

**CHITOSANOVÉ NANOČÁSTICE S ENKAPSULOVANÝM ESENCIÁLNÍM OLEJEM
Z TYMIÁNU (*THYMUS VULGARIS*) PRO PRODLOUŽENÍ TRVANLIVOSTI MANDARINEK**
**CHITOSAN NANOPARTICLES WITH ENCAPSULATED THYME (*THYMUS VULGARIS*)
ESSENTIAL OIL FOR EXTENDING SHELF-LIFE OF MANDARINS**

Štěpánka Penčáková¹ – Zuzana Bytešníková² – Hoang-Anh Cao³ – Jana Pekárková²

¹Ústav technologie potravin, Agronomická fakulta, MENDELU, Zemědělská 1665/1, 613 00 Brno

²Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, MENDELU,
třída Generála Píky 1999/5, 613 00 Brno

³CEITEC VUT, Purkyňova 656/123, 612 00, Brno

<https://doi.org/10.11118/978-80-7701-048-1-0218>



ABSTRAKT

Nanomateriály představují moderní prostředky s širokým potenciálem pro aplikaci v potravinářství. Chitosanové nanočástice s enkapsulovaným esenciální olejem z tymiánu (*Thymus vulgaris*), kterými se zabývá tato práce, byly aplikovány na mandarinky jako ochranný prostředek s cílem prodloužení trvanlivosti a zajištění antimikrobiální odolnosti. Nanočástice byly syntetizovány metodou iontové gelace, velikost byla charakterizována metodami DLS a AFM, stabilita pomocí Zeta potenciálu. Na mandarinky byly nanočástice aplikovány ve formě ochranného postřiku. V průběhu skladování bylo pozorováno úspěšné prodloužení trvanlivosti a zvýšení antimikrobiální odolnosti ošetřených mandarinek ve srovnání s kontrolní skupinou.

Klíčová slova: nanočástice, chitosan, enkapsulace, esenciální olej, prodloužení trvanlivosti

ABSTRACT

Nanomaterials represent modern tools with a wide potential for application in the food industry. Chitosan nanoparticles encapsulating thyme essential oil (*Thymus vulgaris*), which is the focus of this study, were applied to mandarins as a protective agent to extend shelf life and ensure antimicrobial resistance. The nanoparticles were synthesized using the ionic gelation method, with size characterized by DLS and AFM techniques, and stability assessed by Zeta potential. The nanoparticles were applied to mandarins as a protective spray. During storage, successful shelf life extension and enhanced antimicrobial resistance of treated mandarins were observed compared to the control group.

Keywords: bitter taste, anti-nutritional substances, oak, acorn

ÚVOD

Nanomateriály je možné definovat jako látky, jejichž rozměry se pohybují v rozmezí 1–100 nm alespoň v jedné dimenzi (Mulvaney, 2015). Představují moderní prostředky s potenciálem pro zlepšování kvality potravin, prodloužení jejich trvanlivosti a zvýšení udržitelnosti. Polymerní nanočástice z biopolymerů se díky schopnostem tvořit kapsle, sférické nanočástice a nanofilmy používají pro syntézu enkapsulovaných a nosičových systémů (Pulingam et al., 2022). Biopolymery sacharidového nebo proteinového charakteru,

kteřé jsou netoxické a biodegradovatelné mohou sloužit jako potenciální náhrada běžně používaných obalových materiálů ze syntetických plastů (Xing et al., 2019). Pro posílení antimikrobiálních a konzervačních účinků se výzkum zaměřuje na syntézu a vývoj aktivních obalů s inkorporovanými biologicky aktivními látkami (Mihindukulasuriya, Lim, 2014). Biologicky aktivní látky působí jako přírodní antioxidanty a mají antimikrobiální vlastnosti (Wei, Huang, 2019). Kvůli jejich nízké stabilitě a špatné rozpustnosti je nelze v potravinářství používat přímo. Enkapsulace citlivých složek přispívá k jejich ochraně proti nepříznivým vnějším vlivům a umožňuje jejich řízené uvolňování pro požadovaný antimikrobiální účinek. (Gómez-Mascaraque et al., 2017).

Chitosan je polysacharid, který se získává částečnou deacetylací chitinu přítomného ve schránkách korýšů, krabů a hmyzu. Jedná se o biomateriál z obnovitelných zdrojů, který je díky svému původu netoxický, biodegradovatelný a biokompatibilní (Haghighi et al., 2020). Díky schopnostem vytvářet filmy, kulovité částice a vysoké enkapsulační kapacitě je chitosan atraktivní materiál pro využití v nanotechnologii (Mohammadi, Hashemi, Hosseini, 2016).

Esenciální olej z tymiánu (*Thymus vulgaris*) disponuje antimikrobiálními vlastnostmi zejména díky přítomnosti fenolických sloučenin thymol a karvakrol (Amiri, 2012).

MATERIÁL A METODIKA

Chemikálie

Chitosan s nízkou molekulovou hmotností (LMW), tripolyfosfát sodný (TPP) čistoty 85% a Tween 20 byly zakoupeny u společnosti Sigma Aldrich. Kyselina octová 99% byla zakoupena u společnosti Penta. Esenciální olej z tymiánu (TEO) byl zakoupen u české firmy Nobilis Tilia. BIO mandarinky odrůdy Clemenules byly zakoupeny v obchodním řetězci Lidl, země původu Španělsko.

Syntéza nanočástic

Nanočástice s enkapsulovaným esenciálním olejem z tymiánu byly připraveny dvoukrokovou syntézou. Prvním krokem bylo vytvoření emulze TEO ve vodném roztoku chitosanu. Zásobní roztok chitosanu o koncentraci 0,5% byl vytvořen rozpuštěním LMW chitosanu v 1% roztoku kyseliny octové. Pro vytvoření emulze bylo nejprve smícháno 25 mg TEO a 60 mg Tween 20, který sloužil jako surfaktant, ve vhodné kádince. Poté bylo pomalu přikapáváno 20 ml roztoku chitosanu za stálého míchání rychlostí 600 otáček za minutu. Pro zlepšení stability vytvořené emulze byl poté použit homogenizátor po dobu 5 minut a rychlosti 13 000 otáček za minutu. Dalších 30 minut byla směs míchána rychlostí 600 otáček za minutu.

Ve druhém kroku byla iniciována tvorba nanočástic procesem iontové gelace chitosanu a TPP, došlo k zesíťování a tvorbě nanokapslí reakcí kladně nabitých NH_3^+ skupin chitosanu se záporně nabitými fosfátovými skupinami TPP. 0,1% zásobní roztok TPP byl vytvořen rozpuštěním TPP ve vodě. K tvorbě nanočástic došlo samovolně v průběhu pomalého přikapávání roztoku TPP do vytvořené emulze za stálého míchání, jehož rychlost byla postupně zvyšována v závislosti na odkapaném objemu. Hydrofobní TEO byl

uzavřen do vzniklých nanokapslí. Objemový poměr roztoku TPP a emulze TEO v roztoku chitosanu byl 1:1. Pro zvýšení stability byly vzniklé nanočástice míchány rychlostí 650 otáček za minutu do dalšího dne.

Charakterizace nanočástic

Velikost nanočástic byla měřena pomocí dynamického rozptylu světla (DLS) a fotografie byly pořízeny pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM). Stability nanočástic byla charakterizována pomocí Zeta potenciálu. DLS a Zeta potenciál byly měřeny pomocí přístroje ZetaSizer Nano ZS firmy Malvern.

Měření velikosti metodou DLS je založeno na náhodném Brownovu pohybu nanočástic za ozáření laserovým paprskem a sledování změny intenzity rozptýleného světla v závislosti na rychlosti pohybu částic. Změřená intenzita je poté vyhodnocena přístrojem a převedena na hydrodynamický poloměr částic. Tato metoda je vhodná výhradně pro částice kulovitého tvaru (de Kanter et al., 2016). Zeta potenciál je indikátorem stability systému. Pokud mají všechny přítomné částice vyšší kladný nebo záporný Zeta potenciál, mají tendenci se vzájemně odpuzovat a nebude docházet ke shlukování a agregaci. Jako stabilní jsou považovány systémy s hodnotami nižšími než -30 mV a vyššími než 30 mV (Malvern Panalytical, 2024).

Pro účely měření DLS a Zeta potenciálu nebyly nanočástice nijak upravovány. Pro účely pořízení snímků pomocí AFM byly nanočástice pročištěny týdenní dialýzou, byly použity dialyzační trubice z regenerované celulózy o propustnosti 35kDa. Pořízení snímků AFM proběhlo na CEITEC MUNI.

Aplikace ochranného postřiku

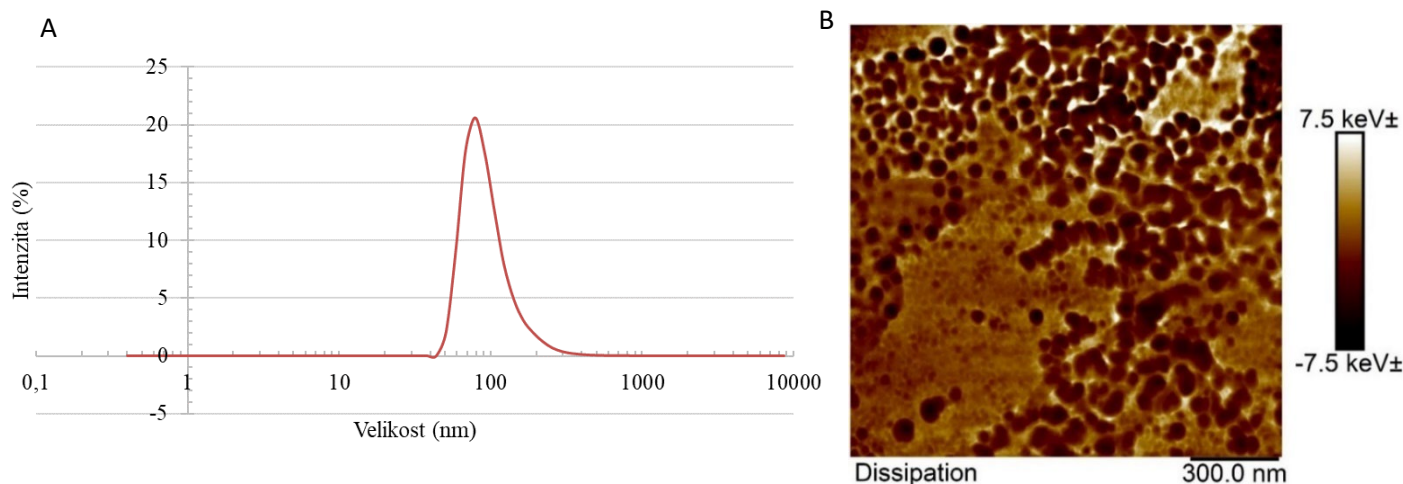
Syntetizované nanočástice byly aplikovány jako ochranný postřik na 20 BIO mandarinek, které byly náhodně rozděleny do čtyř skupin po pěti kusech. Před aplikací postřiku nevykazovala žádná z mandarinek známky mikrobiální kontaminace nebo mechanického poškození. První skupina pěti mandarinek byla skupina kontrolní (K), bez postřiku. Druhá skupina byla ošetřena jednou vrstvou nanočástic s enkapsulovaným TEO (T:1V), třetí skupina dvěma vrstvami nanočástic s enkapsulovaným TEO (T:2V) a čtvrtá skupina třemi vrstvami nanočástic s enkapsulovaným TEO (T:3V). Mandarinky byly naskládány do plastové nádoby v dostatečných rozestupech, aby nedošlo ke křížové kontaminaci a umístěny do místnosti se stálou teplotou a relativní vlhkostí vzduchu, hodnoty byly zaznamenávány digitálním teploměrem Sencor. Experiment probíhal celkem 24 dní.

Pozorováno bylo primárně kažení mandarinek a rozvoj plísně. Dále pak jiné, zrakem, hmatem či čichem zjištěné změny, které se projeví v průběhu experimentu.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Velikost nanočástic

Dle měření metodou DLS byla velikost nanočástic 92 ± 41 nm. Obrázek 1 A zobrazuje velikostní rozdělení „number“, kdy je hodnota získána přepočtem přes nejmenší naměřenou velikost. Nanočástice jsou definovány jako látky s rozměry do 100 nm, lze tedy konstatovat, že syntetizované nanočástice tento velikostní limit splňují.



Obrázek 5: Velikost nanočástic s enkapsulovaným TEO dle DLS (A), AFM snímek nanočástic s enkapsulovaným TEO (B)

Snímek pořízený pomocí AFM, Obrázek 5 B zřetelně zobrazují, že syntetizované nanočástice mají kulovitý tvar. Oproti výsledkům získaných metodou DLS lze vidět, že velikost nanočástic na pořízeném snímku je menší. Nepřesnosti při měření metodou DLS mohla způsobit vysoká koncentrace nanočástic a případná přítomnost drobných nečistot a prachových částic ve vzorku. Fotografie nanočástic vždy představují nejvíce přesný výsledek a předávají pravdivé informace o velikosti a tvaru.

Stabilita nanočástic

Naměřená hodnota Zeta potenciálu nanočástic s enkapsulovaným TEO byla 42 mV. Hodnota je kladná v důsledku převažujícího kladného náboje chitosanu. Jedná se o hodnotu vyšší než 30mV, vzniklý systém je tedy možné označit za vysoce stabilní.

Průběh mikrobiálního kažení mandarinek

Pozorování postupu mikrobiálního kažení a dalších změn na nanopostřikem ošetřených mandarinkách probíhalo celkem čtyři týdny, záznam byl prováděn denně, kromě víkendů. Průměrná teplota ve skladovací místnosti byla 17,7 °C a průměrná relativní vlhkost byla 32,2 %.

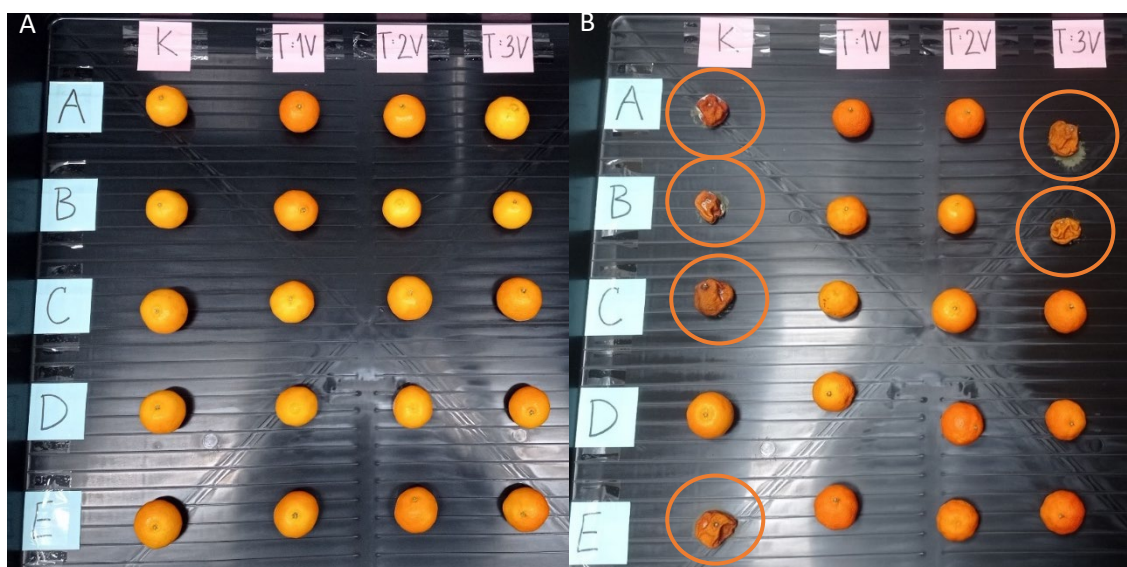
V prvním týdnu se objevily první známky kažení mandarinek. Proces vždy začínal od kontaktní plochy mandarinky s podložkou, první fází bylo změknutí slupky, poté se projevila bílá plíseň. Koncem prvního pozorovacího týdne se bílá plíseň objevila na jedné mandarince z řady K a na jedné mandarince T:3V. Na ostatních mandarinkách nebyly pozorovány žádné změny.

V průběhu druhého týdne postupovalo kažení nejrychleji. Plíseň se objevila na dalších třech mandarinkách z řady K. Kromě bílé plísně se objevila i plíseň zelená a byly pozorovány první známky scvrkávání a změny barvy mandarinek. V řadě T:3V se objevila plíseň na jedné další mandarince a objevily se známky scvrkávání a změny barvy v okolí stopky. Na ostatních mandarinkách nebyly pozorovány žádné změny.

V průběhu třetího týdne se na již zkažených mandarinkách výrazněji projeví znaky mikrobiálního rozkladu. Docházelo k výraznému scvrkávání, hnědnutí a porůstání plísňe i na horní stranu mandarinek. Došlo také

k výraznému rozšíření mikrobiálního zápachu. Na nezkažených mandarinkách se začaly projevovat známky vysychání – sraštění slupek, ztvrdnutí a scvrkávání.

V průběhu čtvrtého týdne již nebyly pozorovány žádné výrazné změny, nejvíce se projevilo vysychání a tvrdnutí nezkažených mandarinek. Obrázek 6 zobrazuje stav mandarinek první (A) a poslední (B) den experimentu, oranžově jsou označeny plesnivé mandarinky. Obrázek 7 pak zobrazuje detail některých plesnivých mandarinek.



Obrázek 6: Stav mandarinek první a poslední den experimentu



Obrázek 7: Detailní fotografie některých plesnivých mandarinek

ZÁVĚR

Syntéza chitosanových nanočástic s enkapsulovaným TEO proběhla úspěšně. Charakterizace metodami DLS, Zeta potenciálu a AFM prokázala, že syntetizované nanočástice měly požadovanou velikost, kulovitý tvar a dostatečnou stabilitu. Jejich aplikace jako ochranný postřik na mandarinky prokázala schopnost ochrany proti nepříznivým mikrobiálním vlivům a tím prodloužení jejich trvanlivosti. Nejlepších výsledků dosáhly jedna a dvě vrstvy nanopostřiku, ze skupin T:1V a T:2V nezplísnila žádná mandarinka. Ze skupiny T:3V se plíseň objevila na dvou mandarinkách, tři vrstvy postřiku tedy nedosáhly tak dobrých výsledků. To mohlo být způsobeno vysokým obsahem vody ve třech vrstvách nanopostřiku. Výše uvedené skladovací podmínky způsobily postupné vysychání a scvrkávání mandarinek. Syntetizovaný nanopostřik nedisponoval žádnými bariérovými vlastnostmi, které by mohly vysychání zabránit.

LITERATURA

Amiri, H. (2012): Essential Oils Composition and Antioxidant Properties of Three Thymus Species. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012, 1–8. ISSN 1741-427X. <https://doi.org/10.1155/2012/728065>

de Kanter, M. et al. (2016): Enabling the measurement of particle sizes in stirred colloidal suspensions by embedding dynamic light scattering into an automated probe head. *Measurement*. 80. ISSN 02632241. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2015.11.024>

Electrophoretic Light Scattering (ELS). (2024): Malvern Panalytical. [cit. 2024-04 26]. <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/light-scattering/electrophoretic-light-scattering>

Gómez-Mascaraque, L. G. et al. (2017): Impact of microencapsulation within electrosprayed proteins on the formulation of green tea extract-enriched biscuits. *LWT - Food Science and Technology*. 81. ISSN 00236438. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.041>

Haghighi, H. et al. (2020): Recent advances on chitosan-based films for sustainable food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*. 26. ISSN 22142894. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100551>

Mihindukulasuriya, S. D. F.; Lim, L.-T. (2014): Nanotechnology development in food packaging: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 40(2), 149–167. ISSN 09242244. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.09.009>

Mohammadi, A.; Hashemi, M.; Hosseini, S. M. (2016): Postharvest treatment of nanochitosan-based coating loaded with Zataria multiflora essential oil improves antioxidant activity and extends shelf-life of cucumber. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 33. ISSN 14668564. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.10.015>

Mulvaney, P. (2015): Nanoscience vs Nanotechnology—Defining the Field. *ACS Nano*. 9(3), 2215–2217. ISSN 1936-0851. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b01418>

Pulingam, T. et al. (2022): Exploring Various Techniques for the Chemical and Biological Synthesis of Polymeric Nanoparticles. *Nanomaterials*. 12. ISSN 2079-4991. <https://doi.org/10.3390/nano12030576>

Wei, Z.; Huang, Q. (2019): Assembly of Protein–Polysaccharide Complexes for Delivery of Bioactive Ingredients: A Perspective Paper. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 67. ISSN 0021-8561. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06063>

Xing, Y. et al. (2019): Antimicrobial Nanoparticles Incorporated in Edible Coatings and Films for the Preservation of Fruits and Vegetables. *Molecules*. 24(9). ISSN 1420-3049. <https://doi.org/10.3390/molecules24091695>

Kontaktní adresa: Bc. Štěpánka Penčáková, Ústav technologie potravin, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1665/1, 613 00 Brno, e-mail: xpencako@mendelu.cz