

# Význam zeinu jako nosiče aktivních látek

Markéta Schuchová

---

Bakalářská práce  
2018



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky  
akademický rok: 2017/2018

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Markéta Schuchová**  
Osobní číslo: **T15199**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie výroby tuků, kosmetiky a detergentů**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Význam zeinu jako nosiče aktivních látek**

Zásady pro vypracování:

### Teoretická část:

1. Klasifikujte proteiny se zaměřením na zein, jeho původ, strukturu, vlastnosti, aplikace.
2. Charakterizujte aktivní látky s potenciálem zabudování do zeinového nosiče.

### Praktická část:

1. Připravte systémy na bázi zeinu a aktivních látek a sledujte vliv modifikace na výsledné fyzikální a antimikrobiální vlastnosti. Dosažené výsledky diskutujte.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] WALSH, G. Proteins-Biochemistry and Biotechnology, John Willey Sons,2014, ISBN 978-0-470-66985-3. USA.
- [2] LAWTON, J. W. Zein: A History of Processing and Use. Cereal Chemistry 2002, 79, 118.
- [3] YONG, Z., LILI, C., XIAOXIA, Ch. a kol. Zein-based Films and Their Usage for Controlled Delivery: Origin, Classes and Current Landscape. Journal of Controlled Release 2015, 206, 206219.
- [4] ANDERSON, T. J., LAMSAL, B. P. Zein Extraction from Corn, Corn Products, and Coproducts and Modifications for Various Applications: A Review. Cereal Chemistry 2011, 88, 159173.
- [5] THORMAR, H. Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents, John Willey Sons, 2011, ISBN: 978-0-470-74178-8.

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Jana Sedlaříková, Ph.D.**

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce:

**5. února 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**18. května 2018**

Ve Zlíně dne 5. února 2018



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



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

Příjmení a jméno: SCHUCHOVÁ HARKÉTA

Obor: p.TVK

## 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 <sup>1)</sup>;
- 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 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> 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 <sup>3)</sup> 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 ..... 18. 5. 2018

Schuchová

<sup>1)</sup> 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 nevydávalečně 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.*

<sup>2)</sup> *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, užíje-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).*

<sup>3)</sup> *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 díla:*

(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 užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.*

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

## **ABSTRAKT**

Bakalářská práce se zabývá významem a využitím přírodního rostlinného materiálu na bázi kukuřičného proteinu zeinu.

V teoretické části jsou klasifikovány proteiny se zaměřením na zein, jeho strukturu, vlastnosti a aplikace. Dále je zde uveden výčet aktivních látek s potenciálem pro zabudování do zeinové matrice za účelem zajištění antimikrobiálních vlastností.

Praktická část se zabývá přípravou vzorků zeinových filmů s obsahem aktivních složek (esenciální oleje, monoacylglycerol kyseliny laurové) a sledováním vlivu této modifikace na inhibici růstu vybraných bakterií, kvasinek a plísní. V další části byly studovány morfologické a fyzikální vlastnosti připravených filmů, jako je propustnost pro vodní páry, rozpustnost ve vodě a smáčivost.

Klíčová slova: antimikrobiální vlastnosti, esenciální olej, fyzikální vlastnosti, kontaktní úhel, laurová kyselina, monolaurin, zein.

## **ABSTRACT**

The bachelor thesis deals with the importance and use of natural plant material based on zein maize protein.

In the theoretical part, proteins with a focus on zein, its structure, properties and applications are classified. Furthermore, there is a list of active substances with potential for incorporation into a zein matrix to provide antimicrobial properties.

Practical part deals with the preparation of zein films containing active ingredients (essential oils, lauric acid monoacylglycerol) and observing the effect of this modification on inhibition of growth of selected bacteria, yeasts and fungi. In the next part, the morphological and physical properties of the prepared films, such as water vapor permeability, water solubility and wettability, were studied.

Keywords: antimicrobial properties, essential oil, contact angle, lauric acid, monolaurin, physical properties, zein.

Ráda bych na tomto místě velmi poděkovala vedoucí bakalářské práce Ing. Janě Sedlaříkové, PhD. za odborné vedení, poskytnuté konzultace, mnoho cenných rad, ochotu, čas a trpělivost, kterou mi věnovala při vypracování této bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat Ústavu pro hydrodynamiku Akademie věd ČR v Praze za realizaci SEM snímků připravených filmů.

Také děkuji manželovi, který mi byl po celou dobu velkou oporou.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 PROTEINY</b> .....	<b>12</b>
1.1 KLASIFIKACE PROTEINŮ .....	12
1.2 STRUKTURA PROTEINŮ .....	13
1.2.1 Primární struktura.....	13
1.2.2 Sekundární struktura .....	13
1.2.3 Terciární struktura.....	14
1.2.4 Kvarterní struktura .....	14
1.2.5 Denaturace.....	14
<b>2 ZEIN</b> .....	<b>15</b>
2.1 ZDROJ ZEINU .....	15
2.1.1 Výskyt a složení proteinů v kukuřici .....	15
2.2 CHEMICKÉ VLASTNOSTI ZEINU .....	16
2.3 STRUKTURA ZEINU .....	17
2.4 PRŮMYSLOVÉ A SPOTŘEBITELSKÉ VYUŽITÍ ZEINU .....	18
2.4.1 Řízené uvolňování.....	18
2.4.2 Povrchové úpravy.....	18
2.4.3 Vlákna .....	19
2.4.4 Biodegradabilní filmy a plasty .....	19
2.4.5 Využití ve zdravotnictví.....	20
<b>3 MONOACYLGLYCEROLY</b> .....	<b>21</b>
3.1 HLAVNÍ VYUŽITÍ MONOACYLGLYCEROLŮ .....	21
3.1.1 Monoacylglyceroly v kosmetice .....	22
3.2 PŘÍPRAVA MONOACYLGLYCEROLŮ .....	22
3.2.1 Esterifikace karboxylových kyselin s alkoholy.....	22
3.2.2 Hydrolýza esterů .....	23
3.2.3 Interesterifikace.....	23
3.2.4 Adice mastné kyseliny otevřením epoxidového kruhu .....	24
3.3 ANTIMIKROBIÁLNÍ PŮSOBNÍ MONOACYLGLYCEROLŮ A MASTNÝCH KYSELIN .....	24
3.4 MONOACYLGLYCEROL KYSELINY LAUROVÉ .....	25
3.4.1 Antimikrobiální působení.....	26
<b>4 ESENCIÁLNÍ OLEJE</b> .....	<b>27</b>
4.1 OBLASTI VYUŽITÍ ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ .....	27
4.2 ESENCIÁLNÍ OLEJE Z CHEMICKÉHO HLEDISKA .....	28
4.3 ZÁKLADNÍ BIOSYNTETICKÉ DRÁHY .....	28
4.4 VÝROBA ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ.....	29
4.4.1 Destilace vodní parou.....	29
4.4.2 Lisování za studena .....	30
4.4.3 Extrakce organickým rozpouštědlem .....	30
4.4.4 Enfleuráž .....	30
4.4.5 Superkritická fluidní extrakce (SFE) .....	31



4.5	BIOLOGICKÁ AKTIVITA ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ .....	31
4.5.1	Antibakteriální aktivita.....	31
4.5.2	Antimykotické účinky .....	32
4.5.3	Antioxidační účinky .....	32
4.6	ESENCIÁLNÍ OLEJ EXTRAHOVANÝ Z OREGANA .....	33
4.7	ESENCIÁLNÍ OLEJ EXTRAHOVANÝ Z TYMIÁNU .....	33
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>		<b>35</b>
<b>5</b>	<b>CÍL PRÁCE .....</b>	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, ZAŘÍZENÍ A POSTUPY .....</b>	<b>37</b>
6.1	CHEMIKÁLIE.....	37
6.2	POMŮCKY A ZAŘÍZENÍ .....	37
6.3	METODY.....	37
6.3.1	Stanovení sušiny zeinu .....	37
6.3.2	Příprava zeinových filmů .....	38
6.3.3	Měření tloušťky filmů .....	38
6.3.4	SEM analýza .....	38
6.3.5	Testování antimikrobiální aktivity .....	38
6.3.5.1	Použité mikroorganismy .....	38
6.3.5.2	Příprava živných pŮd a fyziologického roztoku .....	39
6.3.5.3	Agar difúzní test.....	39
6.3.6	Vlhkost filmů .....	40
6.3.7	Rozpustnost ve vodě .....	40
6.3.8	Stanovení propustnosti pro vodní páry .....	40
6.3.9	Měření povrchové energie a kontaktního úhlu.....	42
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>43</b>
7.1	VZHLED A TLOUŠŤKA FILMŮ .....	43
7.2	VLHKOST FILMŮ A ROZPUSTNOST VE VODĚ .....	44
7.3	PROPUSTNOST PRO VODNÍ PÁRY .....	45
7.4	POVRCHOVÉ VLASTNOSTI.....	47
7.5	SEM ANALÝZA.....	50
7.6	ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY .....	52
7.6.1	Antimikrobiální účinky aktivních látek a jejich kombinací .....	52
7.6.2	Antimikrobiální účinky zeinových filmů s obsahem aktivních látek a jejich kombinací .....	54
<b>ZÁVĚR .....</b>		<b>58</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>		<b>59</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>		<b>66</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>		<b>68</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>		<b>70</b>

## ÚVOD

Antibakteriální polymerní materiály nacházejí využití v mnoha oblastech, jako je například zdravotnický, potravinářský a textilní průmysl. Za účelem prevence proti nežádoucí mikrobiální nákaze jsou využívány nejrůznější organické i anorganické aktivní látky. Současným trendem je využívat biologicky odbouratelné materiály pocházející z obnovitelných zemědělských surovin, živočišných zdrojů, nebo produkovaných mikroorganismy.

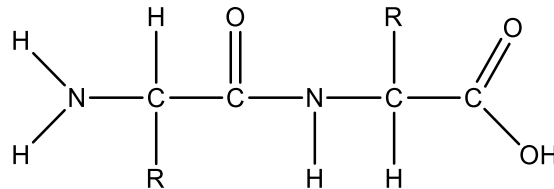
Zajímavou a rychle se vyvíjející technologií představují aktivní polymerní obalové materiály, u nichž je také kladen zvláštní důraz na ekologickou stránku, tj. minimalizaci odpadů, snadnou odbouratelnost, nízkou toxicitu apod. Fólie a povlaky na bázi proteinů představují perspektivní alternativu k tradičním syntetickým materiálům. Zein je jediným proteinem komerčně extrahovaným z kukuřice, který je schopen tvořit pevné hydrofobní biodegradabilní filmy využitelné například jako nosiče aktivních látek s postupným uvolňováním.

Cílem této bakalářské práce bylo zpracovat literární rešerši na dané téma a následně připravit a charakterizovat filmy na bázi zeinu a aktivních látek příznivých pro využití například v potravinářství.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 PROTEINY

Proteiny, nebo také bílkoviny, jsou biomakromolekulární látky, které spolu se sacharidy patří mezi nejdůležitější živiny. Základní stavební složkou proteinů jsou aminokyseliny (dále jen AMK), které jsou vzájemně propojeny peptidovými vazbami (Obr. 1) [4, str. 30–36].



Obr. 1 Peptidová vazba [4]

### 1.1 Klasifikace proteinů

Proteiny mají velmi rozmanité vlastnosti i složení a lze je klasifikovat podle různých kritérií.

- Podle původu:
  - živočišné (z vajec, mléka, masa a ryb)
  - rostlinné (např. z luštěnin, obilovin a ořechů)
- Podle struktury a složení:
  1. jednoduché – obsahují pouze AMK
    - globulární proteiny – rozpustné ve vodě nebo zředěných roztocích solí
    - fibrilární – většinou nerozpustné, vláknité
  2. složené – kromě AMK obsahují i neproteinovou část a dělí se dále na:
 

<ul style="list-style-type: none"> <li>• fosfoproteiny</li> <li>• chromoproteiny</li> <li>• lipoproteiny</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• glykoproteiny</li> <li>• nukleoproteiny</li> <li>• metaloproteiny</li> </ul>
---	---
- Podle rozpustnosti se proteiny rozdělují na:
  1. albuminy
    - snadná rozpustnost ve vodě, srážejí se s roztoky o vysoké koncentraci síranu amonného
    - patří sem ovalbumin (vaječný bílek), laktalbumin (mléko), serumalbumin (krevní sérum)

2. globuliny
  - nerozpustné ve vodě, rozpustné ve zředěných solných roztocích
3. histony
  - rozpustné ve vodě i zředěných kyselinách
  - bazický charakter díky vysokému obsahu argininu a lysinu
  - jsou přítomny v buněčném jádru
4. protaminy
  - více bazické než histony
  - nalezneme je v rybím mlíčí
5. skleroproteiny
  - vláknité proteiny, téměř ve vodě a roztocích solí nerozpustné
  - jsou to například kolagen keratin a elastin
6. gluteliny
  - patří k rostlinným, ve vodě a roztocích soli nerozpustným proteinům
  - naopak jsou rozpustné ve zředěných zásadách a kyselinách
7. prolaminy
  - protein rostlinného původu, nerozpustné jak ve vodě, tak v roztocích solí.
  - dobře se však rozpouští v ethanolu.
  - podle některých prolaminy jsou prolaminy spíše polypeptidy [4 (str. 30-31), 8].

## 1.2 Struktura proteinů

### 1.2.1 Primární struktura

Každý protein má neměnné a pro daný protein charakteristické složení nerozvětveného peptidového řetězce. Primární struktura tedy udává pořadí jednotlivých aminokyselin v proteinovém řetězci. Aminokyseliny mají v peptidovém řetězci specifické prostorové uspořádání [4, str. 31–35].

### 1.2.2 Sekundární struktura

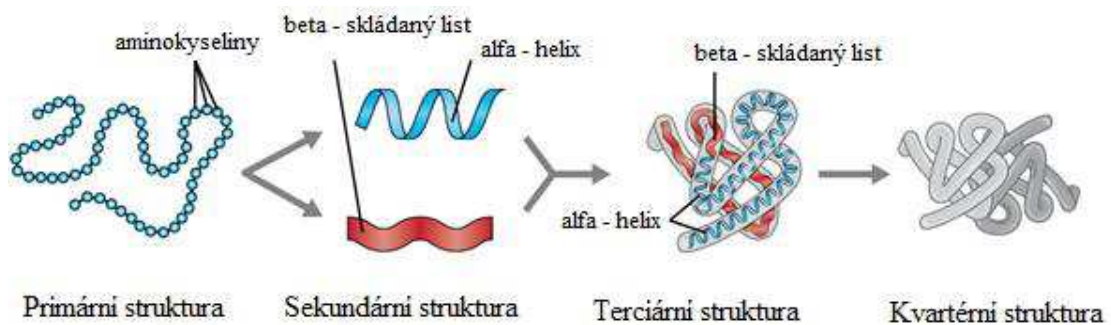
Sekundární struktura souvisí s prostorovým uspořádáním polypeptidového řetězce. Existuje ve dvou formách, a to buď jako tzv.  $\alpha$ -helix (pravotočivá šroubovice), nebo  $\beta$ -skládaný list, což jsou dva peptidové řetězce paralelně spojené vodíkovými můstky [4 str. 31–35].

### 1.2.3 Terciární struktura

Terciární struktura udává uspořádání  $\alpha$ -helixu nebo  $\beta$ -skládaného listu do finálního prostorového tvaru proteinové molekuly. Výsledkem může být fibrilární (vláknitá) nebo globulární struktura (klubko). Význam zde mají vodíkové vazby, elektrostatické, hydrofobní interakce, nebo disulfidické můstky [4 str. 31–35].

### 1.2.4 Kvartérní struktura

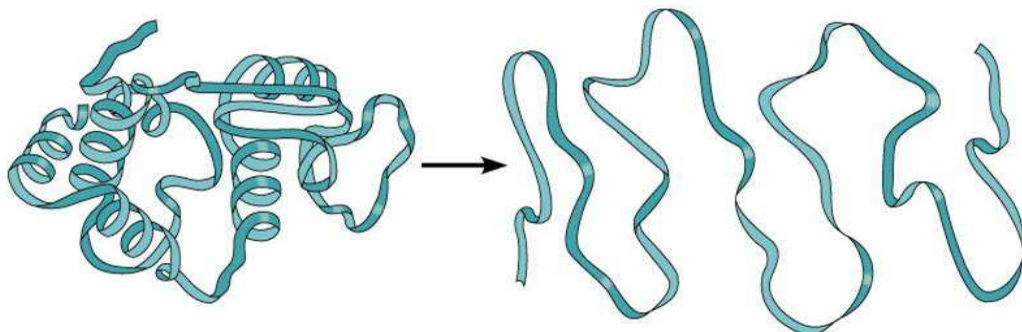
Tato struktura existuje u bílkovin složených z několika polypeptidových řetězců, které jsou spojeny prostřednictvím extramolekulárních vazebných interakcí [4 str. 31–35].



Obr. 2 Struktura proteinů [upraveno podle 32]

### 1.2.5 Denaturace

Denaturace je změna struktury proteinu způsobená řadou fyzikálních a chemických vlivů, jako jsou vysoká teplota, změna pH, UV záření. Dochází k přerušení sekundárních vazeb a tím k rozvinutí polypeptidického řetězce (Obr. 3). Denaturovaný protein ztrácí svou biologickou aktivitu [4 str. 31–35].



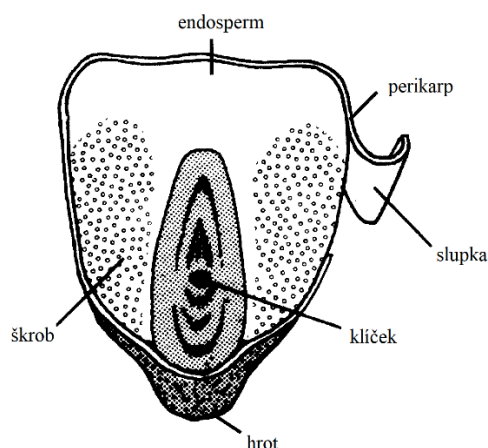
Obr. 3 Denaturace [42]

## 2 ZEIN

Zein patří do skupiny rostlinných proteinů, které se rozdělují na gluteliny a prolaminy. Do skupiny glutelinů řadíme glutenin (pšenice), oryzenin (rýže), hordein (ječmen). K prolaminům patří kromě kukuřičného zeinu zejména gliadin ze pšenice [4 (str.39-46), 8, 9].

### 2.1 Zdroj zeinu

Zein je získáván extrakcí z kukuřičných zrn, jejichž hlavní součástí je endosperm a klíček, které obsahují většinu škrobu a oleje (Obr. 4). Kukuřice je obilnina, která je původem ze Severní Ameriky, odkud se rozšířila i do Evropy. V současnosti se pěstuje ve velkém měřítku téměř po celém světě, po pšenici a rýži je nejpěstovanější plodinou [8, 9].



Obr. 4 Zrno kukuřice [upraveno podle 9]

#### 2.1.1 Výskyt a složení proteinů v kukuřici

Obsah proteinů se liší v závislosti na druhu potraviny. Nejvíce proteinů se nachází v živočišném materiálu, z rostlin jsou bohaté na proteiny luštěniny a olejninny.

Jednotlivé složky kukuřičného zrna jsou uvedeny v tabulce (Tab. 1). Obsah proteinu se pohybuje od 6 do 12 % suché hmotnosti v závislosti na odrůdě. Je tvořen 45–50 % zeinu, 20–30 % směsí glutelinů, zbytek tvoří albuminy a globuliny, které se nacházejí v klíčku. Až 75 % zeinu je obsaženo v endospermu kukuřičného zrna, zbytek je v klíčku a otrubách. Glutelin je rozdělen mezi endosperm a klíček, albuminy a globuliny jsou obsaženy zejména v klíčku (Tab. 2).

Tab. 1. Procentuální zastoupení látek v zrně kukuřice [9].

Složka	Zastoupení (%)
škrob	62
protein	7,8
olej	3,8
popeloviny	1,2
ostatní*	10,2
voda	15

\* volný dusík, pentosany, kyselina fytoová, rozpustné cukry, xantofyly

Tab. 2. Rozdělení proteinů v kukuřici (% suchého podílu) [9].

Protein	Rozpustnost	Celé zrně	Endosperm	Klíček
albumin	voda	8	4	30
globulin	solný roztok	9	4	30
glutelin	zásaditý roztok	40	39	25
zein	alkohol	39	47	5

## 2.2 Chemické vlastnosti zeinu

Jak už bylo výše uvedeno, zein je nerozpustný ve vodě, rozpouští se v přítomnosti alkoholu, v koncentrovaném roztoku močoviny, v silně alkalických roztocích (pH 11 nebo vyšší), nebo v roztocích anionických detergentů. To je způsobeno specifickým složením aminokyselin (Tab. 3)



Tab. 3. Složení aminokyselin v zeinu (g AMK/100 g zeinu) [9].

Třída	AMK	Přírodní zein	Komerční zein
nepolární	glycin	0	0,7
	alanin	10,52	8,3
	valin	3,98	3,1
	leucin	21,1	19,3
	isoleucin	5	6,2
	fenylalanin	7,3	6,8
	tryptofan	0,16	0
	prolin	10,53	9
OH skupina	serin	7,05	5,7
	treonin	3,45	2,7
	tyrosin	5,25	5,1
sírné	methionin	2,41	2
	cystein	0,83	0,8
bazické	lysin	0	0
	arginin	4,71	1,8
	histidin	1,32	1,1
kyselé	kys. asparagová	4,61	0
	asparagin	0	4,5
	kys. glutamová	26,9	1,5
	glutamin	0	21,4

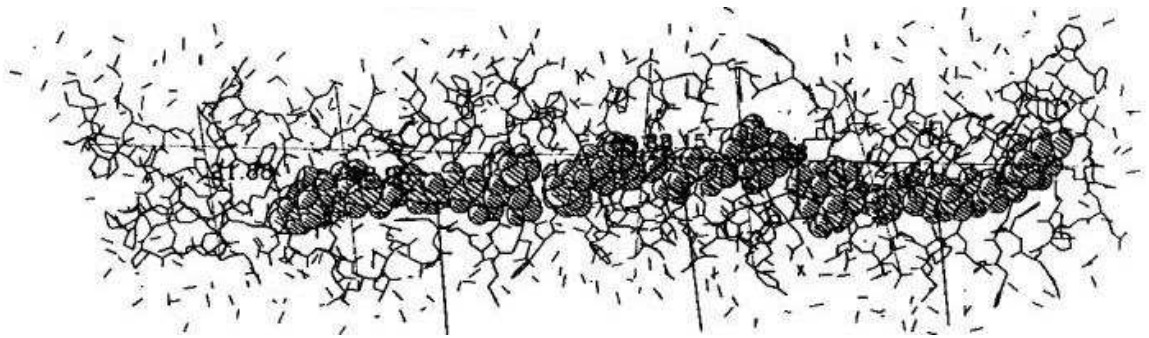
Zein je obzvláště bohatý na kyselinu glutamovou, leucin, prolin a alanin. Má však nedostatečné množství zásaditých a kyselých AMK. Neobsahuje lysin a tryptofan, což ovlivňuje negativně rovnováhu dusíku ve stravě. Vysoký podíl nepolárních AMK a nedostatek bazických a kyselých AMK ovlivňuje jeho nerozpustnost ve vodě [9].

Zein je směsí peptidů s různou molekulovou hmotností, rozpustností a nábojem. Největší procentuální zastoupení v kukuřici má  $\alpha$ -zein (odpovídá 70–80 %), dále  $\beta$ -zein (5 %) a  $\gamma$ -zein (20 %), minoritní zastoupení má také  $\delta$ -zein.  $\alpha$ -zein tvoří centrum struktury proteinu,  $\beta$  a  $\gamma$ -zeiny jsou lokalizované na okrajích proteinové struktury [4 str. 37–39), 8, 9, 11].

### 2.3 Struktura zeinu

Molekula zeinu je mírně asymetrická, má šroubovicové uspořádání s 9 opakujícími se antiparalelně uspořádanými jednotkami stabilizovanými vodíkovými můstky (Obr. 5).

Zein tedy vykazuje v nevodném prostředí globulární strukturu podobnou běžným globulárním proteinům, jako má například inzulin nebo ribonukleáza [9].



Obr. 5 Struktura zeinu [9].

## 2.4 Průmyslové a spotřebitelské využití zeinu

Zein není používán přímo k lidské spotřebě, a to zejména kvůli negativní dusíkové bilanci a špatné rozpustnosti ve vodě. Jeho výroba je omezena asi na 500 tun za rok. Zein má ovšem výbornou schopnost tvořit lesklé, pevné, hydrofobní filmy nepropustné pro mastnotu a odolné vůči mikrobiálnímu napadení. Potenciální aplikace zeinu zahrnují formy vláken, lepidel, inkoustu, keramických materiálů, dále využití v průmyslu textilním, potravinářském a kosmetickém nebo také jako biologicky odbouratelné plasty [9]. Některé další aplikace jsou zahrnuty v dalších kapitolách.

### 2.4.1 Řízené uvolňování

Za účelem oddálení aktivace léčebné látky, například uvnitř střeva, a následně jejího postupného uvolňování do krevního oběhu, jsou vyvíjeny nejrůznější systémy na bázi proteinových mikročástic. Takové systémy mohou být také použity například ke zpožděnému uvolňování pesticidů a hnojiv. Směs zeinu s feromony je používána k enkapsulaci pesticidů za účelem zahubení škůdců a současně zajištění bezpečného pracovního prostředí. Mikročástice zeinu mohou být také použity jako náhrada tuků a k enkapsulaci vybraných potravinových aditiv [9].

### 2.4.2 Povrchové úpravy

Vrstvy na bázi zeinu jsou používány v kosmetických prostředcích za účelem prevence přímého kontaktu mezi pokožkou a anorganickými látkami používanými v těchto výrobcích. Mezi další aplikace patří povrchové úpravy papírových lesklých obálek časopisů, využití při výrobě čisticích bloků pro toalety, obvazových materiálů na rány, umělých štětín různých typů kartáčů nebo umělých šperků [9].

### 2.4.3 Vlákna

Textilní vlákna založená na bázi zeinu byla vyráběna již v 50. letech 20. století spřádáním alkalických zeinových roztoků, následným srážením s kyselinami a solemi a konečně ošetřením pomocí formaldehydu. Likvidace těchto chemických látek byla ovšem spojena s řadou negativních environmentálních aspektů. Později se začala vyrábět vlákna na bázi zeinu prostřednictvím zesíťování [9].

### 2.4.4 Biodegradabilní filmy a plasty

Během posledních let je značný zájem o aplikaci proteinů, jako je želatina, syrovátka, sójový protein, zein z kukuřice nebo pšeničný lepek, v biologicky odbouratelných obalech pro zvýšení trvanlivosti potravin jako je například ovoce a zeleniny.

Jedlé povlaky, pokud jsou použity na ovoci či zelenině, představují bariéru proti vlhkosti, výměně oxidu uhličitého a kyslíku. Zlepšují také mechanické vlastnosti při manipulaci.

Tyto povlaky mohou být obohaceny o různé bioaktivní látky, jako jsou esenciální oleje (oregano, nové koření, česnek, citronová tráva, tymián), organické kyseliny (kyselina sorbová, octová, propionová), bakteriociny (nisin) a enzymy (lysozym).

Nejslibnější aplikace zeinu v poslední době tedy představují biodegradabilní filmy využitelné jako obalové materiály. Zein, hlavní zásobní protein v kukuřičném endospermu, je slibný z důvodů velkého množství zbytků při výrobě kukuřičného škrobu, komerční dostupnosti a v neposlední řadě jeho schopnosti rozpouštět se v hydroalkoholické směsi. Odtud jde snadno převést na transparentní folie s výbornými vlastnostmi právě díky vysokému obsahu nepolárních aminokyselin.

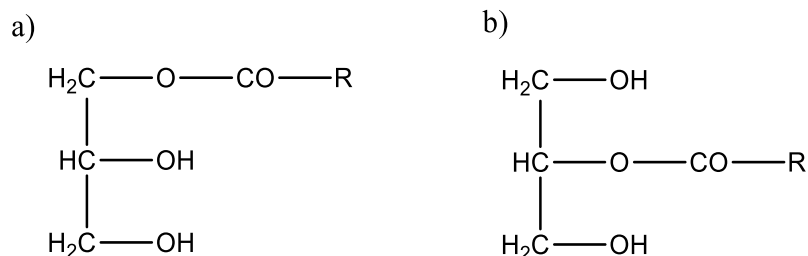
Původní nemodifikované zeinové filmy vykazovaly velkou křehkost, což značně omezovalo většinu aplikací. Mechanické vlastnosti byly později vylepšeny přidávkem různých síťujících činidel, jako je například kyselina citronová nebo formaldehyd. Pevnost zeinových filmů a propustnost pro plyny může být také zlepšena začleněním vysoce stabilních křemičitanových komplexů do proteinové struktury. Řada studií se zabývá modifikací zeinových filmů prostřednictvím antimikrobiálních látek [9, 17, 36].

#### 2.4.5 Využití ve zdravotnictví

I přes nedostatek esenciálních AMK může mít zein určitý nutriční a farmaceutický význam. U enzymaticky modifikovaného zeinu byl prokázán vliv na snížení krevního tlaku testovaného na krysách. Také byla zkoumána antioxidační aktivita tohoto proteinu [9].

### 3 MONOACYLGLYCEROLY

Monoacylglyceroly jsou parciální estery glycerolu, v nichž jedna hydroxylová skupina je esterifikována mastnou kyselinou. Kromě 1-monoacylglycerolů mohou vznikat také 2-monoacylglyceroly (Obr. 6) [1,2,3].



Obr. 6 Struktura a) 1-monoacylglycerolu, b) 2-monoacylglycerolu [upraveno podle 4]

Monoacylglyceroly (dále jen MAG) jsou ve vodě nerozpustné, ale mohou vytvářet stabilní hydratované disperze. MAG jsou polymorfní a mohou existovat v různých krystalických formách v závislosti na teplotě. Molekula MAG má amfifilní charakter, to znamená, že má jak hydrofilní, tak hydrofobní část. Mají tedy tendenci snižovat mezipovrchové napětí na rozhraní dvou nemísitelných kapalin, přičemž MAG s kratším uhlíkovým řetězcem vykazuje zásadnější povrchovou aktivitu. [12, 13].

#### 3.1 Hlavní využití monoacylglycerolů

MAG jsou široce využívány v potravinářském průmyslu jako emulgátory při výrobě margarínů, pomazánek nebo třeba zmrzlin, mražených dezertů a žvýkacích gum. Jsou také hojně aplikovány v pekařství, kde modifikují reologické vlastnosti těsta. Při výrobě těstovin se do těsta přidává hydratovaný MAG, což má za následek snížení lepivosti uvařených těstovin. Díky krystalovému polymorfismu a podobnosti s triacylglycerolem, mohou být MAG používány také jako tuková náhrada do nízkotučných mléčných výrobků.

V textilním a plastikářském průmyslu se MAG přidávají za účelem promazání a změkčení plastových výrobků, vykazují také antistatické vlastnosti. Dále se používají při výrobě polyolefinových vláken, látka je potom odolnější proti vodě a barevně stálější [12].

### 3.1.1 Monoacylglyceroly v kosmetice

V kosmetice se nejčastěji používají MAG nasycených mastných kyselin. Jsou stabilnější vůči oxidaci, inertní i v přítomnosti aktivních látek a jsou bezbarvé. Přidávají se jako emulgační činidla a emolienty, dispergují vodu a dobře penetrují pokožkou. Jsou součástí lipidů v pokožce, tudíž jsou kompatibilní jak s pokožkou, tak sliznicemi a nedráždí ji. Pokožku neodmašťují, tak jako jiné povrchově aktivní látky. Nejčastěji se MAG přidávají do mastí, krémů a lotionů pro svou schopnost stabilizovat emulze. Můžeme je také nalézt v přípravcích na vlasy. MAG s mastnými kyselinami o střední délce řetězce mají také antimikrobiální funkci, zabraňují přenosu patogenů na sliznici [12].

## 3.2 Příprava monoacylglycerolů

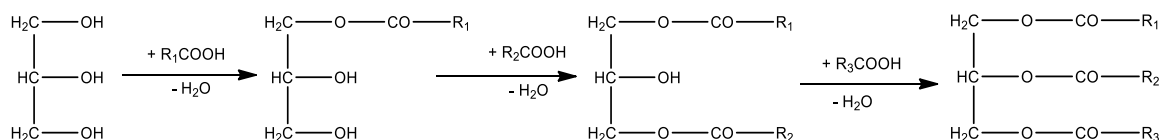
Monoacylglyceroly se začaly průmyslově ve větším měřítku vyrábět roku 1960, a to glycerolózou triacylglycerolů. První zmínka o syntetické výrobě ale pochází již z roku 1853. V současné době lze MAG vyrobit několika způsoby:

- Esterifikací karboxylových kyselin s glycerolem
- Hydrolýzou triacylglycerolů
- Interesterifikací
- Adicí mastné kyseliny na glycidol otevřením epoxidového kruhu

### 3.2.1 Esterifikace karboxylových kyselin s alkoholy

Při esterifikaci karboxylových kyselin s alkoholy, v tomto případě glycerolem, nejdříve vzniknou monoacylglyceroly, další esterifikací diacylglyceroly, až dojde k úplné esterifikaci na triacylglyceroly (Obr. 7). U reakce je předpokládán iontový mechanismus, ale z důvodu nízké rychlosti není příliš využívánou metodou. Při použití katalyzátorů, vodíkových nebo hydroxylových iontů, je výtěžnost vysoká. Mezi nejčastěji používané katalyzátory patří konkrétně hydroxid sodný, dále může být použita i kyselina sírová, fosforečná, chlorovodíková nebo boritá. Při použití kyselých katalyzátorů je výhodou rychlé oddělení po skončení reakce.

Reakce probíhá i bez přítomnosti katalyzátoru za vysoké teploty. Voda uvolňovaná při reakci téká z reakční směsi a tím posunuje reakční rovnováhu ve prospěch esteru [3 str. 44–45, 12, 14].

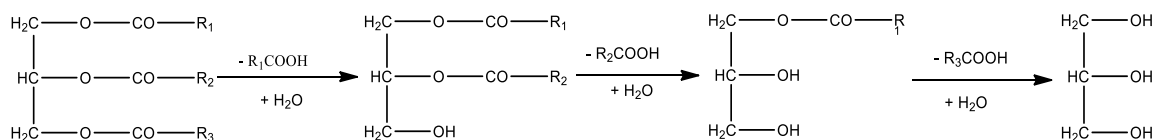


Obr. 7 Schéma esterifikace [upraveno podle 4].

### 3.2.2 Hydrolýza esterů

Hydrolýza je opačnou reakcí esterifikace. Triacylglyceroly při této reakci přijímají molekulu vody, mastná kyselina se odštěpí a vznikne parciální acylglycerol, nejdříve diacylglycerol, dále monoacylglycerol a nakonec volný glycerol (Obr. 8). Reakce je katalyzovaná nejčastěji oxidy nebo hydroxidy kovů druhé skupiny a probíhá pod tlakem a při vysoké teplotě.

Reakce probíhá rychle, protože se parciální estery v reakčním prostředí nehromadí, jelikož voda není mísitelná s triacylglyceroly [3 str. 46–47, 12, 14].



Obr. 8 Schéma hydrolýzy [upraveno podle 4].

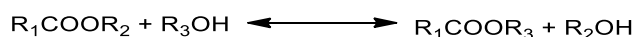
### 3.2.3 Interesterifikace

O interesterifikaci se jedná v případě, že reakčním partnerem při esterifikaci je ester. Součástí jsou tři typy reakcí:

- Alkoholýza

Tato reakce je z technického hlediska nejvýznamnější. Při průmyslové výrobě se nejčastěji využívá glycerolýza. Reakce může být katalyzovaná alkalicky při pokojové teplotě, nebo může probíhat s kyselými katalyzátory, kdy je však nutné směs zahřívat na teplotu 100 °C.

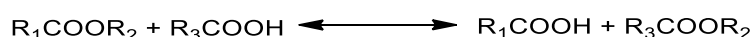
Reakcí molekuly glycerolu s triacylglycerolem postupně TAG přechází na DAG a na MAG (Obr. 9). Reakce je vratná [3 str. 45–47, 12, 14].



Obr. 9 Schéma alkoholýzy [upraveno podle 4].

- Acidolýza

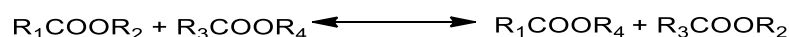
Tato reakce slouží v první řadě k náhradě méně vhodných mastných kyselin v přírodních triacylglycerolech. Nekatalyzovaná reakce probíhá při teplotách 250–300 °C. Reakce v přítomnosti katalyzátoru je prováděna při teplotě okolo 150 °C. Prakticky se acidolýza používá při náhradě nižších mastných kyselin v kokosovém a palmojádrovém oleji za vyšší mastné kyseliny (Obr. 10) [3 str. 45–47], 12, 14].



Obr. 10 Schéma acidolýzy [upraveno podle 4].

- Transesterifikace

Při transesterifikaci neboli vlastní interesterifikaci dochází k esterové výměně a tím k úpravě tuků (Obr. 11) [3 str. 45–47), 12, 14].



Obr. 11 Schéma transesterifikace [upraveno podle 4].

### 3.2.4 Adice mastné kyseliny otevřením epoxidového kruhu

Monoacylglyceroly lze připravit také nukleofilní adicí mastné kyseliny na glycidol, který je velmi reaktivní a při reakci dochází k otevření epoxidového kruhu. Reakce bývá katalyzovaná organickými bázemi. Mezi výhody patří bezesporu univerzálnost reakce, vznik produktů s vysokou konverzí a mírné reakční podmínky [47, 48].

## 3.3 Antimikrobiální působení monoacylglycerolů a mastných kyselin

Antimikrobiální účinky mastných kyselin dle mnohých autorů jsou výsledkem nedisociované molekuly – protonované kyseliny, nikoliv aniontem. Pokud by tomu tak opravdu bylo, jejich aktivita by byla ovlivněna pH, protože právě pH určuje stupeň disociace kyseliny. Tato skutečnost byla prokázána u *Clostridium perfringens*. Zvýšením pH z 6,5 na 7,5 se zvýšily i hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) kyselin s krátkým řetězcem (kapyronové, kaprylové a kaprinové), naopak u MK se středním řetězcem (laurové a myristové) došlo ke snížení hodnoty MIC. Hodnota pH nijak neovlivnila nenasycené MK.



Lze konstatovat, že:

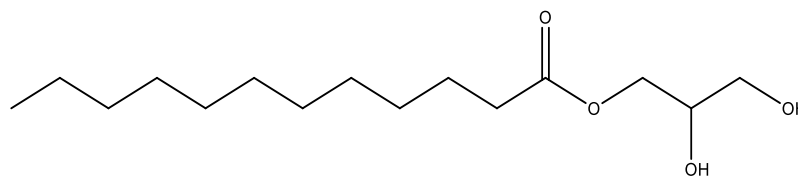
1. s výjimkou MK s krátkými řetězci (méně než 8 atomů uhlíku), lipidy nemají vliv na gramnegativní bakterie
2. za mastnou kyselinu s nejvyšší antimikrobiální aktivitou je považována kyselina laurová (C12:0) z nasycených, z nenasycených pak palmitoolejová (C16:1) a linolová (C18:2)
3. pozice a počet dvojných vazeb aktivitu ovlivňuje více u MK s dlouhým řetězcem
4. cis forma je aktivní, trans isomer neaktivní
5. kvasinky jsou více ovlivněny MK s krátkým řetězcem (C10–12)

Estery mastných kyselin a mastné kyseliny působí na mikroorganismy nespecifickým mechanismem. Inhibiční účinek je založen na narušení buněčné membrány, kde jsou přítomné důležité enzymy pro vstřebávání kyslíku. Inhibiční působení mastných kyselin a MAG je však závislé na jejich koncentraci. Ve vyšších koncentracích mají účinek ireverzibilní a baktericidní, dochází například k přerušení oxidační fosforylace a následné inhibici transportu látek závislých na energii. Některé MK brání fosforylaci adenosintrifosfátu (ATP) na účasti v biosyntetických reakcích v buňce. Detergenční účinky mají za následek porušení membrány a následné odpojení energetického systému. Membrána mikroorganismu může být také porušena v důsledku vytvoření vysoce uspořádaných vrstev MAG na povrchu buňky. Tato membrána ovlivňuje signální transdukcii tím, že blokuje promotory, blokuje buněčné dýchání a mění absorpci aminokyselin.

Obecně lze MAG seřadit od nejvyšší účinnosti takto: monolinolenin > monolaurin > monomyristin > monolinolein. Tyto MAG jsou účinné i proti sporám. Monopalmitin a monostearin byly vyhodnoceny jako méně významné [15, 16].

### 3.4 Monoacylglycerol kyseliny laurové

Tento typ esteru obsahuje na uhlíku navázaný zbytek kyseliny laurové (Obr. 12). Kyselina laurová je nasycená mastná kyselina s 12 uhlíky. Přirozeně se vyskytuje v mateřském mléce, kde tvoří 6,2 % z celkového množství tuku, je ale také v kokosovém oleji, kde její obsah dosahuje až 47,5 % [5].



Obr. 12 Monoacylglycerol kyseliny laurové [upraveno podle 5]

Monoacylglycerol kyseliny laurové, nazýván také monolaurin (ML) je z důvodu antimikrobiálních účinků využíván v kosmetice, potravinářství, ale také ve farmacii.

Hojně se využívá jako emulgátor pod obchodním názvem Lauricidin® při přípravě margarínů. Zde má funkci emulgující, ale také jak je z názvu patrné, působí jako antimikrobiální činidlo. Monolaurin je však ovlivňován přítomností škrobů a proteinů, proto je třeba klást důraz na správnou homogenizaci výrobku a také určitý rozsah pH. Úprava pH probíhá nejčastěji kyselinou octovou, citronovou nebo mléčnou.

Ve farmaceutických přípravcích byl úspěšně aplikován při léčbě infekce prsu způsobené *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus agalactiae* [15].

### 3.4.1 Antimikrobiální působení

Všeobecně je monolaurin efektivnější proti Gram<sup>+</sup> bakteriím jako jsou Stafylokoky nebo Streptokoky, kde je schopen narušit buněčnou membránu bakterií fyzikálními a chemickými procesy [5, 6, 7]. Je také známo, že snižuje tepelnou odolnost bakterie *Bacillus cereus* a *Pseudomonas aeruginosa*, což má význam při sterilizaci potravin, kdy lze snížit teplotu ohřevu [15]. Antimikrobiální účinky monolaurinu mohou být zvýšeny, pokud se použije v kombinaci s jinými aktivními látkami, jako je například nisin nebo EDTA [49].

## 4 ESENCIÁLNÍ OLEJE

Esenciální oleje (EO), také známé pod pojmem éterické oleje nebo silice, jsou složité směsi těkavých sloučenin produkované živými organismy a jsou izolovány fyzikálními prostředky, jako je například lisování či destilace, z celé rostliny nebo její části. Všechny rostliny mají schopnost vytvářet těkavé sloučeniny, avšak pouze ve stopových množstvích. Přestože je známo asi 3000 druhů esenciálních olejů, jen 300 z nich je komerčně významných, využívaných zejména na výrobu vonných a aromatických látek. Rostliny poskytující zásadní množství silic se nazývají „esenciální olejové rostliny“, a dělí se na dvě skupiny:

- rostliny produkující těkavé látky epidermálními vrstvami okvětních lístků (růže, jasmín, tuberóza)
- rostliny, jež vylučují a akumulují těkavé látky ve specializovaných anatomických strukturách (sekreční buňky, kanály, žláznaté trichomy); mezi takové rostliny patří kmín, fenykl, hřebíček nebo kakost.

Rostliny syntetizují esenciální oleje pro různé účely, jako je ochrana rostliny proti houbám, virům a bakteriím, obrana proti hmyzu a býložravcům, vábení opylovačů nebo jako dispergační činidlo pro podporu rozptylu semen a pylu [19 str. 39–58, 151–170; 21, 24].

### 4.1 Oblasti využití esenciálních olejů

Esenciální oleje jsou využitelné v širokém spektru oblastí. Vonné látky jsou nedílnou součástí kosmetických výrobků, jsou aplikovány při výrobě parfémů, nebo dnes rozšířené aromaterapii. Velké množství esenciálních olejů je také používáno v potravinářském průmyslu pro výrobu zmrzlin, nápojů alkoholických i nealkoholických či různých pochutin.

Léčivé účinky těchto olejů jsou známé několik staletí, proto jsou i dnes využívány pro svou antimikrobiální a antifungální aktivitu.

V oblasti zemědělství je aplikace esenciálních olejů významná jako náhrada syntetických pesticidů a herbicidů, některé z esenciálních olejů působí jako přírodní biocidy. Zajímavé je použití olejů ke zvýšení chuti hospodářských zvířat a zlepšení trávení, což vede k rychlejšímu nárůstu hmotnosti.

V neposlední řadě jsou významné některé oleje, například limonen, 1,8-cineole nebo pinen, užitečné jako průmyslová rozpouštědla. Jako parfémy do průmyslových detergentů jsou používány frakce z eukalyptového oleje [17].

## 4.2 Esenciální oleje z chemického hlediska

Hlavními složkami esenciálních olejů jsou terpeny a terpenoidy, vzácněji se mohou vyskytovat sloučeniny obsahující dusík a síru, kumariny nebo homology fenylypropanoidů. Terpeny představují velkou skupinu látek na bázi uhlovodíků odvozených z izoprenové jednotky ( $C_5H_8$ ) s různými chemickými a biologickými vlastnostmi. Tyto látky jsou syntetizovány v cytoplazmě rostlinných buněk. Metabolická dráha syntézy terpenoidů je znázorněna v další podkapitole (Obr. 11). Mezi hlavní terpeny řadíme monoterpeny ( $C_{10}H_{16}$ ) a seskviterpeny ( $C_{15}H_{24}$ ). Existují však i terpeny s delším řetězcem jako diterpeny ( $C_{20}H_{32}$ ), triterpeny ( $C_{30}H_{40}$ ) atd.

Monoterpeny jsou složeny ze dvou izoprenových jednotek a umožňují tak množství rozmanitých struktur. Tvoří asi 90 % esenciálních olejů. Řadíme sem například limonen, p-cymen,  $\alpha$ -pinen,  $\alpha$ -terpinen, karvakrol, tymol nebo kafr.

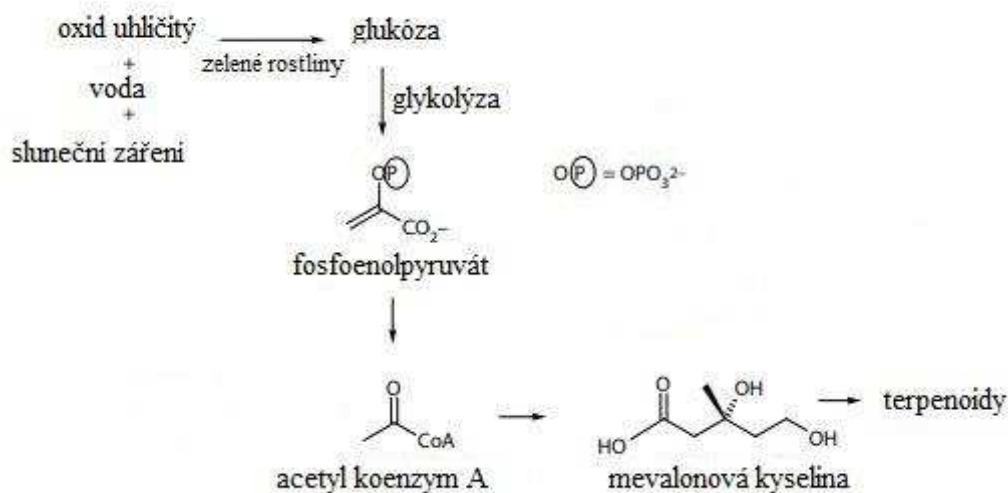
Seskviterpeny tvoří sestava tří izoprenových jednotek. Prodloužení uhlovodíkových řetězců zvyšuje počet možných cyklizací a tím narůstá rozmanitost různých struktur. Struktura a funkce seskviterpenů jsou srovnatelné s monoterpeny [19].

## 4.3 Základní biosyntetické dráhy

Přírodou produkované chemické látky lze klasifikovat do dvou hlavních skupin – na primární a sekundární metabolity.

Primární metabolity jsou univerzální napříč rostlinnými a živočišnými druhy. Dělí se na čtyři podskupiny: proteiny, sacharidy, nukleové kyseliny a lipidy. Jsou z hlediska esenciálních olejů málo významné, i když mohou vznikat jako produkty degradace.

Sekundární metabolity se vyskytují jen v několika druzích a patří sem terpenoidy, shikimáty a alkaloidy. Nejdůležitější jsou terpenoidy [19 str.122]. Na obrázku 13 je uvedeno obecné schéma biosyntézy terpenoidů.



Obr. 13 Metabolická dráha biosyntézy terpenoidů [upraveno podle 19].

#### 4.4 Výroba esenciálních olejů

Esenciální oleje se začaly průmyslově vyrábět v první polovině devatenáctého století kvůli zvýšené poptávce. Zejména se používali při výrobě parfémů a aromat.

Jak bylo zmíněno výše, esenciální oleje jsou tvořeny převážně mono- a seskviterpeny a jejich deriváty, alkoholy, aldehydy a estery. Terpeny jsou velmi strukturálně rozmanitá třída rostlinných produktů. Na základě složení esenciálních olejů jsou využívány k analýze následující extrakční techniky: destilace vodní parou, poté obvykle následuje rektifikace a frakcionace, extrakce organickým rozpouštědlem, macerace, lisování ze studena, enfleuráž, Soxhletova extrakce, superkritická fluidní extrakce, přímá tepelná desorpce a další [19 str. 83–121]. V následujících podkapitolách budou popsány některé techniky získávání esenciálních olejů.

##### 4.4.1 Destilace vodní parou

Tato metoda je vhodná k získávání tepelně odolnějších esenciálních olejů, protože při ní dochází k poškození jemnějších složek silic.

Aparatura k destilaci má čtyři části – nádrž na materiál (v tomto případě rostliny), nádrž na olej, zařízení na výrobu páry a chladičí zařízení. Vzniklá pára je přiváděna k nádrži s rostlinným materiálem, kde dochází k uvolnění vonných silic. Směs páry a rostlinných silic kondenzují v trubici, která prochází chladičem. V důsledku rozdílné hustoty a omezené mísitelnosti oleje a vody lze obě části od sebe oddělit. Olej se poté uchovává v hermeticky uzavřených nádobách, chráněný před teplem a světlem.

Z destilační vody, které obsahuje určité množství nerozpuštěného esenciálního oleje, se poté vyrábí parfémy, prostředky k aromaterapii, nebo je dále zpracovávána v potravinářském průmyslu [18 str. 345–364].

#### 4.4.2 Lisování za studena

Jde o mechanické získávání oleje, k čemuž jsou vhodné jen některé druhy rostlin, zejména citrusové plody. V oplodí citrusů, blízko slupky, se totiž nachází významné množství esenciálních olejů a je tedy možné je získat za pomoci mechanické síly. Pro větší výtěžnost je vhodné použít tzv. skarifikaci, což je narušení olejových váčků jemným propícháním slupky. Z takto upravené kůry olej vytéká a je zachytáván do nádob s filtry. Tato metoda získávání je tradiční a získaný olej je velmi čistý [19 str. 83–121].

#### 4.4.3 Extrakce organickým rozpouštědlem

U rostlinných materiálů, které obsahují malé množství esenciálních olejů, se využívá extrakční proces organickým rozpouštědlem. Je to šetrná metoda k získání olejů například z květů. Získaný olej ovšem obsahuje také vedlejší látky rozpustné v organickém rozpouštědle, jako jsou vosky či rostlinná barviva.

Organickým rozpouštědlem nejčastěji bývá hexan, metanol, etanol nebo petroléter. Rozpouštědlo nasycené vonnými látkami obsahuje mimo esenciální olej také zmíněné vosky, které lze od oleje odstranit rozpuštěním v teplém lihu a následným vymražením. Takto přečištěný olej je již absolutní, velmi čistý a koncentrovaný [18 str. 345–364].

#### 4.4.4 Enfleuráž

Tento typ extrakce patří mezi nejstarší metody získávání vonných látek. Je to metoda velmi šetrná vhodná pro vzácné materiály, které nesnesou vyšší teplotu (květy jasmínu, tuberóza, pomerančovník, fialky). Je to extrakce květů do studeného tuku (nejčastěji do vepřového sádla nebo hovězího loje) rozetřeného na skleněné desce, na kterou jsou kladeny v jedné vrstvě okvětní lístky. Po několika dnech do sebe tuk vstřebá vonné silice a vznikne tzv. pomáda. Tu lze použít samu o sobě, nebo dále upravit extrakcí rozpouštědlem (etanolem) pro získání absolutního extraktu. Metoda je používána omezeně, jelikož je velmi časově náročná a nákladná [19 str. 83–121, 20].

#### 4.4.5 Superkritická fluidní extrakce (SFE)

V této metodě se používá oxid uhličitý (CO<sub>2</sub>) v superkritickém stavu, který je kapalný a má vlastnosti organického rozpouštědla. Je tedy vhodný k získání velmi vzácných a kvalitních silic.

Jedná se o fyzikální proces, kdy nedochází k uvolňování tepla ani k žádným chemickým reakcím. Superkritický CO<sub>2</sub> v tekutém stavu pod tlakem extrahuje z rostlinného materiálu vonnou silici. Po skončení procesu se vyrovnáním tlaků CO<sub>2</sub> odpaří a zůstane pouze čistý esenciální olej. Tato metoda je dokonalejší než destilace a vznikají tak vysoce kvalitní a čisté esenciální oleje. Jedinou nevýhodou je nákladné speciální vybavení a drahé konečné produkty [18 str. 345–364].

### 4.5 Biologická aktivita esenciálních olejů

Bylinky a koření jsou používány ke zlepšení sensorických vlastností potravin od starověku. Byly používány jako konzervační látky, ale také z nutričního a zdravotního hlediska. Tyto rostliny jsou výbornou alternativou syntetických přísad, a to nejen v potravinářském průmyslu, kde slouží zejména jako bezpečné, účinné a přírodní konzervační látky.

Esenciální oleje jsou předmětem výzkumu jednak z hlediska synergického účinku s jinými konzervačními přísadami, ale zejména pro své antibakteriální, antimykotické, antimutagenní, netoxické a antidiabetické vlastnosti.

Jejich biologická aktivita je způsobena vlastnostmi terpenů, terpenoidů, které kvůli své vysoké lipofilní povaze a nízké molekulové hmotnosti jsou schopny narušit buněčnou membránu mikroorganismů a způsobit tím smrt, potlačit sporulaci nebo zastavit jejich růst a množení [21, 24, 25].

#### 4.5.1 Antibakteriální aktivita

Účinnost esenciálních olejů proti bakteriím, kdy ovlivňují jejich růst a množení, je velice dobře prostudovaná, a proto jsou oleje také kvůli této vlastnosti často používány.

Esenciální oleje mohou mít na bakterie účinek bakteriocidní, usmrcení bakterií, nebo bakteriostatický, kdy dojde k inhibici růstu mikroorganismů.

Antibakteriální účinek olejů je ovlivněn řadou faktorů. V první řadě je to chemické složení a poloha substituentů ve struktuře. Bylo uvedeno, že fenolické sloučeniny, jako je například karvakrol, eugenol a tymol vykazují různý účinek proti grampozitivním a gramnegativním

bakteriím kvůli poloze hydroxylové skupiny ve fenolické struktuře terpenů. Aktivita u terpenoidů je zase ovlivněna typem alkylových substituentů a přítomností karbonylové skupiny. Další aspekt ovlivňující biologickou aktivitu je stereochemie a přítomnost dvojných vazeb v molekule. Složení olejů je však také závislé na rostlinném druhu, na podnebí, ve kterém je rostlina pěstována, na metodě získávání a následném uchovávání oleje.

Vzhledem k výše uvedeným údajům lze seřadit vybrané esenciální oleje v pořadí podle snižující se antibakteriální aktivity na: oregano > hřebíček > koriandr > skořice > tymián > máta > rozmarýn > hořčice > šalvěj [21, 22].

Mechanismů antibakteriálního působení esenciálních olejů je několik. Může jít o narušení propustnosti membrány bakteriální buňky, čímž způsobí různé morfologické a fyziologické změny. Lipofilní části esenciálních olejů napadají cytoplazmatickou membránu, což vede ke změnám membránové stability, hydrofobicity, mění se složení mastných kyselin a fluidita. Další mechanismus působení EO je založen na narušení protonové pumpy destabilizující strukturu buněčné membrány. To způsobí nekontrolovatelný tok  $H^+$  iontů, který vede k inhibici pohybu rozpuštěných látek a následnému narušení intracelulárního pH [24].

#### 4.5.2 Antimykotické účinky

Některé druhy plísní a kvasinek jsou patogenní a způsobují řadu problémů. Jsou to eukaryotické organismy, takže je obtížné zjistit jejich přítomnost v živém organismu a zvolit vhodnou terapeutickou léčbu ve srovnání s bakteriálními infekcemi. Znamenají tak nebezpečí pro člověka, ale také například snižují nutriční hodnotu potravin.

Esenciální oleje jsou v tomto ohledu slibnou alternativou, jak zmírnit mikrobiální růst nebo vývoj biofilmů.

Mechanismus účinku EO spočívá ve zvýšení permeability buněčné stěny hub, tudíž dochází k úniku elektrolytů a makromolekul, což vede k jejímu usmrcení. Další možností deaktivace plísní je narušení struktury a funkce buněčné membrány nebo organel, či inhibice syntézy proteinů. Z hlediska inhibice růstu lze antimykotickou aktivitu různých látek odhadnout následovně: fenoly > skořicové aldehydy > alkoholy > aldehydy > ketony > ethery > uhlovdíky [21, 23, 24].

#### 4.5.3 Antioxidační účinky

Antioxidační látky jsou obecně sloučeniny zabraňující či zpomalující nežádoucí oxidační procesy. Použití těchto substancí je významné v biologických systémech, potravinářství,



materiálech obsahující lipidy, proteiny, sacharidy či organické molekuly tvořící živočišné či rostlinné tkáně.

Oxidace nastává radikálovou řetězovou reakcí zprostředkovanou peroxylovým radikálem. Schopnost esenciálního oleje působit jako antioxidační činidlo je způsobena přítomností fenolů. Tyto látky poskytují vodík z fenolické hydroxylové skupiny právě reaktivnímu peroxylovému radikálu, čímž mohou zpomalit peroxidaci nenasycených lipidů [21, 25].

Následující dvě podkapitoly jsou věnovány esenciálním olejům získaným z oregana a tymiánu, jelikož tyto byly použity v praktické části bakalářské práce.

#### 4.6 Esenciální olej extrahovaný z oregana

Dobromysl obecná (*Origanum vulgare*) je rostlina z čeledi hluchavkovité (*Lamiaceae*). Je používána zejména jako koření pod názvem oregano. Dobromysl je pěstovaná již od antiky, a to v oblasti Středomoří, odkud se rozšířila do ostatních částí Evropy, ale i na Blízký východ či do Severní Ameriky [39].

Hlavní sloučeniny identifikované v esenciálních olejích z oregana jsou karvakrol a tymol. Tyto dvě látky jsou zodpovědné za charakteristickou vůni, ale také za antimikrobiální a antioxidační aktivitu. Poskytují také vodíkové atomy volným radikálům, a tak je přeměňují na stabilnější produkty. Karvakrol a tymol působí změny v morfologii plísňových hyf, které vedou k lýze buňky. Terpenoidy v tomto oleji zase svou strukturou zasahují do fosfolipidové dvojvrstvy bakteriálních membrán, zajišťující antimikrobiální účinky. Tyto všechny vlastnosti esenciálního oreganového oleje z něj činí perspektivní přírodní prostředek využitelný například v potravinářském průmyslu. Přídavkem oleje do živočišné stravy nebo do masných výrobků lze zajistit zlepšení nutričních hodnot, získání lepší oxidační stability produktu, a tudíž delší trvanlivosti potravin [21].

#### 4.7 Esenciální olej extrahovaný z tymiánu

Tymián obecný (*Thymus vulgaris*) také známý pod názvem mateřídouška obecná patří do stejné čeledi jako dobromysl, do čeledi hluchavkovitých (*Laminaceae*). Ze Středomoří, kde je jeho původní naleziště, se jeho pěstování rozšířilo do střední a východní Evropy. Je oblíbený pro své léčebné účinky (pozitivně ovlivňuje zažívání a je protizánětlivý), ale také jako konzervační látka v potravinářském průmyslu [38].

Esenciální olej z tymiánu obsahuje více než 60 komponent, z nichž většina vykazuje anti-septické, antioxidační a antimikrobiální vlastnosti. Nejdůležitější složky jsou, podobně jako u oregana, fenoly – tymol, karvakrol a monoterpenové uhlovodíky – p-cymen a terpinen. Antibakteriální vlastnosti těchto sloučenin jsou spojeny s lipofilním charakterem, který vede k jejich akumulaci v membránách a následně například k vyčerpání energie. Polyfenolické sloučeniny mohou působit jako redukční činidla, donory vodíku a chelátory kovů. Antioxidační aktivita je dána chemickou strukturou fenolických sloučenin, které umožňují poskytnout vodík volným radikálům [21].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši zaměřenou na proteiny, konkrétně pak zein, jeho vlastnosti a význam, a charakterizovat aktivní látky vhodné pro inkorporaci do zeinové matrice. Podstatou praktické části pak bylo připravit filmy na bázi zeinu s přídatkem vybraných aktivních látek a testovat vliv na jejich fyzikální a antimikrobiální vlastnosti.

## 6 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, ZAŘÍZENÍ A POSTUPY

### 6.1 Chemikálie

- Zein, (TCI, Europe nv, Belgie)
- Ethanol 96%
- Glycerin bezvodý p.a. (PENTA)
- Monoacylglycerol kyseliny laurové (ML) konverze 98 % (FT UTB)
- Esenciální olej oregano (Nobilis Tilia)
- Esenciální olej tymián (Nobilis Tilia)

### 6.2 Pomůcky a zařízení

- Váhy (KERN 572; Kern)
- Analytické váhy (Sartorius Basic 110 S; Sartorius AG)
- Magnetické míchadlo
- Exikátor (ČSN SIMEX)
- Třepačka (VD LOVĚNA, Praha; typ T22)
- Sušárna (HS 61 A; Chirana)
- Mikrometr (SCHUT)
- Büchnerova nálevka
- Filtrační papír KA 2
- Petriho misky
- Teploměr
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky

### 6.3 Metody

#### 6.3.1 Stanovení sušiny zeinu

Sušina byla stanovena navážením příslušného množství vzorku a sušením do konstantní hmotnosti 105 °C. Sušina zeinu (99,77 %) byla stanovena dle:

$$x = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \cdot 100 \quad (1)$$

Kde  $m_1$  je hmotnost vzorku před sušením [g]

$m_2$  je hmotnost vzorku po sušení [g]

### 6.3.2 Příprava zeinových filmů

Pro přípravu vzorků byl využit postup upravený dle [50]. K vypočítanému množství zeinu (8,6 g) bylo přidáno 50 ml ethanolu (96%). Směs byla za stálého míchání zahřívána po dobu 30 minut a po mírném zchladnutí byla filtrována přes Büchnerovu nálevku. K přefiltrovanému roztoku byl přidán glycerol (2 g) a směs byla přivedena k varu na 5 minut. Po vychladnutí bylo přimícháno dané množství aktivních látek (esenciální olej, resp. ML).

Výsledná směs byla přelita (10 ml) do Petriho misky o průměru 90 mm a ponechána v sušárně při 30 °C po dobu 24 hodin. Po vysušení byly filmy uchovávány v exsikátoru při 60 % vlhkosti.

### 6.3.3 Měření tloušťky filmů

Tloušťka filmů byla měřena pomocí mikrometru s přesností na 0,001 mm na deseti náhodných místech filmu, hodnoty byly poté zprůměrovány a byla vypočítána směrodatná odchylka.

### 6.3.4 SEM analýza

Morfologie vybraných vzorků byla studována pomocí SEM mikroskopie, která byla prováděna na pracovišti Ústavu pro hydrodynamiku Akademie věd ČR v Praze. K analýze byl použit skenovací elektronový mikroskop Vega 3 s vysokým rozlišením (Tescam, ČR).

### 6.3.5 Testování antimikrobiální aktivity

#### 6.3.5.1 Použité mikroorganismy

Pro testování antimikrobiálních účinků byly použity Gram<sup>+</sup> a Gram<sup>-</sup> bakterie (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*), dále pak plísně a kvasinky (*Candida albicans* a *Aspergillus niger*). *Staphylococcus aureus* patří mezi nebezpečné patogeny, způsobující řadu závažných onemocnění. Produkuje exoenzymy a toxiny, které poškozují buněčné membrány, čímž buňku usmrcují. Mezi nemoci způsobené touto bakterií patří například abscesy, meningitidy, furunkulózy, osteomyelitidy atd. Zdravý lidský organismus se ale proti infekcím způsobeným *Staphylococcus aureus* dokáže poměrně dobře bránit [26, 27]. *Escherichia coli* se běžně vyskytuje v tlustém střevě teplokrevných živočichů a člověka. Jde však také o potenciální patogen, který vyvolává různá střevní a extraintestinální onemocnění [28, 29]. *Candida albicans* se řadí mezi podmíněné lidské patogeny, způsobující onemocnění u lidí, kteří mají

oslabenou imunitu. Tito jedinci pak trpí převážně ústními a genitálními kvasinkovými infekcemi, které nejsou život ohrožující [30]. *Aspergillus niger* je vláknitá houba, u níž byla zjištěna produkce mykotoxinu ochratoxin A. Tento toxin kontaminuje potraviny. Konzumací takto postižených potravin se snižuje schopnost reakce imunitního systému. U lidí s oslabenou imunitou může také *Aspergillus niger* vyvolat plicní či ušní infekci [31].

### 6.3.5.2 Příprava živných půd a fyziologického roztoku

Pro testování antimikrobiální aktivity filmů byl použit Mueller – Hintonův (dále MH) agar, na kterém byly kultivovány bakterie *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*.

#### Teoretické složení MH (g/l destilované vody)

Masová infúze	4,0
Kasienový hydrolyzát	17,5
Kukuřičný škrob	1,5
Agar	12,0

Pro kvasinky a plísň *Candida albicans* a *Aspergillus niger* byl použit Sabouraud (SA) agar.

#### Teoretické složení SA (g/l destilované vody)

Pepton	11,0
Glukóza	20,0
Agar	12,0

Navážené komponenty byly důkladně rozmíchány v destilované vodě a sterilovány v autoklávu po dobu asi 1 hodiny. Poté byly agary odlity na sterilní Petriho misky.

### 6.3.5.3 Agar difúzní test

Agar difúzní test patří mezi kvalitativní metody stanovení citlivosti bakterií vůči aktivní látce. Kmen je rezistentní nebo naopak citlivý vůči použité látce podle velikosti inhibiční zóny kolem disku. Pro test byla připravena mikrobiální suspenze ve fyziologickém roztoku o koncentraci 8,5 g/l, koncentrace suspenze byla upravena podle zákalového standardu s ohledem na konkrétní typ mikroorganismu. Takto připravená suspenze byla napipetována na Petriho misky s živnou půdou, na které byly následně nanášeny kruhové vzorky o průměru

9 mm. V případě testování samotných aktivních látek byly použity sterilní disky napuštěné roztokem příslušné látky. Poté byly misky inkubovány v termostatu při daných podmínkách (37 °C, 24 hodin pro bakterie; laboratorní teplota, 48 hodin pro kvasinky a plísně).

Po inkubaci byly pomocí pravítka vyhodnoceny inhibiční zóny kolem vzorků. Test byl prováděn vždy minimálně ve dvou opakováních.

### 6.3.6 Vlhkost filmů

Vlhkost filmů byla stanovena sušením vybraných vzorků filmů (2x2 cm) v sušárně při teplotě 105 °C do konstantní hmotnosti. Ze zjištěných hmotností bylo vypočítáno procento obsahu vlhkosti podle rovnice:

$$MC (\%) = \left( \frac{M_0 - M_d}{M_0} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

Kde  $M_0$  je počáteční hmotnost vzorku [g]

$M_d$  je vysušený vzorek [g]

### 6.3.7 Rozpustnost ve vodě

Vzorky použité pro stanovení vlhkosti (kapitola 6.3.6) byly po vysušení vloženy do Erlenmeyerovy baňky s destilovanou vodou a třepány na třepače po dobu 24 hodin. Po této době byly vzorky opatrně vyjmuty a sušeny při 105 °C do konstantní hmotnosti.

Rozpustnost byla stanovena podle rovnice 3. Výsledné hodnoty rozpustnosti i vlhkosti byly průměrem ze dvou stanovení.

$$S (\%) = \left( \frac{M_i - M_f}{M_i} \right) \cdot 100 \quad (3)$$

Kde  $M_i$  je počáteční hmotnost vzorku před vložením na třepačku [g]

$M_f$  je hmotnost vzorku po třepání a vysušení [g]

### 6.3.8 Stanovení propustnosti pro vodní páry

Propustnost pro vodní páry byla měřena podle postupu uvedeného v normě ASTM E 96-95 [35]. Z vysušených filmů byly připraveny kruhové vzorky (průměr 36 mm), které byly upevněny do testovacích kelímků (Obr. 14) s obsahem destilované vody (100 % relativní vlhkost). Misky se vzorky byly poté vloženy do exsikátoru (0 % relativní vlhkost). V pravidel-



ných časových intervalech byly misky váženy s přesností na 0,0001 g. Hmotnosti byly vyneseny do grafu v závislosti na čase, směrnice dané závislosti byla použita pro výpočet propustnosti dle následujících vztahů 4 a 5. Výsledné hodnoty jsou průměrem ze dvou měření.

$$WVT = \frac{k}{A} \quad (4)$$

$$WVP = \frac{WVT}{\Delta p} = \frac{WVT}{S \cdot (R_1 - R_2)} \quad (5)$$

Kde  $WVT$  je rychlost přenosu vodní páry [ $\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ]

$WVP$  propustnost pro vodní páry [ $\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ]

$k$  je ztráta hmotnosti v čase [ $\text{g} \cdot \text{h}^{-1}$ ]

$A$  je plocha vzorku [ $\text{m}^2$ ]

$\Delta p$  je rozdíl tlaku vodní páry [Pa]

$S$  je tlak nasycené vodní páry [Pa]

$R_1$  je vlhkost v testovacím kelímku [%]

$R_2$  je vlhkost prostředí [%]



Obr. 14. Testovací kelímek s filmem a exsikator pro měření propustnosti pro vodní páry.

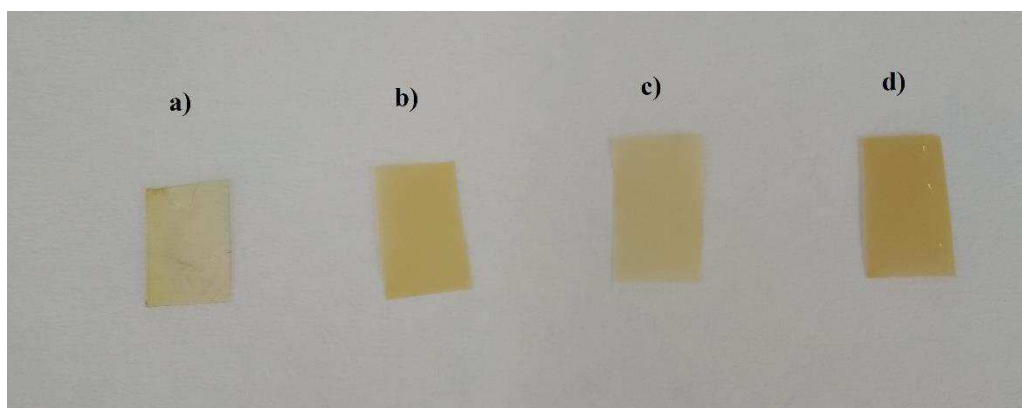
### 6.3.9 Měření povrchové energie a kontaktního úhlu

Smáčivost filmů byla hodnocena měřením kontaktního úhlu na přístroji See Systém 6.2. Pomocí mikropipety byla na film nanášena kapka o objemu 5  $\mu\text{l}$ , obraz byl následně snímán za účelem vyhodnocení úhlu smáčení. Prostřednictvím příslušného softwaru na základě Acid-base modelu byla poté vypočítána povrchová energie připravených filmů. Jako zkušební kapaliny byly použity voda, etylenglykol a diiodometan. Výsledné hodnoty jsou průměry ze tří měření.

## 7 VÝSLEDKY A DISKUZE

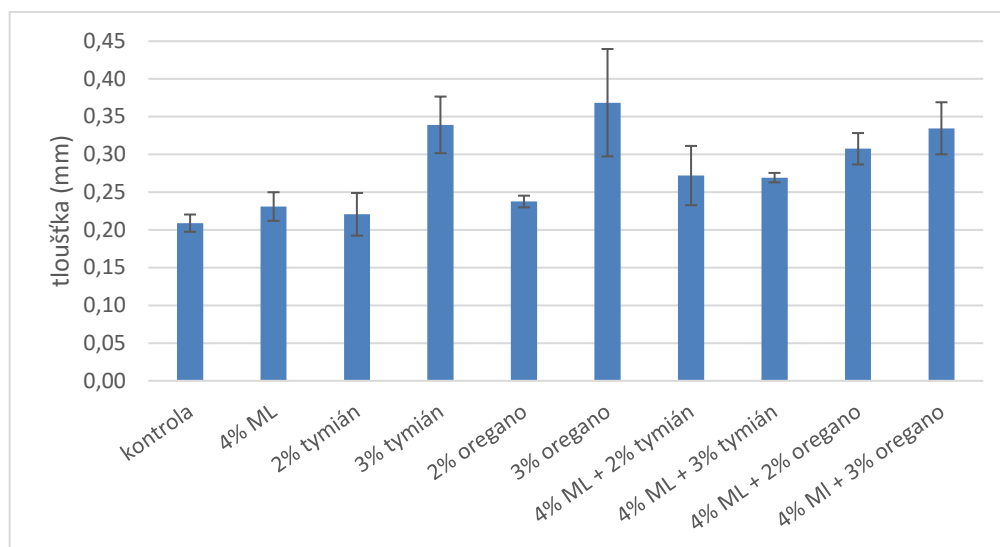
### 7.1 Vzhled a tloušťka filmů

Kontrolní filmy, odlité ze směsi zeinu v ethanolu s glycerolem bez aktivních látek, byly průhledné, homogenní a spíše křehké. Křehkost vykazovaly také vzorky obsahující pouze esenciální olej. Na druhou stranu, filmy s obsahem ML a esenciálního oleje byly flexibilnější. Podobný vliv monolaurinu na mechanické vlastnosti filmů byl potvrzen i ve studii Moradi a kol. [50]. Kontrolní zeinové filmy měly světle žlutý odstín, podobně jako filmy s obsahem ML. Vzorky, které obsahovaly esenciální olej, ať už samotný nebo v kombinaci s ML, byly tmavší (Obr. 15). Všechny připravené vzorky měly homogenní charakter bez žádných viditelných nerozpuštěných složek, resp. bez fázové separace.



Obr. 15. Vzhled filmů a) kontrolní film, b) 2 % ML + 1 % tymián, c) 3 % ML, d) 3 % tymián.

Na obrázku (Obr. 16) jsou hodnoty tloušťky vybraných vzorků, které jsou průměrem z 10 měření. Tloušťka kontrolního zeinového filmu byla 0,209 mm. Po přidání aktivních látek došlo ke zvýšení hodnot, největší rozdíl oproti kontrole (43 %) by prokázán u filmu s obsahem 3 % oreganového oleje. Při srovnání vzorků s obsahem kombinací EO a 4 % ML byly vyšší hodnoty naměřeny u filmů s oreganem.



Obr. 16. Tloušťka vybraných filmů.

## 7.2 Vlhkost filmů a rozpustnost ve vodě

Obsah vlhkosti u kontrolního zeinového filmu bez aktivních látek činil  $10,62 \pm 0,18$  %. V důsledku modifikace pomocí aktivních látek došlo ke zvýšení obsahu vlhkosti, a to na  $21,48 \pm 0,03$  % pro 3 % ML, a  $23,24 \pm 0,04$  % pro 3 % ML s 1 % oregano. Nebyl tedy pozorován zásadní rozdíl vlhkosti vzorků s ML bez a v přítomnosti esenciálního oleje. Vlhkost dalších vzorků nebyl stanovena z časových důvodů a bude třeba se tomu věnovat v rámci dalších experimentů.

Rozpustnost polymerních filmů je další významná charakteristika, ovlivňující například odolnost vůči vlhkosti a stabilitu během skladování. V minulých letech měl ideální obal vykazovat minimální interakce s obsaženým produktem. Tento pohled se změnil s vývojem aktivních obalových materiálů, u nichž mohou být vzájemné interakce s potravinami žádoucí, v závislosti na konkrétní aplikaci.

Hodnota rozpustnosti našeho kontrolního vzorku byla stanovena na 16,03 %, přičemž srovnatelného výsledku bylo dosaženo autory práce [37]. Ve studii [36] činila rozpustnost zeinového filmu o něco méně, a to 12,8 %. Mushtaq a kol. [42] stanovili rozpustnost zeinových filmů 6,2 %, tato hodnota se ovšem zvýšila po přidání extraktu z granátového jablka na 18,3 %. Důvodem může být přítomnost vysokomolekulárních látek na bázi fenolů, elagitaninů a flavonoidů které jsou charakteristické vysokou rozpustností. Moradi a kol. [50] stanovili rozpustnost ve vodě pomocí měření botnacího indexu, kdy vzorky zeinových filmů byly ponořeny do destilované vody a uloženy v klimatizační komoře při vlhkosti 40 až 45 %

po dobu 24 hodin. Ze získaných hodnot vyplývá, že index nabotnění samotného zeinového filmu se pohyboval okolo 9 % a přídavek 1 % monolaurinu vyvolal zvýšení na zhruba dvojnásobnou hodnotu. Rozdíly mezi hodnotami naměřenými různými autory mohou spočívat také v odlišných podmínkách přípravy, obsahu glycerolu apod. Je ovšem zřejmé, že v porovnání s hodnotami rozpustnosti ostatních hydrokoloidů, jako je například želatina (64 %), chitosan (32 %), alginát (99,5 %) lze zeinové filmy považovat za prakticky nerozpustné ve vodě. Toto chování je možné vysvětlit na základě skutečnosti, že 50 % aminokyselinových zbytků obsažených v zeinu je hydrofobních [36, 42].

Rozpustnost byla stanovena jen u kontrolního vzorku, jelikož u zbývajících filmů došlo k znehodnocení během sušení, což znemožnilo realizaci další části experimentu.

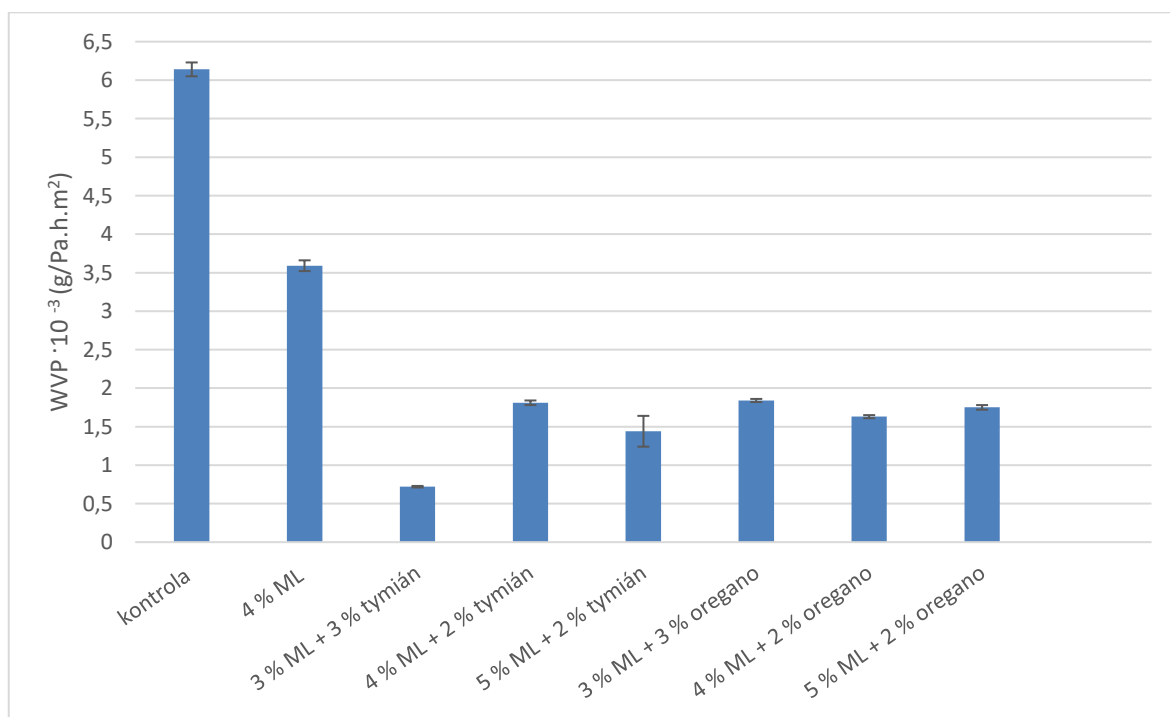
### 7.3 Propustnost pro vodní páry

Propustnost pro vodní páry je významnou fyzikální charakteristikou ovlivňující výsledné aplikace polymerních filmů. Transport vody může nejen u potravinářských obalových materiálů zásadně ovlivnit mechanismy rychlosti degradace produktu, změny barvy, oxidace lipidů, degradaci vitamínů, enzymovou aktivitu, změny textury a další. To vše snižuje životnost a kvalitu balených produktů [36].

I když je zein díky vysokému obsahu nepolárních aminokyselin méně hydrofilní než ostatní proteinové materiály, jako je například syrovátka nebo lepek, v prostředí s vysokou vlhkostí se může hydrofilita zásadně zvyšovat. Následkem je botnění a zhoršení mechanických a bariérových vlastností. [36, 37, 40]. Afinita k vodě může být regulována přidáním různých aditiv, významný vliv mají látky jako je glycerol, dále pak triethylenglykol, kyselina levulová, polyethylen glykol, kyselina olejová [40].

Hodnoty propustnosti pro vybrané vzorky jsou uvedeny na obrázku 17. Kontrolní film vykazoval nejvyšší propustnost  $6,2 \cdot 10^{-3} \text{ g/Pa} \cdot \text{h} \cdot \text{m}^2$ . Vlivem modifikace prostřednictvím aktivních látek (ML a esenciálních olejů) došlo k poklesu hodnot, které se pohybovaly od  $1,4 \cdot 10^{-3}$  do  $1,8 \cdot 10^{-3} \text{ g/Pa} \cdot \text{h} \cdot \text{m}^2$ . Nejnižší propustnost byla naměřena u filmu s obsahem 3 % ML a 3 % EO tymián, a to  $0,7 \cdot 10^{-3} \text{ g/Pa} \cdot \text{h} \cdot \text{m}^2$ . Kashiri a kol. [36], kteří se zabývali studiem zeinových filmů s obsahem lauroyl arginátu, stanovili hodnotu propustnosti kontrolních zeinových vzorků okolo  $5 \cdot 10^{-14} \text{ kg} \cdot \text{m/m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{Pa}$ . Naše hodnota po přepočtu na uvedené jednotky je o řád vyšší ( $3,6 \cdot 10^{-13} \text{ kg} \cdot \text{m/m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{Pa}$ ). Naopak ve studii [54], kde po zamíchání zeinu do roztoku etanolu a přídavku různých typů rozpouštědel využili ještě vysrážení studenou vodou a

další homogenizaci pomocí hnětače, je uvedena propustnost  $1,9 \text{ g}\cdot\text{mm}/\text{kPa}\cdot\text{h}\cdot\text{m}^2$ , což je v přepočtu na námi uváděné jednotky hodnota o tři řády vyšší než u našeho vzorku. Důvodem rozdílných výsledků může být řada faktorů, jako je koncentrace plastifikátoru, následný způsob kondicionace vzorků a samozřejmě podmínky přípravy a s tím související rozdílná tloušťka vzorků, která se může lišit i o několik řádů. Pro srovnání námi připravené kontrolní zeinové vzorky měly průměrnou tloušťku 0,2 mm, zatímco v [57] testovali vzorky s tloušťkou 0,09 mm.



Obr. 17. Propustnost pro vodní páry zeinových filmů s obsahem aktivních látek.

## 7.4 Povrchové vlastnosti

Aplikace zeinových filmů závisí kromě výše uváděných fyzikálních vlastností také na hydrofilitě, resp. hydrofobicitě, která souvisí se smáčivostí daného povrchu. Smáčivost lze v praxi sledovat pomocí měření smáčecího (kontaktního) úhlu, který je funkcí výšky kapky a šířky její základny. Mezní hodnotou smáčení je úhel  $90^\circ$  [33, 34]. Kontaktní úhel závisí na povrchových napětích, resp. energiích jednotlivých rozhraní a pomocí Youngovy rovnice jej lze vyjádřit jako:

$$\cos \theta = \frac{\gamma_{SG} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LG}} \quad (6)$$

Kde  $\cos \theta$  je kontaktní úhel

$\gamma_{SG}$  je povrchové napětí na rozhraní pevná látka/plyn [mN/m]

$\gamma_{SL}$  je povrchové napětí na rozhraní pevná látka/kapaliny [mN/m]

$\gamma_{LG}$  je povrchové napětí na rozhraní kapalina/plyn [mN/m]

V tabulce 4 jsou uvedeny naměřené hodnoty kontaktních úhlů pro všechny testované kapaliny. V případě kontrolního zeinového filmu byl naměřen úhel smáčení pro destilovanou vodu  $45^\circ$ . V dalších studiích byly naměřeny hodnoty vyšší, a to  $72^\circ$  [43], resp.  $62^\circ$  [51]. Tento rozdíl může být způsoben vlivem různého množství použitého plasifikátoru při přípravě vzorků. Bylo také zjištěno, že hydrofilitu zeinového filmu lze regulovat jak pomocí použitého rozpouštědla, tak případnou následnou úpravou. Například ošetření filmů horkou parou po dobu 20 minut způsobilo pokles kontaktního úhlu, a tudíž zvýšení hydrofility [43]. Další možností, jak ovlivnit smáčivost zeinového filmu, je například UV záření nebo ošetření plazmou [44]. U vzorků s obsahem plastifikátorů může docházet k nárůstu hydrofility vzhledem k jejich potenciální hygroscopicitě, tj. schopnosti vázat vodu. Velikost kontaktních úhlů měřených pro vodu se pak může zásadně měnit i během skladování. U vzorků s obsahem glycerolu byl například prokázán nárůst kontaktního úhlu z  $52^\circ$  na  $61^\circ$  během 1 týdne, což lze vysvětlit migrací plastifikátoru a ztrátou podílu vlhkosti ze vzorku [54].

Vzhledem k charakteru a složení monolaurinu a esenciálních olejů lze očekávat po jejich přidavku do zeinové matrice zvýšení hydrofobicity. Z tabulky 4 je patrné, že tento trend byl potvrzen. Největší nárůst kontaktního úhlu pro destilovanou vodu v porovnání s kontrolou (50 %) byl zaznamenán u vzorku s obsahem 5 % ML a 2 % tymiánu.

Tab. 4. Hodnoty kontaktních úhlů zeinových filmů pro různé kapaliny (*W* destilovaná voda, *E* etylenglykol, *DI* diiodometan).

Vzorek	$\theta_w$ (°)	$\theta_E$ (°)	$\theta_{DI}$ (°)
kontrola	45,39	43,61	62,14
4 % ML	83,81	72,78	64,13
3 % ML + 3 % oregano	65,15	77,90	50,00
3 % ML + 3 % tymián	82,92	80,62	58,99
5 % ML + 2 % oregano	77,77	75,23	48,07
5 % ML + 2 % tymián	91,06	74,90	57,70

V tabulce 5 jsou uvedeny hodnoty povrchových energií, které byly počítány na základě Acid-base modelu pro tři kapaliny (destilovaná voda, diiodometan a etylenglykol). Celková povrchová energie  $\gamma^{total}$  se dělí dále na disperzní  $\gamma^{LW}$  a polární složku  $\gamma^{AB}$  (rovnice 7). Dle Acid base teorie lze polární složku dále rozdělit na elektron akceptorovou a elektron donorovou část (rovnice 8).

$$\gamma^{total} = \gamma^{LW} + \gamma^{AB} \quad (7)$$

$$\gamma^{AB} = 2\sqrt{\gamma^+ \gamma^-} \quad (8)$$

Tab. 5. Hodnoty povrchových energií pro jednotlivé vzorky.

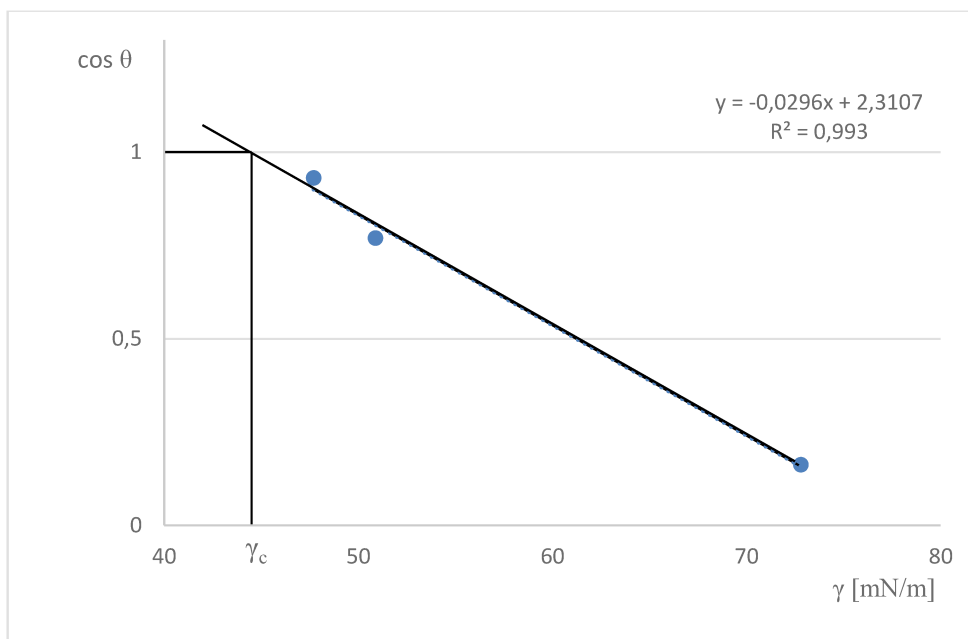
Vzorek	$\gamma^{total}$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma^{LW}$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma^{AB}$ (mJ/m <sup>2</sup> )
kontrola	28,67	27,34	1,33
4 % ML	30,45	26,20	4,25
3 % ML + 3 % oregano	79,02	34,27	44,75
3 % ML + 3 % tymián	46,04	29,15	16,89
5 % ML + 2 % oregano	56,27	35,34	20,93
5 % ML + 2 % tymián	33,40	29,87	3,53

Z tabulky 5 je patrné, že přidávkem aktivních látek došlo ke zvýšení povrchové energie zeinových filmů, což lze vysvětlit nárůstem polárních složek a interakcí v polymerní matici. Nejvyšší hodnoty (79 mN/m) bylo dosaženo u vzorku s obsahem 3 % ML a 3 % oregano.

Podle Zismanovy teorie lze pro pevné povrchy s  $\gamma_s < 100$  mN/m (tzv. nízko energetické povrchy) získat přibližně lineární funkci vynesemím závislosti  $\cos \theta$  na povrchovém napětí dané kapaliny. Z grafu lze pak extrapolací do  $\cos \theta = 1$  odečíst hodnotu, zvanou kritické povrchové napětí smáčení  $\gamma_c$ , které je definováno jako povrchové napětí kapaliny, která se

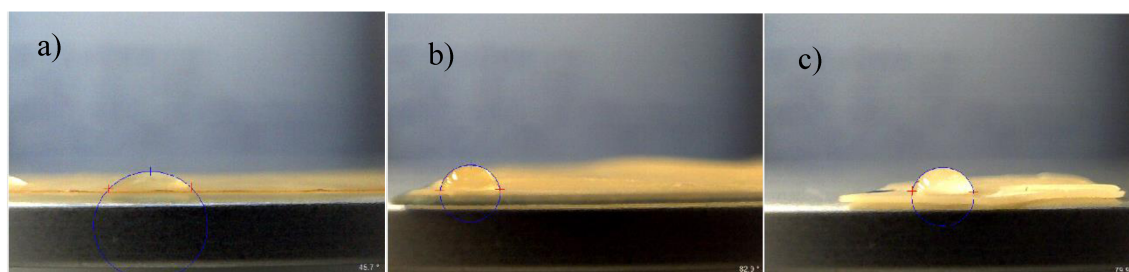


právě rozestře na povrchu pevné látky za účelem kompletního smáčení. Při vynesení námi získaných hodnot  $\cos \theta$  jako funkce povrchových napětí referenčních kapalin (voda 72,8 mN/m, etylenglykol 47,7 mN/m, diiodomethan 50,8 mN/m) byla získána téměř lineární závislost pouze pro kontrolní zeinový film (Obr.18). Extrapolací na  $\cos \theta = 1$  byla získána hodnota kritického povrchového napětí  $\gamma_c = 44,2$  mN/m [51].



Obr. 18 Zismanův graf zeinového filmu pro stanovení kritického povrchového napětí

Na obrázku 19 lze vidět snímky profilu kapky vody nanesené na příslušném vzorku zeinového filmu získané při měření na přístroji See System.

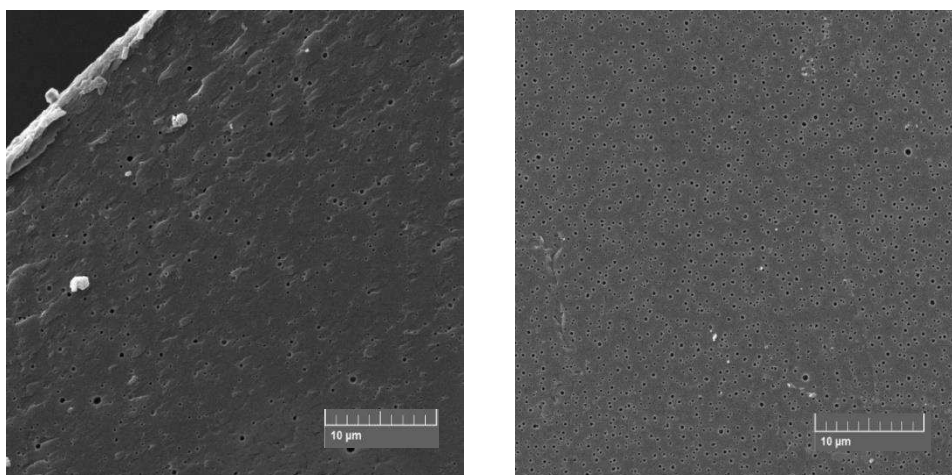


Obr. 19. Kapka vody na a) kontrolním filmu, b) filmu s přísadkami 3 % ML + 3 % tymián a c) filmu s přísadkami 3 % ML + 3 % oregano.

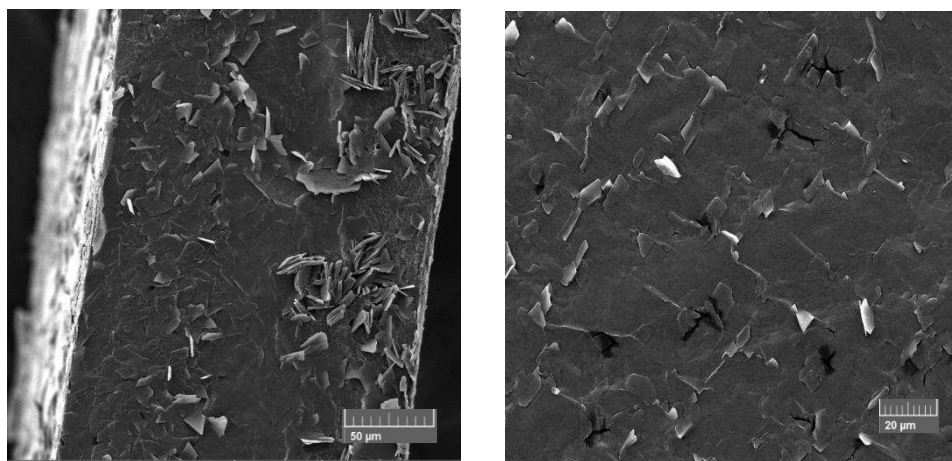
## 7.5 SEM analýza

Na snímcích z elektronového mikroskopu je možné pozorovat strukturní změny zeinu po přidání aktivních látek. Na obrázku (Obr. 20) je vyobrazen kontrolní zeinový film, který zejména na povrchu obsahuje pravidelně rozmístěné póry o průměrně velikosti 0,2  $\mu\text{m}$ . Přesto je struktura poměrně kompaktní bez větších deformací. Podobná struktura byla sledována například ve studii Güçbilmez a kol [55], nebo v [54], kdy jsou bílé částice připisovány plastifikátoru. Na SEM snímcích autorů Khalil a kol. [56] bylo kromě pórů patrné i značné množství sraženin, vzniklých v důsledku nerozpuštění zeinového proteinu. Důvodem může být odlišná příprava vzorků, jiná koncentrace roztoku zeinu a rozdílné změkčovaadlo, kdy v jejich případě byl použit polyetylglykol. Vliv změkčovaadla na kompaktnost zeinové matrice obecně je patrný ze studie [51], kdy vzorek připravený bez změkčovaadla vykazoval volnou strukturu s mnoha dutinami a patrnými nehomogenitami. Na druhou stranu, u zeinu obsahujícího plastifikátory na bázi cukrů byla detekována kompaktní a hustá struktura. Na základě obrázku 20 lze ovšem považovat vybrané podmínky přípravy našich vzorků za optimální, stejně jako koncentraci a typ přidaného změkčovaadla glycerolu.

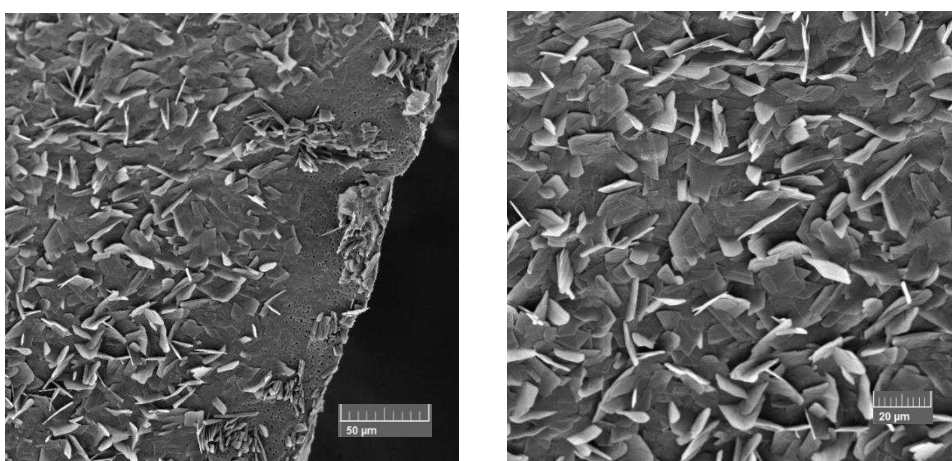
Po přidání ML a EO (oregano, tymián) jsou na povrchu i na řezu filmů patrné zásadní mikrostrukturální změny v podobě zřetelných krystalů. U filmu s přídatkem EO tymián (Obr. 21) jsou útvary menší, o průměrné velikosti 10  $\mu\text{m}$ . U filmu se 4 % ML a 2 % EO oregano (Obr. 22) je zřetelná velmi členitá „listovitá“ struktura s většími útvary (průměrný rozměr cca 15  $\mu\text{m}$ ). Mikrostruktura zeinových filmů byla sledována i v práci [53], kde byly připraveny filmy s obsahem tymolu, tedy složky hojně zastoupené jak v tymiánovém, tak oreganovém esenciálním oleji. Mikroskopické snímky odhalily přítomnost pórů, jejichž množství se zvyšovalo s rostoucí koncentrací tymolu. Vzhledem k charakteru našich snímků (Obr. 21 a 22), kde je patrná zcela odlišná struktura, lze konstatovat, že u našich vzorků hraje primární roli přítomný monolaurin. Z důvodu nedostatku literatury týkající se této problematiky ovšem nebylo možno SEM snímky porovnat s podobnými vzorky.



Obr. 20. SEM řezu (vlevo) a povrchu (vpravo) kontrolního zeinového filmu.



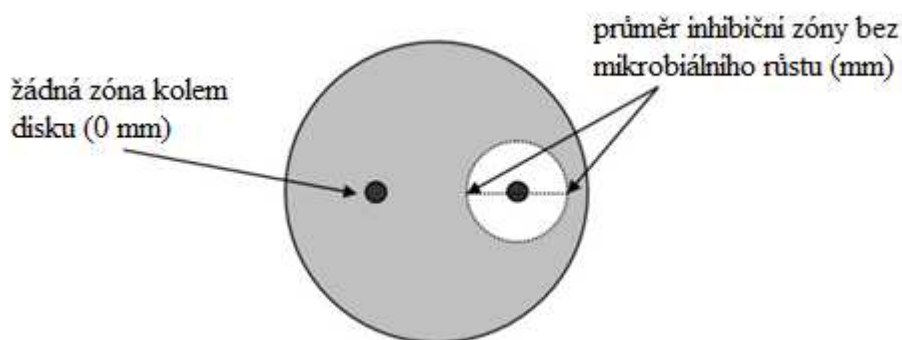
Obr. 21. SEM řezu (vlevo) a povrchu (vpravo) filmu se 4 % ML a 2 % tymiánu.



Obr. 22. SEM řezu (vlevo) a povrchu (vpravo) filmu se 4 % ML a 2 % oregana.

## 7.6 Antimikrobiální účinky

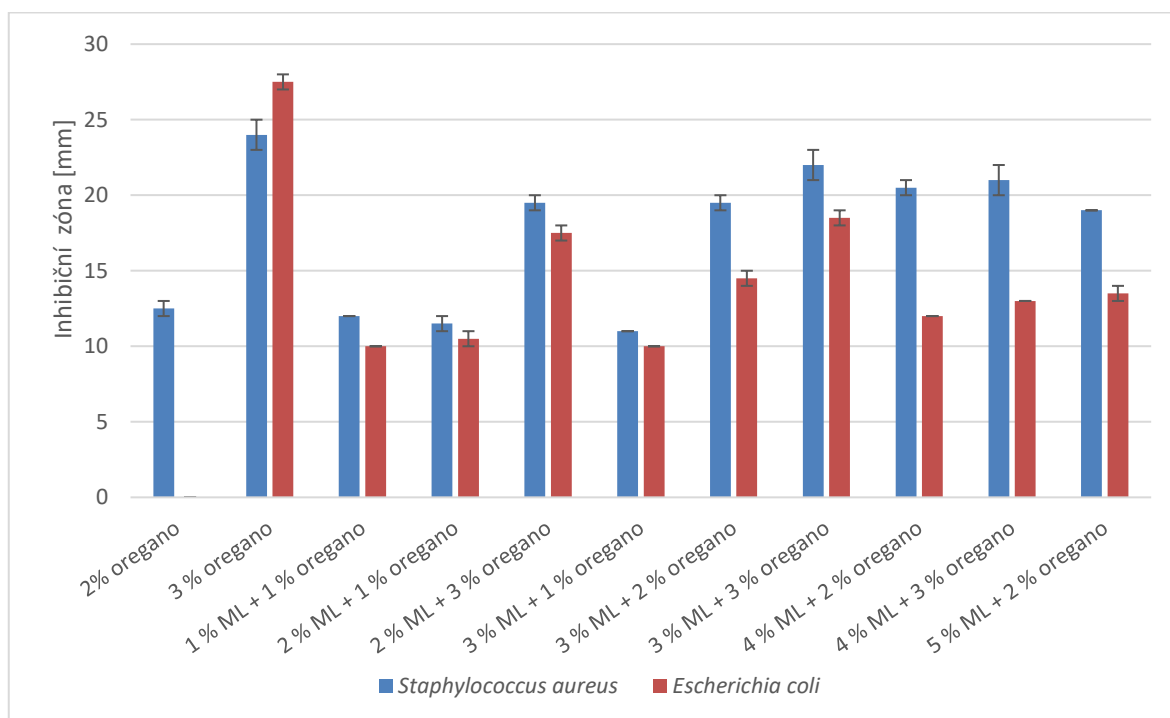
Antimikrobiální aktivita připravených zeinových filmů byla měřena pomocí agar difúzního testu. Inhibiční zóny byly vyhodnoceny jako průměry okolo vzorku, v nichž nebyl zaznamenán mikrobiální růst v mm (Obr. 23).



Obr. 23. Měření inhibičních zón [upraveno podle 46].

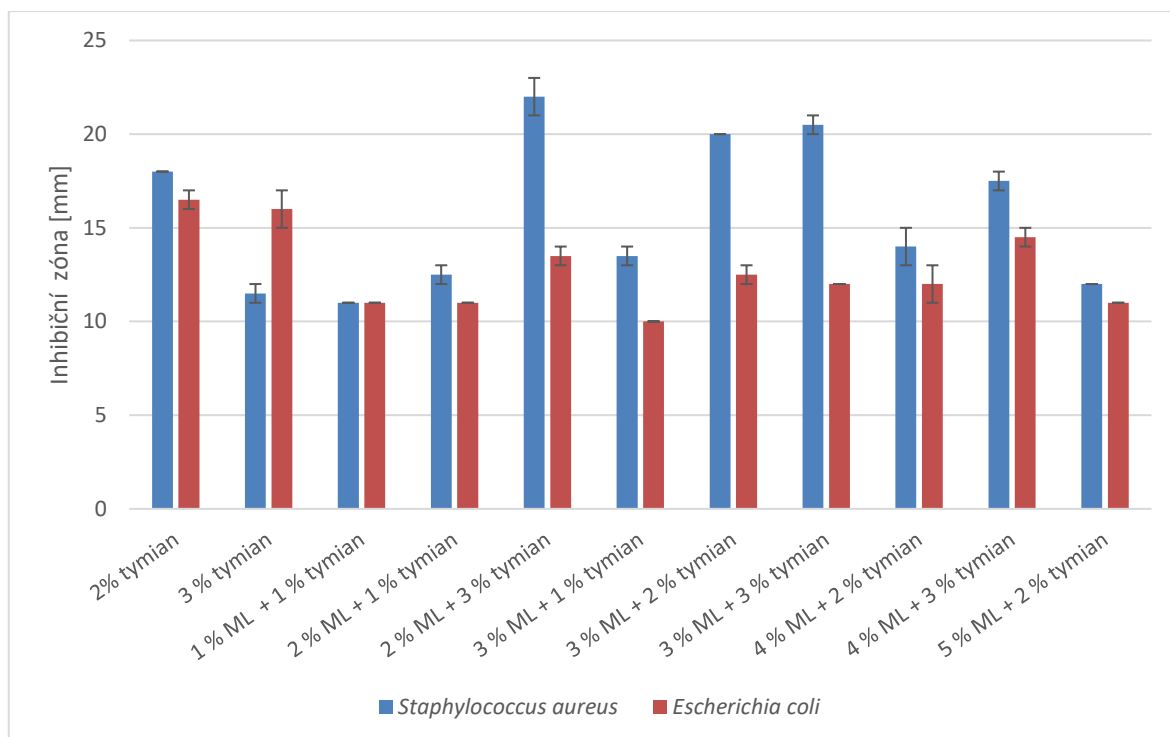
### 7.6.1 Antimikrobiální účinky aktivních látek a jejich kombinací

Nejdříve byly testovány jednotlivé aktivní látky, a to ML a EO (oregano a tymián). Na sterilní disk byl nanesen roztok s aktivními látkami, které byly připraveny rozpuštěním v etanolu v koncentracích, odpovídajících množství použitým pro přípravu zeinových filmů.



Obr. 24. Velikosti inhibičních zón aktivních látek ML a EO oregano.

Na obrázku 24 je srovnání výsledků antibakteriálních testů aktivních látek, a to oreganového EO, resp. kombinace tohoto oleje s ML. Je zřejmé, že samotný EO v koncentraci 3 % prokázal největší aktivitu jak vůči *Staphylococcus aureus* (24 mm), tak proti *E. coli* (27,5 mm). Stejná koncentrace oregana ve směsi s ML vedla ke snížení aktivity, bez ohledu na množství monoacylglycerolu (1 až 4 %). Z testovaných kombinací se jeví jako optimální směs 3 % ML a 3 % oregana. Všechny roztoky byly účinnější vůči G<sup>+</sup> *S. aureus*.



Obr. 25. Velikosti inhibičních zón aktivních látek ML a EO tymián

V případě roztoků s tymiánovým olejem, resp. kombinací tohoto EO s ML, se proti *S. aureus* jevíly nejúčinnější vzorky s obsahem 2 % ML a 3 % tymiánu, dále pak roztoky s 3 % ML a 2, resp. 3 % tymiánu, které prokázaly téměř srovnatelnou účinnost (Obr. 25).

Pro doplnění byly provedeny testy vybraných aktivních látek, případně jejich kombinací proti kvasinkám a plísním. Z tabulky 6 je patrné, že *Aspergillus niger* byl více rezistentní, jelikož většinou nebyly prokázány žádné inhibiční zóny. V případě kvasinky *Candida albicans* bylo největšího inhibičního účinku (inhibiční zóna 29 mm) dosaženo u roztoku obsahujícího 4 % ML a 2 % oreganového EO.

Tab. 6. Velikosti inhibičních zón aktivních látek vůči kvasinkám a plísním

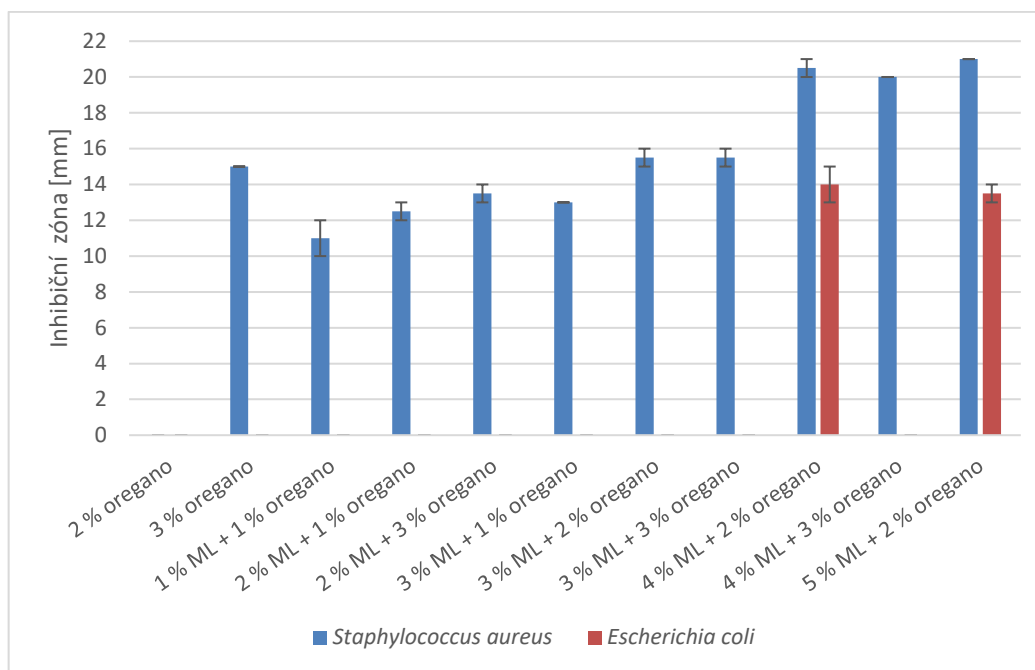
Aktivní látka	Inhibiční zóny [mm]	
	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
4 % ML	10,5±0,5	-
4 % ML + 2 % oregano	29,0±0	11,5±0,5
5 % ML + 2 % oregano	25,0±0	11,0±0
4 % ML + 2 % tymián	20,5±0,5	-
5 % ML + 2 % tymián	13,5±0,5	10,0±0

### 7.6.2 Antimikrobiální účinky zeinových filmů s obsahem aktivních látek a jejich kombinací

V další části byly testovány připravené zeinové filmy. Kontrolní film nevykazoval žádný účinek proti testovaným bakteriím. Ze vzorků zeinu obsahujících pouze ML, byla nejučinnější nejvyšší testovaná koncentrace 4 %, a to pouze proti *S. aureus* (Tab. 7). *E. coli* prokázala rezistenci vůči všem sledovaným koncentracím monolaurinu.

Tab. 7. Velikosti inhibičních zón filmů s obsahem ML.

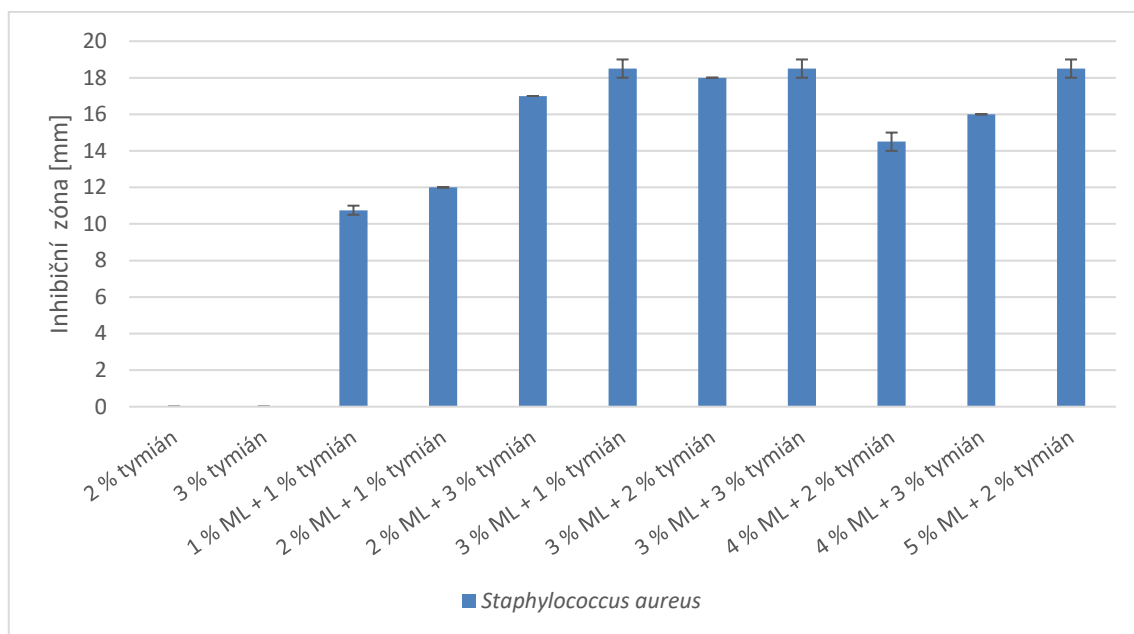
Vzorek	Inhibiční zóna [mm]	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
kontrola	-	-
1 % ML	11,5±0,5	-
2 % ML	12,0±0	-
3 % ML	11,5±0,5	-
4 % ML	15,5±0,5	-



Obr. 26. Velikosti inhibičních zón filmů s obsahem ML a EO oregano.

Při testování zeinových filmů s aktivními látkami byla poměrně zásadně snížena účinnost EO v porovnání s testy samotných aktivních látek (kapitola 7.6.1). Z obrázku 26 je patrné, že vzorek s obsahem 2 % oregana dokonce neprokázal inhibiční zónu ani vůči jednomu testovanému mikroorganismu. Na druhou stranu, ve studii [59], zabývající se filmy na bázi sójového proteinu s obsahem EO z tymiánu, resp. oregana byla prokázána účinnost proti všem vybraným bakteriím (*S.aureus*, *L. monocytogenes*, *E.coli*), a to již v minimální testované koncentraci 1 %. Nobile a kol. [53] potvrdil antimikrobiální účinky zeinových filmů s obsahem tymolu, tedy hlavní složky obsažené v oreganovém a tymiánovém EO. Uvedené vzorky ovšem obsahovaly vyšší koncentrace tymolu od 5 až do 35 %.

Z našich výsledků je zřejmé, že inkorporací EO (v koncentraci nižší než 3 %) do zeinové matrice došlo k inaktivaci EO. Koncentrace 3 % oreganového oleje a další kombinace s ML se projevily jako účinné vůči *S. aureus*, kdy je patrný stoupající trend aktivity s rostoucími koncentracemi aktivních látek. Na druhou stranu, *E. coli* byla velmi rezistentní a inhibiční zóna byla naměřena pouze u vzorku zeinu se 4, resp. 5 % ML a 2 % oregana.



Obr. 27. Velikosti inhibičních zón filmů s obsahem ML a EO tymián.

Na obrázku 27 jsou znázorněny výsledky pro filmy s tymiánovým olejem, ať už samotným, nebo v kombinaci s ML. V případě samotného EO nebyl prokázán žádný antibakteriální efekt, a to ani vůči citlivějšímu *S. aureus*. V této sérii vzorků byly účinnější kombinace tymiánu s ML, a to nejvíce koncentrace 3 % ML s 1, 2, resp. 3 % EO, kdy se naměřené velikosti inhibičních zón příliš nelišily. Další zvýšení koncentrace monolaurinu na 4 nebo 5 % vedlo spíše k poklesu aktivity. Žádný ze systémů neprokázal účinnost proti *E. coli*.

Agar difúzní test využil i Moradi a kol. [50], který sledoval antimikrobiální účinky zeinových filmů s obsahem EO získaného ze *Zataria multiflora* a monolaurinu. Podobně jako v naší studii nebyla prokázána žádná účinnost kontrolního zeinového vzorku, zatímco inkorporace EO, resp. kombinace s ML vedla k poměrně zásadnímu zvýšení účinku, přičemž vyšší aktivita byla prokázána u  $G^+$  *L. monocytogenes* v porovnání s  $G^-$  *E. coli*.

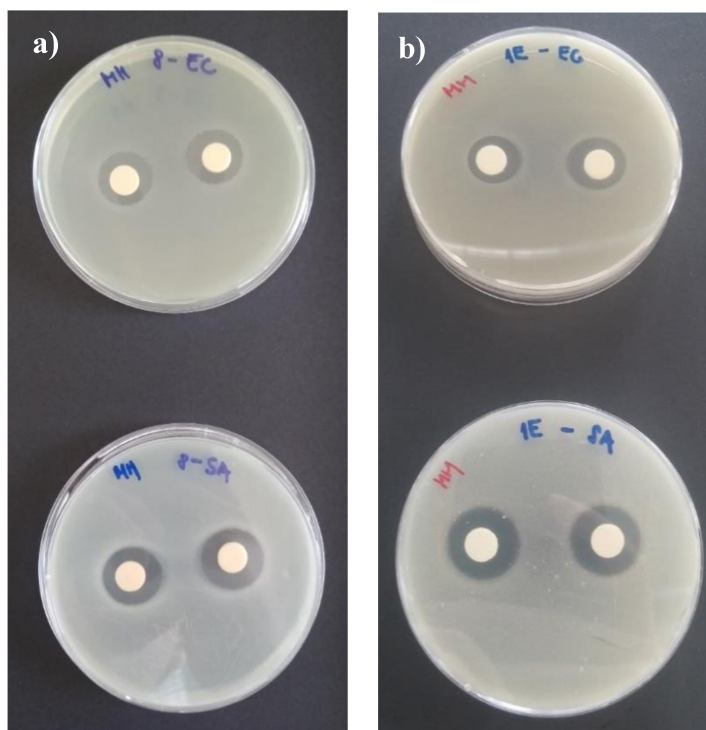
Vybrané vzorky zeinových filmů byly použity i pro testování proti plísním a kvasinkám. Výsledky uvedené v tabulce 8 indikují, že neúčinnější byly filmy obsahující 4 % ML a 2 % oreganového EO, resp. 5 % ML a 2 % oreganového oleje. Ostatní filmy neprokázaly žádnou nebo jen velmi zanedbatelnou aktivitu.



Tab. 8. Velikosti inhibičních zón zeinových filmů vůči kvasinkám a plísním

Vzorek	Inhibiční zóny [mm]	
	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
kontrola	-	-
4 % ML	-	-
4 % ML + 2 % oregano	19,5±0,5	13,5±0,5
5 % ML + 2 % oregano	16,5±0,5	13±0
4 % ML + 2 % tymián	-	-
5 % ML + 2 % tymián	13±0	-

Na obrázku 28 lze vidět srovnání výsledků agar difúzního testu na Petriho miskách s filmy obsahujícími pouze esenciální olej (oregano) a kombinaci 2 % ML s 3 % oregana. V obou případech byl větší účinek sledován u Gram pozitivní bakterie *Staphylococcus aureus*, která obecně vykazovala větší citlivost ve většině případů, jak bylo potvrzeno i na předchozích grafech. Toto tvrzení se potvrdilo i v dalších studiích, například [59], nebo [50].



Obr. 28. Inhibiční zóny vzorků zeinu s a) 2 % oregano a b) 2 % ML + 3 % oregano

## ZÁVĚR

Bakalářská práce se zabývala přípravou a charakterizací filmů na bázi zeinu a vybraných aktivních látek, konkrétně esenciálních olejů tymián, resp. oregano a monoacylglycerolu kyseliny laurové. Všechny složky byly účelově vybrány z důvodu jejich environmentální přiznivosti i ekonomické dostupnosti.

Vlivem začlenění aktivních látek došlo ke změně některých strukturních, povrchových a antimikrobiálních vlastností. Modifikace zeinové matrice se pozitivně projevila na bariérových vlastnostech, kdy u filmu s obsahem 3 % ML a 3 % tymiánového EO došlo k poklesu propustnosti pro vodní páry až o 88 % oproti kontrolnímu vzorku. Vlivem přidaných aktivních látek došlo k nárůstu hydrofobicity filmů, která byla sledována pomocí měření kontaktních úhlů. Významné změny se projevíly i v morfologii filmů, sledované pomocí SEM. Největší podíl praktické části byl věnován testování antimikrobiálních účinků připravených filmů. Bylo zjištěno, že  $G^+$  bakterie (*Staphylococcus aureus*) prokázala vůči použitým aktivním látkám vyšší citlivost v porovnání s  $G^-$  bakterií (*Escherichia coli*). Jako optimální se jevila kombinace se 4, resp. 5 % ML a 2 % oreganového oleje. Vůči *Staphylococcus aureus* prokázal dostatečnou aktivitu i film obsahující 3 % ML a 1, 2, resp. 3 % tymiánového oleje. Při testování proti plísním a kvasinkám byl nejúčinnějším vzorkem film s obsahem 4 % ML a 2 % oreganového oleje.

Závěrem lze říci, že inkorporace vybraných aktivních látek může zásadně ovlivnit fyzikální i antimikrobiální vlastnosti zeinových filmů. Výsledky této bakalářské práce lze považovat za základ pro další experimenty týkající se zejména optimalizace složení zeinových filmů, testování jejich stability a v neposlední řadě studia podmínek uvolňování aktivních látek ze zeinové matrice.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] KODÍČEK M., Biochemické pojmy, VŠCHT Praha, 2004
- [2] VELÍŠEK J., Chemie potravin, Tábor, 1999
- [3] POKORNÝ J., DUBSKÁ L., Technologie tuků, Praha, 1986
- [4] DAVÍDEK J., JANÍČEK G., POKORNÝ J., Chemie potravin, Praha, 1983
- [5] ETTINGER, Marcus. *The Advanced Healing Center of Orange: Antiviral and Antibacterial Actions of Monolaurin and Lauric Acid* [online]. Aug 16, 2010 [cit. 2017-12-06]. Dostupné z: <http://www.advancedhealing.com/antiviral-antibacterial-actions-of-monolaurin-and-lauric-acid/>
- [6] LIEBERMAN, Shari, Mary G ENIG a Harry G PREUSS. Review of monolaurin and lauric acid. *Alternative and Complementary Therapies* [online]. Mary Ann Liebert, 2006, 12(6), 310-314 [cit. 2018-05-06]. DOI: 10.1089/act.2006.12.310. ISSN 10762809.
- [7] TANGWATCHARIN, Pussadee; KHOPAIBOOL, Prapaporn. Activity of Virgin Coconut Oil, Lauric Acid or Monolaurin in Combination with Lactic Acid Against Staphylococcus Aureus. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 2012, vol. 43, no. 4 s. 969-985. [cit. 2018-01-20] ISSN:0125-1562.
- [8] DAL BELLO, Fabio a Elke ARENDT. Gluten-free, Cereal Products and Beverages. *Elsevier* [online]. Amsterdam: Academic, 2008, 2008, - [cit. 2018-05-06]. ISSN -. Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpGFCPB002/gluten-free-cereal-products/gluten-free-cereal-products>.
- [9] SHUKLA, Rishi a Munir CHERYAN. Zein. *Industrial Crops* [online]. Elsevier B.V, 2001, 13(3), 171-192 [cit. 2017-10-25]. DOI: 10.1016/S0926-6690(00)00064-9. ISSN 09266690.
- [10] MOMANY, Frank A, David J SESSA, John W LAWTON, Gordon W SELLING, Sharon A. H HAMAKER a Julious L WILLETT. Structural characterization of  $\alpha$ -zein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. Amer Chemical Soc, 2006, 54(2), 543-547 [cit. 2017-10-25]. DOI: 10.1021/jf058135h. ISSN 00218561
- [11] MATOUŠ, Bohuslav, et al. *Základy lékařské chemie a biochemie*. 1. vydání. Praha: Galén, 2010. 540 s. ISBN 978-80-7262-702-8.

- [12] HAUERLANDOVÁ, Iva. *Antimikrobní účinky Netradičních Monoacylglycerolů*. Zlín, 2008. Dizertační práce. Univerzita Tomáše Bati Ve Zlíně.
- [13] PLEVA, Pavel. *Inhibiční vliv Monoacylglycerolů Na Bakterie Rodu Lactococcus*. Zlín, 2010. Dizertační práce. Univerzita Tomáše Bati Ve Zlíně.
- [14] Fyzikální a chemické vlastnosti lipidů Distanční text, 2008
- [15] DAVIDSON, P. Michael, John Nikolaos SOFOS a Alfred Larry BRANEN. *Antimicrobials in food*. -. London: Taylor & Francis, 2005. ISBN 9780824740375.
- [16] DUFOUR, Muriel, Janet MANSON, Philip BREMER, Jean-Pierre DUFOUR, Gregory COOK a Robin SIMMONDS. Characterization of Monolaurin Resistance in *Enterococcus faecalis*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. American Society for Microbiology, 2007, 73(17), 5507-5515 [cit. 2018-05-06]. DOI: 10.1128/AEM.01013-07. ISSN 00992240.
- [17] PHILLIPS, Glyn O a Peter A WILLIAMS. *Handbook of Food Proteins*. -. Cambridge, UK: Woodhead Publishing, 2011. ISBN 9781845697587.
- [18] SALVADOR, Amparo a Alberto Chisvert SANÍA. *Analysis of Cosmetic Products*. Amsterdam: Elsevier, 2007. ISBN 978-0-444-52260-3.
- [19] BUCHBAUER, Gerhard a K. Husnu Can BASER. *Handbook of essential oils Science, Technology, and Applications*. -. New York: Taylor and Francis Group, 2010. ISBN 978-1-4200-6315-8.
- [20] Nobilis Tilia laboratoře přírodní kosmetiky [online]. [cit. 2018-03-8]. Dostupný z www: <https://eshop.nobilis.cz/co-je-aromaterapie/>
- [21] NIETO, Gema. Biological Activities of Three Essential Oils of the Lamiaceae Family. *Medicines*[online]. MDPI, 2017, 4(3), 63 [cit. 2018-03-15]. DOI: 10.3390/medicines4030063. ISSN 23056320.
- [22] DEANS, S.G. a G. RITCHIE. *International Journal of Food Microbiology: Antibacterial properties of plant essential oils* [online]. Vol.5. -: ScienceDirect, 2002, s. 165-180 [cit. 2018-03-11]. ISBN -. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0168160587900341>
- [23] HAMPL, F. a J. PALEČEK. *Farmakochemie* [online]. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2002, s. - [cit. 2018-05-06]. ISBN 80-7080-495-5. Dostupné z: [http://147.33.74.135/knihy/uid\\_isbn-80-7080-495-5/pdf/312.pdf](http://147.33.74.135/knihy/uid_isbn-80-7080-495-5/pdf/312.pdf)

- [24] NAZZARO, Filomena, Florinda FRATIANNI, Raffaele COPPOLA a Vincenzo De FEO. Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals* [online]. MDPI, 2017, 10(4), 86 [cit. 2017-12-05]. DOI: 10.3390/ph10040086. ISSN 14248247.
- [25] AMORATI, Riccardo, Mario C. FOTI a Luca VALGIMIGLI. Antioxidant Activity of Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. Bologna, Italy, 2013(46), [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1021/jf403496k. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf403496k?src=recsys&journal-Code=jafcau>
- [26] OTTO, Michael. Staphylococcus aureus toxins. *Current Opinion in Microbiology* [online]. Current Biology, 2013, 17(1), 32-37 [cit. 2018-04-05]. DOI: 10.1016/j.mib.2013.11.004. ISSN 13695274.
- [27] Staphylococcus. WikiSkripta [online]. 2017 [cit. 2018-04-05]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Staphylococcus>
- [28] OVEČKA, Bc. Martin. Genotypizace izolátů Escherichia coli z potravin [online]. Zlín, 2013 [cit. 2018-04-05]. Dostupné z: [http://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/24831/ovečka\\_2013\\_dp.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/24831/ovečka_2013_dp.pdf?sequence=1&isAllowed=y). Diplomová práce. Universita Tomáše Bati. Vedoucí práce Mgr. Magda Doležalová Ph.D.
- [29] PENNINGTON, Hugh. Escherichia coli O157. *Lancet*, the [online]. Elsevier, 2010, 376(9750), 1428-1435 [cit. 2018-04-05]. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60963-4. ISSN 01406736.
- [30] BERMAN, Judith. Candida albicans. *Current Biology* [online]. CELL PRESS, 2012, 22(16), R620-R622 [cit. 2018-04-05]. DOI: 10.1016/j.cub.2012.05.043. ISSN 09609822.
- [31] CHOI, Kyle. Aspergillus niger. In: *MicrobeWiki* [online]. 2010 [cit. 2018-04-05]. Dostupné z: [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Aspergillus\\_niger](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Aspergillus_niger)
- [32] In: *Lumen Learning* [online]. Portland [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/proteins/>
- [33] Povrchová energie a povrchové napětí – Distanční text
- [34] ĎUBAŠÍK, Bc. Daniel. Biokompatibilizace syntetických polymerních materiálů [online]. Zlín, 2016 [cit. 2018-04-06]. Dostupné z: [http://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/39279/%20uba%20ík\\_2016\\_dp.pdf?sequence=1](http://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/39279/%20uba%20ík_2016_dp.pdf?sequence=1). Diplomová práce. Universita Tomáše bati. Vedoucí práce Doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.

- [35] *Standard Test Method for Water Vapor Transmission of Materials: ASTM E96 - 95*. - West Conshohocken, USA: ASTM International, 2016.
- [36] KASHIRI, Mahboobeh, Josep P CERISUELO, Irene DOMÍNGUEZ, Gracia LÓPEZ-CARBALLO, Pilar HERNÁNDEZ-MUÑOZ a Rafael GAVARA. Novel antimicrobial zein film for controlled release of lauroyl arginate (LAE). *Food Hydrocolloids* [online]. Elsevier Sci, 2016, 61, 547-554 [cit. 2018-04-28]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2016.06.012. ISSN 0268005X.
- [37] PARRIS, Nicholas, Leland C DICKEY, Michael J KURANTZ, Robyn O MOTEN a James C CRAIG. Water vapor permeability and solubility of zein/starch hydrophilic films prepared from dry milled corn extract. *Journal of Food Engineering* [online]. Elsevier, 1997, 32(2), 199-207 [cit. 2018-04-28]. DOI: 10.1016/S0260-8774(97)00015-0. ISSN 02608774.
- [38] KHELA, S. *The IUCN Red List of Threatened Species: Thymus vulgaris* [online]. 2014 [cit. 2018-04-29]. ISSN 2307-8235. Dostupné z: <http://www.iucnredlist.org/details/203348/0>
- [39] MÖLLEROVÁ, Jana. *ORIGANUM VULGARE L. – dobromysl obecná / pamajorán obyčejný* [online]. 11.1.2008 [cit. 2018-04-29]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/origanum-vulgare/>
- [40] WANG, Ying a Graciela W PADUA. Water Sorption Properties of Extruded Zein Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. Amer Chemical Soc, 2004, 52(10), 3100-3105 [cit. 2018-05-03]. DOI: 10.1021/jf035329t. ISSN 00218561.
- [41] SEDLAŘÍKOVÁ, Jana; DOLEŽALOVÁ, Magda; EGNER, Pavlína; PAVLAČKOVÁ, Jana; KREJČÍ, Jirí; RUDOLF, Ondřej; PEER, Petra. Effect of Oregano and Marjoram Essential Oils on the Physical and Antimicrobial Properties of Chitosan Based Systems. *International Journal of Polymer Science*. 2017, vol. 2017. ISSN:1687-9422.
- [42] *AF MENDELU* [online]. In: . [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: [http://web2.mendelu.cz/af\\_291\\_projekty2/vseo/print.php?page=1679&typ=html](http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1679&typ=html)

- [43] HAN, Yi-Long, Qin XU, Zhi-Qian LU a Jin-Ye WANG. Preparation of transparent zein films for cell culture applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. Elsevier Science Bv, 2014, 120, 55-62 [cit. 2018-05-08]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.04.019. ISSN 09277765.
- [44] GEZER, P. Gizem, Serena BRODSKY, Austin HSIAO, G. Logan LIU a Jozef L KOKINI. Modification of the hydrophilic/hydrophobic characteristic of zein film surfaces by contact with oxygen plasma treated PDMS and oleic acid content. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2015, 135, 433-440 [cit. 2018-05-08]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.07.006. ISSN 09277765.
- [45] GAONA-SÁNCHEZ, V.A, G CALDERÓN-DOMÍNGUEZ, E MORALES-SÁNCHEZ, J.J CHANONA-PÉREZ, G VELÁZQUEZ-DE LA CRUZ, J.V MÉNDEZ-MÉNDEZ, E TERRÉS-ROJAS a R.R FARRERA-REBOLLO. Preparation and characterisation of zein films obtained by electrospraying. *Food Hydrocolloids* [online]. Elsevier Sci, 2015, 49, 1-10 [cit. 2018-05-08]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2015.03.003. ISSN 0268005X
- [46] HUDZICKI, Jan. Kirby-bauer disk diffusion susceptibility test protocol. In: *American Society for Microbiology* [online]. Kansas City: University of Kansas Medical Center, 2009, December 2009, s. - [cit. 2018-05-08]. ISBN -. ISSN -. Dostupné z: <http://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3189#header>
- [47] HONG, Nanjing, Ling-Zhi CHEONG a Xuebing XU. Strategies to obtain high content of monoacylglycerols. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. 2014, vol. 116, issue 2, s. 97–107 [cit. 2018-05-12]. DOI: 10.1002/ejlt.201300336. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.201300336>
- [48] JANIŠ, R., KREJČÍ, J., KLÁSEK, A. Preparation of 1-monoacylglycerols from glycidol and fatty acids catalyzed by the chromium (III) fatty acid system. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2000, s. 351–354.
- [49] ZHANG, Hui, Hewen WEI, Yinan CUI, Guoqun ZHAO a Fengqin FENG. Antibacterial interactions of monolaurin with commonly used antimicrobials and food components. *Journal of Food Science* [online]. Wiley-blackwell, 2009, 74(7), M418-M421 [cit. 2018-05-12]. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2009.01300.x. ISSN 00221147.

- [50] MORADI, Mehran, Hossein TAJIK, Seyed Mehdi RAZAVI ROHANI a Alireza MAHMOUDIAN. Antioxidant and antimicrobial effects of zein edible film impregnated with *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and monolaurin. *LWT - Food Science and Technology* [online]. Elsevier, 2016, 72, 37-43 [cit. 2018-05-12]. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.04.026. ISSN 00236438.
- [51] GHANBARZADEH, Babak, Mohamad MUSAVI, A.R OROMIEHIE, Keramat REZAYI, Elhame RAZMI RAD a Jafar MILANI. Effect of plasticizing sugars on water vapor permeability, surface energy and microstructure properties of zein films. *LWT - Food Science and Technology*[online]. Elsevier, 2007, 40(7), 1191-1197 [cit. 2018-05-09]. DOI: 10.1016/j.lwt.2006.07.008. ISSN 00236438.
- [52] DENG, Lingli, Xuefan KANG, Yuyu LIU, Fengqin FENG a Hui ZHANG. Characterization of gelatin/zein films fabricated by electrospinning vs solvent casting. *Food Hydrocolloids* [online]. -. China: National Engineering Laboratory of Intelligent Food Technology and Equipment, 2017, s. 324-332 [cit. 2018-05-12]. ISBN -. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X1731130X>
- [53] DEL NOBILE, M.A, A CONTE, A.L INCORONATO a O PANZA. Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films. *Journal of Food Engineering* [online]. Elsevier, 2008, 89(1), 57-63 [cit. 2018-05-12]. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2008.04.004. ISSN 02608774.
- [54] GHANBARZADEH, Babak, Abdulrasoul OROMIEHIE, Mohamad MUSAVI, Keramat REZAYI, Elhame RAZMI a Jafar MILANI. Investigation of water vapour permeability, hydrophobicity and morphology of zein films plasticized by polyols. *Research Gate* [online]. 2006, 15(9), 691-700 [cit. 2018-05-14]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/228350995\\_Investigation\\_of\\_water\\_vapour\\_permeability\\_hydrophobicity\\_and\\_morphology\\_of\\_zein\\_films\\_plasticized\\_by\\_polyols](https://www.researchgate.net/publication/228350995_Investigation_of_water_vapour_permeability_hydrophobicity_and_morphology_of_zein_films_plasticized_by_polyols).
- [55] GÜÇBILMEZ, Çiğdem Mecitoğlu, Ahmet YEMENICIOĞLU a Alper ARSLANOĞLU. Antimicrobial and antioxidant activity of edible zein films incorporated with lysozyme, albumin proteins and disodium EDTA. *Food Research International* [online]. Elsevier, 2007, 40(1), 80-91 [cit. 2018-05-14]. DOI: 10.1016/j.foodres.2006.08.007. ISSN 09639969.



- [56] KHALIL, Ashraf A, Sahar F DERAZ, Somia A.bd ELRAHMAN, Somia Abd ELRAHMAN a Gomaa EL-FAWAL. Enhancement of mechanical properties, microstructure, and antimicrobial activities of zein films cross-linked using succinic anhydride, eugenol, and citric acid. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* [online]. Taylor, 2015, 45(6), 551-567 [cit. 2018-05-14]. DOI: 10.1080/10826068.2014.940967. ISSN 10826068
- [57] PARRIS, Nicholas, Leland C DICKEY, Michael J KURANTZ, Robyn O MOTEN a James C CRAIG. Water vapor permeability and solubility of zein/starch hydrophilic films prepared from dry milled corn extract. *Journal of Food Engineering* [online]. Elsevier, 1997, 32(2), 199-207 [cit. 2018-05-14]. DOI: 10.1016/S0260-8774(97)00015-0. ISSN 02608774.
- [58] BITENCOURT, RG, AMM POSSAS, GP CAMILLOTO, RS CRUZ, CG OTONI a NDF SOARES. Antimicrobial and aromatic edible coating on fresh-cut pineapple preservation. *Ciencia Rural*[online]. Univ Federal Santa Maria, 2014, 44(6), 1119-1125 [cit. 2018-05-14]. DOI: 10.1590/S0103-84782014000600027. ISSN 01038478.
- [59] YEMIŞ, Gökçe a Kezban CANDOĞAN. Antibacterial activity of soy edible coatings incorporated with thyme and oregano essential oils on beef against pathogenic bacteria. *Food Science and Biotechnology* [online]. The Korean Society of Food Science and Technology, 2017, 26(4), 1113-1121 [cit. 2018-05-14]. DOI: 10.1007/s10068-017-0136-9. ISSN 12267708.
- [60] OUSSALAH, Mounia, Stéphane CAILLET, Stéphane SALMIÉRI, Linda SAUCIER a Monique LACROIX. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. Amer Chemical Soc, 2004, 52(18), 5598-5605 [cit. 2018-05-14]. DOI: 10.1021/jf049389q. ISSN

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

AMK	aminokyselina
ATP	adenosintrifosfát
CO <sub>2</sub>	Oxid uhličitý
cm	centimetr
DAG	diacylglycerol
EO	esenciální olej
g	gram
G <sup>+</sup>	grampozitivní mikroorganismu
G <sup>-</sup>	gramnegativní mikroorganismu
g/l	koncentrace gram na litr
H <sup>+</sup>	vodíkový iont
MAG	monoacylglycerol
MH	Mueller-Hinton agar
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MK	mastná kyselina
ML	monolaurin
ml	mililitr
mm	milimetr
SA	Sabouraud agar
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
TAG	diacylglycerol
UV	ultrafialové záření
°C	stupně Celsia
μl	mikrolitr

%           procenta

°           stupně

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1 Peptidová vazba [4]</i> .....	12
<i>Obr. 2 Struktura proteinů [upraveno podle 32]</i> .....	14
<i>Obr. 3 Denaturace [42]</i> .....	14
<i>Obr. 4 Zrno kukuřice [upraveno podle 9]</i> .....	15
<i>Obr. 5 Struktura zeinu [9]</i> .....	18
<i>Obr. 6 Struktura a) 1-monoacylglycerolu, b) 2-monoacylglycerolu [upraveno podle 4]</i> .....	21
<i>Obr. 7 Schéma esterifikace [upraveno podle 4]</i> .....	23
<i>Obr. 8 Schéma hydrolyzy [upraveno podle 4]</i> .....	23
<i>Obr. 9 Schéma alkoholýzy [upraveno podle 4]</i> .....	23
<i>Obr. 10 Schéma acidolýzy [upraveno podle 4]</i> .....	24
<i>Obr. 11 Schéma transesterifikace [upraveno podle 4]</i> .....	24
<i>Obr. 12 Monoacylglycerol kyseliny laurové [upraveno podle 5]</i> .....	26
<i>Obr. 13 Metabolická dráha biosyntézy terpenoidů [upraveno podle 19]</i> .....	29
<i>Obr. 14. Testovací kelímek s filmem a exsikator pro měření propustnosti pro vodní páry</i> .....	41
<i>Obr. 15. Vzhled filmů a) kontrolní film, b) 2 % ML + 1 % tymián, c) 3 % ML, d) 3 % tymián</i> .....	43
<i>Obr. 16. Tloušťka vybraných filmů</i> .....	44
<i>Obr. 17. Propustnost pro vodní páry zeinových filmů s obsahem aktivních látek</i> .....	46
<i>Obr. 18 Zismanův graf zeinového filmu pro stanovení kritického povrchového napětí</i> .....	49
<i>Obr. 19. Kapka vody na a) kontrolním filmu, b) filmu s přídavkem 3 % ML+ 3 % tymián a c) filmu s přídavkem 3 % ML + 3 % oregano</i> .....	49
<i>Obr. 20. SEM řezu (vlevo) a povrchu (vpravo) kontrolního zeinového filmu</i> .....	51
<i>Obr. 21. SEM řezu (vlevo) a povrchu (vpravo) filmu se 4 % ML a 2 % tymiánu</i> .....	51
<i>Obr. 22. SEM řezu (vlevo) a povrchu (vpravo) filmů filmu se 4 % ML a 2 % oregana</i> .....	51
<i>Obr. 23. Měření inhibičních zón [upraveno podle 46]</i> .....	52
<i>Obr. 24. Velikosti inhibičních zón aktivních látek ML a EO oregano</i> .....	52
<i>Obr. 25. Velikosti inhibičních zón aktivních látek ML a EO tymián</i> .....	53
<i>Obr. 26. Velikosti inhibičních zón filmů s obsahem ML a EO oregano</i> .....	55

---

<i>Obr. 27. Velikosti inhibičních zón filmů s obsahem ML a EO tymián.....</i>	<i>56</i>
<i>Obr. 28. Inhibiční zóny vzorků zeinu s a) 2 % oregano a b) 2 % ML + 3 % oregano .....</i>	<i>57</i>

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tab. 1. Procentuální zastoupení látek v zrně kukuřice [9].</i>	16
<i>Tab. 2. Rozdělení proteinů v kukuřici (% suchého podílu) [9].</i>	16
<i>Tab. 3. Složení aminokyselin v zeinu (g AMK/100 g zeinu) [9].</i>	17
<i>Tab. 4. Hodnoty kontaktních úhlů zeinových filmů pro různé kapaliny (W destilovaná voda, E etylenglykol, DI diiodometan).</i>	48
<i>Tab. 5. Hodnoty povrchových energií pro jednotlivé vzorky.</i>	48
<i>Tab. 6. Velikosti inhibičních zón aktivních látek vůči kvasinkám a plísním</i>	54
<i>Tab. 7. Velikosti inhibičních zón filmů s obsahem ML.</i>	54
<i>Tab. 8. Velikosti inhibičních zón zeinových filmů vůči kvasinkám a plísním</i>	57