

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY
MATERIALS RESEARCH CENTRE

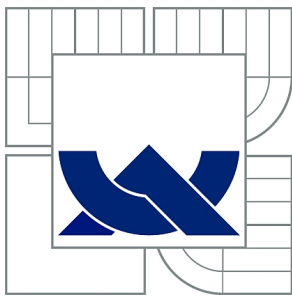
ENKAPSULACE RŮZNÝCH TYPŮ ENZYMŮ DO ORGANICKÝCH
ČÁSTIC.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

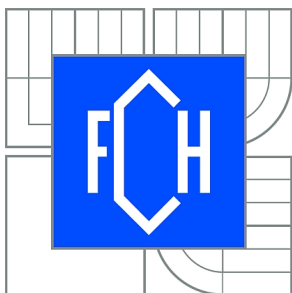
EVA HAZUCHOVÁ

BRNO 2014



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY

MATERIALS RESEARCH CENTRE

ENKAPSULACE RŮZNÝCH TYPŮ ENZYMŮ DO ORGANICKÝCH ČÁSTIC.

ENCAPSULATION OF SOME ENZYMES INTO ORGANIC PARTICLES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

EVA HAZUCHOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2014



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0788/2013** Akademický rok: **2013/2014**
Ústav: Centrum materiálového výzkumu
Student(ka): **Eva Hazuchová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie (B2801)
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)
Vedoucí práce **doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.**
Konzultanti:

Název bakalářské práce:

Enkapsulace různých typů enzymů do organických částic.

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše - enzymy - struktura, aktivita, využití; enkapsulace.
2. Metody - stanovení enzymové aktivity, enkapsulační techniky, charakterizace částic DLS.
3. Experimentální část - enkapsulace vybraných enzymů z třídy hydroláz do organických částic, charakterizace částic s enkapsulovanými enzymy; stabilita a uvolňování enzymů v modelových fyziologických podmínkách.
4. Vyhodnocení výsledků a diskuse.

Termín odevzdání bakalářské práce: 23.5.2014

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

Eva Hazuchová
Student(ka)

doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je zaměřena na enkapsulaci různých typů enzymů do organických částic. Teoretická část je věnována enzymům a jejich obecným vlastnostem, struktuře, aktivitě a využití, dále potom procesu enkapsulace a jejím technikám. Jsou zde popsány i některé metody využívané k analýze částic, a sice stanovení distribuce velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla a stanovení stability částic pomocí zeta potenciálu.

V experimentální části jsou popsány metody přípravy částic, metody stanovení enkapsulační účinnosti a metody stanovení velikosti a stability částic. Během samotného experimentu byly enkapsulovány, jednak pomocí ručních příprav a jednak pomocí enkapsulátoru, čtyři typy enzymů. U těchto částic byla následně stanovena jejich enkapsulační účinnost, velikost a stabilita. Částice byly vystaveny působení umělé pankreatické, žaludeční a žlučové šťávy, rovněž tak působení simulovaných potravin, a následně byla sledována jejich stabilita.

KLÍČOVÁ SLOVA

enkapsulace, částice, enzymy, dynamický rozptyl světla, enkapsulátor

ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on encapsulation of some enzymes into organic particles. The theoretical part is aimed to enzymes, their general characteristics, structure, activity and use, and to encapsulation techniques. Some methods used for analysis of particles, namely the determination of the distribution of particle size using dynamic light scattering, and determining the stability of the particles by the zeta potential, are described too.

The experimental part describes methods of preparing particles, methods of determining the encapsulation efficiency and methods for determining particle size and stability. During the experiment part four types of enzymes were encapsulated, partly by manual preparation and partly by encapsulator. Encapsulation efficiency, size and stability of prepared particles were determined too. The particles were exposed to artificial intestinal, gastric and bile juices, as well as the effect of model foods. Subsequently, their long-term stability was observed.

KEYWORDS

encapsulation, particles, enzymes, dynamic light scattering, encapsulator

HAZUCHOVÁ, E. *Enkapsulace různých typů enzymů do organických částic*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 47 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce doc. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za odborné vedení a všestrannou pomoc při řešení problémů, dále bych ráda poděkovala Ing. Andree Lichnové, Ph.D. a Ing. Petře Matouškové za cenné rady, ochotu a pomoc při zpracování experimentální části.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Enzymy	10
2.1.1	Struktura	10
2.1.2	Aktivita	11
2.1.3	Využití	11
2.2	Enkapsulace a její techniky	12
2.2.1	Sprejové sušení	13
2.2.2	Koacervace	13
2.2.3	Uzavření (entrapment) do lipozomů	13
2.2.4	Inkluze	14
2.2.5	Kokrytalizace	14
2.2.6	Nanočástice	14
2.2.7	Lyofilizace	14
2.2.8	Enkapsulace pomocí kvasinek	14
2.2.9	Emulgace	15
2.3	Vnější fáze používané pro enkapsulaci	15
2.3.1	Alginát	15
2.3.2	Chitosan	16
2.3.3	Škrob	16
2.3.4	Lecitin	16
2.3.5	Cholesterol	17
2.4	Metody využívané k analýze částic	17
2.4.1	Stanovení distribuce velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla	17
2.4.2	Stanovení stability částic pomocí zeta potenciálu	18
3	CÍLE PRÁCE	19
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
4.1	Použité chemikálie a přístroje	20
4.1.1	Chemikálie	20
4.1.2	Přístroje	20
4.2	Použité enzymy a komplexní přírodní preparáty	20
4.3	Příprava částic	21
4.3.1	Příprava částic pro enkapsulaci enzymů – manuální příprava	21
4.3.1.1	Příprava alginátových částic	21

4.3.1.2	Příprava chitosanových částic	21
4.3.1.3	Příprava škrobových částic	21
4.3.1.4	Příprava lipozomových částic	21
4.3.2	Příprava částic pro enkapsulaci enzymů – příprava pomocí enkapsulátoru	21
4.4	Stanovení enkapsulační účinnosti	22
4.4.1	Stanovení koncentrace proteinů Hartree-Lowryho metodou	23
4.4.1.1	Stanovení kalibrační křivky albuminu	23
4.4.2	Stanovení enzymových aktivit	23
4.5	Stanovení velikosti částic	23
4.6	Stanovení stability částic	23
4.7	Stanovení stability částic v modelových tělních tekutinách	23
4.7.1	Složení modelové pankreatické šťávy	23
4.7.2	Složení modelové žaludeční šťávy	23
4.7.3	Složení modelové žlučové šťávy	23
4.8	Stanovení stability částic v modelových potravinách	24
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	25
5.1	Enkapsulace enzymů – manuální příprava	25
5.1.1	Stanovení enkapsulační účinnosti pomocí stanovení koncentrace proteinů	25
5.1.2	Stanovení enkapsulační účinnosti pomocí enzymové aktivity	26
5.1.3	Stanovení velikosti částic	27
5.1.4	Stanovení stability částic	28
5.1.5	Stanovení stability částic v modelových tělních tekutinách	28
5.1.5.1	Stanovení stability částic v pankreatické šťávě	28
5.1.5.2	Stanovení stability částic v žaludeční šťávě	29
5.1.5.3	Stanovení stability částic ve žlučové šťávě	30
5.1.6	Stanovení stability částic v simulovaných potravinách	31
5.1.6.1	Stabilita alginátových částic	31
5.1.6.2	Stabilita chitosanových částic	32
5.1.6.3	Stabilita škrobových částic	32
5.1.6.4	Stabilita lipozomových částic	33
5.2	Enkapsulace enzymů – příprava pomocí enkapsulátoru	34
5.2.1	Stanovení enkapsulační účinnosti pomocí stanovení koncentrace proteinů	34
5.2.2	Stanovení stability částic v modelových tělních tekutinách	34
5.2.2.1	Stanovení stability částic v pankreatické šťávě	35
5.2.2.2	Stanovení stability částic v žaludeční šťávě	35
5.2.2.3	Stanovení stability částic ve žlučové šťávě	36
5.2.3	Stanovení stability částic v simulovaných potravinách	37

5.2.3.1	Stabilita částic připravených z 1% alginátu	37
5.2.3.2	Stabilita částic připravených z 2% alginátu	38
5.2.3.3	Stabilita částic připravených z 1% chitosanu	38
5.2.3.4	Stabilita částic připravených z 2% chitosanu	39
6	ZÁVĚR	40
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	41
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	43
9	SEZNAM PŘÍLOH	44
10	PŘÍLOHY	45

1 ÚVOD

V každém okamžiku působí v lidském těle tisíce enzymů. Pouze s jejich pomocí je možné obnovovat opotřebované buňky a přeměňovat výživné látky na energii či stavební součásti. Enzymy rovněž umožňují zneškodňovat odpadní látky a látky tělu cizí, bránit se choroboplodným zárodkům nebo hojit poranění. Přítomnost enzymů je tedy velmi důležitá pro správné fungování organismu. Můžeme říci, že je doslova nezbytné, aby v těle byly všechny potřebné enzymy zastoupeny v dostatečném množství a v optimálním funkčním stavu [1].

Bakalářská práce se zabývá enkapsulací různých typů enzymů do organických částic. Během enkapsulace dochází k zabalení aktivní látky nosným materiálem, přičemž musíme dbát na to, aby tento materiál byl požitelný, biodegradabilní, a aby umožňoval vytvoření bariéry mezi vnitřní fází a okolím. Důvodů proč enkapsulovat látky, v našem případě enzymy, je celá řada. Mezi ty nejvýznamnější patří zlepšení přenosu enkapsulovaných látek, zlepšení stability a zachování jejich aktivity [2].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Enzymy

Zajištění přísunu energie a stavebního materiálu z okolí, jeho využití na provoz organismů, podobně jako výstavbu jejich součástí, vyřešila příroda vytvořením složité sítě chemických dějů. Na řízení a koordinaci tohoto organizovaného a rovněž vysoce integrovaného souboru chemických reakcí a s ním spojených energetických změn se podílí pestrá škála biokatalyzátorů. Jejich nejpočetnější a nejdůležitější skupinu tvoří bílkovinné makromolekuly s katalytickými funkcemi. Pokud urychlují chemické přeměny, nazýváme je enzymy [3].

Enzymy tedy podobně jako chemické katalyzátory reakce urychlují, avšak nemění jejich rovnováhu, neboť zvyšují rychlost reakce oběma směry. Na směr průběhu reakce nemá vliv druh katalyzátoru, nýbrž energetické a koncentrační poměry v daném systému reakcí [3, 4].

Důležité je si uvědomit, že na činnosti enzymů je založena veškerá existence života, jelikož zajišťují prakticky průběh všech chemických reakcí v buňkách. Enzymů je velké množství a dle jejich reakční specifity je můžeme zařadit do šesti tříd – oxidoreduktázy, transferázy, hydrolázy, lyázy, izomerázy a ligázy. Počet existujících enzymů se odhaduje na miliardy [3, 4].

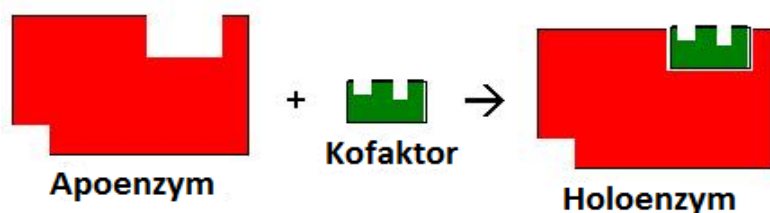
Tab. 1 Četnost zastoupení enzymů jednotlivých tříd [3]

Třída	% zastoupení
1. Oxidoreduktázy	25,6
2. Transferázy	27,6
3. Hydrolázy	22,9
4. Lyázy	13,1
5. Izomerázy	5,3
6. Ligázy	5,5

2.1.1 Struktura

Enzymy jsou látky bílkovinné povahy, a tudíž základ většiny enzymů bude tvořit proteinová složka, čili dlouhé sekvence aminokyselin v prostorově uspořádané struktuře. Existuje však i méně početná skupina enzymů, které místo bílkovin obsahují RNA, tyto RNA enzymy nazýváme ribozomy [3].

Enzymy, které jsou bílkoviny, můžeme dále rozdělit na jednoduché a složené. Pokud je daný enzym tvořen pouze bílkovinou, je jednosložkový, označujeme jej jako jednoduchý. Jestliže enzym obsahuje i jinou složku, nebílkovinnou, říkáme, že enzym je dvousložkový, čili složený. Složené enzymy, které tvoří převažující skupinu, jsou také označovány jako holoenzymy, přičemž bílkovinná část se nazývá apoenzym, zatímco nebílkovinná část kofaktor (obvykle koenzym) [5].

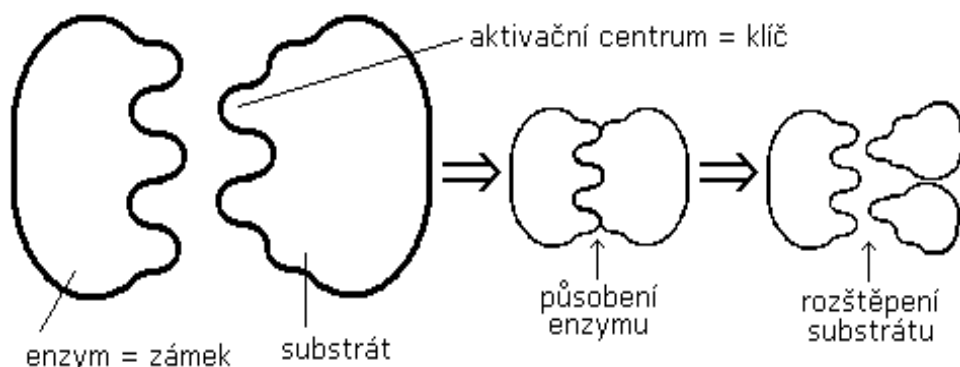


Obr. 1 Schématické znázornění složeného enzymu [5]

2.1.2 Aktivita

Na struktuře enzymů a jejich prostorovém uspořádání závisí i katalytická aktivita enzymů, kdy změny jejich prostorové struktury mohou vést ke snížení, případně úplné ztrátě této aktivity. Při tomto tvrzení vycházíme ze skutečnosti, že počátek enzymové reakce spočívá ve vzniku komplexu enzym-substrát, kde substrát je vázán na určité místo apoenzymu – aktivní centrum (aktivní místo). Právě zde se vyskytují katalyticky aktivní aminokyselinové zbytky. Díky vazbě substrátu do aktivního místa enzymu je možné realizovat reakci energeticky výhodnějším způsobem, což je dáno mimo jiné tím, že substrát v aktivním centru ztrácí hydratační obal a stává se tak reaktivnějším [4].

Důležitou roli hraje i konformace tohoto aktivního centra, je totiž zodpovědná za specifitu enzymu, jelikož se do něj mohou navázat jen substráty určité struktury nebo ty, které vytvoří vhodnou orientaci pro vazbu [4].



Obr. 2 Schéma tvorby komplexu enzym-substrát - „zámek a klíč“ [6]

Obecně však můžeme říci, že katalytická aktivita enzymu je mírou množství aktivního enzymu v určitém preparátu. Určujeme ji na základě informace, kolik substrátu enzym přemění za jednotku času, a je důležitým faktorem například při posuzování množství enzymu, potřebného pro danou technologickou aplikaci [7].

2.1.3 Využití

Vlastnosti některých enzymů využívají lidé od nepaměti, ovšem uvědoměle je začali využívat až v posledních desetiletích, což bylo způsobeno především prudkým rozvojem enzymologie. Tyto úspěchy by však nebyly možné, nebýt současného rozvoje v oblasti izolačních a separačních technik. Díky znalosti enzymů a nyní i znalosti jejich získávání nic nebránilo praktickému využití jejich vlastností [3].

Můžeme říci, že takovými průkopníky mezi enzymy, které byly použity ve větším množství a podstatnou roli hrají dodnes, byly proteázy pro biologicky aktivní prací prostředky. Dalším odvětvím hojně využívajícím právě enzymy je potravinářství, následují enzymy pro analytické účely a farmacii. Enzymy však nacházejí své uplatnění i v ostatních průmyslech, ať už se jedná o kožedělný, textilní či papírenský [3].

To, zda je enzymový preparát k dané aplikaci vhodný, je posuzováno z různých aspektů. Těmi nejzávažnějšími jsou aspekty legislativní, zdravotní, technologické a v neposlední řadě ekonomické [3].

Do budoucna můžeme očekávat také zvýšený zájem v oblasti výzkumu. Předmětem budou jednak metody genové manipulace a jejich použití k získání vhodných producentů enzymů, dále studium stabilizace enzymů či studium metod regenerace významných kofaktorů [3].

2.2 Enkapsulace a její techniky

Enkapsulace je proces zachycení účinné látky do nosného materiálu a je užitečným nástrojem pro zlepšení dodávání bioaktivních molekul a živých buněk do potravin. Jedním z nejdůležitějších důvodů enkapsulace aktivních látek je zlepšení stability, a to jak finálních výrobků, tak během zpracování. Další výhodou enkapsulace je snížení odpařování a rozkladu těkavých účinných látek, jako je například aroma. Enkapsulací můžeme rovněž zabránit reakcím s dalšími komponenty potravinářských produktů [2].

Enkapsulace může být prováděna několika metodami, které označujeme jako enkapsulační techniky [8].

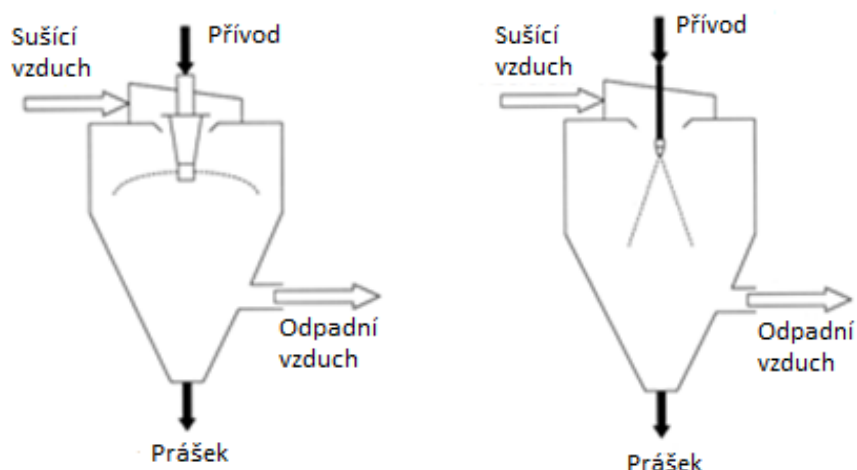
Tab. 2 Přehled používaných enkapsulačních technik [8]

Enkapsulační techniky	Ilustrace charakteristik
Sprejové sušení	<p>Polyfenoly Matrix Molekula polyfenolu Matrix</p>
Koacervace	<p>Polyfenoly Hydrokoloidní gelová síť</p>
Uzavření do lipozomů	<p>Fosfolipidová dvojvrstva Ve vodě nerozpustné polyfenoly Ve vodě rozpustné polyfenoly Hydrofilní oblast Hydrofobní oblast</p>
Inkluze	<p>Quercetin Hydrofobní dutina β-cyklodextrin</p>
Kokrytalizace	<p>Krystaly cukru Polyfenoly</p>
Nanočástice	<p>Ve vodě nerozpustný polyfenol v olejové fázi Vodná fáze</p>
Lyofilizace	<p>Polyfenoly (nerozpustné) Matrix Polyfenoly (rozpustné) Matrix</p>
Enkapsulace pomocí kvasinek	<p>Buňky kvasinek Polyfenoly</p>
Emulgace	<p>Olejová fáze Emulgační činidlo Ve vodě rozpustné polyfenoly ve vodné fázi Vodní fáze Emulgační činidlo V oleji rozpustné polyfenoly v olejové fázi</p>

2.2.1 Sprejové sušení

Sprejové sušení patří mezi nejstarší techniky enkapsulace a je nejrozšířenějším průmyslovým procesem zahrnujícím tvorbu částic a sušení. Tato technika je vhodná pro kontinuální výrobu suchých pevných látek, ať už prášku, granulátu nebo aglomerátu, vytvořených z kapalných surovin, jako jsou například roztoky a emulze. Jedná se o proces, kde konečný produkt je v souladu s normami týkajícími se distribuce velikosti částic, zbytkového obsahu vlhkosti, objemové hmotnosti a tvaru částic [9].

Základní proces sušení rozprašováním spočívá v rozpuštění, emulgaci či disperzi aktivní látky v nosiči, následné atomizaci a sprejování dané směsi do horké komory. Výsledkem je tvorba filmu na povrchu kapek [10].



Obr. 3 Schéma sprejové sušárny – rotační rozprašování, rozprašování vysokotlakými tryskami [11]

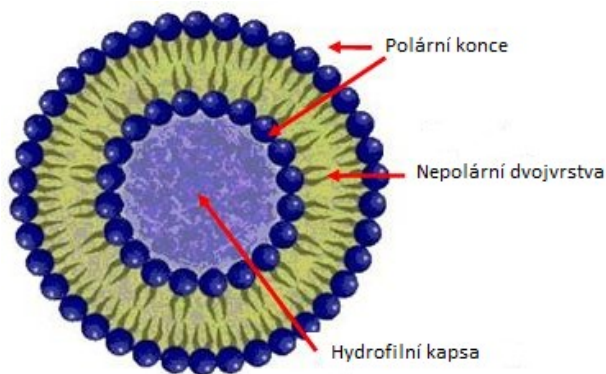
2.2.2 Koacervace

Koacervace je fázová separace polymerního roztoku na dvě nemísitelné kapalně fáze, přičemž fáze koncentrovanější se nazývá koacervační (koacervát), zatímco fáze druhá je označována jako koacervační médium, někdy také supernatant. Dle mechanismu rozlišujeme koacervaci na jednoduchou a komplexní. Během obou těchto procesů se vytváří drobné kapky, ty se usazují nebo spojují, a následně tak tvoří oddělenou koacervovanou fázi. Kapky koacervátu se pak následně hromadí kolem přítomných jader a po přidání vhodného síťovacího činidla vytváří stěnu koacervátu [12].

2.2.3 Uzavření (entrapment) do lipozomů

Lipozomy jsou mikroskopické váčky, které mohou být uměle připraveny jako kulovité nosiče, do nichž je možné zapouzdřit aktivní molekuly. Struktura lipozomů je tvořena fosfolipidy, přičemž dvojvrstva, kterou obsahují, se skládá z řetězců hydrofobních (směřují do středu molekuly) a hydrofilních (směřují do prostředí). Používají se například jako nosiče léků ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu [8, 13].

Lipozomy můžeme připravit hned několika způsoby, běžně používanými metodami jsou mimo jiné ethanolové vstříkování a příprava pomocí ultrazvuku [8, 14].



Obr. 4 Schéma struktury lipozomu [15]

2.2.4 Inkluze

Molekulární inkluze je obvykle dosaženo za použití cyklodextrinů jako enkapsulačního materiálu. Cyklodextriny jsou skupinou přirozeně se vyskytujících cyklických oligosacharidů odvozených od škrobu, vzniklých spojením šesti až osmi glukózových zbytků. Vnější část molekuly cyklodextrinů je hydrofilní, zatímco vnitřní část hydrofobní. Tato charakteristická struktura tedy umožňuje zapouzdření méně polárních molekul do apolárních dutin prostřednictvím hydrofobní interakce [8].

2.2.5 Kokrystalizace

Kokrystalizace je proces, při kterém se jako vnější fáze pro enkapsulaci používá sacharóza. Přesycený sacharózový sirup je udržován při vysoké teplotě, aby nedocházelo ke krystalizaci, přidáme-li ovšem k tomuto sirupu dané množství aktivní látky, ke krystalizaci dochází. Aglomeráty, které z nádoby vypadávají, se následně suší na určenou vlhkost [4, 8].

Mezi hlavní výhody kokrystalizace patří lepší rozpustnost, homogenita, stabilita či tekutost enkapsulovaných materiálů. Své uplatnění nachází například i v cukrářství a farmacii [8].

2.2.6 Nanočástice

Nanoenkapsulace zahrnuje tvorbu částic s průměrem pohybujícím se v rozmezí 1 až 1000 nm. Termín nanočástice je souhrnným označením pro takzvané nanosféry i nanokapsle. Zatímco nanosféry mohou díky své maticové struktuře absorbovat aktivní látky jak na povrchu částice, tak zapouzdřovat tyto látky uvnitř, nanokapsle jsou vezikulární systémy, sestávající z vnitřního kapalného jádra obklopeného polymerní membránou, přičemž aktivní látky jsou obvykle rozpuštěny v kapalném jádře [8].

Nanočástice oproti částicím v rozměrech mikrometrů jsou spojeny s řadou výhod, jednou z nich je například dokonalejší řízené uvolňování, které umožňuje lepší přesnost zacílení enkapsulovaných materiálů [8].

2.2.7 Lyofilizace

Lyofilizace, někdy také vakuové sušení nebo mrazová sublimace, je proces používaný za účelem dehydratace téměř všech tepelně sensitivních materiálů a aromatických látek. Obecně můžeme říci, že až na časovou náročnost je lyofilizace jednoduchá technika pro enkapsulaci ve vodě rozpustných esencí či přírodních aromat, stejně tak léků [8].

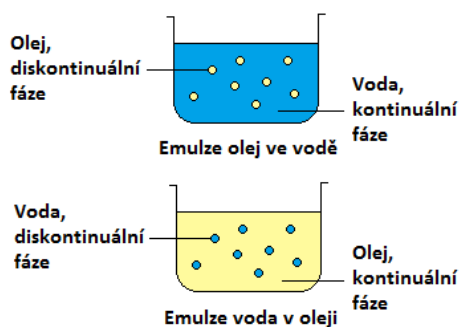
2.2.8 Enkapsulace pomocí kvasinek

Enkapsulace pomocí kvasinek je založena na schopnosti jejich buněk umožňovat účinným látkám volný přístup buněčnou stěnou a membránou. Tato technologie se obvykle používá pro enkapsulaci malých lipofilních molekul, jakými jsou třeba esenciální oleje [8].

2.2.9 Emulpace

Technologie emulpace je obecně aplikovaná za účelem enkapsulace bioaktivních látek rozpustných ve vodě, které mohou být použity buď přímo v kapalném stavu, nebo mohou být sušeny za vzniku prášků [8].

Emulze se v podstatě skládá nejméně ze dvou nemísitelných kapalin, obvykle oleje a vody. Jednu z těchto fází nazýváme disperzním prostředím a druhou, v ní rozptýlenou, dispergovanou látkou. Dispergovanou látku potom většinou pozorujeme ve formě malých kapiček [8].



Obr. 5 Emulze olej ve vodě a voda v oleji [16]

2.3 Vnější fáze používané pro enkapsulaci

Enkapsulace je proces zachycení účinné látky do nosného materiálu. Ať už tento nosný materiál nazýváme povlakem, membránou, skořápkou, kapslí, matricí nebo jen vnější fází, musíme vždy dbát na to, aby byl požitelný, biodegradabilní a rovněž aby byl schopen tvořit bariéru mezi vnitřní fází a okolím [2].

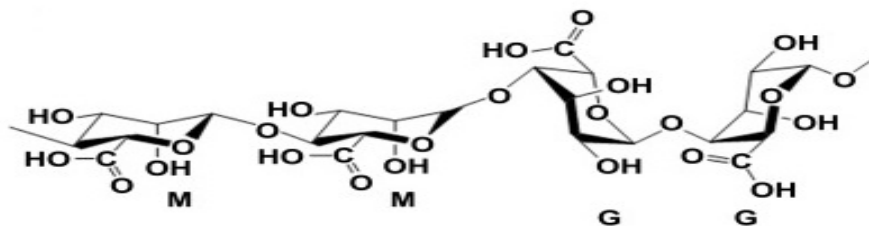
2.3.1 Alginát

Algináty jsou soli alginové kyseliny, kterou můžeme znát také pod názvem algin. Tento algin se získává z takzvaných hnědých mořských řas a tvoří asi 40 % jejich sušiny.

Co se týče struktury, jsou to nevětvené lineární kopolymery β -D-mannuronové kyseliny a α -L-guluronové kyseliny spojené glykosidovými vazbami [17].

Významnou vlastností, kterou můžeme u alginátů pozorovat, je tvorba termostabilních gelů či filmů, a to za pomoci přídavku vápenatých iontů k disperzím alginátu sodného. Během tohoto procesu se totiž na vazbě iontu vápníku nepodílí pouze elektrostatické síly, ale dochází také k chelataci [17].

Své využití nacházejí algináty především jako zahušťovadla, stabilizátory či emulgátory pro zlepšení konzistence. Schopnosti tvorby gelů se pak využívá například k výrobě ovocných a dezertních želé či pudinků. Zájem o produkty spojené s tímto polysacharidem ale roste také v oblasti biomedicíny [17].



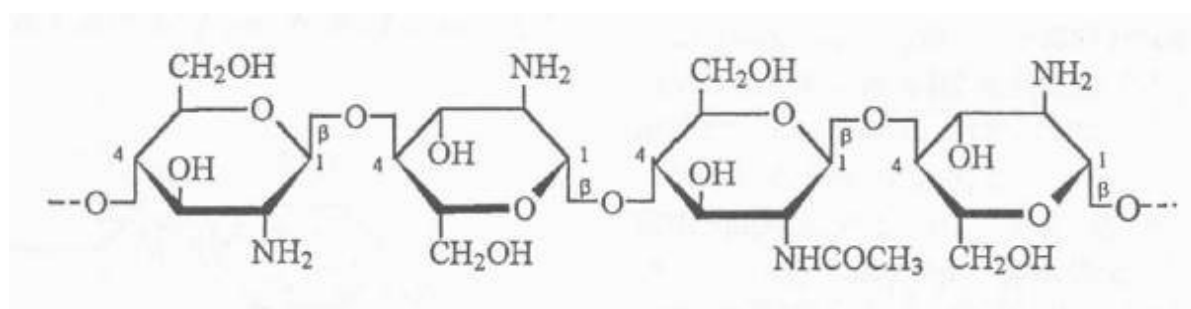
Obr. 6 Struktura alginátu [18]

2.3.2 Chitosan

Chitosan je přírodní polymer typu polysacharidů a získat jej můžeme alkalickou deacetylací chitinu. V přírodě je chitin po celulóze druhým nejčastěji se vyskytujícím polysacharidem [19, 20].

Budeme-li chtít chitosan nějakým způsobem zařadit, můžeme říci, že patří mezi takzvané kationové polymery. Pomocí rentgenové strukturní analýzy rozlišujeme čtyři krystalické formy chitosanu, z nichž tři jsou hydratované a jedna nehydratovaná. Zatímco hydratované formy snadno vytváří ve vodě rozpustné soli s organickými a minerálními kyselinami, nehydratovaná forma je v kyselinách nerozpustná a s kovovými ionty netvoří komplexy [19, 20].

Díky vynikajícím biologickým vlastnostem, kterými jsou jeho netoxičnost, biokompatibilita či biodegradabilita, nachází chitosan (především hydratované formy) bohaté uplatnění v různých oborech zahrnujících vedle biomedicíny také kosmetiku, agrochemii, fyzikální chemii a řadu dalších [20].



Obr. 7 Struktura chitosanu [18]

2.3.3 Škrob

Škrob je hlavním zásobním polysacharidem rostlin a slouží jako pohotová zásoba energie. Většina nativních škrobů je složena z amylózy a amylopektinu, tedy dvou homopolysacharidů, jejichž podjednotkami jsou molekuly α -D-glukopyranózy [17].

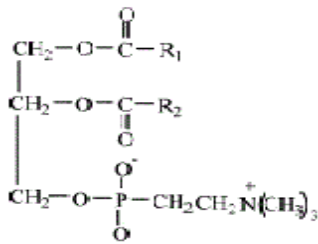
Využití škrobů je různorodé. Nativní škroby se uplatňují například jako zahušťovadla a plnidla, želírující látky, poutače vody či nosiče vonných látek. Jejich používání je však omezeno fyzikálními a chemickými vlastnostmi, které vykazují. V mnoha případech dochází tedy k modifikaci nativních škrobů za účelem omezení těchto nežádoucích vlastností, popřípadě k vytvoření produktů s vlastnostmi jinými [17].

Škrob zastává jednu z nejdůležitějších rolí v potravinářském, papírenském, textilním, farmaceutickém, stavebním či kosmetickém průmyslu [17].

2.3.4 Lecitin

Lecitin je souhrnný název pro skupinu lipidických látek, takzvaných fosfatidylcholinů, řazených mezi fosfolipidy. Lecitin je tělu vlastní látka nezbytná pro celou řadu životních funkcí [21].

Průmyslový lecitin se získává ze sójových bobů, dále pak z řepkových semen či plodů podzemnice olejné a vajec. Za pomoci lisování a extrakce dostáváme surový lecitin, z něhož pak dalším zpracováním vzniká čistý lecitin [21]. Největší část lecitinu se zkrmuje a pouze menší část (kvalitnější) se používá v potravinářství. Lecitin je rovněž důležitým prvkem při přípravě lipozomů [17].



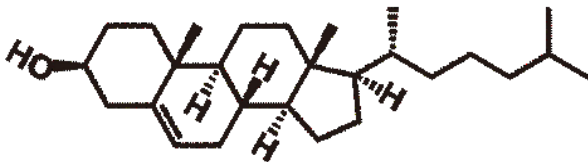
Obr. 8 Struktura lecitinu [18]

2.3.5 Cholesterol

Cholesterol je jedním z nejvýznamnějších a nejdůležitějších sterolů. Patří mezi základní strukturální komponenty buněčné membrány a je výchozí sloučeninou pro biosyntézu významných signálních molekul, steroidních hormonů [22].

Většina cholesterolu je přijímána stravou popřípadě syntetizována v játrech, zbytek si buňky vytváří samy. Můžeme tedy říci, že buňky se jakýmsi způsobem spoléhají na přísun cholesterolu pomocí krevního oběhu, a to prostřednictvím lipoproteinových částic [22].

Nemálo důležitá je schopnost cholesterolu stabilizovat lipozomy [22].



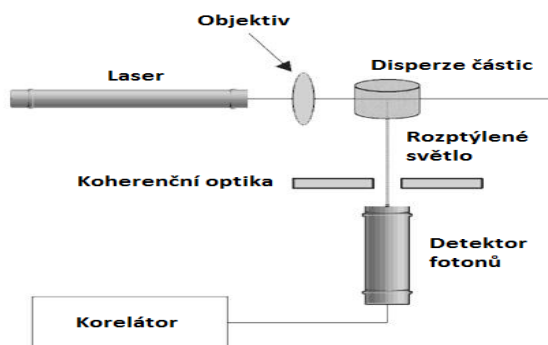
Obr. 9 Struktura cholesterolu [23]

2.4 Metody využívané k analýze částic

2.4.1 Stanovení distribuce velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla

Jednou z technik, díky kterým můžeme určit velikost částic, je i dynamický rozptyl světla. Pomocí této metody stanovujeme rozměry částic na základě měření náhodné změny intenzity světla rozptýleného ze suspenze či roztoku. Nejčastěji je tato metoda používána pro analýzu nanočástic a přístroj, kterým dynamický rozptyl světla měříme, se nazývá Zetasizer [24].

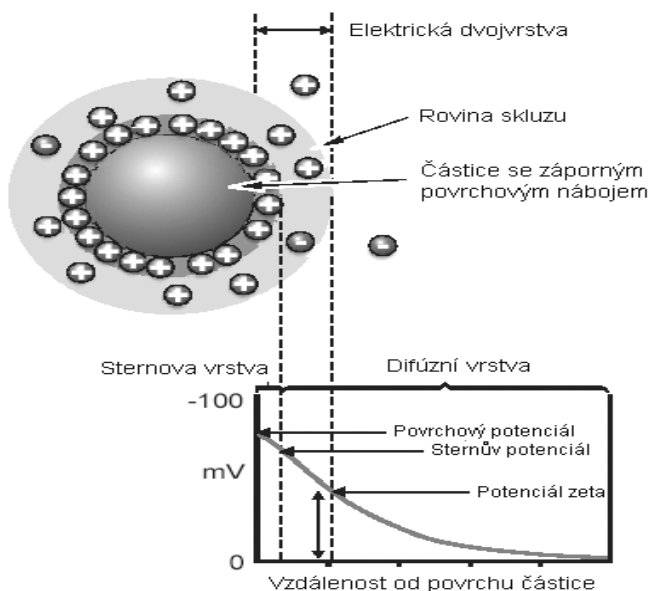
Částice v suspenzi nejsou nehybné, ale podléhají náhodnému takzvanému Brownovu pohybu. Jestliže tyto částice osvítime laserovým paprskem, dojde k jeho rozptýlení. Intenzita rozptýleného světla je potom dána rychlostí difúze dané částice, přičemž důležitou roli zde hraje fakt, že větší částice se pohybují pomaleji, zatímco malé rychleji [24].



Obr. 10 Schematický diagram klasického DLS přístroje [25]

2.4.2 Stanovení stability částic pomocí zeta potenciálu

Každá částice je vybavena elektrickou dvojrůstvou, přičemž vnitřní oblast této dvojrůstvy, známá jako Sternova vrstva, obsahuje ionty silně vázané, zatímco ta vnější obsahuje ionty vázané slaběji. Uvnitř této vnější vrstvy se nachází pomyslná hranice, v níž ionty a částice tvoří stabilní jednotku. Jakmile se částice pohybuje, ionty uvnitř této hranice se pohybují s ní, což neplatí pro ionty za touto hranicí. Potenciál na této hranici, označované často jako rovina skluzu, se nazývá potenciál zeta [26].

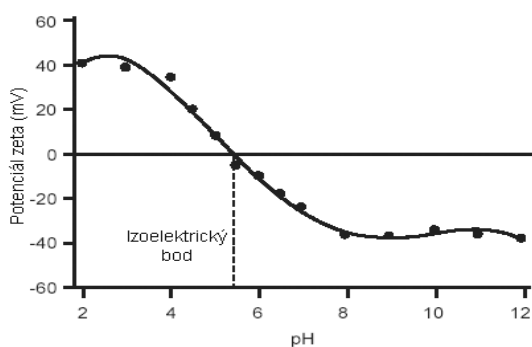


Obr. 11 Schematické znázornění elektrické dvojrůstvy [26]

Velikost potenciálu zeta nám udává potenciální stabilitu koloidního systému, přičemž koloidní systém vzniká tehdy, je-li jedno ze tří skupenství dispergované ve skupenství jiném. Obecně platí, že částice s zeta potenciálem vyšším než +30 mV, či zeta potenciálem nižším než -30 mV, se považují za stabilní [26].

Nejdůležitějším faktorem, který ovlivňuje hodnotu potenciálu zeta, je pH. Vezmeme-li si například částici v suspenzi se záporným zeta potenciálem a budeme k této suspenzi přidávat více alkálie, částice budou poté inklinovat k tomu, aby získaly zápornější náboj. Budeme-li následně přidávat k suspenzi naopak kyselinu, dosáhneme bodu, kde se záporný náboj neutralizuje, přičemž s dalšími přísadkami kyseliny může dojít k vytvoření náboje kladného. Křivka potenciálu zeta bude mít proto následující charakter, při nízkém pH bude kladná, zatímco při vysokém pH bude nižší či záporná [26].

Bod, kde křivka prochází nulovým potenciálem zeta, označujeme jako izoelektrický bod. Můžeme říci, že tento bod je bodem, kde je koloidní systém nejméně stabilní [26].



Obr. 12 Závislost zeta potenciálu na pH [26]

3 CÍLE PRÁCE

Cílem práce je testování postupů enkapsulace vybraných druhů enzymů do organických částic za účelem stabilizace a uchování aktivity enzymů. Za tímto účelem budou řešeny následující dílčí úkoly:

- Zpracování literární rešerše zaměřené na enzymy, jejich strukturu a využití a na techniky enkapsulace.
- Optimalizace metod stanovení enzymové aktivity, enkapsulačních postupů, charakterizace částic pomocí dynamického rozptylu světla.
- Enkapsulace vybraných enzymů z třídy hydroláz a přírodních komplexních extraktů do organických částic, charakterizace částic s enkapsulovanými enzymy.
- Dlouhodobá stabilita částic a uvolňování enzymů v modelových fyziologických podmínkách.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie a přístroje

4.1.1 Chemikálie

Chitosan, Sigma-Aldrich (SRN)
Alginát sodný, Sigma-Aldrich (SRN)
Cholesterol, Sigma-Aldrich (SRN)
Tripolyfosfát sodný, Sigma-Aldrich (SRN)
Škrob rozpustný p.a., Lach-Ner (ČR)
Lecithin, Mogador (ČR)
Kyselina chlorovodíková 35%, Lach-Ner (ČR)
Hydroxid sodný p.a., Lach-Ner (ČR)
Chlorid vápenatý p.a., Lachema (ČR)
Močovina p.a., Penta (ČR)
Azoalbumin, Sigma-Aldrich (SRN)
Kyselina trichloroctová, Serva (SRN)
Hydrogenuhličitan sodný p.a., Lach-Ner (ČR)
Kyselina octová 98%, Lach-Ner (ČR)
Vinan sodno-draselný tetrahydrát, Lachema (ČR)
Uhličitan sodný p.a., Lach-Ner (ČR)
Síran měďnatý pentahydrát p.a., Lachema (ČR)
Folin-Ciocalteuovo činidlo, Penta (ČR)
Bilesalts – směs kyseliny cholové a deoxycholové, Sigma-Aldrich (ČR)

Ostatní použité chemikálie byly vesměs čistoty p.a. a byly získány od běžných dodavatelů.

4.1.2 Přístroje

Analytické váhy – Boeco (SRN)
Mikrocentrifuga – Mikro 200, Hettich Zentrifugen (UK)
Spektrofotometr – Helios γ , Unicam (UK)
Ultrazvukový homogenizátor/dispergátor – Sonopuls, Bandelin (SRN)
ZetaSizer Nano ZS – Malvern (UK)
Optický mikroskop – Intraco Micro (ČR)
Enkapsulátor B-395 Pro – BÜCHI (CH)

4.2 Použité enzymy a komplexní přírodní preparáty

Pro enkapsulaci byly použity 3 typy enzymů a 1 typ doplňku stravy enzymy obsahující.

- Bromelain z ananasového stonku, Sigma-Aldrich (SRN)
- Pankreatin z prasečí slinivky břišní, Sigma-Aldrich (SRN)
- Trypsin z prasečí slinivky břišní, Sigma-Aldrich (SRN)
- Mladý ječmen, Mladík JEČMEN - doplněk stravy (ČR)



Obr. 13 Mladý ječmen použitý k enkapsulaci [27, 28]

4.3 Příprava částic

4.3.1 Příprava částic pro enkapsulaci enzymů – manuální příprava

4.3.1.1 Příprava alginátových částic

3 ml 0,5% chloridu vápenatého byly za stálého míchání přikapávány do 10 ml 0,3% alginátu, v němž byl před přikapáváním rozpuštěn vzorek určený pro enkapsulaci [18].

4.3.1.2 Příprava chitosanových částic

250 mg chitosanu bylo rozpuštěno ve 40 ml vody s již rozpuštěným vzorkem enzymu, následně bylo přidáno 0,5 ml koncentrované kyseliny octové. Vzniklá směs byla ultrazvukována a po malých dávkách byly přidávány 4 ml 2% tripolyfosfátu sodného [18].

4.3.1.3 Příprava škrobových částic

Byl připraven 1% roztok škrobu, kde škrob byl rozpuštěn v roztoku hydroxidu sodného a močoviny v poměru těchto látek 0,8:1 (hmotnostních procent). Do takto připraveného roztoku byl poté přidán vzorek určený k enkapsulaci. 1 ml tohoto roztoku byl přikapáván po malých dávkách do 20 ml ethanolu [18].

4.3.1.4 Příprava lipozomových částic

450 mg lecitinu a 50 mg cholesterolu bylo přidáno do 20 ml vody, ve které byl předem rozpuštěn vzorek určený pro enkapsulaci. Roztok připravený tímto způsobem byl ultrazvukován po dobu 1 minuty [18].

Ukázka některých z připravených částic je uvedena v příloze 2.

4.3.2 Příprava částic pro enkapsulaci enzymů – příprava pomocí enkapsulátoru

Enkapsulátor B-395 Pro (BÜCHI) je poloautomatický přístroj sloužící k polymernímu zapouzdření chemických látek, biologických molekul, drog, vůní a aromátů, pigmentů, extraktů, buněk a mikroorganismů za sterilních i nesterilních podmínek. Tvorba částic je založena na faktu, že pokud regulovaný laminární proud vibruje s optimální frekvencí, rozbije se na kapky stejné velikosti. Enkapsulátor B-395 Pro poskytuje právě takové řízené podmínky, aby generoval částice o velikosti od 0,15 do 2 mm. Přístroj se hodí k zapouzdřování částic menších než 50 μm [29].

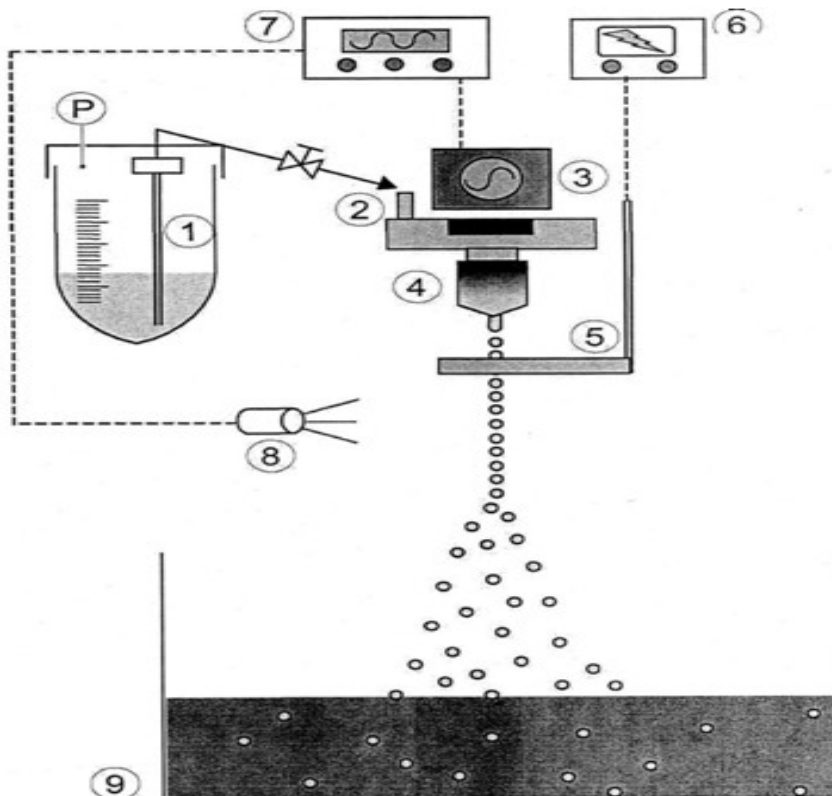
Pokud se přístroj používá s potenciálně toxickými nebo rizikovými látkami, musí se nainstalovat do uzavřené digestoře nebo rukavicového boxu. Veškeré zpracování a obsluha přístroje se v takovém případě musí provádět v odvětrávaném boxu, aby se předešlo otravě a dalším situacím nebezpečným pro uživatele i okolní prostředí [29].



Obr. 14 Enkapsulátor B-395 Pro používaný pro přípravu částic [30]

Látka určená k enkapsulaci se smíchá s enkapsulačním polymerem a tuto směs umístíme do stříkačky (2) nebo tlakové láhve (3), dle požadovaného způsobu enkapsulace. Následně je směs tlačena do pulzační komory (5), buď tedy stříkačkovým čerpadlem (1) nebo tlakovým vzduchem (4). Dále pak prochází přes trysku (7), kde se po výstupu z této trysky rozděljuje do jednotlivých kapiček o stejné velikosti. Kapičky procházejí elektrickým polem mezi tryskou a elektrodou (8), což způsobí, že získají povrchový náboj, viz obr. 15. Díky elektrostatickým odpuzivým silám, jsou částice dopadající do vytvrzovacího roztoku rozptýleny [29].

V předložené práci byly jako látky k enkapsulaci použity enzymy, jako enkapsulační polymer byl použit alginát (1% a 2%, tryska 450 μm) a chitosan (rovněž 1% a 2%, tryska 750 μm) a směs byla dána do tlakové láhve, nikoliv do stříkačky [29].



Obr. 15 Schematické znázornění Enkapsulátoru B-395 Pro [29]

Ukázka některých z připravených částic je uvedena v přílohách 2 a 4.

4.4 Stanovení enkapsulační účinnosti

Enkapsulační účinnost enzymů byla stanovena jednak pomocí stanovení koncentrace proteinů Hartree-Lowryho metodou a jednak s využitím stanovení enzymové aktivity [18].

Při stanovení enkapsulační účinnosti za pomoci Hartree-Lowryho metody byla nejdříve změřena koncentrace proteinů v roztoku, ve kterém byl rozpuštěn enzym určený k enkapsulaci. Následně byl enzym enkapsulován a částice centrifugovány. V supernatantu byla poté stanovena zbytková koncentrace bílkovin a použita k výpočtu množství enkapsulovaných proteinů a k % enkapsulační účinnosti [18].

Při stanovení enkapsulační účinnosti za pomoci enzymové aktivity byla změřena enzymová aktivita nejdříve v roztoku enzymu určeného k enkapsulaci. Následně byl enzym enkapsulován, částice centrifugovány a nakonec byla změřena zbylá enzymová aktivita v supernatantu [18].

4.4.1 Stanovení koncentrace proteinů Hartree-Lowryho metodou

Pro stanovení koncentrace proteinů byla použita Hartree-Lowryho metoda. K 1 ml vzorku obsahujícího enzym bylo přidáno 0,9 ml Hartree-Lowryho činidla A. Roztok byl následně inkubován ve vodní lázni při 50 °C po dobu 10 minut. Po ochlazení roztoku bylo přidáno 0,1 ml Hartree-Lowryho činidla B, dále byl roztok protřepán a inkubován tentokrát při laboratorní teplotě opět po dobu 10 minut. Nakonec byly přidány 3 ml Folin-Ciocalteuova činidla a směs byla ještě jednou inkubována 10 minut ve vodní lázni při 50 °C. Roztok byl ochlazen a byla změřena jeho absorbance při 650 nm [31].

Složení činidel:

Roztok A: 2 g tetrahydrátu vinanu sodno-draselného, 100 g uhličitanu sodného, 500 ml 1M hydroxidu sodného, doplnit destilovanou vodou do 1l

Roztok B: 2 g tetrahydrátu vinanu sodno-draselného, 1 g pentahydrátu síranu měďnatého, 10 ml 1M hydroxidu sodného

Roztok C: Folin-Ciocalteuovo činidlo:destilovaná voda (1:15)

4.4.1.1 Stanovení kalibrační křivky albuminu

Pro sestavení kalibrační křivky byl použit standardní roztok hovězího sérového albuminu, z něhož byla připravena kalibrační řada o koncentraci 0,025 až 0,500 mg/ml. Koncentrace proteinů byla stanovena dle postupu popsaného v předchozí kapitole (kap. 4.4.1) [18].

4.4.2 Stanovení enzymových aktivit

Při stanovení proteázové aktivity trypsinu, bromelainu, pankreatinu a proteolytické aktivity komplexu mladého ječmene byl jako substrát použit roztok azoalbuminu o koncentraci 5 mg/ml [18].

0,1 ml substrátu bylo smícháno s 0,1 ml supernatantu a následně inkubováno při 37 °C po dobu 30 minut. Reakce byla zastavena přidávkem 0,41 ml 10% kyseliny trichloroctové, poté byly vzorky centrifugovány. V kyvetě bylo k 0,5 ml získaného supernatantu přidáno 0,7 ml 1M hydroxidu sodného a nakonec byla změřena absorbance při 440 nm proti blanku [18].

4.5 Stanovení velikosti částic

Velikost částic byla stanovena pomocí přístroje ZetaSizer Nano ZS. Roztoky částic byly naředěny na vhodnou koncentraci (100x zředěny) a změřeny v kyvetě [18].

4.6 Stanovení stability částic

Stabilita částic byla změřena stejně jako velikost částic na přístroji ZetaSizer Nano ZS pomocí Zeta Dipp cely. Před vlastním měřením byla cela ponořena do roztoku v kyvetě. Roztoky byly před analýzou rovněž 100x zředěny [18].

4.7 Stanovení stability částic v modelových tělních tekutinách

4.7.1 Složení modelové pankreatické šťávy

Pankreatická šťáva byla připravena rozpuštěním 0,25 g pankreatinu a 1,5 g hydrogenuhličitanu sodného ve 100 ml destilované vody, pH bylo upraveno na cca 8,9 [18].

4.7.2 Složení modelové žaludeční šťávy

Žaludeční šťáva byla připravena z 0,25 g pepsinu, který byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. Následně bylo přidáno 0,84 ml 35% kyseliny chlorovodíkové a hodnota pH byla upravena na hodnotu 0,9 [18].

4.7.3 Složení modelové žlučové šťávy

Žlučová šťáva byla připravena přidáním 0,8 g žlučových solí do 200 ml pufru o pH 8 [18].

4.8 Stanovení stability částic v modelových potravinách

Simulantem potraviny je označen zkušební roztok přesně definovaného složení a přesně definovaných vlastností, nahrazující určitou potravinu nebo skupinu potravin. Pro potraviny s pH vyšším než 4,5 byla použita voda, pro potraviny s pH nižším byl připraven 3% roztok kyseliny octové. Pro alkoholové potraviny byl potom připraven 10% roztok ethanolu a pro tukové potraviny byl použit jako modelový roztok olej smíchaný s vodou v poměru 1:3 [18].

Částice byly ponechány ve čtyřech typech modelových potravin a pomocí stanovení koncentrace proteinů Hartree-Lowryho metodou byla sledována jejich stabilita, a to po 1 týdnu a 1 měsíci [18].

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Enkapsulace enzymů – manuální příprava

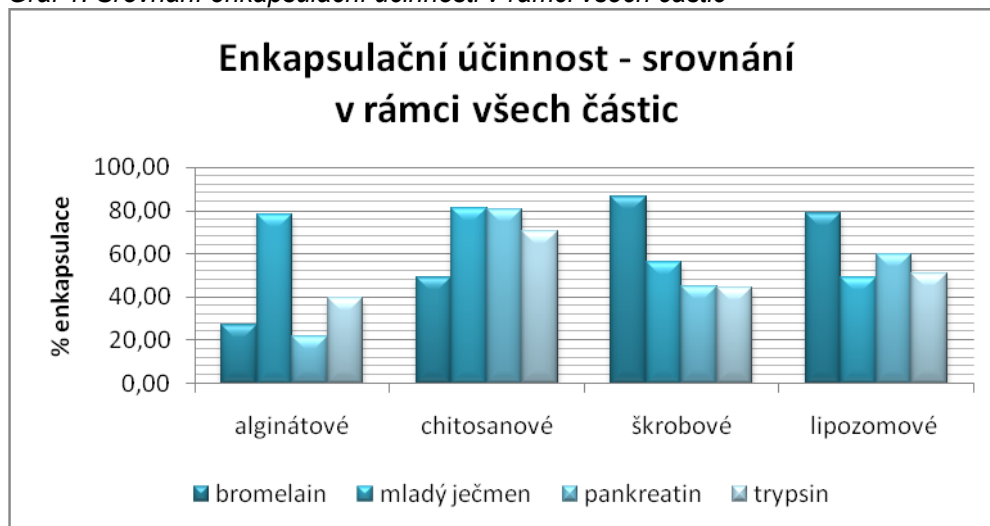
5.1.1 Stanovení enkapsulační účinnosti pomocí stanovení koncentrace proteinů

Postup stanovení enkapsulační účinnosti pomocí stanovení koncentrace proteinů byl popsán v kapitole 4.4.1. Všechny vzorky byly proměřeny dvakrát a ze získaných dat byla následně vypočtena průměrná koncentrace proteinů (kalibrační přímka viz příloha 1). Z rozdílu výchozí koncentrace proteinů v roztoku enzymu a koncentrace proteinů v supernatantu po enkapsulaci bylo určeno procento enkapsulovaného enzymu. Výsledky jsou shrnuty v tab. 3 a grafu 1.

Tab. 3 Enkapsulační účinnost vyjádřena v procentech u jednotlivých typů částic [%]

	alginátové	chitosanové	škrobové	lipozomové
bromelain	27,20	49,20	86,20	78,80
mladý ječmen	78,29	81,25	55,88	48,77
pankreatin	22,00	80,40	44,60	60,00
trypsin	39,60	70,40	44,40	50,80

Graf 1: Srovnání enkapsulační účinnosti v rámci všech částic



Na základě vyhodnocených dat můžeme pozorovat, že nejvyšší enkapsulační účinnost u všech typů enzymů, s výjimkou bromelainu, byla stanovena u chitosanových částic. Do lipozomových částic se s účinností vyšší než 50 % enkapsulovaly enzymy trypsin, pankreatin a bromelain. Mladý ječmen této hranice nedosáhl, ale se svou enkapsulační účinností 48,77 % se jí dosti blíží. U částic škrobových se enkapsulační účinnost všech balených enzymů pohybovala v rozmezí 40 – 60 %, přičemž bromelain vykazoval v tomto případě enkapsulační účinnost vysoce nad tímto rozmezím, a sice 86,20 %, což je v rámci celkového srovnání nejvyšší hodnota. Naopak obecně nejhůře se enkapsulovaly enzymy do částic alginátových, výjimkou byl tentokrát mladý ječmen, který se právě v alginátových částicích enkapsuloval velmi dobře. Enkapsulační účinnost v rámci jednotlivých enzymů, bez ohledu na typ částic, byla nejvyšší u mladého ječmene a bromelainu, nejnižší potom u trypsinu. V případě enkapsulace pankreatinu lze navíc očekávat jeho částečný hydrolytický efekt i vůči materiálu některých částic, poněvadž pankreatin je směs hydroláz

s proteolytickou, amylolytickou i lipolytickou aktivitou. V rámci předložené práce by se mohla uplatnit zejména alfa-amylázová aktivita, a to vůči škrobu nebo jiným polysacharidům obsahujícím α -1,4-glykosidické vazby.

Z celkového hlediska jsou tedy pro enkapsulaci proteolytických enzymů nevhodnější chitosanové částice, popřípadě lipozomové, nejméně vhodnými jsou potom částice alginátové.

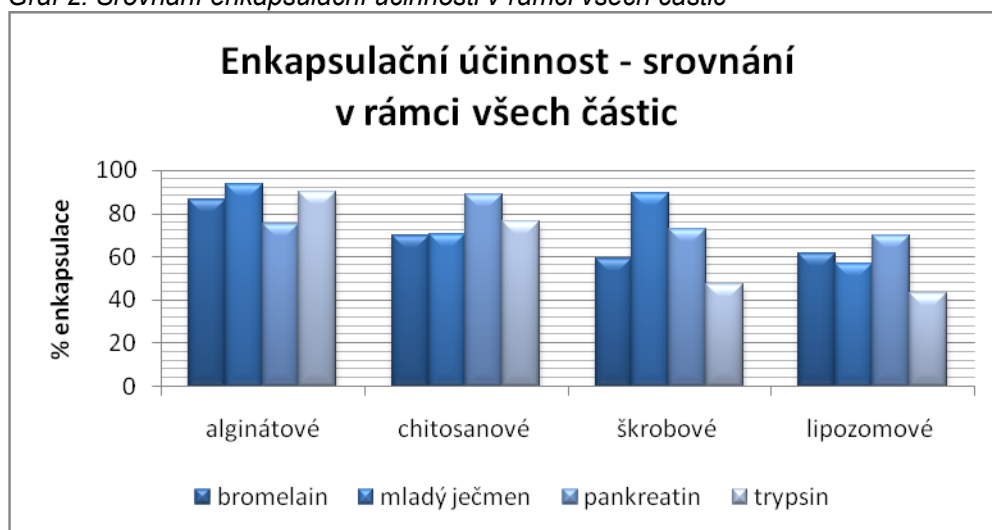
5.1.2 Stanovení enkapsulační účinnosti pomocí enzymové aktivity

Stanovení enkapsulační účinnosti pomocí enzymové aktivity bylo provedeno dle postupu uvedeného v kapitole 4.4.2. Všechny vzorky byly proměřeny dvakrát a ze získaných dat byla poté vypočtena průměrná enzymová aktivita. Z hodnot enzymové aktivity v původním roztoku enzymu a enzymové aktivity v supernatantu po enkapsulaci byla určena enkapsulační účinnost. Výsledky jsou shrnuty v tab. 4 a grafu 2.

Tab. 4 Enkapsulační účinnost vyjádřena v procentech u jednotlivých typů částic [%]

	alginátové	chitosanové	škrobové	lipozomové
bromelain	86,45	69,75	58,97	61,41
mladý ječmen	93,48	70,17	89,39	56,96
pankreatin	75,05	88,59	72,54	69,98
trypsin	89,98	76,5	47,22	43,11

Graf 2: Srovnání enkapsulační účinnosti v rámci všech částic



Při stanovení enkapsulační účinnosti pomocí stanovení enzymové aktivity, byly pozorovány až na pankreatin nejvyšší procenta enkapsulace u alginátových částic. Z tab. 4 je patrné, že rozdíly enkapsulačních účinností v rámci typů částic, nejsou zdaleka tak velké jako v případě stanovení téhož parametru pomocí koncentrace proteinů. Rovněž můžeme vidět, že hodnoty všech enkapsulačních účinností jsou poměrně vysoké, pod 50 % se enkapsuloval jen enzym trypsin, a to v případě škrobových a lipozomových částic. Z hlediska enkapsulace jednotlivých enzymů se nejlépe enkapsuloval extrakt mladý ječmen a pankreatin, hůře pak bromelain s trypsinem.

Obecně můžeme říci, že stanovení enkapsulační účinnosti pomocí enzymových aktivit poskytuje v některých případech i výrazně odlišné hodnoty než u stanovení pomocí koncentrace proteinů. Důvodem může být například interference složek enkapsulační směsi s činidly používanými během jednotlivých stanovení a tím ovlivnění výsledků stanovení

enzymových aktivit. Dalším možným vysvětlením je skutečnost, že metodou enzymových aktivit vlastně zjišťujeme, jaké % účinnosti si jednotlivé enzymy zachovaly po enkapsulaci a to může být odlišné od celkového množství enzymu nebo bílkovin v případě komplexních extraktů.

5.1.3 Stanovení velikosti částic

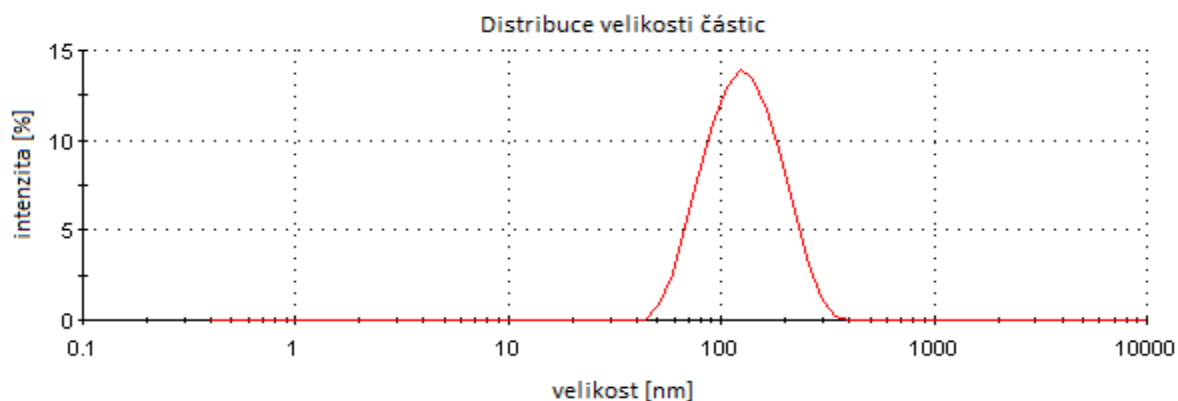
Postup stanovení velikosti částic byl popsán v kapitole 4.5. Všechny vzorky byly proměřeny dvakrát a ze získaných dat byl následně vypočten průměr. Výsledky jsou shrnuty v tab. 5.

Tab. 5 Srovnání velikosti jednotlivých typů částic [nm]

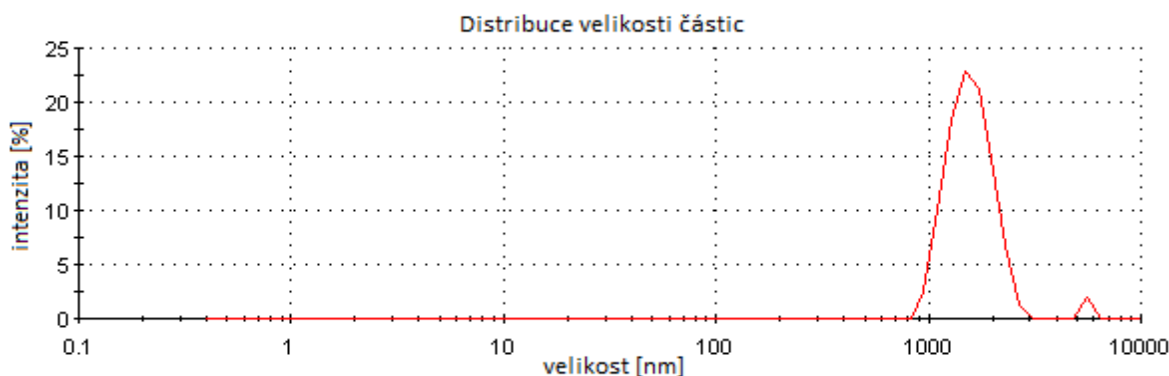
	alginátové	chitosanové	škrobové	lipozomové
prázdné	971,80	1 418,50	266,60	151,95
bromelain	619,65	204,00	171,05	182,13
mladý ječmen	1 037,95	2 161,50	251,20	215,20
pankreatin	337,35	523,30	279,50	117,80
trypsin	634,05	1 384,00	558,05	135,50

Velikost částic byla stanovena jak u částic s enkapsulovanými enzymy, tak u částic prázdných. Největší velikost prázdných částic byla naměřena u částic chitosanových, viz obr. 17, nejmenší pak u částic lipozomových, viz obr. 16. Můžeme pozorovat, že tento trend se uplatňuje rovněž v rámci plných částic.

Ze srovnání velikostí jednotlivých částic je patrné, že největší byly prakticky vždy částice obsahující komplexní extrakt z mladého ječmene.



Obr. 16 Velikost lipozomových částic s enkapsulovaným pankreatinem – nejmenší částice



Obr. 17 Velikosti chitosanových částic s enkapsulovaným mladým ječmenem – největší částice

5.1.4 Stanovení stability částic

Stanovení stability částic bylo provedeno měřením zeta potenciálu dle postupu uvedeného v kapitole 4.6. Všechny vzorky byly proměřeny dvakrát a ze získaných dat byl poté vypočten průměr. Výsledky jsou shrnuty v tab. 6.

Tab. 6 Srovnání stability jednotlivých typů částic [mV]

	alginátové	chitosanové	škrobové	lipozomové
prázdné	-19,45	48,65	-12,05	-39,50
bromelain	-16,10	33,70	-8,11	-38,30
mladý ječmen	-2,63	32,45	-11,75	-32,95
pankreatin	-13,20	36,10	-9,50	-41,60
trypsin	-23,20	50,20	-10,15	-43,23

Stabilita částic byla podobně jako velikost stanovena u částic prázdných (grafické znázornění viz příloha 3) i plných. Budeme-li vycházet z předpokladu, že částice se zeta potenciálem vyšším než +30 mV či zeta potenciálem nižším než -30 mV se považují za stabilní, můžeme za stabilní částice označit chitosanové a lipozomové. Částice alginátové a škrobové do rozmezí stability nespádají, jsou tedy nestabilní. Opět můžeme říci, že tento trend se projevuje jak v rámci částic prázdných, tak v rámci částic s enkapsulovanými enzymy.

5.1.5 Stanovení stability částic v modelových tělních tekutinách

Stabilita částic s enkapsulovanými enzymy byla pozorována v modelové pankreatické, žaludeční a žlučové šťávě (s dobou inkubace 20 min, resp. 40 minut pro šťávu žlučovou), a určena byla pomocí stanovení koncentrace proteinů. Toto stanovení bylo provedeno dle postupu uvedeného v kapitole 4.4.1. Modelové tělní tekutiny byly připraveny podle kapitol 4.7.1, 4.7.2, 4.7.3. Všechny vzorky byly proměřeny dvakrát a ze získaných dat byla následně vypočtena průměrná koncentrace proteinů. Z rozdílu koncentrace proteinů před působením a po působení modelových tělních tekutin bylo určeno množství uvolněných proteinů v procentech. Výsledky jsou shrnuty v tab. 7, 8, 9 a grafech 3, 4, 5.

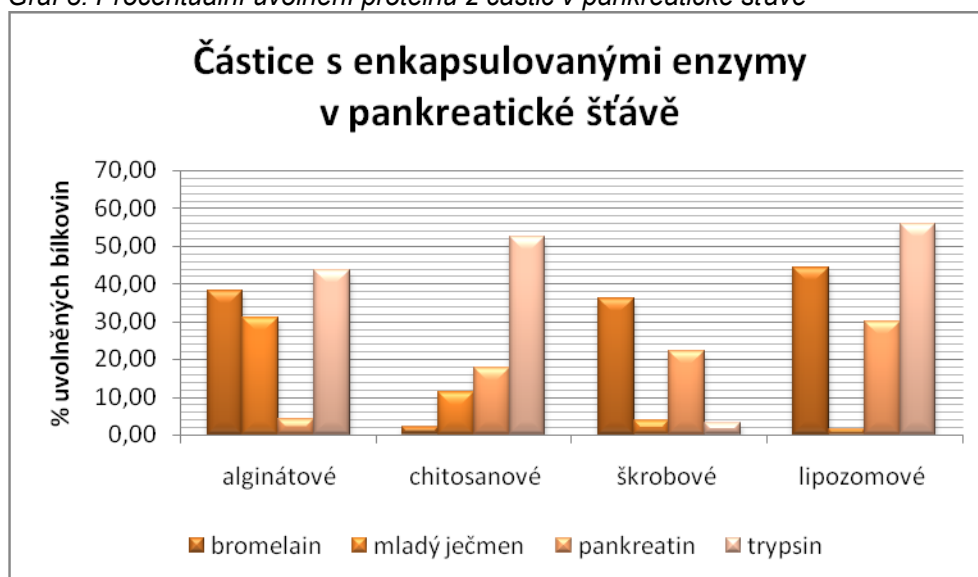
5.1.5.1 Stanovení stability částic v pankreatické šťávě

Stabilita částic v pankreatické šťávě byla určena pomocí stanovení koncentrace proteinů. Toto měření bylo provedeno dle postupu uvedeného v kapitole 4.4. Modelová pankreatická šťáva byla připravena podle kapitoly 4.7.1. Všechny vzorky byly proměřeny dvakrát a ze získaných dat byla následně vypočtena průměrná koncentrace proteinů. Z rozdílu koncentrace proteinů před působením a po působení modelových tělních tekutin bylo určeno množství uvolněných proteinů v procentech. Výsledky jsou shrnuty v tab. 7 a grafu 3.

Tab. 7 Procentuální uvolnění proteinů z jednotlivých typů částic v pankreatické šťávě [%]

	alginátové	chitosanové	škrobové	lipozomové
bromelain	38,24	1,93	36,08	44,19
mladý ječmen	31,05	11,25	3,67	1,50
pankreatin	4,18	17,57	22,26	29,97
trypsin	43,59	52,23	3,06	55,71

Graf 3: Procentuální uvolnění proteinů z částic v pankreatické šťávě



Množství uvolněných proteinů v rámci všech částic se pohybovalo v rozmezí od 1,50 do 55,71 %. Na základě této informace můžeme konstatovat, že procenta uvolněných proteinů u jednotlivých částic byla velmi odlišná. Za nejméně stabilní částice je možné v tomto případě označit částice lipozomové, kde s výjimkou mladého ječmene, bylo vždy množství uvolněných proteinů nejvyšší. Za částice obecně nejstabilnější v prostředí pankreatické šťávy můžeme považovat částice škrobové.

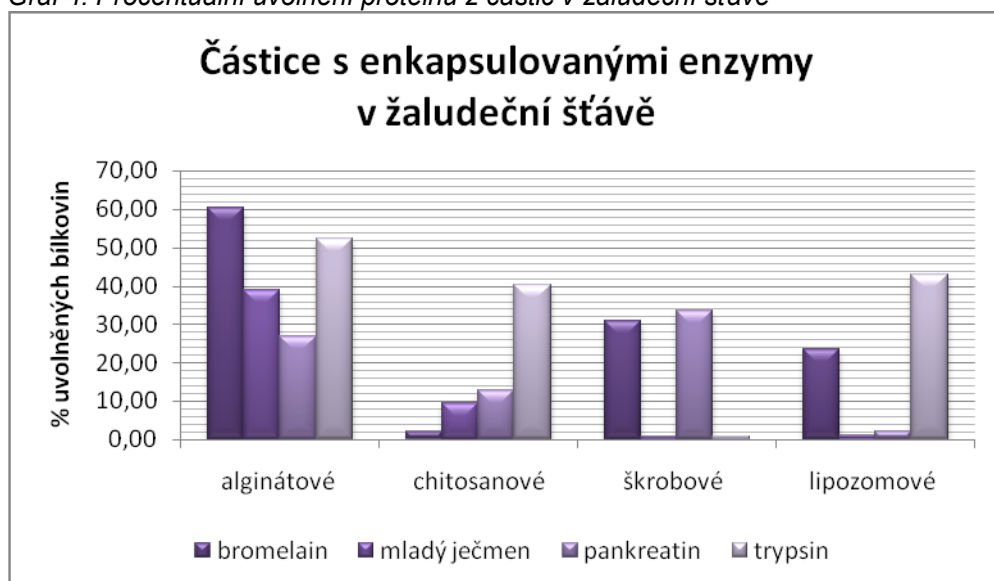
5.1.5.2 Stanovení stability částic v žaludeční šťávě

Stabilita částic v žaludeční šťávě byla určena pomocí stanovení koncentrace proteinů. Toto stanovení bylo provedeno dle postupu uvedeného v kapitole 4.4.1. Modelová žaludeční šťáva byla připravena podle kapitoly 4.7.2. Všechny vzorky byly proměřeny dvakrát a ze získaných dat byla následně vypočtena průměrná koncentrace proteinů. Z rozdílu koncentrace proteinů před působením a po působení modelových tělních tekutin bylo určeno množství uvolněných proteinů v procentech. Výsledky jsou shrnuty v tab. 8 a grafu 4.

Tab. 8 Procentuální uvolnění proteinů z jednotlivých typů částic v žaludeční šťávě [%]

	alginátové	chitosanové	škrobové	lipozomové
bromelain	60,40	1,93	30,90	23,50
mladý ječmen	38,80	9,43	0,86	1,03
pankreatin	26,77	12,72	33,72	2,13
trypsin	52,37	40,14	0,81	43,03

Graf 4: Procentuální uvolnění proteinů z částic v žaludeční šťávě



Dle hodnot uvedených v tab. 8 můžeme opět pozorovat nemalé odlišnosti v procentuálním uvolnění proteinů z jednotlivých typů částic. Na základě měření bylo zjištěno, že nejméně stabilními částicemi jsou v kyselém prostředí žaludeční šťávy částice alginátové. Ostatní typy částic potom v průměru vykazovaly stabilitu podobnou, konkrétně z chitosanových částic se vlivem působení žaludeční šťávy uvolnilo průměrně 16,06 % enzymů, ze škrobových 16,57 % a z lipozomových částic 17,42 %.

5.1.5.3 Stanovení stability částic ve žlučové šťávě

Stabilita částic ve žlučové šťávě byla určena pomocí stanovení koncentrace proteinů. Toto stanovení bylo provedeno dle postupu uvedeného v kapitole 4.4.1. Modelová žlučová šťáva byla připravena podle kapitoly 4.7.3. Všechny vzorky byly proměřeny dvakrát a ze získaných dat byla následně vypočtena průměrná koncentrace proteinů. Z rozdílu koncentrace proteinů před působením a po působení modelových tělních tekutin bylo určeno množství uvolněných proteinů v procentech. Výsledky jsou shrnuty v tab. 9 a grafu 5.

Tab. 9 Procentuální uvolnění proteinů z jednotlivých typů částic ve žlučové šťávě [%]

	alginátové	chitosanové	škrobové	lipozomové
bromelain	22,21	8,01	37,10	47,84
mladý ječmen	21,24	0,97	3,40	0,45
pankreatin	2,64	15,12	47,11	36,75
trypsin	88,64	56,56	20,77	90,47

Graf 5: Procentuální uvolnění proteinů z částic ve žlučové šťávě



Množství uvolněných proteinů v rámci všech částic se pohybovalo v rozmezí od 0,45 do 90,47 %. Na základě těchto výsledků můžeme konstatovat, že odlišnost procentuálního uvolnění proteinů z jednotlivých typů částic zde byla výrazná. Nejmenší stabilitu vykazovaly lipozomové částice, nejvyšší pak částice chitosanové, u nichž se množství uvolněných proteinů pohybovalo od 0,97 do 56,56 %.

Při stanovení stability částic v modelových tělních tekutinách bylo experimentálně zjištěno, že průměrně nejstabilnější byly částice ve šťávě žaludeční, zatímco nejméně stabilní ve šťávě žlučové. V pankreatické šťávě byla nejvyšší stabilita pozorována u částic škrobových, nejnižší u lipozomových. Ve šťávě žaludeční bylo nejvyšší procento uvolněných enzymů stanoveno u částic alginátových. Ve žlučové šťávě byly jako nejstabilnější označeny částice chitosanové, jako nejméně stabilní potom částice lipozomové.

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 rozpouštěny, enzymy se mohou uvolnit a být využity například k hydrolýze složek tráveniny.

5.1.6 Stanovení stability částic v simulovaných potravinách

Stabilita částic s enkapsulovanými enzymy v simulovaných potravinách 4.8 byla určena pomocí stanovení koncentrace proteinů dle postupu uvedeného v kapitole 4.4.1. Všechny vzorky byly proměřeny dvakrát a ze získaných dat byla následně vypočtena průměrná koncentrace proteinů. Z rozdílu koncentrace proteinů před působením a po působení simulovaných potravin bylo určeno množství uvolněných proteinů v procentech. Výsledky jsou shrnuty v tab. 10, 11, 12 a 13.

5.1.6.1 Stabilita alginátových částic

Stabilita alginátových částic v simulovaných potravinách 4.8 byla určena pomocí stanovení koncentrace proteinů dle postupu uvedeného v kapitole 4.4.1. Všechny vzorky byly proměřeny dvakrát a ze získaných dat byla následně vypočtena průměrná koncentrace proteinů. Z rozdílu koncentrace proteinů před působením a po působení simulovaných potravin bylo určeno množství uvolněných proteinů v procentech. Výsledky jsou shrnuty v tab. 10.

Tab. 10 Procentuální uvolnění proteinů z alginátových částic v simulovaných potravinách [%]

	ethanol		ocet		olej		voda	
	týden	měsíc	týden	měsíc	týden	měsíc	týden	měsíc
bromelain	9,45	10,59	1,18	7,65	6,40	31,47	3,24	3,50
mladý ječmen	1,95	4,43	0,13	5,91	0,09	0,65	0,01	2,27
pankreatin	22,27	30,18	2,05	20,68	9,14	9,50	14,27	14,50
trypsin	37,56	59,70	19,44	32,60	59,72	76,64	14,49	14,50

Po týdnu působení simulovaných potravin na alginátové částice s enkapsulovanými enzymy se jako nejstabilnější projeví částice ponechané v 3% roztoku kyseliny octové, jako nejméně stabilní byly potom vyhodnoceny částice ponechané v 10% roztoku ethanolu.

Zaměříme-li se na dlouhodobou stabilitu, tedy na stabilitu po měsíčním působení simulovaných potravin, vidíme, že nejstabilnějšími byly tentokrát částice ponechané ve vodě, zatímco jako nejméně stabilní se opět projeví částice po působení 10% roztoku ethanolu.

Na základě těchto výsledků můžeme říci, že alginátové částice jsou tedy při nižším pH stabilnější než při pH vyšším. Rovněž můžeme tvrdit, že v alkoholových potravinách jsou částice méně stabilní než v nealkoholových.

5.1.6.2 Stabilita chitosanových částic

Stabilita chitosanových částic v simulovaných potravinách 4.8 byla určena pomocí stanovení koncentrace proteinů dle postupu uvedeného v kapitole 4.4.1. Všechny vzorky byly proměřeny dvakrát a ze získaných dat byla následně vypočtena průměrná koncentrace proteinů. Z rozdílu koncentrace proteinů před působením a po působení simulovaných potravin bylo určeno množství uvolněných proteinů v procentech. Výsledky jsou shrnuty v tab. 11.

Tab. 11 Procentuální uvolnění proteinů z chitosanových částic v simulovaných potravinách [%]

	ethanol		ocet		olej		voda	
	týden	měsíc	týden	měsíc	týden	měsíc	týden	měsíc
bromelain	7,87	8,00	1,46	1,50	8,01	8,50	7,60	8,00
mladý ječmen	1,16	4,37	1,11	4,12	1,19	1,19	1,11	1,50
pankreatin	3,51	7,34	0,45	5,68	2,10	2,75	3,42	9,94
trypsin	22,4	27,78	10,09	10,50	29,38	29,50	21,51	22,20

Při pozorování krátkodobé stability v simulovaných potravinách se v případě chitosanových částic ukázaly být nejstabilnější částice po působení 3% roztoku kyseliny octové, naopak nejméně stabilními se projeví částice ponechané v roztoku oleje.

Po měsíčním působení simulovaných potravin byly jako nejstabilnější označeny rovněž částice v 3% roztoku kyseliny octové, nejnižší stabilitu vykazovaly potom částice ponechané v 10% roztoku ethanolu.

Dle výsledků shrnutých v tab. 11 lze konstatovat, že chitosanové částice jsou, podobně jako alginátové, při nižším pH stabilnější. Stejně tak můžeme tvrdit, že v tukových a alkoholových potravinách jsou částice méně stabilní než v potravinách netukových a nealkoholových.

5.1.6.3 Stabilita škrobových částic

Stabilita škrobových částic v simulovaných potravinách 4.8 byla určena pomocí stanovení koncentrace proteinů dle postupu uvedeného v kapitole 4.4.1. Všechny vzorky byly proměřeny dvakrát a ze získaných dat byla následně vypočtena průměrná koncentrace

proteinů. Z rozdílu koncentrace proteinů před působením a po působení simulovaných potravin bylo určeno množství uvolněných proteinů v procentech. Výsledky jsou shrnuty v tab. 12.

Tab. 12 Procentuální uvolnění proteinů ze škrobových částic v simulovaných potravinách [%]

	ethanol		ocet		olej		voda	
	týden	měsíc	týden	měsíc	týden	měsíc	týden	měsíc
bromelain	3,67	4,00	2,04	2,50	0,15	0,96	4,08	4,50
mladý ječmen	4,42	4,50	0,27	3,01	1,27	1,65	4,72	5,00
pankreatin	3,05	3,50	0,07	1,79	1,41	1,50	10,65	11,00
trypsin	7,03	7,50	7,70	8,74	2,16	2,50	8,22	8,50

Po týdnu působení simulovaných potravin na škrobové částice s enkapsulovanými enzymy se jako nejstabilnější projevily částice ponechané v roztoku oleje, jako nejméně stabilní byly potom vyhodnoceny částice ponechané ve vodě.

V případě dlouhodobé stability byly závěry obdobné. Nejvyšší stabilitu vykazovaly částice v roztoku oleje, nejnižší pak částice vystavené působení vody.

Na základě těchto výsledků můžeme říci, že škrobové částice jsou tedy v tukových potravinách stabilnější než v potravinách netukových.

5.1.6.4 Stabilita lipozomových částic

Stabilita lipozomových částic v simulovaných potravinách 4.8 byla určena pomocí stanovení koncentrace proteinů dle postupu uvedeného v kapitole 4.4.1. Všechny vzorky byly proměřeny dvakrát a ze získaných dat byla následně vypočtena průměrná koncentrace proteinů. Z rozdílu koncentrace proteinů před působením a po působení simulovaných potravin bylo určeno množství uvolněných proteinů v procentech. Výsledky jsou shrnuty v tab. 13.

Tab. 13 Procentuální uvolnění proteinů z lipozomových částic v simulovaných potravinách [%]

	ethanol		ocet		olej		voda	
	týden	měsíc	týden	měsíc	týden	měsíc	týden	měsíc
bromelain	20,99	26,38	7,66	10,53	23,10	23,64	8,21	12,55
mladý ječmen	12,02	12,50	1,46	1,50	10,25	10,50	0,51	4,92
pankreatin	17,68	18,00	0,40	6,60	0,97	3,67	0,07	3,88
trypsin	40,49	40,50	0,93	16,30	19,43	23,03	20,94	21,00

Při pozorování krátkodobé stability v simulovaných potravinách se v případě lipozomových částic ukázaly být nejstabilnější částice po působení 3% roztoku kyseliny octové, naopak nejméně stabilními se projevily částice ponechané v 10% roztoku ethanolu.

Po měsíčním působení simulovaných potravin bylo vyhodnocení stability stejné jako v případě měření po týdnu.

Dle výsledků shrnutých v tab. 13 lze konstatovat, že lipozomové částice jsou při nižším pH stabilnější než při pH vyšším. Rovněž můžeme tvrdit, že v potravinách alkoholových jsou částice méně stabilní než v potravinách alkohol neobsahujících.

Při stanovení stability částic v simulovaných potravinách bylo experimentálně zjištěno, že obecně nejstabilnější byly částice v 3% roztoku kyseliny octové, zatímco nejméně stabilními potom v 10% roztoku ethanolu. Na základě výsledků můžeme konstatovat, že tento trend platí jak v rámci krátkodobé stability, tak v rámci stability dlouhodobé. Výsledky jsou

v relativní shodě s daty získanými při testování stability v modelovém fyziologickém prostředí.

5.2 Enkapsulace enzymů – příprava pomocí enkapsulátoru

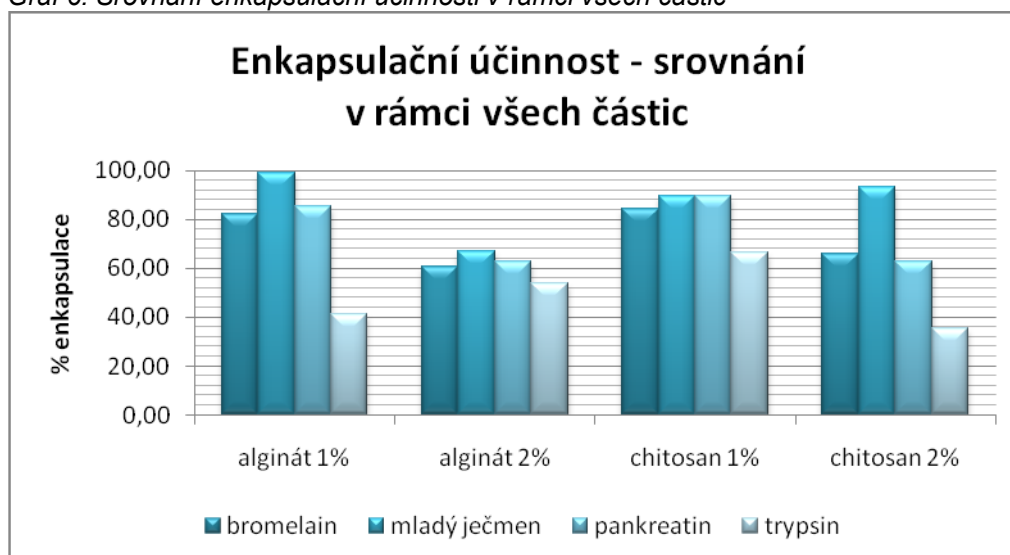
5.2.1 Stanovení enkapsulační účinnosti pomocí stanovení koncentrace proteinů

Postup stanovení enkapsulační účinnosti pomocí stanovení koncentrace proteinů byl popsán v předchozí kapitole 4.4.1. Všechny vzorky byly proměřeny dvakrát a ze získaných dat byla následně vypočtena průměrná koncentrace proteinů. Z rozdílu výchozí koncentrace proteinů v roztoku enzymu a koncentrace proteinů v supernatantu po enkapsulaci bylo určeno procento enkapsulovaného enzymu. Výsledky jsou shrnuty v tab. 14 a grafu 6.

Tab. 14 Enkapsulační účinnost vyjádřena v procentech u jednotlivých typů částic [%]

	alginát 1%	alginát 2%	chitosan 1%	chitosan 2%
bromelain	82,22	60,74	84,55	66,02
mladý ječmen	99,25	67,10	89,83	93,22
pankreatin	85,49	62,75	89,83	62,83
trypsin	41,02	53,78	66,33	35,47

Graf 6: Srovnání enkapsulační účinnosti v rámci všech částic



Na základě vyhodnocených dat můžeme pozorovat, že nejvyšší enkapsulační účinnost u všech typů enzymů, s výjimkou mladého ječmene, byla stanovena u částic z 1% chitosanu. Rovněž můžeme sledovat, že hodnoty všech enkapsulačních účinností jsou poměrně vysoké, pod 50 % se enkapsuloval jen enzym trypsin, a to v případě částic z 1% alginátu a 2% chitosanu. V rámci enkapsulace jednotlivých enzymů se nejlépe enkapsuloval komplex mladý ječmen, který dosáhl ve dvou případech enkapsulační účinnosti nad 90 %, nejhůře se pak enkapsuloval trypsin.

5.2.2 Stanovení stability částic v modelových tělních tekutinách

Stabilita částic s enkapsulovanými enzymy byla pozorována v modelové pankreatické, žaludeční a žlučové šťávě (s dobou inkubace 20 min, resp. 40 minut pro šťávu žlučovou), a určena byla pomocí stanovení koncentrace proteinů. Stanovení koncentrace proteinů bylo provedeno dle postupu uvedeného v kapitole 4.4.1. Všechny vzorky byly proměřeny dvakrát a ze získaných dat byla následně vypočtena průměrná koncentrace proteinů. Z rozdílu

koncentrace proteinů před působením a po působení modelových tělních tekutin bylo určeno množství uvolněných proteinů v procentech. Výsledky jsou shrnuty v tab. 15, 16, 17 a grafech 7, 8, 9.

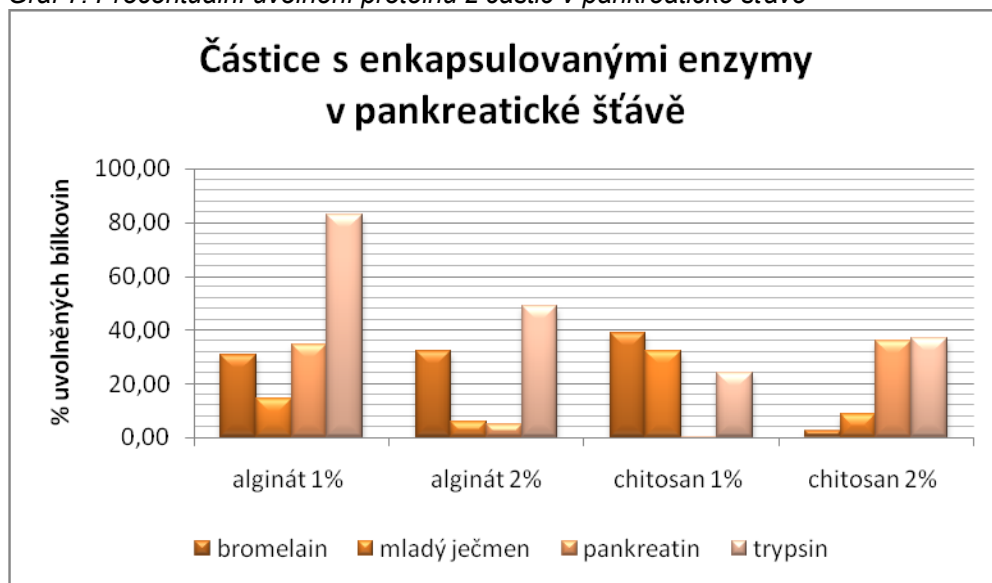
5.2.2.1 Stanovení stability částic v pankreatické šťávě

Stabilita částic v pankreatické šťávě byla určena pomocí stanovení koncentrace proteinů. Toto stanovení bylo provedeno dle postupu uvedeného v kapitole 4.4.1. Modelová pankreatická šťáva byla připravena podle kapitoly 4.7.1. Všechny vzorky byly proměřeny dvakrát a ze získaných dat byla následně vypočtena průměrná koncentrace proteinů. Z rozdílu koncentrace proteinů před působením a po působení modelových tělních tekutin bylo určeno množství uvolněných proteinů v procentech. Výsledky jsou shrnuty v tab. 15 a grafu 7.

Tab. 15 Procentuální uvolnění proteinů z jednotlivých typů částic v pankreatické šťávě [%]

	alginát 1%	alginát 2%	chitosan 1%	chitosan 2%
bromelain	30,66	32,02	38,85	2,42
mladý ječmen	14,36	5,96	32,28	8,48
pankreatin	34,68	5,02	0,11	36,12
trypsin	83,05	48,79	24,19	36,81

Graf 7: Procentuální uvolnění proteinů z částic v pankreatické šťávě



Množství uvolněných proteinů v rámci všech částic se pohybovalo v rozmezí od 0,11 do 83,05 %. Na základě této informace můžeme konstatovat, že procenta uvolněných proteinů u jednotlivých částic byla velmi odlišná. Za nejméně stabilní částice je možné v tomto případě označit částice z 1% alginátu. Ostatní typy částic potom v průměru vykazovaly stabilitu podobnou, konkrétně z částic z 2% alginátu se vlivem působení pankreatické šťávy uvolnilo průměrně 22,95 % enzymů, z částic z 1% chitosanu 23,86 % a z částic z 2% chitosanu 20,96 %.

5.2.2.2 Stanovení stability částic v žaludeční šťávě

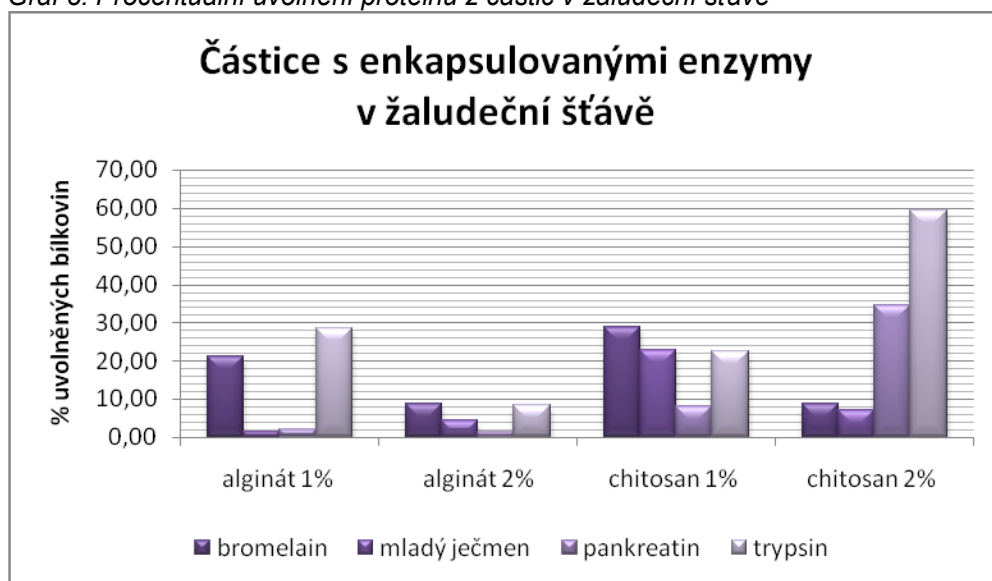
Stabilita částic v žaludeční šťávě byla určena pomocí stanovení koncentrace proteinů. Toto stanovení bylo provedeno dle postupu uvedeného v kapitole 4.4.1. Modelová žaludeční šťáva byla připravena podle kapitoly 4.7.2. Všechny vzorky byly proměřeny dvakrát a ze

získaných dat byla následně vypočtena průměrná koncentrace proteinů. Z rozdílu koncentrace proteinů před působením a po působení modelových tělních tekutin bylo určeno množství uvolněných proteinů v procentech. Výsledky jsou shrnuty v tab. 16 a grafu 8.

Tab. 16 Procentuální uvolnění proteinů z jednotlivých typů částic v žaludeční šťávě [%]

	alginát 1%	alginát 2%	chitosan 1%	chitosan 2%
bromelain	21,29	8,72	28,74	8,64
mladý ječmen	1,56	4,47	22,98	7,03
pankreatin	1,99	1,35	8,01	34,69
trypsin	28,54	8,36	22,38	59,24

Graf 8: Procentuální uvolnění proteinů z částic v žaludeční šťávě



Dle hodnot uvedených v tab. 16 můžeme pozorovat množství uvolněných proteinů v rozmezí 1,35 – 59,24 %. Na základě měření bylo zjištěno, že nejméně stabilními částicemi jsou v tomto případě částice z 2% chitosanu, u nichž se množství uvolněných proteinů pohybovalo od 7,03 do 59,24 %. Jako ty nejstabilnější byly potom stanoveny částice z 2% alginátu, kde procentuální uvolnění enzymů nepřekročilo hranici 10 %.

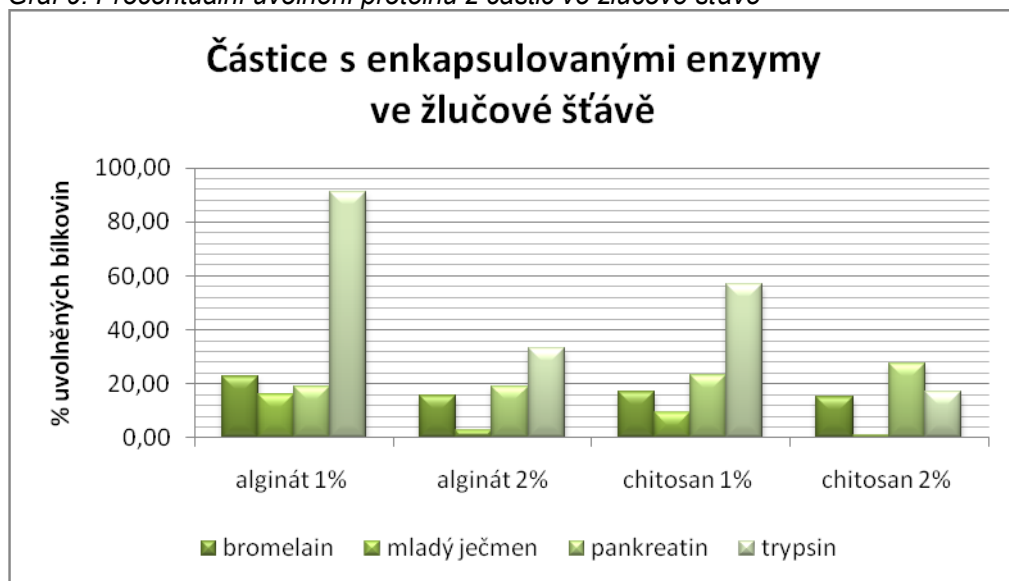
5.2.2.3 Stanovení stability částic ve žlučové šťávě

Stabilita částic ve žlučové šťávě byla určena pomocí stanovení koncentrace proteinů. Toto stanovení bylo provedeno dle postupu uvedeného v kapitole 4.4.1. Modelová žlučová šťáva byla připravena podle kapitoly 4.7.3. Všechny vzorky byly proměřeny dvakrát a ze získaných dat byla následně vypočtena průměrná koncentrace proteinů. Z rozdílu koncentrace proteinů před působením a po působení modelových tělních tekutin bylo určeno množství uvolněných proteinů v procentech. Výsledky jsou shrnuty v tab. 17 a grafu 9.

Tab. 17 Procentuální uvolnění proteinů z jednotlivých typů částic ve žlučové šťávě [%]

	alginát 1%	alginát 2%	chitosan 1%	chitosan 2%
bromelain	22,45	15,56	16,91	15,08
mladý ječmen	15,97	2,83	9,24	0,91
pankreatin	18,77	19,04	22,93	27,53
trypsin	91,22	33,18	56,82	16,93

Graf 9: Procentuální uvolnění proteinů z částic ve žlučové šťávě



Množství uvolněných proteinů v rámci všech částic se pohybovalo v rozmezí od 0,91 do 91,22 %. Na základě těchto výsledků můžeme konstatovat, že odlišnost procentuálního uvolnění proteinů z jednotlivých typů částic byla značná. Nejnížší stabilitu vykazovaly částice z 1% alginátu, nejvyšší pak částice z 2% chitosanu, kde průměrné množství uvolněných enzymů bylo stanoveno na 15,11 %.

Při stanovení stability částic v modelových tělních tekutinách bylo experimentálně zjištěno, že průměrně nejstabilnější byly částice ve šťávách žaludečních, zatímco nejméně stabilními potom ve šťávách pankreatických. V pankreatické šťávě bylo nejvyšší procento uvolněných enzymů stanoveno u částic z 1% alginátu. Ve šťávě žaludeční byla nejvyšší stabilita pozorována u částic z 2% alginátu, nejnižší u částic z 2% chitosanu. Ve žlučové šťávě byly jako nejstabilnější označeny částice z 2% chitosanu, jako nejméně stabilní potom částice z 1% alginátu.

Výsledky stability částic připravených na enkapsulátoru byly podobné datům získaným u částic připravených manuálně. I v tomto případě byla zjištěna vyšší stabilita v kyselém prostředí umělé žaludeční šťávy, která může být využita pro cílený transport enkapsulovaných enzymů do tenkého střeva, kde jsou působením pankreatické a žlučové šťávy rozpouštěny, enzymy se mohou uvolnit a být využity.

5.2.3 Stanovení stability částic v simulovaných potravinách

Stabilita částic s enkapsulovanými enzymy v simulovaných potravinách 4.8 byla určena pomocí stanovení koncentrace proteinů dle postupu uvedeného v kapitole 4.4.1. Všechny vzorky byly proměřeny dvakrát a ze získaných dat byla následně vypočtena průměrná koncentrace proteinů. Z rozdílu koncentrace proteinů před působením a po působení simulovaných potravin bylo určeno množství uvolněných proteinů v procentech. Výsledky jsou shrnuty v tab. 18, 19, 20 a 21.

5.2.3.1 Stabilita částic připravených z 1% alginátu

Stabilita částic připravených z 1% alginátu v simulovaných potravinách 4.8 byla určena pomocí stanovení koncentrace proteinů dle postupu uvedeného v kapitole 4.4.1. Všechny vzorky byly proměřeny dvakrát a ze získaných dat byla následně vypočtena průměrná koncentrace proteinů. Z rozdílu koncentrace proteinů před působením a po působení simulovaných potravin bylo určeno množství uvolněných proteinů v procentech. Výsledky jsou shrnuty v tab. 18.

Tab. 18 Procentuální uvolnění proteinů z alginátových částic v simulovaných potravinách [%]

	ethanol		ocet		olej		voda	
	týden	měsíc	týden	měsíc	týden	měsíc	týden	měsíc
bromelain	14,82	59,64	11,61	45,33	8,10	27,37	18,91	47,30
mladý ječmen	4,84	46,01	3,63	36,15	0,79	21,28	6,41	25,51
pankreatin	15,86	38,25	12,35	35,44	7,02	30,81	8,14	38,67
trypsin	53,36	93,27	69,88	98,54	60,50	66,52	22,81	82,60

Po týdnu působení simulovaných potravin na částice z 1% alginátu se jako nejstabilnější projeví částice ponechané v roztoku oleje, jako nejméně stabilní byly potom vyhodnoceny částice ponechané v 10% roztoku ethanolu.

Zaměříme-li se na dlouhodobou stabilitu, tedy na stabilitu po měsíčním působení simulovaných potravin, vidíme, že nejstabilnějšími byly opět částice ponechané v roztoku oleje, stejně tak jako nejméně stabilní se opět projeví částice po působení 10% roztoku ethanolu.

Na základě těchto výsledků můžeme říci, že částice z 1% alginátu jsou tedy při nižším pH stabilnější než při pH vyšším. Stejně tak lze tvrdit, že částice jsou v alkoholových potravinách méně stabilní než v potravinách nealkoholových.

5.2.3.2 Stabilita částic připravených z 2% alginátu

Stabilita částic připravených z 2% alginátu v simulovaných potravinách 4.8 byla určena pomocí stanovení koncentrace proteinů dle postupu uvedeného v kapitole 4.4.1. Všechny vzorky byly proměřeny dvakrát a ze získaných dat byla následně vypočtena průměrná koncentrace proteinů. Z rozdílu koncentrace proteinů před působením a po působení simulovaných potravin bylo určeno množství uvolněných proteinů v procentech. Výsledky jsou shrnuty v tab. 19.

Tab. 19 Procentuální uvolnění proteinů z alginátových částic v simulovaných potravinách [%]

	ethanol		ocet		olej		voda	
	týden	měsíc	týden	měsíc	týden	měsíc	týden	měsíc
bromelain	24,60	25,00	11,46	15,42	0,99	2,27	15,71	16,00
mladý ječmen	9,21	9,48	6,26	11,90	0,89	0,89	5,64	6,53
pankreatin	44,74	45,00	31,74	32,00	27,63	28,00	20,65	21,00
trypsin	86,72	98,88	38,62	45,65	36,38	50,45	94,53	95,00

Při pozorování krátkodobé stability v simulovaných potravinách se částice z 2% alginátu ukázaly být nejstabilnější po působení roztoku oleje, naopak nejméně stabilními se projeví částice ponechané v 10% roztoku ethanolu.

Po měsíčním působení simulovaných potravin byly jako nejstabilnější označeny rovněž částice v roztoku oleje, nejnižší stabilitu vykazovaly potom částice ponechané v 10% roztoku ethanolu.

Dle výsledků shrnutých v tab. 19 lze konstatovat, že částice z 2% alginátu jsou v potravinách tukových stabilnější než v potravinách alkoholových a naopak.

5.2.3.3 Stabilita částic připravených z 1% chitosanu

Stabilita částic připravených z 1% chitosanu v simulovaných potravinách 4.8 byla určena pomocí stanovení koncentrace proteinů dle postupu uvedeného v kapitole 4.4.1. Všechny vzorky byly proměřeny dvakrát a ze získaných dat byla následně vypočtena průměrná koncentrace proteinů. Z rozdílu koncentrace proteinů před působením a po působení

simulovaných potravin bylo určeno množství uvolněných proteinů v procentech. Výsledky jsou shrnuty v tab. 20.

Tab. 20 Procentuální uvolnění proteinů z chitosanových částic v simulovaných potravinách [%]

	ethanol		ocet		olej		voda	
	týden	měsíc	týden	měsíc	týden	měsíc	týden	měsíc
bromelain	42,94	43,00	22,43	27,61	34,42	45,07	47,13	47,50
mladý ječmen	3,74	5,08	0,47	6,41	1,34	1,50	3,34	10,02
pankreatin	13,56	14,00	8,22	8,50	10,62	11,00	14,43	14,43
trypsin	55,88	56,00	62,21	63,00	72,97	77,22	80,40	87,43

Po týdnu působení simulovaných potravin na částice z 1% chitosanu se jako nejstabilnější projeví částice ponechané v 3% roztoku kyseliny octové, jako nejméně stabilní byly potom vyhodnoceny částice ponechané ve vodě.

V případě dlouhodobé stability byly závěry obdobné. Nejvyšší stabilitu vykazovaly částice v 3% roztoku kyseliny octové, nejnižší pak částice vystavené působení vody.

Na základě těchto výsledků můžeme říci, že částice z 1% chitosanu jsou při nižším pH stabilnější než při pH vyšším.

5.2.3.4 Stabilita částic připravených z 2% chitosanu

Stabilita částic připravených z 2% chitosanu v simulovaných potravinách 4.8 byla určena pomocí stanovení koncentrace proteinů dle postupu uvedeného v kapitole 4.4.1. Všechny vzorky byly proměřeny dvakrát a ze získaných dat byla následně vypočtena průměrná koncentrace proteinů. Z rozdílu koncentrace proteinů před působením a po působení simulovaných potravin bylo určeno množství uvolněných proteinů v procentech. Výsledky jsou shrnuty v tab. 21.

Tab. 21 Procentuální uvolnění proteinů z chitosanových částic v simulovaných potravinách [%]

	ethanol		ocet		olej		voda	
	týden	měsíc	týden	měsíc	týden	měsíc	týden	měsíc
bromelain	14,14	14,14	26,84	33,30	2,09	14,10	16,23	17,03
mladý ječmen	4,89	6,10	2,57	7,50	1,48	3,00	2,57	10,33
pankreatin	40,02	42,00	17,48	18,00	18,05	18,50	20,34	21,56
trypsin	55,67	57,02	46,02	46,60	97,29	97,52	56,18	62,17

Při pozorování krátkodobé stability v simulovaných potravinách se v případě částic z 2% chitosanu ukázaly být nejstabilnější částice po působení roztoku oleje, naopak nejméně stabilními se projeví částice ponechané v 10% roztoku ethanolu a vodě.

Po měsíčním působení simulovaných potravin byly jako nejstabilnější označeny rovněž částice v roztoku oleje, nejnižší stabilitu vykazovaly potom částice ponechané ve vodě.

Dle výsledků shrnutých v tab. 21 lze konstatovat, že částice z 2% chitosanu jsou v potravinách tukových stabilnější než v potravinách alkoholových a naopak.

Při stanovení stability částic v simulovaných potravinách bylo experimentálně zjištěno, že obecně nejstabilnější byly částice v roztoku oleje, zatímco nejméně stabilními potom v 10% roztoku ethanolu. Na základě výsledků můžeme konstatovat, že tento trend platí jak v rámci krátkodobé stability, tak v rámci stability dlouhodobé.

6 ZÁVĚR

Předložená bakalářská práce byla zaměřena na enkapsulaci různých typů enzymů do organických částic. Teoretická část byla věnována enzymům a jejich obecným vlastnostem, struktuře, aktivitě a využití, dále potom procesu enkapsulace a jejím technikám. Byly zde popsány i některé metody využívané k analýze částic, a sice stanovení distribuce velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla a stanovení stability částic pomocí zeta potenciálu.

V experimentální části byly popsány metody přípravy částic, postupy stanovení enkapsulační účinnosti, velikosti a stability částic. Vlastní experiment byl založen na enkapsulaci čtyř typů enzymových preparátů s hydrolytickou aktivitou (trypsin, bromelain – proteázy, pankreatin – směs hydroláz, mladý ječmen – komplexní přírodní preparát s hydrolytickou aktivitou) do organických mikro- a nanočástic. Částice byly připraveny jednak manuálně a rovněž pomocí enkapsulátoru. Částice s těmito enkapsulovanými enzymy byly následně charakterizovány.

Na základě výsledků analýzy enkapsulační účinnosti bylo zjištěno, že nejvhodnějším materiálem pro enkapsulaci enzymů je na základě výsledků stanovení enkapsulační účinnosti i stability chitosan, zatímco nejméně vhodným pak alginát. Co se týká částic připravených pomocí enkapsulátoru, zde byla nejvyšší enkapsulační účinnost pozorována rovněž u částic z 1% chitosanu.

Dále byla stanovena velikost manuálně připravených částic, a to jak u částic s enkapsulovanými enzymy, tak u částic prázdných. Největší velikost byla naměřena u částic chitosanových, nejmenší potom u částic lipozomových, kde se rozměry částic pohybovaly od 117,80 do 215,20 nm. Větší velikost měly částice s enkapsulovaným komplexem enzymů ze zeleného ječmene. Pomocí zeta potenciálu byla stanovena rovněž stabilita částic, jako ty stabilní byly označeny částice chitosanové a lipozomové.

Stabilita částic byla následně pozorována i na základě uvolňování enkapsulovaných enzymů vlivem dlouhodobé inkubace v modelových tělních tekutinách a modelových potravinách. Obecně můžeme říci, že největší stabilitu vykazovaly částice v prostředí umělé žaludeční šťávy. Tento trend vyšší stability částic v kyselém prostředí se potvrdil i v rámci studia stability částic v simulovaných potravinách, kde bylo zjištěno, že částice v potravinách s nižším pH jsou stabilnější než v potravinách s pH vyšším. Rovněž bylo zjištěno, že v potravinách tukových jsou částice stabilnější než v potravinách a nápojích obsahujících alkohol.

Enkapsulace enzymů i komplexních enzymových preparátů se jeví jako vhodná metoda k cílenému transportu enzymů v trávicím traktu i uchování jejich stability a aktivity v přechodně nepříznivém vnějším prostředí.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Referaty-seminarky.cz: enzymy. [online]. [cit. 2014-05-06].
Dostupné z: <http://referaty-seminarky.cz/enzymy/>
- [2] NEDOVIC, Viktor, Ana KALUSEVIC, Verica MANOJLOVIC, Steva LEVIC a Branko BUGARSKI. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* [online]. 2011, vol. 1, s. 1806-1815 [cit. 2014-05-06]. DOI:10.1016/j.profoo.2011.09.265.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211601X11002665>
- [3] VODRÁŽKA, Zdeněk, Jan KÁŠ a Pavel RAUCH. *Enzymologie*. 3. přeprac. vyd. Praha: VŠCHT, 1998, 171 s. ISBN 80-708-0330-4.
- [4] KRÁLOVÁ, Blanka, Ladislav FUKAL, Pavel RAUCH a Tomáš RUMML. *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, 254 s. ISBN 80-708-0449-1.
- [5] Www.e-chembook.eu/cz: biochemie, enzymy. [online]. [cit. 2014-05-06].
Dostupné z: <http://www.e-chembook.eu/cz/biochemie/>
- [6] Lep.wz.cz: škola. [online]. [cit. 2014-05-06].
Dostupné z: <http://lep.wz.cz/skola/index.php?s=3&z=14>
- [7] Vydavatelstvi.vscht.cz: aktivita enzymu katalytická. [online]. [cit. 2014-05-06].
Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es002_v1/hesla/aktivita_enzymu_katalyticka.html
- [8] FANG, Zhongxiang a Bhesh BHANDARI. Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science* [online]. 2010, vol. 21, issue 10, s. 510-523 [cit. 2014-05-06]. DOI: 10.1016/j.tifs.2010.08.003.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224410001925>
- [9] Www.niro.com: Spray Drying. [online]. [cit. 2014-05-06].
Dostupné z: <http://www.niro.com/niro/cmsdoc.nsf/WebDoc/ndkk5hmc6zSprayDryersSprayDryers>
- [10] DESAI, Kashappa Goud H. a Hyun JIN PARK. *Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients* [online]. [cit. 2014-05-06]. DOI: 10.1081/DRT-200063478.
Dostupné z: <http://pack.korea.ac.kr/non/49.pdf>
- [11] Www.ceramicindustry.com: Successful Spray Drying. [online]. [cit. 2014-05-06].
Dostupné z: <http://www.ceramicindustry.com/articles/successful-spray-drying>
- [12] SWARBRICK, James. *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. 3rded. New York: Informa Healthcare, c2007, 6 v. ISBN 08-493-9399-X.
- [13] Www.hielscher.com: Ultrasonic Liposome Preparation. [online]. [cit. 2014-05-06].
Dostupné z: <http://www.hielscher.com/ultrasonic-liposome-preparation.htm>
- [14] GREGORIADIS, Gregory. *Liposome technology*. 3rded. New York: Informa Healthcare, c2007-, v. <1-3>. ISBN 97808493972573.
- [15] Www.horiba.com: Particle Characterization. [online]. [cit. 2014-05-06].
Dostupné z: <http://www.horiba.com/scientific/products/particlecharacterization/applications/pharmaceuticals/liposomes/>
- [16] Www.wasanlab.com: INTRODUCTION TO EMULSIONS. [online]. [cit. 2014-05-06].
Dostupné z: <http://www.wasanlab.com/pharm/emulsion.html>
- [17] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, xxii, 580 s. ISBN 978-80-86659-17-6.

- [18] KAPAR, J. *Testování možností enkapsulace vybraných druhů makromolekul a bakterií*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 93 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [19] SINHA, V.R, A.KSINGLA, S WADHAWAN, R KAUSHIK, R KUMRIA, K BANSAL a S DHAWAN. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2004, vol. 274, 1-2, s. 1-33 [cit. 2014-05-07]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2003.12.026.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S03785173040002257>
- [20] VAVŘÍKOVÁ, EVA a JARMILA VINOVÁ. Chemické Listy: CHITOSAN A JEHO FARMACEUTICKÉ APLIKACE. In: *Chemické listy* [online]. Praha: Česká společnost chemická [cit. 2014-05-07]. ISSN 0009-2770.
Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_01_56-65.pdf
- [21] Www.nutrion.cz: VŠE O LECITINU. [online]. [cit. 2014-05-07].
Dostupné z: <http://www.nutrion.cz/info/detail.php?idzb=128>
- [22] LUBANDA, HANA a MAREK VECKA. ChemickéListy: CHOLESTEROL – PŘÍTEL ČI NEPŘÍTEL?. In: *Chemické listy* [online]. Praha: Česká společnost chemická [cit. 2014-05-07]. ISSN 0009-2770.
Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_01_40-51.pdf
- [23] Dreamhealer.typepad.com: New Cholesterol Advice Startles Even Some Doctors. [online]. [cit. 2014-05-07].
Dostupné z: <http://dreamhealer.typepad.com/dreamhealer/2013/11/new-cholesterol-advice-startles-even-some-doctors.html>
- [24] Www.horiba.com: Dynamic Light Scattering Technology. [online]. [cit. 2014-05-07].
Dostupné z: <http://www.horiba.com/scientific/products/particlecharacterization/technology/dynamic-light-scattering/>
- [25] KASZUBA, Michael, Malcolm CONNAH a Kevin MATTISON. [Www.atomikatechnik.com](http://www.atomikatechnik.com): High concentration particle size measurements using dynamic light scattering. In: [online]. [cit. 2014-05-07].
Dostupné z: <http://www.atomikatechnik.com/pdf/High%20Concentration%20PSA%20by%20PCS.pdf>
- [26] Www.xray.cz: Potenciál zeta a elektrická dvojevrstva. [online]. [cit. 2014-05-07].
Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.htm>
- [27] Www.chutzdravi.cz: Mladý zelený ječmen. [online]. [cit. 2014-05-07].
Dostupné z: http://www.chutzdravi.cz/category.php?id_category=150
- [28] Www.pokladyprirody.cz: Mladý zelený ječmen. [online]. [cit. 2014-05-07].
Dostupné z: <http://www.pokladyprirody.cz/237-mlady-zeleny-jecmen-250g>
- [29] *BŮCHI. Návod k použití: Enkapsulátor B-395 Pro.*
- [30] Www.donaulab.eu: Enkapsulace. [online]. [cit. 2014-05-07].
Dostupné z: <http://www.donaulab.eu/inpage/enkapsulace/>
- [31] MÁROVÁ, Ivana a Dana VRÁNOVÁ. *Praktikum z biochemie – pracovnísešit*. FCH VUT v Brně, Brno, 2002.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

RNA..... ribonukleová kyselina
DLS..... Dynamic Light Scattering

9 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 – Kalibrační přímka pro stanovení proteinů

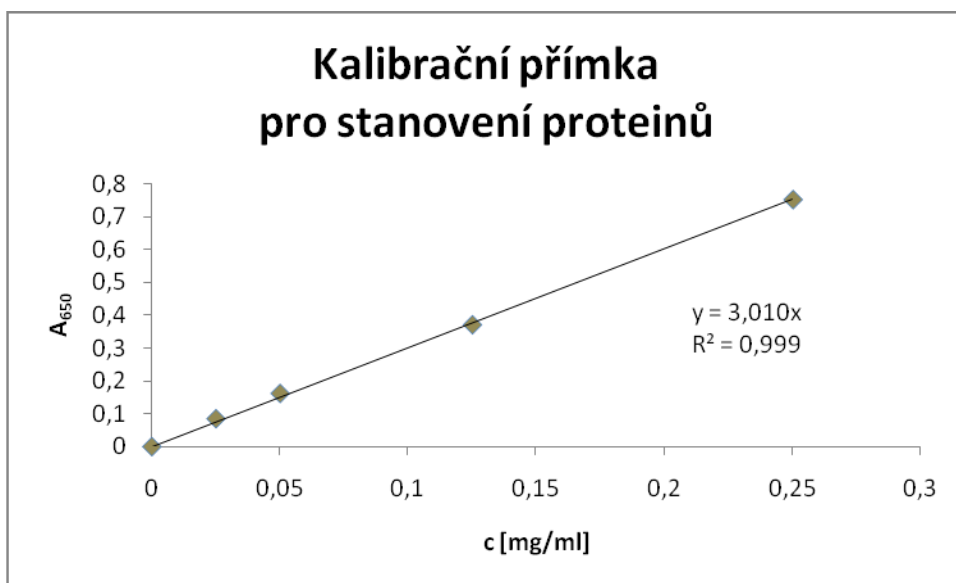
Příloha 2 – Vizualizace částic pomocí optického mikroskopu (zvětšení 64x)

Příloha 3 – Grafické znázornění stability částic pomocí zeta potenciálu

Příloha 4 – Fotografická ukázka připravených částic

10 PŘÍLOHY

Příloha 1 – Kalibrační přímka pro stanovení proteinů

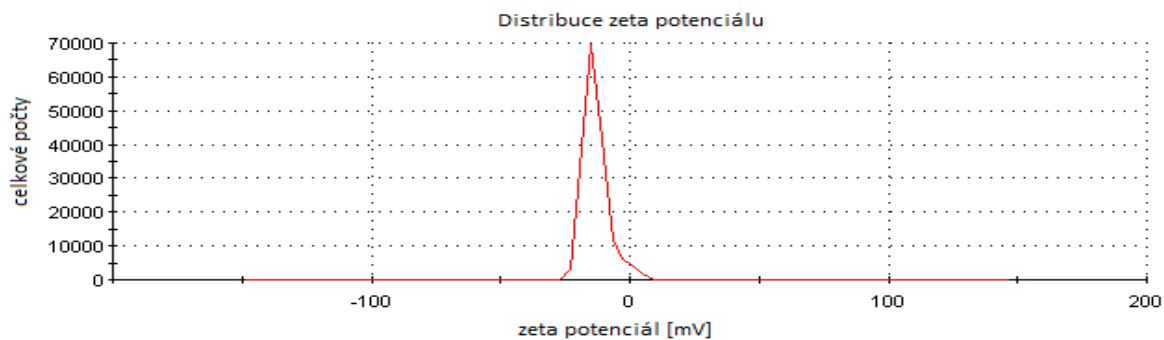


Příloha 2 – Vizualizace částic pomocí optického mikroskopu (zvětšení 64x)

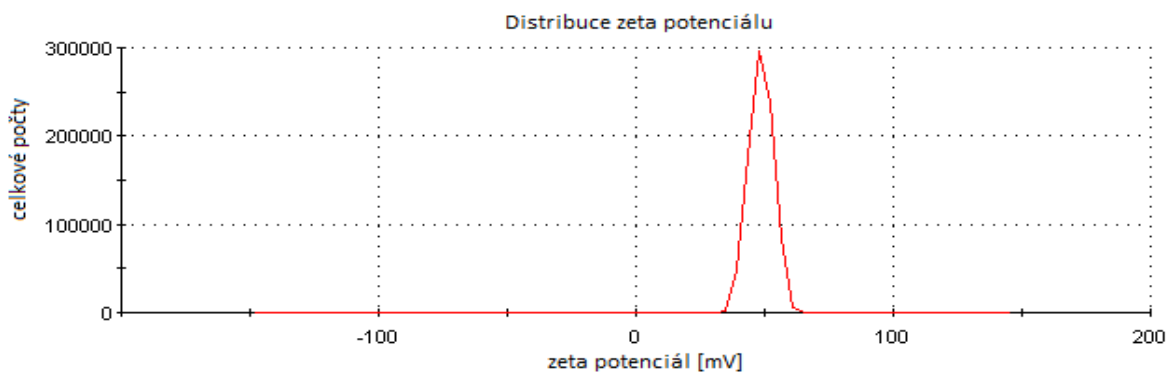


Ukázka připravených částic s enkapsulovaným mladým ječmenem, zleva – alginátové částice, chitosanové částice, škrobové částice, lipozomové částice, částice z enkapsulátoru 1% a 2% alginát a rovněž částice z enkapsulátoru tentokrát 1% a 2% chitosan

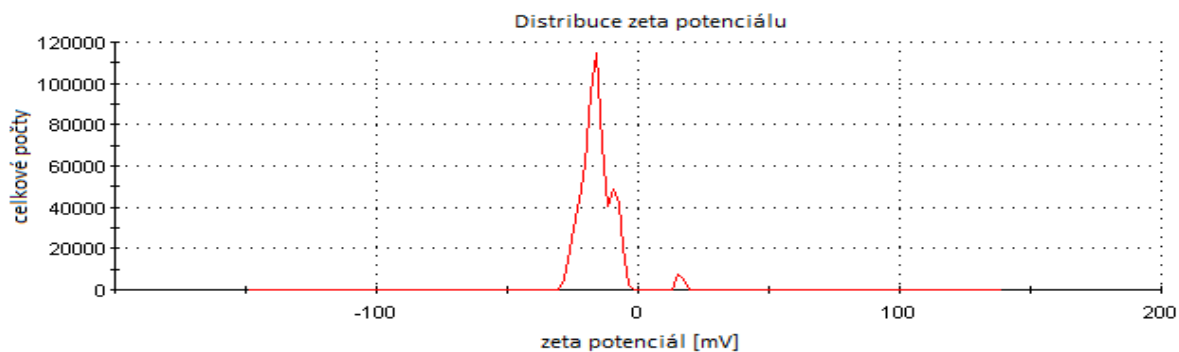
Příloha 3 – Grafické znázornění stability částic pomocí zeta potenciálu



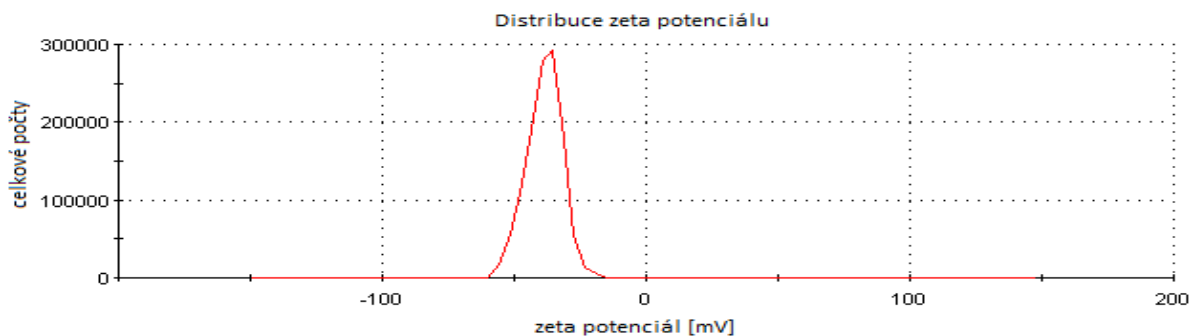
Stabilita prázdných alginátových částic (-19,45 mV) – nestabilní



Stabilita prázdných chitosanových částic (48,65 mV) – stabilní

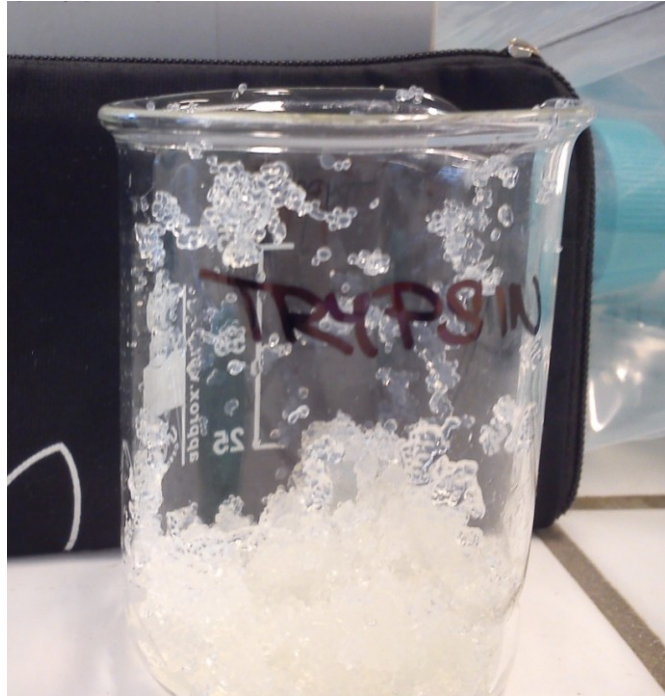


Stabilita prázdných škrobových částic (-12,05 mV) – nestabilní



Stabilita prázdných lipozomových částic (-39,50 mV) – stabilní

Příloha 4 – Fotografická ukázka připravených částic



Na obrázku vlevo nahoře můžeme pozorovat alginátové částice s enkapsulovaným mladým ječmenem, na zbylých dvou obrázcích potom rovněž alginátové částice s enkapsulovaným trypsinem – oba tyto typy částic byly připraveny pomocí enkapsulátoru.