

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY
MATERIALS RESEARCH CENTRE

ENKAPSULACE MLÉČNÝCH BAKTERIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

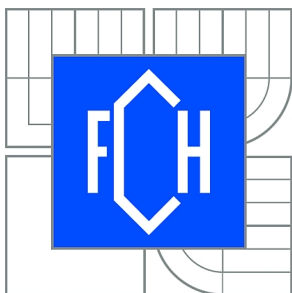
MONIKA VRTNÁ

BRNO 2014



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY

MATERIALS RESEARCH CENTRE

ENKAPSULACE MLÉČNÝCH BAKTERIÍ

ENCAPSULATION OF LACTIC ACID BACTERIA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

MONIKA VRTNÁ

VEDOUcí PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2014



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0818/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Centrum materiálového výzkumu	
Student(ka):	Monika Vrtná	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)	
Vedoucí práce	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti:	Ing. Petra Matoušková	

Název bakalářské práce:

Enkapsulace mléčných bakterií

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše - mléčné bakterie - fyziologie, využití; enkapsulace.
2. Metody - kultivace mléčných bakterií, stanovení viability FC, enkapsulační techniky, charakterizace částic DLS.
3. Experimentální část - enkapsulace mléčných bakterií rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* do organických částic, charakterizace, stabilita a životaschopnost enkapsulovaných bakterií v modelových fyziologických podmínkách.
4. Vyhodnocení výsledků a diskuse.

Termín odevzdání bakalářské práce: 23.5.2014

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

Monika Vrtná
Student(ka)

doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá enkapsulací dvou druhů probiotických bakterií do několika typů obalových materiálů, většinou polysacharidů. V teoretické části jsou popsány enkapsulační techniky aplikovatelné pro potravinářský průmysl.

V experimentální části byly připraveny částice alginátového a chitosanového typu, lišily se jak velikostí, tak různou modifikací, kdy byl do roztoku přidán roztok škrobu nebo karboxymethylcelulózy. Tyto částice byly následně použity pro enkapsulaci dvou probiotických kmenů - *Bifidobacterium breve* a *Lactobacillus acidophilus*. S využitím průtokového cytometru byla proměřena viabilita buněk z 24hodinové kultivace. Pod mikroskopem byla sledována stabilita jednotlivých částic, a to ihned po enkapsulaci a vložení do modelových potravin a poté po dvou dnech, po týdnu a po 4 týdnech inkubace. S využitím Bürkerovy komůrky byl po týdnu a po 4 týdnech pozorován poměr živých a mrtvých bakterií, a to jak uvnitř kapsule, tak i počet uvolněných živých a mrtvých bakterií mimo kapsuli. Byla také sledována stabilita a viabilita buněk v simulovaných fyziologických prostředích – v pankreatické, žlučové a žaludeční šťávě.

Jako nejvhodnější obalový materiál pro enkapsulaci probiotických bakterií byl potvrzen 2% alginát modifikovaný 2% roztokem karboxymethylcelulózy. Nejvyšší viabilita buněk byla stanovena v reálné modelové potravine – v mléce. Připravené částice s laktobacily jsou vhodné pro použití do potravinářského průmyslu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Enkapsulace, mikročástice, probiotika, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus*, enkapsulátor, optický mikroskop, průtoková cytometrie.

ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on encapsulation of two strains of probiotic bacteria. Lactic acid bacteria were encapsulated into several types of materials, mostly polysaccharides. The theoretical part describes the techniques of encapsulation applicable in the food industry.

During the experimental part alginate and chitosan microparticles were prepared. These particles exhibited different sizes and some of them were modified by starch and carboxymethyl cellulose. Particles were used for encapsulation of two strains - *Bifidobacterium breve* and *Lactobacillus acidophilus*. Using flow cytometry cell viability was measured after 24-hours cultivation of bacteria. Particles were observed immediately after encapsulation by optical microscopy and then long-term stability in model foods was evaluated after two days, a week and after four weeks of incubation. Using the Bürker chamber the alive and death bacteria were counted inside and outside the capsule. The stability and viability of the cells were studied also in the artificial intestinal, stomach and bile juices.

As the best material for encapsulation of lactic acid bacteria 2% alginate modified by carboxymethyl cellulose was found. The highest viability of bacteria was observed in milk as the real model food. Prepared particles are suitable for use in the food industry.

KEYWORDS

Encapsulation, microparticles, probiotics, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus acidophilus*, encapsulator, optical microscopy, flow cytometry.

VRTNÁ, M. *Enkapsulace mléčných bakterií*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 52 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc..

Prohlášení

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce doc. RNDr. Ivaně Márové, Csc. za odborné vedení a všestrannou pomoc při řešení problémů. Dále bych ráda poděkovala Ing. Janě Hurtové a Ing. Petře Matouškové za cenné rady, ochotu a pomoc při zpracování experimentální části.

Obsah

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Probiotika	9
2.1.1	Fyziologie probiotických bakterií	9
2.1.2	Využití probiotik	10
2.1.3	Rod <i>Lactobacillus</i>	10
2.1.4	Rod <i>Bifidobacterium</i>	11
2.2	Enkapsulace a její techniky	12
2.2.1	Sprejové sušení	13
2.2.2	Sprejové chlazení	14
2.2.3	Uzavření (entrapment) do liposomů	14
2.2.4	Kokrystalizace	14
2.2.5	Koacervace	15
2.2.6	Lyofilizace	15
2.2.7	Fluidní vrstva	15
2.2.8	Emulgace	15
2.3	Enkapsulátor	16
2.4	Vnější fáze používané pro enkapsulaci do potravin	17
2.4.1	Alginát	17
2.4.2	Chitosan	17
2.4.3	Škrob	18
2.4.4	Celulosa	18
2.5	Metody využívané ke stanovení životaschopnosti bakterií	19
2.5.1	Průtoková cytometrie	19
3	CÍLE PRÁCE	21
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
4.1	Použité chemikálie, přístroje a probiotické kultury	22
4.1.1	Chemikálie	22
4.1.2	Přístroje	22
4.1.3	Použité mikroorganismy	22
4.2	Kultivace laktobacilů	22
4.3	Příprava částic pro enkapsulaci mikroorganismů pomocí enkapsulátoru	23
4.3.1	Příprava alginátových částic	23
4.3.2	Příprava alginát-škrobových částic	23
4.3.3	Příprava alginát-karboxymethylcelulózových částic	23
4.3.4	Příprava chitosan-škrobových částic	23

4.4	Stanovení viability a počtu buněk pomocí průtokové cytometrie	24
4.5	Stanovení stability částic v modelovém prostředí lidského organismu	24
4.5.1	Složení modelové pankreatické šťávy	24
4.5.2	Složení modelové žaludeční šťávy	24
4.5.3	Složení modelové žlučové šťávy	24
4.6	Stanovení stability částic v modelových potravinách	24
5	VÝSLEDKY A DISKUSE	25
5.1	Stanovení viability pomocí průtokového cytometru	25
5.2	Stanovení životaschopnosti bakterií v simulovaných tělních tekutinách	26
5.2.1	Stanovení stability částic v pankreatické šťávě	26
5.2.2	Stanovení stability částic v žaludeční šťávě	26
5.2.3	Stanovení stability částic ve žlučové šťávě	27
5.3	Sledování částic pomocí optické mikroskopie	31
5.4	Stanovení stability částic v modelových potravinách	32
5.4.1	Životaschopnost bakterií v částicích v čase $t=0$	32
5.4.2	Životaschopnost bakterií v částicích po 2 dnech	32
5.4.3	Životaschopnost bakterií v částicích po 6 dnech	32
5.4.4	Sledování částic pomocí optické mikroskopie po 6 dnech	39
5.4.5	Životaschopnost bakterií v částicích po 4 týdnech	40
5.4.6	Sledování částic pomocí optické mikroskopie po 4 týdnech	47
6	ZÁVĚR	49
7	POUŽITÁ LITERATURA	50
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	52

1 ÚVOD

V posledních letech se zvyšuje zájem o zlepšování kvality potravin a doplňků za účelem podpory zdraví a prevenci nemocí. Byly provedeny mnohé pokusy o vytvoření částic, jejichž obal by byl schopen ochránit bioaktivní složky. Tyto částice by měly být vyvinuty tak, aby neměly nepříznivý vliv na vlastnosti potravinového výrobku, do kterého jsou částice zabudovány a zároveň by měly být schopny dodávat prospěšné bioaktivní látky na specifická místa v těle spotřebitele [1]. V tomto případě dochází k vytvoření takového obalu enkapsulované látky, který by byl schopen odolat nízkému pH v žaludku člověka, udržet probiotika uvnitř kapsle co nejdéle naživu a ve vhodnou dobu by mělo dojít v trávicím traktu k rozpadu částice a k uvolnění probiotik do těla.

Enkapsulace je dnes velmi řešeným tématem v oblasti potravinářství. Jak do potravin, tak do potravinových doplňků se přidávají různé typy funkčních sloučenin za účelem zvyšování jejich kvality a nutriční hodnoty. K enkapsulaci dochází z toho důvodu, že některé funkční skupiny jsou citlivé na vnější prostředí nebo na proces zpracování. Jakmile jsou však enkapsulovány, jsou před vnějšími vlivy ochráněny. Kromě této ochrany zajišťuje zachování stability během zpracování a skladování a zamezí nežádoucím reakcím bioaktivních molekul s potravinovou maticí [2].

Bakalářská práce se zabývá enkapsulací mléčných bakterií do organických částic. Pomocí enkapsulátoru byly vytvořeny částice, které se lišily materiálem obalů. Tyto částice byly vloženy do modelových potravin a do simulovaných trávicích šťáv. Po určitých časových intervalech byla sledována viabilita bakterií a také postupné uvolňování buněk mimo prostor částice. Cílem práce bylo zabalit aktivní látku do obalu z materiálu, který by byl požitelný a který by umožnil vytvoření bariéry mezi vnitřní fází a okolím. Tento materiál by měl zároveň udržet enkapsulované bakterie co nejdéle naživu a bakterie by z něj měly být uvolňovány ve chvíli, kdy je potřeba, tedy až ve střevním traktu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Probiotika

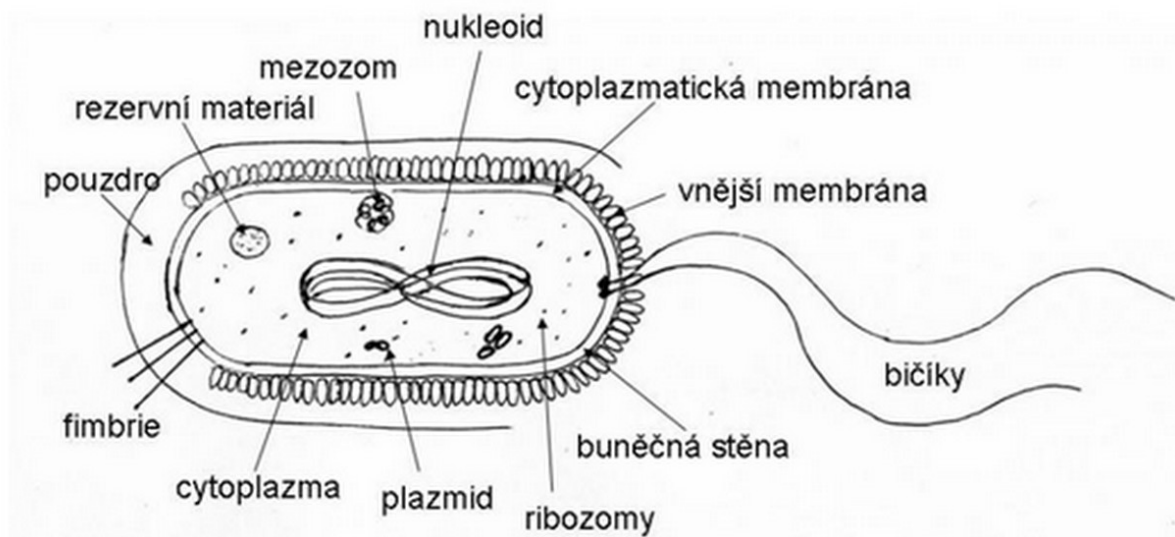
Probiotika jsou mono- nebo směsné kultury živých mikroorganismů, které se dostávají do těla v potravě a mají příznivý vliv na zdraví člověka nebo zvířete. Pokud jsou podána v adekvátním množství, mají pozitivní zdravotní účinek na svého hostitele. Podporují selektivně růst nebo aktivitu jednoho druhu bakterií nebo omezeného množství střevních bakterií a tím pozitivně ovlivňují složení střevní mikroflóry tlustého střeva. Aby se mohly některé druhy bakterií zařadit mezi probiotika, musí splňovat několik požadavků. Bakteriální kmeny musí mít prokazatelně pozitivní vliv na zdraví hostitele a musí být zdravotně nezávadné, nesmí být toxické ani patogenní. Musí být odolné k působení kyselosti žaludeční šťávy a žluči a jsou aplikované v živém stavu. Mezi nejčastější probiotika se řadí laktobacily, bifidobakterie či streptokoky. Mezi probiotické organismy se neřadí jen některé druhy bakterií, ale také kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) či plísně (*Aspergillus oryzae*) [3].

Střevní mikroflóra se udržuje v určité rovnováze mikroorganismů, které jsou organismu potenciálně škodlivé nebo prospěšné. Tato střevní flóra se v průběhu života fyziologicky mění s věkem a výživou, při léčbě antibiotiky, ale také při výskytu některých onemocnění. Například průjem je doprovázen snižováním počtu probiotických bakterií a naopak zvyšováním počtu fakultativních anaerobních bakterií. Ve stáří potenciálně škodlivých mikroorganismů přibývá. Pozitivní účinek probiotických organismů v mikrobiálním ekosystému je vysvětlován tím, že probiotika iniciují aktivaci určitých genů lokalizovaných v buňkách a tak příznivě ovlivňují široké spektrum střevních funkcí. Tento účinek je však jen dočasný a většinou je detekovatelný jen po dobu přijímání potravin s probiotiky [4].

2.1.1 Fyziologie probiotických bakterií

Bakterie jsou malé mikroskopické jednobuněčné organismy, které přežívají téměř v jakémkoliv prostředí, nevadí jim ani extrémně vysoké, ani extrémně nízké teploty. Bakterie dosahují délky několika mikrometrů a jejich typickým tvarem jsou tyčinky nebo koky. Většina bakterií se skládá z cytoplazmatické membrány, což je velmi tenká obalová část tvořená ze specifického buněčného stavebního materiálu, z fosfolipidů. Tato biomembrána slouží jako ohraničující pásmo, přes které putují živiny do buňky a nepotřebné látky z buňky ven. Vnější část bakterie je tvořena pevnou buněčnou stěnou, jejíž hlavní složkou je peptidoglykan. Podle struktury buněčné stěny se bakterie dělí na grampozitivní a gramnegativní. Uvnitř buňky je jádro prokaryotické buňky, tvoří jej molekula DNA, která v sobě nese genetickou informaci. Dále se v buňce nachází cytoplazma, která obsahuje vodu a bílkovinnou složku a ribozomy [6].

U některých typů bakterií se nachází i vakuola či plazmid. Plazmid je malá molekula DNA kruhovitěho tvaru. Mezi další části bakterie se řadí pouzdro, fimbrie a bičík. Pouzdro je vrchní, ochranná část bakterie, skládá se z polysacharidů nebo proteinů. Fimbrie jsou vlákna, která vycházejí z povrchu, mají krátký a vzpřímený tvar, díky čemu se bakterie může nasměrovat k nejbližšímu hostiteli a přichytit se k němu. Bičík slouží k pohybu, dosahuje délky přibližně 20 µm a tloušťky 20 nm [6].



Obr.1 Stavba bakteriální buňky [6]

2.1.2 Využití probiotik

Probiotika jsou aplikována do trávicího ústrojí ve formě, která obsahuje dostatečné množství životaschopných bakterií. Bakterie musí mít schopnost přežít v trávicím ústrojí a musí být metabolicky aktivní. Probiotika mohou být využita pro prevenci a léčbu onemocnění zažívacího ústrojí, průjemových onemocnění, redukci hladiny sérového cholesterolu, pro prevenci kolorektální rakoviny a rakoviny močového měchýře [3].

Probiotické mikroorganismy se nejčastěji používají jako doplňky stravy nebo jako součást specifických mléčných výrobků. V poslední době se využívají také jako součást kojenecké dětské výživy. V případě různých doplňků stravy se jedná většinou o lyofilizované kultury, které se mohou skládat z jednoho nebo z více druhů probiotických bakterií. Tyto kultury jsou samostatně nebo s dalšími látkami vyráběny ve formě kapslí, tobolek či tablet. Kromě toho, že se kultury přidávají do mléčných a zakysaných mléčných výrobků, tak se můžeme setkat i s příkladem, kdy se bifidobakterie přidávají do trvanlivých, tepelně neupravených masných výrobků [7].

2.1.3 Rod *Lactobacillus*

Z rodu *Lactobacillus* se v mlékařském průmyslu nejvíce využívají rody *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* a *Lactobacillus casei*. Buňky těchto bakterií mají tvar pravidelných tyčinek, občas také koků, mohou se vyskytovat jak jednotlivě, tak v řetězcích. Optimální růstová teplota se pohybuje v rozmezí od 30°C do 40°C, optimální pH je mezi 5,5 a 6,2. Tyto bakterie jsou náročné na živiny v médiu, kromě laktózy a glukózy potřebují aminokyseliny, nukleotidy a některé vitamíny [8].

Rod *Lactobacillus* obsahuje fakultativně anaerobní nebo mikroaerofilní nepohyblivé bakterie mléčného kvašení, jež fermentují glukózu a laktózu. Hlavním produktem fermentace je kyselina mléčná, mezi další produkty tohoto procesu patří kyselina octová, ethanol a oxid uhličitý. Nacházejí se ve fermentovaných rostlinných i živočišných materiálech i výrobcích, dále v nápojích, čisté i znečištěné vodě či v kysaném zelí. V potravinářství se využívají zejména proto, že kyselina mléčná snižuje pH v daném prostředí a tím brání množení hnilobných a patogenních bakterií [9].

Lactobacillus acidophilus je tyčinková bakterie, jejíž šířka je 0,6-0,9 µm a délka 1,5-6 µm. Vyskytuje se jednotlivě, ve dvojicích nebo tvoří krátké řetězky. Optimální teplota pro její růst

je 39°C. Tyto kmeny mají díky svým vhodným vlastnostem využití v mlékárenství při výrobě acidofilního mléka, podmáslí a smetany, dále ve zdravotnictví, kdy se pěstují speciální kmeny odolné vůči některým druhům antibiotik. Tento druh bakterie se řadí do skupiny probiotik, které mají dieteticko-léčebné účinky a projevují se v potlačování nežádoucí mikroflóry trávicího systému [10].



Obr. 2 *Lactobacillus acidophilus* po 24 hodinové kultivaci pod optickým mikroskopem (40x)

2.1.4 Rod *Bifidobacterium*

Bifidobakterie jsou grampozitivní, anaerobní bakterie ve tvaru tyčinek, které bývají často rozštěpeny. Vyskytují se jak jednotlivě, tak i v řetízcích nebo hvězdicovitém uspořádání. Optimální teplota pro její růst je 28°C – 41°C, optimální hodnota pH je 6,5 - 7. V dnešní době je známo 38 bakteriálních druhů, z toho se šest využívá pro své probiotické vlastnosti. Mezi tyto druhy se řadí *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium thermophilum*.

Bifidobacterium breve jsou anaerobní bakterie, jejich tvarem jsou tyčinky. U dětí, které byly kojené bylo zjištěno, že většinu bakterií tlustého střeva tvoří právě tento druh. S tím, jak člověk stárne, tyto bakterie ubývají. Úkolem *Bifidobacterium breve* v zažívacím traktu je ničit nežádoucí mikroflóru ve střevě [9].



Obr. 3 *Bifidobacterium breve* po 24 hodinové kultivaci pod optickým mikroskopem (40x)

2.2 Enkapsulace a její techniky

Enkapsulace je proces, při kterém dojde k zachycení jedné látky uvnitř látky druhé. Tím se vytvoří částice, která může mít průměr několik nanometrů až milimetrů. Enkapsulovaná částice se skládá ze dvou částí – z vnější fáze, která umožňuje zapouzdření, také se někdy může označovat jako nosič, kapsle, matrice či membrána. Látka, která je enkapsulovaná se nazývá vnitřní fáze, účinná látka nebo výplň. Je známo množství látek různých typů a vlastností, které mohou být použity k zachycení a zapouzdření pevné látky, kapaliny nebo plynů, ale pouze jen poměrně nízký počet byl certifikován k využití v potravinářství [11].

Při enkapsulaci dochází k obklopení aktivní látky v plynné, kapalně nebo práškové formě nosným materiálem v plynu nebo v kapalně fázi. Díky zapouzdření se může zlepšit dodání bioaktivních molekul a živých buněk do potravin. Materiály, které se používají pro konstrukci ochranného pláště musí být potravinářské kvality, biologicky odbouratelné a schopné vytvořit bariéru mezi vnitřní fází a okolím. Nejčastěji jsou používány polysacharidy, ale také lipidy nebo proteiny. Mezi nejčastěji využívané techniky patří sprejové sušení, sprejové chlazení, vytlačování a vstřikování taveniny, emulgace, lyofilizace, koacervace či kokrytalizace. Tato technologie se využívá z mnoha důvodů a má několik výhod. Mezi nejvýznamnější se řadí to, že poskytuje bariéru mezi citlivými bioaktivními látkami a životním prostředím, maskuje nepříjemné pocity při jídle, jako je hořká chuť či nepříjemná vůně, stabilizuje složky potravin, zlepšuje stabilitu finálních výrobků, zabraňuje reakcím s jinými komponenty v potravinářských produktech, jako je kyslík nebo voda nebo může být využita pro imobilizaci buněk nebo enzymů například při fermentaci [12].

Tab. 1 Přehled jednotlivých technik enkapsulace [13]

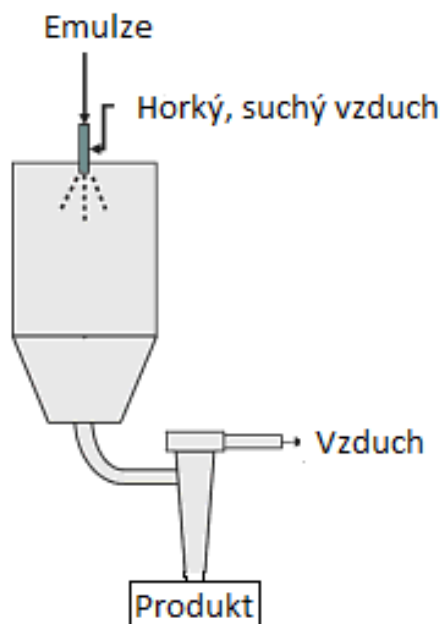
Enkapsulační techniky	Hlavní kroky při enkapsulaci
1. Sprejové sušení	a. Příprava disperze b. Homogenizace disperze c. Atomizace disperze d. Dehydratace částic
2. Sprejové chlazení	a. Příprava disperze b. Homogenizace disperze c. Atomizace disperze
3. Fluidní vrstva	a. Příprava roztoku na obal b. Příprava částic jádra c. Zabalení částic v jádru
4. Vytlačování a vstřikování taveniny	a. Příprava taveniny b. Disperze jádra do roztaveného polymeru c. Chlazení chladným prostředím nebo dehydratací rozpouštědlem
5. Lyofilizace	a. Míchání částic účinné látky v roztoku na obal b. Sublimační sušení směsi
6. Koacervace	a. Vytvoření tří nemísitelných fází b. Depozice obalu c. Tuhnutí obalu
7. Odstředivé oddělení	a. Smíchání částic účinné látky b. Nalítí směsi na rotační disk pro zapouzdření malých částic c. Sušení
8. Kokrystalizace	a. Příprava přesyceného roztoku sacharózy b. Přidání aktivní látky do přesyceného roztoku c. Dodání tepla poté, co dosáhne roztok sacharózy teploty krystalizace
9. Uzavření do liposomů	a. Mikrofluidizace b. Ultrazvuk c. Odpaření reverzní fáze

2.2.1 Sprejové sušení

Sprejové sušení se využívá již od roku 1950, proto tuto metodu můžeme zařadit mezi jeden z nejstarších procesů enkapsulace aktivních látek. Nejdříve se začaly vyrábět aromatické oleje s určitou ochranou proti degradaci, dnes se využívá běžně v potravinářském průmyslu pro přípravu stabilních přídatných látek a příchutí. Mezi látky, které byly zapouzdřeny touto metodou a následně využívány jako příchutě se řadí bílkoviny, gummy a modifikované škroby [14].

Základní proces sušení rozprašováním spočívá v rozpuštění, emulgaci či disperzi aktivní látky v nosiči, následné atomizaci a sprejování dané směsi do horké komory. Ve sprejových sušičkách jsou rozprašovací trysky, které buď sprejují shora dolů nebo zdola nahoru jako fontána. Během sušicího procesu dochází k tvorbě filmu na povrchu kapky, kdy stoupá koncentrace látky v kapce, až nakonec dojde ke vzniku suché částice. Tyto mikrokapsle poté spadnou na dno a mohou být posbírány. Sprejové sušičky jsou vyrobeny tak, aby docházelo k minimálnímu přehřátí částic, především u těch částic, které obsahují teplotně sensitivní

látky. To je zajištěno díky použití vysokotlakých trysek nebo odstředivých kol, kde současně proudí jak vzduch, tak částice [14].



Obr. 4 Schéma sprejové sušárny [12]

2.2.2 Sprejové chlazení

Tato metoda je podobná sprejovému sušení, ale při nižších teplotách nedochází k odpařování vody. Při sprejovém chlazení jsou jádrové a stěnové směsi rozprašeny chlazeným vzduchem v chladicí komoře, což způsobí ztuhnutí stěny kolem jádra. Jako vnější fáze se obvykle používá nějaká forma rostlinného oleje nebo jeho derivátů, také tuky nebo glyceroly. Díky tomu, že mikrokapsle mají lipidový povlak, jsou nerozpustné ve vodě a jsou využívány pro enkapsulaci látek, které jsou ve vodě rozpustné (minerály, enzymy, vitamíny rozpustné ve vodě) [14].

2.2.3 Uzavření (entrapment) do liposomů

Liposomy se skládají z vodné fáze, která je obklopena fosfolipidovou membránou. Mezi nejčastěji využívané fosfolipidy patří lecitin a cholesterol. Pokud je lecitin dispergován ve vodě, liposomy se tvoří spontánně. Tyto částice se používají pro přenos vakcín, hormonů, enzymů a vitamínů [15].

Částice se skládají z jedné nebo více vrstev lipidů, tím pádem jsou netoxické a použitelné v potravinovém průmyslu. Pomocí velikosti a změny polohy lipidů můžeme změnit propustnost, stabilitu, povrchovou aktivitu a afinitu částice. Tato technika je oproti ostatním výhodná v tom, že má vysokou účinnost zapouzdření, jednoduchou výrobní metodu a dobrou stabilitu částic v průběhu času [14].

2.2.4 Kokrystalizace

Tato metoda enkapsulace patří mezi novější, jako obal aktivní látky se využívá sacharóza. Cukrový sirup je v přesyceném stavu a udržuje při dostatečně vysoké teplotě tak, aby se zabránilo krystalizaci. Předem určené množství aktivní látky se poté přidá do sacharózového sirupu za intenzivního míchání a roztok začne krystalizovat. Míchání trvá tak dlouho, dokud nezačnou vypadávat z nádoby aglomeráty. Takto enkapsulované částice se potom suší na požadovanou vlhkost. Mezi výhody této techniky patří to, že prostřednictvím tohoto

procesu může být aktivní látka v kapalně formě převedena na suchou práškovitou formu bez dalšího sušení [16].

2.2.5 Koacervace

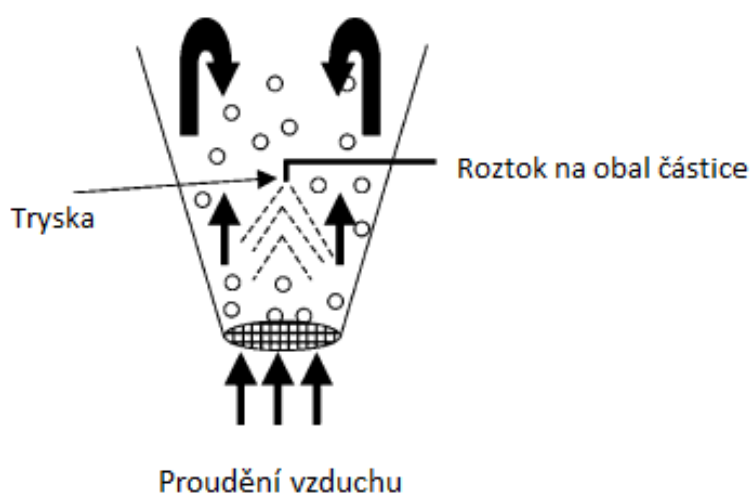
Při této metodě dochází k separaci polymerního roztoku na dvě nemísitelné kapalně fáze, které se nazývají koacervační fáze a koacervační médium. V prvním kroku se přidávají do kapaliny nerozpustné vosky nebo nerozpustné kapalně polymery. Monomer je rozpuštěn a následně polymeruje na rozhraní. Během koacervace se vytváří drobné kapky, které se buď usazují nebo spojují a vytváří oddělenou koacervovanou fázi. V některých případech je potřeba přidat stabilizátor, aby nedocházelo ke koagulaci výsledných mikročástic – například pokud jsou v roztoku přítomna jádra, tak se kapky koacervátu kolem nich hromadí a po přidání vhodného síťovacího činidla vytváří stěnu koacervátu. Nakonec jsou mikrokapsle odděleny filtrací nebo odstředěním, poté se promyjí vhodným rozpouštědlem a vysuší se pomocí sprejového sušení [17].

2.2.6 Lyofilizace

Lyofilizace je proces, který se využívá k dehydrataci většiny tepelně sensitivních materiálů a aromatických látek. Tato metoda byla použita k enkapsulaci esencí a přírodních aromatických látek, které jsou rozpustné ve vodě. Lyofilizace se řadí mezi jednodušší techniky, jedinou nevýhodou je zdoluhavé sublimační sušení, které může trvat až 20 hodin. Udržení těkavých sloučenin během lyofilizace závisí na chemickém charakteru systému [14].

2.2.7 Fluidní vrstva

Tato metoda byla původně vyvinuta pro farmaceutický průmysl, v dnešní době je čím dál tím více využívána v potravinářském průmyslu k doladění účinku funkčních složek a přísad. Mezi hlavní přínosy těchto mikrokapslí patří zvyšování životnosti aktivní látky, maskování chuti, snadná manipulace, řízené uvolňování a zlepšení chuti a barvy. Aktivní látka je suspendována v komoře s řízenou teplotou a vlhkostí a za vysoké teploty dochází k atomizaci vnější fáze. Tím dochází k obklopení aktivní látky vnější fází a k vytvoření částic. Na vytvoření vnější fáze se využívají deriváty celulózy, lipidy, proteinové deriváty nebo deriváty škrobu [14].



Obr. 5 Schéma tvorby částic pomocí fluidní vrstvy [13]

2.2.8 Emulgace

Emulgace je poměrně často využívaná metoda. Používá se v případě ve vodě rozpustných aktivních látek. Existují dvě kombinace emulzí – emulze voda v oleji, kdy olej je

obecně nepolární kapalina a emulze olej ve vodě, kdy je voda obecně polární kapalina. Druhý typ emulze může být sušen různými sušícími metodami, například sprejovým sušením za vytvoření prášku [11].

2.3 Enkapsulátor

Enkapsulátor je přístroj, který slouží k polymernímu zapouzdření chemických látek, biologických molekul, drog, vůní, pigmentů, extraktů, buněk a mikroorganismů za sterilních i nesterilních podmínek. Velikost částic závisí na zvolené velikosti trysky, ta se pohybuje od 0,15 do 2 mm.

Práce na enkapsulátoru spočívá v tom, že mikroorganismy, které je třeba zapouzdřit, se smíchají se zapouzdřovacím polymerem a směs se dá do tlakové lahve. Směs produktu a polymeru je tlačena tlakovým vzduchem do pulzační komory, kde kapalina prochází přes trysku a na výstupu z trysky se rozděluje do jednotlivých kapiček stejné velikosti. Tyto kapky procházejí elektrickým polem mezi tryskou a elektrodou, kde získají povrchový náboj. Rozptýlení částic dopadajících do vytvrzovacího roztoku způsobí elektrostatické odpuzivé síly [18].

Velikost jednotlivých částic reguluje několik parametrů, mezi něž se řadí frekvence vibrací, amplituda, velikost trysky, rychlost průtoku a fyzikální vlastnosti směsi produktu s polymerem. Optimální parametry tvorby částic se indikují vizualizací tvorby částic v reálném čase ve světle stroboskopické lampy. Při dosažení optimálních parametrů je jasné vidět stálý řetízek kapiček. Chybně vytvořené částice, které vznikají na začátku a na konci běhu, jsou zachyceny v krycím sklíčku, které vložíme pod proud částic. Vznikající částice jsou jímány ve vytvrzovacím roztoku, který je nalit na Petriho misce. Roztoky na Petriho misce jsou kontinuálně míchány magnetickým míchadlem, aby se předešlo shlukování jednotlivých částic. Petriho miska nebo roztok musí být elektricky uzemněn. Po vytvoření dostatečného množství částic jsou enkapsulované částice zfiltrovány a použity k dalším účelům [18].



Obr. 6 Enkapsulátor



Obr. 7 Tvorba částic

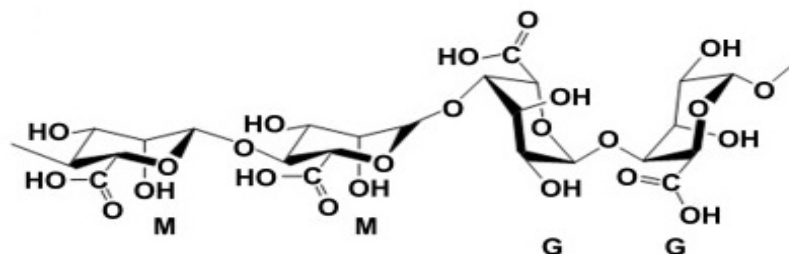
2.4 Vnější fáze používané pro enkapsulaci do potravin

Materiály, které se využívají pro vytvoření vnější fáze pro potravinářské účely jsou většinou biomolekuly, obvykle polysacharidy. Nejčastěji to je alginát, škrob a celulóza a jejich deriváty. Tyto biomolekuly musí být biologicky odbouratelné, musí vytvořit bariéru mezi vnitřním a vnějším prostředím, musí být schopné udržet aktivní látku v kapsli během zpracování a skladování a nesmí reagovat s aktivní látkou [11].

2.4.1 Alginát

Alginát je nevětvený lineární kopolymer β -D-mannuronové kyseliny a α -L-guluronové kyseliny spojené glykosidovými vazbami. Řetězce jsou spirálovité až prakticky lineární. Některé algináty jsou rozpustné, některé nikoli – rozpustnost závisí na hodnotě pH, iontové síle a druhu iontů. V kyselých roztocích se sráží alginová kyselina, při pomalém okyselování se místo sraženiny tvoří gel. Alginát je důležitou součástí řas, vyskytuje se jako exopolysacharid u bakterií, především u bakterie *Pseudomonas aeruginosa* [19].

Algináty se používají v koncentraci 0,25-0,5 % jako zahušťovadla, stabilizátory a emulgátory pro zlepšení konzistence mnoha potravin. Díky svým schopnostem zesílení a vytvoření hydrogelů se využívají pro enkapsulaci především v biomedicíně [20].

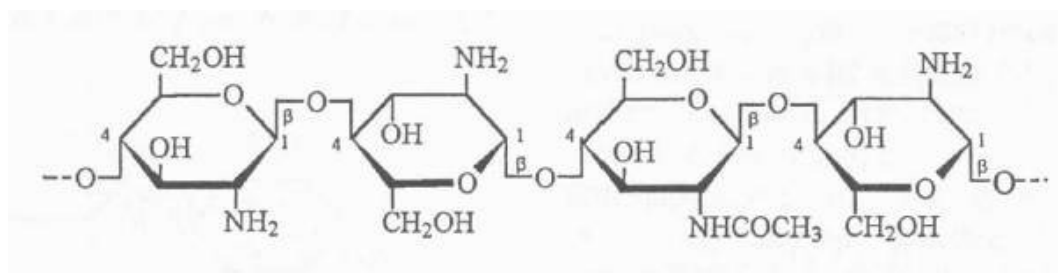


Obr. 8 Struktura alginátu [19]

2.4.2 Chitosan

Chitosan je získáván alkalickou deacetylací chitinu, což je po celulóze druhý nejrozšířenější polysacharid. Chitosan obsahuje 5-25 % N-acetylglukosaminových jednotek a 75-95 % glukosaminových jednotek. Mezi jeho fyzikální a chemické vlastnosti se řadí to, že je nerozpustný ve vodě a v organických rozpouštědlech, ale je rozpustný ve zředěných kyselinách, například v mravenčí a octové. Díky tomu, že má volné aminoskupiny, nese polymer kladný náboj a může reagovat s negativně nabitými povrchy nebo polymery.

Chitosan je k dispozici ve formě suchých vloček, roztoku nebo jemného prášku. Je nestravitelný, ale výrazně snižuje hladinu cholesterolu a tuků v krevním séru a v játrech. Používá se jako emulgátor a stabilizátor emulzí, jako zahušťovadlo, stabilizátor pěn, želírující činidlo, v kosmetice nebo ve farmacii [19].



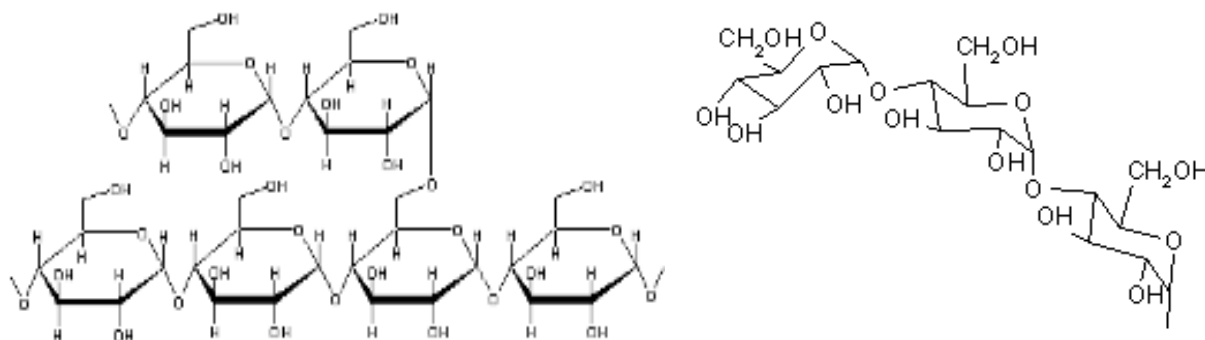
Obr. 9 Struktura chitosanu [21]

2.4.3 Škrob

Škrob je hlavní zásobní živinou rostlin sloužící jako pohotová zásoba glukosy. Na rozdíl od strukturních polysacharidů, které jsou součástí buněčných stěn, se škrob nachází v organelách cytoplasmy, které se nazývají plastidy. V pletivech, kde probíhá fotosyntéza, je v malém množství v chloroplastech, ve velkém množství v amyloplastech. Je uložen v nerozpustných micelách, které se nazývají škrobová zrna nebo škrobové granule.

Většina nativních škrobů je směsí dvou homopolysacharidů, které jsou složené z molekul α -D-glukopyranosy – amylosy a amylopektinu. Tyto homopolysacharidy se obvykle vyskytují v hmotnostním poměru 1:3. Amylosa je složena z několika polymerů s různým stupněm polymerace. Zpravidla obsahuje 1000-2000, v některých případech, například u bramborového škrobu, až 4500 glukosových jednotek. V dnešní době se nativní škroby různými způsoby modifikují, aby se potlačovaly negativní vlastnosti nebo aby se vytvořily škroby s vhodnými fyzikálními a chemickými vlastnostmi [19].

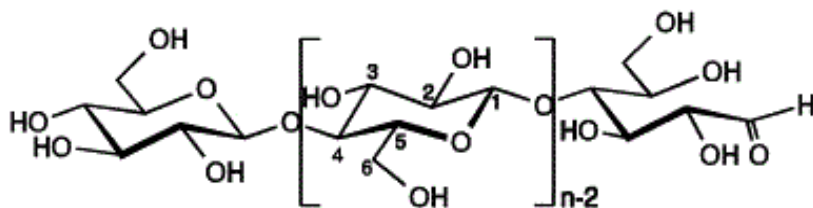
Škrob je jednou z nejdůležitějších složek v potravinářském, textilním, lékařském a chemickém průmyslu. Škrob má poměrně nízkou cenu, je neškodný a široce dostupný, proto se využívá i jako nosič pro nutriční látky a léčiva [19].



Obr. 10 Struktura amylopektinu a amylosy [22,23]

2.4.4 Celulosa

Celulosa je polysacharid sestávající z beta-glukosy. Glukosové jednotky jsou spojené vazbou β -1,4 a tvoří dlouhé, nerozvětvené řetězce, které jsou zcela nerozpustné ve vodě, zředěných kyselinách, zásadách i ve většině rozpouštědel. Celulosa je rozpustná v koncentrovaných kyselinách, protože dochází k hydrolýze na rozpustné fragmenty s kratším řetězcem. Na rozdíl od škrobu se nevětví, ale zůstává ve formě dlouhých, rovných řetězců. Celulosa je nejrozšířenější organickou sloučeninou na zemském povrchu, ročně jí vzniká až 10^{12} tun. Vyskytuje se jako základní strukturní polysacharid buněčných stěn vyšších rostlin [19].



Obr. 11 Struktura celulosy [24]

2.5 Metody využívané ke stanovení životaschopnosti bakterií

2.5.1 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je systém, který využívá principy mikroskopie a citlivé detekce světelného signálu. Umožňuje měření a analýzu fyzikálně-chemických vlastností buňky nebo jiných biologických částic během jejich průchodu laserovým paprskem. Buňky jsou unášeny proudem nosné kapaliny do měrné cely, kde jsou analyzovány. Jsou analyzovány laserovým paprskem - ve chvíli, kdy buňka tento paprsek kříží, dochází k lomu a rozptylu světla. Podle směru a úhlu lomu bývá označován jako „forward scatter“ (přímý rozptyl) a „side scatter“ (boční rozptyl). Přímý rozptyl je charakterizován lomem světla o malém úhlu, do 13°, a je úměrný velikosti buňky. Úhel bočního rozptylu je 90° a je indikátorem vnitřní buněčné struktury (granularity). V průtokové cytometrii je detekována i fluorescence procházejících buněk nebo částic. Fluorescenční barviva se nazývají fluorochromy a jsou navázané na analyzované buňky, nebo částice absorbují světlo určité vlnové délky vyzařované laserem a následně vyzařují část takto absorbovaného světla o odlišné vlnové délce. Používají se fluorochromy, které mají stejné absorpční spektrum a jiné emisní spektrum [25].

Průtokový cytometr se skládá ze tří systémů – fluidního, optického a elektronického. Fluidním systémem je proces řízen, jakmile je vzorek aplikován do průtokového cytometru a částice jsou náhodně rozděleny v trojrozměrném prostoru. Vzorek musí být seřazen do proudu jednotlivých částic, které mohou být vyšetřovány detekčním systémem stroje. Fluidní systém se skládá z centrálního jádra, kterým je vstřikován vzorek. Při pohybu nosné kapaliny je vytvářen masivní tažný efekt na zužující se centrální komoru, což mění rychlost toku centrální kapaliny. Její přední tok se stává parabolický s největší rychlostí v jeho středu a nulovou rychlostí u stěn kapiláry. Výsledkem tohoto děje je proces, který se nazývá hydrodynamická fokusace. Díky ní jsou analyzované částice vyrovnány a seřazeny tak, že se pohybují jedna za druhou v úzkém středovém svazku [26].

Optický systém je složen z excitační části, která je tvořena laserem a soustavou čoček a hranolů usměrňujících světelný paprsek. Sběrná část je část optického systému a je tvořena z optických zrcadel a filtrů, které umožňují detekci světelných kvant specifické vlnové délky příslušnými optickými detektory. Specifičnost detekce je řízená optickými filtry, které blokují určité vlnové délky, zatímco propouštějí ostatní. Elektronický systém převádí optický signál na elektrický a zároveň jej digitalizuje pro počítačovou analýzu [26]. Když světlo dosáhne fotodetektoru, vygeneruje se malý proud, který má hodnotu několika miliampérů. Jeho napětí má amplitudu úměrnou k celkovému počtu fotonů, které detektor přijme. Toto napětí je pak zesíleno řadou lineárních nebo logaritmických zesilovačů a analogově-digitálními konvektory převedeno na elektrické signály o dostatečné velikosti (5 – 10 voltů), aby mohly být graficky vyneseny [26].

Stanovení viability buněk pomocí detekce membránové integrity je založeno na aplikaci látek, které za běžných podmínek neprocházejí neporušenými buněčnými membránami, případně jsou ihned vylučovány zpět do extracelulárního prostředí. Ale v případě, že je cytoplazmatická membrána narušena natolik, že látky mohou do buňky projít, dojde k vazbě na složky buněčné hmoty a k zesílení nebo k posunu spektra fluorescence. Buňky, které mají takto narušené membrány, nejsou považovány za životaschopné. K tomuto určení se využívají především látky, které se v buňce vážou na nukleové kyseliny, protože ty se vyskytují ve všech buňkách mikroorganismů v dostatečném množství. Do této skupiny látek patří propidiumjodid, což je nejrozšířenější fluorescenční sonda vůbec. Propidiumjodid je fenantrolinové interkalační činidlo, které se váže na nukleové kyseliny a po vazbě dochází k posunu a zesílení intenzity fluorescence emitované v červené oblasti spektra. Toto barvivo se využívá v mikrobiologii jak pro určení viability kvasinek, tak bakterií [28].



Obr. 12 Průtokový cytometr

3 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem předložené práce je studium probiotických kultur, možností jejich enkapsulace a sledování životaschopnosti enkapsulovaných bakterií v modelových fyziologických podmínkách a simulovaných potravinách. Za tímto účelem budou provedeny následující dílčí úkoly:

1. Zpracování literární rešerše zaměřené na popis mléčných bakterií, jejich fyziologii, využití a metody enkapsulace.
2. Optimalizace metod kultivace mléčných bakterií, stanovení viability buněk pomocí průtokové cytometrie a optické mikroskopie, zavedení techniky enkapsulace bakterií do mikročástic.
3. Enkapsulace mléčných bakterií rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* do organických částic, charakterizace, stabilita a životaschopnost enkapsulovaných bakterií v modelových fyziologických podmínkách.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie, přístroje a probiotické kultury

4.1.1 Chemikálie

Chitosan, Sigma-Aldrich (SRN)
Alginát sodný, Sigma-Aldrich (SRN)
Cholesterol, Sigma-Aldrich (SRN)
Tripolyfosfát sodný, Sigma-Aldrich (SRN)
Škrob rozpustný p.a., Lach-Ner (ČR)
Karboxymethylcelulosa, Serva (SRN)
Lecithin, Mogador (ČR)
Kyselina chlorovodíková 35%, Lach-Ner (ČR)
Hydroxid sodný p.a., Lach-Ner (ČR)
Chlorid vápenatý p.a., Lachema (ČR)
Močovina p.a., Penta (ČR)
Kyselina trichloroctová, Serva (SRN)
Hydrogenuhličitan sodný p.a., Lach-Ner (ČR)
Kyselina octová 98%, Lach-Ner (ČR)
Uhličitan sodný p.a., Lach-Ner (ČR)
Bile salts – směs kyseliny cholové a deoxycholové, Sigma-Aldrich (ČR)

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

4.1.2 Přístroje

Analytické váhy – Boeco
Optický mikroskop - Intraco Micro
Enkapsulátor – Büchi B-395 Pro
Průtokový cytometr - Apogee A50, Apogee Flow Systems

4.1.3 Použité mikroorganismy

V této práci byly v experimentální části použity bakteriální kultury *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833 a *Bifidobacterium breve* CCM 7825^T, které byly získány z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

4.2 Kultivace laktobacilů

Pro kultivaci bakteriálních kultur *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium breve* bylo použito komerční MRS médium s názvem Lactobacillus MRS agar.

Tab. 2 Základní složky MRS média

pepton	10 g
hovězí extrakt	10 g
kvasničný extrakt	5 g
glukóza	20 g
agar	12 g

Médium bylo smícháno s destilovanou vodou v určitém poměru v Erlenmayerově baňce a sterilizováno v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem po dobu 30 minut. Kultury byly

zaočkovány ve sterilním boxu. Z Erlenmayerovy baňky bylo odebráno 6 ml kultury mikroorganismů do 200 ml sterilního média v 500ml Erlenmayerově baňce.

Kultivace probíhala při 37°C po dobu 24 hodin. Poté byly kultury použity na stanovení viability na průtokovém cytometru a k enkapsulaci.

4.3 Příprava částic pro enkapsulaci mikroorganismů pomocí enkapsulátoru

Pro přípravu částic, které byly určeny pro enkapsulaci mikroorganismů byly použity polysacharidové látky alginát a chitosan, které byly v různém poměru smíchány se škrobem a karboxymethylcelulosou.

4.3.1 Příprava alginátových částic

Do zásobní lahve u enkapsulátoru bylo nalito 40 ml 2% alginátu a 40 ml kultury bakterií z 24hodinové kultivace. Jako srážecí pufr byl použit 2% chlorid vápenatý. Byly použity celkem dvě velikosti trysek, 300 µm a 450 µm. Obdobným způsobem přípravy byly vytvořeny i částice ze 4% alginátu při použití trysky 300 µm.

Částice vytvořené pomocí enkapsulátoru byly zfiltrvány a inkubovány v modelových potravinách a do simulovaných fyziologických prostředích.

4.3.2 Příprava alginát-škrbových částic

Alginátové částice byly smíchány se škrobem v poměru 80 % : 20 % a z 70 % : 30 %. Do zásobní lahve bylo nalito v prvním případě 8 ml 1% škrobu, 32 ml 2% alginátu a 40 ml kultury z 24hodinové kultivace, v druhém případě 12 ml 1% škrobu, 28 ml 2% alginátu a 40 ml kultury z 24hodinové kultivace. Roztok 1% škrobu byl připraven tak, že byl škrob rozpuštěn v roztoku NaOH a močoviny v poměru 0,8:1 (hmotnostních procent). Jako srážecí pufr byl použit 2% chlorid vápenatý, velikost trysky byla 300 µm.

Částice vytvořené pomocí enkapsulátoru byly zfiltrvány a inkubovány v modelových potravinách a do simulovaných fyziologických prostředích.

4.3.3 Příprava alginát-karboxymethylcelulóзовých částic

Alginátové částice byly smíchány s karboxymethylcelulózou v poměru 80 % : 20 % a z 70 % : 30 %. Do zásobní lahve bylo nalito v prvním případě 8 ml 2% karboxymethylcelulózy, 32 ml 2% alginátu a 40 ml kultury z 24hodinové kultivace. V druhém případě bylo smícháno 12 ml 2% karboxymethylcelulózy, 28 ml 2% alginátu a 40 ml kultury z 24hodinové kultivace. Jako srážecí pufr byl použit 2% chlorid vápenatý, velikost trysky byla 300 µm. Byl použit 2% roztok karboxymethylcelulózy, která byla rozpuštěna ve vodě.

Částice vytvořené pomocí enkapsulátoru byly zfiltrvány a inkubovány v modelových potravinách a do simulovaných fyziologických prostředích.

4.3.4 Příprava chitosan-škrbových částic

Chitosanové částice byly smíchány se škrobem v poměru 1:3 a 1:5. Při přípravě byl použit 2% roztok chitosanu ve vodě, do kterého byla přidána kyselina octová do pH 5. Do zásobní lahve bylo nalito 10 ml 1% škrobu, 20 ml roztoku 2% chitosanu a 30 ml kultury z 24hodinové kultivace, v druhém případě bylo do zásobní lahve nalito 6 ml 1% škrobu, 24 ml 2% chitosanu a 30 ml kultury z 24hodinové kultivace. Jako srážecí pufr byl použit 2% tripolyfosfát sodný. Velikost trysky byla 300 µm.

Částice vytvořené pomocí enkapsulátoru byly zfiltrvány a inkubovány v modelových potravinách a do simulovaných fyziologických prostředích.

4.4 Stanovení viability a počtu buněk pomocí průtokové cytometrie

Stanovení viability a počtu buněk z 24hodinové kultivace bylo prováděno na průtokovém cytometru. Vzorek kultury byl 10x zředěn destilovanou vodou. Aby mohla být sledována viabilita buněk, bylo do tohoto roztoku napipetováno potřebné množství propidiumjodidu, který obarvil mrtvé buňky. Takto připravený vzorek byl dán na 15 minut do tmy a poté byla změřena viabilita buněk.

4.5 Stanovení stability částic v modelovém prostředí lidského organismu

Stabilita částic byla stanovena v žaludeční, pankreatické a žlučové šťávě. Vzorky byly připraveny v poměru 1:1 (šťáva:částice). Pod optickým mikroskopem byly sledovány bakterie uvnitř kapsle, bakterie uvolněné z kapsle do šťávy a také poměr živých a mrtvých mikroorganismů. V pankreatické a žaludeční šťávě byly enkapsulované bakterie 20 minut při teplotě 37°C, ve žlučové šťávě byly po dobu 40 minut.

4.5.1 Složení modelové pankreatické šťávy

Pankreatická šťáva byla připravena rozpuštěním 0,25 g pankreatinu a 1,5 g NaHCO_3 ve 100 ml destilované vody. V roztoku bylo pH upraveno na hodnotu 8,9 [29].

4.5.2 Složení modelové žaludeční šťávy

Žaludeční šťáva byla připravena z 0,25 g pepsinu, který byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. Poté bylo přidáno 0,84 ml 35% kyseliny chlorovodíkové. V roztoku bylo pH upraveno na hodnotu 0,9 [29].

4.5.3 Složení modelové žlučové šťávy

Žlučová šťáva byla připravena přidáním 0,8 g žlučových solí do 200 ml pufru o pH 8 [29].

4.6 Stanovení stability částic v modelových potravinách

Simulantem potravin je zkušební roztok, který má přesně definované složení a přesně definované vlastnosti. Tato potravinu nahrazuje určitou potravinu nebo skupinu potravin. Pro potravinu, která má pH vyšší než 4,5 byla použita destilovaná voda. Pro potravinu s pH nižším než 4,5 byl připraven 3% roztok kyseliny octové. Pro potraviny a nápoje s alkoholem byl připraven 10% roztok ethanolu. Pro tukové potraviny byl použit jako modelový roztok olej smíchaný s vodou v poměru 1:4 (olej:destilovaná voda). Jako reálná potravinu bylo použito mléko [30].

Všechny typy částic byly ponechány po dobu 4 týdnů v těchto pěti modelových typech potravin. Stabilita částic byla sledována pod optickým mikroskopem v den, kdy byly částice připraveny, po dvou dnech, po týdnu a po 4 týdnech.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Stanovení viability pomocí průtokového cytometru

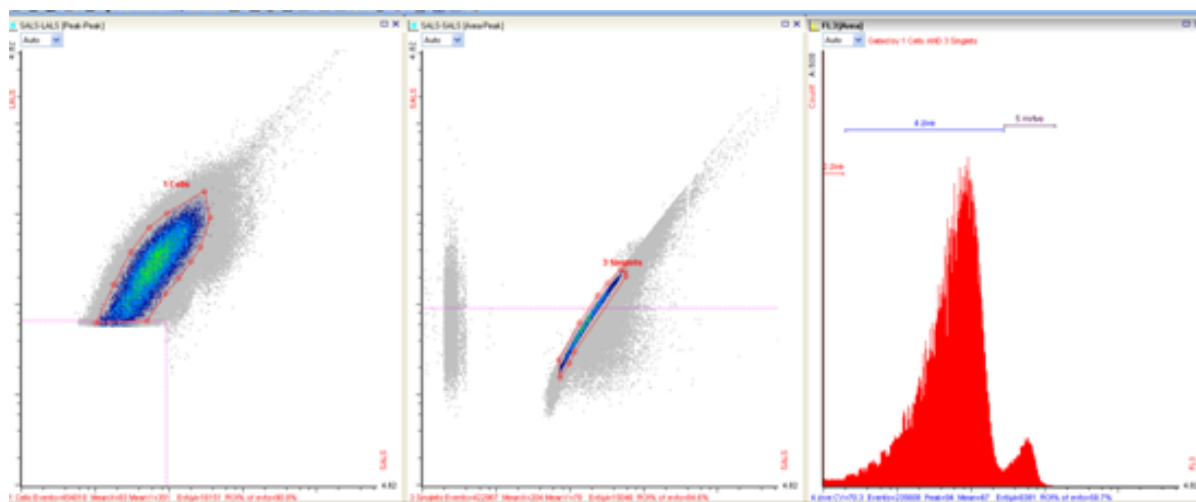
Buňky mikroorganismů byly zředěny destilovanou vodou, obarveny propidiumjodidem a následně byla stanovená viabilita těchto buněk dle postupu uvedeného v kapitole 4.4. Po 15 minutách živé buňky barvivo z buňky vyloučily, mrtvé buňky zůstaly obarvené. Vzorek byl vložen do průtokového cytometru a byla zjištěna viabilita buněk.

Celkově bylo měření na průtokovém cytometru provedeno s každou kulturou 3x po 24hodinové kultivaci. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 3. Na Obr.13 a 14 jsou uvedeny příklady záznamů analýzy viability buněk z průtokového cytometru.

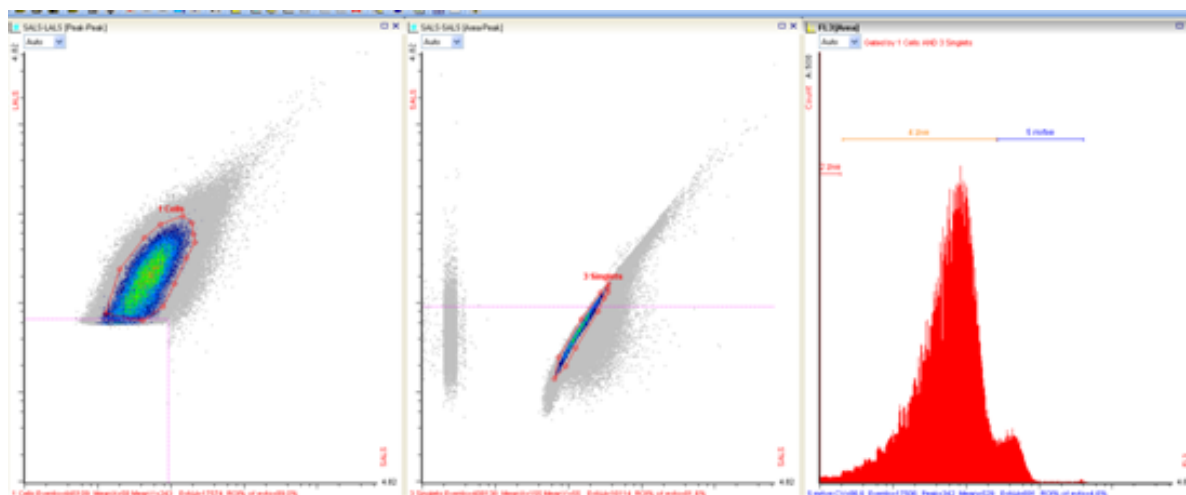
Tab. 3 Poměr živých a mrtvých bakterií po 24hodinové kultivaci

Měření	Druh bakterií	Počet buněk v 1 μ l	Živé buňky v 1 μ l [%]	Mrtvé buňky v 1 μ l [%]
1.	LA	230 580	85	15
	BB	175 740	93	7
2.	LA	161 510	94	6
	BB	202 650	99	1
3.	LA	211 710	98	2
	BB	217 700	99,5	0,5

Zkratka LA znamená typ bakterie *Lactobacillus acidophilus* a BB je bakterie *Bifidobacterium breve*.



Obr. 13 Viabilita buněk *Lactobacillus acidophilus* po 24hodinové kultivaci (v prvních dvou oknech je vidět ohraničení buněk, ze kterých je následně vypočítán poměr živých a mrtvých buněk, ve třetím okně první pík představuje množství živých buněk, druhý pík představuje množství mrtvých buněk)



Obr. 14 Viabilita buněk *Bifidobacterium breve* po 24hodinové kultivaci ((v prvních dvou oknech je vidět ohraničení buněk, ze kterých je následně vypočítán poměr živých a mrtvých buněk, ve třetím okně první pík představuje množství živých buněk, druhý pík představuje množství mrtvých buněk)

Po 24hodinové kultivaci bylo ve vzorku prakticky vždy nad 90 % živých buněk, ve 3 případech dokonce nad 98 %. Tyto bakterie, u kterých byla zjištěna viabilita, byly smíchány s modelovými potravinami a modelovými trávicími šťávami.

5.2 Stanovení životaschopnosti bakterií v simulovaných tělních tekutinách

Stabilita v simulovaných tělních tekutinách byla sledována u 2% alginátových, 4% alginátových, alginát-škrobových, alginát-karboxymethylcelulósových a chitosan-škrobových částic. Bakterie byly po 24hodinové kultivaci a enkapsulaci vloženy do modelových tělních tekutin. V pankreatické šťávě a v žaludeční šťávě byly inkubovány po dobu 20 minut a ve žlučové šťávě byly 40 minut, vše při teplotě 37°C. Po uplynutí této doby byl vzorek částic dán do Bürkerovy komůrky, byla přikápnuta methylenová modř a byl pozorován poměr živých a mrtvých buněk pod mikroskopem. Počítány byly mrtvé a živé buňky jak uvnitř částice, tak živé a mrtvé buňky uvolněné z částice. V Tab. 4, 5 a 6 jsou uvedeny počty živých a mrtvých bakterií v 1 ml simulované tělní tekutiny.

V další kapitole jsou uvedeny příklady některých částic, které byly zaznamenány pod optickým mikroskopem při zvětšení 40x.

5.2.1 Stanovení stability částic v pankreatické šťávě

Výsledky jsou uvedeny v Tab.4. Pankreatická šťáva na strukturu částic působila více než kyselá žaludeční a žlučová šťáva, bylo v ní nejvíce uvolněných buněk. V procentech se počet uvolněných buněk pohyboval nejčastěji mezi 40 % až 60 % z celkového množství. V některých částicích, které byly tvořeny alginátem modifikovaným 1% škrobem a chitosanem modifikovaným 1% škrobem, došlo k rozpadu částic a počet uvolněných buněk byl nad 70 %. Bakterie uvolněné z částice byly ve většině případů živé, v některých případech byly i mrtvé, ale to maximálně do 20 % z celkového počtu uvolněných částic. V částicích modifikovaných škrobem bylo množství mrtvých buněk jen nepatrné. Uvnitř kapsle byl počet živých bakterií nad 80 %. Pankreatická šťáva je součástí tenkého střeva a účelem enkapsulace mléčných bakterií je, aby se bakterie uvolnily právě na tomto místě. Buňky, které se zde uvolnily byly převážně živé.

5.2.2 Stanovení stability částic v žaludeční šťávě

Po působení žaludeční šťavy na částice nebyla pozorována žádná větší změna, uvolnilo se jen nepatrné množství bakterií, většina z nich byla živá (Tab.5). Uvnitř kapsle byla také převážná většina živých buněk. Mimo kapsli bylo uvolněno maximálně 30 % bakterií, a to

z obalu, který byl tvořen chitosanem a roztokem 1% škrobu. Ostatní obaly byly pevnější a bylo uvolněno do žaludeční šťávy jen do 10 % buněk. Obaly zůstaly vůči této šťávě odolné, jelikož se tam nachází stále sliny a enzymy. Žaludeční šťáva působí na částice jako první ze 3 testovaných prostředí a s ohledem na předpokládanou funkci probiotik je nutné, aby obaly částic nebyly v této části trávicího systému porušeny, aby bakterie přežily a mohly se následně uplatnit ve střevě.

5.2.3 Stanovení stability částic ve žlučové šťávě

Ve žlučové šťávě bylo nalezeno podobné množství uvolněných a mrtvých bakterií jako v žaludeční šťávě (Tab.6). Nejvíce uvolněných buněk bylo z částic, které byly modifikované škrobem. Jejich množství bylo kolem 50 %, z toho ve většině případů byly všechny živé. V ostatních částicích se počet uvolněných bakterií pohyboval kolem 15 %. Uvnitř kapsle byly také převážně všechny buňky živé, hlavně v částicích s podílem škrobu. V ostatních obalech byl uvnitř počet mrtvých buněk okolo 20 %.

Tab. 4 Počet a procenta živých a mrtvých bakterií v kapsli a mimo kapsli v pankreatické šťávě

	Pankreatická šťáva							
	uvnitř kapsle				mimo kapsli			
	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%
<i>Lactobacillus acidophilus</i>								
2% alginát, velikost částic 300 µm	48.10 ⁶	92,3	4.10 ⁶	7,7	36.10 ⁶	90	4.10 ⁶	10
2% alginát, velikost částic 450 µm	44.10 ⁶	84,6	8.10 ⁶	15,4	32.10 ⁶	100	0	0
2% alginát + 20 % 1% roztoku škrobu	36.10 ⁶	81,8	8.10 ⁶	18,2	40.10 ⁶	83,3	8.10 ⁶	16,4
2% alginát + 30 % 1% roztoku škrobu	40.10 ⁶	83,3	8.10 ⁶	16,7	40.10 ⁶	83,3	8.10 ⁶	16,7
2% alginát + 20 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	60.10 ⁶	83,3	12.10 ⁶	16,7	40.10 ⁶	83,3	8.10 ⁶	16,7
2% alginát + 30 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	48.10 ⁶	85,7	8.10 ⁶	14,3	84.10 ⁶	95,5	4.10 ⁶	4,5
4% alginát	72.10 ⁶	94,7	4.10 ⁶	5,3	60.10 ⁶	100	0	0
2% chitosan + 33 % 1% roztoku škrobu	28.10 ⁶	100	0	0	24.10 ⁶	100	0	0
2% chitosan + 20 % 1% roztoku škrobu	28.10 ⁶	87,5	4.10 ⁶	12,5	72.10 ⁶	94,7	4.10 ⁶	5,3
<i>Bifidobacterium breve</i>								
	uvnitř kapsle				mimo kapsli			
	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%
2% alginát, velikost částic 300 µm	52.10 ⁶	92,9	4.10 ⁶	7,1	48.10 ⁶	80	12.10 ⁶	20
2% alginát, velikost částic 450 µm	40.10 ⁶	100	0	0	32.10 ⁶	100	0	0
2% alginát + 20 % 1% roztoku škrobu	64.10 ⁶	89	8.10 ⁶	11	72.10 ⁶	81,8	16.10 ⁶	18,2
2% alginát + 30 % 1% roztoku škrobu	24.10 ⁶	85,7	4.10 ⁶	14,3	100.10 ⁶	92,6	8.10 ⁶	7,4
2% alginát + 20 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	56.10 ⁶	93,3	4.10 ⁶	6,7	40.10 ⁶	71,4	16.10 ⁶	28,6
2% alginát + 30 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	72.10 ⁶	94,7	4.10 ⁶	5,3	44.10 ⁶	78,6	12.10 ⁶	21,4
4% alginát	128.10 ⁶	94,1	8.10 ⁶	5,9	48.10 ⁶	92,3	4.10 ⁶	7,7
2% chitosan + 33 % 1% roztoku škrobu	24.10 ⁶	100	0	0	44.10 ⁶	91,7	4.10 ⁶	8,3
2% chitosan + 20 % 1% roztoku škrobu	24.10 ⁶	100	0	0	36.10 ⁶	100	0	0

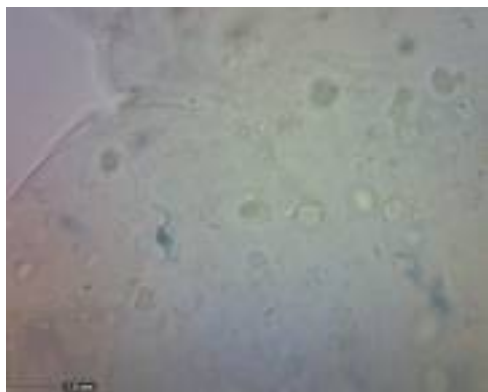
Tab. 5 Počet a procenta živých a mrtvých bakterií v kapsli a mimo kapsli v žaludeční šťávě

	Žaludeční šťáva							
	uvnitř kapsle				mimo kapsli			
	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%
<i>Lactobacillus acidophilus</i>								
2% alginát, velikost částic 300 µm	108.10 ⁶	90	12.10 ⁶	10	4.10 ⁶	100	0	0
2% alginát, velikost částic 450 µm	76.10 ⁶	95	4.10 ⁶	5	4.10 ⁶	100	0	0
2% alginát + 20 % 1% roztoku škrobu	192.10 ⁶	98	4.10 ⁶	2	4.10 ⁶	100	0	0
2% alginát + 30 % 1% roztoku škrobu	68.10 ⁶	94,4	4.10 ⁶	5,6	4.10 ⁶	100	0	0
2% alginát + 20 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	104.10 ⁶	83,9	20.10 ⁶	16,1	4.10 ⁶	50	4.10 ⁶	50
2% alginát + 30 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	92.10 ⁶	92	8.10 ⁶	8	4.10 ⁶	100	0	0
4% alginát	124.10 ⁶	96,9	4.10 ⁶	3,1	8.10 ⁶	100	0	0
2% chitosan + 33 % 1% roztoku škrobu	28.10 ⁶	100	0	0	12.10 ⁶	100	0	0
2% chitosan + 20 % 1% roztoku škrobu	24.10 ⁶	100	0	0	12.10 ⁶	100	0	0
<i>Bifidobacterium breve</i>								
	uvnitř kapsle				mimo kapsli			
	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%
2% alginát, velikost částic 300 µm	84.10 ⁶	91,3	8.10 ⁶	8,7	8.10 ⁶	66,7	4.10 ⁶	33,3
2% alginát, velikost částic 450 µm	80.10 ⁶	95,2	4.10 ⁶	4,8	4.10 ⁶	100	0	0
2% alginát + 20 % 1% roztoku škrobu	68.10 ⁶	94,4	4.10 ⁶	5,6	8.10 ⁶	100	0	0
2% alginát + 30 % 1% roztoku škrobu	124.10 ⁶	94	8.10 ⁶	6	4.10 ⁶	100	0	0
2% alginát + 20 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	84.10 ⁶	91,3	8.10 ⁶	8,7	4.10 ⁶	100	0	0
2% alginát + 30 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	92.10 ⁶	88,5	12.10 ⁶	11,5	8.10 ⁶	100	0	0
4% alginát	84.10 ⁶	87,5	12.10 ⁶	12,5	4.10 ⁶	100	0	0
2% chitosan + 33 % 1% roztoku škrobu	24.10 ⁶	100	0	0	16.10 ⁶	66,7	8.10 ⁶	33,3
2% chitosan + 20 % 1% roztoku škrobu	20.10 ⁶	100	0	0	4.10 ⁶	100	0	0

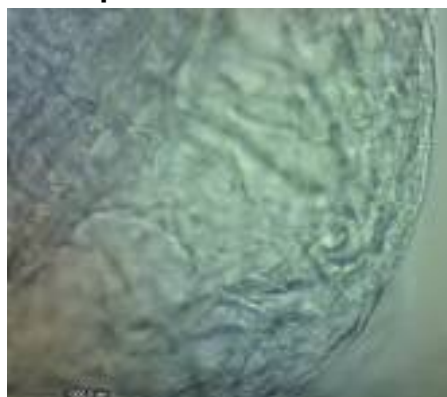
Tab. 6 Počet a procenta živých a mrtvých bakterií v kapsli a mimo kapsli ve žlučové šťávě

	Žlučová šťáva							
	uvnitř kapsle				mimo kapsli			
	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%
<i>Lactobacillus acidophilus</i>								
2% alginát, velikost částic 300 µm	52.10 ⁶	86,7	8.10 ⁶	13,3	8.10 ⁶	100	0	0
2% alginát, velikost částic 450 µm	60.10 ⁶	88,2	8.10 ⁶	11,8	12.10 ⁶	60	8.10 ⁶	40
2% alginát + 20 % 1% roztoku škrobu	48.10 ⁶	92,3	4.10 ⁶	7,7	12.10 ⁶	100	0	0
2% alginát + 30 % 1% roztoku škrobu	48.10 ⁶	70,6	20.10 ⁶	29,4	4.10 ⁶	100	0	0
2% alginát + 20 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	100.10 ⁶	83,3	20.10 ⁶	16,7	20.10 ⁶	100	0	0
2% alginát + 30 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	56.10 ⁶	77,8	16.10 ⁶	22,2	16.10 ⁶	100	0	0
4% alginát	84.10 ⁶	84	16.10 ⁶	16	48.10 ⁶	100	0	0
2% chitosan + 33 % 1% roztoku škrobu	36.10 ⁶	100	0	0	16.10 ⁶	100	0	0
2% chitosan + 20 % 1% roztoku škrobu	56.10 ⁶	87,5	8.10 ⁶	12,5	48.10 ⁶	85,7	8.10 ⁶	14,3
<i>Bifidobacterium breve</i>								
	uvnitř kapsle				mimo kapsli			
	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%
2% alginát, velikost částic 300 µm	68.10 ⁶	85	12.10 ⁶	15	12.10 ⁶	75	4.10 ⁶	25
2% alginát, velikost částic 450 µm	56.10 ⁶	93,3	4.10 ⁶	6,7	4.10 ⁶	100	0	0
2% alginát + 20 % 1% roztoku škrobu	36.10 ⁶	81,8	8.10 ⁶	18,2	4.10 ⁶	100	0	0
2% alginát + 30 % 1% roztoku škrobu	56.10 ⁶	87,5	8.10 ⁶	12,5	24.10 ⁶	100	0	0
2% alginát + 20 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	32.10 ⁶	72,7	12.10 ⁶	27,3	8.10 ⁶	100	0	0
2% alginát + 30 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	102.10 ⁶	89,5	12.10 ⁶	10,5	8.10 ⁶	66,7	4.10 ⁶	33,3
4% alginát	100.10 ⁶	92,6	8.10 ⁶	7,4	24.10 ⁶	100	0	0
2% chitosan + 33 % 1% roztoku škrobu	60.10 ⁶	100	0	0	36.10 ⁶	100	0	0
2% chitosan + 20 % 1% roztoku škrobu	28.10 ⁶	100	0	0	40.10 ⁶	83,3	8.10 ⁶	16,7

5.3 Sledování částic pomocí optické mikroskopie



Obr. 15 Alginátová částice v pankreatické šťávě, bakterie *Bifidobacterium breve*, velikost trysky: 300 μm , 40x



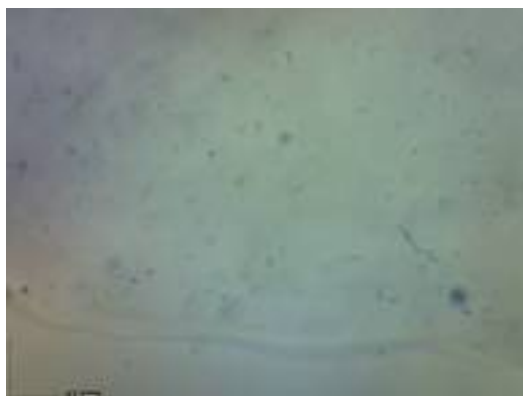
Obr. 16 Chitosanová částice smíchaná s roztokem 1% škrobu v pankreatické šťávě, bakterie *Lactobacillus acidophilus*, 40x



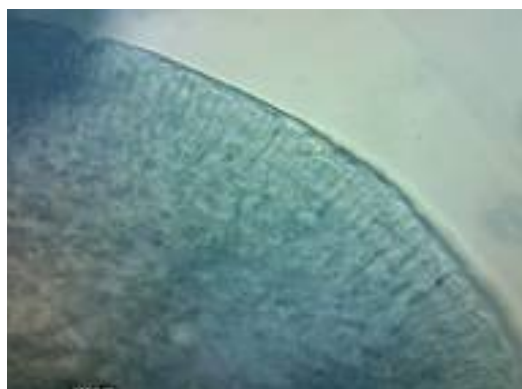
Obr. 17 Alginátová částice v žaludeční šťávě, velikost trysky: 300 μm , bakterie *Bifidobacterium breve*, 40 x



Obr. 18 Alginátová částice smíchaná s 2% roztokem karboxymethylcelulózy v žaludeční šťávě, bakterie *bifidobacterium breve*, 40x



Obr. 19 Alginátová částice ve žlučové šťávě, velikost trysky: 450 μm , bakterie *Lactobacillus acidophilus*, 40x



Obr. 20 Chitosanová částice smíchaná s roztokem 1% škrobu ve žlučové šťávě, bakterie *Lactobacillus acidophilus*, 40x

5.4 Stanovení stability částic v modelových potravinách

Stabilita v modelových potravinách byla sledována u 2% alginátových, 4% alginátových, alginát-škrobových, alginát-karboxymethylcelulóзовých a chitosan-škrobových částic, které byly ponechány inkubovat v modelových podmínkách. Stanovení stability částic v modelových potravinách bylo prováděno obdobným způsobem jak při stanovení stability částic v modelových trávicích šťávách. Rozdílem bylo to, že ihned po enkapsulaci byly částice vloženy do pěti modelových potravin, což byla destilovaná voda, 10% ethanol, 3% kyselina octová, olej smíchaný s vodou a to v poměru 25:75 olej:voda a mléko, které mělo představovat reálnou potravinu.

Částice byly pozorovány pod mikroskopem v den vložení částic do potravin, po dvou dnech, po šesti dnech a nakonec po čtyřech týdnech. Ve dvou posledních zmiňovaných časových intervalech byly částice vloženy do Bürkerovy komůrky, byly obarveny methylenovou modří a byly pozorovány bakterie uvnitř buňky a mimo buňku a to jak živé, tak mrtvé. Výpočet a stanovení procent se provádělo stejným způsobem jak při stanovení stability části v modelových trávicích šťávách (kapitola 5.2). V Tab. 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 a 16 jsou uvedeny počty živých a mrtvých bakterií v modelových potravinách.

5.4.1 Životaschopnost bakterií v částicích v čase $t=0$

Ihned po enkapsulaci nebyly pod mikroskopem vidět téměř žádné uvolněné částice, všechny byly uvnitř kapsle. Nejvíce mrtvých bakterií bylo pozorováno u částic, které byly vloženy do 3% kyseliny octové, a to zejména u alginátových částic o velikosti 450 μm . Alginátové částice s přídavkem 1% roztoku škrobu byly uvnitř zakalené, proto pod mikroskopem nebyly bakterie vidět (Obr. 22).

5.4.2 Životaschopnost bakterií v částicích po 2 dnech

Po dvou dnech nedošlo k žádné výrazné změně, stav uvolněných buněk byl obdobný jako při pozorování částic ihned po enkapsulaci. Většina bakterií u všech typů částic zůstala uvnitř kapsle (Obr. 21). Větší počet uvolněných bakterií byl pozorován pouze u některých částic, zejména s obsahem 1% roztokem škrobu. Nejvíce mrtvých buněk bylo v částicích, které byly v 3% roztoku kyseliny octové. Největší množství živých buněk v porovnání s mrtvými bylo v mléce. Zároveň také v mléce byly nejhorší podmínky pro viditelnost jednotlivých buněk mimo částici (Obr. 29).

Z výsledků je patrné, že polysacharidové částice nejsou vhodné do potravin, které mají kyselé pH, jelikož to působí na obaly částic a také na samotné bakterie, které i po uvolnění z obalu vlivem nízkého pH během krátké doby uhynou. Naopak tyto částice je vhodné dát do potravin, které obsahují živiny, díky nimž bakterie mohou přežívat delší dobu, například do mléka. Po dvou dnech, kdy byly částice v modelových potravinách, nedošlo téměř k žádnému rozpadu částic a uvolnění buněk, tudíž lze počítat s dlouhodobější trvanlivostí těchto částic.

5.4.3 Životaschopnost bakterií v částicích po 6 dnech

5.4.3.1 Životaschopnost bakterií v částicích v destilované vodě

Po 6 dnech inkubace v destilované vodě bylo uvolněno z částic téměř v každém vzorku kolem 50 %. Nejméně uvolněných bakterií bylo z částic tvořených 4% alginátem, kolem 20 %. Bakterie, které se nacházely mimo částici, byly převážně živé, pouze v případě alginátových částic s 30 % obsahem škrobu s enkapsulovaným kmenem *Lactobacillus acidophilus*, u alginátových částic s 30 % CMC a s *Bifidobacterium breve* a u chitosanových částic s roztokem 1% škrobu a *Bifidobacterium breve* byl počet mrtvých bakterií nad 28 %,

ale nepřesahoval 34 %. Uvnitř kapsle nebyly nalezeny žádné mrtvé buňky v chitosanových částicích modifikovaných roztokem 1% škrobu (Tab. 7).

5.4.3.2 Životaschopnost bakterií v částicích v 10% ethanolu

Po 6 dnech inkubace v ethanolu byl počet uvolněných buněk v průměru do 20 %. Ze 2% alginátových částic nebyly uvolněny žádné bakterie, z chitosanových částic s roztokem 1% škrobu bylo uvolněno kolem 40 % buněk. Uvnitř kapsle byly převážně živé buňky, nad 80 %, lišily se jen částice z 2% alginátu, které obsahovaly počet mrtvých bakterií cca 40 %. Buňky uvolněné z částic byly mrtvé pouze částečně, kolem 33 % (Tab.8).

5.4.3.3 Životaschopnost bakterií v částicích v 3% kyselině octové

Po šesti dnech, kdy byly všechny typy částic v 3% roztoku kyseliny octové, se uvolnilo většinou 10 % - 20 % buněk (Tab. 9). Mezi výjimky patřily 2% alginátové částice a 4% alginátové částice s *Bifidobacterium breve*, kdy se neuvolnily z částic žádné buňky. Uvnitř kapsle bylo u většiny částic asi 15 % mrtvých bakterií, ale u 2% alginátových a 4% alginátových částic se počet mrtvých bakterií dostal až přes 50 %. Počet mrtvých buněk, které se nacházely mimo částici, byl nad 50 %, výjimku tvořily částice se škrobem, u kterých mrtvé bakterie nepřesahovaly 30 %.

5.4.3.4 Životaschopnost bakterií v částicích ve směsi voda:olej v poměru 1:4

Z částic, které byly v modelové potravíně s obsahem oleje, se po 6 dnech inkubace uvolnilo nad 55 % buněk z alginátových částic s roztokem 2% škrobu, žádné se neuvolnily z 2% alginátových částic a z ostatních typech obalů bylo mimo kapsli v průměru 30 % buněk. Uvnitř kapsle byl počet mrtvých buněk mezi 15 % - 25 %. Výjimku tvořily 2% alginátové částice o průměru 450 μm s *Lactobacillus acidophilus* kde se počet mrtvých bakterií dostal nad 50 %. Bakterie, které byly uvolněny z částice, byly neživé v průměru do 20 % (Tab. 10).

5.4.3.5 Životaschopnost bakterií v částicích v mléce

V mléce nebylo v některých případech možné určit počet buněk mimo částici, protože prostor okolo částic byl díky mléku zakalený (Obr. 29). Jediné částice, u kterých se daly bakterie spočítat, byly částice z 4% alginátu a chitosanové částice se škrobem (Tab. 11). U alginátových částic bylo po 6 dnech inkubace uvolněno kolem 40 %, u chitosanových částic s 1% roztokem škrobu bylo uvolněno nad 80 % buněk. Ve všech případech bylo mimo částici asi 90 % buněk živých. Uvnitř kapsle bylo také většinou 100 % živých bakterií, až na některé alginátové částice, kde počet mrtvých buněk dosahoval přibližně 10 %.

Tab. 7 Počet a procenta živých a mrtvých bakterií v kapsli a mimo kapsli v destilované vodě po 6 dnech

	Destilovaná voda							
	uvnitř kapsle				mimo kapsli			
	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%
<i>Lactobacillus acidophilus</i>								
2% alginát, velikost částic 300 µm	40.10 ⁶	66,7	20.10 ⁶	33,3	136.10 ⁶	97,1	4.10 ⁶	2,9
2% alginát, velikost částic 450 µm	36.10 ⁶	60	24.10 ⁶	40	28.10 ⁶	87,5	4.10 ⁶	12,5
2% alginát + 20 % 1% roztoku škrobu	68.10 ⁶	89,5	8.10 ⁶	10,5	20.10 ⁶	71,4	8.10 ⁶	28,6
2% alginát + 30 % 1% roztoku škrobu	144.10 ⁶	94,7	8.10 ⁶	5,3	120.10 ⁶	96,8	4.10 ⁶	3,2
2% alginát + 20 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	44.10 ⁶	84,6	8.10 ⁶	15,4	48.10 ⁶	92,3	4.10 ⁶	7,7
2% alginát + 30 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	52.10 ⁶	92,9	4.10 ⁶	7,1	36.10 ⁶	90	4.10 ⁶	10
4% alginát	28.10 ⁶	58,3	20.10 ⁶	41,7	12.10 ⁶	100	0	0
2% chitosan + 33 % 1% roztoku škrobu	20.10 ⁶	100	0	0	16.10 ⁶	80	4.10 ⁶	20
2% chitosan + 20 % 1% roztoku škrobu	16.10 ⁶	100	0	0	12.10 ⁶	75	4.10 ⁶	25
<i>Bifidobacterium breve</i>								
	uvnitř kapsle				mimo kapsli			
	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%
2% alginát, velikost částic 300 µm	56.10 ⁶	70	24.10 ⁶	30	24.10 ⁶	100	0	0
2% alginát, velikost částic 450 µm	40.10 ⁶	29,4	96.10 ⁶	70,6	96.10 ⁶	100	0	0
2% alginát + 20 % 1% roztoku škrobu	104.10 ⁶	50	104.10 ⁶	50	104.10 ⁶	96,3	4.10 ⁶	3,7
2% alginát + 30 % 1% roztoku škrobu	60.10 ⁶	93,7	4.10 ⁶	6,3	60.10 ⁶	93,75	4.10 ⁶	6,25
2% alginát + 20 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	124.10 ⁶	96,9	4.10 ⁶	3,1	96.10 ⁶	92,3	8.10 ⁶	7,7
2% alginát + 30 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	72.10 ⁶	85,7	12.10 ⁶	14,3	20.10 ⁶	71,4	8.10 ⁶	28,6
4% alginát	28.10 ⁶	70	12.10 ⁶	30	12.10 ⁶	75	4.10 ⁶	25
2% chitosan + 33 % 1% roztoku škrobu	12.10 ⁶	75	4.10 ⁶	15	12.10 ⁶	75	4.10 ⁶	25
2% chitosan + 20 % 1% roztoku škrobu	20.10 ⁶	100	0	0	8.10 ⁶	66,7	4.10 ⁶	33,3

Tab. 8 Počet a procenta živých a mrtvých bakterií v kapsli a mimo kapsli v ethanolu po 6 dnech

<i>Lactobacillus acidophilus</i>	10% ethanol							
	uvnitř kapsle				mimo kapsli			
	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%
2% alginát, velikost částic 300 µm	64.10 ⁶	57,1	48.10 ⁶	42,9	0	0	0	0
2% alginát, velikost částic 450 µm	48.10 ⁶	70,6	20.10 ⁶	29,4	0	0	0	0
2% alginát + 20 % 1% roztoku škrobu	44.10 ⁶	84,6	8.10 ⁶	15,4	8.10 ⁶	66,7	4.10 ⁶	33,3
2% alginát + 30 % 1% roztoku škrobu	72.10 ⁶	85,7	12.10 ⁶	14,3	4.10 ⁶	100	0	0
2% alginát + 20 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	64.10 ⁶	88,9	8.10 ⁶	11,1	8.10 ⁶	66,7	4.10 ⁶	33,3
2% alginát + 30 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	76.10 ⁶	90,5	8.10 ⁶	9,5	8.10 ⁶	66,7	4.10 ⁶	33,3
4% alginát	40.10 ⁶	52,6	36.10 ⁶	47,4	8.10 ⁶	66,7	4.10 ⁶	33,3
2% chitosan + 33 % 1% roztoku škrobu	12.10 ⁶	60	8.10 ⁶	40	8.10 ⁶	66,7	4.10 ⁶	33,3
2% chitosan + 20 % 1% roztoku škrobu	16.10 ⁶	80	4.10 ⁶	20	8.10 ⁶	66,7	4.10 ⁶	33,3
<i>Bifidobacterium breve</i>	uvnitř kapsle				mimo kapsli			
	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%
2% alginát, velikost částic 300 µm	40.10 ⁶	58,8	28.10 ⁶	41,2	0	0	0	0
2% alginát, velikost částic 450 µm	28.10 ⁶	58,3	20.10 ⁶	41,7	0	0	0	0
2% alginát + 20 % 1% roztoku škrobu	84.10 ⁶	95,5	4.10 ⁶	4,5	4.10 ⁶	100	0	0
2% alginát + 30 % 1% roztoku škrobu	60.10 ⁶	88,2	8.10 ⁶	11,8	8.10 ⁶	66,7	4.10 ⁶	33,3
2% alginát + 20 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	108.10 ⁶	90	12.10 ⁶	10	4.10 ⁶	100	0	0
2% alginát + 30 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	68.10 ⁶	89,5	8.10 ⁶	10,5	8.10 ⁶	66,7	4.10 ⁶	33,3
4% alginát	44.10 ⁶	64,5	24.10 ⁶	35,3	8.10 ⁶	66,7	4.10 ⁶	33,3
2% chitosan + 33 % 1% roztoku škrobu	12.10 ⁶	75	4.10 ⁶	25	8.10 ⁶	66,7	4.10 ⁶	33,3
2% chitosan + 20 % 1% roztoku škrobu	12.10 ⁶	75	4.10 ⁶	25	8.10 ⁶	66,7	4.10 ⁶	33,3

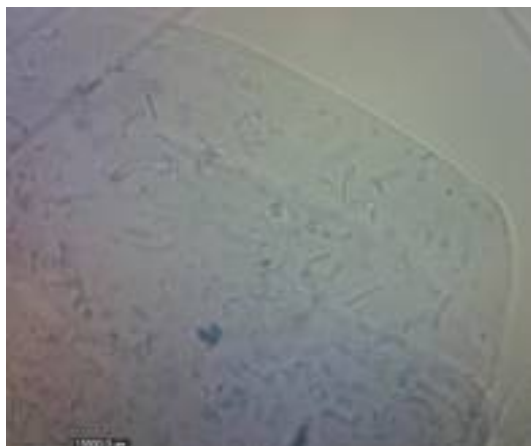
Tab. 9 Počet a procenta živých a mrtvých bakterií v kapsli a mimo kapsli v kyselině octové po 6 dnech

<i>Lactobacillus acidophilus</i>	3% kyselina octová							
	uvnitř kapsle				mimo kapsli			
	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%
2% alginát, velikost částic 300 µm	52.10 ⁶	56,5	40.10 ⁶	43,5	0	0	0	0
2% alginát, velikost částic 450 µm	32.10 ⁶	36,4	56.10 ⁶	63,6	0	0	0	0
2% alginát + 20 % 1% roztoku škrobu	48.10 ⁶	85,7	8.10 ⁶	14,3	4.10 ⁶	25	12.10 ⁶	75
2% alginát + 30 % 1% roztoku škrobu	56.10 ⁶	87,5	8.10 ⁶	12,5	4.10 ⁶	50	4.10 ⁶	50
2% alginát + 20 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	92.10 ⁶	83,6	20.10 ⁶	16,4	4.10 ⁶	50	4.10 ⁶	50
2% alginát + 30 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	92.10 ⁶	88,5	12.10 ⁶	11,5	8.10 ⁶	66,7	4.10 ⁶	33,3
4% alginát	52.10 ⁶	72,2	20.10 ⁶	27,8	8.10 ⁶	66,7	4.10 ⁶	33,3
2% chitosan + 33 % 1% roztoku škrobu	20.10 ⁶	83,3	4.10 ⁶	16,7	12.10 ⁶	60	8.10 ⁶	40
2% chitosan + 20 % 1% roztoku škrobu	24.10 ⁶	75	8.10 ⁶	25	12.10 ⁶	75	4.10 ⁶	25
<i>Bifidobacterium breve</i>	uvnitř kapsle				mimo kapsli			
	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%
2% alginát, velikost částic 300 µm	36.10 ⁶	52	24.10 ⁶	48	0	0	0	0
2% alginát, velikost částic 450 µm	20.10 ⁶	41,7	28.10 ⁶	58,3	0	0	0	0
2% alginát + 20 % 1% roztoku škrobu	100.10 ⁶	86,2	16.10 ⁶	13,8	8.10 ⁶	66,7	4.10 ⁶	33,3
2% alginát + 30 % 1% roztoku škrobu	72.10 ⁶	85,7	12.10 ⁶	14,3	0	0	4.10 ⁶	100
2% alginát + 20 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	56.10 ⁶	87,5	8.10 ⁶	12,5	4.10 ⁶	33,3	8.10 ⁶	66,7
2% alginát + 30 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	96.10 ⁶	85,7	16.10 ⁶	14,3	0	0	8.10 ⁶	0
4% alginát	32.10 ⁶	50	32.10 ⁶	50	8.10 ⁶	100	0	0
2% chitosan + 33 % 1% roztoku škrobu	16.10 ⁶	66,7	8.10 ⁶	33,3	8.10 ⁶	66,7	4.10 ⁶	33,3
2% chitosan + 20 % 1% roztoku škrobu	44.10 ⁶	84,6	8.10 ⁶	15,4	12.10 ⁶	75	4.10 ⁶	25

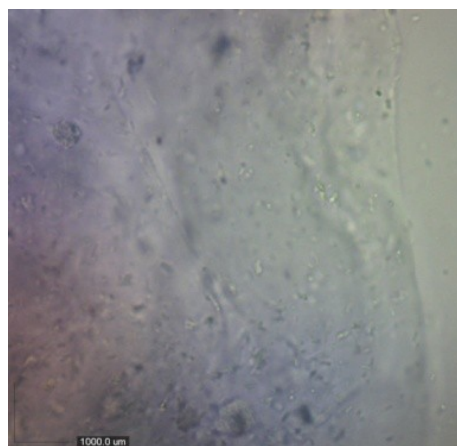
Tab. 11: Počet a procenta živých a mrtvých bakterií v kapsli a mimo kapsli v mléce po 6 dnech

	Mléko							
	uvnitř kapsle				mimo kapsli			
	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%
<i>Lactobacillus acidophilus</i>								
2% alginát, velikost částic 300 µm	36.10 ⁶	100	0	0	/	/	/	/
2% alginát, velikost částic 450 µm	60.10 ⁶	100	0	0	/	/	/	/
2% alginát + 20 % 1% roztoku škrobu	44.10 ⁶	100	0	0	/	/	/	/
2% alginát + 30 % 1% roztoku škrobu	36.10 ⁶	100	0	0	/	/	/	/
2% alginát + 20 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	28.10 ⁶	100	0	0	/	/	/	/
2% alginát + 30 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	48.10 ⁶	100	0	0	/	/	/	/
4% alginát	64.10 ⁶	88,9	8.10 ⁶	11,1	52.10 ⁶	92,9	4.10 ⁶	7,1
2% chitosan + 33 % 1% roztoku škrobu	20.10 ⁶	100	0	0	112.10 ⁶	96,6	4.10 ⁶	3,4
2% chitosan + 20 % 1% roztoku škrobu	20.10 ⁶	100	0	0	116.10 ⁶	96,7	4.10 ⁶	3,3
<i>Bifidobacterium breve</i>								
2% alginát, velikost částic 300 µm	56.10 ⁶	87,5	8.10 ⁶	12,5	/	/	/	/
2% alginát, velikost částic 450 µm	32.10 ⁶	80	8.10 ⁶	20	/	/	/	/
2% alginát + 20 % 1% roztoku škrobu	68.10 ⁶	100	0	0	/	/	/	/
2% alginát + 30 % 1% roztoku škrobu	44.10 ⁶	100	0	0	/	/	/	/
2% alginát + 20 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	72.10 ⁶	100	0	0	/	/	/	/
2% alginát + 30 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	52.10 ⁶	100	0	0	/	/	/	/
4% alginát	84.10 ⁶	95,5	4.10 ⁶	4,5	56.10 ⁶	93,3	4.10 ⁶	6,7
2% chitosan + 33 % 1% roztoku škrobu	20.10 ⁶	100	0	0	128.10 ⁶	91,4	12.10 ⁶	8,6
2% chitosan + 20 % 1% roztoku škrobu	32.10 ⁶	100	0	0	112.10 ⁶	93,3	8.10 ⁶	6,7

5.4.4 Sledování částic pomocí optické mikroskopie po 6 dnech



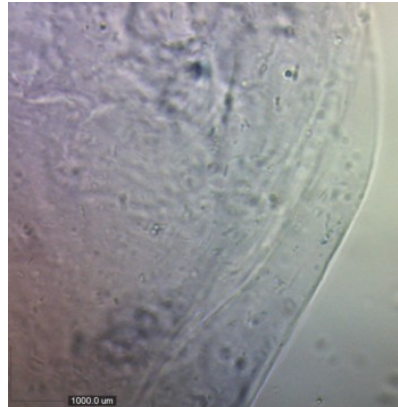
Obr. 21 Alginátová částice v destilované vodě, velikost trysky: 300 µm, bakterie *Bifidobacterium breve*, 40x



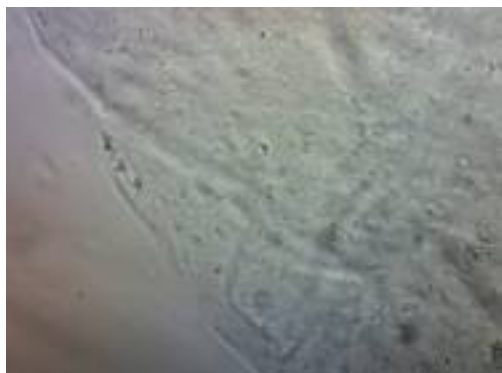
Obr. 22 Alginátová částice smíchaná s roztokem 1% škrobu v destilované vodě, bakterie *Lactobacillus acidophilus*, 40x



Obr. 23 Alginátová částice smíchaná s roztokem 2% karboxymethylcelulózy v 10% ethanolu, bakterie *Lactobacillus acidophilus*, 40x



Obr. 24 Alginátová částice smíchaná s roztokem 1% škrobu v 10% ethanolu bakterie *Bifidobacterium breve*, 40x



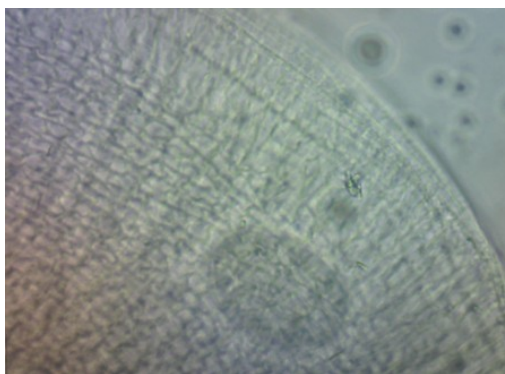
Obr. 25 Alginátová částice smíchaná s roztokem 2% škrobu v 3% kyselině octové, bakterie *Bifidobacterium breve*, 40x



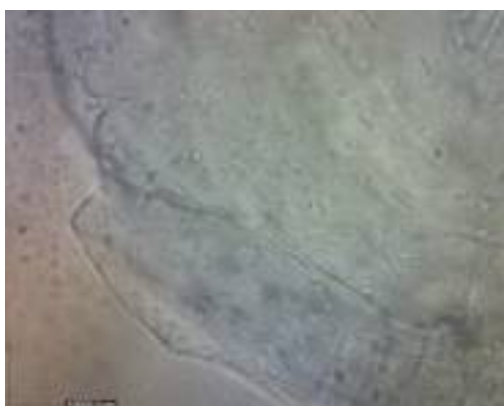
Obr. 26 Alginátová částice v 3% kyselině octové velikost trysky: 300 µm, bakterie *Bifidobacterium breve*, 40x



Obr. 27 Alginátová částice v oleji, velikost trysky 450 μm , bakterie *Bifidobacterium breve*, 40x



Obr. 28 Chitosanová částice smíchaná s roztokem 1% škrobu v oleji, bakterie *Lactobacillus acidophilus*, 40x



Obr. 29 Alginátová částice v mléce, velikost trysky 450 μm , bakterie *Bifidobacterium breve*, 40x



Obr. 30 Alginátová částice smíchaná s roztokem 2% karboxymethylcelulózy v mléce, bakterie *Lactobacillus acidophilus*, 40x

5.4.5 Životaschopnost bakterií v částicích po 4 týdnech

5.4.5.1 Životaschopnost bakterií v částicích v destilované vodě

Po čtyřech týdnech nebylo možné určit počet živých a mrtvých buněk v chitosanových částicích s roztokem 1% škrobu, protože byly značně zakalené. V ostatních částicích byl počet buněk uvnitř kapsle nad 50 %, pouze u alginátových částic s roztokem 1% škrobu bylo uvnitř částice méně než 50 % buněk z celkového původního počtu (Tab. 12). Uvnitř kapsle byl ve většině typech částic počet mrtvých buněk stanoven pod 25 %, jen u částic z 2% alginátu byl počet mrtvých bakterií nad 30 %. Mimo částici byl počet mrtvých buněk mezi 20-40 %, jen u chitosanových částic modifikovaných roztokem 2% škrobu bylo mrtvých bakterií pod 10 %.

V porovnání s částicemi, které byly sledovány po 6 dnech se zvýšil počet uvolněných buněk přibližně o 10 %. Zvýšil se také počet mrtvých bakterií mimo částici, a to v průměru o 20 %. Uvnitř částice se počet mrtvých buněk zvýšil o 10 %. Enkapsulované probiotické bakterie lze tedy považovat za poměrně stabilní i při dlouhodobé uchování.

5.4.5.2 Životaschopnost bakterií v částicích v 10% ethanolu

V prostředí 10% ethanolu byl počet uvolněných bakterií z kapsle za 4 týdny od 10 % do 20 %, z toho bylo 30 % až 50 % mrtvých buněk. V chitosanových částicích modifikovaných škrobem nebylo možné pozorovat počet živých a mrtvých buněk uvnitř částice, protože částice byly zakalené. Uvnitř kapsle byl počet mrtvých buněk stanoven mezi 20 % až 30 %.

Výjimku tvořily 2% alginátové částice s *Bifidobacterium breve*, kdy bylo mrtvých bakterií nad 40 % (Tab. 13).

V porovnání s částicemi, které byly pozorovány po 6 dnech se uvnitř kapsle zvýšil počet mrtvých bakterií o 15 %. Stav mimo částice se téměř nezměnil.

5.4.5.3 Životaschopnost bakterií v částicích v 3% kyselině octové

Po čtyřech týdnech zůstalo v prostředí 3% kyseliny octové uvnitř kapsle ve všech typech částic nad 77 % bakterií. Z toho bylo přibližně 26 % mrtvých, až na 2% alginátové částice, kde počet mrtvých buněk přesahoval 40 %. Tak jako v předchozích případech nebylo možné spočítat množství živých a mrtvých buněk uvnitř chitosanových částic s 2% roztokem škrobu z důvodu zakalení. Mimo částici bylo mrtvých 33 % bakterií, opět s výjimkou 2% a 4% alginátových částic, kde bylo mrtvých bakterií více než 50 % (Tab. 14). Takto vysoký počet mrtvých buněk byl způsoben nejspíš příliš kyselým prostředím, které je pro buňky nevhodné.

Při porovnání s výsledky získanými po 6 dnech se počet mrtvých buněk uvnitř částic zvýšil v průměru o 10 %, dlouhodobá stabilita buněk je tedy pořád poměrně dobrá.

5.4.5.4 Životaschopnost bakterií v částicích ve směsi voda:olej v poměru 1:4

Po 4 týdnech zůstalo uvnitř částic s obsahem oleje přes 60 % z původního počtu bakterií, z toho více než 60 % živých. Chitosanové částice s roztokem 2% škrobu byly zakalené a nebylo možné tedy určit počet živých a mrtvých bakterií uvnitř částice. Mimo kapsli byl počet mrtvých buněk nad 30 %, u částic z 2% alginátu byl počet mrtvých bakterií nad 50 % (Tab. 15).

Z porovnání těchto hodnot s hodnotami zjištěnými po 6 dnech inkubace je patrné, že se zvýšil počet mrtvých bakterií mimo kapsli o 20 % a uvnitř kapsle o 10 %.

5.4.5.5 Životaschopnost bakterií v částicích v mléce

Po 4 týdnech, kdy byly částice v mléce se sice počet mrtvých bakterií navýšil, ale pouze o 3 %. Opět u některých částic nebylo možné z důvodu zakalení spočítat jednotlivé buňky, a to v částicích s 1% roztokem škrobu a u buněk uvolněných ze směsných alginátových částic. Mimo částici se nacházelo přibližně 40-50 % bakterií, z toho bylo u všech částic nad 80 % živých buněk, u chitosanových částic s 2% roztokem škrobu bylo dokonce 100 % živých bakterií. Uvnitř kapsle bylo také nad 80 % buněk živých (Tab.16).

V porovnání s částicemi, které byly v mléce inkubovány po dobu 6 dní se navýšil počet mrtvých buněk v částici ve většině případů o necelých 10 %, maximálně však o 20 %. Dlouhodobá stabilita a životaschopnost probiotických bakterií byla tedy nejvyšší v mléce jako modelové reálné potravině, což je současně i velmi vhodná přirozená aplikační forma pro doplňování probiotik do organismu.

Tab. 12 Počet a procenta živých a mrtvých bakterií v kapsli a mimo kapsli v destilované vodě po 4 týdnech

<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Destilovaná voda							
	uvnitř kapsle				mimo kapsli			
	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%
2% alginát, velikost částic 300 µm	44.10 ⁶	68,7	20.10 ⁶	31,3	24.10 ⁶	60	16.10 ⁶	40
2% alginát, velikost částic 450 µm	72.10 ⁶	78,3	20.10 ⁶	21,7	20.10 ⁶	45,5	24.10 ⁶	54,5
2% alginát + 20 % 1% roztoku škrobu	52.10 ⁶	76,5	16.10 ⁶	23,5	76.10 ⁶	82,6	16.10 ⁶	17,4
2% alginát + 30 % 1% roztoku škrobu	48.10 ⁶	80	12.10 ⁶	20	48.10 ⁶	75	16.10 ⁶	25
2% alginát + 20 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	44.10 ⁶	84,6	8.10 ⁶	15,4	32.10 ⁶	72,7	12.10 ⁶	27,3
2% alginát + 30 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	52.10 ⁶	81,2	12.10 ⁶	18,8	40.10 ⁶	76,9	12.10 ⁶	23,1
4% alginát	48.10 ⁶	75	16.10 ⁶	25	28.10 ⁶	77,8	8.10 ⁶	22,2
2% chitosan + 33 % 1% roztoku škrobu	/	/	/	/	76.10 ⁶	95	4.10 ⁶	5
2% chitosan + 20 % 1% roztoku škrobu	/	/	/	/	216.10 ⁶	100	0	0
<i>Bifidobacterium breve</i>	uvnitř kapsle				mimo kapsli			
	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%
2% alginát, velikost částic 300 µm	44.10 ⁶	55	36.10 ⁶	45	44.10 ⁶	61,1	28.10 ⁶	38,9
2% alginát, velikost částic 450 µm	48.10 ⁶	57,1	36.10 ⁶	42,9	64.10 ⁶	66,7	32.10 ⁶	33,3
2% alginát + 20 % 1% roztoku škrobu	48.10 ⁶	80	12.10 ⁶	20	60.10 ⁶	75	20.10 ⁶	25
2% alginát + 30 % 1% roztoku škrobu	56.10 ⁶	70	24.10 ⁶	30	60.10 ⁶	78,9	16.10 ⁶	21,1
2% alginát + 20 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	60.10 ⁶	78,9	16.10 ⁶	21,1	60.10 ⁶	78,9	16.10 ⁶	21,1
2% alginát + 30 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	36.10 ⁶	81,8	8.10 ⁶	18,2	32.10 ⁶	80	8.10 ⁶	20
4% alginát	48.10 ⁶	75	16.10 ⁶	25	36.10 ⁶	75	12.10 ⁶	25
2% chitosan + 33 % 1% roztoku škrobu	/	/	/	/	44.10 ⁶	91,7	4.10 ⁶	8,3
2% chitosan + 20 % 1% roztoku škrobu	/	/	/	/	40.10 ⁶	90,9	4.10 ⁶	9,1

Tab. 13 Počet a procenta živých a mrtvých bakterií v kapsli a mimo kapsli v ethanolu po 4 týdnech

	10% ethanol							
	uvnitř kapsle				mimo kapsli			
	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%
<i>Lactobacillus acidophilus</i>								
2% alginát, velikost částic 300 µm	64.10 ⁶	72,7	24.10 ⁶	27,3	12.10 ⁶	75	4.10 ⁶	25
2% alginát, velikost částic 450 µm	56.10 ⁶	63,6	32.10 ⁶	36,4	12.10 ⁶	60	8.10 ⁶	40
2% alginát + 20 % 1% roztoku škrobu	36.10 ⁶	69,2	16.10 ⁶	30,8	12.10 ⁶	75	4.10 ⁶	25
2% alginát + 30 % 1% roztoku škrobu	32.10 ⁶	66,7	16.10 ⁶	33,3	8.10 ⁶	66,7	4.10 ⁶	33,3
2% alginát + 20 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	68.10 ⁶	70,8	28.10 ⁶	29,2	12.10 ⁶	60	8.10 ⁶	40
2% alginát + 30 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	60.10 ⁶	75	20.10 ⁶	25	8.10 ⁶	66,7	4.10 ⁶	33,3
4% alginát	48.10 ⁶	66,7	24.10 ⁶	33,3	24.10 ⁶	75	8.10 ⁶	25
2% chitosan + 33 % 1% roztoku škrobu	/	/	/	/	16.10 ⁶	80	4.10 ⁶	20
2% chitosan + 20 % 1% roztoku škrobu	/	/	/	/	20.10 ⁶	62,5	12.10 ⁶	37,5
<i>Bifidobacterium breve</i>								
2% alginát, velikost částic 300 µm	56.10 ⁶	58,3	40.10 ⁶	41,7	24.10 ⁶	50	24.10 ⁶	50
2% alginát, velikost částic 450 µm	40.10 ⁶	58,8	28.10 ⁶	41,2	16.10 ⁶	57,1	12.10 ⁶	42,9
2% alginát + 20 % 1% roztoku škrobu	36.10 ⁶	69,2	16.10 ⁶	30,8	12.10 ⁶	75	4.10 ⁶	25
2% alginát + 30 % 1% roztoku škrobu	44.10 ⁶	73,3	16.10 ⁶	26,7	8.10 ⁶	66,7	4.10 ⁶	33,3
2% alginát + 20 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	68.10 ⁶	70,8	28.10 ⁶	29,2	8.10 ⁶	66,7	4.10 ⁶	33,3
2% alginát + 30 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	68.10 ⁶	73,9	24.10 ⁶	26,1	8.10 ⁶	66,7	4.10 ⁶	33,3
4% alginát	60.10 ⁶	75	20.10 ⁶	25	12.10 ⁶	60	8.10 ⁶	40
2% chitosan + 33 % 1% roztoku škrobu	/	/	/	/	20.10 ⁶	71,4	8.10 ⁶	28,6
2% chitosan + 20 % 1% roztoku škrobu	/	/	/	/	8.10 ⁶	66,7	4.10 ⁶	33,3

Tab. 14 Počet a procenta živých a mrtvých bakterií v kapsli a mimo kapsli v kyselině octové po 4 týdnech

<i>Lactobacillus acidophilus</i>	3% kyselina octová							
	uvnitř kapsle				mimo kapsli			
	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%
2% alginát, velikost částic 300 µm	88.10 ⁶	64,7	48.10 ⁶	35,3	12.10 ⁶	60	8.10 ⁶	40
2% alginát, velikost částic 450 µm	60.10 ⁶	53,6	52.10 ⁶	46,4	8.10 ⁶	50	8.10 ⁶	50
2% alginát + 20 % 1% roztoku škrobu	52.10 ⁶	76,5	16.10 ⁶	23,5	20*10 ⁶	83,3	4.10 ⁶	16,7
2% alginát + 30 % 1% roztoku škrobu	48.10 ⁶	85,7	8.10 ⁶	14,3	8.10 ⁶	66,7	4.10 ⁶	33,3
2% alginát + 20 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	52.10 ⁶	76,5	16.10 ⁶	23,5	12.10 ⁶	75	4.10 ⁶	25
2% alginát + 30 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	56.10 ⁶	77,8	16.10 ⁶	22,2	8.10 ⁶	66,7	4.10 ⁶	33,3
4% alginát	44.10 ⁶	73,3	16.10 ⁶	26,7	8.10 ⁶	50	8.10 ⁶	50
2% chitosan + 33 % 1% roztoku škrobu	/	/	/	/	32.10 ⁶	88,9	4.10 ⁶	11,1
2% chitosan + 20 % 1% roztoku škrobu	/	/	/	/	20.10 ⁶	83,3	4.10 ⁶	16,7
<i>Bifidobacterium breve</i>	uvnitř kapsle				mimo kapsli			
	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%
2% alginát, velikost částic 300 µm	36.10 ⁶	45	44.10 ⁶	55	8.10 ⁶	50	8.10 ⁶	50
2% alginát, velikost částic 450 µm	48.10 ⁶	54,5	40.10 ⁶	45,5	8.10 ⁶	33,3	16.10 ⁶	66,7
2% alginát + 20 % 1% roztoku škrobu	60.10 ⁶	75	20.10 ⁶	25	8.10 ⁶	66,7	4.10 ⁶	33,3
2% alginát + 30 % 1% roztoku škrobu	52.10 ⁶	86,7	8.10 ⁶	13,3	8.10 ⁶	66,7	4.10 ⁶	33,3
2% alginát + 20 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	56.10 ⁶	73,7	20.10 ⁶	26,3	8.10 ⁶	66,7	4.10 ⁶	33,3
2% alginát + 30 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	60.10 ⁶	75	20.10 ⁶	25	8.10 ⁶	66,7	4.10 ⁶	33,3
4% alginát	40.10 ⁶	71,4	16.10 ⁶	28,6	8.10 ⁶	50	8.10 ⁶	50
2% chitosan + 33 % 1% roztoku škrobu	/	/	/	/	20.10 ⁶	83,3	4.10 ⁶	16,7
2% chitosan + 20 % 1% roztoku škrobu	/	/	/	/	20.10 ⁶	83,3	4.10 ⁶	16,7

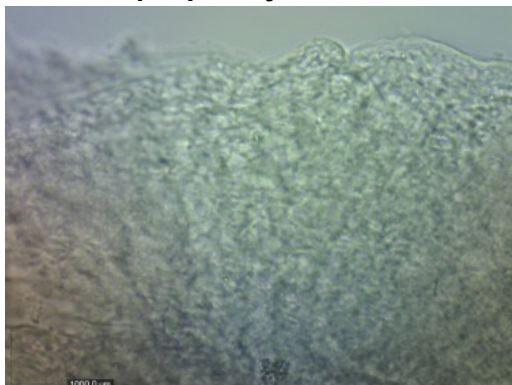
Tab. 16 Počet a procenta živých a mrtvých bakterií v kapsli a mimo kapsli v mléce po 4 týdnech

	Mléko							
	uvnitř kapsle				mimo kapsli			
	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%
<i>Lactobacillus acidophilus</i>								
2% alginát, velikost částic 300 µm	68.10 ⁶	85	12.10 ⁶	15	52.10 ⁶	92,9	4.10 ⁶	7,1
2% alginát, velikost částic 450 µm	68.10 ⁶	81	16.10 ⁶	19	24.10 ⁶	85,7	4.10 ⁶	14,3
2% alginát + 20 % 1% roztoku škrobu	52.10 ⁶	86,7	8.10 ⁶	13,3	/	/	/	/
2% alginát + 30 % 1% roztoku škrobu	52.10 ⁶	92,9	4.10 ⁶	7,1	/	/	/	/
2% alginát + 20 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	52.10 ⁶	92,9	4.10 ⁶	7,1	/	/	/	/
2% alginát + 30 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	52.10 ⁶	92,9	4.10 ⁶	7,1	/	/	/	/
4% alginát	56.10 ⁶	82,4	12.10 ⁶	17,6	56.10 ⁶	87,5	8.10 ⁶	12,5
2% chitosan + 33 % 1% roztoku škrobu	/	/	/	/	88.10 ⁶	100	/	/
2% chitosan + 20 % 1% roztoku škrobu	/	/	/	/	92.10 ⁶	100	/	/
<i>Bifidobacterium breve</i>								
	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%	živé bakterie	%	mrtvé bakterie	%
2% alginát, velikost částic 300 µm	52.10 ⁶	81,2	12.10 ⁶	18,8	40.10 ⁶	77	12.10 ⁶	23
2% alginát, velikost částic 450 µm	48.10 ⁶	75	16.10 ⁶	25	36.10 ⁶	75	12.10 ⁶	25
2% alginát + 20 % 1% roztoku škrobu	64.10 ⁶	88,9	8.10 ⁶	11,1	/	/	/	/
2% alginát + 30 % 1% roztoku škrobu	192.10 ⁶	98	4.10 ⁶	2	/	/	/	/
2% alginát + 20 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	56.10 ⁶	87,5	8.10 ⁶	12,5	/	/	/	/
2% alginát + 30 % 2% roztoku karboxymethylcelulózy	64.10 ⁶	88,9	8.10 ⁶	11,1	/	/	/	/
4% alginát	60.10 ⁶	88,2	8.10 ⁶	11,8	56.10 ⁶	87,5	8.10 ⁶	12,5
2% chitosan + 33 % 1% roztoku škrobu	/	/	/	/	88.10 ⁶	100	/	/
2% chitosan + 20 % 1% roztoku škrobu	/	/	/	/	56.10 ⁶	100	/	/

5.4.6 Sledování částic pomocí optické mikroskopie po 4 týdnech



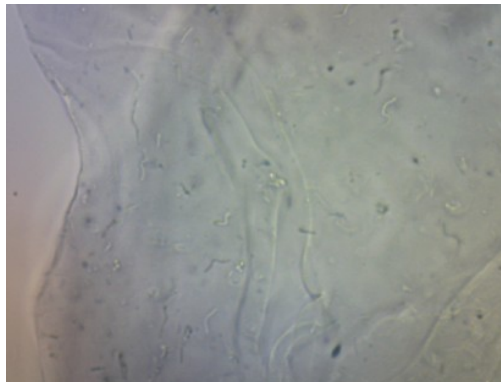
Obr. 31 Alginátová částice v destilované vodě, velikost trysky 300 µm, bakterie *Bifidobacterium breve*, 40x



Obr. 32 Chitosanová částice smíchaná s roztokem 1% škrobu v destilované vodě, bakterie *Bifidobacterium breve*, 40x



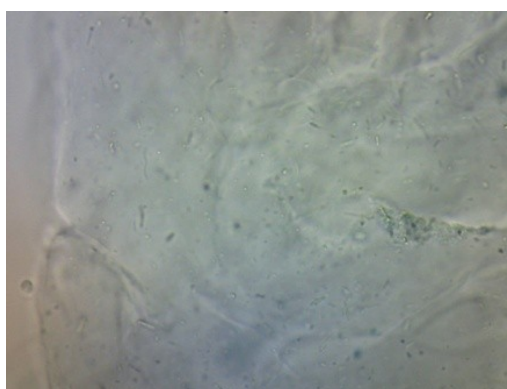
Obr. 33 Chitosanová částice smíchaná s roztokem 1% škrobu v 10% ethanolu, bakterie *Bifidobacterium breve*, 40x



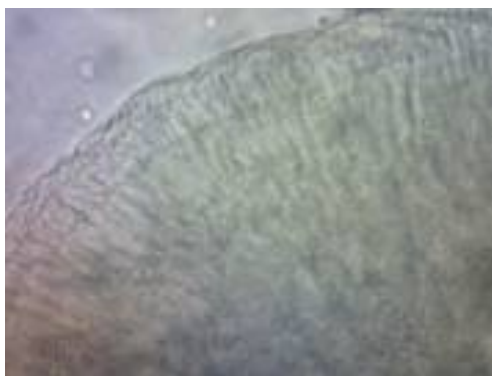
Obr. 34 Alginátová částice v 10% ethanolu, velikost trysky 300 µm, bakterie *Bifidobacterium breve*, 40x



Obr. 35 4% alginátová částice v 3% kyselině octové, bakterie *Lactobacillus acidophilus*, 40x



Obr. 36 Alginátová částice smíchaná s roztokem 1% škrobu v 3% kyselině octové, bakterie *Bifidobacterium breve*, 40x



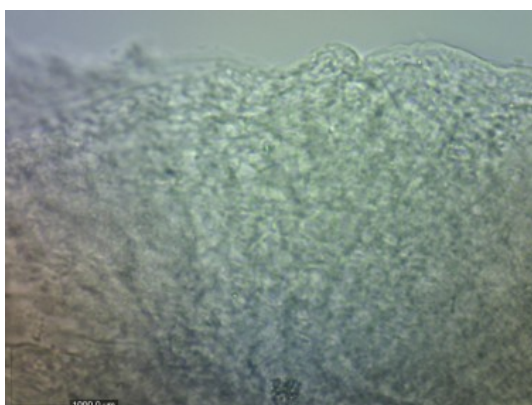
Obr. 37 Chitosanová částice smíchaná s roztokem 1% škrobu v oleji, bakterie *Lactobacillus acidophilus*, 40x



Obr. 38 Alginátová částice v oleji, velikost trysky: 300 µm, bakterie *Lactobacillus acidophilus*, 40x



Obr. 39 Alginátová částice v mléce, velikost trysky 300 µm, bakterie *Bifidobacterium breve*, 40x



Obr. 40 Chitosanová částice smíchaná s roztokem 2% karboxymethylcelulózy v mléce, bakterie *Bifidobacterium breve*, 40x

6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřena na enkapsulaci mikroorganismů do různých typů polysacharidových částic. Enkapsulovanými mikroorganismy byly probiotické kmeny *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium breve*. Použité částice byly připraveny z 2% alginátu o velikosti 300 µm a 450 µm. Ostatní částice – 4% alginátové částice, alginátové částice s roztokem 1% škrobu a karboxymethylcelulózou a chitosanové částice s 1% roztokem škrobu měly velikost 300 µm.

Po enkapsulaci byly částice inkubovány v pěti typech modelových potravin za účelem sledování dlouhodobé stability a zachování životaschopnosti probiotických bakterií. Dále byly částice inkubovány v modelovém fyziologickém prostředí (umělá žaludeční, žlučová a pankreatická šťáva), kde byla posouzena stabilita částic a míra uvolňování jejich obsahu v příslušné části trávicí soustavy. Stabilita částic byla posuzována pod optickým mikroskopem, kdy se pomocí Bürkerovy komůrky počítaly živé a mrtvé bakterie uvnitř částice a bakterie uvolněné z částice. Pomocí průtokového cytometru byl stanoven počet živých buněk po 24hodinové kultivaci – ve startovním preparátu bylo vždy nad 90 % živých buněk u obou testovaných kmenů.

Při stanovení stability částic v modelových fyziologických podmínkách bylo zjištěno, že všechny částice byly poměrně stabilní ve žlučové a v žaludeční šťávě. V pankreatické šťávě došlo k rozpadu částic a k uvolnění bakterií do roztoku, nejvíce z alginátových a chitosanových částic obsahujících 1% roztok škrobu. Tato skutečnost by mohla být využita při cíleném transportu probiotik do střevního traktu; enkapsulované bakterie odolávají lépe kyselému prostředí žaludku, zatímco v prostředí pankreatické šťávy se lépe rozpadají a uvolňují aktivní obsah.

Částice byly poměrně stabilní i v modelových potravinách. Při procentuálním porovnání počtu živých a mrtvých bakterií bylo nejvíce živých buněk zachováno v modelové reálné potravine – v mléce. Ve všech typech částic byl i po 4 týdnech inkubace počet živých buněk nad 80 %. Bylo to způsobeno tím, že bakterie měly možnost z mléka čerpat živiny. Naopak nejvíce mrtvých bakterií bylo v 3% kyselině octové, nejspíš proto, že probiotickým kmenům nevyhovuje kyselé prostředí. Obecně lze konstatovat, že enkapsulace významně prodlužuje dlouhodobou životaschopnost a biologickou aktivitu probiotik i v nepříznivém vnějším prostředí.

Z praktické části této bakalářské práce můžeme usoudit, že pomocí enkapsulátoru je možné úspěšně enkapsulovat oba typy probiotických bakterií do několika druhů polysacharidových obalů. Většina částic, která takto vznikla je stabilní i delší dobu a enkapsulované bakterie si udržují svou životaschopnost. Některé obaly jsou stabilní v modelových trávicích šťávách i v modelových potravinách. Díky tomu je můžeme použít pro stabilizaci enkapsulovaných látek a poté může dojít k cílenému uvolnění bakterií v trávicí soustavě. Takto připravené částice by mohly být přidány do mléčných nebo zakysaných výrobků, do jogurtů a s ohledem na kvalitu použitých materiálů i do výrobků určených pro dětskou výživu a do potravinových doplňků.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] LESMES, Uri a David Julian MCCLEMENTS. Structure-function relationships to guide rational design and fabrication of particulate food delivery. *Trends in Food Science* [online]. 2009, roč. 20, č. 10, s. 448-457. ISSN 09242244. DOI: 10.1016/j.tifs.2009.05.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224409001782>
- [2] DE VOS, Paul, Marijke M. FAAS, Milica SPASOJEVIC a Jan SIKKEMA. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal* [online]. 2010, roč. 20, č. 4, s. 292-302. ISSN 09586946. DOI: 10.1016/j.idairyj.2009.11.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694609002167>
- [3] NEVORAL, Jiří. Prebiotika, probiotika a synbiotika. *Pediatric pro praxi*, 2005, roč. 8, č. 2, s. 59-65. Dostupné z: <http://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2005/02/02.pdf>
- [4] TLÁSKAL, Petr. Využití probiotik v pediatrii. *Pediatric pro praxi*, 2008, roč. 9, s. 288-292. Dostupné z: <http://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2008/05/04.pdf>
- [5] JELÍNEK, Jan a Vladimír ZICHÁČEK, Biologie pro gymnázia, 2. dopl. a rozš. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2007, 551 s., ISBN 80-7182-050-4
- [6] Kúdela, V., Novacky, A., Fucikovsky, L. (2002) Rostlinolékařská bakteriologie 347s., Academia, ISBN 80-200-0899-3
- [7] ŠPELINA, Vladimír a Daniela WINKLEROVÁ. Principy hodnocení účinnosti a bezpečnosti probiotik a charakteristika registrovaných doplňků stravy s obsahem probiotik a prebiotik. *Pediatric pro praxi*, 2009, roč. 10, s.247-250. Dostupné z: <http://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2009/04/08.pdf>
- [8] SEDLÁČEK, I., Taxonomie prokaryot.. Brno: Masarykova univerzita, 2007, první vydání, ISBN 80-210-4207-9
- [9] KREJSEK, Jan, Manuela KUDLOVÁ a Martina KOLÁČKOVÁ. Nutrice, probiotika a imunitní systém II. část: Nutrice, přirozená slizniční mikroflóra a individuální imunitní reaktivita. *Pediatric pro praxi*, 2007, roč. 8, č. 3, s. 126-127. Dostupné z: www.pediatricpropraxi.cz
- [10] KOHOUTKOVÁ, J., Možnosti využití biologických agens v ochraně potravního řetězce, 2005, s. 10-20. Dostupné z: <http://www.phyto sanitary.org/projekty/2004/vvf-08-04.pdf>
- [11] NICOLAAS JAN ZUIDAM, Viktor A. *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing* [online]. Online-Ausg. New York: Springer, 2010. ISBN 978-144-1910-080. Dostupné z: http://www.nottingham.ac.uk/ncmh/harding_pdfs/Paper329.pdf
- [12] NEDOVIC, Viktor, Ana KALUSEVIC, Verica MANOJLOVIC, Steva LEVIC a Branko BUGARSKI. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food* [online]. 2011, roč. 1, s. 1806-1815. ISSN 2211601x. DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.265. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211601X11002665>
- [13] DESAI, Kashappa Goud H. a Hyun JIN PARK. Recent Developments in Microencapsulation of Ingredients. *Drying Technology* [online]. 2005, roč. 23, Č. 7, s. 1361-1394. ISSN 0737-3937. Dostupné z: <http://pack.korea.ac.kr/non/49.pdf>
- [14] DESAI, Kashappa Goud H. a Hyun JIN PARK. Recent Developments in Microencapsulation of Ingredients. *Drying Technology* [online]. 2005, roč. 23, č. 7, s. 1361-1394. ISSN 0737-3937. Dostupné z: <http://pack.korea.ac.kr/non/49.pdf>
- [15] GREGORIADIS, Gregory. *Liposome Technology*. 3rd ed. New York: Informa Healthcare, c2007-, v. <1-3>. ISBN 97808493972573

- [16] DESAI, Kashappa Goud H. a Hyun JIN PARK. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology* [online]. 2005, roč. 23, č. 7, s. 1361-1394. ISSN 0737-3937. DOI: 10.1081/DRT-200063478
Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/DRT-200063478>
- [17] SWARBRICK, James. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. 3rd ed. New York: Informa Healthcare, c2007, 6 v. ISBN 08-493-9399-X
- [18] *BŮCHI. Návod k použití: Enkapsulátor B-395 Pro*
- [19] VELIŠEK, J., HAJŠLOVA, J. *Chemie potravin I*. Vyd. 3. Tabor: OSSIS, 2009, 580 s. ISBN 978-80-86659-15-2
- [20] ZIMMERMANN, Heiko, Stephen G. SHIRLEY a Ulrich ZIMMERMANN. Alginate- based encapsulation of cells: Past, present, and future. *Current Reports* [online]. 2007, roč. 7, č. 4, s. 314-320. ISSN 1534-4827. DOI: 10.1007/s11892-007-0051-1. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s11892-007-0051-1>
- [21] VELIŠEK, J., HAJŠLOVA, J. *Chemie potravin I*. Vyd. 3. Tabor: OSSIS, 2009, 580s. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [22] BOHM, P. Škrob-výskyt a funkce, biochemie. Dostupné z: http://pavelbohm.cz/kurzySCO/biochemie/zima_lekce3/skrob_vyskyt.htm
- [23] MIKEŠ, V. Základní pojmy s biochemie, 1997. Dostupné z: http://orion.chemi.muni.cz/zakladni_pojmy_z_biochemie/page0216.htm
- [24] HEINZE, T a T LIEBERT. Unconventional methods in cellulose functionalization. *Progress in Polymer Science* [online]. 2001, roč. 26, č. 9, s. 1689-1762. ISSN 00796700. DOI: 10.1016/S0079-6700(01)00022-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670001000223>
- [25] BRANSKÁ, Barbora, Michaela LINHOVÁ, Petra PATÁKOVÁ, Leona PAULOVÁ a Karel MELZUCH. Stanovení viability mikroorganismů pomocí fluorescenční analýzy. *Chemické Listy* [online]. 2011, č. 105, s. 586-593. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_08_586-593.pdf
- [26] RAHMAN, Misha. SEROTEC. Introduction to Flow Cytometry. Kidlington, 2005. Dostupné z: <http://static.abdserotec.com/uploads/Flow-Cytometry.pdf>
- [27] ORMEROD, Michael G. Flow Cytometry. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine* [online]. 2006. DOI: 10.1002/3527600906.mcb.200300144. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1002/3527600906.mcb.200300144>
- [28] SHAPIRO, Howard M. *Practical flow cytometry*. 4th ed. New York: Wiley-Liss, c2003, I, 681 p. ISBN 04-714-1125-6
- [29] *Československý lékopis: Pharmacopoea Bohemoslovaca*. 4. vyd. Praha: Avicenum, 1987
- [30] Vyhláška č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů. ČR, 2000. Dostupné z: <http://portal.gov.cz/app/zakony/zakonPar.jsp?idBiblio=49577&fulltext=&nr=258~2F2000&part=&name=&rpp=15#local-content>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

CMC	karboxymethylcelulóza
LA	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
BB	<i>Bifidobacterium breve</i>
FC	průtoková cytometrie
DLS	dynamický rozptyl světla