

Příprava a vlastnosti antimikrobiálních chitosanových roztoků a filmů

Bc. Vendula Varad'ová

Diplomová práce
2018



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Vendula Varadová**
Osobní číslo: **T16230**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Příprava a vlastnosti antimikrobiálních chitosanových roztoků a filmů**

Zásady pro vypracování:

Teoretická část

1. Klasifikace polysacharidů, chitosan struktura, využití.
2. Esenciální oleje jako aktivní antibakteriální látky.
3. Význam a aplikace biopolymerních filmů.

Praktická část

1. Příprava filmotvorných roztoků na bázi chitosan/emulgátor/esenciální olej.
2. Charakterizace filmotvorných roztoků, vliv různých koncentrací emulgační a aktivní látky.
3. Příprava a charakterizace chitosanových filmů fyzikální vlastnosti, antimikrobiální aktivita.
4. Zhodnocení výsledků a diskuze.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. **ELSABEE, M. Z., ABDU, E. S. Chitosan Based Edible Films and Coatings: A Review 2013, C 33, 18191841.**
2. **ŠUPUT, D. Z., LAZIC, V. L. et al. Edible Films and Coatings Sources, Properties and Application. Food and Feed Research 2015, 42, 1122.**
3. **RAMAWAT, K. G., MÉRILLON, J-M. Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology 2015, Springer International Publishing, ISBN 978-3-319-16297-3.**
4. **BASER, K. H. C., BUCHBAUER, G. Handbook of Essential Oils, Science Technology, and Applications 2009, CRC Press, ISBN 978-1-4200-6316-5.**
5. **Databáze elektronických knih a časopisů.**

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Jana Sedlaříková, Ph.D.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

5. února 2018

Termín odevzdání diplomové práce:

18. května 2018

Ve Zlíně dne 5. února 2018



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



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

Příjmení a jméno: VARAJOVÁ VERONIKA

Obor: ITD

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 17.5.2018

.....


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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá problematikou přípravy a vlastností antibakteriálních chitosanových filmů a roztoků. Teoretická část je zaměřena na charakteristiku chitosanu, jako významného zástupce polysacharidů, dále pak na využití chitosanových a dalších biopolymerních filmů, zejména pak v potravinářství a zdravotnictví. Poslední část je věnována složení a vlastnostem esenciálních olejů se zaměřením na olej tymiánový.

Praktická část zahrnuje chromatografickou analýzu použitých esenciálních olejů. Dále se soustřeďuje na přípravu a charakterizaci chitosanových roztoků a filmů, zejména na fyzikální a povrchové vlastnosti, které mají významný vliv na aplikace v praxi.

Klíčová slova:

Antimikrobiální aktivita, emulgátor, esenciální olej, fyzikální vlastnosti, chitosan, tymiánový olej.

ABSTRACT

This thesis studies preparation and properties of antimicrobial chitosan films and solutions. The theoretical part is focused on characterization of chitosan as important polysaccharide, and application of chitosan and other biopolymer films, especially in food industry and health care. The last part is devoted to the composition and properties of essential oils, with the accent on thyme oil. The practical part includes chromatographic analysis of applied essential thyme oils. Also, the preparation and characterization of chitosan films/solutions, mainly their physical and surface properties with a significant impact for practical applications, were investigated

Keywords:

Antimicrobial activity, chitosan, emulsifier, essential oil, physical properties, thyme oil.

Tímto bych chtěla poděkovat své vedoucí práce Ing. Janě Sedlaříkové, Ph.D. za cenné rady, odbornou pomoc, vřící přístup a trpělivost, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout. Dále děkuji Ing. Ondřeji Rudolfovi, Ph.D., Ing. Petře Peer, Ph.D., paní laborantce Lence Plechačové z Ústavu technologie tuků, tenzidů a kosmetiky a kolektivu laboratoří Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí. V neposlední řadě patří velký vděk mé rodině a přátelům, kteří mě během studia vždy podporovali.

Věnováno mamince ...

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 POLYSACHARIDY	12
1.1 ŠKROB.....	12
1.2 CELULÓZA.....	13
1.3 CHITIN.....	14
1.3.1 Struktura chitinu.....	14
1.4 CHITOSAN	15
1.4.1 Výroba chitosanu	15
1.4.1.1 Chemická metoda deacetylce.....	15
1.4.1.2 Enzymatická metoda deacetylce	16
1.4.2 Charakterizace chitosanu	17
1.4.3 Biologické vlastnosti chitosanu.....	18
1.4.4 Antimikrobiální aktivita chitosanu.....	19
1.4.5 Deriváty chitosanu	20
1.5 VYUŽITÍ CHITOSANU	21
1.5.1 Kosmetika	21
1.5.2 Řízené uvolňování léčiv	21
1.5.2.1 Chitosanové micely.....	23
1.5.2.2 Chitosanové hydrogely	24
1.5.3 Tkáňové inženýrství	25
1.5.4 Hojení ran.....	25
1.5.5 Chitosan jako funkční přísada do potravin.....	27
1.5.6 Potravinové obaly.....	27
2 VÝZNAM A APLIKACE ANTIBAKTERIÁLNÍCH BIOPOLYMERNÍCH FILMŮ	28
2.1.1 Filmy na bázi chitosanu	29
2.1.2 Filmy na bázi celulózy	30
2.1.3 Filmy na bázi proteinů	30
2.1.3.1 Zein	31
2.1.4 Alginátové filmy	31
2.1.5 Filmy na bázi škrobu	32
3 ESENCIÁLNÍ OLEJE	33
3.1 AKTIVNÍ LÁTKY ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ	34
3.1.1 Terpenoidní uhlovodíky	34
3.1.2 Fenylypropanoidy	35
3.1.3 Laktony	35
3.1.4 Neterpenoidní uhlovodíky.....	36
3.2 ANTIMIKROBIÁLNÍ VLASTNOSTI ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ	36
3.3 TYMIÁNOVÝ OLEJ.....	37
4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	39
5 CÍLE PRÁCE	41
II PRAKTICKÁ ČÁST	42

6	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A METODY	43
6.1	CHEMIKÁLIE	43
6.2	POMŮCKY A PŘÍSTROJE	43
6.3	METODIKA	45
6.3.1	Chromatografická analýza esenciálních olejů	45
6.3.2	Příprava zásobního roztoku 1% kyseliny octové	45
6.3.3	Příprava chitosanových roztoků a filmů	46
6.3.4	Stanovení zeta potenciálu a velikosti částic filmotvorných roztoků	46
6.3.5	Stanovení obsahu vlhkosti filmů	47
6.3.6	Stanovení rozpustnosti filmů	47
6.3.7	Stanovení tloušťky filmů	48
6.3.8	Stanovení propustnosti filmů pro vodní páry	48
6.3.9	Stanovení smáčivosti filmů	49
6.3.10	SEM analýza filmů	49
6.3.11	Stanovení antimikrobiální účinnosti filmů	50
6.3.12	FTIR analýza chitosanových filmů	51
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	52
7.1	CHROMATOGRAFICKÁ ANALÝZA ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ	52
7.2	STANOVENÍ VELIKOSTI ČÁSTIC	54
7.3	STANOVENÍ ZETA (Z) POTENCIÁLU	55
7.4	STANOVENÍ OBSAHU VLHKOSTI A ROZPUSTNOSTI	57
7.5	STANOVENÍ TLOUŠŤKY FILMŮ	59
7.6	STANOVENÍ PROPUSTNOSTI PRO VODNÍ PÁRY	60
7.7	STANOVENÍ SMÁČIVOSTI FILMŮ	62
7.8	SEM ANALÝZA FILMŮ	63
7.9	FTIR ANALÝZA CHITOSANOVÝCH FILMŮ	65
7.10	STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINNOSTI	68
	ZÁVĚR	72
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	74
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	85
	SEZNAM OBRÁZKŮ	88
	SEZNAM TABULEK	90

ÚVOD

Chitosan patří díky svým výhodným biologickým vlastnostem mezi velmi zajímavé materiály, které jsou intenzivně studovány za účelem využití v řadě průmyslových oblastí. Jeho modifikace prostřednictvím různých aktivních látek představují nové možnosti vývoje například pro kosmetiku, zdravotnictví, či potravinářství. Jelikož současným trendem je minimalizovat obsah chemických přísad, jsou esenciální oleje vhodnou alternativou k syntetickým antimikrobiálním látkám. V dnešní době jsou například velmi rozšířeny potravinářské aplikace chitosanových filmů s esenciálními oleji, které mají zabránit mikrobiální kontaminaci potravin a přispívat tak k prodloužení jejich životnosti. Pro své aroma jsou nejvíce využívány esenciální oleje tymiánu a bazalky, které jsou vhodné pro výrobu ochranných obalů na masné a rybí výrobky či zeleninu. Jejich antimikrobiální a antioxidační vlastnosti závisí na obsahu účinných látek, jako je karvakrol, eugenol nebo thymol. Využití chitosanu a chitosanových filmů s esenciálními oleji roste i v oblasti zdravotnictví, kde se uplatňují například ve formě obvazového materiálu, nebo v systémech s řízeným uvolňováním léčivých látek. Chitosan se také podílí na zástavě krvácení srážením krve a je schopen podporovat hojení ran.

Významným faktorem v oblasti dané problematiky je zajištění stability biopolymerních systémů a optimalizace jejich fyzikálně-chemických vlastností. Předložená diplomová práce se zabývá přípravou a studiem roztoků a filmů na bázi chitosanu a tymiánového esenciálního oleje v kombinaci s různými neionickými emulgátory. Cílem bylo sledovat vliv této modifikace na bariérové, strukturní, povrchové a antimikrobiální charakteristiky výsledných systémů, které zásadně ovlivňují jejich praktické aplikace.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 POLYSACHARIDY

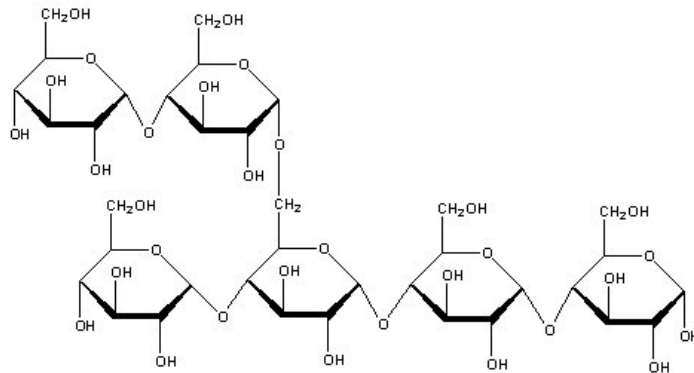
Polysacharidy jsou biologické polymery, které mají nepostradatelný význam v přírodě u rostlin, živočichů, hub a mikroorganismů (celulóza, chitin, pektin, hemicelulóza), ale jsou ve velké míře využívány i v potravinářství, farmacii a dalších průmyslových odvětvích [1], [2, str. 4].

Molekuly polysacharidů obsahují ve své struktuře více jak deset sacharidových jednotek, které jsou navzájem spojeny glykosidickými vazbami. Jednotlivé polysacharidy mohou být tvořeny identickými monosacharidy, v tomto případě se jedná o homopolysacharidy, anebo jsou základní stavební jednotky různé, pak hovoříme o heteropolysacharidech [1], [3, str. 140]. Základními jednotkami jsou nejčastěji D-glukóza, D-galaktóza, D-mannóza, 2-amino-2,6 deoxyglukóza, L-arabinóza, D-xylóza a D-galakturonová kyselina [1].

Polysacharidy můžeme podle funkce dělit na zásobní (např. škrob, glykogen) a stavební (např. celulóza, chitin).

1.1 Škrob

Škrob patří do skupiny zásobních polysacharidů, které obsahují ve svých strukturách méně vodíkových můstků než polysacharidy stavební, což má za následek snazší botnání a přechod do roztoku. Škrob je tvořen glukopyranózovými jednotkami, které jsou spojeny glykosidovou vazbou. Jsou zde přítomny dvě frakce, a to amyulóza a větvený amylopektin [3, str. 142–143], [4, str. 66]. Amyulóza je tvořena lineárními řetězci glukózových jednotek spojených vazbou α -D-(1→4), která je rozpustná v horké vodě. Amylopektin má větvenou strukturu s vazbami α -D-(1→4) a α -D-(1→6). V horké vodě je stabilní za tvorby koloidních viskózních roztoků a mazů. Ve studené vodě je škrob nerozpustný, pouze s minimální absorpcí vody [4, str. 66]. Struktura škrobu je znázorněna na obrázku č. 1.

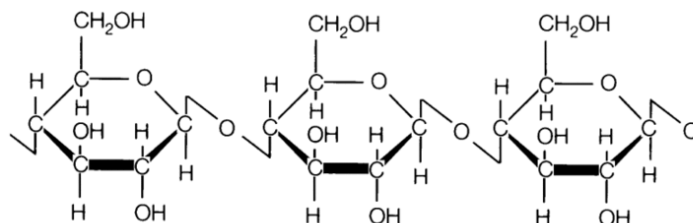


Obr. 1 Struktura škrobu [5]

1.2 Celulóza

Celulóza patří mezi homopolysacharidy, tvořené D-glukozovými zbytky spojenými (1→4) glykosidickými vazbami (Obr. 2). Vznik intermolekulárních vazeb a nerozpustnost celulózy v běžných rozpouštědlech je dán výskytem vodíkových můstků mezi glukozovými zbytky v sousedních řetězcích. Celulóza je schopna vodu pouze vázat a tím zvětšovat svůj objem [2, str. 49], [3, str. 142], [4, str. 67]. Celulózové materiály jsou hojně využívány zejména pro své dobré fyzikální vlastnosti. Ve zdravotnictví jsou používány ve formě obvazového a krycího biomateriálu, který má řadu výhod, jako například:

- obnovitelnost zdrojů,
- čistota,
- biologická nezávadnost,
- biodegradabilita [1].



Obr. 2 Struktura celulózy [6]

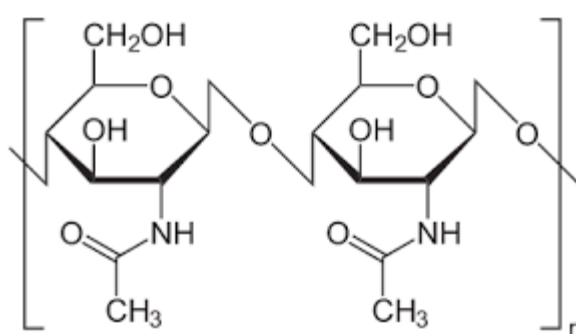
1.3 Chitin

Chitin je v přírodě druhým nejvýznamnějším polysacharidem po celulóze. Od celulózy se liší náhradou hydroxylové skupiny na C₍₂₎ acetamidovou skupinou [2, str. 4], [3, str. 142], [7], [8], [9]. Vyskytuje se nejčastěji v buněčných stěnách hub a řas, dále také u mnoha skupin bezobratlých živočichů, jako jsou například měkkýši a členovci, kde plní podpůrnou funkci exoskeletu [8], [10, str. 16]. Chitin je vysoce hydrofobní, je nerozpustný ve vodě a většině organických rozpouštědlech. Rozpouští se například v hexafluoroisopropanolu, hexafluoroacetonu nebo dimethylacetamidu v přítomnosti chloridu litného [11, str. 21].

Chitin je biokompatibilní, biologicky rozložitelný, netoxický a má dobré adsorpční vlastnosti, které jej předurčují pro různé průmyslové aplikace [10, str. 3].

1.3.1 Struktura chitinu

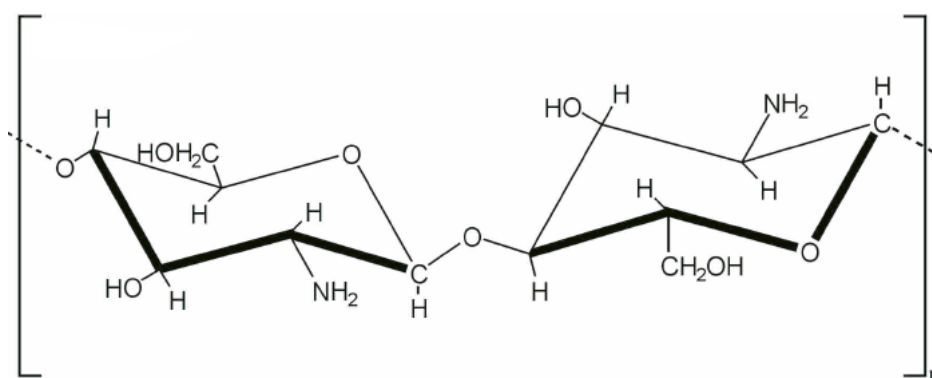
Chitin je vysokomolekulární krystalický polysacharid, jehož struktura je tvořena výhradně N-acetylovanými D-glukosaminovými jednotkami (Obr. 3). Jednotlivé řetězce jsou uspořádány ve vrstvách, přičemž v každé vrstvě mají stejný směr a jsou spojeny vodíkovými vazbami mezi dvěma sousedními řetězci. Existují tři polymorfní formy chitinu, a to α , β a γ chitin, které se od sebe odlišují uspořádáním řetězců. U α -chitinu vyskytujícího se u krabů, humrů a krevet mají sousední (přilehlé) listy opačný směr, a tím i antiparalelní řetězcové uspořádání. Sousední listy β -chitinu mají směr stejný a paralelní řetězcové uspořádání. U γ -chitinu má každý třetí list opačný směr k předchozím dvěma listům [8], [12].



Obr. 3 Struktura chitinu [13]

1.4 Chitosan

Chitosan je biologicky odbouratelný biokompatibilní polymer získávaný z obnovitelných přírodních zdrojů [7]. Z chemického hlediska je to lineární kopolymer jednotek D-glukosaminu a N-acetyl-D-glukosaminu, spojených β -(1 \rightarrow 4) vazbami, s převažujícím zastoupením D-glukosaminu (Obr. 4). Jde o krystalický polymer, ale v porovnání s chitinem jsou sousední řetězce stejného listu více vzdálené, a to z důvodu odstranění N-acetylových skupin při transformaci z chitinu [8].



Obr. 4 Struktura chitosanu [14]

Samotný chitosan je přítomný v myceliích některých hub, v dnešní době se však získává převážně deacetylací chitinu [1], [7], [8], [10, str. 3], [15, str. 2, 16], [16, str. 222–223]. Jako chitosan se obvykle označují produkty s více než 60% stupněm deacetylce, nebo ty, které mohou být rozpuštěny ve zředěných kyselinách [10, str. 16], [15, str. 2].

1.4.1 Výroba chitosanu

1.4.1.1 Chemická metoda deacetylce

Chitin je nejčastěji připravován z exoskeletu krabů a krevet, které byly získány jako odpad při zpracování mořských živočichů [8, str. 223], [10, str. 16], [15, str. 3], [16, str. 223]. Chitin je zde pevně vázán s bílkovinami, anorganickými látkami (CaCO_3), pigmenty a lipidy. Důležitým krokem při výrobě chitosanu z chitinu je deproteinizace a demineralizace, která se provádí působením 1–2 M NaOH při teplotě 70 °C a 1.25 M HCl při teplotě místnosti. U obou postupů je třeba eliminovat riziko nežádoucího štěpení chitinových polymerních řetězců a minimalizovat hydrolyzu glykosidických vazeb během extrakce chitinu. Pigmenty přítomné v exoskeletu korýšů jsou extrahovány ethanolem a acetonem, případně oxidačními činidly jako KMnO_4 [8], [15, str. 3].

Samotná deacetylace může být provedena kyselým i bazickým způsobem. Vzhledem k citlivosti chitinových glykosidických vazeb ke kyselé hydrolyze se upřednostňuje hydrolyza bazická. Deacetylace α -chitinu se provádí za použití silných vodných bází při teplotě 90–150 °C po dobu několika hodin, kdy výsledkem je chitosan se stupněm acetylace 5–30 %. Vysoké reakční teploty vedou sice ke snížení doby potřebné pro deacetylaci, ale zvyšují riziko hydrolyzy polymerních řetězců. V průběhu deacetylace α -chitinu působí NaOH zpočátku na amorfní oblasti polymeru a posléze na oblasti krystalické. Deacetylace β -chitinu je v porovnání s α -chitinem snazší, a to z důvodu nepřítomnosti vodíkových vazeb mezi jednotlivými listy ve struktuře, což umožňuje lepší přístup pro reakční složky. Výsledkem je zcela amorfní produkt [8, str. 223].

Chitosan se specifickým stupněm acetylace může být připraven N-acetylací zcela deacetylovaných chitosanů. Chitosanová N-acetylace je prováděna za pokojových teplot a homogenních podmínek, což vede k náhodnému zavedení acetylových skupin a minimální hydrolyze polymerních řetězců. Proces zahrnuje rozpuštění chitosanu ve zředěném kyselém roztoku před přidáním pomocného rozpouštědla a přidáním acetylačního reakčního acetanhydridu. Tento způsob přípravy je vhodný pro přípravu ve vodě rozpustných chitosanů [8, str. 223].

1.4.1.2 Enzymatická metoda deacetylace

Použitím chitin deacetylázy můžeme nahradit alkalickou metodu pro získání vysoce kvalitního chitosanu enzymatickou cestou. Samotná chitin deacetyláza byla objevena u *Mucor rouxii* nebo u *Colletotrichum lindemuthianum* [10, str. 16], [15, str. 7–8], [17, str. 26]. Chitin deacetylázy jsou získávány i z dalších zdrojů, které ovlivňují relativní molekulovou hmotnost, izoelektrický bod a optimální pH, což vede k rozdílným fyziologickým funkcím. Reakční mechanismus spočívá v systematické enzymatické hydrolyze acetylu z neredukujícího konce vazebného místa poté, co se naváže na substrátový řetězec. Následně substrát opustí a naváže se na jiný [15, str. 7–8].

Enzymatická metoda snižuje míru znečištění životního prostředí, spotřebu energie a také řeší problém dosažení stabilního stupně deacetylace a nízké relativní molekulové hmotnosti, který vzniká při použití klasické chemické metody. Produkt získaný enzymatickou metodou může být použit pro výrobu nových funkčních materiálů [15, str. 7–8].

1.4.2 Charakterizace chitosanu

Nejdůležitějšími parametry, které mají vliv na vlastnosti chitosanu, jsou stupeň deacetylace (DA) a průměrná molekulová hmotnost (M_w) [8, str. 224], [15, str. 5]. Mezi další významné charakteristiky se řadí viskozita ve vodných roztocích, obsah sušiny, množství nerozpustných nečistot a obsah popela. Pro samotnou aplikaci chitosanu jako biomateriálu má zásadní význam mikrobiální kontaminace, přítomnost těžkých kovů, obsah bílkovin a množství bakteriálních endotoxinů [8, str. 224], [15, str. 5].

Stupeň deacetylace (DA) je často uváděn jako důležitý parametr, který určuje mnoho fyzikálně-chemických a biologických vlastností. Mezi tyto vlastnosti patří hustota náboje, krystalinita, rozpustnost, hydrofilita, degradace. Stupeň deacetylace je zpravidla řízen způsobem zpracování přirozeného polymeru alkalickými látkami. Pro stanovení stupně deacetylace byla zavedena řada metod zahrnující elementární analýzu, koloidní titraci polyanionem, adsorpci barviva, spektroskopii v ultrafialové (UV) a infračervené (IR) oblasti, infračervenou spektroskopii s Fourierovou transformací (FT-IR), plynovou chromatografií (GC), vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC), skenovací kalorimetrií či nukleární magnetickou rezonancí ($^1\text{H-NMR}$), která je jednou z nejpřesnějších [8, str. 224], [15, str. 7–8], [16, str. 228–229].

Molekulová hmotnost komerčního chitosanu se liší v závislosti na zdroji, podmínkách deacetylace a pohybuje se v rozmezí od 10^4 do 10^6 g/mol. Pro odhad průměrné molekulové hmotnosti je využíváno několik metod jako kapilární viskozimetrie, ultracentrifugace a rozměrově vylučovací chromatografie (SEC) ve spojení s rozptylem světla. Nejjednodušší metodou pro stanovení je viskozimetrie, kterou ovšem nelze získat absolutní hodnotu [8, str. 224], [15, str. 227].

Rozpustnost chitosanu závisí na hustotě náboje, stupni deacetylace, délce řetězce, distribuci N-acetylovaných glukosaminových jednotek a také na pH prostředí, iontové síle a dielektrické konstantě média. Chitosan s vysokým stupněm deacetylace vykazuje i vyšší rozpustnost, jelikož ta závisí na množství protonovaných aminoskupin v polymerním řetězci, a tedy i podílu acetylovaných a neacetylovaných glukosaminových jednotek. Po protonaci dochází k elektrostatickému odpuzování mezi NH_3^+ skupinami a následně k destrukci vodíkových vazeb mezi řetězci, což má za následek zvýšení rozpustnosti. Vlastnosti chitosanu jsou silně ovlivněny i pH prostředí. Chitosan je silnou bází, jehož primární aminoskupina disponuje hodnotou pK 6.3. Při nízkém pH se aminy protonují a stávají se pozitivně nabitě, což činí

chitosan ve vodě rozpustným. Na druhé straně při zvyšujícím se pH nad hodnotu 6 dochází k deprotonaci chitosanových aminů, polymer ztrácí náboj a stává se nerozpustným. Při pH 6–6.5 může docházet ke srážení nebo gelovatění roztoku, kdy dochází k tvorbě komplexu polyiontů s aniontovým hydrokolloidem za tvorby gelu [8, str. 224], [16, str. 228].

1.4.3 Biologické vlastnosti chitosanu

Pro své vlastnosti, kterými jsou biokompatibilita, biodegradabilita nebo netoxičita, je chitosan využíván v mnoha biomedicínských oblastech. Biologická odbouratelnost chitosanu je dána přítomností mnoha proteáz jako je pepsin, lysozym nebo papain, které jsou přítomny v tělech savců. Jejich hlavním úkolem je degradace chitosanu na netoxické oligosacharidy, které jsou následně začleněny do metabolických drah nebo vyloučeny [10, str. 19–20].

Biokompatibilita chitosanu byla prokázána na řadě buněčných linií *in vitro*, jako jsou například fibroblasty, endoteliální, epiteliální a myokardiální buňky, hepatocyty a chondrocyty. Další studie odhalily vliv stupně deacetylace (DA) na toxicitu, kdy bylo prokázáno, že chitosan s DA nad 35 % je méně toxický. Naopak molekulová hmotnost na toxicitu chitosanu vliv nemá [10, str. 19–20].

Chitosan vykazuje i další vlastnosti jako analgetické, protinádorové, hemostatické, hypocholesterolemické a antioxidační. Většina z nich je přisuzována jeho kationické povaze. Důležitý je ale i stupeň deacetylace a molekulová hmotnost. V Tabulce 1 jsou uvedeny biologické vlastnosti chitosanu a faktory, které je ovlivňují [10, str. 19–20].

Tab. 1 Vlastnosti chitosanu [10, str. 19–20]

Vlastnost/účinek	Faktor
Biodegradabilita	DA, distribuce acetylových skupin, Mw
Biokompatibilita	DA
Hemostatický	DA, Mw
Zlepšení adsorpce	DA
Antimikrobika	Mw
Antioxidační	DA, Mw

1.4.4 Antimikrobiální aktivita chitosanu

Chitosan vykazuje širokospektrální antimikrobiální aktivitu proti bakteriím, kvasinkám a plísním. Je efektivní proti Gram-pozitivním (G^+) a Gram-negativním (G^-) mikroorganismům jako jsou *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida*, *Aspergillus* a mnoho dalších. Této aktivity je možné využít například při výrobě ochranných obalových materiálů pro potraviny, které ovšem vykazují slabé mechanické vlastnosti, propustnost pro plyny a vodní páry, což značně omezuje jejich použití [7], [16, str. 223].

Přesný mechanismus antimikrobiální aktivity chitosanu není zcela objasněn, bylo ovšem navrženo několik modelů. Nejpravděpodobnější z nich je, že antimikrobiální účinek chitosanu způsobuje jeho polykationická povaha [16, str. 224]. Například u bakterií vyvolává chitosan strukturální změny v membránách, což vede k poškození povrchových buněk a následně k usmrcení bakterií. Inhibice růstu bakterií souvisí se schopností chitosanu vyvolat elektrostatické interakce mezi kationickými aminoskupinami chitosanu a negativními zbytky na povrchu buňky, jako jsou kyseliny N-acetylmuramová, kyselina sialová a kyselina neuraminová. Počet protonovaných aminoskupin přítomných v chitosanu se zvyšuje s mírou deacetylace. Vedle elektrostatických interakcí se předpokládá, že k bakteriostatickým účinkům přispívají také hydrofobní interakce vyvolané přítomností N-acetylovaných zbytků v chitosanu, přičemž vysoce acetylované chitosany jsou považovány za vynikající flokulanty bakteriálních suspenzí *Escherichia coli* [7], [8, str. 225–226], [10, str. 7]. Dalším mechanismem je například chelatace některých volných iontů, které brání oxidaci lipidů [18, str. 23–24].

Antimikrobiální aktivita chitosanu závisí na molekulové hmotnosti, stupni deacetylace, pH, teplotě, typu substituentů, typu bakterií a prostředí [7], [8, str. 225–226], [10, str. 7], [15, str. 23], [18, str. 23]. Se zvyšující se molekulovou hmotností antimikrobiální aktivita chitosanu roste. Chitosan s vysokou molekulovou hmotností totiž není schopen procházet buněčnými membránami a vytváří film, který chrání buňky před přenosem živin přes membránu mikrobiálních buněk [10, str. 7]. Deriváty chitosanu s nízkou molekulovou hmotností jsou naopak schopny proniknout do buňky a navázat se na DNA, což vede k inhibici syntézy RNA a proteinu. Nicméně jelikož není přesně určena hranice molekulové hmotnosti pro tzv. nízko a vysokomolekulární chitosan, je obtížné stanovit korelaci právě mezi molekulovou hmotností a antimikrobiální aktivitou [16, str. 235].

Jiná situace je u stupně deacetylace, kde je prokázáno, že s jeho zvyšováním roste i antimikrobiální aktivita. Důsledkem je nárůst počtu protonovaných aminoskupin a tím i lepší rozpustnost chitosanu, což vede ke zvýšené interakci mezi chitosanem a negativně nabitými buněčnými stěnami mikroorganismů [16, str. 235].

1.4.5 Deriváty chitosanu

V posledních letech dochází k velkému rozvoji používání derivátů chitosanu. Důvodem je především nízká rozpustnost samotného chitosanu při pH nad 6.5. Chemické modifikace chitosanu přináší nové funkční vlastnosti, které jsou příznivé pro nové biologické a biomedicínské využití [10, str. 3, 30]. Důraz je v dnešní době kladen především na antibakteriální aktivitu, která je ovlivněna fyzikálními a chemickými vlastnostmi daného typu chitosanu. Mnoho studií prokázalo, že chitosan a jeho deriváty jako například N-trimethyl-chitosan nebo N-karboxymethyl-chitosan jsou účinná a bezpečná absorpční činidla. Chitosanové deriváty jsou známy jako významné složky vakcín, a to z důvodu jejich imunostimulační aktivity a bioadhezivních vlastností, které dokáží zvýšit absorpci buněk, permeaci a ochranu antigenu. Pro tento účel jsou připravovány především nanočástice spolu s mono-N-karboxymethylchitosanem [10, str. 7], [18]. Problematice řízeného uvolňování léčiv s využitím chitosanových derivátů se dále věnuje kapitola 1.5.2.

Různé typy derivátů a jejich významné funkční skupiny jsou uvedeny v tabulce 2 [10, str. 4].

Tab. 2 Příklady derivátů chitosanu [10, str. 4]

Typ derivátu	Funkční skupiny
<i>N</i> -Acyl chitosan	formyl, acetyl, propionyl, butyryl, hexanoyl, octanoyl, decanoyl, dodecanoyl, tetradecenoyl, lauroyl, myristoyl, palmitoyl, benzoyl
<i>N</i> -Karboxyalkyl (aryl) chitosan	<i>N</i> -karboxybenzyl, alanin glucan, tyrosine glucan,
<i>N</i> -Karboxyacyl chitosan	anhydrid kyseliny maleinové, itakové, glutarové
<i>o</i> -Karboxyalkyl chitosan	<i>o</i> -karboxymethyl, zesíťovaný <i>o</i> -karboxymethyl
Cukrové deriváty	1-deoxygalaktik-1-yl, 1-deoxyglucit-1-yl, 1-deoxymelibioit-1-yl, cellobioit-1-yl-chitosan, produkty získané z kyseliny askorbové
Cheláty kovových iontů	palladium, měď, stříbro, jód
Polosyntetické pryskyřice chitosanu	kopolymer chitosanu s methylmetakrylátem, akrylamid maleinanhydrid, polyurea-erethan

1.5 Využití chitosanu

1.5.1 Kosmetika

Chitosan je využíván v různých kosmetických přípravcích pro péči o pleť, rty nebo vlasy. Při aplikaci pleťových produktů s obsahem chitosanu dochází díky jeho hydratačním vlastnostem ke snížení ztráty vody z povrchu pokožky, a tím zvýšení vlhkosti, zatímco schopnost tvořit film zajišťuje dosažení hladšího povrchu po aplikaci. Chitosan v kosmetických přípravcích může také zvyšovat adhezi UV filtru a snížit možnost jeho vymývání. Další potenciální aplikací jsou deodoranty, kde chitosan díky antibakteriálnímu účinku zabraňuje produkci bakteriálních enzymů. Lze jej také využít jako součást rtěnek pro zlepšení přilnavosti při nanášení a pro ochranu rtů před vysoušením [10, str. 18].

1.5.2 Řízené uvolňování léčiv

Chitosan je považován za „nosič léků“ 21. století. Pro účinné a řízené uvolňování léků se používá ve formě tablet, mikročástic, nanočástic, granulí, gelů a v neposlední řadě také

filmů. Takto konstruované systémy jsou aplikovány pro řízené uvolňování protilátek, anti-hypertenziv, protirakovinných činidel, proteinových a peptidových léčiv, vakcín a nutraceutických sloučenin či růstových faktorů [16, str. 239], [18, str. 42].

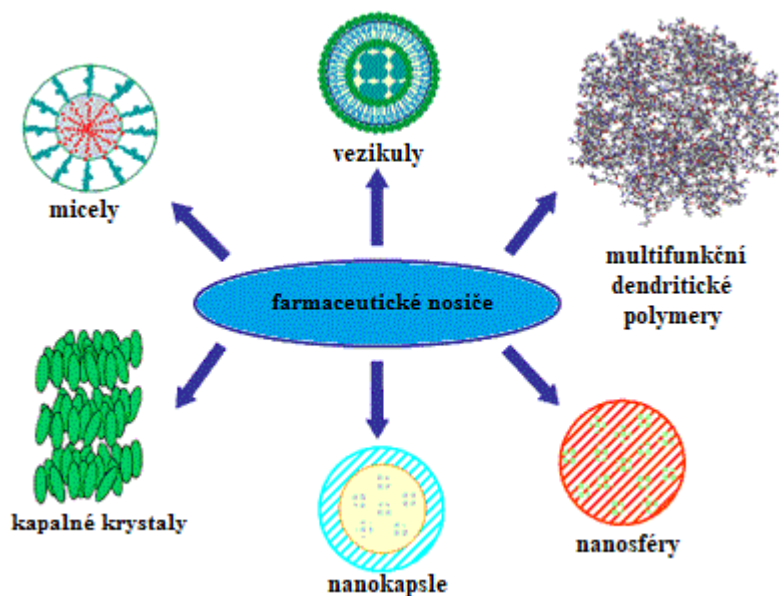
Hlavním důvodem, proč je chitosan v tomto směru využíván, jsou jeho primární aminoskupiny, které jsou odpovědné za řízené uvolňování, transfekci, gelaci *in situ* nebo zvýšení permeace. Tyto vlastnosti mohou být navíc zlepšeny chemickou modifikací chitosanu. Významnou roli zde hraje také molekulová hmotnost a stupeň deacetylace chitosanu. Při použití chitosanu s vyšší Mw dochází k nárůstu viskozity, čehož je využito k prodloužení doby uvolňování a působení účinné látky. Tím se docílí požadovaného zvýšení terapeutické účinnosti nebo také snížení možných vedlejších účinků některých léků [10, str. 21], [20, str. 285]. Další výhodou jsou i filmotvorné a mukoadhezivní vlastnosti, které výrazně prodlouží dobu setrvání léčivé látky v místě účinku [10, str. 21].

Jako příklad komerčního produktu lze uvést lak na nehty Ciclopoli® (Obr. 5), který je na bázi hydroxypropyl chitosanu s obsahem účinné látky ciclopirox. Tento přípravek sloužící k léčbě plísňového onemocnění nehtů, je velmi efektivní, dobře aplikovatelný a nevyžaduje odstraňování organickými rozpouštědly jako ostatní běžné laky na nehty [18, str. 42].



Obr. 5 Ciclopoli® [21]

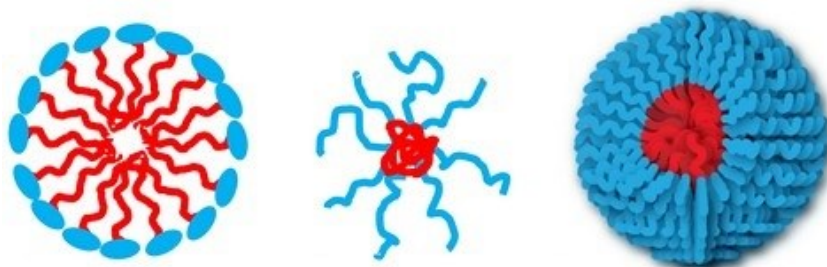
Chitosan a jeho deriváty jsou také využívány k léčbě nádorových onemocnění, kdy jsou aktivní látky dopravovány přímo do rakovinných buněk a postupně uvolňovány z chitosanových konjugátů [10, str. 10]. Na obrázku 6 jsou znázorněny různé formy nosičů aktivních látek, jako například micely, kapalně krystalové a nanočástice.



Obr. 6 Formy nosičů aktivních látek [22]

1.5.2.1 Chitosanové micely

Chitosanové micely jsou rozsáhle studovány v oblasti systémů doručování léčiv a při léčbě nádorových onemocnění. Polymerní micely (Obr. 7) jsou složeny z vnitřního hydrofobního jádra a vnějšího hydrofilního pláště. Z tohoto důvodu mohou být léčiva, která jsou špatně rozpustná ve vodě umístěna do hydrofobního jádra, čímž dojde k celkovému zlepšení rozpustnosti a biologické dostupnosti. K tvorbě micel může docházet také při elektrostatické interakci opačně nabitých polymerů. Tyto micely jsou označovány jako polyion komplexní micely nebo jako PIC micely. Při pH nižším než 6.5 je v důsledku protonace aminoskupin chitosan ve vodě rozpustný a má polykationické vlastnosti [10, str. 22].



Obr. 7 Polymerní micely [23]

1.5.2.2 Chitosanové hydrogely

Chitosanové hydrogely jsou trojrozměrné hydrofilní polymery, které mají schopnost absorbovat a zadržovat až tisíckrát více tekutiny, než je jejich hmotnost v bezvodém stavu a jsou taktéž vhodnými nosiči pro makromolekuly. V závislosti na okolních podmínkách a složení jsou chitosanové hydrogely schopny bobtnat a dehydratovat [10, str. 27–28], [24].

Hydrogely jsou díky biodegradabilitě, biokompatibilitě a strukturální podobnosti s přirozenými tkáněmi atraktivními kandidáty pro aplikace v oblasti tkáňového inženýrství. Chitosanové hydrogely mohou být připraveny na základě iontových, polyelektrolytových, interpolymerních a hydrofobních interakcí, které vedou ke gelaci roztoku. Vlastnosti hydrogelů mohou být regulovány v závislosti na pH, teplotě a iontové síle. Tyto systémy jsou používány při řízeném uvolňování léčiv a bioaktivních molekul. Mechanismy uvolňování se rozdělují na typy řízené difuzí, bobtnáním nebo procesem degradace [10, str. 27–28], [24, str. 5–6].

Hydrogely používané v biomedicínských aplikacích mohou být také klasifikovány z hlediska toho, zda jsou odvozeny z přírodních nebo syntetických polymerů (Tab. 3). Hydrogely vyrobené z přírodních polymerů mají výhody biologické účinnosti, biokompatibility a rozložitelnosti. Vykazují ovšem nízkou mechanickou pevnost, slabou reprodukovatelnost a potenciální přítomnost patogenů. Na druhou stranu syntetické hydrogely mohou být připraveny s požadovanými mechanickými a degradačními vlastnostmi, avšak postrádají přirozenou biologickou aktivitu [24, str. 5-6].

Tab. 3 Příklady přírodních a syntetických polymerů [24, str. 5–6]

Přírodní polymery	Syntetické polymery
Agaróza	Poly(ethylenglykol) (PEG) a jeho deriváty
Celulóza	Poly(akrylamid) (PAAm)
Kyselina hyaluronová	Poly(vinylpyrrolidon) (PVP)
Elastin	Kyselina polyakrylová (PAA)
Kolagen	Poly(<i>N</i> -isopropylakrylamid) (PNIPAm)
Želatina	Poly(vinyl alkohol) (PVA)
Chondroitin sulfát	Poly(hydroxyethyl methakrylát) (HEMA)

1.5.3 Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství je multidisciplinární věda zahrnující biologii, medicínu a inženýrství, jejíž cílem je vyvinout funkční náhrady za poškozené nebo nemocné tkáně a zlepšit tak nebo nahradit jejich biologické funkce. Rozhodující roli hraje výběr vhodných buněk a bioaktivních molekul, stejně jako optimálního tkáňového nosiče. V tomto odvětví jsou používány různé materiály, a to jak přírodní, tak i syntetické. V posledních letech došlo k významnému pokroku ve vývoji biomateriálů na bázi chitosanu a zejména pak jeho derivátů, vzhledem k výše uvedeným pozitivním vlastnostem. Materiály na bázi chitosanu se používají v mnoha tkáních, jako jsou kůže, kosti, chrupavky, játra, nervy a krevní cévy [10, str. 9–10], [18, str. 45], [25]. Vzhledem k odlišnému extracelulárnímu složení jednotlivých tkání, je třeba biomateriály na bázi chitosanu konstruovat podle konkrétního typu [25], [26, str. 425–426].

1.5.4 Hojení ran

Pokožka je jednou z nejdůležitějších částí našeho těla. Z anatomického hlediska ji dělíme na epidermis a dermis. Základními komponenty epidermis jsou keratinocyty tvořící překrývající se struktury propojené pomocí desmozomů. Dermis je složena z různých glykoproteinů, glykosaminoglykanů (GAG) a fibroblastů, které jsou odpovědné na syntetizování a ukládání kolagenových vláken do sítě. Chitosan je schopen ovlivnit chování keratinocytů, fibroblastů a modulovat mitogenezi lidských kožních buněk. Samotná struktura chitosanové molekuly je podobná struktuře GAG a může stimulovat syntézu kolagenu. Biomateriály založené na chitosanu mají schopnost konstruovat epidermální a dermální náhrady [26, str. 428].

Chitosan poskytuje neproteinovou matici pro trojrozměrný (3D) růst tkáně a aktivuje makrofágy tumoricidní aktivitu. Stimuluje buněčnou proliferaci a histoarchitektonickou organizaci tkání. Chitosan funguje také jako hemostat, který napomáhá při přirozeném srážení krve, a to vazbou na červené krvinky, přičemž dochází i k blokaci nervových zakončení a snížení bolesti. Během procesu nastává depolymerizace chitosanu a uvolnění N-acetyl-beta-glukosaminu, který následně iniciuje proliferaci fibroblastů a pomáhá při ukládání kolagenu. Výsledkem je stimulace syntézy kyseliny hyaluronové v místě rány, což usnadňuje hojení a eliminuje tvorbu jizev [10, str. 244–245].

V dnešní době je na trhu mnoho typů obvazového materiálu na bázi chitinu a chitosanu, jejichž účelem je nejen chránit ránu před vnějším prostředím, ale zároveň i napomáhat k samotnému hojení. Je známo, že chitosan a jeho deriváty mají vliv na aktivitu fibroblastů,

stimulaci cytokinů a podporu tvorby tkání, což jsou nejdůležitější procesy, které hrají zásadní roli při hojení ran. Další výhodou obvazového materiálu na bázi chitosanu je jeho semipermeabilita, která zabraňuje dehydrataci a kontaminaci rány [10, str. 244–45], [18, str. 42], [28].

Optimální obvaz by měl:

- zabránit infekci,
- odstranit krev,
- zajistit nebo udržet optimálně vlhké prostředí,
- umožnit tepelnou izolaci,
- snadno odnímatelný,
- netoxický a antialergenní,
- cenově přijatelný.

Samotný obvazový materiál může být ve formě netkaných textílií, nanovláken, kompozitů a filmů. Příkladem může být hemostatická bandáž HemCon® (Obr. 8), která je hojně využívána i pro vojenské jednotky v Iráku či Afghánistánu [10, str. 244–245].

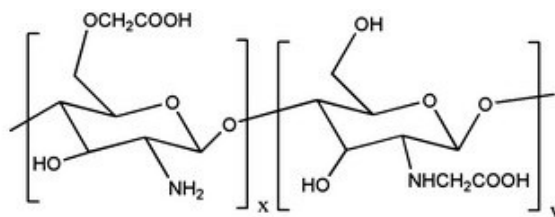


Obr. 8 HemCon® [28]

Vzhledem k bakteriostatickým a fungostatickým vlastnostem chitosanu se používá také jako prostředek k hojení ran v kožních masťích, kde podporuje hojení ran a hemostatickou aktivitu [16, str. 239].

1.5.5 Chitosan jako funkční přísada do potravin

Chitosan je využíván i jako aditivum v masných produktech jako prevence ztráty aroma, mikrobiální kontaminace a oxidace, což vede k prodloužení trvanlivosti. Mono-N-karboxymethylchitosan (MCC) (Obr. 9) a jeho deriváty jsou účinná antioxidační a konzervační činidla využívaná v potravinářství. Chitosan lze také aplikovat jako přísadu do pekárenských produktů za účelem zlepšení jejich textury [16, str. 236].



Obr. 9 Karboxymethyl chitosan [29]

1.5.6 Potravinové obaly

Kvalita a bezpečnost potravin patří mezi hlavní cíle vývoje v oblasti potravinářského průmyslu. Proto jsou v posledních letech intenzivně studovány možnosti směřující právě ke zlepšení bezpečnosti potravin a prodloužení trvanlivosti a skladovatelnosti. Samotné balení potravin je určeno k ochraně před vnějšími faktory, jako je teplota, světlo a vlhkost, které mohou vést k jejich degradaci. Obalový materiál navíc chrání svůj obsah před jinými environmentálními vlivy, jako jsou pachy, mikroorganismy, otřesy, prach a vibrace. V dnešní době se zvyšuje tlak na zachování původních organoleptických vlastností [30].

Velká pozornost je věnována vývoji antimikrobiálních polymerních filmů, které jsou schopny aktivně působit proti sporogenním a patogenním mikroorganismům, jež jsou příčinou kontaminace potravin [31], [32, str. 125]. Pro tyto účely jsou využívány filmy na bázi různých materiálů, z nichž jsou běžné rostlinné a mléčné proteiny, dále pak polysacharidy, jako je škrob, celulóza nebo právě chitosan. Problematice aktivních obalových materiálů je věnována kapitola 2.

2 VÝZNAM A APLIKACE ANTIBAKTERIÁLNÍCH BIOPOLYMERNÍCH FILMŮ

Biopolymerní filmy nacházejí uplatnění zejména v potravinářském a farmaceutickém průmyslu, a to ve formě obalových materiálů, jejichž primárním účelem je zajištění stabilní kvality produktů během skladování, dopravy a distribuce až do finálního použití.

Samotné obaly musí vykazovat určité funkční a specifické vlastnosti. Ve většině případů je žádoucí, aby nedocházelo k dehydrataci povrchu produktů, musí být zajištěny optimální bariérové vlastnosti tak, aby bylo možné minimalizovat pronikání různých nežádoucích látek/plynů. Použitím filmů může být také výrazně sníženo působení UV záření, které vyvolává nežádoucí radikálové reakce [18, str. 39–40], [31].

V současné době jsou na tyto materiály kladeny neustále rostoucí požadavky, a to nejen na vysokou funkčnost a minimální zpracovatelské náklady, ale i na zdravotní a ekologickou bezpečnost. Výsledkem je vývoj nových systémů, jejichž funkce spočívá v aktivních interakcích mezi obalem a produktem [33]. Tzv. aktivní obaly (z ang. „active packaging“) vykazují atributy přesahující rámec základních funkčních vlastností, a to díky obsahu aktivních složek, které mohou být následně uvolňovány nebo mohou absorbovat z obalu látky odpovědné za poškození baleného produktu (Obr. 10). Biopolymerní filmy s antimikrobiální a antioxidační aktivitou jsou schopny omezit nebo zcela zastavit mikrobiální růst na povrchu daného potravinářského nebo farmaceutického produktu. Pro přípravu jedlých a biologicky odbouratelných filmů jsou běžně využívány proteiny, polysacharidy, lipidy nebo také jejich kombinace [30], [31], [34].



Obr. 10 Aktivní obal Thinfilm [35]

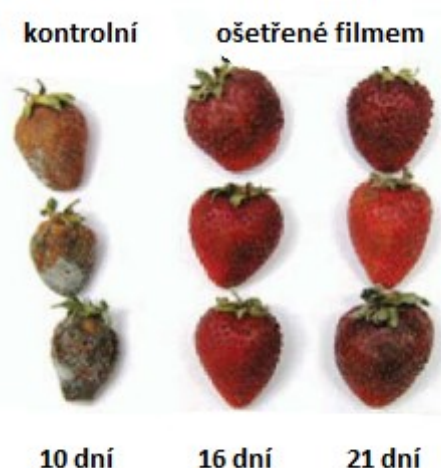
Požadavky na aktivní obaly z hlediska legislativy spadají pod Nařízení EP a Rady (EU) 1935/2004/ES o materiálech a předmětech určených pro styk s potravinami a dále jsou doplněny nařízením 450/2009/ES o aktivních a inteligentních materiálech a předmětech určených pro styk s potravinami. Nařízení definuje rozdíl mezi aktivními a inteligentními obaly, kde aktivní obaly mají prodloužit trvanlivost, udržet stav či zlepšit kvalitu, zatímco inteligentní obaly monitorují historii potraviny a informují o čerstvosti. Organizací, která schvaluje jednotlivé látky, které přicházejí do styku s potravinami, je v EU Evropská agentura pro bezpečnost potravin (EFSA). Dle Nařízení EP a Rady (EU) 1935/2004/ES, článku 4 aktivní obaly nesmí zakrývat kažení potravin a označeny musí být takovou formou, aby spotřebitel snadno rozpoznal, o jaký typ obalu se jedná a zda je, či není jedlý. Je zde i jasně stanoven postup schvalování nových aktivních materiálů pro styk s potravinami [36], [37], [38].

2.1.1 Filmy na bázi chitosanu

Chitosan představuje perspektivní materiál pro aktivní obaly, jelikož má výborné filmotvorné vlastnosti, a navíc sám o sobě vykazuje antimikrobiální aktivitu. Mezi jeho další výhody patří dobré mechanické vlastnosti a selektivní propustnost pro plyny (CO_2 a O_2). Na druhou stranu jsou chitosanové filmy vysoce propustné pro vodní páry, což omezuje jejich použití pro většinu potravin, zejména ve vlhkém prostředí [7], [18, str. 37–38], [31].

Z toho důvodu jsou studovány různé možnosti zlepšení fyzikálních vlastností filmů na bázi chitosanu. Velmi zajímavou alternativou je zabudování esenciálních olejů (EO), které nejen zvyšují antimikrobiální aktivitu, ale také snižují propustnost pro vodní páry. Ve studiích byla zjištěna například významná konzervační aktivita chitosanu ve formě chitosanových filmů s obsahem různých esenciálních olejů, kterými byly ošetřeny potraviny, v tomto případě jahody. Účinky byly sledovány v časovém intervalu a porovnávány vůči neošetřeným potravinám (Obr. 11) [18, str. 39].

Filmy na bázi chitosanu s obsahem EO byly aplikovány i na jiné potravinářské produkty, jako je například maso a ryby. Studie prokázaly významný podíl těchto filmů na prodloužení doby trvanlivosti a skladovatelnosti [41].



Obr. 11 Porovnání morfologických
změn při použití chitosanových filmů
s EO [18]

2.1.2 Filmy na bázi celulózy

Celulóza je v potravinářském průmyslu využívána zejména jako hlavní složka obalových materiálů, dále jako zahušťovadlo a stabilizátor. Celulóza a její deriváty, jako jsou methylcelulóza (MC), karboxymethylcelulóza (CMC), hydroxypropylmethylcelulóza (HPMC) se používají jako filtry nebo absorpční materiály. V antimikrobiálních obalových systémech je využívána jako nosič pro bakteriociny, což jsou peptidy produkované bakteriemi, které inhibují růst dalších příbuzných bakterií. Nisin, polypeptid získaný z *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* byl například přidán do celulózových fólií k zamezení růstu *Listeria monocytogenes* ve zpracovaných masných výrobcích. Antimikrobiální vlastnosti celulózových filmů s nisinem jsou citlivé na přítomnost jiných potravinových složek. Povlaky a filmy na bázi celulózy jsou transparentní, pružné, bez zápachu a chuti, rozpustné ve vodě a odolné vůči CO₂ a O₂. Propustnost pro vodní páry (WVP) těchto filmů je značně ovlivňována poměrem hydrofobních a hydrofilních složek fólie. Komerčně se celulózové filmy používají v oblasti medicíny a jako antimikrobiální nebo konzervační činidla v potravinářských výrobcích [34, str. 76], [42].

2.1.3 Filmy na bázi proteinů

Zejména kvůli zvyšující se poptávce po ekologicky šetrných, obnovitelných náhradách materiálů z ropných zdrojů jsou vyvíjeny proteinové filmy. Hlavními zdroji jsou kasein, syrovátka, sója, kukuřičný zein, kolagen, pšeničný lepek, keratin a vaječný albumin. Tyto filmy

jsou biologicky odbouratelné a kompostovatelné. Ve srovnání se syntetickými materiály vykazují horší voděodolnost a nižší mechanickou pevnost. Fyzikálně-chemické vlastnosti jsou ovlivněny složením, amfifilními vlastnostmi a elektrostatickým nábojem [43, str. 25–33], [44].

2.1.3.1 Zein

Zein je obnovitelný hydrofobní polymerní materiál, který je díky svým jedinečným vlastnostem v porovnání s ostatními zemědělskými proteiny používán pro výrobu jedlých folií a povlaků. Zein obsahuje velké množství nepolárních aminokyselin a nízký podíl bazických a kyselých aminokyselin. Primárními aminokyselinami jsou glutamin, leucin a prolin. Důsledkem je nerozpustnost ve vodě, která pozitivně ovlivňuje bariérové a termoplastické vlastnosti vytvořených filmů. Hlavními frakcemi jsou alfa-zein, rozpustný v 95% ethanolu a beta-zein, který je rozpustný v 60% ethanolu. Zeinové filmy jsou lesklé, pevné a odolné vůči látkám lipidní povahy. Vykazují nízkou propustnost pro vodní páry ve srovnání s většinou ostatních filmů proteinové povahy [42], [43, str. 36], [45].

2.1.4 Alginátové filmy

Alginátové filmy jsou v potravinářském průmyslu využívány jako jedlé fólie především pro ovoce, zeleninu a masné výrobky. Alginát je anionický polysacharid získávaný z hnědých mořských řas jako *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pirifera*, *Laminaria digitata* a *Ascophyllum nodosum*. Je složený z β -D-manuronové kyseliny a α -L-glukuronové kyseliny, které jsou vzájemně propojeny v různých poměrech pomocí 1-4 vazeb. Vzhledem ke snadné dostupnosti, biologické odbouratelnosti a kompatibilitě s gelačními a stabilizačními činidly je alginát široce používán také jako netoxické potravinářské aditivum pro úpravu viskozity, dále jako emulgátor a v neposlední řadě i jako koloidní stabilizátor. Alginátové filmy jsou vysoce transparentní s vysokou mechanickou pevností, avšak mají horší bariérové vlastnosti a jsou méně flexibilní. Za účelem zlepšení mechanických a bariérových vlastností jsou často kombinovány s různými typy kovových, anorganických nebo organických nanoplniv [42], [46], [47].

Byly připraveny například alginátové filmy s obsahem natamycinu nebo skořicového EO, u nichž byla prokázána vysoká antioxidační a antimikrobiální aktivita [46].

2.1.5 Filmy na bázi škrobu

Hlavními pozitivy filmů na bázi škrobu je odbouratelnost, nízká cena, flexibilita a průhlednost. Samotné filmy jsou bez chuti a zápachu, takže neovlivňují organoleptické vlastnosti potravin. Škrobové fólie vykazují také vynikající bariérové vlastnosti vůči O_2 a CO_2 . Na straně druhé mají vzhledem k vysoké hydrofilitě slabší bariérové vlastnosti vůči vodě [42].

3 ESENCIÁLNÍ OLEJE

Esenciální oleje (EO) jsou přírodními rostlinnými produkty, které vykazují různé biologické vlastnosti. Jde o směsi těkavých sloučenin, jako jsou například mono a seskviterpenoidy, benzenoidy nebo také fenylypropanoidy [48, str. 1]. Převážná většina silic je získávána z rostlinného materiálu, a to destilací (vodní parou, suchá) nebo lisováním za studena (oleje z citrusových plodů). Některé výtažky mohou být získávány extrakcí organickými rozpouštědly nebo superkritickou fluidní extrakcí (SFE). Takto získané látky si většinou ponechávají téměř identické vlastnosti jako suroviny, z nichž byly získány. Nelze je považovat za pravé esenciální oleje, ale mohou být aplikovány například v potravinářském průmyslu, a to za předpokladu, že jsou použita rozpouštědla přijatelná pro potraviny a nezanechávají žádné škodlivé látky ve výsledných produktech [48, str. 5]. Existují i EO živočišného původu, vyskytující se například u vorvaňů, cibetky, kapybary pižmového, některé oleje jsou produkovány i mikroorganismy [49, str. 44].

Všechny rostliny mají schopnost produkovat těkavé sloučeniny, často však pouze ve stopovém množství. Komerčně využívané rostliny lze rozdělit do dvou skupin:

1. Rostliny produkující směs těkavých látek, které vytváří charakteristickou vůni (např. růže nebo jasmín), kdy jsou těkavé látky uvolňovány přes epidermální vrstvu jejich plátků do okolí.
2. Rostliny se schopností akumulace těkavých látek ve specifických strukturách, což má za následek vyšší koncentrace EO v dané rostlině [48, str. 39–40].

EO jsou získávány z různých čeledí rostlin jako například *Cupressaceae* (cedrové dřevo a listy, jalovcový olej), *Pinaceae* (borovicový a jedlový olej), *Apiaceae* (fenykl, koriand a další aromatické oleje ze semen/kořenů), *Asteraceae* nebo *Compositae* (heřmáněk, pelyněk, estragonový olej), *Lamiaceae* (máta, pačuli, levandule, oregano a mnoho dalších bylinných olejů) a v poslední řadě také *Lauraceae* (kafr, skořice, litsea) [48, str. 41].

Pro analýzu získaných silic je používána tenkovrstvá chromatografie (TLC), různé typy kapalinové chromatografie (LC) nebo plynová chromatografie (GC). V úvahu připadají i spektroskopické techniky jako je UV a IR spektroskopie nebo MS a $^1\text{H-NMR}$ spektroskopie. V posledních letech bylo vyvinuto několik dalších technik, které se aplikují pro analýzu EO, a to vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), různé druhy protiproudé chromatografie (CCC), superkritická fluidní chromatografie (SFC) nebo Ramanova spektroskopie [48, str. 11–12].

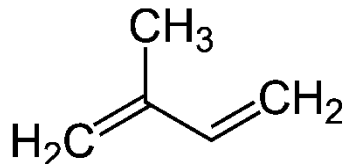
EO jsou využívány v kosmetickém průmyslu jako složky vonných látek a dekorativní kosmetiky. Uplatnění nacházejí i potravinářském průmyslu jako aroma a příchutě a ve farmaceutickém průmyslu jako aktivní složky léků [50, str. 1].

3.1 Aktivní látky esenciálních olejů

U jednotlivých esenciálních olejů existuje velké množství různých aktivních látek, tudíž každý EO má rozdílné složení. Mnoho z těchto těkavých látek plní různé funkce. EO mohou působit například jako obranné látky rostlin proti býložravcům nebo dalším nežádoucím škůdcům.

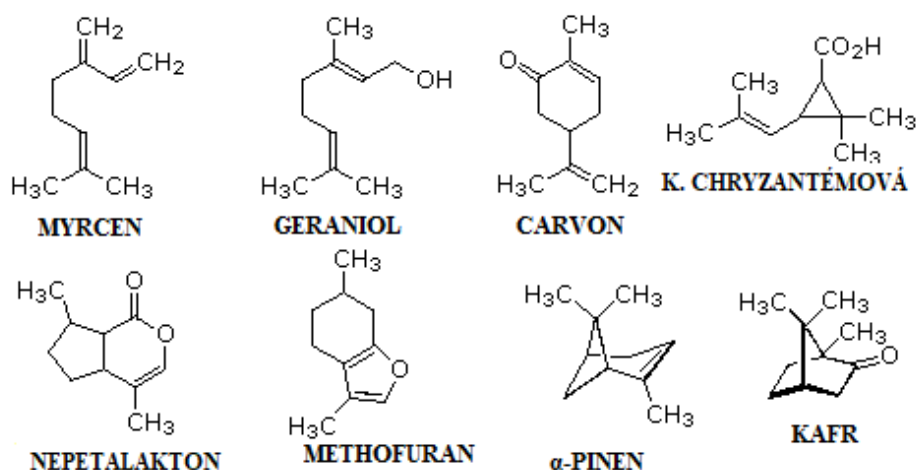
3.1.1 Terpenoidní uhlovodíky

Terpenoidy jsou považovány za nejdůležitější skupinu přírodních látek, které se vyskytují v EO. Jsou tvořeny kombinací několika uhlíkových jednotek izoprenu (Obr. 12). Terpeny jsou děleny podle počtu izoprenových jednotek na monoterpeny (C_{10}), seskviterpeny (C_{15}), hemiterpeny (C_5), diterpeny (C_{20}), triterpeny (C_{30}) a tetraterpeny (C_{40}) [48, str. 129–130], [51, str. 449].



Obr. 12 Izoprenová jednotka [52]

Monoterpeny jsou tvořeny spojením dvou izoprenových jednotek (C_{10}). Představují nejvýznamnější zástupce, jsou obsaženy až v 90 % esenciálních olejů a poskytují velkou strukturní variabilitu. V případě opticky aktivní molekuly mohou různé rostliny obsahovat odlišné enantiomery, jako například (+)- α -pinen z *Pinus palustris*, (-)- β -pinen z *Pinus caribaea* a *Pinus pinaster*, (-) linalol z korinadru a (+)-linalol z některých kafrů [51, str. 449]. Příklady některých monoterpenů jsou zobrazeny na obrázku 13.

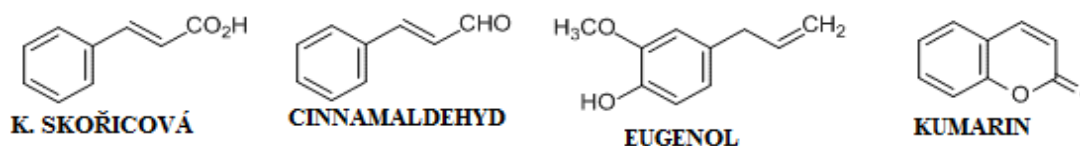


Obr. 13 Monoterpeny [53]

Seskviterpeny jsou tvořeny třemi izoprenovými jednotkami (C_{15}). Rozšířený řetězec zvyšuje počet cyklizací, které umožňují značnou strukturní rozmanitost. Strukturou a funkcemi se podobají monoterpenům [48, str. 135], [51, str. 450].

3.1.2 Fenylypropanoidy

Fenylypropanoidy (Obr. 14) jsou látky odvozené od kyseliny šikimové. Na aromatickém jádře je navázaný řetězec se třemi atomy uhlíku. Tyto látky tvoří vedle terpenů jednu z nejdůležitějších součástí EO. Mezi významné zástupce této skupiny vyskytující se v EO patří eugenol, cinnamaldehyd nebo vanilin [49, str. 64], [54].



Obr. 14 Fenylypropanoidy [55]

3.1.3 Laktony

Laktony jsou cyklické estery kyseliny mléčné ($C_3H_6O_3$), které obsahují navázaný kyslík vedle karbonylové funkční skupiny v pěti či šestičlenných nasycených nebo nenasycených kruzích. Laktony s pětičlenným kruhem se nazývají γ -laktony, substituované v pozici 5, laktony s šestičlenným kruhem pak δ -laktony, které jsou substituované v pozici 6 (Obr. 15). Stejně jako u jiných acyklických sloučenin je pro laktony charakteristické sladké, jemné ovocné

aroma. Jsou složkami mnoha EO a těkavých látek. Vyskytují se v potravinách, jako jsou mléčné výrobky, ovoce, zelenina a ořechy [49, str. 66], [56, str. 183–184].



Obr. 15 δ -Lakton (vpravo) a γ -Lakton (vlevo) [55, str. 66], [56]

3.1.4 Neterpenoidní uhlovodíky

Neterpenoidní uhlovodíky se v EO nacházejí v podobě alkoholů s krátkými řetězci či aldehydů. Jsou tvořeny metabolickou konverzí nebo degradací fosfolipidů a mastných kyselin. Ve své struktuře mohou obsahovat kyslík, dusík a síru [49, str. 44].

3.2 Antimikrobiální vlastnosti esenciálních olejů

Bylo prokázáno, že mnoho přírodních rostlinných extraktů vykazuje antibakteriální, antimykotické a antivirové vlastnosti, které zamezují tvorbě biofilmů. Esenciální oleje jsou obzvláště zajímavé jako přirozené alternativy k syntetickým biocidům, jejichž účinnost v poslední době klesá kvůli zvyšující se odolnosti patogenů. Proto jsou přírodní extrakty stále více využívány jako bioaktivní složky polymerních materiálů aplikovaných v systémech pro podávání léků, v kosmetice, textilním průmyslu nebo v potravinářství jako složky aktivních obalů potravin.

Jednou z hlavních nevýhod EO je jejich vysoká chemická a tepelná nestálost, stejně jako velmi vysoká těkavost. Tento problém omezuje možnost výroby polymerů s obsahem esenciálních olejů prostřednictvím tavení nebo kompresního lisování. Možným východiskem je snížení času míchání nebo výběr polymeru s relativně nízkou teplotou tání [18, str. 312–313].

Biologická aktivita EO obecně závisí na chemickém složení, které je dáno rostlinným genotypem, geografickým původem a okolními podmínkami [57]. Široké spektrum antimikrobiální účinnosti EO je způsobeno přítomností fenolických sloučenin nebo terpenoidů. Fenolové sloučeniny s hydrofilními funkčními skupinami inaktivují patogeny adhezní vazbou, vázáním proteinů a buněčných stěn nebo enzymatickou inaktivací a interkalací do buněčné stěny a/nebo DNA. Terpenoidy se díky lipofilnímu charakteru hromadí v lipidové dvojvrstvě

cytoplazmatické membrány, což má za následek narušení membránové struktury. Bylo zjištěno, že antimikrobiální aktivita jednotlivých složek EO je méně výrazná než aktivita celé frakce. To vede k názoru, že jde o výsledek kombinace několika mechanismů a význam má synergický účinek.

Nejsilnější antimikrobiální vlastnosti byly prokázány u esenciálních olejů s obsahem fenolických sloučenin jako je karvakrol, eugenol a thymol. Karvakrol se řadí mezi monoterpenické alkoholy a je hlavní složkou esenciálních olejů získávaných z oregana, tymiánu a majoránky. Obsah v EO se pohybuje okolo 3–5 % [48, str. 212], [58], [59]. Mechanismus působení karvakrolu proti mikroorganismům zahrnuje interakci fenolických sloučenin s bílkoviny v cytoplazmatické membráně, což vede k úniku iontů a dalších látek a následně pak k lýze buňky [58].

Thymol (2-isopropyl-5-methylfenol) je hlavní monoterpenický fenol nacházející se v EO extrahovaných z rostlin čeledi hluchavkovitých. Hlavním zdrojem je *Thymus vulgaris* L., který může obsahovat až 70 % thymolu [48, str. 226], [60]. Pro své antimikrobiální, antifungální a antioxidační účinky jsou EO obsahující thymol používány v potravinářském průmyslu jako konzervanty. V kosmetice jsou často součástí ústních vod, kde vykazují antiseptické vlastnosti. Další využití je například jako lokální anestetikum [60].

3.3 Tymiánový olej

Tymiánový olej lze získat z různých druhů rostlin rodu *Thymus*, nejčastěji z *Thymus vulgaris*, což je polokeř z čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*), který je pěstován v jižní Evropě, Africe a Asii. Jak již bylo zmíněno, složení je závislé právě na druhu rostliny a geografických a klimatických podmínkách [61], [62], [63]. U druhu *Thymus vulgaris*, rostoucího například ve Francii, má významné zastoupení geraniol, linalool, γ -terpineol, karvakrol, thymol a *trans*-thujan-4-ol/terpinen-4-ol. U *Thymus zygis* subsp. *gracilis* rostoucího divoce v jihovýchodním Španělsku bylo studii prokázáno, že nejběžnějším chemotypem je thymol. U esenciálního oleje z *Thymus hyemalis*, rostoucího na Iberském poloostrově, byla prokázána přítomnost thymolu, karvakrolu, borneolu a linaloolu [64].

Kvůli charakteristicky silnému aroma je *T. vulgaris* používán v potravinářství a kosmetických přípravcích. Další uplatnění nachází v tradiční medicíně, pro své protinádorové, antispazmodické, antihelmintické a diuretické vlastnosti [61], [62], [63].

V tabulce 4 jsou uvedeny aktivní látky stanovené chromatografickou analýzou v *Thymus vulgaris* (Riyadh, Saudská Arábie), které jsou významné pro své biologické účinky [62].

Tab. 4 Účinky významných aktivních látek obsažených v *Thymus vulgaris* [62]

Aktivní látka	Molekulární forma	Účinek
α -Pinen	C ₁₀ H ₁₆	protizánětlivý, chondroprotektivní, antioxidační
Camphen	C ₁₀ H ₁₆	hepatoprotektivní, hypolipidemický
β -Myrcen	C ₁₀ H ₁₆	antioxidační, antiulcerozní, protirakovinné
Carene	C ₁₀ H ₁₆	antioxidační, protizánětlivý
p-Cymene	C ₁₀ H ₁₄	antioxidační, antimikrobiální
γ -Terpinen	C ₁₀ H ₁₆	antioxidační, antimikrobiální
α -Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	antimikrobiální
Thymol	C ₁₀ H ₁₄ O	antioxidační, antimikrobiální
Karyofylén	C ₁₅ H ₂₄	antimikrobiální, lokální anestetikum
Humulen	C ₁₅ H ₂₄	larvicidní, protirakovinný

Karvakrol a thymol patří mezi složky, které jsou nejen odpovědné za antimikrobiální aktivitu, ale jde také o hlavní fenolické sloučeniny, jež se podílejí na vysoké antioxidační kapacitě tymiánu. Braga a kol. [64] potvrdil pozitivní účinek thymolu při procesu hojení zánětlivých ran, kdy samotný mechanismus antimikrobiální aktivity spočívá v principu narušení funkce cytoplazmatické membrány, a tím i narušení aktivního transportu živin a následné koagulace obsahu bakteriální buňky [66], [67].

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Ze studia literatury vyplynulo, že problematikou biopolymerních filmů s obsahem esenciálních olejů se zabývá řada autorů. Předmětem studií bývá většinou příprava účinných systémů s optimálními antimikrobiálními a fyzikálními vlastnostmi, které mají využití zejména v potravinářství a medicíně. Z esenciálních olejů jsou využívány oleje z hřebíčku, fenyklu, tymiánu, cypřiše, levandule, oregana, borovice nebo rozmarýnu [68].

Tymiánový olej vykazuje díky svému složení celou řadu užitečných vlastností, jež byly zmíněny v kapitole 3.3. Ve studii D. Altioka [69] byl tymiánový olej zakomponován do chitosanových filmů pro potenciální aplikace při hojení ran. Autoři Raphaël a Meimandipour [70] využili směs oregana a tymiánu pro inhibici růstu některých bakterií a plísní za účelem využití do živočišných krmiv.

V další práci [71] byl studován vliv homogenizačního postupu na výsledné fyzikální a reologické vlastnosti filmotvorných roztoků na bázi chitosanu a tymiánového či bazalkového EO. Bylo zjištěno, že při použití mikrofluidizace došlo k výraznému poklesu velikosti částic, zvýšení zeta potenciálu a snížení viskozity. Došlo také ke změně reologických vlastností, a to jak v závislosti na homogenizačním postupu, tak na použitém esenciálním oleji. Filmy připravené pomocí rotor/stator homogenizátoru s EO byly měkčí a pružnější než samotné chitosanové filmy. Příprava na vysokotlakém homogenizátoru vedla k zásadnějšímu poklesu viskozity všech vzorků (bez i s obsahem EO) v porovnání s druhým postupem.

A. Perdonés [72] se ve své studii zabývala emulzemi a chitosanovými filmy s obsahem EO z bazalky/tymiánu a kyseliny olejové. Sledována byla stabilita emulzí z hlediska velikosti částic, zeta potenciálu a reologického chování, u filmů pak byl studován vliv na bariérové, optické a mechanické vlastnosti. Bylo prokázáno, že přídavek kyseliny olejové příznivě ovlivnil stabilitu emulzí a současně zlepšil bariérové vlastnosti.

D. Jovanovic se zaměřil na problematiku výskytu listeriózy v důsledku konzumace potravin, které jsou určeny k přímé spotřebě bez dalšího zpracování u těhotných žen a starších osob. Bylo zjištěno, že použití chitosanových filmů, ať už s přídavkem nebo bez esenciálního oleje, představuje moderní a bezpečnou metodu zachování jakosti především u ovoce a zeleniny a tím snížení výskytu *Listeria monocytogenes* [73].

Využitím chitosanových filmů s tymiánovým olejem v potravinářském zpracování se ve svém výzkumu zabýval také J. Quesada [74]. Konkrétně se jednalo o systém aktivního balení pro prodloužení doby použitelnosti masných výrobků připravených ke konzumaci. Na vnitřní stranu obalu byla aplikována vrstva chitosanu s tymiánovým EO v různých koncentracích, která nebyla v přímém kontaktu s masem. Sledovanými parametry během čtyřtýdenního skladování v chladničce byla hodnota pH, mikrobiální růst, barevné změny a senzorické vlastnosti masa. Aplikovanou úpravou došlo ke snížení výskytu některých druhů testovaných organismů, zatímco jiné nebyly ovlivněny. Přítomnost vrstvy na bázi chitosanu a EO dále pozitivně ovlivnila zachování barvy potravin a snížila kondenzaci vlhkosti uvnitř balení.

Vlastnosti tymiánového oleje jsou v neposlední řadě ovlivněny samotnou výchozí surovinou, jak dokládá A. G. Pirbalouti [75]. Ve své práci se zabýval porovnáním výtěžku oleje, složením a zastoupením jednotlivých chemických složek tymiánového oleje z *Thymus vulgaris L.* a *Thymus daenensis*, rostoucích v různých oblastech centrální části Íránu. Bylo zjištěno, že umístění nemělo významný vliv na růst obou druhů, ale množství a kvalita získaných esenciálních olejů, stejně tak jako jejich chemické složení bylo odlišné.

Předmětem studií jsou také chitosanové filmy s obsahem dalších esenciálních olejů. S. Remay [76] ve své práci analyzuje aktivní obalové fólie z chitosanu, do kterých byl zakomponován zázvorový EO v různých koncentracích za účelem zvýšení kvality u rybích produktů při skladování. Hromiš a kol. [77] ve své práci prokázali pozitivní vliv kmínového esenciálního oleje na antioxidační a antimikrobiální aktivitu. Zajímavá je také studie Wanga a kol. [78] která se zabývá chitosanovými filmy s obsahem hřebíčkového, skořicového a anýzového esenciálního oleje. Výsledky prokázaly zásadní vliv typu oleje na finální antimikrobiální a fyzikální vlastnosti.

5 CÍLE PRÁCE

Cíle této diplomové práce jsou:

- připravit chitosanové roztoky a filmy s obsahem tymiánového oleje s různými typy emulgátorů,
- charakterizovat fyzikální a povrchové vlastnosti připravených systémů pomocí dostupných metod (např. velikost částic v roztocích, obsah vlhkosti a bariérové vlastnosti filmů),
- charakterizovat používané aktivní látky a zhodnotit antimikrobiální účinnost jednotlivých filmů lišící se koncentrací tymiánového oleje,
- diskutovat dosažené výsledky.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A METODY

6.1 Chemikálie

Chitosan nízkomolekulární, stupeň deacetylace 87 % (Sigma-Aldrich)

Kyselina octová C₂H₄O₂ (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

Tymiánový olej (Atok)

Tymiánový olej (Nobilis Tilia)

Tween 20 (Sigma-Aldrich)

Tween 80 (Sigma-Aldrich)

Tween 85 (Sigma-Aldrich)

Sabouraud Dextrose Agar M063 (HIMEDIA)

Müeller Hinton Broth M391 (HIMEDIA)

Agar Agar, Type I GRM666 (HIMEDIA)

Destilovaná voda

6.2 Pomůcky a přístroje

Analytické váhy (Sartorius Basic 110 S; Sartorius AG)

Váhy (KERN 572; Kern)

Ultra Turrax (IKA® T-25; IKA)

Sušárna (HS 61 A; Chirana)

Třepačka (MAEST 25)

Plynový chromatograf (DANI Master GC Fast Gas Chromatograph)

Přístroj pro kontaktní úhly See system (Advex Instruments)

Nástavce pro propustnost

Exikátor (ČSN SIMEX)

FTIR (Bruker Alpha-T)

Zeta sizer Nano ZS (Malvern Instruments, Ltd.)

Termostat (Thermo Haake P5)

Vortex (V-1 plus; Biosan)

Automatické mikropipety

Magnetické míchadlo

Mikrometr (SCHUT; 0,0001 mm)

Skenovací elektronový mikroskop Vege 3 (Tescan, ČR)

Laminární box

Denzi-la-meter

Běžné laboratorní sklo

6.3 Metodika

6.3.1 Chromatografická analýza esenciálních olejů

Zastoupení jednotlivých složek esenciálních olejů (EO) od různých výrobců bylo zkoumáno na plynovém chromatografu DANI Master GC Fast Gas Chromatograph, s kolonou Zebron™ ZB-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,5 μm, nepolární) a plameno ionizačním detektorem (FID). Nosným plynem byl dusík s průtokem 1ml/min. Teplota kolony byla postupně zvyšována z 50 °C na 120 °C (4 °C/min) a poté na 230 °C (15 °C/min). Teplota injektoru při nástřiku byla 200 °C a teplota detektoru byla 270 °C. Objem nástřiku byl 1 μl vzorku, který byl připraven navážením cca 5 mg esenciálního oleje a smícháním s 1 ml methanolu.



Obr. 16 Analyzované esenciální oleje

6.3.2 Příprava zásobního roztoku 1% kyseliny octové

Bylo připraveno 500 ml roztoku 1% kyseliny octové (CH₃COOH) napipetováním vypočteného množství CH₃COOH podle rovnice 1 a doplněno po rysku destilovanou vodou. Takto připravený roztok byl použit k rozpuštění nízkomolekulárního chitosanu.

$$V_{\text{CH}_3\text{COOH}} = \frac{m}{\rho} \quad (1)$$

Kde:

- $V_{\text{CH}_3\text{COOH}}$ pipetovaný objem kyseliny octové [ml]
- m hmotnost kyseliny octové pro přípravu 1 % roztoku [g]
- ρ hustota kyseliny octové [g/cm³]

6.3.3 Příprava chitosanových roztoků a filmů

Chitosanový roztok byl připraven navážením 1 g nízkomolekulárního chitosanu a rozpuštěním ve 100 ml 1% roztoku kyseliny octové za stálého míchání při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. Připravený roztok byl přefiltrován přes fritu (pórovitost P3) za účelem odstranění nerozpuštěných částic a případných nečistot.

Poté byla připravena disperze daného emulgátoru (Tween 20 – T20, Tween 80 – T80, nebo Tween 85 – T85) a esenciálního oleje v poměru 1:4 (směs TEO), která byla přidávána do 1% chitosanového roztoku tak, aby bylo dosaženo požadované koncentrace TEO, a to 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 hm. %. Získaná disperze byla míchána pomocí zařízení Vortex po dobu 1 minuty a poté homogenizována za použití Ultra Turrax IKA® T-25 rychlostí 15 600 otáček/minutu po dobu 5 minut.

Roztoky chitosanu s emulgátorem a EO byly odlévány na sterilní Petriho misky a ponechány v sušárně při teplotě 35 °C cca 24 hodin. Vysušené filmy byly skladovány v exsikátoru při teplotě 25 °C a 60% relativní vlhkosti.

6.3.4 Stanovení zeta potenciálu a velikosti částic filmotvorných roztoků

Stanovení velikosti částic a zeta potenciálu bylo provedeno na chitosanových roztocích s TEO. Pro měření velikosti částic a zeta potenciálu chitosanových roztoků o různých koncentracích bylo používáno zařízení Zetasizer Nano ZS. Vzorky o daných koncentracích byly ředěny 1% roztokem kyseliny octové, která byla dvakrát přefiltrována přes filtr o průměru 0,2 µm. Pro stanovení velikosti částic bylo smícháno 0,5 ml vzorku dané koncentrace s 1 ml 1% kyseliny octové. Pro měření zeta potenciálu byl připraven vzorek obsahující 6 µl vzorku dané koncentrace a 3 ml 1% kyseliny octové.

Velikost částic byla měřena pomocí laserové difrakce (index lomu 1,33 a absorpce 0,001). Zeta potenciál byl vyhodnocen pomocí modelu dle Smoluchowskiho. Všechna měření byla prováděna při 25 °C, ve třech opakováních.

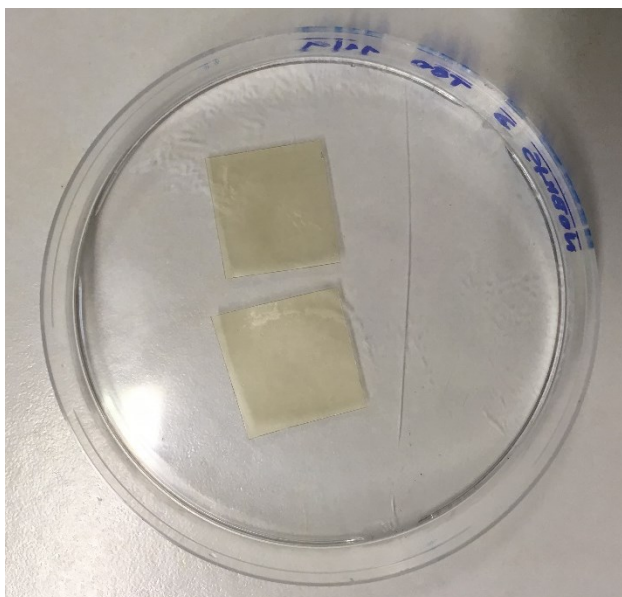
6.3.5 Stanovení obsahu vlhkosti filmů

Obsah vlhkosti byl analyzován sušením filmů o velikosti 2x2 cm v sušárně při teplotě 105 °C do konstantní hmotnosti. Procentuální obsah vlhkosti byl vypočten podle vzorce 2.

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

Kde:

- MC obsah vlhkosti [%]
- M_0 počáteční hmotnost vzorku [g]
- M_d hmotnost vzorku po vysušení [g]



Obr. 17 Vzorky chitosanového filmu s TEO

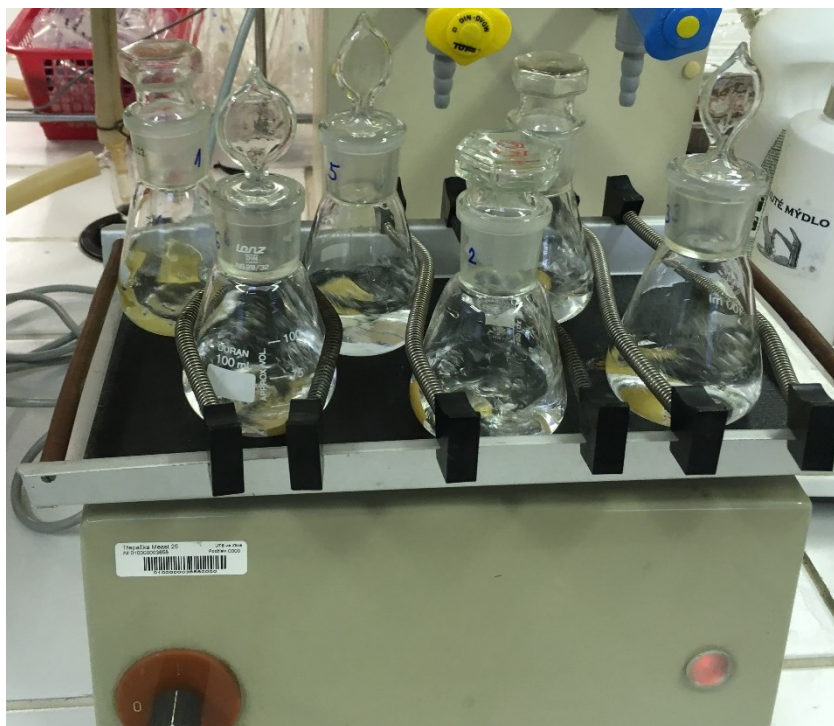
6.3.6 Stanovení rozpustnosti filmů

Rozpustnost filmů byla stanovena metodou dle Mehdizadeha a kol. [79]. Filmy o velikosti 2x2 cm byly vysušeny v sušárně při teplotě 105 °C do konstantní hmotnosti. Následně byly vzorky vloženy do 50 ml destilované vody a umístěny na třepačku, kde byly ponechány po dobu 24 hodin (Obr. 18). Po uplynutí této doby byly zbývající části filmu přefiltrovány z důvodu odstranění přebytečné vody a sušeny při teplotě 105 °C do dosažení konstantní hmotnosti. Výsledná rozpustnost byla vypočtena pomocí vztahu 3.

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

Kde:

- S rozpustnost filmu [%]
- M_i počáteční hmotnost vzorku po vysušení [g]
- M_f hmotnost vzorku po smočení a následném vysušení [g]



Obr. 18 Sada vzorků při stanovení rozpustnosti

6.3.7 Stanovení tloušťky filmů

Tloušťka chitosanových filmů byla stanovena pomocí digitálního mikrometru s přesností ± 0.001 mm. Pro výpočet průměrné tloušťky filmů bylo využito deseti hodnot změřených náhodně na každém vzorku.

6.3.8 Stanovení propustnosti filmů pro vodní páry

Stupeň propustnosti pro vodní páry byl stanoven v souladu s pravidly modifikovanými podle normy ASTM E 96-95 [80]. Vzorky filmů o průměru 36 mm byly umístěny do otevřeného ústí testovací misky obsahující 20 ml destilované vody (100% relativní vlhkost) a umístěny do exsikátoru se silikagelem (0% relativní vlhkost). Miska byla vážena každou hodinu po dobu 6 hodin. Ze závislosti úbytku hmotnosti v daných časových intervalech byla pomocí lineární regrese získána směrnice, která byla použita pro výpočet rychlosti přenosu vodní páry (WVT) podle vzorce 4.

$$WVT = \left(\frac{m}{t}\right) / A \quad (4)$$

Kde:

- WVT rychlost přenosu pro vodní páry [$\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$]
- $\left(\frac{m}{t}\right)$ hmotnostní ztráta vs. čas [$\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$]
- A testovaná plocha filmu [m^2]

Propustnost pro vodní páry (WVP) pak byla vypočítána podle vzorce 5.

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

Kde:

- WVP propustnost pro vodní páry [$\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$]
- WVT rychlost přenosu vodní páry [$\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$]
- Δp rozdíl tlaku vodní páry [Pa]
- S tlak nasycené vodní páry při dané teplotě [Pa]
- R_1 relativní vlhkost v testovací misce [%]
- R_2 relativní vlhkost okolí [%]

6.3.9 Stanovení smáčivosti filmů

Smáčivost byla hodnocena prostřednictvím měření úhlu smáčení provedeného na přístroji See Systém 6.2, kdy byla na část chitosanového filmu nanесena mikropipetou kapka vody o objemu 5 μl . Prostřednictvím digitální kamery byla kapka snímána a následně byl pomocí softwaru vyhodnocen kontaktní úhel (úhel smáčení) na jednotlivých filmech. Měření bylo provedeno vždy třikrát.

6.3.10 SEM analýza filmů

Analýza povrchů a průřezů filmů byla prováděna na Ústavu pro hydrodynamiku AV ČR v Praze za použití skenovacího elektronového mikroskopu Vege 3 s vysokým rozlišením (Tescam, ČR). Před zobrazením byla na film nanесena vodivá povlaková vrstva.

6.3.11 Stanovení antimikrobiální účinnosti filmů

Antimikrobiální aktivita EO a chitosanových filmů byla testována proti vybraným mikroorganismům, a to *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica subsp. enterica sérovar Typhimurium*, *Candida albicans* a *Aspergillus niger* metodou agarového difúzního testu.

Pro testování byly připraveny půdy Mueller Hinton (MH) pro bakterie a Sabourand Dextrose agar (SA) pro kvasinky a plísně. Pro přípravu SA půdy bylo naváženo 26 g příslušné směsi na 400 ml destilované vody (pH = 5.6 ± 0.2). Pro přípravu MH půdy bylo naváženo 8,4 g dopovídající směsi a 6 g agaru na 400 ml destilované vody (pH = 7.4 ± 0.2). Takto připravené roztoky půd byly vloženy do autoklávu (120 °C, 20 minut). Po sterilizaci byly půdy vylity na sterilní Petriho misky a nechány ztuhnout.



Obr. 19 Směsi na přípravu mikrobiologických půd

Do plastových zkumavek bylo připraveno 10 ml suspenze inokula příslušného mikroorganismu o zákalu 0.5 McFarlanda (bakterie, kvasinky) rozmícháním buněk kličkou ve fyziologickém roztoku a následně pomocí přístroje Vortex. Pro přípravu suspenze plísní byla kultura se sporami přelita fyziologickým roztokem s Tween 20 a odsáta do plastové zkumavky. Následně byla rozředěna fyziologickým roztokem na zákal 1.8 McFarlanda.

Na jednotlivé půdy bylo napipetováno 1000 µl suspenze mikroorganismů. Na takto zaočkováné plotny byly po oschnutí sterilní vyžíhanou jehlou nanесeny vždy dva chitosanové disky filmu (průměr 9 mm) příslušné koncentrace.

Kultivace bakterií byla provedena v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Plísně a kvasinky byly ponechány při pokojové teplotě 48 hodin. Po uplynutí stanovené doby kultivace byly odečteny průměry jednotlivých inhibičních zón, které značily míru antimikrobiálního působení filmu o dané koncentraci.

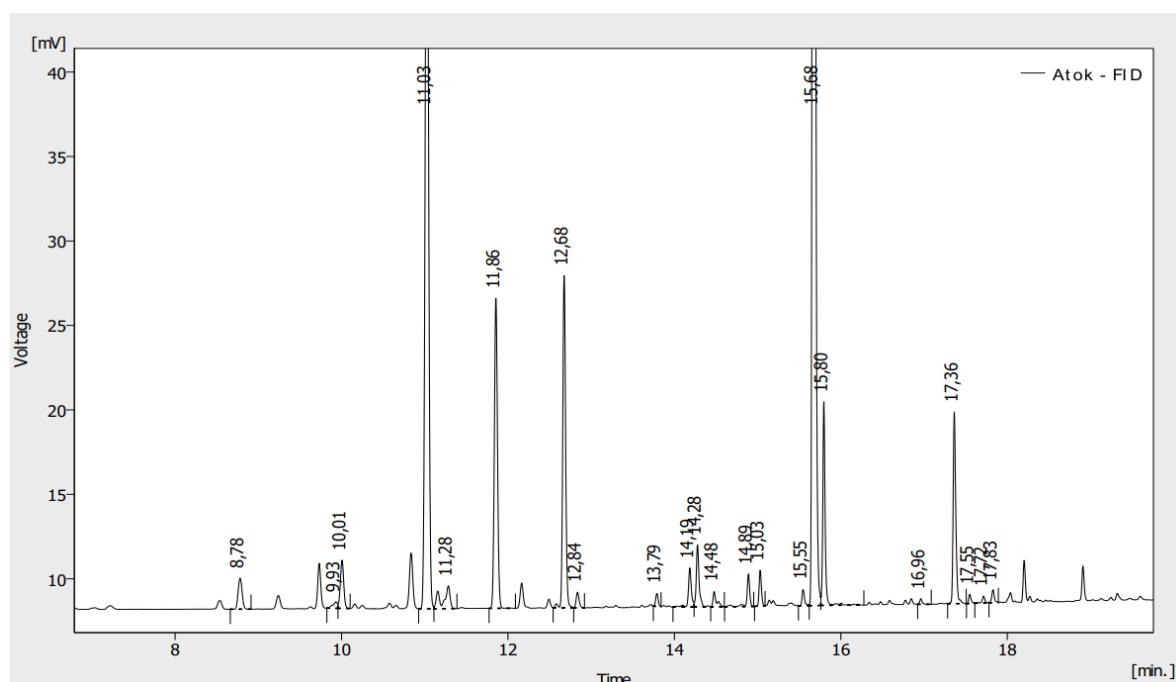
6.3.12 FTIR analýza chitosanových filmů

Vzorky filmů o průměru 12 mm byly vloženy do nástavce přístroje BRUKER Alpha-T, kde byla měřena absorbance infračerveného záření. Spektrum bylo manuálně vyhodnoceno pomocí programu OPUS 7.5.

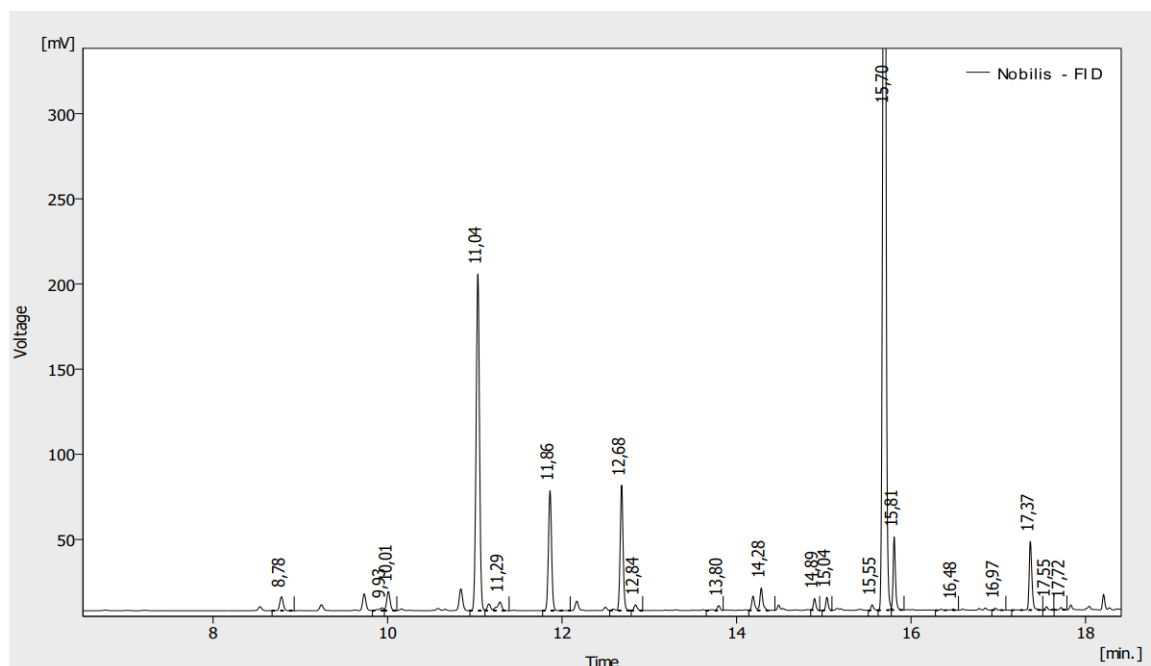
7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Chromatografická analýza esenciálních olejů

Je známo, že složení esenciálních olejů se může výrazně lišit v závislosti na lokalitě, podmínkách a období sběru rostlin. Výsledky GC analýzy tymiánového oleje Atok a Nobilis jsou uvedeny na obr. 20, 21 a v tabulce 5. Z chromatogramů je patrné, že oba vzorky mají podobné složení, u obou olejů byl převažující složkou thymol, *p*-cymen, dále pak linalool, karvakrol a β -karyofylen. Ovšem, procentuální zastoupení jednotlivých složek se mírně liší. U esenciálního oleje Atok bylo prokázáno vyšší množství thymolu (51.7 %) a karvakrolu (2.7 %) v porovnání s EO Nobilis, kdy byl thymol obsažen v zastoupení 34.5 % a karvakrol 1.8 %. Na druhou stranu, u EO Nobilis bylo zjištěno vyšší množství *p*-cymenu (25.3 %) ve srovnání s olejem Atok (16.6 %). Ostatní složky se již zásadně nelišily, rozdíl se pohyboval v jednotkách %. Právě thymol a karvakrol patří mezi velice účinné fenolické biocidní sloučeniny, lze tedy předpokládat, že právě tyto budou mít značný podíl na výsledné antimikrobiální aktivitě. Z výsledků mikrobiologických testů (kapitola 7.10) vyplývá, že v případě vzorků s obsahem tymiánového oleje Atok bylo dosaženo vyšší účinnosti již při nejnižší testované koncentraci směsi TEO, a to 0.5 hm. %.



Obr. 20 Chromatografická analýza EO Atok



Obr. 21 Chromatografická analýza EO Nobilis

Tab. 5 Chromatografická analýza tymiánového oleje Atok a Nobilis

Atok			Nobilis		
Složka	Rt [min]	Plocha [%]	Složka	Rt [min]	Plocha [%]
α -pinen	8.78	0.7	α -pinen	8.78	2.9
β -pinen	9.93	0.2	β -pinen	9.93	0.7
β -myrcen	10.01	0.9	β -myrcen	10.01	2.7
<i>p</i> -cymen	11.03	16.6	<i>p</i> -cymen	11.04	25.3
Eukalyptol	11.28	0.9	Eukalyptol	11.29	2.3
Linalool	12.68	5.4	Linalool	12.68	4.8
Kafr	13.79	0.2	Kafr	13.80	1.6
Menthol	14.19	0.7	Menthol	14.19	1.0
Terpinen-4-ol	14.28	1.0	Terpinen-4-ol	14.28	1.2
Terpineol	14.48	0.3	Terpineol	14.48	0.2
Citronellol	14.89	0.5	Citronellol	14.89	0.5
Neral	15.03	0.5	Neral	15.04	0.4

Tab. 6 Chromatografická analýza tymiánového oleje Atok a Nobilis (pokračování)

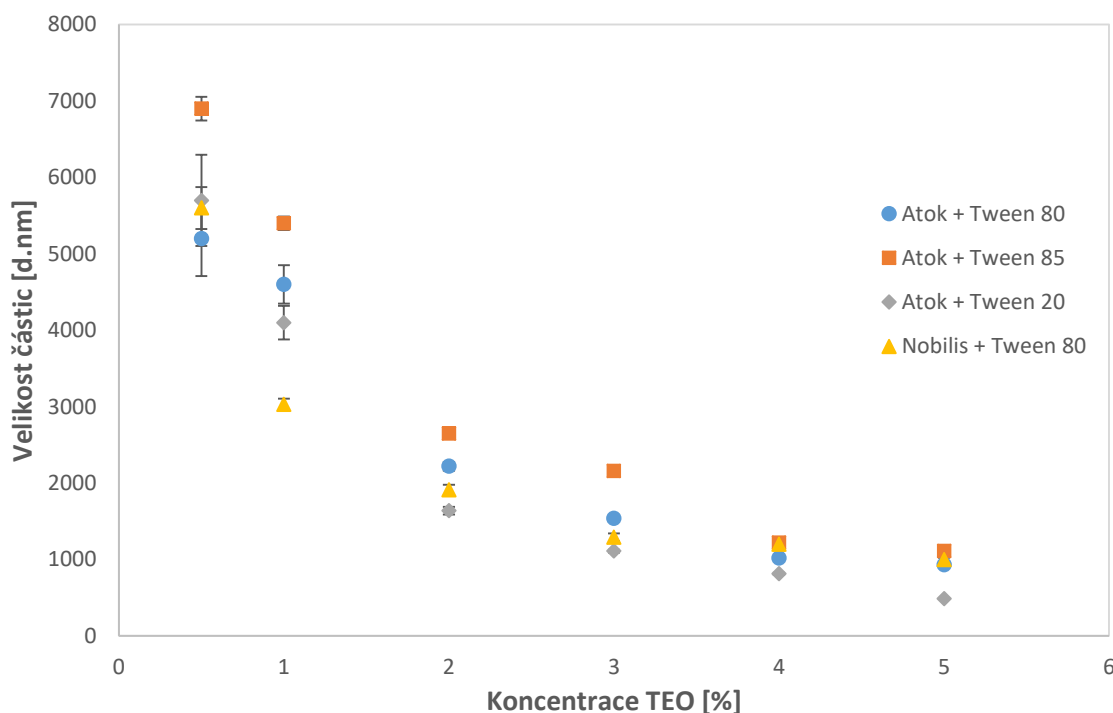
Atok			Nobilis		
Složka	Rt [min]	Plocha [%]	Složka	Rt [min]	Plocha [%]
Cinnamaldehyd	15.55	0.2	Cinnamaldehyd	15.55	0.1
Thymol	15.68	51.7	Thymol	15.70	34.5
Karvakrol	15.80	2.7	Karvakrol	15.81	1.8
β -karyofylén	17.36	2.8	Eugenol	16.48	0.2
Bisabololoxid-A	17.55	0.1	β -karyofylén	17.37	3.4
α -humulen	17.72	0.1	Bisabololoxid-A	17.55	0.1
β -farnesen	17.83	0.2	α -humulen	17.72	0.1
			β -farnesen	17.83	0.1

7.2 Stanovení velikosti částic

Velikost částic je důležitý parametr, který má vliv na výsledné fyzikální a senzorické vlastnosti, jako jsou například vzhled, struktura, stabilita nebo chuť, tedy charakteristiky zásadní pro aplikace chitosanových filmů s EO v praxi [71].

Na obrázku 22 je uvedena závislost velikosti částic jednotlivých filmotvorných roztoků na koncentraci EO s vybraným typem emulgátoru. Je zřejmé, že u nejnižších testovaných koncentrací (0.5 a 1 hm. % TEO) byly částice poměrně velké, tedy na samé hranici měřitelnosti přístroje. Ovšem, u všech vzorků docházelo s rostoucí koncentrací tymiánového oleje k zásadnímu snižování velikosti částic. Největší pokles (91 %) s ohledem na nejnižší a nejvyšší koncentraci TEO je patrný u vzorku tymiánového oleje firmy Atok s emulgátorem Tween 20 (HLB 16.7). Jistý rozdíl v uvedených kombinacích představuje vzorek s olejem Atok ve směsi s Tweenem 85 (HLB 11), kdy se průměrná velikost částic u nejvyšší koncentrace pohybuje cca o 1000 nm výše v porovnání s ostatními emulgátory. I u ostatních testovaných koncentrací vykazoval systém s Tweenem 85 s nejnižší hodnotou HLB největší částice. Tento výsledek byl potvrzen i analýzou SEM (viz kapitola 7.8). Při srovnání roztoků s obsahem tymiánového oleje Atok a Nobilis se stejným emulgátorem, tedy Tweenem 80 (HLB 15), lze pozorovat přibližně stejné hodnoty velikosti částic. Z těchto výsledků je patrné, že charakter

emulgátoru, respektive hodnota hydrofilně-lipofilní rovnováhy (HLB) má vliv na výsledné hodnoty velikosti částic [81].



Obr. 22 Velikost částic u systémů s různými koncentracemi TEO

7.3 Stanovení zeta (ζ) potenciálu

Zeta potenciál je vyjádřením elektrostatického potenciálu (náboje), který je definován jako rozdíl elektrického potenciálu mezi dvěma kapalnými fázemi. Zeta potenciál závisí na chemických a fyzikálních vlastnostech kapalin. Často je využíván pro odhad povrchového náboje pro různé fyzikálně chemické procesy, jako je agregace, adsorpce a dispergace. Důležitý je také pro charakteristiku biopolymerů, jako je v našem případě chitosan [16]. Během analýzy byly stanoveny hodnoty ζ -potenciálu všech kombinací olejů a emulgátorů v koncentraci 0.5 % – 5 hm. % TEO. Pro porovnání bylo provedeno měření ζ -potenciálu samotného chitosanu a dále tymiánových esenciálních olejů v kombinaci s Tweenem 80 (připraveno v poměru 4:1), jehož výsledky jsou uvedeny v tabulce 6. Hodnota ζ -potenciálu (+58,7 mV) 1% roztoku chitosanu v kyselině octové odpovídá skutečnosti, že při kyselém pH jsou přítomné aminoskupiny kladně nabitě. Na druhou stranu ζ -potenciál tymiánových olejů má hodnotu zápornou. Negativní hodnoty byly naměřeny i v práci Bonilly a kol. [71], která studovala vliv bazalkového a tymiánového oleje na vlastnosti chitosanových filmů. Vliv zvyšující se koncentrace TEO směsi na hodnotu ζ -potenciálu je uveden v tabulce 7.

Hodnota potenciálu 0.5% roztoku Atok + Tween 85 (57.3 mV) je téměř shodná se ζ -potenciálem samotného chitosanu. U ostatních systémů došlo při stejné koncentraci již k poklesu ζ -potenciálu.

Z tabulky 7 je patrné, že hodnoty zeta potenciálu vykazovaly rozdílný trend s ohledem na použitý emulgátor. V případě vzorků s Tweenem 20 a 85 došlo s jejich zvyšující se koncentrací k nárůstu zeta potenciálu k hodnotám cca +70 mV, která převyšuje hodnotu ζ -potenciálu samotného chitosanu. Tento jev odporuje původnímu předpokladu a pro jeho vysvětlení bude nutno provést další měření. U nižších koncentrací TEO (0 až 3 hm. %) by se vzhledem k dosaženým hodnotám ζ -potenciálu mohlo předpokládat, že uvedené emulgátory (Tween 20 a 85) favorizují adsorpci chitosanu na rozhraní částic. Podobný jev byl prokázán ve studii [72], která se zabývala filmy na bázi chitosanu a tymiánového či bazalkového oleje s obsahem kyseliny olejové jako potenciálního stabilizačního činidla. Bylo prokázáno, že přítomnost olejové kyseliny způsobila nárůst ζ -potenciálu, a to zřejmě v důsledku její adsorpce na kapky EO, a následné interakce s molekulami chitosanu. Na druhou stranu, v případě roztoků s obsahem Tweenu 80, hodnoty vykazovaly spíše mírně klesající trend, a to bez ohledu na typ tymiánového oleje (Atok vs. Nobilis). Zdá se, že u tohoto emulgátoru hraje primární roli vliv náboje použitých esenciálních olejů. Na základě uvedených výsledků není možno zcela objasnit vzájemné interakce mezi polymerem a aktivní a stabilizační látkou v roztoku. Hodnoty zeta potenciálu jsou evidentně výsledkem několika faktorů, kromě samotného náboje jednotlivých složek je nutno zmínit také vliv HLB hodnoty použitých emulgátorů [82]. Nelze vyloučit ani možnost obsahu potenciálních nečistot, které mohou ovlivňovat velikost náboje částic ve výsledných systémech.

*Tab. 7 Zeta potenciál jednotlivých olejů
a chitosanu v kombinaci s Tween 80*

	Zeta potenciál [mV]
Atok olej	-23.1 ± 0.7
Nobilis olej	-25.6 ± 0.6
Chitosan	+58.7 ± 0.4

Tab. 8 Srovnání zeta potenciálu u systémů s různými kombinacemi olejů a emulgátorů

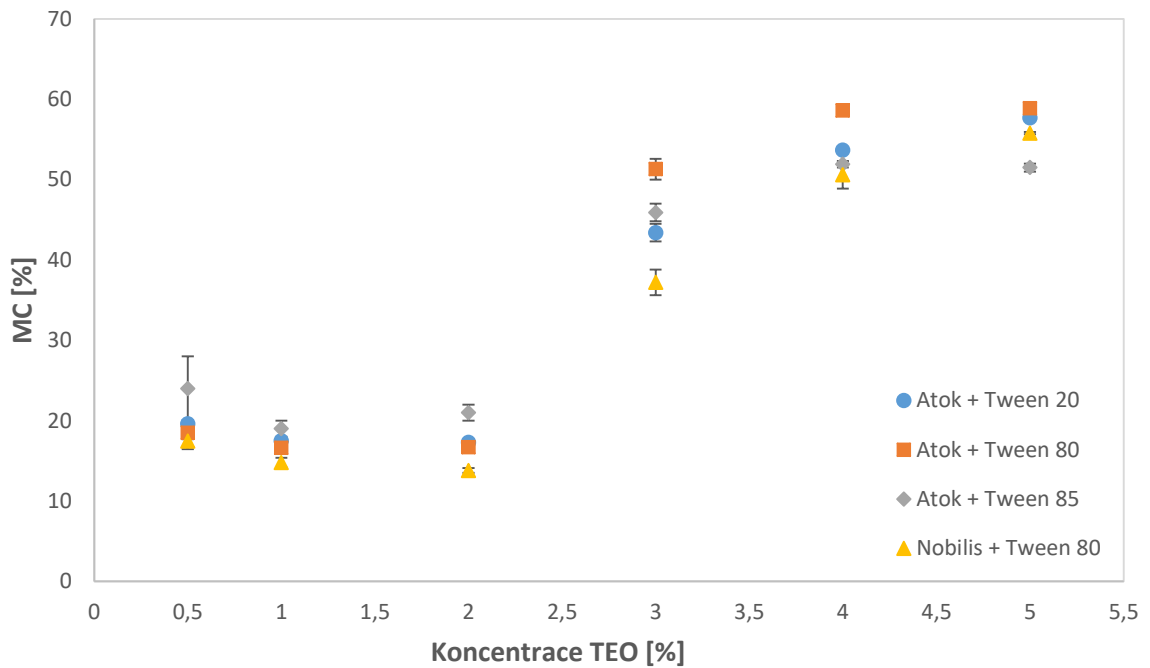
Koncentrace TEO [hm. %]	Atok + T20	Atok + T80	Atok + T85	Nobilis + T80
	Zeta potenciál [mV]			
0.5	40.5 ± 5.7	43.8 ± 1.7	57.3 ± 0.8	34.1 ± 1.7
1	37.4 ± 1.2	28.3 ± 1.4	30 ± 3	27.9 ± 1.2
2	50.6 ± 1.2	30.1 ± 1.2	59.6 ± 0.7	34.2 ± 0.9
3	50.6 ± 1.2	21.5 ± 0.3	54.7 ± 1.2	26.0 ± 0.4
4	64.6 ± 0.9	34.2 ± 0.9	69.6 ± 0.4	27.8 ± 0.4
5	67.5 ± 1.2	22.7 ± 0.3	71 ± 1	27.3 ± 0.6

7.4 Stanovení obsahu vlhkosti a rozpustnosti

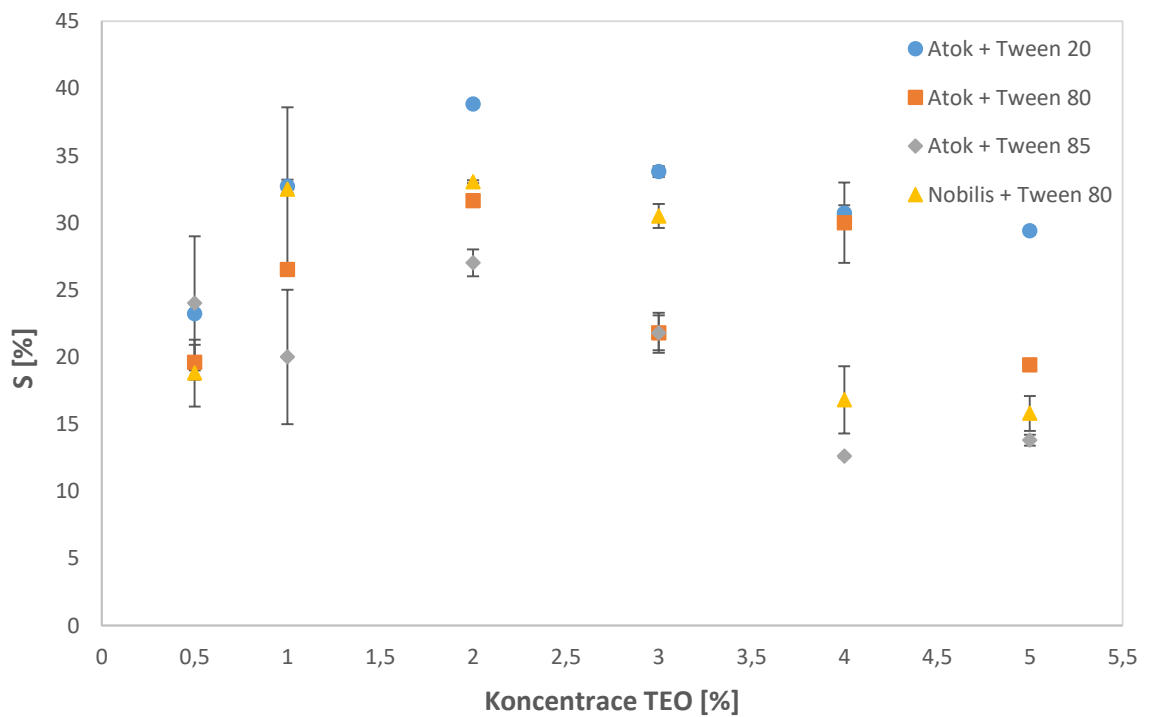
Vliv inkorporace EO na vlhkost (MC) a rozpustnost (S) chitosanových filmů je uveden na obrázku 23 a 24. Zvýšení koncentrace esenciálního oleje většinou přispívá k tvorbě kovalentních vazeb mezi funkčními skupinami chitosanových řetězců. Tento proces vede ke snížení dostupnosti hydroxylových skupin a aminoskupin, a tím se omezují interakce polysacharid-voda pomocí vodíkových vazeb [83]. Námi získané hodnoty obsahu vlhkosti (Obr. 23) vykazují mírně klesající trend v rozmezí koncentrací 0.5–2 hm. %, od 3% koncentrace TEO však dochází u všech vzorků k zásadnímu nárůstu vlhkosti. V porovnání se samotným chitosanem (20.93 %, viz [84]) činí rozdíl téměř 37 %. Důvodem by mohla být nehomogenní a nekompaktní struktura filmů připravovaných s vyššími koncentracemi TEO, a tedy oslabení vazeb mezi polymerním řetězcem a aktivní látkou, což může vést k uvolnění EO do prostředí a následně k zásadnímu ovlivnění fyzikálních vlastností filmu. Dalším vysvětlením by mohlo být zvyšující se množství hydrofilního emulgátoru a jeho převažující vliv nad tvorbou příčných vazeb.

Opačný trend, tedy pokles obsahu vlhkosti v chitosanových filmech s obsahem EO byl zaznamenán v práci S. M. Ojagha [83]. V tomto případě byl chitosan modifikován prostřednictvím různých koncentrací skořicového esenciálního oleje (pouze do 2 obj. %) a Tweenu 80, jehož koncentrace byla konstantní ve všech vzorcích. Pro nalezení vysvětlení růstu vlhkosti u našich filmů s vyšším obsahem TEO a tedy i zjištění primárního vlivu na tuto

charakteristiku by bylo vhodné provést podobný experiment, tedy otestovat vzorky, u nichž by koncentrace emulgátoru byla stabilní.



Obr. 23 Vlhkost chitosanových filmů v závislosti na koncentraci TEO



Obr. 24 Rozpustnost chitosanových filmů v závislosti na koncentraci TEO

Ze závislosti rozpustnosti (Obr. 24) je patrné, že docházelo nejdříve k mírnému nárůstu (do 2 hm. % TEO) a následně pak k poklesu hodnot v porovnání se samotným chitosanem (22.5 % – stanoveno v práci [84]). U vzorků s obsahem Tweenu 20 (HLB 16.7) byly zaznamenány nejvyšší hodnoty rozpustnosti, naopak filmy s emulgátorem Tween 85 (HLB 11) vykazovaly nižší rozpustnost. V případě nejvyšších koncentrací TEO (4 a 5 hm. %) u filmu s Tweenem 85 dosahovaly hodnoty 12 až 14 %, Nejvyšší rozpustnost byla naměřena u vzorků s obsahem 2 hm. % TEO (až 38 % v případě Tweenu 20). Z obrázku 24 je ovšem zřejmé, že reprodukovatelnost výsledků byla horší, vzhledem k vyšším směrodatným odchylkám.

K nárůstu rozpustnosti a zároveň poklesu vlhkosti došlo při přípravě a charakterizaci chitosanových filmů obsahující polyfenoly, tedy běžné složky tymiánového oleje [85]. Rozpustnost při 0.25% koncentraci aktivní látky byla 19.93 % a následně došlo k nárůstu na hodnotu 40.56 % při 1% koncentraci. Naopak, obsah vlhkosti klesl z 25.9 % na 16.94 %.

Je zřejmé, že uvedené fyzikální vlastnosti jsou stejně jako velikost částic a zeta potenciál, ovlivněny více faktory. Význam má nejen použitý EO, ale i typ emulgátoru, jeho HLB hodnota, případně micelizační parametry, které mohou ovlivňovat interakce mezi jednotlivými složkami, jakožto i potenciální solubilizaci tymiánového oleje do amfifilní struktury emulgátoru.

7.5 Stanovení tloušťky filmů

Tloušťka filmů, která může například ovlivňovat bariérové vlastnosti, byla další sledovanou charakteristikou. Chitosanové filmy s nižšími přídávky směsi esenciálního oleje a emulgátoru byly tenčí, pevné a transparentní. U filmů s rostoucí koncentrací TEO se tloušťka filmu zvětšovala, filmy byly spíše matné a snižovala se jejich pevnost. U filmů s nejvyšší koncentrací TEO (5 hm. %) docházelo často k tvorbě trhlin a také olejových ok, z důvodu špatné homogenizace. Tloušťka jednotlivých filmů s rozdílnými kombinacemi olejů a emulgátorů se výrazně nelišila a s rostoucím obsahem TEO se pohybovala v rozmezí 0.04-0.18 mm.

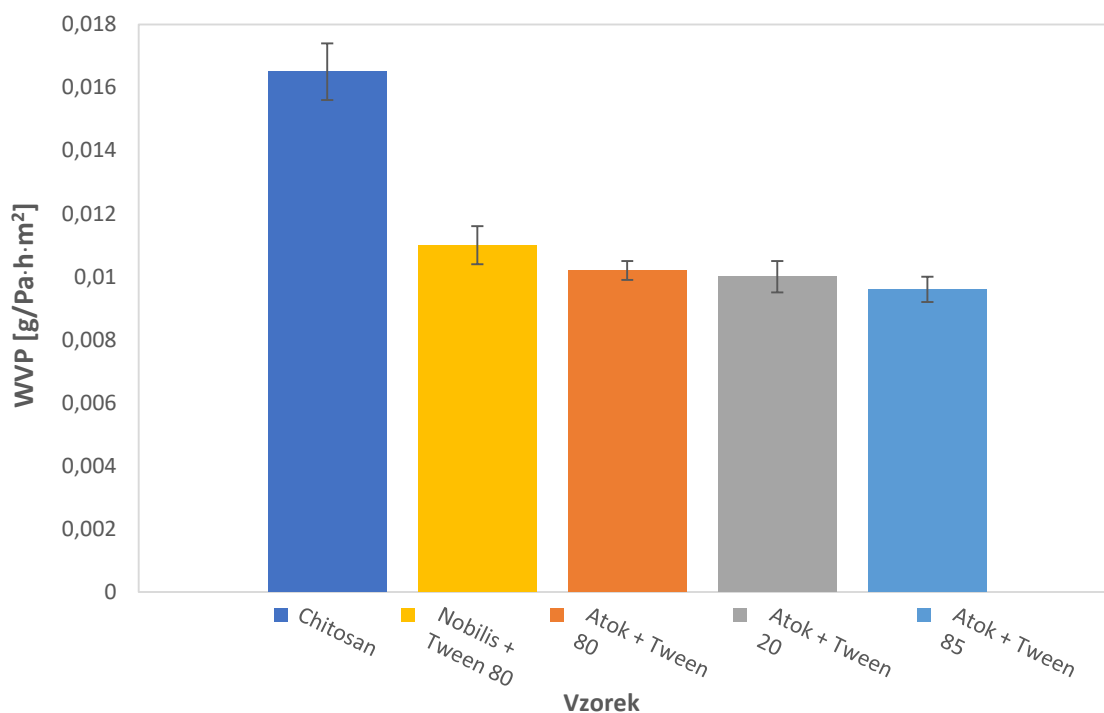
Podobný trend, tedy zvětšující se tloušťka filmu s přídávkem esenciálního oleje byl potvrzen i ve studii L. Sun [85], kdy se tato hodnota pohybovala v rozmezí 0.090 – 0.126 mm (1%). Také ve studii S. M. Ojagha [83] byla naměřena tloušťka filmu odpovídající našim výsledkům, a to okolo 0.107 mm u vzorků s obsahem 2 % hm. skořicového EO.

Tab. 9 Tloušťka chitosanových filmů

Koncentrace TEO [hm. %]	Atok + T20	Atok + T80	Atok + T85	Nobilis + T80
	Tloušťka filmu [mm]			
0,5	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.06 ± 0.01
1	0.08 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01
2	0.11 ± 0.03	0.14 ± 0.03	0.10 ± 0.02	0.11 ± 0.01
3	0.13 ± 0.05	0.14 ± 0.05	0.13 ± 0.03	0.14 ± 0.01
4	0.17 ± 0.04	0.13 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.18 ± 0.01
5	0.17 ± 0.03	0.16 ± 0.03	0.18 ± 0.03	0.18 ± 0.01

7.6 Stanovení propustnosti pro vodní páry

Propustnost polymerních filmů pro vodní páry by měla být pro optimální praktické využití nízká, aby docházelo k prevenci nebo alespoň snížení přenosu vlhkosti mezi okolní atmosférou a ochranným filmem. Samotný přenos vodní páry závisí na poměru hydrofobních a hydrofilních složek filmu, ale také na tloušťce nebo krystalinitě polymeru, kdy amorfni struktury propouštějí více vodních par oproti polymerům krystalickým, jelikož krystalická mřížka znesnadňuje průchod molekul vody [86]. Propustnost je obecně vyjádřena jako doba přenosu vodní páry na jednotku plochy materiálu vyvolaná rozdílem tlaku mezi dvěma povrchy za daných podmínek, a to teploty a vlhkosti. Hlavním cílem je snížit přítomnost kyslíku, který výrazně zkracuje dobu skladovatelnosti [11]. Vliv modifikace chitosanu (koncentrace TEO 2 hm. %) na bariérové vlastnosti filmů je znázorněn na obrázku 25. Je zřejmé, že došlo k zásadnímu poklesu propustnosti u všech modifikovaných vzorků. Hodnota WVP chitosanového filmu ($16.5 \cdot 10^{-3} \text{ g/Pa} \cdot \text{h} \cdot \text{m}^2$) je o řád vyšší než hodnota vzorku obsahujícího esenciální olej s emulgátorem. Nejnižší propustnost byla dosažena u filmu s obsahem esenciálního oleje Atok a Tween 85 (2 hm. %), a to $WVP = 9.6 \cdot 10^{-3} \text{ g/Pa} \cdot \text{h} \cdot \text{m}^2$. U filmů s obsahem 2 hm. % esenciálního oleje Atok s Tweenem 20 a 80 byly hodnoty téměř totožné (cca $10 \cdot 10^{-3} \text{ g/Pa} \cdot \text{h} \cdot \text{m}^2$).



Obr. 25 Propustnost pro vodní páry (WVP) pro chitosanové filmy bez a s obsahem 2 % hm. TEO

Vliv inkorporace esenciálních olejů do chitosanové matrice na snížení propustnosti pro vodní páry byl sledován i v dalších studiích. Ojagh a kol. [83], který studoval účinky různých koncentrací skořicového oleje pro potenciální využití v aktivních obalech, prokázal nejen snížení propustnosti pro vodní páry, ale i vliv na tloušťku filmů. Snížení propustnosti pro vodní páry bylo docíleno i přidávkem karvakrolu, který je součástí tymiánového oleje. Touto problematikou se zabývala L. Sun [85] při sledování fyzikálních vlastností, antioxidační a antimikrobiální aktivity chitosanových filmů obsahujících karvakrol a extrakt z granátového jablka. Bylo prokázáno, že snížení hodnot propustnosti pro vodní páry je způsobeno modifikací hydrofobních částí filmu v důsledku změn poměru mezi chitosanem a karvakrolem [87].

7.7 Stanovení smáčivosti filmů

Kontaktní úhel, který charakterizuje smáčivost daných filmů, je definován jako úhel mezi povrchem filmů a tečnou vedenou z místa kontaktu kapky vody s povrchem. Lze předpokládat, že hodnota kontaktního úhlu se bude zvyšovat s rostoucí hydrofobicitou vzorku [83].

U vzorku samotného chitosanového filmu bez TEO byl naměřen kontaktní úhel 60.7° , tedy poměrně vysoká hodnota. Je ovšem prokázáno, že hydrofilita chitosanu zásadně závisí i na stupni deacetylce DA (námi používaný chitosan má 87 % DA), přičemž s rostoucí hodnotou DA, stoupá i úhel smáčení [88]. Kontaktní úhly jednotlivých esenciálních olejů s emulgátory (obsah TEO 0.5 až 3 hm. %) jsou uvedeny v tabulce 10. Měření bylo pro každý film provedeno třikrát a výsledek je jejich průměrem. U většiny vzorků byl zaznamenán pokles úhlu v porovnání s kontrolním vzorkem, lze tedy předpokládat dominantní vliv hydrofilního emulgátoru. S rostoucí koncentrací TEO (3 hm. %) lze ovšem sledovat nárůst hodnot kontaktního úhlu, tudíž se zde již projevuje role hydrofobního esenciálního oleje. Je ovšem důležité zmínit, že měřené hodnoty jsou zásadně závislé na výběru místa filmu pro nanesení kapky. V případě, že vzorek není zcela homogenní, mohou být hodnoty významně ovlivněny.



Obr. 26 Kontaktní úhel chitosanového filmu s 2 % EO a Tween 20

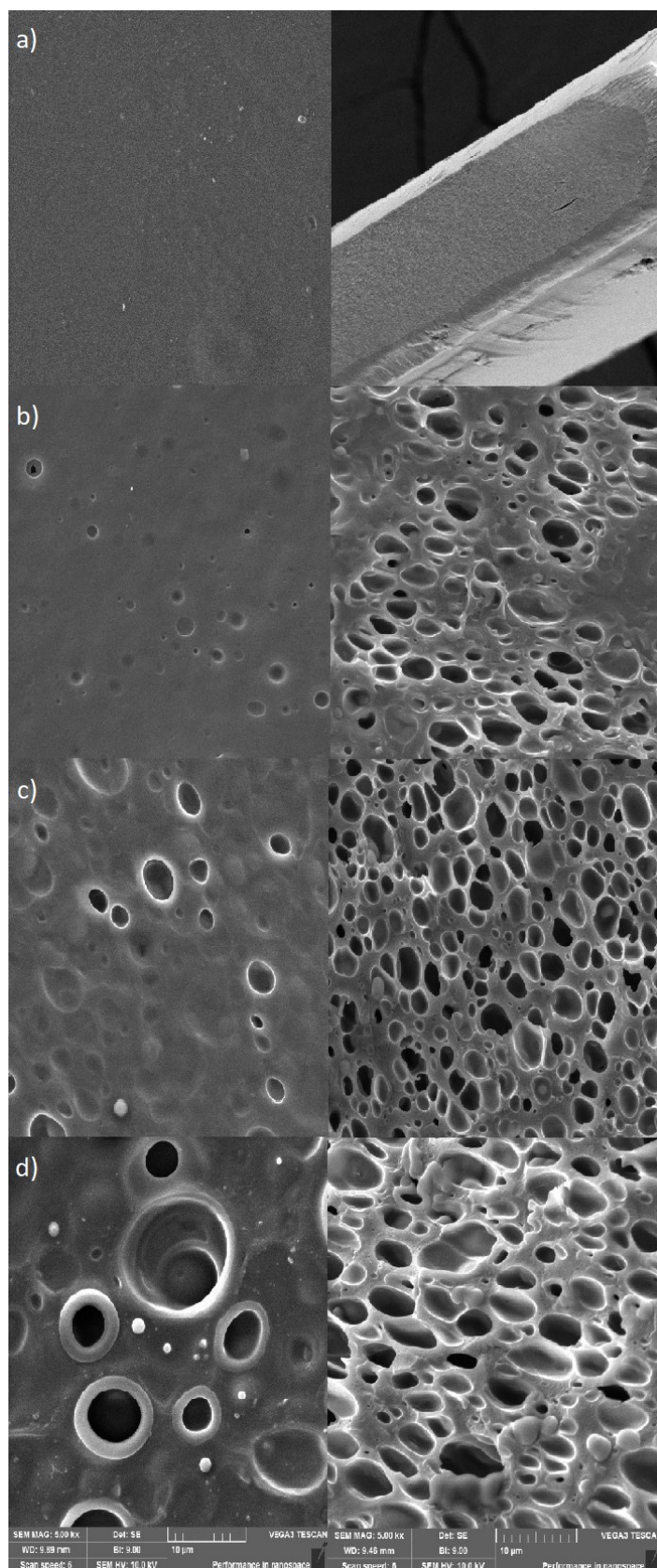
Tab. 10 Úhel smáčení vybraných koncentrací chitosanových filmů

Koncentrace TEO [hm. %]	Atok + T20	Atok + T80	Atok + T85	Nobilis + T80
	Úhel smáčení [°]			
0.5	30.7 ± 0.5	46.0 ± 0.8	42.1 ± 1.8	58.3 ± 1.2
1	39.0 ± 2.0	37.0 ± 4.0	43.1 ± 0.8	56.0 ± 1.0
2	47.7 ± 0.7	27.5 ± 1.6	42.0 ± 3.0	56.4 ± 1.2
3	54.0 ± 3.0	54.6 ± 0.5	60.7 ± 0.9	65.3 ± 0.6

7.8 SEM analýza filmů

SEM analýza skenovacím elektronovým mikroskopem slouží ke sledování mikrostrukturálních změn polymerních filmů vlivem modifikace různými aktivními složkami, které mohou mít vliv na propustnost pro vodní páry nebo i antimikrobiální účinnost. Na obrázku 27 jsou SEM snímky povrchů a řezů chitosanových filmů bez a s obsahem esenciálního tymiánového oleje Atok a různých emulgátorů (obsah TEO 2 hm. %).

Na obrázku 27a je zobrazen snímek kontrolního chitosanového filmu bez přítomnosti esenciálního oleje a emulgátoru. Je patrné, že vzorek má kompaktní homogenní strukturu, bez pórů a jiných deformací. Filmy s obsahem EO a emulgátoru mají méně homogenní strukturu a obsahují různě velké kapky, v závislosti na typu použitého emulgátoru. Na povrchu a řezu chitosanového filmu s Tweenem 20 (Obr. 27b) lze pozorovat nejednotnou distribuci částic o průměrné velikosti od 2 do 5 μm . U chitosanového filmu s Tweenem 80 (Obr. 27c) je na povrchu zřetelné větší množství kapek, na řezu je pak patrná poměrně rovnoměrná distribuce částic s nižším stupněm polydisperzity (průměrná velikost 2 až 3 μm). Na obrázku 27d vlevo, tj. vzorku s obsahem Tweenu 85, jsou na povrchu patrné větší, výrazně ohraničené sférické útvary. Na řezu filmu (Obr. 27d vpravo), jsou v polymerní matici zřetelné větší částice spíše oválného tvaru, přičemž k této deformaci mohlo dojít v důsledku sušení filmu.



Obr. 27 SEM povrchů (vlevo) a řezů (vpravo) chitosanových filmů s 2 % TEO (Atok): a) samotný chitosan, b) Tween 20 (HLB 16.7), c) Tween 80 (HLB 15), d) Tween 85 (HLB 11)

Změny ve struktuře zásadně závisí na složkách obsažených v původním filmotvorném roztoku, tedy v našem případě na přítomnosti hydrofobních esenciálních olejů a také emulgátorů s různou hodnotou HLB. Nejvýraznější částice byly zaznamenány u filmů s obsahem Tweenu 85, který má ze všech testovaných emulgátorů nejnižší hodnotu HLB 11. Lze předpokládat, že tento emulgátor má tendenci posouvat kapky oleje k povrchu filmu, což je patrné i z obrázku 27d vlevo. Vliv emulgátoru na morfoligii chitosanových filmů s obsahem EO byl studován i v práci Y. Peng [89]. Bylo zjištěno, že emulgátor s vyšší HLB (Tween 80) zajistil vznik více homogenní a hladčí struktury. Pro porovnání zde byl ovšem aplikován emulgátor Span 80, který má HLB hodnotu výrazně nižší, než námi studované Tweeny. Přesto lze potvrdit vliv různého typu emulgátoru na morfologické vlastnosti vzorků. Typ esenciálního oleje také výrazně ovlivňuje výslednou strukturu filmu. Zatímco ve studii Valderramy a kol. [90] inkorporace tymiánového oleje do chitosanu vedla k vzniku olejových kapek zakotvených v polymerní matici, podobně jako u našich vzorků, přídavek skořicového EO měl za následek vznik spíše „listové“, vícevrstvé kompaktnější struktury. Na druhou stranu hřebíčkový olej způsobil zásadnější deformaci polymeru v podobě trhlin [83], [91].

7.9 FTIR analýza chitosanových filmů

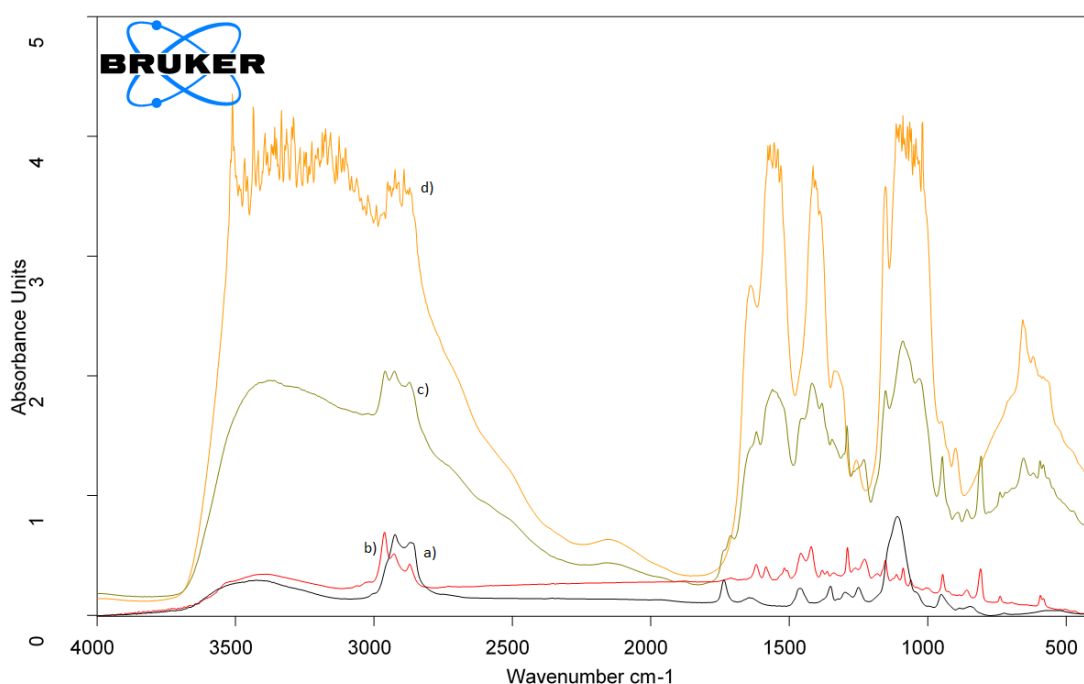
Fourierova transformační infračervená spektroskopie (FTIR) slouží pro stanovení funkčních skupin přítomných v analyzovaném vzorku. Na obrázku 28 je zobrazeno srovnání spekter emulgátoru Tween 80 (a), esenciálního oleje Atok (b), chitosanového filmu obsahujícího 2 hm. % TEO Atok v kombinaci s Tweenem 80 (c) a samotného chitosanového filmu (d). Hlavní absorpční pásy jsou uvedeny v tabulce 10.

U Tweenu 80 (Obr. 28a) byly indikovány charakteristické píky, odpovídající funkčním skupinám tohoto emulgátoru [92]. Z FTIR spektra chitosanu (Obr. 28d) jsou v oblasti 3500-3000 cm^{-1} patrné píky odpovídající volným OH skupinám překrývajícím N-H vazby v aminoskupině. Vlivem přídavku TEO (Obr. 28c) došlo k oslabení tohoto pásu, což vede k předpokladu, že nejvíce reaktivní funkční amino a hydroxylové skupiny chitosanu byly také oslabeny, a to pravděpodobně z důvodu interakcí s funkčními skupinami tymiánového EO [77]. Oblast 2950-2800 cm^{-1} odpovídá „stretching“ módu C-H z $-\text{CH}_2$ skupiny chitosanové molekuly. V důsledku modifikace chitosanu prostřednictvím tymiánového oleje byl indikován pík při 2959 cm^{-1} (Obr. 28c). Lze předpokládat, že absorpční pás v oblasti 1414 cm^{-1} odpovídá $-\text{COO}$ skupinám chitosanu, které jsou zodpovědné za jeho antimikrobiální aktivitu.

Nově vzniklé píky v oblasti $900\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ (Obr. 28c) poukazují na interakci mezi chitosanem a EO, a tím i začlenění EO do chitosanového filmu [70].

Tymiánový olej (b) vykazuje některé charakteristické píky, například při 3390 cm^{-1} (O-H, N-H), 2961 cm^{-1} (C-H „stretching“ metylových a isopropylových skupin na fenolické struktuře thymolu), 1619 cm^{-1} (konjugovaná dvojná vazba cyklu), 1584 cm^{-1} (N-H), 1457 cm^{-1} (CH deformace), 1289 cm^{-1} (C-O-C) [70], [93].

Výsledky FTIR analýzy odhalily některé strukturní změny chitosanu, napovídající o interakci s tymiánovým esenciálním olejem Atok v kombinaci s Tweenem 80.



Obr. 28 FTIR spektra: a) Tween 80, b) tymiánový olej Atok, c) chitosanový film s 2 hm. % TEO Atok s Tween 80, d) chitosan

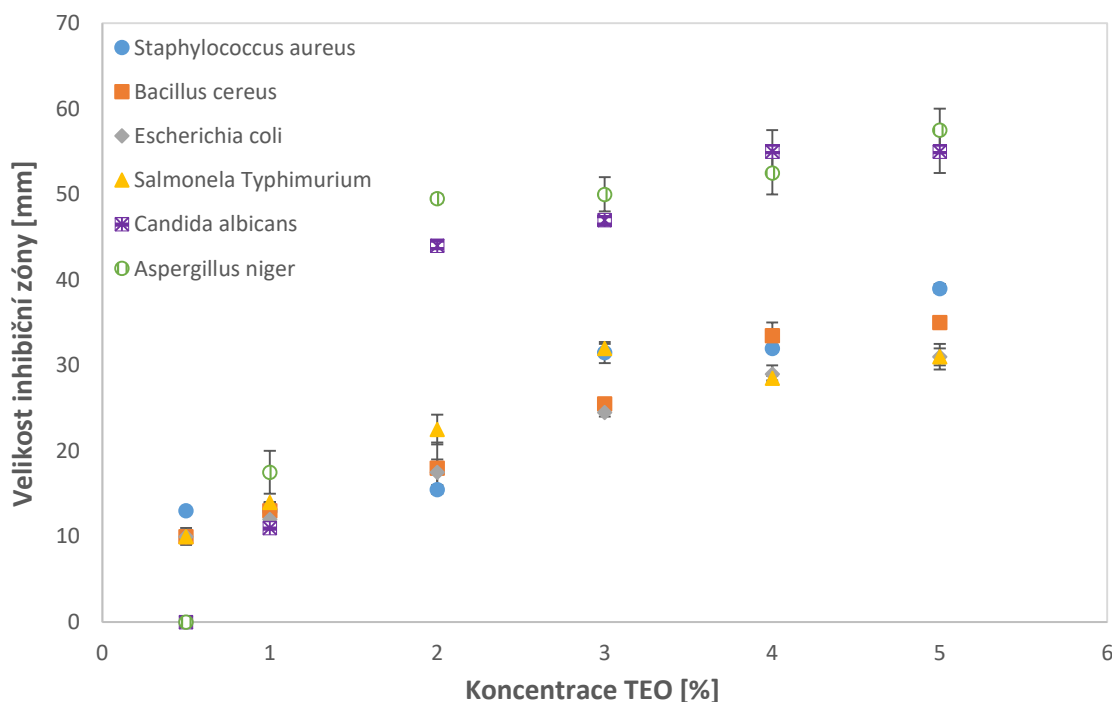
Tab. 11 Výpis signálů FTIR jednotlivých vzorků

Vlnová délka [cm ⁻¹]	Chitosan [v.cm ⁻¹]	Tween 80 [v.cm ⁻¹]	EO Atok [v.cm ⁻¹]	Film s TEO [v.cm ⁻¹]
3000-3500 (N-H, O-H)	3510, 3466, 3435, 3417, 3393, 3358, 3333, 3315, 3290, 3266, 3245, 3224, 3186, 3174, 3156, 3125, 3102,	3429	3390	3372
2500-3000 (C-H)	2923, 2891	2923, 2868	2961, 2927, 2870	2959
1500-2000 (amidy s C=O, N-H)	1569	1736, 1643	1619, 1584, 1517	1618, 1560
1000-1500 (C-O, C-C)	1414, 1152, 1100, 1089, 1072, 1064, 1042, 1019	1462, 1351, 1298, 1250, 1109	1457, 1420, 1381, 1289, 1227, 1153, 1112, 1088,1060	1418, 1291, 1230, 1152, 1089
500-1000 (C-H aromatické)	656	950, 847, 533	945, 858, 809	947, 807, 654, 594

7.10 Stanovení antimikrobiální účinnosti

Antimikrobiální chitosanové filmy jsou v dnešní době využívány především pro tzv. aktivní obaly, jimž byla věnována kapitola 2. Antimikrobiální účinnost námi připravených vzorků byla stanovena pomocí agarové diskové metody. Výsledky jsou uvedeny na obrázku 29 až 32.

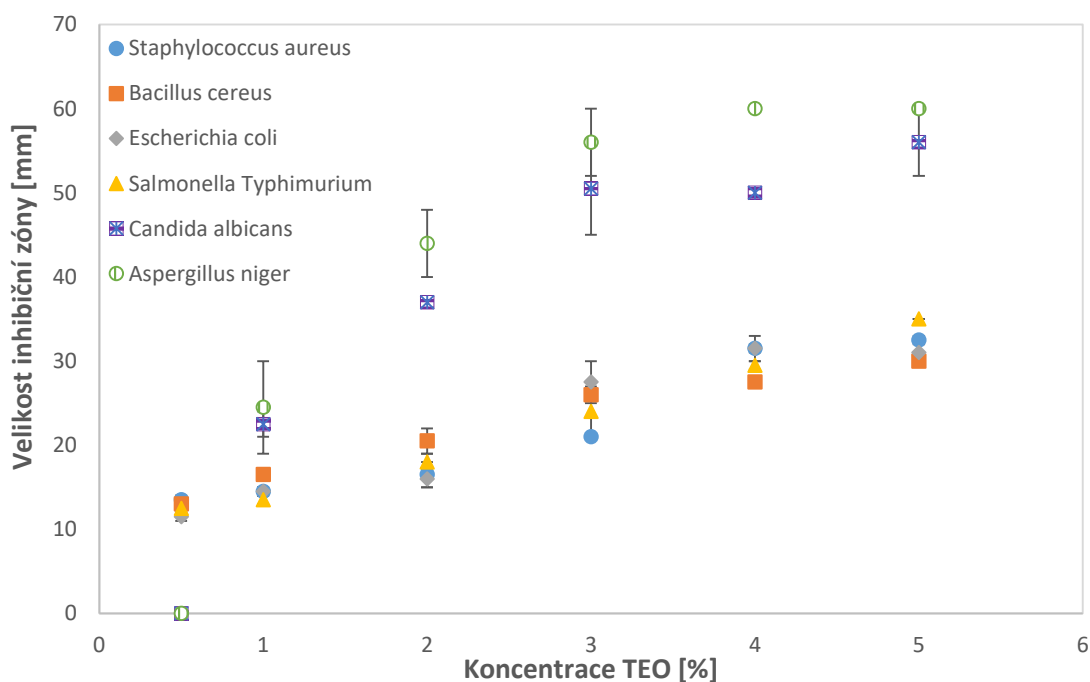
Obrázek 29 znázorňuje velikosti inhibičních zón naměřených u vzorků s obsahem tymiánového oleje Atok s Tweenem 20. Je zřejmé, že bylo dosaženo antimikrobiálního účinku již při nejnižší koncentraci TEO (0.5 hm. %), a to proti Gram⁺ bakteriím (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) a Gram⁻ bakteriím (*Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*). Účinnost proti plísním se projevila až od koncentrace 1 hm. % TEO, od 2 hm. % byl účinek o téměř 31 % vyšší než vůči bakteriím. Se zvyšující se koncentrací docházelo u všech vzorků k nárůstu inhibiční aktivity.



Obr. 29 Antimikrobiální účinnost EO Atok s Tween 20

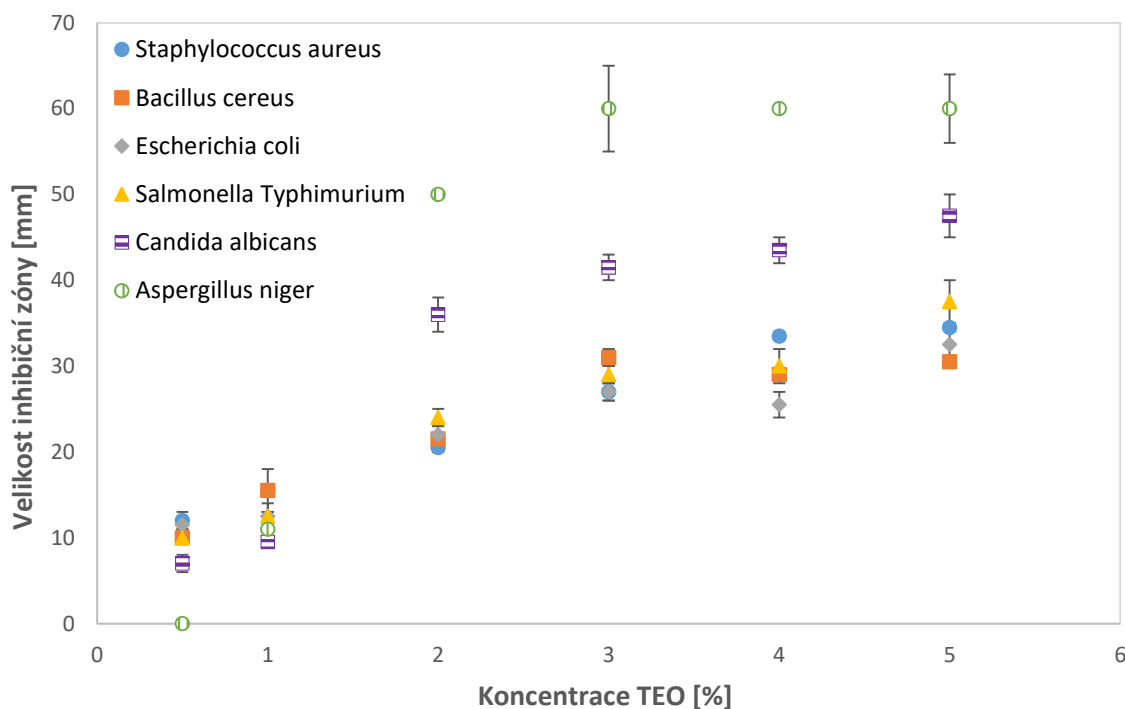
Inhibiční účinek tymiánového oleje Atok s Tweenem 80 na obrázku 30 vykazuje podobný trend jako v předchozím případě. U Gram⁺ a Gram⁻ bakterií dochází k antimikrobiálnímu účinku již při 0.5 hm. % koncentraci TEO. Nárůst je opět pozvolný a nejsou zde významné rozdíly mezi jednotlivými mikroorganismy. Inhibiční účinek na plísně a kvasinky nastává při 1% koncentraci TEO a významně převyšuje inhibiční účinek vůči bakteriím při vyšších

koncentracích. Při 4 a 5% koncentraci TEO byla zaznamenána maximální inhibiční zóna, a to cca 35 mm pro bakterie a 56 mm pro plísně.



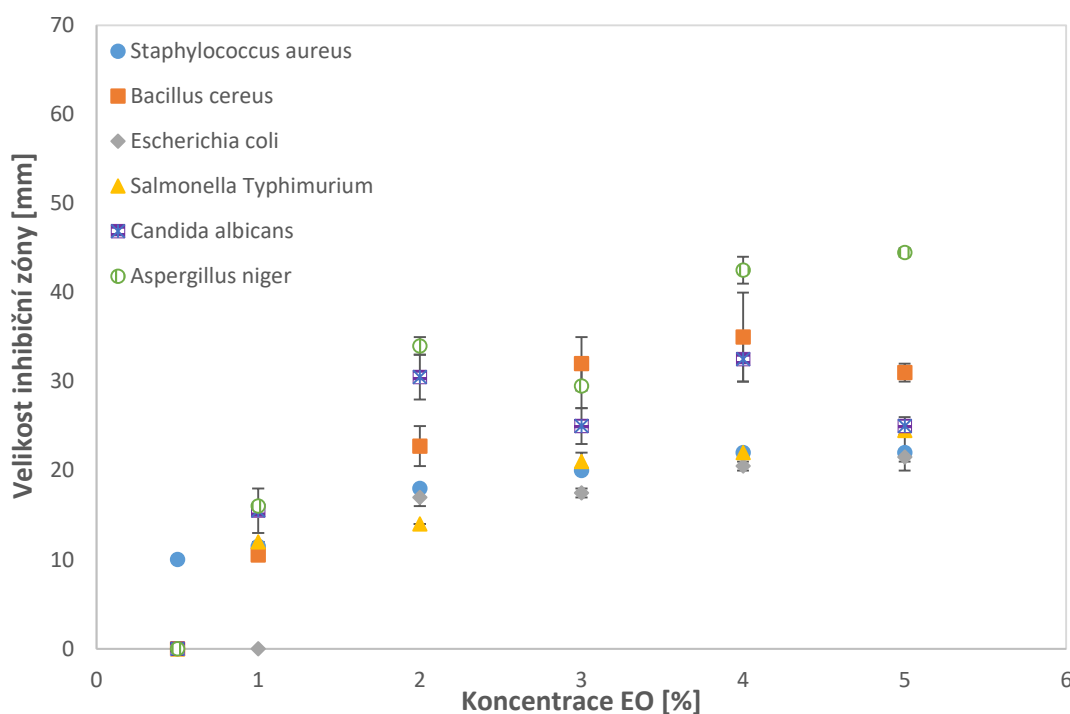
Obr. 30 Antimikrobiální účinnost EO Atok s Tween 80

Vzorčky s tymiánovým olejem Atok a Tweenem 85 vykázaly poněkud rozdílné výsledky (Obr. 31) v porovnání s předchozími dvěma emulgátory. K inhibici bakteriálního růstu dochází podobně již při 0.5% koncentraci, ovšem stejně tak byla zjištěna aktivita proti *Candida albicans*. U bakterií je nárůst pozvolný bez rozdílů mezi jednotlivými druhy, zatímco u kvasinek a plísni je patrný větší rozdíl v účinnosti při vyšších koncentracích TEO. Nejvyššího účinku bylo dosaženo proti plísni *Aspergillus niger*, kdy od 3% koncentrace TEO došlo k vytvoření maximální inhibiční zóny. Menší inhibiční zóna než průměr disku (9 mm) u 0.5% koncentrace TEO byla pravděpodobně způsobena částečnou deformací a odlepením disku od agaru.



Obr. 31 Antimikrobiální účinnost EO Atok s Tween 85

Na obrázku 32 jsou znázorněny výsledky vzorků s obsahem esenciálního oleje Nobilis v kombinaci s Tweenem 80. Inhibiční účinek vůči bakteriím byl prokázán při nejnižší koncentraci (0.5 hm. %) pouze vůči bakterii *Staphylococcus aureus*. Proti dalším testovaným mikroorganismům byla aktivita prokázána až od 1% koncentrace TEO. S dalším zvyšováním obsahu TEO docházelo i k růstu inhibičního účinku u všech vzorků. Obecně ale vzorky s EO Nobilis vykazovaly o něco nižší účinnost v porovnání s EO Atok, kterou lze vysvětlit rozdílným množstvím a zastoupením aktivních látek v daných olejích. Maximální inhibiční zóna byla dosažena proti *Aspergillus niger* při 5% koncentraci TEO, a to 45 mm. V případě plísně *Candida albicans* byl pozorován dokonce mírný pokles aktivity u nejvyšší sledované koncentrace vzorku.



Obr. 32 Antimikrobiální účinnost EO Nobilis s Tween 80

Antimikrobiální účinek tymiánového oleje byl potvrzen v mnoha studiích [64], [94], [95]. M. H. Hosseini ve své práci [91] porovnával antimikrobiální účinek tří esenciálních olejů, a to tymiánového, hřebíčkového a skořicového. Největší antimikrobiální aktivitu vůči testovaným mikroorganismům (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*) vykazoval právě olej tymiánový. Za tymiánovým EO následoval olej hřebíčkový a nejnižší inhibiční aktivitu v tomto srovnání vykazoval olej skořicový. Rozdíly v antimikrobiální účinnosti jsou dány především různým chemickým složením jednotlivých olejů, co se týče samotných složek, nebo jejich množství.

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce byla příprava a charakterizace chitosanových roztoků a filmů s obsahem tymiánového oleje a různých typů emulgátorů, které se navzájem lišily hodnotou HLB.

Úvod praktické části se zabývá chromatografickou analýzou tymiánových olejů, které byly používány pro přípravu antimikrobiálních chitosanových systémů, a to od firmy Atok a Nobilis. Výsledkem byl rozdíl jak v zastoupení některých jednotlivých složek, tak i jejich koncentrace.

Další část práce byla věnována přípravě samotných chitosanových roztoků o různé koncentraci směsi tymiánového oleje a emulgátoru (TEO), v našem případě byly používány emulgátory Tween 20, Tween 80 a Tween 85. U roztoků byla následně měřena velikost částic, která klesala s rostoucí koncentrací TEO. Největší částice byly prokázány u vzorků s obsahem Tweenu 85. Změny ve velikost částic byly potvrzeny i při SEM analýze, kdy byla sledována mikrostruktura filmů. Zatímco chitosanový film měl homogenní strukturu bez pórů, filmy s obsahem TEO obsahovaly různě velké částice v závislosti na použitém emulgátoru. Dalším sledovaným parametrem chitosanových filmotvorných roztoků byl zeta potenciál, který je využíván pro stanovení intenzity náboje. Hodnota zeta potenciálu samotného chitosanového roztoku bez přídavku TEO se pohybovala okolo +58.7 mV. S rostoucím obsahem TEO docházelo k různému průběhu změn zeta potenciálu v závislosti na typu emulgátoru. Roztoky s Tweenem 20 a 85 vykazovaly nárůst zeta potenciálu až k hodnotám, které převyšovaly samotný chitosan. Opačný, tedy klesající trend byl prokázán u systémů s Tweenem 80, bez ohledu na použitý esenciální olej.

Chitosanové filmy připravené odlévací technikou z roztoků byly podrobeny dalším analýzám. Obsah vlhkosti a rozpustnost filmů byla při stanovení ovlivněna přítomností TEO, kdy při vyšších koncentracích docházelo ke vzniku nehomogenních filmů. Nicméně předpokládaného průběhu, tedy poklesu obsahu vlhkosti s rostoucím obsahem TEO bylo dosaženo pouze v rozmezí koncentrací 0.5–2 hm. %, od 3% koncentrace docházelo u všech filmů k nárůstu obsahu vlhkosti. V případě rozpustnosti bylo u všech vzorků dosaženo podobného průběhu, a to nárůstu rozpustnosti u koncentrací 0.5–2 hm. % TEO, a následnému poklesu od 3% koncentrace.

Pro praktické využití polymerních filmů je zásadní propustnost pro vodní páry. Přídavkem tymiánového oleje a emulgátoru do chitosanové matrice bylo dosaženo snížení propustnosti. Tento pokles činil až 58 % u filmu obsahující Tween 85.

Vliv modifikace chitosanu byl analyzován také metodou FTIR. Ze srovnání spekter vyplývá, že u chitosanového filmu s obsahem 2 hm. % TEO došlo ke vzniku nových píků, které signalizují interakci mezi chitosanem a EO, a tím jeho zakomponování do chitosanové matrice.

V neposlední řadě byla sledována antimikrobiální aktivita chitosanových filmů. Pro testování byly vybrány Gram⁻ bakterie (*Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*), Gram⁺ bakterie (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) a *Candida albicans* s *Aspergillus niger* jako zástupci kvasinek a plísní. U všech vzorků byl pozorován rostoucí trend antimikrobiální aktivity se zvyšující se koncentrací TEO. Při srovnání esenciálních olejů firmy Nobilis a Atok se jako účinnější ukázal druhý jmenovaný typ, který byl aktivní již od nejnižších testovaných koncentrací TEO, a to 0.5 hm. %. V tomto oleji byl chromatografickou analýzou prokázán vyšší obsah thymolu a karvakrolu, což jsou vysoce účinné biocidní látky.

Závěrem lze říci, že byly připraveny chitosanové systémy s dostatečnou antimikrobiální aktivitou, jejichž fyzikální a povrchové vlastnosti jsou ovlivněny přítomným esenciálním olejem a především emulgátorem. Výsledky diplomové práce mohou sloužit jako podklady pro další výzkum v oblasti dané problematiky, zaměřený na testování vzorků obsahujících konstantní koncentraci jedné ze složek, za účelem ověření primárního vlivu na výsledné vlastnosti.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ČOPÍKOVÁ, Jana a Andryi SYNYTSYA, *Polysacharidy, jejich význam a uplatnění. Chemické listy [online]. [cit. 2018-01-26]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_09_621.pdf*
- [2] WILLIAMS, Peter A., 2011. *Renewable Resources for Functional Polymers and Biomaterials: Polysaccharides, Proteins and Polyesters. Cambridge: RSC Publishing. ISBN 978-84973-245-1.*
- [3] MAREČEK, Aleš a Jaroslav HONZA, 2014. *Chemie: pro čtyřletá gymnázia. 3. Olomouc: Proton. ISBN 978-80-902402-6-1.*
- [4] BUREŠOVÁ, Iva a Eva LORENCOVÁ, 2013. *Výroba potravin rostlinného původu -zpracování obilovin. Zlín: Academia centrum. ISBN 978-80-7454- 278-7.*
- [5] *Struktura škrobu, In: Exploring Biomolecular Fun [online]. [cit. 2018-01-26]. Dostupné z: <https://tcbiol1362.wordpress.com/2013/03/31/carb-carbs-and-more-carbs-polysaccharides/>*
- [6] *Struktura celulózy, In: MyOrganicChemistry [online]. [cit. 2018-01-26]. Dostupné z: <https://myorganicchemistry.wikispaces.com/Cellulose>*
- [7] ELSABEE, Maher Z. a Entsar S. ABDU, 2013. *Chitosan based edible films and coatings: A review. Elsevier. DOI: 10.1016/j.msec.2013.01.010.*
- [8] BARBOSA, M.A., A.P. PEGO a I.F. AMARAL, 2011. *Comprehensive biomaterials: Metallic, ceramic and polymeric biomaterials. Netherlands: Elsevier, 222-235. ISBN 978-0-08-100692-4.*
- [9] ABDOLLAHI, Mehdi, Masoud REZAEI a Gholamali FARZI, 2012. *A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. Elsevier. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2012.02.012.*
- [10] KIM, Se-Kwon, 2014. *Chitin and chitosan derivatives: Advances in Drug Discovery and Developments. Boca Raton: CRC Press, 511 s. ISBN 978-1-4665-6632-3.*
- [11] DUTTA, Pradip Kumar, Joydeep DUTTA a V. S. TRIPATHI, 2004. *Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. Journal of Scientific & Industrial Research. 20-31. ISSN 0975-1084.*
- [12] VAN DE VELDE, Kathleen a Paul KIEKENS, 2004. *Structure analysis and degree of substitution of chitin, chitosan and dibutyrylchitin by FT-IR spectroscopy and solid*

- state 13C NMR. Carbohydrate Polymers. Elsevier, 409-416. DOI: 10.1016/j.carbpol.2004.08.004.*
- [13] *Struktura chitinu, In: Wikimedia Commons [online]. [cit. 2018-01-26]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chitin_Haworth.svg*
- [14] *Struktura chitosanu, In: Research gate [online]. [cit. 2018-01-26]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/263324738_fig2_Figure-2-Chitosan-chemical-structure*
- [15] TENG, Dayong, 2012. From Chitin to Chitosan. YAO, Kangde, Junjie LI, Fanglian YAO a Yuji YIN. *Chitosan-Based Hydrogels: Functions and Applications*. Boca Raton: CRC Press, s. 2-33. ISBN 978-1-4398-2115-2.
- [16] RAMAWAT, Kishan Gopal a Jean-Michel MÉRILLON, 2015. *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology*. London: Springer reference. ISBN 978-3-319-16298-0.
- [17] KIM, Se-Kwon, 2011. *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivates: Biological Activities and Applications*. Boca Raton: CRC Press. ISBN 978-4398-1603-5.
- [18] FERNÁNDEZ-GARCÍA, Marta a María L. CERRADA, 2014. *Antimicrobial Activity of Chitosan in Food, Agriculture and Biomedicine*. MUÑOZ-BONILLA, Alexandra, Marta FERNÁNDEZ-GARCÍA, María L. CERRADA, Ben ZHONG TANG a Marcos FERNÁNDEZ-GARCÍA. *Polymeric Materials with Antimicrobial Activity: From Synthesis to Applications*. Spain: RCS Publishing.
- [19] VAN DER LUBBEN, Inez M., J. Coos VERHOEF, Gerrit BORCHARD a Hans E. JUNGINGER, 2001. *Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery. European Journal of Pharmaceutical Sciences*. Elsevier, 201-207. DOI: 10.1016/S0928-0987(01)00172-5.
- [20] ZHAO, Jin, 2012. Chitosan-Based Gels for the Drug Delivery System. YAO, Kangde, Junjie LI, Fanglian YAO a Yuji YIN. *Chitosan-Based Hydrogels: Functions and Applications*. Boca Raton: CRC Press, s. 264-290. ISBN 978-1-4398-2115-2.
- [21] *Ciclopoli®, In: Ciclopoli gegen Nagelpilz [online]. [cit. 2018-01-30]. Dostupné z: <https://www.ciclopoli.de/steckbrief/>*
- [22] *Drug delivery systém, In: AZOnano [online]. [cit. 2018-01-30]. Dostupné z: <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=1538>*

- [23] *Polymerní micely*, In: *Cambridge Core [online]*. [cit. 2018-01-30]. Dostupné z: <https://www.cambridge.org/core/journals/mrs-communications/article/catalytic-polymeric-nanoreactors-more-than-a-solid-supported-catalyst/B4D8F832C3E4719EB708205116D30FB6>
- [24] DUTTA, Pradip Kumar, 2016. *Chitin and Chitosan for Regenerative Medicine*. New Delhi, India: Springer, 389 s. ISBN 978-81-322-2511-9.
- [25] VALENCIA-GOMEZ, Laura Elizabeth, Santos Adriana MARTEL-ESTRADA, Claudia VARGAS-REQUENA, José Luis RIVERA-ARMENTA, Noe ALBA-BAENA, Claudia RODRIGUEZ-GONZÁLEZ a Imelda OLIVAS-ARMENDÁRIZ, 2016. *Chitosan/Mimosa tenuiflora films as potential cellular patch for skin regeneration*. *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.09.083.
- [26] *Application of Chitosan-Based Biomaterials in Tissue Engineering, 2011*. KANGDE, Yao, Li JUNJIE, Yao FANGLIAN a Yin YUJI. *Chitosan-Based Hydrogels: Functions and Applications*. Boca Raton: CRC Press, s. 408-458. ISBN 9781138076846.
- [27] DEVI, Nirmla a Joydeep DUTTA, 2017. *Preparation and characterization of chitosan-bentonite nanocomposite films for wound healing application*. *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.02.080.
- [28] *HemCon®*, In: *Bound Tree [online]*. [cit. 2018-01-30]. Dostupné z: <https://www.boundtree.com/hemcon-bandage-pro-hemorrhage-control-bandages-group-3858-150.aspx>
- [29] *Karboxymethyl chitosan*, In: *ResearchGate [online]*. [cit. 2018-01-30]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/258038233_Utilization_of_Carboxymethyl_Chitosan_in_Cosmetics
- [30] RIBEIRO-SANTOS, Regiane, Mariana ANDRADE, Nathália RAMOS DE MELO a Ana SANCHES-SILVA, 2017. *Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends*. *Trends in Food Science & Technology*. Elsevier. DOI: 10.1016/j.tifs.2016.11.021.
- [31] DUTTA, P. K., Shipra TRIPATHI, G. K. MENROTRA a Joydeep DUTTA, 2009. *Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications*. *Food Chemistry*. Elsevier. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.11.047

- [32] BONILLA LAGOS, María Jeannine, 2013. *Development of bioactive edible films and coatings with antioxidant and antimicrobial properties for food use*. Valencia. Tesis Doctoral. Universitat Politecnica de Valencia. Vedoucí práce Amparo Chiralt Boix.
- [33] RUBILAR, J. F., R. M. S. CRUZ, I. KHMELINSKII a M. C. VIEIRA, 2013. CHITOSAN FILMS WITH ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES AS ACTIVE PACKAGING. PEDRESCHI PLASENCIA, F. a Z. CIESAROVÁ. *Chemical Food Safety and Health [online]*. Nova Science Publishers [cit. 2018-01-30]. ISBN 978-1-62948-339-9. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/293171606_CHITOSAN_FILMS_WITH_ANTIOXIDANT_AND_ANTIMICROBIAL_PROPERTIES_AS_ACTIVE_PACKAGING
- [34] KALIA, Susheel a Luc AVÉROUS, 2011. *Biopolymers: Biomedical and Environmental Applications*. Canada: Scrivener Publishing, 614 s. ISBN 978-0-470-63923-8.
- [35] *Active packaging*, In: *Ingredients [online]*. [cit. 2018-01-30]. Dostupné z: <https://www.ingredientsnetwork.com/what-is-smart-packaging-news036518.html>
- [36] FANG, Zhongxiang, Yanyun ZHAO, Robyn D. WARNER a Stuart K. JOHNSON, 2017. *Active and intelligent packaging in meat industry*. *Trends in Food Science & Technology*. Elsevier. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.01.002.
- [37] NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1935/2004 ze dne 27. října 2004 o materiálech a předmětech určených pro styk s potravinami a o zrušení směrnic 80/590/EHS a 89/109/EHS, In. Dostupné také z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32004R1935&from=CS>
- [38] NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 450/2009 ze dne 29. května 2009 o aktivních a inteligentních materiálech a předmětech určených pro styk s potravinami, In: Dostupné také z: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:135:0003:0011:CS:PDFČL>.
- [39] HAFSA, Jawhar, Med ALI SMACH, Med Raafet BEN KHEDHER, Bassem CHARFEDDINE, Khalifa LIMEM, Hatem MAJDOUB a Sonia ROUATBI, 2015. *Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing Eucalyptus globulus essential oil*. *LWT-Food Science and Technology*. Elsevier. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.12.050.

- [40] MUÑOZ-BONILLA, Alexandra, María L CERRADA a Marta FERNÁNDEZ-GARCÍA, 2014. *Polymeric Materials with Antimicrobial Activity: From Synthesis to Applications*. Royal Society of Chemistry. ISBN 978-1-84973-807-1.
- [41] YUAN, Gaofeng, Xiaoe CHEN a Duo LI, 2016. *Chitosan films and coatings containing essential oils: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems*. *Food Research International*. Elsevier. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.10.004.
- [42] ŠUPUT, Danijela Z., Vera L. LAZIC, Senka Z. POPOVIC a Nevena M. HROMIŠ, 2015. *EDIBLE FILMS AND COATINGS – SOURCES, PROPERTIES AND APPLICATION*. *Food and Feed Research*. Serbia. DOI: 10.5937/FFR1501011S.
- [43] EMBUSCADO, Milda E. a Kerry C. HUBER, 2009. *Edible Films and Coatings for Food Applications*. New York: Springer Science+Business Media. ISBN 978-0-387-92823-4.
- [44] DEHGHANI, Samira, Seyed Vali HOSSEINI a Joe M. REGENSTEIN, 2017. *Edible films and coatings in seafood preservation: A review*. *Food Chemistry*. Elsevier. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.07.034.
- [45] KASHIRI, Mahboobeb, Josep P. CERISUELO, Irene DOMÍNGUEZ, Gracia LOPÉZ-CARBALLO, Virginia MURIEL-GALLET, Rafael GAVARA a Pilar HERNÁNDEZ-MUNOZ, 2017. *Zein films and coatings as carriers and release systems of Zataria multiflora Boiss. essential oil for antimicrobial food packaging*. *Food Hydrocolloids*. Elsevier. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2017.02.021.
- [46] RIQUELME, Natalia, Maria Lidia HERRERA a Silvia MATIACEVICH, 2017. *Active films based on alginate containing lemongrass essential oil encapsulated: Effect of process and storage conditions*. *Food and Bioproducts Processing*. Elsevier. DOI: 10.1016/j.fbp.2017.05.005.
- [47] WANG, Long-Feng, Shiv SHANKAR a Jong-Whan RHIM, 2016. *Properties of alginate-based films reinforced with cellulose fibers and cellulose nanowhiskers isolated from mulberry pulp*. *Food Hydrocolloids*. Elsevier. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2016.08.041.
- [48] CAN BASER, K. Hüsnü a Gerhard BUCHBAUER, 2010. *Essential Oils: Science, Technology and Applications*. Boca Raton: CRC Press. ISBN 978-1-4200-6315-8.

- [49] BERGER, R.G., 2007. *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. Germany: Springer Verlag. ISBN 978-3-540-49338-9.
- [50] CHAMORRO, Ester R., Silvia N. ZAMBÓN, Walter G. MORALES, Alfredo F. SEQUEIRA a Gustavo A. VELASCO, 2012. *Study of the Chemical Composition of Essential Oils by Gas Chromatography*. SALIH, Bekir. *Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications*. Croatia: In-Tech Europe. ISBN 978-953-51-0127-7.
- [51] BAKKALI, F., S. AVERBECK, D. AVERBECK a M. IDAOMAR, 2007. *Biological effects of essential oils – A review*. *Food and Chemical Toxicology*. Elsevier. DOI: 10.1016/j.fct.2007.09.106.
- [52] *Izopren*, In: *Wikimedia Commons [online]*. [cit. 2018-01-30]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Isoprene_Structural_Formula_V1.svg
- [53] *Monoterpeny*, In: *Chemistry -Lipids [online]*. [cit. 2018-01-30]. Dostupné z: <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/lipids.htm>
- [54] SLOVÁKOVÁ, Ivana, 2012. *Mikroemulze s obsahem esenciálních olejů*. Zlín. Bakalářská. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce doc. Ing, Věra Kašpárková, CSc.
- [55] *Fenylpropanoidy*, In: *TCI America [online]*. [cit. 2018-01-30]. Dostupné z: http://www.tcichemicals.com/eshop/en/us/category_index/10849/
- [56] ROWE, David J., 2009. *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances*. Chichester, United Kingdom: John Wiley and Sons. ISBN 9781444305517.
- [57] CELIKEL, Nazan a Gokhan KAVAS, *Antimicrobial Properties of Some Essential Oils against Some Pathogenic Microorganisms [online]*. [cit. 2018-01-30]. Dostupné z: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/01450.pdf>
- [58] MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, Ginés Benito, Maria Luisa AMODIO a Giancarlo COLELLI, 2017. *Carvacrol-loaded chitosan nanoparticles maintain quality of fresh-cut carrot*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. Italy: Elsevier. DOI: 10.1016/j.ifset.2017.02.005.
- [59] GOUVEIA, Ana Rita, Márcio ALVES, José Antonio SILVA a Cristina SARAIVA, 2016. *The Antimicrobial Effect of Rosemary and Thyme Essential Oils Against Listeria monocytogenes in Sous Vide Cook-Chill Beef During Storage*. *Procedia Food Science*. Portugal: Elsevier. DOI: 10.1016/j.profoo.2016.10.001.

- [60] MARCHESE, Anna, Ilkay Erdogan ORHAN, Maria DAGLIA, et al., 2016. *Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. Food Chemistry*. Elsevier. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.04.111.
- [61] FERREIRA, Luis E., Bruno I. BENINCASA, Ana L. FACHIN, Suzelei C. FRANCA, Silvia S.H.T. CONTINI, Ana C.S. CHAGAS a Rene O. BELEBONI, 2016. *Thymus vulgaris L. essential oil and its main component thymol: Anthelmintic effects against Haemonchus contortus from sheep. Veterinary Parasitology*. Brazil: Elsevier. DOI: 10.1016/j.vetpar.2016.08.011
- [62] AL-ASMARI, Abdulrahman Khazim, Md Tanwir ATHAR, Ahmed Abdullah AL-FARAIDY a Mohammed Salim ALMUHAIZA, 2016. *Chemical composition of essential oil of Thymus vulgaris collected from Saudi Arabian market. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. Saudi Arabia: Elsevier*. DOI: 10.1016/j.apjtb.2016.11.023.
- [63] NIKOLIČ, Miloš, Jasmina GLAMOČLIJA, Isabel C.F.R. FERREIRA, et al., 2013. *Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of Thymus serpyllum L., Thymus algeriensis Boiss. and Reut and Thymus vulgaris L. essential oils. Industrial Crops and Products*. Elsevier. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.10.006.
- [64] ROTA, María C., Antonio HERRERA, Rosa M. MARTÍNEZ, Jose A. SOTOMAYOR a María J. JORDÁN, 2007. *Antimicrobial activity and chemical composition of Thymus vulgaris, Thymus zygis and Thymus hyemalis essential oils. Food Control*. Spain: Elsevier. DOI: 10.1016/j.foodcont.2007.07.007.
- [65] BRAGA, P.C., M. DAL SASSO, M. CULICI, T. BIANCHI, L. BORDONI a L. MARABINI, 2006. *Anti-inflammatory activity of thymol: inhibitory effect on the release of human neutrophil elastase. Pharmacology*. Milan. DOI: 10.1159/000093790.
- [66] Čl. Burt SA, Vlieland R, Haaqsmán HP, Veldhuizen EJ. *Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against Escherichia Coli O157:H7 by addition of food stabilizers*. J Food Prot. 2005;68(5):919–26
- [67] BOATENG, Joshua S., Kerr H. MATTHEWS, Howard N.E. STEVENS a Gillian M. ECCLESTON, 2007. *Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. Wiley InterScience. UK*. DOI: 10.1002/jps.21210.
- [68] GÓMEZ-ESTACA, J., A LÓPEZ DE LACEY, M.E. LÓPEZ-CABALLERO, M.C. GÓMEZ-GUILLÉN a P. MONTERO, 2010. *Biodegradable gelatinechitosan films*

- incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. Food Microbiology. Spain: Elsevier. DOI: 10.1016/j.fm.2010.05.012*
- [69] ALTIOK, D., E. ALTIOK a F. TIHMINLIOGLU, 2010. *Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. Springer US. DOI: 10.1007/s10856-010-4065-x.*
- [70] RAPHAËL, Kana Jean a Amir MEIMANDIPOUR, 2017. *Antimicrobial Activity of Chitosan Film Forming Solution Enriched with Essential Oils; an in Vitro Assay. Iranian Journal of Biotechnology. DOI: 10.15171/ijb.1360.*
- [71] BONILLA, Jeannine, Maria VARGAS, Lorena ATARÉS a Amparo CHIRALT, 2011. *Physical properties of chitosan-basil essential oil edible films as affected by oil content and homogenization conditions. Procedia Food Science. Spain: Elsevier. DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.009.*
- [72] PERDONES, Ángela, Amparo CHIRALT a Maria VARGAS, 2016. *Properties of film-forming dispersions and films based on chitosan containing basil or thyme essential oil. Food Hydrocolloids. Elsevier. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2016.02.006.*
- [73] JOVANOVIĆ, Gordana D., Anita S. KLAUS a Miomir P. NIKSIC, 2016. *Antimicrobial Activity of Chitosan Films With Essential Oils Against Listeria monocytogenes on Cabbage. Jundishapur Journal of Microbiology. DOI: 10.5812/jjm.34804.*
- [74] QUESADA, J., E. SENDRA, C. NAVARRO a E. SAYAS-BARBERÁ, 2016. *Antimicrobial Active Packaging including Chitosan Films with Thymus vulgaris L. Essential Oil for Ready-to-Eat Meat. Foods. DOI: 10.3390/foods5030057.*
- [75] PIRBALOUTI, Abdollah Ghasemi, Masoud HASHEMI a Fatemeh Taherian GHAFAROKHI, 2013. *Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated Thymus daenensis Celak and Thymus vulgaris L. Industrial Crops and Products. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.04.004.*
- [76] REMYA, S., C.O. MOHAN, J. BINDU, G.K. SIVARAMAN, G. VENKATESHWARLU a C.N. RAVISHANKAR, 2016. *Effect of chitosan based active packaging film on the keeping quality of chilled stored barracuda fish. Journal of Food Science Technology. DOI: 10.1007/s13197-015-2018-6.*

- [77] HROMIŠ, Nevena, Sandra BULUT, Vera LAZIC a Natalija DZINIC, 2015. *Effect of caraway essential oil on the antioxidant and antimicrobial activity of chitosan film*. Food and Feed Research. Serbia. DOI: 10.5937/FFR1501023C.
- [78] WANG, Lina, Fei LIU, Yanfeng JIANG, Zhi CHAI, Pinglan LI, Yongqiang CHENG, Hao JING a Xiaojing LENG, 2011. *Synergistic Antimicrobial Activities of Natural Essential Oils with Chitosan Films*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. China. DOI: 10.1021/jf203165k.
- [79] MEHDIZADEH, Tooraj, Hoosein TAJIK, Seyed Mehdi Razavi ROHANI a Abdol Rassol OROIEHIE, 2012. *Antibacterial, antioxidant and optical properties of edible starch-chitosan composite film containing Thymus kotschyanus essential oil*. Veterinary Research Forum. Iran.
- [80] *ASTM Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials, 1995*
- [81] PERDONES MONTERO, Ángela, 2015. *Antifungal chitosan-based films and coatings containing essential oils for fruit applications*. Valencia. Doctoral thesis. Universitat Politecnica de Valencia. Vedoucí práce Amparo Chiralt Boix, Maria Vargas Colás.
- [82] ĆIRIN, Dejan M., Mihalj M. POŠA, Veljko S. KRSTONOŠIĆ a Maja Lj. MILANOVIĆ, 2012. *Conductometric study of sodium dodecyl sulfate–nonionic surfactant (Triton X-100, Tween 20, Tween 60, Tween 80 or Tween 85) mixed micelles in aqueous solution*. Hemijska Industrija. Serbia. DOI: 10.2298/HEMIND110612059C.
- [83] OJAGH, Seyed Mahdi, Masoud REZAEI, Seyed Hadi RAZAVI a Seyed Hashem HASHEM HOSSEINI, 2010. *Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water*. Food Chemistry. Iran. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.02.033.
- [84] SEDLAŘÍKOVÁ, Jana, Magda DOLEŽALOVÁ, Pavlína EGNER, Jana PAVLAČKOVÁ, Jiří KREJČÍ, Ondřej RUDOLF a Petra PEER, 2017. *Effect of Oregano and Marjoram Essential Oils on the Physical and Antimicrobial Properties of Chitosan Based Systems*. International Journal of Polymer Science. Czech Republic. DOI: 10.1155/2017/2593863.
- [85] SUN, Lijun, Jiaojiao SUN, Lei CHEN, Pengfei NIU, Xingbin YANG a Yurong GUO, 2017. *Preparation and characterization of chitosan film incorporated with*

- thinned young apple polyphenols as an active packaging material*. Carbohydrates Polymers. China. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.01.016.
- [86] ALVES, Vera L.C.D, Bruna P.M. RICO, Rui M.S. CRUZ, António A. VICENTE, Igor KHMELINSKII a Margarida C. VIEIRA, 2017. *Preparation and characterization of a chitosan film with grape seed extract- carvacrol microcapsules and its effect on the shelf-life of refrigerated Salmon (Salmo salar)*. LWT - Food Science and Technology. Portugal. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.11.013.
- [87] YUAN, Gaofeng, Hua LV, Bingjie YANG, Xiaoe CHEN a Haiyan SUN, 2015. *Physical Properties, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Chitosan Films Containing Carvacrol and Pomegranate Peel Extract*. Molecules. China. DOI: 10.3390/molecules200611034.
- [88] FOSTER, Leslie John Ray, Sonia HO, James HOOK, Monica BASUKI a Helder MARÇAL, 2015. *Chitosan as a Biomaterial: Influence of Degree of Deacetylation on Its Physiochemical, Material and Biological Properties*. PLOS One. Australia. DOI: 10.1371/journal.pone.0135153.
- [89] PENG, Yong, Lu YIN a Yunfei LI, 2012. *Combined effects of lemon essential oil and surfactants on physical and structural properties of chitosan films*. International Journal of Food Science and Technology. China. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2012.03155.
- [90] VALDERRAMA, A., W. ALBARRACÍN a N. ALGECIRA, 2015. *Physical and Microbiological Evaluation of Chitosan Films: Effect of Essential Oils and Storage*. International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering. DOI: 10.5281/zenodo.1099038.
- [91] HOSSEINI, M. H., S. H. RAZAVI a M. A. MOUSAVI, 2009. *Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan-based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils*. Journal of Food Processing and Preservation. Iran. DOI: 10.1111/j.1745-4549.2008.00307.x.
- [92] YAMAJI, T., T. SAITO, K. HAYAMIZU, M. YANAGISAWA a O. YAMAMOTO, *Spectral Database for Organic Compounds SDBS. SDBS Compounds and Spectral Search [online]. [cit. 2018-04-11]. Dostupné z: http://sdb.db.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi*

- [93] GHAHFAROKHI, M. Ghaderi, M. BARZEGAR, M. A. SAHARI a M. H. AZIZI, 2016. *Enhancement of Thermal Stability and Antioxidant Activity of Thyme Essential Oil by Encapsulation in Chitosan Nanoparticles*. JAST. Teheran.
- [94] BORUGĂ, O., C. JIANU, C. MIȘCĂ, I. GOLEȚ, A.T. GRUIA a F.G. HORHAT, 2014. *Thymus vulgaris essential oil: chemical composition and antimicrobial activity*. Journal of Medicine and Life. Romania.
- [95] BALLESTER-COSTA, Carmen, Esther SENDRA, Juana FERNÁNDEZ-LÓPEZ a Manuel VIUDA-MARTOS, 2016. *Evaluation of the antibacterial and antioxidant activities of chitosan edible films incorporated with organic essential oils obtained from four Thymus species*. Food Scientists & Technologists. India. DOI: 10.1007/s13197-016-2312-y.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CaCO ₃	Uhličitan vápenatý
NaOH	Hydroxid sodný
HCl	Kyselina chlorovodíková
KMnO ₄	Manganistan draselný
DA	Stupeň deacetylace
Mw	Molekulová hmotnost
UV	Ultrafialová oblast záření
IR	Infračervená oblast záření
FT-IR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GC	Plynová chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
¹ H-NMR	Nukleární magnetická rezonance
kDa	Kilodalton
MDa	Megadalton
SEC	Vylučovací chromatografie
NH ₃ ⁺	Amonný kationt
pK	Záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
G ⁺	Gram pozitivní mikroorganismy
G ⁻	Gram negativní mikroorganismy
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
RNA	Ribonukleová kyseliny
TMC	N-trimethylchitosan
MCC	Mono-N-karboxymethylchitosan
PIC	Polyion komplexní micely
PEG	Poly(ethylenglykol)

PAAm	Poly(akrylamid)
PVP	Poly(vinylpyrollidon)
PAA	Kyselina akrylová
PNIPAm	Poly-N-isopropylakrylamid
PVA	Poly(vinyl alkohol)
GAG	Glykosaminoglykany
3D	Trojrozměrný
CO ₂	Oxid uhličitý
O ₂	Kyslík
MC	Methylcelulóza
EO	Esenciální olej
CMC	Karboxymethylcelulóza
WVP	Propustnost vodních par
SFE	Superkritická fluidní extrakce
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
LC	Kapalinová chromatografie
GC	Plynová chromatografie
MS	Hmotnostní spektroskopie
CCC	Protiproudá chromatografie
SFC	Superkritická fluidní chromatografie
C ₃ H ₆ O ₃	Kyselina mléčná
EP	Evropský parlament
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
EU	Evropská unie
FID	Plameno ionizační detektor
CH ₃ COOH	Kyselina octová

TEO	Směs esenciálního oleje s emulgátory
WVT	Rychlost přenosu pro vodní páry
MH	Mueller Hinton půda
SA	Sabourand Dextrose
Rt	Retenční čas
HLB	Hydrofilně-lipofilní rovnováha
SEM	Analýza skenovacím elektronovým mikroskopem
DD	Stupeň deacetylace
OH	Hydroxy skupina
NH	Amino skupina
COO	Karboxy skupina
CH	Methylová skupina

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1</i> Struktura škrobu [5]	13
<i>Obr. 2</i> Struktura celulózy [6]	13
<i>Obr. 3</i> Struktura chitinu [13]	14
<i>Obr. 4</i> Struktura chitosanu [14]	15
<i>Obr. 5</i> Ciclopoli® [21]	22
<i>Obr. 6</i> Formy nosičů aktivních látek [22]	23
<i>Obr. 7</i> Polymerní micely [23]	23
<i>Obr. 8</i> HemCon® [28]	26
<i>Obr. 9</i> Karboxymethyl chitosan [29]	27
<i>Obr. 10</i> Aktivní obal Thinfilm [35]	28
<i>Obr. 11</i> Porovnání morfologických	30
<i>Obr. 12</i> Izoprenová jednotka [52]	34
<i>Obr. 13</i> Monoterpeny [53]	35
<i>Obr. 14</i> Fenylpropanoidy [55]	35
<i>Obr. 15</i> δ -Lakton (vpravo) a γ -Lakton (vlevo) [55, str. 66], [56]	36
<i>Obr. 16</i> Analyzované esenciální oleje	45
<i>Obr. 17</i> Vzorky chitosanového filmu s TEO	47
<i>Obr. 18</i> Sada vzorků při stanovení rozpustnosti	48
<i>Obr. 19</i> Směsi na přípravu mikrobiologických pūd	50
<i>Obr. 20</i> Chromatografická analýza EO Atok	52
<i>Obr. 21</i> Chromatografická analýza EO Nobilis	53
<i>Obr. 22</i> Velikost částic u systémů s různými koncentracemi TEO	55
<i>Obr. 23</i> Vlhkost chitosanových filmů v závislosti na koncentraci TEO	58
<i>Obr. 24</i> Rozpustnost chitosanových filmů v závislosti na koncentraci TEO	58
<i>Obr. 25</i> Propustnost pro vodní páry (WVP) pro chitosanové filmy bez a s obsahem 2 % hm. TEO	61
<i>Obr. 26</i> Kontaktní úhel chitosanového filmu s 2 % EO a Tween 20	62
<i>Obr. 27</i> SEM povrchů (vlevo) a řezů (vpravo) chitosanových filmů s 2 % TEO (Atok): a) samotný chitosan, b) Tween 20 (HLB 16.7), c) Tween 80 (HLB 15), d) Tween 85 (HLB 11)	64
<i>Obr. 28</i> FTIR spektra: a) Tween 80, b) tymiánový olej Atok, c) chitosanový film s 2 hm. % TEO Atok s Tween 80, d) chitosan	66

<i>Obr. 29 Antimikrobiální účinnost EO Atok s Tween 20</i>	<i>68</i>
<i>Obr. 30 Antimikrobiální účinnost EO Atok s Tween 80</i>	<i>69</i>
<i>Obr. 31 Antimikrobiální účinnost EO Atok s Tween 85</i>	<i>70</i>
<i>Obr. 32 Antimikrobiální účinnost EO Nobilis s Tween 80</i>	<i>71</i>

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1 Vlastnosti chitosanu [10, str. 19–20]</i>	18
<i>Tab. 2 Příklady derivátů chitosanu [10, str. 4]</i>	21
<i>Tab. 3 Příklady přírodních a syntetických polymerů [24, str. 5–7]</i>	24
<i>Tab. 4 Účinky významných aktivních látek obsažených v <i>Thymus vulgaris</i> [62]</i>	38
<i>Tab. 5 Chromatografická analýza tymiánového oleje <i>Atok a Nobilis</i></i>	53
<i>Tab. 5 Chromatografická analýza tymiánového oleje <i>Atok a Nobilis</i> (pokračování)</i>	54
<i>Tab. 6 Zeta potenciál jednotlivých olejů</i>	56
<i>Tab. 7 Srovnání zeta potenciálu u systémů s různými kombinacemi olejů a emulgátorů</i>	57
<i>Tab. 8 Tloušťka chitosanových filmů</i>	60
<i>Tab. 9 Úhel smáčení vybraných koncentrací chitosanových filmů</i>	62
<i>Tab. 10 Výpis signálů FTIR jednotlivých vzorků</i>	67