

Imobilizace biologicky aktivního proteinu v matrici biorozložitelného polymeru pro zdravotnické a kosmetické aplikace

Bc. Kateřina Vojtášková

Diplomová práce
2016



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky
akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Vojtášková**
Osobní číslo: **T14811**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Imobilizace biologicky aktivního proteinu v matrici
biorozložitelného polymeru pro kosmetické a zdravotnické
aplikace**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Vypracujte literární rešerši k problematice biorozložitelných polymerů a jejich využití v kosmetických a zdravotnických aplikacích.
2. Zaměřte se na biorozložitelné polyestery na bázi polymeru kyseliny mléčné (PLA) a jeho kopolymerů.
3. V rámci teoretické části také zohledněte dosavadní stav poznání v oblasti imobilizací biologicky aktivních proteinů v matricích biorozložitelných polymerů se zaměřením na nisin.

II. Praktická část

1. Připravte a charakterizujte polymerní směsi ve formě filmů na bázi PLA a nisinu stabilizovaném v polyetylglykolu (PEG) o různých molekulových hmotnostech (MW).
2. Vyhodnoťte vliv měnící se MW použitých PEG stabilizujících nisin na vlastnosti PLA/PEG směsí.
3. Experimentálně ověřte vliv složení PLA/PEG+nisin systémů na mechanické, tepelné a antimikrobiální vlastnosti připravených filmů.
4. Získané poznatky přehledně zpracujte a diskutujte s dostupnými literárními zdroji.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

[1] BASTIOLI, Catia. Handbook of biodegradable polymers. Second edition. 1 online zdroj (734 pages). ISBN 9781847355287.

[2] ISIN, Lee Tin, A RAHMAT a W RAHMAN. Polylactic acid: PLA biopolymer technology and applications. Oxford: William Andrew, 2012, 1 online zdroj. ISBN 9781437744590.

[3] GODDARD, E a James V GRUBER. Principles of polymer science and technology in cosmetics and personal care. New York: Marcel Dekker, c1999, xi, 671 p. ISBN 9780203907948.

[4] Časopisecké a knižní zdroje dostupné prostřednictvím knihovny UTB ve Zlíně.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Vladimír Sedlařík, Ph.D.

Centrum polymerních materiálů

Datum zadání diplomové práce:

20. ledna 2016

Termín odevzdání diplomové práce:

18. května 2016

Ve Zlíně dne 20. ledna 2016



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



Ing. Martina Černeková, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: VOJTÁŠLOVÁ KATEŘINA

Obor: TTKD

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně ...15. 5. 2016

Vojtěšlová

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

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

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

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

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

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

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

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

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

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

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá přípravou a charakterizací binárních polymerních filmů na bázi polylaktidu a polyethylenglykolu sloužících pro imobilizaci bakteriocinu nisinu s potenciálním využitím v oblasti antibakteriálního balení potravin či ve zdravotnictví. Byly připraveny polymerní filmy s polyethylenglykolem o molekulových hmotnostech 400–6000 g.mol⁻¹ a koncentracích 0–20 hm. %, u kterých byly hodnoceny strukturní, mechanické a tepelné vlastnosti a chování ve vodném prostředí. U filmů s imobilizovaným bakteriocinem nisinem byla studována antibakteriální aktivita dle normy ISO 22196 a kinetika uvolňování.

Klíčová slova: polylaktid, polyethylenglykol, polymerní směs, imobilizace, bioaktivní látka, nisin

ABSTRACT

This diploma work deals with preparation and characterization of binary polymer films based on polylactide/polyethylene glycol developed for immobilization of a bacteriocin nisin with potential applicability in antimicrobial food packaging or medicine. There were prepared polymer films with a polyethylene glycol having molecular weights 400–6000 g.mol⁻¹ and the concentration of 0–20 wt. %. The blends were characterized on the structural, mechanical and thermal properties and behavior in an aqueous environment. Antibacterial activity of these films immobilized bacteriocins nisin was evaluated according to ISO 22196 and release kinetics.

Keywords: polylactide, polyethylene glycol, polymer blend, immobilization, bioactive compound, nisin

Děkuji vedoucímu své diplomové práce doc. Ing. Vladimíru Sedlaříkovi, Ph.D., za odborné vedení, doporučení a ochotný přístup při poskytování informací a rad, při vypracování závěrečné práce. Stejně tak děkuji i Ing. Pavlíně Holčapkové za pomoc v laboratoři a cenné připomínky.

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

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 BIOLOGICKY ROZLOŽITELNÉ POLYMERY	11
1.1 PŘÍRODNÍ BIOROZLOŽITELNÉ POLYMERY	11
1.2 SYNTETICKÉ BIOROZLOŽITELNÉ POLYMERY	17
1.3 POLYMER KYSELINY MLÉČNÉ (PLA).....	18
1.4 OSTATNÍ BIOROZLOŽITELNÉ POLYESTERY	21
1.5 PROCES BIODEGRADACE.....	24
1.6 VYUŽITÍ BIOROZLOŽITELNÝCH POLYMERŮ VE ZDRAVOTNICTVÍ A KOSMETICE	27
2 ANTIMIKROBIÁLNÍ MODIFIKACE POLYMERŮ	29
2.1 ZPŮSOBY ANTIBAKTERIÁLNÍ MODIFIKACE POLYMERŮ	29
2.2 DIFÚZNÍ PROCESY ANTIMIKROBIÁLNÍCH ČINIDEL V POLYMERNÍ MATRICI	31
2.3 ANTIMIKROBIÁLNÍ ČINIDLA.....	32
3 BAKTERIOCINY	36
3.1 ROZDĚLENÍ BAKTERIOCINŮ	36
3.2 NISIN.....	37
4 VYUŽITÍ NISINU PRO MODIFIKACI POLYMERNÍCH MATRIC	39
5 CÍLE PRÁCE	41
II PRAKTICKÁ ČÁST	42
6 MATERIÁLY A METODY	43
6.1 MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE	43
6.2 POUŽITÉ METODY	43
7 VÝSLEDKY A DISKUZE	56
7.1 MORFOLOGIE ZKOUMANÝCH SYSTÉMŮ	56
7.2 FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÁ ANALÝZA	57
7.3 PŮSOBENÍ VODNÉHO PROSTŘEDÍ	59
7.4 MECHANICKÉ VLASTNOSTI.....	60
7.5 TEPelné VLASTNOSTI	61
7.6 MIKROBIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ.....	64
7.7 KINETIKA UVOLŇOVÁNÍ NISINU.....	68
8 ZÁVĚR	70
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	71
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	81
SEZNAM OBRÁZKŮ	83
SEZNAM TABULEK	85

ÚVOD

Polymery jsou v dnešní době každodenní součástí života. Staly se náhradou za dříve hojně využívané materiály jako jsou dřevo, sklo či keramika. Díky svým vlastnostem, mezi které patří např. pevnost, tvarovatelnost za tepla a odolnost proti korozi a různým druhům chemikálií, jsou stále více využívány v mnoha průmyslových odvětvích. Výroba polymerních zdravotnických prostředků patří mezi významné oblasti jejich aplikace.

Avšak využití polymerů ve zdravotnictví s sebou přináší problém jejich nízké rezistence vůči bakteriálnímu osídlování. To může mít za následek vznik negativních efektů ve formě nozokomiálních infekcí, které s sebou mimo zdravotních komplikací pacientů přinášejí i nemalé ekonomické náklady.

Řešením tohoto problému je antibakteriální modifikace polymerů pomocí chemických látek tzv. antibakteriálních činidel, které jsou převážně na bázi synteticky připravených sloučenin.

V současné době se také často diskutuje o nahrazení synteticky vyrobených látek přírodními, které jsou šetrné jak k životnímu prostředí, tak i z hlediska ekonomického. Mezi přírodní látky, které by mohly být využívány pro antimikrobiální modifikace polymerů, patří bakteriociny. Tyto přírodní bioaktivní látky patří mezi antimikrobiální peptidy produkované bakteriemi, s různou úrovní a spektrem účinnosti. Mezi nejznámější, nejvíce studovaný a v potravinářství nejvíce používaný bakteriocin patří nisin. Nisin je produkován bakteriemi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a kromě toho, že je využíván jako konzervant v potravinářství, je perspektivní pro uplatnění i v dalších oblastech.

Cílem této práce je příprava binárního polymerního systému na bázi polylaktidu (PLA) a vodorozpustného polymeru polyethylenglykolu (PEG), za účelem modifikace polymerní matrice, vytvoření vhodného prostředí pro imobilizaci bakteriocinu – nisinu a sledování stability a kinetiky uvolňování do vodného prostředí. PLA/PEG/nisin systémy mají potenciální uplatnění v oblasti bioresorbovatelných zdravotnických prostředků.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOLOGICKY ROZLOŽITELNÉ POLYMERY

Jako biodegradovatelný nebo také biorozložitelný polymer je označována makromolekulární látka, kterou je možné chemicky rozložit působením mikroorganismů (bakterie, plísně, houby a řasy). Výslednými produkty procesu degradace jsou oxid uhličitý, voda a zbytková biomasa [1].

Biologicky rozložitelné polymery tvoří velmi rozsáhlou skupinu materiálů, kterou je možné rozdělovat podle různých hledisek. Jedno z hlavních dělení biorozložitelných polymerů je podle jejich původu na přírodní a syntetické. Mezi přírodní biologicky rozložitelné polymery jsou řazeny polysacharidy, proteiny a mikrobiální polyestery. Syntetické biologicky rozložitelné polymery lze podle jejich struktury rozdělit na polyestery, polyuretany, polyamidy a polymery s hlavním uhlíkovým řetězcem. Dále je možné specifikovat, zda-li se jedná o syntetické biologicky rozložitelné polymery na bázi obnovitelných či neobnovitelných surovinových zdrojů [1], [2].

1.1 Přírodní biorozložitelné polymery

Biopolymery jsou sloučeniny makromolekulárního charakteru, které se nachází v látkách vyskytující se v přírodě v živých organismech, kde vytvářejí uspořádanou nadmolekulární strukturu, společně tvoří stavební materiál buněk, řídí a uskutečňují veškeré buněčné děje a degradace těchto biopolymerů souvisí s přirozeným rozkladem hmoty v životním prostředí. Od většiny syntetických polymerů se odlišují chemickou stavbou základního polymerního řetězce, ve kterém se vždy vyskytují atomy kyslíku nebo dusíku, což je mimo jiné i důvodem jejich biorozložitelnosti [2].

Vznik biopolymerů probíhá procesem nazývaným polykondenzace. Při kondenzaci dochází ke spojování stavebních jednotek (monomerů), vznikají charakteristické kovalentní vazby a současně také dochází k odštěpení nízkomolekulárních látek – převážně molekul vody. Pokud dochází k procesu opačnému tedy degradaci, hovoříme o tzv. hydrolytickém štěpení, pro které je důležitá přítomnost vody a také specifického enzymu.

Podle chemického složení jsou do skupiny biopolymerů řazeny polysacharidy, proteiny a mikrobiální polyestery [2].

a) Polysacharidy

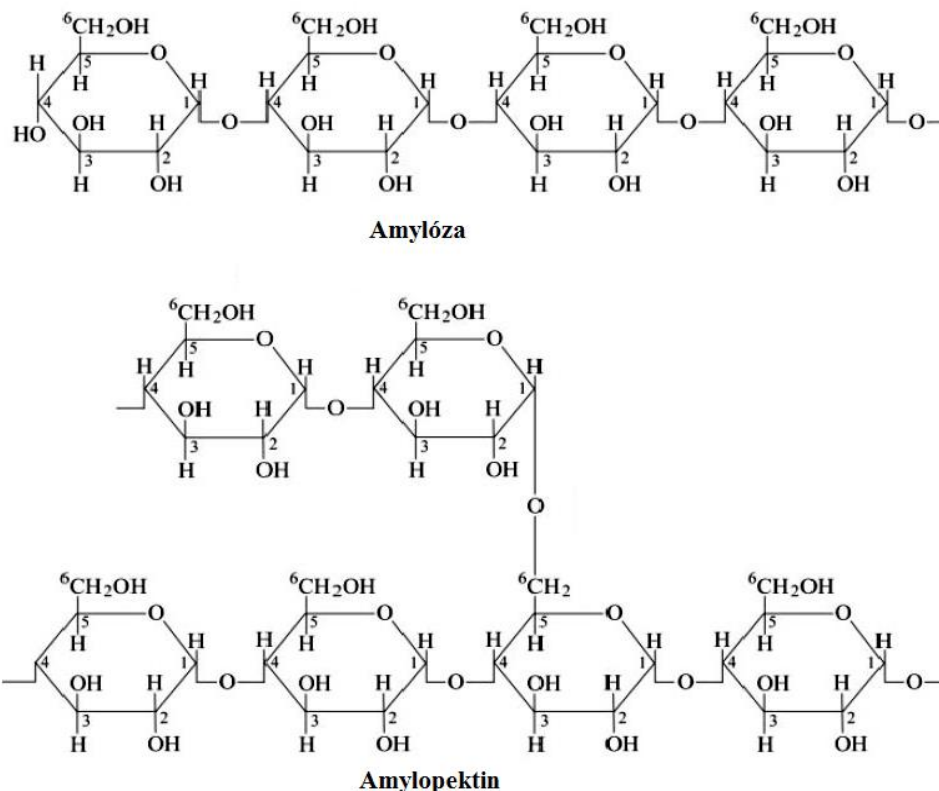
Polysacharidy jsou významnou skupinou makromolekulárních sloučenin, které se vyskytují v přírodě. Vznikají spojováním monosacharidových jednotek pomocí různých typů glykosidických vazeb do lineárních, nebo větvených polysacharidových řetězců. Podle jejich biologické funkce lze polysacharidy rozdělit na látky zásobní – škrob, glykogen, inulin a strukturní – celulóza, chitin, proteoglykany [2], [3].

Škrob

Makromolekulární látka složená z molekul glukózy. Patří mezi větvené polysacharidy a slouží jako zásobní látka v rostlinách. Vyskytuje se hlavně v semenech a hlízách ve formě škrobových zrn různé velikosti. Škrob se skládá ze dvou různých řetězců – amylóza a amylopektin (Obr. 1). Tyto řetězce se odlišují svou strukturou, vlastnostmi a jejich vzájemný poměr je závislý na druhu rostliny.

Amylóza je tvořena z nerozvětvených lineárních řetězců, které obsahují několik stovek molekul glukózy spojené vazbou $\alpha(1,4)$. S jodem vytváří modrý komplex a v horké vodě je rozpustnější a méně viskózní než amylopektin.

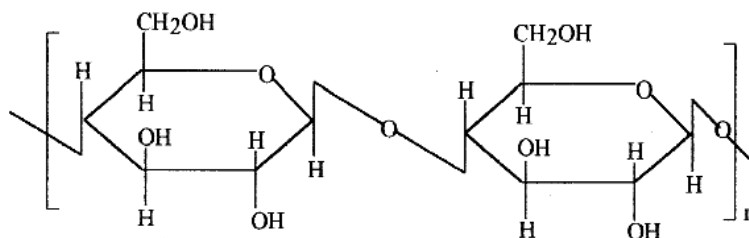
Amylopektin je také složen z glukózových jednotek spojených vazbou $\alpha(1,4)$, ale na rozdíl od amylózy má amylopektin řetězce bohatě větvené pomocí glykosidických vazeb $\alpha(1,6)$. Touto větvenou strukturou se velmi podobá živočišnému zásobnímu polysacharidu glykogen. Při reakci s jodem se barví modrofialově [3].



Obr. 1 Strukturní vzorec amylozy a amylopektinu [3]

Celulóza

Celulóza (Obr. 2) patří do skupiny strukturálních polysacharidů. Její složení se podobá zásobním polysacharidům, ale malou změnou ve struktuře dojde k velkému ovlivnění výsledných vlastností sloučeniny. Celulóza patří mezi nejrozšířenější přírodní polymery na Zemi a je základní stavební složkou stromů a rostlin. Jednou z vlastností je schopnost tvorby vláknité struktury, která se využívá při výrobě bavlny. Glukózové jednotky v polymerním řetězci celulózy jsou spojeny $\beta(1,4)$ glykosidickými vazbami, což zapříčiňuje zásadní rozdíly ve fyzikálních vlastnostech oproti zásobním polysacharidům [3], [4].



Obr. 2 Strukturní vzorec celulózy [3]

Velký význam pro textilní a plastikářský průmysl mají deriváty celulózy.

Acetylcelulóza je technicky nejvýznamnější derivát celulózy v oblasti plastikářského průmyslu. Vzniká esterifikací celulózy acetanhydridem za přítomnosti kyseliny sírové. Tato skupina je využívána na výrobu vláken, plastů, filmů, laminovacích fólií a nátěrů.

Ethylcelulóza je derivát celulózy, který se získává reakcí celulózy s hydroxidem sodným a ethylchloridem. Využívá se v plastikářském průmyslu při výrobě tenkých filmů a v potravinářství a kosmetice jako emulgátor E 462.

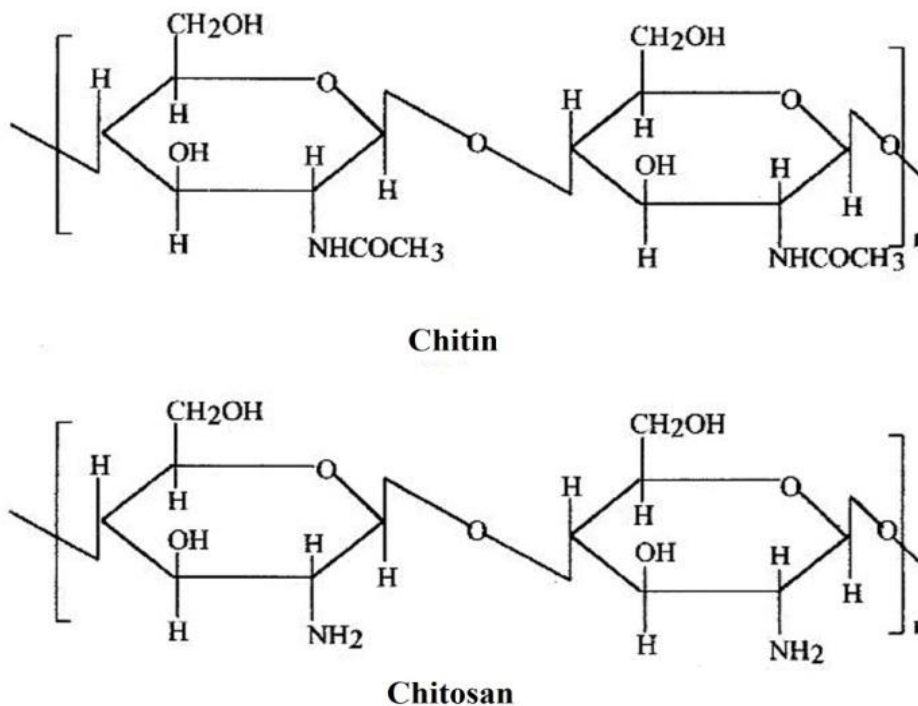
Karboxymethylcelulóza vzniká zásaditě katalyzovanou reakcí celulózy s kyselinou chloroctovou. Významné je využití v potravinářském průmyslu, kde se používá ke změně viskozity, k zahušťování a ke stabilizaci emulzí. Jako přídatná látka v potravinách bývá označována kódem E 466 [4, s. 110].

Chitin

Tento strukturní polysacharid (Obr. 3) tvoří stavební materiál hub, hmyzu a korýšů. Má vláknitou strukturu a jeho řetězec je složen z jednotek N-acetyl-D-glukosaminu pospojovaných $\beta(1,4)$ glykosidickou vazbou. Od struktury celulózy se chitin odlišuje pouze nahrazením hydroxylové skupiny za acetamidovou [2], [3].

Chitosan

Chitosan (Obr. 3) je látka získaná chemickou reakcí – deacetylací chitinu. Tato látka má významnou antibakteriální vlastnost, je schopná na sebe vázat těžké kovy a v lékařství je využívána pro svou schopnost zastavovat krvácení a omezovat srážlivost krve. Další možností využití je v kosmetickém průmyslu, a to díky svým hydratačním schopnostem. V potravinářství se využívá pro výrobu tenkých fólií se schopností propouštět vzduch [3], [5].



Obr. 3 Strukturní vzorec chitinu a chitosanu [3]

b) Proteiny

Proteiny jsou makromolekulární dusíkaté biopolymery skládající se z aminokyselin, které jsou spojeny peptidovou vazbou. Molekulová hmotnost vzniklých proteinů se pohybuje v rozmezí 10^3 – 10^6 g.mol⁻¹. V živém organismu proteiny plní spoustu rozmanitých funkcí. Mohou to být např. funkce katalytické (enzymy), regulační (hormony), obranné (protilátky), zajišťující pohyb (svalové bílkoviny), transportní (hemoglobin, chlorofyl) či podpůrné (skleroproteiny) [4, s. 21], [5, s. 39].

Podle uspořádání proteinového řetězce jsou rozlišovány jednotlivé struktury bílkovin – primární, sekundární, terciární a kvartérní.

Primární struktura proteinů je dána sekvencí jednotlivých aminokyselin v peptidovém řetězci.

Sekundární struktura zahrnuje vzájemné prostorové uspořádání aminokyselin v peptidovém řetězci stabilizovaném vodíkovými můstky. Prvním typem sekundárních struktur jsou šroubovicové struktury neboli helixy. Druhým typem sekundární struktury je β -struktura (β -hřeben).

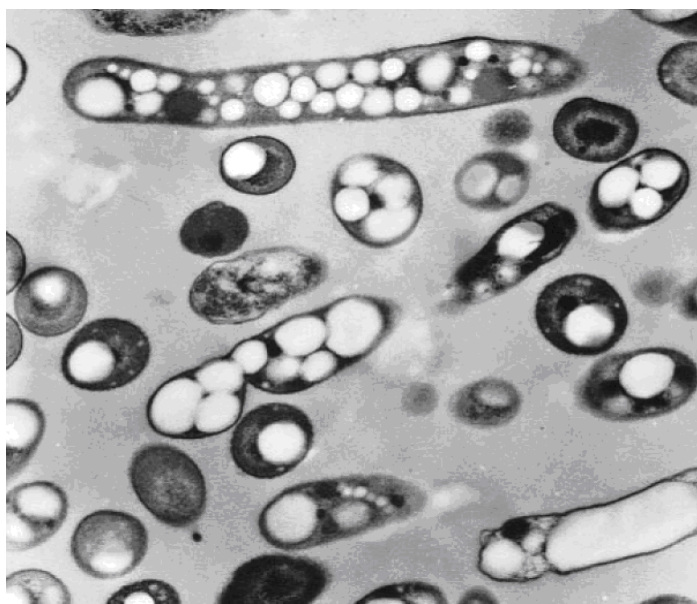
Terciární struktura polypeptidového řetězce je dána jeho celkovým tvarem, který je výsledkem interakcí mezi jednotlivými úseky o odlišné sekundární struktuře. Terciární

struktura je pro každou bílkovinu unikátní a podle terciární struktury jsou bílkoviny rozděleny na fibrilární (vláknité) a globulární (klubkovité).

Kvartérní struktura vzniká spojením několika polypeptidických řetězců za vzniku vyššího molekulárního celku. Taková struktura vzniká u enzymů, hemoproteinů, pojivových bílkovin a virů. Typickým zástupcem heterogenní kvartérní struktury je hemoglobin [2], [4, s. 37–49], [5, s. 38].

c) Mikrobiální estery

Jsou vysokomolekulární látky, které mohou být za určitých okolností produkovány mikroorganismy, jako jsou např. *Alcaligenes eutrophus* a *Rhodobacter shaeroides*. Jedná se o vytváření zásobních látek podobných škrobu nebo glykogenu (Obr. 4). Tyto látky se ukládají ve formě granulí, a pokud daná bakterie nemá dostatek jiného zdroje obživy, tak je spotřebuje. Vlastnosti těchto mikrobiálních polyesterů jsou srovnatelné s vlastnostmi syntetických polymerů. Nejznámějším zástupcem této skupiny jsou polyhydroxyalkanoáty (PHA) [1].



Obr. 4 PHA ve formě granulí uvnitř buněk [6]

1.2 Syntetické biorozložitelné polymery

Tato skupina biologicky rozložitelných polymerů je uměle vyrobená člověkem a příčinou, proč se lidé snaží o výrobu a aplikaci takových materiálů, je ochrana životního prostředí v souvislosti s obrovským množstvím produkovaného plastového odpadu, a dále také vývoj nových materiálů, které umožní rozvoj technologií v medicíně, farmacii a biotechnologii. Mezi synteticky biorozložitelné polymery je možné zařadit některé zástupce ze skupiny polyesterů, polyuretanů, polyamidů, popřípadě polymerů s hlavním uhlíkovým řetězcem [1].

a) Polyuretany

Polyuretany jsou polymery, které se vyrábějí polyadiční reakcí vícefunkčních isokyanátů s vícefunkčními alkoholy – polyoly. Funkčnost alkoholů následně ovlivňuje výsledný produkt, zda bude mít lineární nebo zesítenou strukturu. Polyuretany se používají jako pěny, elastomery, vlákna, či jako adheziva a nátěry. Dále mohou být polyuretany použity i jako biomateriál pro medicínské aplikace např. jako cévy či katetry [1].

b) Polyamidy

Polyamidy jsou polymery, jejichž strukturní jednotky jsou spojeny vazbami NH-CO. Mezi nejznámější zástupce této skupiny jsou řazeny polyamid 6 či 66. Jednou z vlastností polyamidů je zvýšená afinita k vodě ve srovnání např. s polyolefiny [2].

c) Polymery s uhlíkatým řetězcem

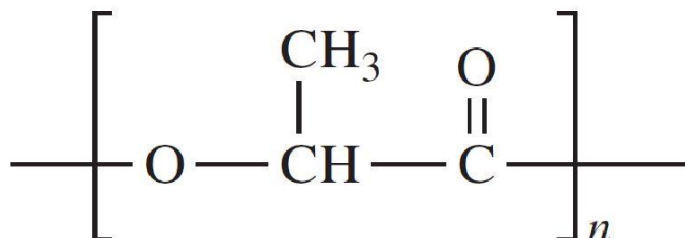
Do skupiny polymerů s uhlíkatým řetězcem jsou zařazovány polymery, jejichž páteřní řetězec je tvořen výhradně uhlíkem a jejich biologická rozložitelnost je zprostředkována bočními substituenty. Mezi zástupce polymerů s hlavním uhlíkovým řetězcem jsou řazeny polyvinylalkohol (PVA) a polyvinylacetáty (PVAC), které jsou známy svou biorozložitelností [1].

d) Polyestery

Tato skupina polymerů se řadí mezi nejperspektivnější syntetické biorozložitelné polymery. Mezi zástupce této skupiny biorozložitelných polymerů jsou řazeny polymer kyseliny mléčné (PLA), polymer kyseliny glykolové (PGA), polykaprolakton (PCL) a polybutylen sukcinát (PBS). Z důvodu rozšířeného využití budou jednotlivé polyestery podrobněji charakterizovány [2].

1.3 Polymer kyseliny mléčné (PLA)

V současnosti je polymer kyseliny mléčné (Obr. 5), neboli polylaktid, považován za jeden z nejvýznamnějších biologicky rozložitelných polymerů. Podle chemické struktury je řazen mezi alifatické polyestery [1].



Obr. 5 Chemická struktura PLA [3]

Vlastnosti

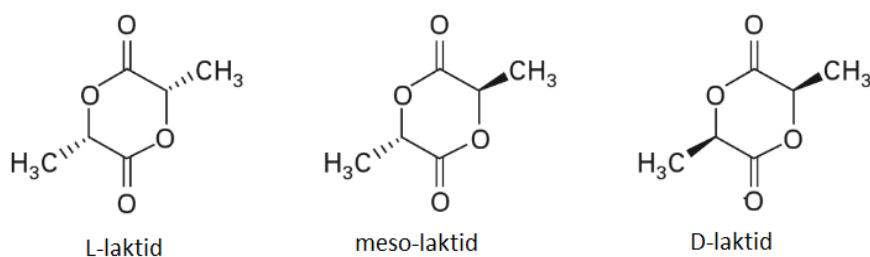
Při pokojové teplotě je PLA tuhá, transparentní, semikrystalická látka, která má teplotu skelného přechodu kolem cca 55–65 °C, teplota tání se pohybuje kolem cca 160–170 °C a pevnost v tahu kolem 32 MPa. Specifická hustota PLA má hodnotu cca 1,25 g.cm⁻³. Ve srovnání s ostatními polymery, u kterých se hodnota specifické hustoty pohybuje v rozmezí od 0,8 do 1,1 g.cm⁻³, je nepatrně vyšší [7], [8], [9].

PLA je odolný vůči rozpouštědlům cyklohexan, ethanol nebo methanol. Naopak se dobře rozpouští v chloroformu, dichlormethanu a benzenu. Ve vodě je PLA stejně jako většina vysokomolekulárních látek nerozpustný, ale při kontaktu s vodou dochází k hydrolyze za vzniku oligomerů a monomerů kyseliny mléčné, které již ve vodě rozpustné jsou [8], [10], [11].

Mezi nejvýznamnější vlastnosti PLA patří jeho biokompatibilita a biodegradabilita. Biokompatibilita je charakterizována jako snášenlivost a vstřebatelnost v organismu. Biodegradabilita je schopnost rozkládat se v prostředí bohatém na vlhkost a mikroorganismy za vzniku látek jako jsou oxid uhličitý, voda a biomasa. Další významnou vlastností PLA je možnost výroby z obnovitelných zdrojů a možnost využití stávajícího výrobního zařízení [1], [11].

Výroba

Polylaktid je možné vyrobit dvěma způsoby – přímou polykondenzací kyseliny mléčné (LA) nebo otevíráním laktidového kruhu s následnou polymerací. Takový druh polymerace je označován jako Ring-Opening Polymerization (ROP). Výchozí surovinou pro výrobu polylaktidu je kyselina mléčná neboli 2-hydroxy propanová, která je opticky aktivní, a tak i polymery z ní připravené se mohou vyskytovat ve více formách (Obr. 6). Při výrobě vzniká L-PLA syntetizovaný z L-kyseliny mléčné nebo z L-laktidu, D-PLA syntetizovaný z D-kyseliny mléčné nebo z D-laktidu a DL-PLA syntetizovaný z DL-kyseliny mléčné nebo z meso-laktidu [7], [8], [11].



Obr. 6 Stereoisomery laktidu [7]

a) Přímá polykondenzace

Přímá polykondenzace LA je finančně méně nákladná než ROP, ale její velkou nevýhodou je zisk PLA o nedostatečně vysoké molekulové hmotnosti. Příčinou je především problematické odstranění vody, která vzniká jako vedlejší produkt polykondenzace. Metodou přímé kondenzace je možné vyrobit PLA o vyhovující molekulové hmotnosti, ale při výrobě je nutné dodržet vysoké teploty kolem 180–200 °C, nízký tlak, reakce musí probíhat dlouhou dobu za použití vhodného katalyzátoru a azeotropického rozpouštědla, které usnadní destilaci vznikající vody [11].

Další nevýhodou přímé polykondenzace je, že dlouhá doba polymerace a působení vysokých teplot způsobí snížení optické čistoty polymeru i v případě použití vysoce čistých monomerů. Dalším velkým problémem je odstraňování rozpouštědla a jeho recyklace [7], [10], [11].

b) Ring-Opening Polymerization (ROP)

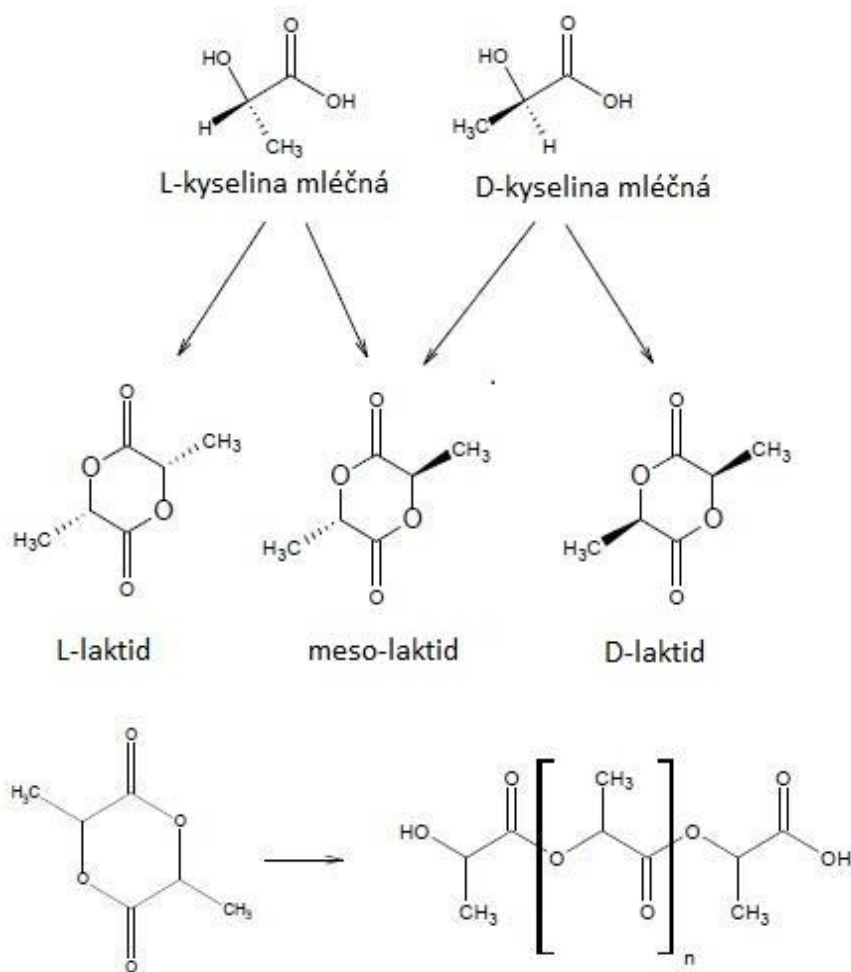
ROP (Obr. 7) vychází z monomeru laktidu, dochází k otvírání laktidového cyklu a následně k polymeraci. Celý postup přípravy PLA je složen ze dvou kroků. Nejprve probíhá příprava laktidu a poté následuje polymerace [11].

Příprava laktidu

V první fázi je vodný roztok kyseliny mléčné převáděn přímou polykondenzací na nízkomolekulární PLA bez použití rozpouštědla při teplotě nižší než 180 °C. Takto připravený prepolymer je vystaven zvýšené teplotě cca 200–300 °C, sníženému tlaku a je přidáván katalyzátor na bázi sloučenin zinku, hliníku, zirkonia a titanu. Vzniká laktid, který se stejně jako kyselina mléčná vyskytuje ve třech enantiomerech. To jaký enantiomer bude ve vzniklé směsi převládat, se odvíjí od formy prepolymeru, teplotě, době polykondenzace a hlavně na použitém katalyzátoru. Žádaným a také častěji získávaným je L-laktid. Vzniklý laktid je nutné očistit od zbytků kyseliny, oligomerů a dalších nečistot pomocí vakuové destilace. Ve druhém kroku dochází k polymerizaci za vzniku vysokomolekulárního PLA [11], [12], [13].

Polymerace

V druhé fázi dochází k samotné polymeraci laktidu, a to nejčastěji v tavenině. Dalšími způsoby mohou být polymerace v roztoku, v suspenzi nebo v emulzi. Reakce probíhá různými mechanismy, např. kationtový, aniontový, nebo koordinační. Mezi reakční podmínky jsou řazeny nízká koncentrace iniciátoru, teplota nižší než 180 °C, doba reakce 2–5 hodin a přítomnost katalyzátoru. Jako iniciátor jsou používány látky s hydroxy skupinou (alkoholy), které slouží pro kontrolu molekulové hmotnosti a zrychlení reakce. Teplota, při které k polymeraci dochází, závisí na tom, zda se jedná o polymeraci L-laktidu (105–108 °C) nebo DL-laktidu (135–155 °C). Pro ROP laktidu se používají jako katalyzátor komplexy hliníku, zinku, cínu nebo sodík, lithium a draslík. Pro svou vysokou katalytickou aktivitu a nízkou racemizaci při reakci je nejpoužívanějším katalyzátorem stannum-[bis(2-ethylhexanoát)] [10], [11], [14], [15].



Obr. 7 Syntéza PLA pomocí ROP [15]

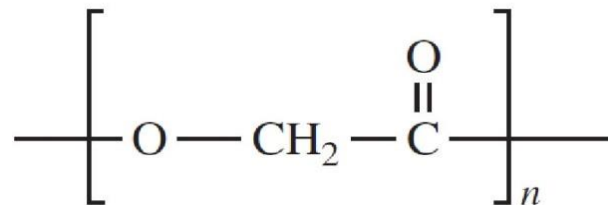
1.4 Ostatní biorozložitelné polyestery

Polyglykolová kyselina (PGA)

Polyglykolová kyselina (Obr. 8) je řazena také do skupiny alifatických polyesterů, strukturně se podobá PLA a vyrábí se obdobným způsobem přes ROP glykolidu. Další jejich společnou vlastností je to, že mohou být vyrobeny jak z monomerů, které se vyskytují v přírodě, tak i z minerálních zdrojů a obě tyto kyseliny spolu vytvářejí kopolymery.

PGA je termoplastický materiál, oproti PLA má větší krystalinitu v rozmezí 45–75 %, teplota skelného přechodu je cca 36 °C a teplota tání se pohybuje kolem 225 °C. PGA se ve většině organických rozpouštědel nerozpouští, ale je velmi náchylná k působení vody.

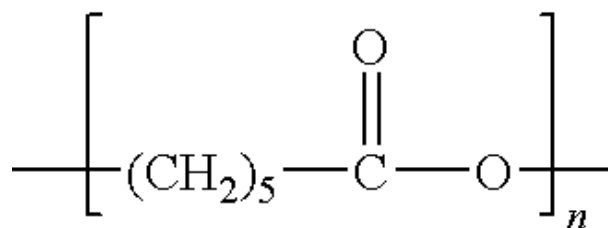
Biodegradace probíhá mnohem rychleji než u PLA. Při degradaci vzniká glykolová kyselina, což je přírodní produkt, a proto je o tento biodegradovatelný materiál velký zájem. Využití PGA je obdobné jako u PLA, a to zejména v lékařství pro výrobu speciálních implantátů, chirurgických pomůcek a pro řízené uvolňování léčiv [1], [10].



Obr. 8 Chemická struktura PGA [3]

Polykaprolakton (PCL)

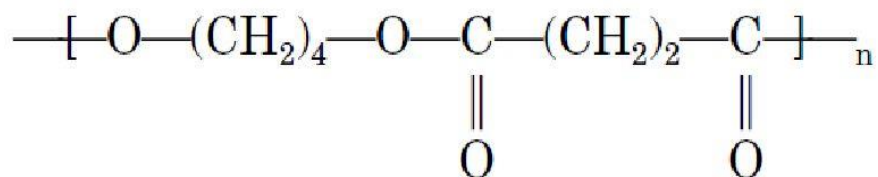
Je biodegradovatelný termoplastický polymer (Obr. 9), který se připravuje polymerací ϵ -kaprolaktonu za použití katalyzátorů. PCL je semikrystalický materiál s teplotou skelného přechodu kolem -60 °C a teplotou tání 60 °C. Vůči vodě, olejům a rozpouštědlům je odolný. Má dobré mechanické vlastnosti, ale ve srovnání s PGA a PLA u něj probíhá degradace o něco pomaleji. Často je využíván v lékařství kopolymer s PLA a PGA jako nosný materiál při tvorbě systémů pro dlouhodobé uvolňování léčiv [2].



Obr. 9 Chemická struktura PCL [3]

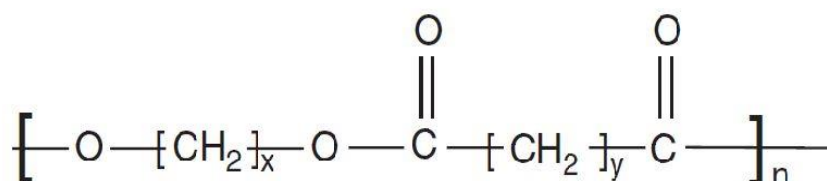
Polybutylensukcinát (PBS) a polybutylensukcinát adipát (PBSA)

PBS (Obr. 10) je synteticky vyrobený biodegradovatelný alifatický polyester. Jeho vlastnosti jsou podobné PET. Krystalinita PBS se pohybuje kolem 35–45 %, teplota skelného přechodu je 32 °C a teplota tání 114 °C. PBS se často používá v kombinaci se škrobem a cílem je modifikovat jeho vlastnosti [1], [2].



Obr. 10 Strukturální vzorec PBS [3]

PBSA (Obr. 11) se svými vlastnosti velmi podobá nízkohustotnímu polyethylen (LDPE). Jeho krystalinita je oproti PBS nižší, teplota skelného přechodu je $-45\text{ }^\circ\text{C}$ a teplota tání $93\text{ }^\circ\text{C}$. Oba materiály PBS i PBSA jsou zpracovávány vyfukováním, extruzí, vstřikováním a využívají se hlavně pro výrobu balicích a mulčovacích fólií, tašek a hygienických výrobků [1].



Obr. 11 Strukturální vzorec PBSA [3]

Aromatické polyestery

Další důležitou částí skupiny biodegradovatelných polymerů jsou aromatické polyestery, které se připravují polykondenzací alifatických diolů a aromatických dikarboxylových kyselin. Výborná odolnost vůči hydrolyze a působení chemických látek je zapříčiněna přítomností aromatického jádra, díky kterému biodegradovatelnost polymeru není primárně možná. Mezi nejznámější aromatické polyestery řadíme polyethyltereftalát (PET) a polybutyltereftalát (PBT), které jsou modifikovány různými přísadami monomerů citlivých k hydrolyze. Taková modifikace způsobí přeměnu nehydrolyzovatelných aromatických polyesterů na hydrolyzovatelné alifaticko-aromatické polyestery, které jsou schopny následného procesu biodegradace [1], [2].

1.5 Proces biodegradace

Biodegradace je proces, při kterém dochází k chemickému rozkladu polymerů na jednodušší látky pomocí mikroorganismů. Vznikají látky jako voda, oxid uhličitý a biomasa. Biodegradační proces zahrnuje dvě základní fáze. V první fázi dochází k depolymerizaci neboli ke štěpení polymerního řetězce na kratší polymerní úseky (oligomery) a ve druhé fázi následuje mineralizace takto vzniklých meziproductů.

Pokud degradace probíhá za přítomnosti kyslíku, jedná se o aerobní degradaci a vzniká oxid uhličitý. V opačném případě, kdy degradace probíhá bez kyslíku, jde o anaerobní degradaci a vzniká methan [1].

Extracelulární fáze – depolymerizace

V této první části biodegradace, která probíhá mimo buňku, dochází ke štěpení dlouhých polymerních řetězců pomocí extracelulárních (mimobuněčných) enzymů. Toto štěpení může probíhat náhodně, nebo pravidelně. Vzniklé oligomerní sloučeniny je možné poté transportovat přes cytoplazmatickou membránu, kde dochází k mineralizaci.

Z energetického hlediska může transport přes cytoplazmatickou membránu probíhat dvojným způsobem. A to jak pasivním, tak i aktivním. Při pasivním přenosu se uplatňuje proces difúze, kdy dochází k samovolnému pohybu částic z místa s vyšší koncentrací do prostředí s koncentrací nižší. Dalším způsobem pasivního přenosu je transport pomocí membránových kanálů, které jsou specifické pro určitou látku. Aktivní způsob transportu přes cytoplazmatickou membránu je pro buňku energeticky náročný, neboť musí pro přenos látky vyvinout určité množství práce. Tato forma práce představuje chemickou energii, která vzniká při hydrolýze adenosintrifosfátu (ATP) na adenosindifosfát (ADP) za vzniku fosfátu (P) [1], [2].

Intracelulární fáze – mineralizace

Tato fáze biodegradace probíhá uvnitř buňky mikroorganismů. Mineralizace je definována jako přeměna biomasy na plyny, vodu, minerály a zbytkovou biomasu. Proces mineralizace je dokončen tehdy, pokud je již celý objem biomasy spotřebován a veškerý uhlík převeden na oxid uhličitý. Mineralizací dochází ke znovu začlenění všech chemických prvků do přírodního cyklu. Biologický rozklad substrátu je zajišťován enzymy, které výrazně ovlivňují chemické štěpení polymerního řetězce.

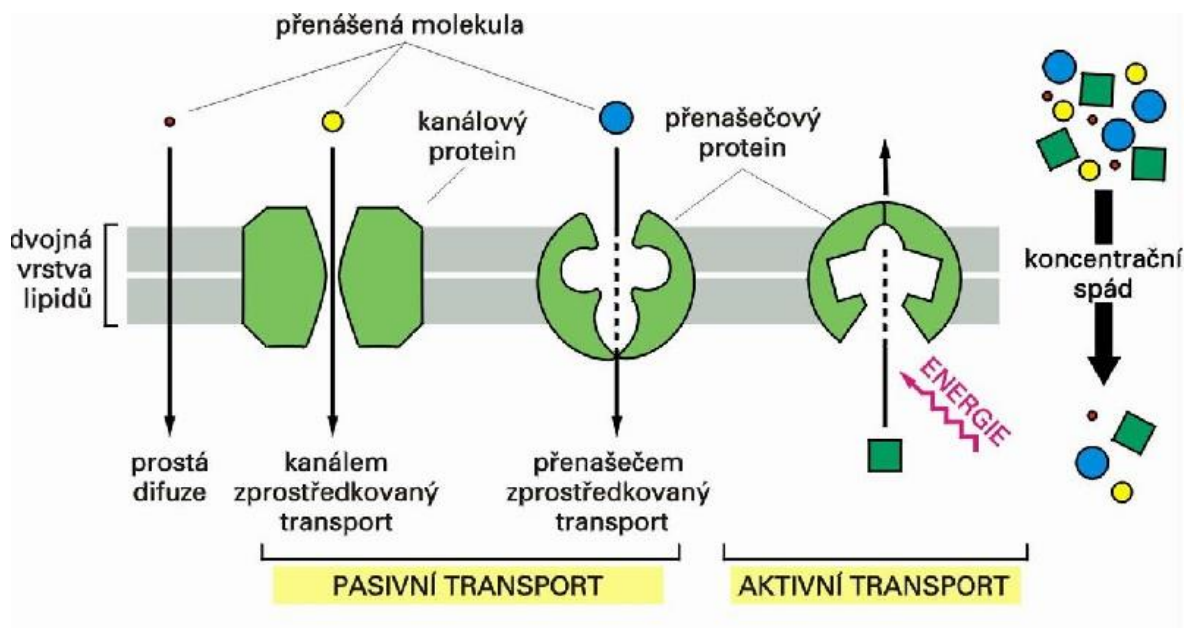
Enzymy dělíme do skupin podle toho, jakou chemickou reakci katalyzují [1]:

- oxidoreduktázy – ovlivňují oxidačně/redukční reakce,
- transferázy – přenášejí funkční skupiny,
- hydrolázy – katalyzují hydrolýzu chemických vazeb,
- lyázy – štěpí chemické vazby jiným způsobem než hydrolýzou či redoxní reakcí,
- izomerázy – katalyzují izomerizační reakce,
- ligázy – spojují dvě molekuly kovalentní vazbou.

Transportní jevy

Každá buňka, jakožto základní stavební a funkční jednotka organismů, má na svém povrchu semipermeabilní membránu oddělující živý obsah buňky od jejího okolí. Cytoplazmatická membrána plní několik důležitých funkcí. Důležitou roli hraje při ukotvení cytoskeletu, dává buňce tvar a dále má vliv na uchycení k extracelulární matrix či k jiným buňkám. Jelikož je membrána selektivně permeabilní, tak další její významnou funkcí je regulace transportu látek dovnitř a ven z buňky [16].

Existuje několik způsobů, kterými může docházet k průniku látek přes membránu (Obr. 12). Způsoby transportu je možné rozdělit podle toho, zda vyžadují energii či nikoliv. Pasivní transport se uskutečňuje bez dodání energie a transport vyžadující energii je transport aktivní.



Obr. 12 Schéma pasivního a aktivního transportu mezi buňkou a okolním prostředím [17]

a) Pasivní transport

Je přenos látek přes buněčnou membránu probíhající samovolně prostřednictvím kanálů a přenašečových proteinů. Pasivní transport je závislý na propustnosti buněčné membrány, na uspořádání dvojité vrstvy fosfolipidů a vmezeřených bílkovin. Základními typy pasivního transportu jsou prostá difúze, dále usnadněná difúze a osmóza. Při usnadněné difúzi musí látky na rozdíl od prosté difúze použít přenašeče či kanály.

Osmóza

Osmóza je pasivní transport vody. Molekuly vody jsou malé a mohou volně přecházet přes cytoplazmatickou membránu z prostředí, kde je nižší koncentrace rozpuštěných látek, do prostředí, kde je koncentrace rozpuštěných látek vyšší.

Usnadněná difúze

Transport velkých molekul jako jsou glukosa nebo Na^+ , které nemohou tak snadno přejít přes fosfolipidovou dvojvrstvu, je umožněn pomocí přenašečových bílkovin umístěných v cytoplazmatické membráně. Směr transportu je vždy ve směru koncentračního spádu a nevyžaduje žádnou energii [18], [19].

b) Aktivní transport

Při aktivním transportu dochází k přenosu látek proti koncentračnímu gradientu a je nutné dodat energii uloženou ve formě ATP. Transport probíhá za pomoci transportních přenašečů, což jsou bílkoviny v cytoplazmatické membráně. Tímto způsobem dochází k přenosu solí, iontů (Na^+ , K^+) nebo organických látek (sacharidy, aminokyseliny, glycerol a mastné kyseliny). Druhem aktivního transportu je cytóza, díky které je umožněn přenos velkých molekul, jako jsou bílkoviny a polysacharidy přes cytoplazmatickou membránu. Podle směru transportu látek je rozlišována endocytóza a exocytóza [19].

Endocytóza – fagocytóza a pinocytóza

Při endocytóze dochází k vchlípení cytoplazmatické membrány a tvorby váčku s transportovanou látkou, který se poté odškrtí a uvolní do cytoplazmy. Podle skupenství přijímané látky do buňky je endocytóza dále rozdělována na fagocytózu, při které jsou pohlcovány pevné částice a na pinocytózu, kdy dochází k pohlcení látek kapalných [20].

Exocytóza

Při tomto procesu dochází k vylučování větších částic skrze buněčnou membránu přímo do extracelulární matrix. Tento druh transportu nastává např. u enzymů nebo hormonů, které jsou připraveny k přenosu z Golgiho aparátu. Vytvoří se membránové měchýřky obsahující produkt, putují k membráně, splynou s ní a následně uvolní vnitřní obsah do svého okolí [20].

1.6 Využití biorozložitelných polymerů ve zdravotnictví a kosmetice

Biorozložitelné polymery představují v současné době skupinu materiálů se širokým aplikačním potenciálem. Díky svým mechanickým vlastnostem, snadnou odbouratelností a výrobou z obnovitelných zdrojů jsou využívány v oblastech zemědělství, potravinářství a kosmetickém průmyslu např. jako obalový materiál. Další významnou vlastností biologicky rozložitelných polymerů využívanou především v lékařství je jejich biokompatibilita [9].

a) Lékařství

Biologicky rozložitelné polymery jsou v oblasti lékařství využívány jako náhrady poškozené, nemocné či nevyvinuté části skeletu, náhrady chybějících částí těla, kostní cement, umělé vazy a šlachy, zubní a cévní protézy, srdeční chlopně, umělé tkáně, nitrooční čočky či prsní implantáty [21].

Další velmi důležitou oblastí, kde se hojně využívá biodegradabilních materiálů, je farmacie. Zde je většinou vytvořen systém, kde je účinná látka uzavřena v polymerním obalu tvořeném biodegradabilním polymerem [22], [23].

b) Kosmetika

V oblasti kosmetického průmyslu mohou být využívány jednak přírodní biologicky rozložitelné polymery jako ingredience kosmetických přípravků, ale také syntetické biorozložitelné polymery např. jako obalový materiál těchto výrobků. V kosmetických přípravcích polymery zastávají mnoho funkcí najednou. Jsou využívány především jako modifikátory viskozity, filmotvorná činidla a humektanty [24].

Typickým modifikátorem viskozity je karboxymethyl celulóza, která se využívá k zahušťování a ke stabilizaci emulzí např. lubrikantů, zubních past, projímadel, dietních tablet a čisticích prostředků [8].

Nitrocelulóza je typickým filmogenním polymerem vytvářející ve vodě nerozpustný tvrdý film a je jednou ze základních ingrediencí laků na nehty. Výborně se mísí s barevnými pigmenty za vzniku jasných živých barev, avšak nevýhodou filmu tvořeného nitrocelulózou je, že nemá vysoký lesk, je křehký a vykazuje slabou adhezi k povrchu nehtu [24], [25].

Dalším představitelem přírodních biologicky rozložitelných polymerů využívaným v kosmetice nejen jako humektant pro ošetření vlasové pokožky, ale také jako emulzifikátor, antistatikum a emolient je chitosan. Má antibakteriální vlastnosti, váže na sebe těžké kovy a v lékařství je využíván pro schopnost zastavovat krvácení a omezovat srážlivost krve [1].

Další používané přírodní biorozložitelné polymery, které se přidávají jako ingredience do kosmetických přípravků jsou bílkovinné povahy a hrají důležitou roli ve stavbě kůže, šlach a dalších orgánů. Jsou to kolagen a elastin. Kolagen je v kosmetice často složkou kosmetických emulzí a krémů sloužící zejména k ošetření pokožky a vlasů. Nízkomolekulární elastin je schopen v organismu stimulovat biosyntézu elastinu a vysokomolekulární elastin zastává funkci hydratantu a ochrany před agresivním prostředím [26].

V oblasti obalových materiálů kosmetických přípravků jsou stále častěji využívány syntetické biologicky rozložitelné polymery. Na trhu se vyskytuje široká paleta obalů, avšak jejich cena je až dvojnásobná oproti běžným obalovým materiálům. Obalové materiály z biorozložitelných polymerů se odbourávají na složky vyskytující se v přírodě a tudíž se přirozeně recyklují. Z hlediska zdraví spotřebitele a likvidace jsou považovány za přijatelnější, neboť se rozkládají bez uvolňování škodlivých chemikálií, které vznikají v důsledku spalování běžných plastů [27].

Biorozložitelné obaly je možné zatraktivnit zabudováním různých nanokompozitů a ty pak mohou měnit podmínky, při kterých jsou výrobky skladovány. Dochází k prodloužení jejich trvanlivosti, změně nutričních a sensorických vlastností nebo eliminaci nežádoucích plynů z atmosfér [28].

2 ANTIMIKROBIÁLNÍ MODIFIKACE POLYMERŮ

V dnešní době jsou polymery nejvíce využívané materiály, kterými jsou postupně nahrazovány tradiční materiály, jako jsou sklo, dřevo a kovy. V mnoha vlastnostech převyšují tyto tradiční materiály, ale existují také vlastnosti, které je nutné pro různé aplikace modifikovat. Mezi takové vlastnosti patří povrchové vlastnosti polymerů. Jsou to např. adheze, smáčivost, barvitelnost, biokompatibilita a antimikrobiální aktivita [1].

Povrchy polymerních systémů jsou často osídlovány různými mikroorganismy, nejčastěji bakteriemi vytvářející zde biofilm. Takové seskupení je na rozdíl od planktonicky se vznášejících buněk odolnější proti působení vnějších vlivů a na povrchu způsobuje znečištění, které s sebou nese problémy při používání polymerů v průmyslovém, technologickém a hlavně v medicínském odvětví. Proto je důležité výskytu nežádoucího bakteriálního biofilmu zamezit. Jednou z možností může být použití polymerního systému s antibakteriální úpravou, která zamezí růstu nežádoucích mikroorganismů [29].

Antibakteriální polymerní systémy jsou materiály, které jsou úmyslně upravovány různými látkami tak, aby docházelo k inhibici růstu bakterií. Takový systém se skládá z hlavní polymerní matrice a nějaké antibakteriální příměsi. Takto upravené polymery nacházejí uplatnění zejména v potravinářství ve formě obalového materiálu a v lékařství [1].

V této kapitole budou popsány způsoby, pomocí kterých je možné polymerní systémy antimikrobiálně modifikovat, dále zde bude popsán proces difúze, díky kterému dochází k uvolňování aktivních látek do prostředí a nakonec antibakteriální přísady, které mohou být pro modifikaci používány.

2.1 Způsoby antibakteriální modifikace polymerů

Existuje několik způsobů, kterými lze docílit antimikrobiální modifikace polymerů. Tyto způsoby je možné rozčlenit do čtyř základních skupin [29], [30]:

- přímá inkorporace antimikrobiální látky do objemu polymerní matrice;
- nanášení antimikrobiální látky na povrch polymerního produktu;
- navázání antimikrobiální látky k polymeru pomocí iontových či kovalentních vazeb;
- fyzikální úpravy polymerních povrchů.

Přímá inkorporace antimikrobiální látky do objemu polymerní matrice

Způsob modifikace polymeru, při kterém dochází k začlenění antimikrobiální látky do polymerní matrice, je poměrně často využíváný a účinný. Jako antimikrobiální látky, které se nejvíce používají při tomto způsobu modifikace polymeru, jsou stříbrné ionty, enzymy, přírodní fenoly typu hydrochinonů a katechinonů a dále také ionty mědi, zinku a jiných ušlechtilých kovů. Obsah těchto látek se v polymerní matrici pohybuje většinou v rozmezí od 1 do 20 hm. %. Do výsledného produktu mohou být tyto látky zakomponovány v tavenině nebo pomocí rozpouštědla přimíchány do matrice polymeru. Co se týká běžných metod při zpracování polymerů např. vstřikováním či vytlačováním, je možné používat pouze tepelně stabilní antimikrobiální činidla [29].

Antimikrobiální přísady, u kterých dochází postupem času k uvolňování z polymerní matrice, jsou výhodné tím, že nepůsobí pouze jako ochrana povrchu polymeru, ale že působí také jako účinný antimikrobiální systém v širším okolí než je jeho fyzický kontakt. Nevýhodou takových druhů látek je jejich dočasná funkce antibakteriálních vlastností [29], [31].

Nanášení antimikrobiální látky na povrch polymerního produktu

Tento způsob antimikrobiální modifikace se volí v takovém případě, že vlastnosti antimikrobiální látky neumožňují zpracovávání společně s polymerní taveninou vzhledem k používání vysokých teplot při výrobním procesu. Existují dva technologické postupy přípravy. První možností je zpracovávat polymer společně s antimikrobiální látkou při relativně nízkých teplotách v roztoku nebo druhým častým způsobem je nanášení antimikrobiální látky až na hotový produkt [29], [32], [33].

Navázání antimikrobiální látky k polymeru pomocí iontových či kovalentních vazeb

Při antimikrobiální úpravě pomocí iontových či kovalentních vazeb je vyžadováno, aby polymer i antimikrobiální činidlo obsahovalo takové funkční skupiny, které umožňují jejich navazování vůči sobě. Mezi takové přísady jsou řazeny peptidy, enzymy, polyaminy a organické kyseliny. Nevýhodou této metody modifikace polymeru je, že dochází ke snížení antimikrobiální vlastnosti látky díky pevnému navázání látky na polymer [29], [34], [35].

Mezi antibakteriální činidla, která je možno navázat kovalentně, lze zařadit např. lysozym, chitinázu, oxidázu glukózy, enzymy laktoferrin a lipáza nebo fosfonium. Další velkou

nevýhodou tohoto způsobu modifikace polymeru je přítomnost substrátu, který je nezbytný k reakcím pro uvolnění antibakteriální látky [36], [37], [38].

Fyzikální úpravy polymerních povrchů

V přírodě je možné se setkat s polymery, jejichž přirozenou vlastností je inhibovat růst mikroorganismů. Dalším způsobem, jak lze z polymerů připravit antibakteriálně aktivní systém, je použití různých technik. Jedním způsobem je např. ultrafialové (UV) ozařování povrchu, kterým dojde ke zvýšení antimikrobiální schopnosti [29], [39].

2.2 Difúzní procesy antimikrobiálních činidel v polymerní matrici

Pohyb nízkomolekulárních složek polymerního systému (změkčovadel, stabilizátorů, antimikrobiálních činidel) je řízen z velké části difúzními procesy. Difúzi je možné definovat jako proces samovolného pohybu částic v prostoru. K takovému pohybu částic dochází z místa o vyšší koncentraci do místa s koncentrací nižší. Proces difúze je závislý na teplotě, molekulové hmotnosti a chemické afinitě antibakteriální látky s plastem. Difúze látky je velmi pomalá a obvykle může trvat i několik dní. Difúzní pohyb je možné popsat Fickovým prvním zákonem (1), podle kterého je hustota difúzního toku rozpuštěné látky v ustáleném stavu přímo úměrná koncentračnímu gradientu látky [40].

$$J_A = -D_A \cdot \frac{\partial c_A}{\partial x} \quad (1)$$

Kde:

J_A difúzní tok látky A [$\text{kg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$],

D_A koeficient difúze neboli difuzivita látky A [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$],

c okamžitá objemová koncentrace látky A [$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$],

A množství látky [kg],

x vzdálenost ve směru osy x , který je směrem difúze [m],

$\frac{\partial c_A}{\partial x}$ gradient koncentrace látky A [$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{m}^{-1}$].

Z polymerních systémů může docházet k uvolňování látek různé povahy. Velké nebezpečí představují zbytkové monomery plastu, jako je např. organická toxická látka a další přísady jako jsou např. změkčovadla. Naopak antimikrobiální látky nebo antioxidanty jsou do matrice polymeru zabudovány z důvodu samovolného uvolňování do okolního prostředí [40], [41], [42].

2.3 Antimikrobiální činidla

Antimikrobiální činidla jsou látky způsobující inhibici růstu mikroorganismů a mohou být děleny na látky anorganické a organické. Mezi anorganické látky jsou řazeny kvartérní amoniové soli (benzalkonium chlorid, cetylpyridinium chlorid) a sloučeniny kovů (stříbro, zinek). Mezi organické látky patří např. antibiotika a bakteriociny [29].

a) Anorganická antimikrobiální činidla

Kvartérní amoniové soli

Tyto sloučeniny jsou soli kvartérních amoniových kationtů s anionty. Jejich struktura se obecně skládá z pozitivně nabitě hydrofilní aminové skupiny a dlouhého hydrofóbního alkylového řetězce. Způsobují zpomalení růstu grampozitivních i gramnegativních bakterií, hub, kvasinek a také některých prvoků. Jejich významnou schopností je vázat se na proteiny a nukleové kyseliny, čímž dochází k porušení celistvosti membrán. Používají se jako dezinfekční látky, tenzidy, změkčovače textilu a antistatická činidla [43].

Benzalkonium chlorid

Patří do skupiny kvartérních amoniových solí, jejichž silnou schopností je denaturovat proteiny. Mechanismus antiseptického účinku je takový, že nejprve dojde k navázání látky na vnitřní stranu bakteriální membrány a poté k narušení její struktury pomocí alkylového řetězce. Benzalkonium chlorid je bílý, nažloutlý prášek nebo ve formě nažloutlých želatinových kousků. Snadno se rozpouští ve vodě, ethanolu a acetonu. Špatně rozpustný je v benzenu a nerozpustný v etheru [43].

Díky svým antiseptickým vlastnostem se tato látka může vyskytovat v mnoha výrobcích kosmetického a farmaceutického průmyslu, např. oční kapky a masti, pastilky na bolest v krku, kloktadla, přípravky na popáleniny, přípravky na omývání ran, nosní kapky a spreje. V kosmetických výrobcích je využívám především při výrobě vlasové kosmetiky, zubních past, ústních vod, deodorantů a roztoků pro čištění a uchovávání kontaktních čoček [43].

Cetylpyridinium chlorid

Tato skupina kvartérních amoniových solí se liší délkou N-alkylového řetězce, který významně ovlivňuje jejich vlastnosti. S rostoucí délkou řetězce se zvyšuje jejich antifungální působení. Cetylpyridinium chlorid je sloučenina, která má široké spektrum antimikrobiální aktivity a její účinek podmiňuje kladně nabitá aminová skupina, která se váže k negativně nabitým proteinům na povrchu mikroorganismu. Pozitivní účinek byl prokázán na gingivitidu související s tvorbou zubního plaku, dále účinkuje při parodontitidě i zápachu z úst [43].

Kovy a jejich sloučeniny

Stříbro

Stříbro (Ag) je možné z pohledu obecných vlastností definovat jako téměř bílý, lesklý, měkký, velmi tažný a poddajný kov. Je to vynikající vodič tepla a elektřiny a vyznačuje se značnou chemickou stabilitou. Stříbro se dobře rozpouští v koncentrované kyselině sírové a kyselině dusičné. Na vzduchu neoxiduje a ve vodě je také velmi stabilní [44].

Stříbro se vyznačuje širokou účinností proti bakteriálním kmenům, některým patogenům a také brání růstu hub a kvasinek způsobujících řadu onemocnění. Použití stříbra je bezpečné, je netoxické, velmi dobře snášeno a působí jako antibiotikum. Stříbro napomáhá rozvoji buněk, nedochází ke shromažďování v těle, nedráždí sliznice, nevytváří se závislost a neobsahuje volné radikály. Možnosti jeho použití jsou téměř neomezené, avšak výjimku tvoří pouze lidé, kteří jsou na tento kov alergičtí. Využívá se při léčbě kožních onemocnění jako je např. akné, otevřené rány, opary nebo mykózy. Při takových onemocněních jsou postižená místa potírána látkou napuštěnou stříbrem [45], [46].

Zinek a oxid zinečnatý

Zinek (Zn) je další prvek, který je možné použít jako přísadu do antimikrobiálního polymerního systému. Sám o sobě je zinek pro lidský organismus velmi důležitý. Napomáhá při hojení ran, neboť podporuje syntézu bílkovin a obnovu buněk. Dále posiluje imunitní systém, zrak a aktivně zabraňuje usazování škodlivých volných radikálů [47].

Oxid zinečnatý (ZnO) je bílá práškovitá látka nerozpustná ve vodě, ale rozpustná v kyselinách a hydroxidech. V přírodě se nachází ve formě nerostu, nazývaného zinkit neboli kalamín či červená ruda zinková. Oxid zinečnatý má široké uplatnění v gumárenském, plastikářském, sklářském průmyslu a při výrobě nátěrových hmot [47].

Oxid zinečnatý a nanočástice oxidu zinečnatého vykazují silné inhibiční a antibakteriální účinky. Nanočástice oxidu zinečnatého nepředstavují pro lidský organismus žádné nebezpečí z pohledu toxicity a jsou biokompatibilní. Jsou hojně využívány jako nosiče léčiv, kosmetické přísady či výplně zdravotnických materiálů. Bylo prokázáno, že vykazují antibakteriální aktivitu proti důležitým potravinovým patogenům, jako je např. *Escherichia coli*. Využití nanočástic oxidu zinečnatého může být efektivní pro uchovávání zemědělských produktů a potravin a na rozdíl od nanočástic stříbra jsou jejich velkou výhodou nízké výrobní náklady, bílý vzhled a ochranné vlastnosti v oblasti UV záření [48].

b) Organická antimikrobiální činidla

Antibiotika

Antibiotika jsou organické látky, jejichž úkolem je zpomalit růst bakterií (bakteriostatické) nebo je usmrtit (bakteriocidní) a jsou produkovány bakteriemi nebo houbami. Základním požadavkem na antibiotikum je optimální antimikrobiální účinek za minimální toxicity na hostitele [49].

Antibiotika je možné rozdělit podle mechanismu účinku na čtyři skupiny [50], [51]:

- inhibice syntézy buněčné stěny – peniciliny, cefalosporiny, vankomycin, bacitracin;
- porucha funkce cytoplazmatické membrány – Amfotericin B, azoly, polymyxiny;
- inhibice syntézy bílkovin – aminoglykozidy, chloramfenikol, tetracykliny;
- inhibice syntézy nukleových kyselin – sulfonamidy, chinolony, rifampicin.

Při virových a plísňových infekcích, které nejsou bakteriálního původu, není používání antibiotik vhodné, neboť nejsou účinná. Antibiotika inhibující pouze malou skupinu bakterií jsou označována jako úzkospektrální a ty, která zasahují větší okruh bakterií, jsou nazývána jako širokospektrální. Účinnost jednotlivých antibiotik se může lišit podle lokality infekce a schopnosti antibiotika zasáhnout dané místo [52].

Hodnocení účinnosti antibiotik se provádí stanovením minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC). MIC je nejmenší koncentrace antibiotika, které zpomaluje růst a množení bakterií v testovacím mediu. MBC odpovídá nejnižší naměřené koncentraci antibiotika, která způsobí usmrcení bakteriální kultury v průběhu 24 hodin [50], [51].

S antibiotickou terapií je spojen také vznik rezistence a různých nežádoucích a toxických účinků. Rezistencí rozumíme odolnost mikroorganismů na působení antibiotika a lze ji

rozdělit na primární a sekundární. Rezistence primární je dána geneticky. Bakterie je k danému antibiotiku odolná bez ohledu na předchozí kontakt. Rezistence sekundární se rozvíjí až v průběhu antibiotické terapie nebo je následkem předchozího podávání antibiotika [50], [51].

Bakteriociny

Bakteriociny jsou proteiny syntetizované bakteriemi a jejich schopností je zastavovat nebo inhibovat růst dalších bakterií. Projevují antibakteriální vlastnosti proti ostatním bakteriím. Více o bakteriocinech bude popsáno v následující kapitole [53].

3 BAKTERIOCINY

Mnoho producentů bakteriocinů je schopných syntetizovat pouze jeden bakteriocin, ale bylo zjištěno, že větší počet různých bakteriocinů jsou schopny produkovat bakterie mléčného kvašení. Bakteriociny obsahují obvykle 30 až 60 aminokyselinových zbytků a jsou primárním nebo modifikovaným produktem ribozomální syntézy peptidů bakterií [54], [55].

Jsou aktivní hlavně proti grampozitivním bakteriím, neboť gramnegativní bakterie jsou před jejich účinky chráněny vnější membránou. Největší aktivity dosahují při nízkém pH a jejich velká výhoda oproti klasickým antibiotikům spočívá v sugestivním enzymatickém zničení [56].

Bakteriociny se od sebe odlišují způsobem působení, spektrem aktivity, molekulovou hmotností, genetickým původem a biochemickými vlastnostmi. Mohou být produkovány samovolně nebo indukovaně na základě podobných či rozdílných vlastností [57].

Podle složení peptidů i některých aminokyselin lze bakteriociny rozdělit do čtyř skupin. Mezi nejznámější bakteriociny se řadí dvě rozdílné skupiny, lantibiotika a nelantibiotika. Nejvíce zkoumanou skupinou antibakteriálních peptidů jsou bakteriociny produkované grampozitivními bakteriemi, neboť využití v potravinářském průmyslu je velmi významné [58], [59].

3.1 Rozdělení bakteriocinů

Bakteriociny lze podle velikosti molekuly rozdělovat do čtyř skupin [53], [56], [60], [61]:

Třída I – nízkomolekulární lantibiotika

Tato skupina bakteriocinů obsahuje zbytky netypických aminokyselin jako např. lanthionin a 3-methylanthionin. Jsou to malé stabilní molekuly s velikostí kolem 2 až 3 kDa. Mezi nejvýznamnější zástupce této třídy patří nisin, subtilin, galidermin, epidermin, pep 5 atd.

Třída II – nízkomolekulární peptidické bakteriociny

Bakteriociny této třídy jsou nemodifikované malé molekuly s velikostí do 10 kDa. Jsou to kationaktivní, hydrofobní a tepelně odolné peptidy produkované bakteriálními kmeny rodů *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* a *Enterococcus*.

Tuto skupinu bakteriocinů je možné dále dělit na tři podtřídy:

- **IIa** – pediocinové bakteriociny se silným antilisteriovým účinkem
 - pediocin PA-1, bavaricin MN, mesentericin Y105, leucocin A, enterocin
- **IIb** – dvoupeptidové bakteriociny
 - lacticin F, plantaricin EF, plantaricin JK, lactococcin G
- **IIc** – sekundárně druhotné sekrety bakteriocinů
 - plantaricin A, lactococcin A, lactococcin 972

Třída III – vysokomolekulární proteinové bakteriociny

Bakteriociny této skupiny jsou velké tepelně labilní peptidy. Velikost molekuly je více než 30 kDa. Mezi zástupce této třídy jsou řazeny helveticin J, caseicin 80 atd.

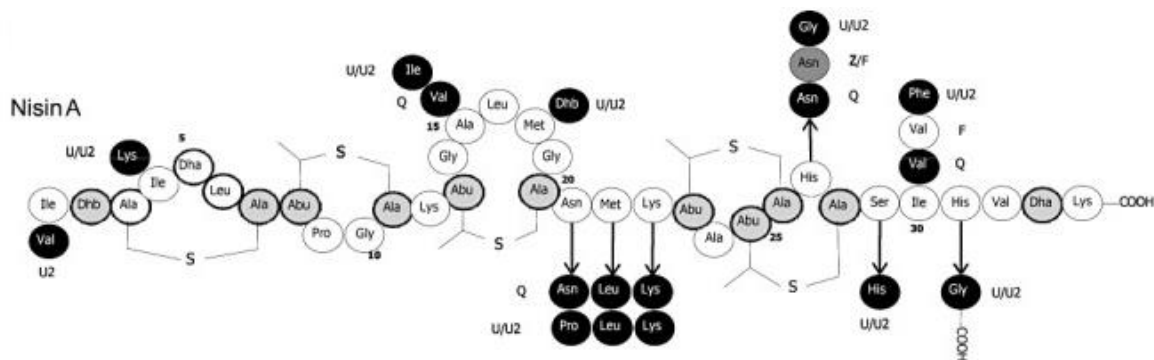
Třída IV – komplexní bakteriociny

Do této skupiny jsou řazeny bakteriociny, které se skládají z části proteinové a z jedné nebo více částí neproteinových (lipidová, sacharidová). Zástupci této skupiny bakteriocinů jsou lactocin 27, plantaricin S, pediocin SJ-1 atd.

3.2 Nisin

Nisin (Obr. 13) patří mezi nejvýznamnější a nejvíce prozkoumaný bakteriocin třídy I. Tento bakteriocin byl také použit při výrobě antibakteriálních filmů na bázi PLA/PEG v praktické části, a proto bude nyní podrobněji popsán.

Bakteriocin nisin je polycyklický peptid skládající se ze 34 aminokyselin. Je produkován bakteriálními kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a vykazuje kationaktivní a hydrofobní vlastnosti. Podle předcházejícího dělení je zařazen do třídy I – skupiny lantibiotik obsahující lanthioninové a methyllanthioninové skupiny. Byl objeven roku 1928 v Anglii Rogersem a Whittierem [62], [63], [64].



Obr. 13 Struktura nisinu A [65]

Nisin se vyskytuje v mnoha různých formách, z nichž nejznámější jsou nisin A a Z, které se od sebe odlišují jednou aminokyselinou v pozici 27. U varianty A se v dané pozici nachází histidin a u varianty Z se v této pozici vyskytuje asparagin. Strukturální změna varianty Z však neovlivňuje jeho antimikrobiální aktivitu, naopak mu poskytuje větší rozpustnost a difúzní vlastnosti ve srovnání s variantou nisinu A [62].

Jak již bylo zmíněno, nisin je produkován bakteriálním kmenem *Lactococcus lactis*, proto se běžně vyskytuje v sýrech, případně některých mléčných kysaných výrobcích. Jeho produkce může být ovlivněna hned několika kultivačními faktory, konkrétně typem produkčního kmene, nutričním složením média, pH, teplotou, agitací a aerací. Dalšími faktory pak jsou např. substrát a inhibice produktu, adsorpce nisinu na produkční buňky a enzymatická degradace [63].

Nisin jako baktericidní činitel působí proti grampozitivním bakteriím zahrnujícím rody *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria* a *Mycobacterium*. Grampozitivní spory *Bacillus sp.* a *Clostridium sp.* jsou k působení nisinu zvláště citlivé. Naopak proti gramnegativním bakteriím, houbám a virům nisin nepůsobí, neboť gramnegativní buňky jsou odolné díky obsahu lipopolysacharidů v buněčné stěně [63], [64].

Bakteriociny třídy I mohou pro zabíjení cílových buněk použít dva mechanismy, a to prostřednictvím inhibice buněčné stěny, nebo tvorbou pórů. Oba mechanismy jsou usnadněny vazbou molekuly nisinu pomocí lipidu II, což je hlavní transportér peptidoglykanových stavebních podjednotek bakteriální buněčné stěny. Při nižších koncentracích nisinu nedochází k syntéze buněčné stěny, což má za následek smrt buňky. Při vyšších koncentracích se nisin váže na lipid II a dochází k úniku buněčných složek, jako jsou ionty a ATP [66].

4 VYUŽITÍ NISINU PRO MODIFIKACI POLYMERNÍCH MATRIC

Kombinace biodegradabilního polymeru a přírodního bakteriocinu (nisinu) má do budoucna velký potenciál za účelem uplatnění jako materiálu pro antibakteriální balení potravin nebo jako antibakteriální přísada do zdravotnických či kosmetických přípravků.

T. Jin a H. Zhang se zabývali antibakteriálními vlastnostmi polymerních filmů na bázi PLA/nisin. Tyto filmy byly připraveny metodou odlévání z roztoku. Byl použit nisin 2,5%. Množství čistého nisinu ve filmech byla $6,25 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ a na povrchovou plochu filmu to činilo $0,04 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}$. Následně byla stanovena antimikrobiální aktivita filmů proti *Listeria monocytogenes* (Scott A 724), *Escherichia coli* O157:H7 (Oklahoma) a *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) v kultivačním médiu a tekutých potravinách, konkrétně v pomerančovém džusu a vaječném bílku. Výsledky této studie ukazují, že zabudování bakteriocinů do polymeru PLA by mohlo vytvořit systém, který by pomohl zlepšit účinnost bakteriocinů v potravinářských aplikacích [67].

Uvolňováním nisinu z biodegradabilních polymerů se zabývali Muhammad Imran a kol. Pro experiment byly použity hydroxypropyl methylcelulóza (HPMC), chitosan, kaseinát sodný (SC) a polylaktid. Z těchto polymerů byly připraveny filmy, do kterých byl začleněn nisin Z a bylo sledováno jeho uvolňování do rozpouštědla voda – ethanol při 4°C a 40°C . Byla sledována struktura povrchu filmů před a po uvolňování a proběhla také mikrobiální kontrola. Největší antibakteriální efekt proti *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus* byl zjištěn u filmů vyrobených z HPMC a SC a to díky silným interakcím mezi médiem a filmem [68].

V roce 2014 byla zveřejněna studie, kde se Showmen Ji a kol. zabývali zapouzdřením hydrofilního peptidu nisinu do hydrofobní matrice polymeru kyseliny mléčné. Metodou emulzní polymerace byly připraveny nanokompozitní částice ve tvaru kuliček o velikosti 50–200 nm a duté mikrokompозitní kuličky o velikosti 1–5 μm . Proces přípravy u dutých částic probíhal za zvýšených teplotních podmínek a u nanokompozitních částic při laboratorní teplotě. Při těchto podmínkách by neměla být ohrožena inhibiční aktivita použitého nisinu. Mikroskopické a povrchové analýzy prokázaly, že nisin byl rovnoměrně rozptýlen jak do matrice polymeru, tak byl adsorbován na povrch částic. Technika emulzní přípravy částic v kombinaci s výhodami, které s sebou nesou biodegradabilní polymery (nízké náklady a biologická rozložitelnost) je velmi atraktivní pro zapouzdření hydrofilní

účinné látky jako jsou proteiny či oligonukleotidy a pro následné využití v medicínských a farmaceutických aplikacích [69].

V další studii z roku 2011 se Roberto Scaffaro a kol. zabývali studií antimikrobiálních vlastností filmů na bázi kopolymeru ethylen–vinylacetátu (EVA) se zabudováním nisinu připravených procesem tavení. Následně byly filmy charakterizovány pomocí skenovací elektronové mikroskopie a tahových zkoušek. Antibakteriální aktivita byla testována proti *Micrococcus luteus* a také bylo hodnoceno uvolňování nisinu z polymerní matrice [70].

Imobilizací biologicky aktivní látky nisinu do matrice síťovaného polymeru polyvinylalkohol (PVA) pomocí netoxické dikarboxylové kyseliny glutarové se zabývala Martina Hrabalíková a kol. Síťovaný systém sloužil jako matrice pro imobilizaci bakteriocinu nisinu. Byl zkoumán vliv stupně zesíťování na fyzikálně-chemické, morfologické, mechanické a tepelné vlastnosti filmů, a to pomocí FTIR, SEM, deformační analýzy, DSC a termogravimetrie. Profil uvolňování nisinu ze síťovaného PVA, byl studován pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Antibakteriální účinnost připravených systémů byla testována pomocí difúzního testu. Výsledky ukázaly účinnost kyseliny glutarové jako síťovadla PVA a s použitím nisinu působí proti testovaným grampozitivním i gramnegativním bakteriálním kmenům synergicky [71].

Jako konkrétní příklad přípravku s bakteriociny je gel vyvinutý v Japonsku obsahující nisin A, používaný na mytí rukou a ústní hygienu. Je účinný při redukci vzniku zubního kazu způsobeném *Streptococcus mutant* a bakteriálního zánětu dásní způsobeném *Porphyromonas gingivalis* [72].

Dalším příkladem je topický přípravek obsahující nisin pro využití v kosmetice nebo farmacii. Je patentován ve Francii a používá se pro ošetření mastné pleti a proti akné [73].

5 CÍLE PRÁCE

Bakteriociny, jakožto látky přírodní povahy s antibakteriálními vlastnostmi mimo jiné i proti určitým druhům patogenních bakterií, jsou v dnešní době zkoumány jako perspektivní antimikrobiální přísady do polymerů.

Jednou z potenciálně významných oblastí jejich využití jsou zdravotnické prostředky, které mohou být na bázi bioinertních i bioresorbovatelných polymerů.

Vzhledem k hydrofobní povaze syntetických biorozložitelných polyesterů a jejich nekompatibilitě s bioaktivními látkami (především hydrofilní povahy) nebylo dosud provedeno mnoho studií, které by se zabývaly imobilizací bakteriocinů do polymerní matrice. Možným řešením, které popisuje tato práce, může představovat kombinace hydrofobního polylaktidu a hydrofilního polyetylen glykolu. Tento biokompatibilní binární systém bude zajišťovat zvýšenou stabilitu bakteriocinu s polymerní maticí a zlepšenou antibakteriální aktivitu daných systémů ve srovnání s materiálem na bázi nemodifikovaného polylaktidu.

Cílem práce bylo vytvořit binární polymerní systém na bázi PLA/PEG s imobilizovaným bakteriocinem nisinem.

Na základě zadání diplomové práce byly stanoveny následující cíle:

1. Připravit polymerní filmy na bázi polylaktidu (PLA) a polyethylenglykolu (PEG) o různé molekulové hmotnosti (MW) (400, 1000 a 6000 g.mol⁻¹) v koncentračním rozmezí 0–20 hm. %.
2. Experimentálně ověřit vliv složení PLA/PEG systémů na mechanické a tepelné vlastnosti připravených filmů pomocí:
 - tahových zkoušek
 - diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC)
 - infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR)
 - skenovací elektronové mikroskopie (SEM)
 - působení vody
3. Imobilizovat bakteriocin nisin do filmů na bázi PLA/PEG.
4. Vyhodnotit antimikrobiální aktivitu připravených systémů pomocí ISO 22196.
5. Stanovit kinetiku uvolňování bakteriocinu z vybraných experimentálně připravených PLA/PEG směsí.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 MATERIÁLY A METODY

6.1 Materiály a chemikálie

Pro přípravu filmů byl použit komerční polylaktid PLA INGENO 2002 D (Nature Works), polyethylenglykol 400 (Merck), polyethylenglykol 1000 (Sigma–Aldrich) a polyethylen glykol 6000 (IPL). Jako rozpouštědlo byl použit chloroform p.a. (IPL) a bioaktivní látkou pro antimikrobiální modifikaci byl nisin from *Lactococcus lactis* 2,5 hm. %, stabilizovaný NaCl (97,5 hm. %) (Sigma Aldrich).

Živné půdy plate count agar, nutrient agar a další materiál pro antibakteriální testy nutrient broth, soybean casein digest broth a tween 80 byly pořízeny od HiMedia Laboratories. Chlorid sodný a dihydrogenfosforečnan draselný z IPL a sójový granulovaný lecitin od firmy Mogador s.r.o.

Jako testovací mikroorganismy byly použity *Staphylococcus aureus* CCM 4516, *Listeria monocytogenes* CCM 4699 a *Escherichia coli* CCM 4517 získané z České sbírky mikroorganismů, Masarykova univerzita, Brno.

Pro HPLC analýzu byly použity jako mobilní fáze HPLC Grade acetonitril a voda (ChemLab) a trifluoroctová kyselina (TFAA) (Sigma Aldrich).

6.2 Použité metody

Příprava PLA/PEG filmů

Pro přípravu PLA/PEG filmů byla použita metoda odlévání z roztoku. Jako forma pro výslednou podobu filmů byla použita Petriho miska o průměru 16,5 cm a požadovaná tloušťka filmu byla cca 200 μm . Byly připraveny PLA filmy s 0–20 hm.% PEG 400, 1000 a 6000 (Tab. 1). V prvním kroku byla navážena množství výchozích surovin – PLA, PEG a následně byly tyto komponenty smíchány s 90 ml chloroformu a homogenizovány na magnetickém míchadle při teplotě 40 °C do úplného rozpuštění po dobu 2–3 hodin při 460 $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$. Po odpaření rozpouštědla na Petriho misce byl film dosušen ve vakuové sušárně při 45 °C a tlaku 30 mb do konstantní hmotnosti.

Tab. 1 Kompozice pro přípravu filmů

hm. % PEG	m PEG [g]	m PLA [g]	m [g]
0	0	4,850	4,850
5	0,243	4,850	5,093
9	0,485	4,850	5,335
13	0,728	4,850	5,578
17	0,970	4,850	5,820
20	1,213	4,850	6,063

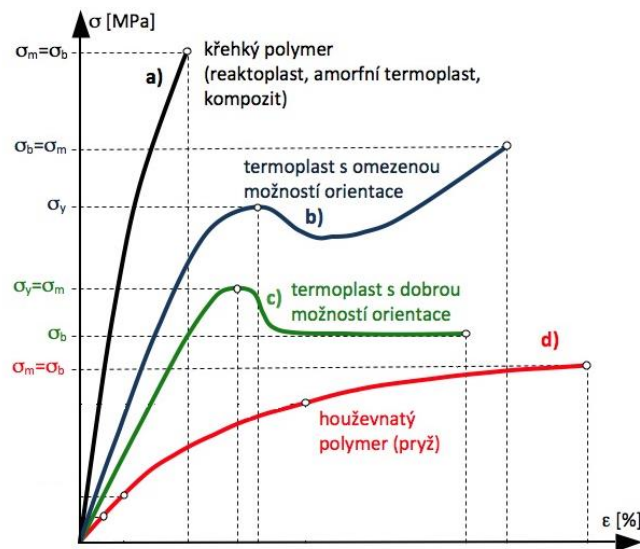
Příprava PLA/NIS a PLA/PEG/NIS filmů

Pro imobilizaci nisinu byl zvolen systém PLA obsahující 20 hm. % PEG6000. Byly připraveny PLA/PEG/NIS a PLA/NIS filmy o koncentraci nisinu 0,15 hm. %. V případě systému s PEG byl připraven zvlášť roztoku PLA v chloroformu a PEG v chloroformu, do kterého byl vmíchán komerční nisinový prášek a poté tato směs přidána k roztoku PLA. Pro účely antibakteriálního testování byly současně také připraveny filmy bez nisinu v podobě PLA, PLA/PEG a PLA/NaCl.

Tahová zkouška

Pro hodnocení mechanických vlastností filmů jsou nejčastěji prováděny tahové zkoušky. Zkoušený vzorek je upnut do čelistí trhacího stroje a je deformován konstantní rychlostí. Výsledkem deformace způsobené napětím jsou tahové křivky různých typů materiálů (Obr. 14). Základní charakteristiky, které je možné pomocí této metody zjistit jsou např. mez pevnosti v tahu, modul pružnosti, prodloužení při přetržení atd.

Z připravených vzorků byla na hydraulické laboratorní sekačce vysekána zkušební tělíska, která odpovídala normě EN ISO 527–2 [74] pro stanovení tahových vlastností plastů. Pro tahovou zkoušku byla použita zkušební tělíska typu 1BA o délce 75 mm a šířce 5 mm. Před provedením tahové zkoušky byla zkušební tělíska kondicionována při teplotě 23 °C a 50% RH po dobu 3 dnů. Rychlost pro tahovou zkoušku byla zvolena 50 mm.min⁻¹. Počáteční délka vzorku byla 40 mm, šířka 5 mm a tloušťka 0,2–0,25 mm. Tahová zkouška byla provedena na zkušebním trhacím stroji a z průměrných hodnot byla zjištěna pevnost v tahu a Youngův modul. Zkoušky byly prováděny pro každý vzorek 6 krát a výsledky byly získány po vyloučení odlehlých hodnot a také byla zjištěna směrodatná odchylka.

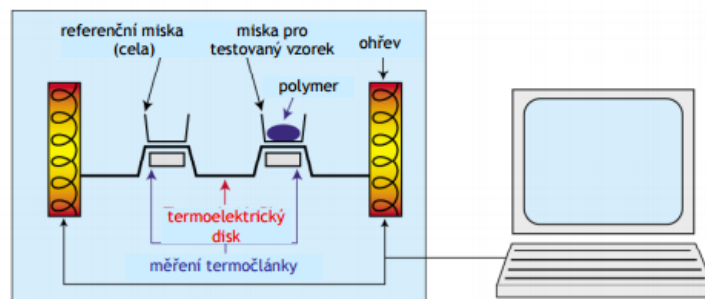


Obr. 14 Typické deformační křivky polymerů v tahu [75]

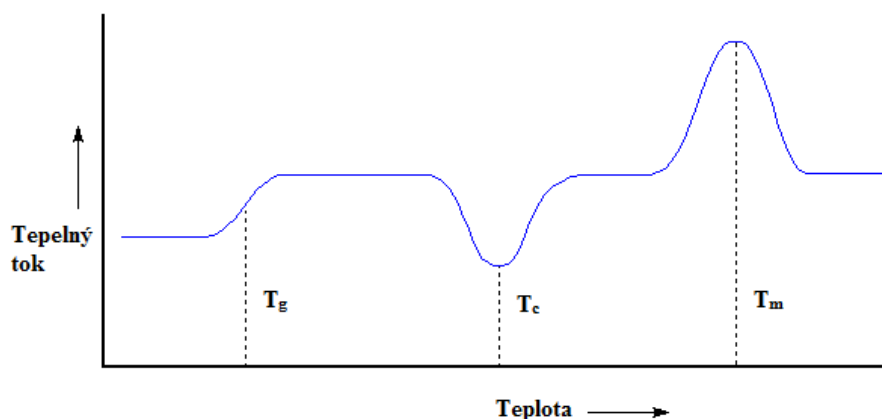
σ_m – mez pevnosti, σ_y – napětí na mezi kluzu, σ_b – napětí při přetržení

Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC)

DSC je termická analytická metoda sledující tepelné efekty, ke kterým dochází ve vzorku v důsledku chemických reakcí, fázových přeměn či dalších energetických změn. Principem této metody je měření elektrického příkonu, který je potřebný k udržení stejné teploty vzorku a referenčního materiálu (Obr. 15). Ty jsou zahřívány postupně rostoucí teplotou. Výstupem je rozdíl tepelných příkonů, který je potřebný k udržení nulového rozdílu teplot mezi vzorkem a referenčním materiálem. Výsledkem takového experimentu je křivka (Obr.16), která popisuje závislost příkonu na teplotě nebo na čase. Pomocí metody DSC je možné určit teplotu skelného přechodu (T_g), krystalizace (T_c), tání (T_m) apod. [76], [77].



Obr. 15 Schéma principu metody DSC [78]

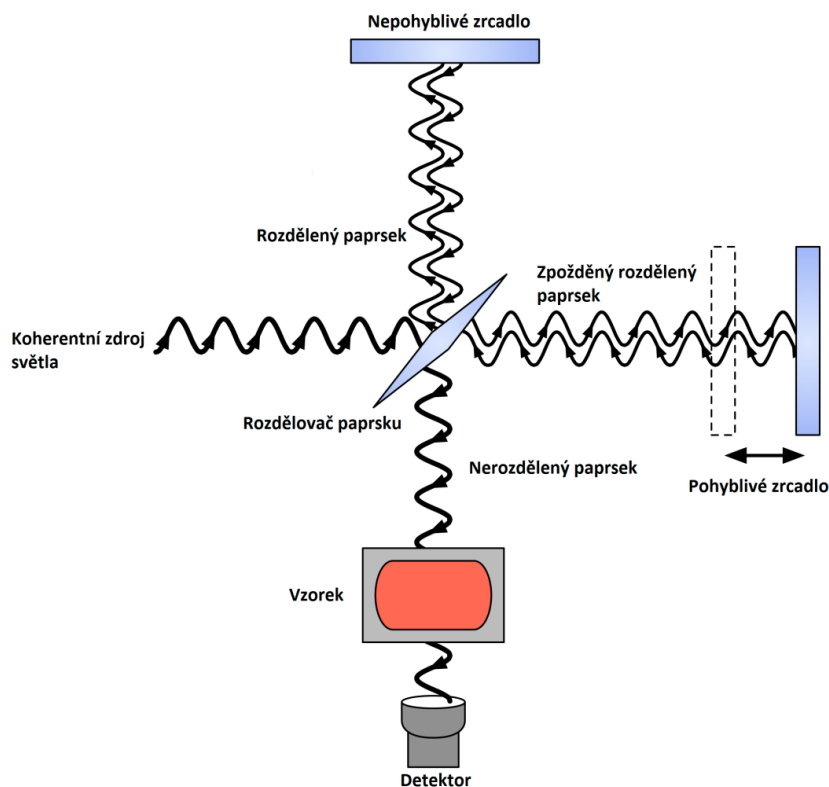


Obr. 16 DSC křivka [79]

Termická analýza PLA/PEG filmů probíhala na zařízení Mettler Toledo DSC 1. Bylo odváženo 5–10 mg předsušeného vzorku, který byl podroben teplotnímu rozsahu -35 – 200 °C dle následující metody: První ohřev z -35 °C na 200 °C rychlostí 10 °C.min⁻¹, držení po dobu 1 minuty, následovalo chlazení na -35 °C rychlostí 10 °C.min⁻¹, na této teplotě držení po dobu 2 minut. Druhý ohřev z -35 °C na 200 °C rychlostí 10 °C.min⁻¹. Teplota tání (T_m) byla určena jako maximální hodnota endotermie z prvního ohřevu. Teplota skelného přechodu (T_g) byla stanovena z druhého ohřevu.

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR)

Infračervená spektroskopie je analytická metoda, pomocí které je možné charakterizovat strukturu, identifikovat funkční skupiny organických sloučenin a stanovit anorganické látky. Základem této metody je absorpce infračerveného záření molekulami vzorku (Obr. 17) [80], [81].



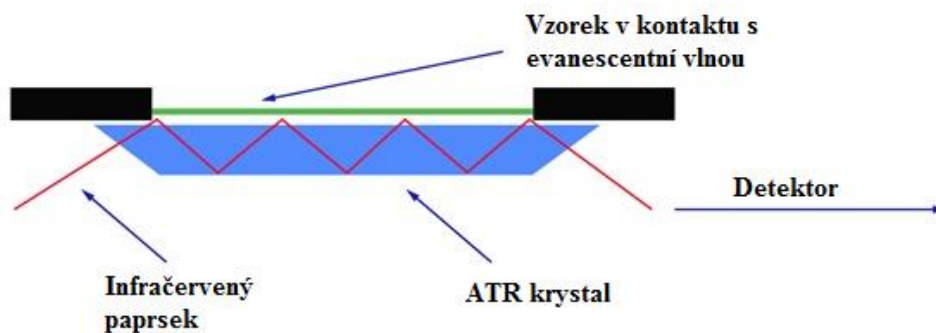
Obr. 17 Schéma metody FTIR [82]

Infračervená oblast (IR) elektromagnetického záření se pohybuje v rozmezí vlnových délek 0,8–1000 μm a je možné ji dále rozdělit na jednotlivá pásma – blízké (NIR – Near-infrared region), střední (MIR – Mid-infrared region) a dlouhé (FIR – Far-infrared region). Výsledkem této analytické metody je infračervené spektrum, které graficky znázorňuje závislosti transmitance nebo absorbance na vlnočtu. Každá látka má své absorpční spektrum, pomocí kterého je možné ji identifikovat. Vlnočty charakteristických píků PLA v IR spektru jsou zobrazeny v Tab. 2. Infračervená spektroskopie se využívá k běžné identifikaci polymerních systémů, výchozích surovin, studiu síťování, k určení stupně degradace polymerů, vzniku nebo zániku charakteristických vazeb ve vzorku či materiálu [80], [81].

Analýza vzorků probíhala na spektrometru Nicolet iS5 s ATR nádstavcem iD5 od výrobce Thermo Scientific a pro vyhodnocení byl použit software OMNIC.

ATR (Attenuated Total Reflectance) neboli metoda zeslabené totální reflexe – je moderní technika, která je vhodná pro silně absorbující kapalné a viskózní vzorky, pasty, gely, polymerní vrstvy i práškové vzorky. Podstatou této metody je totální vnitřní reflexe

infráčerveného záření při průchodu krystalem o velkém indexu lomu (Obr. 18). Ve vzorku, který je v těsném kontaktu s měřícím ATR krystalem, dochází ke vzniku zeslabující se absorpční vlny. Absorpční vlna vzniká při totálním odrazu na rozhraní opticky hustšího prostředí (ATR hranol) s prostředím opticky řidším (vzorek) a exponenciálně klesá se vzdáleností od rozhraní (řádově μm) [83].



Obr. 18 schéma ATR [84]

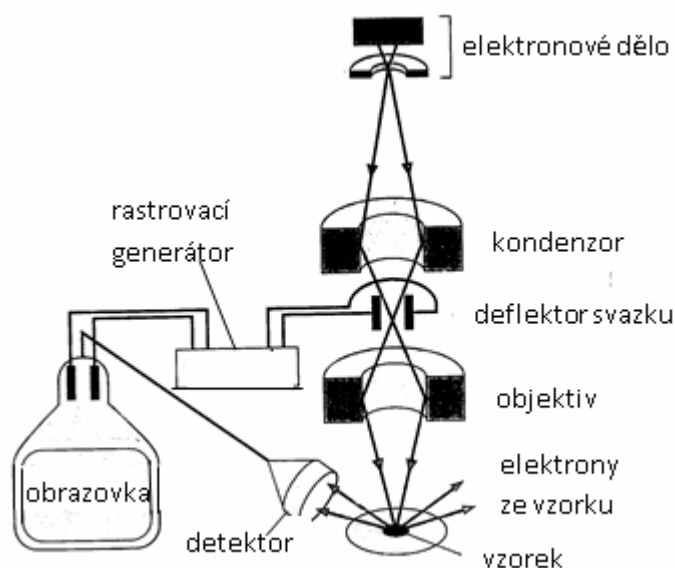
Tab. 2 Vlnočty charakteristických píků PLA v IR spektru [85]

Skupina	Vlnočty [cm^{-1}]
-OH	3571
-CH-	2997 (asym), 2946 (sym), 2877
-C=O	1748
-CH ₃	1456
-C=O	1225
-C-O-	1194, 1130, 1093
-OH	1047
-C-C-	926, 868

Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Skenovací elektronová mikroskopie je metoda sloužící k pozorování povrchů (Obr. 19). Povrch vzorku je skenován sondou pomocí paprsku urychlených elektronů. Tato metoda je považována za nepřímou, protože výsledný obraz vzniká ze sekundárního signálu (z odražených nebo sekundárních elektronů). Výhodou skenovací elektronové mikroskopie je její vysoká rozlišovací schopnost a hloubka ostrosti [86].

Struktura připravených vzorků v lomu byla pozorována skenovacím elektronovým mikroskopem Phenom Pro (Phenom-World BV) za vakua při urychlovacím napětí 5 kV.



Obr. 19 Směr pohybu elektronů v elektronovém mikroskopu (SEM) [87]

Vliv působení vody

Dalším možným způsobem charakterizace vyrobených filmů je odolnost vůči vodnému prostředí. Z vyrobených polymerních filmů byly vystřiženy 3 vzorky o rozměrech 2 x 2 cm, které byly po vysušení do konstantní hmotnosti zváženy a ponechány ve 100ml destilované vody po dobu 7 dní, teplotě 40 °C a za konstantního třepání na třepačce rychlostí 90 ot.min⁻¹. Po této době byl stanoven úbytek hmotnosti a byly pozorovány strukturální změny pomocí skenovací elektronové mikroskopie.

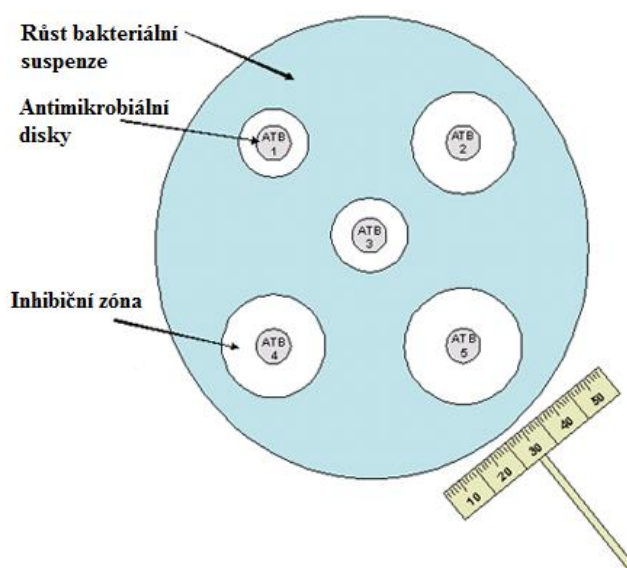
Měření povrchové antibakteriální aktivity

Existuje několik možností jak charakterizovat antibakteriální aktivitu polymerních systémů. Jednou z variant je metoda založená na volné difúzi antimikrobiální látky z polymerní matrice.

a) Difúzní testy

Princip této metody je takový, že dojde k rozprostření bakteriální suspenze na pevný živný substrát, který vyživuje bakteriální buňky. Na tento substrát jsou volně položeny kruhové vzorky. Po inkubaci se kolem vzorků vytvoří tzv. inhibiční zóny, u kterých je odečítán jejich průměr. Podle velikosti vytvořené zóny se následně vyhodnocuje schopnost antibakteriální aktivity použité antibakteriální přísady. Inhibiční zóny vznikají vlivem volné difúze, kdy antibakteriální složka obsažená v testovaném materiálu proniká do bakteriální suspenze a dochází k postupné bakteriostatické respektive bakteriocidní aktivitě proti bakteriálním buňkám [88], [89].

Na MH agar byla pomocí sterilního vatového tamponu nanasena bakteriální suspenze o koncentraci cca 10^8 CFU.ml⁻¹, umístěny vzorky o průměru 8 mm a ponechány inkubovat při 35 °C po dobu 24 hodin (Obr. 20).



Obr. 20 Schéma difúzní diskové metody [89]

I když je použití této metody velmi časté, její nevýhodou je, že ji není možné využít v každém případě, neboť existuje mnoho materiálů, ze kterých antibakteriální částice mimo matrici nedifundují anebo se z matrice uvolňují jen částečně a jejich působení je především na povrchu materiálu. V takovém případě musí být zvolena jiná technika, která umožňuje ohodnotit pouze povrchovou antibakteriální aktivitu. Mezi takové se řadí např. metoda podle normy ISO 22196 [88].

b) Postup podle normy ISO 22196

Hodnocení antibakteriální aktivity připravených filmů bylo prováděno dle dané normy, modifikované na rozměr vzorků 25 x 25 mm.

K testování byly použity dva druhy gramnegativních bakteriálních kolonií – *Staphylococcus aureus* CCM 4516 a *Listeria monocytogenes* CCM 4699 a jeden zástupce grampozitivní bakterie – *Escherichia coli* CCM 4517.

Nejprve byly připraveny vzorky o zmíněné velikosti a jim odpovídající polyetylenové krycí fólie, které byly ošetřeny lihem.

Dalším bodem byla příprava bakteriální suspenze. Pomocí sterilní očkovací kličky bylo přeneseno určité množství předem naočkovaného bakteriálního kmene do 10 ml roztoku nutričního bujónu tak, aby koncentrace bakteriální suspenze byla cca 10^6 CFU.ml⁻¹ (skutečná koncentrace byla stanovena ředěním a počítáním na pevných půdách).

Připravené inokulum v množství 0,1 ml bylo nadávkováno pomocí automatické pipety na testované vzorky a překryto krycí fólií. Takto připravené vzorky byly vloženy v uzavřených Petriho miskách do inkubátoru při 35 °C a 90% vlhkosti a ponechány inkubovat do druhého dne.

Po 24 hodinové inkubaci byl proveden oplach vzorků roztokem SCDLP, což je živná půda kaseinu ze sójových bobů. Takto vzniklý roztok byl převeden do zkumavky a bylo provedeno stanovení koncentrace přeživších bakterií metodou ředění a počítání kolonií na pevných půdách po inkubaci při 35 °C po 24 a 48 hodinách. Stanovení bylo prováděno vždy dvakrát vedle sebe.

Antibakteriální aktivita jednotlivých vzorků:

$$R = (U_t - U_0) - (A_t - U_0) = U_t - A_t \quad (2)$$

Kde:

R antibakteriální aktivita vzorku,

U₀ průměr dekadického logaritmu počtu životaschopných bakterií (buněk.cm⁻²) sejmutých ze vzorků bez antibakteriální úpravy ihned po naočkování;

- U_t průměr dekadického logaritmu počtu životaschopných bakterií (buněk.cm^{-2}) sejmutých ze vzorků bez antibakteriální úpravy 24 hodin po naočkování;
- A_t průměr dekadického logaritmu počtu životaschopných bakterií (buněk.cm^{-2}) sejmutých ze vzorků s antimikrobiální úpravou po 24 hodinách.

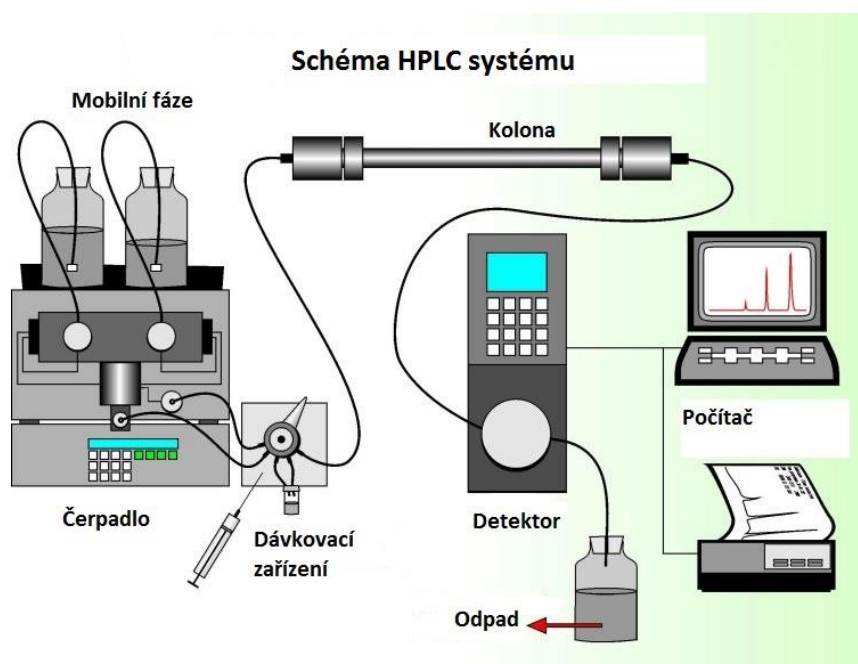
Účinnost vzorku:

$$\text{účinnost vzorku \%} = \frac{U_t}{R} \cdot 100 \quad (3)$$

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography)

Obecně lze chromatografii definovat jako analytickou fyzikálně-chemickou metodu, která je založená na distribuci látek mezi tzv. stacionární a mobilní fází. Stacionární fází je tuhá látka nebo kapalina uložená na pevném nosiči, zatímco mobilní fáze je tvořena výhradně tekutinou. Stacionární fáze je umístěna v chromatografických kolonách, kterými protéká mobilní fáze, v případě vysokoučinné kapalinové chromatografie je mobilní fáze poháněna pomocí vysokotlakého čerpadla [90].

Základní instrumentace HPLC je znázorněna na Obr. 21.



Obr. 21 Schéma HPLC systému [91]

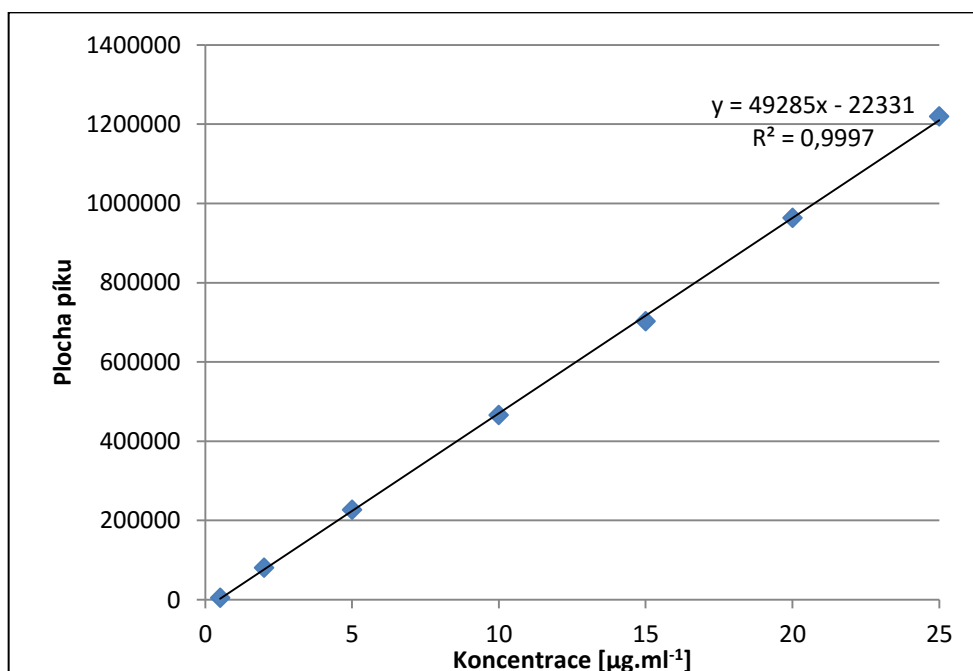
Pro stanovení nisinu pomocí HPLC byla použita mobilní fáze (A) složená z acetonitrilu + 0,05% (v/v) trifluoroctové kyseliny (TFAA) a mobilní fáze (B) voda + 0,05% (v/v) TFAA. Pro vlastní separaci byla použita kolona XSelect, C18 CS (5 μm , 4,6 X 250 mm, Watrex) s předkolonou (Reprosil 100 C18, 50 X 4 mm, 5 μm Watrex). Teplota kolony byla 40 °C. Stanovení nisinu bylo prováděno pomocí metody gradientové eluce (Tab. 3).

Tab. 3 Gradient metody pro stanovení nisinu

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

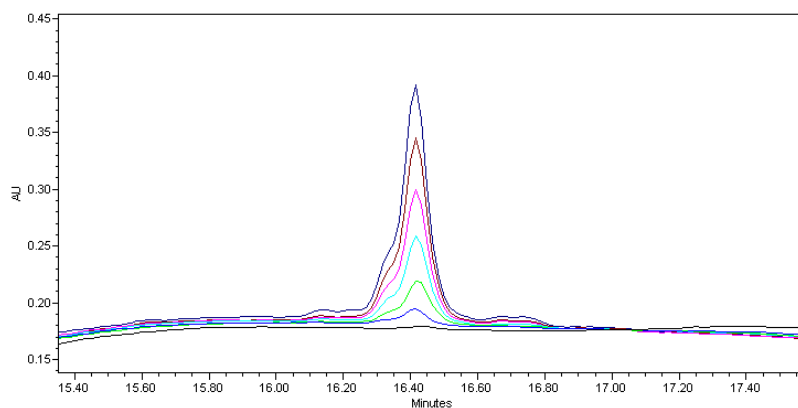
Detekce byla prováděna za použití duálního UV detektoru (při vlnových délkách 200 a 220 nm). Pro vyhodnocení výsledků byly použity chromatogramy při 200 nm.

Kalibrační přímka (Obr. 22) byla sestrojena pomocí kalibračních roztoků komerčního nisinu (2,5%).



Obr. 22 Kalibrační přímka nisinu

Standard nisinu byl rozpuštěn v 0,02 M kyselině chlorovodíkové (HCl) a přefiltrován přes filtr 0,45 μm . Poté byly z daného zásobního roztoku připraveny kalibrační roztoky v rozmezí koncentrací 0,5–25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Na Obr. 23 je zobrazen výsek z chromatogramu znázorňující pík nisinu.



Obr. 23 Chromatogram kalibračních roztoků nisinu

Kinetika uvolňování nisinu

Pro řízené uvolňování nisinu byly vyraženy vzorky filmů PLA/NIS a PLA/PEG/NIS o definovaném průměru 22 mm (Tab. 4), které byly vloženy do 3 ml 0,02 M HCl a ponechány při 37 °C v inkubátoru s orbitálním pohybem GLF 3033 při 60 ot.min⁻¹.

Tab. 4 Navážky vzorků pro uvolňování a koncentrace uvolněného nisinu

Vzorek	m vzorku [g]	NIS ve vzorku [μg]*	Celková koncentrace uvolněného NIS [$\mu\text{g}/\text{ml}$]**
PLA/PEG/NIS 1	0,1059	158,9	53,0
PLA/PEG/NIS 2	0,1060	159,0	53,0
PLA/PEG/NIS 3	0,0872	130,8	43,6
		\emptyset 149,6	\emptyset 49,9
PLA/NIS 1	0,0828	124,2	41,4
PLA/NIS 2	0,0939	140,9	47,0
PLA/NIS 3	0,0859	128,9	43,0
		\emptyset 131,3	\emptyset 43,8
PLA/PEG	0,0929		
PLA	0,0860		

* Teoretický obsah nisinu ve vzorku

** Teoretická koncentrace nisinu při uvolnění veškerého množství obsaženého ve vzorku do daného množství simulantu

Pro HPLC analýzu bylo odebíráno vždy 0,5 ml simulantu a doplněno 0,02M HCl opět na objem 3 ml. Odebírání bylo prováděno od započetí experimentu po dobu 14 dní.

Pro stanovení nisinu byla použita metodika viz výše (Tab. 3, Obr. 22). Koncentrace nisinu byla pro systém PLA/NIS vyhodnocena z plochy píků v retenčním čase 16,4 – 16,5 min a pro systém PLA/PEG/NIS z ploch píků v retenčním čase 16,0 – 16,5 min.

Vzhledem k povaze experimentu byla po zohlednění ředění vypočtena kumulativní koncentrace celkově uvolněného nisinu ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a celkové množství uvolněného nisinu (%):

$$\% \text{ uvolněného NIS} = \frac{C_{\text{NIS kumul.}}}{C_{\text{NIS celk. teor.}}} \cdot 100 \quad (4)$$

Kde:

$C_{\text{NIS kumul.}}$ stanovená kumulativní koncentrace nisinu [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]

$C_{\text{NIS celk. teor.}}$ teoretická koncentrace nisinu při uvolnění veškerého množství obsažené ve vzorku do daného množství simulantu [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

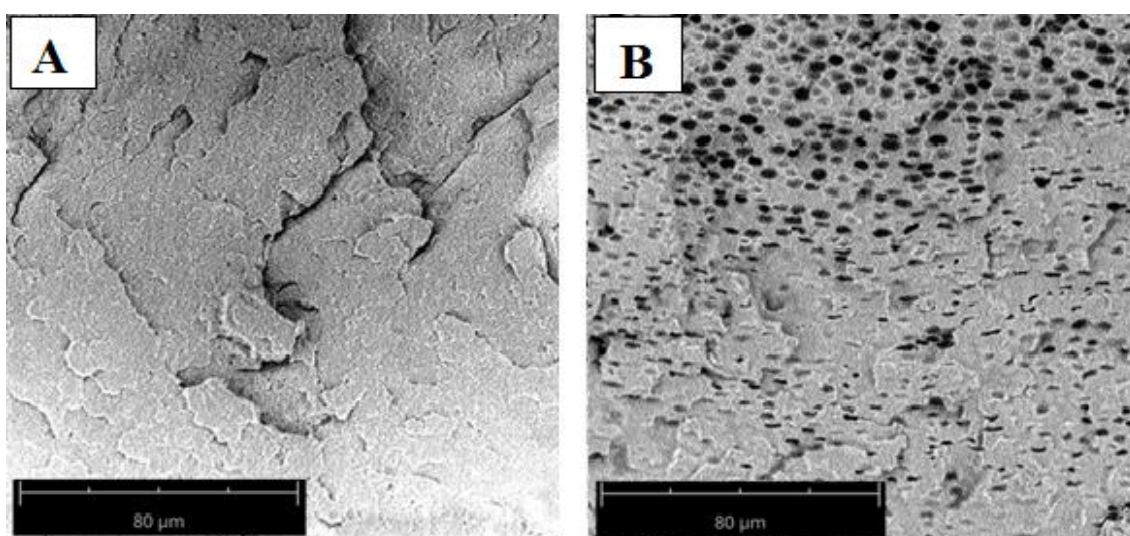
V následující kapitole budou postupně diskutovány výsledky jednotlivých metod, které byly použity pro charakterizaci modifikovaných polymerních filmů na bázi PLA/PEG o různé MW (400, 1000 a 6000 g.mol⁻¹) v koncentračním rozmezí 0–20 hm. %.

Cílem diplomové práce bylo stanovení vlivu MW a koncentrace PEG na morfologii, fyzikálně-chemické, mechanické a tepelné vlastnosti. U dále připravených filmů s imobilizovaným nisinem byla studována antimikrobiální aktivita, kinetika uvolňování nisinu a stabilita.

7.1 Morfologie zkoumaných systémů

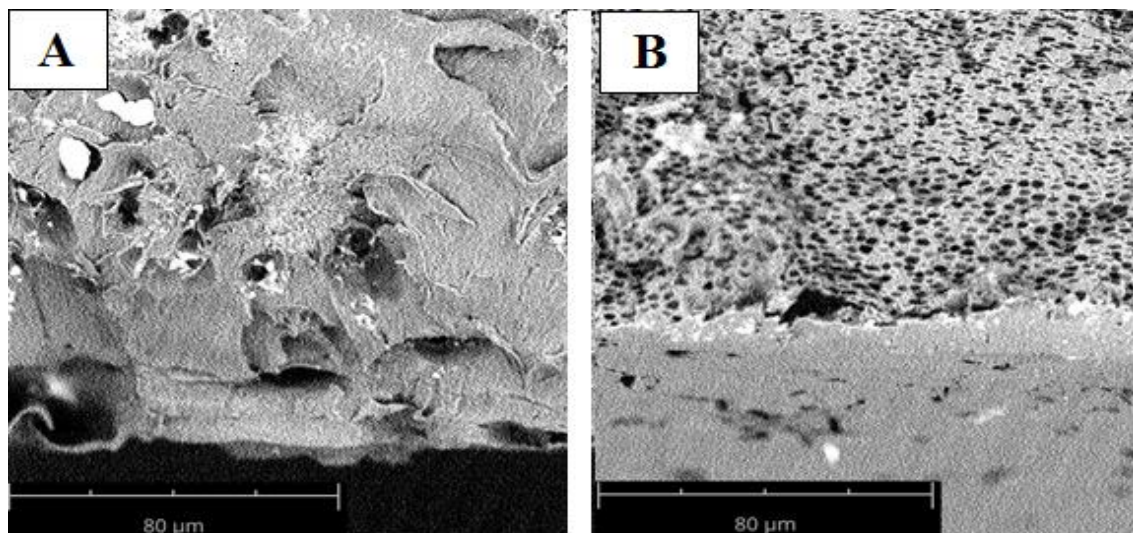
Morfologie PLA/PEG filmů byla hodnocena pomocí SEM u vzorků s 5 a 20 hm. % všech typů PEG. Na Obr. 24 je uveden výsledek SEM analýzy PLA a PLA/PEG po rozpouštění ve vodném prostředí při 40 °C. Z tohoto obrázku je zřejmé, že u připravených filmů došlo k separaci fází systému, kdy PLA je disperzním prostředím a PEG dispergovanou fází. Po působení vodného prostředí došlo k rozpuštění a vyplavení PEG z polymerní matrice a tím vzniku porovité struktury. Vzhledem k tomu, že všechny systémy (nezávisle na použitém typu PEG) vykazovaly podobné výsledky, na Obr. 24 je uveden pouze reprezentativní vzorek s 20 hm. % PEG6000.

Námi naměřené výsledky jsou v souladu s literaturou zabývající se termodynamikou mísení polymerních systémů [92].



Obr. 24 SEM analýza PLA (A) a PLA/20%PEG6000 (B) v lomu po působení vodného prostředí.

Na Obr. 25 jsou dále uvedeny výsledky SEM analýzy připravených filmů s 0,15 hm. % nisinu. U samotného PLA/NIS došlo oproti systému PLA/PEG/NIS po rozpouštění k patrným destruktivním změnám matric. To je způsobeno zřejmě špatnou rozpustností NaCl (v němž je stabilizován nisin v komerčně dostupném produktu) v chloroformu. Přítomnost PEG v systému zřejmě zvýšila jeho rozpuštěnost a v připraveném filmu nejsou zřejmé trhliny pro krystalech NaCl.



Obr. 25 SEM analýza PLA/NIS (A) a PLA/20%PEG6000/NIS (B) v lomu po působení vodného prostředí.

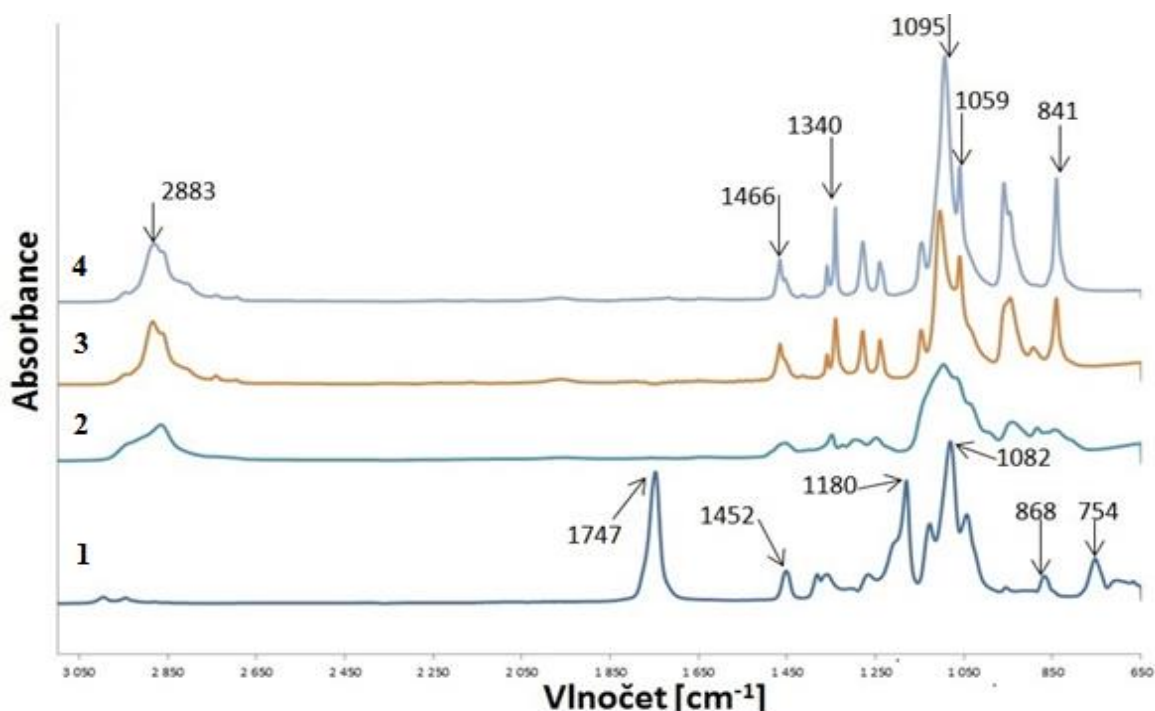
7.2 Fyzikálně-chemická analýza

Strukturální charakterizace vyrobených filmů byla provedena pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací. Obr. 26 zobrazuje spektra čistých komponent, které byly použity pro výrobu filmů. Tyto spektra zobrazují charakteristické absorpční pásy PLA, PEG400, PEG1000 a PEG6000.

Pro PLA jsou charakteristické absorpční pásy při vlnětu 1747 cm^{-1} typické pro C=O skupinu, 1452 cm^{-1} zobrazující -CH_3 skupiny a pík při 868 cm^{-1} charakteristický pro C-C vazbu. Námi zjištěné poznatky o charakteristických absorpčních pásích jsou v souladu s literaturou [85], kde jsou popsány vlnětu charakteristických píků PLA v IR spektru.

Dále jsou na Obr. 26 zobrazeny charakteristické píky PEG400, 1000 a 6000 v IR spektru. Oproti PLA je u IR spektra PEG patrný vznik píku při vlnětu 2883 cm^{-1} charakteristický pro C-H vazbu v alkanech, pík při vlnětu 1340 cm^{-1} zobrazuje sekundární alkohol,

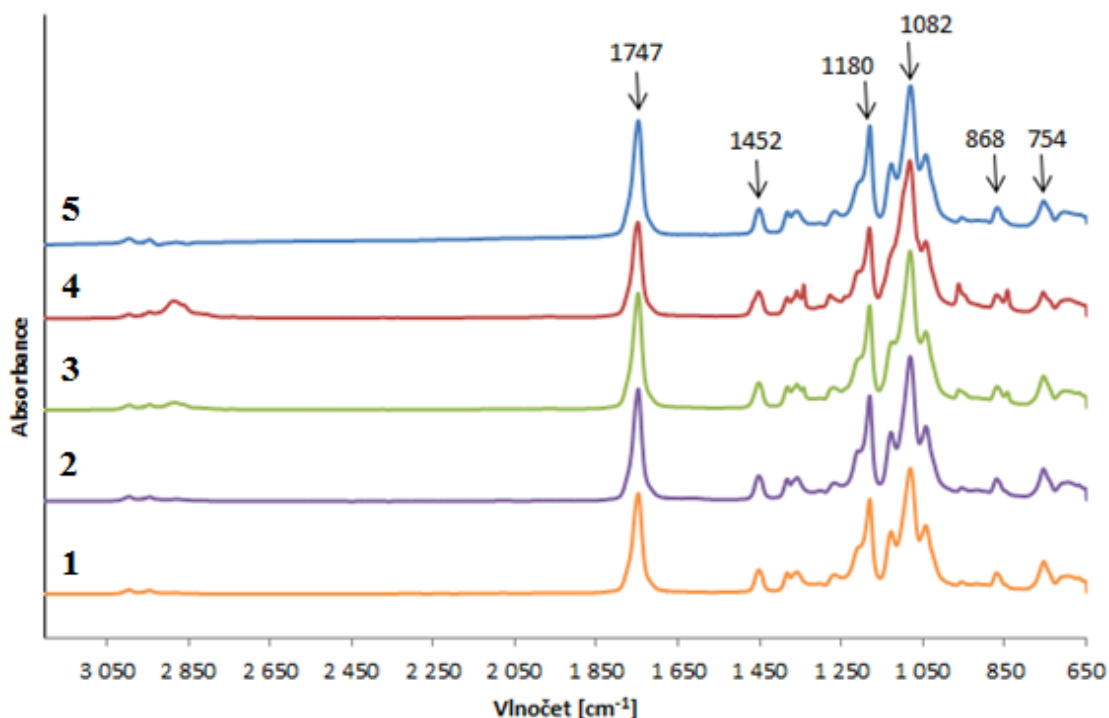
absorpční pás při 1095 cm^{-1} je zřetelný díky C–O–C vazbě v etherech a dále 1059 cm^{-1} znázorňuje C–O vazbu v alkoholech. Ze spektra je možné také vidět, jak s rostoucí molární hmotností PEG roste intenzita jednotlivých píků. Charakteristické absorpční pásy PEG byly popsány podle literatury [93].



Obr. 26 FTIR-ATR spektrum čistých komponent pro přípravu polymerních filmů

1 – PLA, 2 – PEG 400, 3 – PEG 1000, 4 – PEG 6000

Výsledky připravených PLA/PEG filmů jsou uvedeny na Obr. 27. Vzhledem k tomu, že spektra všech systémů (nezávisle na použitém typu PEG) byly podobného charakteru, jsou zde uvedeny pouze výsledky filmů modifikovaných PEG6000.

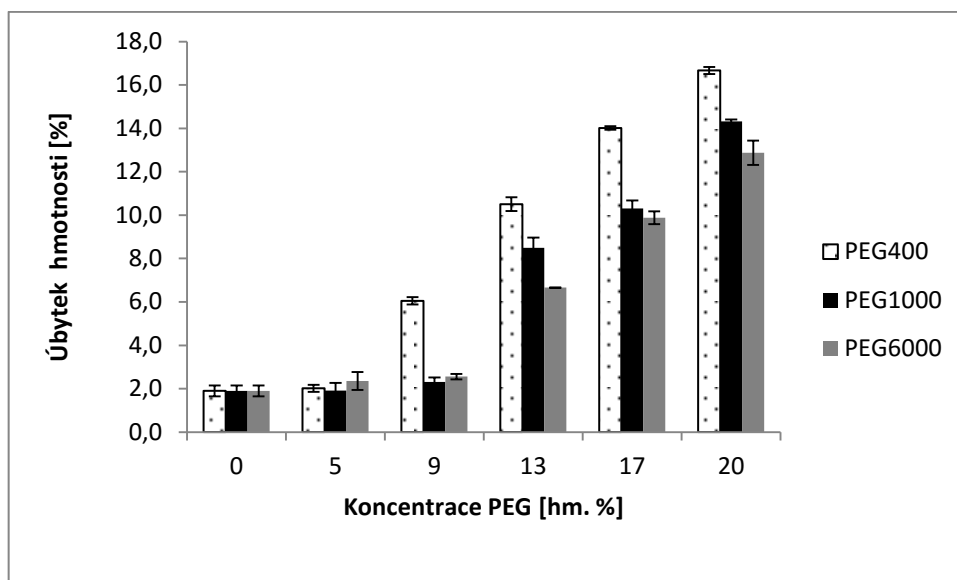


Obr. 27 ATR-FTIR spektra filmů PLA/PEG6000 1 – 5% PEG6000, 2 – 9% PEG6000, 3 – 13% PEG 6000, 4 – 17% PEG6000, 5 – 20% PEG6000

7.3 Působení vodného prostředí

Připravené filmy PLA/PEG byly vystaveny působení abiotickému vodnému prostředí při 40 °C po dobu 7 dní. Na Obr. 28 je vidět závislost hmotnostního úbytku na koncentraci PEG. Hmotnostní úbytky kolem 2 % u vzorků PLA, které nebyly modifikovány PEG mohly nastat v důsledku hydrolýzy PLA po 7 dnech působení vodného prostředí. Naopak úbytky u vzorků s vyšším obsahem PEG jsou způsobeny vyplavováním PEG do vodného prostředí. Největší hmotnostní úbytky byly zaznamenány u vzorků modifikovaných pomocí PEG400, kdy konkrétně u systému PLA/20%PEG400 došlo k uvolnění cca 17 % hmotnosti připraveného filmu.

Obecně lze tedy říci, že se zvyšující se koncentrací PEG dochází ke zvyšování hmotnostního úbytku a v závislosti s rostoucí molární hmotností se vyplavuje PEG do vodného prostředí méně. PEG400 difunduje do vodného prostředí lépe díky svým více pohyblivým molekulám než PEG6000. Stejných výsledků bylo dosaženo i ve studii [93].

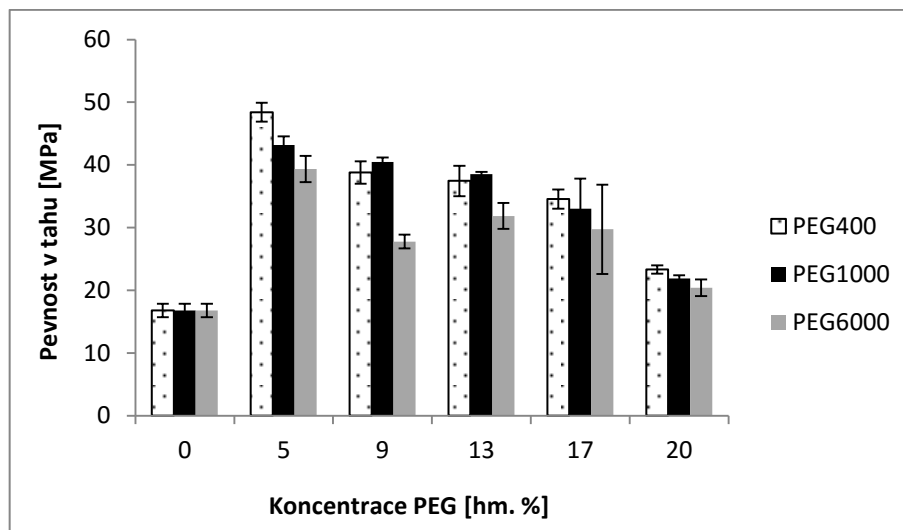


Obr. 28 Úbytek hmotnosti PLA/PEG filmů po 7 dnech ve vodě při 40 °C

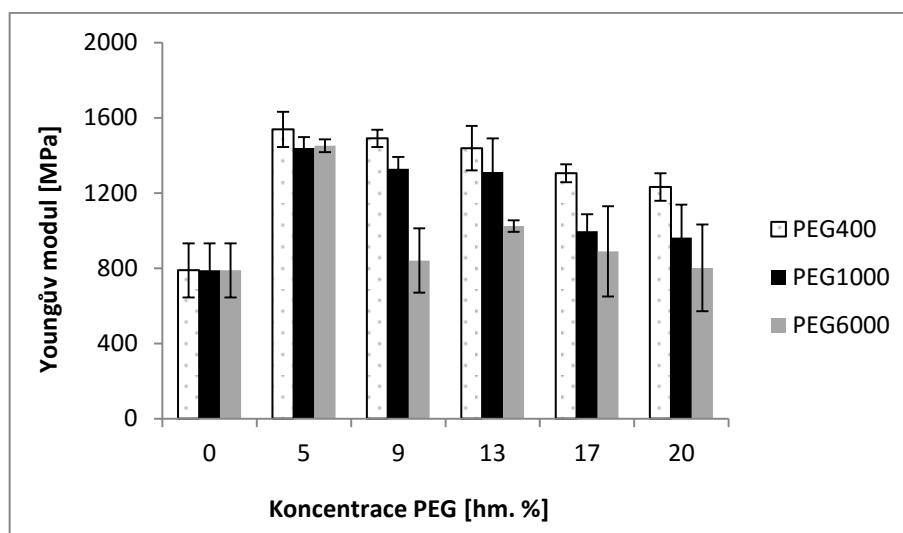
7.4 Mechanické vlastnosti

Mechanické vlastnosti modifikovaných polymerních systémů byly testovány pomocí statické zkoušky v tahu.

Vliv modifikací PEG na mechanické vlastnosti je znázorněn na Obr. 29 a 30, prostřednictvím závislosti Youngova modulu pružnosti (E) a pevnosti v tahu na koncentraci PEG. U obou měřených veličin došlo nezávisle na molekulové hmotnosti použitého PEG přídatkem 5 hm. % ke značnému nárůstu pevnosti v tahu i E (ze 788 na 1538 MPa), tato skutečnost je způsobena plastifikačními schopnosti PEG, nicméně s rostoucí koncentrací PEG docházelo ke snižování sledovaných veličin. V případě vzorků s 20 hm. % PEG došlo ke snížení na hodnoty blízké samotnému PLA. Dále bylo zjištěno, že nejnižší hodnoty charakterizující mechanické vlastnosti připravených filmů při porovnání MW použitých PEG byly naměřeny u PEG6000 a naopak nejvyšší u PEG400. Lze tedy konstatovat, že s rostoucí molekulovou hmotností PEG docházelo ke snížení pevnosti v tahu i E , což může být důsledek snižující se kompatibility s PLA. Výsledky se shodují se studií [93].



Obr. 29 Závislost pevnosti v tahu na koncentraci PEG



Obr. 30 Závislost Youngova modulu pružnosti na koncentraci PEG

7.5 Tepelné vlastnosti

Tepelné vlastnosti filmů PLA/PEG s koncentrací v rozmezí 0–20 hm. % byly analyzovány pomocí DSC. Byl hodnocen vliv koncentrace PEG na teplotu skelného přechodu (T_g) a teplotu tání (T_m) PLA/PEG filmů. Hodnoty T_g a T_m čistých komponent jsou uvedeny v Tab. 5. Teploty tání čistých komponent byly změřeny současně při měření připravených vzorků polymerních filmů a odpovídají informacím, které jsou uváděny v literatuře [94]. Hodnota teploty skelného přechodu byla námi změřena pouze u PLA, neboť T_g u PEG se nachází pod počáteční teplotou námi použité metody měření.

Tab. 5 Teploty skleného přechodu a tání čistých komponent

Materiál	T_g [°C]	T_m [°C]
PEG400	*	6,1
PEG1000	*	40,2
PEG6000	*	62,6
PLA	58,9	151,5

*nestanoveno

V Tab. 6 jsou hodnoty naměřených T_g před a po působení vodného prostředí. U připravených vzorků docházelo se zvyšující se koncentrací PEG ke snižování T_g. Tento výsledek je v souladu s teorií volného objemu, kdy s přibývajícím množstvím PEG a tedy zvyšováním volného objemu daného polymeru vzniká větší prostor pro pohyb segmentů a to se projeví snižováním teploty skelného přechodu [95].

Po působení vodného prostředí lze oproti vzorkům před rozpouštěním pozorovat zvýšení hodnot T_g systémů směrem k teplotě skelného přechodu PLA. Tyto výsledky tedy dokazují uvolňování PEG ze systému a shodují se tak s výsledky stanovení úbytku hmotnosti po rozpouštění.

Tab. 6 Teploty skelného přechodu před a po působení vodného prostředí

Před zkouškou	T_g [°C]	Po zkoušce	T_g [°C]
0%PEG	58,9	0%PEG	58,9
5%PEG400	45,3	5%PEG400	48,4
9%PEG400	35,3	9%PEG400	47,5
13%PEG400	28,0	13%PEG400	47,5
17%PEG400	19,6	17%PEG400	47,9
20%PEG400	12,8	20%PEG400	38,2
5%PEG1000	37,6	5%PEG1000	48,4
9%PEG1000	46,4	9%PEG1000	42,0
13%PEG1000	31,5	13%PEG1000	45,8
17%PEG1000	24,1	17%PEG1000	42,1
20%PEG1000	15,5	20%PEG1000	38,5
5%PEG6000	48,0	5%PEG6000	48,5
9%PEG6000	40,8	9%PEG6000	40,2
13%PEG6000	31,9	13%PEG6000	46,2
17%PEG6000	27,6	17%PEG6000	31,1
20%PEG6000	13,0	20%PEG6000	35,0

Hodnoty T_m jsou zaznamenány v Tab. 7 a 8. V prvním případě před působením vodného prostředí (Tab. 7) jsou u filmů, které byly modifikovány PEG1000 a PEG6000 a zvláště u vyšších koncentrací PEG patrné dvě teploty tání odpovídající tomuto polymeru (T_{m1}), zatímco u vzorků modifikovaných PEG400 byla na DSC křivce pozorována pouze endoterma tání PLA, T_{m2} . Bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací PEG dochází ke snižování T_m daných směsí (při téměř nezměněné entalpii tání), což ukazuje na ovlivnění kvality krystalických struktur PLA [95].

Tab. 7 Teploty tání a entalpie připravených PLA/PEG filmů před působením vodného prostředí

Vzorek	T_{m1} [°C]	ΔH [J.g ⁻¹]	T_{m2} [°C]	ΔH [J.g ⁻¹]
PLA	-	-	151,5	-24,6
5%PEG400	-	-	151,1	-25,2
9%PEG400	-	-	149,2	-24,9
13%PEG400	-	-	148,3	-24,6
17%PEG400	-	-	147,4	-23,7
20%PEG400	-	-	145,9	-18,7
5%PEG1000	-	-	152,5	-31,7
9%PEG1000	47,5	-1,2	151,1	-24,2
13%PEG1000	36,5	-5,8	150,4	-24,1
17%PEG1000	35,9	-8,1	150,2	-23,9
20%PEG1000	32,4	-13,7	146,4	-16,7
5%PEG6000	-	-	152,7	-29,4
9%PEG6000	44,8	-3,4	152,0	-26,8
13%PEG6000	42,0	-4,7	151,2	-24,9
17%PEG6000	51,4	-10,5	152,8	-23,9
20%PEG6000	42,9	-12,4	146,4	-18,0

Tab. 8 Teploty tání a entalpie připravených PLA/PEG filmů po působení vodného prostředí

Vzorek	T _{m1} [°C]	ΔH [J.g ⁻¹]	T _{m2} [°C]	ΔH [J.g ⁻¹]
PLA (0%PEG)	-	-	152,6	-34,3
5%PEG400	-	-	151,6	-28,8
9%PEG400	-	-	151,8	-28,5
13%PEG400	-	-	152,0	-29,0
17%PEG400	-	-	152,6	-29,6
20%PEG400	-	-	151,6	-24,0
5%PEG1000	-	-	151,6	-29,1
9%PEG1000	48,6	-1,4	152,0	-26,9
13%PEG1000	49,0	-0,5	151,0	-28,1
17%PEG1000	35,0	-0,8	151,5	-27,3
20%PEG1000	32,3	-1,1	151,8	-23,6
5%PEG6000	-	-	154,2	-30,0
9%PEG6000	43,6	-0,6	152,0	-28,4
13%PEG6000	39,1	-0,8	152,2	-29,9
17%PEG6000	46,4	-6,1	150,9	-31,0
20%PEG6000	46,4	-6,1	150,9	-22,9

7.6 Mikrobiologické testování

a) Difúzní testy

Difúzní testy byly provedeny proti grampozitivní bakterii *S. aureus* se vzorky obsahující 0,15 hm.% nisinu. V Tab. 9 jsou uvedeny průměry inhibičních zón jednotlivých vzorků. Vzorek PLA vykazoval nulovou inhibiční aktivitu, průměry inhibičních zón u vzorku PLA modifikovaného 20 hm.% PEG6000 byly 9,2±0,6 mm a u vzorku PLA/NIS 8,6±0,3 mm.

Tab. 9 Průměr inhibičních zón jednotlivých vzorků

Vzorek	1. [mm]	2. [mm]	3. [mm]	Průměr
PLA	0; 0; 0;	0; 0; 0;	0; 0; 0	0±0
PLA/PEG/NIS	10; 10; 9,8	9,2; 9; 8,8	8,8; 8,4; 8,6	9,2±0,6
PLA/NIS	8,6; 8,8; 9,2	8,4; 8,2; 8,2	8,8; 8,8; 8,6	8,6±0,3

b) Testy dle normy ISO 22196

Mikrobiologické testování dle normy ISO 22196 probíhalo u vzorků s různou koncentrací nisinu. Získané výsledky antimikrobiální aktivity a účinnosti jsou zaznamenány v Tab. 10–18. Bylo ověřeno, že přítomnost NaCl ani samotného PEG ve vzorcích PLA antibakteriální aktivitu neovlivňují (Tab. 10).

Tab. 10 Vliv PEG a NaCl na antibakteriální aktivitu (R) vzorků proti *S. aureus*

Vzorek	CFU.cm ⁻²	R	Účinnost [%]
PLA	3,5E+04	-	-
PLA + NaCl	5,4E+05	<0	0
PLA + 20 % PEG6000	5,9E+04	<0	0

S největší koncentrací nisinu 0,15 hm. % bylo antimikrobiální testování prováděno proti mikroorganismům *Staphylococcus aureus* (Tab. 11), *Listeria monocytogenes* (Tab. 12) a *Escherichia coli* (Tab. 13).

Tab. 11 Výsledky antibakteriálního testování proti *S. aureus*

Vzorek	CFU.cm ⁻²	R	Účinnost [%]
PLA	1,1E+04	-	-
PLA + 0,15 % NIS	0	4,0	100
PLA + 20 % PEG6000 + 0,15 % NIS	0	4,0	100

Tab. 12 Výsledky antibakteriálního testování proti *L. monocytogenes*

Vzorek	CFU.cm ⁻²	R	Účinnost [%]
PLA	2,7E+01	-	-
PLA + 0,15 % NIS	0	1,4	100
PLA + 20 % PEG6000 + 0,15 % NIS	5,0E-1	<1,4	<100

Tab. 13 Výsledky antibakteriálního testování proti *E. coli*

Vzorek	CFU.cm ⁻²	R	Účinnost [%]
PLA	7,0E+04	-	-
PLA + 0,15 % NIS	3,6E+05	<0	0
PLA + 20 % PEG6000 + 0,15 % NIS	1,8E+04	0,6	12,5

Ze získaných výsledků lze konstatovat vynikající antibakteriální vlastnosti připravených filmů proti oběma testovaným grampozitivním bakteriím (Tab. 11 a 12). Účinnost proti gramnegativní *E. coli* (Tab. 13) prokázána nebyla, což je v souladu s literaturou [57]. Další testování probíhalo se vzorky s koncentrací nisinu 0,05 hm. % a to proti *S. aureus* (Tab. 14) a *L. monocytogenes* (Tab. 15).

Tab. 14 Výsledky antibakteriálního testování proti *S. aureus*

Vzorek	CFU.cm ⁻²	R	Účinnost [%]
PLA	2,2E+03	-	-
PLA + 0,05 % NIS	2,8E+00	2,9	87,9
PLA + 20 % PEG6000 + 0,05 % NIS	0,0E+00	3,3	100

Tab. 15 Výsledky antibakteriálního testování proti *L. monocytogenes*

Vzorek	CFU.cm ⁻²	R	Účinnost [%]
PLA	2,7E+01	-	-
PLA + 0,05 % NIS	0,0E+00	1,4	100
PLA + 20 % PEG6000 + 0,05 % NIS	1,0E+00	<1,4	<100

Jelikož výsledky tohoto testování byly také příznivé, přistoupilo se ještě ke snížení koncentrace na 0,02 hm. % nisinu. Výsledky tohoto testování jsou shrnuty v Tab. 16 a 17. Taková koncentrace nisinu již ale nedokázala inhibovat růst bakterií, a proto se koncentrace nisinu ve vzorcích již dále nesnižovala.

Tab. 16 Výsledky antibakteriálního testování proti *S. aureus*

Vzorek	CFU.cm ⁻²	R	Účinnost [%]
PLA	2,7E+04	-	-
PLA + 0,02 % NIS	5,6E+04	0	0
PLA + 20 % PEG6000 + 0,02 % NIS	3,3E+04	0	0

Tab. 17 Výsledky antibakteriálního testování proti *L. monocytogenes*

Vzorek	CFU.cm ⁻²	R	Účinnost [%]
PLA	3,3E+03	-	-
PLA + 0,02 % NIS	4,0E+00	2,9	82,9
PLA + 20 % PEG6000 + 0,02 % NIS	5,0E+00	2,8	80

Pro zjištění stability nisinu v připravených filmech byly provedeny testy antimikrobiální aktivity se vzorky s obsahem nisinu 0,15 hm. % a 0,05 hm. % po 6 měsících od výroby fólií. Testovaným mikroorganismem byl *S. aureus* a výsledky jsou shrnuty v Tab. 18.

Tab. 18 Výsledky antibakteriálního testování proti *S. aureus* po 6 měsících

Vzorek	CFU.cm ⁻²	R	Účinnost [%]
PLA	1,2E+06	-	-
PLA + 0,15 % NIS	8,2E+03	2,1	34
PLA + 20 % PEG6000 + 0,15 % NIS	0	6,1	100
PLA	1,2E+06	-	-
PLA + 0,05 % NIS	9,1E+04	1,1	18
PLA + 20 % PEG6000 + 0,05 % NIS	0	6,1	100

Při porovnání výsledků antibakteriálního testování v Tab. 11 a 14 s Tab. 18 je patrné, že ani po 6 měsících od výroby filmů nedošlo ke snížení antibakteriální aktivity. U filmů PLA modifikovaných 20 hm. % PEG 6000 zůstala zachována 100% účinnost, zatímco u filmů bez přítomnosti PEG došlo po 6 měsících k poměrně výrazné redukci antibakteriální aktivity.

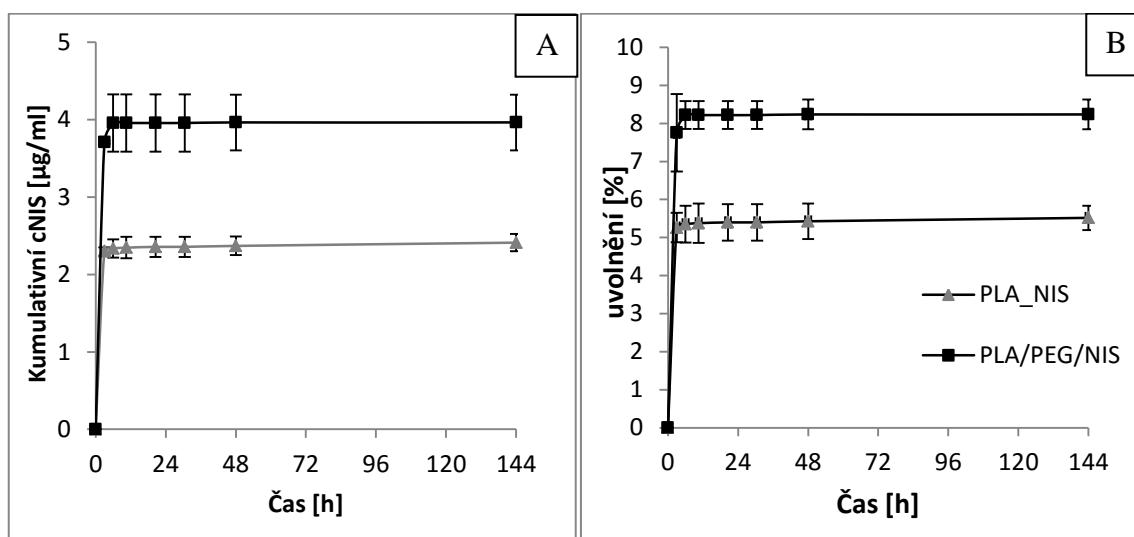
7.7 Kinetika uvolňování nisinu

Kinetika uvolňování nisinu do 0,02 M HCl při 37 °C byla hodnocena pomocí HPLC.

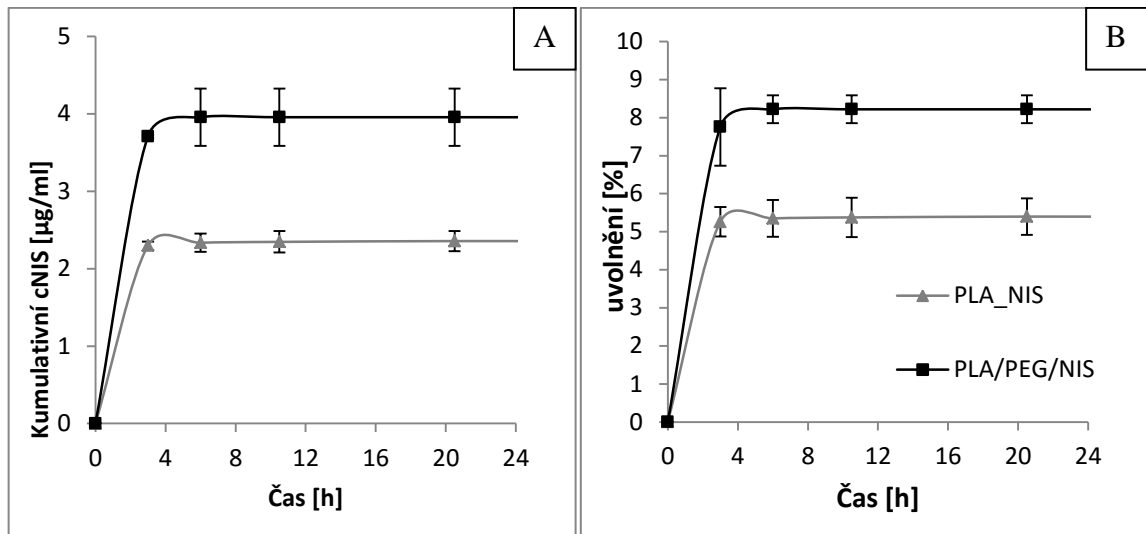
Na Obr. 31 je zaznamenána závislost kumulativní koncentrace nisinu (A) a celkově uvolněného nisinu (B) na čase. Pro názornost je na Obr. 32 zobrazeno prvních 24 hodin experimentu. Z těchto obrázků je zřejmé, že modifikací PLA pomocí PEG došlo ke zvýšení účinnosti uvolnění nisinu v porovnání se vzorky samotné matrice PLA s nisinem.

Z Obr. 31 byly zjištěny směrnice přímk. V případě výsledku stanovení % uvolnění nisinu ze vzorku PLA/NIS byla směrnice 1,7 a u vzorku PLA/PEG/NIS byla tato směrnice 2,3. Z uvedených směrnic vyplývá, že modifikací PEG bylo uvolnění nisinu z polymerní matrice PLA dvakrát rychlejší.

Při delších časech testování by působením vodného prostředí docházelo k hydrolyze PLA [96]. Narušení struktury polymerní matrice by způsobilo další uvolnění PEG a nisinu.



Obr. 31 Závislost kumulativní koncentrace nisinu (A) a uvolnění nisinu (B) na čase odběru vzorku pro HPLC analýzu



Obr. 32 Závislost kumulativní koncentrace nisinu (A) a uvolnění nisinu (B) na čase odběru vzorku pro HPLC analýzu (24 hodin)

8 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce byla příprava a charakterizace binárního polymerního systému na bázi PLA/PEG a imobilizace bakteriocinu nisinu do tohoto systému. U připravených filmů byl studován vliv koncentrace (0–20 hm. %) a molekulové hmotnosti PEG (MW 400–6000 g.mol⁻¹) na strukturní, mechanické a tepelné vlastnosti, stejně jako jejich degradační chování ve vodném prostředí a v neposlední řadě byla hodnocena také jejich antibakteriální aktivita a kinetika uvolňování.

Bylo zjištěno, že s rostoucí MW a koncentrací PEG docházelo ke snížení pevnosti v tahu, Youngova modulu, teploty skelného přechodu i teploty tání. S rostoucí koncentrací PEG docházelo ke zvýšení úbytku hmotnosti při rozpouštění ve vodném prostředí a u vzorků modifikovaných 20 hm. % PEG byla po rozpouštění ve vodném prostředí dobře pozorovatelná pórovitá struktura, která je žádoucí pro imobilizaci biologicky aktivních látek.

Pro imobilizaci nisinu byl zvolen systém PLA modifikovaný 20 hm. % PEG6000. U připravených vzorků byly provedeny difúzní testy a antibakteriální testování podle normy ISO 22196. Difúzní testy byly provedeny proti grampozitivní bakteriální kolonii *S. aureus* se vzorky obsahující 0,15 % nisinu. Průměry inhibičních zón u vzorku PLA modifikovaného 20 hm.% PEG 6000 s nisinem byly 9,2±0,6 mm a u vzorku PLA s nisinem 8,6±0,3 mm. Modifikací polymerní matrice PLA pomocí PEG došlo ke vzniku větších inhibičních zón.

Testování podle normy ISO 22196 bylo prováděno se vzorky s postupně se snižující koncentrací nisinu (0,15; 0,05 a 0,02 hm.%). V první řadě bylo ověřeno, že přítomnost NaCl ani samotného PEG ve vzorcích antibakteriální aktivitu neovlivňují. Výsledky testování prokázaly antibakteriální vlastnosti filmů s obsahem nisinu alespoň 0,05 hm.% proti oběma testovaným grampozitivním bakteriím *S. aureus* i *L. monocytogenes*. Účinnost proti gramnegativní *E. coli* prokázána nebyla.

Při testování kinetiky uvolňování nisinu bylo zjištěno, že modifikací PLA pomocí PEG došlo ke dvojnásobnému zvýšení rychlosti a především pak zvýšení účinnosti uvolnění biologicky látky. Tato uvolňovací studie může být využita ve zdravotnictví či farmacii. Pro další popis zkoumaných systémů se doporučuje stanovení vlivu MW PEG a jeho koncentrace na kinetiku uvolňování nisinu v širším koncentračním rozmezí, což umožní optimalizaci složení a vlastností daného systému.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SMITH, Ray. *Biodegradable polymers for industrial applications*. Boca Raton: CRC Press, c2005. ISBN 0-8493-3466-7.
- [2] CHANDRA, R. Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*. 23(7), 1273-1335. DOI: 10.1016/S0079-6700(97)00039-7. ISSN 00796700. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670097000397>.
- [3] BABAK, Ghanbarzadeh, (2013) *Biodegradable Polymers*, Biodegradation – Life of Science, Dr. Rolando Chamy (Ed.), ISBN: 978-953-51-1154-2, InTech, DOI: 10.5772/56230.
- [4] KLÁSEK, Antonín. *Nauka o polymerech II: biopolymery*. Vyd. 1. Praha: SNTL, 1980, 115 s.
- [5] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2., opr. vyd. Praha: Academia, 1996, 186, 134, 191 s. ISBN 80-200-0600-1.
- [6] OBRUČA, Stanislav. Polyhydroxyalkanoáty – „plasty“ vyráběné bakteriemi. ChemPoint: Vědci pro průmysl a praxi [online]. 2011 [cit. 2015-11-13]. Dostupný z: <http://www.chempoint.cz/obruca-1>
- [7] BLACKBURN, R.S., et al. *Biodegradable and sustainable fibres*. 2005. Cambridge: Woodhead Publishing Limited. ISBN 18-557-3916-X.
- [8] DOMB, A, Joseph KOST a David M WISEMAN. *Handbook of biodegradable polymers*. Amsterdam: OPA, 1997. ISBN 9057021536.
- [9] INKINEN, Saara; HAKKARAINEN, Minna; ALBERTSSON, Ann-Christine; SÖDERGÅRD, Anders. From Lactic Acid to Poly(lactic Acid) (PLA): Characterization and Analysis of PLA and Its Precursors. *Biomacromolecules*. 2011, vol. 12, no. 3 s. 523-532. ISSN:1525-7797.
- [10] WOLF, Oliver et al. *Techno-economic Feasibility of Largescale Production of Bio based Polymers in Europe*. Technical Report EUR 22103 EN, 2005, ISBN 92-79-01230-4.
- [11] SIN, Lee Tin, Abdul Razak RAHMAT a Wan Aizan Wan Abdul RAHMAN. *Poly(lactic acid): PLA biopolymer technology and applications*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier/William Andrew, 2012. Plastics design library. ISBN 978-1-4377-4459-0.

- [12] KRICHELDORF, Hans Rytger, O NUYNEN a Graham SWIFT. *Handbook of polymer synthesis*. 2nd ed. /. New York: Marcel Dekker, c2005. ISBN 9781420030594. Dostupné také z: <http://marc.crcnetbase.com/isbn/9781420030594>.
- [13] NODA, Masaki; OKUYAMA, Hisashi. Thermal Catalytic Depolymerization of Poly(L-lactic Acid) Oligomer into LL-lactide: Effects of Al, Ti, Zn and Zr Compounds as Catalysts. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1999, vol. 47, no. 4 s. 467-471. ISSN:0009-2363.
- [14] TUOMINEN, Jukka. *Chain Linked Lactic Acid Polymers: Polymerization and Biodegradation Studies*. 2003. 54 s. Helsinki University of Technology. Dizertační práce. [cit. 2015-11-13] Dostupný z: <http://lib.tkk.fi/Diss/2003/isbn951226403X/isbn951226403X.pdf>
- [15] PETRUŠ, J. Kyselina polymléčná nejen jako biodegradabilní polymer. ChemPoint: Vědci pro průmysl a praxi [online]. 2011 [cit. 2012-11-06]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/kyselina-polymlecna-nejen-jako-biodegradabilni-polymer>
- [16] NEČAS, Oldřich. 2000. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3. přeprac. vyd., V nakl. H. Jinočany: H. ISBN 80-860-2246-3.
- [17] *Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity* [online]. 2011. [cit. 2016-05-13]. Dostupné z: <http://www.sci.muni.cz/>
- [18] BENEŠ, Jiří, Jaroslava KYMPLOVÁ a František VÍTEK. *Základy fyziky pro lékařské a zdravotnické obory: pro studium i praxi*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2015. ISBN 978-80-247-4712-5.
- [19] KODÍČEK, Milan a Vladimír KARPENKO. *Biofyzikální chemie*. Vyd. 3., opr. a rozš. Praha: Academia, 2013. ISBN 978-80-200-2241-7.
- [20] KODÍČEK, Milan, Olga VALENTOVÁ a Radovan HYNEK. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2015. ISBN 978-80-7080-927-3.
- [21] NARAYANAN, Niju; ROYCHOUDHURY, Pradip K; SRIVASTAVA, Aradhana. L (+) Lactic Acid Fermentation and Its Product Polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2004, vol. 7, no. 2 s. 167-1U2. ISSN:0717-3458.
- [22] SHOICHET, Molly S. Polymer Scaffolds for Biomaterials Applications. *Macromolecules* [online]. 2010-01-26, roč. 43, č. 2, s. 581-591 [cit. 2016-05-05]. DOI: 10.1021/ma901530r. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma901530r>

- [23] BRANNON-PEPPAS L., 1997: Polymers in controlled drug delivery: *Medical Plastics and Biomaterials Magazine*. Databáze online [cit. 2016-05-05]. Dostupné na: <http://www.mddionline.com/article/polymers-controlled-drug-delivery>
- [24] MITSUI, Takeo. *New Cosmetic Science*. New York: Elsevier Science, 1997. ISBN 04-448-2654-8.
- [25] BARAN, Robert a Howard I. MAIBACH. *Textbook of Cosmetic Dermatology*. 3rd ed. London: Taylor & Francis, 2005. ISBN 18-418-4311-3.
- [26] LANGMAIER, Ferdinand. *Základy kosmetických výrob*. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 160 s. ISBN 80-731-8016-2.
- [27] KVASNIČKOVÁ, Alexandra. Obaly na bázi obnovitelných zdrojů. Agronavigator [online]. 2006, č. 51 267 [cit. 2016-05-05]. Dostupný z WWW: <http://www.gate2biotech.cz/obaly-na-bazi-obnovitelnych/>
- [28] KVASNIČKOVÁ, Alexandra. Gate2biotech. Potravinové obaly mohou chránit a informovat spotřebitele [online]. 2007 [cit. 2016-05-05]. Dostupný z WWW: <http://www.gate2biotech.cz/potravinove-obaly-chrani-informuji-spotrebitele/>
- [29] SEDLAŘÍK, Vladimír, (2013) *Antimicrobial Modifications of Polymers*, Biodegradation – Life of Science, Dr. Rolando Chamy (Ed.), ISBN: 978-953-51-1154-2, InTech, DOI: 10.5772/56222.
- [30] KENAWY, El-Rafaie; WORLEY, S.D; BROUGHTON, Roy. The Chemistry and Applications of Antimicrobial Polymers: A State-of-the-art Review. *Biomacromolecules*. 2007, vol. 8, no. 5 s. 1359-1384. ISSN:1525-7797.
- [31] PAULSON, Daryl S. *Handbook of topical antimicrobials: industrial applications in consumer products and pharmaceuticals*. New York: Marcel Dekker, c2003. ISBN 0-8247-0788-5.
- [32] VOJDANI, F.; TORRES, J. A. Potassium sorbate permeability of methylcellulose and hydroxypropyl methylcellulose multi-layer films. *Journal of Processing and Preservation*. 2007, roč. 6, č. 13, s. 417 – 430.
- [33] MOKREJŠ, P. *Aplikace přírodních polymerů*. Vyd. 2. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2009. 157 s.
- [34] GOLLWITZER, H. Antibacterial poly(D,L-lactic acid) coating of medical implants using a biodegradable drug delivery technology. *Journal of Antimicrobial*

- Chemotherapy*. 51(3), 585-591. DOI: 10.1093/jac/dkg105. ISSN 14602091. Dostupné také z: <http://www.jac.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/jac/dkg105>
- [35] LEWIS, Kim; KLIBANOV, Alexander M. Surpassing Nature: Rational Design of Sterile-surface Materials. *Trends in Biotechnology*. 2005, vol. 23, no. 7 s. 343-348. ISSN:0167-7799.
- [36] WANG, San-Lang; CHIO, Sau-Hwa. Reversible Immobilization of Chitinase Via Coupling to Reversibly Soluble Polymer. *Enzyme and Microbial Technology*. 1998, vol. 22, no. 7 s. 634-640. ISSN:0141-0229.
- [37] KANAZAWA, Akihiko, Tomiki IKEDA a Takeshi ENDO. Novel polycationic biocides: Synthesis and antibacterial activity of polymeric phosphonium salts. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 31(2), 335-343. DOI: 10.1002/pola.1993.080310205. ISSN 0887624x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pola.1993.080310205>
- [38] GOLDBERG, S; DOYLE, R J; ROSENBERG, M. Mechanism of Enhancement of Microbial Cell Hydrophobicity by Cationic Polymers. *Journal of Bacteriology*. 1990, vol. 172, no. 10 s. 5650-5654. ISSN:0021-9193.
- [39] PAIK, James S; DHANASEKHARAN, Muthukumar; KELLY, Michael J. Antimicrobial Activity of UV-Irradiated Nylon Film for Packaging Applications. *Packaging Technology and Science*. 1998, vol. 11, no. 4 s. 179-187. ISSN:0894-3214.
- [40] LEE, Dong Sun, Kit L YAM a Luciano PIERGIOVANNI. *Food packaging science and technology*. Boca Raton: Taylor & Francis, 2008. ISBN 978-0-8247-2779-6.
- [41] COLES, Richard, Derek MCDOWELL a Mark J KIRWAN. *Food packaging technology*. Oxford: Blackwell Publ., 2003. ISBN 1841272213.
- [42] ROONEY, Michael L. *Active food packaging*. New York: Blackie Academic, 1995, 260 s. ISBN 07-514-0191-9.
- [43] ATEMA-SMIT, Jelly; WHITE, Don J; BUSSCHER, Henik; VAN DER MEI, Henderina; GEERTSEMA-DOORNBUSCH, Geessien; DE VRIES, Jacob. Surfactive and Antibacterial Activity of Cetylpyridinium Chloride Formulations in Vitro and in Vivo. *Journal of Clinical Periodontology*. 2008, vol. 35, no. 6 s. 547-554. ISSN:0303-6979.
- [44] Chemical properties of silver. Lenntech.com [online]. [cit. 2015-11-21]. Dostupné z: <http://www.lenntech.com/periodic/elements/ag.htm>

- [45] TOBLER, David, Lenna Warner. Nanotech silver fights microbes in medical devices. Mddionline.com [online]. May 2005. [cit. 2015-11-21]. Dostupné z: <http://www.mddionline.com/article/nanotech-silver-fights-microbes-medical-devices>
- [46] SEDLARIK, Vladimír; GALYA, Tsermaa; SEDLARIKOVA, Jana; VALASEK, Pavel; SAHA, Petr. The Effect of Preparation Temperature on the Mechanical and Antibacterial Properties of Poly(vinyl Alcohol)/silver Nitrate Films. *Polymer Degradation and Stability*. 2010, vol. 95, no. 3 s. 399-404. ISSN:0141-3910.
- [47] ACHARYA, Vinod; RATNA PRABHA, C; NARAYANAMURTHY, Chivukula. Synthesis of Metal Incorporated Low Molecular Weight Polyurethanes from Novel Aromatic Diols, Their Characterization and Bactericidal Properties. *Biomaterials*. 2004, vol. 25, no. 19 s. 4555-4562. ISSN:0142-9612.
- [48] HUH, Ae Jung; KWON, Young Jik. "Nanoantibiotics": A New Paradigm for Treating Infectious Diseases Using Nanomaterials in the Antibiotics Resistant Era. *Journal of Controlled Release*. 2011, vol. 156, no. 2 s. 128-145. ISSN:0168-3659.
- [49] GREENWOOD, David. *Lékařská mikrobiologie : přehled infekčních onemocnění : patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Vyd. 1. Praha: Grada Publishing, 1999. 686 s. ISBN 80-7169-365-0.
- [50] VOTAVA, Miroslav, et al. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Vyd. 2. Brno : Neptun, 2005. ISBN 80-86850-00-5.
- [51] LINCOVÁ, Dagmar, et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Vyd. 1. GALÉN, 2002. ISBN 80-7262-168-8.
- [52] TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L., *Microbiology an Introduction*, 9th ed., Pearson Benjamin Cummings, San Francisko, 2006.
- [53] GAJDŮŠEK, S., *Mlékařství II.*, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 1998, str. 34.
- [54] NES, Ingolf F; DIEP, Dzung Bao; HÅVARSTEIN, Leiv Sigve; BRURBERG, May Bente; EIJSINK, Vincent; HOLO, Helge. Biosynthesis of Bacteriocins in Lactic Acid Bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek, *International Journal of General and Molecular Microbiology*. 1996, vol. 70, no. 2-4 s. 113-128. ISSN:0003-6072.
- [55] CLEVELAND, Jennifer; MONTVILLE, Thomas J; NES, Ingolf F; CHIKINDAS, Michael L. Bacteriocins: Safe, Natural Antimicrobials for Food Preservation.

- International Journal of Food Microbiology*. 2001, vol. 71, no. 1 s. 1-20. ISSN:0168-1605.
- [56] CAPLICE, Elizabeth; FITZGERALD, Gerald F. Food Fermentations: Role of Microorganisms in Food Production and Preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 1999, vol. 50, no. 1 s. 131-149. ISSN:0168-1605.
- [57] LEROY, Frédéric; DE VUYST, Luc. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria to Combat Undesirable Bacteria in Dairy Products. *Australian Journal of Dairy Technology*. 2010, vol. 65, no. 3 s. 143-149. ISSN:0004-9433.
- [58] NAIDU, A. *Natural food antimicrobial systems*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2000, 818 s. ISBN 9781420039368.
- [59] AND, H. Chen; HOOVER, D.G. Bacteriocins and Their Food Applications. *Comprehensive Reviews. Food Science and Food Safety*. 2003, vol. 2, no. 3 s. 82-100. ISSN:1541-4337.
- [60] Význam a použití bakteriocinů [online]. [cit. 2007-12-2]. Dostupné na WWW: <http://www.gate2biotech.cz/vyznam-a-pouziti-bakteriocinu/>
- [61] HÉCHARD, Yann; SAHL, Hans-Georg. Mode of Action of Modified and Unmodified Bacteriocins from Gram-positive Bacteria. *Biochimie*. 2002, vol. 84, no. 5 s. 545-557. ISSN:0300-9084.
- [62] EVANGELIN Y., VENKATESWARULU T. C., BABU D. J., KASTURI K. (2015) Bacteriocins from lactic acid bacteria and its potential applications. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 32(1), s. 306-309.
- [63] ARAUZ, L.J., JOZALA, A.F., MAZZOLA, P.G., PENNA, T.Ch.V. Nizin biotechnological production and application: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 2009, vol. 20, s. 146-154.
- [64] CHAN, Weng C; BYCROFT, Barrie W; LIAN, Lu-Yun; ROBERTS, Gordon C.K. Isolation and Characterisation of Two Degradation Products Derived from the Peptide Antibiotic Nisin. *FEBS Letters*. 1989, vol. 252, no. 1 s. 29-36. ISSN:0014-5793.
- [65] PIPER, Clare; HILL, Colin; COTTER, Paul D; ROSS, R. Paul. Bioengineering of a Nisin A-producing *Lactococcus Lactis* to Create Isogenic Strains Producing the Natural Variants Nisin F, Q and Z. *Microbial Biotechnology*. 2011, vol. 4, no. 3 s. 375-382. ISSN:1751-7915.

- [66] PEREZ, Rodney, Maria Teresa PEREZ a Francisco ELEGADO. 2015. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: A Review of Biosynthesis, Mode of Action, Fermentative Production, Uses, and Prospects. *International Journal of Philippine Science and Technology*. **8**(2), 61-67. ISSN 2449-3767.
- [67] JIN, T; ZHANG, H. Biodegradable Polylactic Acid Polymer with Nisin for Use in Antimicrobial Food Packaging. *Journal of Food Science*. 2008, vol. 73, no. 3 s. M127-M134. ISSN:0022-1147.
- [68] IMRAN, M; KLOUJ, A; REVOL-JUNELLES, AM; DESOBRY, S. Controlled Release of Nisin from HPMC, Sodium Caseinate, Poly-lactic Acid and Chitosan for Active Packaging Applications. *Journal of Food Engineering*. 2014, vol. 143 s. 178-185. ISSN:0260-8774.
- [69] JI, SW; LU, J; LIU, ZG; SRIVASTAVA, D; SONG, A; LIU, Y; LEE, I. 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*. 2014, vol. 423 s. 85-93. ISSN:0021-9797.
- [70] SCAFFARO, Roberto, Luigi BOTTA, Sandra MARINEO a Anna Maria PUGLIA. 2011. Incorporation of Nisin in Poly (Ethylene-Co-Vinyl Acetate) Films by Melt Processing: A Study on the Antimicrobial Properties. *Journal of Food Protection*. **74**(7), 1137-1143. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-10-383. ISSN 0362028x. Dostupné také z: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article>
- [71] HRABALIKOVA, Martina; HOLCAPKOVA, Pavlina; SULY, Pavol; SEDLARIK, Vladimir. Immobilization of Bacteriocin Nisin into a Poly(vinyl Alcohol) Polymer Matrix Crosslinked with Nontoxic Dicarboxylic Acid. *Journal of Applied Polymer Science*. 2016, vol. 133, no. 28. ISSN:0021-8995.
- [72] PEREZ, R.H., ZENDO, T., SONOMOTO, K. Novel Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria (LAB): Various Structures and Applications. *Microbial Cell Factories*. 2014, 13(Suppl 1), 3-12.
- [73] THOREL, J. N. Topical Cosmetic or Pharmaceutical Compositions, Containing Nisin as Non-irritating Preservative Having Broad Antimicrobial Spectrum, Also Effective Against Greasy Skin and Acne. Patent, FR2847165 (A1). 2004-05-21.
- [74] ČSN EN ISO 527-2. Plasty – Stanovení tahových vlastností - Část 2: Zkušební podmínky pro tvářené plasty. 1998. 16 s.

- [75] Mechanické vlastnosti polymerů – statické namáhání. *Publi* [online]. [cit. 2016-05-15]. Dostupné z: <https://publi.cz/books/180/09.html>
- [76] ŠTARHA, P., TRÁVNÍČEK, Z. Termická analýza. [online]. Olomouc, 2011 [cit. 2016-02-02]. Dostupné z: http://agch.upol.cz/userfiles/file/pdf/Termicka_analyza.pdf
- [77] EHRENSTEIN, Gottfried W.; RIEDEL, Gabriela; TRAWIEL, Pia. *Thermal Analysis of Plastics: Theory and Practice*. Munich: Hanser Publishers, 2004. 367 s. ISBN 1-56990-362-X.
- [78] Diferenciální skenovací kalorimetrie. *Katedra strojírenské technologie: Technická univerzita v Liberci* [online]. [cit. 2016-05-15]. Dostupné z: http://www.ksp.tul.cz/cz/kpt/obsah/vyuka/stud_materialy/vip/p4/DSC.pdf
- [79] *Differential scanning calorimetry* [online]. 2005. The University of Southern Mississippi [cit. 2016-05-13]. Dostupné z: <http://pslc.ws/macrog/dsc.htm>
- [80] VONDRÁČEK, Petr. *Metody studia a charakterizace struktury polymerů*. Vyd. 1. Praha: VŠCHT, 1988. 235 s.
- [81] SUN, Da-Wen. *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control*. 1st ed. Amsterdam: Academic Press/Elsevier, 2009. ISBN 9780123741363. Dostupné také z: http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpISFQAC0I/infrared_spectroscopy_for_food_quality_analysis_and_control.
- [82] Fourier transform infrared spectroscopy. 2011. *Wikipedia: The Free Encyclopedia* [online]. [cit. 2016-05-13]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Fourier_transform_infrared_spectroscopy
- [83] WEINSTOCK, B. André; GUINEY, Linda M; LOOSE, Christopher. Rapid, Nondestructive Estimation of Surface Polymer Layer Thickness Using Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared (ATR FT-IR) Spectroscopy and Synthetic Spectra Derived from Optical Principles. *Applied Spectroscopy*. 2012, vol. 66, no. 11 s. 1311-1319. ISSN:0003-7028.
- [84] Flüssigkeitsanalyse mit ATR-Infrarotspektroskopie. *Axetris AG* [online]. [cit. 2016-05-13]. Dostupné z: <https://www.axetris.com/de-fr/irs/industrie-und-sicherheit/fluessigkeitsanalyse-mit-atr-infrarotspektroskopie>
- [85] SOCRATES, G. *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts*. 3rd ed. Chichester: Wiley, c2001. ISBN 0-471-85298-8.

- [86] LEVRINI, Luca; BENEDETTO, Giulia Di; RASPANTI, Mario. Dental Wear: A Scanning Electron Microscope Study. *BioMed Research International*. 2014, vol. 2014 s. 1-7. ISSN:2314-6133.
- [87] Nebuněčné formy života, elektronové mikroskopy. *VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie: Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat* [online]. [cit. 2016-05-13]. Dostupné z: [http://mmp.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-
nebunecne_formy_zivota&lang=cz](http://mmp.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-nebunecne_formy_zivota&lang=cz)
- [88] ISO 22196:2007 (E). *Plastics: Measurements of antibacterial activity on plastic surfaces*. Tokyo : Society of Industrial technology for Antimicrobial Articles, 2007. 16 s.
- [89] Antimicrobial Susceptibility Testing of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae*. 2015. *Centers for Disease Control and Prevention* [online]. [cit. 2016-05-15]. Dostupné z: <http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt11-antimicrobial-suscept-testing.html>
- [90] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Vyd. 1. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [91] Liquid Chromatography. Universität Bremen: Zentrum für Umweltforschung und Umwelttechnologie [online]. Bremen. 2003. [cit. 2016-05-13]. Dostupné z: <http://chem.uft.uni-bremen.de/Chromatography/chrom065.htm>
- [92] UTRACKI, Leszek A. *Commercial Polymer Blends*. London: Chapman & Hall, 1998. ISBN 0412810204.
- [93] MOHAPATRA, Aswini Kumar, S. MOHANTY a S.K. NAYAK. 2014. Effect of PEG on PLA/PEG blend and its nanocomposites: A study of thermo-mechanical and morphological characterization. *Polymer Composites*. **35**(2), 283-293. DOI: 10.1002/pc.22660. ISSN 02728397. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pc.22660>
- [94] Polyethylene glycol [MAK Value Documentation, 1998]. 2002. *The MAK-Collection for Occupational Health and Safety*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, 248. DOI: 10.1002/3527600418.mb2532268kske0010. ISBN 3527600418. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/3527600418.mb2532268kske0010>
- [95] SEDLAŘÍK, Vladimír, Nabanita SAHA, Ivo KUŘITKA a Petr SÁHA. 2006. Preparation and Characterization of Poly (vinyl alcohol)/Lactic Acid Compounded

Polymeric Films. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*. **11**(4), 253-270. DOI: 10.1080/10236660600750190. ISSN 1023-666x. Dostupné také z:

<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10236660600750190>

- [96] STLOUKAL, Petr; KUCHARCZYK, Pavel; SEDLAŘÍK, Vladimír; BAŽANT, Pavel; KOUTNÝ, Marek. 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*. 2012.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

PLA	Polymer kyseliny mléčné
PEG	Polyethylen glykol
PHA	Polyhydroxyalkonát
PGA	Polyglykolová kyselina
PCL	Polykaprolakton
PBS	Polybutylensukcinát
PBSA	Polybutylensukcinát adipát
LA	Kyselina mléčná
ROP	Ring-Opening Polymerization
PE	Polyethylen
PET	Polyethylentereftalát
LDPE	Nízkohustotní polyethylen
PBT	Polybutylentereftalát
ATP	Adenosintrifosfát
ADP	Adenosindifosfát
P	Fosfát
Na	Sodík
K	Draslík
Hm.%	Hmotnostní procenta
UV	Ultrafialový
Ag	Stříbro
Zn	Zinek
ZnO	Oxid zinečnatý
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MBC	Minimální baktericidní koncentrace

kDa	Kilodalton
HPMC	Hydroxypropyl methylcelulóza
SC	Kaseinát sodný
PVAC	Polyvinylacetát
EVA	Etylvinylacetát
MW	Molekulová hmotnost
DSC	Diferenciální skenovací kalorimetrie
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fouierovou transformací
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
NaCl	Chlorid sodný
E	Youngův modul pružnosti
T _g	Teplota skelného přechodu
T _c	Teplota krystalizace
T _m	Teplota tání
IR	Infračervená oblast
NIR	Near-infrared region
MIR	Mid-infrared region
FIR	Far-infrared region
CFU.ml ⁻¹	Počet bakterií schopných tvořit kolonie na mililitr
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
TFAA	Trifluoroctová kyselina
HCl	Kyselina chlorovodíková
NIS	Nisin

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1</i> Strukturní vzorec amylozy a amylopektinu [3].....	13
<i>Obr. 2</i> Strukturní vzorec celulózy [3]	13
<i>Obr. 3</i> Strukturní vzorec chitinu a chitosanu [3].....	15
<i>Obr. 4</i> PHA ve formě granulí uvnitř buněk [6]	16
<i>Obr. 5</i> Chemická struktura PLA [3]	18
<i>Obr. 6</i> Stereoisomery laktidu [7]	19
<i>Obr. 7</i> Syntéza PLA pomocí ROP [15]	21
<i>Obr. 8</i> Chemická struktura PGA [3]	22
<i>Obr. 9</i> Chemická struktura PCL [3]	22
<i>Obr. 10</i> Strukturní vzorec PBS [3]	23
<i>Obr. 11</i> Strukturní vzorec PBSA [3]	23
<i>Obr. 12</i> Schéma pasivního a aktivního transportu mezi buňkou a okolním prostředím [17]	25
<i>Obr. 13</i> Struktura nisinu A [65].....	38
<i>Obr. 14</i> Typické deformační křivky polymerů v tahu [75]	45
<i>Obr. 15</i> Schéma principu metody DSC [78]	45
<i>Obr. 16</i> DSC křivka [79]	46
<i>Obr. 17</i> Schéma metody FTIR [82]	47
<i>Obr. 18</i> schéma ATR [84].....	48
<i>Obr. 19</i> Směr pohybu elektronů v elektronovém mikroskopu (SEM) [87]	49
<i>Obr. 20</i> Schéma difúzní diskové metody [89]	50
<i>Obr. 21</i> Schéma HPLC systému [91].....	52
<i>Obr. 22</i> Kalibrační přímka nisinu.....	53
<i>Obr. 23</i> Chromatogram kalibračních roztoků nisinu	54
<i>Obr. 24</i> SEM analýza PLA (A) a PLA/20%PEG6000 (B) v lomu po působení vodního prostředí.....	56
<i>Obr. 25</i> SEM analýza PLA/NIS (A) a PLA/20%PEG6000/NIS (B) v lomu po působení vodního prostředí.....	57
<i>Obr. 26</i> FTIR-ATR spektrum čistých komponent pro přípravu polymerních filmů	58
<i>Obr. 27</i> ATR-FTIR spektra filmů PLA/PEG6000 1 – 5% PEG6000, 2 – 9% PEG6000,	59
<i>Obr. 28</i> Úbytek hmotnosti PLA/PEG filmů po 7 dnech ve vodě při 40 °C	60

<i>Obr. 29 Závislost pevnosti v tahu na koncentraci PEG.....</i>	<i>61</i>
<i>Obr. 30 Závislost Youngova modulu pružnosti na koncentraci PEG.....</i>	<i>61</i>
<i>Obr. 31 Závislost kumulativní koncentrace nisinu (A) a uvolnění nisinu (B) na čase odběru vzorku pro HPLC analýzu.....</i>	<i>68</i>
<i>Obr. 32 Závislost kumulativní koncentrace nisinu (A) a uvolnění nisinu (B) na čase odběru vzorku pro HPLC analýzu (24 hodin)</i>	<i>69</i>

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1 Kompozice pro přípravu filmů</i>	44
<i>Tab. 2 Vlnočty charakteristických píků PLA v IR spektru [85]</i>	48
<i>Tab. 3 Gradient metody pro stanovení nisinu</i>	53
<i>Tab. 4 Navážky vzorků pro uvolňování a koncentrace uvolněného nisinu</i>	54
<i>Tab. 5 Teploty skleného přechodu a tání čistých komponent</i>	62
<i>Tab. 6 Teploty skelného přechodu před a po působení vodného prostředí</i>	62
<i>Tab. 7 Teploty tání a entalpie připravených PLA/PEG filmů před působením vodného prostředí</i>	63
<i>Tab. 8 Teploty tání a entalpie připravených PLA/PEG filmů po působení vodného prostředí</i>	64
<i>Tab. 9 Průměr inhibičních zón jednotlivých vzorků</i>	65
<i>Tab. 10 Vliv PEG a NaCl na antibakteriální aktivitu (R) vzorků proti S. aureus</i>	65
<i>Tab. 11 Výsledky antibakteriálního testování proti S. aureus</i>	65
<i>Tab. 12 Výsledky antibakteriálního testování proti L. monocytogenes</i>	66
<i>Tab. 13 Výsledky antibakteriálního testování proti E. coli</i>	66
<i>Tab. 14 Výsledky antibakteriálního testování proti S. aureus</i>	66
<i>Tab. 15 Výsledky antibakteriálního testování proti L. monocytogenes</i>	66
<i>Tab. 16 Výsledky antibakteriálního testování proti S. aureus</i>	67
<i>Tab. 17 Výsledky antibakteriálního testování proti L. monocytogenes</i>	67
<i>Tab. 18 Výsledky antibakteriálního testování proti S. aureus po 6 měsících</i>	67

