

# Studium antimikrobiální aktivity polymerních směsí

Bc. Lucie Pavlátková

---

Diplomová práce  
2020

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

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

Akademický rok: 2019/2020

## **ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE**

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Pavlátková**  
Osobní číslo: **T17538**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**  
Forma studia: **Kombinovaná**  
Téma práce: **Studium antimikrobiální aktivity biopolymerních směsí**

### **Zásady pro vypracování**

#### **Teoretická část**

Vypracujte literární rešerši na dané téma. Klasifikujte a charakterizujte polymery a aktivní antimikrobiální látky s potenciálem využití v potravinářství a jinde.

#### **Praktická část**

V praktické části připravte vzorky na bázi přírodního polymeru nebo směsí polymerů v kombinaci s aktivními antimikrobiálními látkami. Výsledné polymerní roztoky a z nich připravené filmy charakterizujte pomocí dostupných metod a otestujte jejich antimikrobiální vlastnosti.

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

Seznam doporučené literatury:

1. ELSABEE, M. Z., ABDU, E. S. Chitosan Based Edible Films and Coatings: A Review 2013, C 33, 1819?1841.
2. BASER, K. H. C., BUCHBAUER, G. Handbook of Essential Oils, Science Technology, and Applications 2009, CRC Press, ISBN 978-1-4200-6316-5.
3. THORMAR, H. Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents, UK, John Wiley & Sons, Inc., 2011, ISBN 978-0-470-74178-8.
4. DAVIDSON, P. Michael, John Nikolaos SOFOS a Alfred Larry BRANEN. *Antimicrobials in food*. 3rd ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 145. ISBN 9780824740375.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Magda Janalíková, Ph.D.**  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2020**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

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

Ve Zlíně dne 20. února 2020

## PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

**Prohlašuji,**

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

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## ABSTRAKT

Diplomová práce se zaměřuje na zkoumání antimikrobiální aktivity polymerních směsí. V teoretické části jsou blíže specifikovány základní nosné systémy zahrnující emulze, emulgely, lipozomy, micely, či polymerní částice. V této práci byly připraveny biopolymerní směsi zein/chitosan s přídavkem antimikrobiálních látek (thymol, esenciální oleje - tymián, skořice a oregano), které byly charakterizovány (zeta potenciál, pH, průměrná velikost částic), vizuálně zkoumány, byly sledovány jejich antimikrobiální účinky a také dynamika uvolňování aktivní látky. Roztoky ve vyšších koncentracích u thymolu, tymiánu a oregana působily na gramnegativní bakterie. Naopak roztoky s vyšším obsahem skořice vytvářeli větší inhibiční zóny u grampozitivní bakterie a působili na rozdíl od předchozích i na plíseň. Všechny vzorky obsahující 2% thymol vykazovaly inhibiční účinky. V další části práce byly vytvořeny filmy, jako nejpovedenější se jevily s minimálním obsahem zeinu 2 %. Z výsledků bylo patrné, že filmy měly mnohem větší antimikrobiální aktivitu a to především u plísně *Aspergillus niger*, na kterou roztoky vůbec neúčinkovali. Nakonec byla provedena studie zaměřená na uvolňování aktivních látek v čase. Většina vzorků po 24 hodinách již nevykazovala žádné inhibiční účinky.

Klíčová slova: film, zein, chitosan, thymol, skořice, tymián, oregano

## ABSTRACT

The diploma thesis focuses on the investigation of the antimicrobial activity of polymer mixtures. The theoretical part concerns about the basic carrier systems including emulsions, liposomes, micelles, and polymer particles. In this work, biopolymer mixtures of zein/chitosan were prepared with addition of antimicrobial compound (thymol, essential oils – thyme, cinnamon, or oregano). These solutions were characterized (zeta potential, pH, average particle size), and visually observed. What more, antimicrobial activity and dynamics of active substance release, were determined. Solutions in higher concentrations of thymol, thyme and oregano acted on gramnegative bacteria. The advantages of solutions with higher shell values are larger inhibition zones for grampositive bacteria and an effect on small and medium money. All types of 2% thymol samples showed inhibitory effects. Furthermore, films were evaluated. As the most successful appeared films with a minimum 2% zein. The results showed that the films have greater antimicrobial potential and cause the fungus *Aspergillus niger*, they did not work

at all to solve the problems. Finally, a study focused on the release of active substances over time was performed. The other samples no longer showed any inhibitory effects after 24 hours.

Keywords: film, zein, chitosan, thymol, cinnamon, thyme, oregano

Především bych chtěla velmi poděkovat vedoucí diplomové práce Mgr. Magdě Janalíkové, Ph.D. za neskutečnou trpělivost, obrovské nasazení a mnoho podnětných rad, které mi poskytla během vypracování této práce a ochotu při řešení problémů. Dále mé velké poděkování patří rodině a přátelům, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze 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 NOSNÉ SYSTÉMY</b> .....	<b>12</b>
1.1 EMULZE .....	12
1.1.1 Mikroemulze .....	16
1.1.2 Nanoemulze .....	17
1.2 EMULGELY .....	17
1.3 LIPOSOMY .....	17
1.4 FYTOSOMY .....	19
1.5 ETHOSOMY .....	20
1.6 NIOSOMY .....	21
1.7 MICELY .....	22
1.8 POLYMERNÍ NANOČÁSTICE .....	23
<b>2 BIOPOLYMERY</b> .....	<b>25</b>
2.1 PROTEINY .....	26
2.1.1 Základní charakteristika .....	26
2.1.2 Zein .....	27
2.2 POLYSACHARIDY .....	30
2.2.1 Obecná charakteristika .....	30
2.2.2 Funkce .....	30
2.2.3 Chitosan .....	31
<b>3 ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY</b> .....	<b>35</b>
3.1 KLASIFIKACE ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK .....	35
3.1.1 Polyfenoly .....	36
3.1.2 Alkaloidy .....	36
3.1.3 Terpeny .....	37
3.2 ESENCIÁLNÍ OLEJE .....	37
3.2.1 Mechanismus účinku esenciálních olejů .....	38
3.2.2 Složení esenciálních olejů .....	38
3.3 HODNOCENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍHO ÚČINKU .....	43
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>45</b>
<b>4 CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>46</b>
<b>5 MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>47</b>
5.1 POMŮCKY A PŘÍSTROJE .....	47
5.2 CHEMICKÉ LÁTKY .....	47
5.3 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ A MÉDIÍ .....	48



5.3.1	Příprava zásobního roztoku chitosanu .....	48
5.3.2	Příprava zásobního roztoku zeinu .....	48
5.3.3	Příprava zásobního roztoku thymolu .....	49
5.3.4	Příprava roztoku Tween 20 .....	49
5.3.5	Příprava fyziologického roztoku .....	49
5.3.6	Příprava fosfátového pufru.....	49
5.3.7	Příprava 0,1% roztoku Tweenu 20 .....	49
5.3.8	Příprava pracovních roztoků polymerů s aktivními látkami.....	49
5.4	PŘÍPRAVA MIKROORGANISMŮ .....	51
5.4.1	Bakterie .....	51
5.4.2	Kvasinky .....	51
5.4.3	Plísně.....	51
5.5	MĚŘENÍ ZETA POTENCIÁLU .....	51
5.6	MĚŘENÍ PH .....	52
5.7	MĚŘENÍ VELIKOSTI ČÁSTIC .....	52
5.8	VIZUÁLNÍ HODNOCENÍ ROZTOKŮ .....	52
5.9	STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍCH ÚČINKŮ.....	53
5.9.1	Disková difúzní metoda .....	53
5.9.2	Stanovení minimální inhibiční koncentrace.....	53
5.9.3	Stanovení růstových křivek.....	54
5.10	UVOLŇOVÁNÍ AKTIVNÍ LÁTKY .....	55
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>56</b>
6.1	CHARAKTERISTIKA BIOPOLYMERNÍCH SMĚSÍ.....	56
6.2	ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY BIOPOLYMERNÍCH SMĚSÍ .....	68
6.3	UVOLŇOVÁNÍ AKTIVNÍ LÁTKY .....	78
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>81</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>83</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>102</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ.....</b>	<b>103</b>
	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>104</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH .....</b>	<b>105</b>

## ÚVOD

V důsledku vzrůstajících globálních problémů souvisejících se znečištěním životního prostředí roste rovněž snaha o nalezení možnosti snížení ekologické stopy v podobě biologických substitutů některých současných syntetických materiálů. Rostlinné sloučeniny vzbudily velký zájem díky možnosti snadné biodegradace a v případě éterických olejů i díky svým známým antimikrobiálním a antioxidačním vlastnostem. V současné době tedy zintenzivňuje snaha zkoumat možné kombinace filmů z biopolymerních sloučenin a jejich funkčnost v měnících se podmínkách. Jedlé nebo biologicky rozložitelné filmy mohou poskytnout náhradu, případně fortifikaci přírodních vrstev zabraňující ztrátě vlhkosti, zatímco selektivně umožňují řízenou výměnu důležitých plynů, jako je kyslík, oxid uhličitý, a ethylen, které jsou zapojeny do procesu respirace. Biofilmy však mohou mít i řadu dalších uplatnění odvíjejících se od jejich vlastností.

Většina biologicky rozložitelných filmů je vytvářena z biopolymerů v podobě proteinů a polysacharidů získaných vodných disperzích a odlitím filmu. Bylo však zjištěno, že zapouzdření esenciálních olejů do filmů může ovlivnit jejich mikrostrukturu. Tyto změny mikrostruktury mohou vést k některým změnám fyzikálních vlastností filmu, včetně tahových, optických a bariérových vlastností. Různé kombinace a koncentrace látek mohou vést ke vzniku odlišných filmů s odlišnými vlastnostmi.

Cílem této diplomové práce bylo otestovat dopady různých poměrů biopolymerních látek s aktivní složkou na vlastnosti vzniklých filmů a to včetně antimikrobiální aktivity.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 NOSNÉ SYSTÉMY

Nosné systémy slouží především k přepravě účinných látek, k jejich cílenému doručení a uvolňování na vybrané místo. Kromě toho jsou schopny ochránit účinné látky před vnějšími degradačními vlivy např. před světlem, teplem, kyslíkem, a tím zajistit jejich stabilitu. Pomocí nosných systémů lze regulovat odpařování těkavých složek, maskovat nežádoucí organoleptické vlastnosti a uspořít náklady snížením množství použitých přísad (Costa & Santos, 2017).

### 1.1 Emulze

Obecně se emulze dělí na hrubé emulze neboli makroemulze (200 nm–200 μm), nanoemulze neboli submikronové emulze (20–200 nm) a mikroemulze (4–200 nm) (Sedaghat Doost *et al.*, 2020).

Emulze jsou třídou disperzních systémů sestávajících se ze dvou nemísitelných kapalin. Kapičky kapaliny (disperzní fáze) jsou dispergovány v kapalném médiu (kontinuální fáze). Lze rozlišit několik tříd dle fáze: olej ve vodě (O/V), voda v oleji (V/O) a olej v oleji (O/O). Příkladem může být emulze sestávající z polárního oleje (např. propylenglykolu) dispergovaného v nepolárním oleji (parafinový olej) a naopak. K rozptýlení dvou nemísitelných kapalin je zapotřebí třetí složky - emulgátoru. Volba emulgátoru je rozhodující pro tvorbu emulze a její dlouhodobou stabilitu. Emulze mohou být klasifikovány podle povahy emulgátoru nebo struktury systému (Tadros, 2013).

Nejjednodušší typ představují ionty, jako je  $\text{OH}^-$ , které mohou být specificky adsorbovány na kapičce emulze, čímž se vytvoří náboj či dvojitá vrstva, která poskytuje elektrostatický odpor. Tento jev byl prokázán u velmi zředěných emulzí O/V odstraněním kyselosti (Liang *et al.*, 2020). Nejúčinnějšími emulgátory jsou neionické povrchově aktivní látky, které lze použít k emulgaci O/V nebo V/O. Kromě toho mohou stabilizovat emulzi proti flokulaci a koalescenci (Tadros, 2013). Ionické povrchově aktivní látky, jako je dodecylsulfát sodný (SDS), lze také použít jako emulgátory (pro O/V), ale systém je citlivý na přítomnost elektrolytů. Směsi povrchově aktivních látek, například ionické a neionické, nebo směsi neionických povrchově aktivních látek mohou být účinnější při emulgaci a stabilizaci emulze (Liang *et al.*, 2020).

Neionické polymery, někdy označované jako polymerní povrchově aktivní látky, například Pluronic, jsou účinnější při stabilizaci emulze, ale mohou trpět obtížemi emulgace

(pro výrobu malých kapiček), pokud pro tento proces není aplikována vysoká energie. Polyelektrolyty, jako je kyselina poly (methakrylová), lze také použít jako emulgátory. Směsi polymerů a povrchově aktivních látek jsou ideální pro dosažení snadné emulgace a stabilizace emulze. Lamelární kapalně krystalické fáze, které lze vyrobit pomocí směsi povrchově aktivních látek, jsou velmi účinné při stabilizaci emulze. Pevné částice, které se mohou akumulovat na rozhraní O/V, lze také použít pro stabilizaci emulze. Tyto emulze se označují jako Pickeringovy emulze, přičemž částice jsou částečně zvlhčeny olejovou fází a vodnou fází (Guyot *et al.*, 2003).

Fyzikální jevy zapojené do každého procesu rozpadu nejsou jednoduché a vyžadují analýzu zapojených povrchových sil. Kromě toho se zmiňované procesy mohou odehrávat současně, nikoli postupně, což analýzu komplikuje. Modelové emulze s monodisperzními kapičkami nelze snadno vyrobit, a proto jakýkoli teoretický popis musí brát v úvahu účinek distribuce velikosti kapiček (Miller, 2020). Sedimentace vyplývá z vnějších sil obvykle gravitačních nebo odstředivých. Pokud takové síly přesáhnou tepelný pohyb kapiček (Brownův pohyb), v systému se vytvoří koncentrační gradient s většími kapičkami pohybujícími se rychleji nahoru (pokud je jejich hustota nižší než hustota média) nebo směrem dolů (pokud jejich hustota je větší než hustota média). V omezujících případech mohou kapičky tvořit těsně zabalené (náhodné nebo uspořádané) pole v horní nebo dolní části systému se zbytkem objemu obsazeného kontinuální kapalnou fází (Tadros, 2013). Flokulace označuje agregaci kapiček (bez jakékoli změny velikosti primárních kapiček) do větších jednotek. Je to výsledek přitažlivosti van der Waalsových sil, který je univerzální u všech rozptylových systémů. K flokulaci dochází, když není dostatečné odpuzování k udržení kapiček odděleně na vzdálenosti, kde je van der Waalsova přitažlivost slabá. Flokulace může být „silná“ nebo „slabá“ v závislosti na velikosti přitažlivé energie (Sharadha *et al.*, 2020). Ostwaldovo zrání (disproporce) je výsledkem konečné rozpustnosti kapalných fází. Kapaliny, které jsou označovány jako nemísitelné, mají často vzájemné rozpustnosti, které nejsou zanedbatelné. U emulzí, které jsou obvykle polydisperzní, budou mít menší kapičky větší rozpustnost ve srovnání s většími (kvůli účinkům zakřivení). Postupem času menší kapičky zmizí a jejich molekuly se rozptýlí do velkého objemu a usadí se na větších kapkách. Časem se distribuce velikosti kapiček posune na větší hodnoty. To se týká procesu ztenčování a rozrušení kapalného filmu mezi kapičkami v důsledku fúze dvou nebo více kapiček na větší. Omezujícím případem koalescence je úplné rozdělení emulze na dvě odlišné kapalně fáze. Hnací silou

pro koalescenci jsou kolísání povrchu nebo filmu, které vede k těsnému přiblížení kapiček, přičemž van der Waalsovy síly jsou silné, čímž brání jejich oddělení. Příkladem může být proces, při kterém dojde k výměně mezi disperzní fází a médiem. Například emulze O/V se může s časem nebo změnou podmínek převrátit na emulzi V/O. V mnoha případech fázová inverze prochází přechodným stavem, čímž se vytvoří více emulzí (Tadros, 2013).

Rozhraní mezi dvěma objemovými fázemi, například kapalina a vzduch (nebo kapalina/pára), nebo dvěma nemísitelnými kapalinami (olej/voda) může být definováno za předpokladu, že je zavedena dělicí čára. Mezifázová oblast není pouze vrstva o síle jedné molekuly. Je to oblast o tloušťce  $\delta$  s vlastnostmi odlišnými od dvou objemových fází  $\alpha$  a  $\beta$  (Slomkowski *et al.*, 2011).

Pomocí Gibbsova modelu je možné získat definici povrchového nebo mezifázového napětí  $\gamma$ . Energie bez povrchové energie  $dG^\sigma$  je tvořena třemi složkami: entropický termín  $S^\sigma dT$ , interfaceální energetický termín  $Ad\gamma$  a složený termín  $n_i d\mu_i$  ( $n_i$  je počet molů složky  $i$  s chemickým potenciálem  $\mu_i$ ). Gibbsova-Deuhemova rovnice je (Rovnice 1):

$$dG^\sigma = -S^\sigma dT + Ad\gamma + \sum n_i d\mu_i \quad (1)$$

Při konstantní teplotě a složení platí (Rovnice 2):

$$\begin{aligned} dG^\sigma &= Ad\gamma \\ \gamma &= \left( \frac{\partial G^\sigma}{\partial A} \right)_{T, n_i} \end{aligned} \quad (2)$$

Pro stabilní rozhraní je  $\gamma$  kladné, tj. pokud se plocha rozhraní zvětší,  $G^\sigma$  se zvýší také.  $\gamma$  je energie na jednotku plochy ( $\text{mJm}^{-2}$ ), což je rozměrově ekvivalentní síle na jednotku délky ( $\text{mNm}^{-1}$ ). Pro zakřivené rozhraní je třeba vzít v úvahu účinek poloměru zakřivení. Odhaduje se, že  $\gamma$  pro zakřivené rozhraní je velmi blízko povrchu roviny, pokud nejsou kapičky velmi malé ( $<10$  nm). Zakřivené rozhraní vytváří některé další důležité fyzikální jevy, které ovlivňují vlastnosti emulze, např. Laplaceův tlak  $\Delta p$ , který je určen poloměry zakřivení kapiček (Rovnice 3):

$$\Delta p = \gamma \left( \frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right) \quad (3)$$

kde  $r_1$  a  $r_2$  jsou dva hlavní poloměry zakřivení.

Pro dokonale kulovitou kapičku  $r_1 = r_2 = r$  platí (Rovnice 4):

$$\Delta p = \frac{2\gamma}{r} \quad (4)$$

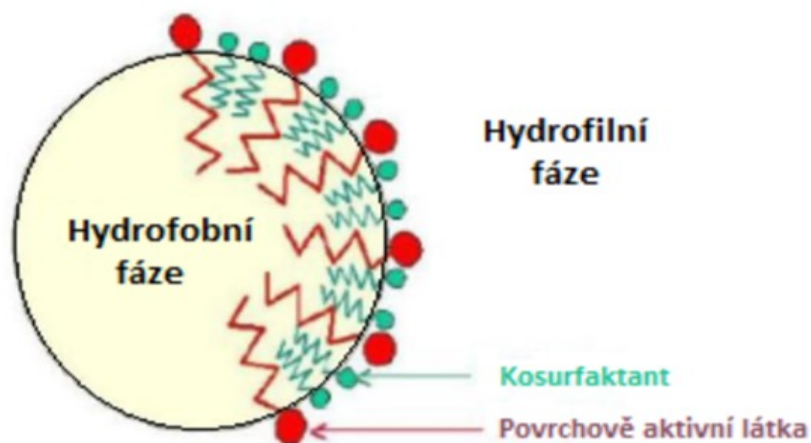
Pro kapičky uhlovodíků s poloměrem 100 nm a  $\gamma = 50 \text{ mNm}^{-1}$ ,  $\Delta p = 106 \text{ Pa}$  (10 atm). V přítomnosti stabilizátoru (povrchově aktivní látky a / nebo polymeru) je mezi kapičkami vytvořena energetická bariéra, a proto se obrácení ze stavu II do stavu I stává nekontinuální v důsledku přítomnosti těchto energetických bariér. V přítomnosti výše uvedených energetických bariér se systém stává kineticky stabilní (Slomkowski *et al.*, 2011).

Obecně lze říci, že mezi kapičkami emulze existují tři hlavní interakční energie (síly), které jsou diskutovány v následujících odstavcích. Van der Waalsova přitažlivost mezi atomy nebo molekulami nabývá tří podob: dipól – dipól, dipólem indukovaný dipól a disperze. Při absenci odporu dochází ke flokulaci velmi rychle produkující velké shluky. Aby bylo možné působit proti van der Waalově přitažlivosti, je nutné vytvořit odpudivou sílu. V závislosti na povaze použitého emulgátoru lze rozlišit dva hlavní typy odpudivosti: elektrostatickou (díky vytvoření dvojité vrstvy) a sterickou (v důsledku přítomnosti adsorbovaných povrchově aktivních látek nebo polymerních vrstev) (Ouarhim *et al.*, 2020).

Dalším procesem je elektrostatický odpor. Toho lze dosáhnout adsorpcí iontové povrchově aktivní látky. Povrchový potenciál  $\psi_0$  lineárně klesá na  $\psi_d$  (Sternův nebo zeta potenciál) a poté exponenciálně se zvyšováním vzdálenosti  $x$ . Prodloužení dvou vrstev závisí na koncentraci a valenci elektrolytu (čím nižší je koncentrace elektrolytu a čím nižší je valence, tím větší je dvojitá vrstva). Když se nabitě koloidní částice v disperzi přibližují k sobě tak, že se dvojitá vrstva začíná překrývat (separace částic je menší než dvojnásobek dvojrstvého prodloužení), dochází k odpuzování. Jednotlivé dvojitě vrstvy se již nemohou neomezeně rozvíjet, protože omezený prostor neumožňuje úplný potenciální rozpad. Energetické maximum zabraňuje blízkému přibližování kapiček a brání ve flokulaci na primární minimum. Čím vyšší je hodnota  $\psi_0$  a nižší koncentrace elektrolytu a valence, tím vyšší je maximum energie. Při středních koncentracích elektrolytu může nastat slabá flokulace na sekundární minimum (Tadros, 2013).

### 1.1.1 Mikroemulze

Mikroemulze jsou obecně tvořeny spontánně, bez jakéhokoliv významného přísunu energie, smícháním olejové fáze s vodnou fází obsahující primární povrchově aktivní látku a kosurfaktant, což bývá obvykle alkohol se střední délkou řetězce (Obrázek 1) (Hegde *et al.*, 2013).



Obrázek 1 Struktura mikroemulze (Srikanth, 2012)

Mohou být připraveny v širokém rozmezí koncentrací povrchově aktivních látek a různém poměru složek olej/voda. Tyto homogenní systémy spadají všechny pod kapaliny s nízkou viskozitou (Lu *et al.*, 2010). Tvorba mikroemulze je reverzibilní. Při příliš nízkých nebo vysokých teplotách se mohou stát nestabilní, avšak po navrácení do normálního rozmezí se znovu vytvoří (Singh *et al.*, 2014).

Jsou často průhledné nebo průsvitné. Zda je systém transparentní, závisí nejen na velikosti, ale také na rozdílu indexu lomu mezi fází oleje a vody. Mikroemulze s malou velikostí (v oblasti 10 nm) se může jevit jako průsvitná, pokud je rozdíl v indexu lomu mezi olejem a vodou velký. Relativně velké mikroemulzní kapičky (v oblasti 50 nm) se mohou jevit jako transparentní, pokud je hodnota indexu lomu velmi malá (Tadros, 2018). Některé mikroemulze vykazují silný světelný rozptyl, přičemž transmitované světlo je obvykle načervenalé, zatímco odražené světlo je bělavé (Mittal *et al.*, 1999). Mezi nevýhody patří jejich omezená solubilizační kapacita pro vysokotající látky a také velká spotřeba povrchově aktivních látek pro stabilizaci kapiček (Singh *et al.*, 2014).



### 1.1.2 Nanoemulze

V porovnání s mikroemulzemi se jedná o nerovnovážné, termodynamicky nestabilní systémy. Stejně jako emulze jsou vysoce kineticky stabilní. Nanoemulze vykazují vysokou solubilizační kapacitu a nízkou viskozitu. Největším problémem u nanoemulzí je Ostwaldovo zrání a vysoké náklady na jejich výrobu (Kale *et al.*, 2016).

Existují dva způsoby jak nanoemulze připravit. Prvním je vysokoenergetická emulgace a druhým nízkoenergetická emulgace. Do vysokoenergetických je zahrnuta např. ultrazvuková emulgace, mikrofluidizace, membránová emulgace, vysokotlaká homogenizace. Do nízkoenergetických patří metoda teplotní fázové inverze, inverzní bod emulze a spontánní emulgace (Jaiswal *et al.*, 2015).

## 1.2 Emulgely

Emulgely se svým složením velmi podobají emulzím. Jsou složeny z dispergované a kontinuální fáze. Jako stabilizátor je použito gelační činidlo, což je pevný materiál, který tvoří síťovou strukturu. Vytvoření síťové struktury omezuje pohyb vnitřní fáze a tím zabraňuje koagulaci rozptýlených fázových kapiček. (Proces koagulace zapříčiňuje destabilizaci emulze) (Sharma *et al.*, 2018). Emulgely díky své trojrozměrné síti mají lepší stabilitu ve srovnání s nanoemulzemi. Emulgely mohou být připraveny za použití syntetických hydrofilních polymerů, pomocí proteinů či polysacharidů iontovým zesíťováním. Velkou nevýhodou při výrobě emulgelů je potřeba vyššího tepelného zpracování pro vytvoření gelové sítě, což může mít nepříznivé účinky na těkavé esenciální oleje (Sedaghat Doost *et al.*, 2020).

## 1.3 Liposomy

Liposomy představují malé, vezikuly kulovitého tvaru umělého původu, které lze vytvořit z cholesterolu a přírodních netoxických fosfolipidů. Vzhledem k jejich velikosti a hydrofobnímu a hydrofilnímu charakteru (kromě biokompatibility) liposomy jsou slibnými systémy pro dodávání léčiv. Vlastnosti liposomů se výrazně liší podle složení lipidů, povrchového náboje, velikosti a způsobu přípravy. Výběr komponent dvojvrstvy dále určuje „tuhost“ nebo „tekutost“ a náboj dvojvrstvy. Například nenasycené druhy fosfatidylcholinů z přírodních zdrojů (fosfatidylcholin z vajec nebo sojových bobů) vytvářejí mnohem propustnější a méně stabilní dvojvrstvy. Na druhou stranu nasycené

fosfolipidy s dlouhými acylovými řetězci (například dipalmitoylfosfatidylcholin), vytvářejí tuhou, spíše nepropustnou dvojrstvou strukturu (Zook & Vreeland, 2010).

Je prokázáno, že fosfolipidy impulzivně vytvářejí uzavřené struktury, když jsou hydratovány ve vodných roztocích. Takové vezikuly, které mají jednu nebo více fosfolipidových dvojrstevných membrán, mohou transportovat vodné nebo lipidové látky. Protože lipidy jsou ve vodných médiích amfipatické (hydrofobní i hydrofilní), jejich termodynamické fázové vlastnosti a samoskládací vlastnosti ovlivňují entropicky zaměřenou konfiskaci jejich hydrofobních sekcí do sférických dvojrstev. Tyto vrstvy se označují jako lamely. Liposomy jsou obecně definovány jako sférické vezikuly s velikostí částic v rozmezí od 30 nm do několika mikrometrů. Skládají se z jedné nebo více lipidových dvojrstev obklopujících vodné jednotky, kde skupiny polárních částí jsou orientovány v cestě vnitřní a vnější vodné fáze. Na druhé straně se sebeagregace polárních lipidů neomezuje pouze na konvenční dvojrstvé struktury, které se spoléhají na molekulární tvar, teplotu a podmínky prostředí a podmínky přípravy, ale mohou se samy sestavit do různých typů koloidních částic (Akbarzadeh *et al.*, 2013).

Liposomy se hojně používají jako nosiče mnoha molekul v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Kromě toho potravinářský a zemědělský průmysl rozsáhle studoval použití liposomového zapouzdření pro růst dodávacích systémů, které mohou zachytit nestabilní sloučeniny (například antimikrobiální látky, antioxidanty, aroma a bioaktivní prvky) a chránit jejich funkčnost. Díky jejich biokompatibilitě, biologické rozložitelnosti, nízké toxicitě a schopnosti zachytit hydrofilní i lipofilní léky liposomy zjednodušily místně specifické dodávání léčiva do nádorových tkání (Simão *et al.*, 2015).

Liposomální enkapsulační technologie (LET) je nejnovější dodávací technika používaná lékaři k transferu léků, které fungují jako léčebné promotory do vybraných tělních orgánů. LET je metoda vytváření sub-mikroskopických pěn zvaných liposomy, které zapouzdřují čtené materiály. Tyto „liposomy“ tvoří bariéru kolem jejich obsahu, která je odolná vůči enzymům v ústech a žaludku, zásaditým roztokům, trávicím šťávám, žlučovým solím a střevní flóře, které jsou vytvářeny v lidském těle, jakož i volným radikálům. Obsah liposomů je proto chráněn před oxidací a degradací. Tento ochranný fosfolipidový štít zůstává nepoškozený, dokud není obsah liposomu dodán do přesné cílové žlázy, orgánu nebo systému, kde bude obsah využit (Wagner & Vorauer, 2011).

Klinická léčba v současné době udržuje obrovskou škálu molekul léčiva a každý rok se do seznamu přidávají nová léčiva. Jedním z hlavních cílů jakéhokoli léku používajícího

léčivo je zvýšit terapeutický index léčiva a zároveň minimalizovat jeho vedlejší účinky. Klinická užitečnost většiny konzervativních chemoterapeutik je omezena buď neschopností dodávat terapeutické koncentrace léčiva do cílové měkké tkáně, nebo škodlivými toxickými vedlejšími účinky na normální orgány a tkáně. Existují různé přístupy k překonání těchto potíží. Jedním z nich je využití „selektivního“ doručení do cílové oblasti, kdy se léčivo zacílí na ty buňky, tkáně, orgány, které jsou danou nemocí postiženy. Pro tyto účely mohou být jako nosiče vhodné například koloidní částice a molekulární konjugáty. Koloidní částice jsou výsledkem fyzického začlenění léčiva do koloidního systému ve formě částic, například reverzních micel, mikro- a nano-sfér, erytrocytů a polymerů a liposomů. Z těchto nosičů byly nejvíce studovány právě liposomy. Jejich atraktivita spočívá v jejich složení, díky kterému jsou biologicky rozložitelné a biologicky kompatibilní. Liposom zahrnuje vodné jádro zachycené jednou nebo více dvojrstvami složenými z přírodních nebo syntetických lipidů. Do liposomů zapouzdřena léčiva s rozdílnou lipofilitou: silně lipofilní léčiva jsou zachycena téměř úplně v lipidové dvojrstvě, intenzivně hydrofilní léčiva jsou umístěna zcela ve vodném kompartmentu (Hemantkumar & Spandana, 2011).

Velikost liposomů se může pohybovat od velmi malých (0,025  $\mu\text{m}$ ) do velkých (2,5  $\mu\text{m}$ ) vesikul. Kromě toho liposomy mohou mít jednu nebo dvovrstvou membránu. Velikost vezikul je hlavním faktorem při určování cirkulačního poločasu liposomů a velikost i počet dvovrstev ovlivňují množství zapouzdření léčiva v liposomech. Na základě své velikosti a počtu dvovrstev mohou být liposomy také klasifikovány do jedné ze dvou kategorií: (1) multilamelární vezikuly a (2) unilamelární vezikuly. Unilamelární vezikuly lze také klasifikovat do dvou kategorií: (1) velké unilamelární vezikuly a (2) malé unilamelární vezikuly. V unilamelárních liposomech má vezikula jednu fosfolipidovou dvojrstvou kouli obklopující vodný roztok. V multilamelárních liposomech mají vezikuly strukturu cibule. Klasicky se vytvoří několik unilamelárních váčků na vnitřní straně s menší velikostí, čímž se vytvoří multilamelární struktura soustředných fosfolipidových koulí oddělených vrstvami vody (Akbarzadeh *et al.*, 2013).

#### 1.4 Fytosomy

Fytosomy (herbosomy), jsou komplexy přírodních bioaktivních materiálů s fosfolipidy. Vznikají tedy reakcí rostlinných extraktů nebo ve vodě rozpustných fytokonstituentů s fosfatidylcholinem, fosfatidylethanolaminem, fosfatidylserinem nebo

fosfatidylinositolem v aprotickém rozpouštědle (Upase *et al.*, 2019). Hydrofilní skupina fosfolipidů se váže s ve vodě rozpustnými fyto-komponenty a je obalena hydrofobní skupinou. V důsledku toho se vytvoří lipidový kompatibilní molekulární komplex nazývaný fytosom (Amin *et al.*, 2012). Velikost fytosomu se pohybuje od 50 nm do několika stovek  $\mu\text{m}$ . (Sriya *et al.*, 2020). Vzniklý komplex se izoluje odpařením rozpouštědla ve vakuu nebo srážením např. alifatickými uhlovodíky, nebo lyofilizací nebo sušením rozprašováním (Upase *et al.*, 2019).

Fytosomy jsou lipofilní látky s určitou teplotou tání, volně rozpustné v nepolárních rozpouštědlech a středně rozpustné v tucích (Sriya *et al.*, 2020). Při srovnání s liposomy mají lepší stabilitu, ale jsou citlivé na změny pH (Sedaghat Doost *et al.*, 2020). Slouží jako nosiče živin mísitelných s tukem i s vodou (Upase *et al.*, 2019), mají schopnost snadno pronikat kůží a mohou být použity pro systematické cílení léčiv. (Sriya *et al.*, 2020).

Složení fytosomu je bezpečné a jeho složky jsou schváleny pro farmaceutické použití. Při použití fytosomů se zvyšuje absorpce a biologická dostupnost fyto-komponentů, a proto může být dávka potřebná k dosažení žádoucího účinku snížena (Amin *et al.*, 2012).

## 1.5 Ethosomy

Ethosomy jsou „ethanolické liposomy“ skládající se z fosfolipidů (fosfatidylcholin, fosfatidylserin, kyselina fosfatidová), vysoké koncentrace ethylalkoholu a vody (Sherin *et al.*, 2019). Ethosomy mají vodné jádro obsahující ethanolický roztok léčiva a vnější vrstvu obsahující lipidovou dvojvrstvu (Sankar *et al.*, 2019). Tyto měkké váčky jsou často formovány od desítek nanometrů po mikrony. Ethosomy jsou neinvazivní měkké, poddajné vezikulární nosiče, které umožňují léčivům dosáhnout hlubokých kožních vrstev případně i systémového oběhu a zlepšit tak dodávání aktivních látek. (Sherin *et al.*, 2019).

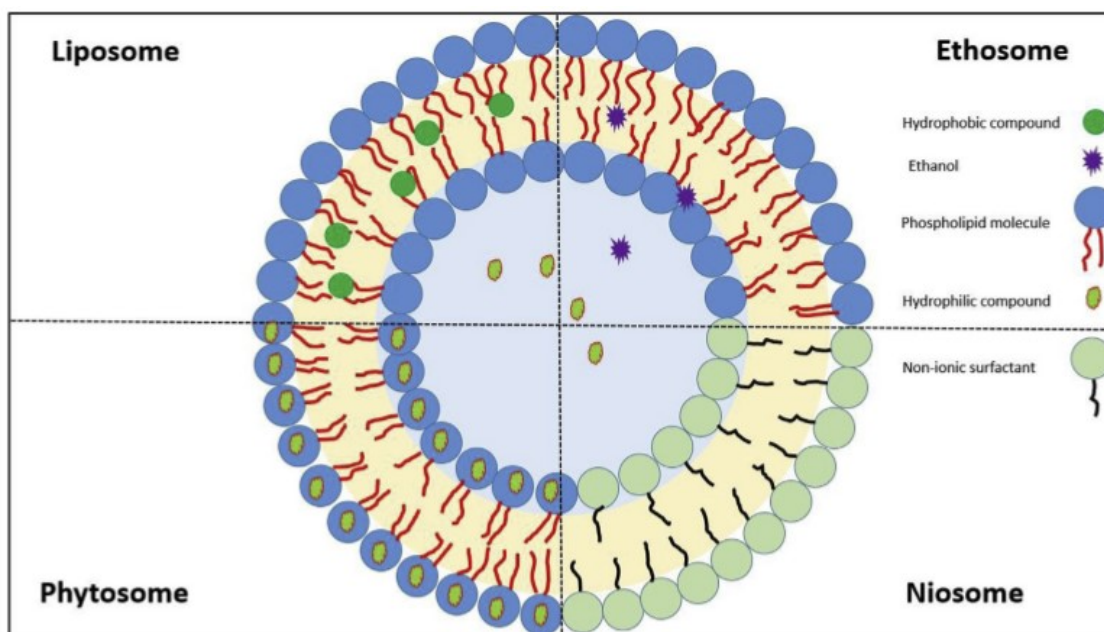
Hlavní nevýhodou ethosomů je jejich nízká stabilita díky odpařování ethanolu (Sedaghat Doost *et al.*, 2020). Vzhledem k tomu, že ethanol narušuje uspořádání dvojvrstvy lipidů i samotné membrány ethosomu, může dojít k průchodu těchto vezikul skrz lipidovou bariéru v kůži. Existují klasické ethosomy, binární ethosomy a transethosomy (Abdulbaqi *et al.* 2016). Mohou být připraveny buď studenou nebo horkou metodou (Sankar *et al.*, 2019).

## 1.6 Niosomy

Niosomy jsou „neionické liposomy“ strukturálně podobné liposomům (Obrázek 2) (Sedaghat Doost *et al.*, 2020). Niosomy jsou vezikuly o velikosti 10-100 nm, skládající se z vodného jádra uzavřeného membránou složenou z neiontových povrchově aktivních látek, především polysorbátů, terpenoidů, alkyloxyethylenů, spanů atd (Basiri *et al.* 2016, Purkait *et al.*, 2020). Získávají se hydratací těchto neiontových povrchově aktivních látek, s nebo bez inkorporace cholesterolu nebo jiných lipidů (Mahmoud *et al.*, 2018). Přidání cholesterolu poskytuje rigiditu a snižuje tak riziko úniku látek z niosomů (Sedaghat Doost *et al.*, 2020).

Liposomy i niosomy jsou dvouvrstvé vezikuly. Liposomy se skládají z fosfolipidové dvojvrstvy, která obsahuje dva hydrofobní konce, zatímco niosomy jsou konstruovány z neiontových vezikul surfaktantu, které obvykle obsahují jediný hydrofobní konec (Purkait *et al.*, 2020).

Existují tři typy niosomů malé unilamelární vezikuly, velké unilamelární vezikuly a multilamelární vezikuly. Mohou být připraveny několika metodami. Za zmínku stojí metoda vícenásobné membránové extruze, metoda hydratace lipidové vrstvy, mikrofluidizace či sonikace (Mahmoud *et al.*, 2018)



Obrázek 2 Schématické znázornění nosných systémů (Sedaghat Doost *et al.*, 2020)

Jejich velkou výhodou je, že jsou biologicky rozložitelné, netoxické a neimunogenní (Basiri *et al.* 2016). Niosomy jsou levnější a stabilnější během skladování a poskytují lepší

kinetiku uvolňování ve srovnání s liposomy. Bylo zjištěno, že enkapsulace EO v niosomech zásadně zlepšuje jejich schopnost pronikání a stabilitu. (Sedaghat Doost *et al.*, 2020).

## 1.7 Micely

Micely jsou lipidové molekuly, které se uspořádají ve sférické formě ve vodných roztocích. Tvorba micely je odpovědí na amfipatickou povahu mastných kyselin, což znamená, že obsahují jak hydrofilní oblasti (skupiny polárních částí), tak hydrofobní oblasti (dlouhý hydrofobní řetězec). Micely obsahují polární části, které obvykle tvoří vnější povrch. Hydrofobní konce jsou uvnitř, protože jsou nepolární. Mastné kyseliny v micelách mají obvykle jeden uhlovodíkový řetězec, to jim umožňuje přizpůsobit se kulovému tvaru pro menší sterickou překážku v mastné kyselině. Mastné kyseliny z glykolipidů a fosfolipidů mají dva hydrofobní řetězce, které jsou příliš objemné, aby se vešly do sférického tvaru jako micely. Proto dávají přednost tvorbě lipidových dvojvrstev (Horne, 2008). Lipidové dvojvrstvy se rychle a spontánně vytvářejí ve vodném médiu a jsou stabilizovány hydrofobními interakcemi, Van der Waalsovými přitažlivými silami a elektrostatickými interakcemi. Funkcí lipidové dvojvrstvy je tvořit bariéru mezi oběma stranami membrány (Medoš *et al.*, 2020).

Velikosti micel se pohybují od 2 nm do 20 nm v závislosti na složení a koncentraci. Velikost micely je omezenější než velikost lipidové dvojvrstvy. Lipidová dvojvrstva může přesahovat až  $10^6$  nm (Berg *et al.*, 2002). Lipidová dvojvrstva není rigidní struktura, naopak je spíše tekutá. Jednotlivé lipidové molekuly jsou schopny poměrně snadno se pohybovat nebo rozptylovat laterálně přes membránu, tento proces se nazývá laterální difúze. Čím více cis dvojných vazeb má uhlovodíkový zbytek, tím více se struktura stává tekutinou. Je tomu tak proto, že když uhlovodíkový zbytek má cis dvojně vazby, nemůže se dále balit, stejně jako nasycený uhlovodíkový zbytek, takže se stává tekutějším (Desikan *et al.*, 2020).

Micely v lidském těle pomáhají vstřebávat vitamíny rozpustné v tucích. Pomáhají tenkému střevu absorbovat esenciální lipidy a vitamíny z jater a žlučníku. Do tenkého střeva také nesou komplexní lipidy, jako je lecitin a vitamíny rozpustné v tucích (A, D, E a K). Bez micel by se tyto vitamíny nemohly absorbovat do těla, což by vedlo k vážným komplikacím. Micely také pomáhají čistit pokožku. Z tohoto důvodu je využívá řada

pleťové kosmetiky. Čistí pokožku odstraněním oleje a dalších látek, aniž by bylo nutné je následně omývat (Takahashi *et al.*, 2020).

## 1.8 Polymerní nanočástice

Porézní polymerní částice, zejména ty, které mají kulovitý tvar, se používají v mnoha odvětvích po celá desetiletí. Byly klasifikovány jako makro-, mezo- a mikroporézní v závislosti na velikosti pórů, respektive  $> 50$  nm,  $50\text{--}2$  nm a  $<2$  nm. Dva hlavní rysy, jejich porézní povaha a vyšší stupeň zesíťování, je odlišují od polymerních částic gelového typu. Tyto rozdíly vedou k různým charakteristikám, jako je vysoká povrchová plocha, schopnost absorbovat různá rozpouštědla s různou polaritou a zvýšená křehkost. Velikost, rozptyl velikosti, chemickou povahu a funkčnost lze zmínit jako další rysy, které porézní částice sdílejí se svými neporézními protějšky, částicemi gelového typu. Obecně jsou polymerní částice vyráběny heterogenní polymerací za použití nemísitelnosti dvou nebo více kapalin. Suspenze, disperze, srážení, membránová/mikrokanálová emulgace a mikrofluidní polymerace jsou hlavními technikami tvorby porézních částic (Gokmen & Du Prez, 2012).

Pokud jde o fyzikální kategorizaci, zatímco emulze označuje disperzi kapalina/kapalina, suspenze označuje disperzi pevná látka/kapalina. To však neplatí pro heterogenní polymerace, protože jak emulzní, tak suspenzní polymerace začínají směsí kapalina/kapalina na začátku a končí jako disperze pevná látka/kapalina. Polymerace suspenze začíná dispergováním kapiček monomeru v kontinuální fázi pomocí povrchově aktivních látek, jako je SDS. Přidá se iniciátor rozpustný v monomeru, jehož cílem je řídit jak iniciaci, tak růst řetězce uvnitř kapiček monomeru. To je hlavní rozdíl oproti emulzní polymeraci, kde se používá iniciátor rozpustný v kontinuální fázi. Kromě toho lze do receptur suspenzní polymerace přidat také látky zachycující radikály, například soli  $\text{NO}_2$ , aby se zabránilo nukleaci v kontinuální fázi (Gokmen & Du Prez, 2012).

Suspenzní polymeraci lze z hlediska jejího mechanismu považovat za nejméně komplikovanou heterogenní polymerační techniku. (Rastogi *et al.*, 2010). Při suspenzní polymeraci se v průběhu celého procesu aplikuje kontinuální mechanické míchání konstantní rychlostí, aby se kapičky monomeru dobře dispergovaly. Protože tvorba kapiček je řízena chaotickým mícháním a protože ke srážení/rozbíjení kapiček dochází nepřetržitě během celého procesu, částice získané polymerací v suspenzi jsou téměř vždy polydisperzní. Bez ohledu na skutečnost, že tato polydisperzita je hlavní nevýhodou

polymerace v suspenzi, je tato technika široce používána v průmyslu kvůli nízkým nákladům (Konishi *et al.*, 2010).

Povrchová plocha, celkový objem pórů a distribuce velikosti pórů definují porézní povahu. Tyto charakteristiky mohou být měřeny pomocí techniky sorpce N<sub>2</sub> a Hg vniknutí, které obě závisí na pronikání uvedených tekutin do pórů. Kromě sorpce N<sub>2</sub> a vniknutí Hg existují další techniky pro kvantifikaci rozdělení velikosti pórů, jako je termoporometrie, inverzní velikostní vylučovací chromatografie a analýza mikroskopického zobrazování (Yanagishita *et al.*, 2010).

Polymerní mikrokuličky mohou být snadno syntetizovány z různých materiálů a povrchový náboj částic může být snadno vyladěn jejich funkcionalizací během syntézy nebo použitím modifikace po syntéze. Dosud existuje řada technik, které poskytují částice s předem stanovenou velikostí a velmi úzkým rozdělením velikosti. Obecně mají polymerní částice kulovité tvary. Polymerní částice v rozmezí velikosti od ca. 100 nm až 1 μm lze předběžně rozdělit na latexy a mikrogely. Latexové částice mají „kondenzovanou“ strukturu, zatímco mikrogely mají „otevřenou“ polymerní síťovou strukturu. Toto dělení je poněkud libovolné: při vhodných hodnotách pH a/nebo ve vhodných rozpouštědlech latexové kuličky bobtnají a transformují se na částice mikrogelu. Otevřená struktura mikrogelů vede k důležitým aplikačním vlastnostem: polymerní síť může sekvestrovat a uvolňovat malé molekuly nebo nanočástice nebo může měnit svůj objem v reakci na vnější podněty, jako je pH, teplota nebo iontová síla (Malloggi *et al.*, 2010).

Polymerní latexy a mikrogely se syntetizují pomocí emulze, disperze, srážení, miniemulze nebo suspenzní polymerizace. Většina polymerů používaných při syntéze latexů a mikrogelů obvykle absorbuje světlo v UV spektrálním rozmezí (Gokmen & Du Prez, 2012).



## 2 BIOPOLYMERY

Existuje celá řada definic popisující biopolymery. Biopolymery jsou molekuly syntetizované biologickými systémy a jsou složeny z materiálů biologického charakteru, jako jsou aminokyseliny, cukry a přírodní tuky (Tang *et al.*, 2012).

Jedná se o polymery složeny z kovalentně navázaných opakujících se monomerních jednotek, schopných vytvářet řetězce. Vznikají během procesu kondenzace. Předpona bio značí, že zdrojem biopolymerů jsou živé organismy a mohou být ve většině případů biologicky degradabilní. Některé biopolymery mohou být mikroorganismy degradovány nebo štěpeny na vedlejší organické produkty, jako je oxid uhličitý a voda. Tyto produkty nepředstavují riziko pro životní prostředí (Shankar *et al.*, 2018). Živé organismy vyžadují tři základní typy polymerů: polypeptid, polynukleotid a polysacharid. Všechny tři typy biopolymerů jsou předem organizované, podmíněně se navzájem doplňují, jsou termodynamicky nestabilní, ale přesto přetrvávají kvůli kinetickému zachycení s chirálními monomery a směrovými řetězci. Všechny tři biopolymery vytváří konkrétní stavy, které je chrání před hydrolyzou (Morin *et al.*, 2015).

Tyto tři typy biopolymerů se výrazně liší ve své struktuře, vlastnostech a funkcích. Polypeptid a polynukleotid dominují ve funkčních a informačních aspektech života, zatímco polysacharid je důležitý pro fyzickou strukturu, ukládání energie a rozpoznávání. Přesto biopolymery sdílejí mnoho kritických vlastností např. chiralitu, směrovost řetězce, chemickou nestabilitu ve vodném médiu a syntézu kondenzační dehydratací pomocí fosforylovaných meziproductů. Proteiny jsou tvořeny kondenzací jedenadvaceti typů aminokyselin. Polynukleotidy jsou tvořeny kondenzací čtyř typů nukleotidů. Celulóza, nejhojnější polymer v biosféře, je tvořena kondenzací glukózy (McNamara *et al.*, 2015). Komplexní polysacharidy na buněčném povrchu obsahují méně než dvacet různých monosacharidů (Gabiús *et al.*, 2011).

Syntéza každého typu biopolymeru využívá fosforylované nebo pyrofosforylované meziproducty v reakcích katalyzovaných procesními motory. V translaci je motorem ribosom. Při replikaci je motorem DNA polymeráza. V transkripci je motorem RNA polymeráza. V syntéze celulózy je motorem glykosyltransferáza (Morgan *et al.*, 2016). Všechny biopolymery se spontánně skládají ve vodném prostředí. DNA, RNA, protein a polysacharid tvoří propracované a vysoce specifické trojrozměrné struktury charakterizované specifickými intramolekulárními interakcemi, nízkou konfigurační entropií a přiřazením funkčních skupin k přesným umístěním v trojrozměrném prostoru.

Molekulární interakce umožňují proteinům skládat se do domén nebo do vláken složené převážně z  $\alpha$ -helixů a  $\beta$  skládaných listů. RNA se skládají do velkých někdy monolitických struktur složených z duplexů, tetrasmyček a pseudouzlů. Doplnkové sekvence DNA se skládají ve dvojité spirály. Polyglukóza tvoří mikrofibrily, což jsou supramolekulární soubory neurčité délky obsahující více paralelních řetězců (Cosgrove, 2014).

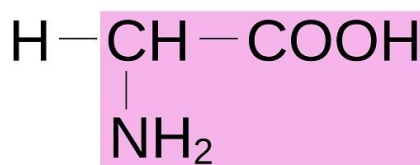
Biopolymery lze charakterizovat jako sebeochranné (intramolekulární skládání) a partnerské (intermolekulární sestavení) struktury, které mohou oddálit, ale ne odvrátit konečný osud jakéhokoli biopolymeru - chemickou degradaci (Lanier *et al.*, 2017).

## 2.1 Proteiny

Proteiny jsou konstruovány pomocí složitého postupu. Tento proces je známý jako proteinová biosyntéza (proteosyntéza, translace) a zahrnuje výstavbu proteinových řetězců z jednotlivých aminokyselin v konkrétní sekvenci podle matrice RNA (Vodrážka, 1996).

### 2.1.1 Základní charakteristika

Všechny aminokyseliny mají centrální alfa uhlíkový atom, na kterém je vázána karboxylová skupina (COOH), atom vodíku (H), aminová skupina (NH<sub>2</sub>) a funkční a variabilní postranní řetězec radikálu, který definuje, o kterou aminokyselinu jde (Shah *et al.*, 2020). Nejzákladnější formou aminokyseliny je glycin (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>), který má postranní řetězec sestávající z jediného atomu vodíku, viz. Obr. 3 (Rousseaux, 2008).



Obrázek 3 Chemická struktura glycinu (Merck, 2020)

Aminokyseliny jsou produkovány tělem nebo jsou přijímány ve stravě. Jsou rozděleny do tří různých skupin: základní, esenciální (nepostradatelné) a podmíněné (Zadák, 2008).

Struktura proteinu je obecně rozdělena do čtyř strukturních forem, které se nazývají primární, sekundární, terciární a kvartérní struktura. Primární struktura proteinu tvoří lineární polymer s řetězcem aminokyselin spojených peptidovými vazbami. Sekundární struktury proteinů jsou obvykle velmi pravidelné ve své konformaci. „Alfa helix“ a „beta

skládání listy“ jsou dva typy sekundárních struktur převážně stabilizovaných vodíkovými vazbami. Terciární struktura proteinu je trojrozměrná struktura stabilizována řadou hydrofobních zbytků aminokyselin a disulfidovými vazbami vytvořenými mezi dvěma cysteinovými aminokyselinami. Kvartérní struktura proteinu je založena na uspořádání více než dvou řetězců peptidu (Gupta *et al.*, 2014)

Hrají zásadní roli v každém živém organismu. Každá protilátka, enzym a chemický posel jsou vytvořeny z bílkovin. Protein je také nezbytný k zajištění, udržování a opravě anatomické struktury. Působí jako vazebné molekuly a nosné molekuly, což umožňuje transport a ukládání atomů a molekul v těle (What are proteins and what do they do?, 2020). Rozkládají větší sloučeniny na odpadní produkty, jsou zodpovědné za složky reprodukce, regulují homeostázu a metabolismus, udržují hodnoty pH a rovnováhu tekutin a dodávají energii (Hopkins *et al.*, 2019).

K proteinům se kromě kolagenu, hedvábí, syrovátky řadí i kukuřičný protein zein, který byl použit v praktické části této práce.

### 2.1.2 Zein

Jedná se o protein získávaný z endospermu kukuřičných jader. Kukuřičný zein se skládá z monomerů a disulfidově vázaných oligomerů. Molární hmotnost bývá od 22 do 27 kDa a hodnota izoelektrického pH 6,228. Zein patří do rodiny prolaminů (Elzoghby *et al.*, 2015) Stejně jako u gliadinu je zeinový prolamin nerozpustný ve vodě, s výjimkou velmi nízkého nebo vysokého pH. Je rozpustný v binárních solventech obsahujících nižší alifatické alkoholy (ethanol, methanol a isopropanol). Zein má amfifilní charakter, kde hlavní řetězec má polární aminokyseliny, ale postranní řetězce obsahují více než 50% nepolárních aminokyselin, včetně leucinu, isoleucinu, valinu, alaninu, fenylalaninu a glycinu. Nejběžnějšími zeinovými aminokyselinami jsou kyselina glutamová (glutamin) 21-26 %, leucin (20 %), prolin (10 %) a alanin (10 %) (Shukla & Cheryan, 2001).

Tento protein lze rozdělit na dvě hlavní frakce;  $\alpha$ -zein, který obsahuje 80% dostupného prolaminu a je definován jako frakce rozpustná v 95% ethanolu, a  $\beta$ -zein, který je relativně nestabilní, ale rozpustný ve vodě. Komerční použití kukuřičného zeinu zahrnuje četné aplikace (např. řízené uvolňování, potahování, biodegradabilní filmy a plasty). Zeinové povlaky se tradičně používají jako kyslíkové a lipidové bariéry pro ořechy, bonbóny, cukrářské výrobky a další potraviny. Na čerstvé a sušené ovoce byly použity nátěry na bázi zeinů jako náhrada za šelakové povlaky. Také se používají jako vlasové fixační prostředky,

do žvýkaček štítků, laků atd. V 70. letech 20. století bylo téměř 75% z 500 tun vyrobeného zeinu použito k potahování tablet (Pomes, 1971).

Pro několik aplikací je žlutá barva zeinu kvůli xanthofylům a karotenoidům neatraktivní. Bylo testováno několik způsobů zesvětlení barvy. Jedním ze způsobů, jak získat relativně bílý zein, je začít s voskovou kukuřicí, která obsahuje méně pigmentu a xanthofylu (Plackett, 2011).

Prvním krokem při výrobě zeinu je extrakce z kukuřičné mouky nebo kukuřičného lepku za použití vhodného rozpouštědla. Na základě převahy nepolárních aminokyselin v zeinu je možné předpovědět, že rozpouštědla pro zein by měla mít smíšené vlastnosti. Dill (1927) použil termín „kritická teplota peptizace“ k popisu limitujících podmínek, pro které by byl zein rozpustný. Zein je považován za „rozpustný“, pokud se > 0,5% (hm./obj.) proteinu rozpustí v rozpouštědle a vznikne vizuálně průhledný roztok při pokojové teplotě (20–25 °C).

Nevodná rozpouštědla pro zein jsou obvykle dvou typů: směs organické sloučeniny s vodou; nebo směs dvou bezvodých organických sloučenin. Vodné alkoholové roztoky byly široce používány pro komerční výrobu zeinu. Zein je rozpustný v 50–90% ethanolu, ale ne v bezvodých alkoholových roztocích (kromě methanolu). Zein je však dispergovatelný ve vysokých koncentracích alkoholu a v absolutním alkoholu, když jsou teploty nad normálním bodem varu rozpouštědel. Podobně může být zein solubilizován ve 40% ethanolu při vysokých teplotách. Při nižších koncentracích ethanolu má zein tendenci denaturovat před dosažením teplot požadovaných pro jeho rozptylování. Zein je také rozpustný v ketonech (např. methylethylketon, aceton), amidových rozpouštědlech (např. acetamid), ve vysokých koncentracích solí (NaCl, KBr), v esterech a glykolech. Chování rozpustnosti zeinu je znázorněno ve formě schématu ternární fáze. Při konstantní teplotě se rozpustnost zeinu mění mezi 2 a 60% (hmot./hmot.), v závislosti na koncentraci ethanolu. Při nižších (<40%) a vyšších (> 90%) koncentracích ethanolu se objevují dvě kapalné fáze, které obsahují zein, vodu a ethanol (Matsushima *et al.*, 2001).

Rozpustnost zeinu ve vodě může být zvýšena buď kyslou nebo alkalickou deamidací nebo enzymatickou modifikací. Kyselá nebo alkalická ošetření s HCl (pH <1) nebo NaOH (pH > 12) se běžně používají k přeměně aminokyselin glutaminu a asparaginu na kyselinové nebo solné formy (Funatsu a Shibata, 1998). Alkalická rozpustnost byla přičítána fenolické hydroxylové skupině aminokyseliny tyrosinu. Asi 25% aminokyselinových zbytků zeinu obsahuje amidovou skupinu a 10% zbytků v zeinu je prolin (bohatý na aminy/amidy). Zein

je tedy rozpustný i v amoniaku. Takové ošetření však spotřebovává velké množství chemikálií nebo způsobuje významnou degradaci proteinu. Hydrolyza hydroxidy kovů alkalických zemin, jako je baryum, vápník, stroncium a lithium, má sklon degradovat méně bílkovin a poskytovat lepší vlastnosti zeinových filmů (Shukla & Cheryan, 2001).

Hydrolyza amidových skupin glutaminových a asparaginových zbytků na karboxylové skupiny solubilizuje zein při nižším pH. Zeinové nebo deamidované peptidy zeinu mohou být také esterifikovány nebo reagovány s mastným alkoholem za vzniku esterů mastných kyselin nebo mastných acylovaných zeinů. Některé modifikované estery vykazují zvýšenou toleranci vůči uhlovodíkům (Pomes, 1971). Zein tvoří komplex sonikací se skupinou fosfatidové kyseliny lecitinu za vzniku komplexu zein-fosfatidátu rozpustného ve vodě, který vykazuje emulgační vlastnosti při širokém rozmezí pH. Tento komplex lze štěpit Pronasou E, aby se zvýšila jeho emulgační kapacita, čímž se zvýší využití potravin. Podobně fosforylace pomocí  $\text{POCl}_3$  v přítomnosti esenciálních aminokyselin vede k 11násobnému zlepšení stravitelnosti (Matheis, 1991).

Enzymatická hydrolyza je dalším prostředkem ke zvýšení rozpustnosti zeinu ve vodných roztocích. Mannheim a Cheryan (1993) použili dvoufázovou sekvenční enzymatickou modifikaci s Alcalasou v každé fázi a ultrafiltraci pro přípravu zeinu rozpustného ve vodě. Nová forma vykazuje zlepšené funkční vlastnosti, včetně rozpustnosti, pěny a adsorpce vlhkosti. Pokusy s jinými enzymy se setkaly s omezeným úspěchem (Mannheim & Cheryan, 1993).

Volba rozpouštědla pro zein je určena nejen jeho rozpustností, ale také jeho gelovými charakteristikami. Čas potřebný k gelovatění závisí na rozpouštědle, koncentraci rozpouštědla (méně vody vede k pomalejší gelaci), teplotě (vyšší teploty podporují gelaci), pH a mechanickým faktorům podporujícím denaturaci proteinu. Vodné alkoholové disperze, obsahující <10% zeinu, gelují velmi pomalu, ale takové nízké koncentrace a jejich odpovídající nízké viskozity nejsou průmyslově příliš užitečné. Většina aplikací zeinu vyžaduje 20–40% koncentrací a taková řešení budou pravděpodobně gelovat za méně než den. Primární rozpouštědla poskytují lepší ochranu proti gelovatění než rozpouštědla obsahující vodu. Stabilita zeinu v roztoku je důležitá pro úspěšné komerční aplikace a může být zvýšena začleněním třetí organické složky. Například zahrnutí 5% formaldehydu do acetonové vody nebo přidání kalafuny nebo šelaku do roztoků alkoholu a vody nebo přidání stabilizátorů, jako je propylenglykol, podstatně zvýšila odolnost systému vůči gelaci. Podobně přidání triethanolaminu do systémů

alkohol-voda výrazně zvýšilo průhlednost filmů vytvořených ze směsí (Shukla & Cheryan, 2001).

Zeinové fólie se snadno odlévají z alkoholových roztoků s přidanými změkčovadly, jako je glycerol, polyethylenglykol nebo směsi. Jak bylo popsáno přidání změkčovadel a zesíťujících činidel se používá k ovlivnění jak mechanických, tak bariérových vlastností. Kromě toho mohou být zeinové filmy tvořeny vytlačováním suchých pryskyřičných pelet (Plackett, 2011).

## 2.2 Polysacharidy

Polysacharidy jsou velké molekuly sestavené z mnoha monosacharidů. Speciální enzymy vážou tyto monomery a vytvářejí velké polysacharidy (Leung *et al.*, 2006).

### 2.2.1 Obecná charakteristika

Polysacharidy mají obecný vzorec  $C_x(H_2O)_y$ , kde  $x$  je obvykle velké číslo mezi 200 a 2 500 (Craddock, 2018). Polysacharid je velká molekula vyrobená z mnoha menších monosacharidů. Speciální enzymy vážou tyto monomery a vytvářejí velké polysacharidy. Polysacharidem může být homopolysacharid, ve kterém jsou všechny monosacharidy stejné, nebo heteropolysacharid, ve kterém se monosacharidy liší. Polysacharidy mohou mít různé formy. Molekula s přímým řetězcem monosacharidů se nazývá lineární polysacharid, zatímco řetězec, který má postranní řetězce, je známý jako rozvětvený polysacharid (Leung *et al.*, 2006). Se zvyšujícím se stupněm rozvětvení dochází k odpovídajícím změnám v takových fyzikálních vlastnostech, jako je rozpustnost ve vodě, viskozita a gelové chování (Stephen *et al.*, 2006). Složitá interakce mezi jejich hydroxylovými skupinami (OH), dalšími postranními skupinami, konfiguracemi molekul a zúčastněnými enzymy ovlivňují výsledný produkovaný polysacharid (Lemarchand *et al.*, 2004). Se zvyšujícím se stupněm rozvětvení dochází k odpovídajícím změnám v takových fyzikálních vlastnostech, jako je rozpustnost ve vodě, viskozita a gelové chování (Stephen *et al.*, 2006). Složitá interakce mezi jejich hydroxylovými skupinami (OH), dalšími postranními skupinami, konfiguracemi molekul a zúčastněnými enzymy ovlivňují výsledný produkovaný polysacharid (Lemarchand *et al.*, 2004).

### 2.2.2 Funkce

V závislosti na struktuře mohou mít polysacharidy v přírodě celou řadu funkcí. Některé polysacharidy se používají pro ukládání energie, jiné pro odesílání buněčných zpráv a jiné

pro poskytování podpory buňkám a tkáním. Umožňují také změny v koncentračním gradientu, což může ovlivnit absorpci živin a vody buňkou (Kruif & Tuinier, 2001). Mnoho polysacharidů se v buňce vyskytuje ve formě glykokonjugátu, když se kovalentně vážou na proteiny nebo lipidy. Glykolipidy a glykoproteiny mohou být použity k vysílání signálů mezi buňkami a uvnitř buněk. Imunitní systémy organismů jsou řízené rozpoznáváním glykoproteinů na povrchu buněk (Coviello *et al.*, 2007). Jednou z největších rolí polysacharidů je funkce stavební. Rostlinné buňky jsou tvořeny celulórou, hmyz a houby mají ve svých buňkách zase chitin. Do rostlinných sacharidů kromě celulózy se řadí škrob a jeho deriváty, algináty a arabská guma, do mikrobiálních se řadí např. curdlan, pullulan či xanthan. Z živočišných zástupců je to chitin a chitosan (Schmitt & Turgeon, 2011).

### 2.2.3 Chitosan

Chitin je po celulóze druhým nejhojnějším přírodním polymerem na světě (Di Silvio, 2009). Nachází se ve skořápkách koryšů a měkkýšů, v páteři chobotnic a kutikulách hmyzu, stejně jako v mořských rozsivkách, v prvocích a buněčné stěně několika druhů hub (Ivanova *et al.*, 2014). Nejčastěji je získáván jako vedlejší odpadní produkt z odvětví zpracování krabů, krevet a plazů (Plackett, 2011). Chemicky je chitin složený z N-acetylglukosaminu a N-glukosaminových monomerů, které jsou spojeny glykosidickými vazbami (Lee *et al.*, 2012). Tyto jednotky mohou být buď náhodně, nebo blokově distribuovány v biopolymerním řetězci. V závislosti na poměru N-acetylglukosaminu k N-glukosaminu se polymer označuje buď jako chitin (počet jednotek N-acetylglukosaminu > 50%, poly (N-acetyl-D-glukosamin)) nebo chitosan (počet N-glukosaminové jednotky > 50%, poly (N-acetyl-D-glukosamin-cDD-glukosamin)) (Ivanova *et al.*, 2014).

Z chitinu se chemickou deacetylací získává kationtový, lineární (Poole-Warren *et al.*, 2016) semikrystalický (Lee *et al.*, 2012) polysacharid (Lewis, 2010) chitosan. Stupeň deacetylace, označující volné aminové skupiny podél hlavního řetězce chitosanu, je klíčovým parametrem, jelikož mění jeho fyzikálně-chemické vlastnosti, jako je například rozpustnost, konformace řetězce, elektrostatické vlastnosti (Lee *et al.*, 2012), hustota náboje, krystalinita a náchylnost k enzymatické degradaci (Di Silvio, 2009). V komerčních přípravcích bývá odstraněno 70 – 95 % acetylových skupin v hlavním řetězci polymeru (Lewis, 2010).

Chitin i chitosan před táním degradují, což je typické pro polysacharidy s rozsáhlou vodíkovou vazbou (Plackett, 2011). Vzhledem k silné vazbě vodíku, která existuje mezi jeho řetězci, je chitin nerozpustný ve většině typických zpracovatelských rozpouštědel, což omezuje jeho dostupnost a zpracovatelnost. Chitosan jako částečně N-deacetylovaný derivát chitinu je však snadno rozpustný (Ivanova *et al.*, 2014) pouze ve vodných roztocích o pH <6,5 (Poole-Warren *et al.*, 2016). Při pH nad 6,2 tvoří chitosanové roztoky hydratovanou gelovou sraženinu. U člověka je chitosan enzymaticky degradován lysozomem (Poole-Warren *et al.*, 2016), N-acetyl-D-glukosaminidázou a lipázami (Lee *et al.*, 2012). Lysozym štěpí polymerní řetězec chitosanu a snižuje jeho molekulovou hmotnost, dokud není dostatečně krátký, aby byl zpracován buňkami. Glukosaminy, konečné degradační produkty chitosanu, jsou netoxické, neimunogenní a nekarcinogenní. *In vivo* produkty konečné degradace procházejí normálními metabolickými cestami a mohou být během dýchání inkorporovány do glykoproteinů nebo vylučovány jako plynný oxid uhličitý (Lee *et al.*, 2012).

Ukázalo se, že chitosan je biologicky rozložitelný, biologicky kompatibilní, netoxický a urychluje hojení ran (Lewis, 2010). Má řadu charakteristik, díky kterým je vhodný k implantaci, jako je vyvolání minimální reakce na cizí těleso, antibakteriální povaha a schopnost formovat se do vysoce porézních struktur s různou geometrií vhodných pro růst buněk a osteokondukcí (Lee *et al.*, 2012). Ze studií vyplývá, že je bezpečný pro použití ve farmacii jako pomocné látky. Protože chitosan vykazuje velký příslib v řízeném uvolňování, je tento materiál stále více využíván pro vývoj nanočástic a mikročástic pro dodávání léčiv, genovou terapii a regenerativní medicínu (Di Silvio, 2009). Ukázalo se, že chitosan i chitosan modifikovaný aniontovými polymery jsou vynikajícími kandidáty na opravu perforovaných tympanických membrán (Ivanova *et al.*, 2014).

Chitosanové gely jako podpora imobilizace enzymů mají obecně velký potenciál pro mnoho aplikací, včetně biosenzorů pro měření *in situ* látek znečišťujících životní prostředí a pro kontrolu metabolitů v umělých orgánech. Tato technika může být užitečná pro odstranění škodlivých látek z odpadních vod ve vinařském, cukrovém a mléčném průmyslu (Plackett, 2011). Chitosan, kolagen a glykosaminoglykany byly použity v kombinaci za vzniku degradovatelného hydrogelu pro nahrazení rohovky (Chirila, 2010).

Chitosan je schopen tvořit filmy bez přidání změkčovadel. Chitosanové filmy se vyznačují nízkou propustností pro kyslík a vykazují vynikající mechanické vlastnosti (Plackett,



2011). Hlavní nevýhodou chitosanových filmů je jejich vysoká citlivost na vlhkost. Funkční vlastnosti chitosanových filmů byly zlepšeny, když byly kombinovány s jinými sloučeninami vytvářejícími film (Plackett, 2011). Chitosanový film byl testován na rychle se kazících výrobcích. Zkoumání povlaků chitosanu za účelem kontroly rozkladu minimálně zpracovaného ovoce a zeleniny (jahody a salát) ukázalo, že přítomnost filmu na salátu vyvolala vývoj hořké chuti a omezený antimikrobiální účinek (4 dny), ale účinek byl zachován na jahody po dobu 12 dnů bez sensorických změn. Obecně se ukázalo, že potahování ovoce polopropustnými fóliemi zpomaluje zrání modifikací hladiny endogenního CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> a ethylenu v ovoci (Plackett, 2011). V nedávné době byl chitosan navržen jako povlak pro obal Tetra Brik pro uchovávání polévky (Plackett, 2011).

Chitosan může být použit v zemědělství také jako povlak pro řízené uvolňování hnojiv, pesticidů, herbicidů, nematocidů a insekticidů v půdě a jako způsob snižování škod na životní prostředí způsobených nadměrným používáním agrochemikálií. Potahování semen a listů chitosanovými filmy může také zabránit mikrobiálním infekcím a indukovat geny v rostlinách, které napomáhají odolnosti chorobám (Plackett, 2011). Chitosan jako takový má významný potenciál pro adsorpci kovových iontů, barviv a proteinů a jako silné chelatační činidlo, které tvoří komplexy s přechodnými kovy a těžkými kovy (Ivanova *et al.*, 2014).

Širokospektrální antimikrobiální a antifungální účinky chitinu, chitosanu a jejich derivátů proti různým skupinám mikroorganismů byly komplexně popsány (Ivanova *et al.*, 2014). Bylo zjištěno, že chitosan vykazuje antimikrobiální účinek proti širokému spektru mikroorganismů - grampozitivním a gramnegativním bakteriím, kvasinkám a houbám vytvářejícím hyfy. To je zvláště zajímavé pro potravinářský průmysl, protože chitosan je schopen u plísní potlačit sporulaci a klíčení spor (Poole-Warren *et al.*, 2016).

Antimikrobiální účinnost chitosanu je větší než účinnost chitinu v důsledku kationtové povahy glukosaminové složky chitosanu při pH 6. Kladně nabitě aminoskupiny glukosaminových jednotek interagují s negativně nabitými složkami v mikrobiálních buněčných membránách, mění jejich bariérové vlastnosti a tím zabraňují vstupu živin, případně způsobují prasknutí buněčné membrány, únik intercelulárního obsahu a nakonec buněčnou smrt (Ivanova *et al.*, 2014). Další uváděný mechanismus zahrnuje pronikání chitosanu s nízkou molekulovou hmotností do buněk, navázání na DNA a následnou inhibici syntézy RNA a proteinů (Plackett, 2011), což vede k buněčné dysfunkci a smrti (Ivanova *et al.*, 2014)

Byla zjištěna korelace mezi dostupností kyseliny teichoové, esenciálního polyaniontového polymeru buněčné stěny grampozitivních bakterií, na citlivost *S. aureus* vůči chitosanu. Při srovnání různých mutantů byl bakteriální kmen s chybějícími nebo redukovanými částmi kyseliny teichoové a následně méně negativně nabitými buněčnými stěnami nejodolnější vůči chitosanu (až pětinasobně vyšší minimální inhibiční koncentrace (MIC) ve srovnání s divokým kmenem). Naopak mutant, který postrádal D-alaninovou modifikaci v kyselině teichoové, vykazoval vyšší negativní náboj a byl téměř stokrát citlivější k chitosanu shodnotou MIC pouze 0,9 mg/ml. Podobné nálezy byly pozorovány za použití mutantu *Salmonella typhimurium* (Poole-Warren *et al.*, 2016).

### 3 ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY

Antimikrobiální látky jsou sloučeniny schopné lokálně usmrcovat bakteriální buňky, inhibovat nebo zpomalovat jejich růst. Látky působící antimikrobiálně mohou být čistě přírodní produkty (např. aminoglykosidy), chemicky modifikované přírodní látky, které zahrnují většinu dnes používaných antibiotik (např. beta-laktamy a cefalosporiny) nebo zcela syntetické sloučeniny. Ačkoli dosud dostupné antimikrobiální látky jsou chemicky různorodé, patogenní mikroorganismy jsou schopné vyvinout proti nim mechanismy rezistence, což je důsledkem rozsáhlého zneužití antimikrobiálních látek jak v zemědělství, tak v oblasti zdravotnictví (Adzitey, 2015).

#### 3.1 Klasifikace antimikrobiálních látek

Antimikrobiální látky lze klasifikovat do pěti skupin: druh účinku, zdroje, spektra aktivity, chemické struktury a funkce (Adzitey, 2015). Rozdělení na základě druhu účinku lze antibakteriální látky klasifikovat na bakteriostatické a baktericidní. Antibakteriální látky, které ničí bakterie zacílením na buněčnou stěnu nebo buněčnou membránu bakterií, se nazývají baktericidní a ty, které zpomalují nebo inhibují růst bakterií, se označují jako bakteriostatické. Fenomén inhibice bakteriostatických látek ve skutečnosti zahrnuje inhibici syntézy proteinů nebo některých bakteriálních metabolických drah (Aminov, 2010). Dělení podle zdroje objasňuje, odkud byla daná látka získána. Zda z přírodních zdrojů - bakterií, plísní, rostlin, živočichů nebo jsou to chemicky pozměněné přírodní produkty či zcela syntetické (Oloke, 2000). Na základě účinku mohou být antimikrobiální látky rozdělené na ty s úzkým nebo širokým spektrem účinku. Látky s úzkým spektrem působí např. pouze proti grampozitivním nebo pouze proti gramnegativním bakteriím. Širokospektrální látky tedy zasahují široké rozpětí mikroorganismů. Antibakteriální látky s úzkým spektrem jsou obvykle preferovány před širokospektrálními látkami (Carbon & Isturiz, 2002).

Co se týká chemické struktury, pak platí, že podobné strukturální jednotky mají podobné vzorce toxicity, účinnosti a další související vlastnosti. Klasifikace antibakteriálních látek na základě jejich chemické struktury je nejpřesnější a tudíž nejrozsáhlejší, proto je rozebráno detailně níže (Kotra *et al.*, 2000).

### 3.1.1 Polyfenoly

Polyfenoly jsou sekundární metabolity rostlin a obvykle se podílejí na obraně proti ultrafialovému záření nebo patogenům. V posledním desetiletí vzrostl zájem o možné zdravotní benefity rostlinných polyfenolů ve funkci antioxidantu. Epidemiologické studie a související metaanalýzy silně naznačují, že dlouhodobá konzumace potravin bohatých na rostlinné polyfenoly nabízí ochranu před rozvojem rakoviny, kardiovaskulárních chorob, cukrovky, osteoporózy a také neurodegenerativních chorob (Vissers *et al.*, 2002).

U různých druhů rostlin bylo identifikováno více než 8 000 polyfenolických sloučenin. Všechny rostlinné fenolové sloučeniny pocházejí z meziprojektu metabolismu fenylalaninu nebo blízkého prekursoru, kyseliny shikimové. Primárně se vyskytují v konjugovaných formách, s jedním nebo více zbytky cukru navázanými na hydroxylové skupiny, ačkoli existují také přímé vazby cukru (polysacharid nebo monosacharid) na aromatický uhlík. Běžné je také spojení s jinými sloučeninami, jako jsou karboxylové a organické kyseliny, aminy, lipidy a vazba s jinými fenoly. Polyfenoly mohou být klasifikovány do různých skupin v závislosti na počtu fenolických kruhů, které obsahují, a na základě strukturálních prvků, které tyto kroužky spojují. Mezi hlavní třídy patří fenolové kyseliny, flavonoidy, stilbenes a lignany (Michalowicz *et al.*, 2007).

### 3.1.2 Alkaloidy

Alkaloidy jsou látky produkované rostlinami. Rostliny obsahují více druhů alkaloidů. Obsah alkaloidů závisí na věku rostliny, regionu, klimatu a ročním období. Řasy a mechorosty neprodukují alkaloidy, houby je produkují zřídka. Naopak vysoký obsah alkaloidů je v čeledích *Solanaceae* (solanin, nikotin, hyoscyamin, atropin), *Rubiaceae* (kofein, chinin) a *Papaveraceae* (morfin, papaverin, kodein, narcein atd.). Nejdůležitějšími alkaloidy jsou: coniin, nikotin, tropan, atropin, kokain, chinin, papaverin, morfin, kodein, strychnin, kofein a další. Jedním z nejznámějších alkaloidů je silný jed curare ochromující nervový systém. Vykazují účinky na lidi a zvířata a používají se v terapii jako narkotika ke zklidnění (Ferdes, 2018).

Chemicky jsou alkaloidy velkou a strukturálně různorodou skupinou sloučenin obsahujících dusík (jeden nebo více atomů dusíku v heterocyklickém kruhu). Alkaloidy se mohou vyskytovat jako monomery, dimery, trimery nebo tetramery. Podle své chemické struktury se alkaloidy dělí do dvou skupin, heterocyklických alkaloidů a neheterocyklických alkaloidů. Heterocyklické alkaloidy se dělí podle své kruhové

struktury do několika tříd monomerních alkaloidů (např. pyrrolové, pyrrolidinové, pyridinové, piperidinové, indolové, chinolinové, isochinolinové alkaloidy) (Casciaro *et al.*, 2019). Vysoce nenasycené rovinné kvartérní alkaloidy mají schopnost interkalovat s DNA a modifikovat nukleotidové sekvence (Ferdes, 2018).

Alkaloid chinin má baktericidní účinky na *E. coli*, *Klebsiella pneumonia* a *S. aureus*. Změna funkčních skupin u substituce chloru v poloze C derivátů kumarinu vykazovala dobrou účinnost proti *S. aureus*, ale nikoli *B. subtilis*. Bylo také zjištěno, že další dimethylaminoskupina na kumarinové sloučenině zvyšuje baktericidní vlastnosti proti *S. aureus* a *B. subtilis* (Antika *et al.*, 2020). Extrakt z listů *Zapoteca portoricensis* má antibakteriální účinek proti grampozitivním bakteriím *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* a gramnegativní *E. coli* a *P. aeruginosa* (Ferdes, 2018).

### 3.1.3 Terpeny

Terpeny jsou sekundární metabolity vznikající v důsledku enzymatických rozkladů primárních metabolitů (aminokyselin, cukrů, vitamínů atd.). Terpeny patří k největší třídě sekundárních metabolitů a sestávají v podstatě z pěti isoprenových jednotek uhlíku, které jsou navzájem spojeny (mnoho isoprenových jednotek). Terpeny jsou jednoduché uhlovodíky, zatímco terpenoidy jsou modifikovanou třídou terpenů s různými funkčními skupinami a oxidovanou methylovou skupinou přesunutou nebo odstraněnou v různých polohách. Terpenoidy se dělí na monoterpeny, seskviterpeny, diterpeny, sesterpeny a triterpeny v závislosti na svých uhlíkových jednotkách. Většina terpenoidů s různou strukturou je biologicky aktivní a celosvětově se používají k léčbě mnoha nemocí. Mnoho terpenoidů inhibovalo různé lidské rakovinné buňky a používá se jako protirakovinová léčiva, jako je taxol a jeho deriváty. Terpeny a jejich deriváty se rovněž používají jako antimalarika. Terpenoidy hrají rozmanitou roli v oblasti potravin, léčiv, kosmetiky, hormonů, vitamínů atd. (Paduch *et al.*, 2007).

## 3.2 Esenciální oleje

Esenciální oleje (nazývané také těkavé nebo éterické oleje) jsou aromatické olejovité kapaliny získané z rostlinného materiálu (květiny, pupeny, semena, listy, větvičky, kůra, byliny, dřevo, ovoce a kořeny). Mohou být získány lisováním, fermentací, enflouráží nebo extrakcí. Pro komerční účely je však nejčastěji využívána metoda destilace. Je známo asi 3 000 esenciálních olejů, z nichž asi 300 je komerčně nejvýznamnějších v podobě

příchutí či vůní. Antimikrobiální vlastnosti těchto látek jsou zkoumány již od poloviny minulého století (Guenther, 1948; Boyle, 1955; Shelef, 1983; Nychas, 1995).

### 3.2.1 Mechanismus účinku esenciálních olejů

Fyziologická role esenciálních olejů dosud nebyla zcela nepochopena. Zdá se, že mechanismus antimikrobiálního působení má vztah k velkému počtu složek v esenciálních olejích namísto pouze specifických bioaktivních metabolitů, což může vést k obtížné identifikaci (Carson *et al.* 2002; Burt 2004). Antimikrobiální účinky esenciálních olejů jsou obecně popsány ve třech fázích. Za prvé, esenciální oleje se šíří na buněčné stěně bakterie zvyšují propustnost membrány, což vede k následné ztrátě buněčných komponent. Druhá odpovídá acidifikaci uvnitř buňky, která blokuje produkci buněčné energie (ATP) v důsledku ztráty iontů, kolapsu protonových pump a snížení membránového potenciálu. Poslední fází je poškození nukleové kyseliny, které má za následek smrt bakterií. Některé studie dále uvádějí, že esenciální oleje mohou také koagulovat cytoplazmu a poškodit lipidy, proteiny, buněčné stěny a membrány, což může následně vést k úniku makromolekul a rozpadu buněk (Cox *et al.* 2000; Lambert *et al.*, 2001; Saad *et al.*, 2013).

Rozdíl v účincích mezi grampozitivními a gramnegativními bakteriemi je založen na rozdílu ve složení buněčné stěny. Struktura stěny grampozitivních bakterií je homogenní s tloušťkou pohybující se od 10 do 80 nm; je bohatá na kyselinu teichoovou ale chudá na lipidy (<2 %). Naopak struktura stěny gramnegativních bakterií je složitější s tloušťkou asi 10 nm a je bohatá na lipidy (10–22 %) (Li, 2014). U esenciálních olejů bylo obecně pozorováno, že jsou aktivnější proti grampozitivním bakteriím než gramnegativním bakteriím, i když existují určité výjimky (Oussalah *et al.* 2007).

### 3.2.2 Složení esenciálních olejů

Destilace parou je nejčastěji používanou metodou pro produkci esenciálních olejů pro komerční účely. Extrakce pomocí kapalného oxidu uhličitého při nízké teplotě a vysokém tlaku vytváří přirozenější organoleptický profil, ale je mnohem dražší. Rozdíl v organoleptickém profilu naznačuje rozdíl ve složení olejů získaných extrakcí rozpouštědlem oproti destilaci, což může také ovlivnit antimikrobiální vlastnosti. Zdá se, že to potvrzuje skutečnost, že bylinné esenciální oleje extrahované hexanem vykazují větší antimikrobiální aktivitu než stejné esenciální oleje destilované v páře (Packiyasothy & Kyle, 2002). Složení esenciálních olejů (Tabulka 1) z konkrétního druhu rostliny se může

lišit mezi obdobím sklizně a mezi geografickými zdroji, proto je pro účely experimentů vhodné vybírat stabilní odrůdy. p-Cymen (1-methyl-4- (1-methylethyl) -benzen) a  $\gamma$ -terpinen (1-methyl-4- (1-methylethyl) -1,4-cyklohexadien) jsou předchůdci karvacrolu (2-methyl) -5- (1-methylethyl) fenol) a thymolu (5-methyl-2- (1-methylethyl) fenolu) u rodů *Origanum* a *Thymus* (Delaquis *et al.*, 2002; Burt, 2004).

Tabulka 1 Složení vybraných esenciálních olejů

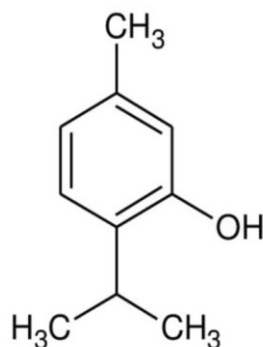
Český název	Latinský název	Hlavní komponenty	Přibližná koncentrace [%]
Koriandr listy	<i>Coriandrum sativum</i>	Linalool	26%
		E-2-decanal	20%
Koriandr semena	<i>Coriandrum sativum</i>	Linalool	70%
		E-2-decanal	–
Skořice	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Trans-cinnamaldehyd	65%
Oregano	<i>Origanum vulgare</i>	Karvacrol	Stopa-80%
		Thymol	Stopa-64%
		$\gamma$ -Terpinen	2–52%
		p-Cymen	Stopa-52%
Rozmarýn	<i>Rosmarinus officinalis</i>	$\alpha$ -pinen	2–25%
		Bornyl acetát	0–17%
		Kafr	2–14%
		1, 8-cineol	3–89%
Šalvěj	<i>Salvia officinalis L.</i>	Kafr	6–15%
		$\alpha$ -pinen	4–5%
		$\beta$ -pinen	2–10%
		1,8-cineol	6–14%
		$\alpha$ -tujon	20–42%
Hřebíček	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol	75–85%
		Eugenyl acetát	8–15%
Tymián	<i>Thymus vulgaris</i>	Thymol	10–64%
		Karvacrol	2–11%
		$\gamma$ -Terpinen	2–31%
		p-Cymen	10–56%

Bylo zjištěno, že součet množství těchto čtyř sloučenin přítomných v rostlinách řeckého oregana je téměř stejný ve vzorcích pocházejících z různých geografických oblastí a zůstává stabilní v rostlinách sklizených v různých ročních obdobích. Totéž platí o *Thymus vulgaris* z Itálie. Obecně lze konstatovat, že esenciální oleje produkované z bylin sklizených během nebo bezprostředně po rozkvětu mají nejsilnější antimikrobiální aktivitu. Složení esenciálních olejů z různých částí téže rostliny se také může velmi lišit. Například esenciální olej získaný ze semen koriandru má zcela odlišné složení než esenciální olej z koriandru, který se získává z nezralých listů téže rostliny (Delaquis *et al.*, 2002; Burt, 2004).

Botanickým zdrojem tymiánu je bylina *Thymus vulgaris* (*Lamiaceae*), ze které se získává parní destilací čerstvé byliny v květu. Jedná se o čirou tekutinu s mírně sladce bylinkovým zápachem s jemným čerstvým podtextem. Typickými složkami jsou monoterpenoly (včetně linaloolu 60–80%, terpinen-4-olu, geraniolu, terpineolu), estery (včetně linalyl/terpenyl/geranyl acetátu), oxidy (včetně oxidu linaloolu), ketony (včetně kafru) sesquiterpeny caryophyllen and humulen, monoterpeny, thymol, karvacrol, 1,8-cineol (Holmes, 2016).

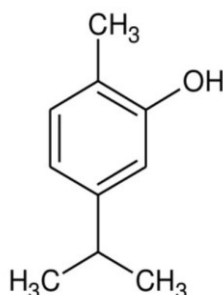
Hlavními antimikrobiální složkami tymiánu a oregana jsou thymol, karvakrol,  $\gamma$ -terpinen a p-cymen (Tabulka 1). Thymol (5-methyl-2-isopropylfenol) (Obrázek 4) je běžnou součástí éterických olejů extrahovaných z tymiánu a oregana. Díky thymolu získávají tyto oleje antimikrobiální vlastnosti. Kromě toho se tento aromatický alkohol v současné době používá ve spojení s chlorhexidinem k potlačení orálních bakterií. Předpokládá se, že thymol snižuje enzymatickou aktivitu a narušuje membránovou integritu změnou proteinových reakcí. Předchozí studie ukázaly, že thymol inhibuje grampozitivní a gramnegativní bakterie, včetně orálních selenomonád a streptokoků (Guarda *et al.*, 2011). Thymol i karvakrol, další antimikrobiální složka těchto olejů, způsobují rupturu vnější lipopolysacharidové vrstvy, což má za následek částečnou dezintegraci vnější membrány (Kalemba, Kunicka, 2003). Minimální inhibiční koncentraci pro kmeny *S. aureus* byla stanovena 140  $\mu\text{g/ml}$  a *Pseudomonas aeruginosa* 385  $\mu\text{g/ml}$ . (Lambert *et al.*, 2001).





Obrázek 4 Chemická  
struktura thymolu  
(Merck, 2020)

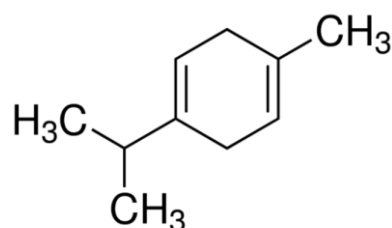
Karvacrol (2-p-kymenol nebo 5-isopropyl-2-methylfenol) (Obrázek 5) je jednou z hlavních složek esenciálních olejů některých členů Labiatae (*Laminaceae*), jako je oregano, tymián a jejichž obsah může dosáhnout až 86%. Těkavé oleje některých jehličnanů také obsahují karvacrol. Bylo prokázáno, že antioxidační aktivita esenciálních olejů výše uvedených bylin je způsobena karvacrolem, jeho izomerem thymolem a některými dalšími fenoly. Antivirová aktivita byla pozorována u všech esenciálních olejů obsahujících karvacrol jako hlavní složku, ale pouze velmi nízká antivirová aktivita byla pozorována pro karvacrol samotný. Studie antimikrobiální aktivity karvacrolu, které byly provedeny, ukázaly, že má široké spektrum antimikrobiální aktivity proti téměř všem testovaným gram-pozitivním a gram-negativním bakteriím (Baser, 2008). Byly publikovány hodnoty minimální inhibiční koncentrace karvacrolu u bakterie *S. aureus* 1700 µg/ml, a u *E. coli* 1200 µg/ml (Veldhuizen *et al.*, 2006).



Obrázek 5 Chemická  
struktura karvacrolu  
(Merck, 2020)

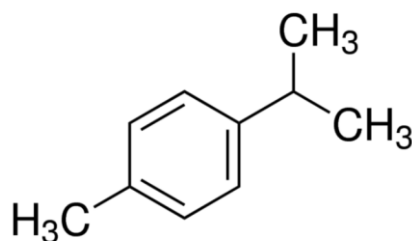
$\gamma$ -Terpinen (Obrázek 6) je monoterpen a hlavní složka éterických olejů vyrobených z citrusových plodů a vykazuje silnou antioxidační aktivitu v různých testovacích

systemech. Rostlinná  $\gamma$ -terpinen syntáza je členem rodiny monoterpenových cykláz, která produkuje specifický monoterpen prostřednictvím cyklizace geranyl difosfátu (Azizi *et al.*, 2009).



Obrázek 6 Chemická struktura  $\gamma$ -terpinenu (Merck, 2020)

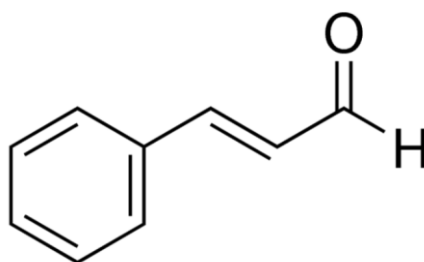
Biologický prekurzor karvacrolu, p-cymen (1-methyl-4- (1-methylethyl) -benzenu) (Obrázek 7) je méně antimikrobiální než karvacrol, je-li použit samostatně. p-Cymen postrádá hydroxylovou skupinu, o které se předpokládá, že hraje důležitou roli v antimikrobiální aktivitě. Byla hlášena synergie mezi karvacrolem a p-cymenem proti *Bacillus cereus* in vitro a v rýži (Bagamboula *et al.*, 2004). Cristani *et al.* (2007) zkoumali inhibiční účinek p-cymenu na kmeny *S. aureus* a *E. coli* a zjistili, že p-cymen inhibuje *S. aureus* při 1250  $\mu\text{g/ml}$  a *E. coli* až při 2500  $\mu\text{g/ml}$ .



Obrázek 7 Chemická struktura p-cymenu (Merck, 2020)

Skořicový olej je získáván pomocí destilace vodní parou z kůry či listů stromu *Cinnammomum zeylanicum* (čeleď *Lauraceae*). Oleje získané z kůry a listů se liší především chemickým složením a organoleptickými vlastnostmi. Cinnamaldehyd, eugenol,  $\alpha$ -pinen  $\beta$ -karyofylen, p-cymen, linalool, 3-fenylpropanal, benzaldehyd, kuminaldehyd, furfural nonnanal, amylmethylketon se nachází v kůře skořicovníku. V listech se vyskytují látky jako  $\alpha$ -pinen, dipenten, linalool, geraniol, borneol,  $\alpha$ -terpineol a jeho estery, cinnamaldehyd, benzylbenzoát, benzylaldehyd, cinnamylalkohol, mentenon, safrol, eugenol (Vonášek *et al.*, 1987). Hlavní antimikrobiální složka skořice je trans-cinnamaldehyd (CIN, 3-fenyl-2-propenal) (Obrázek 8).

Běžně se používá v potravinách a nápojích jako vonná složka. Používá také k aromatizaci a jako agrichemická, antimikrobiální a protirakovinná činidla. Jeho použití je však omezeno jeho nerozpustností ve vodě (Hill *et al.*, 2013). Například ve studii zeleninových a ovocných džusů s obsahem trans-cinnamaldehydu došlo k redukci bakterie *E. coli* (Pan *et al.*, 2014).



Obrázek 8 Chemická struktura trans-cinnamaldehydu (Merck, 2020)

### 3.3 Hodnocení antimikrobiálního účinku

Diagnostika se provádí *in vitro* stanovením minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC). MIC je definována jako nejnižší koncentrace antimikrobiální složky nebo činidla, které je bakteriostatické (zabraňuje viditelnému růstu bakterií). MIC se používají k hodnocení antimikrobiální účinnosti různých sloučenin měřením účinku klesajících koncentrací antibiotik/antiseptik po definované období z hlediska inhibice růstu mikrobiální populace. Tato hodnocení mohou být docela užitečná během fáze výzkumu a vývoje produktu pro stanovení vhodných koncentrací požadovaných v konečném produktu, protože koncentrace léčiva potřebná k vyvolání účinku je obvykle několiksetkrát až tisíckrát menší než koncentrace zjištěná v konečné dávce (Andrews, 2001).

Různé koncentrace sloučenin se inokulují kultivovanými bakteriemi a výsledky se měří za použití ředění agarem nebo ředěním bujónu (makro nebo mikro), aby se stanovilo, na jaké úrovni je stanoven koncový bod MIC. Testování citlivosti se obvykle provádí pomocí organismů, které přispívají k infekčnímu procesu vyžadujícímu antimikrobiální chemoterapii. Běžně používaný koktejl patogenních bakterií je známý jako ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter*). Bakterie ESKAPE jsou rezistentní a jsou považovány za hlavní příčinu nozokomiálních infekcí. Mohou být použity i jiné

organismy, jako jsou aerobní nebo anaerobní bakterie, kvasinky nebo vláknité houby, buď samotné nebo ve více kombinacích (Hannan, 2000; Santajit & Indrawattana, 2016).

MBC je nejnižší koncentrace antibakteriálního činidla potřebná k usmrcení bakterie po pevně stanovené, poněkud prodloužené období, například 18 hodin nebo 24 hodin, za specifického souboru podmínek. Může být stanoveno subkultivací na agarové plotny, které neobsahují testovanou látku. MBC je identifikována stanovením nejnižší koncentrace antibakteriálního činidla, které snižuje životaschopnost původního bakteriálního inokula o  $\geq 99,9\%$ . MBC je komplementární k MIC; zatímco test MIC prokazuje nejnižší koncentraci antimikrobiálního činidla, která výrazně inhibuje růst, MBC prokazuje nejnižší koncentraci antimikrobiálního činidla, což má za následek mikrobiální smrt. Jinými slovy, pokud MIC vykazuje inhibici, nanesení bakterií na agar může stále vést k proliferaci organismu, protože antimikrobiální látka nezpůsobila smrt. Antibakteriální látky jsou obvykle považovány za baktericidní, pokud MBC není více než čtyřnásobek MIC. Testování MBC může být dobrým a relativně levným nástrojem pro souběžné vyhodnocení účinnosti několika antimikrobiálních látek (Odumosu *et al.*, 2019).

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce bylo připravit řady kombinací směsí biopolymerů (roztoky/filmy) o různých poměrech zeinu a chitosanu s různými koncentracemi látek s antimikrobiálním účinkem – thymolu, tymiánového, oregánového, skořicového oleje a tyto směsi následně charakterizovat pomocí fyzikálně-chemických metod a stanovit zeta potenciál, pH, průměrnou velikost částic, vizuálně hodnotit, stanovit jejich antimikrobiální účinky vůči gram pozitivním, gram negativním bakteriím, kvasinkám a plísním a dynamiku uvolňování aktivní látky.

## 5 MATERIÁL A METODY

### 5.1 Pomůcky a přístroje

- Analytické váhy Sartorius Basic (Sartorius AG, Německo)
- Magnetické míchadlo Hei-Standard (Heidolph, Německo)
- Bateriový pH metr CPH 51 s kombinovanou elektrodou HC 103 (Elteca s.r.o., Česká republika)
- Sušárna (ETA, Česká republika)
- Chladnička (Ardo, Česká republika)
- Parní sterilizátor Varioklav 75S (Labortechnik AG, Německo)
- Detektor intenzity rozptylu světla ZETASIZER Nano Series ZS 90 (Malvern Instruments Limited, Velká Británie)
- Laboratorní inkubátor (Mettler, Německo)
- Densi - La – Meter (Erba Lachema, Česká republika)
- Laboratorní třepačka Vortex (Heidolph, Německo)
- Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- Ultrazvuková lázeň (Kraintek Czech, Česká republika)
- Spektrofotometr TECAN Sunrise pro mikrotitrační destičky (Tecan, USA)
- Laminární box (Clean Air, Nizozemsko)
- Plastové zkumavky, kladívko, raznice, prkénko, sterilní disky, kyvety, reagenční lahve, filtr 0,2  $\mu\text{m}$ , injekční stříkačka, stojánky
- Standardní 96-jamková mikrodestička (Gama, Česká republika)
- Laboratorní sklo
- Základní laboratorní pomůcky

### 5.2 Chemické látky

- Zein (TCI, Japonsko)
- Chitosan - střední molekulová hmotnost, stupeň deacetylace 87 % (Sigma-Aldrich, USA)

- Thymol (Sigma-Aldrich, USA)
- Tymián /*Thymus vulgaris*/- Španělsko (Nobilis Tilia, Česká republika)
- Skořice- kůra /*Cinnamomum zeylanicum*/- Německo (Nobilis Tilia, Česká republika)
- Oregano (Dobromysl) /*Origanum vulgare*/- Rumunsko (Nobilis Tilia, Česká republika)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina octová ledová ( $C_2H_4O_2$ ) (PENTA Chemicals, Česká republika)
- Absolutní ethanol (PENTA Chemicals, Česká republika)
- Chlorid sodný (NaCl), (PENTA Chemicals, Česká republika)
- Chlorid draselný (KCl) (PENTA Chemicals, Česká republika)
- Hydrogenfosforečnan sodný / $Na_2HPO_4$ / (Sigma-Aldrich, USA)
- Dihydrogenfosforečnan draselný / $KH_2PO_4$ / (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina chlorovodíková (HCl) (PENTA Chemicals, Česká republika)
- Müller-Hinton (HiMedia, Indie)
- Sabouraud (HiMedia, Indie)

### 5.3 Příprava roztoků a médií

#### 5.3.1 Příprava zásobního roztoku chitosanu

Bylo připraveno 100 ml 0,5% roztoku navážením příslušného množství chitosanu (s přesností na 0,0001 g) a smícháním s 1% roztokem kyseliny octové. Roztok byl umístěn do ultrazvukové lázně (30 minut, teplota 40 °C), a poté byl míchán asi 4 hodiny na magnetickém míchadle do úplného rozpuštění.

#### 5.3.2 Příprava zásobního roztoku zeinu

Roztok zeinu (0,5%) byl připraven navážením 0,5 g zeinu na analytických vahách s přesností na 0,0001 g a smícháním se 75% ethanolem. S využitím magnetického míchadla byl roztok rozpuštěn, následně převeden do 100ml odměrné baňky a doplněn po rysku.

Obdobně byly připraveny i zásobní roztoky 2, 5, a 10% zeinu v 75% roztoku ethanolu navážením příslušných množství zeinu (2, 5 a 10 g).



### 5.3.3 Příprava zásobního roztoku thymolu

Roztok thymolu o koncentraci 20 % byl připraven navážením 20 g thymolu s přesností na 0,0001 g, rozpuštěním v absolutním ethanolu, převedením do 100ml odměrné baňky a doplněním po rysku.

### 5.3.4 Příprava roztoku Tween 20

Pro přípravu 5% roztoku bylo naváženo 0,25 g tenzidu Tween 20 s přesností na 0,0001 g. Navážka byla rozpuštěna v 75% ethanolu, následně převedena do 5ml odměrné baňky a doplněna po rysku.

### 5.3.5 Příprava fyziologického roztoku

Na přípravu fyziologického roztoku bylo naváženo 8,5 g NaCl (s přesností na 0,1 g), rozmícháno v destilované vodě a doplněno po rysku v 1000ml odměrné baňce. Sterilizace proběhla při teplotě 121 °C po dobu 20 minut v reagenčních lahvích.

### 5.3.6 Příprava fosfátového pufru

Fosfátový pufr byl, za pomoci magnetického míchadla, připraven rozpuštěním 8 g chloridu sodného, 0,2 g chloridu draselného, 1,44 g hydrogenfosforečnanu sodného a 0,24 g dihydrogenfosforečnanu draselného v 800 ml destilované vody. Po úplném rozpuštění bylo změřeno pH roztoku a upraveno pomocí kyseliny chlorovodíkové na hodnotu pH 7,4. Roztok byl převeden do 1000ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku. Následně byl sterilizován v reagenčních lahvích v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

### 5.3.7 Příprava 0,1% roztoku Tweenu 20

Pro přípravu 0,1% roztoku tenzidu Tween 20 bylo naváženo 0,1 g s přesností 0,01g, rozpuštěno v připraveném fyziologickém roztoku (viz. Kapitola 5.3.5) a doplněno do 100ml odměrné baňky po rysku. Roztok byl sterilizován při teplotě 121 °C po dobu 20 minut v reagenčních lahvích.

### 5.3.8 Příprava pracovních roztoků polymerů s aktivními látkami

Roztoky byly připraveny dle daného poměru (Tabulka 2). Do kádinky bylo odměřeno příslušné množství zeinu a kontinuálně mícháno na magnetickém míchadle při 500 rpm. Do roztoku zeinu bylo napipetováno příslušné množství aktivní látky (thymol).

V případě esenciálních olejů byl postup opačný, nejdříve bylo naváženo příslušné množství oleje a posléze napipetován příslušný objem zeinu. Po uplynutí 30 minut byl do roztoku za stálého míchání přikapán z byrety připravený roztok chitosanu v 0,5% kyselině octové a po dalších 30 minutách byl přidáván roztok Tweenu 20. Míchání bylo ukončeno za dalších 30 minut. Analogicky byl připraven i vzorek bez aktivní látky, který sloužil jako kontrola.

Tabulka 2 Přidávky jednotlivých složek pro přípravu pracovních roztoků se 2 % aktivní látky

Poměr zein:chitosan *	Množství zeinu [ml]	Množství chitosanu [ml]	Přídavek thymolu [ml]	Přídavek esenciálních olejů [g]	Přídavek Tween 20 [ml]
1:0	25,0	0,0	2,5	0,5	2,0
20:1	23,8	1,2	2,5	0,5	2,0
10:1	22,7	2,3	2,5	0,5	2,0
7:1	21,9	3,1	2,5	0,5	2,0
5:1	20,8	4,2	2,5	0,5	2,0

\* Procentuální přidávky aktivních látek se vztahují na objem směsi zein:chitosan 25 ml.

Roztoky s 2, 5 a 10% zeinem (viz. Kapitola 5.3.2) byly vytvořeny v poměrech 7:1; 5:1 a obsahovaly 2 % aktivní látky. Roztoky se 2,5 % aktivní látky obsahovaly 3,125 ml thymolu a 0,625 g esenciálních olejů. Pro vytvoření roztoků se 3 % aktivní látky přidávky činily 3,75 ml thymolu a 0,75 g esenciálních olejů.

### 5.3.9 Příprava filmů

Pracovní roztoky polymerů s aktivními látkami (viz. Kapitola 5.3.8) byly v laminárním boxu odlity do plastových Petriho misek a sušeny v sušárně při teplotě 35 °C přes noc.

### 5.3.10 Příprava živných médií

Pro přípravu bujony bylo dle návodu na sypké směsi naváženo potřebné množství média Müller-Hinton (s přesností na 0,1 g), doplněno destilovanou vodou na potřebný objem a sterilizováno v autoklávu (121 °C/20 min).

Pro přípravu masopeptonového bujónu (MPB) byly naváženy 3 g masového výtažku, 5 g peptonu a 3 g soli (s přesností na 0,1 g) doplněno vodou na 1000 ml, upraveno pH na 6,8-7,0 a sterilizováno v autoklávu (121 °C/20 min). Média jsou vhodná pro kultivaci bakterií. Přidáním agaru do bujónu Müller-Hinton či Sabouraud-vhodný pro kvasinky a plísně byla připravena pevná média. Bujón s přidaným agarem byl sterilizován při teplotě 121 °C po dobu 20 min. Po vysterilizování byla média rozlita do plastových Petriho misek.

## 5.4 Příprava mikroorganismů

Použité kmeny bakterií, kvasinek a plísní jsou vyjmenované v tabulce (Tabulka 3) a byly získány na Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí, Fakulty technologické UTB ve Zlíně, která je zakoupila ze sbírek mikroorganismů.

Tabulka 3 Seznam použitých kmenů mikroorganismů

Označení kmene
<i>S. aureus</i> CCM3953
<i>E. coli</i> CCM 3954
<i>C. parapsilosis</i> CCM 8260
<i>A. niger</i> ATCC 16404

### 5.4.1 Bakterie

Pro přípravu inokula bakterií byla asepticky odebrána jednodenní kultura bakterií (*S. aureus*, *E. coli*) do fyziologického roztoku a upravena hodnota zákalu na 0,5 McF.

### 5.4.2 Kvasinky

Pro přípravu inokula kvasinek byla asepticky odebrána třídenní kultura *C. parapsilosis* do fyziologického roztoku a upravena hodnota zákalu na 0,5 McF.

### 5.4.3 Plísně

Pro přípravu inokula plísní byla Petriho miska s pětidenní kulturou *A. niger* přelita 1 ml 0,1% tenzidu Tween 20 ve fyziologickém roztoku, následně byl roztok odebrán a ve fyziologickém roztoku upraven na hodnotu zákalu 0,5 McF.

## 5.5 Měření zeta potenciálu

Měření zeta potenciálu bylo uskutečněno pomocí přístroje ZETASIZER Nano Series ZS 90. Principem je proměření roztoků metodou laserové Dopplerovské mikroeletroforézy. Vzorky byly získány smícháním 6  $\mu$ l pracovních roztoků z Kapitoly 5.3.8 s 3 ml 2x zfiltrované destilované vody (injekční filtr o velikosti pórů 0,2  $\mu$ m). Zředěný vzorek byl pomocí injekční stříkačky převeden do kyvety a uzavřen víčkem. Měření proběhlo při teplotě 25 °C ve třech opakováních a bylo zaznamenáno v programu Zetasizer Software

(Malvern Instruments Ltd., Velká Británie). Data byla vyhodnocena pomocí modelu Smoluchowskiho.

## 5.6 Měření pH

Pomocí bateriového pH metru s kombinovanou elektrodou bylo měřeno pH u roztoků s 0,5% zeinem v poměrech zein:chitosan 1:0, 20:1, 10:1, 7:1, 5:1 s přidavkem aktivních látek (thymol, tymián, skořice, oregano) v různých koncentracích (2; 2,5 a 3 %) případně bez aktivní látky. Dále bylo měřeno pH u roztoků s 2, 5 a 10% koncentrací zeinu v poměrech 7:1 a 5:1 s přidavkem výše zmíněných aktivních látek o koncentraci 2 %. Před vlastním měřením byla provedena kalibrace přístroje za použití pufrů o hodnotě pH 4 a pH 7. Měření probíhalo při laboratorní teplotě.

## 5.7 Měření velikosti částic

Na přístroji Zetasizer Nano Series ZS 90 byly metodou laserového rozptylu světla proměřeny vzorky (příprava viz Kapitola 5.5) s 0,5% zeinem ve všech připravených poměrech a také ve všech použitých koncentracích aktivní látky u thymolu i u ostatních esenciálních olejů (případně bez aktivní látky). A dále u roztoků s obsahem zeinu 2 a 5 % a 2% koncentrací aktivní látky v poměrech 7:1 a 5:1.

Z vybraných vzorků bylo odebráno 0,5 ml do kádinky a doplněno 1 ml 2x zfiltrované destilované vody (filtr 0,2  $\mu\text{m}$ ). Do příslušné kyvety byl pomocí injekční stříkačky převeden naředěný vzorek, vložen do přístroje. Měření proběhlo ve třech opakováních při teplotě 25 °C a bylo zaznamenáno v programu Zetasizer Software.

## 5.8 Vizuelní hodnocení roztoků

Všechny polymerní roztoky o koncentraci zeinu 0,5 % a poměry zeinu a chitosanu 1:0, 20:1, 10:1, 7:1, 5:1 s přidavkem aktivních látek (thymol, tymián, skořice, oregano o koncentraci 2 %) případně bez aktivní látky a roztoky o koncentraci zeinu 2, 5 a 10 % v poměrech biopolymerů 7:1 a 5:1 s přidavkem aktivních látek thymol, tymián, skořice, oregano o koncentraci 2 %) připravené dle postupu uvedeného v Kapitole 5.3.8. byly vizuelně hodnoceny. Ihned po namíchání byla zhodnocena barva roztoku a po měsíci byl zhodnocen případný zákal.

## 5.9 Stanovení antimikrobiálních účinků

Byly sledovány antimikrobiální účinky následujícími metodami u připravených polymerních roztoků a filmů.

### 5.9.1 Disková difúzní metoda

Roztoky s 0,5% zeinem ve všech připravených poměrech a o koncentracích aktivní látky 2; 2,5; 3 % byly nanесeny na sterilní 6mm papírové disky v množství 10  $\mu$ l. Souběžně byly připraveny Petriho misky s agary (MH, Sabouraud), které byly přelity 1 ml příslušné suspenze mikroorganismů (bakterií, kvasinek i plísní). Po zaschnutí byly na tyto půdy asepticky přeneseny disky se vzorkem (na jednu misku vždy 2 disky v opakování). Petriho misky byly inkubovány dle použitých mikroorganismů (bakterie 37 °C, 1 den; kvasinky a plísně při laboratorní teplotě 3-5 dní). Po uběhnutí inkubační doby byly změřeny průměry inhibičních zón včetně disku. Obdobným způsobem byly také připraveny vzorky bez aktivní látky. Pro srovnání výsledků se zeinchitosanovými disky byly tyto disky odečteny.

### 5.9.2 Stanovení minimální inhibiční koncentrace

Pro stanovení minimální inhibiční koncentrace u thymolu a ethanolu byla použita mikrodiluční metoda v mikrotitrační destičce.

Byla vytvořena thymolová řada následujícím způsobem. Do první jamky první řady na mikrodestičce bylo napipetováno 195  $\mu$ l MPB a 5  $\mu$ l zásobního roztoku thymolu (či ethanolu) o koncentraci 40 mg/ml. Do každé další jamky v první řadě bylo napipetováno 100  $\mu$ l MPB a následně provedeno dvojkové ředění (z předchozí jamky odebráno 100  $\mu$ l a přeneseno do další jamky v pořadí). Poté bylo napipetováno 5  $\mu$ l bakteriálního inokula (*S. aureus*, *E. coli*) připraveného dříve (Kapitola 5.4.1). Vzhledem k tomu, že roztok thymolu je rozpuštěn v ethanolu, byla pro vyloučení antimikrobiálních účinků ethanolu vytvořena obdobným způsobem i ethanolová řada. Dále byly připraveny blanky vzorku pro thymol a absolutní ethanol (blank thymolové, ethanolové řady) bez bakteriálních kultur. Pro zajištění kontroly růstu bylo do mikrodestičky napipetováno 200  $\mu$ l MPB a 5  $\mu$ l bakteriálních kultur (*S. aureus*, *E. coli*). Čistý 200  $\mu$ l MPB) sloužil pro kontrolu sterility. Po přípravě byla mikrotitrační destička přelepena fólií a vložena do spektrofotometrického přístroje Tecan Sunrise, kde byla měřena optická denzita při vlnové délce 600 nm ( $OD_{600}$ ). Měření probíhalo každých 30 minut po dobu 24 h

při teplotě 37 °C. Výsledky byly uloženy a zpracovány v tabulkovém softwaru Office Excel (Microsoft).

### 5.9.3 Stanovení růstových křivek

Pro stanovení antimikrobiálních účinků roztoků byla použita metoda stanovení růstových křivek v mikrotitračních destičkách s měřením optické density v průběhu 24 h.

Do jamek v mikrodestičce bylo napipetováno 200  $\mu$ l MPB, 5  $\mu$ l bakteriální kultury *E. coli* a vzorek s 0,5% zeinem s přidavkem thymolu (koncentrace 2 %), případně bez thymolu, v různých poměrech zeinu a chitosanu (1:0, 20:1, 10:1, 7:1, 5:1). Dále byl vytvořen blank vzorku bez bakteriální kultury. Kontrolní jamky obsahovaly 200  $\mu$ l MPB a 5  $\mu$ l bakteriální kultury, čistý bujón (MPB) sloužil jako kontrola sterilní práce. Mikrodestička byla následně přelepena fólií proti odpařování a vložena do přístroje Tecan. Měření optické density ( $OD_{600}$ ) probíhalo každých 30 minut po dobu 24 h.

### 5.9.4 Antimikrobiální účinky filmů

Antimikrobiální účinky připravených filmů byly stanoveny diskovou difúzní metodou obdobně jako v Kapitole 5.9.1.

Dle Kapitoly 5.3.9 byly připraveny filmy o různé koncentraci zeinu, aktivní látky a v různých poměrech zeinu a chitosanu (Tabulka 2), ze kterých byly vyseknuty disky o průměru 9 mm. Připravené agary (MH, Sabouraud) byly přelity 1 ml příslušné suspenze mikroorganismů (bakterií, kvasinek i plísní) a po zaschnutí inokula byly na připravená média přeneseny zein-chitosanové disky (na jednu Petriho misku vždy 2 disky v opakování). Agary se zein-chitosanovými disky byly inkubovány dle použitých mikroorganismů (bakterie 37 °C/1 den; kvasinky a plísně při laboratorní teplotě po dobu 3-5 dní). Po inkubaci byly změřeny průměry inhibičních zón včetně disku.

### 5.9.5 Statistická analýza

Z naměřených inhibičních zón u diskové difúzní metody byly vytvořeny aritmetické průměry a směrodatné odchylky byly vypočítány pomocí tabulkového softwaru Office Excel (Microsoft, 2020).

### 5.10 Uvolňování aktivní látky

Byly připraveny filmy s thymolem, tymiánem a oreganem s 2% zeinem v poměrech 7:1 a 5:1 (Kapitola 5.3.9) a z nich vyraženy disky o průměru 9 mm (Kapitola 5.9.4). Zein-chitosanové disky byly každý zvlášť umístěny do plastových zkumavek s 20 ml fosfátového pufru a uloženy v inkubátoru při teplotě 37 °C. Vzorky byly postupně odebrány v časech po 3 h, a dále po 1, 5 a 12 dnech. Zároveň byly připraveny agary (MH, Sabouraud), jež byly zaočkovány 1 ml příslušné suspenze mikroorganismů (bakterií, kvasinek i plísní). Po zaschnutí suspenze byly na připravená média v uvedených časech asepticky přeneseny vždy dva disky z PBS. Agary se zein-chitosanovými disky byly inkubovány dle použitých mikroorganismů (bakterie 37 °C, 1 den; kvasinky a plísně při laboratorní teplotě 3-5 dní). Po inkubaci byly změřeny průměry inhibičních zón včetně disku.

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 6.1 Charakteristika biopolymerních směsí

Bylo připraveno několik řad biopolymerních směsí s aktivními látkami. Tyto byly charakterizovány pomocí fyzikálně chemických parametrů – zeta potenciál, pH a průměrná velikost částic. Připravené směsi byly též vizuálně hodnoceny.

#### 6.1.1 Zeta potenciál

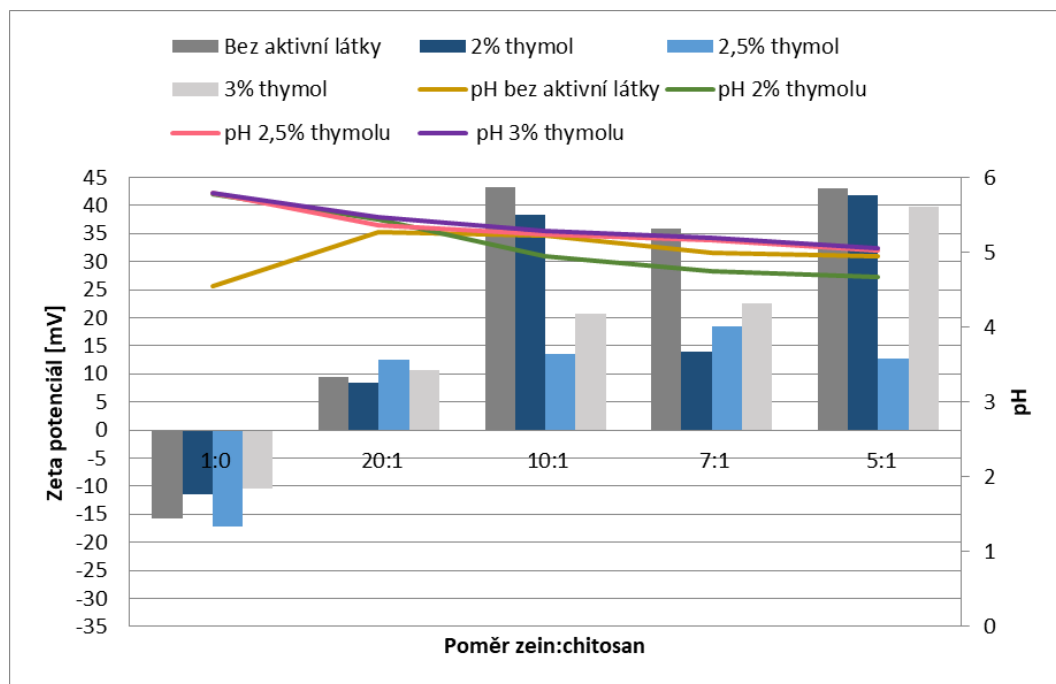
Při vyhodnocování naměřených dat byly sestrojeny grafy pro každou aktivní látku zvlášť. V grafech (Obrázek 9, 10, 11, 12) jsou vždy vyneseny dvě veličiny, pH a zeta potenciál. Z technických důvodů nebylo provedeno měření roztoků s vyšší koncentrací zeinu (2, 5% a 10%).

Po přidání aktivních látek do zein-chitosanového roztoku došlo u většiny vzorků ke snížení zeta potenciálu oproti blanku. Tento jev je možné pravděpodobně přičíst chemickým interakcím mezi aktivními látkami a chitosanem.

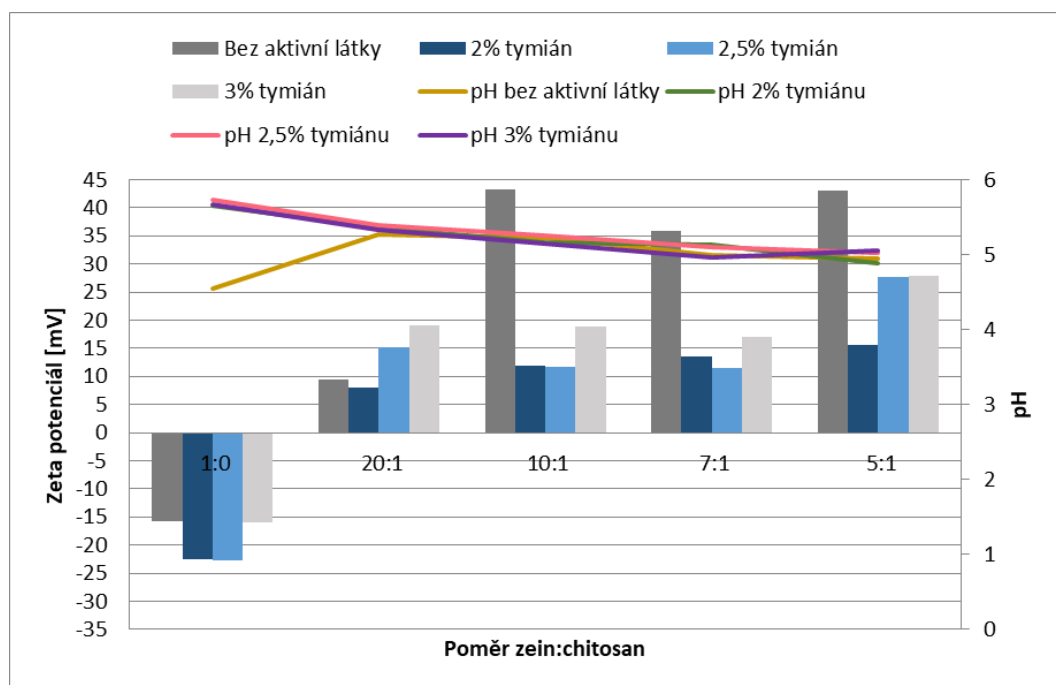
V grafu (Obrázek 9) jsou zobrazeny naměřené hodnoty pro 0,5% polymerní roztoky zeinu ve všech připravených poměrech s 2, 2,5 a 3% přídavkem thymolu případně blanku (bez aktivní látky). Pro roztok s 2% přídavkem thymolu byla naměřena nejnižší hodnota ve vzorku s poměrem zein:chitosan 1:0, která činila -11,4 mV a nejvyšší ve vzorku 5:1 (+41,9 mV). Stejný trend jako u roztoku s 2% přídavkem thymolu byl pozorován i u thymolu o koncentraci 3 %. Nejnižší průměrné hodnoty zeta potenciálu poskytl 3% roztok s poměrem zeinu a chitosanu 1:0 (-10,5 mV) a nejvyšší 5:1 (+39,7 mV). U 2,5% thymolu byla naměřena nejnižší hodnota -17,2 mV v roztoku se zeinem (1:0) a nejvyšší v poměru 7:1 (+18,5 mV). U 2,5% thymolu v poměru zein:chitosan 5:1 došlo k mírnému poklesu na hodnotu +12,7 mV.

Obrázek 10 zobrazuje dvě naměřené veličiny pro 0,5% polymerní roztoky zeinu ve všech připravených poměrech s 2, 2,5 a 3% přídavkem tymiánu, případně blanku (bez aktivní látky). U vzorku s 2% tymiánem v poměru zein:chitosan 1:0 byly zjištěny nejnižší průměrné hodnoty a to -22,5 mV a nejvyšší +15,7 mV v poměru 5:1. Tento trend byl zopakován i v roztocích s 2,5 a 3% přídavkem tymiánu. U 2,5% tymiánu byly průměrné hodnoty zeta potenciálu v rozmezí -22,6 mV a +27,6 mV a u 3% tymiánu od -16,0 mV do +27,8 mV.





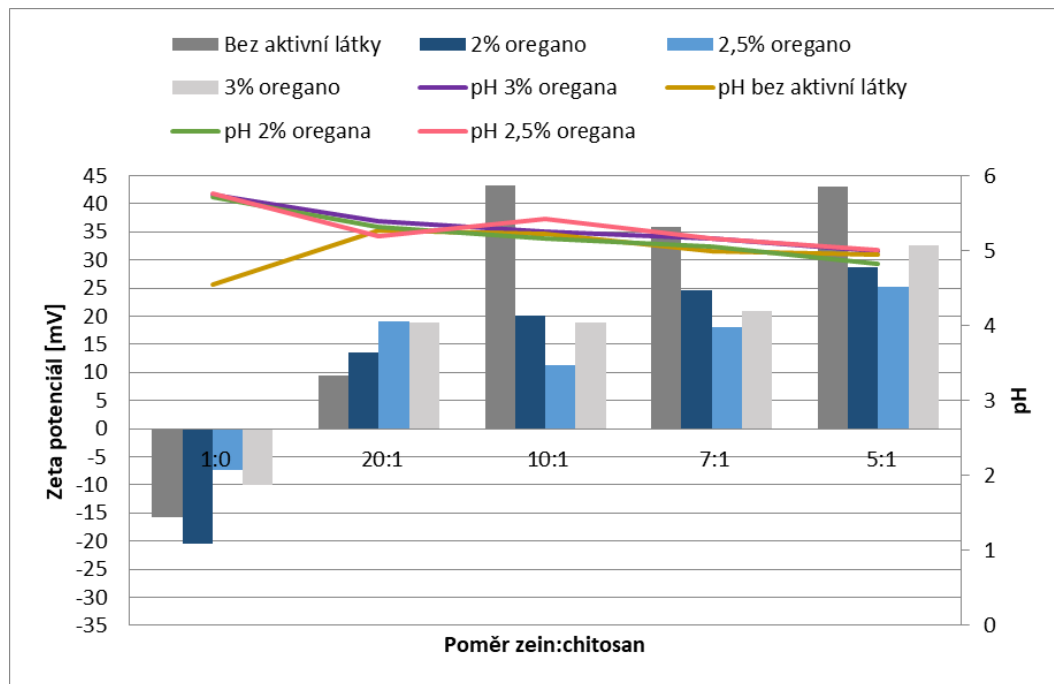
Obrázek 9 Hodnoty zeta potenciálu a pH pro vzorek s různou koncentrací thymolu



Obrázek 10 Hodnoty zeta potenciálu a pH pro vzorek s různou koncentrací tymiánu

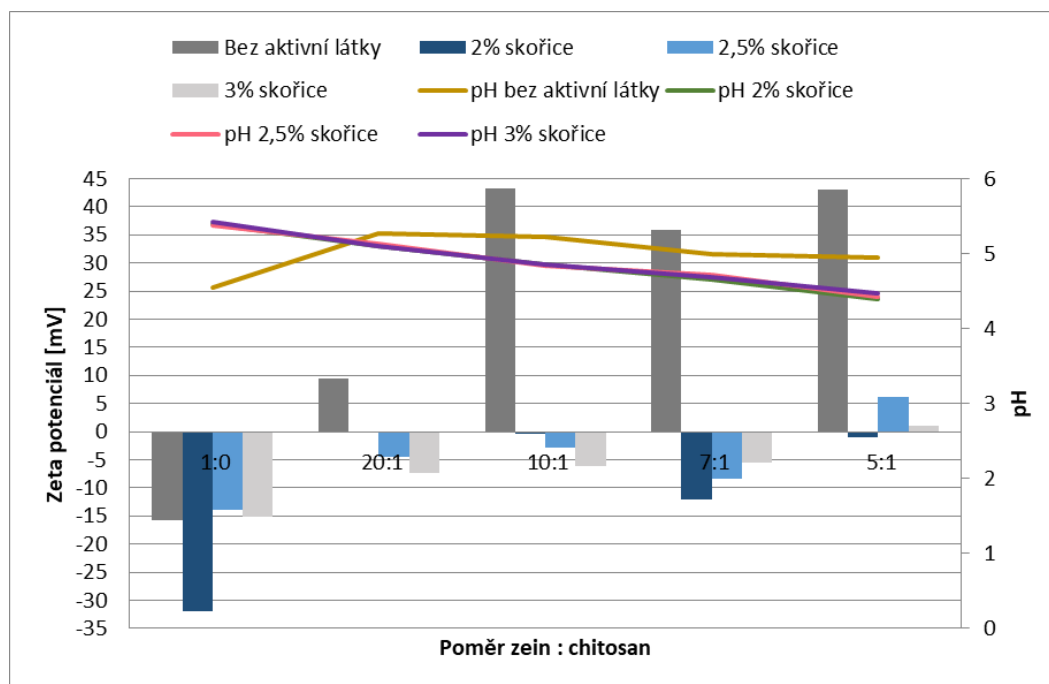
Na Obrázku 11 jsou znázorněny naměřené hodnoty dvou veličin pro 0,5% polymerní roztoky zeinu ve všech připravených poměrech s 2, 2,5 a 3% přidavkem oregana, případně

kontroly bez aktivní látky. Stejně jako u tymiánu i zde se opakuje trend, kdy nejnižší průměrné hodnoty zeta potenciálu jsou sledovatelné v poměru zein:chitosan 1:0 a nejvyšší u roztoku 5:1. Nejnižší hodnoty pro 2, 2,5 a 3% oregano byly -20,5, -7,4 a -10,1 mV a nejvyšší +28,8, +25,3 a +32,7 mV.



Obrázek 11 Hodnoty zeta potenciálu a pH pro vzorek s různou koncentrací oregana

V grafu (Obrázek 12) jsou zobrazeny naměřené hodnoty pro 0,5% polymerní roztoky zeinu ve všech připravených poměrech s 2, 2,5 a 3% přídavkem skořice, případně blanku (bez aktivní látky). Nejnižší průměrné hodnoty zeta potenciálu byly evidovány u 2% skořice na -31,9 mV v poměru zein: chitosan 1:0, nejvyšší u poměru 20:1 (-0,1 mV). Hodnoty pro 2% roztoky skořice byly všechny v záporných hodnotách. Pro 2,5% roztoky byla nejnižší hodnota -13,9 mV (1:0) a nejvyšší +6,2 mV (5:1). Podobně byly zaznamenány hodnoty i pro 3% roztoky skořice, kdy nejnižší byla v poměru 1:0 (-15,2 mV) a nejvyšší u poměru 5:1 (+1,1 mV).



Obrázek 12 Hodnoty zeta potenciálu a pH pro vzorek s různou koncentrací skořice

Z Obrázků 9, 10 a 11 lze vyčíst, že u thymolu, tymiánu a oregana zeta potenciál stoupá do kladných hodnot už při nejnižší koncentraci chitosanu (20:1). Markantní rozdíl nastává u roztoků obsahujících skořici (Obrázek 12), kdy po přidání chitosanu zůstávají hodnoty zeta potenciálu v záporných hodnotách a k mírnému zvýšení do hodnot plusových dochází až při největší koncentraci chitosanu (5:1). V případě studie zabývající se extraktem z kůry skořice zeylanicum byly také pro tuto látku naměřeny záporné hodnoty zeta potenciálu (Sathiskumar *et al.*, 2009)

U všech esenciálních olejů (Obrázek 9, 10, 11 a 12) z naměřených hodnot pH lze usoudit, že s rostoucím množstvím chitosanu ve vzorcích dochází k poklesu pH.

U vzorků bez přídavku jakékoliv aktivní látky došlo k postupnému nárůstu zeta potenciálu ze záporných hodnot až do kladných (Obrázek 9, 10, 11, 12). Zeta potenciál samotného 0,5% roztoku chitosanu v 1% kyselině octové se pohybuje v kladných hodnotách, takže není překvapivé, že došlo ke zvýšení zeta potenciálu až do kladných hodnot u vzorků obsahujících chitosan. Nejnižší hodnota byla zjištěna pro blank na -15,8 mV u roztoku pouze se zeinem (poměr 1:0). U vzorků bez aktivní látky 10:1 a 5:1 byly znatelné nejvyšší hodnoty, jež se řádově lišily o desetiny (+43,3 mV a +43,1 mV). V našem případě, kdy byly zeinové částice potaženy vrstvou chitosanových molekul, byly tyto vzorky kladně nabity +9,4, +43,3, +35,8 a +43,1 mV (20:1, 10:1, 7:1, 5:1). Výsledek může být přičten

protonaci aminoskupin v chitosanových molekulách, což způsobilo, že chitosanové molekuly mají kladný náboj (Fernández-Pan *et al.*, 2015).

K podobnému výsledku dospěli i autoři studie, která se zabývala vlivem frekvencí ultrazvuku na vlastnosti koacervace zeinchitosanového komplexu pro enkapsulaci resveratrolu (Ren *et al.*, 2018). Také v další studii (Luo *et al.*, 2011), poté, co byly nanočástice tokoferolu se zeinem potaženy chitosanem, zeta potenciál komplexu nabyl kladných hodnot v rozmezí +22,8 až +40,9 mV. Z grafů (Obrázky 9, 10, 11, 12) vyplývá, že čím více chitosanu se ve směsi objevilo, tím je systém stabilnější. Z tohoto důvodu vzorky bez aktivní látky s obsahem zeinu a chitosanu v poměru 10:1, 7:1 a 5:1 můžeme považovat za velmi stabilní.

Je všeobecně známé, že kolem každé částice se rozprostírá vrstva nábojů, označovaná jako tzv. elektrická dvojrstva. Ta se skládá z vnitřní neboli Sternovy vrstvy a vnější tzv. difúzní vrstvy. Sternova vrstva je tvořena z hydratovaných iontů, které jsou silně navázány na povrchu částic a spolu s koloidní částicí se i pohybují. Naopak difúzní vrstvu tvoří ionty mnohem volněji navázané a jejich pohyb je nezávislý na pohybu koloidní částice. Vnější a vnitřní vrstvu odděluje tzv. rovina skluzu. Potenciál vznikající na tomto rozhraní je označován jako zeta potenciál, případně jako elektrokinetický potenciál. Velikost potenciálu zeta ukazuje stupeň elektrostatického odpuzování mezi dvěma sousedními částicemi a tím i vliv na stabilitu systému. Částice s potenciálem zeta mezi -10,0 a +10,0 mV bývají považovány za neutrální, zatímco nanočástice s potenciálem zeta větším než +30,0 mV nebo menším než -30,0 mV se považují za silně kationtové či silně aniontové. Měření potenciálu zeta závisí hlavně na chemických vlastnostech polymeru, na stabilizačních činidlech a na pH média (Mora-Huertas *et al.*, 2010). Použitím kationtových polymerů a neionogenních stabilizačních činidel se naměří pozitivní hodnoty zeta potenciálu (Mora-Huertas *et al.*, 2010).

### 6.1.2 Stanovení pH

Hodnoty pH byly měřeny pomocí pH metru ihned po namíchání roztoků. Naměřené hodnoty pH jsou zobrazeny v Tabulkách 4, 5 a 6.

Z naměřených hodnot nelze s jistotou říci, zda při zvyšující se koncentraci aktivních látek dochází ke zvýšení nebo snížení pH. Nejvyšších hodnoty pH byly zaznamenány u čisté látky thymolu, a to 5,8.

Tabulka 4 Hodnoty pH vzorků s 2% koncentrací aktivní látky

Množství zeinu	Poměr Z:CH	Thymol	Tymián	Skořice	Oregano	Bez aktivní látky
0,5 %	1:0	5,8	5,7	5,4	5,7	4,6
	20:1	5,4	5,3	5,1	5,3	5,3
	10:1	4,9	5,2	4,9	5,2	5,2
	7:1	4,8	5,1	4,7	5,1	5,0
	5:1	4,7	4,9	4,4	4,8	4,9
2,0 %	7:1	5,4	5,3	5,1	5,3	5,2
	5:1	5,2	5,1	4,9	5,1	5,1
5,0 %	7:1	5,5	5,4	5,3	5,4	5,1
	5:1	5,3	5,2	5,0	5,2	5,2
10,0 %	7:1	5,6	5,5	5,4	5,3	5,5
	5:1	5,5	5,4	5,1	5,0	5,3

Tabulka 5 Hodnoty pH vzorků s 2,5% koncentrací aktivní látky

Množství zeinu	Poměr Z:CH	Thymol	Tymián	Skořice	Oregano
0,5 %	1:0	5,8	5,7	5,4	5,8
	20:1	5,4	5,4	5,1	5,2
	10:1	5,2	5,3	4,8	5,4
	7:1	5,2	5,1	4,7	5,2
	5:1	5,0	5,0	4,4	5,0

Tabulka 6 Hodnoty pH vzorků s 3% koncentrací aktivní látky

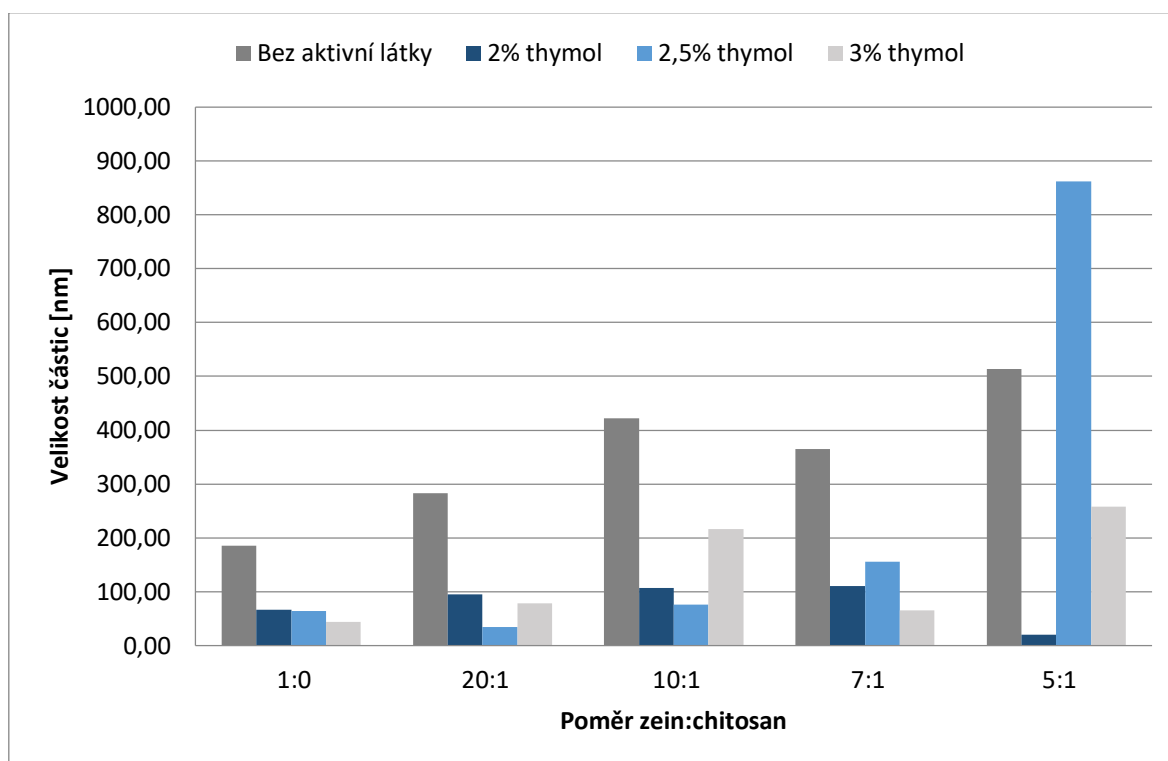
Množství zeinu	Poměr Z:CH	Thymol	Tymián	Skořice	Oregano
0,5 %	1:0	5,8	5,7	5,4	5,8
	20:1	5,5	5,3	5,1	5,4
	10:1	5,3	5,1	4,9	5,3
	7:1	5,2	5,0	4,7	5,2
	5:1	5,1	5,1	4,5	5,0

Z esenciálních olejů byly naměřeny největší hodnoty u vzorku oregana s 0,5% zeinem v poměrech zein:chitosan 1:0. Nejnižší hodnoty byly naměřeny u 2,5% skořice v poměru zein:chitosan 5:1. Jak již bylo zmíněno, z naměřených dat lze odvodit, že při zvyšující se koncentraci chitosanu (změně poměru zein/chitosan v řadě 1:0, 20:1, 10:1, 7:1, 5:1) dochází ke snižování pH. Naopak při zvýšení koncentrace zeinu v řadě 0,5 %, 2 %, 5 %, 10 % dochází k jeho růstu. V případě roztoku bez aktivní látky nejvyšší naměřené hodnoty dosáhly pH 5,5. Lze se dočíst, že hodnota pH zeinu je stanovena na 6,2, při vyšším pH formulace zeinových nanočástic vykazují agregaci a srážení, protože v roztocích s pH nad 5 se zein blíží izoelektrickému bodu (Cheng a Jones, 2017).

### 6.1.3 Průměrná velikost částic

Měření velikosti částic je důležitým aspektem pro studium charakterizace koloidních systémů. Tyto informace jsou užitečné a nezbytné pro pochopení jejich vlastností. Na Obrázcích 13, 14, 15 a 16 jsou znázorněny výsledky měření velikosti částic v roztocích s 0,5% množstvím zeinu, se zvyšující se koncentrací aktivních látek a o různých poměrech zeinu a chitosanu.

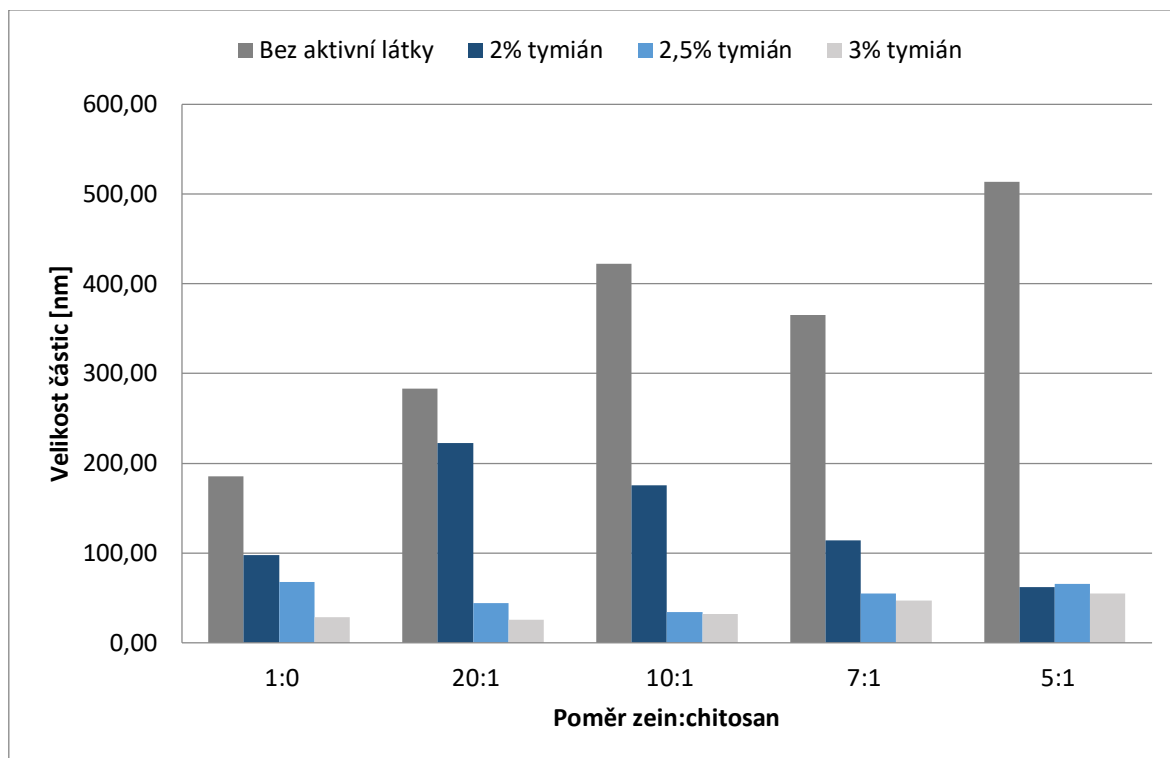
Na Obrázku 13 je zobrazena průměrná velikost částic u roztoků s 2, 2,5 a 3% množstvím thymolu, případně blanku. U polymerního roztoku s 2% thymolem byla naměřena nejnižší hodnota velikosti částic na 20,5 nm v roztoku s poměrem zein:chitosan 5:1. Nejvyšší byla naměřena 111,2 nm v poměru zein:chitosan 7:1. Naopak u roztoku s 2,5% přídavkem thymolu byla naměřena nejvyšší průměrná hodnota velikosti částic právě v poměru 5:1 (861,4 nm) a nejnižší u poměru 20:1 (34,3 nm). U roztoku s 3% přídavkem thymolu byly nejnižší hodnoty naměřeny pro poměr 1:0 (44,6 nm) a nejvyšší 258,1 nm pro poměr 5:1.



Obrázek 13 Závislost velikosti částic na koncentraci thymolu

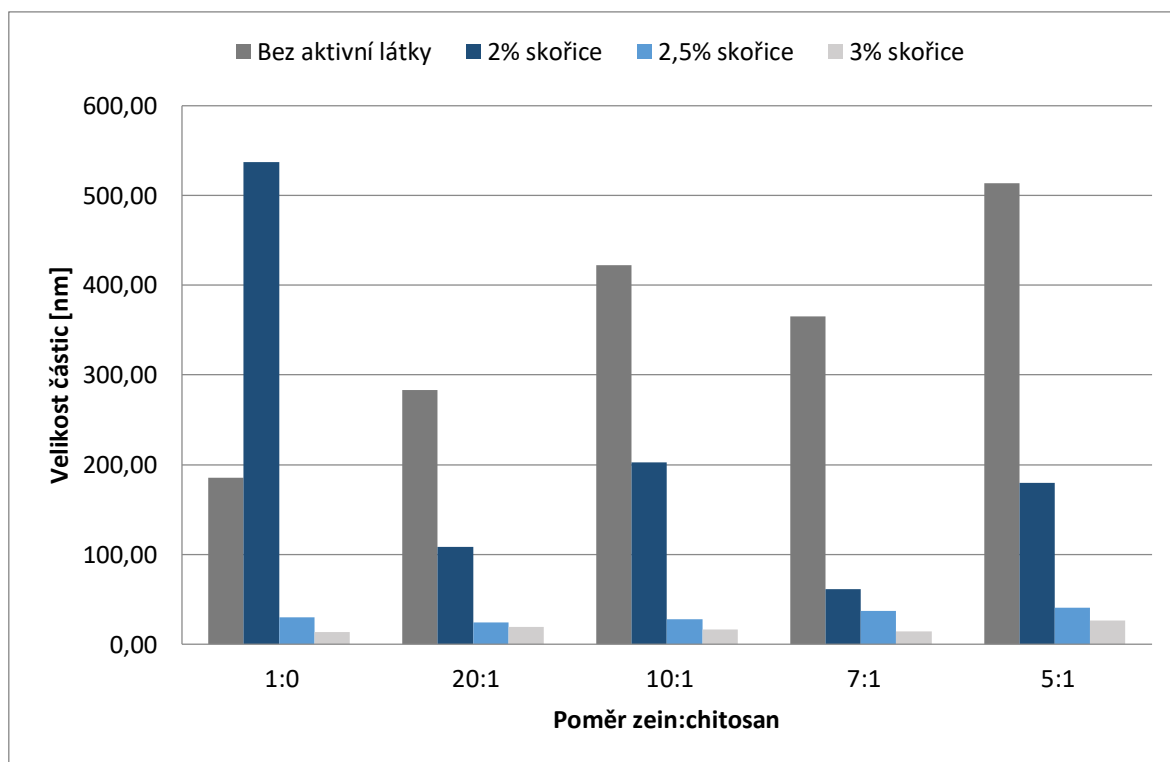
Graf (Obrázek 14) zobrazuje průměrnou velikost částic u roztoků s 2, 2,5 a 3% množstvím tymiánu, případně blanku. Při pohledu na Obrázek 14 lze vidět klesající trend u jednotlivých poměrů. Se zvyšujícím se obsahem tymiánu ve vzorku klesá průměrná velikost částic. Z grafu lze vyčíst, že nejnižší průměrná hodnota velikosti částic, pro roztok

s 2% tymiánem, byla naměřena ve vzorku s poměrem zein:chitosan 5:1 (62,2 nm), nejvyšší 222,9 pro poměr zeinu a chitosanu 20:1. Nejnižší průměrná hodnota velikosti částic v roztoku s 2,5% přídavkem tymiánu byla 34,5 nm (10:1). Nejvyšší 67,7 nm u poměru 1:0. U roztoku se 3 % aktivní látky byla nejnižší hodnota naměřena u poměru zein:chitosan 20:1 (25,8 nm) a nejvyšší byla zaznamenána u poměru 5:1 (55,2 nm).



Obrázek 14 Závislost velikosti částic na koncentraci tymiánu

Obdobně klesající trend lze pozorovat i u roztoků se zvyšujícím se množstvím skořice v roztoku při srovnání jednotlivých poměrů (Obrázek 15). Nejnižší hodnoty průměrné velikosti částic pro 2% roztok skořice byly naměřeny u poměru 7:1 (61,5 nm) a nejvyšší u poměru zein:chitosan 1:0 (537,1 nm). U roztoků s 2,5% přídavkem skořice byly nejnižší hodnoty zaznamenány u poměru zein:chitosan 20:1 (24,5 nm). Nejvyšších hodnot bylo dosaženo u 2,5% roztoků skořice v poměru 5:1 (40,9 nm). Také u roztoků s přídavkem 3 % skořice byly nejvyšší hodnoty sledovány v poměru 5:1 (26,9 nm). Nejnižší hodnoty byly naměřeny pro 3% skořici v poměru 1:0 (13,6 nm).



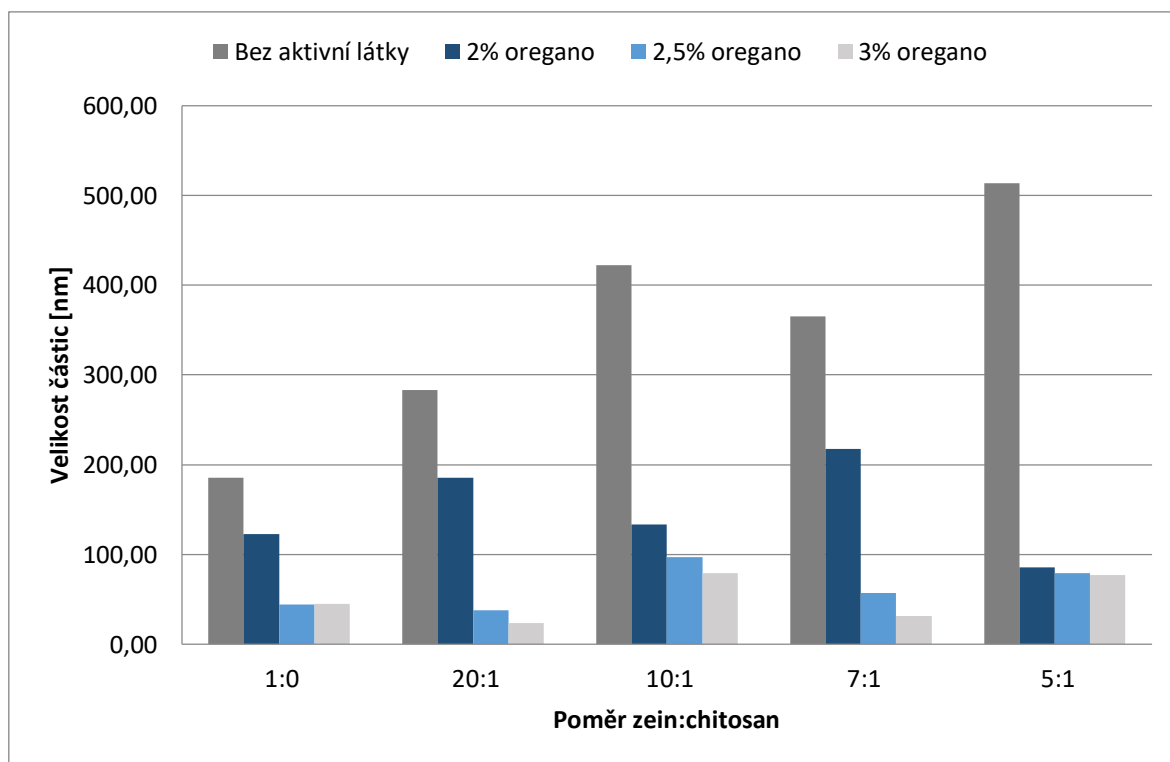
Obrázek 15 Závislost velikosti částic na koncentraci skořice

Na Obrázku 16 je zobrazena průměrná velikost částic u roztoků s 2, 2,5 a 3% množstvím oregana, případně blanku. U 2% roztoku byla nejmenší průměrná velikost částic stanovena na 86,1 nm u poměru 5:1 u 2,5% roztoku na 38,1 nm u poměru 20:1 a u 3% roztoku oregana na 23,9 nm také u poměru 20:1. Nejvyšší průměrné hodnoty velikosti částic nabyly 2% roztok v poměru zein:chitosan 7:1 (217,3 nm), u 2,5% roztoku oregana v poměru 10:1 (97,0 nm) a u 3% roztoku také v poměru 10:1 (79,1 nm).

V případě roztoku bez aktivní látky se se zvyšujícím se množstvím chitosanu v roztoku zvýšila i průměrná velikost částic (Obrázky 13, 14, 15 a 16). Ta se pohybovala v rozmezí od 185,50 nm do 513,30 nm, kdy největší nárůst byl pozorován u vzorku s poměrem zein:chitosan 5:1. Ve studii Park *et al.* (2015) byl pozorován stejný trend.

Po přidání aktivní látky do směsi zein/chitosan, došlo ke snížení velikosti částic téměř u všech roztoků. Výjimkou byly roztoky thymolu v poměru 5:1 a skořice 1:0, kde došlo naopak ke zvýšení průměrné velikosti částic ve srovnání se vzorky bez aktivní látky. Ve všech roztocích s 2,5% a 3% přídatkem esenciálních olejů byla naměřena velikost částic ve všech poměrech pod 100 nm. S výjimkou skořice v poměru 1:0 nepřesáhla průměrná velikost částic u esenciálních olejů (2%) hranici 230 nm.





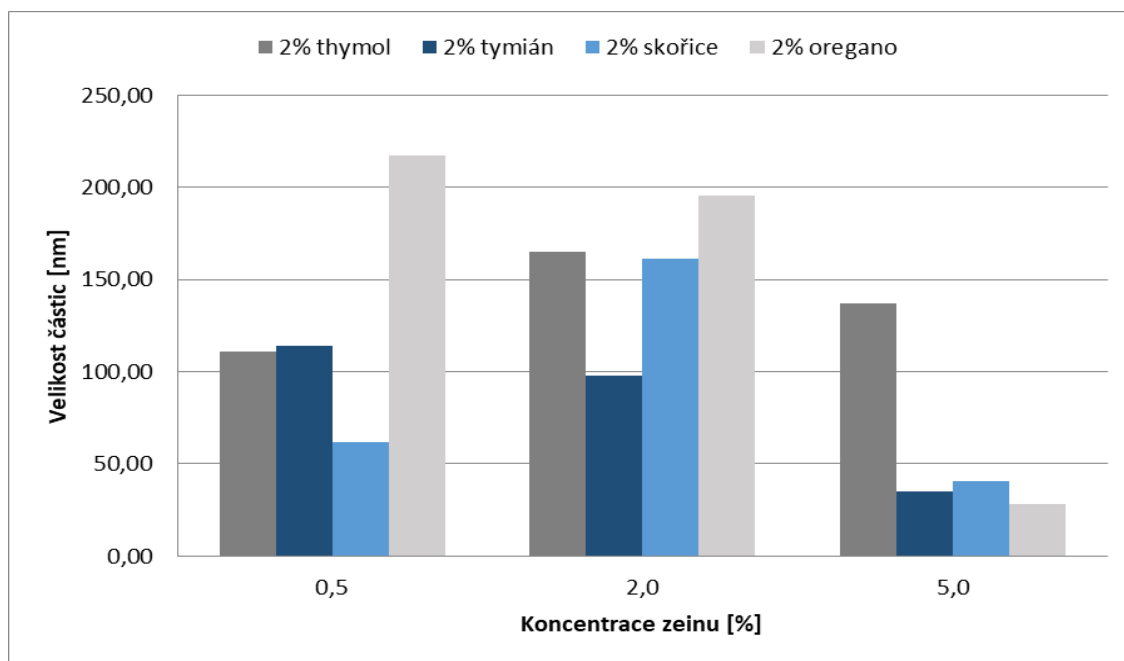
Obrázek 16 Závislost velikosti částic na koncentraci oregana

Všeobecně z naměřených dat můžeme říci, že při nárůstu koncentrace aktivní látky u esenciálních olejů dochází k poklesu průměrné velikosti částic. Bohužel z těchto dat nelze vyčíst, u kterých poměrů biopolymerů zeinu a chitosanu je průměrná velikost částic menší, respektive větší.

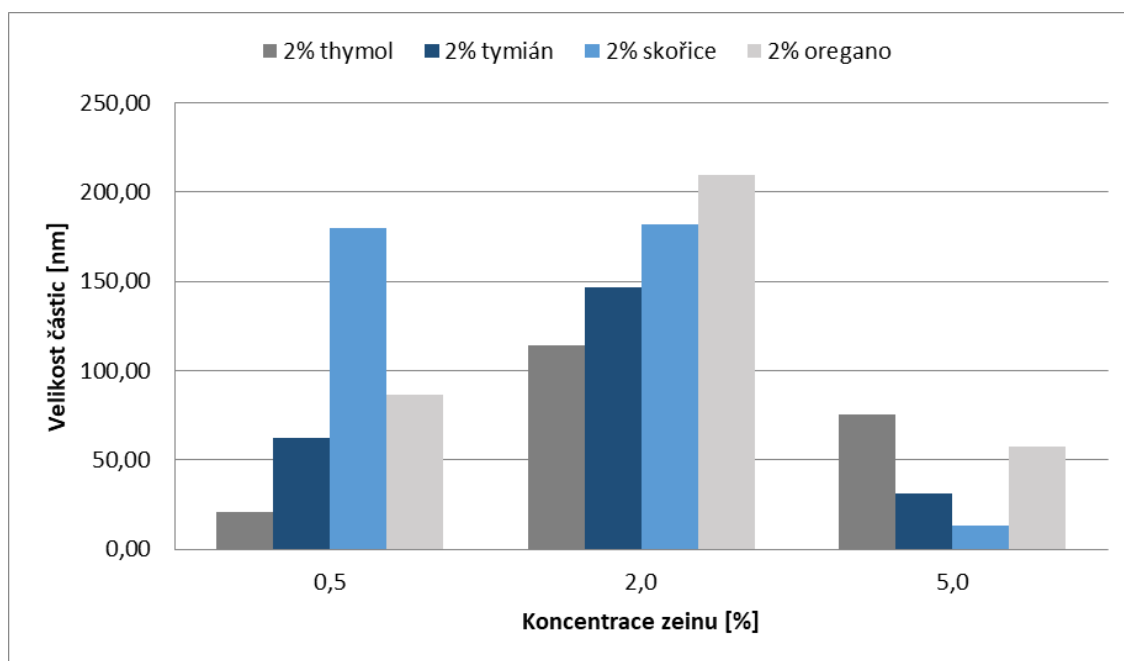
Na Obrázku 17 a 18 jsou zobrazeny naměřené hodnoty velikosti částic u vzorků se zvyšující se koncentrací zeinu v poměrech zeinu a chitosanu 7:1 a 5:1.

Na Obrázku 17 lze nalézt u tymiánu a oregana v roztoku 7:1 klesající trend průměrných hodnot velikosti částic s nárůstem koncentrace zeinu. Největší částice byly naměřeny u 2% roztoku zeinu v poměru 7:1 u tymiánu (164,9 nm) a u skořice (161,3 nm). U 0,5% roztoku zeinu v poměru 7:1 byla naměřena nejvyšší hodnota částic pro tymián na 114,2 nm a u oregana na 217,3 nm.

V případě naměřených dat u roztoku zein:chitosan 5:1 s koncentrací aktivních látek 2 % (Obrázek 18) byly naměřeny nejvyšší hodnoty pro velikost částic u roztoku se 2 % zeinu a to u tymiánu na 114,2 nm, tymiánu na 146,7 nm, skořice na 182,0 nm a oregana 209,4 nm.



Obrázek 17 Průměrné hodnoty velikosti částic v roztoku zein:chitosan 7:1



Obrázek 18 Závislost velikosti částic na koncentraci zeinu u roztoku zein:chitosan 5:1

#### 6.1.4 Vizuální hodnocení roztoků

Pozorováním byla zhodnocena barevnost namíchaných roztoků s aktivními látkami. Samotný 0,5% roztok chitosanu v 1% kyselině octové byl bezbarvý, 0,5% roztok zeinu v 75% ethanolu byl velmi slabě žlutý. U vzorků s 2, 5 a 10 % zeinu po přidání kterékoliv aktivní látky byl roztok žlutý. Se zvyšujícím se množstvím zeinu vzrostla sytost žluté barvy (nejsytější žlutá u 10% zeinu).

Tabulka 7 Vizualní hodnocení zákalu

Množství zeinu	Poměr Z:CH	Thymol	Tymián	Skořice	Oregano	Bez aktivní látky
0,5 %	1:0	Zákal u dna	Zákal u dna	Zákal u dna	Zákal u dna	Bez zákalu
	20:1	Bez zákalu	Bez zákalu	Zákal u dna	Bez zákalu	Bez zákalu
	10:1	Bez zákalu	Bez zákalu	Zákal v celém objemu	Bez zákalu	Bez zákalu
	7:1	Bez zákalu	Bez zákalu	Zákal v celém objemu	Bez zákalu	Bez zákalu
	5:1	Bez zákalu	Bez zákalu	Zákal u dna	Zákal u dna	Bez zákalu
2,0 %	7:1	Zákal u dna	Zákal u dna	Zákal u dna	Zákal u dna	Bez zákalu
	5:1	Zákal u dna	Zákal u dna	Zákal u dna	Zákal u dna	Bez zákalu
5,0 %	7:1	Zákal v celém objemu	Zákal u dna	Zákal v celém objemu	Zákal u dna	Bez zákalu
	5:1	Zákal u dna		Zákal u dna	Zákal u dna	Bez zákalu
10,0 %	7:1	Zákal v celém objemu	Zákal v celém objemu	Zákal u dna	Zákal u dna	Bez zákalu
	5:1	Bez zákalu	Zákal v celém objemu	Zákal u dna	Zákal u dna	Bez zákalu

Připravené 0,5% roztoky zeinu, v poměrech zeinu a chitosanu 1:0, 20:1, 10:1, 7:1, 5:1 s přidavkem thymolu, byly čiré a průhledné. Roztoky s 0,5 % zeinu, v poměrech zeinu a chitosanu 1:0, 20:1, 10:1, 7:1, 5:1 s přidavkem tymiánu se jeví jako narůžovělé. Vzniklé 0,5% roztoky zeinu, v poměrech zeinu a chitosanu 1:0, 20:1, 10:1, 7:1, 5:1 s přidavkem skořice byly žluté a slabě žluté byly i roztoky bez aktivní látky. Připravené 0,5% roztoky zeinu, v poměrech zeinu a chitosanu 1:0, 20:1, 10:1, 7:1, 5:1 s přidavkem tymiánu se jeví jako oranžovorůžové.

Případný vzniklý zákal byl zaznamenán do Tabulky 7. Hodnocení bylo provedeno pro roztoky s 0,5% množství zeinu v různých poměrech (1:0, 20:1, 10:1, 7:1, 5:1) a s přidavkem 2 % thymolu, tymiánu, skořice a oregana a dále u roztoků se 2, 5 a 10 % zeinu v poměrech 7:1 a 5:1.

Jak dokládá tabulka (Tabulka 7), směs bez přidané aktivní látky nevytvořila žádný zákal. Lze tedy předpokládat, že k rozpadu emulze nedošlo a směs vytvořená tímto způsobem je zcela roozpuštěna a poměrně stabilní. Po přidání aktivních látek došlo u většiny k vytvoření zákalu, především v případě skořice, což by mohlo být způsobeno velmi špatnou rozpustností ve vodných roztocích. Také Chen a Zhong (2014) studovali disperze zeinových nanočástic a dospěli k závěru, že vykazují špatnou koloidní stabilitu, snadno vytvářejí agregáty a precipitáty ve formulacích, čímž ztrácí svou funkčnost.

Při vytváření roztoků je důležitá volba jeho rozpouštědla i teplota. Po 6 měsících bylo zjištěno, že připravené roztoky s obsahem zeinu X % a více začaly vytvářet gel. Čas potřebný ke gellovatění závisí na koncentraci rozpouštědla (méně vody vede k pomalejší gelaci), teplotě (vyšší teploty podporují gelaci), pH a mechanických faktorech podporujících denaturaci proteinu. Vodné alkoholové disperze, obsahující <10% zeinu, gelují velmi pomalu, většina aplikací zeinu vyžaduje 20–40% koncentraci zeinu, aby došlo ke zgelovatění do druhého dne (Shukla & Cheryan, 2001).

Roztoky se skořicí byly již od počátku nestabilní, což se projevilo při výrobě filmů, které byly velmi nehomogenní a s některými nešlo již dále pracovat a připravit z nich disky na diskovou difúzní metodu.

## 6.2 Antimikrobiální účinky biopolymerních směsí

V další části této práce byly zkoumány antimikrobiální účinky připravených roztoků a filmů na grampozitivní bakterii *S. aureus*, gramnegativní bakterii *E. coli*, kvasinku *C. parapsilosis* a vláknitou mikromycetu *A. niger*.

### 6.2.1 Disková difúzní metoda

Připravené roztoky byly testovány diskovou difúzní metodou. Případné antimikrobiální účinky se projevily jako inhibiční zóny, jejichž průměry byly měřeny včetně disků. Pro relativizaci dat byly od naměřených hodnot odečteny průměry disků a byla vypočtena směrodatná odchylka.

Velikosti inhibičních zón a jejich směrodatné odchylky pro roztoky thymolu, tymiánu, skořice a oregana u všech použitých mikroorganismů byly zaznamenány do Tabulky 8, 9, 10, 11 a 12. Naměřené velikosti inhibičních zón u papírových disků o velikosti 6 mm s 2, 2,5 a 3% přídatkem thymolu v různých poměrech (1:0, 20:1, 10:1, 7:1, 5:1) pro mikroorganismy *S. aureus*, *E. coli*, *C. parapsilosis* a *A. niger* se nachází v Tabulce 8.

Největší průměrná velikost inhibiční zóny u bakterie *S. aureus* při zkoušení antibakteriálních účinků 2% thymolu s poměrem zeinu a chitosanu 7:1 byla 4,3 mm, u *E. coli* byla zaznamenána u 3% thymolu v poměrech 1:0 a 20:1 - v obou případech na 8,0 mm. U *C. parapsilosis* byla naměřena zóna 4,0 mm u roztoku thymolu 2,5% (1:0, 5:1) a 3% (1:0, 20:1 a 7:1). Při prvním testování všech roztoků thymolu nebyla naměřena žádná zóna u plísně *A. niger* (Tabulka 9). Při testování po 6 měsících (Tabulka 13) došlo u 3% roztoků thymolu (7:1 a 5:1) k naměření přibližně stejných hodnot inhibičních zón (mírné snížení) u bakterií a kvasinky. Naproti tomu, což lze považovat za zajímavé, se u *A. niger* velikost zóny zvětšila na 1 mm.

Tabulka 8 Velikost inhibičních zón pro thymol

Vzorek v poměru Z:CH	zóna <i>S. aureus</i> [mm]	zóna <i>E. Coli</i> [mm]	zóna <i>C. Parapsilosis</i> [mm]	zóna <i>A. Niger</i> [mm]
2% thymol 1:0	2,3±0,3	4,0±0,1	2,5±0,6	0,0±0,1
2% thymol 20:1	3,3±0,3	4,0±0,1	2,0±0,1	0,0±0,1
2% thymol 10:1	3,0±0,1	4,3±0,3	2,0±0,1	0,0±0,1
2% thymol 7:1	4,3±0,3	4,0±0,1	2,0±0,1	0,0±0,1
2% thymol 5:1	2,0±0,1	4,0±0,1	1,0±0,1	0,0±0,1
2,5% thymol 1:0	3,0±0,1	6,0±0,1	4,0±0,1	0,0±0,1
2,5% thymol 20:1	2,0±0,1	3,5±0,6	3,5±0,1	0,0±0,1
2,5% thymol 10:1	2,5±0,6	4,5±0,6	3,0±0,1	0,0±0,1
2,5% thymol 7:1	3,0±0,1	5,5±0,6	3,0±0,1	0,0±0,1
2,5% thymol 5:1	4,0±0,1	7,5±0,6	4,0±0,1	0,0±0,1
3% thymol 1:0	3,5±0,6	8,0±0,1	4,0±0,1	0,0±0,1
3% thymol 20:1	4,0±0,1	8,0±0,1	4,0±0,1	0,0±0,1
3% thymol 10:1	3,5±0,6	5,0±0,1	2,0±2,0	0,0±0,1
3% thymol 7:1	3,0±0,1	6,0±0,1	4,0±0,1	0,0±0,1
3% thymol 5:1	3,0±0,1	6,5±0,6	3,3±0,3	0,0±0,1

\* zóna –hodnoty v tabulce jsou již po odečtu velikosti disku 6 mm.

Naměřené velikosti inhibičních zón u disků s 2, 2,5 a 3% přidavkem tymiánu v různých poměrech (1:0, 20:1, 10:1, 7:1, 5:1) pro mikroorganismy *S. aureus*, *E. coli*, *C. parapsilosis* a *A. niger* se nachází v Tabulce 9. Největší průměrnou velikost inhibiční zóny lze nalézt u bakterie *S. aureus* po použití disku s 2,5 % tymiánu v poměru 1:0 a 3% roztoku v poměru 5:1 na 2,5 mm. U bakterie *E. coli* byla zaznamenána největší inhibiční zóna na 4,0 mm u 2,5% tymiánu v poměrech zein:chitosan 10:1 a 7:1 a 3% tymiánu v poměrech 20:1, 10:1, 7:1 a 5:1. Největší zóna pro kvasinku *C. parapsilosis* byla naměřena na 3,0 mm u 3% tymiánu (20:1). Při prvním testování (Tabulka 9) ani při testování po 6 měsících (Tabulka 12) roztoků tymiánu nebyla naměřena žádná zóna u plísně *A. niger*. Při testování po 6

měsících (Tabulka 13) došlo u 3% roztoků tymiánu (7:1 a 5:1) k naměření mírně nižších hodnot inhibičních zón u bakterií i kvasinky.

Ve studii Donaldsona *et al.* (2008), bylo zkoušeno 14 esenciálních olejů včetně tymiánu a tureckého oregana vůči kvasince *Candida albicans* a bakterii *S. aureus*. Větší zóny byly vytvořeny u tymiánu než oregana. V našem případě byly u tymiánu a oregana výsledky téměř shodné. Rozdíl může být zapříčiněn jiným druhem oregana (Donaldson *et al.*, 2008).

Tabulka 9 Velikost inhibičních zón pro tymián

Vzorek v poměru Z:CH	zóna <i>S. aureus</i>	zóna <i>E. coli</i>	zóna <i>C. parapsilosis</i>	zóna <i>A. niger</i>
2% tymián 1:0	1,0±0,1	2,0±0,1	1,0±0,1	0,0±0,1
2% tymián 20:1	1,0±0,1	2,0±0,1	1,0±0,1	0,0±0,1
2% tymián 10:1	1,0±0,1	2,0±0,1	1,0±0,1	0,0±0,1
2% tymián 7:1	1,0±0,1	2,0±0,1	1,0±0,1	0,0±0,1
2% tymián 5:1	1,0±0,1	2,0±0,1	1,0±0,1	0,0±0,1
2,5% tymián 1:0	2,5±0,6	3,0±0,1	1,0±0,1	0,0±0,1
2,5% tymián 20:1	2,0±0,1	3,5±0,6	2,0±0,1	0,0±0,1
2,5% tymián 10:1	2,0±0,1	4,0±0,1	2,0±0,1	0,0±0,1
2,5% tymián 7:1	1,0±0,1	4,0±0,1	2,0±0,1	0,0±0,1
2,5% tymián 5:1	1,0±0,1	3,0±0,1	2,0±0,1	0,0±0,1
3% tymián 1:0	1,0±0,1	3,5±0,6	1,0±0,1	0,0±0,1
3% tymián 20:1	1,0±0,1	4,0±0,1	3,0±0,1	0,0±0,1
3% tymián 10:1	2,0±0,1	4,0±0,1	2,5±0,6	0,0±0,1
3% tymián 7:1	1,5±0,6	4,0±0,1	2,5±0,6	0,0±0,1
3% tymián 5:1	2,5±0,6	4,0±0,1	2,0±0,1	0,0±0,1

\* zóna –hodnoty v tabulce jsou již po odečtu velikosti disku 6 mm.

Naměřené velikosti inhibičních zón u disků s 2, 2,5 a 3% přídavkem skořice v různých poměrech (1:0, 20:1, 10:1, 7:1, 5:1) pro mikroorganismy *S. aureus*, *E. coli*, *C. parapsilosis* a *A. niger* se nachází v Tabulce 10. Největší průměrnou velikost inhibiční zóny lze nalézt u bakterie *S. aureus* po použití disku s 3% roztokem skořice v poměru 1:0 (10,5 mm). Také u bakterie *E. coli* lze vidět, že největší zóna byla naměřena u disku s přídavkem 3 % skořice v poměrech 1:0 a 20:1 na 5,5 mm. Největší zóna pro kvasinku *C. parapsilosis* byla naměřena na 4,50 mm u 3% skořice (10:1). Pro *A. niger* byla největší velikost inhibiční zóny sledována v 2,5% roztoku 5:1 (3,0 mm). Při prvním testování (Tabulka 10) ani při testování po 6 měsících (Tabulka 12) roztoků tymiánu nebyla naměřena žádná zóna u plísně *A. niger*. Při testování po 6 měsících (Tabulka 12) došlo u 3% roztoků skořice (7:1 a 5:1) k výraznému snížení velikosti inhibičních zón a to až o 9 mm u *Staphylococcus*

*aureus* a k naměření nižších hodnot inhibičních zón u bakterie *E. coli* a kvasinky *C. parapsilosis*. U plísně nebyly pozorovány žádné inhibiční zóny po 6 měsíčním testování. Ve studii Mukhtar a Ghorí (2012) byly zkoumány účinky *Cinnamomum zeylanicum* na bakterii *E. coli*, ve vodných a ethanolických roztocích při různých koncentracích. Při nejnižší (10%) koncentraci ve vodném roztoku nebyla vytvořena žádná zóna a v ethanolickém byla 8 mm, což odpovídá naměřeným výsledkům pro 3% roztoky. Lze usoudit, že kombinace s biopolymery zlepšuje účinky na bakterie.

Tabulka 10 Velikost inhibičních zón pro skořici

Vzorek v poměru Z:CH	zóna <i>S. aureus</i> [mm]	zóna <i>E. coli</i> [mm]	zóna <i>C. parapsilosis</i> [mm]	zóna <i>A. niger</i> [mm]
2% skořice 1:0	0,0±0,1	2,0±0,1	2,0±0,1	0,0±0,1
2% skořice 20:1	0,0±0,1	3,0±0,1	2,0±0,1	0,0±0,1
2% skořice 10:1	0,0±0,1	3,0±0,1	2,0±0,1	0,0±0,1
2% skořice 7:1	0,0±0,1	3,0±0,1	1,5±0,6	0,0±0,1
2% skořice 5:1	0,0±0,1	2,5±0,6	0,0±0,1	0,0±0,1
2,5% skořice 1:0	5,5±0,6	3,0±0,1	4,0±0,1	2,0±0,1
2,5% skořice 20:1	7,5±0,6	5,0±0,1	3,0±0,1	1,5±0,6
2,5% skořice 10:1	8,5±0,6	3,5±0,6	3,0±0,1	2,5±0,1
2,5% skořice 7:1	0,0±0,1	4,0±0,1	3,0±0,1	2,8±0,3
2,5% skořice 5:1	9,0±0,1	4,5±0,6	3,0±0,1	3,0±0,1
3% skořice 1:0	10,5±0,6	5,5±0,6	2,5±0,6	1,5±0,6
3% skořice 20:1	7,5±0,6	5,5±0,6	2,8±0,3	2,5±0,6
3% skořice 10:1	10,0±1,0	4,5±0,6	4,5±0,6	2,0±1,0
3% skořice 7:1	9,0±0,1	4,5±0,6	3,5±0,1	1,5±0,6
3% skořice 5:1	8,5±0,6	4,5±0,6	3,0±0,1	1,0±0,1

\* zóna –hodnoty v tabulce jsou již po odečtu velikosti disku 6 mm.

Naměřené velikosti inhibičních zón u disků s 2, 2,5 a 3% přídavkem oregana v různých poměrech (1:0, 20:1, 10:1, 7:1, 5:1) pro mikroorganismy *S. aureus*, *E. coli*, *C. parapsilosis* a *A. niger* se nachází v Tabulce 11. Největší průměrná velikost inhibiční zóny byla naměřena u bakterie *S. aureus* na 2,50 mm po použití disků s 2,5% přídavkem oregana v poměru 1:0 a 20:1 a u 3% roztoku oregana v poměru 7:1. Pro bakterii *E. coli* byla naměřena největší inhibiční zóna na 7,00 mm v případě roztoku s 3% oreganem (20:1) a u kvasinky *C. parapsilosis* na 2,50 mm u 3% oregana v poměru zein:chitosan 5:1. Při testování po 6 měsících (Tabulka 12) došlo u 3% roztoků oregana (7:1 a 5:1) k mírnému zvýšení velikosti inhibičních zón u bakterií a kvasinek. U plísně *A. niger* nebyly pozorovány žádné inhibiční zóny ani při prvním ani po 6 měsíčním testování.

Extrakce oreganových listů superkritickým CO<sub>2</sub> byla prováděna za různých podmínek a následně zkoušena jejich antimikrobiální aktivita ve studii Santoya et al (2006). Antimikrobiální aktivita byla zkoumána metodou diskové difúze proti šesti různým mikrobiálním druhům, včetně dvou grampozitivních bakterií (*S. aureus* a *Bacillus subtilis*), dvou gramnegativních bakterií (*Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*), kvasinky (*Candida albicans*) a plísně (*A. niger*). Vysušené rostlinné extrakty nebo čisté látky (standarty) byly rozpuštěny v ethanolu až do konečné koncentrace 40 mg/ml. Nejlépe karvakrol působil na *E. coli*, následně na *S. aureus*, *C. albicans* a nejméně na *A. niger*, což je srovnatelné s výsledky této práce. V našem případě dokonce oregano nemělo žádný vliv na *A. niger* (Santoyo et al., 2006).

Tabulka 11 Velikost inhibičních zón pro oregano

Vzorek v poměru Z:CH	zóna <i>S. aureus</i> [mm]	zóna <i>E. coli</i> [mm]	zóna <i>C. parapsilosis</i> [mm]	zóna <i>A. niger</i> [mm]
2% oregano 1:0	1,0±0,1	2,5±0,6	1,0±0,1	0,0±0,1
2% oregano 20:1	2,0±0,1	3,0±0,1	1,0±0,1	0,0±0,1
2% oregano 10:1	1,5±0,6	2,0±0,1	1,0±0,1	0,0±0,1
2% oregano 7:1	1,0±0,1	3,0±0,1	1,0±0,1	0,0±0,1
2% oregano 5:1	2,0±0,1	2,5±0,6	1,0±0,1	0,0±0,1
2,5% oregano 1:0	2,5±0,6	5,0±0,1	1,5±0,1	0,0±0,1
2,5% oregano 20:1	2,5±0,6	5,5±0,6	1,5±0,1	0,0±0,1
2,5% oregano 10:1	1,5±0,6	3,5±0,6	2,0±0,1	0,0±0,1
2,5% oregano 7:1	2,0±0,1	5,0±0,1	2,0±0,1	0,0±0,1
2,5% oregano 5:1	1,5±0,6	5,5±0,6	1,5±0,1	0,0±0,1
3% oregano 1:0	1,3±0,3	4,5±0,6	2,0±0,1	0,0±0,1
3% oregano 20:1	1,5±0,6	7,0±0,1	2,0±0,1	0,0±0,1
3% oregano 10:1	1,5±0,6	5,5±0,6	2,0±0,1	0,0±0,1
3% oregano 7:1	2,5±0,6	3,5±0,6	1,0±0,1	0,0±0,1
3% oregano 5:1	2,0±0,1	4,0±0,1	2,5±0,6	0,0±0,1

\* zóna –hodnoty v tabulce jsou již po odečtu velikosti disku 6 mm.

U roztoků bez aktivní látky byly u všech zkoumaných mikroorganismů hodnoty velikosti inhibičních zón nulové.

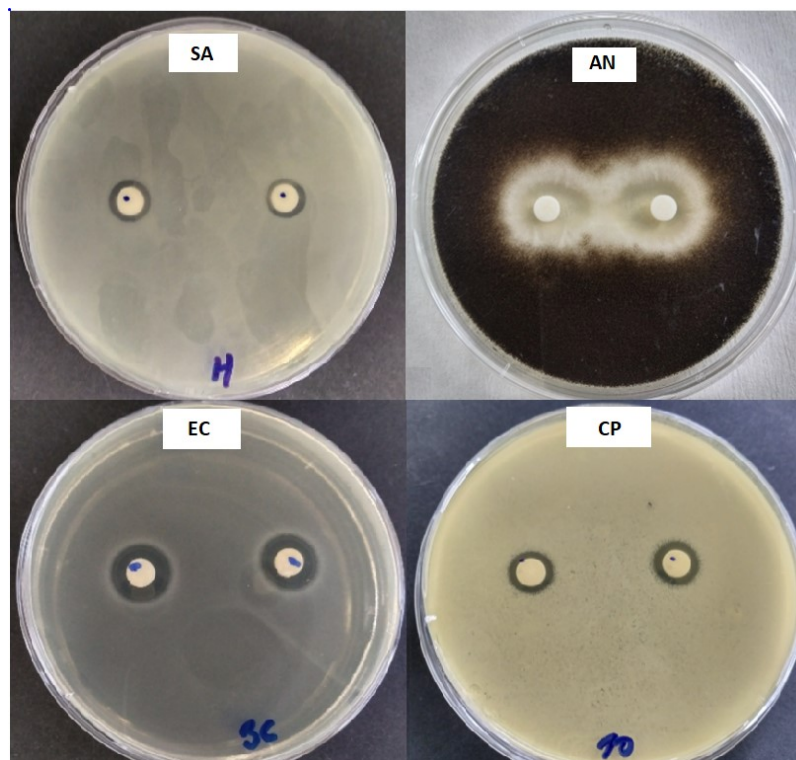
Z naměřených dat lze vyvodit, že thymol, tymián a oregano ve vyšších koncentracích působily nejlépe na bakterii *E. coli*, čili na bakterii gramnegativní. Disky s těmito látkami také působily na grampozitivní bakterii, ale v menší míře. Tyto roztoky bohužel neměly prakticky žádný antimikrobiální účinek na použitou plíseň. Roztok s 2% přídatkem skořice neměl žádný vliv na bakterii *S. aureus* a plíseň *A. niger*. Ve vyšších koncentracích však na tyto zmíněné mikroorganismy velmi dobře působil.



Tabulka 12 Velikost inhibičních zón aktivních látek naměřených po 6 měsících

Vzorek v poměru Z:CH	zóna <i>S. aureus</i> [mm]	zóna <i>E. coli</i> [mm]	zóna <i>C. parapsilosis</i> [mm]	zóna <i>A. niger</i> [mm]
3% thymol 5:1	2,5±0,6	6,0±0,1	3,5±0,6	1,0±0,1
3% thymol 7:1	3,0±0,1	6,0±0,1	4,0±0,1	1,0±0,1
3% tymián 5:1	1,0±0,1	3,0±0,1	1,0±0,1	0,0±0,1
3% tymián 7:1	2,0±0,1	3,5±0,6	1,0±0,1	0,0±0,1
3% oregano 5:1	3,5±0,6	5,0±0,1	2,5±0,6	0,0±0,1
3% oregano 7:1	2,5±0,6	5,0±0,1	1,5±0,6	0,0±0,1
3% skořice 5:1	0,0±0,1	1,0±0,1	3,0±0,1	0,0±0,1
3% skořice 7:1	0,0±0,1	1,0±0,1	3,5±0,6	0,0±0,1

\* zóna –hodnoty v tabulce jsou již po odečtu velikosti disku 6 mm



Obrázek 19 Inhibiční zóny jednotlivých mikroorganismů  
(SA: *S. aureus*, EC: *E. coli*, CP: *C. parapsilosis*, AN: *A. niger*)

Na Obrázku 19 jsou zobrazeny ilustrační fotky z měření inhibičních zón připravených roztoků u mikroorganismů *S. aureus*, *E. coli*, *C. parapsilosis* a *A. niger*.

### 6.2.2 Stanovení minimální inhibiční koncentrace thymolu

Z naměřených dat optické denzity byly vytvořeny růstové křivky pro bakterie *S. aureus* a *E. coli* s thymolem. Koncentrace při kterých byl zkoumán inhibiční účinek jsou

40,0 mg/ml, 20,0 mg/ml, 10,0 mg/ml, 5,0 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1250,0 µg/ml, 625,0 µg/ml, 312,5 µg/ml, 156,3 µg/ml, 78,1 µg/ml, 39,1 µg/ml a 19,5 µg/ml. Pro ujištění, že na růst bakterií nemá vliv absolutní ethanol byl testován také účinek ethanolu. Ani největší koncentrace ethanolu neměla žádný vliv na růst bakterie *E. coli*. Podobných výsledků bylo dosaženo i u bakterie *S. aureus*, pouze největší koncentrace mírně prodloužila lag fázi růstové křivky.

Všechny vzorky o koncentraci od 2,5 mg/ml do 19,5 µg/ml kopírovaly růstovou křivku bakterie *E. coli* (kontrola růstu bakterie). Vzorek o koncentraci 2,5 mg/ml mírně zbrzdil růst bakterie (prodloužil lag fázi). Koncentrace 5,0 mg/ml byla stanovena jako minimální inhibiční koncentrace pro bakterii *E. coli* a u *S. aureus* byla 20,0 mg/ml. Všechny vyšší koncentrace také prokázaly antibakteriální účinek a kopírovaly křivku pro 5,0 mg/ml.

Všechny vzorky o koncentraci od 10,0 mg/ml do 19,5 µg/ml kopírovaly růstovou křivku bakterie *S. aureus* (kontrola růstu bakterie). Koncentrace 10,0 mg/ml a 156,3 µg/ml byla schopna zbrzdit růst bakterie *S. aureus* o několik hodin. Minimální inhibiční koncentrace byla stanovena u *S. aureus* na 20,0 mg/ml. Koncentrace 40,0 mg/ml vykazovala také inhibiční účinky a kopírovala křivku bakterie spolu s 20,0 mg/ml thymolu.

Pomocí mikrodiluční metody byla zkoumána antimikrobiální aktivita thymolu proti *S. aureus* ATCC 68380 a *E. coli* ATCC 15221. Výsledky studie ukázaly, že *S. aureus* se jeví citlivější (MIC: 0,3 mg / ml) než *E. coli* (MIC: 5,0 mg/ml) (Trombetta, 2005). V této studii byla také stanovena MIC na 5 mg/ml u *E. coli*, ovšem odolnější se jevil *S. aureus* (MIC 20 mg/ml). Rozdíly mohou být dány jednak rozdílným složením roztoků či pravděpodobněji jinými kmeny bakterií. Wattanasatcha *et al.* (2012) testovali antimikrobiální aktivitu thymolu i jiných éterických látek proti *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Aktivitu thymolu zkoumali i po enkapsulaci do směsi ethyl/methylcelulózy. Zjistili, že když je thymol enkapsulovaný, jeho antibakteriální aktivita je zpomalena ve srovnání s aktivitou volného thymolu u *Pseudomonas aeruginosa*, ovšem u *S. aureus* a *E. coli* rozdíly nebyly. Lépe působí na *E. coli* stejně jako v této studii s tím rozdílem, že jejich MIC jsou řádově nižší *E. coli* 10 µg/ml a *S. aureus* 156 µg/ml (Wattanasatcha *et al.*, 2012).

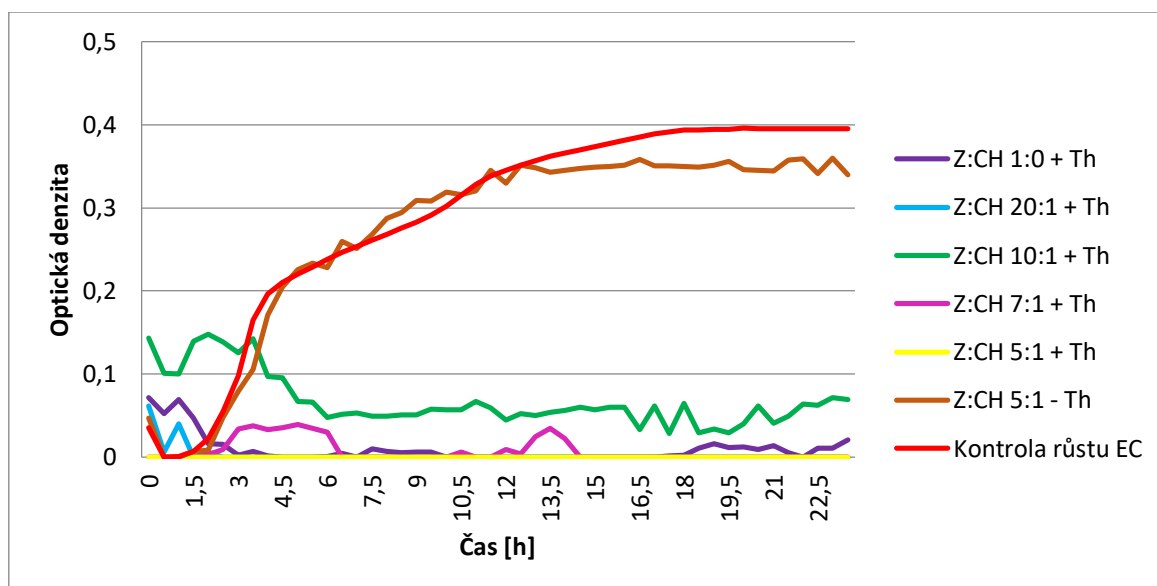
### 6.2.3 Stanovení růstových křivek

Antibakteriální účinky vzorků s 2% thymolem v poměrech zein:chitosan 1:0, 20:1, 10:1, 7:1 a 5:1 a bez aktivní látky ve stejných poměrech byly stanoveny pomocí růstových

křivek. Růstová křivka bez omezení má standardní fáze, které se popisují jako fáze adaptace (lag fáze), fáze zpomaleného růstu, exponenciální fáze, fáze zpomaleného růstu, stacionární fáze a fáze odumírání (Kaprálek, 1986).

Pro lepší přehlednost byly do grafu vyneseny vzorky bez aktivní látky pouze v poměru 5:1, protože se dá předpokládat, že díky možným antibakteriálním účinků chitosanu, kterého je v této směsi nejvíce, by mohlo dojít k zbrzdění růstu bakterie *E. coli*. Tento předpoklad nebyl potvrzen, jelikož tento vzorek kopíroval základní růstovou křivku *E. coli*. Vzorky bez aktivní látky ve všech ostatních poměrech také kopírovaly růstovou křivku bakterie.

Všechny vzorky s 2% thymolem (Obrázek 20) vykazovaly inhibiční účinky, nebyl pozorován žádný zákal, tudíž nebyl prokázán růst bakterie *E. coli*.

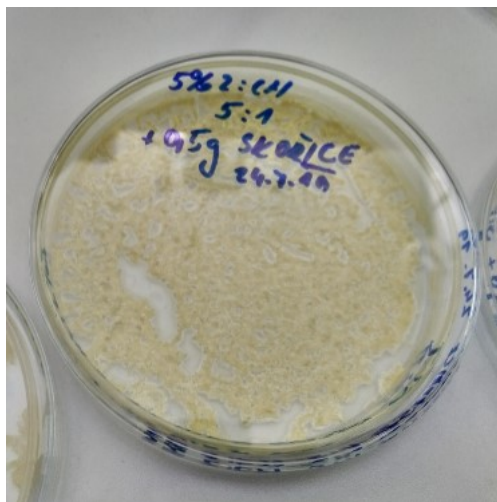


Obrázek 20 Závislost optické denzity na čase pro vzorky s různým poměrem zeinu a chitosanu u *Escherichia coli*

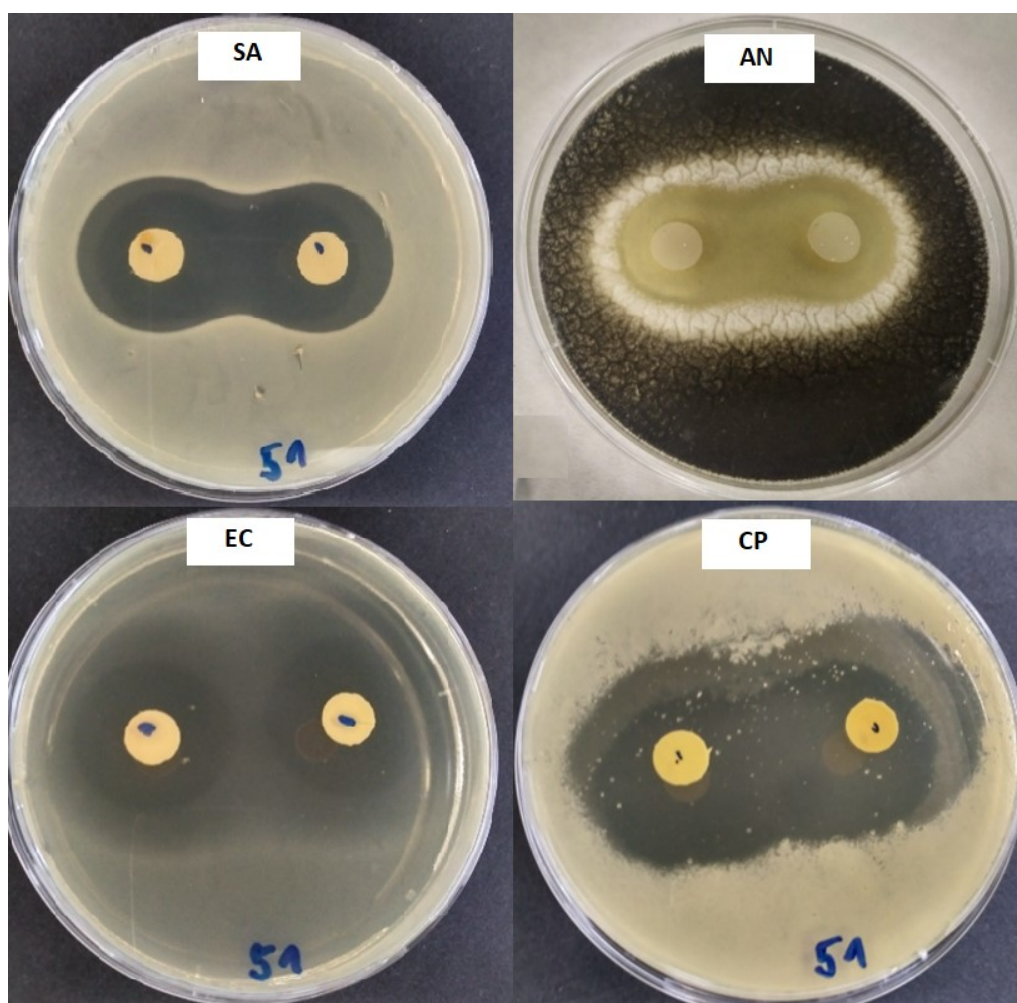
#### 6.2.4 Antimikrobiální účinky filmů

Připravené filmy byly v podobě disků z nich vyseknutých testovány diskovou difúzní metodou. Případné antimikrobiální účinky se projeví jako inhibiční zóny, jejichž průměry byly měřeny včetně disků. Pro relativizaci dat byly od naměřených hodnot odečteny průměry disků a byla vypočtena směrodatná odchylka. Podařilo se odlít filmy až s koncentrací zeinu 2 % a vyšší. Filmy bylo možné použít jen z plastových Petriho misek, ze skleněných nešly odlepit, což by mohlo být přičítáno rozdílné polaritě povrchů (sklo je polární, plasty nepolární). Filmy skořice byly velmi nehomogenní a tudíž nepoužitelné pro další zkoumání (Obrázek 21). Pro porovnání s roztoky byly odečteny

velikosti filmu (u roztoků disků). Oproti roztokům byly inhibiční zóny u filmů mnohem větší. Není stoprocentně jisté, zdali jsou filmy více účinné, jelikož není zaručeno perfektně homogenní rozlití filmů (Obrázek 21).



Obrázek 21 Skořicový film



Obrázek 22 Inhibiční zóny filmů u jednotlivých mikroorganismů

Na Obrázku 22 jsou zobrazeny ilustrační fotky filmů při diskové difúzní metodě pro všechny použité mikroorganismy.

Tabulka 13 Inhibiční zóny zeinichitosanových filmů u jednotlivých mikroorganismů

Složení filmu	zóna <i>S. aureus</i> [mm]	zóna <i>E. Coli</i> [mm]	zóna <i>C. Parapsilosis</i> [mm]	zóna <i>A. Niger</i> [mm]
2% Z:CH 7:1 + 3% thymol	13,0±0,1	23,3±1,3	29,5±0,6	49,0±2,0
2% Z:CH 5:1 + 3% thymol	10,5±0,6	12,0±0,9	31,0±0,1	53,5±2,5
2% Z:CH 7:1 + 3% tymián	9,3±0,5	13,7±0,5	7,5±1,6	41,5±6,5
2% Z:CH 5:1 + 3% tymián	8,3±0,5	8,3±0,5	7,5±1,6	29,5±1,5
2% Z:CH 7:1 + 3% oregano	6,0±0,9	9,3±0,5	16,5±2,5	25,0±1,0
2% Z:CH 5:1 + 3% oregano	8,7±0,5	13,3±0,5	14,0±1,1	40,0±4,0
2% Z:CH 7:1 + 1% skořice	2,5±0,6	1,0±0,1	4,5±1,6	0,0±0,0
2% Z:CH 5:1	0,0±0,1	0,0±0,1	0,0±0,1	0,0±0,0
2% Z:CH 7:1	0,0±0,1	0,0±0,1	0,0±0,1	0,0±0,0
2% Z:CH 7:1 + 0,5 g tymián	8,5±0,6	5,0±0,1	3,0±0,1	16,0±1,0
2% Z:CH 5:1 + 2% thymol	9,0±0,1	11,5±0,6	4,0±0,1	34,0±1,0
5% Z:CH 7:1 + 2% thymol	9,5±0,6	11,5±0,6	3,0±0,1	21,0±0,0
10% Z:CH 5:1 + 2% oregano	8,0±1,1	10,0±0,1	3,0±0,1	20,0±0,0
2% Z:CH 5:1 + 3% thymol	23,0±0,1	21,0±0,1	28,0±1,1	0,0±0,0
2% Z:CH 5:1 + 2,5% thymol	16,0±0,1	15,0±1,1	11,5±0,6	34,5±1,6
2% Z:CH 5:1 + 2% thymol	23,5±1,6	15,0±0,1	2,5±0,6	32,0±1,0
10% Z:CH 1:0	0,0±0,1	0,0±0,1	0,0±0,1	0,0±0,1
10% Z:CH 1:0 + 2% tymián	0,0±0,1	0,0±0,1	0,0±0,1	0,0±0,1
10% Z:CH 1:0 + 2% oregano	1,0±0,1	1,0±0,1	0,0±0,1	5,5±0,6
10% Z:CH 1:0 + 2% skořice	17,5±0,6	15,0±2,0	27,0±1,1	25,0±2,0

\* zóna –hodnoty v tabulce jsou již po odečtu velikosti disku 9 mm.

Tabulka 14 Inhibiční zóny filmů po 6 měsících

Složení filmu	zóna <i>S. aureus</i> [mm]	zóna <i>E. Coli</i> [mm]	zóna <i>C. Parapsilosis</i> [mm]	zóna <i>A. Niger</i> [mm]
2% Z:CH 7:1 + 3% tymián	7,7±0,9	14,0±0,8	9,5±0,6	30,0±1,1
2% Z:CH 5:1 + 3% thymol	4,0±0,1	8,7±0,9	9,5±0,6	35,0±1,1
2% Z:CH 7:1 + 3% thymol	10,0±0,1	11,0±0,8	3,5±0,6	7,0±5,1
2% Z:CH 5:1 + 3% oregano	7,7±0,6	10,7±0,5	4,5±0,6	21,0±3,1
10% Z:CH 5:1 + 2% oregano	2,5±0,5	3,5±0,6	2,0±0,1	6,0±0,1
10 % Z:CH 1:0 + 2% skořice	4,0±0,1	6,5±0,6	28,5±0,6	0,0±9,1
2% Z:CH 5:1 + 2,5% thymol	9,0±1,1	9,0±1,1	10,5±1,6	34,5±1,6
2 % Z:CH 7:1 + 2% tymián	2,7±0,5	2,0±0,1	2,0±0,1	1,5±0,6
5 % Z:CH 1:0	0,0±0,1	0,0±0,1	0,0±0,1	0,0±0,1
10% Z:CH 1:0 + 2% skořice	11,0±0,1	11,0±0,1	23,5±0,6	1,0±0,1

\* zóna –hodnoty v tabulce jsou již po odečtu velikosti disku 9 mm.

V Tabulce 13 jsou naměřené inhibiční zóny a jejich směrodatné odchylky pro bakterie, kvasinku a plíseň. Z naměřených hodnot lze vyčíst, že největší zóny, tudíž nejlepší

antimikrobiální účinky byly pozorovány u filmů s přídavkem thymolu na plíseň *A. niger*. Inhibiční zóny nebyly sledovány u filmu s přídavkem 1 % skořice u plísně, což může být způsobeno nehomogenními filmy, případně takovátou koncentrací skořice není na zastavení růstu dostačující. Thymol i oregano měly velmi dobré účinky na kvasinku. V případě bakterií se nedá říci, že by některý z esenciálních olejů měl větší vliv na jednu nebo druhou. Na mikroorganismy nejméně působila 1% skořice a 3% hřebíček. Filmy s 10% obsahem zeinu s přídavkem oregana vykazovaly také menší účinky a v případě 2% tymiánu dokonce nulové. Také filmy bez aktivní látky nevytvářely žádné inhibiční zóny.

Kombinace chitosanu a esenciálního oleje vykazovala fungicidní účinky proti *Rhizopus stolonifer* a *A. niger*. Povlak těchto látek snížil výskyt prvních známek černé plísně a měkké hniloby v uměle kontaminovaných plodech cherry rajčat během skladování o 9 dnů, kdy na konci skladování vykazovalo ovoce potažené vyšší pevností a nižší ztrátou hmotnosti, zpomalení poklesu lykopenu, kyseliny askorbové, citrónové, glukózy a fruktózy (Barreto *et al.*, 2016). Filmy na bázi pullulanu, u kterých byla zkoumána antimikrobiální aktivita mimo jiné i pro kmen *S. aureus* s přidáním 3% (hm./obj.) koncentrace thymolu, byla naměřena inhibiční zóna 15,5 mm (Gniewosz & Synowiec, 2011).

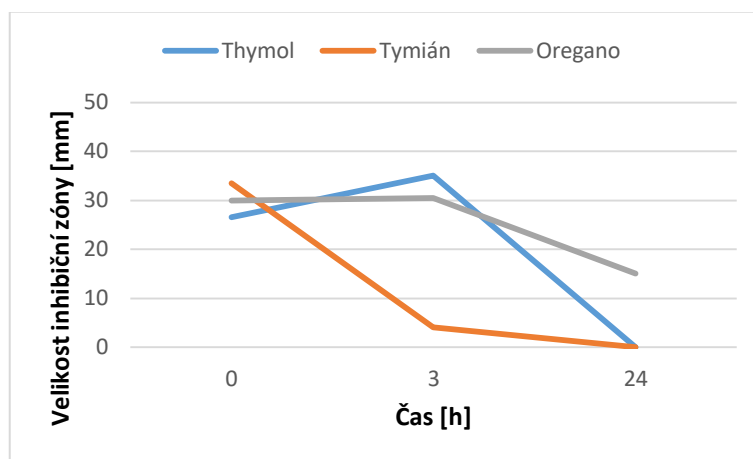
V Tabulce 14 se nachází inhibiční zóny filmů testovaných po 6 měsících, také zde lze největší zóny nalézt u plísně *A. niger* po použití filmů s thymolem. Skořice po 6 měsících nejlépe působí na kvasinku *C. parapsilosis*. Nejmenší účinky vykazují po 6 měsících tymián a oregano. Film s 1% skořice nejlépe působil na kvasinku, také vytvořil 2,5 mm zónu u *S. aureus* ovšem ve studii zaměřené na přípravu filmu na bázi chitosanu s přídavkem EDTA byla u 1% skořice naměřena mnohem větší zóna 92,1 mm (Singh *et al.*, 2012).

### 6.3 Uvolňování aktivní látky

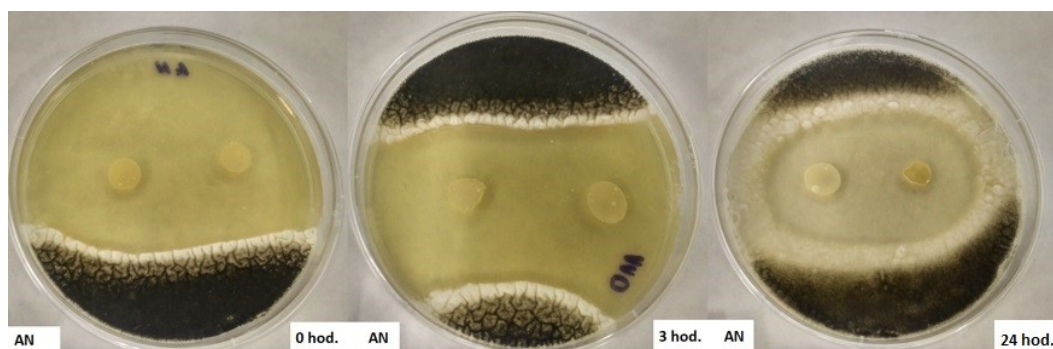
Jednou z klíčových vlastností je i zajištění schopnosti filmu udržet v systému aktivní látku a postupně ji uvolňovat. Snahou bylo zjistit, zda se látka uvolňuje do roztoku a jestli po uvolnění v roztoku vykazují filmy antimikrobiální vlastnosti. Zdá se, že poměr zein:chitosan (7:1, 5:1) neměl zásadní vliv na antimikrobiální účinky. Na obrázcích se nachází velikosti inhibičních zón aktivních látek o koncentraci 3 % u 2% zein-chitosanových filmů s poměrem zein:chitosan 7:1 a 5:1 v čase pro jednotlivé mikroorganismy (Obrázek 23, Příloha PI, PII). Kromě filmu s poměrem 7:1 u *A. niger* byly v čase nula největší zóny naměřeny pro thymol. U plísně v tomto poměru byla největší

zóna vytvořena u tymiánu. Naopak ve všech jiných případech než AN 7:1 byly naměřeny v čase nula nejmenší inhibiční zóny právě pro tymián. Po 24 hodinách byly účinky filmů s tymiánem ve všech případech nulové.

Z grafů lze vyčíst klesající trend antibakteriálních účinků (Obrázek 23, Příloha PIII). S výjimkou oregana byly všechny vzorky na mikroorganismy po 24 hodinách neúčinné. Vzorky byly odebrány i po 5 a 12 dnech a naměřeny ve všech případech nulové inhibiční zóny. U kvasinky a plísně došlo v čase tři hodiny k vytvoření větší zóny než v čase nula. Tento výsledek je přikládán nedostatečné homogenizaci vzorků a tudíž pravděpodobně větší koncentraci účinné látky v některých filmech. Mastromatteo *et al.* (2009) ve své studii zjistili, že uvolňování thymolu ze zeinového filmu se snižovalo se zvětšující se tloušťkou. Li *et al.* (2012) zase uvádí, že uvolňování thymolu ze zeinového filmu z nanočástic je dvoufázový proces – kdy nejdříve dojde k prudkému uvolnění velkého množství a poté se uvolňování výrazně zpomalí.



Obrázek 23 Velikost inhibiční zóny zein-chitosanového filmu v poměru 7:1 u mikroorganismu *Aspergillus niger*



Obrázek 24 Velikost inhibiční zóny zein-chitosanového filmu s oreganem v poměru 7:1 u mikroorganismu *Aspergillus niger*

Lze vidět, že vzorky poměrně rychle ztrácí antibakteriální účinky (již po 24 hodinách). Mohlo by se spekulovat o tom, že ztráta antibakteriálních účinků je spjata s tvarem filmu. Film je poměrně tenký a má velkou plochu což umožňuje rychlou difuzi aktivních látek do roztoku. Z tohoto důvodu nemají dlouhodobé využití pro průmyslové aplikace. Naopak například enkapsulace esenciálních olejů do zeinových nanofilmů může uvolňování aktivních látek výrazně zpomalit (Parris *et al.*, 2008).

V Příloze P III a na Obrázku 24 jsou fotky reálných filmů odebraných v čase pro jednotlivé mikroorganismy. Na těchto obrázcích lze pozorovat, že největší zóny tvořila plíseň *A. niger*, dále pak, že např u oregana působí na mycelium plísně tak že dochází k jeho zbělení. Také zde lze vidět, že připravené filmy si ne vždy udrží svůj tvar, což může být způsobeno nehomogenitou připravených filmů, která se daným způsobem přípravy nedá více zajistit.



## ZÁVĚR

Práce byla zaměřena na výrobu biokompatibilní směsi z biodegradovatelných, netoxických materiálů. Byly připraveny tedy roztoky a filmy s různými koncentracemi zeinu 0,5 %, 2 %, 5 % a 10 % a o různých poměrech zeinu a chitosanu (1:0, 20:1, 10:1, 7:1 a 5:1). Do směsi byly zakomponovány čtyři aktivní látky (thymol, tymián, oregano a skořice) také o různých koncentracích (2 %, 2,5 % a 3 %). Následně byly vizuálně zhodnoceny, a zkoumány základní fyzikálně-chemické vlastnosti.

Bylo zjištěno, že směsi bez aktivní látky a s největší koncentrací chitosanu vykazují větší stabilitu, než vzorky, do kterých byly přidány esenciální oleje a thymol. Dále byl měřen zeta potenciál, pH a velikost částic. U roztoků byla zkoušena antimikrobiální aktivita vůči grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus*, gramnegativní *Escherichia coli*, kvasinice *Candida parapsilosis* a vláknité mikromycetě *Aspergillus niger* pomocí diskové difuzní metody a bylo zjištěno, že lépe působí roztoky ve vyšších koncentracích u thymolu, tymiánu a oregana na gramnegativní bakterii. Naopak roztoky s vyšším obsahem skořice vytvářeli větší inhibiční zóny u grampozitivní bakterie a působili na rozdíl od předchozích i na vláknitou mikromycetu. Také bylo provedeno testování po 6 měsících a naměřené výsledky byly podobné. Kromě diskové difuzní metody byla stanovena minimální inhibiční koncentrace pro bakterie u 2% thymolu. U gramnegativní došlo k potlačení růstu při 5 mg/ml u grampozitivní až při 20 mg/ml. Nakonec byly stanoveny růstové křivky roztoku s 0,5% zeinem ve všech poměrech zeinu a chitosanu a s přídatkem 2 % thymolu i bez něj. Po vyhodnocení lze říci, že všechny vzorky obsahující 2% thymol vykazovaly inhibiční účinky.

V další části práce byly vytvořeny filmy odlitím a následným sušením. Vyrobili se povedly filmy s minimálním obsahem zeinu 2 %. Takto připravené filmy byly podrobeny také difuzní diskové metodě. Z výsledků bylo patrné, že filmy měly mnohem větší antimikrobiální aktivitu a to především u vláknité mikromycety *Aspergillus niger*, na kterou roztoky vůbec neúčinkovali. Nakonec byla provedena studie zaměřená na uvolňování aktivních látek v čase. Vzorky byly odebírány v čase 0, 3 h a 1, 5 a 12 dnů. Většina vzorků po 24 hodinách již nevykazovala žádné inhibiční účinky.

V posledních letech byla velká pozornost zaměřena na výzkum nákladově efektivních náhrad komoditních plastů na bázi ropy biodegradabilními materiály nabízejícími konkurenceschopné mechanické vlastnosti. Biopolymery byly a jsou v tomto směru považovány za nejslibnější materiály. Obecně však vykazují špatné mechanické vlastnosti,

co se týče zpracovatelnosti a konečné použití, jelikož křehkost vykazovaná během tváření za tepla může omezit jejich potenciál pro aplikaci. Za účelem překonání tohoto problému se přidávají změkčovadla, aby se zajistila nezbytná zpracovatelnost biopolymerů. Použití přírodních a biologicky rozložitelných změkčovadel s nízkou toxicitou a dobrou kompatibilitou s několika plasty, pryskyřicemi, kaučukem a elastomery jako náhradou za konvenční změkčovadla, jako jsou ftaláty a jiná syntetická konvenční změkčovadla, přitahují trh spolu s rostoucím celosvětovým trendem používání biopolymerů.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

ABDULBAQI, Ibrahim, Yusrida DARWIS, Nurzalina ABDUL KARIM KHAN, Reem ABOU ASSI a Arshad ALI KHAN. Ethosomal nanocarriers: the impact of constituents and formulation techniques on ethosomal properties, in vivo studies, and clinical trials. *International Journal of Nanomedicine* [online]. [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.2147/IJN.S105016. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <https://www.dovepress.com/ethosomal-nanocarriers-the-impact-of-constituents-and-formulation-tech-peer-reviewed-article-IJN>

ADZITEY, F., 2015. Antibiotic classes and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from selected poultry; a mini review. *World's Veterinary Journal*. **5**(3), 36-41. ISSN 2322-4568.

AKBARZADEH, Abolfazl, Rogaie REZAEI-SADABADY, Soodabeh DAVARAN, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2013, **8**(1) [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1186/1556-276X-8-102. ISSN 1556-276X. Dostupné z: <https://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/1556-276X-8-102>

AMIN, T. a BHAT, S. W. A Review on Phytosome Technology as a Novel Approach to Improve The Bioavailability of Nutraceuticals. *International Journal of Advancements in Research & Technology* [online]. 2012, **1**(3), 43-57. [cit. 2020-05-15] ISSN 2278-7763. Dostupné z: [https://www.academia.edu/2236642/A\\_Review\\_on\\_Phytosome\\_Technology\\_as\\_a\\_Novel\\_Approach\\_to\\_Improve\\_The\\_Bioavailability\\_of\\_Nutraceuticals](https://www.academia.edu/2236642/A_Review_on_Phytosome_Technology_as_a_Novel_Approach_to_Improve_The_Bioavailability_of_Nutraceuticals)

AMINOV, Rustam I., 2010. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Frontiers in Microbiology*. **1**. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00134. ISSN 1664-302X. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2010.00134/abstract>

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2001, **49**(6), 1049-1049 [cit. 2020-05-14]. DOI: 10.1093/jac/dkf083. ISSN 14602091. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkf083>

ANTIKA, L D, D TRIANA a T ERNAWATI, 2020. Antimicrobial activity of quinine derivatives against human pathogenic bacteria. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. **462**. DOI: 10.1088/1755-1315/462/1/012006. ISSN 1755-1315. Dostupné také z: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/462/1/012006>

AZIZI, Ali, Feng YAN a Bernd HONERMEIER, 2009. Herbage yield, essential oil content and composition of three oregano (*Origanum vulgare* L.) populations as affected by soil moisture regimes and nitrogen supply. *Industrial Crops and Products*. **29**(2-3), 554-561. DOI: 10.1016/j.indcrop.2008.11.001. ISSN 09266690. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669008002057>

BAGAMBOULA, C.F, M UYTTENDAELE a J DEBEVERE, 2004. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*. **21**(1), 33-42. DOI: 10.1016/S0740-0020(03)00046-7. ISSN 07400020. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002003000467>

BASIRI, Ladan, Ghadir RAJABZADEH a Aram BOSTAN. A-Tocopherol-loaded niosome prepared by heating method and its release behavior. *Food Chemistry* [online]. 2017, **221**, 620-628 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.11.129. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616319781>

BARRETO, Tainá A., Sonalle C. A. ANDRADE, Janeeyre F. MACIEL, et al., 2016. A Chitosan Coating Containing Essential Oil from *Origanum vulgare* L. to Control Postharvest Mold Infections and Keep the Quality of Cherry Tomato Fruit. *Frontiers in Microbiology*. **7**. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01724. ISSN 1664-302X. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01724/full>

BERG, Jeremy M., John L. TYMOCZKO a Lubert STRYER. *Biochemistry*. 5th ed. New York: W. H. Freeman, 2002. ISBN 9780716746843.

BURTON, L., 2005. Physiological Basis for Growth in Extreme Environments. *Structural and Functional Relationships in Prokaryotes*. New York: Springer-Verlag, 348-393. DOI: 10.1007/0-387-27125-2\_8. ISBN 0-387-20708-2. Dostupné také z: [http://link.springer.com/10.1007/0-387-27125-2\\_8](http://link.springer.com/10.1007/0-387-27125-2_8)

CAN BASER, K., M UYTTENDAELE a J DEBEVERE, 2008. Biological and Pharmacological Activities of Carvacrol and Carvacrol Bearing Essential Oils. *Current Pharmaceutical Design*. **14**(29), 3106-3119. DOI: 10.2174/138161208786404227. ISSN

13816128. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002003000467>

BOYLE, W., 1955. Spices and essential oils as preservatives. *The American Perfumer and Essential Oil Review*. **66**(1), 25-28.

BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2004, **94**(3), 223-253 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160504001680>

CARBON, Claude, Raul ISTURIZ a J DEBEVERE, 2002. Narrow Versus Broad Spectrum Antibacterials: their antibacterial properties and potential applications in foods— a review. *Drugs*. **62**(9), 1289-1294. DOI: 10.2165/00003495-200262090-00001. ISSN 0012-6667. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.2165/00003495-200262090-00001>

CARSON, Christine F., Brian J. MEE a Thomas V. RILEY, 2002. Mechanism of Action of Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil on Staphylococcus aureus Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **46**(6), 1914-1920. DOI: 10.1128/AAC.46.6.1914-1920.2002. ISSN 0066-4804. Dostupné také z: <https://AAC.asm.org/content/46/6/1914>

CASCIARO, Bruno, Ivana D'ANGELO, Xiaoping ZHANG, et al., 2019. Poly(lactide- co - glycolide) Nanoparticles for Prolonged Therapeutic Efficacy of Esculentin-1a-Derived Antimicrobial Peptides against Pseudomonas aeruginosa Lung Infection: in Vitro and in Vivo Studies. *Biomacromolecules*. **20**(5), 1876-1888. DOI: 10.1021/acs.biomac.8b01829. ISSN 1525-7797. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.biomac.8b01829>

CHIRILA, T. *Biomaterials and regenerative medicine in ophthalmology*. Boston: CRC Press, 2002. ISBN 978-1-4398-0215-1.

COX, S. D., C. M. MANN, J. L. MARKHAM, H. C. BELL, J. E. GUSTAFSON, J. R. WARMINGTON a S. G. WYLLIE, 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*. **88**(1), 170-175. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.00943.x. ISSN 13645072. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2672.2000.00943.x>

COSGROVE, Daniel J. Re-constructing our models of cellulose and primary cell wall assembly. *Current Opinion in Plant Biology* [online]. 2014, **22**, 122-131 [cit. 2020-05-15].

DOI: 10.1016/j.pbi.2014.11.001. ISSN 13695266. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369526614001538>

COSTA, Raquel a Lúcia SANTOS. Delivery systems for cosmetics - From manufacturing to the skin of natural antioxidants. *Powder Technology* [online]. 2017, **322**, 402-416 [cit. 2020-05-15].

DOI: 10.1016/j.powtec.2017.07.086. ISSN 00325910. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032591017306320>

COVIELLO, Tommasina, Pietro MATRICARDI, Carlotta MARIANECCI a Franco ALHAIQUE. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *Journal of Controlled Release* [online]. 2007, **119**(1), 5-24 [cit. 2020-05-15].

DOI: 10.1016/j.jconrel.2007.01.004. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365907000399>

CRADDOCK, H. A. *Oilfield Chemistry and its Environmental Impact*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2018. ISBN 9781119244233

DE KRUIF, C. G. a R. TUINIER. Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocolloids* [online]. 2001, **15**(4-6), 555-563 [cit. 2020-05-15].

DOI: 10.1016/S0268-005X(01)00076-5. ISSN 0268005X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X01000765>

DESIKAN, Rajat, Pranesh PADMANABHAN a K. Ganapathy AYAPPA. Opening of smaller toxin pores by lipid micelle formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2020, **117**(10), 5107-5108 [cit. 2020-05-15].

DOI: 10.1073/pnas.1921467117. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1921467117>

DI SILVIO, L. *Cellular response to biomaterials*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2009. ISBN 978-1-4200-9373-5

DILL, B. D. The behavior of the prolamines in mixed solvents. II *J. Biol. Chem.* 1927, **72**, 239-247

DONALDSON, Jack R., Steven L. WARNER, Rex G. CATES a D. GARY YOUNG. Assessment of Antimicrobial Activity of Fourteen Essential Oils When Using Dilution and Diffusion Methods. *Pharmaceutical Biology* [online]. 2008, **43**(8), 687-695 [cit. 2020-05-

15]. DOI: 10.1080/13880200500384932. ISSN 1388-0209. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13880200500384932>

ELZOGHBY, Ahmed O., Mayada M. ELGOHARY a Nayra M. KAMEL. Implications of Protein- and Peptide-Based Nanoparticles as Potential Vehicles for Anticancer Drugs. *Protein and Peptide Nanoparticles for Drug Delivery* [online]. Elsevier, 2015, 2015, s. 169-221 [cit. 2020-05-15]. Advances in Protein Chemistry and Structural Biology. DOI: 10.1016/bs.apcsb.2014.12.002. ISBN 9780128028285. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1876162314000625>

ETTAYEBI, Khalil, Jamal EL YAMANI a Badr-Din ROSSI-HASSANI. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2000, **183**(1), 191-195 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb08956.x. ISSN 03781097. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08956.x>

FERDES, M., M. DINCA, L. TOMA a M. PILHUROV, Inhibitory effect of essential oils on common fungal phytopathogens *Fusarium* and *Alternaria*. *International Symposium, ISB-INMA TEH' 2018, Agricultural and mechanical engineering, Bucharest, Romania*. 2018, 609-614.

FERNÁNDEZ-PAN, I., J.I. MATÉ, C. GARDRAT, et al., 2015. Effect of chitosan molecular weight on the antimicrobial activity and release rate of carvacrol-enriched films: in Vitro and in Vivo Studies. *Food Hydrocolloids*. **51**(5), 60-68. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2015.04.033. ISSN 0268005X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X15001988>

FUNATSU, G. a M. SHIBATA, *Modified zein and its production*. 10017595 Patent JP. Uděleno 1998.

GABIUS, Hans-Joachim, Sabine ANDRÉ, Jesús JIMÉNEZ-BARBERO, Antonio ROMERO a Dolores SOLÍS. From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 2011, **36**(6), 298-313 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1016/j.tibs.2011.01.005. ISSN 09680004. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000411000168>

GNIEWOSZ, Małgorzata a Alicja SYNOWIEC. Antibacterial activity of pullulan films containing thymol. *Flavour and Fragrance Journal* [online]. 2011, **26**(6), 389-395 [cit.

2020-05-15]. DOI: 10.1002/ffj.2063. ISSN 08825734. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ffj.2063>

GUARDA, Abel, Javiera F. RUBILAR, Joseph MILTZ, et al., 2011. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol: in Vitro and in Vivo Studies. *International Journal of Food Microbiology*. **146**(2), 144-150. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.011. ISSN 01681605. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016816051100078X>

GUENTHER, E. a D. ALTHAUSEN, 1948. *The essential oils*. New York: Van Nostrand.

GOKMEN, M. Talha a Filip E. DU PREZ. Porous polymer particles - A comprehensive guide to synthesis, characterization, functionalization and applications. *Progress in Polymer Science* [online]. 2012, **37**(3), 365-405 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2011.07.006. ISSN 00796700. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670011000992>

GUPTA, Pratima a Kush Kumar NAYAK. Characteristics of protein-based biopolymer and its application. *Polymer Engineering & Science* [online]. 2015, **55**(3), 485-498 [cit. 2020-05-10]. DOI: 10.1002/pen.23928. ISSN 00323888. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pen.23928>

GUYOT, Alain, Christian GRAILLAT a Cédric FAVERO. Anionic surfmers in mini-emulsion polymerisation. *Comptes Rendus Chimie* [online]. 2003, **6**(11-12), 1319-1327 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1016/j.crci.2003.07.018. ISSN 16310748. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1631074803002054>

HANNAN, Peter C.T., Javiera F. RUBILAR, Joseph MILTZ, et al., 2000. Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species: in Vitro and in Vivo Studies. *Veterinary Research*. **31**(4), 373-395. DOI: 10.1051/vetres:2000100. ISSN 0928-4249. Dostupné také z: <http://www.edpsciences.org/10.1051/vetres:2000100>

HEGDE, Rahul Rama, Anurag VERMA a Amitava GHOSH. Microemulsion: New Insights into the Ocular Drug Delivery. *ISRN Pharmaceutics* [online]. 2013, **2013**, 1-11 [cit. 2020-05-14]. DOI: 10.1155/2013/826798. ISSN 2090-6153. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/archive/2013/826798/>



HEMANTHKUMAR, M., SPANDANA, V. Liposomal encapsulation technology a novel drug delivery system designed for ayurvedic drug preparation. *IRJP*. 2011, 2(10), 4-7.

HILL, Laura E., Carmen GOMES, T. Matthew TAYLOR, et al., 2013. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications: in Vitro and in Vivo Studies. *LWT - Food Science and Technology*. 51(1), 86-93. DOI: 10.1016/j.lwt.2012.11.011. ISSN 00236438. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643812004598>

HOLMES, Peter. *Aromatica A Clinical Guide to Essential Oil Therapeutics: Volume 1: Principles and Profiles*. 1. London: Singing Dragon, 2016. ISBN 978-1-84819-303-1.

HOPKINS, Erin a Sandeep SHARMA. Physiology, Acid Base Balance. *National Center for Biotechnology Information* [online]. StatPearls Publishing, 2019, June 16, 2019 [cit. 2020-05-09]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507807/>

HORNE, David S. Casein micelle structure and stability. *Milk Proteins* [online]. Elsevier, 2008, 2008, s. 133-162 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1016/B978-0-12-374039-7.00005-2. ISBN 9780123740397. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123740397000052>

IVANOVA, Elena P., Kateryna BAZAKA a Russell J. CRAWFORD. *New functional biomaterials for medicine and healthcare*. Oxford: Woodhead publishing, 2014. Woodhead Publishing series in biomaterials. ISBN 978-1-78242-265-5.

JAIWAL, Manjit, Rupesh DUDHE a P. K. SHARMA. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech* [online]. 2015, 5(2), 123-127 [cit. 2020-05-10]. DOI: 10.1007/s13205-014-0214-0. ISSN 2190-572X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13205-014-0214-0>

JONES, Elizabeth A., Yuanyuan CHENG, Denis O'MEALLY a Katherine BELOV, 2017. Characterization of the antimicrobial peptide family defensins in the Tasmanian devil (*Sarcophilus harrisii*), koala (*Phascolarctos cinereus*), and tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *Immunogenetics*. 69(3), 133-143. DOI: 10.1007/s00251-016-0959-1. ISSN 0093-7711. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00251-016-0959-1>

KALE, Santosh Nemichand a Sharada Laxman DEORE. Emulsion Micro Emulsion and Nano Emulsion: A Review. *Systematic Reviews in Pharmacy* [online]. 2016, 8(1), 39-47

[cit. 2020-05-10]. DOI: 10.5530/srp.2017.1.8. ISSN 09758453. Dostupné z: <http://www.sysrevpharm.org/article/97>

KALEMBA, D., A. KUNICKA, T. Matthew TAYLOR, et al., 2003. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils: in Vitro and in Vivo Studies. *Current Medicinal Chemistry*. **10**(10), 813-829. DOI: 10.2174/0929867033457719. ISSN 09298673. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643812004598>

KAPRÁLEK, F., 1986. *Fyziologie bakterií* [1. vyd.], Praha: Státní pedagogické nakladatelství.

KONISHI, Natsumi, Teruhisa FUJIBAYASHI, Takuya TANAKA, Hideto MINAMI a Masayoshi OKUBO. Effects of properties of the surface layer of seed particles on the formation of golf ball-like polymer particles by seeded dispersion polymerization. *Polymer Journal* [online]. 2010, **42**(1), 66-71 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1038/pj.2009.313. ISSN 0032-3896. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/pj2009313>

KOTRA, Lakshmi P., Jalal HADDAD, Shahriar MOBASHERY, et al., 2000. Aminoglycosides: Perspectives on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **44**(12), 3249-3256. DOI: 10.1128/AAC.44.12.3249-3256.2000. ISSN 1098-6596. Dostupné také z: <https://AAC.asm.org/content/44/12/3249>

LAMBERT, R.J.W., P.N. SKANDAMIS, P.J. COOTE a G.-J.E. NYCHAS, 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol: A review. *Journal of Applied Microbiology*. **91**(3), 453-462. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x. ISSN 1364-5072. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>

LANIER, Kathryn A., Anton S. PETROV a Loren Dean WILLIAMS. The Central Symbiosis of Molecular Biology: Molecules in Mutualism. *Journal of Molecular Evolution* [online]. 2017, **85**(1-2), 8-13 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1007/s00239-017-9804-x. ISSN 0022-2844. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00239-017-9804-x>

LEE, Sunggyu a David HENTHORN, ed. *Materials in BIOLOGY AND MEDICINE* [online]. London: Taylor and Francis Group, 2012 [cit. 2020-04-21]. ISBN 13: 978-1-4398-8170-5.

LEMARCHAND, Caroline, Ruxandra GREF a Patrick COUVREUR. Polysaccharide-decorated nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2004, **58**(2), 327-341 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1016/j.ejpb.2004.02.016. ISSN 09396411. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S093964110400092X>

LEUNG, M. Y. K., C. LIU, J. C. M. KOON a K. P. FUNG. Polysaccharide biological response modifiers. *Immunology Letters* [online]. 2006, **105**(2), 101-114 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1016/j.imlet.2006.01.009. ISSN 01652478. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165247806000770>

LEWIS, Andrew, ed. *Drug device combination products: Delivery technologies and applications*. Boston: CRC Press, 2010. ISBN 978-1-84569-470-8

LI, Kang-Kang, Shou-Wei YIN, Xiao-Quan YANG, Chuan-He TANG a Zi-Hao WEI. Fabrication and Characterization of Novel Antimicrobial Films Derived from Thymol-Loaded Zein–Sodium Caseinate (SC) Nanoparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2012, **60**(46), 11592-11600 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1021/jf302752v. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf302752v>

LI, Ying, Anne-Sylvie FABIANO-TIXIER a Farid CHEMAT. *Essential Oils as Reagents in Green Chemistry* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2014 [cit. 2020-05-17]. SpringerBriefs in Molecular Science. DOI: 10.1007/978-3-319-08449-7. ISBN 978-3-319-08448-0.

LIANG, Xiuping, Cuicui MA, Xiaojia YAN, Huanhuang ZENG, David Julian MCCLEMENTS, Xuebo LIU a Fuguo LIU. Structure, rheology and functionality of whey protein emulsion gels: Effects of double cross-linking with transglutaminase and calcium ions. *Food Hydrocolloids* [online]. 2020, **102** [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2019.105569. ISSN 0268005X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X19314249>

LU, Guang Wei a Ping GAO. Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems* [online]. Elsevier, 2010, 2010, s. 59-94 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1016/B978-0-8155-2025-2.10003-4. ISBN 9780815520252. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780815520252100034>

LUO, Yangchao, Boce ZHANG, Monica WHEENT, Liangli (Lucy) YU a Qin WANG. Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of  $\alpha$ -tocopherol, and its in vitro controlled release study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2011, **85**(2), 145-152 [cit. 2020-04-21]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.02.020. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776511000981>

MILLER, Reinhard. Surfactants - In Solution, at Interfaces and in Colloidal Dispersions. By Bob Aveyard. Oxford University Press: Oxford, UK. 2019, 576. ISBN: 9780198828600

MAHMOUD, Kamal, Maher MOHAMED, Ibrahim AMR a Louis DINA. An Overview on Niosomes: A Drug Nanocarrier. *Drug Designing & Intellectual Properties International Journal* [online]. July 11 2018 [cit. 2020-05-10]. DOI: Maher. ISSN 2637-4706. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/328225729\\_An\\_Overview\\_on\\_Niosomes\\_A\\_Drug\\_Nanocarrier](https://www.researchgate.net/publication/328225729_An_Overview_on_Niosomes_A_Drug_Nanocarrier)

MALLOGGI, Florent, Nicolas PANNACCI, Rafaële ATTIA, et al. Monodisperse Colloids Synthesized with Nanofluidic Technology. *Langmuir* [online]. 2010, **26**(4), 2369-2373 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1021/la9028047. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la9028047>

MASTROMATTEO, M., G. BARBUZZI, A. CONTE a M.A. DEL NOBILE. Controlled release of thymol from zein based film. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* [online]. 2009, **10**(2), 222-227 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1016/j.ifset.2008.11.010. ISSN 14668564. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1466856408001124>

MATSUSHIMA, Norio, Gen-ichi DANNO, Hikaru TAKEZAWA a Yoshinobu IZUMI. Three-dimensional structure of maize  $\alpha$ -zein proteins studied by small-angle X-ray scattering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* [online]. 1997, **1339**(1), 14-22 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1016/S0167-4838(96)00212-9. ISSN 01674838. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167483896002129>

MCNAMARA, Joshua T., Jacob L.W. MORGAN a Jochen ZIMMER. A Molecular Description of Cellulose Biosynthesis. *Annual Review of Biochemistry* [online].

2015, **84**(1), 895-921 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060614-033930. ISSN 0066-4154. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-biochem-060614-033930>

MANLEY, Ralph H. a Cyril D. EVANS, 1943. *Binary Solvents for Zein*. **35**(6), 661-665. DOI: 10.1021/ie50402a008. ISSN 0019-7866. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ie50402a008>

MANNHEIM, A. a M. CHERYAN, 1993. Water-Soluble Zein by Enzymatic Modification in Organic Solvents. *Cereal Chemistry*. **70**(2), 115-121.

MATHEIS, G a I. GHORI, 1991. Phosphorylation of food proteins with phosphorus oxychloride—Improvement of functional and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*. **39**(1), 13-26. DOI: 10.1016/0308-8146(91)90081-X. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/030881469190081X>

MEDOŠ, Žiga, Sergej FRIESEN, Richard BUCHNER a Marija BEŠTER-ROGAČ. Interplay between aggregation number, micelle charge and hydration of cationic surfactants. *Physical Chemistry Chemical Physics* [online]. 2020, **22**(18), 9998-10009 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1039/D0CP00877J. ISSN 1463-9076. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=D0CP00877J>

MERCK [online]. 2020 [cit. 2020-05-14]. Dostupné z: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

MICHAŁOWICZ, J.; DUDA, W. Phenols--Sources and Toxicity. *Polish J. of Environ. Stud.* 2007, **16**(3), 347-362

MITTAL, K. L. a Promod KUMAR. *Handbook of microemulsion science and technology*. New York: Marcel Dekker, 1999. ISBN 0824719794.

MORA-HUERTAS, C.E., H. FESSI, A. ELAISSARI a Yoshinobu IZUMI, 2010. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. **385**(1-2), 113-142. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.10.018. ISSN 03785173. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517309007273>

MORGAN, Jacob L. W., Joshua T. MCNAMARA, Michael FISCHER, Jamie RICH, Hong-Ming CHEN, Stephen G. WITHERS a Jochen ZIMMER. Observing cellulose biosynthesis and membrane translocation in crystallo. *Nature* [online]. 2016, **531**(7594), 329-334 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1038/nature16966. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nature16966>

MORIN, José A., Francisco J. CAO, José M. LÁZARO, J. Ricardo ARIAS-GONZALEZ, José M. VALPUESTA, José L. CARRASCOSA, Margarita SALAS a Borja IBARRA. Mechano-chemical kinetics of DNA replication: identification of the translocation step of a replicative DNA polymerase. *Nucleic Acids Research* [online]. 2015, **43**(7), 3643-3652 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1093/nar/gkv204. ISSN 1362-4962. Dostupné z: <http://academic.oup.com/nar/article/43/7/3643/2414502/Mechanochemical-kinetics-of-DNA-replication>

MUKHTAR, S. a I. GHORI, 2012. Antibacterial activity of aqueous and ethanolic extracts of garlic, cinnamon and turmeric against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Bacillus subtilis* DSM 3256. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. **3**(2), 131-136. ISSN 0976-4550.

NYCHAS, G. J. E., H. FESSI, A. ELAISSARI a Yoshinobu IZUMI, 1995. Natural antimicrobials from plants. *New Methods of Food Preservation*. Boston, MA: Springer US, 1995, **385**(1-2), 58-89. DOI: 10.1007/978-1-4615-2105-1\_4. ISBN 978-1-4613-5876-3. ISSN 03785173. Dostupné také z: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-2105-1\\_4](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-2105-1_4)

ODUMOSU, Patricia O, Victoria A OKWORI a Grace O CHRIS-OTUBOR. Quality assessment and antibacterial properties of a commercial clove sample and copper sulphate as ingredients of an herbal mouth wash. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences* [online]. 2019, **9**(1), 032-038 [cit. 2020-05-14]. DOI: 10.30574/gscbps.2019.9.1.0178. ISSN 25813250. Dostupné z: <https://gsconlinepress.com/journals/gscbps/node/962>

OUARHIM, Wafa, Fatima-Zahra SEMLALI AOURAGH HASSANI, Abou el kacem QAISS a Rachid BOUHFID. Rheology of polymer nanocomposites. *Rheology of Polymer Blends and Nanocomposites* [online]. Elsevier, 2020, 2020, s. 73-96 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1016/B978-0-12-816957-5.00005-7. ISBN 9780128169575. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128169575000057>

OLOKE, J.K., 2000. Activity pattern of natural and synthetic antibacterial agents among hospital isolates. *Microbios*. **102**(403), 157-181.

PACKIYASOTHY, E. V. a S. KYLES, 2002. Antimicrobial properties of some herb essential oils. *Food Australia*. **54**(9), 384-387. ISSN 1032-5298.

PADUCH, Roman, Martyna KANDEFER-SZERSZEŃ, Mariusz TRYTEK a Jan FIEDUREK. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* [online]. 2007, **55**(5) [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1007/s00005-

007-0039-1. ISSN 0004-069X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00005-007-0039-1>

PAN, Xiaolei, Yang YANG a Jing-Ren ZHANG, 2019. Molecular basis of host specificity in human pathogenic bacteria. *Structural and Functional Relationships in Prokaryotes*. New York: Springer-Verlag, **3**(1), 1-10. DOI: 10.1038/emi.2014.23. ISBN 0-387-20708-2. ISSN 2222-1751. Dostupné také z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1038/emi.2014.23>

PARK, Seong-Cheol, Joung-Pyo NAM, Jun-Ho KIM, Young-Min KIM, Jae-Woon NAH a Mi-Kyeong JANG, 2015. Antimicrobial Action of Water-Soluble  $\beta$ -Chitosan against Clinical Multi-Drug Resistant Bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*. **16**(12), 7995-8007. DOI: 10.3390/ijms16047995. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/16/4/7995>

PARRIS, Nicholas, Peter H. COOKE, Robert A. MOREAU a Kevin B. HICKS. Encapsulation of Essential Oils in Zein Nanospherical Particles. PARRIS, Nicholas, LinShu LIU, Cunxian SONG a V. Prasad SHASTRI, ed. *New Delivery Systems for Controlled Drug Release from Naturally Occurring Materials* [online]. Washington, DC: American Chemical Society, 2008, 2008-11-07, s. 175-192 [cit. 2020-05-15]. ACS Symposium Series. DOI: 10.1021/bk-2008-0992.ch010. ISBN 0-8412-7424-X. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-2008-0992.ch010>

POMES, A. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. New York: Wiley. 1971.

PLACKETT, David, ed. *Biopolymers – New Materials for Sustainable Films and Coatings*. West Sussex: Wiley, 2011. ISBN 9780470683415.

POOLE-WARREN, L., P. MARTENS a R. GREEN, ed. *Biosynthetic Polymers for Medical Applications*. London: Woodhead Publishing, 2016. ISBN 978-1-78242-105-4.

PURKAIT, Alope, Dipak Kumar HAZRA a K.Sri Rama MURTHY. Liposomes and niosomes-current trends as vesicular pesticide delivery system: A review. *International Journal of Green and Herbal Chemistry* [online]. March 2020 –May 2020, **9**(2), 101-113 [cit. 2020-05-10]. DOI: 10.24214/IJGHC/GC/9/2 /10113. ISSN 2278-3229. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/339973791\\_Liposomes\\_and\\_niosomes-current\\_trends\\_as\\_vesicular\\_pesticide\\_delivery\\_system\\_A\\_review](https://www.researchgate.net/publication/339973791_Liposomes_and_niosomes-current_trends_as_vesicular_pesticide_delivery_system_A_review)

RAMADAN M. F., ASKER M. M. S., TADROS M., 2013. Lipid profile, antiradical power and antimicrobial properties of *Syzygium aromaticum* oil. *Grasas y Aceites* [online]. 31. 12., 64(5), 509–520. ISSN 1988-4214, 0017-3495. Dostupné z: doi:10.3989/gya.011713

RASTOGI, Vinayak, Antonio A. GARCÍA, Manuel MARQUEZ a Orlin D. VELEV. Anisotropic Particle Synthesis Inside Droplet Templates on Superhydrophobic Surfaces. *Macromolecular Rapid Communications* [online]. 2009, , NA-NA [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1002/marc.200900587. ISSN 10221336. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/marc.200900587>

REN, Xiaofeng, Ting HOU, Qiufang LIANG, et al., 2019. Effects of frequency ultrasound on the properties of zein-chitosan complex coacervation for resveratrol encapsulation. *Food Chemistry*. **279**, 223-230. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.11.025. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814618319630>

ROUSSEAU, Colin G., Ting HOU, Qiufang LIANG, et al., 2008. A Review of Glutamate Receptors I: Current Understanding of Their Biology. *Journal of Toxicologic Pathology*. **21**(1), 25-51. DOI: 10.1293/tox.21.25. ISSN 0914-9198. Dostupné také z: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/tox/21/1/21\\_1\\_25/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/tox/21/1/21_1_25/_article)

SAAD, N., C. DELATTRE, M. URDACI, J.M. SCHMITTER a P. BRESSOLLIER, 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology*. **50**(1), 1-16. DOI: 10.1016/j.lwt.2012.05.014. ISSN 00236438. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643812002319>

SANKAR, V., V WILSON, K. SIRAM, A. KARUPPAIAH a A. JUSTIN. TOPICAL DELIVERY OF DRUGS USING ETHOSOMES: A REVIEW. *INDIAN DRUGS* [online]. 2019, 2019, **56**(8) [cit. 2020-05-10]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/336362516\\_TOPICAL\\_DELIVERY\\_OF\\_DRUGS\\_USING\\_ETHOSOMES\\_A\\_REVIEW](https://www.researchgate.net/publication/336362516_TOPICAL_DELIVERY_OF_DRUGS_USING_ETHOSOMES_A_REVIEW)

SANTAJIT, Sirijan a Nitaya INDRAWATTANA. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International* [online]. 2016, **2016**, 1-8 [cit. 2020-05-14]. DOI: 10.1155/2016/2475067. ISSN 2314-6133. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/2475067/>



SANTOYO, S., S. CAVERO, L. JAIME, E. IBAÑEZ, F. J. SEÑORÁNS a G. REGLERO. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Compounds with Antimicrobial Activity from *Origanum vulgare* L: Determination of Optimal Extraction Parameters. *Journal of Food Protection* [online]. 2006, **69**(2), 369-375 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.4315/0362-028X-69.2.369. ISSN 0362-028X. Dostupné z: <https://meridian.allenpress.com/jfp/article/69/2/369/171809/Supercritical-Carbon-Dioxide-Extraction-of>

SATHISHKUMAR, M., K. SNEHA, S.W. WON, et al., 2009. Cinnamon zeylanicum bark extract and powder mediated green synthesis of nano-crystalline silver particles and its bactericidal activity: Current Understanding of Their Biology. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **73**(2), 332-338. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2009.06.005. ISSN 09277765. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776509002410>

SCHMITT, Christophe and TURGEON, Sylvie L., 2011, Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2011. Vol. 167, no. 1-2, p. 63-70. DOI 10.1016/j.cis.2010.10.001. Elsevier BV

SHELEF, L. A., K. SNEHA, S.W. WON, et al., 1984. ANTIMICROBIAL EFFECTS OF SPICES: Current Understanding of Their Biology. *Journal of Food Safety*. **6**(1), 29-44. DOI: 10.1111/j.1745-4565.1984.tb00477.x. ISSN 0149-6085. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1745-4565.1984.tb00477.x>

SEDAGHAT DOOST, Ali, Maryam NIKBAKHT NASRABADI, Vincent KASSOZI, Henriettah NAKISOZI a Paul VAN DER MEEREN. Recent advances in food colloidal delivery systems for essential oils and their main components. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2020, 29 March 2020, **99**, 474-486 [cit. 2020-05-10]. DOI: 10.1016/j.tifs.2020.03.037. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224419306570>

SHAH, Muhammad Ajmal, Kamal NIAZ, Nosheen ASLAM, Celia VARGAS-DE LA CRUZ, Abuzar KABIR, Abdul Haleem KHAN, Fazlullah KHAN a Pharkphoom PANICHAYUPAKARANANT. Analysis of proteins, peptides, and amino acids. *Recent Advances in Natural Products Analysis* [online]. Elsevier, 2020, 2020, s. 723-747 [cit. 2020-05-10]. DOI: 10.1016/B978-0-12-816455-6.00024-X. ISBN 9780128164556. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012816455600024X>

SHANKAR, Shiv a Jong-Whan RHIM. Bionanocomposite Films for Food Packaging Applications. *Reference Module in Food Science* [online]. Elsevier, 2018, 2018 [cit. 2020-05-09]. DOI: 10.1016/B978-0-08-100596-5.21875-1. ISBN 9780081005965. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081005965218751>

SHARADHA M, GOWDA D V, VISHAL GUPTA N a AKHILA A R. An overview on topical drug delivery system – Updated review. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences* [online]. 2020, **11**(1), 368-385 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.26452/ijrps.v11i1.1831. ISSN 0975-7538. Dostupné z: <https://pharmascope.org/index.php/ijrps/article/view/1831>

SHARMA, Vivek, Suraj K. NAYAK, Suprio R. PAUL, Barbicee CHOUDHARY, Sirsendu S. RAY a Kunal PAL. Emulgels. *Polymeric Gels* [online]. Elsevier, 2018, 2018, s. 251-264 [cit. 2020-05-10]. DOI: 10.1016/B978-0-08-102179-8.00009-0. ISBN 9780081021798. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081021798000090>

SHERIN, Farhath, Fels SAJU, Athira JAGADEESH, S. SYAMASREE, Neena PAUL a Athulya VENUGOPAL. Ethosome: A Novel Approach to Enhance Drug Permeation A. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* [online]. 2019, March - April 2019, **55**(1), 18-22 [cit. 2020-05-10]. Dostupné z: <http://www.globalresearchonline.net/>

SHUKLA, Rishi a Munir CHERYAN. Zein: the industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products* [online]. 2001, **13**(3), 171-192 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1016/S0926-6690(00)00064-9. ISSN 09266690. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669000000649>

SIMÃO, Ana Maria Sper, Maytê BOLEAN, Thuanny Alexandra Campos CURY, Rodrigo Guerino STABELI, Rosangela ITRI a Pietro CIANCAGLINI. Liposomal systems as carriers for bioactive compounds. *Biophysical Reviews* [online]. 2015, **7**(4), 391-397 [cit. 2020-05-10]. DOI: 10.1007/s12551-015-0180-8. ISSN 1867-2450. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12551-015-0180-8>

SINGH, Kumar, Mohammad Kashif IQUBAL, Vikesh Kumar SHUKLA a Mohd SHUAIB. Review Article Microemulsions: Current Trends in Novel Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences* [online]. 19 February 2014, **1**(1), 39-51 [cit. 2020-05-10]. Dostupné z:

[https://www.researchgate.net/publication/321018752\\_Review\\_Article\\_Microemulsions\\_Current\\_Trends\\_in\\_Novel\\_Drug\\_Delivery\\_Systems](https://www.researchgate.net/publication/321018752_Review_Article_Microemulsions_Current_Trends_in_Novel_Drug_Delivery_Systems)

SINGH, Kuldeep, Rajat SURI, A. K. TIWARY a Vikas RANA. Chitosan films: crosslinking with EDTA modifies physicochemical and mechanical properties. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2012, **23**(3), 687-695 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1007/s10856-012-4554-1. ISSN 0957-4530. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-012-4554-1>

SLOMKOWSKI, S., ALEMÁN, J. V., GILBERT, R. G., HESS, M., HORIE, K., JONES, R. G., KUBISA, P., MEISEL, I., MORMANN, W., PENCZEK, S., and STEPTO, R. T. (2011). Terminology of polymers and polymerization processes in dispersed systems (IUPAC Recommendations 2011). *Pure and Applied Chemistry* 83, 12, 2229-2259, Available From: De Gruyter<<https://doi.org/10.1351/PAC-REC-10-06-03>> [Accessed 26 April 2020]

SRIKANTH, K. *Figure 6. Structure of micro emulsion* [online]. In: . 2012 [cit. 2020-05-10]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/236151177\\_PARTICULATE\\_CARRIER\\_SYSTEMS\\_A\\_REVIEW/figures?lo=1](https://www.researchgate.net/publication/236151177_PARTICULATE_CARRIER_SYSTEMS_A_REVIEW/figures?lo=1)

SRIYA, K. Charana, Dividevara SAI a P. Ravi SANKAR. Phytosomes: A Novel Approach for Herbal Phytochemicals for Enhancing the Bioavailability. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* [online]. 28-01-2020, **60**(2), 21-26 [cit. 2020-05-08]. ISSN 0976 – 044X. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/340874985\\_130\\_Phytosomes\\_sai](https://www.researchgate.net/publication/340874985_130_Phytosomes_sai)

STEPHEN, Alistair M., Glyn O. PHILLIPS a Peter A. WILLIAMS, ed. *Food Polysaccharides and Their Applications*. Second edition. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. ISBN 10: 0-8247-5922-2.

TADROS, Tharwat F., ed. *Emulsion Formation and Stability* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2013, 2013-01-29, s. 1-75 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1002/9783527647941.ch1. ISBN 9783527647941. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527647941.ch1>

TADROS, Tharwat F. *Formulation Science and Technology: Volume 3: Pharmaceutical, Cosmetic and Personal Care Formulation*. Boston: De Gruyter, 2018. ISBN 978-3-11-058754-8.

TAKAHASHI, Rintaro, Shotaro MIWA, Fabian H. SOBOTTA, Ji Ha LEE, Shota FUJII, Noboru OHTA, Johannes C. BRENDEL a Kazuo SAKURAI. Unraveling the kinetics of the structural development during polymerization-induced self-assembly: decoupling the polymerization and the micelle structure. *Polymer Chemistry* [online]. 2020, **11**(8), 1514-1524 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1039/C9PY01810G. ISSN 1759-9954. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C9PY01810G>

TANG, X. Z., P. KUMAR, S. ALAVI a K. P. SANDEEP. Recent Advances in Biopolymers and Biopolymer-Based Nanocomposites for Food Packaging Materials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2012, **52**(5), 426-442 [cit. 2020-05-10]. DOI: 10.1080/10408398.2010.500508. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2010.500508>

TROMBETTA, Domenico, Francesco CASTELLI, Maria Grazia SARPIETRO, et al. Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2005, **49**(6), 2474-2478 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1128/AAC.49.6.2474-2478.2005. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <https://AAC.asm.org/content/49/6/2474>

UPASE, Amar U., Omprakash G. BHUSNURE, Sachin B. GHOLVE, Padmaja S. GIRAM a Pragati B. WATTAMWAR. A review on Phytosome loaded with novel herbal drug and their formulation, standardization and applications. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. [online]. 2019, 15 June 2019, **9**(3), 765-769 [cit. 2020-05-10]. DOI: 10.22270/jddt.v9i3-s.2947. Dostupné z: <http://jddtonline.info>

VALÍČEK, P. *Koření a jeho léčivé účinky*. Benešov: Start. 2005, ISBN 978-80-8623134-1.

VELDHUIZEN, Edwin J. A., Johanna L. M. TJEERDSMA-VAN BOKHOVEN, Cindy ZWEIJTZER, Sara A. BURT a Henk P. HAAGSMAN, 2006. Structural Requirements for the Antimicrobial Activity of Carvacrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**(5), 1874-1879. DOI: 10.1021/jf052564y. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf052564y>

VISSERS, Maud N., Peter L. ZOCK, Annet J. C. ROODENBURG, Rianne LEENEN a Martijn B. KATAN. Olive Oil Phenols Are Absorbed in Humans. *The Journal of Nutrition* [online]. 2002, **132**(3), 409-417 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1093/jn/132.3.409. ISSN 0022-3166. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jn/article/132/3/409/4687293>

VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.

VONÁŠEK, František, Ladislav NOVOTNÝ a Emilie TREPKOVÁ, 1987. *Látky vonné a chuťové*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury.

WAGNER, Andreas a Karola VORAUER-UHL. Liposome Technology for Industrial Purposes. *Journal of Drug Delivery* [online]. 2011, **2011**, 1-9 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1155/2011/591325. ISSN 2090-3014. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/jdd/2011/591325/>

WATTANASATCHA, Anna, Sirirat RENGPIPAT a Supason WANICHWECHARUNGRUANG. Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2012, **434**(1-2), 360-365 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.06.017. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037851731200614X>

What are proteins and what do they do? *U. S. National Library of Medicine* [online]. April 28, 2020 [cit. 2020-05-09]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/howgeneswork/protein>

YANAGISHITA, Takashi, Ryoko FUJIMURA, Kazuyuki NISHIO a Hideki MASUDA. Fabrication of Monodisperse Polymer Nanoparticles by Membrane Emulsification Using Ordered Anodic Porous Alumina. *Langmuir* [online]. 2010, **26**(3), 1516-1519 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1021/la903913h. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la903913h>

ZADÁK, Zdeněk. *Výživa v intenzivní péči*. 2., rozš. a aktualiz. vyd. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-2844-5.

ZOOK, Justin M. a Wyatt N. VREELAND. Effects of temperature, acyl chain length, and flow-rate ratio on liposome formation and size in a microfluidic hydrodynamic focusing device. *Soft Matter* [online]. 2010, **6**(6) [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1039/b923299k. ISSN 1744-683X. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b923299k>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

AN	<i>Aspergillus niger, A. niger</i>
C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Kyselina octová ledová
COOH	Karboxylová skupina
CP	<i>Candida parapsilosis, C. parapsilosis</i>
EC	<i>Escherichia coli, E. coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium, S. aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa a Enterobacter</i>
HCl	Kyselina chlorovodíková
Hg	Rtuť
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Dihydrogenfosforečnan draselný
KCl	Chlorid draselný
LET	Liposomální enkapsulační technologie
MBC	Minimální baktericidní koncentrace
MH	Müller-Hinton
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MPB	Masopeptonový bujón
N <sub>2</sub>	Dusík
NaCl	Chlorid sodný
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Hydrogenfosforečnan sodný
O/V	Olej ve vodě
SA	<i>Staphylococcus aureus, S. aureus</i>
SDS	Dodecylsulfát sodný
Th	Thymol
V/O	Voda v oleji

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 Struktura mikroemulze (Srikanth, 2012) .....	16
Obrázek 2 Schématické znázornění nosných systémů (Sedaghat Doost <i>et al.</i> , 2020).....	21
Obrázek 3 Chemická struktura glycinu .....	26
Obrázek 4 Chemická struktura thymolu .....	41
Obrázek 5 Chemická struktura karvacrolu .....	41
Obrázek 6 Chemická struktura $\gamma$ -terpinenu .....	42
Obrázek 7 Chemická struktura p-cymenu .....	42
Obrázek 8 Chemická struktura trans-cinnamaldehydu .....	43
Obrázek 9 Hodnoty zeta potenciálu a pH pro vzorek s různou .....	57
Obrázek 10 Hodnoty zeta potenciálu a pH pro vzorek .....	57
Obrázek 11 Hodnoty zeta potenciálu a pH pro vzorek .....	58
Obrázek 12 Hodnoty zeta potenciálu a pH pro vzorek s různou .....	59
Obrázek 13 Závislost velikosti částic na koncentraci thymolu.....	62
Obrázek 14 Závislost velikosti částic na koncentraci tymiánu .....	63
Obrázek 15 Závislost velikosti částic na koncentraci skořice .....	64
Obrázek 16 Závislost velikosti částic na koncentraci oregana .....	65
Obrázek 17 Průměrné hodnoty velikosti částic v roztoku zein:chitosan 7:1 .....	66
Obrázek 18 Závislost velikosti částic na koncentraci zeinu u roztoku zein:chitosan 5:1 ...	66
Obrázek 19 Inhibiční zóny jednotlivých mikroorganismů (SA: <i>S. aureus</i> , EC: <i>E. coli</i> , CP: <i>C. parapsilosis</i> , AN: <i>A. niger</i> ) .....	73
Obrázek 20 Závislost optické denzity na čase pro vzorky s různým poměrem zeinu a chitosanu u <i>Escherichia coli</i> .....	75
Obrázek 21 Skořicový film.....	76
Obrázek 22 Inhibiční zóny filmů u jednotlivých mikroorganismů.....	76
Obrázek 23 Velikost inhibiční zóny zeinchitosanového filmu v poměru 7:1 u mikroorganismu <i>Aspergillus niger</i> .....	79
Obrázek 24 Velikost inhibiční zóny zeinchitosanového filmu s oreganem v poměru 7:1 u mikroorganismu <i>Aspergillus niger</i> .....	79

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Složení vybraných esenciálních olejů .....	39
Tabulka 2 Přidávky jednotlivých složek pro přípravu pracovních roztoků se 2 % aktivní látky .....	50
Tabulka 3 Seznam použitých kmenů mikroorganismů .....	51
Tabulka 4 Hodnoty pH vzorků s 2% koncentrací aktivní látky.....	61
Tabulka 5 Hodnoty pH vzorků s 2,5% koncentrací aktivní látky.....	61
Tabulka 6 Hodnoty pH vzorků s 3% koncentrací aktivní látky.....	61
Tabulka 7 Vizuální hodnocení zákalu .....	67
Tabulka 8 Velikost inhibičních zón pro thymol .....	69
Tabulka 9 Velikost inhibičních zón pro tymián.....	70
Tabulka 10 Velikost inhibičních zón pro skořici .....	71
Tabulka 11 Velikost inhibičních zón pro oregano .....	72
Tabulka 12 Velikost inhibičních zón aktivních látek naměřených po 6 měsících.....	73
Tabulka 13 Inhibiční zóny zeinchtosanových filmů u jednotlivých mikroorganismů.....	77
Tabulka 14 Inhibiční zóny filmů po 6 měsících .....	77



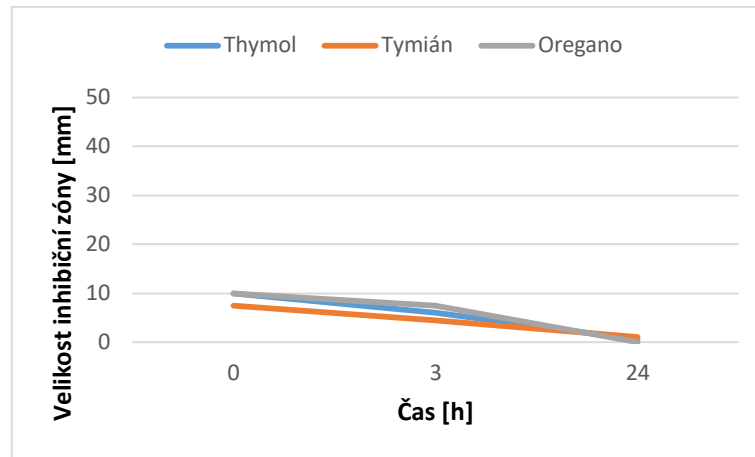
**SEZNAM PŘÍLOH**

PŘÍLOHA P I: Inhibiční zóny mikroorganismů u Zeinchitosanových filmů v poměru 7:1

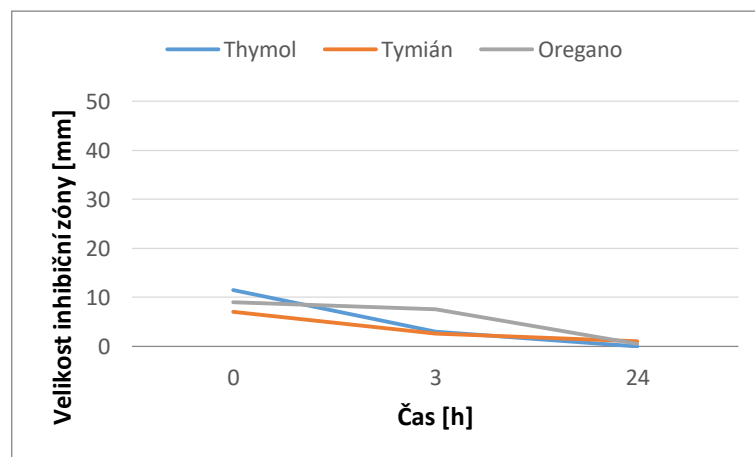
PŘÍLOHA P II: Inhibiční zóny mikroorganismů u Zeinchitosanových filmů v poměru 5:1

PŘÍLOHA P III: Inhibiční zóny mikroorganismů při Uvolňování aktivní látky v čase z filmů Z:CH 7:1

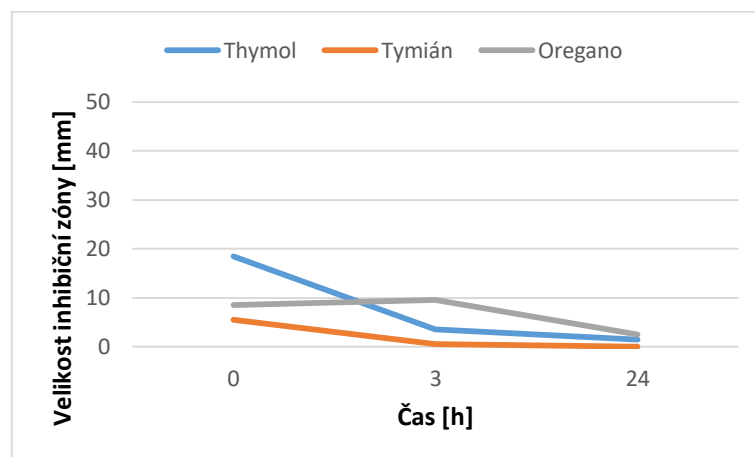
# PŘÍLOHA P I: INHIBIČNÍ ZÓNY MIKROORGANISMŮ U ZEINCHITOSANOVÝCH FILMŮ V POMĚRU 7:1



pozn. *S. aureus*

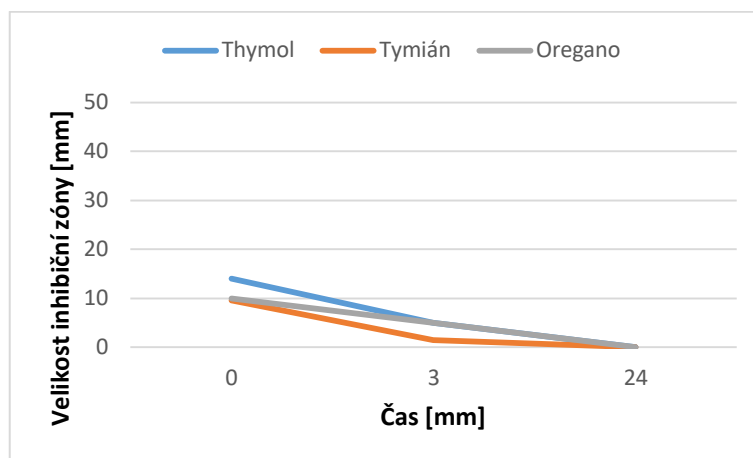


pozn. *E. coli*

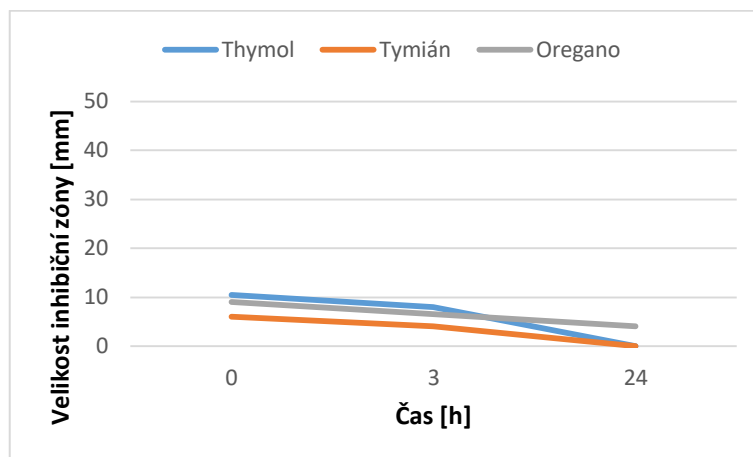


pozn. *C. parapsilosis*

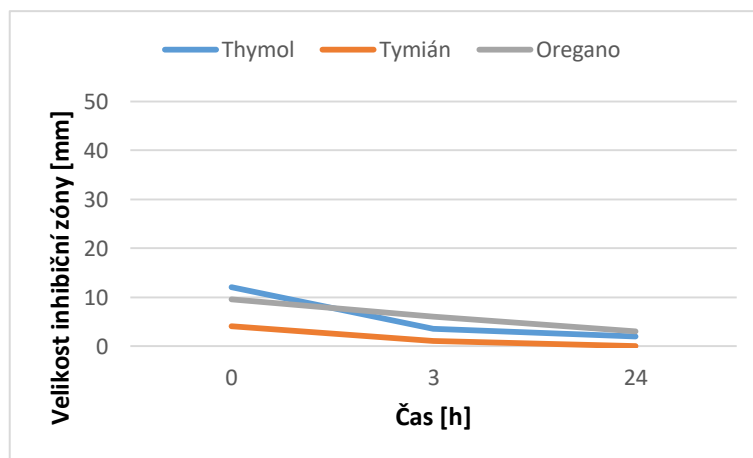
## PŘÍLOHA P II: INHIBIČNÍ ZÓNY MIKROORGANISMŮ U ZEINCHITOSANOVÝCH FILMŮ V POMĚRU 5:1



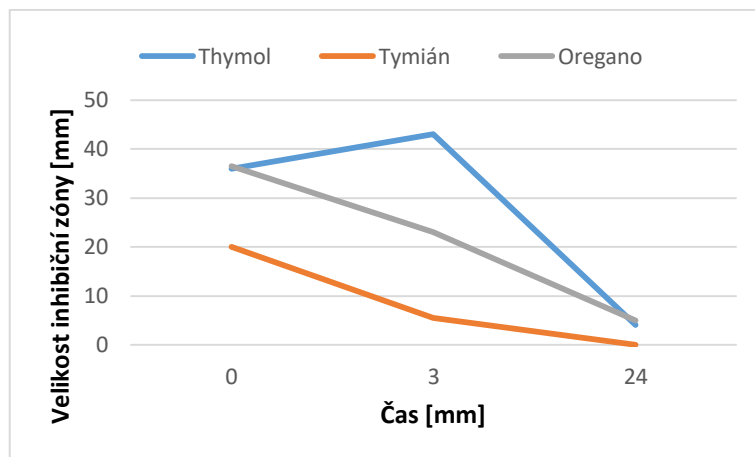
pozn. *S. aureus*



pozn. *E. coli*

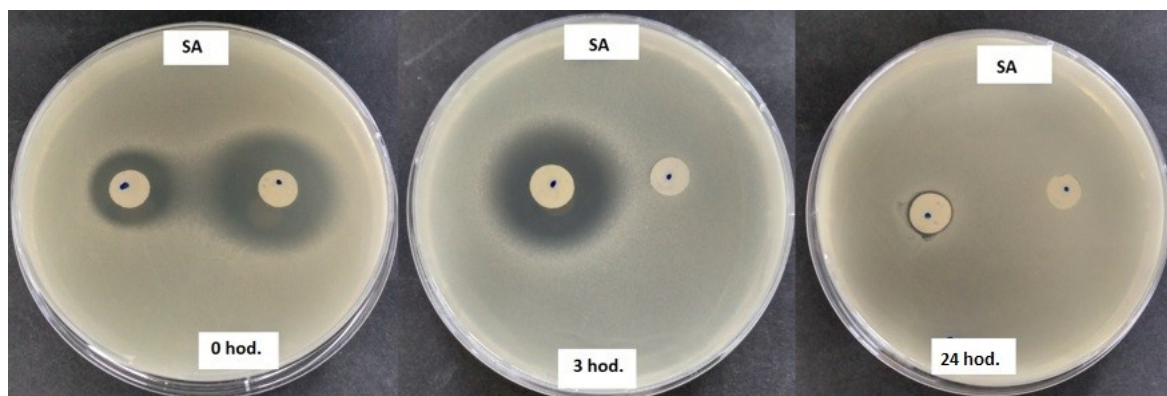


pozn. *C. parapsilosis*

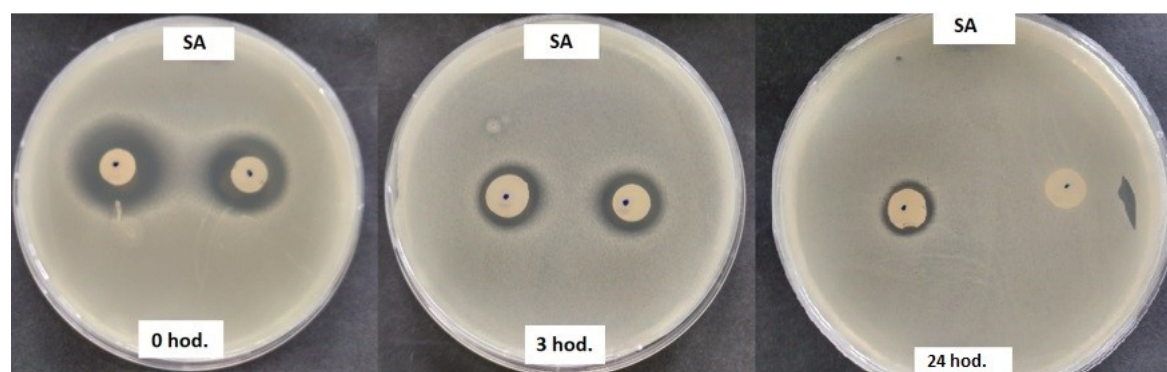


pozn. *A. niger*

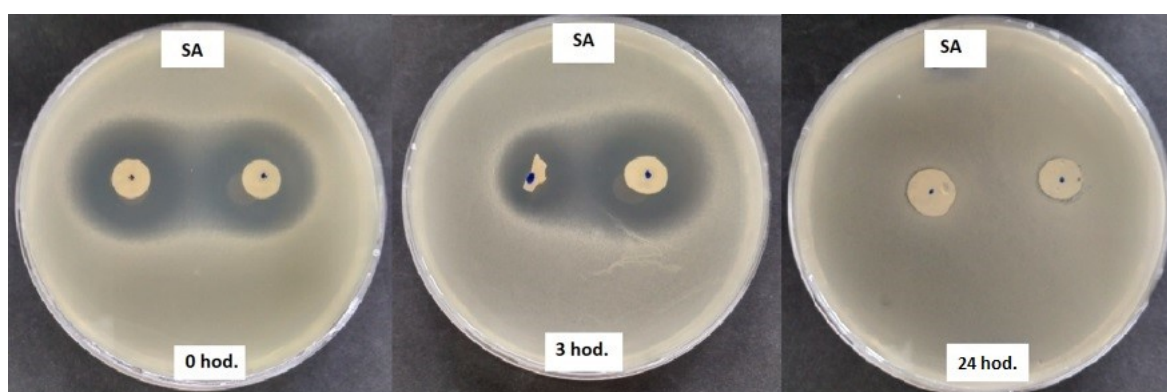
### PŘÍLOHA P III: INHIBIČNÍ ZÓNY MIKROORGANISMŮ PŘI UVOLŇOVÁNÍ AKTIVNÍ LÁTKY V ČASE Z FILMŮ Z:CH 7:1



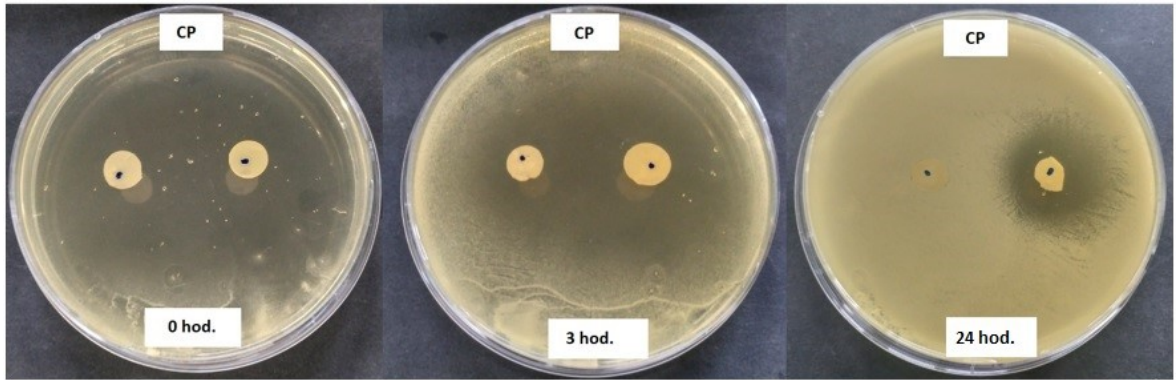
pozn. Aktivní látka thymol, SA- *S. aureus*,



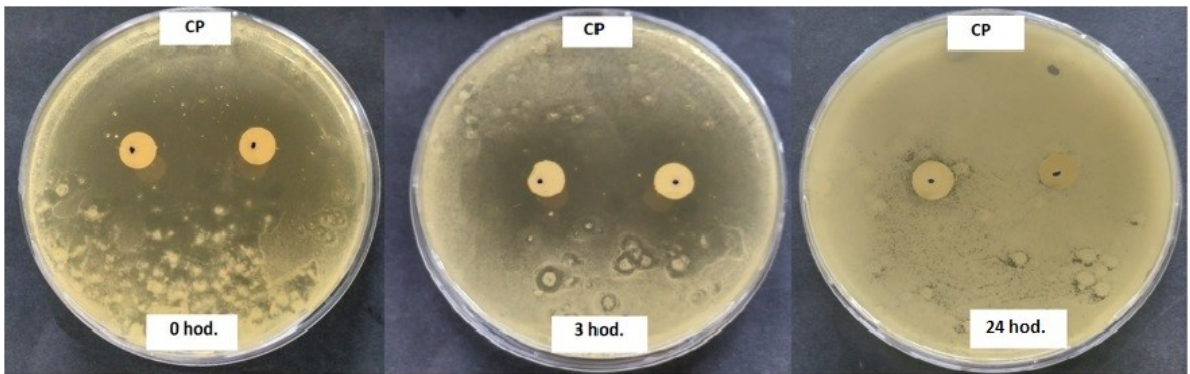
pozn. Aktivní látka tymián, SA- *S. aureus*



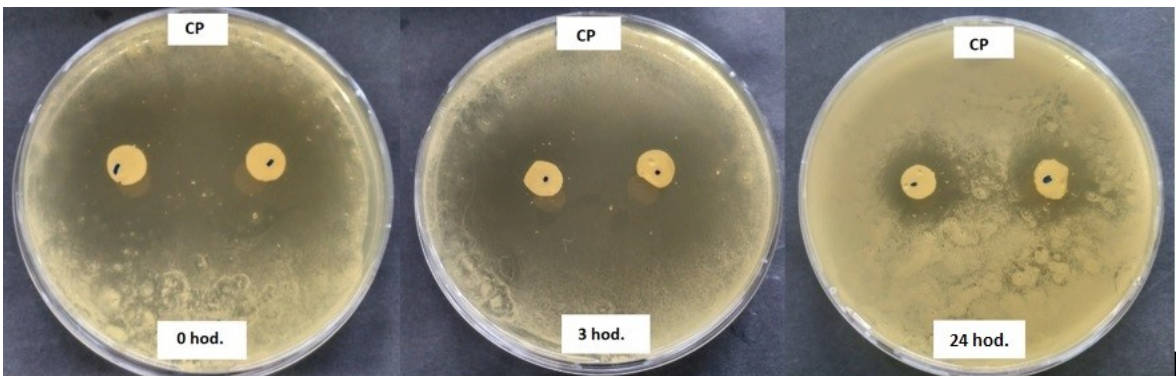
pozn. Aktivní látka oregano, SA- *S. aureus*



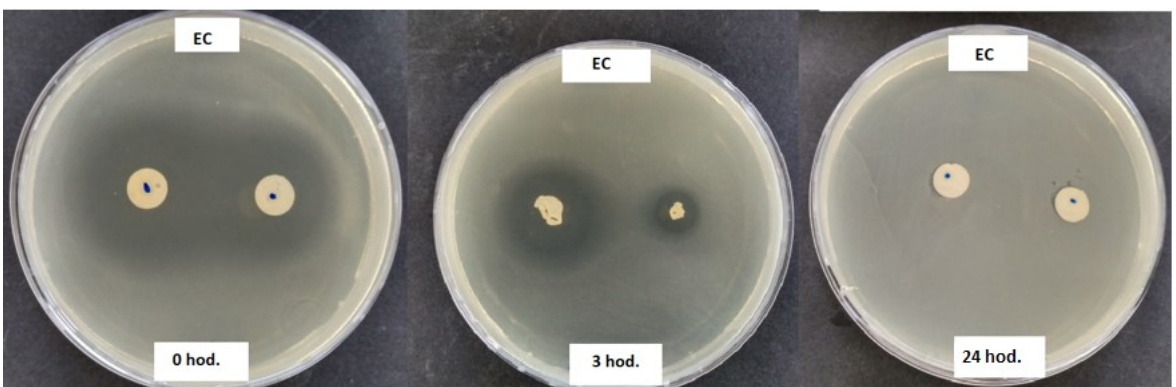
pozn. Aktivní látka thymol, CP- *C. parapsilosis*



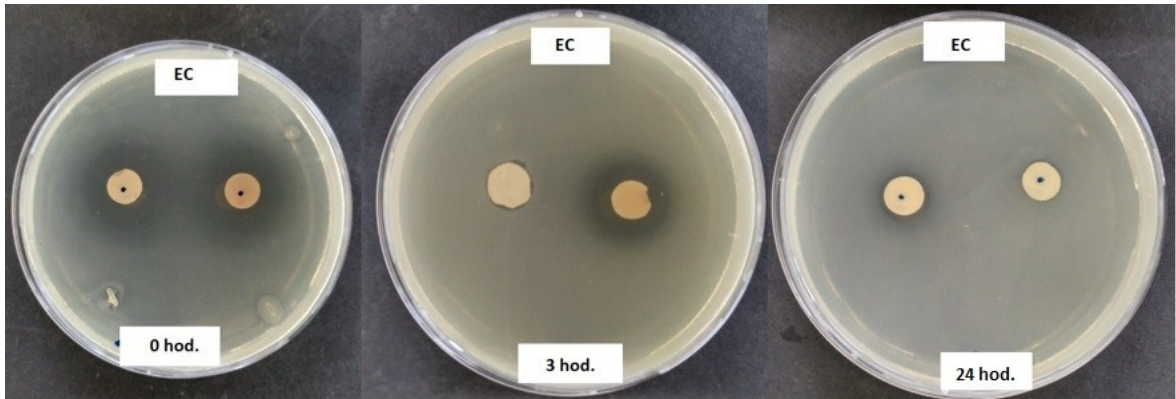
pozn. Aktivní látka tymián, CP- *C. parapsilosis*



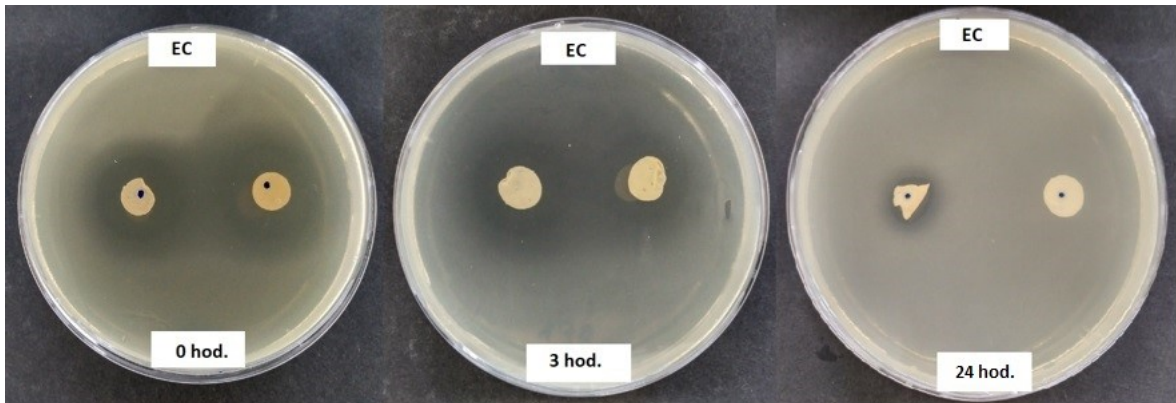
pozn. Aktivní látka oregano, CP- *C. parapsilosis*



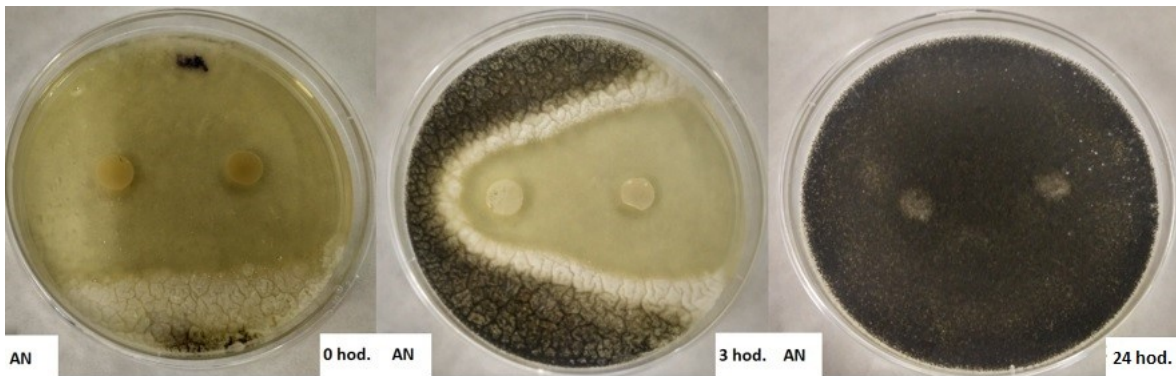
pozn. Aktivní látka thymol, EC- *E. coli*



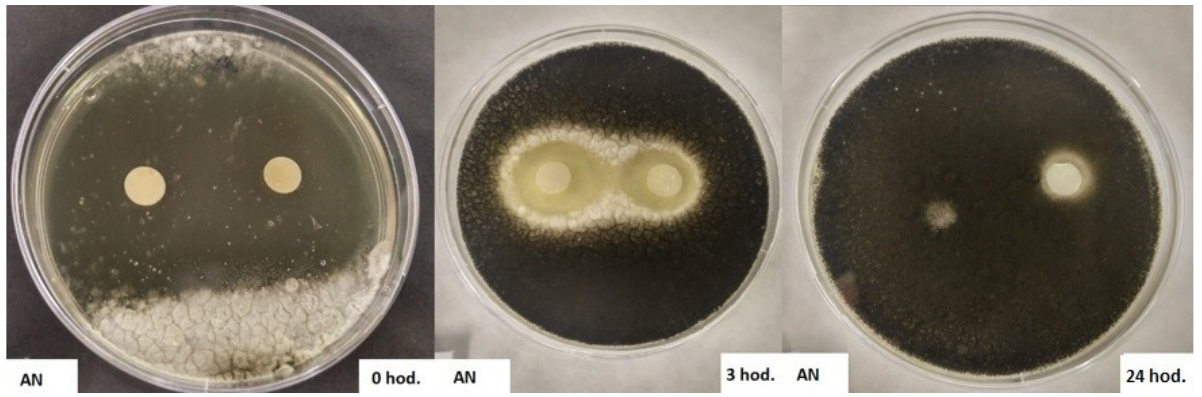
pozn. Aktivní látka tymián, EC- *E. coli*



pozn. Aktivní látka oregano, EC- *E. coli*



pozn. Aktivní látka thymol, AN- *A. niger*



pozn. Aktivní látka tymián, AN- *A. niger*