

Disertační práce

IMOBILIZACE BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK V MATRICI VODOROZPUSTNÉHO POLYMERU

**Immobilization of biologically active compounds in the
water-soluble polymer matrix**

Autor: **Ing. Martina Hrabalíková**

Studijní program: P2901 Chemie a technologie potravin

Studijní obor: 2901V013 Technologie potravin

Školitel: doc. Ing. Pavel Valášek, CSc.

Konzultant: doc. Ing. Vladimír Sedlařík, Ph.D.

Zlín, duben 2015

© Martina Hrabalíková

Vydala **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně** v edici **Doctoral Thesis**.

Publikace byla vydána v roce 2015

Klíčová slova: biologicky aktivní látka, vodorozpustný polymer, nisin, kyselina mléčná, polyvinylalkohol, antimikrobiální polymer

Key words: bioactive compound, water-soluble polymer, nisin, lactic acid, polyvinyl alcohol, antimicrobial polymer

Plná verze disertační práce je dostupná v Knihovně UTB ve Zlíně.

„Tvořivost je schopnost najít souvislosti tam, kde žádné nejsou.“

Thomas M. Disch

Poděkování

Ráda bych poděkovala především svému školiteli doc. Ing. Pavlu Valáškoví, CSc. a konzultantovi doc. Ing. Vladimíru Sedlaříkovi, Ph.D. za jejich odborné vedení, cenné rady a připomínky, které mi poskytovali po celou dobu doktorského studia.

Tato práce vznikla v rámci řešení následujících projektů:

- Centrum polymerních systémů (CZ.1.05/2.1.00/03.0111, poskytovatel: ERDF, MŠMT)
- Výzkum využití syrovátky, jako odpadní látky mlékárenského průmyslu, k produkci antimikrobiálních sloučenin pro modifikace hydrofilních polymerních systémů s využitím v kosmetických a medicínálních aplikacích (QJ1310254, poskytovatel: MZe)
- Centrum pro podporu mezinárodní spolupráce v oblasti výzkumu a vývoje v technických oborech (LE12002, poskytovatel: MŠMT)
- Projekty Interní grantové agentury UTB ve Zlíně

Zvláštní poděkování patří všem kolegům a hlavně mé rodině, která mě podporovala po celou dobu doktorského studia.

OBSAH

| | |
|--|----|
| OBSAH | 4 |
| ABSTRAKT..... | 6 |
| ABSTRACT | 7 |
| ÚVOD | 8 |
| 1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY | 10 |
| 1.1 Biologicky aktivní látky..... | 10 |
| 1.2 BAL z odpadů | 10 |
| 1.3 Syrovátka jako zdroj BAL..... | 12 |
| Syrůvkové proteiny | 13 |
| 1.4 Antimikrobiální látky mající původ v syrovátce..... | 15 |
| Bakteriociny | 15 |
| Bakteriociny ze syrovátky | 16 |
| Bakteriocin z fermentačních produktů syrovátky – nisin..... | 16 |
| Kyselina mléčná..... | 17 |
| 1.5 Polymery a jejich uplatnění v potravinářském průmyslu..... | 20 |
| Přírodní polymery | 20 |
| Syntetické polymery | 21 |
| Vodorozpustné polymery | 22 |
| Polyvinylalkohol..... | 22 |
| 1.6 Aplikace polymerů v potravinářském průmyslu | 26 |
| Antimikrobiální obalové systémy | 28 |
| 1.7 Imobilizace BAL do polymeru..... | 29 |
| Kinetika uvolňování BAL z polymerních matic | 31 |
| Síťování..... | 32 |
| Enkapsulace | 33 |
| 1.8 Současné trendy v použití nisinu a kyseliny mléčné v polymerních maticích..... | 35 |
| SHRNUTÍ SOUČASNÉHO STAVU | 39 |
| CÍL PRÁCE | 40 |
| 2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 41 |

| | |
|--|-----|
| Statistické zpracování dat | 42 |
| 2.1 Flexibilní polyvinylalkoholové filmy s kyselinou mléčnou: Vliv zbytkových acetátových skupin na mechanické, tepelné a antimikrobiální vlastnosti | 43 |
| 2.2 Imobilizace nisinu do zesíťované struktury polyvinylalkoholu..... | 64 |
| 2.3 Imobilizace nisinu do mikrosfér na bázi biorozložitelného polyesteru .. | 96 |
| ZÁVĚR | 106 |
| PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI..... | 107 |
| SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 108 |
| SEZNAM OBRÁZKŮ..... | 132 |
| SEZNAM TABULEK..... | 135 |
| SEZNAM ZKRATEK..... | 136 |
| CURRICULUM VITAE..... | 138 |

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá problematikou imobilizace biologicky aktivních látek majících původ v syrovátce do matrice vodorozpustného polymeru za účelem přípravy antimikrobiálního systému pro potravinářské aplikace. Studovanými bioaktivními látkami byly bakteriocin nisin a kyselina mléčná v kombinaci s polyvinylalkoholem pro přípravu fólií a mikrosfér. Mezi stěžejní výstupy patří popis interakce polyvinylalkoholu s kyselinou mléčnou v závislosti na stupni hydrolýzy polymeru, nalezení nového způsobu síťování polyvinylalkoholu netoxickou dikarboxylovou kyselinou a aplikace čtyř forem nisinových modifikátorů pro úpravu hydrofilních polymerních matic.

ABSTRACT

This thesis deals with immobilization of biologically active compounds, originating from whey, into matrix of water-soluble polymer for preparation of antimicrobial systems with applicability in food industry. A bacteriocine, nisin and lactic acid in combination with polyvinyl alcohol were studied for preparation of antimicrobial foils and microspheres. The description of polyvinyl alcohol-lactic acid interaction in dependence on hydrolysis degree of the polymer, finding of novel way for polyvinyl alcohol crosslinking by nontoxic dicarboxylic acid, and application of four nisin containing modifiers into hydrophilic polymer matrices belong among key outputs of this thesis.

ÚVOD

Biologicky aktivní látky jsou neobyčejně rozsáhlou tematikou. Neustále dochází k objevování nových biologicky aktivních látek nebo se zjišťují nové biologické funkce již známých látek. V současné době se rozvíjí trendy vedoucí k návratu používání přírodních biologicky aktivních látek ve všech oblastech dotýkajících se života. Především se jedná o oblasti potravinářského, kosmetického a farmaceutického průmyslu. Nynější tendence v životním stylu posouvají využívání přírodních biologicky aktivních látek směrem k jejich inkorporaci v polymerních maticích. Progrese polymerů v životě je dána nejen jejich materiálovými vlastnostmi, ale především dostupnými surovinovými zdroji a výrobními postupy, což mělo za následek jejich široké uplatnění v celé řadě odvětví. V případě obalového průmyslu ve značné míře levnější a lehčí polymery postupně vytlačují dříve používaný kov, dřevo či papír [1, 2].

Vývoj polymerních materiálů byl původně zaměřen na dosažení co možná nejlepších vlastností mechanických, chemických a fyzikálních, a tedy i maximální stálosti a odolnosti těchto materiálů v přírodním prostředí. Nicméně se zvyšující se produkcí polymerů se také zvyšují obavy o jejich ekonomické dopady na společnost a vliv na životní prostředí a lidské zdraví [1, 3]. Dnešní životní styl, kdy mají lidé zájem o čerstvé potraviny z různých cizokrajných zemí, rozvíjí potřebu inovovat či vyvíjet nové obalové materiály s výhodnějšími vlastnostmi pro udržení potravin ve zdravotně nezávadném stavu [4]. V posledních letech také narůstá úsilí vyvinout biologicky odbouratelné kompozitní polymerní produkty zahrnující použití takových syntetických polymerních materiálů, které lze za určitých podmínek lehce odbourat, aby byly splněny požadavky na ochranu životního prostředí, multifunkční využívání přírodních zdrojů a aby bylo vyhověno zvýšenému tlaku souvisejícímu se zpřísněním zákonů [5].

Polymerní obalový materiál v potravinářském průmyslu musí být proto volen tak, aby neobsahoval zdraví škodlivé látky, které by se z něj mohly uvolňovat a ani látky, se kterými by potravinářský produkt mohl jakýmkoliv způsobem reagovat. V podstatě musí obal zajišťovat základní funkce, a to ochranu proti mechanickému poškození, ochranu proti chemickým změnám a mikrobiálnímu kažení, kontrolu kvality, podávání informací o produktu, transfer produktu, bezpečnost, propagaci, ekonomičnost a tím vazbu na životní prostředí [4, 6]. Před nedávnem se proto technologie obalového materiálu používaného v potravinářství zaměřila na polymery, které zprostředkovávají jiné funkce, než mají konvenční obaly. Takovým příkladem mohou být aktivní obaly. Jedná se o jeden z inovativních konceptů balení potravin, jakožto odezva na narůstající zájem spotřebitelů a poptávku trhu [7].

Tématika doktorského studia přímo navazuje na řešení projektu Ministerstva zemědělství ČR č. QJ1310254 – Výzkum využití syrovátky, jako odpadní látky mlékárenského průmyslu, k produkci antimikrobiálních sloučenin pro modifikace hydrofilních polymerních systémů s využitím v kosmetických a medicínálních aplikacích. Na základě této rozvíjející se oblasti se disertační práce zabývá problematikou inkorporace biologicky aktivních látek získaných ve formě fermentačních produktů syrovátky do polymerní matrice.

1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

1.1 Biologicky aktivní látky

Biologicky aktivní látky (BAL) jsou látky přírodního nebo syntetického původu, které specificky působí na živé organismy. Jejich hlavním znakem je schopnost účinku již při nízkých koncentracích [8]. Předpokládá se pozitivní účinek BAL v podobě jak přímého působení (např. látky mající pozitivní vliv na metabolismus člověka) [9, 10], tak nepřímého působení (např. látky s bakteriocidním účinkem pro ochranu před patogenními mikroorganismy) [11].

Biologicky aktivní látky lze dělit podle jejich aplikace do několika skupin. Nejčastěji nachází uplatnění v následujících odvětvích:

- a) potravinářský průmysl (konzervační činidla, nutriční doplňkové látky, látky upravující organoleptické vlastnosti) [9-13];
- b) zemědělství (hnojiva, pesticidy) [14, 15];
- c) zdravotnictví (léčiva) [16-19].

V současnosti se do popředí zájmů dostávají BAL přírodního původu, které vznikají primárně v rostlinných, ale i živočišných organismech. Proto se tato práce dále zabývá antimikrobiálními BAL, které se vyskytují v přírodních zdrojích.

BAL se mohou v přírodě vyskytovat také jako sekundární metabolity rostlin, mikroorganismů či živočichů. Jejich účinky jsou široké, avšak za zmínku stojí jejich efekt antimikrobiální, antioxidační či analgetický. Nicméně nevýhodou takových BAL je problém s jejich čistotou a nutností standardizace. V mnoha případech se lze setkat s nekompatibilitou se zpracovatelskými technikami v průmyslu. Především se jedná o nízkou tepelnou stabilitu. Druhou skupinou přírodních biologicky aktivních látek jsou minerální látky, především stopové prvky, které lze většinou bez problémů v průmyslu zpracovat, aniž by byla nějak ovlivněna jejich účinnost. Mezi anorganické BAL patří i látky používané pro hnojiva a sloučeniny vápníků (především fosforečnany), které nachází svá uplatnění v medicíně [14, 20].

1.2 BAL z odpadů

V potravinářském průmyslu a zemědělství jsou významným artiklem pro získávání BAL zbytkové materiály zůstávající po primární produkci, které se

mnohdy stávají nezhodnocenými odpady. Z rostlinných výrob to mohou být např. zbytky částí rostlin, z živočišných se jedná především o využití vedlejších produktů z mlékárenské produkce.

BAL z odpadů rostlinného původu

Sloučeniny s antimikrobiálními a často mnoha dalšími biologickými účinky se syntetizují a akumulují v rostlinných pletivech, jakožto reakce na vnější podnět. Odtud se dále obecně získávají extrakcí [21]. Antimikrobiální aktivitu v potravinářsky významných rostlinách vykazují chemicky rozdílné látky. Hlavními skupinami jsou fenolové sloučeniny, terpenoidní látky, deriváty acetyleny, dusíkaté heterocyklické sloučeniny a mnohé další. Antimikrobiální účinek mají také některé sloučeniny řazené mezi aromatické látky (např. jednoduché fenoly, které jsou složkami silic, kouřová aromata používaná k uzení potravin) [22]. Příklady BAL z produkce rostlinného původu, odkud je lze získat a jejich možná aplikace je uvedena v tabulce 1.

Tabulka 1: Výčet základních skupin BAL z rostlinné produkce

| Skupina látek | Původ | Aplikace | Zdroj |
|-----------------------------|---|---|------------------|
| Alkaloidy | Semena, listy, kůra a kořeny rostlin | Léčiva | [18, 22] |
| Flavonoidy | Lipový květ, nať pohanky, květ černého bezu, hloh | Léčiva | [23, 24] |
| Glykosidy | Semena hořčice, listy šafránu, stévie | Léčiva, Sladidlo | [16, 19, 25, 26] |
| Fenolické sloučeniny | Pivovarnická produkce | Antioxidační a antimikrobiální aplikace | [27] |
| Terpenové uhlovodíky | Nadzemní části bylin | Léčiva, aromata, antimikrobiální obalový materiál | [28-30] |

BAL z odpadů živočišného původu

Odpady z živočišné produkce, jako jsou kosti, srst či kůže, nejsou příliš rozšířeným materiálem pro získávání antimikrobiálně působících BAL. Výjimku takových BAL z odpadů živočišného původu tvoří mlékárenský průmysl s významnou nadprodukcí syrovátky. Tato práce se dále zabývá BAL, které lze získat dalším zpracováním syrovátky – odpadu po výrobě sýrů, tvarohů či kaseinů.

1.3 Syrovátka jako zdroj BAL

Syrovátka je žlutozelená kapalina vznikající jako vedlejší produkt, který zůstává po vysrážení mléka při výrobě sýrů, včetně tvarohů a kaseinů [31-33].

Syrovátka obsahuje mimo řady hodnotných proteinů také laktózu, lipidy, vitamíny (zeleno-nažloutlé zbarvení je způsobeno přítomností riboflavinu) a minerální látky (především NaCl, KCl a vápenaté soli) pocházející z mléka, avšak přesné složení závisí na metodách výroby a čištění. Rozdíly mezi zastoupením látek sladké a kyselé syrovátky jsou zřejmé z tabulky 2. Typické složení syrovátky je uvedeno v tabulce 3 [34, 35].

Tabulka 2: Typické chemické složení sladké a kyselé syrovátky (uvedeno v g/l syrovátky) [37, 38]

| Syrovátka | Proteiny | Laktóza | Minerální látky |
|-----------|----------|---------|-----------------|
| Sladká | 6–10 | 46–52 | 2,5–4,7 |
| Kyselá | 6–8 | 44–46 | 4,3–7,2 |

Tabulka 3: Procentuální zastoupení látek v syrovátce [39, 40]

| Složka | Koncentrace [%] |
|---|-----------------|
| Voda | 93–94 |
| Proteiny | 0,9 |
| Laktóza | 4,7 |
| Vitamíny (B, C, E) a minerální látky (Ca, Fe, K, P, Mg, Zn) | 0,6 |
| Kyselina mléčná, kyselina citronová, rozvětvené řetězce aminokyselin a lipidy | 0,3 |

I přes významnou nutriční hodnotu syrovátky je zde problém její nadprodukce. V roce 2012 se jen v Evropské unii vyprodukovalo zhruba 83 mil. tun [36]. Z původně hodnotné suroviny se tak stává potenciální hrozba pro životní prostředí, která se promítá i do zvýšených ekonomických nákladů jejich producentů.

Z mnoha studií vyplývá, že zmiňované proteiny obsažené v syrovátce vykazují biologickou aktivitu. Především díky obsahu těchto významných látek a vysoké produkci se hledají nová uplatnění syrovátky včetně těch s přidanou hodnotou. Mimo potravinářství lze nacházet uplatnění také ve zdravotnictví,

farmaceutickém a kosmetickém průmyslu [34, 35]. Pro vysoký obsah vody má syrovátka omezenou trvanlivost, proto se ve velké míře zpracovává na zahuštěný syrovátkový koncentrát a sušenou syrovátku. Uvedené výrobky se kromě použití při výrobě krmiv využívají v potravinářském i farmaceutickém průmyslu, jako aditiva v pekárenství a při výrobě dietických výrobků. Ze syrovátky se izolují bílkoviny albumin, globulin a rozkladné produkty kaseinu. Těžištěm průmyslového zpracování syrovátky je pak získávání laktózy, která se využívá ve výrobě dětské výživy, galaktózy a laktulózy, v cukrovarnickém průmyslu, či jako plnivo do tablet. V posledních několika letech značně vzrostla poptávka po syrovátce, ať už jako surovině pro potravinové doplňky obohacené proteiny anebo prekurzoru pro výrobu bioplynu. Z ekonomického i ekologického hlediska je tedy zřejmé, že syrovátku nelze pouze přímo vypouštět do odpadních vod bez adekvátního zužitkování, jakým může být např. její fermentace [33, 41-43].

Syrovátkové proteiny

Syrovátkové proteiny jsou globulární molekuly, které zůstávají v séru mléka po vysrážení kaseinu. Tvoří zhruba 17–20 % z celkových proteinů kravského mléka (tabulka 4) a obsahují pět hlavních proteinových frakcí, u kterých je dokázána biologická aktivita:

a) β -laktoglobulin (β -Lg) – I když je převažujícím proteinem syrovátky (tvoří 57 % proteinů syrovátky; molární hmotnost 18,3 kDa), není nejvíce biologicky aktivním proteinem ve srovnání s dalšími menšími proteiny, jakými jsou imunoglobuliny a laktoferin. Nicméně β -Lg je bohatým zdrojem esenciálních aminokyselin. Kromě toho má potenciál modulovat lymfatické odpovědi, tedy hraje důležitou roli v obranných imunitních funkcích těla proti infekcím a šíření nádorů.

b) α -laktalbumin (α -La) – Druhý nejvíce převládající protein syrovátky (19 % ze všech syrovátkových proteinů; molární hmotnost 14 kDa) je bohatým zdrojem tryptofanu. Bylo prokázáno, že zlepšuje kvalitu spánku a kognitivní výkon při stresu prostřednictvím tvorby neurotransmiteru serotoninu. α -La může také usnadnit vstřebávání minerálů a vyvíjet antibakteriální a imunomodulační účinky. Klinické studie prokázaly při jeho užívání významné snížení deprese a zlepšení vizuální paměti. α -La je bohatý na esenciální a semiesenciální aminokyseliny a je dominantní protein mateřského mléka. Vysoký obsah cysteinu posiluje imunitní systém a podporuje hojení ran.

c) glykomakropeptid (GMP) – Jedná se o hydrofilní peptid κ -kaseinu, který se uvolňuje ze syrovátky při výrobě sýrů působením chymozinu. GMP tvoří asi

15 % z proteinů syrovátky. GMP má několik zajímavých technicko-funkčních vlastností, jako je široký rozsah pH rozpustnosti, emulgační vlastnosti, pěnicí schopnosti, které jsou prokazatelně slibné pro použití v potravinářském průmyslu a výživě, dále hraje roli při detekci syrovátky při falšování mléka a mléčných výrobků. Rovněž je unikátní tím, že neobsahuje fenylalanin, tryptofan a tyrosin, ale naopak má vysoký obsah větvených aminokyselin, včetně leucinu, isoleucinu a valinu.

d) proteozo-peptony – Jedná se o tepelně stabilní proteinové frakce rozpustné v kyselinách. Jejich podíl v kravském mléce představuje přibližně 10 % z celkových syrovátkových proteinů.

e) imunoglobuliny – Imunoglobuliny podporují aktivitu imunitního systému a předpokládá se, že také podporují zdravé a efektivní funkce střev [37, 39, 44-48].

Tabulka 4: Průměrné složení biologicky aktivních látek syrovátky [37, 45, 49, 50]

| Složka syrovátky | Koncentrace [mg/l] |
|---------------------------|---------------------------|
| β-Laktoglobulin | 3,2 |
| α-Laktalbumin | 1,2 |
| Glykomakropeptid | 1,2 |
| Proteozo-peptonová frakce | 1,1 |
| Imunoglobulin G | 0,7 |
| Bovinní sérum albumin | 0,4 |
| Laktoferin | 0,06 |
| Imunoglobulin A | 0,04 |
| Imunoglobulin M | 0,04 |
| Laktoperoxidáza | 0,03 |
| Lysozym | 0,0004 |

Mezi další méně zastoupené, avšak neméně významné složky syrovátky patří boviní sérum albumin, laktoferin, laktoperoxidáza a jiné neproteinové frakce, jako je laktóza, minerální látky, vitamíny a stopové množství mléčného tuku. Hlavními komponenty kaseinu v mléce jsou α-kasein (α-S1 a α-S2), β-kasein a κ-kasein. Hlavní proteiny syrovátky, α-LA a β-Lg, se zdají být zodpovědné za funkční vlastnosti syrovátky, jako je pěnění a tvorba gelu [39, 51].

Syrovátkové proteiny mají mnoho výhod vzhledem ke své vysoké nutriční hodnotě a tedy jejich možných aplikací v potravinářských výrobcích. Nevýhodou syrovátkových proteinů je jejich nestabilita při tepelném zpracování nad 50 °C [51, 52].

Formy syrovátkových proteinů

V závislosti na požadovaném použití a účinku, syrovátka může být použita ve formě čerstvé, pasterované tekuté, nebo ve formě kondenzovaných produktů (syrovátkový proteinový koncentrát – WPC, syrovátkový proteinový izolát – WPI, nízkolaktózová syrovátka, hydrolyzované syrovátkové bílkoviny a demineralizovaná syrovátka). Kondenzované formy zachovávají žádoucí složky, jako je obsah bílkovin, a obsahují snížené množství zbytkových složek, jako jsou laktóza a tuk [39].

WPC a WPI jsou vyráběny ze syrovátky pomocí ultrafiltrace, sušením, rozprašováním a odpařováním [53]. WPC se skládá z přibližně 34–85 % bílkovin a malého množství laktózy, lipidů a minerálních látek. WPI se skládá z 90 % proteinů a malého nebo žádného množství laktózy [39, 43, 54].

1.4 Antimikrobiální látky mající původ v syrovátce

V posledních letech jsou si spotřebitelé vědomi zdravotních problémů týkajících se potravinářských přídatných látek a zdravotních přínosů „přírozených“ a „tradičních“ potravin zpracovaných bez přídavku chemických konzervačních činidel. Jednou z alternativ ke splnění tohoto požadavku jsou bakteriociny, které jsou antimikrobiální peptidy produkované spektrem specifických bakterií. Někdy působí proti určité skupině konkurenčních organismů, jindy jejich široké spektrum aktivity působí jako obecnější obranný mechanismus [55, 56]. Druhou alternativou se jeví jednoduché organické kyseliny.

Bakteriociny

Bakteriocin je definován jako látka bílkovinného charakteru, která má baktericidní účinky proti limitované skupině organismů. Bakteriociny se v potravinách běžně vyskytují díky jejich produkci bakteriemi mléčného kvašení, například fermentací mléčných produktů [4, 57, 58]. Drider et al. [59] rozdělil bakteriociny do tří hlavních skupin podle jejich genetické a biochemické charakteristiky:

a) třída I – lantibiotika (zastoupená nisinem) shromažďuje tepelně stálé peptidy s velmi nízkou molární hmotností (< 5 kDa). Tyto bakteriociny jsou charakterizovány přítomností lanthioninu.

b) třída II se skládá z malých termostabilních peptidů (< 10 kDa) a je dále rozdělena do tří podtříd: IIa (pediocin a enterocin), IIb (lactocin G) a IIc (lactocin B).

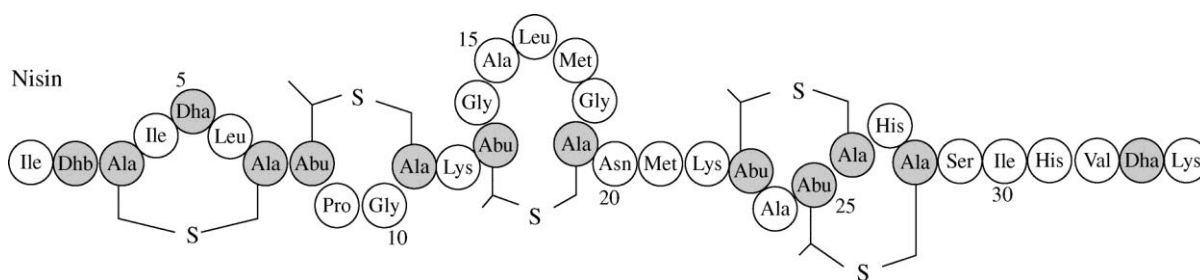
c) třída III je reprezentována termolabilními peptidy s vysokou molární hmotností (> 30 kDa), jako je helveticin J [55, 60].

Bakteriociny ze syrovátky

V syrovátce se přirozeně vyskytují bakteriociny, které do ní přechází z mléka při výrobě sýrů, tvarohů či kaseinů. Významným zástupcem je globulární glykoprotein laktoferin s molární hmotností 80 kDa nebo jemu podobný transferin. Prostřednictvím proteolytického štěpení laktoferinu mohou vznikat peptidy, u kterých byly zjištěny baktericidní účinky především proti grampozitivním bakteriím. Jedná se především o laktofericin B, který vykazuje antimikrobiální aktivitu proti zástupcům grampozitivních i gramnegativních bakterií. Dále se jedná o laktofericin C a laktofericin M, u kterých byl zjištěn vliv i na *E. coli* [51]. Dalším významným zástupcem je laktoperoxidáza, která se v syrovátce vyskytuje v koncentraci až 0,03 mg/l [37].

Bakteriocin z fermentačních produktů syrovátky – nisin

Nisin (obr. 1) objevený v roce 1928 je antimikrobiální peptid nejčastěji testovaný ve filmech buď jako jediná antimikrobiální látka [52, 61-64] nebo ve spojení s jinými antimikrobiálními biologicky aktivními látkami [65-69]. Jedná se o ve vodě rozpustný polycyklický antimikrobiální peptid produkovaný především bakterií *Lactococcus lactis subsp. lactis* a působí proti grampozitivním mikroorganismům. Je tvořen v pěti přírodních variantách: A, Z, Q, F (produkovány *L. lactis*) a U (produkovaný *Streptococcus uberis*). Tyto varianty se od sebe liší změnou několika aminokyselin v základní struktuře řetězce [56, 70-74].



Obr. 1: Struktura nisinu A (Dha – dehydroalanin; Dhb – dehydrobutyrin; S – thioéterový můstek) [75]

Nisin je jedním z prvních popsanych bakteriocinů a v roce 1968 byl uznaný za bezpečný biologický konzervační činitel potravin Organizací pro výživu

a zemědělství FAO (Food and Agriculture Organization) a Světovou zdravotnickou organizací WHO (World Health Organization). O dvacet let později byl Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv FDA (Food and Drug Administration) označen za „generally recognized as safe – GRAS“ (všeobecně považován za bezpečný) [4, 57, 58, 76].

Důvodem rostoucího zájmu o nisin, jakožto antimikrobiálního činidla ve filmech, je jeho relativně ustálený regulační status potravinářské přídatné látky. Avšak cíl inhibovat nežádoucí mikroorganismy v potravinách k tomuto pravděpodobně také přispívá [77].

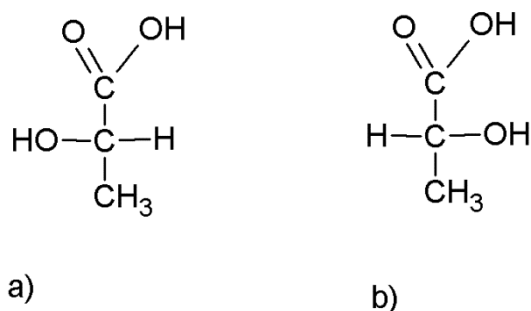
Vyhláška č. 235/2010 Sb. povoluje použití nisinu do potravin jako přídatnou látku pod označením E 234 [78]. Komerčně je využíván při výrobě sýrů. Navzdory velkému počtu experimentálních studií použití nisinu v obalovém materiálu existuje jen malé komerční využití v této oblasti. Je to z důvodu ztráty jeho aktivity při běžné zpracovatelské technologii polymerů a vysoké ceně [4].

Obecně se nisin vyrábí pomocí fermentace média (např. mléka nebo syrovátky) pomocí bakteriálních kmenů (např. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*). Získaná fermentační půda se potom zahustí a oddělí, suší rozprašováním a mele za vzniku malých částic. Konečný produkt obecně obsahuje převahu pevných látek sestávajících z mléčných bílkovin a soli: 74,4 % NaCl, 23,8 % sacharidy, 2,5 % nisinu a 1,7 % vlhkosti [56, 79]. Proto testované antimikrobiální povlaky mohou uvolňovat mimo nisinu i další zmíněné látky, avšak jejich případný vliv na inhibici mikroorganismů nebyl studován a předpokládá se, že je jen zcela minimální či žádný. Nisin může být vmíchán do obalového polymeru anebo být aplikován ve formě prášku či povlaku na povrch. V Evropě je široce používán, a přestože má schválení FDA jako přídatná látka pro přímé použití do potravin, není v USA ve velké míře používán. Pro lepší antimikrobiální účinnost nisinu je potřeba jeho mísení s dalšími látkami. Výzkumy jsou nuceny se pohybovat ve směru vysoce účinných kombinací antimikrobiálních látek a jejich cenové efektivnosti. Pokud se antimikrobiálním filmům nepodaří odstranit vysoký počet nežádoucích mikroorganismů, musí působit další, post-zpracovatelská bezpečnostní opatření [80].

Kyselina mléčná

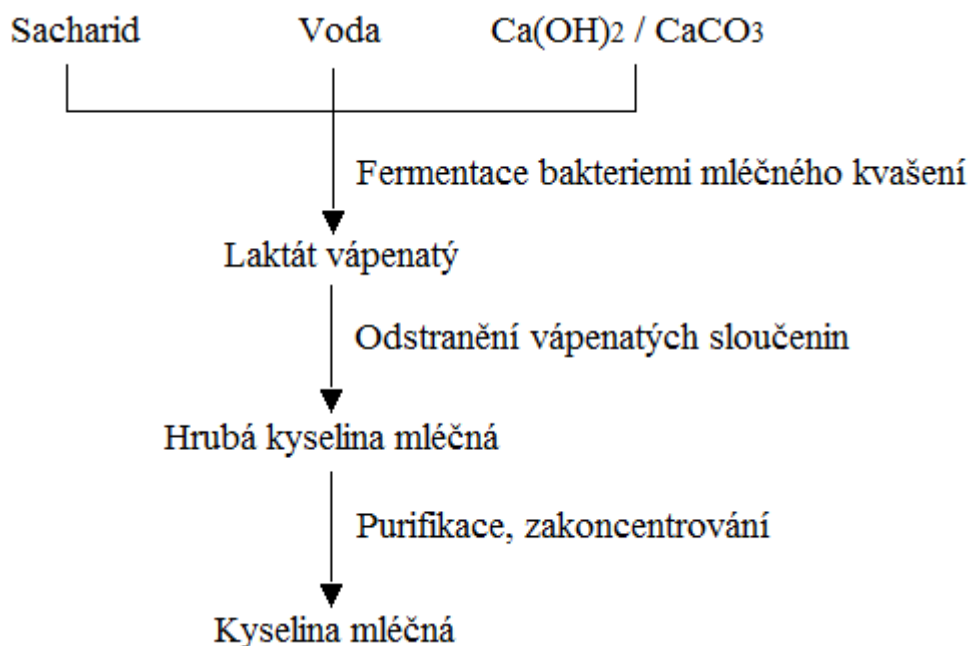
Kyselina mléčná (2-hydroxypropanová kyselina) je bezbarvá nebo nažloutlá kapalina téměř bez zápachu s kyselou chutí. Sestává ze směsi kyseliny mléčné ($C_3H_6O_3$) a jejího laktonu ($C_6H_{10}O_5$). Kyselina mléčná je hygroskopická a při koncentrování varem kondenzuje a tvoří lakton kyseliny mléčné, který zředěním a zahřátím hydrolyzuje zpět na kyselinu mléčnou [81, 82].

Kyselina mléčná hraje významnou roli v mnoha biochemických procesech. Je to nejjednodušší hydroxylová kyselina s jedním asymetrickým uhlíkem, proto vytváří dva optické isomery D a L (obr. 2). Kyselina mléčná vzniká fermentací sacharidů bakteriemi mléčného kvašení. Některé kmeny bakterií (např. *Lactobacillus amylophilus*, *L. bavaricus* a *L. casei*) přednostně produkují L-isomery, naopak např. *L. delbrueckii* a *L. acidophilus* produkují D-isomer anebo jejich směs [38, 82-84].



Obr. 2: a) L-, b) D-stereoisomery kyseliny mléčné [83]

Kyselina mléčná byla objevena v roce 1780 v kyselém mléce a v roce 1881 byla získána pomocí procesu fermentace, což mělo za následek možnost jejího průmyslového využití. Kyselina mléčná je vyráběna v průmyslovém měřítku od konce devatenáctého století. Roční světová produkce v roce 2012 dosáhla kolem 259 tis. tun [85]. Může být připravena chemickou syntézou nebo fermentací mimo jiné syrovátkových sacharidů; okolo 90 % světové produkce je vedena druhým způsobem [81, 83]. Podmínky pro fermentaci jsou různé pro každou průmyslovou metodu, ale jsou obvykle v rozmezí od 45–60 °C a pH 5,0–6,5 pro *Lactobacillus delbrueckii* a 43 °C s pH 6,0–7,0 pro *Lactobacillus bulgaricus*. Syntetizovaná kyselina se neutralizuje hydroxidem vápenatým nebo uhličitánem vápenatým. Fermentace trvá za optimálních laboratorních podmínek 1 až 2 dny. Výtěžek kyseliny mléčné po fázi fermentace je 90–95 hm. % (vztaženo na počáteční koncentraci sacharidů). Rychlost fermentace závisí především na parametrech jako je pH, teplota, počáteční koncentrace substrátu a koncentrace dusíkatých živin. Běžný postup pro fermentační výrobu kyseliny mléčné zahrnuje purifikační kroky, které jsou nezbytné pro dosažení čisté kyseliny mléčné. Alternativy k tomuto průmyslovému postupu jsou studovány. Byly provedeny četné studie na čištění kyseliny mléčné pomocí několika různých technik separace zahrnujících iontovou výměnu, extrakce, membránové technologie, destilace či elektrodialýzu. Schematicky je tento proces výroby znázorněn na obrázku 3 [86, 87].



Obr. 3: Schematické znázornění průmyslové výroby kyseliny mléčné [86]

Kyselina mléčná je především používána v potravinářském průmyslu pod označením E 270 jakožto např. regulátor kyselosti. Hraje úlohu při výrobě jogurtů a sýrů. Při přípravě jogurtů je hlavním produktem kofermentace *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus bulgaricus*. V závislosti na požadovaných sensorických vlastnostech konečného produktu se využívá přímé okyselení kyselinou mléčnou, aby se zabránilo nebezpečí šíření nežádoucích mikroorganismů [85]. Pokud jde o výživu zvířat, řízená mléčná fermentace zvyšuje trvanlivost, chutnost a nutriční hodnotu siláže. Laktát amonný je vynikající neproteinový zdroj dusíku.

V kosmetickém průmyslu se používá při výrobě hygienických a estetických produktů, vzhledem k její hydrataci, antimikrobiálnímu a omlazujícímu účinkům na kůži. Ve farmaceutickém průmyslu se používá jako doplněk při syntéze dermatologických léčiv a proti osteoporóze [85].

Kyselina mléčná je také důležitým prekurzorem pro syntézu polylaktidu – biologicky rozložitelného polyesteru, který je využíván jednak pro výrobu kompostovatelných obalů, ale i vysoce komplexních výrobků s využitím ve zdravotnictví a farmaceutickém průmyslu [83, 85, 88, 89].

1.5 Polymery a jejich uplatnění v potravinářském průmyslu

Obecně se termínu polymer používá pro makromolekulární látky, které jsou charakterizovány specifickými vlastnostmi, příslušejícími molekulám s dlouhou řetězcovou strukturou. Prekurzory polymerů jsou monomery. Výrobky připravené z polymerů se nachází převážně v tuhém stavu, ale v určitém stádiu zpracování ve stavu kapalném, což umožňuje udělit budoucímu výrobku finální tvar [80, 90]. Podle původu lze polymery obecně rozdělit do dvou skupin, a to na přírodní a syntetické.

Přírodní polymery

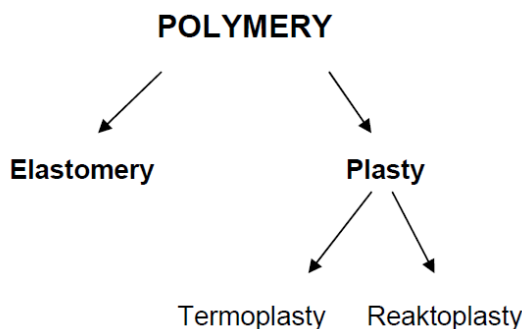
Přírodní polymery jsou produkovány přirozenými procesy, jedná se tedy o organický materiál v převážné míře tvořící hmotu organismu [91]. Podle chemického složení je lze rozdělit do tří základních skupin:

- a) polysacharidy, které jsou tvořeny monosacharidovými jednotkami spojenými glykosidickou vazbou mezi hemiacetalem a hydroxylovou skupinou (např. celulóza, škrob, glykogen, pektin, chitin);
- b) proteiny, které se skládají z aminokyselin spojených peptidovou vazbou mezi aminovou a karboxylovou skupinou (např. kolagen, myozin, hedvábí, vlna, apoenzymy, hormony);
- c) mikrobiální polyestery, které jsou makromolekulárními látkami produkovány za určitých okolností mikroorganismy jako zásobní látky (např. polyhydroxyalkanoáty) [91].

Dnes mohou být v potravinářském průmyslu používány přírodní polymery na bázi proteinů získaných ze sóje a kukuřice, želatina vyráběná z kolagenu, kasein a syrovátkové proteiny z kravského mléka. Želatina se dnes nejvíce používá pro enkapsulaci léků, ale i pro nejrůznější biomedicínské aplikace [2, 83]. Aplikace syrovátkového proteinu jsou možné ve formě mikroenkapsulace tuků, jedlých povlaků, např. pro pražené burské oříšky, mražená kuřata a ryby či nosiče antioxidantů při zpracování lososů. Běžně se také pro balení potravin používají regenerovaná celulóza nebo acetát celulózy [31]. Doposud však tyto biomateriály nebyly schopny zcela nahradit syntetické polymery [80]. Na rozdíl od syntetických polymerů jsou biopolymery, jako je škrob, celulóza, proteiny, chitosan, navíc šetrné k životnímu prostředí a biologicky odbouratelné.

Syntetické polymery

Hlavní surovinou pro chemickou syntézu těchto polymerů je v současné době ropa [31]. Tato skupina polymerů se rozděluje do dvou základních skupin na elastomery a plasty. Plasty se dále dělí na podskupinu termoplastů a reaktoplastů (obrázek 4).



Obr. 4: Rozdělení syntetických polymerů

Elastomery jsou vysoce elastické polymery, které se dají za běžných podmínek vratně deformovat (např. kaučuky, prekurzory pryží). Naproti tomu plasty, které jsou za běžných podmínek tuhé, tvrdé a často také křehké, lze za zvýšené teploty tvarovat vratně – termoplasty (např. polyolefiny, polyestery, polyamidy) nebo nevratně – reaktoplasty (např. fenoplasty, epoxidové pryskyřice) [31]. Mohou být tedy tvářeny do jakéhokoliv tvaru, mají nízkou hustotu a nízký koeficient tření.

Syntetické polymery lze připravit třemi základními chemickými reakcemi:

- a) polymerací – řetězová chemická reakce velkého počtu monomerů, při níž nedochází k vytváření vedlejšího produktu;
- b) polykondenzací – reakce, při níž vzniká ze dvou nízkomolekulárních látek polymer a jiná nízkomolekulární látka – nejčastěji voda;
- c) polyadící – reakce mezi molekulami s násobnými vazbami nebo kruhovými molekulami a sloučeninami s vhodnými funkčními skupinami [31].

Syntetické polymerní materiály jsou dnes nejběžněji používanými materiály pro obaly v potravinářském průmyslu, přičemž nejvíce jsou zde zastoupeny polyolefiny (polyetylen, polypropylen), polyestery (polyetylentereftalát), polyamidy (polyamid 6 a 66). V menší míře pak polykarbonáty a polyuretany [4].

Polymery jsou zřídka použity samostatně v jejich surové formě. Jsou do nich začleňovány přísady pro zlepšení vzhledu, mechanických vlastností a tím změněny vlastnosti podle jejich konečného užití [80]. S možnostmi použití přídatných látek pro žádoucí zlepšení vlastností polymerů se otevřely předpoklady pro nové a inovativní způsoby přípravy nových polymerních materiálů. Některé přísady poskytují lepší zpracování a optimalizaci výrobních postupů, zatímco jiné umožňují vytvořit polymery s přidanou hodnotou. Syntetické polymery jsou snadno získatelné a mají obvykle nízké produkční náklady. Za účelem zvýšení užitečnosti těchto polymerů je v posledních letech trend přidavku aktivní látky pro zvýšení mikrobiální bezpečnosti a jakosti potravin [92].

Vodorozpustné polymery

Ve vodě rozpustné polymery, které vykonávají různé užitečné funkce, jako je zahušťování, vytváření gelů apod., se používají pro celou řadu aplikací, včetně zpracování potravin, při úpravě vody, papíru, zušlechtnění olejů a využití zemního plynu, v čisticích prostředcích a výrobcích pro osobní péči, léčivech, nátěrových hmotách i při těžbě ropy [93].

Ve vodě rozpustné polymery mohou být rozděleny do následujících tří skupin:

- a) syntetické, které se vyrábějí polymerací monomerů syntetizovaných z ropy nebo zemního plynu;
- b) polosyntetické, které se vyrábí chemickou derivatizací přírodních organických materiálů (např. celulóza);
- c) přírodní zahrnující mikrobiální metabolity a materiály živočišného původu [93].

60 % ve vodě rozpustných polymerů používaných v roce 2013 byly syntetického původu, 25 % byly přírodní, a 15 % bylo polosyntetických [93].

Tato práce se dále zabývá hydrofilními polymerními maticemi, které mají potenciální uplatnění v potravinářském průmyslu. Polyvinylalkohol se jeví jako vhodná a perspektivní polymerní matrice pro takové aplikace.

Polyvinylalkohol

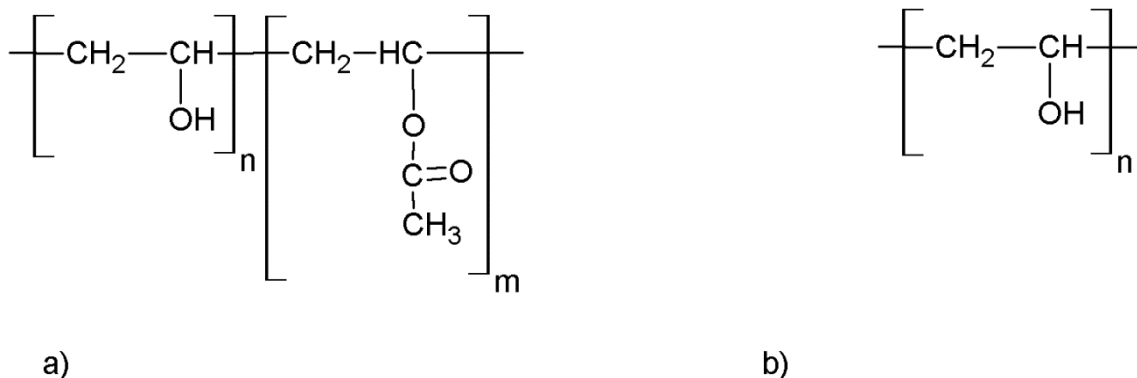
V posledních letech četná průmyslová odvětví hledají možnosti snižování své závislosti na látkách na bázi ropy, mimo jiné i z důvodu zvyšujícího se zájmu o ochranu životní prostředí. To vede ke zkoumání nových materiálů, šetrnějších

k životnímu prostředí a jejich používání namísto konvenčních, těžce odbouratelných polymerů. Obrovský nárůst výroby a použití syntetických polymerů v našem životě má za následek generování velkého objemu plastových odpadů. Díky problémům s jejich likvidací, jakož i přísnější legislativní předpisy, řídí se velká část vědeckých výzkumů směrem k eko-kompozitním materiálům. Ve snaze vyřešit problémy způsobené plastovými odpady je vynaloženo mnoho úsilí získat materiály šetrné k životnímu prostředí. Mnozí vědci pracují na substituci plastů z ropy za biodegradovatelné materiály s podobnými vlastnostmi a nízkými produkčními náklady [94].

Některé syntetické polymery z neobnovitelných zdrojů, jako je například polyvinylalkohol (PVOH), jsou také biologicky odbouratelné. Proto před nedávnem začal přitahovat PVOH velkou pozornost díky své vynikající flexibilitě, transparentnosti, houževnatosti a relativně nízké ceně, a to zejména v době vysokých cen ropy [94, 95].

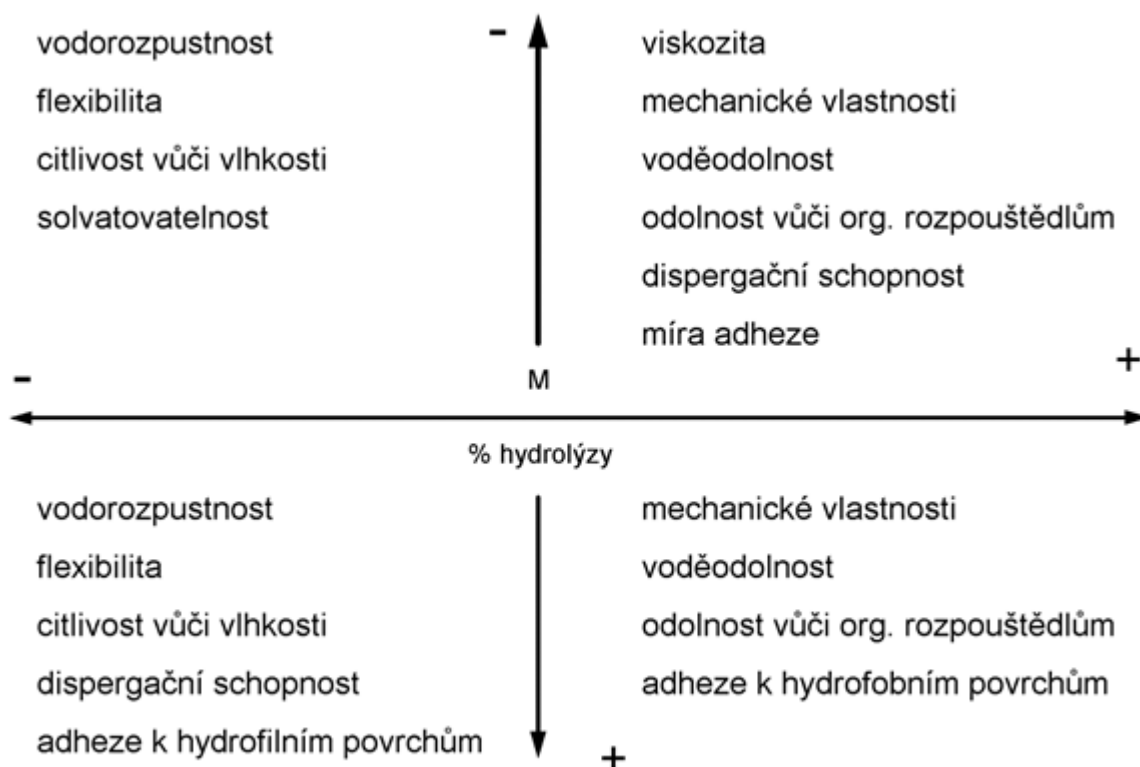
Podle Směrnice Komise EU 2010/67/EU je PVOH pod označením E 1203 definován jako syntetická pryskyřice připravená polymerací vinylacetátu, po níž následuje částečná hydrolýza vzniklého esteru v přítomnosti alkalického katalyzátoru [96].

PVOH je hydrofilní polymer s vynikajícími filmotvornými, emulgačními a adhezními vlastnostmi. To také dodává dobrou pevnost v tahu a biologickou rozložitelnost vzniklým kompozitům. PVOH byl také schválen pro použití jakožto obalový materiál masa a drůbežích produktů podle USDA – United States Department of Agriculture (Americké ministerstvo zemědělství). PVOH se jeví velmi přijatelným syntetickým polymerem, protože je vysoce polární a kontrolovatelně rozpustný ve vodě a vodných roztocích. Mimo to je také biokompatibilní a krystalický polymer s vysokou pevností v tahu, mající vynikající bariérové vlastnosti pro plyny. Jedná se o polymer s jednoduchými C-C hlavními řetězci a polárními postranními –OH a –OCOCH₃ skupinami (obr. 5) [1-3, 94]. Z hlediska mechanických vlastností je pevnost v tahu 35–50 MPa a dá se několikanásobným dloužením zvýšit ve směru orientace až na 400 MPa [97]. Bezvodý PVOH netaje a do 140 °C celkem nemění své vlastnosti. Při vyšší teplotě měkne a při teplotách nad 200 °C se rozkládá a uhelnatí. Teplota skelného přechodu pro částečně hydrolyzovaný PVOH je kolem 60 °C a pro plně hydrolyzovaný cca 85 °C. Teplota tání částečně hydrolyzovaného PVOH je kolem 190 °C a se zvyšujícím se stupněm hydrolýzy roste až ke 230 °C. Teplota zpracování je 120–150 °C, je však nezbytné použití změkčovadel [97, 98].



Obr. 5: Chemická struktura a) částečně hydrolyzovaného, b) plně hydrolyzovaného polyvinylalkoholu [99]

PVOH nemůže být připraven přímou polymerací z monomeru vinylalkoholu (přechází ve stabilnější formu – acetaldehyd), proto je synteticky připravován radikálovou polymerizací vinylacetátu na polyvinylacetát a následně hydrolyzován na polyvinylalkohol [2, 91, 97, 99]. PVOH se získává ve formě bílého prášku. Podle stupně hydrolyzy lze získat produkty obsahující jen alkoholické skupiny. Při neúplné hydrolyze se však získají výrobky s různými fyzikálními vlastnostmi (viz obr. 6). PVOH má silné polární vazby a makromolekuly mezi sebou tvoří vodíkové můstky. Obsahují část hmoty v krystalickém stavu a jeho obsah se s rostoucím stupněm hydrolyzy zvyšuje [1, 2, 97].



Obr. 6: Závislost vlastností polyvinylalkoholu na stupni hydrolýzy a molekulové hmotnosti [99]

V amorfním stavu je díky postranním $-OH$ skupinám PVOH rozpustný ve vodě, fenolu a kyselinách. V organických rozpouštědlech není rozpustný. Rozpustnost ve vodě se dá redukovat nejčastěji působením formaldehydu nebo účinkem kyselin, kdy dochází k zesítnění éterovými můstky [1, 94, 97]. Při polymerním síťování dochází k vzájemnému propojení jednotlivých makromolekul dostatečně pevnými vazbami. Zesítněný polymer je nerozpustný, ve vhodném rozpouštědle dochází jen k jeho nabobtnání [91]. Avšak většina doposud používaných síťovacích činidel je nejen pro člověka toxických a tak je jejich potenciální využití pro materiály pro kontakt s potravinami či biomateriály limitováno. K překonání těchto nevýhod jsou zkoumány některé netoxické či méně toxické látky s vhodnými funkčními skupinami a jednoduché techniky modifikace PVOH pro zlepšení mechanických vlastností a odolnosti vůči vlhkosti výsledných polymerních fólií. Jednou ze zkoumaných skupin jsou karboxylové kyseliny. Vzhledem k jejich multi-karboxylové struktuře by se interakce mohly uskutečnit mezi karboxylovými skupinami kyseliny a hydroxylovými skupinami PVOH [94].

Je však obtížné vyrobit PVOH film zpracováním jeho taveniny, protože jeho hodnota teploty tání T_m je příliš blízko k jeho hodnotě teploty rozkladu T_d .

Navíc má PVOH špatnou odolnost proti vodě. Tyto nedostatky omezují jeho širší uplatnění, zejména v potravinářském průmyslu jako balicí fólie. Pro vyřešení těchto nedostatků byly zkoumány různé fyzikální nebo chemické modifikace PVOH, včetně míchání s jinými látkami. Tyto metody však nemají plně vyhovující výsledky. Například směsi PVOH s jinými polymery nebyly připraveny pomocí zpracování v tavenině. Způsoby přípravy PVOH filmů pomocí metody odlévání z těchto důvodů vytváří vhodnou alternativu konvenčním metodám zpracování polymerů [95]. Bylo provedeno několik výzkumů zabývajících se mísením PVOH s dalšími biopolymery, jako je například chitosan [92], škrob, celulóza [100] a želatina [101].

PVOH se používá především na výrobu vláken. Svým chováním připomíná želatinu, proto se běžně používá v potravinářském průmyslu pro výrobu želé a jako zahušťující složka a také se z něho vyrábí obalové fólie (čistá PVOH fólie je špatnou bariérou pro vodní páry, avšak výborně zabraňuje průchodu kyslíku a lipidů [102]). Vzhledem k tomu, že PVOH je netoxický (LD50 pro krysorálně 2000 mg/kg) a biokompatibilní, je tento polymer předmětem rozsáhlého výzkumu, především pro medicínské aplikace (enkapsulace, krytí ran, hydrogely, nové biokompatibilní polymerní matrice). Dále se používá při výrobě lepidel, oděvů, barev, farmaceutických produktů, stavebních materiálů a keramiky, k preparaci papíru [1, 95, 97, 98].

1.6 Aplikace polymerů v potravinářském průmyslu

Přírodní i syntetické polymery mají široké využití v potravinářském průmyslu. Příklady použití jak přírodních, tak syntetických polymerů jsou uvedeny v tabulce 5.

Z hlediska objemu zpracovávané suroviny patří do jedné z nejvýznamnějších aplikací použití polymerů pro obalové materiály. V současné době se používá několik typů materiálů pro balení potravinářských produktů. Avšak plasty jsou prozatím tou nejlepší volbou z několika důvodů. Jedná se především o jejich lehkost a nízkou výrobní cenu [80, 103]. Použití polymerů, jak přírodních, tak syntetických, je významně rozšířeno v oblasti obalové techniky potravinářského průmyslu a dochází k jejich neustálému vývoji a optimalizacím.

Tabulka 5: Příklady polymerů používaných v potravinářském průmyslu

| Typ polymeru | Původ | Aplikace |
|----------------------|--------------------------|--|
| Celulóza | Přírodní polysacharid | Zahušťující látka, ochranný nátěr, přísada do biorozložitelných obalů |
| Škrob | Přírodní polysacharid | Adhezivum, přísada do biorozložitelných obalů |
| Chitin | Přírodní polysacharid | Adhezivum, pojivo barviv |
| Kolagen | Přírodní protein | Obalový materiál |
| Polyhydroxyalkanoáty | Přírodní polyester | Biorozložitelné obaly |
| Polyamid | Syntetický | Obalový materiál, bariérová vrstva vícevrstevných obalů |
| Polylaktid | Syntetický | Biorozložitelný obal |
| Polyvinylpyrolidon | Syntetický | Zahušťující látka, absorbent |
| Polyolefiny | Syntetický | Obalový materiál |

Obal je důležitým ochranným faktorem v potravinářském průmyslu a dominují zde polymery získané z ropných produktů. V moderní době byl obalový materiál identifikován jako nedílná součást zpracovatelského postupu v potravinářském průmyslu. Obal obecně funguje jako bariéra mezi obsahem a vnější atmosférou a má primárně tři základní úkoly:

- a) ochranná funkce;
- b) podávat informace;
- c) umožnit či ulehčit přepravu [80].

Nicméně se podstatně zvýšilo množství výzkumů zahrnujících výrobu a charakterizaci biologicky odbouratelných filmů, a to především z důvodu zájmů minimalizovat ekologický dopad způsobený používáním konvenčních syntetických obalových materiálů. Některé biopolymery byly využity pro rozvoj výroby ekologického balení potravinářských surovin [80].

Významná část výzkumů takových filmů byla provedena výrobou s použitím obnovitelných zdrojů, tj. produktů nebo vedlejších produktů získaných ze zemědělství nebo ze zemědělsko-průmyslového odvětví. Takovým příkladem může být celulóza či extraktivní látky ze dřeva nebo látky získatelné z produktů po fermentaci syrovátky. Využití takových polymerů je různorodé: mulčovací fólie, materiály pro „zelenou“ výstavbu rodinných domů, obaly a pomůcky pro transport a přesazování rostlin a v neposlední řadě polymery s antimikrobiálními vlastnostmi, které zlepšují bezpečnost potravin a jejich trvanlivost [80, 104].

Hlavními technologiemi aktivních obalů, které již běžně existují a jsou zavedeny v běžném životě, jsou absorbéry kyslíku, regulátory vlhkosti, absorbéry etylenu, emitéry etanolu a oxidu uhličitého, ale také antimikrobiální systémy. Migrace látek z obalu do produktů, které způsobují změnu vůně, pachů nebo vznik jiných látek v potravině, může představovat riziko, pokud dojde k migraci za podmínek, které mohou působit regulační problémy. Další interakce, které by mohly mít vliv na jakost a/nebo bezpečnost výrobků, je sorpce komponent produktu do obalu. Některé z těchto interakcí mohou nakonec ovlivnit celkovou integritu obalu a tím celý produkt [80].

Antimikrobiální balení je jedním z nejslibnějších typů aktivního obalového systému. Již byla vyvinuta řada antimikrobiálních obalů použitých pro inhibici některých bakterií v potravinách, ale doposud existují překážky k jejich komerčnímu použití [94]. Je to způsobeno především jejich vysokou výrobní cenou a použitím antimikrobiálních aditiv, která nejsou vhodná pro kontakt s potravinou [80]. Také z těchto důvodů dochází k inovacím konvenčních obalů za vzniku aktivních obalů, které reagují na poptávku spotřebitelů po prodloužení trvanlivosti zpracovaných potravin a minimálním přidáním konzervačních látek do potravinářských výrobků. To souvisí také s přísnými předpisy pro aditivní látky, které mohou být u potravin použity.

Antimikrobiální obalové systémy

Jednou z výrazných inovací z pohledu přidané hodnoty a bezpečnosti balených potravin představují antimikrobiální obalové systémy. Jedná se o aktivní typ obalovin přinášející prodloužení životnosti, zvýšení bezpečnosti, kvality a senzorických vlastností balených potravin [105]. Vedle toho také probíhá vývoj tzv. inteligentního balení, které představuje pasivní přístup v bezpečnosti a kvalitě potravin [77, 106].

Současně, a na rozdíl od již vyřešeného snížení hmotnosti obalu díky použití polymerů namísto konvenčních materiálů, je také hlavní hnací silou ke zvýšení celkového zastoupení ekologických obalových materiálů v celém potravinovém řetězci vývoj nových ekologicky udržitelných, recyklovatelných a/nebo biologicky odbouratelných obalů [77, 106].

Ke kažení potravin dochází mimo jiné z důvodu přítomnosti bakterií, kvasinek a plísní, ale jen určité mikrobiální druhy obvykle napadají určitý typ potravin a to především na jejich povrchu [63, 64]. Aktivní obal je tedy odpovědí na poptávku spotřebitelů po potravinách neobsahujících konzervační činidla. Výrobci a dodavatelé materiálů zaměřili svá úsilí na rozvoj obalových systémů, které jsou více aktivní a agresivní při ochraně potravin proti

mikrobiální kontaminaci [104]. Aktivní antimikrobiální technologie balení potravin je založena na antimikrobiálních činidlech, která jsou:

- a) začleněna do polymerní struktury;
- b) imobilizována na povrchu.

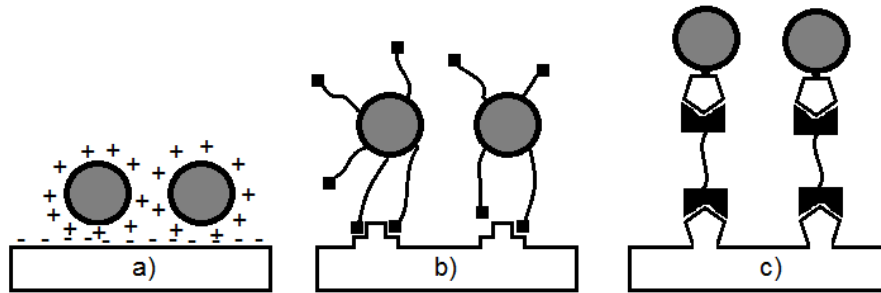
U obou typů se předpokládá, že regulují růst nežádoucích mikroorganismů. Mezi běžné mikroorganismy, které kontaminují potraviny a nápoje patří např. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*, *Clostridium perfringens* a *Bacillus cereus* [80].

Jeden z klíčových problémů technologie antimikrobiálních polymerních obalů spočívá v neřízeném uvolňování antimikrobiálního činidla z polymerního nosiče [77]. Uplatnění účinných látek je proto na území EU striktně kontrolováno a regulováno řadou nařízeních [107]. Také na území mimo EU existuje řada legislativních regulací. Příkladem může být organizace FDA ve Spojených státech, která upravuje použití antimikrobiálních látek vhodných pro začlenění do obalu pro potraviny. Podle úřadu FFDC (Federal Food, Drug and Cosmetic Act) organizace FDA zajišťuje, aby tyto antimikrobiální aplikace byly bezpečné s ohledem na jejich příjem konzumentem potravou [80].

1.7 Imobilizace BAL do polymeru

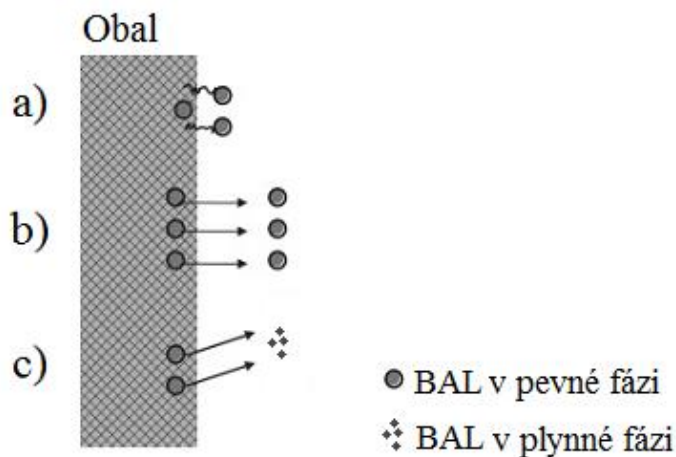
Imobilizace je metoda krátkodobého nebo dlouhodobého ukotvení fyzikálními nebo chemickými postupy. Tato metoda si získala velkou pozornost z hlediska zabudování biologicky aktivních látek pro dlouhodobé použití [108]. Imobilizace BAL do polymerních matic lze principiálně uskutečnit pomocí dvou metod, kdy se látky imobilizují buď na povrch, nebo do celého objemu systému [4, 57, 109].

Povrchová imobilizace BAL může být zprostředkována pomocí nanesení tenké vrstvy obsahující relevantní množství BAL (procesy koextruze, nátěry, máčení), anebo prostřednictvím vazebných či nevazebných interakcí znázorněných na obrázku 7. Hlavní způsoby imobilizace BAL jsou adsorpce na polymer prostřednictvím elektrostatických interakcí, ligand – receptor interakcí (jako je tomu v párování biotin – avidin) a připojení kovalentní vazbou (obr. 7). Nekovalentní adsorpce je někdy žádoucí, např. v některých aplikacích pro podávání léčiv. Interakce mezi ligandem a receptorem je atraktivní především v povrchových biokonjugacích. Nicméně kovalentní imobilizace nabízí několik výhod tím, že vznikají nejstabilnější vazby mezi sloučeninou a povrchem polymeru. V případě aktivních aplikací balení potravin kovalentní vazba zajišťuje, že biologicky aktivní sloučenina nebude migrovat nebo se bude uvolňovat postupně do potravin [110].



Obr. 7: Imobilizace BAL na polymerní povrch prostřednictvím
 a) elektrostatických interakcí, b) interakcí mezi ligandem a receptorem,
 c) kovaletních vazeb [110]

Polymerní systémy modifikované pomocí imobilizace BAL v celém objemu lze rozdělit na nemigrační bioaktivní systémy a migrační bioaktivní systémy, umožňující mnohdy i kontrolované uvolňování BAL do prostoru mezi obalem a produktem (obr. 8). U polymerního systému s nemigrující látkou je BAL ukotvena fyzikálně nebo pomocí jejich funkčních skupin nebo kovaletních vazeb. Běžnými BAL pro takovéto systémy jsou např. enzymy, peptidy, polysacharidy. Naproti tomu u polymerních systémů s BAL, která se řízeně uvolňuje do prostředí, se používá často biodegradovatelných polymerů pro dosažení postupného uvolňování [111].



Obr. 8: Schéma a) nemigračního bioaktivního systému; b) migračního bioaktivního systému s netěkovou BAL; c) migračního bioaktivního systému s těkovou BAL [111]

Kinetika uvolňování BAL z polymerních matric

Hnací silou uvolňování nízkomolekulárních BAL z polymerní matrice je koncentrační gradient. V tomto případě lze na proces difúze BAL aplikovat zákonitosti popsané tzv. Fickovými zákony [113].

Pro statický systém platí první Fickův zákon (1), který popisuje závislost mezi hustotou difúzního toku a gradientem koncentrace.

$$J = -D \frac{dc}{dx} \quad (1)$$

kde: J difúzní tok [mol/cm²s] představuje množství difundované BAL za jednotku času skrze plochu kolmou na směr proudění; c koncentrace BAL [mol/cm³]; x vzdálenost [cm] ve směru toku; dc/dx je vyjádření koncentračního gradientu (je roven 0, jestliže rychlost pohybu molekul oběma směry je stejná); D je mírou mobility BAL v polymerní matrici.

Jedná se o přestup hmoty, a tedy lze aplikovat bilanci difúzního toku skrze tenkou vrstvu polymerního filmu. Dosazením za J z 1. Fickova zákona s předpokladem, že D je konstantní, získáme 2. Fickův zákon (2), který popisuje podmínky za nestabilního stavu [113, 114]:

$$D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} = \frac{\partial c}{\partial t} \quad (2)$$

kde: D je mírou mobility BAL v polymerní matrici; c koncentrace BAL [mol/cm³]; x vzdálenost [cm] ve směru toku; t čas. V ustáleném stavu je $\partial c / \partial t = 0$ a proto nenastává akumulace BAL ve filmu.

Dosažení ustáleného stavu difúze BAL skrze polymerní film je otázkou hodin. To je obvykle zanedbatelné s životností balené potraviny, proto se spíše v praxi sleduje až stav po ustálení rovnováhy [113, 114].

Je-li tedy permeační rychlost za ustáleného stavu Q (3), pak

$$Q = \frac{\bar{P}}{L} \cdot A \cdot \Delta p \quad (3)$$

kde: L tloušťka vrstvy; \bar{P} permeabilita ($\bar{P} = D \cdot S$); D je mírou mobility BAL v polymerní matrici; S koeficient rozpustnosti; A plocha.

Rovnice pro výpočet Q pak popisuje rychlost permeace jako funkci, jak materiálovou, tak i proměnnou související s okolními podmínkami (teplotou, tlakem, vlhkostí) [113, 114].

V případě, že se materiál skládá z více vrstev, tak se při výpočtu permeability postupuje analogicky s Ohmovým zákonem – sériové zapojení rezistorů ($R_t = \sum R_i$), tedy:

$$\frac{L_t}{P_T} = \sum_{i=1}^n \frac{L_i}{P_i} \quad (4)$$

kde: L_T celková tloušťka; L_i tloušťka vrstvy i ; P_T celková permeabilita; P_i permeabilita vrstvy i (předpoklad konstantní plochy A).

V případě vodorozpustných polymerů souvisí proces vlastní imobilizace a následně kinetiky uvolňování BAL také s konfigurací a konformací polymerní matrice, kdy výraznou roli hraje přítomnost příčných vazeb, které jsou do systému zaváděny prostřednictvím síťovacích reakcí.

Síťování probíhá díky funkčním skupinám přítomným v polymeru. Síťování se běžně používá pro zlepšení mechanických a tepelných vlastností a snížení rozpustnosti polymeru, čímž se otevírají nové možnosti aplikací pro tento materiál [58, 112].

Síťování

Polymerní síť může vzniknout tehdy, pokud se vytvoří dostatečně velký počet intermolekulárních uzlů sítě. Tato spojení mohou mít charakter chemický či fyzikální. Pokud uzly sítě vznikají chemickou reakcí, označují se jako kovalentně síťované systémy. V případě vzniku uzlů prostřednictvím mezimolekulových interakcí, které nejsou spojeny se vznikem chemických vazeb, se mluví o fyzikálně síťovaných systémech. Existují čtyři mechanismy výstavby takových systémů.

- a) polyadice nebo polykondenzační reakce nízkomolekulárních látek – dochází k vytváření sítě prostřednictvím reakcí vícefunkčních reaktantů (např. epoxidové a fenolové pryskyřice);
- b) polymerační řetězová reakce, síťovací polymerace (kopolymerace) – polymerní síť vznikají prostřednictvím řetězové reakce za přítomnosti komonomeru schopného zprostředkovat tvorbu příčných intermolekulárních spojení během reakce (např. kopolymerace styrenu a divinylbenzenu);

c) spojování reaktivních konců nízkomolekulárních polymerů – nedochází zde k syntéze dlouhých řetězců nízkomolekulárních látek, jako je tomu u polyadičních či polykondenzačních reakcí (např. reakce vícefunkčních izokyanátů s polyoly);

d) zavedení příčných vazeb do vysokomolekulárních polymerů – příkladem je vulkanizace pryže či radiální síťování polyetylenu [90].

Disertační práce se dále zabývá první uvedenou skupinou, a to reakcemi funkčních skupin. Zesítení chemickými reakcemi je důležitý proces v technologii polymerů. Vysoký stupeň zesítení vede k vytvoření trojrozměrné sítě polymerů nebo prostoru, ve kterém jsou všechny polymerní řetězce spojeny, za vzniku jedné velké molekuly. Při vysokém stupni zesítení polymery získají pevnost, rozměrovou stabilitu a odolnost vůči teplu a rozpouštědlům [34]. Vzhledem k jejich struktuře sítě takové polymery nemohou být rozpuštěny v rozpouštědlech a nemohou být měkčené teplem; silný ohřev pouze způsobí rozklad. Polymery nebo pryskyřice, které jsou transformovány do zesíteného produktu, jsou teplem tvrditelný typ. Zcela běžně se tyto materiály připravují úmyslně jen v částečně polymerizovaném stavu (tzv. prepolymery) tak, že mohou být deformovány do vyhřívané formy a pak vytvrzeny zesítením [90].

PVOH může být přímo síťován pomocí multifunkčních sloučenin reakcí s hydroxylovými skupinami. Tyto typy reakcí mají průmyslový význam, protože poskytují způsoby, jak získat lepší odolnost proti vlhkosti, nebo k rychlému zvýšení viskozity. Síťovací činidla, která lze použít, zahrnují glyoxal, glutaraldehyd, močovina-formaldehyd, melamin-formaldehyd, trimetylolmelamin, boritan sodný nebo kyselinu boritou a izokyanáty. Většina reakcí je katalyzovaná buď kyselinou anebo bází. PVOH molekuly jsou tedy volně zesítené, což zabraňuje rozpustnosti, ale umožňuje bobtnání. Účinek vysoké teploty při zpracování PVOH filmu nebo povlaku je obecně postačující k dosažení zesítení, avšak tento způsob není kompatibilní s většinou BAL [98]. Běžně se v průmyslu pro PVOH používá jako síťovací činidlo glyoxal či glutaraldehyd, avšak jedná se o toxické látky [58].

Enkapsulace

Technika enkapsulace byla popsána zejména v procesu, ve kterém jsou malé částice nebo kapičky obklopeny homogenním nebo heterogenním povlakem, a tvoří kuličky nebo kapsle s různými aplikacemi. V tomto smyslu jsou mikročástice, mikrokapsle nebo mikrokuličky definovány jako produkt procesu mikroenkapsulace v závislosti na jejich morfologii a vnitřní struktuře. V prvním případě je BAL zahrnuta v pevné nebo kapalné formě v jádru částice. Zatímco

v mikrokuličce je účinná látka rozptýlena a imobilizována v matrici, která tvoří celý objem částice [115].

Enkapsulace tyto látky stabilizuje, chrání proti nutričním ztrátám a v neposlední řadě umožňuje využití jakožto antimikrobiálních látek [115]. Enkapsulace byla také vyvinuta pro zapouzdření aktivní látky do formy částice za účelem ochrany aktivní látky v okolním prostředí nebo kontroly její kinetiky uvolňování do média [116]. Polymerní systémy jsou široce použity pro zapouzdření a dodání účinných látek. Mezi různými typy nosičů jsou polymerní částice jednou z nejatraktivnějších strategií vzhledem k jejich flexibilitě a reprodukovatelné výrobě, kontrole velikosti či tvaru polymerních částic. Proto byly částice předmětem mnoha studií pro efektivní zapouzdření a dodávky aktivních látek [116, 117].

Mnoho metod pro přípravu částic zahrnuje dva hlavní kroky. Příprava emulgovaného systému odpovídá prvnímu stupni, zatímco částice jsou tvořeny během druhého stupně. Tento druhý krok se dosáhne buď srážením anebo gelováním polymeru nebo polymerací monomerů. Několik jiných metod nevyžaduje přípravu emulze před získáním částic. Tyto metody jsou založeny na principu srážení polymeru v podmínkách spontánní tvorby disperze nebo díky vlastnímu shlukování makromolekul za vzniku nanogelů nebo polyelektrolytových komplexů z roztoku polymeru [118]. Metoda sušení rozprašováním nabízí širokou škálu možností pro zpracování částic. Během procesu však dochází ke změně parametrů BAL díky expozici vůči teplu a jejich následné degradaci. Zmiňované vlivy vedou k omezení aplikace v potravinářském a farmaceutickém průmyslu [117].

Výroba mikro/nanočástic s nestabilními BAL je provázána několika problémy. Zejména omezené použití technologických přísad, jako jsou povrchově aktivní látky nebo stabilizátory, které mohou indukovat např. denaturaci bílkovin nebo toxické účinky, výtěžnost produktu a možnost efektivního zapouzdření BAL jsou eliminující [60].

Velmi oblíbenou metodou pro inkorporaci BAL je metoda odpaření rozpouštědla. Existuje několik způsobů, jak vyvolat vysrážení polymeru v emulzi odstraněním jeho rozpouštědla. Obecně platí, že tato metoda vede k produkci sfér, pokud jsou prováděny jednoduchou emulzí olej ve vodě [118, 119]. Speciálním typem pro zapouzdření látek touto metodou je vytvoření mnohonásobné emulze, obzvláště tzv. $w_1/o/w_2$ (voda/olej/voda). Hydrofilní aktivní látky mohou být tímto způsobem zabudovány přímo z vodné suspenze. Je známo, že tento postup přípravy emulze je použitelný pro sloučeniny citlivé na teplotu a má lepší kontrolu velikosti částic a tvaru než příprava částic sušením pomocí rozprašování. Kromě toho mohou být vysoká účinnost zapouzdření a nízký obsah zbytkového rozpouštědla přizpůsobeny nastavením parametrů zpracování [117].

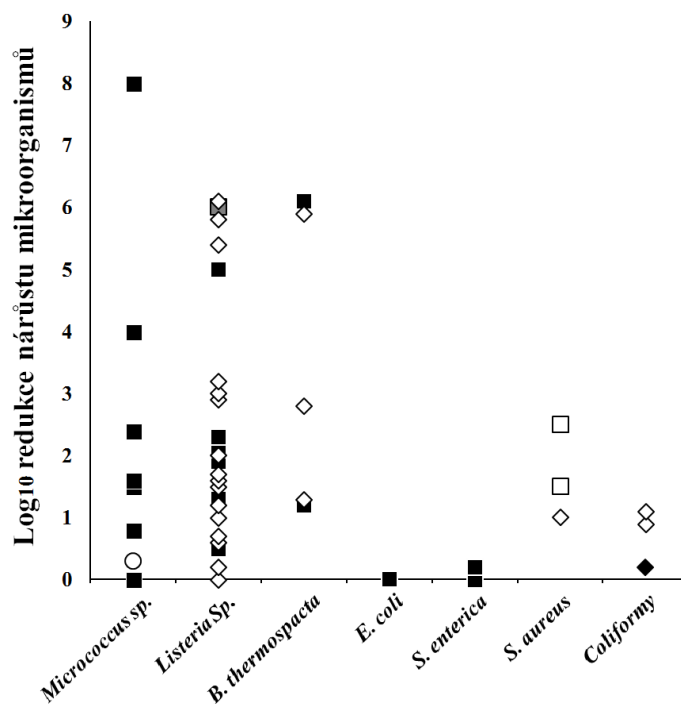
V potravinářském průmyslu a biotechnologii je možno mikroenkapsulace využít pro docílení začlenění přísad, jako jsou např. peptidy, proteiny a nukleové kyseliny, polyfenoly, těkavé látky, enzymy a probiotické bakterie v malých kapslích nebo částicích [115].

1.8 Současné trendy v použití nisinu a kyseliny mléčné v polymerních matricích

Nisin svou malou velikostí molekuly umožňuje výrobu filmů, které ho uvolňují po kontaktu s potravinami nebo kapalinou. Běžně je nisin začleněn do povlaku spolu s kyselinami a jen občas s jinými sloučeninami. Nisin se často objevuje společně s kyselinou etylendiamintetraoctovou (EDTA), zejména při požadovaném antimikrobiálním účinku proti gramnegativním bakteriím [77,120,121].

Většina studií uvádí snížení \log_{10} pro filmy obsahujících nisin v rozmezí 3 a níže, ale některé studie uvádějí snížení \log_{10} o 6 až 9 řádů. Zejména studie Kim et al. [63] a Lee et al. [66] podávají zprávu o velkém snížení \log_{10} mikrobiálního růstu při použití obalových materiálů s nisinem. Jejich studie byly provedeny s papírem potaženým vrstvou z nisinu a jeho expozici mikroorganismy v živné půdě (mléku a pomerančovém džusu). Je možné, že kapalně médium přispělo k vyššímu antimikrobiálnímu působení, než jakého by bylo možno dosáhnout na relativně pevném povrchu potravin. Dvě jiné studie popisují snížení \log_{10} o cca 6 řádů. Další studie testovala účinek nisinu v celulóze nanesené na povrchu polyetylenové folie proti *Listeria monocytogenes* na tofu [65] a párcích [122]. Tyto příklady naznačují, že fólie potažené vrstvou obsahující nisin mají také potenciálně značnou účinnost stejně jako v nápojích a tekutých potravinách.

Některé testy byly provedeny pomocí povlaku s nisinem nebo fólií obsahujících nisin na grampozitivních i gramnegativních bakteriích; inhibice koliformních bakterií *Escherichia coli* nebo *Salmonella enterica* subsp. *serovary* byla velmi nízká nebo žádná (viz obr. 9) [77].



Obr. 9: Log_{10} redukce nárůstu mikroorganismů nebo skupiny mikroorganismů vystavených v nepotravinových vzorcích (■) antimikrobiálním filmům obsahujících nisin. Vzorky potravin: maso a masné výrobky (◇), mléko (○), tofu (□). [77].

BAL původem z fermentačních produktů syrovátky mají široké praktické využití, především pokud se jedná o organické kyseliny – především kyselinu mléčnou, která se běžně používá jako regulátor kyselosti E 270 v potravinářském průmyslu. Zároveň vykazuje baktericidní vlastnosti v průmyslu použitelném koncentračním rozsahu. Dalším ze zajímavých produktů fermentace syrovátky je nisin, který je běžně v potravinářství používán pod označením E 234. Jak již bylo uvedeno, má široké antimikrobiální působení vůči gram pozitivním bakteriálním kmenům.

Obě výše zmíněné BAL jsou tedy prakticky uplatnitelné v potravinářských aplikacích. Imobilizace obou zmíněných látek do vhodných polymerních matic by pak rozšířila jejich využití do oblasti speciálních potravinářských obalů. Vzhledem k fyzikálně chemickým vlastnostem obou látek se jako výhodné jeví použití hydrofilních polymerních matic, které vykazují materiálovou kompatibilitu s oběma BAL. Mezi perspektivní a často využívané hydrofilní polymery patří PVOH pro svoji snadnou dostupnost, dobrou zpracovatelnost, biokompatibilitu a netoxičnost.

Inkorporace kyseliny mléčné anebo nisinu je v odborné literatuře popsána sporadicky a je zde mnoho nepopsaných aspektů z hlediska pohledu základního výzkumu i následného praktického uplatnění.

V posledních letech se studie zaměřují na použití nisinu i kyseliny mléčné jako antimikrobiální látky pro aplikace v potravinářském průmyslu [102]. Příklady nejčastějších polymerních nosičů a způsoby použití vzniklých systémů jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6: Přehled studií zabývajících se inkorporací nisinu a kyseliny mléčné do polymerní matrice

| BAL | Polymerní matrice | Forma | Aplikace | Reference |
|-----------------|-------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|------------------|
| Nisin | Želatina | Film | Kuřecí maso, šunka | [123-126] |
| | | Vlákna | Kultivační medium | [127] |
| | Kukuřičný zein | Film | – | [128] |
| | Syrovátkový protein | Film | Kultivační medium | [124, 128] |
| | HPMC | Film/vícevrstvá PE fólie | Kultivační medium | [120, 129, 130] |
| | Kopolymer vinyliden chloridu a EVAc | Fólie | Hovězí maso | [131] |
| | PP/syrovátkový protein | Fólie | – | [132] |
| | Lipozomy | Částice | – | [117] |
| | Alginát | Částice | Odstředěné mléko | [133, 134] |
| | Chitosan | Částice | – | [117] |
| | PVC, LDPE, PA | Film | Kuřecí kůže | [135] |
| | PE | Fólie | Hovězí maso | [136, 137] |
| | PLA | Fólie | Vaječný bílek, pomerančový džus | [138] |
| Kyselina mléčná | PLA | Částice | Čedar | [139, 60] |
| | Monokrystalický křemík | Film | Hovězí maso | [7] |
| | PVOH | Fólie | Kultivační medium | [89] |
| | Želatina | Částice | – | [140] |

S imobilizací také souvisí problematika zesítnění PVOH. Pro síťování PVOH mohou být teoreticky použity všechny multifunkční sloučeniny schopné reagovat s jeho hydroxylovými skupinami [112]. Dosavadní studie se zabývaly síťováním PVOH pomocí toxických sloučenin jakou je např. glutaraldehyd. Ovšem tendence inklinují k vytváření systémů s netoxickými sloučeninami. Přehled těchto studií je uveden v tabulce 7.

Tabulka 7: Stručný přehled zkoumaných síťovacích činidel

| Síťovací činidlo | Reference |
|-----------------------------|-------------------------|
| Kyselina adipová | [141] |
| Kyselina citronová | [141, 142] |
| Kyselina malonová | [143] |
| Kyselina maleinová | [112, 140, 142, 59, 60] |
| Anhydrid kyseliny maleinové | [144] |
| Glutaraldehyd | [141, 145] |
| Glyoxal | [142] |
| Persíran draselný | [121] |

V pracích zabývajících se kyselinou maleinovou, kde byly polymerní matrice následně vystaveny vysokým teplotám, nelze určit, zda síťování proběhlo vazbami s kyselinou maleinovou nebo až po působení vysoké teploty. Nicméně prozatím neexistuje studie, která by se zabývala síťováním PVOH kyselinou glutarovou.

SHRNUTÍ SOUČASNÉHO STAVU

BAL mající původ ve fermentačních produktech syrovátky mají široké praktické využití, zejména pokud se jedná o organické kyseliny – především kyselinu mléčnou, která se běžně používá jako regulátor kyselosti E 270 v potravinářském průmyslu. Zároveň vykazuje baktericidní vlastnosti v koncentracích běžně použitelných v průmyslu. Další ze zajímavých produktů fermentace syrovátky je nisin, který je v potravinářství používán pod označením E 234. Má široké antimikrobiální působení vůči grampozitivním bakteriálním kmenům.

Obě výše zmíněné BAL jsou tedy prakticky uplatnitelné v potravinářských aplikacích. Imobilizace obou látek do vhodných polymerních matric by pak rozšířila jejich uplatnitelnost do oblasti speciálních potravinářských obalů. Vzhledem k fyzikálně chemickým vlastnostem obou látek se jako výhodné jeví použití hydrofilních polymerních matric, které vykazují materiálovou kompatibilitu s těmito BAL.

Mezi perspektivní a často využívané hydrofilní polymery patří PVOH pro svoji snadnou dostupnost, dobrou zpracovatelnost, biokompatibilitu a netoxičnost.

Inkorporace kyseliny mléčné anebo nisinu je v odborné literatuře popsána sporadicky a je zde mnoho nepopsaných aspektů z hlediska pohledu základního výzkumu i následného praktického uplatnění.

Na základě provedené literární rešerše byly identifikovány následující okruhy pro další rozšíření znalostí studované problematiky:

- definice vlivu strukturních charakteristik PVOH na kvalitativní a kvantitativní interakce se zvolenými BAL;
- metodologie analytického stanovení BAL v komplexní matici polymeru;
- způsoby úpravy vlastností PVOH matrice, které budou kompatibilní s jeho aplikovatelností v potravinářském průmyslu obzvláště z hlediska použití netoxických a ekonomicky dostupných síťovacích činidel.

CÍL PRÁCE

Na základě poznatků získaných literární studií byl stanoven cíl disertační práce, který si vytyčuje vývoj, charakterizaci a optimalizaci nových typů antimikrobiálních polymerních systémů pro potravinářské aplikace na bázi PVOH/nisin a PVOH/kyselina mléčná.

Vzhledem k šíři studované problematiky byly definovány pro dosažení tohoto základního cíle následující dílčí cíle:

- stanovení vlivu materiálových charakteristik PVOH matrice na její zpracovatelnost na tenké filmy a mikrosféry;
- vývoj metodiky síťování PVOH pomocí netoxických činidel jako matrice pro imobilizaci BAL vhodných pro potravinářské aplikace;
- vývoj a optimalizace metodiky přesného stanovení nisinu v maticích PVOH;
- stanovení vlivu modifikace PVOH nisinem a kyselinou mléčnou na výsledné vlastnosti systémů;
- publikace dosažených výsledků v odborných periodících;
- optimalizace materiálových a zpracovatelských charakteristik pro transfer do praxe.

Pro splnění výše stanovených cílů jsou experimentální aktivity rozděleny do tří okruhů:

I – Flexibilní PVOH filmy s kyselinou mléčnou

II – Imobilizace nisinu do zesíťované struktury PVOH

III – Imobilizace nisinu do mikrosfér na bázi biorozložitelného polyesteru

Výstupem řešení každého z výše uvedených okruhů je souhrnná práce určená k publikaci v odborném časopise. V relevantních případech budou získané výsledky využity pro podání přihlášky patentu nebo užitého vzoru.

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Uspořádání experimentů

Praktická část disertační práce byla rozdělena **do tří tematických okruhů**.

První část se zabývá vlivem modifikace PVOH polymerní matrice s různým stupněm hydrolyzy acetátových skupin kyselinou mléčnou na mechanické, strukturní a antimikrobiální vlastnosti výsledných polymerních systémů, které byly připraveny ve formě z roztoku odlévaných filmů.

Cílem první části praktické práce bylo vypracovat ucelenou studii vlivu obsahu reziduálních acetátových skupin PVOH a různého přídatku kyseliny mléčné jakožto plastifikátoru polymerní matrice a antimikrobiálního činidla na výsledné vlastnosti polymerních systémů. Synergie PVOH a kyseliny mléčné jako antimikrobiálního polymerního systému byla již zkoumána řešitelským kolektivem na pracovišti, kde byla tato práce realizována. Přesto se ukázalo, že PVOH s různým stupněm hydrolyzy (HD) může hrát klíčovou roli z hlediska makroskopických vlastností PVOH. Tato práce navrhuje aktivní antimikrobiální filmy vhodné buď pro lékařské účely, ochranné povlaky nebo potravinářské obaly.

Tři PVOH matrice lišící se HD (80 až 98 mol %) byly smíchány s L-kyselinou mléčnou v koncentraci 0 až 30 hm. %. Koncentrační posun byl zvolen 5 hm. %. Vzorky byly připraveny odlévací technikou. Byla provedena studie rozpustnosti, dále vliv modifikace na strukturní charakterizaci, mechanické a tepelné vlastnosti. Antimikrobiální aktivita byla provedena proti modelovým kmenům *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*.

Vliv stupně zesíťení na vodorozpustnost PVOH byl stanoven **v druhé části** práce. Byl nalezen nový systém pro síťování PVOH na bázi dikarboxylových kyselin, který neobsahuje oproti běžně používaným síťovacím činidlům toxické komponenty (např. dialdehydy). Tato část práce se tedy také zabývá důležitou potřebou náhrady konvenčních síťovacích činidel polymerů za jiné (např. kyselina glutarová bez použití dosíťování pomocí vysokých teplot), které mají potenciál šetrnosti k životnímu prostředí [146]. Do takto zesíťených polymerních matric byl imobilizován nisin, jakožto antimikrobiální látka. Vzniklé systémy byly dále studovány z hlediska antimikrobiální aktivity. Dále byl řešen vliv stupně zesíťení PVOH na mechanické, strukturní a tepelné vlastnosti systémů, vliv stupně zesíťení PVOH na kinetiku uvolňování antimikrobiální látky do simulovaného vodného prostředí, vliv stupně zesíťení PVOH, resp. obsah kyseliny glutarové v systémech a imobilizace nisinu na antimikrobiální vlastnosti.

Byly připraveny modelové vzorky PVOH matrice se stupněm zesíťení 0–100 % obsahující čtyři formy nisinových modifikátorů (komerčně dostupný

stabilizovaný solemi, nisin stabilizovaný polyetylglykolem, solemi a poly(oxyetylen)sorbitan-monooleátem v koncentraci 150 µg/g polymerního vzorku. Byla provedena, stejně jako v předešlé části praktické práce, studie rozpustnosti, dále strukturní charakterizace a antimikrobiální aktivita proti kmenům *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*.

Ve třetím okruhu se praktická část disertační práce zaměřuje na enkapsulaci nisinu do mikrosfér skládajících se z polymeru kyseliny mléčné – polylaktidu (PLA) a stabilizovaný PVOH. Mikrosféry byly připraveny modifikovanou metodou odpařování rozpouštědla systému (tzv. voda/olej/voda). Byly sledovány následující parametry: efektivita enkapsulace, velikost mikrosfér a její distribuce. V čase publikace této disertační práce byly získány poznatky o efektivitě enkapsulace, velikosti připravených mikrosfér a její distribuce. V další fázi budou provedeny časově náročné studie kinetiky uvolňování enkapsulovaného nisinu do různých prostředí v závislosti na teplotě a čase.

Statistické zpracování dat

Naměřené výsledky vlhkosti vzorků, stupně bobtnání a rozpustnosti, efektivita antimikrobiální aktivity či kontaktního úhlu smáčení byly vyhodnoceny ze třech nezávislých měření a jsou uvedeny jako průměrná hodnota (5) se směrodatnou odchylkou (6) [147] stejně jako výsledky mechanických vlastností, které byly dle normy ČSN EN ISO 527 měřeny šestkrát.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (5)$$

kde: n počet měření, x_i naměřené hodnoty.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}} \quad (6)$$

kde: N počet vzorků, x_i naměřené hodnoty, \bar{x} aritmetický průměr.

Kalibrační křivky potřebné při chromatografických analýzách byly statisticky vyhodnoceny pomocí lineárních regresí naměřených dat. Pro vlastní výpočty dvojitě výběrového Studentova t-testu byl použit Interaktivní statistický systém pro analýzu dat offline QC Expert 3.3 [148] a Microsoft Office Excel 2010 (Redmond, WA, USA). Všechna statistická vyhodnocení byla provedena na hladině významnosti 5 %.

2.1 Flexibilní polyvinylalkoholové filmy s kyselinou mléčnou: Vliv zbytkových acetátových skupin na mechanické, tepelné a antimikrobiální vlastnosti

Úvod

Polyvinylalkohol (PVOH) byl již intenzivně zkoumán díky jeho vlastnostem, jako jsou průhlednost, houževnatost, biodegradabilita, biokompatibilita, chemická odolnost a netoxičita [89, 95, 149-159]. Chemická modifikace PVOH představuje významné způsoby získání materiálu s žádanými vlastnostmi, vzhledem k praktickému využití hydroxylových skupin výhodných z hlediska reakcí s mnoha činidly. Reakce alkoholů s kyselinou mléčnou (LA) prostřednictvím různých metodik jsou zkoumány již mnoho let [160]. Například Ding et al. [95] popsal roubování PVOH kyselinou mléčnou, kdy bylo nadávkováno přesné množství PVOH, LA a destilované vody do vakuového reaktoru, následně byl přidán katalyzátor a směs byla poté čištěna. Také byla zkoumána syntéza PVOH/LA gelů [155], kdy byl polymerní gel vytvořen opakovaným zmrazováním a rozmrazováním.

Modifikace PVOH kyselinou mléčnou může mít několik výhod z hlediska výsledného polymerního materiálu. Například esterifikace sekundárních hydroxylových skupin PVOH kyselinou mléčnou může snížit jeho hydrofilitu a PVOH/LA interakce zvýšit mezimolekulární vzdálenost mezi řetězci PVOH [161-163]. To znamená, že LA hraje roli v systému PVOH jako plastifikátor [95, 164-166], který je tak zajímavý z pohledu mechanických vlastností. Kromě toho je LA také multifunkční chemická sloučenina široce využívána v potravinářském, farmaceutickém, textilním a kožedělném, stejně jako polymerním průmyslu. Navíc je získávána z obnovitelných zdrojů, jakým je např. syrovátka. Kyselina mléčná je přirozeně mísitelná s vodou či etanolem a existuje ve formě dvou optických isomerů D a L. Z těchto dvou je využívána v potravinářství a farmacii právě L-kyselina mléčná, protože lidské tělo je přizpůsobeno pro vstřebávání pouze této optické formy [167-169].

Navíc bylo zjištěno, že LA může být v nedisociované formě účinná proti určitým typům mikroorganismů zahrnujících grampozitivní i gramnegativní bakterie. Nedisociované molekuly jsou schopné pronikat skrz bakteriální buněčnou stěnu, disociovat uvnitř a snížit intracelulární pH bakterie. V této souvislosti energetický proces, způsobený odtokem přebytečných protonů (H^+), vyčerpá buněčný metabolismus, což má za následek zánik bakteriální buňky [170-172]. Navíc kyseliny mohou měnit propustnost membrány a zasahovat do mnoha enzymatických procesů, které vedou k zabránění transportu živin do mikrobiální buňky [173].

Synergie PVOH a LA jako antimikrobiálního polymerního systému již byla zkoumána [95]. Přestože se ukázalo, že stupeň hydrolýzy (HD) PVOH může hrát klíčovou roli v jeho makroskopických charakteristikách, stejně jako reaktivitě s jinými sloučeninami, efekt HD na interakce s LA a následné mechanické, tepelné a antimikrobiální vlastnosti výsledných systémů nebyly studovány. Byly tedy navrženy formy antibakteriálních filmů vhodné pro zdravotnické účely, jako ochranné vrstvy nebo pro balení potravin složené ze třech druhů PVOH s různým HD (80–90 mol %) spolu s L-kyselinou mléčnou a zpracovány technikou roztokového odlévání. U navržených systémů byly provedeny studie rozpustnosti, strukturní charakteristiky a hodnoceny mechanické i tepelné vlastnosti. Antimikrobiální aktivita pak byla stanovována proti modelovým bakteriálním kmenům *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*.

Použité materiály

Pro tuto část experimentální práce byly vybrány tři typy polyvinylalkoholu s různým stupněm hydrolýzy (HD) blíže specifikované v tab. 8 dodané firmou Sigma Aldrich a L-kyselina mléčná 80% od Penta chemicals.

Tabulka 8: Specifikace vybraných typů PVOH matric

| Typ PVOH | M_w [g/mol] | HD [mol %] |
|-----------|----------------|------------|
| PVOH 80 | ~ 9 000–10 000 | 80 |
| PVOH 8-88 | ~ 67 000 | 88 |
| PVOH 6-98 | ~ 47 000 | 98 |

Příprava vzorků

Polymerní filmy na bázi PVOH s různým stupněm HD a různou koncentrací LA byly připraveny technikou odlévání roztoků do formy. Nejprve byl PVOH rozpuštěn za stálého míchání v demineralizované vodě (10 hm. % roztok) při 90 °C po dobu 30 min. Poté bylo do tohoto roztoku přidáno adekvátní množství LA (koncentrace 0–30 hm. %, vztaženo na hmotnost polymeru) za kontinuálního míchání 15 min. Následně byly výsledné roztoky vlity do arylové odlévací desky a sušeny v horkovzdušné sušárně při 35 °C 48 hodin. Získané filmy byly skladovány v exikátoru v temnu při 25±2 °C v polyetylenových sáčkách pro zamezení přístupu vlhkosti. Tloušťka vzniklých filmů byla 100–130 μm. Vzorky filmů jsou dále označeny jako PVOH $_x$ /LA $_y$, kde x značí typ PVOH matrice a y ukazuje koncentraci LA (hm. %).

Použité metody

Při zpracovávání experimentální části disertační práce byly použity metody, které umožnily zhodnocení inkorporace BAL do polymerní matrice a její následnou optimalizaci.

Stanovení vlhkosti vzorků

Obsah vody PVOH a modifikovaných PVOH filmů byl stanoven gravimetricky [174, 175]. Vzorky byly nejprve zváženy (w_0) a potom sušeny ve vakuové sušárně při 60 °C do konstantní hmotnosti (w_1). Obsah vody byl následně vypočten podle rovnice (7). Testování bylo provedeno třikrát pro každý vzorek.

$$w = \frac{(w_0 - w_1)}{w_0} \cdot 100 \quad (7)$$

Stanovení stupně bobtnání a rozpustnosti

Stupeň bobtnání (DS) PVOH a modifikovaných PVOH filmů byl stanovován u vzorků nastříhaných na čtverečky o rozměrech 1,5 x 1,5 cm, které byly nejprve sušeny při 60 °C do konstantní hmotnosti (w_1). Poté byl každý ze vzorků ponořen do demineralizované vody při teplotě 25 °C. V předem určených časových intervalech byly vzorky z vody vyjmuty a po opatrném odstranění povrchové vlhkosti byla měřena jejich hmotnost (w_2). Stupeň bobtnání byl vypočten následovně (8):

$$DS(\%) = \frac{(w_2 - w_1)}{w_1} \cdot 100 \quad (8)$$

Zbobtnalé vzorky byly po posledním měření DS sušeny při 60 °C do konstantní hmotnosti (w_3) a rozpustnost (S) byla vypočtena podle rovnice (9):

$$S = \frac{(w_1 - w_3)}{w_1} \cdot 100 \quad (9)$$

Strukturní charakterizace

Jednou ze studovaných technik umožňujících zjištění účinnosti zesílení PVOH byla metoda infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací se zeslabenou úplnou reflektancí (FTIR-ATR). Jedná se o nedestruktivní metodu pro stanovení chemické struktury materiálů na základě jejich chemických vazeb [176].

Měření spekter bylo prováděno na přístroji Nicolet 320 FTIR (Nicolet Instrument Corporation, Charleston, WV, USA) s použitím Zn-Se krystalu a softwaru OMNIC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) v rozsahu $4000\text{--}650\text{ cm}^{-1}$. Ve všech případech bylo měřeno při rozlišení 2 cm^{-1} .

Tepelné vlastnosti

Pro termickou analýzu byla zvolena diferenční snímací kalorimetrie (DSC). Jedná se o měření změn tepla absorbovaného nebo uvolňovaného vzorkem při definovaném teplotním programu. Výsledkem tohoto měření bylo zjištění změn krystalické struktury, teploty tání a teploty skelného přechodu modifikovaných polymerních matric vůči čistému PVOH [177, 178].

PVOH a modifikované PVOH filmy byly analyzovány diferenční snímací kalorimetrií pomocí přístroje NETZSCH (Selb, Germany) DSC 200 F3 za účelem posouzení změn tepelných vlastností vzorků. Před samotnou analýzou byly vzorky sušeny při 60 °C po dobu 14 hodin a ponechány vychladnout v exikátoru. Pro analýzu bylo odebráno 8–10 mg z každého vzorku. Samotná analýza probíhala rychlostí 10 °C/min od teploty -20 °C do 160 °C a po dosažení této teploty byla udržována ještě 15 min kvůli zabránění vlivu vlhkosti (první ohřev). Poté došlo stejnou rychlostí k chlazení na -20 °C . Po udržení této teploty po dobu 1 minuty následoval druhý ohřev naprogramovaný od -20 °C do 250 °C . Teplota tání (T_m) byla určena jako maximální hodnota endotermy z prvního ohřevu. Teplota skelného přechodu (T_g) byla stanovena z druhého ohřevu ze středu postupného nárůstu měrného tepla spojeného se skelným přechodem. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí programu STAR^e Default DB V9.20.

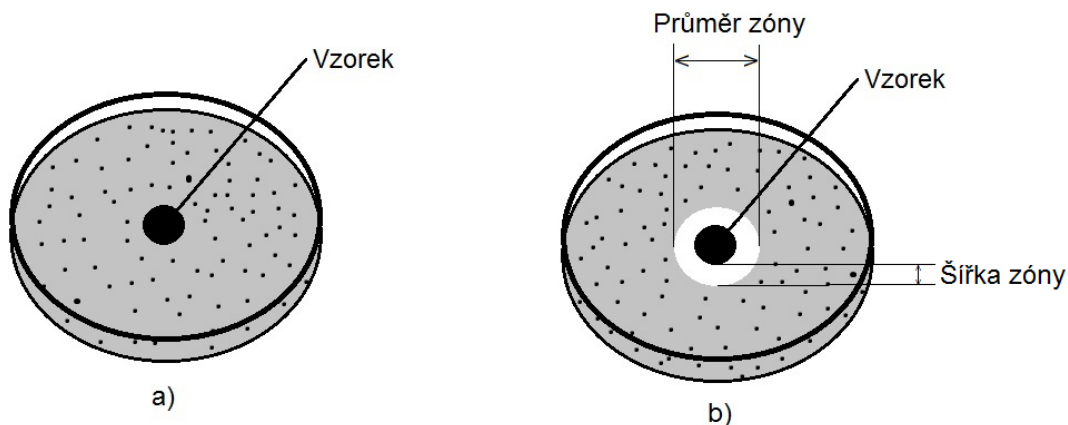
Mechanické vlastnosti

Mechanické vlastnosti polymerů se zjišťují měřením jejich pevnosti. Modifikované polymerní systémy byly testovány pomocí statické zkoušky v tahu [179]. Tahová zkouška byla prováděna na zkušebním trhacím stroji M350-5CT (TESTOMETRIC Co. Ltd, Velká Británie).

Youngův modul a pevnost v tahu byly měřeny na vzorcích PVOH, a PVOH/LA obdélníkového tvaru dle normy ČSN EN ISO 527-1 [180] a ČSN EN ISO 527-3 [181]. Počáteční délka vzorků byla 50 mm, šířka 10 mm a tloušťka 100–130 μm . Zkoušky byly prováděny pro každý vzorek šestkrát na přístroji Instron (Norwood, MA, USA) 8871, při 25 °C a 40% relativní vlhkosti. Přesné parametry zkušebního tělesa byly změřeny při samotném testování digitálním mikrometrem napojeným na počítač. Rychlost deformace byla nastavena na 50 mm/min. Před samotnou zkouškou byly vzorky kondicionovány při 25 °C, 50% vlhkosti po dobu 10 dnů k dosažení rovnovážného stavu (podle ČSN EN ISO 291 [182]). Vlastní měření tahových vlastností probíhalo upnutím zkušebního tělesa do čelistí trhacího stroje tak, aby podélná osa zkušebního tělesa byla shodná s osou čelistí trhacího stroje. Zkušební těleso bylo protahováno ve směru své podélné osy konstantní rychlostí až do přetržení. Měření byla prováděna šestkrát pro každý vzorek a výsledky jsou uvedeny jako průměrná hodnota.

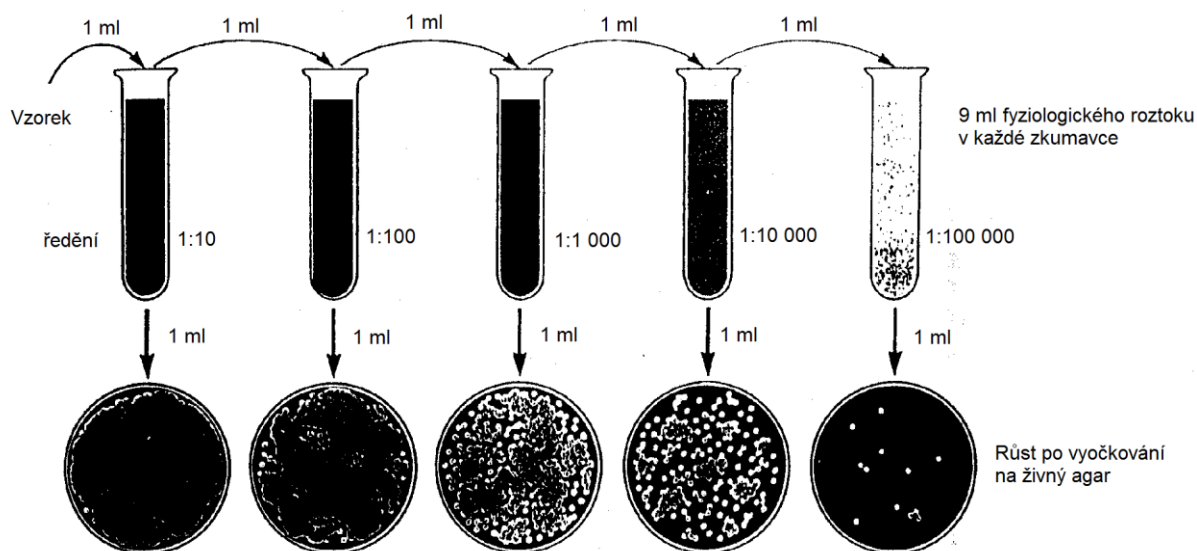
Antimikrobiální vlastnosti

Běžně používaná norma pro testování antimikrobiální aktivity povrchu polymerů ISO 22196 [183] nemohla být z fyzikálně chemických vlastností PVOH provedena. Proto se jako vhodnou alternativou jeví dvě metody. Jednou z nich je testování na agarových plotnách podle Kirby-Bauerovy metody, která byla původně vyvinuta pro testování antibiotik (obr. 10) [7, 108, 184]. Dle této metody bylo 100 μl bakteriální suspenze (přibližně 10^8 CFU/ml) rozetřeno na agarovou plotnu, na kterou byly následně umístěny vzorky o průměru 8 mm (každý vzorek čtyřikrát pro každou bakterii). Po 24 h inkubace při 35 ± 2 °C pro *S. aureus* CCM 4516 a 37 ± 2 °C pro *E. coli* CCM 4517 byly měřeny inhibiční zóny v pěti směrech. Běžně stanovovaný průměr zóny inhibice nebylo možno měřit z důvodu nesouměrného bobtnávání PVOH matrice vzorků. Následně byla vypočtena průměrná hodnota a směrodatná odchylka velikosti šířky inhibiční zóny.



Obr. 10: Kirby-Bauerova disková metoda; a) vzorek bez zóny inhibice, b) vzorek se zónou inhibice

Při metodě zředování a inkubace na agarových plotnách byly vzorky polymerních filmů (cca 0,5 g) umístěny do zkumavek obsahujících 9 ml roztoku Nutrient bujónu a 1 ml bakteriální suspenze. Po 2 hodinách inkubace při 37 °C bylo provedeno počáteční ředění převedením 1 ml směsi do 9 ml fyziologického roztoku, zkumavka byla řádně protřepána a proces opakován po několik dalších ředění jak schematicky znázorněno v obrázku 11 [184]. Z těchto zředěných roztoků byly stanoveny přeživší bakterie pomocí metody počítání na pevných půdách následujícím postupem: 100 µl roztoku bylo nadávkováno do sterilní Petriho misky, zalito Nutrient agarem a inkubováno při 37±2 °C po dobu 24 h, po jejímž uplynutí byl stanoven počet kolonie tvořících jednotek (CFU).



Obr. 11: Sériové ředění vzorku a přímé stanovení počtu kolonie tvořících jednotek [184]

Efektivita antibakteriální aktivity (EAA) PVOH/LA filmů byla vyhodnocena pomocí následující rovnice:

$$EAA(\%) = \frac{N_0 - N_S}{N_0} \cdot 100 \quad (10)$$

kde: N_0 představuje počet CFU/ml pro kontrolní vzorek (čisté PVOH) a N_S pro vzorek obsahující LA.

Vypočtené hodnoty EAA byly poté vyhodnoceny pomocí rovnice (11) a křivky regrese, které byly zpracovány metodou nejmenších čtverců pomocí funkce *Solver* v Microsoft Office Excel 2010 (Redmond, WA, USA).

$$EAA = EAA_{max} \cdot (1 - e^{-kc}) \quad (11)$$

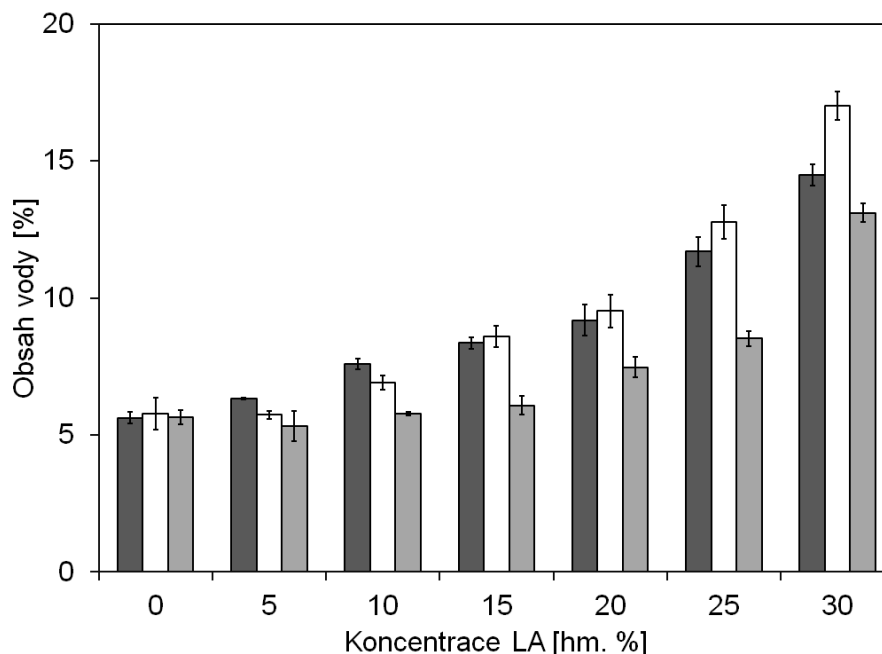
kde: EAA [%] je efektivita antibakteriální aktivity, EAA_{max} představuje maximum EAA (limitní hodnota za daných podmínek), c [hm. %] je koncentrace antimikrobiálního činidla (přepočtený obsah LA ve filmu) a $-k$ představuje konstantu účinnosti určující míru antimikrobiální aktivity činidla působící proti vybranému bakteriálnímu kmenu v daných podmínkách experimentu (teplota, čas inkubace). Každé stanovení bylo provedeno třikrát vedle sebe.

Výsledky a diskuze

Stanovení obsahu vody

Pro modifikace s LA byly použity tři typy PVOH s různým reziduálním obsahem acetátových skupin (rozlišné HD). Gravimetrické stanovení obsahu vody v závislosti na koncentraci LA je znázorněno na obrázku 12. Je zřejmé, že obsah vody u vzorků po kondicionaci stoupá v závislosti na rostoucím množství LA u všech tří typů PVOH. Statisticky významný nárůst je znatelný u PVOH 80 již při přídatku 5 % LA, kdežto u PVOH 8-88 při 15 % LA a PVOH 6-98 až při 20 % LA. Filmy s 30 % LA vykazovaly nejvyšší obsah vlhkosti, zatímco obsah vody u čistých PVOH byl pod 6 % hm. Obsah u PVOH80-LA30, PVOH8-88-LA30 a PVOH6-98-LA30 byl 14,5; 17,0 a 13,1 % hm. Nejnižší hodnota byla zjištěna u plně hydrolyzovaného PVOH 6-98, následovaná hodnotou PVOH 80. Nejvyšší hodnota u PVOH8-88-LA30 může být vysvětlena nejvyšší molární hmotností PVOH 8-88 v porovnání s ostatními typy použitých PVOH matic. Krystalinita PVOH má tendenci ke snižování v závislosti na růstu molární

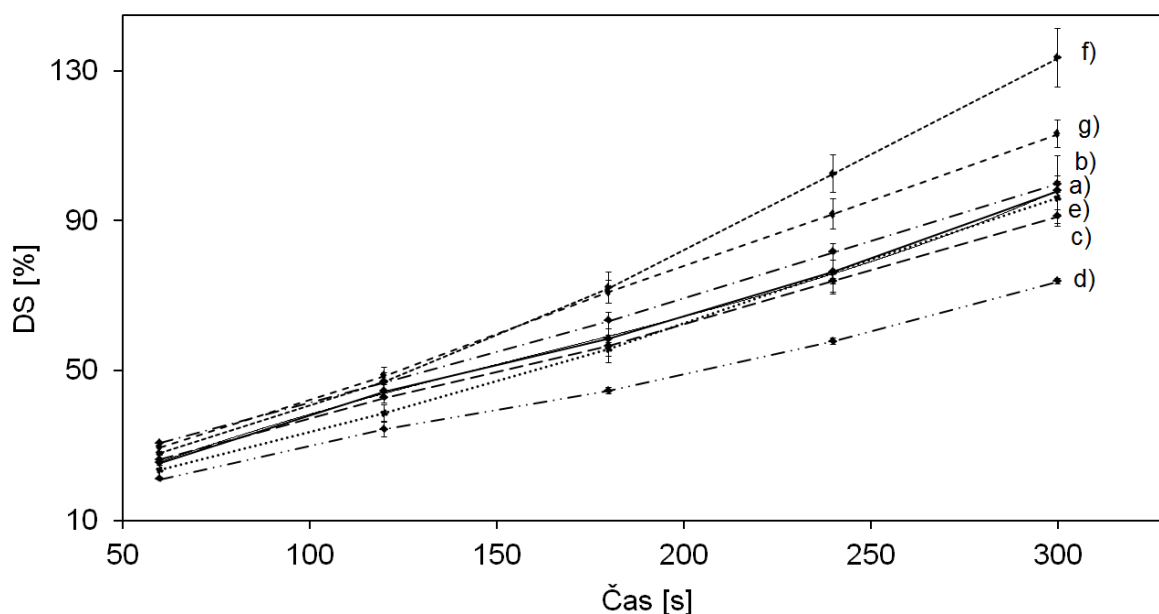
hmotnosti. Tedy dlouhé molekulární řetězce narušují segmentální pohyb, což způsobuje obtížnější ukládání molekul do krystalické struktury. Navíc rostoucí odstup v důsledku vysokého zatížení LA může naznačovat vyšší absorpci vlhkosti z okolního prostředí.



Obr. 12: Obsah vody v PVOH/LA filmech v závislosti na HD a obsahu LA; PVOH 80 (tmavě šedý), PVOH 8-88 (bílý), PVOH 6-98 (světle šedý)

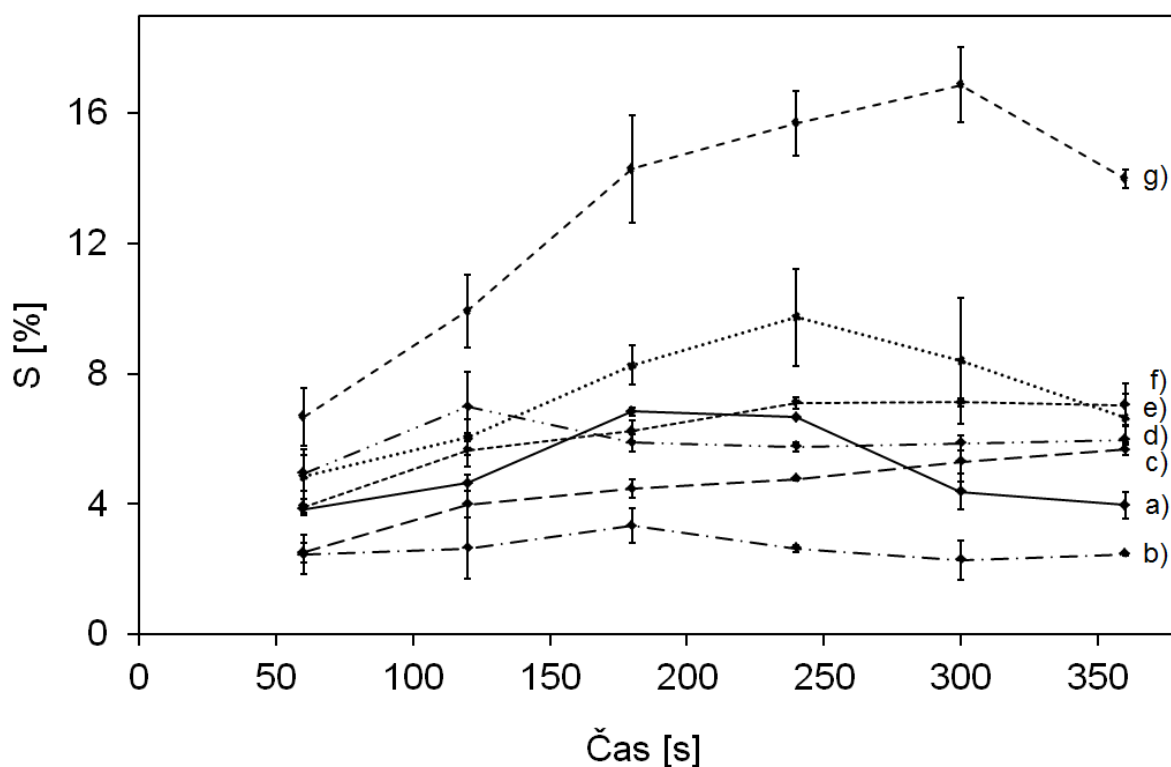
Stupeň bobtnání a rozpustnost

Vzhledem k tomu, že částečně hydrolyzované PVOH matrice tvoří vodíkové můstky mezi zbytkovými acetátovými skupinami a molekulami vody, je možno konstatovat, že nejvyšší dosažený stupeň zbobtnání je omezený v důsledku rozpouštění vzorků [166]. Nejsou zde proto uvedeny údaje o bobtnání vzorků PVOH 80 a PVOH 8-88. Vzhledem k rychlému rozpouštění vzorků PVOH s nižším HD, obrázek 13 znázorňuje pouze závislost bobtnání na čase podle rovnice (8) pro plně hydrolyzovaný PVOH (PVOH 6-98). Rostoucí rychlost bobtnání by mohla být výsledkem plastifikačního efektu vlivem přídavku LA, tedy molekuly vody pronikají amorfní oblastí polymerní matrice s další interakcí bočních hydroxylových skupin; obdobně se zvyšuje volný objem matrice. Rychlost uvolňování amorfních oblastí je důsledkem snížené krystalinity [166].



Obr. 13: Závislost stupně bobtnání filmů a) PVOH6-98, b) PVOH6-98/LA5, c) PVOH6-98/LA10, d) PVOH6-98/LA15, e) PVOH6-98/LA20, f) PVOH6-98/LA25, g) PVOH6-98/LA30 na čase

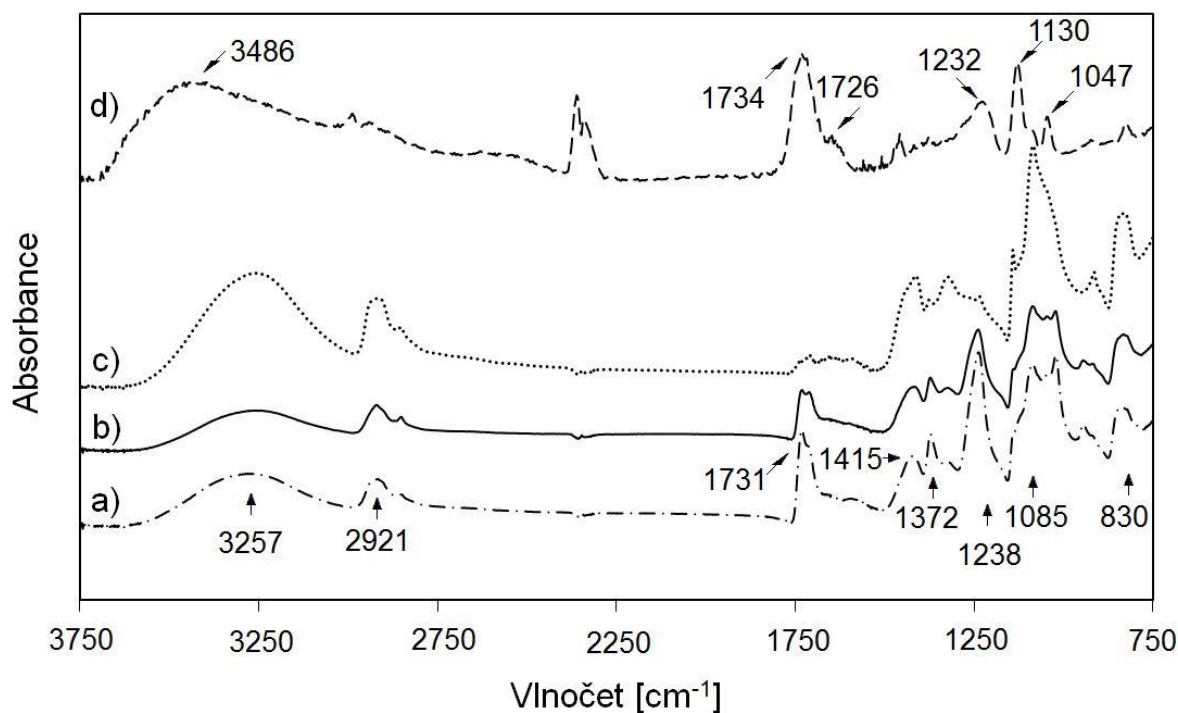
Všechny připravené filmy byly bezbarvé a transparentní. Nicméně poté co byly v kontaktu s vodou, vykazovaly různé stupně rozpustnosti. Filmy připravené z částečně hydrolyzovaného PVOH se rozpouštěly rychle (během 30 sekund) a plně hydrolyzované, jak již bylo zmíněno, pomaleji. Přítomnost acetátových skupin zde podpořila vznik vodíkových můstků mezi řetězci PVOH a molekulami vody. Navíc podobné hodnoty parametrů rozpustnosti (δ_v) pro polyvinylacetát ($19,06 \text{ J}^{1/2} \text{ cm}^{-3/2}$) a vodu ($22,27 \text{ J}^{1/2} \text{ cm}^{-3/2}$) mohou podporovat vyšší afinitu s PVOH s nižším HD [185]. Nicméně plně hydrolyzované PVOH filmy se ve vodě při pokojové teplotě jeví jako nepatrně rozpustné a bobtnají za vzniku hydratovaných filmů. Silné inter- a intramolekulární vodíkové můstky tvořené prostřednictvím hydroxylových skupin omezují interakci mezi PVOH a molekulami vody, což vede k nižší rozpustnosti. Jak je znázorněno na obrázku 14, v případě nízkého obsahu LA (5 %) je rozpustnost systémů nižší, avšak statisticky nevýznamná v porovnání s čistým PVOH. Zvýšení rozpustnosti bylo pozorováno až u filmů s vyšším množstvím LA, kdy rozdílnost obsahu LA v rozmezí 10–25 % byla na hladině významnosti 5 % zanedbatelná. V této souvislosti se potvrzuje, že funkce LA jako plastifikátoru ve volné formě způsobuje v polymerním systému změny ve volném objemu PVOH a pohání k neomezené difúzi molekul vody přes matrici [89, 166].



Obr. 14: Závislost rozpustnosti filmů a) PVOH6-98, b) PVOH6-98/LA5, c) PVOH6-98/LA10, d) PVOH6-98/LA15, e) PVOH6-98/LA20, f) PVOH6-98/LA25, g) PVOH6-98/LA30 na čase

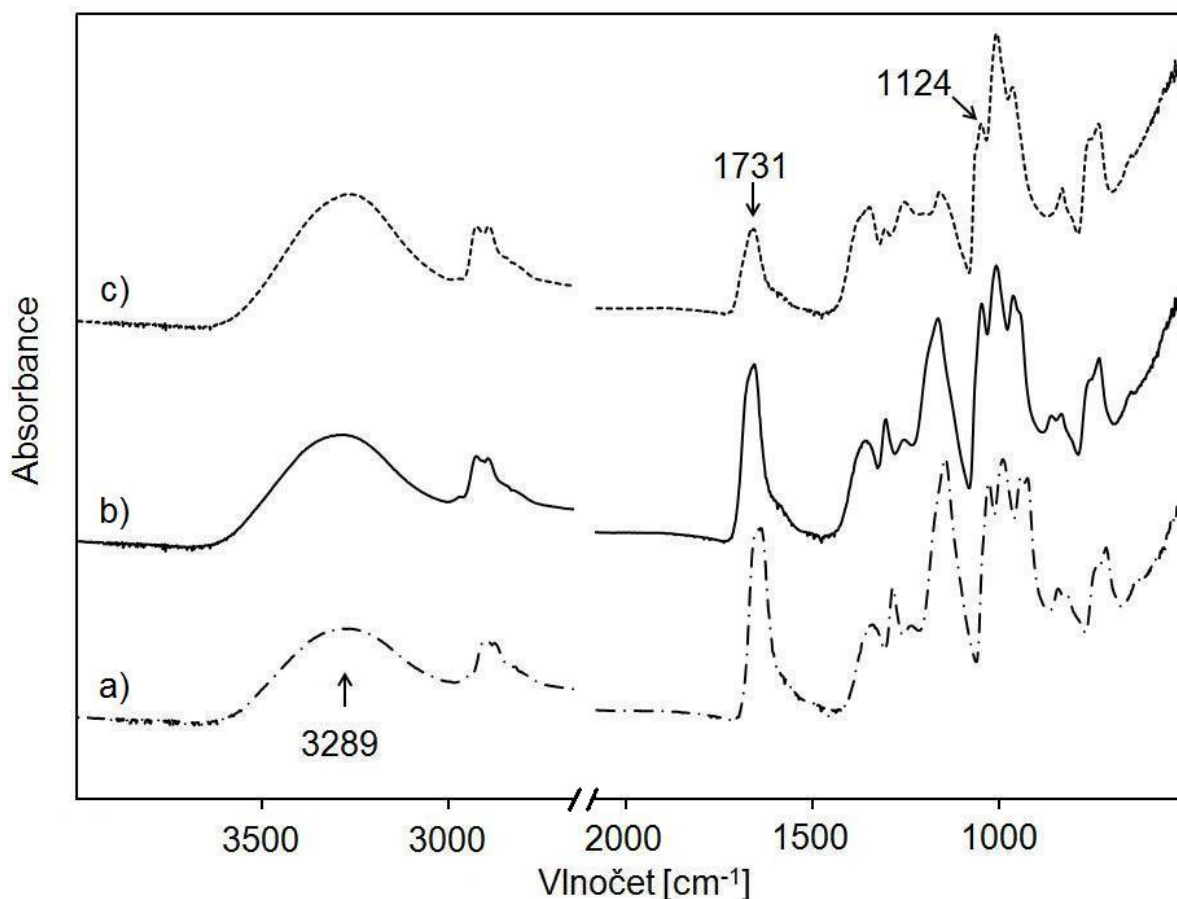
Strukturní charakterizace

Strukturní identifikace čistých komponent (PVOH a LA) a jejich směsí (PVOH/LA) byla prováděna technikou FTIR-ATR. Spektra čistých materiálů jsou zobrazena na obrázku 15. Typické absorpční pásy spekter PVOH s rozdílnými HD jsou následující: pík 3257 cm^{-1} (O–H) v kondenzované fázi, 2921 cm^{-1} (C–H), 1415 , 1372 , 1238 a 1085 cm^{-1} (C–O), 1021 cm^{-1} (O–H) a 830 cm^{-1} (C–H). Konkrétně, v plně hydrolyzované formě je přítomnost absorpčního pásu v 1731 cm^{-1} , typického pro karbonylové skupiny (C=O), slabá vzhledem k nižšímu obsahu zbytkových reziduálních acetátových skupin.



Obr. 15: FTIR-ATR spektra čistých komponent a) PVOH 80, b) PVOH 8-88, c) PVOH 6-98, d) LA

FTIR-ATR spektrum LA zobrazuje charakteristické absorpční píky v 3486 cm^{-1} (O–H), 1734 a 1726 cm^{-1} (C=O), dále 1232 , 1130 a 1047 cm^{-1} (C–O). Současně s rostoucím obsahem LA rostla intenzita většiny těchto píků, stejně jako posun k vyšším hodnotám vlnových délek. Například pík v 3257 cm^{-1} byl pak detekován v 3289 cm^{-1} a tyto zřejmé změny jsou viditelné na obrázku 16. Zřejmá byla také přítomnost pásu v 1731 cm^{-1} pro PVOH6-98-LA30 (karbonylové skupiny C=O). Mohlo by to být způsobeno roubováním docházejícím mezi PVOH a LA, stejně jako intenzita píku v 1124 cm^{-1} , která koresponduje s publikovanou studií Carlotii et al. [160] o částečné tvorbě PVOH-LA esteru prokázané na základě nukleární magnetické rezonance (NMR).



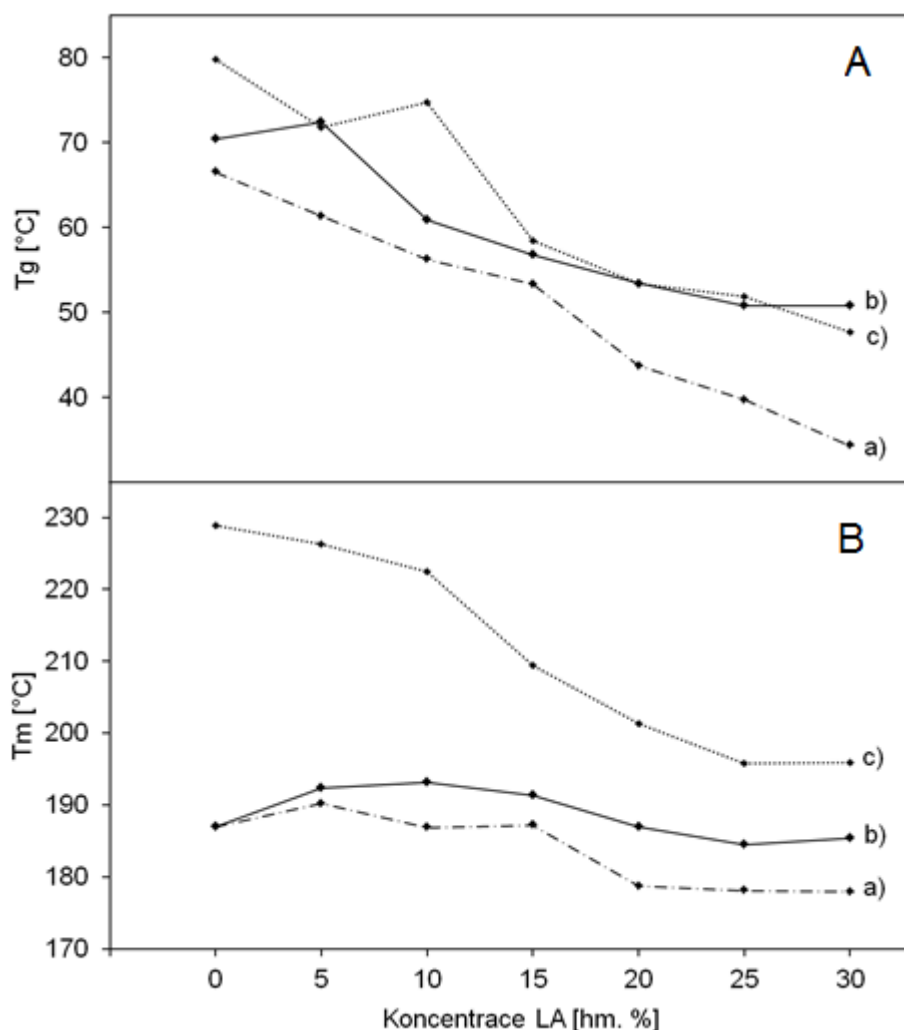
Obr. 16: FTIR-ATR spektra filmů a) PVOH 80, b) PVOH 8-88, c) PVOH 6-98 a 30% hm. LA

Možná PVOH/LA interakce již byla detailně popsána [89]. Interakce mezi řetězcí PVOH a LA byla zkoumána pomocí FTIR a termogravimetrií s FTIR analýzou uvolněného plynu (TG FTIR). Výsledky potvrdily, že část LA je navázaná na PVOH esterovou vazbou. Kyselina mléčná ve volné formě (nenavázaná) byla zjištěna také. Nenvázaná forma LA je odpovědná za plastifikaci PVOH, jak je diskutováno dále.

Tepelné vlastnosti

Závislost teploty skelného přechodu T_g a teploty tání T_m na koncentraci LA je uvedena na obrázku 17. Z termogramu je možné konstatovat rozdíly v závislosti na HD použitých PVOH. Například charakteristické T_g a T_m závislé na HD jsou vidět u čistých PVOH, kdy se zvyšujícím se HD jsou současně detekovány vyšší T_m a T_g . Navíc hodnoty pro T_g a T_m jsou vyšší než v systémech PVOH s LA. Se zvyšujícím se obsahem LA klesá T_g i T_m , což znovu potvrzuje funkci LA v navržených systémech jako plastifikátoru a toto zjištění koresponduje se

stupněm bobtnání a studii rozpustnosti stejně jako s informacemi z FTIR spekter. Celkový pokles T_g je o 50 % a T_m o 8 % s ohledem na nejvyšší koncentraci LA v porovnání s čistým PVOH. Dosavadní výsledky jsou v souladu s Carlotii et al. [160], kde T_g klesá spolu s rostoucím stupněm substituce PVOH roubovaného LA. V případě PVOH 80 s 30 % LA nebylo možné vyčíslit množství krystalické fáze, která je spojena s výskytem a plochou píku endotermického tání. Nehledě na to však lze předpokládat, že obě komponenty vzhledem k jejich polaritě demonstrují vysokou kompatibilitu. Následné změny ve volném objemu ovlivňují krystalinitu stejně jako amorfni oblast, tudíž je patrný pokles T_g i T_m . V této souvislosti ukazuje plně hydrolyzovaný PVOH dobře uspořádané, seřazené řetězce orientované směrem k sobě, které zde zvyšují krystalinitu (vyšší T_m), zatímco acetátové skupiny v částečně hydrolyzovaném PVOH působí jako vložky, které omezují krystalinitu tím, že brání vázání řetězců vytvářením uzavřeného systému. Redukce krystalické struktury je ovlivněna orientací krystalů a morfologií, což se odráží ve výsledných mechanických vlastnostech systémů [156, 165, 172].

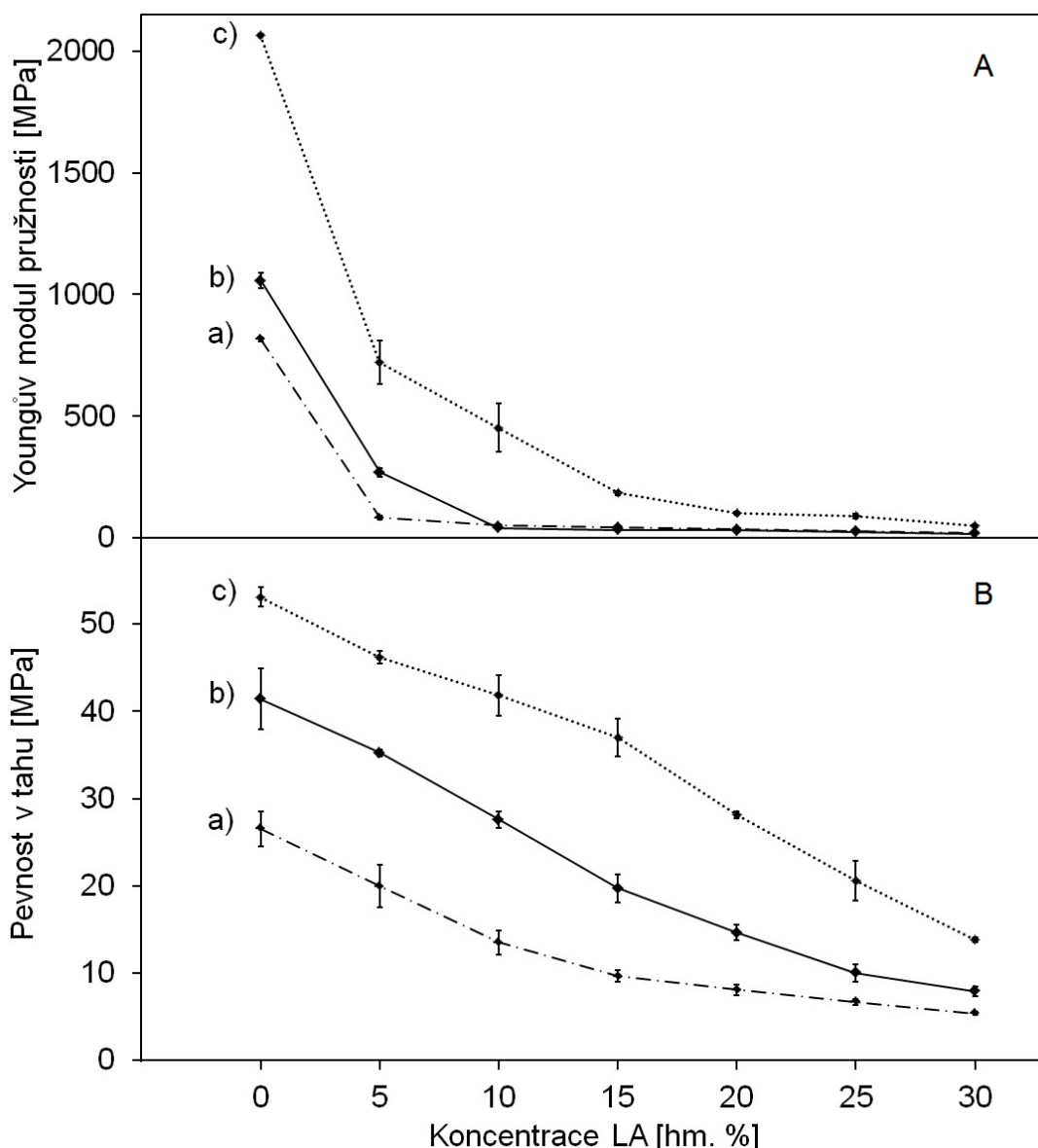


Obr. 17: DSC charakterizace [T_g (A) a T_m (B)] jako funkce obsahu LA v a) PVOH 80, b) PVOH 8-88, c) PVOH 6-98

Mechanické vlastnosti

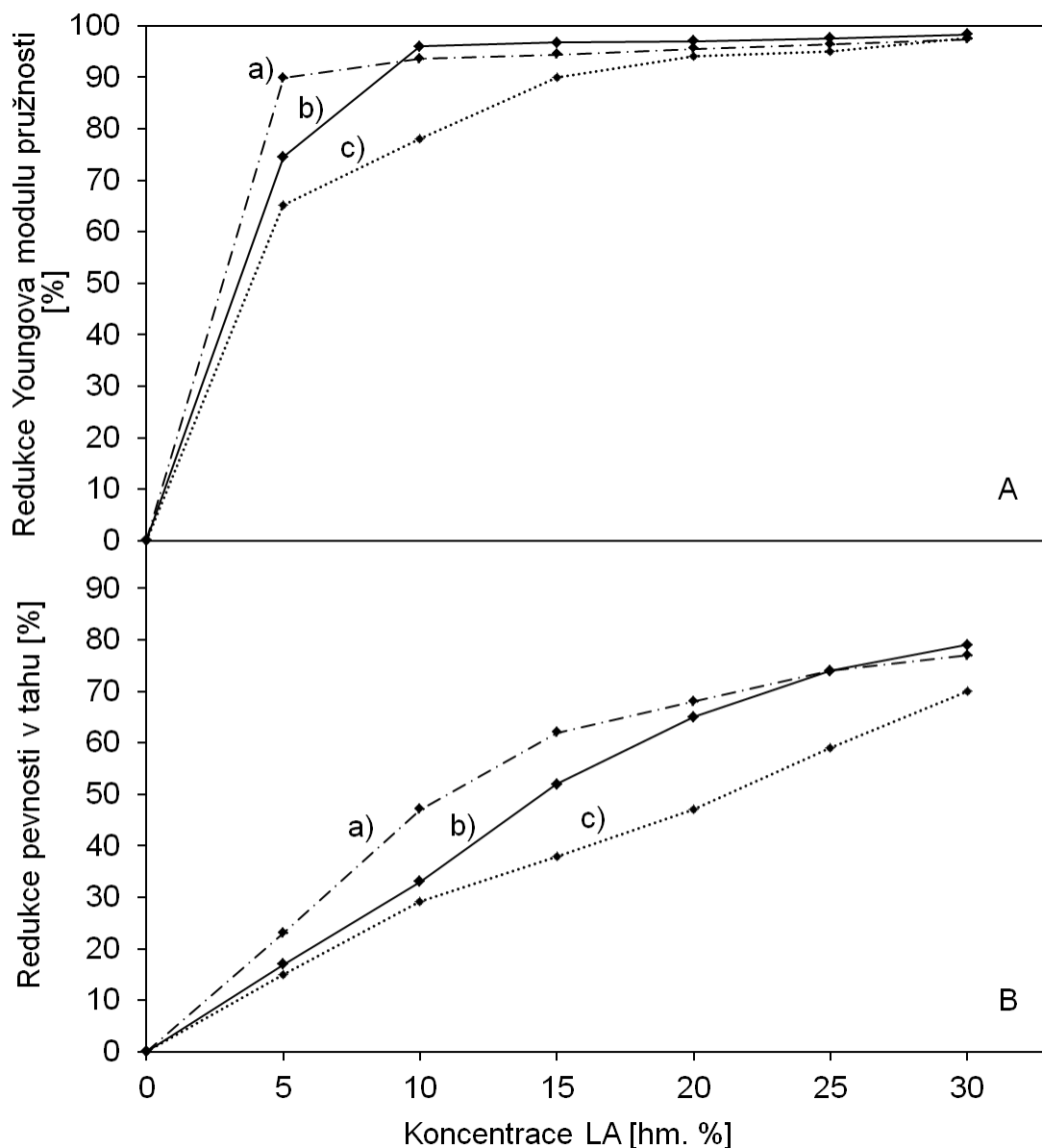
Vliv modifikací LA na mechanické vlastnosti filmů je zřejmý. Závislost Youngova modulu pružnosti (E) na obsahu LA ve filmech je zobrazen na obrázku 18A. U vzorků bez LA bylo možno vidět, že se snižujícím se obsahem reziduálních acetátových skupin v PVOH docházelo k nárůstu E daných filmů. Čistý PVOH 6-98 dosahoval nejvyšší hodnoty E (2065 MPa), zatímco PVOH 80 představoval nejnižší E (816 MPa). Tyto poznatky se shodují s již uvedenými výsledky z DSC (T_m a T_g). Vysvětlení lze nalézt například ve strukturních rozdílech polymerů v souvislosti s obsahem acetátových skupin. Plně hydrolyzovaný PVOH obsahuje 2 mol % zbytkových acetátových skupin, kdežto částečně hydrolyzovaný 12–20 mol %. Nicméně hodnota E u všech typů PVOH filmů s LA klesá se zvyšujícím se množstvím modifikátoru. Relativní redukce E v případě vysokých koncentrací LA není překvapující, nicméně hodnota E je ve srovnání s nemodifikovaným PVOH velmi nízká. Obdobný trend byl pozorován také u pevnosti v tahu, kde docházelo

u PVOH-LA filmů k značnému poklesu této hodnoty v závislosti na zvyšujícím se množství modifikátoru (obrázek 18B). Výsledky jsou v souladu s tepelnými vlastnostmi a testováním rozpustnosti, kdy přítomnost LA značně snižuje T_g a T_m , což naznačuje její plastifikační působení v systému. Mechanické vlastnosti byly ovlivněny také nízkou molární hmotností látek, která je zodpovědná za křehkost a snížené mechanické pevnosti. S tímto tvrzením plně koresponduje právě PVOH 80, který měl z použitých polymerních matic nejnižší molární hmotnost. Nicméně PVOH 8-88, který měl nejvyšší molární hmotnost, ukazoval jen mírné zvýšení hodnot modulu a pevnosti v tahu při přetržení. Proto lze konstatovat, že větší vliv na měřené vlastnosti filmů měl HD použitých PVOH matic.



Obr. 18: Youngův modul pružnosti (A) a pevnost v tahu při přetržení (B) jako funkce obsahu LA v a) PVOH 80, b) PVOH 8-88, c) PVOH 6-98 a 30% hm. LA

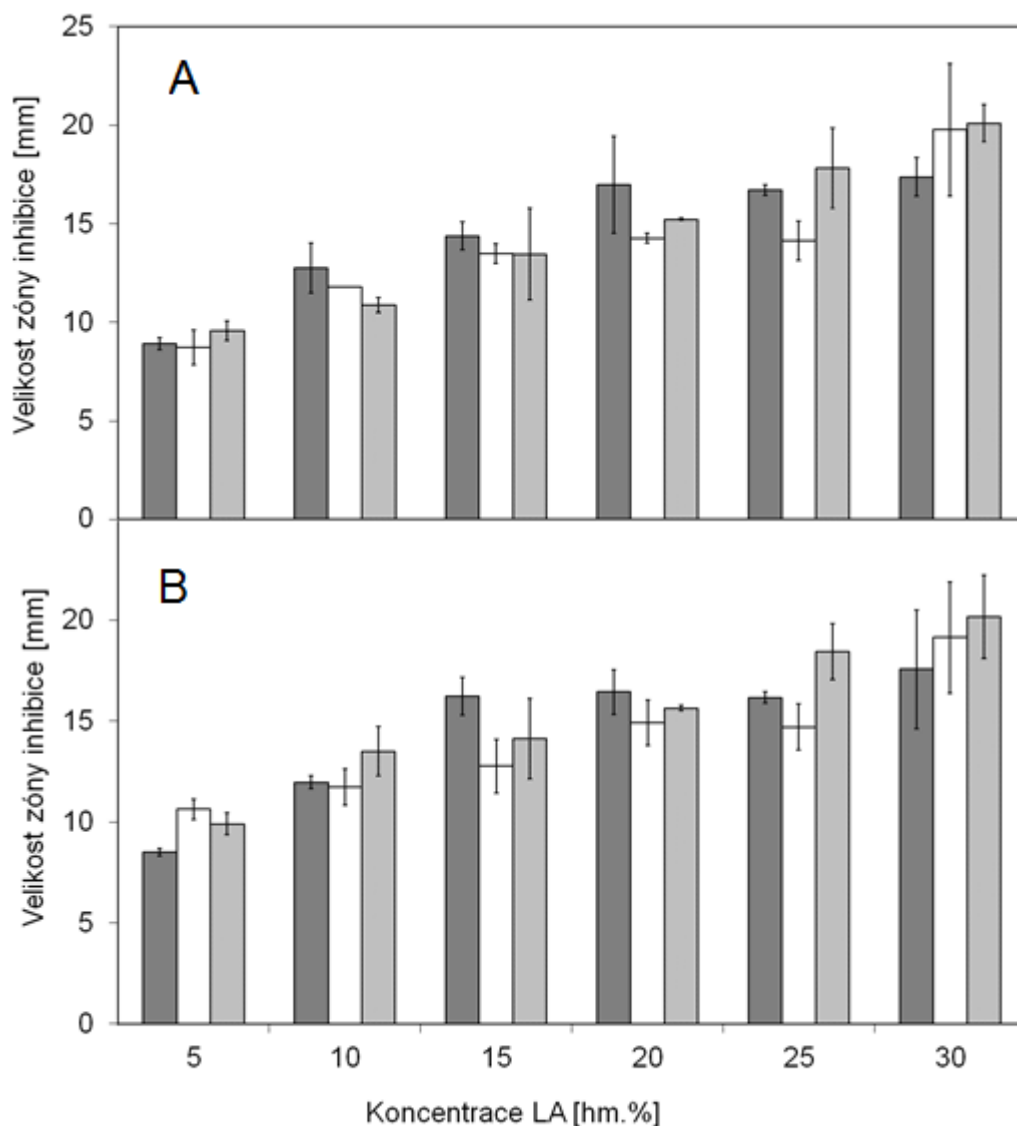
Obrázek 19 zobrazuje procentuální snížení hodnot Youngova modulu pružnosti a pevnosti v tahu při přetržení vzhledem k původním nemodifikovaným vzorkům. Modifikace filmů pomocí LA výrazně snižuje Youngův modul pružnosti od přídavku 10 % LA v případě PVOH 80 a PVOH 8-88, zatímco u PVOH 6-98 až od 15 % LA, přičemž další přídavky LA jej již statisticky významně nemění. V případě pevnosti v tahu při přetržení jsou hodnoty snižovány u všech systémů postupně, mírně lineárně v závislosti na přidaném množství LA.



Obr. 19: Relativní redukce mechanických vlastností [Youngova modulu pružnosti (A) a pevnosti v tahu při přetržení (B)] a) PVOH 80, b) PVOH 8-88, c) PVOH 6-98 filmů v závislosti na obsahu LA

Antimikrobiální vlastnosti

Antimikrobiální vlastnosti připravených filmů byly hodnoceny difúzními agarovými testy. Závislosti velikosti růstových inhibičních zón na koncentraci LA jsou znázorněny na obrázku 20. Z výsledků je zřejmé, že všechny filmy byly účinné proti zástupcům jak grampozitivních (*S. aureus*), tak gramnegativních (*E. coli*) kmenů bakterií a to i při nejnižší koncentraci LA, kromě vzorku PVOH s 0 % LA, který sloužil jako kontrolní vzorek. Schopnost LA měnit se z nedisociované formy na disociovanou zvyšuje antimikrobiální účinek. Pokud je LA v nedisociované formě, může volně difundovat přes polopropustnou membránu mikroorganismů do buněčné cytoplazmy [172]. Antimikrobiální aktivita rostla se zvyšujícím se množstvím LA v systému, nicméně je zřejmé, že antimikrobiální aktivita do koncentrace 25 % LA byla u obou bakteriálních kmenů mírně vyšší pro PVOH 80. Toto zjištění může být spojeno s dobrou rozpustností vzorků na bázi PVOH 80, která již byla diskutována. Dobrá rozpustnost vzorků ve vodě zvyšuje difúzi LA inhibující bakterie na agaru.



Obr. 20: Výsledky difúzního testu PVOH/LA filmů proti *Staphylococcus aureus* (A) a *Escherichia coli* (B); PVOH 80 (tmavě šedý), PVOH 8-88 (bílý), PVOH 6-98 (světle šedý)

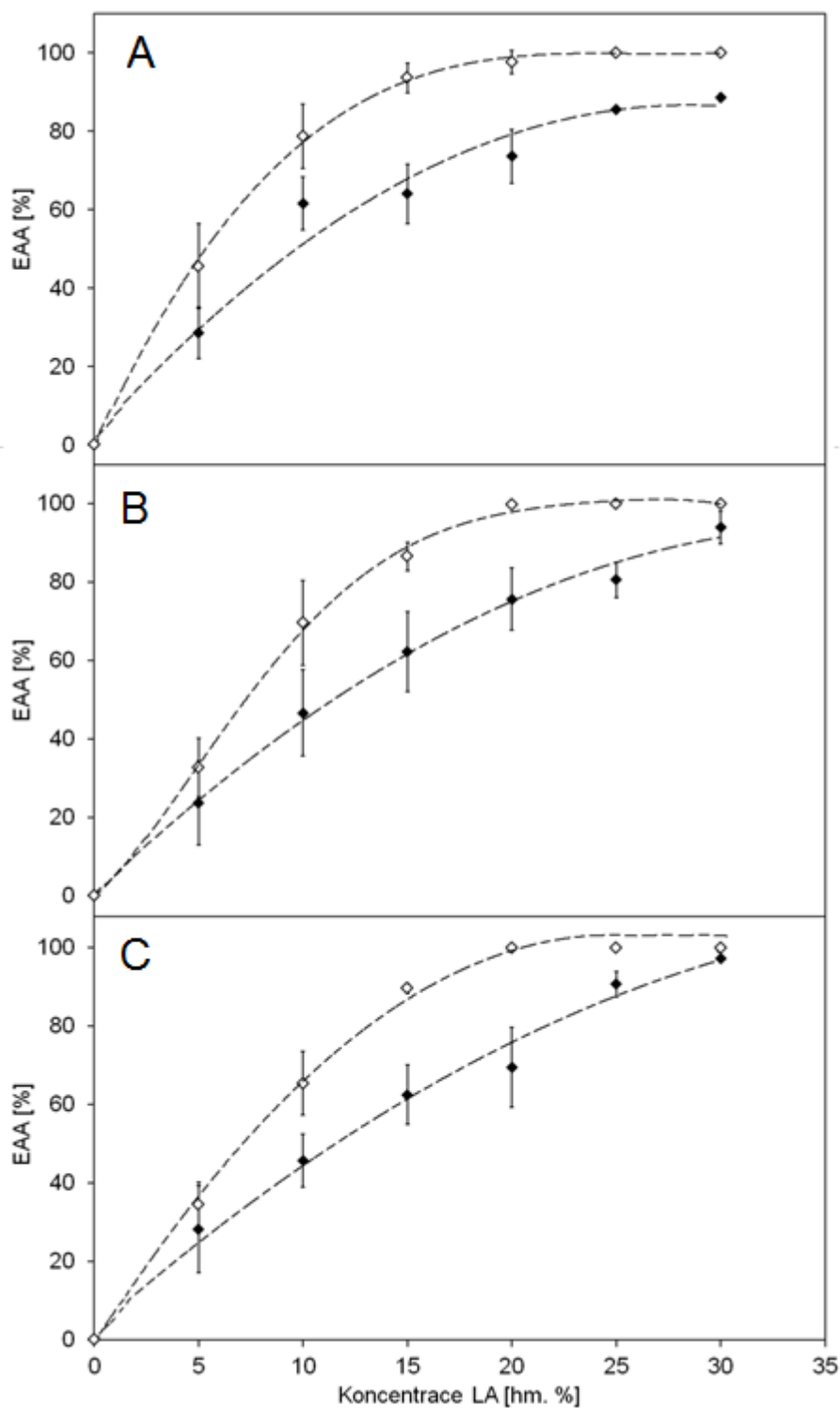
Jako druhá zkouška použitá ke studiu antimikrobiální aktivity daných materiálů v tekutém médiu proti patogenům, byla prováděna metoda zředování a inkubace na agarových plotnách. Účinnost antimikrobiální aktivity (EAA) byla stanovena podle rovnice (10) a konečné hodnoty CFU byly vyhodnoceny na základě množství LA v systému s použitím vhodného modelu k charakterizaci experimentálních dat. EAA data byla zpracována pomocí rovnice (11) a křivky regrese získány pomocí metody nejmenších čtverců. Výsledky experimentu jsou shrnuty na obrázku 21 a přehled konstant je uveden v tabulce 9. Je možno konstatovat, že hodnota EAA je vyšší pro PVOH 80 (nejnižší HD) než u ostatních dvou použitých PVOH na grampozitivního zástupce bakterií.

Nicméně PVOH 8-88 a PVOH 6-98 mají také vysoké hodnoty konstanty účinnosti, což znamená, že vysoká aktivita systému není ovlivněna HD použitého PVA. Obecně lze říci, že čím je vyšší hodnota k , tím je systém účinnější. Navíc už i hodnota EAA systému s nejnižším obsahem LA byla významná, tudíž i koncentrace LA menší než 5 % by mohla být v daných systémech účinná jak proti bakteriálním kmenům *E. coli* tak i *S. aureus*. To potvrzuje i fakt, že všechny navržené systémy působící proti *E. coli* vykazují limitní hodnotu pro EAA 100 % s vysokou hodnotou $-k$.

Tabulka 9: Konstanty vzorce (11) popisující antimikrobiální aktivitu PVOH/LA filmů

| Bakteriální kmen | Typ PVOH | EAA_{max} [%] | $-k$ | R^2 |
|------------------------------|-----------------|-----------------------------------|------------------------|-------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | PVOH 80 | 95,99 | 0,0812 | 0,99 |
| | PVOH 8-88 | 100 | 0,0671 | 0,99 |
| | PVOH 6-98 | 100 | 0,0700 | 0,98 |
| <i>Escherichia coli</i> | PVOH 80 | 100 | 0,1475 | 0,99 |
| | PVOH 8-88 | 100 | 0,1185 | 0,99 |
| | PVOH 6-98 | 100 | 0,1189 | 0,98 |

Oba testy prováděné k posouzení antimikrobiální aktivity naznačují vynikající výkonnost navržených systémů bez ohledu na skupinu použitých bakteriálních kmenů.



Obr. 21: Závislost EAA proti *Staphylococcus aureus* (plné symboly) a *Escherichia coli* (prázdné symboly) na obsahu LA v PVOH 80 (A), PVOH 8-88 (B) a PVOH 6-98 (C) filmech (čárkovaná křivka znázorňuje regresní křivku dle vzorce 11)

Shrnutí okruhu I

Flexibilní polymerní filmy na bázi třech různých typů PVOH a LA, připravené technikou roztokového odlévání, byly charakterizovány sledováním vlivu HD na strukturální, mechanické a tepelné vlastnosti. Strukturální charakterizace pomocí FTIR potvrzuje esterifikační reakci mezi řetězci PVOH a LA. Kromě toho byla demonstrována vysoká afinita obou komponent v systému pomocí stupně bobtnání a testování rozpustnosti, stejně jako prostřednictvím hodnocení skelného přechodu a teploty tání, kdy bylo potvrzeno, že LA působí jako plastifikátor.

Ve srovnání hodnot stupně hydrolyzy PVOH 80, PVOH 8-88 a jejich odpovídající modifikované systémy kyselinou mléčnou ukazují jak snížení T_g a T_m tak mechanických vlastností. Toto chování úzce souvisí se strukturou čisté PVOH matrice a jejím uspořádáním přítomných zbytkových acetátových skupin a také účastí LA. Roubování pomocí LA narušuje nebo zeslabuje vodíkové můstky mezi řetězci PVOH, což objasňuje konečnou podobu systémů.

Byla zde také hodnocena antimikrobiální účinnost navrhovaných systémů pomocí dvou rozdílných metod. Tato účinnost byla popsána matematickým modelem, kdy konečné parametry dosáhly limitu pro EAA_{max} s vysokými konstantami účinnosti. LA je účinnou antimikrobiální BAL vhodnou pro modifikaci PVOH filmů, které mají potenciál pro uplatnění v potravinářských i zdravotnických aplikacích.

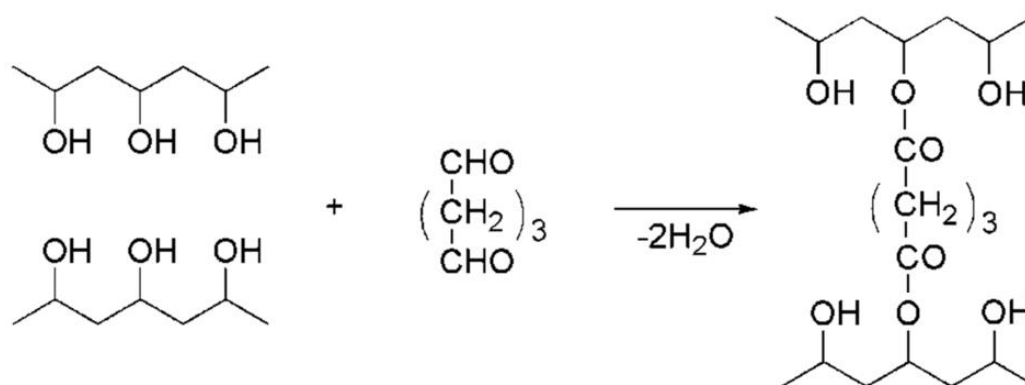
2.2 Imobilizace nisinu do zesíťované struktury polyvinylalkoholu

Úvod

Síťování vodorozpustných polymerů je důležitou reakcí při přípravě speciálních obalů, hydrogelových soustav a systémů pro řízené dodávání léčiv či jiných biologicky aktivních látek.

V případě polyvinylalkoholu (PVOH) se vybízí zavedení příčných vazeb mezi jednotlivé řetězce prostřednictvím přítomných hydroxylových skupin. Doposud známé metody zavedení příčných vazeb mezi řetězci PVOH se omezují převážně na použití velmi reaktivních dialdehydů [186]. Jejich hlavní nevýhodou je jejich toxický charakter pro buňky [187]. Například glutaraldehyd (LD50 orálně pro krysou 134 mg/kg) byl identifikován jako neurotoxický a jeho vliv na lidské tělo není ještě zcela prozkoumán [188]. O glyoxalu (LD50 orálně pro krysou 200 mg/kg) je známo, že je mutagenní [189]. Jsou náznaky jejich náhrady genipinem (LD50 orálně pro krysou 237 mg/kg), který oproti nim vykazuje nižší toxicitu [190, 191].

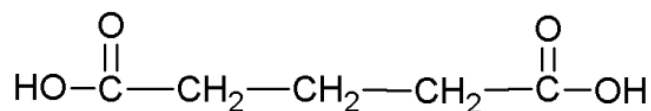
Jednou z možností řešení tohoto problému je nahrazení dialdehydů dvojfunkčními karboxylovými kyselinami, kde je možná esterifikace mezi karboxylem a hydroxylem (obr. 22) [192-194]. Jejich výhodou je, že jsou ve vodě rozpustné, proto jsou velmi vhodné pro PVOH matrici.



Obr. 22: Schematické znázornění síťování PVOH matrice glutarovou kyselinou

Kyselina glutarová (GA) je typickým představitelem dikarboxylových kyselin. GA (1,5-pentandiová kyselina), organická kyselina s pěti atomy uhlíku zobrazená na obr. 23, obsahuje dvě karboxylové skupiny, které mohou reagovat

s hydroxylovými skupinami polymeru za vzniku kovalentní vazby mezi molekulami polymeru. Je dostupná ve formě bílého krystalického prášku. GA je netoxická (LD50 orálně pro krysou 2000 mg/kg) a vyskytuje se hlavně v rostlinných a živočišných tkáních, nalézá se také v krvi a moči [146, 189], dále je často identifikována ve vzorcích atmosférických částic [195].



Obrázek 23: Struktura kyseliny glutarové (GA)

Použité materiály

Pro tuto část experimentální práce byl použit PVOH 6-98 ($M_w \sim 47\,000$ g/mol, HD 98 mol %), který byl dodán firmou Sigma Aldrich, nisin ve čtyřech formách, které jsou specifikované v tabulce 10. Při výrobě byla dále použita HCl 35% a metylalkohol od Penta chemicals.

Tabulka 10: Charakterizace 4 typů nisinových modifikátorů

| Forma | Označení | Obsah nisinu | Stabilizován |
|-------|-----------------------------------|--------------|--|
| 1 | NIS-PEG | 0,53 % | PEG 2050 a solemi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ |
| 2 | NIS- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 0,17 % | Solemi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ |
| 3 | NIS-Tween | 0,14 % | Poly(oxyetylen)sorbitan-monooleátem (Tween 80) a solemi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ |
| 4 | NIS-NaCl | 2,5 % | NaCl |

Nisinové modifikátory ve formě 1–3 byly získány experimentálně ve spolupráci s projektem MZe QJ 1310254. Forma 4 byla zakoupena u firmy Sigma-Aldrich.

Příprava vzorků

Na základě výsledků získaných z okruhu I (viz kapitola 2.1) byl pro tuto studii zvolen PVOH 6-98 z důvodu jeho výhodných fyzikálně-chemických vlastností. Pro zjištění chování nisinu imobilizovaného do polymerní PVOH matrice byly připraveny modelové vzorky obsahující PVOH, nisin (NIS) ve čtyřech formách, GA (netoxické síťovací činidlo), metylalkohol a kyselinu chlorovodíkovou 0,02M (vytvářející kyselé prostředí pro stabilizaci nisinu).

Nejdříve, pro pochopení vlastního síťování PVOH glutarovou kyselinou, byla připravena série modelových vzorků zesíťovaného PVOH neobsahujícího nisin pro zjištění materiálového chování a následného porovnání změn způsobených inkorporací jednotlivých nisinových forem. Obsah GA byl volen podle rovnice (12) [60] pro dosažení stupně zesíťování polymeru v rozmezí 0–100 %.

$$X_{GA} = \frac{W_{GA} \times M_{PVOH} \times 2}{W_{PVOH} \times M_{GA}} \times 100 \quad (12)$$

kde: X_{GA} stupeň zesíťování PVOH; W_{GA} hmotnost síťovacího činidla [g]; W_{PVOH} hmotnost PVOH [g]; M_{GA} molekulová hmotnost síťovacího činidla; M_{PVOH} molekulová hmotnost PVOH.

PVOH byl rozpuštěn (10 hm. % roztok) za stálého míchání při 90 °C po dobu 30 min v 0,02M HCl. Po samovolném ochlazení tohoto roztoku do něj byla postupně přidána GA (koncentrace 0–100 hm. %, vztaženo na hmotnost polymeru – viz tab. 11) a metylalkohol za kontinuálního míchání po dobu 16 hodin pro vytvoření vazeb mezi řetězci PVOH a GA. Po této době bylo přidáno 5 ml 0,02M HCl obsahující adekvátní množství NIS (popř. bez nisinu), předem přefiltrované přes stříkačkový mikrofiltr (PTFE 0,45 μm), pro získání koncentrace 150 μg čistého NIS v 1 g výsledného filmu. Takto připravený roztok vzorku byl ještě míchán dalších 15 minut pro dosažení úplné homogenity vzorku a následně byl rozlit do akrylových forem a ponechán vysušit v horkovzdušné sušárně 24 hodin při 35 °C. Vzorky byly před vlastní charakterizací skladovány v polyetylenových sáčkách pro zamezení přístupu vlhkosti v exikátoru v temnu při 25±2 °C. Tloušťka vzniklých filmů byla 100–130 μm. Vzorky filmů jsou dále označeny jako PVOH/xGA/NIS-y, kde x značí procentuální zesíťování PVOH matrice a y ukazuje typ nisinového modifikátoru.

Tabulka 11: Obsah GA v jednotlivých vzorcích polymerních fólií

| Vzorek | GA [g/10g PVOH] | Vzorek | GA [g/10g PVOH] |
|-------------|--------------------|--------------|--------------------|
| PVOH/0% GA | 0,0000 | PVOH/40% GA | 5,6217 |
| PVOH/5% GA | 0,7027 | PVOH/60% GA | 8,4326 |
| PVOH/10% GA | 1,4054 | PVOH/80% GA | 11,2434 |
| PVOH/20% GA | 2,8109 | PVOH/100% GA | 14,0543 |
| PVOH/25% GA | 3,5136 | | |

Použité metody

Stanovení stupně bobtnání a rozpustnosti vzorků

Tato stanovení probíhala za stejných podmínek, jako je uvedeno výše v kapitole 2.1.

Morfologická analýza - skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Skenovací elektronový mikroskop (Vega II/LMU, Tescan, Česká republika) se používá ke zkoumání morfologie povrchů i vnitřní struktury (v lomu) materiálů při vysokých zvětšeních. Poskytuje pseudo trojrozměrné obrázky a má oproti jiným zobrazovacím technikám výhodu, že není ovlivněna mnoha odchylkami. Rozsah zvětšení se obvykle pohybuje v rozmezí od 20 násobku až do 50 000 i více násobku [196]. K získání obrázků vnitřní struktury kompozitů byly vzorky zmrazeny podchlazením v hlubokomrazícím boxu při $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, rozlámány a opatřeny vodivou vrstvou obsahující těžké atomy.

Termogravimetrická analýza (TGA)

Termogravimetrie patří mezi jednu z nejvíce využívaných metod, při které se zaznamenává změna hmotnosti vzorku při definovaném teplotním programu a stanovených podmínkách. Důvodem úbytku hmotnosti vzorku vlivem zvyšující se teploty je vznik plynných produktů, které bývají pomocí nosného inertního plynu (dusík, hélium) odnášeny, aby nedošlo k jejich případným reakcím a ovlivnění výsledku. TGA poskytuje rychlý způsob pro odlišení jednoho polymeru od jiného pomocí pouze miligramových množství materiálu [197].

Při této analýze bylo naváženo přibližně 11 mg z každého vzorku a umístěno do platinové pánvičky. Termogravimetrická analýza byla provedena pomocí termogravimetru Q500 (TA Instrument, USA) v rozmezí teplot $25\text{--}750\text{ }^{\circ}\text{C}$ při rychlosti ohřevu $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ v proudícím dusíku ($100\text{ ml}/\text{min}$). Pro vyhodnocení výsledků byl použit program V20.13 Build 39.

Strukturní charakterizace

Analýza změn chemické struktury filmů byla provedena infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací se zeslabenou úplnou reflektancí (FTIR-ATR) dle kap. 2.1.

Tepelné vlastnosti

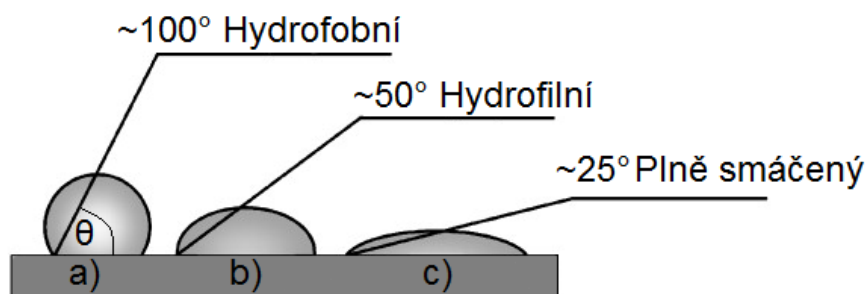
Termická analýza byla provedena pomocí diferenční snímací kalorimetrie (DSC) s obdobně připravenými vzorky a na stejném přístroji, jako je uvedeno v kapitole 2.1. Samotná analýza probíhala rychlostí 10 °C/min od teploty -20 °C do 230 °C a po dosažení této teploty byla udržována ještě 1 minutu (první ohřev). Poté došlo stejnou rychlostí k chlazení na -20 °C. Po udržení této teploty po dobu 1 minuty následoval druhý ohřev naprogramovaný od -20 °C do 230 °C. Výsledky byly taktéž vyhodnoceny pomocí programu STAR^e Default DB V9.20.

Mechanické vlastnosti

Podstatou této metody je stanovit mechanické vlastnosti vyrobených vzorků v závislosti na jejich koncentraci aditivních látek. Měření a vyhodnocení mechanických vlastností PVOH matric modifikovaných různým množstvím GA probíhalo obdobně, jak je popsáno v kap. 2.1.

Povrchové vlastnosti

Kontaktní úhel smáčení vodou je jednou z několika přímo měřitelných vlastností fázového rozhraní pevná látka/kapalina/plyn. Jedná se o úhel, který svírá tečna k povrchu kapky, vedená v bodě styku kapky s rozhraním. Jde o metodu citlivou na chemickou stavbu svrchní vrstvy molekul vzorku [198]. Pomocí měření kontaktního úhlu lze tedy určit hydrofilnost povrchu materiálu. Jak je znázorněno na obr. 24, čím nižší je kontaktní úhel, tím více je povrch hydrofilní. Důvodem může být, že se povrch stává více oxidovaným nebo má více ionizovatelné skupiny, které na něho byly zavedeny, anebo také tvoření vodíkových můstků s molekulami vody [110].



Obr. 24: Kontaktní úhel θ přisedlé kapky na a) hydrofobním, b) hydrofilním, c) plně smáčeném povrchu [110]

Přisedlá kapka na povrchu vzorku byla pozorována mikroskopem vybaveným goniometrickým okulárem a úhel smáčení byl automaticky vyhodnocován z fotografie kapky pomocí programu SEE System 7.0 a rovnice (13).

$$\tan\left(\frac{\theta_s}{2}\right) = \frac{h}{x} \quad (13)$$

kde: θ_s statický kontaktní úhel; h výška kapky; x polovina šířky kapky [110].

Antimikrobiální vlastnosti

Disková diluční metoda byla provedena stejně, jako je popsáno v bodě 2.1.

Druhá modifikovaná technika, tzv. metoda zředování a inkubace na agarových plotnách, spočívala ve vytvoření desetinného ředění z bakteriálních suspenzí *Staphylococcus aureus* CCM 4516 *Listeria monocytogenes* CCM 1699 a *Escherichia coli* CCM 4517, do kterých byl přidán a nechán po určenou dobu působit vzorek polymeru [174, 175].

Vzorky polymerních filmů (cca 0,1 g) byly třikrát vedle sebe vloženy do zkumavek obsahujících 9 ml roztoku bujónu (1/500 Nutrient broth with 1% peptone) a 1 ml bakteriální suspenze. Po 24 hodinách inkubace, při 35 ± 2 pro grampozitivní a 37 ± 2 °C pro gramnegativní bakterie, byly tři zkumavky ze stejného vzorku slity dohromady pro získání průměrného vzorku a bylo provedeno počáteční ředění převedením 1 ml vzorku do 9 ml fyziologického roztoku, zkumavka byla řádně protřepána a proces opakován po několik dalších ředění. Z těchto zředěných roztoků byly stanoveny přeživší bakterie, jak je uvedeno v kapitole 2.1. Po uplynutí inkubační doby byl stanoven počet přeživší kolonie tvořících jednotek (CFU) N pomocí rovnice (14):

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d} \quad (14)$$

kde: ΣC součet všech kolonií spočítaných na vybraných plotnách; n_1 počet ploten použitých pro výpočet z prvního ředění; n_2 počet ploten použitých pro výpočet z druhého ředění; d faktor prvního pro výpočet použitého ředění.

Titrační stanovení volné kyseliny glutarové

Stanovení volné GA, která se kovalentně nenavázala s PVOH, bylo provedeno pomocí zjištění titrační kyselosti (TK). Zhruba 0,2 g z každého vzorku bylo dáno do 20 ml demineralizované vody a ponecháno třepat 24 hodin při 25 °C pro uvolnění veškeré kovalentními vazbami nenavázané GA

do vodného prostředí. Takto vzniklé výluhy byly titrovány 0,1M odměrným roztokem hydroxidu sodného na fenolftalein do prvního stálého růžového zabarvení. Odměrný roztok byl standardizován pomocí kyseliny šťavelové. Ze zjištěných spotřeb odměrného roztoku byla vypočtena reálná koncentrace nenavázané GA podle vzorců (15)–(17). Stanovení bylo provedeno pro každý vzorek třikrát.

$$TK = \frac{A_{NaOH} \cdot c_{NaOH}}{m} \quad (15)$$

$$TK_{GA} = TK - TK_{PVOH} \quad (16)$$

$$m_{GA} = TK_{GA} \cdot M_{GA} \quad (17)$$

kde: TK titrační kyselost [mmol/g] zjištěná pro každý vzorek filmu; A_{NaOH} spotřeba odměrného roztoku NaOH [ml]; c_{NaOH} reálná koncentrace odměrného roztoku [mol/l]; TK_{GA} titrační kyselost GA (bez vlivu kyselosti samotné PVOH matrice); TK_{PVOH} titrační kyselost slepého pokusu (čistý PVOH); m_{GA} reálná hmotnost uvolněné GA; M_{GA} molární hmotnost GA [g/mol].

Kinetika uvolňování nisinu

Pro kvantitativní stanovení BAL byla vybrána vysoce účinná kapalinová chromatografie s detekcí pomocí UV-VIS detektoru, která je vhodnou metodou pro stanovení netěkavých látek [108]. Modifikované polymery a kontrolní vzorky (cca 0,5 g) byly ponechány v 10 ml demineralizované vody a v předem definovaných časových intervalech bylo odebíráno 0,5 ml vodného média pro stanovení pomocí vysokoúčinného kapalinového chromatografu (HPLC Waters). Parametry měření byly následující:

Kolona: XSelect, C18 CS, (5 μ m, 4,6 X 250 mm, Waters) + předkolona (Reprosil 100 C18, 50 X 4mm, 5 μ m, Watrex), teplota kolony: 40°C

Mobilní fáze: Acetonitril + 0,05% (v/v) trifluoroctové kyseliny (TFAA) (A); Voda + 0,05% (v/v) TFAA (B). Gradient metody je uveden v tabulce 12.

Tabulka 12: Gradient chromatografické metody

| Mobilní fáze A [%] | Mobilní fáze B [%] | Čas [min] |
|--------------------|--------------------|-----------|
| 20 | 80 | 0–5 |
| 80 | 20 | 5–20 |
| 20 | 80 | 20–25 |
| 20 | 80 | 25–40 |

Detekce probíhala pomocí duálního UV detektoru (200, 220nm). Výpočty kumulativní koncentrace uvolněného nisinu byly prováděny z vlnové délky 220 nm pomocí kalibrační křivky ($y = 33\,143\,222,66x - 13\,702,27$; $R^2 = 0,9910$) a zjištěných ploch píků jednotlivých vzorků. Metoda pro stanovení nisinu byla vytvořena a optimalizována v rámci této práce.

Výsledky a diskuze

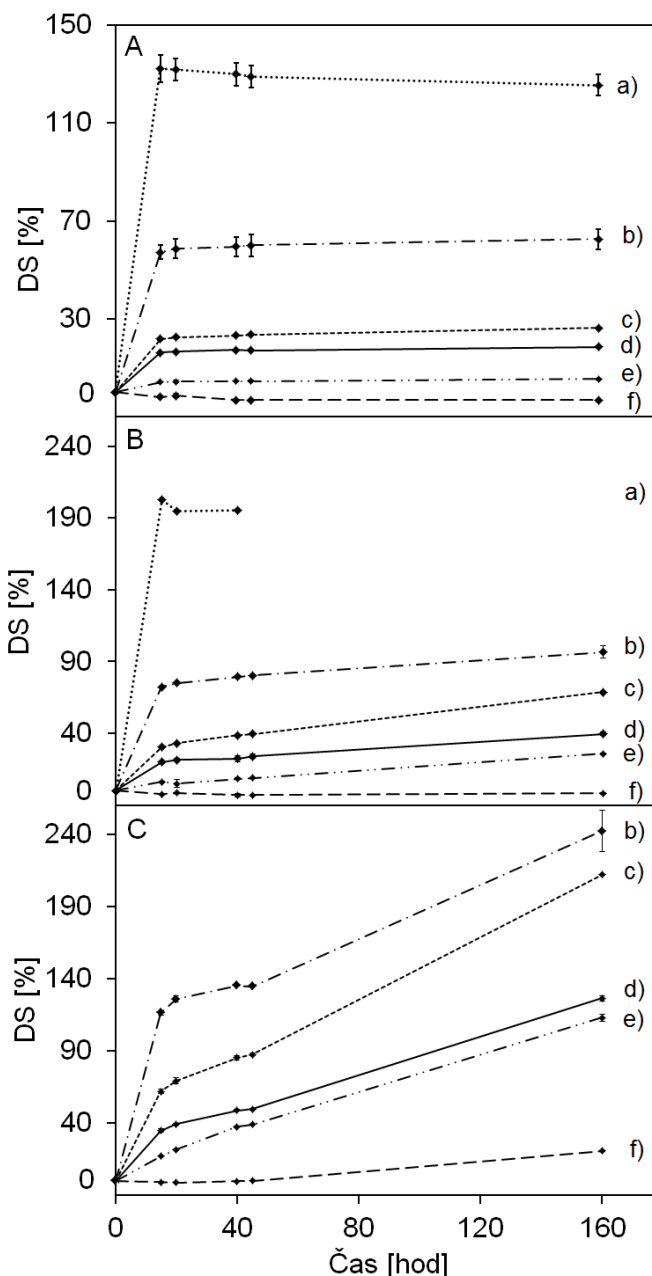
Stanovení stupně bobtnání a rozpustnosti vzorků

Závislost stupně nabobtnání (DS) čisté PVOH fólie a vzorků s různým stupněm zesílení GA (10, 25, 40, 60, 100 %) v čase (0–160 hodin) a při různých teplotách (25, 50 a 70 °C) je znázorněn na obrázku 25. V případě čisté PVOH fólie je patrný výrazný vliv teploty, kdy vzorky měřené při 50 °C (obr. 25B) bylo možno analyzovat pouze do 40 hodiny experimentu, zatímco při 70 °C došlo k úplnému rozpuštění fólie již během prvních 24 hodin experimentu. Tento výsledek je v souladu jak s teoretickými předpoklady danými termodynamickými zákonitostmi, tak s experimentálními výsledky jiných autorů [121, 199].

S rostoucím stupněm síťování dochází k významnému poklesu stupně nabobtnání zkoumaných vzorků, přičemž maximální DS po 160 hodinách experimentu roste se zvyšující se teplotou. Tyto výsledky jednoznačně potvrzují vznik příčných kovalentních vazeb mezi řetězci PVOH, které limitují interakci hydrofilních makromolekul s molekulami rozpouštědla – vody.

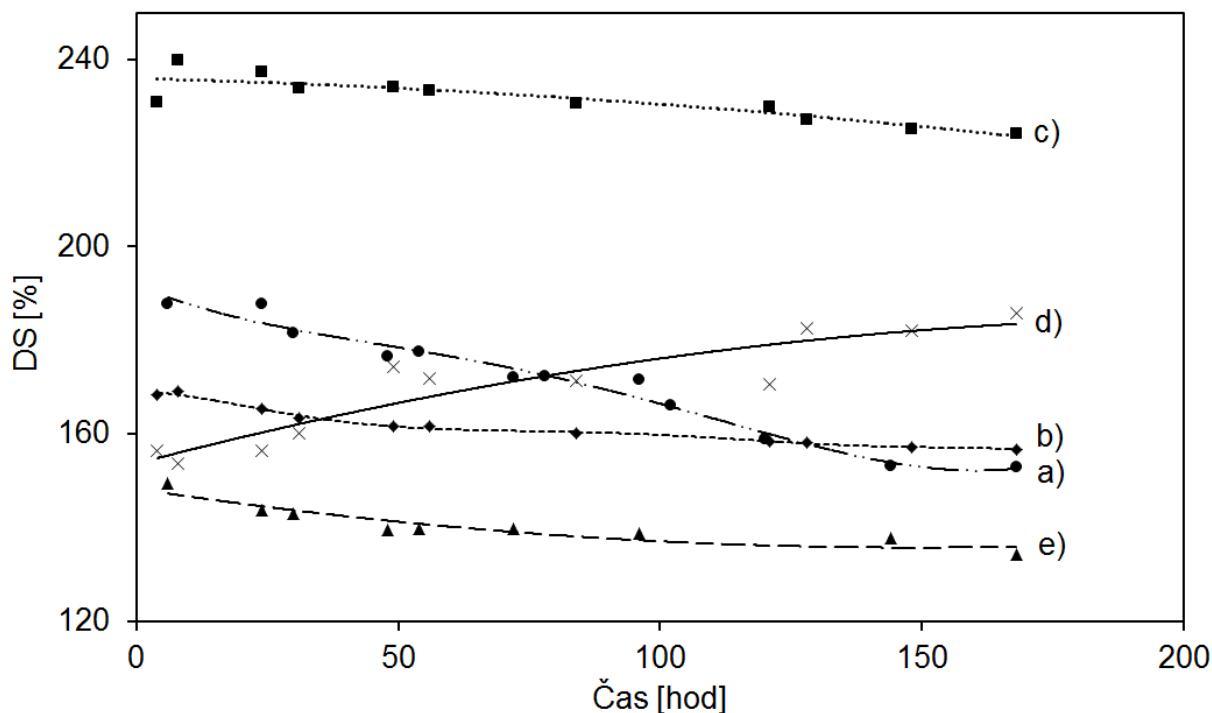
Z hlediska praktického uplatnění byly dále studovány systémy se stupněm zesílení 0, 5, 20 a 60 % GA, které byly modifikovány nisinem ve čtyřech formách (viz tab. 10). Vzhledem k tomu, že jednotlivé formy použitého nisinu zahrnují i příměsi anorganických solí ((NH₄)₂SO₄), NaCl), emulgátor (polyoxyethylensorbitanmonooleát) a polyéter (polyetylglykol) bylo nutné stanovit i vliv výše zmíněných příměsí na základní charakteristiky PVOH/GA systémů. Vliv přídavku nisinového modifikátoru na stupeň bobtnání PVOH filmů s různým stupněm zesílení GA při 25 °C v čase je prezentován v tabulce 13. Z výsledků vyplývá, že přídavek nisinového modifikátoru forem 1, 2, a 4 do čisté PVOH matrice neovlivňuje stupeň bobtnání vzorků. Naproti tomu

přídavek emulgátoru, který je obsažen ve formě 3, způsobuje mírné zvýšení stupně nabobtnání, což je patrné i na obrázku 26. Pozorovaný jev lze přisoudit specifickým interakcím PVOH a poly(oxyetylen)sorbitan-monooleátu [200]. Úbytek sledovaného parametru pro čistou PVOH fólii (obr. 26) je způsoben pozvolným rozpouštěním vzorku. V případě filmů zesíťovaných GA (60 %) je pozorovatelný efekt přidavku různých forem nisinového modifikátoru do PVOH, kdy nejvyšší stupeň bobtnání vykazovaly filmy obsahující formu stabilizovanou Tweenem 80. Obecně je také pozorovatelný významný vliv stupně zesíťování GA.



Obr. 25: Vliv zesíťování na stupeň bobtnání a) PVOH, b) PVOH/10%GA, c) PVOH/25%GA, d) PVOH/40%GA, e) PVOH/60%GA, f) PVOH/100%GA fólií v závislosti na teplotě prostředí – při 25 °C (A), 50 °C (B), 70 °C (C)

Statistické zhodnocení výsledků vlivu plniva (typu nisinového modifikátoru) na nabobtnání fólií naznačuje významné rozdíly mezi jednotlivými typy plniv v PVOH matrici, jak je také vidět na obr. 26. Hodnoty bobtnání fólie, která obsahuje nisin stabilizovaný v soli síranu amonného (křivka c) vykazuje oproti ostatním větší příjem vody do svého objemu o zhruba 80 %. U křivky čistého PVOH (a) je znatelný strmější pokles bobtnání související s rozpouštěním tohoto vzorku. Oproti tomu PVOH plněno nisinem v Tweenu 80 vykazuje i po 168 hodinách bobtnání znatelný příjem vody do svého objemu.

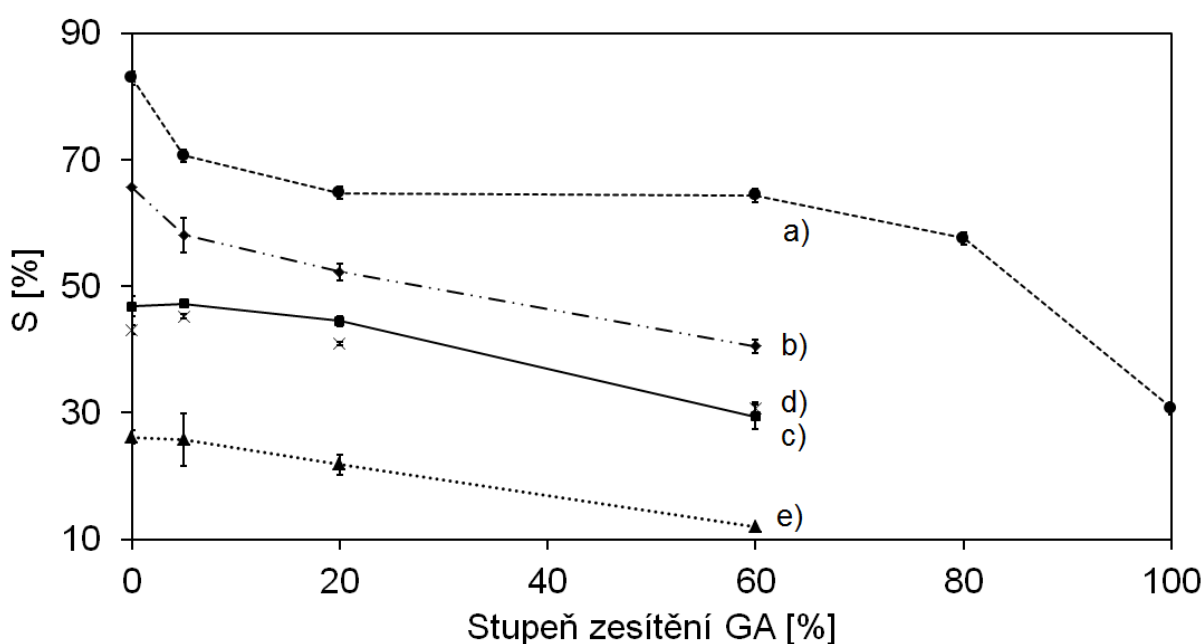


Obr. 26: Vliv nisinového modifikátoru na stupeň bobtnání fólií a) PVOH, b) PVOH /NIS-PEG, c) PVOH /NIS-(NH₄)₂SO₄, d) PVOH /NIS-tween, e) PVOH /NIS-NaCl. V grafu jsou uvedeny pomocné křivky pro přehlednější znázornění trendu jednotlivých závislostí.

Tabulka 13: Stupeň bobtnání fólií ve vybraných časech měření ($\bar{x} \pm SD$)

| Forma | Vzorek | Stupeň bobtnání [%] při 25 °C v čase [hod] | | | | | | |
|-------|--|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | 8 | 24 | 48 | 56 | 84 | 120 | 168 |
| | PVOH | 187,8±5,2 | 187,8±7,2 | 176,6±4,1 | 177,6±5,1 | 172,3±4,6 | 158,9±0,4 | 153,0±4,7 |
| 1 | 0% GA/NIS-PEG | 123,5±1,0 | 169,0±0,9 | 163,3±0,7 | 161,5±0,8 | 160,1±0,5 | 158,4±1,0 | 156,7±0,4 |
| | 5% GA/NIS-PEG | 156,7±6,1 | 163,1±5,1 | 153,8±5,3 | 153,7±5,3 | 151,1±5,0 | 151,1±4,9 | 151,6±4,7 |
| | 20% GA/NIS-PEG | 137,9±1,0 | 132,6±0,8 | 129,1±1,0 | 128,6±0,4 | 126,0±0,9 | 126,0±0,9 | 122,6±0,6 |
| | 60% GA/NIS-PEG | 78,2±3,5 | 74,6±3,3 | 72,2±3,6 | 72,5±3,7 | 71,2±3,6 | 70,8±3,8 | 68,3±3,7 |
| 2 | 0% GA/NIS-(NH ₄) ₂ SO ₄ | 239,9±5,3 | 237,2±4,3 | 234,2±3,7 | 233,45,0 | 230,6±4,7 | 227,1±3,3 | 224,2±3,0 |
| | 5% GA/NIS-(NH ₄) ₂ SO ₄ | 207,7±2,7 | 206,9±2,0 | 206,0±1,9 | 205,2±1,3 | 204,8±1,3 | 203,3±2,4 | 198,4±1,5 |
| | 20% GA/NIS-(NH ₄) ₂ SO ₄ | 155,4±2,6 | 154,6±1,6 | 152,1±1,5 | 150,0±1,8 | 148,4±2,0 | 148,0±3,2 | 145,9±0,8 |
| | 60% GA/NIS-(NH ₄) ₂ SO ₄ | 67,5±4,1 | 60,4±8,1 | 56,8±6,3 | 55,0±7,8 | 51,9±8,9 | 50,6±8,2 | 49,0±8,1 |
| 3 | 0% GA/NIS-tween | 153,7±9,7 | 156,4±9,8 | 174,3±9,5 | 171,9±9,6 | 171,4±9,8 | 170,7±9,8 | 185,7±5,8 |
| | 5% GA/NIS-tween | 255,2±4,2 | 255,6±4,4 | 266,6±6,2 | 265,2±8,1 | 265,7±7,6 | 262,0±7,1 | 259,9±4,6 |
| | 20% GA/NIS-tween | 291,4±7,7 | 291,4±9,9 | 294,0±7,4 | 294,5±7,2 | 292,9±7,2 | 290,4±7,9 | 285,9±7,3 |
| | 60% GA/NIS-tween | 112,4±9,0 | 106,7±9,4 | 102,6±9,4 | 102,6±9,3 | 100,4±9,7 | 98,6±9,1 | 96,1±9,1 |
| 4 | 0% GA/NIS-NaCl | 149,4±1,6 | 143,8±0,4 | 139,4±0,7 | 139,8±0,8 | 138,7±0,5 | 137,7±0,3 | 134,2±1,2 |
| | 5% GA/NIS-NaCl | 143,6±9,7 | 138,2±7,7 | 137,4±7,8 | 135,9±8,2 | 135,6±8,2 | 134,9±8,0 | 131,0±6,8 |
| | 20% GA/NIS-NaCl | 101,7±4,5 | 98,9±4,1 | 98,1±4,0 | 97,0±4,0 | 97,7±4,1 | 97,3±4,0 | 95,9±3,8 |
| | 60% GA/NIS-NaCl | 97,5±4,5 | 91,2±3,3 | 88,6±1,7 | 87,2±2,5 | 90,4±3,6 | 90,1±3,6 | 88,9±3,6 |

Na bobtnací experimenty navazovala stanovení rozpustnosti vzorků, která byla vypočítána dle rovnice (9). Na obrázku 27 je uvedena závislost rozpustnosti na stupni zesílení GA. Stanovení rozpustnosti bylo provedeno při 25 °C a po 168 hodinách experimentu. Průběh síťovací reakce byl opět potvrzen prostřednictvím klesající hodnoty rozpustnosti se zvyšujícím se stupněm zesílení GA u všech testovaných vzorků. Výrazně redukovanou rozpustnost však vykazovaly vzorky obsahující nisinový modifikátor typu 4 (obr. 27 e)), které při 60% zesílení vykazovaly o 90 % nižší hodnotu rozpustnosti ve srovnání s nemodifikovaným PVOH. Tento vzorek vykazoval také výrazně nižší rozpustnost i ve srovnání s ostatními nisin obsahujícími fóliemi. Tento výsledek může být zapříčiněn synergickými interakcemi NaCl s PVOH matricí ve smyslu tvorby nerozpustných komplexů [201].



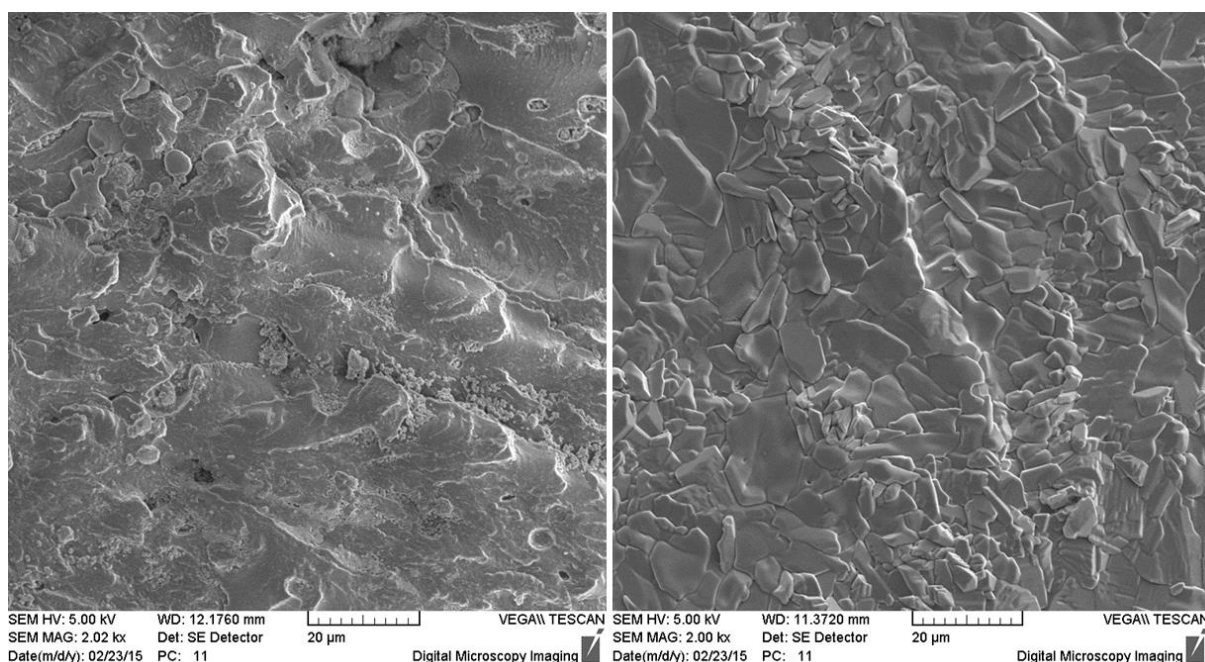
Obr. 27: Vliv synergie procentuálního zesílení glutarovou kyselinou a různého typu stabilizátoru nisinu na rozpustnost polymerní matrice při 25 °C; a) PVOH_GA, b) PVOH_GA_NIS-PEG, c) PVOH_GA_NIS-(NH₄)₂SO₄, d) PVOH_GA_NIS-tween, e) PVOH_GA_NIS-NaCl

Morfologická analýza – skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

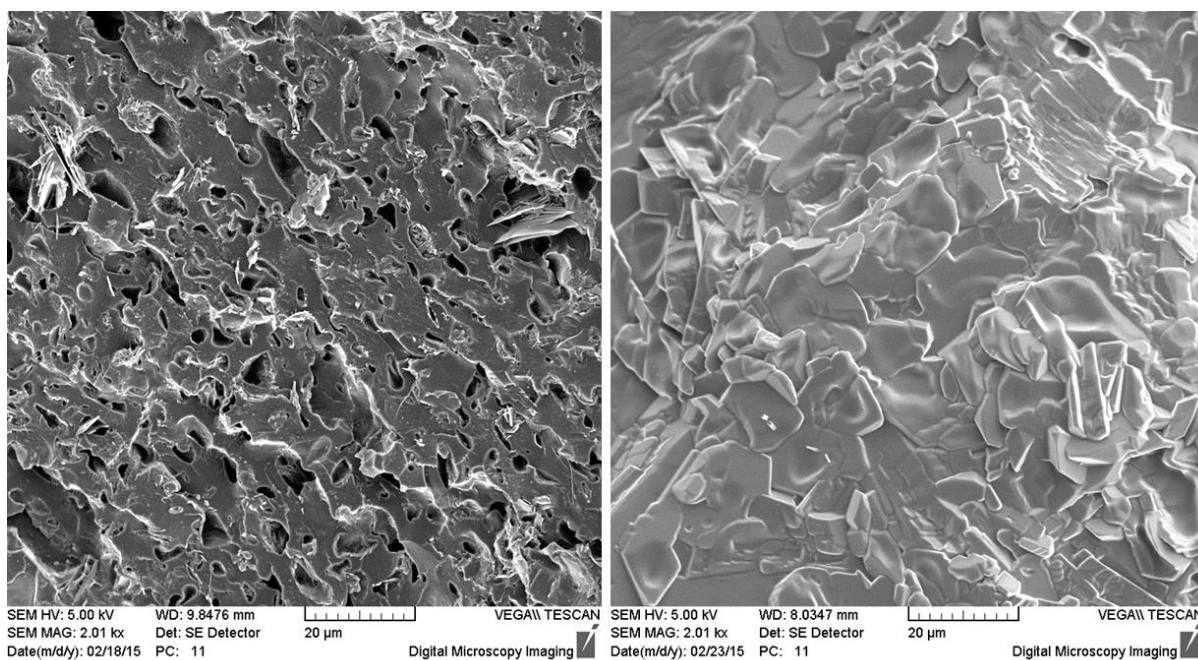
Vliv síťování PVOH pomocí GA a kompatibilita mezi PVOH matricí a nisinovými modifikátory byla také studována pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Snímky z elektronového mikroskopu prezentovány níže byly pořízeny na lomových plochách připravených fólií. Lomy byly provedeny na vzorcích podchlazených na -60 °C.

Obrázek 28 znázorňuje SEM snímky nezesíťované (vlevo) a zesíťované PVOH fólie 60 % GA (vpravo) obsahující nisinový modifikátor formy 1. Vliv síťování se projevil komplexnější povrchovou strukturou lomové plochy, což je způsobeno právě vyšší soudržností materiálu z důvodu přítomnosti příčných kovalentních vazeb. Tento efekt byl sledován i u ostatních vzorků. V případě formy 1 se systém skládá ze dvou omezeně mísitelných polymerních matric (PVOH, PEG) [202, 203], což v závislosti na teplotě může vést k fázové separaci obou matric. Nicméně sledovaný systém neobsahuje výrazné množství PEG a výše popsaný jev nebyl pozorován. Naopak tento systém vykazoval vysokou míru kompatibility.

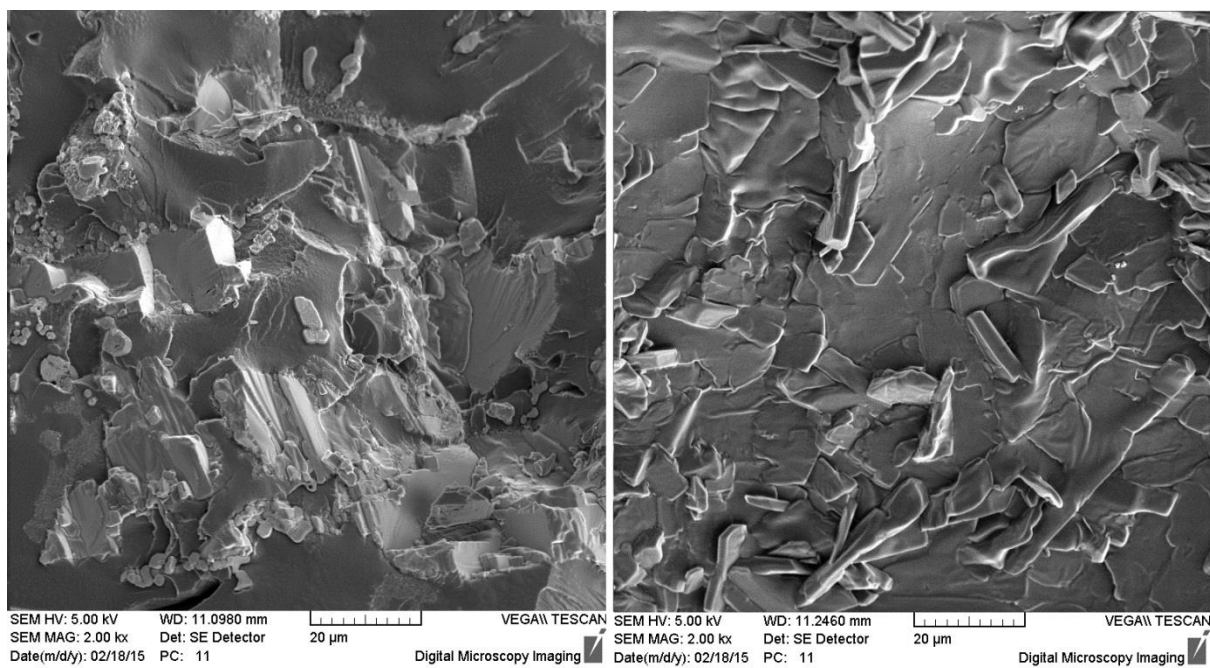
Naproti tomu PVOH film obsahující formu 2 vykazoval v nezesíťovaném stavu značnou nehomogenitu lomové plochy (obr. 29, vlevo). Tento efekt již nebyl sledován v případě zesíťovaného vzorku (obr. 29, vpravo). Podobný výsledek byl pozorován i pro filmy obsahující formu 3, jak je patrné z obr. 30. Na druhou stranu přítomnost NaCl v PVOH (forma 4) nezesíťovaných filmech (obr. 31, vlevo) zapříčiňuje nehomogenní morfologii lomové plochy, která zřetelně ukazuje výskyt útvarů, kterými mohou být buď krystaly NaCl, popřípadě komplexy NaCl/PVOH, jak je naznačeno výše.



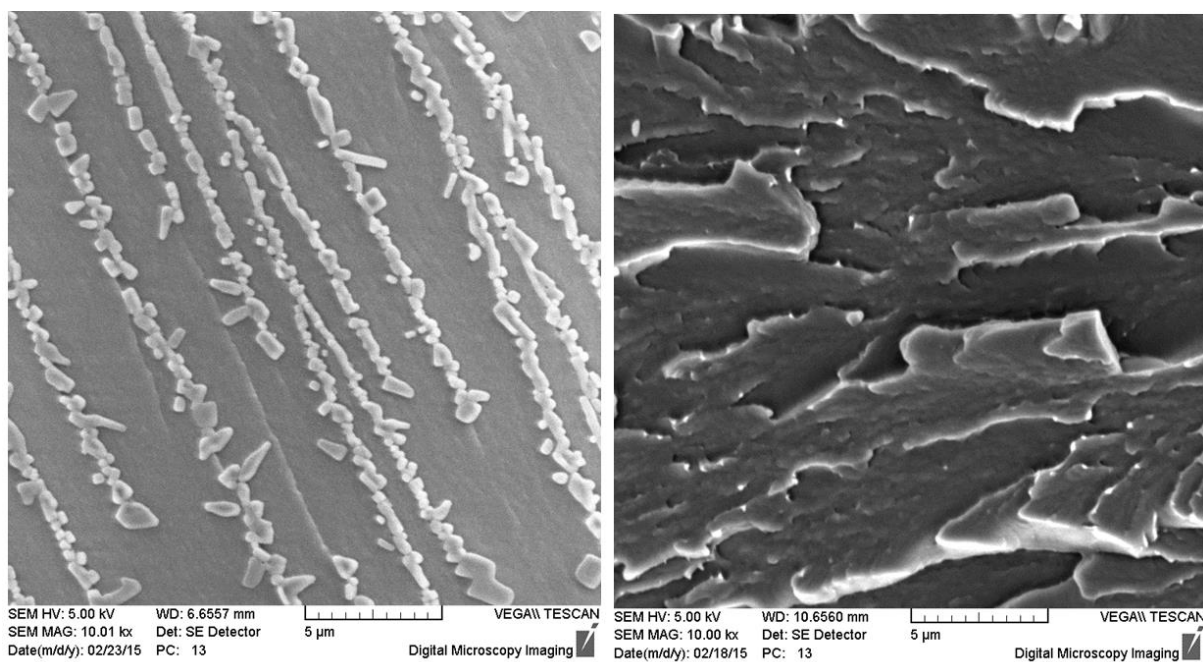
Obr. 28: SEM analýza PVOH filmů s NIS-PEG (vlevo 0% GA, vpravo 60% GA)



Obr. 29: SEM analýza PVOH filmů s NIS-(NH₄)₂SO₄ (vlevo 0% GA, vpravo 60% GA)



Obr. 30: SEM analýza PVOH filmů s NIS-tween (vlevo 0% GA, vpravo 60% GA)



Obr. 31: SEM analýza PVOH filmů s NIS-NaCl (vlevo 0% GA, vpravo 60% GA)

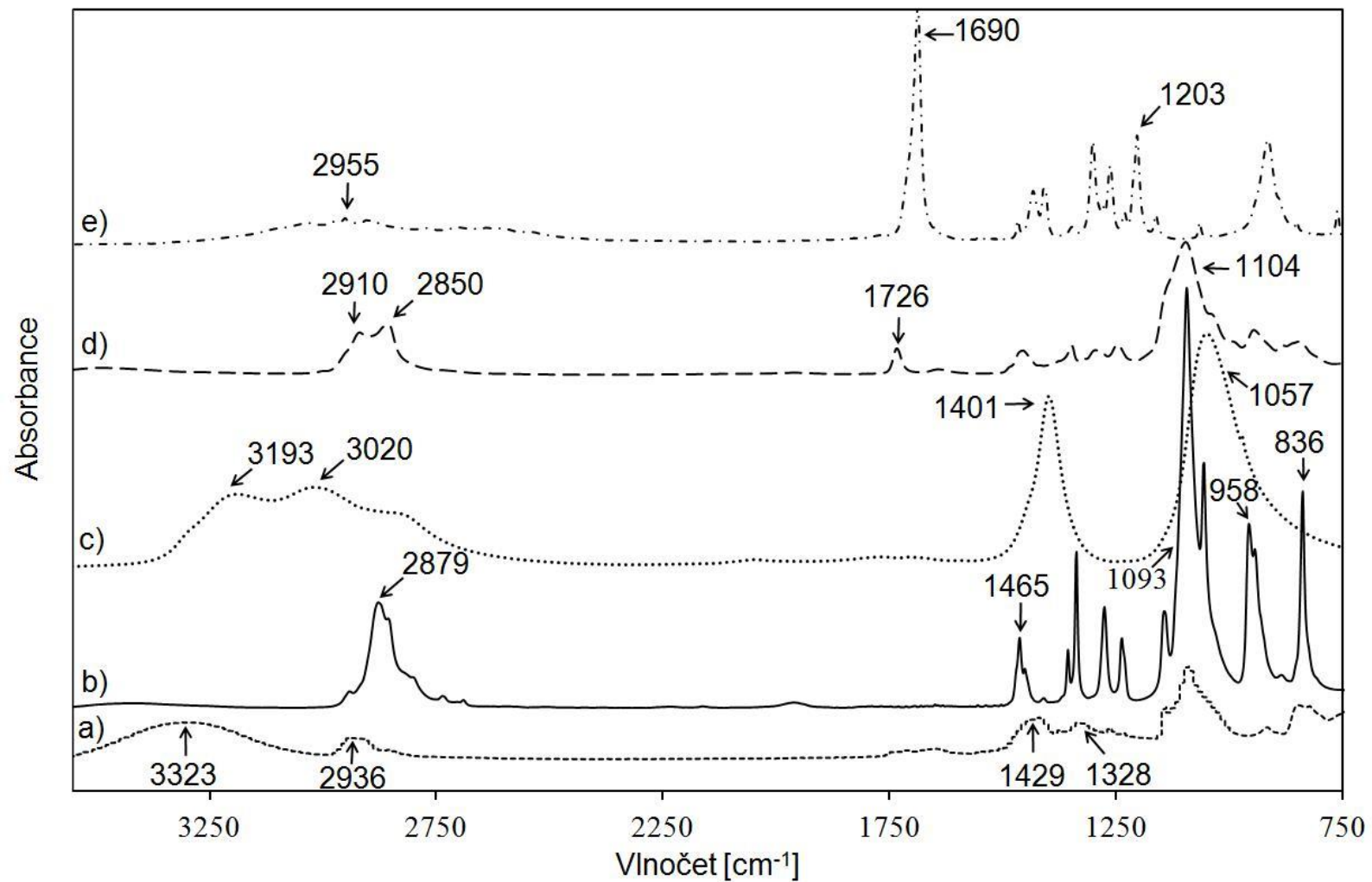
Strukturní analýza

FTIR-ATR spektra čistých komponent (obr. 32) ukazují charakteristické absorpční pásy PVOH, PEG, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Tween 80 a GA, které odpovídají spektrům prezentovaným v odborné literatuře. Charakteristické píky pro PVOH mohou být nalezeny při vlnočtech 3323, 2936, 1429 a 1328 cm^{-1} . Spektrum PEG vykazuje typické pásy v hodnotách 2879, 1465, 1093, 958 a 836 cm^{-1} [204]. Spektrum síranu amonného ukazuje pásy vlivem S=O při 1057 cm^{-1} . Absorpční pásy N–H jsou přítomny při 3193, 3020 a 1401 cm^{-1} . To koresponduje s výsledky [205]. NaCl nevykazuje při použité metodě absorpční spektrum. Ve spektru poly(oxyetylen)sorbitan-monooleátu (Tween 80) se karbonylové skupiny objeví při 1726 cm^{-1} . Pásy v rozmezí $2850\text{--}2950\text{ cm}^{-1}$ jsou přiřazeny k $-\text{CH}_2-$ skupinám. Absorpční pás při 1104 cm^{-1} je zřetelný kvůli $-(\text{CO})-\text{O}$ vazebným spojením [206]. U spektra GA je znatelný pás v okolí 2955 cm^{-1} , který značí $-\text{CH}_2-$ řetězec. Pík při 1690 cm^{-1} patří k C=O a 1203 cm^{-1} k C–OH vazbám pocházejícím z karboxylových skupin.

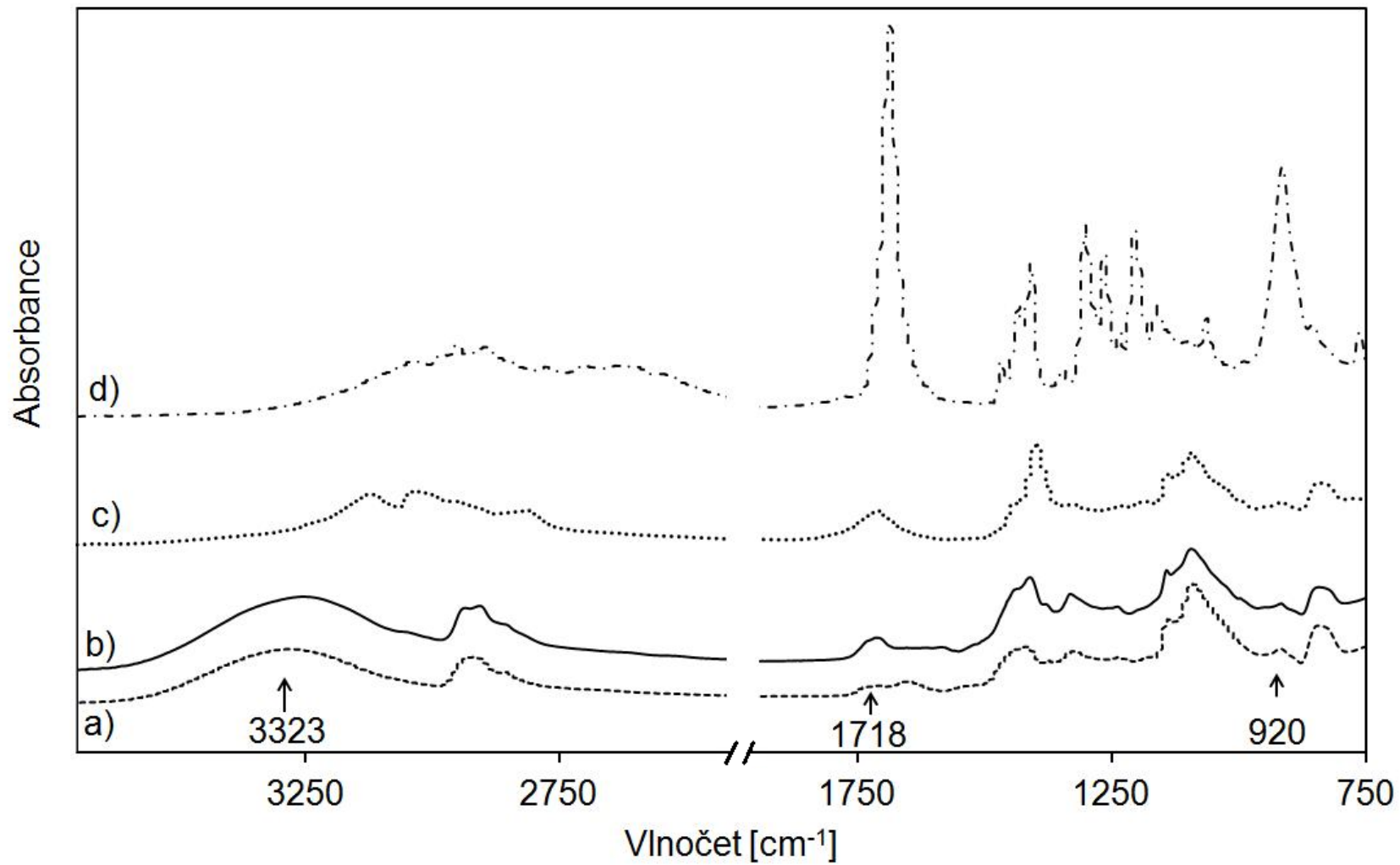
Strukturní charakterizace vzorků PVOH/GA fólií pomocí FTIR-ATR potvrzuje již zjištěné výsledky o vzniku esterových vazeb. Jedná se především o klesající trend pásů v 3323 a 2936 cm^{-1} (OH), 1146 a 1088 cm^{-1} (C–OH), které jednoznačně naznačují eliminaci volných OH skupin v polymerní struktuře. Průběh síťovací reakce je také potvrzen přítomností charakteristického absorpčního pásu při $1718\text{--}1729\text{ cm}^{-1}$ (C=O). S narůstajícím stupněm zesílení také roste pík v 920 cm^{-1} se symetrickým pohybem řetězce (C–O–C) a pík při 1718 cm^{-1} (C=O).

Spektra studovaných vzorků obsahujících čtyři formy nisinového modifikátoru a s různým stupněm zesílení GA jsou uvedena na obrázcích 33–36. V tomto případě FTIR-ATR spektra neukazují na specifické interakce mezi polymerní maticí a modifikátory.

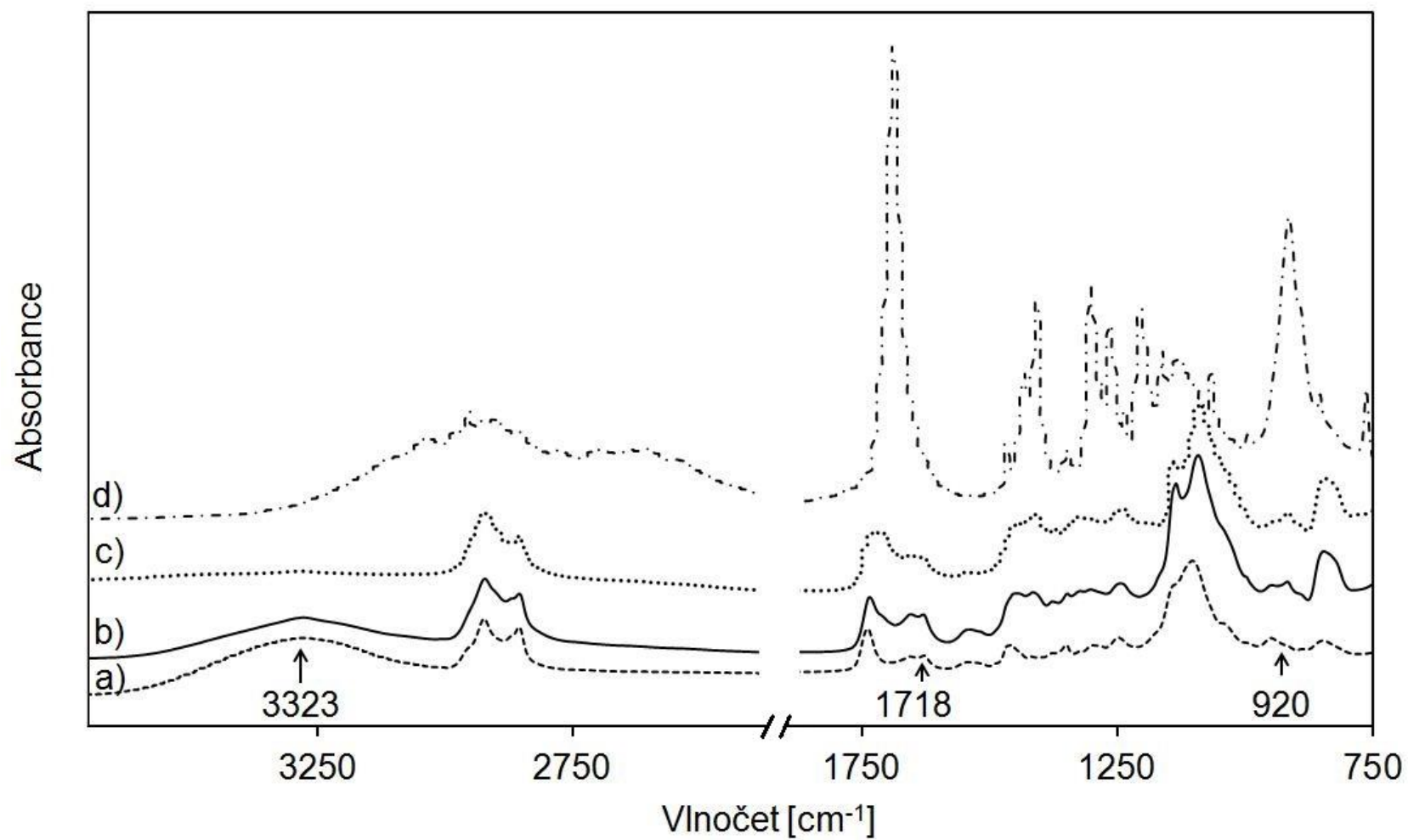
Vliv přítomnosti jednotlivých modifikátorů na FTIR-ATR spektra vzorků není patrný z důvodu nízké koncentrace modifikátorů v PVOH matici.



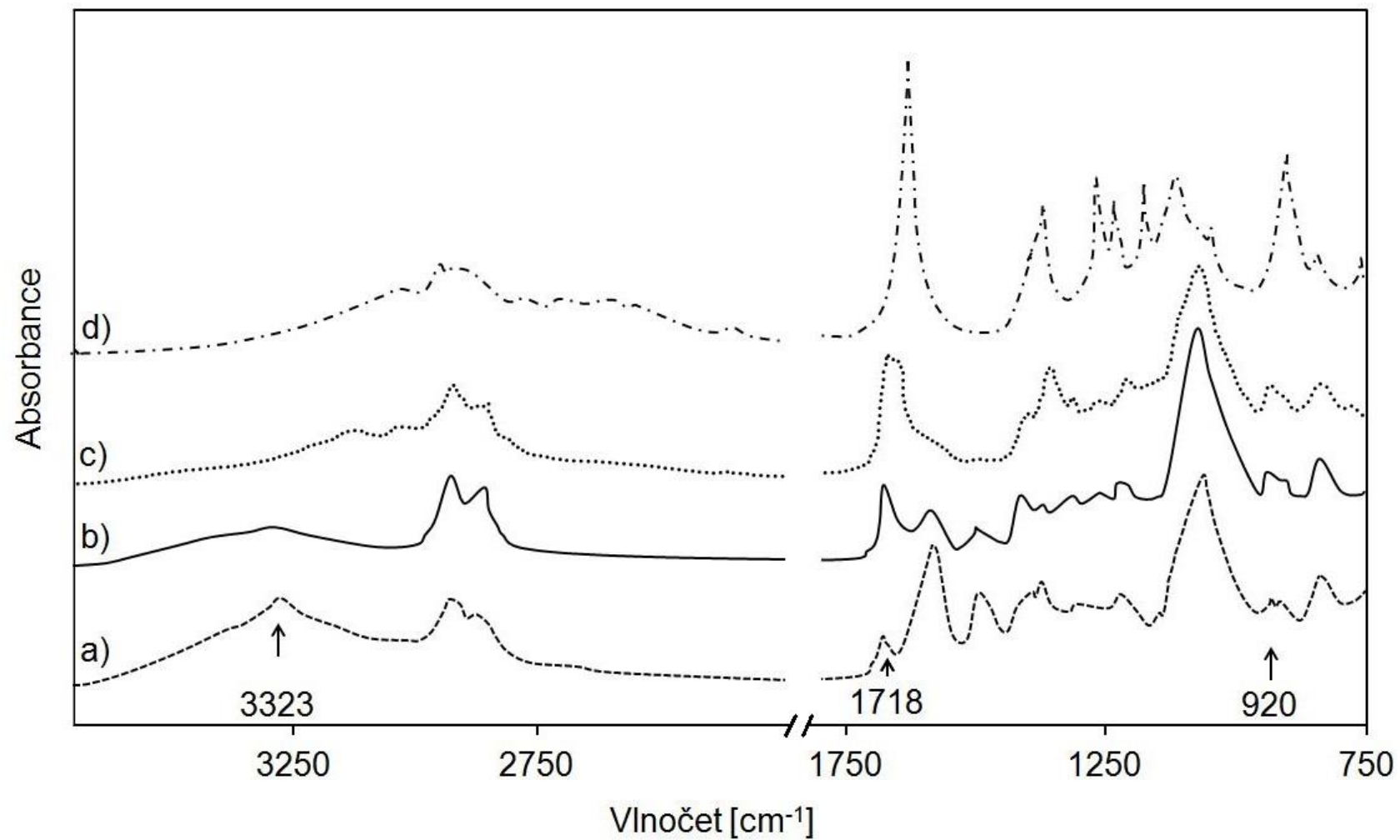
Obr. 32: FTIR-ATR spektra čistých komponent použitých při výrobě antimikrobiálních PVOH filmů; a) PVOH, b) PEG (M_n 2050), c) $(NH_4)_2SO_4$, d) Tween 80, e) GA



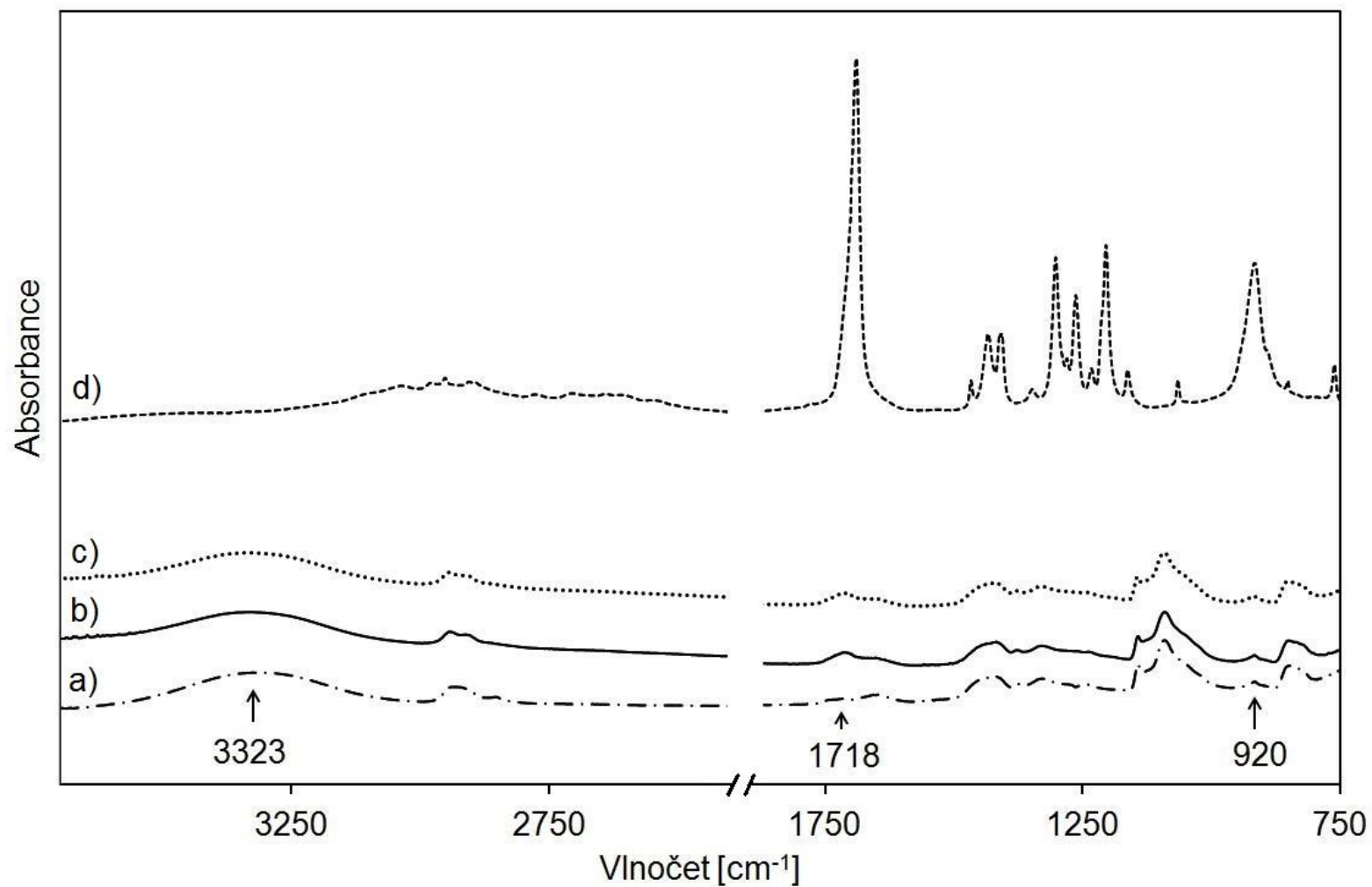
Obr. 33: FTIR-ATR spektra a) PVA/0%GA/NIS-PEG, b) PVA/5%GA/NIS-PEG, c) PVA/20%GA/NIS-PEG, d) PVA/60%GA/NIS-PEG



Obr. 34: FTIR-ATR spektra a) PVOH/0%GA/NIS-(NH₄)₂SO₄, b) PVOH/5%GA/NIS-(NH₄)₂SO₄, c) PVOH/20%GA/NIS-(NH₄)₂SO₄, d) PVOH/60%GA/NIS-(NH₄)₂SO₄



Obr. 35: FTIR-ATR spektra a) PVOH/0%GA/NIS-tween, b) PVOH/5%GA/NIS-tween, c) PVOH/20%GA/NIS-tween, d) PVOH/60%GA/NIS-tween



Obr. 36: FTIR-ATR spektra a) PVOH/0%GA/NIS-NaCl, b) PVOH/5%GA/NIS-NaCl, c) PVOH/20%GA/NIS-NaCl, d) PVOH/60%GA/NIS-NaCl

Tepelné vlastnosti

Vliv síťovací reakce na tepelnou stabilitu PVOH fólií je patrný z TGA křivek uvedených na obr. 37 a z tabulky 14. Z obr. 37 je jednoznačně zřetelný posun zahájení termodegradačních procesů k vyšším teplotám oproti čisté PVOH. Všechny analyzované vzorky vykazovaly vícestupňovou degradaci, kdy v případě PVOH měl dva stupně, v případě zesíťovaných systémů byly pozorovány 3 degradační stupně. Obecně lze rozklad zkoumaných vzorků rozdělit do čtyř teplotních intervalů. V prvním intervalu (do 260 °C) docházelo k rozkladu tepelně nestabilní GA, proteinů (pokud byly přítomny), odpařování vody, eventuálně dehydrataci a případné depolymeraci vedoucí k tvorbě polyenů, které byly rozkládány ve druhém intervalu při teplotách do 380 °C. Degradace vyšších uhlíkatých sloučenin nastala při teplotách nad 380 °C.

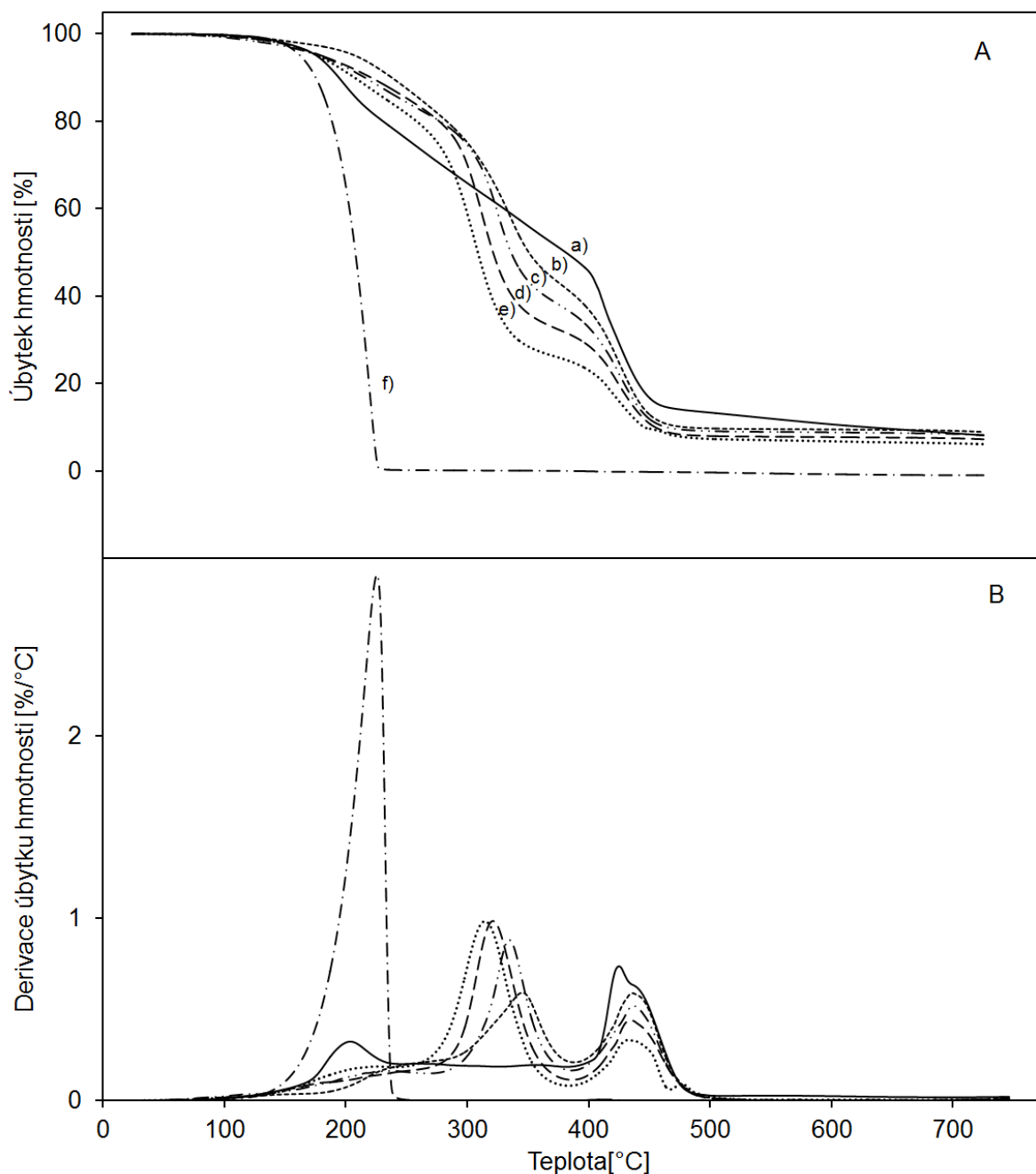
Tabulka 14: Hodnoty oblastí teplot odpovídající ztrátě hmotnosti vzorku

| Vzorek | Tp₁ | Tp₂ | Tp₃ |
|---------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| PVOH_0% GA | – | 357,0 | 425,0 |
| PVOH_20% GA | 265,4 | 345,4 | 436,2 |
| PVOH_40% GA | 235,4 | 334,5 | 437,4 |
| PVOH_60% GA | 230,8 | 321,2 | 435,6 |
| PVOH_100% GA | 225,3 | 314,7 | 432,3 |
| GA | 225,6 | – | – |

Výsledky TGA analýzy vzorků PVOH s 60% stupněm zesíťování GA obsahující různé formy nisinového modifikátoru jsou uvedeny v tab. 15. Výrazný posun začátku degradačních reakcí směrem k nižším teplotám byl pozorován pro formy 1 a 4, což je způsobeno vlastnostmi přísad. NaCl se rozkládá při teplotách vysoko nad 500 °C, ale přítomnost nečistot v modifikátoru může vést k iniciaci degradačních procesů při nižších teplotách (188 °C) a PEG vykazuje typický trend TGA záznamu se ztrátou hmoty již pod 100 °C [207].

Tabulka 15: Vliv typu nisinového modifikátoru na termogravimetrii PVOH matrice zesíťované na 60 %

| Forma | Typ nisinu | Tp₀ | Tp₁ | Tp₂ | Tp₃ |
|--------------|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1 | NIS-PEG | 86,6 | 229,4 | 319,2 | 425,1 |
| 2 | NIS-(NH₄)₂SO₄ | – | 247,6 | 330,5 | 436,8 |
| 3 | NIS-tween | – | 251,2 | 334,8 | 440,6 |
| 4 | NIS-NaCl | 188,6 | 230,8 | 321,2 | 435,6 |



Obr. 37: Termogravimetrické křivky (A) a jejich derivace (B) a) PVOH, b) PVOH/20% GA, c) PVOH/40% GA, d) PVOH/60% GA, e) PVOH/100% GA, f) čistá GA

Vliv síťovací reakce mezi PVOH a GA lze také pozorovat na výsledcích z měření na diferenčním snímacím kalorimetru v tabulce 16. Zatímco čistý PVOH vykazoval v prvním ohřevu teplotu tání (T_m) s maximem při 185 °C a teplotu skelného přechodu (T_g) při druhém ohřevu 112 °C, zesíťované systémy vykazovaly výrazně nižší hodnoty obou sledovaných charakteristik. Snížená mobilita polymerních řetězců vlivem zavedení příčných vazeb se projevuje

dramatickým snížením T_g a zároveň dochází k tvorbě méně dokonalých krystalických struktur PVOH, jehož důsledkem je snížení T_m . Pokles mobility polymerních řetězců a tedy i T_g lze pozorovat i u vzorků obsahující nisinové modifikátory všech čtyř forem. Naproti tomu teploty tání zůstávají buď nezměněny, nebo jsou dokonce zvýšeny vlivem přítomnosti nisinových modifikátorů. Míra zvýšení T_m závisí na formě modifikátoru, přičemž nejvýraznější změna T_m byla pozorována u forem 3 (Tween 80) a 4 (NaCl). Naopak PEG (forma 1) a $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (forma 2) hodnoty T_m nikterak výrazněji neovlivňují.

Tabulka 16: Hodnoty skelného přechodu (T_g) a teploty tání (T_m)

| Forma nisinu | Vzorek | T_g [°C] | T_m [°C] |
|--------------|---|------------|------------|
| | PVOH/0% GA | 112,98 | 185,00 |
| | PVOH/20% GA | 92,87 | 167,95 |
| | PVOH/40% GA | 82,89 | 161,99 |
| | PVOH/80% GA | 49,74 | 157,14 |
| 1 | PVOH/0% GA_NIS-PEG | 133,24 | 200,17 |
| | PVOH/5% GA_NIS-PEG | 120,82 | 202,33 |
| | PVOH/20% GA_NIS-PEG | 68,76 | 199,50 |
| | PVOH/60% GA_NIS-PEG | 40,67 | 201,00 |
| 2 | PVOH/0% GA_NIS- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 96,01 | 199,73 |
| | PVOH/5% GA_NIS- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 75,23 | 186,07 |
| | PVOH/20% GA_NIS- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 68,42 | 195,60 |
| | PVOH/60% GA_NIS- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 44,77 | 197,14 |
| 3 | PVOH/0% GA_NIS-tween | 155,80 | 195,46 |
| | PVOH/5% GA_NIS-tween | 135,51 | 183,83 |
| | PVOH/20% GA_NIS-tween | 103,00 | 195,11 |
| | PVOH/60% GA_NIS-tween | 101,83 | 224,69 |
| 4 | PVOH/0% GA_NIS-NaCl | 121,58 | 184,07 |
| | PVOH/5% GA_NIS-NaCl | 115,38 | 182,28 |
| | PVOH/10% GA_NIS-NaCl | 107,84 | 189,12 |
| | PVOH/20% GA_NIS-NaCl | 97,21 | 207,95 |
| | PVOH/40% GA_NIS-NaCl | 95,67 | 212,50 |
| | PVOH/60% GA_NIS-NaCl | 65,49 | 205,23 |
| | PVOH/100% GA_NIS-NaCl | 49,51 | 212,27 |
| | GA | 53,30 | 98,42 |

Mechanické vlastnosti

Hodnoty vlivu síťovacích reakcí na mechanické vlastnosti PVOH filmů jsou uvedeny v tabulce 17 ve formě závislosti Youngova modulu pružnosti (E), pevnosti v tahu a prodloužení při přetržení na stupeň zesílení GA. Výsledky jasně ukazují výrazný pokles E i pevnosti v tahu prokazující průběh síťovací reakce a vznik příčných vazeb. Z pohledu mechanických vlastností a praktické aplikovatelnosti se jako použitelné jeví zesílení do 25 %. Nad touto hranicí již nedochází k výraznému zvýšení efektivity síťovacích reakcí a zároveň dochází k výraznému znehodnocení mechanických vlastností fólií vlivem přebytku GA.

Tabulka 17: Výsledky měření mechanických vlastností PVOH filmů v závislosti na stupni zesílení

| Vzorek | E [MPa] | Pevnost v tahu [MPa] | Prodloužení při přetržení [%] |
|---------------|----------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| PVOH | 670,15±49,98 | 39,15±3,66 | 189,39±17,24 |
| PVOH/5% GA | 215,67±20,29 | 35,21±3,83 | 173,66±15,68 |
| PVOH/15% GA | 82,05±7,61 | 28,19±3,59 | 188,97±21,72 |
| PVOH/20% GA | 46,28±4,27 | 22,71±2,74 | 292,56±30,09 |
| PVOH/25% GA | 48,19±3,72 | 21,45±2,20 | 210,97±21,94 |
| PVOH/40% GA | 16,50±2,12 | 7,72±0,62 | 92,25±12,16 |
| PVOH/80% GA | 7,60±0,53 | 1,93±0,24 | 35,95±3,84 |

Povrchové vlastnosti fólií

Vliv síťovací reakce mezi PVOH a GA na povrchové vlastnosti připravených fólií byl testován také pomocí měření kontaktního úhlu smáčení vodou. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 18. Je patrné, že s rostoucím stupněm zesílení dochází k razantnímu snížení kontaktního úhlu smáčení a tedy i k zvýšení hydrofilnosti studovaných povrchů. Na hladině významnosti 5 % není mezi 60% a 100% zesílením statisticky významný rozdíl.

Tyto výsledky korelují s titračním zjištěním volné GA, kdy se v systému vyskytuje více volných karboxylových skupin (tab. 19).

Tabulka 18: Vliv stupně zesíťení filmů na velikost kontaktního úhlu smáčení

| Vzorek | Kontaktní úhel [°] |
|--------------|-----------------------|
| PVOH | 68,2±0,7 ^a |
| PVOH/40% GA | 34,2±3,5 ^b |
| PVOH/60% GA | 25,9±1,8 ^c |
| PVOH/100% GA | 22,2±2,4 ^c |

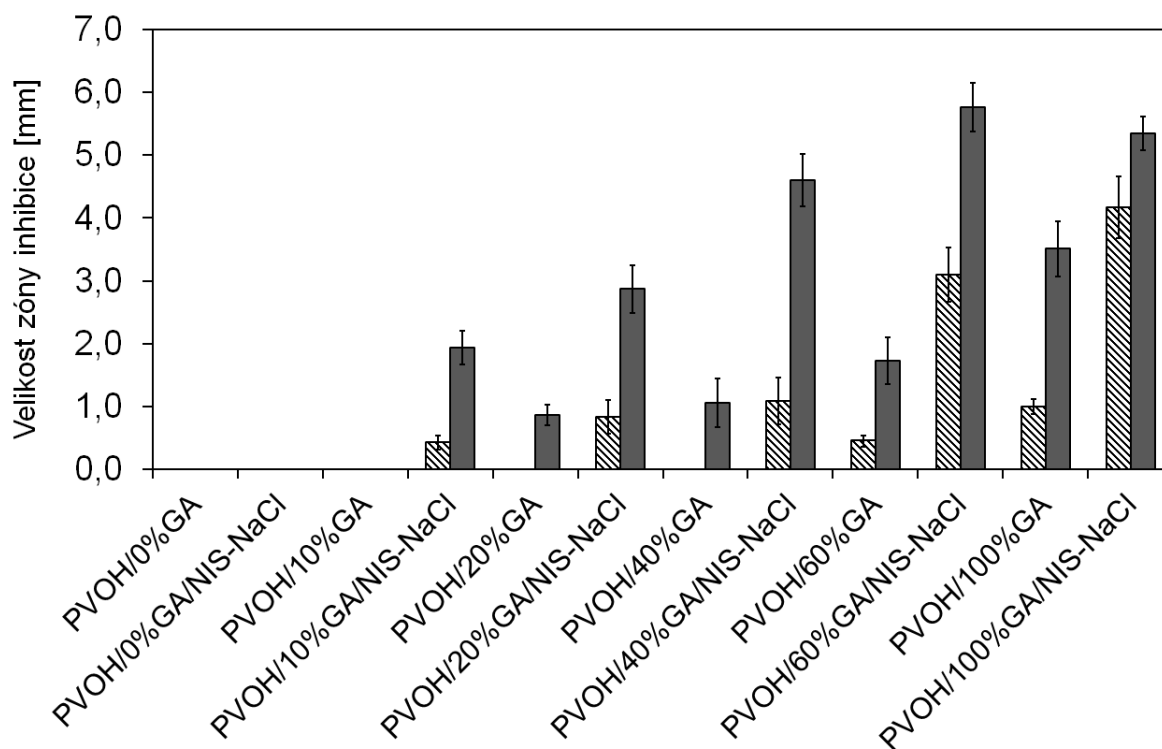
Z tabulky 19 je patrné, že i když je teoreticky podle vzorce (12) možno PVOH matici reakcí s GA zesíťovat ze 100 %, reálně k tomu nedochází.

Tabulka 19: Výsledky titračního stanovení volné GA ve vzorcích

| Vzorek | Volná GA [%] |
|-------------|--------------|
| PVOH/5% GA | 5,74±2,00 |
| PVOH/10% GA | 7,62±1,48 |
| PVOH/20% GA | 9,04±0,36 |
| PVOH/25% GA | 10,53±0,30 |
| PVOH/40% GA | 13,79±0,49 |
| PVOH/80% GA | 21,64±0,73 |

Antimikrobiální vlastnosti

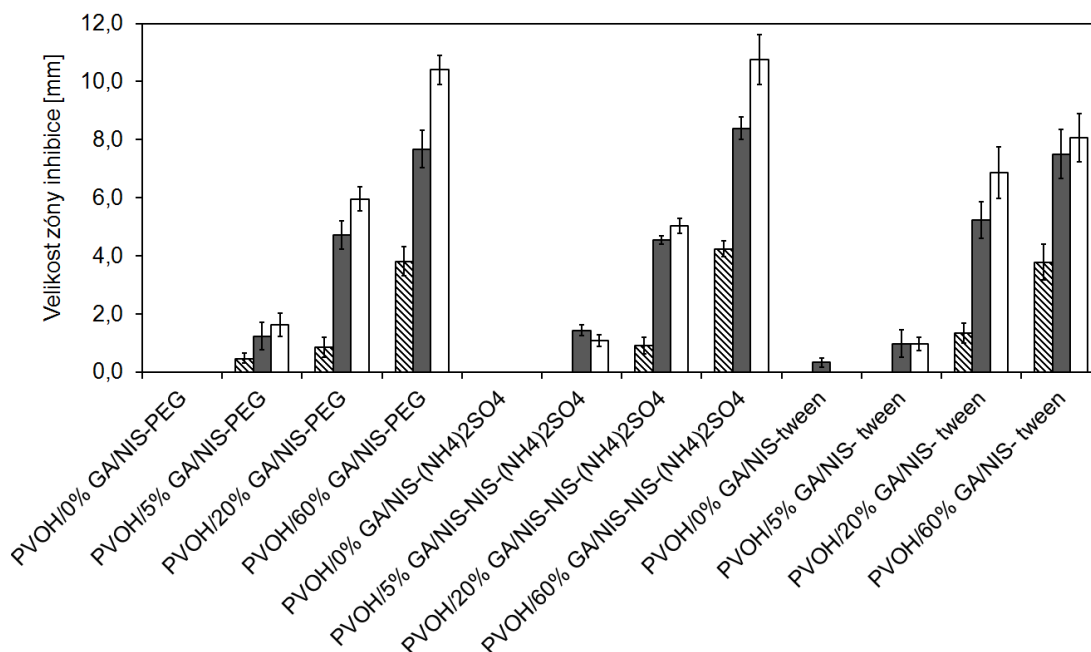
Pro zhodnocení antimikrobiální účinnosti jednotlivých folií byly vzorky podrobeny testování pomocí diskové difúzní metody (velikosti šířky zón jsou uvedeny v grafech 38–40 (jako průměr z 20 měření). Z obrázku 38 je patrné, že vzorek PVOH/0% GA/0% NIS-NaCl, který neobsahoval ani GA ani nisin nijak nepůsobí proti *Escherichia coli* ani *Staphylococcus aureus* stejně jako PVOH/0% GA. Oproti tomu vzorek PVOH/100% GA/NIS-NaCl (obsahující 150 µg nisinu/g folie a GA odpovídající 100% zesíťení) působí proti oběma bakteriálním kmenům, kdy vznikla kolem vzorků zóna inhibice růstu mikroorganismů. Důležité je zjištění, že GA v PVOH systému nepůsobila antimikrobiálně proti gramnegativní *Escherichia coli* až do úrovně 40% stupně zesíťení GA. Je tedy zřejmé, že odezva na gramnegativní kmen je způsobena samotným nisinovým modifikátorem nebo zde nastává synergické působení modifikátoru a GA.



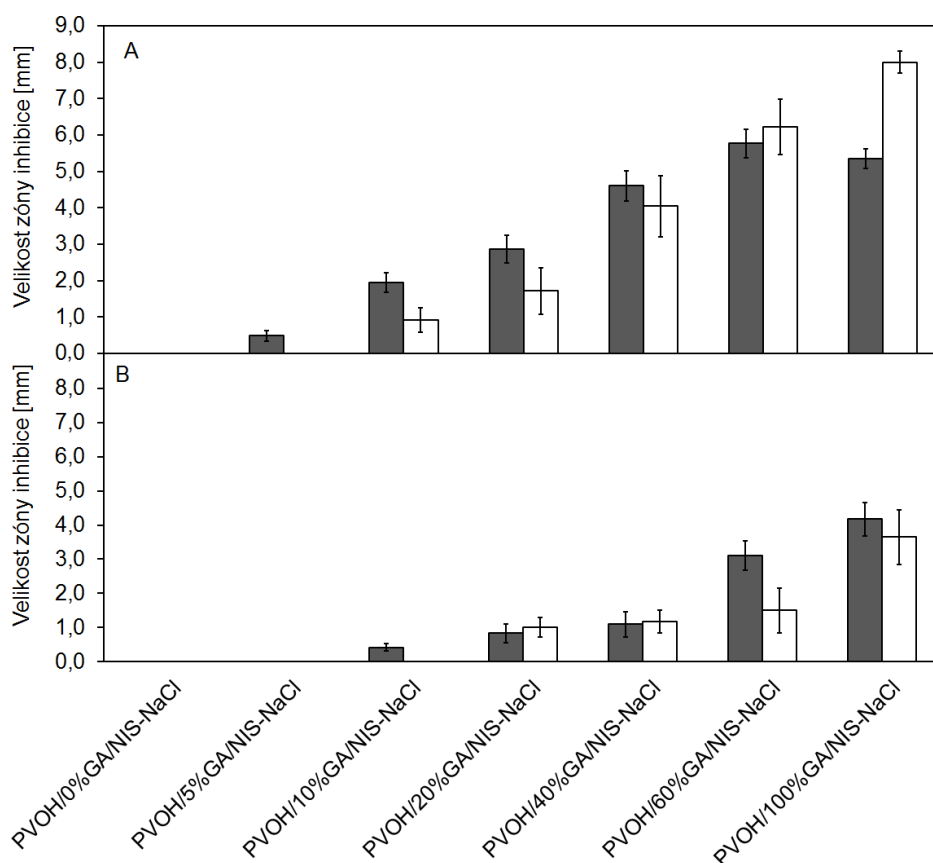
Obr. 38: Porovnání působení různě zesíťovaných PVOH fólií bez obsahu a s obsahem nisinového modifikátoru formy 4 proti *E. coli* (čárkované sloupce) a *S. aureus* (šedé sloupce)

Závislost antimikrobiálních vlastností připravených fólií na typu použitého nisinového modifikátoru (formy 1–3) při různých stupních zesíťení PVOH pomocí GA je prezentována na obrázku 39. Studie byla rozšířena o gram pozitivní bakteriální kmen *Listeria monocytogenes*, který patří mezi tzv. potravinové patogeny [122, 124]. Výsledky ukazují velmi dobré antimikrobiální vlastnosti připravených fólií obsahujících nisin ve všech zhoubných formách, přičemž nejúčinnější se z pohledu velikosti zón inhibice jeví forma 1 (s PEG) a forma 2 (s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Dále je patrné, že výrazněji větší odezvu na přítomnost nisinu mají oba gram pozitivní bakteriální kmeny, což je v souladu s literaturou, která udává účinnost nisinu spíše proti těmto typům bakterií [60, 61, 63, 66, 75].

Je známo, že nisin je náchylný na degradaci v čase, pokud není dostatečně stabilizován. Účinnost připravených fólií proti *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* po 7 a 21 dnech od výroby je ukázaná na příkladu použití nisinového modifikátoru formy 1 na obrázku 40. Z výsledků je zřejmé, že v čase dochází k drobné redukci inhibiční aktivity proti oběma testovaným bakteriálním kmenům obzvláště u fólií s nižším stupněm zesíťení GA. Naproti tomu vyšší stupně zesíťení (40 % a více) poskytují stabilní systém s dlouhotrvajícími antimikrobiálními účinky.



Obr. 39: Velikost zón inhibice PVOH filmů v závislosti na typu nisinového modifikátoru a stupně zesítnění proti *E. coli* (čárkované sloupce), *S. aureus* (šedé sloupce) a *L. monocytogenes* (bílé sloupce)



Obr. 40: Vliv stárnutí antimikrobiálních fólií v závislosti na zvyšujícím se stupni zesítnění proti *S. aureus* (A) a *E. coli* (B); stanoveno 1. týden po výrobě (šedé sloupce) a po 3 týdnech (bílé sloupce)

Druhou metodou testování byla modifikovaná diluční a zředovací metoda, kdy byly bakteriální suspenze vystaveny působení známého množství vzorků ve zkumavkách po dobu 24 hodin. Po dalších 24 hodinách kultivace na agaru byly odečteny počty kolonií v jednotlivých ředěních. Test se vzorky obsahujícími komerční nisin (forma 4) byl znovu zopakován po týdnu pro zjištění změn účinnosti folií.

Výsledky diluční a zředovací metody jsou uvedeny v tabulce 20 a je zde jasně pozorovatelný kombinovaný účinek nisinu a GA na příkladu použití nisinového modifikátoru formy 4.

Tabulka 21 prezentuje výsledky při použití ostatních forem nisinových modifikátorů proti bakteriálním kmenům obdobně, jako tomu bylo na obrázku 39. V tomto případě je neúčinnější forma 1 (s PEG), která vykazuje významný inhibiční účinek již při nízkých stupních zesílení GA. Předpokládá se, že to je důsledek materiálové kompatibility PVOH a PEG matric [203, 208].

Tabulka 20: Vliv stárnutí různě zesílených filmů obsahujících nisinový modifikátor formy 4 na jejich antimikrobiální působení

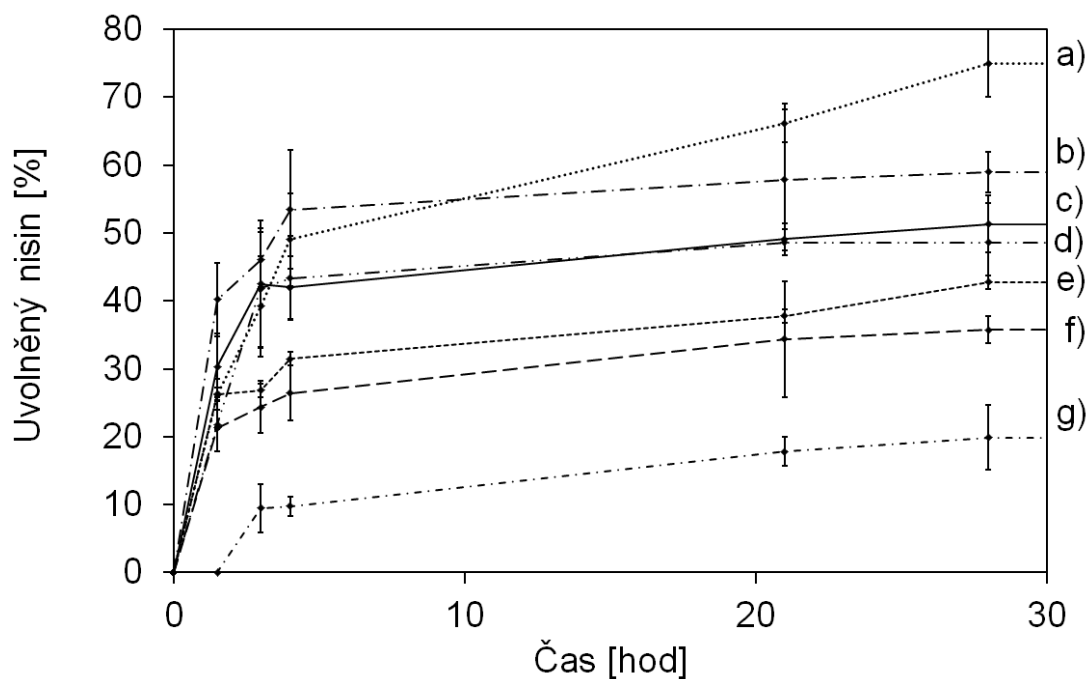
| Vzorek | [CFU/ml] | | | |
|--------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | <i>E. coli</i> | | <i>S. aureus</i> | |
| | Po 1 týdnu | Po 3 týdnech | Po 1 týdnu | Po 3 týdnech |
| PVOH/0%GA/ NIS-NaCl | $2,9 \cdot 10^6$ | $5,0 \cdot 10^6$ | $1,4 \cdot 10^4$ | $2,1 \cdot 10^4$ |
| PVOH/5%GA/ NIS-NaCl | 0 | $1,3 \cdot 10^4$ | $1,1 \cdot 10^3$ | $3,0 \cdot 10^3$ |
| PVOH/10%GA/ NIS-NaCl | 0 | $4,2 \cdot 10^3$ | $4,5 \cdot 10^1$ | $1,8 \cdot 10^3$ |
| PVOH/20%GA/ NIS-NaCl | 0 | $1,3 \cdot 10^3$ | $7,0 \cdot 10^1$ | $1,1 \cdot 10^2$ |
| PVOH/40%GA/ NIS-NaCl | 0 | $5,0 \cdot 10^0$ | 0 | $8,2 \cdot 10^1$ |
| PVOH/60%GA/ NIS-NaCl | 0 | 0 | 0 | 0 |
| PVOH/100%GA /NIS-NaCl | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabulka 21: Antimikrobiální působení různě zesíťovaných PVOH filmů s různými typy nisinových modifikátorů

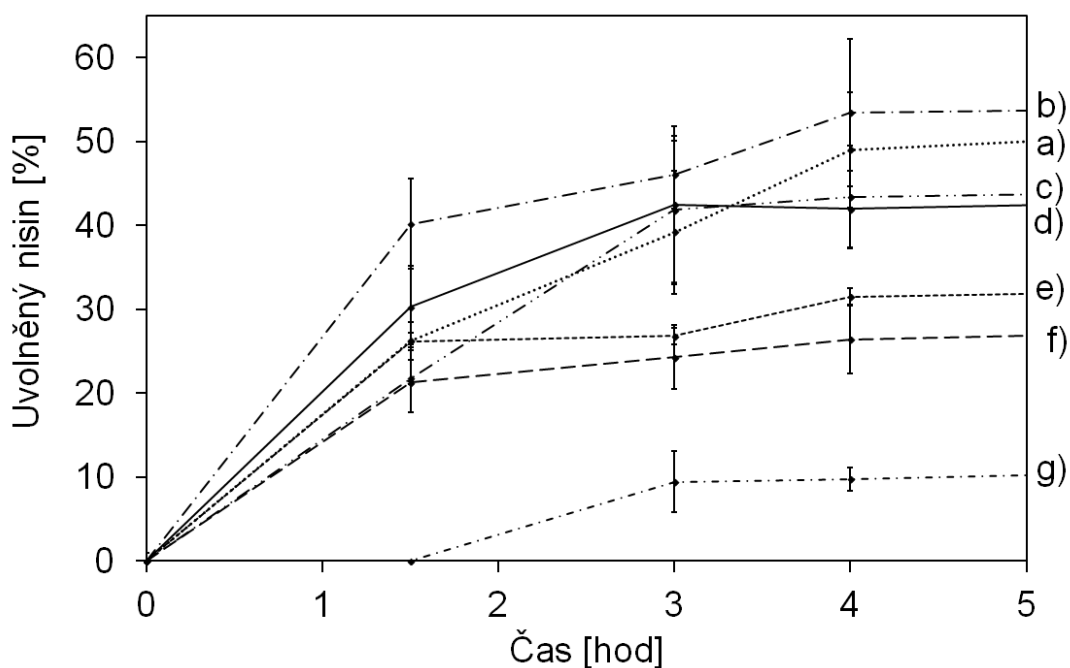
| Vzorek | [CFU/ml] | | |
|--|------------------|------------------|-------------------------|
| | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> | <i>L. monocytogenes</i> |
| PVOH/0%GA/NIS-PEG | $6,4 \cdot 10^4$ | $1,4 \cdot 10^3$ | $5,0 \cdot 10^4$ |
| PVOH/5%GA/NIS-PEG | $3,4 \cdot 10^4$ | $5,7 \cdot 10^2$ | <1 |
| PVOH/20%GA/NIS-PEG | $3,6 \cdot 10^1$ | <1 | 0 |
| PVOH/60%GA/NIS-PEG | 0 | <1 | 0 |
| PVOH/0%GA/NIS-(NH ₄) ₂ SO ₄ | $1,6 \cdot 10^6$ | $1,1 \cdot 10^5$ | $9,7 \cdot 10^2$ |
| PVOH/5%GA/NIS-(NH ₄) ₂ SO ₄ | $2,5 \cdot 10^5$ | $3,0 \cdot 10^4$ | $2,3 \cdot 10^2$ |
| PVOH/20%GA/NIS-(NH ₄) ₂ SO ₄ | $1,5 \cdot 10^5$ | $6,5 \cdot 10^2$ | 0 |
| PVOH/60%GA/NIS-(NH ₄) ₂ SO ₄ | $6,3 \cdot 10^2$ | $5,5 \cdot 10^1$ | 0 |
| PVOH/0%GA/NIS-tween | $7,2 \cdot 10^5$ | $2,3 \cdot 10^3$ | $3,7 \cdot 10^2$ |
| PVOH/5%GA/NIS-tween | $1,1 \cdot 10^5$ | $2,9 \cdot 10^4$ | $1,0 \cdot 10^1$ |
| PVOH/20%GA/NIS-tween | $4,4 \cdot 10^4$ | $2,5 \cdot 10^3$ | 0 |
| PVOH/60%GA/NIS-tween | 0 | $4,9 \cdot 10^2$ | 0 |

Kinetika uvolňování nisinu z PVOH fólií

Profil uvolňování nisinu z PVOH polymerní matrice byl sledován po dobu 10 dnů při teplotě 25 °C. Množství uvolněného nisinu v různých časech bylo stanoveno pomocí HPLC. Jak je vidět z obrázku 41 a 42 s narůstajícím stupněm zesíťování dochází k pomalejšímu uvolňování nisinu. V obrázku 42 je detailně vidět, že polymerní matrice, která byla zesíťovaná ze 100 %, umožnila uvolnění nisinu až po uplynutí lagové fáze o délce 1,5 hodiny. Výsledky tedy naznačují, že je možno pomocí zesíťování vytvořit polymerní systém, který bude pozvolna řídit uvolnění nisinu. Zjištěné výsledky korelují se zjištěním Alishahi [209], který imobilizoval nisin do chitosanových nanočástic pomocí elektrostatických interakcí mezi jejich řetězci. Bylo zjištěno, že k největšímu uvolnění dochází během prvních 24 hodin [209].



Obr. 41: Kumulativní nárůst uvolněného nisinu; a) PVOH, b) PVOH/5% GA, c) PVOH/10% GA, d) PVOH/20% GA, e) PVOH/40% GA, f) PVOH/60% GA, g) PVOH/100% GA



Obr. 42: Přiblížení uvolnění nisinu v prvních pěti hodinách; a) PVOH, b) PVOH/5% GA, c) PVOH/10% GA, d) PVOH/20% GA, e) PVOH/40% GA, f) PVOH/60% GA, g) PVOH/100% GA

Shrnutí okruhu II

Byla testována efektivita zesíťení PVOH pomocí dikarboxylové kyseliny glutarové na různých úrovních stupně zesíťení. Do PVOH a zesíťených PVOH fólií byly inkorporovány nisinové modifikátory ve 4 formách, které se lišily podle typu látky použité pro izolaci a stabilizaci nisinu.

Vlastnosti výsledných fólií byly zkoumány z pohledu strukturních, morfologických, mechanických, povrchových a antimikrobiálních vlastností. Dále byla sledována kinetika uvolňování inkorporovaného nisinu do PVOH filmů.

Výsledky ukazují, že GA je vhodné síťovací činidlo pro PVOH, které působí synergicky s nisinem antimikrobiálně proti testovaným grampozitivním i gramnegativním bakteriálním kmenům. Nisin byl pro inkorporaci do PVOH fólií použit ve 4 formách, přičemž nejúčinnější se jevila forma obsahující stabilizátor PEG. Z pohledu mechanických vlastností zkoumaných systémů je výhodné zachování nižších stupňů zesíťení PVOH pomocí GA, kdy nedochází k výrazným negativním změnám u vzorků z pohledu Youngova modulu pružnosti, pevnosti v tahu i tažnosti. Na druhou stranu je vyšší stupeň zesíťení zajímavý z pohledu antimikrobiální aktivity a řízení kinetiky uvolňování nisinu z PVOH matrice. Jako optimální se jeví použití nisinového modifikátoru ve formě 1 (stabilizovaný polyetylenglykolem) a stupeň zesíťení na úrovni 20 %.

2.3 Imobilizace nisinu do mikrosfér na bázi biorozložitelného polyesteru

Úvod

Mikroenkapsulace patří mezi efektivní metody imobilizace, resp. balení účinných látek v nejrůznějších matricích, polymery nevyjímaje. Aplikace mikrokapslí lze nalézt ve zdravotnictví, farmacii, ale i v potravinářském průmyslu a zemědělství [210]. Technologie výroby částic je široce používaná jako zaváděcí systém pro zachycení a homogenitu rozptýlení nisinu v potravinářské matrici, která nejen chrání nisin za nepříznivých podmínek, ale také poskytuje řízené uvolňování [117].

Polyvinylalkohol (PVOH) patří mezi vodorozpustné polymery, které jsou charakteristické biokompatibilitou, výbornými bariérovými vlastnostmi a širokou škálou aplikovatelnosti. PVOH je za určitých podmínek i biorozložitelný, což dokazuje jeho mnohostranné použití [159].

Mikrokapsle na bázi PVOH jsou tedy studovány již mnoho let. Jedním z nejvíce rozšířených způsobů výroby PVOH mikrokapslí je technika komplexní koacervace, která v sobě zahrnuje kroky dispergace enkapsulované látky hydrofobního charakteru v roztoku PVOH následovaná procesem inverze fází, která má za následek koncentraci PVOH na stěnách hydrofobní dispergované látky. Finálním krokem celého procesu je síťování polymerní matrice, které se nejčastěji provádí pomocí dialdehydu [186]. V případě takto připravených PVOH mikrokapslí se však potýkáme s jejich nízkými mechanickými vlastnostmi. Proto se tato část disertační práce zabývala jinými technikami přípravy odolnějších částic.

Technika odpařování rozpouštědla je jednou z nejslibnějších univerzálních metod k získání zabudování hydrofilních i hydrofobních materiálů díky své relativní jednoduchosti bez nutnosti speciálního vybavení [15]. Nejrozšířenějším typem pro zapouzdření látek je metoda vytvoření více emulzí, zejména tzv. $w_1/o/w_2$ emulze. Hydrofilní aktivní látky mohou být tímto způsobem zabudovány přímo z vodné suspenze. Postup přípravy emulzí při metodě odpaření rozpouštědla je použitelný pro sloučeniny citlivé na teplotu a má lepší kontrolu velikosti částic a tvaru, než např. sušení rozprašováním. Navíc vysoká účinnost zapouzdření a nízký obsah zbytkového rozpouštědla mohou být přizpůsobeny nastavením parametrů zpracování [117].

Díky své biologické odbouratelnosti a netoxicitě se polylaktid (PLA) hojně používá pro řízené uvolňování pro potraviny, farmaceutické i biomedicínské aplikace [211]. Nisin byl inkorporován do PLA matrice pomocí různých přístupů. Nicméně výroba byla omezena kvůli vnitřní hydrofobnosti PLA, jež

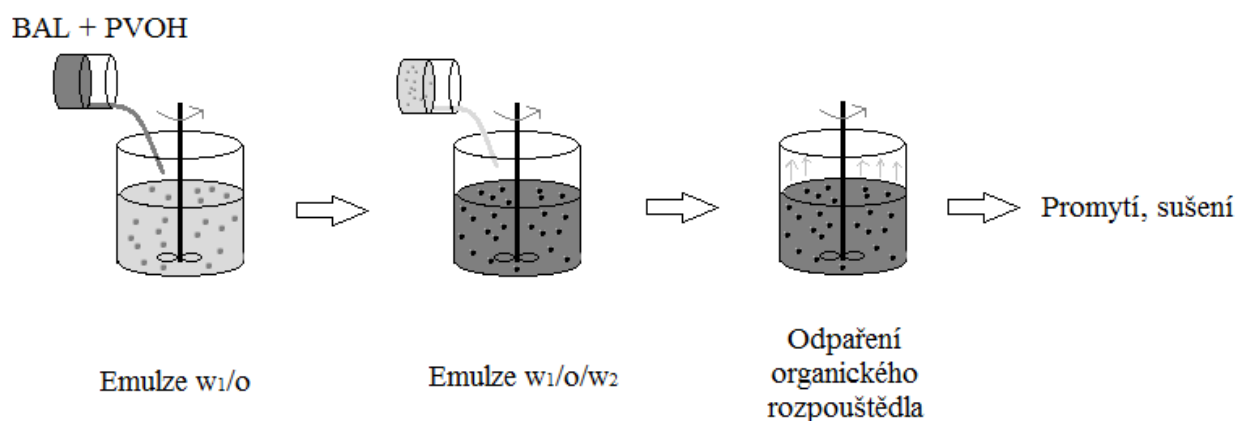
vedla ke špatné mezifázové adhezi mezi nisinem a polymerní matricí, a tím k ovlivnění inkorporační kapacity nisinu [117]. Tento problém lze vyřešit pomocí modifikace metody odpaření rozpouštědla. Tato modifikace spočívá ve vytvoření dvouemulzního systému, kdy je nisin uchycen do hydrofilní PVOH matrice a následně zapouzdřen pomocí PLA.

Použité materiály

Pro přípravu mikrosfér byl použit PVOH 6-98 ($M_w \sim 47\,000$ g/mol, HD 98 mol %) a nisin (2,5% from *Lactococcus lactis*), které byly dodané firmou Sigma Aldrich. PLA 3251D ($M_w \sim 55\,400$ g/mol) byl obdržen od firmy NatureWorks, LLC a dichlormetan od Penta chemicals.

Příprava vzorků

Polymerní sféry byly připraveny metodou odpaření rozpouštědla dle schématu znázorněném v obrázku 43. V prvním kroku byl připraven polymerní 10% PVOH 6-98 roztok, který obsahoval různá množství GA a NIS-NaCl (viz tabulka 22).



Obr. 43: Schematické znázornění výroby sfér

Dále byl připraven 10% roztok PLA 3251D v dichlormetanu. Do 10 ml tohoto polymeru byl přidán 1 ml roztoku PVOH modifikované matrice z prvního kroku. Směs byla dispergována za stálého míchání při 24 000 otáčkách za minutu po dobu 1 minuty (homogenizátor DI 18, IKA, Belgie), přičemž směs byla chlazená v ledové lázni pro eliminaci odpařování rozpouštědla. Po homogenizaci byl proveden třetí krok odpovídající vytvoření $w_1/o/w_2$ emulze.

PLA/PVOH suspenze byla přidána do 100 ml 0,5% PVOH roztoku pro dosažení obrácení fázi. Směs byla dispergována za stálého míchání při 24 000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut. V posledním kroku byla připravená emulze přemístěna do Erlenmayerovy baňky, organické rozpouštědlo bylo odpařeno za stálého míchání a sníženého tlaku. Tím byla vytvořena suspenze mikrosfér ve vodné fázi.

Tabulka 22: Přehled navážek jednotlivých komponent mikrosfér (NIS-NaCl je přepočten na čistý nisin)

| Vzorek | PVOH [g] | GA [g] | NIS-NaCl [mg/g PVOH] |
|------------------------------|----------|--------|----------------------|
| PLA/PVOH/0% GA/1,5 NIS-NaCl | 1 | 0 | 1,5 |
| PLA/PVOH/60% GA/1,5 NIS-NaCl | 1 | 0,8433 | 1,5 |
| PLA/PVOH/0% GA/3,0 NIS-NaCl | 1 | 0 | 3,0 |
| PLA/PVOH/60% GA/3,0 NIS-NaCl | 1 | 0,8433 | 3,0 |
| PLA/PVOH/0% GA/5,0 NIS-NaCl | 1 | 0 | 5,0 |
| PLA/PVOH/60% GA/5,0 NIS-NaCl | 1 | 0,8433 | 5,0 |
| PLA/PVOH | 1 | 0 | 0 |

Získané sféry byly promyty demineralizovanou vodou, lyofilizovány (Lyo Scanvac CoolSafe 110-4 Pro, Trigon-plus, Česká republika) a skladovány v temnu při 8 ± 2 °C za nepřístupu vlhkosti. Velikost sfér byla v průměru 15 μm . Vzorke mikrosfér jsou dále označeny jako PLA/PVOH/ x GA/ y NIS-NaCl, kde x značí procentuální zesíťení glutarovou kyselinou a y ukazuje koncentraci komerčního nisinu (vyjádřeno v mg čistého nisinu na g PVOH matrice).

Použité metody

Studium morfologie sfér

Snímky připravených mikrosfér byly pořízeny pomocí optického mikroskopu Olympus CX31 vybaveného digitálním fotoaparátem. Mikrosféry byly pozorovány pomocí optické mikroskopie při zvětšení 400x. Jejich velikost byla vyhodnocena v PC programu (Software QuickPhoto Camera, verze 2.2). Z výsledných hodnot měření 120 sfér z každého vzorku byla určena distribuce velikosti sfér a průměrná velikost afér.

Skenovací elektronová mikroskopie byla provedena stejně, jako je uvedeno v kapitole 2.2 s tím rozdílem, že vzorky sfér nebylo potřeba upravovat zmrazením.

Efektivita enkapsulace

Enkapsulační efektivita (EE [%]) byla definována jako poměr mezi hmotností imobilizovaného nisinu (m_{en}) a množstvím nisinu přidávaného do reaktoru (m_{on}) na začátku procesu [15]:

$$EE = \frac{m_{en}}{m_{on}} \cdot 100 \quad (19)$$

Pro stanovení efektivity procesu enkapsulace nisinu v mikrosférách byla použita metoda HPLC (viz metodologie v kapitole 2.2). Výpočty enkapsulační efektivity nisinu byly prováděny z vlnové délky 220 nm pomocí kalibrační křivky ($y = 51683833,839x - 14274,405$, $R^2 = 0,9990$) a zjištěných ploch píků jednotlivých vzorků. Každý vzorek byl měřen třikrát a výsledky jsou dále uvedeny jako průměrná hodnota.

Výsledky

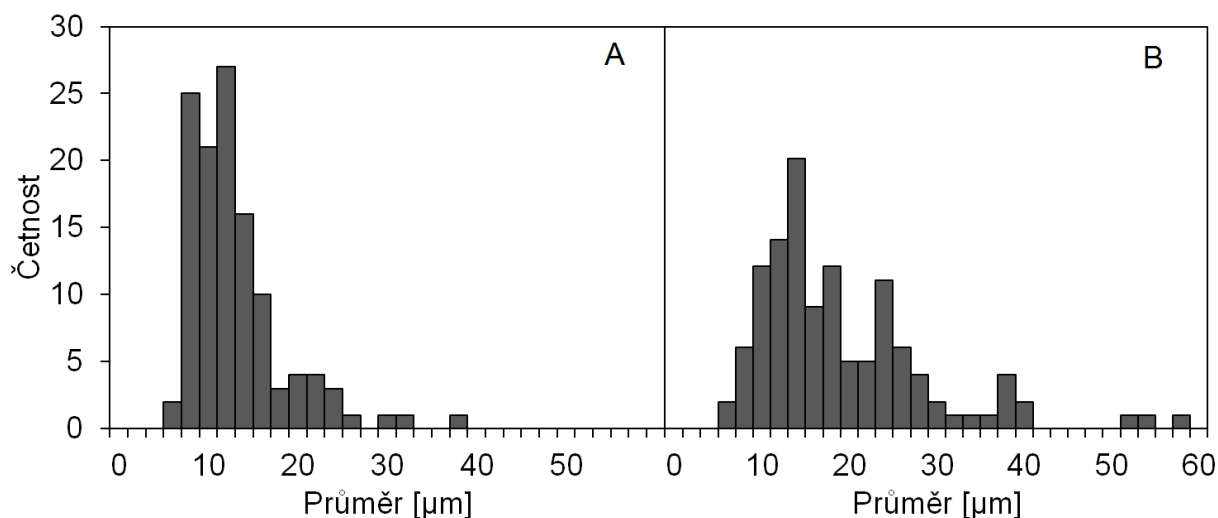
Morfologie sfér

Průměrné velikosti připravených sfér se pohybovaly přibližně 11–18 μm , jak je uvedeno v tabulce 23. Na hladině významnosti 5 % bylo zjištěno, že obsah nisinu ve sférách nemá vliv na jejich výslednou velikost. Na velikost sfér má ovšem statisticky významný vliv působení GA v polymerní matrici. Výjimkou jsou sféry obsahující nejvíce nisinu (PLA/PVOH/60% GA/5,0NIS), které se od nezesíťovaných sfér se stejným množstvím nisinu statisticky neliší. Zde mohlo pravděpodobně dojít k působení stabilizujících solí nisinového modifikátoru a tedy taktéž k částečnému utvoření komplexů s PVOH matricí [201].

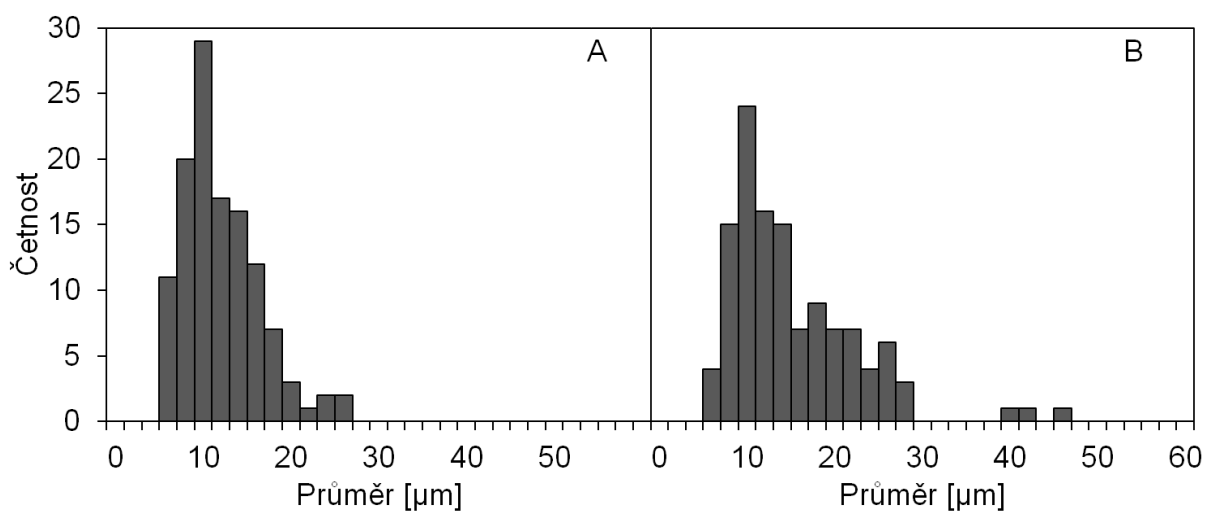
Tabulka 23: Přehled průměrných velikostí mikrosfér ($\bar{x} \pm \text{SD}$)

| Vzorek | Velikost sfér [μm] |
|------------------------|---|
| PLA/PVOH | 11,914 \pm 7,992 ^a |
| PLA/PVOH/0% GA/1,5NIS | 11,944 \pm 5,322 ^a |
| PLA/PVOH/60% GA/1,5NIS | 18,067 \pm 9,782 ^b |
| PLA/PVOH/0% GA/3,0NIS | 10,986 \pm 4,368 ^a |
| PLA/PVOH/60% GA/3,0NIS | 14,040 \pm 7,325 ^c |
| PLA/PVOH/0% GA/5,0NIS | 13,232 \pm 5,255 ^{a,d} |
| PLA/PVOH/60% GA/5,0NIS | 13,704 \pm 7,155 ^d |

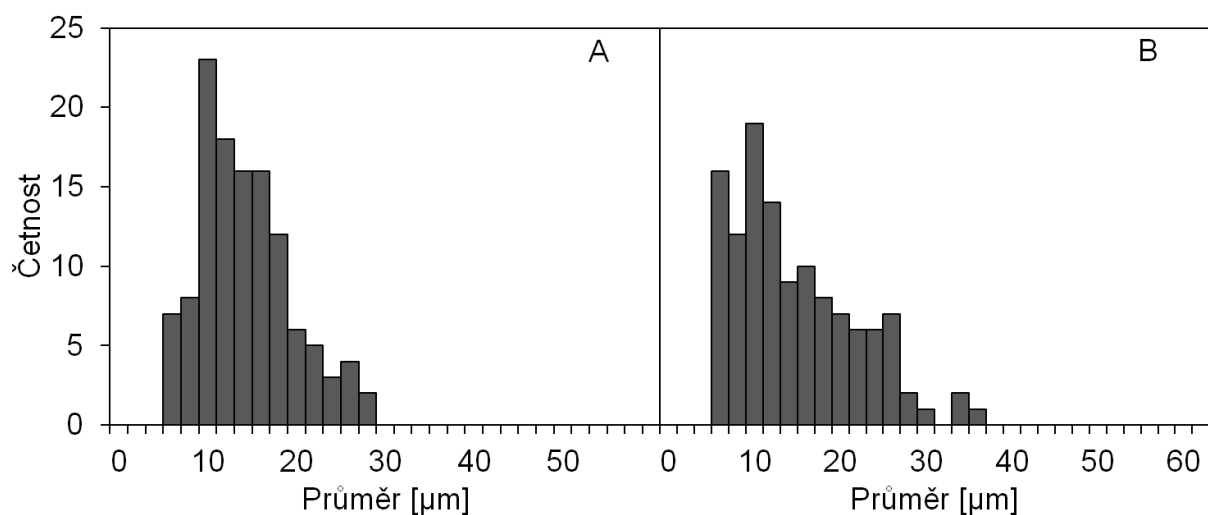
Mimo průměrné hodnoty byly mikrosféry analyzovány i pomocí získaných histogramů (obrázky 44–46), které ukazují fakt, že mikrosféry na bázi zesíťného PVOH vykazují širší distribuci velikostí (1,23) ve srovnání s nezesíťným PVOH (1,12). To lze pozorovat i na snímcích z optického mikroskopu (obrázky 47–49).



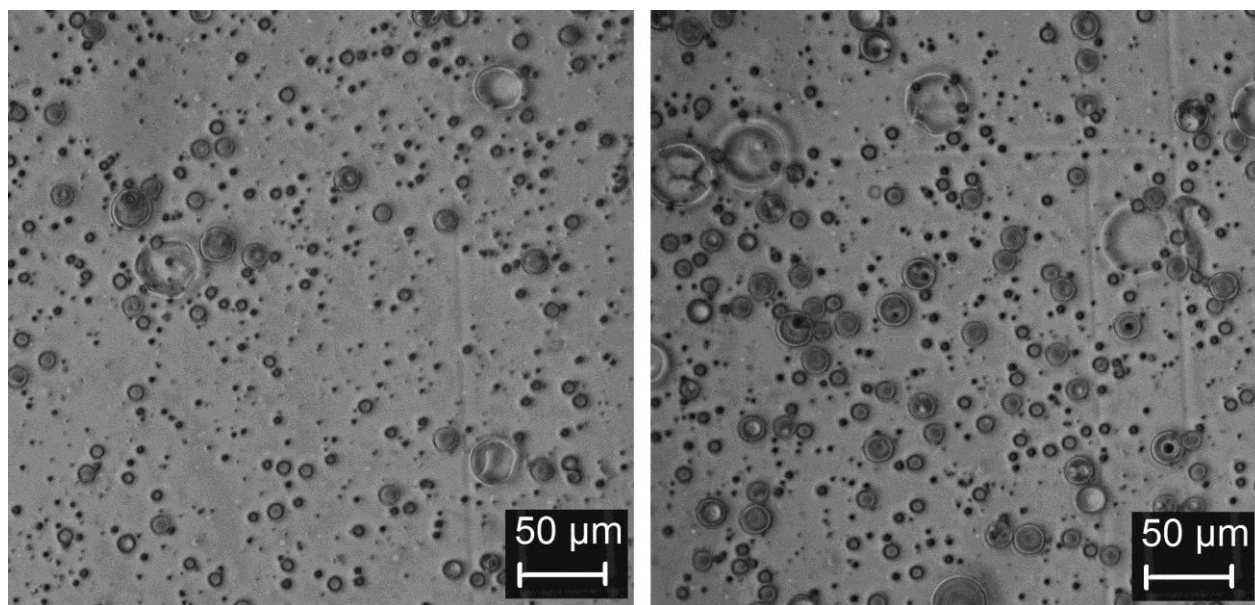
*Obr. 44: Histogram sfér PLA/PVOH/0% GA/1,5 mg NIS-NaCl (A),
PLA/PVOH/60% GA/1,5 mg NIS-NaCl (B)*



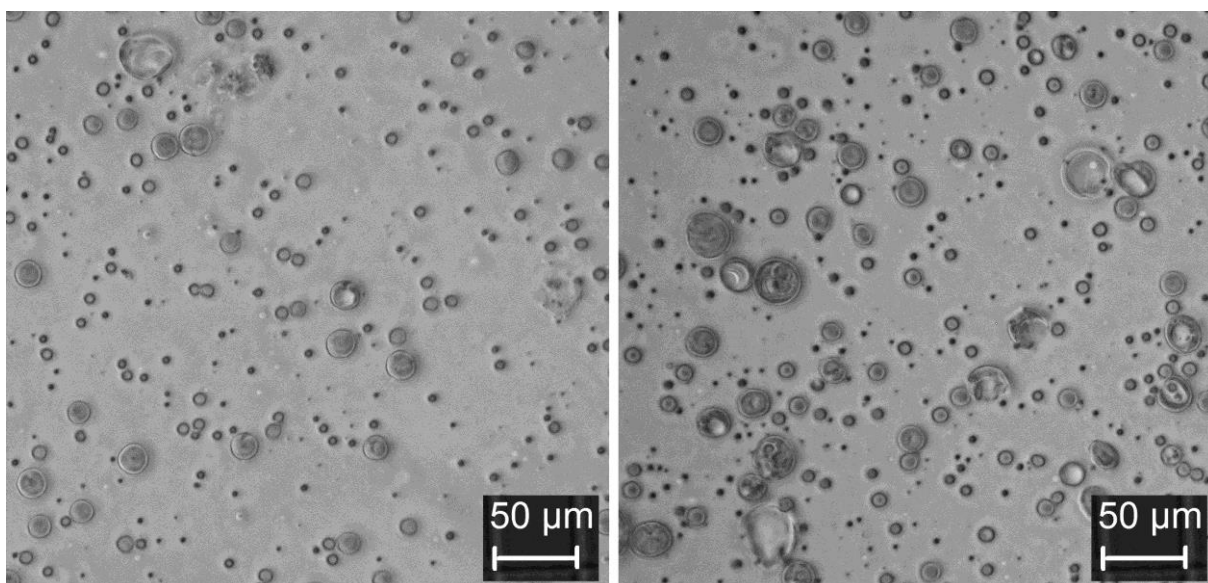
*Obr. 45: Histogram sfér PLA/PVOH/0% GA/3,0 mg NIS-NaCl (A),
PLA/PVOH/60% GA/3,0 mg NIS-NaCl (B)*



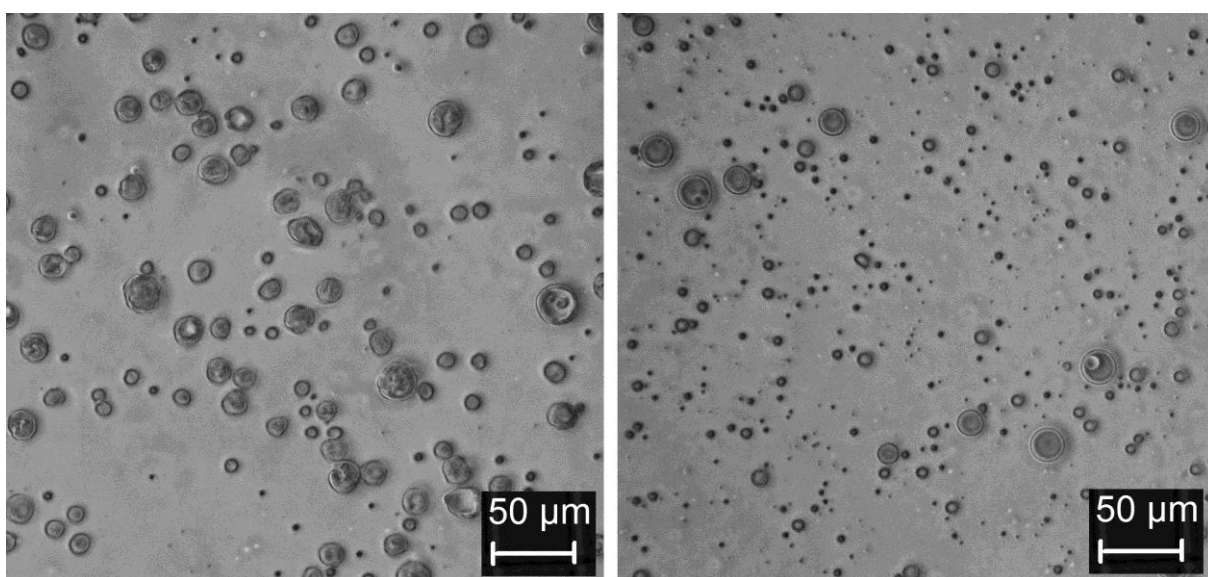
Obr. 46: Histogram sfér PLA/PVOH/0% GA/5,0 mg NIS-NaCl (A),
PLA/PVOH/60% GA/5,0 mg NIS-NaCl (B)



Obr. 47: Obrázek z optického mikroskopu – sféry PLA/PVOH/0% GA/1,5 mg
NIS-NaCl (vlevo), PLA/PVOH/60% GA/1,5 mg NIS-NaCl (vpravo)

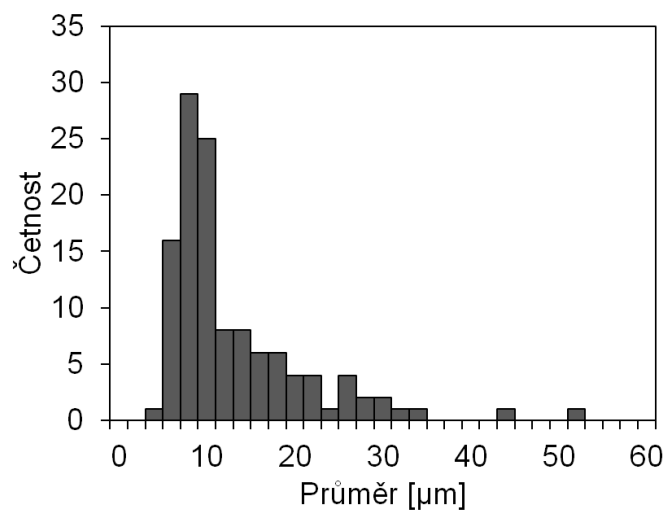


Obr. 48: Obrázek z optického mikroskopu – sféry PLA/PVOH/0% GA/3,0 mg NIS-NaCl (vlevo), PLA/PVOH/60% GA/3,0 mg NIS-NaCl (vpravo)

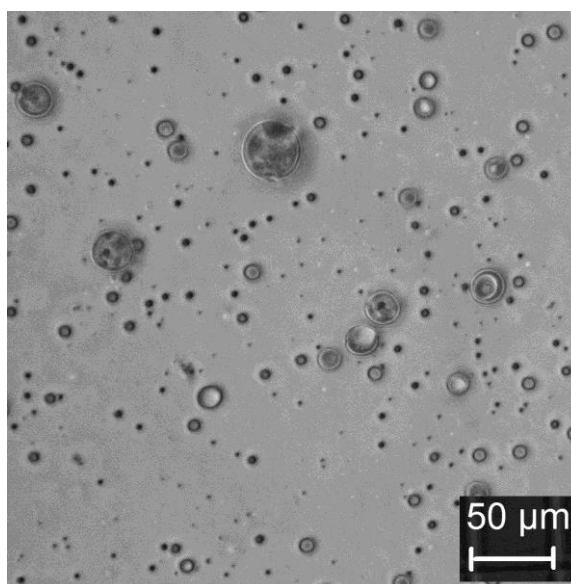


Obr. 49: Obrázek z optického mikroskopu – sféry PLA/PVOH/0% GA/5,0 mg NIS-NaCl (vlevo), PLA/PVOH/60% GA/5,0 mg NIS-NaCl (vpravo)

Efekt přidavku nisinového modifikátoru na distribuci velikosti připravených mikrosfér je patrný z obrázků 50 a 51, kde jsou prezentovány výsledky pro nemodifikovaný systém na bázi pouze PVOH. Ten ukazuje poměrně úzkou distribuci (1,28), která se však statisticky neodlišuje od nisin obsahujících systémů.

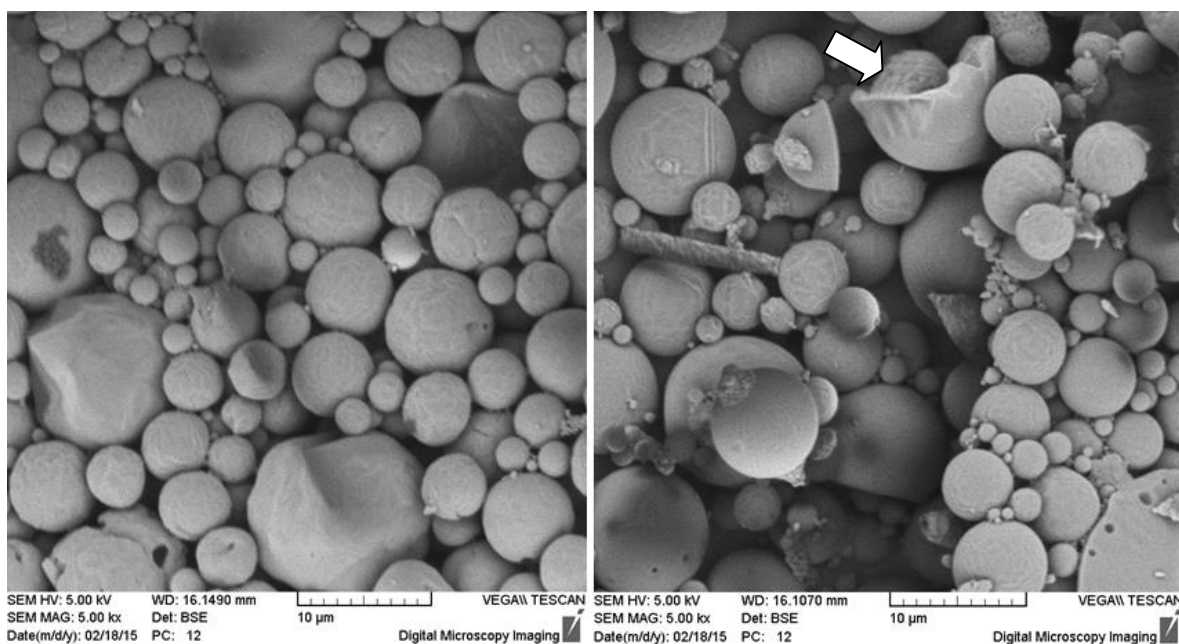


Obr. 50: Histogram sfér PLA/PVOH bez přídavku GA a nisinu



Obr. 51: Obrázek z optického mikroskopu – sféry PLA/PVOH bez přídavku GA a nisinu

Snímky z elektronového mikroskopu na obrázku 52 ukazují bližší pohled na připravené mikrosféry z jádra z PVOH a obalu z PLA. Jádro (PVOH) a PLA obal jsou zřejmé na obrázku 52 vpravo, kde je rozpadlá mikrosféra s jasně zřetelným PLA obalem a PVOH jádrem označena bílou šipkou.



Obr. 52: SEM obrázek PLA/PVOH/0% GA/1,5 mg NIS-NaCl (vlevo) a PLA/PVOH/60% GA/1,5 mg NIS-NaCl (vpravo)

Efektivita enkapsulace

Enkapsulační efektivita nisinu v připravené řadě vzorků mikrosfér byla vypočítána z výsledků měření HPLC a vzorce (19). Zjištěné výsledky jsou uvedeny v tabulce 24.

Z výsledků vyplývá, že imobilizace nisinu ve vzorku PLA/PVOH/0GA/1,5NIS byla kompletní, což je důsledkem vysoké afinity použité matrice k enkapsulované látce při nejnižší použité koncentraci nisinu. Vyšší koncentrace nisinu však vedly k poměrně vysokým hodnotám EE (> 90 %), které se zvyšovaly s rostoucí koncentrací nisinu. PVOH síťované GA obecně vykazovaly nižší hodnoty EE, přičemž nejvyšších hodnot účinnosti bylo dosaženo při nejnižší sledované koncentraci nisinu. Přesto lze hodnoty EE pro síťované systémy považovat ve srovnání s odbornou literaturou za vysoké (> 50 %) [117, 134].

Otázkou zůstává, jak se vliv síťování projeví na kinetice uvolňování nisinu z připravených mikrosfér. To bude předmětem studií navazujících na tuto práci.

Tabulka 24: Hodnoty enkapsulační efektivity nisinu EE [%] ($\bar{x} \pm SD$)

| Vzorek | EE [%] |
|------------------------|------------|
| PLA/PVOH/0% GA/1,5NIS | * |
| PLA/PVOH/60% GA/1,5NIS | 76,43±0,00 |
| PLA/PVOH/0% GA/3,0NIS | 90,57±0,34 |
| PLA/PVOH/60% GA/3,0NIS | 59,43±3,54 |
| PLA/PVOH/0% GA/5,0NIS | 94,2±0,10 |
| PLA/PVOH/60% GA/5,0NIS | 70,7±1,01 |

*U tohoto vzorku nebyl pomocí HPLC detekován neenkapsulovaný nisin. Je tedy předpoklad 100% hodnoty EE.

Shrnutí okruhu III

Byly připraveny multikomponentní mikrosféry skládající se z jádra na bázi nemodifikovaného PVOH a PVOH zesíťovaného z 60 % GA. Obal mikrosféry byl tvořen biorozložitelným PLA. Zároveň byly provedeny pokusy enkapsulace nisinového modifikátoru (forma 4) do PVOH jádra. Následně byly sledovány morfologické vlastnosti připravených mikrosfér pomocí optické i elektronové mikroskopie. Efektivita enkapsulace byla vyhodnocena pomocí HPLC.

Výsledky naznačují, že přítomnost nisinu ve sférách nemá statisticky významný vliv na jejich velikost. Naproti tomu bylo zjištěno, že síťování PVOH pomocí GA zvyšuje průměrnou velikost připravených mikrosfér a zároveň rozšiřuje distribuci jejich velikostí.

Výsledky stanovení efektivity enkapsulačního procesu ukazují vyšší hodnoty pro nesíťované systémy (> 90 %), nicméně také hodnoty EE pro síťované systémy lze považovat ve srovnání s odbornou literaturou za vysoké (> 50 %). O optimálním složení enkapsulačního systému vypoví až studie kinetiky uvolňování nisinu, která bude navazovat na tuto práci v podobě časově náročných experimentů za účelem popisu procesu uvolňování imobilizovaného nisinu v čase do různých prostředí a v závislosti na změně vybraných parametrů (teplota, pH).

ZÁVĚR

Cílem této dizertační práce byl vývoj, charakterizace a optimalizace nových typů antimikrobiálních polymerních systémů pro potravinářské aplikace na bázi PVOH/kyselina mléčná a PVOH/nisin.

V rámci experimentálních aktivit bylo dosaženo následujících výstupů:

1) Byl stanoven vliv stupně hydrolyzy PVOH matric na jejich zpracovatelnost na tenké fólie a byla podrobně studována interakce PVOH s různým stupněm hydrolyzy a kyseliny mléčné, jako účinné antimikrobiální přísady.

2) Byl vyvinut a popsán způsob síťování PVOH pomocí netoxické dikarboxylové kyseliny.

3) Byly aplikovány 4 formy nisin obsahujících modifikátorů pro PVOH matrice. Zároveň byl podrobně zkoumán a popsán jejich vliv na strukturní, morfologické, mechanické, tepelné, povrchové a antimikrobiální vlastnosti výsledných systémů včetně popisu jejich synergického působení se síťovacím činidlem (glutarová kyselina).

4) Pro účely popisu kinetiky uvolňování nisinu z PVOH fólií byla vyvinuta a odzkoušena metoda na jeho stanovení pomocí HPLC techniky.

5) Byly připraveny multikomponentní mikrosféry s jádrem na bázi PVOH s imobilizovaným nisinem a obalem z biorozložitelného polyesteru – PLA. Připravené systémy byly důkladně morfologicky popsány pomocí optické a elektronové mikroskopie. Byla stanovena účinnost enkapsulace nisinu do formy mikrosfér. Na tyto experimenty naváže časově náročná studie kinetiky uvolňování nisinu za různých podmínek.

6) Získané výsledky byly publikovány v impaktovaném časopise a prezentovány na odborných konferencích. Předpokládá se odeslání další publikace do recenzovaného odborného časopisu během roku 2015.

I přes naplnění vytyčených cílů jsou plánovány další experimentální aktivity vedoucí k rozšíření získaných poznatků dané problematiky a její implementace do praxe. Výstupy této práce jsou i výsledky podléhající registraci Úřadem průmyslového vlastnictví.

PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI

Tato disertační práce přináší nové pohledy na využití vedlejších produktů mlékárenské produkce pro výrobky s přidanou hodnotou, které se zároveň přibližují legislativním požadavkům pro využití v potravinářském průmyslu, kosmetice či ve zdravotnictví. Zároveň přináší nový pohled na polymerní materiály, jako potenciální obaly nejen pro suroviny, ale také pro meziprodukty a finální výrobky. Z tohoto hlediska se jedná o materiály, které disponují ochrannými schopnostmi pro balené produkty z hlediska jak mechanického, tak antimikrobiálního.

Jednoznačným přínosem pro vědu je zde důležitý popis zákonitostí interakcí PVOH s kyselinou mléčnou v závislosti na koncentraci zbytkových acetátových skupin navázaných na hlavní uhlíkový řetězec polymeru. Získané výstupy bude možno dále modifikovat pro obalové materiály, které budou pro účely přípravy polymerních systémů s imobilizovanými biologicky aktivními látkami vhodné. Zde se jedná nejen o hledání a aplikace vhodných polymerních materiálů s žádanými vlastnostmi, ale také o získávání a použití jiných biologicky aktivních látek, jejichž úloha kromě antimikrobiální ochrany bude spočívat také v tom, že budou dotvářet celkový charakter a užité vlastnosti produktů, k jejichž ochraně budou uvedené systémy použity.

Praktický přínos této práce lze jednoznačně nalézt v metodě síťování PVOH pomocí dikarboxylové kyseliny, jakožto netoxického síťovacího činidla. Dalším výstupem jsou nisinové modifikátory ve 3 formách, které vykazují stabilitu v čase. S tím souvisí přínos zavedení a optimalizace metodiky pro stanovení nisinu v komplexních matricích pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie. Přínosem pro školitelské pracoviště jsou i publikační aktivity vzniklé v rámci této práce.

Další přínos bude v prvních fázích spočívat ve vhodném využití získaných produktů v obalové technice, kdy bude možno postupnými kroky vytvářet sofistikované obalové systémy s vysokou užitečnou hodnotou, které umožní lepší a delší uskladnění např. potravin, kosmetických a farmaceutických přípravků při zachování jejich vysoké kvality.

V závěru lze konstatovat, že spolu s využitím nových poznatků se nacházíme na prahu vývoje obalových materiálů nové generace.

V neposlední řadě je nutno zdůraznit, že tato práce vznikala v rámci řešení projektů aplikovaného výzkumu implementovaných na školitelském pracovišti. Na těchto projektech se přímo podílejí soukromé subjekty a výstupy řešení jsou směřovány do praktických aplikací.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MUNK, Petr a Tejraj M. AMINABHAVI. Introduction to macromolecular science. Wiley-interscience: Kanada. ©2002, 2. vydání, 609 s. ISBN 0-471-41716-5.
- [2] SELKE, Susan E., John D. CULTER a Ruben J. HERNANDEZ. Plastics packaging: Properties, processing, applications, and regulations. 2nd ed. Cincinnati, Ohio: Hanser Gardner Publications. ©2004, xvii, 448 s. ISBN 15-699-0372-7.
- [3] QIU, Kaiyan a Anil N. NETRAVALI. Fabrication and characterization of biodegradable composites based on microfibrillated cellulose and polyvinyl alcohol. *Composites Science and Technology* [online]. 2012, roč. 72, č. 13, s. 1588-1594 [cit. 2014-08-05]. ISSN 0266-3538. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0266353812002345>.
- [4] ROBERTSON, Gordon L. Food packaging: principles and practice. 2nd ed. Boca Raton: Taylor, ©2006, 550 s. Food science and technology (Taylor, 152. ISBN 08-493-3775-5.
- [5] GAO, Cun-dian et al. Preparation of Polyvinyl Alcohol/Xylan Blending Films with 1,2,3,4-Butane Tetracarboxylic Acid as a New Plasticizer. *Journal of Nanomaterials* [online]. 2014, roč. 2014, s. 1-8 [cit. 2014-11-11]. ISSN 1687-4129. Dostupné z:
<http://www.hindawi.com/journals/jnm/2014/764031/>.
- [6] GAMAGE, Gayani R., Hyun-Jin PARK a Ki Myong KIM. Effectiveness of antimicrobial coated oriented polypropylene/polyethylene films in sprout packaging. *Food Research International* [online]. 2009, roč. 42, č. 7, s. 832-839 [cit. 2014-08-29]. ISSN 0963-9969. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996909000751>.
- [7] QUINTAVALLA, Stefania a Loredana VICINI. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science* [online]. 2002, roč. 62, č. 3, s. 373-380 [cit. 2014-08-05]. ISSN 1873-4138. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174002001213>.
- [8] BIESALSKI, Hans-Konrad et al. Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition* [online]. 2009, roč. 25, č. 11-12, s. 1202-1205 [cit. 2014-09-21]. ISSN 0899-9007. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900709002251>.
- [9] KRIS-ETHERTON, Penny M. et al. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine* [online]. 2002, roč. 113, č. 9, s. 71-88 [cit. 2015-03-11]. ISSN 1552-4833. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002934301009950>.

- [10] KRIS-ETHERTON, P. M. et al. Bioactive compound in nutrition and health – Research methodologies for establishing biological function: The Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Flavonoids on Atherosclerosis. *Annual Review of Nutrition* [online]. 2004, roč. 24, č. 1, s. 511-538 [cit. 2015-03-11]. ISSN 1545-4312 . Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.nutr.23.011702.073237>.
- [11] DAGLIA, Maria. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2012, roč. 23, č. 2, s. 174-181 [cit. 2015-03-11]. ISSN 0958-1669. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166911006756>.
- [12] HARTMANN, Rainer a Hans MEISEL. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2007, vol. 18, issue 2, s. 163-169 [cit. 2015-01-12]. ISSN 0958-1669. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166907000146>.
- [13] SAHARI, Mohammad Ali a Sara ASGARI. Effects of Plants Bioactive Compounds on Foods Microbial Spoilage and Lipid Oxidation. *Food Science and Technology*. 2013, roč. 1, č. 3, s. 52-61. ISSN 0023-6438.
- [14] MACKENZIE, Kenneth et al. Calcium-containing inorganic polymers as potential bioactive materials. *Journal of Materials Science*. 2010, roč. 45, č. 4, s. 999-1007 [cit. 2014-08-05]. ISSN 1573-4803 . Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10853-009-4031-5>.
- [15] STLOUKAL, Petr et al. Low Molecular Weight Poly(lactic acid) Microparticles for Controlled Release of the Herbicide Metazachlor: Preparation, Morphology, and Release Kinetics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2012, roč. 60, č. 16, s. 4111-4119 [cit. 2014-08-12]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf300521j>.
- [16] BERNHOFT, Ed Aksel. *Bioactive compounds in plants: benefits and risks for man and animals: proceedings from a symposium held in Norwegian Academy of Science and Letters, Oslo, 13 - 14 November 2008* [online]. Oslo: Novus Forlag, 2010 [cit. 2015-02-19]. ISBN 978-827-0995-837. Dostupné z: <http://www.dnva.no/binfil/download.php?tid=48677>.
- [17] HUANG, Xiaodong et al. Strategy for analysis and screening of bioactive compounds in traditional Chinese medicines. *Journal of Chromatography B* [online]. 2004, roč. č. 812, 1-2, s. 71-84 [cit. 2014-07-09]. ISSN 1570-0232. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S157002320400546X>.
- [18] NIKOLIC, Milan a Sinisa DJORDJEVIC. Alkaloids in the pharmaceutical industry: Structure, isolation and application. *Hemijska industrija* [online]. 2003, vol. 57, issue 10, s. 471-478 [cit. 2015-03-11]. ISSN 2217-

7426. Dostupné z: <http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=0367-598X0310471N>.
- [19] YADAV, Sudesh Kumar a Praveen GULERIA. Steviol Glycosides from Stevia: Biosynthesis Pathway Review and their Application in Foods and Medicine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2012, roč. 52, č. 11, s. 988-998 [cit. 2015-02-11]. ISSN 1549-7852. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2010.519447>.
- [20] LIU, Y, J. P. LI, E. B. HUNZIKER a K. DE GROOT. Incorporation of growth factors into medical devices via biomimetic coatings. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* [online]. 2006, roč. 364, č. 1838, s. 233-248 [cit. 2015-03-11]. ISSN 1471-2962. Dostupné z: <http://rsta.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsta.2005.1685>.
- [21] LAHLOU Mouhssen. Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. *Flavour and Fragrance Journal* [online]. 2004 roč. 19, č. 2, s. 159-165 [cit. 2015-02-02]. ISSN 0882-5734. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ffj.1288/epdf>.
- [22] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*. 1.vyd. Tábor: OSSIS, ©1999. 368 s. ISBN 80-902391-5-3.
- [23] ANDERSEN, Oyvind M a Kenneth R MARKHAM. *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*. Boca Raton, FL: CRC, Taylor & Francis, 2006, 1237 s. ISBN 9781420039443.
- [24] HODEK, Petr, PREFIL, Pavel a Merie STIBOROVÁ. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting wit cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2002, roč. 139, č. 1, s. 1-21 [2015-01-15]. ISSN 0009-2797. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000927970100285X>.
- [25] YANG, Chong-Ren a Osamu TANAKA. *Advances in plant glycosides, chemistry and biology: proceedings of the International Symposium on Plant Glycosides, August 12-15, 1997 Kunming, China* [online]. 1st ed. New York: Elsevier, 1999, xiii, 428 s. [cit. 2015-03-11]. ISBN 04-445-0180-0. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=cWtFR13NqNcC&pg=PA320&dq=glycosides&hl=cs&sa=X&ei=yk4AVYTwdMv9ygOimYHwBA&ved=0CEMQ6AEwBQ#v=onepage&q&f=false>.
- [26] YADAV, Sudesh Kumar a Praveen GULERIA. Steviol Glycosides from Stevia: Biosynthesis Pathway Review and their Application in Foods and Medicine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2012, roč. 52, č. 11, s. 988-998 [cit. 2015-03-13]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2010.519447>.

- [27] BARBOSA-PEREIRA, Letricia et al. Brewery waste as a potential source of phenolic compounds: Optimisation of the extraction process and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities. *Food Chemistry* [online]. 2014, roč. 145, s. 191-197 [cit. 2015-03-13]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814613011023>.
- [28] SUPPAKUL, Panuwat et al. Diffusion of linalool and methylchavicol from polyethylene-based antimicrobial packaging films. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2011, roč. 44, č. 9, s. 1888-1893 [cit. 2015-02-17]. ISSN 0023-6438. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643811001113>.
- [29] SUPPAKUL, Panuwat et al. Loss of AM additives from antimicrobial films during storage. *Journal of Food Engineering* [online]. 2011, roč. 105, č. 2, s. 270-276 [cit. 2015-02-17]. ISSN 0260-8774. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877411000951>.
- [30] MIYASHITA, Michiko a Yasuyuki SADZUKA. Effect of linalool as a component of *Humulus lupulus* on doxorubicin-induced antitumor activity. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2013, roč. 53, s. 174-179 [cit. 2015-03-01]. ISSN 0278-6915. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691512008423>.
- [31] CHARLES Onwulata a Peter J. HUTH. et al. *Whey processing, functionality and health benefits* [online]. 1st ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2008, 416 s. [cit. 2014-06-12]. ISBN 978-081-3803-845. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1002/9780813803845.ch11>.
- [32] SUKOVÁ, Irena. *Syrovátka v potravinářství*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, ©2006, 60 s. Potravinářské informace. ISBN 80-727-1173-3.
- [33] ČESKO. Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 77/2003 Sb., kterou se stanoví *Požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje*, v platném znění. 2003. Dostupné z: <http://www.esipa.cz/sbirka/sbsrv.dll/sb?DR=SB&CP=2003s77>.
- [34] YALCIN, A. Emerging Therapeutic Potential of Whey Proteins and Peptides. *Current Pharmaceutical Design* [online]. 2006, roč. 12, č. 13, s. 1637-1643 [cit. 2014-08-9]. ISSN 1381-6128. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.2174/138161206776843296>.
- [35] PRAZERES, Ana R., Fátima CARVALHO a Javier RIVAS. Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management* [online]. 2012, roč. 110, s. 48-68 [cit. 2014-11-11]. ISSN 0301-4797. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301479712002769>.
- [36] ČESKÝ STATISTICKÝ ÚŘAD: Databáze Eurostatu. [online]. [cit. 2015-03-11]. Dostupné z: <http://apl.czso.cz/pll/eutab/html.h>.

- [37] ONWULATA, Charles a Peter HUTH. Whey processing, functionality and health benefits. 1st ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, ©2008, xiv, 400 s. ISBN 08-138-0903-7.
- [38] PANESAR, P. et al. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry* [online]. 2007, roč. 105, č. 1, s. 1-14 [cit. 2014-12-1]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607002816>.
- [39] PAL, Sebely a Simone RADAVELLI-BAGATINI. The effects of whey protein on cardiometabolic risk factors. *Obesity Reviews* [online]. 2013, roč. 14, č. 4, s. 324-343 [cit. 2014-11-28]. ISSN 1467-789X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/obr.12005>.
- [40] TSAKALI, Efstathia et al. A review on whey composition and the methods used for its utilization for food and pharmaceutical products. *FOODSIM'2010* [online]. ©2010 [cit. 2014-12-21]. ISBN 978-907-7381-564. Dostupné z: <http://www.fabe.gr/images/stories/SYNEDRIA/8.pdf>.
- [41] ANONYM, *Zelená energie ze syrovátky* [online]. Asociace soukromého zemědělství ČR. 2007. [cit. 2015-1-12]. Dostupné z: <http://www.asz.cz/cs/zpravy-z-tisku/lesnictvi-ekologie-a-myslivost/zelena-energie-ze-syrovatky.html>.
- [42] ŠLESINGER Josef. *Zvýšení rentability provozu mlékárny využitím metodiky čistší produkce*. [online 2015-1-12]. Dostupné z: <http://www.apic-ak.cz/zvyseni-rentability-provozu-mlekarny-vyuzitim-metodiky-cistsi-produkce.php?akce=hodnot&id=14370&year=2014&week=49>.
- [43] AUDIC, Jean-Luc, Bernard CHAUFER a Georges DAUFIN. Non-food applications of milk components and dairy co-products: A review. *Le Lait* [online]. 2003, roč. 83, č. 6, s. 417-438 [cit. 2014-10-18]. DOI: 10.1051/lait:2003027. ISSN 1958-5594. Dostupné z: <http://www.edpsciences.org/10.1051/lait:2003027>.
- [44] NEELIMA, Rajan et al. Chemical and functional properties of glycomacropeptide (GMP) and its role in the detection of cheese whey adulteration in milk: a review. *Dairy Science* [online]. 2013, roč. 93, č. 1, s. 21-43 [cit. 2014-10-30]. ISSN 0022-0302. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13594-012-0095-0>.
- [45] KAMAU, Samuel Mburu, Seronei Chelulei CHEISON, Wei CHEN, Xiao-Ming LIU a Rong-Rong LU. Alpha-Lactalbumin: Its Production Technologies and Bioactive Peptides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2010, roč. 9, č. 2, s. 197-212 [cit. 2014-9-30]. ISSN 1541-4337. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2009.00100.x>.
- [46] SÉVERIN, Sindayikengera a Xia WENSHUI. Milk Biologically Active Components as Nutraceuticals: Review. *Critical Reviews in Food Science*

- and Nutrition [online]. 2005, roč. 45, č. 7-8, s. 645-656 [cit. 2014-10-18]. ISSN 1549-7852. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408690490911756>.
- [47] INNOCENTE, Nadia et al. Dynamic Surface Properties of the Proteose-Peptide Fraction of Bovine Milk. *Journal of Dairy Science* [online]. 1998, roč. 81, č. 7, s. 1833-1839 [cit. 2015-1-12]. ISSN 0022-0302. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030298757534>.
- [48] LUCAS, O. David. Breakthrough Technology Produces Concentrated Whey Protein with Bioactive Immunoglobulins. *Clinical Nutrition Insights* [online]. 1999, roč. 6, č. 21, s. 1-4 [cit. 2015-1-13]. ISSN 2162-9838. Dostupné z: <http://healingpoints.com/Whey%20Protein.PDF>.
- [49] MADUREIRA, Ana R. et al. Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Research International* [online]. 2007, roč. 40, č. 10, s. 1197-1211 [cit. 2015-1-8]. ISSN 0963-9969. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996907001251>.
- [50] KORHONEN, Hannu et al. Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends in Food Science and Technology* [online]. 1998, roč. 9, 8-9, s. 307-319 [cit. 2014-12-16]. ISSN 0924-2244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224498000545>.
- [51] MADUREIRA, A. R. et al. Invited review: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *Journal of Dairy Science* [online]. 2010, roč. 93, č. 2, s. 437-455 [cit. 2015-1-12]. ISSN 0022-0302. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030210714879>.
- [52] WIJAYANTI, Heni B., Nidhi BANSAL a Hilton C. DEETH. Stability of Whey Proteins during Thermal Processing: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2014, roč. 13, č. 6, s. 1235-1251 [cit. 2015-01-10]. ISSN 1541-4337. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1541-4337.12105>.
- [53] ETZEL, Mark R. Manufacture and Use of Dairy Protein Fractions. *The Journal of Nutrition* [online]. 2004, roč. 134, č. 4, s. 996-1002 [cit. 2014-07-13]. Dostupné z: <http://jn.nutrition.org/content/134/4/996S.full.pdf+html> ISSN 1541-6100
- [54] WALZEM, R. L., C. J. DILLARD a J. B. GERMAN. Whey Components: Millennia of Evolution Create Functionalities for Mammalian Nutrition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2002, roč. 42, č. 4, s. 353-375 [cit. 2014-07-13]. ISSN 1549-7852. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408690290825574?journalCode=bfsn20#.VQK9LfmG9w4>.
- [55] BALCIUNAS, Eduardo Marcos et al. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control* [online]. 2013, roč. 32, č. 1,

- s. 134-142 [cit. 2015-2-5]. ISSN 0956-7135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713512006275>.
- [56] DE ARAUZ, Luciana Juncioni et al. Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends in Food Science and Technology* [online]. 2009, roč. 20, č. 3-4, s. 146-154 [cit. 2015-1-2]. ISSN 0924-2244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224409000594>.
- [57] BHAT, Rajeev, Abd Karim ALIAS a Gopinadhan PALIYATH. *Progress in food preservation* [online]. 1st ed. Chicester: John Wiley, 2011 [cit. 2014-07-05]. ISBN 978-111-9962-045. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9781119962045>.
- [58] MITRA, Suranjita, Pran Krishna CHAKRABARTTY a Swadesh Ranjan BISWAS. Production and Characterization of Nisin-Like Peptide Produced by a Strain of *Lactococcus lactis* Isolated from Fermented Milk. *Current Microbiology* [online]. 2005, roč. 51, č. 3, s. 183-187 [cit. 2014-12-28]. ISSN 1432-0991. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-005-4545-2>.
- [59] DRIDER, D., G. FIMLAND, Y. HECHARD, L. M. MCMULLEN a H. PREVOST. The Continuing Story of Class IIa Bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2006, roč. 70, č. 2, s. 564-582 [cit. 2014-07-06]. ISSN 1098-5557. Dostupné z: <http://mmbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00016-05>
- [60] SALMASO, Stefano et al. Nisin-loaded poly-l-lactide nano-particles produced by CO₂ anti-solvent precipitation for sustained antimicrobial activity. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2004, roč. 287, č. 1-2, s. 163-173 [cit. 2014-12-20]. ISSN 0378-5173. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517304005320>.
- [61] CHA, D. S. et al. Release of nisin from various heat-pressed and cast films. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2003, roč. 36, č. 2, s. 209-213 [cit. 2014-06-23]. ISSN 0023-6438. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643802002098>
- [62] SCANNELL, Amalia G. M. et al. Development of bioactive food packaging materials using immobilised bacteriocins Lacticin 3147 and Nisaplin®. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2000, roč. 60, č. 2-3, s. 241-249 [cit. 2014-06-13]. ISSN 0168-1605. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160500003147>.
- [63] KIM, Young-Min et al. Properties of nisin-incorporated polymer coatings as antimicrobial packaging materials. *Packaging Technology and Science* [online]. 2002, roč. 15, č. 5, s. 247-254 [cit. 2014-06-13]. ISSN 1099-1522. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pts.594/pdf>.

- [64] KIM, Young-Min, Hyun-Dong PAIK a Dong-Sun LEE. Shelf-life characteristics of fresh oysters and ground beef as affected by bacteriocin-coated plastic packaging film. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2002, roč. 82, č. 9, s. 998-1002 [cit. 2014-06-13]. ISSN 1097-0010. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.1125>.
- [65] CHA, Dong et al. Antimicrobial Films Based on Na-alginate and κ -carrageenan. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2002, roč. 35, č. 8, s. 715-719 [cit. 2014-06-13]. ISSN 0023-6438. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002364380290928X>
- [66] LEE, Chan Ho et al. Wide-spectrum antimicrobial packaging materials incorporating nisin and chitosan in the coating. *Packaging Technology and Science* [online]. 2003, vol. 16, issue 3, s. 99-106 [cit. 2014-06-13]. ISSN 1099-1522. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pts.617>.
- [67] LEE, Chan Ho, Hyun Jin PARK a Dong Sun LEE. Influence of antimicrobial packaging on kinetics of spoilage microbial growth in milk and orange juice. *Journal of Food Engineering* [online]. 2004, roč. 65, č. 4, s. 527-531 [cit. 2014-06-13]. ISSN 0260-8774. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877404000792>
- [68] HO LEE, Chan et al. A coating for use as an antimicrobial and antioxidative packaging material incorporating nisin and α -tocopherol. *Journal of Food Engineering* [online]. 2004, roč. 62, č. 4, s. 323-329 [cit. 2014-06-13]. ISSN 0260-8774. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877403002462>
- [69] LI, B. et al. Preparation and performance evaluation of glucomannan-chitosan-nisin ternary antimicrobial blend film. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2006, roč. 65, č. 4, s. 488-494 [cit. 2014-06-13]. ISSN 0144-8617. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861706000701>
- [70] KALETTA, Cortina a KARL-DIETER ENTIAN. Nisin, a Peptide Antibiotic: Cloning and Sequencing of the nisA Gene and Posttranslational Processing of Its Peptide Product. *Journal of bacteriology* [online]. 1989, roč. 171, č. 3, s. 1597-1601. ISSN 2155-9597 [cit. 2014-07-05]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC209786/pdf/jbacter00169-0373.pdf>.
- [71] DE VOS, Willem M. et al. Properties of Nisin Z and Distribution of Its Gene, nisZ, in *Lactococcus lactis*. *Applied and environmental microbiology* [online]. 1993, roč. 59, č. 1, s. 2013-2018. ISSN 1098-5336 [cit. 2014-8-10]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC202080/>.

- [72] ZENDO, Takeshi et al. Identification of the Lantibiotic Nisin Q, a New Natural Nisin Variant Produced by *Lactococcus lactis* 61-14 Isolated from a River in Japan. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* [online]. 2003, roč. 67, č. 7, s. 1616-1619 [cit. 2014-09-15]. ISSN 1347-6947. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12913315>.
- [73] DE KWAADSTENIET, M., K. TEN DOESCHATE a L. M. T. DICKS. Characterization of the Structural Gene Encoding Nisin F, a New Lantibiotic Produced by a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Isolate from Freshwater Catfish (*Clarias gariepinus*). *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2008, roč. 74, č. 2, s. 547-549 [cit. 2014-09-01]. ISSN 1098-5336. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.01862-07>.
- [74] WIRAWAN, R. E. et al. Molecular and Genetic Characterization of a Novel Nisin Variant Produced by *Streptococcus uberis*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2006, roč. 72, č. 2, s. 1148-1156 [cit. 2014-09-01]. ISSN 1098-5336. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.72.2.1148-1156.2006>.
- [75] PIPER, C. et al. A comparison of the activities of lacticin 3147 and nisin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2009, roč. 64, č. 3, s. 546-551 [cit. 2014-09-02]. ISSN 1460-2091. Dostupné z: <http://www.jac.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jac/dkp221>.
- [76] BACTIBASE: *Database dedicated to bacteriocins*. [online]. [cit. 2014-09-17]. Dostupné z: <http://bactibase.pfba-lab-tun.org/BAC047>.
- [77] JOERGER, Rolf D. Antimicrobial films for food applications: a quantitative analysis of their effectiveness. *Packaging Technology and Science* [online]. 2007, roč. 20, č. 4, s. 231-273 [cit. 2014-9-6]. ISSN 1099-1522. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pts.774>.
- [78] ČESKO. Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 235/2010 Sb., o Stanovení požadavků na čistotu a identifikaci přídatných látek, v platném znění. 2010. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1007449&docType=ART&>.
- [79] DEEGAN, Lucy H. et al. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal* [online]. 2006, roč. 16, č. 9, s. 1058-1071 [cit. 2014-06-23]. ISSN 0958-6946. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694605002827>.
- [80] SINGH, Preetiet al. Role of plastics additives for food packaging. *Pigment and Resin Technology* [online]. 2012, roč. 41, č. 6, s. 368-379 [cit. 2014-

- 11-02]. ISSN 0369-9420. Dostupné z:
<http://www.emeraldinsight.com/doi/abs/10.1108/03699421211274306>.
- [81] ČESKO. Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 235/2010 Sb., o *Stanovení požadavků na čistotu a identifikaci přídatných látek*, v platném znění. 2010. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1007449&docType=ART&>.
- [82] JOHN, Rojan P., K. Madhavan NAMPOOTHIRI a Ashok PANDEY. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2007, roč. 74, č. 3, s. 524-534 [cit. 2014-10-18]. ISSN 1432-0614. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-006-0779-6>.
- [83] BELGACEM, Mohamed Naceur a Alessandro GANDINI. *Monomers, polymers and composites from renewable resources*. 1st ed. Boston: Elsevier, ©2008, viii, 552 s. ISBN 978-008-0453-163.
- [84] MIGALLÓN, Jiménez Alfonso a Roxana A RUSECKAITE. *Lactic acid: production, properties, and health effects*. New York: Nova Biomedical/Nova Science Publishers, ©2012, xi, 169 p. Progress in food science and technology. ISBN 16-208-1643-1.
- [85] MARTINEZ, Fabio Andres Castillo et al. Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in Food Science and Technology* [online]. 2013, roč. 30, č. 1, s. 70-83 [cit. 2014-11-25]. ISSN 0924-2244. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224412002683>.
- [86] CORBION. *How is lactic acid produced?* [online]. [cit. 2015-1-12]. Dostupné z: http://www.lactic-acid.com/production_process.html.
- [87] GHAFAR, Tayyba et al. Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* [online]. 2014, roč. 7, č. 2, s. 222-229 [cit. 2014-12-21]. ISSN 1687-8507. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1687850714000314>.
- [88] VAIDYA, A. N. et al. Production and Recovery of Lactic Acid for Polylactide—An Overview. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* [online]. 2005, roč. 35, č. 5, s. 429-467 [cit. 2014-10-18]. ISSN 1547-6537. Dostupné z:
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10643380590966181>.
- [89] SEDLARIK, Vladimir et al. Preparation and Characterization of Poly (vinyl alcohol)/Lactic Acid Compounded Polymeric Films. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization* [online]. 2006, roč. 11, č. 4, s. 253-270 [cit. 2014-10-29]. ISSN 1563-5341. Dostupné z:
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10236660600750190>.

- [90] CHANDA, Manas a Salil K ROY. *Plastics technology handbook* [online]. 3th ed. Boca Raton: CRC Press; Taylor, 2007, sv. 1 [cit. 2014-10-02]. ISBN 08-493-7039-6. Dostupné z: http://books.google.cz/books/about/Plastics_Technology_Handbook_Third_Editi.html?id=1vIZmXLcnXwC&redir_esc=y.
- [91] VESELÝ, Karel. *Polymery: Struktura, syntézy, vlastnosti, zpracování*. Brno: ČSPCH, ©1992, 177 s. ISBN 80-020-0951-7.
- [92] KANATT, Sweetie R. et al. Active chitosan-polyvinyl alcohol films with natural extracts. *Food Hydrocolloids* [online]. 2012, roč. 29, č. 2, s. 290-297 [cit. 2014-11-02]. ISSN 0268-005X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X12000653>.
- [93] ANONYM. *Water-soluble polymers* [cit. 2015-2-7]. 2013. Dostupné z: <https://www.ihs.com/products/chemical-water-soluble-polymers-scup.html>.
- [94] PRIYA, Bhanu et al. Synthesis, characterization and antibacterial activity of biodegradable starch/PVA composite films reinforced with cellulosic fibre. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2014, roč. 109, s. 171-179 [cit. 2014-11-02]. ISSN 0144-8617. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861714002768>.
- [95] DING, Jing et al. Synthesis and Properties of Thermoplastic Poly(vinyl Alcohol)- Graft -Lactic Acid Copolymers. *Industrial ang Engineering Chemistry Research* [online]. 2009, vol. 48, issue 2, s. 788-793 [cit. 2014-03-08]. ISSN 0888-5885. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ie8013428>.
- [96] ČESKO. Směrnice Komise 2010/67/EU, kterou se mění směrnice Komise 2008/84/ES, kterou se stanoví *specifická kritéria pro čistotu potravinářských přídatných látek jiných než barviva a náhradní sladidla*, v platném znění. 2010. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:277:0017:0026:CS:PDF>.
- [97] DUCHÁČEK, Vratislav. *Polymery: výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, ©1995, 381 s. ISBN 80-708-0241-3.
- [98] MARK, H. *Encyclopedia of polymer science and technology* [online]. Concise 3rd ed. Hoboken, N. J.: Wiley-Interscience, ©2007, xxv, 1462 s. [cit. 2015-01-26]. ISBN 978-047-0046-104. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=Vfh1AQAAQBAJ&pg=PR4&lpg=PR4&dq=encyclopedia+of+polymer+science+and+technology&source=bl&ots=5D6M2O0nC-&sig=EkvQaCJA8BHd2QcdUNyKmFNeJBQ&hl=cs&sa=X&ei=Ma-vVOLpKs37atWHgdgF&ved=0CDsQ6AEwAjkK#v=onepage&q=encyclopedia%20of%20polymer%20science%20and%20technology&f=false>.

- [99] ANONYM. *Encyclopedia of polymer science and technology* [online]. 3rd ed. Hoboken: Wiley-Interscience, ©2003, 925 s. [cit. 2014-12-29]. ISBN 0-471-28780-69-12. Dostupné z: <http://www.scribd.com/doc/97313695/Vinyl-Alcohol-Polymers#scribd>.
- [100] CIUMPILIAC, Stefana et al. Antimicrobial Agar Particles for Food Preservation. *Revista de Chimie* [online]. 2010, roč. 61, č. 11, s. 1076-1079 [cit. 2014-10-13]. ISSN 0034-7752. Dostupné z: <http://www.revistadechimie.ro/pdf/CIUMPILIAC%20ST.pdf%2011%2010.pdf>.
- [101] PAL, Kunal, Ajit K. BANTHIA a Dipak K. MAJUMDAR. Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-gelatin hydrogel membranes for biomedical applications. *AAPS PharmSciTech* [online]. 2007, roč. 8, č. 1, s. E142-E146 [cit. 201-12-09]. ISSN 1530-9932. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1208%2Fpt080121>.
- [102] ROBERTSON, Gordon L. *Food packaging: principles and practice*. 2nd ed. Boca Raton: Taylor, ©2006, 550 s. ISBN 08-493-3775-5.
- [103] COLES Richard, Derek McDOWELL a Mark J. KIRWAN. *Food Packaging Technology*. Oxford: Blackwell Pub, ©2003, 368 s. ISBN 978-140-5147-712.
- [104] SINGH, Preeti et al. Understanding Critical Factors for the Quality and Shelf-life of MAP Fresh Meat: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2011, roč. 51, č. 2, s. 146-177 [cit. 2014-12-31]. ISSN 1549-7852. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408390903531384>.
- [105] QUINTAVALLA, Stefania a Loredana VICINI. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science* [online]. 2002, roč. 62, issue 3, s. 373-380 [cit. 2014-10-15]. ISSN 1873-4138. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174002001213>.
- [106] GONTARD, Nathalie a Stéphane GUILBERT. Mass Transfer in Novel “Food Contact Materials”: Scales and Stakes. *Japan Journal of Food Engineering* [online]. 2010, roč. 11, č. 4, s. 153-159 [cit. 2014-11-12]. Dostupné z: http://www.jsfe.jp/journal/PDF/vol11_4_2.pdf.
- [107] ČESKO. Nařízení Komise (EU) č. 10/2011, *o materiálech a předmětech z plastů určených pro styk s potravinami*, v platném znění. 2011. Dostupné z: http://ezu.cz/wp-content/uploads/2014/03/Narizeni_Komise_c10-2011.pdf.
- [108] SAWAN, Samuel P a Gurusamy MANIVANNAN. *Antimicrobial/anti-infective materials: principles, applications, and devices*. Lancaster, Pa.: Technomic Pub. Co., ©2000, xvi, 346 s. ISBN 15-667-6794-6.
- [109] EMBUSCADO, Milda E. a Kerry C. HUBER. *Edible Films and Coatings for Food Applications*. London: Springer, ©2009, xi, 403 s. ISBN 03-879-2823-5.

- [110] GODDARD, J. M. a J. H. HOTCHKISS. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress in Polymer Science* [online]. 2007, roč. 32, č. 7, s. 698-725 [cit. 2015-03-03]. ISSN 0079-6700. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670007000512>.
- [111] DAINELLI, Dario et al. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *Trends in Food Science and technology* [online]. 2008, roč. 19, s. 103-112 [cit. 2014-09-19]. ISSN 0924-2244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224408002355>
- [112] GOHIL, J. M., A. BHATTACHARYA a P. RAY. Studies On The Crosslinking Of Poly (Vinyl Alcohol). *Journal of Polymer Research* [online]. 2006, roč. 13, č. 2, s. 161-169 [cit. 2014-09-17]. ISSN 1572-8935. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10965-005-9023-9>.
- [113] JÜRGEN GROTE, Daniel Reneau. *Oxygen Transport to Tissue – II* [online]. Boston, MA: Springer US, 1976 [cit. 2015-03-01]. ISBN 978-146-8432-732. Dostupné z: http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4684-3273-2_32.
- [114] MILLIGEN, B. et al. On the applicability of Fick's law to diffusion in inhomogeneous systems. *European Journal of Physics* [online]. 2005, roč. 26, issue 5, s. 913-925 [cit. 2015-01-09]. ISSN 1361-6404. Dostupné z: <http://stacks.iop.org/0143-0807/26/i=5/a=023?key=crossref.18ae1d798b557c850b35a3b3bc9d721c>.
- [115] LUPO, Bryshila et al. Preparation of alginate microspheres by emulsification/internal gelation to encapsulate cocoa polyphenols. *Food Hydrocolloids* [online]. 2014, roč. 38, s. 56-65 [cit. 2014-12-15]. ISSN 0268-005X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X13003640>.
- [116] MARTINHO, N., Ch. DAMGÉ a C. PINTO REIS. Recent Advances in Drug Delivery Systems. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* [online]. 2011, roč. 02, č. 5, s. 510-526 [cit. 2014-9-5]. ISSN 2158-7043. Dostupné z: <http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/jbnb.2011.225062>.
- [117] JI, Shaowen et al. Dynamic encapsulation of hydrophilic nisin in hydrophobic poly (lactic acid) particles with controlled morphology by a single emulsion process. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2014, roč. 423, s. 85-93 [cit. 2015-1-2]. ISSN 0021-9797. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979714001015>.
- [118] VAUTHIER, Christine a Kawthar BOUCHEMAL. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharmaceutical Research* [online]. 2009, roč. 26, č. 5, s. 1025-1058 [cit. 2014-8-

- 26]. ISSN 1573-904X. Dostupné z:
<http://link.springer.com/10.1007/s11095-008-9800-3>.
- [119] PINTO REIS, Catarina et al. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* [online]. 2006, roč. 2, č. 1, s. 8-21. [cit. 2014-9-5]. ISSN 1549-9642. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963406000050>.
- [120] CHOLLET, E. et al. Monitoring nisin desorption from a multi-layer polyethylene-based film coated with nisin loaded HPMC film and diffusion in agarose gel by an immunoassay (ELISA) method and a numerical modeling. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* [online]. 2009, roč. 10, č. 2, s. 208-214 [cit. 2014-08-29]. ISSN 1466-8564. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1466856408000096>.
- [121] GUPTA, A. et al. Synthesis, characterization and efficacy of chemically crosslinked PVA hydrogels for dermal wound healing in experimental animals. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2009, roč. 111, č. 3, s. 1400-1408 [cit. 2014-09-15]. ISSN 1097-4628. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.28990>.
- [122] FRANKLIN, Nathan B. et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on the Surface of Individually Packaged Hot Dogs with a Packaging Film Coating Containing Nisin. *Journal of Food Protection* [online]. 2004, roč. 67, č. 3, s. 480-485 [cit. 2014-12-09]. ISSN 0362-028X. Dostupné z: <http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/2004/00000067/00000003/art00008>.
- [123] LIANG, Rong et al. Application of Gelatin-Based Antimicrobial Edible Coatings on the Preservation of Chicken Meat and Prepared Products. *Advanced Materials Research* [online]. 2011, 236-238, s. 2255-2258 [cit. 2014-08-29]. ISSN 1662-8985. Dostupné z: <http://www.scientific.net/AMR.236-238.2255>.
- [124] KYOUNGJU, Ku a Bin Song KYUNG. Physical properties of nisin-incorporated gelatin and corn zein films and antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2007, roč. 17, č. 3, s. 520-523 [cit. 2014-09-11]. ISSN: 1017-7825. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18050958>.
- [125] GILL, A. O. a R. A. HOLLEY. Surface application of lysozyme, nisin, and EDTA to inhibit spoilage and pathogenic bacteria on ham and Bologna. *Journal of Food Protectiononline* [online]. 2000, roč. 63, č. 10, s. 1338-1346 [cit. 2014-09-01]. ISSN: 0362-028X. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11041132>.

- [126] MIN, B. J., I. Y. HAN a P. L. DAWSON. Antimicrobial gelatin films reduce *Listeria monocytogenes* on turkey bologna. *Poultry Science* [online]. 2010, roč. 89, č. 6, s. 1307-1314 [cit. 2014-08-26]. ISSN 1466-1799. Dostupné z: <http://ps.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.3382/ps.2009-00451>.
- [127] DHERAPRASART, Chanuttaporn et al. Morphology, Release Characteristics, and Antimicrobial Effect of Nisin-Loaded Electrospun Gelatin Fiber Mat. *Journal of Food Protection* [online]. 2009, roč. 72, č. 11, s. 2293-2300 [cit. 2014-09-15]. ISSN 1944-9097. Dostupné z: <http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/2009/00000072/00000011/art00008>.
- [128] PADGETT, T., I. Y. HAN a P. L. DAWSON. Incorporation of food-grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films. *Journal of Food Protection* [online]. 1998, roč. 61, č. 10, s. 193-216 [cit. 2014-09-16]. ISSN: 1330-1335. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9798150>.
- [129] GUIGA, W. et al. Innovative multilayer antimicrobial films made with Nisaplin® or nisin and cellulosic ethers: Physico-chemical characterization, bioactivity and nisin desorption kinetics. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* [online]. 2010, roč. 11, č. 2, s. 352-360 [cit. 2014-08-29]. ISSN 1466-8564. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S146685641000010X>.
- [130] COMA, V. et al. Antimicrobial Edible Packaging Based on Cellulosic Ethers, Fatty Acids, and Nisin Incorporation To Inhibit *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Protection* [online]. 2001, roč. 4, s. 439-586 [cit. 2014-08-30]. ISSN 1944-9097. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11307881>.
- [131] ERCOLINI, Danilo et al. Development of spoilage microbiota in beef stored in nisin activated packaging. *Food Microbiology* [online]. 2010, roč. 27, č. 1, s. 137-143 [cit. 2014-09-13]. ISSN 0740-0020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002009002044>.
- [132] LEE, Joo-Won, Seok-Min SON a Seok-In HONG. Characterization of protein-coated polypropylene films as a novel composite structure for active food packaging application. *Journal of Food Engineering* [online]. 2008, roč. 86, č. 4, s. 484-493 [cit. 2014-08-25]. ISSN 1745-4530. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877407005535>.
- [133] WAN, J. et al. Incorporation of nisin in micro-particles of calcium alginate. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 1997, roč. 24, č. 3, s. 153-158 [cit. 2015-1-6]. ISSN 1472-765X. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1472-765X.1997.00294.x/epdf>

- [134] KHAKSAR, Ramin et al. Nisin-loaded alginate-high methoxy pectin microparticles: preparation and physicochemical characterisation. *International Journal of Food Science and Technology* [online]. 2014, roč. 49, č. 9, s. 2076-2082 [cit-2014-12-20]. ISSN 1365-2621. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/ijfs.12516>.
- [135] NATRAJAN, N. a B. W. SHELDON. Efficacy of nisin-coated polymer films to inactivate *Salmonella Typhimurium* on fresh broiler skin. *Journal of Food Protection* [online]. 2000, roč. 63, č. 9, s. 1189-1196 [cit. 2014-08-01]. ISSN 0362028X. Dostupné z: <http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/2000/00000063/00000009/art00005>.
- [136] SIRAGUSA, G. R, C. N. CUTTER a J. L. WILLETT. Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat. *Food Microbiology* [online]. 1999, roč. 16, č. 3, s. 229-235 [cit. 2014-08-25]. ISSN 1745-4530. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002098902398>.
- [137] CUTTER, C. N., J. L. WILLETT a G. R. SIRAGUSA. Improved antimicrobial activity of nisin-incorporated polymer films by formulation change and addition of food grade chelator. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 2001, roč. 33, č. 4, s. 325-328 [cit. 2014-09-31]. ISSN 1472-765X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1472-765X.2001.01005.x>.
- [138] JIN, T. a H. ZHANG. Biodegradable Polylactic Acid Polymer with Nisin for Use in Antimicrobial Food Packaging. *Journal of Food Science* [online]. 2008, roč. 73, č. 3, s. 127-134 [cit. 2014-12-20]. ISSN 1365-2621. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2008.00681.x>.
- [139] LARIDI, R, E et al. Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. *International Dairy Journal* [online]. 2003, roč. 13, č. 4, s. 325-336 [cit. 2013-11-19]. ISSN 0958-6946. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694602001942>.
- [140] DINARVAND, Rassoul et al. Preparation of gelatin microspheres containing lactic acid-effect of cross-linking on drug release. *Acta pharmaceutica* [online]. 2005, roč. 55, č. 1, s. 57-67 [cit. 2014-9-06]. ISSN 1330-0075. Dostupné z: <http://www.pubfacts.com/detail/15907224/Preparation-of-gelatin-microspheres-containing-lactic-acid--effect-of-cross-linking-on-drug-release>.
- [141] BURSHE, M. C. et al. Pervaporative Dehydration of Organic Solvents. *Separation Science and Technology* [online]. 1997, roč. 32, č. 8, s. 1335-

- 1349 [cit. 2014-08-31]. ISSN 1520-5754. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01496399708000964>.
- [142] BURSHE, M. C. et al. Sorption and permeation of binary water-alcohol systems through PVA membranes crosslinked with multifunctional crosslinking agents. *Separation and Purification Technology* [online]. 1997, roč. 12, č. 2, s. 145-156 [cit. 2014-09-31]. ISSN 1520-5754. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383586697000427>.
- [143] QIU, Kaiyan a Anil N. NETRAVALI. Halloysite nanotube reinforced biodegradable nanocomposites using noncrosslinked and malonic acid crosslinked polyvinyl alcohol. *Polymer Composites* [online]. 2013, roč. 34, č. 5, s. 799-809 [cit. 2014-08-30]. ISSN 1548-0569. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pc.22482>.
- [144] LIOU, Feng Jyh a Yng Jiin WANG. Preparation and characterization of crosslinked and heat-treated PVA-MA films. *Journal of Applied Polymer Science*. 1996 [online], roč. 59, č. 9, s. 1395-1403 [cit. 2014-09-08]. ISSN 1097-4628. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/%28SICI%291097-4628%2819960228%2959:9%3C1395::AID-APP7%3E3.0.CO;2-6/abstract>.
- [145] ALVES, Priscila M. et al. Development of films based on blends of gelatin and poly(vinyl alcohol) cross linked with glutaraldehyde. *Food Hydrocolloids* [online]. 2011, roč. 25, č. 7, s. 1751-1757 [cit. 2014-07-20]. ISSN 0268-005X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X11001044>.
- [146] ZHU, Zhifeng, Yongsheng ZHOU a Junfeng LI. Environment-friendly crosslinking of cornstarch by pentanedioic acid for stabilizing the viscosity of starch paste during warp sizing. *Fibers and Polymers* [online]. 2014, roč. 15, č. 4, s. 707-715 [cit. 2014-9-16]. ISSN 1875-0052. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12221-014-0707-9>.
- [147] WU, Chien-Fu a Michael HAMADA. *Experiments: planning, analysis, and parameter design optimization*. New York: John Wiley & Sons, ©2000, xxviii, 630 s. ISBN 0471255114.
- [148] TriloByte Statistical Software. *Interaktivní statistický systém pro analýzu dat off-line QC Expert 3.3*. České Budějovice: Česká republika. Dostupný z: <http://www.trilobyte.cz/Nase-Produkty/QC-Expert.html>.
- [149] DEMERLIS, C. C. a D. R. SCHONEKER. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2003, roč. 41, č. 3, s. 772-772 [cit. 2014-06-21]. ISSN 0278-6915. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691502002582>.
- [150] KELLY, C. M. et al. Subchronic toxicity study in rats and genotoxicity tests with polyvinyl alcohol. *Food and Chemical Toxicology* [online].

- 2003, roč. 41, č. 5, s. 719-727 [cit. 2014-10-08]. ISSN 0278-6915. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691503000036>.
- [151] SEDLARIK, Vladimir et al. Environmentally friendly biocomposites based on waste of the dairy industry and poly(vinyl alcohol). *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2007, roč. 106, č. 3, s. 1869-1879 [cit. 2014-09-09]. ISSN 1097-4628. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/app.26589/epdf>.
- [152] CHIELLINI, Emo, Andrea CORTI, Salvatore D'ANTONE a Roberto SOLARO. Biodegradation of poly (vinyl alcohol) based materials. *Progress in Polymer Science* [online]. 2003, roč. 28, č. 6, s. 963-1014 [cit. 2015-06-20]. ISSN 0079-6700. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670002001491>.
- [153] GHOLAP, Shubhangi G., Jyoti P. JOG a Manohar V. BADIGER. Synthesis and characterization of hydrophobically modified poly(vinyl alcohol) hydrogel membrane. *Polymer* [online]. 2004, roč. 45, č. 17, s. 5863-5873 [cit. 2014-08-08]. ISSN 0032-3861. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386104006172>.
- [154] ONYARI, John Mmari a Samuel J. HUANG. Synthesis and properties of novel polyvinyl alcohol-lactic acid gels. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2009, roč. 113, č. 4, s. 2053-2061 [cit. 2014-08-15]. ISSN 1097-4628. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.29909>.
- [155] FINCH, C. *Chemistry and technology of water-soluble polymers*. New York: Plenum Press, ©1983, xvi, 258 p. ISBN 03-064-1251-9.
- [156] MATSUMURA, Shuichi. *Biopolymers*. Weinheim: Wiley-VCH, ©2003, 598 s. ISBN 352730228X.
- [157] XU, Xiang-Ju, Shao-Ming HUANG a Li-Hua ZHANG. Biodegradability, antibacterial properties, and ultraviolet protection of polyvinyl alcohol-natural polyphenol blends. *Polymer Composites* [online]. 2009, roč. 30, č. 11, s. 1611-1617 [cit. 2014-10-09]. ISSN 1548-0569. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pc.20734>.
- [158] GUASCITO, Maria Rachele et al. Development and characterization of a novel bioactive polymer with antibacterial and lysozyme-like activity. *Biopolymers* [online]. 2014, roč. 101, č. 5, s. 461-470 [cit. 2014-10-10]. ISSN 1097-0282. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bip.22404>.
- [159] SEDLARIK, Vladimir et al. Modification of poly(vinyl alcohol) with lactose and calcium lactate: potential filler from dairy industry. *Plastics, Rubber and Composites* [online]. 2006, roč. 35, č. 9, s. 355-359 [cit. 2014-02-27]. ISSN 1465-8011. Dostupné z: <http://www.maneyonline.com/doi/abs/10.1179/174328906X149682>.
- [160] CARLOTTI, Stéphane J., Olivia GIANI-BEAUNE a François SCHUÉ. Characterization and mechanical properties of water-soluble poly(vinyl alcohol) grafted with lactic acid and glycolic acid. *Journal of Applied*

- Polymer Science* [online]. 2001, roč. 80, č. 2, s. 142-147 [cit. 2014-07-09]. ISSN 1097-4628. Dostupné z: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-4628\(20010411\)80:2%3C142::AID-APP1082%3E3.0.CO;2-4/epdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-4628(20010411)80:2%3C142::AID-APP1082%3E3.0.CO;2-4/epdf).
- [161] HAN, Jung H. *Innovations in food packaging*. Amsterdam: Elsevier, ©2005, xii, 517 s. ISBN 978-0-12-311632-1.
- [162] BONINI, M. et al. Extraction and gas chromatographic evaluation of plasticizers content in food packaging films. *Microchemical Journal* [online]. 2008, roč. 90, č. 1, s. 31-36 [cit. 2014-07-08]. ISSN 0026-265X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026265X08000337>.
- [163] HEDE, Peter Dybdahl, Poul BACH a Anker D. JENSEN. Fluidized-Bed Coating with Sodium Sulfate and PVA-TiO₂, 1. Review and Agglomeration Regime Maps. *Industrial and Engineering Chemistry Research* [online]. 2009, roč. 48, č. 4, s. 1893-1904 [cit. 2014-06-05]. ISSN 0888-5885. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ie800940e>.
- [164] MARIA, Thaís M. C. et al. The effect of the degree of hydrolysis of the PVA and the plasticizer concentration on the color, opacity, and thermal and mechanical properties of films based on PVA and gelatin blends. *Journal of Food Engineering* [online]. 2008, roč. 87, č. 2, s. 191-199 [cit. 2014-03-18]. ISSN 1556-3758. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877407005985>.
- [165] SHI, Rui et al. The effect of citric acid on the structural properties and cytotoxicity of the polyvinyl alcohol/starch films when molding at high temperature. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2008, roč. 74, č. 4, s. 763-770 [cit. 2014-07-30]. ISSN 0144-8617. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861708002208>
- [166] BERNAL, Andres, Ivo KURITKA a Petr SAHA. Preparation and characterization of poly(vinyl alcohol)-poly(vinyl pyrrolidone) blend: A biomaterial with latent medical applications. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2013, roč. 127, č. 5, s. 3560-3568 [cit. 2014-08-30]. ISSN 097-4628. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.37723>.
- [167] VIJAYAKUMAR, J., R. ARAVINDAN a T. VIRUTHAGIRI. Recent Trends in the Production, Purification and Application of Lactic Acid. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* [online]. 2008, roč. 22, č. 2, s. 245-264 [cit. 2015-07-21]. ISSN 1846-5153. Dostupné z: http://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id_clanak_jezik=39106.
- [168] HOFVENDAHL, Karin a Bärbel HAHN-HÄGERDAL. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources1. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2000, roč. 26, č. 2-4, s. 87-107 [cit. 2014-08-19]. ISSN 0141-0229. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022999001556>.

- [169] DATTA, Rathin a Michael HENRY. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies — a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* [online]. 2006, roč. 81, č. 7, s. 1119-1129 [cit. 2014-08-01]. ISSN 1097-4660. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.1486/epdf>.
- [170] HISMIOGULLARI, S. E. et al. Investigation of Antibacterial and Cytotoxic Effects of Organic Acids Including Ascorbic Acid, Lactic Acid and Acetic Acids on Mammalian Cells. *Journal of Animal and Veterinary Advances* [online]. 2008, roč. 7, č. 6, s. 681-684 [cit. 2014-08-01]. ISSN 1680-5593. Dostupné z: <http://docsdrive.com/pdfs/medwelljournals/javaa/2008/681-684.pdf>.
- [171] EKLUND, Trygve. The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. *Journal of Applied Bacteriology* [online]. 1983, roč. 54, č. 3, s. 383-389 [cit. 2014-10-20]. ISSN 0021-8847. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.1983.tb02632.x>.
- [172] HUYGHEBAERT, Gerard, Richard DUCATELLE a Filip Van IMMERSEEL. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *The Veterinary Journal* [online]. 2011, roč. 187, č. 2, s. 182-188 [cit. 2014-06-05]. ISSN 1090-0233. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090023310000869>.
- [173] PAULUS, Wilfried. *Directory of microbicides for the protection of materials: a handbook*. Dordrecht: Springer, ©2005, xx, 787 s. ISBN 1402028172.
- [174] SEDLARIK, Vladimir et al. The effect of preparation temperature on the mechanical and antibacterial properties of poly(vinyl alcohol)/silver nitrate films. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2010, roč. 95, č. 3, s. 399-404 [cit. 2014-09-12]. ISSN 0141-3910. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014139100900367X>
- [175] GALYA, Tsermaa et al. Antibacterial poly(vinyl alcohol) film containing silver nanoparticles: Preparation and characterization. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2008, roč. 110, č. 5, s. 3178-3185 [cit. 2014-09-19]. ISSN 1097-4628. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.28908>.
- [176] KANE, Sheryl R., Paul D. ASHBY a Lisa A. PRUITT. ATR-FTIR as a thickness measurement technique for hydrated polymer-on-polymer coatings. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* [online]. 2009, 91B, č. 2, s. 613-620 [cit. 2014-07-30]. ISSN 1552-4981. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.b.31436>.
- [177] POMMERENKE, K. Ověřování jakosti polymerů s použitím termické analýzy. *Chemagazín* [online]. 2009, roč. 19, č. 1, s. 8-9 [cit. 2014-09-

- 12]. Dostupné z: http://www.chemagazin.cz/userdata/chemagazin_2010/file/chxix_1_cl1.pdf.
- [178] ČSN EN ISO 11357-1. *Plasty – Diferenční snímací kalorimetrie (DSC): Část 1: Základní principy*. Praha: Česká normalizační institut, 2009.
- [179] JARUŠEK, Jaroslav. *Metody zkoumání polymerů*. 1. vyd. Pardubice: VŠCHT, ©1984, 105 s. ISBN 80-851-1301-5.
- [180] ČSN EN ISO 527-1. *Plasty: Stanovení tahových vlastností – Část 1: Obecné principy*. Praha: Česká normalizační institut, 2012.
- [181] ČSN EN ISO 527-3. *Plasty: Stanovení tahových vlastností – Část 3: Zkušební podmínky pro fólie a desky*. Praha: Česká normalizační institut, 1997.
- [182] ČSN EN ISO 291. *Plasty: Standardní prostředí pro kondicionování a zkoušení*. Praha: Česká normalizační institut, 2009.
- [183] ISO 22196. *Plasty – Měření antimikrobiální aktivity na povrchu plastů*. Ženeva, 2007. Dostupné z: <http://file.yizimg.com/334736/2011031410314415.pdf>.
- [184] HARLEY, John P. *Laboratory exercises in microbiology*. 6th ed. Boston, Mass: McGraw-Hill, 2005. ISBN 9780072556803.
- [185] SEDLARIK, Vladimir et al. The Effect of Hydrolysis Degree on the Properties of Antibacterial Polymeric Films Based on Poly(vinyl alcohol) and Zinc Sulphate for Biomedical Applications. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. 2010, roč. 21, č. 11, s. 1421-1440 [cit. 2014-07-13]. ISSN 0920-5063. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1163/092050609X12517858243742>.
- [186] BACHTSI, Aristi R. a Costas KIPARISSIDES. Synthesis and release studies of oil-containing poly(vinyl alcohol) microcapsules prepared by coacervation. *Journal of Controlled Release* [online]. 1996, vol. 38, issue 1, s. 49-58 [cit. 2015-03-02]. ISSN 0168-3659. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168365995000992>.
- [187] SMITH, Derek R. a Rui-Sheng WANG. Glutaraldehyde exposure and its occupational impact in the health care environment. *Environmental Health and Preventive Medicine* [online]. 2006, roč. 11, č. 1, s. 3-10 [cit. 2013-12-5]. ISSN 1347-4715. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02898201>
- [188] BEAUCHAMP, Robert O. et al. A Critical Review of the Toxicology of Glutaraldehyde. *Critical Reviews in Toxicology* [online]. 1992, roč. 22, č. 3-4, s. 143-174 [cit. 2013-12-5]. ISSN 1547-6898. Dostupné z: <http://www.informapharmascience.com/doi/abs/10.3109/10408449209145322>.
- [189] MITRA, T., G. SAILAKSHMI a A GNANAMANI. Could glutaric acid (GA) replace glutaraldehyde in the preparation of biocompatible

- biopolymers with high mechanical and thermal properties? *Journal of Chemical Sciences* [online]. 2014, roč. 126, č. 1, s. 127-140 [cit. 2014-4-1]. ISSN 0973-7103. Dostupné z:
<http://link.springer.com/article/10.1007/s12039-013-0543-2>.
- [190] MI, Fwu-Long et al. Synthesis and characterization of biodegradable TPP/genipin co-crosslinked chitosan gel beads. *Polymer* [online]. 2003, vol. 44, issue 21, s. 6521-6530 [cit. 2015-03-10]. ISSN 0032-3861. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386103006207>.
- [191] KANUNGO, Ivy, N. Nishad FATHIMA, J. Raghava RAO a Balachandran Unni NAIR. Hydration dynamics of collagen/PVA composites: Thermoporometric and impedance analysis. *Materials Chemistry and Physics* [online]. 2013, vol. 140, issue 1, s. 357-364 [cit. 2015-03-10]. ISSN 0254-0584. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0254058413002733>.
- [192] BOLTO, Brian et al. Crosslinked poly (vinyl alcohol) membranes. *Progress in Polymer Science* [online]. 2009, roč. 34, č. 9, s. 969-981 [cit. 2014-9-5]. ISSN 0079-6700. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670009000549>.
- [193] JIKIHARA, Atsushi et al. Electroalytic Transport Properties of Anion-Exchange Membranes Prepared from Poly(vinyl alcohol) and Poly(vinyl alcohol-co-methacryloyl aminopropyl trimethyl ammonium chloride). *Membranes* [online]. 2013, vol. 3, issue 1, s. 1-15 [cit. 2015-03-04]. ISSN 2077-0375. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2077-0375/3/1/1/htm>.
- [194] KAKIUCHI, Hiroshi. SEIKO INSTRUMENTS INC. *Electrochromic display device* [patent]. EP0083988 B1. Uděleno 11. listopad 1987. Zapsáno 10. leden 1983 [cit. 2015-03-04]. Dostupné z:
<http://www.google.co.uk/patents/EP0083988B1?cl=en>.
- [195] JORDANOV, N. a R. ZELLNER. Investigations of the hygroscopic properties of ammonium sulfate and mixed ammonium sulfate and glutaric acid micro droplets by means of optical levitation and Raman spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics* [online]. 2006, roč. 8, č. 23, s. 2759-2764 [cit. 2014-12-21]. ISSN 1463-9076. Dostupné z:
<http://pubs.rsc.org.proxy.k.utb.cz/en/content/articlepdf/2006/cp/b604439e>.
- [196] REIMER, Ludwig. *Image formation in low-voltage scanning electron microscopy*. Bellingham, Wash.: SPIE Optical Engineering Press, ©1993, xii, 143 p. ISBN 0-8194-1206-6.
- [197] MEYERS, Robert A. *Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory, and instrumentation*. New York: Wiley, ©2000, 13970 s. ISBN 04-719-7670-9.

- [198] STAMM, Manfred. *Polymer surfaces and interfaces: characterization, modification and applications*. Berlin: Springer, ©2007, xvi, 324 p. ISBN 3540738649.
- [199] ABD ALLA, Safaa G., Reham H. HELAL a Abdel Wahab M. EL-NAGGAR. Characterization of poly(vinyl alcohol)/acrylamide/alkylammonium montmorillonite clay nanocomposites prepared by electron beam irradiation. *Advanced Composite Materials* [online]. 2014, roč. 24, č. 1, s. 41-56 [cit. 2015-02-10]. ISSN 1568-5519 . Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09243046.2013.871178>.
- [200] LI, Ting, Yuan REN a Chaohai WEI. Study on preparation and properties of PVA-SA-PHB-AC composite carrier for microorganism immobilization. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2014, roč. 131, č. 3, s. 1-10 [cit. 2015-01-13]. ISSN 1097-4628. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.39837>.
- [201] SAKURADA, Ichiro, Yasuyoshi SAKAGUCHI a Shuji YOSHIDA. Effects of Sodium Chloride on Acetalization of Polyvinyl Alcohol in Water. *Kobunshi Kagaku* [online]. 1964, roč. 21, č. 234, s. 620-624 [cit. 2015-01-11]. ISSN 1884-8079. Dostupné z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/koron1944/21.620?from=CrossRef>.
- [202] LI, Yangbo et al. The interaction between poly(vinyl alcohol) and low-molar-mass poly(ethylene oxide). *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2012, roč. 126, č. 1, s. 162-168 [cit. 2015-03-13]. ISSN 1097-4628. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.35308>
- [203] PATEL, S. K. et al. Role of polyvinyl alcohol in the conductivity behaviour of polyethylene glycol-based composite gel electrolytes. *Pramana* [online]. 2007, roč. 69, č. 3, s. 467-475 [cit. 2015-03-13]. ISSN 0973-7111. Dostupné z: <http://www.ias.ac.in/pramana/v69/p467/fulltext.pdf>.
- [204] SELVAKUMAR, M., D. Krishna BHAT a N. G. RENGANATHAN. Miscibility of polymethylmethacrylate and polyethyleneglycol blends in tetrahydrofuran. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2009, roč. 111, č. 1, s. 452-460 [cit. 2015-02-14]. ISSN 1097-4628 . Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.29113>.
- [205] HALLQUIST, Mattias et al. Hydrolysis of N₂O₅ on sub-micron sulfate aerosols. *Physical Chemistry Chemical Physics* [online]. 2003, roč. 5, č. 16, s. 3453-3463 [cit. 2015-03-10]. ISSN 1463-9076. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b301827j>.
- [206] MEI, Lin et al. Novel docetaxel-loaded nanoparticles based on PCL-Tween 80 copolymer for cancer treatment. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2011 [cit. 2015-02-28]. ISSN 1178-2013. Dostupné z:

http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=3218581_ijn-6-2679f3&req=4.

- [207] RAMÍREZ-SANTOS, Álvaro A., Próspero ACEVEDO-PEÑA a Elcy M. CÓRDOBA. Photo-assisted electrochemical copper removal from cyanide solutions using porous TiO₂ thin film photo-anodes. *Materials Research* [online]. 2014, roč. 17, č. 1, s. 69-77 [cit. 2015-03-03]. ISSN 0884-2914. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext.
- [208] HASSAN, Christie M. a Nikolaos A. PEPPAS. Structure and Applications of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking or by Freezing/Thawing Methods. *Biopolymers · PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2000, s. 37 [cit. 2015-03-10]. ISSN 0065-3195. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/3-540-46414-X_2.
- [209] ALISHAHI, Alireza. Antibacterial Effect of Chitosan Nanoparticle Loaded with Nisin for the Prolonged Effect. *Journal of Food Safety* [online]. 2014, roč. 34, č. 2, s. 111-118 [cit. 2015-03-02]. ISSN 1745-4565. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jfs.12103>.
- [210] YEOM, C. K. et al. Microencapsulation of water-soluble herbicide by interfacial reaction. I. Characterization of microencapsulation. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2000, roč. 78, č. 9, s. 1645-1655 [cit. 2015-02-27]. ISSN 1097-4628. Dostupné z: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-4628\(20001128\)78:9%3C1645::AID-APP100%3E3.0.CO;2-2/epdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-4628(20001128)78:9%3C1645::AID-APP100%3E3.0.CO;2-2/epdf).
- [211] ANDERSON, James M. a Matthew S. SHIVE. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 1997, roč. 28, č. 1, s. 5-24 [cit. 2015-01-27]. DOI: 10.1016/S0169-409X(97)00048-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X97000483>.

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|--|-----------|
| <i>Obr. 1: Struktura nisinu A (Dha – dehydroalanin; Dhb – dehydrobutyrin; S –thioéterový můstek)</i> | <i>16</i> |
| <i>Obr. 2: a) L-, b) D-stereoisomer kyseliny mléčné</i> | <i>18</i> |
| <i>Obr. 3: Schematické znázornění průmyslové výroby kyseliny mléčné</i> | <i>19</i> |
| <i>Obr. 4: Rozdělení syntetických polymerů</i> | <i>21</i> |
| <i>Obr. 5: Chemická struktura a) částečně hydrolyzovaného, b) plně hydrolyzovaného polyvinylalkoholu</i> | <i>24</i> |
| <i>Obr. 6: Závislost vlastností polyvinylalkoholu na stupni hydrolyzy a molekulové hmotnosti.....</i> | <i>25</i> |
| <i>Obr. 7: Imobilizace BAL na polymerní povrch prostřednictvím a) elektrostatických interakcí, b) interakcí mezi ligandem a receptorem, c) kovaletních vazeb.....</i> | <i>30</i> |
| <i>Obr. 8: Schéma a) nemigračního bioaktivního systému; b) migračního bioaktivního systému s netěkavou BAL; c) migračního bioaktivního systému s těkavou BAL.....</i> | <i>30</i> |
| <i>Obr. 9: Log₁₀ redukce nárůstu mikroorganismů nebo skupiny mikroorganismů vystavených v nepotravinových a potravinových vzorcích.....</i> | <i>36</i> |
| <i>Obr. 10: Kirby-Bauerova disková metoda; a) vzorek bez zóny inhibice, b) vzorek se zónou inhibice.....</i> | <i>48</i> |
| <i>Obr. 11: Sériové ředění vzorku a přímé stanovení počtu kolonie tvořících jednotek.....</i> | <i>48</i> |
| <i>Obr. 12: Obsah vody v PVOH/LA filmech v závislosti na HD a obsahu LA; PVOH 80(tmavě šedý), PVOH 8-88 (bílý), PVOH 6-98 (světle šedý).....</i> | <i>50</i> |
| <i>Obr. 13: Závislost bobtnání filmů a) PVOH6-98, b) PVOH6-98/LA5, c) PVOH6-98/LA10, d) PVOH6-98/LA15, e) PVOH6-98/LA20, f) PVOH6-98/LA25, g) PVOH6-98/LA30 na čase</i> | <i>51</i> |
| <i>Obr. 14: Závislost rozpustnosti filmů a) PVOH6-98, b) PVOH6-98/LA5, c) PVOH6-98/LA10, d) PVOH6-98/LA15, e) PVOH6-98/LA20, f) PVOH6-98/LA25, g) PVOH6-98/LA30 na čase</i> | <i>52</i> |
| <i>Obr. 15: FTIR-ATR spektra čistých komponent a) PVOH 80, b) PVOH 8-88, c) PVOH 6-98, d) LA</i> | <i>53</i> |
| <i>Obr. 16: FTIR-ATR spektra filmů a) PVOH 80, b) PVOH 8-88, c) PVOH 6-98 a 30% hm. LA.....</i> | <i>54</i> |
| <i>Obr. 17: DSC charakterizace [T_g (A) a T_m (B)] jako funkce obsahu LA v a) PVOH 80, b) PVOH 8-88, c) PVOH 6-98.....</i> | <i>56</i> |
| <i>Obr. 18: Youngův modul pružnosti (A) a pevnost v tahu při přetržení (B) jako funkce obsahu LA v a) PVOH 80, b) PVOH 8-88, c) PVOH 6-98 a 30% hm. LA.....</i> | <i>57</i> |
| <i>Obr. 19: Relativní redukce mechanických vlastností [Youngova modulu (A) a pevnosti v tahu při přetržení (B)] a) PVOH 80, b) PVOH 8-88, c) PVOH 6-98 filmů v závislosti na obsahu LA</i> | <i>58</i> |

| | |
|---|-----------|
| <i>Obr. 20: Výsledky difúzního testu PVOH/LA filmů proti Staphylococcus aureus (A) a Escherichia coli (B); PVOH 80 (tmavě šedý), PVOH 8-88 (bílý), PVOH 6-98 (světle šedý).....</i> | <i>60</i> |
| <i>Obr. 21: Závislost EAA proti Staphylococcus aureus (plné symboly) a Escherichia coli (prázdné symboly) na obsahu LA v PVOH 80 (A), PVOH8-88 (B) a PVOH 6-98 (C) filmech (čárkovaná křivka znázorňuje regresní křivku dle vzorce 11)</i> | <i>62</i> |
| <i>Obr. 22: Schematické znázornění síťování PVOH matrice glutarovou kyselinou</i> | <i>64</i> |
| <i>Obr. 23: Struktura kyseliny glutarové (GA)</i> | <i>65</i> |
| <i>Obr. 24: Kontaktní úhel θ přisedlé kapky na a) hydrofobním, b) hydrofilním, c) plně smáčeném povrchu [110].....</i> | <i>68</i> |
| <i>Obr. 25: Vliv zesítení na stupeň bobtnání a) PVOH, b) PVOH/10%GA, c) PVOH/25%GA, d) PVOH/40%GA, e) PVOH/60%GA, f) PVOH/100%GA fólií v závislosti na teplotě prostředí - při 25 °C (A), 50 °C (B), 70 °C (C).....</i> | <i>72</i> |
| <i>Obr. 26: Vliv nisinového modifikátoru na stupeň bobtnání fólií a) PVOH, b) PVOH /NIS-PEG, c) PVOH /NIS-(NH₄)₂SO₄, d) PVOH /NIS-tween, e) PVOH /NIS-NaCl. V grafu jsou uvedeny pomocné křivky pro přehlednější znázornění trendu jednotlivých závislostí.</i> | <i>73</i> |
| <i>Obr. 27: Vliv synergie procentuálního zesítení glutarovou kyselinou a různého typu stabilizátoru nisinu na rozpustnost polymerní matrice při 25 °C; a) PVOH_GA, b) PVOH_GA_NIS-PEG, c) PVOH_GA_NIS-(NH₄)₂SO₄, d) PVOH_GA_NIS-tween, e) PVOH_GA_NIS-NaCl</i> | <i>75</i> |
| <i>Obr. 28: SEM analýza PVOH filmů s NIS-PEG (vlevo 0% GA, vpravo 60% GA)</i> | <i>76</i> |
| <i>Obr. 29: SEM analýza PVOH filmů s NIS-(NH₄)₂SO₄ (vlevo 0% GA, vpravo 60% GA).....</i> | <i>77</i> |
| <i>Obr. 30: SEM analýza PVOH filmů s NIS-tween (vlevo 0% GA, vpravo 60% GA).....</i> | <i>77</i> |
| <i>Obr. 31: SEM analýza PVOH filmů s NIS-NaCl (vlevo 0% GA, vpravo 60% GA)</i> | <i>78</i> |
| <i>Obr. 32: FTIR-ATR spektra čistých komponent použitých při výrobě antimikrobiálních PVOH filmů. a) PVOH, b) PEG (M_n 2050), c) (NH₄)₂SO₄, d) Tween 80, e) GA</i> | <i>80</i> |
| <i>Obr. 33: FTIR-ATR spektra a) PVA/0%GA/NIS-PEG, b) PVA/5%GA/NIS-PEG, c) PVA/20%GA/NIS-PEG, d) PVA/60%GA/NIS-PEG</i> | <i>81</i> |
| <i>Obr. 34: FTIR-ATR spektra a) PVOH/0%GA/NIS-(NH₄)₂SO₄, b) PVOH/5%GA/NIS-(NH₄)₂SO₄, c) PVOH/20%GA/NIS-(NH₄)₂SO₄, d) PVOH/60%GA/NIS-(NH₄)₂SO₄</i> | <i>82</i> |
| <i>Obr. 35: FTIR-ATR spektra a) PVOH/0%GA/NIS-tween, b) PVOH/5%GA/NIS-tween, c) PVOH/20%GA/NIS-tween, d) PVOH/60%GA/NIS-tween.....</i> | <i>83</i> |

| | |
|--|-----|
| Obr. 36: FTIR-ATR spektra a) PVOH/0%GA/NIS-NaCl, b) PVOH/5%GA/NIS-NaCl, c) PVOH/20%GA/NIS-NaCl, d) PVOH/60%GA/NIS-NaCl..... | 84 |
| Obr. 37: Termogravimetrické křivky (A) a jejich derivace (B) a) PVOH, b) PVOH/20% GA, c) PVOH/40% GA, d) PVOH/60% GA, e) PVOH/100% GA, f) čistá GA..... | 86 |
| Obr. 38: Porovnání působení různě zesíťovaných PVOH fólií bez obsahu a s obsahem nisinového modifikátoru formy 4 proti <i>E. coli</i> (čárkované sloupce) a <i>S. aureus</i> (šedé sloupce)..... | 90 |
| Obr. 39: Velikost zón inhibice PVOH filmů v závislosti na typu nisinového modifikátoru a stupně zesíťení proti <i>E. coli</i> (čárkované sloupce), <i>S. aureus</i> (šedé sloupce) a <i>L. monocytogenes</i> (bílé sloupce)..... | 91 |
| Obr. 40: Vliv stárnutí antimikrobiálních fólií v závislosti na zvyšujícím se stupni zesíťení proti <i>S. aureus</i> (A) a <i>E. coli</i> (B); stanoveno 1. týden po výrobě (šedé sloupce) a po 3 týdnech (bílé sloupce)..... | 91 |
| Obr. 41: Kumulativní nárůst uvolněného nisinu; a) PVOH, b) PVOH/5% GA, c) PVOH/10% GA, d) PVOH/20% GA, e) PVOH/40% GA, f) PVOH/60% GA, g) PVOH/100% GA | 94 |
| Obr. 42: Přiblížení uvolnění nisinu v prvních pěti hodinách; a) PVOH, b) PVOH/5% GA, c) PVOH/10% GA, d) PVOH/20% GA, e) PVOH/40% GA, f) PVOH/60% GA, g) PVOH/100% GA | 94 |
| Obr. 43: Schematické znázornění výroby sfér | 97 |
| Obr. 44: Histogram sfér PLA/PVOH/0% GA/1,5 mg NIS-NaCl (A), PLA/PVOH/60% GA/1,5 mg NIS-NaCl (B)..... | 100 |
| Obr. 45: Histogram sfér PLA/PVOH/0% GA/3,0 mg NIS-NaCl (A), PLA/PVOH/60% GA/3,0 mg NIS-NaCl (B)..... | 100 |
| Obr. 46: Histogram sfér PLA/PVOH/0% GA/5,0 mg NIS-NaCl (A), PLA/PVOH/60% GA/5,0 mg NIS-NaCl (B)..... | 101 |
| Obr. 47: Obrázek z optického mikroskopu - sféry PLA/PVOH/0% GA/1,5 mg NIS-NaCl (vlevo), PLA/PVOH/60% GA/1,5 mg NIS-NaCl (vpravo)..... | 101 |
| Obr. 48: Obrázek z optického mikroskopu - sféry PLA/PVOH/0% GA/3,0 mg NIS-NaCl (vlevo), PLA/PVOH/60% GA/3,0 mg NIS-NaCl (vpravo)..... | 102 |
| Obr. 49: Obrázek z optického mikroskopu - sféry PLA/PVOH/0% GA/5,0 mg NIS-NaCl (vlevo), PLA/PVOH/60% GA/5,0 mg NIS-NaCl (vpravo)..... | 102 |
| Obr. 50: Histogram sfér PLA/PVOH bez přídavku GA a nisinu..... | 103 |
| Obr. 51: Obrázek z optického mikroskopu – sféry PLA/PVOH bez přídavku GA a nisinu..... | 103 |
| Obr. 52: SEM obrázek PLA/PVOH/0% GA/1,5 mg NIS-NaCl (vlevo) a PLA/PVOH/60% GA/1,5 mg NIS-NaCl (vpravo)..... | 104 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|---|-----|
| Tabulka 1: Výčet základních skupin BAL z rostlinné produkce..... | 11 |
| Tabulka 2: Typické chemické složení sladké a kyselé syrovátky (uvedeno v g/l syrovátky)..... | 12 |
| Tabulka 3: Procentuální zastoupení látek v syrovátce..... | 12 |
| Tabulka 4: Průměrné složení biologicky aktivních látek syrovátky..... | 14 |
| Tabulka 5: Příklady polymerů používaných v potravinářském průmyslu..... | 27 |
| Tabulka 6: Přehled studií zabývajících se inkorporací nisinu a kyseliny mléčné do polymerní matrice | 37 |
| Tabulka 7: Stručný přehled zkoumaných síťovacích činidel..... | 38 |
| Tabulka 8: Specifikace vybraných typů PVOH matic | 44 |
| Tabulka 9: Konstanty vzorce (11) popisující antimikrobiální aktivitu PVOH/LA filmů | 61 |
| Tabulka 10: Charakterizace 4 typů nisinových modifikátorů..... | 65 |
| Tabulka 11: Obsah GA v jednotlivých vzorcích polymerních fólií | 66 |
| Tabulka 12: Gradient chromatografické metody | 71 |
| Tabulka 13: Stupeň bobtnání fólií ve vybraných časech měření ($x \pm SD$)..... | 74 |
| Tabulka 14: Hodnoty oblastí teplot odpovídající ztrátě hmotnosti vzorku | 85 |
| Tabulka 15: Vliv typu nisinového modifikátoru na termogravimetrii PVOH matrice zesíťované na 60 % | 85 |
| Tabulka 16: Hodnoty skelného přechodu (T_g) a teploty tání (T_m)..... | 87 |
| Tabulka 17: Výsledky měření mechanických PVOH filmů v závislosti na stupni zesíťování..... | 88 |
| Tabulka 18: Vliv stupně zesíťování filmů na velikost kontaktního úhlu smáčení.. | 89 |
| Tabulka 19: Výsledky titračního stanovení volné GA ve vzorcích | 89 |
| Tabulka 20: Vliv stárnutí různě zesíťovaných filmů obsahujících nisinový modifikátor formy 4 na jejich antimikrobiální působení | 92 |
| Tabulka 21: Antimikrobiální působení různě zesíťovaných PVOH filmů s různými typy nisinových modifikátorů | 93 |
| Tabulka 22: Přehled navážek jednotlivých komponent mikrosfér (NIS-NaCl je přepočten na čistý nisin) | 98 |
| Tabulka 23: Přehled průměrných velikostí mikrosfér ($x \pm SD$) | 99 |
| Tabulka 24: Hodnoty enkapsulační efektivity nisinu EE [%] ($x \pm SD$)..... | 105 |

SEZNAM ZKRATEK

| | |
|--------------|--|
| α -La | α -laktalbumin |
| β -Lg | β -laktoglobulin |
| BAL | Biologicky aktivní látka |
| CCM | Česká kolekce mikroorganismů |
| CFU | Kolonie tvořící jednotka |
| DS | Stupeň bobtnání |
| DSC | Diferenční snímací kalorimetrie |
| E | Youngův modul pružnosti |
| EAA | Efektivita antibakteriální aktivity |
| EDTA | Etylendiamintetraoctová kyselina |
| EVAc | Etylvinylacetát |
| FAO | Organizace pro výživu a zemědělství |
| FDA | Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (USA) |
| FFDCA | Federální zákon o jídle, léčích a kosmetice |
| FTIR-ATR | Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací se zeslabenou úplnou reflektancí |
| GA | Glutarová kyselina |
| GMP | Glykomakropeptid |
| GRAS | Všeobecně považovaný za bezpečný |
| HD | Stupeň hydrolyzy |
| HPLC | Vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| HPMC | Hydroxypropylmethylcelulóza |
| LA | Kyselina mléčná |
| LDPE | Nízkohustotní polyetylen |
| LD50 | Smrtelná dávka (uhyne 50 % testovaných jedinců za 24 hodin) |
| MZe | Ministerstvo zemědělství ČR |
| NIS | Nisin |
| NMR | Nukleární magnetická rezonance |
| PA | Polyamid |
| PE | Polyetylen |
| PEG | Polyetylenglykol |
| PLA | Polylaktid |
| PP | Polypropylen |
| PVOH | Polyvinylalkohol |
| PTFE | Polytetrafluoretylen |
| PVC | Polyvinylchlorid |
| S | Rozpustnost |
| SEM | Skenovací elektronová mikroskopie |
| TFAA | Trifluoroctová kyselina |
| TGA | Termogravimetrická analýza |
| TG FTIR | Termogravimetrie s FTIR analýzou |

| | |
|------|-----------------------------------|
| TK | Titrační kyselost |
| USA | Spojené státy americké |
| USDA | Americké ministerstvo zemědělství |
| UV | Ultrafialové záření |
| WHO | Světová zdravotnická organizace |
| WPC | Syrovátkový proteinový koncentrát |
| WPI | Syrovátkový proteinový izolát |

CURRICULUM VITAE

OSOBNÍ ÚDAJE

Jméno a příjmení: Martina Hrabalíková
Datum narození: 15. 04. 1987
Místo narození: Uherské Hradiště, Česká republika
Bydliště: Dělnická 1053, 688 01 Uherský Brod
Česká republika
E-mail: hrabalikova@ft.utb.cz
Národnost: česká

VZDĚLÁNÍ

2011–2015 Doktorské studium,
Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Studijní program: Chemie a technologie potravin
2009–2011 Magisterské studium, Ing.
Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Studijní program: Technologie, hygiena a ekonomika
výroby potravin
2006–2009 Bakalářské studium, Bc.
Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Studijní program: Chemie a technologie potravin

JAZYKOVÉ ZNALOSTI

Anglický jazyk Aktivní znalost
Německý jazyk Pasivní znalost

ZAHRANIČNÍ STUDIUM

2012, 2014 (4 měsíce) Slovinsko, Univerzita v Lublani, Biotechnologická fakulta

ODBORNÉ KURZY

2011 Absolvování semináře „Systémy managementu bezpečnosti potravin se zaměřením na požadavky referenčních norem: HACCP (Věstník MZe č. 2/2010), ČSN EN ISO 22000:2006, IFS, BRC“

Absolvování semináře „Systémy managementu se zaměřením na normy: ČSN EN ISO 9001:2009, ČSN EN ISO 22000:2006, ČSN OHSAS 18001:2008“

2013, 2014 Absolvování odborného semináře instrumentace firmy Shimadzu, Praha

2014 Absolvování kurzu hmotnostní spektrometrie, Pragolab, Praha

2015 Absolvování kurzu kapalinové chromatografie, Pragolab, Praha

SPOLUPRÁCE NA PROJEKTECH

Projekty externích poskytovatelů

2013–2015 Projekt Ministerstva zemědělství ČR QJ1310254 – „Výzkum využití syrovátky, jako odpadní látky mlékárenského průmyslu, k produkci antimikrobiálních sloučenin pro modifikace hydrofilních polymerních systémů s využitím v kosmetických a medicínálních aplikacích“ (ve spolupráci s firmami Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o. a MVDr. Jiří Pantůček – TOPVET)

2013–2015 Projekt Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR LE12002 – „Centrum pro podporu mezinárodní spolupráce v oblasti výzkumu a vývoje v technických oborech“

2014–2015 Centrum polymerních systémů – CZ.1.05/2.1.00/03.0111

2014–2015 Projekt Centra kompetence TE02000006 – „Centrum alternativních ekologicky šetrných vysoce účinných antimikrobiálních prostředků pro průmyslové aplikace“ v konsorciu UTB a 7 partnerů (SYNPO akciová společnost, Centrum organické chemie s.r.o., Fatra a.s., Státní zdravotní ústav, Univerzita Palackého v Olomouci – Přírodovědecká fakulta, INOTEX spol. s r.o., Biomedica spol. s r. o.)

Interní grantová agentura UTB

2012 Grant UTB IGA/2012/028
Analýza změn obsahu biologicky a senzorycky aktivních látek v průběhu výroby révového vína

2013 Grant UTB IGA/2013/004
Příprava a charakterizace nových biologicky aktivních polymerních systémů na bázi přírodních látek

Grant UTB IGA/2013/021
Optimalizace metodiky na stanovení senzorycky aktivních látek v ovocných destilátech

2014 Grant UTB IGA/2014/012
Výzkum biologicky rozložitelných a antimikrobiálních polymerních systémů

SEZNAM PUBLIKACÍ

Příspěvky v mezinárodních časopisech s impakt faktorem (J_{imp})

HRABALÍKOVÁ M. (40 %), MERCHAN, M., GANBOLD, S., VALÁŠEK, P., SEDLAŘÍK, V. SÁHA, P. Flexible Polyvinyl alcohol/2-hydroxypropanoic Acid Films: Effect of Residual Acetyl Moieties on Mechanical, Thermal and Antibacterial Properties. *Journal of Polymer Engineering*. ISSN 2191-0340. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/polyeng.ahead-of-print/polyeng-2014-0125/polyeng-2014-0125.xml>.

URBÁNKOVÁ M., **HRABALÍKOVÁ, M. (20 %)**, MISKOLCZI, N., SEDLAŘÍK, V. Antibacterial polymer composites based on low-density polyethylene and essential oils immobilized on various carriers. Odesláno k recenznímu řízení do časopisu *Journal of Applied Polymer Science*, 2015.

Příspěvky v recenzovaných časopisech (J_{rec})

HRABALÍKOVÁ, M. (50 %), VALÁŠEK, P., URBÁNKOVÁ, M., SEDLAŘÍK, V. Antibacterial modifications of plastics with natural bioactive compounds, *Plasty a kaučuk*, 2012, Zlín, Česká republika, ISSN 0322-7340.

Příspěvky ve sbornících z konferencí (D, O)

HRABALÍKOVÁ M. (100 %) Stanovení senzory významných látek destilátů plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí. *Chemické listy (abstrakt)*, 2014, Česká republika, ISSN 0009-2770.

HRABALÍKOVÁ, M. (50 %), VALÁŠEK, P., SEDLAŘÍK, V. Příprava a charakterizace kapslí na bázi polyvinylalkoholu síťovaného karboxylovými skupinami kyseliny mléčné. *Plastko*, Zlín, 2014, Česká republika. ISBN 978-80-7454-675-7.

HRABALÍKOVÁ, M. (50 %), SEDLAŘÍK, V. Síťování polyvinylalkoholu kyselinou maleinovou. *Plastko*, Zlín, 2014, Česká republika. ISBN 978-80-7454-335-7.

HRABALÍKOVÁ, M. (50 %), VESELÁ, D., SEDLAŘÍK, V. Vliv fermentačních produktů syrovátky na stabilitu hydrogelu na bázi karboxymethylcelulózy. *Plastko*, Zlín, 2014, Česká republika. ISBN 978-80-7454-335-7.

KOLÁŘOVÁ RAŠKOVÁ Z., HOLČAPKOVÁ P., VESELÁ D., **HRABALÍKOVÁ M. (10 %)**, SEDLAŘÍK V. Stabilitní studie hydrogelů s obsahem syrovátkových bílkovin. Plastko, Zlín, 2014, Česká republika. ISBN 978-80-7454-335-7.

URBÁNKOVÁ M., **HRABALÍKOVÁ M. (10 %)**, POLJANŠEK I., SEDLAŘÍK V. Imobilizace biologicky aktivních látek esenciálních olejů na inertních nosičích pro antimikrobiální modifikaci polymerů. Plastko, Zlín, 2014, Česká republika. ISBN 978-80-7454-335-7.

HRABALÍKOVÁ, M. (20 %), VESELÁ, D., KOLÁŘOVÁ RAŠKOVÁ, Z., SÁHA, T., VALÁŠEK, P., DRBOHLAV, J., SEDLAŘÍK, V. Využití fermentačních produktů syrovátky jako modifikátoru hydrofilních polymerních matic pro kosmetické aplikace. Mezinárodní kosmetologická konference, 2013, Luhačovice, Česká republika, ISSN 978-80-904679-7-2.

KOLÁŘOVÁ RAŠKOVÁ, Z., VESELÁ, D., **HRABALÍKOVÁ, M. (10 %)**, SEDLAŘÍK, V., ŠALAKOVÁ, A., SÁHA, T. Stabilitní studie hydrogelů s obsahem syrovátkových proteinů využitelných v dermatologické praxi. Mezinárodní kosmetologická konference, 2013, Luhačovice, Česká republika, ISSN 978-80-904679-7-2.

HRABALÍKOVÁ, M. (50 %), VALÁŠEK, P., URBÁNKOVÁ, M., SEDLAŘÍK, V. Antimicrobial modifications of polyethylene with terpenoids, Studentská vědecká konference Fakulty technologické, 2012, Zlín, Česká republika.

Funkční vzorky (G)

SEDLAŘÍK, V., **HRABALÍKOVÁ, M. (50 %)** Polymerní hydrogelová kompozice pro ochranu vemen s kyselinou mléčnou VEMLACT, funkční vzorek č. 12/2014 (Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně), 2014.

SEDLAŘÍK, V., **HRABALÍKOVÁ, M. (50 %)** Polymerní hydrogelová kompozice pro ochranu vemen s nisinem VEMNIS, funkční vzorek č. 11/2014 (Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně), 2014.

Užitný vzor (F)

SEDLAŘÍK, V., **HRABALÍKOVÁ, M. (30 %)**, VALÁŠEK, P., SÁHA, P. Kompozice ochranného prostředku s antimikrobiálními a bariérovými vlastnostmi, užitný vzor č. 27109 (Úřad průmyslového vlastnictví ČR), datum přijetí: 23 června 2014.