

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

# ENKAPSULACE VYBRANÝCH PŘÍRODNÍCH EXTRAKTŮ PRO VYUŽITÍ V POTRAVINÁŘSTVÍ

ENCAPSULATION OF SELECTED NATURAL EXTRACT FOR FOOD APPLICATION.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. TEREZIE VYSKOČILOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.



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

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0844/2013** Akademický rok: **2013/2014**  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student(ka): **Bc. Terezie Vyskočilová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin (N2901)  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)  
Vedoucí práce **doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.**  
Konzultanti:

### Název diplomové práce:

Enkapsulace vybraných přírodních extraktů pro využití v potravinářství

### Zadání diplomové práce:

1. Vypracujte literární přehled - metody enkapsulace a jejich možné aplikace v potravinářství
2. Popište použité metody - enkapsulace, analýza aktivních složek přírodních extraktů, charakterizace částic
3. Příprava vhodných typů částic s aktivní složkou; stabilita v modelových a reálných podmínkách, aplikace.
4. Vyhodnocení a diskuse výsledků

### Termín odevzdání diplomové práce: 9.5.2014

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

-----  
Bc. Terezie Vyskočilová  
Student(ka)

-----  
doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
Vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Diplomová práce pojednává o enkapsulaci přírodních extraktů. V teoretické části jsou popsány metody enkapsulace, materiály používané pro přípravu částic a aplikace enkapsulačních technik v potravinářství.

V rámci experimentální části práce byly charakterizovány vybrané přírodní extrakty získané z propolisu, zeleného ječmene a probiotik. Tyto látky byly enkapsulovány do alginátu a chitosanu. Bylo vytvořeno 25 typů částic, u kterých byla analyzována dlouhodobá stabilita ve 3 modelových typech fyziologického prostředí a ve čtyřech různých modelových potravinách. U vybraných typů částic byla sledována stabilita též ve čtyřech druzích reálných mléčných potravin.

Míra stability částic byla v případě přírodních extraktů sledována spektrofotometricky stanovením množství uvolněných polyfenolů, bílkovin, chlorofylů a celkové antioxidační aktivity. U probiotických kultur byly použity techniky optické a fluorescenční mikroskopie. Přírodní extrakty propolisu a ječmene byly podrobeny testu antimikrobiálního účinku, u propolisu byly doplněny i cytotoxické testy.

Jako nejlepší obalový materiál u propolisu byla navržena směs agar-chitosan, jež prokazovala optimální stabilitu v modelových podmínkách trávicího traktu i v modelových potravinách. Lipozomy byly v této práci vyhodnoceny jako nestabilní a nevhodné pro další aplikaci. V případě práškového ječmene byl jako obalový materiál zvolen škrob-alginát (poměr 1:4) a agar-chitosan, přičemž druhý typ vykazoval vyšší stabilitu z pohledu uvolněných bílkovin. Tento druhý typ byl vhodný i pro čerstvý ječmen. Pro enkapsulaci probiotických kultur byl zvolen alginát, případně alginát ve směsi se škrobem, a to díky porozitě a možnosti difúze živin.

Nejlepších výsledků u reálných potravin bylo dosaženo aplikací probiotických částic do mléka. V Koencapsulace práškového ječmene a probiotik nevedla k inhibici růstu kultur. Rovněž nebyl potvrzen antimikrobiální účinek propolisu ani ječmene, stejně jako cytotoxický efekt propolisu.

## ABSTRACT

This diploma thesis deals with encapsulation of natural extracts. In the theoretical part the methods of encapsulation, materials for particle preparation, as well as application of encapsulation techniques in food industry were described.

In experimental part selected natural extracts of propolis, green barley and probiotics were characterized. These substances were encapsulated into alginate and chitosan. In the total of 25 types of prepared particles long-term stability in some model physiological conditions as well as in four different model foods was evaluated. Additionally, stability of selected particles in several real milk-based products was followed too.

The stability of particles was determined spectrophotometrically. In natural extract a content of polyphenols, proteins, chlorophylls, as well as total antioxidant activity were analysed. To analysis of probiotics optical and fluorescence microscopy were used. In propolis and green barley antimicrobial activity was tested too. Moreover, in the sample of propolis also cytotoxic assay was applied.

Agar-chitosan was chosen as the best shell material for propolis due to its optimal stability in model physiological conditions as well as model foods. Liposomes were evaluated as unstable and were not recommended for further application. As the suitable shell material for powdered green barley starch-alginate (rate 1:4) and agar-chitosan were proposed, while the second one showed better stability for released proteins. Agar-chitosan shell material was usable for fresh green barley too. For probiotics encapsulation alginate or alginate-starch were chosen because of their porosity and possibility of nutrients diffusion.

In real foods the best results were reached with application of probiotic particles into milk. Coencapsulation of powdered barley and probiotics did not confirm inhibition of culture growth. Neither the antimicrobial effect of propolis and barley nor the cytotoxic effect of propolis were confirmed.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

enkapsulace, propolis, zelený ječmen, probiotika, alginát, chitosan

## **KEYWORDS**

encapsulation, propolis, green barley, probiotics, alginate, chitosan

VYSKOČILOVÁ, T. *Enkapsulace vybraných přírodních extraktů pro využití v potravinářství*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 129 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc..

## PROHLÁŠENÍ

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

.....  
podpis studentky

Chtěla bych poděkovat doc. RNDr. Ivaně Márové, CSc., nejen za vedené této práce, ale za udělené informace, vzdělání a rady, stejně jako vstřícnost během celého studia. Další poděkování patří Ing. Andrei Lichnové PhD. a Ing. Petře Matouškové, které mi byly oporou při tvorbě práce. Cení si jejich dobré nálady, trpělivosti a ochoty. Především bych ale chtěla poděkovat své rodině a známým, kteří mi byli velkou podporou během celého studia.

## OBSAH

1	Úvod.....	9
2	Teoretická část.....	10
2.1	Enkapsulace.....	10
2.1.1	Historie a současnost.....	10
2.1.2	Důvody enkapsulace.....	10
2.1.3	Typy částic .....	10
2.1.4	Jádro .....	11
2.1.5	Obalový materiál .....	11
2.2	Metody enkapsulace .....	15
2.2.1	Sprejové sušení.....	15
2.2.2	Enkapsulace na fluidním loži .....	16
2.2.3	Sprejové chlazení a mražení.....	16
2.2.4	Lyofilizace, vakuové sušení .....	16
2.2.5	Extruze.....	17
2.2.6	Ko-extruze a „spinning“ disk .....	17
2.2.7	Emulzifikace.....	18
2.2.8	Lipozomy.....	18
2.2.9	Inkluze .....	19
2.2.10	Koacervace .....	19
2.2.11	Kokrystalizace .....	19
2.3	Aplikace .....	20
2.3.1	Enkapsulace probiotik .....	20
2.3.2	Enkapsulace aromat.....	21
2.3.3	Enkapsulace mikronutrientů.....	21
2.4	Enkapsulátor.....	23
2.4.1	Princip přístroje .....	23
2.4.2	Popis procesu.....	24
2.4.3	Velikost částic .....	26
2.4.4	Teoretické vztahy .....	27
2.5	Propolis.....	28
2.5.1	Historie, původ .....	28
2.5.2	Propolis a včely .....	29
2.5.3	Vlastnosti a složení.....	29
2.5.4	Účinek .....	30
2.5.5	Získávání propolisu a jeho použití .....	31
2.6	Zelený ječmen .....	31
2.6.1	Historie .....	31
2.6.2	Ječmen – botanika a zemědělství .....	31
2.6.3	Složení.....	33
2.6.4	Ječmen a zdraví .....	34
2.6.5	Výroba.....	34
2.7	Probiotika .....	35
2.7.1	Gastrointestinální trakt .....	35
2.7.2	Zástupci .....	35
2.7.3	Zdravotní přínost probiotik.....	36
2.7.4	Účinek probiotik.....	37
2.7.5	Výběr probiotických kmenů.....	37

2.8	Prebiotika .....	38
2.9	Charakterizace částic, analýza aktivních látek .....	39
2.9.1	Polyfenoly .....	39
2.9.2	Chlorofyly .....	40
2.9.3	Analýza částic obsahujících živé mikroorganismy .....	41
2.9.4	DLS .....	42
2.9.5	Zeta potenciál .....	43
2.9.6	Antimikrobiální test.....	44
2.9.7	Cytotoxický test.....	45
3	Cíl práce .....	46
4	Experimentální část .....	47
4.1	Použité chemikálie, přístroje a pomůcky.....	47
4.1.1	Standardní a speciální chemikálie .....	47
4.1.2	Přístroje a pomůcky.....	47
4.1.3	Testovací mikroorganismy .....	48
4.2	Analyzované vzorky.....	48
4.2.1	Propolis.....	48
4.2.2	Ječmen.....	49
4.2.3	Ječmen čerstvý .....	49
4.2.4	Probiotika .....	49
4.2.5	Reálné potraviny.....	49
4.3	Příprava vzorků .....	50
4.3.1	Propolis.....	50
4.3.2	Ječmen.....	50
4.3.3	Kultivace .....	50
4.3.4	Příprava mikroorganismů pro enkapsulaci .....	51
4.4	Charakterizace přírodních extraktů .....	51
4.4.1	Skupinové charakteristiky přírodních extraktů.....	51
4.4.2	Stanovení antioxidační aktivity .....	51
4.4.3	Stanovení koncentrace bílkovin dle metody Hartree-Lowryho.....	52
4.4.4	Stanovení obsahu chlorofylů .....	52
4.4.5	Zjištění absorpčního spektra.....	52
4.5	Enkapsulace vybraných přírodních extraktů .....	53
4.5.1	Příprava obalového materiálu.....	53
4.5.2	Proces enkapsulace.....	53
4.5.3	Příprava lipozomových částic.....	54
4.6	Charakterizace částic .....	54
4.6.1	Stanovení účinnosti enkapsulace .....	54
4.6.2	Sledování stability částic v modelových trávicích šťávách.....	54
4.6.3	Sledování stability částic v modelových potravinách.....	54
4.6.4	Sledování stability částic v reálných potravinách.....	55
4.6.5	Stanovení velikosti a stability lipozomových částic.....	55
4.6.6	Analýza částic obsahujících probiotické kultury .....	55
4.6.7	Optimalizace množství biomasy probiotik pro enkapsulaci .....	56
4.6.8	Antimikrobiální test.....	56
4.6.9	Cytotoxický test.....	56
5	Výsledky a diskuze.....	58
5.1	Charakterizace přírodních extraktů .....	58
5.1.1	Skupinové charakteristiky přírodních extraktů.....	58
5.1.2	Zjištění absorpčního spektra.....	59

5.2	Enkapsulace vybraných přírodních extraktů .....	60
5.3	Charakterizace částic .....	62
5.3.1	Stanovení účinnosti enkapsulace .....	62
5.3.2	Sledování stability částic v modelovém fyziologickém prostředí .....	64
5.3.3	Simulace podmínek v trávicím traktu.....	64
5.3.4	Stabilita v modelových potravinách .....	70
5.3.5	Stabilita v reálných potravinách .....	91
5.3.6	Stanovení velikosti a stability lipozomových částic.....	96
5.4	Optimalizace množství biomasy pro enkapsulaci .....	98
5.5	Antimikrobiální testy.....	103
5.5.1	Antimikrobiální test č. 1 .....	103
5.5.2	Antimikrobiální test č. 2 .....	104
5.5.3	Antimikrobiální test č. 3 .....	104
5.5.4	Antimikrobiální test č. 4.....	104
5.6	Cytotoxický test.....	106
5.6.1	Cytotoxický test č. 1 .....	107
5.6.2	Cytotoxický test č. 2.....	107
5.6.3	Cytotoxický test č. 3.....	108
6	Závěry.....	111
7	Seznam použitých zdrojů .....	114
8	Seznam zkratk a symbolů .....	119
9	Seznam příloh.....	120
10	Přílohy .....	121



# 1 ÚVOD

Současný rozvoj moderní potravinářské vědy s sebou přináší řadu nových či inovovaných technologií včetně technologií enkapsulace. Metoda enkapsulace umožňuje zlepšovat fyzikálně-chemické vlastnosti a stabilitu zejména přírodních látek a tak rozšiřovat možnosti jejich aplikace a využití.

Enkapsulace je technologie, která nachází uplatnění jak na poli farmaceutickém, tak potravinářském. V kontextu vývoje enkapsulace, který má své počátky v polovině dvacátého století [1], se v současné době hledají nové metody, funkční a vyhovující obalové materiály a jsou testovány různé kombinace s cílem získat částice požadovaných vlastností a parametrů.

Důvodů pro enkapsulaci se najde mnoho. Ať už jde o snahu ochránit labilní látky před negativními účinky prostředí, omezit jejich reaktivitu, usnadnit či řídit jejich dávkování a cílený transport do organismu či regulovat organoleptické vlastnosti [2].

Přírodní látky a jejich extrakty, stejně jako probiotika, jsou známá a používána pro svůj příznivý účinek pro lidský organismus po řadu let. V předložené práci bude testována možnost enkapsulace některých významných druhů komplexních přírodních látek.

Jednou ze studovaných látek je propolis, jež patří mezi pět nejvýznamnějších včelích produktů využívaných člověkem. Odedávna byl propolis používán v lidovém léčitelství. Vzhledem k povaze látek, které včely sbírají a přeměňují, získáváme přírodní koncentrát bohatý na obsah polyfenolů a flavonoidů, stejně jako minerálů a vitaminů. Komplexní složení propolisu je příčinou jeho vysokého antioxidačního, protizánětlivého i léčebného účinku [3]. Vzhledem k tomu, že je propolis lipofilní povahy, rozpouští se v organických rozpouštědlech a pro praktické využití jsou k dispozici zejména extrakty v ethanolu, což není vždy vhodná forma. Další vlastností komplikující potenciální využití je charakteristické aroma propolisu, jež může být pro senzitivní jedince značně nepříjemné.

Další typ studovaného komplexního extraktu je zelený ječmen, komplexní potravinový doplněk, jež se dostává do popředí teprve od nedávné doby. Užívá se šťáva z mladých výhonků, která představuje koncentrát nejrůznějších vitaminů, minerálů a enzymů, vlákniny a chlorofylu [4]. Nevýhodou zeleného ječmene je ovšem jeho velmi nepříjemný organoleptický charakter, stejně tak někomu nemusí vyhovovat konzumace ve formě prášku nebo husté suspenze.

Vedle extraktů propolisu a zeleného ječmene jsou další zdraví prospěšnou složkou potravy probiotika. Probiotické kultury jsou v poslední době středem zájmu kvůli diskutovaným účinkům na střevní mikroflóru a a celkovou imunitu. Suplementace stravy probiotiky se doporučuje s ohledem na nezdravý životní styl, stejně jako častou terapii antibiotiky, což jsou faktory, které vedou k narušení střevní mikroflóry. Společně s prebiotiky (př. vláknina) by měla probiotika představovat pravidelnou součást našeho jídelníčku. Stejně jako v předchozích případech i zde se setkáváme s technologickým problémem. Probiotika jsou velmi citlivé mikroorganismy a jejich viabilita je ovlivněna řadou nepříznivých podmínek v trávicím traktu i v potravinách. Tím se komplikuje možnost využití některých procesních kroků při výrobě potravin a zejména možnost plného využití biologických účinků probiotických bakterií ve střevním traktu.

Uvedené problémy týkající se aplikace a biologického využití výše zmíněných přírodních extraktů a doprovodné technologické problémy mohou být alespoň částečně řešeny pomocí technik enkapsulace. Tím může dojít k lepšímu vnímání produktů spotřebiteli a tím s širším využitím těchto zdraví prospěšných látek. Enkapsulace může s výhodou zamaskovat jejich nežádoucí vlastnosti a umožnit snazší dávkování do různých druhů potravin a tím zprostředkovat pozitivní účinek, který tyto extrakty přináší. Tím je možné a přispět ke snížení výskytu civilizačních onemocnění a podpořit zdravou výživu obyvatel.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Enkapsulace

„Enkapsulace neboli zapouzdření je proces zachycení aktivních látek do nosného materiálu a je to užitečný nástroj ke zlepšení dopravy bioaktivních molekul a živých buněk do potravin [2].“

Během procesu vznikají malé kapsule. Systém představuje vytvoření fyzické bariéry mezi náplní a okolním prostředím, přičemž tyto kapsule za určitých podmínek postupně uvolňují svůj obsah [2].

#### 2.1.1 Historie a současnost

Metody enkapsulace zaznamenávají rozvoj v posledních 60 letech [1]. Počátky této vědy souvisejí s biotechnologiemi, kdy byla testována enkapsulace mikroorganismů jako možnost pro jejich snadné oddělení od produktů a médií. Dalším oborem, kde enkapsulace nacházela své uplatnění, byla aplikace léčiv a vakcín. V poslední době ovšem přichází do popředí aplikace v potravinářství [2].

#### 2.1.2 Důvody enkapsulace

Existuje mnoho důvodů, proč zvolit technologii enkapsulace:

- ochrana jádra před vnějším prostředím
- kontrolované uvolňování a dávkování malých množství látky [1]
- snazší manipulace, modelace rozpustnosti [5]
- změna skupenství: kapalně složky do pevných částic – lepší dávkování [6]
- separace substancí rozdílných organoleptických vlastností
- zamezení či zmírnění nežádoucích pachů a chutí (zápach, hořkost, trpkost aj.)
- zamezení nežádoucích interakcí s potravinou
- ochrana labilních a prchavých látek před degradací (vitaminy, antioxidanty...)
- zabránění nežádoucích reakcí, jako například s kyslíkem, vodou aj.
- modulace místa účinku aktivní látky v organismu – selektivní doručení
- imobilizace mikroorganismů/probiotik a enzymů
- stabilizace během výroby i skladování, prodloužení doby účinnosti [2].

Přes výše zmíněné přínosy je třeba uvážit ekonomický faktor. Enkapsulace je přídatná metoda, další proces, který zvyšuje náklady procesu. Důvod zavedení této metody by tedy měl být opodstatněný a rovněž cena by měla být přijatelná.

Pokud se uváží, jaké přínosy enkapsulace může mít, ať už to je zvýšení rozpustnosti látek (a tedy nižší dávkování dražších substancí), zamezení či snížení vyprchávání aromat (a také možnost nižšího dávkování) a pokud se uváží, jak velké (resp. malé) množství enkapsulovaných částic je do potravin dávkováno, je možné se domnívat, že zvýšení konečné ceny fortifikovaného produktu nemusí být tak výrazné, aby převýšilo výhody enkapsulace.

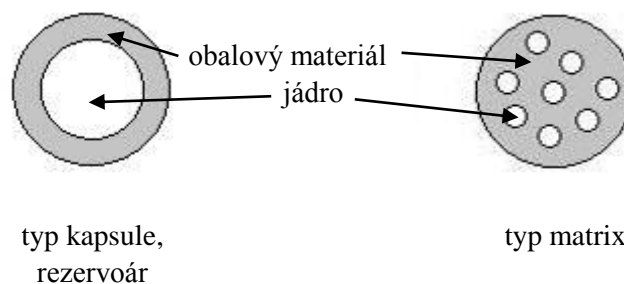
#### 2.1.3 Typy částic

Rozměry částic se pohybují v řádu několika milimetrů až nanometrů. Mezi několika typy částic dominují dva hlavní modely.

V prvním případě se okolo jádra (aktivní substance) vytvoří vrstva, resp. obal; částice je uzavřená uvnitř. Jde o mononukleární typ kapsule, neboli rezervoár [1, 2, 5].

V případě druhém jde o typ matrix. Agregáty obsahující mnoho drobných jader dispergovaných v obalovém materiálu. Stupeň disperze se může lišit. Molekuly aktivní látky se mohou vyskytovat i na povrchu, proto se v některých případech přidává povrchová ochranná vrstva [1, 5]

Oba druhy částic nejsou vždy kulatého tvaru, závisí vždy na podmínkách i použitých materiálech [5].



Obrázek 1: Dva typy částic [1]

#### 2.1.4 Jádro

Aktivní látkou, která se volí pro enkapsulaci, jsou různé substance, u nichž chceme dosáhnout efektů či účinků zmíněných v kapitole 2.1.2.

Může jít o vitaminy, antioxidanty, pigmenty, barviva, aromata, příchutě, mikronutrienty, probiotika, enzymy, přírodní extrakty, polyfenoly aj. Většinou jde o substance nestálé ve vztahu k prostředí, technologii, skladování či jiným nepříznivým parametrům a podmínkám. Proto volíme proces enkapsulace, abychom je ochránili před různými formami znehodnocení [2].

Probiotika mohou být dopravena cíleně do střev a ochráněna před účinkem trávicích šťáv. Antioxidanty, vitaminy a ostatní aditiva mohou být ochráněny před degradací během skladování. Vonné prchavé látky, například z olejů, mohou být uchovány rovněž pomocí enkapsulace; tím je zároveň můžeme uchránit před účinkem vzdušného kyslíku. Obdobně můžeme zamaskovat nežádoucí pachy potravin, jež sice mohou mít pozitivní zdravotní přínos, ale jsou nepříjemné po stránce organoleptických vlastností – rybí olej, propolis, česnek atp. [2].

Pro výběr metody a materiálu je žádoucí řídit se dle rozpustnosti aktivní látky a dalších parametrů, které ovlivňují proces (termolabilita, změna vlastností dle pH aj.) [2].

#### 2.1.5 Obalový materiál

Obalový materiál volíme dle požadavků na způsob uvolňování, stabilitu, cenu a aplikaci. Měl by být přírodního původu a schopný biodegradace, stejně jako by měl mít schopnost vytvořit kolem látky obrannou vrstvu a tak ji v dostatečné míře chránit před účinky okolí. V neposlední řadě by se obalový materiál měl chovat vůči náplni samotné inertně. Z technologického hlediska musí materiál vyhovovat technologii enkapsulace a při vyšší koncentracích je vhodné sledovat i rheologické parametry [2].

V porovnání s obalovými materiály volenými pro aplikaci ve farmacii, potravinářský průmysl klade požadavky vyšší. Použitelné jsou jen materiály nesoucí označení GRAS – všeobecně považován za bezpečný („Generally Recognized As Safe“). Technologický proces stejně tak podléhá požadavkům EFSA (Evropský úřad pro bezpečnost potravin, European Food Safety Authority) či FDA (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, Food and Drug Administration) platícími v EU, resp. v USA. [2]

##### 2.1.5.1 Polysacharidy

Majoritní skupinu obalových materiálů představují biopolymery. V potravinářské praxi se využívají především polysacharidy. Mezi nejvíce využívané patří [1]:

- škrob,
- deriváty škrobu: dextriny, maltodextriny, resp. amyulóza a amylopektin (E 1400-1452),
- celulóza a její deriváty (E 459-469),
- rostlinné extrakty – guma arabská (E 414), tragantová (kozinec, E 413) a karaya (E 416),
- pektiny, galaktomannany (E 440),
- sójové polysacharidy,
- živočišné a mikrobiální zdroje: chitosan, dextran, xantan (E 415), gellan (E 418), pullulan,
- extrakty z mořských řas: alginát, karagenan (E 400-407) [2, 7].

Parametry, které určují výběr, souvisí se samotnou strukturou molekuly polysacharidů. Zásadním faktorem je nejen druh monomeru, ale i jeho vazby, sekvence a počet. Tyto vlivy determinují molekulovou hmotnost polysacharidu, náboj, reaktivitu, místa a náchyllost ke štěpení po stránce chemické i enzymatické [8].

Elektrický náboj souvisí s nábojem na sacharidické kostře a na podmínkách prostředí. Polysacharidy rozdělujeme na [8]:

- neutrální: celulóza, škrob,
- anionické: alginát, karagenan, guma arabská a xantan,
- kationické: chitosan [8].

Náboj se odvíjí od hodnoty pH ve vztahu k dané hodnoty pKa. Nositelem náboje jsou skupiny [8]:

- sulfátové (karagenan)  
 $-\text{SO}_4\text{H} \leftrightarrow -\text{SO}_4^-$  (pKa~2),
- karboxylové (alginát, pektin, xantan, CMC)  
 $-\text{CO}_2\text{H} \leftrightarrow -\text{CO}_2^-$  (pKa~3.5),
- aminoskupiny (chitosan)  
 $-\text{NH}_3^+ \leftrightarrow -\text{NH}_2$  (pKa~6.5) [8].

Pro enkapsulaci jsou však nejdůležitější parametry rozpustnosti, gelovatění, stravitelnosti a schopnosti emulzifikace. Vedle toho sledujeme hustotu, náboj, stabilitu v závislosti na pH okolí, stejně jako stabilitu v prostředí solí a dostupnost enzymům [8].

### 2.1.5.2 *Lipidy a proteiny*

Kromě polysacharidů najdou své uplatnění také lipidy a proteiny:

- fosfolipidy,
- vosky: včelí (E 901), karnaubský (E 902), candelilla (E 902),
- mastné kyseliny,
- proteiny mléka a syrovátky, jako je kasein,
- gluten,
- želatina (E 441) [2, 7],
- laktoferrin, ovalbumin,  $\beta$ -laktoglobulin [8].

V případě proteinů sledujeme obdobné parametry, jako je tomu u polysacharidů, neboť i v tomto případě mají zásadní vliv na proces gelovatění. Při výběru sledujeme následující faktory [8]:

- teplota denaturace (pro globulární proteiny),
- izoelektrický bod (souvisí s celkovým nábojem a tím i stabilitou, resp.  $\zeta$ -potenciálem),
- míra interakce s ionty,
- dostupnost enzymům,
- možnost provedení cross-link reakcí [8].

Pro výběr proteinových obalů jsou pro nás tedy podstatné informace o jejich stabilitě, náboji, morfologii a velikosti [8].

### 2.1.5.3 *Další materiály*

V poslední době se testuje použití dalších materiálů, např. šelaku (jde o živici tvořenou hmyzem) a polymeru polyvinylpyrrolidonu [2].

### 2.1.5.4 Aplikované obalové materiály

#### Alginát

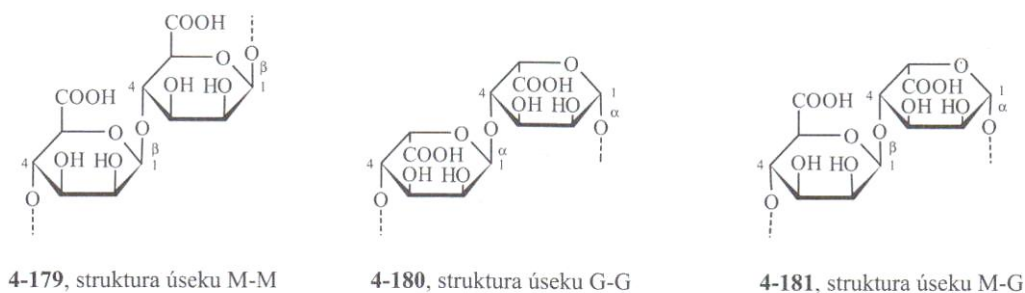
Alginát je označení pro sůl kyseliny alginové. Zdrojem těchto látek jsou mořské hnědé řasy čeledi *Phaeophyceae*, jež se nachází na severoatlantském pobřeží. Mezi hlavní zdroje patří *Macrocystis pyrifera* nebo *Laminaria hyperborea*. Alginát je možné získat rovněž mikrobiální cestou, jde avšak spíše o polymannuronany. Z produkčních mikroorganismů je možné zmínit například *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* a *Azotobacter vinelandii* [9].

Po chemické stránce představuje alginát nevětvený lineární kopolymer složený z  $\beta$ -D-mannuronové kyseliny a  $\alpha$ -L-guluronové kyseliny. Tyto jednotky jsou spojené glykosidickými vazbami  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). Obě kyseliny jsou v řetězci uspořádány v jednotlivých blocích, rozložení záleží na původu. Poměr obou kyselin ovšem determinuje jeho technologické vlastnosti [9].

Z řas se extrakcí získává sodná sůl, která se převádí na vápenatou sůl či na kyselinu. Dalším krokem je neutralizace kyseliny za vzniku komerčního alginátu (sodná sůl) [9].

Algináty alkalických kovů stejně jako amonné soli jsou rozpustné, vápenaté jsou ovšem nerozpustné. Toho se využívá i při procesu enkapsulace, kdy roztok alginátu sodného srážíme v roztoku chloridu vápenatého za vzniku termostabilních gelů. Rozpustnost se mění vlivem pH, druhem iontu, stejně jako iontovou silou [9].

Pro své vlastnosti se algináty využívají v potravinářství jako emulgátory, stabilizátory a zahušťovadla. Jako želírovací činidla se používají při výrobě želé a pudinků [9].



Obrázek 2: Struktura alginátu [9].

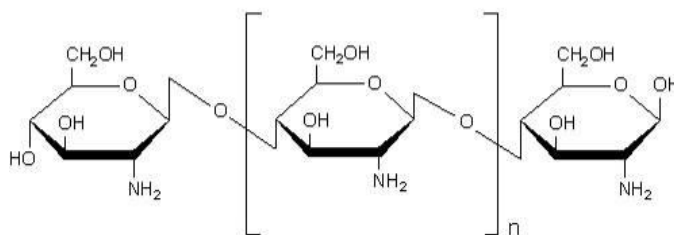
#### Chitosan

Chitosan je kladně nabitý polysacharid, který vzniká deacetylací chitinu. Po chemické stránce jde o kopolymer N-acetylglukosaminových a glukosaminových jednotek vázaných  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glykosidickými vazbami [9, 10].

Chitin lze považovat za hlavní stavební polysacharid schránek hmyzu, korýšů a bezobratlých. Dále je možné jej nalézt v houbách, řasách, bakteriích a kvasinkách. Obvykle bývá asociován s bílkovinami [9].

Chitosan je nerozpustný v organických rozpouštědlech i kyselinách, naopak se rozpouští v alkalickém a neutrálním roztoku. Molekuly chitosanu obsahují kladné náboje a v přítomnosti záporných nábojů dochází ke koagulaci. Tohoto jevu je využíváno i při enkapsulaci, kdy chitosan srážíme roztokem tripolyfosfátu sodného [9, 10].

V přítomnosti kovů dochází ke tvorbě komplexů. Pro člověka jsou obě sloučeniny nestravitelné, ale chitosan výrazným způsobem snižuje hladinu cholesterolu a tuků v játrech a krevním séru. Využívá se proto ve farmacii; dále pro své vlastnosti i jako emulgátor, stabilizátor, zahušťovadlo a želírující prostředek [9].



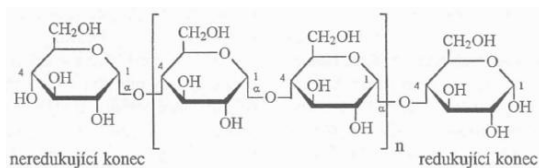
Obrázek 3: Struktura chitosanu [11]

## Škrob

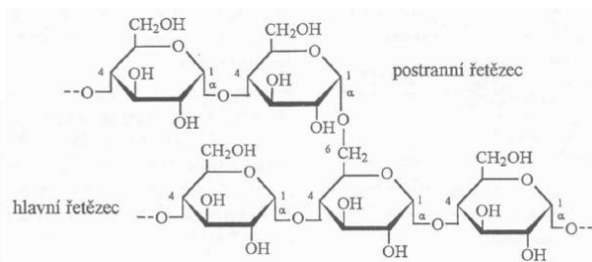
Škrob představuje hlavního zástupce polysacharidů rostlin. Rostlina jej získává fotosyntézou, plní funkci energetickou a je uložen v nerozpustných miscelách nazývaných granule. Tyto granule se liší dle druhu rostliny, ze kterého byl škrob získán [9].

Po chemické stránce se škrob skládá ze dvou hlavních jednotek – lineární amylozy a větveného amylopektinu [9].

V amyloze jsou jednotky glukózy vázány  $\alpha$ -(1→4) glykosidickou vazbou; v případě amylopektinu je řetězec průměrně na každém 25. místě doplněn větvením pomocí vazby  $\alpha$ -(1→6). Molekulová hmotnost závisí na stupni polymerace a pohybuje se mezi 200-1 000 kDa u amylozy a 10-200 MDa u amylopektinu. Tyto dva řetězce se spolu skládají do granulí a dle uspořádání řetězců dělí granule na oblast krystalovou a amorfní [9].



Obrázek 4: Struktura amylozy [9]



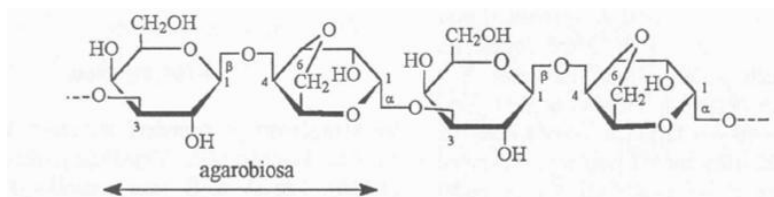
Obrázek 5: Struktura amylopektinu [9]

Zdrojem škrobu jsou obiloviny, brambory a luštěniny. Škrob se z nich získává prostým rozemletím a promýváním. V průmyslovém měřítku se škrob stává součástí potravin, ať už ve své nativní formě či modifikovaný. Zajišťuje konzistenci, stabilizaci, želírování a bobtnání vody a náhražku tuků aj. [9].

## Agar

Agar, stejně jako alginát, představuje intracelulární gelovou matici ruduch (rod *Rhodophyceae*), tedy červených mořských řas. Tvoří kostru buněčné stěny stejně jako je tomu v případě celulózy u rostlin [9].

Po stránce chemické jde o lineární polysacharid tvořený  $\beta$ -D-galaktopyranózou a 3,6-anhydro- $\alpha$ -L-galaktopyranózou. Tyto dvě jednotky jsou vázány střídavě vazbami (1→3) a (1→4). Celá struktura agaru je pak doplněna hydroxylací, methylací a esterifikací sulfátovou skupinou. Svým komplexním složením je tedy agar je polydisperzní struktura, jehož molekulová hmotnost se pohybuje přibližně v intervalu od 100 do 400 kDa. Agar je slabě kyselý [9].



Obrázek 6: Základní struktura agaru [9]

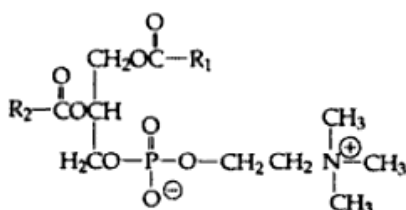
Agar se z řas získává především extrakcí horkou vodou; je nutné pohybovat se v teplotách nad bodem tání a udržovat jej tak v kapalném stavu. Při rozpouštění agaru se pracuje s teplotami obvykle nad 85 °C. Z roztoku se práškový agar získá vymražením. Díky svým želírujícím schopnostem a tepelné stabilitě se používá v pekařství, cukrářství, při výrobě džemů, želé a v masném průmyslu [9].

### Lecitin

Lecitin je triviální název pro 1,2-diacyl-glycero-3-fosfocholin či také fosfatidylcholin. Získává se z rostlinných zdrojů rafinací olejů sojového, slunečnicového, řepkového; stejně tak i ze živočišných zdrojů (vaječný žloutek, hovězí mozek). Rostlinné zdroje poskytují lecitin jako vedlejší produkt při rafinaci (při odstraňování vody z olejů se izolují jako složky ve vodě obsažené), kdežto v případě živočišných zdrojů se těží cíleně polárními rozpouštědly (polární rozpouštědla slouží k účelu rozrušení vazeb s proteiny). Komerční preparát představuje směsici fosfolipidů, mastných kyselin a triacylglycerolů – jejich složení a zastoupení se liší dle zdroje [12].

Lecitin má amfifilní charakter. Hodnota pK pro cholinový zbytek je 13,9 a pro fosfát 2, proto je molekula lecitinu neutrální v celém rozpětí pH [12].

Lecitin je jednou z hlavních složek biologických membrán (jeho obsah je 50 – 60%); kromě toho jde o přírodní povrchově aktivní látku, užívanou v mnoha technologiích, například v gastronomii pro margaríny, pekařství, cukrářství, dále v kosmetice, farmacii aj. [12].



Obrázek 7: Lecitin (fosfatidylcholin) [12]

## 2.2 Metody enkapsulace

Proces enkapsulace probíhá několika různými způsoby. Většinu technologií pojí společný princip: vytvořit kapičky aktivní látky a následně je obklopit nosičem. Výběr techniky úzce souvisí s požadavky na funkčnost, stejně jako dostatečnou míru inertnosti vůči matrixu fortifikované potraviny, resp. neměl by ovlivnit organoleptické vlastnosti [2, 5].

Z technik lze jmenovat sprejové sušení, sprejové chlazení, lyofilizaci, extruzi, koacervaci, inkluzi či tvorbu emulzí a lipozomů.

### 2.2.1 Sprejové sušení

Mezi nejstarší metody patří technika sprejového sušení, které se používá již od padesátých let minulého století. Jde o metodu v průmyslu nejrozšířenější, která přemění kapalnou látku do formy sypkého prášku, vhodného pro další aplikace. Používá se pro enkapsulaci nejrůznějších aditiv a příchutí [1, 2].

Aktivní látky jsou rozpuštěny či dispergovány do roztoku obalového materiálu. Následuje atomizace směsi a sušení v komoře, kde dochází k odpaření vody při styku s horkým vzduchem. Získáváme porózní částice o velikosti 10-100 μm [1, 2, 5].

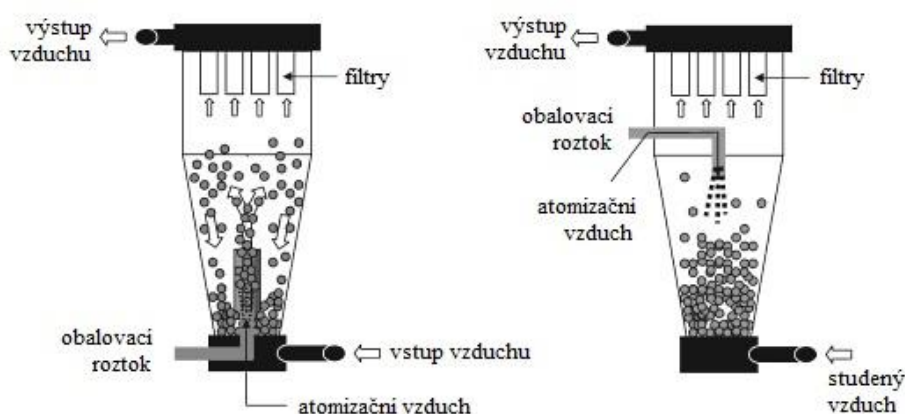
Hlavní limitací metody je nutnost použití materiálu rozpustného ve vodě. Používají se jen některé polysacharidy a jejich směsi, jako jsou modifikované škroby, maltodextrin (enkapsulace aromat, polyfenolů) gumy arabská, akáciová a karagenan. Stejně tak nevýhodou této metody je nutnost pracovat s vyššími teplotami, což je obtížné v případě labilních složek [1, 5].

## 2.2.2 Enkapsulace na fluidním loži

Při této technice je obalový materiál nanášen a vrstven na pevné částice. Ty jsou pomocí proudu vzduchu dispergovány do reaktoru, kde je na ně v opačném směru rozprašován obalový materiál. Pro dokončení procesu se obsah reaktoru vysuší nebo ochladí [2].

S výhodou je možné pracovat se všemi druhy obalových materiálů, které není nutné rozpouštět pro atomizaci. Používají se roztoky dextransů, derivátů škrobu a celulosy. Celý proces ovlivňují dva zásadní parametry: objem vzhovného plynu a teplota vzduchu. Metoda je vhodná pro částice o průměru 100  $\mu\text{m}$  a větší. Pro částice menší již platí elektrostatické síly a proces komplikují [5, 6, 13].

Metoda se používá pro enkapsulaci vitaminů, preparátů do pekařských produktů, okyselovadel pro zpracování masa aj [13].



Obrázek 8: Schéma fluidního lože [5]

## 2.2.3 Sprejové chlazení a mražení

Tyto sprejové techniky pracují s lipidickými obalovými materiály (tuky, vosky). Směs rozpuštěného tuku a aktivní složky je atomizována do chladicí komory, kde tuhne na jemné částice. Jde o nejlevnější metodu; podobá se sprejovému sušení, pracuje ovšem s nižšími teplotami [2, 5, 13].

Sprejové chlazení pracuje s pokojovými teplotami a používá rostlinný olej s bodem tání mezi 45 a 122  $^{\circ}\text{C}$ . Sprejové mražení pracuje s teplotami chladicích zařízení a používá frakcionovaný či hydrogenovaný olej [13].

Vznikají částice typu matrix, aktivní látka zůstává v určité míře také adherována na povrchu částice. Dále je nutné mít na paměti různé krystalové konformace mastných kyselin a acylglycerolů. Z těchto mnoha důvodů metoda není příliš rozšířená. Používá se pro enkapsulaci aromat, enzymů, přípravků do sušených polévek a pekařských produktů [6, 13].

## 2.2.4 Lyofilizace, vakuové sušení

Tato metoda umožňuje vytvoření částic bez použití vysokých teplot, je tedy vhodná pro materiály termolabilní (např. aroma) [1].

Nosič a aktivní látka se rozpouští ve vodě. Principem je se snížení teploty (zmražení) a snížení tlaku do té míry, že zmražená voda je odstraněna pomocí sublimace. Někdy se užívají tzv. kryoprotektanty, které mají za úkol chránit a stabilizovat citlivé složky, jako jsou probiotika či liposomy [5].

Lyofilizace je metoda vhodná pro vodorozpustné složky; je jednoduchá, ale nákladná a vyžaduje jistý čas nutný pro dostatečné snížení teploty směsi. S výhodou jsou zachovány vlastnosti aktivní látky, na druhou stranu vzniklý obal je do značné míry porózní a stupeň ochrany je tak nižší [1, 2].

Sušení může probíhat i za podmínek vakua. Proces probíhá při teplotách bod tuhnutí rozpouštědla. Je tedy rychlejší a méně energeticky náročný [5].

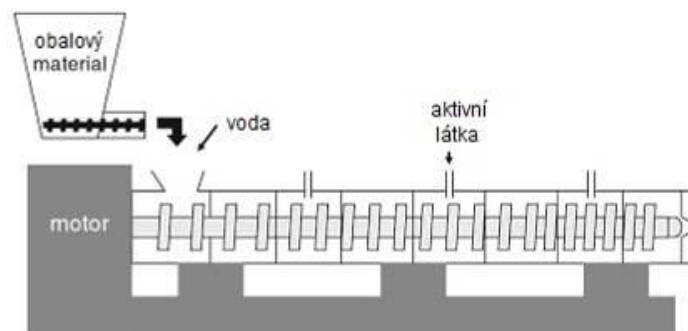


## 2.2.5 Extruze

Tato metoda téměř výhradně zastupuje enkapsulaci těkavých aromatických látek do sklovitých sacharidických obalů; jde o podobný princip extruze, jak je tomu u pufovaných výrobků [6].

Podstatnou výhodou celého procesu je velmi dobrá skladovatelnost produktu. Těkavé aromatické látky jsou často náchylné k oxidaci; sacharidický obalový materiál je velmi obtížně propustný pro plyny, zejména téměř nepropustný pro kyslík. Jako příklad je množné uvést enkapsulované citrusové oleje: při sprejovém sušení jsou skladovatelné 1 rok, v případě extruze až 5 let [6].

Částice vniklé extruzí obsahují ovšem nízký podíl jádra, asi 8 %. Toto hledisko je nepříznivé jak po stránce ekonomické, tak technologické, protože přítomné vyšší množství sacharidů již mění složení výrobku. Proto se volí spíše hydrofobně modifikované škroby, které zvýší množství jádra až 5x [6].



Obrázek 9: Extrudér [5]

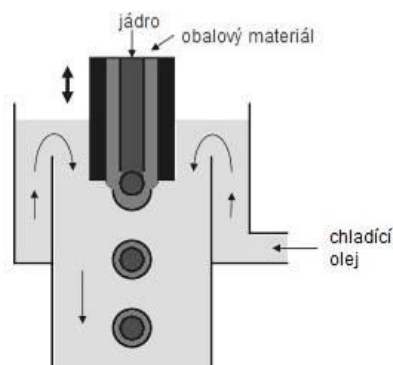
Kromě extrudérů je možné použít jednoduché stříkačky či trysky. Při této variantě „vstřikování“ dochází přikapávání roztoku polymeru s aktivní látkou do roztoku gelovacího činidla nejen obyčejnou pipetou, ale také pomocí různých přístrojů, obsahující vibrační trysky, stříkačky či rozprašovací disky [2].

## 2.2.6 Ko-extruze a „spinning“ disk

Tyto dvě techniky jsou si podobné v principu: pracují s atomizací roztoku a vychází z modifikované enkapsulace sprejovým chlazením a mražením. Při této technologii se využívá soustředných trysek různých typů – stacionární, vibrační, rotační [5, 6].

Ko-extruze je realizována pomocí vibrační mezifázové trysky, kterou proudí laminární tok směsi. Na tok kapaliny jsou aplikovány vibrace a Raleighova nestabilita na konci trysky dává vzniknout kapičkám přibližně dvojnásobného průměru, než je průměr trysky [5,6].

Při variantě „spinning disk“ je nejprve vytvořena suspenze jádra a obalového materiálu; tato směs prochází přes rotující disk, na jehož konci dochází odstředivou silou k atomizaci. Částice pak vznikají mezifázovým chlazením (želatina, tuk), nebo gelováním (alginát sodný a vápenaté ionty) či může být tryska ponořena do chladicího média (např. olej) [5, 6].



Obrázek 10: Schéma extruze [5].

### 2.2.7 Emulzifikace

Další hojně využívanou metodou je emulzifikace. Emulze je složena z nemísitelných fází, přičemž jedna je dispergována ve druhé ve formě jemných kapiček. Je možné vytvořit emulze několika typů: O/V a V/O či V/O/V a O/V/O. Emulze nejčastěji vznikají mechanickým způsobem: pomocí homogenizérů, mixérů, míchadel, v koloidních mlýnech. Je možné přidat i emulgátory a stabilizátory pro zvýšení stability emulzí [1, 2, 5].

Emulze mohou být využívány pro dopravení hydrofilních nebo lipofilních aktivních složek do potravin. Musíme ale zajistit stabilitu emulze po celou dobu aplikace. Pokud enkapsulujeme ty typy emulzí, kde se aktivní látky nacházejí ve vodném prostředí, pak je možné částice dehydratovat a převést na prášek [1, 2, 5].

Platí, že monodisperzní emulze jsou výhodnější po stránce uvolnění aktivních látek a také se dá lépe studovat jejich chování, na rozdíl od polydisperzních emulzí. Pomocí emulzifikace se enkapsulují například lipofilní látky jako karotenoidy, vitamin A [5].

Emulzifikace se ovšem nejeví jako vhodná procedura pro aplikaci v potravinářství. V procesu je nutné přidávat olej a emulzifikátory a jejich rezidua nejsou v potravinách žádoucí, stejně jako přítomnost oleje zvyšuje kalorickou hodnotu potraviny [5].

### 2.2.8 Lipozomy

Lipozomy jsou útvary tvořené dvojrůstvou lipidové membrány obsahující dutinu. Membrána je složena z fosfolipidů (lecitin) a cholesterolu, útvary vznikají na základě hydrofilně-hydrofobních interakcí mezi vodou a fosfolipidy. Díky amfifilitě molekul, ze kterých jsou lipozomy tvořené, mohou být zachyceny jak látky hydrofilní, tak hydrofobní. Vznikají částice o velikosti 30 nm až několik mikrometrů [1, 2, 5].

Lipozomy byly popsány v roce 1965 na Cambridžské univerzitě skupinou vedenou doktorem Banghamem. Rozvoj souvisel s aplikací pro farmacii a kosmetiku, nyní se dostávají do popředí i potraviny [1, 6].

Existuje několik způsobů přípravy lipozomů: TLE (odpařování na tenké vrstvě – „thin layer evaporation“), RPE (odpařování na reverzní fázi – „reverse phase evaporation“, RP-TLE), sonifikace, tání a metoda střídavého zmražování a rozmražování [1].

Tabulka 1: Typy lipozomů [1]

typ částice	metoda	účinnost* (1 – nejvyšší, 5 – nejnižší)
malé unilamelární vezikuly	sonikace, extruze	4
velké unilamelární vezikuly	RPE	3
multilamelární vezikuly	TLE, zmražování-rozmražování	2 / 1

\*účinnost je ovlivněna povahou enkapsulovaného jádra.

Lipozomy jsou vhodné pro vodorozpustné složky, neboť umožní jejich stabilitu ve vodném prostředí. V potravinářství nachází své uplatnění například v případě enkapsulace proteináz pro tenderizaci masa, ke zvýšení stability vitamínu C aj. [6].

Lipozomy mohou být cíleně doručeny za kontrolovaných podmínek teploty: při 50 °C, při teplotě přechodu fosfolipidů, dochází k rozpadu dvojrůstvy a uvolnění obsahu. Umožňují ochranu jádra v žaludku a zvyšují jeho absorpci v zažívacím traktu [1, 6].

Praktické využití je determinováno nižší stabilitou při skladování (hlavně v emulgovaných potravinách), nízkými výtěžky při enkapsulaci a vyššími náklady. Je proto žádoucí další vývoj a výzkum [6].

### 2.2.9 Inkluze

Při procesu molekulární inkluze dochází k zachytávání aktivních látek do dutin. Ty mohou být vytvořeny pomocí cyklodextrinů. Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy tvořené 6-8 jednotkami D-glukosy, jež jsou spojené  $\alpha$ -(1,4) vazbami do cylindrické struktury. Rozlišují se  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -cyklodextriny (dle počtu jednotek). Cyklodextriny se získávají enzymaticky ze škrobu pomocí enzymu cyklodextrin glykosyltransferázy [5, 6].

Vnitřní lipofilní kapsa molekuly má průměr 0,5-0,8 nm a proto může být enkapsulován jen limitovaný výběr molekul vhodné velikosti. Účinnost enkapsulace roste s rostoucí lipofilitou aktivní látky a s klesající velikostí molekuly [1, 5].

Do cyklodextrinů se enkapsulují aromata a lipofilní vitaminy, nejčastěji se používá  $\beta$ -cyklodextrin [6].

### 2.2.10 Koacervace

Principem koacervace je separace fází hydrokoloidů, tedy vodních disperzí biomateriálů (přírodní či syntetické polymery). Oddělením dvou vodných fází v roztoku do fáze bohaté na polymer a chudé na polymer dochází k obalení přítomné aktivní substance a ke vzniku koacervátů. V závislosti na počtu použitých polymerů se rozlišují koacervace jednoduché (1 polymer) či komplexní (2 a více polymerů opačných nábojů; více využívané pro enkapsulaci) [1, 5].

Jako obalové materiály se používají arabská guma, CMC, pektin, karagenan, sójový protein, PVA aj. Hydrokoloidní obal může být vytvrzen chemickým či enzymatickým činidlem. Koacerváty je možné dále sušit [5, 6].

Metoda má i svá negativa. Ačkoliv je proces velmi efektivní, je zároveň i značně ekonomicky náročný a existuje zde limitace ve výběru vhodných obalových materiálů. V případě aplikace glutaraldehydu jakožto cross-link činidla je nutné řídit se legislativou. Náklady se mohou snížit použitím jednoduchých sušících zařízení a glutaraldehyd se dá nahradit enzymatickými činidly (transglutamináza pro proteiny). Často se používá pro enkapsulaci vonných olejů, vitaminů, konzervantů, enzymů aj. [6, 13].



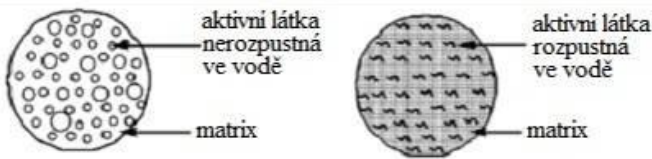
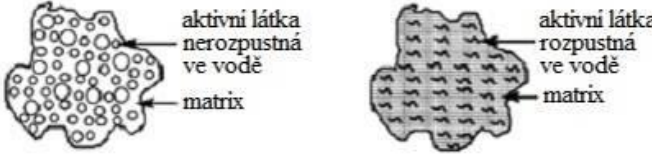
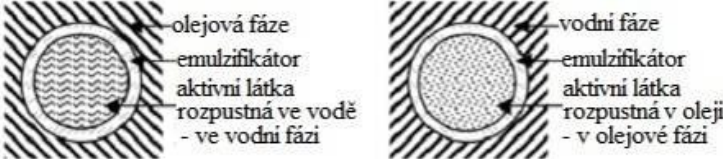
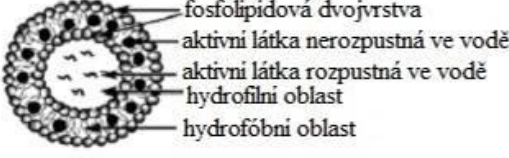
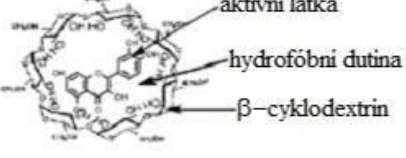
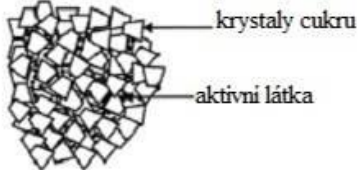
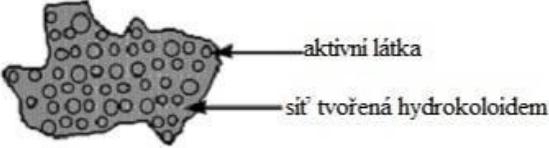
Obrázek 11: Vonný olej enkapsulovaný koacervací [6]

### 2.2.11 Kokrystalizace

Během kokrystalizace dochází ke změně krystalů sacharózy, a to z pravidelného do nepravidelného tvaru aglomerátu. Přitom dochází ke tvorbě porózní struktury, a pokud je v prostředí přítomna i aktivní substance, dochází k jejímu zapouzdření [1].

Proces bývá veden s přesyceným roztokem sacharózy za vyšších teplot (nad 120 °C) a nižší vlhkosti (95-97% sirup) [1].

Nespornou výhodou je možnost převedení kapalných látek na prášek bez nutnosti sušení, následně je díky struktuře aglomerátů usnadněn proces převedení prášku na tablety, což je výhodné pro farmaceutický průmysl [1].

Enkapsulační technika	Schéma částic
Sprejové sušení	 <p>aktivní látka nerozpustná ve vodě matrix</p> <p>aktivní látka rozpustná ve vodě matrix</p>
Lyofilizace	 <p>aktivní látka nerozpustná ve vodě matrix</p> <p>aktivní látka rozpustná ve vodě matrix</p>
Emulzifikace	 <p>olejová fáze emulzifikátor aktivní látka rozpustná ve vodě - ve vodní fázi</p> <p>vodní fáze emulzifikátor aktivní látka rozpustná v oleji - v olejové fázi</p>
Lipozomy	 <p>fosfolipidová dvojvrstva aktivní látka nerozpustná ve vodě aktivní látka rozpustná ve vodě hydrofilní oblast hydrofóbní oblast</p>
Inkluze	 <p>aktivní látka hydrofóbní dutina <math>\beta</math>-cyklodextrin</p>
Kokrystalizace	 <p>krystaly cukru aktivní látka</p>
Koacervace	 <p>aktivní látka síť tvořená hydrokolloidem</p>

Obrázek 12: Přehled částic [1]

## 2.3 Aplikace

### 2.3.1 Enkapsulace probiotik

Probiotika patří mezi velmi citlivé mikroorganismy. Jsou citlivé na vnější podmínky, jako je teplota, vlhkost, pH aj. Z toho je možné vyvodit, že stejně tak je pro ně průchod zažívacím traktem velmi stresující záležitost [14].

Je vhodné ochránit probiotika v žaludku a směřovat rozpad částic až do sekce střev. Bylo zjištěno, že při průchodu probiotik zažívacím traktem představuje největší komplikace pH v žaludku a účinek žlučových solí; míra odolnosti se liší dle druhu a kmene. Enkapsulace se jeví jakožto vhodná metoda

pro ochranění probiotik nejen před negativními účinky zažívacího traktu, ale i během procesu výroby a skladování produktu [15].

Je možné použít zmíněné druhy sušení. Další alternativou může být emulzifikace. Jde ale o proces finančně náročnější, neboť vyžaduje další suroviny, tedy olej, který je navíc nemožné sterilizovat, a emulzifikátory. Prudké míchání pro vytvoření emulze má negativní účinek na mikroorganismy, ty jsou následně enkapsulovány nepravidelně [10].

Jako obalové materiály se nejčastěji využívají polysacharidy či běžné proteiny. Enkapsulovaná probiotika byla již aplikována do mléka, jogurtů, sýrů, mražených dezertů. Pole aplikace se dále rozšiřuje na džusy a čokoládu [10].

### **2.3.2 Enkapsulace aromat**

S výhodou je možné aplikovat enkapsulaci u aromat. Nositelem vůně bývají těkavé organické sloučeniny nízkých molekulových hmotností. Vzhledem k vysoké ceně aromat je žádoucí snížit jejich těkavost a prodloužit údržnost v potravině. Proto se dá enkapsulace považovat za vhodné řešení. Dalším přínosem může být ochrana před vzájemným mísením aromat, degradací a nežádoucím reakcím [2].

Není zde limitace při výběru metod; vhodné jsou různé druhy sušení či fluidní lože. Jako obalové materiály se používají mono- a disacharidy, maltodextriny, deriváty kukuřičného sirupu, arabská guma, modifikovaný škrob, mléčné a sójové proteiny, hydrolyzovaná želatina a různé kombinace [2].

Pomocí enkapsulace můžeme také zamaskovat nepříjemné chutě a vjemy jinak velmi prospěšných potravin, jako je propolis, rybí olej, třísloviny aj. Příkladem může být skupina polyfenolů. Většina se vyznačuje nepříjemným svíravým vjemem v ústech; ačkoliv jejich zdravotní přínos je nesporný. Enkapsulace se proto jeví jako vhodné řešení; stejně jak vyznanou mírou podpoříme stabilitu a odolnost v potravinách (zvýšení odolnosti vůči účinkům světla a kyslíku) a modulujeme místo uvolnění v organismu (cílená modulace vzhledem k rozpustnosti, trávicím šťávám, pH a přítomným interferujícím živinám) [2].

### **2.3.3 Enkapsulace mikronutrientů**

Mnohé ze skupiny mikronutrientů, jako jsou vitaminy, minerály, fytochemikálie, oleje a mnoho dalších, vykazují často velkou nestabilitu v potravinách, ať už během výroby, nebo skladování. Stejně tak mohou některé sloučeniny být hůře dostupné pro náš organismus. I v tomto případě může enkapsulace představovat vhodné řešení [16].

#### **2.3.3.1 Fytochemikálie**

Fytochemikálie představují označení pro komplexní skupinu látek vyskytujících se v rostlinách. V potravinách bylo identifikováno na tisíce zástupců a stále jsou objevovány nové. Fytochemikálie vykazují vysokou biologickou aktivitu a bývá jim připisován pozitivní účinek na lidské zdraví, přičemž působí proti civilizačním onemocněním, jako je cukrovka, artritida, vysoký krevní tlak, rakovina a další [16].

Významným zástupcem fytochemikálií jsou polyfenoly. Zahrnují širokou skupinu látek různých funkčních skupin a charakteristik. Polyfenoly se však často vyskytují v nízkých koncentracích, při skladování bývají náchylné vůči účinkům vzdušného kyslíku, teploty, pH a dalším faktorům. Stejně tak vykazují nestabilitu i při zažívání, kvůli nízké vstřebatelnosti se pro naše tělo stávají méně dostupné. Některé polyfenoly vykazují nežádoucí senzorické vlastnosti. Enkapsulace proto může být řešením, jak eliminovat tyto nepříznivé faktory. Nově rozvíjejícím se trendem je ko-enkapsulace různých sloučenin s cílem dosáhnout synergických efektů [1, 2].

### 2.3.3.2 Vitaminy

Mezi další významné zástupce mikronutrientů patří vitaminy. U každé jedince není samozřejmou součástí jídelníčku porce čerstvého ovoce a zeleniny. Enkapsulací vitaminů tedy můžeme získat preparáty, které vykazují vyšší stabilitu ve fortifikovaných potravinách a tím podporují dostatečný příjem vitaminů [16].

Pro enkapsulaci zejména lipofilních vitaminů vyhovují lipozomové částice. Mají totiž schopnost výrazným způsobem zvýšit biodostupnost oproti volné formě vitaminů – například vitamin E v lipozomech oproti jeho volné formě v rybím oleji. Další možností jsou emulze. Jejich výhodou je aplikace – mohou být přijímány bez dalších úprav přímo v jídle a zvýšit tak dostupnost obsažených vitaminů [17].

Významným způsobem je inkluze lipofilních vitaminů do  $\beta$ -cyklodextrinu. Tím se umožní jejich rozpustnost ve vodě. Stabilita ovšem závisí na pH a složení prostředí. Příkladem může být  $\beta$ -karoten. Používá se jako barvivo a je vhodné ke stabilizaci. Bylo zjištěno, že vzniklé preparáty vykazují vyšší stabilitu, než tomu bylo u  $\beta$ -karotenu rozpuštěného v oleji. Stabilita byla podpořena i ve smyslu ochrany proti světlu [17].

Vitamin A byl enkapsulován pomocí komplexní koacervace do obalových materiálů želatiny a akáciové gumy. Vitamin D2 byl enkapsulován do kaseinových micel, resp. jeho ethanolický roztok do kaseinátu sodného. Vzájemné nekovalentní vazby daly vzniknout stabilním částicím, chránícím vitamin před světlem [17].

### 2.3.3.3 Fortifikace železem

Anemie (nedostatek železa) je v současné společnosti rozšířené onemocnění, kterým trpí jí mnoho dětí, dospívajících i těhotných žen. Problém může být krátkodobě vyřešen suplementací tabletami, ale je na místě uvažovat i o fortifikaci potravy železem. Existuje zde však technologický problém, který způsobují organoleptické vlastnosti železa, stejně jako jeho reaktivita. Železo interferuje s mnohými přírodními látkami, jako jsou polyfenoly a vitaminy, a vykazuje nežádoucí sensorický efekt, navíc jakožto reaktant ve Fentonově reakci způsobuje vznik hydroxylového radikálu. Variantou je proto enkapsulace sloučenin železa, a to pomocí lipozomů. Vhodnou sloučeninou železa je fumarát a sukcinát železnatý z důvodu nižší polaritě, než je tomu např. u citrátů, vlnanů a síranů [18].

Další aplikace enkapsulace jsou uvedeny v Tab.2 a 3.

Tabulka 2: Přehled aktivních látek a používaných metod enkapsulace [13]

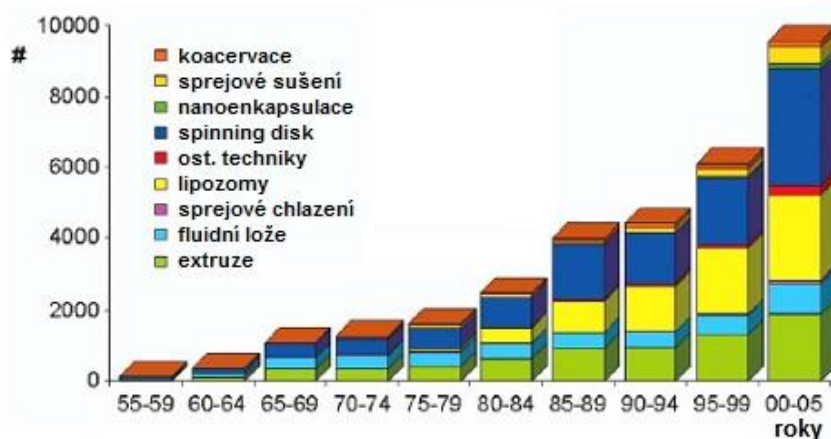
aktivní látka	metoda
vitaminy, příchutě, tuky a oleje,	sprejové sušení
síran železnatý, vitaminy, minerály, okyselovačla	sprejové chlazení a mražení
vitamin C, kyselina citrónová, mléčná, sorbová; uhličitan sodný (pečivo)	fluidní lože
vitamin C; prodloužení skladovatelnosti	extruze
hormony, enzymy, vitaminy	liposomy
vitamin A	koacervace

Tabulka 3a: Přehled enkapsulovaných aditiv a složek potravin, používaných metod a aplikace [19]

kategorie	příklad	metoda	aplikace
okyselovačla	kyselina mléčná, glukono- $\delta$ -lakton, vitamin C, kyselina octová, sorbát draselný	fluidní lože, extruze	aplikace v masném průmysle, udržení barvy a příchutě u emulzí využití v pekařství – kypřicí efekt, okyselení

Tabulka 3b: Přehled enkapsulovaných aditiv a složek potravin, používaných metod a aplikace [19]

kategorie	příklad	metoda	aplikace
příchutě	citrusové oleje, mátový olej, cibulový a česnekový olej, oleoresziny koření	inkluze, extruze, sprejové sušení	přeměna kapalných příchutí do práškové formy, snadnější pro dávkování i manipulaci
sladidla	cukry a sladidla	kokystalizace, fluidní lože	snížení hygroskopicity, zlepšení sypkosti a prodloužení vnímání
barviva	annatto, $\beta$ -karoten, kurkuma	extruze, emulze	lepší rozpustnost a manipulace, odolnost vůči oxidaci
lipidy	rybí olej, kyselina linolenová a palmitová, bílek	sprejové sušení, lyofilizace, vakuové sušení	zamezení oxidační degradace při výrobě a skladování
vitaminy a minerály	vitaminy lipofilní i hydrofilní	koacervace, enkluze, sprejové sušení, lipozomy	odstranění off-flavoru, postupné uvolňování, odolnost vůči okolním podmínkám, zamezení interakcí
mikroorganismy a enzymy	Penicillium roqueforti, invertáza, lipáza,	koacervace, sprejové metody, lipozomy	vylepšení stability, zkrácení zrání



Obrázek 13: Průmyslové využití technik enkapsulace [6]

## 2.4 Enkapsulátor

Přístroj Enkapsulátor B-395 od firmy Büchi je laboratorní přístroj určený pro tvorbu částic. Proces enkapsulace je realizován pomocí polymerního zapouzdření různých typů aktivních látek, jako jsou:

- biologické molekuly
- drogy
- vůně či aroma
- pigmenty a barviva
- extrakty
- buňky [20].

### 2.4.1 Princip přístroje

Při zvolení optimální frekvence vibrace, která je aplikována na laminární kapalnou proud, dochází k jeho roztříštění a ke tvorbě drobných kapiček identické velikosti. Frekvence vibrační přitom určuje

množství kapiček, např. 500 Hz vytvoří 500 kapiček za sekundu. Přístroj byl konstruován tak, aby generoval kapičky v rozmezí velikostí 0,15-2 mm [20].

### 2.4.2 Popis procesu

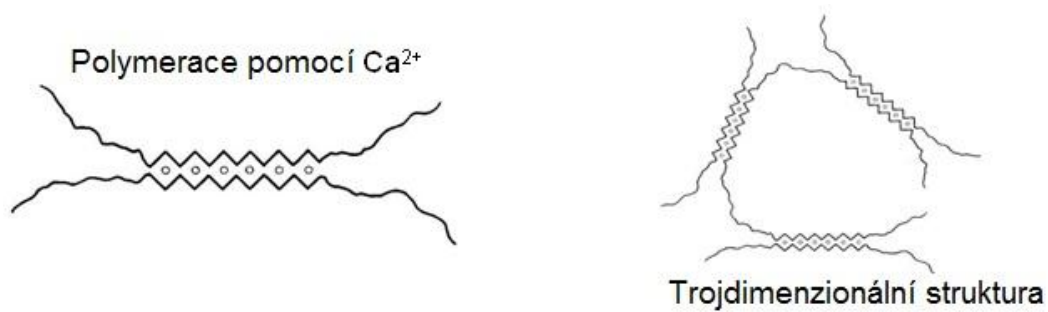
Zvolená aktivní substance (mikroorganismy či jiné chemické látky a biomolekuly) se smíchá s obalovým materiálem, resp. zapouzdřovacím polymerem. Směs se buď vpraví do stříkačky a pomocí stříkačkového čerpadla se tlačí do pulzační komory, nebo se vpraví do tlakové láhve a do pulzační komory se směs tlačí stlačeným vzduchem. Na své cestě prochází kapalinou systémem trysek o přesné velikosti otvorů, které z proudu kapaliny vibracemi vytváří identické kapičky. Jejich průchodem elektrickým polem, které se nachází mezi tryskou a elektrodou, získají stejný povrchový náboj. Působením elektrostatické odpudivé síly pak následně dochází k rozptýlení kapiček, přičemž je možné tento proces sledovat ve světle stroboskopické lampy a tím si ověřit i optimální nastavení procesu [20].



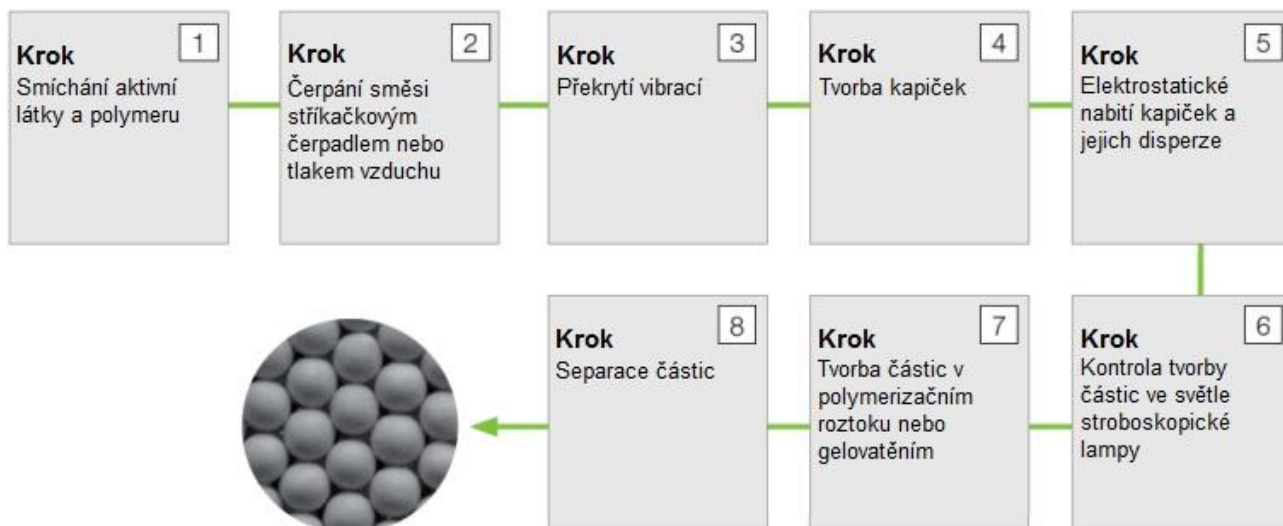
Obrázek 14: Proces enkapsulace pomocí přístroje B-395 Pro od firmy Büchi

Vznikající proud, resp. kužel kapiček je směřován do reakční nádoby s polymerizačním, resp. vytvrzujícím roztokem a magnetickým míchadélkem. Reakční nádoba s roztokem musí být uzemněna. Po dopadení kapiček do polymerizačního roztoku dochází k jejich vytvrzení a vzniku částic.

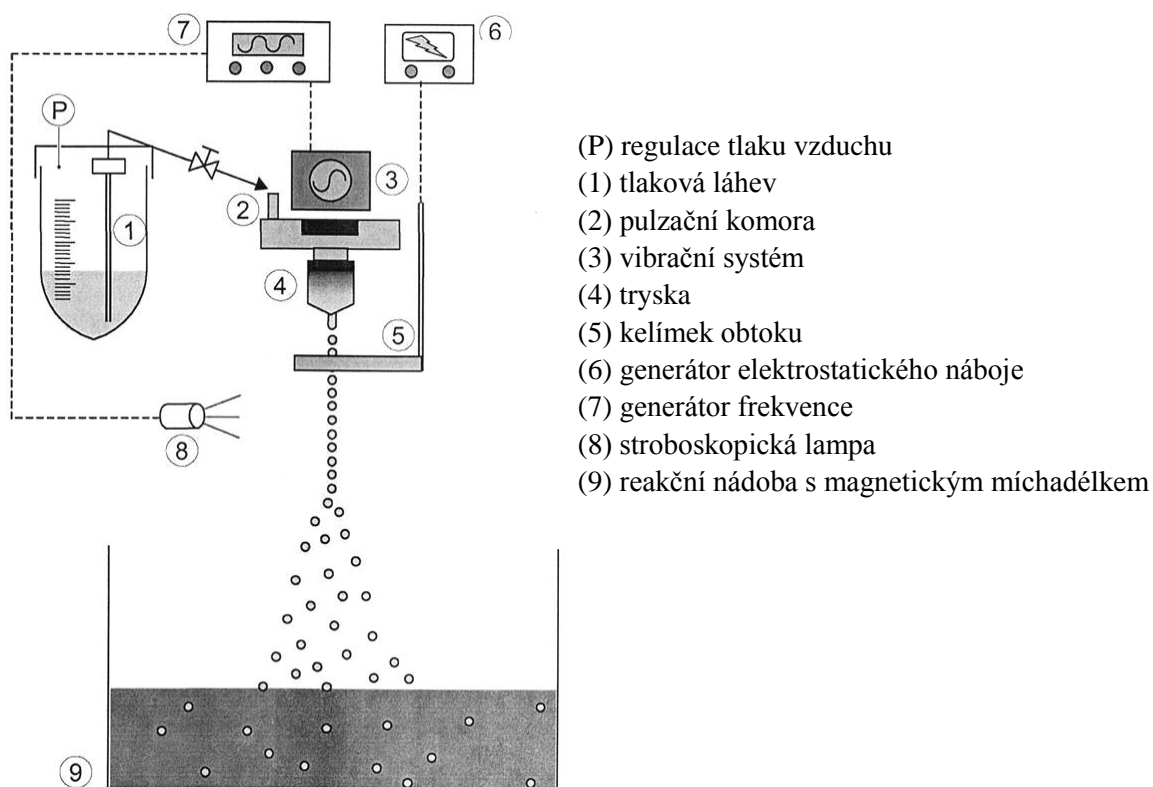




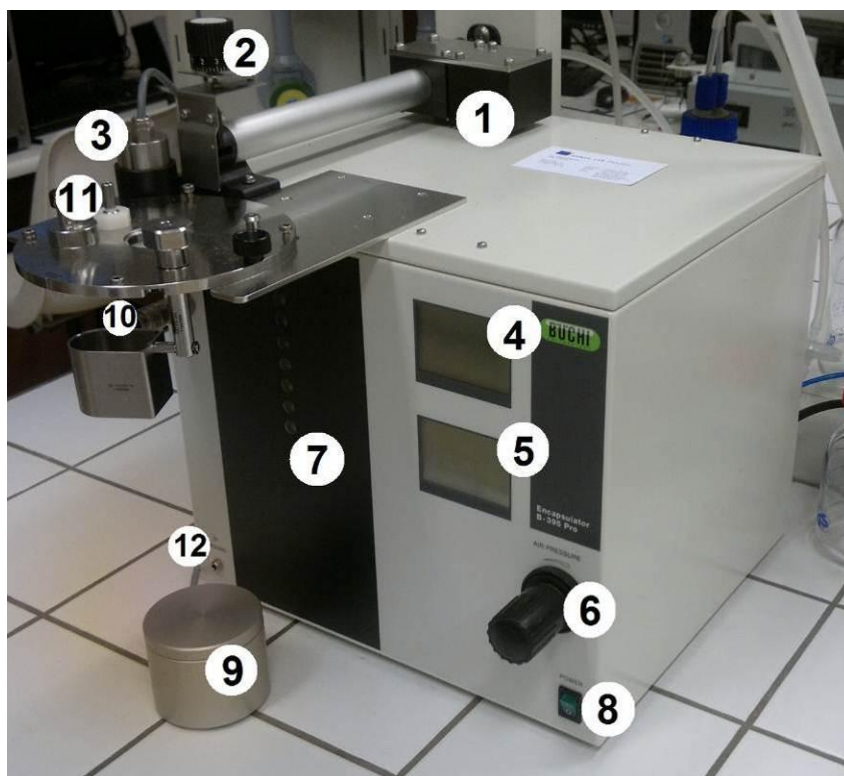
Obrázek 15: Proces gelovatění alginátu pomocí vápenatých iontů [21]



Obrázek 16: Schéma enkapsulačního procesu [21]



Obrázek 17: Schéma přístroje B-395 Pro (Büchi) [20]



- (1) stříkačkové čerpadlo
- (2) ventil pro regulaci průtoku kapaliny
- (3) vibrační jednotka
- (4) horní displej (frekvence vibrací a elektroda)
- (5) dolní displej (čerpadlo, míchání, indikátor tlaku)
- (6) regulační vzduchový/tlakový ventil
- (7) stroboskopická lampa
- (8) vypínač přístroje (on/off)
- (9) magnetické míchadlo
- (10) výstup vzduchu
- (11) EDU (elektrostatická disperzní jednotka - výstup napětí)

Obrázek 18: Popis přístroje [20]

### 2.4.3 Velikost částic

Velikost vznikajících částic je ovlivněna několika parametry, které shrnuje Tab.4. Mezi ně patří velikost trysky, frekvence vibrací, amplitudy, rychlost průtoku včetně fyzikálních vlastností směsi určené k enkapsulaci. V Tab.4 je zobrazena míra vlivu i směr ovlivnění [20].

Tabulka 4: Parametry procesu, které ovlivňují velikost částic a produktivitu [20]

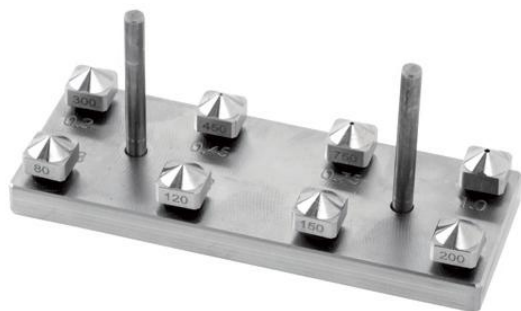
parametr \ výsledek	velikost trysky	vibrační frekvence	průtok	napětí na elektrodě	viskozita
velikosti částic	↑	↓	↑	↑	↑
produktivita	↑	↑	↑	—	—

symbol	vliv
↑	velký
↑	střední
↑	malý
—	žádný

U částic vyrobených z alginátu je velikost částic přibližně dvojnásobná v porovnání s průměrem použité trysky.

Tabulka 5: Rozměry trysek [20]

	průměr otvoru [μm]							
	80	120	150	200	300	450	750	1000
vnitřní trysky (středové trysky)								
vnější trysky (obvodové trysky)	200	300	400	500	600	700	900	

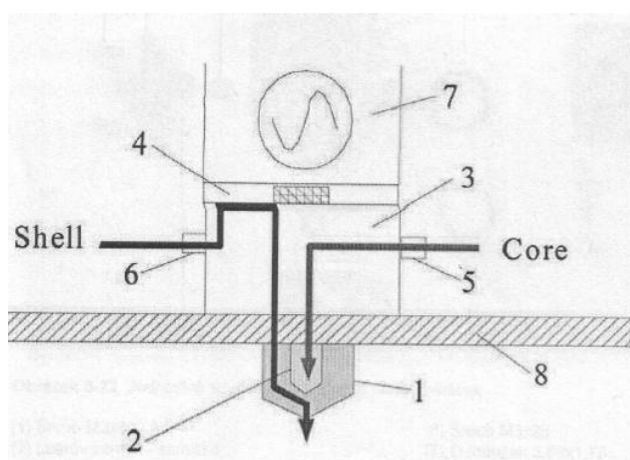


Obrázek 19: Vnitřní trysky [20]



Obrázek 20: Vnější trysky [20]

V procesu se používá jednoduchý systém trysek, který používá vnitřní trysky, nebo koncentrický systém trysek (CN systém), který se skládá z obou typů trysek, uvedených v Tab.5.



- (1) obvodová tryska
- (2) středová tryska
- (3) CN pulzační těleso
- (4) držák magnetu
- (5) luerova spojka pro centrální kapalinu
- (6) luerova spojka pro obvodovou kapalinu
- (7) vibrační jednotka
- (8) nosná deska

„shell“, nebo také obalový materiál, obvodová kapalina  
 „core“, nebo také jádro, centrální kapalina

Obrázek 21: Schéma CN jednotky tvorby částic [20]

#### 2.4.4 Teoretické vztahy

Mezi frekvencí a vlnovou délkou platí vztah:

$$f = \frac{v}{\lambda} \quad [\text{Hz}] \quad (1)$$

$f$ ...frekvence [Hz]

$v$ ...rychlost světla [ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ]

$\lambda$ ...vlnová délka [m] [20].

Je-li laminární proud mechanicky rušený s frekvencí  $f$ , tvoří se kapičky jednotné velikosti. Optimální vlnová délka  $\lambda_{\text{opt}}$  pro roztříštění je dána rovnicí:

$$\lambda_{\text{opt}} = \pi\sqrt{2D} \cdot \sqrt{1 + \frac{3\eta}{\sqrt{\rho\sigma D}}} \quad (2)$$

$D$ ...průměr trysky

$\eta$ ...dynamická viskozita [ $\text{Pa}\cdot\text{s}$ ]

$\rho$ ...hustota [ $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ] (roztoky alginátů cca  $1\,000\,\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ )

$\sigma$ ...povrchové napětí [ $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$ ] (roztoky alginátů cca  $55\cdot 10^{-3}\,\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$ ) [20].

Zvolení optimální vlnové délky  $\lambda_{\text{opt}}$  vede ke tvorbě částic nejlepších parametrů – při trysce daného průměru, stejně jako viskozitě směsi určené pro enkapsulace [20].

Průměr částic  $D$  je možné zjistit z rychlosti průtoku  $V'$  a frekvence pulzací dle vztahu:

$$d = \sqrt[3]{\frac{6V'}{\pi f}} \quad \text{[m]} \quad (3)$$

$d$ ...průměr částic [m]

$V'$ ...rychlost průtoku [ $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ ]

$f$ ...frekvence pulzování [20].

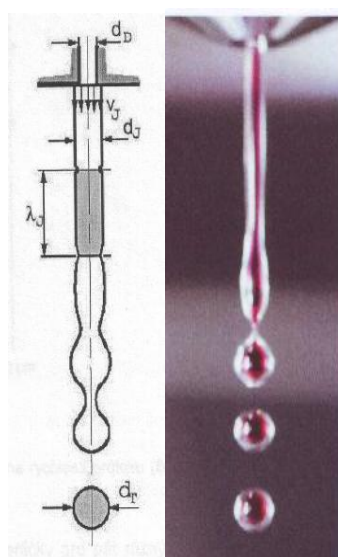
Rychlost průtoku je determinována těmito proměnnými:

$$V' = \frac{\pi v D^2}{4} \quad \text{[m}^3 \cdot \text{s}^{-1}] \quad (4)$$

$V'$ ...rychlost průtoku [ $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ ]

$v$ ...rychlost proudu [ $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ]

$D$ ...průměr trysky [m] [20].



Obrázek 22: Tvorba kapiček [20]

## 2.5 Propolis

Propolis je přírodní produkt tvořený hmotou pocházející z pryskyřičných výměšků rostlin. Tyto látky sbírá včela medonosná (*Apis mellifera*) a pomocí svých slin zpracovává v úlu na propolis. Mezi včelí produkty patří kromě propolisu především med, dále včelí vosk, mateří kašička a včelí jed (apitoxin) [3].

Název propolis pochází z řeckých slov *pro* (před) a *polis* (město). I čeština má vlastní názvy, např. smoluňka [22].

### 2.5.1 Historie, původ

Propolis byl pro své výjimečné léčivé účinky používán v průběhu téměř celé lidské historie. Zmínky o něm sahají až do dob starověkých Egypťanů, Řeků a Peršanů. Egypťané vyobrazovali na vázy způsob získávání propolisu a široce ho používali v lékařství. Řekové a Římané popisovali použití propolisu a označovali ho za třetí produkt včel, vedle vosku a medu. Stejně se předpokládá, že balzám, o kterém je zmínka v Bibli a který darovala královna ze Sáby králi Šalamounovi, představoval propolis. Z doby 3 000 let př. n. l. pochází zmínky o lidovém léčení [23, 24].

V zemích východní Evropy a jižní Ameriky se v současné době stále používá jakožto lidový léčivý přípravek, který dezinfikuje, uklidňuje a hojí při různých poraněních, popáleninách; tinktury jsou doporučovány při bolestech v krku a jiných obtížích. V Argentině včelaři žvýkávají surový propolis

pro léčení infekcí úst a horní části trávicího traktu. Místní venkované užívali propolis rozpuštěný ve směsi mléka a medu pro zmírnění zažívacích obtíží [25].

Nejen kvůli studiu svých vlastností, ale i ve snaze charakterizovat jeho složení i účinné látky je již asi 30 let propolis předmětem vědeckého bádání a výzkumu. Z důvodu proměnlivého složení dle různých lokalit tato látka vyžaduje neustálá vědecká zkoumání [26].

## 2.5.2 Propolis a včely

Vzhledem k tomu, že složení včelích produktů se odvíjí dle rostlin, které se v okolí úlu nachází, je složení propolisu proměnlivé a závisí na zeměpisné poloze. Přestože se tedy složení propolisu liší, má stále tutéž funkci. Včely jej používají jako lepidlo, izolant a tmel, se kterým ucpávají různé trhliny ve stěnách. Jde také o bojovou látku, kterou nahromadí na tělo vetřelce a tím ho usmrtí. V důsledku této mumifikace zabrání infekci z rozkládajících se těl [3, 26].

Složeniny, které se nacházejí v propolisu, pocházejí ze tří hlavních zdrojů:

1. včelami sbírané rostlinné výměšky,
2. sekrety včelího metabolismu,
3. minerály, které se do propolisu dostanou během zpracování [27].

Složky propolisu jsou sbírány z různých částí rostlin – tedy nejen z okvěť, ale také různé pryskyřice vytékající z poranění rostlin. Včely létavky tedy sbírají tuto lepivou rostlinnou hmotu do hrudek na třetím páru svých končetin obdobně jak je tomu u pylu. Hmota je dále přenášena do úlu a zpracována včelími slinami, aby byl propolis dostatečně tekutý pro další použití [22, 26].

## 2.5.3 Vlastnosti a složení

Propolis má specifickou charakteristickou vůni a okrovou až hnědou barvu, která se odvíjí od složení a stáří propolisu. Při teplotě pod 0 °C propolis ztvrdne a stane se lámavým. Při pokojové teplotě propolis měkne a nad 65 °C se rozpouští. Pro svou lepivou konzistenci se propolisu říká také včelí lepidlo [23, 28].

Je rozpustný v ethanolu, zcela se rozpustí v etheru. Ve vodě se rozpouští velmi špatně, asi do 5 %. Propolis je lipofilní povahy, a to vzhledem k tomu, že materiály sbírané včelami jsou různé pryskyřice lipofilního charakteru [23, 28].

Složení propolisu je přibližně následující:

50 % pryskyřice a rostlinné balzámy (polyfenolová frakce)

30 % vosk

10 % esenciální a aromatické oleje

5 % pyl

5 % různé další látky včetně organického i anorganického zbytku [24, 29].

Propolis obsahuje několik set různých látek (uvádí se 200 až 300), mezi něž patří polyfenoly, fenolové aldehydy, kumariny, seskviterpenové chinony, aminokyseliny, tanniny,  $\beta$ -amylázu, polysacharidy, mastné kyseliny, steroidy a anorganické sloučeniny [28].

Z fenolických látek je možné jmenovat pinocembrin, pinobanksin, acacetin, chrysin, rutin, katechin, naringenin, galangin, luteolin, kaempferol, apigenin, myricetin, kvercetin, artemillin C, kyseliny kávovou a její estery (např. fenylethyl-ester kyseliny kávové), p-kumarovou a skořicovou s jejími deriváty [3, 28].

Propolis obsahuje různé minerály, jako je draslík, hořčík, jód, mangan, měď, sodík, vápník, zinek a železo; stejně tak vitaminy, jako jsou B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, C a E. Kromě toho obsahuje některé enzymy jako sukcinát dehydrogenázu, glukózo-6-fosfatázu, adenosin trifosfatázu a kyselou fosfatázu [28].

Při sběru propolisu se uvolňuje do včelích slin enzym  $\beta$ -glukosidáza. Jak začne včela zpracovávat propolis, žvýkat jej a mísit s voskem, začne  $\beta$ -glukosidáza účinkovat a dochází k hydrolyze glykosidů flavonoidů. Proto se flavonoidy vyskytují v propolisu ve formě aglykonů. Složení flavonoidů v propolisu je charakteristické a stejně tak ovlivňuje jeho funkční vlastnosti a biologickou aktivitu [29, 30].

V nedávné době bylo zjištěno, že propolis v Evropě (mimo přímořské oblasti) pochází z topolu černého (*Populus nigra*), a to z jeho pryskyřičných výměšků, které včely sbírají na pupenech. Tento fakt byl zjištěn pomocí analýzy a charakterizace fenolických látek (resp. flavonoidních aglykonů), kdy většina z nich měla nápadně podobnou strukturu. Bylo odhaleno, že jsou společné právě pro topoly. Mezi další druhy patří topol balzámový (*Populus balsamifera*), u něž se uvádí, že jeho vůně připomíná typickou propolisovou vůni. Jiné zdroje uvádí i břízu [22, 24, 26].

Protože se topoly nachází v jen mírném pásmu, tropický propolis má z důvodu jejich absence velmi variabilní složení, neboť jsou včely nuceny hledat jiné rostliny. Pro srovnání je v Tab.6 uvedeno složení brazilského propolisu, jehož původ bývá odvozen od rostliny *Baccharis dracunculifolia* [26].

Tabulka 6: Srovnání složení evropského brazilského propolisu [26]

Typ propolisu	antibakteriální aktivita	protizánětlivá aktivita	protinádorová aktivita	antioxidační aktivita	alergický původce
evropský (typ topolu)	flavanony, flavony, fenolické kyseliny a jejich estery	flavanony, flavony, fenolické kyseliny a jejich estery	fenethyl ester kyseliny kávové	flavonoidy, fenolické kyseliny a jejich estery	3,3-dimethylallyl ester kyseliny kávové
brazilský (typ <i>Baccharis</i> )	prenylovaná kyselina p-kumarová, labdanové dyterpeny	nedetekováno	prenylovaná kyselina p-kumarová, klerodanové dyterpeny, benzofurany	prenylovaná kyselina p-kumarová, flavonoidy, ligniny, chlorogenová kyselina	prenylovaná kyselina p-kumarová, flavonoidy

## 2.5.4 Účinek

Hlavní účinek propolisu závisí na jeho složení. Funkce propolisu je zajištěna různými sloučeninami, které můžeme zařadit do skupiny polyfenolů. Jejich obsah bývá natolik vysoký, že propolis vykazuje mnoho účinků na lidské zdraví. Mezi ně patří antimikrobiální, antivirotický, antioxidační, protizánětlivý, lokálně anestetický, antikarcinogenní, stejně jako imunostimulační účinek. Propolis může být použit při regeneraci pokožky při popálení, ozáření a zranění [3, 22].

### 2.5.4.1 Antimikrobiální aktivita

Bylo zjištěno, že je propolis účinný proti grampozitivním bakteriím (tyčinkám), méně proti gramnegativním druhům. Při kultivacích inhiboval růst *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, a bakterie rodu *Bacillus* [25, 27].

Propolis dokázal taky podpořit účinek antibiotik, například při kultivaci *S. aureus* a *E. coli*, kdy byl obsažen v médiu [27].

### 2.5.4.2 Antioxidační aktivita

Propolis je bohatý na obsah polyfenolů a flavonoidů. Ty jsou známé pro své výrazné antioxidační účinky a propolis tak může fungovat jako prostředek proti účinkům volných radikálů. Bylo zjištěno, že je propolis schopen ochránit lipidy před oxidací účinněji než vitamin E [31].

Nejvýraznější antioxidační aktivita ze skupiny fenolických sloučenin byla identifikována u kyseliny 3-[3,4-dihydroxy-5-prenylphenyl]-2-(E)-propenové, prokázána jako dvakrát účinnější než BHT (butylhydroxytoluen) [31].

### 2.5.4.3 Antikarcinogenní aktivita

Ve spojitosti s účinkem proti vzniku a růstu nádorů se zmiňuje v propolisu přítomný diterpen klerodanového typu, u něhož byla objevena cytotoxicita a schopnost bojovat proti lidských buňkám hepatocelulárního karcinomu. Zmíněná látka má účinek i proti buňkám karcinomu plic. Fenylethyl-ester kyseliny kávové (CAPE) vykazuje značnou cytotoxicitu vůči různým rakovinným buňkám [31].

### 2.5.5 Získávání propolisu a jeho použití

Propolis se z úlů získává oškrabáváním ze stěn. Pro zvýšení produkce se do úlů vkládají různé rošty, které podněcují včely k jejich zacelování. Tato síta se pak mohou vyjmout a zmrazit, čímž propolis ztuhne; následně se snadno rozláme a oddělí. Při intenzivní nadprodukcí včely ředí propolis voskem a tak dochází k poklesu jeho kvality a účinku [22].

Z propolisu se vyrábí nejčastěji tinktury a masti. Před aplikací by měla být ověřena snášenlivost, protože se vyskytují případy alergické reakce pokožky. Bylo zjištěno, že alergické reakce způsobují estery kyseliny skořicové a kávové [22].

Propolis nachází své uplatnění nejen v oblasti potravinových doplňků, ale i léčebných přípravků a kosmetiky. V případě aplikace do potravin významnou mírou brání peroxidaci tuků [3].

## 2.6 Zelený ječmen

Zelený ječmen představuje mladé výhonky ječmene setého *Hordeum vulgare* L. (nebo také *Hordeum sativum* L.). Tyto výhonky se sklízí a získává se z nich šťáva, která se následně suší. Vzniká tak potravina známá pro své zdraví prospěšné látky [32].

### 2.6.1 Historie

Ječmen je jednou z nejstarších zemědělských plodin, zmiňovanou již v Bibli (například Kniha Rút ve Starém zákoně) Pozůstatky jeho zrn našli archeologové a datovali je do starší doby kamenné. Archeologické nálezy z Egypta a Babylónie datují jeho pěstování do doby asi 5 000 let př. n. l., přičemž na území střední Evropy se dostal o dva tisíce let později. Ječmen se mlel na mouku, byl surovinou pro přípravu alkoholických nápojů a stejně tak se z něj vyráběly kroupy. Hojně rozšířenou plodinou byl ječmen ve starověku ve všech vyspělejších společnostech. Již tehdy lidé věděli o prospěšnosti ječmenných výhonků. Rozšířený byl dokonce více než pšenice, z důvodu jeho nižších nároků na pěstování [33, 34].

V současné době jde o plodinu hojně pěstovanou, neboť se používá k výrobě sladu a tedy piva. Ječmen se dostává do popředí také jakožto krmivo. Jeho živiny mají pozitivní zdravotní přínos a umožňují předejít nemocem zvířete. V neposlední řadě se začíná ječmen dostávat do popředí i díky roli zdravé potraviny pro lidskou výživu a racionální stravu [33, 35].

### 2.6.2 Ječmen – botanika a zemědělství

Ječmen patří do říše rostlin, oddělení krytosemenných, třídy jednoděložných, čeledi lipnicovitých rostlin, rodu *Hordeum*. Přesné zařazení je uvedené v Tab.7.

Ječmen rychle roste, oproti ostatním obilninám je vysoce adaptovaný jak na půdy, tak i na klimatické podmínky. Nalezneme jej od pásma subarktického po subtropické. Ječmen se však nepěstuje v tropickém pásu z důvodu vysoké teploty a vlhkosti [37, 38].

Dle způsobu růstu se dělí na plané ječmeny, které rostou divoce, a na ječmeny kulturní, seté – tedy ječmen setý *Hordeum sativum (vulgare)* [36].

Ječmen se dělí dle morfologie klasu a polohy zrn na dvě skupiny: dvouřadý (*Hordeum distichum*), kdy se obilky nachází ve dvou řadách (Obr. 23) a šestiřadý (*Hordeum vulgare*), kdy se obilky nacházejí v šesti řadách (Obr. 24). Dvouřadý ječmen má větší obilky, šestiřadý má vyšší produkci. Rozlišují se ještě nahá a pluchatá forma v závislosti na přítomnosti vousů či osin, které kryjí zrna v klasech [35].

Kulturní odrůdy vyskytují jako zimní (ozim) či jarní (jařina). Zimní varianta se vysévá od půlky září do října a sklizeň probíhá v první polovině července, jarní varianta se vysévá většinou v období od března do dubna a sklizeň je v srpnu. V zimní variantě se vyskytuje dvou- i šestiřadý ječmen; na jaro se vysazuje pouze dvouřadý ječmen. Jarní ječmen se převážně používá pro výrobu sladu [35].



Obrázek 23: Ječmen dvouřadý [34]



Obrázek 24: Ječmen šestiřadý [34]

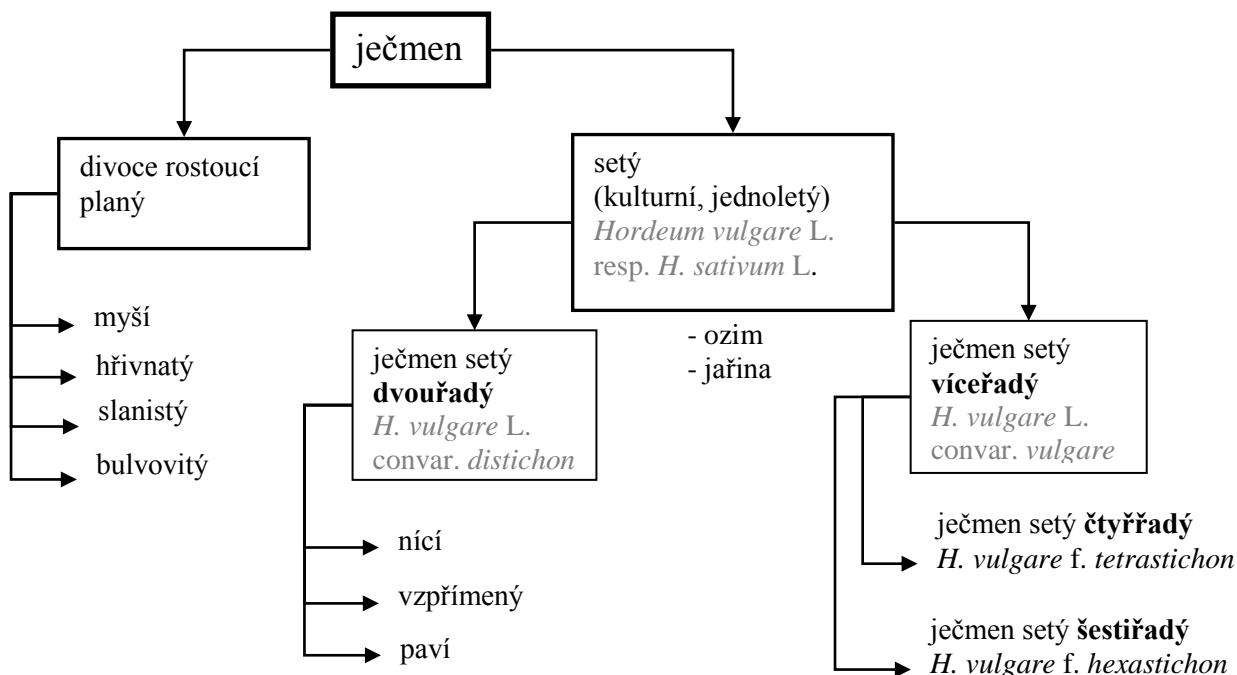
Asi 30% z celé sklizně je určeno pro sladařský průmysl, zbytek je určen ke krmným účelům. Na potravinářský průmysl přiléhá jen minimální podíl – z ječmene se vyrábí kroupy [35].

Z ječmene se dále vyrábí mnoho nápojů, pochutin, potravin: nejen pivo, ale i skotská whisky, kávové náhražky (melta) - v Itálii nazvané „caffè d'orzo“. Dále je možné z ječmene vyrábět sladidla pro cukrářskou a pekařskou výrobu– maltózové sirupy. Mezi největší producenty ječmene patří Francie, Německo, Španělsko a Velká Británie [38].

Tabulka 7: Biologická klasifikace ječmene [39, 40]

říše	rostliny	<i>Plantae</i>
podříše	cévnaté rostliny	<i>Cormophytae (Tracheophyta)</i>
oddělení	krytosemenné	<i>Magnoliophyta</i>
třída	jednoděložné	<i>Liliopsida (Monocotyledonae)</i>
podtřída	Commelinids	<i>Commelinidae</i>
řád	lipnicotvaré	<i>Poales</i>
čeleď	lipnicovité	<i>Poaceae</i>
podčeleď	vlastní lipnicovité	<i>Pooideae</i>
rod	ječmen	<i>Hordeum L.</i>
druh	setý/obecný	<i>H. vulgare L.</i>





Obrázek 25: Dělení druhů ječmene [41, 42]

### 2.6.3 Složení

Mladé výhonky ječmene obsahují široké spektrum různých živin, které vykazují prospěšné účinky. Složení je ovšem proměnlivé a záleží na lokalitě a způsobu pěstování, zda-li půda obsahovala dostatek živin, byl dostatek slunečního záření (vliv na obsah chlorofylu) aj.. Doporučovány jsou výrobky pocházející z Austrálie a USA, stejně jako v BIO kvalitě [4].

#### 2.6.3.1 Mikronutrienty

Extrakt mladých výhonků obsahuje vitaminy skupiny B, vitamin C, vitamin E a  $\beta$ -karoten. Mladý ječmen obsahuje dále vitamin H (biotin) a cholin. Minerály jsou v ječmeni zastoupeny ve vyšším množství. Ve výhoncích je nejvíce zastoupen draslík, vápník, hořčík, železo [4, 43].

#### 2.6.3.2 Enzymy

Ječmen obsahuje velké množství enzymů. Jejich účinek je násoben přítomnými vitaminy a minerály, které slouží jako kofaktory enzymů. Odhaduje se, že v extraktu se nachází až 3 000 různých enzymů, které představují až 40 % hmotnosti. Jde zejména o superoxidodismutázu (SOD), cytochromoxidázu, katalázu, peroxidázu a transhydrogenázu. Mezi další enzymy patří nitrogenoxidoreduktáza a aspartátaminotransferáza [4, 43].

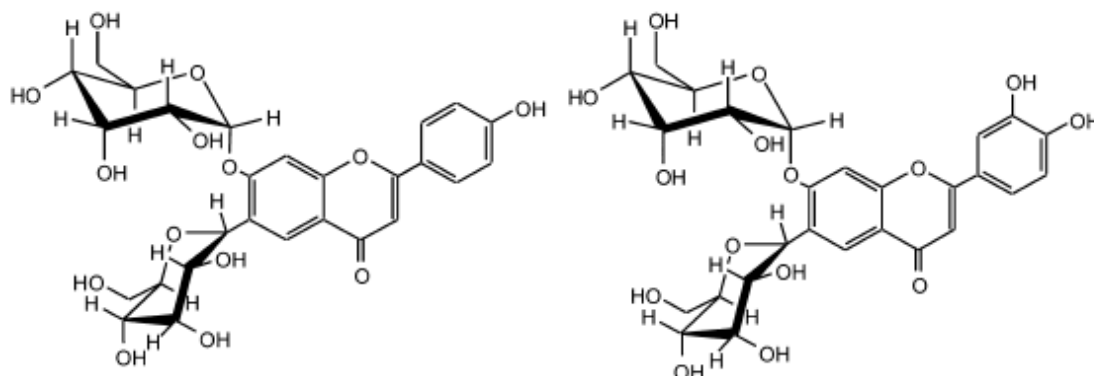
SOD rozkládá reaktivní superoxydy, které vznikají v těle a poškozují DNA, lipidy a okolní ochranné buněčné struktury. Cytochromoxidáza ovlivňuje buněčné dýchání, peroxidáza rozkládá peroxid vodíku, transhydrogenáza se podílí na správné funkci srdečního svalu. Existuje i hypotéza o možném účinku cytochromoxidázy, katalázy a peroxidázy proti rakovině [4].

#### 2.6.3.3 Antioxidanty

K antioxidační aktivitě zeleného ječmene přispívá především flavonoid 2-O-GIV (2“-0-glykosylisovitexin), vitamin C a E a  $\beta$ -karoten. Testováním sloučeniny 2-O-GIV bylo zjištěno, že pomáhá buňkám bránit se proti negativním účinkům glyoxalu, škodlivé látky obsažené např. v

cigaretovém kouři, která je spojována s tzv. AGEs (Produkty pokročilé glykace, Advanced glycation end products), které poškozují tkáň [4, 43].

Mezi další účinné antioxidanty ječmene patří saponarin (7-O-glycosylisovitexin), a lutonarin (isoorientin-7-O-glukosid). [35, 38].



Obrázek 26: Saponarin a lutonarin [35]

#### 2.6.3.4 Další zdraví prospěšné látky [4]

Mezi další látky obsažené v zeleném ječmeni patří zejména chlorofyl. Uvádí se, že umožňuje potlačovat tělesné pachy. Účinek je podpořen i jeho antibakteriálními a protizánětlivými schopnostmi. Díky porfyrinovému jádru v kombinaci s železem zlepšuje krevní obraz.

Další významnou látkou obsaženou v mladém ječmeni je vláknina. Čistí střeva, odstraňuje nežádoucí látky ze střev a tak zmírňuje výskyt rakoviny. Podporuje pohyb potravy ve střevech, což má za následek snížení kalorického příjmu.

Další složkou ječmene jsou lipidy. Zastoupeny jsou převážně PUFA (polynenasycené mastné kyseliny, polyunsaturated fatty acids). Nasycené mastné kyseliny ani cholesterol se v mladém ječmeni nevyskytují.

#### 2.6.4 Ječmen a zdraví

Průkopníkem vědy o zeleném ječmenu byl japonský farmakolog Yoshihide Hagiwara, který vydal knihu s názvem Green Barley Essence (1986, Keats Publishing) [44]. Extrakt zeleného ječmene se považuje za komplexní a velmi přínosný potravinový preparát. Uvádí se, že přispívá k celkové dobré kondici organismu, pomůže při léčbě nemocí a zotavování, zlepšuje stav pokožky a pomáhá při kožních problémech. Bojuje proti infekcím a nachlazení, pomáhá předcházet alergiím, podporuje imunitní systém a čistí krev. Podporuje trávení, předchází zažívacím obtížím a zánětům celého trávicího traktu, redukuje obsah cholesterolu a detoxikuje, neboť vláknina i chlorofyl podporují peristaltiku a neutralizují toxiny ve střevě. Působí proti revmatickým obtížím, nádorům, onemocněním jater, srdečně cévním onemocněním, diabetu a anémii [4]

Bylo zjištěno, že enzymy dokázaly inaktivovat toxické látky Try-P1 a P2 obsažené v opečeném mase a rybách. Uvádí se, že tyto látky jsou až 20krát více mutagenní a karcinogenní než složky tabákového kouře. Výhonky zeleného ječmene mají schopnost zpomalovat růst rakovinných buněk vyskytujících se v prostatě [4].

#### 2.6.5 Výroba

Od různých výrobců a prodejců z oblasti zdravé výživy byly získány tyto informace:

##### Na cestě ke zdraví, Petr Horna

„Mladík ječmen“ – teplota sušení se pohybuje okolo  $40 \pm 5$  °C, proces sušení trvá 4 hodiny.

### **ASP CZECH s.r.o.**

„Medicol Zelený ječmen“ – pro výrobu prášku se používají celé lístky. Tzv. bleskovou metodou se suší při teplotě 60-65 °C v sušícím tunelu. Zde teplý vzduch proudící vysokou rychlostí odvádí maximum vlhkosti z listů během krátkého okamžiku. Poté jsou vysušené listy mlety na jemný prášek.

### **Empower Company**

„Bio mladý ječmen Juice“ – výhonky mladého ječmene se lisují pro získání šťávy, která se následně suší v prostředí ochranné CO<sub>2</sub>-atmosféry při teplotě do 31 °C.

### **Allnature s.r.o.**

„Mladý ječmen“ - ječmen se suší a poté se mele na prášek.

### **Chlorela centrum s.r.o.**

„Barley Green šťáva z ječmene“ – produkt pochází z Kanady; sklízí se asi 20 cm rostlinky, které se následně roztřídí, omyjí, zvalchují, sterilují. Vylisuje se šťáva, z ní jsou odstraněna hrubá vlákna. V posledních krocích se šťáva homogenizuje a sprejově suší. Prášek se proseje, projde kontrolou v laboratoři a po zabalení výrobek je připraven k prodeji.

### **Energy group, a.s.**

„Barley juice“ – z listů ječmene je lisována šťáva, která se následně sprejově suší a upraví na prášek.

„Barley grass“ – ječmen je sklizen vzrostlý do výšky 15-18 cm, celá rostlina je usušena a následně mikronizována.

## **2.7 Probiotika**

Dle definice FAO/WHO jsou probiotika živé organizmy, které při užívání v dostatečném množství přinášejí zdravotní prospěch svému hostiteli. Probiotika chápeme jako určitou mikrobiální kulturu, kterou přidáváme do potravin nebo krmiv, abychom tím zlepšili mikrobiální rovnováhu v trávicím traktu příjemce a celkově zlepšili stav celého organismu [45, 46].

Pojem probiotika je odvozen od řeckého ‚pro‘ a ‚bios‘, což můžeme vyložit jako ‚pro život‘. Protikladem je pojem ‚antibiotikum‘, tedy ‚proti životu‘ [46].

### **2.7.1 Gastrointestinální trakt**

Ve střevním traktu lidí a zvířat je zastoupena celá řada mikroorganismů, které žijí na mukózním povrchu epitelu komenzálním způsobem (tj. způsob neškodného přizpůsobení). Zastoupeny jsou různé druhy mikroorganismů; odhaduje se asi 500 druhů bakterií. Mají zde plno funkcí. Jejich úkolem je trávit potravu, bránit vzniku infekcí a onemocnění, regulovat alergické reakce, produkovat vitaminy skupiny B. Stejně tak ochraňují buňky střevní sliznice a potlačují růst patogenů [45, 47].

Počet příznivých mikroorganismů může být však během života snížen. Důvody jsou různé: terapie antibiotiky, infekční střevní onemocnění, nevhodné stravování, stres, vysoký věk. Je proto nutné udržovat střevní ekosystém v pořádku, neboť koreluje s naším imunitním systémem [45].

### **2.7.2 Zástupci**

Hlavními zástupci probiotik jsou laktobacily a bifidobakterie.

#### **2.7.2.1 Rod *Lactobacillus***

Laktobacily jsou grampozitivní fakultativně anaerobní až mikroaerofilní nepohyblivé paličkovité bakterie mléčného kvašení. Jde o rovné, různě dlouhé i ohnuté tyčinky, přičemž tvar se odvíjí od věku kultury, složení média a obsahu kyslíku. Považují se za acidotolerantní až acidofilní mikroorganismy;

co se týče teploty, jde o mezofily (do 40 °C) až mírné termofily (do 55 °C). Stejně tak některé druhy dokážou růst i při teplotách blízkých nule (*L. plantarum*) [47].

Nachází se na rostlinných i živočišných materiálech, méně v zažívacím traktu lidí i zvířat.

Na agarových plotnách jsou kolonie hladké, lesklé a vyduté, neprůhledné a bez barvy. Mají pravidelný okraj a jejich průměr bývá 2-5 mm. V obvyklých médiích na rozdíl od běžných poživatin netvoří zápy [47].

Laktobacily jsou velmi náročné na výživu. V přírodě fermentují komplexní organické substráty a podobné podmínky jim musíme zajistit i my v laboratorních podmínkách. Pro fermentaci vyžadují jako zdroj energie a uhlíku různé sacharidy, dále i aminokyseliny, nukleové kyseliny a vitaminy skupiny B-komplex. Pro kultivaci jsou vhodná média s hodnotou pH 6,4-4,5, produkcí kyselin dojde k poklesu a růst se zastavuje u hodnot 4,0-3,6 [47].

Produkují především kyselinu mléčnou, ale dokážou stejně tak dobře tvořit kyselinu octovou, ethanol a oxid uhličitý. Těmito produkty jsou schopny snížit pH v prostředí až pod hodnotu 4,0. Nízká hodnota pH spolu s nedisociovanými kyselinami působí proti výskytu ostatních mikroorganismů (kromě kvasinek a jiných bakterií mléčného kvašení). Pro tuto schopnost nacházejí uplatnění v potravinářské technologii (kysané zelí a okurky, siláž, pivo, víno) a stejně tak mají přínos v zažívacím traktu (*L. acidophilus*) [47].

Jedním z nejvýznamnějších druhů je *L. acidophilus*. Dalšími zástupci jsou *L. salivarius*, *L. casei* ssp. *casei*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus* GG [47].

### 2.7.2.2 Rod *Bifidobacterium*

Jde o grampozitivní, chemoorganotrofní, zpravidla striktně anaerobní, kataláza negativní, nesporující a nepohyblivé nepravidelné tyčinky. Projevuje se u nich větvení či sekupování do tvaru písmene V či Y. Kyselé prostředí jim příliš nevyhovuje. Kolonie bývají hladké, vypouklé s hladkými okraji, lesklé, měkké konzistence. Na Petriho misce za aerobních podmínek nerostou; tolerují určitou přítomnost kyslíku, pokud je přítomen i oxid uhličitý a biogenní faktory [47].

Tabulka 8: Teplotní a pH optima pro rod *Bifidobacterium* [47]

	minimum	optimum	maximum
teplota	25-28	37-41	43-45
pH	4,5-5,0	6,5-7,0	8,0-8,5

Stejně jako u laktobacilů fermentují sacharidy za vzniku kyseliny mléčné a octové (v poměru 2:3), jsou heterofermentativní. Tyto kyseliny dokážou inhibovat nežádoucí bakterie a stimulovat peristaltiku. Vzhledem k vyššímu podílu kyseliny octové, která je účinnější než kyselina mléčná, dokážou výrazněji inhibovat nežádoucí gramnegativní bakterie. Oxid uhličitý neprodukuje. Vytváří i vedlejší produkty, což jsou malá množství kyseliny mravenčí, jantarové a ethanolu [48].

Jejich růst podporují tzv. bifidogenní faktory. Řeč je o sloučeninách laktulóze, N-acetyl-D-glukosaminu, transgalaktozylovaných oligosacharidech, dále i fruktooligosacharidech [48].

V zažívacím traktu mají prospěšnou funkci; pomocí produktů svého metabolismu mají podíl na potlačování nežádoucí mikroflóry. Hrají důležitou roli v trávicím traktu kojenců [47, 48].

Určité kmeny bifidobakterií se používají v mlékárenském průmyslu, kdy společně s dalšími bakteriemi mléčného kvašení slouží k výrobě fermentovaných mléčných výrobků [47].

Jako zástupce probiotické řady je možné uvést *Bifidobacterium bifidum* (dříve *L. bifidus*), *B. longum*, *B. infantis*, *B. adolescents* [46, 47].

### 2.7.3 Zdravotní přínos probiotik

Společně s prebiotiky podporují správné složení střevní mikroflóry. Probiotické bakterie posilují přirozené obranné mechanismy těla a snížením hodnoty pH brání existenci a růstu nepříznivé mikroflóry, která svými produkty může narušit rovnováhu a vést tak k různým méně či více závažným

onemocněním. Současné výzkumy směřují ke studiu zdravotního přínosu, ke kterému může patřit nejen obrana proti infekcím, ale dokonce i ochrana proti rozvoji rakoviny. Snížením pH byla totiž snížena aktivita enzymů, které jsou spojené s rozvojem rakoviny tlustého střeva. Probiotika dále snižují aktivitu prokarcinogenních enzymů  $\beta$ -glukuronidázy, azoreduktázy, nitroreduktázy aj. [15, 48].

#### 2.7.4 Účinek probiotik

V tlustém střevě se nachází asi  $10^{11}$  až  $10^{12}$  mikroorganismů, zastoupených několika stovkami adaptovaných druhů, přičemž adaptace mikroflóry tlustého střeva je vyšší než v případě střeva tenkého. Existuje teda otázka, do jaké míry jsou přijímaná probiotika schopna tento ekosystém ovlivnit. [15].

Terapie probiotiky má pozitivní účinek při průjemových onemocněních. Pro představu je v Tab.9 uveden příklad těch mikroorganismů, u nichž byl zmíněn pozitivní vliv dokázán [15].

Tabulka 9: Probiotika, která prokázala pozitivní účinek při léčbě střevních onemocnění [15]

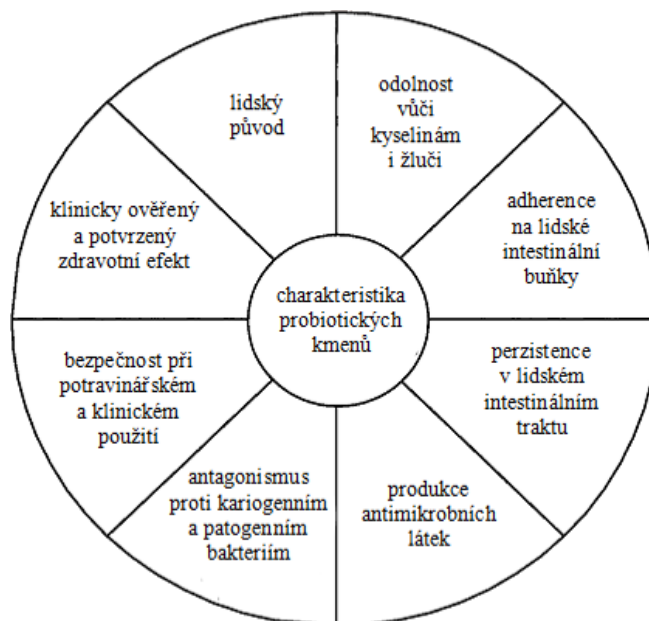
původce onemocnění	zasazená oblast	probiotická kultura
rotaviry	tenké střevo	<i>B. bifidum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>C. difficile</i>	tlusté střevo	<i>L. rhamnosus</i> gG
<i>E. coli</i> – cestovní průjem	tenké střevo	<i>L. rhamnosus</i> gG
<i>Shigella</i>	tenké i tlusté střevo	<i>L. rhamnosus</i> gG

V případě infekce bakterií *Campylobacter jejuni* byla zjištěna úplná její eliminace pomocí terapie *L. acidophilus*. Kampylobakteriíza se vyskytuje především u nedostatečně tepelně ošetřeného masa a je příčinou mnoha alimentárních onemocnění. U *L. rhamnosus* GG bylo zjištěno, že jeho suplementací v případě rotavirové infekce zkracuje dobu onemocnění a to nejspíše proto, že vyvolává místní imunitní odpověď. Výše zmíněné jevy tedy potvrzují, že probiotika ovlivňují střevní ekosystém a v případě nemoci mají pozitivní vliv na jejich průběh [15].

#### 2.7.5 Výběr probiotických kmenů

Pro zařazení mikroorganismů k probiotickým kulturám musí být splněna určitá kritéria. Po požití musí buňky překonat kyselé prostředí žaludku, snášet působení žlučových kyselin a nízké povrchové napětí a také odolávat peristaltice. Pro vhodný účinek je nezbytné doručení viabilních buněk na místo cíleného působení, tedy do střev. Ve střevě se předpokládá jejich požadovaná funkčnost (zmíněná adherence, případně produkce antimikrobiálních látek), schopnost přežití, kolonizace, stejně jako stimulace imunity a prevence před patogeny. V neposlední řadě vlastností kultury musí vyhovovat případné průmyslové produkci - mikroorganismy po přidání do potravin by měly být schopny zachovat svou životnost a funkci po dobu zpracování a skladování; nesmí zároveň nepříznivě senzoricky ovlivňovat danou potravinu [47, 48].

Při studiu probiotických bakterií je nezbytné použít molekulární metody pro odlišení probiotických bakterií od ostatních zástupců střevní mikroflóry a stejně tak zjistit vliv probiotik na jiné mikroby a potvrdit, že probiotika nemají škodlivý vliv na člověka [48].



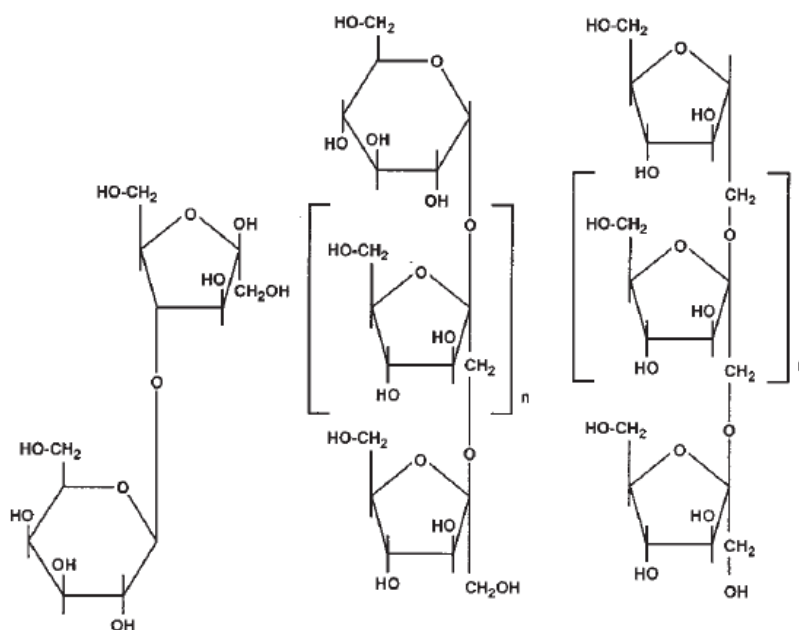
Obrázek 27: Požadavky při výběru probiotických kmenů [48]

## 2.8 Prebiotika

Pod pojmem prebiotika označujeme nutriční doplňky. Bývají součástí vlákniny a nejsou využitelné pro naše tělo. Netráví se v tenkém střevě, ale jsou utilizovány až v tlustém střevě přítomnými probiotickými kulturami. Pro zařazení do skupiny prebiotik musí daná sloučenina splňovat následující tři požadavky [46, 49]:

- nesmí být ani hydrolyzována y ani absorbovány v horní části GIT
- musí být selektivním substrátem pro jeden nebo více druhů příznivé mikroflóry v našich střevech, tedy stimulovat jejich růst, a to selektivně
- musí mít schopnost měnit složení střevní mikroflóry ve prospěch žádoucích kultur [49].

Do skupiny prebiotik patří laktulóza, fruktooligosacharidy, xylooligosacharidy, mannanooligosacharidy a inulin [14].



Obrázek 28: Laktulóza, inulin a fruktooligosacharid [15]

Získávají se extrakcí z rostlin hydrolýzou polysacharidů nebo transgalaktosylačními reakcemi. Mannanooligosacharidy se získávají z buněčných stěn kvasinek [14].

Laktulóza představuje disacharid složený z galaktózy a fruktózy (4-O-β-D-galaktopyranosyl-D-fruktofuranóza). Utilizací laktulózy dochází k poklesu pH; amoniak je protonován a odchází výkaly, takto dochází ke snížení jeho obsahu v krvi [14].

Fruktosacharidy obsahují až 70 jednotek fruktózy, které mohou být připojeny k terminální molekule sacharózy (fruktooligosacharidy, glukooligosacharidy a inulin) [14].

Nejvýznamnějším zástupcem je inulin. Je složen z jednotek β-(2-1)fruktozyl-fruktózy. Inulin se nachází v různých rostlinách, jako je čeleď liliovitě (lilie, řebčík, tulipán), amarylkovitě (sneženka, bledule, narcis), lipnicovitě (resp. trávy) a hvězdicovitě (zejména široká skupina léčivek). Průmyslově se inulin získává z čekanky [47, 50].

β-konfigurace vazem mezi fruktózovými jednotkami činí tuto skupinu látek nestravitelnou v lidském traktu. Pouze až v tlustém střevě nachází své uplatnění díky enzymovému aparátu přítomných bakterií [50].

Mezi pozitivní účinky prebiotik patří podpora růstu a aktivity pozitivní složky střevní mikroflóry, stejně jako posílení bariérové funkce střevního epitelu a stimulace imunity [14].

Při suplementaci fruktooligosacharidů či inulinu v množství 15 g za den ve výkalech desetinásobně vzrostlo množství bifidobakterií; pokles byl zaznamenán u bakteroidů, koků a koliformních bakterií. Obdobný jev byl sledován v případě aplikace galaktooligosacharidů krysám kolonizovaných lidskou fekální mikroflórou [15].

Probiotika mohou posílit bariérovou funkci střev při různých negativních vlivech a aktivovat imunitní odpovědi v GALT (střevní lymfatická tkáň). Mukózní vrstva střev se skládá z dvojité ochranné vrstvy. Vnitřní vrstva je velmi hustá, téměř nekolonizovaná a vrstva vnější je řídkší a kolonizovaná. Ukazuje se, že prebiotika mají schopnost zvýšit množství mucinu a tak posílit ochrannou funkci střev. Stejně tak úprava složení mikroflóry pomocí prebiotik má vliv na imunitní odpověď. Současná aplikace probiotik a prebiotik je proto žádoucí a tyto preparáty se nazývají symbiotika [14, 15].

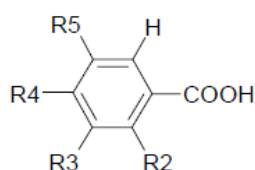
## 2.9 Charakterizace částic, analýza aktivních látek

### 2.9.1 Polyfenoly

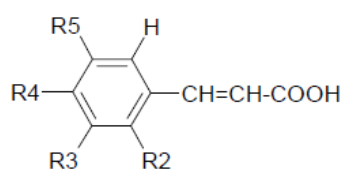
Skupinou aktivních přírodních látek jsou polyfenoly. Polyfenoly představují komplexní skupinu rostlinných sekundárních metabolitů a vykazují vysokou biologickou aktivitu, příznivou pro organismus jak lidí, tak zvířat. Jde o účinky antioxidantní, antibakteriální, antivirotické, protizánětlivé, protirakovinové. Účinně bojují proti civilizačním chorobám, jako je cukrovka, kardiovaskulární onemocnění, neurodegenerativní onemocnění, rakovina [1].

Polyfenoly jsou obecně charakterizovány přítomností aromatického jádra a mezi zástupce patří skupiny derivátů kyseliny hydroxybenzoové a hydroxyskořicové; ligniny, tanniny a skupina flavonoidů, mezi něž patří anthokyanidiny, flavan-3oly (katechiny), flavony, flavanony a isoflavony [1].

V této práci bylo zvoleno měření obsahu polyfenolů jakožto sledovaný parametr pro zjištění stability částic a uvolňování jejich obsahu.

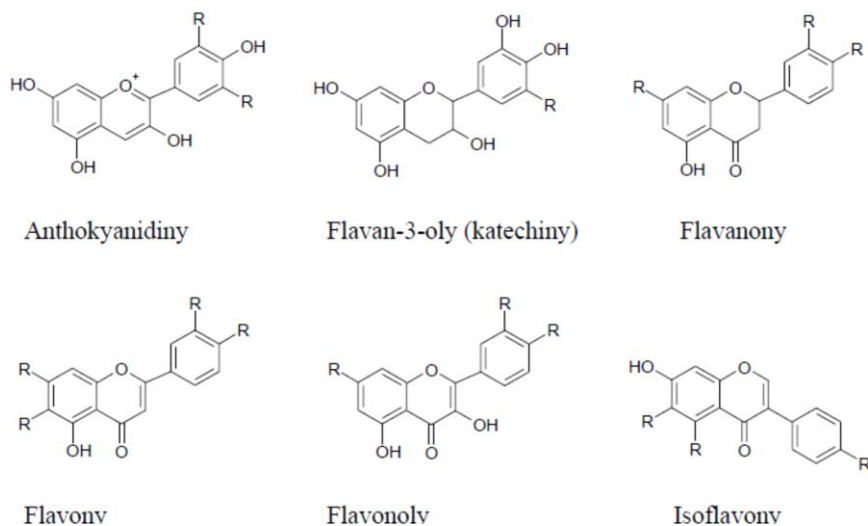


Obrázek 29: Deriváty kyseliny benzoové [51]



Obrázek 30: Deriváty kyseliny skořicové [51]

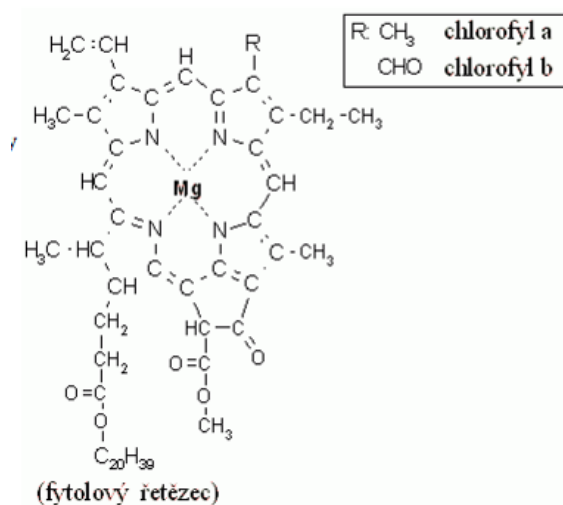
R2	R3	R4	R5		R2	R3	R4	R5	
H	H	H	H	benzoová	H	H	H	H	skořicová
OH	H	H	H	salicylová	H	H	OH	H	p-kumarová
H	OH	OH	OH	gallová	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	ferulová
H	OH	OH	H	protokatechová	H	OH	OH	H	kávová



Obrázek 31: Dělení flavonoidů dle stupně oxidace [52]

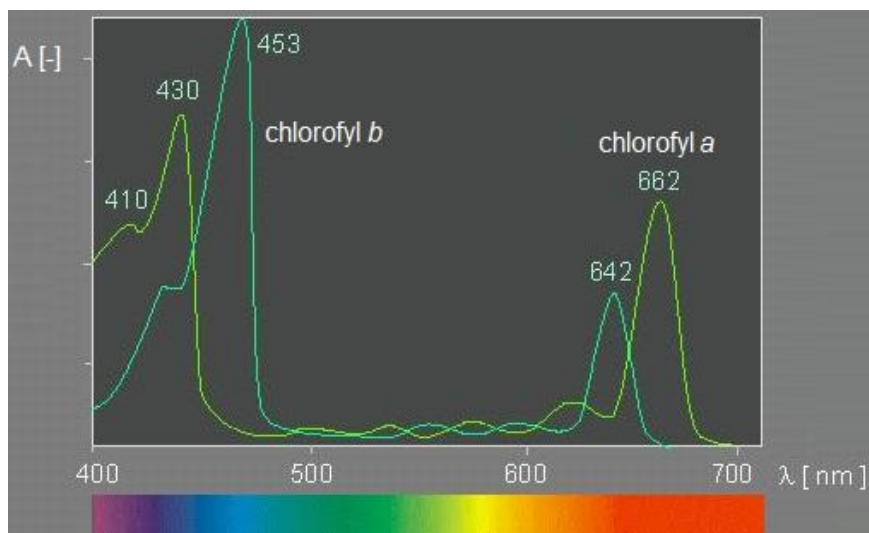
## 2.9.2 Chlorofyly

Chlorofyly představují skupinu zelených fotosyntetických pigmentů. Absorbují fotony při vlnových délkách odpovídajících červené a modré barvě. Molekula chlorofylů je tvořena porfyrinovým jádrem s centrálním atomem hořčíku. Struktura je modifikována molekulou izoprenoidního alkoholu fytolu a jednotlivé chlorofyly se vzájemně liší dalšími substituenty na porfyrinovém kruhu. Hrají zásadní roli v metabolismu rostlin, kdy se nacházejí v chloroplastu rostlin a jsou funkčními prvky při fotosyntéze. Absorpcí fotonu vhodné vlnové délky dochází k excitaci chlorofylů a postupně tvorbě NADPH, ATP. Tyto látky slouží k asimilaci CO<sub>2</sub> a tvorbě biomasy [53].



Obrázek 32: Struktura chlorofylu [53]





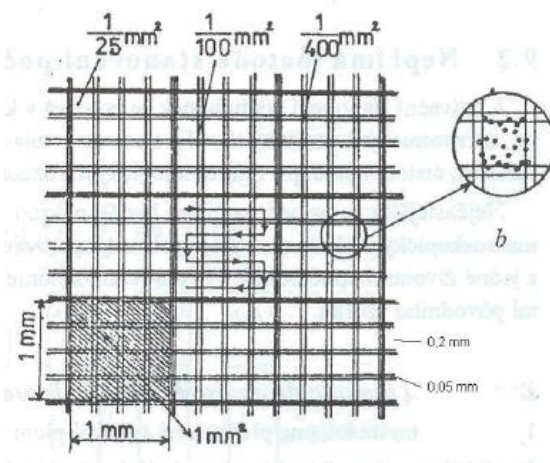
Obrázek 33: Absorpční spektrum chlorofylů [54]

### 2.9.3 Analýza částic obsahujících živé mikroorganismy

Mezi způsoby zjištění počtu mikroorganismů řadíme metody přímé (mikroskopické), nepřímé (kultivační) a metody měření zákalu (turbidimetrie, nefelometrie). Počet mikroorganismů je možné zjistit i pomocí moderních přístrojů, jako je průtokový cytometr [55].

Mezi metody přímé patří počítání buněk pomocí Bürkerovy komůrky. Jde o speciálně upravené podložní sklíčko, které obsahuje dvě mikroskopicky vybroušené mřížky definovaných rozměrů. Mřížka se skládá z velkých a malých čtverečků a obdélníků definované plochy [55].

Pokud na tuto mřížku nanese se suspenzi buněk a přikryjeme ji krycím sklíčkem, po jeho upevnění pomocí dvou klipsů se mezi Bürkerovou komůrkou a sklíčkem vytvoří prostor definovaného objemu. Počítáním je zjištěn počet mikroorganismů, které se nachází na polích mřížky. Pomocí výpočtu, který v sobě zahrnuje právě definovaný objem mezi komůrkou a sklíčkem, můžeme vyjádřit počet mikroorganismů v 1 ml analyzované suspenze buněk [55].



Obrázek 34: Bürkerova komůrka [55]

Výpočet pro stanovení počtu buněk:

$$x = MO \cdot z \cdot X \cdot 1000 \quad (\text{počet buněk v 1 ml kultury}) \quad (5)$$

MO ....průměrný počet buněk v jednom čtverci

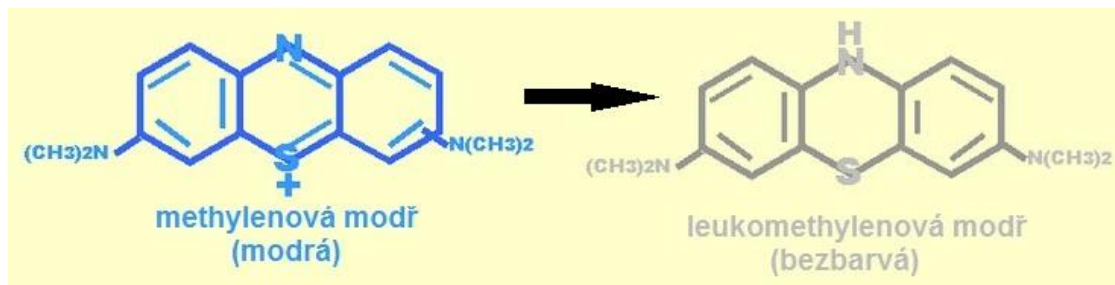
z .....použité zředění

X .....přepočet na 1 mm<sup>3</sup> (velký čtverec 250, obdélník 1000, malý čtverec 4000)

1000...přepočet mm<sup>3</sup> → ml [55].

### 2.9.3.1 Vitální test

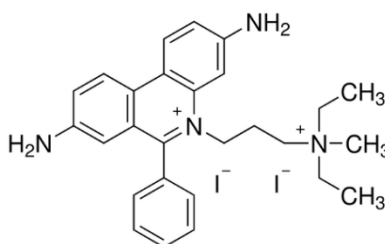
Methylenová modř slouží k rozlišení živých a mrtvých buněk. Toto barvivo má schopnost procházet membránou buněk. V případě živých buněk je methylenová modř pomocí reduktáz odbarvena, mrtvým buňkám tato enzymová aktivita chybí a jsou obarveny v celém objemu [55].



Obrázek 35: Methylenová modř [56]

### 2.9.3.2 Průtokový cytometr

Metoda cytometrie se zabývá měřením fyzikálních a chemických parametrů jednotlivých buněk. V modifikaci průtokové cytometrie pak toto měření probíhá při průchodu buněk měrnou aparaturou, tedy průtokovým cytometrem. Buňky jsou zkoncentrovány do proudu tekutiny, který prochází přes detektor. Výraz průtoková cytometrie se používá jednak pro fyzikálně chemickou charakterizaci buněk, dále pro zjišťování fyzikálních vlastností, které se zjišťují pomocí senzoru (např. fluorescence, rozptyl světla) nebo činidla reagujícím přímo s buňkami (např. propidium jodid a jeho fluorescence po interkalaci do DNA mrtvých buněk) [57].



Obrázek 36: Propidiumjodid [58]

## 2.9.4 DLS

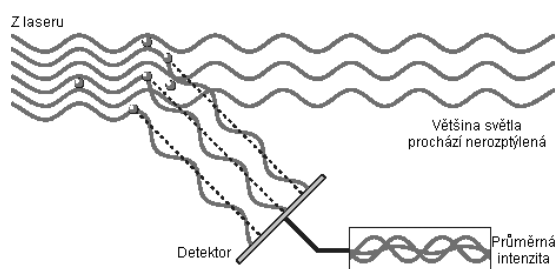
Metoda DLS („Dynamic Light Scattering“ – dynamický rozptyl světla) slouží ke stanovení velikosti částic. Částice se pohybují na základě Brownova pohybu. Pokud je sledován rozptyl paprsku, jež prochází prostředím, korelací míry fluktuace tohoto rozptýleného světla, resp. odchylky světelné intenzity od průměrné hodnoty, je možné detekovat velikost částic. Platí, že menší částice se pohybují rychleji a způsobují tak více dynamický rozptyl procházejícího paprsku, neboli že fluktuace okolo průměrné hodnoty je vyšší [59, 60].

Byl definován Stokes-Einsteinův vztah, který popisuje závislost mezi rychlostí Brownova pohybu a velikostí částice [61].

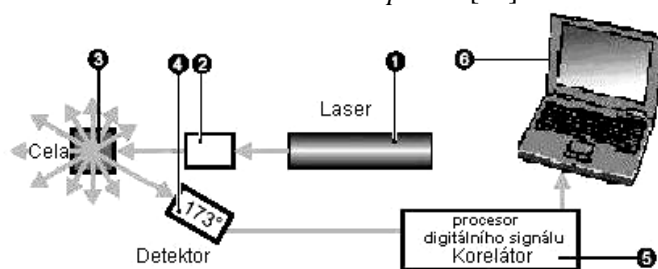
$$d \llcorner \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (6)$$

- $k$ ...Boltzmanova konstanta
- $\eta$ ...viskozita prostředí
- $T$ ...teplota
- $D$ ...difúzní koeficient.

Přístroj Zetasizer Nano tedy zaznamenává intenzitu dopadajícího světelného paprsku, následně vypočítá distribuci velikosti částic dle korelační funkce. Ta popisuje změnu intenzity světelného prstku ve vztahu k její průměrné hodnotě.



Obrázek 37: Princip DLS [61].



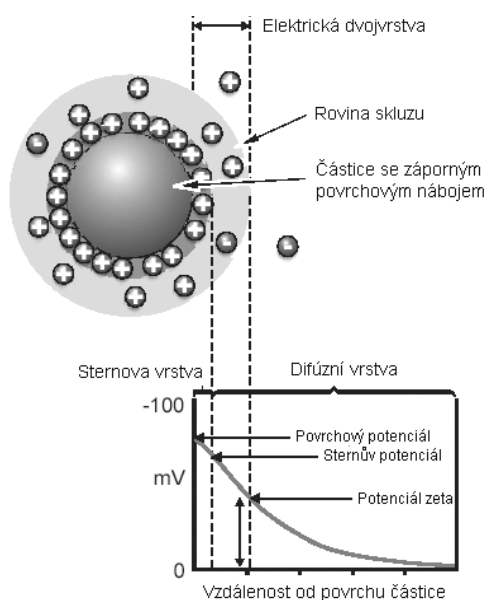
Obrázek 38: Schéma přístroje Zetasizer Nano ZS – měření velikosti částic [61]

## 2.9.5 Zeta potenciál

Měření zeta potenciálu slouží ke zjištění stability, resp. povrchového náboje částic.

Dle teorie o elektrické dvojvrstvě vrstvě každá částice v roztoku vytváří okolo sebe nabitý obal, slupku. V závislosti na vzdálenosti od povrchu částice rozlišujeme vrstvu pevně vázanou k povrchu – tedy primární (Sternovu vrstvu) a vrstvu difúzní, která je k povrchu vázána slabě [61].

Pokud dojde k pohybu částice, volná část difúzní vrstvy začne vykonávat také pohyb a vnitřní difúzní vrstva zůstává nehybná. Na povrchu tak vzniká náboj, který již není kompenzovaný. Hranice mezi těmito vrstvami se nazývá rovinou skluzu a její potenciál se nazývá zeta potenciál. Pro dostatečnou stabilitu systému byla zvolena hranice  $-30$  až  $30$  mV. Pokud leží hodnota zeta potenciálu mimo tento interval, částice se odpuzují a systém je dostatečně stabilní [61].



Obrázek 39: Elektrická dvojvrstva okolo částice [61]

Zeta potenciál se zjišťuje skrze stanovení elektroforetické pohyblivosti a užitím Henryovy rovnice [61].

$$U_E = \frac{2\varepsilon f \zeta a}{3\eta} \quad (7)$$

$U_E$  .....elektroforetická pohyblivost,

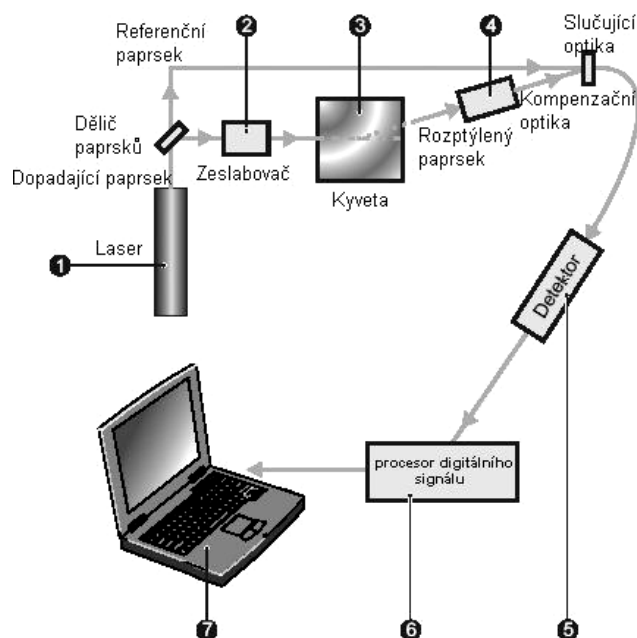
$\varepsilon$  .....dielektrická konstanta,

$\zeta$  .....potenciál zeta,

$f(\kappa a)$  ...Henryho funkce

$\eta$  .....viskozita.

Elektroforetická pohyblivost se stanoví elektroforézou, pomocí analýzy rychlosti pohybu částic metodou laserové Dopplerovy velocimetrie (Laser Doppler Velocimetry - LDV). Do kyvety obsahující vzorek jsou vloženy dvě elektrody, kladná a záporná, na které je aplikován potenciál. Částice ve vzorku směřují k opačně nabitým elektrodám a tak vykonávají pohyb. Obdobně, jak je tomu v případě metody DLS, je měřena míra fluktuace intenzity světelného paprsku, která je úměrná rychlosti částic. Z frekvenčního spektra se vypočte elektroforetická pohyblivost a následně potenciál zeta. [61]

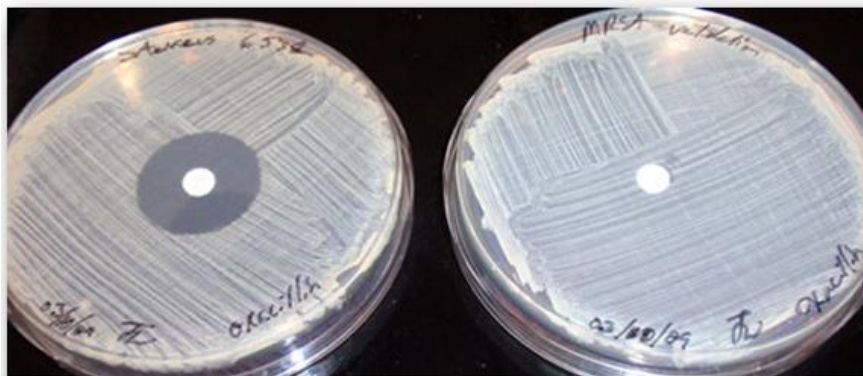


Obrázek 40: Schéma přístroje Zetasizer Nano ZS – měření zeta potenciálu [61]

## 2.9.6 Antimikrobiální test

Antimikrobiální test testuje vliv látek na vybrané mikroorganismy a umožňuje stanovit schopnost inhibice růstu [62].

Vybrané mikroorganismy se naočkují na pevné médium a inkubují se v přítomnosti antimikrobiální látky po dobu 18-24 hodin. V případě antimikrobiální aktivity zkoumané látky je možné v okolí aplikovaného vzorku pozorovat tzv. inhibiční zóny, tedy čistou zónu bez porostu bakterií. Velikost této zóny je úměrná míře antimikrobiální aktivity [62].



Obrázek 41: Antimikrobiální testy. Vlevo je patrná inhibiční zóna [62].

### 2.9.7 Cytotoxický test

Stejně jako stanovení viability buněk je klíčové zjištění cytotoxicity daných sloučenin. Mezi techniky patří:

- funkční testy (např. množství ATP)
- testy na stanovení integrity membrán (LDH testy)
- mitochondriální testy (XTT test)
- genomické, proteomické testy [63].

Jednou z možností pro provedení cytotoxického testu jsou spektrofotometrické metody založené na kolorimetrické reakci barviva a komponent souvisejících s buněčnou aktivitou [64].

Analýza v této studii je založena na barevné reakci, ve které figurují mitochondriální dehydrogenáza viabilních buněk a sodná sůl XTT, neboli vnitřní sůl 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl]-2H-tetrazolium-5-karboxyanilidu. Roztok XXT v médiu či fyziologickém roztoku bez přítomnosti fenolové červeně vykazuje nažloutlou barvu [64].

Pokud analyzovaný vzorek vykazuje cytotoxický efekt, dochází k narušení buněk a vylití jejich obsahu. Reakcí XTT s mitochondriální membránou viabilních buněk je tetrazolový kruh XTT redukován na oranžový derivát formazanu. Koncentrace tohoto barviva je pak měřena spektrofotometricky [64].

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce byla příprava a charakterizace organických mikro- a nanočástic s aktivní přírodní složkou pro aplikace v potravinářství.

1. Rešerše vztahující se k dané problematice - metody enkapsulace a jejich možné aplikace v potravinářství.
2. Metody přípravy a charakterizace částic a analýzy aktivních složek přírodních extraktů.
3. Příprava vhodných typů částic s aktivní složkou typu komplexního přírodního extraktu.
4. Analýza dlouhodobé stability připravených částic v modelových fyziologických podmínkách a v modelových i reálných potravinách.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité chemikálie, přístroje a pomůcky

#### 4.1.1 Standardní a speciální chemikálie

Kyselina gallová, gallic acid, Sigma-Aldrich (Německo)  
Katechin, (+)-Catechin hydrate, minimum 98 %, Sigma-Aldrich (Německo)  
Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), Randox laboratories LTD (Velká Británie)  
Azoalbumin, Sigma-Aldrich (Německo)  
Zkoumadlo Folin-Ciocalteuovo, Penta Chrudim (ČR)  
2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina) ABTS purum >99,0 %, Sigma-Aldrich (Německo)  
Chitosan, Sigma-Aldrich (Německo)  
Alginát sodný, Sigma-Aldrich (Německo)  
Tripolyfosfát sodný, Sigma-Aldrich (Německo)  
Lecitin žlutkový, Serva (Německo)  
Cholesterol, Serva (Německo)  
Agar práškový bakteriologický, Himedia (Indie)  
MRS médium, Himedia (Indie)  
LB médium, Sigma-Aldrich (Německo)  
Pepton bakteriologický, Himedia (Indie)  
Hovězí extrakt práškový, Himedia (Indie)  
Kvasniční autolyzát, Himedia (Indie)  
Pankreatin (vepřový pankreas), Sigma-Aldrich (Německo)  
Proteináza K, Sigma-Aldrich (Německo)  
Pepsin - Sigma-Aldrich (Německo)  
Kyselina cholová – směs solí, Fluka Sigma-Aldrich (Německo)  
Propidiumjodid, eBioscience (USA)  
Methylenová modř, E-Merck (Německo)  
Souprava In Vitro Toxicology Assay Kit, XTT based, Sigma-Aldrich (Německo)  
Formaldehyd 37%, Sigma-Aldrich (Německo)  
4-N-nitrochinolin-1-oxid, Sigma-Aldrich (Německo)  
Dodecylsírán sodný, Sigma-Aldrich (Německo)  
N-laurylsarcosin, Sigma-Aldrich (Německo)  
2-merkptoethanol, Sigma-Aldrich (Německo)

Všechny ostatní použité chemikálie byly vesměs čistoty p.a. a byly získány od běžných distributorů.

#### 4.1.2 Přístroje a pomůcky

Enkapsulátor Büchi B-395 Pro (Švýcarsko)  
Předvážky Kern 440-33 (Německo)  
Předvážky Ohaus ScoutPro (USA)  
Analytické váhy Boeco Germany (Německo)  
Spektrofotometr Thermo Spectronic Helios  $\delta$  (Velká Británie)  
Spektrofotometr Unicam Helios  $\alpha$  (Velká Británie)  
Spektrofotometr Implen Nanophotometer (Německo)  
Třepačka Heidolph Promax 1020 a Inkubátor 1000 (Německo)

Třepačka Labicom s.r.o. Yellowline RS 10 basic (Slovenská republika)  
Elisa Reader Biotek EL 808 (USA)  
Vortex Heidolph Reax top (Německo)  
Centrifuga Boeco U-32R (Německo)  
Mikrocentrifuga Hettich Mikro 200 (Velká Británie)  
Ultrazvukový homogénizátor Bandelin Sonoplus (Německo)  
Magnetická míchačka Lavat (ČR)  
Vodní lázeň Labo Play W 620E (Polsko)  
Vodní lázeň Biotech Julabo TW2 (ČR)  
Koloidní analyzátor Malvern Zetasizer Nano ZS (Velká Británie)  
Membránový lipozomátor extrudér Avestin včetně membrán (Německo)  
Průtokový cytometr ApogeeFlow (Velká Británie)  
Optický mikroskop Intracomicro LM666PC/∞LED (ČR)  
Fluorescenční mikroskop Olympus IX71, Microtime 200 (Německo)  
Laminární box Bioair Instruments Aura mini (Itálie)  
Inkubátor LTE Scientific Raven2incubator (Velká Británie)  
Inkubátor Memmert INB 400 (Německo)  
Bürkerova komůrka Marienfeld (Německo)

#### 4.1.3 Testovací mikroorganizmy

V práci byly použity kultury *Bacillus subtilis* CCM 2793, *Escherichia coli* CCM 109 pro antimikrobiální test a *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8191 pro cytotoxický test. Tyto kultury pochází z České sbírky mikroorganizmů Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity.

## 4.2 Analyzované vzorky

Pro enkapsulaci byly použity extrakty a mikroorganizmy uvedené v následujícím přehledu.

### 4.2.1 Propolis

Sušený propolis byl zakoupen ve specializované včelařské prodejně Včelařství Petr Vydra, Brno. Minimální trvanlivost do listopadu 2015. Skladován byl v temnu při laboratorní teplotě.



Obrázek 42: Propolis



#### 4.2.2 Ječmen

K experimentům byl použit sušený ječmen, resp. prášek ze zelených listů značky „Mladík Ječmen“, minimální trvanlivost do konce listopadu roku 2015. Skladován byl v temnu při laboratorní teplotě.



Obrázek 43: mladík Ječmen [65]



Obrázek 44: Práškový ječmen

Tabulka 10: Mladík Ječmen - složení ve 100 g prášku

energie	1529 kJ/361 kcal
vlhkost	6,4 g
vláknina	7,26 g
bílkoviny	16,5 g
tuky	3,1 g
sacharidy	66,8 g
pH	5,71

#### 4.2.3 Ječmen čerstvý

Ke srovnání byly taktéž vypěstovány čerstvé výhonky ječmene klasické zemědělské odrůdy Ječmen jarní krmný.

#### 4.2.4 Probiotika

K experimentům byly zvoleny kmeny *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833 a *Bifidobacterium breve* CCM 7825<sup>T</sup> pocházející z České sbírky mikroorganismů Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity.

#### 4.2.5 Reálné potraviny

Enkapsulované extrakty byly aplikovány do těchto vybraných potravin:

Polotučné čerstvé mléko pasterované, Albert (Moravia Lacto a.s.), minimální trvanlivost do 15.3.2014,

Actimel, Danone, minimální trvanlivost do 13.3.2014,

Selský jogurt bílý, Hollandia, minimální trvanlivost do 8.3.2014,

Choceňský smetanový jogurt, Choceňská mlékárna, minimální trvanlivost do 8.3.2014

Tabulka 11: Výživové hodnoty na 100 ml (A) /100 g (B)

potravina	množství		energetická hodnota	tuk	bílkoviny	sacharidy
mléko	1 l	A	190 kJ / 45 kcal	1,5 g	3,2 g	4,6 g
Actimel	378 ml	B	301 kJ / 71 kcal	1,6 g	2,8 g	10,5 g
selský jogurt	200 g	B	277 kJ / 66 kcal	3,9 g	3,5 g	4,3 g
smetanový jogurt	150 g	B	500 kJ / 120 kcal	10,3 g	4,2 g	2,8 g



Obrázky 45-48: Reálné mléčné potraviny – mléko [66], jogurtový nápoj Actimel, Selský jogurt a Choceňský smetanový jogurt

### 4.3 Příprava vzorků

#### 4.3.1 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.

Pro provedení antimikrobiálních i cytotoxických testů byl propolis rozpuštěn také v DMSO (dimethylsulfoxid).

#### 4.3.2 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  $0,01 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pro enkapsulaci za vzniku částic typu matrix. V případě enkapsulace za vzniku částic typu kapsule byl připravena suspenze ječmene ve vodě o koncentraci  $0,05 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; 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).

#### 4.3.3 Kultivace

Probiotické kultury (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifibacterium breve*)

Pro kultivaci bylo připraveno MRS médium dle návodu. Pro přípravu pevného média byl přidán agar ( $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Následovala sterilace v tlakovém hrnci se zavřeným ventilem 35 minut při 120 °C.

Kultivace probíhala při 37 °C, pro enkapsulaci byly použity 24hodinové kultury a počet buněk byl zjištěn pomocí průtokového cytometru.

#### *Bacillus subtilis*

Bylo připraveno médium, které obsahovalo pepton ( $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), hovězí extrakt ( $3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), síran hořečnatý tetrahydrát ( $0,01 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ); pro přípravu pevného média byl přidán agar ( $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Následovala sterilace v tlakovém hrnci se zavřeným ventilem 35 minut při 120 °C. Kultivace probíhala při 30 °C na třepačce.

#### *Escherichia coli*

Bylo připraveno LB médium dle návodu; pro přípravu pevného média byl přidán agar (20 g·l<sup>-1</sup>). Následovala sterilace v tlakovém hrnci se zavřeným ventilem 35 minut při 120 °C. Kultivace probíhala při 37 °C.

#### *Saccharomyces cerevisiae*

Bylo připraveno médium, které obsahovalo D-glukózu (40 g·l<sup>-1</sup>), hydrogenfosforečnan draselný (5 g·l<sup>-1</sup>), síran amonný (5 g·l<sup>-1</sup>), síran hořečnatý heptahydrát (0,696 g·l<sup>-1</sup>) a kvasniční autolyzát (7 g·l<sup>-1</sup>). Následovala sterilace v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem 35 minut při 120 °C. Kultivace probíhala při laboratorní teplotě na třepače.

### 4.3.4 Příprava mikroorganismů pro enkapsulaci

Probiotické kultury (*L. acidophilus*, *B. breve*) byly smíchány s obalovým materiálem a enkapsulovány. V případě směsného obalu alginátu a škrobu byl připraven vodný a ethanolový roztok chloridu vápenatého. Pro enkapsulaci buněk bez média bylo médium centrifugováno (10 min, 5 000 rpm, 25 °C) a peletka buněk byla dispergována v obalovém materiálu.

## 4.4 Charakterizace přírodních extraktů

### 4.4.1 Skupinové charakteristiky přírodních extraktů

#### 4.4.1.1 Stanovení celkových polyfenolů

Ve zkumavce byl smíchán 1 ml destilované vody, 1 ml desetkrát zředěného Folin-Ciocalteuova činidla a 50 µl vzorku. Po 5 minutách byl přidán 1 ml nasyceného roztoku Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Po 15 minutách byla změřena absorbance při λ = 750 nm. Jako blank byl použit slepý vzorek, kdy místo samotného vzorku bylo přidáno 50 µl destilované vody.

Pro sestavení kalibrační rovnice byl připraven roztok kyseliny gallové o koncentraci 0,1-0,5 mg·ml<sup>-1</sup>.

Byla sestrojena kalibrační rovnice:

$$y = 1,076 \cdot x \quad (8)$$

Výsledky byly vyhodnoceny jako průměr ze tří měření. Směrodatná odchylka byla stanovena pomocí software Microsoft Excel.

#### 4.4.1.2 Stanovení celkových flavonoidů

Pro provedení reakce bylo do zkumavky přidáno 0,5 ml vzorku, 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5% roztoku NaNO<sub>2</sub>. Po 5 minutách bylo přidáno 0,2 ml 10% roztoku AlCl<sub>3</sub>. Po dalších 5 minutách bylo přidáno 1,5 ml 1M NaOH a 1 ml destilované vody. Po 15 minutách byla změřena absorbance proti slepému vzorku při λ = 510 nm. Kalibrační rovnice byla zjištěna pomocí roztoku katechinu o koncentraci 0,05-0,3 mg·ml<sup>-1</sup>.

Byla sestrojena kalibrační rovnice:

$$y = 2,8243 \cdot x \quad (9)$$

Výsledky byly vyhodnoceny jako průměr ze tří měření. Směrodatná odchylka byla stanovena pomocí software Microsoft Excel.

### 4.4.2 Stanovení antioxidační aktivity

Před samotnou analýzou byl připraven radikálový kation ABTS<sup>•+</sup>. Nejprve byl rozpuštěn ABTS ve vodě na koncentraci c = 7 mM a přidáním peroxodisíranu draselného (aby jeho konečná koncentrace činila 2,45 mM) byl touto reakcí připraven radikálový kation ABTS<sup>•+</sup>. Roztok byl ponechán 12 h k odstátí ve tmě při pokojové teplotě.

Před použitím byl ABTS<sup>•+</sup> zředěn ethanolem na  $A = 0,70 \pm 0,02$  při  $\lambda = 734$  nm, měřeno proti ethanolu.

Byla zjištěna výchozí hodnota  $A_0$ , zjištěná z 1 ml ABTS<sup>•+</sup> a 10  $\mu$ l destilované vody. Všechny následně naměřené hodnoty poklesu absorbance vzorku byly odečítány od výchozí hodnoty absorbance  $A_0$ .

Při samotném měření byl do zúžené květy o objemu 1,4 ml napipetován 1 ml ATBS<sup>•+</sup>, 10  $\mu$ l vzorku a po 10 minutách byl zaznamenán pokles absorbance.

Pro kalibraci byl připraven roztok Troloxu v rozmezí koncentrace 50-400  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup>. Trolox byl rozpuštěn v 60% ethanolu, výchozí hodnota absorbance pro odečet byla zjištěna z 1 ml ATBS<sup>•+</sup> a 10  $\mu$ l 60% ethanolu.

Byla sestrojena kalibrační rovnice:

$$y = 1,0699 \cdot x \quad (10)$$

Výsledky byly vyhodnoceny jako průměr ze tří měření. Směrodatná odchylka byla stanovena pomocí software Microsoft Excel.

#### 4.4.3 Stanovení koncentrace bílkovin dle metody Hartree-Lowryho

Pro provedení reakce byly připraveny 3 roztoky:

Roztok A: 2 g tetrahydrátu vinanu sodno-draselného, 100 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 500 ml 1M NaOH, vše doplněno destilovanou vodou do objemu 1 litr.

Roztok B: 2 g tetrahydrátu vinanu sodno-draselného, 1 g CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O a 10 ml 1M NaOH.

Roztok C: Folin-Ciocalteuovo činidlo zředěné destilovanou vodou v poměru 1:15 [67].

Při reakci byl smíchán 1 ml vzorku a 0,9 ml roztoku A. Následovala 10minutová inkubace při 50 °C, po ochlazení bylo přidáno 0,1 ml roztoku B a následovala 10minutová inkubace při laboratorní teplotě. Poté byly rychle přidány 3 ml roztoku C a následovala 10minutová inkubace při 50 °C. Po ochlazení byla změřena absorbance proti slepému vzorku při  $\lambda = 650$  nm [67].

Pro sestavení kalibrační rovnice byl připraven roztok albuminu o koncentracích 25-75  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup>.

Byla sestrojena kalibrační rovnice:

$$y = 3,2462 \cdot x \quad (11)$$

Výsledky byly vyhodnoceny jako průměr ze tří měření. Směrodatná odchylka byla stanovena pomocí software Microsoft Excel.

#### 4.4.4 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 [67].

Obsah chlorofylu a byl zjištěn pomocí rovnice [67]:

$$c_a = 12,70 \cdot A_{663} - 2,69 \cdot A_{645} \quad \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \quad (12)$$

Obsah chlorofylu b byl zjištěn pomocí rovnice: [67]

$$c_b = 22,90 \cdot A_{645} - 4,68 \cdot A_{663} \quad \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \quad (13)$$

Výsledky byly vyhodnoceny jako průměr ze tří měření. Směrodatná odchylka byla stanovena pomocí software Microsoft Excel.

#### 4.4.5 Zjištění absorpčního spektra

Daný vzorek byl zředěn a následně bylo proměřeno a zjištěno celé jeho absorpční spektrum v rozsahu od 200 do 800 nm. Spektrum bylo proměřeno proti destilované vodě jako blanku. V případě čerstvého ječmene byla před samotným měřením provedena extrakce barviv přidáním ekvivalentního objemu acetonu; vzorek byl měřen proti roztoku acetonu zředěného 1:1 destilovanou vodou.

## 4.5 Enkapsulace vybraných přírodních extraktů

Pro enkapsulaci byl použit přístroj Enkapsulátor Büchi B-395 Pro. Enkapsulace zvolených přírodních extraktů a probiotik byly vytvořeny částice dvou základních typů. V prvním případě (typ kapsule) byl zapouzdřen do obalového materiálu; v druhém případě (typ matrix) byl extrakt do obalového materiálu dispergován.

Byly zvoleny dva druhy obalových materiálů; jednak byly použity polysacharidy a pro tvorbu lipozomů byly zvoleny vaječný lecitin a cholesterol.

### 4.5.1 Příprava obalového materiálu

#### 4.5.1.1 Příprava alginátových částic

Byl připraven 2% roztok alginátu. Enkapsulace probíhala přikapáváním do 2% roztoku  $\text{CaCl}_2$ .

#### 4.5.1.2 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 vztažena k roztoku). Následně byl alginátový a škrobový roztok smíchán ve zvoleném poměru; enkapsulace probíhala přikapáváním do vodného, resp. ethanolického roztoku  $\text{CaCl}_2$ .

#### 4.5.1.3 Příprava chitosanových částic

Byl připraven 2% roztok chitosanu; pH bylo následně upraveno pomocí kyseliny octové na hodnotu pH 5. Enkapsulace probíhala přikapáváním do 2% roztoku tripolyfosfátu sodného.

#### 4.5.1.4 Příprava chitosan-agarových částic

V určeném poměru byl smíchán 2% chitosanový roztok a 2% roztok horkého agaru; následně byla provedena enkapsulace, dokud byl agar díky vyšší teplotě dostatečně tekutý.

### 4.5.2 Proces enkapsulace

Před zahájením enkapsulace byl zvolen systém dodávání roztoku, čili směsi, a to buď pomocí stříkačkového čerpadla, nebo pomocí láhve – v závislosti na způsobu enkapsulace a typu částic – kapsule či matrix.

#### Stříkačkové čerpadlo

Stříkačka byla naplněna zvoleným roztokem a pomocí luerové koncovky byla připojena k jednotce tvorby částic (tj. pulzační jednotka spolu s držákem magnetu). Obsah stříkačky je vytlačován pohybem pístu čerpadla dle zvoleného průtoku [20].

#### Tlaková láhev

Tlaková láhev byla naplněna zvoleným roztokem a přes výstup v pojistném uzávěru byla silikonovou hadičkou a luerovou koncovkou připojena k jednotce tvorby částic. Na silikonovou hadičku byl nainstalován regulační ventil průtoku kapaliny [20].

Byla zvolena jednotka tvorby částic, resp. CN jednotka tvorby částic a byly k ní připevněny zvolené trysky. Sestava byla upevněna k přístroji pomocí šroubků, vibrační jednotka byla připevněna ke krycí desce jednotky [20].

Elektroda byla připevněna k EDU, stejně jako přívod vzduchu do tlakové láhve byl připojen k vzduchovému výstupu přístroje. Pod trysku byla na míchadlo umístěna miska s míchadélkem a polymerizačním roztokem. Na okraj misky byla zaháknuta uzemňovací svorka a její konec byl

ponořen do kapaliny. Na ovládacím panelu byly nastaveny vibrace, elektrostatická disperze a rychlost čerpadla [20].

Byl otevřen externí přívod tlakového vzduchu. Regulováním tlakového ventilu a ventilu průtoku kapaliny byl spuštěn průtok roztoku umístěného v tlakové láhvi, resp. bylo na displeji spuštěno stříkačkové čerpadlo vytlačující obsah stříkačky. Na ovládacím displeji byla zapnuta regulace vibrací a frekvence; proud byl upraven tak, aby ve světle stroboskopické lampy byl patrný řetízek kapiček. Tyto kuličky byly zachytávány v polymerizačním roztoku, popř. byl použit kelímek obtoku pro jímání nežádoucích frakcí. Po skončení procesu byl přístroj vypnut a částice byly přefiltrovány a promyty pro odstranění polymerizačního roztoku [20].

### **4.5.3 Příprava lipozomových částic**

#### **4.5.3.1 Příprava částic pomocí ultrazvuku**

Ve 20 ml přírodního extraktu bylo rozmícháno 450 mg vaječného lecitinu a 50 mg cholesterolu. Roztok byl 30 sekund ultrazvukován za vzniku částic.

#### **4.5.3.2 Příprava částic pomocí ethanolového vstříkovaní**

Byl připraven roztok přírodního extraktu, vaječného lecitinu a cholesterolu ve stejné koncentraci jako v předchozí kapitole 4.5.3.1. Částice byly vytvořeny vstříkovaním roztoku pomocí mikrostříkačky do destilované vody za stálého míchání.

## **4.6 Charakterizace částic**

### **4.6.1 Stanovení účinnosti enkapsulace**

Účinnost enkapsulace byla zjištěna pomocí množství extraktu, který nebyl enkapsulován. Z rozdílu obsahu aktivních látek přírodního extraktu určeného pro enkapsulaci a jejich obsahu v polymerizačním roztoku, tedy neenkapsulovaného podílu, byla zjištěna účinnost enkapsulace a vyjádřena v procentech.

### **4.6.2 Sledování stability částic v modelových trávicích šťávách**

Pro simulaci fyziologického prostředí ke sledování stability částic v gastrointestinálním traktu byly připraveny tři modelové trávicí šťávy dle Československého lékopisu [68].

Žaludeční šťáva: 0,25 g pepsinu, 0,84 ml koncentrované HCl a 100 ml vody.

Pankreatická šťáva: 0,25 g pankreatinu, 1,5 g NaHCO<sub>3</sub> a 100 ml vody.

Žlučová šťáva: 0,8 g žlučových solí (směs kyseliny cholové a deoxycholové) a 200 ml fosfátového pufru o pH = 8.

Částice byly přidány do trávicích šťáv v koncentraci 0,35 g·ml<sup>-1</sup>; následovala inkubace při 37 °C 20 minut pro přidavek žaludeční a pankreatickou šťávu a 40 minut pro žlučovou šťávu. Roztok byl následně centrifugován (2 min, 14 000 rpm, 25 °C) a supernatant byl použit pro stanovení obsahu uvolněných složek a tedy míry natrávení daného typu částic.

### **4.6.3 Sledování stability částic v modelových potravinách**

Pro sledování stability v potravinách byly připraveny 4 modelové roztoky potravin [69].

Modelová potravina č. 1: destilovaná voda: potraviny s obsahem vody a hodnotou pH > 4,5

Modelová potravina č. 2: kyselina octová (3% roztok): potraviny s hodnotou pH ≤ 4,5

Modelová potravina č. 3: ethanol (10% roztok): potraviny s obsahem alkoholu a nápoje

Modelová potravina č. 4: slunečnicový olej (25% roztok): tukové potraviny

Částice byly přidány do modelových roztoků v koncentraci 0,33 g·ml<sup>-1</sup> a po celou dobu uchovány v ledničce. Ve stanovených intervalech byl proveden odběr roztoku pro stanovení obsahu uvolněných složek.

#### 4.6.4 Sledování stability částic v reálných potravinách

Rovněž byla sledována stabilita částic v reálných potravinách.

Zvoleny byly 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).

Tabulka 12: Typy částic, jejichž stabilita byla sledována v reálných potravinách.

	jádro	obalový materiál	typ částic
1.	ječmen čerstvý	alginát	matrix
2.	ječmen práškový		
3.	probiotika		
4.	směs částic 2. a 3.		
5.	ječmen práškový a probiotika		

Částice byly přidány do reálných potravin v koncentraci  $0,33 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a po celou dobu uchovány v ledničce. Ve stanovených intervalech byl proveden odběr roztoku pro stanovení obsahu uvolněných složek.

#### 4.6.5 Stanovení velikosti a stability lipozomových částic

U vytvořených lipozomových částic byla proměřena velikost a stabilita částic pomocí přístroje a softwaru Zetasizer Nano od firmy Malvern Instruments Ltd.

#### 4.6.6 Analýza částic obsahujících probiotické kultury

##### 4.6.6.1 Optický mikroskop

Částice byly na podložním sklíčku suspendovány v roztoku methylenové modři, po 5 minutách bylo pozorováno modré zbarvení mrtvých buněk.

Na určená místa Bürkerovy komůrky byla nanесena 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 a jejich počet vyjádřen dle rovnice uvedené v kapitole 2.9.3.

##### 4.6.6.2 Fluorescenční mikroskop

Pro zobrazení částic a buněk na fluorescenčním mikroskopu bylo použito barvení pomocí fluoresceinu a propidiumjodidu.

Částice byly suspendovány v 1 ml destilované vody a obarveny  $5 \mu\text{l}$  FDA a  $5 \mu\text{l}$  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 fluoresceindiacetát (FDA) na fluoreskující fluorescein, naopak v případě mrtvých došlo k interkalaci propidiumjodidu do DNA. První snímek při nižší vlnové délce zobrazil fluorescenci živých i mrtvých buněk, vyšší vlnová délka zvýraznila fluorescenci pouze mrtvých buněk.

##### 4.6.6.3 Průtokový cytometr

Médium obsahující buňky bylo 10krát zředěno a umístěno do sampleru průtokového cytometru. Byl zjištěn počet buněk a po obarvení propidiumjodidem ( $5 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$  20 minut ve tmě) po jeho vazbě na DNA mrtvých buněk byla stanovena životnost.

#### 4.6.7 Optimalizace množství biomasy probiotik pro enkapsulaci

Byly připraveny 24hodinové kultury *L. acidophilus* a *B. breve*. Na průtokovém cytometru byla zjištěna koncentrace i viabilita buněk. Výsledek byl vyhodnocen jako průměr ze dvou měření.

Obě kultury byly smíchány v poměru 1:1 a pro 4 různé výchozí koncentrace mikroorganismů byly naředěny čistým médiem 2krát, 10krát, 50krát a 100krát. Byly prováděny 2 paralelní experimenty, kdy byly enkapsulovány zmíněné 4 koncentrace spolu s médiem, a rovněž bylo médium odstředěno (10 min, 5 000 rpm, 25 °C a peletka buněk byla resuspendována v obalovém materiálu. Pro enkapsulaci byl zvolen poměr obalového materiálu a jádra 2:1 (v případě ostředování média bylo pro centrifugaci zvolen stejný objem média – dle poměru 2:1 – a získaná peletka byla resuspendována). Jako obalový materiál byl zvolen alginát.

Po provedení enkapsulace (viz kapitola 4.5.2) byl nadávkován 1 g vzniklých částic do 1 ml destilované vody a v pravidelných intervalech bylo pomocí Bürkerovy komůrky a optického mikroskopu odečítáno množství buněk a jejich viabilita v částicích i v destilované vodě.

#### 4.6.8 Antimikrobiální test

Byly připraveny 24hodinové kultury *L. acidophilus*, *B. breve* pro ječmen a propolis a *B. subtilis* a *E. coli* pro propolis. Byly připravené Petriho misky s pevným médiem a byly zaočkovány 0,5 ml příslušné kultury; objem byl rozetřen hokejkou a miska byla ponechána 24 hodin kultivovat. Po této době byly vytvořeny jamky, do kterých byly naneseny 2 µl vzorku. Testován byl samotný extrakt, rozpouštědlo a několik kuliček vybraných částic. Ve stanovených intervalech byla zjišťována velikost inhibiční zóny, jakožto projevu antimikrobiálního účinku testovaného extraktu na přítomný mikroorganismus.

#### 4.6.9 Cytotoxický test

Pro provedení testu byla použita souprava In Vitro Toxicology Assay Kit, XTT based (Sigma-Aldrich). Dle návodu byla připravena suspenze buněk v koncentraci  $10^6$ , pro testování byla zvolena eukaryotická kultura *S. cerevisiae*. Bylo připraveno činidlo XTT rozpuštěním ve fyziologickém roztoku na koncentraci  $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Do mikrozkušavky typu Eppendorf bylo napipetováno 0,8 ml suspenze buněk, 0,2 ml XTT a 0,2 ml vzorku, resp. destilované vody pro blank.

Směs byla dvě hodiny inkubována, poté promíchána na vortexu a nepipetována m v množství 0,25 ml do mikrotitrační destičky. Každý vzorek byl nanesen třikrát pro získání průměru z měření.

Destička byla umístěna do Elisa Readeru a byla změřena absorbance při vlnové délce 450 nm (detekce zbarvení) a 690 nm (korekce zákalu tvořeného suspenzí buněk).

Jakožto pozitivní kontrola byl testován acetonový roztok 4-N-nitrochinolin-1-oxidu v koncentracích 0,48-9,60  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , dále peroxid vodíku, formaldehyd, 0,1 a 0,01M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 0,1 a 0,01M NaOH a činidla SDS, NDS, LET a lytický pufr, každý z nich s přídatkem enzymu proteinázy K v koncentraci  $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Ze vzorků byl analyzován propolis rozpuštěný v ethanolu a v DMSO. U částic propolis obsahujících byla testována modelová potravina a byl ověřován cytotoxický efekt uvolněného propolisu. Z hodnot absorbancí byla vyhodnocena míra cytotoxického účinku vzorků. Výsledky byly vyhodnoceny jako průměr ze tří měření. Směrodatná odchylka byla stanovena pomocí software Microsoft Excel.

##### 4.6.9.1 Příprava pufrů pro cytotoxický test

###### NDS pufr

NDS pufr obsahující 500mM EDTA, 10mM TRIS a 1% laurylsarcosin byl připraven rozpuštěním odpovídající navážky EDTA a TRIS destilované vodě v polovičním objemu. Pomocí NaOH bylo pH upraveno na hodnotu 7,5. Poté bylo přidáno odpovídající množství laurylsarcosinu. Pufr byl doplněn do výsledného objemu pomocí sterilní destilované vody.



**LET pufr**

LET pufr obsahující 500mM EDTA, 7,5%  $\beta$ -merkптоethanol a 10mM TRIS byl připraven rozpuštěním odpovídající navážky EDTA a TRIS destilované vodě v polovičním objemu. Pomocí NaOH bylo pH upraveno na hodnotu 7,5. Poté byl přidán  $\beta$ -merkптоethanol v množství 7,5 ml na 100 ml. Pufr byl doplněn do výsledného objemu pomocí sterilní destilované vody.

**Lytický pufr**

Lytický pufr obsahující 50mM EDTA, 7,5% SDS a 50mM TRIS-HCl byl připraven rozpuštěním odpovídající navážky sloučenin v destilované vodě; pH bylo upraveno pomocí kyseliny chlorovodíkové na hodnotu 8.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce byla zaměřena na studium enkapsulace vybraných přírodních extraktů pro aplikaci v potravinářství. Byly testovány možnosti enkapsulace propolisu, ječmene a probiotik do různých přírodních obalů organické povahy. Přírodní extrakty byly nejprve charakterizovány; následně byly připraveny částice. V rámci analýzy bylo zjišťováno chování částic během inkubace v prostředí modelových trávicích šťáv a též dlouhodobá stabilita při uchování v modelových potravinách. Pro analýzu chování v reálných podmínkách bylo sledováno uvolňování obsahu částic ve vybraných zástupcích skupiny mléčných výrobků. Studie byla doplněna antimikrobiálními a cytotoxickými testy.

### 5.1 Charakterizace přírodních extraktů

#### 5.1.1 Skupinové charakteristiky přírodních extraktů

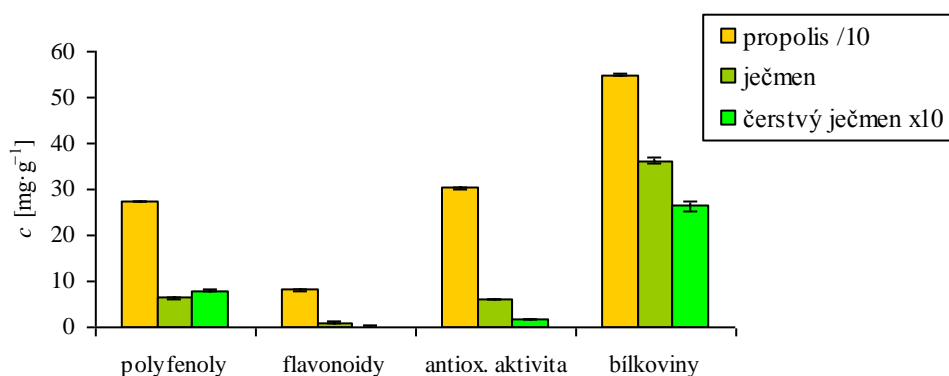
Přírodní extrakty byly charakterizovány pomocí následujících skupinových charakteristik: stanovení celkových polyfenolů, celkových flavonoidů, stanovení antioxidační aktivity, stanovení obsahu bílkovin a zjištění absorpčního spektra.

Stanovení celkových polyfenolů bylo provedeno pomocí reakce s Folin-Ciocalteuovým činidlem. Jako standard byla použita kyselina gallová (4.4.1.14.4.1.1). Stanovení celkových flavonoidů bylo provedeno pomocí reakce s hlinitou solí v zásaditém prostředí. Jako standard byl použit katechin (4.4.1.2). Míra antioxidační aktivity byla zjištěna pomocí metody TEAC – „Trolox Equivalent Antioxidant Capacity“. Samotná aktivita se potom přirovná k množství sloučeniny nazývané Trolox, které má ekvivalentní antioxidační aktivitu jako samotný vzorek (4.4.2). Obsah bílkovin byl stanoven pomocí Hartree-Lowryho metody, kdy využíváme reakce vinanu sodno-draselného, síranu měďnatého a Folin-Ciocalteuova činidla. Jako standard byl použit azoalbumin (4.4.3). Přítomné chlorofyly ve vzorku byly extrahovány přidávkem stejného množství acetonu a jejich koncentrace byla stanovena pomocí absorbance při vlnových délkách 645 a 663 nm dle postupu uvedeného v kapitole 5.2.4.4. Výsledky uvedených parametrů jsou shrnuty v Tab.13 a přehledně uvedeny i v Grafu 1.

Tabulka 13: Charakterizace přírodních extraktů – koncentrace daného parametru byla vztažena na 1 g látky

	$c$ [ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ]					
	polyfenoly	flavonoidy	antioxidační aktivita	bílkoviny	chlorofyl <i>a</i>	chlorofyl <i>b</i>
propolis	273,931 ± 2,061	81,790 ± 1,770	302,209 ± 2,453	548,719 ± 1,925	-	-
práškový ječmen	6,332 ± 0,091	1,086 ± 0,043	5,954 ± 0,028	36,145 ± 0,316	-	-
čerstvý ječmen	0,798 ± 0,013	0,020 ± 0,004	0,176 ± 0,006	2,630 ± 0,109	840,920	758,506

## Charakteristiky extraktů



Graf 1: Charakteristiky extraktů

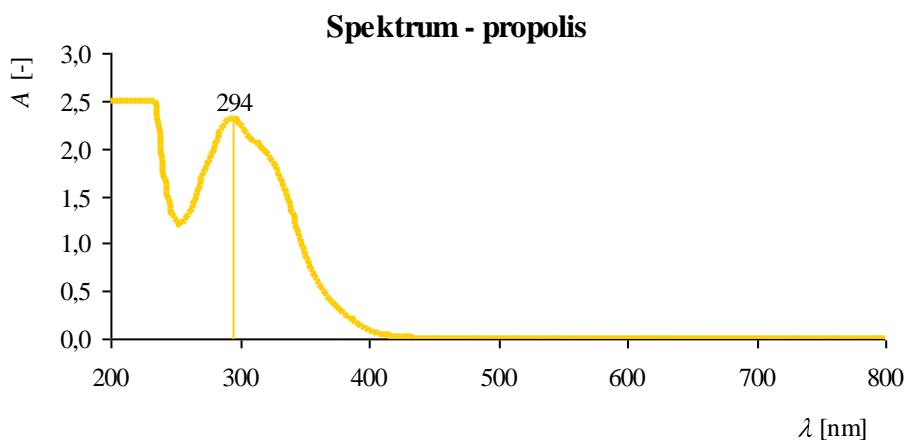
Pro srovnání jednotlivých přírodních extraktů byly výše uvedené hodnoty vztaženy na jeden gram extraktu. Je patrné, že zcela nejvíce bioaktivním extraktem je propolis, kde obsah sledovaných aktivních látek více než desetinásobně převyšuje ostatní extrakty. Propolis skutečně představuje koncentrát různých přírodních látek, které sbírají včely z výměšků rostlin [3].

U práškového ječmene je nejnápadnějším vysoký obsah bílkovin, což potvrzuje fakt, že zelený ječmen je bohatý na obsah enzymů (viz kapitola 2.6.3) [4]. V porovnání s práškovým ječmenem byly u čerstvého ječmene stanoveny velmi nízké hodnoty bílkovin. Obsah aktivních látek se odvíjí od způsobu pěstování a době sklizně [4]. Je tedy možné, že komerční preparát byl připraven ze vzrostlejších výhonků, bohatších na obsah živin a bioaktivních sloučenin. V práškovém preparátu došlo zřejmě i ke značnému zakoncentrování proteinů vlivem odstranění vody.

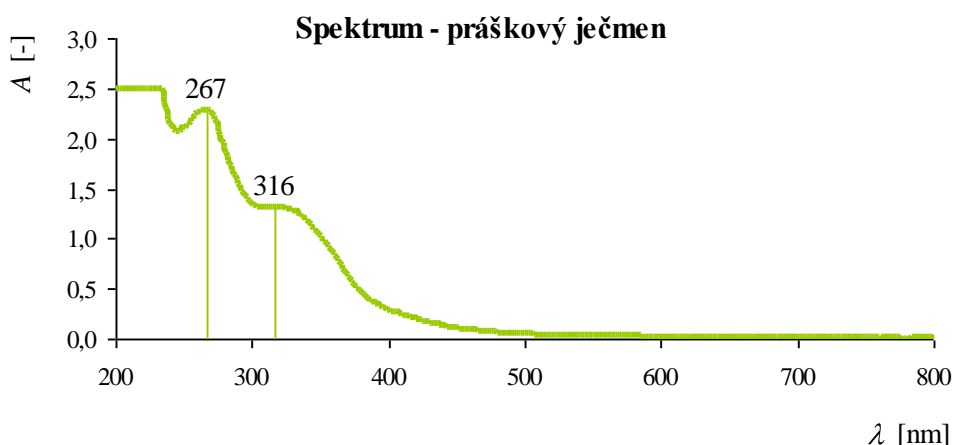
Obsah flavonoidů tvoří u propolisu asi třetinu, u práškového ječmene asi pětinu celkového obsahu polyfenolů. V případě ječmene čerstvého tvoří flavonoidy jen asi 2,5 % celkového obsahu polyfenolů. Obsah chlorofylů *a* a *b* byl zjištěn pouze u čerstvého ječmene, v práškovém ječmeni nebyly identifikovány v detekovatelném množství. Důvodem je zřejmě obecně nízká stabilita chlorofylů [7].

### 5.1.2 Zjištění absorpčního spektra

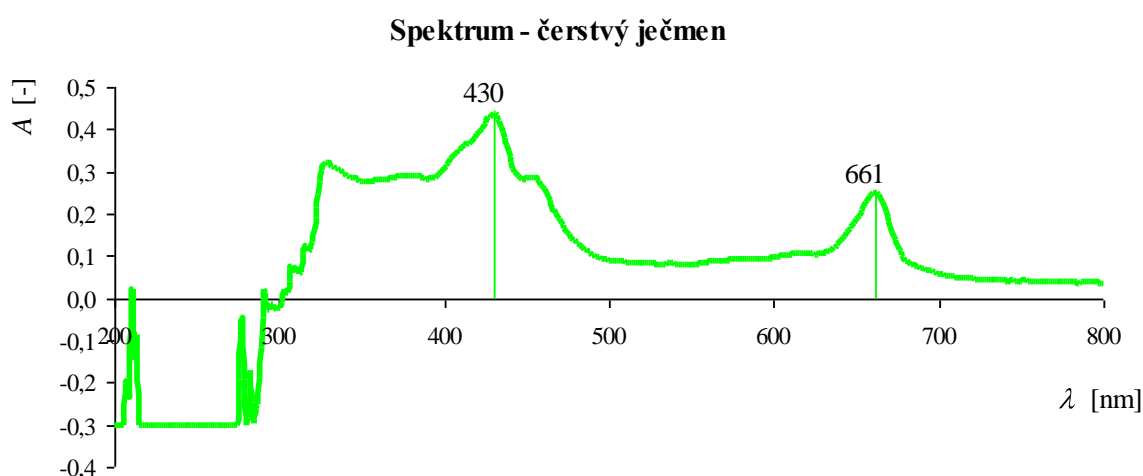
Zjištění absorpčního spektra bylo provedeno pro charakterizaci přírodních extraktů a jejich aktivních složek. Byla zjištěna maxima i minima absorbance daného vzorku v rozsahu vlnových délek 200 až 800 nm..



Graf 2: Spektrum propolisu



Graf 3: Spektrum práškového ječmene



Graf 4: Spektrum čerstvého ječmene

Maximum absorbance u propolisu bylo identifikováno při vlnové délce 294 nm (Graf 2). U práškového ječmene bylo identifikováno hlavní maximum při vlnové délce 267 nm, druhé maximum při vlnové délce 316 nm (Graf 3). Zjištěná maxima leží v oblasti UV a odpovídají absorbanci benzenového jádra. To vypovídá o množství polyfenolových sloučenin, které poskytují funkční vlastnosti těmto přírodním extraktům. V případě čerstvého ječmene byla nalezena 2 maxima odpovídající chlorofylu *b* a chlorofylu *a*, tedy 430 a 661 nm (Graf 4).

## 5.2 Enkapsulace vybraných přírodních extraktů

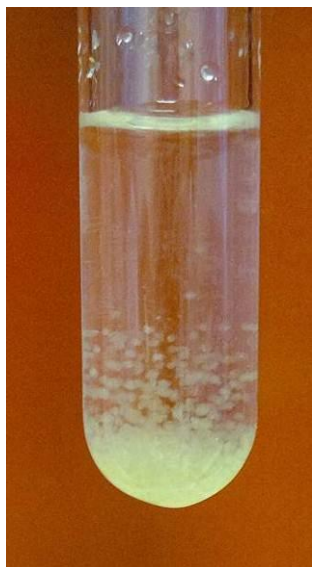
Přírodní extrakty byly enkapsulovány v kombinaci následujících obalů a typů:

Tabulka 14a: Přehled vytvořených částic

	alginát	alginát:škrob	chitosan	chitosan:agar	lipozomy
propolis	✓ kapsule		✓ kapsule	✓ kapsule 1:1	✓
práškový ječmen	✓ kapsule, matrix	✓ matrix 1:1 & 4:1	✓ matrix	✓ matrix 1:1	
čerstvý ječmen	✓ kapsule, matrix		✓ matrix	✓ matrix 1:1	

Tabulka 14b: Přehled vytvořených částic

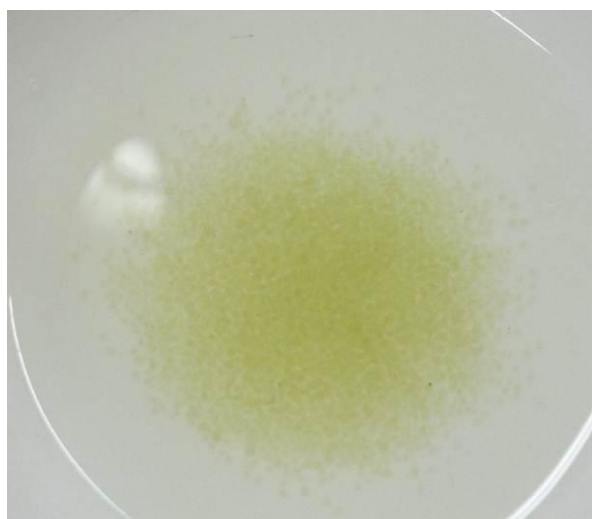
	alginát	alginát:škrob	chitosan	chitosan:agar	lipozomy
<i>L. acidophilus</i>	✓ matrix		✓ matrix		
<i>B. breve</i>	✓ kapsule				
směs probiotik	✓ matrix	✓ matrix 4:1	✓ matrix	✓ matrix 1:1	



Obrázek 49: Částice obsahující práškový ječmen, typ matrix, tryska 300 mm



Obrázek 50: Částice obsahující probiotika, typ matrix, tryska 300 mm



Obrázek 51: Částice obsahující zelený ječmen, typ matrix, tryska 300



Obrázek 52: Částice obsahující zelený ječmen, typ matrix, tryska 450 mm



Obrázek 53: Částice obsahující  
probiotika, typ matrix, tryska 300



Obrázek 54: Částice obsahující  
probiotika, typ matrix, tryska 450 mm

V této diplomové práci byly vedle přírodního extraktu propolisu a práškového ječmene prováděny rovněž experimenty s čerstvě vypěstovaným mladým ječmenem pro srovnání obou produktů a forem, stejně jako pro ověření vlivu technologického postupu na obsah živin a složek v ječmeni sušeném, práškovém. Další enkapsulovanou látkou byly probiotické kultury *L. acidophilus* a *B. breve*.

Jako hlavní dva typy obalových materiálů pro přípravu mikročástic na enkapsulátoru byly zvoleny alginát a chitosan (4.5.1). Alginát byl ve vybraných případech dále kombinován se škrobem pro optimalizaci míry rozpadu částic v umělém trávicím prostředí. Byly testovány vzájemné poměry alginátu a škrobu 1:1 a 4:1. Obdobně byly testovány kombinace materiálů v případě chitosanu, kdy byla přísadkou agar zpevněna konzistence chitosanových částic. Agar byl přidáván v poměru 1:1. Nejprve byl testován přísadka 1% agaru k 2% chitosanu, z důvodu nedostatečného zpevnění byla pro další aplikace zvolena 2% koncentrace agaru.

V případě propolisu byl zvolen typ částic kapsule, čímž došlo k zapouzdření jak rozpouštědla, tak aroma. V případě typu matrix by docházelo k postupnému uvolňování z vnějších vrstev částic a byl by negativně ovlivněn sensorický profil potravin (Příloha 11 a Příloha 16).

Příprava nanočástic – lipozomů byla provedena manuálně, jako aktivní jádro byl zvolen propolis. Ječmen nebyl zvolen, neboť jeho disperzí v rozpouštědle získáme suspenzi, tedy systém přesahující rozměry lipozomů a tak by nedošlo k enkapsulaci ve vhodné míře.

U ječmene byla pro enkapsulaci použita suspenze práškového ječmene (typ matrix) i supernatant (typ kapsule). Byly testovány všechny druhy obalů. Byl zvolen typ matrix, protože nebylo technologicky možné enkapsulovat suspenzi práškového ječmene do částic typu kapsule. Použitelné trysky by vytvořily částice příliš velké pro aplikaci v potravinách, menší rozměry nebyly kvůli rozměrům částic prášku aplikovatelné. Tím bylo umožněno enkapsulovat i vlákninu a nerozpustné složky práškového ječmene, což znamená zvýšení přídatné hodnoty produktu a značný přínos pro zdraví konzumenta (Příloha 1, Příloha 1 a Příloha 16). Jako srovnávací studii byl za obdobných podmínek enkapsulován i čerstvý ječmen (Příloha 3 až Příloha 5, Příloha 18)

U probiotik byl jako hlavní trend sledována směsná kultura *L. acidophilus* a *B. breve*, jakožto zástupce probiotik. Byla testována enkapsulace buněk s médiem, stejně jako od média odstředěných a dispergovaných v obalovém materiálu. Jako srovnávací studie byla provedena enkapsulace jednotlivých kmenů jakožto modelových systémů (Příloha 12, Příloha 12 a Příloha 18)

## 5.3 Charakterizace částic

### 5.3.1 Stanovení účinnosti enkapsulace

Účinnost enkapsulace byla stanovena dle postupu uvedeného v kapitole 4.6.1. Pro enkapsulaci byl použit v případě obou typů částic (kapsule i matrix) enkapsulátor Büchi B-395 Pro.

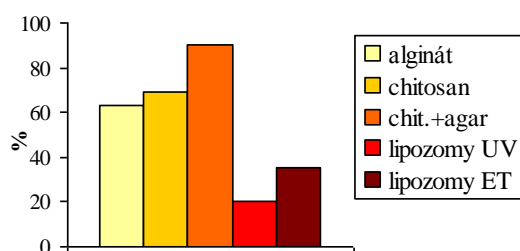
Příprava liposomů byla provedena pomocí ultrazvukového homogenizátoru Bandelin Sonoplus a ručně pomocí ethanolového vstříkávání (viz kapitola 4.5.3).

Účinnost enkapsulace byla zjištěna dle množství uvolněných polyfenolů a bílkovin a byla vyjádřena v procentech. Výsledky jsou shrnuty v následující Tab.15 a grafech č. 5 až 8.

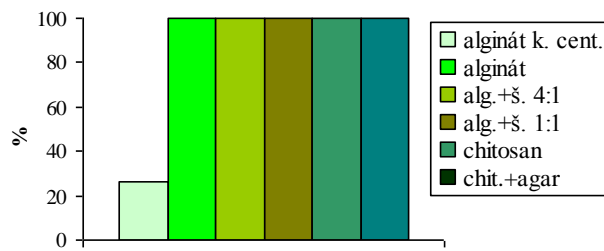
Tabulka 15: Účinnost enkapsulace

přírodní extrakt	obal	způsob enkapsulace	účinnost [%]
propolis	alginát	kapsule	63,5
	chitosan	kapsule	68,9
	chitosan + agar	kapsule	90,2
	lipozomy	ultrazvuk	20,5
	lipozomy	ethanolové vstříkávání	35,4
ječmen práškový	alginát	kapsule (centrif.)	26,1
	alginát	matrix	100,0
	alginát + škrob 1:1	matrix	100,0
	alginát + škrob 4:1	matrix	100,0
	chitosan	matrix	100,0
	chitosan + agar	matrix	100,0
ječmen čerstvý	alginát	kapsule (centrif.)	25,7
	alginát	kapsule	56,2
	alginát	matrix	100,0
	chitosan	matrix	100,0
	chitosan + agar	matrix	100,0
<i>B. breve</i>	alginát	kapsule	93,2
<i>L. acidophilus</i>	chitosan	matrix	100,0
	alginát	matrix	100,0
probiotika	alginát + škrob 4:1 → do ethanolu	matrix	100,0
	alginát + škrob 4:1 → do vody	matrix	80,0
	alginát	matrix, bez média	100,0
	chitosan	matrix, bez média	100,0
	chitosan + agar	matrix	100,0

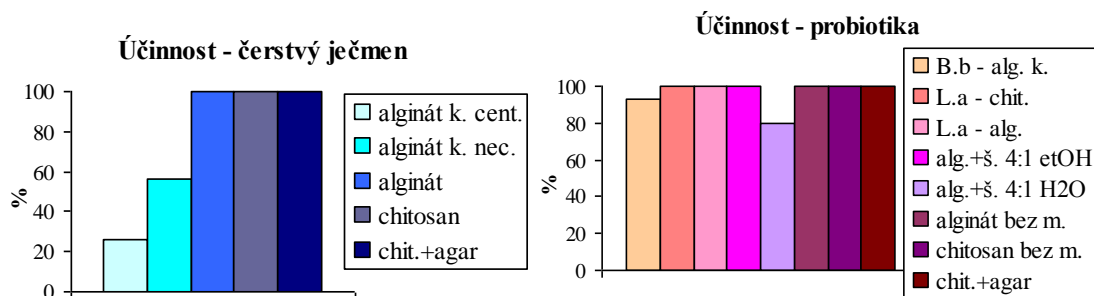
Účinnost - propolis



Účinnost - sušený ječmen



Graf 5 a 6: Účinnost enkapsulace – částice obsahující propolis a práškový ječmen



Graf 7 a 8: Účinnost enkapsulace – částice obsahující čerstvý ječmen a probiotika

Při srovnání výsledků účinnosti enkapsulace je patrné, že účinnost v případě tvorby částic typu kapsule byla nižší, než tomu bylo v případě částic typu matrix a pohybovala se v rozmezí 25,7-93,2 %. U druhého typu účinnost dosahovala téměř 100 % (Tab.15; Grafy 5-8).

Nejnižší účinnosti bylo dosaženo u extraktů ječmene (Graf 6, 7), které byly před samotnou enkapsulací centrifugovány pro odstranění nerozpustného podílu. Zabalena byla asi čtvrtina dávky extraktu. Vliv na nízkou účinnost má nejspíše povaha enkapsulovaného roztoku. V případě propolisu bylo dosaženo vyšší účinnosti použitím chitosanu (Graf 5), nejlepších výsledků (90,2 %) bylo dosaženo přidavkem agaru. Agar v tomto případě zpevňoval strukturu částice a umožnil i vyšší enkapsulační účinnost (Tab.15).

Účinnost enkapsulace byla v případě lipozomů nízká, 20,5 a 35,4 % pro metody ultrazvuk a ethanolové vstřikování. Příčinou může být interakce lipozomů aktivní složkou a způsob přípravy, délka sonikace. Vliv na účinnost má i poměr složek obalového materiálu lecitinu a cholesterolu, jež tvoří lipozomové membrány (Tab.15).

Nejvyšší účinnost byla naopak vyhodnocena v případě enkapsulace mikroorganismů. V případě modifikace alginátu škrobem byla testována enkapsulace do polymerizačního roztoku, kterým byl v prvním případě alkoholický roztok chloridu vápenatého (škrob se sráží v ethanolu) a v druhém případě pouze ve vodném roztoku škrobu. Bylo zjištěno, že v případě vodného roztoku byla účinnost 80%. Toto zjištění může být přínosem, protože nevyžaduje použití antimikrobiálního ethanolu, který by následně snížil množství viabilních buněk v částicích (Graf 8, Tab.15).

### 5.3.2 Sledování stability částic v modelovém fyziologickém prostředí

Stabilita částic byla charakterizována v několika typech modelového fyziologického prostředí a rovněž v modelových a reálných potravinách.

Fyziologická stabilita byla testována ve 3 modelových šťávách a dlouhodobá stabilita byla zjišťována i v prostředí 4 typů modelových potravin. Vybrané částice byly dále uchovávány i v potravinách reálných (4 druhy mléčných výrobků).

Stabilita částic byla sledována pomocí množství uvolněných látek. V závislosti na charakteru přírodního extraktu byl sledován obsah polyfenolů, bílkovin, chlorofylů, resp. antioxidační aktivity. V případě částic obsahujících probiotika byly použity techniky optické a fluorescenční mikroskopie.

### 5.3.3 Simulace podmínek v trávicím traktu

Odolnost částic v podmínkách gastrointestinálního traktu byla sledována pomocí modelových trávicích šťáv připravených dle receptury uvedené v Československém lékopisu [68]. Byla použita žaludeční, pankreatická a žlučová šťáva. Příprava vzorku pro tuto analýzu je popsána v kapitole 4.6.2.

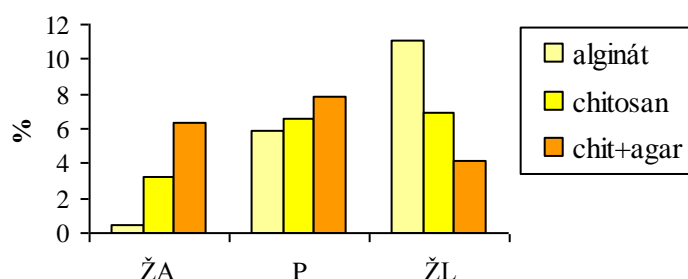


### 5.3.3.1 Propolis – fyziologické prostředí

Tabulka 16: Fyziologické prostředí – stabilita částic obsahujících propolis

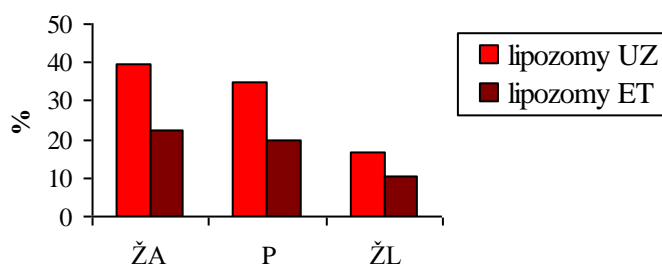
obal	způsob enkapsulace	množství uvolněného obsahu [%]		
		polyfenoly		
		šťáva		
		žaludeční	pankreatická	žlučová
alginát	kapsule	0,5	5,9	11,1
chitosan	kapsule	3,2	6,6	6,9
chitosan + agar	kapsule	6,4	7,8	4,2
lipozomy	ultrazvuk	39,7	34,9	16,5
lipozomy	ethanolové vstříkování	22,2	19,7	10,2

#### PROPOLIS - fyziologické prostředí



Graf 9: Fyziologické prostředí – stabilita částic obsahujících propolis – mikročástice

#### PROPOLIS - fyziologické prostředí



Graf 10: Fyziologické prostředí – stabilita částic obsahujících propolis – nanočástice (lipozomy)

Při testování míry rozkladu a stability částic obsahujících propolis bylo nejlepších výsledků dosaženo v případě alginátových částic (Tab.14, Graf 9), které vykazovaly minimální uvolňování obsahu v modelové žaludeční šťávě, tedy za nízkého pH (0,9). Nejnižší stabilita byla prokázána po přidavku žlučové šťávy, kdy vysoká hodnota pH (8) způsobovala rozpouštění alginátu, uvolnění nastalo z 11,1 %. Z hlediska digestce a cíleného transportu extraktu do organismu je proto nejvhodnější alginát, kdy částice odolá kyselému prostředí žaludku a rozpadne se až ve střevě. Obdobný trend, avšak při vyšších hodnotách stravitelnosti, prokazoval chitosan. Přidávkem agaru pro vytvrzení částic došlo ke zvýšení stravitelnosti v případě žaludeční a pankreatické šťávy, ale u žlučové šťávy došlo k poklesu stravitelnosti přibližně 1,5krát nižší než u částic bez přidavku agaru. Agar se prostředí

střevních šťáv lépe rozkládal (z 6,6 % na 7,8 % v pankreatické šťávě); žlučové soli oproti tomu jeho stabilitu výrazně nesnížily. Příčinou rozdílné stability alginátu a chitosanu v žlučové šťávě může být elektrostatická interakce záporně nabitých žlučových solí a kladně nabitého chitosanu, které způsobovala vzájemnou koagulaci.

V případě lipozomů byla zjištěná nejvyšší nestabilita ze všech typů použitých obalových materiálů. Lecitin s cholesterolem byly vyhodnoceny jako nejméně stabilní obalové materiály. Nejméně stabilní byly lipozomy v kyselém prostředí, nejvíce stabilní v případě žlučové šťávy. Nižší stabilitu, přibližně 1,7krát, vykazují lipozomy vytvořené pomocí ultrazvuku (Graf 10).

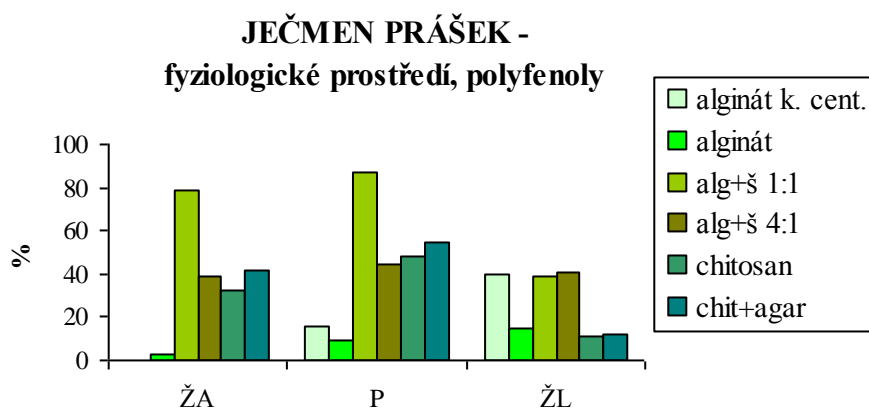
### 5.3.3.2 Práškový ječmen – fyziologické prostředí

Tabulka 17: Fyziologické prostředí – stabilita částic obsahujících práškový ječmen

přírodní extrakt	obal	způsob enkapsulace	množství uvolněného obsahu [%] polyfenoly		
			šťáva		
			žaludeční	pankreatická	žlučová
ječmen práškový	alginát	kapsule (centrif.)	0,0	7,8	39,4
ječmen práškový	alginát	matrix	3,0	9,0	15,1
	alginát + škrob 1:1	matrix	78,6	87,2	38,4
	alginát + škrob 4:1	matrix	38,6	44,6	40,6
	chitosan	matrix	32,1	47,7	10,9
	chitosan + agar	matrix	42,1	54,2	11,7

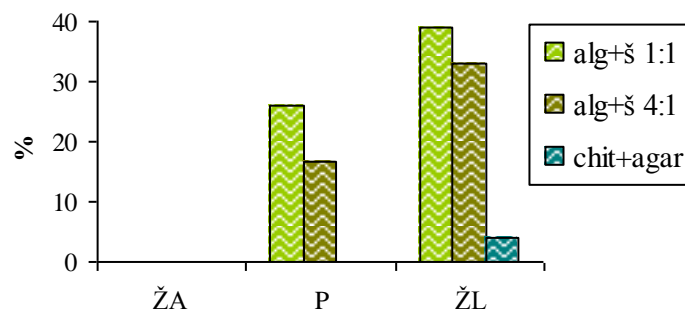
Tabulka 18: Fyziologické prostředí – stabilita částic obsahujících práškový ječmen – bílkoviny

přírodní extrakt	obal	způsob enkapsulace	množství uvolněného obsahu [%] bílkoviny		
			šťáva		
			žaludeční	pankreatická	žlučová
ječmen práškový	alginát + škrob 1:1	matrix	0,0	26,0	39,1
	alginát + škrob 4:1	matrix	0,0	16,7	32,9
	chitosan + agar	matrix	0,0	0,0	4,0



Graf 11: Fyziologické prostředí – stabilita částic obsahujících práškový ječmen – uvolnění polyfenolů

## JEČMEN PRÁŠEK - fyziologické prostředí, bílkoviny



Graf 12: Fyziologické prostředí – stabilita částic obsahujících práškový ječmen – uvolnění bílkovin

Co se týče stability částic obsahujících práškový ječmen, nejvyšší stability a tedy nejnižšího rozpadu-bylo dosaženo v případě použití čistého alginátu u částic typu matrix (Tab.17). Rozpad nastal z 3,0; 9,0 a 15,1 %. Tyto hodnoty jsou velmi nízké, a proto byla zvýšena míra rozpadu přidávkem škrobu do obalového materiálu. Nejprve byl testován poměr alginátu ke škrobu 1:1. V tomto případě byl podíl škrobu vyhodnocen jako příliš vysoký – modelovými šťávami se uvolnila většina obsahu částice (78,6; 87,2 a 38,4 % pro žaludeční, pankreatickou a žlučovou šťávu). Poměr alginátu a škrobu byl proto snížen na hodnotu 4:1. Tento krok upravil míru rozpadu alginátových částic oproti čistým alginátovým částicím při dosažení dostatečné míry trávení (přibližně okolo 40 %).

V případě chitosanových obalů byla nejvyšší nestabilita zjištěna s přidávkem pankreatické šťávy, tedy 47,7 a 54,2 % pro chitosanový a agar-chitosanový obal; v prostředí žluči byly částice nejstabilnější – 10,9 a 11,7% rozpad. Agar v tomto případě opět zlepšil mechanické vlastnosti částic a zvýšil i stabilitu ve fyziologickém prostředí; v prostředí žlučových solí nedošlo ke změně (Tab.17).

Protože bylo potvrzeno (Tab.13), že ječmen je bohatý na obsah bílkovin, resp. enzymů, byl sledován rozklad ve fyziologickém prostředí z pohledu uvolňování bílkovin. Pro testování byly zvoleny škrob-alginátové a agar-chitosanové částice, vyhodnocené jako nejlepší ze série. Škrob-alginát prokázaly dostatečnou míru stability a agar-chitosan poskytoval rovněž dostatečnou míru stability spolu s mechanickou pevností částic (Tab.18).

Přidávkem žaludeční šťávy nedošlo k významnému uvolnění bílkovin ani u jednoho z vybraných typů částic škrob-alginátových a agar-chitosanových; uvolnění nastalo až přidávkem pankreatické a žlučové šťávy, což je žádoucí z pohledu doručování bioaktivních složek do střev a jejich ochrany v žaludečním prostředí. U škrob-alginátových částic bylo potvrzeno, že vyšší poměr škrobu způsobuje vyšší rozklad částic (Tab.18). V případě chitosanu došlo k minimálnímu uvolnění bílkovin, a to jen přidávkem žlučové šťávy. Je možné, že docházelo k interakci bílkovin a chitosanu (Graf 12).

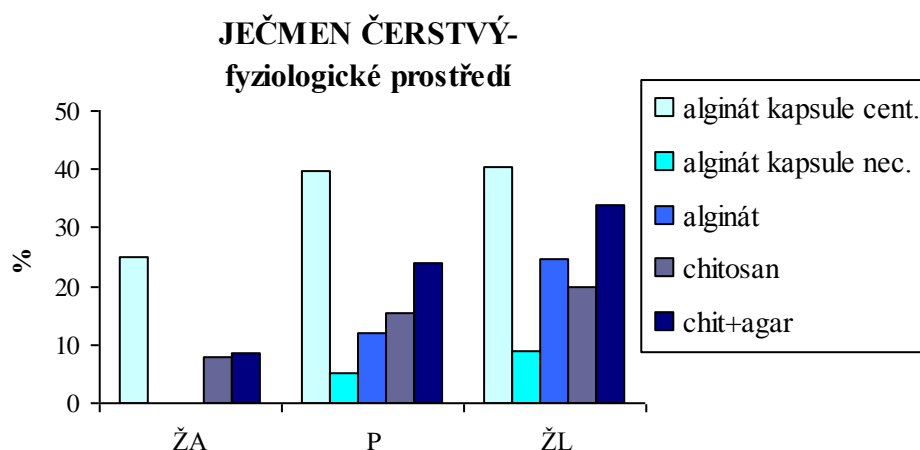
### 5.3.3.3 Čerstvý ječmen – fyziologické prostředí

Tabulka 19: Fyziologické prostředí – stabilita částic obsahujících čerstvý ječmen

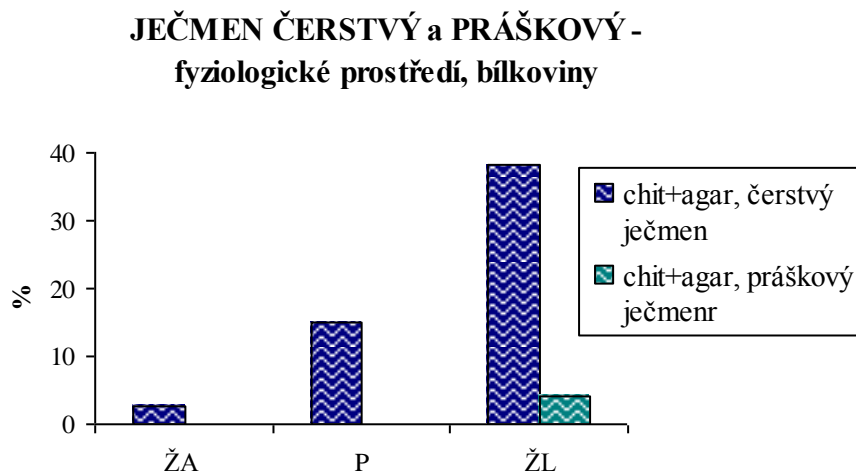
obal	způsob enkapsulace	množství uvolněného obsahu [%]		
		polyfenoly		
		šťáva		
		žaludeční	pankreatická	žlučová
alginát	kapsule (centrif.)	25,0	39,7	40,4
alginát	kapsule	0,0	5,3	9,1
alginát	matrix	0,0	11,9	24,5
chitosan	matrix	7,9	15,5	19,7
chitosan + agar	matrix	8,4	24,0	33,8

Tabulka 20: Fyziologické prostředí – stabilita částic obsahujících čerstvý ječmen - bílkoviny

obal	způsob enkapsulace	množství uvolněného obsahu [%]		
		bílkoviny		
		šťáva		
		žaludeční	pankreatická	žlučová
chitosan + agar	matrix	2,8	15,1	38,2



Graf 13: Fyziologické prostředí – stabilita částic obsahujících čerstvý ječmen – uvolnění polyfenolů



Graf 14: Fyziologické prostředí – stabilita částic obsahujících čerstvý ječmen – uvolnění bílkovin

Při modelovém fyziologickém působení na částice obsahující čerstvý ječmen bylo zjištěno, že největší uvolňování obsahu nastává v případě alginátových částic obsahujících supernatant získaný centrifugací za podmínek uvedených v kapitole 4.3.2, kdy v prostředí střev došlo asi k 40% uvolnění obsahu; vysoký rozklad byl zjištěn také v případě chitosanových částic (Tab.19). Příspěvek při uvolnění obsahu chitosanových částic mohla být jeho měkká konzistence, která byla následně zpevněna přidávkem agaru. Ostatní alginátové částice vykazují vysokou stabilitu, kdy uvolnění nastalo až v pankreatické šťávě v míře 5,3 % a 9,1 % pro alginátové částice kapsule a 11,9 % a 24,5 % pro alginátové částice matrix. Optimální model, kdy se částice rozpadá až ve střevě, byl zjištěn u alginátových částic typu matrix (Tab.19, Graf 13).

Při modifikaci chitosanového obalu pomocí agaru byla vylepšena nejen mechanická stabilita částic, ale i stabilita při působení trávicích šťáv; částice se ve vyšší míře rozkládaly až ve střevě (24,0 a 33,8 % pro pankreatickou a žlučovou šťávu), což je žádoucí z hlediska cíleného doručování extraktů.

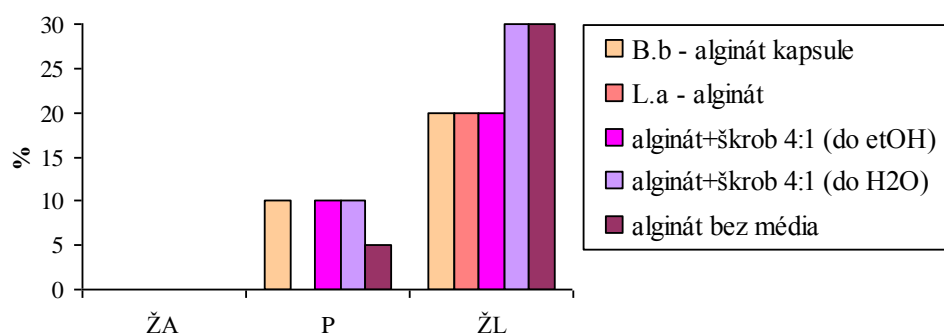
Sledováním stability ve fyziologickém prostředí u agar-chitosanových částic obsahujících čerstvý ječmen z pohledu uvolněných bílkovin a jeho srovnáním s ječmenem práškovým bylo zjištěno, že přidavek agaru v případě čerstvého ječmene výrazně zvýší rozklad oproti ječmeni práškovému. Příčinou můžou být enzymy v čerstvém extraktu, které snižují stabilitu částic či odlišné interakce obou ječmenů s chitosanem (Tab.19, Graf 14).

### 5.3.3.4 Probiotické kultury – fyziologické prostředí

Tabulka 21: Fyziologické prostředí – stabilita částic obsahujících probiotické kultury

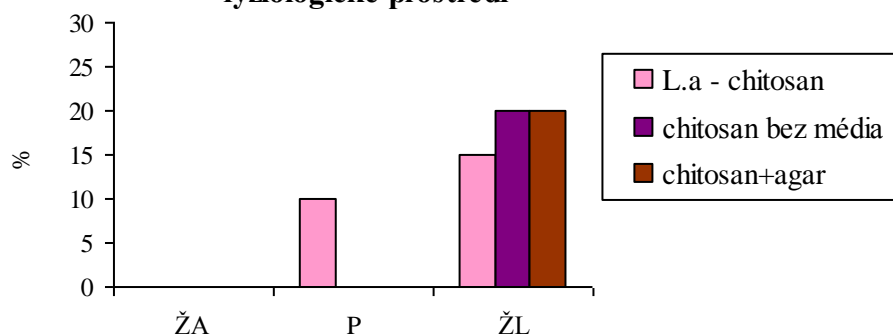
přírodní extrakt	obal	způsob enkapsulace	uvolnění částic do okolí [%]		
			šťáva		
			žaludeční	pankreatická	žlučová
<i>B. breve</i>	alginát	kapsule	0,0	10,0	20,0
<i>L. acidophilus</i>	chitosan	matrix	0,0	0,0	20,0
	alginát	matrix	0,0	10,0	15,0
probiotika	alginát + škrob 4:1 → do ethanolu	matrix	0,0	10,0	20,0
	alginát + škrob 4:1 → do vody	matrix	0,0	10,0	30,0
	alginát	matrix	0,0	5,0	30,0
	chitosan	matrix	0,0	0,0	20,0
	chitosan + agar	matrix	0,0	0,0	20,0

#### MIKROORGANISMY alginát - fyziologické prostředí



Graf 15: Fyziologické prostředí – stabilita částic obsahujících probiotické kultury – obalový materiál alginát

### MIKROORGANISMY chitosan - fyziologické prostředí



Graf 16: Fyziologické prostředí – stabilita částic obsahujících probiotické kultury – obalový materiál chitosan

Modelovým studiem fyziologické stability částic obsahujících probiotika bylo zjištěno, že nedochází k uvolňování obsahu částic v žaludku, ale až v prostředí střev. Tento jev je vysoce žádoucí v úmyslu ochránit probiotika před účinkem žaludeční šťávy a nízkého pH. Nejvyšší míra uvolnění nastala v případě škrob-alginátových částic srážených vodným roztokem chloridu vápenatého (Tab.21). Vyšší nestabilita byla zjištěna i v případě částic, které vznikly enkapsulací buněk, od nichž bylo odstředěno médium (viz kapitola 4.3.4). Bylo zjištěno, že způsob enkapsulace částic, kdy vzniká typ kapsule či matrix, u probiotik nemá vliv na míru stability. Vhodnějším než typ kapsule bude však typ matrix, a to z důvodu umožnění difúze živin z prostředí potravin k buňkám v částici.

Stabilita škrob-alginátových částic v případě ethanolového srážecího roztoku chloridu vápenatého je vyšší než v případě vodného roztoku; ethanol zde nejspíše má vliv na pevnost a odolnost škrobu, neboť způsobuje jeho srážení. Rozdíl byl zaznamenán v prostředí žlučové šťávy - 20,0 a 30,0 % pro ethanolové a vodné srážení (Graf 15).

Chitosan čistý i v kombinaci s agarem vykazuje stejnou tendenci – buňky se uvolňovaly až ve střevě; přičemž byl chitosan obdobně odolný jako alginát u jednotlivých kultur či v případě ethanolového srážení (Graf 16).

#### 5.3.4 Stabilita v modelových potravinách

Vytvořené částice byly testovány z hlediska jejich dlouhodobé stability v potravinách. Byly připraveny systémy modelových potravin, které sloužily jako modelové prostředí pro částice. Použity byly roztoky uvedené v kapitole 4.6.3. Dlouhodobá stabilita byla zjišťována v intervalech 0, 1, 4 a 8 týdnů. Kvůli časovému harmonogramu byla stabilita lipozomů testována pouze po dobu 4 týdnů. Přílohy 16 až 19 zobrazují fotografie všech částic na konci celého experimentu.

##### 5.3.4.1 Dlouhodobá stabilita – propolis

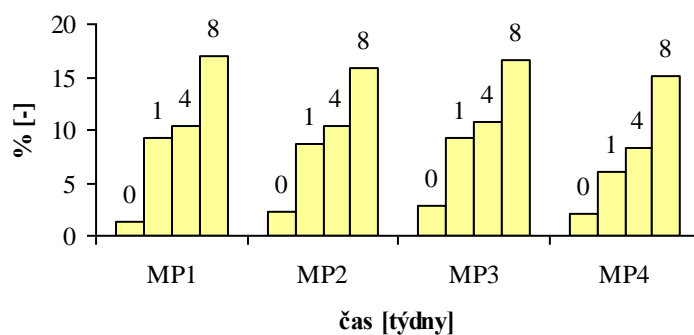
Tabulka 22a: Dlouhodobá stabilita částic obsahujících propolis

obal	způsob enkapsulace	množství uvolněného obsahu [%] polyfenoly				
		modelová potravina				
		čas [týdny]	MP1	MP2	MP3	MP4
alginát	kapsule	0	1,4	2,2	2,9	2,0
		1	9,2	8,7	9,2	6,1
		4	10,3	10,5	10,8	8,3
		8	16,9	15,9	16,6	15,1

Tabulka 22b: Dlouhodobá stabilita částic obsahujících propolis

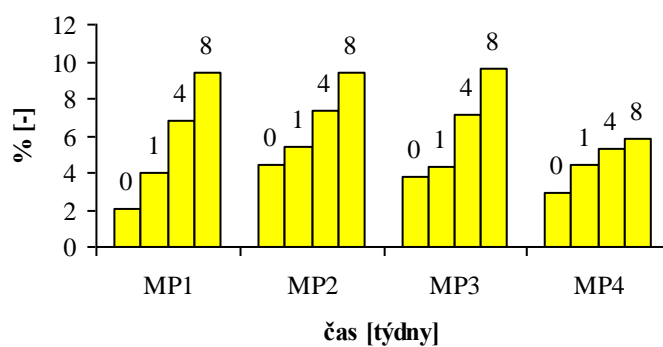
obal	způsob enkapsulace	množství uvolněného obsahu [%] polyfenoly				
		modelová potravina				
		čas [týdny]	MP1	MP2	MP3	MP4
chitosan	kapsule	0	2,1	4,4	3,8	2,9
		1	4,0	5,4	4,4	4,5
		4	6,8	7,4	7,1	5,3
		8	9,5	9,4	9,6	5,8
chitosan + agar	kapsule	0	3,9	5,1	4,6	3,8
		1	13,7	11,4	13,6	7,3
		4	17,7	14,5	17,7	13,2
		8	18,2	23,9	26,3	18,7
lipozomy	ultrazvuk	0	14,7	21,4	11,9	17,1
		1	29,5	32,4	32,2	22,0
		4	50,8	36,9	47,0	31,5
lipozomy	ethanolové vstřikování	0	19,3	18,1	16,4	18,6
		1	27,9	28,1	28,3	24,0
		4	57,3	39,5	54,8	35,3

**PROPOLIS - stabilita  
alginát**

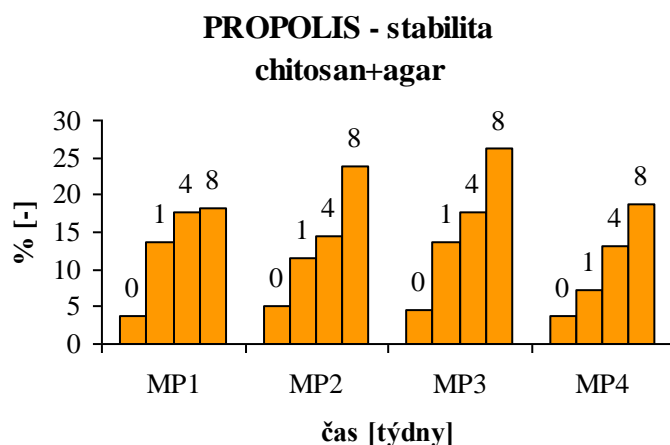


Graf 17: Stabilita částic obsahujících propolis – obalový materiál alginát

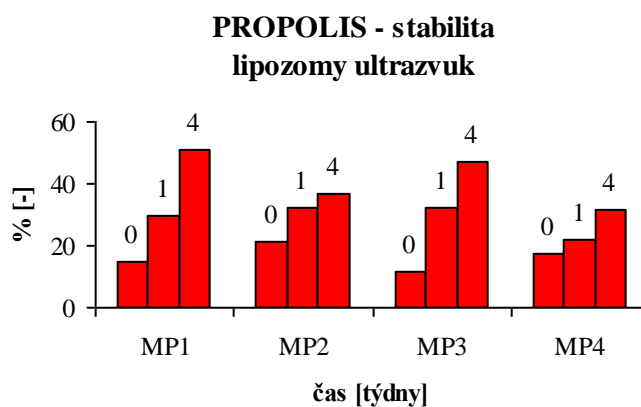
**PROPOLIS - stabilita  
chitosan**



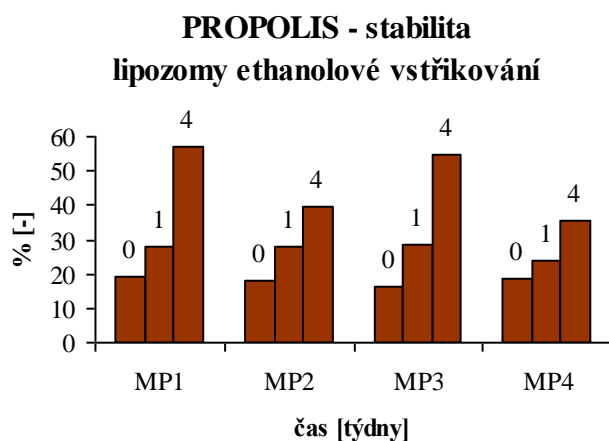
Graf 18: Stabilita částic obsahujících propolis – obalový materiál chitosan



Graf 19: Stabilita částic obsahujících propolis – obalový materiál chitosan s agarem



Graf 20: Stabilita částic obsahujících propolis – lipozomy



Graf 21: Stabilita částic obsahujících propolis – lipozomy

Stabilita částic obsahujících propolis byla nejnižší u alginátových částic, nejvyšší v případě chitosanového obalu (Tab.22). Přídavkem agaru pro zpevnění struktury chitosanu došlo k snížení stability částic (v 8. týdnu z 5,8 až 9,6% uvolnění na 18,2 až 26,3% uvolnění); tato kombinace obalového materiálu ovšem měla vyhovující mechanické vlastnosti částic a vykazovala dostatečnou



míru stability, resp. v pankreatické šťávě nejvyšší míra ze všech propolisových makročásteč, tedy 7,8 % (Grafy 17-19).

Stabilita lipozomových částic, stejně jako jejich rozklad, bylo vyhodnoceno jako technologicky nejméně vyhovující. Po 4-týdenním uchování částic v chladu a tmě došlo k uvolnění u ultrazvukových částic z 31,5 až 50,8 % a u částic vytvořených ethanolovým vstřikováním z 35,3 až 57,3% uvolnění. Lipozomy tedy nejsou vhodná varianta pro dlouhodobé skladování (Grafy 20, 21).

V závislosti na druhu modelové potraviny je možné říci, že nejvyšší stabilitu prokazovaly částice převážně v kyselém prostředí (modelová potravina MP2). Tento fakt potvrzuje, že přírodní polysacharidy alginát a chitosan prokazují stabilitu v kyselých roztocích, resp. nejsou zde rozpustné. Obecně se ale stabilita částic v závislosti na modelových potravinách příliš nelišila. Nejnižší dlouhodobá stabilita v případě lipozomů byla prokázána u modelové potraviny MP1 a MP3, teda v neutrálním prostředí a v alkoholickém roztoku (Tab.22).

Výrobky, které by byly vhodné pro aplikaci propolisových částic, jsou různé bylinné sirupy, šťávy, dropsy. Bylo by možné konzumovat propolisové enkapsuláty jako doplněk výživy, neboť enkapsulace zamezí uvolňování propolisového aroma, které může být pro senzitivní jedince nepříjemné.

*Tabulka 23: Dlouhodobá stabilita částic obsahujících propolis – antioxidační aktivita*

obal	způsob enkapsulace	podíl antioxidační aktivity [%]				
		modelová potravina				
		čas [týdny]	MP1	MP2	MP3	MP4
alginát	kapsule	4	11,4	18,9	18,3	15,5
		8	13,4	21,4	20,1	17,6
alginát	kapsule	4	11,4	18,9	18,3	15,5
		8	13,4	21,4	20,1	17,6
chitosan	kapsule	4	15,9	10,3	15,3	18,4
		8	18,8	11,4	20,2	21,2
chitosan + agar	kapsule	4	24,3	16,1	20,9	18,1
		8	29,7	23,9	31,1	30,2
lipozomy	ultrazvuk	1	30,5	18,1	29,8	17,6
		4	38,6	25,0	35,9	27,3
lipozomy	ethanolové vstřikování	1	14,5	20,7	16,1	14,5
		4	47,2	57,6	29,6	22,1

Stabilita částic obsahujících propolis byla také ověřena pomocí sledování antioxidační aktivity v čase 4. a 8. týden; v případě lipozomů v čase 1. a 4. týden. K nejvyššímu uvolnění u alginátu došlo v případě modelové potraviny s hodnotou pH vyšší než 4,5 (MP1). U chitosanu a agar-chitosanu nastalo nejnižší uvolnění v případě kyselá modelové potraviny (MP2). Tyto jevy souvisí s rozpustností alginátu a chitosanu v zásaditém, resp. nekyselém prostředí (Tab.23).

V případě lipozomů se trend liší, u částic připravených ultrazvukem byla identifikována nejvyšší stabilita v případě MP2 a MP4 (kyselá a tuková modelová potravina) a nejnižší v případě MP1. U částic připravených pomocí ethanolového vstřikování byla nejnižší stabilita zjištěna u MP2, nejvyšší naopak u MP3 a MP4 (alkoholická a tuková modelová potravina). Je patrné, že na stabilitu má vliv i způsob přípravy částic. Podobný jev byl zjištěn v případě stability v tukové modelové potravine. Příčinou může být stabilizace interakci s lipidy.

### 5.3.4.2 Dlouhodobá stabilita – lyofilizovaný propolis

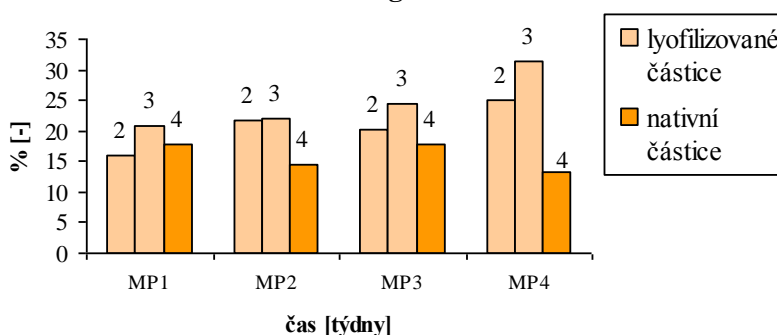
Tabulka 24: Dlouhodobá stabilita lyofilizovaných propolisových částic

obal	způsob enkapsulace	množství uvolněného obsahu [%]				
		polyfenoly				
		modelová potravina				
		čas [týdny]	MP1	MP2	MP3	MP4
chitosan + agar	kapsule	2	15,9	21,8	20,3	24,9
		3	20,7	21,9	24,3	31,4

Tabulka 25: Dlouhodobá stabilita lyofilizovaných propolisových částic – antioxidační aktivita

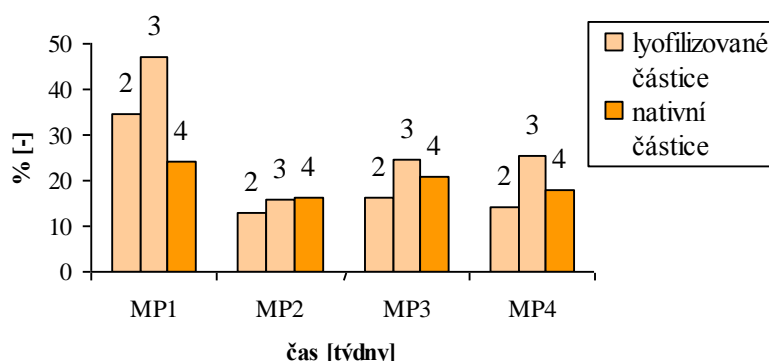
obal	způsob enkapsulace	podíl antioxidační aktivity [%]				
		modelová potravina				
		čas [týdny]	MP1	MP2	MP3	MP4
chitosan + agar	kapsule	2	34,5	12,8	16,4	14,0
		3	47,0	16,0	24,7	25,5

**PROPOLIS - stabilita, polyfenoly**  
chitosan+agar



Graf 22: Stabilita částic obsahujících propolis – lyofilizovaný chitosan s agarem

**PROPOLIS - stabilita, antioxidační aktivita**  
chitosan+agar



Graf 23: Stabilita částic obsahujících propolis – lyofilizovaný chitosan s agarem, antioxidační aktivita

Jako srovnávací test byly lyofilizovány vybrané částice propolisu v agar-chitosanovém obalu. Tyto lyofilizované částice byly vloženy do modelových potravin a v čase 2 a 3 týdnů byla zjištěna stabilita pomocí zjištění obsahu polyfenolů a antioxidační aktivity (Tab.24, 25). Srovnáním s

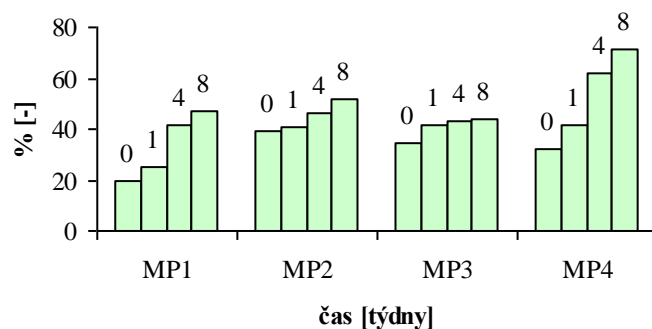
neenkapsulovanými částicemi je patrné, že stabilita lyofilizovaných částic byla nižší. Z hlediska uvolnění polyfenolů můžeme srovnat hodnoty lipozomů ve 3. týdnu – 20,7 až 31,4% uvolnění, u nativních částic ve 4. týdnu nastalo pouze 13,2 až 17,7% uvolnění. Z hlediska míry antioxidační aktivity uvolněný obsah lipozomů ve 3. týdnu vykazoval 16,0 až 47,0% podíl, kdežto u nativních částic ve 4. týdnu byl zjištěn 16,1 až 24,3% podíl (Grafy 22, 23). Lyofilizace agar-chitosanového obalu není tedy vhodnou technologickou úpravou, je možné, že při odpařování vlhkosti obalový materiál díky své porozitě nezabrání také odparu ethanolu, čímž dochází ke ztrátám propolisu. Pro nastavení procesu tvorby a stability lyofilizovaných částic by bylo nutné optimalizovat složení obalového materiálu.

### 5.3.4.3 Dlouhodobá stabilita – práškový ječmen

Tabulka 26: Dlouhodobá stabilita částic obsahujících práškový ječmen

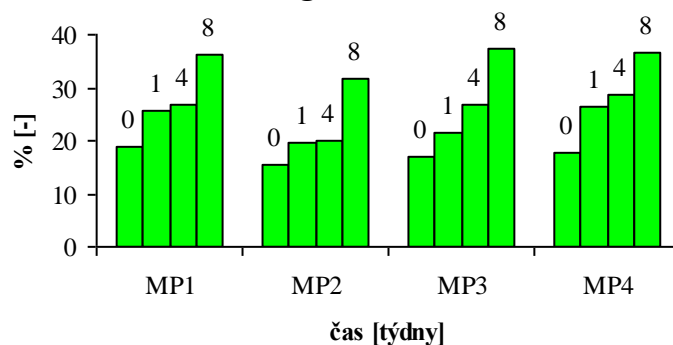
obal	způsob enkapsulace	množství uvolněného obsahu [%]				
		polyfenoly				
		čas [týdny]	MP1	MP2	MP3	MP4
alginát	kapsule (centrif.)	0	19,6	39,1	34,9	32,4
		1	25,0	40,5	41,9	49,6
		4	41,8	46,0	42,9	62,0
		8	47,0	51,6	43,8	71,4
alginát	matrix	0	18,7	15,3	16,9	17,7
		1	25,7	19,6	21,3	26,3
		4	26,7	20,1	26,8	28,5
		8	36,2	31,5	37,4	36,7
alginát + škrob 1:1	matrix	0	24,3	37,2	16,7	31,7
		1	49,0	51,2	25,4	47,8
		4	62,5	56,7	42,6	54,8
		8	72,6	66,0	63,4	63,0
alginát + škrob 4:1	matrix	0	14,3	25,2	13,4	29,7
		1	17,8	34,2	18,3	32,6
		4	25,4	34,8	19,7	34,5
		8	35,6	39,0	40,3	40,6
chitosan	matrix	0	8,3	6,7	6,4	12,9
		1	12,9	13,2	11,5	23,9
		4	17,5	22,4	20,9	31,8
		8	27,3	23,3	32,8	36,9
chitosan + agar	matrix	0	2,5	2,7	0,6	4,4
		1	10,3	11,9	7,2	11,6
		4	10,5	15,0	12,2	15,1
		8	14,3	19,9	14,4	21,7

**JEČMEN PRÁŠEK ALGINÁT - stabilita  
alginát kapsule**



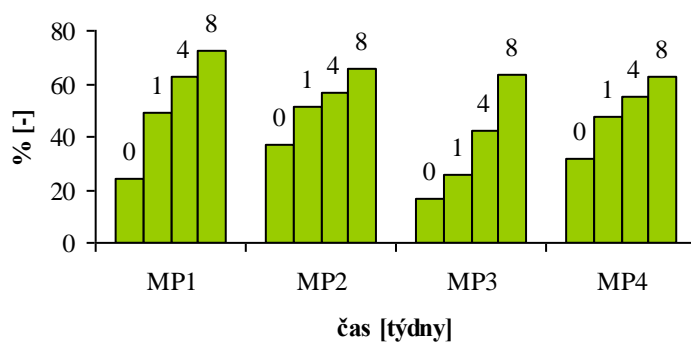
Graf 24: Stabilita částic obsahujících práškový ječmen – alginát, kapsule

**JEČMEN PRÁŠEK - stabilita  
alginát matrix**



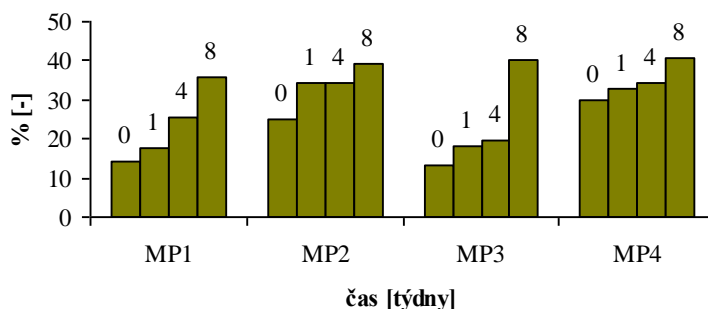
Graf 25: Stabilita částic obsahujících práškový ječmen – alginát matrix

**JEČMEN PRÁŠEK - stabilita  
alginát+škrob 1:1**



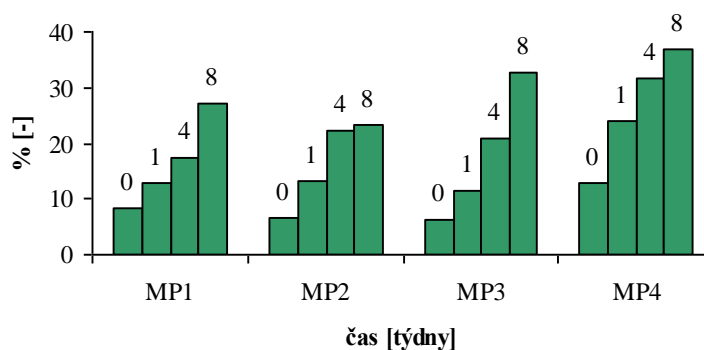
Graf 26: Stabilita částic obsahujících práškový ječmen – alginát se škrobem

**JECMEN PRASEK - stabilita  
alginát+škrob 4:1**



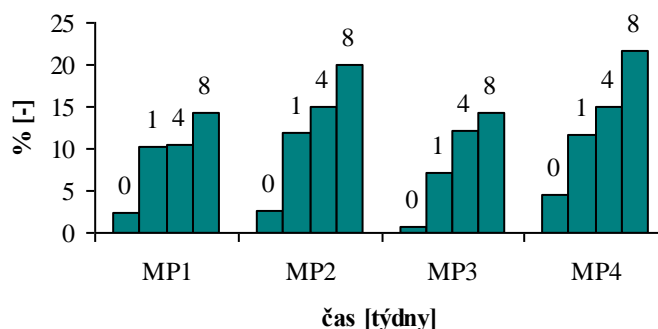
Graf 27: Stabilita částic obsahujících práškový ječmen – alginát se škrobem

**JEČMEN PRÁŠEK - stabilita  
chitosan**



Graf 28: Stabilita částic obsahujících práškový ječmen – chitosan

**JEČMEN PRÁŠEK - stabilita  
chitosan+agar**



Graf 29: Stabilita částic obsahujících práškový ječmen – chitosan s agarem

Stabilita částic obsahujících práškový ječmen byla ovlivněna druhem obalového materiálu, stejně jako způsobem enkapsulace (Tab.26). Zcela nejnižší stabilita je patrná u alginátových kapsulí obsahujících supernatant ze suspenze ječmene (Graf 24), kdy po osmi týdnech došlo k přibližně polovičnímu uvolnění obsahu 43,8 až 71,4 %). Rovněž tak u částic vytvořených z alginátu a škrobu v

oměru 1:1 došlo k vysokému uvolnění obsahu, a to v míře nad 60 % (Graf 26). V případě suspenze je problém povaha vzorku; je možné, že došlo k enkapsulaci nestabilních složek, které mají vysokou rozpustost a přechází do okolí. U škrob-alginátových částic má na stabilitu hlavní podíl obsah škrobu (Graf 26 a 27). Tyto 2 typy částic byly tedy vyhodnoceny jakožto nevhodné pro další aplikaci. Částice alginátové vykazovaly obdobnou stabilitu jak částice škrob-alginátové v poměru 1:4 (po 8. týdnech tedy 31,5 až 37,4% uvolnění pro agarové částice a 35,6 až 40,6% uvolnění pro škrob-agarové částice), ale škrob-alginátových částic vykazovaly lepší stravitelnost. Proto je vhodnější použití druhého typu částic.

Nejvyšší stabilita byla identifikována u chitosanových částic, přičemž v případě přídavku agaru k chitosanu došlo nejen k vylepšení pevnostních charakteristik, ale rovněž i stability (Grafy 28, 29).

*Tabulka 27: Dlouhodobá stabilita částic obsahujících práškový ječmen – bílkoviny*

obal	způsob enkapsulace	množství uvolněného obsahu [%]				
		bílkoviny				
		modelová potravina				
		čas [týdny]	MP1	MP2	MP3	MP4
alginát + škrob 4:1	matrix	0	16,0	23,3	14,4	17,5
		1	17,8	26,0	20,6	24,4
		4	30,7	28,1	23,9	29,8
		8	43,6	33,9	38,7	37,2
chitosan + agar	matrix	0	0,9	0,1	2,2	5,1
		1	7,7	6,8	6,1	11,0
		4	11,2	12,6	9,2	15,1
		8	18,7	13,7	11,2	19,2

U dvou typů obalů, které vyhovovaly po stránce stability, byla rovněž sledována míra uvolnění bílkovin, resp. enzymů v ječmeni obsažených (Tab.27). Je patrný výrazný rozdíl, kdy v případě agar-chitosanových částic je míra uvolnění je více než o polovinu nižší, než je tomu v případě škrob-alginátových částic 1:4, tedy uvolnění v případě škrob-alginátových částic bylo v 8. týdnu 33,9 až 43,6%, u agar-chitosanových pouze 11,2 až 19,2%.

Aplikace práškového ječmene v enkapsulované formě najde své využití v oblasti zdravé výživy; nejen pro obohacování potravy vlákninou, minerály a vitamíny, ale rovněž pro doplnění enzymů. Společně s chitosanem může ječmen nabídnout funkci preparátu na redukci hmotnosti, přičemž chitosan váže tuky a ječmen přispívá vlákninou. Obdobné využití lze doporučit i pro čerstvý extrakt ječmene. Oba tyto ječmeny vykazují nepříjemné sensorické vlastnosti; enkapsulace je tedy vhodným řešením.

#### 5.3.4.4 Dlouhodobá stabilita – čerstvý ječmen

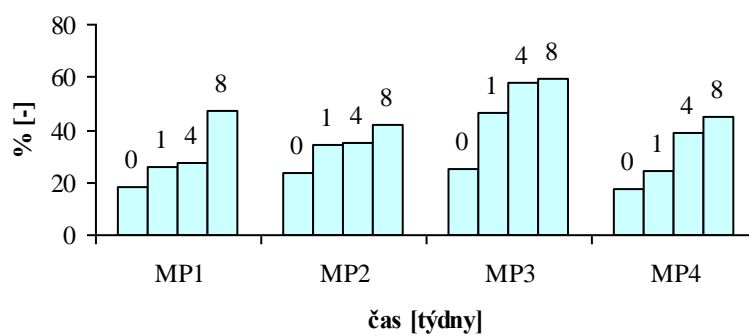
*Tabulka 28a: Dlouhodobá stabilita částic obsahujících čerstvý ječmen*

obal	způsob enkapsulace	množství uvolněného obsahu [%]				
		polyfenoly				
		modelová potravina				
		čas [týdny]	MP1	MP2	MP3	MP4
alginát	kapsule (centrif.)	0	18,2	23,4	22,5	17,3
		1	25,7	34,4	46,6	24,7
		4	27,6	35,4	57,7	38,5
		8	47,1	42,2	59,2	44,8

Tabulka 28b: Dlouhodobá stabilita částic obsahujících čerstvý ječmen

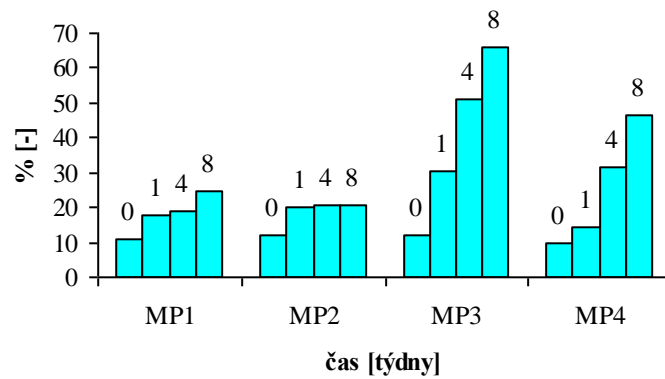
obal	způsob enkapsulace	množství uvolněného obsahu [%]				
		polyfenoly				
		modelová potravina				
		čas [týdny]	MP1	MP2	MP3	MP4
alginát	kapsule	0	11,1	11,8	12,1	10,7
		1	17,6	19,9	30,6	14,2
		4	18,9	20,5	50,9	31,5
		8	24,7	20,8	65,9	46,7
alginát	matrix	0	3,5	4,6	6,1	6,9
		1	5,7	6,7	9,7	11,5
		4	6,4	8,1	15,1	17,4
		8	9,0	8,9	17,0	22,9
chitosan	matrix	0	0,5	3,7	6,4	6,4
		1	13,4	11,0	14,0	15,3
		4	36,5	35,4	31,7	24,5
		8	50,5	51,5	48,4	54,6
chitosan + agar	matrix	0	4,8	8,2	17,7	16,5
		1	12,2	8,2	21,7	16,6
		4	38,0	29,0	39,4	31,4
		8	43,4	34,4	36,7	42,3

**JEČMEN ČERSTVÝ - stabilita  
alginát kapsule centrifugace.**



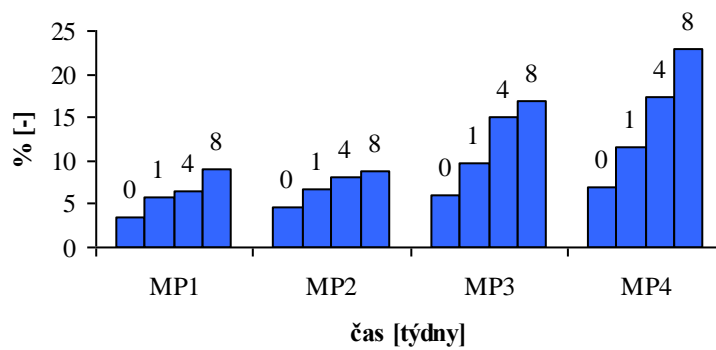
Graf 30: Stabilita částic obsahujících čerstvý ječmen – alginát, kapsule, centrifugace

**JEČMEN ČERSTVÝ - stabilita kapsule necentrifugace**



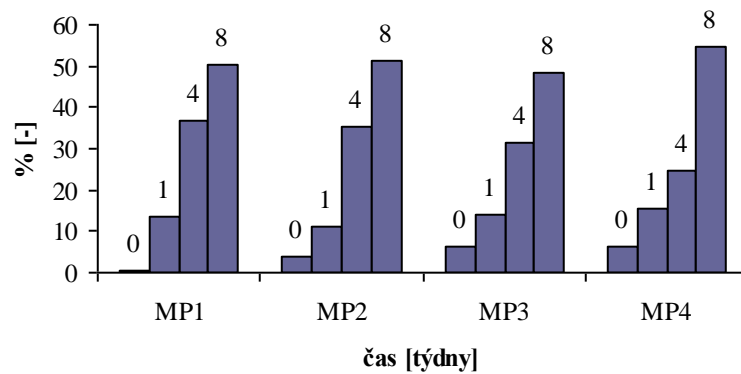
Graf 31: Stabilita částic obsahujících čerstvý ječmen – alginát, kapsule, bez centrifugace

**JEČMEN ČERSTVÝ - stabilita alginát matrix**



Graf 32: Stabilita částic obsahujících čerstvý ječmen – obalový materiál alginát

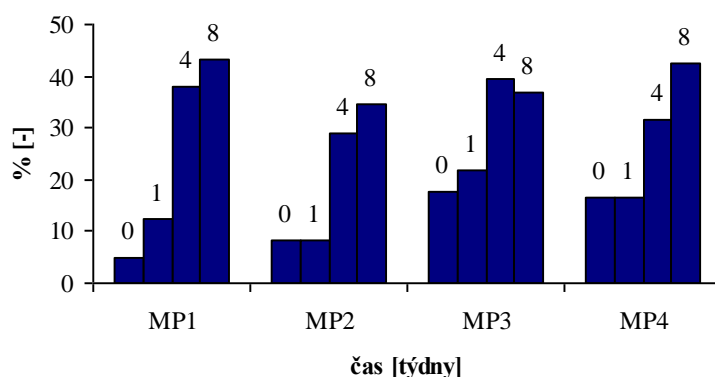
**JEČMEN ČERSTVÝ - stabilita chitosan**



Graf 33: Stabilita částic obsahujících čerstvý ječmen – obalový materiál chitosan



### JEČMEN ČERSTVÝ - stabilita chitosan+agar



Graf 34: Stabilita částic obsahujících čerstvý ječmen – obalový materiál agar-chitosan

Při analýze částic obsahujících čerstvý ječmen bylo zjištěno, že v případě alginátových částic vykazovala stabilita vzrůstající tendenci v řadě částic kapsule (centrif.) – kapsule (necentr.) – matrix (Tab.28). Stejně jako v případě práškového ječmene i v tomto případě částice typu kapsule, vytvořené enkapsulací supernatantu vykazovaly velmi nízkou stabilitu. Příčina může být povaha extraktu, jak bylo již diskutováno výše – enkapsulovány mohly být pouze nestabilní a vysoce rozpustné složky, které snadno difundovaly. Přidavkem agaru došlo k vylepšení stability, v 8. týdnu byla míra uvolnění agar-chitosanových částic přibližně 80% ve srovnání s chitosanovými částicemi. Ve srovnání s alginátovými částicemi je ovšem stabilita chitosanových částic velmi výrazně nižší: v 8. týdnu došlo u chitosanu k 48,6 až 54,6% uvolnění, u alginátových částic typu pouze k 8,9 až 2,9% uvolnění. Z fotografie v Příloze 18 je patrné, že oproti alginátovým částicím u chitosanových částic nastal ke konci experimentu rozpad struktury. Příčinou může být přítomnost aktivních enzymů v čerstvém extraktu ječmene (Grafy 30-34).

Nejvíce stabilní modelovou potravinou je kyselá a alkoholická modelová potravina (MP2 a MP3), neutrální a tukové prostředí naopak prokazuje stabilitu nižší. V kyselém prostředí jsou použité polysacharidové obaly nerozpustné, v ethanolu se polysacharidy sráží, s čímž může souviset stabilita. Naopak se rozpustnost zvyšuje v neutrálním prostředí; podíl tuku je nejspíš také destabilizační faktor.

Tabulka 29: Dlouhodobá stabilita částic obsahujících čerstvý ječmen - bílkoviny

obal	způsob enkapsulace	množství uvolněného obsahu [%]				
		bílkoviny				
		čas [týdny]	modelová potravina			
MP1	MP2		MP3	MP4		
alginát	kapsule (centrif.)	4	18,8	23,4	29,6	24,8
		8	28,6	30,8	38,1	37,5
alginát	kapsule	4	25,0	29,5	59,5	49,6
		8	24,0	46,2	67,6	51,6
alginát	matrix	4	22,3	35,2	49,7	60,0
		8	29,5	47,2	68,2	75,6
chitosan	matrix	4	59,6	47,6	46,1	64,7
		8	91,6	89,5	85,2	88,3
chitosan + agar	matrix	4	33,5	49,2	29,9	42,6
		8	72,2	77,1	66,1	79,0

Analýzou míry uvolnění obsahu bílkovin v rámci dlouhodobé stability ve 4. a 8. týdnu byl vyhodnocen jako nejstabilnější obalový materiál alginát, typ částic kapsule, kdy byl enkapsulován supernatant. Po 8. týdnu došlo k uvolnění z 28,6 až 38,1 % (Tab.29). Je možné, že centrifugací supernatantu došlo k odstranění selektivního podílu bílkovin a enkapsulované bílkoviny mohly reagovat s alginátem a prokazovat tak vyšší stabilitu; tento typ částic ovšem prokazoval nízkou účinnost i celkovou dlouhodobou stabilitu. Nejméně stabilní z alginátových obalů byl třetí typ, tedy typ matrix.

Vysoká míra uvolnění bílkovin byla zjištěna i v případě chitosanových obalů obou typů. Maximální hodnoty uvolnění obsahu bílkovin u chitosanového obalu (V 8. týdnu 85,2 až 91,6 %) korespondují s rozpadem částic zachyceným v Příloze 18.

Je zde patrný jev, kdy čerstvý ječmen obsahuje vyšší množství enzymů a destabilizačních faktorů, které zkracují interval, po který částice vykazují dostatečnou stabilitu.

*Tabulka 30: Dlouhodobá stabilita částic obsahujících čerstvý ječmen - chlorofyly*

obal	způsob enkapsulace	množství uvolněného obsahu [%] chlorofyly				
		modelová potravina				
		čas [týdny]	MP1	MP2	MP3	MP4
alginát	kapsule (centrif.)	4	6,6	4,3	5,2	5,3
		8	0,5	3,3	2,4	0,5
alginát	kapsule	4	1,9	2,7	2,9	4,3
		8	6,6	4,2	4,7	6,6
alginát	matrix	4	0,6	0,8	0,7	0,8
		8	0,8	1,1	0,8	0,9
chitosan	matrix	4	0,8	0,8	1,2	1,7
		8	1,2	1,0	1,5	2,1
chitosan + agar	matrix	4	0,7	1,1	1,2	1,1
		8	2,3	1,6	1,8	1,7

Jako další z charakteristik v průběhu sledování dlouhodobé stability částic bylo ve 4. a 8. týdnu zjišťování obsahu chlorofylů *a* a *b* (Tab.30). V prvním typu částic (obalový materiál alginát, typ částic kapsule, enkapsulace supernatantu – došlo k poklesu obsahu chlorofylů, tím byla prokázána nestabilita a nedostatečná ochrana jádra. Srovnáním dvou typů částic, kdy suspenze čerstvého ječmene nebyla centrifugována, bylo zjištěno, že suspenze ječmene enkapsulovaná jakožto kapsule a matrix se liší stabilitou; v prvním případě došlo k více než čtyř- až pětinasobnému uvolnění obsahu chlorofylů, resp. uvolnění ze 4,2 až 6,6 % u kapsule a 0,8 až 1,1 % u matrixu po 8. týdnu skladování. Stejný trend, kdy je kapsule méně stabilní než matrix, byl prokázán i sledováním obsahu polyfenolů. Je možné, že dispergací aktivní složky do obalového materiálu posílíme její stabilitu.

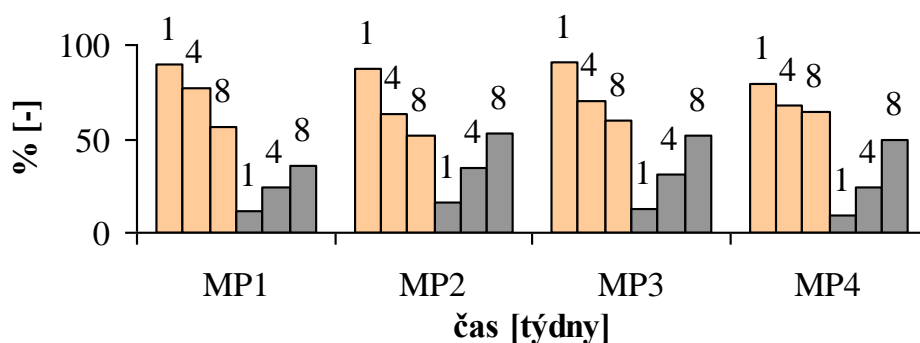
Míra uvolněných chlorofylů u MP1 a MP2 je nižší u samotného chitosanu, než je tomu v případě chitosanu s přidavku agaru. U zbylých dvou druhů modelových potravin je míra uvolnění, a tedy i stabilita, srovnatelná. Chitosanové obaly jsou však z pohledu ochrany chlorofylů méně stabilní, než je tomu u typu alginát matrix, který prokazuje nejlepší stabilitu u typu matrix.

### 5.3.4.5 Dlouhodobá stabilita - probiotika

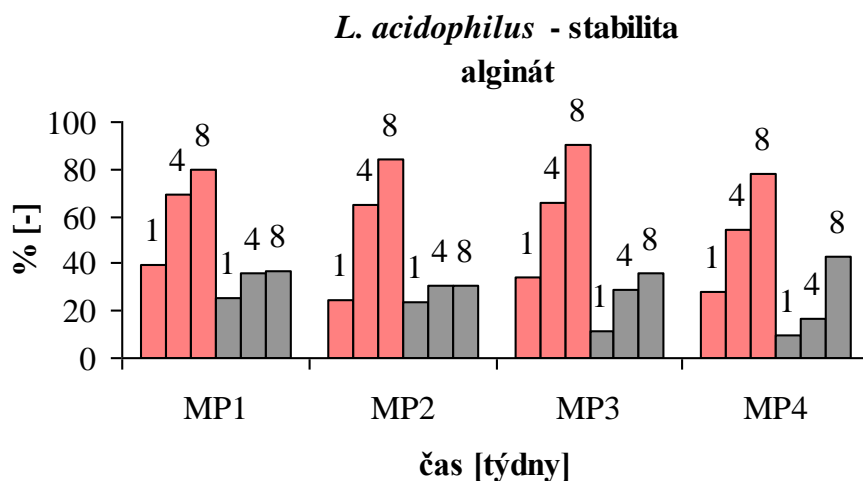
Tabulka 31: Dlouhodobá stabilita částic obsahujících probiotické kultury – nárůst výchozí počet – 100 % buněk v částici po zaenkapsulování

přírodní extrakt	obal	způsob enkaps.	nárůst buněk v částicích (počet/z toho mrtvé) [%]				
			modelová potravina				
			čas [týd]	MP1	MP2	MP3	MP4
<i>B. breve</i>	alginát	kapsule	1	89,5/11,2	87,3/15,6	91,3/12,6	79,5/9,0
			4	76,5/24,3	62,7/34,1	69,7/31,0	68,1/24,7
			8	56,6/36,0	52,0/52,9	59,7/51,3	64,3/50,0
<i>L. acidophilus</i>	alginát	matrix	1	39,6/25,6	24,7/23,3	34,2/11,8	27,7/9,6
			4	69,2/35,6	64,6/31,0	65,9/29,0	54,6/16,4
			8	80,0/36,5	84,6/30,9	90,7/35,6	78,4/43,1
	chitosan	matrix	1	22,5/20,0	19,9/18,9	28,6/24,6	34,3/29,4
			4	47,0/35,1	41,9/47,6	40,9/49,0	51,9/32,7
			8	64,9/60,0	56,9/36,8	50,9/68,3	58,9/55,9
směsná kultura	algin.+škrob 4:1 → do ethanolu	matrix	1	118,7/10,3	104,3/6,4	94,3/18,8	69,9/9,5
			4	117,8/25,0	101,7/24,2	109,6/22,1	78,5/26,7
			8	107,1/51,1	120,5/53,6	126,5/62,1	91,3/57,9
	algin.+škrob 4:1 → do vody	matrix	1	74,9/11,0	108,7/15,6	125,6/14,4	70,0/10,3
			4	96,8/23,3	103,1/20,6	104,6/19,2	64,2/34,0
			8	108,0/61,8	102,6/44,8	62,8/54,3	54,0/55,9
	alginát (bez média)	matrix	1	46,6/12,7	45,8/8,6	61,6/13,8	45,8/14,3
			4	17,8/16,0	24,1/32,2	19,3/27,2	16,4/24,0
			8	16,4/58,0	19,5/56,1	13,4/53,6	12,1/54,0
	chitosan (bez média)	matrix	1	15,7/9,3	11,6/15,0	11,0/15,8	12,2/16,7
			4	11,7/25,9	10,5/18,9	12,6/25,9	11,4/19,2
			8	10,5/65,7	10,3/67,8	9,5/56,2	9,1/58,2
	chitosan + agar	matrix	1	105,2/10,6	116,9/16,3	129,9/15,5	113,3/9,2
			4	111,9/39,7	134,4/29,7	141,8/17,3	125,4/20,5
			8	141,0/59,7	161,2/41,7	167,9/47,3	127,7/35,5

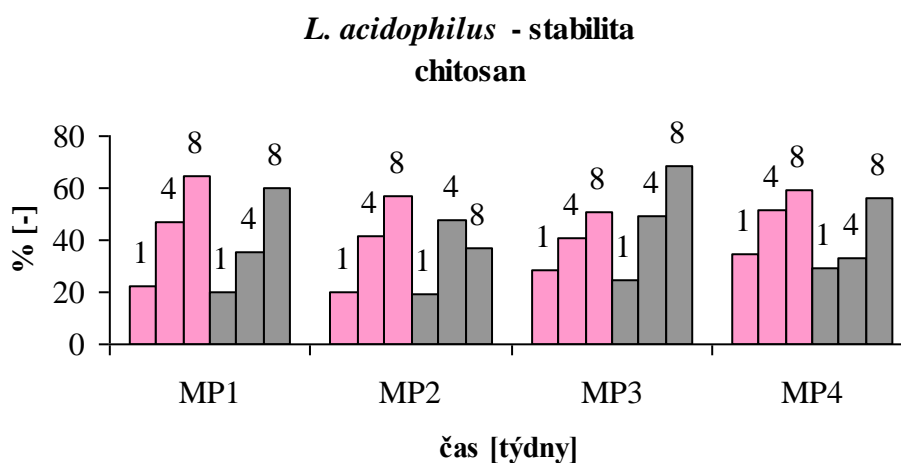
***B. breve* - stabilita alginát k.**



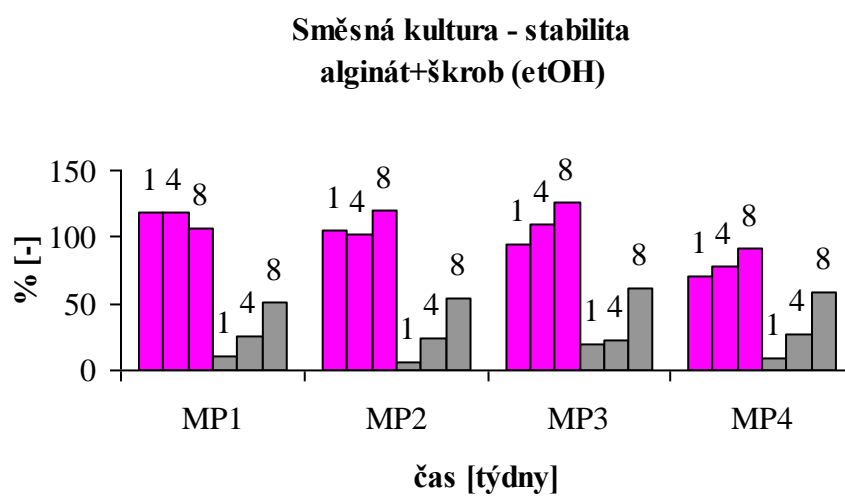
Graf 35: Stabilita částic obsahujících probiotické kultury – *B. breve* alginát kapsule



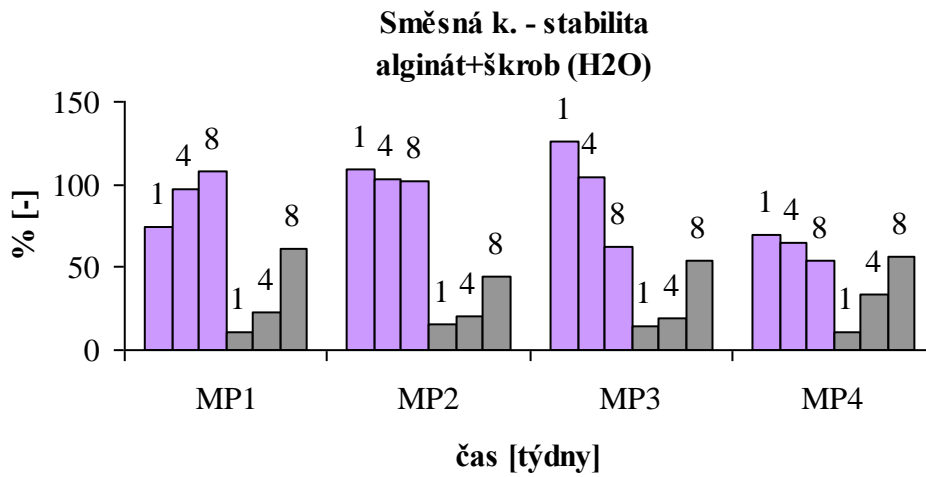
Graf 36: Stabilita částic obsahujících probiotické kultury – *L. acidophilus* alginát



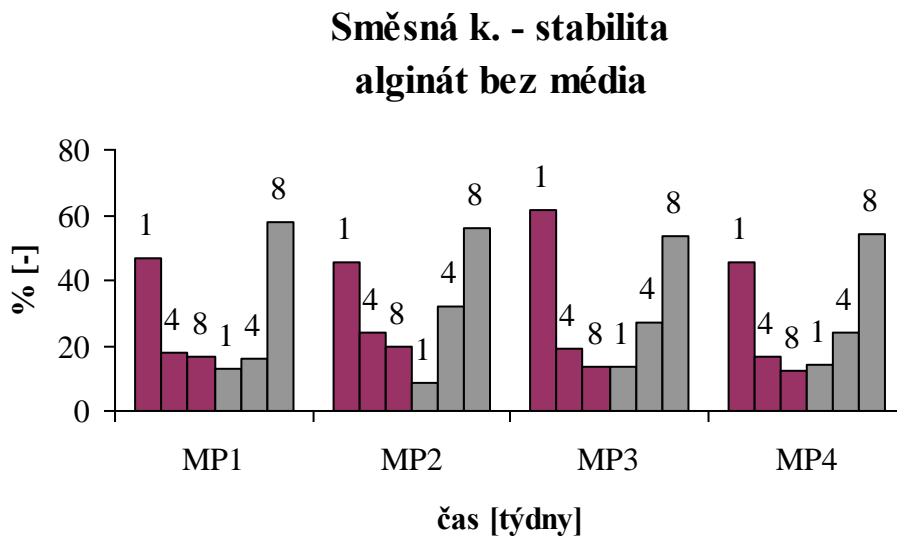
Graf 37: Stabilita částic obsahujících probiotické kultury – *L. acidophilus* chitosan



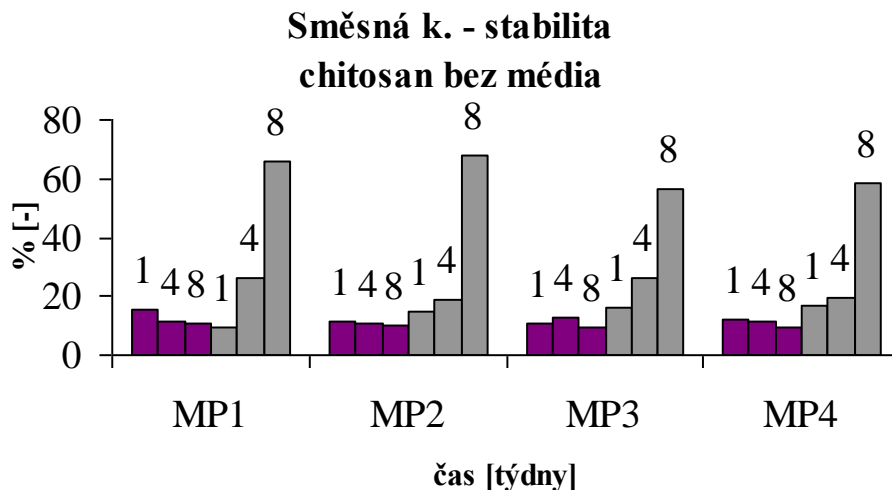
Graf 38: Stabilita částic obsahujících probiotické kultury – směsná kultura škrob-alginát (ethanolové srážení)



Graf 39: Stabilita částic obsahujících probiotické kultury – směsná kultura škrob-alginát (vodné srážení)

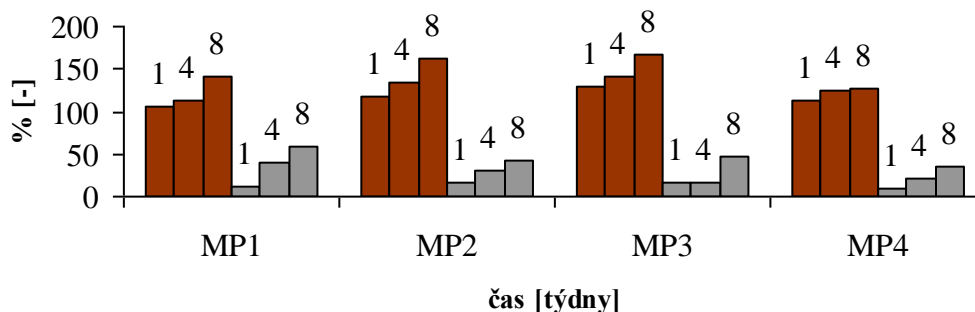


Graf 40: Stabilita částic obsahujících probiotické kultury – směsná kultura bez média, alginát



Graf 41: Stabilita částic obsahujících probiotické kultury – směsná kultura bez média, chitosan

## Směsná k. - stabilita chitosan + agar



Graf 42: Stabilita částic obsahujících probiotické kultury – směsná kultura, agar-chitosan

V případě enkapsulace *B. breve* do alginátu, typ částic kapsule, je patrný úbytek počtu mikroorganismů a zvyšující se podíl úmrtnosti (Tab.31, Graf 35). Jev může být způsoben nižší difúzí živin do středu částic, protože mikroorganismy nejsou dispergovány v celém objemu. Dalším faktorem může být vysoká výchozí koncentrace mikroorganismů, přičemž nedostatek přítomných živin způsobuje smrt. Nejnižší nárůst koncentrace mikroorganismů a tím i nejméně příznivé modelové prostředí představuje kyselá a alkoholická modelová potravina. Je tedy možné, že alginátový obalový materiál je porózní a umožňuje difúzi látek z prostředí. V případě modelových potravin šlo o jev nežádoucí; pro budoucí aplikaci do potravin reálných, např. mléčných potravin obsahujících živiny vhodné pro probiotické kultury, jde o jev žádaný.

V případě *L. acidophilus* v alginátu došlo k nárůstu počtu mikroorganismů; viabilita i koncentrace mikroorganismů byla vyšší oproti chitosanu (v 8. týdnu 78,4 až 80,0 % nárůst v alginátu oproti 50,9 až 64,9 % v chitosanu), kde byla identifikována vysoká úmrtnost (v 8. týdnu ve většině případů nadpoloviční podíl – 36,8; 55,9; 60,0 a 68,3 %). V případě alginátu bylo jako nejméně příznivé identifikováno kyselé prostředí, v případě chitosanu prostředí alkoholické (Grafy 36 a 37).

Na konci experimentu byla ověřována životnost enkapsulovaných buněk výsevem částic na pevná média; u alginátových částic byl výsledek pozitivní a na pevných médiích narostly kolonie, u chitosanových negativní.

V případě enkapsulace směsné kultury probiotik (Grafy 38-42). byl testován alginát se škrobem, chitosan s agarem; dále alginát a chitosan po odstředění buněk z média. V případě alginát-škrobových částic byla enkapsulace provedena srážením ethanolovým i vodným polymerizačním roztokem. Kromě rozdílné účinnosti bylo dále zjištěno, že vyšší přírůstek buněk je v prvním případě, kdy byl použit ethanolový roztok. Nižší účinnost enkapsulace vedla k nižší koncentraci buněk v částicích a tím byl vyšší poměr živin na jednotlivé buňky. Viabilita v částicích byla obdobná. V porovnání s alginátovými částicemi obsahujícími *L. acidophilus* v tomto případě byl vyšší nárůst buněk; škrob tedy vytváří příznivější prostředí pro buňky. Nejméně příznivé prostředí představovala tuková modelová potravina (MP4). V Příloze 19 je patrné, že u modelových potravin č. 3 a 4 došlo ke konci experimentu k úplnému rozpadu částic.

Analýzou částic získaných enkapsulací buněk bez média bylo zjištěno výrazně nižší množství buněk v částicích, a to z důvodu absence živného kultivačního média. V alginátovém obalu tento rozdíl byl průměrně 5,5násobný (Grafy 36 a 40). Tomu odpovídá i vysoká úmrtnost. Dostatečné množství buněk bylo zachováno pouze po dobu prvního týdne. Výsevem částic na pevná média po

skončení experimentu byla ovšem ověřena životnost buněk v těchto třech typech alginátových obalů, kdy okolo částice na pevném médiu došlo k nárůstu kolonie.

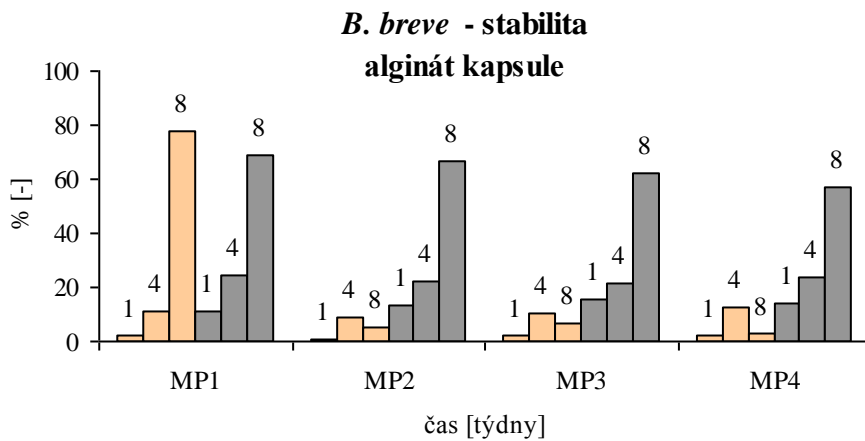
Vysoká úmrtnost a nízký počet buněk byl zjištěn v případě směsné kultury v chitosanu po odstředění buněk (Graf 41). Po prvním týdnu byl identifikován pokles koncentrace buněk; v prostředí neutrální a kyselé modelové potraviny (MP1, MP2) 1,4 a 1,7krát, v prostředí alkoholické a tukové modelové potraviny 2,6 a 2,8krát. Chitosan tedy lépe ochránil před kyselým prostředím modelové potraviny MP2. Oproti tomu v případě enkapsulace buněk do chitosanu a agaru s médiem byl identifikován značný nárůst buněk a nižší úmrtnost. Agar tedy zmírňuje nepříznivé prostředí chitosanu a může sloužit jako substrát pro buňky.

Výsev částic na pevné médium po skončení experimentu poskytl negativní výsledek o životnosti enkapsulovaných buněk. Chitosan tedy vystupuje jako méně vhodný obalový materiál pro enkapsulaci živých organismů. Je tedy možné, že buňky dokážou v určité míře využít i alginát, kdežto chitosan může působit mírně antimikrobiálně.

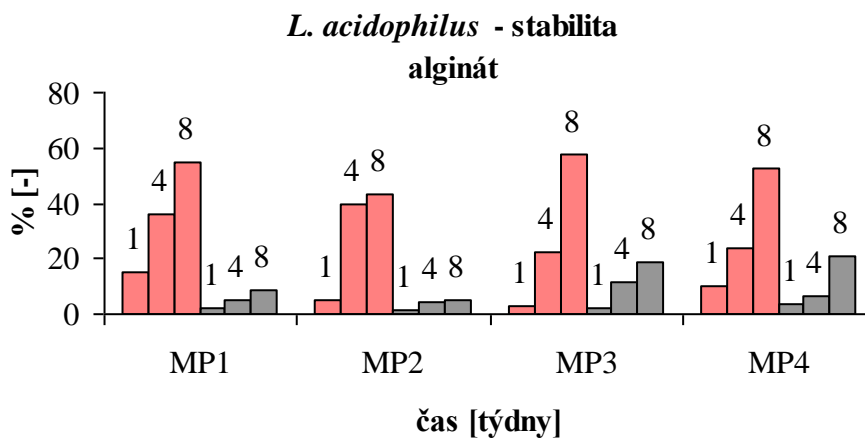
Tabulka 32: Dlouhodobá stabilita částic obsahujících probiotické kultury – uvolnění výchozí počet – 100 % buněk v částici po zaenkapsulování

přírodní extrakt	obal	způsob enkapsulace	uvolnění z částic do okolí (počet buněk/z toho mrtvé) [%]				
			šťáva				
			čas [týd]	MP1	MP2	MP3	MP4
<i>B. breve</i>	alginát	kapsule	1	2,1/11,2	1,0/13,6	1,9/15,4	2,0/14,4
			4	7,8/24,8	9,0/22,5	10,6/21,6	12,3/23,4
			8	11,2/69,2	5,0/66,4	6,9/62,5	2,7/57,1
<i>L. acidophilus</i>	chitosan	matrix	1	15,1/2,2	5,2/1,2	3,1/2,3	10,2/3,8
			4	36,1/5,0	39,5/4,2	22,3/11,6	24,1/6,5
			8	54,8/9,0	43,5/5,1	57,5/18,4	52,5/20,9
	alginát	matrix	1	ND*	ND*	ND*	ND*
			4	0,1/24,5	0,1/20,8	0,1/25,8	0,1/19,6
			8	0,3/55,1	0,2/52,9	0,2/76,7	0,2/66,7
probiotika	alginát + škrob 4:1 → do ethanolu	matrix	1	0,5/25,8	0,4/19,8	0,2/11,2	0,2/14,8
			4	0,6/31,0	0,6/36,2	0,3/19,5	0,4/26,1
			8	1,9/54,8	2,0/64,8	1,5/65,7	1,5/57,1
probiotika	alginát + škrob 4:1 → do vody	matrix	1	0,8/12,1	0,7/11,2	0,6/16,2	0,7/10,1
			4	1,0/16,5	1,1/16,5	0,9/23,5	1,1/12,1
			8	1,5/21,0	1,3/17,7	1,3/29,6	1,6/24,3
probiotika	alginát	matrix	1	0,2/15,5	0,1/13,4	0,1/12,3	0,1/11,8
			4	1,5/20,4	1,1/24,8	1,1/25,1	1,2/22,1
			8	0,9/46,7	0,1/57,7	0,2/57,9	0,2/58,3
probiotika	chitosan	matrix	1	ND*	ND*	ND*	ND*
			4	0,1/36,8	0,1/19,3	0,1/21,1	0,1/33,6
			8	0,1/52,9	0,1/22,7	0,3/42,6	0,3/68,7
probiotika	chitosan + agar	matrix	1	ND*	ND*	ND*	ND*
			4	0,2/25,5	0,1/32,5	0,1/10,2	0,1/20,1
			8	0,3/50,0	0,2/75,0	0,2/14,3	0,1/50,0

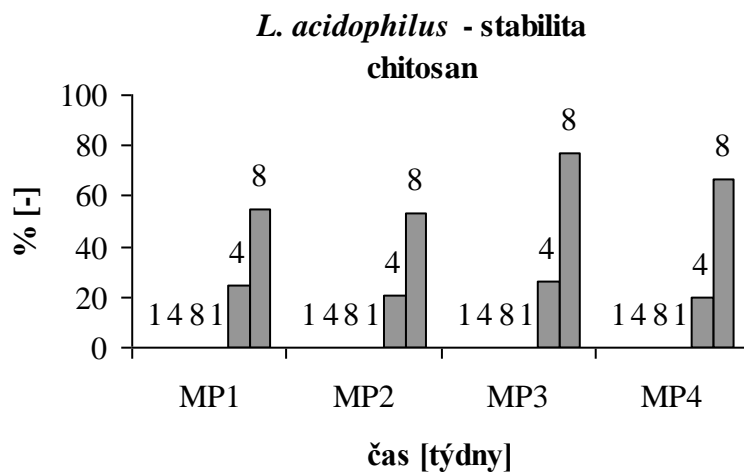
\* - nebylo detekováno



Graf 43: Stabilita částic obsahujících probiotické kultury, uvolnění – *B. breve* alginát kapsule

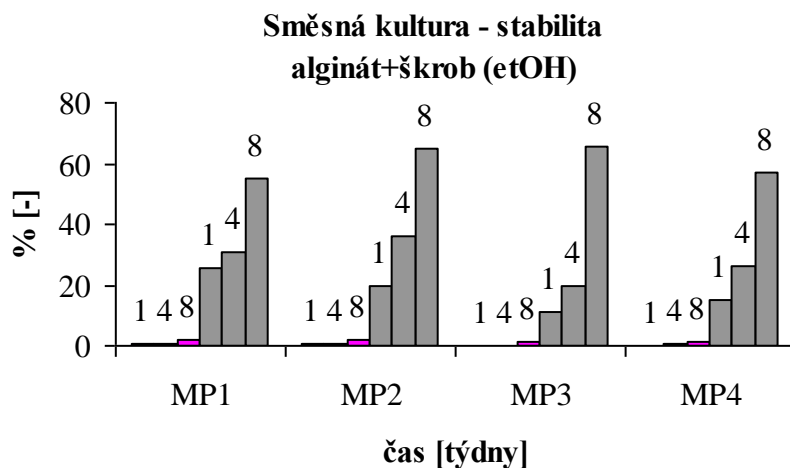


Graf 44: Stabilita částic obsahujících probiotické kultury, uvolnění – *L. acidophilus* alginát

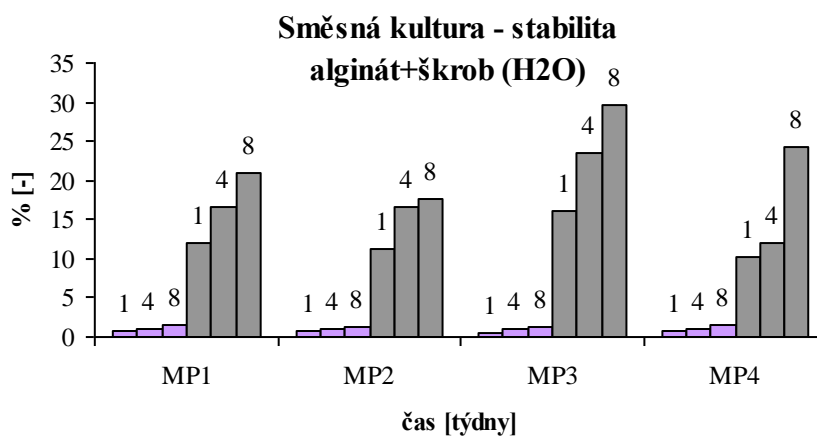


Graf 45: Stabilita částic obsahujících probiotické kultury, uvolnění – *L. acidophilus* chitosan

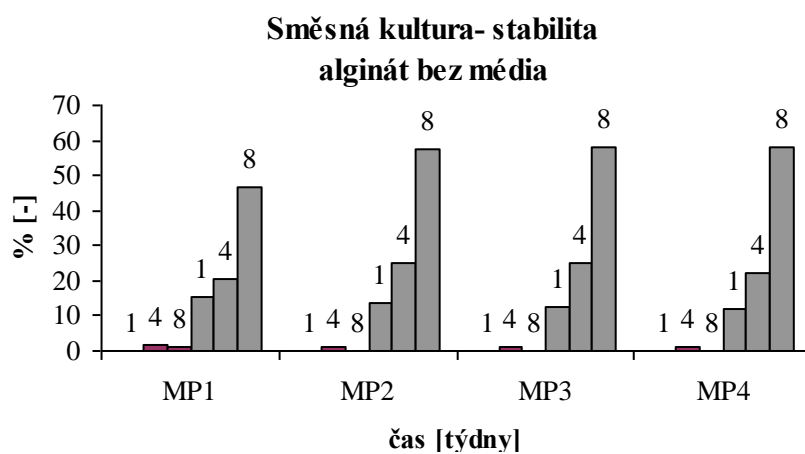




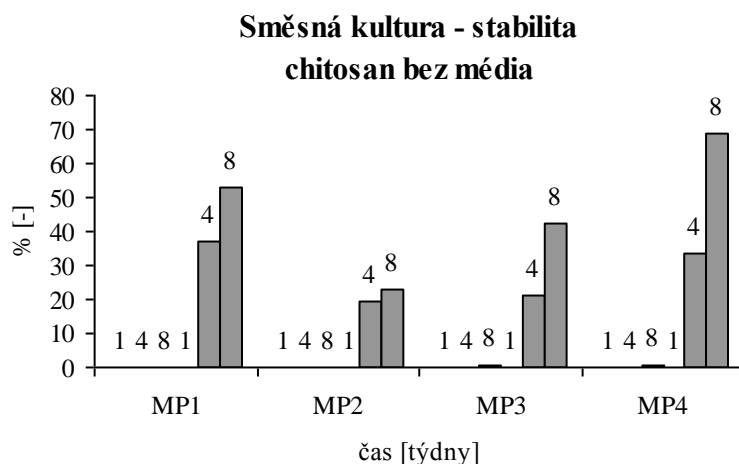
Graf 46: Stabilita částic obsahujících probiotické kultury, uvolnění – směsná kultura škrob-alginát (ethanolové srážení)



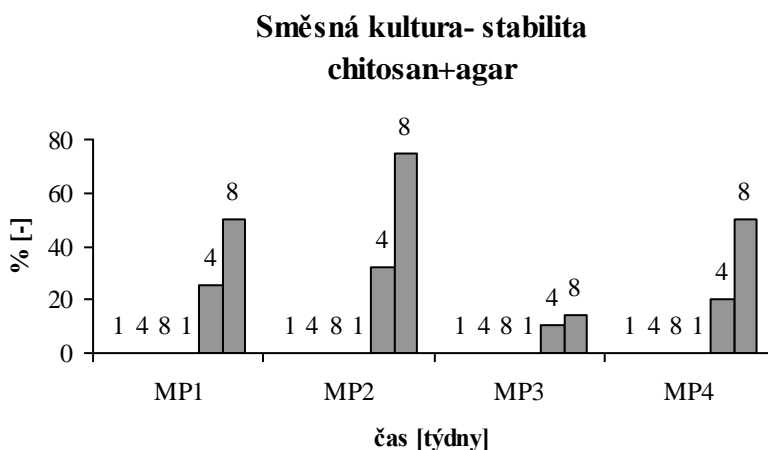
Graf 47: Stabilita částic obsahujících probiotické kultury, uvolnění – směsná kultura škrob-alginát (vodné srážení)



Graf 48: Stabilita částic obsahujících probiotické kultury, uvolnění – směsná kultura bez média alginát



Graf 49: Stabilita částic obsahujících probiotické kultury, uvolnění – směsná kultura bez média, chitosan



Graf 50: Stabilita částic obsahujících probiotické kultury, uvolnění – směsná kultura agar-chitosan

Uvolnění buněk do okolí bylo zcela minimální, a to do 1 až 2 % (Tab.32). Výjimku představoval *L. acidophilus* enkapsulovaný do alginátu, kdy došlo k výraznému uvolnění buněk od 43,5 až 52,5 % v 8. týdnu, přičemž úmrtnost byla minimální (do 10 % v neutrální a kyselé modelové potravine, okolo 20 % v alkoholické a tukové modelové potravine). Alginát v tomto případě nejspíš vystupuje jako substrát (Graf 44). Ochrana částic je ovšem nedostatečná, protože došlo k maximálnímu uvolnění buněk oproti ostatním případům. Detekovatelné množství uvolněných buněk nastalo i u *B. breve* v typu částic kapsule. V tomto případě byla identifikována vyšší úmrtnost buněk uvolněných do prostředí (Graf 43). Je možné, že faktorem mohl být i typ kapsule, kdy buňky v jádře neměly dostatek živin a po uvolnění do prostředí velmi brzy zahynuly. Vysoká úmrtnost byla identifikována rovněž u chitosanových částic obsahujících *L. acidophilus*, tedy 52,9 až 76,7 %. Tento jev jen doplňuje výše zmíněné úvahy o nízké kompatibilitě chitosanu pro úchovu buněk. Množství uvolněných buněk bylo ovšem minimální, 0,2 až 0,3 %. Je možné, že nízké hodnoty korespondují s vysokou úmrtností v částici a nízkým počtem přítomných viabilních buněk, které by byly schopné pohybu z částice ven (Graf 45).

U směsných kultur enkapsulovaných do škrob-alginátových částic byl zjištěn výrazní rozdíl mezi počtem mrtvých buněk uvolněných do prostředí, a to přibližně dvojnásobný v případě částic srážených ethanolickým roztokem (Grafy 46, 47).. Největší počet mrtvých buněk byl identifikován u kyselé a

alkoholické modelové potraviny (MP2 a MP3). Počet mrtvých uvolněných buněk byl v případě alginátových částic bez média přibližně srovnatelný se škrob-alginátovými částicemi sráženými ethanolickým roztokem. I zde byl nejvyšší počet mrtvých buněk identifikován v MP2 a MP3 (Grafy 46, 47 a 48).

V případě chitosanových obalových materiálů lze u bezmediových částic úmrtnost uvolněných buněk nejnižší v případě kyselé modelové potraviny (22,7 %), nejvyšší u tukové modelové potraviny (68,7 %). V prvním případě může mít vliv stabilita chitosanu v kyselém prostředí, kdy nedocházelo k narušení obalového materiálu. Přídavek agaru k chitosanu neovlivnil míru uvolnění buněk, neboť je zde patrný vliv modelových potravin. V prvním případě největší podíl mrtvých buněk byl identifikován u MP4, v druhém případě u MP2 (Graf 49).

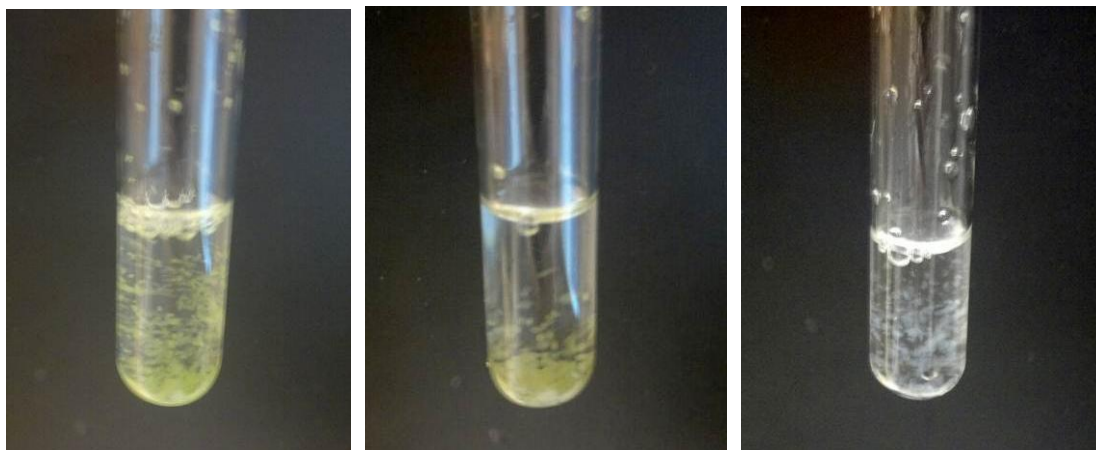
Je možné, že výrazný podíl mrtvých buněk je výsledkem nedostatku živin v modelových potravinách, do kterých se buňky uvolňovaly.

Aplikace částic obsahující probiotika je možná do široké skupiny mléčných výrobků; nejen z důvodu ochrany částic před účinky technologických kroků, ale stejně tak částice umožňuje dostatečný nárůst buněk a ochranu před převahou startovacích kultur. Dále bylo zjištěno, že částice poskytují i dostatečnou ochranu před účinky žaludeční šťávy. Enkapsulace dále rozšiřuje pole aplikace i mimo mléčné výrobky; do úvahy připadají různé ovocné šťávy, vitaminové sirupy, speciální přípravky pro post-antibiotické rekonvalescenty atd.

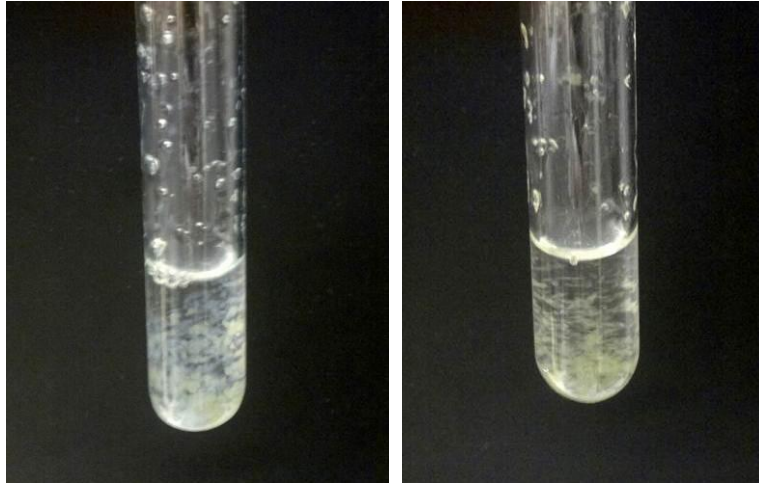
### 5.3.5 Stabilita v reálných potravinách

Stabilita vybraných částic byla zkoumána rovněž v prostředí reálných potravin. Jako reprezentant skupiny mléčných výrobků bylo zvoleno mléko, mléčný nápoj a dva druhy jogurtu, jak je podrobně uvedeno v kapitole 4.6.4. Přesné složení a druh částic je uveden v Tab.12. Stabilita byla sledována v období 4 týdnů.

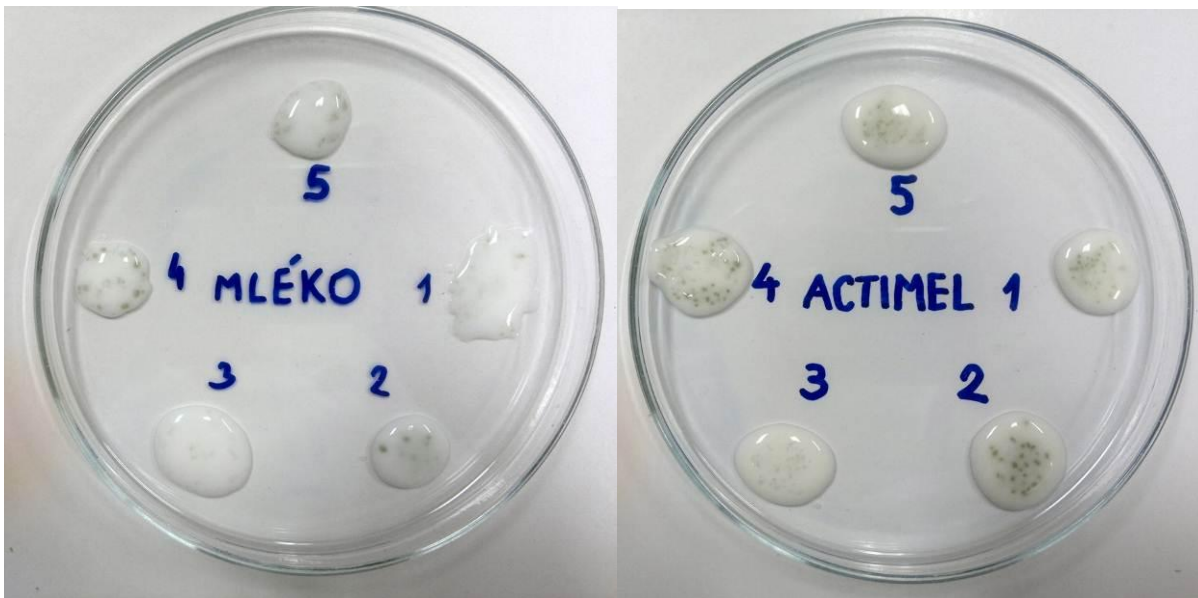
Stabilita a tedy množství uvolněných složek byla stanovena pomocí sledování obsahu polyfenolů, bílkovin, a počtu a viability mikroorganismů. Výsledky zobrazuje Tab.33 a Grafy 51 až 60. Viabilita buněk v částicích obsahující probiotické kultury ve 4. týdnu byla zjišťována pomocí fluorescenčního mikroskopu a je uvedena v Příloze 20 až 43. Postup je uveden v kapitole 4.6.6.



Obrázek 55 až 57: Částice typ 1 – čerstvý ječmen, typ 2 – práškový ječmen a typ 3 - probiotika



Obrázek 58 a 59: Částice typ 4 – směs částic 2. a 3. a typ 5 – ko-enkapsulát 2. a 3.



Obrázek 60 a 61: Vybrané částice aplikované do reálných potravin



Obrázek 62 a 63: Vybrané částice aplikované do reálných potravin

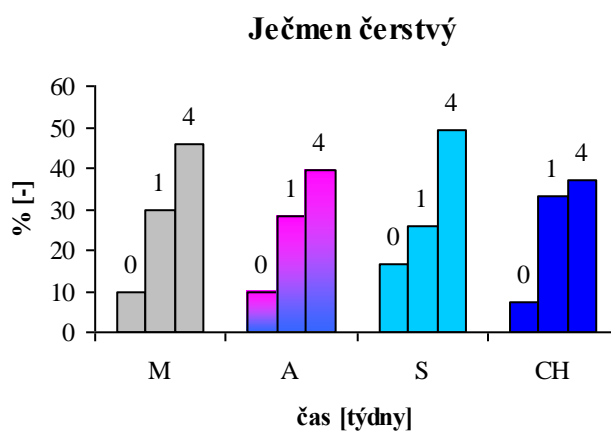
Tabulka 33: Dlouhodobá stabilita částic v reálných potravinách. Typ částic alginát matrix

	přírodní extrakt	množství uvolněného obsahu polyfenoly [%]				
		čas [týdny]	reálná potravina			
			M	A	S	CH
1.	ječmen čerstvý	0	9,8	10,0	16,7	7,1
		1	29,7	28,2	25,7	33,1
		4	45,8	39,7	49,3	37,0
2.	ječmen práškový	0	15,3	6,6	4,3	12,6
		1	26,0	19,5	8,2	16,9
		4	32,5	26,3	21,7	30,7
4.	směs částic 2. a 3.	0	8,7	2,6	4,2	9,8
		1	23,5	17,4	13,5	15,5
		4	49,0	29,9	25,3	30,5
5.	ko-enkapsulát ječmen práškový a probiotika	0	14,7	11,0	9,6	16,3
		1	26,0	22,0	19,2	18,7
		4	33,5	26,1	25,4	23,1

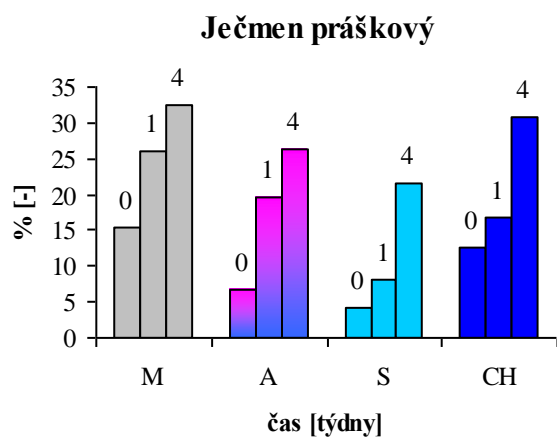
částice č. 3 obsahující probiotika jsou uvedeny v Tab.34, použity byly techniky mikroskopie

Tabulka 34: Dlouhodobá stabilita v reálných potravinách – částice obsahující probiotika (typ 3-5) výchozí počet – 100 % buněk v částici po zaenkapsulování

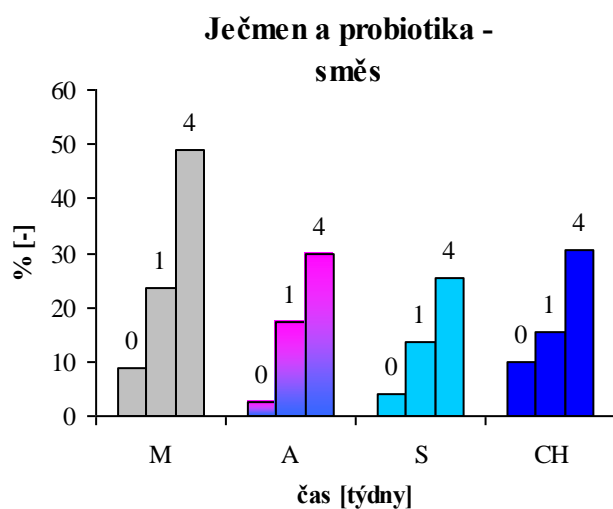
	nárůst MO v částicích (počet buněk/z toho mrtvé) [%]				uvolnění MO do okolí (počet buněk/z toho mrtvé) [%]					
	čas [týd]	reálná potravina				čas [týd]	reálná potravina			
		M	A	S	CH		M	A	S	CH
3.	1	69,2/15,3	44,6/18,7	50,0/19,4	37,0/24,5	1	7,9/0,0	2,4/2,9	1,7/4,6	4,7/5,2
	4	68,8/21,5	27,8/22,4	25,6/23,9	33,0/37,9	4	12,6/0,0	4,6/4,0	4,1/6,3	10,6/7,2
4.	1	28,8/15,6	38,3/11,3	26,4/15,8	50,9/9,7	1	11,9/0,9	36,4/13,7	1,8/6,3	4,4/4,8
	4	48,3/29,4	67,6/25,2	49,4/25,3	80,1/17,0	4	15,2/2,2	53,2/20,7	3,2/13,3	9,5/11,1
5.	1	31,7/14,6	25,5/28,9	27,6/19,5	21,5/20,6	1	17,7/4,5	21,9/5,5	3,8/3,7	8,6/8,4
	4	54,6/20,8	31,8/46,4	42,1/27,0	34,1/26,7	4	27,2/9,6	36,3/11,8	5,7/7,1	13,5/15,2



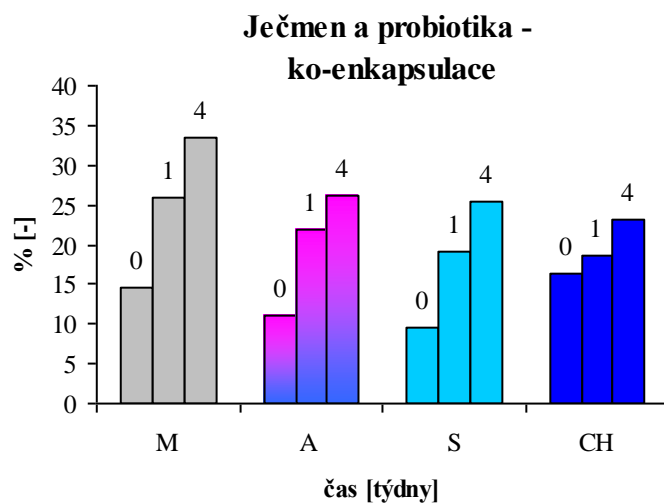
Graf 51: Stabilita částic v reálných potravinách – částice typu 1



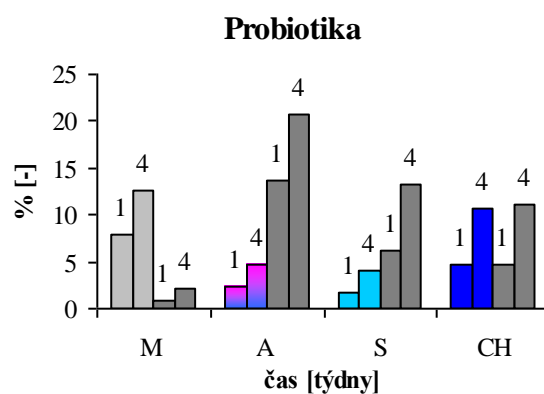
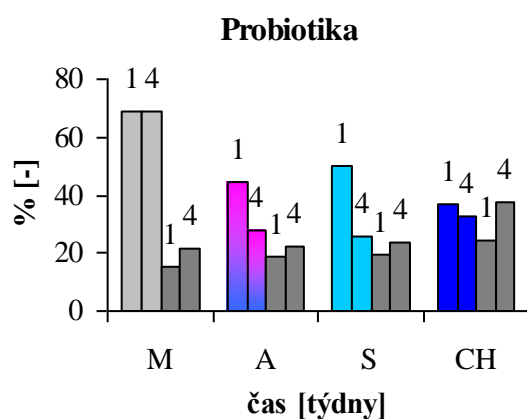
Graf 52: Stabilita částic v reálných potravinách – částice typu 2



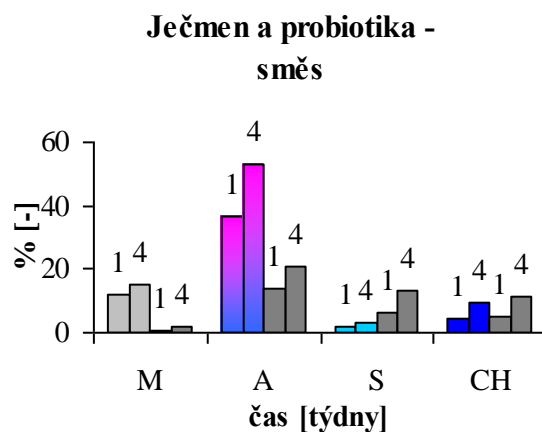
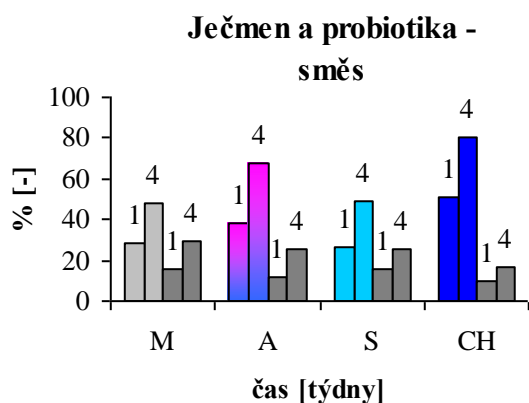
Graf 53: Stabilita částic v reálných potravinách – částice typu 4



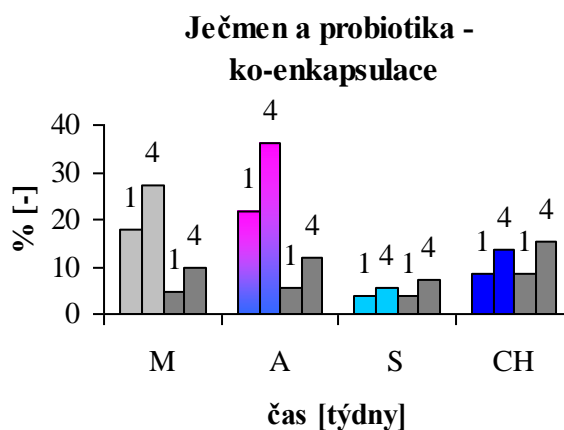
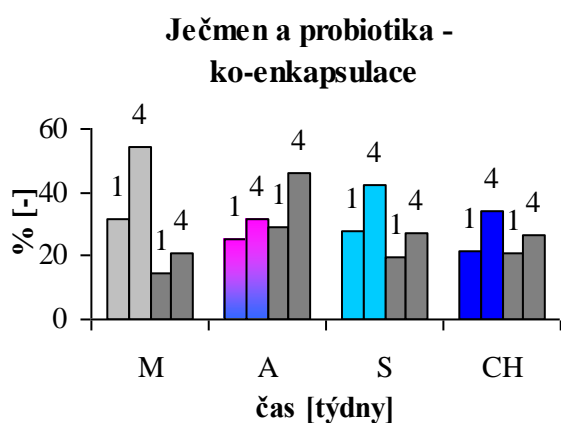
Graf 54: Stabilita částic v reálných potravinách – částice typu 5



Graf 55 a 56: Stabilita částic v reálných potravinách: nárůst v částicích a uvolnění – částice, typ 3



Graf 57 a 58: Stabilita částic v reálných potravinách: nárůst v částicích a uvolnění – částice, typ 4



Graf 59 a 60: Stabilita částic v reálných potravinách: nárůst v částicích a uvolnění – částice typ 5

Stabilita vybraných částic v reálných potravinách skupiny mléčných výrobků byla sledována po dobu 4 týdnů (Tab.33, 34). Nejméně stabilním druhem částic ve všech typech reálných potravin byl stanoven čerstvý ječmen (č. 1, Graf 51).

Srovnáním částic 4 a 5, kdy v případě 4 byly smíchány částice obsahující práškový ječmen a probiotika (Graf 53) a v případě 5 byly tyto extrakty smíchány a koenkapsulovány (Graf 54), je patrné, že v případě částic č. 5 došlo k většímu uvolnění obsahu částic, než tomu bylo v případě částic pouze smíchaných.

Částice č. 1 (čerstvý ječmen) byly nejvíce stabilní v Choceňském smetanovém jogurtu. Ostatní částice vykazovaly nejvyšší stabilitu v Selském jogurtu. Částice obsahující probiotické kultury byly dále analyzovány pomocí mikroskopických metod. Bylo stanoveno množství a životnost buněk v částicích a v okolním prostředí v 1. a 4. týdnu (Tab.34).

Probiotika, tedy 3. typ částic, vykazovala nejvyšší nárůst a viabilitu v přítomnosti mléka (Graf 55, 56). Jev je způsoben dostatkem živin v mléce obsažených, které difundují do částice. U ostatních typů částic byl ve 4. týdnu zaznamenán pokles počtu buněk v částicích, stejně jako nižší viabilita. Nejvyšší úmrtnost byla identifikována u Choceňského smetanového jogurtu. Co se týče množství uvolněných částic, vyšší hodnoty byly zjištěny u mléka, nízký počet uvolněných buněk a výrazná úmrtnost byla zjištěna u jogurtového nápoje Actimel. Je možné, že vysoká úmrtnost byla způsobena vysokým množstvím buněk a nedostatkem vhodných živin (Graf 55, 56)

V případě směsi částic s probiotiky a práškovým ječmenem byla obecně nižší stabilita identifikována v případě jogurtového nápoje Actimel. Minimální uvolnění a úmrtnost byla stanovena v Selském jogurtu, maximální naopak v jogurtovém nápoji Actimel (Graf 57, 58)

Společnou enkapsulací probiotik a ječmene do částic a jejich aplikací do potravin byla zjištěna nejvyšší úmrtnost v případě jogurtového nápoje Actimel, nejnižší úmrtnost v mléce; v ostatních druzích potravin byla úmrtnost jen mírně vyšší. Stejně jako v předchozím případě bylo v případě uvolnění buněk do okolí zjištěno nejvyšší uvolnění a úmrtnost v případě jogurtového nápoje Actimel. Nejnižší uvolněné bylo zjištěno u Selského jogurtu (Graf 59, 60)

V Příloze 20 až 43 až jsou zobrazeny snímky z fluorescenčního mikroskopu. Pomocí barvení částic fluoresceindiacetátem a propidiumodidem byla ověřena viabilita a koncentrace buněk. Je patrné, že i po 4 týdnech je zachována vyhovující viabilita; alginátový obalový materiál vykazuje porozitu a možnost difúze živin dovnitř částic. Stejně tak je patrné, že směsí či koenkapsulací ječmene nedošlo k ovlivnění viability buněk; ve druhém případě byla zjištěna pouze nižší koncentrace buněk.

### 5.3.6 Stanovení velikosti a stability lipozomových částic

Velikost a stabilita lipozomových částic byla zjištěna pomocí přístroje Zetasizer Nano od firmy Malvern Instruments Ltd.

Metoda zjištění velikosti částic je založena na rozptylu světla, tzv. DLS (dynamický rozptyl světla, Dynamic Light Scattering). Procházející paprsek je rozptylován pohybem částic, přičemž platí závislost, kdy s menším průměrem částic roste rychlost pohybu a tím i rychlost rozptylu paprsku.

Stabilita částic se vyjadřuje pomocí zeta potenciálu; pokud hodnota leží mimo interval  $\langle -30; 30 \rangle$  mV, je možné o částici říci, že je stabilní (v dostatečné míře dochází k odpuzování částic).

Tabulka 35: Velikost lipozomů obsahujících propolis v rámci dlouhodobé stability

způsob enkapsulace	čas [týdny]	velikost [nm]				
		částice	modelová potravina			
			MP1	MP2	MP3	MP4
ultrazvuk	0	147,0	361,3	167,2	274,1	300,8
	4		371,5	450,3	243,0	721,1
ethanolové vstříkování	0	168,0	280,2	379,9	274,2	255,1
	4		450,3	1589,0	470,1	628,8



Velikost lipozomů se pohybovala okolo hranice 150 nm, tedy 147,0 nm pro částice připravené ultrazvukovou sondou a 168,0 nm pro částice vytvořené ethanolovým vstříkáním. Po aplikaci do modelových potravin bylo u ultrazvukových částic zjištěno, že se velikost zvýšila na 167,2 až 361,3 nm, a to nejméně v kyselém modelové potraviny a nejvíce v neutrální modelové potraviny. Tento fakt koresponduje s výsledky dlouhodobé stability uvedené v Tab.22 a 23, kdy nejvyšší stabilita byla zjištěna vedle tukové modelové potraviny i kyselém modelové potraviny a nejnižší stabilita naopak z neutrální modelové potraviny. Je tedy patrné, že existuje vztah mezi změnou velikosti částic a jejich stabilitou. Remodelingem membrány a spojováním částic dochází ke ztrátám obsahu lipozomů, nejméně vhodné prostředí pro ultrazvukové lipozomy je tedy kyselém prostředí.

Obdobný trend je patrný u druhého typu lipozomových částic připravených ethanolovým vstříkáním. Po vložení částic do modelových potravin byla velikost postupně změněna na 255,1 až 379,9 nm, přičemž minimum bylo pozorováno v tukové modelové potraviny a maximum v kyselém modelové potraviny. Srovnáním výsledků stability v Tab.22 a 23 se potvrzuje fakt, že zvětšování velikosti částic souvisí s nízkou stabilitou. Pro částice připravené ethanolovým vstříkáním je tedy nejvhodnější tukové prostředí.

Nelze ovšem vyloučit, že variace rozměrů částic v závislosti na prostředí mohla být způsobena širokou distribucí vytvořených lipozomů, kdy při dávkování do jednotlivých potravin se lišila průměrná velikost odebírané frakce.

Velikost částic se po 4 týdnech změnila; ve většině případů došlo ke zvětšení. K největším změnám došlo v modelovém kyselém prostředí (zvětšení z 167,2 na 450,3 nm pro první typ a z 379,9 na 1589,0 nm pro druhý typ lipozomů), nejméně intenzivní shlukování bylo zaznamenáno a v roztoku ethanolu (89 % pro první typ lipozomů) a v destilované vodě (161 % pro druhý typ lipozomů); u částic vytvořených ultrazvukem došlo dokonce k poklesu velikosti.

Příčinou může být aglomerace částic v důsledku nízké stability částic, o čem vypovídá i následující Tab.36

Tabulka 36: Stabilita lipozomů obsahujících propolis v rámci dlouhodobé stability

způsob enkapsulace	čas [týdny]	zeta potenciál [mV]				
		částice	modelová potravina			
			MP1	MP2	MP3	MP4
ultrazvuk	0	-36,2	12,0	12,8	-21,1	20,2
	4		-26,7	-18,4	-31,6	-32,4
ethanolové vstříkání	0	-28,8	-28,0	28,5	-14,5	-24,6
	4		-32,8	-10,3	-32,8	-28,6

U lipozomových částic byla analyzována také jejich stabilita. Vytvořené částice se pohybovaly na hranici nestability, která je definována intervalem  $\langle -30; 30 \rangle$  mV, přičemž vyšší stabilita byla prokázána u částic vytvořených pomocí ultrazvuku (-36,2; resp. -28,8 mV). V jednotlivých modelových prostředích došlo ke změně stability; tato změna byla ovlivněna i způsobem přípravy částic. U ultrazvukových částic největší změna byla identifikována přidáním do tukové modelové potraviny (změna o 56,4 mV), u druhého typu částic u kyselém modelové potraviny nastala změna o 57,3 mV (Tab.36).

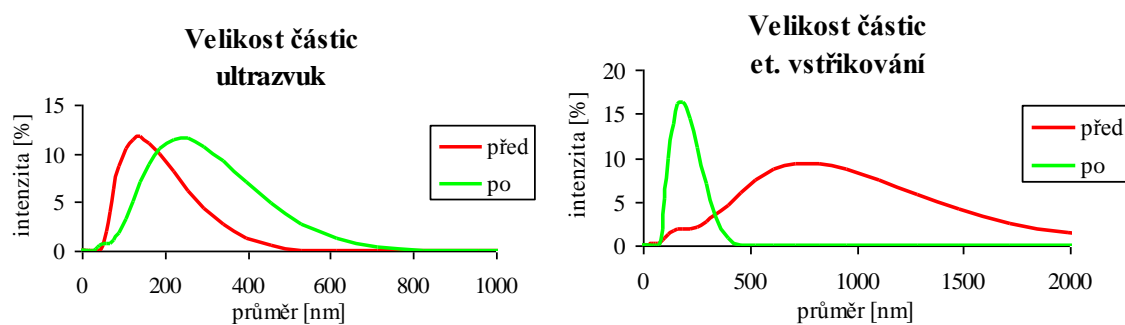
U ultrazvukových částic došlo k nejmenší změně stability po přidání do alkoholových modelových potravin (o 15,1 mV). V ostatních případech došlo k nárůstu zeta potenciálu do kladných hodnot; hranice nestability ovšem překročena nebyla. Důvodem mohou být interakce s prostředím, které se liší svým pH. Po 4 týdnech uchování lipozomů se stabilita přiblížila původní hodnotě samotných částic, tzn -36,2 mV. Je možné, že aglomerací částic, kdy došlo k zvětšení jejich rozměrů, došlo i ke zvýšení stability částic.

V případě metody ethanolového vstřikování rovněž došlo k ovlivnění stability po přidání do modelových potravin, nejmenší vliv měla destilovaná voda (MP1), největší roztok kyseliny octové (MP2). Jev souvisí pH prostředím a množství kladných a záporných nábojů, které ovlivňují náboj částice. Po 4 týdnech byla stabilita zvýšena, resp. poklesla do záporných hodnot, jak je tomu v případě zmíněné kyseliny octové.

Existuje souvislost mezi změnou velikosti při dlouhodobé stabilitě, jež je uvedena v Tab.35 a hodnotou zeta potenciálu (Tab.36). U obou typů lipozomů k maximálnímu zvětšení v kyselé modelové potravine, čemuž odpovídá i nejmenší zeta potenciál (−18,4 a −10,3 mV). Malé změny zeta potenciálu souvisely i s nejmenší změnou velikosti částic (o 10,5 mV v MP3 pro první typ a o 4,8 MP1 pro druhý typ částic).

Tabulka 37: Velikost a stabilita lipozomů obsahujících propolis po použití membránového extrudéru

způsob enkapsulace	použití extrudéru	velikost [nm]	zeta potenciál [mV]
		částice	
ultrazvuk	před	134,1	−27,4
	po	196,8	−30,2
ethanolové vstřikování	před	570,4	−30,0
	po	172,7	−27,6



Graf 61 a 62: Velikost lipozomů před a po použití lipozomátoru

Liposomy byly připraveny a použity z důvodu srovnání možností enkapsulace studovaných komplexních extraktů nejen do mikročástic na enkapsulátoru, ale i do nanočástic. Liposomy byly připraveny manuálně dvěma různými postupy a velikost částic byla natolik malá, že bylo možné aplikovat přístrojové metody na analýzu velikosti a stability částic (DLS).

Vzhledem k tomu, že vytvořené lipozomové částice přesahovaly rozměry 100 nm (viz Tab.35), byl pro úpravu velikosti použit membránový extrudér s polykarbonátovou membránou s rozměry pórů 100 nm. Výsledná velikost částic se u prvního typu (ultrazvuková homogenizace) zvětšila. U druhého typu došlo sice ke snížení velikosti lipozomů, ale nikoliv na rozměry pórů membrány (Grafy 61, 62). Stabilita částic byla extruzí ovlivněna jen nepatrně. Jev je možné vysvětlit tak, že liposomy jsou fluidní útvary, které při extruzi flexibilně mění svůj tvar a není možné modulovat jejich velikost na požadované rozměry. Pro přípravu nanočástic bych navrhovala jinou metodu, alternativně s použitím jiných organických rozpouštědel, včetně optimalizace složek obalového materiálu.

## 5.4 Optimalizace množství biomasy pro enkapsulaci

Vzhledem k tomu, že v případě probiotik je součástí extraktu i kultivační médium, je nutné uvažovat jeho vliv na potravinu. Je třeba zvážit nezbytnost přítomnosti média, stejně jako schopnost

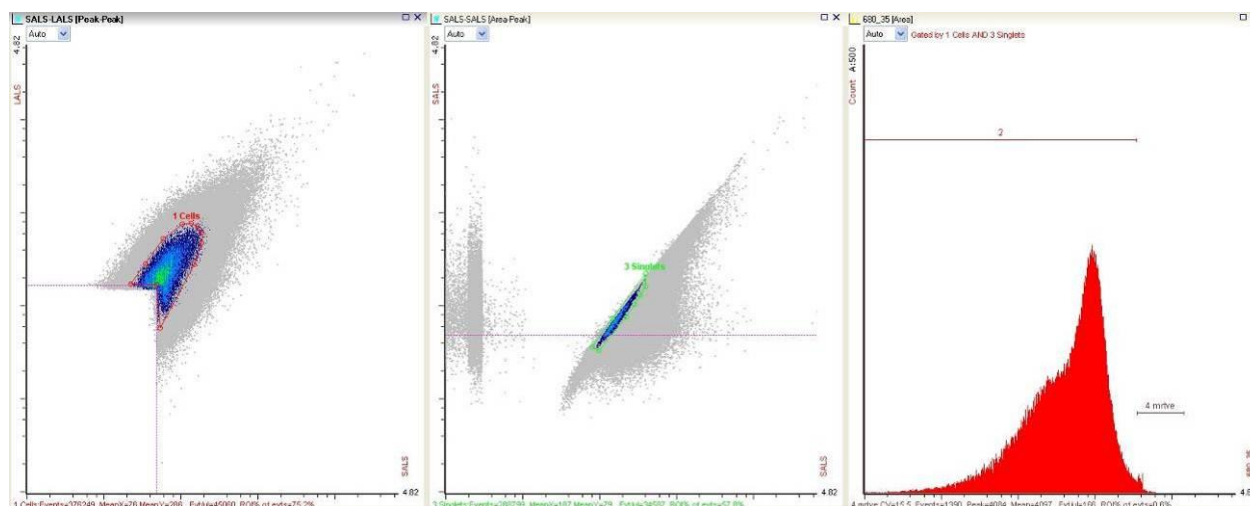
růstu a viabilitu probiotik. Z toho důvodu byla provedena studie, která sledovala vliv výchozí koncentrace buněk v médiu, stejně jako vliv přítomnosti a nepřítomnosti média na počet a viabilitu enkapsulovaných probiotik.

Byly provedeny dva optimalizační experimenty – v prvním případě byly enkapsulovány buňky s médiem, v druhém případě bylo médium odstředěno a byla použita peletka biomasy, která byla resuspendována v gelu. Oba způsoby byly připraveny z kultur zředěných 2krát, 10krát, 50krát a 100krát. Po dobu 22 dní byla sledována míra uvolnění buněk, jejich počet a viabilita v částicích. Způsob enkapsulace je popsán v kapitole 4.5.2.

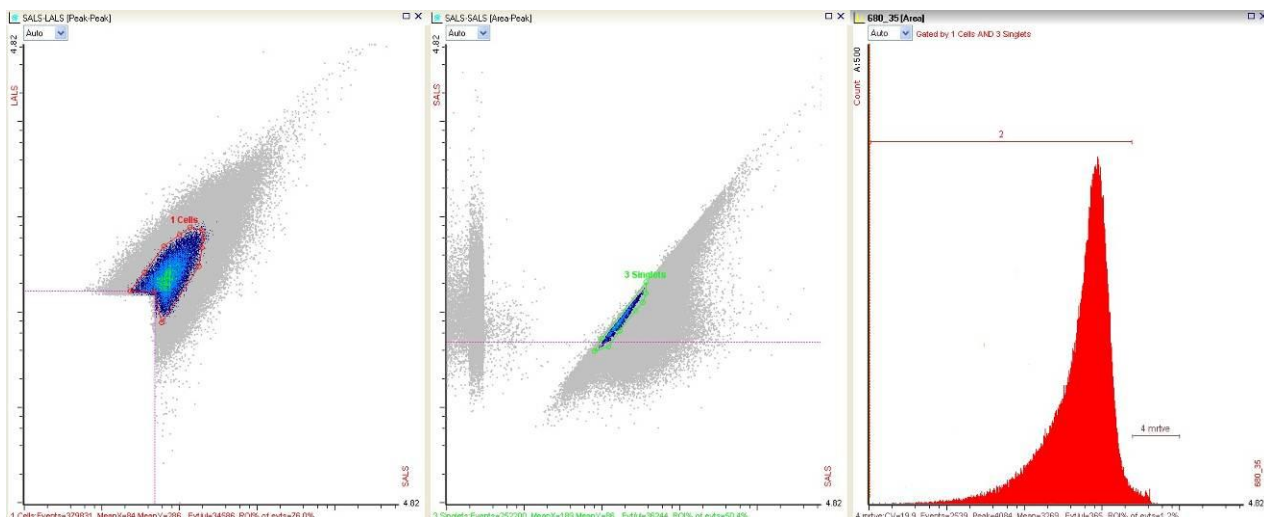
Tabulka 38: Výchozí koncentrace určené k enkapsulaci

počet·ml <sup>-1</sup> média		podíl mrtvých buněk [%]	počet· ml <sup>-1</sup> média			
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. breve</i>		koncentrace směsné kultury po zředění			
			2krát	10krát	50krát	100krát
4,63·10 <sup>8</sup>	3,86·10 <sup>8</sup>	3	2,12·10 <sup>8</sup>	4,24·10 <sup>7</sup>	8,49·10 <sup>6</sup>	4,24·10 <sup>6</sup>

V Tab.38 je zobrazen výchozí počet buněk u kultur *L. acidophilus* a *B. breve*, údaje byly zjištěny pomocí průtokového cytometru. Data jsou uvedena na Obr.64 a 65.



Obrázek 63: Počet buněk a viabilita u *L. acidophilus*. 24hodinová kultura, inkubace v MRS médiu při 37 °C. Pro analýzu pomocí fluorescenčního mikroskopu byla odebrána suspenze buněk a 10krát zředěna destilovanou vodou. Barvení propidiumjodidem v množství 5 μl·ml<sup>-1</sup> bylo prováděno 20 minut ve tmě. (4.3.3 a 4.6.6.3).

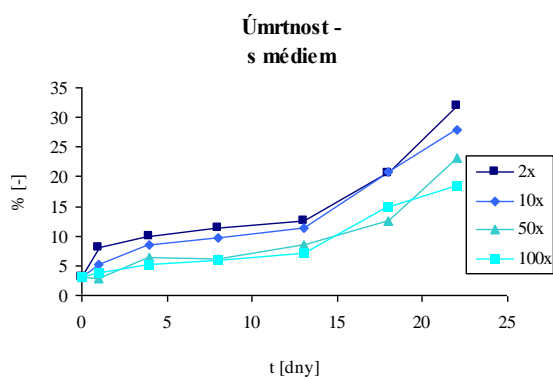
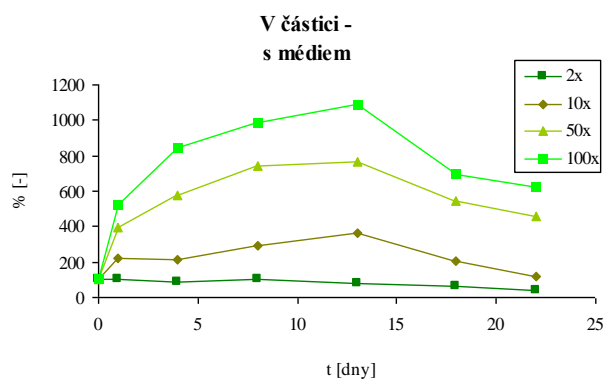


Obrázek 64: Počet buněk a viabilita u *B. breve* 24hodinová kultura, inkubace v MRS médiu při 37 °C. Pro analýzu pomocí fluorescenčního mikroskopu byla odebrána suspenze buněk a 10krát zředěna destilovanou vodou. Barvení propidiumjodidem v množství  $5 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$  bylo prováděno 20 minut ve tmě. (4.3.3 a 4.6.6.3).

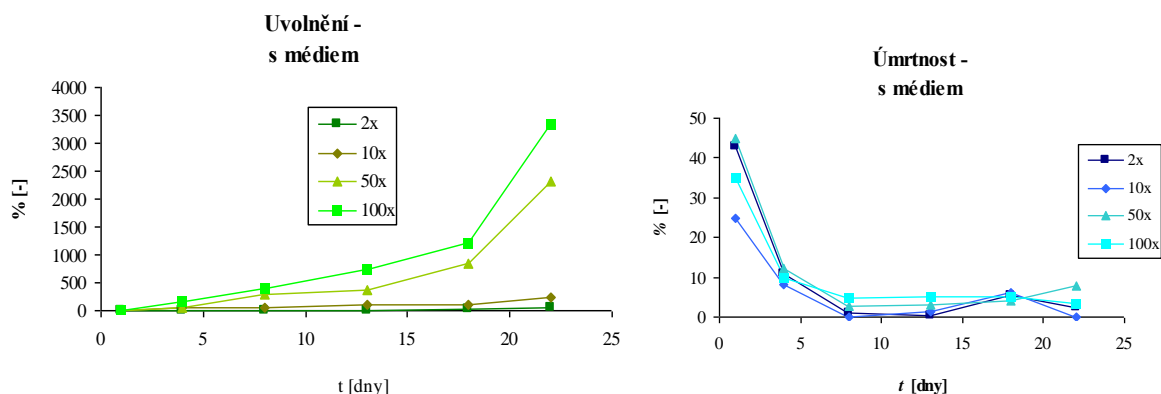
Obě nakultivovaná média byla následně smíchána v poměru 1:1 a naředěna dle Tab.38. Tato naředěná média byla pak dispergována do obalového materiálu, resp. nejprve centrifugována a poté dispergována a enkapsulována.

Tabulka 39: Probiotické kultury s médiem – nárůst a viabilita v částicích

zředění	2krát		10krát		50krát		100krát	
	nárůst MO [%]	z toho mrtvé [%]	nárůst MO [%]	z toho mrtvé [%]	nárůst MO [%]	z toho mrtvé [%]	nárůst MO [%]	z toho mrtvé [%]
0	-	3,0	-	3,0	-	3,0	-	3,0
1	99,0	8,0	217,7	5,2	394,8	2,9	520,9	3,8
4	90,5	10,0	212,0	8,5	579,6	6,5	848,2	5,2
8	101,8	11,3	294,0	9,6	742,1	6,2	989,5	5,8
13	81,4	12,5	361,9	11,3	763,3	8,6	1089,0	7,1
18	63,3	20,5	203,6	20,8	542,8	12,5	692,7	14,8
22	42,4	32,0	121,6	27,9	459,4	23,1	622,0	18,4



Graf 65 a 66: Částice s médiem: nárůst a úmrtnost v částicích

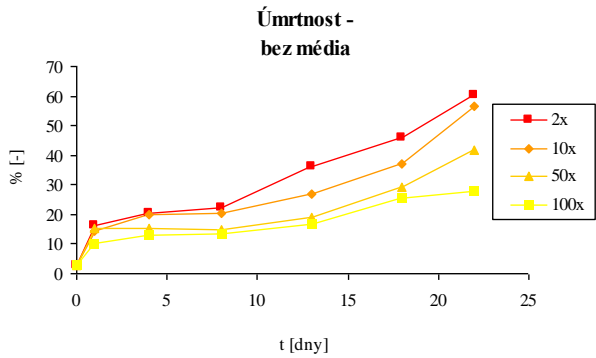
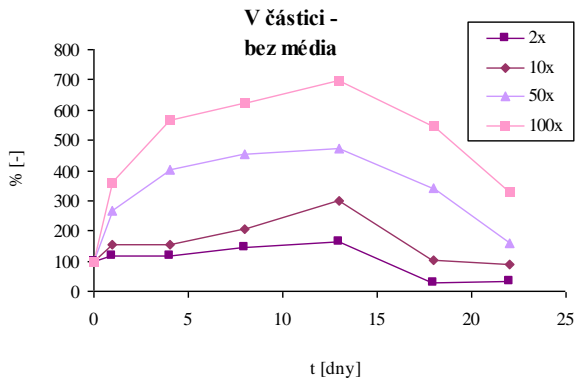


Graf 67 a 68: Částice s médiem: uvolnění z částic a úmrtnost

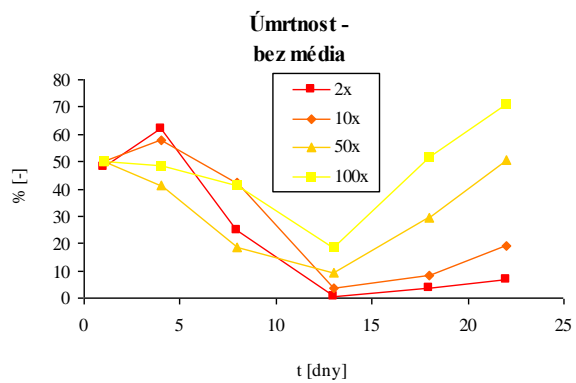
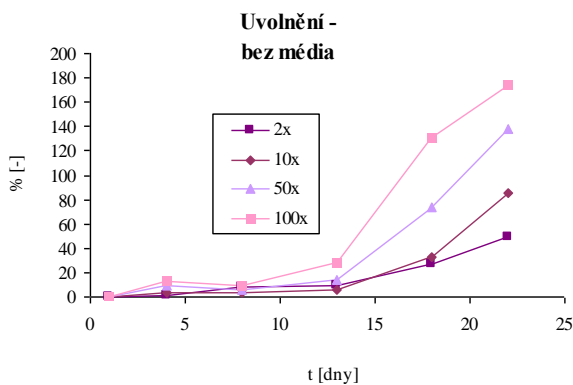
Při srovnání různých výchozích koncentrací buněk a jejich vlivu na uvolnění, množství a viabilitu buněk můžeme říci, že přítomnost média v částicích má pozitivní vliv na množství a růst enkapsulovaných probiotik (Tab.39). Exponenciální fáze růstu trvala asi do 13. dne, pak nastala stacionární fáze růstu a postupný úbytek buněk (Graf 65, 66). Stejně tak po 13. dnu docházelo k vyššímu uvolnění buněk do okolí. Tento trend je patrný v případě zředění 100 a 50násobného, mírně i 10násobného. Je tedy patrné, že pokud jsou buňky dostatečně naředěné médiem a tedy je dostupný dostatek živin, velmi rychle se množí a dochází k intenzivnímu růstu buněk (přes 900 % po 8 dnech v případě 100násobného zředění, (Graf 65). Intenzita množení rostla s mírou zředění, a tedy s poklesem výchozího počtu buněk. V případě nižšího zředění nebyl dostatek živin a buňky s vysokou rychlostí umíraly, nebyla ani identifikována exponenciální fáze růstu. Tento fakt je patrný i v Grafu 66, kdy se vzrůstajícím zředěním klesá úmrtnost. K vyššímu uvolnění buněk do okolí docházelo v případě 100 a 50násobného zředění po 18. dnu. Úmrtnost uvolněných buněk klesala s časem (Grafy 67 a 68).

Tabulka 40: probiotické kultury bez média – nárůst a viabilita v částicích

zředění	2krát		10krát		50krát		100krát	
	nárůst MO [%]	z toho mrtvé [%]	nárůst MO [%]	z toho mrtvé [%]	nárůst MO [%]	z toho mrtvé [%]	nárůst MO [%]	z toho mrtvé [%]
0	-	3,0	-	3,0	-	3,0	-	3,0
1	117,0	16,4	156,4	14,5	268,6	15,5	358,1	10,0
4	117,9	20,3	152,7	20,0	400,5	15,4	565,4	13,2
8	145,7	22,1	203,6	20,5	452,4	15,0	622,0	13,5
13	164,7	36,3	297,8	26,7	471,2	19,2	697,4	16,7
18	26,4	46,0	101,8	37,2	339,3	29,4	546,6	25,7
22	33,2	60,1	88,6	56,7	160,2	41,7	329,8	27,6



Graf 69 a 70: Částice bez média: nárůst a úmrtnost v částicích

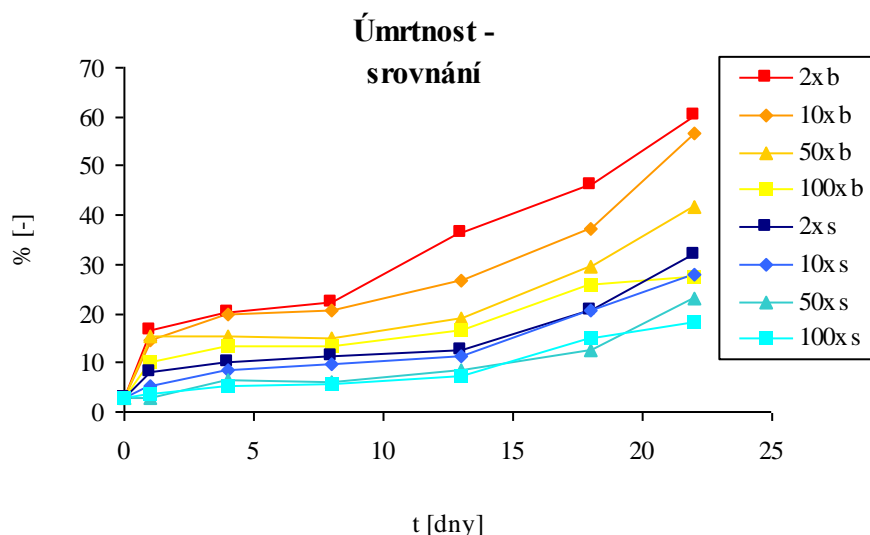


Graf 71 a 72: Částice bez média: uvolnění z částic a úmrtnost

V případě enkapsulace buněk bez média zjišťujeme vyšší úmrtnost, než tomu bylo v případě přítomného média v částicích (Tab.40). Exponenciální fáze trvá rovněž přibližně do 13. dne, ve srovnání s částicemi obsahujícími médium je množství buněk však nižší – v případě 100násobného zředění asi 1,5krát. Stejně tak identifikujeme vyšší úmrtnost buněk v částicích (Graf 69, 70).

Množství uvolněných buněk do prostředí je výrazně nižší než v případě enkapsulace média, v případě 100násobného zředění ke konci experimentu téměř 10krát (Graf 71). Úmrtnost uvolněných buněk kulminuje 4. den, pak nastává pokles a od 13 dne je opět identifikován nárůst úmrtnosti. Vzhledem k tomu, že počet buněk v částicích po 13. dnu klesá, je patrné, že nastává intenzivnější odumírání buněk, čemuž odpovídá i vyšší podíl mrtvých buněk uvolněných do média. Vysoké procento mrtvých buněk 4. dne by mohlo souviset s vysokou počáteční koncentrací, kdy dochází k intenzivní kompetici buněk, které se následně uvolňují z částice a v okolním prostředí bez živin dochází k odumření buňky (Graf 72).

Vyšší úmrtnost je identifikována v případě vyššího zředění; je možné, že tento nárůst odpovídá vyššímu množství mikroorganismů, které pro dostatečné zředění během kultivace v částicích narostly.



Graf 73: Srovnání úmrtnosti v částicích s médiem a bez média

Při konečném srovnání viability mikroorganismů v částicích jakožto zásadního parametru kvality částic bylo ověřeno, že nižší zředění a tedy vyšší výchozí koncentrace buněk vede k jejich vyšší úmrtnosti.

Pro aplikaci do reálných potravin v průmyslu je stěžejní minimální trvanlivost daného výrobku, resp. předpokládaná doba, dokdy bude výrobek zkonsumován. Dle toho parametru je možné nastavit výchozí koncentraci probiotik tak, aby ve zvoleném termínu narostly do požadovaného množství, se zachováním si optimální aktivity a viability i při konzumaci. Dle předchozích zjištění lze doporučit maximální dobu úchovy do 13. dne, přičemž výchozí koncentrace buněk by se měla pohybovat v řádu  $10^6$  CFU·ml<sup>-1</sup> média.

## 5.5 Antimikrobiální testy

Pro zjištění interakce přírodních extraktů a mikroorganismů byly provedeny antimikrobiální testy.

V případě propolisu byl analyzován roztok v ethanolu a v DMSO a 4 typy částic: oba typy lipozomů, agar-chitosanové částice v nativním stavu a lyofilizované.

V případě ječmene byl analyzován roztok (suspenze) práškového ječmene a alginátové částice, tedy 1 typ částic.

Byl stanoven inhibiční vliv propolisu na *Bacillus subtilis* a na probiotika (*L. acidophilus* a *B. breve*) a vliv práškového ječmene na probiotika. Seznam provedených testů je uveden níže.

### 5.5.1 Antimikrobiální test č. 1

Tabulka 41: Částice – antimikrobiální test č. 1  
*Propolis a částice – B. subtilis*

propolis		výsledek
propolis	ethanolvý roztok	negativní
chitosan + agar	kapsule	negativní
chitosan + agar	kapsule, lyofilizováno	negativní
lipozomy	ultrazvuk	negativní
lipozomy	ethanolvé vstříkávání	negativní

### 5.5.2 Antimikrobiální test č. 2

Tabulka 42: Částice – antimikrobiální test č 2  
Propolis a částice, ječmen a částice – *L. acidophilus*, *B. breve*

propolis		výsledek	ječmen		výsledek
propolis	ethanolvý roztok	negativní	ječmen	vodná suspenze	negativní
chitosan + agar	kapsule	negativní	alginát	matrix	negativní
chitosan + agar	kapsule, lyofilizováno	negativní			
lipozomy	ultrazvuk	negativní			
lipozomy	ethanolvé vstříkávání	negativní			

### 5.5.3 Antimikrobiální test č. 3

Tabulka 43: Antimikrobiální test č. 3  
Propolis, koncentrační řada (ethanol) – *B. subtilis*

koncentrace [%]	výsledek	koncentrace [%]	výsledek
1,0	negativní	5,0	negativní
2,5	negativní	6,7	negativní
3,0	negativní	7,5	negativní
3,3	negativní	10	negativní



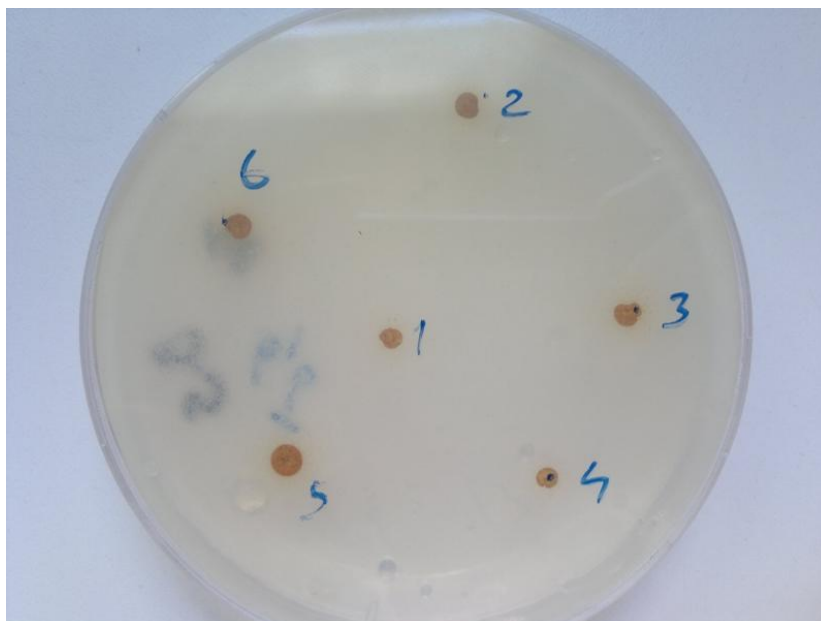
Obrázek 66: Koncentrační řada propolisu rozpuštěného v ethanolu

### 5.5.4 Antimikrobiální test č. 4

Tabulka 44: Antimikrobiální test č 4  
Propolis, koncentrační řada (DMSO) – *B. subtilis*, *E. coli*

koncentrace [%]	výsledek
0,1	negativní
0,5	negativní
1,0	negativní
3,0	negativní

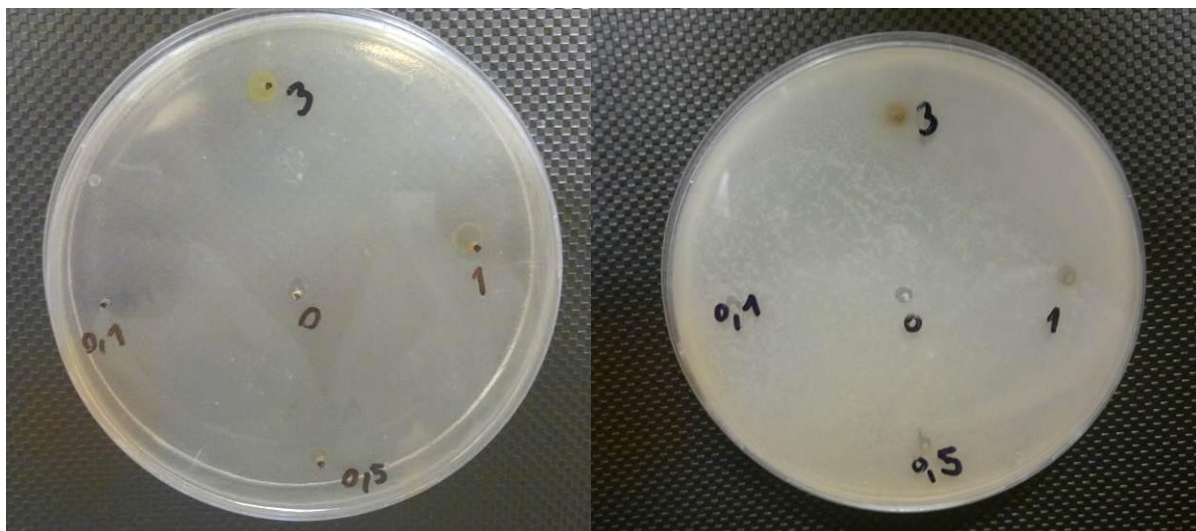




Obrázek 67: Antimikrobiální test s *B. subtilis* a roztokem propolisu v ethanolu (různé koncentrace, na obrázku 6,7%)



Obrázek 68 a 69: Antimikrobiální test: *B. subtilis* a 6 testovacích jamek s ethanolom (vlevo), 6 testovacích jamek s 3% ethanolový roztokem propolisu (vpravo), po 24 hodinách inkubace



Obrázek 70 a 71: Antimikrobiální test: *E. coli* (vlevo) a *B. subtilis* (vpravo) – roztok propolisu v DMSO (různé koncentrace), po 18 hodinách inkubace

Antimikrobiální aktivita propolisu nebyla v předložené práci potvrzena. Inhibiční zóna roztoku propolisu byla ve srovnání s čistým rozpouštědlem nezměněna, a to jak na G+ kmeni *B.subtilis*, tak ani na G- kmeni *E.coli*. Vedle ethanolu jakožto rozpouštědla byl testován i DMSO, a to z důvodu eliminace antimikrobiálního účinku ethanolu. Výsledky antimikrobiálních testů byly v této práci negativní, a to u všech variant rozpouštědel i koncentrací propolisu. Je tedy možné, že propolis má příznivý účinek na imunitní systém, avšak podstata jeho účinku nemusí být přímo antimikrobiální. Pro potvrzení by bylo třeba testovat propolis na jiné druhy patogenních mikroorganismů.

Antimikrobiální aktivita práškového ječmene, testovaná na *L. acidophilus* a *B. breve*, byla vyhodnocena rovněž jako negativní. Toto zjištění potvrdilo možnost koenkapsulace zeleného ječmene s probiotickými kulturami, kdy by měl funkci prebiotické složky a nesnižoval by viabilitu kultury.

## 5.6 Cytotoxický test

Studovaný extrakt propolisu byl testován rovněž na potenciální cytotoxický účinek. Cytotoxický test, založený na barevné reakci mitochondriální dehydrogenázy a sodné soli XTT, byl testován na modelové eukaryotické buňce, v podmínkách práce byla zvolena kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*. Důkazem cytotoxického působení dané látky je tvorba červeného barviva formazanu, jehož koncentrace se stanoví spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm. Druhé kontrolní měření probíhalo při vlnové délce 690 nm pro eliminaci nespecifického příspěvku zákalu buněk. Test se prováděl v mikrotitračních destičkách a odečet byl proveden na Elisa readeru.

Cytotoxický test byl proveden s roztokem propolisu v ethanolu a v DMSO a u vybraných částic obsahujících propolis. Jako modelový eukaryotický organismus sloužily buňky *S. cerevisiae*.

Tabulka 45: Legenda použitých vzorků a označení

pozitivní kontrola		pozitivní kontrola		pozitivní kontrola
NCH	4-N-nitrochinolin-1-oxid (různé koncentrace)	SDS	SDS	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1M
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxid vodíku	NDS	NDS pufr	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,01M
formald.	formaldehyd	LET	LET pufr	NaOH 0,1M
		l. p.	lytický pufr	NaOH 0,01M

Činidla SDS, NDS, LET a l. p. obsahovala proteinázu K v koncentraci 2 mg·ml<sup>-1</sup>

### 5.6.1 Cytotoxický test č. 1

V prvním testu byly analyzovány následující propolisové částice: lipozomy obou typů, agar-chitosanové částice v nativní formě i lyofilizované. Stejně tak byl analyzován ethanolový roztok propolisu. Byl testován pozitivní cytotoxický vzorek 4-N-nitrochinolin-1-oxid.

Tabulka 46: Cytotoxický test č. 1 - propolisové částice, ethanolový roztok propolisu

částice	MP	A <sub>450</sub> [-]	A <sub>690</sub> [-]	částice	MP	A <sub>450</sub> [-]	A <sub>690</sub> [-]	vzorek	A <sub>450</sub> [-]	A <sub>690</sub> [-]
lipozomy ultrazvuk	1	1,680	1,269	částice chitosan + agar lyofil.	1	0,580	0,509	blank1	0,565	0,483
	2	0,815	0,674		2	0,620	0,548	blank2	0,616	0,537
	3	1,394	0,976		3	0,510	0,452	NCH 0,48	0,458	0,395
	4	0,682	0,544		4	0,526	0,469	NCH 2,4	0,463	0,395
lipozomy ethanolové vsířkovaní	1	1,569	1,191	částice chitosan + agar lyofil.	1	0,514	0,452	NCH 4,8	0,511	0,435
	2	1,684	1,369		2	0,596	0,533	propolis 1%	2,510	2,116
	3	1,518	1,128		3	0,456	0,410	propolis 3%	2,639	2,312
	4	1,271	0,899		4	0,555	0,501			

### 5.6.2 Cytotoxický test č. 2

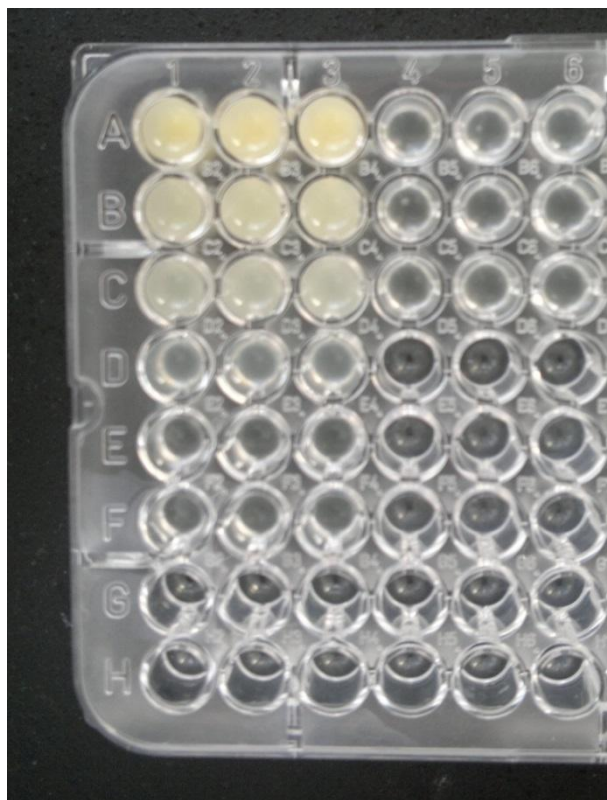
Ve druhém testu byly analyzovány roztoky propolisu v DMSO o různých koncentracích. stejně jako 4-N-nitrochinolin-1-oxid ve vyšší koncentraci oproti testu č. 1.

Tabulka 47: Cytotoxický test č. 2 – roztok propolisu v DMSO

vzorek	A <sub>450</sub> [-]	A <sub>690</sub> [-]	vzorek	A <sub>450</sub> [-]	A <sub>690</sub> [-]
propolis 3%	3,878	2,991	blank	0,501	0,464
propolis 1%	2,888	2,428	NCH 6	0,447	0,382
propolis 0,5%	2,393	2,005	NCH 7,2	0,488	0,414
propolis 0,1%	0,972	0,628	NCH 9,6	0,492	0,406
DMSO	0,388	0,351			

Tabulka 48: Destička č. 2 - roztok propolisu v DMSO

	1	2	3	4	5	6
A	P 3%	P 3%	P 3%	NCH 6	NCH 6	NCH 6
B	P 1%	P 1%	P 1%	NCH 7,2	NCH 7,2	NCH 7,2
C	P 0,5%	P 0,5%	P 0,5%	NCH 9,6	NCH 9,6	NCH 9,6
D	P 0,1%	P 0,1%	P 0,1%			
E	DMSO	DMSO	DMSO			
F	blank	blank	blank			



Obrázek 72: Destička č. 2

### 5.6.3 Cytotoxický test č. 3

V posledním, třetím testu byla testována série pozitivních kontrolních činidel. Jejich názvy jsou uvedeny v Tab.45.

Tabulka 49: Cytotoxický test č. 3 – pozitivní kontroly

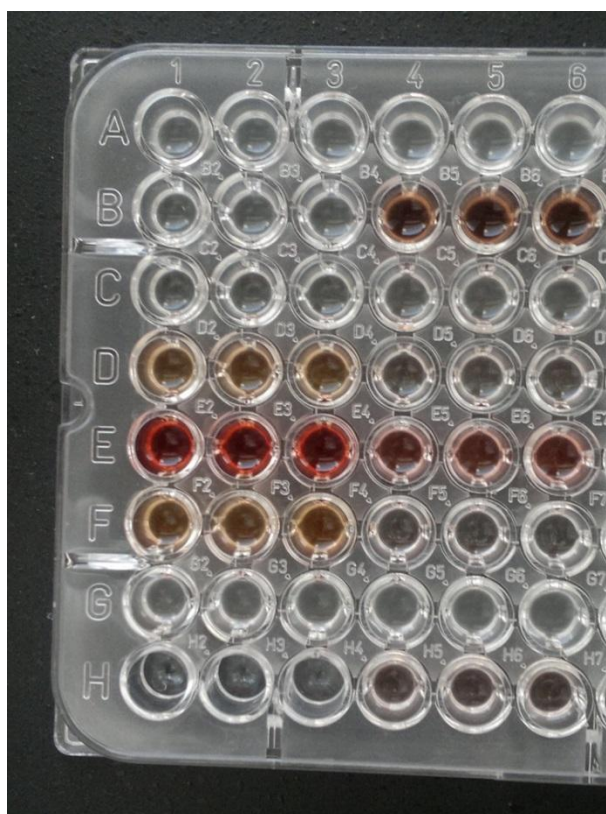
vzorek	A <sub>450</sub> [-]	A <sub>690</sub> [-]	vzorek	A <sub>450</sub> [-]	A <sub>690</sub> [-]	vzorek	A <sub>450</sub> [-]	A <sub>690</sub> [-]	vzorek	A <sub>450</sub> [-]	A <sub>690</sub> [-]
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,315	0,282	SDS	0,187	0,143	NaOH 0,1M (5x ř.)	0,326	0,168	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1M	0,421	0,387
formald.	0,237	0,212	NDS	0,664	0,181	NDS (5x ř.)	0,285	0,174	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,01M	0,491	0,453
blank	0,493	0,448	LET	2,647	0,266	LET (5x ř.)	0,637	0,171	NaOH 0,1M (5x ř.)	1,800	0,774
			l. p.	0,724	0,183	l. p. (5x ř.)	0,219	0,135	NaOH 0,01M	0,370	0,316

Tabulka 50a: Destička č. 3 - pozitivní kontroly

	1	2	3	4	5	6
A	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,01M	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,01M	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,01M
B	formald.	formald.	formald.	NaOH 0,1M	NaOH 0,1M	NaOH 0,1M
C	SDS	SDS	SDS	NaOH 0,01M	NaOH 0,01M	NaOH 0,01M

Tabulka 50b: Destička č. 3 - pozitivní kontroly

	1	2	3	4	5	6
D	NDS	NDS	NDS	NDS 5x ř.	NDS 5x ř.	NDS 5x ř.
E	LET	LET	LET	LET 5x ř.	LET 5x ř.	LET 5x ř.
F	l. p.	l. p.	l. p.	l. p. 5x ř.	l. p. 5x ř.	l. p. 5x ř.
G	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1M	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1M	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1M	blank	blank	blank
H				NaOH 0,1M 5x ř.	NaOH 0,1M 5x ř.	NaOH 0,1M 5x ř.



Obrázek 73: Destička č. 3

Vyhodnocením prvního cytotoxického testu, jehož výsledky jsou shrnuty v Tab.46, bylo zjištěno, že žádný se vzorků neprokázal cytotoxický efekt. Zjištěné hodnoty absorbance vzorků přesahovaly absorbance pozitivních kontrol a nebylo identifikováno pozitivní červené zabarvení, způsobené produktem reakce formazanem. Byl proto proveden test č. 2, kdy byly zvýšeny koncentrace pozitivních kontrol a pro eliminaci cytotoxického efektu ethanolu bylo jako rozpouštědlo zvoleno DMSO; připraveny byly různé koncentrace propolisů pro ověření účinnosti. Výsledky shrnuté v Tab.47 vypovídají o zjištěné vyšší absorbanci propolisů oproti blanku, ovšem jak je patrné z Obr.72, příspěvek absorbance tvoří zákal, nikoliv formazanové barvivo, které vzniká v důsledku cytotoxického účinku vzorku.

Pro potvrzení správnosti testu byl proveden třetí test, kdy bylo zvoleno několik pozitivních kontrol, jež jsou shrnuty v Tab.49. Dle Tab.50 a Obr.73 je patrné, že zvolené pozitivní kontroly vykazaly skutečně cytotoxický efekt, kdy došlo k barevné reakci XXT s mitochondriálními dehydrogenázami za vzniku červeného formazanu. Jako nejúčinnější činidlo byl stanoven LET pufr obsahující merkaptoethanol a dále 0,1M roztok hydroxidu sodného. Peroxid vodíku, formaldehyd, kyselina sírová a 0,01M hydroxid sodný bylo vyhodnoceny jako neúčinné, resp. neprokazující cytotoxickou aktivitu za daných podmínek testu.

Dle výše uvedených hodnot a obrázků je patrné, že nedošlo k barevné reakci a tedy nebyl identifikován cytotoxický efekt u propolisu, a to u obou variant rozpouštědel. Cytotoxický efekt nevykazovaly ani modelové potraviny, ve kterých byly propolisové částice uchovávané. Tato studie doplnila a potvrdila negativní výsledky propolisových antimikrobiálních testů.

## 6 ZÁVĚRY

Cílem předložené diplomové práce bylo testování možnosti enkapsulace vybraných komplexních přírodních extraktů do organických biopolymerů přírodního původu za účelem aplikace v potravinářství. Pro testování byly vybrány čtyři druhy komplexních extraktů: propolis, práškový ječmen, čerstvý ječmen a probiotické kultury. Jako obalový materiál pro přípravu organických mikročástic byl zvolen alginát, směs alginátu a škrobu, chitosan, směs chitosanu a agaru a dále byly připraveny i liposomové nanočástice. V kombinaci těchto látek a materiálů bylo připraveno 23 typů mikročástic a 2 typy nanočástic.

V teoretické části byly popsány metody enkapsulace apoužívané materiály. V druhé části rešerše byly charakterizovány testované přírodní extrakty – propolis a zelený ječmen a jejich aktivní složky. Poslední z enkapsulovaných látek byly probiotické kultury zastoupené druhy *L. acidophilus* a *B. breve*.

V experimentální části byly tyto vytvořené částice podrobně analyzovány. Prvním ze sledovaných parametrů byla stabilita částic v modelových fyziologických podmínkách simulujících prostředí různých úseků trávicího traktu. Byly použity tři modelové trávicí šťávy - žaludeční, pankreatická a žlučová. Dále byla u částic sledována dlouhodobá stabilita a míra uvolnění obsahu ve čtyřech modelových potravinách – v destilované vodě jako modelu neutrální potraviny, ve 3% roztoku kyseliny octové jako modelu kyselé potraviny, v 10% roztoku ethanolu jako modelu alkoholického nápoje a ve 25% emulzi oleje ve vodě jako modelu tukové potraviny. Vybrané částice byly rovněž analyzovány z hlediska stability ve čtyřech reálných mléčných potravinách - v mléce, jogurtovém nápoji Actimel, v Selském jogurtu a Choceňském smetanovém jogurtu. V průběhu experimentální části byly zjištěny následující hlavní výsledky.

- Propolis byl enkapsulován do obalového materiálu alginátu, chitosanu a směsi agar-chitosan. Jako typ částic byla zvolena „kapsule“ pro úplné uzavření aktivní látky. V případě propolisu byla jako nejlepší obalový materiál použita směs 2% chitosanu a 2% agaru v poměru 1:1. Uvedené částice vykazovaly dostatečnou mechanickou odolnost a míru stability, stejně jako přijatelnou dobu úchovy. V případě lyofilizované varianty těchto částic tak významná stabilita potvrzena nebyla. Pokud by měly být částice aplikovány do výrobků s delší trvanlivostí (8 týdnů a déle), jsou vhodnější chitosanové částice, které jsou sice méně rozložitelné, ale prokazovaly nejvyšší dlouhodobou stabilitu. Z hlediska dlouhodobé stability je vhodným řešením i lyofilizace, avšak je nutný další výzkum a optimalizace obalových materiálů.
- Rozklad lipozomů ve fyziologickém prostředí byl několikanásobně vyšší; dlouhodobá stabilita lipozomových částic byla nízká, po měsíci došlo k uvolnění třetiny až poloviny obsahu (31,5 až 50,8 % u ultrazvukových částic, 35,3 až 57,3 % obsahu u částic vytvořených ethanolovým vstříkáním). Analýzou jejich velikosti i stability bylo zjištěno, že s časem dochází ke shlukování částic, zvětšení jejich průměru a jistému zvýšení stability koloidního systému. Úpravou velikosti liposomových nanočástic na 100 nm pomocí membránového extruderu nebylo dosaženo homogenní distribuce částic. V případě částic připravených ultrazvukovou homogenizací došlo k určitému zvětšení, zatímco u částic připravených ethanolovým vstříkáním došlo ke zmenšení částic, nikoliv však na hranici 100 nm.
- Optimální obalový materiál pro částice s enkapsulovaným práškovým ječmenem představovala směs 2% alginátu a 2% škrobu v poměru 4:1, přičemž přídavek škrobu zvyšoval rozpad částic

v určitých částech trávicí soustavy. Úpravou obsahu škrobu je tedy možné modelovat cílené uvolňování obsahu částic. Dalším vhodným materiálem je směs 2% chitosanu a 2% agaru v poměru 1:1. Z hlediska ochrany a stability enzymů a bílkovin obsažených v ječmeni je vhodnější typ částic agar-chitosan. Zásadní podmínkou je volba částic typu matrix, kdy je možné enkapsulovat i vlákninu obsaženou v nerozpustném podílu. V případě částic typu kapsule lze očekávat technickou limitaci vlivem průměru trysek a tím i omezenou aplikací do potravin.

- V případě čerstvého ječmene byla obecně zjištěna nižší kompatibilita s obalovými materiály, důvodem může být výrazně hydrofilní povaha extraktů s vysokým podílem aktivních enzymů ve srovnání s ječmenem sušeným. Jako optimální obalový materiál byla stanovena směs agar-chitosan, vyhovující i po stránce stability. Bylo zjištěno, že tento materiál maximálně chrání obsažené bílkoviny a uvolnění nastává až ve střevním prostředí. Nejvyšší stabilita byla zjištěna v případě alginátových částic.
- Částice obsahující ječmen je možné kombinovat i s probiotiky a vytvářet jak koenkapsuláty, tedy směsné částice. Provedené testy nepotvrdily antimikrobiální účinek ječmene na probiotické kultury. Lze tedy uvažovat o aplikaci podobného komplexního směsného preparátu i do potravin. Použitím chitosanového obalového materiálu je možné dále zvýšit zdravotní benefit preparátu díky schopnosti chitosanu vázat tuky. Společně s vlákninou obsaženou v ječmeni by bylo možné preparát zaměřit jako kvalitní doplněk k podpoře zdravého životního stylu.
- Enkapsulace probiotických kultur doplněná analýzou částic prokázala, že vhodným obalovým materiálem je alginát, případně směs alginátu se škrobem. Zachování viability probiotik však bylo poměrně krátkodobé, nejvýše po dobu 4 až 5 týdnů. Při použití chitosanu docházelo ve většině případů k vysoké úmrtnosti buněk a nízkému počtu enkapsulovaných buněk v částicích. Vhodným postupem je enkapsulace za vzniku částic typu matrix, kdy je zajištěna lepší difúze živin k buňkám dispergovaných v celém objemu oproti typu kapsule. Optimalizací výchozí koncentrace buněk určených k enkapsulaci bylo dále zjištěno, že pro maximální zachování viability by měla být výchozí koncentrace buněk nejvýše  $10^6$  CFU·ml<sup>-1</sup>. Při těchto koncentracích je zásadní i přítomnost média.
- V případě aplikace částic do reálných mléčných potravin byla nejnižší stabilita zjištěna u částic s obsahem čerstvého ječmene, a to zejména v prostředí mléka. Oproti tomu maximální stabilita byla zjištěna v případě enkapsulovaných probiotických kultur uchovaných v mléce. Vyšší úmrtnost probiotických kultur byla identifikována ve smetanovém jogurtu. Zajímavým zjištěním byl fakt, že koenkapsulace ječmene a probiotik neovlivní jejich viabilitu, změněna byla jen účinnost enkapsulace a míra uvolňování obsahu. Tato skutečnost bude předmětem dalšího testování.
- Za účelem zjištění účinku použitých přírodních extraktů na živé organismy byly provedeny antimikrobiální a cytotoxický test. V práci nebyla potvrzena antimikrobiální aktivita u propolisu ani u zeleného ječmene ve volné ani v enkapsulované formě. V podmínkách této práce nebyla potvrzena všeobecně uváděná antimikrobiální aktivita propolisu, je však pravděpodobné, že vykaazuje jiný typ efektu na imunitní systém. Pro doplnění studie byly u propolisu provedeny i cytotoxické studie na eukaryotickém modelu *S. cerevisiae*. Bylo potvrzeno, že propolis nevykazuje cytotoxickou aktivitu. Propolis je komplexní látka bohatá na obsah bioaktivních fytochemikálií, které mohou mít významný příznivý účinek na zdraví jedince a může působit imunostimulačně. Komplexní účinek propolisu může být ovlivněn i rozdílným složením v závislosti na regionálních podmínkách jeho produkce.



Dle výše uvedených zjištění a charakteristik může být enkapsulace přínosným procesem jak v oblasti farmacie a kosmetiky, tak i v potravinářské oblasti. Enkapsulace umožňuje zamaskovat a vylepšit nežádoucí vlastnosti přírodních extraktů a rozšířit tak jejich aplikace. V případě propolisu bylo enkapsulací omezeno jeho specifické aroma, přičemž ve formě agar-chitosanových částic je možné tyto částice aplikovat do potravin nebo uvést na trh ve formě doplňků stravy. V případě zeleného ječmene byly vytvořeny dvě optimální varianty částic: škrob-alginátové a agar-chitosanové, přičemž první typ umožňoval modulaci uvolňování aktivních látek v trvicím traktu a druhý typ prokazoval vysokou míru ochrany bílkovin a enzymových aktivit. Lze pak cíleně specializovat aplikaci do potravin za účelem zvýšení příjmu vlákniny a nutrientů nebo suplementací nejrůznějšího spektra enzymů obsažených v mladém ječmeni. Přínosem enkapsulace u probiotických kultur je možnost účinné ochrany probiotických mikroorganismů před účinkem žaludeční šťávy. Jako vhodný obalový materiál byl zvolen alginát, který umožňuje dostatečnou difúzi živin z prostředí a činí tak částice vhodné pro aplikaci do reálných prostředí, zejména mléčných výrobků.

Zařazením technologického kroku enkapsulace se testované látky mohou stát dostupnější a přijatelnější pro širší skupinu konzumentů, čímž lze přispět ke zvýšení a zkvalitnění stravovacích návyků a k podpoře zdravého životního stylu.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] FANG, Zhongxiang a Bhesh BHANDARI. Encapsulation of polyphenols - a review. *Trend in Food Science & Technology* [online]. 2010, č. 21, s. 510-523 [cit. 2014-03-30]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224410001925>
- [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, č. 1, s. 1806-1815 [cit. 2014-01-31]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211601X11002665>
- [3] MOREIRA, Leandro, Luís G. DIAS, José Alberto PEREIRA a Leticia ESTEVINHO. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2008, č. 46, s. 3482-3485 [cit. 2013-10-28]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18804144>
- [4] DALLEN, Maria. *Zelené potraviny: Když jídlo je naším lékem*. Praha: Ratio Bona, c2010, 113 s. ISBN 978-80-254-4590-7.
- [5] ZUIDAM, N, Viktor A. NEDOVIĆ. *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. NeV York: Springer Science+Business Media, LLC, 2010, 400 s. ISBN 978-144-1910-080.
- [6] GOUIN, Sébastien. Micro-encapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2004, č. 15, s. 330-347 [cit. 2014-01-24]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224403002723>
- [7] Seznam Éček. *Éčka v potravinách, emulgátory, konzervanty, barviva, přídatné látky* [online]. [cit. 2014-02-24]. Dostupné z: <http://www.emulgatory.cz/seznam-ecek>
- [8] MATALANIS, Alison, Owen Griffith JONES a David Julian McCLEMENTS. Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids* [online]. 2011, č. 25, s. 1865-1880 [cit. 2014-02-16]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X11001263>
- [9] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, xxii, 580 s. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [10] GBASSI, Gildas K. a Thierry VANDAMME. Probiotic Encapsulation Technology: From Microencapsulation to Release into the Gut. *Pharmaceutics* [online]. 2012, vol. 4, issue 4, s. 149-163 [cit. 2014-02-16]. DOI: 10.3390/pharmaceutics4010149. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1999-4923>
- [11] Key Resources: Carbohydrate Analysis | Sigma-Aldrich. *Sigma-Aldrich* [online]. © 2014 [cit. 2014-04-04]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/carbohydrate-analysis/carbohydrate-analysis-ii.html>
- [12] *Encyclopedia of surface and colloid science* [online]. 2nd ed. New York: Taylor & Francis Group, 2006, s. 3299-3313 [cit. 2014-04-12]. ISBN 0-8493-9615-8.
- [13] WILSON, N. a N.P. SHAH. Microencapsulation of Vitamins. *ASEAN Food Journal* [online]. 2007, roč. 1, č. 14, s. 1-14 [cit. 2014-03-19]. Dostupné z: <http://www.ifrj.upm.edu.my/afjv14%281%292007/1-14.pdf>
- [14] ÖTLEŞ, Semih. *Probiotics and Prebiotics in Food, Nutrition and Health* [online]. CRC Press, 2013 [cit. 2014-04-10]. ISBN 978-1-4665-8623-9.
- [15] BEZKOROVAINY, Anatoly. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am J Clin Nutr* [online]. 2001, č. 73, s. 399-405 [cit. 2014-03-03]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11157348>
- [16] IKEGAKI, Masaharu Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 1998, roč. 17, č. 10, s. 567-575 [cit.

2014-02-27]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0924224406001932>

[17] GONNET, M., L. LETHUAUT, F. BOURY. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *Journal of Controlled Release* [online]. 2010, č. 146, s. 276-290 [cit. 2014-03-04]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20600399>

[18] MEHANSHO, H. a F. BOURY. Iron Fortification Technology Development. *American Society for Nutrition* [online]. 2006, roč. 4, č. 136, s. 1059-1063 [cit. 2014-04-10]. Dostupné z: <http://jn.nutrition.org/content/136/4/1059.full?related-urls=yes&legid=nutrition;136/4/1059http://search.proquest.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/docview/197448889?accountid=17115>

[19] DESAI, Kashappa Goud H. a JIN PARK. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology* [online]. 2005, vol. 23, issue 7 [cit. 2014-04-25]. DOI: 10.1081/DRT-200063478.

[20] BÜCHI LABORTECHNIK AG. *Návod k použití: Enkapsulátor B-395 Pro*. 2011.

[21] BÜCHI LABORATORIEN AG. *Encapsulator presentation for external use*. September 1, 2011.

[22] MORENO, M.I. Nieva, M.I. ISLA, A.R. SAMPIETRO a M.A. VATTUONE. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2000, č. 71, s. 109-114 [cit. 2014-03-28]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874199001890>

[23] MORENO, M.I. Nieva, A.K. KUROPATNICKI, E. SZLISZKA, W. KROL. Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [online]. 2013, ID 964149 [cit. 2014-04-17]. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/964149/#B27>

[24] ISLA, M.I., J.F. PAREDES-GUZMAN, M.I. NIEVA-MORENO, H. KOO a .. PARK. Some Chemical Composition and Biological Activity of Northern Argentine Propolis. *J. Agric. Food Chem.* [online]. 2005, č. 53, s. 1166-1172 [cit. 2013-10-28]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf040130h>

[25] MORENO, M.I. Nieva, M. I. ISLA, N.G. CUDMANI, M.A. VATTUONE a A.R. SAMPIETRO. Screening of antibacterial activity of Amaicha del Valle (Tucumán, Argentina) propolis. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 1999, č. 68, s. 97-102 [cit. 2013-10-28]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874199000513>

[26] BANKOVA, Vassya. Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [online]. 2005, vol. 2, issue 1, s. 29-32 [cit. 2013-10-28]. DOI: 10.1093/ecam/neh059. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2005>

[27] MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* [online]. 1995, č. 26, s. 83-99 [cit. 2013-10-28]. Dostupné z: [http://www.apidologie.org/articles/apido/abs/1995/02/Apidologie\\_0044-8435\\_1995\\_26\\_2\\_ART0002/Apidologie\\_0044-8435\\_1995\\_26\\_2\\_ART0002.html](http://www.apidologie.org/articles/apido/abs/1995/02/Apidologie_0044-8435_1995_26_2_ART0002/Apidologie_0044-8435_1995_26_2_ART0002.html)

[28] LOTFY, Mahmoud. Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease. *Asian Pac J Cancer Prev* [online]. 2006, č. 7, s. 22-31 [cit. 2013-10-28]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16629510>

[29] KOSALEC, Ivan, Marina BAKMAZ, Stjepan PEPELJNJAK a Sanda VLADIMIR-KNEŽEVIĆ. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharm.* [online]. 2004, č. 54, s. 65-72 [cit. 2013-10-22]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15050046>

[30] PARK, Yong Kun, Masaharu IKEGAKI a M.A. VATTUONE. Preparation of Water and Ethanolic Extracts of Propolis and Evaluation of the Preparations. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* [online]. 1998, roč. 11, č. 62, s. 2230-2232 [cit. 2013-10-28]. Dostupné z: [http://www.researchgate.net/publication/247821820\\_Preparation\\_of\\_Water\\_and\\_Ethanolic\\_Extracta\\_of\\_Propolis\\_and\\_Evaluation\\_of\\_the\\_preparations](http://www.researchgate.net/publication/247821820_Preparation_of_Water_and_Ethanolic_Extracta_of_Propolis_and_Evaluation_of_the_preparations)

- [31] Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research* [online]. 2001, vol. 15, issue 7, s. 561-571 [cit. 2013-10-28]. DOI: 10.1002/ptr.1029. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.1029>
- [32] BRÁEZINOVÁ BELCREDI, Natálie, Jaroslava EHRENBERGEROVÁ, Vlasta FIEDLEROVÁ, Sylvie BEŘLÁKOVÁ a Katerína VACULOVÁ. Antioxidant Vitamins in Barley Green Biomass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2010-11-24, vol. 58, issue 22, s. 11755-11761 [cit.2013-11-14]. DOI: 10.1021/jf1014389. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf1014389>
- [33] TIETZE, Harald W. *Supreme green medicine* [online]. New Dehli: J. J. Offset Printers, 1998 [cit. 2013-11-20]. ISBN 1876173-092.
- [34] JEČMEN. TICHÁ, Markéta a Petra VYZÍNOVÁ. *Multimediální skriptum: Polní plodiny* [online]. 13. 12. 2006 [cit. 2014-03-02]. Dostupné z: <http://cit.vfu.cz/vegetabilie/plodiny/czech/jecmen.htm>
- [35] KAMIYAMA, Masumi a Takayuki SHIBAMOTO. Flavonoids with Potent Antioxidant Activity Found in Young Green Barley Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2012-06-27, vol. 60, issue 25, s. 6260-6267 [cit. 2013-11-21]. DOI: 10.1021/jf301700j. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf301700j>
- [36] VŠCHT. *Sladařství: Sylabus k předmětu*. 11. listopadu 2004. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/kch/download/sylaby/sladarstvi.pdf>
- [37] FAO. *Agribusiness handbook: Barley, Malt, Beer*. Rome, 2009. Dostupné z: [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/tci/docs/AH3\\_BarleyMaltBeer.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/tci/docs/AH3_BarleyMaltBeer.pdf)
- [38] LIM, T. K. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Volume 5, Fruits* [online]. Dordrecht: Springer, 2013, s. 267-300 [cit. 2014-03-02]. ISBN 978-94-007-5653-3.
- [39] Plants Profile for *Hordeum vulgare* (Common barley). *Plants Database* [online]. 04/21/2014 [cit. 2014-03-02]. Dostupné z: <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=HOVU>
- [40] KUBÁT, Karel. Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, Přírodovědecká fakulta, katedra biologie. *Fylogeneze a systém vyšších rostlin*. Ústí nad Labem, 2006. Dostupné z: [http://biology.ujep.cz/vyuka/file.php/1/opory/Fylogeneze\\_a\\_system\\_vyssich\\_rostlin.pdf](http://biology.ujep.cz/vyuka/file.php/1/opory/Fylogeneze_a_system_vyssich_rostlin.pdf)
- [41] Sladovnický ječmen. [online]. [cit. 2014-04-01]. Dostupné z: <http://athena.zcu.cz/kurzy/vspu/000/HTML/41/>
- [42] Názorná květena zemí koruny české: svazek 4, strana 430. POLÍVKA, Fr. [online]. [cit. 2014-04-01]. Dostupné z: <http://botanika.wendys.cz/kvetena/kvetena.php?dil=4&page=430>
- [43] CICHOKÉ, Anthony J. *The complete book of enzyme therapy* [online]. Garden City Park, N.Y.: Avery Publishing, c1999, s. 76 [cit. 2013-11-20]. ISBN 0895298171.
- [44] HAGIWARA, Yoshihide. *Green barley essence: the many health benefits of nature's "ideal fast food"*. Los Angeles: Keats Pub., c1986, vii, 22 p. ISBN 08-798-3423-4.
- [45] FAO, WHO. *Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*. Córdoba, Argentina, 1-4 October 2001, 34 s. Dostupné z: [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/probiotics.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf)
- [46] KLABAN, Vladimír. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 1. vyd. Praha: Galén, 2005, 654 s. ISBN 80-726-2341-9.
- [47] GÖRNER, Fridrich a Lubomír VALÍK. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodky sú prenášané požívatinami*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. ISBN 80-967-0649-7.
- [48] SAARELA, Maria, Gunnar MOGENSEN, Rangne FONDÉN, Jaana MÄTTÖ a Tiina MATTILA-SANDHOLM. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal*

of *Biotechnology* [online]. 2000, č. 84, s. 197-215 [cit. 2013-11-21]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11164262>

[49] COLLINS, M David, Glenn R GIBSON a Jaana MÄTTÖ. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *American Society for Clinical Nutrition* [online]. 1999, vol. 69, no. 5, s. 1052-1057 [cit. 2014-04-10]. Dostupné z: <http://ajcn.nutrition.org/content/69/5/1052s.full>

[50] ROBERFROID, Marcel B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods?. *American Society for Clinical Nutrition* [online]. 2006, vol. 71, no. 6, s. 1682-1687 [cit. 2014-04-10]. Dostupné z: <http://ajcn.nutrition.org/content/71/6/1682s.full>

[51] DVOŘÁKOVÁ, Markéta, Petr HULÍN, Marcel KARABÍN a Pavel DOSTÁLEK. Determination of Polyphenols in Beer by an Effective Method Based on Solid-Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection. *Czech Journal of Food Science*. 2009, roč. 25, č. 4, s. 182-188 [CIT. 2014-04-18]. Dostupné z: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/00311.pdf>

[52] KOPLÍK, Richard. *Rostlinné fenolové látky a flavonoidy: Speciální analýza potravin - přednášky* [online]. [cit. 2014-04-18]. Dostupné z: <http://web.vscht.cz/koplikr/Rostlinné%20fenoly%20a%20flavonoidy.pdf>

[53] Chlorofyly. KODÍČEK, Milan. *Výkladový slovník biochemických pojmů* [online]. 2004 [cit. 2014-04-20]. Dostupné z: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002\\_v1/hesla/chlorofyly.html](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/chlorofyly.html)

[54] Photosynthesis - Absorption Spectra - Chlorophyll a and b. *Botany online* [online]. 1996-2004 [cit. 2014-04-20]. Dostupné z: <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e24/3.htm>

[55] VUT BRNO. *Praktikum z mikrobiologie: Přímé stanovení počtu buněk MO počítáním pod mikroskopem, Vitální barvení*. 2008.

[56] Methylene blue Pictures, Methylene blue Image, Science&Technology Photo Gallery. *With friendship.com* [online]. [cit. 2014-04-21]. Dostupné z: <http://withfriendship.com/user/nmicky/methylene-blue.php>

[57] SHAPIRO, Howard M. *Practical flow cytometry* [online]. 4th ed. New York: Wiley-Liss, c2003, s. 1-60 [cit. 2014-04-10]. ISBN 0471411256.

[58] Propidium iodide  $\geq 94.0\%$  (HPLC). *Sigma-Aldrich* [online]. © 2014 [cit. 2014-04-11]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/Sigma/p4170?lang=en&region=CZ>

[59] ODDĚLENÍ STRUKTURNÍ ANALÝZY: KATEDRA FYZIKY KONDENZOVANÝCH LÁTEK MFF UK. *Dynamický rozptyl světla* [online]. Praha [cit. 2014-04-14]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/dls.htm>

[60] MALVERN INSTRUMENTS LTD. *Zetasizer Nano Series: User Manual*. England, Feb. 2004. Dostupné z: [http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer\\_Nano\\_user\\_manual\\_Man0317-1.1.pdf](http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf)

[61] CHT PRAHA: ÚSTAV TECHNOLOGIE MLÉKA A TUKŮ. *Distribuce velikosti částic a koloidní stabilita* [online]. Praha [cit. 2012-04-15]. Dostupné z: [http://www.vscht.cz/tmt/studium/LOTP/LOTP\\_09\\_emulse.pdf](http://www.vscht.cz/tmt/studium/LOTP/LOTP_09_emulse.pdf)

[62] Zone of Inhibition Test | Photo and Description. ANTIMICROBIAL TEST LABORATORIES. *Antimicrobial and Disinfectant Testing Lab* [online]. 2006-2013 [cit. 2014-04-11]. Dostupné z: [http://www.antimicrobialtestlaboratories.com/Zone\\_of\\_Inhibition\\_Test\\_for\\_Antimicrobial\\_Activity.htm](http://www.antimicrobialtestlaboratories.com/Zone_of_Inhibition_Test_for_Antimicrobial_Activity.htm)

[63] Cell Proliferation & Cytotoxicity. BIOVISION, Inc. *BioVision - Life Science Source* [online]. © 2014 [cit. 2014-04-11]. Dostupné z: <http://www.biovision.com/cell-proliferation-cytotoxicity-810/>

[64] SIGMA-ALDRICH. *Technical bulletin: In Vitro Toxicology Assay Kit, XTT based*. St. Louis, USA.

- [65] Mladý ječmen prášek 100g, Dej si Bacha. *Www.chutzdravi.cz* [online]. © 2012 [cit. 2014-04-02]. Dostupné z: [http://www.chutzdravi.cz/product.php?id\\_product=591](http://www.chutzdravi.cz/product.php?id_product=591)
- [66] Albert basic - sortiment. AHOLD CZECH REPUBLIC. *Albert* [online]. © 2013 [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: <http://basic.albert.cz/basic/sortiment.html>
- [67] Márová I., Vránová D: *Praktikum z biochemie*. Pracovní sešit, FCH VUT Brno, 2008.
- [68] *Československý lékopis*. Praha: Avicenum – Zdravotnické nakladatelství, 1987.
- [69] Česká Republika. Vyhláška Ministerstva zdravotnictví o hygienických požadavcích na výrobky určené pro styk s potravinami a pokrmy. In: *Sbírka zákonů ČR*. 2001, č. 38, 13/2001. Dostupné z: <http://www.zakonyprolidi.cz/cs/2001-38>

## 8 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

- GRAS – všeobecně považován za bezpečný (generally recognized as safe)  
EFSA – Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority)  
FDA – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)  
CMC – karboxymethylcelulóza  
PVA – polyvinylalkohol  
CAPE – fenethyl ester kyseliny kávové (caffeic acid phenethyl ester)  
BHT – butylhydroxytoluen  
SOD - superoxidismutáza  
AGEs – produkty pokročilé glykace (advanced glycation end product)  
GIV – glykosylisovitexin  
WHO – Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)  
FAO – Organizace pro výživu a zemědělství (Food and Agricultural Organization)  
GIT – gastrointestinální trakt  
GALT – střevní lymfatická tkáň (gut associated lymphatic tissue)  
LDH – laktátdehydrogenáza  
SDS – dodecylsírany sodný  
FDA – fluorescein diacetát  
PUFA – polynenasycené mastné kyseliny

## 9 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 a 2: Ječmen v alginátu a v chitosanu, matrix

Příloha 3 a 4: Čerstvý ječmen v alginátu, centrifugovaný a necentrifugovaný, typ kapsule

Příloha 5 a 6: Čerstvý ječmen v alginátu, typ matrix

Příloha 7 a 8: Lipozomy, ultrazvuk

Příloha 9 a 10: Lipozomy, ethanolové vstříkování

Příloha 11: Propolis v alginátu, typ kapsule

Příloha 12 a 13: *L. acidophilus* v alginátu a v chitosanu, typ matrix

Příloha 14 a 15: Částice aplikované do reálných potravin: typ 3 a 5

Příloha 16 a 17: Přehled částic obsahujících propolis a práškový ječmen

Příloha 18 a 19: Přehled částic obsahujících čerstvý ječmen a probiotika

Příloha 20 a 21: Fluorescenční mikroskop, částice č. 3 v mléce

Příloha 22 a 23: Fluorescenční mikroskop, částice č. 4 v mléce

Příloha 24 a 25: Fluorescenční mikroskop, částice č. 5 v mléce

Příloha 26 a 27: Fluorescenční mikroskop, částice č. 3 v jogurtovém nápoji Actimel

Příloha 28 a 29: Fluorescenční mikroskop, částice č. 4 v jogurtovém nápoji Actimel

Příloha 30 a 31: Fluorescenční mikroskop, částice č. 5 v jogurtovém nápoji Actimel

Příloha 32 a 33: Fluorescenční mikroskop, částice č. 3 v Selském jogurtu

Příloha 34 a 35: Fluorescenční mikroskop, částice č. 4 v Selském jogurtu

Příloha 36 a 37: Fluorescenční mikroskop, částice č. 5 v Selském jogurtu

Příloha 38 a 39: Fluorescenční mikroskop, částice č. 3 v Choceňském smetanovém jogurtu

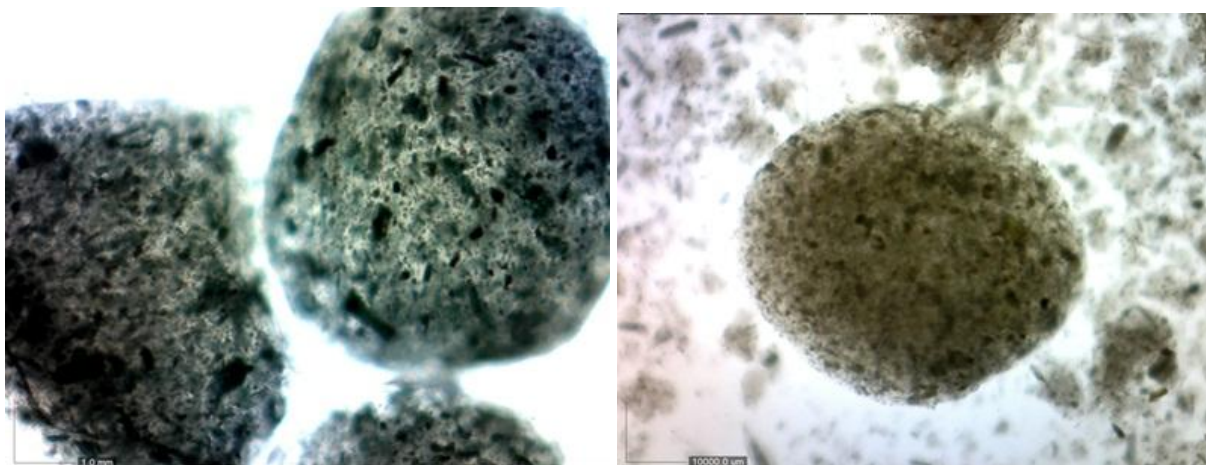
Příloha 40 a 41: Fluorescenční mikroskop, částice č. 4 v Choceňském smetanovém jogurtu

Příloha 42 a 43: Fluorescenční mikroskop, částice č. 5 v Choceňském smetanovém jogurtu

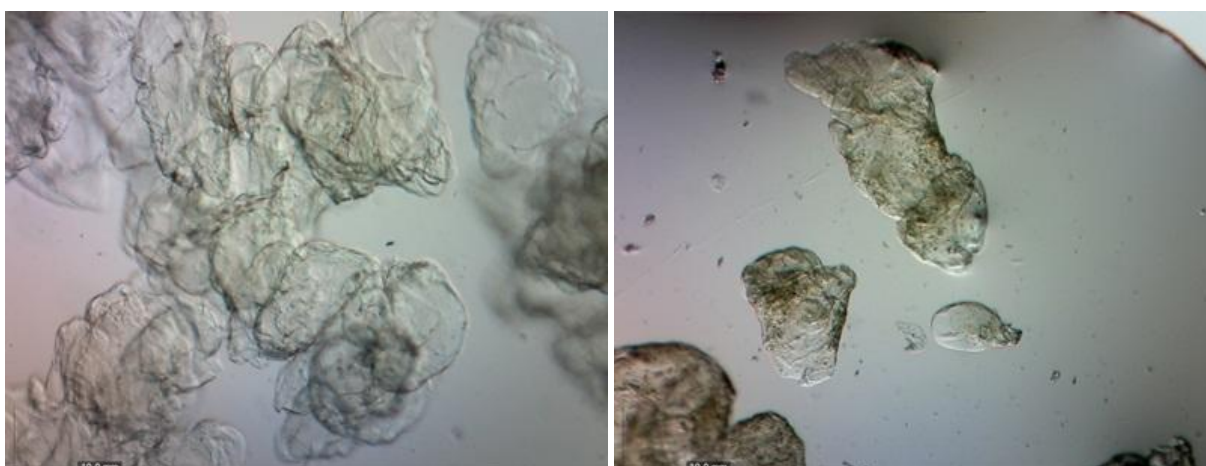


## 10 PŘÍLOHY

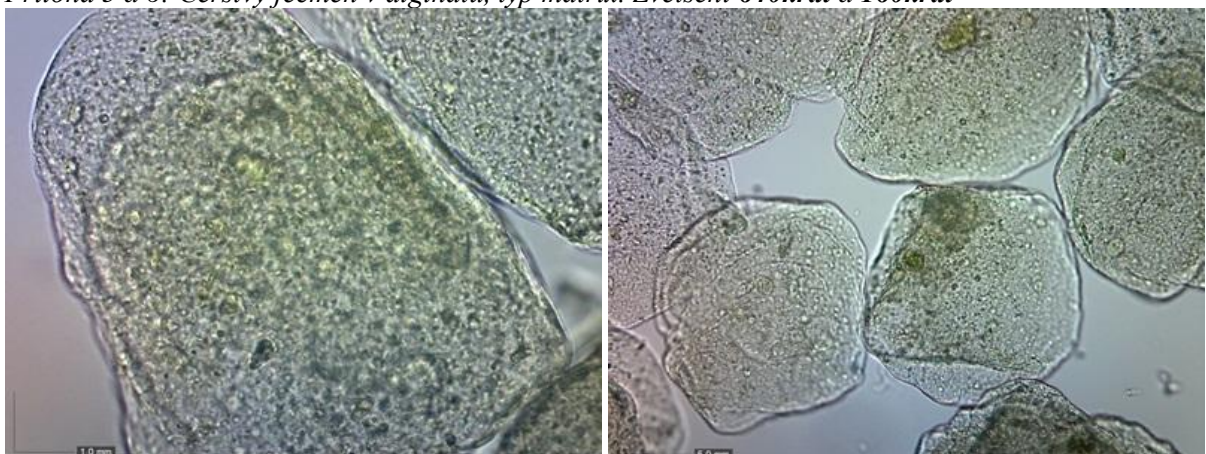
*Příloha 1 a 2: Ječmen v alginátu a v chitosanu, matrix. Zvětšení 160krát*



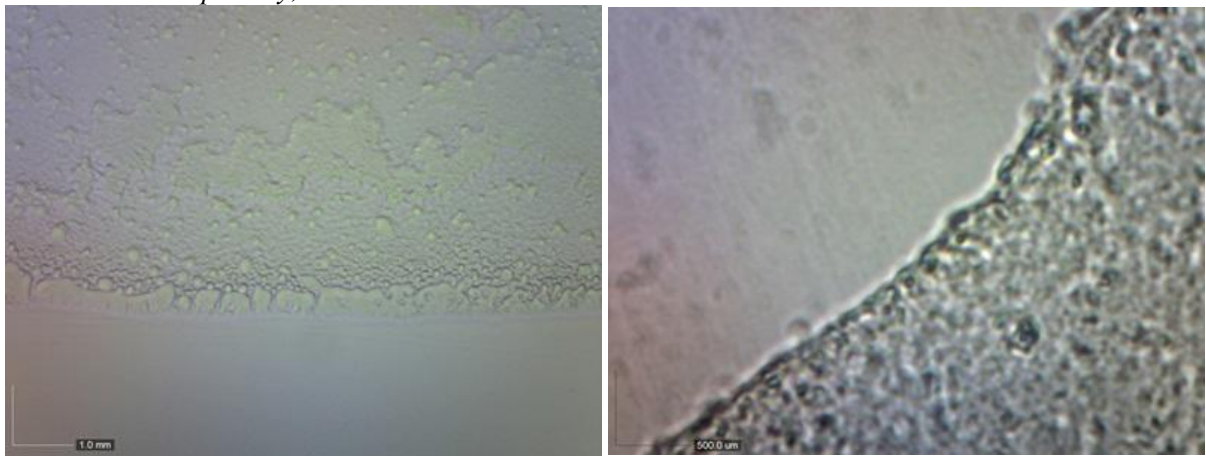
*Příloha 3 a 4: Čerstvý ječmen v alginátu, centrifugovaný a necentrifugovaný, typ kapsule. Zvětšení 160krát*



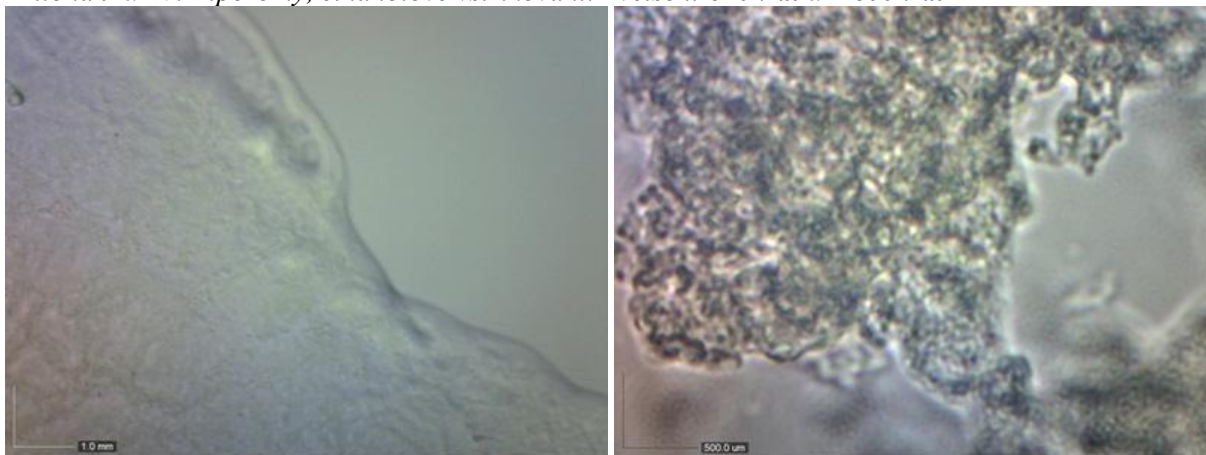
*Příloha 5 a 6: Čerstvý ječmen v alginátu, typ matrix. Zvětšení 640krát a 160krát*



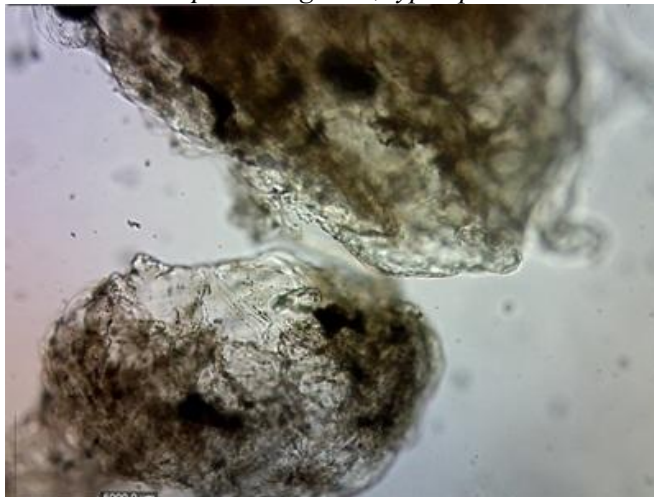
*Příloha 7 a 8: Lipozomy, ultrazvuk. Zvětšení 640krát a 1 600x*



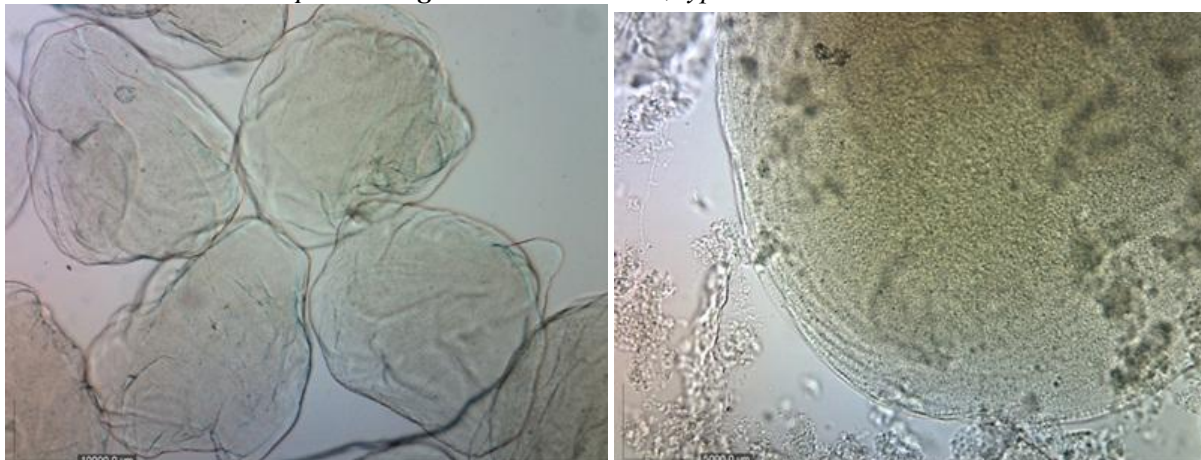
*Příloha 9 a 10: Lipozomy, ethanolové vstřikování. Zvětšení 640krát a 1 600krát*



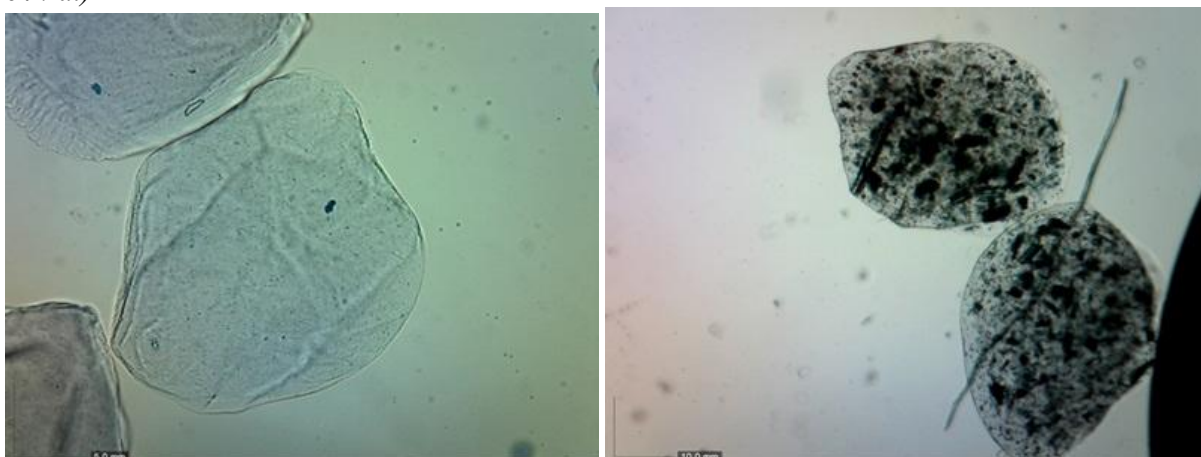
*Příloha 11: Propolis v alginátu, typ kapsule. Zvětšení 160krát*



Příloha 12 a 13: *L. acidophilus* v **alginátu** a v **chitosanu**, typ *matrix*. Zvětšení **16x** a **160x**



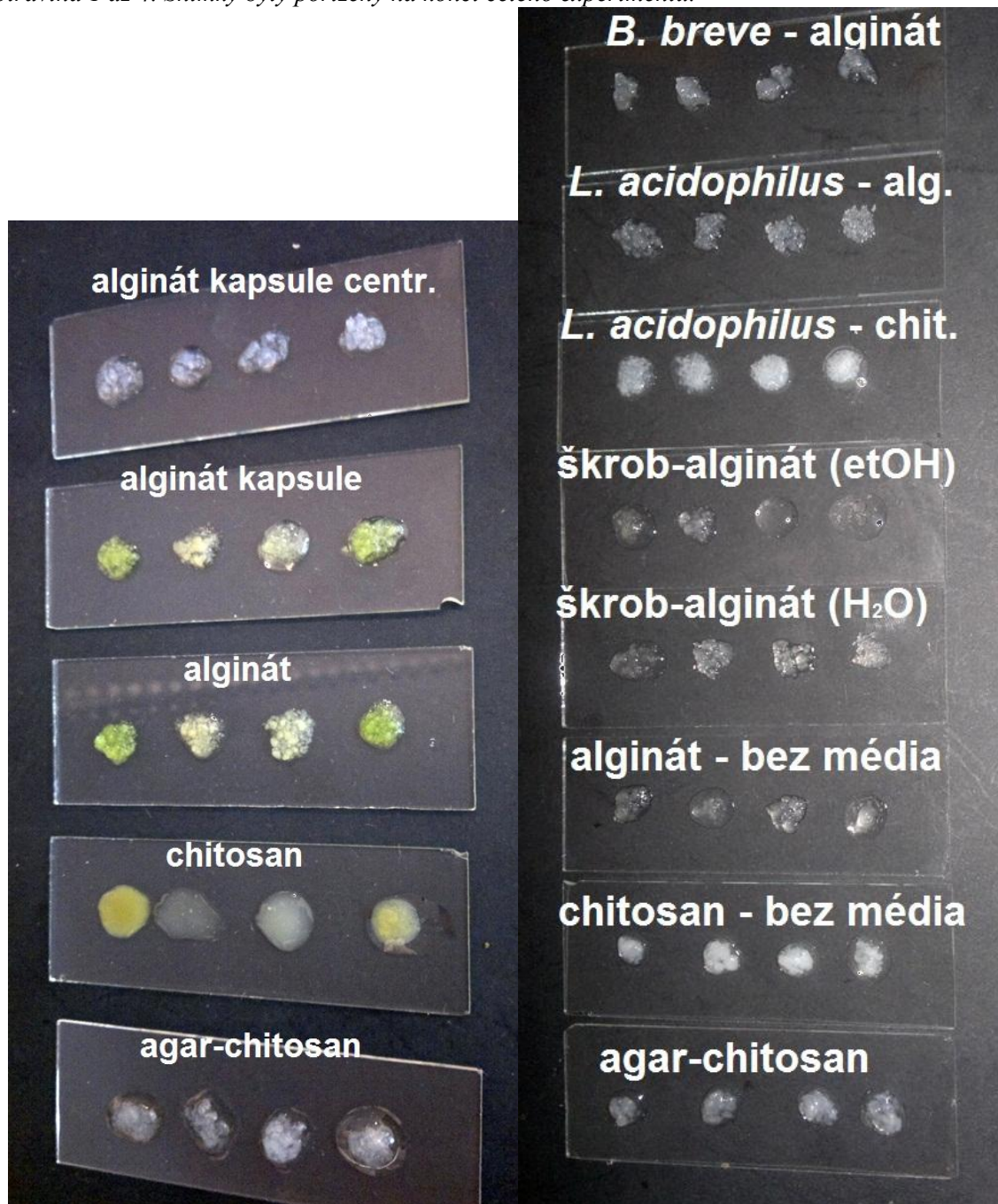
Příloha 14 a 15: Částice aplikované do reálných potravin: **typ 3** (směsná kultura v alginátu, *matrix*. Zvětšení **160x**) a **typ 5** (ko-inkapsulát práškového ječmene a probiotik v alginátu, *matrix*. Zvětšení **64krát**)



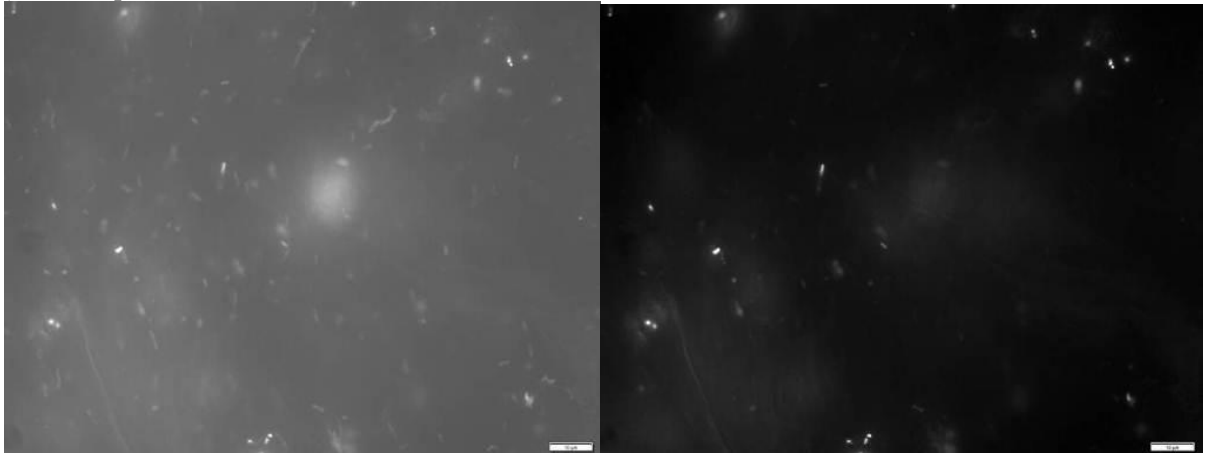
Příloha 16 a 17: Přehled částic obsahujících propolis a práškový ječmen v modelových potravinách. V řadě je uvedena modelová potravina 1 až 4. Snímky byly pořízeny na konci celého experimentu.



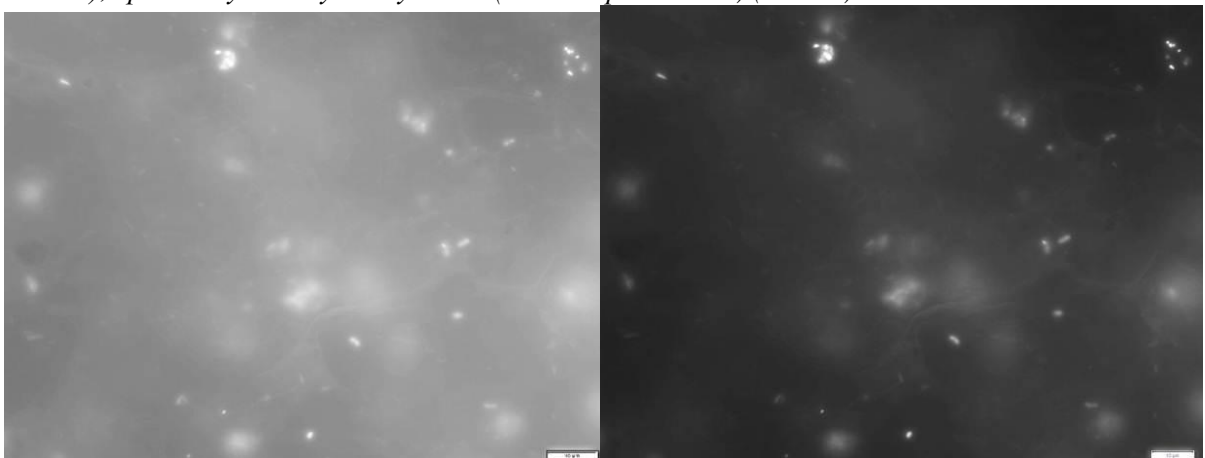
Příloha 18 a 19: Přehled částic obsahujících propolis a práškový ječmen. V řadě je uvedena modelová potravina 1 až 4. Snímky byly pořízeny na konci celého experimentu.



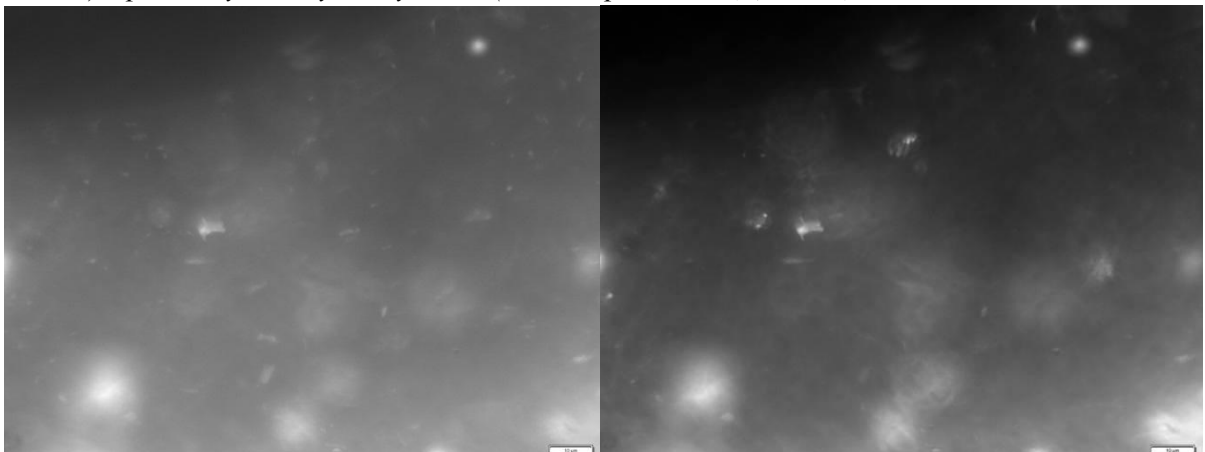
*Příloha 20 a 21: Fluorescenční mikroskop, částice č. 3 (probiotické kultury) uchovávané 4 týdny v mléce. Vlevo zobrazeny buňky živé a mrtvé (excitace při 470 nm), vpravo zvýrazněny buňky mrtvé (excitace při 552 nm) (4.6.6.2).*



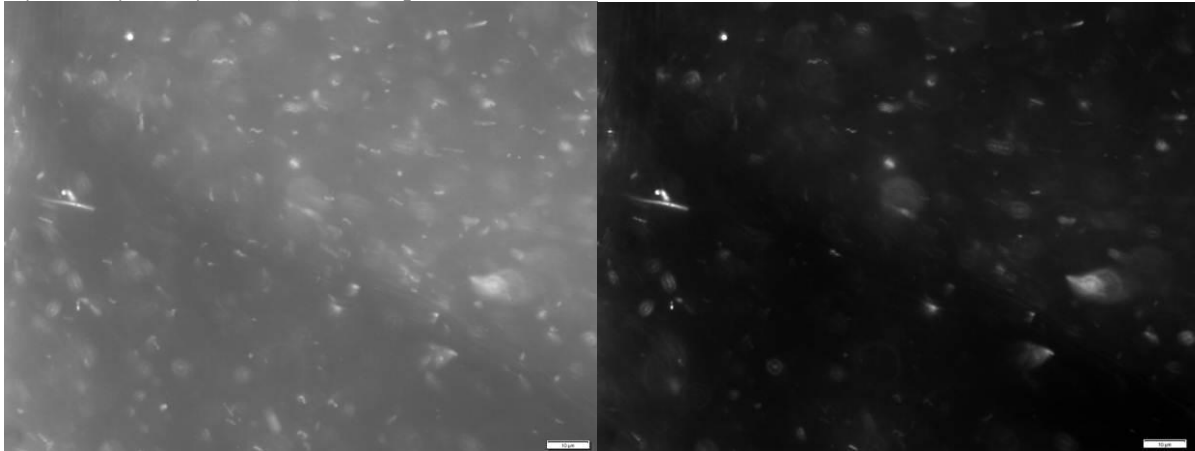
*Příloha 22 a 23: Fluorescenční mikroskop, částice č. 4 (směs částic s probiotickými kulturami a částic s práškovým ječmenem) uchovávané 4 týdny v mléce. Vlevo zobrazeny buňky živé a mrtvé (excitace při 470 nm), vpravo zvýrazněny buňky mrtvé (excitace při 552 nm) (4.6.6.2).*



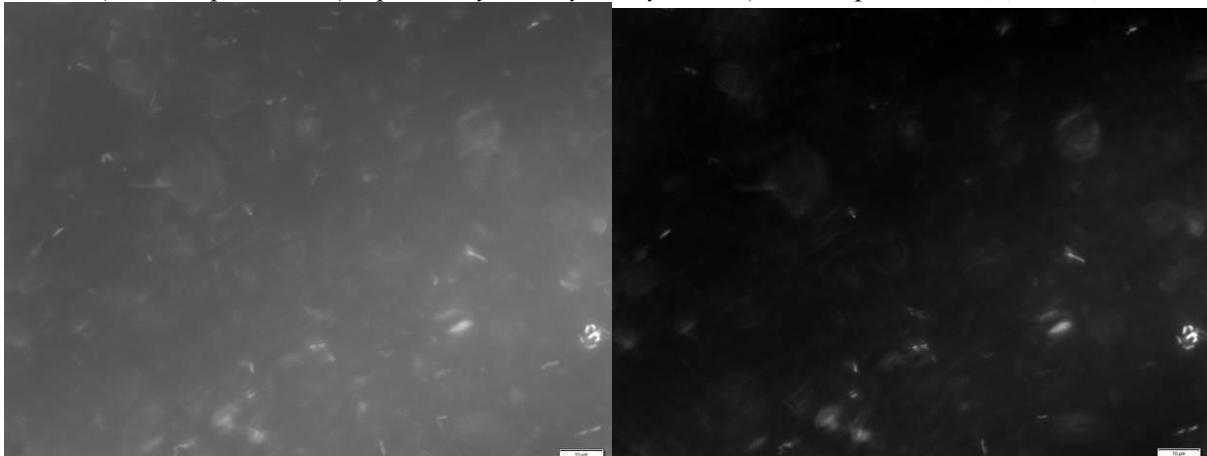
*Příloha 24 a 25: Fluorescenční mikroskop, částice č. 5 (ko-inkapsulát s probiotickými kulturami a s práškovým ječmenem) uchovávané 4 týdny v mléce. Vlevo zobrazeny buňky živé a mrtvé (excitace při 470 nm), vpravo zvýrazněny buňky mrtvé (excitace při 552 nm) (4.6.6.2).*



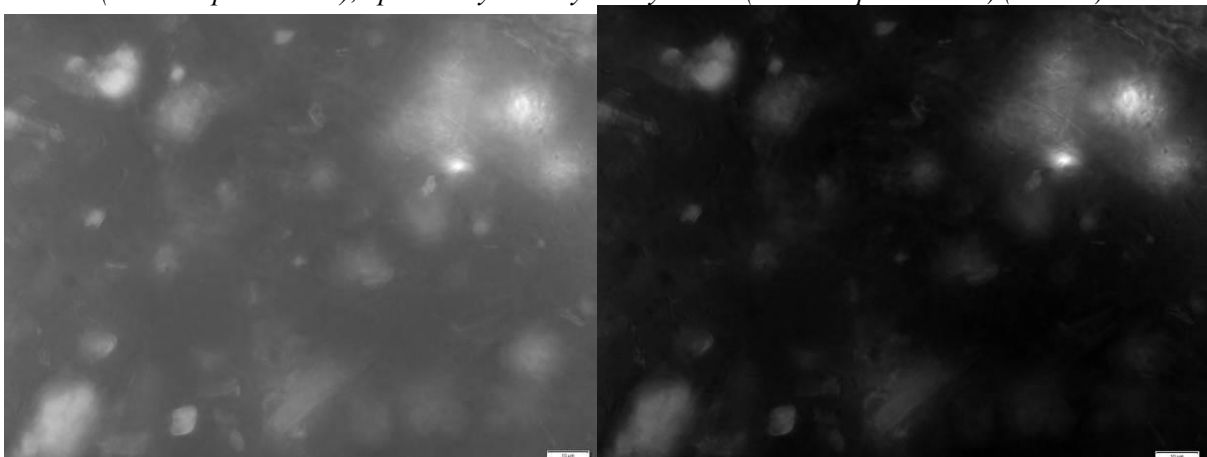
*Příloha 26 a 27: Fluorescenční mikroskop, částice č. 3 (probiotické kultury) uchovávané 4 týdny v jogurtovém nápoji Actimel. Vlevo zobrazeny buňky živé a mrtvé (excitace při 470 nm), vpravo zvýrazněny buňky mrtvé (excitace při 552 nm) (4.6.6.2).*



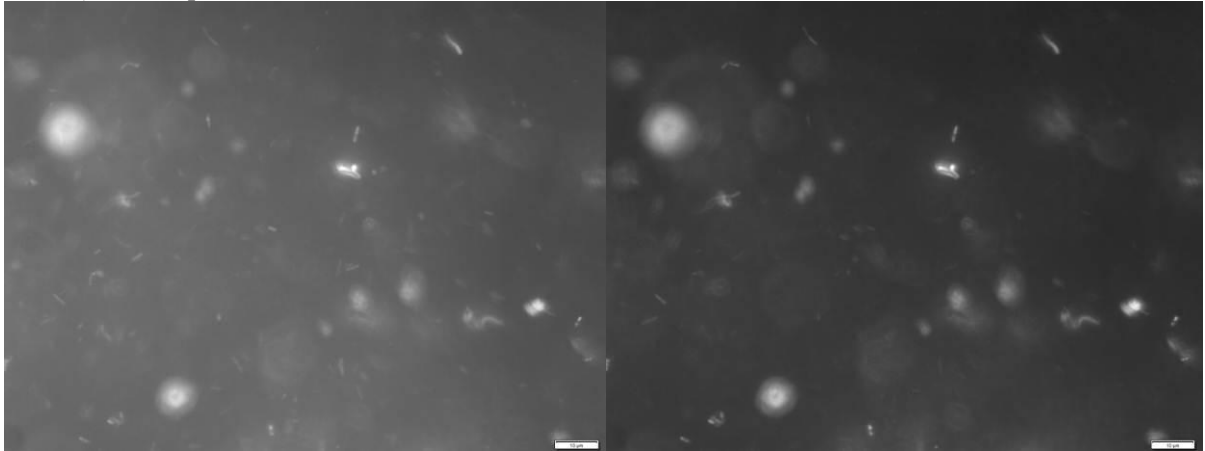
*Příloha 28 a 29: Fluorescenční mikroskop, částice č. 4 (směs částic s probiotickými kulturami a částic s práškovým ječmenem) uchovávané 4 týdny v jogurtovém nápoji Actimel. Vlevo zobrazeny buňky živé a mrtvé (excitace při 470 nm), vpravo zvýrazněny buňky mrtvé (excitace při 552 nm) (4.6.6.2).*



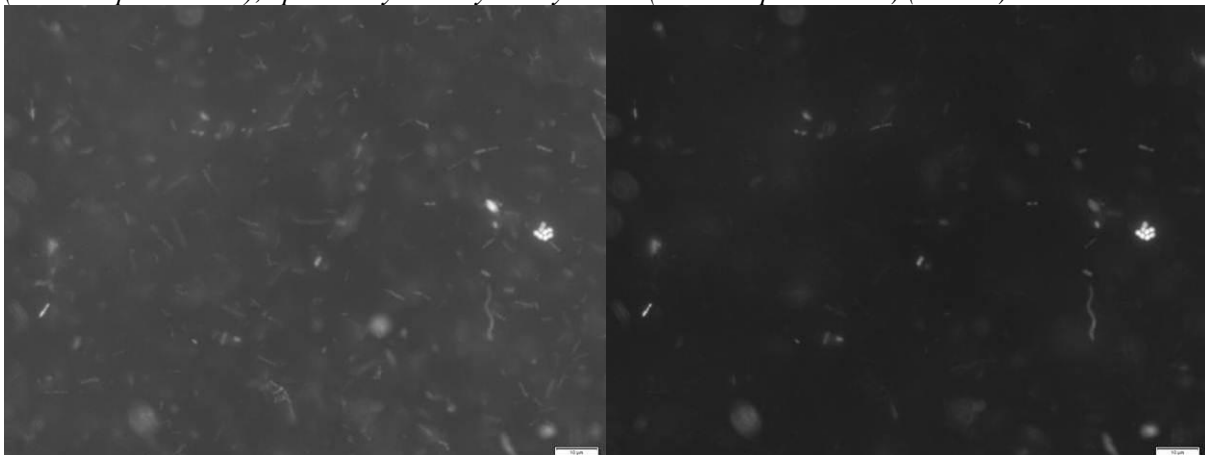
*Příloha 30 a 31: Fluorescenční mikroskop, částice č. 5 (ko-inkapsulát s probiotickými kulturami a s práškovým ječmenem) uchovávané 4 týdny v jogurtovém nápoji Actimel. Vlevo zobrazeny buňky živé a mrtvé (excitace při 470 nm), vpravo zvýrazněny buňky mrtvé (excitace při 552 nm) (4.6.6.2).*



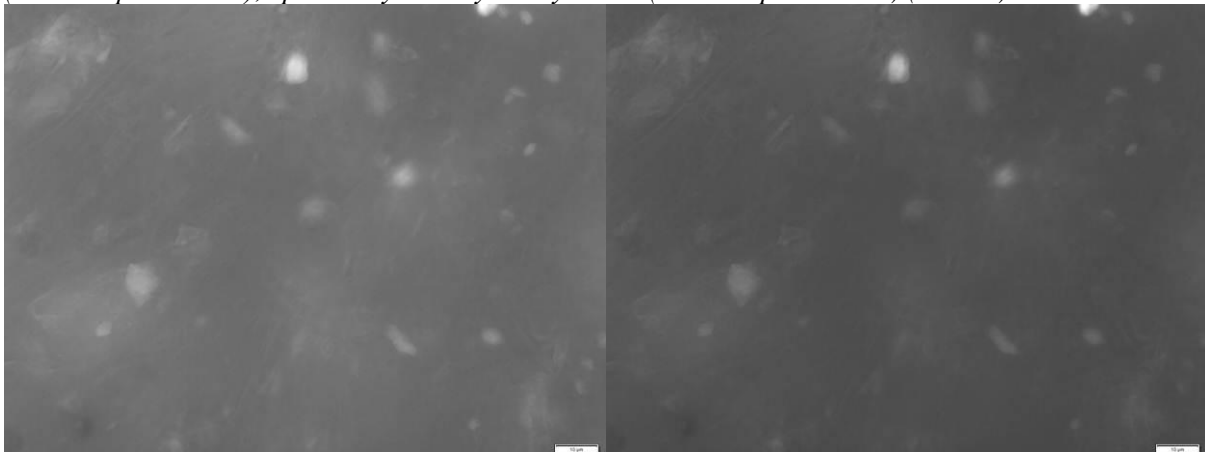
*Příloha 32 a 33: Fluorescenční mikroskop, částice č. 3 (probiotické kultury) uchovávané 4 týdny v Selském jogurtu Vlevo zobrazeny buňky živé a mrtvé (excitace při 470 nm), vpravo zvýrazněny buňky mrtvé (excitace při 552 nm) (4.6.6.2).*



*Příloha 34 a 35: Fluorescenční mikroskop, částice č. 4 (směs částic s probiotickými kulturami a částic s práškovým ječmenem) uchovávané 4 týdny v Selském jogurtu Vlevo zobrazeny buňky živé a mrtvé (excitace při 470 nm), vpravo zvýrazněny buňky mrtvé (excitace při 552 nm) (4.6.6.2).*

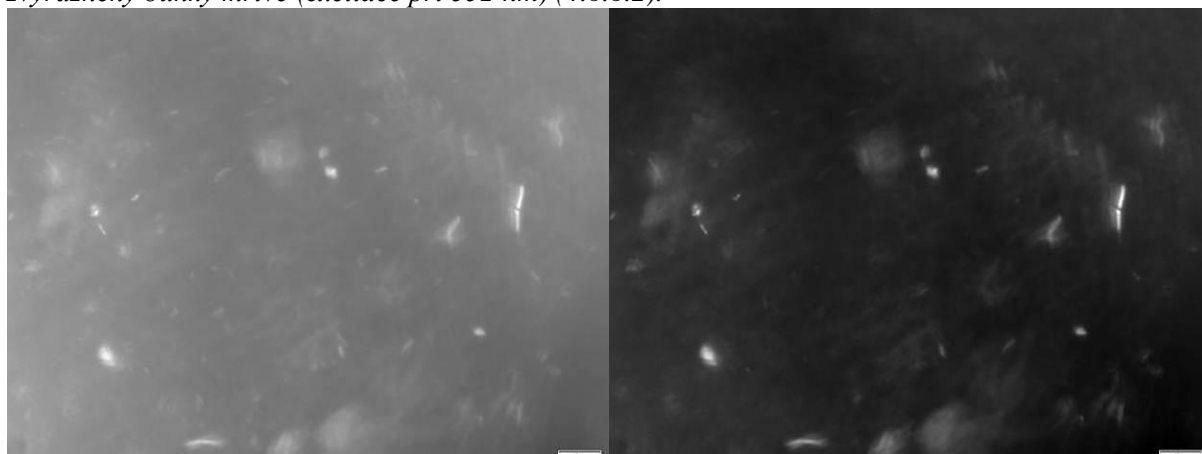


*Příloha 36 a 37: Fluorescenční mikroskop, částice č. 5 (ko-inkapsulát s probiotickými kulturami a s práškovým ječmenem) uchovávané 4 týdny v Selském jogurtu Vlevo zobrazeny buňky živé a mrtvé (excitace při 470 nm), vpravo zvýrazněny buňky mrtvé (excitace při 552 nm) (4.6.6.2).*

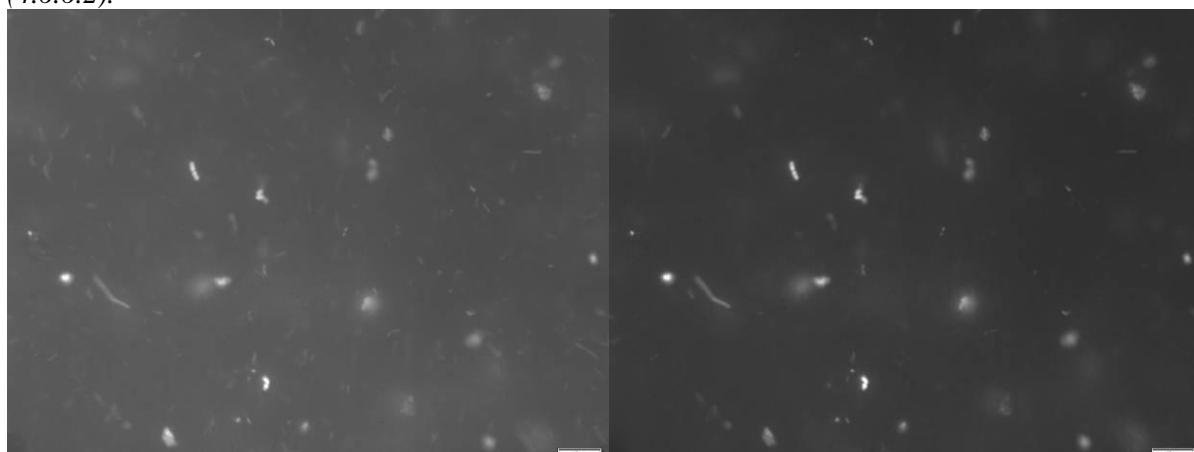




*Příloha 38 a 39: Fluorescenční mikroskop, částice č. 3 (probiotické kultury) uchovávané 4 týdny v Choceňském smetanovém jogurtu Vlevo zobrazeny buňky živé a mrtvé (excitace při 470 nm), vpravo zvýrazněny buňky mrtvé (excitace při 552 nm) (4.6.6.2).*



*Příloha 40 a 41: Fluorescenční mikroskop, částice č. 4 (směs částic s probiotickými kulturami a částic s práškovým ječmenem) uchovávané 4 týdny v Choceňském smetanovém jogurtu Vlevo zobrazeny buňky živé a mrtvé (excitace při 470 nm), vpravo zvýrazněny buňky mrtvé (excitace při 552 nm) (4.6.6.2).*



*Příloha 42 a 43: Fluorescenční mikroskop, částice č. 5 (ko-inkapsulát s probiotickými kulturami a s práškovým ječmenem) uchovávané 4 týdny v Choceňském smetanovém jogurtu Vlevo zobrazeny buňky živé a mrtvé (excitace při 470 nm), vpravo zvýrazněny buňky mrtvé (excitace při 552 nm) (4.6.6.2).*

