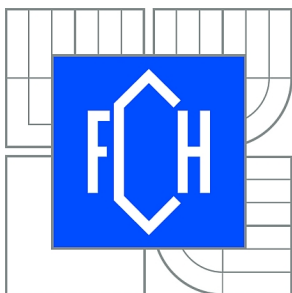


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU
FACULTY OF CHEMISTRY
MATERIALS RESEARCH CENTRE

CHARAKTERIZACE ORGANICKÝCH NANOČÁSTIC S ENKAPSULOVANÝMI ANTIMIKROBIÁLNÍMI PEPTIDY

CHARACTERIZATION OF ORGANIC NANOPARTICLES WITH ENCAPSULATED ANTIMICROBIAL
PEPTIDES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

PETRA VEJROSTOVÁ

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-BAK0816/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Centrum materiálového výzkumu	
Student(ka):	Petra Vejrostová	
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:

Charakterizace organických nanočástic s enkapsulovanými antimikrobiálními peptidy

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše - antimikrobiální peptidy- struktura, aktivita, využití; techniky enkapsulace.
2. Metody - stanovení bílkovin a peptidů, testování antimikrobiální aktivity vybraných peptidů, enkapsulace, charakterizace částic DLS.
3. Experimentální část - enkapsulace vybraných antimikrobiálních peptidů (lysozym) do organických částic, charakterizace částic a změny antimikrobiální aktivity 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.

Petra Vejrostová
Student(ka)

doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je zaměřena na charakterizaci částic s enkapsulovaným antimikrobiálním peptidem – lysozymem. V teoretické části byla zpracována literární rešerše zaměřená na charakterizaci a popis antimikrobiálních peptidů. Dále byl popsán vybraný zástupce využívaný v práci – lysozym. Byla popsána jak jeho struktura, tak mechanismus účinku a možné využití. V experimentální části byla pro stanovení lysozymu využita metoda Hartree-Lowryho, a to jak pro určení enkapsulační účinnosti, tak i pro určení množství uvolněného lysozymu po inkubaci v modelovém fyziologickém prostředí a v modelových potravinách. Při enkapsulaci obsahovaly nejvíce lysozymu 1% chitosanové částice, alginátové manuálně připravené částice a lipozomy. Studium stability částic v modelových potravinách bylo zjištěno, že nejméně stabilní jsou manuálně připravené chitosanové částice. Důležitým poznatkem bylo, že uvolněný lysozym prošel změnami, které způsobily jeho degradaci. Nejvíce ovlivňujícím prostředím byla 3% kyselina octová. Při studiu stability částic v modelovém fyziologickém prostředí se rozložily nejvíce manuálně připravené chitosanové částice. Nejstabilnější byly alginátové částice. V práci byly také studovány změny antimikrobiální aktivity enkapsulovaného lysozymu u připravených částic i po aplikaci do modelových prostředí. K testování antimikrobiální aktivity byla využita grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis*. Antimikrobiální testy ukázaly, že lysozym po enkapsulaci ve většině případů ztrácí svou antimikrobiální aktivitu. Pomocí metody dynamického rozptylu světla byla určena velikost a stabilita připravených částic.

KLÍČOVÁ SLOVA

Antimikrobiální aktivita, antimikrobiální peptidy, *Bacillus subtilis*, bílkoviny, DLS, enkapsulace, lysozym

ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on characterization of particles containing encapsulated antimicrobial enzyme lysozyme. The theoretical part deals with characterization of antimicrobial peptides and their description. Further part of review was focused on lysozyme, the selected representative used in this thesis, its structure, mechanism of action and possible usage. In the experimental part the Hartree-Lowry method was used for lysozyme detection, determination of encapsulation efficiency and for detecting the amount of lysozyme released after incubation in model physiological environment and in model foods. In process of encapsulation the highest amount of lysozyme was packed into 1% chitosan particles, manually prepared alginate particles and into liposomes. During study of stability of particles in model foods as the least stable manually prepared chitosan particles were found. The released lysozyme exhibited changes probably caused by its degradation. The highest influence on particles proved 3% acetic acid. During studying the stability of the particles in artificial digestive fluids as the most unstable manually prepared chitosan particles were found, while alginate particles were the most stable. The thesis also deals with changes in antimicrobial activity of encapsulated lysozyme in prepared particles and after its application into the model environments. A gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* was used in order to test the antimicrobial activity. Antimicrobial tests showed that after encapsulation antimicrobial activity of lysozyme was substantially decreased in most samples. Size and stability of prepared particles was tested using dynamic light scattering.

KEYWORDS

Antimicrobial activity, antimicrobial peptides, *Bacillus subtilis*, peptides, DLS, encapsulation, lysozyme

VEJROSTOVÁ, P. *Charakterizace organických nanočástic s enkapsulovanými antimikrobiálními peptidy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 69 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 děkanem FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

*Na tomto místě bych ráda poděkovala
doc. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za cenné rady
a odborné vedení při zpracování mé bakalářské práce.
Dále Ing. Petře Matouškové za nepostradatelnou pomoc
při začátcích mé experimentální práce a také
Ing. Andree Lichnové, Ph.D. za celkovou pomoc, rady
a trpělivost v průběhu měření.
V neposlední řadě patří velký dík mé rodině za trpělivost
a podporu po celou dobu psaní této práce.*

OBSAH

OBSAH	6
1. ÚVOD	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1. Antimikrobiální peptidy	10
2.1.1. Historie výzkumu antimikrobiálních peptidů	10
2.1.2. Struktura antimikrobiálních peptidů	11
2.1.3. Účinky antimikrobiálních peptidů	12
2.1.4. Využití antimikrobiálních peptidů	13
2.2. Lysozym	13
2.2.1. Historie výzkumu lysozymu	13
2.2.2. Struktura lysozymu	14
2.2.3. Mechanismus antimikrobiálního účinku lysozymu	15
2.2.4. Využití lysozymu v praxi	15
2.3. Techniky enkapsulace	16
2.3.1. Sprejové sušení	16
2.3.2. Sprejové chlazení	16
2.3.3. Extruze	16
2.3.4. Emulgace	17
2.3.5. Fluidní vrstva	17
2.3.6. Tvorba hydrogelů	17
2.3.7. Tvorba lipozomů	17
2.3.8. Enkapsulace pomocí enkapsulátoru	17
2.4. Organické nanočástice	19
2.4.1. Lipozomy	19
2.4.2. Polysacharidové částice	20
2.4.2.1. Alginátové částice	21
2.4.2.2. Chitosanové částice	22
2.4.2.3. Škrobové částice	22
2.5. Testování antimikrobiální aktivity	23
2.5.1. Testování na pevných médiích	23
2.5.2. Testování v tekutých médiích	23
2.5.3. <i>Bacillus subtilis</i>	24
3. CÍL PRÁCE	25
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26

4.1.	Použité mikroorganismy	26
4.2.	Použité chemikálie	26
4.2.1.	Standardní a speciální chemikálie	26
4.3.	Přístroje a pomůcky	26
4.4.	Spektrofotometrické stanovení proteinů	27
4.4.1.	Metoda Hartree-Lowryho	27
4.5.	Příprava částic s enkapsulovaným lysozymem	27
4.5.1.	Příprava lipozomů	27
4.5.2.	Manuální příprava alginátových částic	28
4.5.3.	Příprava alginátových částic na enkapsulátoru	28
4.5.4.	Manuální příprava chitosanových částic	28
4.5.5.	Příprava chitosanových částic na enkapsulátoru	29
4.5.6.	Příprava škrobových částic	29
4.6.	Stanovení enkapsulační účinnosti	29
4.7.	Charakterizace částic v modelových potravinách	30
4.7.1.	Modelové potraviny	30
4.7.2.	Aplikace částic do modelových potravin	30
4.8.	Charakterizace částic v modelovém fyziologickém prostředí	30
4.8.1.	Trávicí šťávy	30
4.8.2.	Aplikace částic do trávicích šťáv	31
4.9.	Testování antimikrobiální aktivity	31
4.9.1.	Kultivace <i>Bacillus subtilis</i>	31
4.9.2.	Antimikrobiální test	31
4.10.	Stanovení velikosti a stability částic pomocí DLS	32
5.	VÝSLEDKY A DISKUSE	33
5.1.	Enkapsulační účinnost	33
5.2.	Charakterizace částic v modelových potravinách	33
5.2.1.	Částice připravené na enkapsulátoru	34
5.2.2.	Manuálně připravené částice	37
5.2.3.	Srovnání dlouhodobé stability jednotlivých částic v časových intervalech	39
5.3.	Charakterizace částic v modelovém fyziologickém prostředí	41
5.3.1.	Pankreatická trávicí šťáva	41
5.3.2.	Žaludeční trávicí šťáva	42
5.3.3.	Žlučová trávicí šťáva	43
5.4.	Antimikrobiální testy	43
5.4.1.	Čerstvě připravené částice	44

5.4.2.	Testování po aplikaci do modelových potravin.....	44
5.4.2.1.	Alginátové částice – enkapsulátor.....	44
5.4.2.2.	Chitosanové částice – enkapsulátor.....	46
5.4.2.3.	Manuálně připravené částice	48
5.4.3.	Testování po aplikaci do modelového fyziologického prostředí.....	50
5.4.3.1.	Pankreatická trávící šťáva	50
5.4.3.2.	Žaludeční trávící šťáva.....	51
5.4.3.3.	Žlučová trávící šťáva	52
5.5.	Aktivita a stabilita volného lysozymu v modelovém prostředí	53
5.6.	Stanovení distribuce velikosti částic.....	54
5.7.	Stanovení stability částic pomocí ζ -potenciálu	55
6.	ZÁVĚR.....	56
7.	LITERATURA.....	58
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	62
9.	SEZNAM PŘÍLOH.....	63
10.	PŘÍLOHY	64

1. ÚVOD

Náplní této bakalářské práce bylo studium stability organických částic, do kterých byl enkapsulován lysozym. Cílem bylo také ověření antimikrobiálních účinků těchto částic.

Lysozym patří do široké skupiny antimikrobiálních peptidů. Jedná se o různé velké molekuly složené z různého počtu aminokyselin. Antimikrobiální peptidy jsou složkami imunitních systémů živočichů a dělí se na kationické a anionické. Tyto peptidy disponují baktericidním účinkem. Ve většině případů se studie zabývají peptidy kationickými. Kationické AMP mohou díky svému kladnému náboji interagovat s negativně nabitými membránami bakterií, mohou působit také na některé houby a viry. Výzkum antimikrobiálních peptidů začal v roce 1939 a pokračuje intenzivně dodnes. I přes velké množství již popsaných antimikrobiálních peptidů se jejich databáze stále rozrůstají. Možnosti využití antimikrobiálních peptidů jsou velmi široké a již bylo připraveno několik preparátů obsahující tyto látky.

Lysozym je enzym patřící do skupiny hydroláz. Vyskytuje se v tělesných sekretech živočichů a vykazuje značné antimikrobiální účinky. Stěžejní osobností figurující v oblasti výzkumu lysozymu je Alexander Fleming, který jej roku 1921 objevil. Lysozym lze dělit na čtyři strukturní skupiny. Zřejmě nejvýznamnějším typem lysozymu je lysozym izolovaný z vaječného bílku, se kterým bylo pracováno i v této práci. Tento typ lysozymu je schválen pro použití v potravinářství. Důležitou vlastností lysozymu je jeho baktericidní účinek, kdy lysozym štěpí β -1,4-glykosidické vazby mezi *N*-acetylmuramovou kyselinou a *N*-acetylglukosaminem, které jsou obsaženy v buněčných stěnách především grampozitivních bakterií. Možnosti využití lysozymu jsou tak jako u jiných AMP široké, od využití v potravinářství až k výrobě biočipů. Lysozym enkapsulovaný do organických částic otevírá další možnosti jeho širokého využití.

Lysozym je možné enkapsulovat různými technikami. V této práci bylo využito extruze, tvorby lipozomů a enkapsulace pomocí enkapsulátoru, v teoretické části jsou popsány i jiné možné metody enkapsulace. V práci bylo využito několik typů obalových materiálů částic. Byly připravovány lipozomy a částice z polysacharidových materiálů. Využitými polysacharidy byly alginát, chitosan a škrob. Jejich struktura a vlastnosti jsou popsány v teoretické části práce.

Všechny připravené částice byly podrobeny charakterizaci jak čerstvé tak v různých modelových prostředích. Částice byly aplikovány do modelových potravin – 3% kyseliny octové, 10% alkoholu, emulze oleje a vody a do destilované vody. Dalším prostředím, ve kterém byly částice podrobeny charakterizaci, bylo modelové fyziologické prostředí – pankreatická trávicí šťáva, žaludeční trávicí šťáva a žlučová trávicí šťáva.

Součástí práce bylo i testování antimikrobiální aktivity připravených částic. Ověřena byla i antimikrobiální aktivita samotného lysozymu. Testům byly podrobeny jak čerstvé částice, tak částice po aplikaci do modelových prostředí. Pro antimikrobiální testy byla zvolena disková metoda testování s využitím bakterie *Bacillus subtilis*.

V rámci práce byla využita i metoda DLS. Touto metodou byla stanovena velikost manuálně připravených částic a byla stanovena jejich stabilita.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Antimikrobiální peptidy

Antimikrobiální peptidy jsou přírodní látky nacházející se ve většině organismů. Je popsáno více než 1 000 známých druhů antimikrobiálních peptidů. Některé z nich jsou součástí imunitního systému živočichů. V rámci nespecifické imunitní odezvy brání vstupu infekčních mikroorganismů. Existují antimikrobiální peptidy anionické a kationické [1].

V případě anionických antimikrobiálních peptidů se jedná o malé molekuly s homopolymerní aspartátovou oblastí, která zodpovídá za jejich charakter. Baktericidní účinek těchto peptidů je inhibován přítomností EDTA a s rostoucí koncentrací NaCl se zvyšuje. Tento druh antimikrobiálních peptidů byl nalezen v plicích, játrech, tenkém střevě savců a v krevním séru [1].

V případě kationických antimikrobiálních peptidů se jedná o molekuly obsahující maximálně 50 aminokyselin, u kterých převažuje pozitivní náboj. Právě kationické peptidy mohou díky svému náboji interagovat s bakteriálními membránami, které mají negativní náboj. Kationické antimikrobiální peptidy mohou vykazovat aktivitu proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím, mikroskopickým houbám a proti některým virům obsahujícím virový obal. Některé peptidy vykazují protirakovinotvornou aktivitu nebo podporují hojení [1].

2.1.1. Historie výzkumu antimikrobiálních peptidů

Začátek výzkumu antimikrobiálních enzymů (AMP) se datuje do poloviny dvacátého století. První antimikrobiální peptidy eukaryotických buněk byly prokázány roku 1939. Tyto AMP byly pojmenovány jako gramicidiny a byly izolovány z bakterie *Bacillus brevis*. Již dlouho je také známo, že AMP se nachází ve složkách lidského imunitního systému. Na konci roku 1920 byl objeven velmi významný zástupce AMP - lysozym. Podle některých autorů je právě lysozym označován jako první peptid s prokázanou antimikrobiální aktivitou. Rok 1960 je považován za skutečný počátek výzkumu antimikrobiálních peptidů. Přelomové výzkumy začaly studiemi z let 1950 - 1960 spojenými s výzkumem kationických AMP. Rok 1962 se vyznačuje prvním popisem zvířecích antimikrobiálních peptidů. Na konci 70. a 80. let 20. století byly popsány AMP obsažené v leukocytech. Mezníkem studií AMP je rok 1981, kdy Boman izoloval indukovatelné antimikrobiální peptidy z hemolymfy kukel mûry *Hyalophora cecropia* [2]. Dalším významným rokem je rok 1989, v tomto roce byl izolován kationtový AMP z žáby *Xenopus laevis* [2]. Na základě studií bylo zjištěno, že antimikrobiální peptidy se vyskytují téměř u všech organismů a hrají významnou roli v imunitních systémech. Zásadní otázkou výzkumu je i fakt, že při výzkumu antimikrobiální aktivity *in vitro* je nutná mnohem vyšší koncentrace peptidů, než jaká je ve fyziologickém prostředí organismů. Ve studiích z posledních desetiletí bylo zjištěno, že některé organismy produkují AMP jako skupiny peptidů působících synergicky. Každým rokem přibývají v databázi AMP nově objevené peptidy. Tyto databáze obsahují údaje asi o 2 000 známých AMP. I přes velké množství známých antimikrobiálních peptidů jejich výzkum pokračuje a databáze se rychle rozrůstají [2].

2.1.2. Struktura antimikrobiálních peptidů

Důležitou vlastností antimikrobiálních peptidů je tvorba amfipatické či amfifilní konformace. Jejich názvy jsou odvozeny od jejich vlastností, organismů, ze kterých byly získány, nebo kombinací obou, a jsou zaznamenány v databázi antimikrobiálních peptidů. Molekula AMP obsahuje ve struktuře opakující se úseky s hydrofobními a hydrofilními doménami [1].

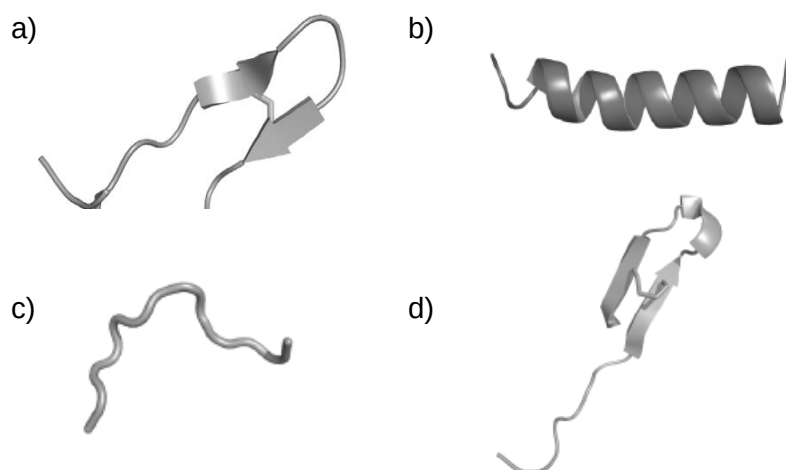
Struktura většiny kationických AMP byla objasněna pomocí cirkulárního dichroismu (měření rozdílů absorbancí cirkulárně polarizovaných paprsků světla, polarizovaného pomocí opticky aktivních látek), metoda však neobjasňuje prostorovou konformaci. Asi 50 kationických AMP včetně 14 syntetických bylo popsáno pomocí NMR [1].

Z celkového počtu 1 528 antimikrobiálních peptidů má 1 355 pozitivní náboj, 95 je bez náboje a 78 je nabito negativně. V současné době probíhá výzkum převážně kationických AMP [3].

Antimikrobiální peptidy lze klasifikovat dle jejich sekundární struktury do 4 skupin [1]:

- a) β -list
- b) α -helix
- c) smyčka
- d) rozvolněné peptidy.

Nejvíce zastoupenými strukturami jsou β -list a α -helix.



Obr. 1: Obecné struktury antimikrobiálních peptidů [1]

Ve 118 bakteriálních AMP jsou převažujícími aminokyselinami zapojenými v řetězci alanin a glycin. V rostlinných AMP jsou nejčastějšími aminokyselinami cystein a glycin, naopak metionin zde má nejnižší procento zastoupení. Leucin, glycin a lysin jsou pak časté složky řetězců v antimikrobiálních peptidech živočichů [3].

Zastoupení aminokyselin v řetězcích molekul podle struktury antimikrobiálního peptidu je následovné: V peptidech se strukturou α -helixu jsou nejčastější leucin, alanin, glycin a lysin. U β -strukturovaných AMP jsou hlavními AMK cystein, glycin a arginin.

Aminokyselina cystein tvoří v molekulách peptidů disulfidické vazby. Glycin zajišťuje řetězci flexibilitu. Arginin je nezbytný pro antibakteriální a antivirovou aktivitu [3].

2.1.3. Účinky antimikrobiálních peptidů

Většina studií účinků antimikrobiálních peptidů je zaměřena na interakce kationických AMP s modelovými membránovými systémy. Na základě výsledků výzkumu byly antimikrobiální peptidy rozděleny do dvou skupin [4]:

- peptidy rozkládající membránu
- peptidy s jinými mechanismy účinku.

Peptidy narušující membránu mají většinou strukturu α -helixu. Jsou popsány tři modely mechanismu působení [1]:

- mechanismus „sudové skruže“
- mechanismus „micelárních agregátů“
- „kobercový“ model.

U modelu sudové skruže probíhá mechanismus účinku tvorbou pórů, procházejících přes membránu buňky. Póry umožňují unikání částí cytoplazmatické membrány a narušují membránový potenciál [1].

Mechanismus micelárních agregátů probíhá tak, že peptidy vytvoří shlukovitá uspořádání, která zasahují do membrány. Kolapsem shluku pak dojde k translokaci do cytoplazmy [1].

Při kobercovém mechanismu se peptidy řadí paralelně k dvojvrstvě membrány, jsou tak v kontaktu s lipidovými skupinami a pokrývají okolní oblast. Tento jev vede k poruchám stability membrány, vytváří se trhliny a složky cytoplazmy se dostávají ven z buňky. V důsledku tohoto působení se pak narušuje membránový potenciál a nakonec dochází i k dezintegraci membrány [1].

Všechny tyto modely mají bez rozdílu za následek depolarizaci buněčné stěny a vedou k buněčné smrti. Mechanismy účinku jsou prozatím spíše hypotézami a každý z nich může být u kteréhokoliv antimikrobiálního peptidu správný [1].

V případě peptidů s jinými mechanismy účinku je pravděpodobné, že působí na cíle přímo v cytoplazmě. Průchod AMP membránou zřejmě probíhá mechanismem, který je podobný mechanismu micelární agregace. Tento mechanismus však vede jen k dočasné změně propustnosti membrány a ne ke smrti buňky. Zajímavé je, že peptidy s vysokým obsahem argininu mají schopnost procházet přes buněčnou i jadernou membránu jako přenašeče. Po průchodu AMP přes membránu se předpokládá jeho interakce s DNA, RNA nebo celulárními proteiny. Dále proběhne inhibice funkce těchto molekul. Některé peptidy působí také přímo na specifické enzymy [1, 4].

Další možnost popisu mechanismu účinku AMP je na základě jejich struktury. Ke každé strukturní skupině je přiřazen modelový zástupce, na kterém je mechanismus účinku demonstrován [1, 4].

Pro peptidy se strukturou β -listu jsou zástupcem malé peptidy tachyplesiny. Přes dobře popsanou strukturu a aktivitu těchto AMP není mechanismus jejich účinku zcela objasněn. Tachyplesiny vykazují velkou afinitu k lipopolysacharidům, ale předpokládá se, že existují i jejich intracelulární cíle. Při analýzách funkce disulfidových můstků v molekulách těchto peptidů bylo zjištěno, že jsou nezbytné pro průchod peptidu přes membránu [1, 4].

Zástupci skupiny peptidů s α -helikální strukturou jsou meganiny. Peptidy se strukturou α -helixu obsahují v centru molekuly ohyb. Tyto AMP způsobují permeabilizaci membrán což vede k výkyvům membránového potenciálu. Jejich působení se vysvětluje pomocí micelárního modelu. Bylo také dokázáno, že odstraněním některých AMK z řetězce molekuly se snižuje antimikrobiální aktivita. Při ztrátě více než 20 AMK pak antimikrobiální aktivita mizí úplně [1, 4].

V případě AMP s rozvolněnou strukturou nelze mluvit o klasické sekundární struktuře, protože jejich finální struktura je tvořena pomocí nevazebných interakcí s membránovými lipidy. Zástupci této skupiny jsou např. kolicin a některé syntetické peptidy. Mechanismus působení rozvolněných AMP není prozatím zcela objasněn. Vzhledem k malé velikosti modelové molekuly indolicinu se předpokládá, že při účinku se vytváří kanály v cytoplazmatické membráně. Následně je tedy změněn membránový potenciál a je umožněn přístup AMP do buňky. Není ovšem prokázáno, že molekuly indolicinu jsou schopny úplné depolarizace membrány [1, 4].

AMP se strukturou smyčky zastupuje peptid thanatin. U thanatinu se předpokládá, že cílem není cytoplazmatická membrána. Usmrcení buněk závisí na konkrétním mikroorganismu [1, 4].

2.1.4. Využití antimikrobiálních peptidů

Antimikrobiální peptidy mají velký potenciál, využitelný v různých odvětvích. S využitím jejich terapeutického účinku je možné je upotřebit pro různé aplikace. Jedno z možných využití je jejich účinkování spolu s antibiotiky. Velké možnosti se otevírají i při jejich použití vůči multirezistentním kmenům mikroorganismů, přispívá k tomu i skutečnost, že proti AMP nevzniká rezistence. Dalším využitím je jejich baktericidní působení. S využitím AMP již bylo vyvinuto několik preparátů pro oblast medicíny, např. Pexiganan, preparát MX594AN nebo Isegran [6, 7]

2.2. Lysozym

Jako zástupce antimikrobiálních peptidů byl v této bakalářské práci používán lysozym. Jedná se o enzym ze skupiny hydroláz (enzym katalyzující hydrolýzu), jehož výskyt byl prokázán v tělesných sekretech, jako jsou sliny, slzy, nosní hlen a mateřské mléko, dále pak v krevní plazmě a vaječném bílku, kde tvoří asi 3 % všech bílkovin [1, 8]. Významnou vlastností lysozymu jsou především jeho antimikrobiální účinky.

2.2.1. Historie výzkumu lysozymu

Prvním objevitelem antimikrobiálních účinků lysozymu byl profesor hygieny na univerzitě v Tomsu P. Laschtschenko, a to v roce 1909 při zkoumání přístupu vajec pro kultivaci mikroorganismů. Při dalším experimentu použil při důkazu inhibičního účinku bílku bakterii *Bacillus subtilis* [9].

Jak již bylo zmíněno, lysozym je obsažen v tělesných sekretech, což způsobuje jejich antibakteriální účinek. Tento účinek popsal v roce 1919 Bloomfield, který se zabýval studiem bakterií vstupujících do horních cest dýchacích [9].

Nejvýznamnější osobností v oblasti výzkumu lysozymu je Alexander Fleming. Ten prováděl v roce 1921 výzkum s bakteriálními kulturami na agaru. V průběhu výzkumu byl nachlazený a kapka sekretu z jeho nosu upadla na bakteriální kulturu. Kolem této kapky se vytvořila zóna, ze které začala bakteriální kultura mizet. Fleming po tomto zjištění vyslovil myšlenku, že nosní sekrety obsahují lytickou látku, kterou nazval lysozymem. Své domněnky potvrdil sérií pokusů s bakterií *Micrococcus lysodeikticus* a nosním hlenem. Právě Fleming objevil přítomnost lysozymu v tělesných sekretech a také ve vaječném bílku, ze kterého jej rovněž izoloval. Jeho antimikrobiální účinek prokázal i na jiných bakteriálních druzích [9, 10].

V roce 1930 bylo zjištěno, že lysozym je produkován všemi obratlovci [1].

Od svého objevu slouží lysozym jako modelový systém pro mnoho studií, zejména pak lysozym z vaječného bílku se strukturou zvanou HEWL. Tato jeho struktura byla objasněna v roce 1963 dvěma nezávislými výzkumnými skupinami. O dva roky později byla určena trojrozměrná struktura HEWL jakožto prvního enzymu [9].

Roku 1998 byl lysozym klasifikován organizací FDA jako obecně bezpečný (GRAS) [11]. Vzhledem k možnosti izolace lysozymu z vaječného bílku, což je běžně používaná potravina, je podle JEFCA u lysozymu povoleno od roku 1992 použití pro potravinářské aplikace a lze jej považovat také za potravinu [12].

Téměř stoletý výzkum udělal z lysozymu jeden z nejlépe prostudovaných enzymů.

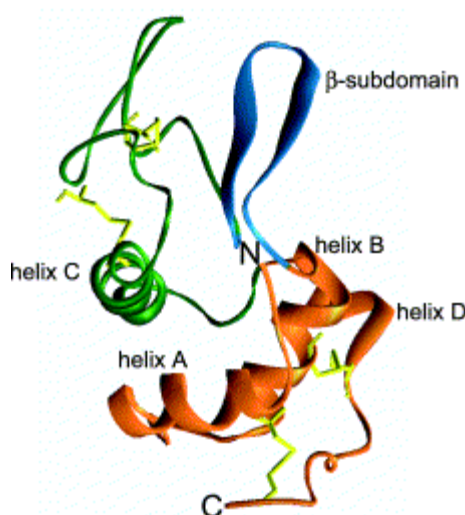
2.2.2. Struktura lysozymu

Lysozym je možné dělit na základě složení a aktivity do čtyř tříd [9]:

- lysozym ze slepičího bílku (HEWL)
- lysozym z husího bílku (GEWL)
- lysozym bakteriofága T4
- Ch-lysozym.

Vzhledem k tomu, že v této práci je využíván lysozym izolovaný ze slepičího bílku (HEWL), bude níže popsána i struktura tohoto lysozymu.

Lysozym, jinými názvy muramidáza, mukopeptid-glykohydroláza nebo mukopeptid *N*-acetyl-muramoylhydroláza, je enzym složený ze 129 zbytků aminokyselin seřazených v jediném řetězci. Jeho molekulová hmotnost je 14,4 kDa. Uvnitř své molekuly obsahuje lysozym 4 disulfidické můstky, díky kterým je molekula fixovaná. Primární struktura lysozymu typu HEWL byla popsána v roce 1963, trojrozměrná pak roku 1965 [8, 9, 13, 14]. Molekula lysozymu je složena ze dvou domén a má zhruba kulovitý tvar. Napříč celou molekulou je umístěno nepolární aktivní centrum ve tvaru štěrbiny. Do aktivního centra lze zakomponovat šest zbytků aminocukrů. Lysozym ve své struktuře obsahuje pět α -helikálních úseků a jeden úsek s uspořádáním β -skládaného listu [9, 14].



Obr. 2: Struktura lysozymu (HEWL) [15]

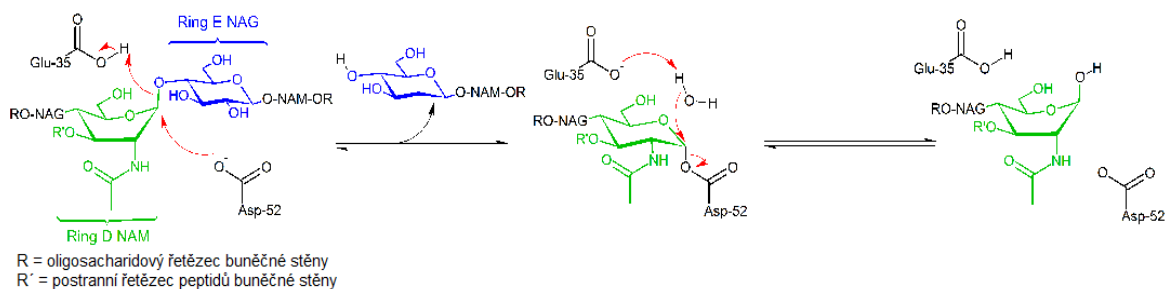
2.2.3. Mechanismus antimikrobiálního účinku lysozymu

Hlavním mechanismem účinku lysozymu je štěpení β -1, 4-glykosidické vazby mezi *N*-acetylmuramovou kyselinou a *N*-acetylglukosaminem, které jsou obsaženy v buněčných stěnách především grampozitivních bakterií. Toto štěpení může způsobit jednak celkové zadržení konfigurace anomeru (HEWL) anebo obrácení této konfigurace. Je zřejmé, že lysozym obsažený v různých organismech se liší také svým reakčním mechanismem [9, 14, 16].

Z chemického hlediska se při působení lysozymu mění acetal na poloacetal. Reakce je katalyzována kyselým prostředím s H^+ ionty. Při působení lysozymu probíhá nejdříve jeho připojení na bakteriální buněčnou stěnu pomocí vazby na jeho hexasacharidovou jednotku. Dále probíhá protonace atomu kyslíku, proton poskytuje skupina *Glu-35*, štěpí se vazba C-O a při ději vzniká alkohol a stabilizovaný karbokation. Stabilizaci karbokationtu zajišťuje skupina *Asp-52* pomocí elektrostatické interakce. Po tomto sledu reakcí se voda aduje na vzniklý karbokationt a vzniká již zmíněný poloacetal, regeneruje se také kyselé prostředí, ve kterém reakce probíhá [1, 14, 16].

Zmíněných šest aminocukrů obsažených v aktivním centru lysozymu a vázaných pomocí vodíkových můstků obsahuje šest vazebných míst (A, B, C, D, E, F). Každé vazebné místo je určeno pro jinou funkci. U zbytku D dochází ze sterických důvodů ke zhroucení židlíkové konformace na položidlíkovou, po tomto ději je zde možné připojení substrátu. V místě F dochází k navázání glykosidické jednotky ze substrátu. Štěpné vazby jsou pak umístěny mezi úseky D a E [14].

Lysozym zajišťuje díky svému účinku štěpení peptidoglykanu na disacharidové jednotky. Díky tomu zajišťuje odolnost živočišných tkání proti bakteriálním infekcím. Buňky, které podlehly účinku lysozymu, jsou tedy zbaveny své buněčné stěny, praskají, jsou lyzovány a poté snadno fagocytovány [17, 18].



Obr. 3: Mechanismus účinku lysozymu [19]

2.2.4. Využití lysozymu v praxi

Vzhledem k tomu, že lysozym je enzym, může najít uplatnění v mnoha oblastech. Nejvíce diskutovaný je poslední dobou návrat k přirozeným potravinářským výrobkům, je tedy důležité nalezení antimikrobiálních ochranných prostředků, které by byly také přirozené. V této oblasti může být lysozym v kombinaci např. s nisinem nebo monoacylglyceroly velmi důležitou látkou [20].

Aktivita lysozymu je ovšem omezena pouze na grampozitivní bakterie, účinek proti gramnegativním bakteriím je velmi malý. Pokud je lysozym ve směsi s EDTA, jeho účinek se výrazně zvyšuje a může tak působit proti mikroorganismům, které by byly proti němu jinak

odolné. Přídavkem EDTA je lysozym schopen inhibovat také bakterie *Escherichia coli* a *Listeria monocytogenes* [20].

Enkapsulace lysozymu přináší jisté výhody. Při enkapsulaci lze použít větší koncentrace lysozymu a enkapsulovaný lysozym je možné poté využít pro dekontaminaci povrchů různých struktur, kontaminovaných grampozitivními a gramnegativními bakteriemi. Rozpad buněk je v tomto případě pomalejší, ale má větší účinek [21].

Dalším možným využitím lysozymu je jeho umístění na povrch SiO_2 při výrobě bílkovinných biočipů. Dále lze lysozym v kombinaci s polymyxinem B, polyhistidinem, polyhistaminem, polylysinem a histidinem využít jako prostředek pro zachycení bakteriálních endotoxinů [22].

2.3. Techniky enkapsulace

Enkapsulace byla vyvinuta v 60. letech. Jedná se o proces, při kterém je jeden materiál či směs materiálů uzavřena uvnitř materiálu či systému jiného. Vnitřní složkou kapsle může být jak kapalina, tak plyn nebo pevná látka. Vnitřní složka je označována jako jádro, aktivní látka či vnitřní fáze. Obal částice se pojmenovává jako nosič, membrána, „skořápka“ či povlak [23]. Enkapsulace je využívána v mnoha oblastech a má různé techniky. Při využití některých technik může být produkt navržen tak, aby se aktivní složka uvolňovala postupně nebo v přesně určený okamžik. Velikost částic se pohybuje v řádu nano až milimetrů. Nejvíce používanými obalovými materiály jsou polysacharidy, jako aktivní látky jsou velmi často používané lipidy a peptidy [24, 25].

2.3.1. Sprejové sušení

V případě této techniky se jedná o jednu z nejstarších a nejrozšířenějších metod. Tato technika je velmi úsporná a má široké využití. Při procesu sprejového sušení dochází k dehydrataci, a proto se využívá k přípravě sušených materiálů. Pomocí sprejového sušení se dají vytvořit částice v dobré kvalitě s rozměry menšími než 40 μm . Při sprejovém sušení se smísí hydratovaný materiál povlaku (např. maltodextrin, škrob, guma) a aktivní látky většinou v poměru 4:1. Směs je přiváděna do rozprašovací sušárny, kde je např. pomocí trysky atomizována. Přiváděný horký vzduch vysušuje vodu a vznikají vysušené částice [23, 25].

2.3.2. Sprejové chlazení

Sprejové chlazení je velmi podobné sprejovému sušení. Také zde dochází ke smísení povlaku a aktivní látky. Nedochozí však k odpaření vody. Směs je rozprašována do prostoru se studeným vzduchem, který způsobí ztuhnutí obalu kolem jádra. Nejčastějšími materiály pro obal jsou rostlinné oleje, do kterých se zakomponuje vůně. Při procesu sprejového chlazení je možné zvolit bod tání částic, tudíž je tato technika vhodná pro tvorbu částic s řízeným uvolňováním [23].

2.3.3. Extruze

Extruze je proces, při kterém probíhá disperze materiálu jádra do roztaveného obalu. Vytvořená směs je pak vytlačována do dehydratační kapaliny, kde se vytvoří vlákna. Vlákna jsou následně rozdělena na malé kousky a ty jsou vysušeny. Nejběžnější dehydratační kapalinou je isopropylalkohol [23].

Dalším možným vysvětlením extruze je vytlačování kapiček jádra a jejich pád do roztoku, který zajistí srážení částic. Vytlačován je obvykle roztok polymeru a aktivní látky (např. alginát). V případě alginátu je srážecím roztokem CaCl_2 . Tato metoda poskytuje částice s většími rozměry, avšak při elektrostatické extruzi je možné dosáhnout velikosti až 50 μm [25].

2.3.4. Emulgace

Jedná se o další velmi využívanou techniku. Emulgace je využívána k enkapsulaci ve vodě rozpustných aktivních látek. Je možné připravit emulze tří typů: olej/voda, voda/olej nebo voda/olej/voda. Před enkapsulací je možné aktivní látku vysušit, a to různými způsoby (rozprašování, lyofilizace). To pak vede ke zvětšení stability částic [25, 26].

2.3.5. Fluidní vrstva

Při tvorbě fluidní vrstvy jsou částičky v podobě prášku umístěny v proudu vzduchu. Ten má určitou teplotu a částičky jsou postříkány potahovým materiálem, který je atomizovaný. Velikost částic závisí také na výběru látky, která bude sloužit jako obal [27].

2.3.6. Tvorba hydrogelů

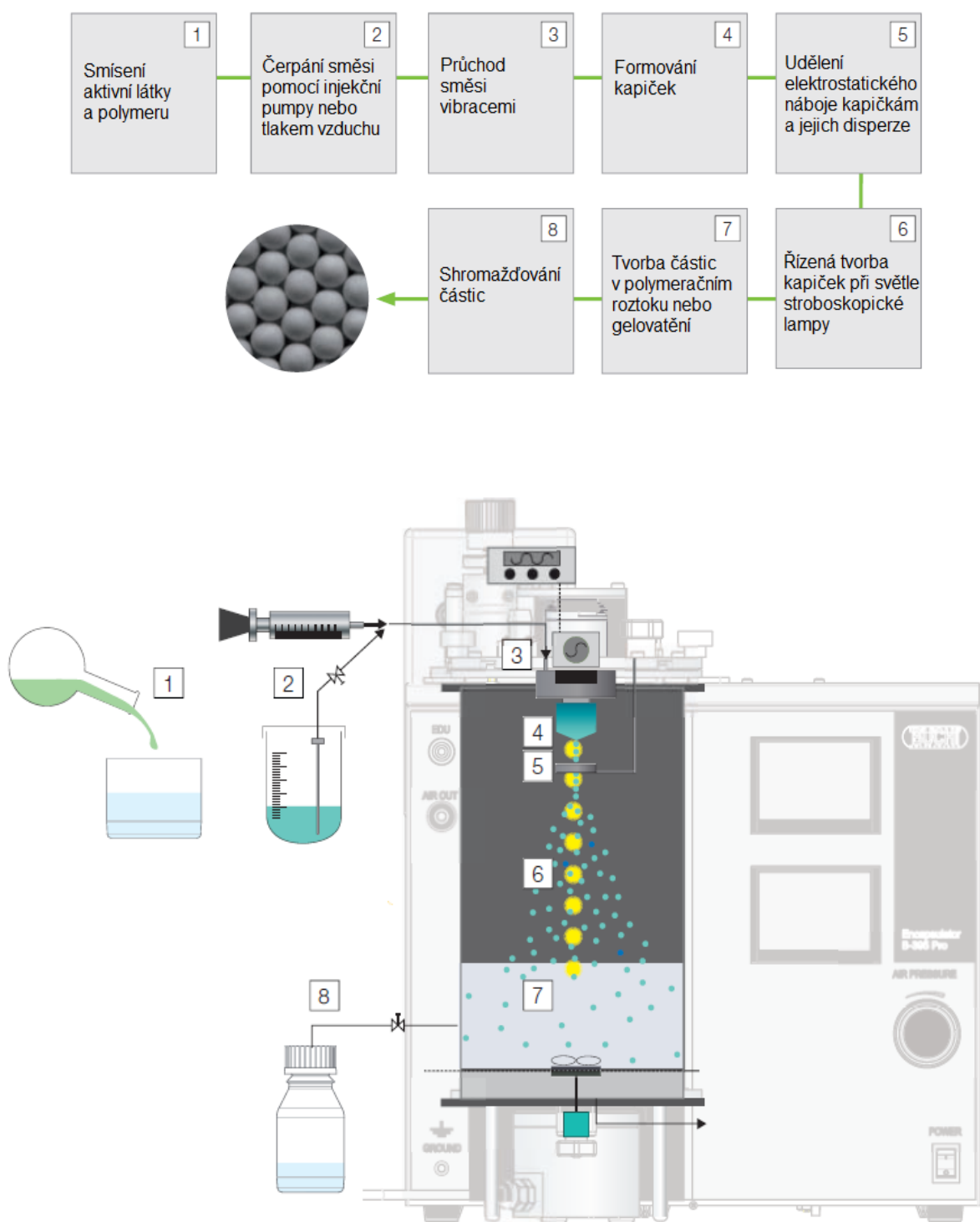
Při tvorbě hydrogelů je tvořena síť vláken polymerů, ve které se nachází prostor pro umístění aktivních látek. Pro přípravu se využívají kationtové a aniontové polymery, jako je chitosan a karagenan [24].

2.3.7. Tvorba lipozomů

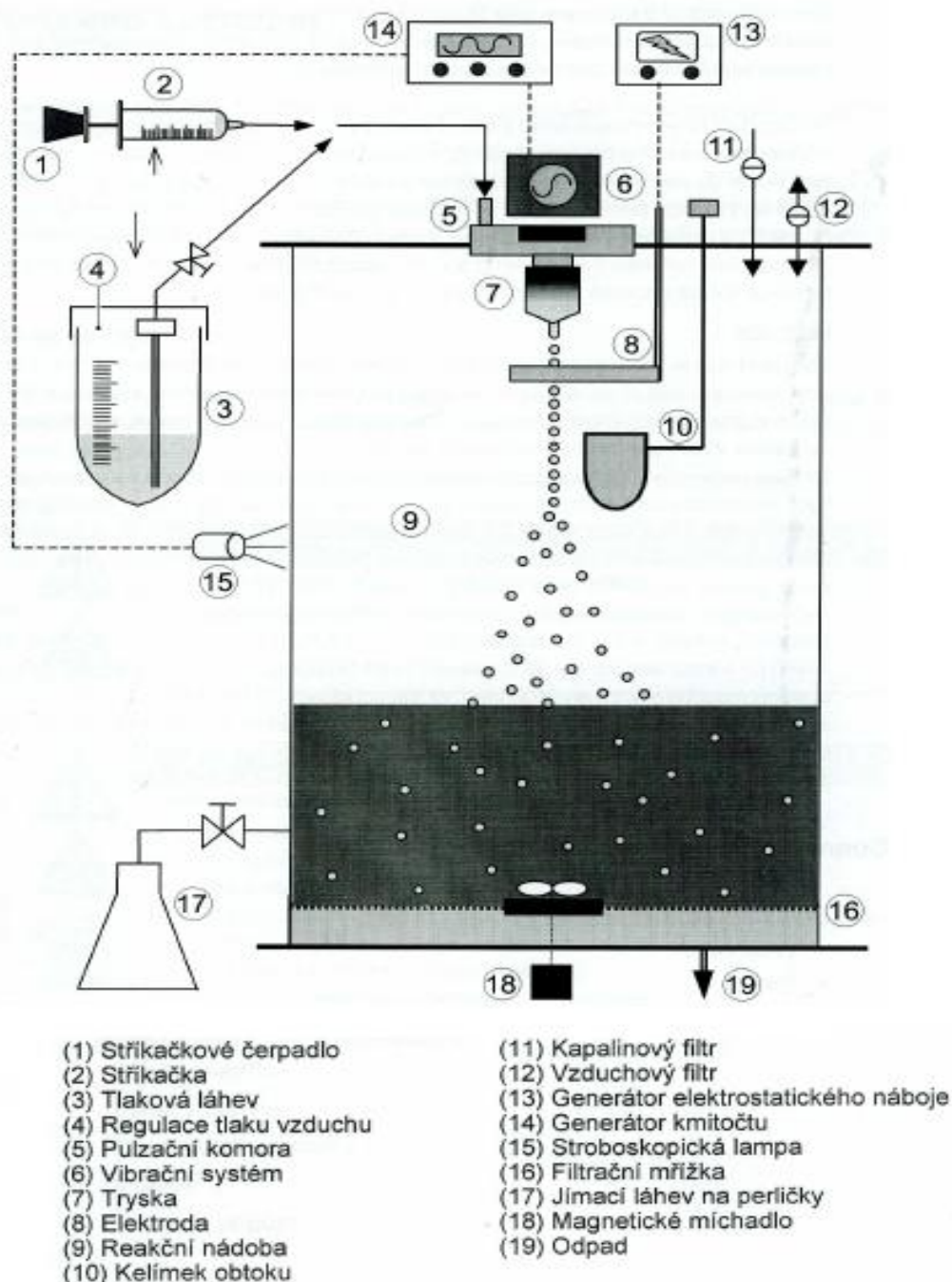
Tvorba lipozomů probíhá při interakci mezi fosfolipidy a vodou. Hydrofilní látky se umísťují ve formě roztoku dovnitř lipozomů, hydrofobní látky lze zakomponovat do membrány [28]. Při tvorbě lipozomů je vytvořena směs aktivní látky a fosfolipidu např. ve vodě. Směs je následně sonifikována a vznikají lipozomy. Ty mají velikost od 30 nm do několika mikrometrů [25].

2.3.8. Enkapsulace pomocí enkapsulátoru

Novou metodou tvorby částic se zabudovanými aktivními látkami je enkapsulace pomocí enkapsulátoru. Ten umožňuje tvořit jak lipozomy, tak i nanočástice z různých jiných materiálů. Rovněž lze pomocí něj připravovat částice o různé velikosti, která je zrovna požadována. Princip tvorby částic je založen na laminárním proudění kapaliny, která tvoří tenký paprsek, ten se pak rozpadá do stejně velkých kapiček díky superponovaným vibracím. Tyto kapičky pak padají do elektrolytu, kde vznikají částice. Na enkapsulátoru je možné tvořit jak částice složené z jádra obsahujícího aktivní látku a z obalu, tak částice, kdy aktivní látka je zabudovaná v membráně částic [29].



Obr. 4: Schéma tvorby částic pomocí enkapsulátoru [29]



Obr. 5: Schéma enkapsulátoru [30]

2.4. Organické nanočástice

2.4.1. Lipozomy

Lipozomy jsou malé sférické vezikuly. Jsou tvořené lipidovou dvojvrstvou a uvnitř je uzavřena vodná fáze. Pokud chceme enkapsulovat do lipozomů hydrofilní látky, pak jsou tyto látky uzavírány dovnitř, do vodné fáze. Je-li aktivní látka hydrofobní, je zakomponována do lipidové dvojvrstvy. Lipozomy lze rozdělit dle jejich struktury do několika skupin:

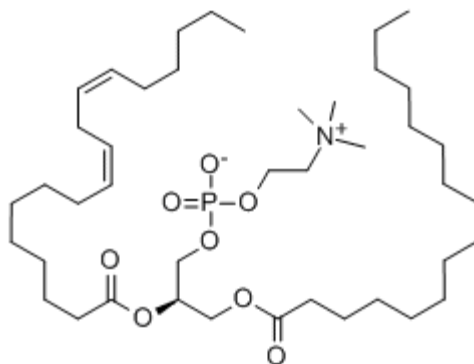
- malé unilamelární vezikuly (20 – 50 nm)
- velké unilamelární vezikuly (<100 nm)
- multilamelární vezikuly (100 – 20 000 nm).

Dle náboje mohou být lipozomy rozděleny na:

- neutrální
- kationické
- anionické.

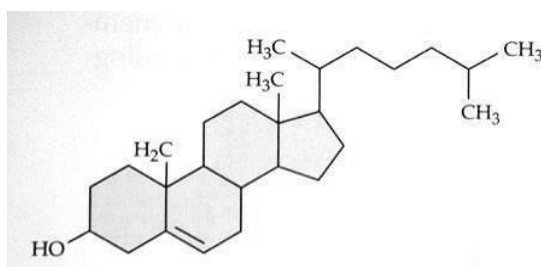
Vlastnosti lipozomů jsou ovlivněny mnoha faktory. Mezi tyto faktory patří fosfolipidová kompozice, počet dvojvrstev a jejich vzájemné interakce, náboj [30].

Hlavní složkou fosfolipidů připravovaných v rámci této práce byl sójový lecithin. Lecithin extrahovaný ze sójového oleje se skládá ze tří složek - fosfatidylcholinu, fosfatidylethanolaminu a fosfatidylinositolu. Obecné použití lecithinu je jako přírodní emulgátor, stabilizátor nebo pro aplikace v potravinářství [31].



Obr. 6: Vzorec lecithinu [32]

Další složkou lipozomů je cholesterol. Jedná se o základní složku živočišných buněčných membrán a lipoproteinů. Cholesterol patří do skupiny sterolů a poprvé byl objeven roku 1859. Molekula cholesterolu obsahuje ve své struktuře hydroxylovou skupinu a dvojné vazby. Cholesterol je často využívanou látkou pro studium organických reakcí [32]. Cholesterol nalezneme především ve vaječném žloutku, svalovině, mléku, sádle či mozku. Nejvíce cholesterolu pak z rostlinných potravin obsahuje palmový olej [34, 35].



Obr. 7: Vzorec cholesterolu [36]

2.4.2. Polysacharidové částice

Polysacharidy jsou velmi rozšířené přírodní látky. Základními dvěma skupinami polysacharidů jsou heteropolysacharidy a homopolysacharidy. Podle funkce se dělí do tří skupin [35]:

- strukturní polysacharidy
- polysacharidy se schopností vázat vodu
- rezervní polysacharidy.

Polysacharidy nebo také glykany, jsou látky složené z více než 10 monosacharidových jednotek, které jsou spojeny glykosidovými vazbami. Na konci své molekuly mají polysacharidy většinou redukující monosacharidový zbytek. Jedná se o polydisperzní látky vyskytující se v přírodě jak volně, tak i vázané ve sloučeninách. Polysacharidy jsou stabilní a netoxické, proto jsou velmi využívány. Mnoho polysacharidů nacházejících se v rostlinách se využívá např. v potravinářství jako aditiva [34, 37]

Při enkapsulaci pro potravinové aplikace jsou právě polysacharidy nejvyužívanějšími látkami pro obaly částic. Jsou využívány např. škrob a jeho deriváty nebo polysacharidy obsažené v rostlinách. Dalším velmi využívaným zástupcem je alginát [25].

Při zabudování aktivních látek do částic dochází k jejich přichycení ke struktuře polysacharidu. Pokud je k polysacharidu s aktivní látkou přidán elektrolyt, dochází k vytvoření gelové struktury [24].

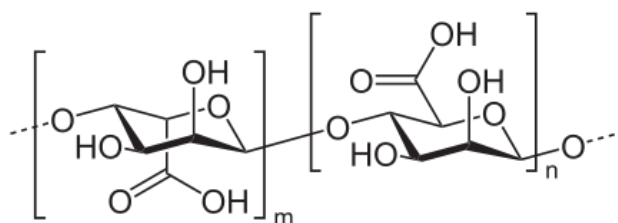
2.4.2.1. Alginátové částice

V případě alginátu se jedná o biopolymer s lineárním nerozvětveným řetězcem tvořeným sacharidovými jednotkami. Je možné nalézt jej ve velkém množství řas. Obvykle je získáván jako sodná sůl extrakcí. Alginát je ve vodě rozpustný polymer s širokým rozsahem aplikací. Po přidavku vápenatých iontů k alginátu sodnému se snadno tvoří gely. Při vazbě iontů dochází jak k vazbám pomocí elektrostatických sil, tak k chelaci. Strukturu a vlastnosti vytvořeného alginátového gelu určují především faktory jako molekulová hmotnost alginátu a sekvence polymerních bloků v molekule. Gely vytvořené z alginátu jsou termostabilní a přes své membrány jsou schopné propouštět malé molekuly a kapaliny. Tato jejich vlastnost je důležitá právě pro tvorbu částic s řízeným uvolňováním látek, imobilizaci proteinů a enzymů. Algináty je možné použít v různých koncentracích. Uplatnění je možné v potravinářství i v jiných oborech [34, 38].

Při přípravě alginátových částic se využívá tří technik:

- extruze
- emulgace
- sprejové sušení.

Při extruzi je hydrokoloidní roztok vytlačován do lázně obsahující srážecí roztok. Při emulgaci se polymer přidává do rostlinného oleje, kde probíhá tvorba částic. Postup sprejového sušení je popsán výše. Nejvyužívanější technikou je extruze [39].

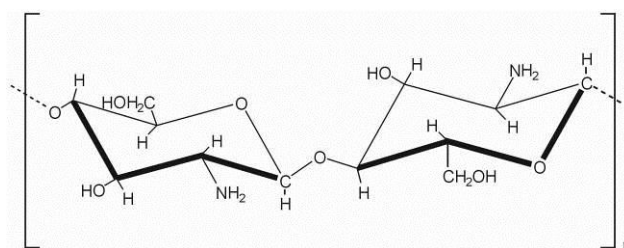


Obr. 8: Struktura alginátu sodného [40]

2.4.2.2. Chitosanové částice

Chitosan je sloučenina složená z *N*-acetylglukosaminových a glukosaminových jednotek. Jedná se o nestrávitelnou látku, snižující hladinu cholesterolu a tuků v krevním séru a játrech. Je to látka biologicky rozložitelná, netoxická a biokompatibilní. Využití chitosanu je také velmi široké, a to hlavně v potravinářství. Je využíván jako emulgátor a stabilizátor a jako přídavek některých potravin. Chitosan je rozpustný ve vodě, kyselinách, zásadách a organických rozpouštědlech. V případě molekul chitosanu se jedná o polykationty. Jejich koagulace probíhá po přidání látky s negativním nábojem. Chitosan je získáván alkalickou deacetylací chitinu [24, 34, 41].

Jedním z polyaniontů, který může interagovat s chitosanem při tvorbě gelu, je tripolyfosfát. Zesíťování je zajištěno pomocí elektrostatických sil. Po přidání TPP k chitosanu zajistí jeho rychlé zgelovatění. Vlastnosti chitosanových gelů závisí na podmínkách přípravy, především na pH [41]. Při tvorbě chitosanových částic je využívána interakce záporně nabitého tripolyfosfátu s kladným chitosanem. Po interakci chitosanu s TPP se mohou tvořit mezimolekulární nebo intramolekulární částice. Nevýhodou částic při jejich použití např. v gastrointestinálním traktu je fakt, že nejsou odolné vůči kyselinám [42].



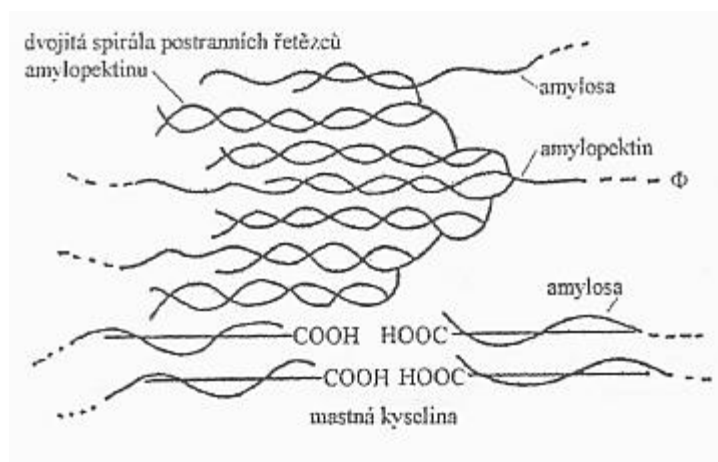
Obr. 9: Struktura chitosanu [43]

2.4.2.3. Škrobové částice

Škrob se v přírodě vyskytuje uložený v micelách, které se nazývají škrobová zrna nebo škrobové granule. Ty jsou obvykle uloženy v pletivech rostlin, chloroplastech, amyloplastech nebo v buňkách kořenů, hlíz a semen. Jedná se o hlavní zásobní živinu rostlin. Existuje několik typů škrobu, většinou se jedná o směsi amylozy a amylopektinu v poměru 1:3. Škrobová zrna se liší strukturně v závislosti na zdroji. Pro různé typy škrobu byl vytvořen jeden obecný strukturní model. Tento model popisuje škrob pomocí radiálně uspořádaných molekul amylopektinu s neredukujícími konci směřujícími ven. Ve struktuře škrobu se střídají oblasti krystalové a amorfní. Na molekuly amylopektinu jsou navázány molekuly amylozy, které tvoří v některých částech levotočivé šroubovice s neredukujícími konci směřujícími na povrch granulí. Škrobové částice tvoří tzv. inklusní sloučeniny s lipidy. Hlavními zdroji škrobu jsou brambory a obiloviny, dále také semena luštěnin [34].

Vysvětlení struktury škrobu na zmíněném modelu umožňuje výrobu škrobových částic. Spolu s tvorbou těchto částic se otevírají možnosti pro jejich široké využití. Škrobové částice by bylo možné využít pro zlepšení vlastností biokompozitů, při průmyslovém balení atd. Příprava škrobových částic spočívá ve srážení amorfního škrobu. Tyto částice pak mají různé vlastnosti a tvary. Jako srážecí činidlo je obvykle používán ethanol.

Do něj se pak přidává škrob smísený s vodou. Dále je možné částice vysušit odpařením ethanolu. Samozřejmě existují i jiné postupy přípravy škrobových částic, které ovšem v této práci vzhledem ke své složitosti nejsou využívány [44].



Obr. 10: Struktura škrobového zrna [34]

2.5. Testování antimikrobiální aktivity

Antimikrobiální testy jsou důležitou součástí především v oboru mikrobiologie, jsou využívány ale i v mnoha jiných oborech. Pro určitou antimikrobiální látku je vždy využívána kultura s potřebnými vlastnostmi. Existuje mnoho variant testování antimikrobiální aktivity. Výběr vhodné metody je založen na mnoha faktorech, např. časová náročnost, automatizace nebo reprodukovatelnost a přesnost. Dále budou zmíněny dva způsoby tohoto testování [45].

2.5.1. Testování na pevných médiích

Testování na pevných médiích je velmi jednoduchou a značně využívanou metodou. Při tomto testování se využívá kultura, narostlá na agarové půdě. Metoda spočívá v nanesení antimikrobní látky do jamky, vytvořené v agaru. Po nanesení látky do jamky se sleduje její inhibiční účinek. Ten se projeví tak, že v daném místě je potlačen růst kultury a vytvoří se prázdné místo. Variantou této metody je disková difuzní metoda, při které je antimikrobiální látka nanesena na papírový terč o průměru 5 mm, který je poté položen na agarovou půdu s kulturou [45].

2.5.2. Testování v tekutých médiích

Další variantou testování antimikrobiální aktivity je test pomocí měření zákalu spektrofotometricky. K tomuto testu je využívána 24hodinová kultura. Test spočívá v přidání antimikrobiální látky k roztoku kultury. Poté je na spektrofotometru sledováno zvyšování absorbance v určitých časových intervalech. Přidání antimikrobiální látky má za následek zánik buňky a vylití jejího obsahu, což způsobí snížení hodnoty absorbance. Tento test nebyl v této práci využíván vzhledem k potřebě vyššího množství antimikrobiální látky a obtížněji reprodukovatelným výsledkům.

2.5.3. *Bacillus subtilis*

Testovacím organismem pro antimikrobiální testy je velmi často nepatogenní grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis*. Jedná se o tyčinkovitou bakterii z rodu *Bacillus*. Tyto bakterie vytváří bělavé až hnědavé kolonie buněk a v nepříznivých podmínkách jsou schopny tvořit spóry. Jedná se o aerobní nebo fakultativně aerobní organismy. Tato bakterie je pro člověka netoxická a nepatogenní. Bakterie *Bacillus subtilis* se vyskytuje v půdě, vodě, ovzduší na rostlinách i v lidských střevech [46].

3. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo testování možností enkapsulace antimikrobiálních látek za účelem zvýšení stability a prodloužení účinku v reálných podmínkách.

V rámci práce byly řešeny tyto dílčí úkoly:

1. Zpracování rešerše zaměřené na antimikrobiální peptidy, jejich strukturu, aktivitu a možnosti využití a dále na techniky enkapsulace.
2. Optimalizace metod pro stanovení množství lysozymu, testování antimikrobiální aktivity, enkapsulace do organických částic a charakterizace částic pomocí dynamického rozptylu světla.
3. Experimentální část zaměřená na enkapsulaci lysozymu do organických částic, charakterizaci částic a změny antimikrobiální aktivity lysozymu v modelových fyziologických podmínkách a v modelových potravinách.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použité mikroorganismy

Jediným mikroorganismem, používaným v této práci, byla bakteriální kultura *Bacillus subtilis* CCM 2793. Tato kultura pochází z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

4.2. Použité chemikálie

4.2.1. Standardní a speciální chemikálie

- Lysozym, Serva (GER)
- Alginát sodný, Sigma-Aldrich (GER)
- Dihydrát chloridu vápenatého, Lachema (ČR)
- Chitosan (medium molecular weight), Sigma-Aldrich (GER)
- Tripolyfosfát sodný, Sigma-Aldrich (GER)
- Lecithin sójový, Mogador (ČR)
- Cholesterol, Serva (GER)
- Pepton, Himedia (Indie)
- Hovězí extrakt, Himedia (Indie)
- Agar, Himedia (Indie)
- Pankreatin z vepřové slinivky, Sigma-Aldrich (GER)
- Pepsin z prasečí žaludeční sliznice, Sigma-Aldrich (GER)
- Bile salts - žlučové soli, směs Sigma-Aldrich (GER)

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

4.3. Přístroje a pomůcky

- Centrifuga Eppendorf Centrifuge 5430 R (USA)
- Mikrocentrifuga Hettich Zentrifugen Mikro 200 (GER)
- Vodní lázeň TW2, Julabo (GER)
- Vodní lázeň W620E, LaboPlay (POL)
- Spektrofotometr Thermo Spectronic Helios δ (UK)
- Spektrofotometr Unicam Helios α (UK)
- Světelný mikroskop Intraco Micro LM 666 PV/∞ LED (ČR)
- Software Dino-Capture 2.0 (ČR)
- Laminární box Aura mini, Bio Air Instruments (USA)
- Termostat Raven 2 Incubator (USA)
- Termostat Memmert GmbH Co. KG (GER)
- Temperovaná třepačka Heidolph Unimax 1010, Labicom (ČR)
- Vortex REax Top, Heidolph (GER)
- Analytické váhy BOECO (GER)
- Předvážky Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH (GER)
- Předvážky Scout Pro, OHAUS (USA)
- Ultrazvukový homogenizátor - Bandelin Sonoplus - Sonorex Technik (GER)
- Enkapsulátor B-395 Pro, Büchi (CH)
- ZetaSizer Nano ZS - Malvern (UK)

4.4. Spektrofotometrické stanovení proteinů

V experimentální práci byl enkapsulován do organických částic enzym lysozym. Protože se jedná o peptid, byl stanovován pomocí spektrofotometrického stanovení proteinů. Jako metoda stanovení proteinů byla vybrána metoda Hartree-Lowryho. Při použití této metody bylo postupováno podle předepsaného návodu [47]. Podle této metody byla získána i kalibrační křivka lysozymu, která byla později použita při vyhodnocování dat.

4.4.1. Metoda Hartree-Lowryho

Tato metoda zahrnuje reakci dvou činidel se vzorkem. Prvním činidlem je biuretové činidlo, reakce s ním je založena na chelaci měďnatého iontu imidovými strukturami polypeptidového řetězce. Druhým činidlem je Folin-Ciocalteuovo činidlo, při reakci vzorku s tímto činidlem probíhá redukce kyseliny fosfomolybdenové a fosfowolframové tyrosinovými zbytky proteinů, po reakci se roztok barví modře.

Do zkumavky byl napipetován 1 ml vzorku, k němu bylo přidáno 0,9 ml činidla A. Roztok byl inkubován 10 min při 50 °C ve vodní lázni. Poté byl roztok ochlazen na laboratorní teplotu a bylo přidáno 0,1 ml činidla B. Po přidání činidla B byl roztok ponechán 10 min při laboratorní teplotě. V dalším kroku byly rychle přidány 3 ml činidla C a proběhla poslední inkubace 10 min při 50 °C. Následně byla po ochlazení měřena absorbance roztoku na spektrofotometru při 650 nm. Absorbance vzorku byla měřena proti slepému vzorku, který neobsahoval protein.

Příprava 1 000 ml činidla A [47]:

- 2 g vínan sodno-draselný · 4 H₂O
- 100 g Na₂CO₃
- 500 ml 1 mol/l NaOH

Po rozpuštění pevných látek v NaOH byl roztok doplněn destilovanou vodou na 1 000 ml.

Příprava 100 ml činidla B [47]:

- 2 g vínan sodno-draselný · 4 H₂O
- 1 g CuSO₄ · 5 H₂O
- 10 ml 1 mol/l NaOH
- 90 ml destilované voda

Příprava činidla C [47]:

1 objem Folin-Ciocalteuova činidla byl zředěn 15 objemy destilované vody. Celkový objem činidla se připravuje v násobcích 16 ml dle potřeby.

4.5. Příprava částic s enkapsulovaným lysozymem

Bylo připraveno 6 druhů organických částic, jejichž charakterizace byla náplní práce. Ke každému typu částic byly pro porovnání a vyhodnocení připraveny prázdné částice, které neobsahovaly enkapsulovaný lysozym. Postup další práce s prázdnými částicemi byl shodný jako u částic s enkapsulovaným lysozymem. V případě částic připravovaných na enkapsulátoru byly použity vždy dvě různé koncentrace alginátu/chitosanu a u každé koncentrace byly použity vždy 2 trysky s různou velikostí kapiček.

4.5.1. Příprava lipozomů

Bylo připraveno 40 ml roztoku lysozymu o koncentraci 1 mg/ml. K roztoku bylo přidáno 100 mg cholesterolu a 900 mg lecithinu. Tato směs byla ultrazvukována po dobu 1 minuty. Stejně byly připraveny i prázdné částice s použitím vody místo roztoku lysozymu.

S roztokem připravených lipozomů bylo dále pracováno a proběhla jejich charakterizace v různých podmínkách.

4.5.2. Manuální příprava alginátových částic

Bylo připraveno 40 ml roztoku lysozymu o koncentraci 1 mg/ml. V tomto roztoku bylo rozpuštěno takové množství alginátu, aby jeho konečná koncentrace byla 0,3 %. Za stálého míchání bylo pak k roztoku přikapáváno 12 ml 0,5% CaCl_2 . Stejně byly připraveny i prázdné částice s použitím vody místo roztoku lysozymu.

Připravené částice byly ponechány v roztoku a dále proběhla jejich charakterizace v různých prostředích.

4.5.3. Příprava alginátových částic na enkapsulátoru

Pro přípravu částic z alginátu byl připraven nejdříve roztok alginátu o dvojnásobné procentuální koncentraci, než byla požadovaná konečná koncentrace. Pro konečný objem roztoku (100 %) k přípravě částic bylo smíšeno 50 % objemu dvojnásobně koncentrovaného roztoku alginátu a 50 % roztoku lysozymu připraveného tak, aby konečná koncentrace lysozymu ve směsi byla 1 mg/ml. Po zapnutí regulační jednotky enkapsulátoru a zapojení všech jeho součástí včetně připojení trysky byla směs k tvorbě částic nalita do tlakové lahve. Na láhev bylo nasazeno víko s hadičkou pro přívod vzduchu a s hadičkou pro přívod směsi k trysce. Průměry použitých trysek byly 300 μm a 450 μm u každé koncentrace alginátu. Do Petriho misky, do které vytvořené kapičky padaly, byl nalit dostatečný objem 2% CaCl_2 (cca 80 ml na 60 ml směsi). Miska s CaCl_2 byla umístěna na magnetickou míchačku a bylo do ní vloženo míchadlo. Hadička pro přívod směsi byla připojena k trysce a byla na ni umístěna svorka. Dále proběhla samotná tvorba částic. Na ovládacím panelu enkapsulátoru bylo na základě vizualizace kapek v reálném čase zapnuto míchání s dostatečnou intenzitou, byla zapnuta a nastavena vhodná frekvence vibrací, elektrostatická disperze a zvolena vhodná intenzita světla. Použité hodnoty frekvence vibrací a elektrostatické disperze jsou uvedeny v *Příloze 2*. Poté byl otevřen přívod vzduchu na hlavním uzávěru. Regulace vzduchu probíhala na redukčním ventilu regulační jednotky enkapsulátoru. Tok vzduchu byl nastaven tak, aby směs začala stoupat hadičkou k trysce a po povolení svorky byl proud směsi přes trysku optimální k tvorbě kapiček.

Částice byly tvořeny z alginátu o konečné koncentraci 1 % hm. a 2 % hm. Jako u všech ostatních částic byly připravovány i částice, které neobsahovaly lysozym. Postup tvorby prázdných částic byl stejný, pouze byl použit roztok alginátu s již konečnou koncentrací, který byl nalit do tlakové lahve, a z něj byly vytvořeny částice.

Vytvořené alginátové částice byly po dokončení enkapsulace zfiltrovány. Pro další práci byl používán jak filtrát, tak zfiltrované alginátové částice.

4.5.4. Manuální příprava chitosanových částic

Bylo připraveno 40 ml roztoku lysozymu o koncentraci 1 mg/ml. K tomuto roztoku bylo přidáno 250 mg chitosanu o střední molekulové hmotnosti a 0,5 ml koncentrované kyseliny octové. Po rozpuštění chitosanu byl tento roztok ultrazvukován a po malých dávkách byly přidávány 4 ml 2% tripolyfosfátu sodného. Stejně bylo postupováno i u prázdných částic za použití vody místo roztoku lysozymu.

Tak jako u manuálně připravených alginátových částic byly i tyto ponechány v roztoku a dále probíhala jejich charakterizace za různých podmínek.

4.5.5. Příprava chitosanových částic na enkapsulátoru

Při přípravě chitosanových částic byl nejdříve připraven roztok chitosanu o požadované koncentraci. Např. na 100 ml 1% roztoku chitosanu bylo do nádoby dáno 100 ml destilované vody, dále byl přidán 1 g chitosanu o střední molekulové hmotnosti (Sigma) a bylo přidáno tolik kyseliny octové, aby roztok měl přibližně pH 5. V tomto roztoku byla rozpuštěna navážka lysozymu, aby jeho konečná koncentrace byla 1 mg/ml. Takto připravená směs byla po zapnutí regulační jednotky enkapsulátoru a zapojení všech jeho částí včetně připojení trysky nalita do tlakové lahve. Na lahev bylo nasazeno víko s přívodem vzduchu a s hadičkou pro přívod směsi k trysce. Průměry použitých trysek byly 450 μm a 750 μm u každé koncentrace chitosanu. Do Petriho misky, do které vytvořené kapičky padaly, byl nalit dostatečný objem 2% tripolyfosfátu (cca 100 ml na 80 ml směsi). Miska s TPP byla umístěna na magnetickou míchačku a bylo do ní vloženo míchadlo. Hadička pro přívod směsi byla připojena k trysce a byla na ni umístěna svorka. Dále proběhla samotná tvorba částic. Na ovládacím panelu enkapsulátoru bylo na základě vizualizace kapek v reálném čase zapnuto míchání s dostatečnou intenzitou, byla zapnuta a nastavena vhodná frekvence vibrací, elektrostatická disperze a zvolena vhodná intenzita světla. Použité hodnoty frekvence vibrací a elektrostatické disperze jsou uvedeny v *Příloze 2*. Poté byl otevřen přívod vzduchu na hlavním uzávěru. Regulace vzduchu probíhala na redukčním ventilu regulační jednotky enkapsulátoru. Tok vzduchu byl nastaven tak, aby směs začala stoupat hadičkou k trysce a po povolení svorky byl proud směsi přes trysku optimální k tvorbě kapiček.

Částice byly tvořeny z chitosanu o konečné koncentraci 1 % hm. a 2 % hm. Jako u všech ostatních částic byly připravovány i částice, které neobsahovaly lysozym. Postup tvorby prázdných částic byl stejný, pouze chitosan byl připraven o výsledné koncentraci a přímo nalit do tlakové lahve, z něj pak byly vytvořeny částice.

Vzhledem ke struktuře chitosanových částic byly částice ponechány v roztoku TPP a dále s nimi probíhala jejich charakterizace podobně jako u částic připravených manuálně.

4.5.6. Příprava škrobových částic

Nejdříve byl připraven 1% roztok škrobu. Škrob byl rozpuštěn v roztoku NaOH a močoviny v poměru 0,8:1 hmotnostních procent. V tomto roztoku byl rozpuštěn lysozym tak, aby jeho konečná koncentrace byla 1 mg/ml. Za stálého míchání byl poté 1 ml tohoto roztoku přikapáván k 20 ml ethanolu. Při přípravě prázdných částic byl použit 1 ml roztoku škrobu bez lysozymu.

Se škrobovými částicemi bylo pracováno stejně jako s ostatními manuálně připravenými částicemi. Byly ponechány v roztoku a charakterizovány v různých podmínkách.

4.6. Stanovení enkapsulační účinnosti

Při stanovení enkapsulační účinnosti bylo využito stanovení koncentrace lysozymu uvolněného v roztoku po enkapsulaci. Ke stanovení byla použita metoda Hartree-Lowryho pro stanovení proteinů popsaná v *kapitole 4.4.1*. Roztok částic, příp. filtrát po alginátových částicích z enkapsulátoru, byl centrifugován 15 min při 14 000 otáčkách a laboratorní teplotě. Pro stanovení byl odebrán potřebný objem supernatantu a v něm bylo stanoveno množství lysozymu. Porovnáním hodnot naměřených po enkapsulaci a hodnot z proměření prázdných částic byla vypočítána enkapsulační účinnost.

4.7. Charakterizace částic v modelových potravinách

Experimentální práce zahrnovala i charakterizaci částic umístěných v modelových potravinách. Částice byly do čtyř modelových prostředí vloženy vždy v určitém poměru k prostředí a poté bylo v určitých časových intervalech měřeno Hartree-Lowryho metodou množství uvolněného lysozymu.

4.7.1. Modelové potraviny

Pro charakterizaci byly používány čtyři typy modelových potravin. První typ potraviny představoval kyselé prostředí. Tato modelová potravina byla tvořena 3% roztokem kyseliny octové. Druhou modelovou potravinou bylo prostředí obsahující alkohol. Tato potravina byla tvořena 10% roztokem ethanolu. Třetím typem modelové potraviny byla emulze rostlinný olej:voda v poměru 0,25:0,75 hm. %. Tento typ potraviny představoval prostředí obsahující tuk. Poslední modelovou potravinou byl simulován vodný roztok tvořený pouze destilovanou vodou [48].

4.7.2. Aplikace částic do modelových potravin

Do modelových potravin byly vloženy všechny typy částic včetně prázdných pro porovnání. Modelové potraviny s částicemi byly inkubovány v chladničce při 5 °C. Měření uvolněného lysozymu bylo prováděno v intervalech 1 den, 3 dny, 7 dní a 4 týdny.

V případě částic připravených manuálně a chitosanových částic vytvořených na enkapsulátoru byly do 20 ml potraviny aplikovány 4 ml roztoku částic. U alginátových částic z enkapsulátoru byly do 20 ml potraviny navázeny 2 g částic.

Do modelových potravin byl pro porovnání vložen i roztok lysozymu o koncentraci 1 mg/ml. Roztok lysozymu byl dáván do modelových potravin v množství 4 ml do 20 ml potraviny.

Po inkubaci požadovanou dobu byl vždy odebrán vzorek směsi částic s modelovou potravinou. Tento vzorek byl centrifugován 15 min při 14 000 otáčkách a laboratorní teplotě a v supernatantu pak bylo stanoveno uvolněné množství lysozymu.

4.8. Charakterizace částic v modelovém fyziologickém prostředí

Další součástí experimentální práce byla charakterizace částic po jejich aplikaci do modelových fyziologických podmínek. Do modelového prostředí byly opět aplikovány všechny typy částic včetně částic bez lysozymu. Množství uvolněného lysozymu bylo opět stanoveno Hartree-Lowryho metodou (*kapitola 4.4.1*).

4.8.1. Trávicí šťávy

Pro práci byly používány tři modelové trávicí šťávy.

Pankreatická šťáva byla připravena smísením 0,25 g pankreatinu, 1,5 g NaHCO₃ a 100 ml destilované vody. pH pankreatické šťávy bylo upraveno na 8,9.

Při přípravě žaludeční šťávy bylo rozpuštěno 0,25 g pepsinu ve 100 ml destilované vody. Poté bylo přidáno 0,84 ml koncentrované HCl, pH této šťávy bylo upraveno na 0,9.

Poslední trávicí šťávou byla šťáva žlučová. Ta byla připravena rozpuštěním 0,8 g žlučových solí ve 200 ml destilované vody [49].

4.8.2. Aplikace částic do trávicích šťáv

Částice připravené manuálně a chitosanové částice z enkapsulátoru byly do trávicích šťáv aplikovány v poměru 1:1 (šťáva : částice). V případě alginátových částic z enkapsulátoru byl do 5 ml šťávy navážen 1 g částic.

Inkubace směsí částic a trávicích šťáv probíhala při 37 °C. Směs se žlučovou šťávou byla inkubována po dobu 40 minut. V případě směsi částic s pankreatickou a žaludeční šťávou trvala inkubace 20 minut. Po skončení inkubace byla směs částic s trávicí šťávou centrifugována 15 min při 14 000 otáčkách a laboratorní teplotě. V supernatantu pak bylo stanoveno uvolněné množství lysozymu.

Tak jako do modelových potravin byl i do trávicích šťáv pro porovnání vložen roztok lysozymu o koncentraci 1 mg/ml v poměru 1:1.

4.9. Testování antimikrobiální aktivity

Pro testování antimikrobiální aktivity byla v experimentální práci zvolena metoda testů na pevném médiu. Antimikrobiální aktivita byla testována u čerstvě připravených částic, u částic v modelových potravinách po 7 dnech a po 4 týdnech, a u částic po aplikaci do modelových fyziologických šťáv. Antimikrobiální aktivita byla stanovena i u kalibrační řady čistého lysozymu a u roztoku lysozymu, který byl vložen do modelových potravin (po 7 dnech a po 4 týdnech) a trávicích šťáv. Organismem zvoleným pro testování antimikrobiální aktivity byla grampozitivní, nepatogenní bakterie *Bacillus subtilis*. Právě na tuto bakterii vykazuje také mimo jiné lysozym antimikrobiální aktivitu.

4.9.1. Kultivace *Bacillus subtilis*

Pro kultivaci bakteriálního kmene *Bacillus subtilis* bylo využíváno médium, jehož složení pro objem 1 000 ml je (v případě tekutého média bez agaru):

- 5 g pepton
- 3 g hovězí extrakt
- 0,01 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 20 g agar.

Sterilizace média probíhala 50 min v tlakovém hrnci.

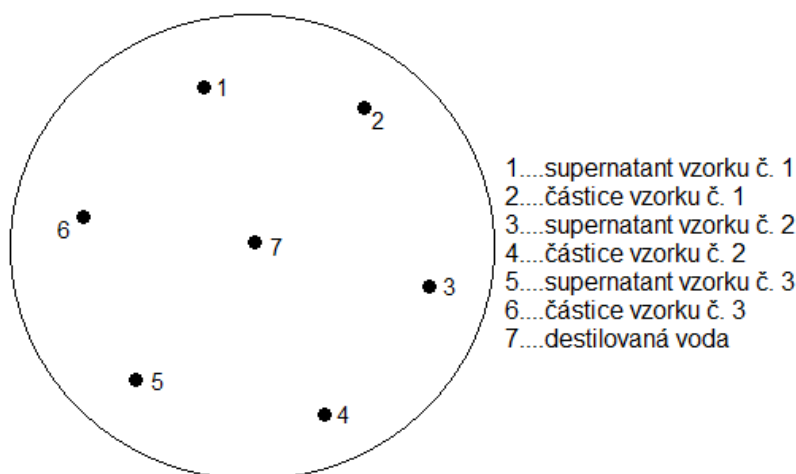
Příprava inokula bakteriální kultury *Bacillus subtilis* probíhala ve vysterilizovaném médiu následujícím způsobem. V laminárním boxu bylo sterilní médium zaočkováno z Petriho misky kulturou uchovávanou při 4 °C. Z kultury bylo zaočkováno vždy 100 ml média ve 250 ml Erlemeyerově baňce. Kultivace v tekutém médiu proběhla za stálého třepání při 30 °C 24 h.

Z připraveného 24hodinového inokula byly poté zaočkovány agarové plotny. Ty byly připraveny ze sterilního média obsahujícího agar, do Petriho misek bylo médium nalito opět v laminárním boxu. Na připravené Petriho misky s agarem bylo pak napipetováno sterilně 0,5 ml inokula. Kultivace bakteriální kultury na agarové půdě probíhala v termostatu při 30 °C. Petriho misky s kulturou byly použity pro testování antimikrobiální aktivity.

4.9.2. Antimikrobiální test

Antimikrobiální testy byly prováděny na připravených Petriho miskách s pevným médiem zaočkovaných kulturou *Bacillus subtilis*. Ke každé sadě vzorků byly použity vždy tři Petriho misky. Do agarové půdy s kulturou bylo sterilní špičkou pipety uděláno

7 jamek. Do nich byl vždy vpraven požadovaný vzorek v objemu 2 μ l. 7. jamka sloužila jako kontrola a obsahovala 2 μ l destilované vody. Po vložení všech vzorků do jamek byly Petriho misky inkubovány v termostatu při 30 °C. Po projevení účinku byly zaznamenány inhibiční zóny kolem každé jamky. Čistý roztok lysozymu a jeho kalibrační řada byly testovány na samostatné sadě Petriho misek.



Obr. 11: Schéma rozmístění vzorků na agarové půdě s kulturou

4.10. Stanovení velikosti a stability částic pomocí DLS

K charakterizaci manuálně připravených částic byla využita také metoda dynamického rozptylu světla (DLS) a laserové Dopplerovy velocimetrie. Pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS byla určena distribuce velikosti čerstvě připravených částic. Dále byla podle hodnoty ζ -potenciálu odvozena jejich stabilita. Charakteristice byly podrobeny manuálně připravené částice s enkapsulovaným lysozymem a manuálně připravené prázdné částice.

Všechny roztoky manuálně připravených částic byly 100x zředěny a v takto zředěných roztocích byla určena distribuce velikosti částic. Při stanovení velikosti částic přístroj Zetasizer Nano ZS měří časovou závislost kolísání intenzity rozptýleného světla. To je dáno Brownovým pohybem jednotlivých částic. Podle této analýzy pak lze stanovit distribuci velikosti částic ve vzorku.

Ve stejném vzorku byl po přidání elektrodového nastavce změřen i ζ -potenciál částic v roztoku. Při tomto měření je využito metody laserové Dopplerovy velocimetrie. Po vložení napětí je sledována rychlost pohybu částic k opačně nabitě elektrodě. Z údajů získaných touto analýzou lze určit ζ -potenciál. Podle ζ -potenciálu lze poté stanovit stabilitu částic. Pokud ζ -potenciál dosahuje hodnot v rozmezí -30 až +30 mV, je systém nestabilní.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

Ze všech typů použitých materiálů byly připraveny jak částice s lysozymem (původní koncentrace ve směsi byla 1 mg/ml), tak i částice prázdné, které lysozym neobsahovaly. Příprava prázdných částic byla nezbytná pro vyhodnocení výsledků naměřených při stanovení enkapsulační účinnosti, charakterizaci částic v modelových podmínkách (potravinách a trávicích šťávách) i při antimikrobiálních testech. Částice byly připraveny dle jednotlivých postupů popsaných v kapitole 4.5. V následující kapitole této práce jsou shrnuty výsledky měření.

5.1. Enkapsulační účinnost

U každých čerstvě připravených částic bylo zjištěno, jaké množství z původní koncentrace lysozymu ve směsi bylo enkapsulováno. Enkapsulační účinnost byla stanovena podle postupu uvedeného v kapitole 4.6. Porovnáním s původní koncentrací lysozymu přidávanou do směsi bylo zjištěno jeho enkapsulované množství. Pro každý vzorek bylo měření zopakováno třikrát a ze získaných hodnot byl získán průměr. Rozptyl hodnot měření jednotlivých vzorků nebyl větší než 5 %. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1: Enkapsulační účinnosti jednotlivých částic

Typ částic	Množství enkapsulovaného lysozymu [%]	Množství enkapsulovaného lysozymu [mg/ml]
Alginátové enkapsulátor		
1% 300 μm	37,48	0,37
1% 450 μm	44,01	0,44
2% 300 μm	46,71	0,47
2% 450 μm	44,97	0,45
Chitosanové enkapsulátor		
1% 450 μm	99,71	1,00
1% 750 μm	99,69	1,00
2% 450 μm	84,13	0,84
2% 750 μm	98,74	0,99
Manuální		
Alginátové	94,64	0,95
Chitosanové	21,87	0,22
Lipozomy	34,89	0,35
Škrobové	99,52	1,00

Při počáteční koncentraci lysozymu 1 mg/ml se jeví jako nejvíce účinná příprava chitosanových částic na enkapsulátoru. Právě u těchto částic je procento enkapsulace přes 99 % (1% 450 μm a 1% 750 μm). Velmi dobrá účinnost enkapsulace byla dosažena také u škrobových částic a u manuálně připravených alginátových částic. Naopak nejméně lysozymu se enkapsulovalo do manuálně připravených chitosanových částic.

5.2. Charakterizace částic v modelových potravinách

Do čtyř typů modelových potravin byly aplikovány všechny typy částic dle postupu popsaného v kapitole 4.7.2. V určených časových intervalech bylo metodou Hartree-Lowryho

(kapitola 4.4.1) stanoveno uvolněné množství lysozymu. Pro každý typ potravin byly provedeny v každém časovém intervalu tři odběry, ze kterých byla stanovena průměrná hodnota uvolněného enzymu. Odchylka hodnot nepřesahuje hodnotu 5%. Vyhodnocení a charakterizace částic v modelových potravinách je uvedeno v následující části práce.

5.2.1. Částice připravené na enkapsulátoru

V Tabulkách 2, 3, 4 a 5 jsou uvedeny výsledky charakterizace alginátových částic z enkapsulátoru po aplikaci do modelových potravin.

Tabulka 2: Částice 1% 300 μm - potraviny

1% 300 μm		Množství uvolněného lysozymu [%]
1 den	Kyselina	0,74
	Alkohol	-0,61
	Olej	1,11
	Voda	0,37
3 dny	Kyselina	2,89
	Alkohol	3,62
	Olej	13,14
	Voda	8,91
7 dní	Kyselina	0,18
	Alkohol	4,55
	Olej	9,64
	Voda	0,68
4 týdny	Kyselina	1,41
	Alkohol	3,19
	Olej	25,98
	Voda	3,62

Tabulka 3: Částice 1% 450 μm - potraviny

1% 450 μm		Množství uvolněného lysozymu [%]
1 den	Kyselina	-1,09
	Alkohol	-1,72
	Olej	-0,80
	Voda	-0,88
3 dny	Kyselina	5,02
	Alkohol	2,88
	Olej	9,89
	Voda	4,50
7 dní	Kyselina	1,15
	Alkohol	1,99
	Olej	3,56
	Voda	0,58
4 týdny	Kyselina	0,84
	Alkohol	1,46
	Olej	15,12
	Voda	-0,21

Tabulka 4: Částice 2% 300 μm - potraviny

2% 300 μm		Množství uvolněného lysozymu [%]
1 den	Kyselina	-1,97
	Alkohol	-1,49
	Olej	-1,17
	Voda	-0,75
3 dny	Kyselina	3,11
	Alkohol	2,22
	Olej	4,68
	Voda	1,92
7 dní	Kyselina	0,99
	Alkohol	0,30
	Olej	3,40
	Voda	0,20
4 týdny	Kyselina	1,28
	Alkohol	-0,97
	Olej	3,75
	Voda	1,82

Tabulka 5: Částice 2% 450 μm - potraviny

2% 450 μm		Množství uvolněného lysozymu [%]
1 den	Kyselina	-0,28
	Alkohol	-1,41
	Olej	-11,66
	Voda	-0,15
3 dny	Kyselina	3,53
	Alkohol	2,10
	Olej	5,48
	Voda	4,25
7 dní	Kyselina	0,72
	Alkohol	0,82
	Olej	3,79
	Voda	-0,36
4 týdny	Kyselina	0,46
	Alkohol	0,00
	Olej	6,50
	Voda	0,05

Měřením uvolněného lysozymu bylo zjištěno, že u všech alginátových částic z enkapsulátoru se v průběhu dlouhodobého uchovávání v modelových potravinách neuvolnilo více než 10 % lysozymu s výjimkou prostředí s olejem, kde jsou u některých částic hodnoty po 4 týdnech o něco vyšší (Tabulka 2, 3). Největší procento enzymu se uvolnilo po třech dnech od aplikace do jednotlivých potravin. Jak již bylo zmíněno, nejvyšší procento uvolnění bylo zaznamenáno v prostředí s olejem. Lze tedy soudit, že emulze oleje a vody je pro alginátové částice nejvíce destabilizujícím prostředím. Kromě prostředí simulujícího tučnou potravinu se množství uvolněného enzymu postupně snižuje. Lysozym tedy pravděpodobně po uvolnění v prostředí degraduje. Tabulky s výsledky obsahují i záporné hodnoty, což může být způsobeno zmíněnou degradací enzymu (v tukovém prostředí), případně chybou metody. S ohledem na vyšší hodnot se vesměs nacházíme v rámci 5% odchylky stanovení volného lysozymu.

Vyhodnocení charakterizace chitosanových částic připravených pomocí enkapsulátoru jsou uvedeny v Tabulkách 6, 7, 8, a 9.

Tabulka 6: Částice 1% 450 μm - potraviny

1% 450 μm		Množství uvolněného lysozymu [%]
1 den	Kyselina	4,90
	Alkohol	-0,09
	Olej	-1,26
	Voda	0,09
3 dny	Kyselina	5,70
	Alkohol	0,72
	Olej	4,48
	Voda	0,07
7 dní	Kyselina	4,27
	Alkohol	-0,32
	Olej	2,49
	Voda	-0,42
4 týdny	Kyselina	5,45
	Alkohol	0,95
	Olej	7,80
	Voda	0,74

Tabulka 7: Částice 1% 750 μm - potraviny

1% 750 μm		Množství uvolněného lysozymu [%]
1 den	Kyselina	-0,95
	Alkohol	-0,18
	Olej	-1,86
	Voda	0,23
3 dny	Kyselina	1,27
	Alkohol	-0,72
	Olej	1,20
	Voda	-0,16
7 dní	Kyselina	-0,67
	Alkohol	-1,13
	Olej	0,69
	Voda	-0,72
4 týdny	Kyselina	0,37
	Alkohol	4,43
	Olej	3,58
	Voda	-0,07

Tabulka 8: Částice 2% 450 μm - potraviny

2% 450 μm		Množství uvolněného lysozymu [%]
1 den	Kyselina	6,37
	Alkohol	1,04
	Olej	0,74
	Voda	0,42
3 dny	Kyselina	14,20
	Alkohol	-0,66
	Olej	3,07
	Voda	0,41
7 dní	Kyselina	14,50
	Alkohol	-0,71
	Olej	1,70
	Voda	-0,79
4 týdny	Kyselina	15,30
	Alkohol	0,71
	Olej	6,73
	Voda	2,24

Tabulka 9: Částice 2% 750 μm - potraviny

2% 750 μm		Množství uvolněného lysozymu [%]
1 den	Kyselina	0,94
	Alkohol	0,93
	Olej	-0,51
	Voda	1,02
3 dny	Kyselina	0,28
	Alkohol	-1,45
	Olej	2,31
	Voda	-0,23
7 dní	Kyselina	0,28
	Alkohol	-1,03
	Olej	1,66
	Voda	-1,31
4 týdny	Kyselina	1,84
	Alkohol	-0,02
	Olej	4,24
	Voda	0,47

Obal chitosanových částic zřejmě pevně váže enkapsulovaný enzym. Uvolněné množství enzymu není v žádném testovaném časovém intervalu dlouhodobého uchovávání příliš velké. Nejvíce lysozymu se uvolnilo z 2% částic tvořených tryskou 450 μm , a to v kyselém prostředí 3% kyseliny octové. Z 1% i 2% částic o velikosti 750 μm se po 4 týdnech inkubace uvolnilo pouze nepatrné množství lysozymu. Opět je možné, že enzym vlivem sorpce na obalový materiál či vlivem modelové potravinu degraduje. Nejvíce destabilizujícím prostředím pro chitosanové částice je ve všech případech právě kyselé prostředí. Tak jako u alginátových částic se v tabulkách pro chitosanové částice vyskytují záporné hodnoty, které jsou v rámci chyby měření, případně mohou být ovlivněny degradací enzymu.

5.2.2. Manuálně připravené částice

Vyhodnocení charakterizace manuálně připravených částic je shrnuto v následujících *Tabulkách 10, 11, 12 a 13.*

Tabulka 10: Alginátové částice - potraviny

Alginátové		Množství uvolněného lysozymu [%]
1 den	Kyselina	0,83
	Alkohol	0,10
	Olej	-2,00
	Voda	0,31
3 dny	Kyselina	1,31
	Alkohol	0,34
	Olej	-0,68
	Voda	0,17
7 dní	Kyselina	1,00
	Alkohol	0,07
	Olej	2,46
	Voda	1,05
4 týdny	Kyselina	0,56
	Alkohol	0,27
	Olej	2,65
	Voda	-0,02

Tabulka 11: Chitosanové částice - potraviny

Chitosanové		Množství uvolněného lysozymu [%]
1 den	Kyselina	0,85
	Alkohol	30,69
	Olej	41,75
	Voda	34,17
3 dny	Kyselina	0,79
	Alkohol	21,88
	Olej	47,01
	Voda	26,67
7 dní	Kyselina	4,13
	Alkohol	11,86
	Olej	41,05
	Voda	22,68
4 týdny	Kyselina	2,38
	Alkohol	4,35
	Olej	36,78
	Voda	19,32

Tabulka 12: Lipozomy - potraviny

Lipozomy		Množství uvolněného lysozymu [%]
1 den	Kyselina	19,45
	Alkohol	50,73
	Olej	55,65
	Voda	50,20
3 dny	Kyselina	45,86
	Alkohol	57,88
	Olej	45,80
	Voda	56,82
7 dní	Kyselina	54,31
	Alkohol	65,20
	Olej	64,67
	Voda	63,55
4 týdny	Kyselina	43,09
	Alkohol	60,45
	Olej	71,80
	Voda	43,29

Tabulka 13: Škrobové částice - potraviny

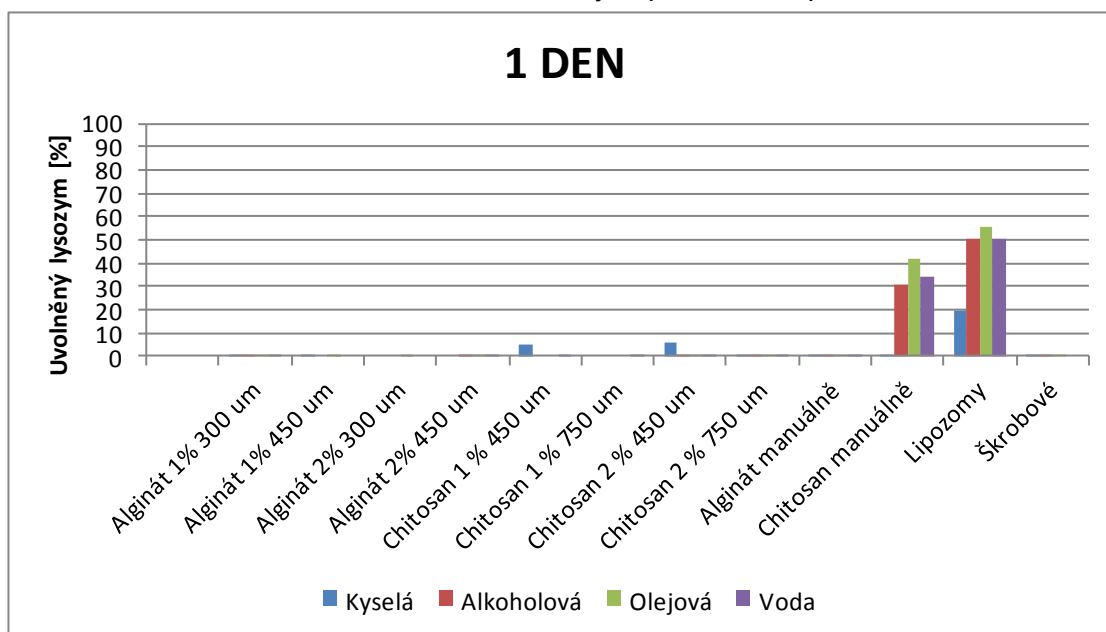
Škrobové		Množství uvolněného lysozymu [%]
1 den	Kyselina	0,32
	Alkohol	0,31
	Olej	1,13
	Voda	-0,18
3 dny	Kyselina	-1,06
	Alkohol	2,43
	Olej	-1,16
	Voda	0,16
7 dní	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,69
	Olej	1,90
	Voda	0,12
4 týdny	Kyselina	1,23
	Alkohol	0,83
	Olej	4,42
	Voda	-0,79

Vyhodnocením dlouhodobé stability manuálně připravených částic v modelových potravinách bylo zjištěno, že největší procento lysozymu bylo uvolněno v případě lipozomů. Vzhledem k podobným hodnotám uvolněného enzymu lze předpokládat, že došlo k jeho postupnému uvolnění z částic ve všech typech prostředí. Manuálně připravené chitosanové částice vykazují také značné množství uvolněného enzymu oproti ostatním materiálům. V případě škrobových a manuálně připravených alginátových částic se opět uvolnilo nepatrné množství enzymu, případně došlo k jeho značné degradaci. Nejvíce stabilitu částic opět ovlivnilo prostředí s přísadkou oleje a kyseliny. Opět je v tabulkách patrný vliv chyby metody nebo degradace enzymu projevující se jako záporné hodnoty.

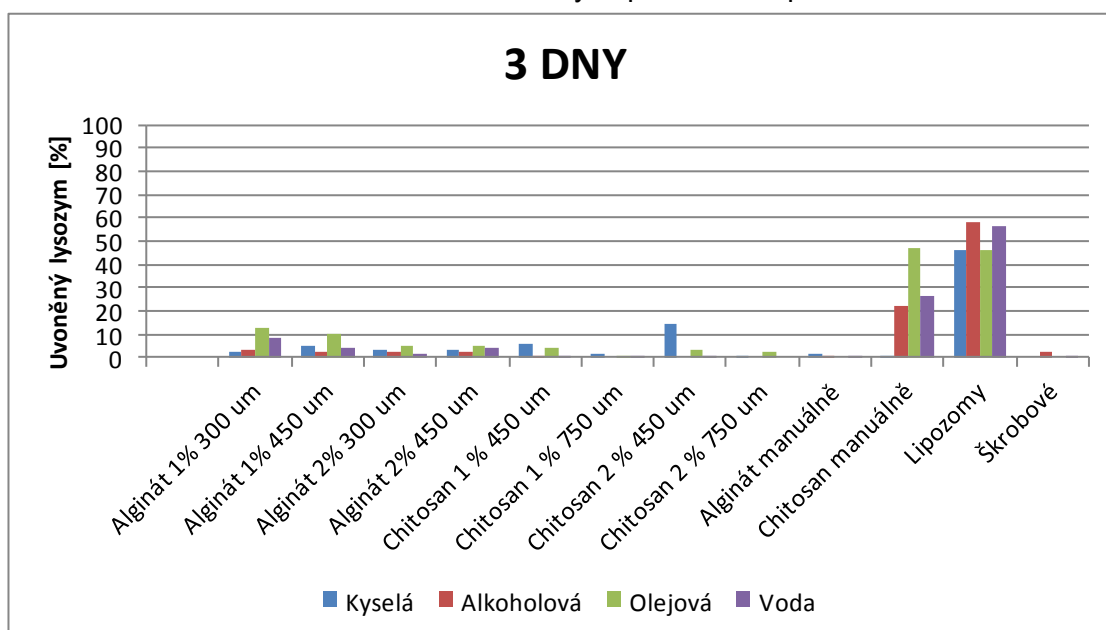
5.2.3. Srovnání dlouhodobé stability jednotlivých částic v časových intervalech

Při porovnání výsledků dlouhodobé stability všech částic v jednotlivých odběrových intervalech je v *grafech 1 – 4* vidět, že nejvíce uvolněného lysozymu bylo naměřeno 3. den po aplikaci do potravin. Obecně je nejvíce destabilizujícím prostředím voda s olejem. Značný vliv má také kyselé prostředí. V neutrálním vodném prostředí ani v alkoholu nedochází tak k velkému rozpadu částic. Částice připravené pomocí enkapsulátoru jsou obecně podstatně stabilnější než manuálně připravené částice, zejména lipozomy a chitosanové částice.

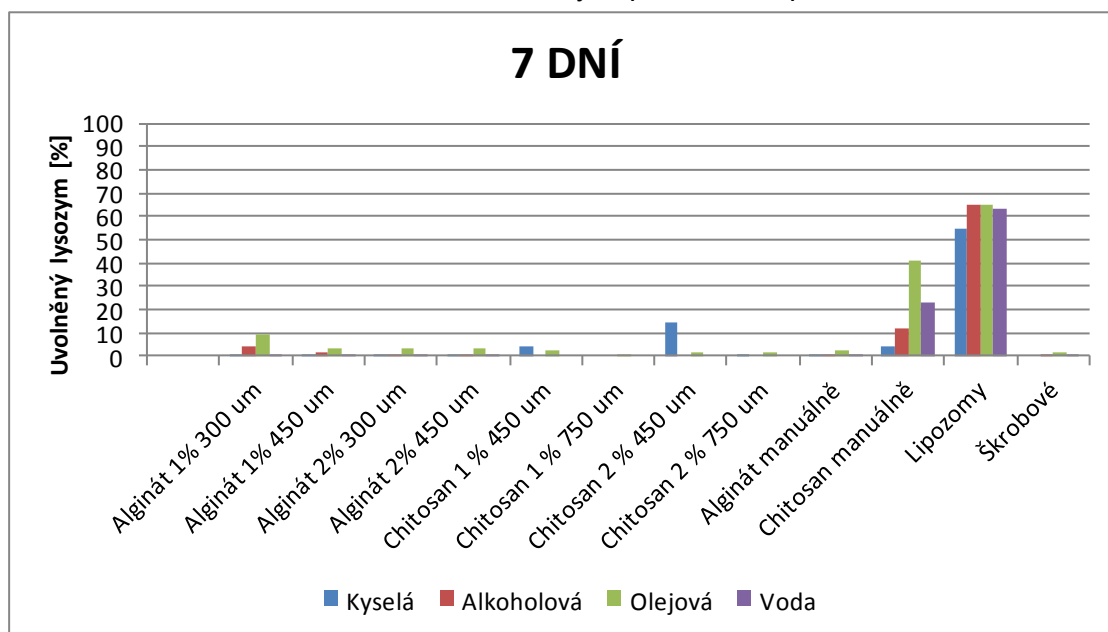
Graf 1: Částice v modelových potravinách po 1 dni



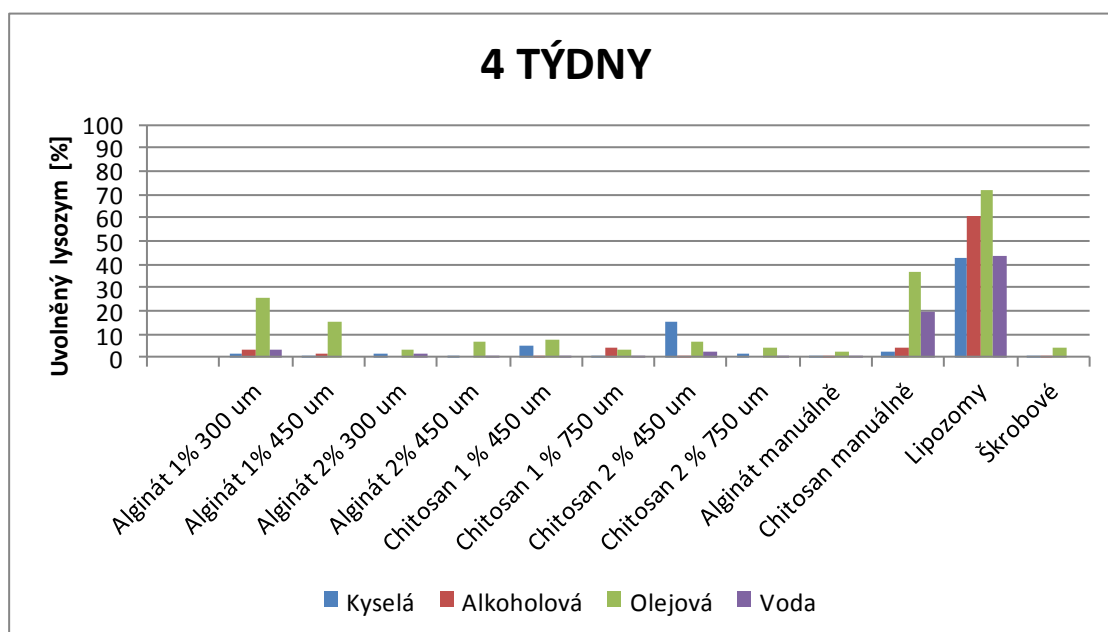
Graf 2: Částice v modelových potravinách po 3 dnech



Graf 3: Částice v modelových potravinách po 7 dnech



Graf 4: Částice v modelových potravinách po 4 týdnech



5.3. Charakterizace částic v modelovém fyziologickém prostředí

Do modelového fyziologického prostředí byly tak jako do potravin aplikovány jak částice s lysozymem, tak i prázdné částice. Počáteční koncentrace lysozymu byla opět u všech částic 1 mg/ml. Postup stanovení je uveden v kapitole 4.8. Po inkubaci byly u každé modelové šťávy provedeny tři odběry a z nich vyhodnocena průměrná hodnota uvolněného enzymu. Rozptyl hodnot měření jednotlivých vzorků nebyl větší než 5 %. Vyhodnocení je uvedeno v následující kapitole.

5.3.1. Pankreatická trávicí šťáva

Množství lysozymu uvolněného v umělé pankreatické trávicí šťávě je uvedeno v Tabulce 14.

Tabulka 14: Pankreatická trávicí šťáva

Typ částic	Množství uvolněného lysozymu [%]
Algínátové enkapsulátor	
1% 300 µm	45,74
1% 450 µm	33,54
2% 300 µm	38,99
2% 450 µm	39,88
Chitosanové enkapsulátor	
1% 450 µm	-1,48
1% 750 µm	-1,80
2% 450 µm	-1,43
2% 750 µm	-1,70
Manuální	
Algínátové	41,83
Chitosanové	106,20
Lipozomy	71,54
Škrobové	-1,99

Po aplikaci částic do modelové pankreatické trávicí šťávy byl opět změřen obsah uvolněného lysozymu. Veškeré množství (tj. 100 %) enkapsulovaného lysozymu se uvolnilo z chitosanových částic. Nepatrně vyšší hodnoty může ovlivňovat chyba metody nebo interference. V případě nulových hodnot je pravděpodobné že se enzym uvolnil, ale působením pankreatické trávicí šťávy obsahující proteolytické enzymy degradoval. Relativně velké množství se uvolnilo i ze všech ostatních částic s výjimkou chitosanových částic z enkapsulátoru a škrobových částic. Stabilita v modelovém fyziologickém prostředí je zřejmě ovlivněna kombinací použitého materiálu a typu enkapsulované látky.

5.3.2. Žaludeční trávicí šťáva

Tabulka 15 obsahuje vyhodnocení výsledků po aplikaci částic do žaludeční trávicí šťávy.

Tabulka 15: Žaludeční trávicí šťáva

Typ částic	Množství uvolněného lysozymu [%]
Alginátové enkapsulátor	
1% 300 μm	-3,47
1% 450 μm	-3,13
2% 300 μm	-2,66
2% 450 μm	-2,39
Chitosanové enkapsulátor	
1% 450 μm	-3,87
1% 750 μm	-2,20
2% 450 μm	-0,64
2% 750 μm	-1,36
Manuální	
Alginátové	38,92
Chitosanové	103,89
Lipozomy	47,82
Škrobové	-1,17

Dle hodnot v Tabulce 15 je vidět, že prostředí žaludeční trávicí šťávy ovlivnilo připravené částice nejméně. Ve většině případů nedošlo k uvolnění žádného enzymu, případně došlo k jeho plné degradaci, hodnocení může být tedy zkresleno. S ohledem na výsledky chitosanových manuálně připravených částic a lipozomů však lze předpokládat spíše vysokou stabilitu částic připravených v enkapsulátoru. Tak jako u předchozích výsledků jsou patrné mírně záporné hodnoty, které mají opět stejné vysvětlení jako v předchozích částech (kapitoly 0, 5.2.2, 5.3.1).

5.3.3. Žlučová trávicí šťáva

Procento uvolněného lysozymu ve žlučové trávicí šťávě je uvedeno v *Tabulce 16*.

Tabulka 16: Žlučová trávicí šťáva

Typ částic	Množství uvolněného lysozymu [%]
Alginátové enkapsulátor	
1% 300 μm	0,88
1% 450 μm	3,31
2% 300 μm	2,14
2% 450 μm	0,61
Chitosanové enkapsulátor	
1% 450 μm	-0,46
1% 750 μm	-0,45
2% 450 μm	0,38
2% 750 μm	-1,06
Manuální	
Alginátové	3,52
Chitosanové	104,60
Lipozomy	103,68
Škrobové	5,41

Po aplikaci částic do žlučové trávicí šťavy se uvolnilo mimo chitosanových částic a lipozomů jen nepatrné nebo žádné množství enzymu. V *Tabulce 16* se opět opakují mírně záporné hodnoty a hodnoty nad 100%, které vyznačují minimum/maximum uvolnění enzymu.

Při porovnání jednotlivých modelových fyziologických prostředí lze říci, že nejvíce destabilizujícím prostředím je pro částice pankreatická trávicí šťáva. Právě zde se působením jejích enzymů rozložilo nejvíce částic. Prostředí žlučové trávicí šťavy je pak zřejmě nejméně ovlivňující.

Ze získaných výsledků je patrné, že enkapsulaci lysozymu lze využít k jeho cílenému transportu trávicím traktem, stabilizaci při průchodu žaludkem a k postupnému uvolňování ve střevech, což by mohlo být výhodné při využití jeho biologického účinku.

5.4. Antimikrobiální testy

Postup provádění antimikrobiálních testů je uveden v *kapitole 4.9.2*. Na antimikrobiální testy byly pro všechny typy testovaných částic použity vždy tři Petriho misky s kulturou. Změřené hodnoty pak byly zprůměrovány. Odchylna hodnot nepřesáhla ve všech případech hodnotu 5 %. Vyhodnocení antimikrobiálních testů na bakteriální kultuře *Bacillus subtilis* je uvedeno v následující části práce.

5.4.1. Čerstvě připravené částice

Tabulky 17 a 18 obsahují výsledky antimikrobiálních testů čerstvě připravených částic.

Tabulka 17: Čerstvé částice

Typ částic	Průměr inhibiční zóny [mm]
Alginátové enkapsulátor	
1% 300 µm	3,0
1% 450 µm	4,0
2% 300 µm	5,0
2% 450 µm	4,0
Chitosanové enkapsulátor	
1% 450 µm	0,0
1% 750 µm	0,0
2% 450 µm	0,0
2% 750 µm	0,0
Manuální	
Alginátové	3,00
Chitosanové	4,00
Lipozomy	2,00
Škrobové	2,00

Tabulka 18: Supernatanty po přípravě částic

Typ částic	Průměr inhibiční zóny [mm]
Alginátové enkapsulátor	
1% 300 µm	5,0
1% 450 µm	5,0
2% 300 µm	6,0
2% 450 µm	5,0
Chitosanové enkapsulátor	
1% 450 µm	0,0
1% 750 µm	0,0
2% 450 µm	0,0
2% 750 µm	0,0
Manuální	
Alginátové	0,00
Chitosanové	3,00
Lipozomy	0,00
Škrobové	2,00

Při testování antimikrobiální aktivity měly největší inhibiční efekt právě čerstvě připravené částice. Mimo chitosanových částic z enkapsulátoru vykazovaly všechny ostatní antimikrobiální aktivitu. Velikosti inhibičních zón po aplikaci částic na Petriho misky jsou uvedeny v *Tabulce 17*. Testována byla také antimikrobiální aktivita lysozymu, který nebyl enkapsulován. Tyto hodnoty jsou uvedeny v *Tabulce 18*. V případě poloviny supernatantů se neprokázala žádná antimikrobiální aktivita. Koncentrace enzymu v supernatantu tedy byla velmi nízká, nebo došlo v průběhu enkapsulace nebo po zředění k narušení jeho enzymové aktivity.

5.4.2. Testování po aplikaci do modelových potravin

U všech částic i supernatantů byla po 7 dnech a 4 týdnech ověřena antimikrobiální aktivita. Výsledky jsou uvedeny v následujících kapitolách.

5.4.2.1. Alginátové částice – enkapsulátor

Následující tabulky (*Tabulka 19 – 23*) obsahují výsledky antimikrobiálních testů alginátových částic z enkapsulátoru po aplikaci do potravin. Dále jsou v *Tabulkách 23, 24, 25* a *26* uvedeny výsledky antimikrobiálních testů supernatantů po těchto částicích

Tabulka 19: Částice 1% 300 μm

1% 300 μm		Průměr inhibiční zóny [mm]
7 dní	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	3,00
4 týdny	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00

Tabulka 20: Částice 1% 450 μm

1% 450 μm		Průměr inhibiční zóny [mm]
7 dní	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	3,00
4 týdny	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00

Tabulka 21: Částice 2% 300 μm

2% 300 μm		Průměr inhibiční zóny [mm]
7 dní	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	3,00
	Voda	3,00
4 týdny	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00

Tabulka 22: Částice 2% 450 μm

2% 450 μm		Průměr inhibiční zóny [mm]
7 dní	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	3,00
	Voda	0,00
4 týdny	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00

Na základě získaných výsledků je patrné, že po aplikaci do modelových potravin ztrácejí částice svou původní antimikrobiální aktivitu. Jedinou výjimkou je vodné prostředí, kde u částic z 1% alginátu a u částic 2% 300 μm zůstala alespoň po sedmi dnech antimikrobiální aktivita zachována. Antimikrobiální aktivita se také projevila po 7 dnech u částic 2% 300 μm po aplikaci do emulze olej:voda.

Dále byla ověřena aktivita uvolněného lysozymu v roztoku supernatantu. Inhibiční efekt se projevil opět pouze po 7 dnech, a to u 1% alginátových částic v prostředí oleje a vody. Ve stejném prostředí působil také lysozym uvolněný z částic 2% 300 μm a lysozym v oleji po částicích 2% 450 μm .

Na základě antimikrobiálních testů se potvrzuje předpoklad, že lysozym v daných prostředích časem degraduje či denaturuje a ztrácí tak svou enzymovou aktivitu.

*Tabulka 23: Supernatanty po částicích
1% 300 μm*

1% 300 μm		Průměr inhibiční zóny [mm]
7 dní	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	2,00
	Voda	4,00
4 týdny	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00

*Tabulka 24: Supernatanty po částicích
1% 450 μm*

1% 450 μm		Průměr inhibiční zóny [mm]
7 dní	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	2,00
	Voda	4,00
4 týdny	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00

*Tabulka 25: Supernatanty po částicích
2% 300 μm*

2% 300 μm		Průměr inhibiční zóny [mm]
7 dní	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	3,00
	Voda	3,00
4 týdny	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00

*Tabulka 26 Supernatanty po částicích
2% 450 μm*

2% 450 μm		Průměr inhibiční zóny [mm]
7 dní	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	3,00
	Voda	0,00
4 týdny	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00

5.4.2.2. Chitosanové částice – enkapsulátor

Tabulky 27, 28, 29 a 30 obsahují přehled výsledků antimikrobiálního účinku lysozymu enkapsulovaného do chitosanových částic. Hodnocení rozměrů inhibičních zón bylo provedeno v průběhu inkubace v modelových potravinách. Dále jsou zde uvedeny Tabulky 31, 32, 33 a 34 s výsledky antimikrobiální aktivity supernatantů (volného lysozymu).

Tabulka 27: Částice 1% 450 μm

1% 450 μm		Průměr inhibiční zóny [mm]
7 dní	Kyselina	3,00
	Alkohol	4,00
	Olej	0,00
	Voda	3,00
4 týdny	Kyselina	0,00
	Alkohol	2,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00

Tabulka 28: Částice 1% 750 μm

1% 750 μm		Průměr inhibiční zóny [mm]
7 dní	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00
4 týdny	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00

Tabulka 29: Částice 2% 450 μm

2% 450 μm		Průměr inhibiční zóny [mm]
7 dní	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00
4 týdny	Kyselina	3,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00

Tabulka 30: Částice 2% 750 μm

2% 750 μm		Průměr inhibiční zóny [mm]
7 dní	Kyselina	3,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00
4 týdny	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00

U částic tvořených z chitosanu je antimikrobiální účinek větší než u předchozích. I přesto částice svou antimikrobiální aktivitu ztratily. Nejméně ovlivnilo antimikrobiální efekt částic kyselé prostředí. Po čtyřech týdnech je již antimikrobiální působení částic zanedbatelné.

V případě supernatantů po aplikaci chitosanových částic do potravin se opět antimikrobiální účinek prokázal pouze u minima vzorků. Opět se zde potvrzuje buď malá koncentrace uvolněného lysozymu, nebo pravděpodobněji jeho degradace spojená se změnami způsobenými enkapsulací, prostředím potravin a denaturací. Nejméně byl uvolněný lysozym ovlivněn opět kyselým prostředím.

Tabulka 31: Supernatanty po částicích 1% 450 μm

1% 450 μm		Průměr inhibiční zóny [mm]
7 dní	Kyselina	3,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	3,00
4 týdny	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00

Tabulka 32 Supernatanty po částicích 1% 750 μm

1% 750 μm		Průměr inhibiční zóny [mm]
7 dní	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00
4 týdny	Kyselina	4,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00

Tabulka 33: Supernatanty po částicích
2% 450 µm

2% 450 µm		Průměr inhibiční zóny [mm]
7 dní	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00
4 týdny	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00

Tabulka 34 Supernatanty po částicích
2% 750 µm

2% 750 µm		Průměr inhibiční zóny [mm]
7 dní	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00
4 týdny	Kyselina	1,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00

5.4.2.3. Manuálně připravené částice

V následujících tabulkách (Tabulka 35 – 38) jsou výsledky antimikrobiálních testů manuálně připravených částic po aplikaci do potravin.

Tabulka 35: Alginátové částice

Alginátové		Průměr inhibiční zóny [mm]
7 dní	Kyselina	5,00
	Alkohol	3,00
	Olej	4,00
	Voda	5,00
4 týdny	Kyselina	3,00
	Alkohol	3,00
	Olej	3,00
	Voda	3,00

Tabulka 36: Chitosanové částice

Chitosanové		Průměr inhibiční zóny [mm]
7 dní	Kyselina	3,00
	Alkohol	3,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00
4 týdny	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	2,00

Tabulka 37: Lipozomy

Lipozomy		Průměr inhibiční zóny [mm]
7 dní	Kyselina	4,00
	Alkohol	0,00
	Olej	3,00
	Voda	0,00
4 týdny	Kyselina	3,00
	Alkohol	4,00
	Olej	3,00
	Voda	0,00

Tabulka 38: Škrobové částice

Škrobové		Průměr inhibiční zóny [mm]
7 dní	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00
4 týdny	Kyselina	3,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00

Z Tabulek 35 a 37 je patrné, že antimikrobiální aktivita manuálně připravených alginátových částic a lipozomů zůstává zachována velmi dlouhou dobu a při porovnání s čerstvě připravenými částicemi je v některých případech i větší. U částic chitosanových a škrobových jsou výsledky testů podobné jako u částic z enkapsulátoru. Postupem času se jejich antimikrobní účinek snižuje.

Supernatanty po manuálně připravených částicích v prostředí modelových potravin opět potvrzují degradaci volného lysozymu (Tabulka 39 – 42).

Tabulka 39: Supernatanty po alginátových částicích

Alginátové		Průměr inhibiční zóny [mm]
7 dní	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00
4 týdny	Kyselina	1,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00

Tabulka 40 Supernatanty po chitosanových částicích

Chitosanové		Průměr inhibiční zóny [mm]
7 dní	Kyselina	0,00
	Alkohol	3,00
	Olej	0,00
	Voda	4,00
4 týdny	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	3,00

Tabulka 41: Supernatanty po lipozomech

Lipozomy		Průměr inhibiční zóny [mm]
7 dní	Kyselina	3,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00
4 týdny	Kyselina	3,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00

Tabulka 42 Supernatanty po škrobových částicích

Škrobové		Průměr inhibiční zóny [mm]
7 dní	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00
4 týdny	Kyselina	0,00
	Alkohol	0,00
	Olej	0,00
	Voda	0,00

5.4.3. Testování po aplikaci do modelového fyziologického prostředí

Další série antimikrobiálních testů byla provedena s částicemi a supernatanty po inkubaci v modelových trávicích šťávách.

5.4.3.1. Pankreatická trávicí šťáva

V *Tabulkách 43 a 44* jsou shrnuty výsledky antimikrobiální aktivity po aplikaci částic do pankreatické trávicí šťávy. Z výsledků se potvrzuje, že pankreatická trávicí šťáva působí svými enzymy na částice velmi intenzivně a dojde ke zrušení antimikrobiálního účinku jak u částic, tak u uvolněného lysozymu v supernatantech. Výjimkou jsou alginátové manuálně připravené částice a supernatant po chitosanových manuálně připravených částicích.

Tabulka 43: Částice – pankreatická trávicí šťáva

Typ částic	Průměr inhibiční zóny [mm]
Alginátové enkapsulátor	
1% 300 µm	0,0
1% 450 µm	0,0
2% 300 µm	0,0
2% 450 µm	0,0
Chitosanové enkapsulátor	
1% 450 µm	0,0
1% 750 µm	0,0
2% 450 µm	0,0
2% 750 µm	0,0
Manuální	
Alginátové	6,00
Chitosanové	0,00
Lipozomy	0,00
Škrobové	0,00

Tabulka 44: Supernatanty – pankreatická trávicí šťáva

Typ částic	Průměr inhibiční zóny [mm]
Alginátové enkapsulátor	
1% 300 µm	0,00
1% 450 µm	0,00
2% 300 µm	0,00
2% 450 µm	0,00
Chitosanové enkapsulátor	
1% 450 µm	0,00
1% 750 µm	0,00
2% 450 µm	0,00
2% 750 µm	0,00
Manuální	
Alginátové	0,00
Chitosanové	4,00
Lipozomy	0,00
Škrobové	0,00

5.4.3.2. Žaludeční trávící šťáva

Podobně jako pankreatická trávící šťáva rovněž umělá žaludeční šťáva působí značně destruktivně na stabilitu lysozymu v částicích i aktivitu volného lysozymu. Opět se v případě částic i supernatantů projevilo minimum inhibičních zón. Antimikrobiální efekt zůstal zachován pouze u alginátových manuálně připravených částic a u škrobových částic. Ze supernatantů pak působí inhibičně lysozym uvolněný z 2% alginátových částic 300 μm , manuálně připravených chitosanových a škrobových částic (Tabulka 45, 46).

Tabulka 45: Částice – žaludeční trávící šťáva

Typ částic	Průměr inhibiční zóny [mm]
Alginátové enkapsulátor	
1% 300 μm	0,00
1% 450 μm	0,00
2% 300 μm	0,00
2% 450 μm	0,00
Chitosanové enkapsulátor	
1% 450 μm	0,00
1% 750 μm	0,00
2% 450 μm	0,00
2% 750 μm	0,00
Manuální	
Alginátové	4,00
Chitosanové	1,00
Lipozomy	0,00
Škrobové	3,00

Tabulka 46: Supernatanty – žaludeční trávící šťáva

Typ částic	Průměr inhibiční zóny [mm]
Alginátové enkapsulátor	
1% 300 μm	0,00
1% 450 μm	0,00
2% 300 μm	1,00
2% 450 μm	0,00
Chitosanové enkapsulátor	
1% 450 μm	0,00
1% 750 μm	0,00
2% 450 μm	0,00
2% 750 μm	0,00
Manuální	
Alginátové	0,00
Chitosanové	1,00
Lipozomy	0,00
Škrobové	1,00

5.4.3.3. Žlučová trávicí šťáva

Z Tabulek 47 a 48 je vidět, že i žlučová trávicí šťáva způsobila potlačení antimikrobiálního účinku částic a uvolněného lysozymu. Inhibiční zóna se vytvořila pouze u chitosanových částic připravených manuálně, lipozomů a po působení supernatantů z manuálně připravených alginátových a chitosanových částic (Tabulka 47, 48).

Tabulka 47: Částice – žlučová trávicí šťáva

Typ částic	Průměr inhibiční zóny [mm]
Alginátové enkapsulátor	
1% 300 μm	0,00
1% 450 μm	0,00
2% 300 μm	0,00
2% 450 μm	0,00
Chitosanové enkapsulátor	
1% 450 μm	0,00
1% 750 μm	0,00
2% 450 μm	0,00
2% 750 μm	0,00
Manuální	
Alginátové	0,00
Chitosanové	4,00
Lipozomy	1,00
Škrobové	0,00

Tabulka 48: Supernatanty – žlučová trávicí šťáva

Typ částic	Průměr inhibiční zóny [mm]
Alginátové enkapsulátor	
1% 300 μm	0,00
1% 450 μm	0,00
2% 300 μm	0,00
2% 450 μm	0,00
Chitosanové enkapsulátor	
1% 450 μm	0,00
1% 750 μm	0,00
2% 450 μm	0,00
2% 750 μm	0,00
Manuální	
Alginátové	3,00
Chitosanové	1,00
Lipozomy	0,00
Škrobové	0,00

5.5. Aktivita a stabilita volného lysozymu v modelovém prostředí

Součástí testování antimikrobiální aktivity částic bylo i ověření této vlastnosti u čerstvého roztoku lysozymu a po jeho aplikaci do modelových prostředí. Inkubace probíhala podle postupů uvedených v kapitole 4.7.2 a 4.8.2 Výsledky jsou uvedeny v *Tabulkách 49 a 50*.

Tabulka 49: Antimikrobiální test lysozymu

LYSOZYM	Průměr inhibiční zóny [mm]
Čerstvý 1 mg/ml	5,0
Potraviny 7 dní	
Kyselá	4,0
Alkoholová	0,0
Olejová	3,0
Voda	0,0
Potraviny 4 týdny	
Kyselá	4,0
Alkoholová	3,5
Olejová	4,0
Voda	3,5
Trávicí šťávy	
Pankreatická	4,0
Žaludeční	0,0
Žlučová	0,0

Tabulka 50: Antimikrobiální test – kalibrační řada lysozymu

Kalibrační řada c [mg/ml]	Průměr inhibiční zóny [mm]
0,02	0
0,04	0
0,06	0
0,08	3
0,10	4
0,12	4
0,14	3
0,16	4
0,18	4
0,20	4

Vzhledem k tomu, že počáteční koncentrace lysozymu aplikovaná do všech prostředí byla stejná (1 mg/ml), lze pozorovat, že vlivem všech typů modelových prostředí došlo ke zmenšení inhibičního účinku. Degradace samotného lysozymu je pak značně patrná u trávicích šťáv.

Antimikrobiálnímu testu byla podrobena i kalibrační řada lysozymu o rostoucí koncentraci. Při nízkých koncentracích se jeho antimikrobiální účinek neprojevil vůbec. Od koncentrace 0,08 mg/ml se naměřené inhibiční zóny příliš nelišily, ale inhibiční účinek enzymu byl prokazatelný.

Dosažené výsledky potvrzují, že volný lysozym je relativně labilní a enkapsulace může významně ovlivnit jeho využitelnost v organismu. Relativní stabilita volného lysozymu v pankreatické šťávě (*Tabulka 49*) spojená s nízkou odolností některých částic v tomto prostředí (*kapitola 5.5*) je vhodným základem pro vývoj preparátů s cíleným transportem lysozymu.

5.6. Stanovení distribuce velikosti částic

Velikost částic byla analyzována metodou dynamického rozptylu světla. V Tabulce 51 je patrné, že distribuce velikosti manuálně připravených částic se pohybuje ve stovkách až tisících nanometrů. Na základě těchto výsledků lze říci, že u žádných částic nebylo dosaženo přímo nano-rozměrů (pod 100 nm). Nanočástice by mohly být připraveny následnou úpravou připravených částic např. membránovou extruzí nebo jinými metodami přípravy. V případě částic připravených pomocí enkapsulátoru nemohla být jejich velikost z důvodu velkých rozměrů (stovky mikrometrů) měřena pomocí metody DLS, tyto rozměry přesahují detekční limit přístroje. Připravené mikročástice by navíc měly mít cca dvakrát větší velikost než je průměr použité trysky enkapsulátoru [30].

Tabulka 51: Distribuce velikosti částic

Typ částic	Průměrná velikost [nm]	Velikost částic- 1. pík [nm]	Procentuální zastoupení - 1. pík	Velikost částic- 2. pík [nm]	Procentuální zastoupení - 2. pík
Alginátové s lysozymem	158,7	158,7	100,0	0,0	0,0
Alginátové prázdné	819,0	480,5	95,2	5556,5	4,8
Lipozomy s lysozymem	150,7	178,9	95,4	4885,8	4,6
Lipozomy prázdné	141,6	139,1	100,0	0,0	0,0
Chitosanové s lysozymem	235,7	299,4	100,0	0,0	0,0
Chitosanové prázdné	643,6	775,5	76,4	4412,0	16,1
Škrobové s lysozymem	311,8	173,1	85,5	44,2	14,6
Škrobové prázdné	303,1	209,2	78,6	46,9	21,5

5.7. Stanovení stability částic pomocí ζ -potenciálu

V následující tabulce je uvedena hodnota ζ -potenciálu a následně odvozená stabilita částic.

Tabulka 52: ζ -potenciál částic

Typ částic	ζ -potenciál [mV]	Stabilita
Alginátové s lysozymem	-13,4	nestabilní
Alginátové prázdné	-11,3	nestabilní
Lipozomy s lysozymem	-41,2	stabilní
Lipozomy prázdné	-37,0	stabilní
Chitosanové s lysozymem	29,9	nestabilní
Chitosanové prázdné	43,6	stabilní
Škrobové s lysozymem	-12,4	nestabilní
Škrobové prázdné	-13,4	nestabilní

Pro zjištění změn ve stabilitě po enkapsulaci lysozymu byly charakterizovány jak plné, tak i prázdné částice. Změna stability nastala pouze u chitosanových částic, u ostatních enkapsulace stabilitu neovlivnila a hodnoty ζ -potenciálu jsou si velmi podobné. Většina manuálně připravených částic kromě lipozomů a chitosanových částic je spíše nestabilní. Částice z enkapsulátoru nebyly opět pro svou velikost měřeny.

6. ZÁVĚR

Předložená bakalářská práce byla zaměřena na studium přípravy organických nanočástic s enkapsulovaným enzymem lysozymem a jejich charakterizaci v různých typech prostředí. Značnou část práce tvoří testování antimikrobiální aktivity připravených částic. Ověřena byla také antimikrobiální aktivita volného lysozymu.

V teoretické části práce jsou obecně popsány vlastnosti antimikrobiálních peptidů, jejich struktura a využití. Další část byla zaměřena na samotný lysozym, jeho strukturu, vlastnosti, mechanismus účinku a možnosti jeho využití. Dále bylo zmíněno několik metod přípravy částic, včetně nově zaváděné techniky přípravy částic na enkapsulátoru. Protože antimikrobiální testy byly prováděny na bakteriální kultuře *Bacillus subtilis*, je zde také popsána tato grampozitivní nepatogenní bakterie. Součástí teorie je i popis možností testování antimikrobiální aktivity látek.

Praktická část je zaměřena na přípravu jednotlivých typů částic. Další kapitolou experimentální práce je aplikace těchto částic do modelových potravin a sledování dlouhodobé stability. Součástí práce je i inkubace částic a charakterizace změn v modelovém fyziologickém prostředí. Na závěr byl popsán a vyhodnocen antimikrobiální účinek částic čerstvých, po aplikaci do modelových prostředí a rovněž efekt volného lysozymu.

Celkově bylo připraveno 6 typů organických částic, přičemž pomocí enkapsulátoru byly připraveny částice s různou koncentrací alginátu a chitosanu jakožto obalového polysacharidu a s použitím trysky o různém průměru (300 – 750 μm). U každého typu částic byla stanovena enkapsulační účinnost, tj. kolik lysozymu z původního množství lysozymu ve směsi bylo enkapsulováno. Nejlepší enkapsulační účinnost byla stanovena u 1% chitosanových částic, u alginátových manuálně připravených částic a u lipozomů. Nejméně lysozymu se enkapsulovalo do chitosanového obalu manuálně připravených částic. Základní koncentrace lysozymu ve směsích pro tvorbu částic byla vždy 1 mg/ml. Při snaze vytvořit částice s vyšší koncentrací lysozymu (5 mg/ml a 10 mg/ml) nebyly výsledky enkapsulace uspokojivé a některé částice se nepovedlo vytvořit vůbec.

Po zjištění množství enkapsulovaného lysozymu byly částice vloženy do čtyř typů modelových potravin za účelem studia dlouhodobé stability v různém prostředí. Těmi byly 3% kyselina octová, 10% ethanol, emulze olej:voda a prostředí s destilovanou vodou. V intervalech 1 den, 3 dny, 7 dní a 4 týdny bylo stanoveno množství uvolněného lysozymu a vyhodnocena stabilita částic v těchto prostředích. Jako nejméně stabilní se prokázaly manuálně připravené chitosanové částice. V ostatních typech částic došlo buď k uvolnění velmi malého procenta enkapsulovaného enzymu nebo mohlo také dojít k uvolnění značného množství lysozymu, který poté rychle degradoval nebo denaturoval. Tuto skutečnost by bylo případně vhodné ověřit v navazující práci. U lipozomů se enkapsulovaný lysozym uvolňoval zřejmě postupně, tudíž se tyto částice jeví jako nejvíce stabilní a nabízejí se různé možnosti k jejich využití. Prostředím nejvíce ovlivňujícím dlouhodobou stabilitu částic byla 3% kyselina octová následovaná simulantem tukové potravin.

V další části práce bylo provedeno vyhodnocení stability částic po aplikaci do modelového fyziologického prostředí. Fyziologickým prostředím byly tři typy modelových trávicích šťáv – pankreatická, žaludeční a žlučová. Všechna tři prostředí jsou díky svému složení a obsahu rozkládajících látek vůči částicím i lysozymu značně destruktivní. Nejvíce byly částice ovlivněny v prostředí pankreatické trávicí šťávy, kde byla rozložena značná část obalové vrstvy všech typů testovaných částic kromě chitosanových částic připravených

na enkapsulátoru. Chitosanové manuálně připravené částice byly natolik nestabilní, že neodolaly žádnému fyziologickému prostředí a ve všech došlo k jejich plnému rozkladu. Důvodem může být mimo jiné i jejich relativně malý rozměr (cca 200 – 300 nm). Naopak alginátové částice se projeví jako relativně stabilní.

Antimikrobiální testy byly provedeny pomocí diskové plotnové metody na agarové půdě porostlé kulturou *Bacillus subtilis*. Právě na tuto G+ bakterii působí lysozym inhibičně. Důležitou součástí bylo prokázání antimikrobiální aktivity samotného lysozymu. Jeho antimikrobiální efekt se prokázal již u koncentrací pod 0,2 mg/ml. Pro dostatečný účinek pak byla zvolena do částic koncentrace lysozymu 1 mg/ml, který samotný vykazoval inhibiční zónu s průměrem 5 mm. Čerstvě připravené částice s enkapsulovaným lysozymem s výjimkou chitosanových částic z enkapsulátoru, projeví značný antimikrobiální účinek, jenž zhruba odpovídal množství enkapsulovaného enzymu. U chitosanových částic z enkapsulátoru je buď adsorpce lysozymu na chitosan velmi pevná, nebo dojde enkapsulací ke změně jeho struktury, čímž se ztratí jeho antimikrobiální efekt.

Částice byly podrobeny antimikrobiálnímu testu také po aplikaci do modelových potravin, a to po 7 dnech a 4 týdnech. Po 7 dnech byla v některých případech ještě antimikrobiální aktivita prokázána. Po 4 týdnech došlo jak u částic, tak u uvolněného enzymu ke ztrátě jeho antimikrobiální aktivity. Výjimkou jsou lipozomy a manuálně připravené alginátové částice, které mají stabilní strukturu a antimikrobiální aktivita je zachována. Na antimikrobiální působení částic měla nejmenší vliv kyselá modelová potravina. Modelové trávicí šťávy měly na antimikrobiální aktivitu částic také velmi destruktivní vliv, a to u všech částic až na určité výjimky (manuálně připravené částice) i u volného enzymu.

Velikost manuálně připravených částic a jejich stabilita byla ověřena metodou dynamického rozptylu světla. Většinou byla velikost částic stanovena ve stovkách nanometrů. Velikosti pod 100 nm (tj. nano-rozměru) by mohlo být dosaženo úpravou částic například membránovou extruzí nebo jinou volbou metody jejich přípravy. Podle hodnot ζ -potenciálu se ukázaly jako stabilní pouze lipozomy a manuálně připravené chitosanové částice. Stabilita částic by se dala zvýšit např. modifikacemi obalových materiálů.

Lysozym jako antimikrobiální peptid stále otevírá nové možnosti jeho využití a ještě dlouhou dobu bude objektem výzkumu. Enkapsulace lysozymu do různých typů částic může tyto možnosti ještě dále rozšiřovat. Částice s enkapsulovaným lysozymem by bylo možné využít k řízenému uvolňování lysozymu v organismu a k cílenému transportu do střevního traktu, což lze aplikovat v potravinářském průmyslu nebo v jiných oborech. Další směry výzkumu by měly být zaměřeny na optimální kombinaci materiálu částic a jeho stability v různém prostředí tak, aby nedocházelo k nežádoucí degradaci částic v určitém prostředí a naopak aby byl obsah částic uvolněn v prostředí žádoucím při pokud možno co nejvyšším zachování biologické aktivity lysozymu.

7. LITERATURA

- [1] DOLEŽÍLKOVÁ, Ivana, Martina MACKOVÁ a Tomáš MACEK. Antimikrobiální peptidy: Vztah mezi jejich strukturou a antimikrobiální aktivitou. *Chemické Listy*. 2011, č. 105, s. 346-355.
- [2] PHOENIX, David, Sarah R DENNISON a Frederick HARRIS. *Antimicrobial peptides*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH VerlagGmbH& Co. KGaA, 2002. ISBN 9783527652853.
- [3] WANG, Guangshun. *Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic strategies*. Cambridge, MA: CABI, c2010, xvii, 230 p. *Advances in molecular and cellular microbiology*, 18.
- [4] Friedrich C. L., Moyles D., Beveridge T. J., Hancock R. E. W.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2086 (2000).
- [5] POWERS, Jon-Paul S a Robert E.W HANCOCK. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*. 2003, vol. 24, issue 11, s. 1681-1691. DOI: 10.1016/j.peptides.2003.08.023.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196978103003425>
- [6] MARR, A, W GOODERHAM a R HANCOCK. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology*. 2006, vol. 6, issue 5, s. 468-472. DOI: 10.1016/j.coph.2006.04.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471489206001299>
- [7] ANDRÈS, Emmanuel a Jean Luc DIMARCQ. Clinical development of antimicrobial peptides. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2005, vol. 25, issue 5, s. 448-449. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2005.02.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857905000464>
- [8] Lysozyme. In: *Lysozyme* [online]. 2006 [cit. 2014-04-14]. Dostupné z: <http://lysozyme.co.uk/>
- [9] RAU, Astrid. *The crystal structure of a bacterial lysozyme at atomic resolution*. Jena, 2005. Dissertation. Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- [10] FLEMING, A. On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 1922-05-01, roč. 93, č. 653, s. 306-317. ISSN 0962-8452. DOI: 10.1098/rspb.1922.0023. Dostupné z: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspb.1922.0023>
- [11] LAKE, Robert. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. 89G-0393. *Direct Food Substances Affirmed as Generally Recognized as Safe: Egg White Lysozyme*. USA, 1998, 12421-12426. Dostupné z: <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-1998-03-13/html/98-6571.htm>
- [12] LYSOZYME HYDROCHLORIDE. In: *Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* [online]. 1992 [cit. 2014-04-16]. Dostupné z: <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=3398>

- [13] Lysozyme from chicken egg white. In: *SERVA Electrophoresis* [online]. 2007 [cit. 2014-04-16]. Dostupné z: http://www.serva.de/enDE/ProductDetails/592_28262_Lysozyme_from_chicken_egg_white_min_100_000_units_mg_cryst.html
- [14] VODRÁŽKA, Zdeněk, Jan KÁŠ a Pavel RAUCH. *Enzymologie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. ISBN 80-708-0330-4.
- [15] FRARE, Erica, Patrizia POLVERINO DE LAURETO, Jesús ZURDO, Christopher M DOBSON a Angelo FONTANA. A Highly Amyloidogenic Region of Hen Lysozyme. *Journal of Molecular Biology*. 2004, vol. 340, issue 5, s. 1153-1165. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.05.056. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283604006369>
- [16] JANHUBA, Filip. *Antimikrobiální peptidy a možnosti jejich aplikace do potravin*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2012. 69 s. Bakalářská práce. Vedoucí práce Ivana Márová.
- [17] KAPRÁLEK, F. *Fyziologie bakterií*. Praha, Státní pedagogické nakladatelství, 1986.
- [18] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře*. Praha, SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1983.
- [19] Lysozym. In: *Wiki Skripta* [online]. 2013 [cit. 2014-04-17]. Dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Lysozym>
- [20] BRANEN, J. K.; DAVIDSON, P. M. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 90, str.421-433.
- [21] BERMUDER, O.; FORCINITI, D. Decontamination of surfaces by lysozyme encapsulated in reverse micelles. *Journal of Chromatography B*, 2004, 807, str. 95-103
- [22] ZAVADILOVÁ, Šárka. *Antimikrobiální účinky lysozymu*. Zlín, 2006. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Mgr. Leona Čechová, Ph.D.
- [23] SARA J. RISCH, Sara J. editor. Encapsulation and controlled release of food ingredients developer from a symposium sponsored by the Division of Agricultural and Food Chemistry at the 206th national meeting of the American Chemical Society, Chicago, Illinois, August 22-27, 1993. Washington, DC: American Chemical Society, 1995. ISBN 978-084-1215-153.
- [24] PATOČKOVÁ, Klára. *Možnosti enkapsulace kofeinu*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2012. 61 s. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [25] NEDOVIC, Viktor, Ana KALUSEVIC, Verica MANOJLOVIC, Steva LEVIC a Branko BUGARSKI. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* [online]. 2011, vol.1, s. 1806-1815 [cit. 2014-04-20]. DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.265. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211601X11002665>
- [26] WEBSTER, Thomas J. *Safety of nanoparticles: from manufacturing to medical applications*. New York: Springer, c2009, xii, 239 p. ISBN 978-0-387-78607-0.

- [27] ZUIDAM, Nicholas Jan a Viktor NEDOVIĆ. *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*. London: Springer, 2009, x, 400 p. ISBN 14-419-1007-7.
- [28] GRABIELLE-MADELMONT, Cécile, Sylviane LESIEUR a Michel OLLIVON. Characterization of loaded liposomes by size exclusion chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2003, vol. 56, 1-3, s. 189-217. DOI: 10.1016/S0165-022X(03)00059-9. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165022X03000599>
- [29] BÜCHI. *Büchi* [online]. [cit. 2014-04-20]. Dostupné z: www.buchi.com
- [30] BÜCHI. *Návod k použití: Enkapsulátor B-395 Pro*.
- [31] KORVASOVÁ, Zina. *Příprava liposomálních preparátů s protivirovou aktivitou*. Brno, 2006. 77 l. Diplomová práce. Masarykova univerzita v Brně.
- [32] Lecithin Basic information. In: *Chemical Book* [online]. 2008 [cit. 2014-04-23]. Dostupné z: http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB1242041_EN.htm
- [33] MORZYCKI, Jacek W. Recent advances in cholesterol chemistry. *Steroids*. 2014, vol. 83, s. 62-79. DOI: 10.1016/j.steroids.2014.02.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039128X14000361>
- [34] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, xxii, 580 s. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [35] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. 1. české vyd. Praha: Grada, 2012, xiv, 498 s. ISBN 978-802-4729-770.
- [36] *Cholesterol - obávaný i potřebný* [online]. [cit. 2014-04-21]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/cholesterol-obavany-i-potrebnny>
- [37] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. Vyd. 1. Praha: Academia, 1992, 2 v. ISBN 80-200-0438-6.
- [38] CABALLERO, F., M. FORADADA, M. MIÑARRO, P. PÉREZ-LOZANO, E. GARCÍA-MONTOYA, J.R. TICÓ a J.M. SUÑÉ-NEGRE. Characterization of alginate beads loaded with ibuprofen lysine salt and optimization of the preparation method. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014, vol. 460, 1-2, s. 181-188. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.10.034. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517313009290>
- [39] REN, Lu. *Production of Alginate Beads*. Nový Zéland, 2008. Diplomová práce. Massey University, Auckland, New Zealand.
- [40] *Sodium Alginate Food Grade* [online]. [cit. 2014-04-21]. Dostupné z: <http://www.visit-alginate.com/product/sodium-alginate-food-grade>
- [41] MI, Fwu-Long, Hsing-Wen SUNG, Shin-Shing SHYU, Chia-Ching SU a Chih-Kang PENG. Synthesis and characterization of biodegradable TPP/genipin co-crosslinked chitosan gel beads. *Polymer*. 2003, vol. 44, issue 21, s. 6521-6530. DOI: 10.1016/S0032-3861(03)00620-7. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386103006207>

- [42] MI, Fwu-Long, Shin-Shing SHYU, Sung-Tao LEE a Tsung-Bi WONG. Kinetic study of chitosan-tripolyphosphate complex reaction and acid-resistive properties of the chitosan-tripolyphosphate gel beads prepared by in-liquid curing method. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. 1999, vol. 37, issue 14, s. 1551-1564. DOI: [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1099-0488\(19990715](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1099-0488(19990715).
- [43] Chitosan [online]. [cit. 2014-04-21]. Dostupné z: <http://www.gmp-chitosan.com/en/products-services/chitosan.html>
- [44] CORRE, DéborahLe, Julien BRAS a Alain DUFRESNE. Starch Nanoparticles: A Review. *Biomacromolecules*. 2010, vol. 11, issue 5, s. 1139-1153. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/bm901428y>.
- [45] Metody stanovení koncentrace bakterií. Metody určování citlivosti a rezistence bakterií k antibiotikům, chemoterapeutikům a dezinfekčním prostředkům. Průkaz betalaktamáz. In: *Veterinární a farmaceutická univerzita Brno* [online]. [cit. 2014-04-24]. Dostupné z: http://fvl.vfu.cz/sekce_ustavy/infekcni_choroby_mikrobiologie/pedagog/mikrobiologie_p_ro_farmaceuty/praktikum05/index.html
- [46] Bacillus subtilis Final Risk Assessment. In: *United States Environmental Protection Agency* [online]. 1997 [cit. 2014-04-23]. Dostupné z: <http://www.epa.gov/oppt/biotech/pubs/fra/fra009.htm>
- [47] Márová I., Vránová D. : Praktikum z biochemie - pracovní sešit. FCH VUT v Brně, Brno 2002.
- [48] Vyhláška č. 38/2001 Sb. o hygienických požadavcích na výrobky určené pro styk s potravinami a pokrmami. In: 38/2001 Sb. 2001. Dostupné z: <http://www.tzb-info.cz/pravni-predpisy/vyhlaska-c-38-2001-sb-o-hygienickych-pozadavcich-na-vyrobky-urcene-pro-styk-s-potravinami-a-pokrmami.html>
- [49] Český lékopis 2005: doplněk 2006 : (ČL 2005 - Doplněk 2006) : *Pharmacopoea Bohemica MMV: Addendum MMVI : (Ph. B. MMV - ADD. MMVI)*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006, 2 sv. (3255-4995 s.).

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMPAntimikrobiální peptidy

Asp-52*Aspartát-52*

DLSDynamic light scattering (dynamický rozptyl světla)

EDTA.....Ethylenediaminetetraacetic acid (kyselina ethylendiamintetraoctová)

FDAFood and Drug Administration

GEWL.....Goose egg white lysozyme

Glu-35.....*Glutamát-35*

GRASGenerally recognized as safe (Všeobecně považovaný za bezpečný)

HEWLHen egg white lysozyme

JEFCA.....The Joint FAO/WHO Committee on Food Additives (Kontrolní
komise FAO/WHO pro potravinářské přísady)

NMRNuclear magnetic resonance (nukleární magnetická rezonance)

TPPTripolyfosfát sodný

9. SEZNAM PŘÍLOH

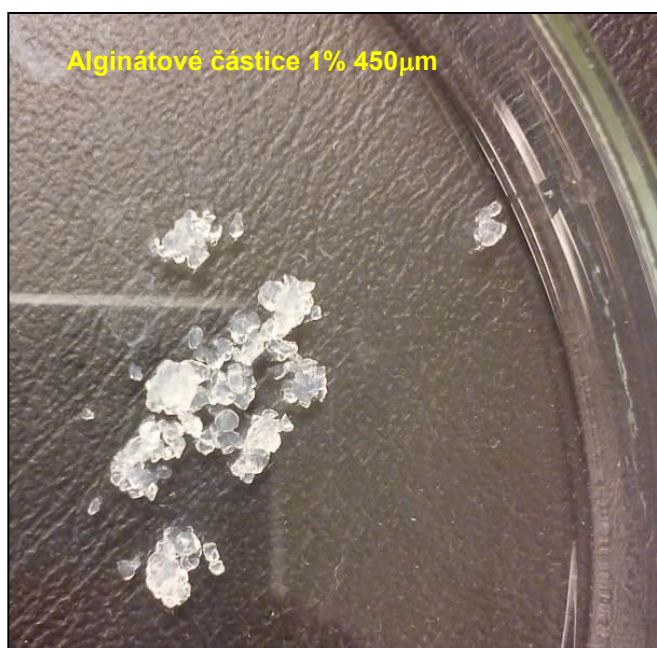
Příloha 1: Ukázky některých čerstvě připravených částic

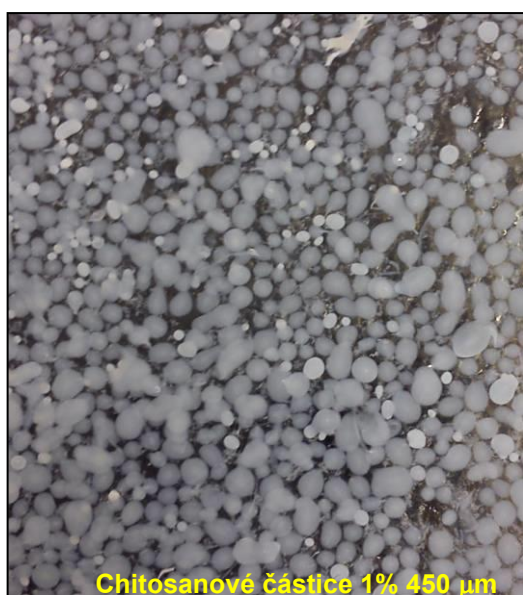
Příloha 2: Použité hodnoty frekvence vibrací a elektrostatické disperze při tvorbě částic na enkapsulátoru.

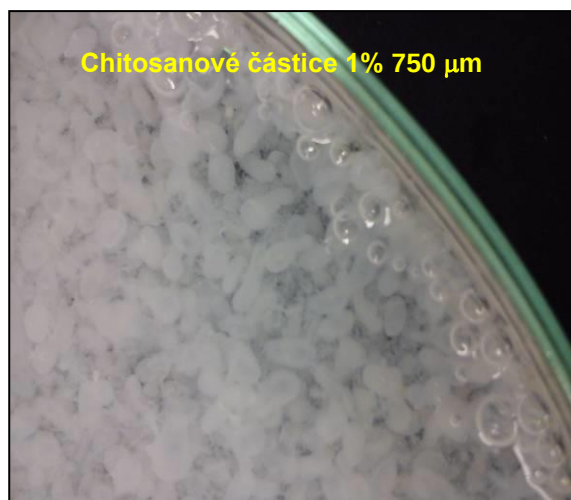
Příloha 3: Vizualizace antimikrobiálního účinku

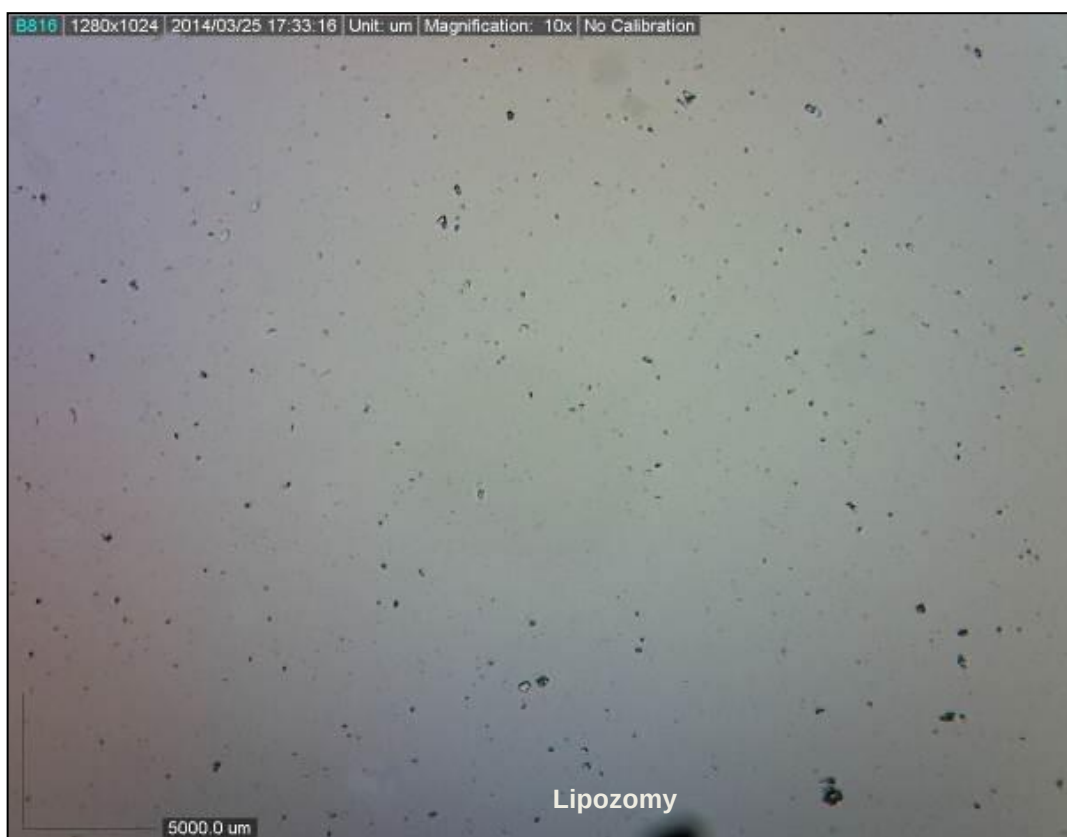
10. PŘÍLOHY

Příloha 1: Ukázky některých čerstvě připravených částic









Příloha 2: Použité hodnoty frekvence vibrací a elektrostatické disperze při tvorbě částic na enkapsulátoru.

Typ částic	Plné částice		Prázdné částice	
Alginátové	Frekvence [Hz]	Elektroda [Hz]	Frekvence [Hz]	Elektroda [Hz]
1% 300 μm	1 500	1 300	1 500	1 100
1% 450 μm	1 000	2 500	1 000	2 500
2% 300 μm	1 500	1 400	1 200	1 800
2% 450 μm	900	2 500	2 900	1 600
Chitosanové				
1% 450 μm	1 500	1 000	2 000	2 500
1% 750 μm	3 500	1 000	2 000	2 500
2% 450 μm	1 500	1 000	1 000	2 000
1% 750 μm	3 500	1 000	1 000	2 500

Příloha 3: Vizualizace antimikrobiálního účinku

