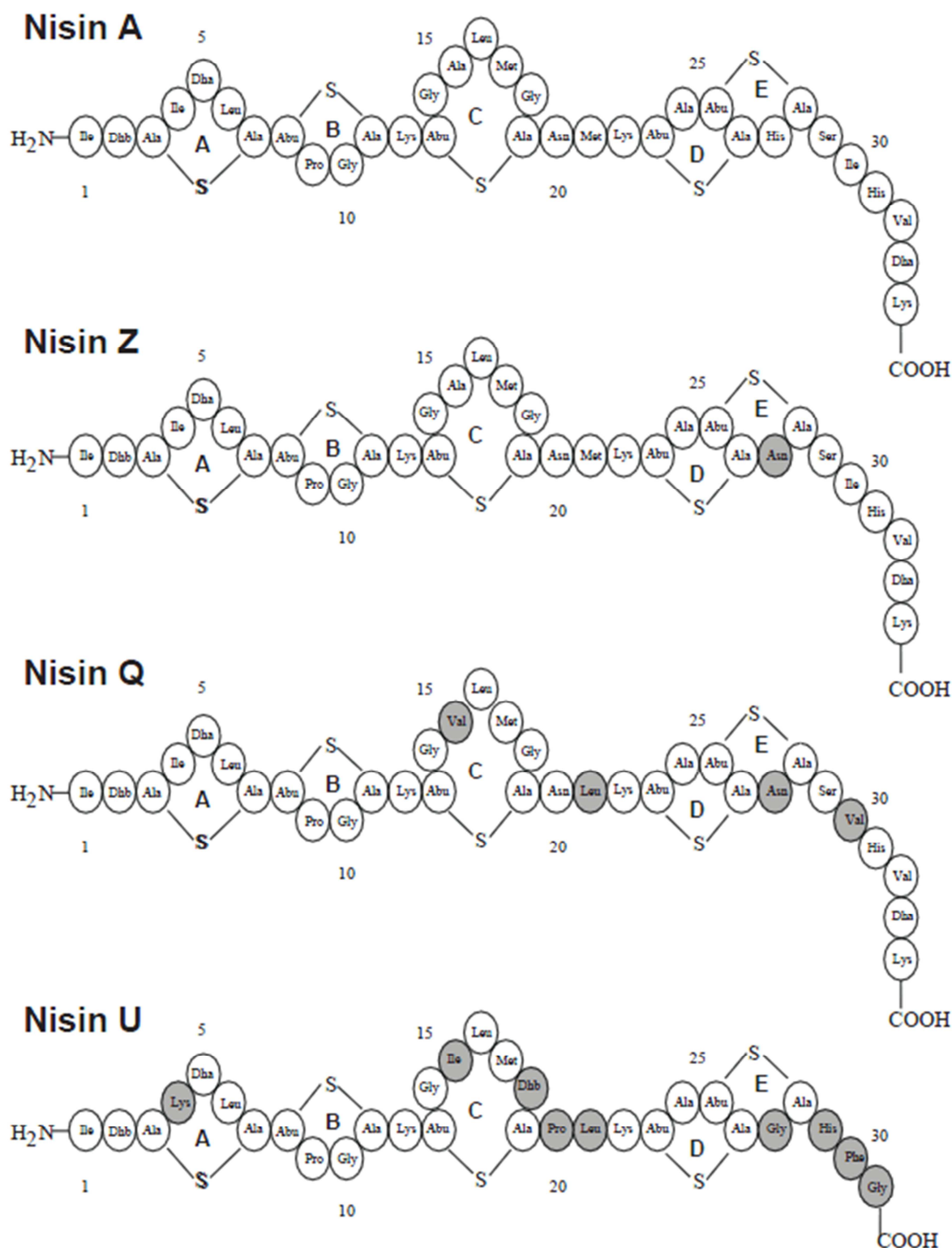
2.2.1 Struktura

V čisté přírodní formě jde o směs strukturně velmi blízkých antimikrobiálních peptidů produkovaných některými bakteriemi mléčného kvašení. Hlavním a nejúčinnějším peptidem je Nisin A, který je komerčně dostupný pouze v podobě 2,5% preparátu (2,5 % nisin A, 77,5 % NaCl a 20 % netučné sušené mléko) [7]. Tento preparát byl použit v podobě produktu firmy Sigma – Aldrich pro experimentální část práce. Izolace je náročná a nisin je při vyšších koncentracích nestabilní, proto i 2,5% preparát je velmi finančně nákladný. Druhou nejrozšířenější modifikací je Nisin Z, lišící se mírně odlišnou kompozicí aminokyselin a biologickou aktivitou [12;6]. Další již méně významné typy jsou Nisin Q a Nisin U (Obr. 2) a nejméně významný Nisin F.

Nisin je tvořen třiceti čtyřmi aminokyselinovými zbytky [11], obsahuje pět cyklických struktur a je zasíťován pomocí pěti disulfidických můstků. Jako základ obsahuje modifikovanou aminokyselinu lanthionin, podle které jsou lantibiotika obecně pojmenována, jde v podstatě o dvě molekuly alaninu spojené přes atom síry (Obr. 1).



Obr. 1: Aminokyseliny charakteristické pro lantibiotika [6].



Obr. 2: Primární struktura variant přírodního nisinu. Aminokyseliny lišící se oproti těm v nisinu A jsou zvýrazněny šedě. Zkratky: Dha – didehydroalanin; Dhb – didehydrobutyryn; Ala-S-Ala – lanthionin; Abu-S-Ala – methyllanthionin [6].

2.2.2 Vlastnosti nisinu

Je stabilní v kyselém pH, což mu umožňuje dostatečnou stabilitu v kombinaci s dalším typem konzervace – snižováním pH. Naopak pravděpodobně z důvodu určité chemické modifikace se v alkalickém prostředí stává biologicky neaktivním [8]. Obecně působí jako kationtové povrchově aktivní činidlo (patří do skupiny kationických bakteriocinů) a jeho aktivitu lze neutralizovat aniontovými detergenty [13;14].

2.2.2.1 Mechanismus účinku

Působení nisinu proti bakterii je způsobeno depolarizací cytoplasmatické membrány, tzn. vznikem kanálků, díky kterým buňka ztrácí membránový potenciál, protonmotivní sílu a v neposlední řadě je omezen transport některých důležitých látek, především aminokyselin a patrně je i vytrácení draselných iontů [14;15].

Nisin specificky rozpoznává peptidoglykanový prekurzor lipidu (lipid I) a může tak díky N-konci reagovat s dalším lipidem (lipid II), který zprostředkovává tvorbu membránových pórů [16]. K reakci s dvěma lipidy je zapotřebí čtyř molekul nisinu, a to pro každou stranu membrány, takže stechiometrie tvorby pórů je 8:2. Výsledná velikost takto vzniklých pórů je 2 nm [17].

2.2.3 Význam nisinu

Nisin patří mezi lantibiotika, což jsou flexibilní, amfipatické molekuly, které narušují cytoplasmatickou membránu. Inhibuje růst především grampozitivních bakterií, zejména rody *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus* a *Listeria*, ovšem byly popsány i interakce mezi nisinem a některými chelatačními činidly (EDTA), které zvyšují antimikrobiální účinek proti gramnegativním bakteriím [18]. Jde dokonce o patentovaný princip, jelikož přítomnost EDTA zvyšuje mimoděk i účinnost proti grampozitivním bakteriím (Patent US 5 135 910; 5 217 950; 5 260 271 - Blackburn a kol. [14]). Naopak proti kvasinkám a plísním je nisin téměř nebo vůbec neúčinný.

2.2.4 Biosyntéza

Nisin, je stejně jako ostatní lantibiotika syntetizován ribozomálně. Jeho prekurzor s N-koncovým peptidem a C-koncovou pro-peptidickou oblastí je podroben posttranslačním modifikacím, kdy vznikají specifické aminokyseliny jako je lanthionin [19].

2.2.5 Využití v potravinách

Z důvodu netoxicity pro člověka je nisin konzervační látka vhodná pro potravinářské aplikace, ke kterým byl nisin schválen WHO již v roce 1967 [8]. Je aktivní při nízkém pH, což umožňuje aktivitu v přirozeně kyselejších potravinách, nebo i v potravinách s uměle regulovanou kyselostí. Ovšem v zažívacím traktu se rychle tráví a neovlivňuje tak střevní mikroflóru. Jeho účinek je velmi významný především v potravinářských produktech náchylných na množení grampozitivní bakterie *Listeria monocytogenes*, jelikož tepelné opracování a skladování při nízké teplotě poskytuje ochranu pouze před gramnegativními bakteriemi. Mezi takovéto produkty patří hlavně předpřipravené potraviny určené k přímé spotřebě bez další úpravy, tzv. „ready to eat“, např. produkty obsahující maso (speciálně drůbeží), ryby a zeleninu [20;21]. Např. průzkumy potravin provedené v USA odhadují výskyt patogenní bakterie *Listeria monocytogenes* až v 7,6 % takovýchto potravin [20].

Dále se nisin hojně používá při konzervaci potravin, které nemohou být standardně sterilizovány, protože by mohlo dojít ke kvalitativní újmě, jako např. u mléčných výrobků (jogurty, sýry, mléčné dezerty a krémy). U jogurtů je ovšem třeba zajistit vhodné kultury, které nisin produkují a zároveň jsou vůči němu rezistentní [21].

Nisin může být také aplikován pro prodloužení trvanlivosti piva, jelikož bakterie kazící pivo (rody *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Leuconostoc*) jsou na nisin citlivé, ale kvasinky nikoli. Vhodná je tak zejména přítomnost nisinu už při fázi kvašení.

Vhodná je rovněž aplikace nisinu v inteligentním obalu, tzn. ve stravitelné enkapsulované formě (např. do liposomů), kdy dochází k uvolňování látky z obalu do prostředí (do potraviny), aby se zabezpečila stálá účinná hladina látky po požadovanou dobu. Princip je obdobný jako u léků typu CR (controlled release) s řízeným uvolňováním léčivé látky.

2.3 Lysozym

Lysozym nebo také N-acetylmuramidglykanhydrolasa [22;23;24] je enzym patřící do skupiny hydroláz. Jde o enzym vyskytující se v tělesných sekretech, tzn. slinách, slzách, nosním hlenu, v mateřském mléce, dále také v krevní plazmě a nakonec velký obsah lysozymu má také vaječný bílek. Je velmi známý pro své významné antibakteriální účinky.

Antibakteriální účinky lysozymu poprvé popsal v roce 1909 P. Laschtschenko [25], ovšem pojmenován a izolován z vaječného bílku byl až objevitelem penicilinu Alexandrem Flemingem v roce 1922 [26;27]. Teprve v roce 1930 bylo zjištěno, že lysozym produkuje každý obratlovec [27;28]. V přírodě se tak vyskytuje mnoho forem a není překvapivé, že se lysozym produkovaný člověkem liší od enzymu produkovaného zvířaty nebo rostlinami. V této práci bylo nakládáno s komerčním vzorkem od firmy SERVA, který byl izolován z vaječného bílku. Dle JEFCA byl povolen pro potravinářské aplikace s odůvodněním, že pokud se získává z živočišných tkání (vejce) běžně používaných jako potraviny, je možné jej považovat také za potravinu a jeho číslo EEC pro potravinářská aditiva bylo zvoleno E1105. V roce 1998 byl FDA klasifikován jako GRAS [29].

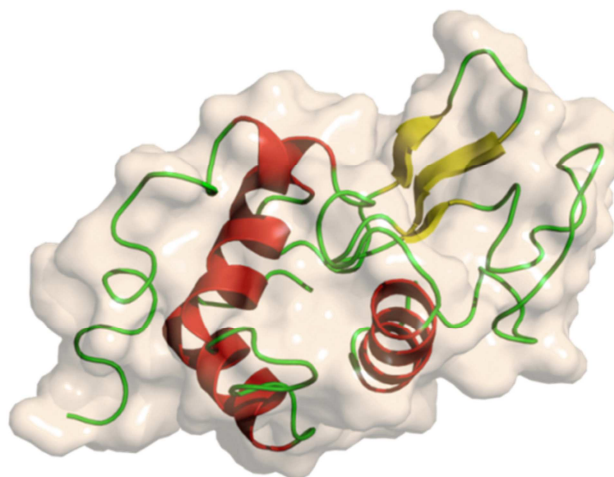
Naopak nevýhodou lysozymu získávaného z vaječného bílku je potenciální možnost způsobovat, jakožto vaječný produkt, alergickou reakci u lidí alergických na vejce.

Tab. 2: Obecné informace o lysozymu získaném z vaječného bílku [30;31;32].

C.A.S.: lysozym z vaječného bílku	12650-88-3
Molekulová hmotnost:	~ 14 400 g·mol ⁻¹ (14,4 kDa)
Kód enzymu (číslo EC):	3.2.1.17
Alternativní názvy:	E1105; Muramidase; mucopeptide-glycohydrolase; mucopeptide N-acetyl-muramoylhydrolase
Toxicita (LD ₅₀ , perorálně, krysa):	4 g·kg ⁻¹
Optimum pH	9,2

2.3.1 Struktura lysozymu

Strukturně jde o malý protein o velikosti 14,6 kDa, jehož jednoduchý polypeptidový řetězec se skládá ze 129 aminokyselinových zbytků a je vnitřně zesíťován čtyřmi disulfidickými můstky. Obsahuje několik víceméně helikálních segmentů a jeden třípramenný antiparalelní β -skládání list. Podle očekávání je většina nepolárních postranních řetězců uvnitř molekuly mimo kontakt s vodným rozpouštědlem [28].



Obr. 3: Protein Data Bank (PDB) render struktury lysozymu izolovaného z vaječného bílku slepice (*Gallus gallus*) [33].

2.3.2 Vlastnosti lysozymu

Vykazuje antibakteriální účinky proti grampozitivním bakteriím, jako jsou např. rody *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria*, *Streptococcus* nebo *Lactococcus* [27]. Lysozym je také velmi stabilní při vyšších teplotách [27].

2.3.2.1 Mechanismus účinku

Podstatou účinku je schopnost katalyzovat hydrolýzu β -1,4 glykosidických vazeb peptidoglykanů, nacházejících se v buněčné stěně především grampozitivních bakterií. Konkrétně jde o vazbu mezi molekulami N-acetylmuramové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu. Z pohledu chemické reakce jde o přeměnu acetalu na poloacetal [28]. Pro srovnání neenzymová hydrolýza acetalu je reakce katalyzovaná v kyselém prostředí H^+ ionty, zahrnující protonaci atomu kyslíku a následné štěpení vazby C–O za vzniku alkoholu a rezonančně stabilizovaného karbokationu. Adicí vody na karbokation vzniká poloacetal a regeneruje se kyselé prostředí H^+ iontů. Pro enzymatickou katalýzu pomocí lysozymu tak je možné v jeho struktuře v blízkosti reakčního centra nalézt kyselé katalytické skupiny a skupiny stabilizující karbokation, především Glu-35 a Asp-52 [28]. Dle Philipsova mechanismu tak enzymaticky katalyzovaná reakce vypadá ve zjednodušené formě následovně. V prvním kroku se lysozym připojuje na bakteriální buněčnou stěnu vazbou na příslušnou hexasacharidovou jednotku, v druhém kroku Glu-35 poskytuje svůj proton k protonaci atomu kyslíku ve složce buněčné stěny a vazba C–O je poté rozštěpena z vzniku rezonančně stabilizovaného karbokationu, který je stabilizován ionizovanou skupinou Asp-52. Nakonec v posledním kroku dochází k adici vody z roztoku a reprotonaci Glu-35.

2.3.3 Funkce v živých systémech

Lysozym v organismu zabezpečuje především ochranu vstupních cest do organismu před invazí patogenních bakterií. Tuto roli plní jako složka slin, při ochraně vstupu dále do trávicího traktu. Dále působí také jako složka hlenu nosní sliznice chránící vstup do dýchacích cest nebo slz pro ochranu očního kanálku a celkově očí jakožto vysoce důležitého smyslového orgánu. Jeho přítomnost v mateřském mléce je také nutná pro zachování kvality a aseptických vlastností mléka.

2.4 Kultivace mikroorganismů

Pro studium antimikrobiálních vlastností je potřeba zvolit vhodný mikroorganismus a vytvořit vhodné podmínky pro kultivaci a vhodné zvolení a provedení antimikrobiálního testu na vhodných živných půdách.

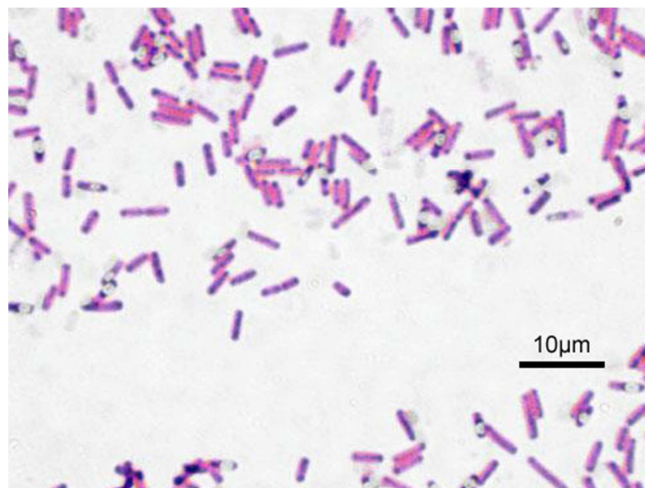
2.4.1 Rozdělení mikrobů

Mikroorganismy jsou velmi malé jednobuněčné a pouze mikroskopicky viditelné organismy. Dělí se převážně na prokaryota (bakterie) a eukaryota (plísňe, kvasinky).

Bakterie se dělí na dvě hlavní skupiny podle barvení metodou dle Grama. První skupinou jsou bakterie nazývané grampozitivní, které mají díky přítomnosti vysokého obsahu peptidoglykanů v buněčné stěně a absenci vnější vrstvy lipopolysacharidů na povrchu na konci barvení modrofialovou barvu. Druhou skupinou jsou naopak gramnegativní bakterie, které se barví podle Grama pouze světle růžově. Další dělení bakterií může být podle patogenity na nepatogenní a patogenní, které mohou vlivem produkce toxinů různých vlastností způsobovat nejrůznější závažné nemoci.

2.4.2 Charakteristika testovacích bakterií druhu *Bacillus subtilis*

Bakterie rodu *Bacillus* patří mezi nejrozšířenější bakterie, ať už jde o prostředí vody, vzduchu nebo půdy. Tvoří velmi rezistentní spory, které přežívají i vysoký var, extrémní pH, radiaci a vystavení organickým rozpouštědlům. Tento mikroorganismus je také obávaným kontaminantem v potravinářské praxi, ovšem otravy nejsou časté a újmy jsou převážně kvalitativní. Tvoří proteolytický enzym subtilisin [34;35].



Obr. 4: Bakterie *Bacillus subtilis* barvené dle Grama [36]

2.4.3 Živná média

Živná média by měla obsahovat životně důležité látky a hlavně vodu jako rozpouštědlo. V praxi se jako zdroj základních živin používá masový výtažek z hovězího masa (Beef Extrakt). Jako zdroj peptidů, aminokyselin a růstových faktorů se používá bílkovinný hydrolyzát (Pepton). V případě pevných médií je potřeba použít látku zpevňující médium. Běžně se používá se agar jakožto sušená substance z mořské řasy (*Agar agar*), která zpětně bobtná v přítomnosti vody. Vhodná hodnota pH média je pro běžné druhy okolo 7. Jako zdroj manganatých iontů je vhodný přírůstek malého množství síranu manganatého [37].

2.4.4 Kultivační metody

Kultivací se rozumí umělé namnožení bakterií, které je prováděno na živných půdách za účelem získání čisté kultury vhodné pro daný typ využití. Kultivačních metod je velká řada různého zaměření. Dělí se především podle požadavků mikroorganismu na kyslík (aerobní a anaerobní) a různých typů složek živných půd. Ty jsou děleny dle původu na přirozené a umělé. Podle obsahu živin dělíme média na základní a obohacené a podle konzistence na tekutá, polotuhá a pevná (agar) [37].

2.4.4.1 Kultivace v tekutých médiích

Metoda kultivace v tekutých substrátech se používá pouze pro pomnožení kultury nebo pro různá stanovení zákalu, barvy a na antimikrobiální testy. Je nevhodná k izolaci čistých kultur bakterií.

2.4.4.2 Kultivace na pevných médiích

Naopak metoda kultivace na pevných médiích je využívána pro získání čistých kultur. Tato metoda je vhodná např. na různé selektivní testy, např. Endův agar, MacConkeyův agar, k diskové difuzní metodě používané k zjištění inhibičního účinku antimikrobiálních látek na narostlé kolonie a v neposlední řadě také na počítání vzniklých kolonií [37].

2.4.5 Látky potlačující růst

Do skupiny látek potlačující růst mikroorganismů patří zejména látky zvané antibiotika. Jsou již po staletí používána k terapeutickým účelům, ať už nevědomě v podobě obkladů z plesnivých potravin již od dávných dob, nebo od objevení penicilinu Alexandrem Flemिंगem v roce 1928 v lékové formě. Jde o heterogenní skupinu látek a neexistuje typická struktura. Ovšem nejznámějším antibiotikem bude navždy penicilin.

Nejdůležitější vlastností antibiotik je jejich selektivnost, kdy ničí určité bakterie, tedy původce infekce, ale pacienta v podstatě nijak nepoškozují, i když je známá řada nežádoucích účinků, především likvidace střevní mikroflóry. Selektivnost je dána účinností na různé druhy bakterií. Nejčastěji se používají širokospektrá antibiotika účinkující na více bakteriálních druhů, naopak úzkospektrá antibiotika zasahují buď gramnegativní či grampozitivní bakterie a často dokonce jen určité bakteriální rody. Vzhledem k různým účinnostem se zavádí minimální inhibiční koncentrace (MIC) nutná k potlačení růstu a minimální baktericidní koncentrace (MBC) nutná k usmrcení bakterií [38].

Antimikrobiální peptidy patří do skupiny bakteriocinů a kvůli připodobnění k antibiotikům se nazývají lantibiotika. Jde o látky produkované bakteriemi, které ničí jiné bakterie, jde tedy zřejmě o typ přirozené selekce v rámci přežití. Největší výhodou antimikrobiálních peptidů je možnost zastoupení klasických antibiotik při boji s infekcemi způsobenými multirezistentními bakteriálními kmeny [39].

2.4.6 Využití mikrobiálních systémů při některých analytických stanoveních

2.4.6.1 Stanovení antimikrobiální aktivity

Podstatou je aplikace antimikrobiální látky na začátku kultivace pro omezení růstu, resp. potlačení růstu daného mikroorganismu, případně přidání antimikrobiální látky do již narostlé kultury a sledování jejího inhibičního vlivu. Je obvykle využíváno diskové difuzní metody, kdy se na agarovou plotnu vloží papírový kruh o průměru 5 mm nasáklý

antimikrobiální látkou a je sledována inhibiční zóna, nebo jen prosté nanesení roztoku antimikrobiální látky na plotnu, případně do předem vytvořené skuliny [37].

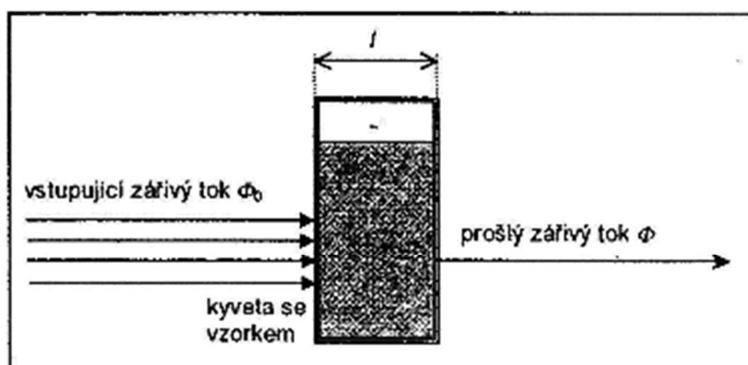
2.5 Vybrané metody analýzy a charakterizace peptidů a bílkovin

2.5.1 Absorpční spektrofotometrie

Podstatou všech metod je reakce proteinu s činidlem příslušné metody za vzniku zbarvení, které je úměrné koncentraci proteinu (za konstantních podmínek) dle Lambert-Beerova zákona a je změřitelné pomocí spektrofotometru při známé vlnové délce, kdy dochází k maximu absorpce.

Zdroj záření spektrofotometru vysílá světlo o dané vlnové délce (určitý zářivý tok Φ_0) a pomocí detektoru se detekuje kyvetou prošlé záření (určitý zářivý tok Φ). Z rozdílu hodnot se vypočítá transmittance (1), tzn. relativní hodnota prošlého záření, která nabývá hodnot od nuly do jedné, případně po vynásobení stokrát odpovídají hodnoty procentům.

$$(1) \quad T = \frac{\phi}{\phi_0}$$



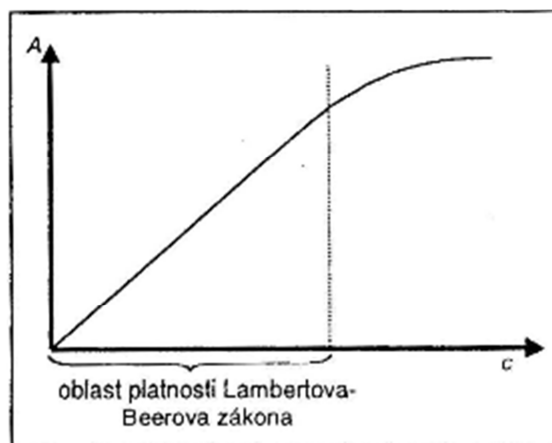
Obr. 5: Absorpce při průchodu záření kyvetou se vzorkem [40].

Lambert-Beerův zákon je vztah mezi absorbancí a koncentrací dané látky. Vyjadřuje jej rovnice (2), kde A je bezrozměrná hodnota absorpce, ε_λ je extinkční koeficient (závislý na vlnové délce, jednotka $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), l je délka optické dráhy (tloušťka kyvety, obvykle 1 cm) a c je koncentrace stanovované látky ve vzorku v $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Absorpce souvisí s transmittancí dle rovnice (3).

$$(2) \quad A = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot c = \text{konst.} \cdot c$$

$$(3) \quad A = -\log T$$

Z naměřených hodnot absorpce u řady vzorků o vzrůstající koncentraci lze tak sestavit kalibrační závislost (křivku; přímku). Lambert-Beerův zákon je splněn jen pro zředěné roztoky do koncentrace cca $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Proto při použití příliš koncentrovaných roztoků nebo případném nadbytku barviva či činidla může docházet k deformaci kalibrační křivky.



Obr. 6: Oblast platnosti Lambert-Beerova zákona [40].

2.5.1.1 Biuretová metoda stanovení celkových proteinů

Metoda je založená na chelataci měďnatého iontu imidovými strukturami polypeptidu ionizovanými v silně alkalickém prostředí za vzniku červeného komplexu. Název vychází ze sloučeniny biuret, což je sloučenina vznikající tavením močoviny za odštěpení amoniaku a sloužící jako model peptidové vazby, která vytváří barevný komplex s mědí.

Se stanovením interferují látky redukující měď, jako např. glukóza, nebo na sulfhydrylové skupiny bohaté proteiny, amonné soli nebo některé fosfáty. Metoda je vhodná pro vzorky obsahující 1 až 10 mg proteinu v ml, které se ředí zhruba pětkrát přidáním činidla na konečnou koncentraci 0,2 až 2 mg proteinu na ml.

Biuretové činidlo se skládá ze silně alkalického (NaOH) roztoku skalice modré a vínanu sodno-draselného. Tmavě červeně zbarvené roztoky pak poskytují maximum absorbance při 550 nm [50].

2.5.1.2 Metoda Hartree-Lowryho

Původní metoda Lowryho z roku 1951 je založena na dvousložkovém činidle. Prvním je biuretové a druhým je Folin-Ciocalteu činidlo na fenoly. Jde o reakci polykyselin fosfomolybdenové a fosfowolframové, které se redukují tyrozinovými zbytky proteinů a barví se pak modře a poskytuje nejvyšší absorbanci při 650 nm.

V roce 1972 Hartree metodu modifikoval, kdy použil odlišnou kompozici činidel a metoda se tak stala citlivější [50].

2.5.1.3 Metoda dle Bradfordové

Metoda využívá vazby barviva Coomassie (Briliant Blue G250) na protein v kyselém pH. Vazba je realizována dvěma způsoby. Prvním je vazba trifenylmethanové skupiny barviva na nepolární část proteinu a druhá spočívá ve vazbě sulfoskupiny na vedlejší řetězce aminokyselin nesoucí kladný náboj (např. arginin a lysin). Při vazbě na protein dochází k barevné změně, která je úměrná množství proteinu. Měří se při 595 nm. Citlivost metody je zhruba třikrát větší než ostatní metody. Stanovení je rušeno některými detergenty, např. SDS [50].

2.5.1.4 Bicinchoninová metoda

Metoda využívá alkalické redukce měďnatého iontu na měďný protein a následně chelataci měďného iontu kyselinou bicinchoninovou za vzniku červeného zbarvení, které je

měřeno při vlnové délce 562 nm. Citlivost závisí na teplotě a době inkubace a interferují např. amonné ionty a sacharidy [50].

2.5.1.5 Absorpční spektrum v UV oblasti

V proteinu absorbují určité složky, které se nazývají chromofory (jde o $\pi \rightarrow \pi^*$). Elektrony π mohou při excitaci přecházet do antivazebného MO.

Proteiny obsahující fenolové nebo indolové struktury, tedy tyrosin a tryptofan absorbují UV světlo v oblasti spektra okolo 280 nm. Naopak fenylové struktury (fenylalanin) absorbují jen velmi slabě. Při kratších vlnových délkách, např. při 235 nm, resp. 225 nm absorbují převážně disulfidické, resp. peptidové vazby.

Proměření UV spektra je nutné např. pro chromatografickou analýzu pomocí PDA detekce pro zjištění maxima [40;50]

2.5.2 Gelová elektroforéza

Elektroforéza je praktická a obecně používaná metoda pro analytické dělení a stanovení molekulové hmotnosti proteinů. Využívá migrace iontů proteinů ve stejnosměrném elektrickém poli v porézním gelu, separace je tak založena na rozdílné elektroforetické pohyblivosti a na velikosti molekul, dle velikosti pórů gelu.

Běžně používaným gelem je inertní, mechanicky pevný a průhledný polyakrylamidový gel, který skýtá možnost přípravy nosiče různých předem určených vlastností (hustota zesíťování, gradient hustoty aj.). Takovýto druh elektroforézy se označuje zkratkou PAGE, mezi další metody patří elektroforéza na agarosovém gelu vhodná především pro stanovení relativní molekulové hmotnosti nukleových kyselin.

Polyakrylamidový gel vzniká kopolymerizací akrylamidu (AA) a metylenbisakrylamidu (BIS), která je zahájena volnými radikály vzniklými při rozpadu APS (amonium persulfate, neboli peroxodisíran amonný). Radikály jsou stabilizovány přidávkem látky TEMED, což je tetrametyletylendiamin. Fyzikální vlastnosti gelu a velikost pórů jsou dány podílem polyakrylamidu v gelu a stupněm zesíťování (stupeň lze měnit změnou poměru AA/BIS). Nejčastější koncentrace AA jsou v rozmezí 3 – 15% (značeno % T), přičemž koncentrace BIS obvykle odpovídá 5% celkového množství AA (značí se % C) [50].

Uspořádání elektroforézy bývá obvykle tenkovrstvé, a to v horizontální nebo vertikální poloze podle typu aparatury. V pokročilejších separacích se používá kombinace dvou koncentrací gelů. Dělicí (separační) gel, který je hustější se překryje asi 1 cm zaostřovacího (startovního) gelu s velkými póry.

Zaostřovací a vzorkovací pufr (přidávaný do vzorku) obsahují Tris-HCl pufr, jehož pH (6,8) je zhruba o dvě jednotky nižší, než pH pufru dělicího gelu (8,8; 9,2). Elektrodotový roztok obsahuje ovšem Tris-Glycinový pufr o pH 8,3 nebo 8,8. Podstatou je, že v prostředí gelu je nepohyblivějším aniontem chloridový a pohyblivost vzorků (proteinu) je výrazně nižší. Za zónou chloridů následují zóny bílkovin seřazené podle elektroforetických pohyblivostí. Poslední zónu tvoří glycin. Takto seřazené ionty se pohybují stejnou rychlostí. Po vstupu seřazených iontů do dělicího gelu, který má vyšší pH, se glycin stává druhým nepohyblivějším hned po chloridech. Pohyb čela se indikuje přidáním nízkomolekulárního barviva (bromfenolová modř) ke vzorku, které vytváří ostrý pruh putující s čelem.

Hodnoty intenzity proudu a napětí jsou obvykle nastaveny po celou dobu elektroforézy na konstantní velikost [50].

2.5.2.1 *Laemmli-SDS-PAGE*

Častou variantou PAGE je elektroforéza v přítomnosti SDS, který se váže na bílkoviny v poměru přibližně 1,4 g SDS na g bílkoviny a uděluje jim uniformní náboj. Přesná povaha takto vzniklých útvarů není přesně známá, ale je pravděpodobné, že jde o micelární strukturu, uvnitř které dochází k nekovalentním interakcím mezi uhlovodíkovými řetězci dodecylsíranu a hydrofobními oblastmi bílkoviny. Nabité skupiny na povrchu micely jsou pak v kontaktu s pufrům. Celkový náboj částice je přitom záporný [50].

Aby tyto částice mohly vzniknout, je třeba nejprve zredukovat disulfidické můstky, např. pomocí merkaptoethanolu a proteiny celkově denaturovat i zvýšenou teplotou v rozmezí 60 – 100 °C. Vzniklé asociáty mají uniformní záporný náboj, tvar tyčinky o konstantním průměru a délce úměrné relativní molekulové hmotnosti. Nutný je přídavek SDS jak ke vzorku, tak i do gelu.

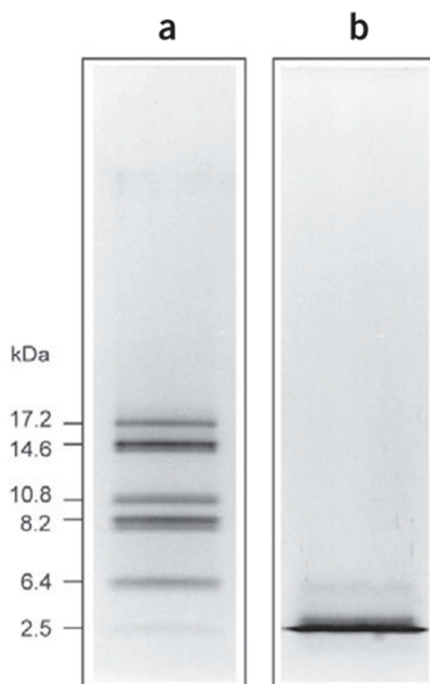
Metoda je vhodná k dělení proteinů ideálně nad 20-30 kDa. Pro separaci menších proteinů je nutno použít vyšších koncentrací gelu, případně je nutný přídavek močoviny přímo do gelu, což zabraňuje migraci malých peptidů s asociáty [41].

Barvení gelu pro detekci bývá běžně realizováno pomocí barviva Coomassie Brilliant Blue G250, případně stříbrem (AgNO_3) [41;42;50].

2.5.2.2 *Tricine-SDS-PAGE*

Pro dělení malých peptidů do 10 kDa je potřeba modifikovaná verze SDS-PAGE. Modifikace spočívá v jiné volbě katodového pufru, kdy je komponenta Tris nahrazena Tricinem [42]. Přínos Tricine-SDS-PAGE pro separaci velmi malých proteinů je patrný na modelovém příkladu (Obr. 7).

Další odlišností oproti standardnímu Laemmliho řešení je přídavek močoviny o koncentraci 6 mol/dm^3 , která z neznámých důvodů brzdí vznik částic SDS-krátký protein [41;42].



Obr. 7: Srovnání rozdělení bromcyanových fragmentů z myoglobinu při použití Tricine-SDS-PAGE (a) a Laemmli-SDS-PAGE (b) s použitím (10%T; 3%C) gelu [42].

2.5.3 Využití chromatografie v analýze proteinů

2.5.3.1 Princip chromatografie

Chromatografie patří do analytických separačních metod. Jejím základním principem je průchod stanovované látky unášené mobilní fází (pohyblivou) a rozdělení mezi mobilní a stacionární (nepohyblivou) fází.

Jednotlivé složky vzorku tak mohou být stacionární fází zachycovány a na určitý čas zdrženy oproti mobilní fází. Více se zdržují ty složky, které jsou stacionární fází poutány silněji. Poté jsou v různém čase opět eluovány a na výstupu zachyceny např. on-line průtokovým detektorem nebo jako frakce a následně detekovány jiným způsobem [40].

2.5.3.2 Základní dělení chromatografických metod

Chromatografické metody mohou být děleny podle různých parametrů [40].

Podle skupenství mobilní fáze:

- **Kapalinová chromatografie** – (LC) mobilní fází je kapalina
- **Plynová chromatografie** – (GC) mobilní fází je plyn

Podle uspořádání stacionární fáze:

- **Kolonová** – stacionární fáze je umístěna v trubici
- **Papírová** – stacionární fází je chromatografický papír
- **Tenkovrstvá** – stacionární fází je obvykle hliníková folie potažená porézním materiálem

Podle povahy děje převládajícího při separaci:

- **Rozdělovací chromatografie** – základní technika, kdy je vzorek rozdělován mezi stacionární a mobilní fází o různém nebo stejném skupenství
- **Adsorpční chromatografie** – separace je závislá na rozdílné schopnosti adsorbovat se na povrch stacionární fáze
- **Iontoměničová chromatografie** – separace je řízena elektrostatickými silami mezi ionty vzorku a funkčními skupinami stacionární fáze (iontoměnič)
- **Gelová chromatografie** – složky se separují dle velikosti na porézním gelu, uplatňuje se síťový efekt (menší molekuly se zdržují déle)
- **Afinitní chromatografie** – stacionární fáze váže pouze určité složky, ke kterým má vysokou afinitu

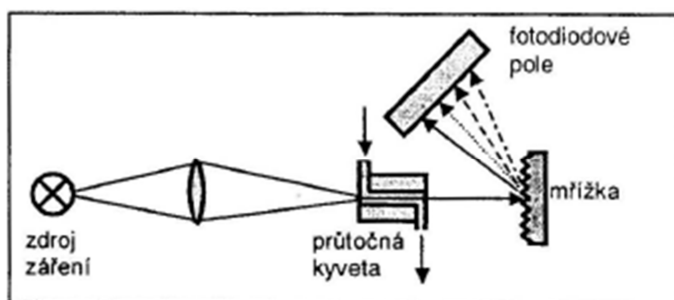
2.5.3.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Mobilní fází je zde kapalina. Moderní přístroje jsou natolik účinné, že jsou označovány HPLC (High Performance Liquid Chromatography). O separaci rozhoduje mimo interakce vzorku se stacionární fází také volba mobilní fáze [40]. Během separace je analyt rozdělován mezi stacionární a mobilní fází a čas, který stráví v jedné nebo druhé fází, závisí na afinitě ke každé z nich. Dříve se používaly polární stacionární fáze a nepolární mobilní fáze, kdy tento typ byl vhodný pro polární vzorky, které ovšem nebyly v rozumném čase eluovány z kolony [39]. Proto je v dnešní době obvyklé použití metody Reversed Phase High Performance Chromatography (RP-HPLC), kdy jsou polarity fází prohozeny. Stacionární fáze je nepolární, obvykle vlivem alkylů vázaných na silikagel (obvykle patentované komerční řešení) a mobilní fáze je polární (voda, acetonitril, methanol).

Retence složek roste s jejich klesající polaritou a zvětšující se polární částí molekul a je vhodná pro všechny typy vzorků. Tento typ rozdělovací chromatografie je vhodný především pro dělení látek menších až středních relativních molekulových hmotností [40].

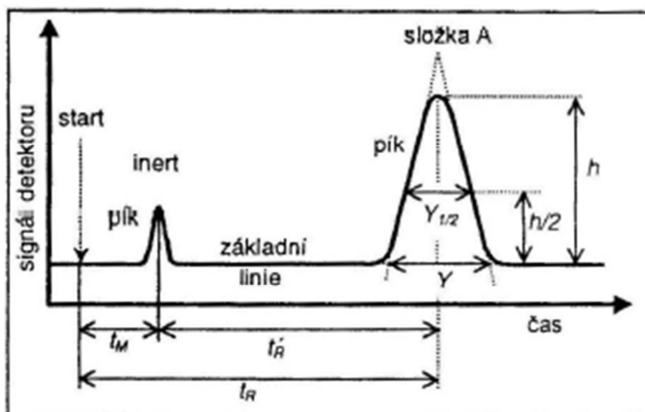
Kapalinový chromatograf se skládá z čerpadla, směšovacího a dávkovacího zařízení a především z vhodné náplňové kolony. Kolony mohou mít různou délku, vnitřní průměr a především náplň a mohou být přizpůsobeny na detekci různých látek, např. malých peptidů. Kolony bývají také termostatovány na konstantní teplotu.

Mezi metody detekce patří spektrofotometrická zařízení (v práci bylo využito detekce diodovým polem), dále může být využito také refraktometrický, elektrochemický, fluorescenční detektor nebo hmotnostní spektrometr [40;60].



Obr. 8: Schéma detekce pomocí diodového pole (PDA) [40].

Výsledkem separace vzorku metodou kapalinové chromatografie je chromatogram (Obr. 9). Jde o závislost intenzity signálu na čase kde h je výška píku, Y šířka píku v základně, $Y_{1/2}$ šířka píku v polovině výšky, A plocha píku a t_r retenční čas, po který se složka zdrží v koloně. První pík nebo píky jsou nazývány inerty a reprezentují látky procházející kolonou bez zdržení, stejně jako nosná mobilní fáze [40].



Obr. 9: Chromatogram HPLC [40].

Kvalitativní analýza

Pro identifikaci dané látky je podstatné umístění maxima píku v chromatogramu, především na časové ose dle retenčního času.

Kvantitativní analýza

Plocha píku, resp. jeho velikost obvykle roste se vzrůstající koncentrací stanovované složky vzorku. V moderních HPLC systémech je plocha píku počítána integrací v příslušném

vyhodnocovacím programu. Přepočet plochy píku na koncentraci je pak realizován pomocí interní nebo externí kalibrace s využitím sady roztoků standardů o známé koncentraci.

2.5.3.4 Specifika analýzy peptidů metodou RP-HPLC

Volba stacionární fáze

Pro biopolymery nad 2 kDa je vhodná chromatografie na obrácených fázích (RP) s kolonou obsahující dlouhé řetězce vázané na silikagelu [40;43]. Vhodné je hlavně použití RP-HPLC s kolonou navrženou pro dělení peptidů, která má obvykle charakter molekulového síta.

Volba mobilní fáze

Hlavními rozpouštědly v RP-HPLC jsou polární látky voda, methanol, acetonitril a THF. V praxi se obvykle používá voda v kombinaci s levným a účinným methanolem, nebo dražším a z hlediska viskozity lepším acetonitrilem.

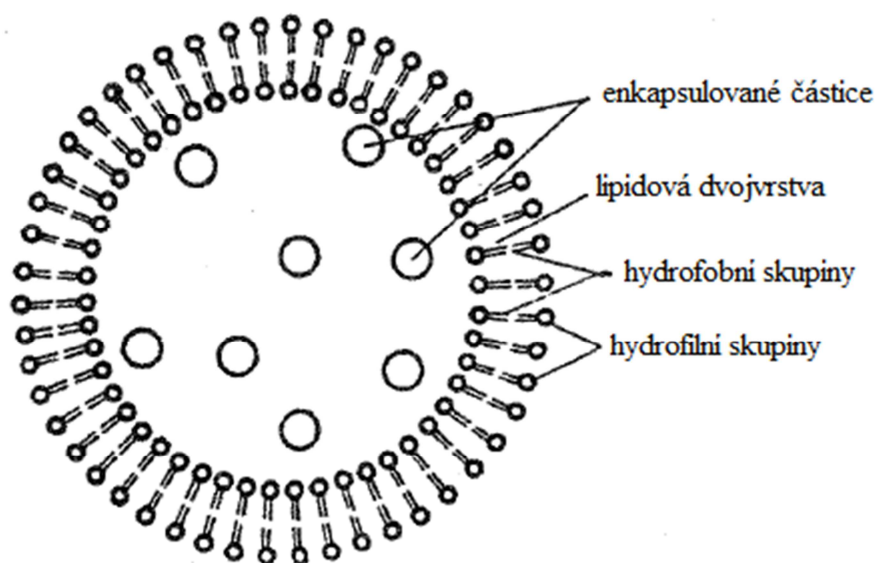
Rostoucí podíl organického rozpouštědla zvyšuje eluční sílu a snižuje retenční čas a také poměr rozpouštědel ovlivňuje selektivitu pro různé analyty [40].

2.6 Metody enkapsulace peptidů a analýzy enkapsulovaných částic

2.6.1 Liposomy

Jsou to malé vesikuly tvořené hydrofobní fosfolipidovou dvojvrstvou, které mohou být uni- nebo i multilamelární. Mezi vrstvami fosfolipidů je uzavřena hydrofilní fáze, kam mohou být enkapsulovány různé polární látky. Pokud je záměrem enkapsulovat látky hydrofobní, je možné je naopak zabudovat do lipidové dvojvrstvy.

První liposomy připravil A.D. Bangham již v 60. letech [44]. V následujících desetiletích byly liposomy intenzivně studovány za účelem terapeutické aplikace v podobě léčiv se zvýšenou účinností a pozvolným uvolňováním. Bylo vyvinuto několik metod přípravy a je možné vytvořit liposomy s různým povrchovým nábojem nebo velikostí.



Obr. 10. Model liposomu [46].

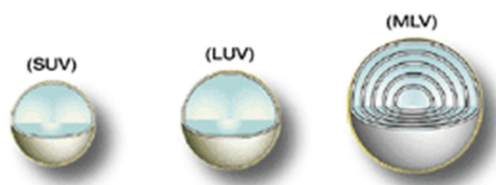
2.6.1.1 Chemické složení liposomů

Základní složkou pro přípravu liposomů je kyselina fosfatidová, resp. její estery s alkoholem, např. deriváty glycerolu, sterolu. Pro přípravu se tak používá například fosfatidylcholin (lecitin), pro stabilizaci membrán se přidává cholesterol. Fosfolipidy jsou ve vodném prostředí velmi omezeně rozpustné, a tak se v takovéto disperzi reorganizují do dvojvrstev. Dvě vrstvy fosfolipidů obsahující hydrofobní řetězce se orientují těmito řetězci k sobě a hydrofilní fosfátovou hlavičkou k okolnímu vodnému polárnímu prostředí.

2.6.1.2 Rozdělení liposomů

Dle struktury lze dělit liposomy na:

- Malé unilamelární vesikuly (SUV) o velikosti 20 - 50 nm
- Velké unilamelární vesikuly (LUV) o velikosti nad 100 nm
- Multilamelární vesikuly (MLV) o velikosti 100 - 20 000 nm



Obr. 11. Typy liposomální částic [45].

Dle náboje je možno liposomy dělit na:

- Neutrální
- Kladně nabitě (kationické)
- Záporně nabitě (anionické).

2.6.1.3 Stabilita liposomů

Pro udržení fyzikální stability liposomových částic v suspenzi je důležitý náboj, protože zabraňuje agregaci částic. Z toho důvodu jsou např. neutrální liposomy náchylné na agregaci a následnou sedimentaci. Velikost povrchového náboje určuje zeta potenciál prostředí.

Chemická stabilita může být narušena hydrolýzou esterových vazeb, případně oxidací vazeb na uhlovodíkovém konci.

2.6.2 Enkapsulace látek do liposomů

Pro enkapsulaci je potřebné definovat následující pojmy:

- Enkapsulovaný objem ($\mu\text{l}/\mu\text{mol}$)
Jde o membránou uzavřený objem látky vztažený na jednotku lipidů.
- Enkapsulační účinnost (%)
Jde o podíl enkapsulované látky k jejímu původnímu množství.

Postup enkapsulace je závislý na metodě přípravy, ovšem elementárně se provádí přidáním fosfolipidu k roztoku enkapsulované látky a následným rozmícháním. Enkapsulační účinnost je primárně ovlivňována enkapsulovanou látkou, ovšem svoji roli zde hraje i použitá metoda enkapsulace [44;61].

2.6.2.1 *Ultrazvuková enkapsulace*

K vodnému roztoku vzorku enkapsulované látky je přidán např. sójový lecitin a cholesterol v určitém poměru a pomocí zdroje ultrazvuku je směs po určitý čas intenzivně promíchávána.

2.6.2.2 *Ethanolové vstříkávání*

Etanolový roztok lecitinu, který byl získán acetonovou a etanolovou extrakcí z vaječného žloutku [50] je pomocí injekční stříkačky vstříkován do vodného roztoku vzorku látky určené k enkapsulaci, kde následně začínají tvořit liposomy.

2.6.2.3 *Metoda TLE*

Směs sójového lecitinu a cholesterolu je spolu s rozpouštědlem (methanolem a chloroformem v určitém poměru) odpařena na vakuové rotační odparce a poté je do směsi přidán roztok vzorku ve fosfátovém pufru o teplotě 40 °C.

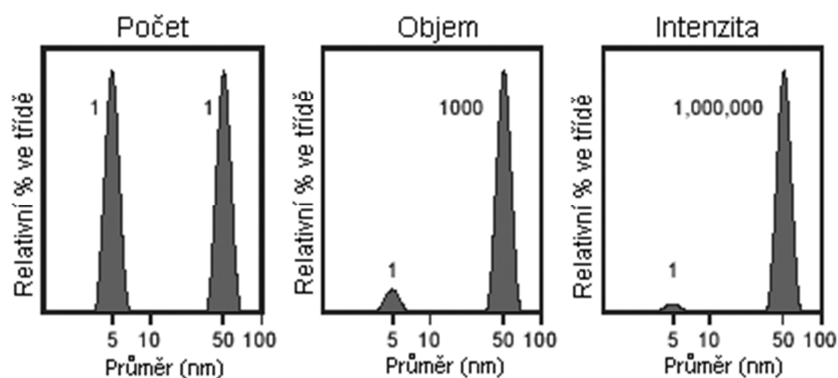
2.6.3 **Možnosti aplikace a stabilizace antimikrobiálních látek v potravinách**

Liposomy jsou v rozumném množství netoxické, protože jsou přirozenou součástí všech buněk celého těla. Jsou tedy jedlé a je možné do nich uzavřít nejrůznější látky, např. léčiva, enzym a tedy i antimikrobiální látky. Tyto látky se pak mohou do okolí uvolňovat postupně a mohou působit delší dobu. Zároveň pokud jde např. o jednoduché liposomy, ty jsou v první části trávicího traktu rozloženy vlivem nízkého pH a postupně degradovány.

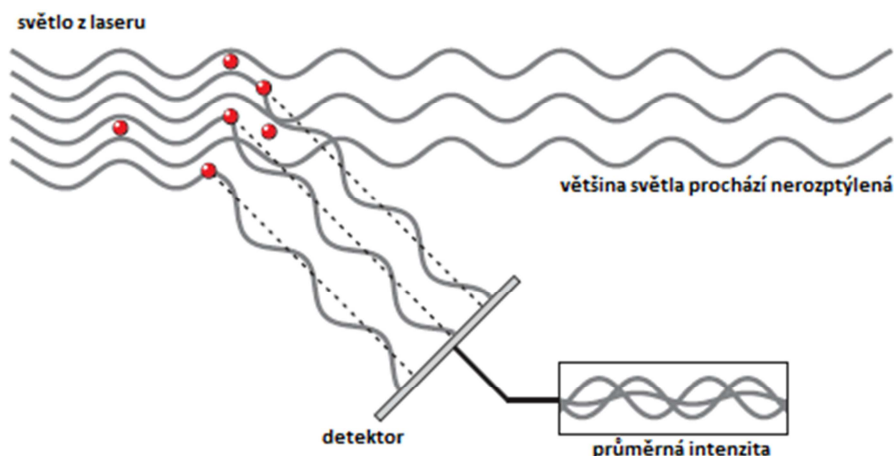
V rámci experimentální části byly připravené liposomové částice s enkapsulovanými antibakteriálními peptidy podrobeny testování ve čtyřech modelových potravinách a po čase byla zjišťována jejich stabilita a uvolněné množství. Také byla otestována stabilita v žaludeční, pankreatické a žlučové šťávě.

2.6.4 **Charakterizace částic metodou DLS**

Jde o metodu využívající dynamického rozptylu světla (DLS), kdy je pomocí osvětlování částic vzorku laserem měřena fluktuace intenzity rozptýleného světla. Rozptyl světla je tvořen právě koloidními částicemi, které se v roztoku náhodně pohybují podle Brownova pohybu. Měření získané informace o Brownově pohybu jsou poté pomocí vhodného software převáděny do vztahu s velikostí částic [47] dle příslušných rovnic. Výsledkem je integrální a distribuční funkce daného souboru částic. Pomocí nástavce na kyvetu (elektrod) je možné měřit další parametr, a to ζ -potenciál.



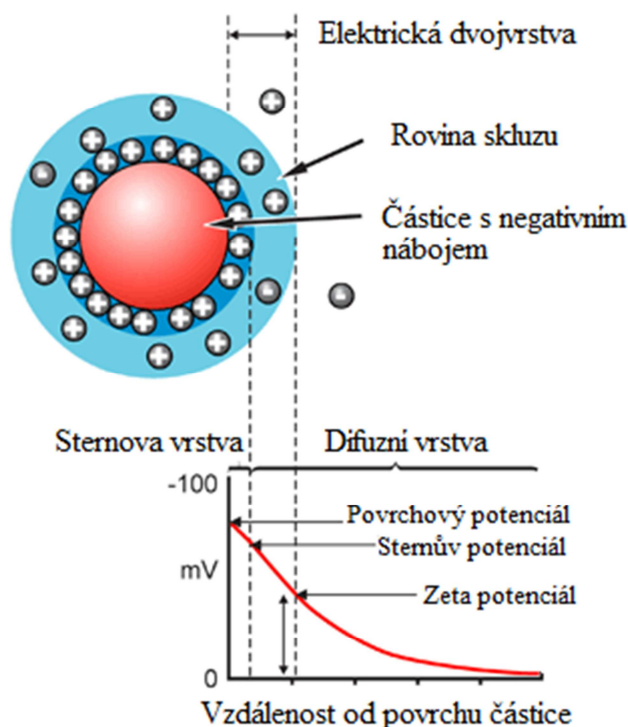
Obr. 12: Distribuce částic dle počtu, objemu a intenzity [47;48].



Obr. 13: Schématické znázornění rozptylu světla a jeho následné detekce [47].

2.6.4.1 Zeta potenciál

Pro veškeré elektrokinetické jevy je potřeba nenulová hodnota elektrokinetického potenciálu (ζ -potenciálu), jinak by nemohla fungovat např. elektroforéza. Rovněž pro stabilitu liposomů je jeho hodnota vysoce důležitá. Hodnota ζ -potenciálu se u liposomů obvykle pohybuje od 30 mV do 100 mV absolutního náboje (nad 30 mV, resp. pod -30 mV) a hodnoty okolo nuly se souhrnně nazývají hraniční ζ -potenciál, kdy jsou již částice s takovým nábojem málo stabilní. Potenciál je ovlivňován přítomností elektrolytů [62].



Obr. 14: Schématické znázornění elektrostatického potenciálu [48].

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce je testování možností enkapsulace antimikrobiálního peptidu nisinu do organických částic. Součástí práce je řešení následujících dílčích úkolů:

- Optimalizace metod stanovení koncentrace nisinu a lysozymu, včetně konvenčních spektrofotometrických a vysokoúčinné kapalinové chromatografie.
- Optimalizace identifikace nisinu a lysozymu pomocí SDS-PAGE.
- Studium antimikrobiální aktivity nisinu a lysozymu na kulturách *Bacillus subtilis* v tekutých i pevných médiích.
- Enkapsulace nisinu a lysozymu do liposomů, analýza enkapsulovaných částic a studium stability částic v modelových podmínkách.
- Aplikace enkapsulovaných peptidů do modelových potravin.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité mikroorganismy

V této práci byla použita bakteriální kultura *Bacillus subtilis* CCM 2793, která pochází z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

4.2 Použité standardní chemikálie

- Nisin, Sigma – Aldrich (Německo)
- Lysozym, Serva (Německo)
- BSA, Sigma – Aldrich (Německo)

4.2.1 Chemikálie použité na spektrofotometrické stanovení

- Modrá skalice (pentahydrát síranu měďnatého), Lach-ner (ČR)
- Vínan sodno-draselný, Lachema (ČR)
- Hydroxid sodný, Lach-ner (ČR)
- Uhličitan sodný, Lach-ner (ČR)
- Folin-Ciocalteu činidlo, Serva (Německo)
- Coomassie Brilliant blue G250, Serva (Německo)
- Ethanol, Lach-ner (ČR)
- Kyselina fosforečná, Lach-ner (ČR)
- 4,4'-dikarboxy-2,2'-bichinolin (dvojsodná sůl), Sigma – Aldrich (Německo)
- Vínan sodný, Lach-ner (ČR)
- Hydrogenuhlíčan sodný, Lach-ner (ČR)

4.2.2 Chemikálie použité na elektroforézu

- N,N'-metylenbisakrylamid, Serva (Německo)
- Akrylamid, Serva (Německo)
- Akrylamid (Rothiphorese), Roth (Německo)
- Tris, Serva (Německo)
- Tricine, Serva (Německo)
- SDS, Serva (Německo)
- APS, Serva (Německo)
- TEMED, Serva (Německo)
- Coomassie Brilliant Blue G250, Serva (Německo)
- Chloroform, Lach-ner (ČR)
- Methanol, Lach-ner (ČR)
- Kyselina octová, Lach-ner (ČR)
- Protein test mixture 6 for SDS PAGE, Serva (Německo)
- Recombinant SDS PAGE Protein Marker 10 – 150 kDa PLUS, liquid mix, Serva (Německo)

4.2.3 Chemikálie použité na HPLC

- Acetonitril pro HPLC, Sigma – Aldrich (Německo)
- Kyselina trifluoroctová, Lach-ner (ČR)

4.2.4 Chemikálie použité na kultivaci *Bacillus subtilis*

- Agar Powder, Himedia (India)
- Pepton, Himedia (India)
- Hovězí extrakt, Difco laboratories (USA)
- Síran manganatý, Lach-ner (ČR)

4.3 Přístroje a pomůcky

4.3.1.1 Přístroje

- Thermo Scientific Finnigan Surveyor PDA Plus Detector
- Thermo Scientific Finnigan Surveyor Pump
- Koloidní DLS analyzátor Zetasizer ZS, Malvern (UK)
- IMPLEN Nanophotometer UV-VIS
- ELISA ReaderBioTek ELx808
- Sada BIORAD Mini-PRTOEAN
- Zdroj stejnosměrného proudu
- Ultrazvukový homogenizátor Sonopuls HS3200, Bandeline
- Rotační vakuová odparka
- Laminární box Aura mini, Bioair
- Temperovaná třepačka Heidolph Unimax 1010, Labicom (ČR)
- Analytické váhy, Boeco, (Německo)
- Centrifuga Boeco U-32R, Hettich Zentrifugen, (Německo)
- Vortex, TK3S, Kartell spa (USA)
- Termostat LS-35, (ČR)
- Termostat IP 60, LTE Scientific, (Německo)
- Kolona Phenomenex - Aeris Peptide 3,6u XB-C18 New Column 150x4,6mm

4.4 Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinů a peptidů

V rámci optimalizace metod stanovení antimikrobiálních látek nisinu a lysozymu byly vyzkoušeno čtyři základní metody kvantitativní analýzy proteinů. Jako srovnávací protein byl použit albumin (BSA). Nakonec bylo také proměřeno elektronové absorpční spektrum v UV části spektra u všech proteinů včetně referenčního BSA.

Postupováno bylo v případě biuretové, Hartree-Lowryho metody a metody Bradfordové podle návodu [50] a v případě bicinchoninové metody podle protokolu The Colorimetric Detection and Quantitation of Total Protein [51].

Kalibrační závislost koncentrace proteinu na absorbanci byla sestrojena na základě dat získaných měření absorbance roztoků o známé koncentraci (po reakci s činidlem příslušným dané metodě) na spektrofotometru při dané vlnové délce odpovídající použité metodě. Ředění roztoků bylo realizováno destilovanou vodou.

4.4.1 Biuretová metoda

Do jednotlivých zkumavek byla z připraveného roztoku proteinu o koncentraci 3 mg/ml série standardů v rozmezí koncentrací 500 – 3000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a ke každému vzorku bylo přidáno 0,3 ml biuretového činidla. Po 30 minutách inkubace za laboratorní teploty byla změřena absorbance při 550 nm proti slepému vzorku neobsahující protein.

Na přípravu **100 ml** biuretového činidla byly připraveny následující chemikálie [52].

- **0,15 g** pentahydrátu síranu mědnatého
- **0,6 g** vlnanu sodno-draselného (tetrahydrátu)
- **30 ml** hydroxidu sodného o koncentraci 10%

Po rozpuštění uhličitanu a vlnanu v hydroxidu byla směs doplněna na 100 ml dest. vodou.

4.4.2 Metoda Hartree-Lowry

Byl připraven zásobní roztok proteinu o koncentraci $0,3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a z něj byla vytvořena série kalibračních standardů o koncentraci v rozmezí $30 - 150 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. U nisinu bylo provedeno vždy o jednu mezikoncentraci více pro případné odhalení náhodných fluktuací.

Do každé zkumavky bylo přidáno 0,9 ml Hartree-Lowryho činidla A a roztoky byly inkubovány při $50 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 10 minut. Po inkubaci byly ochlazeny na laboratorní teplotu a po přidání 0,1 ml činidla B byly ponechány 10 minut při laboratorní teplotě. Nakonec bylo přidáno množství 1 ml činidla C (zředěné Folin-Ciocalteau činidlo) a opět inkubováno při $50 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 10 minut. Následně byla na spektrofotometru změřena absorbance při 650 nm proti slepému vzorku neobsahující protein.

Měření bylo provedeno pro srovnání na ELISA readeru s využitím jeho spektrofotometru, ovšem jelikož neobsahuje monochromátor, tak pouze při nejbližší dostupné vlnové délce 630 nm.

Na přípravu **100 ml** činidla A bylo připraveno následující množství chemikálií [50].

- **10 g** uhličitanu sodného
- **1 g** vlnanu sodno-draselného (tetrahydrátu)
- **50 ml** hydroxidu sodného o koncentraci $1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$

Po rozpuštění uhličitanu a vlnanu v hydroxidu byla směs doplněna na 100 ml dest. vodou.

Na přípravu **100 ml** činidla B bylo připraveno následující množství chemikálií [50].

- **1 g** pentahydrátu síranu mědnatého
- **2 g** vlnanu sodno-draselného (tetrahydrátu)
- **10 ml** hydroxidu sodného o koncentraci $1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$

Po rozpuštění skalice a vlnanu v hydroxidu byla směs doplněna na 100 ml dest. vodou.

4.4.3 Metoda dle Bradfordové

Sada kalibračních standardů o koncentraci $25 - 150 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla připravena ze zásobního roztoku o koncentraci $1,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ přidáním určitého množství do každé a doplněním na 1 ml destilovanou vodou.

Po přidání 2 ml činidla a 5 minutové inkubaci za laboratorní teploty byla změřena absorbance při 595 nm.

Na přípravu **100 ml** činidla bylo připraveno následující množství chemikálií [50].

- **10 mg** barviva Coomassie Brilliant Blue G250
- **10 ml** kyseliny fosforečné o hmotnostní koncentraci 88%

- **4,7 ml** ethanolu o hmotnostní koncentraci 96%

Barvivo bylo rozpuštěno v ethanolu a po přidání kyseliny fosforečné byla směs zfiltrována a doplněna na 100 ml destilovanou vodou.

4.4.4 Bicinchoninová metoda

Byl připraven zásobní roztok proteinu o koncentraci $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a z něj byla připravena řada kalibračních standardů o koncentraci $125 - 2000 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Z takto vytvořených roztoků bylo ve zkumavkách přidáno k 50 μl vzorku 1 ml BCA činidla a ponecháno inkubaci při $50 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 30 minut. Poté byla změřena absorbance při 562 nm proti slepému vzorku. BCA činidlo vzniklo smícháním 50 dílů činidla B s 1 dílem činidla A.

Na přípravu **100 ml** činidla A bylo ve 100 ml destilované vody rozpuštěno navážené množství následujících chemikálií [51;53]:

- **1 g** disodné soli kyseliny bicinchoninové
- **1,71 g** uhličitanu sodného
- **0,160 g** vlnanu sodného
- **0,4 g** hydroxidu sodného
- **0,95 g** hydrogenuhličitanu sodného

Na přípravu 10 ml činidla B bylo v 10 ml rozpuštěno 0,4 g pentahydrátu síranu mědnatého.

4.4.5 Stanovení absorpčního spektra v UV oblasti

Absorpční spektrum bylo proměřeno se vzorky o koncentraci $0,3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ na spektrofotometru v rozmezí vlnových délek 200 – 400 nm a ze získaných elektronových absorpčních spekter byla přibližně odvozena struktura a množství chromoforů.

4.5 SDS-PAGE

4.5.1 Laemmli-SDS-PAGE

Příprava vertikální elektroforézy s pufrů podle Laemmliho [54] probíhala podle protokolu BIORAD [55], kdy bylo použito uvedené množství akrylamidu, pufru, roztoku SDS a ultračisté vody Milli-Q pro docílení koncentrace gelu 8 %, resp. 15 %. Byl použit komerční roztok akrylamid/bisakrylamid Rothiphorese od firmy Roth.

Elektroforéza byla provedena ve dvou variantách s rozdílnou koncentrací močoviny, která byla do roztoku přidána v množství 3,604 g, resp. 4,805 g, což odpovídá výsledné koncentraci $6 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, resp. $8 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ na celý roztok. Do roztoku obsahujícího větší obsah močoviny bylo přidáno více APS a TEMED pro lepší iniciaci polymerace a rychlejší tuhnutí, a to 60 μl APS a 7 μl TEMED. V případě roztoku s $6 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ močovinou činilo množství přidaného APS a TEMED 50 μl , resp. 5 μl . Příprava zaostřovacího 8% gelu proběhla již přesně podle protokolu BIORAD [55], stejně jako příprava roztoků SDS, APS, vzorkovacího, gelového a elektrodového pufru.

Jako standard byl zvolen proteinový standard SERVA Recombinant SDS PAGE Protein Marker 10 – 150 kDa PLUS Liquid Mix a elektroforéza byla provedena se vzorkem

lysozymu a dvěma vzorky nisinu. Elektroforéza probíhala z podmínek 100 V, 400 mA a barvení bylo provedeno pomocí Coomassie Brilliant Blue G250.

4.5.2 Tricine-SDS-PAGE

Modifikovaná metoda elektroforézy určená pro dělení malých peptidů byla provedena podle protokolu NATURE [42]. Gel obsahoval rovněž močovinu a katodový pufr obsahoval namísto sloučeniny Tris Tricine. Zaostřovací gel byl zvolen o koncentraci 4 % a separační gel 16 %. Namísto komerčního roztoku Rothiphorese jako v předchozím případě byl připraven samostatný roztok (49,5% T, 3% C) smícháním 48 g akrylamidu a 1,5 g bisakrylamidu se 100 ml Milli-Q vody.

Jako standard byl použit proteinový standard SERVA Protein Test Mixture 6 pro SDS PAGE obsahující menší peptidy (od 6,5 kDa). Elektroforéza probíhala za podmínek 100 V, 400 mA a barvení bylo provedeno pomocí Coomassie Brilliant Blue G250.

4.6 Stanovení koncentrace nisinu metodou HPLC

Nadalší analýzu pomocí RP/HPLC bylo využito zařízení Thermo Scientific Finnigan Surveyor PDA s detekcí pomocí diodového pole, spřažená pumpa mobilní fáze Thermo Scientific Finnigan Surveyor Pump a k vyhodnocení bylo využito software Xcalibur. Obecně bylo použito metody RP-HPLC, kdy mobilní fází byly polární rozpouštědla a stacionární nepolární náplň kolony.

Nástřik byl dávkován po 20 μl . Kalibrační závislost byla sestrojena pomocí koncentrací v rozmezí u nisinu 0,625 – 125 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a u lysozymu 7 – 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

4.6.1 Volba stacionární fáze (kolony)

Pro analýzu stanovovaných antimikrobiálních látek byla použita speciální 150 mm kolona Aeris Peptide XB-C18 obsahující 3,6 μm částice Core-Shell® vázané na silikagelu s vnitřním průměrem 4,6 mm [56]. Kolona je určena na analýzu menších peptidů. Průtok byl zvolen na 600 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ a kolona byla temperována na 30°C.

4.6.2 Volba mobilní fáze

Jako mobilní fáze byla dle specifikací kolony použita směs rozpouštědel voda a acetonitril v poměru 20:80, obě s 0,1% obsahem kyseliny trifluoroctové [57].

Jelikož rostoucí podíl organického rozpouštědla zvyšuje eluční sílu a snižuje retenční čas a také poměr rozpouštědel ovlivňuje selektivitu pro různé analyty [40], bylo vyzkoušeno použití gradientu [57], ovšem tento krok nepřinesl požadovaný efekt a bylo od jeho použití upuštěno.

4.7 Antimikrobiální test

Jako pokusný organismus byla zvolena nepatogenní grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis*, na kterou obě studované antimikrobiální látky vykazují antimikrobiální aktivitu.

4.7.1 Kultivace *Bacillus subtilis*

Kultura byla uchovávána na Petriho miskách při teplotě 4 °C.

4.7.1.1 Živná média

Pro kultivaci bakteriální kultury *Bacillus subtilis* bylo použito médium o následujícím složení (Tab. 3). V případě tekutého média bez přídavku agaru.

Tab. 3: Složení tuhých i tekutých živných médií [58].

Látka	Množství na 500 ml tuhého/tekutého média
Agar	10 g / - g
Pepton	2,5 g
Beef extract	1,5 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,005 g
Destilovaná voda	500 ml

Sterilizace probíhala v tlakovém hrnci 30 minut. Inokulum kultury *Bacillus subtilis* bylo zočkovááno z Petriho misky do 30 ml sterilního média ve 100 ml Erlenmayerově baňce. Kultivace proběhla za stálého třepání při teplotě 30 °C. Z takto připraveného inokula byly po 24 hodinách zaočkovány (po 1 ml kultury) do Erlenmeyerových baňek (100 ml) 30 ml tekutá média a (po 0,5 ml inokula) pevné agarové plotny. Baňky byly použity na stanovení antimikrobiální aktivity nisinu. Kultivace v baňkách proběhla za stálého třepání rovněž při teplotě 30 °C. Agarové plotny byly kultivovány v termostatu při teplotě 30 °C a následně použity pro stanovení antimikrobiální aktivity enkapsulovaných antimikrobiálních peptidů.

4.7.2 Testy antimikrobiální aktivity

4.7.2.1 Studium antimikrobiální aktivity nisinu

Nejprve byl připraven sterilní roztok nisinu o koncentraci 0,025 mg·ml⁻¹. Dvanáct baněk ze sady bylo rozděleno do dvou sad po šesti a v laminárním boxu bylo přidáno dané množství roztoku obsahující nisin pro dosažení koncentrace znázorněné v Tab. 4. Baňka s číslem 6 a 12 byla v obou sadách považována za kontrolní a nebyl do ní přidán žádný objem nisinu.

Tab. 4: Koncentrace nisinu v baňkách.

Číslo baňky	Koncentrace přidaného nisinu [µg/ml]
1, 7	2,7500
2, 8	1,3750
3, 9	0,6875
4, 10	0,3575
5, 11	0,1742
6, 12	0

Všech dvanáct baněk bylo ponecháno při 30 °C na temperované třepačce. Po 24h byl v první sadě změřen zákal spektrofotometricky při 630 nm a stanoven obsah sušiny gravimetricky. Po dalších 24 h byl opět změřen zákal, tentokrát však v druhé sadě.

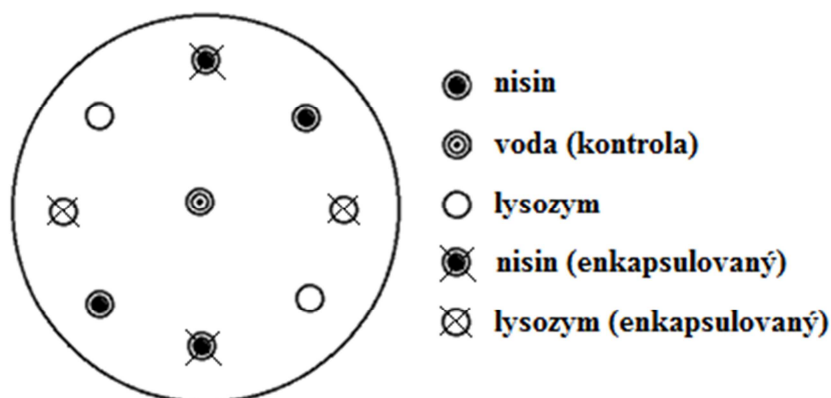
4.7.2.2 Ověření antimikrobiální aktivity enkapsulovaných látek

Do dvou agarových ploten bylo vytvořeno 9 děr sterilní špičkou od pipety a vždy do čtyř bylo vpraveno 2 µl příslušného roztoku nisinu (do dvou čistého a do dvou enkapsulovaného),

do dalších čtyř 2 µl příslušného roztoku lysozymu (do dvou čistého a do dvou enkapsulovaného) a pátá sloužila jako kontrola, kam byla vpravena jen sterilní voda v množství 2 µl.

Metody enkapsulace byly zvoleny následující. Ultrazvuková enkapsulace se 450 mg lecitinu a ethanolové vstříkávání s poměrem 1:2. Koncentrace nisinů činily u ultrazvukové metody 0,025 mg·ml⁻¹ a u lysozymu 1 mg·ml⁻¹. U ethanolového vstříkávání 0,3 mg·ml⁻¹ u nisinu, resp. 25 mg·ml⁻¹ u lysozymu.

Agarové plotny byly inkubovány při teplotě 30 °C a po projevení účinku byl výsledek zaznamenán.



Obr. 15: Znárodnění dávkování testovaných antimikrobiálních látek na agar.

4.7.3 Stanovení koncentrace biomasy testovacího kmene – stanovení antimikrobiální aktivity v tekutém médiu

Během kultivace byla biomasa v určitých intervalech stanovována pomocí spektrofotometrického měření zákalu, kdy byl z baněk s kulturou odebrán 1 ml buněčné suspenze a změřen na spektrofotometru při 630 nm oproti destilované vodě. Pokud byl zákal velký (obvykle u kontrolních baněk), byl vzorek zředěn destilovanou vodou.

4.7.4 Kalibrační křivka

Kalibrační křivka byla sestrojena z gravimetrického stanovení sušiny. Kdy bylo odebráno z jednotlivých baněk 10 ml roztoku buněčné suspenze. Poté bylo na centrifuze stočeno při 12 000 otáčkách po dobu 20 minut. Následně byl roztok nad biomasou slit (supernatant) a usazená biomasa (sediment) byla kvantitativně přenesena do předem zvážených a vysušených hliníkových misek, které byly sušeny při 105 °C do konstantní hmotnosti.

Hmotnost vysušených misek s biomasou byla porovnána s hmotností prázdných misek a tak byla vypočítána hmotnost biomasy v 10 ml a převedena na jednotku g.l⁻¹.

4.8 Enkapsulace

4.8.1 Příprava liposomů

Pomocí tří metod enkapsulace byly připraveny liposomy, a to ve třech variantách s různým množstvím fosfolipidu.

4.8.1.1 Ultrazvuk

Do sady kádinek obsahujících 20 ml vodného roztoku nisinů o koncentraci 0,025 mg·ml⁻¹, resp. lysozymu o koncentraci 1 mg·ml⁻¹ bylo naváženo dané množství sójového lecitinu a

cholesterolu a směs byla vystavena jednu minutu intenzivnímu promíchávání pomocí ultrazvuku. Zároveň byla provedena kontrola pouze s 20 ml vody.

Tab. 5: Množství přidávaného lecitinu a cholesterolu.

Číslo vzorku	Lecitin	Cholesterol
1	90 mg	10 mg
2	180 mg	20 mg
3	450 mg	50 mg

4.8.1.2 Etanolové vstříkávání

Do mikrozkuumavek (typ eppendorf) obsahujících daný objem vodného roztoku nisinu o koncentraci $0,025 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, resp. lysozymu o koncentraci 1 mg/ml byl v daném poměru k vodnému roztoku vstříknut etanolový roztok lecitinu izolovaného z vaječného žloutku pomocí acetonové a ethanolové extrakce [50]. Zároveň byla provedena kontrola pouze s roztokem vody.

Tab. 6: Poměr a množství vodného roztoku a lecitinu.

Číslo vzorku	Poměr roztok:lecitin	Objem roztoku antimikrobiální látky	Objem etanolového roztoku lecitinu
1	1:0,25	1 ml	0,25 ml
2	1:0,5	0,5 ml	0,25 ml
3	1:1	0,5 ml	0,5 ml

4.8.1.3 Metoda TLE

Na vakuové rotační odparce bylo odpařeno dané množství lecitinu a cholesterolu spolu s 10 ml rozpouštědla (8 ml chloroformu a 2 ml methanolu). Poté byl ke směsi přidán roztok nisinu o koncentraci $0,025 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ v 50 mM fosfátovém pufru o pH 8, resp. lysozymu o koncentraci $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a teplotě $40 \text{ }^\circ\text{C}$ byl přilít v množství 10 ml přidán do směsi. Směs byla střídavě míchána na vortexu a ultrazvukována, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění lipidového filmu na stěnách baňky. Zároveň byla provedena kontrolní sada pouze s roztokem pufru.

Tab. 7: Množství přidávaného lecitinu a cholesterolu.

Číslo vzorku	Lecitin	Cholesterol
1	80 mg	10 mg
2	100 mg	12,5 mg
3	420 mg	15 mg

4.8.2 Stanovení enkapsulační účinnosti

Enkapsulační účinnost byla vyhodnocena pomocí stanovení volného nisinu, resp. lysozymu v roztoku po enkapsulaci. Ke stanovení byla použita optimalizovaná metoda HPLC.

Enkapsulační účinnost (%) byla spočítána jako podíl enkapsulovaného množství k celkovému množství v původním roztoku.

4.8.3 DLS měření parametrů liposomů

Připravené liposomy byly analyzovány na koloidním analyzátoru a byla zjištěna distribuce velikosti částic a stabilita, která byla odvozena z hodnot zeta potenciálu.

4.8.3.1 Distribuce velikosti částic a zeta potenciál

Do kyvety byl umístěn desetkrát, resp. u ethanolového vstřikování a TLE dvacetkrát zředěný vzorek enkapsulovaných částic. Poté byla kyveta umístěna do DLS přístroje Malvern Zetasizer ZS a byla zjištěna distribuce velikosti částic. Poté s přidáním elektrodovým nástavcem byl změřen zeta potenciál.

4.8.4 Studium stability enkapsulovaných částic v modelových podmínkách

Vybrané enkapsulované částice připravené pomocí tří metod byly podrobeny studiu v modelových podmínkách trávicího traktu. V případě nisinu šlo u ethanolového vstřikování o variantu s poměrem lecitin:vzorek 1:1, u ultrazvuku o variantu s 450 mg lecitinu a u metody TLE o variantu se 120 mg lecitinu.

Žaludeční šťáva byla připravena z 0,25 g pepsinu, který byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. Následně bylo přidáno 0,84 ml 35% HCl a hodnota pH byla upravena na hodnotu 0,9. Pankreatická šťáva byla připravena rozpuštěním 0,25 g pankreatinu a 1,5 g NaHCO₃ v 100 ml destilované vody, pH bylo upraveno na 8,9. Žlučové šťávy byly přichystány přidáním 0,8 g žlučových solí do 200 ml pufru (pH 8).

Ve všech případech byly vzorky připraveny v poměru 1:1 (šťáva:částice) a byl změřen zeta potenciál a koncentrace nisinu a lysozymu v čase nula a po 30 minutách působení šťávy, přičemž byly vzorky inkubovány při 37 °C. Množství uvolněného nisinu bylo stanovenou metodou HPLC, resp. u lysozymu metodou podle Hartree-Lowryho.

4.8.5 Aplikace enkapsulovaných částic do modelových potravin

Připravené liposomové částice s enkapsulovaným peptidem byly ponechány 1 týden ve čtyřech modelových typech potravin a v průběhu testování byla sledována stabilita a uvolněné množství peptidu.

Prvním modelem (model A) byla simulace vodného roztoku, kdy modelovou potravinu tvořila jen destilovaná voda. Dalším modelem (model B) bylo simulováno kyselé prostředí a modelová potravina byla tvořena 3% kyselinou octovou. Model C tvořila potravina obsahující ethanol a simulující tak alkoholickou potravinu. Poslední model (model D) simuloval tučnou potravinu a obsahoval rostlinný olej a vodu v poměru 1:1.

Pro tento pokus byly vybrány částice připravené pomocí ultrazvuku, 450 mg lecitinu a 50 mg cholesterolu a přidavek částic do modelové potraviny činil 20 %.

Modelové potraviny byly inkubovány 7 dní při 28 °C. Po prvním dni, po třech dnech a po týdně byla stanovena hodnota zeta potenciálu. Souběžně byly modelové potraviny skladovány při 5 °C a u těchto vzorků byla stanovena hodnota zeta potenciálu po týdně. U obou variant bylo po týdně stanoveno uvolněné množství enkapsulantu.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

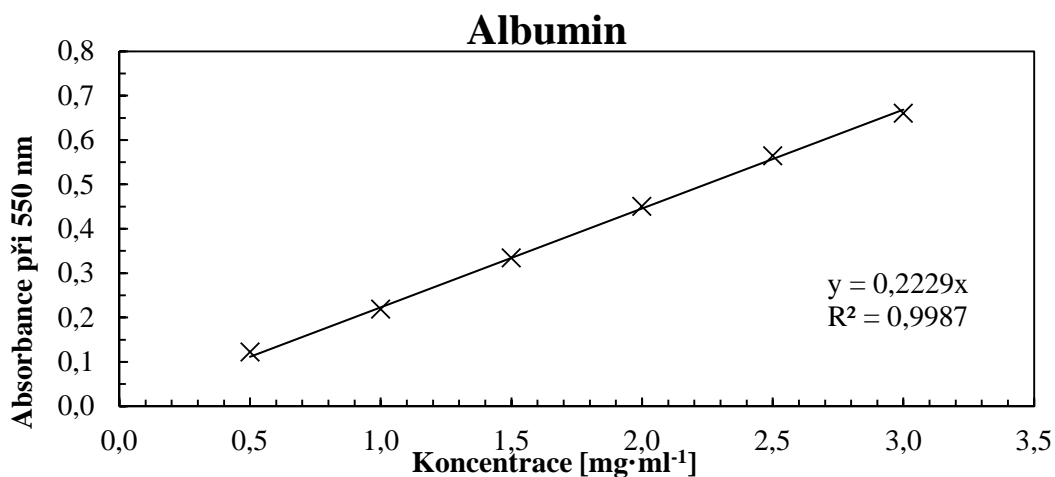
5.1 Optimalizace metod stanovení koncentrace peptidů konvenčními metodami

5.1.1 Kalibrační křivky

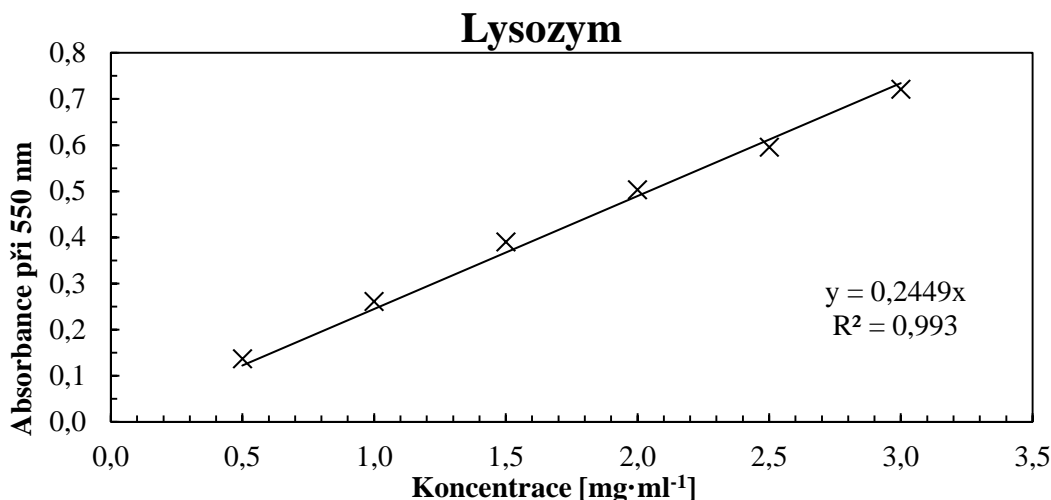
Kalibrační křivky, jakožto závislosti absorbance na koncentraci proteinu, byly sestrojeny na základě postupů popsaných v experimentální části (4.4). U nisinu bylo měření provedeno ze spektrofotometrických metod pouze metodou Hartree-Lowry, bicinchoninovou metodou a dále na HPLC. Kalibrační křivky lysozymu byly sestrojeny s využitím všech spektrofotometrických metod a porovnány s referenčním vzorkem albuminu. Každá hodnota kalibrační závislosti byla měřena dvakrát a v grafu je uvedena průměrná hodnota ze dvou měření.

5.1.1.1 Biuretová metoda

Vzhledem k tomu, že biuretová metoda je založena na chelataci měďnatého iontu imidovými strukturami proteinu, je vhodná pro stanovení lysozymu, který má těchto struktur dostatek, na rozdíl od nisinu. Rovněž referenční BSA podává téměř identickou odezvu jako lysozym. Tato metoda je také vhodná pro větší koncentrace proteinů.



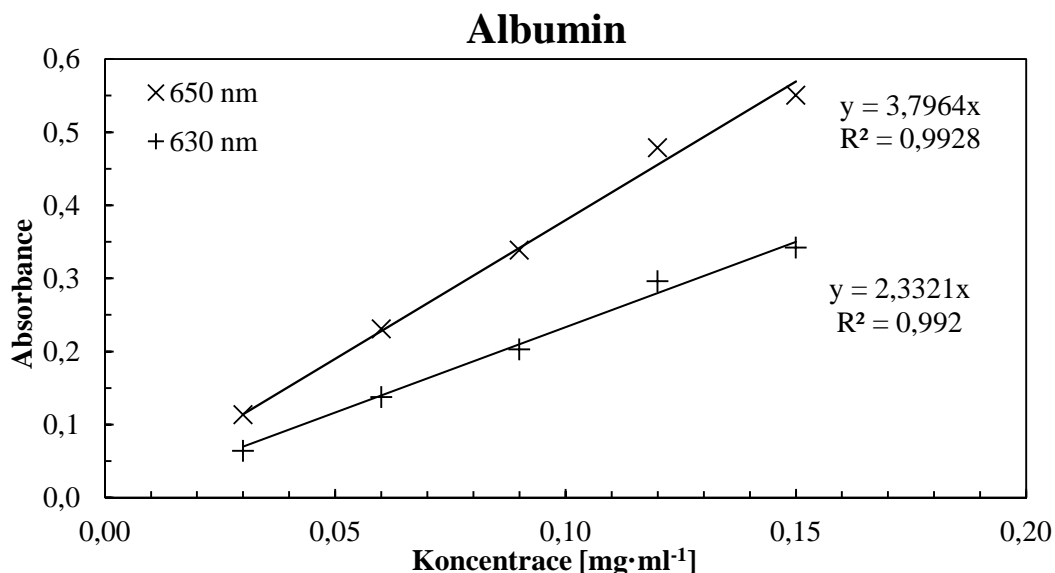
Obr. 16: Kalibrační závislost albuminu při použití biuretové metody.



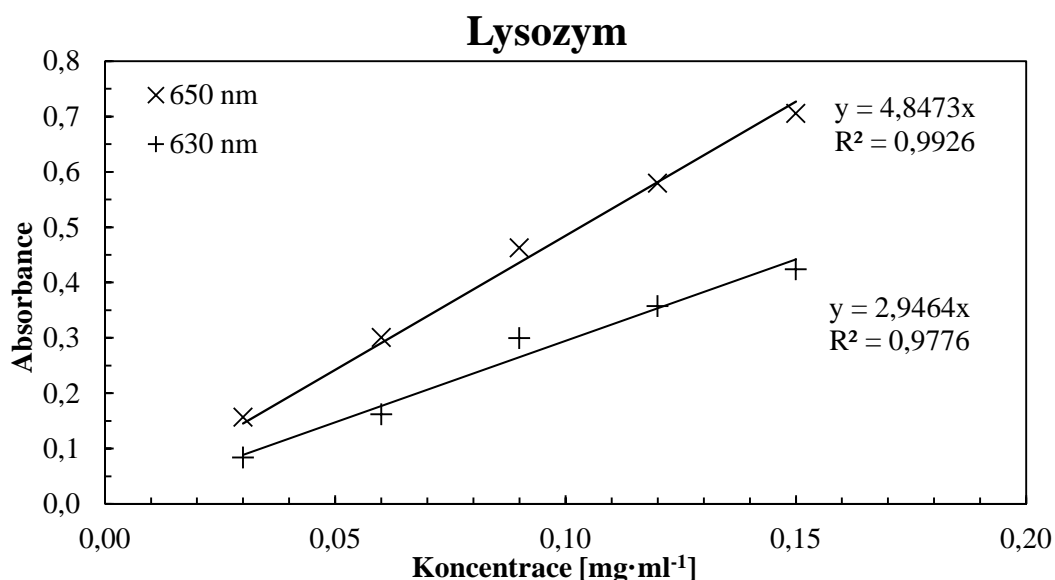
Obr. 17: Kalibrační závislost lysozymu při použití biuretové metody.

5.1.1.2 Metoda dle Hartree-Lowryho

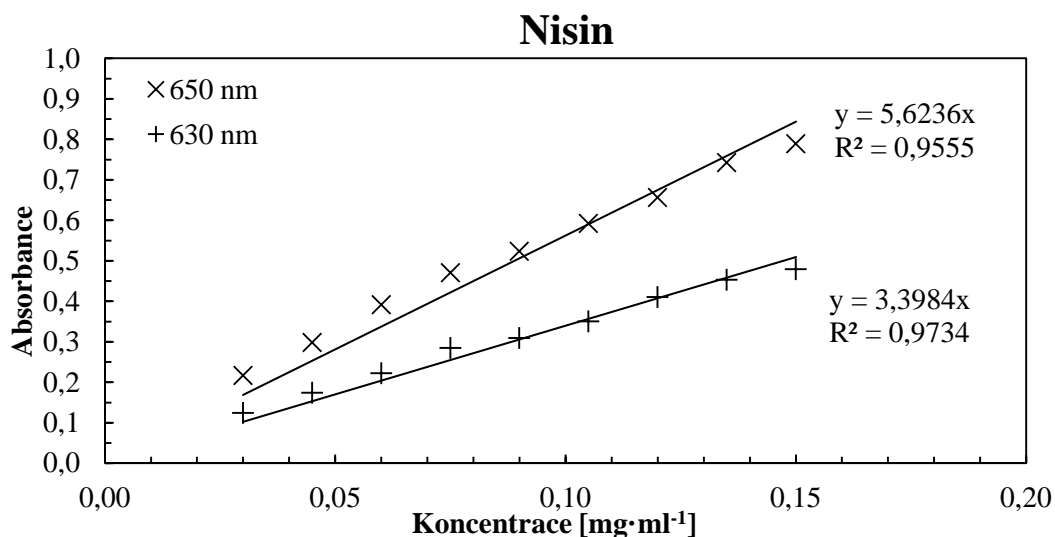
U této metody bylo navíc provedeno porovnání na ELISA readeru, ovšem pouze při 630 nm, což neodpovídá maximu absorpce u metody dle Hartree-Lowryho, a tak má kalibrační křivka jiný sklon, resp. směrnici. Z naměřených hodnot je patrné, že je metoda dobře použitelná pro stanovení obsahu lysozymu i nisinu. V případě nisinu bylo zvolena širší série kalibračních standardů pro omezení náhodných fluktuací.



Obr. 18: Porovnání kalibračních závislosti metody Hartree-Lowry u albuminu naměřených na spektrofotometru při 650 nm a na ELISA readeru při 630 nm.



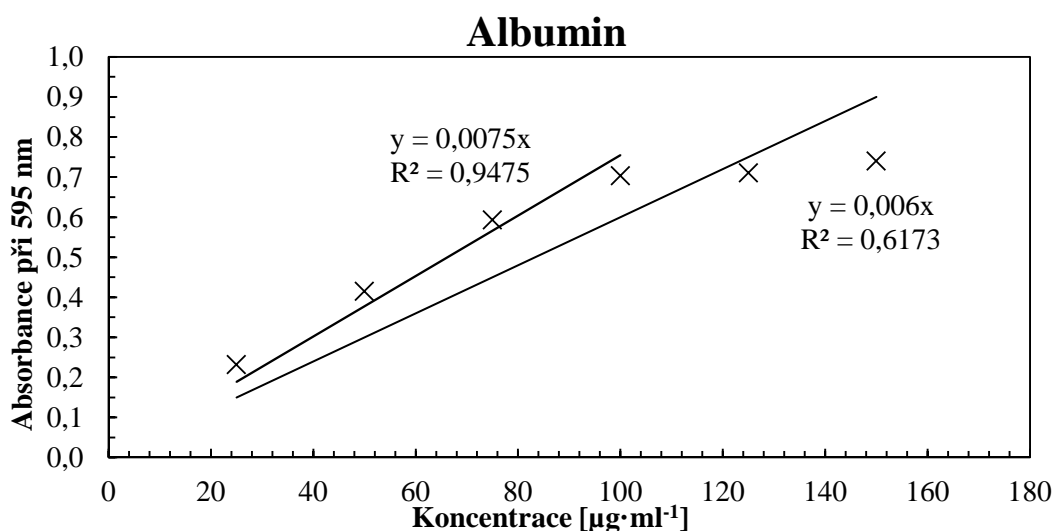
Obr. 19: Porovnání kalibračních závislosti metody Hartree-Lowry u lysozymu naměřených na spektrofotometru při 650 nm a na ELISA readeru při 630 nm.



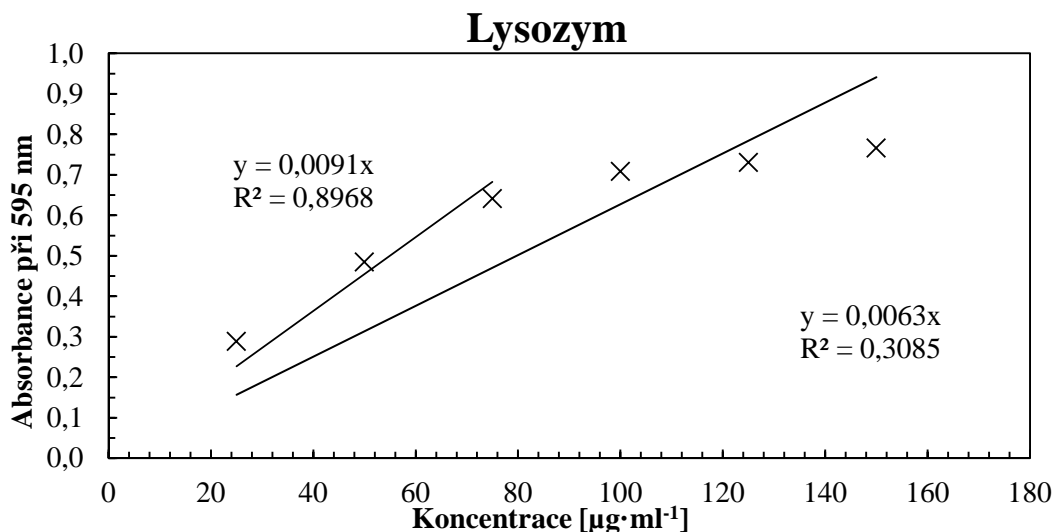
Obr. 20: Porovnání kalibračních závislosti metody Hartree-Lowry u nisinu naměřených na spektrofotometru při 650 nm a na ELISA readeru při 630 nm.

5.1.1.3 Metoda dle Bradfordové

Rovněž byla vyzkoušena jednoduchá metoda barvení proteinů pomocí barviva Coomassie. Z naměřených dat je patrná menší citlivost ve vyšších koncentracích, kdy již není absorbance relevantně úměrná koncentraci a kalibrační křivka začíná být konkávní, stejné znaky lze pozorovat v u obou proteinů a tak pravděpodobně nejde o chybu ředění [50]. Jinak jde o relativně citlivou metodu. Z proložení první poloviny získaných hodnot regresní přímkou je patrný již vhodnější trend kalibrační křivky.



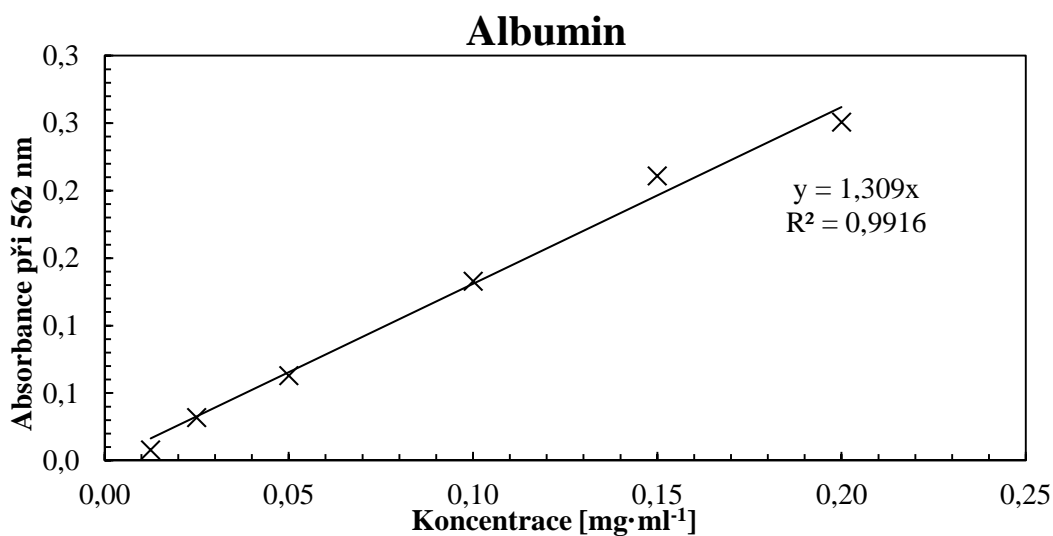
Obr. 21: Kalibrační závislost albuminu při použití barviva Coomassie.



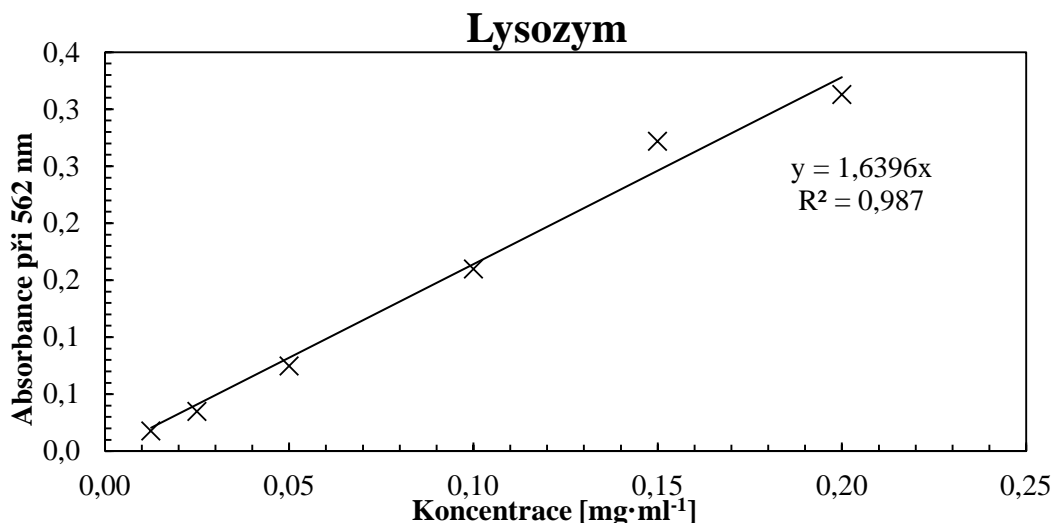
Obr. 22: Kalibrační závislost lysozymu při použití barviva Coomassie.

5.1.1.4 Bicinchinová metoda (BCA)

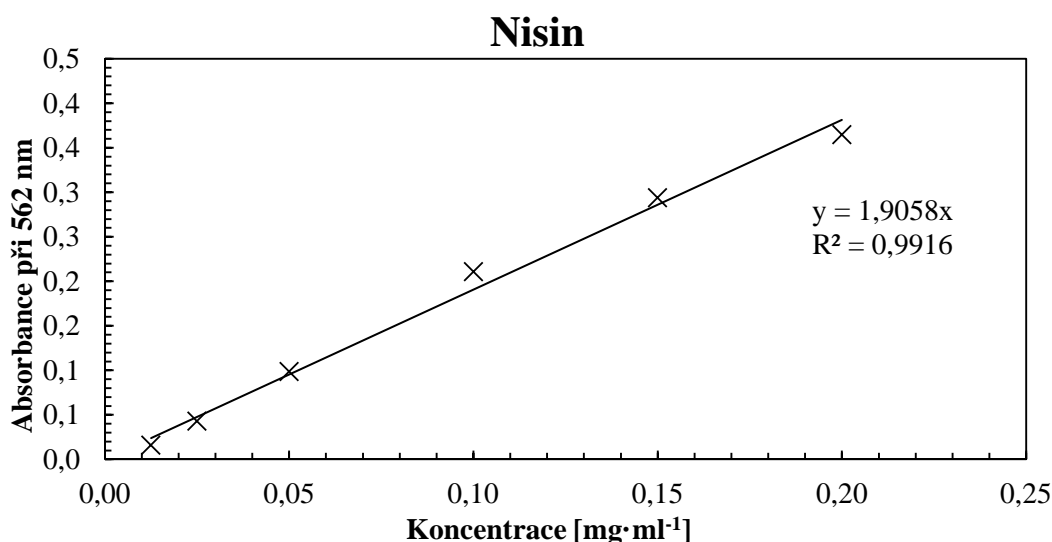
Nakonec byla vyzkoušena a optimalizována metoda BCA, kdy bylo použito nejvhodnějšího postupu uvedeného i v protokolu [51]. Metoda podává dobré výsledky jak u lysozymu, tak u nisinu. Intenzita zbarvení je velmi variabilní a závisí na délce inkubace a teplotě. Vzorčky proto byly inkubovány při vyšší teplotě (50 °C), ovšem po standardní dobu 30 minut. Výhodou je pokrytí velkého rozsahu koncentrací - od 125 do 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Nevýhodou je vysoká spotřeba činidla, resp. jeho nejdražší komponenty - dvojsodné soli kyseliny bicinchinové (samostatná kyselina není rozpustná ve vodě).



Obr. 23: Kalibrační závislost albuminu při použití BCA metody



Obr. 24: Kalibrační závislost lysozymu při použití BCA metody.

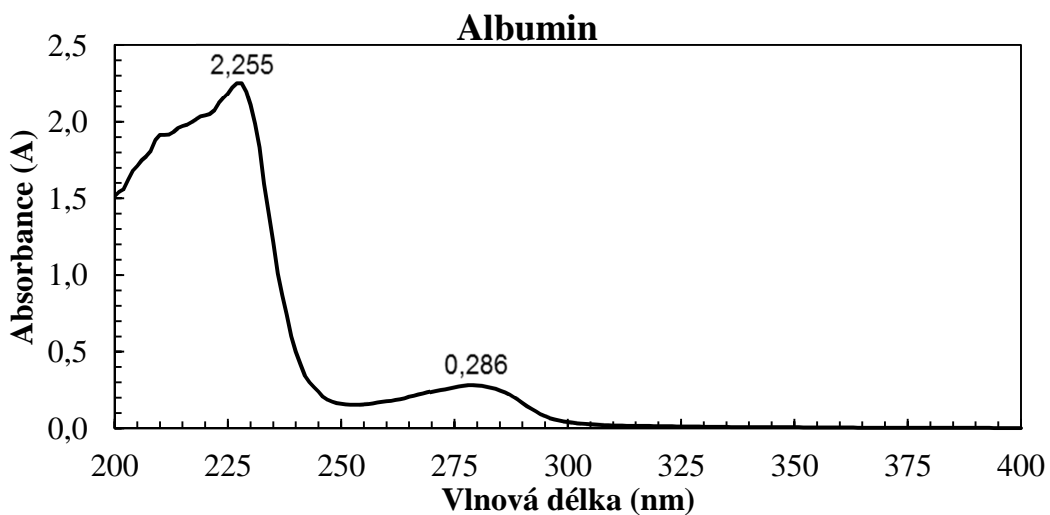


Obr. 25: Kalibrační závislost nisinu při použití BCA metody.

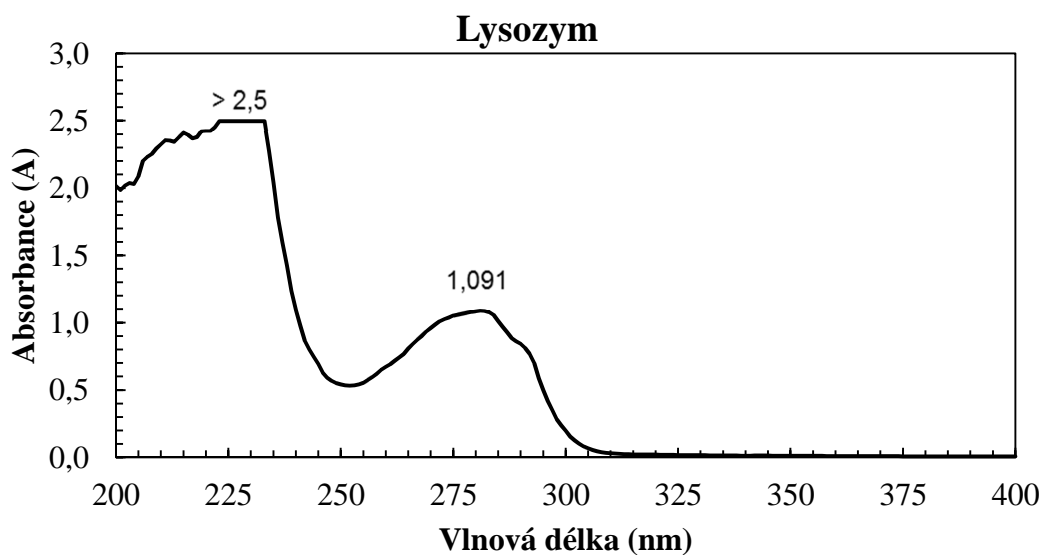
5.1.2 Stanovení absorpčního spektra

Z absorpčního spektra každého proteinu je patrné, kdy daný protein absorbuje a v jakém množství se dané složky (chromofory) způsobující absorpci nacházejí. Při 280 nm absorbují převážně aromatické sloučeniny, které jsou v lysozymu (maximum 1,091 při 281 nm) lépe přístupné a vykazují vyšší absorpci UV záření než v případě albuminu (maximum 0,286 při 279 nm), který je větší a část aromatických skupin může být stíněna uvnitř molekuly. Jak lysozym, tak albumin patří ke globulárním proteinům, u nichž je zastoupení aromatických aminokyselin přibližně stejné [50]. Pod 240 nm absorbují převážně disulfidické můstky a aminokyseliny obsahující disulfidické můstky (Met), případně další méně obvyklé struktury jako fenolické (Tyr, Phe) a heterocyklické (His) a nakonec nejbliže hodnotě 205 nm peptidické vazby. I při 230 nm je u lysozymu (maximum větší než detekční limit spektrometru) patrný větší obsah daných struktur než u albuminu (maximum 2,255 při 228 nm).

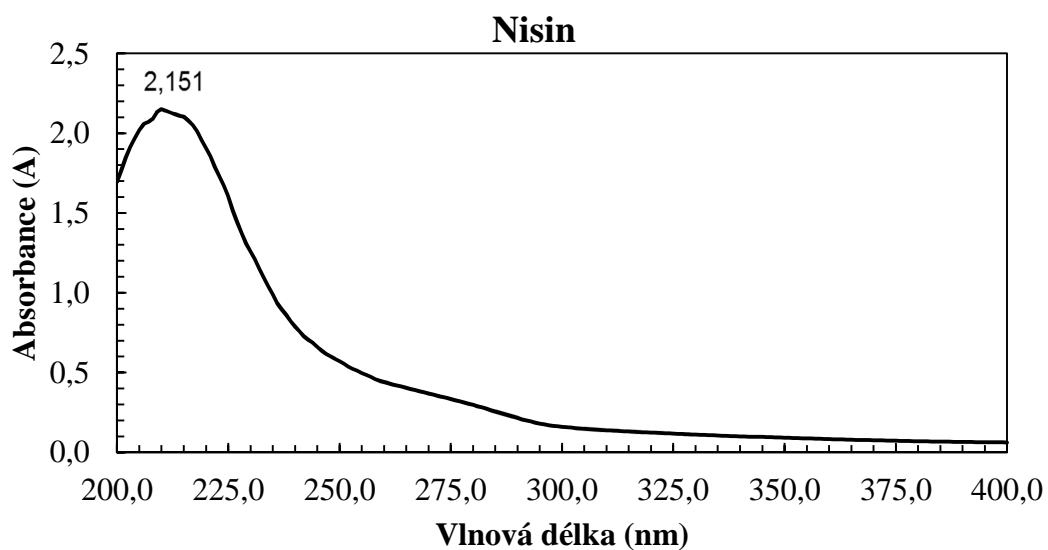
Naopak tvar UV spektra nisinu naznačuje v podstatě absenci aromatických kruhů, což je v souladu se strukturou peptidu. Struktura nisinu uvedena v kapitole (2.2.1).



Obr. 26: UV absorpční spektrum albuminu při 200 – 400 nm.



Obr. 27: UV absorpční spektrum lysozymu při 200 – 400 nm.

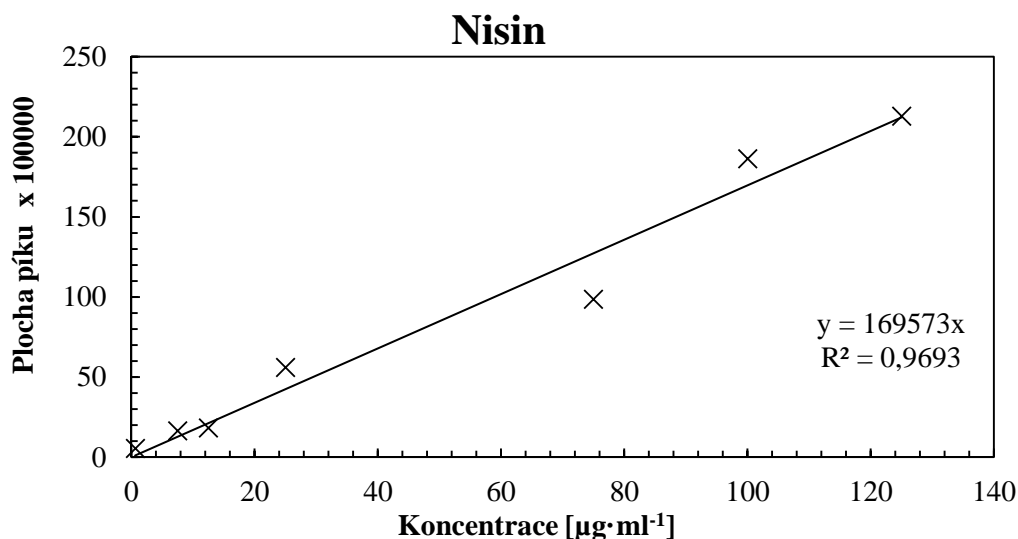


Obr. 28: UV absorpční spektrum nisinu při 200 – 400 nm.

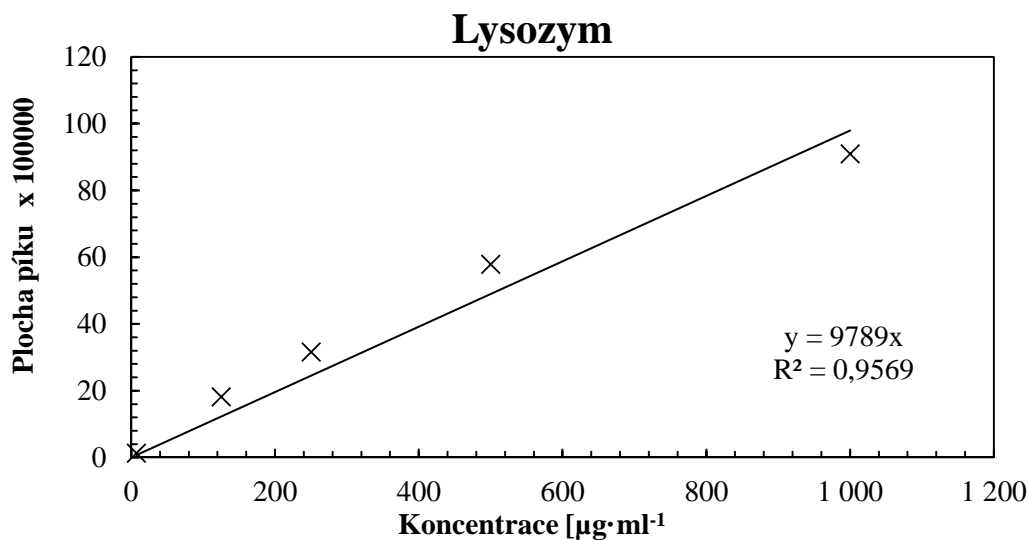
5.2 Optimalizace stanovení koncentrace peptidů pomocí HPLC

Dále byly s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie sestrojeny kalibrační křivky pro nisin i lysozym, které byly později využity především k zjištění enkapsulační účinnosti. Metoda byla provedena dle postupu uvedeného v kapitole (6.2).

Každá hodnota kalibrační závislosti byla měřena dvakrát a v grafu je uvedena průměrná hodnota ze dvou (měření).



Obr. 29: Závislost plochy píku v chromatogramu na koncentraci nisinu.



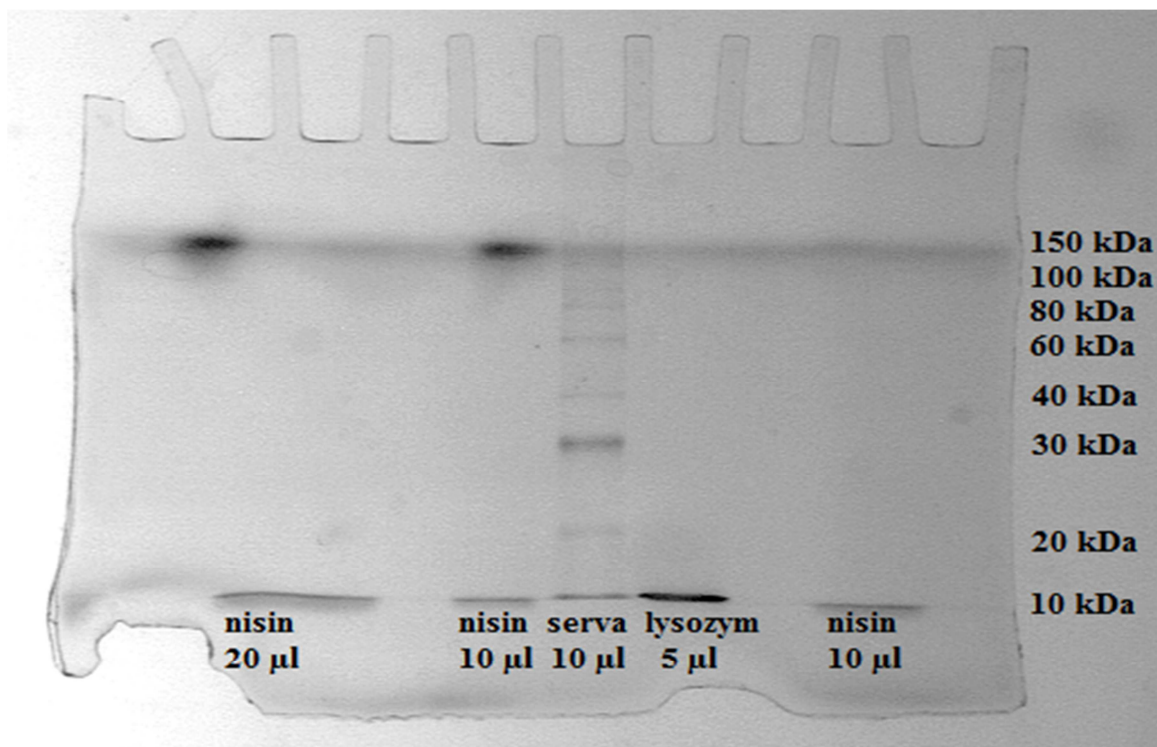
Obr. 30: Závislost plochy píku v chromatogramu na koncentraci lysozymu.

5.3 Identifikace proteinů pomocí SDS-PAGE

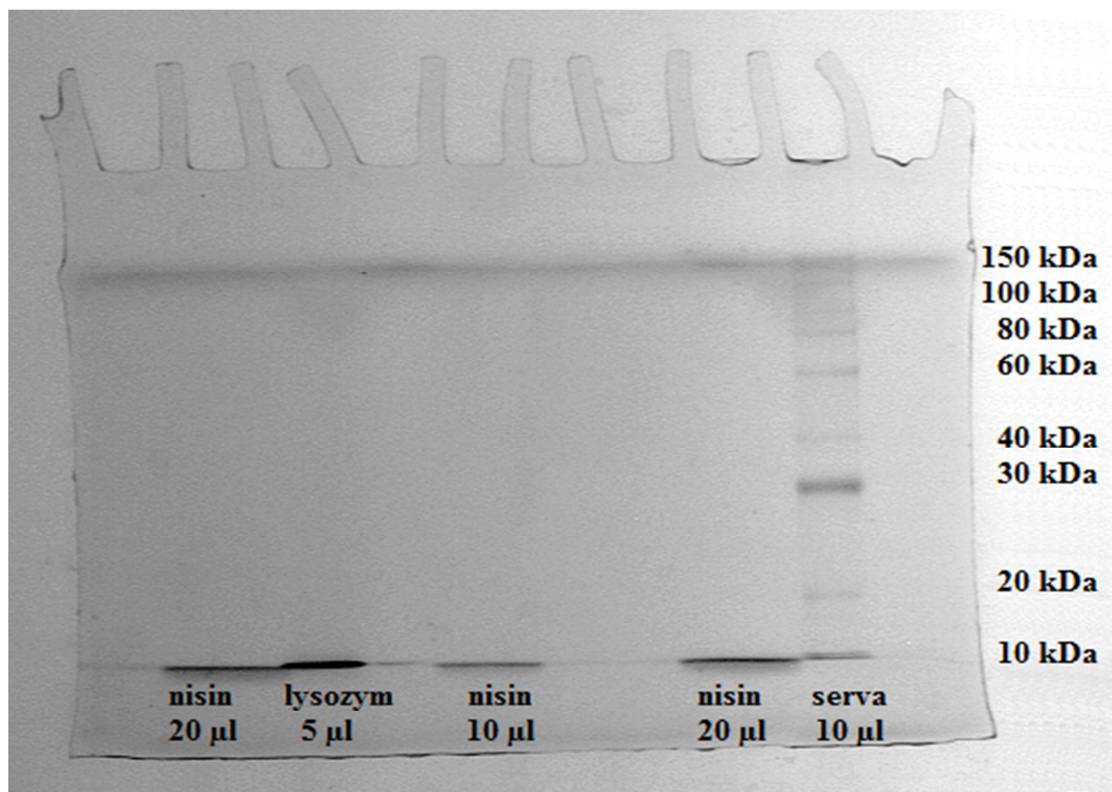
Metoda PAGE-SDS byla provedena dle postupu uvedeného v kapitole (4.6). Zatímco při použití močoviny (6 i $8 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) byly zóny nisinu na čele elektroforeogramu a skutečná separace lysozymu a nisinu nebyla patrná, při použití Tricine-SDS je separace malých peptidů zcela jasná a úspěšná a potvrzuje i M_r lysozymu cca $14,4 \text{ kDa}$ a nisinu kolem $3,3 \text{ kDa}$. Tuto metodu lze tedy využít k identifikaci i separaci malých peptidů ve směsi.

Zároveň však došlo pravděpodobně z důvodu použití příliš vysokého množství proteinového standardu k rozmazání zón nejmenších proteinů. Ovšem obě zóny nisinu (3,4 kDa) jsou dobře patrné i bez srovnávacího standardu.

5.3.1 Laemmli-SDS-PAGE

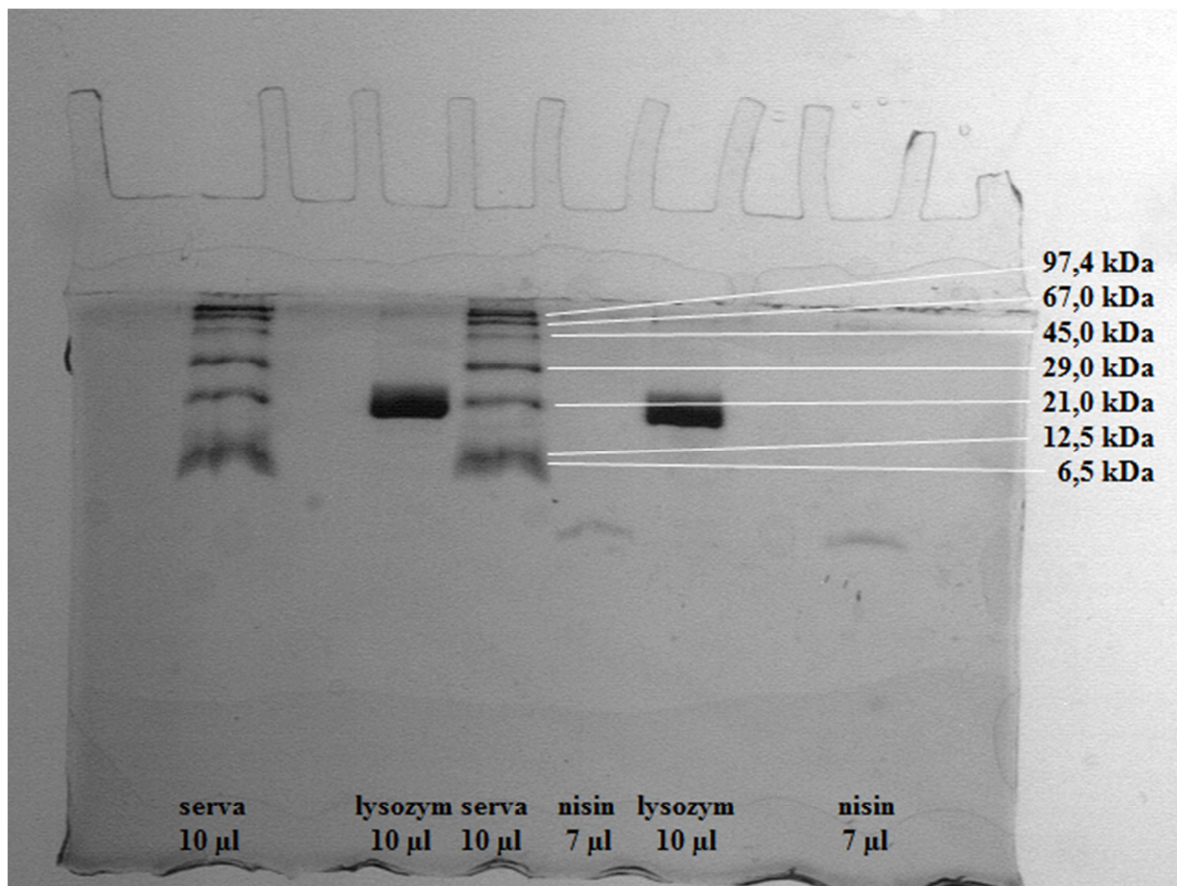


Obr. 31: Výsledek Laemmli-SDS-PAGE při použití močoviny o koncentraci $6 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.



Obr. 32: Výsledek Laemmli-SDS-PAGE při použití močoviny o koncentraci $8 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

5.3.2 Tricine-SDS-PAGE



Obr. 33: Výsledek Tricine-SDS-PAGE s močovinou o koncentraci $6 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ [52]

5.4 Testy antimikrobiálních vlastností

5.4.1 Tekutá média

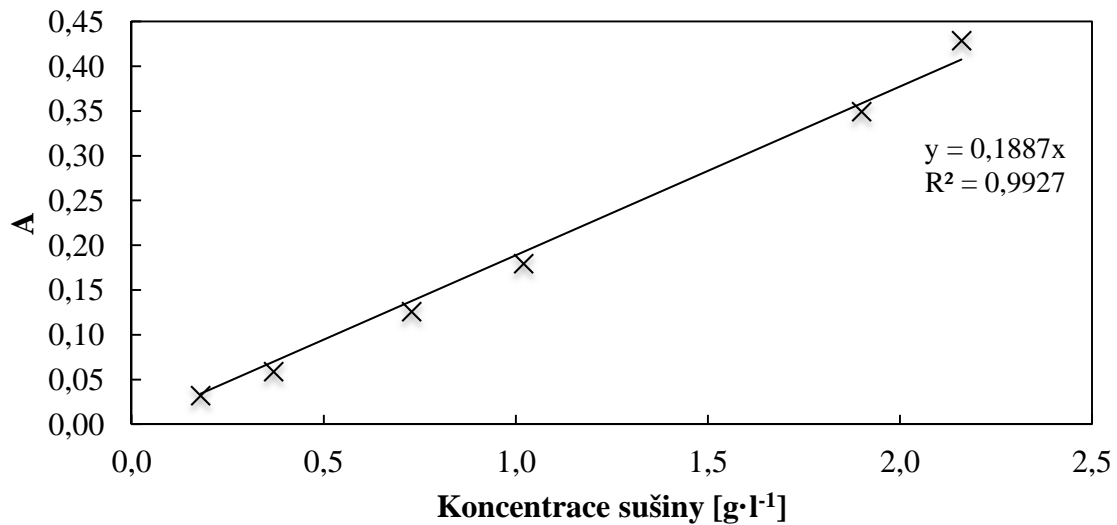
Dvě sady baněk obsahující kultury *Bacillus subtilis* a rozdílnou koncentraci nisinu byly inkubovány tři dny (72 h) při 30°C (4.7.2). V průběhu inkubace byl měřen zákal spektrofotometricky při 630 nm vždy po 24h.

Po prvních 24h byla sestrojena kalibrační závislost zákalu na koncentraci biomasy potřebná pro budoucí přepočty naměřeného zákalu na koncentraci a na tvorbu růstových křivek.

Tab. 8: Koncentrace nisinu v médiích a gravimetrické stanovení koncentrace sušiny.

Číslo baňky	Koncentrace přidaného nisinu [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Prázdňá váženka [g]	Váženka se sušinou [g]	Sušina [$\text{g}\cdot 10 \text{ ml}^{-1}$]	Sušina [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]
1	2,7500	15,479	15,481	0,002	0,180
2	1,3750	16,100	16,104	0,004	0,370
3	0,6875	16,374	16,381	0,007	0,730
4	0,3575	15,691	15,702	0,010	1,020
5	0,1742	15,925	15,944	0,019	1,900
6	0	16,467	16,489	0,022	2,160

Závislost zákalu na sušině po 24h

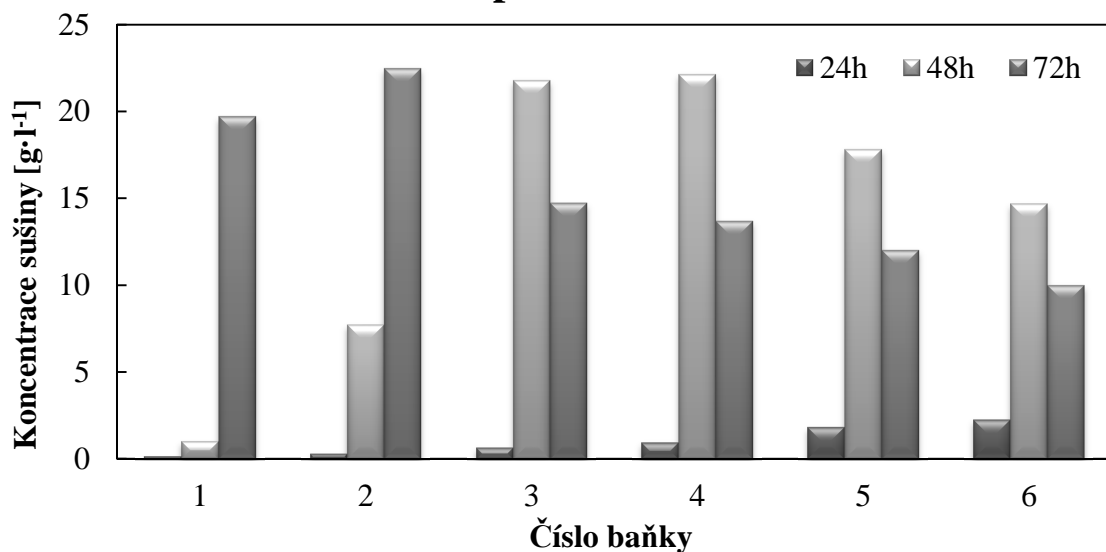


Obr. 34: Závislost zákalu měřeného spektrofotometricky při 630 nm na koncentraci sušiny.

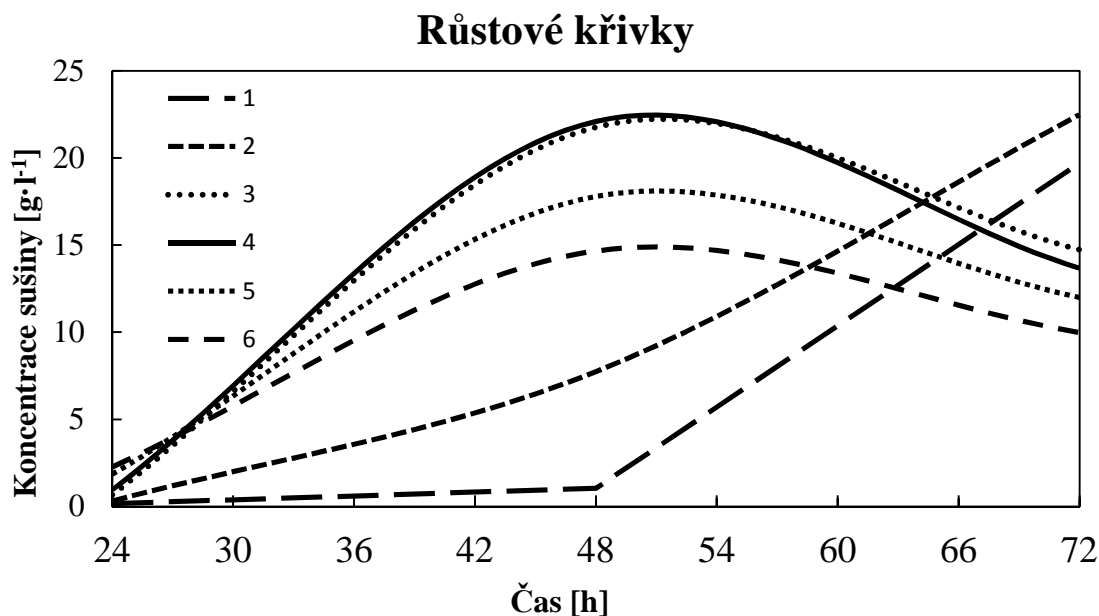
Tab. 9: Koncentrace biomasy v médiích získána pomocí kalibrační závislosti (Obr. 34)

Číslo baňky	Koncentrace biomasy po 24h [g·l ⁻¹]	Koncentrace biomasy po 48h [g·l ⁻¹]	Koncentrace biomasy po 72h [g·l ⁻¹]
1	0,168	1,042	19,714
2	0,313	7,737	22,487
3	0,665	21,763	14,732
4	0,954	22,099	13,672
5	1,849	17,788	11,994
6	2,268	14,662	9,981

Zákal v průběhu kultivace



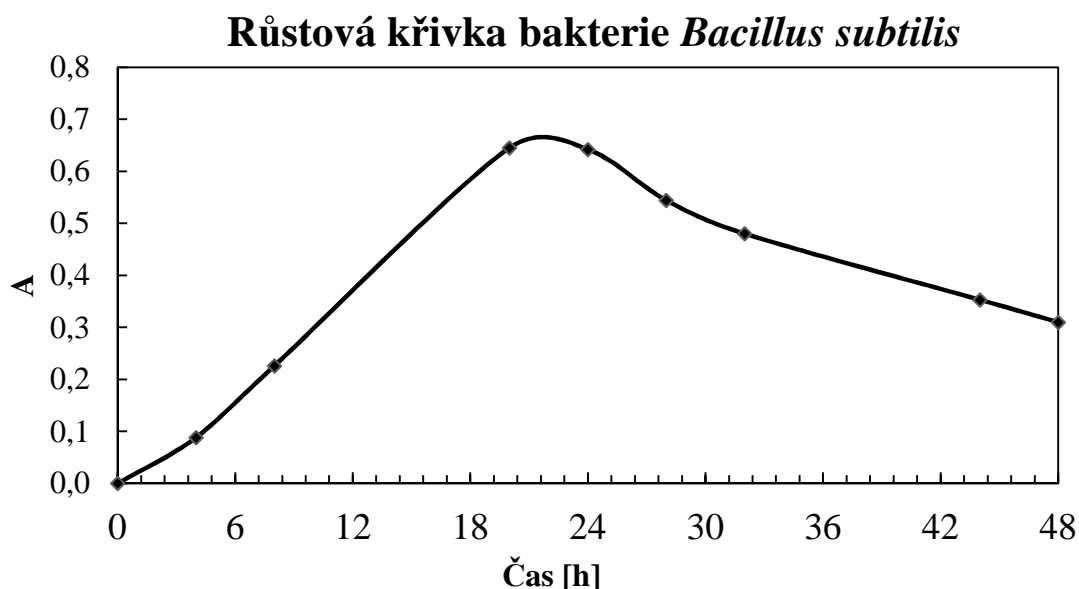
Obr. 35: Průběžná koncentrace biomasy v médiích.



Obr. 36: Růstové křivky jako závislost koncentrace biomasy na čase.

Z výsledků je patrné, že v souvislosti s výsledky závislosti zákalu na koncentraci, kdy při odběru po 48 hodinách byla koncentrace biomasy v baňkách s obsahem nisinu vyšší, než v kontrolní baňce, byl zvolen nevhodný interval odběrů.

Podle růstové křivky bakterie *Bacillus subtilis* [58] vrchol exponenciální fáze nastává zhruba po 24 hodinách a po 48 hodinách již kultura nachází daleko ve fázi odumírání. Tam kde byl přítomen nisin se protáhla doba lag fáze a exponenciální fáze startovala později (nisin bakterie neničil, ale po určitý čas zabraňoval množení). Tato situace by se dala odstranit přizpůsobením intervalů odběru růstové křivce bakterie, např. po 4h.



Obr. 37: Růstová křivka *Bacillus subtilis* [58]

5.5 Enkapsulace

5.5.1 Enkapsulační účinnost

V práci byly zavedeny některé metody enkapsulace nisinu a lysozymu. Enkapsulační účinnost byla zjišťována u enkapsulace roztoku nisinu o koncentraci $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a lysozymu o $1\,000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Nejlepší enkapsulační účinnost byla dosažena s roztokem lysozymu u ultrazvukové enkapsulace (okolo 51 %) při použití 180 mg lecitinu (59,5 %), naopak nejhorší výsledek byl naměřen celkově u etanolového vstřikování, kdy se hodnoty enkapsulační účinnosti v případě nisinu a poměru lecitin:vzorek 1:2 a 1:4 rovnají téměř nule. Při použití poměru 1:1 činí účinnost v případě nisinu 11,89 % a v případě lysozymu 17,18 %. Metoda TLE poskytuje enkapsulační účinnost průměrně okolo 30 %.

Tab. 10: Enkapsulační účinnost a enkapsulované množství.

Použitá metoda přípravy	Vzorek	Enkapsulační účinnost[%]	Enkapsulované množství [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]
ultrazvuk 100	nisin	9,29	3,07
ultrazvuk 100	lysozym	51,61	521,48
ultrazvuk 200	nisin	25,58	8,46
ultrazvuk 200	lysozym	59,50	601,24
ultrazvuk 500	nisin	23,51	7,77
ultrazvuk 500	lysozym	51,07	516,04
TLE 90	nisin	19,72	6,52
TLE 90	lysozym	7,52	69,83
TLE 112,5	nisin	26,66	8,81
TLE 112,5	lysozym	40,51	376,26
TLE 135	nisin	29,81	9,86
TLE 135	lysozym	23,03	213,93
etanolové vstřikování 1:1	nisin	11,89	1,69
etanolové vstřikování 1:1	lysozym	17,18	109,66
etanolové vstřikování 1:2	nisin	0,70	0,06
etanolové vstřikování 1:2	lysozym	4,60	33,62
etanolové vstřikování 1:4	nisin	0,00	0,00
etanolové vstřikování 1:4	lysozym	2,59	23,20

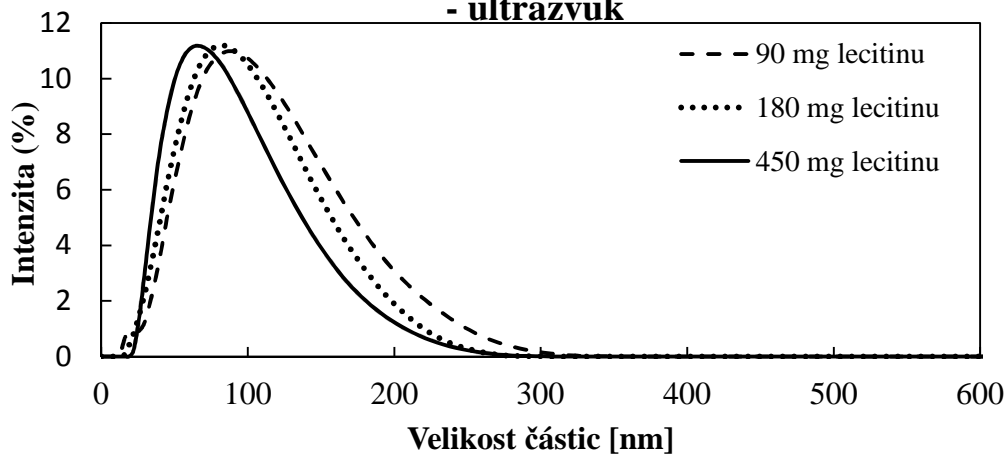
5.5.2 Analýza částic s enkapsulovaným nisinem a lysozymem

5.5.2.1 Distribuce velikosti částic

Analýza liposomových částic byla provedena na koloidním analyzátoru metodou dynamického rozptylu světla. Byly proměřeny vzorky všech modelových metod přípravy liposomů.

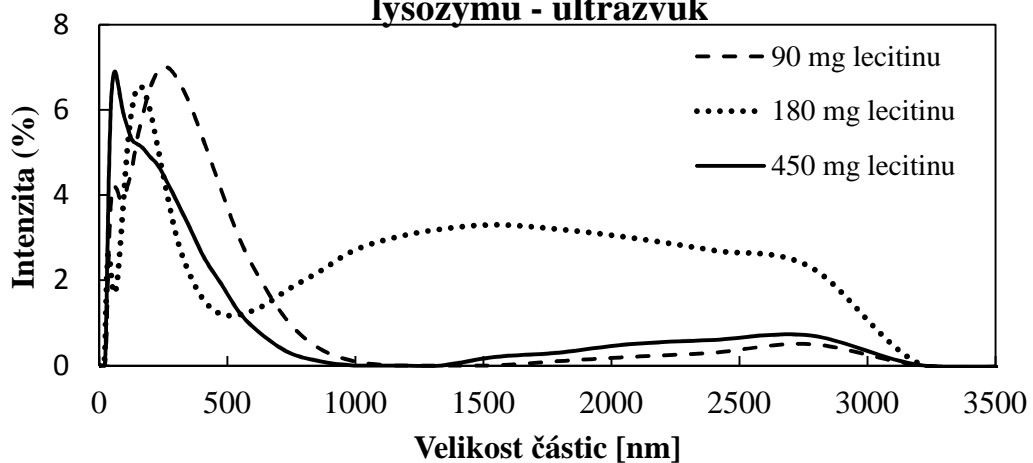
Všeobecně nejlepší distribuci částic dává ultrazvuková enkapsulace u nisinu, a to nezávisle na množství lecitinu a cholesterolu. V daném vzorku je pak patrná pouze jedna velikost částic okolo 100 nm. V dalších distribucích je patrná různá velikost částic. Velikost částic je zde obvykle okolo 100 nm, pak 500 nm a zřídka 1 000 nm.

**Distribuce velikosti částic enkapsulovaného nisinu
- ultrazvuk**



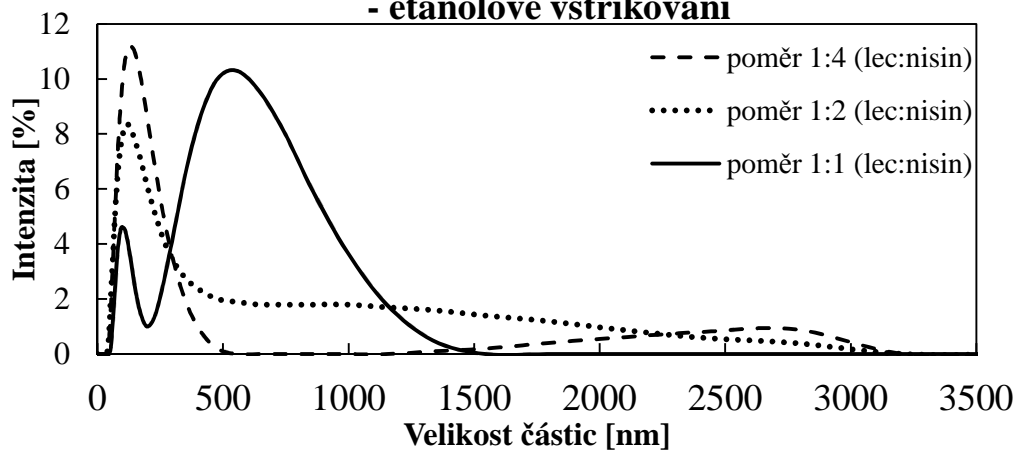
Obr. 38: Distribuce velikosti částic nisinu.

**Distribuce velikosti částic enkapsulovaného
lysozymu - ultrazvuk**

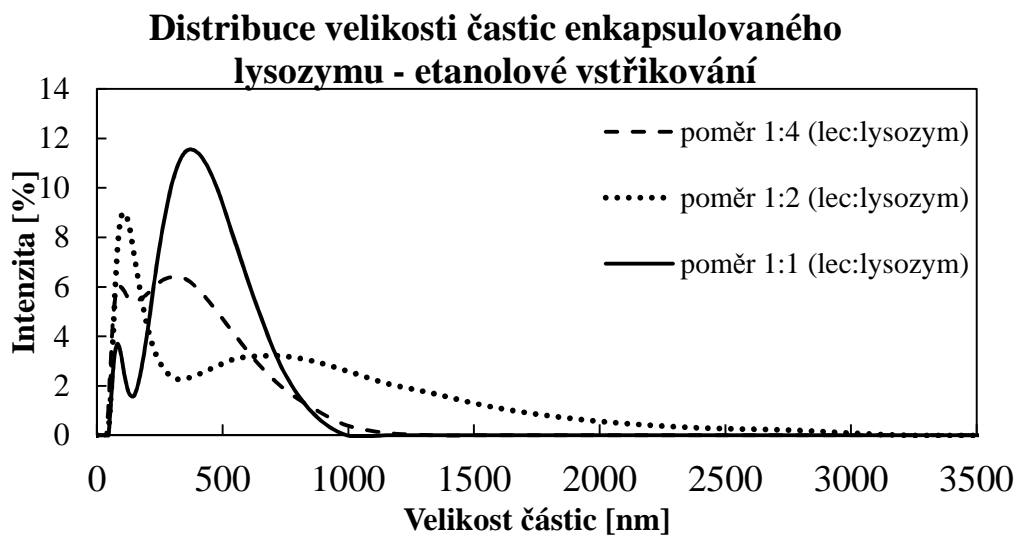


Obr. 39: Distribuce velikosti částic lysozymu.

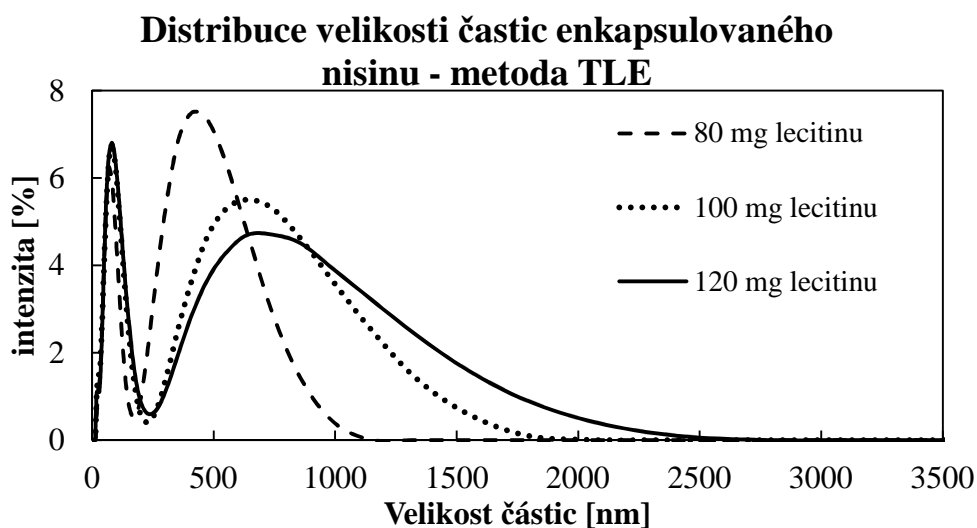
**Distribuce velikosti částic enkapsulovaného nisinu
- etanolové vstříkávání**



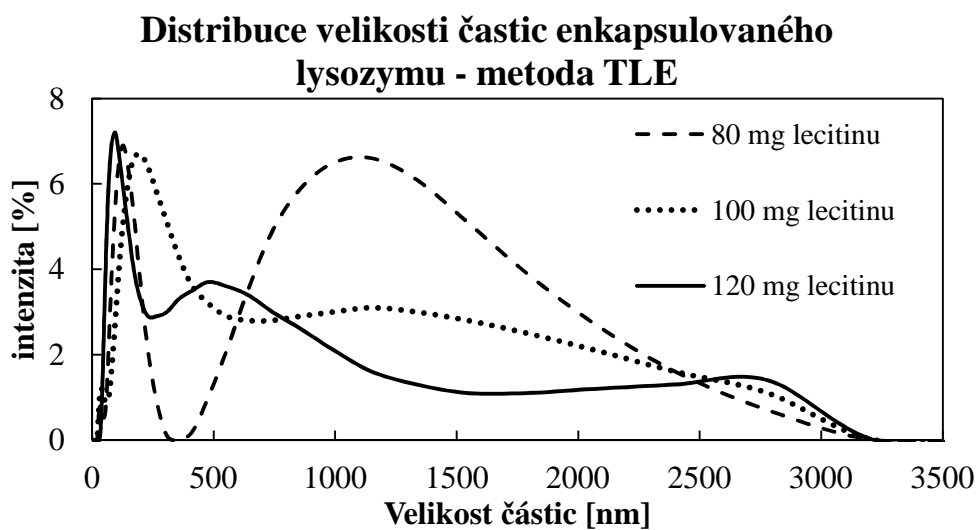
Obr. 40: Distribuce velikosti částic nisinu.



Obr. 41: Distribuce velikosti částic lysozymu.



Obr. 42: Distribuce velikosti částic nisinu.



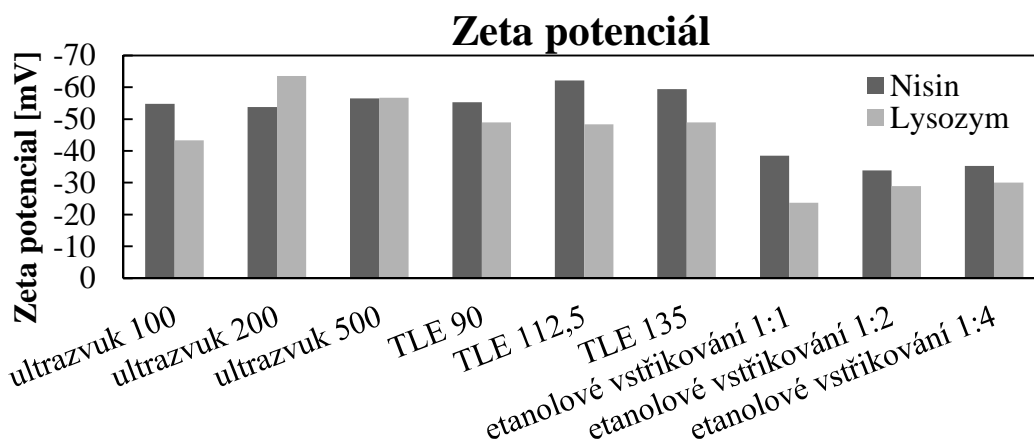
Obr. 43: Distribuce velikosti částic lysozymu.

5.5.2.2 Zeta potenciál

Zeta potenciál proměřených částic byl téměř ve všech případech v intervalu od -30 mV do -60 mV. Pouze v případě etanolového vstřikování klesl lehce nad hraniční hodnotu -30 mV. Konkrétně k hodnotám -23,7 mV a -28,9 mV, které již leží spíše v hraničním intervalu zeta potenciálu a takovéto částice se již nedají pokládat za 100% stabilní a dochází ke shlukování (agregaci) do větších agregátů. Naopak ve dvou případech - u ultrazvukové enkapsulace a TLE se pohyboval nad -60 mV. Konkrétně u ultrazvuku s poměrem lecitin/cholesterol 180/20 mg činila hodnota zeta potenciálu -63,5 mV a u metody TLE při poměru 100/12,5 mg činila -62,1 mV. Všeobecně se dá říci, že nejstabilnější částice byly připravené pomocí ultrazvuku nebo metody TLE, bez ohledu na enkapsulovaný peptid.

Tab. 11: Zeta potenciál připravených liposomových částic.

Použitá metoda přípravy	Množství lec./chol. [mg]	Vzorek	ζ- potenciál [mV]
ultrazvuk 100	90/10	nisin	-54,8
ultrazvuk 100	90/10	lysozym	-43,3
ultrazvuk 200	180/20	nisin	-53,8
ultrazvuk 200	180/20	lysozym	-63,5
ultrazvuk 500	450/50	nisin	-56,5
ultrazvuk 500	450/50	lysozym	-56,7
TLE 90	80/10	nisin	-55,3
TLE 90	80/10	lysozym	-49,0
TLE 112,5	100/12,5	nisin	-62,1
TLE 112,5	100/12,5	lysozym	-48,3
TLE 135	120/15	nisin	-59,4
TLE 135	120/15	lysozym	-49,0
etanolové vstřikování 1:1	1:1 (lecitin:vzorek)/0	nisin	-38,5
etanolové vstřikování 1:1	1:1 (lecitin:vzorek)/0	lysozym	-23,7
etanolové vstřikování 1:2	1:2 (lecitin:vzorek)/0	nisin	-33,9
etanolové vstřikování 1:2	1:2 (lecitin:vzorek)/0	lysozym	-28,9
etanolové vstřikování 1:4	1:4 (lecitin:vzorek)/0	nisin	-35,3
etanolové vstřikování 1:4	1:4 (lecitin:vzorek)/0	lysozym	-30,0



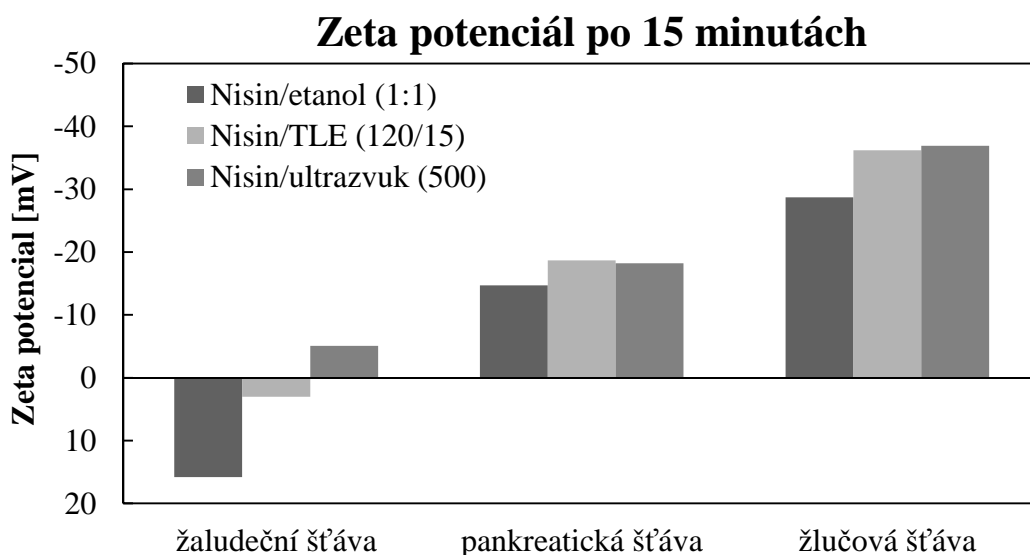
Obr. 44: Zeta potenciál připravených částic v závislosti na metodě přípravy.

5.5.3 Studium stability částic v různých modelových podmínkách

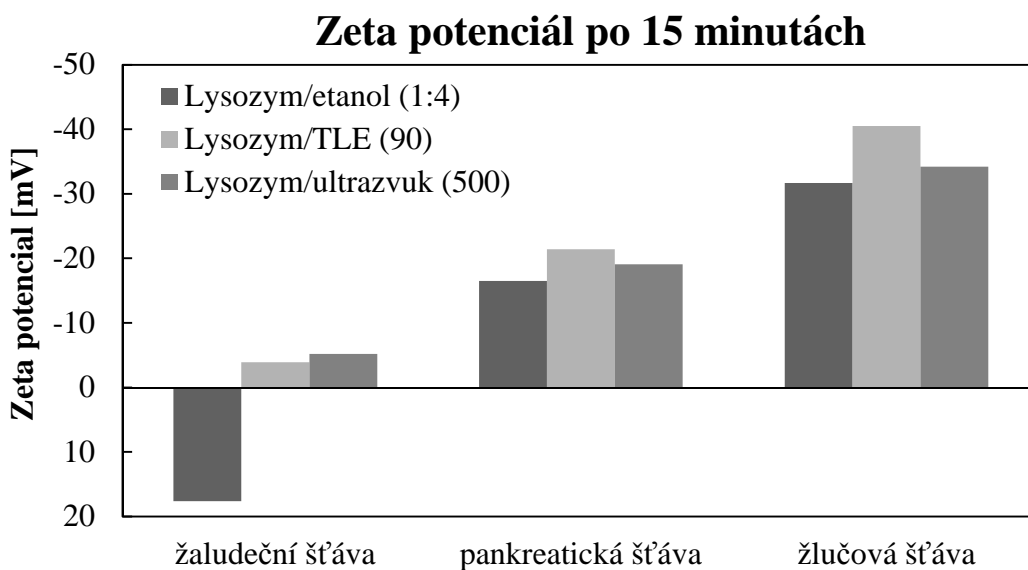
Ze studia stability částic v modelových podmínkách, resp. modelových trávicích šťávách vyplývá, že podle očekávání byly částice nejméně stabilní v kyselém prostředí žaludečních šťáv. Hodnoty zeta potenciálu klesly pod -5 mV, případně dokonce až do kladných hodnot. Naopak nejvíce stabilní byly při zásaditém pH žlučové šťávy, kdy sice hodnota zeta potenciálu klesla, ovšem stále nedosahovala hraniční hodnoty -30 mV. V pankreatické šťávě se obecně hodnoty pohybovaly pod -20 mV, což se již nedá považovat za 100% stabilní částice. Obecně se také dá říci, že stabilita se od přidání do měření po 15 minutách již výrazně neměnila.

Co se týče uvolněného množství, je situace obdobná. Ve žlučových šťávách se neuvolnilo žádné množství, ale v pankreatické šťávě se již uvolnilo průměrně stejně jak v žaludeční šťávě, kde částice vykazovaly nejnižší zeta potenciál.

Závěrem lze říci, že vhodná enkapsulace nisinu a stabilita částic v modelovém fyziologickém prostředí umožňuje řízené využití částic s obsahem nisinu v prostředí střeva, kde může napomoci regulaci střevní mikroflóry.



Obr. 45: Zeta potenciál enkapsulovaného nisinu po 15 minutách od přidání trávicí šťávy.



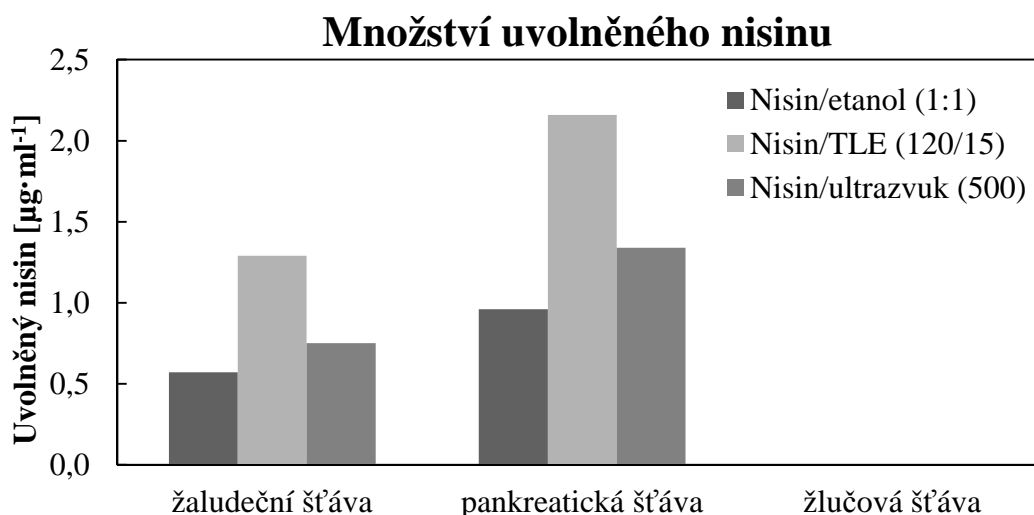
Obr. 46: Zeta potenciál enkapsulovaného lysozimu po 15 minutách od přidání trávicí šťávy.

Tab. 12: Stabilita částic v modelových trávicích šťávách a uvolněné množství nisinu

Typ trávicí šťávy	Enkapsulant/použitá metoda (varianta)	ζ-potenciál (0 min)	ζ-potenciál po přidání šťávy	ζ-potenciál (15 min)	Uvolněný nisin [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]
žaludeční šťáva	Nisin/etanol (1:1)	-38,5	17,7	15,8	0,57
žaludeční šťáva	Nisin/TLE (120/15)	-59,4	-6,4	3,0	1,29
žaludeční šťáva	Nisin/ultrazvuk (500)	-56,5	-5,1	-5,1	0,75
pankreatická šťáva	Nisin/etanol (1:1)	-38,5	-16,1	-14,7	0,96
pankreatická šťáva	Nisin/TLE (120/15)	-59,4	-18,0	-18,7	2,16
pankreatická šťáva	Nisin/ultrazvuk (500)	-56,5	-21,3	-18,2	1,34
žlučová šťáva	Nisin/etanol (1:1)	-38,5	-30,9	-28,7	0,00
žlučová šťáva	Nisin/TLE (120/15)	-59,4	-35,6	-36,2	0,00
žlučová šťáva	Nisin/ultrazvuk (500)	-56,5	-32,7	-36,9	0,00

Tab. 13: Stabilita částic v modelových trávicích šťávách a uvolněné množství lysozymu.

Typ trávicí šťávy	Enkapsulant/použitá metoda (varianta)	ζ-potenciál (0 min)	ζ-potenciál po přidání šťávy	ζ-potenciál (15 min)	Uvolněný lysozym [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]
žaludeční šťáva	Lysozym/etanol (1:4)	-30,0	17,6	17,6	2,89
žaludeční šťáva	Lysozym/TLE (90)	-49,0	-5,7	-3,9	3,30
žaludeční šťáva	Lysozym/ultrazvuk (500)	-56,7	-5,5	-5,2	8,46
pankreatická šťáva	Lysozym/etanol (1:4)	-30,0	-17,0	-16,5	4,74
pankreatická šťáva	Lysozym/TLE (90)	-49,0	-17,4	-21,4	0,00
pankreatická šťáva	Lysozym/ultrazvuk (500)	-56,7	-22,4	-19,1	1,03
žlučová šťáva	Lysozym/etanol (1:4)	-30,0	-30,2	-31,7	0,00
žlučová šťáva	Lysozym/TLE (90)	-49,0	-36,4	-40,5	0,00
žlučová šťáva	Lysozym/ultrazvuk (500)	-56,7	-33,9	-34,2	0,00



Obr. 47: Množství uvolněného nisinu v závislosti na metodě druhu šťávy metodě přípravy.



Obr. 48: Množství uvolněného lysozymu v závislosti na metodě druhu šťávy metodě přípravy.

5.5.4 Aplikace do modelových potravin

Studium stability liposomových částic s enkapsulovanými antimikrobiálními peptidy ukázalo, že se po 7 dnech zeta potenciál klesl pouze v jednom případě (kyselá potravina) pod -30 mV. Z tohoto se dá usoudit, že takové částice by byly v potravinách dostatečně stabilní.

Uvolněné množství odpovídá předchozímu studiu v trávicích šťávách, kdy se v kyselém prostředí simulujícím kyselou potravinu uvolnilo v 1 ml až 8,4 µg nisinu ze zhruba celkových 25µg a u lysozymu až 94,9 µg z celkových 1 000 µg. Naopak v destilované vodě se neuvolnilo žádné množství, částice jsou tedy ve vodě stabilní. V ethanolové potravine uvolnění záleželo ze všech testovaných případů nejvíce na teplotě, kdy se při 28°C uvolnilo výrazné množství jak nisinu, tak především lysozymu, ovšem při 5 °C se neuvolnilo množství žádné. A nakonec tučná potravina vykazovala také větší uvolněné množství.

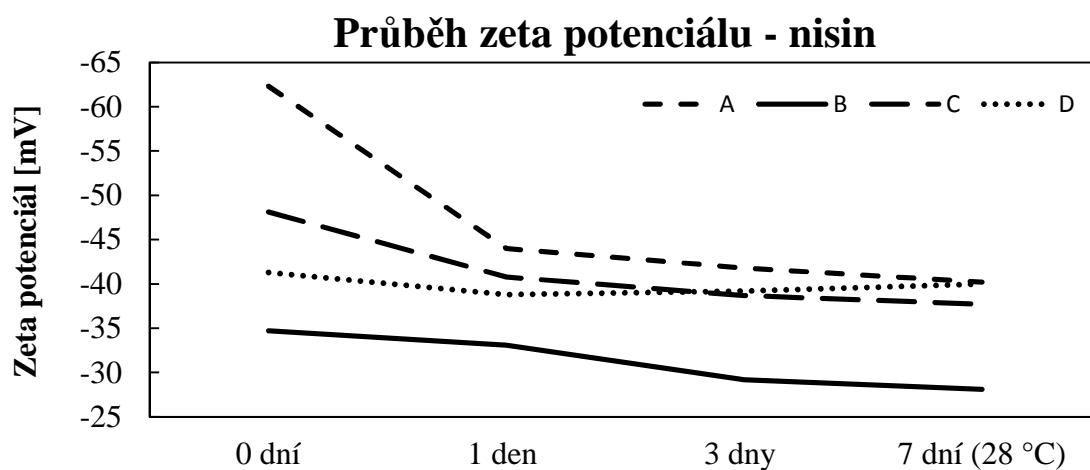
Zajímavé je také zjištění, že částice při 5 °C vykazovaly větší stabilitu a nižší uvolněné množství, než při uchování při 28 °C.

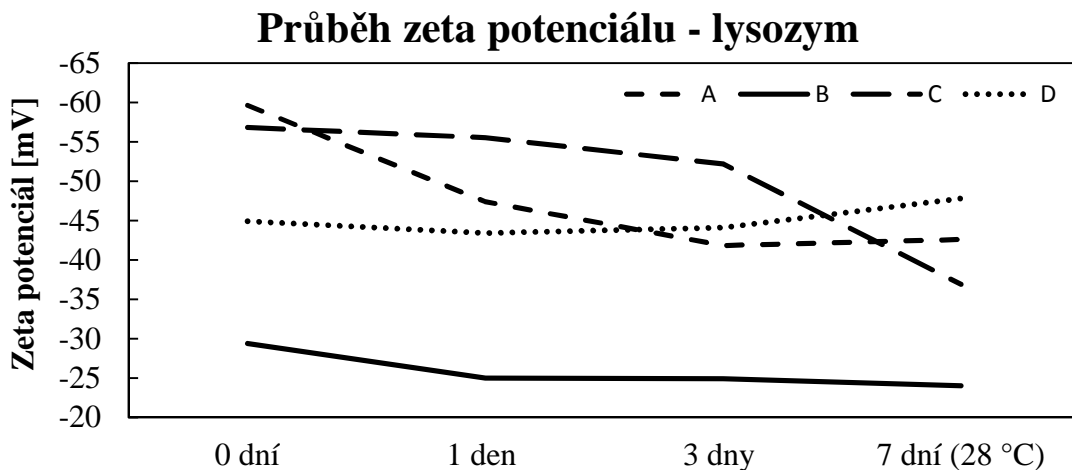
Tab. 14: Stabilita částic v modelových potravinách.

Látka	nisin	lysozym	nisin	lysozym	nisin	lysozym	nisin	lysozym
Modelová potravina	A	A	B	B	C	C	D	D
Částice	-56,5	-56,7	-56,5	-56,7	-56,5	-56,7	-56,5	-56,7
Částice v potravine 0 dní	-62,3	-59,6	-34,7	-29,4	-48,1	-56,8	-41,3	-44,9
Částice v potravine 1 den (28 °C)	-44,0	-47,4	-33,1	-25,0	-40,8	-55,5	-38,8	-43,4
Částice v potravine 3 dny (28 °C)	-41,8	-41,8	-29,2	-24,9	-38,7	-52,2	-39,2	-44,1
Částice v potravine 7 dní (28 °C)	-40,2	-42,6	-28,1	-24,0	-37,7	-36,9	-40,0	-47,8
Částice v potravine 7 dní (5 °C)	-43,2	-44,3	-33,5	-25,7	-39,9	-46,4	-42,9	-48,2

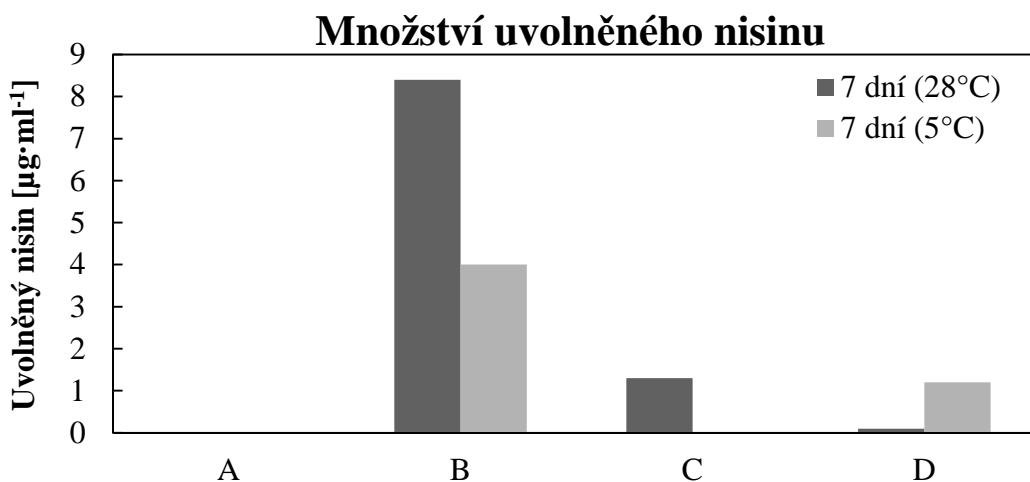
Tab. 15: Stabilita částic v modelových trávicích šťávách a uvolněné množství lysozymu.

Modelová potravina	Množství uvolněného nisinu [µg/ml]		Množství uvolněného lysozymu [µg/ml]	
	7 dní (28°C)	7 dní (5°C)	7 dní (28°C)	7 dní (5°C)
A	0,0	0,0	0,0	0,0
B	8,4	4,0	94,9	28,9
C	1,3	0,0	49,5	0,0
D	0,1	1,2	24,8	12,4

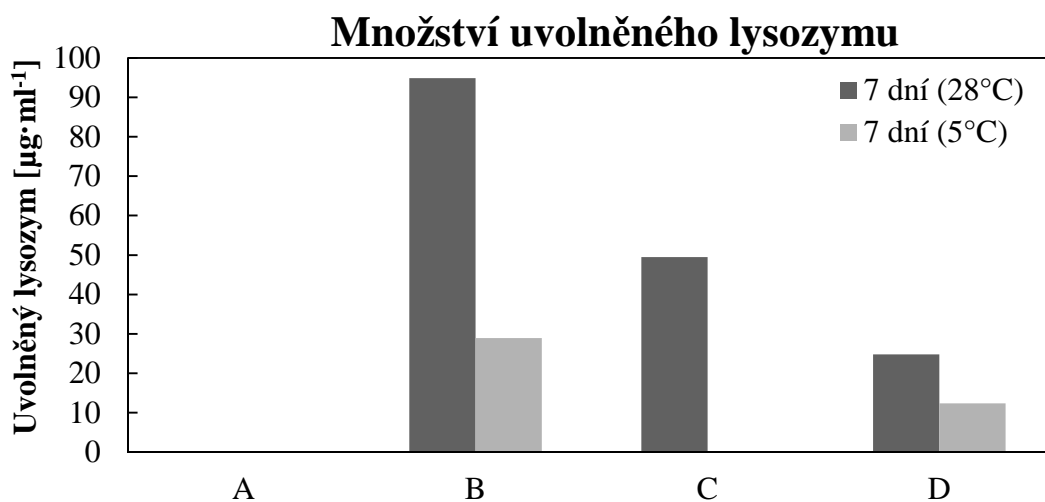
**Obr. 49:** Průběh zeta potenciálu liposomů s nisinem v modelových potravinách při 28 °C.



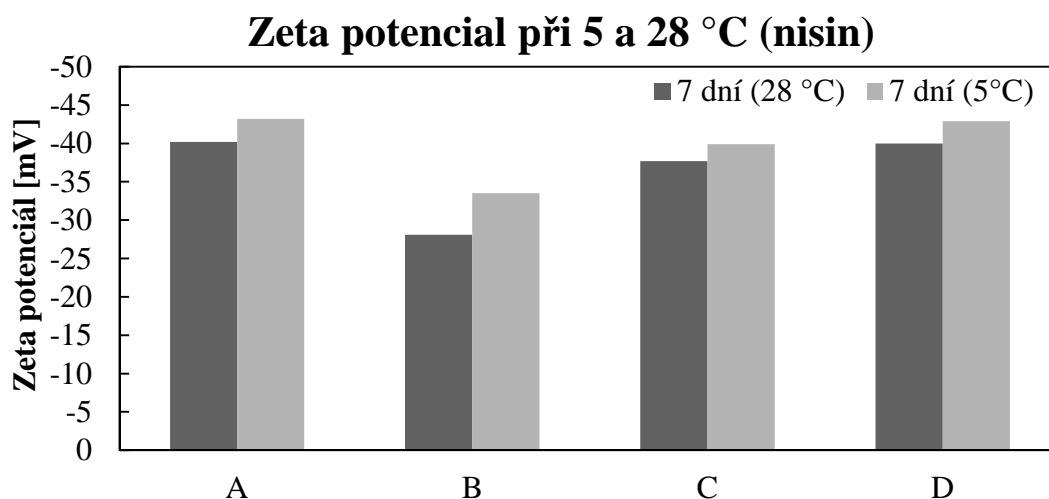
Obr. 50: Průběh zeta potenciálu liposomů s lysozymem v modelových potravinách při 28 °C.



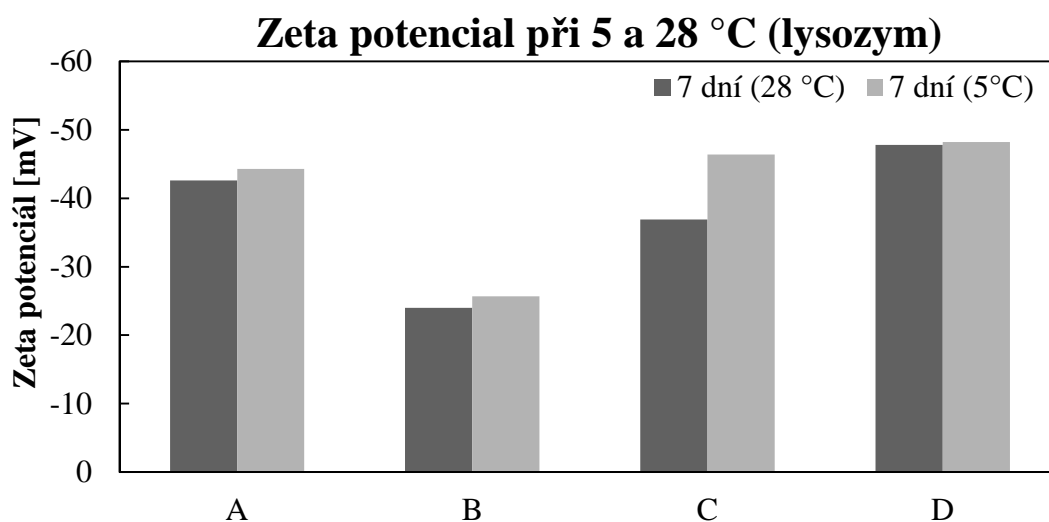
Obr. 51: Množství uvolněného nisinů v závislosti na druhu modelové potraviny.



Obr. 52: Množství uvolněného lysozymu v závislosti na druhu modelové potraviny.



Obr. 53: Průběh zeta potenciálu v různých modelových potravinách při teplotě 5 a 28 °C.



Obr. 54: Průběh zeta potenciálu v různých modelových potravinách při teplotě 5 a 28 °C.

5.5.5 Testování antimikrobiální aktivity na tuhých médiích

Testování na tuhých médiích bylo použito pro srovnání antimikrobiálního účinku volného a enkapsulovaného peptidu. V práci bylo zjištěno, že liposomové částice, nezávisle na druhu enkapsulovaného peptidu vykazovaly menší antimikrobiální aktivitu než čistá antimikrobiální látka. Uvolněné množství antimikrobiální látky z liposomů přispělo k inhibici pravděpodobně jen minimálně.

Zajímavé je, že velikost inhibiční zóny při použití roztoku nisinu o koncentraci $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ve srovnání s roztokem o koncentraci $300 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (dvanáctkrát větší koncentrace) vzrostla jen minimálně. Naopak u lysozymu při použití dvacetpětkrát koncentrovanějšího roztoku byla inhibiční zóna téměř dvojnásobná.

Co se týče srovnání inhibičního účinku nisinu a lysozymu, tak lze z výsledků u koncentrace lysozymu $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (3,8 mm) a nisinu $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (2,9 mm) usoudit, že by v případě použití koncentrace nisinu $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla velikost inhibiční zóny pravděpodobně větší.

Možnosti testování antimikrobiální aktivity na tuhém médiu bude třeba ještě dále optimalizovat. Vhodné by bylo např. vyzkoušení použití diskové difuzní metody. Nakonec v předložené práci byly lepší výsledky získány s využitím tekutých médií.

Tab. 16: Velikost inhibičních zón na tuhém médiu.

Přidávaná látka	Enkapsulace (metoda/varianta)	Koncentrace [mg·ml⁻¹]	Velikost inhibiční zóny [mm]
Agarová plotna č. 1			
nisin	-	0,025	2,7
nisin	ultrazvuk/450 mg lecitinu	0,025	2,4
lysozym	-	1	3,8
lysozym	ultrazvuk/450 mg lecitinu	1	3,5
Agarová plotna č. 2			
nisin	-	0,3	2,9
nisin	ethanolové vstřikování/1:2	0,3	2,6
lysozym	-	25	6,3
lysozym	ethanolové vstřikování/1:2	25	5,5

6 ZÁVĚRY

Tato práce byla zaměřena na studium analýzy, vlastností a možností enkapsulace antimikrobiálního peptidu nisinu, který se v potravinářské praxi používá jako konzervant a srovnávacího enzymu lysozymu, který je přirozenou součástí slin a slz obratlovců a je rovněž používán v podobě lysozymu izolovaného ze slepičího vejce jako konzervant.

V teoretické části byla zpracována rešerše na téma antimikrobiální peptidy, především zaměřená na nisin a lysozym. Byla popsána charakteristika, struktura a mechanismus jejich účinku a využití v potravinářství. Nakonec byly podrobně zpracovány metodické postupy analýzy nisinu a lysozymu, metody jejich enkapsulace do liposomů a metody studia stability takto vzniklých liposomů.

V praktické části byl využit jediný dostupný vzorek nisinu, a to 2,5% preparát. Tím byla poněkud ztížena optimalizace a nastavení podmínek analytických postupů. Existují sice postupy přečišťování, především pak zakoncentrování pomocí alkoholové extrakce a následném sušení pomocí rozprašování, ovšem stále jsou zde velké finanční náklady na jednotkové množství nisinu. Je tedy jasné, že pro testování většího rozsahu by bylo třeba si nisin vyprodukovat kulturami *Lactococcus lactis*.

Nejprve byly optimalizovány metody stanovení celkové koncentrace proteinů, především tedy metoda biuretová, Hartree-Lowryho, metoda dle Bradfordové a metoda bicinchoninová. Oba proteiny byly srovnány s referenčním proteinem – bovinním sérovým albuminem. Také byla pro zjištění koncentrace využita HPLC s kolonou na dělení malých peptidů. Vzhledem k nákladnému vzorku nisinu byly sestrojeny kalibrační křivky nisinu pouze pomocí metod podle Hartree-Lowryho, metody bicinchoninové a HPLC. Použita nakonec byla pro stanovení lysozymu metoda Hartree-Lowryho a HPLC, pro nisin pouze metoda HPLC.

Dále byly peptidy identifikovány pomocí optimalizované gelové elektroforézy, konkrétně modifikované SDS-PAGE s přidavkem močoviny a tricínového pufru. I přes malou molekulovou hmotnost nisinu se jej podařilo nakonec úspěšně analyzovat a nastavit podmínky separace malých peptidů.

Podstatnou část práce zaujímá enkapsulace testovaných antimikrobiálních peptidů. Studované peptidy byly enkapsulovány do liposomů a byla prostudována jejich stabilita a stabilita v modelových podmínkách. Částice byly připraveny pomocí tří metodických postupů, přičemž největší enkapsulační účinnost a stabilitu vykazaly částice připravené pomocí ultrazvuku (až 60% enkapsulační účinnost, hodnota zeta potenciálu -63 mV), následované metodou TLE (až 40% a -62 mV). Naopak metoda etanolového vstřikování se ukázala jako nevyhovující daným peptidům (až 17% a -37 mV).

Při testování stability vytvořených liposomů v modelovém fyziologickém prostředí bylo prokázáno, že největší stabilitu vykazaly liposomy v žlučových šťávách, kdy se neuvolnilo žádné množství, naopak v žaludeční šťávě byly částice velmi nestabilní a uvolněné množství bylo rovněž výrazné. U nisinu se uvolnilo $1,3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a lysozymu $8,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ po 15 minutách a základní enkapsulační koncentraci nisinu $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a lysozymu $1\,000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Poněkud stabilnější byly liposomy i v pankreatické šťávě.

Při aplikaci do modelových potravin se potvrdila vysoká stabilita liposomových částic ve vodné potravíně, kdy se neuvolnilo žádné množství. Vysoká nestabilita byla naopak potvrzena v modelové kyselé potravíně, kdy uvolněné množství činilo u nisinu $8,4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a u lysozymu až $94,9 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ při $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ a základní enkapsulační koncentraci nisinu $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a lysozymu $1\,000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Naopak částice uchované při $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ vykazaly nižší uvolněné

množství a vyšší stabilitu. Byl také patrný vliv teplot na stabilitu a uvolněné množství v modelové alkoholické potravine, kdy se při nižší teplotě neuvolnilo žádné množství antimikrobiálních látek z liposomů.

Nakonec byl také proveden antimikrobiální test na kulturách *Bacillus subtilis*, kdy byla otestována antimikrobiální aktivita nisinu v tekutých médiích, a to v rozmezí koncentrací 0,625 – 2,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ média. Nisin vykázal antimikrobiální aktivitu již okolo koncentrace 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Dále bylo provedeno studium antimikrobiální aktivity enkapsulovaných peptidů na pevných médiích, kdy enkapsulované částice vykazovaly také výraznou antimikrobiální aktivitu.

Závěrem lze říci, že nisin je perspektivní a bezpečná antimikrobiální látka s rozsáhlým potenciálním využitím ať už v potravinářském průmyslu, tak i v kosmetice. Není příliš pravděpodobné, že by měl nějakou spojitost se zvyšováním výskytu rezistencí vůči konvenčním antibiotikům, kvůli které je v poslední době přezkoumáván. Co se týče aplikace v enkapsulované formě, použitá metoda enkapsulace do liposomů se ukázala jako vhodná pro aplikace do potravin. Test stability v modelových potravinách ukázal, že jsou liposomy v běžných potravinách relativně stabilní a pozvolna uvolňují dostatečnou koncentraci nisinu pro zajištění antimikrobiální aktivity. Naopak při požití jsou liposomy vlivem velmi nízkého pH v žaludečních šťávách rychle degradovány a uvolněný nisin je rovněž rychle rozložen a nedochází tak k ovlivňování střevní mikroflóry.

7 LITERATURA

- [1] RILEY, Margaret a John WERTZ. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochemie*. 2002, roč. 28, č. 4, s. 357-364.
- [2] GAJDŮŠEK, S. MENDELOVA ZEMĚDĚLSKÁ A LESNICKÁ UNIVERZITA V BRNĚ. *Mlékařství II*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 1998.
- [3] CAPLICE, E a G.F FITZGERALD. Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 1999, roč. 50, 1-2, s. 131-149.
- [4] POSPÍŠILOVÁ, Marta. Význam a použití bakteriocinů. GATE2BIOTECH. *Gate2Biotech: vše o českých biotechnologiích na jednom místě* [online]. 2007 [cit. 2012-04-25]. Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/vyznam-a-pouziti-bakteriocinu/>
- [5] HÉCHARD, Y., SAHL, H.G., Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria, *Biochemie*, 2002, vol. 84, p. 545-557
- [6] REUNANEN, Justus. *Lantibiotic nisin and its detection methods*. Helsinki, 2007. ISBN 978-952-10-4436-6. Dostupné z: <https://www.doria.fi/bitstream/handle/10024/29669/lantibio.pdf>. Dizertační práce. University of Helsinki, Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Applied Chemistry and Microbiology, Division of Microbiology.
- [7] CHEN, H. a D.G. HOOVER. Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2003, roč. 2, č. 3, s. 82-100. ISSN 1541-4337. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2003.tb00016.x.
- [8] LIU, Wei a Norman HANSEN. Some chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Applied Environmental Microbiology*. 1990, roč. 56, č. 8, s. 2551-2558.
- [9] HURST, A. Nisin. *Advances in Applied Microbiology: Academic Press*. 1981, č. 27, s. 85-123. ISSN 0065-2164. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70342-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70342-3). Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065216408703423>.
- [10] JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. *Compendium of food additive specifications*. 2007, 155 s. ISBN 9251058660 9789251058664
- [11] DOLEŽÍLKOVÁ, Ivana, Martina MACKOVÁ a Tomáš MACEK. Antimikrobiální peptidy: Vztah mezi jejich strukturou a antibakteriální aktivitou. *Chemické listy*. 2011, č. 105, s. 346-355. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_05_346-355.pdf
- [12] MULDER, J. W. M, J BOERRIGATE a H ROLLEMA. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *European Journal of Biochemistry*. 1991, č. 201, s. 581-584.
- [13] RAMSIER, H. R. Die Wirkung von Nisin auf *Clostridium butyricum*. *Arch. Mikrobiol.* 1960, č. 37, s. 57-94.
- [14] BLACKBURN, Peter a Beth GOLDSTEIN. AMBI INC. *Léčivo určené k léčbě infekce způsobené multidrogově-rezistentními kmeny stafylokoka, streptokoka nebo enterokoka* [patent]. PV PCT, CZ 290578 B6. Uděleno 17.06.2002. Zapsáno 21.06.1996. Dostupné z: <http://spisy.upv.cz/Patents/FullDocuments/290/290578.pdf>

- [15] JUNG, Günther a Hans George SAHL. PHYSIKZENTRUM BAD HONNEF, F.R.G. *Nisin and novel lantibiotics: Proceedings of the First International Workshop on Lantibiotics*. Leiden: ESCOM Science Publishers, 1991. ISBN 978-90-72199-11-9.
- [16] DELVES-BROUGHTON, Joss. DANISCO. *Nisin as a food preservative: Antimicrobial Applications*. Copenhagen, 2005
- [17] VŠCHT. *Antimikrobiální látky* [online]. Praha: Ústav biochemie a mikrobiologie, © 2012 [cit. 2012-04-23]. Dostupné z: <http://biomikro.vscht.cz/cz/>
- [18] GILL, A. O a R. A HOLLEY. Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24° C. *Food Microbiol.* 2003, č. 80, s. 251-259.
- [19] GILLOR, O., NIGRO, L.M., RILEY, M.A., Genetically Engineered Bacteriocins and their Potential as the Next Generation of Antimicrobials, *Current Pharmaceutical Design*, 2005, vol. 11, No. 8, p. 1067- 1075
- [20] New, More Effective Nisin Antibiotics Combat Superbugs And Food Diseases. SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY. *Science Daily: Your source for the latest research news* [online]. 30.3.2009 [cit. 2012-04-25]. Dostupné z: <http://www.sciencedaily.com/releases/2009/03/090330200710.htm>
- [21] STANCOVÁ, Vlasta. Účinnější nisinová antibiotika. GATE2BIOTECH. *Gate2Biotech: vše o českých biotechnologiích* [online]. 20.4.2009 [cit. 2012-04-25]. Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/ucinnejsi-nisinova-antibiotika/>
- [22] IMOTO, Taiji, Hidenori YAMADA, Kiyotaka OKAZAKI, Tadashi UEDA, Ryota KUROKI a Takanori YASUKOCHI. Modifications of stability and function of lysozyme. *Journal of Protein Chemistry*. 1987, roč. 6, č. 2, s. 95-105. ISSN 0277-8033. DOI: 10.1007/BF00247759. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF00247759>
- [23] SAMBROOK, Joseph a David W RUSSELL. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd. ed. New York: Cold spring harbor laboratory press, 2001, 3 s. ISBN 978-0-87969577-4.
- [24] AUSUBEL, Frederick M. MASSACHUSETTS GENERAL HOSPITAL & HARVARD MEDICAL SCHOOL. *Current protocols in molecular biology*. Massachusetts: Media, Pa. J. Wiley, 1994. ISBN 97804715033782.
- [25] LASCHTSCHENKO, P. Über die keimtötende und entwicklungshemmende Wirkung von Hühnereiweiß. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*. 1909, roč. 64, č. 1, s. 419-427. ISSN 0300-8584. DOI: 10.1007/BF02216170. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF02216170>
- [26] FLEMING, A. On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 1922-05-01, roč. 93, č. 653, s. 306-317. ISSN 0962-8452. DOI: 10.1098/rspb.1922.0023. Dostupné z: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspb.1922.0023>
- [27] Lysozyme: Activity, Stability, Safety. FORDRAS S.A. *Fordras: Official websites* [online]. Lugano, Switzerland, 2012 [cit. 2012-04-25]. Dostupné z: <http://www.fordras.com/lysozyme/>
- [28] VOET, Donald. *Biochemie*. 1. vyd. Praha: VICTORIA PUBLISHING, 1995, 1325 s. ISBN 80-856-0544-9.

- [29] LAKE, Robert. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. 89G-0393. *Direct Food Substances Affirmed as Generally Recognized as Safe;: Egg White Lysozyme*. USA, 1998, 12421-12426. Dostupné z: <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-1998-03-13/html/98-6571.htm>
- [30] Lysozyme from chicken egg white. SERVA. *Serva Electrophoresis* [online]. 2007 [cit. 2012-04-25]. Dostupné z: http://www.serva.de/enDE/ProductDetails/592_28262_Lysozyme_from_chicken_egg_white_min_100_000_units_mg_cryst.html
- [31] SPEIJERS, G. J. A a M. E VAN APELDOORN. Lysozyme: National Institute of Public Health and Environmental Protection, Laboratory for Toxicology. INCHEM. *International Programme on Chemical Safety: Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations* [online]. Bilthoven, The Netherlands, 2012 [cit. 2012-04-25]. Dostupné z: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v30je04.htm>
- [32] THAMMASIRIRAK, Sompong, Sutthidech PREECHARRAM, Pornpimol PONKHAM, Sakda DADUANG, Tomohiro ARAKI a Jisnuson SVASTI. New variant of quail egg white lysozyme identified by peptide mapping. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2007, roč. 147, č. 2, s. 314-324. ISSN 10964959. DOI: 10.1016/j.cbpb.2007.01.019. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096495907000747>
- [33] The PDB structure of HEN EGG WHITE LYSOZYME. PDBE. *Protein Data Bank Europe: Bringing Structure to Biology* [online]. 1993 [cit. 2012-04-25]. Dostupné z: <http://www.pdbe.org/1321>
- [34] KLABAN, Vladimír. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. První české vydání. Na Bělidle 34, 150 00 Praha 5 : Galén, 2005. 654 s. ISBN 80-7262-341-9.
- [35] Bacillus subtilis: Final Risk Assessment. U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. *Biotechnology Program under the Toxic Substances Control Act (TSCA)* [online]. 2007, 31.1.2011 [cit. 2012-04-25]. Dostupné z: <http://www.epa.gov/oppt/biotech/pubs/fra/fra009.htm>
- [36] TAMBE, Y. Microscopic image of Bacillus subtilis (ATCC 6633): Gram staining, magnification: 1,000. The oval unstained structures are spores. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2012-04-25]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Bacillus_subtilis_Gram.jpg. GNU Licence.
- [37] Kultivace bakterií: Půdy, podmínky a metody. VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO. *Fakulta veterinárního lékařství: Mikrobiologie pro farmaceuty* [online]. 2006 [cit. 2012-04-25]. Dostupné z: http://fvf.vfu.cz/sekce_ustavy/mikrobiologie/mikrobiologie_pro_farmaceuty/praktikum03/index.html
- [38] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: Neptun, 2001, 247 s. ISBN 80-902-8962-2.
- [39] ŠÍMA, Petr. Antimikrobiální peptidy - nahradíme antibiotika?. *Lékařské listy*. 2006, č. 8. Dostupné z: <http://www.zdn.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/antimikrobialni-peptidy-nahradime-antibiotika-172383>

- [40] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [41] RAPLEY, Ralph a John M WALKER. *Molecular biomethods handbook*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1998, 725 s. 1. ISBN 08-960-3501-8.
- [42] SCHÄGGER, Hermann. Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*. 2006, roč. 1, č. 1, s. 16-22. ISSN 1754-2189. DOI: 10.1038/nprot.2006.4. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2006.4>
- [43] Aeris: Core-Shell Particles Precision Engineered for Protein and Peptide Separations. PHENOMENEX. *Phenomenex: A Global Leader in the Separation Sciences* [online]. © 2012 Phenomenex [cit. 2012-04-25]. Dostupné z: <http://www.phenomenex.com/Aeris/AerisCoreShellStory>
- [44] KORVASOVÁ, Zina. *Příprava liposomů s antivirálním účinkem*. Brno, 27.4.2006. Dostupné z: <http://is.muni.cz/th/67561/>. Diplomová práce. Masyrykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce RNDr. Jaroslav Turánek, CSc.
- [45] Science and Technology: Liposomes. COLLAGENRX. *CollagenRX: Creates beautiful skin* [online]. USA, 2012 [cit. 2012-04-25]. Dostupné z: <http://collagenrx.com/content/science-and-technology>
- [46] KRÁLOVÁ, Blanka, Ladislav FUKAL a Pavel RAUCH. VŠCHT. *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, 254 s. ISBN 80-708-0449-1.
- [47] Malvern Zetasizer Nano ZS: Dynamický rozptyl světla, zeta potenciál. KUZEL, Radomír. KRYSTALOGRAFICKÁ SPOLEČNOST. *Karlova univerzita v Praze, Fakulta Matematicko-fyzikální, Katedra fyziky kondenzovaných látek, Oddělení strukturní analýzy* [online]. Praha, 8.2.2008 [cit. 2012-04-25]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/>
- [48] MALVERN INSTRUMENTS LTD. *Zetasizer Nano Series: User Manual*. Worcestershire, UK, 2004. Dostupné z: http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf
- [49] Zeta potential measurement using laser Doppler electrophoresis: Zeta potential characterisation of particulate dispersions, emulsions and biomolecules. MALVERN INSTRUMENTS LTD. *Malvern official websites* [online]. Worcestershire, UK, © Copyright 2012 [cit. 2012-04-25]. Dostupné z: http://www.malvern.com/LabEng/technology/zeta_potential/zeta_potential_LDE.htm
- [50] MÁROVÁ, Ivana. VUT V BRNĚ. *Praktikum z biochemie*. 2. vyd. Brno: VUTIUM, 2012.
- [51] KROHN, Randall. The Colorimetric Detection and Quantitation of Total Protein. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. : 2000. ISBN 9780471142911. DOI: 10.1002/0471142913.
- [52] PEČ, Pavel. UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI. *Laboratorní cvičení z biochemie*. Olomouc: UP Olomouc, 2000.
- [53] WALKER, John M. *The protein protocols handbook: The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation*. 2nd ed. Totowa, N.J: Humana Press, 2002, s. 11-14. ISBN 978-1-59259-169-5.

- [54] LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970-8-15, roč. 227, č. 5259, s. 680-685. ISSN 0028-0836. DOI: 10.1038/227680a0. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/227680a0>
- [55] BIO-RAD LABORATORIES, Inc. *Mini-Protean Tetra-cell: Instruction Manual*. Hercules, 2012. Dostupné z: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10007296.pdf>.
- [56] Aeris: Application-Reduction of Alpha-1 Acid Glycoprotein Map on Aeris PEPTIDE 3.6. PHENOMENEX. *Phenomenex: A Global Leader in the Separation Sciences* [online]. © 2012 Phenomenex [cit. 2012-04-25]. Dostupné z: <http://www.phenomenex.com/Application/Detail/19938?returnURL=/Aeris/ApplicationSearch>
- [57] Peptides and Peptide Mapping: Aeris PEPTIDE 1.7u XB-C18 New Column 50 x 2.1 mm. PHENOMENEX. *Phenomenex: A Global Leader in the Separation Sciences* [online]. © 2012 Phenomenex [cit. 2012-04-25]. Dostupné z: <http://www.phenomenex.com/Aeris/AerisOrderNow/PEPTIDE%20XB-C18/?returnURL=/Application/Detail/19938>
- [58] PALA, Martin. *Produkce proteolytických enzymů vybranými mikroorganismy*. Brno, 2011. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [59] XIAO, Dan, P. MICHAEL DAVIDSON, Doris H. DSOUZA, Jun LIN a Qixin ZHONG. Nisin extraction capacity of aqueous ethanol and methanol from a 2.5% preparation. *Journal of Food Engineering*. 2010, roč. 100, č. 2, s. 194-200. ISSN 02608774. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2010.03.044. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877410001718>
- [60] PATRICK, Jeffrey, Kevin SIEK, Joe BINKLEY, Viatcheslav ARTAEV a Michael MASON. A New Path to High-Resolution HPLC–TOF-MS. *Spectroscopy*. 2011, roč. 26, č. 5. ISSN 0887-6703. Dostupné z: <http://www.spectroscopyonline.com/spectroscopy/Articles/A-New-Path-to-High-Resolution-HPLCndashTOF-MS-mdas/ArticleStandard/Article/detail/725236>
- [61] LASIC, Danilo. *Liposomes in gene delivery*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1997, 295 s. ISBN 08-493-3109-9.
- [62] NOVÁK, Josef. *Fyzikální chemie: bakalářský a magisterský kurz*. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-675-3

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- HACAP – Hazard Analysis and Critical Control Points (Analýza nebezpečí a kritické kontrolní body)
- BSA – bovine serum albumin (hovězí sérový albumin)
- GRAS – Generally recognized as safe (Obecně shledáno jako bezpečné)
- FAO – Food and Agriculture Organization (Organizace pro výživu a zemědělství)
- WHO – World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)
- JECFA – The Joint FAO/WHO Committee on Food Additives (Kontrolní komise FAO/WHO pro potravinářské přísady)
- SDS – sodium dodecyl sulfate (Dodecylsírán sodný)
- PAGE – Polyacrylamide gel electrophoresis (Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu)
- AA – akrylamide (akrylamid)
- BIS – N,N'-metylenbisakrylamide (N,N'-metylenbisakrylamid)
- APS – amonium persulfate (Peroxodisírán amonný)
- TEMED – N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin)
- TRIS – 2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
- TRICINE – N-(2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)glycine
- BCA – Bicinchoninic acid assay (Bicinchoninová metoda)
- ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Imunologická metoda pro detekci protilátek)
- HPLC – High Performance Liquid Chromatography (Vysokoučinná kapalinová chromatografie)
- PDA – Photo Diode Array (Diodového pole)
- THF – tetrahydrofurane (tetrahydrofuran)
- DLS – Dynamic Light Scattering (Dynamický rozptyl světla)
- TLE – Thin layer evaporation (odpařování na tenké vrstvě)