

Antimikrobiální polymerní filmy na bázi zeinu

Bc. Kateřina Pekárková

Diplomová práce
2021



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Pekárková**
Osobní číslo: **T19460**
Studijní program: **N0711A130011 Biomateriály a kosmetika**
Studijní obor: **Biomateriály a kosmetika**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Antimikrobiální polymerní filmy na bázi zeinu**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

1. Stručně klasifikujte polymerní materiály běžně využívané pro přípravu antimikrobiálních filmů.
2. Zaměřte se na metody přípravy a charakterizace filmů.

II. Praktická část

1. Připravte filmy na bázi zeinu bez a s obsahem vybraných aktivních látek a charakterizujte jejich fyzikálně-chemické, mechanické a antimikrobiální vlastnosti.
2. Dosažené výsledky přehledně zpracujte a stanovte závěry.

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

- [1] WALSH, G. Proteins-Biochemistry and Biotechnology, John Willey Sons, 2014, ISBN 978-0-470-66985-3. USA.
- [2] EMBUSCADO, M. E. Edible Films and Coatings for Food Applications. Springer Science 2009, ISBN 978-0-387-93823-4.
- [3] YONG, Z., LILI, C., XIAOXIA, Ch. a kol. Zein-based Films and Their Usage for Controlled Delivery: Origin, Classes and Current Landscape. Journal of Controlled Release 2015, 206, 206-219.
- [4] ANDERSON, T. J., LAMSAL, B. P. Zein Extraction from Corn, Corn Products, and Coproducts and Modifications for Various Applications: A Review. Cereal Chemistry 2011, 88, 159-173.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Jana Sedlaříková, Ph.D.**
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 20. února 2021

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou 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. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou 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);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové 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.

Prohlašuji,

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá problematikou přípravy a charakterizace filmů na bázi přírodních polymerů, zeinu a chitosanu, s přidavkem různých typů aktivních látek, resp. jejich směsí. Teoretická část je zaměřena na charakteristiku filmů na bázi proteinů, na jejich přípravu a také na faktory, které ovlivňují jejich výsledné vlastnosti. Poslední kapitola je věnována konkrétním aktivním látkám, které polymerním filmům zajišťují jejich antimikrobiální účinnost.

Praktická část se zabývá přípravou filmů na bázi zeinu a kompozitních zein/chitosanových filmů s obsahem aktivních složek (monoacylglycerol kyseliny laurové, esenciální oleje). Kromě hodnocení vzhledu a morfologie byly taktéž studovány mechanické a povrchové vlastnosti. V neposlední řadě byl ověřován antimikrobiální účinek připravených filmů proti vybraným druhům mikroorganismů.

Klíčová slova: zein, chitosan, esenciální olej, monolaurin, mechanické vlastnosti, smáčivost, antimikrobiální aktivita.

ABSTRACT

The diploma thesis deals with the preparation and characterization of films based on natural polymers, zein and chitosan, with the addition of various types of active substances, respectively mixtures thereof. The theoretical part is focused on the characteristics of protein-based films, their preparation and also on the factors that affect their final properties. The last chapter is devoted to specific active substances that provide antimicrobial activity in polymer films.

The practical part deals with the preparation of zein-based films and composite zein/chitosan films containing active ingredients (lauric acid monoacylglycerol, essential oils). As well as to the evaluation of appearance and morphology, mechanical and surface properties were also studied. In conclusion, antimicrobial effect of prepared films against selected species of microorganisms was verified.

Keywords: zein, chitosan, essential oil, monolaurin, mechanical properties, wettability, antimicrobial activity.

Mé poděkování patří především vedoucí mé diplomové práce Ing. Janě Sedlaříkové, Ph.D., za její odborné vedení, mnoho cenných rad, trpělivost a v neposlední řadě za její ochotu a velmi vstřícný přístup. Dále děkuji Ing. Petře Peer, Ph.D., Ing. Pavlovi Plevovi, Ph.D. a paním laborantkám Ing. Alici Štítkovcové a Ing. Markétě Kudláčkové, Ph.D., za pomoc při realizaci experimentální části. Poděkování patří i mé rodině, přátelům a příteli, kteří mě po celou dobu studia velmi podporovali.

V neposlední řadě patří můj největší vděk a obdiv mamince a tatínkovi, kteří už zde sice nemohou být, ale díky jejich péči a životní odhodlanosti pro mě byli velkou motivací.

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

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 PROTEINOVÉ FILMY	11
1.1 KLASIFIKACE PROTEINOVÝCH FILMŮ	11
1.1.1 Živočišné proteiny.....	12
1.1.2 Rostlinné proteiny	13
2 PŘÍPRAVA FILMŮ/VRSTEV	17
2.1 ODLÉVÁNÍ Z ROZTOKU	17
2.2 VYTLAČOVÁNÍ	18
2.3 ZVLÁKŇOVÁNÍ	19
3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VLASTNOSTI FILMŮ	22
3.1 VLIV PŘÍDATNÝCH LÁTEK	22
3.1.1 Změkčovadla	22
3.1.2 Síťovadla	23
3.2 IONTOVÁ SÍLA	25
3.3 VELIKOST ČÁSTIC.....	25
3.4 KONCENTRACE.....	25
3.5 HODNOTA PH	26
3.6 TEPLOTA SUŠENÍ	26
3.7 RELATIVNÍ VLHKOST	27
4 ANTIBAKTERIÁLNÍ FILMY	28
4.1 ESENCIÁLNÍ OLEJE.....	29
4.1.1 Antimikrobiální působení esenciálních olejů.....	30
4.2 MONOACYLGLYCEROLY	32
4.2.1 Antimikrobiální působení monoacylglycerolů.....	33
4.3 CHITOSAN	34
4.3.1 Antimikrobiální působení chitosanu	36
5 CÍLE PRÁCE	37
II PRAKTICKÁ ČÁST	38
6 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A METODY	39
6.1 CHEMIKÁLIE.....	39
6.2 POMŮCKY A PŘÍSTROJE.....	39
6.3 METODIKA	40
6.3.1 Příprava filmů na bázi zeinu	40

6.3.2	Příprava filmů na bázi zeinu a chitosanu	41
6.3.4	Měření mechanických vlastností	42
6.3.5	Měření povrchové energie a kontaktního úhlu.....	44
6.3.6	Stanovení antimikrobiální účinnosti	46
6.3.7	FTIR analýza	47
6.3.8	SEM analýza	47
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	48
7.1	VZHLED A TLOUŠŤKA FILMŮ	48
7.1.1	Filmy na bázi zeinu	48
7.1.2	Filmy na bázi zein/chitosanu.....	49
7.2	MECHANICKÉ VLASTNOSTI.....	51
7.2.1	Filmy na bázi zeinu	51
7.2.2	Filmy na bázi zein/chitosanu.....	54
7.3	POVRCHOVÉ VLASTNOSTI.....	56
7.3.1	Filmy na bázi zeinu	57
7.3.2	Filmy na bázi zein/chitosanu.....	59
7.4	ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY	62
7.4.1	Antibakteriální účinky.....	63
7.4.2	Antifungální účinky	64
7.5	FTIR ANALÝZA	66
7.6	SEM ANALÝZA.....	67
	ZÁVĚR	70
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	72
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	80
	SEZNAM OBRÁZKŮ	82
	SEZNAM TABULEK.....	84

ÚVOD

Antimikrobiální polymerní materiály na bázi proteinů jsou v dnešní době předmětem zvýšeného zájmu z důvodu větší poptávky spotřebitelů po ekologických a obnovitelných náhradách syntetických produktů. Většina těchto proteinů pochází z různých zemědělských bílkovin rostlinného nebo živočišného původu.

Jedním ze zástupců rostlinného proteinu je kukuřičný zein, který je schopen tvořit hydrofobní degradabilní filmy a i díky svému jedinečnému složení aminokyselin vykazuje řadu významných vlastností, oproti ostatním proteinům. Zeinové filmy lze připravit pomocí různých metod, jako například vytlačováním, či odléváním z roztoku. Výsledné vlastnosti těchto filmů jsou ovlivněny řadou faktorů, z nichž lze zmínit iontovou sílu, velikost částic, či teplotu sušení a relativní vlhkost. Nezanedbatelný je také vliv přídatných látek, jako jsou změkčovadla a síťovadla. Zesíťované proteinové filmy jsou často stabilnější než filmy na bázi polysacharidů a mají také delší životnost.

Zein sám o sobě nevykazuje žádné antimikrobiální účinky, proto jsou za tímto účelem do jeho matrice přidávány různé aktivní látky. Příkladem těchto antimikrobiálních aditiv jsou různé esenciální oleje, které představují také výhodnou alternativu běžně používaných syntetických látek. Velkou výhodou využití esenciálních olejů je jejich široká škála účinku proti různým druhům mikroorganismů (bakterie, plísně i viry), která primárně závisí na obsahu účinných látek, jako je thymol, karvakrol či eugenol. Dalším příkladem antimikrobiálních látek inkorporovaných do zeinových filmů jsou monoacylglyceroly a přírodní chitosan, získávaný z chitinu mořských koryšů, který je v současné době také velmi populární. Antimikrobiální polymerní materiály na bázi zeinu nacházejí své uplatnění v mnoha oblastech, jako je například farmaceutický, textilní, potravinářský či kosmetický průmysl.

Cílem diplomové práce bylo vypracovat literární rešerši na dané téma a následně připravit zeinové filmy s přídavkem vybraných aktivních látek. Pozornost byla kromě antimikrobiálních účinků zaměřena na studium výsledných strukturních, mechanických a povrchových vlastností připravených filmů.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 PROTEINOVÉ FILMY

Výzkum a vývoj filmů, které jsou vyrobeny z různých zemědělských bílkovin, byl prováděn v období posledních 20 let, nyní je ale předmětem zvýšeného zájmu z důvodů větší poptávky po ekologických a obnovitelných náhradách ropných polymerních materiálů a plastů. Příkladem těchto zdrojů může být např. kasein, syrovátka, sója, kukuřičný zein a mnohé další [1]. Tyto materiály mohou fungovat jako nosiče různých přísad, jako jsou antimikrobiální látky, antioxidanty a nutraceutika. Zejména antimikrobiální látky, které významně snižují riziko růstu patogenů a to jak v potravinářském, ale i kosmetickém průmyslu, jsou v posledních letech rozsáhle studovány. Často používanými antimikrobiálními látkami jsou organické kyseliny, chitosan, nisin a nebo také esenciální oleje získané z různých druhů rostlin [2].

Proteiny vykazují řadu vlastností, které je předurčují jako vynikající výchozí materiál pro přípravu filmů. Nabité, polární i nepolární aminokyseliny umístěné podél proteinového řetězce představují významný chemický potenciál a díky výsledným interaktivním silám vzniká kohezní proteinová matrice filmu. Filmy jsou stabilizovány prostřednictvím elektrostatických interakcí, vodíkových vazeb, kovalentních vazeb, Van der Waalsových sil a disulfidických můstků. Filmotvorné vlastnosti jsou nejlépe prokazatelné v emulzních systémech, ve kterých amfipatické proteiny vytvářejí filmy na rozhraní voda-vzduch nebo voda-olej. Výhodou proteinů je přítomnost četných aktivních míst, které jsou dostupné pro různé chemické interakce a funkcionalizace. Chemické modifikace proteinů mohou zlepšit stabilitu filmů a vrstev. Zesíťované proteinové filmy jsou často stabilnější než filmy na bázi polysacharidů a mají také delší životnost. Filmy na bázi bílkovin jsou navíc biologicky odbouratelné a kompostovatelné. Během degradačního procesu poskytují zdroj dusíku, který lze využít jako hnojivo [1].

1.1 Klasifikace proteinových filmů

Proteinové filmy mohou být vyrobeny z proteinů jak živočišného, tak rostlinného původu a připravují se z roztoků obsahujících tři hlavní složky: bílkovina, změkčovadlo a rozpouštědlo. Vlastnosti finálního filmu jsou ovlivněny složením aminokyselin, krystalinitou (proteinu i změkčovadla), hydrofobicitou/hydrofilitou, povrchovým nábojem a velikostí molekul. Mezi vnější faktory, které ovlivňují výsledný film, patří teplota zpracování, podmínky sušení, pH, iontová síla, relativní vlhkost během zpracování a skladování, smykové napětí a tlak [1].

1.1.1 Živočišné proteiny

Kasein

Kasein je hlavní zástupce mléčných bílkovin a obsahuje čtyři hlavní podjednotky: κ -kasein, β -kasein, α_1 -kasein a α_2 -kasein. Kaseinové filmy lze snadno tvořit z vodných roztoků z důvodu silné koheze mezi řetězci a velkým množstvím mezimolekulárních vodíkových, hydrofobních a elektrostatických vazeb. Kasein vykazuje vysokou tepelnou stabilitu, není toxický a má schopnost vázat malé molekuly a ionty a také tvořit micely, což jej činí vhodným materiálem pro přípravu biologicky rozložitelných filmů. Navíc je rozpustný ve vodě, má emulgační vlastnosti a je snadno dostupný [3]. I přes tyto výhodné vlastnosti mají filmy z kaseinu určité nedostatky, které lze odstranit modifikací polymerní matrice. Většina filmů na bázi kaseinu jsou sice rozpustné ve vodě, ale jsou také citlivé na vlhkost, což je podstatné při procesu sušení, kdy mají tendenci se smršťovat a křehnout. Proto se ke zvýšení volného objemu polymeru používají změkčovadla, která učiní filmy pružnější snížením jejich teploty skelného přechodu. Důležitá je však také koncentrace změkčovadla, vyšší koncentrace změkčovadla totiž působí negativně na tahové a mechanické vlastnosti [4].

Syrovátka

Dalším zástupcem mléčných proteinů je syrovátka, která je vedlejším produktem procesu výroby sýra a syrovátkové proteiny jsou definovány jako ty, které zůstávají v mléčném séru po vysrážení kaseinů při pH 4,6 a teplotě 20 °C. Skládá se z několika jednotlivých proteinů, přičemž hlavními proteiny jsou beta-laktoglobulin, alfa-laktalbumin, bovinní (též hovězí) sérový albumin a imunoglobuliny [1].

Filmy na bázi syrovátky lze získat buď ze syrovátkových proteinových koncentrátů, nebo z izolátů. Obsah bílkovin v těchto dvou materiálech je odlišný, v koncentrátu je to minimálně 90 % bílkovin, zatímco v izolátu 50–80 %, a oba jsou bohaté na aminokyseliny obsahující síru [3]. Konformaci syrovátkových proteinů ovlivňuje několik faktorů, např. hustota náboje nebo hydrofilně-hydrofobní rovnováha, které nakonec určují fyzické a mechanické vlastnosti filmu. Tvorba syrovátkových filmů je založena na tepelné denaturaci proteinů ve vodných roztocích, při absenci tepelného zpracování by se takové filmy při sušení snadno rozpadly, kvůli slabým intermolekulárním interakcím. Zahřívání modifikuje trojrozměrnou strukturu proteinů prostřednictvím vnitřních sulfidových vazeb a hydrofobních skupin. Proteinové filmy jsou nakonec získány z gelů syrovátkových proteinů prostřednictvím dehydratace za tepla, nebo za studena [5]. Ke zlepšení vlastností se využívá některých

fyzikálních a chemických metod, např. UV záření, alkalizace nebo použití ultrazvuku. Například aplikace vysoké dávky UV záření na filmotvorný roztok významně zlepšuje většinu mechanických vlastností filmu [3].

1.1.2 Rostlinné proteiny

Pšenice

Pšeničné proteiny lze klasifikovat podle jejich rozpustnosti na albuminy (rozpustné ve vodě), globuliny (rozpustné ve zředěných solných roztocích), gliadiny (rozpustné v 70–90% ethanolu) a gluteniny (nerozpustné ve všech zmíněných roztocích). Glutenin a gliadin jsou hlavními bílkovinami v pšeničné mouce a tvoří 47 % celkového obsahu bílkovin. Gliadin je peptid s jedním řetězcem obsahující intramolekulární disulfidové vazby, které jsou důležité při samotné tvorbě filmu a závisí na nich mechanické vlastnosti filmů, jako je pevnost a pružnost. Glutenin je směs proteinů a má distribuci molekulové hmotnosti mezi 100 až 1000 kDa (gliadin cca 40 kDa) v závislosti na počtu intermolekulárních disulfidových vazeb. Pevnost a pružnost filmu lze ovlivnit přidávkem oxidačních činidel, jako je bromičnan draselný, jodičnan draselný nebo kyselina askorbová. V pšeničných proteinech mohou být také přítomny nízkomolekulární sloučeniny obsahující thiol, jako je např. glutathion. Tyto thiolové sloučeniny reagují s disulfidovými vazbami uvnitř a mezi molekulami lepku, štěpí je a tím snižují pevnost pšeničného filmu. Řešením může být přidavek oxidačních činidel, které mohou selektivně reagovat s malými thiolovými molekulami a následně tak zvyšovat pevnost a pružnost filmu [1].

Filmy na bázi pšeničných proteinů se obvykle získávají dvěma způsoby, prvním z nich je odlévání, které se provádí v tenké vrstvě a druhým je vaření proteinových roztoků, kdy se po vyvaření sbírají filmy vytvořené na povrchu roztoků. Filmy připravené prvním způsobem mají lepší vlastnosti při protažení, zatímco filmy připravené vařením vykazují vyšší odolnost proti prasknutí, což naznačuje, že výrobní proces ovlivňuje síťovou strukturu proteinů. Nejběžněji používaným rozpouštědlem je vodný ethanol a homogenitu filmů lze regulovat úpravou alkalických nebo kyselých podmínek v roztoku. V tomto případě je pevnost v tahu filmů vyrobených z alkalických roztoků významně vyšší než pevnost filmů vyrobených z kyselých roztoků. Pozitivní vliv na jednotnou dispergaci proteinu, a tedy i mechanické vlastnosti výsledných filmů, má také zahřívání a mechanické míchání [3].

Sója

Sójový protein se skládá ze směsi globulárních proteinů a přibližně 90 % těchto proteinů se dělí na různé frakce na základě molekulové hmotnosti a sedimentačního koeficientu. Dva hlavní zástupci globulárních proteinů jsou beta-konglycinin a glycinin. Působením tepla a vyššího pH může docházet k denuraci sójových proteinů, což následně ovlivní tvorbu filmu. Stabilita sójových proteinů závisí na pH a iontové síle, je tak známo, že beta-konglycinin je méně tepelně stabilní než glycinin [1].

Sójové proteiny se skládají z polárních i nepolárních postranních řetězců. Silné polární interakce mezi postranními řetězci molekul omezují rotaci segmentů a molekulární mobilitu, což zvyšuje tuhost a pevnost výsledných filmů. Výroba filmů se provádí dvoustupňovým procesem, který zahrnuje zahřívání filmotvorných roztoků (narušení proteinové struktury), následné štěpení nativních disulfidových vazeb a vystavení sulfhydrylových a hydrofobních skupin, a konečnou tvorbu nových disulfidových, hydrofobních a vodíkových vazeb. Filmy na bázi sójových proteinů vykazují z důvodu vyšší hydrofility horší bariérové vlastnosti proti vlhkosti. Jednou z možností, jak eliminovat tuto nevýhodu, je inkorporace hydrofobních sloučenin, například lipidů, do filmotvorného roztoku [6].

Při výrobě sójových filmů se využívají i další přídatné látky, které ovlivňují výsledné vlastnosti. Například přidání dodecylsulfátu sodného (SDS) podstatně zvyšuje roztažnost filmů a taktéž současně zlepšuje bariéru proti vlhkosti. Přidáním karboxymethylcelulózy (CMC) se zase významně zlepšují bariérové vlastnosti a přidáním cysteinu se zvyšuje počet disulfidových vazeb, čímž se film stává pevnějším. Pro zlepšení mechanických vlastností sójových filmů se také využívá metod ozařování, nebo vytvrzování teplem [3].

Zein

Zein, který je získáván jako vedlejší produkt při zpracování kukuřice, tvoří asi 45–50 % kukuřičných proteinů. Byl poprvé objeven v roce 1821 v produktu *zea*, jinak známého jako „indická kukuřice“ a byl klasifikován do skupiny prolaminů extrahovatelných ve vodném alkoholu, jako je například ethanol. Vzhledem k tomu, že výroba zeinu byla komercializována již v roce 1939, je pro tuto látku známá celá řada uplatnění v průmyslu. Zein je protein, který se nachází pouze v kukuřici, existují však také proteiny, které mají podobné vlastnosti. Ostatní obiloviny, jako je pšenice, ječmen, nebo žito obsahují prolaminy s podobně charakteristickými vlastnostmi a každý extrahovaný prolaminový protein z těchto obilovin má svůj průmyslový význam. Zein je však upřednostňován z důvodu vyšších

výtěžků a velkému objemu dostupných vedlejších kukuřičných produktů pro zpracování [3][7].

Na základě rozpustnosti lze zein rozdělit do čtyř tříd na α -zein, β -zein, δ -zein a γ -zein, z nichž nejdůležitější jsou α -zein a β -zein. α -zein je rozpustný v 95% ethanolu a tvoří přibližně 80 % celkových prolaminů přítomných v kukuřici, zatímco β -zein je rozpustný v 60% ethanolu a ve vyšší koncentraci ethanolu už se nerozpouští [1][8].

Tab. 1 Aminokyselinové složení zeinu (g AMK/100 g zeinu) [9]

Třída	Aminokyselina	Nativní zein	Komerční zein
Nepolární	Glycin	0	0,7
	Alanin	10,52	8,3
	Valin	3,98	3,1
	Leucin	21,1	19,3
	Isoleucin	5	6,2
	Phenylalanin	7,3	6,8
	Tryptophan	0,16	–
	Prolin	10,53	9,0
Polární	Serin	7,05	5,7
	Threonin	3,45	2,7
	Tyrosin	5,25	5,1
	Methionin	2,41	2,0
	Cystein	0,83	0,8
Bazické	Lysin	0	–
	Arginin	4,71	1,8
	Histidin	1,32	1,1
Kyselé	Kyselina aspartová	4,61	–
	Kyselina glutamová	26,9	1,5

Zein obsahuje vysoké procento nepolárních aminokyselin a nízký podíl bazických a kyselých aminokyselin (Tab. 1). Tři primární aminokyseliny v kukuřičném proteinu jsou glutamin (21–26 %), leucin (20 %) a prolin (10 %). Zjevný rozdíl mezi zeinem a jinými proteiny je ten, že téměř úplně postrádá lysin a tryptofan a obsahuje několik zbytků argininu a histidinu. V důsledku tohoto jedinečného složení aminokyselin je zein nerozpustný ve

vodě, což je vlastnost, která ovlivňuje bariérové vlastnosti filmů vytvořených na jeho bázi. Rozpustný je hlavně v acetonu, kyselině octové, ve vodných alkoholech a vodných alkalických roztocích [1][8].

Pro přípravu filmů na bázi zeinu lze využít více druhů metod, avšak nejčastější je využití rozpouštědel na bázi polyolů nebo mastných kyselin. Nejprve je vybráno vhodné rozpouštědlo pro rozpuštění zeinu, změkčovaadlo a některá další činidla. Poté je homogenní roztok odlit na povrch, který by měl být rovný a nelepivý. Po vysušení se pak film z povrchu volně odloupne. Zeinové filmy lze také připravit kombinací mokrého a suchého procesu, například natažením nebo extruzí [3].

2 PŘÍPRAVA FILMŮ/VRSTEV

Filmy, resp. tenké vrstvy mohou být připravovány několika různými způsoby v závislosti na výchozím materiálu. Výběr metody ovlivňuje vlastnosti výsledného filmu. Mezi nejznámější a také nejčastěji používané metody patří odlévání z roztoku, vytlačování nebo také zvlákňování [1].

2.1 Odlévání z roztoku

Metoda odlévání, respektive odlévání z rozpouštědla, je nejběžněji používanou technikou pro tvorbu filmu v laboratorních podmínkách. Tato metoda zahrnuje tři základní kroky: solubilizace polymeru ve vhodném rozpouštědle, odlévání roztoku do formy a nakonec sušení odlévaného roztoku (Obr. 1) [10].

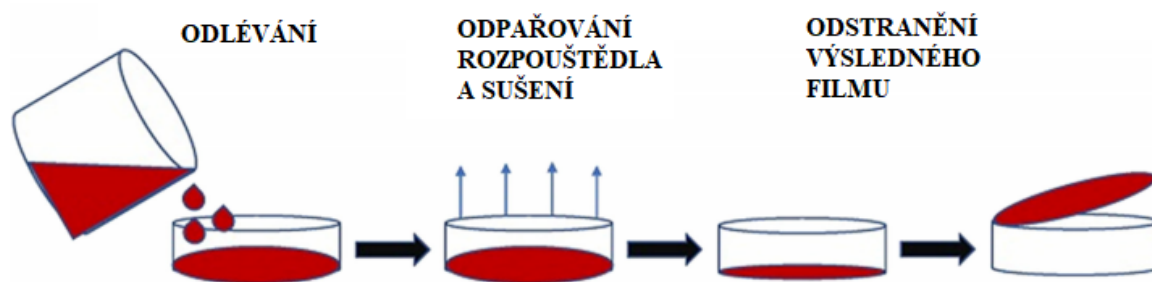
V první řadě je vybrán vhodný polymer, nebo směs, která bude tvořit základní matici polymerního filmu. V prvním kroku, tzv. solubilizaci, je vybraný polymer rozpuštěn nebo dispergován ve vhodném rozpouštědle [10]. Například filmy z izolátu sójového proteinu, syrovátkového proteinu nebo z proteinů vaječného bílku jsou obvykle odlévány z vodných roztoků. Jiné proteiny, které mají vyšší obsah nepolárních aminokyselin, jako je zein a pšeničný lepek, se odlévají z roztoků na bázi vodného ethanolu. Pro výrobu zeinových filmů lze využít rovněž jiná organická rozpouštědla, jako je aceton, methanol nebo izopropylalkohol. Dalším důležitým parametrem při přípravě filmotvorných roztoků je úprava pH tak, aby hodnota byla mimo izoelektrický bod proteinu, za účelem prevence srážení proteinu. Například filmy z pšeničného lepku, který má izoelektrický bod 7,5, se odlévají z filmotvorných roztoků o pH 9 až 11, nebo 2 až 6 [11].

Pro odlévání filmů z rozpouštědla existují různé typy zařízení, od jednoduchých odlévacích desek až po pokročilejší dávkovací a kontinuální laboratorní potahovače. Pro přípravu v laboratorních podmínkách je nejméně nákladné ruční roztírání roztoků do rovných Petriho misek a poté sušení při kontrolované relativní vlhkosti. Použitím sofistikovanějšího zařízení se mohou vyrábět větší proteinové filmy mechanickým rozprostřením roztoku na pevnou plochu [1].

Během sušení dochází k tvorbě hydrofobních, vodíkových a iontových vazeb, případně intra- a intermolekulárních disulfidových vazeb (v případě tvorby filmů z proteinů obsahujících síru). To vede k vytvoření proteinové sítě, která funguje jako matrice pro zapouzdření dalších složek filmu, jako jsou například změkčovadla. Nejdůležitějšími

parametry při tvorbě filmů sušením jsou teplota a relativní vlhkost, které ovlivňují rychlost tvorby filmu, a také výslednou strukturu a vlastnosti. Obecně platí, že odlévání filmů pomocí rychleschnoucích metod vede k negativnímu dopadu na fyzikální, mechanické a strukturní vlastnosti. Filmy lze sušit horkým vzduchem, pomocí infračerveného záření nebo mikrovlnných vln [6][10][11].

Připravený film by měl být homogenní a bez známek mechanického poškození. Nejdůležitějšími hodnocenými parametry filmů jsou tloušťka, opacita, stupeň botnání, tepelná stabilita, mechanická pevnost, propustnost pro kyslík a vodní páry, a také biologické vlastnosti. Hlavní výhodou odlévací metody jsou nízké náklady a snadná proveditelnost bez nutnosti použití specializovaného přístroje. Metoda odlévání, kterou řadíme do tzv. mokrých metod, vede k lepší interakci spojení částice-částice, díky čemuž je obal částic homogenní a bez větších defektů. Výhodou je také využití nižší teploty během zpracování, protože většinu potravinářských materiálů nelze formovat při vyšších teplotách bez vyvolání nevratné strukturální změny. Naopak mezi nevýhody této techniky patří omezení možností výběru forem, do kterých se roztoky mohou odlévat a také možnost zachycení toxického rozpouštědla uvnitř polymeru. Dalším negativním aspektem, který se projevuje zejména při komerční výrobě, může být delší doba sušení, navíc různé podmínky odpařování mohou vést k tvorbě filmů s rozdílnými vlastnosti [10].



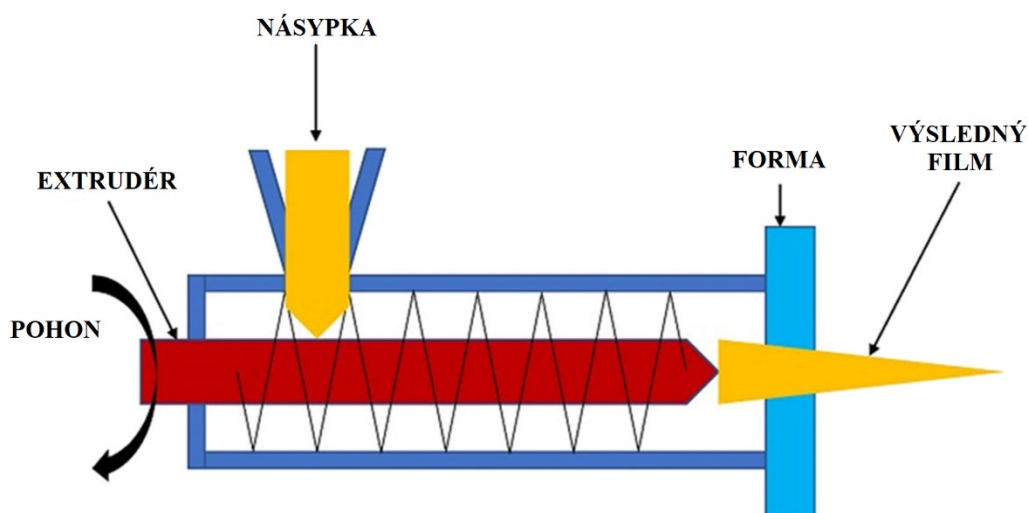
Obr. 1 Příprava filmů odléváním z rozpouštědla při laboratorních podmínkách [10]

2.2 Vytlačování

Alternativou k metodě odlévání z roztoku je extruze, neboli vytlačování (Obr. 2). Jedná se o poměrně rychlou a energeticky nenáročnou metodu, která je využívána ve větších provozech, kde je zajištěno snížení nákladů na přípravu biopolymerních filmů na úroveň produktů vyrobených ze syntetických polymerů [1].

Během procesu vytlačování je materiál nejdříve přiváděn do extrudéru, kde probíhá hnětení a ohřev, dále následuje výstup produktu ze stroje. Jelikož se při této technice používá minimální množství vody, případně dalších rozpouštědel, je nazývána jako „suchý proces“. Pro zvýšení flexibility filmu je však nutný přídavek změkčovadel. Obvykle se přidává polyethylenglykol nebo sorbitol v množství 10 až 60 hmotnostních %. Když směs přejde do hnětací zóny, zvýší se teplota a hustota celé směsi. Důležitými parametry při tvorbě filmů touto metodou je mechanická a tepelná energie. Dalšími významnými faktory, které ovlivňují homogenitu filmu, smykovou rychlost a další vlastnosti výsledného produktu, jsou rychlost otáček šneku (otáčky/min) při vytlačování, teplota válce a tlak [10].

Mezi hlavní výhody metody vytlačování filmu oproti odlévání z roztoku patří kratší doba zpracování, nízká spotřeba energie a také lepší mechanické a optické vlastnosti, jako je prodloužení a vyšší průhlednost výsledného filmu. Další výhodou je také snadnější manipulace s polymery s vysokou viskozitou, absence rozpouštědel a variabilita zpracovatelských podmínek (teplota 70–500 °C, tlak 0–500 barů). Výhodou je také snadnější kontrola průběhu procesu a možnost ovlivnit stupeň míchání. Při vytlačování lze využít i formy, které jsou v mokřém procesu technologicky nedostupné. Nevýhodou této techniky je omezení pro použití surovin odolných vůči zpracovatelské teplotě a také vyšší počáteční náklady na specializované vybavení a na údržbu [10].

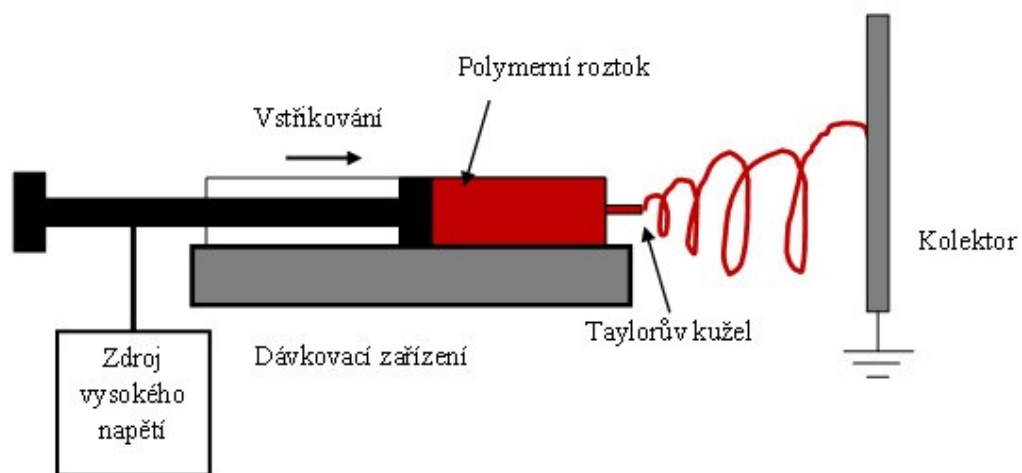


Obr. 2 Schéma technologie vytlačování filmů [10]

2.3 Zvlákňování

Elektrostatické zvlákňování patří mezi poměrně jednoduché a univerzální techniky, které umožňují výrobu vláken o průměru několika desítek nanometrů až mikrometrů,

z polymerních roztoků nebo polymerních tavenin pomocí elektricky vynuceného proudu kapaliny. Během elektrostatického zvlákňování je na polymerní kapalinu (roztok nebo tavenina) aplikováno elektrické pole vysokého napětí. Odpuzování mezi náboji na povrchu kapky na kapilárním hrotu soutěží s povrchovým napětím, které má naopak tendenci kapku stabilizovat. Jakmile je dosaženo kritického stavu, kdy dominuje odpuzování povrchového náboje, hemisférický povrch kapaliny na špičce se prodlužuje a vytváří se kuželovitý tvar známý jako Taylorův kužel. Před dosažením do kolektoru se nabitý polymerní roztok odpaří, nebo ztuhne a shromažďuje se ve formě jemných vláken na opačně nabitým uzemněném kolektoru (Obr. 3) [12].



Obr. 3 Schéma principu elektrostatického zvlákňování [13]

Zařízení pro proces elektrostatického zvlákňování je jednoduché a obsahuje pouze tři hlavní části: napájecí zdroj vysokého napětí, zásobník polymerního roztoku (např. injekční stříkačka s jehlou o malém průměru) vybavený čerpadlem pro řízení průtoku a kovové sběrné síto. Polymerní roztok je udržován v zásobníku a je připojen k napájecímu zdroji, aby se vytvořil nabitý proud polymeru. Plnění polymerního roztoku lze provádět buď injekční stříkačkou s kovovou jehlou, nebo kapilárou s kovovým hrotem ponořeným v polymerním roztoku. Pokud není stříkačka umístěna vodorovně, může být tok polymeru poháněn gravitací. Síto pro shromažďování vláken je vodivé a může být buď ve formě stacionární desky, nebo rotující plošiny či substrátu [14].

V důsledku rostoucího zájmu o tuto technologii mnoho výzkumných skupin vyvinulo sofistikované mechanismy, pomocí kterých lze efektivně a řízeně vyrábět složitější nanovláknenné struktury. Například lze využít vícenásobných trysek pro výrobu materiálu,

skládajícího se z více vrstev, přičemž každá vrstva je získaná z jiného typu polymeru nebo z kombinace různých druhů polymerů [14].

Proces elektrického zvlákňování ovlivňují tři hlavní faktory, a to jsou parametry roztoku, podmínky procesu a okolní prostředí. Tyto faktory hrají velkou roli při určování požadované kvality vyráběného vlákna. Pro mnoho aplikací jsou nejvýhodnější vlákna s průměrem v rozsahu 10-1000 nm a morfologií hladkého povrchu [14]. Dále by mělo být pro rozpuštění polymeru zvoleno vhodné rozpouštědlo tak, aby se neodpařovalo příliš rychle, aby vlákno neztuhlo dříve než dosáhne požadovaných rozměrů. Napájení by mělo být přiměřené k překonání viskozity a povrchového napětí polymerního roztoku a mezera mezi pipetou a uzemněným kolektorem by neměla být příliš malá na to, aby se vytvořily jiskry mezi elektrodami. Zároveň by ale měla být dostatečně velká na to, aby se rozpouštědlo odpařilo včas a vlákna se mohla bez problémů správně formovat [15].

3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VLASTNOSTI FILMŮ

3.1 Vliv přídatných látek

Při přípravě proteinových filmů lze využít různé přídatné látky k ovlivnění celé řady vlastností výsledného produktu. Naprosto nezbytné je například použití změkčovadel, dále se mohou přidávat různá síťovadla, antimikrobní látky a další.

3.1.1 Změkčovadla

Změkčovadla neboli plastifikátory, jsou sloučeniny s malou molekulovou hmotností, které lze přidat do filmu ke zlepšení mechanických vlastností a celkové pružnosti polymerní matrice. Filmy na bázi proteinů jsou bez použití změkčovadel velmi pevné, ale zároveň křehké, což zásadně omezuje jejich další aplikace [1].

Obecně rozlišujeme dva typy plastifikace, a to vnitřní a vnější. Vnitřní plastifikátory chemicky modifikují proteinový řetězec přidáním substitučních skupin připojených prostřednictvím kovalentních vazeb. V průběhu běžných reakcí jako je acetylace, nebo sukcinylace, vytvářejí vnitřní plastifikátory stericou překážku mezi proteinovými řetězci, což vede ke zvýšení volného objemu a zlepšení flexibility. Vnější plastifikátory napomáhají solvataci proteinových řetězců, snižují teplotu skelného přechodu a taktéž zvyšují volný objem [1].

Při výběru mezi různými typy změkčovadel je třeba vzít v úvahu několik faktorů. Plastifikátory a proteinové materiály musí mít podobnou polaritu, aby byly kompatibilní, nedostatečná dispergace změkčovadla v proteinové matrici taktéž negativně ovlivňuje vlastnosti filmu. Molekulární hmotnost, konfigurace a celkový počet funkčních skupin změkčovadla jsou dalšími faktory, které ovlivňují interakce mezi změkčovadlem a polymerem [6][16].

Mezi nejčastěji používané plastifikátory v proteinových filmech patří mono-, di- a oligosacharidy, polyoly (glycerol a jeho deriváty, polyethylenglykoly, sorbitol) a lipidy a jejich deriváty (mastné kyseliny, monoglyceroly a jejich estery, fosfolipidy a další emulgátory). Vůbec nejoblíbenějším plastifikátorem je ale již výše zmíněný glycerol, který je dobře mísitelný s většinou proteinů. Voda samotná také snižuje teplotu skelného přechodu proteinových filmů, to znamená, že je taktéž velmi účinným změkčovadlem a často se používá právě v kombinaci s glycerolem [6][11][16].

Nevýhodou použití změkčovadel je to, že snižují bariérové vlastnosti filmů, což znamená, že se zvyšuje propustnost filmu pro transport látek. Z tohoto důvodu je důležité zvolit správnou koncentraci změkčovadla, která sice zajistí požadované mechanické charakteristiky, ale zároveň nebude mít zásadní negativní vliv na bariérové vlastnosti filmů [16].

3.1.2 Síťovadla

Zesíťování je proces spojování polymerních řetězců kovalentními nebo nekovalentními vazbami, které vytvářejí trojrozměrné sítě. Jedná se o jednu z hlavních modifikačních technik polymerů a může být intra- nebo intermolekulární. Zesíťování snižuje pohyblivost polymerní struktury a obvykle zlepšuje její mechanické a bariérové vlastnosti i odolnost proti vodě, čím se snižuje její rozpustnost ve vodě. Kromě toho činí strukturu odolnější vůči teplu a světlu, zlepšuje tvarovou stabilitu a chemickou odolnost a také odolnost vůči rozpouštědlům. Použití síťovadel vede také ke snížení volného objemu, což má za následek zvýšení teploty skelného přechodu. Síťovadla mohou také zpomalovat biodegradaci proteinových materiálů [17].

Chemická síťovací činidla

Zesíťovací reakce se běžněji aplikují na proteiny, než na polysacharidy, protože proteiny obsahují více funkčních skupin. Nejběžnějším síťovacím činidlem jsou symetrické bifunkční sloučeniny s reaktivními skupinami se specifitou pro funkční skupiny přítomné na makromolekulách polymerní matrice. Aldehydy, zejména formaldehyd a glutaraldehyd, jsou široce používanými síťovacími činidly, protože jsou relativně levné a v proteinech rychle reagují s volnými neprotonovanými ϵ -aminoskupinami. Bylo prokázáno, že hodnota pH je klíčovým faktorem pro zesíťování pomocí aldehydů, protože určuje stupeň protonace ϵ -aminoskupin. Glutaraldehyd i formaldehyd však souvisejí s nepříznivými účinky na zdraví a životní prostředí, proto byly studovány alternativní aldehydy a další typy síťovacích činidel, které nepatří mezi potenciálně toxické látky. Jedním z nich je méně toxický cinnamaldehyd, který disponuje obdobnými vlastnostmi ve srovnání s jinými aldehydy a jeho přidáním se zvyšuje jak pevnost v tahu, tak modul pružnosti. Taktéž snižuje permeabilitu pro vodní páry, kyslík a oxid uhličitý a filmy si po přidání cinnamaldehydu zachovávají svoji průhlednost [17].

Mezi další netoxická zesíťovadla můžeme zařadit několik přírodních fenolických sloučenin odvozených z rostlin, které lze použít zejména pro proteiny obsahující velké množství

prolinu. Takto fungující fenolické kyseliny zahrnují kyselinu taninovou, kyselinu ferulovou, nebo také kyselinu gallovou. Nevýhodou použití fenolických sloučenin ve filmech je změna barvy. Ztmavnutí filmů s vyšší koncentrací fenolových kyselin je připisováno tvorbě chinonové sloučeniny při oxidaci fenolické struktury [17].

Další látkou používanou při síťování proteinových filmů je genipin, což je přirozeně se vyskytující síťovadlo s nízkou toxicitou. Genipin je aglykonový derivát z iridoidního glykosidu (geniposidu), který se vyskytuje v plodech tradičního čínského bylinného léčiva. Jeho velkou nevýhodou je jeho tmavě modrá barva, což může být pro některé aplikace nepřijatelné. Genipin kovalentně váže primární aminoskupiny proteinů prostřednictvím nukleofilní substituční reakce, která je závislá na pH [17].

Enzymatická zesíťovací činidla

Proteinové filmy mohou být zesíťovány také pomocí enzymů, které jsou oproti chemickým zesíťovacím činidlům šetrnější, jelikož jsou netoxické a nedochází ke vzniku toxických zbytků. Mezi tyto enzymy můžeme zařadit transglutaminázu, lipoxygenázu, lisyloxidázu, polyfenoloxidázu a peroxidázu. Transglutamináza je však druh enzymu, který může katalyzovat kovalentní síťovací reakce mezi proteiny za vzniku biopolymerů s vysokou molekulovou hmotností [6][18].

Transglutaminázy jsou potravinářské enzymy, které využívají mechanismus acyltransferázy k navázání γ -karboxyamidu (donoru acylu) glutaminového zbytku na γ -amin (akceptor acylu) lysinových zbytků podél proteinových řetězců. Transglutaminázy jsou rozšířeny v přírodě a nachází se v mnoha bezobratlých živočiších, v tkáních savců a v mikrobiálních buňkách. Nejčastěji se používají transglutaminázy izolované z mikrobiálních zdrojů, např. ze *Streptomyces platensis* či *Corynebacterium ammoniagenes*, z důvodu nižší ceny. Mechanismus zesíťovací reakce je velmi podobný těm, které probíhají se síťovadly získávaných z nemikrobiálních zdrojů. Mohou být použity jak v homogenních proteinových systémech, tak ve směsích proteinů. V takto zesíťovaných filmech dochází ke zlepšení mechanických i bariérových vlastností. Nevýhodou však zůstává fakt, že enzymatické zesíťování proteinových filmů je časově náročnější, složitější a také nákladnější oproti použití výše zmíněných chemických zesíťovadel [18].

3.2 Iontová síla

Vlastnosti filmů na bázi proteinů mohou být ovlivněny rozpustností proteinu v daném systému rozpouštědel. Například zvýšení rozpustnosti proteinu ve vodě může zlepšit vzhled a zvýšit elasticitu proteinových filmů. Podobně je možné zlepšit bariérové vlastnosti proti vlhkosti filmů naopak snížením rozpustnosti proteinu ve vodě. Změna iontové síly roztoku, ze kterého se film připravuje, představuje jeden z mnoha způsobů, jak ovlivnit rozpustnost konečného produktu. Ve studii Qi et al. (2006) byla analyzována rozpustnost vybraných typů kaseinu pomocí různých koncentrací soli (NaCl). Konkrétně byl studován vysrážený kasein pomocí CO₂ a kaseinát vápenatý. Výsledky ukázaly, že rozpustnost vysráženého kaseinu významně vzrostla se zvyšující se koncentrací soli, oproti tomu rozpustnost kaseinátu vápenatého se v podstatě nezměnila. Na základě měření pomocí transmisního elektronového mikroskopu (TEM) bylo pozorováno, že se agregáty vysráženého kaseinu rozpadly na menší částice v závislosti na zvýšení koncentrace soli. To naznačuje, že elektrostatické interakce mezi kaseiny způsobené zpracováním pomocí CO₂ mohou být hlavním důvodem pro tvorbu těchto agregátů [1].

3.3 Velikost částic

Výsledné vlastnosti filmu mohou také ovlivnit změny velikosti částic obsažené buď v proteinové matici, nebo v přísadách filmotvorné disperze. Nerozpustné částice uložené v matici filmu mohou ovlivnit hlavně bariérové vlastnosti, protože propustnost je ovlivněna právě rozpustností difundující sloučeniny ve filmu a také difúzním koeficientem. Změna dráhy pohybu molekuly plynu, která difunduje filmem, může změnit rychlost difúze. Nerozpustné částice v polymerní matici tedy vytvářejí překážku pro migrující molekuly. Zmenšením částic lze vytvořit více zakřivenou difúzní dráhu, čímž se prodlouží doba migrace alepší se tak bariérové vlastnosti filmu [1].

3.4 Koncentrace

Proteinové filmy tvoří složité komplexní struktury a interakce protein-protein v agregátech mohou mít odlišnou povahu, což může vést k různým stupňům soudržnosti. To následně ovlivňuje mobilitu proteinů a jejich schopnost vytvářet filmy. Koncentrace filmotvorných roztoků ovlivňuje adhezi polymerů a rychlost tvorby matrice při přípravě filmu. Je třeba nalézt optimální koncentraci, která umožní dosažení střední viskozity a zajištění co nejvyšší soudržnosti. Optimální koncentrace každého proteinového filmu je ale jiná. Například

výroba filmů s izolátem syrovátkové bílkoviny vyžaduje relativně vysokou koncentraci bílkovin (až 8 %) ve filmotvorném roztoku, aby došlo k tvorbě disulfidového můstku. Oproti tomu při výrobě filmů z rybích bílkovin vznikají silnější filmy už při nižší koncentraci (1,5–2 %) [6].

3.5 Hodnota pH

Hodnota pH hraje důležitou roli v proteinových filmech připravených z materiálů ve vodě rozpustných, jako je např. izolát sójového nebo syrovátkového proteinu, protože rozpustnost těchto proteinů závisí na jejich izoelektrickém bodě. Během rozpouštění makromolekulárních látek jsou kohezní síly mezi rozpuštěnými makromolekulami neutralizovány nenabitými molekulami rozpouštědla. V průběhu reakce, kdy se funkční skupiny na lineárním polymeru během rozpouštění ionizují dochází ke vzájemnému odpuzování nábojů, a tím k expanzi polymerního řetězce. Čím větší je stupeň rozpouštění a náboj na řetězci, tím větší je stupeň „rozbalení“ polymerního řetězce. Interakce mezi nabitými molekulami polymeru a molekulami polárního rozpouštědla se zvyšuje se zvyšujícím se nábojem v řetězci. Maximální rozpustnosti proteinu lze dosáhnout při hodnotě pH mimo jeho izoelektrický bod. Aby se však mohl připravit film při extrémním pH, je třeba brát v úvahu také sensorické vlastnosti filmu [6].

3.6 Teplota sušení

Filmy na bázi proteinů se často získávají metodou odlévání. Tento proces zahrnuje sušení komplexního koloidního roztoku připraveného z proteinu, rozpouštědla a dalších látek, který byl předtím nalit do vhodné formy. Účinek specifické teploty sušení závisí na různých charakteristikách suroviny, jako je výskyt již existující gelové fáze, nebo výskyt tepelné gelace během sušení. Dále mohou nastat různé jevy, jako je přechod z kaučukovité fáze do skelné fáze, fázová separace nebo krystalizace. Interakce mezi fyzikálně-chemickou povahou biopolymerů a podmínkami sušení je velmi důležitá [6].

Teplota je pro proteiny hlavním denaturačním faktorem a dokonce i tepelná stabilita a konformace proteinu závisí na složení aminokyselin. Během procesu sušení, kdy dochází k postupnému odpařování vody, se konformace proteinů mění. Stupeň rozbalení proteinu dále určuje typ a podíl kovalentních nebo nekovalentních interakcí přítomných mezi proteinovými řetězci. Je obecně známo, že když jsou proteiny denaturovány, mohou prostřednictvím disulfidových vazeb řetězce interagovat silněji a snadněji. Vysoká teplota,

kolem 70–100 °C, ovlivňuje tvorbu tuhých struktur v proteinových roztocích právě z důvodu denaturace proteinů. Nadměrné teplo nebo nadměrná rychlost odpařování rozpouštědla během procesů může vést k tvorbě nesoudržných filmů. Ve vodě rozpustné proteiny potřebují pro tvorbu filmů vyšší teplotu a delší dobu sušení, než filmy z bílkovin rozpustných v alkoholu, jako je kukuřičný zein nebo pšeničný lepek, kterým stačí kratší doba a nižší teplota sušení [6].

3.7 Relativní vlhkost

Interakce vody s proteinovými filmy jsou považovány za hlavní kritérium pro možné vysvětlení změn fyzikálních vlastností vyvolaných obsahem vlhkosti. Při adsorpci vodních par během sušení materiálů dochází k navázání molekul vody na hlavní řetězce peptidové skupiny a na specifická hydrofilní místa, jako jsou karboxylové, amino a hydroxylové zbytky. Při vysoké relativní vlhkosti dochází k multimolekulární adsorpci botnáním a také ke konformačním změnám v makromolekulární struktuře. Vlastnosti proteinových filmů se mohou měnit kvůli vnitřní nestabilitě použitých surovin. Migrací nízkomolekulárních látek a jiných aditiv použitých ve formulaci filmu (např. změkčovadla), může dojít například k přesmyku polymerních řetězců. Lze ji tedy považovat za hlavní příčinu fyzikální nestability proteinových filmů [6].

Vztah mezi rovnovážnou relativní vlhkostí a obsahem vody v polymerních filmech může být hodnocen měřením sorpčních izoterm. Vliv relativní vlhkosti na mechanické vlastnosti a permeabilitu proteinových filmů, byl vysvětlen poklesem teploty skelného přechodu, vyvolaným plastifikačními jevy na proteinových filmech [6].

4 ANTIBAKTERIÁLNÍ FILMY

V uplynulých letech došlo k výraznému nárůstu poptávky spotřebitelů po obalech, které potravinám zaručí delší životnost a zároveň budou bezpečné, netoxické a vyrobené z ekologických materiálů, které neškodí životnímu prostředí. Výzkum těchto systémů je velmi aktuální jak ve farmaceutické oblasti, konkrétně při výrobě některých druhů léků, tak v potravinářském průmyslu [19][20].

Tzv. aktivní obal (z angl. „active packaging“) je komplexní systém, který umožňuje vzájemnou interakci mezi obalem, produktem a prostředím. Tyto materiály vykazují chemické, fyzikální a biologické aktivity, které mohou měnit podmínky balených produktů a pomáhají prodlužovat trvanlivost výrobku. Aktivní obal je zároveň schopný zlepšit mikrobiologickou bezpečnost a senzorické vlastnosti při zachování kvality produktu [21]. Aktivní obal, nebo film lze využít k odstranění nežádoucích sloučenin, ke změně propustnosti filmu pro plyny a zejména k prevenci mikrobiálního růstu začleněním antimikrobiálních látek do jeho matrice [19]. Jelikož je proteinová struktura většinou hydrofilní povahy, umožňuje řízené uvolňování aditivních a bioaktivních sloučenin. Z tohoto důvodu jsou filmy na bázi proteinů jedním z nejslibnějších médií, které lze použít v aplikacích aktivního antimikrobiálního obalového systému [21].

Při výběru antimikrobiální látky je třeba vzít v úvahu její účinnost proti cílovému mikroorganismu a potenciální interakce s filmotvorným biopolymerem a dalšími přítomnými složkami, které mohou ovlivnit rozsah antimikrobiálního účinku a také výsledné vlastnosti filmu [19]. Mezi hlavní cíle těchto látek patří patogenní mikroorganismy produkující toxiny, mikroorganismy způsobující infekce a také mikroorganismy, jejichž metabolické produkty zapříčiňují nežádoucí pachy, chutě, problémy s texturou a zabarvením produktu [20].

Antimikrobiální látky mohou být syntetické a přírodní. Nejčastěji využívanými syntetickými konzervačními látkami v potravinářském, resp. kosmetickém průmyslu jsou organické kyseliny. Některé z nich, například kyselinu citrónovou, jablečnou, benzoovou, sorbovou či mléčnou lze inkorporovat do filmů a to buď nepřímo, nebo ve formě solí. Spektrum jejich antimikrobiálního působení je velmi široké, a to z důvodu poklesu pH substrátu, nebo růstového média v důsledku zvýšení koncentrace protonu. To následně vede ke změně permeability buněčné membrány v důsledku interakcí mezi membránovými proteiny a fosfolipidy, což má vliv na její funkci. Kromě toho mohou nedisociované formy slabých

organických kyselin snadněji pronikat do lipidové dvojvrstvy buněčné membrány mikroorganismů a to nakonec vede k inaktivaci buněk [20].

Lze také využívat přírodní antimikrobiální látky, které lze klasifikovat, v závislosti na jejich původu, na rostlinné, živočišné, mikrobiální nebo anorganické. Rostlinná antimikrobiální činidla se přirozeně vyskytují v různých částech rostlin, jako jsou stonky, kůra, kořeny, květy a plody. Mezi takové sloučeniny patří esenciální oleje, koření a další přírodní extrakty. Do skupiny látek živočišného původu můžeme zařadit enzymy, a také například polysacharid chitosan, který je získáván z exoskeletu mořských korýšů. Jako další antimikrobiální látky se pro zabudování do filmové matrice používají bakteriociny, jako je nisin a anorganické látky zahrnující oxidy titanu a zinku, či stříbro ve formě nanočástic [20].

4.1 Esenciální oleje

Esenciální oleje (EO) jsou olejovité kapaliny získávané z různých částí aromatických rostlin, např. z listů, květů, pupenů, semen či kůry a pojmenovávají se podle toho, z které rostliny se extrahují. EO mohou obsahovat až 60 druhů různých složek při zcela odlišných koncentracích. Vyznačují se však dvěma, nebo třemi hlavními, které tvoří až 70 % oleje ve srovnání s ostatními složkami, které jsou přítomné ve stopovém množství. Skládají se z komplexní směsi sloučenin, jako jsou alkoholy, ketony, kyseliny, aldehydy a estery, zatímco nejdůležitější složky tvoří terpeny a fenoly, které jsou rovněž zodpovědné za jejich biologické vlastnosti a antimikrobiální aktivitu [22][23][24].

EO jsou tekuté, těkavé, zřídka zbarvené kapaliny rozpustné v tucích a v organických rozpouštědlech a nerozpustné ve vodě, které se vyznačují velmi výraznou vůní. Tyto těkavé kapaliny lze charakterizovat pomocí různých druhů fyzikálně-separačních metod jako je tenkovrstvá chromatografie (TLC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) či plynová chromatografie (GC). Kromě toho je možné využít několika spektrofotometrických technik, jako je UV nebo IR spektroskopie, nebo také modernější NMR či Ramanovy spektroskopie [25].

Převážná většina EO se vyrábí z rostlinného materiálu pomocí různých druhů destilace nebo lisováním za studena. Obecně je proces parní destilace nejrozšířenější metodou výroby éterických olejů ve větším měřítku. Metodou lisování za studena se EO vyrábí ze slupek citrusových plodů, které se mechanicky rozdrtí, aby došlo k uvolnění požadované látky. Tyto procesy vedou k produktům, které nejsou zcela těkavé, nicméně jsou uznávány jako éterické oleje. Naproti tomu produkty získané extrakcí pomocí různých organických rozpouštědel,

nebo superkritickou fluidní extrakcí (SFE) nelze považovat za pravé éterické oleje i přesto, že mají identické vlastnosti se surovinou, ze které byly získány. Z tohoto důvodu se často používají v potravinářském průmyslu, ovšem jen pokud jsou zvolena rozpouštědla pro potraviny přijatelná a nezanechávají žádné škodlivé zbytky [25].

EO mají kromě antimikrobiálních účinků i řadu dalších vlastností, které je činí populárními v různých průmyslových odvětvích. Působí také jako antioxidanty, to znamená, že kůži chrání před volnými radikály, které jsou zodpovědné za její stárnutí. Z tohoto důvodu je lze využít v anti-age kosmetice. Dále je můžeme najít v přípravcích vlasové kosmetiky, jelikož vlasům poskytují lesk a mají také kondiční účinky. EO se také využívají v potravinářském průmyslu jako aromata a příchutě v kosmetickém průmyslu zase za účelem parfemace [25].

4.1.1 Antimikrobiální působení esenciálních olejů

Antimikrobiální aktivita EO je dobře známa již řadu let a je také předmětem velkého množství studií. EO jsou účinné jak proti bakteriím, patogenním bakteriím, tak vůči plísním a virům. Rozsah antimikrobiálních účinků je obecně určen složením a koncentrací jednotlivých složek EO, které se liší a závisí na chemotypu, stáří rostliny, klimatických podmínkách, době sklizně a metodě destilace, či extrakce. EO jsou komplexní sloučeniny, které se skládají z terpenů a také z aromatických a alifatických sloučenin s nízkou molekulovou hmotností. Monoterpeny jsou nejčastěji vyskytující se molekuly, které tvoří 90 % éterických olejů. Aromatické sloučeniny jsou zastoupeny méně často a spíše ve stopovém množství [26].

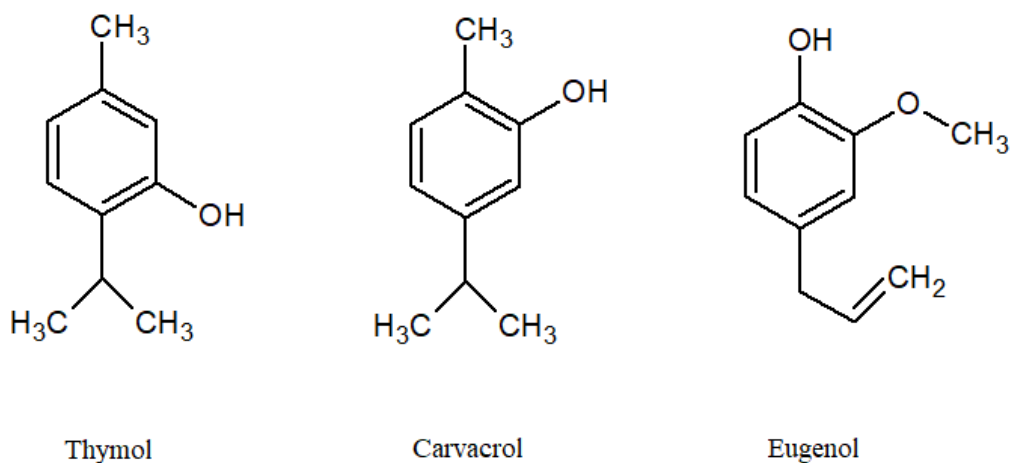
Antimikrobiální aktivita *Thymus vulgaris* (tymián obecný) je způsobena hlavně obsahem thymolu, karvakrolu, γ -terpinenu a p-cymenu. Studie jednotlivých složek EO prokázaly, že za největší antimikrobiální aktivitu mohou fenolické sloučeniny, konkrétně hydroxylové skupiny, které jsou v jejich struktuře přítomny. Bylo prokázáno, že volná hydroxylová skupina karvakrolu a thymolu je zodpovědná za zvýšení fluidity buněčných membrán změnou jejich složení. Důsledkem toho dochází k vyčerpání intracelulárního ATP a zvýšení permeability buněčné membrány pro ionty draslíku, což má poté za následek usmrcení bakteriálních buněk. Jsou také prokázány rozdíly ve způsobu působení na bakteriální buňky mezi různými EO. Tymián a oregano, bohaté na thymol a karvakrol, tedy způsobují smrt bakteriálních buněk poškozením membrány, zatímco skořicový olej bohatý na eugenol,

působí bez jakéhokoli vážného poškození membrány, což naznačuje jiný způsob působení (Tab. 2) [26].

Tab. 2 Srovnání hlavních složek vybraných EO a jejich koncentrace v % [23]

Esenciální olej	Hlavní sloučeniny	Obsah (%)
Skořicový list	eugenol	76,74–87,3
	benzyl benzoate	4,01
	bicyclogermacrene	3,6
	β -caryophyllene	1,9–3,47
	α -phellandrene	1,9
Oregano	carvacrol	32,0–61,3
	thymol	13,9–35,0
	γ -terpinene	4,75–10,5
	p-cymene	9,1–15,4
Tymián	thymol	5,34–57,7
	p-cymene	17,53–18,7
	γ -terpinene	8,3–9,92
	carvacrol	2,8–41,33

Podobný účinek látek thymolu a karvakrolu vyplývá z jejich téměř identické chemické struktury. Tyto dvě sloučeniny jsou totiž izomery, které se liší pouze polohou hydroxylové skupiny. Kromě toho má volná hydroxylová skupina delokalizovaný elektronový systém umožňující uvolňování protonu. Naproti tomu eugenol (hlavní účinná látka skořicového oleje) obsahuje methoxylovou skupinu v orto poloze, což snadné uvolnění protonu hydroxylové skupiny znemožňuje (Obr. 4) [26].



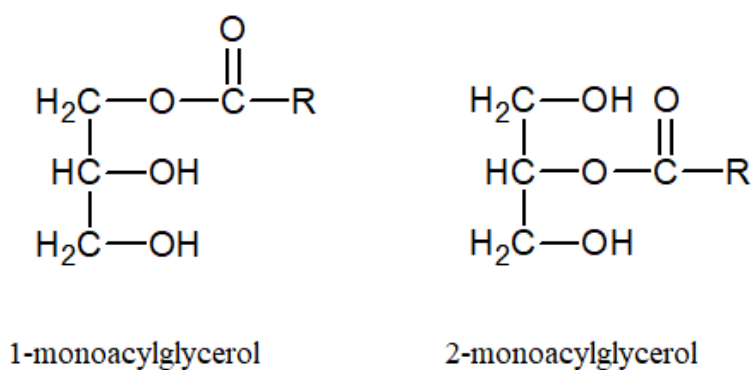
Obr. 4 Srovnání struktur složek EO thymolu, carvacrolu a eugenolu

EO jsou také účinné proti plísním a kvasinkám, což je jejich další velká výhoda. Některé druhy EO vykazují největší antimikrobiální působení proti druhům *Aspergillus sp.* a *Candida albicans*. Antifungální působení opět nejspíš zahrnuje narušení permeabilizace membrány, inhibici mitochondriálního transportu elektronů vedoucí ke snížení hladiny ATP a nakonec buněčnou apoptózu. Přestože jsou antifungální vlastnosti EO dobře zdokumentovány, přesný molekulární mechanismus stále není znám. Předpokládá se, že v antifungální aktivitě hrají roli i jiné mechanismy, které nezahrnují narušení membrány [26].

Některé druhy EO jsou také silnými antivirovými látkami. Antivirová aktivita byla potvrzena vůči virům Herpes simplex, cytomegalovirům, rinovirům, koronavirům a adenovirům. Mechanismus a místo antivirového působení jsou stejně jako u antifungálního působení nejasné [26].

4.2 Monoacylglyceroly

Monoacylglyceroly jsou parciálními estery glycerolu, u nichž je mastnou kyselinou esterifikována pouze jedna hydroxylová skupina. Struktura monoacylglycerolu závisí na poloze této mastné kyseliny. Pokud se nachází mastná kyselina na prvním uhlíku, jedná se o 1-monoacylglyceroly, pokud na druhém, nazýváme tyto látky 2-monoacylglyceroly (Obr. 5) [27][28].



Obr. 5 Struktura 1-monoacylglycerolu a 2-monoacylglycerolu

Molekula monoacylglycerolu má dvě části, hydrofobní a hydrofilní, a proto tyto molekuly vykazují amfifilní chování. Tato vlastnost umožňuje monoacylglycerolům snižovat mezipovrchové napětí na rozhraní dvou nemísitelných kapalin. Jsou dobře rozpustné v alkoholu, méně v petroletheru a ve vodě jsou částečně rozpustné pouze mastné kyseliny. Povaha uhlíkatého řetězce má na vlastnosti monoacylglycerolů velký vliv. Platí, že bod tání

stoupá s rostoucím počtem uhlíků v molekule a zvyšující se nasyceností mastných kyselin bod tání klesá. Hustota klesá s rostoucí délkou řetězce mastných kyselin, přítomností kyslíkatých funkčních skupin se hustota zvyšuje. V závislosti na teplotě mohou monoacylglyceroly existovat v různých krystalických modifikacích, tato schopnost je označována jako polymorfismus [27].

Monoacylglyceroly lze vyrábět několika způsoby pomocí alkoholýzy, esterifikace nebo částečné hydrolyzy triacylglycerolů. Průmyslové parciální acylglyceroly se nejčastěji vyrábějí alkalicky katalyzovanou glycerolýzou tuků a olejů. Při této reakci se využívá nízkých nákladů na katalyzátory a krátké reakční doby. Vysokoteplotní chemická katalýza však vede k rychlé oxidaci oleje, což má za následek vznik tmavé barvy oleje a zhoršení sensorických vlastností. Monoacylglyceroly získané tímto procesem musí být proto dále čištěny, aby mohly být použity v potravinářském, či kosmetickém průmyslu. Při výrobě těchto látek lze využít i procesu enzymatické katalýzy, který je oproti chemické katalýze výhodnější z důvodu mírných reakčních podmínek, což vede k výrobě čistších a méně degradovaných produktů [29].

Monoacylglyceroly a jejich deriváty jsou široce používány jako emulgátory v potravinářském i kosmetickém průmyslu. Jsou považovány za bezpečné a nezávadné látky, které nepůsobí nepříznivě na lidský organismus a nejsou toxické. Kromě potravinářského průmyslu se monoacylglyceroly používají v již zmíněném kosmetickém průmyslu, konkrétně při výrobě masť, krémů a dalších produktů řadících se k péči o tělo. V plastikářském průmyslu fungují jako antistatické, mazací a plastifikační činidla. Mohou také zlepšit stálost barev a kontrast ve tkaninách, proto jsou široce využívány i v průmyslu textilním [28].

4.2.1 Antimikrobiální působení monoacylglycerolů

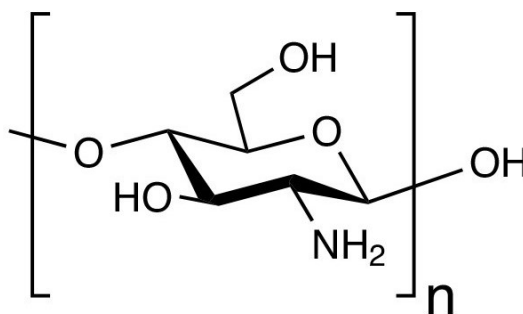
Mastné kyseliny a monoacylglyceroly vykazují inhibiční účinky proti některým druhům mikroorganismů. Antimikrobiální aktivita monoacylglycerolů závisí na počtu atomů uhlíků v řetězci mastné kyseliny a také na přítomnosti a počtu dvojných vazeb. Systematickým zkoumáním nasycených mastných kyselin s uhlovodíkovými řetězci v rozmezí 6 až 18 atomů uhlíku bylo zjištěno následující. Kyselina laurová, která má ve svém řetězci 12 atomů uhlíku, vykazuje největší inhibiční účinky proti grampozitivním bakteriím, včetně *Staphylococcus aureus*, hlavního původce bakteriálních kožních infekcí. Monoacylglycerol monolaurin ve srovnání s kyselinou laurovou však vykazuje ještě větší účinnost, což

naznačuje nižší hodnota minimální inhibiční koncentrace (MIC). Obecně tedy platí, že esterifikace mastné kyseliny na její odpovídající derivát inhibiční účinky zvyšuje. Kyselina kaprinová s řetězcem o 10 atomech uhlíku a její monoacylglycerolový derivát monokaprin, mají taktéž vysokou antibakteriální aktivitu a to zejména proti gramnegativním bakteriím, např. proti *Campylobacter jejuni*, které jsou běžně spojovány s infekcemi v potravinách. Antimikrobiální účinnost mastných kyselin závisí na hodnotě pH roztoku, zatímco aktivita monoacylglycerolů není hodnotou pH ovlivněna. Je to způsobeno tím, že mastné kyseliny obsahují ionizovatelnou funkční skupinu, zatímco monoacylglyceroly jsou neiontové molekuly [30][31].

Mechanismus antibakteriální aktivity mastných kyselin a monoacylglycerolů byl zkoumán pomocí různých experimentálních metod, zaměřujících se hlavně na bakteriální buněčné membrány a klíčové procesy spojené s ochranou a funkcí buněk. Chování těchto látek v bakteriálních membránách pochází z jejich amfipatických vlastností, což vede k různým reakcím, včetně destabilizace membrány. Zejména aktivita destabilizující membránu buněk způsobuje zvýšenou permeabilitu a buněčnou lýzu, což vede k inhibici růstu bakteriálních buněk (bakteriostatický účinek) nebo k buněčné smrti (baktericidní účinek) [31].

4.3 Chitosan

Chitosan je lineární biopolymer, konkrétně polyaminosacharid, který se skládá z β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranózy a 2-amino-2-deoxy- β -D-glykopyranózy. Lze jej získat hydrolyzací aminoacetylových skupin chitinu, který je hlavní složkou exoskeletu korýšů, jako jsou krevety a krabi. Chitin se přirozeně nachází také v několika druzích hub. Chitosan má jedinečnou kationtovou povahu ve srovnání s jinými neutrálními nebo negativně nabitými polysacharidy. Tato sloučenina obsahuje tři reaktivní skupiny: primární hydroxylovou skupinu, sekundární hydroxylovou skupinu a aminoskupinu. Aminoskupinu NH_2 obsaženou v chitosanu lze protonizací v kyselém prostředí převést na skupinu NH_3^+ , z čehož poté vychází jeho antimikrobiální a antifungální aktivita (Obr. 6) [32][33].



Obr. 6 Struktura chitosanu [33]

Extrakce chitinu se provádí pomocí několika reakcí, které zahrnují deproteinizaci a demineralizaci a získaný produkt tedy nazýváme chitin. Takto získaný produkt je chemicky deacetylován, aby se odstranily některé, nebo všechny jeho acetylové skupiny. Tato chemická deacetylace se provádí hydrolýzou chitinu v silně alkalickém prostředí, nejčastěji v přítomnosti 40–50% NaOH za vysokých teplot. Alternativou oproti použití chemických rozpouštědel je enzymatická deacetylace chitinu s použitím enzymů nazývaných chitin-deacetylasy. Pomocí enzymatické deacetylace je možné lépe regulovat vlastnosti konečného produktu, jako je stupeň acetylace a také molekulovou hmotnost [34].

Chitosan je nerozpustný ve vodě, ale rozpustný v kyselých rozpouštědlech pod hodnotou pH 6. K rozpouštění se používají organické kyseliny, jako je kyselina mravenčí, či mléčná ale nejběžněji používaným rozpouštědlem je 1% roztok kyseliny octové. Chitosan je netoxický, biologicky odbouratelný polymer s vysokou molekulovou hmotností, který je široce využíván v mnoha aplikacích. Kladné iontové náboje, které jsou obsaženy v jeho struktuře mu dávají možnost chemicky se vázat s negativně nabitými tuky, lipidy, cholesterolem, ionty kovů, bílkovinami a dalšími makromolekulami. Filmy obsahující chitosan jsou pružné, pevné materiály, poskytující dobré bariérové vlastnosti a také antimikrobiální účinky [32].

Chitosan je díky svým jedinečným vlastnostem využíván v mnoha odvětvích průmyslu. V potravinářském průmyslu se využívá pro konzervaci potravin či při čištění vod, ale objevuje se také v různých doplňcích stravy, či jako prebiotikum. Používá se i ve farmaceutickém průmyslu, buď v obvazech, jelikož podporuje hojení ran a nebo se jeho vlastností využívá jako vehikulum pro léky. V neposlední řadě ho najdeme také v kosmetice, kde se používá v různých kosmetických formulacích pro své antioxidační, hydratační a emulgační vlastnosti [32].

4.3.1 Antimikrobiální působení chitosanu

Chitosan vykazuje silnou antimikrobiální aktivitu proti různým skupinám mikroorganismů, jako jsou např. bakterie, a to jak proti grampozitivním, tak proti gramnegativním bakteriím. Vykazuje také antifungální účinky, což znamená, že je účinný i proti některým druhům hub. Tato aktivita závisí na mnoha faktorech, jako je stupeň deacetylace, molekulová hmotnost chitosanu, jeho koncentrace v roztoku nebo hodnota pH a také iontová síla. Za hlavní důvod této aktivity jsou považovány interakce mezi kladně nabitými aminoskupinami chitosanu a aniontovými složkami mikroorganismů. V případě gramnegativních bakterií interakce s lipopolysacharidy a v případě grampozitivních bakterií s kyselinou teichoovou. Tyto reakce pak mohou souviset se změnou buněčné propustnosti, což pak vede k úniku intracelulárních elektrolytů a proteinových složek a nakonec k buněčné smrti. Mnoha studiemi pak bylo potvrzeno, že kombinace chitosanu a esenciálních olejů antimikrobiální účinky chitosanových filmů ještě zvyšuje [35][36].

5 CÍLE PRÁCE

Cíle této diplomové práce lze shrnout následovně:

- vypracovat literární rešerši zaměřenou na proteinové filmy, konkrétně na jejich vlastnosti a přípravu, a dále na charakterizaci aktivních látek do nich inkorporovaných;
- připravit filmy na bázi zeinu a kombinace zeinu a chitosanu s přídavkem vybraných aktivních látek;
- charakterizovat jejich fyzikálně-chemické a mechanické vlastnosti a antimikrobiální účinky;
- diskutovat dosažené výsledky.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A METODY

6.1 Chemikálie

Zein (TCI, Europe nv, Belgie)

Chitosan nízkomolekulární (50–190kDa, Sigma-Aldrich)

Ethylalkohol 96%

Glycerol bezvodý p.a. (molární hmotnost 92,10 g·mol⁻¹, obsah 99,70 %, Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

Ethylenglykol p.a. (molární hmotnost 62,07 g·mol⁻¹, Ing. Petr Švec – PENTA)

Kyselina octová 99,8% (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

Monoacylglycerol kyseliny laurové, dosažená konverze 86,35 %; 98 % (FT UTB)

Éterický olej tymián (Nobilis Tilia)

Éterický olej oregano (Nobilis Tilia)

Eugenol (molární hmotnost 164,20 g·mol⁻¹, obsah 99 %, Sigma-Aldrich)

Mueller-Hinton agar

Saboraud agar

Mikroorganismy (*Escherichia coli* (CCM 3954), *Staphylococcus aureus* (CCM 3953), *Candida albicans* (CCM 8261), *Aspergillus sp.* (CCM 8262))

6.2 Pomůcky a přístroje

Analytické váhy (Sartorius Basic 110 S)

Laboratorní předvážky (KERN 572)

Magnetické míchadlo s ohřevem (Lavot Chotutice, Heidolph Hei-Standard)

Sušárna (Memmert ULM 400, Memmert UN)

FTIR spektrometr (Thermo Scientific Nicolet Summit)

Texturometr (AMETEK –TA1 from Lloyd Instruments)

Tenziometr (Attension Theta by Biolin Scientific)

Digitalní třmenový mikrometr (rozsah 0–25 mm, Schut Geometrical Metrology)

Vortex (V-1 plus; Biosan)

Biologický termostat (Mettler INE 600)

Filtrační papír KA 2

Exsikátor ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

Automatické mikropipety

Sterilní disky

Petriho misky

Běžné laboratorní sklo a pomůcky

6.3 Metodika

6.3.1 Příprava filmů na bázi zeinu

Filmy na bázi zeinu (Z) byly připravovány dle modifikace metody [37]. Vypočítané množství zeinu 8,6 gramů bylo naváženo s přesností na 0,0001 g a následně bylo smícháno s 50 ml 96% ethanolu. Směs byla za stálého míchání zahřívána na magnetickém míchadle při cca 250 ot./min asi 30 minut, dokud nebyla homogenní (Obr. 7).



Obr. 7 Příprava filmů na bázi zeinu

Poté byla za horka filtrována přes Büchnerovu nálevku a k přefiltrovanému roztoku byly následně přidány 2 g glycerolu. Tento roztok byl přiveden k varu po dobu 5 minut a po vychladnutí bylo přimícháno dané množství aktivních látek. Aktivními látkami byly buď

monoacylglycerol kyseliny laurové (ML), či různé druhy esenciálních olejů, či jejich složek (oregano, O; tymián, T; eugenol, EU), případně jejich vzájemné kombinace (Tab. 2). Po důkladném rozmíchání aktivních látek byla tato směs odlita po 10 ml do Petriho misek (o průměru 90 mm) a byla ponechána v sušárně při 30° C po dobu dlouhou minimálně 24 hodin. Před dalšími experimenty byly filmy uchovávány v exsikátoru při relativní vlhkosti 60%.

Tab. 3 Procentuální zastoupení aktivních látek ve filmech na bázi zeinu

Vzorek	Monolaurin [%]	Tymián [%]	Oregano [%]	Eugenol [%]
Z	-	-	-	-
Z/3T	-	3	-	-
Z/3O	-	-	3	-
Z/3EU	-	-	-	3
Z/3ML	3	-	-	-
Z/3ML/2O	3	-	2	-
Z/4ML/2O	4	-	2	-
Z/5ML/2O	5	-	2	-
Z/3ML/2T	3	2	-	-
Z/5ML/2T	5	2	-	-
Z/3ML/2EU	3	-	-	2
Z/4ML/2EU	4	-	-	2
Z/5ML/2EU	5	-	-	2
Z/3ML/3EU	3	-	-	3

6.3.2 Příprava filmů na bázi zeinu a chitosanu

Pro přípravu filmů kombinace zeinu a chitosanu (Z/CH) byl zvolen upravený postup dle [38]. Roztok chitosanu byl připraven rozpuštěním naváženého množství chitosanu (0,24 g s přesností na 0,0001 g) ve 4 ml předem připraveného 1% roztoku kyseliny octové. Směs byla míchána na magnetickém míchadle při cca 500 ot./min po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě. Následně bylo přidáno 16 ml 96% ethanolu a 0,5 g glycerolu a homogenizace pokračovala dalších 10 minut. Poté byly za stálého míchání a teplotě cca 60° C pomalu přidávány 2 g zeinu tak, aby docházelo k postupnému pomalému rozpouštění zeinu a důkladné homogenizaci. Na závěr bylo do roztoku přimícháno zvolené množství a kombinace aktivních látek stejných jako v případě přípravy zeinových filmů v kapitole 6.3.1 (Tab. 3). Po rozmíchání aktivních látek byla tato směs odlita po 10 ml do Petriho misek (o průměru 90 mm) a byla sušena v sušárně cca 3 hodiny při 50° C. Před dalšími experimenty

byly tyto filmy, obdobně jako filmy na bázi zeinu, uchovávány v exsikátoru při relativní vlhkosti 60%.

Tab. 4 Procentuální zastoupení aktivních látek ve filmech na bázi zein/chitosan

Vzorek	Monolaurin [%]	Tymián [%]	Oregano [%]	Eugenol [%]
Z/CH	-	-	-	-
Z/CH/3T	-	3	-	-
Z/CH/3O	-	-	3	-
Z/CH/3EU	-	-	-	3
Z/CH/4EU	-	-	-	4
Z/CH/3ML	3	-	-	-
Z/CH/3ML/2O	3	-	2	-
Z/CH/5ML/2O	5	-	2	-
Z/CH/5ML/2T	5	2	-	-
Z/CH/3ML/2EU	3	-	-	2
Z/CH/4ML/2EU	4	-	-	2
Z/CH/5ML/2EU	5	-	-	2

6.3.3 Měření tloušťky filmů

Tloušťka filmů byla měřena pomocí digitálního mikrometru s přesností na 0,001 mm na pěti náhodných místech každého vzorku. Tyto hodnoty byly následně zprůměrovány a byla vypočítána směrodatná odchylka.

6.3.4 Měření mechanických vlastností

Před měřeními byly vzorky kondicionovány při 60 % relativní vlhkosti po dobu nejméně 24 hodin. Mechanické vlastnosti byly stanoveny na přístroji pro analýzu textury AMETEK TA1 from Lloyed Instruments a naměřené hodnoty byly následně vyhodnoceny pomocí softwaru NEXYGENPlus.

Zkouška vpichem

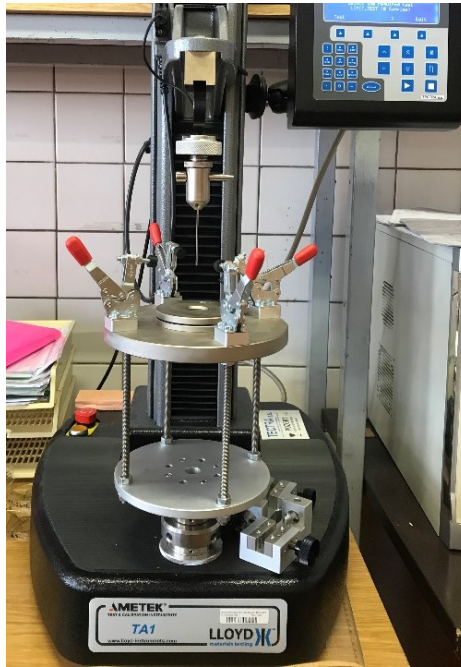
Před zkouškou odolnosti proti protržení pomocí penetrační sondy (vpich) byl film nařezán na požadované rozměry 40x40 mm². Takto připravený vzorek byl umístěn mezi dvě desky s kruhovým otvorem o průměru 20 mm a byl zajištěn svorkami. Středovou částí vzorku byla poté vtlačena válcová sonda o průměru 2 mm (Obr. 8). Pomocí metody vpichu byla stanovována pevnost filmu při vpichu (PS) a deformace při vpichu (PD). Pevnost filmu při vpichu (PS) byla následně vypočítána dle vzorce (1).

$$PS = \frac{F_{max}}{T} [N \cdot mm^{-1}] \quad (1)$$

Kde:

- F_{\max} ...maximální síla při vpichu [N]
- T ...průměrná tloušťka vzorku filmu [mm]

Deformace při vpichu (PD) v mm byla vyhodnocena pomocí softwaru ze vzdálenosti, kdy se sonda dotkla vzorku filmu a bodu zlomu.



Obr. 8 Mechanická zkouška vpichem

Zkouška tahem

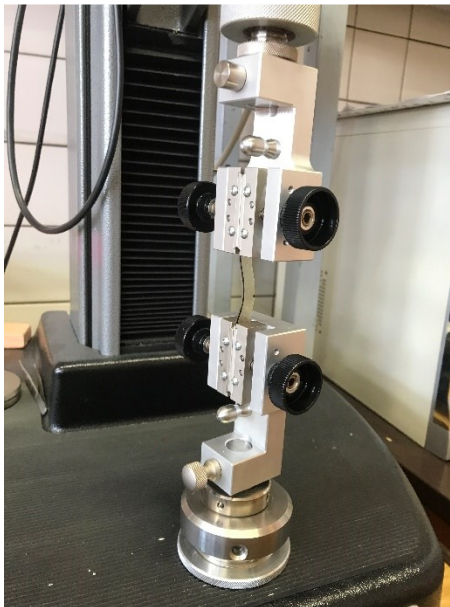
Před tahovou zkouškou byl film nařezán na požadované rozměry 10x60 mm². Konce filmů byly přichyceny do tahových úchytů tak, aby exponovaná plocha vzorku byla cca 10x40 mm² (Obr. 9). Pomocí této metody byla stanovována pevnost v tahu a také celkové prodloužení při přetržení. Pevnost v tahu (TS) v MPa byla vyhodnocena softwarem pomocí vzorce (2).

$$TS = \frac{F_t}{TW} [MPa] \quad (2)$$

Kde:

- F_t ...maximální pevnost v tahu [N]
- T ...průměrná tloušťka vzorku filmu [mm]
- W ...šířka vzorku filmu [mm]

Procentuální celkové prodloužení filmu při přetržení (E) v % bylo stanoveno vydělením celkového prodloužení vzorku (v mm) v bodě přetržení, počáteční délkou vzorku (v mm) vynásobenou 100.



Obr. 9 Tahová zkouška

6.3.5 Měření povrchové energie a kontaktního úhlu

Měření kontaktního úhlu a následné stanovení povrchové energie jednotlivých vzorků bylo prováděno pomocí optického tenziometru Attension Theta (Biolion Scientific) (Obr. 10). Před měřením byly vzorky kondicionovány při 60 % relativní vlhkosti po dobu nejméně 24 hodin. Pro měření byla použita metoda přisedlé kapky. Časová závislost úhlu smáčení pro obě dvě kapaliny (destilovaná voda a ethylenglykol) byla zaznamenávána videokamerou a zdrojem světla byla LED dioda. Přesné dávkování (objem 5 μl) bylo zajištěno automatickou mikropipetou, která byla součástí přístroje. Obrazový záznam a naměřené hodnoty byly zpracovávány pomocí softwaru OneAttension. Hodnota kontaktního úhlu pro jednotlivá měření byla odečítána v ustáleném stavu pokaždé v rozmezí 5–6 sekund. Tyto hodnoty kontaktního úhlu byly taktéž použity pro výpočet povrchové energie. Pro každou kapalinu a každý vzorek byly prováděny minimálně tři měření.

Kontaktní úhel byl vypočítán pomocí softwaru dle Youngovy rovnice (3).

$$\cos \theta = \frac{\gamma_{SG} - \gamma_{LS}}{\gamma_{LG}} \quad (3)$$

Kde:

- $\cos \theta$...kontaktní úhel

- γ_{SG} ...povrchové napětí na rozhraní pevná látka/plyn [mN/m]
- γ_{LS} ...povrchové napětí na rozhraní pevná látka/kapalina [mN/m]
- γ_{LG} ...povrchové napětí na rozhraní kapalina/plyn [mN/m]

Pomocí hodnot povrchového napětí bylo možno stanovit celkovou povrchovou energii pevných látek s použitím vybraných semi-empirických modelů. Pro tuto práci bylo využito vyhodnocení softwarem pomocí dvou modelů [39]. První z nich, OWRK (Owens, Wendt, Rabel, Kaebel) vychází ze vzorce (4).

$$\sqrt{\gamma_{SG}^d \gamma_{LG}^d} + \sqrt{\gamma_{SG}^p \gamma_{LG}^p} = 0,5\gamma_l(1 + \cos\theta) \quad (4)$$

Kde:

- $\cos \theta$...kontaktní úhel
- γ_{SG}^d ...povrchové napětí disperzní složky na rozhraní pevná látka/plyn [mN/m]
- γ_{LG}^d ...povrchové napětí disperzní složky na rozhraní pevná látka/kapalina [mN/m]
- γ_{SG}^p ...povrchové napětí polární složky na rozhraní kapalina/plyn [mN/m]
- γ_{LG}^p ...povrchové napětí polární složky na rozhraní pevná látka/kapalina [mN/m]
- γ_l ...povrchové napětí kapaliny (destilovaná voda; ethylenglykol)

Druhým modelem použitým pro zhodnocení dat byla Wuova metoda dle vzorce (5).

$$\left[\frac{\gamma_{SG}^d \gamma_{LG}^d}{(\gamma_{SG}^d + \gamma_{LG}^d)} + \frac{\gamma_{SG}^p \gamma_{LG}^p}{(\gamma_{SG}^p + \gamma_{LG}^p)} \right] = 0,25\gamma_l(1 + \cos\theta) \quad (5)$$

Kde:

- $\cos \theta$...kontaktní úhel
- γ_{SG}^d ...povrchové napětí disperzní složky na rozhraní pevná látka/plyn [mN/m]
- γ_{LG}^d ...povrchové napětí disperzní složky na rozhraní pevná látka/kapalina [mN/m]
- γ_{SG}^p ...povrchové napětí polární složky na rozhraní kapalina/plyn [mN/m]
- γ_{LG}^p ...povrchové napětí polární složky na rozhraní pevná látka/kapalina [mN/m]
- γ_l ...povrchové napětí kapaliny (destilovaná voda; ethylenglykol)



Obr. 10 Optický tenziometr Attension Theta

6.3.6 Stanovení antimikrobiální účinnosti

Antimikrobiální aktivita filmů na bázi zeinu s různou koncentrací eugenolu byla testována proti vybraným mikroorganismům pomocí metody agar difúzního testu. Pro toto stanovení byly vybrány grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus*, gramnegativní bakterie *Escherichia coli* a dále pak plísně *Aspergillus sp.* a kvasinky *Candida albicans*. Pro stanovení byly použity předem připravené půdy Mueller-Hinton pro bakterie a Sabouraud agar pro kvasinky a plísně.

Pro testování byly připraveny různé mikrobiální suspenze ve fyziologickém roztoku a jejich koncentrace byla upravena podle zákalového standardu s ohledem na konkrétní typ mikroorganismu. Takto připravené inokulum bylo následně pipetováno v množství 1 ml na Petriho misku s příslušným agarem. Poté byly na každou misku umístěny 2 předem vyseknuté kruhové vzorky vybraných filmů o průměru 9 mm. Následně se misky nechaly kultivovat v termostatu při daných podmínkách (bakterie při 37 °C po dobu 24 hodin, kvasinky a plísně při laboratorní teplotě po dobu 48 hodin). Po inkubaci byly odečteny průměry inhibičních zón kolem vzorků.

6.3.7 FTIR analýza

Chemické složení vybraných filmů bylo charakterizováno infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací (FTIR) pomocí spektrometru Nicolet 6700 (ThermoFisher Scientific, Waltham) (Obr. 11) nastaveného na režim ATR v rozmezí 4000 až 400 cm^{-1} a rozlišení 2 cm^{-1} . Vzorek filmu byl vložen do přístroje a spektrum bylo následně vyhodnoceno pomocí softwaru OMNIC Paradigm.



Obr. 11 Spektrometr Nicolet 6700

6.3.8 SEM analýza

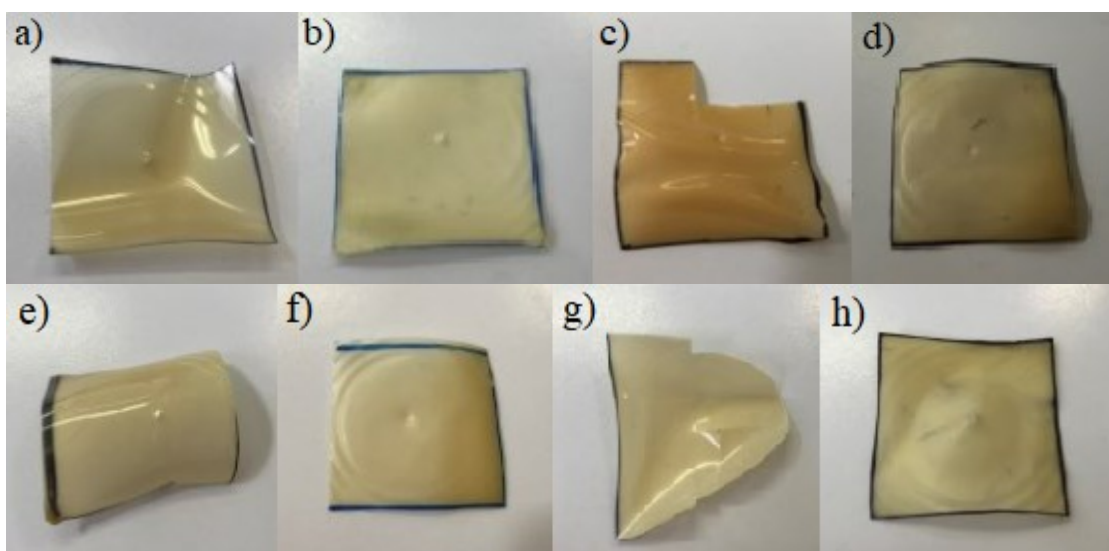
Analýza povrchů a průřezů vybraných filmů byla prováděna na Ústavu pro hydrodynamiku Akademie věd ČR v Praze pomocí metody SEM mikroskopie. K této analýze byl použit skenovací elektronový mikroskop Vega 3 s vysokým rozlišením (Tescam).

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Vzhled a tloušťka filmů

7.1.1 Filmy na bázi zeinu

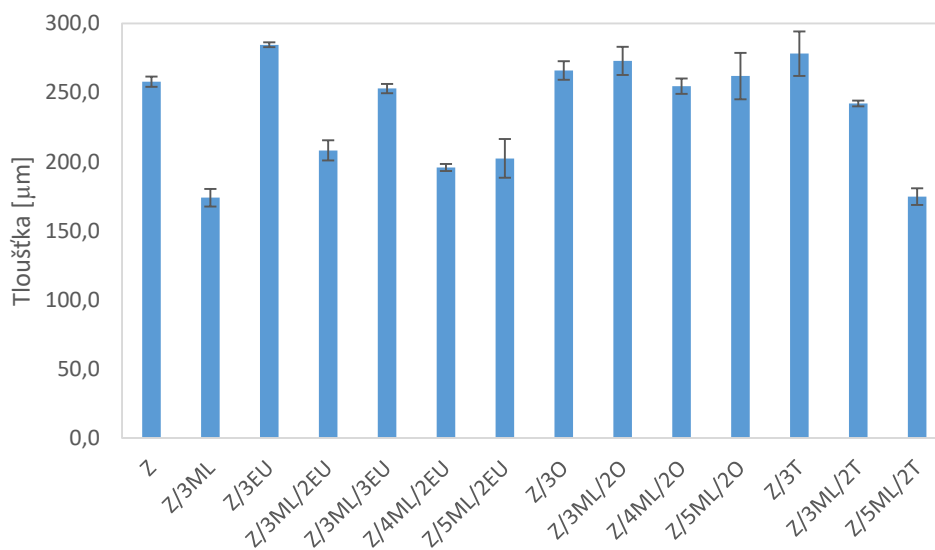
Připravené filmy na bázi zeinu bez a s přidávanými aktivními látkami nebyly transparentní a vykazovaly různé odstíny žluté, v závislosti na přidané aktivní látce, či jejich směsí (Obr. 12). Nejtmavší žlutohnědý odstín byl zaznamenán u vzorku s přidavkem samotné aktivní látky eugenolu (Obr. 12 c). Z přiložených fotek (Obr. 12) lze také vidět, že filmy bez přidavku monolaurinu jsou lesklejší (Obr. 12 a, c, e, g), v porovnání se vzorky obsahujícími pouze esenciální oleje, či jejich složku eugenol (Obr. 12 b, d, f, h). Kontrolní zeinové filmy spolu se vzorky s obsahem EO tymián či oregano byly velmi křehké, což značně ztěžovalo jejich sejmutí z misek po vysušení. Naopak po přidání monolaurinu do polymerní matrice se staly filmy flexibilnějšími. Podobný trend po přidavku monolaurinu do zeinových filmů byl potvrzen i ve studii Moradi a kol. [37]. Vyšší elasticita byla prokázána i u vzorků se samotným eugenolem, což se potvrdilo i při testování mechanických vlastností (Obr. 17). Vzorky zeinových filmů byly většinou homogenní, pouze v případě vzorků s oleji bez přidavku monolaurinu, konkrétně u vzorků Z/3T a Z/3O se na povrchu filmů objevil jev ojínění v podobě mastných oblastí.



Obr. 12 Vzhled vzorků filmů na bázi zeinu a) Z b) Z/3ML c) Z/3EU d) Z/3ML/2EU e) Z/3T f) Z/3ML/2T g) Z/3O h) Z/5ML/2O

Tloušťka filmů na bázi zeinu se obecně pohybovala ve větším rozmezí, a to od 170 μm do 280 μm . Kontrolní zeinový film měl průměrnou tloušťku 258 μm , zatímco u vzorků Z/3ML

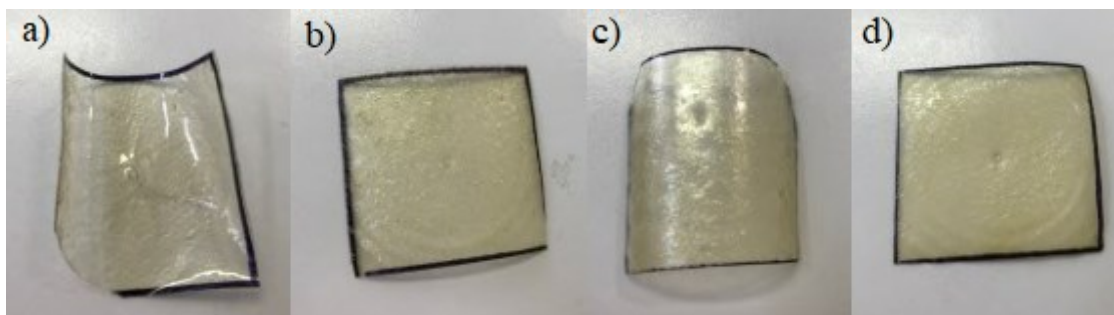
a Z/5ML/2T (průměrná tloušťka 175 μm), a kombinací ML a 2 % eugenolu (průměrná tloušťka 199 μm) došlo k výraznějšímu poklesu. Z grafu je zřejmé, že rostoucí koncentrace monolaurinu měla vliv na snížení tloušťky připraveného filmu. Je pravděpodobné, že povrchové vlastnosti ML usnadnily dispergaci dalších hydrofobních složek v zeinové matici.



Obr. 13 Průměrné hodnoty tloušťky jednotlivých filmů na bázi zeinu

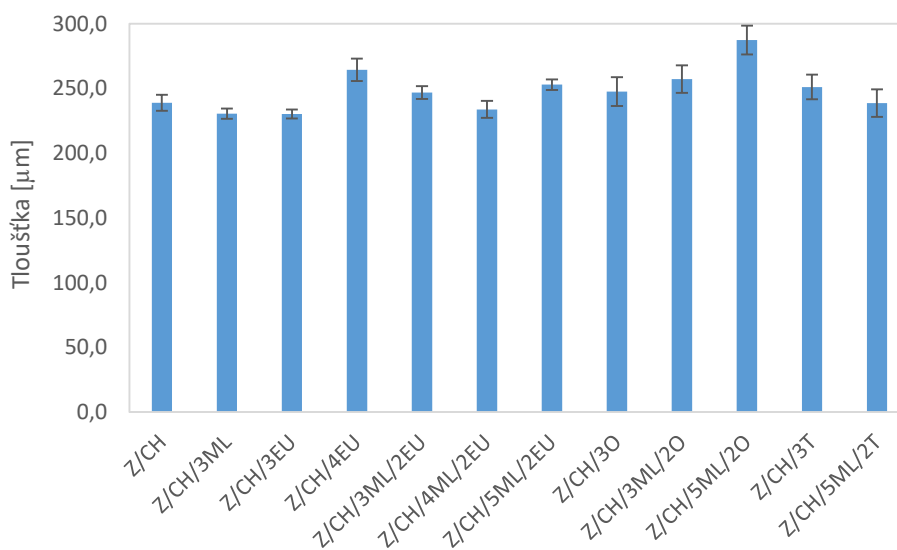
7.1.2 Filmy na bázi zein/chitosanu

Všechny filmy připravené kombinací zeinu s chitosanem měly nažloutlou barvu (Obr. 14), zhruba o odstín světlejší v porovnání s filmy na bázi zeinu (bez chitosanu). Podobně jako v případě zeinových filmů (kapitola 7.1.1) byl prokázán vliv monolaurinu na zvýšení flexibility a pružnosti vzorků. Tento jev byl potvrzen i v jiných studiích, kdy monoacylglyceroly sloužily částečně jako náhrada změkčovadel [37][40]. Na rozdíl od vzorků bez chitosanu při přípravě zein/chitosanových filmotvorných disperzí vyvstaly problémy s homogenizací, což následně ovlivnilo vzhled odlitých filmů, které byly na povrchu drsnější. Fotky vybraných filmů jsou na Obrázku 14, ostatní připravené filmy se vzhledem zásadně nelišily. Podobný jev byl prokázán ve studii [41], kde ovšem přídavek EO snížil tendenci k tvorbě agregátů a podpořil vznik hladšího povrchu. V našem případě se vzhled Z/CH/EO filmů nijak významně nelišil od vzorků bez esenciálních olejů.



Obr. 14 Vzhled vzorků filmů na bázi zein/chitosan a) Z/CH b) Z/CH/3ML c) Z/CH/3T d) Z/CH/5ML/2T

Tloušťka kontrolního filmu na bázi zein/chitosanu byla 239 μm a vlivem modifikace aktivními látkami nedošlo k zásadním změnám hodnot. Přídavek EO (konkrétně skořicového) se nijak výrazně neprojevil na tloušťku zein/chitosanových filmů ani ve studii Vahedikia a kol [42]. Hodnoty tloušťky se zde ovšem pohybovaly o řád níže v porovnání s našimi vzorky, a to okolo 65 μm . Ani tloušťka jednotlivých modifikovaných vzorků se od sebe výrazně nelišila, hodnoty se pohybovaly v rozmezí od 230 μm do cca 290 μm (Obr. 15). Na rozdíl od zeinových filmů se zde neprojevil efekt monolaurinu na snižující se tloušťku, naopak byl zaznamenán opačný trend. Důvodem může být už zmíněná horší homogenita filmů a s tím související nerovnoměrná dispergace aktivních látek v Z/CH matici.



Obr. 15 Průměrné hodnoty tloušťky jednotlivých filmů na bázi zein/chitosan

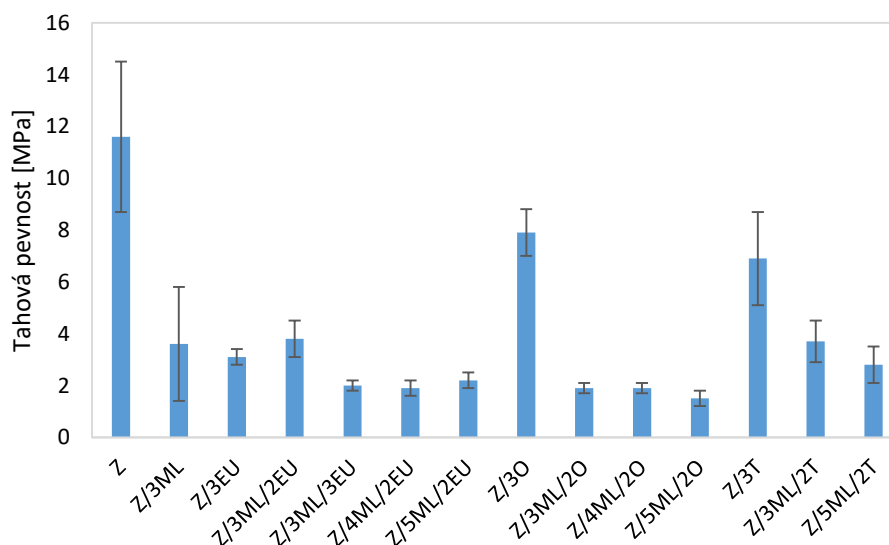
7.2 Mechanické vlastnosti

Mechanické vlastnosti jsou velmi důležité pro využití filmů na bázi proteinů v mnoha různých aplikacích. Pomocí tahových zkoušek a zkoušky vpichem byla charakterizována pevnost v tahu, resp. tahová síla (TS), dále celkové protažení filmu při přetržení (E), pevnost filmu při vpichu (PS) a také deformace filmu při vpichu (PD).

7.2.1 Filmy na bázi zeinu

Z grafu (Obr. 16) je patrné, že největší pevnost v tahu, která je definována jako maximální napětí vyvíjené na vzorek [43], vykazoval kontrolní film (11,6 MPa). Vlivem modifikace prostřednictvím aktivním látek došlo k poklesu pevnosti v tahu, přičemž nejnižší hodnoty byly pozorovány u Z/5ML/2O (1,5 MPa). Snížení tahových vlastností polymerních filmů vlivem přidavku různých nejen hydrofobních sloučenin bylo sledováno i v jiných studiích [44]. Výjimku tvoří síťovací činidla, která naopak mechanické vlastnosti zlepšují [45]. Například v práci [43] došlo vlivem inkorporace tymiánového EO k poklesu pevnosti v tahu chitosanových filmů v průměru o 56 %. Důvodem může být rozvolnění polymerní struktury v důsledku vzájemného oddálení polymerních řetězců, což následně snižuje pevnostní charakteristiky.

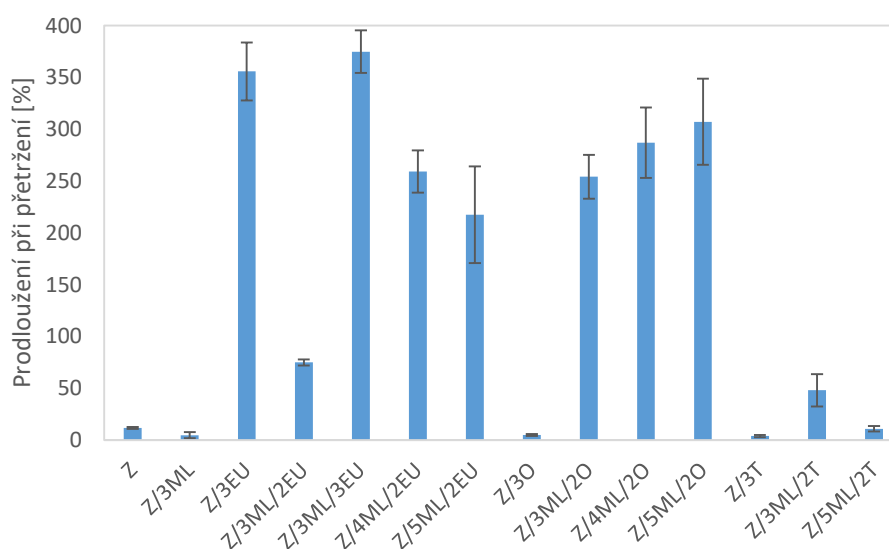
Opačný trend byl ale zaznamenán autory Vahedikia a kol [42], kdy u vzorku s přidavkem skořicového EO došlo ke zvýšení TS a zároveň ke snížení tažnosti. Je tedy zřejmé, že významnou roli hraje charakter konkrétních složek přidávaných esenciálních olejů a jejich vzájemné interakce s polymerní maticí.



Obr. 16 Tahová pevnost filmů na bázi zeinu

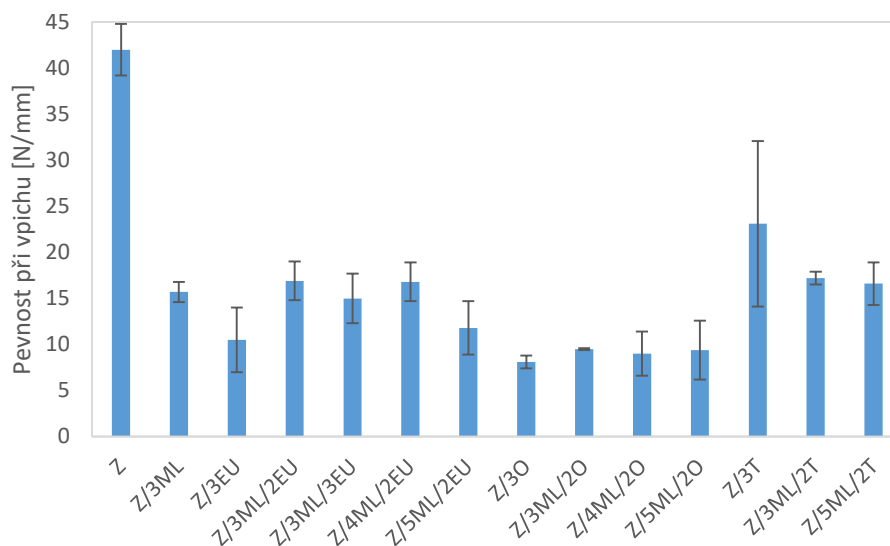
Hodnoty tažnosti, resp. celkového prodloužení při přetržení napomáhají určit stupeň pružnosti a elasticity materiálu. Z grafu (Obr. 17) lze vidět, že mezi jednotlivými vzorky byly patrné značné výkyvy. Zatímco kontrolní zeinový film vykazoval hodnotu velmi nízkou (11,7 %), filmy 3 % eugenolu prokázaly tažnost v průměru 356 %, tedy o 97 % více ve srovnání s referencí. Filmy obsahující monolaurin bez přítomnosti EO však vykazovaly naprosto odlišný trend, kdy hodnoty byly ještě nižší než u kontrolních filmů, to znamená, že monolaurin sám o sobě elasticitu filmu nezaručuje. Další vzorky filmů s různou koncentrací eugenolu a monolaurinu měly taktéž velmi vysoké hodnoty celkového protažení, stejně jako kombinace monolaurinu a oregana. Na druhou stranu filmy s obsahem tymiánového oleje vykazovaly velmi nízké hodnoty (v rozmezí od 3,9 % do 48 %). Podobný trend byl prokázán v práci Pereira a kol. [46], kteří studovali zeinové filmy s obsahem kombinace EO (česnekového a tymiánového). Výsledky ukázaly, že vlivem inkorporace této směsi došlo k poklesu prodloužení při přetržení, stejně jako tahové pevnosti, pravděpodobně v důsledku póru, které se objevily ve struktuře filmu. Hodnoty celkového protažení souvisí s pevností v tahu, kdy při porovnání obou grafů (Obr. 16 a Obr. 17) je patrné, že oboje hodnoty, jak tažnost, tak pevnost v tahu spolu úzce souvisí. U filmů, které disponují vyšší pevností v tahu, nedošlo téměř k žádnému protažení a naopak.

I z výsledků měření tažnosti je zřejmé, že klíčovou roli hraje výběr konkrétní aktivní látky. V našem případě lze také potvrdit synergický účinek mezi eugenolem a monolaurinem (Obr. 17).



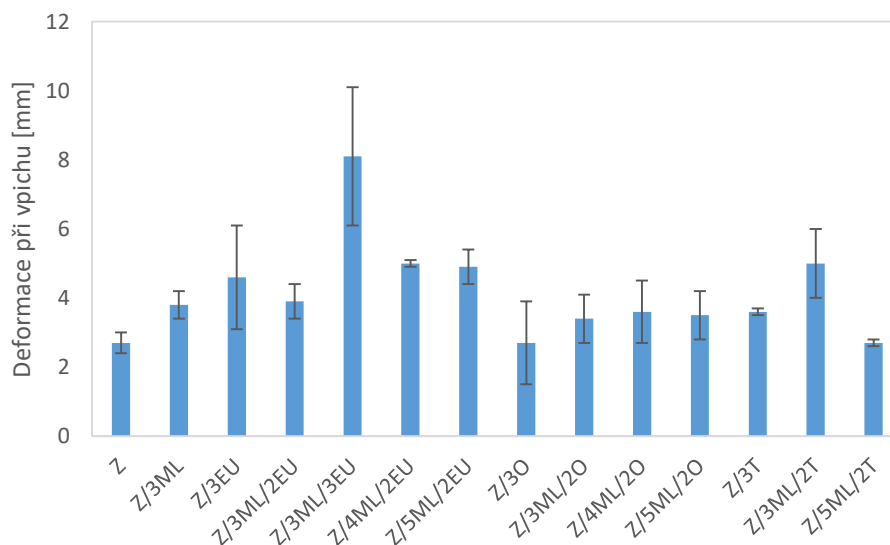
Obr. 17 Prodloužení při přetržení filmů na bázi zeinu

Pomocí zkoušky vpichem lze zjistit informace o integritě vzorku a chování při penetraci [43]. Hodnoty z grafu (Obr. 18) poukazují na významný pokles (v průměru o 67 %) v pevnosti při vpichu ve filmech s přídavkem EO ve srovnání s kontrolním vzorkem. Výsledky také víceméně korelují s hodnotami pevnosti v tahu.



Obr. 18 Pevnost při vpichu filmů na bázi zeinu

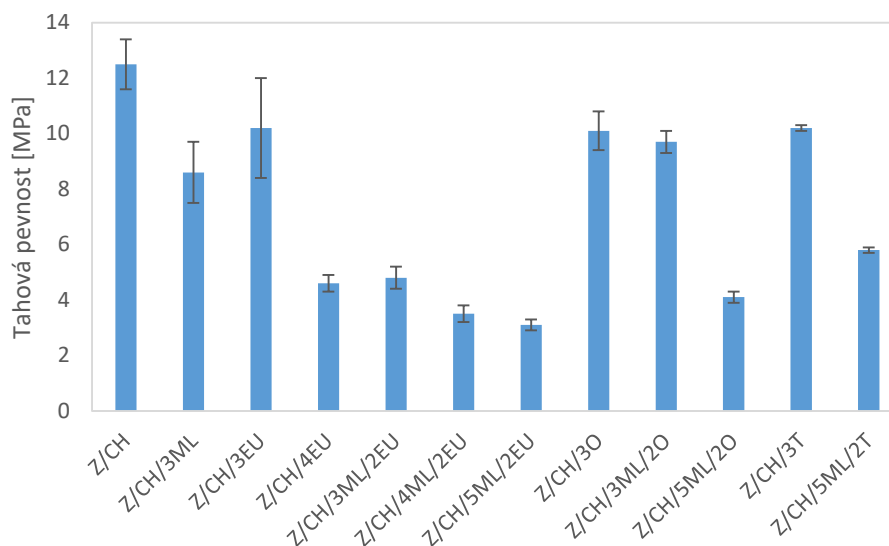
Co se týká hodnot deformace při vpichu (Obr. 19), došlo vlivem modifikace u většiny vzorků ke zvýšení hodnot, v porovnání s referenčním zeinovým filmem. Výjimku tvořily pouze vzorky s obsahem samotných EO, a to Z/3O a Z/3T, které vykazovaly stejnou hodnotu (2,7 mm).



Obr. 19 Deformace při vpichu filmů na bázi zeinu

7.2.2 Filmy na bázi zein/chitosanu

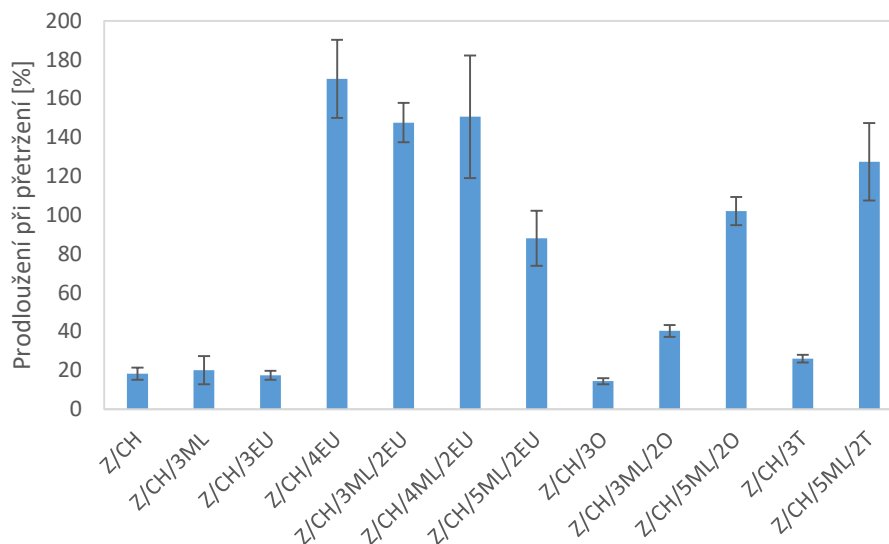
Při testování těchto vzorků bylo cílem zjistit, zda přídavek dalšího přírodního polymeru nějakým způsobem ovlivní mechanické vlastnosti připravených filmů. Z grafu (Obr. 20) lze vyčíst, že nejvyšší pevnost v tahu vykazuje kontrolní vzorek zein/chitosan, podobně jako v případě samotných zeinových filmů (Obr. 16). Ovšem tyto kompozitní filmy tvořené kombinací polymerů vykazovaly hodnoty pevnosti v tahu vyšší, jak lze vidět např. u vzorků Z/CH/3ML, Z/CH/3EU a také Z/CH/3ML/2O. Na základě těchto zjištění lze konstatovat, že se přídavek chitosanu pozitivně projevil na pevnosti v tahu. Pozitivní vliv chitosanu, konkrétně chitosanových nanočástic, byl pozorován i ve studii [42], kde po přidání chitosanu do zeinových filmů došlo taktéž k zvýšení pevnosti v tahu (z 0,95 MPa v kontrolním vzorku na 2,15 MPa v modifikovaném vzorku).



Obr. 20 Tahová pevnost filmů na bázi zein/chitosan

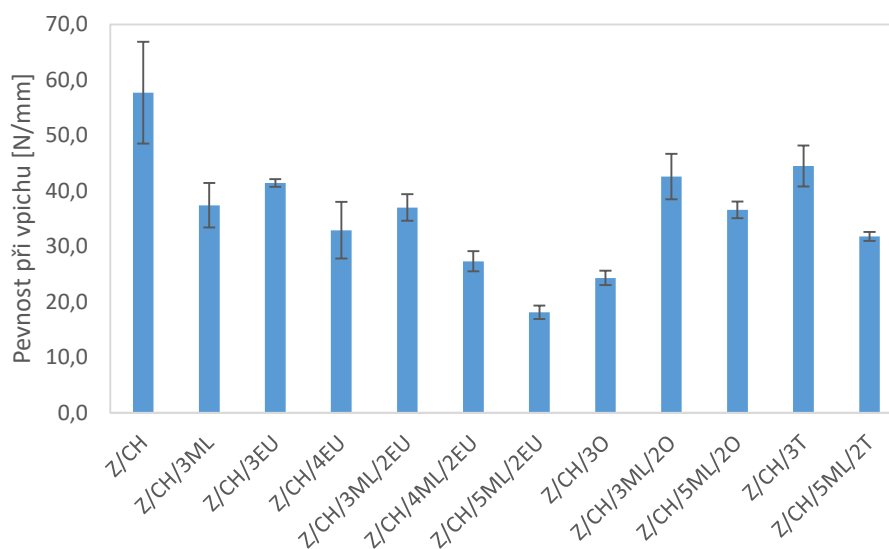
Modifikací zeinových filmů prostřednictvím chitosanu došlo ke snížení celkového prodloužení při přetržení, jak lze vidět z grafu na Obr. 21. Například u vzorku Z/CH/4ML/2EU došlo ke snížení hodnoty o 42 % oproti stejnému vzorku bez modifikace chitosanem (Z/4ML/2EU). Řada studií [41][42] potvrzuje schopnost EO snížit inter- a intramolekulární interakce a zvýšit tak flexibilitu filmů v závislosti na kompatibilitě olejů s proteiny. Modifikace pomocí EO způsobí přeskupení polymerní struktury a omezení reakcí postranních řetězců. Výjimku představují vzorky Z/CH/3EU a Z/CH/3ML/2O, které vykazovaly horší homogenitu. V případě monoacylglycerolů lze také očekávat vliv na flexibilitu, případně na pevnost filmů. Zde jsou ovšem klíčové vlastnosti původního nosného

substrátu/polymeru a následně pak způsob adsorpce amfifilní struktury monolaurinu. Z grafu (Obr. 21) lze ale opět sledovat synergický účinek EO, případně jeho složky eugenolu s monoacylglycerolem, při zvýšení elasticity filmů.



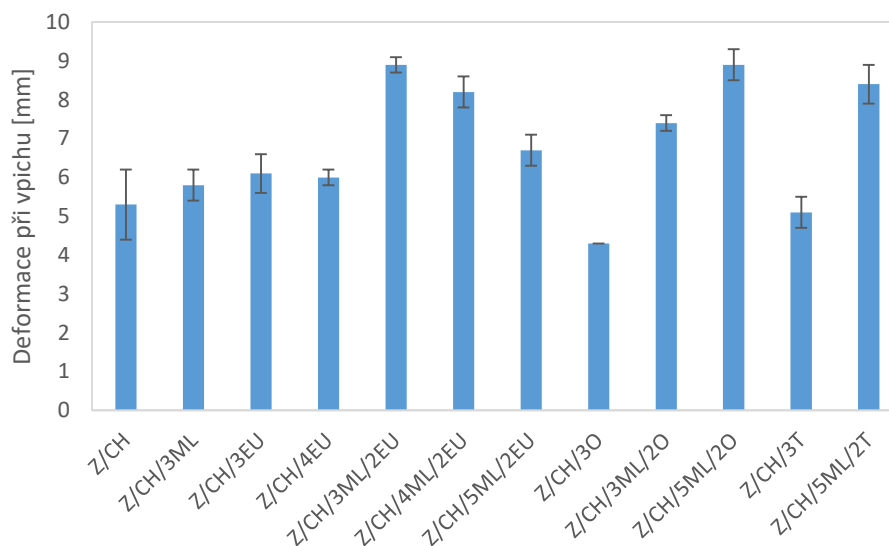
Obr. 21 Prodloužení při přetržení filmů na bázi zein/chitosan

Pevnost při vpichu u vzorků připravených kombinací zeinu a chitosanu s dalšími aktivními látkami oproti vzorkům bez chitosanu taktéž významně vzrostla, jak je patrné z grafu (Obr. 22). Zde je viditelné, že došlo ke zvýšení pevnosti při vpichu u všech vzorků a u některých dokonce až o 50 %.



Obr. 22 Pevnost při vpichu filmů na bázi zein/chitosan

Oproti zeinovým filmům (2,7 mm), byla u zein/chitosan filmu zaznamenána vyšší deformace při vpichu (5,3 mm). Vlivem inkorporace aktivními látkami došlo k dalšímu zvýšení. Nejvýraznější změny byly pozorovány u filmů s dvěma aktivními látkami (Z/CH/3ML/2EU a Z/CH/5ML/2O).



Obr. 23 Deformace při vpichu filmů na bázi zein/chitosan

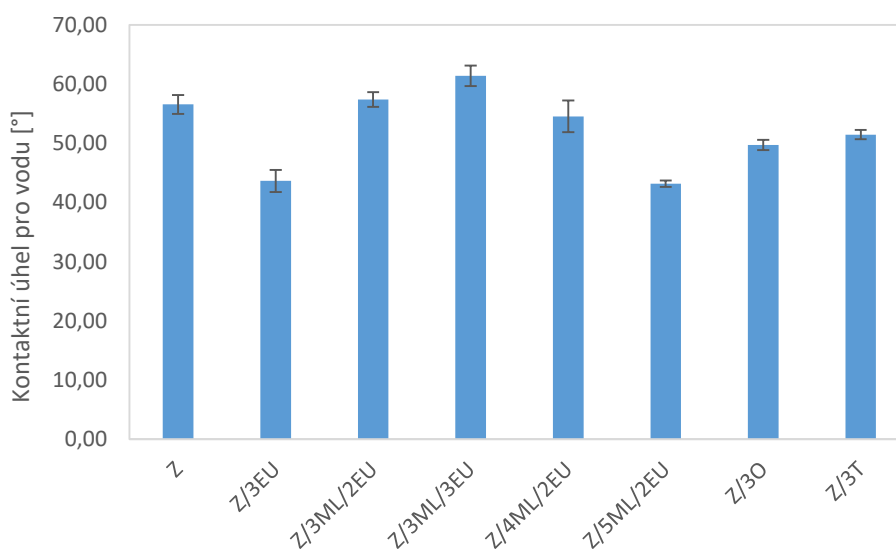
Na základě dosažených výsledků (zejména pevnosti v tahu a pevnosti při přetržení) lze konstatovat, že přidavek chitosanu měl příznivý vliv na mechanické vlastnosti kompozitních filmů Z/CH. Je ale nutno si uvědomit, že mechanické charakteristiky polymerních filmů závisí na více faktorech, ať už se jedná o přítomnost, typ a koncentraci změkčovadla, krystalinitu, případně přítomnost chemických síťovadel, nebo mikrostrukturu [46].

7.3 Povrchové vlastnosti

Povrchové vlastnosti filmů jsou další důležitou charakteristikou ovlivňující konečné využití těchto polymerních materiálů. Smáčivost filmů se nejčastěji stanovuje měřením kontaktního úhlu, který je definován jako úhel mezi povrchem filmu a tečnou vedenou z místa kontaktu kapky kapaliny s povrchem filmu. Kromě toho měření kontaktního úhlu poskytuje informace o hydrofobicitě, resp. hydrofilnosti povrchu filmů. Obecně lze říci, že čím větší je kontaktní úhel, tím je povrch hydrofobnější [47]. Měření bylo pro každý film provedeno třikrát a výsledná hodnota je průměrem všech tří naměřených hodnot.

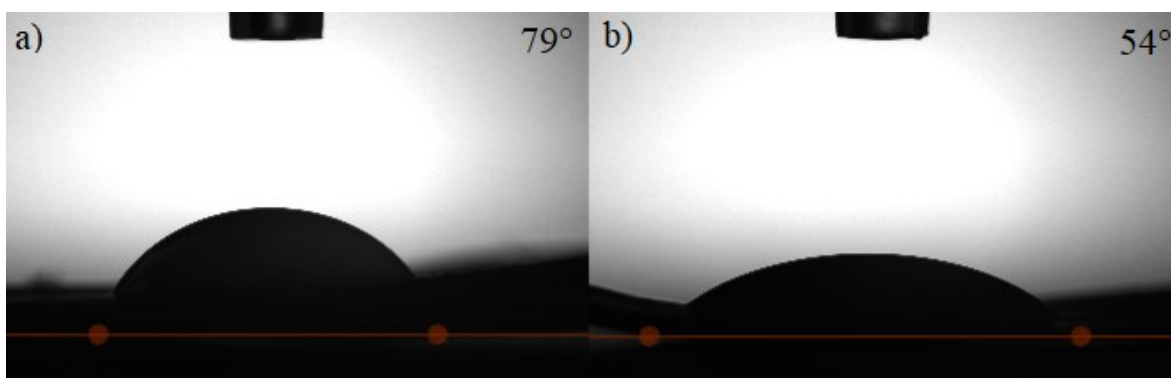
7.3.1 Filmy na bázi zeinu

Kontaktní (smáčecí) úhly stanovené metodou přisedlé kapky jsou uvedeny v grafu na Obr. 24. U kontrolního zeinového filmu byl naměřen kontaktní úhel pro destilovanou vodu 56° , tedy nižší v porovnání s dalšími studiemi, kdy byl prokázán úhel smáčení průměrně kolem 75° [48][49]. Rozdíl v naměřených hodnotách může být způsoben vlivem různého množství použitého plastifikátoru při přípravě filmů. Z výsledků na grafu (Obr. 24) lze pozorovat, že modifikací zeinu došlo ke změnám hodnot kontaktního úhlu, v závislosti na přidané aktivní látce, resp. jejich směsí. Vlivem přídavku vybraných typů EO (Z/3O a Z/3T) došlo ke snížení úhlu ve srovnání s referencí, a to v průměru na 50° . Ze získaných dat lze dále konstatovat, že s rostoucí koncentrací monolaurinu v polymerní matrici klesá úhel smáčení, což je viditelné u vzorků Z/3ML/3EU, Z/4ML/2EU a Z/5ML/2EU. Podobný vliv přídavku monolacylglycerolu na zvýšenou hydrofilitu byl zaznamenán i u PVB membrán, kterými se zabývá studie [50]. Autoři Shi a kol. [49] se také zabývali možnostmi regulace hydrofility povrchů filmů na bázi zeinu. Pomocí metody UVO (modifikace pomocí kombinace ultrafialového záření a působení ozónu) došlo k poklesu kontaktního úhlu zeinových filmů na hodnotu menší než 10° za velmi krátkou dobu (2 min). U vzorků obsahujících plastifikátory může docházet k nárůstu hydrofility vzhledem k jejich potencionální hygroscopicitě, tj. schopnosti vázat vodu. Z tohoto důvodu se pak velikost kontaktních úhlů měřených pro vodu může zásadně měnit i během skladování. U vzorků s obsahem glycerolu byl například prokázán nárůst kontaktního úhlu z 58° na 61° během 1 týdne, což lze vysvětlit migrací plastifikátoru a ztrátou podílu vlhkosti ze vzorku [51].



Obr. 24 Kontaktní úhly jednotlivých filmů na bázi zeinu

Je známo, že pevné povrchy mohou být klasifikovány do dvou skupin, na hydrofilní (smáčené vodou, s vysokou povrchovou energií) a hydrofobní (nesmáčené vodou, s nízkou povrchovou energií) [52]. Všechny vzorky vykazovaly úhel smáčení menší než 90° , což indikuje povrchy smáčivé. Na přiložené fotografii (Obr. 25) jsou zaznamenány snímky profilu kapky ethylenglykolu na vybraných zeinových filmech naměřené pomocí tenziometru Attension Theta. Na první pohled jsou patrné rozdíly ve smáčivosti jednotlivých povrchů a zmíněný vliv rostoucí koncentrace monolaurinu na pokles kontaktního úhlu.



Obr. 25 Kapka ethylenglykolu na vzorku a) Z/3ML/3EU b) Z/4ML/2EU

Stanovené hodnoty povrchových energií jednotlivých vzorků na bázi zeinu, vyhodnoceny dle modelu OWRK (viz kap. 6.3.5), se pohybovaly v rozmezí od 45 do 83 mJ/m^2 (Tab. 5). Je patrné, že modifikace vybranými aktivními látkami měla za následek zvýšení hodnot oproti kontrolnímu filmu, což by mělo indikovat vyšší smáčivost. V porovnání s hodnotami kontaktního úhlu (Obr. 24) lze tento trend potvrdit, kromě vzorků zeinu s obsahem 3 % monolaurinu a 2, resp. 3 % eugenolu.

Tab. 5 Hodnoty povrchové energie filmů na bázi zeinu (model OWRK)

Vzorek	OWRK		
	$\gamma_{\text{tot}} [\text{mJ/m}^2]$	$\gamma_{\text{d}} [\text{mJ/m}^2]$	$\gamma_{\text{p}} [\text{mJ/m}^2]$
Z	$44,81 \pm 1,86$	$8,95 \pm 1,96$	$35,86 \pm 3,80$
Z/3EU	$60,47 \pm 2,85$	$3,83 \pm 0,84$	$56,64 \pm 3,68$
Z/3ML/2EU	$82,98 \pm 8,02$	$3,10 \pm 1,43$	$79,88 \pm 6,61$
Z/3ML/3EU	$78,81 \pm 8,58$	$3,37 \pm 1,68$	$75,44 \pm 6,94$
Z/4ML/2EU	$54,41 \pm 4,27$	$1,58 \pm 0,59$	$52,83 \pm 4,82$
Z/5ML/2EU	$73,99 \pm 2,26$	$0,21 \pm 0,19$	$73,78 \pm 2,45$
Z/3O	$57,63 \pm 1,45$	$2,10 \pm 0,25$	$55,53 \pm 1,68$
Z/3T	$51,89 \pm 1,66$	$4,84 \pm 1,15$	$47,05 \pm 2,72$

Celková povrchová energie γ_{tot} se dále dělí na disperzní složku γ_{d} a polární složku γ_{p} . Z Tabulky 5 je patrné, že polární složka u všech zeinových vzorků převažuje, bez ohledu na typ a koncentrace zvolených aktivních látek. Největší změna (46 %) povrchové energie oproti referenci byla pozorována u vzorku Z/3ML/2EU. Nejvyšší hodnoty polární složky byly prokázány u filmů s obsahem monolaurinu, což by mohlo indikovat adsorpci hydrofobní částí molekuly směrem k polymernímu substrátu a polární složky orientované do prostředí.

Podobný trend, tedy zvýšení v porovnání s kontrolním vzorkem, lze pozorovat u hodnot povrchových energií vyhodnocených dle modelu WU (viz kap. 6.3.5), které jsou shrnuty v Tabulce 6. Nejnižší hodnota celkové povrchové energie $46,29 \text{ mJ/m}^2$, byla vypočítána u kontrolního vzorku, stejně jako v případě výpočtu dle modelu OWRK.

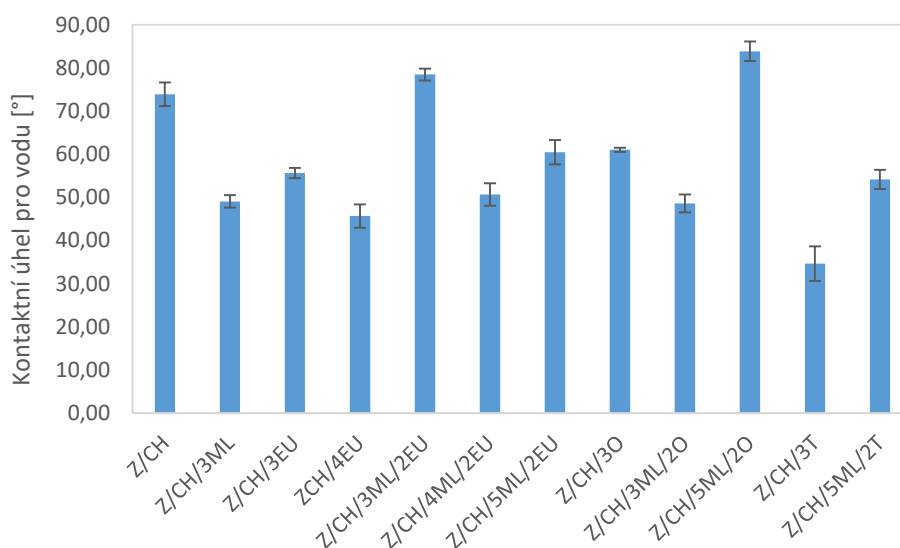
Tab. 6 Hodnoty povrchové energie filmů na bázi zeinu (model WU)

Vzorek	WU		
	$\gamma_{\text{tot}} [\text{mJ/m}^2]$	$\gamma_{\text{d}} [\text{mJ/m}^2]$	$\gamma_{\text{p}} [\text{mJ/m}^2]$
Z	$46,29 \pm 1,18$	$12,85 \pm 0,91$	$33,44 \pm 2,07$
Z/3EU	$56,29 \pm 1,58$	$11,57 \pm 0,45$	$44,72 \pm 1,96$
Z/3ML/2EU	$60,17 \pm 3,63$	$0,67 \pm 0,64$	$59,50 \pm 4,27$
Z/3ML/3EU	$57,45 \pm 3,98$	$0,02 \pm 0,61$	$57,44 \pm 4,53$
Z/4ML/2EU	$50,05 \pm 2,44$	$7,52 \pm 0,31$	$42,53 \pm 2,60$
Z/5ML/2EU	$60,92 \pm 0,86$	$6,97 \pm 0,57$	$53,96 \pm 1,37$
Z/3O	$52,96 \pm 0,80$	$8,98 \pm 0,17$	$43,99 \pm 0,91$
Z/3T	$50,50 \pm 0,78$	$11,00 \pm 0,81$	$39,50 \pm 1,43$

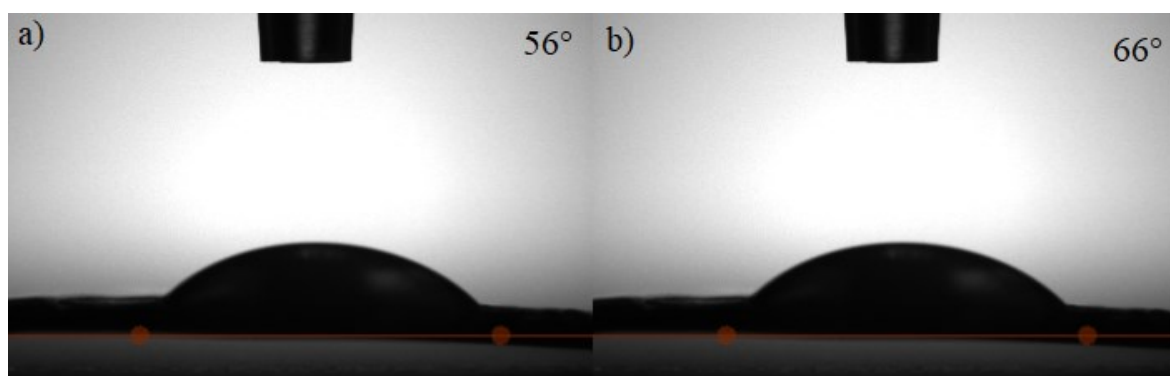
7.3.2 Filmy na bázi zein/chitosanu

Vzhledem k tomu, že chitosan se řadí mezi hydrofilnější polymery, bylo předpokládáno, že jeho přídavek do zeinových filmů (Z/CH) způsobí pokles kontaktního úhlu. Tento teoretický předpoklad se ale v našem případě nepotvrdil, jelikož hodnoty Z/CH filmů vykazovaly úhly vyšší (74°) oproti kontrolnímu filmu samotného zeinu (Z), u něhož byla zaznamenána hodnota 56° . Ve studii [43] byl kontaktní úhel filmu na bázi samotného chitosanu stanoven na 60° . Při hodnocení povrchových vlastností je třeba vzít v úvahu více faktorů. Kromě zmíněného typu a množství změkčovadla, či vlivu skladování je smáčivost chitosanu významně ovlivněna i jeho stupněm deacetylce DA (DA chitosanu použitého při přípravě našich vzorků byl 87 %). S rostoucí hodnotou DA poté stoupá i úhel smáčení [53]. Nejvyšší hodnota kontaktního úhlu byla stanovena u vzorku Z/CH/5ML/2O a to 84° . Ve studii Xue a kol. [54] byly zkoumány povrchové vlastnosti filmů, které byly kombinací zeinu, chitosanu

a oregana. Kontaktní úhel byl v této studii stanoven na 85° , což odpovídá hodnotě již zmíněného vzorku Z/CH/5ML/2O. Bohužel z dalších testovaných vzorků filmů nelze statisticky vyhodnotit žádný vzrůstající, či klesající trend, nebo vliv koncentrace monolaurinu, jako tomu bylo u filmů na bázi zeinu v předchozí kapitole (7.3.1). Tento fakt dokládají i vybrané fotografie na Obr. 27. Tuto skutečnost lze přičíst nehomogenitě vzorků, na kterou bylo již upozorněno výše v textu. V případě vzorků s horší homogenitou jsou hodnoty smáčivosti významně závislé na výběru zvoleného pro umístění přisedlé kapky.



Obr. 26 Kontaktní úhly jednotlivých filmů na bázi zein/chitosan



Obr. 27 Kapka ethylenglykolu na vzorku a) Z/CH/3ML/2EU b) Z/CH/4ML/2EU

Tabulka 7 obsahuje vypočítané hodnoty povrchové energie filmů na bázi zeinu a chitosanu dle modelu OWRK. Z ní je patrné, že hodnoty velmi kolísají a je v tomto případě složité určit vliv různých aktivních látek na povrchovou energii. Lze ovšem konstatovat, že polární složka opět převyšuje složku disperzní, podobně jako tomu bylo u zeinových filmů. Kromě

vzorků Z/CH/3ML/2EU a Z/CH/5ML/2O došlo opět ke zvýšení hodnot povrchové energie v porovnání s referencí (film Z/CH bez modifikace). Nejvyšší celková energie byla naměřena u vzorku Z/CH/5ML/2T, a to 86,45 mJ/m².

Tab. 7 Hodnoty povrchové energie filmů na bázi zein/chitosan (model OWRK)

Vzorek	OWRK		
	γ_{tot} [mJ/m ²]	γ_{d} [mJ/m ²]	γ_{p} [mJ/m ²]
Z/CH	31,65 ± 2,94	5,97 ± 2,81	25,68 ± 5,73
Z/CH/3ML	72,38 ± 6,13	0,31 ± 0,20	72,07 ± 5,94
Z/CH/3EU	44,66 ± 0,92	13,77 ± 1,31	30,89 ± 1,98
Z/CH/4EU	66,09 ± 4,51	0,94 ± 0,43	65,16 ± 4,92
Z/CH/3ML/2EU	26,45 ± 0,97	7,96 ± 1,51	18,49 ± 1,86
Z/CH/4ML/2EU	64,89 ± 2,58	0,21 ± 0,09	64,68 ± 2,59
Z/CH/5ML/2EU	80,53 ± 5,79	3,52 ± 1,68	77,01 ± 4,48
Z/CH/3O	42,78 ± 0,49	23,14 ± 1,85	19,65 ± 1,40
Z/CH/3ML/2O	60,17 ± 3,55	1,79 ± 0,67	58,39 ± 4,17
Z/CH/5ML/2O	23,87 ± 2,90	5,83 ± 2,36	18,05 ± 5,24
Z/CH/3T	63,94 ± 4,66	8,09 ± 2,17	55,85 ± 6,82
Z/CH/5ML/2T	86,45 ± 7,54	2,80 ± 1,12	83,65 ± 6,47

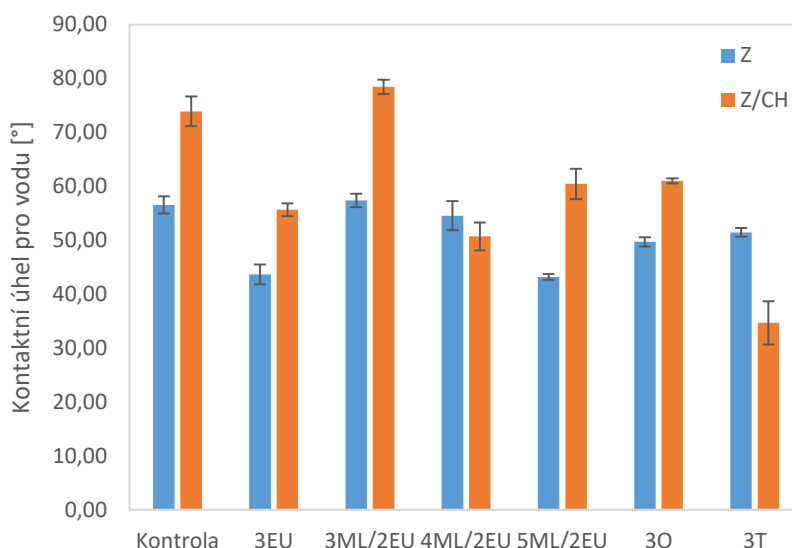
Hodnoty povrchové energie filmů na bázi zeinu a chitosanu dle modelu WU jsou znázorněny v Tab. 8. Zde lze stejně jako v Tab. 7 konstatovat velmi různé hodnoty. Nicméně nejvyšší hodnota celkové povrchové energie (62,44 mJ/m²) byla opět prokázána u vzorku Z/CH/5ML/2T, stejně jako v případě hodnot získaných dle OWRK modelu (Tab. 7).

Tab. 8 Hodnoty povrchové energie filmů na bázi zein/chitosan (model WU)

Vzorek	WU		
	γ_{tot} [mJ/m ²]	γ_{d} [mJ/m ²]	γ_{p} [mJ/m ²]
Z/CH	34,94 ± 2,18	7,69 ± 1,39	27,25 ± 3,57
Z/CH/3ML	58,40 ± 2,73	5,11 ± 0,75	53,29 ± 3,45
Z/CH/3EU	46,94 ± 0,77	16,00 ± 0,67	30,94 ± 1,10
Z/CH/4EU	57,29 ± 2,48	8,08 ± 0,47	49,20 ± 2,68
Z/CH/3ML/2EU	31,34 ± 0,86	8,43 ± 0,88	22,91 ± 1,23
Z/CH/4ML/2EU	55,09 ± 1,77	6,04 ± 0,58	49,05 ± 1,38
Z/CH/5ML/2EU	58,41 ± 2,63	0,07 ± 0,96	58,34 ± 3,09
Z/CH/3O	44,69 ± 0,23	20,15 ± 0,95	24,54 ± 0,81
Z/CH/3ML/2O	54,23 ± 1,87	8,69 ± 0,75	45,54 ± 2,25
Z/CH/5ML/2O	28,64 ± 2,10	6,13 ± 1,46	22,51 ± 3,53
Z/CH/3T	61,14 ± 2,69	16,33 ± 0,91	44,81 ± 3,60
Z/CH/5ML/2T	62,44 ± 3,68	1,14 ± 0,41	61,30 ± 4,00

V rámci vypracování experimentální části bylo v plánu hodnocení povrchových vlastností i dle modelu Acid-base, který také předpokládá dvě komponenty povrchové energie, ale využívá pro stanovení tří referenčních kapalin. Bohužel stanovení pro třetí kapalinu nakonec nemohlo být realizováno, jelikož bylo obtížné nadávkovat nastavený větší objem kapky (5 μ l) rozpouštědla diiodomethanu. Z toho důvodu pro vyhodnocení chyběla nepolární kapalina, což mohlo znesnadnit určení disperzní složky povrchové energie a obecně snížit spolehlivost celého stanovení.

Každopádně, srovnáním vzorků polymerních filmů bez a s obsahem chitosanu lze konstatovat, že došlo ve většině případů ke zvýšení kontaktních úhlů a tedy ke snížení smáčivosti povrchu, jak dokládá Obr. 28 (kontrolou jsou v uvedeném grafu filmy bez modifikace aktivními látkami).



Obr. 28 Srovnání kontaktních úhlů

7.4 Antimikrobiální účinky

Filmy na bázi zeinu s přidavkem aktivních látek jsou využívány především pro tzv. aktivní obaly, kterým je věnována kapitola 4 této práce. Z důvodu hydrofilní povahy většiny proteinových filmů, dochází k uvolňování aditivních a bioaktivních sloučenin, což činí tyto materiály velmi perspektivními pro mnohé aplikační oblasti. Antimikrobiální účinek aditivních látek jako jsou EO a monoacylglyceroly je rovněž popsán v kapitole 4. Pro testování antibakteriálních a antifungálních vlastností vybraných vzorků filmů obsahujících kombinace eugenolu a monolaurinu byla využita metoda agar difúzního testu.

7.4.1 Antibakteriální účinky

V Tab. 9 jsou uvedeny inhibiční zóny testovaných vzorků, na základě kterých lze konstatovat, že kontrolní zeinové filmy nevykazovaly antibakteriální účinek vůči žádnému z testovaných druhů bakterií, podobně jako uvádí studie Kashiri a kol. [55]. Z výsledků je patrné, že testované vzorky vykazují významný účinek jak proti grampozitivním bakteriím (G^+), tak proti gramnegativním bakteriím (G^-) (vyjma vzorku 5ML/2EU). Nižší antibakteriální účinek všech vzorků proti *Escherichia coli* (G^-) může být způsoben rozdílným charakterem buněčné stěny G^- a G^+ bakterií. Zatímco buněčná stěna G^+ bakterií obsahuje hlavně peptidoglykan s malým množstvím proteinů, buněčná stěna G^- mikroorganismů je složitější a obsahuje vnější stabilnější lipopolysacharidovou vrstvu, která zvyšuje jejich odolnost ve srovnání s G^+ [42].

Tab. 9 Velikosti inhibičních zón zeinových filmů vůči bakteriím

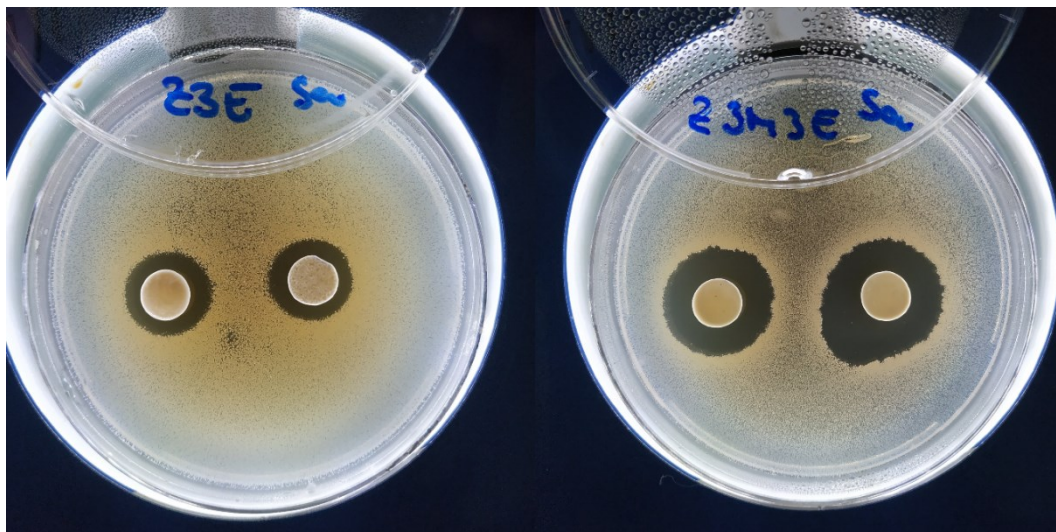
Vzorek	Inhibiční zóna [mm]	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Z	–	–
Z/3EU	11,3 ± 0,5	14,0 ± 1,0
Z/3ML/2EU	22,3 ± 0,3	10,0 ± 0,0
Z/3ML/3EU	24,7 ± 0,3	15,0 ± 0,0
Z/4ML/2EU	17,3 ± 0,3	7,0 ± 0,0
Z/5ML/2EU	20,7 ± 0,7	–

– žádná inhibiční zóna

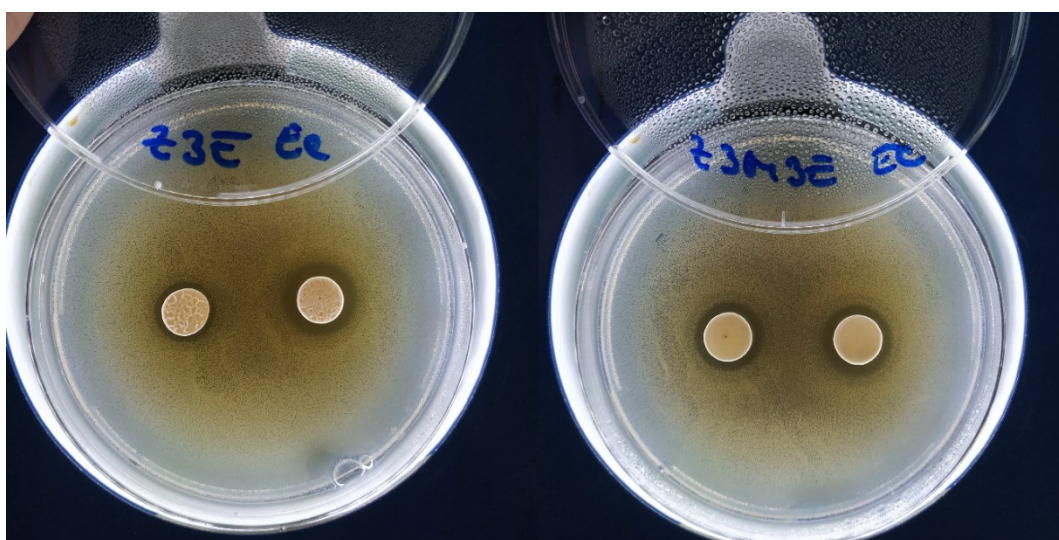
Při srovnání vzorků Z/3EU a Z/3ML/3EU můžeme konstatovat, že po přidání monolaurinu do matrice filmů významně vzrostl účinek proti G^+ bakterii a také mírně proti G^- při totožné koncentraci eugenolu. Zároveň lze tvrdit, že při vyšší koncentraci eugenolu se zvýšil inhibiční účinek proti G^- bakteriím, jak dokládá srovnání vzorků Z/3ML/2EU a Z/3ML/3EU. Účinnost eugenolu v zeinových filmech je také potvrzena ve studii Boyaci a kol. [56], kde byl zkoumán vliv přídatku EO proti patogenním bakteriím *Listeria innocua* a *Escherichia coli*. Ovšem nebyl prokázán další významný růst inhibičního účinku filmů s eugenolem při zvyšující se koncentraci monolaurinu.

Ze všech testovaných vzorků se jako neoptimálnější jeví kombinace s 3% monolaurinu a 3% eugenolu, což dokazují největší inhibiční zóny 24,7 mm vůči bakterii *S. aureus* a 15 mm vůči *E. coli*.

Pozitivní vliv přídatku monolaurinu na inhibiční účinek, zejména vůči G^+ bakterii *S. aureus*, lze pozorovat na srovnání výsledků agar difúzního testu (Obr. 29 a 30).



Obr. 29 Inhibiční zóny vzorků Z/3EU a Z/3ML/3EU proti *Staphylococcus aureus*



Obr. 30 Inhibiční zóny vzorků Z/3EU a Z/3ML/3EU proti *Escherichia coli*

7.4.2 Antifungální účinky

Vzorky filmů obsahující kombinace aktivních látek eugenolu a monolaurinu byly testovány také vůči plísním a kvasinkám. Dle výsledků uvedených v Tab. 10 můžeme konstatovat, že kontrolní zeinové filmy, podobně jako v případě bakterií, nevykazovaly žádnou aktivitu. Inhibiční účinky proti *Aspergillus sp.* se nepotvrdily ani u vzorku obsahující eugenol bez monolaurinu. Ve všech ostatních vzorcích lze potvrdit antimikrobiální účinek jak proti plísním, tak proti kvasinkám. Z Tab. 10 je patrné, že zvyšující se koncentrace monolaurinu nezaručuje vyšší antifungální aktivitu.

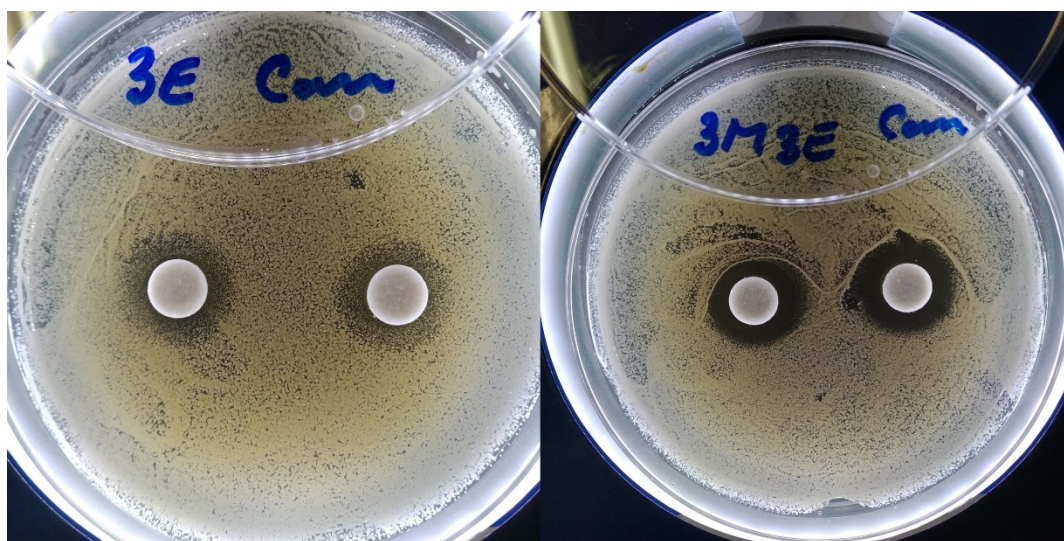
Ze všech námi testovaných filmů se opět jako neoptimálnější kombinace aktivních látek jeví vzorek s obsahem 3 % monolaurinu a 3 % eugenolu, což dotvrzují i největší inhibiční zóny, které byly 19,7 mm proti kvasince *Candida albicans* a 18,3 mm proti plísni *Aspergillus sp.* Na základě tohoto zjištění lze potvrdit synergický účinek mezi eugenolem a monolaurinem při tomto konkrétním zastoupení v polymerní matrici zeinu.

Tab. 10 Velikosti inhibičních zón zeinových filmů vůči plísním a kvasinkám

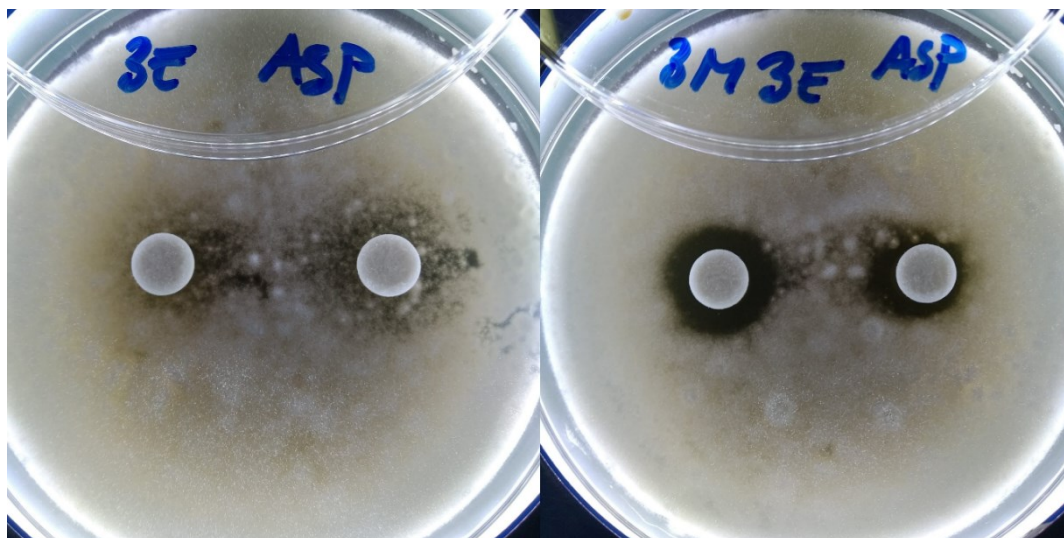
Vzorek	Inhibiční zóna [mm]	
	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus sp.</i>
Z	–	–
Z/3EU	11,3 ± 0,5	–
Z/3ML/2EU	Neměřeno	Neměřeno
Z/3ML/3EU	19,7 ± 0,3	18,3 ± 0,3
Z/4ML/2EU	12,3 ± 0,3	12,0 ± 0,0
Z/5ML/2EU	15,0 ± 0,0	11,3 ± 0,3

– žádná inhibiční zóna

Na fotografiích (Obr. 31 a 32) lze pozorovat srovnání výsledků antimikrobiálních účinků mezi vzorky obsahujícími v prvním případě pouze 3 % eugenolu a v druhém 3% eugenolu a 3 % monolaurinu proti vybraným druhům kvasinek a plísní. Významný rozdíl je patrný zejména v působení proti *Aspergillus sp.*, kdy bez přítomnosti monolaurinu nebyla prokázána žádná inhibiční zóna (Obr. 32).



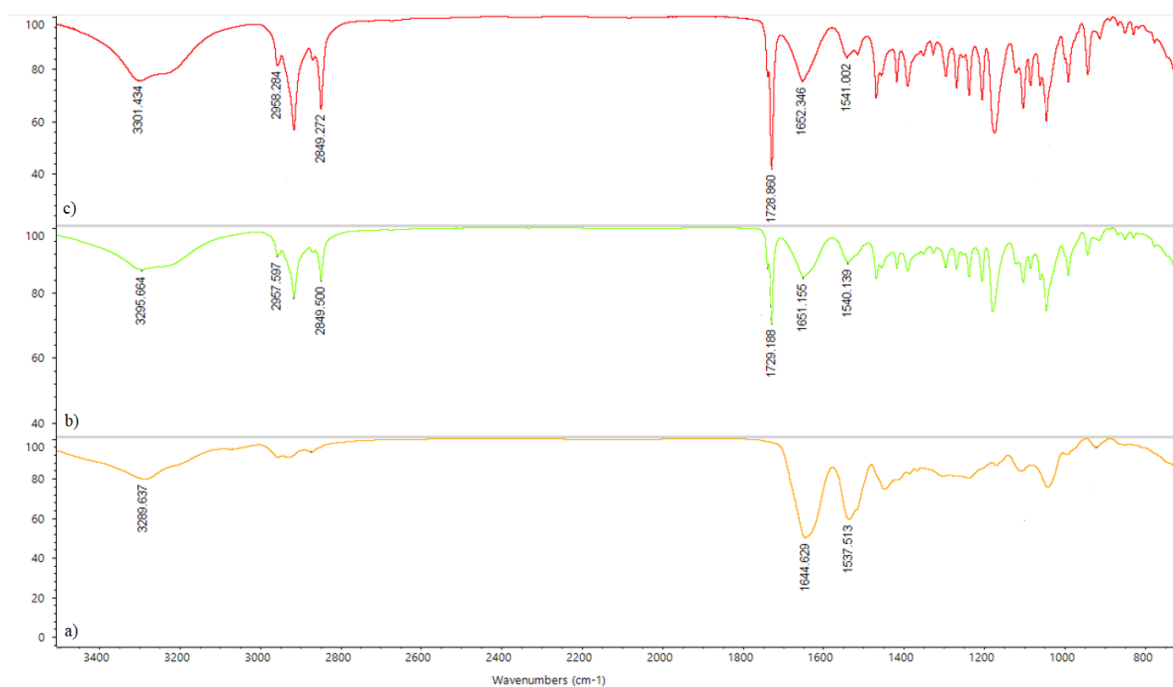
Obr. 31 Inhibiční zóny vzorků Z/3EU a Z/3ML/3EU proti *Candida albicans*



Obr. 32 Inhibiční zóny vzorků Z/3EU a Z/3ML/3EU proti *Aspergillus sp.*

7.5 FTIR analýza

Vzájemné interakce mezi zeinovým polymerem a vybranými aktivními látkami byly analyzovány prostřednictvím FTIR-ATR spektroskopie (Obr. 33). Na spektrech kontrolního zeinového filmu (Obr.33 a) lze vidět píky charakteristické pro tento polymer odpovídající amidu I, II a III, tj. 3290 cm^{-1} ($-\text{NH}_2$), 1645 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$), 1538 cm^{-1} ($\text{N}-\text{H}$, $\text{C}-\text{N}$). Pík 1645 cm^{-1} potvrzuje přítomnost vyššího množství α -šroubovicové sekundární struktury. Na druhou stranu, strukturu β nelze ze získaného spektra detekovat, z důvodu absence píků při 1614 cm^{-1} a 1631 cm^{-1} [57]. Spektrum vzorku s obsahem monolaurinu (Obr. 33 b) ukazuje přítomnost píků charakteristických pro tuto strukturu [58], tedy píky při 2957 cm^{-1} , 2849 cm^{-1} a 1729 cm^{-1} odpovídající $\text{C}=\text{O}$ a $\text{C}-\text{O}$ vazbám. Srovnáním se spektrem vzorku obsahujícího kromě monolaurinu tymiánový EO nebyly prokázány žádné zásadní změny. Lze předpokládat, že ester kyseliny laurové hrál dominantní roli při interakci s nosným polymerem zeinem. Tento fakt je zřejmý i ze zvětšujících se příslušných píků při rostoucí koncentraci monolaurinu z 3 na 4 %hm ve směsi (Obr. 33 b) a c)).



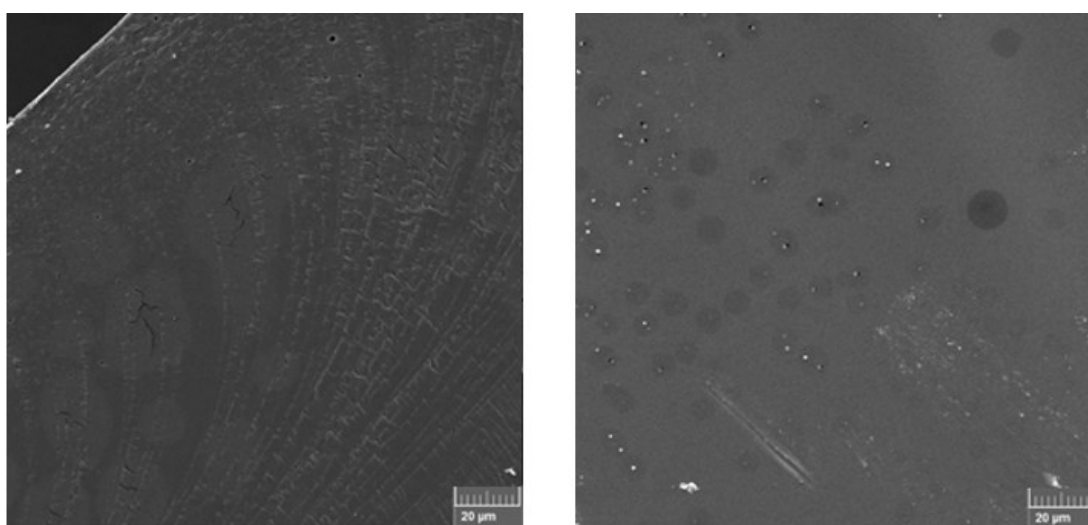
Obr. 33 FTIR-ATR spektra pro a) kontrolní vzorek zeinu b) Z/3ML c) Z/4ML/2T

7.6 SEM analýza

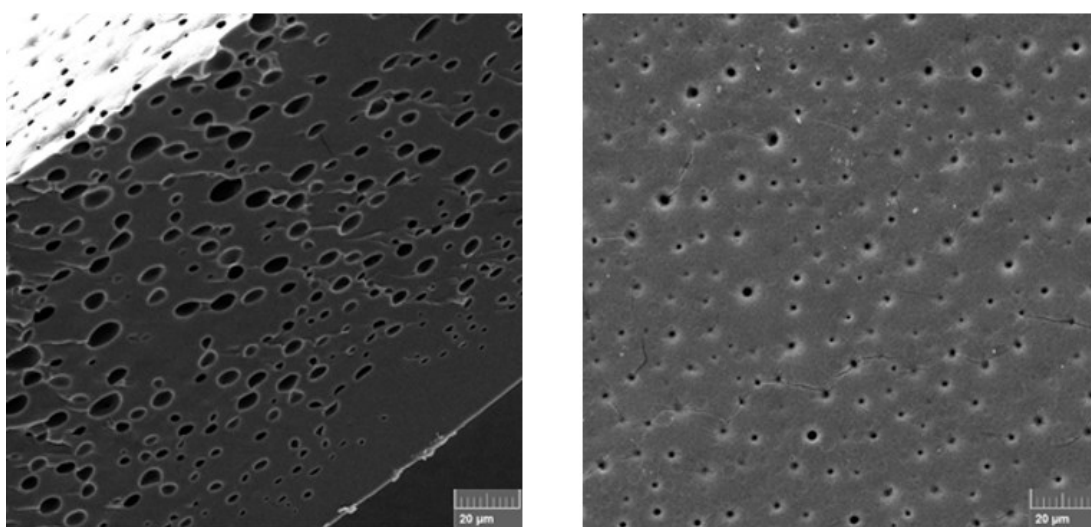
Pomocí skenovacího elektronového mikroskopu byl sledován vliv aktivních látek eugenolu a monolaurinu na povrch a strukturu zeinových filmů. Na obrázku (Obr. 34) je zobrazen snímek kontrolního zeinového filmu, tedy bez přítomnosti aktivních látek, který má víceméně kompaktní homogenní strukturu. Na řezu kontrolního filmu (Obr. 34 vlevo) lze vidět pouze malé množství menších prasklin, způsobené pravděpodobně poměrně křehkou strukturou zeinových filmů. Podobný jev, ale v mnohem větším rozsahu, byl sledován ve studii autorů Pereira a kol. [46]. V práci [56] byly v povrchové morfologii zeinových filmů prokázány dvě odlišné fáze, což indikuje proces fázové separace mezi polymerem a použitým plastifikátorem (glycerolem).

Na Obr. 35 lze vidět snímky řezu a povrchu vzorku zeinu po přidání aktivní látky eugenolu. Na první pohled jsou viditelné zásadní morfologické změny v porovnání s kontrolním filmem v podobě pórů o průměru cca rovnoměrně dispergovaných v zeinové matici. Došlo zde také k redukci trhlin, které se vyskytovaly v kontrolním. Ve studii [46] byl prokázán příznivý vliv rostoucí koncentrace eugenolu (na koncentraci srovnatelnou s naším vzorkem), podporující vznik silnějších interakcí mezi polymerem a aktivní látkou. Tento fakt byl v souladu s našimi výsledky, vzorky vykazovaly mnohem kompaktnější strukturu s menším stupněm pórovitosti (Obr. 35).

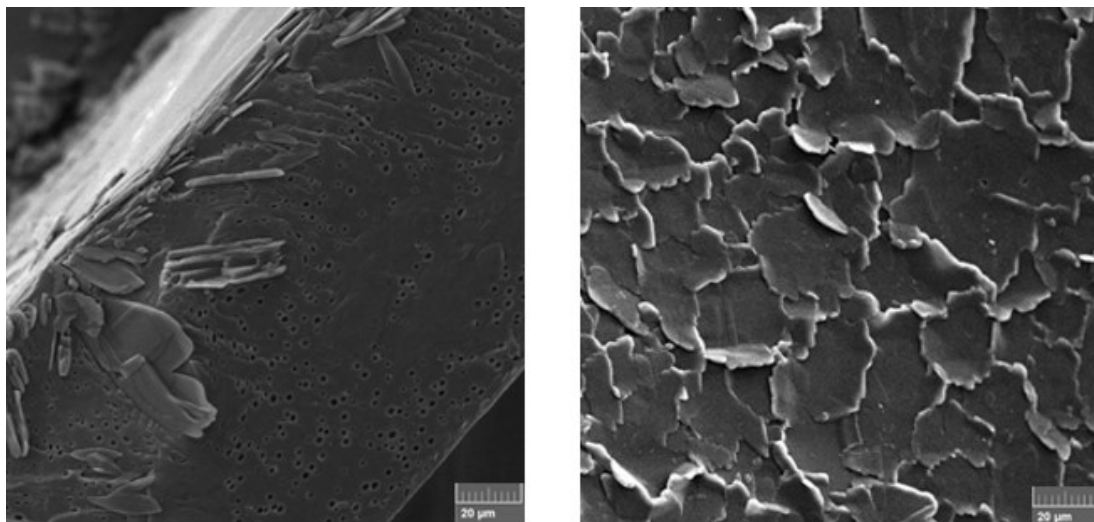
Na posledním Obr. 36 lze vidět snímky filmu s přidavkem kombinace aktivních látek, eugenolu a monolaurinu. Při srovnání Obr. 35 a Obr. 36 je pozorovatelný významný rozdíl ve struktuře testovaných filmů. Přidavek monolaurinu způsobil vznik nepravidelné „listovité“ struktury, která může být důsledkem polymorfního charakteru monoacylglycerolů mastných kyselin. Na řezu (Obr. 36 a) tohoto vzorku lze vidět, že zmíněná „listovitá“ struktura je nashromážděna především v horní části filmu, zatímco v objemu jsou zřetelné póry způsobené přítomností eugenolu. Zjištěné morfologické změny se projeví na mechanických vlastnostech (diskutovaných v kapitole 7.2), zejména na poklesu pevnosti v tahu oproti referenčnímu zeinovému filmu (viz Obr. 16).



Obr. 34 SEM řezu (vlevo) a povrchu (vpravo) kontrolního zeinového filmu



Obr. 35 SEM řezu (vlevo) a povrchu (vpravo) vzorku Z/3EU



Obr. 36 SEM řezu (vlevo) a povrchu (vpravo) vzorku Z/3ML/3EU

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce byla příprava a charakterizace filmů na bázi zeinu, resp. zeinu a chitosanu s obsahem vybraných aktivních látek, konkrétně esenciálních olejů tymiánu, oregana a eugenolu, hlavní účinné složky skořicového oleje, a také monoacylglycerolu kyseliny laurové.

Zatímco filmy na bázi samotného zeinu byly homogenní a víceméně kompaktní, přidavek chitosanu k zeinu negativně ovlivnil homogenitu filmů, což zásadně ovlivnilo jejich vzhled i výsledné vlastnosti. Mechanické zkoušky prokázaly, že modifikací aktivními látkami došlo k poklesu pevnosti v tahu, zřejmě z důvodu morfologických změn v podobě pórů a nepravidelné „listovité“ struktury, které byly potvrzeny na snímcích ze SEM mikroskopie. V případě zeinových filmů se jako nejslibnější projeví vzorky s obsahem eugenolu a monolaurinu v různých koncentracích, které vykazovaly tažnost v průměru 356 %, tedy o 97 % více ve srovnání s referencí. Obecně byl u všech vzorků prokázán vliv přídavku monolaurinu na zvýšení flexibility a pružnosti filmů. Filmy na bázi zeinu a chitosanu vykazovaly hodnoty pevnosti v tahu vyšší, zatímco hodnoty prodloužení se mírně snížily, lze ale konstatovat, že přídavek chitosanu měl na mechanické vlastnosti spíše pozitivní vliv.

Při studiu povrchových vlastností bylo zjištěno, že modifikace zeinových filmů pomocí vybraných aktivních látek měla za následek zvýšení hodnot povrchových energií oproti kontrolnímu filmu, což indikuje vyšší smáčivost. U vzorků na bázi zeinu a chitosanu se však tento trend nepotvrdil, nejspíše kvůli špatné homogenitě vzorků.

Pro testování antimikrobiálních účinků byly vybrány vzorky filmů na bázi zeinu s různou koncentrací eugenolu a monolaurinu. Bylo zjištěno, že zmíněné filmy vykazují vyšší účinnost proti G^+ bakteriím, zatímco zástupce G^- *E. coli* prokázala vyšší odolnost. Dále byla testována účinnost proti plísním a kvasinkám, kde se pozitivně projevil přídavek monolaurinu v kombinaci s eugenolem. Při komplexním zhodnocení všech zmíněných testů se jako neoptimálnější jeví kombinace s 3% monolaurinu a 3% eugenolu.

Vliv aktivních látek přítomných v zeinových filmech byl analyzován také metodou FTIR. Ze srovnání spekter vyplývá, že u filmu obsahující 3 % monolaurinu došlo ke vzniku nových píků, které signalizují interakci mezi zeinem a monolaurinem. Vzhledem k tomu, že u spektra vzorku obsahujícího kromě monolaurinu tymiánový EO nebyly prokázány žádné zásadní změny, lze předpokládat, že pro interakci s polymerem hraje dominantní roli monolaurin.

Závěrem lze říci, že byly připraveny zeinové filmy s dostatečnou antimikrobiální aktivitou, jejichž mechanické a povrchové vlastnosti jsou ovlivněny přítomností esenciálních olejů a esterem kyseliny laurové. Tyto systémy by mohly být, vzhledem k charakteru využitých materiálů, aplikovány například pro výrobu aktivních jedlých potravinářských obalů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HUBER, Kerry C. a Milda E. EMBUSCADO, ed. *Edible Films and Coatings for Food Applications* [online]. New York, NY: Springer New York, 2009 [cit. 2021-01-06]. ISBN 978-0-387-92823-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-0-387-92824-1
- [2] CAMPOS, Carmen A., Lía N. GERSCHENSON a Silvia K. FLORES. Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. *Food and Bioprocess Technology* [online]. 2011, **4**(6), 849-875 [cit. 2021-01-06]. ISSN 1935-5130. Dostupné z: doi:10.1007/s11947-010-0434-1
- [3] CHEN, Hongbo, Jingjing WANG, Yaohua CHENG, et al. Application of Protein-Based Films and Coatings for Food Packaging: A Review. *Polymers* [online]. 2019, **11**(12) [cit. 2021-01-09]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym11122039
- [4] BONNAILLIE, Laetitia, Han ZHANG, et al. Casein Films: The Effects of Formulation, Environmental Conditions and the Addition of Citric Pectin on the Structure and Mechanical Properties. *Polymers* [online]. 2014, **6**(7), 2018-2036 [cit. 2021-01-09]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym6072018
- [5] RAMOS, Óscar L., et al. Edible Films and Coatings from Whey Proteins: A Review on Formulation, and on Mechanical and Bioactive Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2012, **52**(6), 533-552 [cit. 2021-01-09]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2010.500528
- [6] WITTAYA, Thawien. Protein-Based Edible Films: Characteristics and Improvement of Properties. AMER EISSA, Ayman, ed. *Structure and Function of Food Engineering* [online]. InTech, 2012, 2012-08-22 [cit. 2021-01-12]. ISBN 978-953-51-0695-1. Dostupné z: doi:10.5772/48167
- [7] ANDERSON, Timothy J. a Buddhi P. LAMSAL. REVIEW: Zein Extraction from Corn, Corn Products, and Coproducts and Modifications for Various Applications. *Cereal Chemistry Journal* [online]. 2011, **88**(2), 159-173 [cit. 2021-01-20]. ISSN 0009-0352. Dostupné z: doi:10.1094/CCHEM-06-10-0091
- [8] ZHANG, Yong, Lili CUI, Xiaoxia CHE, Heng ZHANG, Nianqiu SHI, Chunlei LI, Yan CHEN a Wei KONG. Zein-based films and their usage for controlled delivery: Origin, classes and current landscape. *Journal of Controlled Release* [online].

- 2015, **206**, 206-219 [cit. 2021-01-20]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2015.03.030
- [9] SHUKLA, Rishi a Munir CHERYAN. Zein: the industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products* [online]. 2001, **13**(3), 171-192 [cit. 2021-01-20]. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/S0926-6690(00)00064-9
- [10] SUHAG, Rajat, Nishant KUMAR, Anka Trajkovska PETKOSKA a Ashutosh UPADHYAY. Film formation and deposition methods of edible coating on food products: A review. *Food Research International* [online]. 2020, **136** [cit. 2021-01-30]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2020.109582
- [11] GENNADIOS, A. Edible films and coatings from proteins. *Proteins in Food Processing* [online]. Elsevier, 2004, 2004, s. 442-467 [cit. 2021-01-31]. ISBN 9781855737235. Dostupné z: doi:10.1533/9781855738379.3.442
- [12] MACAGNANO, Antonella, Emiliano ZAMPETTI a Erich KNY, ed. *Electrospinning for High Performance Sensors* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2015 [cit. 2021-04-07]. NanoScience and Technology. ISBN 978-3-319-14405-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-14406-1
- [13] *Schéma principu elektrostatického zvlákňování*. [online]. [cit. 2021-04-07]. Dostupné z: <https://www.nanopharma.cz/cs/produkty-a-technologie/technologie>
- [14] L-HAZEEM, Nabeel Zabar Abed. Nanofibers and Electrospinning Method. KYZAS, George Z. a Athanasios C. MITROPOULOS, ed. *Novel Nanomaterials - Synthesis and Applications* [online]. InTech, 2018, 2018-04-18 [cit. 2021-04-07]. ISBN 978-1-78923-088-8. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.72060
- [15] RAMAKRISHNA, Seeram. *An introduction to electrospinning and nanofibers*. New Jersey: World Scientific, c2005. ISBN 981-256-454-3.
- [16] ULLSTEN, N. Henrik, Mikael GÄLLSTEDT a Mikael S. HEDENQVIST. Plasticizers for Protein-Based Materials. EL-AMIN, Mohamed Fathy, ed. *Viscoelastic and Viscoplastic Materials* [online]. InTech, 2016, 2016-09-21 [cit. 2021-04-03]. ISBN 978-953-51-2602-7. Dostupné z: doi:10.5772/64073
- [17] AZEREDO, Henriette M.C. a Keith W. WALDRON. Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact – A review. *Trends*

- in Food Science & Technology* [online]. 2016, **52**, 109-122 [cit. 2021-04-12]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2016.04.008
- [18] BENBETTAÏEB, Nasreddine, Jean-Pierre GAY, Thomas KARBOWIAK a Frédéric DEBEAUFORT. Tuning the Functional Properties of Polysaccharide-Protein Bio-Based Edible Films by Chemical, Enzymatic, and Physical Cross-Linking. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2016, **15**(4), 739-752 [cit. 2021-04-12]. ISSN 15414337. Dostupné z: doi:10.1111/1541-4337.12210
- [19] ROBERTSON Gordon L. *Food and Packaging Principles and Practise, Third Edition*. CRC Press. USA, 2013. ISBN 978-1-4398-6242-1
- [20] THAKUR, Vijay Kumar a Manju Kumari THAKUR, ed. *Functional Biopolymers* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2018 [cit. 2021-04-15]. Springer Series on Polymer and Composite Materials. ISBN 978-3-319-66416-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-66417-0
- [21] SAADAH SAID, Nurul a Norizah MHD SARBON. Protein-Based Active Film as Antimicrobial Food Packaging: A Review. VAR, Işıl a Sinan UZUNLU, ed. *Active Antimicrobial Food Packaging* [online]. IntechOpen, 2019, 2019-1-30 [cit. 2021-04-15]. ISBN 978-1-78985-003-1. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.80774
- [22] SHARMA, Shubham, Sandra BARKAUSKAITE, Amit K. JAISWAL a Swarna JAISWAL. Essential oils as additives in active food packaging. *Food Chemistry* [online]. 2021, **343** [cit. 2021-04-17]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2020.128403
- [23] PERDONES-MONTERO, Ángela. *Antifungal Chitosan-based Films and Coatings Containing Essentials Oils for Fruit Applications*. Doctoral thesis, Valencia, 2015.
- [24] BAKKALI, F., S. AVERBECK, D. AVERBECK a M. IDAOMAR. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2008, **46**(2), 446-475 [cit. 2021-04-17]. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2007.09.106
- [25] CAN BASER, K. Hüsnü a Gerhard BUCHBAUER. *Essential Oils: Science, Technology and Applications*. Boca Raton: CRC Press, USA, 2009. ISBN 978-1-4200-6315-8.

- [26] DREGER, Mariola a Karolina WIELGUS. Application of essential oils as natural cosmetic preservatives. *Herba Polonica* [online]. 2013, **59**(4), str. 144-147 [cit. 2021-04-17]. ISSN 0018-0599. Dostupné z: doi:10.2478/hepo-2013-0030
- [27] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin I*. Tábor: Osis, 1999. 352 s. ISBN 80-902391-3-7
- [28] HOBUSS, Cristiane B., et al. Synthesis and characterization of monoacylglycerols through glycerolysis of ethyl esters derived from linseed oil by green processes. *RSC Advances* [online]. 2020, **10**(4), 2327-2336 [cit. 2021-04-21]. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/C9RA07834G
- [29] FELTES, Maria Manuela Camino, Débora DE OLIVEIRA, Jane Mara BLOCK a Jorge Luiz NINOW. The Production, Benefits, and Applications of Monoacylglycerols and Diacylglycerols of Nutritional Interest. *Food and Bioprocess Technology* [online]. 2013, **6**(1), 17-35 [cit. 2021-04-21]. ISSN 1935-5130. Dostupné z: doi:10.1007/s11947-012-0836-3
- [30] RŮŽIČKA, Jan, Kateřina VELCLOVÁ, Rahula JANIŠ a Jiří KREJČÍ. Antimicrobial effects of 1-monoacylglycerols prepared by catalytic reaction of glycidol with fatty acids. *European Food Research and Technology* [online]. 2003, **217**(4), 329-331 [cit. 2021-04-22]. ISSN 1438-2377. Dostupné z: doi:10.1007/s00217-003-0764-6
- [31] OON, Bo, Joshua JACKMAN, Elba VALLE-GONZÁLEZ a Nam-Joon CHO. Antibacterial Free Fatty Acids and Monoglycerides: Biological Activities, Experimental Testing, and Therapeutic Applications. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, **19**(4) [cit. 2021-04-22]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19041114
- [32] KALIA, S. and Luc AVÉROUS, ed. *Biopolymers: Biomedical and Environmental Applications*. Scrivener publishing, 2011, 644 p. ISBN 978-0-470-63923-8
- [33] JIMTAISONG, A. a N. SAEWAN. Utilization of carboxymethyl chitosan in cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 2014, **36**(1), 12-21 [cit. 2021-4-27]. ISSN 01425463. Dostupné z: doi:10.1111/ics.12102
- [34] BOUDOUAIA, Nacer, Zohra BENGHAREZ a Salah JELLALI. Preparation and characterization of chitosan extracted from shrimp shells waste and chitosan film:

- application for Eriochrome black T removal from aqueous solutions. *Applied Water Science* [online]. 2019, **9**(4) [cit. 2021-4-27]. ISSN 2190-5487. Dostupné z: doi:10.1007/s13201-019-0967-z
- [35] MALINOWSKA-PANCZYK, Edyta, Hanna STAROSZCZYK, Karolina GOTTFRIED, Ilona KOŁODZIEJSKA a Anna WOJTASZ-PAJAK. Antimicrobial properties of chitosan solutions, chitosan films and gelatin-chitosan films. *Polimery* [online]. 2015, **61**(11/12), 735-741 [cit. 2021-4-27]. ISSN 00322725. Dostupné z: doi:10.14314/polimery.2015.735
- [36] KANA, Jean Raphaël a Amir MEIMANDIPOUR. Antimicrobial Activity of Chitosan Film Forming Solution Enriched with Essential Oils; an in Vitro Assay. *Iranian Journal of Biotechnology* [online]. 2017, **15**(2), 111-119 [cit. 2021-4-27]. ISSN 1728-3043. Dostupné z: doi:10.15171/ijb.1360
- [37] MORADI, Mehran, Hossein TAJIK, Seyed Mehdi RAZAVI ROHANI a Alireza MAHMOUDIAN. Antioxidant and antimicrobial effects of zein edible film impregnated with *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and monolaurin. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2016, **72**, 37-43 [cit. 2021-4-27]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2016.04.026
- [38] QU, Liangfan, Guiyun CHEN, Shuang DONG, Yaoxing HUO, Zhonglin YIN, Shuhong LI a Ye CHEN. Improved mechanical and antimicrobial properties of zein/chitosan films by adding highly dispersed nano-TiO₂. *Industrial Crops and Products* [online]. 2019, **130**, 450-458 [cit. 2021-4-27]. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2018.12.093
- [39] HEJDA F., SOLAŘ P., KOUSAL J. Surface Free Energy Determination by Contact Angle Measurements – A Comparison of Various Approaches, Charles University, Faculty of Mathematics and Physics, Praha, 2010. ISBN 978-80-7378-141-5.
- [40] LOTFI, Mohamad, Hossein TAJIK, Mehran MORADI, Mehrdad FOROUGH, Elahe DIVSALAR a Bambang KUSWANDI. Nanostructured chitosan/ monolaurin film: Preparation, characterization and antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes* on ultrafiltered white cheese. *LWT* [online]. 2018, **92**, 576-583 [cit. 2021-5-13]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2018.03.020
- [41] ESCAMILLA-GARCÍA, Monserrat, Georgina CALDERÓN-DOMÍNGUEZ, Jorge CHANONA-PÉREZ, Angélica MENDOZA-MADRIGAL, Prospero DI

- PIERRO, Blanca GARCÍA-ALMENDÁREZ, Aldo AMARO-REYES a Carlos REGALADO-GONZÁLEZ. Physical, Structural, Barrier, and Antifungal Characterization of Chitosan–Zein Edible Films with Added Essential Oils. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2017, **18**(11) [cit. 2021-5-6]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms18112370
- [42] VAHEDIKIA, Nooshin, Farhad GARAVAND, Behjat TAJEDDIN, Ilaria CACCIOTTI, Seid Mahdi JAFARI, Tayebah OMIDI a Zahra ZAHEDI. Biodegradable zein film composites reinforced with chitosan nanoparticles and cinnamon essential oil: Physical, mechanical, structural and antimicrobial attributes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2019, **177**, 25-32 [cit. 2021-5-6]. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2019.01.045
- [43] SEDLAŘÍKOVÁ, Jana, Magda JANALÍKOVÁ, Ondřej RUDOLF, Jana PAVLAČKOVÁ, Pavlína EGNER, Petra PEER, Vendula VARAĐOVÁ a Jiří KREJČÍ. Chitosan/Thyme Oil Systems as Affected by Stabilizing Agent: Physical and Antimicrobial Properties. *Coatings* [online]. 2019, **9**(3) [cit. 2021-5-4]. ISSN 2079-6412. Dostupné z: doi:10.3390/coatings9030165
- [44] ALTIOK, Duygu, Evren ALTIOK a Funda TIHMINLIOGLU. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2010, **21**(7), 2227-2236 [cit. 2021-5-8]. ISSN 0957-4530. Dostupné z: doi:10.1007/s10856-010-4065-x
- [45] CAGRI, A., Z. USTUNOL a E.T. RYSER. Antimicrobial, Mechanical, and Moisture Barrier Properties of Low pH Whey Protein-based Edible Films Containing p-Aminobenzoic or Sorbic Acids. *Journal of Food Science* [online]. 2001, **66**(6), 865-870 [cit. 2021-5-8]. ISSN 0022-1147. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2621.2001.tb15188.x
- [46] PEREIRA, Lívio Antônio Silva, Priscila de Castro e SILVA, Jorge Pamplona PAGNOSSA, Kelvi Wilson Evaristo MIRANDA, Eliton Souto MEDEIROS, Roberta Hilsdorf PICCOLI a Juliano Elvis de OLIVEIRA. Antimicrobial zein coatings plasticized with garlic and thyme essential oils. *Brazilian Journal of Food Technology* [online]. 2019, **22** [cit. 2021-5-6]. ISSN 1981-6723. Dostupné z: doi:10.1590/1981-6723.13518

- [47] LUÍS, DOMINGUES a RAMOS. Production of Hydrophobic Zein-Based Films Bioinspired by The Lotus Leaf Surface: Characterization and Bioactive Properties. *Microorganisms* [online]. 2019, 7(8) [cit. 2021-5-7]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms7080267
- [48] GU, Luping, Miao WANG a Jingwen ZHOU. Effects of protein interactions on properties and microstructure of zein–gliadin composite films. *Journal of Food Engineering* [online]. 2013, 119(2), 288-298 [cit. 2021-5-9]. ISSN 02608774. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.05.022
- [49] SHI, Ke, Jozef L. KOKINI a Qingrong HUANG. Engineering Zein Films with Controlled Surface Morphology and Hydrophilicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2009, 57(6), 2186-2192 [cit. 2021-5-9]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf803559v
- [50] PEER, Petra, Jana SEDLAŘÍKOVÁ, Magda JANALÍKOVÁ, Liliana KUČEROVÁ a Pavel PLEVA. Novel Polyvinyl Butyral/Monoacylglycerol Nanofibrous Membrane with Antifouling Activity. *Materials* [online]. 2020, 13(17) [cit. 2021-5-9]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma13173662
- [51] GHANBARZADEH, Babak, Abdulrasoul OROMIEHIE, Mohamad MUSAVI, Keramat REZAYI, Elhame RAZMI a Jafar MILANI. Investigation of water vapour permeability, hydrophobicity and morphology of zein films plasticized by polyols. Research Gate [online]. 2006, 15(9), 691-700 [cit. 2018-05-14]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/228350995_Investigation_of_water_vapour_permeability_hydrophobicity_and_morphology_of_zein_films_plasticized_by_polyols.
- [52] LÓPEZ-GARCÍA, Jorge, Florence CUPESSALA, Petr HUMPOLÍČEK a Marian LEHOCKÝ. Physical and Morphological Changes of Poly(tetrafluoroethylene) after Using Non-Thermal Plasma-Treatments. *Materials* [online]. 2018, 11(10) [cit. 2021-5-9]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma11102013
- [53] FOSTER, Leslie John Ray, Sonia HO, James HOOK, Monica BASUKI, Helder MARÇAL a Warren BATCHELOR. Chitosan as a Biomaterial: Influence of Degree of Deacetylation on Its Physicochemical, Material and Biological

- Properties. *PLOS ONE* [online]. 2015, **10**(8) [cit. 2021-5-9]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0135153
- [54] XUE, Feng, Mingzhe ZHAO, Xinye LIU, Rui CHU, Ziyu QIAO, Chen LI a Benu ADHIKARI. Physicochemical properties of chitosan/zein/essential oil emulsion-based active films functionalized by polyphenols. *Future Foods* [online]. 2021, **3** [cit. 2021-5-9]. ISSN 26668335. Dostupné z: doi:10.1016/j.fufo.2021.100033
- [55] KASHIRI, Mahboobeh, Josep P. CERISUELO, Irene DOMÍNGUEZ, Gracia LÓPEZ-CARBALLO, Pilar HERNÁNDEZ-MUÑOZ a Rafael GAVARA. Novel antimicrobial zein film for controlled release of lauroyl arginate (LAE). *Food Hydrocolloids* [online]. 2016, **61**, 547-554 [cit. 2021-5-10]. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2016.06.012
- [56] BOYACI, Derya, Gianmarco IORIO, Gozde Seval SOZBILEN, Derya ALKAN, Silvia TRABATTONI, Flavia PUCILLO, Stefano FARRIS a Ahmet YEMENICIOĞLU. Development of flexible antimicrobial zein coatings with essential oils for the inhibition of critical pathogens on the surface of whole fruits: Test of coatings on inoculated melons. *Food Packaging and Shelf Life* [online]. 2019, **20** [cit. 2021-5-10]. ISSN 22142894. Dostupné z: doi:10.1016/j.fpsl.2019.100316
- [57] ALI, Shamshad, Zeeshan KHATRI, Kyung Wha OH, Ick-Soo KIM a Seong Hun KIM. Zein/cellulose acetate hybrid nanofibers: Electrospinning and characterization. *Macromolecular Research* [online]. 2014, **22**(9), 971-977 [cit. 2021-5-10]. ISSN 1598-5032. Dostupné z: doi:10.1007/s13233-014-2136-4
- [58] SADIQ, Sara, Muhammad IMRAN, Huma HABIB, Saima SHABBIR, Ayesha IHSAN, Yusuf ZAFAR a Fauzia Yusuf HAFEEZ. Potential of monolaurin based food-grade nano-micelles loaded with nisin Z for synergistic antimicrobial action against *Staphylococcus aureus*. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2016, **71**, 227-233 [cit. 2021-5-10]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2016.03.045

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AMK	Aminokyselina
ATP	Adenosintrifosfát
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
CMC	Karboxymethylcelulóza
CO ₂	Oxid uhličitý
DA	Stupeň deacetylce
E	Celkové protažení při přetržení
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EO	Esenciální olej
EU	Eugenol
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
G ⁻	Gramnegativní
G ⁺	Grampozitivní
GC	Plynová chromatografie
HLPC	Vysokoúčinná chromatografie
CH	Chitosan
IR	Infračervené záření
kDa	Kilodalton
Kol.	Kolektiv
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
ML	Monoacylglycerol kyseliny laurové
NaCl	Chlorid sodný
NaOH	Hydroxid sodný
NH ₃ ⁺	Amonný kation
NMR	Nukleární magnetická rezonance

O	Oregano
PD	Deformace při vpichu
PS	Pevnost při vpichu
PVB	Polyvinyl butyral
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
SDS	Dodecylsulfát sodný
SEM	Skenovací elektronový mikroskop
SFE	Superkritická fluidní extrakce
T	Tymián
TEM	Transmisní elektronový mikroskop
TLC	Tenkvrstvá chromatografie
TS	Tahová síla
UV	Ultrafialové záření
Z	Zein

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1 Příprava filmů odléváním z rozpouštědla při laboratorních podmínkách [10]</i>	18
<i>Obr. 2 Schéma technologie vytlačování filmů [10]</i>	19
<i>Obr. 3 Schéma principu elektrostatického zvlákňování [13]</i>	20
<i>Obr. 4 Srovnání struktur složek EO thymolu, carvacrolu a eugenolu</i>	31
<i>Obr. 5 Struktura 1-monoacylglycerolu a 2-monoacylglycerolu</i>	32
<i>Obr. 6 Struktura chitosanu [33]</i>	35
<i>Obr. 7 Příprava filmů na bázi zeinu</i>	40
<i>Obr. 8 Mechanická zkouška vpichem</i>	43
<i>Obr. 9 Tahová zkouška</i>	44
<i>Obr. 10 Optický tenziometr Attension Theta</i>	46
<i>Obr. 11 Spektrometr Nikolet 6700</i>	47
<i>Obr. 12 Vzhled vzorků filmů na bázi zeinu a) Z b) Z/3ML c) Z/3EU d) Z/3ML/2EU e) Z/3T f) Z/3ML/2T g) Z/3O h) Z/5ML/2O</i>	48
<i>Obr. 13 Průměrné hodnoty tloušťky jednotlivých filmů na bázi zeinu</i>	49
<i>Obr. 14 Vzhled vzorků filmů na bázi zein/chitosan a) Z/CH b) Z/CH/3ML c) Z/CH/3T d) Z/CH/5ML/2T</i>	50
<i>Obr. 15 Průměrné hodnoty tloušťky jednotlivých filmů na bázi zein/chitosan</i>	50
<i>Obr. 16 Tahová pevnost filmů na bázi zeinu</i>	51
<i>Obr. 17 Prodloužení při přetržení filmů na bázi zeinu</i>	52
<i>Obr. 18 Pevnost při vpichu filmů na bázi zeinu</i>	53
<i>Obr. 19 Deformace při vpichu filmů na bázi zeinu</i>	53
<i>Obr. 20 Tahová pevnost filmů na bázi zein/chitosan</i>	54
<i>Obr. 21 Prodloužení při přetržení filmů na bázi zein/chitosan</i>	55
<i>Obr. 22 Pevnost při vpichu filmů na bázi zein/chitosan</i>	55
<i>Obr. 23 Deformace při vpichu filmů na bázi zein/chitosan</i>	56
<i>Obr. 24 Kontaktní úhly jednotlivých filmů na bázi zeinu</i>	57
<i>Obr. 25 Kapka ethylenglykolu na vzorku a)Z/3ML/3EU b)Z/4ML/2EU</i>	58
<i>Obr. 26 Kontaktní úhly jednotlivých filmů na bázi zein/chitosan</i>	60
<i>Obr. 27 Kapka ethylenglykolu na vzorku a)Z/CH/3ML/2EU b)Z//CH/4ML/2EU</i>	60
<i>Obr. 28 Srovnání kontaktních úhlů</i>	62
<i>Obr. 29 Inhibiční zóny vzorků Z/3EU a Z/3ML/3EU proti Staphylococcus aureus</i>	64
<i>Obr. 30 Inhibiční zóny vzorků Z/3EU a Z/3ML/3EU proti Escherichia coli</i>	64
<i>Obr. 31 Inhibiční zóny vzorků Z/3EU a Z/3ML/3EU proti Candida albicans</i>	65
<i>Obr. 32 Inhibiční zóny vzorků Z/3EU a Z/3ML/3EU proti Aspergillus sp.</i>	66

<i>Obr. 33 FTIR-ATR spektra pro a) kontrolní vzorek zeinu b) Z/3ML c) Z/4ML/2T</i>	<i>67</i>
<i>Obr. 34 SEM řezu (vlevo) a povrchu (vpravo) kontrolního zeinového filmu</i>	<i>68</i>
<i>Obr. 35 SEM řezu (vlevo) a povrchu (vpravo) vzorku Z/3EU</i>	<i>68</i>
<i>Obr. 36 SEM řezu (vlevo) a povrchu (vpravo) vzorku Z/3ML/3EU</i>	<i>69</i>

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1 Aminokyselinové složení zeinu (g AMK/100 g zeinu) [9]</i>	<i>15</i>
<i>Tab. 2 Srovnání hlavních složek vybraných EO a jejich koncentrace v % [23]</i>	<i>31</i>
<i>Tab. 3 Procentuální zastoupení aktivních látek ve filmech na bázi zeinu</i>	<i>41</i>
<i>Tab. 4 Procentuální zastoupení aktivních látek ve filmech na bázi zein/chitosan</i>	<i>42</i>
<i>Tab. 5 Hodnoty povrchové energie filmů na bázi zeinu (model OWRK)</i>	<i>58</i>
<i>Tab. 6 Hodnoty povrchové energie filmů na bázi zeinu (model WU)</i>	<i>59</i>
<i>Tab. 7 Hodnoty povrchové energie filmů na bázi zein/chitosan (model OWRK)</i>	<i>61</i>
<i>Tab. 8 Hodnoty povrchové energie filmů na bázi zein/chitosan (model WU)</i>	<i>61</i>
<i>Tab. 9 Velikosti inhibičních zón zeinových filmů vůči bakteriím</i>	<i>63</i>
<i>Tab. 10 Velikosti inhibičních zón zeinových filmů vůči plísním a kvasinkám</i>	<i>65</i>