

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

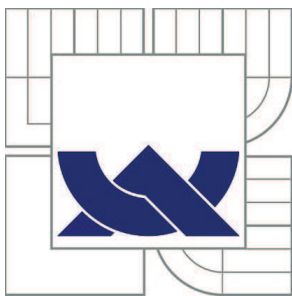
VYUŽITÍ RŮZNÝCH TECHNIK ENKAPSULACE K ŘÍZENÉMU
UVOLŇOVÁNÍ AKTIVNÍCH LÁTEK V POTRAVINÁŘSKÝCH A
KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVCÍCH

DIZERTAČNÍ PRÁCE
DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Ing. PETRA MATOUŠKOVÁ

BRNO 2015



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

VYUŽITÍ RŮZNÝCH TECHNIK ENKAPSULACE K ŘÍZENÉMU UVOLŇOVÁNÍ AKTIVNÍCH LÁTEK V POTRAVINÁŘSKÝCH A KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVCÍCH

USE OF SOME ENCAPSULATION TECHNIQUES TO CONTROLLED RELEASE OF ACTIVE
SUBSTANCES IN FOOD AND COSMETICS PRODUCTS.

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

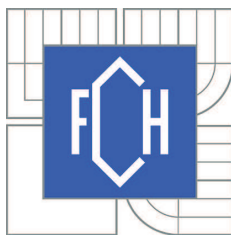
Ing. PETRA MATOUŠKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2015



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

Zadání dizertační práce

Číslo dizertační práce:	FCH-DIZ0108/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Ing. Petra Matoušková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (P2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901V021)	
Vedoucí práce	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti:		

Název dizertační práce:

Využití různých technik enkapsulace k řízenému uvolňování aktivních látek v potravinářských a kosmetických přípravcích

Zadání dizertační práce:

Cílem práce bylo zavést metody enkapsulace za účelem přípravy mikro- a nanočástic s řízeným uvolňováním pro aplikaci do potravinářství, případně kosmetiky. Součástí zadání je řešení následujících dílčích úkolů:

- zpracování literární rešerše
- zavedení postupů pro přípravu organických mikro- a nanočástic
- metody enkapsulace vybraných nízkomolekulárních látek a jejich směsi
- metody enkapsulace vysokomolekulárních složek a buněk
- zavedení metod stanovení enkapsulační účinnosti a charakterizace částic
- enkapsulace vybraných molekul a směs a komplexní charakterizace vzniklých částic
- testy krátkodobé i dlouhodobé stability a biologické aktivity částic v různých typech modelových a reálných prostředí
- návrh vhodných transportních systémů pro řízené uvolňování aktivních látek v nových typech potravinářských a kosmetických produktů

Termín odevzdání dizertační práce: 31.8.2015

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

Ing. Petra Matoušková
Student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.9.2011

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

ABSTRAKT

Předložená dizertační práce je zaměřena na studium enkapsulace přírodních aktivních látek do různých typů organických mikro- a nanočástic, zejména do liposomů a polysacharidových částic. Polysacharidové částice byly připraveny metodou pracující na principu zesílení polymeru, jako materiál byly použity především alginát, chitosan a škrob. Polysacharidy byly rovněž různě kombinovány s dalšími materiály jako agar, agarosa, karboxymethylcelulóza a pullulan. Liposomy byly připraveny ze směsi vaječného/sojového lecitinu a cholesterolu, použity byly metody sonifikace, odpaření na tenké vrstvě, odpaření na tenké vrstvě s reverzní fází a ethanolové vstřikování. Jako aktivní složky byly enkapsulovány kofein, klotrimazol, ibuprofen, antioxidanty a vitaminy – př. kyselina gallová, katechin, beta-karoten, vitamin C, vitamin E. Dále byly enkapsulovány různé bylinné extrakty, lysozym, nisin a další antimikrobiální látky. Enkapsulovány byly i vybrané hydrolytické enzymy, především proteasy (pepsin, trypsin, bromelain, pankreatin, alkalasa, kolagenasa) a lipasy. Částice byly použity i pro enkapsulaci vybraných probiotických kmenů *Bifidobacterium breve* a *Lactobacillus acidophilus* a prebiotik. Prebiotika byla rovněž koenkapsulována společně s probiotickými buňkami. Z přírodních extraktů byly enkapsulovány např. extrakty z guarany, ženšenu, kustovnice čínské, zeleného ječmenu, propolisu černého, zeleného a bílého čaje, kávy, ovoce a zeleniny.

Enkapsulační účinnost byla stanovena pomocí spektrofotometrických metod a pomocí HPLC/PDA. Dlouhodobá stabilita částic a množství uvolněných složek bylo sledováno v modelových i v reálných potravinách a v modelových fyziologických prostředích. Velikost liposomových částic a polysacharidových nanočástic byla měřena pomocí DLS. Velikost a morfologie připravených částic byla sledována rovněž pomocí světelné a elektronové mikroskopie. Koloidní stabilita částic byla měřena pomocí zeta potenciálu, přičemž všechny připravené částice vykazovaly dobrou stabilitu. Ke stanovení sedimentační stability částic byla použita analytická centrifugace. Antimikrobiální aktivita byla testována při použití dvou gram-pozitivních bakterií (*Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*), dvou gram-negativních bakterií (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*) a jednoho kvasinkového kmene (*Candida glabrata*). Pro stanovení antimikrobiální vlastnosti aktivity byly použity dvě metody - agarová difuzní metoda a bujónová diluční metoda. Životaschopnost probiotických kmenů byla stanovena pomocí průtokové cytometrie a také pomocí fluorescenční mikroskopie.

Enkapsulace aktivních složek byla úspěšná ve všech typech částic. Liposomy vykazovaly velmi dobrou dlouhodobou stabilitu, zejména ve vodných podmínkách s neutrálním pH. Naopak, polysacharidové částice byly stabilní v kyselém prostředí. Připravené částice byly také stabilní v modelovém prostředí žaludeční šťávy, k uvolnění aktivních složek docházelo pak v modelovém prostředí střevní šťávy.

Částice s kofeinem, stejně jako i s dalšími testovanými antioxidanty a vitaminy by mohly být použity pro aplikace do moderních typů energetických nápojů, potravinových doplňků a také pro některé kosmetické aplikace. Enkapsulované antimikrobiální složky lze také využít v potravinářství, ale i v kosmetice a farmaceutickém průmyslu jako antimikrobiální a hojivé přípravky. Enkapsulované enzymy s řízeným uvolňováním mohou být použity v přípravcích pro hojení ran, dále naleznou uplatnění jako součást farmaceutických přípravků a potravinových doplňků určených pro enzymovou terapii. Enkapsulované probiotické bakterie a také koenkapsulovaná prebiotika s prebiotiky díky zachování vyšší dlouhodobé životaschopnosti buněk a stability částic jsou rovněž vhodné k aplikaci do potravinářských výrobků a doplňků stravy s pozitivními účinky na lidský organismus.

KLÍČOVÁ SLOVA: kofein, antioxidanty, nisin, lysozym, antimikrobiální aktivita, enzymy, enkapsulace, imobilizace, liposomy, polysacharidové částice, průtoková cytometrie, probiotika, dynamický rozptyl světla, analytická centrifugace.

ABSTRACT

The presented doctoral thesis is focused on preparation, characterization and application of organic micro- and nanoparticles as transport systems for active components and some their complex natural sources. Active component were packed into liposomes and polysaccharide particles.

The polysaccharide particles were prepared by the method based on gelation and cross-linking polymers using encapsulator B-392P (Büchi) or by using manual procedures. As materials for the preparation alginate, chitosan, and starch were used. These materials were also variously combined and enriched with some additives such as agar, agarose, CMC and pullulan. Liposomes were prepared from mixture of egg/soy lecithin and cholesterol. Sonication, thin layer evaporation, thin layer evaporation on reverse phase and ethanol injection methods were used.

As active components were used caffeine, some drugs – clotrimazole and ibuprofen, further antioxidants and vitamins - gallic acid, catechin, beta-carotene, vitamin C and vitamin E. Antimicrobial herbs and spices extract, antimicrobial peptides lysozyme, nisin and other antimicrobial ingredients were encapsulated too. Encapsulation of selected hydrolytic enzymes, e.g. proteases (pepsin, trypsin, bromelain, pancreatin, alcalase, collagenase) and lipase was tested, too. Particles were also used for encapsulation of probiotic strains *Bifidobacterium breve* and *Lactobacillus acidophilus* and prebiotic components. These prebiotics were co-encapsulated into capsules with probiotic cells. Natural extracts were encapsulated e.g. extracts of guarana, ginseng, goji, green barley, propolis, black, green and white tea, coffee, fruit and vegetable extracts.

The efficiency of encapsulation was determined by HPLC/PDA and by spectrophotometry. Long-term stability of particles and amount of released component in model/real foods, in model cosmetic conditions and in a model physiological environment were monitored too. Size of prepared liposomes and polysaccharide particles was determined by dynamic light scattering and by light microscopy and electron microscopy, respectively. Stability of the particles was measured using a zeta potential and all prepared particles exhibited good stability. Also, analytical centrifugation was used to measurement of sedimentation velocity and stability of the prepared particles. The antimicrobial activity were tested using two Gram-positive (*Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*), two Gram-negative (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*) bacteria and one fungal strains (*Candida glabrata*). For determining the antimicrobial properties of active component and prepared particles two the most widely used methods were used - agar diffusion method and broth dilution method. The viability of probiotic strains were performed using flow cytometry and fluorescence microscopy.

Encapsulation of active component was successful in all types of particles. Liposome showed a very good long-term stability mainly in water conditions with neutral pH and polysaccharide particles were stable in acidic conditions. Prepared particles showed a very good stability in model stomach environment, while in model intestines environments particles were disintegrated and active component were released.

Prepared particles with encapsulated caffeine as well as other tested antioxidants and vitamins could be used to modern types of energy drinks, food supplements and also for some cosmetics applications. Encapsulated antimicrobial components could be used for food application as well as for cosmetics and pharmaceutical application like antimicrobial wound formulation. Encapsulated enzymes can be used for controlled release of proteases in wound healing, as delivery systems in digestive tract and as a part of pharmaceutical preparative and food supplements for enzyme therapy. The study revealed that encapsulation of probiotics and also co-encapsulation of probiotics with prebiotics exhibited longer stability of particles and survival bacterial cells. So, prepared particles are suitable for use to food product with beneficial effects on the human body.

KEYWORDS: caffeine, antioxidants, nisin, lysozyme, antimicrobial activity, enzymes, encapsulation, immobilization, liposomes, polysaccharide particles, flow cytometry, probiotic bacteria, dynamic light scattering, analytical centrifugation.

MATOUŠKOVÁ, P. *Využití různých technik enkapsulace k řízenému uvolňování aktivních látek v potravinářských a kosmetických přípravcích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 156 s. Vedoucí dizertační práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Dizertační práce je z hlediska obsahu majetkem fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem školitele dizertační práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studentky

PODĚKOVÁNÍ:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své vedoucí dizertační práce, prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc., za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a ochotu v průběhu celého mého studia. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým kolegům a přátelům za podporu, motivaci a příjemně strávené společné chvíle. Můj velký dík patří také mé rodině za podporu během celého studia.

OBSAH

1	ÚVOD	11
2	TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1	METODY IMOBILIZACE	12
2.1.1	Vazba na povrch nosiče	12
2.1.1.1	Adsorpce	13
2.1.1.2	Iontová vazba	13
2.1.1.3	Kovalentní vazba na nerozpustný nosič	13
2.1.1.4	Afinitní vazba	13
2.1.1.5	Vazba pomocí kovu	13
2.1.1.6	Disulfidický můstek	13
2.1.2	Cross-linking (zesítnění)	14
2.1.3	Entrapment - zachycení v pórovitém materiálu	14
2.1.4	Enkapsulace	14
2.2	METODY ENKAPSULACE	14
2.2.1	Sprejové sušení	14
2.2.2	Sprejové chlazení	15
2.2.3	Extruze	15
2.2.4	Tvorba polymerních kapslí	15
2.2.5	Emulgace	16
2.2.6	Fluidní vrstva	16
2.2.7	Koacervace	17
2.2.8	Lyofilizace	17
2.2.9	Kokrystalizace	18
2.2.10	Enkapsulace do liposomů	18
2.2.10.1	Dělení liposomů	18
2.2.10.2	Techniky přípravy liposomů	18
2.2.10.3	Aplikace liposomů	19
2.3	NEJČASTĚJI POUŽÍVANÉ NOSIČE PŘI ENKAPSULACÍCH	19
2.3.1	Agar	20
2.3.2	Agarosa	20
2.3.3	Celulosa	20
2.3.4	Škrob	20
2.3.5	κ -karagenan	20
2.3.6	Polyvinylalkohol	20
2.3.7	Chitosan	21
2.3.8	Želatina	21
2.3.9	Alginát	21
2.3.10	Pullulan	21
2.3.11	Syrovátkové proteiny	21
2.3.12	Lecithin a cholesterol	22
2.4	VYUŽITÍ ENKAPSULACE V POTRAVINÁŘSKÉM, KOSMETICKÉM A FARMACEUTICKÉM PRŮMYSLU	22
2.4.1	Enkapsulace vitaminů a antioxidantů	23
2.4.1.1	Hydrofilní látky	24
2.4.1.2	Hydrofobní látky	24
2.4.2	Enkapsulace kofeinu	26
2.4.3	Enkapsulace antibakteriálních látek	26

2.4.4	Enkapsulace a imobilizace enzymů.....	28
2.4.5	Enkapsulace a imobilizace buněk.....	30
2.4.5.1	Enkapsulace probiotických bakterií.....	31
2.4.5.2	Rod Lactobacillus.....	31
2.4.5.3	Rod Bifidobacter.....	32
2.4.6	Využití anorganických nanočástic.....	32
2.4.6.1	Zlaté nanočástice.....	32
2.4.6.2	Stříbrné nanočástice.....	33
2.5	TESTY KE STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY.....	33
2.5.1	Diluční metody.....	33
2.5.1.1	Agarová diluční metoda.....	33
2.5.1.2	Bujónová diluční metoda.....	33
2.5.2	Difuzní metody.....	34
2.5.2.1	Difúzní disková metoda.....	34
2.5.2.2	Agarová difúzní metoda.....	34
2.5.3	Epsilon test (E-test).....	34
2.6	STANOVENÍ VIABILITY BUNĚK.....	34
2.6.1	Průtoková cytometrie.....	35
2.6.2	Fluorescenční mikroskopie.....	36
2.7	METODY CHARAKTERIZACE ČÁSTIC.....	36
2.7.1	Stanovení velikosti částic – dynamický rozptyl světla.....	36
2.7.2	Stanovení stability a náboje částic – zeta potenciál.....	38
2.7.3	Sedimentační stabilita částic – analytická centrifugace.....	39
2.8	BEZPEČNOST A GENOTOXICITA ČÁSTIC.....	40
3	CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE.....	41
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	42
4.1	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE.....	42
4.1.1	Použité chemikálie.....	42
4.1.2	Použité přístroje a pomůcky.....	42
4.2	LÁTKY POUŽITÉ K ENKAPSULACI.....	43
4.3	POUŽITÉ REÁLNÉ POTRAVINY.....	43
4.4	POUŽITÉ MIKROORGANISMY.....	44
4.4.1	Kultivace probiotik.....	44
4.4.2	Kultivace mikroorganismů pro testování antimikrobiální aktivity.....	44
4.4.2.1	Příprava médií pro E. coli.....	45
4.4.2.2	Příprava médií pro B. subtilis.....	45
4.4.2.3	Příprava média pro M. luteus a S. marcescens.....	45
4.4.3	Kultivace Candida glabrata.....	46
4.5	PŘÍPRAVA MIKROORGANISMŮ PRO ENKAPSULACI.....	46
4.6	PŘÍPRAVA VZORKŮ K ENKAPSULACI A ZÁKLADNÍ CHARAKTERIZACI.....	46
4.6.1	Propolis.....	46
4.6.2	Zelený ječmen.....	46
4.6.3	Příprava bylinných extraktů.....	47
4.6.4	Příprava kofeinových extraktů.....	47
4.6.5	Příprava ovocných a zeleninových šťáv a extraktů.....	47
4.7	METODY PRO STANOVENÍ ZÁKLADNÍCH CHARAKTERISTIK.....	47
4.7.1	Stanovení kofeinu metodou HPLC/PDA/MS.....	47
4.7.2	Stanovení celkových polyfenolů.....	47

4.7.3	Stanovení celkových flavonoidů	48
4.7.4	Stanovení celkových antokyanů	48
4.7.5	Stanovení jednotlivých flavonoidů metodou RP-HPLC s UV-VIS detekcí	48
4.7.5.1	Úprava vzorků pro stanovení individuálních flavonoidů pomocí HPLC	48
4.7.6	Stanovení individuálních katechinů	48
4.7.6.1	Úprava vzorků pro stanovení individuálních katechinů pomocí HPLC	48
4.7.7	Stanovení α -tokoferolacetátu pomocí HPLC	49
4.7.8	Stanovení β -karotenu pomocí HPLC	49
4.7.8.1	Úprava vzorků pro stanovení β -karotenu pomocí HPLC	49
4.7.9	Stanovení kyseliny askorbové pomocí HPLC	49
4.7.9.1	Úprava lyofilizovaných vzorků pro stanovení kyseliny askorbové pomocí HPLC	49
4.7.10	Titrační stanovení kyseliny L-askorbové	49
4.7.11	Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS	49
4.7.12	Stanovení koncentrace klotrimazolu a ibuprofenu pomocí HPLC	49
4.7.13	Spektrofotometrické stanovení proteinů - metoda dle Haetree – Lowryho	50
4.7.14	Bicinchoninová metoda	50
4.7.15	Stanovení koncentrace peptidů metodou HPLC	50
4.7.16	Stanovení enzymových aktivit	50
4.7.16.1	Stanovení proteasové aktivity	50
4.7.16.2	Stanovení lipasové aktivity	50
4.7.17	Stanovení obsahu chlorofylů	51
4.8	PŘÍPRAVA ČÁSTIC	51
4.8.1	Příprava polysacharidových částic	51
4.8.1.1	Příprava alginátových částic A	51
4.8.1.2	Příprava chitosanových částic CH	51
4.8.1.3	Příprava škrobových částic Š	51
4.8.1.4	Příprava alginátových částic pomocí ultrazvuku A	51
4.8.1.5	Příprava chitosanových částic pomocí ultrazvuku CH	51
4.8.1.6	Příprava chitosan-alginátové částice pomocí ultrazvuku CHA	51
4.8.2	Příprava polysacharidových částic pomocí enkapsulátoru	52
4.8.2.1	Alginátové částice s jádrem – EA2%, EA4%	52
4.8.2.2	Příprava alginátových částic	52
4.8.2.3	Příprava alginát-škrobových částic	52
4.8.2.4	Příprava alginát-CMC částic	53
4.8.2.5	Příprava chitosanových částic	53
4.8.2.6	Příprava chitosan-agarových částic	53
4.8.2.7	Příprava chitosan-škrobových částic	53
4.8.2.8	Příprava chitosan-alginátových částic	53
4.8.2.9	Příprava agarosových částic	53
4.8.2.10	Příprava agarových částic	53
4.8.2.11	Příprava alginát-agarosových částic	53
4.8.2.12	Příprava alginát-agarových částic	53
4.8.2.13	Příprava alginát-pullulanových částic	54
4.8.3	Příprava lipidových částic	54
4.8.3.1	Příprava liposomových částic pomocí ultrazvuku U	54
4.8.3.2	Odpařování na tenké vrstvě – TLE	54
4.8.3.3	Metoda reverzních fází – RP-TLE	54
4.8.3.4	Ethanolové vstříkávání EV	54
4.8.3.5	Liposomy s přídavkem lipidového extraktu z lososa – marinosomy, M	55
4.9	IZOLACE LIPIDOVÉHO EXTRAKTU Z LOSOSA	55

4.9.1	Stanovení obsahu mastných kyselin u lipidového extraktu z lososa	55
4.10	STANOVENÍ ENKAPSULAČNÍ ÚČINNOSTI	55
4.11	STANOVENÍ VELIKOSTI ČÁSTIC POMOCÍ DLS A STABILITY POMOCÍ ZETA-POTENCIÁLU	55
4.12	STANOVENÍ VLASTNOSTÍ SYSTÉMU POMOCÍ ANALYTICKÉ CENTRIFUGACE	56
4.13	STANOVENÍ STABILITY ČÁSTIC V TRÁVICÍCH ŠŤÁVÁCH	56
4.14	STANOVENÍ STABILITY ČÁSTIC V MODELOVÝCH POTRAVINÁCH	56
4.15	STANOVENÍ STABILITY V REÁLNÝCH POTRAVINÁCH	56
4.15.1	Stanovení stability částic v reálných nápojích	56
4.15.2	Stanovení stability částic v mléčných produktech	56
4.16	ANTIMIKROBIÁLNÍ TESTY	57
4.16.1	Bujónová diluční metoda	57
4.16.2	Agarová difúzní metoda	57
4.16.3	Testy antimikrobiální aktivity - zkumavkový test	57
4.16.4	Testy antimikrobiální aktivity monitorující kinetiku lyze buněk G+ bakterií	57
4.17	ANALÝZA ČÁSTIC -OPTICKÝ MIKROSKOP	58
4.18	ANALÝZA ČÁSTIC - ELEKTRONOVÝ MIKROSKOP	58
4.19	ANALÝZA ČÁSTIC - FLUORESCENČNÍ MIKROSKOP	58
4.20	PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE	58
4.21	LYOFILIZACE	58
4.22	SYNTÉZA ZLATÝCH NANOČÁSTIC	59
4.23	IMOBILIZACE ZLATÝCH NANOČÁSTIC	59
4.24	POSTUP PŘÍPRAVY ZLATÝCH NANOČÁSTIC UVNITŘ LIPOSOMŮ	59
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	60
5.1	ENKAPSULACE KOFEINU A JEHO PŘÍRODNÍCH EXTRAKTŮ	60
5.1.1	Charakterizace vybraných přírodních extraktů	60
5.1.2	Stanovení enkapsulační účinnosti	60
5.1.2.1	Enkapsulační účinnost standardního kofeinu	61
5.1.2.2	Enkapsulační účinnost kofeinu ve formě extraktů přírodních zdrojů	61
5.1.2.3	Enkapsulační účinnost extraktů kofeinu koenkapsulovaných s ovocnou složkou	62
5.1.3	Stanovení velikosti a stability částic s obsahem kofeinu	63
5.1.4	Stanovení sedimentační stability	65
5.1.5	Stanovení dlouhodobé stability – modelové potraviny	66
5.1.6	Stanovení dlouhodobé stability – modelové kosmetické prostředí	67
5.1.7	Stanovení stability částic v reálných podmínkách	69
5.1.8	Stanovení stability částic obsahujících kofein v modelových trávicích šťávách	70
5.2	ENKAPSULACE OVOCNÝCH, ZELENINOVÝCH A ROSTLINNÝCH EXTRAKTŮ A ŠŤÁV S VYSOKÝM OBSAHEM POLYFENOLŮ A VITAMINŮ	72
5.2.1	Charakterizace	72
5.2.2	Stanovení enkapsulační účinnosti	74
5.2.3	Stanovení velikosti a stability částic s obsahem antioxidantů	76
5.2.4	Stabilita částic – modelové trávení	77
5.2.5	Stanovení dlouhodobé stability částic – modelové potraviny	79
5.2.6	Stanovení dlouhodobé stability částic s antioxidanty – modelové kosmetické prostředí	81
5.2.7	Stanovení sedimentační stability částic s antioxidanty	83
5.3	ENKAPSULACE ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK, JEJICH PŘÍRODNÍCH EXTRAKTŮ A VYBRANÝCH LÉČIV ...	84
5.3.1	Charakterizace použitých antimikrobiálních složek	85
5.3.2	Stanovení enkapsulační účinnosti	86
5.3.2.1	Enkapsulace bylinných extraktů	86
5.3.2.2	Enkapsulace antimikrobiálních peptidů a bílkovin	87

5.3.2.3	Enkapsulace antimikrobiálních léčiv	88
5.3.3	Stanovení stability a velikosti částic	88
5.3.4	Dlouhodobá stabilita částic s antimikrobiálními látkami – základní model voda	90
5.3.5	Dlouhodobá stabilita částic s antimikrobiálními látkami - modelové potraviny	91
5.3.6	Stanovení stability antimikrobiálních částic -modelové trávení.....	93
5.3.7	Stanovení antimikrobiální aktivity	95
5.3.7.1	Disková a agarová difúzní metoda	95
5.3.7.2	Bujónová diluční metoda.....	99
5.4	ENKAPSULACE ENZYMŮ, JEJICH SMĚSÍ A PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ	104
5.4.1	Stanovení enkapsulační účinnosti	104
5.4.2	Stanovení velikosti a stability částic	106
5.4.3	Stanovení dlouhodobé stability – modelové kosmetické prostředí	107
5.4.4	Stanovení proteolytické aktivity uvolněných enzymů během skladování.....	109
5.4.5	Stanovení dlouhodobé stability enkapsulovaných enzymů v prostředí modelových potravin	110
5.4.6	Stanovení stability částic – modelové trávení	112
5.4.7	Stanovení sedimentační stability částic s enkapsulovanými enzymy	114
5.5	ENKAPSULACE PROBIOTIK A PREBIOTIK	115
5.5.1	Charakterizace	115
5.5.2	Stanovení enkapsulační účinnosti	116
5.5.3	Stanovení stability částic s prebiotiky v modelových podmínkách trávicího traktu	118
5.5.4	Stanovení stability částic s probiotiky a prebiotiky v modelových potravinách	121
5.5.4.1	Prebiotika – zelený ječmen.....	121
5.5.4.2	Probiotika	123
5.5.5	Stanovení dlouhodobé stability částic s probiotiky v prostředí reálné potraviny.....	126
5.5.6	Optimalizace množství biomasy	128
5.5.7	Zachování viability buněk v částicích	130
5.6	ANORGANICKÉ NANOČÁSTICE A MOŽNOSTI JEJICH KOMBINACE S ORGANICKÝMI ČÁSTICEMI	131
5.6.1	Zlaté nanočástice	131
5.6.2	Příprava zlatých nanočástic - metoda fotochemické syntézy	131
5.6.3	Imobilizace zlatých nanočástic.....	133
5.6.3.1	Imobilizace zlatých nanočástic na skleněné povrchy a jejich následná funkcionalizace	133
5.6.3.2	Funkcionalizace zlatých nanočástic.....	134
5.6.3.3	Využití liposomů jako nanoreaktorů pro fotochemickou syntézu nanočástic zlata	134
6	ZÁVĚR.....	137
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	141
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	142
9	ŽIVOTOPIS A PUBLIKAČNÍ ČINNOST	153

1 ÚVOD

Produkce potravin je jedním ze základních průmyslových odvětví ve všech zemích, kvalita a bezpečnost potravin jsou prioritou spotřebitelů, jakož i potravinářského průmyslu. Průmysl proto stále hledá nové technologie, aby mohl nabízet výrobky s lepší chutí, příchutí, texturou, delší trvanlivost a vyšší bezpečností. Jsou hledány také nové způsoby, jak snížit množství soli, cukru, tuku, umělých barviv a konzervačních látek v produktech, a řešit tím související onemocnění, jako je obezita, vysoký krevní tlak, cukrovka, kardiovaskulární onemocnění, zažívací poruchy, některé druhy rakoviny (např. rakovina tlustého střeva) a potravinové alergie. Potravinářské technologie, materiály a systémy zaměřené na zlepšení kvality, výživové hodnoty, bezpečnosti a trvanlivosti potravin se tak stále intenzivně rozvíjí. Mezi tyto technologie patří i enkapsulační techniky (zejména mikro- a nanočástice).

Hlavním cílem jsou především částice s řízeným uvolňováním zapouzdřených biologicky aktivních molekul (např. antioxidanty, stabilizátory, vitamíny, enzymy, stimulatory atd.), které mohou být použity pro obohacování potravin, nápojů a potravinových doplňků. Získáme tak výrobky s původním složením, ale vysokou kvalitou, stabilitou a přidanou hodnotou. Proto má trend nanotechnologií obrovský potenciál, avšak i mnoho otázek, jako je například vhodná technologie či bezpečnost těchto částic.

Enkapsulace se v potravinářském průmyslu používá již mnoho let. Nanoenkapsulace však přináší další výhody. Vyšší biologická dostupnost otevírá rozsáhlou oblast použití v dalších potravinách, příkladem jsou nanoenkapsulace vitamínů, antioxidantů, barviv, příchutí či konzervačních látek. Lepší optické vlastnosti nanočástic také umožňují použití v celé řadě výrobků, jako jsou například i čiré nápoje. Nanoenkapsulace lze tak použít k zachování složek a přísad během zpracování a skladování, maskování nepříjemné chutě a příchutě, řízenému uvolňování látek, lepšímu rozptylu ve vodě nerozpustné potravinových přísad a aditiv či přípravě inteligentních obalů.

Nové trendy se rozvíjí i v kosmetických a farmaceutických aplikacích. S použitím nové generace aktivních látek přichází i problémy s udržení stability výrobku či komplikace při použití více účinných látek. To vede technology k vývoji nových transportních systémů. Hlavním cílem těchto nových technologií je například doručení aktivní složky přípravku na cílové místo.

V kosmetickém průmyslu se tak nanočástice využívají jako nosiče aktivních látek, které umožňují řízené uvolňování a pomáhají lepšímu vstřebání aktivních látek do pokožky, vlasů či nehtů. Mezi nejčastěji používané nosiče patří liposomy. V medicíně je enkapsulace využívána především k cílenému transportu léčiv do organismu, k vývoji nových dezinfekčních a ochranných prostředků, k urychlení hojení ran, případně zefektivnění diagnostických metod.

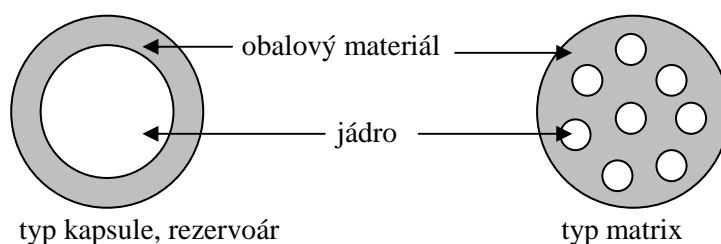
Cílem této práce je vyvíjet a testovat vhodné typy částic připravených z přírodních materiálů, připravit je ve stabilní formě a ověřit jejich použitelnost do potravin i kosmetických produktů. A tím získat moderní funkční potraviny a nápoje s lepšími výživovými a senzorickými vlastnostmi a vysokou přidanou hodnotou. Případně kosmetické a farmaceutické přípravky s vysokou funkcí.

2 TEORETICKÁ ČÁST

Enkapsulace je definována jako technologie balení pevných látek, kapalin nebo plyných materiálů do uzavřených kapslí, které mohou uvolňovat svůj obsah za definovaných a kontrolovaných podmínek. Připravené částice mohou mít průměr několika nm až několik mm. V potravinářském průmyslu se enkapsulace z různých důvodů využívá již více než 60 let, například chrání materiál před nepříznivým vlivem okolního prostředí (jako je teplota, vlhkost, vzduch, světlo), usnadňuje také manipulaci s enkapsulovaným materiálem [1, 2, 3].

Dále umožňuje pozvolné nebo cílené uvolňování, čímž lze snížit potřebné množství aditiv a konzervačních látek. Řízené uvolňování lze definovat jako metodu, ve které je jedna nebo více účinných látek k dispozici v požadovaném místě, čase, koncentraci a dávkována s požadovanou rychlostí. K uvolňování enkapsulovaných složek, v závislosti na způsobu použití, lze využít například změny pH, mechanického napětí, teploty, enzymatické aktivity, času, osmotické síly, atd. [1]. Například při enkapsulaci aktivních látek do polymerních nosičů dochází k uvolňování hydrofilních látek difuzí, zatímco lipofilní sloučeniny jsou uvolňovány převážně enzymatickou degradací proteinového nosiče v zažívacím traktu [4].

Enkapsulaci lze také použít k maskování nepříjemné chuti (například hořká a svíravá chuť polyfenolů), zabránění odpařování těkavých látek, jako je aroma, či oddělení složek směsi, které by spolu jinak reagovaly. Kromě výše uvedeného může být enkapsulace použita také k uzavření buněk nebo enzymů, u kterých se rovněž využívá dalších technik imobilizace [1, 2].



Obrázek 1. Dva základní typy částic [5]

Vlastnosti kapslí jako je velikost, složení, forma či mechanismus uvolňování lze jednoduše měnit výběrem vhodné metody či materiálu [1]. Existuje celá řada technik pro enkapsulaci potravinářských látek. Vzhledem k tomu, že enkapsulované sloučeniny jsou velmi často v kapalné formě, mnoho technologií je založeno na sušení (sprejové sušení, chladové/mrazové sušení, fluidní vrstva, extruze). Nejstarší a nejrozšířenější enkapsulační metodou v potravinářském průmyslu je právě sprejové sušení, a to zejména díky své flexibilitě, možnosti kontinuální přípravy a ekonomickému provozu. Dalšími enkapsulačními technikami jsou sprejové chlazení, lyofilizace, extruze, emulgace, koacervace, příprava liposomů a další [2]. Mezi metody imobilizace patří zmíněna enkapsulace, dále adsorpce, iontová, kovalentní či afinitní vazba a mnohé další [2]. Blíže se metodám imobilizace a enkapsulace věnují následující kapitoly.

2.1 Metody imobilizace

2.1.1 Vazba na povrch nosiče

Tato technika je nejčastější formou imobilizace a byla zřejmě prvním příkladem buněčné imobilizace. Buňky jsou vázány na porézní materiál pomocí fyzikálních nebo chemických sil, nejčastěji adsorpcí či kovalentní vazbou na nosič, který plní funkci podpůrného materiálu [6, 7]. Výhody této techniky jsou jednoduchá a rychlá imobilizace, minimální chemické změny imobilizovaných látek nebo poškození buněk a možnost reverzibilního procesu, který umožňuje opakované použití. Mezi nevýhody patří nespecifické vazby, nízká ochrana před nepříznivým vlivem okolního prostředí a vyšší pravděpodobnost uvolnění imobilizovaných složek [2, 6, 8].

2.1.1.1 Adsorpce

Při adsorpci jsou aktivní složky (především enzymy) zachyceny na povrch nosiče pomocí fyzikálních sil (van der Waalovy síly), ale uplatňují se i další interakce, jako iontové nebo vodíkové vazby a hydrofobní interakce. Jako nosiče se nejčastěji používají sklo, křemičitany a silikagel. Výhodou této metody je jednoduchost, nevýhodou malá pevnost, která je závislá na pH, teplotě, iontové síle, koncentraci substrátu a použitém rozpouštědle. Úspěšně byla touto metodou imobilizována lipasa na práškový oxid křemičitý a enkapsulována do silikagelu, kde bylo dosaženo zvýšené teplotní stability [6, 9, 10, 11]. V případě imobilizace buněk se používají jako nosiče dřevní piliny, porézní sklo, keramika, aktivní uhlí, želatina a ionexové nosiče [6, 7]. Hlavní výhodou této metody je přímý kontakt mezi živinami, nosičem a buňkou. Důležitá je volba vhodné velikosti pórů, například při použití malé velikosti dochází k limitaci difuze [6, 7, 8].

2.1.1.2 Iontová vazba

Iontová vazba je založena na elektrostatické přitažlivosti opačně nabitých skupin nosiče a enzymu. Pro vazbu záporně nabitých skupin enzymu se jako nosič využívá anex, pro vazbu kladně nabitých skupin enzymu se jako nosič využívá katex. Velkou výhodou této imobilizační metody je snadnost navázání enzymu a velice snadná regenerace [6, 9].

2.1.1.3 Kovalentní vazba na nerozpustný nosič

Imobilizace použitím kovalentní vazby je jednou z nejrozšířenějších technik zachycení enzymu. Největší výhodou tohoto postupu je vysoká stabilita vazby mezi enzymem a nosičem. Biokatalyzátor je stabilnější, je lokalizován na povrchu nosiče a tudíž v neomezeném kontaktu se substrátem [12]. Jako nosiče mohou být použity organické látky, přirozené nebo syntetické polymery, musí však být nerozpustné a mít hydrofobní či hydrofilní povrch. K vazbě dochází přes aminoskupiny, karboxylové, sulfhydrylové, hydroxylové, imidazolové a fenolové skupiny bílkoviny. Je vždy nutné uskutečnit vazbu přes ty skupiny, které nejsou důležité pro samotnou reakci, aby nebyla ovlivněna aktivita enzymu [6, 9]. Mechanismus kovalentní vazby se využívá rovněž k imobilizaci průmyslově využívaných mikroorganismů. Ke vzniku kovalentní vazby dochází mezi aktivním anorganickým nosičem a buňkou v přítomnosti síťujícího reagentu. Vhodným nosičem je především oxid křemičitý [8].

2.1.1.4 Afinitní vazba

Imobilizace afinitní vazbou je někdy zahrnována mezi techniky adsorpce. Jedná se o vytvoření pevné afinitní vazby mezi biokatalyzátorem a nosičem vybaveným komplementárními afinitními ligandy. Díky existenci nespočtu druhů afinitních párů nabízí tato metoda rozsáhlé možnosti využití [12, 13].

2.1.1.5 Vazba pomocí kovu

Chelatace je vzhledem k relativně pevné vazbě nosiče a biokatalyzátoru a zároveň snadné regeneraci používána nejčastěji jako chromatografická metoda. Ionty přechodných kovů jsou vázány na povrch organického nosiče koordinační vazbou. Nosič však není schopný vázat všechna koordinační místa kovu a proto jsou některá volná pro vazbu s ligandy. Některé postranní řetězce aminokyselin (histidin, tryptofan, tyrosin, cystein, fenylalanin) mají schopnost substituovat slabě vázané ligandy kovových iontů a umožnit tak vazbu enzymu na kov. Pro chelataci lze využít velké množství přechodných kovů a výhoda metody tak spočívá v její široké použitelnosti [12].

2.1.1.6 Disulfidický můstek

Zachycení přes disulfidický můstek bývá někdy zařazováno mezi imobilizace pomocí kovalentní vazby. Vzniklá vazba mezi thiolovou skupinou cysteinu a aktivovaným nosičem je velmi pevná, avšak už za poměrně mírných podmínek lze tuto vazbu rozštěpit [12].

2.1.2 Cross-linking (zesítnění)

Tvorba příčných vazeb (cross-linking; zesítnění) je ireverzibilní technikou imobilizace především enzymů, která nevyžaduje nosič. Metoda využívá síťovací činidlo, kterým je nejčastěji glutaraldehyd. Glutaraldehyd je levný a široce dostupný pro průmyslové využití, avšak pro zesítnění některých enzymů nevhodný; v takových případech se využívá jiných činidel, např. dextranu či diazoniových solí [12].

2.1.3 Entrapment - zachycení v pórovitém materiálu

Entrapment (zachycení) je ireverzibilní metodou imobilizace, kde jsou biokatalyzátory zachyceny uvnitř vhodné matrice. Nejdůležitějším faktorem determinujícím účinnost metody je výběr vhodné matrice, především z hlediska množství a velikosti jejích pórů. Je důležité zabezpečit inkorporaci dostatečného množství biokatalyzátoru do matrice. Imobilizace zachycením v pórovitém materiálu je nejběžněji používaná metoda imobilizace mikrobiálních buněk. Vhodnými organickými nosiči jsou agar, alginát, chitosan, κ -karagenan, kolagen polyvinylalkohol a želatina. Mezi používané anorganické nosiče v této metodě patří polystyren, polyuretan a různé silikátové gely [6, 12].

2.1.4 Enkapsulace

Enkapsulace je další ze základních forem imobilizace. V procesu enkapsulace je enkapsulovaná složka obalena částečně propustnou membránou, nejčastěji ve formě kapsule. Membrána umožňuje vstup okolního prostředí do nitra částice, avšak zamezuje úniku aktivní látky do prostředí. Velikost pórů membrány je tedy hlavním determinujícím faktorem této metody. Membrána musí umožňovat přístup substrátu a nutrientů, ale zároveň biokatalyzátor ochránit před nepříznivými podmínkami vnějšího prostředí [12]. Princip metody je nejčastěji založen na polymerace gelu prováděné v prostředí enkapsulované aktivní složky. Pro tento účel imobilizace se používá nejčastěji agar, agarosa želatina, alginát, karagenan a další přírodní polymery [6, 9, 14].

2.2 Metody enkapsulace

2.2.1 Sprejové sušení

Sprejové sušení je nejrozšířenější a nejstarší enkapsulační metodou používanou v potravinářském průmyslu. Touto metodou je připravováno 80-90% částic v potravinářství, částice jsou připravovány v dobré kvalitě a jejich velikost je menší než 40 μm . Velikost částic však závisí na povrchovém napětí a viskozitě kapaliny, na rychlosti sprejování a jeho teplotě. Částice připravené touto metodou splňují žádoucí senzorické a texturní vlastnosti [1,2]. Tato technika se používá k přípravě suchých a stabilních potravinářských přídatných látek a příchutí. Proces je úsporný a flexibilní [1].

Jediným omezením této metody je vhodný obalový materiál, který musí být rozpustný ve vodě. Typickým obalovým materiálem jsou arabská guma, maltodextriny, modifikovaný škrob a jejich směsi. Ostatní polysacharidy (alginát, karboxymethylcelulosa, guarová guma) a proteiny (syrovátkové, sojové proteiny, kasein) mohou být také použity jako obalový materiál, ale jejich použití je dražší a časově náročnější z důvodu jejich nízké rozpustnosti ve vodě. K enkapsulaci dochází homogenizací enkapsulované aktivní látky s obalovým materiálem. Směs je poté pomocí vysokotlakých trysek nebo rotačního rozprašovače sprejována do prostoru sušárny. Během tohoto procesu dochází k tvorbě filmu na povrchu kapek. Díky horkému vzduchu pak, dochází k odpaření vody a ke shromažďování částic na dně sušárny. Důležité je volba správné teploty sušícího vzduchu, aby nedocházelo k přehřátí částic a degradaci teplotně senzitivních aktivních látek [1, 15].

Sprejové sušení se v průmyslovém měřítku používá rovněž při enkapsulaci probiotických kultur. Buňky v polymerním roztoku jsou unášeny do horkého sušícího vzduchu a zde jsou prudce vysušeny. Mikrokapsle jsou pak připraveny ve formě suchého prášku [16, 17].

Nejdůležitějším bodem je volba vhodné teploty přiváděného vzduchu. Nízká teplota vzduchu snižuje rychlost odpařování vody, což vede k tvorbě agregátů. Naopak příliš vysoká teplota vzduchu může nepříznivě ovlivnit životaschopnost buněk. Mikrokapsle v podobě suchého prášku lze dlouhou dobu skladovat a manipulace s nimi je velmi jednoduchá [16, 17].

2.2.2 Sprejové chlazení

Sprejové chlazení je obdoba technologie sprejového sušení. Jedná se o nejlevnější metodu pro enkapsulace organických i anorganických látek. Směs aktivní látky a obalového materiálu je vstříkována do chlazeného prostoru, případně jsou drobné kapičky chlazeny i proudem vzduchu. Tato technika tedy není založena na principu odpařování vody. Kapsle se vytváří ztuhnutím obalového materiálu kolem jádra tvořeného enkapsulovanou látkou. Při této metodě se jako nosiče hojně využívají lipidy, zejména oleje nebo jeho deriváty. Nicméně lze použít širokou škálu materiálů. Mikrokapsle připravené technologií sprejového chlazení, jsou nerozpustné vodě v důsledku své lipidové vrstvy a většinou jsou používány k enkapsulaci ve vodě rozpustných látek (minerály, vitaminy, enzymy, příchutě...), které tvoří jádro [1, 15].

2.2.3 Extruze

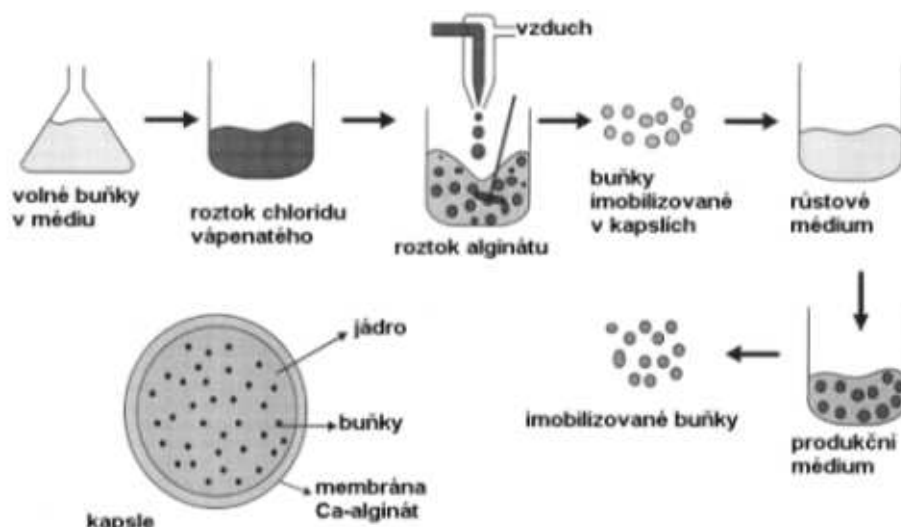
Tavenina složená ze sacharosy, škrobu, maltodextrinu, glukosového sirupu nebo z dalších mono- a disacharidů či jejich směsí je emulgována s enkapsulovaným materiálem a protlačena přes otvor či otvory trysek. Poté jsou proudy odkapávajících částic zchlazeny chladným prostředím a dehydratací rozpouštědlem, přičemž k enkapsulaci aktivní látky dochází ztvrdnutím obalového materiálu při kontaktu s tímto rozpouštědlem. Nejčastěji se používá isopropanol a tekutý dusík. Částice připravené touto metodou jsou ve vodě rozpustné a jejich velikost se pohybuje v rozmezí mezi 200–2000 μm [1, 15]. Díky elektrostatické extruzi lze touto metodou připravit i malé částice, a to částice okolo 50 μm . Alternativní metodou mohou být také připravovány například sférické kapsle s hydrofobním jádrem a hydrofilním obalem [2]. Výhodou technologie extruze je, že enkapsulovaný materiál je zcela obklopen materiálem tvořícím stěny kapsle. Částice jsou tak velmi odolné a stabilní, velmi často se používají k enkapsulaci látek podléhajících oxidaci, či látek s pozvolným uvolňováním [1]. Extruze je také běžně využívána metoda pro enkapsulace mikrobiálních buněk. Při této metodě se polymerní roztok nejprve smíchá s mikrobiální kulturou a potom vytlačuje tryskou jako kapky do roztoku zesíťovacího činidla. Mezi faktory, které ovlivňují velikost připravovaných kuliček, je průměr trysky, viskozita, teploty, rychlost průtoku polymerního roztoku a vzdálenost otvoru trysky od síťujícího roztoku. Mezi hlavní výhody metody extruze je jednoduchost výroby, nižší náklady a vysoká životaschopnost buněk. Vhodnými polymery jsou opět chitosan, alginát a další přírodní polymery. I když má metoda výše uvedené výhody, ve velkém průmyslovém měřítku nedosahuje požadované efektivity z důvodu vyšších nároků na počet trysek a jejich udržení sterility a čistoty [16, 17].

2.2.4 Tvorba polymerních kapslí

Metoda pracuje na principu přikapávání roztoku nebo taveniny do želírující či vytvrzující lázně [2, 15]. Například alginát je touto formou úspěšně používán k enkapsulaci řady aktivních složek včetně mikrobiálních buněk, které si udrží svou životaschopnost i při dlouhodobých kultivacích [18]. V případě enkapsulace buněk je velmi důležité zajištění snadnou difuze pro substráty i produkty [6]. Alginát jako materiál získávaný z přírodních zdrojů může obsahovat zbytkové nečistoty (proteiny a polyfenoly, lipopolysacharidy), které mohou zjistiť dostatečnou výživu pro enkapsulované buňky, rovněž však mohou omezovat jeho biokompabilitu a tím i jeho použití ve farmacii [6, 18].

Alginátové kapsle se obvykle připravují kapáním buněčné suspenze v roztoku alginátu do síťujícího roztoku dvojmocného iontu. Ve většině případů je používán Ca^{2+} , jsou známy i studie za použití Ba^{2+} , kde bylo dosaženo větší pevnosti, avšak báriem nevyniká biokompabilitou jako vápník [18].

Podobným způsobem jako alginát lze také použít κ -karagenan, který se zesítujeme pomocí vápníku, nebo draslíku [6, 16, 19]. Kapajícím nástrojem může být jednoduše pipeta, stříkačka, tryska, či rozprašovač. Vlastnosti částic, jako je například velikost, lze měnit použitím různé teploty, tlaku při enkapsulaci, koncentrací nosiče, či tvaru a velikosti trysky [2, 15].



Obrázek 2. Imobilizace buněk do alginátových kapslí [20]

První kuličky z alginátu vápenatého byly poprvé připraveny v roce 1980. Alginátové částice byly připraveny i použitím opačného postupu, kdy byla připravena směs enkapsulované složky v roztoku chloridu vápenatého a přidávána do roztoku alginátu [20].

Mezi používané nosiče patří tedy alginát, dále modifikovaný škrob, celulóza, agar, agarosa, karagenan, kolagen, chitosan, celulóza a další přírodní polymery [1, 20].

2.2.5 Emulgace

Další hojně využívanou metodou je metoda emulzifikace. Využívá se nejčastěji v případě enkapsulace ve vodě rozpustné aktivní látky. Existují dvě kombinace, emulze voda/olej nebo emulze olej/voda. Emulze nejčastěji vznikají mechanickým způsobem: pomocí homogenizérů, mixérů, míchadel, v koloidních mlýnech. Je možné přidat i emulgátory a stabilizátory pro zvýšení jejich stability [2, 21].

Emulze je poté možno sušit různými způsoby, jako je sprejové sušení, nebo lyofilizace, a tak produkovat částice ve formě prášku. Tyto sušené emulze mohou být použity pro řadu potravinářských výrobků [2]. Technika emulgace je široce používanou enkapsulační metodou i různých mikrobiálních buněk. Rozptýlené vodné kapičky monomeru a buněk, míchané v organické směsi vytvoří emulzi. Přídavkem polymerizačního činidla, dochází ke vzniku kapslí. Kapsle jsou následně získány odstředěním. Vhodným netoxickým nosičem v této metodě je například chitosan [20]. Velikost kapslí lze ovlivňovat rychlostí míchání či koncentrací použité povrchově aktivní látky. Metoda emulgace však vede ve většině případů ke vzniku kapslí s širokou distribucí velikosti. Hlavní nevýhodou této metody je potenciální toxicita použitých organických rozpouštědel. K přípravě emulzí lze tak využít olejů, avšak odstranění oleje ze směsi je složitější a ekonomicky náročnější ve srovnání s organickými rozpouštědly [16, 17].

2.2.6 Fluidní vrstva

Fluidní vrstva je technika enkapsulace, kde se na enkapsulovanou látku nanáší ochranný povlak. Nanášení je kontinuální proces, kde je na aktivní látku v proudu vzduchu při konkrétní teplotě nanášen atomizovaný materiál, tvořící stěnu kapsle. Mezi nejpoužívanější materiály tvořící stěnu částic patří roztoky celulózy, škrobu, některých bílkoviny a jejich deriváty [2].

V posledních letech se objevují také částice z lipidů, hydrogenovaných rostlinných olejů, mastných kyselin, emulgátorů, vosků a jejich směsí. Původně byla tato metoda vyvinuta pro farmaceutický průmysl, stále častěji se však používá i v potravinářském průmyslu. Mezi hlavní výhody této metody patří vznik mikrokapslí, které vynikají stabilitou, životaschopností, texturou a dobrou manipulovatelností. Technologie fluidní vrstvy se používá k enkapsulaci široké palety potravinářských aditiv. Fluidní technologii ovlivňuje řada faktorů jako je poloha trysky, použití chladného či horkého vzduch, koncentrace obalové látky, rychlost atomizace atd. Fluidní vrstva se používá například k ochraně železa, k enkapsulaci kyseliny mléčné, kyseliny sorbové, kyseliny octové, vitaminů a jejich směsí, hydrogenuhličitanu sodného a dalších solí s uplatněním zejména v pekárenském a masném průmyslu [1, 15].

2.2.7 Koacervace

Koacervace je metoda, při které dochází k rozdělení polymerního roztoku na dvě nemísitelné kapalně fáze, z nichž jedna bohatá na makromolekulární materiál se označuje jako koacervační fáze, a druhá, zředěná, se nazývá koacervační médium. Koacervační médium pak tvoří jádro částice a koacervační fáze jeho obal. Koacervace se dělí podle mechanismu na jednoduchou a komplexní. Jednoduchá koacervace je děj, kdy separace nastává v přítomnosti jednoho typu makromolekulární látky, komplexní koacervace probíhá v přítomnosti dvou a více opačně nabitých polymerů. Během procesu koacervace se tedy vytváří drobné kapky, které se usazují nebo spojují a vytváří oddělenou koacervovanou fázi. Pokud jsou v roztoku přítomná jádra, kapky koacervátu se kolem nich hromadí a po přidání vhodného síťovacího činidla vytváří stěnu koacervátů. Mícháním roztoku se může předejít shlukování a sedimentaci kapek koacervátu. V některých případech je nezbytný přírůstek stabilizátoru, aby nedocházelo ke koagulaci výsledných mikročástic. Tvorba mikročástic koacervací obvykle vyžaduje další kroky pro jejich zpevnění. Těmi mohou být relativně jednoduché procesy vedoucí k odstranění zbytkového rozpouštědla, např. snížením teploty a propláchnutím srážecím roztokem nebo stabilizace síťovacími činidly [1]. Kapsle se obvykle oddělí filtrací nebo odstředěním, promyjí vhodným rozpouštědlem a následně vysuší. Nejčastěji používanými materiály v této metodě je kombinace želatiny a arabské gumy. Dalšími možnostmi jsou například želatina-karboxymethylcelulosa, želatina-gliadin, polyvinylalkohol, karagenan, chitosan, sojový protein, dextran atd. Jednou z možností je také využití techniky vícevrstvé koacervace. Tento postup zahrnuje vytvoření vícevrstevných kapslí, tak že na stěny kapsle je aplikována další vrstva různých koacervačních fází. Metoda koacervace má také některé nevýhody. Tento proces je velmi nákladný a poměrně složitý. Dalším problémem klasické koacervace je nemožnost enkapsulace za laboratorní teploty, tedy enkapsulace těkavých látek a látek citlivých na teplo. Řešením může být oddělení koacervačních fází pomocí úpravy pH, fáze se oddělí, vodná fáze se nahradí velkým množstvím enkapsulované aktivní složky, které má laboratorní teplotu. Dochází tedy k rychlému snížení teploty v celém systému. Vysoká teplota působí jen velmi krátce a nedochází tak k degradaci a ztrátám aktivních látek [15]. Koacervace je velmi účinnou metodou imobilizace i pro imobilizace mikrobiálních buněk, ale jedná se o nákladný proces [16, 20].

2.2.8 Lyofilizace

Lyofilizace je také jednou z enkapsulačních technik. Používá se k enkapsulaci ve vodě rozpustných přírodních aromatických látek, esencí a materiálů citlivých na teplo. Hlavními nevýhodami lyofilizace je však vysoká vstupní energie a dlouhá doba přípravy. Kromě toho, v průběhu zpracování částic s otevřenou porézní strukturou dochází mezi účinnou látkou a okolím k nedostatečné ochraně [1, 2]. Nosič a aktivní látka se nejprve rozpouští ve vodě a následně zmrazují. Za sníženého tlaku (vakua) je odstraněna voda pomocí sublimace. Někdy se užívají tzv. kryoprotektanty, které mají za úkol chránit a stabilizovat citlivé složky při mražení [21].

Lyofilizace se využívá i v případě enkapsulace buněk. Životaschopnost buněk v případě použití lyofilizace je v mnoha případech vyšší než při použití například sprejového sušení. Nicméně potřebné zmrazení před samotnou lyofilizací rovněž způsobuje částečnou ztrátu viability buněk [16, 17].

2.2.9 Kokrystalizace

Kokrystalizace je enkapsulační technika využívající jako základní materiál tvořícího stěnu částic sacharózu. Cukrový sirup se koncentruje do přesyceného stavu a udržuje při teplotě dostatečně vysoké, aby se zabránilo krystalizaci. Enkapsulovaný materiál se poté přidá do tohoto koncentrovaného sirupu a za mechanického míchání dochází k postupné krystalizaci a současně enkapsulaci aktivních složek. Enkapsulovaný produkt se poté suší na požadovanou vlhkost (pokud je to nutné) a třídí dle velikosti. Důležitým faktorem je řízení krystalizace pomocí teploty a rychlosti míchání. Výhodou metody je její jednoduchost, získání částic v suchém stavu (snazší manipulace), vysoká dostupnost základního materiálu a široká škála možností aplikace v potravinářském a farmaceutickém průmyslu [1].

2.2.10 Enkapsulace do liposomů

Mechanismus pro vytvoření liposomů je v podstatě hydrofilní a hydrofobní interakce mezi fosfolipidy a molekulami vody [2]. Liposomy jsou definovány jako malé sférické vezikuly, které jsou vytvořeny z jedné nebo více lipidových dvojvrstev, které jsou převážně tvořeny fosfolipidy. Do liposomů může být enkapsulována řada aktivních látek, přičemž hydrofobní látky jsou enkapsulovány do lipidové dvojvrstvy a hydrofilní látky do vnitřního vodného prostředí [22].

2.2.10.1 Dělení liposomů

Liposomy mohou být připraveny s různým povrchovým nábojem v závislosti na použitém fosfolipidu, o různé velikosti i počtu lamel (unilamelární, multilamelární). Všechny parametry jsou závislé na zvolené metodě přípravy a chemickém složení liposomů. Náboj je nezbytný pro zajištění stability. Liposomy složené z neutrálních fosfolipidů jsou náchylné k agregaci a následné sedimentaci. Unilamelární liposomy jsou ohraničeny pouze jednou dvojvrstvou membránou, velikost částic se pohybuje v rozmezích od 25 do 1 000 nm. Oproti multilamelárním liposomům mají výhodu ve vysoké enkapsulační účinnosti ve vodě rozpustných aktivních látek. Multilamelární liposomy mají nejméně dvě dvojvrstvé membrány, jejich velikost se pohybuje od 50 do 10 000 nm [22, 23].

U těchto liposomů lze však opakovaným zmrazováním a rozmrazováním dosáhnout zvětšení uzavřeného objemu a tím také dosáhnout vyšší enkapsulační účinnosti [22, 23].

Pro přípravu liposomů různé fosfolipidy. V případě potravinářských aplikací se nejčastěji používá lecithin a cholesterol. Lecithin neboli fosfatidylcholin je získáván nejčastěji z přírodních zdrojů (vaječný žloutek, sójové boby), ale lze ho však připravovat i synteticky. Cholesterol je používán pro zlepšení stability lipidové dvojvrstvy. Stabilita liposomů lze také zvýšit potažením povrchu určitým polymerem, jako je například polyethylenglykol nebo chitosan [24, 25].

2.2.10.2 Techniky přípravy liposomů

Základní metodou pro přípravu liposomů je metoda hydratace fosfolipidového filmu, kde dochází odpařením roztoku fosfolipidu v organickém rozpouštědle ke vzniku tenkého filmu na stěnách baňky. Po převrstvení tohoto filmu vodou dojde spontánně ke vzniku liposomů. Liposomy lze rovněž připravit přidáním vodného roztoku k roztoku fosfolipidu v organickém rozpouštědle a odpařením tohoto rozpouštědla. V tomto případě po přidání vodné fáze vzniknou nejprve reverzní micely.

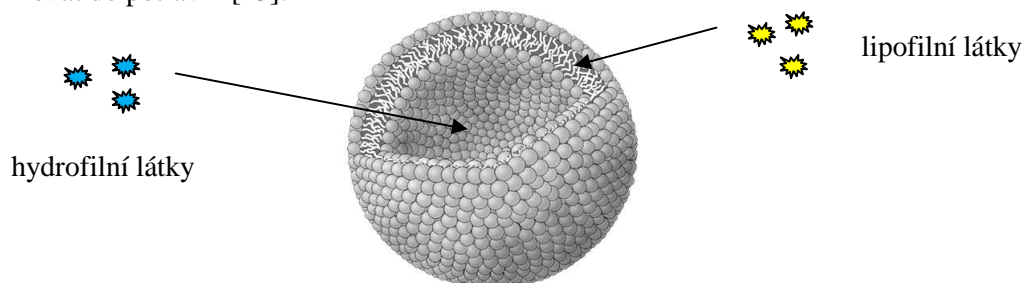
Při odpařování rozpouštědla dochází postupně k jejich kolapsu za vzniku liposomů. V případě obou metod jsou povětšinou připraveny multilamelární liposomy. Unilamelární liposomy lze poměrně snadno připravit účinkem ultrazvuku na vodnou disperzi fosfolipidů [22, 23, 24, 25].

Alternativní metodou pro přípravu unilamelárních liposomů je taktéž tzv. injekční metoda, při které se injekční stříkačkou s úzkou jehlou vstříkují alkoholický roztok fosfolipidů do vodné fáze. Liposomy lze dále upravovat nebo přímo připravovat pomocí extruze, kdy jsou liposomy přetlačovány přes póry filtru. Lze tak získat unilamelární liposomy o stejné velikosti. Na závěr lze u všech typů liposomů použít metodu lyofilizace k přípravě stabilních preparátů pro dlouhodobé skladování [22, 23, 24, 25].

2.2.10.3 Aplikace liposomů

Liposomy lze použít k enkapsulaci hydrofilních i hydrofobních látek, jsou využívány k aplikacím do potravinářského, kosmetického i farmaceutického průmyslu. Jsou vhodným kandidátem k enkapsulaci peptidů, nízkomolekulárních látek jako jsou vitamíny a antioxidanty, ale i enzymů. Velký potenciál má aplikace antimikrobiálních látek, například lysozymu. Účinnost enkapsulace do liposomů může být ovlivněna několika parametry, jako je koncentrace fosfolipidů a jejich složení, pH, koncentrace a velikost enkapsulované složky, velikost liposomů a hlavně interakce mezi fosfolipidy a enkapsulovanou aktivní látkou [24, 26, 27].

Za účelem přípravy liposomů pro potravinářské účely, je nutné splnit zákonné požadavky, týkající se použitých rozpouštědel. Liposomy připravené metodou za použití toxických rozpouštědel tedy není možné aplikovat do potravin [25].



Obrázek 3. Liposom

2.3 Nejčastěji používané nosiče při enkapsulacích

V předchozích kapitolách byla u vybraných aplikací uvedena celá řada látek, které lze použít k různým typům enkapsulace. Následující podkapitoly přehledně shrnují nosiče používané v potravinářství. Přestože existuje velké množství látek, které mohou být používány k enkapsulacím, mnohé nosiče, které jsou využívány pro enkapsulaci v jiných průmyslových odvětvích, nelze použít v potravinářském průmyslu.

Látky používané k enkapsulacím v potravinářském průmyslu musí být certifikovány pro použití v potravinářství a musí být zařazeny mezi aditiva, které patří do skupiny “všeobecně považovaných za bezpečné” (GRAS - Generally Recognised As Safe). Materiály použité k enkapsulaci musí být požitelné, biologicky odbouratelné a schopné tvořit bariéru mezi vnitřní fází a okolím. Většina použitých materiálů pro enkapsulaci v potravinářském průmyslu jsou biomolekuly, které musí splňovat určité základní podmínky. Musí být schopné zadržet a chránit aktivní látku v kapsli během zpracování a skladování za různých podmínek a po určenou dobu. Příprava kapslí by měla být jednoduchá a umožňovat snazší manipulaci s enkapsulovaným materiálem. Částice by měli mít vhodné reologické a vlastnosti a použitý materiál by neměl reagovat s enkapsulovanou aktivní látkou. Nejčastěji používané materiály pro enkapsulaci v potravinářských aplikacích jsou zejména polysacharidy, hlavně škrob a celulóza a jejich deriváty, dále rostlinné extrakty jako je například arabská guma, extrakty z mořských řas, jako jsou karagenany a alginát, dále mikrobiální a živočišné polysacharidy, jako je dextran, chitosan, xantan a gellan. Vhodnými materiály jsou však i bílkoviny a tuky. Příkladem nejběžněji používaných jsou mléčné a syrovátkové proteiny, kasein, želatina, gluten, mastné kyseliny, vosky, glyceridy a fosfolipidy. Celý proces enkapsulace musí být navržen tak, aby byly splněny bezpečnostní požadavky Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) [2].

2.3.1 Agar

Agar je lineární polysacharid tvořený β -D-galaktopyranosou a 3,6-anhydro- α -L-galaktopyranosou střídavě spojenými glykosidickými vazbami. Agar je základní strukturou řady druhů červených mořských řas. Želírující vlastnosti agaru jsou široce využívány ve farmaceutickém, kosmetickém a potravinářském průmyslu. Například kombinace agar-želatina je hojně používané metoda k imobilizaci buněk [6, 28, 29].

2.3.2 Agarosa

Agarosa je neutrální přírodní polysacharid izolovaný z červených mořských řas [30]. Základní stavební jednotkou je agarobiosa. Působením tepla dochází k tvorbě gelu, pro zesílení je nutné agarosu roztavit při teplotě vyšší než 85°C. Agarosové kapsle jsou makroporézní a mají uplatnění v řadě praktických aplikací. Mohou být vhodné při chromatografické separaci, v lékařství a farmacii, hojně se však využívají při enkapsulaci buněk a v potravinářském průmyslu jako želírující a stabilizační činidlo [6, 30].

2.3.3 Celulosa

Celulosa je nejrozšířenější organickou sloučeninou. Vyskytuje se jako základní strukturní polysacharid buněčných stěn vyšších rostlin. Celulosa je vysokomolekulární lineární polymer D-glukosových jednotek, je nerozpustná ve vodě, zředěných kyselinách, zásadách a většinou rozpouštědel, rozpouští se v koncentrovaných kyselinách, čímž dochází k rozkladu celulosy na rozpustné fragmenty cellobiosu, případně i na D-glukosu. Nativní celulosa se hojně využívá v potravinářském průmyslu. Větší uplatnění má ovšem modifikovaná celulosa [6, 31].

2.3.4 Škrob

Většina nativních škrobů se skládá z amylosy a amylopektinu, dvou homopolysacharidů složených z molekul α -D-glukopyranosy. V dnešní době se nativní škroby různým způsobem modifikují, aby se nevhodné vlastnosti omezily nebo aby se vytvořily škroby s jinými vlastnostmi. Škrob je jednou z nejdůležitějších složek v potravinářském, textilním, lékařském a chemickém průmyslu. Škrob je stále více využíván jako nosič z důvodu jeho nízké ceny, široké dostupnosti a neškodnosti [6, 32].

2.3.5 κ -karagenan

κ -karagenan je přirozeně se vyskytující polysacharid izolovaný z mořské červené řasy. Je snadno dostupný, netoxický a o vysoké molekulové hmotnosti. Polymer je složený z opakujících se jednotek β -D-galaktosy sulfátu a 3,6 anhydro- α -D-galaktosy. κ -karagenan lze snadno převést na gel v přítomnosti kovových iontů, aminů, aminokyselinových derivátů a ve vodě rozpustných organických rozpouštědel. κ -karagenan byl úspěšně použit k enkapsulacím aktivních složek potravin včetně probiotických buněk [33, 34].

2.3.6 Polyvinylalkohol

Jedná se o bílý krystalický prášek. Polyvinylalkohol je dostupný, netoxický, odolný vůči organickým rozpouštědlům a rozpustný ve vodě. Ve vodě nerozpustným se může stát použitím síťovacích činidel, svým chováním tedy připomíná želatinu [7, 20, 35, 36]. Samotný není příliš pevný, ale kapsle z polyvinylalkoholu síťované s roztokem kyseliny borité jsou velmi pevné a vykazují dobré elastické vlastnosti, PVA lze použít také ve formě vláken nebo fólií. Použití polyvinylalkoholu jako gelového nosiče získává pozornost v posledních letech. Známou průmyslovou aplikací polyvinylalkoholu jsou kapsle ve tvaru čočky s imobilizovanými buňkami vyráběné pod názvem LentiKat [20, 35, 36].

2.3.7 Chitosan

Chitosan je přírodní polysacharid, který se získává deacetylací chitinu. Chitin je to přírodní polysacharid, který se hojně vyskytuje u hmyzu a hub. Chitosan se používán v aplikované biochemii a medicíně jako nosič již několik let. Je biokompatibilní, málo toxický, biodegradabilní a má schopnost vytvářet vlákna i filmy. Velikost částic, hustota, viskozita, molekulová hmotnost a stupeň deacetylace jsou velmi důležité vlastnosti chitosanu. Chitosan je nerozpustný ve vodě a v organických rozpouštědlech. Rozpustný je ve zředěném vodném kyselém roztoku při pH pod 6,5 [14, 37].

2.3.8 Želatina

Želatina je rozpustný protein získaný částečnou hydrolýzou kolagenu, který je hlavní složkou chrupavek, kostí, kůže a kůže. Vzhledem ke své vynikající biokompatibilitě, biologické odbouratelnosti a mechanické pevnosti jsou hydrogely na bázi želatiny považovány za ideální biomateriál. Jsou známy dva druhy želatiny v závislosti na její přípravě: želatina typu A (isoelektrický bod při pH 8-9), želatina typu B (isoelektrický bod při pH 4-5), které byly získány v rámci kyselých a zásaditých podmínek. Zejména v potravinářském průmyslu se zvyšuje využití želatiny jako nosiče při enkapsulaci. Želatinové kapsule s imobilizovanými aktivními složkami vytvořené pomocí sprejového sušení jsou používány již řadu let [38, 39].

2.3.9 Alginát

Alginát je nerozvětvený přírodní polysacharid složený z mannuronové a guluronové kyseliny. Tento kopolymer je důležitou součástí řas. Alginát je také produkovan řadou bakterií, komerčně dostupný je však pouze alginát izolovaný z mořských řas ve formě sodné soli. Díky své schopnosti zesílení a tvorbě hydrogelů se alginát hojně využívá k enkapsulaci celého spektra látek včetně samotných mikrobiálních buněk [20, 40].

Alginát je extrahovaný ze tří druhů hnědých řas a obvykle prodáván jako sodná sůl. Alginát je rozpustný ve vodě a tvoří síť v přítomnosti dvojmocných kationů (nejčastěji Ca, Ba, Sr). Obecně platí, že polysacharidy jako jsou algináty, se vyznačují polydisperzitou molekulové hmotnosti a z tohoto důvodu se používá jako molekulární hmotnost jejich průměrná hodnota. Molekulární hmotnost přitom udává fyzikální vlastnosti polymeru, při příliš nízké hmotnosti se snižují mechanické vlastnosti. Distribuce molekulové hmotnosti má tak vliv na biokompabilitu, stabilitu, mechanickou odolnost, prodyšnost, biologickou rozložitelnost a tvorbu gelu. Alginát se hojně používá v potravinářství jako zahušťovadlo, emulzifikátor a stabilizátor, našel také uplatnění ve farmaceutickém průmyslu jako pomocná látka s mukoadhezivními vlastnostmi. První studie popisující použití alginátu na mikroenkapsulace byla publikována v roce 1980. V současné době je tento polymer nejčastěji používaným materiálem pro buněčné enkapsulace [18].

2.3.10 Pullulan

Jedná se o extracelulární polysacharid produkovaný *Aureobasidium pullulans*, v současné době stále více využíván díky svým vlastnostem. Pullulan není toxický, imunogenní, karcinogenní a mutagenní. Suchý pullulan je bílý prášek, bez zápachu. Polysacharid pullulan je dobře rozpustný ve vodě a ve zředěných zásadách, nerozpustný v alkoholech a organických rozpouštědlech. V posledních letech je zkoumán pro biomedicínské účely, pro cílené terapie, při hojení ran a jako nosič léčiv [41, 42].

2.3.11 Syrovátkové proteiny

Hlavním syrovátkovým proteinem je β -laktoglobulin. Výroba částic pomocí syrovátkových proteinů je často prováděna v kombinaci s dalšími polysacharidy, jako je chitosan nebo alginát. V poslední době se syrovátkové proteiny používají k potahování částic z alginátu nebo pektinu pro zvýšení stability při enkapsulaci mikroorganismů, ale také pro přípravu samostatných částic například pro imobilizace probiotik [43, 44].

2.3.12 Lecithin a cholesterol

Lecithin je významná chemikálie pro přípravu liposomů. Patří mezi fosfolipidy. Z chemického hlediska se jedná o fosfatidylcholin. V potravinách se nachází především ve vnitřnostech, v sádle, másle, obilí, zelenině a rostlinných olejích. Hlavní obsah lecitinu je ve vaječném žloutku, který je celkově bohatý na fosfolipidy. Průmyslový lecithin, vzniklý při rafinaci rostlinného oleje, obsahuje acylglyceroly, steroly, volné mastné kyseliny, tokoferoly, barviva a další stržené látky. V potravinách se používá při přípravě těsta, jako emulgátor při výrobě majonéz nebo ke snížení viskozity při výrobě čokolády. Cholesterol je významnou složkou živočišných plazmatických membrán a v menší míře se vyskytuje také v membráně vnitrobuněčných organel [45].

Cholesterol je metabolickým prekurzorem steroidních hormonů, vyskytuje se především ve vaječném žloutku, mozku, svalovině, mléku, sýru či sádlu. Zdravotní problémy jsou spojeny s přenosem cholesterolu v lipoproteinech s nízkou hustotou (LDL) ze střeva do krevního oběhu. Dochází k vylučování lipidů a ucpání tepny či žíly. Při enkapsulaci je díky své amfifilní povaze chopen začlenit se do fosfolipidové dvojvrstvy a stabilizovat tak liposomy, jeho použití v potravinářském průmyslu je však omezené [45].

2.4 Využití enkapsulace v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu

V poslední době se potravinářský průmysl zaměřuje na navrhování potravin, které mají pozitivní vliv na lidské tělo. Tyto výrobky jsou označovány jako funkční potraviny. Princip funkčních potravin je založen na obsahu aktivních látek, které mohou být ve výrobku obsaženy i přirozeně, ale jejich prospěšné vlastnosti jsou limitované. Tyto potraviny se tedy zaměřují na zachování maximální biologické aktivity těchto látek během procesu zpracování a skladování. Další funkcí je poskytnutí aktivní látky do cílového místa v těle. Funkční potraviny musí také splňovat požadavky spotřebitele, což je zejména cena a organoleptické vlastnosti, a v neposlední řadě účinnost těchto výrobků musí být prokázána a zdokumentována. Hlavní cíle účinnosti funkčních potravin jsou zaměřeny na prevenci obezity, osteoporózy, střevních poruch a srdečních chorob, dále snížení hladiny cholesterolu a krevního tlaku, zlepšení psychických a fyzických výkonů, nebo prevence rakoviny a cukrovky. Vymezení mezi potravinami a léky se stává v tomto případě velmi obtížná. V Evropě, proto formuloval v roce 1998 International Life Science Institute (ILSI), definici o funkčních potravinách: potravina může být považována za "funkční", je-li dostatečně prokázáno, že ovlivňují pozitivně jeden nebo více cílových funkcí v lidském těle, mimo přirozené výživové účinky, a to způsobem, který je relevantní pro lepší zdravotní stav a pohodu či snížení rizika onemocnění. Podle této definice, funkční potraviny musí zůstat potravinami a prokázat své účinky v množství, která lze očekávat, že bude běžně konzumována ve stravě. To znamená, že funkční potraviny nemohou být podávány ve formě pilulky nebo kapsle, ale pouze jako součást normální stravy [46, 47].

Evropská unie vydala v roce 1997 také směrnici o tzv. "Novel Foods". Za Nové potraviny jsou považovány: (i) potraviny, které byly vyrobeny s novou technologií, která nebyla dříve použita v potravinářském průmyslu, nebo (ii) potraviny, které obsahují fyziologicky aktivní složky, které nejsou přirozeně se vyskytující v dané potravine, nebo koncentrace aktivní složky je podstatně vyšší než v původním produktu. Tyto potraviny musí projít přes přísné hodnocení bezpečnosti. Také funkční potraviny lze klasifikovat jako nové potraviny, i když zdraví prospěšné tvrzení nelze do této kategorie zařadit [46].

Zavedením nových technologií jako je enkapsulace lze tedy lépe zachovat přirozeně se vyskytující aktivní látky v potravinách nebo zlepšit celkovou kvalitu surovin, jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, výživové vlastnosti a bezpečnost výrobku. Nové potraviny jsou v první řadě zaměřeny na udržení přirozených vlastností potraviny, zvýšení skladovatelnosti výrobku, snížení nákladů a zachování bezpečnosti produktu [46, 48].

Nové technologie jsou zaváděny též v procesu balení, jako je použití modifikované atmosféry, způsob balení, aktivní obalové systémy, minimalizace obalových materiálů a nákladů. Stejně jako použití jedlých obalů na bázi škrobu a mléčných proteinů, zejména při balení ovoce, zeleniny a pekařských výrobků. Krom mléčných proteinů jsou jako bariéra proti mikrobiální kontaminaci a dalšímu mikrobiálnímu kažení potravin testovány také různé další rostlinné bílkoviny, sacharidy a vosky, s konečným cílem prodloužit trvanlivost a bezpečnost potravin. Tyto bariéry využívají imobilizované aktivní látky, enzymy, živé mikroorganismy, pro zvýšení jejich účinnosti. Další inovační technologií je také samotná enkapsulace specifických složek s přímou aplikací do potravin [46, 48].

Jedním z nejdůležitějších důvodů enkapsulace aktivních látek v potravinářském průmyslu je, jak již bylo zmíněno poskytnout lepší stabilitu dané enkapsulované látky v konečném výroku a v průběhu jeho zpracování, zabránění odpařování a rozkladu těkavých účinných látek, jako jsou aromatické složky, dále k maskování nepříjemné chuti, zvýšení stability a biologickou dostupnosti aktivních látek, zabránění reakce mezi aktivní složkou a ostatními složkami potravin a řízené uvolňování aktivních složek [2].

Enkapsulace má mnohostranné uplatnění nejen v potravinářském průmyslu při aplikaci ve funkčních potravinách, ale i ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Ve farmacii slouží různá částice jako nosiče léčiv, v kosmetických přípravcích se využívá zejména liposomů a jejich schopnosti prostupovat i přes neporušené povrchové struktury a vnášet aktivní látky do hlubších vrstev kůže. Díky své povaze jsou liposomy navíc schopny hydratace, napomáhají tak ke snížení suchosti kůže, což představuje hlavní příčinu jejího stárnutí. Liposomy se v kosmetice používají jako nosiče hydrofilních i hydrofobních látek. Do vnitřního vodného prostoru tak lze enkapsulovat například vitamín C, či vitaminy skupiny B. Do lipidové dvojvrstvy mohou být dále zabudovány například vitaminy A, E, kyselina γ -linolenová, koenzym Q10, různé esenciální oleje a další. Většina výrobků s liposomy jsou pleťové krémy proti stárnutí. Opalovací krémy, parfémů, vlasové kondicionéry, přípravky po holení a další, množství těchto výrobků na trhu se neustále zvyšuje. Liposomy však v posledních letech nacházejí své uplatnění hlavně v případě cíleného transportu léčiv a diagnostice [49].

2.4.1 Enkapsulace vitaminů a antioxidantů

V potravinářském průmyslu je hlavním cílem enkapsulace ochrana vitaminů a aktivních látek před nepříznivým vlivem okolního prostředí při skladování a zejména při průchodu trávicím traktem, čímž je umožněno jejich řízené uvolňování a tím i zvýšení jejich biologické dostupnosti. V případě polyfenolů lze také použít k maskování jejich mnohdy nepříjemné svíravé chuti [2, 5, 50, 51]. Rostoucí zájem při tvorbě nosičů k ochraně a řízenému uvolňování biologicky aktivních sloučenin, jako jsou například mastné kyseliny, fytosteroly, flavonoidy, karotenoidy, vitaminy apod., se rozvíjí nejen v oblasti potravin ale i v kosmetickém průmyslu a v biomedicině [48]. Hlavním cílem je tedy zabránit fyzikální nebo chemické degradaci v průběhu skladování, a doručit je na vhodné místo působení, zároveň by částice pro potravinářské a zejména nápojové produkty neměly nepříznivě ovlivnit jejich vzhled, stabilitu, texturu, nebo chuť [48, 52, 53]. Vzhledem k rostoucí poptávce po výrobcích s vysokou nutriční hodnotou se potravinářský průmysl snaží rozvíjet funkční potraviny obohacené o vitamíny a další aktivní složky. Velmi významnou skupinou v rámci těchto funkčních potravin, jsou produkty obsahující ω - 3 a ω -6 mastné kyseliny, vitaminy a další antioxidanty. Vitaminy mají důležité funkce v některých metabolických procesech v lidském těle. Vitamin E například chrání buněčné membrány a další lipidy před oxidačním poškozením. Další antioxidant - vitamin C udržuje hodnoty oxidačně - redukčního potenciálu, inhibuje tvorbu nitrosaminů, účastní se syntézy kolagenu, je enzymatický kofaktor atd. Nicméně, přidat vitaminy do vodné potraviny a zachovat při tom jejich účinnost není jednoduchý problém. Většina vitaminů na vzduchu či světle snadno oxiduje a svoji účinnost ztrácí i při zvýšené teplotě. Vhodným řešením je enkapsulace těchto vitaminů do liposomů. Liposomy podporují ochranu a aktivitu vitamínu, navíc umožňují řízené a cílené uvolňování aktivních složek [54].

Také polynenasycené mastné kyseliny, jako je kyselina linolenová ($\omega - 3$) a kyselina linolová ($\omega - 6$), byly enkapsulovány do liposomových struktur. Výzkumy z posledních let ukazují, že mastné kyseliny jsou prospěšné mimo jiné v prevenci kardiovaskulárních chorob, schizofrenie a rakoviny [54].

2.4.1.1 Hydrofilní látky

Jednou z hlavních skupin aktivních látek s možností enkapsulace do potravin jsou různé hydrofilní antioxidanty a provitaminy či vitaminy. Antioxidanty jsou látky bránící oxidaci, čímž prodlužují trvanlivost potravin. Typickým zástupcem je kyselina gallová, která je používána jako model pro enkapsulaci fenolických látek [55]. Enkapsulována byla kyselina gallová například metodou lyofilizace, jako nosiče byly použity chitosan, xantan a cyklodextrin. Při enkapsulaci nedocházelo ke ztrátě antioxidační aktivity, přičemž nejvyšší enkapsulační účinnosti bylo dosaženo při použití chitosanu [55]. Pro enkapsulace polyfenolů, flavonoidů, katechinů a dalších ve vodě rozpustných aktivních složek (např. kofein, vitaminy) s aplikací do potravinářského průmyslu se hojně využívá metoda sprejového sušení. Jako nosiče se nejčastěji používá škrob, maltodextrin a chitosan. Další metodou je koacervace, kde se používá želatina, arabská guma, gluten, dextran, karagenan, karboxymethylcelulosa, polyvinylalkohol a sojové proteiny. Některé druhy liposomů a metoda kokrytalizace jsou taktéž využívány k enkapsulacím těchto aktivních složek. K přípravě práškových forem s imobilizovanou aktivní složkou byl použit také pullulan v metodě lyofilizace [5]. Nanočástice s enkapsulovanými vitaminy mají slibný potenciál pro zvýšení trvanlivosti výrobků a jejich dostupnosti v biologických systémech [56]. Vhodným materiálem k enkapsulaci vitamínu C je přírodní polymer chitosan, který byl použit k ochraně vitamínu před nepříznivým vlivem okolního prostředí zejména při průchodu trávicím traktem [57]. Svě uplatnění nalézá vitamin C i v kosmetickém průmyslu. V kosmetice se nejčastěji využívá jako bělicí činidlo. Kyselina L-askorbová je však velmi nestabilní, a proto se častěji používají její deriváty, např. askorbyl-2-fosfát hořečnatý nebo askorbyl-6-palmitát. Díky svým antioxidačním účinkům se vitamin C rovněž využívá k ochraně tkáně a buněk před oxidačním poškozením [58]. Vitamin C a jeho deriváty také ovlivňují syntézu kolagenu, pomáhají tak udržovat pružnost pokožky a napomáhají rozjasnit a opravit poškozenou kůži [59]. Stejný aplikační potenciál nalezneme i v případě různých polyfenolů, které se používají s cílem ochrany kůže před oxidačním stresem, předčasným stárnutím nebo před kožními nemocemi [60]. Díky polyfenolům se navíc lépe absorbuje a udržuje vlhkost, pokožka je tedy dostatečně hydratována a zpomaluje se proces jejího stárnutí. Navíc ji chrání i před slunečním zářením [61]. Nově se navíc rozvíjejí trendy koenkapsulace s cílem dosažení synergických efektů [2, 5]. Další možností fortifikace potravin je například železo. Nedostatek železa je v dnešní společnosti velmi rozšířen. Problém bývá krátkodobě řešen suplementací tabletami. Z důvodu technologických problémů, jako jsou organoleptické vlastnosti a reaktivita železa, nebyla tato fortifikace možná. Tyto problémy však našly řešení ve formě enkapsulace sloučenin železa například do liposomů [62].

2.4.1.2 Hydrofobní látky

Výběr vhodné techniky určuje charakteristiku částic jako je morfologie, náboj, prodyšnost či enkapsulační účinnost. V potravinářském průmyslu se pro enkapsulace vitaminů rozpustných v tucích vymezi dva hlavní technologické směry - využití i) lipidových a ii) polymerních částic (chitosan, dextran, kasein, polymléčná kyselina, polyetylglykol, polyvinylalkohol, atd.) [50, 51].

Lipidické částice lze připravit několika postupy. Avšak pouze dvě základní techniky mají předpoklady k produkci ve velkém měřítku s aplikací do potravin. Jedná se o homogenizaci za horka nebo za chladu. V horkém homogenizačním metodě je lipidický nosič roztaven při teplotě přibližně o 5 až 10°C vyšší než je bod tání. Bioaktivní hydrofobní složka je rozpuštěna v roztaveném lipidu a následně je směs dispergována ve vodném roztoku a za využití vysokotlakého homogenizátoru a homogenizována za vzniku O/W emulze [63].

Pro složky citlivé na teplo se využívá chlazené homogenizace, při které dochází k rekrystalizaci směsi lipidů a aktivních složek za vzniku pevných lipidových nanočástic. Takto vzniklé částice se posléze homogenizují za laboratorní teploty [63]. Jak již bylo zmíněno, lipidové částice jsou nejčastěji připravovány pomocí homogenizace. Proces homogenizace určuje charakteristiku částic, která je silně ovlivněna jeho parametry (tlak, teplota, doba homogenizace atd.). Nevýhodou této metody je vyšší teplota ohřevu, která podporuje degradaci labilní aktivní látky, jako je například b- karoten. Při homogenizaci za nižší teploty nedochází k degradaci, částice však jsou o něco větší. Složení nosiče je také jedním z klíčových parametrů při kontrole vlastnosti a struktury částic [64].

Jedním z nejčastěji průmyslově používaných procesů k enkapsulaci hydrofobních vitaminů a aktivních látek je enkapsulace do želatinových kapslí. Pro enkapsulaci zejména lipofilních vitaminů vyhovují i liposomové částice. Mají totiž schopnost výrazným způsobem zvýšit biodostupnost aktivních látek oproti jejich volné formě [2, 5]. Nicméně některé metody přípravy liposomů vyžadují pomocné látky, jako jsou rozpouštědla, která neumožňují použití v potravinách. Enkapsulace vitaminu do liposomů jsou však velmi vhodné při aplikaci do kosmetického a farmaceutického průmyslu. Naopak příprava částic pomocí emulze je vhodnou metodou pro aplikace aktivních látek do potravin, výhodou je nejen její použitelnost pro většinu průmyslových odvětví, ale také snadná a levná příprava. Používá se nejen k enkapsulaci hydrofobních látek (vitaminy, karotenoidy), ale také hydrofilních (např. polyfenolů). Připravené částice lze použít přímo v kapalném stavu, nebo je lze dále sušit a aplikovat v práškové formě. Také mechanické metody přípravy částic, jako sprejové sušení či extruze, jsou hojně využívány. Nicméně tyto metody jsou omezené z důvodu použití vysokého tlaku nebo teploty. Při enkapsulaci vitaminu pomocí sprejového sušení jsou proto využívány materiály jako jsou přírodní vosky, nebo lipidy, které umožňují práci při nižší teplotě (70 °C vstupní teplota, 40 °C výstupní teplota). Pro enkapsulaci hydrofobních látek jsou vhodným nosičem i cyklodextriny. Z důvodu nutného použití organických rozpouštědel je tato metoda vhodná pouze pro aplikace mimo potravinářství. Částice vznikají emulgací rozpuštěného polymeru a vitaminu v organickém rozpouštědle s vodou, následně je rozpouštědlo odpařeno [5, 50, 51].

Vitaminy A, D, E, K a karotenoidy jsou sloučeniny rozpustné v tucích, které se přirozeně vyskytují v potravinách nebo jsou používány jako pomocné látky v různých průmyslových odvětvích, jako je kosmetika, farmacie nebo potravinářství. Vitamíny jsou velmi citlivé molekuly k nepříznivému okolnímu prostředí. Enkapsulace představuje slibný postup k jejich ochraně a zachování tak jejich přirozených vlastností v průběhu času. V potravinářském průmyslu, jsou karotenoidy, ale i kurkumin, používány i jako barviva, a enkapsulace přináší vhodné řešení pro zvýšení jejich stability a tím stabilizaci barvy v potravině [50, 51].

Karotenoidy jsou přírodní pigmenty přirozeně syntetizované řadou mikroorganismů a rostlin. Nejrozšířenějším ze všech karotenoidů je b-karoten, který je nerozpustný ve vodě a mírně rozpustný v oleji při laboratorní teplotě. Proto je jeho začlenění do potravinářských matic obtížné. Karotenoidy jsou také nestabilní v přítomnosti světla, kyslíku a tepla. Stabilita, manipulace a biologická dostupnost těchto sloučenin může být však výšena pomocí enkapsulace. K enkapsulaci karotenoidů je vhodná například metoda nanoemulsifikace, vysokotlaké homogenizace, koacervace a použití různých lipidových částic, například liposomů [52].

Vitamin E je hojně využíván v potravinářském, farmaceutickém, i kosmetickém průmyslu. Některé studie uvádějí, že biologická dostupnost vitaminu E může být zvýšena, pokud je dodáván v koloidní formě. Vitamin E je nestabilní vůči oxidaci v mnoha potravinářských výrobcích a ke značným ztrátám dochází během zpracování i skladování. Pro jeho enkapsulaci se nejčastěji využívá metoda homogenizace pracující na principu vzniku emulze (např. olej ve vodě), pro zmenšení velikosti částic je vhodné použití povrchově aktivních látek [52].

Vitamin D byl úspěšně enkapsulován do polymerních nosičů, například kombinace chitosanu a sojových proteinů. Ale také do liposomů při aplikaci v mlékárenském průmyslu kde byla takto zvýšena jeho stabilita v mléce [25, 65]. Enkapsulací vitaminů tak můžeme získat preparáty, které vykazují vyšší stabilitu ve fortifikovaných potravinách a tím podporují jejich dostatečný příjem [5].

2.4.2 Enkapsulace kofeinu

Kofein je přírodní alkaloid přítomný v různých množstvích v semenech, listech a plodech více než 63 druhů rostlin rostoucích na celém světě. Nejznámější výskyt je v kávových zrnech, kakaových bobech, guaraně, čaji, liánách a kole [66].

Kofein je zřejmě nejvíce konzumovaná psychoaktivní látka na světě. Nejčastěji je kofein přijímán do organismu ve formě extraktů ze semen kávovníku a listů čaje, ale také z různých potravin a nápojů obsahujících produkty získané z kola ořechu [67]. U lidí kofein zvyšuje fyzický výkon a vytrvalost tím, že přímo podporuje centrální nervový systém. Kofein zvyšuje bdělost, schopnost soustředit se, řešit problémy, a dodává pocit "energie", pozvedá náladu a zmírňuje úzkost [68]. Proto se nápoje obsahující kofein jako káva, čaj, nealkoholické nápoje a energetické nápoje těší velké oblibě [66]. Kofein je hojně používán i sportovci ke zvýšení výkonu. Je využíván také jako lék, a tona základě jeho účinku na respirační, kardiovaskulární a centrální nervový systém. Například kofein společně s aspirinem je součástí některých přípravků k léčbě bolesti hlavy [69].

Kofein v dostatečně vysokých dávkách je toxický, ale běžná spotřeba nepředstavuje žádná zdravotní rizika. Naopak několikaleté studie účinku kofeinu prokázaly mírný ochranný účinek proti některým chorobám, včetně některých typů rakoviny [68, 69]. U některých lidí může také kofein způsobovat poruchy spánku, pokud je konzumován zejména ve večerních hodinách, ale tyto účinky jsou výrazně individuální [66].

Nejnovější trendy ve vývoji nápojů jsou zaměřeny na dosažení pozvolného uvolňování kofeinu z nápojů do lidského organismu. Jedním z těchto způsobů je enkapsulace do požitelných organických mikro- a nanočástic s řízeným uvolňováním. Vhodnou metodou enkapsulace kofeinu, stejně jako v případě enkapsulace vitaminů, je příprava liposomů. Další vhodné metody jsou emulzifikace, koacervace, extruze a tvorba polymerních kapslí, nevýhoda těchto metod je příprava částic větší velikosti, což neumožňuje jejich aplikaci do čirých nápojů. Enkapsulovaný kofein však nachází své uplatnění nejen v potravinářství, ale i v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu [5, 54, 70].

V kosmetickém průmyslu je kofein používán díky své biologické aktivitě a schopnosti proniknout přes kožní bariéru. Mezi nejvíce používané kosmetické produkty s obsahem kofeinu patří denní nebo noční krémy, zeštíhlující krémy, krémy proti celulitidě nebo stárnutí kůže a také vlasové šampóny. Koncentrace proniknutí kofeinu do lidského těla však záleží na době absorpce, tedy přímého působení kosmetického produktu na lidské kůži. Zřejmě nejčastěji se účinku kofeinu v kosmetice využívá v produktech zabraňující vznik celulitidy, tzv. pomerančové kůže, protože zamezuje hromadění tuků v buňkách. Využívá se nejen čistá forma kofeinu, ale i jeho enkapsulovaná varianta. Například v kosmetice proti celulitidě je používán kofein v alginátových částicích. Kofein má také silné antioxidační účinky, které pomáhají chránit buňky proti UV záření a které navíc zpomalují stárnutí pokožky. Také podporuje růst vlasů a inhibuje aktivitu enzymu 5- α -reduktasy, který zodpovídá za vypadávání vlasů [71, 72].

2.4.3 Enkapsulace antibakteriálních látek

Mnohá z dostupných antimikrobiálních látek z důvodu zvyšující se rezistence patogenních mikroorganismů ztrácejí svou účinnost. Vzhledem k tomu, že bezpečnost potravin je významným směrem potravinářského průmyslu, získává aplikace dalších antimikrobiálních složek a především peptidů stále větší pozornost. Antimikrobiální peptidy jsou produkovány řadou mikroorganismů z řad prokaryontních i eukaryotních organismů, přičemž jejich antimikrobiální účinky souvisí s několika různými mechanismy, jako je například narušení buněčné stěny nebo membrány [73].

Také bakterie mléčného kvašení, které jsou široce používány pro výrobu fermentovaných potravin a do značné míry přispívají k chuti, textuře a celkové charakteristice těchto výrobků, jsou producenty antibakteriálních látek, tzv. bakteriocinů. Proto tyto organismy zlepšují bezpečnost a trvanlivost potravin [73, 74].

Bakteriociny jsou tedy peptidy produkované bakteriemi, vykazující antimikrobiální vlastnosti. Jde obvykle o kratší peptidy, např. nisin se skládá z 34 aminokyselin. Všechny bakteriociny jsou aktivní zejména vůči gram pozitivním bakteriím, jelikož gramnegativní bakterie mají odolnější buněčnou stěnu, která jim poskytuje dostatečnou ochranu [75]. Antimikrobiální látky jsou hojně aplikovány do potravin pro zvýšení jejich bezpečnosti v případě, že nemohou být standardně sterilizovány. Tradičně jsou antimikrobiální přísady pro kontrolu růstu mikroorganismů a prodloužení trvanlivosti výrobků přidávány přímo do potravin. Nicméně tento postup není vždy účinný, interakcí s potravinou dochází často k neutralizaci účinku antimikrobiální složky [76].

Bylo prokázáno že enkapsulace antimikrobiálních látek je účinný nástroj k inhibici kontaminace potravin a rozvoji patogenních organismů. Například enkapsulací nisinu byla zvýšena jeho stabilita, účinnost, doba působení a distribuce v potravinové matrici [27, 74, 75, 77], přičemž nejvíce prostudovanou technikou je příprava liposomů [25, 27, 78].

Nisin je antimikrobiální peptid produkovaný bakteriálním kmenem *Lactococcus lactis subsp. lactis*, je považován za bezpečný a z důvodu netoxicity pro člověka je schválen WHO již od roku 1967 jako konzervační látka vhodná pro potravinářské aplikace [71, 78, 79].

Další známou antimikrobiální látkou je lysozym, enzym patřící do skupiny hydrolas, známý pro své významné antibakteriální účinky především na gram-pozitivní bakterie. Jde o enzym vyskytující především v některých tělesných sekretech, velký obsah lysozymu má také vaječný bílek. Díky své bezpečnosti je také schválen jako aditivum vhodné pro potravinářské aplikace [80].

V posledních letech byla pozornost zaměřena především na imobilizaci antimikrobiálních látek v požitelných obalech. Byly připraveny například jedlé povlaky z celulosy, chitosanu a syrovátkové bílkoviny s imobilizovaným lysozymem, nebo povlaky s kyselinou polymléčné a pektinu s enkapsulovaným nisinem, kde byla prokázána dostatečná antimikrobiální aktivita pro dlouhodobé skladování potravin. Také enkapsulace antimikrobiálních látek ve formě liposomů a za využití polymerních nosičů (želatina, karboxymethylcelulosa, chitosan, syrovátkové proteiny, škrob, alginát, polyvinylalkohol) jsou vhodnými metodami k řízenému uvolňování těchto látek a zabezpečení stálého působení účinné hladiny antimikrobiální látky po požadovanou dobu [76, 81, 82, 83, 84]. Lysozym byl například úspěšně enkapsulován do částic na bázi škrobu, kdy bylo pomocí amylas dosaženo řízeného uvolňování. Systém je tak plně funkční k patogenním gram-pozitivním bakteriím produkujícím amylasy. Záporně nabitý škrob lze snadno použít k enkapsulaci řady dalších kladně nabitých antimikrobiálních látek [80].

V posledním desetiletí se objevuje rostoucím zájmem rovněž o přírodních antioxidanty, především na bázi fenolických sloučenin [85]. Polyfenoly, sekundární metabolity všech vyšších rostlin, hrají důležitou roli při obraně proti rostlinným patogenům a dalších nepříznivých podmínkách. Mohly by tedy představovat zdroj antimikrobiálních látek proti rezistentním patogenům [86].

Extrakty z rostlin byly z hlediska jejich antibakteriální aktivity testovány mnoha výzkumnými skupinami [87, 88]. Některé studie navíc uvádějí, že byl prokázán synergický efekt proti rezistentním kmenům v případě použití přírodních flavonoidů a jiných antibakteriálních látek [89].

Mezi biologické vlastnosti polyfenolů mimo antimikrobiální aktivity patří antioxidační aktivita a protizánětlivé účinky. Proto v posledních letech narůstá zájem o použití těchto rostlinných složek nejen v potravinářském průmyslu, ale rovněž pro hojení ran. Hojení ran je složitý proces, který zahrnuje tři hlavní překrývající etapy; záněty, růst buněk a tvorba kolagenové mřížky. Zánět je základní fyziologický proces, společné u všech ran. Zánětlivá fáze může být zkrácena zabráněním kolonizování ran bakteriemi [90, 91].

Antimikrobiální látky a antibiotika se proto tradičně používají k těmto hojení ran a léčbě různých kožních onemocnění [90].

Mnohé z antimikrobiálních látek dostupných na trhu, mají však potíže při transportu přes buněčné membrány a vykazují nízkou intracelulární aktivitu, což vede ke snížení jejich účinnosti. Enkapsulace především do liposomů však zlepšuje dostupnost těchto aktivních látek a rovněž přináší možnost řízeného uvolňování, či transport látek přímo do buněk [90].

Antimikrobiální látky nalézají bohaté použití i ve farmacii a ve formě různých výživových doplňků a terapeutických aplikací. Například u antimikrobiálních doplňků lze enkapsulací dosáhnout zvýšení jejich biologické dostupnosti a účinnosti. Rovněž díky pozvolnému uvolnění lze dosáhnout déle trvajícího účinku ve srovnání s neenkapsulovanou variantou. Cílený transport a řízené uvolňování antimikrobiálních látek například pomocí liposomů je perspektivní v léčbě různých infekcí. Enkapsulované antimikrobiální složky lze tak využít jako alternativní výrobky k používaným antibiotikům. Enkapsulace nejen antimikrobiálních složek tak představuje nový systém podávání léku, který může nabídnout významné terapeutické výhody oproti stávajícím metodám dodávání léčiva [90, 92].

2.4.4 Enkapsulace a imobilizace enzymů

Enzymy jsou bioaktivní látky, které katalyzují složité a specifické chemické reakce. Kromě těchto nesporných výhod mají enzymy také řadu nevýhod. Jsou to především vysoké náklady na izolaci a purifikaci enzymů, jejich vysoká nestabilita a nízká aktivita v jiných než optimálních podmínkách. Proto byly navrženy postupy k ochraně enzymů před nepříznivým vlivem okolního prostředí, popřípadě pro opakované použití těchto enzymů. Nejvhodnější technikou je imobilizace enzymů, kdy je dosaženo fixace těchto enzymů na povrch nebo uvnitř nosiče. Výzkumy ukazují, že imobilizované enzymy jsou odolnější než enzymy volné. Další jejich výhodou může být jednoduchá separace od produktu, vícenásobné použití a možnost využití v kontinuálním procesu [14].

Enzymy mohou být imobilizovány různými fyzikálními a chemickými způsoby. Mezi fyzikální metody patří enkapsulace, adsorpce, zachycením v gelu, mikroenkapsulace s pevnou nebo kapalnou membránou. Mezi chemické metody patří kovalentní vazba na nerozpustnou matici a zesítní. Žádná metoda není nejlepší a vhodná pro všechny enzymy a jejich využití, a to z důvodu velmi odlišných chemických vlastností a složení jednotlivých enzymů. Kromě toho všechny metody mají své vlastní výhody a nevýhody. Adsorpce je jednoduchá, levná, ale často málo účinná. Kovalentní vazba a zesítní má naopak vyšší účinnost, ale jejich nevýhodou je cena. Při mikroenkapsulaci zase dochází k problémům s difúzí [14].

Aplikace enkapsulovaných enzymů do potravinářského průmyslu nachází své uplatnění zejména v mlékárenství, kde byly například navrženy postupy k urychlení zrání sýrů za využití lipolytických a proteolytických enzymů enkapsulovaných do liposomů bez negativního vlivu na organoleptické vlastnosti produktu [93, 94].

Enzymy lze úspěšně enkapsulovat nejen do liposomů, ale také do polymerních nosičů jako je agar, agarósa, alginát, škrob, pektin, karagenan, xantanová guma a chitosan [9, 25, 94, 95]. Na rozdíl od syntetických polymerů, jako je polyakrylamid, jsou tyto matrice biokompatibilní, netoxické a poskytují přirozené mikroprostředí pro většinu enzymů [10, 95, 96].

Imobilizační a enkapsulační techniky mají důležitý význam pro udržení jejich stability, při jejich ochraně před nepříznivým okolním prostředím. Pro vyšší stabilitu a delší dobu úchovu se hojně používá také lyofilizace [10, 95, 96]. Lipasy společně s proteolytickými enzymy patří mezi nejatraktivnější a perspektivní enzymy pro potravinářský a farmaceutický průmysl [10].

V dalších studiích byla však pozornost zaměřena také na lignolytické enzymy s aplikací do nápojů k číření ovocných šťáv. K těmto enkapsulacím byly jako nosiče použity želatina, pektin a karboxymethylcelulosa [97]. Alginátové částice byly rovněž použity k enkapsulaci enzymů, tyto částice jsou však velmi porézní a jejich stabilita je většinou nízká, může tedy docházet k vyplavování enzymů. Této vlastnosti lze však využít k řízenému uvolňování [9].

Některé proteolytické enzymy se rovněž využívají v kosmetickém průmyslu například jako jedna z forem peelingu, díky jejich schopnosti hydrolyzovat peptidické vazby kolagenu a keratinu v rohové vrstvě kůže. Odstraňují tedy odumřelé kožní buňky a napomáhají tak přirozenému procesu obnovy lidské pokožky [98].

Ve srovnání s mechanickými (abraze pevnými částicemi) a chemickými (kyselina glykolová) peelings jsou enzymové přípravky výrazně šetrnější. Nejrozšířenějšími enzymy v peelingsových přípravcích jsou rostlinné proteasy papain a bromelain [98].

Použitím kosmetických prostředků obsahujících enzymy jako je superoxiddismutasu a peroxidasu je možné posílit ochranu pokožky před oxidativním stresem a zabránění tak jejímu poškození a tedy i jejímu stárnutí. Superoxiddismutasa a peroxidasa mají významný podíl na vychytávání volných radikálů. Přesněji superoxiddismutasa převádí nebezpečný superoxidový anion na peroxid vodíku, který je následně neutralizován peroxidasou. Kožní buňky přirozeně disponují tímto obranných mechanismů, avšak s věkem tyto ochranné mechanismy těla slábnou [99].

Dalším enzymem, který může zpomalit proces stárnutí pleti, je např. alkalická fosfatasa. Tento enzym stimuluje buněčný metabolismus a růst fibroblastů, čímž zabraňuje předčasnému úbytku kolagenu [100]. Kolagen je jedním z nejdůležitějších komponent lidské kůže. Množství kolagenových vláken v dermis definuje stav a vzhled pleti. Ztráta kolagenu způsobuje stárnutí pleti, které se projevuje ztrátou pevnosti a vznikem jemných linek a vrásek [101].

Obecně jsou kosmetické výrobky zabraňující stárnutí kůže označovány jako „*Anti-wrinkle*“ a „*anti-ageing*“ kosmetika. Enzymy nalezneme rovněž v přípravcích proti celulitidě. Tyto přípravky nejčastěji obsahují enzymatický komplex lipasy a hyaluronidasy. Účinek lipolytického enzymu se projevuje rychlejší hydrolyzou tuků uložených v buňkách tukové tkáně. Hyaluronidasa navíc hydrolyzuje fibroblasty, které jsou zodpovědné za zadržování nadměrného množství vody [98].

Enzymy se stávají rovněž součástí zubních past, ústních vod či žvýkaček především za účelem odstranění patogenní mikroflóry způsobující zubní plak a kazy. Některé zubní pasty obsahují amyloglukosidasu a glukosaoxidasu. Amyloglukosidasa štěpí škrob na glukosu a glukosaoxidasa využívá glukosu na glukonolakton a peroxid vodíku. Peroxid je dále peroxidasou ve slinách přeměněn na hypothiokyanát, což je velmi silné antibakteriální činidlo. Součástí takových výrobků někdy bývá i enzym lysozym. Lysozym hydrolyzuje buněčné stěny některých patogenních bakterií, které způsobujících plak a záněty dásní [98].

Proteolytické enzymy jsou však především díky svým vlastnostem široce využívány v procesu hojení ran. Enzymy mají schopnost odstraňovat nekrotickou tkáň, používají se při léčbě popálenin apod. Enzymatické čištění ran je ve srovnání s mechanickým a chemickým mnohem šetrnější a nepoškozuje zdravou tkáň. Gelové krytí obsahující proteolytické enzymy rovněž výrazně zkracuje dobu hojení a zároveň snižují riziko infekce. Nejčastěji používanými enzymy určenými k hojení ran jsou bromelain a kolagenasa [102].

Enzymy nalézají bohaté použití i ve farmacii. Nejčastější aplikací je enzymová substituční terapie. Principem enzymové substituční terapie je intravenózní dodání enzymů, jichž je v organismu kvůli genetické poruše nedostatek. Enzymu se tak využívá při podpoře trávení, kdy se pankreatické enzymové přípravky podávají jako suplementy deficitních trávicích enzymů. Tyto produkty obsahují směs trávicích enzymů amylas, lipas a proteas. Používají se pro zlepšení trávení upacientů s nedostatkem vlastních trávicích enzymů. Dále například při potížích s laktosovou intolerancí jsou podávány suplementy obsahující laktasu, případně podáním suplementů obsahujících některé peptidasy se snižuje závažnost imunitní reakce na protein gliadin při celiakii. Enzymy se podávají rovněž jako trombolytika. Trombolytika jsou léky používané k rozpouštění krevních sraženin a obnovení průchodnosti cév. Enzymy obsažené v takových přípravcích jsou streptokinasa, urokinasa a nattokinasa (serinová proteasa). Enzymy lze využít i jako antimikrobiální složky. Například lysozym, který se vyznačuje silnými antibakteriálními účinky, hydrolyzuje polysacharidové řetězce buněčných stěn bakterií. Používá se při léčbě některých infekčních onemocnění podobně jako i chitinasy, které štěpí chitin který je součástí buněčné stěny mnoha patogenních mikroorganismů [102].

2.4.5 Enkapsulace a imobilizace buněk

Dle definice je imobilizace buněk technika používaná k fyzikální nebo chemické fixaci buněk na pevný povrch nebo jejich zadržení membránou za účelem zvýšení jejich stability a umožnění jejich opakovaného nebo kontinuálního používání. Imobilizaci buněk můžeme podle typu imobilizovaných buněk rozdělit na imobilizace živých buněk, mrtvých buněk a spor [6].

Při imobilizaci mrtvých buněk dochází ke stabilizaci vnitřní struktury buněk, takže současně dochází k usmrcení buněk, ale například aktivita jejich enzymů je zachována. Nevýhoda těchto imobilizací je jejich značně obtížná příprava. Častěji se používá imobilizace živých buněk na nejrůznějších pevných nosičích, jednak na jejich povrch, ale i do jejich vnitřní struktury. Zejména pak do přírodních polymerních materiálů a membrán [6, 103], jejichž výhodou je biokompatibilita a nízká cena [2].

Imobilizace buněk se používá v průmyslu již řadu let. K výhodám imobilizace buněk ve srovnání s volnými buňkami patří vyšší hustota buněk, menší velikost reaktoru, kratší doba kultivace, snazší separace produktů, lepší využití substrátu, opětovné použití buněk, kontinuální výroba, nižší riziko kontaminace a nižší náklady. Dalšími výhodami jsou možnost vytvoření příznivého prostředí pro buňky, zvýšení jejich stability a ochrany před mechanickým poškozením a nepříznivým vlivem okolního prostředí jako je například pH, teplota, přítomnost organickým rozpouštědel, či toxických látek [6, 104, 105].

Naopak problémem imobilizace buněk může být náročnější difuze jak živin, tak i produktů, nebo narušení imobilizačních matic růstem buněk. Difuzi u většiny organických nosičů lze ovšem měnit modifikací různých polymerů nebo jejich zkombinováním. Například fosforečnan vápenatý použitý v kombinaci s κ -karagenanem lépe udržuje pH v kapslích, udržuje vyšší životaschopnost buněk, usnadňuje vstup produktů a také přispívá k větší hustotě a pevnosti kapslí [8, 20, 106, 107]. Pro zvýšení stability narušené růstem buněk se pak používá potažení kapslí dalším polymerem s vhodnými vlastnostmi. Například alginátové kapsle, u kterých dochází k vyššímu uvolňování buněk, se potahují vrstvou chitosanu, nebo polyvinylalkoholu. Dochází tak k zvýšení mechanické odolnosti a snížení počtu uvolněných buněk [7, 16].

Imobilizované buňky jsou nejčastěji připravovány ve formě sférických kapslí, které lze rozdělit na dvě skupiny na základě jejich velikosti na makro-enkapsulace a mikro-enkapsulace. Makro-enkapsulace je technika zachycení buněk v polymerních kapslích o velikosti v rozsahu od několika milimetrů až centimetrů. Na druhé straně, mikro-enkapsulací jsou připraveny částice v rozmezí velikostí 1-1000 μm . V případě makro-enkapsulace jsou popsány případy nižší životaschopnosti buněk ve středu částice, vzhledem k vyčerpání živin z důvodu nižší účinnosti difuze. Proto se nachází buňky u větších kapslí při povrchu částice. U mikro-enkapsulace je dosažena vyšší životaschopnost buněk v celém objemu částice, kromě toho také mají tyto částice vyšší mechanickou stabilitu [108].

V posledních letech byla testována rovněž řada dalších metod jako extruze, koacervace, sprejové sušení, emulgace a další [108]. Průmyslově se využívá zejména chemické imobilizace adsorpcí především v případě produkce různých metabolitů [2, 6, 8, 109].

V současnosti se výzkumy zaměřují na optimalizaci metod pro zmenšení částic, zvýšení jejich stability, usnadnění řízeného uvolňování a udržení adekvátní biologické dostupnosti a životaschopnosti enkapsulovaných buněk [110].

V potravinářském průmyslu je imobilizace buněk využívána především v mlékárenském a masném průmyslu, a to zejména při ochraně probiotických kultur. Dále se technologie imobilizace buněk používá například při výrobě piva, vína a alkoholu [2].

Technologie imobilizace buněk je většinou zaměřena na monokulturu, postupem času se však začínají zkoumat i výhody imobilizace směsných kultur. Vybrané mikroorganismy tak mohou využívat svých doplňkových metabolických drah a navzájem se podporovat [111].

2.4.5.1 Enkapsulace probiotických bakterií

Probiotika jsou definovány Světovou zdravotnickou organizací (WHO) jako živé mikroorganismy, které mají při podání v přiměřeném množství přínos pro lidské zdraví [112, 113]. Nejdůležitějšími probiotickými mikroorganismy jsou rody *Lactobacillus* a *Bifidobacter* [114].

Nejnámějšími probiotiky z rodu *Bifidobacter* jsou zejména *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. infantis* a *B. breve*, z *Lactobacillus* je to především *Lactobacillus acidophilus*. Nicméně, mezi probiotika patří také bakterie mléčného kvašení, zejména rody *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* a *Streptococcus* [115]. Výčet probiotických mikroorganismů je však daleko bohatší a obsahuje další bakteriální rody a druhy, jako je rod *Bacillus*, *Propionibacterium*, či *Clostridium butyricum*, ale také kvasinky, například *Saccharomyces cerevisiae* [115].

U probiotických buněk je nesmírně důležitá především jejich životaschopnost, protože probiotika mohou poskytnout blahodárné účinky na lidský organismus, jako je zachování zdravé střevní mikroflóry, zamezení růstu patogenních bakterií, stimulace imunitního systému, zlepšení vstřebávání vápníku, či syntézy vitaminů a antimikrobiálních látek, pouze pokud zůstávají v dostatečné míře naživu až do místa jejich působení ve střevě [113, 116].

V současné době jsou probiotika zásadní složkou funkčních potravin, a to zejména v mléčných výrobcích. Tyto buňky je nutné ochránit nejen při průchodu trávicím traktem ale rovněž před nepříznivým vlivem okolního prostředí při zpracovávání a skladování potravin [2,3, 113, 117, 118]. Důležitým faktorem je výběr vhodné enkapsulační techniky, aby bylo dosaženo vysoké efektivity, snadné přípravy, vhodné textury a chuti. Mezi nejčastější enkapsulované mikroby patří kmeny rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacter* [2, 3, 119]. Materiály pro zapouzdření probiotických buněk jsou alginát, gellan, albumin, pektin, želatina, kolagenu, kasein, xanthan, chitosan, škrob, celulóza, karagenan, želatina, mléčné proteiny a další [33, 113, 118, 120, 110].

Probiotické bakterie jsou začleněny do širokého sortimentu potravin, včetně mléka a mléčných výrobků (např. jogurt, sýr, zmrzlina, mléčné dezerty), ale také do nemléčných výrobků (např. čokoláda, cereálie, džusy) [3, 115, 120]. Další možností je podávání probiotik ve formě kapslí, lyofilizovaných, popř. sušených preparátů. Ve všech produktech je vždy třeba řešit problematiku zachování počtu živých buněk až do konce expirační doby [3, 17, 43, 121, 122, 123].

2.4.5.2 Rod *Lactobacillus*

Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou grampozitivní nesporeující tyčky. Rod obsahuje fakultativně anaerobní nebo mikroaerofilní nepohyblivé bakterie mléčného kvašení fermentující glukózu a laktózu, přičemž hlavním výchozím výrobkem této fermentace je kyselina mléčná, octová, ethanol a CO₂. Nacházejí se ve fermentovaných materiálech a výrobcích. Teplotní rozsah pro růst tohoto rodu je široký, pohybuje se mezi 15°C – 45°C, závisí na druhu bakterií, optimálně mezi 30-40 °C. Řada z nich je součástí přirozené mikroflóry člověka. Optimální pH pro rod je 4,5 až 6,4. Rod je náročný na přítomnost živiny v médiu, kromě laktózy a glukózy také potřebuje aminokyseliny, nukleotidy a některé vitamíny. V potravinářství se používají z důvodu produkce kyseliny mléčné, která snižuje pH v daném prostředí a tím brání množení hnilobných a patogenních bakterií. Rod *Lactobacillus* je schopný produkce řady látek včetně látek s antimikrobiálním účinkem. V průmyslu se používají nejvíce rody *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *Lactobacillus lactis* a *Lactobacillus casei*.

Obecně rod *Lactobacillus* dělíme do tří základních skupin: první skupinou jsou obligátně homofermentativní laktobacily, u kterých je konečným produktem fermentace hexóz kyselina mléčná; mezi zástupce této skupiny patří např. *L. acidophilus* a *L. helveticus*. Do druhé skupiny patří fakultativně heterofermentativní bakterie, konečným produktem fermentace hexóz je zde kyselina mléčná nebo směs kyselina mléčná, mravenčí, octová a ethanol, a konečným produktem fermentace pentóz je pak kyselina mléčná a octová. Mezi zástupce této skupiny patří např. *L. fermentum*. [115, 124, 125, 126].

Poslední skupinou jsou kmeny obligátně heterofermentativní, u kterých je konečným produktem fermentace hexóz kyselina mléčná, octová, ethanol a CO₂, a konečným produktem fermentace pentóz kyselina mléčná a octová. Mezi zástupce této skupiny patří např. *L. casei* a *L. plantarum* [125, 126].

2.4.5.3 Rod *Bifidobacter*

Bifidobakterie jsou součástí přirozené mikroflóry trávicího traktu člověka. Řadí se do skupiny bakterií označovaných jako GRAS. Jsou součástí řady fermentovaných mléčných výrobků. Bakterie rodu *Bifidobacterium* jsou chemoorganotrofní, tvarově různorodé, nesporulující, nepohyblivé tyčinky. Objevují se jak jednotlivě, tak i v řetězcích nebo hvězdovitě uspořádání. Bifidobakterie jsou grampozitivní anaerobní bakterie. Ačkoliv se dá rod považovat za striktně anaerobní, vyskytují se druhy, které jsou za přítomnosti určitého množství CO₂ nebo bifidogenních faktorů schopny snášet přítomnost O₂ v prostředí. Teplotní optimum pro tento rod je v rozmezí 37°C až 41°C, minimum je okolo 28°C, maximum okolo 43°C. Optimální hodnoty pH jsou v rozmezí mezi 6,5 a 7. Rod *Bifidobacterium* štěpí fermentovatelné sacharidy na kyselinu mléčnou a octovou. V současnosti je v rámci rodu *Bifidobacterium* určeno 38 bakteriálních druhů, z nichž je šest využíváno pro své probiotické vlastnosti. Jako probiotické kultury se používají především rody *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium thermophilum* a *Bifidobacterium infantis* [115, 124, 125, 126].

2.4.6 Využití anorganických nanočástic

V kosmetickém a farmaceutickém průmyslu mimo organické částice nalézají své uplatnění i částice anorganické. Anorganické nanočástice mohou být připraveny použitím různých metod. Můžeme tedy připravit částice o požadované velikosti a tvaru a tím tak docílit požadovaných chemických a fyzikálních vlastností. Mezi nejrozšířenější typy anorganických nanočástic patří nanočástice zlata a stříbra. Nejčastěji používaná metoda pro přípravu těchto částic je chemická metoda. Princip této metody je založen na nukleaci na počátečním pevném bodu a následném růstu kovových částic. Tento proces je řízen chemickou redukcí solí kovů. Ke kontrole růstu nanočástic a k ochraně před jejich agregací se používá různých stabilizátorů [127].

Kovové nanočástice se spontánně obalují proteiny. Dochází ke vzniku slabých vazebných interakcí mezi částicemi a -SH skupinami cysteinu, -NH(3)⁺ skupinami lyzinu. Adsorpce probíhá ve vodném koloidu, ke kterému je přidán patřičný protein rozpuštěný v odpovídajícím pufru. Stabilizační anionty či polymery jsou nahrazovány molekulami proteinu. Proteinový obal pak sféricky stabilizuje částice proti shlukování. Nedostatečně obalené částice se sráží roztokem soli. Přebytky proteinu mohou být odstraněny pomocí centrifugace modifikovaného koloidu. I přestože je síla vazebné interakce s částicemi velmi slabá, proteinový obal je poměrně stabilní. Bylo zjištěno, že při adsorpci enzymů může docházet k mírnému poklesu aktivity vlivem drobných konformačních změn, ovšem enzym si stále zachovává dostatečnou aktivitu. Na kovové nanočástice lze však vázat nejen proteiny, ale rovněž celou řadu dalších aktivních látek jako jsou nukleové kyseliny, protilátky, fluorescenční sondy atd. Kovové nanočástice a především pak nanočástice zlata jsou tak široce využívány jako nosiče léčiv [127, 128, 129].

2.4.6.1 Zlaté nanočástice

Zlaté nanočástice jsou známé hlavně pro své biomedicínské a kosmetické aplikace. Zlaté nanočástice jsou nejdéle známé a využívané nanočástice. Mají široké uplatnění a představují relativně levný a netoxický materiál. Nanočástice se například používají v krémech na podporu tvorby kolagenu a zlepšení regenerace buněk. Koloidní nanočástice zlata však nachází své uplatnění především v oblasti nanomedicíny, například při použití k cílenému transportu léčiv či diagnostice. Déle pak v oblasti biosenzorů, analytických testech, mikroskopii a mnoha dalších [129].

Syntéza nanočástic zlata se v průběhu času neustále zdokonaluje. Jedná se o různé druhy přípravy až po snahu o co nejlepší stabilizaci ve vodném roztoku. Dnes již existuje velké množství metod, jak připravit a modifikovat nanočástice zlata, což poukazuje na velké pokroky v tomto oboru. V posledních letech se nejvyšší pozornost obrací hlavně k lékařským aplikacím. Například protilátkou značené zlaté nanočástice mohou nalézt uplatnění v medicíně při léčbě nádorů [127, 129]. Nanočástice zlata lze využít také k přípravě hybridních částic, kdy jsou anorganické částice enkapsulovány do organických. Jednou z možností je například jejich enkapsulace do liposomů. Liposomy s enkapsulovanými zlatými nanočásticemi pak nacházejí své uplatnění při řízeném uvolňování aktivních složek v mnoha oblastech. V případě aplikace ve formě nosiče léčiv se stávají tyto hybridní částice stabilnější a biologicky více kompatibilní. [130, 131].

2.4.6.2 Stříbrné nanočástice

Nanočástice stříbra jsou známy především pro své antimikrobiální vlastnosti. Vlastnosti koloidního stříbra a jeho účinek jsou však pevně spjaty s velikostí částic. Čím je velikost částic menší, tím se antibakteriální vlastnosti stříbra stávají více efektivní. Rovněž nanočástice stříbra mohou být syntetizovány mnoha různými technikami, díky kterým vznikají nanočástice různých tvarů a velikostí. V medicíně nanočástice stříbra mnohdy nahrazují antibiotika, používají se například i jako součást obvazů a různých antibakteriálních povlaků. Nanostříbro je tak často obsaženo v desinfekčních gelech. Stejně jako zlaté nanočástice se rovněž nanočástice stříbra využívají k transportu léčiv a diagnostice [132, 133].

2.5 Testy ke stanovení antimikrobiální aktivity

K testování účinnosti antimikrobiální látky jsou užívány difuzní a diluční metody. Testování je prováděno pomocí mikroorganismů ve vhodných kultivačních médiích a za optimálních podmínek [134, 135].

2.5.1 Diluční metody

Diluční metody jsou metody vhodné pro kvantifikaci a stanovení hladiny MIC, tzv. minimální inhibiční koncentrace, což je nejnižší koncentrace, která viditelně inhibuje růst daného mikroorganismu. V některých studiích se používá i termín minimální baktericidní koncentrace MBC - nejnižší koncentrace antimikrobiální látky schopná testovaný mikroorganismus usmrtit. Diluční metody tak poskytují přesnější informace o množství a účinku látky vykazující antibakteriální efekt. Podstatou metody je přidání přesného množství testované látky do kultivačního média. Antimikrobiální látky lze přidávat do pevných i tekutých médií. Po zaočkování a kultivaci se hodnotí růst, respektive absence růstu mikroorganismu [76, 84, 134, 135].

2.5.1.1 Agarová diluční metoda

MIC se zjišťuje v agarovém médiu obsahujícím zvolené koncentrace antimikrobiální látky. Standardní inokulum vyšetřovaných bakterií je nanášeno na povrch agarových medií. Po inkubaci hledáme nejnižší koncentraci antimikrobiální látky, která inhibuje růst daného kmene. Agarová diluční metoda je metodou referenční sloužící k hodnocení nových antimikrobiálních látek, je však pracná a ekonomicky náročná [134, 135].

2.5.1.2 Bujónová diluční metoda

Do řady zkumavek či do mikrotitrační destičky s kultivačním médiem obsahujícím sestupnou koncentraci antimikrobiální látky se očkuje inokulum testovaného kmene. Po dané době inkubace se jako MIC hodnotí nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, kde není patrný růst mikroorganismu, tj. nevznikl zákal nebo sediment vyjadřující růst mikroorganismu [76, 84, 134, 135].

Hodnocení lze provést vizuálně, další možností je turbidimetrické stanovení, měření absorbance nebo přímé stanovení počtu buněk například pomocí počítačích komůrek či průtokové cytometrie [134, 135].

2.5.2 Difuzní metody

Difuzní metody jsou často používány díky jejich jednoduchosti a rychlosti. Principem těchto metod je difúze antimikrobiální látky ze zdroje do okolí. Tímto vzniká klesající koncentrační gradient, který zabrání růstu mikroorganismu do vzdálenosti účinné inhibiční koncentrace (tzv. inhibiční zóna). Difuzní metoda se provádí na pevných půdách, na jejich povrchu jsou naočkovány mikroorganismy [134, 135].

2.5.2.1 Difúzní disková metoda

Tato jednoduchá metoda je založena na difúzi antimikrobiální látky z papírového disku do agarové půdy. Agar je naočkován stanovenou koncentrací testovaného mikroorganismu. Absorpcí vody z půdy dochází k rozpouštění látky a její následné difúzi do média. Kolem disku vzniká koncentrační gradient účinné látky inhibující růst mikroorganismu. Vzniká tzv. zóna inhibice, jejíž průměr a naměřená hodnota se srovnává. Diskovou difuzní metodou lze zjistit i účinné koncentrace antimikrobiální látky. V tomto případě jsou disky napuštěny různými koncentracemi testované látky [76, 84, 134, 135].

2.5.2.2 Agarová difúzní metoda

Princip metody je obdobný jako u diskové difuzní metody. Rozdíl spočívá v aplikaci antimikrobiální látky. Látka se přímo pipetuje do hloubených jamek v agarovém médiu [134, 135].

2.5.3 Epsilon test (E-test)

Metoda kombinující difuzní i diluční metodu je podobná diskové difuzní metodě, ale lze s ní stanovit i hodnotu MIC. Metoda je však pracnější a finančně náročná. Na agar, na němž je naočkován testovaný mikroorganismus, jsou aplikovány E-testové proužky, které na svých krajích obsahují gradient antimikrobiální látky. Látka proniká do média a ovlivňuje růst. Po uplynutí inkubační doby je vytvořena elipsoidní inhibiční zóna. Hodnota MIC je odečtena v místě kde se prolíná okraj proužku s hranicí růstu bakterií [136].

2.6 Stanovení viability buněk

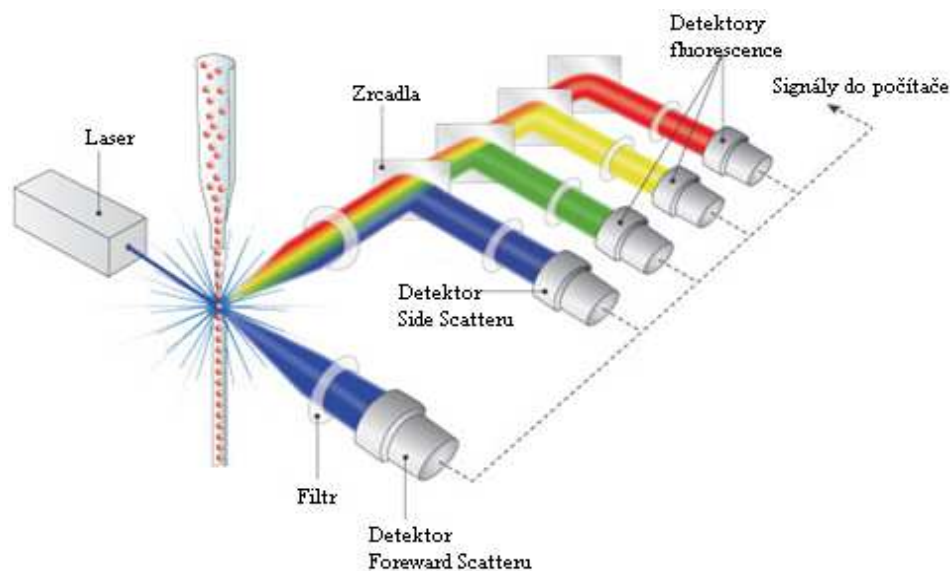
Viabilita je výraz používaný k vyjádření schopnosti buněk růst, reprodukovat se a interagovat se svým bezprostředním okolím. Obecně je chápána jako „poměr“ mezi živými a mrtvými buňkami. Tradičně se životaschopnost buněk měří na základě schopnosti tvořit kolonie na pevném růstovém médiu, tato metoda však nemůže poskytnout zcela přesné výsledky. Buňky se mohou vyskytovat v řetězcích nebo shlucích, což vede k podhodnocení skutečného počtu živých buněk. Velmi významným omezením této metody je také časová náročnost, která neumožňuje dostatečně rychlou odezvu. Kromě toho si může poškozená nebo narušená buňka nadále udržet svou metabolickou aktivitu, avšak její růstové a rozmnožovací schopnosti mohou být omezené [137].

Proto byly vyvinuty alternativní postupy stanovení viability, mezi něž mimo jiné patří fluorescenční analýza. Stanovení viability buněk je založeno na detekci životně důležitých funkcí, které jsou sledovány pomocí selektivního značení fluorescenčními sondami. Fluorescenční sondy jsou nevlastní fluorofory, které se ke sledované struktuře vážou nekovalentně a často přitom mění své fluorescenční vlastnosti. Volba fluorescenční sondy je klíčovou součástí experimentu ve fluorescenční spektroskopii, neboť právě její vlastnosti umožňují získat potřebné informace. Ke sledování značených buněk je tradičně využíván fluorescenční mikroskop, který poskytuje náhled na jednotlivé buňky, počet analyzovaných částic za určitou dobu je však omezený a i s využitím analyzátorů obrazu mnohdy pracný [137, 138, 139, 140, 141].

Fluorimetry naopak mohou měřit velký počet buněk, ale neumožňují pohled na vlastnosti konkrétní buňky. K velkému rozvoji fluorescenčního značení tak vedlo především rozšíření průtokové cytometrie [137, 138, 139, 140, 141]. Technologie průtokové cytometrie je kvantitativní analýza, která charakterizuje buněčné populace na úrovni jedné jediné buňky. Klíčovým rysem průtokové cytometrie je její schopnost měřit velké množství částic (100 000 buněk za sekundu) při současném měření více buněčných parametrů v každé buňce současně. Průtoková cytometrie je tak metoda s výhodami objektivity, vysoké rychlosti analýzy, přesnosti a citlivosti [138].

2.6.1 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je metoda, která umožňuje měření a analýzu fyzikálně-chemických vlastností buňky nebo jiných biologických částic během jejich průchodu laserovým paprskem. Ve chvíli, kdy buňka tento paprsek kříží, dochází k lomu a rozptylu světla, který podle směru a úhlu lomu bývá označován jako přímý rozptyl - tzv. „forward scatter“ (FSC) a boční rozptyl – tzv. „side scatter“ (SSC). FSC je charakterizován lomem světla o malém úhlu (2° - 13°) a je úměrný velikosti buňky. Úhel bočního rozptylu (SSC) je 90° a je indikátorem vnitřní buněčné struktury resp. granularity. Kromě parametrů lomu a rozptylu světla je detekována rovněž fluorescence procházejících buněk nebo částic. Fluorescenční barviva (fluorochromy) navázané na analyzované buňky nebo částice absorbují světlo určité vlnové délky vyzařované laserem a následně vyzařují (emitují) část takto absorbovaného světla, avšak již o odlišné vlnové délce. V průtokové cytometrii se používají fluorochromy, které mají většinou stejné spektrum absorpční, ale jiné emisní. Vlastní analytická zařízení se nazývají průtokové cytometry a skládají se ze systému fluidního, optického a elektronického. Pomocí fluidního systému jsou buňky obaleny pláštěm nosné tekutiny a pod tlakem hnány do speciálního prostoru, kde dochází ke křížení dráhy paprsku monochromatického laseru procházejícího buňkou. Optický systém sestává z části excitační tvořené laserem a soustavou čoček a hranolů usměrňujících světelný paprsek a části sběrné. Sběrná část optiky se sestává z optických zrcadel a filtrů umožňujících detekci světelných kvant specifické vlnové délky příslušnými optickými detektory. Systém pak elektronický převádí optický signál na elektrický a zároveň jej digitalizuje pro počítačovou analýzu [139, 142].



Obrázek 4. Schéma průtokového cytometru [143]

K detekci viability buněk se využívají tzv. fluorescenční sondy, které lze rozdělit do několika skupin. Nejčastějšími jsou měření intracelulární esterasové aktivity, sledování membránové integrity a existence transmembránového potenciálu, v menší míře je pak u mikroorganismů využívána detekce respirační aktivity či měření intracelulárního pH.

Při stanovení viability pomocí membránové integrity je založeno na aplikaci látek, které za běžných podmínek neprocházejí neporušenými buněčnými membránami, popřípadě jsou ihned vylučovány do extracelulárního prostředí. Naopak, je-li cytoplazmatická membrána porušena natolik, že mohou do buněk projít, dojde k vazbě na buněčnou hmotu a k zesílení a/nebo k posunu spektra fluorescence. Tyto buňky se nepovažují za životaschopné.

Využívají se především látky, které se v buňce vážou na nukleové kyseliny, kterých je v buňkách dostatečné množství. Do této skupiny se řadí především fluorescenční sonda propidiumjodid, která je využívána pro detekci viability kvasinek a bakterií. Další možností stanovení viability buněk je sledování intracelulární enzymové aktivity. Využívají se nefluorescenční sondy schopné procházet do buněk a poté jsou v buňkách pomocí enzymů přeměněny na fluorescenční látky nesoucí náboj, které jsou v buňce zadržovány a koncentrovány.

Pokud je narušena integrita buněk, jsou tyto látky vyplavovány ven a tyto buňky nejsou vyhodnoceny jako životaschopné. Indikátorem buněčné viability je rovněž transmembránový potenciál udržovaný na cytoplazmatické membráně činností iontových pump. K měření tohoto potenciálu se používají tzv. distribuční sondy. Jde o lipofilní barviva, která mohou volně procházet cytoplazmatickou membránou do buněk a hromadit se v nich závisle na jejich náboji [139, 140, 142]. Průtoková cytometrie se hojně využívá rovněž ke stanovení viability probiotických buněk [113].

2.6.2 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenčních sond lze také využít při fluorescenční mikroskopii. Technika fluorescenční mikroskopie umožňuje specifikovat buňky či buněčné komponenty s vysokým stupněm rozlišitelnosti uprostřed nefluoreskujícího materiálu. Díky tomu je fluorescenční mikroskop schopen odhalit přítomnost i jedné molekuly. S použitím více fluorescenčních značení je možné současně identifikovat několik cílových molekul současně [141].

Základními součástmi fluorescenčního mikroskopu jsou zdroj světla, ze kterého vychází světlo s různými vlnovými délkami od ultrafialového až po infračervené, dále excitační filtry, což jsou filtry propouštějící pouze světlo, které potřebujeme k fluorescenci vzorku, obvykle s kratší vlnovou délkou. Ostatní světlo je pohlceno.

Dále je důležitý samotný fluorescenční preparát, který musí reagovat na dopadající světlo fluorescencí. Vzorky samotné buď mohou být fluorofory a nebo mohou poskytovat fluorescenci po přidání fluorescenční sondy. Poslední částí je bariérový filtr, který pohlcuje všechno excitační světlo, které nebylo použito k excitaci a propouští pouze fluorescenční světlo [141].

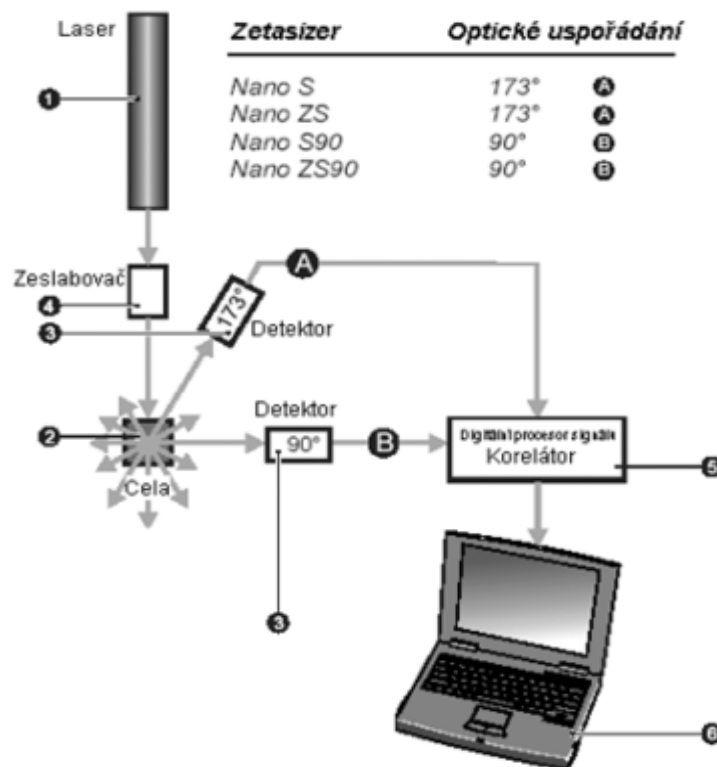
2.7 Metody charakterizace částic

V posledních letech zažívá oblast nanotechnologie velký rozvoj, je ovšem nutné systematicky a přesně definovat vlastnosti částic, aby bylo možné pochopit a stanovit potenciální toxicitu nanočástic na biologické systémy [145, 146]. Mezi hlavní směry tak patří stanovení fyzikálně-chemických a mechanických vlastností částic včetně jejich biokompability, dále stanovení náboje, chemické stability či propustnosti [146]. Pro sledování velikosti, složení či pórovitosti částic lze využít například metod jako je světelná, elektronová či fluorescenční mikroskopii.

2.7.1 Stanovení velikosti částic – dynamický rozptyl světla

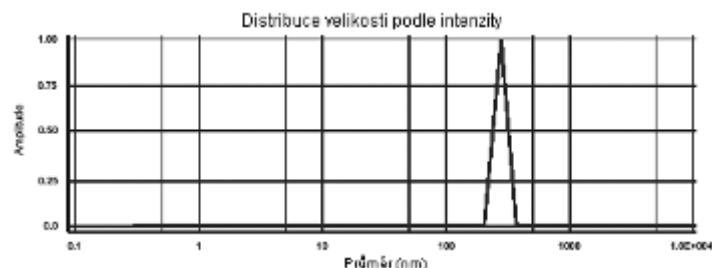
Pro charakterizaci velikosti částic v roztoku, se nečastěji používají přístroje (např. Malvern Zetasizer Nano-ZS) provádějící měření velikosti na principu dynamického rozptylu světla (Dynamic Light Scattering (DLS) (také známý jako PCS - Photon Correlation Spectroscopy - Fotonová korelační spektroskopie), měří Brownův pohyb a uvádí jej do vztahu s velikostí částic. To se provádí osvětlením částic laserem a analyzováním fluktuací intenzity v rozptýleném světle. Jedná se nejuniverzálnější techniku, které zajistí reprodukovatelnost výsledků [145, 147, 148, 149].

Typický systém měřící na principu DLS se skládá z šesti hlavních komponent (viz obr.5). Především je to laser pro zajištění zdroje světla pro osvětlení částic vzorku uvnitř cely. Většina laserových paprsků prochází přímo skrz vzorek, ale některé jsou rozptýlené částicemi ve vzorku. Detektor se používá pro měření intenzity rozptýleného světla. U vzorků, které mnoho světla nerozptylují, jako velmi malé částice nebo vzorky o nízké koncentraci, se množství rozptýleného světla musí zvýšit. V takové situaci se propustí do vzorku více světla laseru. U vzorků, které rozptylují více světla, jako velké částice nebo vzorky o vyšší koncentraci, se množství rozptýleného světla musí zmenšit. Toho se dosáhne použitím zeslabovače pro snížení množství světla laseru, které prochází do vzorku. Zeta-sizer během měření automaticky stanoví příslušnou polohu zeslabovače. Signál intenzity rozptylu pro detektor projde na desku digitálního zpracování signálu, nazvanou korelátor. Korelátor srovnává intenzitu rozptylu v po sobě jdoucích časových intervalech, aby odvodil rychlost, kterou se intenzita mění [150].



Obrázek 5. Schéma přístroje Zetasizer [150]

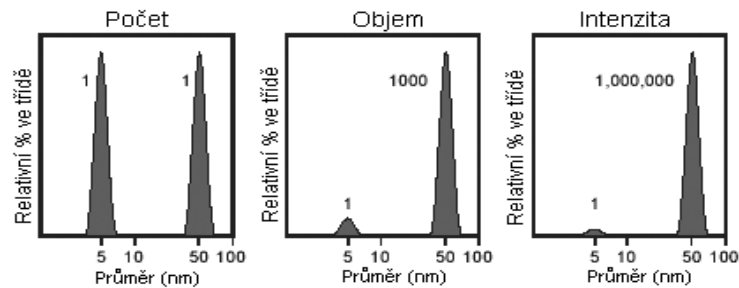
Tato informace korelátoru pak přejde do počítače, kde software data zanalyzuje, odvodí a vypočítá ze Stokes-Einsteinovy rovnice informaci o distribuci velikosti částic ve vzorku [150].



Obrázek 6. Typický graf distribuce velikosti částic [150]

Vyhodnocený graf distribuce velikosti částic pak na ose x ukazuje distribuci tříd velikostí částic, osa y ukazuje relativní intenzitu rozptýleného světla. Proto se toto rozložení velikosti částic označuje jako distribuce intenzity a je základním rozložením velikosti generované pomocí DLS. Distribuce intenzity lze ovšem převést na distribuci objemu-či distribuci počtu [150].

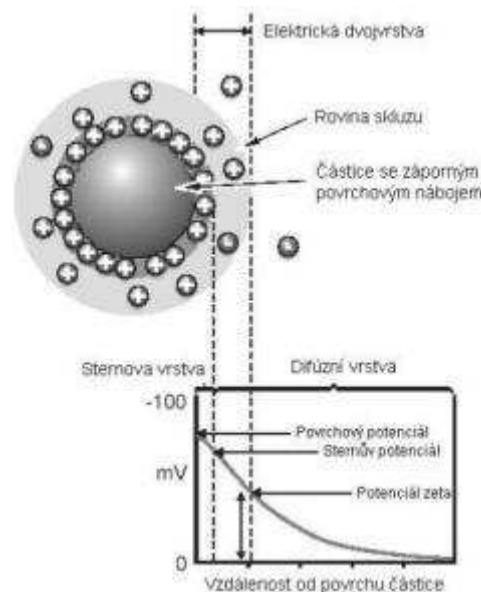
Distribuce počtu, případně objemu se používají v případě nutnosti posouzení zastoupení větších a menších částic v roztoku. Na obrázku 7 je velmi jednoduchým způsobem znázorněn rozdíl jednotlivých distribucí. Ve všech případech se jedná o vzorek obsahující jen dva typy částic (5 nm a 50 nm). U grafu distribuce intenzity je patrná výrazná plocha píku pro 50 nm částice v porovnání s 5 nm částicemi. Tento jev je způsoben tím, že velké částice rozptylují mnohem více světla, než malé částice. V případě distribuce objemu je plocha maxima pro 50 nm částice rovněž větší, než u 5 nm (objem 50 nm částice je 1000-krát větší, než 5 nm částice). V případě grafu distribuce počtu mají obě maxima stejnou velikost, obě velikosti mají tedy stejný počet částic [150].



Obrázek 7. Distribuce částic dle počtu, objemu a intenzity [150]

2.7.2 Stanovení stability a náboje částic – zeta potenciál

V důsledku síťového náboje na povrchu částice se těsně u povrchu hromadí ionty s opačným nábojem než má částice. Kolem každé částice tak existuje elektrická dvojvrstva. Vrstva kapaliny obklopující částici existuje jako dvě části; vnitřní oblast, nazývaná Sternova vrstva, kde jsou ionty silně vázané, a vnější, difúzní oblast, kde jsou ionty méně pevně připojené [150].



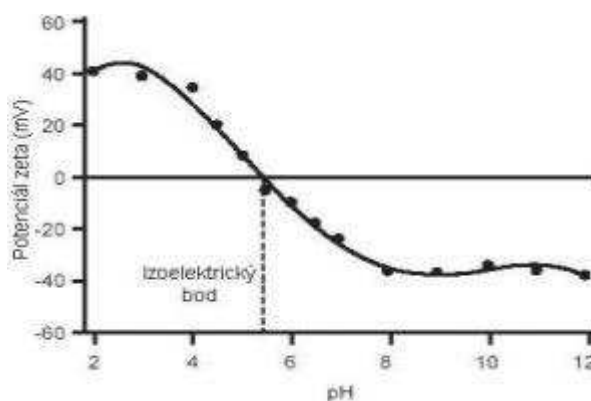
Obrázek 8. Schématické znázornění elektrostatického potenciálu [150]

Uvnitř difúzní vrstvy existuje teoretická hranice, uvnitř které ionty a částice tvoří stabilní jednotku. Když se částice pohybuje (např. kvůli gravitaci), ionty uvnitř hranice se pohybují s ní, ale všechny ionty za hranicí s částicí neputují. Tato hranice se nazývá povrch hydrodynamického smyku nebo rovina skluzu. Potenciál, který existuje na této hranici, je pak označován jako potenciál zeta.

Velikost zeta potenciálu naznačuje potenciální stabilitu koloidního systému. Koloidní systém vzniká tehdy, když jedno ze tří skupenství (kapalné, plynné, pevné) je dispergované v jednom skupenství. Přístroje měřící zeta potenciál nejprve stanoví elektroforetickou pohyblivost částic a poté použitím Henryovy rovnice je zeta potenciál vypočítán [150].

Jestliže všechny částice v suspenzi mají velký záporný nebo kladný potenciál zeta, pak budou inklinovat k odpuzování se navzájem a suspenze bude stabilní. Jestliže však částice mají nízké hodnoty potenciálu zeta, pak neexistuje žádná síla k tomu, aby zabránila částicím se shlukovat a flokulovat. Obecná dělicí čára mezi stabilní a nestabilní suspenzí se zpravidla bere buď při +30 mV nebo -30 mV [150].

Nejdůležitější faktor, který ovlivňuje potenciál zeta, je pH. Hodnota potenciálu zeta sama o sobě, bez uvedení pH, je prakticky číslo nemající žádný smysl. Pokud máme částice v suspenzi se záporným potenciálem zeta a k této suspenzi se přidá více alkálie, pak částice budou inklinovat k tomu, aby získaly zápornější náboj. Jestliže se pak k této suspenzi přidává kyselina, dosáhne se bod, kde se záporný náboj neutralizuje. Jakékoliv další přidávání kyseliny může způsobit vytváření kladného náboje. Proto křivka potenciálu zeta proti pH bude kladná při nízkém pH, a nižší nebo záporná při vysokém pH. Bod, kde vynesení prochází nulovým potenciálem zeta, se nazývá izoelektrický bod a z praktických důvodů je velmi důležitý. Normálně je to bod, kde je koloidní systém nejméně stabilní [151].



Obrázek 9. Znárodnění závislosti zeta potenciálu na pH [151]

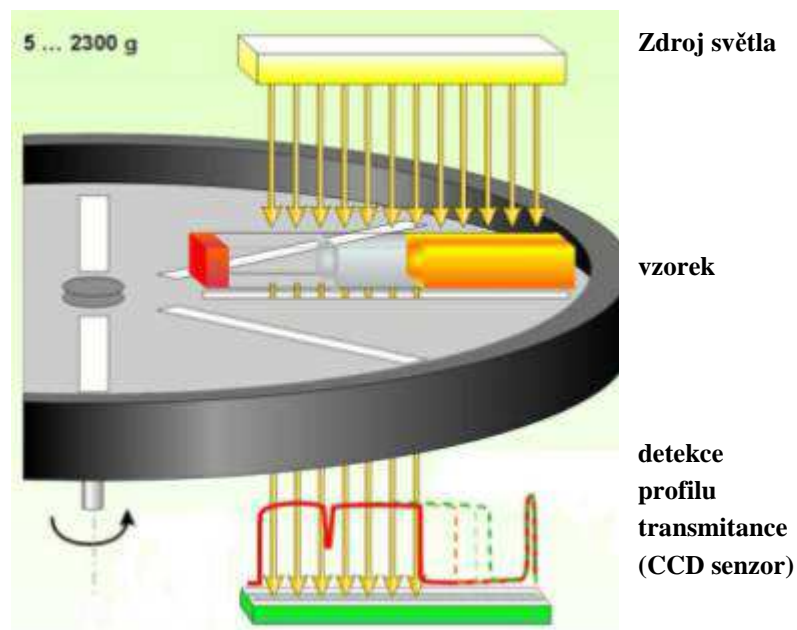
2.7.3 Sedimentační stabilita částic – analytická centrifugace

Sedimentační analýza je nástroj pro charakterizaci a kontrolu kvality disperzí. Charakterizace rozptýleného stavu suspenzí či emulze má zásadní význam v oblasti nanomateriálů ale i pro technické aplikace v mnoha dalších oblastech.

Jednou z hlavních příčin koloidní nestability emulzí je separace fází podle měrných hmotností, obecně označovaná jako usazování neboli sedimentace. Jedná se o proces, při kterém dochází vlivem působení hmotnostní (objemové) síly vyvolané gravitačním zrychlením k oddělení dispergovaných částic od disperzního prostředí. Směr usazování závisí na rozdílu hustot. Částice s vyšší hustotou než disperzní prostředí se pohybují ve směru gravitačního zrychlení, částice s nižší hustotou proti němu.

Rychlost pohybu částic při pomalém usazování (Reynoldsovo kritérium usazování $Re_u < 0,2$), které je obvyklé pro malé částice, vyjadřuje Stokesův vztah. Jelikož je usazování v gravitačním poli obvykle relativně pomalé, je vhodné pro účely hodnocení sedimentační stability proces separace fází urychlit nahrazením gravitačního zrychlení zrychlením odstředivým [152, 153].

Ze závislosti rychlosti usazování na odstředivém zrychlení (otáček odstředivky) lze pak extrapolací odhadnout rychlost separace fází při skladování v normálním gravitačním poli [152, 153].



Obrázek 10. Schéma analytické centrifugace [152]

Za předpokladu lineární závislosti pak k tomuto odhadu dostačuje pouze jeden údaj o rychlosti sedimentace při působení zvoleného odstředivého zrychlení. K měření sedimentační stability se tak používají centrifugy, které umožňují fotometrické sledování změn koncentrace dispergovaných látek ve vzorku vlivem působení odstředivé síly. Vzorky jsou umístěny v kyvetách, kde je sledován profil transmittance NIR zářením. Sedimentace dispergovaných částic se projeví jednak vyčeřením části vzorku, tzn. zvýšením transmittance, a jednak tvorbou sedimentu, tzn. snížením transmittance [152, 153].

Ze sedimentačních dat lze pak získat odhad velikosti a tvaru částic, údaje o distribuci jednotlivých typů sedimentujících částic ve vzorku a v neposlední řadě studovat rovnovážnost systému, včetně určení příslušných rovnovážných konstant [154].

2.8 Bezpečnost a genotoxicita částic

Enkapsulace pro potravinářské použití by měly splňovat podmínky nejen, co se týče vhodnosti materiálů, které musí být netoxické a biologicky odbouratelné, ale rovněž všechny pomocné látky použité při procesu enkapsulace musí být bezpečné. Také samotné částice se musí podrobit pečlivému posouzení toxikologické bezpečnosti, než mohou být použity k lidské spotřebě [64]. Proto musí být částice pro aplikace do potravin a nápojů vyrobeny výhradně z materiálů obecně považované za bezpečné (GRAS) [52, 53]. Celý proces enkapsulace musí být navržen tak, aby byly splněny bezpečnostní požadavky Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) [2]. Nejnovější směry navržené EFSA doporučuje pro testování částic provést také in vitro testy genotoxicity a některé testy in vivo [64].

3 CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Cílem práce bylo vyvíjet a testovat vhodné typy částic připravených z přírodních materiálů, připravit je ve stabilní formě a ověřit jejich použitelnost do potravinářských a kosmetických výrobků. Hlavním záměrem bylo získat moderní funkční potraviny a nápoje s lepšími výživovými a sensorickými vlastnostmi a vysokou přidanou hodnotou, případně kosmetické či farmaceutické výrobky s vysokou funkčností.

V průběhu dizertační práce byly řešeny následující dílčí cíle:

- zavedení postupů pro enkapsulace nízkomolekulárních látek a jejich směsi (např. kofein, polyfenoly, vitaminy, antioxidanty, stabilizátory, antimikrobiální látky), vysokomolekulárních složek (např. enzymy) a probiotických mikroorganismů
- zavedení metod stanovení enkapsulovaných aktivních složek (spektrofotometrické metody, HPLC/UV-VIS/PDA/MS, stanovení viability buněk, antimikrobiální testy atd.)
- zavedení metod charakterizace částic – analýza velikosti, tvaru, distribuce a náboje
- enkapsulace vybraných molekul a směsí; stanovení efektivity enkapsulace, charakterizace vzniklých částic
- testy dlouhodobé stability a biologické aktivity částic při různém pH, teplotě, v různých typech modelových a reálných prostředí i v simulovaných fyziologických podmínkách
- návrh vhodných transportních systémů pro řízené uvolňování aktivních látek v nových typech potravinářských a kosmetických produktů
- sensorická analýza funkčních potravin
- vyhodnocení kvality a stability nových potravinářských a kosmetických produktů při dlouhodobém skladování

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité přístroje a chemikálie

4.1.1 Použité chemikálie

2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonoová kyselina)-(ABTS), Sigma-Aldrich (DEU); 2,6-dichlorindofenol, Sigma-Aldrich (DEU); Acetonitril pro HPLC, Gradient Grade, Sigma-Aldrich (DEU); Agar Powder, Himedia (IND); Alginát sodná sůl, Sigma-Aldrich (DEU); Agarosa, Serva (DEU), β -karoten 95% typ I: syntetický, Sigma-Aldrich (DEU); Bile salts – směs kyseliny cholové a deoxycholové, Sigma-Aldrich (DEU); Carbomer 980, Sino Lion (USA); Diethylether, VWR Chemicals BDH PROLABO (USA); DL- α -tokoferol acetát, MERCK (DEU); Dusitan sodný, Vitrum-LachNer (CZE); Epikatechin, Sigma-Aldrich (DEU); Ethanol, Vitrum-LachNer (CZE); Ethylacetát, Vitrum-LachNer (CZE); Folin-Ciocalteuovo činidlo, Penta (CZE); Glukóza, Vitrum-LachNer (CZE); Hovězí extrakt, Difco laboratories (USA); Hydroxid sodný, Vitrum-LachNer (CZE); Hydrogenuhlíčitán sodný, Vitrum-LachNer (CZE); Chitosan, Sigma-Aldrich (DEU); Chloroform, VWR Chemicals BDH PROLABO (USA); Chlorid hlinitý, Vitrum-LachNer (CZE); Chlorid sodný, Vitrum-LachNer (CZE); Chlorid vápenatý, Vitrum-LachNer (CZE); Cholesterol Sigma-Aldrich (DEU); Ibuprofen, Sigma-Aldrich (DEU); Katechin, Sigma-Aldrich (DEU); Karboxymethylcelulóza, sodná sůl, Sigma-Aldrich (DEU); Klotrimazol, Sigma-Aldrich (DEU); Kofein, Sigma-Aldrich (DEU); Kyselina L-askorbová, Sigma-Aldrich (DEU); Kyselina citronová, Vitrum-LachNer (CZE); Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (DEU); Kyselina chlorovodíková 35%, Lach:Ner (CZE); Kyselina chlorogenová, Sigma-Aldrich (DEU); Kyselina mléčná 80%, Vitrum-LachNer (CZE); Kyselina metafosforečná, Lachema (CZE); Kyselina octová 98%, Vitrum-LachNer (CZE); Kyselina trichloroctová, Serva (DEU); LB médium (Luria-Berthani), Sigma-Aldrich (DEU); Lecithin ze sojových bobů, Serva (DEU); Lecithin vaječný, Serva (DEU); Luteolin, Sigma-Aldrich (DEU); Lysozym from chicken egg white, Serva (DEU); Methanol pro HPLC, VWR Chemicals BDH PROLABO (UK); Močovina p.a., Penta (CZE); Morin, Sigma-Aldrich (DEU); Myricetin, Sigma-Aldrich (DEU); n-hexan pro HPLC, VWR (USA); Pankreatin z vepřové slinivky, Sigma-Aldrich (DEU); Pepsin z prasečí žaludeční sliznice, Sigma-Aldrich (DEU); Pepton, Himedia (IND); Peroxodisíranem draselným, Sigma-Aldrich (DEU); Phloridzin, Sigma-Aldrich (DEU); Pullulan Sigma-Aldrich (DEU); Quercetin, Sigma-Aldrich (DEU); Rutin, Sigma-Aldrich (DEU); Síran měďnatý, pentahydrát, Vitrum-LachNer (CZE); Síran manganatý, hydrát, Vitrum-LachNer (CZE); Škrob rozpustný p.a., Lach-Ner (CZE); Tripolyfosfát, Sigma-Aldrich (DEU); Trolox-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-dikarboxylová kyselina, Sigma-Aldrich (DEU); Uhlíčitán sodný bezvodý, Lach:Ner (CZE); Vinan sodno-draselný, Vitrum-LachNer (CZE)

4.1.2 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy, Boeco (DEU); Předvážky Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH (DEU); Předvážky Scout Pro, OHAUS (USA); ELISA Reader BioTek ELx808, Biotek (DEU); Mikrocentrifuga Mikro 200, Hettich Zentrifugen (DEU); Mikrocentrifuga Sartorius, Sigma (DEU); Centrifuga Boeco U-32R, Hettich Zentrifugen (DEU); Koloidní DLS analyzátor ZetaSizer Nano ZS, Malvern (GBR); Sestava HPLC/PDA/MS, Thermo Finnigan SURVEYOR, Thermo Fischer (USA); Pumpa - MS Pump Plus, Detektor PDA - PDA Plus Detector, Hmotnostní detektor LCQ Advantage Max; Termostat - LCO 101, Column Oven (ECOM, CZE); Dávkovací analytický ventil smyčkový C R54157 (ECOM, CZE); Vyhodnocovací systém Xcalibur Thermo Fischer (USA), Sestava HPLC/PDA/RI ThermoFisher Scientific (USA); Programátor gradientu UltiMate 3000 Fotometrický detektor: UltiMate 3000 DAD, Refraktometrický detektor: RefractoMax 520, Pumpa: LPG-3400SD, Vyhodnocovací software: Chromeleon 7; Sestava HPLC, Ecom spol. s.r.o. (CZE), Vysokotlaké čerpadlo LCP 4020 (Pumpa - Beta 10), Dávkovací analytický ventil smyčkový C R54157, Termostat kolon LCO 101

(LCO 102 LONG), Spektrofotometrický detektor LCD 2084, Kolona Zorbax Eclipse plus C18 (4,6 x 150 mm), Kolona Kinetex 5u C18, 4,6 x 150 mm, Kolona: Luna 10u NH2 100A 250 x 4,6 mm, Kolona Eclipse plus XDB-C18, 5 μ m, 4,6 x 150 mm (Agilent Technologies – USA), Kolona Supelcosil™ LC-NH2, 5 μ m, 4,6 x 250 mm; Ultrazvukový homogenizátor / dispergátor - Bandelin Sonoplus HS3200, SonorexTechnik (DEU); Ultrazvuková lázeň PS02000 (CZE); Membránový extrudér – LiposoFast, Avestin (DEU); Vortex: Genius 3, IKA Vortex (DEU); Vortex, TK3S, Kartell spa (USA); Vortex REax Top, Heidolph (DEU); Vodní lázeň TW2, Julabo (DEU); Vodní lázeň W620E, LaboPlay (POL); Optický mikroskop Intraco Micro LM 666 PV/ ∞ LED (CZE); Software Dino-Capture 2.0 (CZE); Fluorescenční mikroskop Olympus IX71, Microtime 200 (DEU); Bürkerova komůrka Marienfeld (DEU), Spektrofotometr Thermo Spectronic Helios δ (GBR); Spektrofotometr Unicam Helios α (GBR); Spektrofotometr – Helios γ , Unicam (GBR); Vakuová odparka Werke RV06-ML: IKA (DEU); Průtokový cytometr - Apogee A50, Apogee Flow Systems (GBR); Magnetická míchačka: Lavat (CZE); LUMiSizer – Dispersion analyzer – Lum (USA); Automatické pipety v různém rozsahu objemu – Discovery (DEU) a Biohit (DEU); IMPLEN Nanophotometer UV-VIS (DEU); Laminární box Aura mini, Bio Air Instruments (USA); Temperovaná třepačka Heidolph Unimax 1010, Labicom (CZE); Termostat Raven 2 Incubator (USA); Termostat Memmert GmbH Co. KG (DEU); Skenovací elektronový mikroskop JEOL JSM-7600F (USA); Enkapsulátor BÜCHI B-392 Pro (CHE); Lyofilizátor – BenchTop 4K ZL, VirTis (USA)

4.2 Látky použité k enkapsulaci

V této práci byly k enkapsulaci použity tyto standardní chemikálie: kofein, nisin, lysozym katechin, β -karoten, ergosterol, bromelain, pepsin, pankreatin, papain, kolagenasa, alkalasa, lipasa, morin, rutin, kvercetin, kyselina gallová, vitamin C. Dále byl použit rovněž lyofilizovaný bílek, vzorky zázvoru lékařského, hřebíčku, a česneku běžně dostupné v obchodech.

Enkapsulovány byly i následující bylinné extrakty: vodný/ethanolový extrakt z kopřivy dvoudomé rozmarýnu lékařského, heřmánku pravého, levandule lékařské, černého bezu, šalvěje lékařské, pelyňku pravého, mateřídoušky, echinacey, lékořice, měsíčku lékařského, rakytníku řešetlákového, tymiánu obecného, jitrocele kopinatého, majoránky zahradní a třezalky tečkované, které byly zakoupeny v Léčivé rostliny, Brno.

Dále byly použity vzorky černého, bílého a zeleného čaje (sypaný černý čaj, Gunpowder Black (Čína); sypaný zelený čaj, Formosa Gunpowder (Tchaj-wan); sypaný bílý čaj, Pai Mu Tan (Čína), kávy (pražená zrnková plantážní káva (100% arabica), Brazília Santos (Brazílie)), guarana - drcená semena guarany, EXOTIC HERBS (Brazílie), goji - kustovnice čínská, WOLFBERRY (EU) a ženšenu - drcený kořen ženšenu, EXOTIC HERBS (Asie). Při práci byly použity rovněž vzorky mrkve, červených jablek, citronu, pomeranče, kiwi a směsi lesních plodů (maliny, jahody, borůvky; mražené) běžně dostupné v obchodech, zelený ječmen - čerstvý a doplněk stravy Mladík JEČMEN (Česká republika), propolis- Včelařství Petr Vydra (Brno) a inulin – rozpustná vláknina, FAN (Česká republika).

4.3 Použité reálné potraviny

Vybrané částice byly aplikovány do těchto vybraných potravin: polotučné čerstvé mléko pasterované, Albert (Moravia Lacto a.s.): na 100 ml: 4,6 g sacharidů, 3,2 g bílkovin, 1,5 g tuků, 190 kJ / 45 kcal, Actimel, (Danone) na 100 g: 10,5 g sacharidů, 2,8 g bílkovin, 1,6 g tuků, 301 kJ / 71 kcal, selský jogurt bílý (Hollandia) na 100 g: 4,3 g sacharidů, 3,5 g bílkovin, 3,9 g tuků, 277 kJ / 66 kcal, choceňský smetanový jogurt (Choceňská mlékárna) na 100 g: 2,8 g sacharidů, 4,2 g bílkovin, 10,3 g tuků, 500 kJ / 120 kcal.

Dále byly použity vzorky komerčních nápojů: pravý černý čaj (Jemča) -příprava: 1 sáček byl louhován ve 100 ml vroucí vody po dobu 20 minut, zelený čaj (Ahmad Tea)-příprava: 1 sáček byl louhován ve 100 ml vody o teplotě $^{\circ}$ C po dobu 20 minut, citronová minerálka (Ondrášovka) -složení na 100 ml:

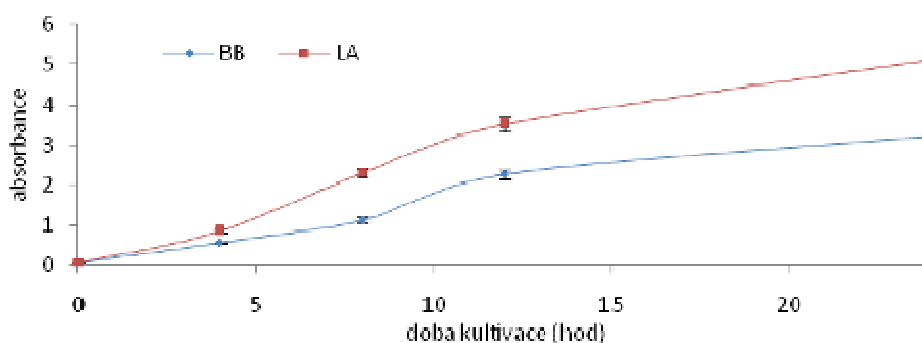
4,6g sacharidů, méně než 0,3 g bílkovin, méně než 0,1 g tuků a 0,008 g soli, 19 kcal, Nestea zelený čaj citrus (Nestea)-složení na 100 ml: 4,5 g sacharidů, 0,02 g sodíku, 48 kcal, Coca Cola (Coca Cola)-složení na 100 ml: 10,5 g sacharidů, 42 kcal, pomerančový džus Hello (Linea Nivnice)-složení na 100 ml: 11 g sacharidů z toho 8 g cukrů, méně než 0,1 g bílkovin, méně než 0,1 g tuků, 0,05 g, 40 kcal.

4.4 Použité mikroorganismy

V této práci byly v experimentální části pro testování antimikrobiální aktivity použity čtyři bakteriální kultury: *Micrococcus luteus* CCM 1569, *Bacillus subtilis* CCM 2794, *Escherichia coli* CCM 7395 a *Serratia marcescens* CCM 8587a jeden kvasinkový kmen: *Candida glabrata* CCM 8270. Veškeré kmeny byly získány z České sbírky mikroorganismů v Brně. K enkapsulaci byly v této práci použity probiotické bakteriální kultury *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833 a *Bifidobacterium breve* CCM 7825^T rovněž získané z České sbírky mikroorganismů v Brně.

4.4.1 Kultivace probiotik

Pro kultivaci bakteriálních kultur *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium breve* bylo použito komerční MRS médium. Základní složky MRS média: pepton 10 g/l, hovězí extrakt 10 g/l, kvasničný extrakt 5 g/l, glukóza 20 g/l. Médium bylo smícháno s destilovanou vodou v určeném poměru v Erlenmayerově baňce a sterilizováno v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem po dobu 30 minut. Kultury byly zaočkovány ve sterilním boxu. Kultivace probíhala při 37°C po dobu 24 hodin. Poté byly kultury použity na stanovení viability na průtokovém cytometru a k enkapsulaci. V případě přípravy tuhého média bylo dále přidáno množství agaru o koncentraci 15 g/l. Pevné médium bylo použito k dlouhodobému uchování kultur při 4 °C v podobě křížového roztěru na agarové plotně. U použitých mikroorganismů byla stanovena růstová křivka. Růstová křivka byla sestrojena pomocí série odběrů s následným měřením zákalu při 630 nm, vždy po 4 hodinách.



Graf 1. Růstová křivka - *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium breve*

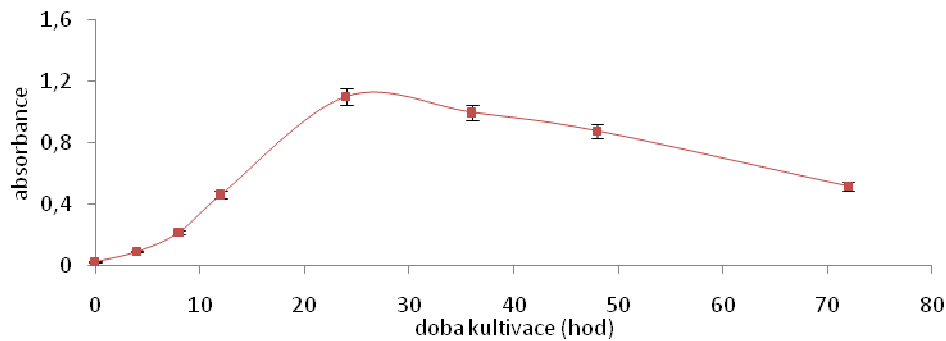
4.4.2 Kultivace mikroorganismů pro testování antimikrobiální aktivity

Jako testovací modelové mikroorganismy pro sérii antimikrobiálních testů byly zvoleny dva grampozitivní bakteriální kmeny - *B. subtilis* a *M. luteus* a dva gramnegativní bakteriální kmeny - *E. coli* a *S. marcescens*. Kultury byly dlouhodobě uchovávány v podobě křížového roztěru na agarové plotně při 4 °C v lednici. Vždy před samotnou kultivací bylo připraveno z dlouhodobě uchovávané kultury inokulum zaočkováním do sterilního příslušného tekutého média. Pro kultivaci mikroorganismů bylo vždy použito 50 ml příslušného média připraveno do 100ml Erlenmayerových baněk a sterilizováno v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem po dobu 30 minut. Zaočkované tekuté médium bylo poté inkubováno 24h v termostatu při optimální teplotě za stálého třepání. *Bacillus subtilis* byl inkubován při 30 °C a ostatní bakterie (*Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* a *Serratia marcescens*) byly inkubovány při 37 °C. Z připraveného inokula byly po 24 hodinách zaočkovány (po 1 ml kultury) pevné agarové plotny a rovněž bylo přeočkováno do nového tekutého média, které bylo použito na stanovení antimikrobiální aktivity na mikrotitrační destičce.

Agarové plotny byly kultivovány 24h v termostatu při optimální teplotě a následně použity pro stanovení antimikrobiální aktivity studovaných vzorků. U použitých mikroorganismů byla stanovena růstová křivka. Růstová křivka byla sestrojena pomocí série odběrů s následným měřením zákalu při 630 nm, vždy po 4 h, resp. noční měření nebylo realizováno.

4.4.2.1 Příprava médií pro *E. coli*

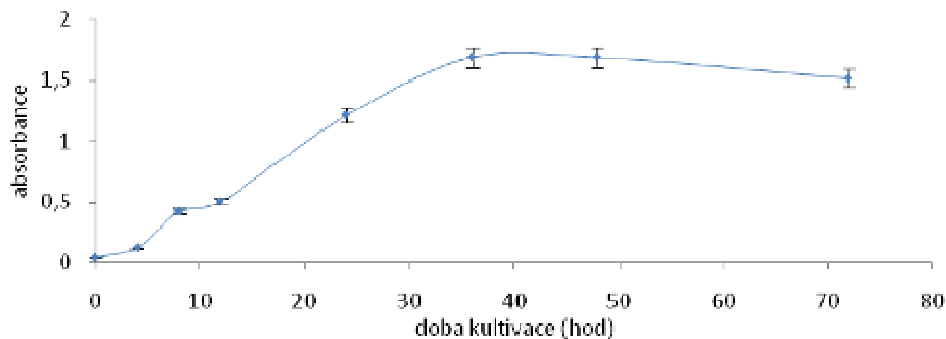
Jako kapalné médium bylo použito komerční LB médium připravené podle návodu na koncentraci 25 g/l. V případě přípravy tuhého média bylo dále přidáno množství agaru o koncentraci 20 g/l. Základní složky LB média: trypton 10 g/l, kvasničný extrakt 5 g/l, NaCl 10 g/l.



Graf 2. Růstová křivka – *E. coli*

4.4.2.2 Příprava médií pro *B. subtilis*

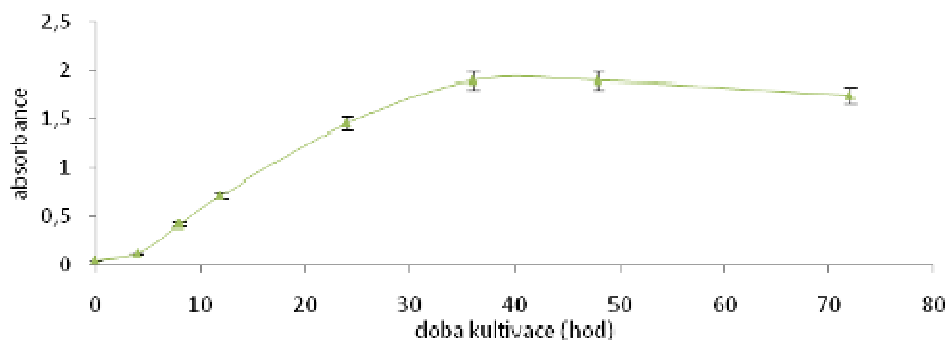
Pro přípravu kapalného média bylo použito následujícím složení: 5 g/l peptonu, 3 g/l beef extraktu, 0,01 g/l $MnSO_4 \cdot H_2O$. V případě přípravy tuhého média bylo dále přidáno množství agaru o koncentraci 20 g/l.



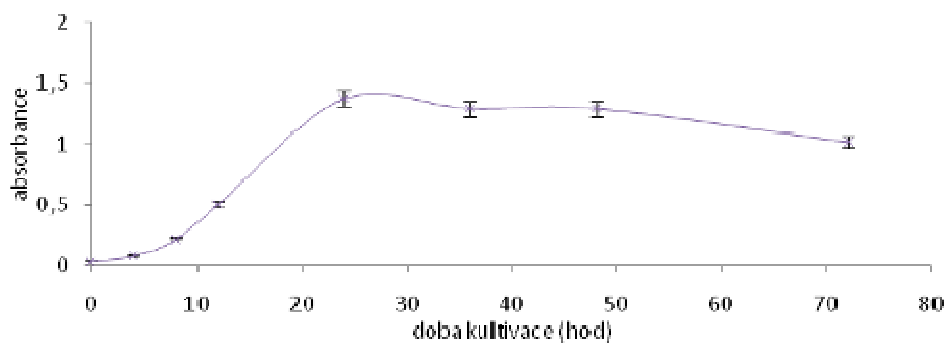
Graf 3. Růstová křivka – *Bacillus subtilis*

4.4.2.3 Příprava média pro *M. luteus* a *S. marcescens*

Pro přípravu kapalného média bylo použito následujícím složení: 5 g/l peptonu, 3 g/l beef extraktu a 3 g/l NaCl. V případě přípravy tuhého média bylo dále přidáno množství agaru o koncentraci 20 g/l.



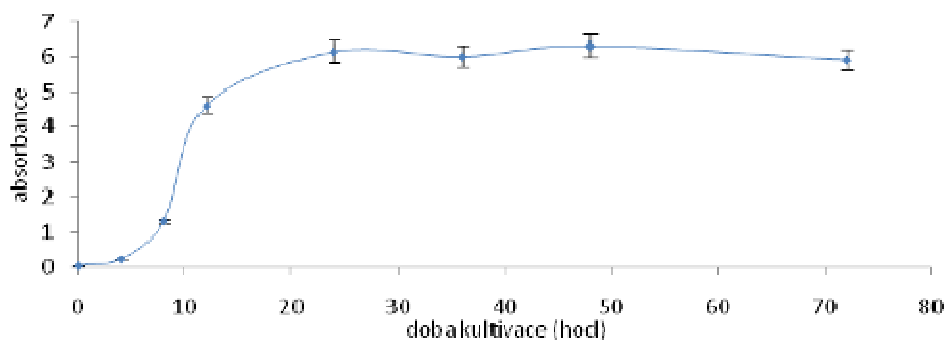
Graf 4. Růstová křivka – *Micrococcus luteus*



Graf 5. Růstová křivka – *Serratia marcescens*

4.4.3 Kultivace *Candida glabrata*

Candida glabrata byla kultivovaná v tekutých médiích v Erlenmayerových baňkách i na pevných médiích na Petriho miskách. Kultivace probíhala při teplotě 37 °C. Pro kultivaci *Candida glabrata* bylo připraveno medium o následujícím složení: pepton 10g/l, glukóza 40g/l v případě pevných médií s přidavkem agarů 15 g/l.



Graf 6. Růstová křivka – *Candida glabrata*

4.5 Příprava mikroorganismů pro enkapsulaci

Probiotické kultury (*L. acidophilus*, *B. breve*) byly smíchány s obalovým materiálem a enkapsulovány. Pro enkapsulaci buněk bez média bylo médium centrifugováno (10 min, 5 000 rpm, 25 °C) a peletky buněk byla dispergovány v obalovém materiálu.

4.6 Příprava vzorků k enkapsulaci a základní charakterizaci

4.6.1 Propolis

Byla připravena tinktura o koncentraci 1 g propolisu na 100 ml absolutního ethanolu. Směs byla rozpouštěna za stálého míchání po dobu 48 hodin, před použitím byl roztok přefiltrován pro odstranění případných pevných částic.

4.6.2 Zelený ječmen

Pro přípravu nápoje z prášku byl použit komerční preparát. Dle doporučení na etiketě (1-2 čajové lžičky do nápoje) byla připravena suspenze ječmene v obalovém materiálu o koncentraci 0,01 g/ml pro enkapsulaci za vzniku částic typu matrix. V případě enkapsulace za vzniku částic typu kapsule byl připravena suspenze ječmene ve vodě o koncentraci 0,05 g/ml; suspenze byla centrifugována (2 min, 12 000 rpm, 25 °C) a pro další práci byl použit supernatant. Čerstvý ječmen byl vypěstován na vlhčené celulóze. Po 10 dnech byly natě (cca 15 cm) sklizeny a rozmixovány pomocí ručního mixéru ve 100 ml vody, čímž byly převedeny na suspenzi. Dle potřeby byla následně použita centrifugace (2 min, 12 000 rpm, 25 °C).

4.6.3 Příprava bylinných extraktů

Na základní přípravu bylinných extraktů bylo naváženo 1 g sušené bylinky. Toto množství bylo zalito a louhováno ve 100 ml vroucí vody, kyseliny citronové, případně 40% roztoku ethanolu, po dobu 15 minut.

4.6.4 Příprava kofeinových extraktů

Roztoky nápojů byly připraveny podle návodu na obalu. Sypaný zelený čaj byl zalit vodou o teplotě 70–80 °C v poměru 1,5 dl na 1 čajovou lžičku (2,820 g). Připravený čaj byl ponechán k louhování 2–3 minuty. Poté byl přefiltrován přes gázu. Sypaný černý čaj byl zalit vroucí vodou v poměru 1,5 dl na 1 čajovou lžičku (2,192 g). Připravený čaj byl ponechán k louhování 3–5 minut. Poté byl přefiltrován přes gázu. Sypaný bílý čaj byl zalit vodou o teplotě přibližně 90 °C v poměru 1,5 dl na 1 čajovou lžičku (1,980 g). Připravený čaj byl ponechán k louhování 5 minut. Poté byl přefiltrován přes gázu. Guarana (semeno mleté) 1 čajová lžička (2,476 g) byla zamíchána do vroucí vody. Poté byl připravený roztok přefiltrován přes gázu. Zrnka kávy byly pomocí mlýnku rozemlety. Na 1,5 dl byly použity 2 kávové lžičky mleté kávy (1,982 g). Káva byla zalita horkou vodou o teplotě 93–94 °C. Připravený roztok byl ponechán chvíli k louhování a poté byl přefiltrován přes gázu.

4.6.5 Příprava ovocných a zeleninových šťáv a extraktů

Šťáva z testovaného ovoce a zeleniny byla získána odšťavněním. Díky dužině byla šťáva velmi hustá. Roztoky byly tedy dále odstředěny při 7 500 otáčkách za minutu po dobu 5 minut.

Extrakt z testovaného ovoce a zeleniny byly získány extrakcí z lyofilizátu. K extrakci byly použity následující roztoky: 1%, 5% a 10% kyselina citronová, 1%, 5% a 10% kyselina mléčná, ethylacetát a ethanol.

4.7 Metody pro stanovení základních charakteristik

4.7.1 Stanovení kofeinu metodou HPLC/PDA/MS

K analyzování extraktů a stanovení všech sloučenin z potravin je důležité nalézt účinnou a rychlou analytickou metodu. K tomuto stanovení se obvykle využívá vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) s reverzní fází. Vzorky kofeinu byly aplikovány na kolonu pomocí dávkovací smyčky o objemu 20 μ l. Dělení směsi probíhalo na koloně Kinetex 5u C 18 s reverzní fází při 30 °C. Eluce byla použita izokratická při průtoku mobilní fáze 0,6 ml·min⁻¹. Mobilní fází byla směs methanolu a vody v poměru 60:40. Vzorky byly detekovány na PDA detektoru při vlnové délce 270 nm. Z chromatogramů o různých koncentracích kofeinu byly zjištěny plochy píků a sestavena externí kalibrační křivka pro kvantitativní stanovení koncentrace kofeinu, $y=7 \cdot 10^7 \cdot x$ (mg/ml). Pro potvrzení složení reálných vzorků byla použita rovněž metoda hmotnostní spektrometrie s přímým nástřikem. Hmotnostní spektrum typu „full scan“ bylo získáno pomocí ESI ionizace v negativním modu, jako detektor byla použita iontová past.

4.7.2 Stanovení celkových polyfenolů

Ke stanovení se používá Folin-Ciocalteuovo činidlo. Fenoly jsou oxidovány v zásaditém prostředí a v činidle přítomné molybdenany a wolframany jsou redukovány na směs modrých oxidů wolframu a molybdenanu. Vzniklé modré zbarvení je úměrné celkovému množství původní přítomných fenolických sloučenin a stanoví se spektrofotometricky při 750 nm. Získané výsledky lze interpretovat jako množství celkových polyfenolů ve vzorku, popř. jako ekvivalent kyseliny gallové (GAE, Gallic Acid Equivalent), protože kyselina gallová je zde použita jako standard [155].

Pro sestavení kalibrační křivky byla připravena kalibrační řada kyseliny gallové od 0,1 do 0,7 mg/ml. Z naměřených hodnot byl následně sestaven graf kalibrační závislosti, $A = 1,3307 \cdot c$ (mg/ml).

4.7.3 Stanovení celkových flavonoidů

Chlorid hlinitý tvoří stabilní kyselé komplexy s C₄ ketoskupinou a s C₃ nebo C₅hydroxylovou skupinou flavonoidů, roztok tak získává oranžové zabarvení, které je měřeno spektrofotometriky [156]. Koncentrace neznámého vzorku je poté vypočítána z rovnice z kalibračního grafu závislosti absorbance na koncentraci standardu, kterým je katechin. Závislost absorbance na koncentraci byla v případě katechinu proměřena v intervalu od 0,05-0,3 mg/ml. Z naměřených hodnot byl následně sestrojen graf kalibrační závislosti, $A = 2,8729 \cdot c$ (mg/ml).

4.7.4 Stanovení celkových antokyanů

5 g vzorku bylo rozetřeno s 20 ml methanolu okyseleného kyselinou chlorovodíkovou. Směs byla extrahována po dobu 15 minut na třepačce a poté centrifugována při 10 000 ot./min. po dobu 15 minut. Supernatant byl odlit a pevná fáze byla znovu extrahována okyseleným methanolem. Supernatanty z obou centrifugací byly spojeny a doplněny na objem 150 ml. Vzorky byly měřeny spektrofotometriky při 528 nm. Jako blank byl použit okyselený methanol. Každý vzorek byl analyzován třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr. Koncentrace byla vypočítána z kalibrační křivky závislosti absorbance na koncentraci kyaninhydrochloridu, $A = 60,3368 \cdot c$ (mg/ml).

4.7.5 Stanovení jednotlivých flavonoidů metodou RP-HPLC s UV-VIS detekcí

Pro stanovení jednotlivých flavonoidů metodou HPLC byla extrakce vzorků provedena v 10% kyselině mléčné, aby došlo k uvolnění vázaných polyfenolických sloučenin. Extrakt ze vzorku byl protřepán v ethylacetátu. Poté byla organická fáze oddělena a odpařená na rotační odparce. Odparek byl rozpuštěn v 1 ml mobilní fáze. Pro stanovení jednotlivých flavonoidů byly použité standardy morinu, myricetinu a luteolinu, které byly rozpuštěny v ethanolu. Standard rutinu byl rozpuštěn v methanolu. Takto připravené standardy byly přidávány ke vzorkům a analyzovány metodou RP-HPLC/UV-VIS na koloně Zorbax Eclipse plus C18 při teplotě 30° C a průtoku 0,75 ml/min. Detekce byla provedena spektrofotometriky při vlnové délce 370 nm. Mobilní fáze je roztok o složení acetonitril : methanol : voda : kyselina fosforečná v poměru 30 : 20 : 49,5 : 0,5. Naměřená data byla analyzována pomocí software Clarity. Rovnice kalibračních křivek (koncentrace v mg/ml): Rutin: $A=12,13 \cdot c$; Kyselina chlorogenová: $A=14,44 \cdot c$; Phloridzin: $A=1,08 \cdot c$; Myricetin: $A=424,62 \cdot c$; Morin: $A=57,43 \cdot c$; Quercetin: $A=282,156 \cdot c$.

4.7.5.1 Úprava vzorků pro stanovení individuálních flavonoidů pomocí HPLC

Přesně zvážené množství lyofilizátu vzorku bylo smícháno ve tmě a chladu hydrolyzováno pomocí 1 M HCl. Poté byla směs odstředěna. K supernatantu byl přidán ethylacetát a směs byla vytřepávána. Vodná vrstva byla odstraněna, ethylacetátová vrstva byla převedena do odpařovací baňky. Na vakuové odparce byl ethylacetát odpařen do sucha a odparek v baňce byl rozpuštěn v 1 ml mobilní fáze. Takto připravený vzorek byl nastříkovan na HPLC.

4.7.6 Stanovení individuálních katechinů

Jako mobilní fáze byl použit roztok methanolu a vody v poměru 45 : 55. Eluce byla izokratická, kolona byla v termostatu zahřívána na 30°C a průtok byl nastaven na 0,75 ml za minutu. Byla použita kolona Eclipse XDB-C18. Na začátek kolony byl do dávkovací smyčky o objemu 20 µl nastříkovan vzorek a detekce látek probíhala v detektoru při 280 nm. Rovnice kalibračních křivek (koncentrace v mg/ml): Katechin: $A=2,416 \cdot c$; Epikatechin: $A=3,752 \cdot c$.

4.7.6.1 Úprava vzorků pro stanovení individuálních katechinů pomocí HPLC

Úprava vzorku pro stanovení individuálních katechinů byla téměř totožná s úpravou vzorků pro stanovení individuálních flavonoidů (4.7.5.1). Odparek v baňce byl ale po odpaření rozpuštěn v 1 ml methanolu a tento vzorek byl poté nadávkován na HPLC.

4.7.7 Stanovení α -tokoferolacetátu pomocí HPLC

Stanovení α -tokoferol acetátu bylo provedeno pomocí metody HPLC s UV-VIS detekcí. Podmínky analýzy byly nastaveny na teplotu 45 °C, průtok 1 ml·min⁻¹, mobilní fáze byla absolutní methanol a kolona Eclipse plus XDB-C18. Detekce byla prováděna při vlnové délce 289 nm. Retenční čas pro α -tokoferol acetát byl 4,26 min. Rovnice kalibrační křivky: $Y=1,59 \cdot 10^7 \cdot x$ (mg/ml).

4.7.8 Stanovení β -karotenu pomocí HPLC

Stanovení β -karotenu bylo provedeno pomocí metody HPLC s UV-VIS detekcí. Podmínky analýzy byly nastaveny na teplotu 45 °C, průtok 1 ml/min, mobilní fáze byla absolutní methanol a kolona Eclipse plus XDB-C18. Detekce byla prováděna při vlnové délce 450 nm. Retenční čas β -karotenu byl 10,10 min. Rovnice kalibrační křivky: $Y=2,13 \cdot 10^5 \cdot x$ (mg/ml).

4.7.8.1 Úprava vzorků pro stanovení β -karotenu pomocí HPLC

Směs karotenoidů byla z přesně zváženého množství lyofilizátu vzorku extrahována pomocí několika ml diethyletheru. Ten byl poté ze směsi odpipetován do odpařovací baňky a na vakuové odparce byl odpařen do sucha. Odparek byl poté rozpuštěn v 1 ml methanolu. Takto připravený vzorek byl nastříkovan na HPLC.

4.7.9 Stanovení kyseliny askorbové pomocí HPLC

Jako mobilní fáze byl použit roztok 0,05 M octanu sodného a acetonitrilu v poměru 95 : 5. Eluce byla izokratická, kolona byla v termostatu zahřívána na 30°C a průtok byl nastaven na 0,6 ml za minutu. Byla použita kolona Supelcosil TM LC-NH2. Detekce probíhala při 254 nm. Rovnice kalibrační křivky (koncentrace v mg/l): $A=273,35 \cdot c$.

4.7.9.1 Úprava lyofilizovaných vzorků pro stanovení kyseliny askorbové pomocí HPLC

Kyselina askorbová byla z přesně zváženého množství lyofilizátu vzorku extrahována pomocí několika ml 2% kyseliny metafosforečné. Směs byla odstředěna a supernatant byl nastříkovan na HPLC.

4.7.10 Titrační stanovení kyseliny L-askorbové

Nejprve byla provedena standardizace. Navážka kyseliny L-askorbové byla rozpuštěna v 2% kyselině chlorovodíkové. Připravený roztok byl titrován odměrným roztokem 2,6-dichlorindofenolu o koncentraci 0,0005 mol·dm⁻³ do lososově růžového zbarvení stálého minimálně 15 sekund. Vzorky částic s kyselinou L-askorbovou byly centrifugovány při 14 800 ot·min. Pro stanovení byl použit supernatant. K 1 ml takto připraveného vzorku bylo přidáno 10 ml 2% kyseliny chlorovodíkové a titrováno do světle růžového zbarvení. Koncentrace vitamínu C byla poté vypočtena trojčlenkou za použití získaných hodnot ze standardizace [144].

4.7.11 Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS

Ke stanovení antioxidační aktivity byla v této práci použita metoda za pomocí činidla s obsahem ABTS⁺ [157]. Tato metoda je jednou ze základních pro stanovení antioxidační kapacity. Kalibrační křivka byla sestavena pro standardní roztok Troloxu rozpuštěném v 60% ethanolu. Rozmezí koncentrací bylo 50-400 ng/ml. Do rovnice byla dosazována hodnota ΔA ($A_0 - A_{10}$). Hodnota antioxidační aktivity byla vyjádřena jako hodnota antioxidační aktivity vzorku ve stejné míře, jakoby vzorek obsahoval dané množství Troloxu. Rovnice kalibrační křivky: $y=1,389 \cdot 10^{-3} \cdot x$ ($\mu\text{g/ml}$).

4.7.12 Stanovení koncentrace klotrimazolu a ibuprofenu pomocí HPLC

K analýze koncentrace léčiv pomocí HPLC/PDA byla použita jako mobilní fáze acetonitril:voda v poměru 6:4. Průtok mobilní fáze byl 1ml/min a teplota analýzy byla 30°C.

Jako stacionární fáze byla použita kolona 150 mm Kinetex 5u C18 100 A, s vnitřním průměrem 4,6 mm. Rovnice kalibračních křivek: klotrimazol $y=3 \cdot 10^7 \cdot x$ (mg/ml), ibuprofen $y=1 \cdot 10^7 \cdot x$ (mg/ml).

4.7.13 Spektrofotometrické stanovení proteinů - metoda dle Haetree – Lowryho

Jedná se o kolorimetrické stanovení, založené na dvousložkovém činidle [158]. Tato metoda byla mnohokrát upravena. Dnešní verze využívá tři činidla, namísto původních pěti. Dochází k intenzivnějšímu zbarvení roztoku a stanovení pracuje v širším rozsahu koncentrací. Roztoky jsou stabilnější a metoda je také méně pracná. Spektrofotometrické stanovení se provádí při vlnové délce $\lambda = 650$ nm proti blanku [158]. Pro sestavení kalibrační křivky byl použit roztok albuminu a rovněž roztok lysozymu, z něhož byla připravena kalibrační řada o koncentraci 0,15 až 0,75 mg/ml respektive 0,03 -0,12 mg/ml. Rovnice kalibračních křivek: albumin $y=3,0992 \cdot x$, lysozym $y= 4,7104 \cdot x$ (mg/ml).

4.7.14 Bicinchoninová metoda

Metoda je založena reakcí BCA činidla se vzorky při 50 °C. Změna absorbance je poté měřena při 562 nm proti slepému vzorku [159]. Kalibrační řada nisinu byla připravena o koncentraci 125-2000 $\mu\text{g/ml}$. Rovnice kalibrační křivky: $y=1,9058 \cdot x$ (mg/ml).

4.7.15 Stanovení koncentrace peptidů metodou HPLC

Pro analýzu peptidů pomocí HPLC/PDA byla použita 150 mm kolona Aeris Peptide XB-C18 obsahující 3,6 μm částice Core-Shell® vázané na silikagelu s vnitřním průměrem 4,6 mm. Průtok byl zvolen na 600 $\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ a kolona byla temperována na 30°C. Jako mobilní fáze byla dle specifikací kolony použita směs rozpouštědel voda a acetonitril v poměru 20:80, obě s 0,1% obsahem kyseliny trifluoroctové. Kalibrační závislost byla sestavena pomocí koncentrační řady v rozmezí u nisinu 0,625-125 $\mu\text{g/ml}$ a u lysozymu 7-1000 $\mu\text{g/ml}$. Rovnice kalibračních křivek: nisin $y=1,7 \cdot 10^5 \cdot x$, lysozym $y=9,8 \cdot 10^3 \cdot x$ ($\mu\text{g/ml}$).

4.7.16 Stanovení enzymových aktivit

4.7.16.1 Stanovení proteasové aktivity

Při stanovení proteasové aktivity bromelainu, trypsinu, pepsinu, alkalasy, papainu, pankreatinu a kolagenasy byl jako substrát použit roztok azoalbuminu (5 mg/ml). Azoalbumin je chemicky modifikovaný protein s navázanou oranžovou sulfanilamidovou skupinou. Enzymatickou hydrolyzou (37 °C) se uvolňují barevné peptidy rozpustné v trichloroctové kyselině, které jsou následně detekovány při 440 nm. Jednotka aktivity je pak definována jako množství enzymu katalyzující přeměnu substrátu doprovázenou nárůstem absorbance o 0,001 za 1 minutu za podmínek testu [160]. Vlastní stanovení bylo provedeno smícháním 0,1 ml substrátu s 0,1 ml vzorku a inkubováno při 37 °C po dobu 30 minut. Reakce byla zastavena přidáním 0,41 ml 10% trichloroctové kyseliny, poté byly vzorky centrifugovány. K 0,5 ml získaného supernatantu bylo v květetě přidáno 0,7 ml 1M NaOH a změřena absorbance při 440 nm proti blanku.

4.7.16.2 Stanovení lipasové aktivity

Stanovení lipolytické aktivity s využitím p-nitrofenylpalmitátu je založeno na schopnosti lipolytických enzymů štěpit tento substrát za vzniku žlutě zbarveného produktu p-nitrofenolu. Při stanovení lipasové aktivity bylo 1,25 ml substrátu (0,0135 g p-nitrofenyl palmitát, 0,017g SDS, 1 g triton X-100) smícháno s 1,25 ml pufru o pH = 8 a s 0,5 ml vzorku. Takto vzniklý roztok byl inkubován při 55 °C po dobu 5 minut. Poté byla absorbance změřena při 410 nm proti blanku, ve kterém byl vzorek nahrazen destilovanou vodou. Kalibrační křivka: $y = 14,14 \cdot x$ (mmol/l).

4.7.17 Stanovení obsahu chlorofylů

K odebranému množství zkoumaného roztoku bylo přidáno stejné množství acetonu. Byla zjištěna absorbance při 645 a 663 nm, jako blank byl použit aceton zředěný vodou 1:1 [158].

Obsah chlorofylu a byl zjištěn pomocí rovnice: $c_a = 12,70 \cdot A_{663} - 2,69 \cdot A_{645}$ [mg · ml⁻¹]

Obsah chlorofylu b byl zjištěn pomocí rovnice: $c_b = 22,90 \cdot A_{645} - 4,68 \cdot A_{663}$ [mg · ml⁻¹]

4.8 Příprava částic

4.8.1 Příprava polysacharidových částic

Připravené polysacharidové částice byly připraveny na principu metody zesítnění. Při přípravě alginátových částic byl jako sířující roztok použit chlorid vápenatý [18, 20]. Dále byla testována možnost přípravy alginátových částic, které byly dále zpevněny potažením vrstvou chitosanu [161]. Chitosanové částice byly připraveny pomocí roztoku tripolyfosfátu sodného [162]. Škrobové částice byly připraveny srážením v ethanolu [163]. Přesné postupy jsou uvedeny níže.

4.8.1.1 Příprava alginátových částic A

6 ml 0,5% chloridu vápenatého bylo přikapáváno za stálého míchání do 20 ml extraktu, ve kterém bylo rozpuštěno 0,06 g alginátu (vznikl 0,3% roztok alginátu).

4.8.1.2 Příprava chitosanových částic CH

6 ml 0,5% roztoku tripolyfosfátu sodného (TTP) bylo za stálého míchání přikapáváno k 20 ml extraktu, ve kterém byla předem rozpuštěná navážka 0,06 g chitosanu s přísadkou 0,2 ml koncentrované kyseliny octové.

4.8.1.3 Příprava škrobových částic Š

Byl připraven 1% roztok škrobu. Škrob byl rozpuštěn v roztoku NaOH a močoviny v poměru 0,8:1 (hmotnostních procent). Do takto připraveného roztoku byl přidán vzorek určený k enkapsulaci. 1 ml tohoto roztoku byl přidáván za stálého míchání na magnetické míchačce po malých dávkách do 20 methanolu.

4.8.1.4 Příprava alginátových částic pomocí ultrazvuku A

60 mg alginátu bylo rozpuštěno ve 20 ml extraktu. Vzniklá směs byla sonifikována a po malých dávkách bylo přidáváno 6 ml 0,5% roztoku chloridu vápenatého.

4.8.1.5 Příprava chitosanových částic pomocí ultrazvuku CH

250 mg chitosanu bylo rozpuštěno ve 40 ml extraktu a poté bylo přidáno 0,5 ml koncentrované kyseliny octové. Vzniklá směs byla ultrazvukována a po malých dávkách byly přidávány 4 ml 2% tripolyfosfátu sodného.

4.8.1.6 Příprava chitosan-alginátové částice pomocí ultrazvuku CHA

25 ml alginátu o koncentraci 6 mg/ml bylo smícháno s 25 ml enkapsulovaného vzorku, pH roztoku bylo pomocí HCl upraveno přibližně na 5. Poté bylo do roztoku přidáváno 10 ml roztoku CaCl₂ o koncentraci 3,35 mg/ml s pH upraveným na 5 pomocí HCl. V průběhu přidávání byl roztok ultrazvukován. Dále bylo k takto vzniklému roztoku přidáváno 20 ml roztoku chitosanu. Ten byl připraven rozpuštěním chitosanu v 1% kyselině octové tak, aby vznikl roztok o koncentraci 0,8 mg/ml, pH tohoto roztoku bylo opět upraveno přibližně na 5 pomocí NaOH. Takto vzniklý roztok byl po malých dávkách přidáván do předchozího roztoku a celý roztok byl průběžně homogenizován.

4.8.2 Příprava polysacharidových částic pomocí enkapsulátoru

Pro enkapsulaci byl rovněž použit přístroj Enkapsulátor Büchi B-395 Pro. Jedná se o poloautomatický přístroj sloužící k polymernímu zapouzdření chemických látek, biologických molekul, drog, vůní a aromat, pigmentů, extraktů, buněk a mikroorganismů za sterilních i nesterilních podmínek. Tvorba kapsulí je založena na faktu, že pokud regulovaný laminární kapalný proud vibruje s optimální frekvencí, rozbije se na kapky stejné velikosti. Hlavními součástmi jsou regulační jednotka se stříkačkovým čerpadlem, elektrický a pneumatický systém a reakční nádoba. Všechny součásti přístroje, které jsou v kontaktu s kapsulemi, je možné sterilizovat autoklávováním.

Enkapsulovaný produkt (buňky, mikroorganismy nebo jiné biologické látky a chemikálie) se smíchá se zapouzdřovacím polymerem a směs je z tlakové láhve vzduchem tlačena do pulzační komory. Kapalina pak prochází přes přesně definovanou trysku a na výstupu z trysky se rozděluje do jednotlivých kapiček stejné velikosti. Tyto kapky procházejí elektrickým polem mezi tryskou a elektrodou, kde získají povrchový náboj. Elektrostatické odpuzivé síly způsobí rozptýlení perliček dopadajících do vytvrzovacího roztoku. Velikost perličky reguluje několik parametrů včetně frekvence vibrací, amplitudy, velikosti trysky, rychlosti průtoku a fyzikálních vlastností směsi produktu s polymerem. Obecně platí, že průměr perličky je dvojnásobkem průměru trysky, ale změnou rychlosti toku a frekvence vibrací může být rozsah změněn přibližně o $\pm 15\%$ [164]. V práci byly připraveny dva základní typy částic. V prvním případě (typ matrix) byla enkapsulovaná složky do obalového materiálu dispergovány a příprava probíhala výše popsaným způsobem. V druhém případě (typ kapsule) byla enkapsulovaná složka zapouzdřena do obalového materiálu ve formě jádra.

V tomto případě byla enkapsulovaná složky pomocí stříkačkového čerpadla vytlačována přes vnitřní trysku do pulzní komory, do které byl současně přes vnější trysku z tlakové láhve vzduchem dávkován zapouzdřovací polymer. Po vhodném nastavení podmínek byl získán řetízek kapiček, u kterých byl vnitřní prostor tvořen enkapsulovanou složkou a vnější část byla tvořena čistým polymerem. Tyto kuličky byly zachytávány v polymerizačním roztoku, kde došlo k jejich vytvrzení.

4.8.2.1 Alginátové částice s jádrem – EA2%, EA4%

Byl připraven 2% roztok alginátu pro vytvoření obalu kolem aktivní látky. Jako srážecí roztok byl použit 50 ml 2% roztok CaCl_2 . 20 ml vzorku určeného k enkapsulaci bylo tlačeno tryskou o průměru 150 μm . Velikost trysky pro obalovou látku byla 300 μm .

Mikročástice z alginátu byly dále připraveny ze 4% roztoku alginátu použitého pro vytvoření obalu kolem aktivní látky. Jako srážecí roztok bylo použito 50 ml 2% roztok CaCl_2 . 20 ml vzorku bylo tlačeno tryskou o průměru 200 μm rychlostí 10,4 ml \cdot min⁻¹. Velikost trysky pro obalovou látku byla 400 μm .

4.8.2.2 Příprava alginátových částic

Vzorek, případně roztok vzorku určený k enkapsulaci byl smíchán s roztokem 2% (4%) alginátu. Vzniklá směs byla převedena do zásobní láhve a pomocí enkapsulátoru (Büchi) byla tryskou o definovaném průměru rozprašována do 50 ml 2% chloridu vápenatého, který byl nepřetržitě míchán. Velikosti použitých trysek byly 300 a 450 μm .

4.8.2.3 Příprava alginát-škrobových částic

Roztok škrobu o koncentraci 2 % byl připraven rozpuštěním odpovídající navážky škrobu v roztoku obsahujícím hydroxid sodný a močovinu v jejich poměru 0,8:1,0 (hmotnostní procenta vztahena k roztoku). Následně byl alginátový a škrobový roztok smíchán ve zvoleném poměru; enkapsulace probíhala přikapáváním do vodného, resp. ethanolového roztoku CaCl_2 . Velikost trysky byla 300 μm .

4.8.2.4 Příprava alginát-CMC částic

Postup je shodný s přípravou alginátových, jen obalový materiál pro enkapsulaci byl vytvořen smícháním 2% alginátu a 2% CMC v různých poměrech (4:1; 2:1; 1:1). Velikost trysky byla 300 µm.

4.8.2.5 Příprava chitosanových částic

Byl připraven 2% roztok chitosanu s obsahem enkapsulované složky, pH bylo upraveno pomocí kyseliny octové na hodnotu pH 5. Enkapsulace probíhala přikapáváním do 2% roztoku tripolyfosfátu sodného.

4.8.2.6 Příprava chitosan-agarových částic

V určeném poměru byl smíchán 2% chitosanový roztok, enkapsulovaný vzorek a 2% roztok horkého agaru; následně byly částice připraveny přikapáváním do vychlazeného roztoku 2% tripolyfosfátu, dokud byl agar díky vyšší teplotě dostatečně tekutý.

4.8.2.7 Příprava chitosan-škrobových částic

Roztok chitosan byl smíchán s 1% roztokem škrobu v poměru 1:3 a 1:5, dále byl přidán enkapsulovaný vzorek a směs byla převedena do zásobní láhve enkapsulátoru. Jako srážecí roztok byl použit 2% tripolyfosfát sodný. Velikost trysky byla 300 µm. Při přípravě byl použit 2% roztok chitosanu u kterého bylo pH upraveno kyselinou octovou na hodnotu 5.

Roztok 1% škrobu byl připraven tak, že byl škrob rozpuštěn v roztoku NaOH a močoviny v poměru 0,8:1 (hmotnostních procent).

4.8.2.8 Příprava chitosan-alginátových částic

Nejprve byly připraveny z 2% alginátu s přídavkem enkapsulovaných mikroorganismů a směs byla přikapávána za stálého míchání do 2% chloridu vápenatého. Poté byly částice odfiltrovány a přidány za stálého míchání do 0,6% roztoku chitosanu okyselený pomocí kyseliny octové. Po vytvoření chitosanové vrstvy byly částice vytvrzeny v 2% tripolyfosfátu sodném.

4.8.2.9 Příprava agarosových částic

Agarosové částice byly připraveny rozpuštěním agarosy ve vodě za vzniku 2% roztoku agarosy, který byl za teplého stavu (40 °C) pipetován do studené vody, která měla okolo 4 °C.

4.8.2.10 Příprava agarových částic

Pro přípravu agarových částic byl použit 2% roztok agaru, který byl za teplého stavu (40 °C) pipetován do studené vody s teplotou okolo 4 °C.

4.8.2.11 Příprava alginát-agarosových částic

Při přípravě alginát-agarosových částic byla připravena 4% agarosa a 2% alginát. Tyto dva roztoky byly smíchány v poměru 1:1. Ve směsi roztoků byly suspendovány buňky a poté byl roztok přikapáván do studeného 2% roztoku chloridu vápenatého.

4.8.2.12 Příprava alginát-agarových částic

Alginát-agarové částice byly připraveny smícháním 2% agaru a 2% alginátu v poměru 1:1. V tomto roztoku byla suspendována kultura mikroorganismů a poté byl roztok přikapáván do studeného 2% roztoku chloridu vápenatého.

4.8.2.13 Příprava alginát-pullulanových částic

Při přípravě alginát-pullulanových částic byl smíchán 4% roztok pullulanu a 4% roztok alginátu v poměru 1:1. V tomto roztoku byly suspendovány buňky a roztok byl přikapáván do 2 % roztoku chloridu vápenatého.

4.8.3 Příprava lipidových částic

4.8.3.1 Příprava liposomových částic pomocí ultrazvuku U

Lecitin a cholesterol v různých navážkách při zachování poměru 9:1 (lecitin:cholesterol) byly testovány pro přípravu liposomů pomocí ultrasonifikace. Jako nejhodnější byla zvolena koncentrace 450 mg lecitinu a 50 mg cholesterolu po přidavku do 20 ml vodného roztoku či extraktu vzorku určeného k enkapsulaci. Příprava liposomů byla provedena pomocí ultrazvuku, kdy byla připravená směs homogenizována po dobu několika minut při použití chladicí lázně [165]. Liposomy byly rovněž připraveny (zejména při enkapsulaci ve vodě nerozpustných složek) s přidavkem organické fáze (U2). Směs sójového/vaječného lecitinu a cholesterolu v chloroformu byla smíšena s vodou v poměru 1:10 (chloroform:voda). Takto připravená směs byla ultrazvukována za vzniku emulze. Kádinka s roztokem byla při ultrazvukování ponořena do studené vodní lázně. Na závěr byl z emulze na magnetické míchače při 50 °C odpařen chloroform.

4.8.3.2 Odpařování na tenké vrstvě – TLE

80 mg sójového/vaječného lecitinu a 10 mg cholesterolu bylo rozpuštěno v 10 ml směsi chloroformu a methanolu v poměru 80:20. Roztok byl přelit do odpařovací baňky a na vakuové odparce byl odpařen do sucha. K vytvořenému lipidovému filmu bylo přidáno 10 ml enkapsulováno vzorku a směs byla střídavě míchána na vortexu a ultrazvuku do úplného rozpuštění lipidového filmu ze stěn baňky. V případě enkapsulace hydrofobní složky, byla daná aktivní látka přidána společně s lecitinem již do směsi chloroformu a methanolu. Vzniklý lipidový film byl poté rozpuštěn v 10 ml čisté vody [166].

4.8.3.3 Metoda reverzních fází – RP-TLE

50 mg sójového/vaječného lecitinu a 12,5 mg cholesterolu bylo rozpuštěno ve směsi chloroformu a methanolu v poměru 80:20. Roztok byl přelit do odpařovací baňky a na vakuové odparce odpařen do sucha. Vytvořený lipidový film byl rozpuštěn v 8 ml etheru. K tomuto roztoku byly přidány 2 ml enkapsulovaného vzorku. Směs byla dále s přestávkami ultrazvukována po dobu přibližně 1 minuty do vytvoření emulze. Poté byl ether odpařen na vakuové odparce a vzniklá vodná suspenze byla doplněna destilovanou vodou na konečný objem 10 ml. V případě enkapsulace hydrofobní složky, byla daná aktivní látka přidána společně s lecitinem již do směsi chloroformu a methanolu, 2 ml enkapsulovaného vzorku pak byly nahrazeny 2 ml vody [167].

4.8.3.4 Ethanolové vstříkávání EV

Nejdříve byl podle následujícího postupu izolován lecitin z vaječného žloutku, který byl následně použit k nástřiku. Při izolaci lecitinu byl vaječný žloutek smíchán s 25 ml acetonu a za občasného míchání ponechán stát 10 minut. Poté byla směs zfiltrována a ze sraženiny na filtru byla izolace acetonem opakována. Vzniklá směs byla opět zfiltrována. Sraženina byla rozpuštěna v 10 ml ethanolu, směs byla zfiltrována a sraženina byla znovu rozpuštěna v ethanolu a směs poté zfiltrována. Oba Ethanolové filtráty byly spojeny dohromady a odpařeny do sucha [160]. Odparek (izolovaný lecitin) byl rozpuštěn v 15 ml ethanolu. Takto připravený roztok lecitinu (o koncentraci 100 mg·ml⁻¹) byl pomocí injekční stříkačky s tenkou jehlou velmi pomalu nástřikován do enkapsulovaných vzorků v různých poměrech [168].

4.8.3.5 Liposomy s přidavkem lipidového extraktu z lososa – marinosomy, M

Pro přípravu liposomů s přidavkem lipidového extraktu z lososa byly vybrány pouze metody TLE a upravená metoda přípravy pomocí ultrazvuku. Jejich složení bylo 10 mg cholesterolu, obsah lipidového extraktu z lososa bylo 2,5; 5; 10; 20; 25; 50 a 100%, jako zbytek do 100% (90 mg) byl přidán lecithin.

4.9 Izolace lipidového extraktu z lososa

K izolaci lipidů ze vzorku lososa byla použita extrakce lipidů dle Folche. Vzorek byl homogenizován ručním mixerem, poté byl 1 g takto upraveného vzorku míchán s 20 ml extrakční směsi (chloroform:methanol v poměru 2:1) při laboratorní teplotě po dobu 60 minut. Poté byl extrakt přefiltrován. Vzorek z filtru byl převeden do kádinky a smíchán s 10 ml extrakční směsi a opět míchán při laboratorní teplotě 30 minut. Filtráty z obou kroků byly smíchány, bylo k nim přidáno 36 ml destilované vody (1,2 násobek).

Takto připravená směs byla centrifugována 5 minut při 1 000 ot/min. Spodní chloroformová fáze byla přečištěna přes bezvodý síran sodný. Na závěr byl chloroform odpařen na vakuové rotační odparce při 40 °C.

4.9.1 Stanovení obsahu mastných kyselin u lipidového extraktu z lososa

Složení lipidového extraktu z lososa bylo charakterizováno plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem.

Podmínky analýzy zahrnovaly následující teplotní program: 60 °C 10 min, vzestupný gradient 10 °C·min⁻¹ do 200 °C s výdrží 10 min, poté vzestupný gradient 5 °C·min⁻¹ do 220 °C s výdrží 15 min a vzestupný gradient 10 °C·min⁻¹ do 240 °C s výdrží 10 min. Celková doba analýzy byla 62,67 min. Teplota injektoru byla nastavena na 250 °C, splitless time byl 5 min a dávkování bylo zajištěno pomocí autosamplery bez děliče toku (objem dávkovaného vzorku 1 µl). Nosným plynem byl dusík o průtoku 0,5 ml·min⁻¹. Jako detektor byl použit plamenově ionizační detektor. Jeho teplota byla nastavena na 250 °C, průtok vzduchu na 350 ml·min⁻¹, průtok vodíku 35 ml·min⁻¹ a make-up dusíku na 30 ml·min⁻¹.

4.10 Stanovení enkapsulační účinnosti

Vzorek po enkapsulaci danými metodami byl centrifugován při 14 800 otáčkách za minutu, supernatant byl slit, zředěn v určitém poměru a byla v něm stanovována pomocí HPLC či spektrofotometrických metod (popsaných v kapitole 4.7) koncentrace zbylé volné enkapsulované složky. V případě částic připravených z enkapsulátoru byla místo centrifugace provedena filtrace.

Vzorku byly analyzovány i před enkapsulací. Z těchto dvou hodnot byla poté vypočítána enkapsulační účinnost dané metody. Vypočet enkapsulační účinnosti byl proveden dle následující rovnice:

$$EU\% = \frac{\text{aktivní látka celkové množství} - \text{aktivní látka volné množství}}{\text{aktivní látka celkové množství}} \times 100.$$

4.11 Stanovení velikosti částic pomocí DLS a stability pomocí zeta-potenciálu

Velikost částic různě připravených vzorků byla stanovena na přístroji Zetasizer Nanoseries, který využívá dynamického rozptylu světla. Tento přístroj měří časovou závislost kolísání intenzity rozptýleného světla dané Brownovým pohybem částic. Analýza intenzity rozptýleného světla umožňuje určit difúzní koeficient částic a vypočítat distribuci velikosti částic v daném vzorku [150]. Připravené částice byly vhodně zředěny Mili-Q vodou a analyzovány.

Měření zeta potenciálu bylo provedeno rovněž na přístroji Zetasizer Nanoseries. Měření je založeno na technice „Laser Doppler Velocimetry“, tedy na tom, jak rychle se pohybují částice v kapalině za působení elektrického pole.

Zeta potenciál je rozdíl potenciálů na pohybovém rozhraní, který se ustavuje při relativním pohybu tuhé fáze s elektrickou dvojrivrstvou vůči roztoku. Znaménko je opačné než znaménko iontů vnější vrstvy elektrické dvojrivrstvy. Čím větší náboj částice nese, tím je stabilnější [150]. Vzorky byly opět vhodně zředěny a proměřeny.

4.12 Stanovení vlastností systému pomocí analytické centrifugace

Pro analytickou centrifugaci byly použity vzorky částic po enkapsulaci bez jakýchkoliv dalších úprav. Vzorky byly napipetovány do kyvet určených pro analytickou centrifugaci, byly nastaveny vhodné otáčky v kombinaci s dobou centrifugace a spuštěno měření. Při centrifugaci byla snímána měnící se transmitance vzorku v kyvetě. Výsledky byly zobrazeny v grafech závislostí transmitance na pozici v kyvetě, což vypovídá o rychlosti sedimentace daných částic [152, 153].

4.13 Stanovení stability částic v trávicích šťávách

Pro simulaci fyziologického prostředí ke sledování stability částic v gastrointestinálním traktu byly připraveny tři modelové trávicí šťávy dle Československého lékopisu [169]. Připravené částice byly k roztoku trávicí šťávy přidávány vždy v poměru 1:1. Inkubace probíhala při 37°C po dobu 20 min, v případě žaludeční a pankreatické šťávy a 40 min v případě žlučové šťávy. Po ukončení inkubace byla pomocí HPLC a spektrofotometrických metod změřena koncentrace uvolněných složek z částic působením trávicích šťáv. V případě enkapsulace probiotických buněk bylo stanoveno uvolněné množství pomocí průtokové cytometrie, případně počítáním buněk v Bürkerové komůrce. Současně byla sledována viabilita uvolněných buněk a také poměr živých a mrtvých mikroorganismů uvnitř částice.

4.14 Stanovení stability částic v modelových potravinách

Simulantem potraviny je zkušební roztok, který má přesně definované složení a přesně definované vlastnosti. Tato potravina nahrazuje určitou potravinu nebo skupinu potravin. Pro potravinu, která má pH vyšší než 4,5 byla použita destilovaná voda. Pro potravinu s pH nižším než 4,5 byl připraven 3% roztok kyseliny octové. Pro potraviny a nápoje s alkoholem byl připraven 10% roztok ethanolu [170]. Pro tukové potraviny byl použit jako modelový roztok olej smíchaný s vodou v poměru 1:4 (olej:destilovaná voda) [170]. Vzorek byl vždy připraven v poměru 1:3 (částice:modelová potravina). Částice byly v těchto 4 modelových potravinách uchovány při teplotě 5°C/25°C. V pravidelných intervalech byla sledována koncentrace uvolněných enkapsulovaných složek obdobným způsobem jako v případě stability částic v trávicích šťávách.

4.15 Stanovení stability v reálných potravinách

4.15.1 Stanovení stability částic v reálných nápojích

Jako reálné nápoje byly použity: Nestea zelený čaj, zelený čaj, černý čaj, pomerančový džus, citronová minerálka, Coca Cola a voda s medem (50 ml vody a 5,5g medu). Stabilita částic v reálné potravine byla sledována v čase nula, jeden týden a čtyři týdny. U ručně vyrobených částic (alginátové, chitosanové, chitosan-alginátové a liposomové) bylo použito ředění v poměru 1,3:0,2 reálná potravina:částice. V případě částic z enkapsulátoru bylo použito ředění 1 ml reálné potraviny a 0,2 g částic. V průběhu skladování byla sledována změřena koncentrace kofeinu, vitamínu C a celkových polyfenolů.

4.15.2 Stanovení stability částic v mléčných produktech

Pro testování stability vybraných částic s obsahem probiotických kultur byly zvoleny tyto mléčné výrobky (v závorce uvedená zkratka): polotučné čerstvé mléko pasterované (M), jogurtový nápoj Actimel (A), selský jogurt bílý (S), a choceňský smetanový jogurt (CH).

Částice byly přidány do reálných potravin v koncentraci 0,33 g/ml a po celou dobu uchovány při teplotě 5°C. Ve stanovených intervalech (v čase nula, jeden týden a čtyři týdny) byl proveden odběr roztoku pro stanovení obsahu uvolněných složek a probiotických buněk. Současně byl s množstvím a viabilitou uvolněných buněk sledován rovněž nárůst buněk a jejich viabilita v částicích.

4.16 Antimikrobiální testy

Ke stanovení antimikrobiální aktivity testovaných vzorků bylo využito standardních dilučních a difuzních testů [134, 135]. Testování bylo provedeno pomocí mikroorganismů na vhodných kultivačních médiích a za optimálních podmínek viz. kap. 4.4.

4.16.1 Bujónová diluční metoda

Při této metodě byl měřením zákalu sledován růst mikroorganismu na mikrotitrační destičce. Vždy k 150 μ l buněk v médiu (byly použity vždy čerstvě přeočkované buňky a pro porovnání byla testována i 24 hodinová kultura) bylo pipetováno 50 μ l antimikrobiální látky či extraktu. Jako blank byla použita kultura s přídatkem 50 μ l vody, případně jiného použitého rozpouštědla. Růst byl sledován v čase 0, 3 a 24 hod.

4.16.2 Agarová difúzní metoda

Nejprve byly připraveny agarové plotny, na které bylo zaočkováno z 24 hod. kultury vybraných MO. Po dalších 24 hodinách, kdy došlo k nárůstu buněk na povrchu tuhého média, byl zahájen test. Do tuhého média byly vytvořeny jamky. Do jamek dle jejich velikosti bylo pipetováno 3-80 μ l připraveného antimikrobiálního vzorku. Jako blanky byla použita voda, případně rozpouštědlo.

Po 24 hodinách byla sledována velikost inhibiční zóny vytvořené okolo jamek. Druhou metodou byla aplikace vzorků pomocí filtračních papírků o průměru 5 mm. Tyto disky obsahující 10 μ l vzorku byly sterilně aplikovány na agarové plotny s narostlou kulturou a rovněž byly sledovány velikosti inhibičních zón.

4.16.3 Testy antimikrobiální aktivity - zkumavkový test

V této metodě byl sledován růst mikroorganismu pomocí zákalu. Pro testování byla připravena série baněk/zkumavek obsahující příslušná sterilní média, které byly zaočkovány 2% suspenze buněk z inokula. Současně byl přidán testovaný roztok či částice s antimikrobiální složkou. Připravené kultivační nádoby byly inkubovány při optimální teplotě a byl sledován zpomalený či zastavený nárůst buněk v porovnání s blankem, který v médiu neobsahoval antimikrobiální složku. Nárůst buněk byl sledován měřením zákalu při 630 nm v čase 0, 24 a 48 hod. V případě testování vlivu rozrušení liposomů na antimikrobiální/antimykotický účinek byl k rozrušení liposomů použit olej. Jako blanky pak sloužily zkumavky s přídatkem vody i oleje.

4.16.4 Testy antimikrobiální aktivity monitorující kinetiku lyze buněk G+ bakterií

Princip tohoto stanovení vychází z podstaty účinku antibakteriálního lysozymu, kterou je schopnost katalyzovat hydrolýzu β -1,4 glykosidických vazeb peptidoglykanů, nacházejících se v buněčné stěně gram pozitivních bakterií. Ze suspenze buněk, resp. z každé buňky se po enzymovém rozrušení buněčné stěny uvolnění jejich obsah do roztoku, což bude mít za následek teoretické zvýšení zákalu. Pro tuto variantu antimikrobiálního testu byla připravena suspenze buněk z inokula zředěná 1:10 destilovanou vodou. Vlastní antimikrobiální test byl proveden přidáním 100 μ l příslušného roztoku testovaného vzorků v destilované vodě přímo do kyvety s 1,5 ml 10krát zředěné kultury. V čase $t=0$ byla odečtena hodnota absorbance při 630 nm. Poté byla po 5 minutách odečtena konečná hodnota zákalu. Odečtením hodnot počáteční a konečné absorbance vznikla relativní porovnatelná antimikrobiální účinnost reprezentovaná rychlostí lyze buněk.

4.17 Analýza částic -optický mikroskop

Mikroskopie byla použita ke sledování velikosti a morfologie připravených částic. V případě enkapsulace probiotických buněk byla využita rovněž ke stanovení počtu a viability buněk uvnitř částice. V některých případech, kde nebylo možné použít průtokového cytometru, byl sledován rovněž počet a viabilita uvolněných buněk.

Při stanovení viability byly částice suspendovány v roztoku methylenové modři, po 5 minutách bylo pozorováno modré zbarvení mrtvých buněk. V případě sledování počtu a viability buněk byla na určená místa Bürkerovy komůrky nanášena kapka vhodně zředěné suspenze buněk, resp. modelové či reálné potraviny. Byla přidána kapka methylenové modři; obarvená suspenze byla přikryta krytým sklíčkem, které bylo uchyceno pomocí klipsů. Po pěti minutách, kdy byly buňky obarveny a sedimentovaly, byl spočten výskyt živých a mrtvých buněk.

4.18 Analýza částic - elektronový mikroskop

Mikroskopie byla použita ke sledování velikosti a morfologie připravených částic. Měření byla provedena pomocí skenovacího elektronového mikroskopu JEOL JSM-7600F (USA) ve spolupráci s Ústavem chemie materiálů.

4.19 Analýza částic - fluorescenční mikroskop

Fluorescenční mikroskopie bylo využito především ke stanovení viability enkapsulovaných probiotických buněk. Pro zobrazení částic a buněk na fluorescenčním mikroskopu bylo použito barvení pomocí fluoresceinu (FDA) a propidiumjodidu (PI).

Částice byly suspendovány v 1 ml destilované vody a obarveny 5 μl FDA a 5 μl PI. Po 20minutové inkubaci ve tmě byly pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu pomocí excitace světlem o vlnových délkách 470 a 552 nm, čímž byly rozlišeny živé a mrtvé buňky. Živé buňky pomocí svých enzymů přemění fluorescein diacetát (FDA) na zeleně fluoreskující fluorescein, naopak v případě mrtvých došlo k vazbě propidiumjodidu na DNA.

První snímek při nižší vlnové délce zobrazil fluorescenci živých i mrtvých buněk, vyšší vlnová délka zvýraznila fluorescenci pouze červeně svítících mrtvých buněk.

4.20 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie byla využívána ke stanovení počtu a viability buněk před jejich použitím na testování antimikrobiální aktivity. Pro testovací bakteriální kmeny byly současně stanoveny kalibrační křivky závislosti absorbance měřené při 630 nm na počtu buněk v médiu. Cytometrie byla rovněž použita ke stanovení počtu a viability probiotických buněk před a po enkapsulaci a též ke sledování množství uvolněných buněk s částic při dlouhodobém uchovávání v modelových i reálných potravinách a při simulovaných podmínkách zažívacího traktu. Vzorek obsahující buňky byl vhodně zředěn a umístěn do sampleru průtokového cytometru. Byl zjištěn počet buněk a po vizualizaci propidiumjodidem (5 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ 20 minut ve tmě), bylo stanoveno procentuální zastoupení mrtvých a živých buněk.

4.21 Lyofilizace

Proces lyofilizace byl využit k přípravě lyofilizovaného vaječného bílku a vybraného ovoce, k přípravě liposomových preparátů pro pozorování na elektronovém mikroskopu a rovněž jako jedna z možností uchovávání vybraných polysacharidových částic.

4.22 Syntéza zlatých nanočástic

Zlaté nanočástice byly připraveny pomocí velmi rychlé a jednoduché metody fotochemické syntézy [171]. Čerstvě připravené roztoky H_{Au}Cl₄ a Irg o různých koncentracích v deionizované vodě byly smíseny v různých poměrech a ozářeny ve fotoreaktoru s 108 μW/m² UVA světlem (365 nm) po dobu 15–60 minut, za vzniku zlatých nanočástic.

4.23 Imobilizace zlatých nanočástic

Zlaté nanočástice byly imobilizovány spontánně po přidání imobilizované látky v odpovídajícím pufru k připraveným částicím. Přebytek imobilizované složky byl odstraněn pomocí centrifugace [172]. K imobilizaci byly použity krátké peptidy a sekvence DNA. Možnost imobilizace byla testována na volné nanočástice a rovněž na nanočástice, které byly nejprve pomocí polyelektrolytické pěti-vrstvy (PEI,PSS,PAH,PSS,PAH) imobilizovány na skleněný povrch (poly(iminoethylen) (PEI), polystyren, polysulfonát sodný (PSS) a poly(allylamin-hydrochlorid) (PAH).

4.24 Postup přípravy zlatých nanočástic uvnitř liposomů

Pro syntézu malých nanočástic s konstantní velikostí byla optimalizována příprava nanočástic zlata uvnitř liposomů. K přípravě zlatých nanočástic bylo opět využito fotochemické syntézy. Čerstvě připravené roztoky H_{Au}Cl₄ (0,1 mg/ml) a Irg (1 mM) v deionizované vodě byly enkapsulovány do POPC (palmitoyloleoylfosfocholin, 2 mg/ml) liposomů, připravených pomocí techniky hydratace na tenké vrstvě. Následně byl vzorek liposomů upraven pomocí membránového extrudéru za použití polykarbonátového filtru o velikosti pórů 100 nm. Po odstranění neenkapsulovaného množství H_{Au}Cl₄ a Irg oddělením přes kolonu Sephadexu G-25, byly vzorky ozářeny ve fotoreaktoru s 108 μW/m² UVA světlem (365 nm) po dobu 15 minut, za vzniku stabilních zlatých nanočástic uvnitř liposomů.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Předložená práce je zaměřena na vývoj a přípravu vybraných typů mikro- a nanočástic obsahujících aktivní složky s řízenou dobou uvolňování. Cílem práce bylo zavedení a srovnání různých technik enkapsulace. Do částic byly enkapsulovány jak nízkomolekulární látky a jejich směsi, tak i vysokomolekulární složky a mikrobiální buňky. U připravených částic byla studována efektivita enkapsulace, dlouhodobá stabilita při různém pH, teplotě, v různých typech prostředí i v simulovaných fyziologických podmínkách. Výstupem práce by měl být návrh vhodných transportních systémů pro řízené uvolňování aktivních látek v nových typech funkčních potravin či v kosmetických produktech.

5.1 Enkapsulace kofeinu a jeho přírodních extraktů

Tato část práce byla zaměřena na studii enkapsulace vybraných přírodních extraktů s obsahem kofeinu pro aplikaci v potravinářském průmyslu a v kosmetice. Byly testovány možnosti enkapsulace standardu kofeinu a extraktů z kávy, černého čaje, zeleného čaje, bílého čaje a guarany. Dále byly tyto extrakty kombinovány s ovocnými extrakty. Byly použity extrakty pomeranče, citronu, kiwi a kustovnice čínské (goji). Všechny přírodní extrakty byly nejprve charakterizovány a následně použity k enkapsulaci. Na problematice enkapsulace kofeinu byla nově zavedena, optimalizována a ověřena převážná většina metod přípravy a charakterizace mikro- a nanočástic, které dosud nebyly na Ústavu chemie potravin a biotechnologií prováděny.

5.1.1 Charakterizace vybraných přírodních extraktů

Přírodní rostlinné extrakty byly charakterizovány na obsah kofeinu dále na celkový obsah polyfenolů. V případě ovocných extraktů byl sledován celkový obsah polyfenolů a obsah vitamínu C. Podrobné postupy stanovení jsou uvedeny v kapitole 4.7. Příprava jednotlivých extraktů probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 4.6.

Tabulka 1. Charakterizace použitých extraktů

	Černý čaj	Zelený čaj	Bílý čaj	Guarana	Káva
Obsah kofeinu [mg/ml]	74,8±1,7	83,4±2,1	73,5±1,2	122,0±3,9	104,1±2,5
Obsah celkových polyfenolů [mg/ml]	38,0±0,8	87,5±1,3	99,0±1,8	81,1±1,2	55,8±0,6
	Citron	Kiwi	Pomeranč	goji	
Obsah celkových polyfenolů [mg/ml]	0,050±0,003	0,022±0,002	0,014±0,001	0,131±0,005	
Obsah vitamínu C [mg/ml]	1,003±0,012	0,390±0,025	0,320±0,016	0,481±0,035	

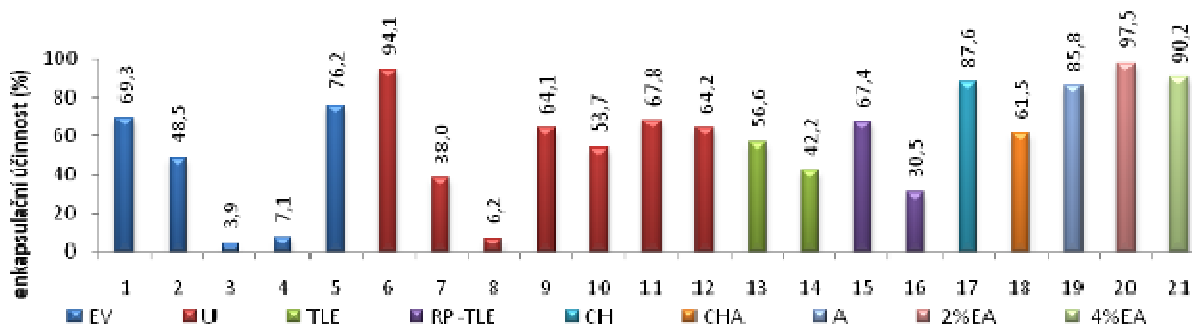
Obsah kofeinu, testovaných přírodních extraktů, stejně jako celkové obsahy polyfenolů a vitamínu C jsou uvedeny v Tabulce 1. Nejvyšší obsah kofeinu byl stanoven u extraktu z guarany (122 mg/ml), naopak nejnižší obsah byl detekován v bílém čaji (73,5 mg/ml). Bílý čaj obsahoval nejvyšší množství polyfenolů (99mg/ml), nejnižší obsah polyfenolických látek měly káva a černý čaj. Z ovocných složek měl nejvyšší obsah polyfenolů extrakt z goji (0,13 mg/ml). Nejvyšší obsah vitamínu C byl naměřen u šťávy z citronu.

5.1.2 Stanovení enkapsulační účinnosti

K enkapsulaci byly použity různé koncentrace standardu kofeinu a extrakty z přírodních zdrojů kofeinu. Na závěr byly extrakty z přírodních zdrojů kofeinů koenkapsulovány s přídatkem ovocných složek. Vzorky po enkapsulaci danými metodami byly centrifugovány při 14 800 otáčkách za minutu, supernatanty byly slity, zředěny ve vhodném poměru a byla v nich stanovována pomocí HPLC koncentrace zbylého volného kofeinu, stejně jako ve vzorcích před enkapsulací. Z těchto dvou hodnot byla poté vypočítána enkapsulační účinnost dané metody. U přírodních extraktů bylo navíc pomocí spektrofotometrické metody stejným způsobem sledováno množství enkapsulovaných polyfenolů a vitamínu C. Metody pro přípravu jednotlivých typů částic jsou uvedeny v kapitole 4.8.

5.1.2.1 Enkapsulační účinnost standardního kofeinu

Do liposomových a polysacharidových částic byl nejprve enkapsulován standard kofeinu, pomocí kterého byla provedena optimalizace jednotlivých metod přípravy částic.



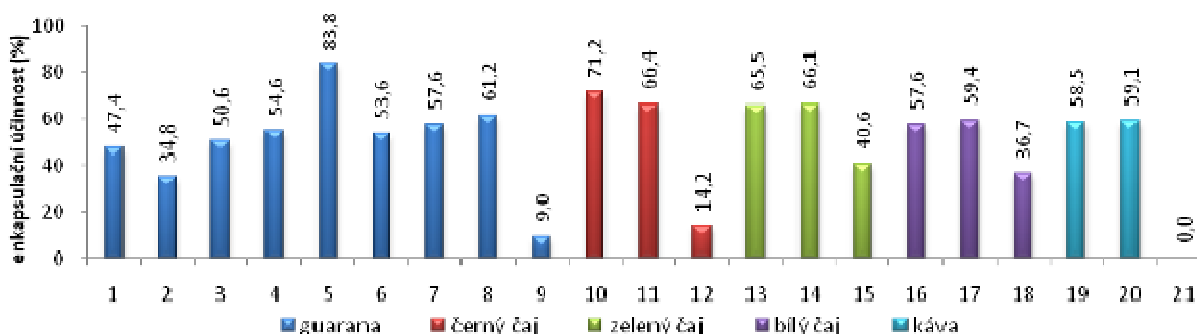
Graf 7. Enkapsulační účinnost standardu kofeinu

1 EV kofein 0,05 mg/ml 1:10 (lecitin:kofein)	8 U1 kofein 1 mg/ml – 9 lec. 1 chol. (mg/ml)	15 kofein (0,1 mg/ml) RP-TLE
2 EV kofein 0,1 mg/ml 1:10 (lecitin:kofein)	9 U1 kofein 0,1 mg/ml – 18 lec. 2 chol. (mg/ml)	16 kofein (0,2 mg/ml) RP-TLE
3 EV kofein 1 mg/ml 1:10 (lecitin:kofein)	10 U1 kofein 0,1 mg/ml – 9 lec. 1 chol. (mg/ml)	17 kofein CH
4 EV kofein 0,1 mg/ml 1:1 (lecitin:kofein)	11 U2 kofein 0,1 mg/ml – 18 lec. 2 chol. (mg/ml)	18 kofein CHA
5 EV kofein 1 mg/ml 1:1 (lecitin:kofein)	12 U2 kofein 0,1 mg/ml – 9 lec. 1 chol. (mg/ml)	19 kofein A
6 U kofein 1 mg/ml – 22,5 lec. 2,5 chol. (mg/ml)	13 kofein (0,1 mg/ml) TLE	20 kofein 2%EA
7 U1 kofein 1 mg/ml – 18 lec. 2 chol. (mg/ml)	14 kofein (1 mg/ml) TLE	21 kofein 4%EA

Kofein se velmi dobře enkapsuloval do liposomových i polysacharidových částic. V případě použití metody přípravy liposomů využitím ethanolového vstříkávání byl jako nejúčinnější zvolen postup, kdy byl použit roztok kofeinu o koncentraci 1 mg/ml a současně byl ethanolový roztok lecithinu nastříknut v množství 1:1 k tomuto kofeinovému roztoku. U metody přípravy liposomů pomocí ultrasonifikace byla nejvhodnější opět koncentrace kofeinu 1 mg/ml, za použití lecithinu o koncentraci 45mg/ml a cholesterolu 5 mg/ml. U metod TLE a RP-TLE bylo shodně dosaženo vyšší enkapsulační účinnosti v případě použití nižší koncentrace kofeinu. Do polysacharidových částic se obecně kofein enkapsuloval velmi dobře (EU nad 80%). Nejlepších výsledků bylo dosaženo při přípravě částic na enkapsulátoru, kde byla enkapsulační účinnost u 2% alginátových částic více než 97%.

5.1.2.2 Enkapsulační účinnost kofeinu ve formě extraktů přírodních zdrojů

Enkapsulace kofeinu z jeho přírodních zdrojů byla rovněž velmi účinná. Enkapsulační účinnost se pohybovala v průměru okolo 55%.

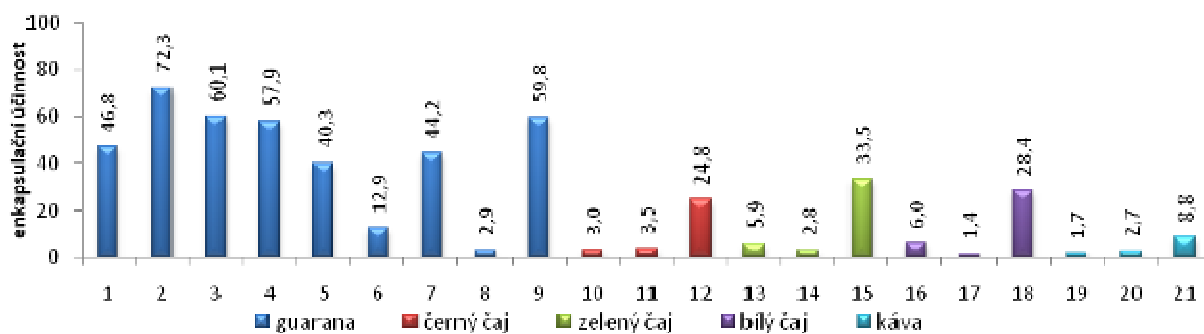


Graf 8. Enkapsulační účinnost kofeinu z jeho přírodních zdrojů

1 guarana CH	8 guarana U2 - 9 lec. 1 chol. (mg/ml)	15 zelený čaj TLE
2 guarana CHA	9 guarana TLE	16 bílý čaj U1 - 18 lec. 2 chol. (mg/ml)
3 guarana A	10 černý čaj U1 - 18 lec. 2 chol. (mg/ml)	17 bílý čaj U2 - 9 lec. 1 chol. (mg/ml)
4 guarana U	11 černý čaj U2 - 9 lec. 1 chol. (mg/ml)	18 bílý čaj TLE
5 guarana 2%EA	12 černý čaj TLE	19 káva U1 - 18 lec. 2 chol. (mg/ml)
6 guarana 4%EA	13 zelený čaj U1 - 18 lec. 2 chol. (mg/ml)	20 káva U2 - 9 lec. 1 chol. (mg/ml)
7 guarana U1 - 18 lec. 2 chol. (mg/ml)	14 zelený čaj U2 - 9 lec. 1 chol. (mg/ml)	21 káva TLE

Pouze u enkapsulace guarany a černého čaje do liposomů připravených metodou TLE byla účinnost enkapsulace kofeinu nižší (v průměru okolo 10%), u kávy byla u této metody enkapsulační účinnost dokonce nulová. Nejvyšší enkapsulační účinnost byla opět naměřena u alginátových částic připravených na enkapsulátoru. U liposomových částic bylo nejvyšší enkapsulační účinnosti kofeinu dosaženo použitím metody ultrasonifikace.

Enkapsulační účinnost polyfenolických složek připravených kofeinových extraktů byla o poznání nižší než v případě enkapsulace kofeinu. Polyfenoly se nejlépe enkapsulovaly do polysacharidových částic (Graf 9). Z liposomových částic se polyfenolické složky nejvýhodněji enkapsulovaly při použití metody TLE, kde naopak bylo dosaženo u kofeinu nejnižší enkapsulační účinnosti.

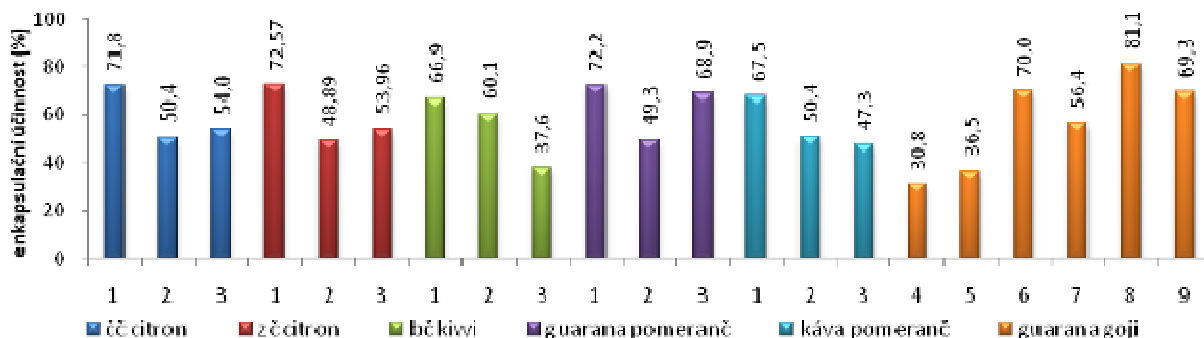


Graf 9. Enkapsulační účinnost polyfenolů přírodních zdrojů kofeinu

1 guarana CH	8 guarana U2 - 9 lec. 1 chol. (mg/ml)	15 zelený čaj TLE
2 guarana CHA	9 guarana TLE	16 bílý čaj U1 - 18 lec. 2 chol. (mg/ml)
3 guarana A	10 černý čaj U1 - 18 lec. 2 chol. (mg/ml)	17 bílý čaj U2 - 9 lec. 1 chol. (mg/ml)
4 guarana U	11 černý čaj U2 - 9 lec. 1 chol. (mg/ml)	18 bílý čaj TLE
5 guarana 2%EA	12 černý čaj TLE	19 káva U1 - 18 lec. 2 chol. (mg/ml)
6 guarana 4%EA	13 zelený čaj U1 - 18 lec. 2 chol. (mg/ml)	20 káva U2 - 9 lec. 1 chol. (mg/ml)
7 guarana U1 18lec. 2 chol. (mg/ml)	14 zelený čaj U2 - 9 lec. 1 chol. (mg/ml)	21 káva TLE

5.1.2.3 Enkapsulační účinnost extraktů kofeinu koenkapsulovaných s ovocnou složkou

Dále byla testována možnost koenkapsulace kofeinových extraktů s vybranou ovocnou složkou.



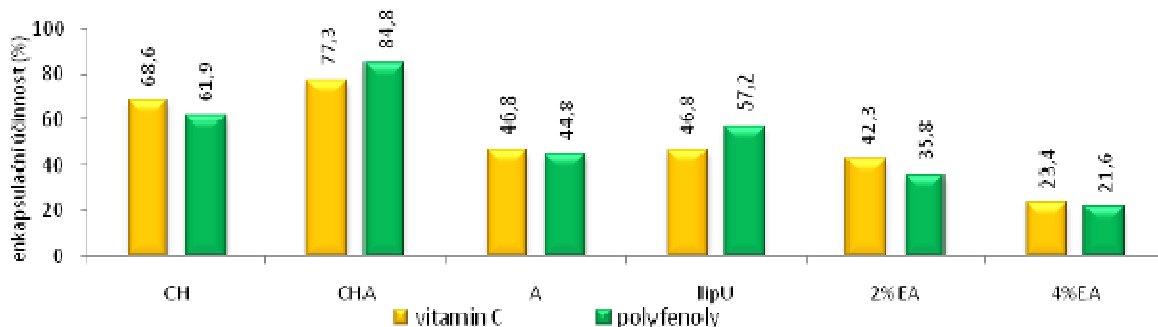
Graf 10. Enkapsulační účinnost kofeinu – koenkapsulace jeho přírodních zdrojů s ovocnou složkou

1 U1 -18lec.20chol. mg/ml)	2 U2-90lec.10chol.(mg/ml)	3 TLE- 80lec.10chol.(mg/ml)	4 CH	5 CHA
6 A	7 U-450lec.50chol.(mg/ml)	8 2%EA	9 4%EA	

Koenkapsulace extraktů kofeinu a ovocných složek byla úspěšná ve všech typech testovaných částic a u všech použitých kombinacích. V průměru se enkapsulační účinnost pohybovala okolo 60%. Enkapsulační účinnost kofeinu při koenkapsulaci byla tak srovnatelná anebo vyšší než v případě enkapsulace samotných kofeinových extraktů.

Při koenkapsulaci guarany a goji byla sledována i účinnost enkapsulace polyfenolů a vitamínu C. Z výsledků je patrné (Graf 11) že polyfenolické složky se enkapsulovaly obdobně jako vitamin C. Enkapsulace tedy probíhala komplexně bez preference polyfenolické či vitaminové složky.

Rozdíly jsou patrné pouze ve srovnání s enkapsulací kofeinu. U částic s nižší enkapsulační účinností kofeinu bylo vždy dosaženo vyšší enkapsulační účinnosti polyfenolických a vitaminových složek.



Graf 11. Enkapsulační účinnost polyfenolů a vitamínu C – guarana a goji

5.1.3 Stanovení velikosti a stability částic s obsahem kofeinu

Velikost částic a jejich distribuce velikosti jsou klíčové parametry používané pro hodnocení fyzikální stability nanočástic. Zejména dynamický rozptyl světla (DLS) je nejběžněji používanou technikou pro měření velikosti částic. DLS je široce používanou metodou k určení distribuce velikosti, zejména malých částic suspendovaných v kapalném médiu. Dalším důležitým sledovaným parametrem, kromě průměrné velikosti a distribuce velikosti částic, je index polydisperzity (PDI). Hodnoty PDI 0,1 až 0,25 indikují úzké rozdělení velikosti, zatímco PDI větší než 0,5 poukazují na široké rozdělení velikostí částic [148, 149, 175].

V této práci byly připravené částice analyzovány na koloidním analyzátoru Malvern Zetasizer Nano ZS, který poskytl základní data o částicích jako distribuce velikosti částic, průměrná velikost částic a index polydisperzity.

Pomocí nástavce s elektrodou byl změřen rovněž zeta potenciál, ze kterého byla přímo odhadnuta přibližná stabilita částic. Zeta potenciál (ZP) vyhodnocuje elektroforetickou pohyblivost suspendovaných částic v médiu. Dle obecného pravidla, absolutní hodnota ZP nad 60 mV značí vynikající stabilitu částic, hodnota 30 mV obecně udává dobrou stabilitou, 20 mV je přijatelných v případě krátkodobé stability, méně než 5 mV značí již velmi rychlou agregaci a nestabilitu částic [150, 175].

Tabulka 2. Stanovení velikosti (nm) a stability (mV) částic

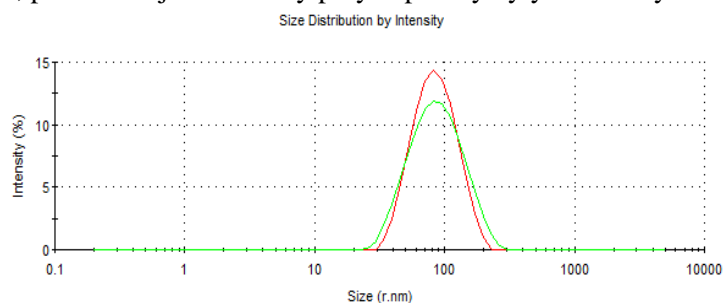
	L U1	LU2	L U	L TLE	L RP-TLE	L EV
nm	166,9	212,3	111,1	257,8	283,7	293,1
mV	-33,4	-43,8	-40,6	-47,5	-39,9	-46,0
	L TLE kofein	L RP-TLE kofein	L U guarana	L U1 guarana	L U1 káva	L U1 černý čaj
nm	210	351	157,5	187,8	118,0	171,1
mV	-54,5	-52,5	-51,7	-37,0	-40,2	-49,0
	L U1 zelený čaj	L U1 bílý čaj	L U kofein	L EV kofein	L U guarana-goji	
nm	189,5	174,5	94,9	320,0	118,9	
mV	-51,8	-47,5	-47,9	-45,1	-41,8	
	CHA	CHA kofein	CHA guarana	CHA guarana-goji	CH	CH kofein
nm	995,9	672,6	403,8	358,4	182,5	200
mV	29,6	25,1	21,7	20,9	46,2	42,5
	CH guarana	CH guarana-goji	A	A kofein	A guarana	A guarana-goji
nm	377,5	534,9	3148,5	623,35	260,1	1169,9
mV	-5,3	-0,8	-12,6	-17	-12,9	-7,5

Zkratky: A-Alginátové částice, CH-chitosanové částice, CHA-chitosan-alginátové částice, L-liposomy, U-metoda ultrasonifikace (U-22,5mg/ml lecithinu, U1-18mg/ml lecithinu, U2-18mg/ml lecithinu v chloroformu, TLE- metoda odpařování na tenké vrstvě, RP-TLE-metoda odpařování na tenké vrstvě s reverzní fází, EV-etanolové vstříkávání.

Dle hodnoty zeta potenciálu (Tabulka 2) vykazovaly z připravených částic především liposomy velmi dobrou stabilitu, v průměru okolo -50 mV. Z polysacharidových částic byly stabilní chitosanové částice s obsahem standardu kofeinu (42,5). Alginát-chitosanové částice se pohybovaly na hranici stability (okolo -25mV). Alginátové částice byly nejméně stabilní, hodnoty zeta potenciálu se pohybovaly od -7,5 do -17 mV.

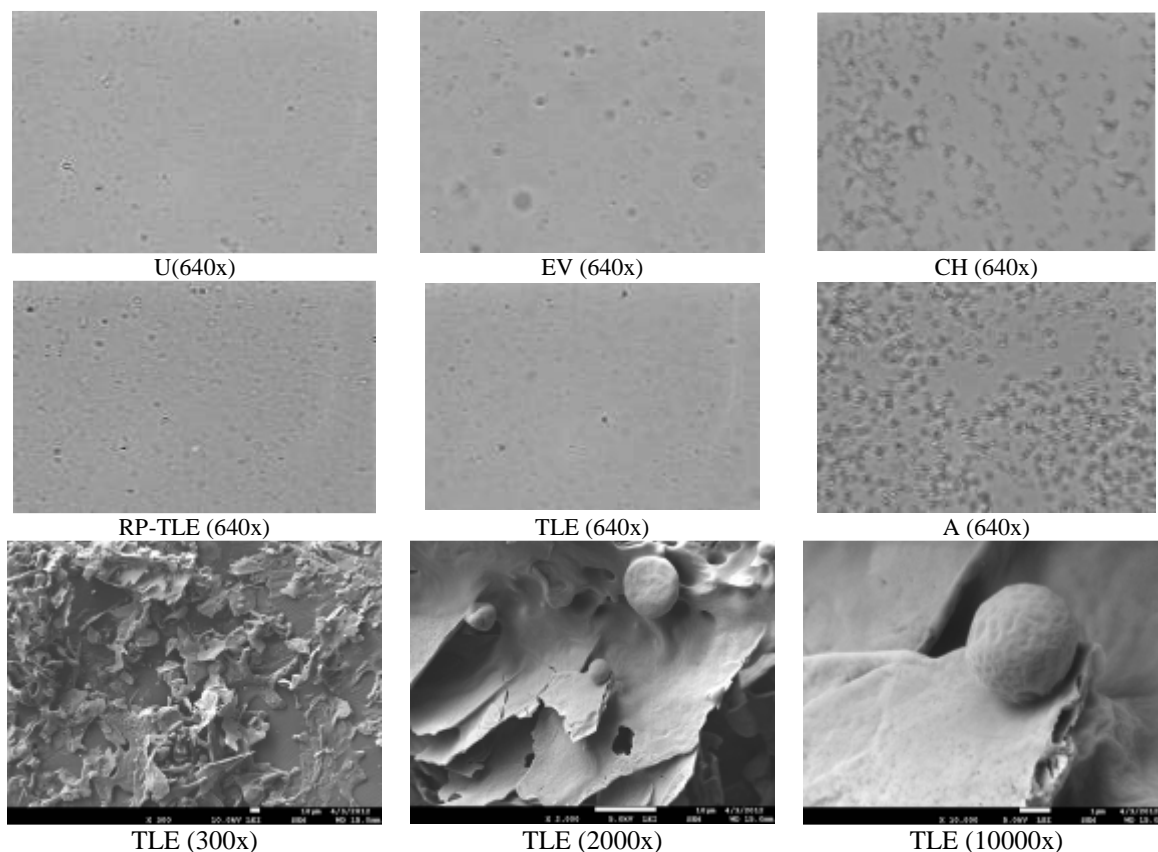
Průměrná velikost liposomů byla 200 nm, liposomy připravené metodou ultrasonifikace byly v porovnání s ostatními metodami menší a průměrná velikost se u nich pohybovalo okolo 150 nm. Naopak největší liposomové částice byly připraven pomocí metod RP-TLE a ethanolového vstřikování, zde byla průměrná velikost dvakrát vyšší (nad 300 nm).

Průměrná velikost polysacharidových částic byla ve srovnání s liposomy větší, v průměru 300 nm u chitosanových částic, u alginátových částic a chitosan-alginátových částicích byla průměrná velikost 600 až 900 nm. Rovněž indexy polydisperzity polysacharidových částic byly vyšší a pohybovaly se v rozmezí od 0,2 do 0,6, přičemž nejnižší indexy polydisperzity byly naměřeny u chitosanových částic.



Obrázek 11. Ukázka DLS dat stanovení distribuce velikostí -liposomy metoda ultrazvuk

I když DLS technika, poskytují rychlé měření velikosti částic a distribuci jejich velikosti, nemají schopnost hodnocení morfologie částic [175]. Proto byly v práci použity i techniky mikroskopie a byla tak sledována i morfologie testovaných částic. Morfologie připravených částic byla pozorována pomocí světelné a elektronové mikroskopie.



Obrázek 12. Připravené částice – snímky z optického a elektronového mikroskopu

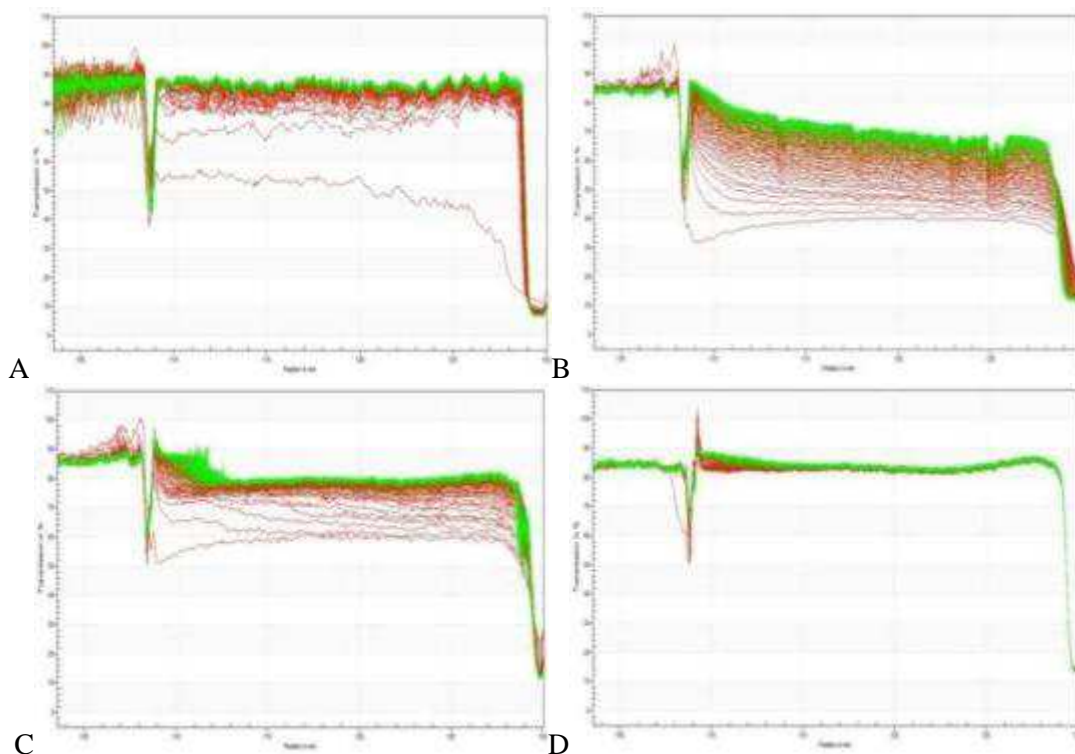
5.1.4 Stanovení sedimentační stability

Vlivem gravitačního zrychlení dochází k oddělení dispergovaných částic v systému. Částice s nižší hustotou než okolní prostředí směřují proti gravitačnímu zrychlení, částice s větší hustotou putují se zrychlením. Ze závislosti rychlosti usazování v odstředivém zrychlení lze odhadnout rychlost usazování v tíhovém poli. Sedimentace částic se projeví vyčereáním části vzorku a zároveň tvorbou sedimentu [152, 153].

Stanovení sedimentačních vlastností pomocí analytické centrifugace bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 4.12. Tabulka 3 porovnává nestabilitu jednotlivých vzorků. Index nestability udává směrnici křivky v prvních fázích centrifugace. Čím je hodnota vyšší, tím je systém méně stabilní [153, 154]. Nejvyšší hodnota směrnice byla dosažena u liposomů připravených metodou RP-TLE. Tyto částice jsou tedy nejméně stabilní z testovaných částic a nejrychleji u nich dochází k sedimentaci. Následují liposomy připravené pomocí ethanolového vstřikování a liposomy připravené metodou TLE. Sedimentační stability u liposomů tedy přímo úměrně souvisí s průměrnou velikostí částic.

Tabulka 3. Porovnání indexu nestability jednotlivých vzorků (K-kofoein)

částice	Index nestability (1/h)	částice	Index nestability (1/h)
TLE	$2,1071 \pm 0,0327$	TLE - K	$2,7284 \pm 0,0527$
RP-TLE	$4,143 \pm 0,0926$	RP-TLE - K	$5,1821 \pm 0,2634$
EV	$3,0386 \pm 0,1279$	EV - K	$3,2432 \pm 0,1760$
CHA	$0,1914 \pm 0,0468$	CHA - K	$0,2537 \pm 0,0434$
CH	$0,1676 \pm 0,0315$	CH - K	$0,1973 \pm 0,0350$



Graf 12. Rychlost usazování částic A) ethanolové vstřikování; B) TLE; C) RP-TLE, D) polysacharidové částice

V případě polysacharidových částic bylo dosaženo naopak lepších výsledků vzhledem k sedimentační stabilitě. U chitosanových částic navíc nedocházelo k výraznému pozorování sedimentace, vzorky byly velmi čiré již na počátku centrifugace, nedocházelo tedy ke změně transmitance vlivem odstředivého pole, a proto nemohly být tyto vzorky vyhodnoceny pomocí indexu nestability.

U polysacharidových částic zřejmě došlo k tvorbě gelové struktury (hydrogelů), která tak celý systém stabilizovala a došlo u nich ke zvýšení sedimentační stability. Vlivem enkapsulace kofeinu nedošlo u všech testovaných částic z pohledu jejich sedimentační stability k žádným výrazným změnám. Hlavní vliv na sedimentaci měla tedy hlavně použitá metoda přípravy částic. V Grafu 12 jsou tyto rozdíly porovnány. K nejrychlejší sedimentaci docházelo u liposomů při použití metody ethanolového vstříkávání a RP-TLE, kde na počátku centrifugace došlo k rychlému usazení větších částic, později docházelo k homogenní sedimentaci drobnějších liposomů. U připravených liposomů metodou TLE došlo z počátku k rychlejšímu usazení větších částic, v tomto případě však docházelo k výraznější homogenní sedimentaci než u předchozích dvou metod. V případě polysacharidových částic nebyla zaznamenána takřka žádná sedimentace. Vzorky mohly být pro stanovení příliš čiré, nebo došlo k zmiňované tvorbě gelové struktury a následné sedimentační stabilizaci celého vzorku. Díky vysoké sedimentační stabilitě jsou polysacharidové částice vhodné například i pro aplikace do čirých nápojů.

5.1.5 Stanovení dlouhodobé stability – modelové potraviny

Částice s enkapsulovaným standardem kofeinu byly podrobeny analýze dlouhodobé stability v prostředích modelových potravin. Ve stanovených intervalech byly provedeny odběry vzorků pro stanovení obsahu uvolněného kofeinu. Jako modelové potraviny byly zvoleny čtyři základní typy modelových podmínek dle popisu v kapitole 4.14.

Tabulka 4. Srovnání stability částic v různých podmínkách - kofein standard

uvolněné množství %		kofein/EV	kofein/TLE	kofein/U	kofein/RP-LE	kofein/A	kofein/CH	kofein/CHA
voda	1 den	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	3 dny	ND	ND	ND	ND	7,5	ND	10,2
	týden	5,5	ND	ND	ND	19,8	5,5	25,4
	2 týdny	11,9	ND	ND	ND	29,0	13,1	35,2
	3 týdny	23,4	8,6	3,5	7,9	42,5	21,6	51,6
	měsíc	31,7	11,2	9,5	12,3	44,8	35,0	54,2
ethanol	1 den	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	3 dny	31,0	15,2	ND	18,6	ND	ND	ND
	týden	36,2	23,1	20,6	35,1	6,3	ND	11,1
	2 týdny	43,3	33,1	27,9	52,3	15,2	8,6	19,7
	3 týdny	50,9	45,0	39,1	65,9	24,6	15,5	34,8
	měsíc	67,5	49,1	44,4	72,2	26,9	18,1	51,2
kyselina	1 den	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	3 dny	5,7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	týden	17,9	9,9	11,0	10,5	ND	ND	ND
	2 týdny	25,5	13,1	15,6	16,3	4,5	ND	12,4
	3 týdny	33,2	29,7	35,1	32,1	7,0	9,5	19,8
	měsíc	68,2	42,2	61,9	53,3	19,5	12,3	29,1
olej	1 den	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	3 dny	15,9	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	týden	25,3	31,2	28,9	19,7	ND	ND	13,2
	2 týdny	49,0	34,8	33,2	41,1	15,5	5,6	15,4
	3 týdny	52,9	44,5	32,2	50,2	18,5	8,9	22,4
	měsíc	69,9	48,3	38,1	68,0	35,0	11,8	31,2

Zkratky: EV-metoda ethanolové vstříkávání, U-metoda ultrasonifikace, TLE-metoda odpaření na tenké vrstvě, RP-TLE-metoda odpaření na tenké vrstvě s reverzní fází, A-alginátové částice, CH-chitosanové částice, CHA-chitosan-alginátové částice, ND-nedetkováno.

Liposomové částice s obsahem kofeinu byly stabilní především v modelovém vodném prostředí, kde nebylo z krátkodobého hlediska pozorováno žádné uvolnění množství.

Po měsíci bylo uvolněné množství u metody ethanolového vstřikování 31,7%, u ostatních metod přípravy liposomů bylo uvolněno pouze do 12,3% enkapsulovaného množství kofeinu.

V případě polysacharidových částic bylo ve vodném prostředí uvolněno vyšší množství kofeinu, v průměru okolo 40% po měsíci skladování. Polysacharidové částice byly stabilní především v kyselých modelových podmínkách, kde bylo uvolněno u alginátových a u chitosanových částic po měsíci průměrně 15% enkapsulovaného množství kofeinu. Polysacharidové částice však vykazovaly dobrou stabilitu i v ethanolovém prostředí a v tučném prostředí, uvolněné množství se zde po měsíci skladování pohybovalo od 20 do 50%. Naopak liposomy vykazovaly v kyselém, alkoholovém i tučném prostředí vyšší uvolněné množství enkapsulovaného kofeinu. Po měsíci se toto uvolněné množství pohybovalo v rozmezí od 40 do 70%.

Obecně nejstabilnější liposomové částice byly částice připravené metodou ultrasonifikace a částice připravené metodou TLE. Z polysacharidových částic byly nejstabilnější chitosanové částice. Rovněž alginátové částice měly dobrou stabilitu. Pouze v případě přípravy dvouvrstevných alginát-chitosanových částic byla pozorována nižší stabilita.

Většina testovaných částic s obsahem kofeinu je tedy vhodná pro aplikace do potravin. Liposomy především do vodných potravin s neutrálním pH. Polysacharidové částice do ostatních testovaných prostředí, zejména pak do potravin s kyselým pH.

5.1.6 Stanovení dlouhodobé stability – modelové kosmetické prostředí

Částice s enkapsulovaným standardem kofeinu, s jeho přírodními extrakty a s kombinací kofeinových extraktů a ovocných složek byly podrobeny analýze dlouhodobé stability. Velikost liposomových částic byla upravena pomocí membránového extrudéru na průměrnou hodnotu 100 nm. Částice byly poté přidány do modelového vodného roztoku a uchovávány při laboratorní teplotě a při teplotě 5°C. Ve stanovených intervalech byly provedeny odběry pro stanovení obsahu uvolněných složek. Bylo měřeno množství uvolnění kofeinu, celkových polyfenolů a vitamínu C.

Tabulka 5. Srovnání stability liposomů udržovaných při různé teplotě - kofein standard -3 týdny [%]

Metody příprav liposomů	Ultrazvuk 1	Ultrazvuk 2	TLE	RP-TLE
Laboratorní teplota	12,11	31,06	ND	ND
Snížená teplota	ND	17,50	ND	ND

Po týdnů nebylo u připravených částic detekováno žádné množství uvolněného kofeinu. Po uplynutí 3 týdnů bylo již zaznamenáno malé množství uvolněného kofeinu, přičemž k vyššímu uvolňování kofeinu docházelo při vyšší teplotě (Tabulka 5).

Při laboratorní teplotě nebylo ani po 3 týdnech u metod TLE a RP-TLE detekováno žádné uvolněné množství kofeinu. Kofeinu se nejvíce uvolnilo u částic připravených pomocí metody Ultrazvuk 2, a to 31,06 %. Při sledování dlouhodobé stability při teplotě 5°C nebylo po 3 týdnech stanoveno žádné uvolněné množství enkapsulovaného kofeinu u metod Ultrazvuk 1, TLE a RP-TLE. Kofein se tedy uvolnil pouze u částic připravených pomocí metody Ultrazvuk 2, a to 17,5 %.

U částic s enkapsulovanými extrakty kofeinu nebylo po týdnů, stejně jako v případě enkapsulace standardu, detekováno žádné uvolněné množství kofeinu. Po 3 týdnech bylo již v některých případech zaznamenáno částečné uvolnění kofeinu. Nejvíce kofeinu se uvolnilo z částic s extraktem zeleného čaje, přesněji 30,95 %. Naopak uvolnění kofeinu nebylo detekováno u částic s enkapsulovaným extraktem černého čaje a kávy (Tabulka 6).

Také u částic připravených koenkapsulací extraktů z přírodních zdrojů kofeinu a ovocné složky nebyla po týdnů detekována žádná změna koncentrace kofeinu. Uvolněné množství kofeinu nebylo detekováno ani po 3 týdnech skladování u částic s extrakty z černého, zeleného a bílého čaje.

Nejvíce kofeinu z částic připravených metodou TLE se uvolnilo při enkapsulaci guarany, okolo 3 %. Touto metodou však bylo zároveň enkapsulováno nejmenší množství kofeinu, proto mohlo docházet k tak malému uvolňování (Tabulka 7).

Tabulka 6. Srovnání dlouhodobé stability – množství uvolněného kofeinu – prostředí voda

		Černý čaj	Zelený čaj	Bílý čaj	Guarana	Káva
1 týden	kofein	ND	ND	ND	ND	ND
	polyfenoly	20,38	18,74	18,07	28,17	28,24
3 týdny	kofein	ND	30,95	ND	18,77	ND
	polyfenoly	30	54,25	36,09	39,3	42,27

K výraznějšímu uvolnění kofeinu docházelo u částic připravených pomocí ultrazvuku, kde byla zaznamenána i nejvyšší enkapsulační účinnost. Uvolněné množství bylo nejnižší u extraktu z bílého čaje, 7,8 % a nejvyšší u extraktu z guarany, kde dosahovalo 45 %.

Tabulka 7. Srovnání dlouhodobé stability koenkapsulovaných částic – množství uvolněného kofeinu a polyfenolů – prostředí voda

	metoda ultrazvuk			metoda ultrazvuk 2			metoda TLE		
	kofein	polyfenoly		kofein	polyfenoly		kofein	polyfenoly	
	3 týdny	1týden	3 týdny	3 týdny	1týden	3 týdny	3 týdny	1týden	3 týdny
Černý čaj citron	32,76	22,02	26,45	3,08	4,52	11,64	ND	2,13	15,21
Zelený čaj citron	27,39	8,69	19,9	ND	14,07	15,12	ND	25,83	31,13
Bílý čaj kiwi	7,75	1,88	20,02	14,62	14,04	16,93	ND	0,31	18,78
Guarana pomeranč	44,96	6,87	9,66	ND	5,66	13,37	3,56	0,35	6,85
Káva pomeranč	25,25	5,71	24,84	43,14	49,48	56,37	2,97	6,02	21,37

Při sledování celkových polyfenolů se po týdnu z částic s extrakty kofeinu uvolnilo nejmenší množství v případě enkapsulace extraktu z bílého čaje, 18,1 %. Naopak nejvíce se uvolnilo z částic s enkapsulovaným extraktem z kávy, a to až 28,2 %. Průměrně se uvolněné množství kofeinu po týdnu skladování pohybovalo okolo 20%.

Po 3 týdnech došlo opět k nárůstu uvolněných celkových polyfenolů. Nejmenší množství celkových polyfenolů se uvolnilo z částic s enkapsulovaným extraktem z černého čaje (30 %). Naopak nejvíce se uvolnilo z částic s enkapsulovaným extraktem ze zeleného čaje, a to až 54,3 %. V průměru se po třech týdnech skladování v modelovém vodním prostředí uvolnilo ze všech částic 40% enkapsulovaného množství polyfenolů.

U koenkapsulovaných extraktů se množství uvolněných polyfenolů po týdnu navýšilo u všech tří metod. Nejvíce polyfenolů se uvolnilo z částic připravených metodou Ultrazvuk 2 s enkapsulovaným extraktem z kávy (49,5 %). Nejméně polyfenolů se uvolnilo po týdnu z částic připravených metodou TLE s enkapsulovaným extraktem z bílého čaje (pouhých 0,31 %), a guarany (0,35 %).

Velmi nízké množství uvolněných polyfenolů bylo stanoveno u všech částic připravených metodou TLE. Výjimkou byly pouze částice s koenkapsulovanou směsí zelený čaj a citron, kde se uvolnilo 25,8% enkapsulovaného množství polyfenolů.

Po 3 týdnech došlo opět k nárůstu uvolněných polyfenolů. Nejvyšší uvolněné množství bylo stanoveno u částic připravených metodou Ultrazvuk 2 s enkapsulovaným extraktem z kávy, a to až 56,37 %. U ostatních částic připravených metodou pomocí ultrazvuku se však uvolněné množství pohybovalo do 27%. Nejméně se po 3 týdnech uvolnilo obecně z částic s koenkapsulovaným extraktem z guarany. Z výsledků je tedy zřejmé, že u částic docházelo během skladování k postupnému uvolňování polyfenolů. I po třech týdnech bylo však zachováno v částicích vysoké množství enkapsulovaných polyfenolů.

Dále byla sledována stabilita částic z pohledu vitamínu C. Po 3 týdnech skladování nebylo detekováno žádné uvolněné množství enkapsulovaného vitamínu C. Snížení koncentrace volného vitamínu C mohlo být způsobeno i jeho degradací a mohlo tak zamaskovat jeho uvolňování.

Celkově jako nejvhodnější částice pro kosmetické účely byly zvoleny liposomy připravené ultrazvukovou metodou. Jejich dlouhodobá stabilita by vyhovovala aplikačním požadavkům. Stejně tak měly tyto částice dobrou stabilitu a vynikaly i vysokou enkapsulační účinností. Nejvhodnější aplikační formou obsahující tyto částice by byla například pleťová voda nebo gel. Navíc s delší dobou působení na pokožce by mohl přípravek dosahovat vysokého účinku.

Mezi hlavní kosmetické účinky kofeinu patří antioxidační účinek, který chrání buňky proti UV záření, kofein dále zpomaluje stárnutí pokožky a vyhlazuje ji [72]. Díky kofeinu tak docílíme převážně vyhlazení pleti. Při kombinaci s dalšími aktivními látkami jako jsou polyfenoly a vitamíny, můžeme dále navyšovat pozitivní účinky přípravků pro spotřebitele.

5.1.7 Stanovení stability částic v reálných podmínkách

Dlouhodobá stabilita byla také sledována v různých reálných nápojích, především vliv na množství uvolněných polyfenolů a kofeinu. Cílem bylo ověřit potenciální aplikaci připravených částic do tzv. „energy drinků“. Pro tyto aplikace byly vybrány částice, do kterých byl enkapsulován jak čistý kofein, tak i komplexní zdroj kofeinu s nejvyšším obsahem kofeinu z testovaných přírodních zdrojů – guarana. Dále byla testována koenkapsulovaná směs guarany a goji, kde extrakt z goji posloužil především jako zdroj vitamínu C, který podporuje účinek kofeinu.

Tabulka 8. Dlouhodobá stabilita částic v různých nápojích hodnocená jako množství uvolněného kofeinu v %

kofein	týden CHA	týden CH	týde n A	týden 2%EA	týden 4%EA	týden Lip.	měsíc CHA	měsí c CH	měsí c A	měsíc 2%EA	měsíc 4%EA	měsíc Lip.
černý čaj	1,0	ND	ND	27,4	25,9	0,1	12,8	3,6	21,6	27,6	36,0	30,6
zelený čaj	ND	ND	ND	14,6	31,2	ND	11,9	6,8	23,7	16,1	54,1	10,0
coca- cola	ND	ND	ND	14,6	12,9	5,0	25,1	5,4	2,8	34,9	24,6	1,8
nestea	ND	ND	ND	14,6	15,3	ND	4,2	13,5	10,6	ND	ND	4,2
mine- rálka	ND	ND	ND	14,6	8,0	ND	ND	8,2	4,3	ND	13,6	4,3
voda+ med	ND	ND	ND	14,6	ND	ND	ND	6,7	ND	ND	ND	ND
džus pomera nč.	ND	ND	ND	14,6	18,2	ND	ND	3,0	3,8	13,3	6,3	ND

Stabilita částic byla hodnocena jako množství aktivní látky uvolněné z částic v průběhu dlouhodobého uchovávání. Přírůstek koncentrace v roztoku předpokládá rozpad částice a uvolnění obsahu.

Dlouhodobá stabilita testovaných částic byla testována z pohledu uvolněného množství kofeinu. V případě částic s enkapsulovanou guaranou a koenkapsulovanou guaranou s goji i z pohledu množství uvolněných polyfenolů.

U kofeinových částic nebylo po týdnu zaznamenáno žádné množství uvolněného kofeinu. Pouze v případě polysacharidových částic připravených pomocí enkapsulátoru bylo detekováno uvolnění kofeinu v průměru okolo 10%. Po měsíci došlo k uvolnění kofeinu i ostatních testovaných částic, detekované uvolněné množství se pohybovalo od 0 do 54%, u většiny částic však bylo stanoveno do 10% uvolněného množství kofeinu.

Při enkapsulaci guarany a koenkapsulaci guarany a goji bylo po týdnu skladování u většiny typů částic stanoveno vyšší uvolněné množství kofeinu než při enkapsulaci standardu kofeinu. Po měsíci bylo u většiny testovaných částic detekováno v průměru okolo 30% uvolněného množství kofeinu.

Nejstabilnější byly liposomové částice. Celkově bylo u částic po měsíci skladování v reálných podmínkách stanoveno nejvyšší uvolněné množství kofeinu v případě koenkapsulace guarany a goji. Enkapsulované polyfenolické látky vykazovaly v částicích menší stabilitu než kofein. Po týdnu došlo k uvolnění polyfenolů z chitosanových částic, chitosan-alginátových částic a 4% alginátových částic připravených na enkapsulátoru a to ve většině sledovaných podmínek.

Obecně nejvíce stabilní byly liposomové částice, zde nedošlo po týdnu k uvolnění žádného množství enkapsulovaných polyfenolů.

Po měsíci došlo již k uvolnění polyfenolů i z liposomových částic, a to v průměru okolo 10%. U ostatních částic byly zaznamenány jen nepatrně zvýšené hodnoty uvolněných polyfenolů v porovnání s hodnotami po týdnu. Stejně jako v případě uvolňování kofeinu i u stanovení polyfenolů byl zaznamenán trend vyššího uvolněného množství v případě koenkapsulace guarany a goji ve srovnání s případem enkapsulace čisté guarany.

Na závěr byla u koenkapsulované varianty guarany a goji hodnocena dlouhodobá stability i z pohledu množství uvolněného vitamínu C. Koncentrace volného vitamínu se po týdenním skladování zvýšila, pouze v coca-cole, černém čaji a pomerančovém džusu v případě chitosan-alginátových částic. U týdenní stability vitamínu C v alginátových částicích připravených na enkapsulátoru bylo zjištěno uvolněné množství vitamínu C kolem 10 % v případě uchování v coca-cole, nestea, minerálce a vodě s medem. U ostatních typů částic byl zaznamenán pouze pokles koncentrace, způsobený s největší pravděpodobností degradací volného vitamínu C. Koncentrace vitamínu C poklesla rovněž u všech testovaných částic po měsíci skladování. Snížení koncentrace volného vitamínu C způsobené jeho degradací však mohlo zamaskovat jeho další uvolňování.

5.1.8 Stanovení stability částic obsahujících kofein v modelových trávicích šťávách

Stabilita částic v modelových trávicích šťávách byla sledována pomocí změny zeta potenciálu a množství uvolněného enkapsulovaného množství kofeinu.

Ze studia stability částic pomocí zeta potenciálu v modelových podmínkách trávicího systému (Tabulka 9) vyplývá, že byly částice nejméně stabilní v kyselém prostředí žaludečních šťáv. Kde došlo k nejvýraznějšímu poklesu hodnot zeta potenciálu.

Tabulka 9. Stabilita částic v modelových trávicích šťávách – množství uvolněného kofeinu % a změna zeta potenciálu

		kofein/ EV	kofein/ TLE	kofein/ U	kofein/ RP-TLE	kofein/ A	kofein/ CH	kofein/ CHA
ZP původní hodnota (mV)		-45,1	-54,5	-43,5	-52,5	-12,6	42,5	-29,2
žaludeční šťáva	ZP čas 0 (mV)	-1,2	-21,3	-25,3	-21,9	-14,2	38,3	-28,2
	ZP 15 min (mV)	-0,6	-22,5	-23,9	-22,5	-14,3	35,7	-1,9
	uvolněné množství %	76,4	26,4	18,1	38,4	3,5	0	49,7
pankreati cká šťáva	ZP čas 0 (mV)	-41,2	-43,0	-42,6	-48,8	-9,0	41,8	-7,8
	ZP 15 min (mV)	-7,1	-45,4	-41,1	-50,7	-8,8	25,1	-4,6
	uvolněné množství %	71,8	33,3	35,1	0	55,9	47,7	37,9
žlučová šťáva	ZP čas 0 (mV)	-45,0	-52,9	-44,1	-53,2	-9,3	44,0	-28,4
	ZP 15 min (mV)	-34,9	-51,4	-40,9	-52,0	-8,7	43,8	-24,1
	uvolněné množství %	30,6	0	11,2	0	14,5	0	36,6

Naopak nejvíce stabilní byly částice při zásaditém pH žlučové šťávy, kdy se hodnota zeta potenciálu měnila pouze minimálně. V pankreatické šťávě byl rovněž zaznamenán výraznější vliv na stabilitu částice zejména v případě chitosan-alginátových částic a liposomů připravených pomocí ethanolového vstříkávání.

U těchto dvou částic byl rovněž zaznamenán pokles jejich stability v průběhu celého působení trávicích šťáv. U ostatních typů částic se stabilita od přidání do měření po 15 minutách již výrazně neměnila, což může poukazovat na přítomnost velmi pozvolného uvolňování.

Co se týče výsledků uvolněného množství (Tabulka 9), ve žlučových šťávách se v tomto krátkém čase neuvolnilo u většiny částic žádné významné množství, pouze u méně stabilních chitosan-alginátových částic a u liposomů připravených metodou ethanolového vstříkávání byl zaznamenán uvolněný kofein i působením této trávicí šťávy.

Naopak v pankreatické šťávě se u většiny částic uvolnilo největší množství enkapsulovaných složek. Výrazné množství se uvolnilo rovněž v žaludeční šťávě, kde částice vykazovaly nejnižší zeta potenciál.

Trend pozvolného uvolňování při průchodu trávicím traktem byl pozorován u všech ostatních typů částic. Tabulka 10 srovnává stabilitu liposomových částic, polysacharidových částic připravených pomocí ultrazvuku a polysacharidových částic připravených na enkapsulátoru.

Obecně se nejvíce kofeinu i polyfenolů uvolnilo vlivem modelové pankreatické a žlučové šťávy, tedy v modelovém prostředí tenkého střeva. V žaludeční šťávě bylo vyšší uvolněné množství kofeinu stanoveno pouze v případě chitosan-alginátových částic.

Tabulka 10. Stanovení stability částic - modelové trávení, množství uvolněného kofeinu a polyfenolů %

		kofein	guarana kofein	guarana a goji kofein	guarana polyfenoly	guarana a goji polyfenoly
žaludeční šťáva	CHA	40,5	64,3	38,3	12,2	40,0
	CH	22,3	2,0	16,6	26,6	50,5
	A	12,0	23,7	11,7	32,5	10,6
	2% A	3,2	0,5	1,5	0,0	34,6
	4% A	0,0	34,1	0,5	0,0	0,5
	Liposomy	11,8	16,9	6,0	3,2	5,4
pankreatická šťáva	CHA	39,8	84,8	36,3	92,7	21,4
	CH	52,6	55,1	46,9	20,3	23,4
	A	9,0	49,8	17,7	8,3	54,0
	2%EA	34,8	18,2	33,0	39,6	68,0
	4%EA	10,9	22,5	50,0	6,8	2,9
	Liposomy	30,0	40,5	7,1	11,0	30,0
žlučová šťáva	CHA	37,2	42,4	25,2	53,2	33,2
	CH	67,1	8,7	22,2	9,5	46,6
	A	46,3	12,0	9,8	22,6	53,4
	2%EA	32,0	6,3	18,8	9,0	35,6
	4%EA	13,9	17,5	51,7	42,7	7,6
	Liposomy	27,8	9,8	26,2	14,9	38,4

Při porovnání enkapsulované a koenkapsulované varianty bylo v případě kofeinu dosaženo obdobných výsledků. V případě polyfenolů bylo výraznější množství uvolněných polyfenolů vlivem modelového trávení detekováno z částic s koenkapsulovanými extrakty.

Stabilita částic v modelovém trávení byla sledována také po jejich měsíčním skladování v reálných nápojích. Dlouhodobá stabilita v reálných nápojích je popsána v kapitole 5.1.7.

I v tomto případě byl zaznamenán shodný trend výraznějšího uvolněného množství enkapsulovaných složek v prostředí tenkého střeva. Vlivem dlouhodobého skladování však u některých částic došlo k uvolnění většího množství enkapsulovaných složek.

Při porovnání jednotlivých typů reálných prostředí se nejvíce kofeinu i polyfenolů vlivem trávení uvolňovalo u částic skladovaných v černém a zeleném čaji, coca-cole i pomerančovém džusu.

Díky zachování výrazného trendu pozvolného uvolňování v tenkém střevě a díky velmi dobré dlouhodobé stabilitě především manuálně připravených chitosanových částic, alginátových částic a liposomů v reálných prostředích lze využít testované částice pro aplikaci do „energy drinků“ s pozvolným uvolňováním kofeinu v zažívacím traktu. Zejména použití černého a zeleného čaje ale i coca-coly a pomerančového džusu jako nosiče vybraných částic je pro tyto aplikace velmi vhodným řešením.

5.2 Enkapsulace ovocných, zeleninových a rostlinných extraktů a šťáv s vysokým obsahem polyfenolů a vitaminů

V této dílčí části práce byly testovány možnosti přípravy mikro- a nanočástic a postupy enkapsulace vybraných přírodních šťáv a různých extraktů s vysokým obsahem antioxidantů.

K enkapsulaci byly použity: šťáva z citronu, pomeranče a kiwi, dále byly použity vzorky mrkve, červených jablek a směs lesních plodů (maliny, jahody, borůvky). Rovněž byly enkapsulovány standardy vitamínu C, β -karotenu, vitamínu E, kvercetinu, morinu, rutinu kyseliny gallové a katechinu. Dále byly enkapsulovány i extrakty guarany, goji a ženšenu.

5.2.1 Charakterizace

Šťáva z citronu, pomeranče a kiwi byla získána odšťavněním příslušného ovoce. Připravená šťáva byla dále odstředěna při 7 500 ot/min po dobu 5 minut. Takto připravené roztoky byly charakterizovány na obsah polyfenolů a vitamínu C a použity k enkapsulaci (výsledky charakterizace jsou uvedeny v kapitole 5.1.1). Vzorky byly rovněž použity v případě koenkapsulace společně s kofeinem a jeho extrakty (viz kap.5.1).

Různé extrakty z mrkve, červených jablek a směsi lesních plodů byla charakterizovány na obsah polyfenolů, flavonoidů, antokyanů a antioxidační aktivity. Dále bylo pomocí HPLC sledováno množství individuálních flavonoidů, katechinů, obsah β -karotenu a vitamínu C.

V případě extraktů z guarany, goji a ženšenu byl spektrofotometricky sledován obsah celkových polyfenolů a flavonoidů a pomocí HPLC i obsah individuálních flavonoidů.

Nejprve byly porovnávány hodnoty celkových polyfenolů a celkových flavonoidů v jednotlivých extraktech. Výsledky jsou uvedeny v mg na g suchém podílu jedlé části plodů (Tabulka 11). Jednotlivé metody pro stanovení charakteristik jsou uvedeny v kapitole 4.7.

Tabulka 11. Charakterizace – spektrofotometrické metody (jablka, mrkev, lesní plody)

typ extraktu	celkové polyfenoly (mg/g)			celkové flavonoidy (mg/g)		
	Jablko	Mrkev	lesní plody	Jablko	Mrkev	lesní plody
šťáva	0,57±0,02	1,59±1,50	x	0,12±0,00	0,43±0,01	x
voda	2,00±0,11	0,85±0,60	x	0,41±0,01	ND	x
ethylacetát	2,37±0,50	0,81±0,09	x	0,50±0,01	ND	x
ethanol	1,88±0,30	0,77±0,09	x	0,76±0,01	0,31±0,01	x
1% kys. citronová	2,81±0,13	2,12±0,12	x	0,84±0,02	0,01±0,00	x
5% kys. citronová	3,27±0,29	2,36±0,23	14,68±1,23	0,95±0,02	0,22±0,01	3,09±0,15
1% kys. mléčná	2,78±0,08	2,34±0,56	x	0,62±0,01	0,02±0,00	x
5% kys. mléčná	3,65±0,18	3,03±0,80	13,60±1,09	1,02±0,02	0,44±0,03	3,08±0,12
10% kys. mléčná	4,25±0,20	2,57±0,95	11,08±1,16	1,40±0,02	0,35±0,02	3,26±0,10
	antioxidační aktivity (mg/g)			celkové antokyany (mg/g)		
	Jablko	Mrkev	lesní plody	Jablko	Mrkev	lesní plody
5% kys. citronová	3,62±0,22	1,29±0,21	12,54±0,36	0,21±0,01	0,06±0,01	33,98±0,50
5% kys. mléčná	2,94±0,18	1,44±0,33	12,27±0,29	0,11±0,00	0,05±0,00	25,25±0,16
10% kys. mléčná	2,41±0,12	1,29±0,15	8,51±0,11	0,10±0,00	0,05±0,01	24,94±0,18

U čerstvých plodů byla použita přírodní šťáva, vodný, ethanolový a ethylacetátový extrakt. U lyofilizovaných vzorků byly ověřovány extrakce do 1% a 5% kyseliny citrónové a 1%, 5% a 10% kyseliny mléčné. Jak lze vidět z výsledků uvedených v Tabulce 11, nejvhodnější extrakční činidla se ukázaly 5% kyselina citrónová, 5% kyselina mléčná a 10% kyselina mléčná. Proto byly tyto tři typy extrakce použity ke stanovení ostatních charakteristik.

Nejvyšší obsah polyfenolů, flavonoidů, antokyanů byl naměřen u všech typů extraktů u lesních plodů. Tyto hodnoty korespondovaly rovněž s nejvyšší naměřenou antioxidační aktivitou, která byla v případě lesních plodu několikanásobně vyšší v porovnání s extrakty z jablka a mrkve.

Z Tabulky 12 je patrné, že nejvyšší obsah každého ze stanovovaných individuálních flavonoidů a katechinů, stejně tak nejvyšší obsah vitamínu C, byl naměřen u extraktu z lesních plodů. Obsah β -karotenu v mrkvi byl stanoven na 296,3 $\mu\text{g/g}$. Obsah karotenu u ostatních extraktů byl dle očekávání minimální.

Tabulka 12. Charakterizace pomoci HPLC (jablka, mrkev, lesní plody)

	Rutin [$\mu\text{g/g}$]	k.chlorogenová [$\mu\text{g/g}$]	quercetin [$\mu\text{g/g}$]
Jablko	46,91 \pm 2,13	146,60 \pm 7,11	2,35 \pm 0,29
Mrkev	10,58 \pm 0,55	116,05 \pm 6,23	ND
Lesní plody	288,25 \pm 4,89	889,04 \pm 19,10	4,34 \pm 0,55
	myricetin [$\mu\text{g/g}$]	phloridzin [$\mu\text{g/g}$]	β karoten [$\mu\text{g/g}$]
Jablko	ND	4285,86 \pm 51,03	4,97 \pm 0,90
Mrkev	ND	629,13 \pm 29,45	296,28 \pm 8,12
Lesní plody	5,66 \pm 1,23	17314,11 \pm 182,30	4,43 \pm 0,85
	vitamin C [$\mu\text{g/g}$]	katechin [$\mu\text{g/g}$]	epikatechin [$\mu\text{g/g}$]
Jablko	21,73 \pm 2,33	10,91 \pm 1,02	3,86 \pm 0,95
Mrkev	175,84 \pm 5,25	5,20 \pm 0,85	3,25 \pm 0,15
Lesní plody	708,26 \pm 8,12	17,33 \pm 1,45	6,11 \pm 1,36

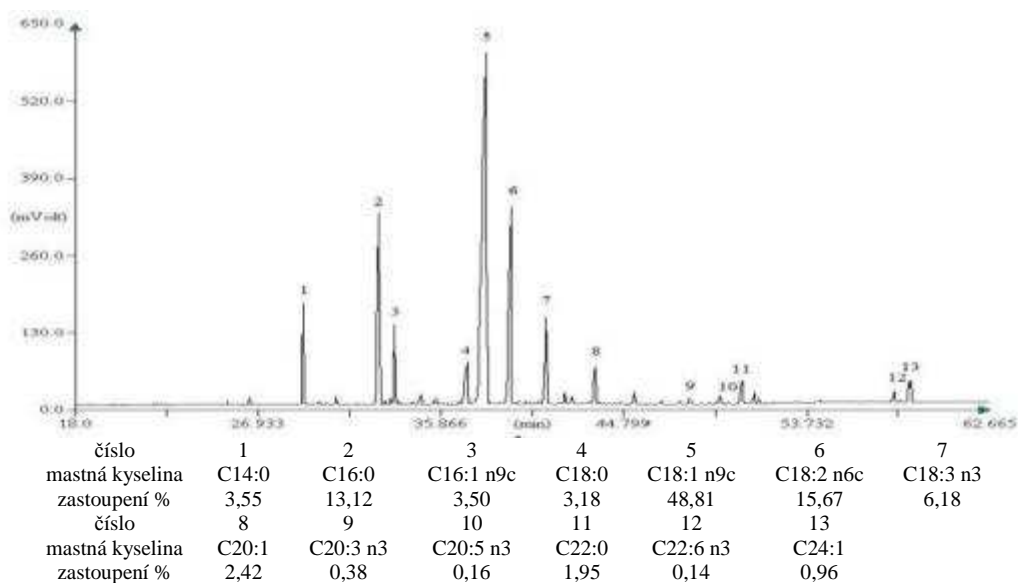
Na závěr byly rovněž charakterizovány použité extrakty guarany, goji a ženšenu. Opět byl vyšší obsah fenolických složek stanoven v kyselých extraktech. Přičemž nejvyšší množství polyfenolů stejně jako ostatních testovaných složek obsahoval extrakt z guarany.

Tabulka 13. Charakterizace- guarana, goji, ženšen

	polyfenoly [mg/g]		flavonoidy [mg/g]		antokyany [$\mu\text{g/g}$]
	Voda	10% kys. mléčná	Voda	10% kys. mléčná	
Guarana	63,38 \pm 1,26	111,84 \pm 2,58	30,94 \pm 5,12	33,67 \pm 2,87	1,45 \pm 0,26
Goji	2,78 \pm 0,09	2,96 \pm 0,04	0,19 \pm 0,06	0,26 \pm 0,08	0,21 \pm 0,07
Ženšen	4,33 \pm 0,15	4,75 \pm 0,11	0,43 \pm 0,03	0,44 \pm 0,02	0,12 \pm 0,01
	Rutin [$\mu\text{g/g}$]	Morin [$\mu\text{g/g}$]	Myricetin [$\mu\text{g/g}$]	Luteolin [$\mu\text{g/g}$]	
Guarana	112,60 \pm 3,58	2,52 \pm 0,72	2,20 \pm 0,12	ND	
Goji	8,12 \pm 0,09	ND	ND	ND	
Ženšen	15,1 \pm 1,56	ND	0,22 \pm 0,02	1,19 \pm 0,28	

Pro přípravu marinosomů byl použit extrakt lipidů z lososa. Tento extrakt byl připraven a analyzován dle postupu uvedeného v kapitole 4.9.

Zastoupení jednotlivých druhů mastných kyselin v extraktu lipidů z lososa: SFA 21,05%, MUFA 6,55%, PUFA 74,82%, n3 6,85%. Extrakt obsahoval 0,17 % DHA a 0,16 % EPA (Obrázek 13).

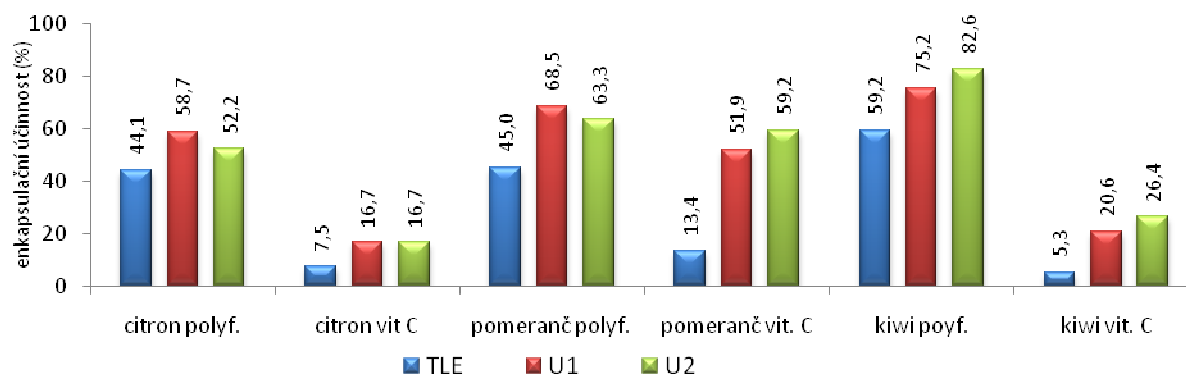


Obrázek 13. Chromatogram plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem – zastoupení mastných kyselin u extraktu z lososa

5.2.2 Stanovení enkapsulační účinnosti

Metody pro přípravu jednotlivých typů částic jsou uvedeny v kapitole 4.8. Vzorky po enkapsulaci danými metodami byly centrifugovány při 14 800 ot./min.

Supernatant byl slit, a byla v něm stanovována pomocí spektrofotometrické metody a pomocí HPLC koncentrace zbylých volných složek, stejně tak jako ve vzorku před enkapsulací. Z těchto dvou hodnot byla poté vypočítána enkapsulační účinnost dané metody. Pro každý vzorek bylo měření opakováno třikrát a ze získaných hodnot byl získán průměr. Rozptyl hodnot měření jednotlivých vzorků nebyl větší než 5 %.



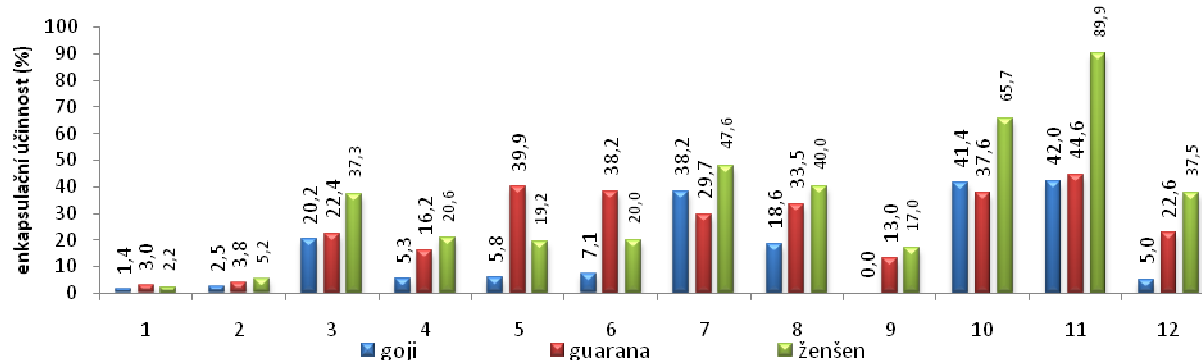
Graf 13. Enkapsulační účinnost – polyfenoly a vitamin C z ovoce

Enkapsulační účinnost ovocných šťáv do liposomů byla sledována spektrofotometrickým stanovením celkových polyfenolů a rovněž stanovením enkapsulovaného množství vitamínu C. Z výsledků je patrné, že polyfenolické složky se enkapsulovaly lépe než vitamin C.

Polyfenolické látky se nejlépe enkapsulovaly z kiwi, naopak vitamin C se nejlépe enkapsuloval ze šťávy z pomeranče. Při porovnání metod byla vhodnější metoda využívající ultrasonifikace (Graf 13). Z výsledků enkapsulace ovocných extraktů do různých typů částic je patrné, že polyfenoly se lépe enkapsulovaly do liposomů.

Zde bylo dosaženo enkapsulační účinnosti od 10 do 30%. Výjimkou byl pouze extrakt z jablka, kde byla účinnost enkapsulace u metody RP-TLE 75,6%. Obecně se polyfenoly lépe enkapsulovaly z extraktů než ze šťáv.

Po srovnání enkapsulační účinnosti jednotlivých částic při enkapsulaci guarany, goji a ženšenu (Graf 14) bylo nejlepší výsledky dosaženo u metody přípravy částic na enkapsulátoru. Především u 2% alginátových částic s jádrem, účinnost enkapsulace u guarany a goji zde dosahovala 40%, u ženšenu až 89,9%. Enkapsulátor tedy umožňuje přípravu částic o definované velikosti, které jsou připraveny optimalizovanou technologií, při níž je eliminován případný negativní efekt složek přírodních extraktů na proces enkapsulace [164]. Při porovnání výsledků u polysacharidových částic je patrné že makro- a mikročástice jsou z hlediska enkapsulované množství polyfenolů vhodnější aplikační forma než nanočástice. Dobrou enkapsulaci extraktů bylo však rovněž možné pozorovat u obou typů liposomů, kde se nejlépe enkapsulovala guarana s účinností kolem 40%. Do polysacharidových částic se nejlépe enkapsuloval ženšen, následoval extrakt guarany a nejmenší enkapsulaci polyfenolických látek vykazovala goji.



Graf 14. Enkapsulační účinnost polyfenolů

1	manuálně	Alginátové částice	5	na ultrazvuku	liposomových částic	9	2% alginát	300 μm
2	manuálně	Chitosanové částice	6	TLE	liposomových částic	10	1% alginát	s jádrem
3	na ultrazvuku	Alginátové částice	7	1% alginát	300 μm	11	2% alginát	s jádrem
4	na ultrazvuku	Chitosanové částice	8	1% alginát	450 μm	12	alginát+CMC	s jádrem

Z výsledků enkapsulace ovocných extraktů do různých typů částic je patrné, že polyfenoly se lépe enkapsulovaly do liposomů. Zde bylo dosaženo enkapsulační účinnosti od 10 do 30%. Výjimkou byl pouze extrakt z jablka, kde byla účinnost enkapsulace u metody RP-TLE 75,6%. Obecně se polyfenoly lépe enkapsulovaly z extraktů než ze šťáv.

Vitamin C se velmi dobře enkapsuloval do liposomových i polysacharidových částic, nejlépe se enkapsuloval ze šťávy z lesních plodů, naopak nejméně se vitamin C enkapsuloval z jablečné šťávy. Flavonoidy se rovněž velmi dobře enkapsulovaly do liposomů i polysacharidových částic, přičemž u individuálních flavonoidů byla zaznamenána vyšší účinnost enkapsulace u liposomů, při stanovení celkového množství se flavonoidy enkapsulovaly výrazněji do polysacharidových částic. Z výsledků srovnání enkapsulace extraktů a šťáv se obecně lépe enkapsulovaly flavonoidy ze šťáv, rozdíly však byly minimální.

Katechiny se dobře enkapsulovaly do liposomových i polysacharidových částic s průměrnou enkapsulační účinností 50%. Antokyany se velmi dobře enkapsulovaly především do liposomů, u ethanolového vstříkávání zde byla enkapsulační účinnost takřka 90%.

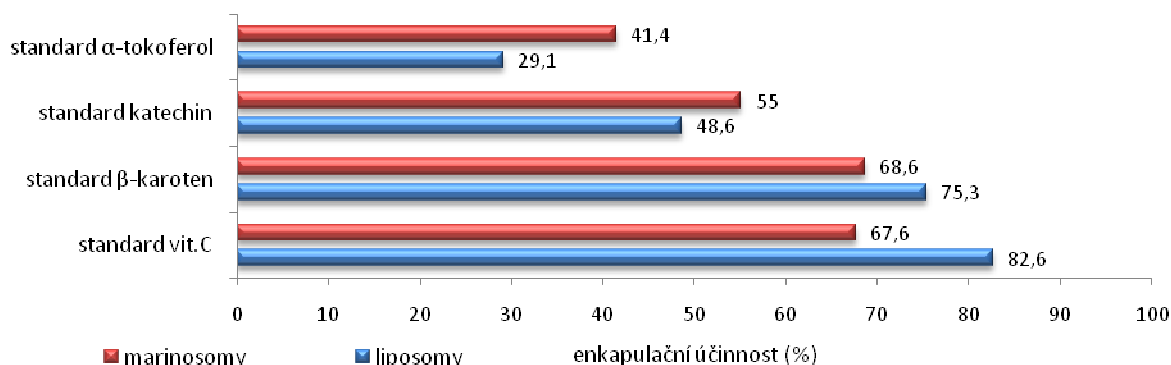
Karoten se nejlépe enkapsuloval do alginát-chitosanových částic (92,5%). Rovněž do liposomů se beta-karoten enkapsuloval velmi dobře s účinností okolo 50%, nejvyšší enkapsulační účinnosti u liposomů bylo dosaženo u metody ethanolového vstříkávání.

Při srovnání enkapsulace jednotlivých standardů flavonoidů a polyfenolů bylo dosaženo obdobných výsledků jako při enkapsulaci jejich přírodních směsí (Tabulka 14). Bylo potvrzeno, že se tyto aktivní složky lépe enkapsulují do liposomových částic. U jednotlivých standardů však rovněž záleželo na použité metodě přípravy liposomů.

Dále byla srovnána možnost enkapsulace vybraných standardů do liposomů a liposomů s přídavkem lipidového extraktu z lososa (Graf 15).

Tabulka 14. Srovnání enkapsulační účinnosti vybraných standardů - %

	kvercetin	morin	rutin	katechin	kys. Gallová
EV	29,4	18,9	77,2	50,9	72,5
TLE	93,1	54,7	13,8	68,0	89,9
RP-TLE	88,2	44,9	25,4	54,7	93,2
U	53,2	69,0	48,9	48,6	66,5
CH	35,2	25,5	14,9	22,5	41,9
A	29,6	34,3	37,1	49,9	53,7
CHA	11,1	16,5	9,5	2,9	21,1



Graf 15. Enkapsulační účinnosti

Nejvyšší enkapsulační účinnost měly liposomové částice s vitamínem C 82,6 %, přidavek lipidového extraktu enkapsulační účinnost snížil o 15 %. Velice dobrou enkapsulační účinnost vykazoval také β -karoten, kdy při enkapsulaci do liposomů byla jeho enkapsulační účinnost 75,3 %. Nejnižší hodnota enkapsulační účinnosti byla stanovena pro α -tokoferol v liposomech 29,1 %. Celkově byla enkapsulační účinnost vyšší v liposomech u β -karotenu a vitamínu C a v liposomech s lipidovým extraktem u α -tokoferolu a katechinu.

5.2.3 Stanovení velikosti a stability částic s obsahem antioxidantů

Velikost částic a jejich distribuce velikostí společně s indexem polydisperzity byly sledovány při měřeních na koloidním analyzátoru Malvern Zetasizer Nano ZS. Rovněž byl změřen zeta potenciál pro posouzení stability připravených částic.

Dle hodnoty zeta potenciál (Tabulka 15) vykazovala většina připravených částic velmi dobrou stabilitu. U liposomů byly stabilní všechny částice včetně marinosomů. Pouze liposomy připravené metodou ethanolového vstřikování vykazovaly vyšší nestabilitu a rychlou agregaci. Hodnota zeta potenciálu se u nich pohybovala v rozmezí od -3,7 do -10,8 mV. Z polysacharidových částic byly stabilní především chitosanové částice, pouze v případě enkapsulace ženšenu u nich došlo k výraznému snížení hodnoty zeta potenciálu. Alginát-chitosanové a alginátové částice byly méně stabilní hodnoty jejich zeta potenciálu se pohybovaly od -20 do -25 mV.

Průměrná velikost liposomů byla 200 nm, u většiny částic došlo k mírnému zvětšení jejich velikosti vlivem enkapsulované složky. Největší liposomové částice byly připraveny pomocí metod RP-TLE a ethanolového vstřikování, zde byla průměrná velikost nad 300 nm. Indexy polydisperzity se u všech připravených liposomů pohybovaly do hodnoty 0,2, pouze v případě ethanolového vstřikování se hodnoty polydisperzity pohybovaly od 0,2 do 0,3. Průměrná velikost polysacharidových částic byla, ve srovnání s liposomy větší, pohybovala se od 300 do 600 nm v případě chitosanových částic a alginátových částic. U chitosan-alginátových částic byla průměrná velikost 600 až 900 nm. Rovněž indexy polydisperzity polysacharidových částic byly vyšší a pohybovaly se v rozmezí od 0,2 do 0,6, přičemž nejnižší indexy polydisperzity byly naměřeny u chitosanových a alginátových částic.

Tabulka 15. Stanovení velikosti a stability připravených částic

	ø velikost [nm]	ø zeta potenciál [mV]		ø velikost [nm]	ø zeta potenciál [mV]
L TLE jablko šťáva	188,2	-35,9	CH jablko šťáva	382,9	35,0
L TLE jablko extrakt	540,7	-30,5	CH jablko extrakt	741,7	37,6
L TLE mrkev šťáva	116,6	-44,1	CH mrkev šťáva	303,9	35,5
L TLE mrkev extrakt	355,7	-30,1	CH mrkev extrakt	502,9	30,7
L TLE lesní plody šťáva	213,6	-25,1	CH lesní plody šťáva	457,0	25,5
L TLE lesní plody extrakt	380,8	-28,5	CH lesní plody extrakt	237,5	36,9
L RP-TLE jablko šťáva	206,7	-42,1	CHA jablko šťáva	588,5	-26,3
L RP-TLE jablko extrakt	222,6	-42,7	CHA jablko extrakt	867,4	-22,1
L RP-TLE mrkev šťáva	203,6	-37,3	CHA mrkev šťáva	527,5	-25,5
L RP-TLE mrkev extrakt	307,8	-41,9	CHA mrkev extrakt	851,9	-22,2
L RP-TLE lesní plody šťáva	282,7	-30,6	CHA lesní plody šťáva	650,1	-19,7
L RP-TLE lesní plody extrakt	138,9	-33,6	CHA lesní plody extrakt	1187,0	-17,6
L EV jablko šťáva	524,0	-8,0	CH U - prázdné	1001,0	47,1
L EV jablko extrakt	226,3	-9,9	CH U - goji	697,9	39,6
L EV mrkev šťáva	258,8	-10,8	CH U - guarana	1156,0	44,4
L EV mrkev extrakt	676,1	-3,7	CH U - ženšen	526,0	14,5
L EV lesní plody šťáva	362,8	-3,0	CH - prázdné	326,4	25,3
L EV lesní plody extrakt	403,0	-8,2	CH - goji	314,9	23,8
L TLE	158,7	-55,4	CH - guarana	426,6	21,5
L RP-TLE	154,7	-53,8	CH - ženšen	279,4	0,49
L EV	308,6	-24,3	A U - goji	785,1	-19,1
CH	396,6	33,8	A U - guarana	336,0	-18,5
CHA	467,4	-39,3	A U - ženšen	361,8	-19,2
U - goji	192,1	-35,0	M TLE 10% lip. extraktu	505,5	-37,1
U - guarana	121,6	-43,3	M TLE 20% lip. extraktu	408,4	-34,5
U - ženšen	119,3	-42,2	M U 2,5% lip. extraktu	232,4	-30,7
L TLE	382,6	-29,6	M U 5% lip. extraktu	178,5	-29,9
L U	241,7	-26,9	M U 10% lip. extraktu	170,9	-35,0
M TLE 2,5% lip. extraktu	563,4	-33,9	M U 20% lip. extraktu	110,5	-36,3

Zkratky: A-Alginátové částice, CH-chitosanové částice, CHA-chitosan-alginátové částice, L-liposomy, M-marinosomy U-metoda ultrasonifikace (U-22,5mg/ml lecithinu, U1-18mg/ml lecithinu, U2-18mg/ml lecithinu v chloroformu, TLE- metoda odpařování na tenké vrstvě, RP-TLE-metoda odpařování na tenké vrstvě s reverzní fází, EV-etanolové vstříkávání.

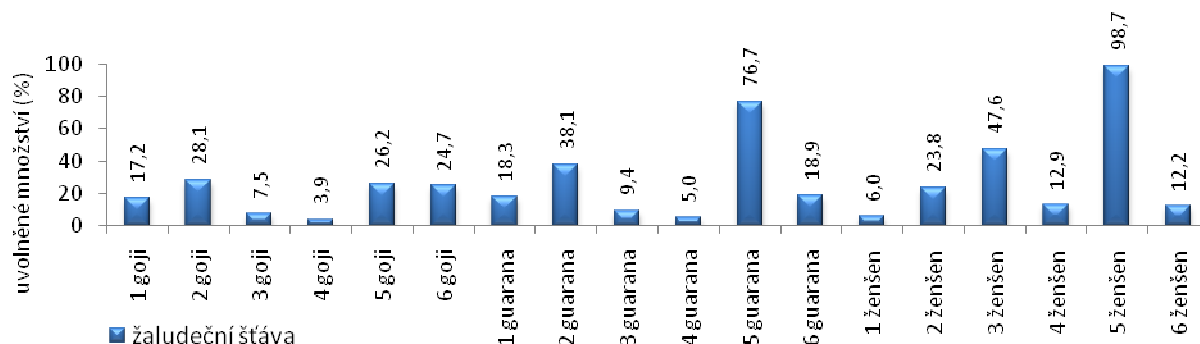
5.2.4 Stabilita částic – modelové trávení

Připravené částice s obsahem goji, guarany a ženšenu byly aplikovány do modelových trávicích šťáv, kde bylo sledováno uvolněné množství enkapsulovaných složek. Stejně jako v mnohých studiích byla testována možnost pozvolného uvolňování a zajištění vyšší biologické dostupnosti aktivních látek [5, 54].

Z dosažených výsledků vyplývá, že v žaludeční šťávě (Graf 16) byly nejstabilnější částice s obsahem goji, naopak nejvíce docházelo k uvolňování enkapsulovaných polyfenolických složek v případě enkapsulovaného ženšenu, u kterého byla však stanovena nejvyšší enkapsulační účinnosti.

Nejmenší stabilita byla naměřena u 1% alginátových částic připravených na enkapsulátoru (tryska 450 µm) se zapouzdřeným ženšenem.

Zde se vlivem kyselého prostředí žaludeční šťávy uvolnilo skoro veškeré množství polyfenolů. U stejného typu částic, při enkapsulaci guarany bylo také uvolněno významné množství polyfenolů (76,7%). U alginátových částic s přísadkou CMC bylo zaznamenáno rovněž vyšší množství uvolněných polyfenolů, v případě enkapsulace ženšenu 72,7%, u enkapsulace guarany 48,5%.

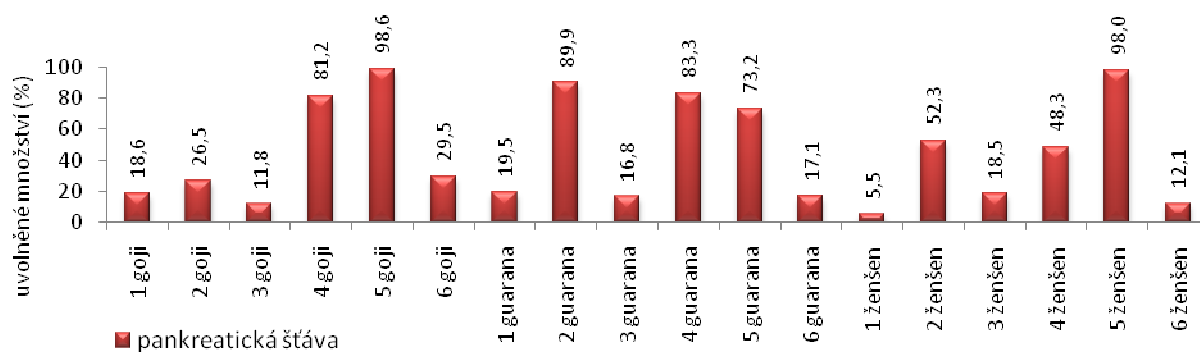


Graf 16. Stabilita částic v modelovém trávení-uvolnění polyfenoly

na ultrazvuku	Alginátové částice	1	na ultrazvuku	liposomových částic	3	1% alginát	450 μm	5
na ultrazvuku	Chitosanové částice	2	1% alginát	300 μm	4	1% alginát	s jádrem	6

Ostatní polysacharidové částice byly obecně v žaludeční šťávě stabilní a uvolněné množství se v průměru pohybovalo okolo 20%.

Liposomové částice byly v žaludeční šťávě stabilní především v případě enkapsulace goji a guarany, kde nebylo zaznamenáno uvolněné množství do 9,4% enkapsulovaného množství polyfenolů. U liposomů s enkapsulovaným extraktem ženšenu bylo detekována vyšší uvolněné množství okolo 50%.

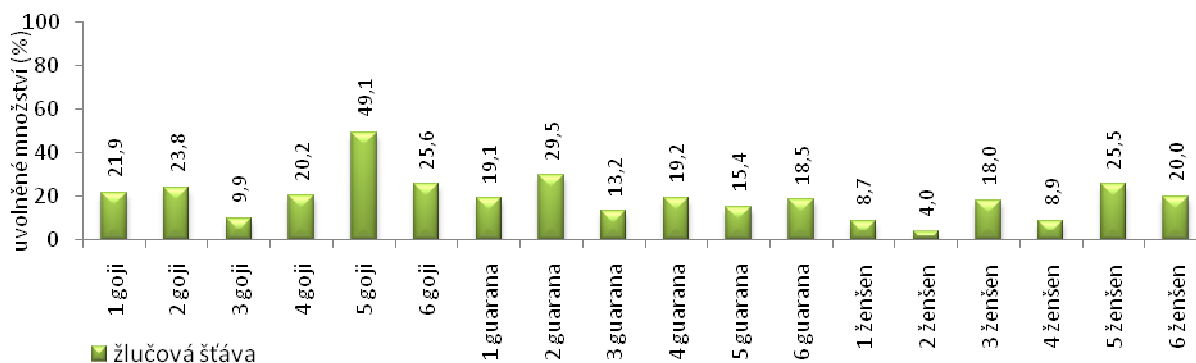


graf 17. Stabilita částic v modelovém trávení-uvolnění polyfenoly

na ultrazvuku	Alginátové částice	1	na ultrazvuku	liposomových částic	3	1% alginát	450 μm	5
na ultrazvuku	Chitosanové částice	2	1% alginát	300 μm	4	1% alginát	s jádrem	6

Působením pankreatické šťávy došlo k výraznějšímu uvolnění enkapsulovaných polyfenolů než v případě modelové žaludeční šťávy. Trend stability/nestability jednotlivých částic byl však zachován. Nejlépe se však polyfenoly v prostředí tenkého střeva (48 až 83%) uvolňovaly z 1% alginátových částic připravených na enkapsulátoru, kde bylo v žaludeční šťávě zaznamenáno minimální uvolněné množství. Polyfenoly se v prostředí pankreatické šťávy rovněž velmi dobře uvolňovaly z chitosanových částic (26,5 až 90%). U ostatních částic se uvolněné množství pohybovalo v průměru okolo 20%. Docházelo u nich tedy pouze k pozvolnému uvolňování.

Vlivem umělé žlučové tekutiny došlo k nejmenšímu rozpadu připravených částic, v porovnání se žaludeční a pankreatickou šťávou. Pravděpodobně zde docházelo velmi pozvolnému uvolňování. Nejlépe se polyfenoly uvolňovaly u 1% a 2% alginátových částic připravených na enkapsulátoru, dále pak u směsných částic alginátu a CMC a u chitosanových částicích. Naopak nejnižší uvolněné množství bylo naměřeno u liposomů a 1% alginátových částic s tryskou 300 μ (v případě alginátových částic došlo k uvolnění významného množství v pankreatické šťávě).



graf 18. Stabilita částic v modelovém trávení-uvolněné polyfenoly

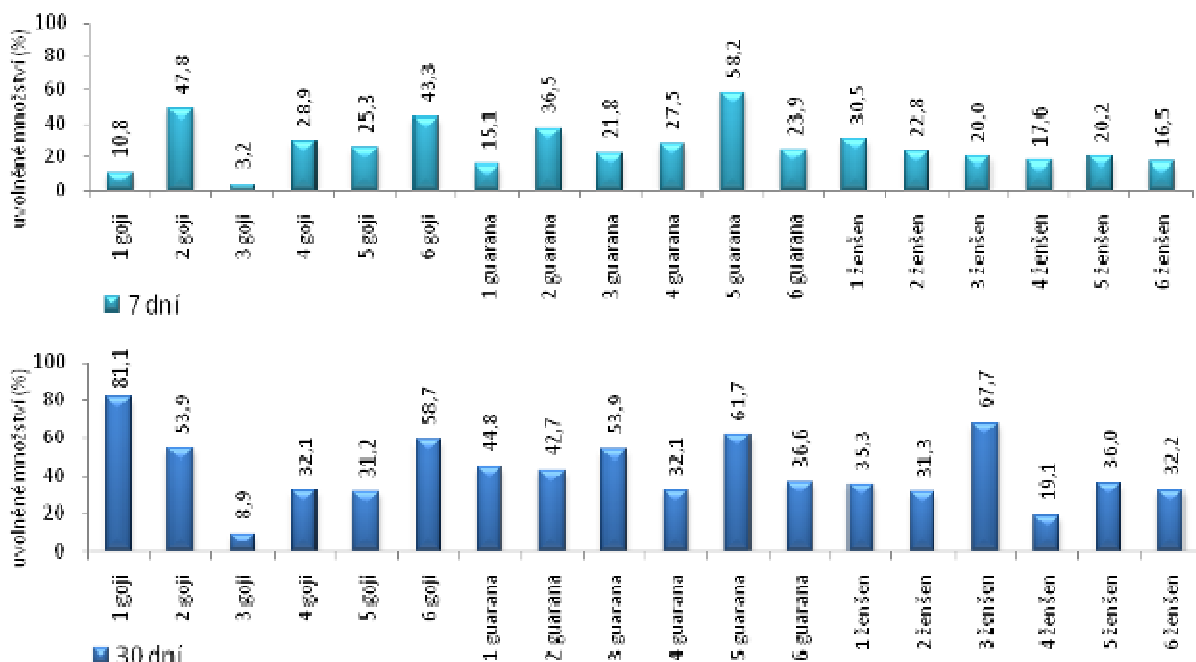
na ultrazvuku	Alginátové částice	1	na ultrazvuku	liposomových částic	3	1%alginát	450 μm	5
na ultrazvuku	Chitosanové částice	2	1%alginát	300 μm	4	1%alginát	s jádrem	6

Ze získaných výsledků je patrné, že enkapsulace polyfenolických složek a jejich extraktů lze využít k cílenému transportu trávicím traktem. Kdy při průchodu žaludkem dojde k zachování stability částic, a k řízenému uvolňování aktivních složek pak dochází v prostředí střev.

5.2.5 Stanovení dlouhodobé stability částic – modelové potraviny

U částic s enkapsulovanými extrakty goji, guarany a ženšenu byla dále sledována dlouhodobá stabilita v modelových potravinách. Složení jednotlivých modelových podmínek je uvedeno v kapitole 4.14.

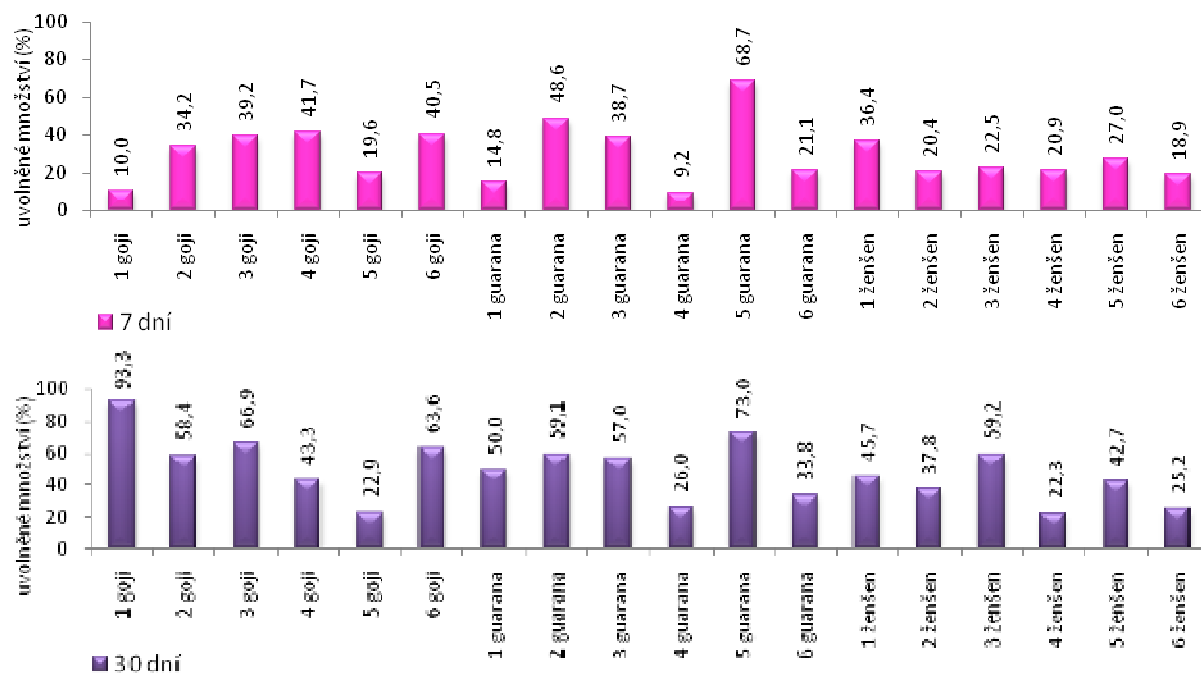
V modelové vodné potravine (Graf 19) docházelo k největšímu uvolňování polyfenolů u extraktu z goji v alginátových částicích připravených na ultrazvuku i enkapsulátoru, dále u ženšenových extraktů v liposomech připravených odpařením reversní fáze a rovněž u 1% alginátových částic s jádrem. Naopak k nejmenšímu uvolnění polyfenolů došlo u 1% alginátových částic typu matrix rovněž s enkapsulovaným ženšenem.



Graf 19. Dlouhodobá stabilita částic – uvolněné polyfenoly – prostředí voda

na ultrazvuku	Alginátové částice	1	na ultrazvuku	liposomových částic	3	2%alginát	300 μm	5
na ultrazvuku	Chitosanové částice	2	1%alginát	300 μm	4	2%alginát	s jádrem	6

V modelovém prostředí kyselé potraviny (Graf 20) bylo nejvíce uvolněných polyfenolických látek u alginátových částic připravených na ultrazvuku s extraktem z goji, kde bylo uvolněno 93,34 % polyfenolů. Velká nestabilita byla rovněž pozorovatelná u 1% alginátových částic s jádrem připravených na enkapsulátoru s extraktem goji i ženšenu, kde byl rozpad stanoven na více než 80 %. Naopak největší stabilitu vykazovaly ženšenové částice typu matrix připravené na enkapsulátoru, kde se uvolnilo pouze 25 %. Co se týče porovnání stability jednotlivých extraktů (Graf 20), největší uvolňování polyfenolických látek dochází u extraktu z goji. Nejstabilnějším extraktem v kyselém prostředí je naopak ženšen, kde ve většině částic nepřesáhlo uvolněné množství po měsíci skladování 50 % enkapsulovaného množství.



Graf 20. Dlouhodobá stabilita částic – uvolněné polyfenoly – prostředí 3% kyselina octová

na ultrazvuku Alginátové částice 1 na ultrazvuku liposomových částic 3 2%alginát 300 µm 5
na ultrazvuku Chitosanové částice 2 1%alginát 300 µm 4 2%alginát s jádrem 6

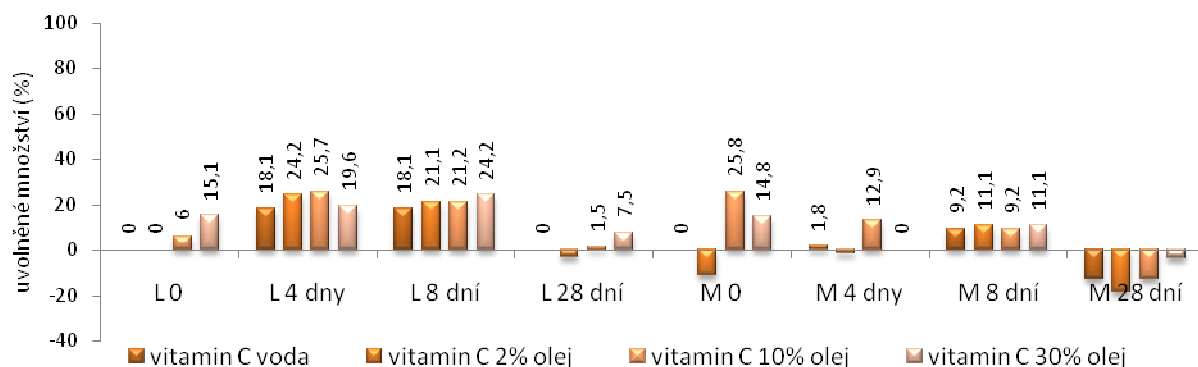
V modelové alkoholové potraviny docházelo k největšímu uvolňování polyfenolů u alginátových částic připravených na ultrazvuku a u 1% alginátových částic připravených na enkapsulátoru s tryskou 450 µm, kde se během měsíce skladování uvolnilo v průměru 80 % enkapsulovaných polyfenolických složek. U ostatních částic bylo po měsíčním skladování uvolněné množství v průměru 40%.

K největšímu rozpadu částic v modelové tučné potraviny docházelo u ženšenu u 1% alginátu s jádrem, liposomů připravených na ultrazvuku a alginátových částic připravených na ultrazvuku, kde došlo k uvolnění více než 70 % polyfenolů. Naopak nejstabilnější částice byly s enkapsulovaným extraktem z guarany a alginátové částice s enkapsulovaným ženšenu, kde se uvolnění polyfenolů z částic pohybovalo kolem 20 %.

Závěrem lze říci, že při stanovení stability v modelových potravinách bylo jako nejvhodnější modelové prostředí pro dlouhodobé uchování stanoveno vodné prostředí, pro většinu polysacharidových částic pak i kyselá prostředí. Jako velmi vhodnou aplikační formou pro přidání studovaných přírodních extraktů do reálných potravin by mohly být alginátové částice připravené na enkapsulátoru. Bylo u nich dosaženo nejvyšší enkapsulační účinnosti a rovněž vykazovaly dobrou stabilitu v modelových tělních tekutinách a modelových potravinách. Lze je tedy využít k cílenému transportu a uvolňování enkapsulovaných aktivních látek v trávicím traktu a tím dosáhnout vyšší biologické dostupnosti a přínosnosti pro zdraví spotřebitele.

5.2.6 Stanovení dlouhodobé stability částic s antioxidanty – modelové kosmetické prostředí

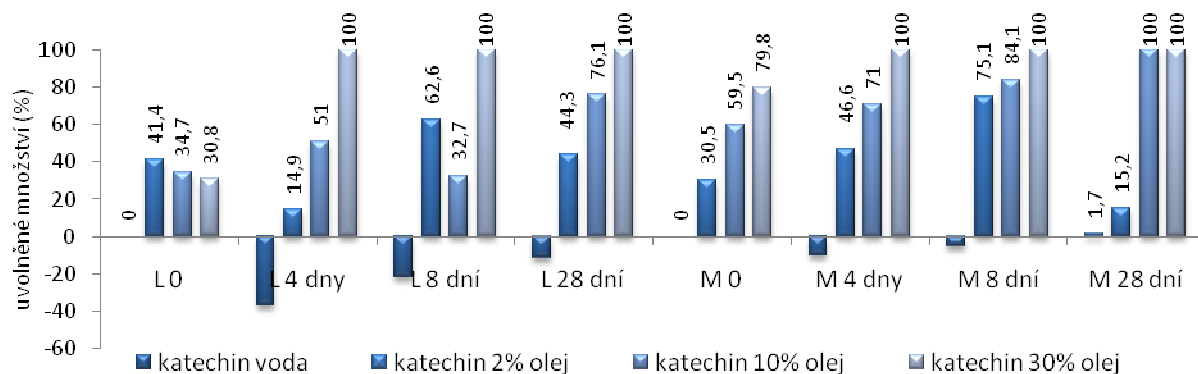
Stabilita částic s enkapsulovanými aktivními látkami byla testována ve čtyřech modelových kosmetických prostředích - voda, 2%, 10% a 30% emulze olej ve vodě. Liposomy i marinosomy byly připraveny metodou pomocí ultrazvuku (kap. 4.8.3.1). Marinosomy byly připraveny s přidávkem 10% lipidového extraktu (kap 4.8.3.5).



Graf 21. Dlouhodobá stabilita – vitamin C

Označení: L- liposomy; M-marinosomy

Vitamin C vykazoval v liposomech postupné uvolňování do 8. dne ve všech modelových prostředích. Dále již docházelo k snížení obsahu vitaminu C ve volném prostředí pravděpodobně vlivem degradace. Vitamin C v marinosomech vykazoval (Graf 21) vyšší stabilitu, a do vodného prostředí se uvolňoval jen minimálně.



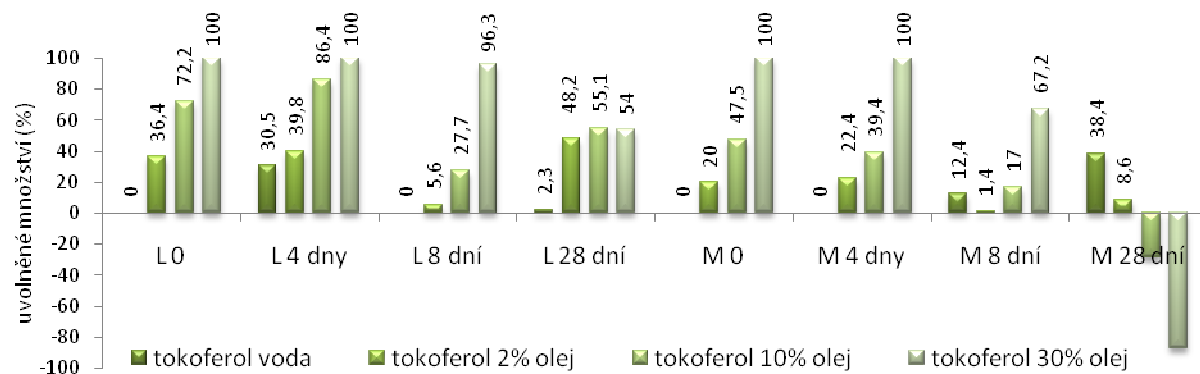
Graf 22. Dlouhodobá stabilita – katechin

Označení: L- liposomy; M-marinosomy

U liposomů s obsahem katechinu (Graf 22) bylo dosaženo v případě čistě vodného prostředí nejlepších výsledků, kdy po měsíci skladování nebylo zaznamenáno žádné uvolněné množství. Naopak v prostředí 30% emulze se již 4. den uvolnilo 100 % enkapsulovaného množství katechinu. Při sledování uvolňování katechinu u marinosomů nebylo opět pozorováno žádné výrazné uvolňování do vodného prostředí. Naopak v případě emulzí se již v čase 0 uvolnilo významné množství. Během skladování docházelo k nárůstu uvolněného množství, po měsíci skladování již bylo u všech emulzí uvolněno veškeré enkapsulované množství katechinu.

Z výsledků v Grafu 23 je patrné, že vitamin E se z liposomů výrazně uvolňuje již během prvních čtyř dnů. Uvolněné množství navíc roste se vzrůstající koncentrací oleje v modelových prostředích. Naopak z marinosomů se vitaminu E začíná uvolňovat do výhradně vodného prostředí až během 8. dne. Po měsíci skladování se pak do vodného prostředí uvolnilo jen 38 % enkapsulované množství vitaminu E. V 2 % a 10% emulzi se již v den 0 uvolnilo částečné množství vitaminu E, které bylo detekováno i po 4 dnech.

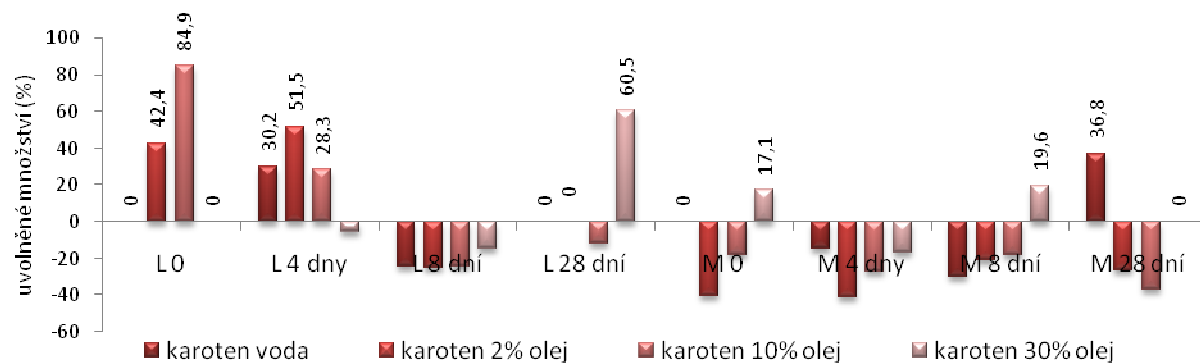
Následně během dalšího skladování, zřejmě vlivem degradace, však docházelo ke snížení obsahu volného vitamínu E v testovaných prostředích. V 30% emulzi došlo k okamžitému uvolnění veškerého enkapsulovaného množství ihned po aplikaci vzorku do tohoto prostředí. Uvolněné množství přetrvávalo v prostředí do 4. dne. Poté opět došlo ke snížení koncentrace volného vitamínu E pravděpodobně vlivem degradace.



Graf 23. Dlouhodobá stabilita - α -tokoferol

Označení: L- liposomy; M-marinosomy

Při sledování stability liposomů s obsahem β -karotenu (Graf 24) bylo v čase 0 pouhým přidání částic do emulze uvolněno významné množství karotenu. V případě 2% emulze se uvolnilo 42 % množství, v případě 10% emulze téměř 85 %. U volného β -karotenu, který je na světle nestálý, docházelo poté během skladování k jeho výrazné degradaci. Naopak v čistě vodném prostředí nebylo v průběhu celého testu stanoveno žádné uvolněné množství β -karotenu. U marinosomů nedocházelo k téměř žádnému uvolňování β -karotenu v průběhu celého měsíčního skladování a ve všech sledovaných podmínkách, což bylo patrné i ze zachování zbarvení částic.



Graf 24. Dlouhodobá stabilita - β -karoten

Označení: L- liposomy; M-marinosomy

Tabulka 16. Hodnoty uvolňování karotenu z liposomů pro různé koncentrace ve 4. den

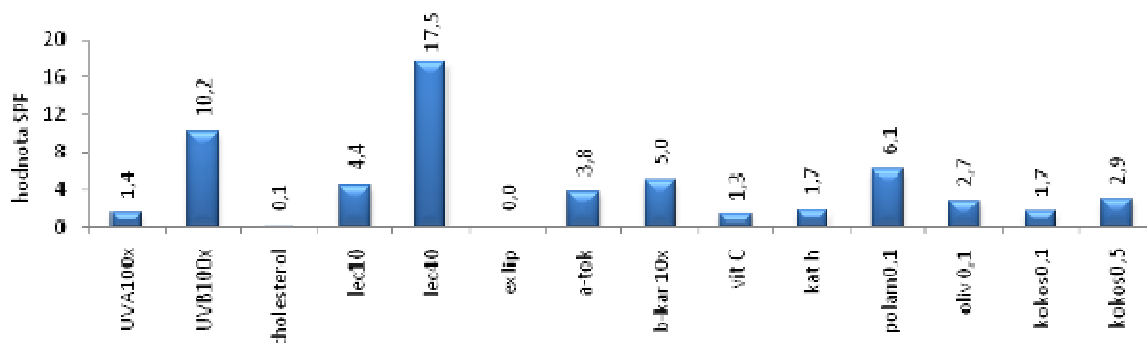
	1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	3 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	6 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
	uvolňování [%]		
voda	17,40	ND	ND
2% emulze	43,44	ND	18,34
10% emulze	45,94	7,71	23,81
30% emulze	50,46	37,03	31,63

Stabilita liposomů s β -karotenem byla porovnávána i pro různé koncentrace, jak je zobrazeno v tabulce 19. Ve vodě se u nižší koncentrace 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ uvolnilo téměř 20 %. U vyšších koncentrací byly částice již stabilní a nebylo detekováno žádné uvolněné množství. Podobná data byla získána v případě 2% emulze.

Z výsledků je patné, že u všech koncentrací β -karotenu je uvolňování nejvýraznější v případě skladování ve 30% emulzi, vždy okolo 20-40 % do 4. dne. Nejvhodnějším prostředím pro dlouhodobé skladování testovaných částic bylo vyhodnoceno vodné prostředí.

U připravených emulzí byla rovněž sledována sedimentační stabilita po přidání testovaných částic. Z dosažených výsledků lze konstatovat, že vlivem částic nedochází ke změně sedimentační stability emulzí. Připravené částice jsou tedy z hlediska sedimentační stability vhodnou formou pro kosmetické aplikace ve formě různých krémů. Vzhledem k dosaženým výsledkům dle uvolněného množství aktivní látek během skladování by však tyto kosmetické přípravky neměly obsahovat více než 2% lipidických složek.

U jednotlivých komponent byly dále, pro potenciální aplikace částic v opalovacích krémech, proměřeny hodnoty SPF pomocí metody *in vitro* [173]. Již samotný lecithin vykazoval SPF 17. Z aktivních látek byl nejvyšší SPF 5 zjištěn u β -karotenu, vitamin E vykazoval SPF 3,8, srovnatelný SPF 1,5 měli vitamin C a katechin. Dále byly proměřeny i oleje použité pro přípravu kosmetických emulzí (palmový, olivový a kokosový), u všech byl dosažen SPF faktor 5-6. Celkově tedy můžeme říci, že i samotné částice, vykazovaly určitý protektivní efekt vůči UV záření a všechny enkapsulované složky tento SPF faktor zvyšovaly. Enkapsulované aktivní složky jsou tedy vhodné do různých kosmetických přípravků včetně opalovacích.



Graf 25. Přehled hodnot SPF faktorů pro jednotlivé složky částic, aktivní látky a rostlinné oleje

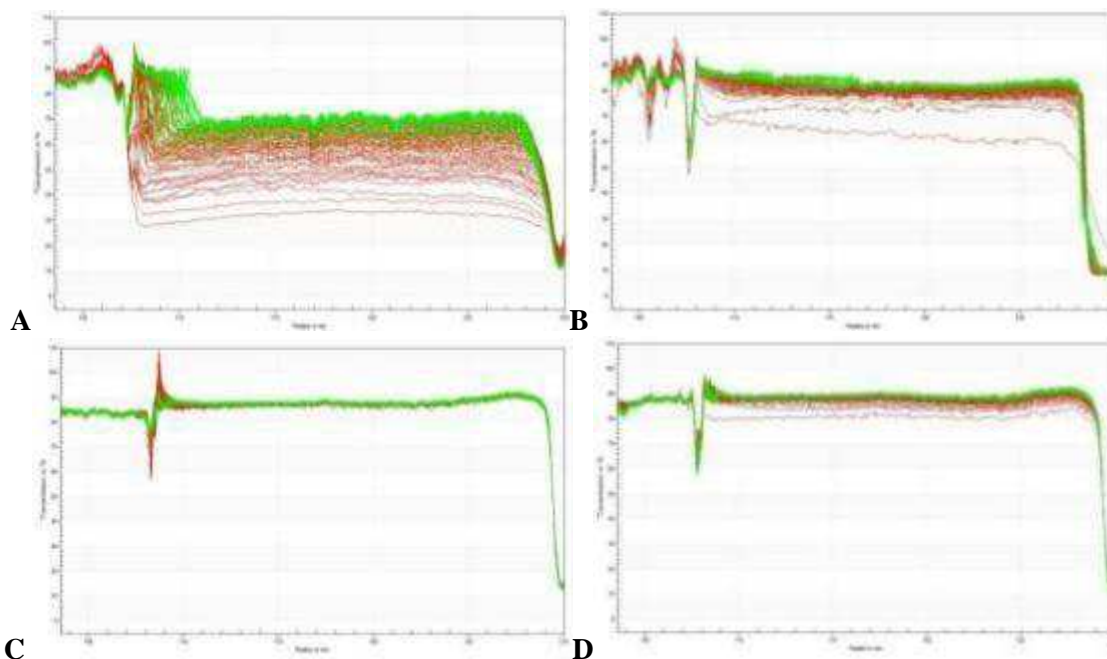
Vitaminu E obohacuje přípravky o antioxidační účinky, zvláčňuje dehydratovanou pokožku a prodlužuje rovněž trvanlivost výsledného produktu. Přídavek β -karotenu je velmi vhodné pro opalovací krémy díky vyššímu SPF a schopnosti zvýraznění opálení. Vitamin C při aplikaci s vitaminem E zajišťuje jeho regeneraci. Dále by samotný vitamin C, stejně jako katechin, mohl v cílovém výrobku působit antioxidačně, v případě opalovacích přípravků může vitamin C napomoci i při redukcii pigmentových skvrn.

5.2.7 Stanovení sedimentační stability částic s antioxidanty

Stanovení sedimentační stability částic s antioxidanty bylo provedeno pomocí analytické centrifugace dle postupu uvedeného v kapitole 4.12.

Tabulka 17. Analytická centrifugace – indexy nestability

	TLE	RP-TLE	EV	CH	CHA
jablko- šťáva	1,3589±0,0860	0,1160±0,0325	1,0106±0,850	1,0959±0,0320	2,4294±0,9523
mrkev - šťáva	0,1872±0,0313	4,0149±0,2356	0,7070±0,0562	1,5251±0,7526	0,4464±0,2365
lesní plody - šťáva	1,9613±0,0256	1,8987±0,0856	1,0748±0,9500	1,3112±0,5689	1,0796±0,3265
jablko - extrakt	0,1183±0,0155	0,9855±0,0230	0,5674±0,0652	0,7127±0,0569	3,1061±0,8757
mrkev - extrakt	0,8740±0,0475	2,3222±0,8652	0,6436±0,0453	0,3690±0,0236	2,991±0,7692
lesní plody- extrakt	1,7752±0,0652	1,4887±0,0952	1,0830±0,0236	0,7063±0,0784	2,1905±0,8093
prázdne	0,9280±0,0356	4,1029±0,7550	3,1580±0,9391	0,7781±0,0158	0,9566±0,6523



Graf 26. Stanovení sedimentační stability - vybrané vzorky; liposomy metoda RP-TLE A) mrkev (extrakt), B) mrkev(šťáva);chitosanové částice G) jablka(extrakt), H) jablka (šťáva)

Z Tabulky 17 vyplývá, že nejméně stabilní liposomy, připravené metodou TLE, byly částice s obsahem extraktu i šťávy z lesního ovoce. Relativně méně stabilní byly částice i při enkapsulaci jablečné šťávy, naopak v případě enkapsulace jablečného extraktu byly tyto částice nejstabilnější. U metody RP-TLE byly nejméně stabilní vzorky částic bez enkapsulovaných látek, poměrně málo stabilní byla také mrkvová šťáva. Ostatní vzorky u této metody vykazovaly dobrou sedimentační stabilitu. Rovněž u ethanolového vstříkávání byly prázdné liposomy nejméně stabilní, vlivem enkapsulace tak u ostatních vzorků došlo ke zvýšení jejich sedimentační stability. V případě chitosanových částic došlo ke snížení stability vlivem enkapsulace šťáv, v případě extraktů byla sedimentační stabilita naopak vyšší, v porovnání s částicemi bez enkapsulované složky. U chitosan-alginátových částic došlo vlivem enkapsulace šťáv i extraktů k destabilizaci systému. Nejvýrazněji pak v případě enkapsulace jablečných vzorků.

Obecně u liposomů připravených metodou ethanolového vstříkávání docházelo k rychlé sedimentaci velkých částic (Graf 26). U liposomů připravených metodami TLE a RP-TLE docházelo k homogenní sedimentaci, pouze v některých případech, převážně vlivem enkapsulace šťáv došlo k snížení stability a zvýšení rychlosti sedimentace. Polysacharidové částice byly z hlediska sedimentační stability velmi stabilní, u alginát-chitosanových částic však vlivem enkapsulace došlo ke snížení stability částic.

Jako nejvhodnější z testovaných částic byly z hlediska sedimentační stability, například pro aplikace do nápojů, vyhodnoceny chitosanové částice. U těchto částic byla jejich vysoká sedimentační stabilita zachována i v případě enkapsulace aktivních složek. Z enkapsulovaných složek pak byly vhodné především ovocné extrakty.

5.3 Enkapsulace antimikrobiálních látek, jejich přírodních extraktů a vybraných léčiv

Další část práce byla zaměřena na studium enkapsulace vybraných přírodních antimikrobiálních extraktů z rostlinných a živočišných zdrojů. K enkapsulaci byl použit propolis, nisin, dále lysozym a ovotransferin a jejich přírodní zdroj - vaječný bílek. Z rostlinných zdrojů byly testovány možnosti enkapsulace bylinných a kořeněných extraktů z šalvěje, rozmarýnu, kopřivy, hřebíčku, levandule, heřmánku, černého bezu, pelyňku, mateřídoušky, echinacey, lékořice, měsíčku, rakytníku, tymiánu, jitrocele, majoránky, třezalky, zázvoru a česneku.

Tyto vzorky byly nejprve charakterizovány a následně použity k enkapsulaci. Rovněž byla testována možnost enkapsulace léčiv klotrimazolu a ibuprofenu a jejich koenkapsulace s vybranými rostlinnými antimikrobiálními extrakty.

U všech použitých antimikrobiálních složek byla sledována jejich antimikrobiální/antimykotická aktivita před a po enkapsulaci do různých typů částic.

5.3.1 Charakterizace použitých antimikrobiálních složek

Přírodní rostlinné extrakty a propolis byly charakterizovány na obsah polyfenolů a flavonoidů. Rovněž byla sledována jejich antioxidační aktivity pomocí ABTS radikálu. U propolisu byla navíc sledována celková koncentrace bílkovin. Podrobné postupy stanovení jsou uvedeny v kapitole 4.7. Příprava extraktu probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 4.6.

Antioxidační aktivity testovaných bylinných extraktů, stejně jako celkové obsahy polyfenolů a flavonoidů jsou uvedeny v Tabulce 18. Nejvyšší antioxidační aktivita byla naměřena u extraktu z hřebíčku (46,7 mg/g) a extraktu z třapatky (45,6 mg/g). Extrakty z tymiánu, šalvěje, černého bezu, jitrocele, majoránka, třezalky, zázvor a česneku měly velmi podobnou antioxidační aktivitu pohybující se v průměru kolem 30 mg/g. Ostatní testované bylinné extrakty měly antioxidační aktivitu průměrně 10 mg/g. Nejnižší antioxidační aktivita byla měřena u extraktů z heřmánku a kopřivy.

Tabulka 18. Charakterizace vodných bylinných extraktů

	pelyněk	tymián	echinacea	lékořice	měsíček	rakytník
Antioxidační aktivita mg/g	10,3±1,3	30,4±1,3	45,6±1,3	7,8±0,8	9,7±0,5	10,3±0,6
celkové polyfenoly mg/g	11,2±0,1	31,1±0,3	31,1±0,2	8,7±0,1	23±0,2	3,3±0,1
celkové flavonoidy mg/g	14,3±0,2	29±0,2	23,6±0,1	6,1±0,1	15,5±0,1	1,2±0,0
	šalvěj	rozmarýn	kopřiva	hřebíček	levandule	heřmánek
Antioxidační aktivita mg/g	34,8±1,6	11,9±0,8	9,5±0,2	46,7±1,5	9,6±0,5	3,8±0,3
celkové polyfenoly mg/g	34,3±0,3	11,5±0,1	16,3±0,2	60,8±0,2	19,2±0,1	5,7±0,1
celkové flavonoidy mg/g	17,2±0,1	9,5±0,1	13,8±0,1	16,2±0,1	10,8±0,1	0,6±0,0
	Černý bez	jitrocel	majoránka	třezalka	zázvor	česnek
Antioxidační aktivita mg/g	24±0,9	27,9±1,3	37,7±1,8	30,3±1,7	28,9±1,1	31,2±1,3
celkové polyfenoly mg/g	38,8±0,2	43±0,3	48,7±0,5	44,1±0,6	1,4±0,1	1,5±0,0
celkové flavonoidy mg/g	32,9±0,2	24,7±0,2	31,3±0,3	39,3±0,3	0,2±0,0	0,1±0,0

Nejvyšší obsah celkových polyfenolů byl naměřen u hřebíčku (60,8 mg/g) dále u majoránky, tymiánu a třezalky (okolo 45 mg/g). Černý bez a šalvěj měli obsah polyfenolů v průměru 36 mg/g. Nejnižší hodnota obsahu celkových polyfenolů byla změřena u extraktu česneku a zázvoru. Je zajímavé, že tyto extrakty měly současně vynikající antioxidační aktivitu. Výsledky mohou naznačovat, že polyfenolické složky nejsou jediným ukazatelem antioxidačního charakteru rostlinných extraktů.

Výsledky obsahu celkových flavonoidů, ve většině případů, kopírují stejný trend jako v případě obsahu celkových polyfenolů. Pouze extrakt hřebíček, který vykazoval nejvyšší naměřenou hodnotu celkových polyfenolů, měl obsah flavonoidů výrazně nižší. Nejvyšší celkový obsah flavonoidů byl zaznamenán u třezalky (39,3 mg/g), následovaly extrakty z černého bezu, majoránky, tymiánu a jitrocele, jejichž obsah celkových flavonoidů se pohyboval okolo hodnoty 30 mg/g.

Tabulka 19. Charakterizace propolisu - ethanolový extrakt

	obsah aktivních složek mg/g			
	polyfenoly	flavonoidy	antioxidační aktivita	bílkoviny
propolis	273,9 ± 2,0	81,8 ± 1,7	302,2 ± 2,4	548,7 ± 1,9

Z dosažených výsledků při charakterizaci bylin a propolisu je patrné, že zcela nejvíce bio-aktivním extraktem je právě propolis, kde obsah sledovaných aktivních látek více než desetinásobně převyšuje ostatní extrakty.

5.3.2 Stanovení enkapsulační účinnosti

Metody pro přípravu jednotlivých typů částic jsou uvedeny v kapitole 4.8. Pro každý vzorek bylo měření opakováno třikrát a ze získaných hodnot byl získán průměr. Rozptyl hodnot měření jednotlivých vzorků nebyl větší než 5 %.

5.3.2.1 Enkapsulace bylinných extraktů

Bylinný extrakt po enkapsulaci danými metodami byl vždy centrifugován při 14 800 ot./min. Supernatant byl slit, a byla v něm stanovována pomocí spektrofotometrické metody koncentrace zbylých volných polyfenolů, stejně tak jako ve vzorku před enkapsulací. Z těchto dvou hodnot byla poté vypočítána enkapsulační účinnost dané metody.

V práci byly použity tři základní typy extraktů: vodné, ethanolové a kyselé viz kap. 4.6.3. Obecně lze říci, že polyfenolické složky rostlinných extraktů se nejvýhodněji enkapsulovaly z vodných extraktů (Tabulka 20). Naopak, nejmenší enkapsulační účinnost byla stanovena ve většině případů při použití extrakce pomocí kyseliny citrónové.

Tabulka 20. Enkapsulační účinnost polyfenolů – různé typy extrakce – enkapsulace do liposomů

EU%	tymián	jitrocel	majoránka	třezalka	zázvor	česnek
vodné extrakty	45,2	27,9	37,7	39,5	28,9	93,2
ethanolové extrakty	33,6	15,4	42,5	35,6	11,5	15,2
extrakty kyseliny citrónové	17,2	22,7	33,9	28,9	8,0	9,6
	pelyněk	echinacea	lékořice	měsíček	rakytník	šalvěj
vodné extrakty	3,7	26,6	60,2	37,5	20,5	69,7
ethanolové extrakty	25,6	25,5	54,3	34,4	12,9	32,0
extrakty kyseliny citrónové	2,8	9,1	18,3	26,9	13,1	42,4
	rozmarýn	kopřiva	hřebíček	levandule	heřmánek	Černý bez
vodné extrakty	35,3	48,5	2,5	71,9	77,0	51,7
ethanolové extrakty	46,5	33,5	55,3	11,2	4,5	6,8
extrakty kyseliny citrónové	32,1	61,2	51,1	31,9	2,0	42,4

Enkapsulace polyfenolů do liposomových částic byla tedy úspěšná ve všech typech vodných extraktů. Nejvyšší účinnost enkapsulace byla stanovena u česnekového extraktu (93,2%). Naopak nejnižší enkapsulační účinnost měly extrakty z pelyňku a hřebíčku (v průměru okolo 3,5%). Velmi dobrá enkapsulační účinnost (nad 50%) byla stanovena u extraktů lékořice, šalvěže, levandule a černého bezu. Ostatní extrakty měly enkapsulační účinnost v průměru okolo 30%.

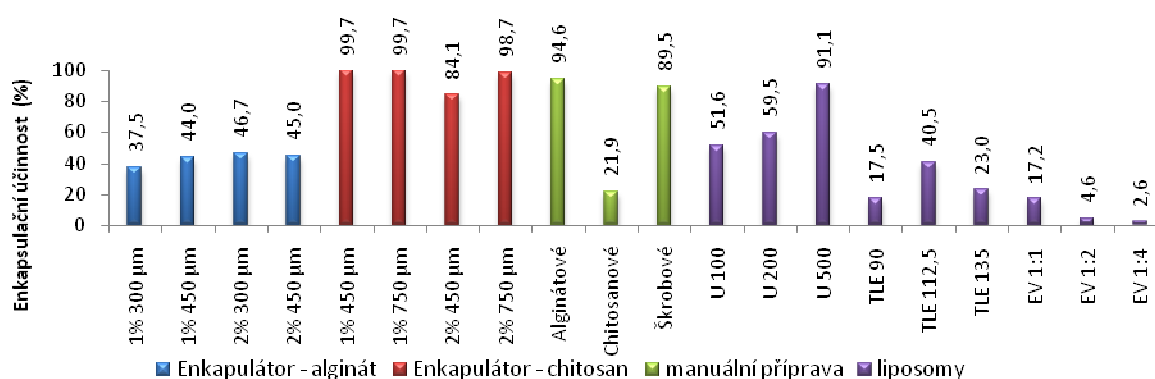
Tabulka 21. Enkapsulační účinnost polyfenolů – liposomy a polysacharidové částice

EU%	tymián	jitrocel	majoránka	třezalka	zázvor	česnek
liposomy	45,2	27,9	37,7	39,5	28,9	93,2
alginátové částice	36,5	41,6	11,7	20,5	68,4	62,6
chitosanové částice	43,8	37	17,8	36,0	81,3	44,7
	pelyněk	echinacea	lékořice	měsíček	rakytník	šalvěj
liposomy	3,7	26,6	60,2	37,5	20,5	69,7
alginátové částice	28,9	19,0	38,2	32,0	46,5	41,9
chitosanové částice	35,5	28,4	47,3	35,7	39,5	50,3
	rozmarýn	kopřiva	hřebíček	levandule	heřmánek	Černý bez
liposomy	35,3	48,5	2,5	71,9	77,0	51,7
alginátové částice	13,9	18,1	29,6	31,8	22,5	31,5
chitosanové částice	8,1	16,5	42,1	23,0	23,9	24,4

Při porovnání enkapsulace polyfenolických složek bylinných extraktů do liposomů a polysacharidových částic (Tabulka 21), bylo lepších výsledků dosaženo častěji v případě liposomů. U některých extraktů, například u extraktu zázvoru bylo avšak výrazně vyšší enkapsulační účinnosti dosaženo u polysacharidových částic, zejména pak v případě použití chitosanu, kde byla enkapsulační účinnost stanovena na 81,3%. To je zhruba 3x vyšší účinnost než byla u stejného vzorku dosažena v případě použití liposomových částic. Vyšší enkapsulační účinnosti v polysacharidových částicích bylo dosaženo rovněž u extraktů z pelyňku a hřebíčku. Obecně lze říci, že enkapsulační účinnost alginátových i chitosanových částic byla dosti podobná, rozdíly jejich enkapsulačních účinností byly v průměru okolo 10% a kopírovaly podobný trend v závislosti na enkapsulované bylinné složce.

5.3.2.2 Enkapsulace antimikrobiálních peptidů a bílkovin

Roztoky peptidů a bílkovin byly po enkapsulaci danými metodami centrifugovány při 14 800 ot./min, supernatant byl slit, a byla v něm pomocí spektrofotometrické metody stanovena celková koncentrace bílkovin. Toto stanovování množství volných peptidů a bílkovin bylo provedeno stejně i ve vzorku před enkapsulací. Z těchto dvou hodnot byla poté vypočítána enkapsulační účinnost dané metody. Enkapsulační účinnost v případě nisinu a lysozymu bylo rovněž sledována pomocí vysokoučinné kapalinové chromatografie (HPLC/PDA).



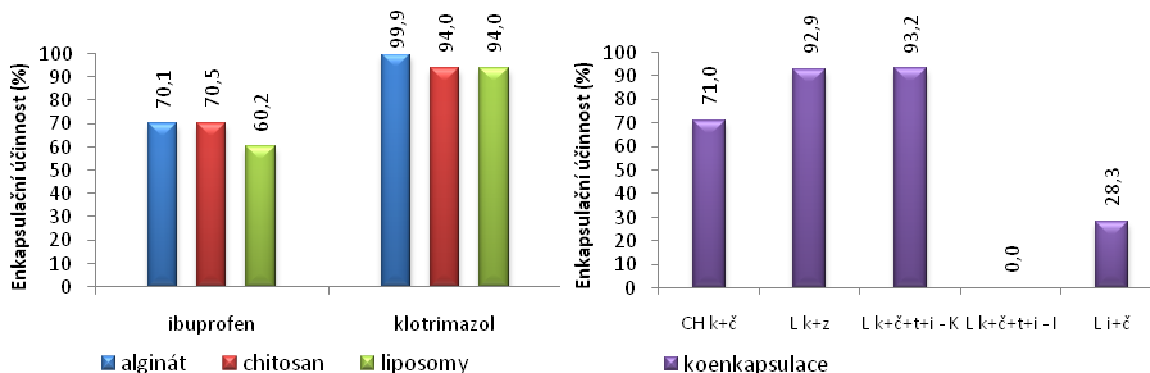
Graf 27. Enkapsulační účinnost lysozymu

Enkapsulační účinnost byla sledována u roztoku lysozymu o koncentraci 1 000 µg/ml (Graf 27). Nejlepší enkapsulační účinnost (takřka 100%) bylo dosaženo při enkapsulaci do chitosanových částic připravených na enkapsulátoru. Je zajímavé, že v případě chitosanových částic připravených manuálně pomocí ultrazvuku bylo dosaženo enkapsulační účinnosti pouze 21,8%. Vysokou enkapsulační účinnost vykazovaly i manuálně připravené alginátové a škrobové částice (okolo 90%). Naopak enkapsulační účinnost alginátových částic připravených pomocí enkapsulátoru se v průměru pohybovala pouze lehce nad 40%. Roztok lysozymu se dále velmi dobře enkapsuloval do liposomů připravených pomocí ultrazvuku za použití 450 mg lecitinu/10ml roztoku (okolo 91%), a při použití 180 mg lecitinu (59,5%). Naopak nejnižší enkapsulační účinnost byla naměřena v případě liposomů připravených metodou ethanolového vstříkávání, kdy hodnoty enkapsulační účinnosti dosahovaly při poměru lecitin:vzorek 1:2 a 1:4 minimálních hodnot (okolo 4%). Při použití poměru 1:1 činila účinnost enkapsulace lysozymu 17,2%. Metoda TLE poskytovala enkapsulační účinnosti v průměru okolo 30%.

Enkapsulační účinnost byla dále sledována u enkapsulace roztoku nisinu o koncentraci 25 µg/ml do liposomů. Enkapsulační účinnost nisinu se u většiny částic pohybovala v průměru okolo 25%. Nejnižší enkapsulační účinnost bylo dosaženo při použití metody ethanolového vstříkávání. Hodnoty enkapsulační účinnosti při poměru lecitin:vzorek 1:2 a 1:4 se rovnaly téměř nule. Při použití poměru 1:1 činila enkapsulační účinnost nisinu 11,9%.

5.3.2.3 Enkapsulace antimikrobiálních léčiv

Roztoky léčiv (antimykotikum klotrimazol a protizánětlivý lék ibuprofen), případně směsné vzorky léčiv a bylinných extraktů po enkapsulaci danými metodami byly centrifugovány při 14 800 otáčkách za minutu. Supernatant byl slit, a byla v něm stanovována pomocí HPLC/PDA, koncentrace zbylých volných léčiv stejně tak jako ve vzorku před enkapsulací. Z těchto dvou hodnot byla poté vypočítána enkapsulační účinnost dané metody. V případě koenkapsulace s bylinnými extrakty byla rovněž sledována obdobným způsobem enkapsulační účinnost polyfenolů pomocí spektrofotometrických metod.



Graf 28. Enkapsulační účinnost - klotrimazol, ibuprofen, česnek, zázvor, tymián

Při enkapsulaci vybraných léčiv bylo v případě klotrimazolu dosaženo velmi vysoké enkapsulační účinnosti. V případě alginátových částic byla účinnost takřka 100%, u chitosanových a liposomových částic dosahovala účinnost shodných 94%.

V případě enkapsulace ibuprofenu bylo dosaženo rovněž velmi dobré enkapsulační účinnosti, u polysacharidových částic okolo 70%, u liposomů byla účinnost enkapsulace 60%.

Dále byla sledována možnost koenkapsulace a to především v liposomových částicích. U klotrimazolu zde bylo opět dosaženo vysoké enkapsulační účinnosti. V kombinaci s extraktem z česneku při koenkapsulaci do chitosanových částic byla jeho enkapsulační účinnost 71%. V případě liposomových částic a koenkapsulace klotrimazolu se zázvorem, stejně jako v kombinaci klotrimazolu s česnekem, ibuprofenem a tymiánem byla účinnost enkapsulace klotrimazolu dokonce až 93%. Ve srovnání s klotrimazolem se ibuprofen při koenkapsulacích enkapsuloval podstatně hůře. U liposomů s česnekem bylo dosaženo účinnosti pouze 28%, a u kombinace s česnekem, klotrimazolem a tymiánem nebylo detekováno žádné enkapsulované množství ibuprofenu.

5.3.3 Stanovení stability a velikosti částic

Velikost částic a jejich distribuce velikosti společně s indexem polydisperzity byla sledována při měření na koloidním analyzátoru Malvern Zetasizer Nano ZS. Pomocí nástavce s elektrodou byl změřen rovněž zeta potenciál.

Zeta potenciál připravených liposomů byl téměř ve všech případech v rozmezí od -30 mV do -60 mV. Obecně lze říci, že nejstabilnější částice byly liposomy připraveny působením ultrazvuku, popřípadě metodou odpařování na tenké vrstvě, a to bez ohledu na zapouzdřenou účinnou složku. Jako nejméně stabilní byly stanoveny částice škrobu (-12,4 mV). Polysacharidové částice měly obecně menší stabilitu než liposomové částice, absolutní hodnoty jejich zeta potenciálu se pohybovaly nejčastěji od 20 do 30 mV. Vlivem enkapsulace některých složek došlo k destabilizaci některých částic (například chitosanové částice s extraktem z česneku, 2,4 mV). Obecně byly však všechny připravené částice dostatečně stabilní.

Velikost liposomů byla v průměru okolo 180 nm a hodnoty indexů polydisperzity nebyly větší než 0,25. Průměrná velikost polysacharidových částic byla, ve srovnání s liposomy větší, v průměru 300 až 600nm. Rovněž indexy polydisperzity polysacharidových částic byly vyšší a pohybovaly se v rozmezí od 0,2 do 0,6.

Obecně se u většiny připravených částic v porovnání s prázdnými částicemi vlivem enkapsulace jejich velikost mírně zvětšila. Nejlepší rozložení velikosti částic bylo stanoveno v případě liposomů připravených pomocí ultrazvukové enkapsulace. Pro další aplikace byla však i u ostatních liposomů získána jednotná velikost částic (100 nm) pomocí membránového extrudéru.

Tabulka 22. Stanovení velikosti a stability připravených částic- bylinné extrakty

	pelyněk	tymián	echinacea	lékořice	měsíček	rakytník
L ϕ velikost (nm)	215,9	219,1	167,0	185,6	204,3	162,3
L ϕ zeta potenciál (mV)	-31,4	-28,3	-42,5	-37,7	-47,4	-47,0
A ϕ velikost (nm)	456,3	523,9	423,6	489,2	502,3	401,3
A ϕ zeta potenciál (mV)	-23,1	-17,5	-25,0	-22,2	-27,4	-23,9
CH ϕ velikost (nm)	348,9	356,2	295,5	326,6	289,9	301,0
CH ϕ zeta potenciál (mV)	35,3	18,9	31,9	28,5	21,0	26,6
	rozmarýn	kopřiva	hřebíček	levandule	heřmáněk	černý bez
L ϕ velikost (nm)	186,0	192,0	121,0	183,0	202,0	204,0
L ϕ zeta potenciál (mV)	-37,4	-36,2	-44,9	-42,5	-35,1	-38,2
A ϕ velikost (nm)	457,5	483,6	325,0	529,7	489,8	501,0
A ϕ zeta potenciál (mV)	-18,9	25,8	-27,1	-19,8	-24,7	-20,9
CH ϕ velikost (nm)	368,5	352,0	299,1	415,2	409,5	321,9
CH ϕ zeta potenciál (mV)	16,8	24,2	30,8	27,0	24,5	30,2
	jitrocel	majoránka	třezalka	šalvěj	zázvor	prázdné
L ϕ velikost (nm)	187,1	199,5	211	188,0	175,9	166,9
L ϕ zeta potenciál (mV)	-42,2	-39,1	-45,7	-38,0	-31	-33,4
A ϕ velikost (nm)	452,3	482,6	436,9	521,3	375,2	425,4
A ϕ zeta potenciál (mV)	-23,9	-19,3	-21,9	-24,0	-25,3	-22,6
CH ϕ velikost (nm)	452,3	397,4	423,3	407,7	362,8	289,0
CH ϕ zeta potenciál (mV)	27,6	19,5	28,1	25,0	32,1	42,9

Tabulka 23. Stanovení velikosti a stability připravených částic- nisin, lysozym

typ částice/metoda	liposomy U	liposomy U	liposomy U	liposomy TLE	liposomy TLE	liposomy TLE	liposomy EV
koncentrace lecitinu	9 mg/ml	18mg/ml	45mg/ml	9 mg/m	11,25 mg/ml	13,5 mg/ml	10mg/ml
nisin ϕ velikost (nm)	125,3	122,0	156,9	178,1	192,0	178,5	248,2
nisin ϕ ZP (mV)	-54,8	-53,8	-56,5	-55,3	-62,1	-59,4	-38,5
lysozym ϕ velikost (nm)	183,7	198,2	280,8	166,0	174,9	190,6	312,0
lysozym ϕ ZP (mV)	-43,3	-63,5	-56,7	-49,0	-48,3	-49,0	-28,9
částice	alginát	chitosan	škrob	částice	alginát	chitosan	škrob
lysozym ϕ velikost (nm)	533,8	297,9	311,8	prázdné ϕ velikost (nm)	458,7	289,2	303,1
lysozym ϕ ZP (mV)	-23,4	39,4	-12,4	prázdné ϕ ZP (mV)	-21,3	43,6	-13,4

Tabulka 24. Stanovení velikosti a stability připravených částic- klotrimazol, ibuprofen

typ částice/metoda	liposomy/U	liposomy /U	liposomy /U	liposomy /U	liposomy /U	liposomy/U	liposomy/U
enkapsulovaná složka	ibuprofen+česnek	ibuprofen	česnek	klotrimazol	kombinace	tymián	klotrimazol+zázvor
ϕ velikost (nm)	209,5	227,7	358,3	159,6	156,3	195,3	252,5
ϕ zeta potenciál (mV)	-49,9	-49	-47,3	-43,2	-43	-37,3	-33,5

částice	alginát	alginát	alginát	chitosan	chitosan	chitosan	chitosan
enkapsulovaná složka	česnek	klotrimazol	prázdné	klotrimazol	česnek	klotrimazol+česnek	prázdné
ø velikost (nm)	639,8	447,9	521,5	729,2	473,75	345,4	194,9
ø zeta potenciál (mV)	-34,4	-22,6	-26,8	23,4	2,4	8,2	26,2

5.3.4 Dlouhodobá stabilita částic s antimikrobiálními látkami – základní model voda

Částice s enkapsulovanou antimikrobiální složkou byly rovněž podrobeny analýze dlouhodobé stability. Částice byly přidány do modelového vodného roztoku a uchovávány při teplotě 5°C.

Tabulka 25. Dlouhodobá stabilita částic s obsahem bylin – uvolněné polyfenoly %- prostředí voda

EU%	pelyněk	tymián	echinacea	lékořice	měsíček	rakytník	šalvěj	rozmarýn	kopřiva
L týden	ND	ND	3,5	15,9	48,1	ND	6,4	ND	9,5
L měsíc	ND	ND	21,6	39,8	80,8	21,4	12,1	12,9	25,6
A týden	6,5	7,6	9,1	4,7	9,0	5,9	11,3	25,5	20,7
A měsíc	20,5	15,5	31,0	16,6	25,9	18,7	22,1	39,0	42,9
CH týden	12,1	25,9	26,0	19,8	24,4	12,9	21,7	12,9	23,1
CH měsíc	25,9	49,9	39,5	50,0	38,5	25,9	40,2	19,6	52,2
	hřebíček	levandule	heřmánek	černý bez	jitrocel	majoránka	třezalka	zázvor	česnek
L týden	ND	ND	44,1	ND	ND	ND	74,7	ND	29
L měsíc	ND	38,1	ND	ND	5,5	ND	90,0	ND	28,6
A týden	3,5	19,3	12,9	15,5	4,0	12,5	14,5	6,9	19,2
A měsíc	14,8	32,4	25,5	27,8	20,1	35,9	24,4	18,5	41,9
CH týden	11,1	21,9	22,5	19,5	14,3	20,1	17,1	29,0	24,5
CH měsíc	19,0	43,7	46,6	27,0	27,9	43,2	38,7	52,1	41,0

Ve stanovených intervalech byly provedeny odběry roztoků pro stanovení obsahu uvolněných složek. Pomocí spektrofotometrických metod bylo měřeno množství uvolnění celkových polyfenolů, případně bílkovin a pomocí HPLC bylo sledováno množství uvolněných léčiv.

U většiny liposomů s extrakty z bylin nebyl pozorován během skladování ve vodném prostředí rozpad částic, a rovněž nebylo pozorováno žádné množství uvolněných polyfenolických složek (Tabulka 25). U většiny těchto vzorků docházelo pouze k degradaci volných polyfenolů. Některé z testovaných extraktů však připravené liposomy destabilizovaly. V případě enkapsulace třezalky bylo stanoveno již po jednom týdnu velmi významné uvolněné množství fenolických složek (74,7%). Uvolňování polyfenolů z částic bylo pozorováno rovněž v případě liposomů s česnekem, heřmánkem a jitrocelem (průměrná týdenní hodnota uvolněného množství přibližně 30%). Dále byl zaznamenán nárůst koncentrace uvolněných polyfenolů během skladování u liposomů s výtažky z echinacey, lékořice a měsíčku. Přičemž nejvíce polyfenolů se uvolnilo právě z liposomů s extraktem z měsíčku, kde se po měsíci uvolnilo téměř veškeré enkapsulované množství.

Z polysacharidových částic byly méně stabilní částice chitosanové. Po týdnu u nich došlo k uvolnění v průměru okolo 20%, u alginátových částic se uvolnilo do 15%. Po měsíci bylo zaznamenáno uvolnění v průměru 30% u alginátových částic a 40% u chitosanových částic.

Při sledování dlouhodobé stability částic s obsahem vybraných léčiv nebylo pozorováno u většiny částic žádné uvolněné množství. Uvolněné množství bylo zaznamenáno pouze v případě enkapsulace ibuprofenu. Při jeho enkapsulaci do liposomů se po týdnu uvolnilo již 30%, při koenkapsulaci s extraktem česnek do stejného typu částic došlo dokonce k uvolnění 66% enkapsulovaného množství.

Na základě výsledků lze konstatovat, že z hlediska dlouhodobé stability částic a množství uvolněných složek ve vodném prostředí, byly stabilní především liposomové částice. Některé z testovaných extraktů však připravené liposomy destabilizovaly.

5.3.5 Dlouhodobá stabilita částic s antimikrobiálními látkami - modelové potraviny

V případě testování dlouhodobé stability částic v modelových potravinách byly zvoleny čtyři základní typy modelových podmínek dle popisu v kapitole 4.14.

Tabulka 26. Dlouhodobá stability částic- množství uvolněné složky – modelové potraviny

	liposomy	heřmáněk	Černý bez	šalvěj	hřebíček	lysozym
vodné prostředí	týden	44,1	ND	6,4	ND	1,8
	měsíc	ND	ND	12,1	ND	13,2
kyselé prostředí	týden	ND	ND	8,3	ND	7,2
	měsíc	ND	ND	55,3	ND	32,7
ethanolové prostředí	týden	ND	ND	12,5	ND	ND
	měsíc	ND	ND	41,3	ND	50,9
tučné prostředí	týden	27,4	28,5	37,1	25,1	97,2
	měsíc	5,9	ND	7,1	ND	100,9

Ve vodné modelové potravine po týdnu došlo k největšímu uvolnění aktivních látek z liposomů heřmánku, kdy se uvolnilo 44 % enkapsulovaných polyfenolů. Nejstabilnější byly naopak liposomy s enkapsulovaným černým bezem a hřebíčkem, kde nedošlo k uvolnění žádného množství sledovaných polyfenolů (Tabulka 26). U lysozymu se po týdnu uvolnilo 1,8 % enkapsulovaného množství. Po měsíčním skladování ve vodném prostředí se uvolnilo nejvíce aktivních látek z částic s lysozymem (13,2%). Nejstabilnější zůstaly částice s černým bezem a hřebíčkem. U měsíční stability byly v některých případech zaznamenány nižší hodnoty uvolněného množství než při stanovení po týdnu. Během měsíčního skladování se pravděpodobně uvolnilo větší množství, které však s největší pravděpodobností degradovalo.

V kyselé modelové potravine byly nejstabilnější liposomy s enkapsulovanými aktivními látkami heřmánku, černého bezu a hřebíčku. Z částic šalvěje a lysozymu se uvolnilo pouze minimální množství enkapsulovaných látek. V tomto případě lze říci, že částice uchovávány v kyselém prostředí po dobu 1 týdne jsou stabilní. Po měsíčním skladování se z liposomů s heřmánkem, černým bezem a hřebíčkem také neuvolnily enkapsulované složky a částice zůstaly stabilní. Z liposomů se šalvějí se však již uvolnilo 55,3 % enkapsulovaných polyfenolů a z liposomů s lysozymem se uvolnilo 32,7 %.

V modelové potravine s obsahem alkoholu byly po týdenní skladování částice stabilní. K uvolnění polyfenolů došlo pouze v případě enkapsulace šalvěje (12,5 %). I po měsíčním skladování byla většina částic v tomto prostředí stabilní. Z liposomů s obsahem extraktu šalvěje se však již uvolnilo 41,3 % polyfenolů, z liposomů s lysozymem se uvolnilo 50,9 % enkapsulovaného enzymu.

V tučné modelové potravine byly částice nejméně stabilní. K uvolnění části enkapsulovaného obsahu došlo již po týdenní inkubaci u všech testovaných liposomů. U liposomů s lysozymem došlo navíc po týdnu k uvolnění většiny enkapsulovaného množství.

Z výsledků je tedy patrné, že v modelových prostředích byly liposomové částice z dlouhodobého hlediska nejméně stabilní v prostředí obsahující olej, simulující tučnou potravinu. U lysozymu zde po měsíci došlo k uvolnění celého enkapsulovaného obsahu. Vhodným prostředím pro dlouhodobé stabilitu připravených liposomů je především vodné prostředí.

Studium stability liposomových částic s enkapsulovanými antimikrobiálními peptidy dle hodnoty zeta potenciálu ukázalo, že po 7 dnech zeta potenciál klesl pod hranici stability (-30 mV) pouze v případě modelu kyselou potraviny. S poklesem stability částic rostlo i uvolněné množství enkapsulovaných aktivních látek. Uvolněné množství antimikrobiálních složek v kyselém prostředí simulujícím kyselou potravinu bylo tedy nejvýraznější.

Naopak v destilované vodě se neuvolnilo žádné množství enkapsulovaných bílkovin. V ethanolové potravíně uvolnění ovlivňovala především teplota skladování. Při 28°C se uvolnilo výrazné množství lisinu i lysozymu, ovšem při 5 °C se nebylo detekováno žádné uvolněné množství. V případě tučné potraviny vykázaly částice opět větší uvolněné množství. Z výsledků tedy vyplývá, že při uchovávání při vyšší teplotě dochází k výraznějšímu uvolňování aktivních složek.

Nejvhodnějším prostředím pro dlouhodobé uchování liposomových částic s obsahem antimikrobiálních peptidů je tedy voda. V případě potřeby řízeného uvolňování enkapsulované složky v potravíně lze využít vlastnosti rozpadu částic při nižším pH. A to nejen u kyselých potravin, ale také v případě kdy vlivem mikroorganismů klesá pH, tím by mohl být lépe regulována bezpečnost a kvalita potravin. Dále, například u masných výrobků, lze díky vlastnosti liposomů, které se při delší době v kontaktu s tukem rovněž rozpadají a uvolňují enkapsulovanou složku, využít tyto částice k regulaci mikrobiální kontaminace.

Tabulka 27. Dlouhodobá stabilita částic obsahující lysozym – uvolnění % - manuálně připravené částice

	[%]	Alginátové částice	Chitosanové částice	Liposomy	Škrobové částice
Kyselina	1 den	0,83	0,85	1,45	0,32
	3dny	1,31	0,79	5,86	1,00
	7 dní	1,00	4,13	43,09	2,30
	28 dní	0,56	2,38	54,31	11,23
Voda	1 den	0,31	0,17	0,20	43,30
	3dny	0,17	0,670	0,20	50,20
	7 dní	9,30	26,70	1,10	56,80
	28 dní	22,70	34,20	11,50	63,60
Olej	1 den	2,00	1,75	25,65	11,13
	3dny	10,50	17,01	45,80	20,00
	7 dní	32,46	21,05	64,67	31,90
	28 dní	42,65	36,78	71,80	34,42
Alkohol	1 den	0,10	3,69	0,73	31,20
	3dny	0,34	12,88	7,88	2,43
	7 dní	7,20	21,86	35,20	0,69
	28 dní	27,50	34,35	60,45	0,83

Dále byla sledována stabilita liposomů a polysacharidových částic s obsahem lysozymu (Tabulka 27 a Tabulka 28). Při porovnání dlouhodobé stability manuálně připravených částic ve vodném prostředí lze pozorovat rozpad částic a uvolnění lysozymu zejména ze škrobových částic. Dále docházelo k výraznějšímu uvolňování enkapsulovaného obsahu i u manuálně připravených chitosanových částic (Tabulka 27). Ostatní manuálně připravené částice byly ve vodném prostředí stabilní a neuvolňovalo se u nich významné množství enkapsulovaného lysozymu. V kyselém prostředí byl pozorován rozpad a uvolnění lysozymu zejména u liposomů. V prostředí 10% ethanolu se alginátové a chitosanové částice z hlediska dlouhodobé stability chovaly obdobně jako v případě vodného prostředí. Nejvíce stabilní částice v ethanolovém prostředí byly částice škrobové, naopak nejméně stabilní byly liposomy, kde po měsíci došlo k uvolnění až 60,5% enkapsulovaného lysozymu. Nejvyšší procento uvolnění lysozymu bylo však zaznamenáno v prostředí s olejem. Například z liposomů zde došlo k uvolnění více než 70% enkapsulovaného množství.

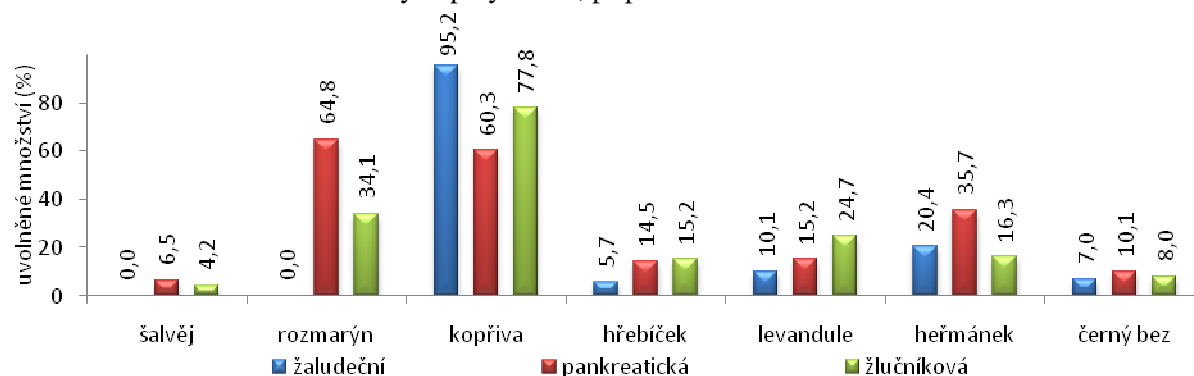
Částice připravené pomocí enkapsulátoru (Tabulka 28) byly obecně v modelovém prostředí potravin podstatně stabilnější než manuálně připravené částice. Měřením uvolněného lysozymu bylo zjištěno, že u většiny částic z enkapsulátoru se v průběhu dlouhodobého uchovávání v modelových potravinách neuvolnilo v průměru více než 10 % lysozymu. Na rychlost uvolňování lysozymu z částic bude mít zřejmě velký vliv velikost částice, kdy s rostoucí velikostí části roste i jejich stabilita.

Tabulka 28. Dlouhodobá stabilita částic obsahující lysozym – uvolnění % - částice z enkapsulátoru

[%]	Čas (dny)	1% A 300µm	1% A 450 µm	2% A 300µm	2% A 450 µm	1% CH 450 µm	2% CH 450 µm	1% CH 750µm	2% CH 750µm
Kyselina	1	0,74	0	0	0	4,90	6,37	0	0,94
	3	2,89	5,02	3,11	3,53	5,70	14,2	1,27	0,28
	7	0,18	1,15	0,99	0,72	4,27	14,5	0	0,28
	28	1,41	0,84	1,28	0,46	5,45	15,3	0,37	1,84
Voda	1	0,37	0	0	0	0,09	0,42	0,23	1,02
	3	8,91	4,50	1,92	4,25	0,07	0,41	0	0
	7	0,68	0,58	0,2	0	0	0	0	0
	28	3,62	0	1,82	0,05	0,74	2,24	0	0,47
Olej	1	1,11	-0,80	0	0	0	0,74	0	0
	3	13,14	9,89	4,68	5,48	4,48	3,07	1,2	2,31
	7	9,64	3,56	3,4	3,79	2,49	1,7	0,69	1,66
	28	25,98	15,12	3,75	6,5	7,80	6,73	3,58	4,24
Alkohol	1	0	0	0	0	0	1,04	0	0,93
	3	3,62	2,88	2,22	2,10	0,72	0	0	0
	7	4,55	1,99	0,3	0,82	0	0	0	0
	28	3,19	1,46	-0,97	0	0,95	0,71	4,43	0

5.3.6 Stanovení stability antimikrobiálních částic -modelové trávení

Vybrané částice s enkapsulovanou antimikrobiální složkou byly také podrobeny analýze stability v modelovém fyziologickém prostředí. Simulováno bylo modelové trávení. Částice byly přidány do modelových trávicích šťáv a inkubovány při teplotě 37°C. Ve stanovených časech byly provedeny odběry roztoků pro stanovení obsahu uvolněných složek. Pomocí spektrofotometrických metod bylo měřeno množství uvolnění celkových polyfenolů, případně bílkovin.



Graf 29. Stabilita liposomů v modelových trávicích šťávách – uvolněné polyfenoly

Tabulka 29. Stabilita polysacharidových částic v modelových trávicích šťávách – uvolněné polyfenoly

[%]	A - šalvěj	A - rozmarýn	A - hřebíček	A - levandule	A - heřmánek	A - černý bez
žaludeční	20,5	30	11,5	26,3	32,5	36,8
pankreatická	60,4	59,8	71,2	59,9	82,5	48,8
žlučová	19,1	20,3	17,9	21,2	23,1	63,0
	CH – šalvěj	CH – rozmarýn	CH – hřebíček	CH – levandule	CH – heřmánek	CH – černý bez
žaludeční	40,5	32,6	7,9	24,0	54,2	23,8
pankreatická	69,9	92,0	77,0	100	77,7	100
žlučová	52,3	46,3	29,3	51,1	64,2	44,7

Připravené liposomy obsahující enkapsulované bylinné extrakty byly v žaludeční šťávě obecně stabilnější v porovnání se střevním prostředím (Graf 29).

Nejvíce bylo v modelové žaludeční šťávě rozloženo liposomů s enkapsulovaným extraktem kopřivy, kde došlo k rozpadu částic a uvolnění 95% enkapsulovaných polyfenolů. Druhým v pořadí byly liposomy s extraktem z heřmánku, zde působením žaludeční trávící šťávy došlo k uvolnění 20% polyfenolických složek. Ostatní vzorky byly v žaludečním prostředí stabilní. V modelové pankreatické a žlučkové šťávě byl pozorován výrazný rozpad částic a nejvýraznější množství uvolněných složek. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u liposomů s extraktem rozmarýnu. Tyto částice byly velmi stabilní v žaludeční šťávě a působení střevních šťáv došlo k pozvolnému uvolnění celého jejich antimikrobiálního obsahu. Rovněž u všech testovaných polysacharidových částic docházelo k pozvolnému uvolňování polyfenolických složek především v modelových prostředích tenkého střeva (Tabulka 29). Ze studia stability liposomů s enkapsulovaným nisinem a lysozymem, pomocí zeta potenciálu v modelových podmínkách, resp. modelových trávících šťávách (Tabulka 30) vyplývá, že částice byly nejméně stabilní v kyselém prostředí žaludečních šťáv. Hodnoty zeta potenciálu klesly pod -5 mV, případně až do kladných hodnot. Naopak nejvíce stabilní byly liposomy 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. Obecně lze také říci, že stabilita se od přidání částic do modelového prostředí do měření po 15 minutách již výrazně neměnila, což může poukazovat na přítomnost velmi pozvolného uvolňování.

Tabulka 30. Stabilita částic v modelových trávících šťávách – uvolněné antimikrobiální složky a změna zeta potenciálu

	Nisin/ EV	Nisin/ TLE	Nisin/ U	Lysozym/ EV	Lysozym/ TLE	Lysozym/ U
ZP původní hodnota (mV)	-38,5	-59,4	-56,5	-30,0	-49,0	-56,7
žaludeční	ZP čas 0 (mV)	17,7	-6,4	-5,1	17,6	-5,7
	ZP 15 min (mV)	15,8	3,0	-5,1	17,6	-3,9
	uvolněné množství %	33,7	13,1	9,7	12,5	4,7
pankreatická	ZP čas 0 (mV)	-16,1	-18,0	-21,3	-17,0	-17,4
	ZP 15 min (mV)	-14,7	-18,7	-18,2	-16,5	-21,4
	uvolněné množství %	56,8	21,9	17,3	20,4	0,9
žlučová	ZP čas 0 (mV)	-30,9	-35,6	-32,7	-30,2	-36,4
	ZP 15 min (mV)	-28,7	-36,2	-36,9	-31,7	-40,5
	uvolněné množství	0	0	0	1,3	1,2

Co se týče výsledků uvolněného množství, ve žlučových šťávách se v tomto krátkém čase neuvolnilo žádné významné množství, naopak v pankreatické šťávě se u většiny částic uvolnilo největší množství enkapsulovaných složek. Výrazné množství se uvolnilo rovněž v žaludeční šťávě, kde částice vykazovaly nejnižší zeta potenciál. Nízká hodnota zeta potenciálu poukazuje na snížení stability částic a vznik agregátů. Enkapsulované množství však může být v částicích zachováno, tak jak bylo stanoveno i v případě testované žaludeční šťávy.

Tabulka 31. Stabilita částic v modelových trávících šťávách – uvolněný lysozym %

[%]	1% A 300µm	1% A 450 µm	2% A 300µm	2% A 450 µm	A	CH
žaludční	0	0	0	0	38,9	103,9
pankreatická	45,7	33,5	39,0	39,9	41,8	106,2
žlučová	0,9	3,3	2,1	0,6	3,5	104,6
	1% CH 450 µm	2% CH 450 µm	1% CH 750µm	2% CH 750µm	Š	L
žaludční	0	0	0	0	0	47,8
pankreatická	0	0	0	0	0	71,5
žlučová	0	0	0,4	0	5,4	103,7

Z výsledků stability částic v modelovém trávení po enkapsulaci lysozymu do polysacharidových částic vyplývá (Tabulka 31), že lysozym se z těchto částic uvolňoval postupně, a to zejména v simulovaném prostředí tenkého střeva. U menších částic byl rovněž znatelný výraznější vliv žaludeční šťávy. Nejméně stabilní byly v případě enkapsulace lysozymu manuálně připravené částice chitosanu u kterých došlo k uvolnění 100% obsahu již při působení žaludeční šťávy. Tím se lišily od chitosanových částic připravených pomocí enkapsulátoru, kde nebylo v prostředí žaludeční trávicí šťávy stanoveno žádné uvolněné množství lysozymu. Po aplikaci částic do modelové pankreatické trávicí šťávy byly jako nejméně stabilní stanoveny manuálně připravené chitosanové částice. Relativně velké množství se uvolnilo i ze všech ostatních testovaných částic s výjimkou škrobových částic a chitosanových částic připravených na enkapsulátoru. Po aplikaci částic do žlučové trávicí šťávy se uvolnilo mimo manuálně připravených chitosanových částic a liposomů jen nepatrné nebo žádné enkapsulované množství lysozymu.

Polysacharidové částice připravené pomocí enkapsulátoru byly tedy v trávicím traktu o poznání stabilnější v porovnání s manuálně připravenými částicemi. Nejstabilnější byly chitosanové částice, naopak nejméně stabilní byly manuálně připravené částice ze stejného materiálu. Velikost částic s enkapsulovaným lysozymem zde tedy hrála významnou roli. S rostoucí velikostí částic rostla i jejich stabilita, tedy množství uvolněných složek je v případě mikro- a makročástic pozvolnější. Jako nejvhodnější materiál k enkapsulaci lysozymu byl stanoven alginát. Tyto částice měly dobrou stabilitu v žaludeční šťávě a docházelo u nich k žádoucímu pozvolnému uvolňování v prostředí tenkého střeva. Závěrem lze říci, že v modelovém fyziologickém prostředí docházelo u testovaných částic s obsahem antimikrobiálních složek k pozvolnému uvolňování polyfenolických látek a antimikrobiálních peptidů především v podmínkách simulujících tenké střevo. Díky tomuto cílenému a pozvolnému uvolňování společně s velmi dobrou dlouhodobou stabilitou jsou připravené polysacharidové částice i liposomy vhodné i k aplikaci do různých potravinových doplňků, nebo přímo do potravin, a to například s cílem využití částic k řízenému uvolňování antioxidantů a antimikrobiálních složek v prostředí střeva, což by mohlo být výhodné pro zvýšení biologického účinku. Zejména pak polysacharidové částice vynikaly svou stabilitou v žaludeční šťávě a řízeným uvolňováním antimikrobiálních a antioxidačních složek v cílovém prostředí tenkého střeva. Řízené uvolňování antimikrobiálních složek v prostředí střeva, může dále napomoci například k regulaci střevní mikroflóry, nebo v případě aplikace do potravin přispět k antimikrobiální ochraně při jejich skladování.

5.3.7 Stanovení antimikrobiální aktivity

Antimikrobiální aktivita je testována pomocí standardních antimikrobiálních testů. Testování je prováděno na mikroorganismech ve vhodných kultivačních médiích a při optimálních podmínkách. Antimikrobiální testy se dělí na difúzní a diluční [134, 135].

V práci byly použity oba uvedené typy testů. Testovány byly tedy různé metody stanovení inhibičních vlastností zahrnující jak vizuální detekci inhibičních zón na tuhých agarových plotnách, tak měření změny koncentrace kultury v průběhu kultivace v tekutých médiích. U vybraných vzorků byla také sledována antimikrobiální účinnost pomocí změny zákalu během lyze buněk.

Antimikrobiální účinnost testovaných látek a extraktů byla sledována vůči čtyřem druhům bakteriálních kmenů a vůči jednomu kmenu kvasinek. Z bakteriálních kmenů byli vybráni dva zástupci gram pozitivních kmenů - *Bacillus subtilis* a *Micrococcus luteus*. A dva zástupci gram negativních kmenů - *Escherichia coli* a *Serratia marcescens*. Z kvasinkových kmenů byl použit kmen *Candida glabrata*.

5.3.7.1 Disková a agarová difúzní metoda

Disková difúzní metoda je velmi jednoduchá metoda stanovení antimikrobiální aktivity, jejím principem je difuze antimikrobiální látky z papírového disku do agarového média. Médium je naočkováno stanovenou koncentrací testovaného mikroorganismu. Z agarového média se uvolňuje voda a rozpouští antimikrobiální látku, která je difúzí vpravována do média.

Kolem papírového disku vzniká koncentrační gradient účinné látky inhibující růst mikroorganismu. Touto metodou je možné zjistit i účinné koncentrace antimikrobiálních látek. V tomto případě bývají papírové disky napuštěné různými koncentracemi účinných látek. U agarové difúzní metody se antimikrobiální aktivita určuje na stejném principu jako u difúzní diskové metoda. Rozdíl mezi těmito metodami je v aplikaci antimikrobiálních látek. U agarové metody se antimikrobiální látky pipetují přímo do vyhloubených jamek v pevném médiu [135].

Příprava jednotlivých vzorků a extraktu byla provedena dle postupu uvedeného v kapitole 4.6. Přesný postup celého antimikrobiálního testu je uveden v kapitole 4.16.2.

Nejprve bylo u hodnocených bylin provedeno testování antimikrobiálních vlastností jejich různých typů extraktů. Srovnání bylo provedeno mezi extrakty vody, ethanolu a kyseliny citronové. U jednotlivých extraktů došlo při měření jejich antibakteriální aktivity k výrazným rozdílům.

Tabulka 32: stanovení antimikrobiální aktivity bylinných extraktů – velikost inhibičních zón (mm)-vodné extrakty

	pelyněk	tymián	echinacea	lékořice	měsíček	rakytník	šalvěj	rozmarnýn
<i>Bacillus subtilis</i>	4,25	2,5	3,25	3,5	6	1,5	3,75	1,5
<i>Micrococcus luteus</i>	6,5	5	7	7,5	6,5	6,5	8,25	6,5
<i>Serratia marcescens</i>	5,5	3,5	5	5	1,5	2,5	3,25	5,5
<i>Escherichia coli</i>	3,5	7	8,5	5	6	3	5,25	5,5
	hřebíček	levandule	heřmáněk	černý bez	jitrocel	majoránka	třezalka	zázvor
<i>Bacillus subtilis</i>	6,5	2	1,5	4,25	7	1,25	4,5	1,5
<i>Micrococcus luteus</i>	4	2,5	1,5	5,5	5,5	4	7	4
<i>Serratia marcescens</i>	5	1,5	1,5	4	3,5	2,5	2,5	2,5
<i>Escherichia coli</i>	9	10	8,5	7,5	5	4,25	5,5	2,5

Významně vyšší celkovou inhibiční účinnost vůči všem čtyřem testovaným bakteriím v porovnání s ostatními vykazovaly vodné extrakty. Průměrné hodnoty inhibičních zón všech testovaných bylinných vodných extraktů jsou uvedeny v Tabulce 32.

Antimikrobiální aktivita vybraných rostlinných extraktů byla tedy testována na čtyřech bakteriálních kmenech. Všechny vodné extrakty vykazovaly alespoň částečnou antimikrobiální aktivitu proti všem testovaným kmenům. Je zajímavé, že většina z bylinného extraktu měla velmi dobrý antimikrobiální účinek i proti testovaným gram-negativním bakteriálním kmenům. Na kmen *E. Coli* měly nejvyšší antimikrobiální účinek extrakty z levandule, hřebíčku, echinacey, heřmánku, černého bezu, tymiánu, měsíčku a kopřivy. Na druhý testovaný gram-negativní kmen *Serratia marcescens* měly extrakty menší inhibiční účinek, než v případě *E. Coli*. Nicméně, dobrou antimikrobiální aktivitu měly extrakty z pelyňku, rozmarýnu, kopřivy, hřebíčku, lékořice a echinacey.

Extrakty z hřebíčku, měsíčku a jitrocele měly velmi dobrou inhibiční účinnost proti gram-pozitivnímu kmenu *Bacillus subtilis*. Na druhém gram pozitivní kmen *Micrococcus luteus* měly nejvyšší antimikrobiální účinek extrakty z šalvěje, lékořice, echinacey, třezalky, pelyňku, rozmarýnu, měsíčku, rakytníku, jitrocele, černého bezu a tymiánu. U většiny z extraktů byl zaznamenán lineární vztah mezi antioxidační aktivity a antibakteriální aktivitu. Nicméně, v některých případech u byliny s nižší antioxidační aktivitou (například lékořice, rakytník, kopřiva a heřmáněk) byla pozorována vysoký antibakteriální aktivita. Tento jev, kdy i nefenolové složky rostlinných extraktů mají schopnost působit jako antimikrobiální látky, potvrzují i některé další studie [87].

Při testování antimikrobiální aktivity lysozymu byl antimikrobiální účinek zaznamenán vůči všem testovaným kmenům (Tabulka 33). V případě kmenu *E. coli* byl však tento inhibiční účinek v porovnání s ostatními kmeny minimální. Navíc při nižších koncentracích nebyl u tohoto kmene zaznamenán žádný inhibiční účinek. Na ostatní kmeny lysozym působil s vysokým inhibičním účinkem.

Především na gram-pozitivní kmeny (z testovaných *Bacillus subtilis* a *Micrococcus luteus*) byl zaznamenán nejvyšší účinek, což odpovídá i literárním údajům [80]. Zajímavé je, že v případě gram negativního kmenu *Serratia marcescens* bylo dosaženo při vyšších koncentracích vysokého antimikrobiálního účinku.

Tabulka 33. Stanovení antimikrobiální aktivity lysozymu – velikost inhibičních zón (mm)

	lysozym 1000 μ g/ml	lysozym 750 μ g/ml	lysozym 500 μ g/ml	lysozym 250 μ g/ml	lysozym 100 μ g/ml
<i>Bacillus subtilis</i> (disky)	11	9	6	4	3
<i>Bacillus subtilis</i> (jamky)	17	15	12	10	7
<i>Micrococcus luteus</i> (jamky)	19	15	11	9	7
<i>Serratia marcescens</i> (jamky)	17	14	9	6	4
<i>Escherichia coli</i> (jamky)	5	3	1,6	0	0
	lysozym 50 μ g/ml	lysozym 2,50 μ g/ml	lysozym 10 μ g/ml	lysozym 0,50 μ g/ml	lysozym 0,25 μ g/ml
<i>Bacillus subtilis</i> (disky)	2	1	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i> (jamky)	5	4	3,5	1,5	0,5
<i>Micrococcus luteus</i> (jamky)	4	3	2,5	1	0
<i>Serratia marcescens</i> (jamky)	1	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> (jamky)	0	0	0	0	0

Tabulka 34. Stanovení antimikrobiální aktivity nisinu – velikost inhibičních zón (mm)

	nisin 30 μ g/ml	nisin 10 μ g/ml	nisin 5 μ g/ml	nisin 2,5 μ g/ml	nisin 1 μ g/ml	nisin 0,3 μ g/ml	nisin 0,03 μ g/ml
<i>Bacillus subtilis</i>	18	15	12	9	5	3	1
<i>Escherichia coli</i>	7,5	6	5	3	1	0	0

Výsledky stanovení antimikrobiální aktivity lysozymu srovnávají metody za použití disků a jamek (Tabulky 33). Výsledky ukazují, že jamková metoda v porovnání s metodou diskovou je výrazně citlivější. Dále byla tetována antimikrobiální aktivita peptidu nisinu. Nisin stejně jako lysozym vykazoval výraznější antimikrobiální účinek proti gram-pozitivním bakteriím (Tabulka 34).

Tabulka 35. Stanovení antimikrobiální aktivity částic s enkapsulovaným lysozymem(L)/nisinem(N)– velikost inhibičních zón (mm)

Průměr inhibiční zóny (mm)	alginátové č. L(1mg/ml)	chitosanové č. L (1mg/ml)	škrobové č. L (1mg/ml)	liposomy L (1mg/ml)	liposomy L (2,5mg/ml)
<i>B. subtilis</i>	3	4	2	3	6,5
<i>E. coli</i>	0	1	0	0	1
	liposomy N (3 μ g/ml)	liposomy N (0,3 μ g/ml)	A 1% 300 μ m L (1mg/ml)	A 1% 450 μ m L (1mg/ml)	A 2% 300 μ m L (1mg/ml)
<i>B. subtilis</i>	2,5	1	3	4	5
<i>E. coli</i>	0	0	0	1	1
	A 2% 450 μ m L (1mg/ml)	CH 1% 450 μ m L (1mg/ml)	CH 1% 750 μ m L (1mg/ml)	CH 2% 450 μ m L (1mg/ml)	CH 2% 750 μ m L (1mg/ml)
<i>B. subtilis</i>	4	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	1	0	0	0	0

Testování na tuhých médiích bylo použito pro srovnání antimikrobiálního účinku volných ale i enkapsulovaných složek (Tabulka 35). Bylo zjištěno, že částice, nezávisle na druhu enkapsulovaného peptidu vykazovaly menší antimikrobiální aktivitu než čistá antimikrobiální látka. Uvolněné množství antimikrobiální látky z částic je tedy pozvolné a přispívá k inhibici postupně.

U všech částic byla detekována antimikrobiální aktivita zejména na gram-pozitivní kmeny, na gram-negativních bakteriálních kmenech byla antimikrobiální aktivita lysozymu i nisinu minimální nebo nulové. Je zajímavé, že chitosanové částice měly nejvyšší inhibiční účinek, ale současně měly nejnižší účinnost enkapsulace. Tyto výsledky potvrzují závěry některých studií, o možném použití antimikrobiální aktivity chitosanu. Chitosan je tak velmi vhodným kandidátem k enkapsulaci antimikrobiálních složek. Vzhledem k jeho přirozeně kladnému náboji, může interagovat s negativně nabitými mikrobiálními buněčnými stěnami a cytoplazmatickou membránou, což může vést ke snížení osmotické stability, narušení membrány a případně k lyzím buněk. Kromě toho, chitosan je schopný inhibovat mRNA a syntézu bílkovin vazbou na mikrobiální DNA. Navíc nanočástice chitosanu, mají vyšší poměr povrchu k objemu, což vede k vyšší hustotě povrchového náboje. Tím zvyšují tyto částice svou afinitu vůči bakteriím, což způsobují výrazně vyšší antimikrobiální aktivitu [174].

Tabulka 36. Zachování antimikrobiálního účinku lysozymu a částic s jeho obsahem v průběhu skladování– *B. subtilis*

zóny (mm)		původní hodnota	kyselé pH 7 dní	kyselé pH 28 dní	EtOH 7 dní	EtOH 28 dní	olej/voda 7 dní	olej/voda 28 dní	voda 7 dní	voda 28 dní
1%A	částice	3,5	0	0	0	0	0	0	3	0
	roztok	5	0	0	0	0	2	0	4	0
2%A	částice	4,5	0	0	0	0	3	0	3	0
	roztok	5,5	0	0	0	0	2	0	3	0
1%CH	částice	0	3	0	4	2	0	0	3	0
	roztok	0	3	0	0	4	0	0	3	0
2%CH	částice	0	3	3	0	0	0	0	0	0
	roztok	0	0	0	0	1	0	0	0	0
A	částice	3	5	3	3	3	4	3	5	3
	roztok	0	0	1	0	0	0	0	0	0
CH	částice	4	3	0	3	0	0	0	0	0
	roztok	3	0	0	3	0	0	0	0	3
L	částice	2	4	3	0	4	3	3	0	0
	roztok	0	3	3	0	0	0	0	0	0
Š	částice	2	0	3	0	0	0	0	0	0
	roztok	2	0	0	0	0	0	0	0	0
lysozym	volný	4	4	4	3	0	3	0	4	3

U všech částic s obsahem lysozymu i u jejich supernatantů a souběžně u volného lysozymu byla po týdnu a následně po 4 týdnech ověřena antimikrobiální aktivita v průběhu jejich skladování v různých modelových podmínkách (Tabulka 36). Na základě získaných výsledků je patrné, že po aplikaci do modelových potravin ztrácejí částice částečně svou původní antimikrobiální aktivitu. Antimikrobiální testy rovněž potvrdily předpoklad, že volný lysozym v těchto různých prostředích v čase degraduje/denaturuje a ztrácí svou aktivitu. Dosažené výsledky tedy potvrzují, že volný lysozym je poměrně nestabilní a zapouzdření může významně ovlivnit jeho použitelnost a zvýšit jeho stabilitu.

Obecně jako nejvhodnějším prostředím pro skladování většiny částic bylo stanoveno vodné prostředí. Avšak u polysacharidových částic připravených na enkapsulátoru ovlivnilo antimikrobiální účinek částic nejméně kyselé prostředí. Po čtyřech týdnech byl však již antimikrobiální účinek u všech těchto částic zanedbatelný. Naopak antimikrobiální aktivita manuálně připravených alginátových částic a liposomů zůstává zachována velmi dlouhou dobu a při porovnání s čerstvě připravenými částicemi byla jejich účinnost srovnatelná v některých případech i větší (zřejmě z důvodu klesající stability částic a tedy rychlejšímu uvolňování lysozymu z částic). U chitosanových a škrobových částic byly dosažené obdobné výsledky jako u částic z enkapsulátoru. Postupem času se tedy jejich antimikrobiální účinek snižuje.

Na základě výsledků lze konstatovat, že připravené částice, jsou vhodné pro skladování především ve vodném prostředí s neutrálním, případně kyselým pH. Vybrané částice jsou zde stabilní, a také si zde zachovávají svoji antimikrobiální aktivitu. Připravené částice jsou tak vhodné pro použití například v různých formách gelů na bázi vody, pro použití v kosmetickém průmyslu, případně pro aplikace do potravin.

Pro potenciální aplikace v potravinářském průmyslu byla rovněž sledována schopnost částic zachovat svoji antimikrobiální aktivitu při průchodu trávicím traktem.

Umělá žaludeční šťáva působí značně destruktivně na aktivitu volného lysozymu, rovněž v částicích došlo k částečné ztrátě jeho aktivity. Antimikrobiální účinek zůstal zachován především u manuálně připravených alginátových částic a u škrobových částic. Vlivem pankreatické trávicí šťávy docházelo rovněž k částečné ztrátě antimikrobiální aktivity volného lysozymu. Výsledky rovněž potvrzují, že pankreatická trávicí šťáva působí svými enzymy na částice velmi intenzivně a dochází tak k uvolňování enkapsulovaného lysozymu z částic. I žlučová trávicí šťáva způsobila potlačení antimikrobiálního účinku volného lysozymu avšak ne tak výrazně jako u předchozích dvou trávicích šťáv. Nejvyšší inhibiční účinek vykazovaly v tomto prostředí především manuálně připravené chitosanové částice a liposomy.

Dosažené výsledky tedy potvrzují, že volný lysozym je v průběhu trávení relativně labilní a enkapsulace může významně ovlivnit jeho využitelnost v organismu, zejména při ochraně před negativním vlivem žaludeční šťávy. Dobrá dlouhodobá stabilita lysozymu v částicích spojená s nízkou odolností některých částic v prostředí střeva je tak vhodným základem pro vývoj preparátů s cíleným transportem lysozymu s pozvolným uvolňováním v prostředí tenkého střeva. Důležitým faktorem pro zachování antimikrobiální aktivity i v tomto prostředí je však schopnost částic uvolnit v dostatečně krátkém čase požadovanou minimální inhibiční koncentraci enkapsulovaného lysozymu.

Jako jedna z dalších možných aplikačních forem byla testována možnost lyofilizace připravených částic, avšak v tomto případě došlo k úplné ztrátě jejich antimikrobiální aktivity.

Na závěr byla u testovaných léčiv a rostlinných extraktů sledována antimykotická aktivita na kvasinkový kmen *Candida glabrata*. Testovaný klotrimazol měl velmi dobrý antimikrobiální účinek. Z testovaných rostlinných extraktů působil antimikrobiálně především extrakt česneku. U ostatních bylinných extraktů bylo dosaženo pouze minimálního nebo nulového účinku. Extrakt česneku i vzorek klotrimazolu byly úspěšně enkapsulovány do liposomů a chitosanových částic. Antimikrobiální účinek takto připravených částic byl srovnatelný se vzorky bez enkapsulace, nebo byl jejich účinek vyšší. V případě koenkapsulace klotrimazolu a česneku do chitosanových částic byl stanoven nejvyšší inhibiční účinek (Tabulka 37).

Tabulka 37. Stanovení antimykotické aktivity – velikost inhibičních zón (mm)

Průměr inhibiční zóny (mm)	klotrimazol 20mg/ml	klotrimazol 10mg/ml	klotrimazol 2mg/ml	klotrimazol 0,2mg/ml	klotrimazol 0,02mg/ml
<i>Candida glabrata</i>	3	2	1,5	1	0
	L česnek	L klotrimazol	CH klotrimazol	CH klotrimazol+česnek	česnek 0,3g/ml
<i>Candida glabrata</i>	2,5	2,5	2	3,5	3

5.3.7.2 Bujónová diluční metoda

Dříve se tato metoda prováděla v řadě zkumavek. Dnes jsou hlavně využívány mikrotitrační destičky. Testované kultury mikroorganismů se očkují k testovaným látkám. Po inkubaci se hodnotí minimální inhibiční koncentrace antimikrobiální látky v těch suspenzích, kde nevznikl zákal nebo sediment, který vyjadřuje růst mikroorganismu. Vyhodnocení lze provést vizuálně, turbidimetry, měřením absorbance nebo pomocí přímého stanovení počtu buněk v počítacích komůrkách, či pomocí průtokové cytometrie [134, 135].

Pomocí tohoto testu byla ověřena antimikrobiální aktivita všech testovaných rostlinných i živočišných antimikrobiálních vzorků před i po enkapsulaci do různých typů částic.

Při stanovení antimikrobiální aktivity v tekutém médiu bylo postupováno podle postupu uvedeného v kapitole 4.16.1. Při testování přímého účinků na lyzi buněk byl, v případě vždy 24 hodinového inokula, po 10 minutách sledovaný zákal způsobený rozpadem buněk, viz. kap. 4.16.4.

Inhibice růstu mikroorganismů v daných časech byla stanovena pomocí spektrofotometrického měření, případně pomocí průtokové cytometrie. Výsledky stanovení antimikrobiální aktivity lysozymu a nisinu, po 24 hodinách kultivace jsou uvedeny v Tabulce 38 a Tabulce 39.

Lysozym i nisin působily výrazněji na gram-pozitivní bakterie, obdobně jak bylo prokázáno již u diskového/jamkového difuzního testu. Minimální inhibiční koncentrace lysozymu byla stanovena pro kmen *B. subtilis* na více než 500 µg/ml, 1000 µg/ml pro kmen *M. luteus* a více než 1000 µg/ml pro testované gram-negativní kmeny. Minimální inhibiční koncentrace nisinu byla stanovena na 5 µg/ml, pro gram-pozitivní kmen *B. subtilis* a více než 50 µg/ml pro gram-negativní kmen *E. coli*.

Tabulka 38. Stanovení antimikrobiální aktivity lysozymu – absorbance (630 nm) – 24hod.

	lysozym 1000µg/ml	lysozym 750µg/ml	lysozym 500µg/ml	lysozym 250µg/ml	lysozym 100µg/ml
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0,037	0,094	0,175	0,204
<i>Micrococcus luteus</i>	0,046	0,24	0,403	0,517	0,608
<i>Serratia marcescens</i>	0,104	0,363	0,468	0,589	0,684
<i>Escherichia coli</i>	0,279	0,47	0,695	0,71	0,763
	lysozym 50µg/ml	lysozym 2,50µg/ml	lysozym 10µg/ml	lysozym 0,50µg/ml	blank
<i>Bacillus subtilis</i>	0,394	0,507	0,654	0,705	0,794
<i>Micrococcus luteus</i>	0,659	0,703	0,783	0,899	0,917
<i>Serratia marcescens</i>	0,782	0,859	0,946	0,945	0,947
<i>Escherichia coli</i>	0,801	0,879	0,877	0,88	0,877

Tabulka 39. Stanovení antimikrobiální aktivity nisinu – absorbance (630 nm)

	nisin 100µg/ml	nisin 50µg/ml	nisin 30µg/ml	nisin 10µg/ml	nisin 5µg/ml
<i>B. subtilis</i> 24 hod	0	0	0,004	0,022	0,037
<i>B. subtilis</i> 48 hod	0	0	0,029	0,085	0,147
<i>E. coli</i> 24 hod	0,025	0,094	0,225	0,415	0,565
<i>E. coli</i> 48 hod	0,256	0,389	0,654	0,811	1,004
	nisin 2,5µg/ml	nisin 1µg/ml	nisin 0,3µg/ml	nisin 0,03µg/ml	blank
<i>B. subtilis</i> 24 hod	0,084	0,112	0,389	0,694	0,805
<i>B. subtilis</i> 48 hod	0,338	0,678	1,215	1,518	2,698
<i>E. coli</i> 24 hod	0,678	0,711	0,844	0,871	0,870
<i>E. coli</i> 48 hod	1,089	1,112	1,529	1,632	1,563

U nisinu byl tedy zaznamenán vyšší antimikrobiální účinek při použití nižší koncentrace. Výsledky rovněž naznačují i jeho dlouhotrvající inhibiční efekt. Po 48 hodinách kultivace v přítomnosti nisinu v koncentraci vyšší než 10 µg/ml nebyl stále zaznamenán růst gram pozitivních buněk (Tabulka 39). Pro zachování inhibičního účinku po dobu 72 hodin bylo třeba koncentrace nisinu větší než 50 µg/ml. Na nižších testovaných koncentracích byl postupně zaznamenán nárůst mikroorganismů. V porovnání s kontrolním médiem, kde bylo již dosaženo konce stacionární fáze (po 48 hod), docházelo u vzorků s nisinem (u koncentrace nižší než 2,5µg/ml) k růstu buněk v exponenciální fázi. Antimikrobiální účinek nisinu tedy zřejmě nespočíval v usmrcení buněk, ale pouze v oddálení jejich růstu.

Pro zajištění komplexního antimikrobiálního účinku případného produktu by byla vhodná kombinace lysozymu se vzorky působícími především na gram negativní bakterie, například s bylinnými extrakty.

Tabulka 40. Antimikrobiální účinek po 24 hod – absorbance (630 nm)

	pely- něk	tymián	echina- cea	lékořice	měsí- ček	rakyt- ník	šalvěj	rozma- rýn	kopřiva
<i>Bacillus subtilis</i>	0,776	0,694	0,237	0,425	0,436	0,966	0,644	0,86	0,275
<i>Micrococcus luteus</i>	0,522	0,512	0,46	0,544	0,56	0,052	0,144	1,295	0,556
<i>Serratia marcescens</i>	1,015	0,901	0,772	0,925	0,678	0,661	0,947	1,419	0,732
<i>Escherichia coli</i>	0,283	0,304	0,257	0,31	0,443	0,067	0,692	1,057	0,634
	hřebí- ček	levan- dule	heřmá- nek	černý bez	jitrocel	majorán- ka	třezal- ka	zázvor	blank
<i>Bacillus subtilis</i>	0,694	1,007	0,639	1,243	0,562	0,854	0,686	0,849	0,877
<i>Micrococcus luteus</i>	0,181	0,927	0,473	1,237	0,669	0,798	0,65	0,774	0,905
<i>Serratia marcescens</i>	0,812	1,488	0,991	1,396	0,801	0,852	0,939	0,844	0,941
<i>Escherichia coli</i>	0,033	0,752	0,522	0,989	0,719	0,731	0,705	0,885	0,904

Z výsledků stanovení antimikrobiální aktivity bylinných extraktů (Tabulka 40), lze pozorovat inhibiční účinek na gram-pozitivní bakterie, a rovněž i na gram-negativní bakteriální kmeny.

Na kmen *B. subtilis* vykazoval antimikrobiální aktivitu především extrakt z echinacey a z kopřivy. Dále byla stanovena vysoká antimikrobiální aktivita u použitých extraktů z lékořice a měsíčku. Částečný inhibiční účinek vykazovaly extrakty jitrocele, šalvěje, hřebíčku, heřmánku a třezalky. Stejně extrakty jako v případě prvního kmene měly antimikrobiální účinek i na druhý testovaný gram-pozitivní kmen *Micrococcus luteus*.

Navíc nejvyšší antimikrobiální aktivita u kmenem *Micrococcus luteus* byla detekována u extraktu z rakytíku. Na gram-negativní kmen *Serratia marcescens* měly inhibiční účinek extrakty z rakytíku, měsíčku, kopřivy, hřebíček, echinacey, jitrocele, majoránky, zázvoru, tymiánu a lékořice. Na druhém testovaném gram-negativním kmenu *E. coli* byla zjištěna antimikrobiální aktivita u všech testovaných extraktů kromě rozmarýnu a černého bezu. V případě extraktu hřebíčku byl naměřen téměř 100% inhibiční účinek po celých 24 hodin.

Tabulka 41. Antimikrobiální účinek liposomů - 24 hod – absorbance (630 nm)

liposomy	pely- něk	tymián	echina- cea	léko- řice	měsí- ček	rakyt- ník	šalvěj	rozma- rýn	kopřiva
<i>Bacillus subtilis</i>	0,513	0,512	0,215	0,276	0,129	0,112	0,027	0,714	0,110
<i>Micrococcus luteus</i>	0,507	0,489	0,325	0,388	0,199	0,020	0,004	0,789	0,256
<i>Serratia marcescens</i>	0	0,213	0	0,453	0,202	0,284	0,025	0,952	0,389
<i>Escherichia coli</i>	0,253	0,441	0,469	0,16	0,107	0,112	0,171	0,901	0,407
liposomy	hřebí- ček	levan- dule	heřmá- nek	černý bez	jitro- cel	majo- ránka	třezal- ka	zázvor	blank
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0,800	0,156	0,789	0,423	0,765	0,301	0,415	0,846
<i>Micrococcus luteus</i>	0	0,756	0	0,815	0,393	0,652	0,285	0,325	0,917
<i>Serratia marcescens</i>	0	0,839	0,109	0,906	0,516	0,728	0,408	0,533	0,997
<i>Escherichia coli</i>	0	0,717	0,035	0,740	0,597	0,821	0,490	0,565	0,794

Dále byly testovány inhibiční účinky připravených částic. Všechny testované liposomy obsahující extrakty bylin vykazovaly vůči všem testovaným kmenům alespoň částečný inhibiční účinek (Tabulka 41). Ze všech testovaných částic měly výrazný antimikrobiální účinek zejména liposomy a chitosanové částice (Tabulky 41, 42 a 43). Nejvýraznější antimikrobiální účinek vykazovaly liposomy s extraktem z hřebíčku (u extraktu z hřebíčku byla naměřena nejvyšší antioxidační aktivita).

Tyto částice vykazovaly 100% antimikrobiální ochranu po celých 24 hodin u všech testovaných kmenů. Dále měly velmi vysoký antimikrobiální účinek, na všechny testované kmeny, liposomy s obsahem lysozymu, šalvěže, heřmánku, rakytníku, a měsíčku. Na kmen *Serratia marcescens* měly 100% inhibiční účinek liposomy s obsahem pelyňku a echinacey.

Tabulka 42. Antimikrobiální účinek polysacharidové částice - 24 hod – absorbance (630 nm)- alginát

alginát	pelyněk	tymián	echinacea	lékořice	měsíček	rakytník	šalvěj	rozmarýn	kopřiva
<i>Bacillus subtilis</i>	0,592	0,685	0,335	0,336	0,293	0,516	0,273	0,814	0,615
<i>Micrococcus luteus</i>	0,489	0,529	0,425	0,288	0,309	0,520	0,294	0,809	0,560
<i>Serratia marcescens</i>	0,123	0,334	0,304	0,555	0,448	0,649	0,225	0,897	0,896
<i>Escherichia coli</i>	0,421	0,641	0,619	0,316	0,507	0,683	0,370	0,710	0,747
alginát	heřbiček	levandule	heřmánek	černý bez	jitrocel	majoránka	třezalka	zázvor	blank
<i>Bacillus subtilis</i>	0,227	0,858	0,56	0,659	0,203	0,853	0,366	0,401	0,846
<i>Micrococcus luteus</i>	0,114	0,760	0,367	0,755	0,295	0,692	0,350	0,359	0,917
<i>Serratia marcescens</i>	0,320	0,899	0,339	0,762	0,468	0,721	0,488	0,500	0,997
<i>Escherichia coli</i>	0,289	0,671	0,345	0,694	0,702	0,809	0,460	0,526	0,794

Z alginátových částic (Tabulka 42) měly částice rovněž dobrý inhibiční účinek. Pouze částice s obsahem extraktů z majoránky, levandule, černého bezu, rozmarýnu a kopřivy vykazovaly minimální nebo nulový účinek. V případě chitosanových částic (Tabulka 43) byl rovněž u rozmarýnu, levandule a majoránky pouze minimální účinek.

U ostatních extraktů byl zaznamenán již výraznější antimikrobiální efekt, zejména pak u částic s obsahem heřbičku, echinacey, lékořice, rakytníku, šalvěže a měsíčku.

Tabulka 43. Antimikrobiální účinek polysacharidové částice - 24 hod – absorbance (630 nm)-chitosan

chitosan	pelyněk	tymián	echinacea	lékořice	měsíček	rakytník	šalvěj	rozmarýn	kopřiva
<i>Bacillus subtilis</i>	0,327	0,385	0,037	0,113	0,103	0,096	0,063	0,614	0,433
<i>Micrococcus luteus</i>	0,288	0,329	0,105	0,158	0,198	0,022	0,099	0,706	0,480
<i>Serratia marcescens</i>	0,023	0,140	0,296	0,099	0,338	0,152	0,154	0,834	0,551
<i>Escherichia coli</i>	0,111	0,291	0,453	0,102	0,205	0,131	0,277	0,801	0,740
chitosan	heřbiček	levandule	heřmánek	černý bez	jitrocel	majoránka	třezalka	zázvor	blank
<i>Bacillus subtilis</i>	0,026	0,712	0,123	0,598	0,124	0,812	0,232	0,209	0,846
<i>Micrococcus luteus</i>	0,009	0,852	0,229	0,550	0,195	0,764	0,197	0,101	0,917
<i>Serratia marcescens</i>	0,052	0,899	0,481	0,705	0,221	0,783	0,274	0,394	0,997
<i>Escherichia coli</i>	0,044	0,750	0,592	0,788	0,544	0,757	0,329	0,310	0,794

Tabulka 44. Antimikrobiální účinek prázdných částic po 24 hod – absorbance (630 nm)

	blank	liposomy	alginátové částice	chitosanové částice
<i>Bacillus subtilis</i>	0,846	0,715	0,852	0,685
<i>Micrococcus luteus</i>	0,917	0,861	0,912	0,829
<i>Serratia marcescens</i>	0,997	0,900	1,003	0,887
<i>Escherichia coli</i>	0,794	0,698	0,809	0,654

Při stanovení antimikrobiální aktivity prázdných částic byl částečný antimikrobiální účinek zaznamenán u liposomových a chitosanových částic (tabulka 44). Oba typy částic tedy přispívají k antimikrobiálnímu účinku enkapsulovaných složek.

Tento jev je patrný i v případě enkapsulace lysozymu, kdy bylo u liposomů a chitosanových částic dosaženo výrazně vyššího antimikrobiálního účinku než v případě alginátových částic (tabulka 45).

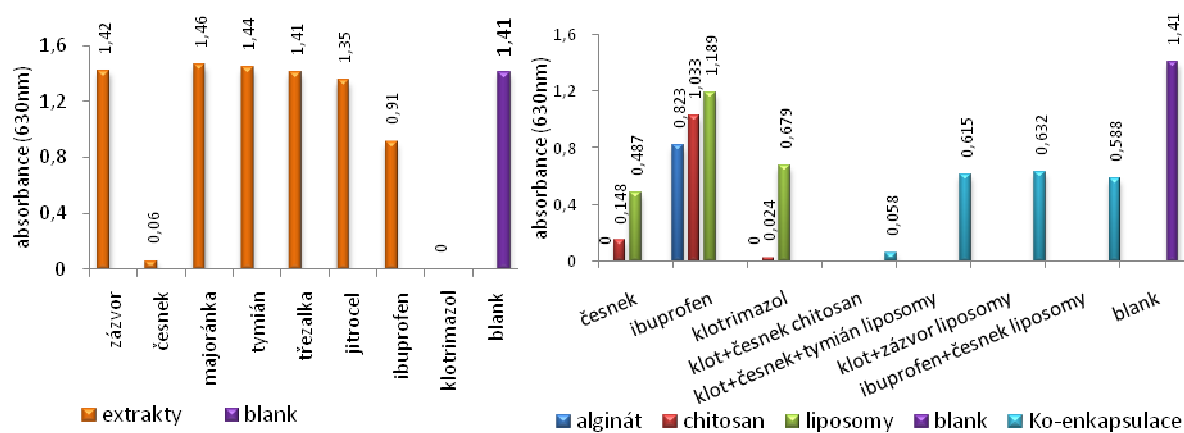
Tabulka 45. Antimikrobiální účinek částic lysozymu po 24 hod – absorbance (630 nm)

liposomy	blank	lysozym chitosanové částice	lysozym alginátové částice	lysozym liposomy
<i>Bacillus subtilis</i>	0,846	0	0,226	0,027
<i>Micrococcus luteus</i>	0,917	0,023	0,289	0,073
<i>Serratia marcescens</i>	0,997	0,222	0,327	0,225
<i>Escherichia coli</i>	0,794	0,315	0,399	0,175

Významné zvýšení antimikrobiální aktivity po enkapsulaci může podporovat využití testovaných bylinných extraktů a antimikrobiálních vzorků pro průmyslové aplikace, a to nejen v kosmetice, ale i ve farmaceutických aplikacích a v potravinářském průmyslu. Důležitým faktorem pro zachování inhibičního účinku je především schopnost částice uvolnit antimikrobiálních obsah v dostatečně krátkém čase a v požadované minimální inhibiční koncentraci.

Antimykotické testy

Při sledování antimykotické aktivity nebyl u žádné ze zvolených bylin zaznamenán výrazný inhibiční účinek. Antimikrobiální charakter vůči kvasinkovým kmenům vykazoval pouze extrakt česneku (Graf 30). Jeho inhibiční účinek se navíc vyrovnal účinku klotrimazolu. Rovněž druhé testované léčivo, ibuprofen, vykazoval drobný inhibiční účinek.



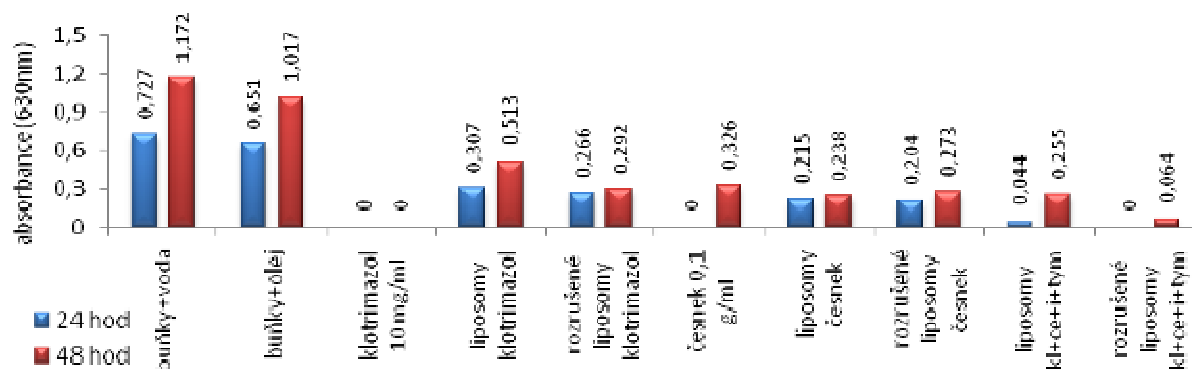
Graf 30. Antimykotická aktivita – inhibice růstu (*Candida glabrata*) – absorbance 630nm – 24 hod

Při sledování antimykotické aktivity připravených liposomů a polysacharidových částic (Graf 30) byl výrazný inhibiční účinek vůči kvasinkovému kmeni stanoven u všech částic s obsahem extraktu česneku či klotrimazolu. Vysoký antimikrobiální účinek částic s klotrimazolem byl stanoven především u polysacharidových částic. Inhibiční účinek česnekových částic se opět vyrovnal účinku částic s obsahem klotrimazolu. Ibuprofen taktéž vykazoval i po enkapsulaci drobný inhibiční účinek.

Po koenkapsulaci vykazovaly připravené částice částečný inhibiční účinek, pouze v případě koenkapsulace klotrimazolu a extraktu z česneku do chitosanových částic, byl zaznamenán vysoký inhibiční účinek. Klotrimazol i extrakt česneku si svoji aktivitu zachovali i po enkapsulaci do liposomů. K většímu účinku však došlo vždy působením rozrušených liposomů v porovnání s neporušenými. Došlo zde tedy k předpokládanému jevu, kdy se u rozrušených liposomů (rozrušení liposomů bylo provedeno stykem s olejem – takto byl simulován styk s pokožkou a pozvolné uvolnění léčiv) podařilo rychleji uvolnit enkapsulovanou antimikrobiální složku.

Lze konstatovat, že antimikrobiální účinek částic klotrimazolu i částic obsahujících extrakt česneku byly vůči kmenu *Candida glabrata* srovnatelné.

Na závěr byl testován inhibiční účinek použitím zkumavkového testu (kap.4.16.3). I v tomto testu inhibice růstu vykazovaly vyšší inhibiční účinek rozrušené liposomy, v porovnání neporušenými. Ovšem i neporušené liposomy pozvolna uvolňovaly enkapsulovanou složku a měly tak velmi dobrý inhibiční účinek na růst kvasinkových buněk.



Graf 31. Antimykotická aktivita – inhibice růstu kvasinek (*Candida glabrata*) – absorbance 630nm

To bylo potvrzeno v případě všech typů testovaných liposomů, avšak 100% inhibičního účinku po celých 48 hodin bylo dosaženo pouze v případě neenkapsulovaného roztoku klotrimazolu o koncentraci 10 mg/ml (Graf 31). U neenkapsulovaného extraktu česneku byl 100% antimikrobiální účinek zajištěn po dobu 24 hod.

Pro získání 100% inhibičního účinku i u částic je tak třeba použít jejich vyšší koncentraci nebo využít možnosti koenkapsulace. Koenkapsulací klotrimazolu, ibuprofenu, česneku a tymiánu a částečným narušením liposomů (simulace kontaktu s pokožkou) bylo rovněž dosaženo 100% inhibičního účinku po minimálně 24hodin.

5.4 Enkapsulace enzymů, jejich směsí a přírodních zdrojů

Tato část práce byla zaměřena na přípravu a testování vhodné formy enkapsulovaných enzymů s potenciálním využitím v potravinářském průmyslu, stejně tak i v kosmetice a farmacii, a to zejména pro hojení ran a regeneraci tkání.

K enkapsulaci byly použity následující enzymy: alkalasa, bromelain, kolagenasa, lipasa, lysozym, pankreatin, papain, trypsin a jako komplexní vzorek mladý zelený ječmen. Enzymy byly enkapsulovány především do polysacharidových částic tvořených alginátem, chitosanem, škrobem a jejich kombinacemi. Dále byla testována možnost enkapsulace enzymů do liposomových částic.

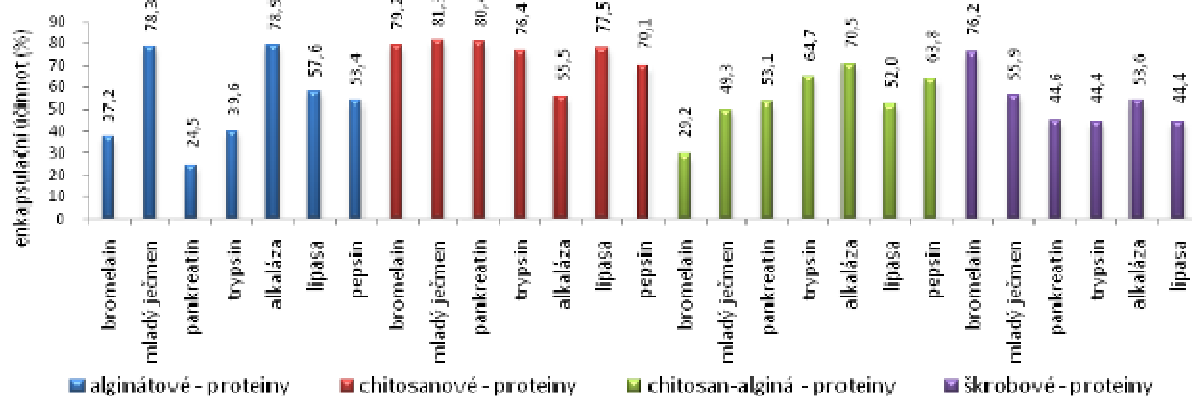
5.4.1 Stanovení enkapsulační účinnosti

Metody pro přípravu jednotlivých typů částic jsou uvedeny v kapitole 4.8. Vzorky po enkapsulaci danými metodami byl centrifugován při 14 800 ot./min, případně u částic připravených na enkapsulátoru byla použita filtrace. V supernatantu/filtrátu byla následně stanovována pomocí spektrofotometrické metody, koncentrace zbylých volných enzymů, stejně tak jako ve vzorku před enkapsulací. Z těchto dvou hodnot byla poté vypočtena enkapsulační účinnost dané metody. Obdobným způsobem byla stanovena i enkapsulační účinnost dle stanovení enzymových aktivit, kde byl rovněž pozorován vliv enkapsulace na aktivitu jednotlivých enzymů. Pro každý vzorek bylo měření opakováno třikrát a ze získaných hodnot byl získán průměr. Rozptyl hodnot měření jednotlivých vzorků nebyl větší než 5 %.

U manuálně připravených polysacharidových částic (Graf 32) byla obecně nejvyšší enkapsulační účinnost stanovena u většiny testovaných enzymů v případě chitosanových částic (nad 70%).

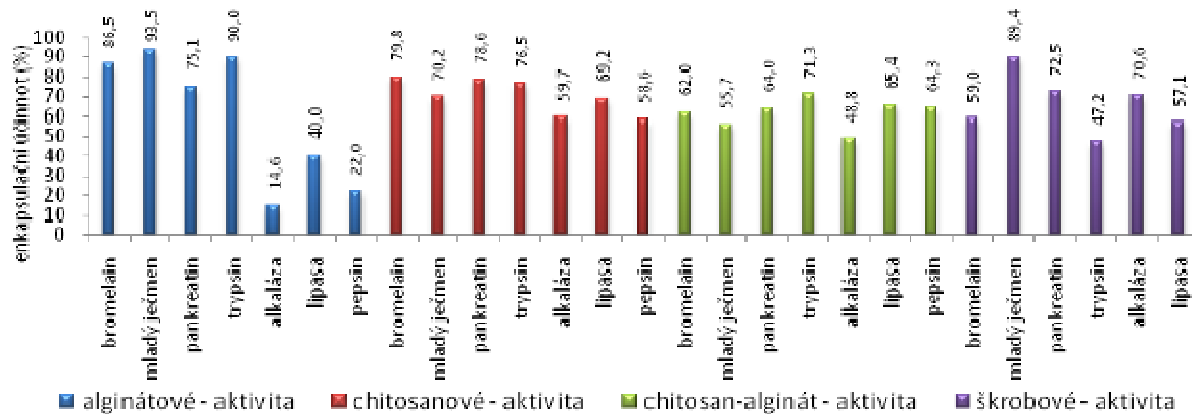
Pouze alkalasa se lépe enkapsulovala do alginátových částic. Do alginátových částic se rovněž velmi dobře enkapsuloval extrakt ze zeleného ječmene.

U alginátových částic zpevněných chitosanem došlo k vyšší nebo srovnatelné enkapsulační účinnosti jako u alginátových částic. Pouze u zeleného ječmene bylo zaznamenáno výrazné snížení enkapsulační účinnosti, a to až o 30%. Do škrobových částic se velmi dobře enkapsuloval především bromelain (76,2%), u ostatních enzymů se enkapsulační účinnost pohybovala v průměru okolo 48%.

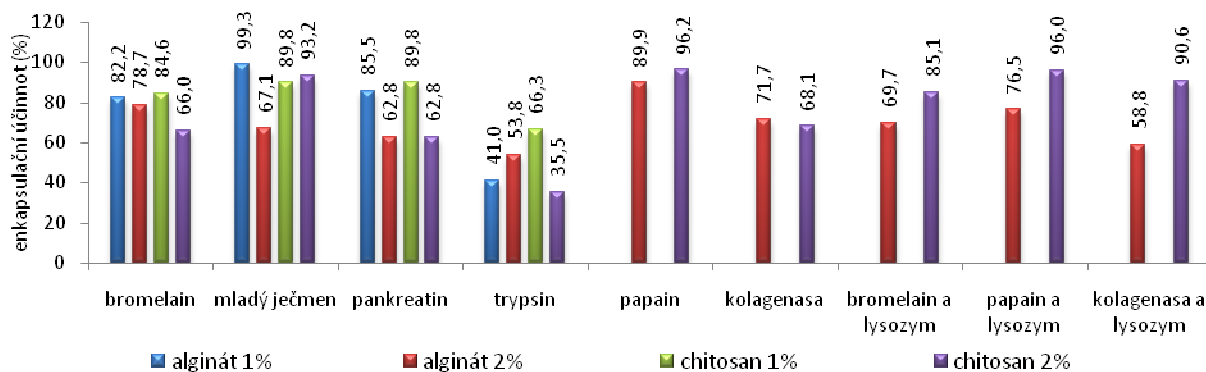


Graf 32. Enkapsulační účinnost enzymy – polysaccharidové částice manuálně připravené – bílkoviny

Obdobných výsledků jako v případě stanovení koncentrace bílkovin, bylo dosaženo i při stanovení enzymových aktivit (Graf 33). Pouze u alkalasy, lipasy a pepsinu byla enkapsulační účinnost v případě alginátových částic výrazně nižší než u stanovení celkových bílkovin. Tato odchylka mohla být způsobena nárůstem aktivity jednotlivých enzymů při procesu enkapsulace. Obecně je z výsledků patrné, že si enzymy zcela či alespoň částečně zachovaly svoji původní enzymovou aktivitu.

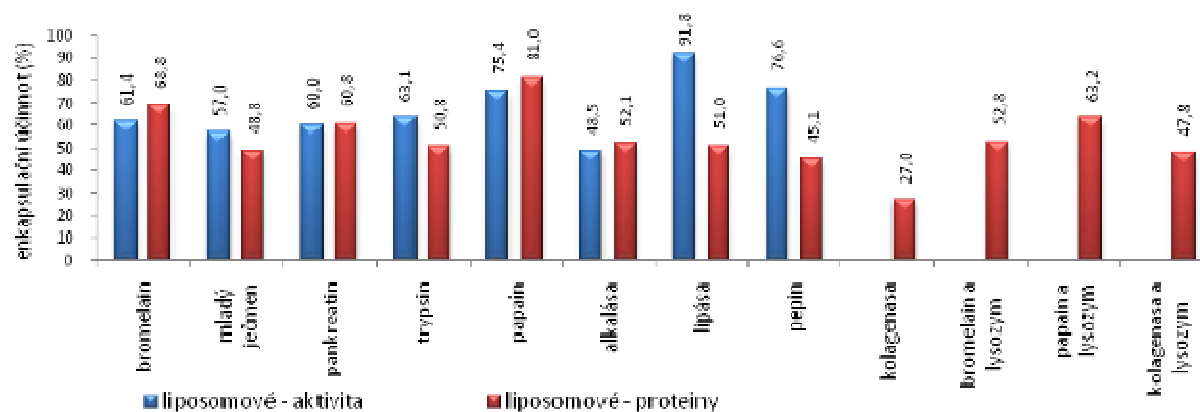


Graf 33. Enkapsulační účinnost enzymy – polysaccharidové částice manuálně připravené - aktivity



Graf 34. Enkapsulační účinnost enzymy – polysaccharidové částice připravené na enkapsulátoru – bílkoviny

U polysacharidových částic připravených pomocí enkapsulátoru (Graf 34) bylo dosaženo z hlediska enkapsulační účinnosti nejlepších výsledků. Účinnost enkapsulace se pohybovala v průměru okolo 80%. Obecně se enzymy lépe enkapsulovaly do chitosanových částic. Stejně jako v předchozím případě u manuální přípravy částic. Rovněž koncentrace použitého polysacharidu měla vliv na enkapsulační účinnost, přičemž většina enzymů se lépe enkapsulovala v případě použití 1% roztoku polysacharidu.



Graf 35. Enkapsulační účinnost enzymy – liposomy

Rovněž liposomové částice jsou vhodnou formou pro enkapsulace enzymů, což potvrzují i další studie [25]. Enkapsulace byla úspěšná u všech testovaných enzymů a dosahovala v průměru 50%. Také aktivita testovaných enzymů byla částečně či zcela zachována i po procesu enkapsulace.

Obecně se enzymy velmi dobře enkapsulovaly do všech typů testovaných částic. Nejvyšších enkapsulačních účinností bylo dosaženo u polysacharidových částic připravených pomocí enkapsulátoru, kde dosahovala průměrná enkapsulační účinnost hodnot nad 80%. U manuálně připravených polysacharidových částic a u liposomů byla stanovená enkapsulační účinnost nižší, i tak však byla ve většině případů vyšší než 50%. Navíc během procesu enkapsulace nedošlo u testovaných enzymů ke ztrátě jejich aktivity.

5.4.2 Stanovení velikostí a stability částic

Velikost liposomů a manuálně připravených polysacharidových částic byla stanovena měřením na principu DLS, stabilita částic byla sledována pomocí stanovení zeta potenciálu.

Tabulka 46. Stanovení velikostí a stability připravených liposomů

enzym	ø velikost [nm]	ø zeta potenciál [mV]	enzym	ø velikost [nm]	ø zeta potenciál [mV]
prázdné	111,8	-57,7	pepsin	156,5	-53,9
alkalasa	173,5	-46,4	trypsin	219,3	-58,6
bromelain	178,1	-56,0	mladý ječmen	215,2	-33,0
kolagenasa	125,7	-55,8	bromelain a lysozym	125,0	-52,4
lipasa	198,7	-61,0	koleganasa a lysozym	135,1	-67,9
papain	178,4	-44,3	papain a lysozym	131,4	-38,4
pankreatin	180,9	-58,2			

Zeta potenciál připravených liposomů byl ve všech případech v rozmezí od -30 mV do -60 mV. Liposomy tedy vykazovaly velmi dobrou stabilitu. Nejméně stabilní byly liposomy s enkapsulovaným obsahem zeleného ječmenu (-33 mV). Velikost liposomů byla v průměru okolo 180 nm a hodnoty indexů polydisperzity nebyly větší než 0,2. Z připravených polysacharidových částic, dle hodnoty zeta potenciálu, vykazovaly velmi dobrou stabilitu pouze chitosanové částice.

Alginátové částice se pohybovaly na hranici stability, jejich zeta potenciál byl okolo -25 mV. Chitosan-alginátové a škrobové částice měly nižší stabilitu, jejich zeta potenciál se pohyboval okolo -10 mV.

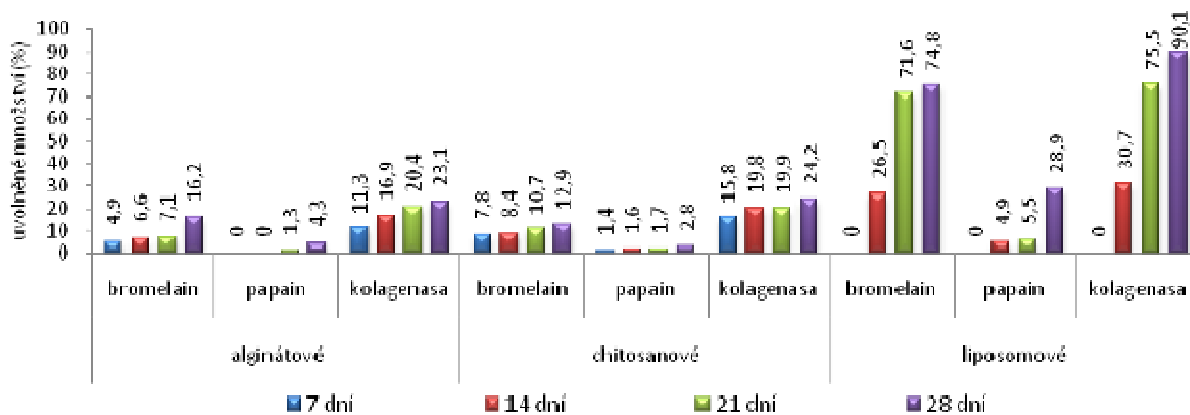
Tabulka 47. Stanovení velikosti a stability připravených polysacharidových částic

	Škrob		Chitosan-alginát		Chitosan		Alginát	
	ø velikost [nm]	ø zeta potenciál [mV]	ø velikost [nm]	ø zeta potenciál [mV]	ø velikost [nm]	ø zeta potenciál [mV]	ø velikost [nm]	ø zeta potenciál [mV]
prázdné	266,6	-16,8	715,5	-29,6	242	48,65	597,6	-19,45
alkalasa	956,7	-15,6	1281	-2,3	236	30,4	459,7	-25,7
bromelain	171,1	-22,4	1372	-5,7	204	33,7	542,7	-25,4
lipasa	151,8	-17,9	1503	-10	452	39,1	591,7	-27,1
pankreatin	279,5	-9,5	743,3	-12	323	36,1	615,2	-24,2
pepsin	326,1	-16,3	888,2	-8,5	167	30,2	615,9	-24,3
trypsin	558,1	-10,2	802,2	0,4	251	38,5	634,05	-23,2
mladý ječmen	251,2	-11,8	935,3	-15,2	2161	32,45	1037	-2,63

Průměrná velikost polysacharidových částic byla, ve srovnání s liposomy větší, v průměru 300 nm u chitosanových a škrobových částic, u alginátových částic a u chitosan-alginátových částic byla průměrná velikost 600 až 900 nm. Rovněž indexy polydispersity polysacharidových částic byly vyšší a pohybovaly se v rozmezí od 0,2 do 0,6. Přičemž nejnižší indexy polydispersity byly naměřeny u chitosanových a u alginátových částic.

5.4.3 Stanovení dlouhodobé stability – modelové kosmetické prostředí

Jako první modelové kosmetické prostředí pro sledování dlouhodobé stability částic byla zvolena voda (Graf 36). Stabilita byla sledována u alginátových částic a chitosanových částic připravených na enkapsulátoru a u připravených liposomů. Testované částice obsahovaly enkapsulovaný papain bromelain a kolagenasu. Tyto enzymy jsou jedny z častěji používaných v kosmetickém průmyslu [98].

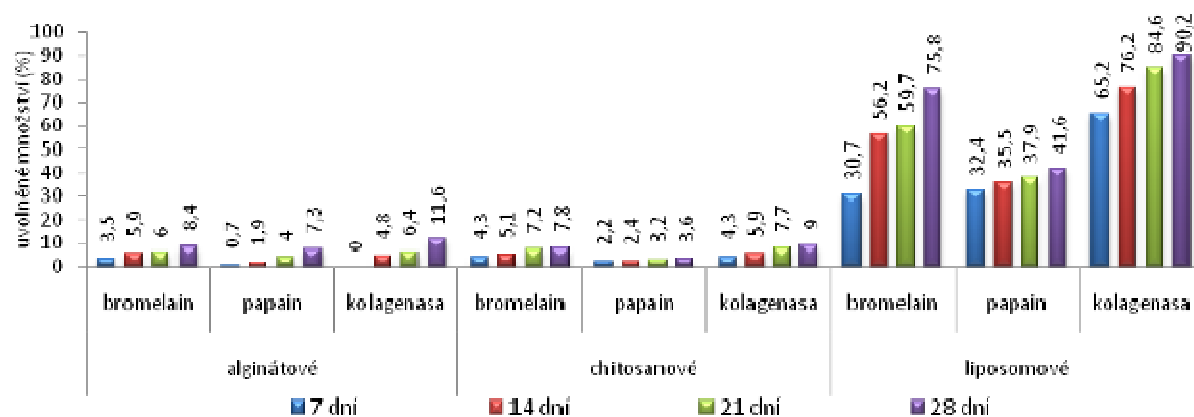


Graf 36. Dlouhodobá stabilita částic – prostředí voda

Z částic obsahujících bromelain byly ve vodě nejméně stabilní liposomové částice, z nichž se po 21 dnech uvolnil prakticky veškerý enkapsulovaný obsah. Naopak z alginátových a chitosanových částic bylo po 28 dnech uvolněno méně než 20 % enkapsulovaného enzymu. Částice s obsahem papainu, byly ve vodném prostředí velice stabilní. Z alginátových i chitosanových částic bylo po 28 dnech uvolněno jen přibližně 5 % enzymu. V případě liposomů došlo po 28 dnech k uvolnění asi 30% enzymu. Částice s kolagenasou byly z testovaných částic při skladování ve vodném prostředí nejméně stabilní.

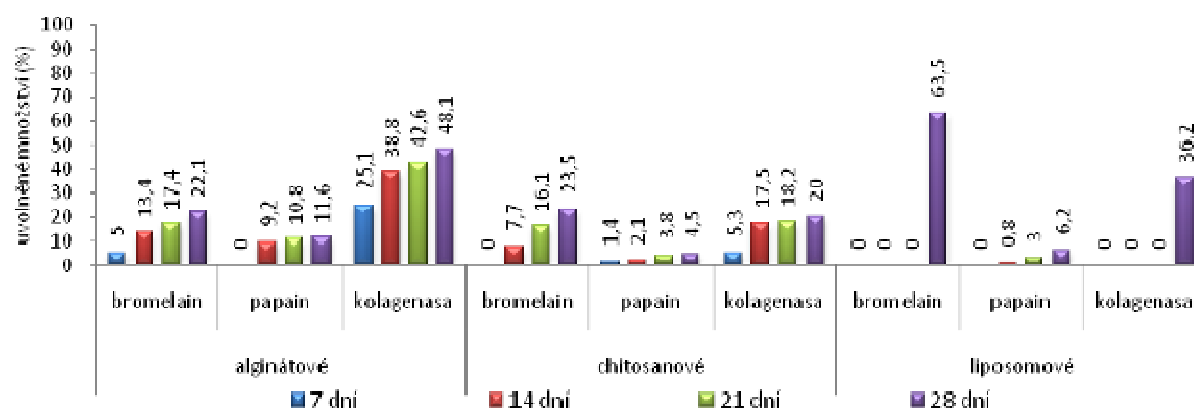
Z alginátových a chitosanových částic bylo po 28 dnech uvolněno téměř 30 % enkapsulovaného množství a z liposomových částic se uvolnilo více než 90 %.

V další části experimentů byla testována možnost koenkapsulace směšného preparátu obsahujícího dva různé hydrolytické enzymy (jednotlivé enzymy bromelain, papain i kolagenasa byly vždy kombinovány společně s lysozymem) s cílem zachování jejich aktivity v kombinovaném preparátu. I v případě koenkapsulace jednotlivých enzymů s lysozymem byla pozorována vyšší stabilita v případě polysacharidových částic a nízká stabilita v případě enkapsulace do liposomů (Graf 37). Při srovnání enkapsulované a koenkapsulované formy došlo k výraznějšímu uvolňování enkapsulovaných enzymů v případě jejich koenkapsulace. Při srovnání polysacharidových částic a liposomů může být hlavním důvodem odlišné stability pevnost a především velikost jednotlivých částic. Zatímco polysacharidové částice byly připraveny na enkapsulátoru a jejich velikost byla kolem 600 μm , připravené liposomy dosahovaly průměrné velikosti kolem 180 nm (viz kap. 5.4.2).



Graf 37. Dlouhodobá stabilita částic – prostředí voda – koenkapsulace s lysozymem

Dále byl navržen hydrogel jako jedno ze simulovaných reálných prostředí pro předpokládané dlouhodobé uchovávání částic. Hydrogel z karboxymethylcelulózy byl zvolen jako základní prostředí pro tato stanovení.



Graf 38. Dlouhodobá stabilita částic – prostředí gel

U hydrogelu (Graf 38) byl zazenmenám obdobný trend jako v případě uchovávání ve vodném prostředí. Jako nejstabilnější byly opět vyhodnoceny chitosanové částice. S enzymů byl nejvíce stabilní papain a naopak nejméně stabilní byla kolagenasa. Z alginátových i chitosanových částic bylo po 28 dnech uvolněno asi 20 % enkapsulovaných enzymů pouze v případě kolagenasy a její enkapsulace do alginátových částic bylo uvolněno více než 60% enzymu.

Zajímavým zjištěním bylo zvýšení stability liposomových částic. Liposomy byly v prostředí hydrogelu velmi stabilní, po dobu 21 dnů se neuvolnilo žádné nebo pouze minimální množství enkapsulovaných enzymů.

Významnější množství uvolněných bílkovin bylo zaznamenáno až po 28 dnech skladování, nejvíce u bromelainu a to více než 60 %. Naopak u nejstabilnějšího papainu bylo detekované uvolnění pouze 6% enkapsulovaného enzymu po 28 denním skladování v hydrogelu.

V případě koenkapsulace s lysozymem bylo opět zaznamenáno u většiny částic vyšší uvolněné množství než v případě enkapsulace. U polysacharidových částic bylo po 28 dnech průměrně uvolněno 30% enkapsulovaných enzymů. U liposomových částic bylarovněž zaznamenána nižší stability, již po 14 dnech bylo detekováno v průměru 10 % uvolněných bílkovin. K výrazné destabilizaci liposomů došlo především v případě koenkapsulace papainu a lysozymu, kde bylo po 28 dnech uvolněno veškeré enkapsulované množství.

Emulze byla vedle gelu zvolena jako druhé simulované reálné prostředí pro stanovení stability připravených částic. Použita byla 10% emulze O/V připravená pomocí ultrazvuku a stabilizovaná pomocí lecitinu.

U alginátových i chitosanových částic bylo již po 7 dnech uchování v emulzi zjištěno úplné uvolnění enkapsulovaných enzymů. Z liposomových částic byly veškeré enzymy uvolněny v případě bromelainu po 14 dnech a v případě papainu po 21 dnech skladování. U koenkapsulovaných enzymů s lysozymem bylo u alginátových a chitosanových částic dosaženo obdobných výsledků jako v případě liposomů, úplného uvolnění enzymů bylo dosaženo již po 7 dnech skladování. U liposomových částic došlo překvapivě při koenkapsulaci k jejich stabilizaci v prostředí emulze. Veškeré enzymy byly uvolněny v případě koenkapsulace papainu a lysozymu po 28 dnech skladování, v případě částic s obsahem bromelainu a lysozymu bylo pozorováno po 28 dnech uvolnění 60% enkapsulované obsahu. Tento jev mohl být způsobený imobilizací uvolněných enzymů na povrch liposomové částice, která tak byla více chráněna před nepříznivým vlivem lipidického prostředí.

Obecně lze říci, že alginátové částice s enkapsulovanými enzymy byly nejstabilnější v modelovém vodním prostředí, nejméně stabilní byly tyto částice v emulzi. Chitosanové částice i liposomy měly nejvyšší stabilitu v gelu, a nejnižší pak opět v emulzi. Emulze v použitém složení tedy není vhodným prostředím pro dlouhodobé uchování těchto typů částic v potenciálních kosmetických výrobcích. U většiny částic uchovávaných v emulzi docházelo k velmi rychlé ztrátě stability a uvolnění celého enkapsulovaného množství již po sedmi dnech skladování. Na druhou stranu lze z těchto výsledků usuzovat, že při styku s pokožkou, jež má lipidický charakter, dojde k žádoucímu uvolnění obsažené aktivní složky. Jako nejvhodnější prostředí pro potenciální aplikace byl vyhodnocen gel, při použití vhodných částic by tato forma mohla být vysoce perspektivní pro hojení ran. Což potvrzují i další studie [98].

5.4.4 Stanovení proteolytické aktivity uvolněných enzymů během skladování

Dále byla testována zbytková proteolytická aktivita enzymů uvolněných z částic v průběhu jejich dlouhodobého skladování. Proteolytická aktivita byla zjišťována s využitím metody uvedené v kapitole 4.7.16.1. Výsledná aktivita byla vyjádřena jako množství substrátu rozloženého působením enzymu vztahované na čas a množství enzymu [$\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{ml})$]. Pro každý enzym byla před enkapsulací stanovena hodnota referenční aktivity v daném prostředí při známém množství enzymu. Po zjištění množství uvolněného enzymu (měření koncentrace bílkoviny Hartree-Lowryho metodou, kap. 4.7.13) byla naměřená aktivita porovnána s referenční hodnotou. Výsledek byl vyjádřen jako procentuální podíl referenční aktivity.

Z výsledků vyplývá (Tabulka 48), že nejvhodnějším prostředím pro uchování proteolytické aktivity testovaných enzymů je gel. Bromelain zde vykazoval proteolytickou aktivitu i po 28 dnech uchování. Ve vodě byla aktivita tohoto enzymu nulová již po 14 dnech skladování, v emulzi dokonce již po 7 dnech. Obdobných výsledků jako u bromelainu bylo dosaženo i v případě papainu, který si nejlépe zachoval svoji aktivitu rovněž v hydrogelu. U některých typů částic vykazoval i po 21denní inkubaci více než 50 % původní aktivity. Naopak v emulzi jeho aktivita prudce klesla již po 7 dnech inkubace.

Kolagenasa uvolněná do gelu také vykazovala i po 28 dnech skladování téměř 50 % své původní aktivity. Ve vodě její proteolytická aktivita výrazně klesla po 14 dnech a po 28 dnech byla nulová. V případě emulze nebyla žádná aktivita kolagenasy zaznamenána již po 7 dnech skladování.

Tabulka 48. Zachování proteolytické aktivity uvolněných enzymů v průběhu skladování – vyjádřeno v % původní aktivity

částice	prostředí	bromelain				papain				kolagenasa			
		7 dní	14 dní	21 dní	28 dní	7 dní	14 dní	21 dní	28 dní	7 dní	14 dní	21 dní	28 dní
alginát	voda	98,5	5,8	0,2	0,0	64,2	2,6	0,0	0,0	95,7	34,6	23,7	0,0
	gel	86,3	60,1	43,6	7,6	75,8	20,3	0,0	0,0	73,5	69,3	64,6	44,1
	emulze	15,1	6,1	5,1	0,8	26,4	15,0	10,1	4,0	0	0	0	0
chitosan	voda	24,0	3,8	0,6	0,0	80,0	59,2	19,6	0,0	92,3	10,9	0,0	0,0
	gel	52,3	20,6	4,8	0,0	82,7	70,7	57,6	3,2	97,0	89,9	58,6	55,8
	emulze	6,1	2,9	2,4	0,3	1,7	1,2	0,5	0,0	0	0	0	0
liposomy	voda	42,6	2,2	0,2	0,0	60,5	31,2	0,0	0,0	45,9	12,1	6,9	0,0
	gel	92,3	70,9	48,3	15,5	99,2	95,1	61,9	51,7	81,1	69,4	54,2	43,7
	emulze	9,6	3,5	0,9	0,4	24,6	21,9	3,6	2,6	0	0	0	0

Celkově lze shrnout, že nejlepším prostředím pro uchování proteolytické aktivity enzymů je podle dosažených výsledků hydrogel. Enzymy v gelu jsou aktivní i po 28 dnech skladování.

5.4.5 Stanovení dlouhodobé stability enkapsulovaných enzymů v prostředí modelových potravin

Při sledování dlouhodobé stability částic v modelových potravinách byly použity čtyři základní typy modelových podmínek.

Tabulka 49. Dlouhodobá stabilita částic – množství uvolněných složek %- modelové potraviny

	%	týden				měsíc			
		alginát	chitosan	škrob	liposomy	alginát	chitosan	škrob	liposomy
voda	bromelain	3,2	7,6	4,1	8,2	3,5	8,0	4,5	12,6
	mladý ječmen	0,0	1,1	4,7	0,5	2,3	1,5	5,0	4,9
	pankreatin	14,3	3,4	10,7	0,1	14,5	9,9	11,0	3,9
	trypsin	14,5	21,5	8,2	20,9	14,5	22,2	8,5	21,0
kyselina	bromelain	1,2	1,5	2,0	7,7	7,7	1,5	2,5	10,5
	mladý ječmen	0,1	1,1	0,3	1,5	5,9	4,1	3,0	1,5
	pankreatin	2,1	0,5	0,1	0,4	20,7	5,7	1,8	6,6
	trypsin	19,4	10,1	7,7	0,9	32,6	10,5	8,7	16,3
ethanol	bromelain	9,5	7,9	3,7	21,0	10,6	8,0	4,0	26,4
	mladý ječmen	2,0	1,2	4,4	12,0	4,4	4,4	4,5	12,5
	pankreatin	22,3	3,5	3,1	17,7	30,2	7,3	3,5	18,0
	trypsin	37,6	22,4	7,0	40,5	59,7	27,8	7,5	40,5
olej/voda	bromelain	6,4	8,0	0,2	23,1	31,5	8,5	1,0	23,6
	mladý ječmen	0,1	1,2	1,3	10,3	0,7	1,2	1,7	10,5
	pankreatin	9,1	2,1	1,4	1,0	9,5	2,8	1,5	3,7
	trypsin	59,7	29,4	2,2	19,4	76,6	29,5	2,5	23,0

Při pozorování krátkodobé stability (týden) v simulovaných potravinách se v případě testovaných manuálně připravených polysacharidových částic a liposomů ukázalo jako nejvhodnější prostředí ke skladování, prostředí kyselé potraviny. Částice byly převážně stabilní i ve vodném prostředí. Obecně nejméně stabilní byly částice v alkoholovém a tučném modelovém prostředí (Tabulka 49).

Po měsíčním skladování v simulovaných potravinách bylo dosaženo obdobných výsledků jako po týdnu. U většiny částic byla pozorována pouze minimální změna v uvolněném množství. Z dlouhodobého hlediska byly tedy připravené částice stabilní. U většiny částic bylo po měsíci zachováno nad 70% enkapsulovaného množství. V průměru se uvolněné množství pohybovalo okolo 10%. Pouze v případě enkapsulace trypsinu do alginátových částic bylo uvolněné množství podstatně vyšší a to zejména v simulovaném ethanolovém a tučném prostředí.

Při stanovení dlouhodobé stability v modelových potravinách u polysacharidových částic připravených pomocí enkapsulátoru bylo pozorováno vyšší uvolněné množství než u manuálně připravených částic. Vysoké uvolněné množství u všech testovaných částic a ve všech prostředích bylo zaznamenáno především v případě enkapsulace trypsinu, kdy po měsíci bylo uvolněno průměrně 80% enkapsulovaného množství. U ostatních enzymů se jejich uvolněné množství ve všech testovaných prostředích pohybovalo v rozmezí do 40%, přičemž stabilita částic v jednotlivých typech prostředí se výrazně nelišila.

Tabulka 50. Dlouhodobá stabilita částic v modelových potravinách – změna zeta potenciálu

mV		voda		3% kys. octová		10% ethanol		olej/voda	
		čas 0	7 dní	čas 0	7 dní	čas 0	7 dní	čas 0	7 dní
alginátové částice	Prázdné	-19,5	-14,4	-11,3	-12,2	-10,3	-9,8	-13,6	-18,9
	Trypsin	-23,2	-13,6	-19,6	-16,6	-22,4	-17,4	-26,6	-32,1
	Pepsin	-24,3	-21,4	-20	-22,1	-26,3	-25,9	-24,1	-25,7
	Brom.	-25,4	-24,9	-24,9	-22,7	-27,7	-21,4	-33,7	-23,9
	Pankr.	-24,2	-23,5	-21,3	-17,2	-25,1	-23,7	-28,9	-20,5
	Lipasa	-27,1	-23,5	-21,5	-20,8	-22,9	-14,9	-30,6	-36,8
	Alkalasa	-25,7	-25,7	-18	-20,9	-17,5	-20,1	-34,5	-28,3
chitosanové částice	Prázdné	48,6	31	43,2	55	47,8	56,9	52,2	46,7
	Trypsin	32,9	28,5	53,6	52,3	54,7	54,6	41,9	41,3
	Pepsin	34,3	32,2	42,6	40,7	43,5	41,5	39,4	33,4
	Brom.	33,7	31,5	34,2	35,7	32,4	33,7	34,4	21,7
	Pankr.	35,3	33,2	44,1	44,2	41,8	39,7	39,2	31,1
	Lipasa	39,9	39,1	52,9	54,4	55,6	49	37,8	35,5
	Alkalasa	32,3	30,4	53	55,5	50,6	52,9	40,9	40,6
škrobové částice	Prázdné	-16,8	-16,8	-35,1	-34	-41,6	-36	-45,7	-32,2
	Trypsin	-22,9	-22,4	-31,3	-23,6	-36,2	-30,6	-45,1	-38
	Pepsin	-18,3	-17,9	-27	-21,2	-31	-25	-43,3	-39
	Brom.	-15,7	-15,6	-19,2	-11,2	-26	-11,2	-35,9	-35,3
liposomy	Prázdné	-57,7	-57,7	-36,7	-34,6	-36,9	-30,8	-36,5	-31,1
	Trypsin	-58,9	-58,6	-47,6	-45,8	-53,1	-55,5	-53,8	-57,7
	Pepsin	-54,7	-53,9	-35,5	-33,8	-42	-41,4	-53,5	-58,1
	Brom.	-56	-50,8	-33,5	-32,9	-41,3	-46,5	-48,1	-55,5
	Pankr.	-58,2	-50,6	-37,7	-38,2	-44,7	-39,3	-48,7	-35,3
	Lipasa	-61	-59,4	-34,9	-32,2	-40	-39,5	-51,9	-53,1
	Alkalasa	-46,4	-44,6	-35,1	-30,6	-37,9	-41	-41,1	-44,3

Dlouhodobá stabilita částic byla rovněž sledována z pohledu zeta potenciálu. Stanovení bylo provedeno u vybraných manuálně připravených chitosanových, alginátových a škrobových částic a u liposomů (Tabulka 50).

Chitosanové částice byly ve vodě po 7 dnech stabilní. V kyselém prostředí byl naměřen zeta potenciál vyšší než v čase nula, což značí, že chitosanové částice jsou v nižším pH stabilnější než při pH vyšším. V alkoholovém prostředí a v roztoku olej/voda byly chitosanové částice taktéž stabilní. Alginátové částice vykazovaly mírnou nestabilitu ve vodě. V 3% kyselině octové byly alginátové částice stabilní i po několika dnech. V 10% roztoku ethanolu stejně jako v emulzi olej/voda byly alginátové částice po 7 dnech stabilní pouze u některých enkapsulovaných enzymů a hodnota zeta potenciálu mírně klesala. Stabilita škrobových částic se vlivem modelových prostředí dle hodnoty zeta potenciálu po 7 dnech výrazně nelišila. Škrobové částic vykazovaly nejvyšší stabilitu především v ethanolovém prostředí a v emulzi olej/voda. Naopak nejméně stabilní byly tyto částice ve vodném prostředí.

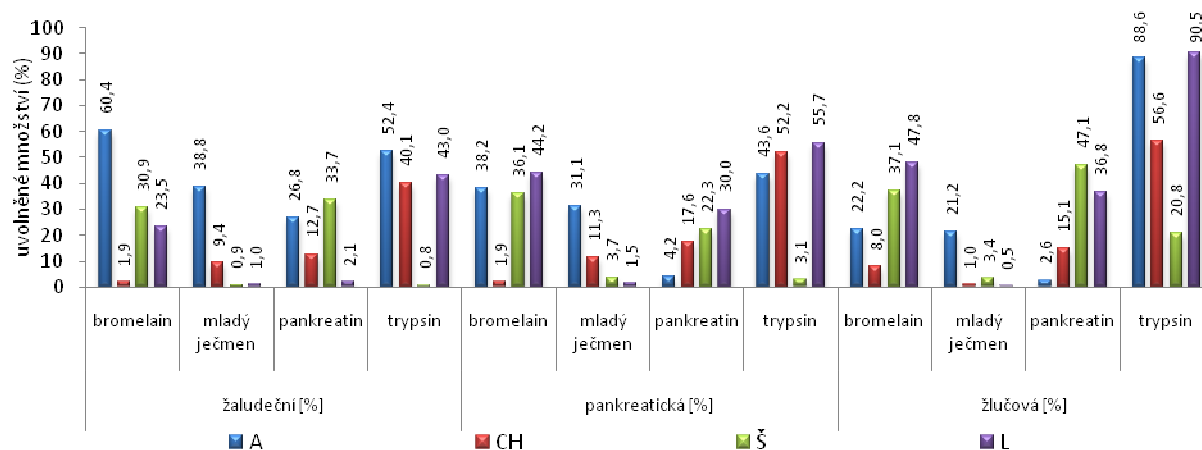
Liposomové částice byly naopak velmi stabilní především ve vodě. Po 7 dnech docházelo k mírnému poklesu zeta potenciálu, i tak však částice zůstávaly stabilní s hodnotu zeta potenciálů pohybující okolo -50 mV. V 3% kyselině octové byly liposomové částice po týdnu stabilní, opět docházelo pouze k mírnému poklesu zeta potenciálu. V roztoku ethanolu a emulzi olej/voda byly liposomové částice rovněž stále stabilní dle hodnoty zeta potenciálu, která se měnil jen minimálně.

Při pozorování krátkodobé (týdenní) stability v simulovaných potravinách pomocí zeta potenciálů se potvrdila stabilita testovaných částic. Docházelo pouze k drobným změnám hodnot zeta potenciálu s velmi pozvolným uvolňováním enkapsulovaných enzymů.

5.4.6 Stanovení stability částic – modelové trávení

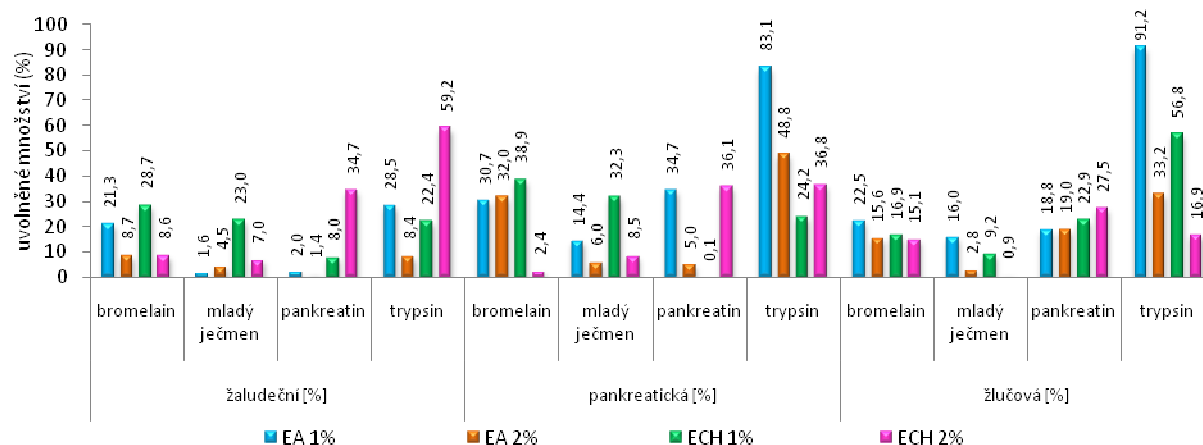
Stabilita částic s enkapsulovanými enzymy byla pozorována v modelové žaludeční, pankreatické a žlučové šťávě (s dobou inkubace 20 min, resp. 40 minut pro šťávu žlučovou). Stabilita byla sledována pomocí stanovení koncentrace uvolněných proteinů. Z rozdílu koncentrace proteinů před působením a po působení modelových tělních tekutin bylo určeno množství uvolněných proteinů a vyjádřeno v procentech. Na základě měření (Graf 39) bylo zjištěno, že průměrně nejstabilnější byly manuálně připravené polysacharidová částice a liposomy v žaludeční šťávě. Naopak nejvíce enzymů se uvolnilo působením žlučové šťávy. Rovněž v pankreatické šťávě docházelo k výraznému uvolňování enkapsulovaných enzymů.

Vyšší stabilita v kyselém prostředí umělé žaludeční šťávy je výhodou pro cílený transport enkapsulovaných enzymů do tenkého střeva, kde jsou působením pankreatické a žlučové šťávy částice rozloženy a enzymy se mohou uvolnit a být požitý například k enzymové terapii.



Graf 39. Stanovení stability částic – množství uvolněné složky – modelové trávení – manuální částice

Výsledky stability částic připravených na enkapsulátoru (Graf 40) byly podobné datům získaným u částic připravených manuálně. I v tomto případě byla zjištěna vyšší stabilita v kyselém prostředí umělé žaludeční šťávy. Těchto vlastností polysacharidových částic tedy může být využito pro cílený transport s pozvolným uvolňováním enkapsulovaných enzymů do tenkého střeva.



Graf 40. Stanovení stability částic – množství uvolněné složky – modelové trávení – enkapsulátor

Tabulka 51. Stanovení stability vybraných částic v modelových fyziologických podmínkách – změna zeta potenciálu při modelovém trávení

	zeta potenciál [mV]	původní hodnota	žaludeční šťáva		uvolněno (%)	pankreatická šťáva		uvolněno (%)	žlučová šťáva		uvolněno (%)
			0 min	20 min		0 min	20 min		0 min	40 min	
alginátové částice	alkalasa	-25,7	-12	-11,1	1,9	-20,0	-19,7	54,8	-23,5	-24,3	2,0
	bromelain	-25,4	-19,8	-19,1	24,9	-27,1	-29,0	28,2	-28	-25,9	22,2
	lipasa	-27,1	-15,1	-13,5	16,8	-22,9	-28,5	21,2	-23,6	-22,1	2,9
	pankreatin	-24,2	-12	-14,4	6,8	-26,0	-28,0	34,2	-22,3	-21,4	2,6
	pepsin	-24,3	-12,3	-13,2	3,5	-21,3	-29,1	31,8	-25,5	-24,8	1,9
	trypsin	-23,2	-13,9	-9,2	25,4	-26,4	-26,7	43,6	-26,3	-23,9	58,6
chitosanové částice	alkalasa	30,4	44,7	44,4	1,2	34,9	33,6	46,1	53,3	45,4	20,9
	bromelain	33,7	29,8	35,9	1,9	31,5	31,1	42,1	44,1	44,3	18,0
	lipasa	39,1	50,5	42	6,1	34,5	33,5	39,3	54,7	49,4	17,2
	pankreatin	36,1	38	38,6	2,5	32,6	31,4	54,7	41,1	43,7	15,3
	pepsin	30,2	37,9	34,2	1,2	19,2	30,9	42,0	38,6	43,1	9,8
	trypsin	38,5	47,3	24,9	14,8	35,8	37,7	50,5	51	39,7	56,1
škrobové částice	alkalasa	-15,6	2,7	1,3	3,5	-14	-16,7	30,2	-15,6	-17,4	5,9
	bromelain	-22,4	-2,2	1,0	30,9	-15,6	-15,0	36,7	-21,5	-21,2	37,1
	lipasa	-17,9	-5,3	-4,8	2,1	-16,9	-14,3	14,0	-18,1	-16,5	8,2
	pankreatin	-9,5	2,5	1,8	33,7	-6,5	-5,3	22,3	-11,2	-13,7	47,1
	pepsin	-16,3	0	1,8	0	-15,1	-16,7	20,9	-22,1	-22,9	2,5
	trypsin	-10,2	0,8	-1,2	1,9	-16,6	-16,3	13,1	-18,2	-16,9	20,7
liposomy	alkalasa	-46,4	-42,6	-34,8	5,2	-41,0	-55,3	25,2	-44,5	-48,7	2,1
	bromelain	-56,0	-46,3	-26,6	23,5	-49,2	-52,5	44,2	-43,2	-49,1	17,8
	lipasa	-61,0	-35,1	-1,61	7,3	-52,4	-56	21,5	-40,6	-52,3	1,3
	pankreatin	-58,2	-49,8	-27,2	3,9	-59,2	-57,6	29,9	-44,6	-48,9	16,7
	pepsin	-53,9	-42,8	-30,4	2,1	-47,2	-59,7	32,2	-43,9	-54,2	6,6
	trypsin	-58,6	-42,1	-14,5	6,5	-58,8	-56,9	55,7	-49,5	-50,3	10,5

Z výsledků stanovení stability částic pomocí zeta potenciálu v modelových trávicích šťávách (Tabulka 51) vyplývá, že testované částice byly nejméně stabilní v kyselém prostředí žaludečních šťáv. Hodnoty zeta potenciálu klesly zejména u alginátových a škrobových částic, což odpovídá i stanovení uvolněného množství, které bylo u těchto částic výraznější.

V pankreatické a žlučové šťávě se hodnota zeta potenciál měnila pouze minimálně. U částic bylo však zaznamenáno uvolněné množství enkapsulovaných enzymů zejména vlivem střevních šťáv s vyšším pH, tedy v pankreatické a žlučové šťávě. Vlivem žaludeční šťávy tedy došlo zejména k agregaci testovaných částic a pouze k částečnému uvolnění jejich obsahu (do 30%). V případě aplikace do modelových střevních šťáv pak dále došlo k pozvolnému uvolnění zbylých enkapsulovaných enzymů. Proteasy a lipasy jsou jedny z nejpřespektivnějších enzymů v potravinářském a farmaceutickém průmyslu [10]. Jak bylo potvrzeno i řadou studií je možné jejich imobilizaci [9], ale i enkapsulace do různých typů částic včetně liposomů [25]. Dle dosažených výsledků jsou testované částice s enkapsulovanými enzymy vhodné pro potravinářské i farmaceutické aplikace. Zejména v podobě přípravků s cíleným transportem enzymů do trávicího traktu s pozvolným uvolňováním, při zachování jejich dostatečné aktivity. Díky enkapsulaci, jak potvrzují i jiné studie [96], jsou tedy enzymy stabilní v různých podmínkách a zachovávají si i svoji aktivitu.

Dále byla pomocí jamkového difuzního testu potvrzena antimikrobiální aktivita jak prázdných částic, především chitosanových, ale zejména částic, které obsahovaly směs proteás a lysozymu. Provedené experimenty potvrdily, že lysozym i po enkapsulaci společně s některými proteasami nedegraduje a zachovává si i svoji aktivitu (stejně jako v případě jeho enkapsulace samostatně viz. kap.5.3.7). Může být tedy součástí i víc složkového preparátu určeného ke komplexnímu hojení ran, případně pro aplikace v enzymové terapii. Tyto předpoklady a potenciální aplikace potvrzují i další odborné studie [98, 102].

5.4.7 Stanovení sedimentační stability částic s enkapsulovanými enzymy

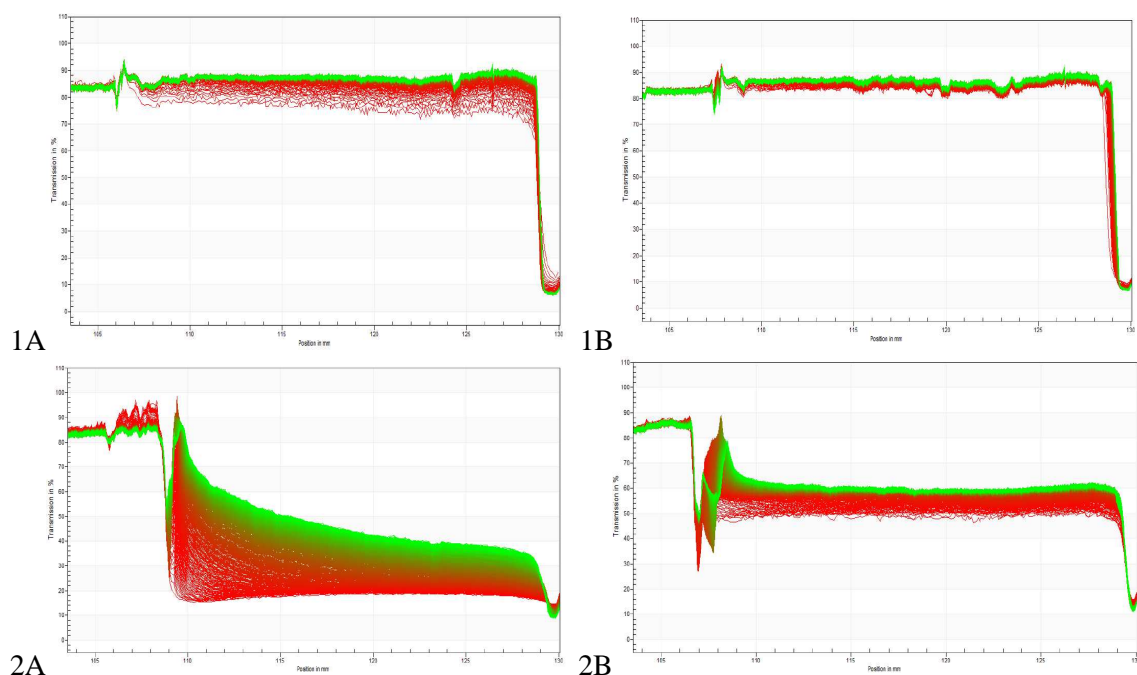
Stanovení sedimentačních vlastností pomocí analytické centrifugace bylo provedeno u manuálně připravených polysacharidových částic a liposomů, podle postupu uvedeným v kapitole 4.12. Tabulka 52 porovnává nestabilitu jednotlivých vzorků. Index nestability udává směrnici křivky v prvních fázích centrifugace. Čím je hodnota vyšší, tím je systém méně stabilní.

Tabulka 52 Porovnání indexů nestability vybraných vzorků - stanovení sedimentační stability

částice	Index nestability (1/h)	částice	Index nestability (1/h)
CHA - Trypsin	3,1122±0,0665	CHA - Bromelain	3,5164±0,0712
A - Trypsin	0,4992±0,0265	A - Bromelain	1,8253±0,0520
L - Trypsin	0,8926±0,0318	L - Bromelain	1,0582±0,0451
L - prázdné	0,4876±0,0356	A - prázdné	0,7677±0,0299
CHA - prázdné	2,3958±0,0625		

Nejvyšší hodnota směrnice byla dosažena u prázdných chitosan-alginátových částic. Tyto částice jsou tedy nejméně stabilní z testovaných částic a nejrychleji u nich dochází k sedimentaci. U škrobových a chitosanových částic nedocházelo k viditelnému usazování vzorků. Vzorky byly velmi čiré již na počátku centrifugace, nedocházelo tedy ke změně transmitance vlivem odstředivého pole, a proto nemohly být tyto vzorky vyhodnoceny pomocí indexu nestability.

V následujících grafech je zobrazena na ose y transmitance, na ose x pak pozice v kyvetě (vpravo je dno kyvetě). Vzorky chitosanových částic byly velmi čiré a nebyla u nich pozorovat žádnou sedimentaci stejně jako u škrobových částic. Obecně lze říci, že vlivem enkapsulace enzymů se sedimentační vlastnosti částic nezmění nebo pouze minimálně. U chitosan-alginátových částic docházelo k homogenní sedimentaci. U dna byl pozorován vznik sedimentu. Pouze u tohoto typu částic docházelo k odlišné sedimentaci prázdných částic a částic s enzymem. Přičemž u prázdných částic dochází k výraznější sedimentaci než u vzorků s enkapsulovaným enzymem. U alginátových částic docházelo z počátku k homogennímu usazování částic s pozvolným náznakem zónové sedimentace. Pravděpodobně tedy postupně dochází k tvorbě agregátů a jejich následnému hromadnému usazování. U prázdných liposomů docházelo k homogenní sedimentaci a tvorbě sedimentu na dně kyvetě. U liposomů s enkapsulovanými enzymy však docházelo spíše k vzlýnání a než k sedimentaci vzorku.



Graf 41. Stanovení sedimentační stability částic A) prázdné částice; B) částice s bromelainem; 1- alginát-chitosanové částice; 2- liposomové částice

5.5 Enkapsulace probiotik a prebiotik

V této části práce byly testovány možnosti enkapsulace probiotických kmenů. Dále byla testována možnost koenkapsulace probiotických bakterií a zeleného ječmene jako prebiotika.

Modelovými mikroorganismy pro enkapsulace byly zvoleny kmeny *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacter breve*. Byly připraveny alginátové, chitosanové, chitosan-alginátové, chitosan-agarové, chitosan-škrobové, alginát-agarové, alginát-agarosové, alginát-škrobové, alginát-pullulanové částice a alginátové částice s přísádkem CMC.

Mikroorganismy byly kultivovány v komerčním MRS médiu při teplotě 37°C. Po 24 hodinách byly buňky enkapsulovány. Přírodní extrakty zeleného ječmene byly nejprve charakterizovány a následně použity k enkapsulaci.

5.5.1 Charakterizace

Přírodní extrakty zeleného ječmene, připravené dle návodu uvedeného v kapitole 4.6.2., byly charakterizovány pomocí následujících skupinových charakteristik: stanovení celkových polyfenolů, celkových flavonoidů, stanovení antioxidační aktivity, stanovení obsahu bílkovin a chlorofylu *a* a *b*.

Tabulka 53. Charakterizace zelených ječmenů

c (mg/g)	polyfenoly	flavonoidy	antioxidační aktivita	bílkoviny	chlorofyl <i>a</i>	chlorofyl <i>b</i>
práškový ječmen	6,33 ± 0,09	1,09 ± 0,04	5,95 ± 0,03	36,15 ± 0,32	ND	ND
čerstvý ječmen	0,80 ± 0,01	0,02 ± 0,004	0,18 ± 0,006	2,63 ± 0,11	840,92	758,51

Dle výsledků uvedených v Tabulce 53 má práškový ječmen zejména vysoký obsah bílkovin, což potvrzuje fakt, že zelený ječmen je bohatý na obsah enzymů. V porovnání s práškovým ječmenem byly u čerstvého ječmene stanoveny velmi nízké hodnoty bílkovin. V práškovém preparátu tedy došlo k značnému zkoncentrování proteinů vlivem odstranění vody. Naopak obsah chlorofylů *a* a *b* byl zjištěn pouze u čerstvého ječmene, v práškovém ječmeni nebyly identifikovány v detekovatelném množství. Důvodem je zřejmě obecně nízká stabilita chlorofylů.

5.5.2 Stanovení enkapsulační účinnosti

Pro přípravu částic byl použit enkapsulátor Büchi B-395 Pro, přesný postup je uveden v kapitole 4.8.2. Účinnost enkapsulace byla zjištěna dle množství volných polyfenolů, bílkovin případně buněk po enkapsulaci stejně jako před enkapsulací a byla vyjádřena v procentech.

Množství polyfenolů a bílkovin bylo stanoveno pomocí spektrofotometrických metod. Množství buněk bylo sledováno pomocí průtokové cytometrie, případně počítáním buněk pomocí Bürkerovy komůrky.

Tabulka 54. Stanovení enkapsulační účinnosti - ječmen

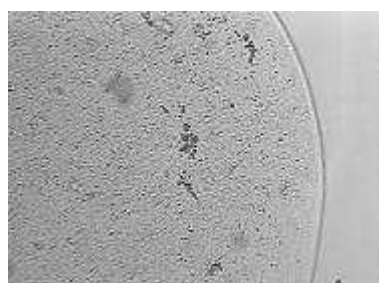
materiál	typ částice	ječmen čerstvý	ječmen sušený
alginát	kapsule (centrif)	25,7	26,1
alginát	matrix	100	100
alginát škrob (1:1)	matrix	x	100
alginát škrob (4:1)	matrix	x	100
chitosan	matrix	100	100
chitosan a agar	matrix	100	100
alginát	kapsule	56,2	x

U většiny částic bylo dosaženo takřka 100% enkapsulační účinnosti (Tabulka 54 a Tabulka 55). Nejmenší účinnosti bylo dosaženo u zeleného ječmene při použití částic z alginátů typu kapsule (kdy ječmen tvořil jádro a obal tvořil čistý alginát). U testovaných částic s obsahem probiotik byla enkapsulační účinnost 100%, pouze u částic s přídavkem škrobu byla účinnost nižší, pohybovala se od 80 do 98%.

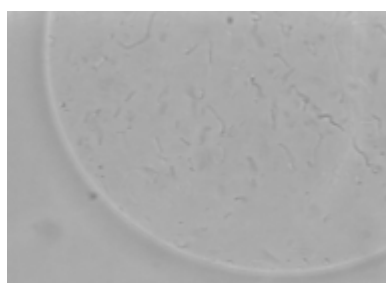
Tabulka 55. Stanovení enkapsulační účinnosti – probiotika

materiál/typ částice	alginát agar/matrix	alginát pullulan/matrix	alginát škrob (1:1)/matrix	alginát škrob (4:1)/ matrix	alginát/ kapsule
EU (%)	100	100	100	80	93,2
materiál/typ částice	alginát, 300 μm/matrix	alginát, 450 μm/matrix	alginát/škrob (2:1)/matrix	alginát CMC (4:1)/ matrix	alginát CMC (2:1)/ matrix
EU (%)	100	100	95	100	100
materiál/typ částice	chitosan/ matrix	alginát chitosan/matrix	chitosan škrob (4:1)/ matrix	chitosan škrob (2:1)/ matrix	chitosan a agar/matrix
EU (%)	100	100	98	90	100

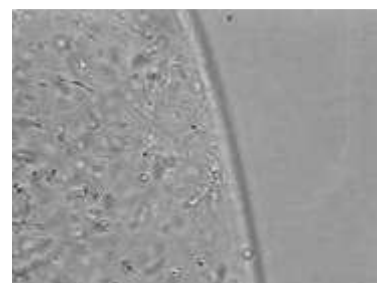
Po enkapsulaci byly částice dále charakterizovány z hlediska jejich velikosti a morfologie pomocí mikroskopie.



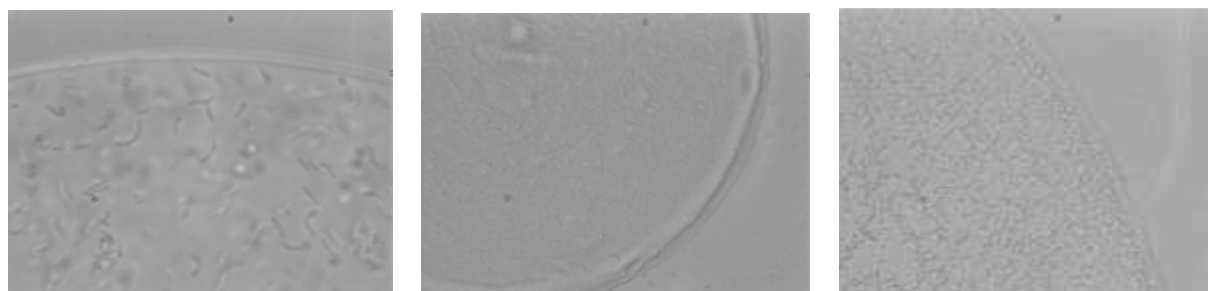
160x alginátové částice
Lactobacillus acidophilus



640x alginátové částice
Lactobacillus acidophilus



1600x alginátové částice
Lactobacillus acidophilus

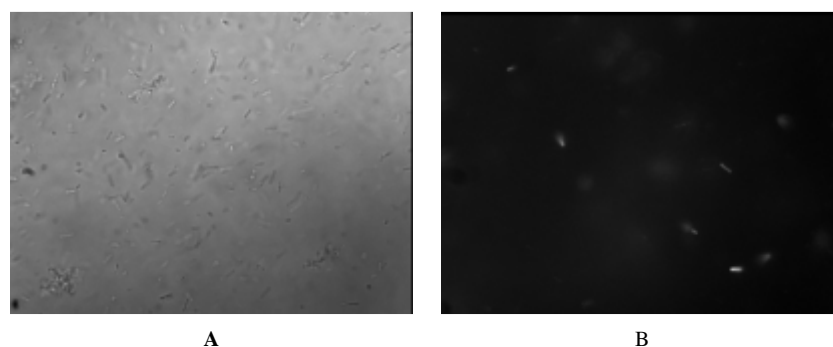


1600x alginátové částice
Bifidobacter breve

40x – alginát-chitosanové částice
Lactobacillus acidophilus

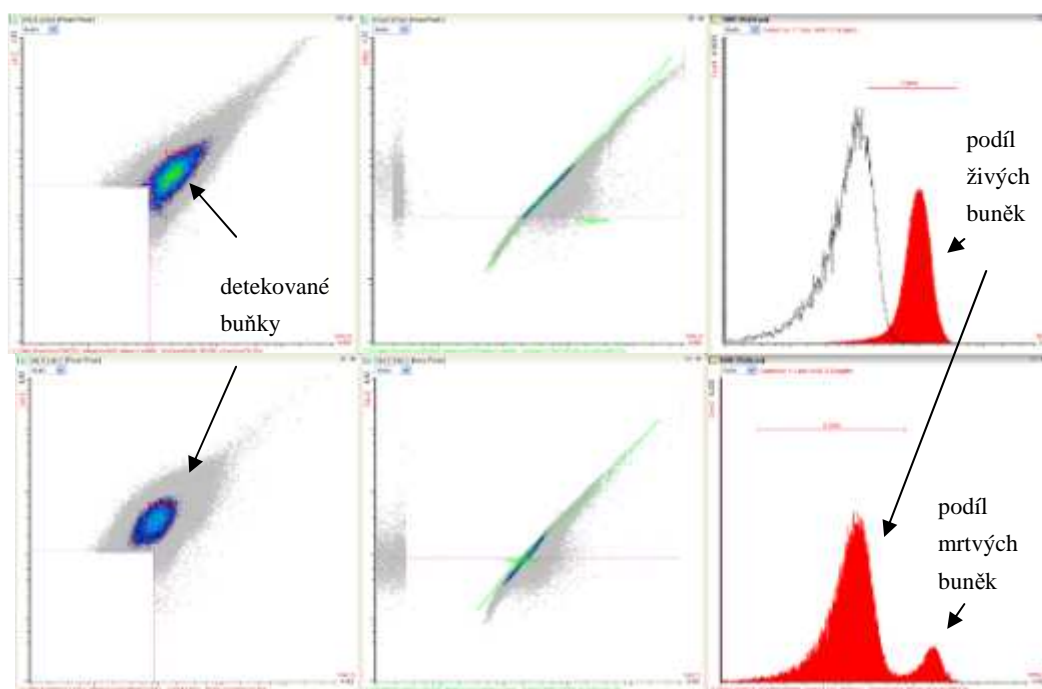
40x– alginát-chitosan-
alginátové *Lactobacillus*
acidophilus

Obrázek 14. Stanovení morfologie a velikosti částic s obsahem probiotických buněk – světelná mikroskopie



Obrázek 15. Stanovení viability buněk v částicích pomocí fluorescenční mikroskopie (A všechny buňky); B) mrtvé buňky

Viability buněk byla sledována před enkapsulací pomocí průtokové cytometrie (použitá fluorescenční sonda byl propidiumjodid, viz Tabulka 56. V případě enkapsulace probiotických bakterií byla sledována rovněž viabilita enkapsulovaných buněk, a to i v průběhu skladování a vlivem trávení. Viabilita buněk v částicích byla sledována pomocí optické a fluorescenční mikroskopie (Obrázek 15) za využití methylenové modři a propidiumjodidu.

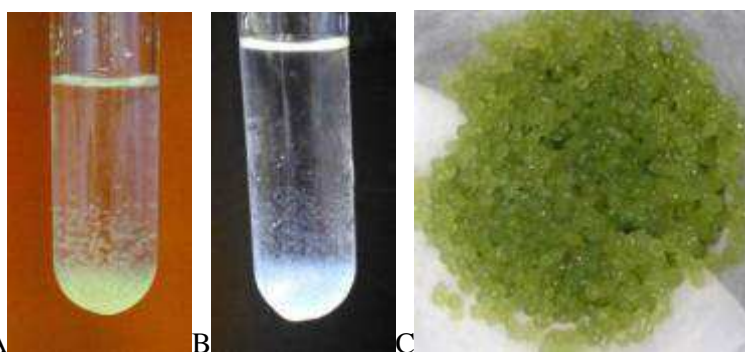


Obrázek 16: Příklad stanovení viability a počtu buněk na cytometru

Množství uvolněných buněk bylo sledováno pomocí průtokové cytometrie (Obrázek 16), případně počítáním buněk pomocí Bürkerovy komůrky s použitím methylenové modři.

Tabulka 56. Poměr živých a mrtvých bakterií po 24hodinové kultivaci

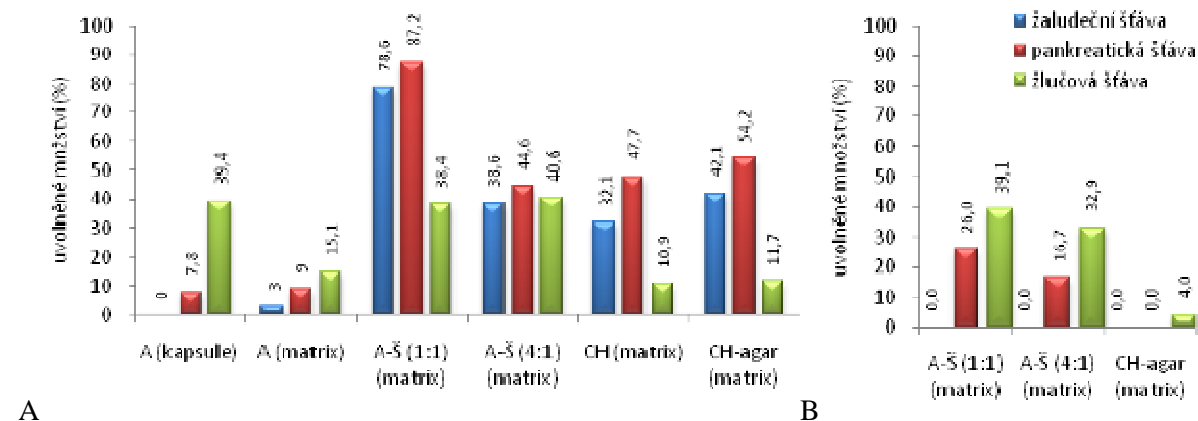
druh bakterie	Měření	Počet buněk v 1 μ l	Živé buňky v 1 μ l [%]
LA	1	230 580	95
	2	261 510	94
	3	211 710	93
BB	1	195 740	98
	2	202 650	99
	3	217 700	99,5



Obrázek 17. Alginátové částice A) koenkapsulace probiotik a zeleného ječmene - 400 μ m; B) enkapsulace probiotik- 300 μ m, C- koenkapsulace probiotik a zeleného ječmene - 900 μ m

5.5.3 Stanovení stability částic s prebiotiky v modelových podmínkách trávicího traktu

U částic s enkapsulovanou aktivní složkou byla sledována jejich stabilita v modelovém fyziologickém prostředí simulujícím trávení. Odolnost částic v podmínkách gastrointestinálního traktu byla sledována pomocí modelových trávicích šťáv připravených dle běžné receptury (4.13). Byla použita žaludeční, pankreatická a žlučová šťáva.

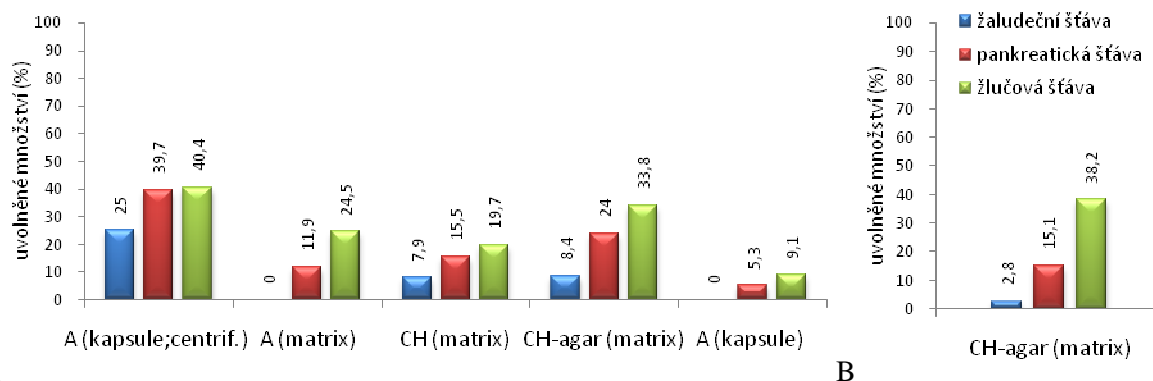


Graf 42. Stabilita částic obsahujících práškový ječmen – množství uvolněných A) polyfenolů, B) bílkovin % – modelové trávení

Zkratky: A - alginátové částice; A-Š – alginátové částice s přísadkou škrobu; CH – chitosanové částice

Během trávení docházelo k pozvolnému uvolňování enkapsulovaných složek. U částic obsahujících zelený ječmen (Graf 42) docházelo k nejvýraznějšímu rozpadu vlivem střevních šťáv. Částice jsou tedy vhodné k pozvolnému uvolňování aktivních složek v zažívacím traktu. V kyselém žaludečním prostředí byly stabilní zejména alginátové částice, u kterých docházelo i v prostředí střeva k minimálnímu uvolnění enkapsulovaných složek.

Díky kombinaci alginátu a škrobu bylo však dosaženo již vhodnějších vlastností částic s výraznějším pozvolným uvolňováním v cílovém prostředí tenkého střeva. V případě zeleného ječmene byla testována nejen možnost použití komerčního práškového produktu, ale i čerstvě vypěstovaného ječmene, ze kterého byl připraven extrakt (Graf 43). Srovnáním stability obou testovaných bylo ve fyziologickém prostředí modelového trávení dosaženo obdobných výsledků.



A Graf 43. Stabilita částic obsahující čerstvý ječmen – množství uvolněných A) polyfenolů, B) bílkovin % – modelové trávení

Zkratky: A - alginátové částice; A-Š – alginátové částice s přidavkem škrobu; CH – chitosanové částice

Rovněž u připravených částic s obsahem probiotických buněk byla sledována jejich stabilita v simulovaných tělních tekutinách, a to nejen z pohledu množství uvolněných buněk (Tabulka 57), ale i z hlediska zachování viability enkapsulovaných a uvolněných buněk (Tabulka 58).

Bakterie byly po 24hodinové kultivaci a enkapsulaci vloženy do modelových tělních tekutin. V pankreatické šťávě a v žaludeční šťávě byly inkubovány po dobu 20 minut a ve žlučové šťávě byly ponechány 40 minut, vše při teplotě 37°C. Ve volném roztoku bylo pomocí průtokové cytometrie sledováno množství a viabilita uvolněných buněk. V částicích byl poměr živých a mrtvých buněk sledován pomocí optické a fluorescenční mikroskopie za využití methylenové modři a propidiumjodidu.

Působením žaludeční šťávy na připravené částice nebyla pozorována žádná větší změna, uvolnilo se jen nepatrné množství bakterií a většina z nich byla živá. Uvnitř kapsle byla také převážná většina živých buněk. Mimo částice bylo uvolněno maximálně 30 % bakterií, a to z obalu, který byl tvořen kombinací chitosanu a škrobu. Ostatní částice byly odolnější a do žaludeční šťávy uvolňovaly jen do 10 % enkapsulovaných buněk. Polysacharidové částice tedy zůstaly vůči této modelové šťávě odolné a splnily tak hlavní kritérium pro ochranu buněk před nepříznivým vlivem kyselý žaludeční šťávy. Druhou testovanou byla pankreatická šťáva (model začátku tenkého střeva). Z výsledků vyplývá, že na strukturu částic působila více než žaludeční prostředí a žlučová šťáva. Bylo v ní nejvíce uvolněných buněk. V procentech se počet uvolněných buněk pohyboval nejčastěji mezi 40 % až 60 % enkapsulovaného množství. U některých částic, především u alginát-škrobových, případně chitosan-škrobových částic, došlo k výraznějšímu rozpadu a počet uvolněných buněk byl nad 70 %. Bakterie uvolněné z částice byly ve většině případů živé, výskyt mrtvých buněk se v maximech pohyboval do 20 % z celkového počtu uvolněných. V částicích modifikovaných škrobem bylo množství mrtvých buněk jen nepatrné. Uvnitř ostatních kapslí byl počet živých bakterií nad 80 %.

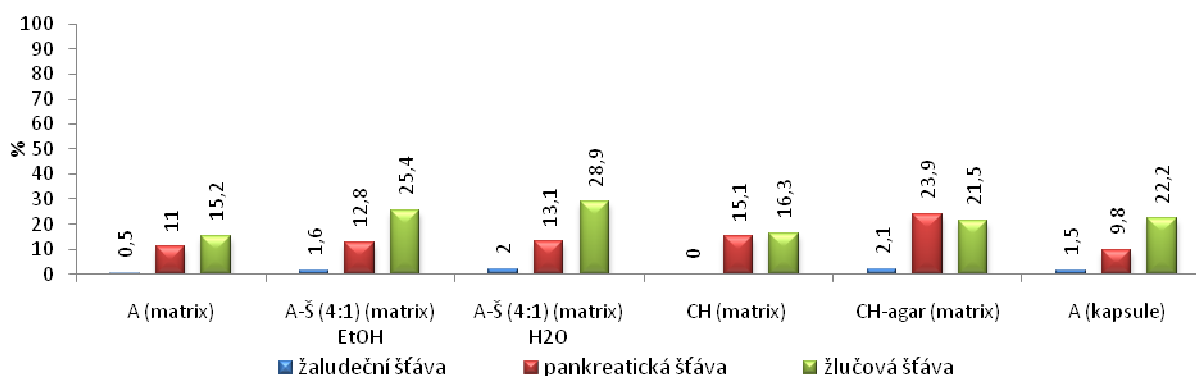
V posledním testovaném modelu (tenkého střeva), ve žlučové šťávě, bylo nalezeno podobné množství uvolněných buněk jako v žaludeční šťávě. Nejvíce uvolněných buněk bylo stanoveno z částic, které byly modifikovány škrobem, okolo 50 %. Z toho ve většině případů byly všechny buňky živé. Rovněž alginátové částice modifikované pullulanem uvolňovaly větší množství enkapsulovaných buněk. V ostatních částicích se počet uvolněných bakterií pohyboval kolem 20 %. Uvnitř částic s podílem škrobu byly převážně všechny buňky živé. U ostatních typů částic byl počet mrtvých buněk uvnitř kapslí do 20 %.

Tabulka 57. Množství uvolněných buněk z částic - modelové trávení

Uvolněné množství %	Žaludeční šťáva		Pankreatická šťáva		Žlučová šťáva	
	LA	BB	LA	BB	LA	BB
Typ částice						
alginát, 300 µm	3,8	9,6	55,1	42,3	15,6	17,8
alginát, 450 µm	5,4	5,1	52,8	40,1	20,1	7,3
alginát škrob (4:1)	2,1	11,9	81,1	72,5	25,2	31,4
alginát škrob (2:1)	6,0	3,3	80,0	75,3	28,5	43,0
alginát CMC (4:1)	3,9	4,9	46,7	41,5	20,1	25,2
alginát CMC (2:1)	4,5	8,8	54,8	51,2	28,7	7,9
4% alginát, 450 µm	6,5	4,9	63,4	37,6	27,2	24,1
chitosan škrob (4:1)	23,1	30,8	85,8	83,0	44,6	50,1
chitosan škrob (2:1)	30,2	20,4	86,6	79,8	55,7	42,7

Tabulka 58. Procenta živých bakterií v kapsli a mimo kapsli - modelové trávení

živé bakterie %	Žaludeční šťáva				Pankreatická šťáva				Žlučová šťáva			
	uvnitř kapsle		mimo kapsli		uvnitř kapsle		mimo kapsli		uvnitř kapsle		mimo kapsli	
	LA	BB	LA	BB	LA	BB	LA	BB	LA	BB	LA	BB
Typ částice												
alginát, 300 µm	90	91,3	100	66,7	92,3	92,9	90	80	86,7	85	100	75
alginát, 450 µm	95	95,2	100	100	84,6	100	100	100	88,2	93,3	60	100
alginát škrob (4:1)	98	94,4	100	100	81,8	89	83,3	81,8	92,3	81,8	100	100
alginát škrob (2:1)	94,4	94	100	100	83,3	85,7	83,3	92,6	70,6	87,5	100	100
alginát CMC (4:1)	83,9	91,3	50	100	83,3	93,3	83,3	71,4	83,3	72,7	100	100
alginát CMC (2:1)	92	88,5	100	100	85,7	94,7	95,5	78,6	77,8	89,5	100	66,7
4% alginát, 450 µm	96,9	87,5	100	100	94,7	94,1	100	92,3	84	92,6	100	100
chitosan škrob (4:1)	100	100	100	66,7	100	100	100	91,7	100	100	100	100
chitosan škrob (2:1)	100	100	100	100	87,5	100	94,7	100	87,5	100	85,7	83,3



Graf 44. Stabilita částic obsahující probiotika a ječmen – množství uvolněných buněk % – modelové trávení

Zkratky: A - alginátové částice; A-š – alginátové částice s přidavkem škrobu; CH – chitosanové částice

Rovněž i u polysacharidových částic s koenkapsulovanou směsí probiotik a zeleného ječmene byl u částic zaznamenán stejný trend pozvolného uvolňování buněk v prostředí tenkého střeva (Graf 44) a minimální uvolnění buněk v simulovaném žaludečním prostředí.

Závěrem lze říci, že připravené polysacharidové částice (především však částice s přidavkem modifikovaného škrobu) jsou velmi vhodné k ochraně probiotických buněk i enzymů a antioxidantů zeleného ječmene před nepříznivým vlivem žaludeční šťávy. Tím může dojít k jejich pozvolnému uvolňování v prostředí tenkého střeva, kde mohou v plné síle plnit svoji funkci.

5.5.4 Stanovení stability částic s probiotiky a prebiotiky v modelových potravinách

Dále byla u částic, obdobným způsobem jako v případě sledování stability ve fyziologickém prostředí, sledována i stabilita v modelových a reálných potravinách dle postupu v kapitole 4.14.

5.5.4.1 Prebiotika – zelený ječmen

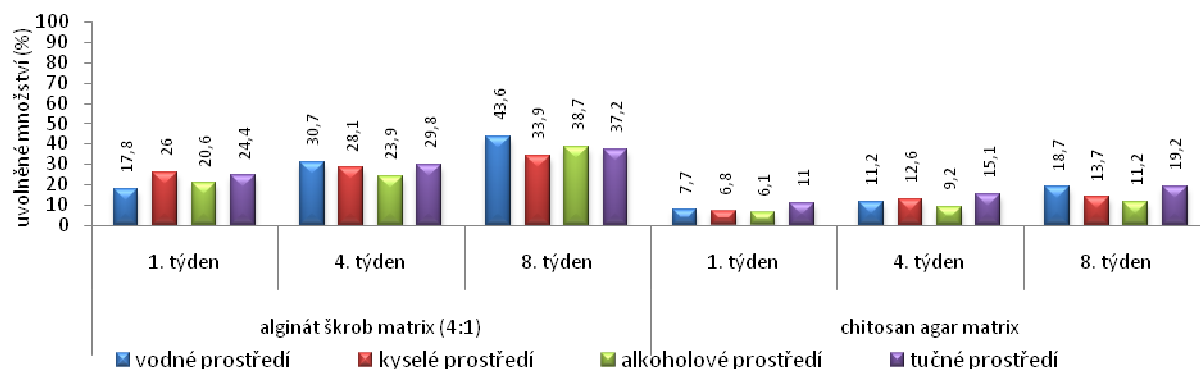
Při sledování dlouhodobé stability částic v modelových potravinách bylo u částic s obsahem zeleného ječmene sledováno množství uvolněných polyfenolů, proteinů a chlorofylů.

Tabulka 59. Dlouhodobá stabilita částic osahujících práškový ječmen – množství uvolněných polyfenolů % - modelové potraviny

typ částice	doba skladování	vodné prostředí	kyselé prostředí	alkoholové prostředí	tučné prostředí
alginát kapsule	1. týden	25,0	40,5	41,9	49,6
	4. týden	41,8	46,0	42,9	62,0
	8. týden	47,0	51,6	43,8	71,4
alginát matrix	1. týden	25,7	19,6	21,3	26,3
	4. týden	26,7	20,1	26,8	28,5
	8. týden	36,2	31,5	37,4	36,7
alginát škrob matrix (1:1)	1. týden	49,0	51,2	25,4	47,8
	4. týden	62,5	56,7	42,6	54,8
	8. týden	72,6	66,0	63,4	63,0
alginát škrob matrix (4:1)	1. týden	17,8	34,2	18,3	32,6
	4. týden	25,4	34,8	19,7	34,5
	8. týden	35,6	39,0	40,3	40,6
chitosan matrix	1. týden	12,9	13,2	11,5	23,9
	4. týden	17,5	22,4	20,9	31,8
	8. týden	27,3	23,3	32,8	36,9
chitosan agar matrix	1. týden	10,3	11,9	7,2	11,6
	4. týden	10,5	15,0	12,2	15,1
	8. týden	14,3	19,9	14,4	21,7

Stabilita částic obsahujících práškový ječmen byla ovlivněna nejen druhem obalového materiálu, ale i způsobem enkapsulace (Tabulka 59). Zcela nejnižší stabilita byla zaznamenána u alginátových kapslí s obsahem ječmene v jádru. Po osmi týdnech skladování došlo k uvolnění přibližně poloviny enkapsulovaného množství, v tučném prostředí dokonce až 71,4 %. Také u částic tvořených alginátem s přidavkem škrobu v poměru 1:1 došlo k uvolnění vysokého množství enkapsulovaných polyfenolických složek, nad 60%. Zde má na nestabilitu hlavní podíl obsah škrobu.

Alginátové částice měly obdobnou stabilitu jako částice alginát-škrobové připravené v poměru 4:1. Alginát-škrobové částice ale navíc vykazovaly mnohem lepší stravitelnost. Po dvou měsících skladování se u těchto částic, a to ve všech testovaných prostředích, uvolnilo do 40% enkapsulovaných polyfenolů. Nejvyšší stabilita byla však stanovena u chitosanových částic, přičemž v případě přidavku agaru došlo navíc nejen k vylepšení mechanické stability těchto částic, ale rovněž i k zvýšení jejich dlouhodobé stability při uchovávání v modelových potravinách. Uvolněné množství se po dvouměsíčním skladování pohybovalo do 20%. Při porovnání stability v jednotlivých prostředích nebyly u většiny testovaných částic zaznamenány výrazné rozdíly. U alginát-škrobových (4:1) a chitosan-agarových částic, které byly vyhodnoceny jako nejvhodnější pro enkapsulaci práškového zeleného ječmene, byla rovněž sledována míra uvolnění bílkovin, resp. enzymů.



Graf 45. Dlouhodobá stabilita částic obsahujících práškový ječmen – množství uvolněných bílkovin % - modelové potraviny

I v tomto případě stejně jako u sledování množství uvolněných polyfenolických složek byly jako stabilnější vyhodnoceny chitosan-agarové částice (Graf 45). Míra uvolnění bílkovin zde byla o více než polovinu nižší, než v případě alginát-škrobových částic. Při srovnání stability v jednotlivých prostředích nebyly opět zaznamenány výrazné rozdíly.

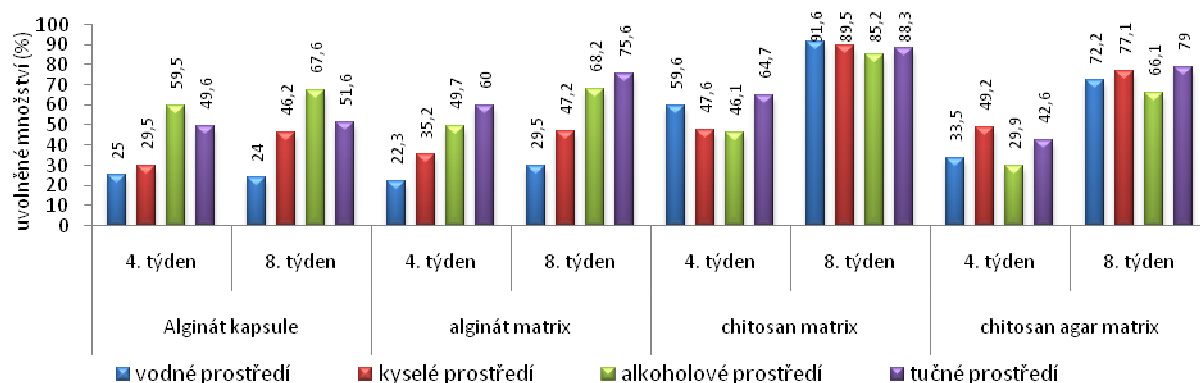
Tabulka 60. Dlouhodobá stabilita částic obsahujících čerstvý ječmen – množství uvolněných polyfenolů % - modelové potraviny

typ částice	doba skladování	vodné prostředí	kyselé prostředí	alkoholové prostředí	tučné prostředí
alginát kapsule	1. týden	25,7	34,4	46,6	24,7
	4. týden	27,6	35,4	57,7	38,5
	8. týden	47,1	42,2	59,2	44,8
alginát matrix	1. týden	5,7	6,7	9,7	11,5
	4. týden	6,4	8,1	15,1	17,4
	8. týden	9	8,9	17	22,9
chitosan matrix	1. týden	13,4	11	14	15,3
	4. týden	36,5	35,4	31,7	24,5
	8. týden	50,5	51,5	48,4	54,6
chitosan agar matrix	1. týden	12,2	8,2	21,7	16,6
	4. týden	38	29	39,4	31,4
	8. týden	43,4	34,4	36,7	42,3

Stejně jako v případě enkapsulace práškového ječmene i v případě použití čerstvého ječmene měly částice typu kapsule nejnižší stanovenou stabilitu (Tabulka 60). V případě enkapsulace čerstvého ječmene byla zaznamenána zvýšená stabilita alginátových částic, a naopak nižší stabilita u chitosanových částic ve srovnání s částicemi se sušeným ječmenem, kde byly stabilnější chitosanové částice. U chitosanových částic s přidavkem agaru bylo opět sledováno zvýšení dlouhodobé stability. Obecně nejstabilnější modelovou potravinou byla modelová kyselá a alkoholická potravina. Naopak neutrální vodné prostředí a tukové prostředí působilo na snížení stability polysacharidových částic. Rozdíly byly však opět minimální.

Analýzou míry uvolnění obsahu bílkovin v rámci dlouhodobé stability (Graf 46) byl v případě enkapsulace čerstvého extraktu zeleného ječmene vyhodnocen jako nejstabilnější obalový materiál alginát. Nejvyšší uvolněné množství bílkovin bylo detekováno u chitosanových částic, kde po 8 týdnech skladování došlo k uvolnění až 90 % enkapsulovaného množství bílkovin.

Čerstvý ječmen obsahuje vyšší množství aktivních enzymů, které jsou tak destabilizačních faktorů a zkracují interval, po který částice vykazují dostatečnou stabilitu. Pro dlouhodobé uchovávání částic s obsahem ječmenu je vhodnější použití jeho práškové formy.



Graf 46. Dlouhodobá stabilita částic obsahujících čerstvý ječmen – množství uvolněných bílkovin % - modelové potraviny

Jako další z charakteristik v průběhu sledování dlouhodobé stability částic byl zjišťován obsah uvolněných chlorofylů *a* a *b*. Nejvyšší uvolněné množství chlorofylů bylo stanoveno u alginátových částic typu kapsule, kde bylo v průměru po 8 týdnech uvolněno 6% enkapsulovaného množství. U ostatních částic, kde byl použit typ částice matrix, bylo zaznamenáno po 8 týdnech pouze minimální uvolněné množství do 2%. Při interpretaci těchto dat je však třeba vzít do úvahy vysokou nestabilitu chlorofylů při manipulaci a jejich velmi nízký obsah v preparátu zeleného ječmene.

Závěrem lze říci, že optimální obalový materiál pro částice s enkapsulovaným práškovým ječmenem představovala směs alginátu a škrobu v poměru 4:1, přičemž přídavek škrobu zvyšoval rozpad částic v požadovaných částech trávicí soustavy. Dalším vhodným materiálem byla směs chitosanu a agaru v poměru 1:1. A to zejména z hlediska ochrany a stability enzymů a bílkovin obsažených v ječmeni. Zásadní podmínkou je volba částic typu matrix, kdy je možné enkapsulovat i vlákninu obsaženou v nerozpustném podílu. V případě čerstvého ječmene byla obecně zjištěna nižší kompatibilita s obalovými materiály, důvodem může být obsah výrazně aktivnějších složek ve srovnání s ječmenem sušeným. Jako optimální obalový materiál k enkapsulaci čerstvého ječmenu z hlediska dlouhodobé stability byl vyhodnocen alginát. Bylo zjištěno, že tento materiál maximálně chrání obsažené antioxidanty, chlorofyly i bílkoviny, navíc uvolnění všech aktivních složek nastává až ve střevním prostředí. Částice jsou tedy vhodné pro aplikace do potravin a řízené uvolňování aktivních látek v zažívacím traktu.

5.5.4.2 Probiotika

Další část práce se týkala enkapsulace probiotických bakterií za účelem jejich stabilizace a uchování viability. Ihned po enkapsulaci a aplikaci do modelových potravin nebyly uvolněny žádné buňky. Po dvou dnech, kdy byly částice v modelových potravinách, nedošlo téměř k žádnému uvolnění buněk. Větší počet uvolněných bakterií byl pozorován pouze u některých částic, zejména u částic s obsahem škrobu. Co se týče viability buněk, počet mrtvých buněk ve všech typech částic a u všech testovaných prostředích nepřesáhl 10%.

Po 6 dnech skladování bylo uvolněno u většiny částic a ve všech typech modelových prostředí okolo 5 % z enkapsulovaného množství buněk (Tabulka 61).

Uvnitř kapslí (Tabulka 62), uchovávaných ve vodném prostředí, nebyly nalezeny žádné mrtvé buňky. Při uchovávání v roztoku ethanolu byl počet živých buněk uvnitř částic nad 80 %. V kyselém prostředí bylo uvnitř většiny částic asi 15 % mrtvých buněk.

Tabulka 61. Uvolněné množství buněk % - modelové potraviny

	destilovaná voda		ethanol		kyselina octová 3%		Směs voda: olej v poměru 1:4	
	6 dní	4 týdny	6 dní	4 týdny	6 dní	4 týdny	6 dní	4 týdny
A	3,9	55,1	4,6	15,5	3,1	10,6	2,5	39,1
B	5,5	64,2	3,8	12,0	2,4	22,8	2,5	40,3
C	6,9	71,1	2,0	13,5	4,1	25,2	4,0	52,5
D	7,2	59,5	4,7	14,9	5,0	18,5	3,3	45,0
E	6,7	46,7	4,2	21,8	5,9	20,1	4,0	45,7
F	6,3	54,8	3,4	16,0	4,5	11,9	2,1	31,2
G	3,8	63,4	1,1	9,6	2,5	16,3	1,0	36,7
H	7,3	75,8	3,0	12,5	6,1	14,6	3,5	43,0
I	7,9	66,6	5,2	9,1	5,2	25,7	5,9	49,8

Pozn.: A) alginát, 300 μm ; B) alginát, 450 μm ; C) alginát škrob (4:1); D) alginát škrob (2:1); E) alginát CMC (4:1); F) alginát CMC (2:1); G) 4% alginát; H) chitosan škrob (4:1); I) chitosan škrob (2:1)

Tabulka 62. Procenta živých bakterií v kapsli a mimo kapsli - modelové potraviny

	6 dní destilovaná voda				4 týdny destilovaná voda				6 dní ethanol				4 týdny ethanol			
	uvnitř kapsle		mimo kapsli		uvnitř kapsle		mimo kapsli		uvnitř kapsle		mimo kapsli		uvnitř kapsle		mimo kapsli	
	LA	BB	LA	BB	LA	BB	LA	BB	LA	BB	LA	BB	LA	BB	LA	BB
A	66,7	70	97,1	100	68,7	55	60	61,1	57,1	58,8	0	0	72,7	58,3	75	50
B	60	29,4	87,5	100	78,3	57,1	45,5	66,7	70,6	58,3	0	0	63,6	58,8	60	57,1
C	89,5	50	71,4	96,3	76,5	80	82,6	75	84,6	95,5	66,7	100	69,2	69,2	75	75
D	94,7	93,7	96,8	93,7	80	70	75	78,9	85,7	88,2	100	66,7	66,7	73,3	66,7	66,7
E	84,6	96,9	92,3	92,3	84,6	78,9	72,7	78,9	88,9	90	66,7	100	70,8	70,8	60	66,7
F	92,9	85,7	90	71,4	81,2	81,8	76,9	80	90,5	89,5	66,7	66,7	75	73,9	66,7	66,7
G	58,3	70	100	75	75	75	77,8	75	52,6	64,5	66,7	66,7	66,7	75	75	60
H	100	75	80	75	/	/	95	91,7	60	75	66,7	66,7	/	/	80	71,4
I	100	100	75	66,7	/	/	100	90,9	80	75	66,7	66,7	/	/	62,5	66,7
	6 dní kyselina octová 3%				4 týdny kyselina octová 3%				6 dní Směs voda: olej v poměru 1:4				4 týdny Směs voda: olej v poměru 1:4			
	uvnitř kapsle		mimo kapsli		uvnitř kapsle		mimo kapsli		uvnitř kapsle		mimo kapsli		uvnitř kapsle		mimo kapsli	
	LA	BB	LA	BB	LA	BB	LA	BB	LA	BB	LA	BB	LA	BB	LA	BB
A	56,5	52	48,2	45,0	64,7	45	60	50	70,6	75	69,5	65,0	60,9	66,7	50	45,5
B	36,4	41,7	39,0	33,3	53,6	54,5	50	33,3	45,5	73,3	50	58,1	73,3	61,9	50	54,5
C	85,7	86,2	66,7	25	76,5	75	83,3	66,7	89,5	88,2	96	95,7	72,2	69,6	62,5	66,7
D	87,5	85,7	50	35,0	85,7	86,7	66,7	66,7	87,5	83,3	95	84,6	72,2	70,6	70	66,7
E	83,6	87,5	50	33,3	76,5	73,7	75	66,7	83,3	90,5	77,8	84,6	72,2	65	62,5	57,1
F	88,5	85,7	66,7	30,2	77,8	75	66,7	66,7	87,5	85	77,8	94,1	97,4	70	60	70
G	72,2	50	66,7	39,5	73,3	71,4	50	50	80,8	86,4	90	80	80	75	66,7	66,7
H	83,3	66,7	60	66,7	/	/	88,9	83,3	71,4	77,8	80	75	/	/	66,7	75
I	75	84,6	75	55	/	/	83,3	83,3	83,3	75	100	100	/	/	77,8	80

Pozn.: A) alginát, 300 μm ; B) alginát, 450 μm ; C) alginát škrob (4:1); D) alginát škrob (2:1); E) alginát CMC (4:1); F) alginát CMC (2:1); G) 4% alginát; H) chitosan škrob (4:1); I) chitosan škrob (2:1)

V případě skladování v modelové potravine s obsahem oleje bylo po 6 dnech stanoveno v částicích mezi 15 % a 25 % mrtvých buněk. Počet mrtvých bakterií, které byly uvolněny z částice, byl nejčastěji do 20 %. V kyselém prostředí byl podíl mrtvých buněk, které se nacházely mimo částici, nad 50 %, především pak u kmene *Bifidobacter breve*.

Po 4 týdnech skladování ve vodném prostředí byl počet mrtvých buněk uvnitř kapsle stanoven pod 25%, jen u částic z alginátu byl počet mrtvých bakterií nad 30 %. Mimo částici byl počet mrtvých buněk mezi 20-40 %, pouze u chitosanových částic modifikovaných škrobem bylo mrtvých bakterií pod 10%. Množství uvolněných buněk bylo u většiny částic 50-60 % enkapsulovaného množství. V prostředí alkoholu byl počet uvolněných bakterií z částic za 4 týdny od 10 % do 20 %, z toho množství bylo 30 % až 50 % mrtvých buněk. Uvnitř kapsle byl počet mrtvých buněk stanoven mezi 20% až 30 %. V kyselém prostředí bylo po čtyřech týdnech uvolněno do 30 % enkapsulované množství buněk. Částice obsahovaly v průměru okolo 30 % mrtvých buněk, mimo částici bylo mrtvých buněk zhruba o 10 % více. Po 4 týdnech v modelovém tučném prostředí bylo uvolněno 40% z původního počtu bakterií a částice obsahovaly více než 60 % živých buněk. Enkapsulované probiotické bakterie lze tedy považovat za poměrně stabilní i při dlouhodobém uchování v různých modelových podmínkách

V případě částic, u kterých bylo v úvodním experimentu při enkapsulaci probiotik dosaženo nejlepších výsledků stability a které byly rovněž použity k enkapsulaci zeleného ječmene, byla dále přesněji posuzována jejich dlouhodobá stabilita. U částic byla sledována nejen viabilita a množství uvolněných buněk, ale rovněž nárůst buněk uvnitř částice. Enkapsulovány byly buňky bez média.

Vyšší uvolněné množství enkapsulovaných buněk bylo zaznamenáno u částic z alginátu při použití typu kapsle, rovněž byl u těchto částic stanoven zvyšující se podíl mrtvých buněk. Jev může být způsoben vyšší nestabilitou částic a nižší difúzí živin do středu částic v porovnání s případy, kdy jsou buňky dispergovány v celém objemu. U ostatních částic bylo zaznamenáno pouze minimální uvolněné množství enkapsulovaných probiotických buněk (do 1%), a to ve všech typech testovaných modelových prostředí.

V částicích byl rovněž pozorován nárůst mikroorganismů. Nejnižší množství bylo zaznamenáno u chitosanových částic, kde byl nárůst buněk okolo 10%. U alginátových částic byl zaznamenán vyšší nárůst buněk, v průměru okolo 50%. Nejvyšší nárůst buněk byl stanoven u alginát-škrobových a chitosan-agarových, kde bylo stanoveno již po týdnů 100% navýšení počtu buněk ve všech typech modelových prostředí. Agar tedy zmírňuje nepříznivé prostředí chitosanu a může sloužit jako substrát pro buňky. Stejně tak škrob, v případě alginátových částic, slouží zřejmě jako substrát.

Dále byla ověřována viability enkapsulovaných a uvolněných buněk. Viabilita buněk v polysacharidových částicích byla v jednotlivých prostředích velmi podobná, rovněž mezi jednotlivými částicemi nebyly znamenány příliš výrazné rozdíly. U všech testovaných částic bylo po měsíci v částicích zaznamenáno v průměru 25% mrtvých. Po dvou měsících skladování v modelových potravinách byl počet mrtvých buněk v částicích v průměru 50%. Nejvíce živých buněk bylo stanoveno v alginát-škrobových a alginátových částicích. V případě uvolněných buněk vykazovala viabilita shodný trend jako v částicích, přičemž u uvolněných buněk bylo stanoveno v průměru o 10% vyšší množství mrtvých buněk. Výraznější podíl mrtvých buněk v provedeném experimentu je výsledkem nedostatku živin v modelových potravinách.

Výsevem částic na pevná média po skončení experimentu byla rovněž ověřena životaschopnost buněk. V případě většiny částic, došlo okolo částic na pevném médiu k nárůstu kolonií. Pouze čistě chitosanové částice poskytly negativní výsledek a po dvouměsíčním skladování nebyl zaznamenán na pevných médiích růst takto enkapsulovaných buněk.

Obecně byl jako nejvhodnější materiál pro enkapsulace buněk zvolen alginát. Je možné, že buňky dokážou v určité míře využít alginát jako substrát, kdežto chitosan může působit spíše mírně antimikrobiálně. Nejvhodnějšími částicemi byly s nejvyšším počtem buněk v částicích a s nejvyšší viabilitou buněk stanoveny alginát škrobové částice (poměr 4:1) a dále chitosan agarové částice. Agar zmírňoval nepříznivé prostředí chitosanu, zpevňoval částice a pro buňky sloužil jako substrát. Z dosažených výsledků vyplývá, že částice byly v modelových potravinách poměrně stabilní. Obecně lze tedy konstatovat, že enkapsulace významně prodlužuje dlouhodobou životaschopnost a biologickou aktivitu probiotik i v nepříznivém vnějším prostředí.

Byl tedy potvrzen, stejně jako v řadě dalších studií [104, 105], pozitivní vliv enkapsulace na ochranu mikrobiálních buněk před nejrůznějšími negativními vlivy prostředí.

5.5.5 Stanovené dlouhodobé stability částic s probiotiky v prostředí reálné potravin

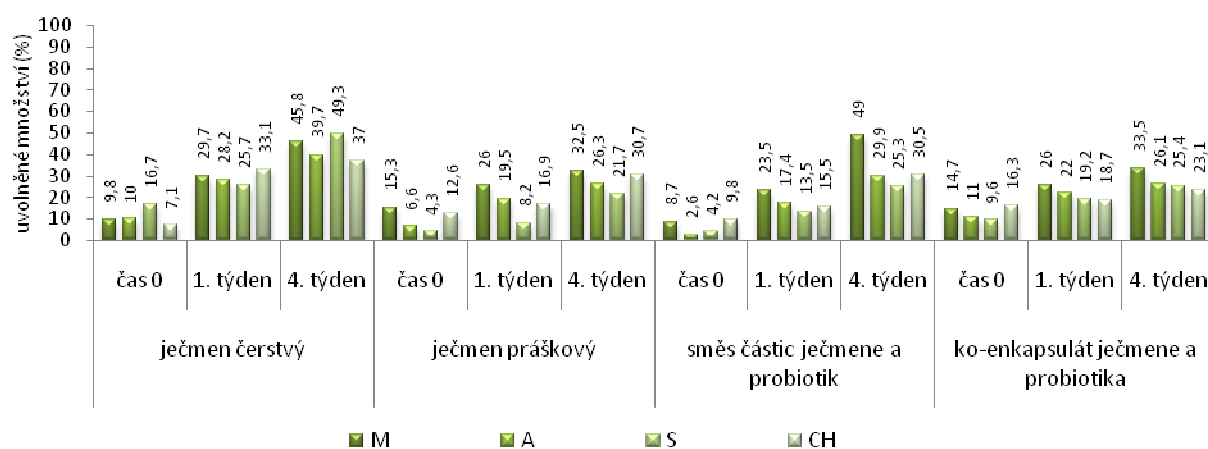
Dále byla sledována stability částic v reálných potravinách. Použity byly mléko, jogurtový nápoj Actimel, selský jogurt a choceňský smetanový jogurt.

V úvodním experimentu byla sledována stabilita různých typů částic v mléce. Po 6 dnech skladování bylo uvolněno (Tabulka 63) v průměru okolo 10 % enkapsulovaného množství buněk, u alginátových částic však nebyly pozorovány žádné uvolněné buňky. Ve všech případech bylo mimo částici 90 % buněk živých. Uvnitř kapsle bylo rovněž takřka 100% buněk živých, pouze u některých alginátových částic byl počet mrtvých buněk přibližně 10 %.

Tabulka 63. Uvolněné množství buněk z částice a procenta živých bakterií v kapsli i mimo kapsli - reálná potravina - mléko

%	6 dní mléko						4 týdny mléko					
	uvnitř kapsle		mimo kapsli				uvnitř kapsle		mimo kapsli			
	viability buněk		viability buněk		uvolněno		viability buněk		viability buněk		uvolněno	
	LA	BB	LA	BB	LA	BB	LA	BB	LA	BB	LA	BB
alginát, 300 µm	100	87,5	/	/	0	0	85	81,2	92,9	77	11,5	9,3
alginát, 450 µm	100	80	/	/	0	0	81	75	85,7	75	9,2	10,8
alginát škrob (4:1)	100	100	96,3	95,9	2,2	3,8	86,7	88,9	94,5	92,9	9,5	7,9
alginát škrob (2:1)	100	100	92,9	87,2	16,9	11,5	92,9	98	90,0	87,7	11,2	6,0
alginát CMC (4:1)	100	100	94,4	95,0	1	1	92,9	87,5	90,1	92	43,3	43,4
alginát CMC (2:1)	100	100	89,9	91,3	4,5	6,0	92,9	88,9	88,9	89,6	48,6	41,9
4% alginát	88,9	95,5	/	/	0	0	82,4	88,2	87,5	87,5	4,9	3,8
chitosan škrob (4:1)	100	100	96,6	95,3	1,9	3,2	89,2	90,6	100	100	34,5	33,9
chitosan škrob (2:1)	100	100	96,7	89,3	2,5	6,5	87,5	90,0	100	100	41,9	43,1

Po 4 týdnech, kdy byly částice skladovány v mléce, se počet mrtvých bakterií v částicích navýšil, ale pouze o necelých 10%. Mimo částici se nacházelo přibližně 10-50 % enkapsulovaného množství bakterií, z toho bylo u všech částic nad 80 % buněk živých. V částicích současně došlo i k nárůstu buněk, který byl podrobně sledován v dalším experimentu (Graf 48), kde byly také porovnány všechny testované reálné potraviny.

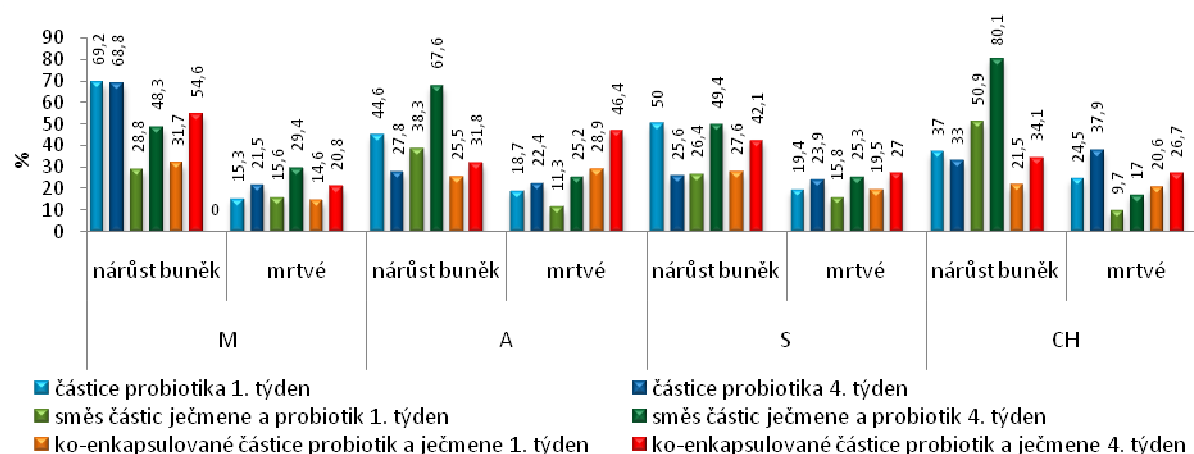


Graf 47. Dlouhodobá stabilita částic (alginát-matrix) v reálných potravinách – množství uvolněných polyfenolů

zkratky: Polotučné čerstvé mléko pasterované (M), jogurtový nápoj Actimel (A), Selský jogurt bílý (S), a Choceňský smetanový jogurt (CH)

V reálných potravinách byla sledována stabilita alginátových částic obsahující probiotika i stabilita částice s enkapsulovaným zeleným ječmenem. Analýze byly podrobeny rovněž koenkapsulované částice a směsné preparáty.

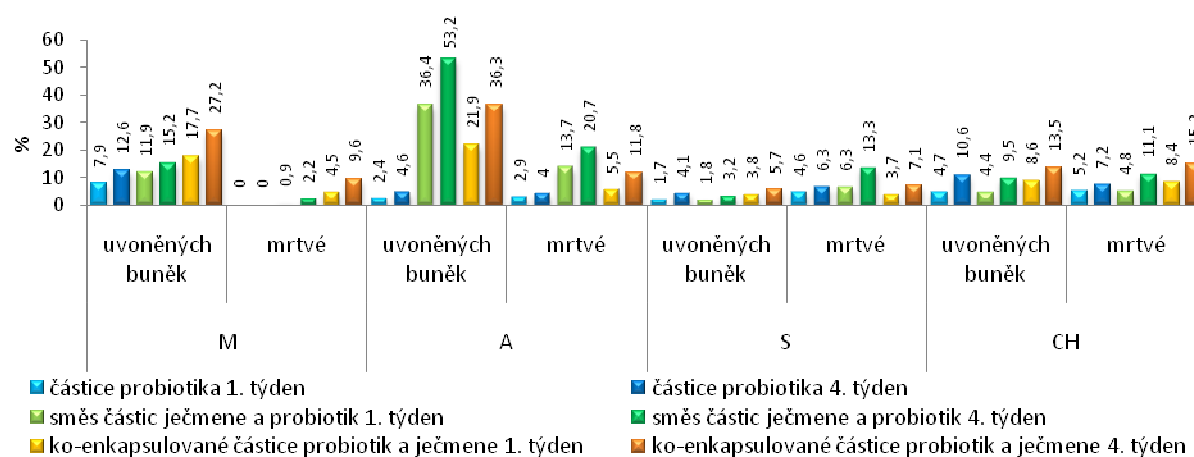
Nejméně stabilní byly dle uvolněných polyfenolů ve všech typech reálných potravin stanoveny částice obsahující čerstvý zelený ječmen (Graf 47). Srovnáním částic, kdy v prvním případě byly smíchány enkapsulované částice obsahující práškový ječmen a probiotika a v druhém případě byly extrakty ječmene s probiotiky nejprve smíchány a poté koenkapsulovány je patrné, že v případě koenkapsulace u částic došlo k většímu uvolnění polyfenolů než v případě směsných částic. Částice s enkapsulovaným čerstvým ječmenem byly nejvíce stabilní v choceňském smetanovém jogurtu. Ostatní částice vykazovaly nejvyšší stabilitu v selském jogurtu. Nicméně stabilita částic ve všech reálných mléčných produktech byla z hlediska uvolněných polyfenolů velmi podobná.



Graf 48. Dlouhodobá stabilita částic obsahujících probiotické kultury v reálných potravinách – nárůst buněk v částici a jejich viability %

Polotučné čerstvé mléko pasterované (M), jogurtový nápoj Actimel (A), Selský jogurt bílý (S), a Choceňský smetanový jogurt (CH)

Částice obsahující probiotické kultury byly dále analyzovány pomocí mikroskopických metod. Bylo stanoveno množství a životnost buněk v částicích (Graf 48) a v okolním prostředí (Graf 49) po týdnu a měsíci skladování.



Graf 49. Dlouhodobá stabilita částic obsahujících probiotické kultury v reálných potravinách - uvolněné množství buněk z částic a jejich viability %

Polotučné čerstvé mléko pasterované (M), jogurtový nápoj Actimel (A), Selský jogurt bílý (S), a Choceňský smetanový jogurt (CH)

Měření byla provedena na fluorescenčním mikroskopu za pomoci barvení částic fluoresceindi-acetátem a propidiumjodidem.

Z výsledků je patrné, že i po 4 týdnech je zachována vyhovující viabilita buněk ve všech testovaných prostředích. Alginátový materiál tedy zajišťuje dobrou difúze živin dovnitř částic. Stejně tak je z výsledků zřejmé, že u směsí či koenkapsulací ječmene nedošlo k ovlivnění viability buněk, ve druhém případě byla zjištěna pouze nižší koncentrace buněk v částicích.

Nejvyšší nárůst a viabilitu zejména pak při skladování v mléce vykazovaly částice s obsahem čistě probiotické směsi bakterií. Jev je způsoben dostatkem živin v mléce, které difundují do částice. Vynikající viabilita buněk v částicích uchovávaných v mléce byla zachována i po čtyřech týdnech skladování. U směsných částic a u koenkapsulovaných částic byl ve 4. týdnu již zaznamenán pokles počtu buněk v částicích, stejně jako nižší viabilita. Co se týče množství uvolněných buněk, vyšší hodnoty byly zjištěny u jogurtového nápoje Actimel, kde byla detekována i výraznější úmrtnost buněk. Je možné, že vysoká úmrtnost byla způsobena vysokým množstvím buněk a nedostatkem vhodných živin v tomto prostředí.

Závěrem lze konstatovat, že aplikace částic obsahující probiotika je možná do široké skupiny mléčných výrobků, a to nejen z důvodu ochrany buněk před negativním vlivem technologických kroků, ale i pro poskytnutí dostatečné ochrany před účinky žaludeční šťávy a schopnost řízeného uvolňování buněk v prostředí střev. Zejména na dosažení těchto vlastností se zaměřují nejnovější výzkumy, protože pouze při dostatečné životaschopnosti jsou probiotika schopny plnit svoji funkci [110, 113, 117, 118]. Mezi hlavní funkce probiotik patří zachování zdravé střevní mikroflóry, zamezení růstu patogenních bakterií a stimulace imunitního systému [113, 116].

Z výsledků můžeme usoudit, že pomocí enkapsulátoru je možné úspěšně enkapsulovat oba typy probiotických bakterií do několika druhů polysacharidových obalů. Většina takto připravených částic je stabilní i po delší dobu a enkapsulované bakterie si udržují svou životaschopnost. Vhodným obalovým materiálem probiotických kultur byl stanoven alginát případně směs alginátu se škrobem, který vykazoval dostatečnou stabilitu i schopnost řízeného uvolňování. Vhodným postupem je enkapsulace za vzniku částic typu matrix, kdy je zajištěna lepší difúze živin k buňkám dispergovaných v celém objemu oproti typu kapsule. Testované částice umožňuje rovněž dostatečný prostor pro nárůst buněk a také ochranu před převahou startovacích kultur v mléčných produktech.

Enkapsulace dále rozšiřuje pole aplikace i mimo mléčné výrobky. Díky dostatečné stabilitě polysacharidových částic, zejména v kyselém prostředí, a zachování viability buněk i při dlouhodobějším skladování do úvahy připadají i různé ovocné šťávy a sirupy. Tyto aplikace potvrzují i další výzkumné skupiny [115, 120]. Částice obsahující probiotika je možné navíc kombinovat i s komplexními prebiotiky, jako je například zelený ječmen a vytvářet jak koenkapsuláty, tak směsné částice. Přípravky s probiotiky/prebiotiky s řízeným uvolňováním by bylo možné použít jako kvalitní doplněk k podpoře zdravého životního stylu.

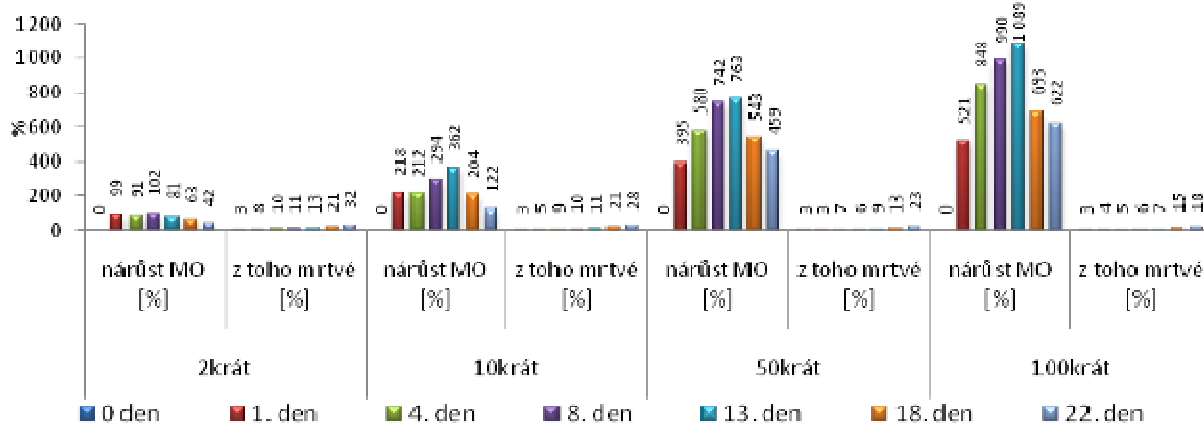
5.5.6 Optimalizace množství biomasy

U částic s obsahem probiotických kultur byla sledována schopnost růstu buněk a jejich viabilita v přítomnosti/nepřítomnosti média. Dále byla provedena studie, která sledovala vliv výchozí koncentrace buněk v médiu na počet a viabilitu enkapsulovaných probiotických buněk. Byly provedeny dva experimenty – v prvním případě byly enkapsulovány buňky s médiem, v druhém případě bylo médium odstraněno centrifugací a enkapsulovány byly pouze buňky. Oba experimenty byly připraveny z kultur zředěných na různou koncentraci buněk.

Po dobu 22 dní byla sledována míra uvolnění buněk z částic a jejich viabilita, stejně jako počet a viabilita buněk v částicích v modelovém vodním prostředí.

Tabulka 64. Výchozí koncentrace buněk určených k enkapsulaci

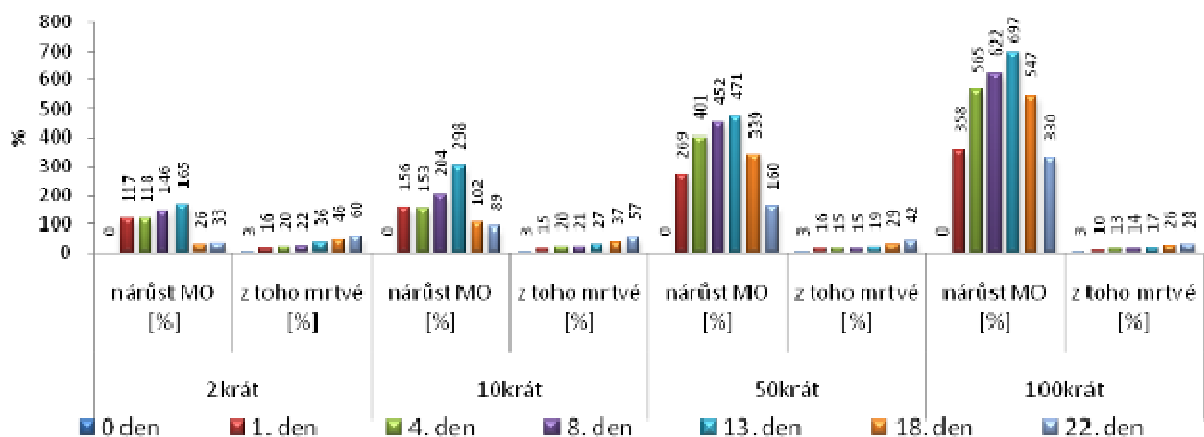
koncentrace inokula (počet buněk/ml)		podíl mrtvých buněk [%]	koncentrace buněk směsné kultury po zředění (počet buněk/ml)			
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. breve</i>	3	2krát	10krát	50krát	100krát
$4,63 \cdot 10^8$	$3,86 \cdot 10^8$		$2,12 \cdot 10^8$	$4,24 \cdot 10^7$	$8,49 \cdot 10^6$	$4,24 \cdot 10^6$



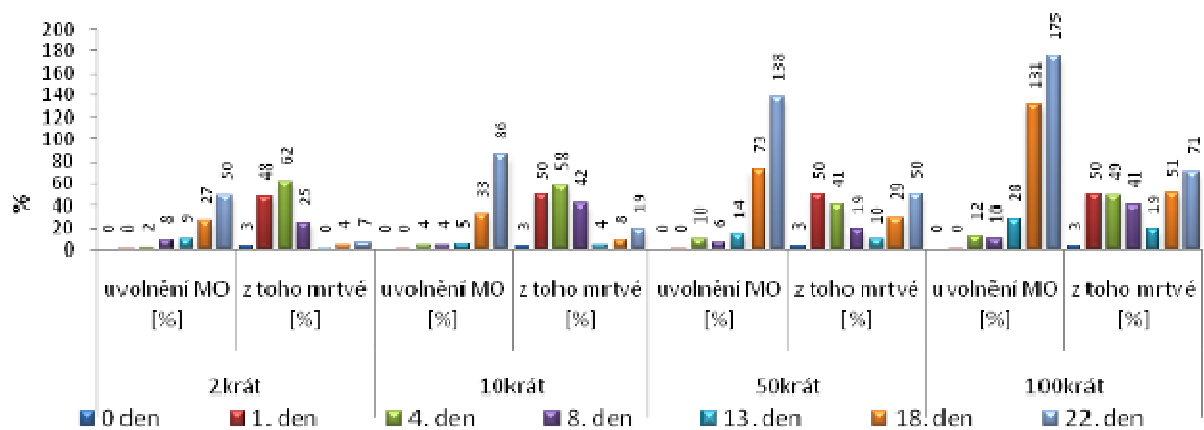
Graf 50. Probiotika s médiem – nárůst a viabilita v částicích

Při srovnání různých výchozích koncentrací probiotických buněk lze konstatovat, že nižší počáteční koncentrace buněk v částicích má pozitivní vliv na množství a růst enkapsulovaných probiotik (Graf 50). Exponenciální fáze růstu buněk trvala v částicích až do 13. dne, poté nastala stacionární fáze růstu a byl pozorován postupný úbytek buněk, které byly ve vyšší míře uvolňovány do okolí. Tento trend je patrný zejména v případě vyššího zředění.

Pokud jsou tedy buňky dostatečně naředěny a je dostupný dostatek živin, velmi rychle se množí i v prostředí částice (nárůst přes 900 % po 8 dnech u 100násobného zředění). Intenzita množení roste s mírou zředění, a tedy s poklesem výchozího počtu buněk. V případě vyšší počáteční koncentrace buněk nebylo zřejmě zajištěno dostatečné množství živin pro jejich růst.



Graf 51. Probiotika bez média – nárůst a viabilita v částicích



Graf 52. Probiotika bez média – uvolněné množství buněk a jejich viabilita

V případě enkapsulace buněk bez média (Graf 51) byla zjištěna vyšší úmrtnost, než tomu bylo v případě jeho přítomnosti v částicích. Exponenciální fáze však rovněž trvala přibližně do 13. dne. Ve srovnání s částicemi s obsahem média byl však nárůst buněk nižší, zhruba 1,5krát.

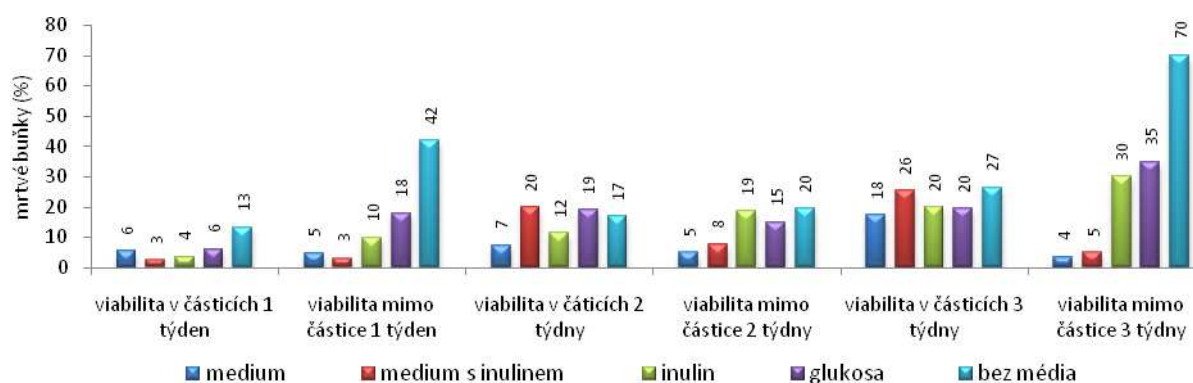
Množství uvolněných buněk do prostředí bylo naopak výrazně nižší (Graf 52). Úmrtnost uvolněných narůstala od 13. dne skladování. Vzhledem k tomu, že počet buněk v částicích po 13. dnu klesá, je patrné, že nastává intenzivnější uvolňování buněk do prostředí a v okolním prostředí bez přítomnosti živin docházelo k vyššímu odumírání buněk.

Pro aplikaci do reálných potravin je stěžejní zajištění stability částic a viability buněk po minimální trvanlivost daného výrobku. Dle toho parametru je třeba nastavit výchozí koncentraci probiotik tak, aby ve zvoleném termínu narostly do požadovaného množství, se zachováním jejich optimální aktivity a viability i při konzumaci. Dle dosažených výsledků lze doporučit maximální dobu úchovy do 14. dne, přičemž výchozí koncentrace buněk by se měla pohybovat v řádu 10^6 CFU·ml⁻¹ média.

5.5.7 Zachování viability buněk v částicích

Jak již bylo stanoveno, pro zachování vyšší viability částic a zajištění vyšší koncentrace buněk v produktech, by bylo vhodné zajistit dostatek živin ve výrobku, případně přímo v částicích.

Mikrobiální médium však není dle sensorického hlediska nejvhodnější volbou. Byla tedy testována možnost jeho nahrazení přísadami glukosy, respektive inulinem. Jako modelové byly použity alginátové částice.



Graf 53. Srovnání dlouhodobé stability částic - přidavek různých živin - viability buněk v částicích a mimo částice

Výsledky potvrzují, že při zajištění dostatečného množství živin v částicích, případně v potravině mají buňky v částicích vynikající viabilitu po dobu 14 dní. Po této době již dochází k výrazné dezintegraci částic vlivem růstu buněk a rovněž k poklesu jejich viability. Naopak při nedostatku živin nedochází k tak výraznému růstu a následnému uvolňování buněk, avšak viabilita buněk a jejich koncentrace v částicích je nižší. Optimálním řešením je nižší výchozí koncentrace buněk a adekvátní množství živin. Ideální je obohacení částic o zdroj živin ve formě různých využitelných polysacharidů (prebiotik), například inulinu (Graf 53). Buňky v tomto případě dosahovaly ideální rychlosti růstu, nedocházelo k tak výraznému uvolnění buněk jako v případě enkapsulace buněk s médiem a rovněž viabilita buněk byla během skladování v modelovém vodném prostředí vyhovující. Po dvou týdnech bylo v částicích pouze 11,5% mrtvých buněk, po třech týdnech obsahovaly tyto částice 30% mrtvých buněk, přičemž nárůst buněk během skladování dosahoval 10násobku původní koncentrace. Prebiotika navíc mohou sloužit jako částečný zdroj živin v průběhu skladování, ale i v tenkém stěvě po požití částic. Zdravotní přínos pro spotřebitele by byl v takovém případě vyšší.

Na závěr byla jako jedna z možností zachování dlouhodobější viability buněk při skladování enkapsulovaných mikroorganismů zvolena lyofilizace. Proces lyofilizace je v případě probiotik velmi užívanou metodou v přípravě komerčních preparátů. Enkapsulované preparáty byly lyofilizovány a uchovány v chladu a suchu po dobu jednoho měsíce.

Poté byla stanovena viabilita buněk v těchto preparátech a porovnána s ne-enkapsulovanými lyofilizovanými buňkami a s výsledky před enkapsulací. Stanovení bylo provedeno pomocí průtokové cytometrie a barvení propidiumjodidem. Lyofilizované částice byly dezintegrovány a ponechány ve fyziologickém roztoku několik hodin, uvolněné buňky byly poté obarveny a stanoveny. Ve všech testovaných typech částic byly po lyofilizaci přítomny převážně živé buňky. Viabilita buněk byla tedy shodná s viabilitou buněk před enkapsulací a lyofilizací. Rovněž ne-enkapsulované buňky po lyofilizaci, vykazovaly velmi dobrou viabilitu. Zachování viability buněk v lyofilizovaných částicích se předpokládá na několik měsíců. Mikrokapsle v podobě suchého preparátu rovněž umožňují snadnou manipulaci.

Částice po rehydrataci však nedosahovaly stejných mechanických vlastností jako čerstvě připravené částice. Došlo k poklesu jejich mechanické stability, částice rychleji degradovaly a uvolňovaly enkapsulované buňky. Po rehydrataci jsou tedy částice určeny spíše k rychlejší spotřebě (v rádech hodin až dnů) než pro dlouhodobé uchování. Částice s probiotickou kulturou s/bez přídavku různých prebiotik je tedy možné použít jako lyofilizovaný doplněk stravy. Takovýto výrobek by bylo možné re-hydratovat v různých mléčných výrobcích, džusech či vodě. Po konzumaci by byl zajištěn transportovat probiotické buňky s vysokou viabilitou do cílového prostředí střev.

5.6 Anorganické nanočástice a možnosti jejich kombinace s organickými částicemi

Tato kapitola byla řešena v rámci pobytu Erasmus na Linköping University ve skupině doc. Daniela Aili, která se zabývá vývojem nanomateriálů pro medicínské aplikace, zejména pro aplikace v diagnostice, řízeném uvolňování léčiv a regenerativní medicíně.

5.6.1 Zlaté nanočástice

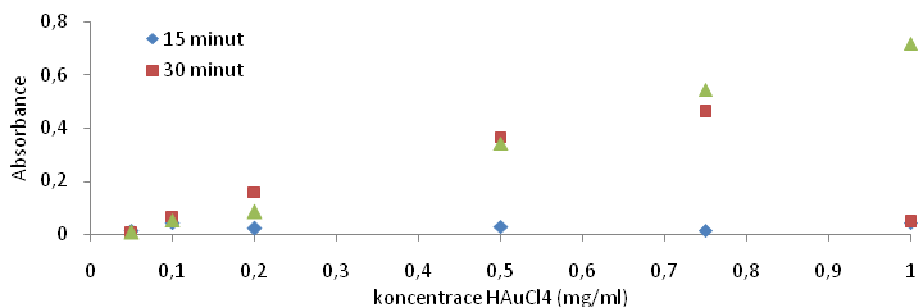
Zlaté nanočástice mají rozsáhlé využití v oblasti biosenzorů, katalyzátorů, v plazmonice, elektronice a nanomedicíně, například v diagnostice či transportu léčiv. Také mnohé kosmetické produkty využívají nanočástic zlata coby nosiče aktivních látek za účelem zvýšení jejich průniku do pokožky.

Vzhledem k jejich širokému použití a využití, byla vyvinuta řada metod pro jejich syntézu. Téměř ve všech těchto metodách, je základním principem přípravy částic redukce Au(III) na Au(0). Kromě redukčního činidla, se v některých případech používají také různá stabilizační činidla, která se přidávají do reakční směsi, aby se zabránilo agregaci syntetizovaných nanočástic [127, 128, 129].

5.6.2 Příprava zlatých nanočástic - metoda fotochemické syntézy

V této práci byly zlaté nanočástice připraveny velmi jednoduchou a rychlou metodou fotochemické syntézy. V této syntéze, dochází k redukci Au působením radikálů generovaných působením UVA záření na fotoiniciátor Irgacure-2959 (Irg) [171].

Touto metodou jsou syntetizovány většinou monodisperzní sférické zlaté nanočástice, které jsou stabilní v suspenzi. Faktory, které mají vliv na velikost a tvar syntetizovaných zlatých nanočástic, jsou například koncentrace reaktantů (zlaté soli a Irg) a doba ozařování [171]. Přesný postup přípravy zlatých nanočástic je uveden v kapitole 4.22.

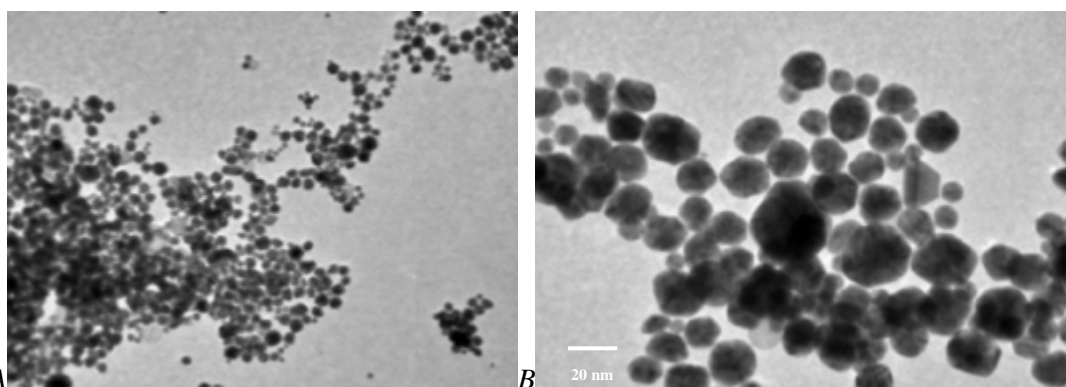


Graf 54. Vliv koncentrace reaktantů a doby ozařování na množství připravených nanočástic zlata

V práci byla nejprve testována nejvhodnější koncentrace obou reaktantů a jejich vhodný poměr. Dále byla sledována vhodná doba syntézy (doba ozařování UVA zářením). Z výsledků je patrné, že při vzrůstající koncentraci reaktantů je třeba delší doby ozařování pro vznik nanočástic. Doba ozařování lze zkrátit přidáním vyššího množství fotoiniciátorů. Jako nejvhodnější byly vyhodnoceny vzorky s následujícím obsahem reaktantů: 0,1 mg/ml HAuCl₄; 1 mM Irg a 0,2 mg/ml HAuCl₄; 4 mM Irg. Doby syntézy nanočástic, při daných koncentracích reaktantů, byly 15 minut. V případě potřeby získání velkého množství nanočástic je poté vhodné použít směs reaktantů o koncentraci 1 mg/ml HAuCl₄ a 10 mM Irg, při tomto složení je však potřebná doba ozařování 45 minut.

U syntetizovaných zlatých nanočástic byla rovněž, měřením pomocí DLS, stanovena jejich průměrná velikost a distribuce jejich velikostí. Obecně lze konstatovat, že bylo při syntéze zlatých nanočástic fotochemickou syntézou dosaženo průměrné velikosti 30-70 nm.

Velikost a tvar syntetizovaných zlatých nanočástic byl sledován pomocí elektronové mikroskopie (Obrázek 18). Kde bylo potvrzeno, že během testované syntézy docházelo k přípravě sférických nanočástic.



Obrázek 18. Zlaté nanočástice syntetizované fotochemickou syntézou (TEM); A) 56000x; B) 190000x

V dalších testech byl rovněž sledován vliv pH na syntézu nanočástic, především na jejich tvar a velikost. Z výsledků je jasně patrné, že při nižším pH docházelo k syntéze menších nanočástic, navíc částice si zachovaly sférický tvar i syntetizované množství.

Velikost částic závisela rovněž na koncentraci použitých reaktantů. Při použití nižších koncentrací bylo možné připravit menší částice, při použití koncentrace 0,2 mg/ml HAuCl₄ a 4 mM Irg byla průměrná velikost 20 nm. Při dvojnásobné koncentraci reaktantu byla průměrná velikost 50 nm. Se vzrůstající koncentrací tedy velikost syntetizovaných zlatých nanočástic rostla.

Velikost nanočástic zlata lze velmi jednoduše sledovat rovněž pomocí spektrofotometrie. Při měření pomocí UV-VIS spekter, lze vzrůstající velikost nanočástic detekovat posunem absorpčního maxima do delších vlnových délek. Tento posun je přímo úměrný změny velikosti nanočástic.

Optické vlastnosti zlatých nanočástic vyplývají z frekvence oscilace volných elektronů kovu na jeho povrchu. Tyto rezonanční oscilace jsou známy jako povrchové plazmony [176].

V případě malých monodisperzních nanočástic zlata povrchová plazmonová rezonance způsobuje absorpci světla v modro-zelené oblasti, zatímco červená spektra se odráží. Tím získáme povětšinou sytě červené zbarvení roztoku nanočástic. Se zvyšující se velikostí nanočástic, dochází k absorpčním posunům do delších, červených vlnových délek. Červené světlo je pak absorbováno, a modré světlo se odráží. Tím získávají roztoky fialové, až modré zbarvení [176].

Tento jev je pozorovatelný i při agregaci, či imobilizaci nanočástic, kdy se barva roztoku mění z červené na modrou. Koloidní nanočástice zlata malých rozměrů (5-40 nm) se tedy jeví jako jasně červené. U většiny nanočástic (velikost 30-40nm) je dosaženo absorpčního maxima v oblasti 530 nm. U menších nanočástic (5-10nm) je toto maximum posunuto do oblasti 520 nm [176]. Optické vlastnosti nanočástic zlata jsou dále závislé nejen na jejich velikosti, ale i tvaru či povrchu. Díky těmto unikátním vlastnostem lze jednoduše pozorovat viditelné změny a detekovat je měřením absorbance.

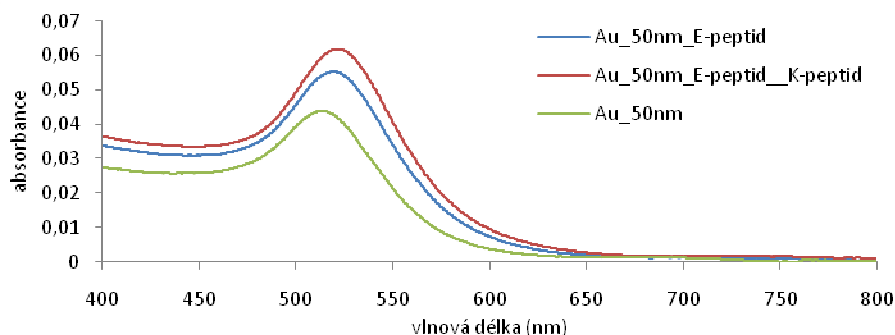
5.6.3 Imobilizace zlatých nanočástic

5.6.3.1 Imobilizace zlatých nanočástic na skleněné povrchy a jejich následná funkcionalizace

V tomto testu byly k imobilizaci použity komerční sférické zlaté nanočástice o velikosti 50 nm. Imobilizace nanočástic na povrch byla provedena pomocí polyelektrolytické vícevrstvy, která je založena na principu střídání vrstev s opačným nábojem. Jako nejvhodnější byla zvolena imobilizace za využití 5 vrstev (PEI, PSS, PAH, PSS, PAH). Nevhodnější doba imobilizace stanovena na 15 hodin. Po delší době docházelo ještě k další imobilizaci částic, ale toto množství již nebylo vzhledem časové náročnosti dostačující. Zlaté nanočástice imobilizované na skleněném povrchu byly dále funkcionalizovány peptidy a kratšími sekvencemi DNA, kap. 4.23. Imobilizace aktivních látek na povrch nanočástic byl potvrzen pomocí UV-VIS měření, kde při úspěšné imobilizaci došlo k nárůstu absorpce a posunu absorpčního maxima do delších vlnových délek.

Tento posun je přímo úměrný změny velikosti funkcionalizovaných nanočástic. Například při imobilizaci E-peptidem, došlo k posunu absorpčního maxima z 514 nm na 518 nm, což je již velmi výrazná a dobře měřitelná změna. Z výsledků vyplývá, že nejvhodnější doba imobilizace peptidů, na povrch nanočástic, je 1 hodina. Při delší imobilizaci již nedocházelo k významným změnám. Při imobilizaci K-peptidem došlo k výraznějším posunu absorpčního maxima, než tomu bylo u E-peptidu. Přesněji, maximum se posunulo z 514 nm na 519 nm. K-peptid je větší než E-peptid. Tento posun tedy opět potvrzuje, že jeho velikost je přímo úměrná změně velikosti imobilizovaných nanočástic.

Při testování byl pozorován také vliv teploty na množství imobilizovaných struktur. Testování bylo provedeno při dvou různých teplotách, a to při laboratorní teplotě 25°C a při 50°C. U všech testovaných vzorků nedocházelo vlivem teploty k významným změnám. Všechny ostatní postupy imobilizace byly tedy prováděny při laboratorní teplotě.



Graf 55. Funkcionalizace zlatých nanočástic imobilizovaných na skleněném povrchu pomocí kombinace E a K peptidů – UV-VIS měření

Pro zvětšení posunu absorpčního maxima byla testována také imobilizace pomocí kombinace obou používaných peptidů (E a K), které je možno vzájemně vázat do dvou-šroubovice [172]. Při tomto testu bylo dosaženo absorpčního posunu 7 nm (Graf 55).

K funkcionalizaci zlatých nanočástic lze použít i řada dalších látek, jako jsou proteiny, či DNA. Toto bylo v práci potvrzeno testováním imobilizace nanočástic různými krátkými sekvencemi DNA. Velkou výhodou takto funkcionalizovaných zlatých nanočástic je nejen snadná manipulace s nimi, jelikož jsou imobilizovány na skleněném povrchu, ale také možnost jejich regenerace a opakovaného použití.

Velmi jednoduchou metodou regenerace je například působení regeneračních roztoků HCl o různém pH. V našem případě byl jako nejvhodnější roztok pro regeneraci imobilizovaných peptidů zvolen roztok o pH 3. Snížením pH, lze částice nejen regenerovat pro další použití, ale rovněž může sloužit k řízenému uvolňování imobilizovaných složek.

Zlaté nanočástice s imobilizovanými antimikrobiálními peptidy by tak mohly být vhodné pro aplikace do různých potravinových obalů, kde by mohlo být vlivem pH řízeno pozvolné uvolňování antimikrobiální složky. Díky barevné změně (větší imobilizované částice mají fialové až modré zbarvení, naopak částice bez imobilizace mají barvu červenou) by rovněž mohly sloužit i jako senzor snižujícího se pH, blížící se doby spotřeby, apod.

5.6.3.2 Funkcionalizace zlatých nanočástic

Obdobným způsobem, jak bylo postupováno při imobilizaci aktivních látek na zlaté nanočástice na skleněném povrchu, lze různé látky imobilizovat i na volné zlaté nanočástice v roztoku.

Na zlaté nanočástice byly opět úspěšně imobilizovány postupně oba komplementární peptidy, což bylo potvrzeno posunem absorpčního maxima při spektrofotometrickém měření.

Lze tedy také konstatovat, že další možná použitelnost těchto částic je jako velmi rychlá detekce přítomnosti peptidových či proteinových látek v roztocích a snadná identifikace jejich velikosti.

V této práci byla dále potvrzena možnost opakovaného použití zlatých nanočástic. Částice lze velmi snadno regenerovat zvýšenou teplotou, regeneračními roztoky s kyselým pH, a dokonce i působením laserů. Této regenerace lze využít také v případě různých biosenzorů, kde lze využít kontinuální funkce.

Možnost regenerace byla testována zejména pro zlaté nanočástice s imobilizovanými peptidy. Schopnost regenerace, jak již bylo zmíněno, byla potvrzena ve všech testovaných případech. Sledováno bylo použití teploty, regeneračních roztoků s kyselým pH a použití laseru.

V případě regenerace použitím teploty bylo optimální regenerace dosaženo při teplotě 50°C. Při nižší teplotě byla regenerace s krátkodobého hlediska méně účinná, při vyšší teplotě by naopak mohlo dojít k poškození imobilizovaných peptidů. Při teplotě 37 °C bylo veškeré imobilizované množství zachováno. Této vlastnosti lze využít v případě nanočástic jako nosičů léčiv. V takovémto případě by léčivo v těle zůstalo navázáno na částice a k jeho uvolnění by došlo až v cílovém místě s vyšší teplotou (zánět, infekce, atd.).

Velmi rychlým způsobem regenerace je použití kyselého pH, částečná regenerace byla potvrzena u roztoků s pH 3, pro účinnější regeneraci bylo nutné použít roztoků s pH 1,5. Toto prostředí však již může negativně ovlivnit další použitelnost imobilizovaných složek.

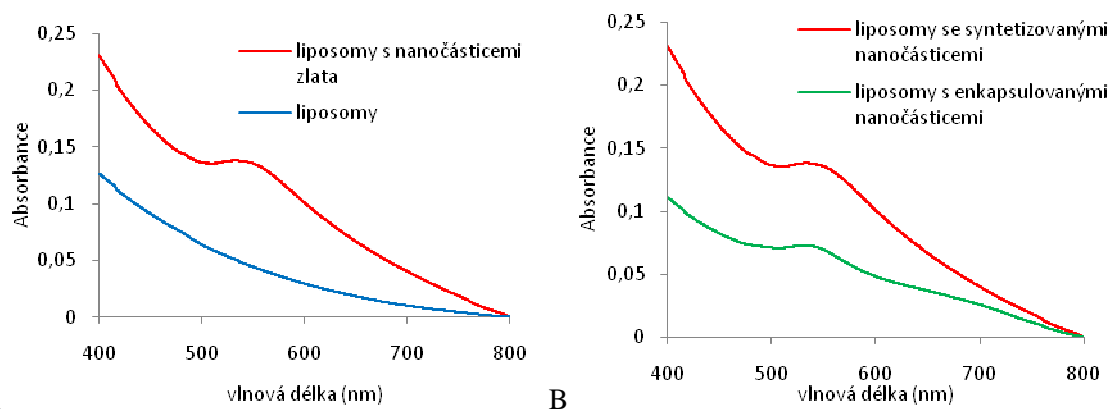
Velmi účinným způsobem regenerace imobilizovaných částic bylo použití laseru. V tomto případě docházelo vlivem laseru k lokálnímu zvýšení teploty a uvolnění imobilizovaných složek. K uvolnění imobilizovaných peptidů došlo již po desetiminutovém působení. Laser je tedy jednou z velmi efektivních možností pro řízené uvolňování imobilizovaných aktivních látek [130].

5.6.3.3 Využití liposomů jako nanoreaktorů pro fotochemickou syntézu nanočástic zlata

Při potenciálních aplikacích nanočástic pro cílený transport léčiv hledají různé vědecké skupiny možnosti rychlé a snadné syntézy částic s velmi malou velikostí, a to především pro zajištění dostatečně velkého povrchu. Dalším zásadním parametrem pro tyto aplikace je i jednotná velikost připravených nanočástic [177].

Liposomy se nabízejí jako vynikající kandidáti na řízenou syntézu zlatých nanočástic. Syntéza uvnitř liposomů nabízí možnost kontrolovat dané prostředí a rovněž řídit velikost syntetizovaných nanočástic. Navzdory těmto výhodám, předchozí pokusy o syntézu zlatých nanočástic uvnitř liposomů neměly tak příznivé výsledky. Velikost částic byla velmi polydisperzní, částice byly také nehomogenní ve svém tvaru, nebo docházelo k nízkému výtěžku syntetizovaných nanočástic [177, 178]. V posledních letech, bylo dosaženo lepších výsledků při syntéze zlatých nanočástic uvnitř liposomů, díky přidavku stabilizačních činidel do enkapsulovaného roztoku soli zlata, nebo přidavkem lipidů s glycerolem, které působily jako redukční činidlo. Nicméně, u těchto postupů bylo pro řízenou syntézu nanočástic zlata nutné buď upravit způsob přípravy liposomů, nebo použít speciální fosfolipidy [179, 180, 181].

V této práci je navržena a popsána jednoduchá metoda (kap.4.24) pro řízenou syntézu sférických zlatých nanočástic uvnitř liposomů.



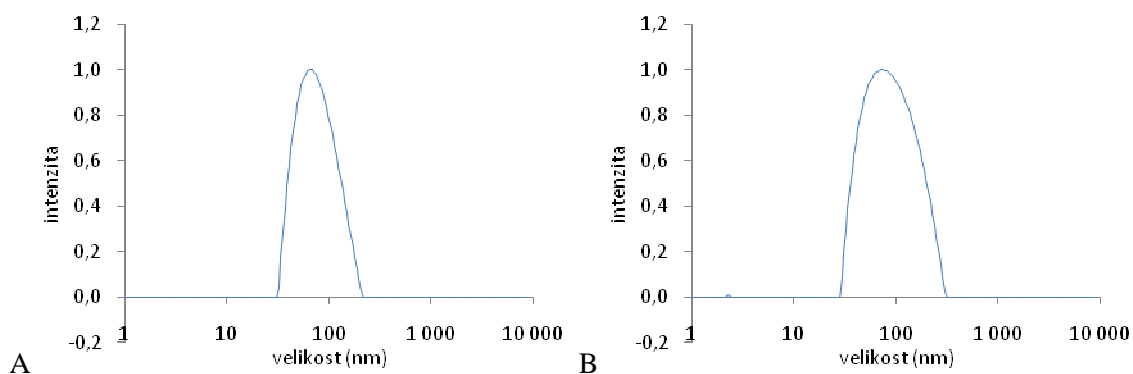
Graf 56. UV-Vis spektra liposomů A) s enkapsulovanými zlatými nanočásticemi (zelená) a liposomů se zlatými nanočásticemi syntetizovanými uvnitř nich (červená) B) prázdné liposomy (modrá), liposomy s nanočásticemi zlata (červená)

Takto syntetizované zlaté nanočástice byly homogenní, co se týče jejich velikosti i tvaru. Kromě toho, tento jednoduchý způsob obchází nutnost oddělovat ne-enkapsulované zlaté nanočástice po jejich syntéze, což bylo při použití zavedených metod mnohdy náročné. Za použití této metody lze uvedený náročný krok separace obejít díky zařazení tohoto kroku již před samotnou syntézu zlatých nanočástic. Dochází tedy pouze k separaci ne-enkapsulovaného solného roztoku zlata pomocí sloupcové chromatografie (Sephadex G-25), což je mnohem jednodušší a rychlejší než odstraňování zlatých nanočástic.

Díky této metodě lze tedy syntetizovat zlaté nanočástice, aniž by bylo nutné modifikovat techniky pro přípravu liposomů, přidávat další stabilizační činidla, nebo upravovat složení fosfolipidů. Fotochemická syntéza zlatých nanočástic uvnitř liposomů byla potvrzena přítomností lokalizované povrchové plazmonové rezonance se středem okolo 530 nm (Graf 56).

Alternativní strategie pro získání enkapsulovaných zlatých nanočástic v liposomech je enkapsulace předem připravených nanočástic. Liposomy byly opět připravovány metodou hydratace tenké vrstvy, kde byl tenký film fosfolipidů hydratován suspenzí zlatých nanočástic o průměrné velikosti 15 nm. Po extruzi liposomů, přičemž byla velikost upravena na 100 nm, následoval proces separace. Vzhledem k malému rozdílu v jejich velikosti (zlaté nanočástice a liposomy), však byla separace neenkapsulovaných částic časově náročnější.

Rozdíl v koncentraci nanočástic uvnitř liposomů je patrný v Grafu 56-B. V případě syntézy obsahují liposomy výrazně vyšší koncentraci nanočástic. Lze tedy předpokládat, že velikost syntetizovaných nanočástic bude menší.

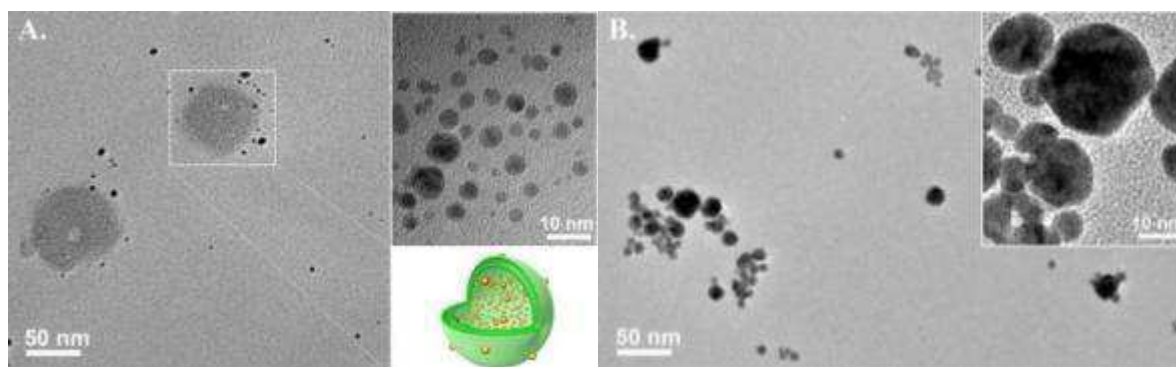


Graf 57. DLS měření vzorku liposomů A) s enkapsulovanými reaktanty před použitím uv záření; B) se syntetizovanými zlatými nanočásticemi

Pro zjištění účinků UV záření na liposomy, byly vzorky analyzovány pomocí dynamického rozptylu světla (DLS) před i po vystavení UV záření. Měřením bylo potvrzeno, že si liposomy zachovávají svou velikost, což je znamením, že si udržují svou integritu a nedochází k jejich poškození vlivem záření (Graf 57).

Dále byly měření pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) potvrzeny rozdíly ve velikosti nanočástic. Rozdíl ve velikosti zlatých nanočástic syntetizovaných uvnitř liposomů a ve volném rozpouštědle je zobrazen na Obrázku 19.

V případě zlatých nanočástic syntetizovaných uvnitř liposomů byly zaznamenány velmi homogenní částice jak v případě jejich kulovitého tvaru, tak i velikosti (Obrázek 19-A).



Obrázek 19. A - Zlaté nanočástice syntetizované fotochemickou syntézou uvnitř liposomů (TEM), B - Zlaté nanočástice syntetizované fotochemickou syntézou (TEM)

Analýzou distribuce velikosti nanočástic, měřením na principu DLS, byla přesně stanovena jejich průměrná velikost na $2,8 \pm 1,6$ nm. Pro srovnání, je zde tedy významný rozdíl ve velikostech v porovnání se zlatými nanočásticemi syntetizovanými ve volném rozpouštědle, kde se velikost pohybuje od 3 do 30 nm. Nanočástice syntetizované mimo liposomy jsou tedy podstatně větší a více polydisperzní.

Z měření na TEM (Obrázek 19-A), je také zřejmé, že některé zlaté nanočástice jsou přítomny vně liposomů. To je s největší pravděpodobností způsobeno v důsledku kombinace několika faktorů (1) šíření stopových množství zlata z vnitřní oblasti liposomů během fáze izolace a purifikace (2) v důsledku rozpadu liposomů během fáze izolace a purifikace a/nebo (3) narušením liposomů při přípravě vzorků pro měření na TEM.

V případě zlatých nanočástic syntetizovaných v liposomech je tedy obtížné přesně zjistit jejich umístění. Kromě toho, že se nacházejí ve vodné oblasti liposomů, v menší míře, se očekává, jejich zachyceny jak na periferiích liposomů (prostřednictvím elektrostatické interakce), tak uvnitř dvojvrstvy.

Závěrem lze říci, že fotochemickou syntézou uvnitř liposomů, připravených pomocí metody hydratace tenké vrstvy, bylo dosaženo vzniku zlatých nanočástic o průměrné velikosti $2,8 \pm 1,6$ nm. Další výhodou této metody byla nejen homogenní velikost a tvar, ale i snadná izolace a purifikace. Dohromady tyto výsledky ukazují, že je možné syntetizovat zlaté nanočástice uvnitř liposomů, aniž by bylo nutné upravit metody jejich přípravy. Je pravděpodobné, že tento způsob syntézy může být rozšířen na další metody přípravy liposomů. I když byla prokázána pouze řízená syntéza zlatých nanočástic v liposomů připravených z POPC, lze předpokládat potenciální rozšíření této metody i na liposomy připravené z jiných fosfolipidů. Výběrem těchto fosfolipidů lze pak dále kontrolovat jejich stabilitu a řídit uvolnění nanočástic a případně na nich imobilizovaných látek. Toho lze využít například pro systémy s řízeným uvolňováním léčiv. Tato metoda však nemusí být vhodná pro všechny látky, omezení je dáno interakcí dané látky se zlatými nanočásticemi a také stabilitou dané látky vůči UVA záření.

6 ZÁVĚR

Předložená dizertační práce je zaměřena na vývoj a přípravu vybraných typů mikro- a nanočástic s obsahem aktivní složek s řízeným uvolňováním. Byly testovány různé techniky enkapsulace, především do liposomů a polysacharidových částic. Enkapsulovány byly jak nízkomolekulární látky a jejich směsi, tak i vysokomolekulární složky a mikrobiální buňky. U připravených částic byla studována efektivita enkapsulace, dlouhodobá stabilita při různém pH, teplotě, v různých typech prostředí i v simulovaných fyziologických podmínkách. Závěrem byly navrženy vhodné transportní systémy pro řízené uvolňování jednotlivých aktivních složek a aplikace v nových typech funkčních potravin či v kosmetických produktech.

První část práce byla zaměřena na studium možnosti enkapsulace kofeinu a jeho přírodních zdrojů (káva, guarana, černý, zelený, a bílého čaj). Kofein a jeho extrakty byly enkapsulovány do různých liposomů i polysacharidových částic. Jako nejvhodnější metoda přípravy liposomů byla vyhodnocena metoda ultrasonifikace. Takto připravené liposomy vykazovaly velmi vysokou enkapsulační účinnost (až 94%) a rovněž dobrou dlouhodobou stabilitu v testovaných prostředích. Připravené liposomy měly i velmi dobrou stabilitu dle hodnoty zeta potenciálu (-50 mV). V případě polysacharidových částic bylo také dosaženo vysoké enkapsulační účinnosti a stability částic. Bylo prokázáno pozvolné uvolňování obsahu částic v prostředí tenkého střeva. Díky velmi dobré dlouhodobé stabilitě především manuálně připravených chitosanových, alginátových částic a liposomů v modelových i reálných prostředích lze využít testované částice pro aplikaci do různých energetických nápojů či funkčních potravin s pozvolným uvolňováním kofeinu a dalších aktivních složek v zažívacím traktu. Při aplikacích do nápojů případně potravin s neutrálním pH jsou vhodné především liposomy, pro aplikace do prostředí s nižším pH jsou velmi vhodné chitosanové i alginátové částice.

Další sledovanou aplikací bylo využití vybraných typů nanočástic v kosmetice. Jako nejvhodnější částice byly pro tyto účely vybrány liposomy. Částice měly dobrou stabilitu a vysokou enkapsulační účinnost. Také jejich dlouhodobá stabilita vyhovovala aplikačním požadavkům. Navíc pro zlepšení kvality potencionálních přípravků byly částice s obsahem kofeinu a jeho přírodních extraktů úspěšně obohaceny i o ovocnou složku. Jako nejvhodnější aplikační forma obsahující liposomy byla navržena pleťová voda a gel, používaný například jako přípravek proti celulitidě. Přípravky vynikají díky schopnosti liposomů prostupovat pokožkou a vnášet aktivní látky do hlubších vrstev kůže. Díky své povaze jsou liposomy navíc schopny hydratace, napomáhají tak ke snížení suchosti kůže, což představuje hlavní příčinu jejího stárnutí. Díky kofeinu pak dochází k vyhlazení pleti, kofein vyniká i svým antioxidačním účinkem, chrání tak buňky proti UV záření a zpomaluje stárnutí pokožky. Při kombinaci s dalšími aktivními látkami jako jsou polyfenoly a vitaminy, lze dále navyšovat pozitivní účinky kosmetických přípravků.

Druhá část práce byla zaměřena na přípravu a enkapsulaci přírodních extraktů s vysokým obsahem polyfenolických látek a vitaminů. Enkapsulovány byly extrakty z guarany, ženšenu a goji. Dále byla testována možnost enkapsulace šťáv a extraktů z vybraných druhů ovoce a zeleniny – citronu, pomeranče, kiwi, jablek, mrkve a směsi lesních plodů. Rovněž byly enkapsulovány vybrané standardy: vitamin C, β -karoten, vitamin E, kvercetin, morin, rutin, kyselina gallová a katechin. Aktivní látky byly enkapsulovány do liposomů a polysacharidových částic. Při stanovení stability v umělých modelových trávicích tekutinách docházelo opět k nejvýraznějšímu uvolňování enkapsulovaných aktivních složek v modelových střevních šťávách. V žaludeční šťávě docházelo pouze k částečné degradaci částic. Při stanovení stability v modelových potravinách bylo jako nejvhodnější modelové prostředí pro dlouhodobé uchovávání stanoveno prostředí vodné, pro většinu polysacharidových částic pak i kyselé prostředí. Jako nejvhodnější aplikační forma pro přidání studovaných přírodních extraktů do reálných potravin byly zvoleny alginátové částice připravené na enkapsulátoru.

Bylo u nich dosaženo nejvyšší enkapsulační účinnosti a rovněž vykazovaly dobrou stabilitu v modelových tělních tekutinách i modelových potravinách. Lze je tak využít k cílenému transportu a uvolňování enkapsulovaných aktivních látek v trávicím traktu a tím dosáhnout vyšší biologické dostupnosti a přínosnosti pro zdraví spotřebitele. Použitelné by byly rovněž do přípravků pro dětskou výživu.

Práce se rovněž zabývala aplikací liposomů s aktivní látkou v kosmetice. Jako modelová prostředí byla pro aplikaci v kosmetice testována destilovaná voda a 2; 10 a 30% emulze oleje ve vodě. Se zvyšujícím se obsahem lipidů v prostředí docházelo během dlouhodobého skladování k výraznějšímu rozpadu částic a uvolnění aktivních složek. U připravených emulzí byla sledována také sedimentační stabilita po přidání testovaných částic. Z dosažených výsledků lze konstatovat, že vlivem částic nedochází ke změně sedimentační stability emulzí. Připravené částice jsou tedy vhodnou formou i pro kosmetické aplikace ve formě různých krémů. Během skladování by však tyto kosmetické přípravky neměly obsahovat více než 2% lipidických složek. Částice jsou díky dobrému protektivnímu efektu vůči UV záření vhodné i pro aplikace do opalovací kosmetiky. Stejný aplikační potenciál naleznou částice s obsahem testovaných antioxidantů a vitaminů i v případě hydratace pokožky, ochrany kůže před oxidačním stresem a předčasnému stárnutí.

Ve třetí části práce byl testován antimikrobiální účinek lysozymu, nisinu propolisu a extraktů z různých koření a bylin před a po enkapsulaci. Rovněž byla testována možnost enkapsulace léčiv klotrimazolu a ibuprofenu a jejich koenkapsulace s vybranými rostlinnými antimikrobiálními extrakty. Inhibiční účinky byly pozorovány pomocí antimikrobiálních testů proti gram-negativním a gram-pozitivním bakteriálním kmenům pomocí difúzních i dilučních metod. Studie prokázala, že jednoduché extrakty z bylin mají velmi dobrý antimikrobiální účinek proti gram-pozitivním i gram-negativním bakteriím. Lysozym a nisin měly velmi dobrý antimikrobiální účinek zejména proti gram-pozitivním kmenům, ve vyšší koncentraci i vůči gram-negativním kmenům. U bylinných extraktů společně s klotrimazolem byla testována i jejich antimykotická aktivita. Tuto aktivitu z testovaných přírodních vzorků vykazoval především extrakt česneku. Před i po enkapsulaci se svou účinností vyrovnal antimykotickému léčivu – klotrimazolu. Dále byly po enkapsulaci jako neúčinnější a nejkompexnější stanoveny liposomové částice s extraktem z hřebíčku, zde byl po dobu 24 hodin zcela zastaven růst všech testovaných bakterií. Také chitosanové částice měly velmi vysoký inhibiční účinek, způsobený zřejmě kombinovaným účinkem samotného chitosanu a enkapsulovaných antimikrobiálních komponent. Antimikrobiální složky byly tedy úspěšně enkapsulovány do liposomů i polysacharidových částic. Připravené částice vykazovaly velmi dobrou stabilitu dle hodnoty zeta potenciálu. Dlouhodobá stabilita částic a množství uvolněných složek byla sledována v různých modelových podmínkách. Na základě výsledků lze konstatovat, že připravené částice byly stabilní, přičemž liposomy jsou vhodné pro skladování především ve vodném prostředí, polysacharidové částice spíše v kyselém prostředí. Částice byly v modelových podmínkách navíc nejen stabilní, ale také si zachovaly antimikrobiální aktivitu. V modelovém fyziologickém prostředí docházelo k pozvolnému uvolňování enkapsulovaných složek především v podmínkách simulujících tenké střevo. Díky tomuto cílenému a pozvolnému uvolňování společně s velmi dobrou dlouhodobou stabilitou jsou připravené polysacharidové částice i liposomy vhodné k aplikaci do různých potravinových doplňků a potravin. Řízené uvolňování antimikrobiálních složek v prostředí střeva může napomoci například k regulaci střevní mikroflóry, v případě aplikace do potravin přispět k antimikrobiální ochraně při jejím skladování. Připravené částice s enkapsulovanými antimikrobiálními bylinnými a kořeněnými extrakty a/nebo s částicemi s obsahem lysozymu/nisinu by mohly být také použity pro antimikrobiální přípravky s řízeným uvolňováním ve formě hydrogelů. Antibakteriální účinek gelu spolu s antioxidační aktivitou z bylinných extraktů by mohl být velmi slibným nástrojem pro dezinfekci a hojení ran.

Další část práce byla zaměřena na přípravu a testování vhodných forem pro enkapsulaci enzymů s potenciálním využitím ve formě potravinových doplňků, ale i kosmetických a farmaceutických přípravků. Pro enkapsulaci byly použity enzymy bromelain, papain, trypsin, pepsin, alkalasa, lipasa, pankreatin, lysozym, kolagenasa a mladý ječmen jako komplexní přírodní preparát. Enzymy byly enkapsulovány do polysacharidových částic a liposomů. Polysacharidové částice byly připraveny jednak manuálně a rovněž pomocí enkapsulátoru. Z polysacharidů byly použity alginát, chitosan a škrob. Z naměřených výsledků lze konstatovat, že při použití vhodných materiálů lze úspěšně enkapsulovat všechny vybrané enzymy i jejich kombinace. Nejvyšších enkapsulačních účinností bylo dosaženo u polysacharidových částic připravených pomocí enkapsulátoru, kde dosahovala průměrná enkapsulační účinnost hodnot nad 80%. Všechny testované částice byly stabilní i při dlouhodobém uchovávání a enkapsulované enzymy si uchovávaly i svoji aktivitu. Při testování v modelovém fyziologickém prostředí vykazovaly především polysacharidové částice nejvyšší stabilitu v prostředí umělé žaludeční šťávy. V rámci studia stability částic v simulovaných potravinách bylo zjištěno, že polysacharidové částice v potravinách s nižším pH jsou stabilnější. Liposomové částice byly naopak velmi stabilní především ve vodě při neutrálním pH. Enkapsulace je tedy jednou z perspektivních metod pro produkci kvalitních potravin a potravinových doplňků s vysokou přidanou hodnotou s možností transportu enzymů a jejich řízenému uvolnění v trávicí soustavě.

Enkapsulované enzymy mohou být rovněž součástí přípravků, jež slouží k hojení ran a regeneraci poškozené tkáně po nejrůznějších typech poranění včetně popálenin, nekrotizací apod. Nejlepší volbou pro základ potenciálního kosmetického či farmaceutického přípravku je podle zjištěných výsledků prostředí hydrogelu. Všechny připravené typy částic byly v hydrogelu stabilní a v tomto prostředí rovněž docházelo k nejmenšímu poklesu proteolytické aktivity enzymů. Výsledky potvrzují, že při styku připravených částic s pokožkou, jež má hydrofobní charakter, dojde k žádoucímu uvolnění obsažené aktivní složky. U směsných preparátů s lysozymem byl potvrzen rovněž vysoký antimikrobiální účinek, přičemž tento efekt zůstal zachován i po dlouhodobém uchovávání. Částečnou antimikrobiální aktivitu prokázaly i prázdné chitosanové částice a částice s ostatními tetovanými enzymy. Tento fakt může napomáhat při rychlosti procesu hojení a obnovování pokožky.

Další část práce byla zaměřena na testování možnosti enkapsulace probiotických kultur (*Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacter breve*) a prebiotik do polysacharidových částic. Jako prebiotikum byl použit inulin a komplexní přírodní extrakt zeleného ječmene. Z výsledků můžeme usoudit, že pomocí enkapsulátoru je možné úspěšně enkapsulovat oba typy probiotických bakterií do několika druhů polysacharidových obalů. Většina částic byla stabilní i při dlouhodobém skladování a enkapsulované bakterie si udržovaly svou životaschopnost. Vhodným postupem byla enkapsulace za vzniku částic typu matrix, kdy je zajištěna lepší difúze živin k buňkám dispergovaných v celém objemu oproti typu kapsule. Vhodným obalovým materiálem pro enkapsulace probiotických kultur byl stanoven alginát, případně směs alginátu se škrobem. Zachování vysoké viability probiotik bylo potvrzeno po dobu 4 až 5 týdnů. Optimální obalový materiál pro částice s enkapsulovaným práškovým ječmenem představovala směs alginátu a škrobu v poměru 4:1, přičemž přídavek škrobu zvyšoval rozpad částic v cílových částech trávicí soustavy. Úpravou obsahu škrobu je tedy možné modelovat cílené uvolňování obsahu částic. Dalším vhodným materiálem byla směs chitosanu a agaru v poměru 1:1. A to zejména z hlediska ochrany a stability enkapsulovaných enzymů a bílkovin obsažených v ječmeni. Zásadní podmínkou je opět volba částic typu matrix, kdy je možné enkapsulovat i vlákninu obsaženou v nerozpustném podílu. V případě čerstvého ječmene byl jako optimální obalový materiál stanoven alginát. Při stanovení stability polysacharidových částic v modelových fyziologických podmínkách bylo zjištěno, že všechny testované částice byly poměrně stabilní v žaludeční šťávě. Ve střevní šťávě došlo vždy k nejvýraznějšímu rozpadu částic a k uvolnění probiotik i prebiotik do prostředí. Nejvíce pak z částic obohacených přídavkem škrobu. Tato skutečnost by mohla být využita při cíleném transportu probiotik/prebiotik do střevního traktu.

Především pak enkapsulované bifidobakterie mohou lépe odolávat kyselému prostředí žaludku a být doručený do cílového místa ve střevě v životaschopném stavu. Částice byly poměrně stabilní i v modelových potravinách. Ve všech typech částic byl i po 4 týdnech skladování počet živých buněk nad 80 %. Obecně lze tak konstatovat, že enkapsulace významně prodlužuje dlouhodobou životaschopnost a biologickou aktivitu probiotik i v nepříznivém vnějším prostředí. Nejvíce živých buněk bylo však zachováno v reálných potravinách, především v mléce. V reálných potravinách docházelo rovněž k vyššímu nárůstu buněk v částicích. Optimální výchozí koncentrace buněk, pro maximální zachování růstu a viability buněk, byla stanovena nejvýše na 10^6 CFU·ml⁻¹. Při této koncentraci je však zásadní i zajištění dostatečného množství živin v částicích, případně v okolním prostředí. Nejvhodnější je zajištění optimálního množství živin v částicích ve formě různých prebiotik, například inulinu, či jiného využitelného polysacharidového zdroje. Na závěr byla potvrzena i úspěšná možnost koenkapsulace do částice obsahující probiotika i prebiotika, jako je například zelený ječmen či inulin a bakterie. Přípravky s probiotiky/prebiotiky s řízeným uvolňováním by tak bylo možné použít jako kvalitní doplněk k podpoře zdravého životního stylu. Testované částice by mohly být přidány do různých mléčných výrobků, s ohledem na kvalitu použitých materiálů i do výrobků určených pro dětskou výživu. Enkapsulace dále rozšiřuje pole aplikace i mimo mléčné výrobky. Díky dostatečné stabilitě polysacharidových částic, zejména v kyselém prostředí, a zachování viability buněk i při dlouhodobějším skladování do úvahy připadají i různé ovocné šťávy apod. Dále jsou připravené částice vhodné pro aplikace do různých potravinových doplňků, přičemž použitelnost enkapsulovaných probiotik byla potvrzena i ve formě lyofilizovaných preparátů.

V rámci zahraniční stáže byla testována možnost kombinace organických a anorganických nanočástic. Nejprve byla optimalizována metoda fotochemické syntézy zlatých nanočástic. Na tyto částice byly dále imobilizovány především peptidy a byla sledována možnost řízeného uvolňování pro potenciální aplikace jako nosiče léčiv, případně pro aplikaci na poli biosenzorů. Z organických částic byly použity liposomy, které sloužily především jako reaktor pro přípravu zlatých nanočástic. Takto připravené nanočástice dosahovaly velmi malých a konstantních rozměrů (okolo 3 nm). Velikost syntetizovaných nanočástic zlata mimo liposomy byla 10x větší a podstatně polydisperznější. I když byla prokázána pouze řízená syntéza zlatých nanočástic v liposomu připravených z POPC, lze předpokládat potenciální rozšíření této metody i na liposomy připravené z jiných fosfolipidů. Výběrem těchto fosfolipidů, lze pak dále kontrolovat jejich stabilitu a řídit uvolnění nanočástic, případně na nich imobilizovaných látek. Toho lze využít například pro systémy s řízeným uvolňováním léčiv.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	alginátové částice
DHA	dokosahexaenová kyseliny
DLS	dynamický rozptyl světla
EFSA	Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority)
EPA	eikosapentaenová kyselina
EU	enkapsulační účinnost
EV	ethanolové vstřikování (metoda přípravy liposomů)
FSC	přímý rozptyl (forward scatter)
GRAS	obecně považováno za bezpečné (Generally Recognised As Safe)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
CH	chitosanové částice
CHA	alginátové částice potažené chitosanem
ILSI	International Life Science Institute
L	liposomy
LDL	low-density lipoprotein
MO	mikroorganismus
MUFA	mononenasycené mastné kyseliny
NIR	infračervené záření (near-infrared)
PAH	poly(allylamin-hydrochlorid)
PCS	Photon Correlation Spectroscopy
PDA	detektor diodového pole (Photodiode Array Detector)
PEI	poly(iminoethylen)
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol fosfatidylcholin
PSS	Polystyren sulfonát sodný
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
RP-TLE	metoda přípravy liposomů odpařením na tenké vrstvě s reverzní fází (thin layer evaporation on reverse phase)
SSS	boční rozptyl (side scatter)
SFA	nasycené mastné kyseliny
Š	škrobové částice
TEM	transmisní elektronová mikroskopie (transmission electron microscopy)
TLE	metoda přípravy liposomů odpařením na tenké vrstvě (thin layer evaporation)
U	liposomy připravené pomocí ultrazvuku (ultrasonifikace)
UV-VIS	detektor ultrafialovo-viditelné oblasti(Ultraviolet-visible)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] DESAI, K. G-H. and H. JIN PARK. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology*. 2005, 23(7): 1361-1394. DOI: 10.1081/DRT-200063478.
- [2] NEDOVIC, V., A. KALUSEVIC, V. MANOJLOVIC, S. LEVIC and B. BUGARSKI. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*. 2011, 1: 1806-1815. DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.265.
- [3] BURGAIN, J., C. GAIANI, M. LINDER and J. SCHER. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*. 2011, 104(4): 467-483. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031.
- [4] WANG, R., Z. TIAN and L. CHEN. Nano-encapsulations liberated from barley protein microparticles for oral delivery of bioactive compounds. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011, 406(1-2): 153-162. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.12.039.
- [5] FANG, Z. and B. BHANDARI. Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science*. 2010, 21(10): 510-523. DOI: 10.1016/j.tifs.2010.08.003.
- [6] GUISAN, J. M.. *Immobilization of enzymes and cells*. 2nd ed. Totowa, N.J.: Humana Press, 2006, 449 p. ISBN 978-158-8292-902.
- [7] KOUTKOUTAS, Y., A. BEKAROORU, I. M. BANAT, R. MARCHANT and A.A. KOUTINAS. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*. 2004, 21(4): 377-397. DOI: 10.1016/j.fm.2003.10.005.
- [8] RAMAKRISHNA, S.V. and R. S. PRAKASHAM. Microbial fermentations with immobilized cells. *Current Science*. 1999, 77(5).
- [9] SASSOLAS, A., L. J. BLUM and B. D. LECA-BOUIER. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*. 2012, 30(3): 489-511. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.09.003.
- [10] MACARIO, A., M. MOLINER, A. C. and G. GIORDANO. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic–inorganic system. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2009, 118(1-3): 334-340. DOI: 10.1016/j.micromeso.2008.09.003.
- [11] MATSUURA, S., S. A. EL-SAFETY, M. CHIBA, E. TOMON, T. TSUNODA and T. HANAOKA. Enzyme encapsulation using highly ordered mesoporous silica monoliths. *Materials Letters*. 2012, 89: 184-187. DOI: 10.1016/j.matlet.2012.08.110.
- [12] GORECKA, E., M. JASTRZEBSKA. Immobilization techniques and biopolymer carriers. *Biotechnology and Food Science* [online]. 2011 [cit. 2014-04-18].
- [13] ANDREESCU, S., B. BCUR and MARTY, J.L.. Affinity Immobilization of Tagged Enzymes. [online]. *Immobilization of enzymes and cells*. Humana Press, 2006. p. 97-106. [cit. 2014-04-18].
- [14] KRAJEWSKA, B.. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*. 2004, 35(2-3): 126-139. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2003.12.013.
- [15] GOUIN, S.. Microencapsulation. *Trends in Food Science*. 2004, 15(7-8): 330-347. DOI: 10.1016/j.tifs.2003.10.005.
- [16] RATHORE, S., P. M. DESAI, C. V. LIEW, L. W. CHAN and P. W. S. HENG. Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering*. 2013, 116(2): 369-381. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2012.12.022.
- [17] DONG, Q-Y., M-Y. CHEN, Y. XIN, X-Y. QIN, Z. CHENG, L-E. SHI and Z-X. TANG. Alginate-based and protein-based materials for probiotics encapsulation: a review. *International Journal of Food Science*. 2013, 48(7): 1339-1351. DOI: 10.1111/ijfs.12078.
- [18] MAZZITELLI, S., L. CAPRETTO, F. QUINCI, R. PIVA and C. NASTRUZZI. Preparation of cell-encapsulation devices in confined microenvironment. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013, 1533-1555. DOI: 10.1016/j.addr.2013.07.021.

- [19] NILSSON, K., S. BIRNBAUM, S. FLYGARE, L. LINSE, U. SCHREDER, U. Jeppsson, P-O. Larsson, K. Mosbach and P. Brodelius. A general method for the immobilization of cells with preserved viability. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 1983, 17(6): 319-326. DOI: 10.1007/BF00499497.
- [20] PARK, J.K, H.N CHANG, C. V. LIEW, L. W. CHAN and P. W. S. HENG. Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnology Advances*. 2000, 18(4): 303-319. DOI: 10.1016/S0734-9750(00)00040-9.
- [21] ZUIDAM, N, V. A. NEDOVIC. *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. New York: Springer Science+Business Media, LLC, 2010. ISBN 978-144-1910-080.
- [22] DÜZGÜNES, Edited by Nejat. *Liposomes*. 1st ed. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 2009. ISBN 978-012-3749-697.
- [23] BASU, S. C. and M. BASU. *Liposome methods and protocols*. Springer Science & Business Media, 2002. ISBN 08-960-3845-9.
- [24] LAOUINI, A., C. JAAFAR-MAALEJ, I. LIMAYEM-BLOUZA, S. SFAR, C. CHARCOSSET and H. FESSI. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*. 2012-12-01, 1(2): 147-168. DOI: 10.1166/jcsb.2012.1020.
- [25] REZA M., M., CHAD JOHNSON, S. HATZIANTONIOU and C. DEMETZOS. Nanoliposomes and Their Applications in Food Nanotechnology. *Journal of Liposome Research*. 2008, 18(4): 309-327. DOI: 10.1080/08982100802465941.
- [26] HWANG, S. Y., H. K. KIM, J. CHOO, G.H. SEONG, T. B. D. HIEN and E.K. LEE. Effects of operating parameters on the efficiency of liposomal encapsulation of enzymes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012, 94: 296-303. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.02.008.
- [27] DA SILVA MALHEIROS, P., D. J. DAROIT. Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. *Trends in Food Science*. 2010, 21(6): 284-292. DOI: 10.1016/j.tifs.2010.03.003.
- [28] MARINHO-SOROANO, E.. Agar polysaccharides from Gracilaria species (Rhodophyta, Gracilariaceae). *Journal of Biotechnology*. 2001, 89(1): 81-84. DOI: 10.1016/S0168-1656(01)00255-3.
- [29] LAM, P-L., S. H-L. KOK, Y-W. HO, R. S-M. WONG, G. Y-M. CHENG, CH-H. CHENG, K-H. LAM, R. GAMMBARI, K. K-H. LEE and CH-H. CHUI. A novel green gelatin–agar microencapsulation system with *P. urinaria* as an improved anti-*A. niger* model. *Carbohydrate Polymers*. 2013, 92(1): 877-880. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.09.080.
- [30] ELLIS, A. and J.C. JASQUIER. Manufacture and characterisation of agarose microparticles. *Journal of Food Engineering*. 2009, 90(2): 141-145. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2008.05.036.
- [31] LAVOINE, N., I. DESLOGES, A. DUFRESNE and J. BRAS. Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. *Carbohydrate Polymers*. 2012, 90(2): 735-764. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.05.026.
- [32] SHI, A., D. LI, L. WANG, Y. ZHOU and B. ADHIKARI. Spray drying of starch submicron particles prepared by high pressure homogenization and mini-emulsion cross-linking. *Journal of Food Engineering*. 2012, 113(3): 399-407. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2012.06.017.
- [33] SHI, L-E., Z-H. LI, Z-L. ZHANG, T-T. ZHANG, W-M. YU, M-L. ZHOU and Z-X. TANG. Encapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* in carrageenan-locust bean gum coated milk microspheres with double layer structure. *LWT - Food Science and Technology*. 2013, 54(1): 147-151. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.05.027.
- [34] JEGANNATHAN, K. R., E-S. CHAN and P. RAVINDRA. Physical and stability characteristics of *Burkholderia cepacia* lipase encapsulated in κ -carrageenan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009, 58(1-4): 78-83. DOI: 10.1016/j.molcatb.2008.11.009.

- [35] ZHANG, L., E. WU, J. WANG, K-CH. CHEN and J-Y. HOUNG. Immobilization of activated sludge using improved polyvinyl alcohol (PVA) gel. *Journal of Environmental Sciences*. 2007, 19(11): 207-216. DOI: <http://dx.doi.org/10.1385/0-89603-386-4:207>.
- [36] TING, Y-P. and G. SUN. Use of polyvinyl alcohol as a cell immobilization matrix for copper biosorption by yeast cells. *Journal of Chemical Technology*. 2000, 75(7): 541-546. DOI: [http://dx.doi.org/10.1002/1097-4660\(200007\)75:7<54](http://dx.doi.org/10.1002/1097-4660(200007)75:7<54).
- [37] SINHA, V.R., A.K. SINGLA, S. WADHAWAN, R. KAUIK, R. KUMRIA, K. BANSAL and S. DHAWAN. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004, 274(1-2): 1-33. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2003.12.026.
- [38] GÓMEZ-GIULLÉN, M.C., B. GIMÉNEZ, M.E. LÓPEZ-CABALLERO and M.P. MONTERO. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*. 2011, 25(8): 1813-1827. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2011.02.007.
- [39] HU, M., M. KURISAWA, R. DENG, CH-M. TEO, A. SCHUMACHER, Y-X. THONG, L. WANG, K. M. SCHUMACHER and J. Y. YING. Cell immobilization in gelatin–hydroxyphenylpropionic acid hydrogel fibers. *Biomaterials*. 2009, 30(21): 3523-3531. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.03.004.
- [40] ZIMMERMANN, H., S.G. SHIRLEY and U. ZIMMERMANN. Alginate-based encapsulation of cells: Past, present, and future. *Current Diabetes Reports*. 2007, 7(4): 314-320. DOI: 10.1007/s11892-007-0051-1.
- [41] GUPTA, M. and A. K. GUPTA. Hydrogel pullulan nanoparticles encapsulating pBUDLacZ plasmid as an efficient gene delivery carrier. *Journal of Controlled Release*. 2004, 99(1): 157-166. DOI: 10.1016/j.jconrel.2004.06.016.
- [42] PRAJARATI, V. D., G. K. JANI and S. M. KHANDA. Pullulan: An exopolysaccharide and its various applications. *Carbohydrate Polymers*. 2013, 95(1): 540-549. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.02.082.
- [43] YING, D-Y., S. SCHWANDER, R. WEERAKKODY, L. SANGUANSRI, C. GANTENBEIN-DEMARCHI and M. A. AUGUSTIN. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein and resistant starch matrices: Probiotic survival in fruit juice. *Journal of Functional Foods*. 2013, 5(1): 98-105. DOI: 10.1016/j.jff.2012.08.009.
- [44] SOUZA, F. N., C. GEBARA, M.C.E. RIBEIRO, K. S. CHAVES, M. L. GIGANTE and C. R.F. GROSSO. Production and characterization of microparticles containing pectin and whey proteins. *Food Research International*. 2012, 49(1): 560-566. DOI: 10.1016/j.foodres.2012.07.041.
- [45] FERNANDES, G. D., R.M. ALBERICI, G. G. PEREIRA, E. C. CABRAL, M. N. EBERLIN and D. BARRERA-ARELLANO. Direct characterization of commercial lecithins by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2012, 135(3): 1855-1860. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.06.072.
- [46] KORHONEN, H.. Technology options for new nutritional concepts. *International Journal of Dairy Technology*. 2002, 55(2): 79-88. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-0307.2002.00050.x>.
- [47] PRADO F. C., J. L. PARADA, A. PANDEY and C. R. SOCCOL. Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*. 2008, 41(2): 111-123. DOI: 10.1016/j.foodres.2007.10.010.
- [48] DE VOS P., M. M. FAAS, M. SPASOJEVIC and J. SIKKEMA. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*. 2010, 20(4): 292-302. DOI: 10.1016/j.idairyj.2009.11.008.
- [49] LASIC, D. D.. Applications of liposomes. *Handbook of biological physics*, 1995, 1: 491-519.
- [50] GONNET, M., L. LETHUAUT and F. BOURY. New trends in encapsulation of lipo-soluble vitamins. *Journal of Controlled Release*. 2010-09-15, 146(3): 276-290. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.01.037.

- [51] SAUVANT, P., M. CANSELL, A. H. SASSI and C. ATGIE. Vitamin A enrichment: Caution with encapsulation strategies used for food. 2012, 46(2): 469-479. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.09.025.
- [52] YANG, Y. and D. J. MCCLEMENTS. Encapsulation of vitamin E in edible emulsions fabricated using a natural surfactant. *Food Hydrocolloids*. 2013, 30(2): 712-720. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2012.09.003.
- [53] ZIANI, K., Y. FANG and D. J. MCCLEMENTS. Encapsulation of functional lipophilic components in surfactant-based colloidal delivery systems: Vitamin E, vitamin D, and lemon oil. *Food Chemistry*. 2012, 134(2): 1106-1112. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.03.027.
- [54] MARSANASCO, M., A. L. MÁRQUEZ, J. R. WAGNER, S. V. ALONSO and N. S. CHIARAMONI. Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. *Food Research International*. 2011, 44(9): 3039-3046. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.07.025.
- [55] DA ROSA, C. G., C. D. BORGES, R.C. ZAMBIAZI, M. R. NUNES, E. V. BENVENUTTI, S. RICKES DA LUZ, R. F. D'AVILA and J. K. RUTZ. Microencapsulation of gallic acid in chitosan, β -cyclodextrin and xanthan. *Industrial Crops and Products*. 2013, 46(1): 138-146. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.12.053.
- [56] ALISHAHI, A., A. MIRVAGHEFI M.R. TEHRANI, H. FARAHMAND, S.A. SHOJAOSADATI, F.A. DORKOOSH and MAHER Z. ELSABEE. Shelf life and delivery enhancement of vitamin C using chitosan nanoparticles. *Food Chemistry*. 2011, 126(3): 935-940. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.11.086.
- [57] ALISHAHI, A., A. MIRVAGHEFI M.R. TEHRANI, H. FARAHMAND, S. KOSHIO, F.A. DORKOOSH and M. Z. ELSABEE. Chitosan nanoparticle to carry vitamin C through the gastrointestinal tract and induce the non-specific immunity system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Carbohydrate Polymers*. 2011, 86(1): 142-146. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.04.028.
- [58] WANG, CH-CH. and S-M. WU. Simultaneous determination of l-ascorbic acid, ascorbic acid-2-phosphate magnesium salt, and ascorbic acid-6-palmitate in commercial cosmetics by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*. 2006, 576(1): 124-129. DOI: 10.1016/j.aca.2005.12.017
- [59] HAN, R., L. L., J. LI, G. DU and J. CHEN. Functions, applications and production of 2-O-d-glucopyranosyl-l-ascorbic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012, 95(2): 313-320. DOI: 10.1007/s00253-012-4150-9
- [60] ZILLICH, O. V., et al. Release and in vitro skin permeation of polyphenols from cosmetic emulsions. *International Journal of Cosmetic Science*. 2013, 35(5): 491-501. DOI: 10.1111/ics.12072.
- [61] WEI, X ., et al. Protective Effects of Tea Polysaccharides and Polyphenols on Skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, 57(17): 25-33. DOI: 10.1079/9781845931124.0025.
- [62] MEHANSHO, H. and F. BOURY. Iron Fortification Technology Development. *American Society for Nutrition*. 2006, 4(136): 1059-1063.
- [63] FATHI, M., M.R. MOZAFARI and M. MOHEBBI. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in Food Science*. 2012, 23(1): 13-27. DOI: 10.1016/j.tifs.2011.08.003.
- [64] GUTIÉRREZ, F. J., et. al. Methods for the nanoencapsulation of β -carotene in the food sector. *Trends in Food Science*. 2013, 32(2): 73-83. DOI: 10.1016/j.tifs.2013.05.007.
- [65] TENG, Zi, Y. LUO and Q. WANG. Carboxymethyl chitosan-*soy* protein complex nanoparticles for the encapsulation and controlled release of vitamin D3. *Food Chemistry*. 2013,141(1): 524-532. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.03.043.

- [66] WANYIKA, H. N., E. G. GATEBE, L. M. GITU, E. K. NGUMBA and C. W. MARITIM. Determination of caffeine content of tea and instant coffee brands found in the Kenyan market. *African journal of food science*. 2010, 6(4): 353 – 358. ISSN 1996-0794.
- [67] NAWROT, P., S. JORDAN, J. EASTWOOD, J. ROTSTEIN, A. HUGENHOLTZ and M. FEELEY. Effects of caffeine on human health. *Food Additives and Contaminants*. 2003, 20(1): 1-30. ISSN 0265-203x. DOI: 10.1080/0265203021000007840.
- [68] GLADE, M. J.. Caffeine-Not just a stimulant. *Nutrition*. 2010, 26(10): 932-938. ISSN 08999007. DOI: 10.1016/j.nut.2010.08.004.
- [69] SMITH, A.. Effects of caffeine on human behavior. *Food and Chemical Toxicology*. 2002, 40(9): 1243-1255. ISSN 02786915. DOI: 10.1016/S0278-6915(02)00096-0.
- [70] PHAM, T. T., CH. JAAFAR-MAALEJ, C. CHARCOSSET and H. FESSSI Liposome and niosome preparation using a membrane contactor for scale-up. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012, 94(1): 15-21. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.12.036.
- [71] RIBEIRO, A. C.F., et al. Transport properties of aqueous solutions of sodium alginate at 298.15K. *Food Chemistry*. 2011, 125(4): 1213-1218. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.10.036.
- [72] HERMAN, A. and A.P. HERMAN. Caffeine's Mechanisms of Action and Its Cosmetic Use. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2013, 26(1): 8-14. DOI: 10.1159/000343174.
- [73] CLEVELAND, J., T. J. MONTVILLE, I. F. NES, M. L. CHIKINDAS. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, 71(1): 485-511. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/9781119962045.ch23>.
- [74] LARIDI, R, E.E. KHEARD, R-O. BENECH, J.C. VUILLEMARD, C. LACRIX and I. FLISS. Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. *International Dairy Journal*. 2003, 13(4): 325-336. DOI: 10.1016/S0958-6946(02)00194-2.
- [75] DA SILVA MALHEIROS, P., D. J. DAROIT, N. PESCE DA SILVEIRA and A. BRANDELI. Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of *Listeria monocytogenes* in milk. *Food Microbiology*. 2010, 27(1): 175-178. DOI: 10.1016/j.fm.2009.09.013.
- [76] GEMILI, S., A. YEMENICIOGLU and S.A. ALTINKYA. Development of cellulose acetate based antimicrobial food packaging materials for controlled release of lysozyme. *Journal of Food Engineering*. 2009, 90(4): 453-462. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2008.07.014.
- [77] DA SILVA MALHEIROS, P., V. SANT'ANNA, M. UTPOTT and A. BRANDELLI. Antilisterial activity and stability of nanovesicle-encapsulated antimicrobial peptide P34 in milk. *Food Control*. 2012, 23(1): 42-47. DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.06.008.
- [78] DA SILVA MALHEIROS, P., V. SANT'ANNA, M-S. BARBOSA, A. BRANDELLI and B. D. GOMBOSSY DE MELO FRANCO. Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* growth in Minas frescal cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 2012, 156(3): 272-277. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.004.
- [79] BOUALEM, K., M. SUBIRADE, Y. DESJARDINS and L. SAUCIER. Development of an Encapsulation System for the Protection and Controlled Release of Antimicrobial Nisin at Meat Cooking Temperature. *Journal of Food Research*. 2013, 2(3): 36. DOI: 10.5539/jfr.v2n3p36.
- [80] LI, Y., S. KADAM, T. ABEE, T.M. SLAGHEK, J. W. TIMMERMANS, M. A. COHEN STUART, W. NORDE and M. J. KLEIJN. Antimicrobial lysozyme-containing starch microgel to target and inhibit amylase-producing microorganisms. *Food Hydrocolloids*. 2012, 28(1): 28-35. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2011.11.011.
- [81] LIAN, Z-X., Z-S MA, J. WEI and H. LIU. Preparation and characterization of immobilized lysozyme and evaluation of its application in edible coatings. *Process Biochemistry*. 2012, 47(2): 201-208. DOI: 10.1016/j.procbio.2011.10.031.
- [82] JIN, T., L-S. LIN, H- ZHANG and HICKS. Antimicrobial activity of nisin incorporated in pectin and polylactic acid composite films against *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Science*. 2009, 44(2): 322-329. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2008.01719.x.

- [83] CHENG, X., R. LIU and Y. HE. A simple method for the preparation of monodisperse protein-loaded microspheres with high encapsulation efficiencies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2010, 76(3): 336-341. DOI: 10.1016/j.ejpb.2010.07.013.
- [84] BARBIROLI, A., F. BONOMI, G. CAPRETTI, S. IAMETTI, M. MANZINI, L. PIERGIOVANNI and M. ROLLINI. Antimicrobial activity of lysozyme and lactoferrin incorporated in cellulose-based food packaging. *Food Control*. 2012, 26(2): 387-392. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.01.046.
- [85] OH, J., H. JO, A.R. ChO, S-J. KIM and J. HAN. Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. *Food Control*. 2013, 31(2): 403-409. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.10.021. ISSN 09567135
- [86] DAGLIA, M.. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*. 2012, 23(2): 174-181. DOI: 10.1016/j.copbio.2011.08.007. ISSN 09581669.
- [87] WEERAAKKODY, N. S., N. CAFFIN, M.S. TURNER and G. A. DYKES. In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. *Food Control*. 2010, 21(10): 1408-1414. DOI: 10.1016/j.foodcont.2010.04.014. ISSN 09567135.
- [88] COWAN, M.M.. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 1999, 12(4): 564-582.
- [89] CUSHINIE, T.P. T. and A. J. LAMB. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2005, 26 (5): 343-356. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002. ISSN 09248579.
- [90] ZHAI, Y. a G. ZHAI. Advances in lipid-based colloid systems as drug carrier for topic delivery. *Journal of Controlled Release*. 2014, 193: 90-99. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.05.054. ISSN 01683659.
- [91] MENSAH, A. Y., P. J. HOUGHTON, R. A. DICKSON, T. C. FLEISCHER, M. HEINRICH and P. BREMNER. In Vitro evaluation of effects of two ghanaiian plants relevant to wound healing. *Phytotherapy Research*. 2006, 20(11): 941-944. DOI: 10.1002/ptr.1978. ISSN 0951418x
- [92] OSTRO, M. J.; CULLIS, P. R. Use of liposomes as injectable-drug delivery systems. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 1989, 46(8): 1576-1587.
- [93] KHEADR, E. E, J.C VUILLEMARD and S.A EL-DEEB. Impact of liposome-encapsulated enzyme cocktails on cheddar cheese ripening. *Food Research International*. 2003, 36(3):. 241-252. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0963-9969\(02\)00166-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0963-9969(02)00166-7).
- [94] ANJANI, K., K. KAILASAPATHY and M. PHILIPS. Microencapsulation of enzymes for potential application in acceleration of cheese ripening. *International Dairy Journal*. 2007, 17(1): 79-86. DOI: 10.1016/j.idairyj.2006.01.005.
- [95] LIU, H., K.NAKAGAWA, D. KATO, D. CHAUDHARY and MOSES O. TADÉ. Enzyme encapsulation in freeze-dried bionanocomposites prepared from chitosan and xanthan gum blend. *Materials Chemistry and Physics*. 2011, 129(1-2): 488-494. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2011.04.043.
- [96] MATEO, C-E., J. M. PALOMO, G. FERNANDEZ-LORENTE, J. M. GUISAN and R. FERNANDEZ-LAFUENTE. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007, 40(6): 1451-1463. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2007.01.018.
- [97] GASSARA-CHATTI, F., S. K. BRAR, C.M. AJILA, M. VERMA, R.D. TYAGI and J.R. VALERO. Encapsulation of ligninolytic enzymes and its application in clarification of juice. *Food Chemistry*. 2013, 137(1-4): 18-24. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.09.083.
- [98] AEHLE, W. (ed.). *Enzymes in industry: products and applications*. John Wiley & Sons, 2007, p 489. ISBN 35-273-1689-2.
- [99] LODS, L.M., C. DRES, C. JONHSON, SCHOLZ and G. J. BROOKS. The future of enzymes in cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science*. 2000, 22(2): 85-94.

- [100] DRISKELL, R. R. and F. M. WATT. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. *Trends in Cell Biology*. 2015, 25(2): 92-99. DOI: 10.1016/j.tcb.2014.10.001. ISSN 09628924.
- [101] MAYNES, R.(ed.). *Structure and function of collagen types*. Elsevier, 2012.
- [102] RAAMANDEEP, K. and S. S. BHUPINDER. Enzymes as drugs: an overview. *Journal of Pharmaceutical Education and Research* [online]. 2012 [cit. 2014-04-18].
- [103] MAHMOUND D, D. AR; HELMY, W. A. Potential Application of Immobilization Technology in Enzyme and Biomass Production . *Journal of Applied Sciences Research*. 2009, 5(12): 2466-2476.
- [104] FREEMAN, A. and M.D. LILLY. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. *Enzyme and Microbial Technology*. 1998, 23(5): 335-345. DOI: 10.1016/S0141-0229(98)00046-5.
- [105] KONSOUOLA, Z. and M. LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES. Thermostable α -amylase production by *Bacillus subtilis* entrapped in calcium alginate gel capsules. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006, 39(4): 690-696. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.12.002.
- [106] ANSARI, S.A. and Q. HUSAIN. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnology Advances*. 2012, 30(3): 512-523. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.09.005.
- [107] WANG, H. Y. and D. J. HETTWER. Cell immobilization in k-carrageenan with tricalcium phosphate. *Biotechnology and Bioengineering*. 1982, 24(8): 1827-1838. DOI: 10.1002/bit.260240809.
- [108] RATHORE, S., P.M. DASAI, C.V. LIEW, L.W. CHAN and P.W.S. HENG. Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering*. 2013, 116(2): 369-381. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2012.12.022.
- [109] IGBAL, CH. M. and B.A. SAEED. Novel method for cell immobilization and its application for production of organic acid. *Letters in Applied Microbiology*. 2005, 40(3): 178-182. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2004.01646.x.
- [110] DOHERTY, S.B., V.L. GEE, R.P. ROSS, C. STANTON, G.F. FITGERALD and A. BRODKORB. Development and characterization of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. *Food Hydrocolloids*. 2011, 25(6): 1604-1617. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2010.12.012.
- [111] O'RIILY, A. M. and J. A. SCOTT. Defined coimmobilization of mixed microorganism cultures. *Enzyme and Microbial Technology*. 1995, 17(7): 636-646. DOI: 10.1016/0141-0229(94)00103-X.
- [112] MARTIN, M.J., F. LARA-VILLSLADA, M.A. RIUZ and M.E. MORALES. Effect of unmodified starch on viability of alginate-encapsulated *Lactobacillus fermentum* CECT5716. *LWT - Food Science and Technology*. 2013, 53(2): 480-486. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.03.019.
- [113] MARTIN-DEJARDIN, F., B. EBEL, G. LEMETAIS, H. N.T. MINH, P. GERVAIS, R. CACHON and O. CHAMBIN. A way to follow the viability of encapsulated *Bifidobacterium bifidum* subjected to a freeze-drying process in order to target the colon: Interest of flow cytometry. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013, 49(2): 166-174. DOI: 10.1016/j.ejps.2013.02.015.
- [114] COOK, M. T., G. TZORTZIS, D. CH. VITALIY ,V. KHUTORYANSKIY. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*. 2012, 162(1): 56-67. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.06.003.
- [115] RIVERA-ESPINOZA, Y. and Y. GALLARDO-NAVARRO. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*. 2010, 27(1): 1-11. DOI: 10.1016/j.fm.2008.06.008.
- [116] SHI, Lu-E., Z-H. LI, D-T. LI, M. XU, H-Y. CHEN, Z-L. ZHANG and Z-X. TANG. Encapsulation of probiotic *Lactobacillus bulgaricus* in alginate–milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Food Engineering*. 2013, 117(1): 99-104. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2013.02.012.

- [117] SAARELA, M., G. MOGENEN, R. FONDÉN, J. MÄLTÖ, T. MATTILA-SANDHOLM and D. DONOHUE. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*. 2000, 84(3): 197-215. DOI: 10.1007/springerreference_75538.
- [118] GEBARA, C., K.S. CHAVES, M.C.E. RIBEIRO, F. N. SOUZA, C. R.F. GROSO and M. L. GIGANTE. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin–whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*. 2013, 51(2): 872-878. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.02.008.
- [119] RAJAM, R., P. KARTHIK K., S. PARTHAHSRATHI, G.S. JOSEPH and C. ANANHDHARAMAKRISHNA. Effect of whey protein – alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*. 2012, 4(4): 891-898. DOI: 10.1016/j.jff.2012.06.006.
- [120] TRABELSI, I., W. BEJAR, D. AYADI, H. CHOUAYEKH, R. KAMMOUN, S. BEJAR and R. B. SALAH. Encapsulation in alginate and alginate coated-chitosan improved the survival of newly probiotic in oxgall and gastric juice. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013, 61(1): 36-42. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.06.035.
- [121] KAILASAPATHY, K. and J. CHIN. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and Cell Biology*. 2000-02-15, 78(1): 80-88. DOI: 10.1046/j.1440-1711.2000.00886.x.
- [122] CHAN, E.S. and Z. ZHANG. Encapsulation of Probiotic Bacteria *Lactobacillus Acidophilus* by Direct Compression. *Food and Bioproducts Processing*. 2002, 80(2): 78-82. DOI: 10.1205/09603080252938708.
- [123] SULTANA, K., G. GODWARD, N. REYNOLDS, R. ARUMUGASWAMY, P. PEIRIS and K. KAILASAPATHY. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*. 2000, 62(1-2): 47-55. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00380-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00380-9).
- [124] WOHLGEMUTH, S., G. LOH and M. BLAUT. Recent developments and perspectives in the investigation of probiotic effects. *International Journal of Medical Microbiology*. 2010, 300(1): 3-10. DOI: 10.1016/j.ijmm.2009.08.003.
- [125] RANADHEERA, R.D.C.S., S.K. BAINES and M.C. ADAMS. Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*. 2010, 43(1) 1-7. DOI: 10.1016/j.foodres.2009.09.009.
- [126] HOLZAPFEL, W.H., et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American journal of clinical nutrition*. 2001, 73(2): 365-373.
- [127] PATUNGWASA, W. and J. H. HODAK. Ph tunable morphology of the gold nanoparticles produced by citrate reduction. *Materials Chemistry and Physics*. 2008, 108(1): 45-54. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2007.09.001. ISSN 02540584.
- [128] GOLE, A., CH. DAH, V. RAMAKRISHNAN, S. R. SAINKAR, A. B. MANDALE, M. RAO and M. SASTRY. Pepsin–Gold Colloid Conjugates: Preparation, Characterization, and Enzymatic Activity. *Langmuir*. 2001, 17(5): 1674-1679. DOI: 10.1021/la001164w. ISSN 0743-7463.
- [129] YEH, Y.CH., B. CRERAN and V. M. ROTELLO. Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale*. 2012, 4(6): 1871-1880. DOI: 10.1039/C1NR11188D. ISSN 2040-3364.
- [130] PAASONEN, L., T. LAAKSON, CH. JOHANS, M. YLIPERTTULA, K. KONTTURI and A. URTTL. Gold nanoparticles enable selective light-induced contents release from liposomes. *Journal of Controlled Release*. 2007, 122(1): 86-93. DOI: 10.1016/j.jconrel.2007.06.009. ISSN 01683659.
- [131] DASTJERDI, R. and M. MONTAZER. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: Focus on anti-microbial properties. *Colloids*

- and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010, 79(1): 5-18. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.03.029. ISSN 09277765
- [132] TRAN, Q.H., V.Q. NGUYEN and A-T. LE. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. 2013, 4(3): 033001. DOI: 10.1088/2043-6262/4/3/033001. ISSN 2043-6262.
- [133] RAVINDRAN, A., P. CHANDRAN and S. S. KHAN. Biofunctionalized silver nanoparticles: Advances and prospects. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013, 105: 342-352. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.07.036. ISSN 09277765.
- [134] TENOVER F.C., SWENSON J.M., O'HARA C.M., STOCKER S.A. Ability of commercial and reference antimicrobial susceptibility testing methods to detect vancomycin resistance in enterococci. *Journal of clinical microbiology*. 1995, 33 (6): 1524-1527.
- [135] WIEGAND I., HILPERT K., HANCOCK R.E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*. 2008, 3(2): 163-175.
- [136] SCHWALBE R., STEELE-MOORE L., GOODWIN A.C.. *Antimicrobial susceptibility testing protocols*. Crc Press. 2007.
- [137] DOHERTY, S.B., L. WANG, R.P. ROSS, C. STANTON, G.F. FITZGERALD and A. BRODKORB. Use of viability staining in combination with flow cytometry for rapid viability assessment of *Lactobacillus rhamnosus* GG in complex protein matrices. *Journal of Microbiological Methods*. 2010, 82(3): 301-310. DOI: 10.1016/j.mimet.2010.07.003.
- [138] DIAZ, M., M. HERRERO, L. A. GARCIA and C. QUIROS. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*. 2010, 48(3): 385-407. DOI: 10.1016/j.bej.2009.07.013.
- [139] RAHMAN, M. S. *Introduction to Flow Cytometry*. Kidlington, 2005.
- [140] ORMEROD, M. G.. Flow Cytometry. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*. 2006. DOI: 10.1002/3527600906.mcb.200300144.
- [141] SPRING, K.R.. Fluorescence Microscopy. *Encyclopedia of Optical Engineering*. 2003, p 548-555. ISSN 9780824709402.
- [142] SHAPIRO, H.M.. *Practical flow cytometry* [online]. 4th ed. New York: Wiley-Liss, c2003 [cit. 2013-03-16]. ISBN 0-471-41125-6.
- [143] Flow Cytometry. *Semrock* [online]. 2013 [cit. 2013-09-19]. Dostupné z: <http://www.semrock.com/flow-cytometry.aspx>
- [144] REKHA, C., G. POORNIMA, M. MANASA, V. ABHIPSA, J. P. DEVI, H. T. VIJAY KUMAR and T. R. PRASHITH KEKUDA. Ascorbic Acid, Total Phenol Content and Antioxidant Activity of Fresh Juices of Four Ripe and Unripe Citrus Fruits. *Chemical Science Transactions*. 2012, 1(2): 303-310. DOI: 10.7598/cst2012.182. ISSN 22783318
- [145] MURDOCK, R. C., L. BRAYDICH-STOLLE, A. M. SCHRAND, J. J. SCHLAGER and S. M. HUSSAIN. Characterization of Nanomaterial Dispersion in Solution Prior to In Vitro Exposure Using Dynamic Light Scattering Technique. *Toxicological Sciences* . 2008, 101(2): 239-253. DOI: 10.1093/toxsci/kfm240.
- [146] ROKSTAD, A.M. A., I. LACÍK, P. De VOS and B. L. STRAND. Advances in biocompatibility and physico-chemical characterization of microspheres for cell encapsulation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2014, 67: 111-130. DOI: 10.1016/j.addr.2013.07.010.
- [147] DALGLEISH, D.G. a F.R. HALLETT. Dynamic light scattering: applications to food systems. *Food Research International*. 1995, 28(3): 181-193. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0963-9969\(94\)00053-b](http://dx.doi.org/10.1016/0963-9969(94)00053-b).
- [148] PECORA, R.. Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *Journal of Nanoparticle Research*. 2000, 2(2): 123-131. DOI: 10.1023/A:1010067107182.
- [149] BRAR, S. K. and M. VERMA. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2011, 30 (1): 4-17. DOI: 10.1016/j.trac.2010.08.008.

- [150] Particle size distribution. In: *Malvern* [online]. © 2013 [cit. 2013-03-16].
- [151] Zeta potential theory. In: *NBTC* [online]. [2010] [cit. 2013-03-16].
- [152] DETLOFF, T., T. SOBISCH and D. LERCHE. Particle size distribution by space or time dependent extinction profiles obtained by analytical centrifugation (concentrated systems). *Powder Technology*. 2007, vol. 174(1-2): 50-55. DOI: 10.1016/j.powtec.2006.10.021
- [153] L., DOSKOČIL. Charakterizace disperzních soustav pomocí analytické odstředivky. In: *Chempoint* [online]. 2012 [cit. 2013-09-19].
- [154] *Emulsion stability particle size dispersion stability characterization* [online]. 2013 [cit. 2013-09-19].
- [155] SINGLETON, V. L.; ROSSI, Jr J.A.. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 1965, 16 (3): 144-158.
- [156] CHANG C. Y. M., WEN H., CHERN J.. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 2002; 10(3): 178-182.
- [157] RE R., PELLEGRINI N., PROTEGGENTE A., PANNALA A., YANG M., RICA-EVANS C.. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999, 26(9-10): 1231-1237. DOI: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3. ISSN 08915849.
- [158] MÁROVÁ, I. VUT V BRNĚ. *Praktikum z biochemie*. 2. vyd. Brno: VUTIUM, 2012.
- [159] WALKER, J. M.. The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation. *The Protein Protocols Handbook*, Humana Press, 2009, p 11-15. DOI: 10.1385/1-59259-169-8:11. ISBN 1-59259-169-8.
- [160] MORITA Y., HASAN Q., SAKAGUCHI T., MURAKAMI Y., YOKOYAMA K.. Properties of coldactive protease from psychrotrophic *Flavobacterium balustinum* P104. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, 50(6): 669-675.
- [161] LI, P., DAI, Y.-N., ZHANG, J.P., WANG, A-Q, WEI, Q.. Chitosan-Alginate Nanoparticles as a Novel Drug Delivery System for Nifedipine. *International Journal of Biomedical Science*. 2008, 4(3): 221-228.
- [162] DUNSTGAMI, A., F. VASHEGHANI, E., IMANI, M.. Preparation of chitosan nanoparticles loaded by Dexamethose sodium phosphate. *Iranian Journal of Pharmaceutical Science*. 2008, 4(2): 111-114.
- [163] CHIN, S. F., S.C. PANG and S.H. TAY. Size controlled synthesis of starch nanoparticles by a simple nanoprecipitation method. *Carbohydrate Polymers*. 2011, 86(4): 1817-1819. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.07.012. ISSN 01448617.
- [164] BÜCHI LABORTECHNIK AG. *Návod k použití: Enkapsulátor B-395 Pro*. 2011.
- [165] AKBARZADEH, A.I, R. REZAEI-SADABADY, S. DAVARAN, S. WOO JOO, N. ZARGHAMI, Y. HANIFEHPOUR, M. SAMIEI, M. KOUHI and K. NEJATI-KOSHKI. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*. 2013, 8(1): 102. DOI: 10.1186/1556-276X-8-102. ISSN 1556-276x.
- [166] PUGLIA, C., F. BONINA, L. RIZZA, R. CORTESI, E. MERLOTTI, M. DRECHSLER, P. MARIANI, C. CONNTADO, L. RAVANI. Evaluation of percutaneous absorption of naproxen from different liposomal formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010, 99(6): 2819-2829. DOI: 10.1002/jps.22028. ISSN 00223549.
- [167] SZOKA, F., PAPAHAJDOPOULOS, D.. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 1978. 75(9): 4194-4198.
- [168] FAN, M., S. XU, S. XIA and X. ZHANG. Preparation of salidroside nano-liposomes by ethanol injection method and in vitro release study. *European Food Research and Technology*. 2008, 227(1): 167-174. DOI: 10.1007/s00217-007-0706-9. ISSN 1438-2377.

- [169] *Československý lékopis*. Praha: Avicenum – Zdravotnické nakladatelství, 1987
- [170] Česká Republika. Vyhláška Ministerstva zdravotnictví o hygienických požadavcích na výrobky určené pro styk s potravinami a pokrmů. In: *Sbírka zákonů ČR*. 2001, č. 38, 13/2001.
- [171] MCGILVRAY, K. L., M. R. DECAN, D. WANG and J. C. S. FACILE. Photochemical Synthesis of Unprotected Aqueous Gold Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*. 2006, 128(50): 15980-15981. DOI: 10.1021/ja066522h. ISSN 0002-7863.
- [172] AILI, D., K. ENANDER, J. RYDBERG, I. LUNDSTRÖM, L. BALTZER and B. LINDBERK. Aggregation-Induced Folding of a De Novo Designed Polypeptide Immobilized on Gold Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*. 2006, 128(7): 2194-2195. DOI: 10.1021/ja057056j. ISSN 0002-7863.
- [173] MALSAWMTLUANGI, C., D. K. NATH, I. JAMATIA, L. RALTE, E. ZARZOLIANA, L. PACHUAU. Determination of Sun Protection Factor (SPF) number of some aqueous herbal extracts. *J App Pharm Sci*. 2013; 3 (09): 150-151.
- [174] SHARMA, A., D. K. ARYA, M. DUA, G. S. CHHATWAL and A. K. JOHRI. Nanotechnology for targeted drug delivery to combat antibiotic resistance. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2012, 9(11): 1325-1332. DOI: 10.1517/17425247.2012.717927. ISSN 1742-5247.
- [175] WU, L., J. ZHANG and W. WATANABE. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011, 63(6): 456-469. DOI: 10.1016/j.addr.2011.02.001. ISSN 0169409x.
- [176] ORENDORFF, CH. J., T. K. SAU and C. J. MURPHY. Shape-Dependent Plasmon-Resonant Gold Nanoparticles. *Small*. 2006, 2(5): 636-639. DOI: 10.1002/sml.200500299. ISSN 1613-6810.
- [177] HE, P., M. W. URBAN and C. J. MURPHY. Phospholipid-Stabilized Au-Nanoparticles. *Biomacromolecules*. 2005, 6(3): 1224-1225. DOI: 10.1021/bm0501961. ISSN 1525-7797.
- [178] SHCHUKIN, D. G., G. B. SUKHORUKOV and C. J. MURPHY. Nanoparticle Synthesis in Engineered Organic Nanoscale Reactors. *Advanced Materials*. 2004, 16(8): 671-682. DOI: 10.1002/adma.200306466. ISSN 0935-9648.
- [179] CHOW, G.M., M.A. MARKOWITZ, R. RAYNE, D.N. DUNN and A. SINGH. Phospholipid Mediated Synthesis and Characterization of Gold Nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1996, 183(1): 135-142. DOI: 10.1006/jcis.1996.0527. ISSN 00219797.
- [180] GENC, R., M. ORTIZ, C. K. O'SULLIVAN, D.N. DUNN and A. SINGH. Diffusion-controlled synthesis of gold nanoparticles: nano-liposomes as mass transfer barrier. *Journal of Nanoparticle Research*. 2014, 16(4): -. DOI: 10.1007/s11051-014-2329-y. ISSN 1388-0764.
- [181] GENC, R., G. CLERGEAUD, M. ORTIZ, C.K. O'SULLIVAN and A. SINGH. Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using Glycerol-Incorporated Nanosized Liposomes: nano-liposomes as mass transfer barrier. *Langmuir*. 2011, 27(17): 10894-10900. DOI: 10.1021/la201771s. ISSN 0743-7463.

9 ŽIVOTOPIS A PUBLIKAČNÍ ČINNOST

OSOBNÍ ÚDAJE

Jméno a příjmení: Petra Matoušková
Datum narození: 13. 3. 1987
Místo narození: Třebíč
Národnost: česká
Trvalé bydliště: Mihoukovice 54, 675 03 Budišov
Telefon: +420 737 026 827
E-mail: xcmatouskovap@fch.vutbr.cz

VZDĚLÁNÍ

2002 – 2006 SPŠT Třebíč, Technické lyceum
2006 – 2009 VUT Brno, Fakulta chemická, bakalářské studium zakončeno státní zkouškou, titul Bc., téma bakalářské práce: „Řízená produkce pullulanu mikroorganismem *Aureobasidium pullulans*“
2009 – 2011 VUT Brno, Fakulta chemická, magisterské studium zakončeno státní zkouškou, titul Ing., téma diplomové práce: „Produkce a charakterizace extracelulárních hydroláz z vybraných druhů plísní“
2011 - Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, doktorské studium

PRACOVNÍ ZKUŠENOSTI

2012 - Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Centrum materiálového výzkumu, technicko-hospodářsky pracovník

Zahraniční stáž

Místo: Linköping University, The Institute of Technology/The Department of Physics, Chemistry and Biology, Sweden

Doba: 28.2.2014 - 25.7.2014

Projekt:

- 1) Peptide and DNA functionalized gold nanoparticles for biosensor applications
- 2) Synthesis of gold nanoparticles, preparation and characterization of liposomes with encapsulated gold nanoparticles

Pedagogická činnost

2012/2013, 2013/2014, 2014/2015 zimní semestr - Praktikum z instrumentální a strukturní analýzy

PUBLIKAČNÍ ČINNOST

Časopisy s IF

- **Matoušková P.**, Márová I., Bokrová J., Benešová P.: Effect of encapsulation of antimicrobial activity of herbal extracts with lysozyme. *V recenzním řízení*.
- Gudlur S., Sandén C., **Matoušková P.**, Fasciani Ch., Aili D.: Liposomes as nanoreactors for the photochemical synthesis of gold nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2015, 456: 206-209. DOI: 10.1016/j.jcis.2015.06.033. ISSN 00219797.

- Lichnová A., Márová I., Valentová R., **Matoušková P.**: Antimutagenic properties of several kinds of rice as tested upon yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* D7. *Acta Alimentaria*. 2014, 43(1): 158-169. DOI: 10.1556/AAlim.43.2014.1.16. ISSN 0139-3006.
- Gojkovic Z., Marova I., **Matouskova P.**, Obruca S., Pekar M.: Use of ultrasonic spectroscopy and viscosimetry to characterization of chicken skin collagen in comparison with collagens from other animal tissues. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 44(8): 761-771. DOI: 10.1080/10826068.2013.867869. ISSN 1082-6068.
- Obruča S., Márová I., **Matoušková P.**, Hároniková A., Lichnová A.: Production of lignocellulose-degrading enzymes employing *Fusarium solani* F-552. *Folia Microbiologica*. 2012, 57(3): 221-227. DOI: 10.1007/s12223-012-0098-5. ISSN 0015-5632.

Sborníky s plným uvedením textu

- **Matoušková, P.**; Vyskočilová, T.; Benešová, P.; Hurtová, J.; Lichnová, A.; Vrtná, M.; Márová, I. *Co-encapsulation of probiotics with prebiotics into polysaccharide particles and its effect on viability in simulated gastrointestinal fluid*. NANOCON 2014 - Conference Proceedings. 2014. Ostrava: TANGER Ltd., 2014. 1-6. ISBN: 978-80-87294-55-0.
- Márová, I.; **Matoušková, P.**; Byrtusová, D.; Patočková, K.; Bokrová, J.; Hurtová, J.; Benešová, P. *Preparation and stability of organic core-shell particles with encapsulated complex natural sources of phenolics, caffeine and vitamins*. Conference Proceedings; 6th International Conference NANOCON 2014. Ostrava: TANGER Ltd., Ostrava, 2014. 1-6. ISBN: 978-80-87294-55-0.
- **Matoušková, P.**; Hurtová, J.; Lichnová, A.; Benešová, P.; Obruča, S.; Márová, I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacter breve* encapsulated into different polysaccharide particles. *Industrial, medical and environmental applications of microorganisms*. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 2014. 391-396. ISBN 978-90-8686-243-6.
- Benešová, P.; Obruča, S.; Ondruška, V.; **Matoušková, P.**; Márová, I. Controlled simultaneous production of pullulan and poly-L-malate by *Aureobasidium pullulans*. *Industrial, medical and environmental applications of microorganisms*. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 2014. 414-418. ISBN 978-90-8686-243-6.
- **Matoušková, P.**; Benešová, P.; Hurtová, J.; Obruča, S.; Márová, I. *Encapsulation of probiotic bacteria into polysaccharide particles*. NANOCON 2013 - Conference Proceedings, Different Authors. 2013. Ostrava: TANGER Ltd., 2013. 1-6. ISBN: 978-80-87294-44-4.
- Márová, I.; **Matoušková, P.**; Lichnová, A.; Kapar, J.; Obruča, S. *Organic biopolymer-based particles as delivery systems for enzymes*. NANOCON 2013 - Conference Proceedings, Different Authors. 2013. Ostrava: TANGER Ltd., 2013. 1-6. ISBN: 978-80-87294-44-4.

- **Matoušková P.**, Lichnová A., Patočková K., Benešová P., Hurtová J., Obruča S., Márová I.: *Use of physical-chemical methods to analysis of organic micro- and nanoparticles with encapsulated caffeine*. Proceedings, CECE 2012 (9th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis), 295-299. ISBN: 978-80-904959-1-3
- **Matoušková, P.;** Márová, I. Encapsulation of caffeine into organic nanoparticles. In *Studentská konference Chemie je život, Sborník příspěvků*. Brno: VUT v Brně, Fakulta chemická, 2012. 369-374. ISBN: 978-80-214-4644- 1.
- Petrik, S.; Zhivkov, I.; Milenkov, V.; Mladenova, D.; Márová, I.; **Matoušková, P.;** Hároníková, A.; Weiter, M.: Influence of pulse electric field on red yeasts strains. In *Electronic Devices and Systems IMAPS CS International Conference 2013*. Brno. 78-84. ISBN: 978-80-214-4754- 7.

Mezinárodní konference

- **Matoušková, P.;** Hároníková, A.; Petrik, S.; Kostovová, I.; Márová, I. *Growth and production properties of red yeast cultivated on lignocellulose waste substrates*. Book of Abstracts - V International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology - BioMicroWorld2013. 2013. Madrid: 2013. p.339.
- Marova I., **Matoušková P.**, Patočková K., Hároníková A., Obruča S.: preparation and characterization of organic micro- and nanoparticles with encapsulated caffeine. 7th CRF (International Conference on Chemical reaction in Foods), November 14-16, 2012, Praha. Book of abstracts, p.152. ISBN 978-80-7080-836-8.
- Márová I., **Matoušková P.**, Lichnová A., Milotová J.: Influence of sample processing on values of lipoxygenase activity in barely grain. 7th CRF (International Conference on Chemical reaction in Foods), November 14-16, 2012, Praha. Book of abstracts, p.176. ISBN 978-80-7080-836-8.
- Hároníková, A.; Márová, I.; **Matoušková, P.;** Janhuba, F.; Obruča, S. *Encapsulation of antimicrobial agents nisin and lysozyme into organic micro- and nanoparticles*. 12th INTERNATIONAL NUTRITION AND DIAGNOSTIC CONFERENCE Abstract book and Final program. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2012. s. 146. ISBN: 978-80-7395-456- 7.
- **Matoušková, P.;** Márová, I.; Patočková, K.; Hároníková, A.; Obruča, S. *Encapsulation of caffeine into organic micro- and nanoparticles*. 12th INTERNATIONAL NUTRITION AND DIAGNOSTICS CONFERENCE Abstrakt Book and Final Program August 27 - 30, 2012. Pardubice: 2012. s. 69. ISBN: 978-80-7395-456- 7.
- Marova I., Haronikova A., Benesova P., Bokrova J., Vyskocilova T., **Matouskova P.**, Mikulikova R.: Evaluation of some beneficial effects of consumption of Czech beer on human health. Lecture. 12th INTERNATIONAL NUTRITION AND DIAGNOSTICS CONFERENCE Abstrakt Book and Final Program August 27 - 30, 2012. Pardubice: 2012. s. 58. ISBN: 978-80-7395-456- 7.
- **Matoušková, P.;** Patočková, K.; Doskočil, L.; Márová, I. *Encapsulation of caffeine into organic micro- and nanoparticles*. NANOCON 2012 - Conference Proceedings, 2012. Ostrava: TANGER Ltd., 2012. s. 99-99. ISBN: 978-80-87294-32- 1.

- Obruča S., **Matoušková P.**, Janhuba F., Wurstová A., Doskočil L., Pekař M., Márová I.: Biopolymer-based particles working as delivery systems for antimicrobial peptides. 4th International Conference Nanocon 2012, 23.-25.10.2012, Brno. Conference Proceedings, 2012. Ostrava: TANGER Ltd., 2012. s. 102. ISBN: 978-80-87294-32- 1.
- Obruča S., **Matoušková P.**, Márová I., Lichnová A., Pospíšilová A., Čertík M.: Production of enzyme cocktails for hydrolysis of complex waste substrates. *Chemické Listy* 105, 2011, p.1021 -1022. ISSN 0009-2770.
- **Matoušková P.**, Obruča S., Márová I., Lichnová A.: Production and characterization of lignocellulose degrading enzyme cocktail from selected fungal strains. Proceedings, XIII. Meeting of Biochemists and Molecular Biologists, Brno, 2011. p.84.
- Márová I., **Matoušková P.**, Hároniková A., Pospíšilová A., Čertík M., Obruča S., Lichnová A., Duroňová K.: Use of *A.pullulans* exoenzyme complex to waste substrate processing for carotenoid production by red yeasts. 39th Annual Conference on Yeasts, May 3-6, 2011, Smolenice, SR. Book of abstracts, p.83. ISSN 1336-4839
- Obruča, S.; Márová, I.; **Matoušková, P.**; Staňková, M.; Pekař, M. Preparation of Artificial PHA Granules Working as a Delivery System for Native Proteins. In *3rd International Conference, NANOCON 2011, Conference Proceedings*. 1. Ostrava: Tanger Ltd., 2011. s. 104. ISBN: 978-80-87294-23- 9.
- Lichnová A., Vondráčková H., Obruča S., **Matoušková P.**, Hároniková A., Márová I.: Comparison of hydrolytic activity of some yeast and fungal extracellular enzymes to cereal waste substrates: a preliminary study. 38th Annual Conference on Yeasts. May 11-14, 2010, Smolenice (Slovakia). Proceedings, p.92. ISSN 1336-4839.
- Ondruška V., **Matoušková P.**, Márová I., Obruča S.: The influence of different type of exogenous stress on production of extracellular polysaccharide pullulan by yeast strain *Aureobasidium pullulans*. 8th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods and 15th ISSS Symposium, September 2-4, Siofok (Hungary). Book of abstracts, P-68, p.141, 2010. ISBN 978-963-06-7878-0.
- Ondruška V., **Matoušková P.**, Obruča S., Skutek M., Márová I.: Biomass and pullulan production in *Aureobasidium pullulans* grown under exogenous stress 37th Annual Conference on Yeasts; Smolenice (Slovakia), 13 – 15 May, 2009. Book Of Abstracts, p.99. ISSN 1336-4839.
- Ondruška V., **Matoušková P.**, Márová I., Obruča S.: Production of extracellular polysaccharide pullulan by stressed *A. pullulans* cells. *ChemZi* 5/9, 2009, p.218. ISSN 1336-7242.