

Příprava emulzí s obsahem rybích olejů

Bc. Lenka Pučálková

Diplomová práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky
akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lenka Pučálková**
Osobní číslo: **T12622**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie a ekonomika výroby tuků, detergentů
a kosmetiky**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Příprava emulzí s obsahem rybích olejů**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. V teoretické části vypracujete literární rešerši na zadané téma. Zaměřte se na složení a vlastnosti rybiho oleje. Charakterizujte disperzní systémy a zaměřte se na emulze jedlých olejů. Shrňte rovněž současný stav problematiky enkapsulace rybích olejů. Dále se věnujte analytickým metodám vhodným pro charakterizaci studovaných systémů.

II. Praktická část

1. V praktické části připravte emulze rybích olejů za pomoci zvolených surfaktantů. Připravené vzorky charakterizujte a určete vliv složení emulzí na jejich vlastnosti, především na velikost částic a stabilitu. Výsledky zpracujte, přehledně uspořádejte a diskutujte.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

BREIVIK, Harald. Long-chain omega-3 specialty oils. Sawston, Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2007. ISBN 978-0-9552512-1-4.

ZUIDAM, Nicolaas Jan and Viktor A. NEDOVIC (Eds.). Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. Springer New York Dordrecht Heidelberg London, 2010. ISBN 978-1-4419-1007-3.

NIELSEN, Nina Skall, Anna Frisenfeldt HORN and Charlotte JASOBSEN. Effect of emulsifier type, pH and iron on oxidative stability of 5% fish oil in water emulsions. European Journal of Lipid Science and Technology, 2013, 115, s. 874-889.

AGHBASHLO, Mortaza, Hossien MOBILI, Ashkan MADADLOU and Shahin RAFIEE. The correlation of wall material composition with flow characteristics and encapsulation behavior of fish oil emulsion. Food Research International, 2012, 49, s. 379-388.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky


Datum zadání diplomové práce:

20. ledna 2015

Termín odevzdání diplomové práce:

18. května 2015

Ve Zlíně dne 20. ledna 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.

děkan




Ing. Martina Černeková, Ph.D.

ředitel ústavu

Příjmení a jméno:PUČÁLKOVÁ.....LENKA.....

Obor:TEV.TDK.....

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně18.5.2014.....

.....Lenka Pučálková.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²¹ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³¹ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá formulací emulzních systémů obsahujících rybí olej. Forma emulzí byla zvolena jako jeden z možných způsobů enkapsulace aktivní látky. Emulze se lišily obsahem olejové fáze, typem a koncentrací stabilizující látky (kaseinát sodný, komplex kaseinátu sodného s dextrans) a hodnotou pH disperzní fáze. Jejich příprava byla provedena pomocí dvou různých zařízení, homogenizátoru Ultraturax a sonikátoru. Charakterizována byla velikost částic a stabilita emulzí. Vlastnosti emulzí se měnily vlivem různých podmínek přípravy.

Klíčová slova: rybí olej, emulze, velikost částic, stabilita, kaseinát sodný, dextran

ABSTRACT

The thesis is focused on the formulation of emulsions containing fish oil. Emulsion form was selected as one of the possible ways to encapsulate active agent. Emulsions differed in concentration of fish oil, type and concentration of wall materials (sodium caseinate, complex of sodium caseinate with dextran) as well as pH of dispersed phase. They were prepared using two different devices, namely homogenizer Ultraturax and sonicator. The particle size and stability of the emulsions were determined. There were significant differences in the emulsion characteristics when the formulations were varied.

Keywords: fish oil, emulsion, particle size, stability, sodium caseinate, dextran

Chtěla bych poděkovat vedoucí své diplomové práce, paní doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc., za předávání znalostí, pomoc a ochotu při vyhledávání informací, čas věnovaný konzultacím a korekci textu, stejně jako za její pozitivní přístup, nadhled a příkladné řešení překážek, které nás posunovaly dál.

Také děkuji svým rodičům, nejlepší kamarádce a příteli za nekonečnou podporu.

Motto: Stáváš se navždy zodpovědným za to, cos k sobě připoutal, jsi zodpovědný za svou rúži.

Antoine de Saint-Exupéry

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	11
TEORETICKÁ ČÁST.....	12
1 TUKY A OLEJE	13
1.1 MASTNÉ KYSELINY	13
1.2 ESENCIÁLNÍ MASTNÉ KYSELINY	14
2 RYBÍ OLEJ.....	16
2.1 ZDROJE RYBÍHO OLEJE.....	16
2.1.1 Ostatní zdroje DHA a EPA	17
2.2 FYZIOLOGICKÉ ÚČINKY MASTNÝCH KYSELIN	17
2.2.1 Eikosanoidy	18
2.2.2 Výživová doporučení	19
2.3 OXIDACE RYBÍHO TUKU.....	19
3 ENKAPSULACE RYBÍHO OLEJE	21
3.1 METODY ENKAPSULACE	21
3.1.1 Fyzikální metody.....	21
3.1.2 Chemické metody.....	22
3.2 PŘÍPRAVA EMULZÍ	23
3.2.1 Faktory ovlivňující velikost částic	24
3.2.2 Příprava emulzí pomocí vybraných zařízení	25
3.2.2.1 Vysokorychlostní homogenizátor	25
3.2.2.2 Ultrazvukový homogenizátor	25
4 NETRADIČNÍ EMULGÁTORY.....	26
4.1 MLÉČNÉ PROTEINY	27
4.1.1 Interakce v kaseinových micelách	28
4.2 DEXTRANY	29
4.3 INTERAKCE PROTEIN-POLYSACHARID.....	30
4.4 FYZIKÁLNÍ STABILITA EMULZÍ.....	31
4.4.1 Mechanismy založené na separaci gravitačních sil.....	32
4.4.2 Mechanismy destabilizace emulzí založené na agregaci částic vnitřní fáze	32
4.4.2.1 Můstková a depleční flokulace	32
5 CHARAKTERIZACE EMULZNÍCH SYSTÉMŮ	34
5.1 CHARAKTERIZACE OLEJOVÉ FÁZE	34
5.1.1 Číslo kyselosti, číslo zmýdelnění a esterové číslo	34
5.1.2 Jodové číslo	34
5.1.3 Peroxidové číslo	34
5.1.4 Thiobarbiturové číslo	35
5.1.5 Stanovení konjugovaných dienů a trienů	35
5.1.6 Stanovení mastných kyselin.....	35
5.2 CHARAKTERIZACE EMULGAČNÍHO ČINIDLA	36
5.3 METODY PRO STANOVENÍ VELIKOSTI EMULZNÍCH ČÁSTIC	36
5.3.1 Dynamický rozptyl světla	36

5.4	METODY SLOUŽÍCÍ K HODNOCENÍ FYZIKÁLNÍ STABILITY	39
5.4.1	Zeta potenciál	39
6	SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY	42
7	CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	44
	PRAKTICKÁ ČÁST	45
8	MATERIÁLY A METODY	46
8.1	MATERIÁLY	46
8.2	PŘÍSTROJE	46
8.3	CHARAKTERIZACE OLEJOVÉ FÁZE	47
8.3.1	Číslo kyselosti a číslo zmydelnění	47
8.3.2	Jodové číslo	48
8.3.3	Peroxidové číslo	48
8.3.4	Stanovení konjugovaných dienů a trienů	48
8.3.5	Plynová chromatografie	48
8.4	CHARAKTERIZACE EMULGÁTORU	49
8.5	PŘÍPRAVA EMULZÍ	49
8.5.1	Emulze stabilizované kaseinátem sodným	49
8.5.2	Emulze stabilizované komplexem kaseinát-dextran	49
8.5.3	Homogenizace emulzí - použití homogenizátoru Ultraturax	50
8.5.4	Homogenizace emulzí - použití sonikačního zařízení	50
8.6	CHARAKTERIZACE EMULZÍ	50
8.6.1	Měření velikosti částic	50
8.6.1.1	Dynamický rozptyl světla	50
8.6.1.2	Mikroskopie	51
8.6.2	Měření ζ -potenciálu	51
8.6.3	Index krémování	51
9	VÝSLEDKY A DISKUZE	52
9.1	CHARAKTERIZACE RYBÍHO OLEJE	52
9.2	POVRCHOVÉ NAPĚTÍ EMULGAČNÍCH ČINIDEL	55
9.3	PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE EMULZÍ	55
9.4	VELIKOST ČÁSTIC	56
9.4.1	Emulze připravené Ultraturaxem	56
9.4.2	Emulze připravené sonikací	57
9.4.2.1	Vliv adjustace pH na velikost částic	59
9.4.2.2	Vliv koncentrace olejové fáze na velikost částic	60
9.4.2.3	Vliv přípravy emulzí na velikost částic	60
9.4.2.4	Vliv typu použitého emulgátoru na velikost částic	63
9.4.3	Stabilita emulzí	63
9.5	MIKROSKOPIE	69
9.6	ZETA POTENCIÁL	70
9.7	INDEX KRÉMOVÁNÍ	74
9.7.1	Emulze připravené pomocí Ultraturaxu	74
9.7.2	Emulze připravené pomocí sonikátoru	77
9.7.3	Komplex kaseinát-dextran	78

ZÁVĚR	81
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	82
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	87
SEZNAM OBRÁZKŮ	88
SEZNAM TABULEK.....	91

ÚVOD

Polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem jsou nezbytné pro správný vývoj organismu. Ve skladbě buněčných membrán mají nezastupitelnou roli týkající se membránové fluidity a flexibility. Unikátní je jejich protizánětlivé působení, prevence proti kardiiovaskulárním chorobám, stejně jako úloha ve výživě.

Polynenasycené mastné kyseliny jsou součástí různých rostlinných olejů. Kyselina eikosa-pentaenová a kyselina dokosahexaenová jsou však významně zastoupeny především v rybích produktech. Možností, jak zvýšit často nedostatečný příjem těchto kyselin, je fortifikace potravin nebo užívání doplňků stravy v podobě koncentrátů. Vzhledem k délce řetězce a počtu dvojných vazeb v řetězci těchto kyselin dochází snadno k jejich oxidaci a tvorbě senzoricky nežádoucích oxidačních produktů. Potřebná stabilita olejů s obsahem nenasycených mastných kyselin proto vychází z vhodně nastavených parametrů jejich enkapsulace. Zachycení oleje do částic zamezí jeho kontaktu s prooxidanty, jako je kyslík, ionty kovu nebo UV záření.

V předložené diplomové práci byla z možných způsobů enkapsulace zvolena emulgace s použitím přírodních emulgátorů proteinové a polysacharidové povahy. Optimální vlastnosti a podmínky fyzikálně-chemické stability emulzí byly sledovány v závislosti na různé koncentraci stabilizující látky (kaseinát sodný), jejím složení (kaseinát a jeho směsi s dextrans), jakož i na obsahu olejové fáze a pH disperzní fáze. Emulze byly charakterizovány měřením velikosti částic, hodnotou ζ -potenciálu a indexem krémování.

TEORETICKÁ ČÁST

1 TUKY A OLEJE

Tuky a oleje patří do strukturně i funkčně nesourodé skupiny lipidů, která může být původu rostlinného i živočišného. Jedná se o deriváty (estery nebo amidy) mastných kyselin o více jak čtyřech atomech uhlíku s alkoholy nebo aminoalkoholy. Společným znakem lipidů je hydrofobní charakter, špatná rozpustnost ve vodě a dobrá rozpustnost v nepolárních organických rozpouštědlech. [1, s. 147]

Biologické funkce lipidů mohou být:

- strukturní, jsou součástí cytoplazmatických membrán a membrán buněčných organel;
- ochranná, např. v tepelné izolaci nebo ochraně neuronů myelinovými pochvami;
- zdroj energie (tuk poskytuje 9 cal/g, zatímco bílkoviny nebo uhlovodíky pouze 4 cal/g) a energetická rezerva, která se uplatňuje prostřednictvím oxidace mastných kyselin;
- vehikulum pro vitamíny rozpustné v tucích;
- zdroj esenciálních mastných kyselin, prekurzorů eikosanoidů;
- syntéza steroidních hormonů a prostaglandinů. [1, s. 147] [2, s. 117-135] [3, s. 499]

1.1 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny (MK) jsou alifatické monokarboxylové kyseliny, které se vyskytují volně nebo vázané esterickou vazbou v triacylglycerolech. Řetězec téměř všech MK je nerozvětvený se sudým počtem atomů uhlíků, neboť vznikají ze dvou uhlíkatých jednotek Acetylkoenzymu A v cytoplazmě. Čím delší je uhlíkový řetězec MK, tím víc převažuje hydrofobní povaha nad hydrofilní, která je představována karboxylovou skupinou molekuly. [1, s. 147] [2, s. 117]

Lipidy, které se v přírodě a v potravinách běžně vyskytují, obsahují skupiny mastných kyselin, které mohou být:

- nasycené (SFA, saturated fatty acid) bez dvojných vazeb;
- monoenoové (MUFA, monounsaturated fatty acid) s jednou dvojnou vazbou;
- polyenoové (PUFA, polyunsaturated fatty acid) s více dvojnými vazbami;
- MK s trojnými vazbami s různými substituenty (alkinové, cyklické, rozvětvené nebo hydroxykyseliny);
- polyenových MK s alespoň jednou dvojnou vazbou v konfiguraci trans. [4, s. 74]

1.2 Esenciální mastné kyseliny

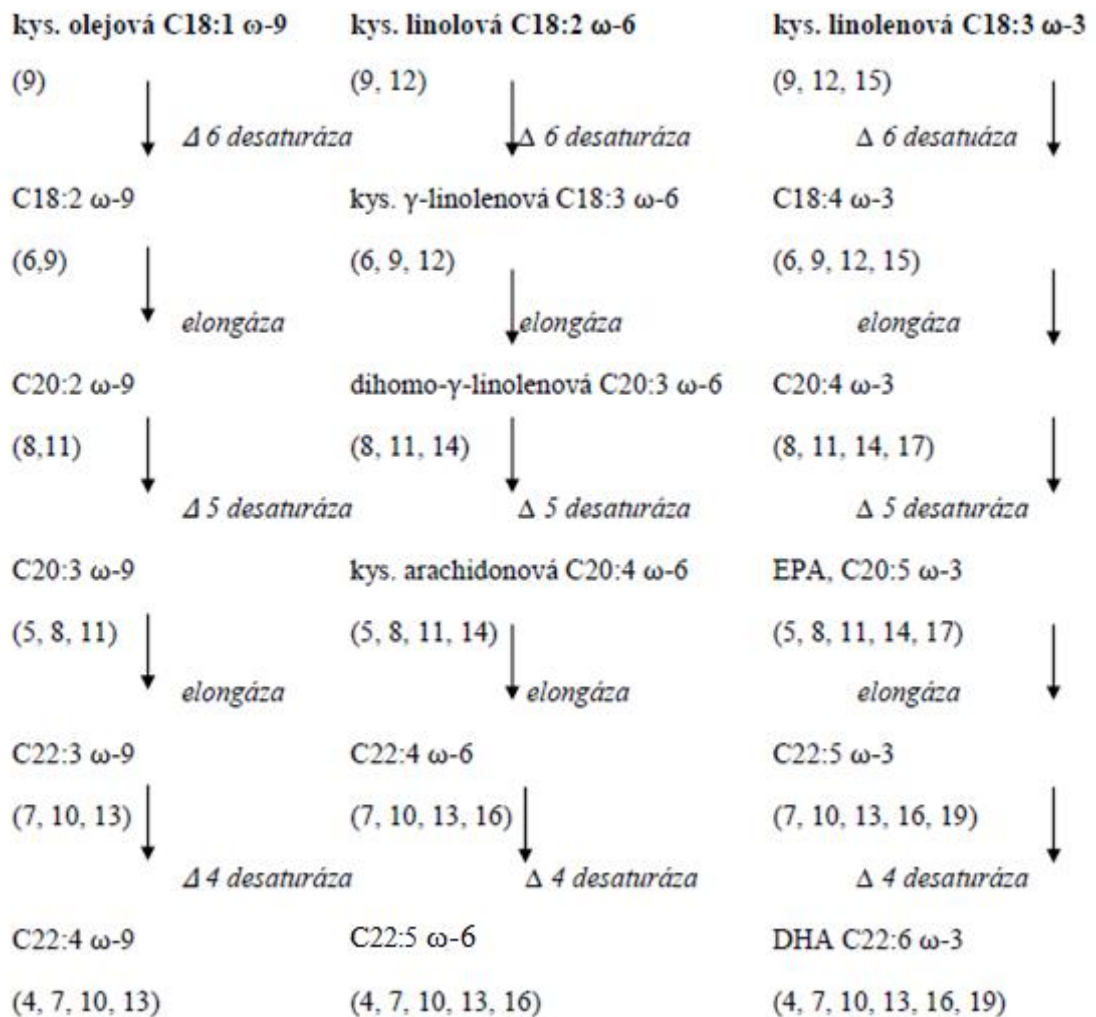
Esenciální mastné kyseliny patří mezi makronutrienty. Jedná se o polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým uhlíkatým řetězcem, resp. s více jak 18 uhlíky (long chain polyunsaturated fatty acid; PUFA-LC). Pro polohu dvojných vazeb je typické 1,4-dienové uspořádání (-CH=CH-CH₂-CH=CH-). Esenciální mastné kyseliny bývají členěny na dvě skupiny, ω -3 a ω -6. Klasifikace s použitím malého řeckého písmene „omega“ je založena na označení polohy první dvojně vazby v řetězci mastné kyseliny od jejího methylového konce. Dřívější názvosloví používalo pro označení polohy této vazby písmeno *n*. [5, s. 4] [6, s. 127]

Důležitost ω -6 MK je známa od 20. let minulého století. Nedostatek kyselin této skupiny (jmenovitě kyseliny linolové, γ -linolenové, k. eikosadienové, k. arachidonové, k. dokosadienové, k. dokosatetraenové a k. dokosapentaenové) je potvrzen sníženým růstem, zvýšenou transepidermální ztrátou vody (TEWL) nebo zhoršeným hojením ran. Později, v 70. letech minulého století, byl shromážděn dostatek informací o nezbytnosti dostatečného příjmu ω -3 MK (tedy kyseliny α -linolenové, k. stearidonové, k. eikosatrienové, k. eiksatetraenové, k. eikosapentaenové, k. dokosapentaenové a k. dokosahexaenové) pro správný vývoj a funkci lidského organismu. [5, s. 10] [6, s. 33]

Esenciální mastné kyseliny si živočichové, na rozdíl od rostlin, neumí syntetizovat a jsou tedy odkázáni na jejich příjem ve stravě. Bohatým zdrojem nenasycených MK jsou rostlinné oleje, především olej sójový, řepkový, olej z lněných nebo chia semínek a vlašské ořechy. Pozornost této práce je směřována na PUFA-LC typu ω -3 a ω -6 vyskytujících se ve významném množství v rybím oleji. Příjem esenciálních MK je podmíněn i příjmem MK s kratším řetězcem. Z těchto prekurzorů v elongačních a desaturačních systémech buňky (mitochondriích, endoplazmatickém retikulu) vznikne prodloužením a/nebo vytvořením dvojně vazby metabolitů původní mastné kyseliny, který se liší délkou a stupněm nenasycenosti. [4, s. 79]

Na Obr. 1 je znázorněna syntéza tří nenasycených mastných kyselin. Kyselina olejová se neřadí mezi esenciální mastné kyseliny a do schématu je přidána pouze pro ilustraci, že mezi výchozími kyselinami dochází k soutěži o enzym $\Delta 6$ desaturázu, která metabolismus těchto mastných kyselin zahajuje. Relativní zastoupení kyselin v potravě rozhoduje o množství jejich metabolitů. Důležitý je především správný poměr metabolitů kyseliny

linolové a linolenové. Jednotlivé metabolity mají i rozdílnou afinitu k enzymu (18:3 > 18:2 > 18:1). [4, s. 79]



Obrázek 1 - Syntéza nenasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem, kde na pravé straně vznikají důležité ω -3 MK - kyselina eikosapentaenová (EPA) a dokosaheptaenová (DHA) [4, s. 79]

Syntéza kyseliny eikosapentaenové na dokosaheptaenové je na Obr. 1 znázorněna jako desaturace $\Delta 4$ desaturázou. Watkins a German vysvětlují úsek této syntézy jako složitější dvojitě prodloužení, desaturaci a β -oxidaci na místo dlouho předpokládané jednokrokové desaturace. Během degradativní β -oxidace v peroxizomech dojde k odstranění dvou uhlíků jedním cyklem oxidace. [7, s. 521]

2 RYBÍ OLEJ

Rybí olej je zároveň označován i jako rybí tuk. Zatímco ostatní tuky živočišného původu (sádlo, lůj či máslo) jsou díky vysokému množství nasycených MK v acylglycerolech, pevné podstaty, rybí tuk je kapalný. Důvodem kapalného skupenství rybích olejů je vysoký obsah polynenasycených MK skupin ω -3, ω -6, ω -9 a dalších jiných polynenasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem. [4, s. 86]

V medicíně byl rybí olej poprvé použit v Anglii koncem 18. století při potížích jako artritida a revmatismus. Na počátku 19. století se začal používat v prevenci proti křivici (rachitis). Mastné kyseliny skupiny „omega“ izolovala ze lnu v roce 1923 dvojice amerických vědců Burr a Evans, kteří je označili jako vitamin F. Další výzkumy prokázaly, že se nejedná o jednu látku, ale o skupinu mastných kyselin s různými účinky. [8, s. 161] [9, s. 20]

2.1 Zdroje rybího oleje

Největší podíl surového rybího oleje je vyráběn jako vedlejší produkt při zpracování rybího masa. Světová produkce rybích olejů je okolo 132 tun ročně, což je pouhé 1 % světové produkce rostlinných olejů a ostatních živočišných tuků. [10, s. 11] [11, s. 84-91]

Rybí maso je snadno stravitelné. Obsahuje vhodné zastoupení MK, pestrou škálu aminokyselin, včetně esenciálních, vitamín D, B₁₂, A a důležité stopové prvky jako Ca, P, I, Fe. [6, s. 157]

Tuk je z ryb získáván filtrací vařených částí, kterou následují purifikační kroky, jako je odstranění volných mastných kyselin, pigmentů a oxidačních produktů. Obsah tuku v rybím mase je proměnlivý a závisí na druhu ryb, věku ryb a na dalších faktorech, například místu jejich výskytu. Podle množství tuku v rybím mase se ryby dělí na libové (málo tučné, s méně jak 2 % tuku ve svalovině), středně tučné (s obsahem tuku 2-10 %) a tučné (s obsahem tuku nad 10 %). Mezi libové ryby se řadí většina treskovitých mořských ryb a sladkovodní štika, candát nebo okoun. Středně tučné ryby jsou například pstruzi, kapři, sumci, lososi nebo platýzovité ryby. Mezi tučné, nutričně významné ryby, patří díky vysokým obsahům ω -3 MK mořští úhoři, sledř, makrela nebo šproty; ze sladkovodních ryb pak tolstobik a peledř. Polynenasycené mastné kyseliny ω -3 jsou vzhledem k celkovému tuku v rybích produktech obsaženy v množství 20-40 %. [6, s. 130-157] [8, s. 163]

Tabulka 1 - Zastoupení vybraných MK v tuku některých ryb a zastoupení stejných MK v léčivém přípravku z tresčího jaterního tuku dostupném v lékárnách [8, s. 163] [12]

MK	Procentuální zastoupení MK [%]				
	Kapr	Tuňák	Makrela	Tresčí jaterní tuk	Léčivý přípravek
linolenová C _{18:3} ω-3	3,0	1,8	2,1	0,2-1,0	0-2,0
linolová C _{18:2} ω-6	8,5	1,7	1,4	1,0-2,0	0,5-3,0
EPA C _{20:5} ω-3	5,3	14,0	7,0	8,0	7,0-16,0
arachidonová C _{22:4} ω-6	4,0	1,8	1,4	-	-
DHA C _{22:6} ω-6	1,7	14,8	9,4	6,0-17,0	6,0-18,0

Ryby přijímají kyselinu linolenovou z planktonu. Ta je výše popsány kroky enzymaticky přeměněna na kyselinu EPA a DHA. [8, s. 163]

2.1.1 Ostatní zdroje DHA a EPA

Červené maso je po rybách druhým největším zdrojem nenasycených mastných kyselin EPA a DHA. Množství závisí na zvoleném krmivu hospodářských zvířat. Oleje obsahující DHA (nikoliv EPA) se dnes také získávají snadno kontrolovatelnou produkcí jednobuněčných mikroorganismů, konkrétně *Cryptocodinium cohnii*, *Schyzochytrium sp.* a pravděpodobně i *Ulkenia sp.* [11, s. 7-8]

2.2 Fyziologické účinky mastných kyselin

Mastné kyseliny, především PUFA-LC, jsou významné v celé řadě biologických procesů. Esenciální polynenasycené mastné kyseliny jsou prekurzory eikosanoidů (leukotrienů, prostaglandinů, tromboxanů a dalších) se schopností měnit hladiny eikosanoidů v těle a zasahovat do procesů zánětlivých a imunitních reakcí. [13, s. 539]

Po přijetí stravou jsou MK transportovány z tenkého střeva prostřednictvím chylomikronů k adypocytům a svalovým buňkám, kde jsou inkorporovány do struktury fosfolipidů buněčných membrán. Hrají klíčovou roli v membránové fluiditě a flexibilitě, v metabolismu a kontrole genové exprese. Koncentrace a rychlost metabolismu MK jsou faktory, které kontrolují množství eikosanoidů uvolněných buňkou. [13, s. 548]

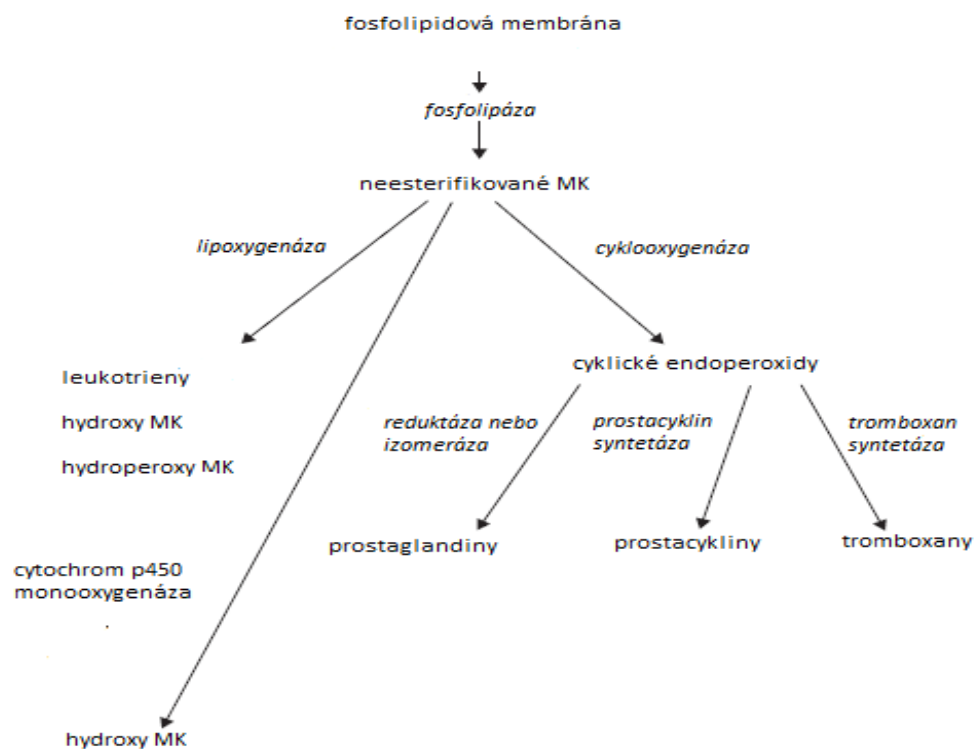
Úloha PUFA-LC je posuzována v souvislosti s léčbou a prevencí řady nemocí a poruch zdraví, především kardiovaskulárních chorob a regulaci nervového systému, dále také duševních nemocí, deprese, schizofrenie, poruchy pozornosti a demence. Zapojení PUFA-LC

do membránových procesů a přenosů signálu je důležité právě pro mozek, jehož tkáň je tvořena velkým podílem lipidů, především kyselin eikosanové a arachidonové. Pokud dochází k změnám v lipidovém složení mozku, může být rozvinuta řada patologických stavů, zejména Alzheimerova choroba. [9, s. 20-21]

Přítomností PUFA v buněčných membránách je zvýšená fluidita a zvýšená činnost membránových mediátorů, jež rychleji přenáší signál mezi neurony. Fluidita podporuje synaptickou plasticitu, která má vliv na paměť, učení a další kognitivní procesy. Klusáčková a Skumalová z Ústavu lékařské chemie a biochemie v Praze dokazují na myších experimentech vliv PUFA ω -3 na membránové receptory, iontové kanály, enzymy a expresi genů na transkripční úrovni. [14, s. 182]

2.2.1 Eikosanoidy

Eikosanoidy jsou širokou skupinou cyklických derivátů esenciálních mastných kyselin, které mají potenciální biologickou aktivitu. Tyto dvacetí uhlíkaté sloučeniny mají většinou velmi krátký život (měřeno ve vteřinách). Jedná se o jeden z několika množných způsobů, kterým je možné ovlivnit imunitní systém stravou. [13, s. 539]



Obrázek 2 - Enzymatické reakce, které předcházejí vzniku eikosanoidů

[13, s. 540]

Mezi eikosanoidy se řadí prostanoidy a leukotrieny. Prostanoidy lze dále členit na prostaglandiny, prostacykliny a tromboxany. Prostaglandiny vznikají ve dvou hlavních řadách, které se označují písmenem E nebo F a číslem referujícím o umístění dvojné vazby. Například prostaglandiny odvozené z EPA jsou označeny E₃ nebo F_{3α}. Tromboxany způsobují agregaci krevních destiček a podílejí se na zúžení cév. Velké množství tromboxanů vede k nadměrné srážlivosti krve, vzniku trombů, nahromadění tukových látek ve stěnách tepen, což posléze může vyústit v onemocnění aterosklerózou, infarkt myokardu nebo mrtvici. Leukotrieny jsou necyklické mediátory řady zánětlivých reakcí (např. anafylaxe). [13, s. 541]

2.2.2 Výživová doporučení

Poměr příjmu ω -3 a ω -6 MK v běžné stravě není obvykle vyrovnaný. Optimální poměr je variabilní v různých životních etapách, zvýšený například v období růstu. Růst vyžaduje nové buňky, buněčné membrány, jejichž stavební jednotkou jsou fosfolipidy, pro které je EPA a DHA nezbytná. Názory na příjem PUFA-LC a poměr ω -6 : ω -3, který ovlivňuje inkorporaci těchto lipidů mezi fosfolipidy, se různí i v odborných kruzích. Podle aktuálního výživového doporučení pro obyvatele ČR, by měl být zachován poměr ω -6 : ω -3 maximálně 5 : 1. Denní příjem kyseliny eikosapentaenové i dokosaheptaenové pro dospělého by měl být okolo 180-500 mg při prevenci srdečních chorob a až do 1 000 mg za účelem mírnění mentálních onemocnění. [8, s. 164] [15]

2.3 Oxidace rybího tuku

Polynenasycené MK s dlouhým řetězcem jsou vysoce náchylné k oxidaci. Degradativní oxidace radikálovým mechanismem je jeden z hlavních důvodů zhoršení organoleptických a nutričních vlastností. Proces bývá iniciován faktory jako je teplo, UV záření nebo stopová množství oxidů kovů, která jsou v malém množství v surovém produktu vždy přítomna. [8, s. 164]

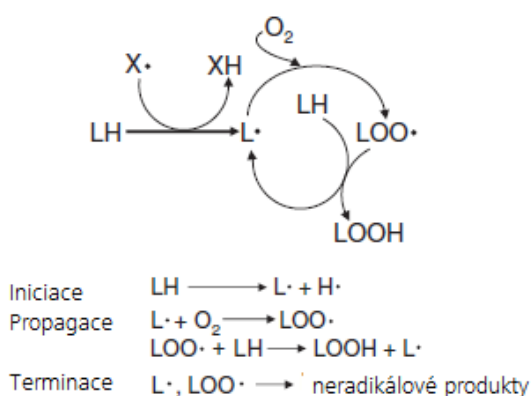
Klíčovou roli během první části oxidace (iniciace) hraje radikál X· vznikající teplem, světlem nebo jiným oxidačním faktorem. Ten masné kyselině odejme atom vodíku a přemění ji na reaktivní volný radikál L·, jež poskytne s molekulou O₂ peroxylový radikál LOO·, který při nepřítomnosti antioxidantů odebere atom vodíku další MK. Tímto postupem vzniká primární produkt oxidace - hydroperoxid (LOOH) a nový lipidový radikál (L·), kte-

rý může iniciovat další proces oxidace (Obr. 3). Reakce probíhá mírným tempem, které se zrychluje s množstvím vznikajících sekundárních oxidačních produktů. [8, s. 166]

Proces je ukončen reakcí radikálu s antioxidantem nebo s druhým radikálem za vzniku stabilních molekulových produktů. Princip oxidace je podobný jak v rybí svalovině, tak v rybím oleji během jeho zpracování a skladování. Lipidové radikály jsou v rybí svalovině tvořeny v důsledku poklesu pH, které nastane po usmrcení ryby. Prooxidanty, jako jsou stopová množství nízkomolekulárního železa a jiných kovových iontů, které jsou v surovém rybím oleji obsaženy, se postupně odstraňují v procesech rafinace. [1, s. 150] [10, s. 22-23]

Primární produkty oxidace jsou sensoricky neutrální. Následným homolytickým a heterolytickým štěpením z nich vznikají sekundární oxidační produkty (aldehydy, ketony, alkoholy a další). Tyto těkavé sloučeniny mají extrémně nízký práh zápachu, což znamená výrazný uživatelský problém. [10, s. 22]

Enzymatická oxidace je katalyzovaná enzymy jako *lipoxygenáza*. Tento železo obsahující enzym je situován v buňkách cytosolu různých tkání. Běžnou metodou k zachování oxidační stability u rybích tuků je přidání antioxidantů. Nabízí se využití rozsáhlého množství antioxidantů, tokoferoly, askorbylpalmitát, syntetický butylhydroxyanisol a další. [10, s. 20]



Obrázek 3 - Fáze lipooxidace [8, s. 166]

3 ENKAPSULACE RYBÍHO OLEJE

Enkapsulace je proces, při kterém dochází k zachycení aktivních látek do částic. Rybí olej bývá enkapsulován s cílem omezit vznik a průběh oxidace, ke které jsou PUFA-LC obsažené v oleji náchylné. Enkapsulací je možno předejít kontaktu oleje s kyslíkem, s ionty kovů nebo světlem. Enkapsulovány mohou být rovněž těkavé látky, které se projevují nepříjemnými sensorickými vlastnostmi. [8, s. 167]

Velikost kapsulí se pohybuje v rozmezí milimetrů, v případě mikrokapsulí pak v rozmezí mikrometrů. Vznikající systémy se skládají z jádra – vnitřního materiálu, který obsahuje jednu či více aktivních látek a z vnější obalové vrstvy tvořené polymerem nebo kombinací polymerů, které s vnitřní částí nereagují a jsou přednostně biodegradabilní a netoxické. Pro stabilizaci kapsulí lze použít i jiné materiály, jako například klasické povrchově aktivní látky komerčního typu nebo fosfolipidy. [16] [17, s. 125-126]

3.1 Metody enkapsulace

Výběr vhodné technologie pro enkapsulaci závisí na charakteru produktu, do kterého má být enkapsulovaný olej dodán. Za účelem enkapsulace byla vyvinuta řada fyzikálních a chemických procesů. Může být použito i více metod, které na sebe navazují a doplňují se. Mezi požadavky, kterým by měl výsledný enkapsulát vyhovovat, patří kvalita, absence sensoricky nepříjemných vlastností, zdravotní výhody jako obsah a vhodný poměr aktivní látky, stabilita během skladování, biodegradabilita použitých ingrediencí a cena výrobního procesu. [8, s. 167-168, 180]

3.1.1 Fyzikální metody

Nejstarší a běžně používanou přípravou kapsulí je *sprejové sušení (spray – drying)*. Principem metody je zanesení emulze o/v, obsahující stabilizující materiál (protein, sacharid, arabská guma, pektin, modifikovaný škrob nebo celulóza) rozpuštěný ve vodné fázi, do horkého vzduchu nebo dusíku. Odpařením vodné fáze vznikne suchý prášek. Nevýhodou tohoto postupu je vysoká teplota, která může vyvolat degradaci enkapsulované látky, v případě lipidů tedy oxidaci. Mimo to má prášek získaný sprejovým sušením porézní strukturu, díky které má kyslík k oleji snadný přístup. [8, s. 168-169]

Principem dalších postupů, jako *vstřikování taveniny (melt injection)* a *vytlačování taveniny (melt extrusion)* je roztavení směsi stabilizujících látek při teplotě nad 100 °C, které jsou

smíchány s vodou a olejem. V chladicí vaně naplněné organickým rozpouštědlem (isopropanol, tekutý dusík) je směs v krystalickém stavu chlazená a promývána terpeny, které odstraní z povrchu částic přítomný olej. Poté jsou částice sušeny. [8, s. 169-170]

Teploty pod hodnotami trojného bodu vody využívá *lyofilizace (freeze drying)*, kdy jsou enkapsulovaná látka a stabilizující materiál rozpuštěny ve vodě a vymrazeny do suché, porézní struktury. Do receptury jsou zahrnuty tzv. kryoprotektivní látky, kterými mohou být mléčné proteiny nebo sacharidy. Nevýhodou metody je vysoká energetická náročnost, neboť se pracuje při teplotách mezi $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$, dále poměrně dlouhá doba procesu a otevřená struktura vzniklých kapsulí. Technologie *vakuového sušení (vacuum drying)* je ve způsobu provedení podobná lyofilizaci, je ovšem rychlejší a levnější, jelikož se pracuje při teplotách nad bodem mrazu. [8, s. 22]

Stále více rozšířenou metodou enkapsulace je *formulace emulzí* jako nosičů rybího oleje, který je tímto způsobem chráněn před oxidací. Během emulgace dochází působením síly na fázovém rozhraní k vytvoření malých kapek oleje ve vodě a k adsorpci povrchově aktivní látky. Například primární emulze, kde je použit ionický emulgátor, může být dále stabilizována opačně nabitým elektrolytem, čímž vznikne sekundární emulze s dvěma mezifázovými vrstvami. Opakováním procesu může pak vzniknout násobná emulze s několika mezifázovými vrstvami. [8, s. 14] [10, s. 20-21] [18, s. 305]

3.1.2 Chemické metody

Jedním z mnoha chemických postupů enkapsulace může být *komplexace enkapsulované látky s cyklodextriny*. Tyto cyklické oligosacharidy vznikají spojením 6-8 glukózových jednotek do kruhu. Princip enkapsulace spočívá ve vytvoření komplexu cyklodextrin-PUFA. Proces zahrnuje míchání oleje s dextriny ve vodě (v dusíkové atmosféře) bez přítomnosti světla při $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 hodin. Ze vzniklé pasty je odstraněn přebytek vody sušením při $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu až 48 hodin. [8, s. 171-172]

Zachycování enkapsulované látky uvnitř vodných fází vezikul využívají *lipozomy*. Nejčastějšími membránovými lipidy lipozomů jsou fosfolipidy (lecitin) nebo cholesterol. Lipozomy vznikají dispergováním těchto lipidů ve vodné fázi za vysokých smykových rychlostí. Na jejich vzniku se podílejí hydrofilně-lipofilní interakce lipidů a molekul vody. Nevýhodou této metody je nízká stabilita lipozomů. [8, s. 20-21]

Koacervace neboli *tvoreni komplexu koacervátů* je reverzibilní postup, během něhož je emulze, která obsahuje stabilizující látky polymerní povahy, rozdělena na dvě fáze vlivem měnících se fyzikálních podmínek. Snížením pH dojde k rozdělení disperze na fázi bohatou na polymery a fázi s nízkým počtem polymerů, přičemž se polymery vysráží na mezi-fázovém povrchu olejových kapek. V případě zvýšení pH se polymery zpětně rozpustí. Běžně se využívá dvou a více polymerů s opačným nábojem, ale je možné pracovat i s jediným polymerem při tzv. jednoduché koacervaci [8, s. 172]

3.2 Příprava emulzí

Emulze jsou koloidní soustavy s kapalným disperzním prostředím (vnější fáze) a kapalnou dispergovanou fází (vnitřní fáze). Velikost dispergovaných částic je obvykle v rozsahu 100 až 1 000 nm. Emulze s většími disperzními částicemi mají mléčné zbarvení a jsou nestabilní se sklonem koalescenci. Dalším typem emulzí jsou mikroemulze, které mají velikost částic od 10-100 nm, jsou termodynamicky stabilní a čiré. Nanoemulze jsou pak transparentní až semitransparentní systémy, stabilní pouze kineticky, s částicemi velkými 50-200 nm. [19, s. 15]

Emulze zřídka vznikají přirozenou emulgací, tedy smícháním dvou kapalin, mezi nimiž je dostatečně malé mezipovrchové napětí. Častěji je nutné systém stabilizovat přidávkem emulgátoru, povrchově aktivní látky nebo vysokomolekulárního lyofilního koloidu či jemnými nerozpustnými práškovými materiály, a to za mechanického dispergování (míchání, vibrace, působení ultrazvuku, protřepávání). Emulgace se často provádí dvojstupňově. Výsledkem primární emulgace je hrubá emulze s velkými částicemi dispergované fáze, které jsou během sekundární emulgace upraveny. Druhý krok je označován jako homogenizace. Částice dispergované fáze zaujímají kulovitý tvar, ve kterém dosahují nejmenšího poměru plochy k objemu. [20, s. 42-43] [21, s. 139]

Z principů termodynamiky vyplývá, že pokud dojde ke zvýšení plochy povrchu olej-voda o ΔA , potřebná práce (změna volné energie) činí (Rov. 1):

$$\Delta G = \gamma \cdot \Delta A \quad (1)$$

kde γ je povrchové napětí. Dejme tomu, že je potřeba připravit emulzi o/v s obsahem 10 obj. % oleje, která obsahuje kapky o stejné velikosti s poloměrem 1 mm, za použití emulgátoru, který sníží povrchové napětí na $\gamma \sim 5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Z termodynamiky je možno odhadnout, že teoretická práce, která je spojená s tvorbou nového rozhraní, odpovídá

$\Delta G = 10^3 \text{ J}\cdot\text{m}^{-3}$. V praxi je však skutečné množství práce, kterou je potřeba vykonat, řádově $10^6 \text{ J}\cdot\text{m}^{-3}$, tedy tisíckrát větší. Důvodem velkého rozdílu je skutečnost, že malé emulzní kapky mají velmi zakřivená rozhraní a rozpad větších kapek na menší vyžaduje působení optimálně velké síly potřebné k překonání mezifázových sil, které drží větší kapky pohromadě. Pokud je potřeba rozbít kapku o poloměru a , je k tomu potřeba vnější tlakový gradient, který působí proti Laplaceovu tlaku Δp , o velikosti (Rov. 2):

$$\Delta p/a = 2\gamma/a^2 \quad (2)$$

tedy tlakový gradient řádově $10^{10} \text{ Pa}\cdot\text{m}^{-1}$. Smykové síly, potřebné k dosažení takto vysokého, lokálního tlakového gradientu, jsou během homogenizace generovány pomocí intenzivního laminárního proudění (smyková a tahová deformace) a/nebo setrvačnými účinky (turbulence a kavitace). [22, s. 1474]

3.2.1 Faktory ovlivňující velikost částic

Velikost částic emulze ovlivňuje řadu jejích vlastností, např. stabilitu emulze, vzhled, texturu či chuť (v případě potravinářského výrobku). Hlavní parametry ovlivňující velikost částic je typ a koncentrace emulgátoru. Pro koncentraci emulgátoru existuje kritická koncentrace c^* , která ve vodném roztoku plně pokryje kapky emulze. Čím menší kapky během homogenizace vzniknou, tím je větší jejich celkový povrch. Jakmile velikost kapek poklesne pod určitou hodnotu, je překročen maximální povrch, který je daný emulgátor schopen pokrýt. Kapky nepokryté kompletně mají sklon ke shlukování do větších celků. Minimální velikost stabilních kapek je dána vztahem (Rov. 3):

$$d_{min} = \frac{6\Gamma_{sat}\Phi}{c_e} \quad (3)$$

kde Γ_{sat} je povrchová koncentrace emulgátoru při nasycení, Φ je objem kontinuální fáze a c_e koncentrace emulgátoru. Pro polydisperzní systém d_{min} znamená průměr částice se středním poměrem plochy k objemu, tzv. Sauterův průměr. [21, s. 68, 141]

Zmenšení částic lze dosáhnout navýšením koncentrace emulgátoru nebo snížením koncentrace emulgovaných částic. Pokud není v systému dostatečná koncentrace emulgátoru, velikost kapek se řídí touto koncentrací a není ovlivněna množstvím energie dodané homogenizátorem. Naopak pokud je emulgátoru více, než je potřeba ke kompletnímu pokrytí povrchu kapek, velikost částic se odvíjí od energie dodané homogenizátorem a emulgátor může vytvářet násobnou vrstvu ($\Gamma > \Gamma_{sat}$). [23, s. 307-308]

Velikost kapek je možné zmenšit prostřednictvím intenzity nebo doby působení rozrušujících sil homogenizátoru. Při konkrétních homogenizačních podmínkách lze dosáhnout určité minimální velikosti kapek, která se již dále nemění ani opakovanou prodlouženou homogenizací. [23, s. 306-307]

3.2.2 Příprava emulzí pomocí vybraných zařízení

Za účelem efektivní přípravy emulzí jsou využívána míchadla (rámová, křížová, kotvová, atd.), statické mixéry, vysokorychlostní mixéry jako Ultraturax, koloidní mlýny, vysokotlaké homogenizátory nebo ultrazvukové generátory. V praktické části této práce jsou pro přípravu emulzí použity dva typy zařízení, a to Ultraturax a ultrazvukový homogenizátor. [23, s. 120]

3.2.2.1 Vysokorychlostní homogenizátor

Ultraturax je vysokorychlostní homogenizátor, který funguje na principu rotor-stator. Dispergační hlava mixéru samočinně axiálně nasává zpracovávané médium a radiálně jej vytlačuje bočními štěrbinami. Emulze je zatěžována značnými stříhovými a smykovými silami. V mezeře mezi rotorem a státorem dochází k turbulenci a optimálnímu promíchávání emulze. Účinnost zařízení je závislá na smykovém gradientu a době pohybu částice ve smykovém poli. Prodloužení doby zpracování nemá na velikost částic velký vliv, zatímco značně zvýší teplotu, což může připravovanou emulzí významně destabilizovat v souvislosti s vlastnostmi emulgátoru, např. tepelnou stabilitou proteinů nebo iniciací oxidace tuků, který v počátečních fázích emulgace není dostatečně pokryt emulgátorem. [21, s. 141-142]

3.2.2.2 Ultrazvukový homogenizátor

Ultrazvukové homogenizátory vytvářejí ultrazvukové pole o vysoké intenzitě a amplitudě, které je přenášeno pomocí sondy do kapaliny. Sonikační zařízení dodává zpracovávanému médium sílu potřebnou k rozptýlení kapalně dispergované fáze na malé kapičky v kapalném disperzním prostředí. V místě ponoření sondy vzniká disperzní zóna, v níž podtlakem následovaný prudkým vyrovnáváním tlaků vznikají kavitační bubliny, které poté implozivně praskají. Bubliny indukují vlny v okolní kapalině, v důsledku kterých se vytvoří kapalně proudy o velmi vysoké rychlosti. Emulgační a stabilizující přísady brání shlukování nově vzniklých kapek emulze a přispívají k zachování stejné velikosti částic od jejich vzniku v disperzní zóně. [21, s. 145] [24]

4 NETRADIČNÍ EMULGÁTORY

Emulgace je energeticky náročný proces, který může být usnadněn přidáním emulgátoru, jež sníží mezifázového napětí γ . Množství emulgátoru potřebné ke zmenšení velikosti částic závisí na jeho koncentraci ve vnější fázi. Gibbsova adsorpční izoterma vyjadřuje tuto závislost mezifázového napětí na koncentraci adsorbující složky rovnicí (Rov. 4):

$$-d\gamma = RT\Gamma d\ln a \quad (4)$$

kde R je plynová konstanta, T absolutní teplota a Γ přebytečné množství látky na fázovém rozhraní. Velikost mezifázového napětí závisí na charakteru použitého oleje a emulgátoru. Emulgátory s menšími molekulami (např. neionické emulgátory) sníží γ více než polymerní emulgátory. [18, s. 306]

Povrchově aktivní látky lze rozdělit podle řady kritérií. Mezi běžné rozdělení patří klasifikace podle přítomnosti a typu náboje (anionické, kationické, amfoterní a neionické) nebo podle hodnoty HLB, hydrofilně-lipofilní rovnováhy (emulgátory, smáčedla, detergenty, solubilizátory). [21, s. 72]

Cílem této práce je podívat se na povrchově aktivní látky z hlediska jejich původu a zaměřit se na emulgační vlastnosti přírodních látek. Běžně používanými potravinářskými emulgačními činidly jsou proteiny obsažené v mléce, vaječném bílku nebo sóji. Stejně jako ostatní emulgátory, mají amfifilní charakter, což znamená, že jejich molekula má hydrofobní a hydrofilní část. Rozpustnost proteinů ve vodném roztoku souvisí s jejich aminokyselínovým složením a solvatačním obalem, tzv. vrstvou iontů a molekul vody, mezi nimiž působí elektrostatické síly. [22, s. 1473]

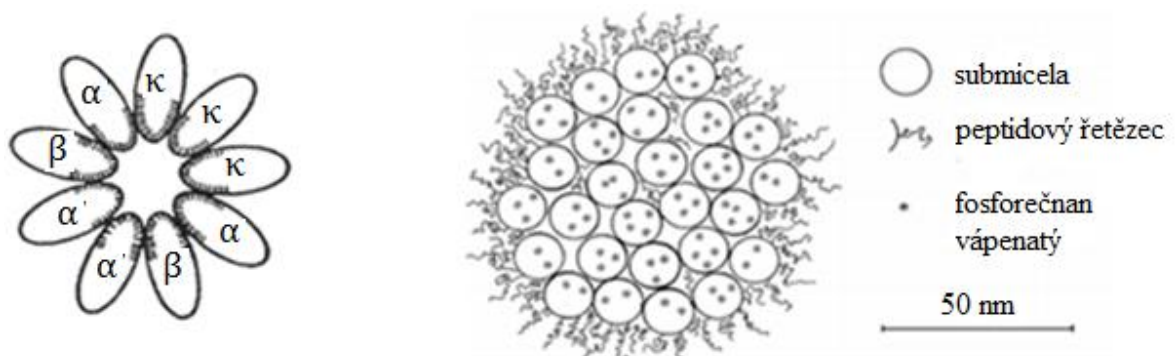
Široce používanými potravinářskými emulgátory jsou rovněž polysacharidy typu modifikovaných škrobů, modifikované celulózy, arabská guma, některé druhy pektinu, dextriny, chitosan a další. Povrchová aktivita těchto hydrokoloidů je dána nepolárním charakterem chemických skupin navázaných na hydrofilní polysacharidový řetězec (v hydrofobně modifikovaném škrobu/celulóze) nebo přítomností proteinové složky spojené kovalentní nebo fyzikální vazbou s polysacharidem (některé gummy, pektiny). Přírodní emulgátory použité v této práci jsou podrobněji rozebrány dále v textu. [22, s. 1473]

4.1 Mléčné proteiny

Mléčné proteiny jsou obsaženy v kravském mléce v množství okolo 3,2 %. Čtyři pětiny proteinů připadají na kasein, zbylá pětina jsou sérové globulární bílkoviny. Kaseinové bílkoviny jsou komplexem fosfoproteinů, které se rozdělují do čtyř základních frakcí: α_{S1} , α_{S2} , β , κ a na deriváty těchto frakcí. Dvě hlavní kaseinové frakce, α_{S1} a β kasein, jsou zřetelně amfifilní se silnou tendencí adsorbovat na rozhraní oleje a vody a stabilizovat emulze o/v. Mimo emulgační schopnosti mají mléčné proteiny schopnost tvořit film na povrchu částic, produkovat pěnu, ovlivňovat viskozitu a tvořit gelovité struktury. [25, s. 227-228] [26, s. 438-439]

Kaseiny jsou v mléce uspořádány do tzv. submicel po cca 25-30 molekulách. Příčný řez typickou submicelou znázorňuje levá část na Obr. 4. Nepolární část molekuly je orientována dovnitř submicely a polární části - fosfoserinové zbytky α_s a β kaseinů a treoninový zbytek s oligosacharidem v molekule κ kaseinu reagují s Ca^{2+} ionty a vodou. [27, s. 228]

Prostřednictvím fosfoserinových zbytků α_s a β kaseinů (κ kasein nemá vazebnou oblast) s vápenatými ionty nebo prostřednictvím volných fosfátů a citrátů se submicely spojují do větších koloidních částic, micel (pravá část Obr 4.). Mimo zhruba 20 000 molekul kaseinu obsahuje každá micela také anorganické sloučeniny, a to především fosforečnan vápenatý. Její velikost je průměrně 50-300 nm. [4, s. 46] [28, s. 12]



Obrázek 4 – Příčný řez submicelou (hydrofobní část molekuly je vyznačena čárkovaně) a strukturu kaseinové micely [4, s. 46] [27, s. 12]

Mléčné kaseinové koncentráty jsou využívány pro své funkční, nutriční nebo emulgační vlastnosti. Vyrábí se z kyselého kaseinu, který vznikne srážením odstředěného mléka fermentací laktosy bakteriemi mléčného kvašení nebo přidáním kyseliny mléčné. [25, s. 228]

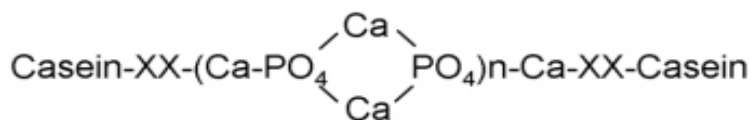
Jelikož je kyselý kasein nerozpustný ve vodě, není v potravinářských produktech přímo využitelný. Z toho důvodu se nechává reagovat se silnou alkálií, kdy vzniká téměř neutrální proteinový produkt - kaseinát, jehož typ je určen použitou zásadou. Reakcí kyselého kaseinu a roztoku NaOH (na hodnotu pH 6,8) vzniká kaseinát sodný. Kaseinát sodný je ze všech druhů kaseinátů nejvíce rozpustný ve vodě. Vyšší rozpustnost (i viskozita) je dána vyšším obsahem sodíku. Vysušený kaseinát sodný tvoří ve vodě viskózní disperzi jantarové barvy. [28]

4.1.1 Interakce v kaseinových micelách

Primární roli z hlediska stability proteinu mají hydrofobní interakce. Principem těchto interakcí je snaha nepolárních částí molekul dosáhnout energeticky výhodného stavu spojením s ostatními nepolárními částmi molekul podobného aminokyselinového složení. Opačné části molekuly s hydrofilním charakterem brání ve vytvoření čím dál většího hydrofobního jádra kaseinové submicely. [27, s. 14]

Elektrostatické odpuzování je rozhodující pro správné sbalování kaseinových agregátů. Tato síla je dána povrchovým nábojem kaseinu. Náboj může být ovlivněn úpravou pH nebo chemickou reakcí, například konverzí pozitivně nabitých lysinových zbytků na neutrálně nebo záporně nabitě deriváty. Zvýšený negativní náboj proteinu sníží tendenci kaseinových molekul k agregaci. [27, s. 15]

Integrita kaseinových micel je zabezpečena esterovou vazbou hydrofilní fosfátové skupiny kaseinu s anorganickým fosfátem vápenatým za vzniku koloidního fosforečnanu vápenatého, jak je vidět na Obr. 5. [27, s. 15]



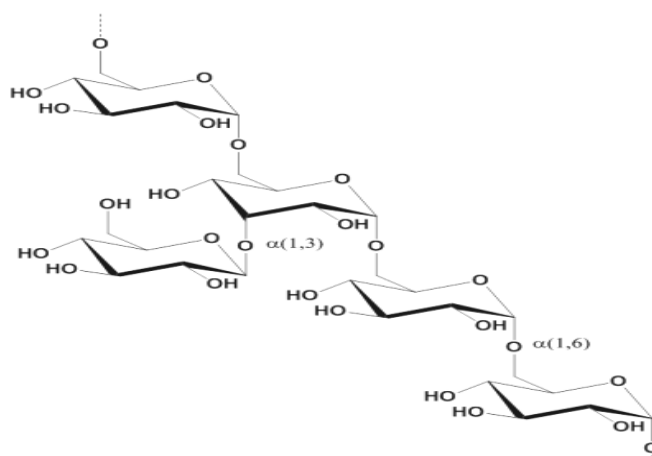
XX= **fosfoserinová skupina nebo karboxylát**

Obrázek 5 - Vazba koloidního fosfátu vápenatého
[27, s. 16]

Stabilita kaseinových micel, jejich seskupování a odlučování, jsou určovány teplotou, přítomností dalších látek v disperzním prostředí (zvláště chelatačních činidel schopných vázat vápenaté ionty), tlakem nebo pH roztoku. Díky nepřítomnosti terciální struktury kaseinu je jeho odolnost vůči zahřívání vyšší než u jiných proteinů. K vysrážení kaseinu dochází při teplotě 125 °C při zahřívání po dobu více jak 1 hodinu. Za daleko mírnějších podmínek však dochází k odštěpení peptidových řetězců a zvětšování kaseinových micel. [27, s. 16-20] [29, s. 16]

4.2 Dextrany

Dextrany patří do skupiny hydrokoloidů. Jsou to větvené, exogenní bakteriální polysacharidy, produkty fermentace sacharózy bakterií *Leuconostoc mesenteriodes*. Jedná se o α -D-glukany (základní stavební jednotkou je glukóza) s α -(1 \rightarrow 6) glykosidickou vazbou a postranními řetězci navázanými po každých 10-12 glukózových jednotkách α -(1 \rightarrow 3) glykosidickou vazbou. [30, s. 298]



Obrázek 6 - Fragment dextranové struktury [30, s. 299]

Pro dextrany je charakteristická široká distribuce molekulových hmotností, a to od 1 000 g/mol do 2 000 000 g/mol. Dextranové frakce jsou snadno rozpustné ve vodě, ve které tvoří čirý, transparentní roztok. Na rozpustnost nemá vliv pH roztoku. Dextranový prášek i rozpuštěný dextran je vysoce biokompatibilní, biodegradabilní a stabilní. Hydrolyzované a frakciované části dextranu se používají v řadě intravenózních přípravků. Osmotický tlak je srovnatelný s tlakem lidské plazmy. Díky své velké molekulové hmotnosti dextran neprostupuje cévní stěnou, udržuje krevní tlak, dokáže stabilizovat krevní erythrocyty a zabraňovat intravaskulární agregaci krevních buněk. [30, s. 298]

Jako hydrokoloidy v potravinářském průmyslu se dextransy využívají především z důvodu úpravy reologických vlastností. Vnitřní viskozita $[\eta]$ souvisí s molekulovou hmotností M dle uvedeného vztahu (Rov. 5) v rozsahu molekulových hmotností 20 000-200 000 g/mol.

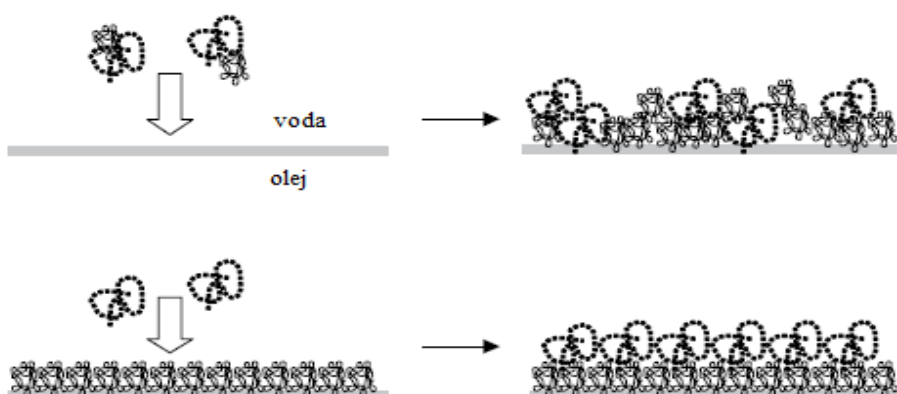
$$[\eta] = 10^{-3}M^{1/2} \quad (5)$$

4.3 Interakce protein-polysacharid

Komplex proteinu s polysacharidy je chápán jako společné funkční emulgační činidlo a stabilizátor. Obě látky se mohou spojovat prostřednictvím kovalentní vazby nebo elektrostatických interakcí. Kovalentní vazby mezi proteinem a polysacharidem lze dosáhnout enzymaticky nebo chemickou reakcí. [22, s. 1478-1480]

Zdaleka nejvhodnější metodou přípravy komplexu se zdá být sušení směsi obou biopolymerů. Konjugace vyvolaná suchým teplem trvale zlepšuje rozpustnost proteinů za méně příznivých podmínek (nízké pH roztoku, vysoká iontová síla) a zvyšuje emulgační vlastnosti. Vzniklý konjugát má silnější povrchově aktivní vlastnosti a kritické koncentrace c^* je dosaženo při nižší objemové koncentraci látek. Vzhledem k rozložení kovalentně vázaného polysacharidu je adsorbovaný protein chráněn proti destabilizaci vlivem okolního prostředí. Velikost a hydrofilita polysacharidových skupin v komplexu způsobuje dlouhý dosah strérického odpuzování mezi kapkami emulze (viz. dále), ve které je takový komplex použit. [22, s. 1478-1480]

Při praktickém použití komplexu protein-polysacharid hraje roli způsob přípravy emulze společně s dalšími faktory jako pH, stérická stabilita a struktura mezifázové vrstvy komplexu. V zásadě se rozlišují dva způsoby formulace, které jsou znázorněny na Obr. 7. V prvním případě je připraven směsný roztok obou polymerů, který slouží během homogenizace jako jediné emulgační činidlo. Komplex adsorbuje na rozhraní současně. V druhém případě je emulze připravena pouze s proteinem a následně smíchána s roztokem polysacharidu. Polysacharid adsorbuje na protein, na němž vytvoří druhou stabilizující vrstvu. [22, s. 1479-1480]

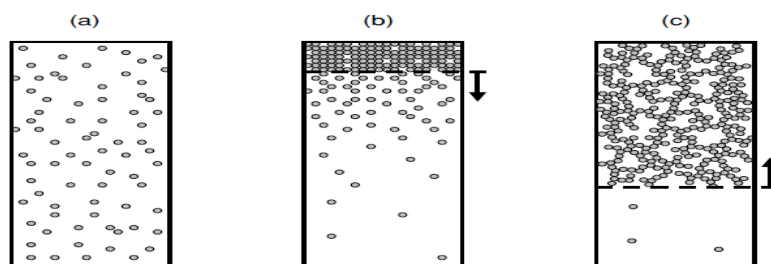


Obrázek 7 - Alternativní způsoby uspořádání vrstvy, která se skládá z komplexu protein-polysacharid na rozhraní vody a oleje [22, s. 1479]

Oba uvedené postupy lze využít při přípravě léčiv či doplňků stravy s emulzní povahou, kde hydrokoloidy slouží jako vehikula žádaných enkapsulovaných látek. V případě vícevrstvých enkapsulací jsou zadržovaný protein a aktivní látka ve vnitřní fázi dobře chráněny proti enzymatické degradaci během trávení. [22, s. 1479-1480]

4.4 Fyzikální stabilita emulzí

Fyzikální stabilitu emulzí je možné hodnotit z hlediska termodynamického a kinetického. Termodynamická stabilita souvisí s pravděpodobností, zda dojde k rozpadu emulze či nikoliv. Obecně jsou emulze agregátně nestálé s přebytkem volnou energií na fázovém rozhraní. Kinetická stabilita je pak vyjádřena rychlostí rozpadu emulze. V podkapitolách jsou uvedeny hlavní faktory nestability emulzí, které se mohou vzájemně podmiňovat. [19, s. 24-25]



Obrázek 8 - Možné distribuce částic v emulzi: (a) stabilní emulze; (b) krémující emulze, kde částice nejsou agregovány; (c) separující se emulze, kde částice agregují. Šipkami je znázorněn směr pohybu viditelné hranice koncentrovanou a zředěnou částí [31, s. 530]

4.4.1 Mechanismy založené na separaci gravitačních sil

Separace na základě gravitačních sil je řízena Stokesovým zákonem (Rov. 6):

$$v = \frac{2}{9} \frac{\rho_1 - \rho_2}{\eta} g \cdot a^2 \quad (6)$$

kde v značí rychlost sedimentace, ρ_1 a ρ_2 hustotu vnitřní a vnější fáze, g je gravitační zrychlení, a poloměr kulovitých částic dispergované fáze a η viskozita kontinuální fáze. Krémováním se rozumí shromažďování dispergovaných částic s nižší hustotou v horní části systému. Opačným dějem je sedimentace, kdy částice s vyšší hustotou než disperzní prostředí sedimentují směrem dolů. Rychlost sedimentace stabilní soustavy by měla být co nejnižší ($v \rightarrow 0$). Zákon je platný pro monodisperzní systém, kde jsou částice stejně velké. V reálném systému je nutné počítat s odchylkami. [32, s. 231]

4.4.2 Mechanismy destabilizace emulzí založené na agregaci částic vnitřní fáze

Během již zmiňovaného děje, koalescence, vytvoří dvě a více kapek novou kapku o větším průměru. Tento jev může přispívat ke gravitační separaci emulze. Rychlost koalescence závisí také na kvalitě stabilizujícího filmu vytvořeného kolem částice. [22, s. 1424] [32, s. 231]

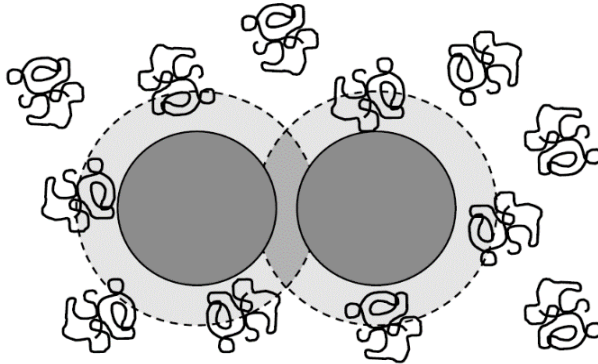
Při flokulaci dochází k agregaci částic do větších celků, avšak jejich individualita zůstává zachována. Ve zředěných emulzích urychluje flokulace gravitační separaci nebo může způsobit zvýšení viskozity. Ke koalescenci a flokulaci dochází při nedostatečném množství emulgátoru, který by kompletně pokryl celý povrch emulzních kapek. [22, s. 1424] [32, s. 231]

4.4.2.1 Můstková a depleční flokulace

V souvislosti s polymery o vysoké molekulové hmotnosti, které jsou použity jako stérické stabilizátory v emulzích, se často hovoří o tzv. můstkové flokulaci. Při můstkové flokulaci dochází k přemostění lyofobních částic makromolekulou. Dlouhá makromolekula se současně absorbuje na povrchu několika částic a přitahuje je k sobě. [33, s. 470]

Při tzv. depleční flokulaci nastává situace, kdy velké molekuly polysacharidu nejsou schopny obklopit kapku emulze v místě styku dvou přiléhajících kapek. Tloušťka této depleční vrstvy je přibližně stejně velká jako poloměr zbotnalé polysacharidové molekuly. Z tohoto prostoru mezi částicemi jsou makromolekuly vypuzovány, takže mezera mezi

povrchy částic obsahuje pouze disperzní prostředí. Mezi povrchy částic se tak mohou uplatnit přitažlivé van der Waalsovy síly, které jsou příčinou dalšího přibližování částic. [31, s. 526]



Obrázek 9 - Emulzní kapky (tmavě) obklopené depleční vrstvou (světle) [31, s. 526]

5 CHARAKTERIZACE EMULZNÍCH SYSTÉMŮ

Cílem této práce bylo studovat emulzní systémy, kdy emulgace byla zvolena jako jedna z možností enkapsulace rybího oleje. V rámci práce byla provedena charakterizace jak olejové fáze a emulgátoru, tak připravených emulzí.

5.1 Charakterizace olejové fáze

Stanovení fyzikálních a chemických konstant tuků spočívá v jednoduchých zkouškách, které slouží k rámcovému popisu stavu daného tuku či oleje. Mezi fyzikální konstanty se řadí bod tání, bod tuhnutí nebo bod skápnutí. Mezi nejběžnější chemické konstanty patří číslo kyselosti, číslo zmydelnění, jodové číslo, hydroxylové číslo, anisidinové číslo. Způsoby provedení uvádí české technické normy - třída 58 03 pro tuky živočišného původu nebo návody v Českém lékopise. [34] [47]

5.1.1 Číslo kyselosti, číslo zmydelnění a esterové číslo

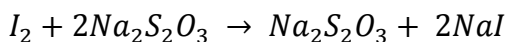
Číslo kyselosti využívá odměrného roztoku hydroxidu draselného k neutralizaci volných mastných kyselin v 1 gramu tuku. Výsledek je vyjádřen v mg KOH, stejně jako číslo zmydelnění, které za odlišných podmínek výpočtu slouží k určení zneutralizovaných mastných kyselin a zmydelnění jejich esterů. Rozdílem čísla zmydelnění a čísla kyselosti se získá esterové číslo, které značí množství esterově vázaných MK. Vynásobením esterového čísla faktorem 0,547 se získá množství glycerolu vázaného v tuku. [36, s. 40]

5.1.2 Jodové číslo

Jodovým číslem je míněno procentuální množství halogenu, přepočteno na jód, navázaného na tuk. Principem je adice známého množství halogenu na dvojně vazby polynenasycených mastných kyselin v tuku. Nezreagovaný jód je stanoven titrací thiosíranem. [36, s. 39]

5.1.3 Peroxidové číslo

Peroxidové číslo představuje množství primárních oxidačních produktů. Principem zkoušky je redukce hydroperoxidové skupiny jodidovými ionty. Množství uvolněného jódu, které je zjištěno titrací standardizovaným roztokem thiosíranu sodného, je úměrné koncentraci přítomných hydroperoxidů. Průběh reakce znázorňují chemické rovnice (Rov. 7). Jako indikátor reakce se používá škrobový maz. [35, s. 390]



5.1.4 Thiobarbiturové číslo

Thiobarbiturové číslo je nejčastěji používaná hodnota pro zjištění přítomného množství sekundárních oxidačních produktů. Během zkoušky reaguje kyselina 2-thiobarbiturová s oxidačním produktem, malondialdehydem, za vzniku růžového zbarvení, které je hodnoceno spektrofotometricky. [35, s. 323-324]

5.1.5 Stanovení konjugovaných dienu a trienů

Během oxidace PUFA-LC dochází při vzniku hydroperoxidů k posunům dvojných vazeb a z původně izolovaných dvojných vazeb vzniká konjugovaný systém. Konjugované systémy jsou silnými UV chromofory, které se stanovují spektrofotometricky při absorpčních maximech 233 nm pro konjugované dieny a při 268 nm pro konjugované trieny. [35, s. 391]

5.1.6 Stanovení mastných kyselin

Ke kvalitativnímu a kvantitativnímu zjištění přítomných mastných kyselin ve vzorku tuku se využívá separačních metod, jako je plynová chromatografie (GC), kapalinová chromatografie (HPLC) nebo tenkovrstvá chromatografie (TLC). Metodami lze rovněž zjišťovat minoritní složky tuku (např. steroly, tokoferoly) nebo oxidační produkty. [36, s. 45]

Předmětem zájmu této práce je stanovení podílu MK na plynovém chromatografu. Principem separace je rozdělení analyzovaného vzorku mezi dvě fáze, mobilní a stacionární. V případě plynové chromatografie je mobilní fází nosný plyn. Jelikož je metoda vhodná pro těkavé látky, musí být nejprve mastné kyseliny z triacylglycerolů převedeny na těkavé metylestery. Analyzovaný vzorek se zavede nástřikem do injektoru, ve kterém je odpařen a unášen v plynném stavu do kolony, kde je separován na jednotlivé složky. Tyto složky jsou kolonou zadržovány dle afinity, kterou mají ke stacionární části. V pořadí rostoucích distribučních konstant, složky vystupují z kolony a vstupují do detektoru, který registruje jejich koncentraci. Jedním z běžně používaných detektorů je plamenoionizační FID detektor, ve kterém je vzorek spálen plamenem vodíku a převeden na ionty a volné elektrony. Měřitelný tok elektrického proudu vytvořený z nabitých částic je stanoven detekčními elektrodami. [36, s. 44-46]

5.2 Charakterizace emulgačního činidla

Primární vlastností emulgátoru je hromadit se na rozhraní dvou fází a snižovat mezi nimi povrchové napětí. Ke stanovení povrchového napětí se běžně využívá metoda odtrhávání Wilhelmyho destičky nebo Du Noého prstence. Tenká měřicí destička je během stanovení smáčena studovanou kapalinou, přičemž tvar a výška menisků tvořících se z obou stran je dána Laplaceovou-Youngovou rovnicí. Pro velmi tenkou destičku ($t \ll 1$, $\theta = 90^\circ$) platí (Rov. 8):

$$F_{max} = 2l\gamma \quad (8)$$

kde l je délka destičky a γ je mezifázové napětí. V tomto případě je navozen stav úplného smáčení a povrch použité destičky musí být naprosto čistý. Pohybuje-li se fázové rozhraní vzhledem k destičce směrem dolů, roste síla působící na destičku a v okamžiku před odtržením dosahuje maxima (F_{max}). [37]

Další metody mohou být založeny na určování zvýšení hladiny kapaliny v kapiláře (metoda kapilární elevace), na určování tvaru kapky (metoda přisedlé a visící kapky), vážení kapek (stalagmometrická metoda) nebo měření maximálního přetlaku v kapce. U kapalin, jejichž povrchové vrstvy jsou výrazně nerovnovážné, jsou využívány dynamické metody, jako například rozptyl světla nebo pozorování kapilárního vlnění na fázovém rozhraní. [37]

5.3 Metody pro stanovení velikosti emulzních částic

Mezi standardní techniky charakterizace enkapsulovaných systémů patří měření velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla či mikroskopického pozorování, které podávají informace o velikosti, distribuci velikostí a struktuře mikrokapsulí. [8, s. 179]

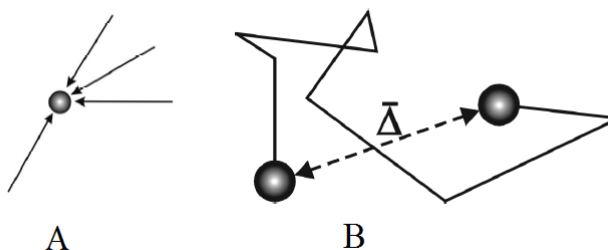
5.3.1 Dynamický rozptyl světla

K posouzení formulace a stability emulzních systémů je běžně využíváno měření velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla (dynamic light scattering DLS nebo také fotonová korelační spektroskopie). Metoda je založena na měření fluktuace intenzity rozptýleného světla, které prochází vzorkem emulze, jejíž kapky podléhají Brownovu pohybu. Tento koloidní pohyb částic, který působí proti gravitaci, je důsledkem nárazů disperzního prostředí, kdy se částice vzájemně vychylují jiným směrem, jak znázorňuje Obr. 10 A. Pohyb je intenzivnější s vyšší teplotou a menší velikostí částic. Při velikost okolo 4 μm Brownův pohyb ustává. [18, s. 304] [20, s. 10-11]

Projevem Brownova pohybu je difúze, kde je hnací silou rozdílný chemický potenciál difundující látky. Směr difúze je směr koncentračního gradientu, tedy pohyb z prostředí o vyšší koncentraci do prostředí o koncentraci nižší. Vzdálenost, kterou částice v daném čase vlivem Brownova pohybu urazí, se nazývá střední posuv částice $\bar{\Delta}$ (Obr. 10 B) a je definována rovnicí (Rov. 9), kterou odvodili Einstein a Smoluchowski:

$$\bar{\Delta} = \sqrt{\frac{kT\Delta t}{3\pi\eta a}} \quad (9)$$

kde k je Boltzmannova konstanta, T je termodynamická teplota, Δt je vzdálenost, η je viskozita prostředí a a je poloměr sféricky symetrické částice.



Obrázek 10 - Nárazy molekul disperzního prostředí na koloidní částici (A) a střední posun částice (B)
[20, s. 10,11]

Rychlost Brownova pohybu je vyjádřena parametrem zvaným translační difúzní koeficient, označovaným D [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]. Na difúzní koeficient u malých částic může mít vliv řada faktorů, jako je pH, teplota, interakce mezi dalšími molekulami či iontová síla prostředí.
[20, s. 10-11] [38, s. 41]

Velikost částice je pomocí DLS stanovena na základě Stokes-Einsteinovy rovnice (Rov. 10) z translačního difúzního koeficientu D , jako její hydrodynamický průměr d_H . Ten je aproximací skutečného tvaru na kulovitý tvar, který odpovídá poloměru, při kterém by taková koule vykazovala identický difúzní koeficient, jako daná částice.

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (10)$$

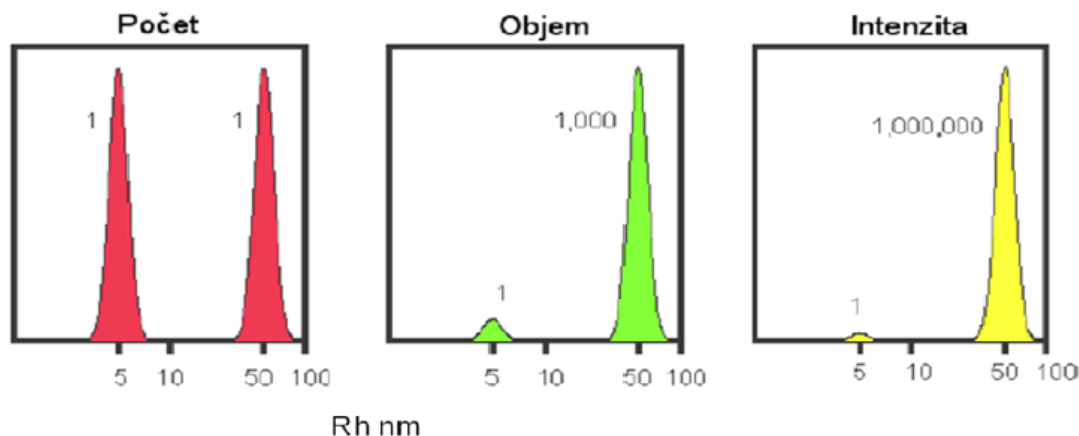
Význam symbolů je uveden výše. Koherentní a monochromatický laserový paprsek, který slouží jako zdroj světla při DLS, v kombinaci s vhodným detektorem dokáže stanovit

množství rozptýlených fotonů, čímž přesně změří intenzitu světla rozptýleného částicemi v emulzi. [38, s. 34-41]

Změny intenzity rozptýleného světla částicemi lze matematicky zpracovat pomocí tzv. autokorelační funkce, ze které je řadou algoritmů možné získat informace o velikosti částic. Jedním ze způsobů zpracování je proložení částic, tzv. „z-average“ (z-průměr) a zohlednění šířky distribuce (PDI, polydispersity index). Druhým možným postupem je proložení multiexponenciální funkce, pomocí které lze charakterizovat vzorky částic s bimodální a multimodální distribucí. Distribuce velikosti částic je vyjádřena graficky jako závislost relativní intenzity světla rozptýleného částicemi různých velikostí a označuje se jako „distribuce intenzity“. Tuto distribuci je možno s použitím Mieho teorie převést na distribuci objemu. Teoreticky lze distribuci objemu dále převést na distribuci počtu; tento postup se však nevyužívá, protože je zatížen velkou chybou. [38, s. 34-41]

Obsahuje-li vzorek velké a malé částice, větší částice rozptylují světlo mnohem více, než částice malé a jejich příspěvek k celkové intenzitě rozptýleného světla vzorkem je silně nadhodnocen. Proto je lepší jejich zastoupení vyjadřovat pomocí distribuce objemu. Obrázek 11 znázorňuje vlivy velikosti částic na jednotlivé typy vyjádření distribuce podle počtu, objemu a intenzity. Pokud např. vzorek obsahuje stejný počet částic o velikosti 5 a 50 nm, pak při vynesení podle počtu částic je výsledkem graf se 2 píky v poměru 1 : 1. Pokud převedeme data na distribuci podle objemu je poměr píků malých a velkých částic 1 : 1 000 (objem kulovitých částic odpovídá $\frac{4}{3}\pi(d/2)^3$ a je v poměru třetích mocnin). Převedením na distribuci podle intenzity pak získáme píky v poměru 1 : 1 000 000. Důvodem je aproximace podle Rayleigha, podle které je intenzita světla rozptýleného částicemi úměrná šesté mocnině průměru částice. [38, s. 34-41]

Jelikož složitější systémy nejsou perfektně monodisperzní, množství rozptýleného světla je analyzováno pro polydisperzní systém a výsledek je vyjádřen jako průměrná velikost částic s indexem polydispersity (PDI), který vyjadřuje odchylku průměrné velikosti. [38, s. 34-41]



Obrázek 11 - Srovnání distribucí velikostí částic podle počtu, objemu a intenzity ve vzorku s částicemi 5 a 50 nm v poměru 1 : 1 [38, s. 41]

5.4 Metody sloužící k hodnocení fyzikální stability

Koloidní stabilita emulzních systémů může být hodnocena z hlediska sterickej a elektrostatickej stabilizace. Jednoduchá sterickej stabilizace (sterickej odpuzování) spočívá v adsorpci polymeru na povrchu částic a prevenci kontaktu vnějších stran částic. Elektrostatickej stabilizace vychází z reverzibilních interakcí v důsledku rozložení náboje v systému a je úměrná koncentraci přítomných iontů. Zeta potenciál (ζ -potenciál) je velmi dobrým ukazatelem míry vzájemného působení mezi koloidními částicemi a měření ζ -potenciálu je běžně uplatňováno ke stanovení stability koloidních systémů. [39, s. 4-5]

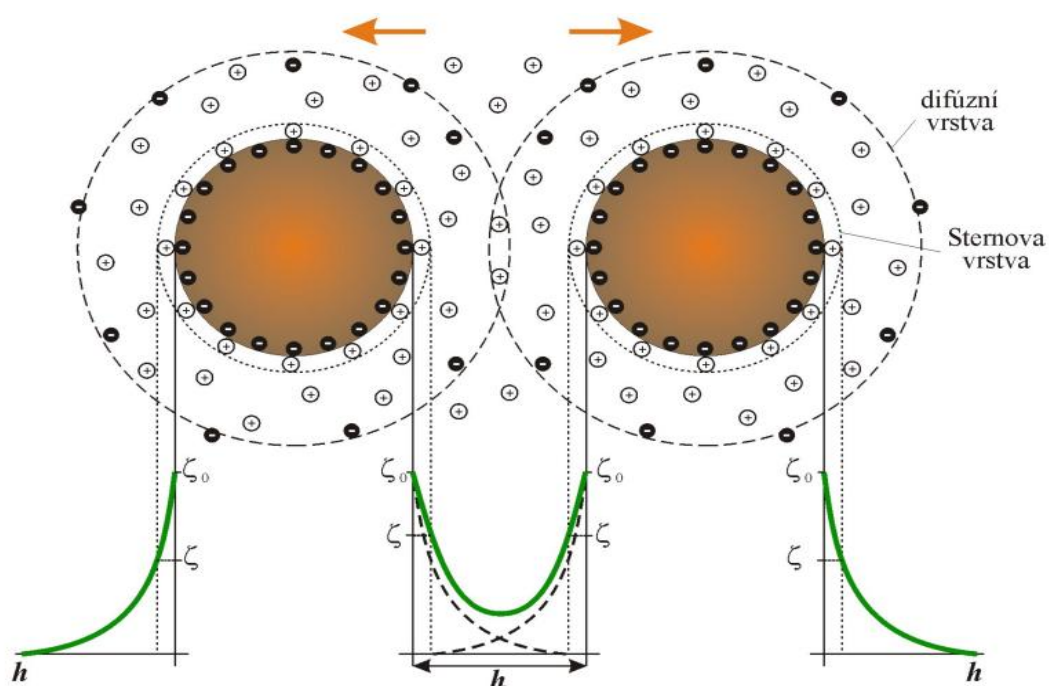
Fyzikální stabilitu emulzních systémů je možné také hodnotit sledováním výšky vrstvy vzniklé krémováním, a to vizuálně nebo optickými analyzátory. [33, s. 471]

5.4.1 Zeta potenciál

Většina koloidních disperzí nese ve vodném prostředí elektrický náboj, který vzniká ionizací kyselých nebo zásaditých skupin. Velikost náboje závisí na koncentraci adsorbovaných kladných nebo záporných skupin a na pH roztoku. Druh náboje, ovlivňuje rozložení iontů v okolí mezifázové oblasti. Jinými slovy je povrchový náboj částice vyrovnáván ekvivalentním množstvím opačně nabitých iontů. Tento model je znám pod pojmem elektrická dvojvrstva, která se skládá z vnitřní Sternovy vrstvy a vnější difúzní vrstvy. Ionty ve Sternově vrstvě, resp. protiionty ke koloidní částici, těsně přiléhají a pohybují se společně s ní, např. při pohybu vlivem gravitační síly. Ionty difúzní vrstvy jsou ve větší vzdálenosti

od koloidní částice a pohybují se na ni nezávisle. Pohybové rozhraní, které obě vrstvy rozděluje, vykazuje tzv. elektrokinetický neboli ζ -potenciál. [39, s. 7]

Mají-li všechny částice v emulzi vysoký negativní nebo pozitivní ζ -potenciál budou se vzájemně odpuzovat a nebudou mít sklon ke shlukování. Naopak při nízkých hodnotách ζ -potenciálu bude odpuzování mezi částicemi nedostatečné a bude docházet k agregaci a vysrážení částic. Obecně jsou částice se ζ -potenciálem větším než 30 mV a menším než -30 mV považovány za stabilní, zatímco částice s velikostí ζ -potenciálu od -30 do 30 mV jsou považovány za nestabilní. [40, s. 6]

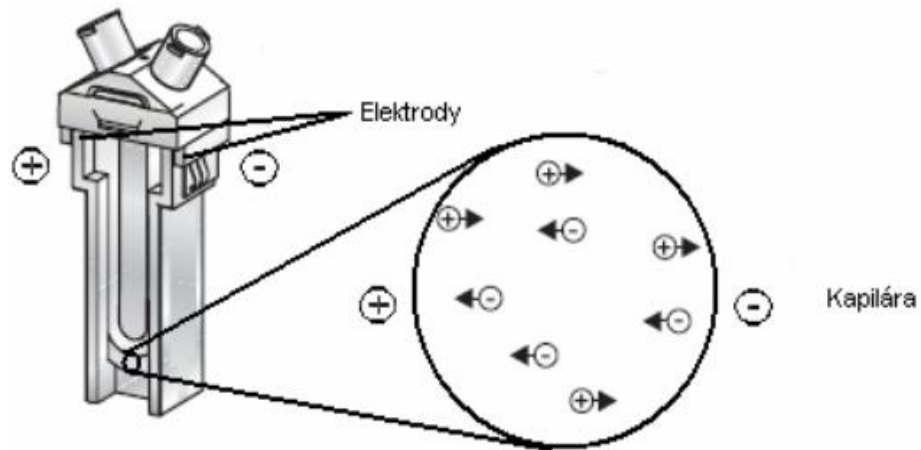


Obrázek 12 - Elektrická dvojvrstva [41]

Velikost ζ -potenciálu je nejvíce ovlivněna změnou pH vzorku. V případě závislosti ζ -potenciálu na pH bude potenciál dosahovat vyšších kladných hodnot s nižším pH a nižších záporných hodnot s vyšším pH. V oblasti isoelektrického bodu, kdy je ζ -potenciál nulový, je emulze nejméně stabilní a dochází k vysrážení částic. Obrázek 12 ilustruje nulový ζ -potenciál i rozmezí -30 mV a 30 mV, kdy částice nejsou stabilní (zelená parabola). [39, s. 9]

Princip měření ζ -potenciálu na analyzátoru částic Zetasizeru spočívá v měření elektroforérické pohyblivosti částic v kyvetě s elektrodami umístěnými na opačných stranách kapiláry

speciální kyvety, která je na Obr. 13. Částice vzorku se pohybují k elektrodám s opačným nábojem, přičemž laserový Dopplerův velocimetr měří jejich rychlost, která je popsána jako elektroforetická pohyblivost. [42, s. 15-16]



Obrázek 13 - Kyveta s elektrodami [42, s. 16]

6 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

O problematice nedostatečného příjmu olejů s obsahem polynenasycených mastných kyselin typu ω -3 a ω -6 je možné najít mnoho odborných textů, stejně tak jako o snahách vhodně olej enkapsulovat. Kritériem každé enkapsulační metody je přiměřená stabilita vzniklého systému. Pokud se na fyzikální stabilitu díváme jako na udržení určitých vlastností emulze beze změny v čase a na chemickou stabilitu jako na stabilitu oxidační nebo hydrolytickou zjistíme, že se tyto parametry sice do jisté míry doplňují, ale často jsou to protichůdné děje. Je proto často obtížné dosáhnout jak chemické, tak fyzikální stability současně. Tadros uvádí, že velmi malé kapky emulze snižují Brownův pohyb a nejsou ovlivněny gravitační silou. Ve vzorcích obsahujících malé částice proto nedochází vůbec, nebo velmi málo, ke krémování nebo sedimentaci. Systém tak zůstává déle disperzní bez separace. [18, s. 304]

Z pohledu chemické stability hodnotí emulze Nielsen se spolupracovníky, kteří dokazují, že malé kapky emulze jsou méně odolné vůči oxidaci než kapky větší. Menší kapky mají větší povrch, na kterém může snadněji dojít k oxidační reakci mezi olejem a prooxidanty. Podle autorů stabilita emulzí závisí na typu emulgátoru a jeho koncentraci, kdy obecně jeho vyšší koncentrace zaručuje lepší oxidační stabilitu. V této práci byly jako emulgátory použity mléčné proteiny (sérové i kaseinové) a lecitin. [38, s. 875]

Množství stabilizujícího materiálu, konkrétně kaseinátu sodného, který je schopen dostatečně stabilizovat rybí olej, zkoumal kolektiv vědců vedený Dayem. Ve své práci vysvětlují, jak velikost částic a jejich distribuce závisí na obsahu proteinu jako emulgátoru. Kritická koncentrace kaseinu c^* ve vodném roztoku je dostatečná k plnému pokrytí kapek vznikající emulze. Při nízké koncentraci proteinu ($c < c^*$) vznikají bi- a multimodální distribuce a průměrná velikost částic se zvyšuje. Protein v nedostatečném množství není schopen plně pokrýt povrch kapek a stabilizovat je. Tvoří se větší částice a důsledkem toho dochází ke koalescenci nebo můstkové flokulaci. Naopak při vyšší koncentraci proteinu, kdy jej systém obsahuje nadbytek ($c > c^*$), může dojít k dalšímu typu destabilizace emulze, a to k depleční flokulaci emulzních kapek, která vede ke krémování v důsledku snahy kaseinových submicel vytvářet malé proteinové částice. Neadsorbované proteiny mají tendenci shlukovat se do malých proteinových částic, čímž dochází k jejich úniku z okolí lyofobních částic, které se k sobě přibližují a vznikají aglomeráty. [33, s. 470]

Nedostatečnou efektivitu emulgace způsobenou nízkou koncentrací stabilizujícího materiálu potvrzuje i Aghbashlo a kol., kteří rybí olej enkapsulovali pomocí několika různých emulgátorů, a to mléčného proteinu, sacharózy, laktózy, maltodextrinu a jejich směsí. Jelikož mají stabilizující materiály přírodního původu obecně nižší enkapsulační účinnost v porovnání s klasickými emulgátory přidali autoři k těmto emulgátorům neionickou povrchově aktivní látku TWEEN 20 (polyoxyethylensorbitanmonolaurát). Začlenění této povrchově aktivní látky způsobilo snížení velikosti částic v emulzích. Emulze pak byly zpracovány metodou vakuového sušení. [43, s. 379]

Řadu nejzajímavějších publikací z oblasti aplikací přírodních emulgátorů, komplexů protein-polysacharid, lze nalézt mezi pracemi Dickinsona a kol. Tyto práce se věnují rovněž interakcím a problematice adsorbované proteinové vrstvy u emulzí různých formulací. [22]

Další prací zabývající se použitím přírodních emulgátorů je publikace autorů Klaypradit a Huang, kteří při enkapsulaci rybího oleje chitosanem použili metodu sonikace. Samotný chitosan se nejevil jako vhodný stabilizátor a pro zvýšení účinnosti musel být doplněn směsí maltodextrinu se sérovým proteinem v poměru 1 : 10 a 1 : 1. Emulze stabilizované takovými směsmi přinesly požadovaný výsledek, a to vysoký obsah enkapsulovaných mastných kyselin EPA a DHA. [44, s. 1137-1138]

Se sonikačním zařízením a komplexem kaseinát-chitosan pracovali při enkapsulaci oleje Zinoviadou a kolektiv, podle nichž tento komplex zajišťuje dostatečnou stabilizaci oleje při dlouhodobém skladování i při okyselení. Se zvyšující koncentrací chitosanu jsou vzorky více viskózní, což působí preventivně proti krémování. Autoři naznačují možná budoucí využití tohoto systému, který je vhodný pro enkapsulaci a doručení bioaktivních látek, určených pro perorální užití, či pro zlepšení textury acidofilních mléčných produktů. [45, s. 94]

Záměrem práce Katsudy a kol. bylo stabilizovat emulze o/v komplexem β -lactoglobulinu s pektinem. K emulzi rybího oleje s rozpuštěným β -laktoglobulinem přidávali různá množství pektinu a tímto způsobem vytvořili stabilní vícevrstvé emulzní systémy. [46, s. 5926]

Jourdain a kol. zase zkoumali vlastnosti emulze stabilizované anionickým polysacharidem, dextran sulfátem, který přidávali do emulze o/v předem stabilizované kaseinátem sodným (vícevrstevná emulze). Dále připravili směsný komplex obou emulgátorů. V tomto případě byla stabilita emulzí se směsným komplexem větší, než u emulzí připravených dvojstupňově. [50, s. 658]

7 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo vypracovat rešerši na téma emulzních systémů se zaměřením na emulgaci rybího oleje. Dále bylo úkolem zaměřit se na vlastnosti těchto emulzí, primárně na jejich stabilizaci s využitím přírodních emulgátorů. Z řady přírodních stabilizujících látek byly zvoleny kaseinát sodný a komplex kaseinátu s dextranem o dvou rozdílných molekulových hmotnostech, konkrétně 10 000 a 500 000 g/mol.

V praktické části bylo úkolem připravit emulze dvěma rozdílnými způsoby, a to za použití homogenizátoru Ultraturax a sonikačního zařízení, popsat vliv přípravy, pH vodné fáze, koncentrace stabilizujících látek a olejové fáze na vlastnosti emulzí. Dalším úkolem bylo sledovat stabilitu připravených emulzí v čase hodnocením změn velikostí částic, stupně krémování a ζ -potenciálu; v dílčích experimentech pak charakterizovat rybí olej a schopnost přírodních emulgátorů snížit povrchové napětí disperzní fáze.

PRAKTICKÁ ČÁST

8 MATERIÁLY A METODY

Následující podkapitoly představují použité materiály a zvolené metody experimentální práce.

8.1 Materiály

Připravované emulze typu o/v byly složeny z rybího oleje, demineralizované vody, kaseinátu sodného nebo směsi kaseinátu sodného a dextransu. Byly použity následující chemikálie:

- Kaseinát sodný z kravského mleziva, zakoupen spol. Sigma-Aldrich, Inc., USA (CAS RN 9005-46-3). Průměrné složení kaseinových frakcí (g/l) je α_{s1} (12-15), α_{s2} (3-4), β (9-11) a κ (2-4).
- Dextran T10 (molekulová hmotnost 10 000 g/mol) a dextran T500 (molekulová hmotnost 500 000 g/mol) byl dodán Pharmacia LKB Biotechnology, Švédsko.
- Rybí olej Typ A (*Jecoris aselli oleum Typus A*) je čištěný olej z tresčích jater tresky obecné a jiných treskovitých ryb, zakoupený jako léčivý přípravek v lékárně (šarže 14B17-T07-012102). Ověření jakosti bylo provedeno kontrolní laboratoří Fagron, a.s., Česká republika.

Dále byly použity následující chemikálie:

- etanol, metanol, hydroxid draselný a sodný, kyselina chlorovodíková, jodid draselný, thiosíran sodný, chloroform a kyselina octová dodavatele Ing. Petra Lukeše;
- xylen, hexan, Hanušovo činidlo (jodmonobromid) dodavatele Ing. Petra Ševce;
- fenolftalein, škrobový maz, dichroman draselný od spol. Lachema Brno, závod Neratovice

a běžné laboratorní sklo a vybavení.

8.2 Přístroje

Použity byly následující přístroje a pomůcky:

- Laboratorní váhy Kern EW 420-NM, Německo;
- Plynový chromatograf DANI Master GC Fast Gas Chromatograph, Itálie

- součásti: kolona Zebron™, ZB-5MS (30 m x 0,32 mm x 0,25 μm); detektor FID, software;
- Spektrofotometr Photo Lab 6600 UV-VIS series, WTW, Německo;
- Tenziometr EasyDyne K20, Německo
 - součásti: temperanční lázeň, teplotní čidlo, platinová destička;
- pH metr CPH 51, Elteca, Česká republika
 - součásti: magnetická míchačka HI 190M, Hanna instruments, USA;
- Ultraturax IKA®T25, Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, Německo
 - součásti: magnetická míchačka MM4;
- Sonikační zařízení UP400S, Hielscher, Německo
 - součásti: sonda H7 (7 mm, délka 100 mm, titan);
- Zetasizer Nano ZS90 a Zetasizer Nano ZS, Malvern, Instruments Ltd, Švýcarsko
 - součásti: kyvety DTS0012 pro měření velikosti částic a kyvety DTS1070 pro měření ζ-potenciálu, software;
- Mikroskop IX73 Olympus, Japonsko
 - součásti: software;

a řada běžných laboratorních pomůcek.

8.3 Charakterizace olejové fáze

8.3.1 Číslo kyselosti a číslo zmýdelnění

Pro společné stanovení čísla kyselosti a čísla zmýdelnění byl ke vzorku přidán xylen, neutrální etanol a fenolftalein jako indikátor. Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem a titrována etanolickým roztokem KOH do stálého růžového zbarvení. Z této spotřeby bylo zjištěno číslo kyselosti.

Ke ztitrovanému vzorku byl dále přidán další díl roztoku KOH a roztok v baňce opět zahříván pod zpětným chladičem 2 hodiny, po nichž byl přidán fenolftalein. Směs byla titrována roztokem HCl do vymizení červeného zbarvení. Dokonalé ztitrování bylo několikrát prověřeno krátkým povařením a dotitrováním kyselinou do té doby, než se zbarvení přestalo objevovat. Ze spotřeby bylo vypočteno číslo zmýdelnění.

8.3.2 Jodové číslo

Vzhledem k vysokému zastoupení nenasycených mastných kyselin v rybím oleji byla očekávána vysoká hodnota jodového čísla. Z tohoto důvodu byla zvolena nízká navážka vzorku. Vzorek byl rozpuštěn v chloroformu a smíchán s Hanušovým činidlem a byl ponechán na tmavém místě reagovat 1 hodinu. Poté byl přidán KI a demineralizovaná voda. Směs byla titrována thiosíranem sodným do žlutého zbarvení, po kterém následovala další titrace, tentokrát s přidavkem škrobového mazu. Titrace byla prováděna do odbarvení.

8.3.3 Peroxidové číslo

Rybí olej byl rozpuštěn ve směsi chloroformu a kyseliny octové v poměru 1 : 1. K roztoku byl přidán nasycený roztok KI. Po krátkém stání roztoku ve tmě byla přidána demineralizovaná voda, škrobový maz a byla provedena titrace thiosíranem za intenzivního protřepávání do odbarvení roztoku.

8.3.4 Stanovení konjugovaných dienů a trienů

Pro stanovení konjugovaných dienových a trienových mastných kyselin byl ze vzorku oleje připraven 1% roztok v n-hexanu. UV spektrum bylo proměřeno v rozmezí vlnových délek 200-400 nm proti čistému n-hexanu a zaznamenaly se absorbance při charakteristických vlnových délkách pro dieny a trieny. Obsah konjugovaných dienů (CD; Rov. 11) a obsah konjugovaných trienů (CT; Rov. 12) byl spočítán ze vztahů:

$$CD = 0,91 \cdot (a_{233} - 0,07) \quad (11)$$

$$CT = 1,316 \cdot [a_{268} - 0,05 \cdot (a_{262} - a_{274})] \quad (12)$$

Každá z uvedených analýz vzorku rybiho oleje (části 8.3.1.-8.3.4) byla provedena dvakrát. Z výsledků byl vypočten průměr a směrodatná odchylka podle Deana a Dixona pro $n \ll 10$. Naměřené hodnoty byly porovnány s údaji uvedenými v certifikátu ověření jakosti léčivého přípravku, *Jecoris aselli oleum Typus A*.

8.3.5 Plynová chromatografie

Před analýzou mastných kyselin na plynovém chromatografu (GC) bylo nutné převést mastné kyseliny ve vzorku tuku na těkavé metylestery. Příprava metylesterů spočívala v zásaditě katalyzované esterifikaci. Vzorek oleje byl společně s metanolem a roztokem KOH povařen a poté převeden do dělicí nálevky, ve které byl po přidání n-hexanu a rozto-

ku NaCl protřepán. Hexanová fáze, obsahující metylestery byla oddělena a po filtraci přes bezvodý Na₂SO₄ naředěna n-hexanem a použita pro analýzu na GC.

Analýza byla provedena na DANI Master GC chromatografu s kapilární kolonou Zebron ZB-MS (30 m x 0,32 mm x 0,25 μm). Byly použity následující chromatografické podmínky: nástřik při 230 °C, průtok 1ml/min, dělič toku 1 : 25, oplach septa 5 ml/min. Objem nastříkovaného vzorku byl 1 μl. Byl použit teplotní gradient s počáteční teplotou 110 °C a ohřevem na 240 °C rychlostí 5 °C/min, dále od 240 °C do 280 °C rychlostí 2 °C/min a konečným izotermálním krokem v trvání 20 min při 280 °C. Plamenoionizační detektor pracoval při teplotě 250 °C, průtok dusíku činil 25 ml/min, vodíku 40 ml/min a vzduchu 280 ml/min. Celkový čas analýzy 66 min.

8.4 Charakterizace emulgátoru

Povrchové napětí vodných roztoků obsahujících kaseinát sodný nebo směs kaseinátu s dextranem bylo stanoveno metodou odtrhávání Wilhelmyho destičky na tenziometru Easdyne Krüss při teplotě (24±3) °C. Doba měření činila 1 s, plocha smáčení byla 40,2 mm. Před měřením byla prověřena funkčnost přístroje stanovením povrchového napětí demineralizované vody.

8.5 Příprava emulzí

8.5.1 Emulze stabilizované kaseinátem sodným

Nejprve byla připravena disperze kaseinátu sodného v koncentracích 0,5; 1; 2; 5; 7,5 a 10 % (hm.) v demineralizované vodě. Kaseinát byl ponechán botnat ve vodě při teplotě 4-8 °C (chladnička) po dobu cca 24 hodin. Druhý den byly vodné disperze kaseinátu homogenizovány pomocí magnetického míchadla. Část vzorků byla ponechána bez úpravy pH, u další části bylo pH adjustováno 0,5M NaOH na hodnotu 9. Pro práci byly zvoleny dvě koncentrace olejové fáze, a to 5 a 10 %. Vodná a olejová fáze byly smíchány a homogenizovány postupy uvedenými v části 8.5.3 a 8.5.4. této práce.

8.5.2 Emulze stabilizované komplexem kaseinát-dextran

Vodné fáze pro stabilizaci emulzí, obsahující kombinaci kaseinátu (CAS) s dextranem (DX), byly připraveny smícháním obou polymerů v poměrech CAS/DX 5/5, 5/2 a 2/5 (Tab. 2). Byly použity dva typy dextranů s rozdílnou molekulovou hmotností, DX T500 (500 000 g/mol) a DX T10 (10 000 g/mol). Postup botnání směsí byl stejný jako v případě

CAS (část 8.5.1). Pro dokonalé rozpuštění a komplexaci proteinu s polysacharidem byl roztok zahříván na teplotu 40 °C a ponechán zchladnout. Obdobně jako v případě emulzí stabilizovaných CAS byla použita koncentrace oleje 5 nebo 10 %.

Tabulka 2 - Přehled složení emulzí o/v připravených s komplexem kaseinátu (CAS) a dextransu (DX). Použity byly DX T500 nebo DX T10

Emulze	Poměr olejné a vodné fáze	Složení komplexu [hm. %]	
		CAS	DX
CAS/DX	5/95	5	5
CAS/DX	5/95	2	5
CAS/DX	5/95	5	2
CAS/DX	10/90	5	5
CAS/DX	10/90	2	5
CAS/DX	10/90	5	2

8.5.3 Homogenizace emulzí - použití homogenizátoru Ultraturax

Homogenizace pomocí Ultraturaxu probíhala po dobu 15 minut při 14 600 ot./min. V sérii emulzí s pH 9 a obsahem olejové fáze 10 % nebyl připraven vzorek s nejvyšší koncentrací CAS z důvodu jeho příliš vysoké viskozity a obtížím během homogenizace.

8.5.4 Homogenizace emulzí - použití sonikačního zařízení

Homogenizace ultrazvukem probíhala sonikačním zařízením s parametry 400 W, 24 kHz, po dobu 1 minuty se 100% amplitudou oscilace. Během sonikace byl vzorek umístěn v kádince naplněné ledem.

8.6 Charakterizace emulzí

8.6.1 Měření velikosti částic

8.6.1.1 Dynamický rozptyl světla

Emulze byly charakterizovány pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS90 (úhel detekce 90°) a Zetasizer Nano ZS (úhel detekce 173°). Za účelem měření byly připraveny vzorky ředěním 3,5 µl emulze v 1 ml dvakrát filtrované demineralizované vody. Optické parametry

nastavení přístroje byly následující: index lomu pro proteiny $n = 1,45$; index pomu pro vodu $n = 1,33$; absorpce činila 0,001. Měření pod úhlem 90° bylo prováděno na emulzích stabilizovaných kaseinátem po dobu prvních 5 dnů a emulzích stabilizovaných kaseinátem s pH 9 po dobu prvních 2 dnů. Pod zpětným úhlem 173° byla provedena všechna ostatní měření. Důvodem používání dvou přístrojů byla porucha na jednom z nich. Teplota měření byla 25°C . Výsledek měření je průměrnou hodnotou ze tří stanovení. Sledovány byly průměrné velikosti částic na základě měření intenzity rozptýleného světla (z-průměr), index polydisperzity, velikosti každé z populací částic a procentuální zastoupení dané populace na základě distribuce objemu (viz. Část 5.3.1). Emulze byly charakterizovány ihned po přípravě a byla rovněž sledována jejich stabilita v čase, během skladování při $4-8^\circ\text{C}$ (chladnička).

8.6.1.2 Mikroskopie

Pro mikroskopické zobrazení byly emulze vhodně naředěny a pozorovány imerzním objektivem při 60x zvětšení.

8.6.2 Měření ζ -potenciálu

Pro měření ζ -potenciálu na přístrojích Zetasizer Nano ZS90 a Zetasizer Nano ZS byly vzorky emulzí připraveny stejným způsobem jako pro měření velikosti částic. Stanovení probíhalo při 25°C . Hodnota ζ -potenciálu je průměrem tří měření.

8.6.3 Index krémování

Měření indexu krémování probíhalo vizuálním pozorováním a zaznamenáváním výšky vrstvy vzniklé krémováním (v mm). Pozorování probíhalo u nově připravených emulzí a dále v průběhu času, vždy po zhruba 3-4 dnech. Index krémování (IC, index of creaming) byl vypočítán podle vztahu:

$$IC = 100 \cdot (\text{výška krémovací vrstvy} / \text{celková výška emulze}) \quad (13)$$

9 VÝSLEDKY A DISKUZE

9.1 Charakterizace rybího oleje

Tabulka 3 podává přehled o tukových číslech a složení mastných kyselin rybího oleje, který byl použit pro přípravu emulzí. Zkoušky byly provedeny před zahájením používání oleje. Z uvedených hodnot je možno učinit následující závěry. Nízká hodnota čísla kyselosti značí nízkou koncentraci volných mastných kyselin, přítomných v charakterizovaném oleji. Volné mastné kyseliny vznikají štěpením triacylglycerolů během lipolýzy. Lipolýza oleje v okamžiku stanovení tedy probíhala téměř nezatelně.

Číslo zmydelnění bylo stanoveno na $(182,3 \pm 0,8)$ mg/g oleje a nevybočuje z běžných hodnot. Hodnota čísla zmydelnění odráží délku mastných kyselin přítomných v triacylglycerolech daného oleje a pro rybí oleje je obtížné v literatuře nalézt jeho typickou hodnotu. Důvodem je skutečnost, že se oleje značně liší v závislosti na druhu ryb, ze kterých byl olej získán.

Jodové číslo bylo naměřeno nižší, než uvádí specifikace certifikátu ověření jakosti, což by značilo nižší obsah nenasycených mastných kyselin, než je u tohoto typu rybího oleje požadováno. Specifikacím nevyhovovala ani hodnota peroxidového čísla, která byla oproti předepsané hodnotě vyšší. To značí, že olej obsahoval vyšší množství hydroperoxidů a tedy jevil známky počínající oxidativní degradace.

Výsledky stejných zkoušek kontrolní laboratoře firmy Fagron a.s., která olej dodává, provedené před jeho distribucí vyhovovaly všem požadavkům. Rozdílné výsledky mezi kontrolní laboratoří a údaji stanovenými v této diplomové práci mohou být, s největší pravděpodobností, způsobeny změnami složení oleje od okamžiku ověřování jakosti po stanovení v laboratořích FT UTB, které mohlo nastat např. vlivem přepravy nebo doby skladování v lékárně, kde byl olej zakoupen.

Množství přítomných konjugovaných dienových mastných kyselin činilo $(1,2 \pm 0,2)$ %, obsah konjugovaných trienových mastných kyselin pak $(0,8 \pm 0,1)$ %. Systém konjugovaných dvojných vazeb vzniká v lipidech při oxidaci polyenových mastných kyselin na hydroperoxydy.

Výsledky analýzy zastoupení MK v rybím oleji získané pomocí plynové chromatografie odpovídají, s menšími odchylkami diskutovanými níže, výsledkům kontrolní laboratoře Fagron a.s. Ta uvedla následující hodnoty: kyselina myristová 4,25 %; palmitová 11,16 %;

stearová 2,36 %; palmitolejová 7,45 %; cis-vakcenová 4,47 %; olejová 14,28 %; gadolejová 1,79 %; gondoová 9,90 %; eruková 0,92 %; cetolejová 7,05 %; linolová 1,59 %; α -linolenová 0,71 %; moroktová 1,89 %; eikosapentaenová 8,51 % a dokosaheptaenová 10,14 %.

Jak je zřejmé z Tab. 3, při analýze v naší laboratoři nebylo možné použitou GC kolonou separovat některé mastné kyseliny. Jednalo se o dvojice: kyselina cis-vakcenová (C18:1, ω -7) a olejová (C18:1, ω -9) a dále kyselina gadolejová (C20:1, ω -11) a gondoová (C20:1, ω -9). Tyto mastné kyseliny mají vždy podobné složení a liší se pouze v poloze dvojné vazby. Z toho důvodu jsou hodnoty procentuálního zastoupení v tabulce pro tyto dvojice vždy společné. Obdobná situace nastala i pro stanovení kyseliny α -linolenové (C18:3, ω -3), kdy na použitém typu kolony pravděpodobně nedošlo k její separaci od kyseliny moroktové (C18:4, ω -3). Tato dvojice mastných kyselin se liší v počtu dvojných vazeb ve stejně dlouhém řetězci. Z uvedených 4 % bude tedy ve vzorku zastoupena nejen kyselina α -linolenová, ale i kyselina moroktová, která nebyla identifikována z důvodu chybějícího standardu. Odchytky mezi výsledky analýz v naší a kontrolní laboratoři tedy vznikly z důvodu použití jiné kolony, která není pro separaci polynenasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem zcela optimální.

Tabulka 3 - Naměřené hodnoty a limity zkoušek pro olej *Jecoris aselli oleum* (Typus A)

Parametr	Výsledek	Přípustný limit	Jednotka
číslo kyselosti	0,32±0,01	≤ 2,0	mg/g
číslo zmýdelnění	182,3±0,8	není uvedeno	mg/g
jodové číslo	127±4	150-180	%
peroxidové číslo	18,3±0,5	≤ 10	μval/g tuku
konjugované dieny	1,2±0,2	není uvedeno	%
konjugované trieny	0,8±0,1	není uvedeno	%
mastné kyseliny			
▪ myristová	5,0	2,0-6,0	%
▪ palmitová	12,0	7,0-14,0	%
▪ stearová	2,0	1,0-4,0	%
▪ palmitolejová	8,0	4,5-11,5	%
▪ cis-vakcenová		2,0-7,0	%
▪ olejová	19,0*	12,0-21,0	%
▪ gadolejová		1,0-5,5	%
▪ gondoová	8,0**	5,0-17,0	%
▪ eruková	-	0,0-1,5	%
▪ cetolejová	9,5	5,0-12,0	%
▪ linolová	2,0	0,5-3,0	%
▪ α-linolenová	4,0***	0,0-2,0	%
▪ moroktová	-	0,5-4,5	%
▪ EPA	10,0	7,0-16,0	%
▪ DHA	11,0	6,0-18,0	%

* 19,0 % je společný výsledek pro kyselinu olejovou a cis-vakcenovou

** 8,0 % je společný výsledek pro kyselinu gondoovou a gadolejovou

*** 4,0 % je společný výsledek pro kyselinu α-linolenovou a moroktovou

Limity testovaných parametrů byly převzaty ze specifikace uvedené v Českém lékopise.

[47]

9.2 Povrchové napětí emulgačních činidel

V rámci diplomové práce bylo stanoveno povrchového napětí vodných disperzí kaseinátu i jeho směsí s dextranskem v různých poměrech CAS/DX. Tato analýza byla prováděna s cílem zjistit, do jaké míry má protein a komplex proteinu s polysacharidem účinnost snižovat povrchové napětí kontinuální fáze. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 4, spolu s hodnotami povrchového napětí demineralizované vody, která byla použita pro kontrolu přístroje.

Tabulka 4 - Povrchové napětí (γ_E) disperzí emulgátorů CAS a komplexu CAS/DX

Emulgační činidlo		γ_{H_2O} [$\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$]	γ_E [$\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$]
CAS		72,40±0,04	47,30±0,10
CAS/DX T500	5/5	70,60	46,10±0,04
	5/2		45,00±0,05
	2/5		47,80±0,05
CAS/DX T10	5/5	72,20±0,01	45,90±0,03
	5/2		48,20±0,01
	2/5		47,00±0,02

Z Tab. 4 je zřejmé, že všechny disperze biopolymerů, ať už samotného kaseinátu, tak i jeho směsí s dextranskem, snižovaly povrchové napětí vody z cca $72 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ na hodnoty ležící v intervalu od $45,0$ do $48,2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Touto skutečností byla potvrzena schopnost proteinu i komplexu snižovat povrchové napětí a působit v uvedených koncentracích jako emulgátor. Rozdíly mezi povrchovým napětím stanoveným pro CAS a jeho komplexy s dextranskem jsou nevýznamné.

9.3 Příprava a charakterizace emulzí

Jak již bylo uvedeno v teoretické části práce, emulze rybího oleje byly připraveny pomocí dvou homogenizačních technik, a to homogenizátoru Ultraturax a ultrazvukového procesoru. Pro přípravu byly použity dvě koncentrace oleje 5 a 10 % a vodná fáze obsahující buď disperze samotného kaseinátu sodného o koncentracích 0,5 až 10 % hm., nebo směsi kaseinátu s dextranskem. Na základě literární rešerše, konkrétně prací Nielsen [38] a Zinoviadona [45] byly kaseinátové disperze použity buď v nativním stavu, tedy s neadjustovaným pH a dále s pH adjustovaným na hodnotu 9. Hodnoty pH neadjustova-

ných vzorků se pohybovaly v rozmezí 6,7-7,2 v závislosti na množství kaseinátu. Kaseinát společnosti Sigma-Aldrich nebylo možné upravit na nižší hodnotu pH z důvodu relativně vysokého izoelektrického bodu (pI). Průměrný pI kaseinu byl, dle informací dodavatele, 4,6. pI jednotlivých kaseinových frakcí pak činilo 4,2-4,7 pro α kasein, 4,6-5,1 pro β kasein a 4,1-5,8 pro κ kasein. [48] Proteolýzou β kaseinu vzniká minoritní frakce zvaná γ kasein, jehož pI je 5,8-6,0. Možné vyšší zastoupení tohoto derivátu způsobilo při snížení pH téměř okamžité vysrážení proteinů z roztoku při snaze adjustovat pH 0,5 M kyselinou chlorovodíkovou. U komplexů kaseinátu s dextranem pH upravováno nebylo. [27, s. 9]

9.4 Velikost částic

9.4.1 Emulze připravené Ultraturaxem

Průměrná velikost částic emulzí připravených Ultraturaxem se pohybovala v rozmezí od 0,36-5,67 μm . Výsledky shrnuje Tab. 5, ze které lze odvodit obecný trend, který ukazuje, že čím méně CAS bylo použito ke stabilizaci emulzních částic, tím větší měly velikost. Stejný výsledek zaznamenali se své práci Nielsen a kol. [38] ve studii enkapsulace rybího oleje za použití emulgátoru CAS. Emulze byly připraveny rovněž Ultraturaxem při stejných otáčkách, jaké byly zvoleny pro naši diplomovou práci. Autoři článku použili Ultraturax pro přípravu primární emulze, která byla navíc v dalším kroku podrobena homogenizaci vysokotlakým homogenizátorem, při které byla velikost emulzních částic dále zmenšena.

Emulze stabilizované CAS o nejnižších koncentracích (0,5 a 1 %) vykazovaly v den přípravy velké rozdíly mezi jednotlivými naměřenými hodnotami z-average (tři replikační měření). Možným důvodem špatné opakovatelnosti měření byla skutečnost, že připravené částice byly se svou velikostí na samé hranici měřicího limitu přístroje Zetasizer. Částice podléhaly Brownovu pohybu a difundovaly do prostředí o nižší koncentraci. Laserový paprsek tak zachytil částice rozdílných velikostí, čemuž napovídá i maximální index polydispersity. Nejméně vhodnými podmínkami pro přípravu emulzí byla tedy nízká koncentrace CAS a vysoká koncentrace oleje. Během dalšího měření (a to zvláště u sonikovaných emulzí) bylo pozorováno, že v koncentrační řadě 0,5-10 % emulgátoru mají vzorky s 0,5 % CAS největší částice, jejichž velikost se skokově lišila od velikostí ostatních emulzí, pravděpodobně z důvodu nedostatku emulgátoru, který by pokryl povrch jednotlivých emulzních kapek při jejich vzniku.

Srovnáním velikostí částic v emulzích připravených s 10 % CAS a velikostí částic s komplexem CAS/DX lze učinit závěr, že částice stabilizované komplexem jsou výrazně větší. Emulze s přídavkem komplexu CAS/DX za použití DX T500 měly velikost částic 0,53-3,01 μm a s DX T10 1,26-4,76 μm (Tab. 6). Pro srovnání, velikost částic emulze, kde byl emulgátor pouze 10 % CAS, byla 0,39 μm (5 % oleje) a 0,53 μm (10 % oleje).

Zvýšení množství olejové fáze se u emulzí stabilizovaných CAS/DX T500 projevilo při poměru emulgátorů 2/5 a výrazněji při poměru 5/2, kdy emulze s obsahem oleje 10 % obsahovaly částice s dvojnásobnou velikostí ve srovnání s emulzemi, kde bylo oleje 5 %. U emulzí s CAS a dextranem T10 se větší množství oleje projevilo zvětšením emulzních částic, a to ve všech poměrech CAS/DX, při poměru 2/5 však nejméně.

9.4.2 Emulze připravené sonikací

Velikost částic sonikovaných emulzí se pohybovala v rozmezí 0,29-2,34 μm (Tab. 5). Největší částice měly, obdobně jako při použití Ultraturaxu, emulze s nejnižší koncentrací emulgátoru (0,5 %). U emulze připravené s 5 % CAS byl zaznamenán zajímavý efekt, a to skoková změna velikostí částic. Částice této emulze byly výrazně větší ve srovnání s emulzemi obsahujícími jak 7,5 %, tak 2 % emulgátoru. Stejný efekt bylo možno pozorovat i u sonikovaných emulzí s pH disperzní fáze adjustovaným na hodnotu 9, ovšem rozdíly ve velikostech nebyly tak patrné.

U emulzí se 7,5 % CAS a 10 % oleje byla velikost částic $\leq 0,5 \mu\text{m}$. Při tomto složení se podařilo připravit emulze s velmi malou velikostí částic a vhodnou hodnotou PDI, která podává přehled o šířce distribuce. U vzorků s velkou šířkou distribuce přístroj analyzoval velikost částic (z-average), avšak nepodal kompletní informace o populacích částic, které se nacházely za hranicí 5 μm , což je limitní hodnota pro měření použitým přístrojem.

Velikosti částic stabilizovaných komplexem CAS/DX byly opět větší, pokud byl použit dextran s nižší molekulovou hmotností T10 (ne však tak markantně jako při přípravě Ultraturaxem) a poměr emulgátorů v komplexu nebo koncentrace olejové fáze neměly na velikost částic výrazný vliv (Tab. 6).

Tabulka 5 - Velikost částic emulzí stabilizovaných CAS stanovená v den přípravy. Obsah olejové fáze 5 % (5/95) a 10 % (10/90). pH emulze bylo nativní pH = 7 nebo adjustované na pH = 9

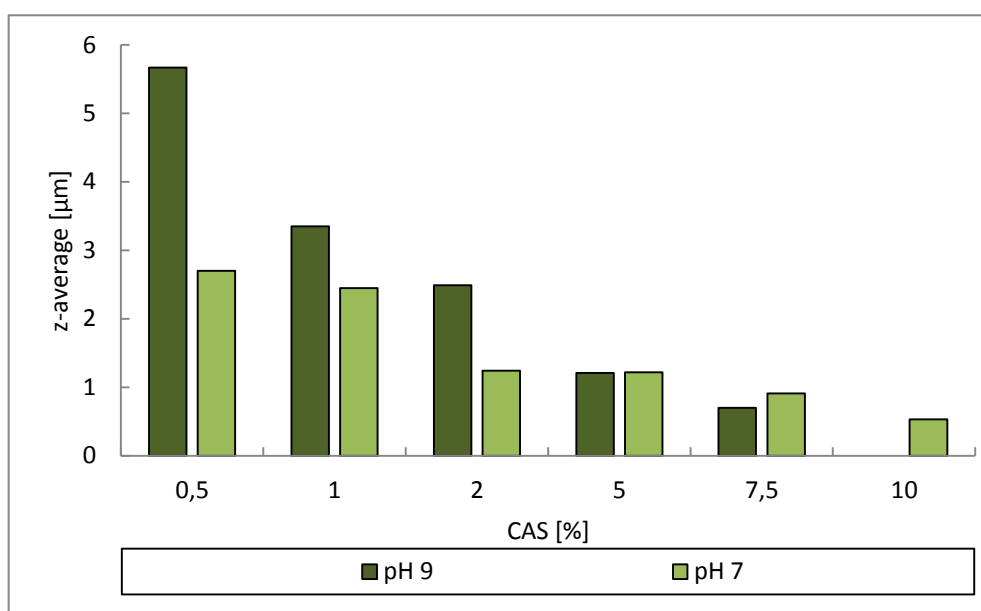
CAS [%]	Z-average (Ultraturax) [μm]			
	5/95; pH 7	10/90; pH 7	5/95; pH 9	10/90; pH 9
0,5	1,76±0,00	2,7±0,00	1,12±0,09	5,67±0,03
1	1,32±0,22	2,45±0,33	1,12±0,03	3,35±0,22
2	0,53±0,07	1,24±0,24	0,78±0,04	2,49±0,09
5	0,36±0,01	1,22±0,18	0,99±0,09	1,21±0,17
7,5	0,39±0,01	0,91±0,06	0,62±0,03	0,70±0,06
10	0,39±0,00	0,53±0,03	0,43±0,01	-
CAS [%]	Z-average (sonikátor) [μm]			
	5/95; pH 7	10/90; pH 7	5/95; pH 9	10/90; pH 9
0,5	1,26±0,18	2,34±0,43	1,49±0,32	1,67±0,27
1	0,94±0,11	0,53±0,02	0,49±0,04	1,35±0,29
2	1,02±0,21	1,12±0,24	0,38±0,03	0,29±0,00
5	1,30±0,19	1,94±0,22	0,55±0,01	0,77±0,03
7,5	0,30±0,00	0,46±0,01	0,36±0,00	0,34±0,00
10	0,29±0,00	0,29±0,00	0,34±0,00	0,50±0,01

Tabulka 6 - Velikost částic s komplexem CAS/DX v den přípravy (Ultraturax, sonikátor). Obsah olejové fáze činil 5 % (5/95) a 10 % (10/90)

o/v	CAS/DX	Z-average [μm]			
		Ultraturax		sonikátor	
		CAS/DX T500	CAS/DX T10	CAS/DX T500	CAS/DX T10
5/95	5/5	0,77±0,20	1,50±0,34	0,29±0,00	0,34±0,01
10/90	5/5	0,78±0,21	3,51±0,45	0,30±0,01	0,32±0,00
5/95	2/5	1,85±0,20	4,76±0,48	0,29±0,01	0,39±0,01
10/90	2/5	3,01±0,47	4,56±0,56	0,32±0,01	0,34±0,01
5/95	5/2	0,53±0,10	1,26±0,04	0,30±0,00	0,35±0,00
10/95	2/5	1,03±0,18	3,88±0,31	0,39±0,01	0,30±0,01

9.4.2.1 Vliv adjustace pH na velikost částic

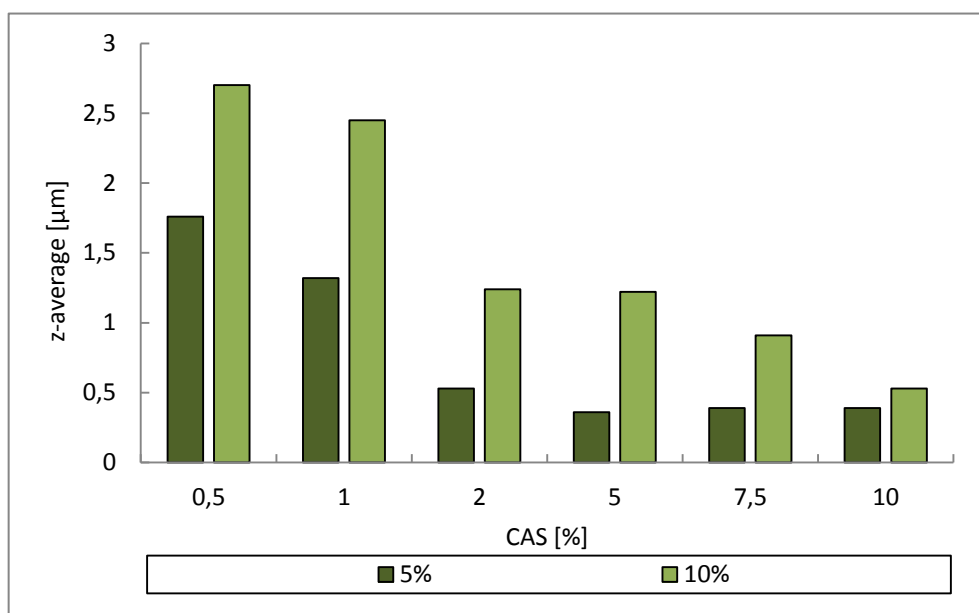
Adjustace vodné fáze emulze na pH 9 způsobila nárůst velikostí částic ve srovnání s emulzemi, kde pH zůstalo nativní (Obr. 14). Emulze stabilizované 0,5 % CAS obsahovaly částice o průměrné velikosti $(5,67 \pm 0,03) \mu\text{m}$, což je opět na hranici detekčního limitu Zetasizeru. Důvodem nárůstu velikosti emulzních kapek při pH 9 je změna konformace kaseinových micel, které je stabilizují. Tyto výsledky se shodují se závěry vědců Liu a Guo [49], kteří při studiu závislosti struktury a vlastností kaseinových micel na měnícím se pH potvrzují, že při vyšším pH dochází k elektrostatickému odpuzování mezi molekulami kaseinu v kaseinové submicelle. Struktura kaseinové micely je tedy kompaktnější při nízkých hodnotách pH a volnější při vysokém pH, což ovlivňuje i velikost emulzních částic.



Obrázek 14 - Emulze o/v 10/90 stabilizované CAS v koncentracích 0,5-10 % připravené Ultraturaxem při pH 7 a 9

9.4.2.2 Vliv koncentrace olejové fáze na velikost částic

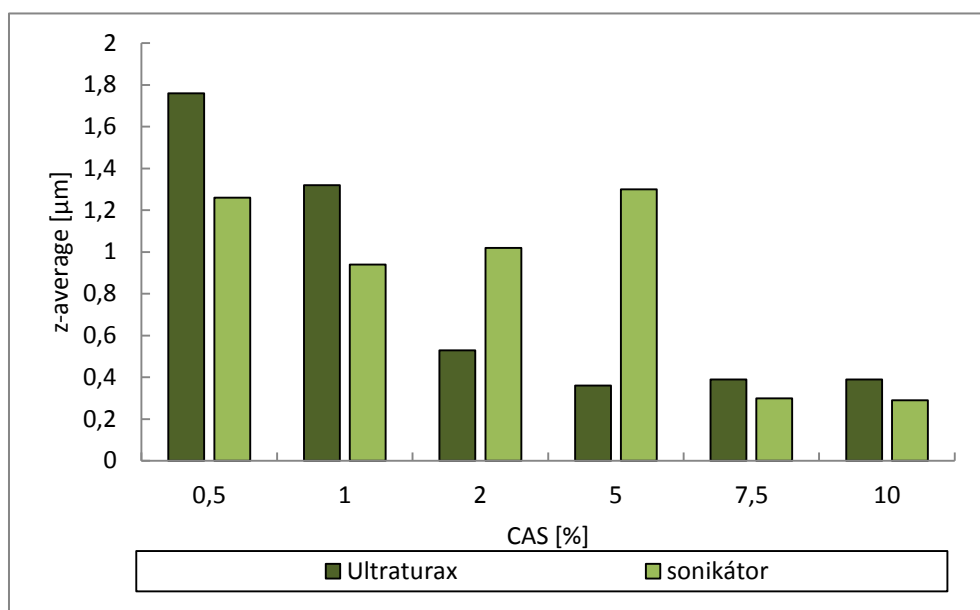
S vyšším množstvím oleje v emulzi se zvětšovala i velikost částic. To lze vysvětlit tím, že v emulzním systému bylo při větším množství oleje méně dostupného stabilizujícího materiálu. Typický příklad zobrazuje Obr. 15. Výjimku tvořily emulze obsahující komplex CAS/DX T10 ve všech třech zvolených poměrech, připravené pomocí sonikátoru. V tomto případě byly částice o 0,02-0,05 μm větší při nižším obsahu oleje (Tab. 6).



Obrázek 15 - Emulze (pH 7) stabilizované CAS v koncentracích 0,5-10 % připravené Ultraturaxem. Obsah olejové fáze 5 a 10 %

9.4.2.3 Vliv přípravy emulzí na velikost částic

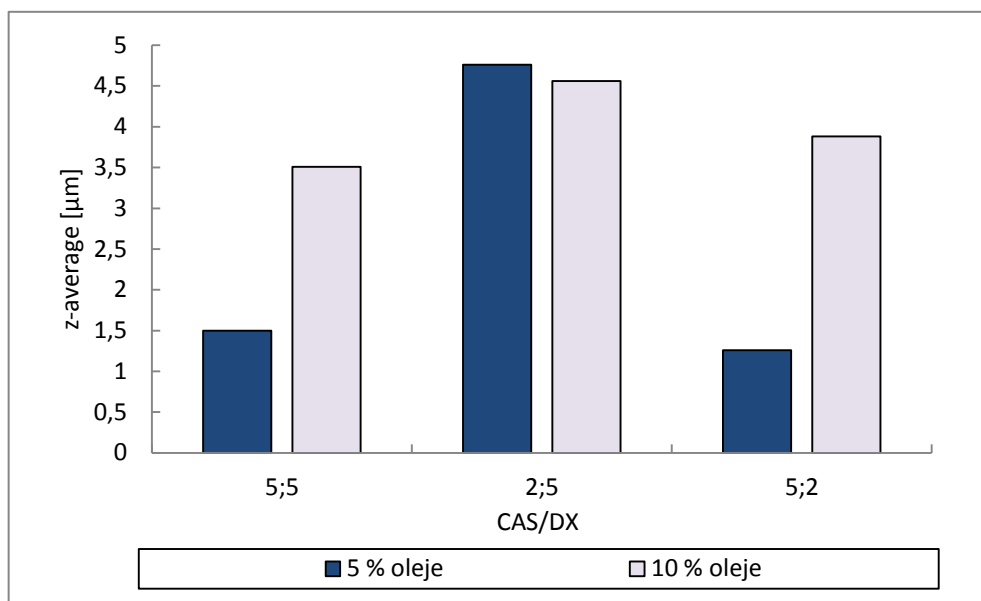
Sonikace poskytla emulze s menšími částicemi, především při koncentracích CAS > 5 %. Zajímavé srovnání emulzí připravených Ultraturaxem a sonikací je uvedeno na Obr. 16. Zatímco v případě použití Ultraturaxu se velikost emulzních částic snižovala s rostoucí koncentrací CAS postupně, u sonikovaných emulzí docházelo ke zmenšení velikosti částic skokově, a to při koncentraci CAS = 7,5 %.



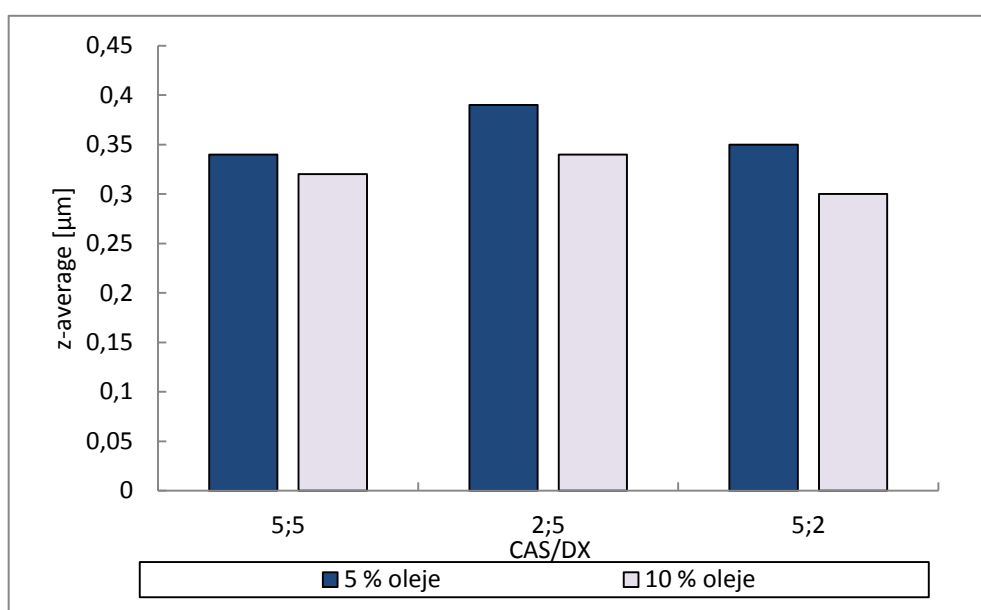
Obrázek 16 - Emulze o/v 5/95 (pH 7) stabilizované CAS v koncentracích 0,5-10 % připravené Ultraturaxem a sonikátorem

Následující dva grafy znázorňují, jak se projevila rozdílná metoda přípravy na emulzích stabilizovaných komplexem CAS/DX. Obrázek 17 představuje emulze připravené Ultraturaxem a Obr. 18 emulze sonikované. Důležitým poznatkem je, že sonikací dochází ke zmenšení částic daleko efektivněji. Ze srovnání obou obrázků vyplývá, že velikost částic v emulzích připravených sonikací leží v oblasti nanometrů, zatímco emulze homogenizované Ultraturaxem obsahují částice s velikostí v řádu mikrometrů.

Zajímavé dále je, že sonikací se eliminuje negativní vliv většího množství oleje na růst velikosti částic a emulzní kapky tvořené větším množstvím oleje jsou dokonce o něco menší (tento jev se projevil jen v přítomnosti CAS/DX T10, ne však při použití DX T500).



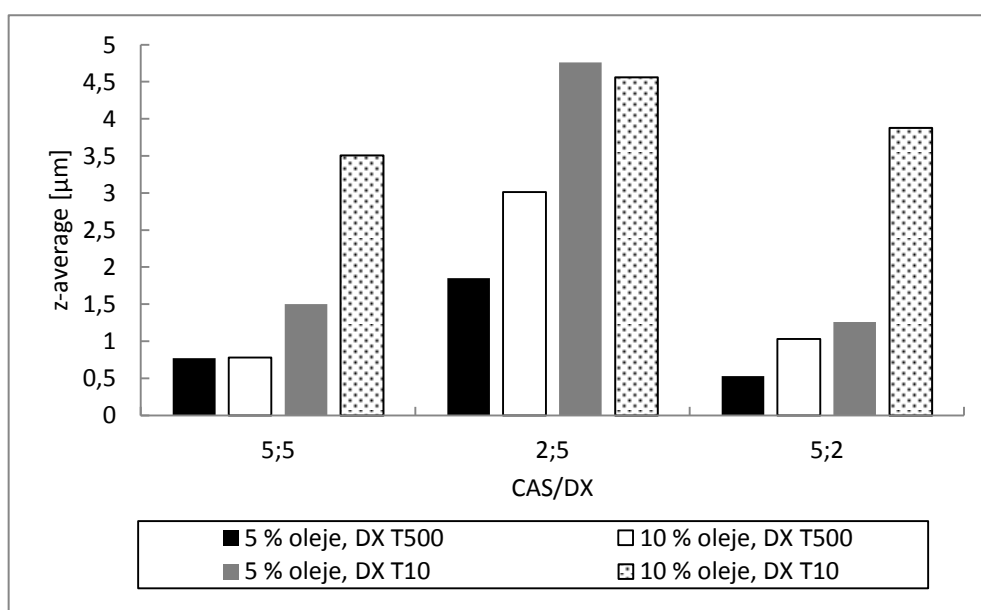
Obrázek 17 - Emulze o/v 5/95 a 10/90 stabilizované komplexem CAS/DX T10 připravené Ultraturaxem



Obrázek 18 - Emulze o/v 5/95 a 10/90 stabilizované komplexem CAS/DX T10 připravené sonikátorem

9.4.2.4 Vliv typu použitého emulgátoru na velikost částic

Obrázek 19 ilustruje, že při poměru CAS/DX 2/5 vznikaly větší emulzní částice, především pokud byl použit dextrans s nižší molekulovou hmotností T10. Pro srovnání byla stanovena i velikost částic v disperzi obsahující pouze komplex CAS/DX bez přídavku oleje (data nejsou uvedena). Rovněž v tomto případě byla pozorována větší velikost disperzních částic, které obsahovaly CAS a DX s nižší molekulovou hmotností. Velikosti částic v emulzích klesají v pořadí poměrů emulgátorů CAS/DX $5/2 < 5/5 < 2/5$ jak při použití Ultraturaxu, tak i sonikátoru.

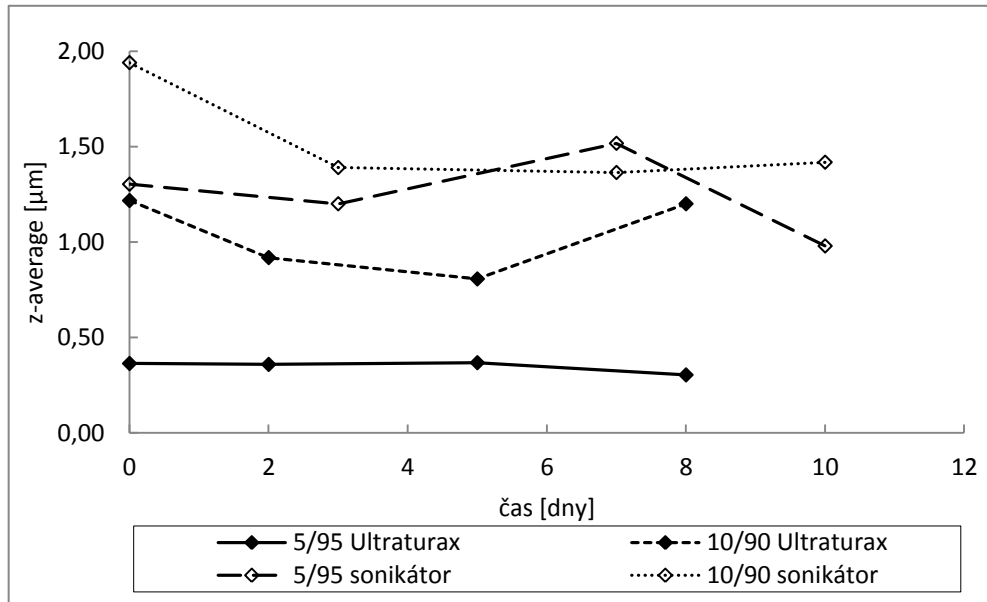


Obrázek 19 - Emulze o/v 5/95 a o/v 10/90 stabilizované dextrans T10 a T500 v komplexu s CAS, připravené Ultraturaxem

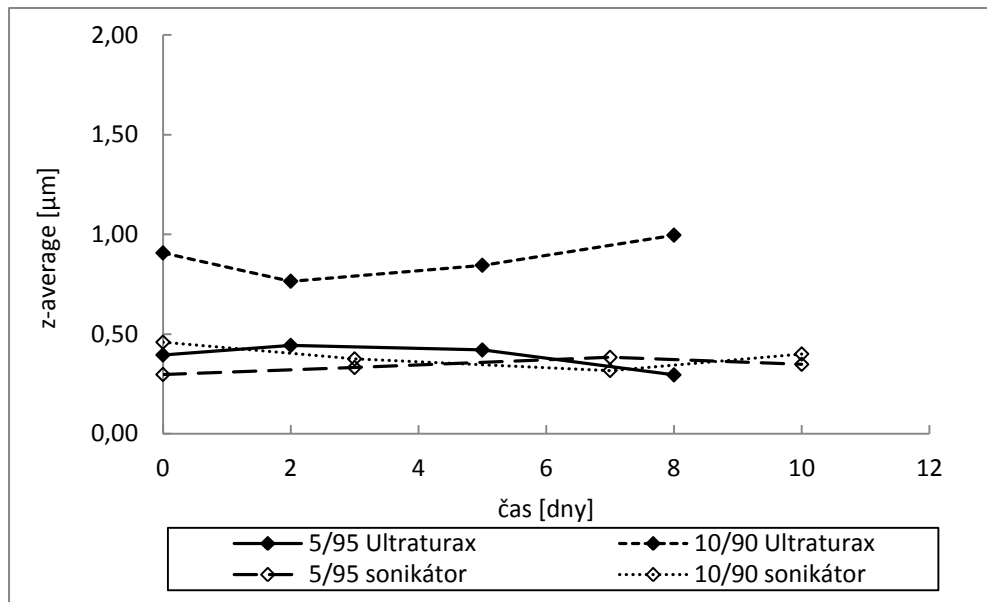
9.4.3 Stabilita emulzí

Velikost částic emulzí připravených na Ultraturaxu, stabilizovaných CAS v koncentracích 0,5; 1 a 2 %, se úměrně zvětšovala s prodlužující dobou jejich skladování (4-8 °C). Například v emulzi s obsahem 2 % CAS během 8 dnů pozorování rostla velikost částic z hodnoty $(0,53 \pm 0,07) \mu\text{m}$ na $(1,70 \pm 0,40) \mu\text{m}$ při obsahu oleje 5 % a z $(1,24 \pm 0,24) \mu\text{m}$ na $(2,67 \pm 0,28) \mu\text{m}$ při 10 % oleje. Emulze s koncentrací CAS ≥ 5 %, u kterých během 8 dnů nebyly pozorovány výraznější změny ve velikostech částic (Obr. 20-22), byly sledovány ještě další 20 dnů, takže po dobu 28 dnů nebyly u těchto vzorků pozorovány významnější změny. Emulze s adjustovaným pH 9 byly sledovány po kratší dobu. Důvodem byla jejich nestabilita a přítomnost velkých částic ihned po přípravě.

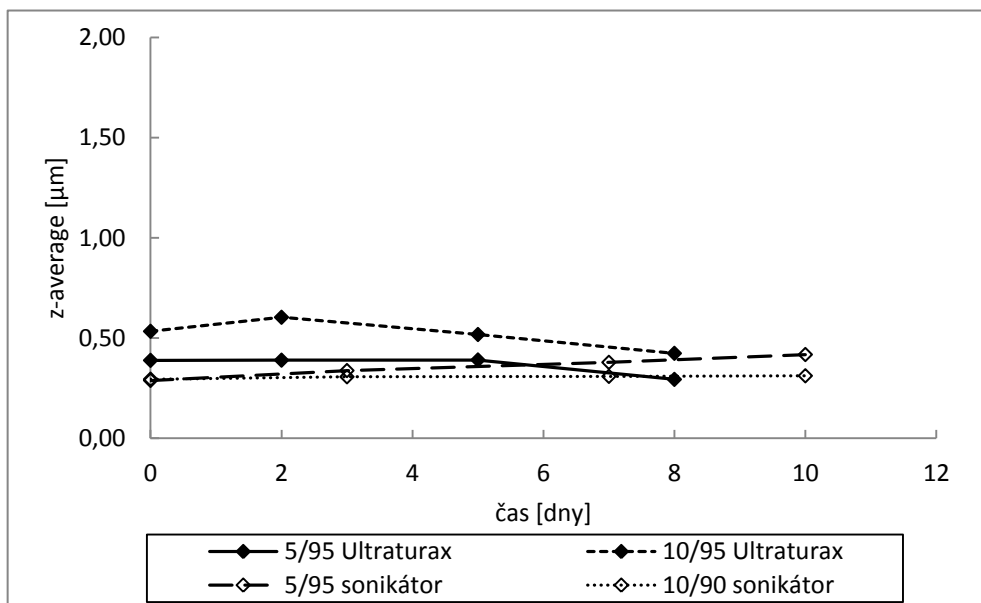
Sonikované emulze byly, s mírnými změnami zaznamenanými u emulzí s nižší koncentrací emulgátoru, stabilní 13 dnů, po které byly sledovány. Na Obr. 20-22 jsou zobrazeny výsledky stabilitního testu emulzí s obsahem CAS 5; 7,5 a 10 %, které byly stabilní po dobu 8 až 10 dnů.



Obrázek 20 - Stabilita emulzí s obsahem CAS 5 %

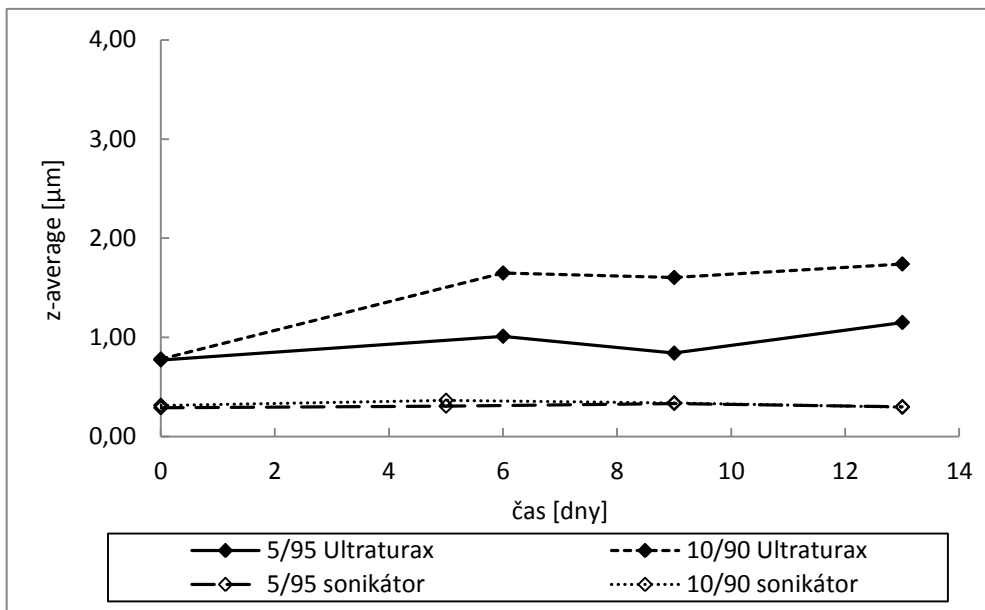


Obrázek 21- Stabilita emulzí s obsahem CAS 7,5 %

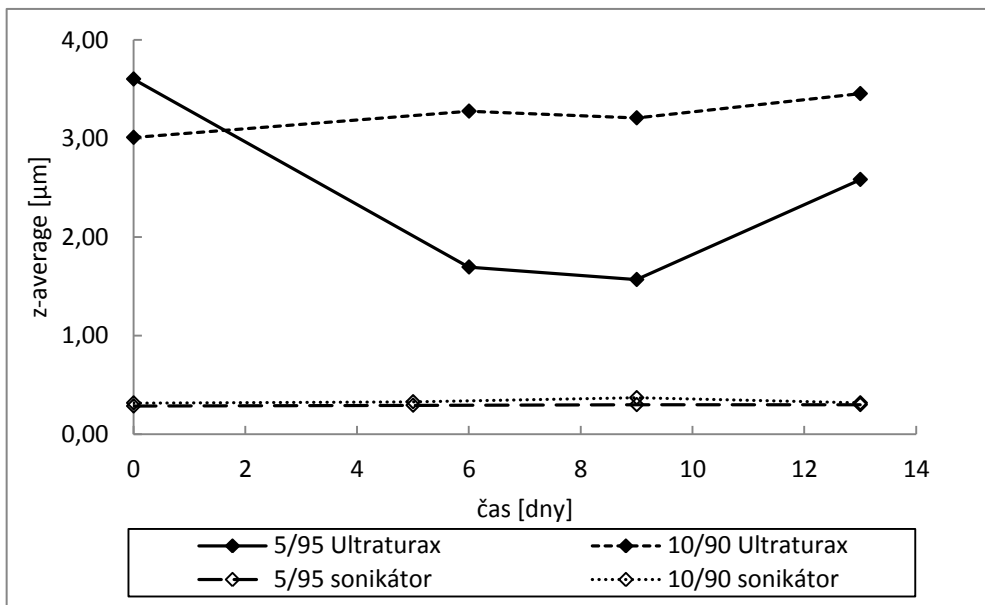


Obrázek 22 - Stability emulzí s obsahem CAS 10 %

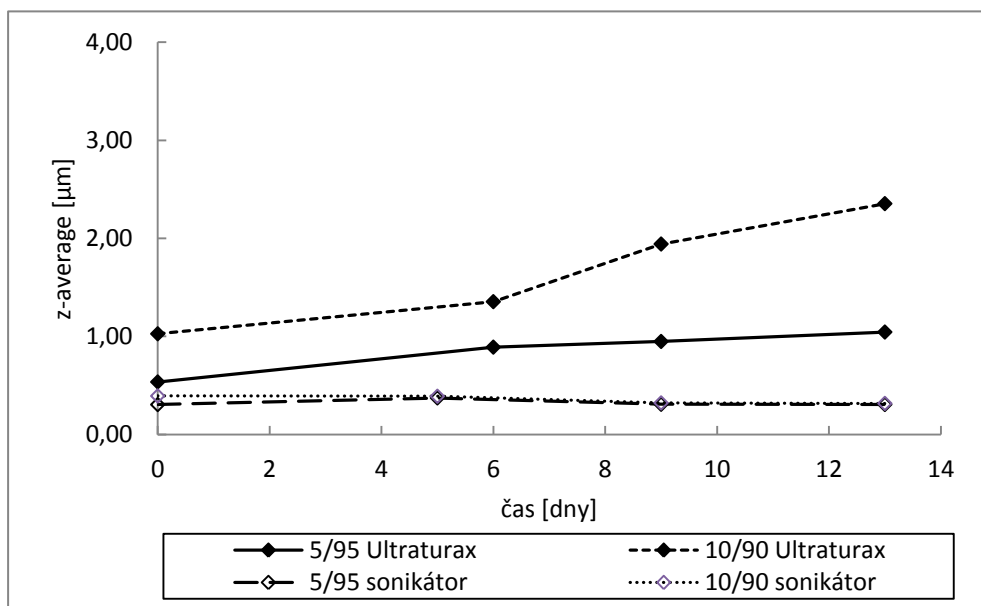
Emulze stabilizované komplexem CAS/DX T500 byly stabilní po 13 dnů a změny ve velikostech částic v závislosti na čase byly minimální. Stabilita nebyla rovněž ovlivněna poměrem emulgátorů. Emulze s komplexem CAS/DX T10 byly nestabilní, a proto byly sledovány pouze 3 dny. Obrázky 23-25 ilustrují změny v emulzích s DX T500 v komplexu s CAS. Zřejmá je malá velikost částic u sonikovaných emulzí a jejich významná stabilita. Naopak velké částice emulzí připravených na Ultraturaxu vykazují rozdílné chování, které je ovlivněno obsahem olejové fáze. V emulzích s CAS/DX 2/5 s 5 % oleje, velikosti částic s časem rostou. V tomto systému došlo nejprve ke zmenšení velikosti emulzních kapek a poté (po 9. dni) nastal jejich růst, jak je vidět na Obr. 24.



Obrázek 23 - Stabilita emulzí stabilizovaných komplexem CAS/DX T500 v poměru 5/5



Obrázek 24 - Stabilita emulzí stabilizovaných komplexem CAS/DX T500 v poměru 2/5



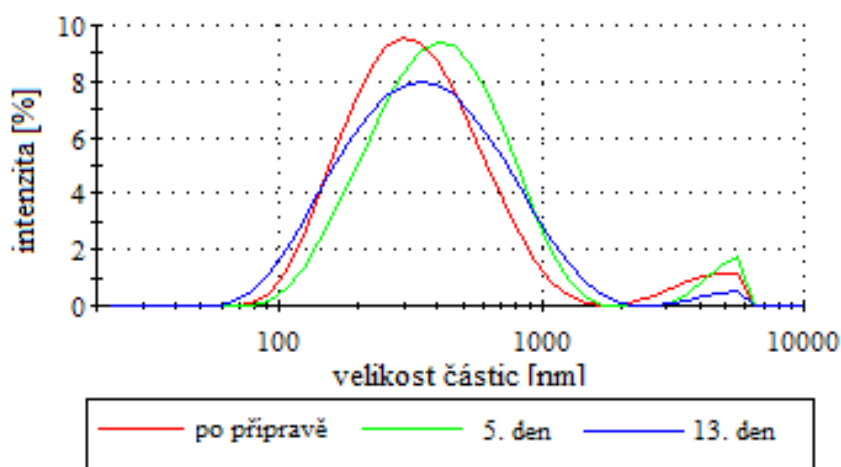
Obrázek 25 - Stabilita emulzí stabilizovaných komplexem CAS/DX T500 v poměru 5/2

Změny probíhající v emulzích během skladování bylo možno sledovat i pomocí distribučních křivek, představujících celou populaci částic přítomných v daném vzorku. Vybrané distribuce jsou, jako příklad, uvedeny na Obr. 26 a 27. Distribuce jsou bimodální, což značí přítomnost dvou populací částic o rozdílných velikostech. V Tab. 7 je možné sledovat, že průměrná velikost částic sonikovaných emulzí, obsahujících komplex CAS/DX T500 v poměru 5/2 s 5 % oleje se změnila v rozmezí 0,07 µm během 13 dnů skladování. Částice jsou v tomto vzorku uniformní, což lze usuzovat i z nízké hodnoty indexu polydisperzity (0,27-0,34). První populace částic v sonikovaných emulzích (první pík) představovala emulzní kapky o menší velikosti (0,4-0,5 µm). Zastoupení velkých částic (v mikronové oblasti, pík 2) se s prodlužujícím se časem skladování snižovala. Na Obr. 26 je tento druhý pík znázorněn pouze jako zlomek populace velkých částic, které Zetasizer nebyl schopen dále analyzovat.

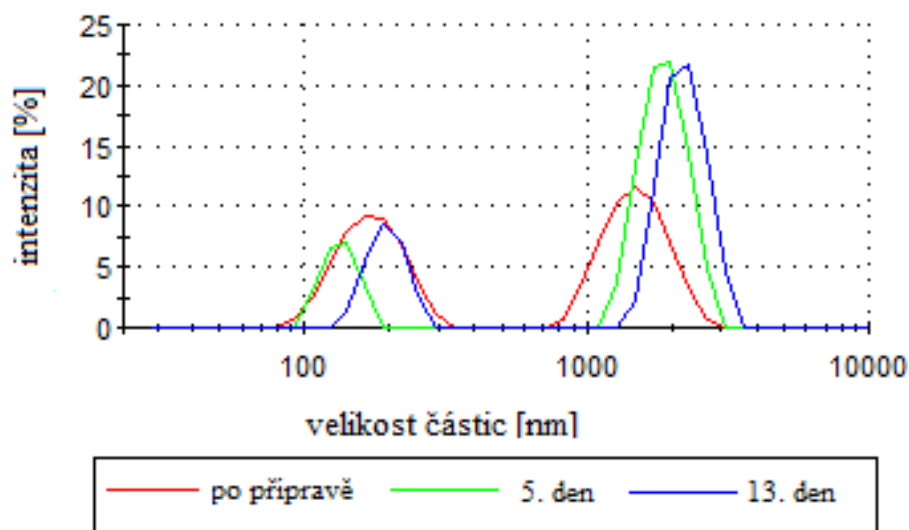
Druhá část tabulky uvádí stejné parametry emulzí připravených Ultraturaxem s obsahem komplexu CAS/DX T500 v poměru 5/5. U těchto emulzí byl zaznamenán větší posun ve velikostech částic. Populace menších částic se snižovala a populace větších částic rostla. Bimodální křivky, v porovnání s křivkami sonikovaných emulzí, změnily ode dne přípravy tvar i velikost. Lze tedy předpokládat, že chování studovaných emulzních systémů ovlivňuje jak rozdílný poměr emulgátoru CAS/DX, tak výběr homogenizačního zařízení, které výrazně ovlivnilo počáteční velikost částic i jejich následnou stabilitu.

Tabulka 7 – Změny velikosti částic (z-average), šířky distribuce (PDI) a zastoupení každé z populací částic ve vzorku; (S) - emulze sonikované, (U) - připravené Ultraturaxem. Emulze byly stabilizovány CAS/DX T500

Vzorek	Čas [dny]	Z-average [μm]	PDI	Velikost podle intezity [μm]		Zastoupení podle objemu [%]	
				pík 1	pík 2	pík 1	pík 2
CAS/DX (S)	1	0,30	0,27	0,4	4,2	86	14
	5	0,37	0,34	0,5	4,8	93	7
	13	0,31	0,28	0,4	4,7	97	3
CAS/DX (U)	1	0,52	0,69	0,2	1,5	8	92
	5	1,54	0,87	0,1	1,9	2	98
	13	1,80	0,85	0,2	2,2	2	98



Obrázek 26 - Změny distribuce velikosti částic během skladování; emulze o/v 5/95 stabilizované komplexem CAS/DX T500 v poměru 5/2 připravené sonikátorem

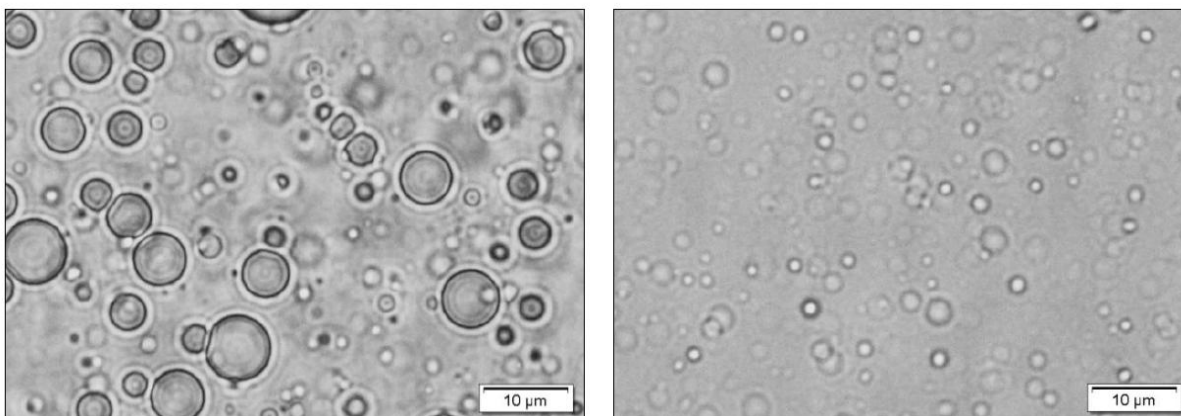


Obrázek 27 - Změny distribuce velikosti částic během skladování; emulze o/v 10/90 stabilizované komplexem CAS/DX T500 v poměru 5/5 připravené Ultraturaxem

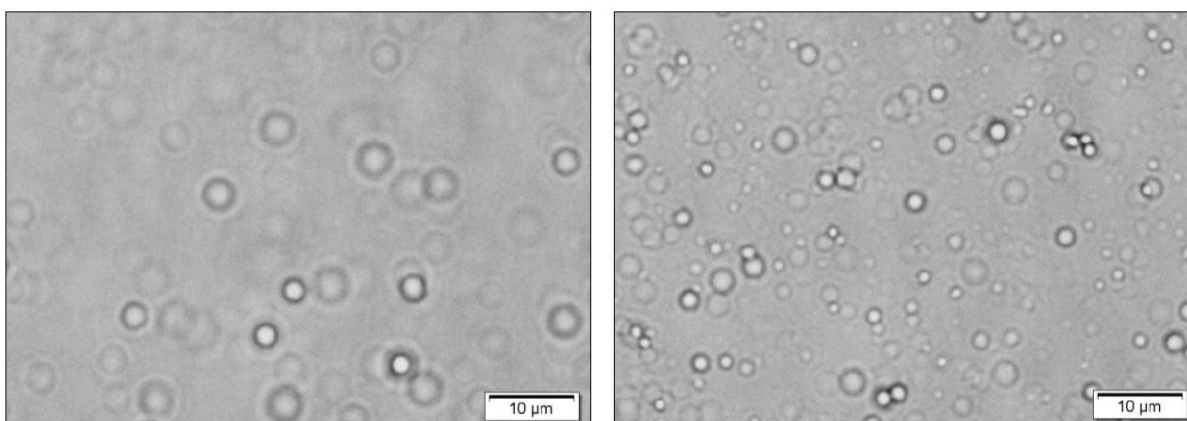
9.5 Mikroskopie

Snahou této části studie bylo objektivněji posoudit populaci velkých částic v emulzi, které nejsou detekovatelné pomocí Zetasizeru. K tomuto účelu byl nejprve použit analyzátor částic Mastersizer 3 000, Malvern Instruments, Ltd. s mokrou dispergační jednotkou, s rozsahem měření 0,01-3 500 μm . U analyzátoru se však brzy po začátku studie projevila závada a musel být odeslán na opravu. Alternativně bylo proto zvoleno mikroskopické pozorování (optická mikroskopie), které o velikosti částic také poskytuje důležité informace. Předmětem zájmu bylo i použití skenovacího elektronového mikroskopu (SEM), kterým by bylo možné sledovat povrchy částic a interakce na površích emulzních kapek. Pro tento účel je však nutné nejprve vyvinout metodu, jak vhodně zafixovat emulzní částice na pevný substrát.

Na Obr. 28 je možné sledovat rozdíl ve velikosti částic emulzí připravovaných Ultraturaxem a sonikátorem. Na levé části obrázku jsou patrné emulzní kapky s rozdílnou velikostí, z čehož lze usuzovat na širokou distribuci velikostí částic. Obrázek 29 ilustruje větší částice emulze připravené Ultraturaxem s obsahem oleje 5 % (vlevo) a částice sonikované emulze s 10 % oleje (vpravo), u kterých je možno sledovat počínající agregaci částic.



Obrázek 28 - Mikroskopická struktura kapek emulzí stabilizovaných 10 % CAS o rozdílných koncentracích oleje připravených Ultraturaxem (levý obrázek; o/v 10/90) a sonikátorem (pravý obrázek; o/v 5/95)



Obrázek 29 - Mikroskopická struktura kapek emulzí stabilizovaných komplexem CAS/DX T10 2/5 o rozdílných koncentracích oleje připravených Ultraturaxem (levý obrázek; o/v 5/95) a sonikátorem (pravý obrázek; o/v 10/90)

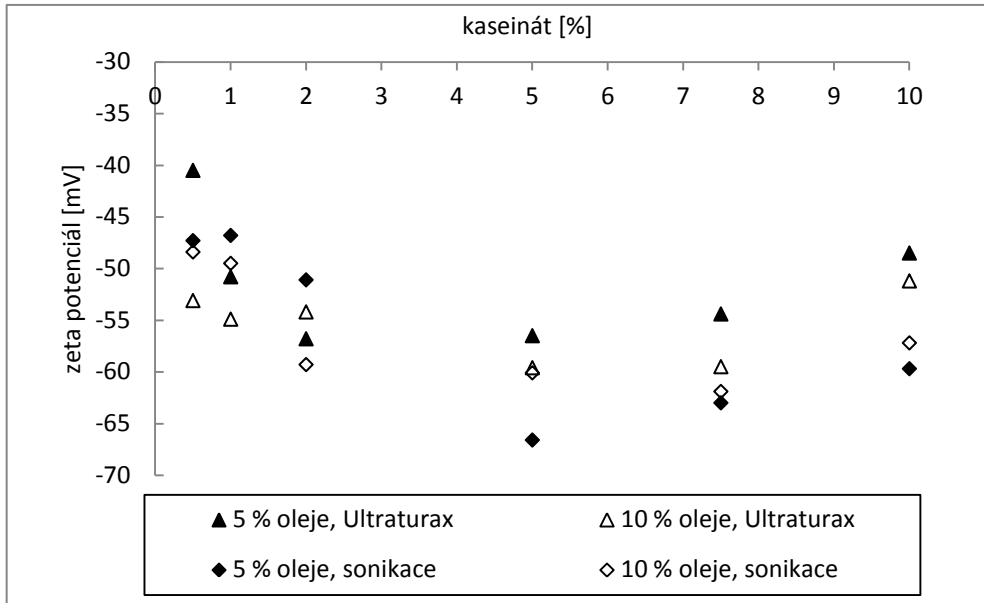
9.6 Zeta potenciál

Závislost ζ -potenciálu na koncentraci kaseinátu v emulzi je znázorněna na Obr. 30. Zároveň obrázek ilustruje vliv dalších proměnných, jako je způsob přípravy emulze či množství olejové fáze. Z výsledků vyplývá, že CAS, který stabilizuje emulze má při neadjustovaném pH (6,7 – 7,2), tedy při pH hodnotách vyšších než jejich isoelektrický bod, negativní náboj. Z Obr. 30 je zřejmé, že křivka závislosti ζ -potenciálu na koncentraci použitého emulgátoru má typický tvar, který je obdobný pro všechny emulze, ať už jsou připraveny Ultraturaxem

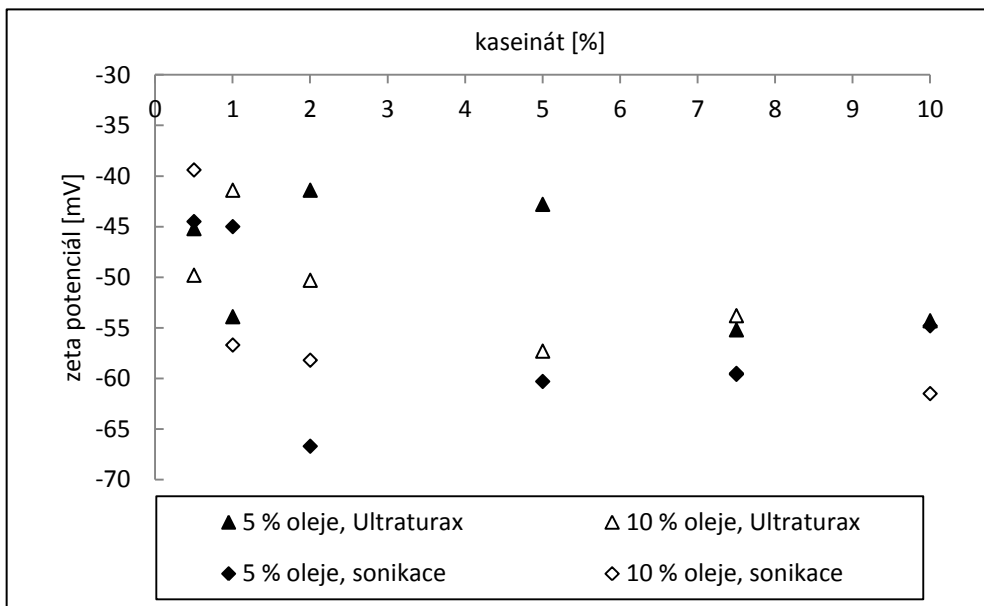
nebo sonikátorem a obsahují nižší či vyšší množství oleje. Při koncentraci 5 % CAS byl zaznamenán nejnižší ζ -potenciál ($-66,6 \pm 1,9$) mV, což znamená, že emulze o/v 5/95 stabilizované kaseinátem o této koncentraci by měly vykazovat největší stabilitu.

Obrázek 31 ilustruje obdobné emulze s disperzními fázemi adjustovanými na pH 9. U těchto emulzí není na první pohled přímá závislost ζ -potenciálu na koncentraci CAS. Nejnižší hodnoty ζ -potenciálu dosahuje sonikovaná emulze o/v 5/95 s 2 % CAS. Předpoklad, že při vyšší koncentraci CAS bude dosaženo nižších hodnot ζ -potenciálu, nebyl zcela prokázán.

U emulzí s kaseinátem a dextrans (CAS/DX) byl ζ -potenciál nižší než -30 mV, což je hodnota obecně udávaná pro dosažení stabilních disperzních systémů (Obr. 32-33). Výsledky měření částic i indexu krémování však ukázaly, že použití směsí kaseinátu s dextrans neposkytovalo stabilnější emulze ve srovnání se samotným CAS. Jourdain a kol. [50] ve své práci uvádí, že se ζ -potenciál po přidání polysacharidu (dextrans sulfát) ke kaseinátu snížil a vykazoval více záporné hodnoty. Hodnota ζ -potenciálu samotného kaseinátu sodného byla -32 mV a po přidání dextrans sulfátu -55 mV. V naší studii se ζ -potenciál samotného CAS a komplexu CAS/DX tak výrazně nelišil. Jednou z možných příčin těchto výsledků je nedokonalá tvorba komplexu kaseinát-dextrans. V diplomové práci bylo použito pro jeho tvorbu zahřátí rozpuštěných směsí CAS/DX na 40 °C a jejich následné ochlazení.

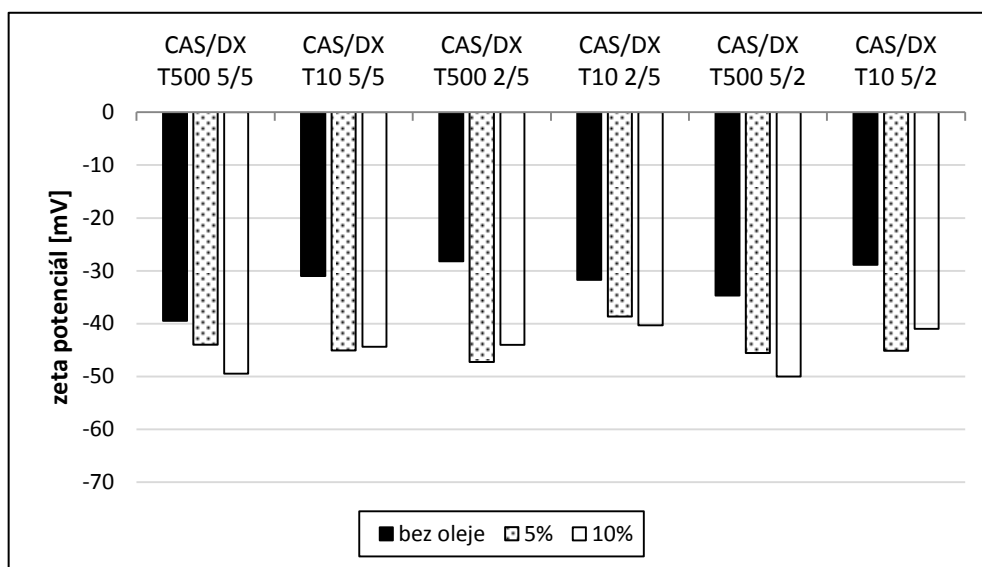


Obrázek 30 - Vliv koncentrace CAS na hodnotu ζ -potenciálu emulzí s neadjustovaným pH

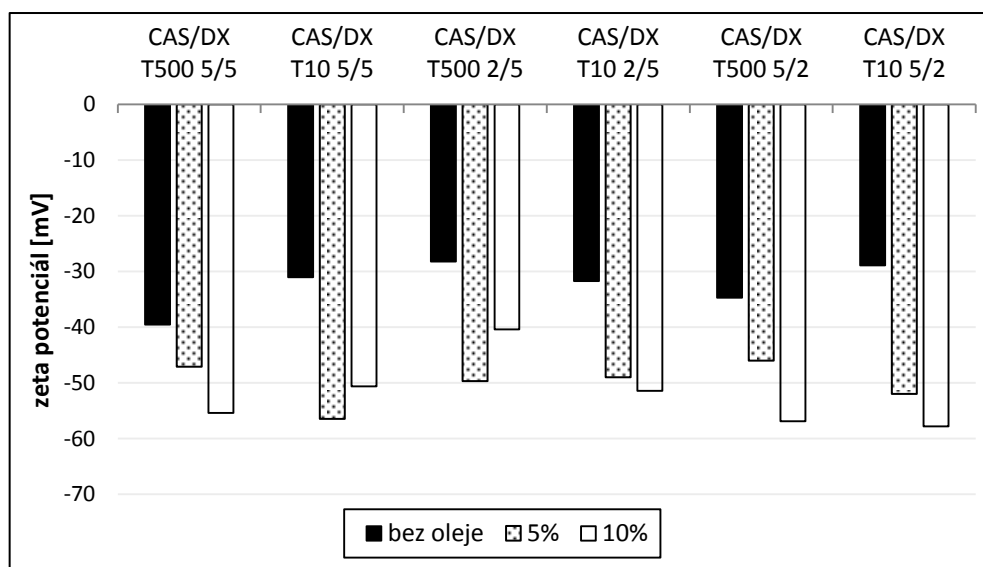


Obrázek 31 - Vliv koncentrace CAS na hodnotu ζ -potenciálu částic s adjustovanou hodnotou pH = 9

Hodnota ζ -potenciálu byla ovlivněna procesem emulgace a množstvím přidaného oleje. V případě emulzí připravených Ultraturaxem měla nejnižší hodnotu ζ -potenciálu, ($-50,0 \pm 0,4$) mV, emulze s CAS/DX T500 v poměru 5/2 a 10 % oleje (Obr. 32). U sonikovaných vzorků byla situace obdobná a komplexy emulgátorů snižovaly více ζ -potenciál emulzím 10/90. Nejnižší hodnoty ζ -potenciálu, ($-57,8 \pm 1,2$) mV, dosahovala emulze s CAS/DX T10 v poměru 5/2 a 10 % oleje (Obr. 33). Výjimkou byl ζ -potenciál sonikované emulze stabilizované CAS/DX T10 v poměru 5/5 s 5 % oleje, dosahující hodnoty ($-56,5 \pm 0,7$) mV.



Obrázek 32- Emulze stabilizované komplexem CAS/DX (T500 a DX T10) připravené Ultraturaxem



Obrázek 33 - Emulze stabilizované komplexem CAS/DX (T500 a DX T10) připravené sonikátorem

9.7 Index krémování

Index krémování byl stanoven podle (Rov. 13) z měření výšky vrstvy krémování (v milimetrech), které bylo provedeno vždy u nově připravených emulzí i během sledování jejich stability (obvykle každé 3 dny). V druhé polovině pozorování byly vzorky sledovány po delších časových intervalech. Měření výšky krémování bylo v některých případech obtížné, a to zvláště u emulzí s vyššími koncentracemi kaseinátu, kde hranice mezi emulzí a vrstvou krémování nebyla vždy zcela zřetelná. S vyšší koncentrací CAS byla emulze pod krémovací vrstvou tmavší díky větší koncentraci částic. Emulze s nižší koncentrací CAS byly více transparentní a bílá vrstva krémování s emulzí jasně kontrastovala.

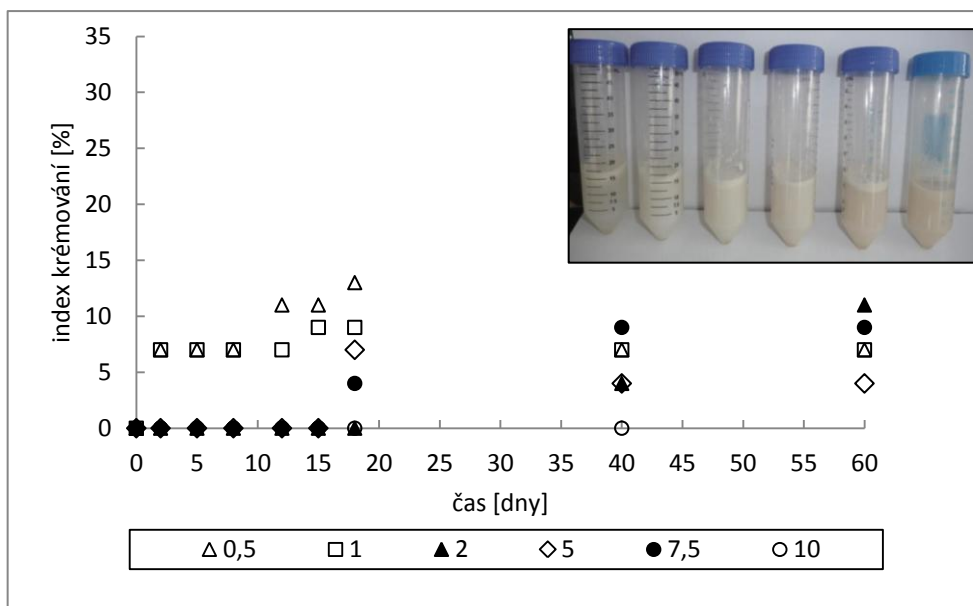
Ke konci studie vzorky vykazovaly nepříjemné sensorické vlastnosti, což lze přičítat přítomnosti vzniklých sekundárních oxidačních produktů použitého rybího oleje. Některé vzorky rovněž měnily zhruba po 40 dnech barvu. Vzorky s CAS připravené Ultraturaxem tmavly nebo se pod vrstvou krémování začalo objevovat slabé oranžové zbarvení. Vzorky připravené sonikací měly narůžovělou krémovou vrstvu. Tyto barevné změny mohly být projevem počínajícího mikrobiálního rozkladu.

9.7.1 Emulze připravené pomocí Ultraturaxu

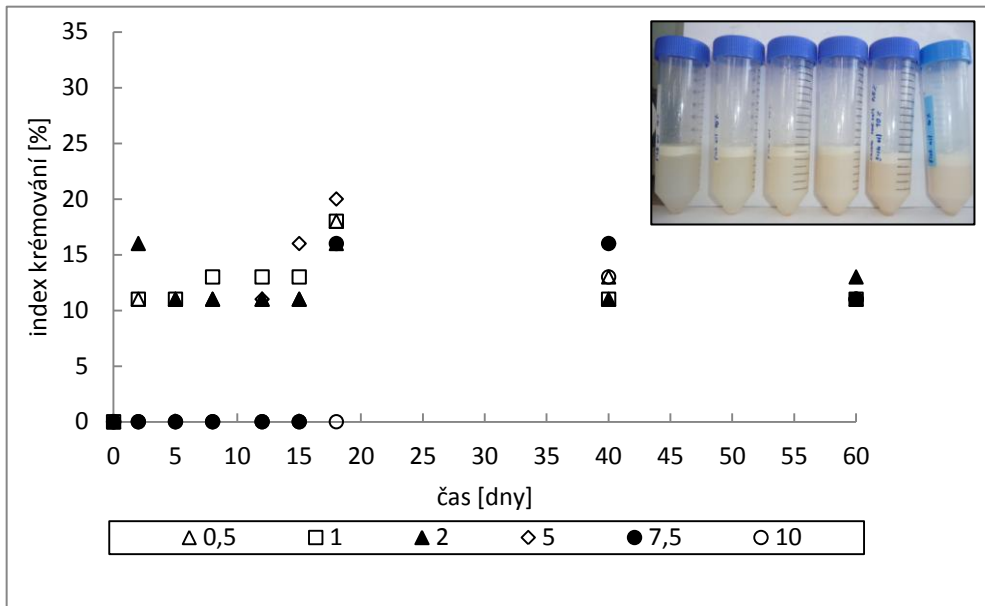
Všechny emulze stabilizované CAS s neadjustovaným i adjustovaným pH byly v den přípravy stabilní. V průběhu sledování stability však bylo patrné, že nízká koncentrace CAS nedokáže stabilizovat vzniklé kapky disperzní fáze, které se shlukovaly (pravděpodobně vlivem můstkové flokulace) a shromažďovaly na povrchu emulze. Obrázek 34 zároveň ukazuje, že emulze s vyšším obsahem CAS byly stabilní zhruba dva týdny. Při koncentraci CAS 10 % se krémování neobjevilo vůbec. Po 60 dnech však i tato emulze jevila známky nehomogenity.

Vyšší koncentrace olejové fáze vedla k rychlejšímu a výraznějšímu nástupu krémování (Obr. 35). U emulzí s poměrem o/v 10/90, kde bylo použito CAS s koncentracemi nižšími než 5 %, došlo ke krémování již v prvních dnech, emulze s 5 % CAS byla stabilní 8 dnů, emulze 7,5 % CAS 15 dnů a emulze 10 % CAS začala mírně krémovat po 18 dnech.

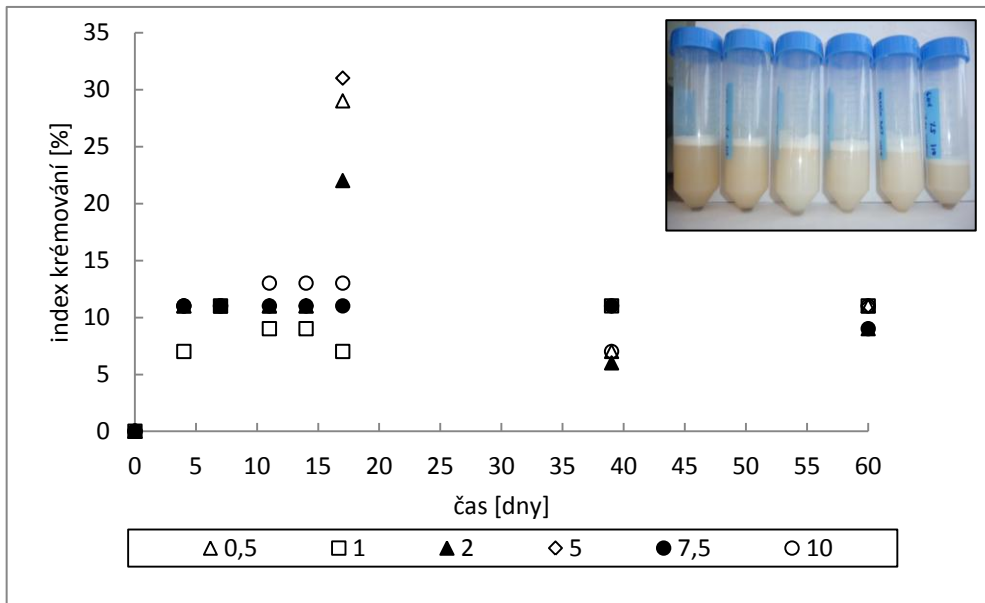
Na Obr. 36 a 37 je znázorněn výskyt vrstvy krémování u emulzí s adjustovaným pH a rozdílnými obsahy olejové fáze. Vrstva krémování se u těchto vzorků začala tvořit rychleji, především u emulzí s vyšším obsahem CAS. Například emulze s 7,5 % CAS a 10 % oleje, při neadjustovaném pH, měla IC = 16 % až v 18. den sledování, zatímco stejná emulze s adjustovaným pH krémovala již 5. den IC = 19 %. Při vyšší koncentraci oleje bylo opět zaznamenáno intenzivnější krémování.



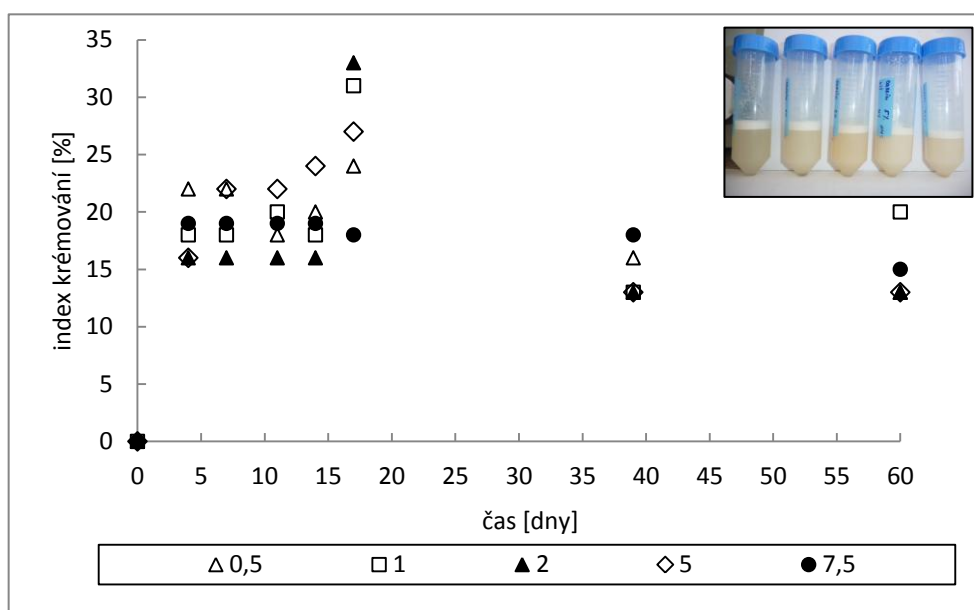
Obrázek 34 – Index krémování emulzí o/v 5/95 s přidavkem CAS v koncentracích 0,5; 1; 2; 5; 7,5 a 10 % připravených Ultraturaxem (pH = 7)



Obrázek 35 – Index krémování emulzí o/v 10/90 s přidavkem CAS v koncentracích 0,5; 1; 2; 5; 7,5 a 10 % připravených Ultraturaxem (pH = 7)



Obrázek 36 - Index krémování emulzí o/v 5/95 s přidavkem CAS v koncentracích 0,5; 1; 2; 5; 7,5 a 10 % připravených Ultraturaxem (pH = 9)



Obrázek 37 - Index krémování emulzí o/v 10/90 s přidavkem CAS v koncentracích 0,5; 1; 2; 5; 7,5 a 10 % připravených Ultraturaxem (pH = 9)

Mírné kolísání výšky vrstvy, a tedy i indexu krémování v rámci několika procent, bylo pravděpodobně důsledkem manipulace se vzorky během pozorování. Ve většině případů bylo dosaženo maximálního IC přibližně po 17 dnech od přípravy. V dalších dnech se výška vrstvy snižovala a stabilizovala.

Efekt snižování vrstvy krémování s časem bylo možné vysvětlit destabilizačními pochody, probíhajícími v emulzi během skladování. Pokud by došlo ke koalescenci více emulzních kapek, přítomných v krémovací vrstvě v jednu, její objem by se zvýšil, ale celkový povrch nové kapky by se zmenšil. Tím by mohlo dojít k uvolnění přebytečného stabilizujícího materiálu z povrchu kapek (CAS), který by se přesunul do kapalně, disperzní fáze. Tomuto procesu by napovídala i změna barvy emulze pod krémovací vrstvou. S časem tak pravděpodobně může docházet u stanovení rovnováhy mezi vrstvou emulzních kapek a disperzní fází.

9.7.2 Emulze připravené pomocí sonikátoru

U sonikovaných emulzí docházelo ke krémování brzy po jejich přípravě. Kinetická stabilita sonikovaných vzorků byla nízká. Vzhled emulzí byl mléčný a po lehkém promíchání homogenní. Čím byla vyšší vrstva krémování, tím více emulze pod ní ztrácela na mléčném

zabarvení. Podobně jako při použití Ultraturaxu byla pozorována závislost výšky vrstvy krémování na množství oleje.

Index krémování bylo o něco vyšší u emulzí s vyšším pH. Zde se mohlo projevit rozvolnění polymerního klubka a zvětšení částic stabilizujícího materiálu, který rozšířil i vrstvu krémování. Podle Biana [27] vyšší pH roztoku snižuje obsah fosforečnanu vápenatého, což vede ke snížení hydrofobních interakcí mezi kaseinovými bílkovinami a tedy zvýšené rozpustnosti kaseinových micel. Otázkou zůstává, zda fosforečnan obsažený v micelách v minoritním množství může natolik ovlivnit strukturu micel. Dosažené výsledky by tuto možnost mohly potvrzovat.

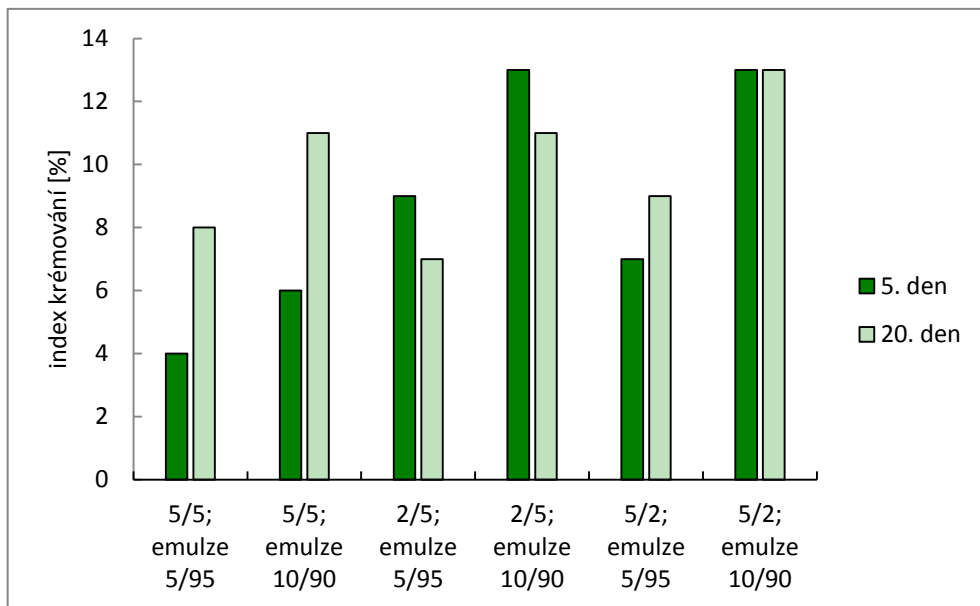
U emulze stabilizované 7,5 a 10 % CAS se v prvním týdnu skladování výška vrstvy krémování výrazně měnila, poté jejich index krémování výrazně stoupl a znovu se po čase snižoval. Emulze s nižšími koncentracemi CAS zůstávaly prakticky neměnné.

Pokud jde o vzhled emulzí, vzorky s 2 % CAS a 5 % CAS vykazovaly od počátku rozdílné chování, které se odráželo v odlišné barvě. Emulze s koncentrací CAS < 5 % byly mléčné a s vyšší koncentrací CAS vykazovaly pouze slabý zákal.

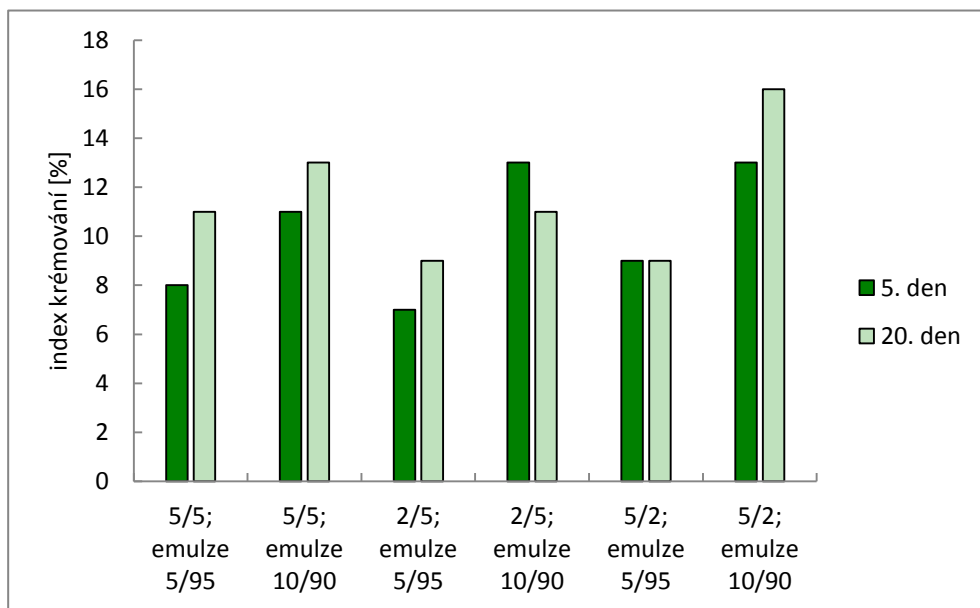
9.7.3 Komplex kaseinát-dextran

Krémování probíhalo i u emulzí stabilizovaných kaseinátem a dextranem. Zvolený typ hydrokoloidu, dextran, na první pohled nesplnil předpoklad prevence krémování modifikací reologických vlastností kontinuální fáze. Dickinson [22] popisuje jev, kdy při příliš nízké koncentraci hydrokoloidu má tato látka na emulzi destabilizující vliv. Díky depleční flokulaci, vyvolané neadsorbovaným hydrokoloidem, se posílí separace fází. Při vyšší koncentraci hydrokoloidu by mělo být krémování inhibováno, vzhledem k viskoelastickému chování propojených oblastí emulze, vytvářejících gelovitou strukturu.

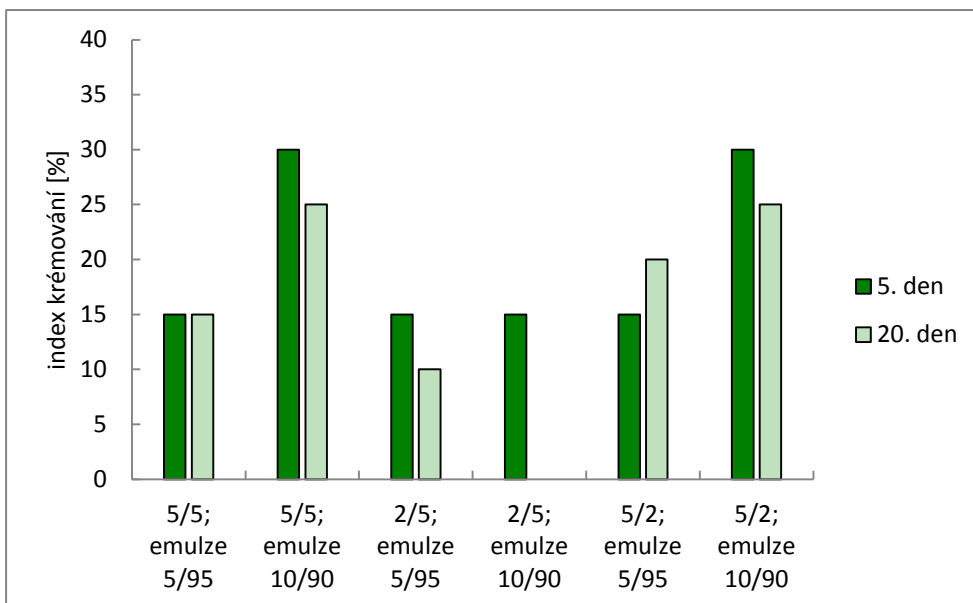
V den přípravy emulze připravené oběma způsoby nekrémovaly; 3. až 5. den byla výška vrstvy krémování již znatelná a obdobná při použití dextransu s vysokou nebo nízkou molekulovou hmotností. Emulze o/v 10/90 s komplexem CAS/DX 2/5 byla stabilní, nekrémující, po dobu 20 dnů (Obr. 40).



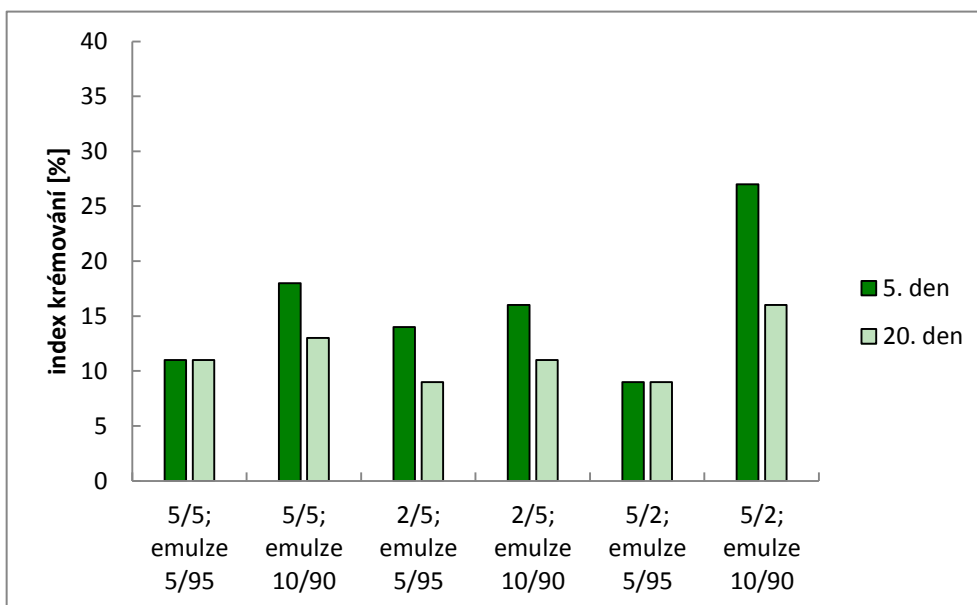
Obrázek 38 - Emulze o/v 5/95 a 10/90 s komplexem CAS/DX T500 připravené Ultraturaxem sledované 20 dnů



Obrázek 39 - Emulze o/v 5/95 a 10/90 s komplexem CAS/DX T10 připravené Ultraturaxem sledované 20 dnů



Obrázek 40 - Emulze o/v 5/95 a 10/90 s komplexem CAS/DX T500 připravené sonikátorem sledované 20 dnů



Obrázek 41 – Emulze o/v 5/95 a 10/90 s komplexem CAS/DX T10 připravené sonikátorem sledované 20 dnů

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo připravit emulze, resp. pre-emulze, obsahující rybí olej. Pre-emulze jsou obvykle využívány jako první krok před dalším emulgačním procesem, který se provádí za účelem následného zmenšení velikosti částic a posílení stability emulzí, např. pomocí vysokotlakého homogenizátoru.

Snahou této pilotní studie bylo realizovat kompletně biologický systém bez přidání klasických povrchově aktivních látek. Zvolený stabilizující materiál (kaseinát sodný), který zároveň sloužil jako emulgační činidlo snižující povrchové napětí mezi olejovou a vodnou fází, byl přírodního původu. Předmětem zájmu byla koncentrace tohoto emulgátoru, která by optimálně pokryla povrch emulzních kapek a byla schopna je dostatečně stabilizovat. Dále bylo studováno, zda dojde k průkazným změnám chování emulzních systémů po přidání komplexu původního emulgátoru proteinové povahy s polysacharidem, dextranem.

Představenou studií bylo zjištěno, že největší vliv na velikost emulzních částic, jejich distribuci a stabilitu má způsob přípravy. Sonikací (při vyšších koncentracích stabilizujícího materiálu) byly připraveny homogennější emulze s úzkou distribucí s malou velikostí částic. Emulze vystavené smykovému namáhání na Ultraturaxu měly větší částice a byly méně stabilní. Na jejich vlastnostech se výrazněji projeví změny složení, jako pH disperzní fáze, vyšší obsah oleje a typ emulgačního činidla.

Měření ζ -potenciálu prokázalo, že po přípravě nesly emulzní částice záporný náboj, díky kterému se vzájemně se odpuzovaly a zpočátku nejevily sklon k výrazným projevům fyzikální nestability. Během několika dnů však docházelo k vizuálně pozorovatelným změnám. Na povrchu emulzí vznikala vrstva krémování, a to v závislosti na počátečním množství stabilizující látky a koncentraci emulgované fáze.

Použití komplexu protein-polysacharid, jako stabilizátoru emulzních kapek, neposkytlo průkazně lepší výsledky, co se týká jak velikosti částic, tak stability emulze. Možným důvodem bylo nedostatečné vytvoření komplexu mezi kaseinátem a dextranem. Nalezení postupu vedoucího k lepší tvorbě komplexu těchto emulgátorů, např. sušením, by proto mohlo být námětem pro další výzkum.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] DOSTÁL, Jiří a Petr KAPLAN. *Lékařská chemie II*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2001, s. 223. ISBN 80-210-2731-2.
- [2] HOLEČEK, Milan. *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006, s. 286. ISBN 80-247-1562-7.
- [3] KRITCHEVSKY, David. Fats and Oils in Human Health. AKOH, Casimir C. a David B. MIN. *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. 3 vydání. Boca Raton: CRC Press/Taylor, 2008, s. 499-506. ISBN 1420046632.
- [4] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Vyd. 1. Tábor: OSSIS, 1999, 3 vydání. s. 328. ISBN 80-902391-4-5.
- [5] O'KEEFE, Sean Francis. Nomenclature and Classification of Lipids. AKOH, Casimir C. a David B. MIN. *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. 3 vydání. Boca Raton: CRC Press/Taylor, 2008, s. 3-35. ISBN 1420046632.
- [6] MOUREK, Jindřich. *Mastné kyseliny Omega-3: zdraví a vývoj*. 2., rozš. vyd. Praha: Triton, 2009, s. 187. ISBN 978-80-7387-310-3.
- [7] WATKINS, Steven M. a J. Bruce GERMAN. Unsaturated Fatty Acids. AKOH, Casimir C. a David B. MIN. *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. 3 vydání. Boca Raton: CRC Press/Taylor, 2008, s. 514-530. ISBN 1420046632.
- [8] BEINDORFF, Christian M. a Nicholas J. ZUIDAM. Microencapsulation of Fish Oil. ZUIDAM, Nicholas Jan a Viktor NEDOVIĆ. *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*. London: Springer, 2009, s. 161-186. ISBN 1441910077.
- [9] FREJ, David. *Zdravé tuky omega*. Praha: Nakladatelství EB, 2004. ISBN 80-903234-1-3.
- [10] Scientific Opinion on Fish Oil for Human Consumption. Food Hygiene, including Rancidity. *EFSA Journal* [online]. 2010, 8(10), č. 1874, s. 1-48 [cit. 2015-01-31]. Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu/it/search/doc/1874.pdf>
- [11] BREIVIK, Harald. *Long-chain omega-3 specialty oils*. Bridgwater, England: Oily Press, 2007, s. 299. ISBN 0955251214.
- [12] FAGRON A.S. KONTROLNÍ LABORATOŘ Č. 536. *Certifikát o ověření jakosti léčivé látky, přípravku: Jecoris Aselli Oleum (Typus A)*. 27. 5. 2014.
- [13] KLURFELD, David M. Dietary Fats, Eicosanoids, and the Immune System. AKOH,

Casimir C. a David B. MIN. *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. 3 vydání. Boca Raton: CRC Press/Taylor, 2008, s. 539-548. ISBN 1420046632.

- [14] KLUSÁČKOVÁ, Zdeňka a Alice SKOUMALOVÁ. Úloha mastných kyselin v rozvoji Alzheimerovy choroby. *Klinická chemie a metabolismus* [online]. 2012, č. 3, s. 182-187 [cit. 2015-02-04]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2012/2012-3/KBM12-3-Klusackova-182.pdf>
- [15] DOSTÁLOVÁ, Jana et al. *Společnost pro výživu: Výživová doporučení pro obyvatelstvo České republiky* [online]. 2012, 16. 4. 2012 [cit. 2015-02-04]. Dostupné z: <http://www.vyzivaspol.cz/rubrika-dokumenty/konecne-zneni-vyzivovych-doporuceni.html>
- [16] SUKOVÁ, Irena. Metody enkapsulace: Popis principů metody kapkové, nanášecí, emulzifikační a potahovací. *Agronavigátor* [online]. 2010, č. 105420 [cit. 2015-02-05]. Dostupné z: <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=154&ch=13&typ=1&val=105420>
- [17] JANSEN, Jocélia a Howard I. MAIBACH Encapsulation to Deliver Topical Actives. *Handbook of cosmetic science and technology*. 2nd ed. New York: Taylor, 2006, 125 - 140. ISBN 1-57444-824-2.
- [18] TADROS, Tharwat, P IZQUIERDO, J ESQUENA a C SOLANS. Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2004, 108-109, s. 303-318. DOI: 10.1016/j.cis.2003.10.023. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000186860300157X>
- [19] KŘÍŽOVÁ, Markéta. *Příprava stabilních mikroemulzí 1-monoacylglycerolů s antimikrobními účinky*. Zlín, 2011. s. 69. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Věra Kašpárková.
- [20] KVÍTEK, Libor a Aleš PANÁČEK. *Základy koloidní chemie*. Olomouc: Katedra fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, 2007. s. 52.
- [21] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Procesy a zařízení v potravinářství a biotechnologiích*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2013, s. 496. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-163-4.
- [22] DICKINSON, Eric. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids* [online]. 2009, vol. 23, issue 6, s. 1473-1482 [cit. 2015-04-02]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2008.08.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X08001902>

- [23] MCCLEMENTS, David Julian. Protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid*. 2004, vol. 9, issue 5. DOI: 10.1016/j.cocis.2004.09.003.
- [24] Generation of Emulsions by Ultrasonic Cavitation. HIELSCHER. *Hielscher: Ultrasound Technology* [online]. [cit. 2015-02-17]. Dostupné z: http://www.hielscher.com/emulsify_01.htm
- [25] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Co byste měli vědět o výrobě potravin? Technologie potravin*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2009, s. 536. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-051-4.
- [26] USTUNOL, Zeynep. *Applied food protein chemistry*. Chichester: John Wiley & Sons, 2015, s. 503, [2] s. obr. příl. ISBN 978-1-119-94449-2.
- [27] BIAN, Hang. *Colloidal behavior of casein biopolymer in alkaline solution and its application in self-levelling underlayments (SLUs)*. München, 2012. Disertační práce. Technische Universität München. Vedoucí práce Volker A. Sieber.
- [28] How Does Milk Protein Concentrate and Isolate Differ from Casein or Caseinates? In: *Idaho Milk Products* [online]. 2011 [cit. 2015-03-03]. Dostupné z: <http://idahomilkproducts.com/content/how-does-milk-protein-concentrate-differ-casein-or-caseinates>
- [29] BINDER, Michael, Jan DRBOHLAV, Marta PECHAČOVÁ a Jan JARMAR. Tepelná stabilita nápojů na bázi mléčných složek v závislosti na koncentraci syrovátkových bílkovin. *Mlékařské listy*. 2012, č. 135, s. 15-20.
- [30] Polymers and macromolecules. ATTWOOD, Alexander T. Florence; David. *Physicochemical principles of pharmacy*. 4. ed., reprinted. London [u.a.]: Pharmaceutical Press, 2007, s. 273-329. ISBN 085369608x.
- [31] AKEN, George A. Polysaccharides in Food Emulsions. STEPHEN, Alistair M., Glyn O. PHILLIPS a Peter A. WILLIAMS. *Food polysaccharides and their applications*. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC/Taylor, 2006, s. 521-537. Food science and technology Taylor. ISBN 9780824759223.
- [32] Emulsions, dispersions and other disperse systems. ATTWOOD, Alexander T. Florence; David. *Physicochemical principles of pharmacy*. 4. ed., reprinted. London [u.a.]: Pharmaceutical Press, 2007, s. 229-273. ISBN 085369608x.
- [33] DAY, L., M. XU a M. AUGUSTIN. Characterisation of fish oil emulsions stabilised by

- sodium caseinate. *Food Chemistry* [online]. 2007, vol. 105, issue 2. [cit. 2015-04-03]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.04.013.
- [34] ČSN online: pro jednotlivce. [online]. [cit. 2015-04-03]. Dostupné z: <https://csnonline.unmz.cz/>
- [35] SHAHIDI, Fereidoon a Udaya N. WANASUNDARA Oxidative Rancidity in Fats and Oils. AKOH, Casimir C. a David B MIN. *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press/Taylor, 2008, s. 387-403. ISBN 1420046632.
- [36] GUNSTONE, F. *Oils and fats in the food industry*. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell Pub., 2008, s. 146. ISBN 14-051-7121-9.
- [37] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Co je co v povrchové a koloidní chemii*. [online]. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2005 [cit. 2015-01-03]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/
- [38] NIELSEN, Nina Skall, Anna Frisenfeldt HORN a Charlotte JACOBSEN. Effect of emulsifier type, pH and iron on oxidative stability of 5% fish oil-in-water emulsions. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. 2013, vol. 115, issue 8, s. 874-889 [cit. 2015-04-04]. DOI: 10.1002/ejlt.201200303.
- [39] MALVERN INSTRUMENTS LTD. *Zeta potential - An introduction in 30 minutes*. Technical note. 2015, s. 15.
- [40] Stabilita suspenzí a disperzí: Proč jsou parametry jako velikost částic, zeta potenciál a reologické vlastnosti tak důležité? *Chemagazín*, 2011, XXI, č. 2, s. 6-8.
- [41] PIVOKONSKÝ, Martin. Úprava podzemních a povrchových vod: 2. přednáška. In: [online]. [cit. 2015-04-14]. Dostupné z: http://www.pivokonsky.wz.cz/UV/uprava_vod_2.pdf
- [42] HÁJKOVÁ, Hana. *Studium disperzity nanoemulzních nosičů léčiv*. Hradec Králové, 2009. s. 59. Dostupné z: <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/71986/Rigorózní práce>. Univerzita Karlova v Praze. Vedoucí práce Pavel Doležal.
- [43] AGHBASHLO, Mortaza, Hossien MOBLI, Ashkan MADADLOU a Shahin RAFIEE. The correlation of wall material composition with flow characteristics and encapsulation behavior of fish oil emulsion. *Food Research International* [online]. 2012, vol. 49, issue 1, s. 379-388 [cit. 2015-04-04]. DOI: 10.1016/j.foodres.2012.07.031.

- [44] KLAYPRADIT, Wanwimol a Yao-Wen HUANG. Fish oil encapsulation with chitosan using ultrasonic atomizer. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2008, vol. 41, issue 6, s. 1133-1139 [cit. 2015-04-04]. DOI: 10.1016/j.lwt.2007.06.014.
- [45] ZINOVIADOU, Kyriaki G., Elke SCHOLTEN, Thomas MOSCHAKIS a Costas G. BILIADERIS. Properties of emulsions stabilised by sodium caseinate–chitosan complexes. *International Dairy Journal* [online]. 2012, vol. 26, issue 1, s. 94-101 [cit. 2015-04-04]. DOI: 10.1016/j.idairyj.2012.01.007.
- [46] KATSUDA, Marly S., D. J. MCCLEMENTS, Lucia H. S. MIGLIORANZA a Eric A. DECKER. Physical and Oxidative Stability of Fish Oil-in-Water Emulsions Stabilized with β -Lactoglobulin and Pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2008, vol. 56, issue 14, s. 5926-5931 [cit. 2015-04-04]. DOI: 10.1021/jf800574s.
- [47] Jecoris aselli oleum (Typus A). *Český lékopis 1997* [online]. [cit. 2015-04-05]. Dostupné z: <http://www.lekopis.cz/>
- [48] SIGMA-ALDRICH, Inc. *Product information: Casein sodium salt form bovine milk*. Sant Louis, Missouri, USA.
- [49] LIU, Yan a Rong GUO. PH-dependent structures and properties of casein micelles. *Biophysical Chemistry* [online]. 2008, vol. 136, 2-3, s. 67-73 [cit. 2015-05-07]. DOI: 10.1016/j.bpc.2008.03.012.
- [50] JOURDAIN, Laureline, Martin E. LESER, Christophe SCHMITT, Martin MICHEL a Eric DICKINSON. Stability of emulsions containing sodium caseinate and dextran sulfate: Relationship to complexation in solution. *Food Hydrocolloids* [online]. 2008, vol. 22, issue 4, s. 647-659 [cit. 2015-04-16]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2007.01.007.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

MK	mastná kyselina
SFA	nasyčená mastná kyselina (z angl. saturated fatty acid)
MUFA	monoenová mastná kyselina (z angl. monounsaturated fatty acid)
PUFA, PUFA-LC	polynenasycená mastná kyselina nebo polynenasycená mastná kyselina s dlouhým řetězcem (z angl. polyunsaturated fatty acid with long chain)
TEWL	transepidermální ztráta vody (z angl. transepidermal water loss)
EPA	eikosapentaenová kyselina
DHA	dokosahexaenová kyselina
HLB	hydrofilně-lipofilní rovnováha
GC	plynová chromatografie (z angl. gas chromatography) nebo také plynový chromatograf
HPLC	kapalinová chromatografie (z angl. high-performance liquid chromatography)
TLC	tenkovrstvá chromatografie (z angl. thin layer chromatography)
CD	obsah celkových dienuů
CT	obsah celkových trienuů
DLC	dynamický rozptyl světla (z angl. dynamic light scattering)
PDI	index polydisperzity neboli šířka distribuce (z angl. polydisperzity index)
CAS	kaseinát sodný
DX	dextran
CAS/DX	komplex kaseinátu a dextranu
IC	index krémování (z angl. index of creaming)
SEM	skenovací elektronový mikroskop (angl. scanning electron microscope)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Syntéza nenasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem, kde na pravé straně vznikají důležité ω -3 MK - kyselina eikosapentaenová (EPA) a dokosahexaenová (DHA) [4, s. 79]	15
Obrázek 2 - Enzymatické reakce, které předcházejí vzniku eikosanoidů [13, s. 540]	18
Obrázek 3 - Fáze lipoxidace [8, s. 166]	20
Obrázek 4 - Příčný řez submicelou (hydrofobní část molekuly je vyznačena čárkování) a strukturu kaseinové micely [4, s. 46] [27, s. 12]	27
Obrázek 5 - Vazba koloidního fosfátu vápenatého [27, s. 16]	28
Obrázek 6 - Znázornění fragmentu dextranové struktury [30, s. 299]	29
Obrázek 7 - Alternativní způsoby uspořádání vrstvy skládající se z komplexu protein-polysacharid na rozhraní vody a oleje [22, s. 1479]	31
Obrázek 8 - Možné distribuce částic v emulzi: (a) stabilní emulze; (b) krémující emulze, kde částice nejsou agregovány; (c) separující se emulze, kde částice agregují. Šipkami je znázorněn směr pohybu viditelné hranice mezi koncentrovanou a zředěnou částí [31, s. 530]	31
Obrázek 9 - Emulzní kapky (tmavá) obklopené depleční vrstvou (světlá) [31, s. 526]	33
Obrázek 10 - Nárazy molekul disperzního prostředí na koloidní částici (A) a střední posun částice (B) [20, s. 10, 11]	37
Obrázek 11 - Srovnání distribucí velikosti částic podle počtu, objemu a intenzity ve vzorku s částicemi 5 a 50 nm v poměru 1 : 1 [38, s. 41]	39
Obrázek 12 - Elektrická dvojvrstva [41]	40
Obrázek 13 - Kyveta s elektrodami [42, s. 16]	41
Obrázek 14 - Emulze o/v 10/90 stabilizované CAS v koncentracích 0,5-10 % připravené Ultraturaxem při pH 7 a 9	59
Obrázek 15 - Emulze (pH 7) stabilizované CAS v koncentracích 0,5-10 % připravené Ultraturaxem. Obsah olejové fáze 5 a 10 %	60
Obrázek 16 - Emulze o/v 5/95 (pH 7) stabilizované CAS v koncentracích 0,5-10 %, připravené Ultraturaxem a sonikátorem	61
Obrázek 17 - Emulze o/v 5/95 a 10/90 stabilizované komplexem CAS/DX T10 připravené Ultraturaxem	62
Obrázek 18 - Emulze o/v 5/95 a 10/90 stabilizované komplexem CAS/DX T10 připravené sonikátorem	62

Obrázek 19 - Emulze o/v 5/95 a 10/90 stabilizované dextranskem T10 a T500 v komplexu s CAS, připravené Ultraturaxem	63
Obrázek 20 - Stabilita emulzí s obsahem CAS 5 %	64
Obrázek 21 - Stabilita emulzí s obsahem CAS 7,5 %	64
Obrázek 22 - Stabilita emulzí s obsahem CAS 10 %	65
Obrázek 23 - Stabilita emulzí stabilizovaných komplexem CAS/DX T500 v poměru 5/5	66
Obrázek 24 - Stabilita emulzí stabilizovaných komplexem CAS/DX T500 v poměru 2/5	66
Obrázek 25 - Stabilita emulzí stabilizovaných komplexem CAS/DX T500 v poměru 5/2	67
Obrázek 26 - Změny distribuce velikosti částic během skladování; emulze o/v 5/95 stabilizované komplexem CAS/DX T500 v poměru 5/2 připravené sonikátorem.....	68
Obrázek 27 - Změny distribuce velikosti částic během skladování; emulze o/v 10/90 stabilizované komplexem CAS/DX T500 v poměru 5/5 připravené Ultraturaxem.....	69
Obrázek 28 - Mikroskopická struktura kapek emulzí stabilizovaných 10 % CAS o rozdílných koncentracích oleje připravených Ultraturaxem (levý obrázek; o/v 10/90) a sonikátorem (pravý obrázek; o/v 5/95)	70
Obrázek 29 - Mikroskopická struktura kapek emulzí stabilizovaných komplexem CAS/DX T10 2/5 o rozdílných koncentracích oleje připravených Ultraturaxem (levý obrázek; o/v 5/95) a sonikátorem (pravý obrázek; o/v 10/90)	70
Obrázek 30 - Vliv koncentrace CAS na hodnotu ζ -potenciálu emulzí s neadjustovaným pH	72
Obrázek 31 - Vliv koncentrace CAS na hodnotu ζ -potenciálu emulzí s adjustovanou hodnotou pH = 9	72
Obrázek 32- Emulze stabilizované komplexem CAS/DX (T500 a DXT10) připravené Ultraturaxem.....	73
Obrázek 33 - Emulze stabilizované komplexem CAS/DX (T500 a DX T10) připravené sonikátorem.....	73
Obrázek 34 – Index krémování emulzí o/v 5/95 s přidavkem CAS v koncentracích 0,5; 1; 2; 5; 7,5 a 10 % připravených Ultraturaxem (pH = 7)	75

Obrázek 35 – Index krémování emulzí o/v 10/90 s přídavkem CAS v koncentracích 0,5; 1; 2; 5; 7,5 a 10 % připravených Ultraturaxem (pH = 7)	76
Obrázek 36 - Index krémování emulzí o/v 5/95 s přídavkem CAS v koncentracích 0,5; 1; 2; 5; 7,5 a 10 % připravených Ultraturaxem (pH = 9)	76
Obrázek 37 - Index krémování emulzí o/v 5/95 s přídavkem CAS v koncentracích 0,5; 1; 2; 5; 7,5 a 10 % připravených Ultraturaxem (pH = 9)	77
Obrázek 38 - Emulze o/v 5/95 a 10/90 s komplexem CAS/DX T500 připravené Ultraturaxem sledované 20 dnů.....	79
Obrázek 39 - Emulze o/v 5/95 a 10/90 s komplexem CAS/DX T10 připravené Ultraturaxem sledované 20 dnů.....	79
Obrázek 40 - Emulze o/v 5/95 a 10/90 s komplexem CAS/DX T500 připravené sonikátorem sledované 20 dnů.....	80
Obrázek 41 - Emulze o/v 5/95 a 10/90 s komplexem CAS/DX T10 připravené sonikátorem sledované 20 dnů.....	80

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Zastoupení vybraných MK v tuku některých ryb a zastoupení stejných MK v léčivém přípravku z tresčího jaterního tuku dostupném v lékárnách [8, s. 163] [12]	17
Tabulka 2 - Přehled složení emulzí o/v připravených s komplexem kaseinátu (CAS) a dextranu (DX). Použity byly DX T500 nebo DX T10	50
Tabulka 3 - Naměřené hodnoty a limity zkoušek pro olej <i>Jecoris aselli oleum</i> (Typus A)	54
Tabulka 4 - Povrchové napětí (γ_E) disperzí emulgátorů CAS a komplexu CAS/DX	55
Tabulka 5 - Velikost částic emulzí stabilizovaných CAS stanovená v den přípravy. Obsah olejové fáze 5 % (5/95) a 10 % (10/90). pH emulze bylo nativní pH = 7 nebo adjustované na pH = 9	58
Tabulka 6 - Velikost částic s komplexem CAS/DX v den přípravy (Ultraturax, sonikátor). Obsah olejové fáze činil 5 % (5/95) a 10 % (10/90)	58
Tabulka 7 – Změny velikosti částic (z-average), šířky distribuce (PDI) a zastoupení každé z populací částic ve vzorku; (S) - emulze sonikované, (U) - připravené Ultraturaxem. Emulze byly stabilizovány CAS/DX T500	68