



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

TIŠTĚNÝ INDIKÁTOR PH PRO BALENÉ POTRAVINY

PRINTED INDICATOR OF PH VALUE DESIGNED FOR FOOD PACKAGING

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Michaela Valíková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Mária Veselá, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1733/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Michaela Valíková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **RNDr. Mária Veselá, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Tištěný indikátor pH pro balené potraviny

Zadání diplomové práce:

1. Vypracujte literární rešerši na téma chemické indikátory pro inteligentní obaly s důrazem na indikátory změny pH prostředí obalu způsobené mikrobiálním rozkladem potravin.
2. Prostudujte síťování chitosanu v prostředí polyvinylalkoholu (PVA) pomocí vanilinu.
3. Připravte tenké vrstvy s polymerní směsí PVA a chitosanu s obsahem aktivních látek, schopných barevné odezvy na různé koncentrace amoniaku v prostředí.
4. Studujte rychlost barevné odezvy na koncentraci amoniaku.
5. Ověřte tisk optimalizované formulace indikátoru.
6. Výsledky vyhodnoťte a diskutujte.

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Michaela Valíková
studentka

RNDr. Mária Veselá, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Cíl této diplomové práce spočíval v navržení inteligentního indikátoru pH pro balené potraviny. Intelligentní balení představuje novou skupinu obalů, které jsou schopny prostřednictvím různých indikátorů poskytovat spotřebitelům informaci o kvalitě balených potravin v reálném čase. V teoretické části byla vypracována rešerše na téma inteligentní balení s důrazem na indikátory čerstvosti. Menší část byla věnována problematice kažení potravin. Důraz byl kladen i na popis hlavních komponent funkční vrstvy, a na problematiku síťování chitosanu. V rámci experimentální části bylo studováno síťování chitosanu v prostředí polyvinylalkoholu pomocí vanilinu. U připravených vrstev byla sledována jejich rozpustnost a stupeň zesíťování, který byl stanoven pomocí ninhydrinové metody. Pro vytvoření kolorimetrického indikátoru pH byl do kompozice vpraven extrakt anthokyanů, který byl získán extrakcí z červeného zelí. Byly připraveny celkem 3 extrakty anthokyanů, u kterých byla stanovena celková koncentrace anthokyanů metodou difference. U připravených vrstev byla spektrofotometricky hodnocena jejich barevná reakce při působení různých koncentrací plynného amoniaku. Sledována byla také stabilita vrstev v čase. Poslední částí experimentu byla aplikace připravených vrstev do balení s reálným masem.

KLÍČOVÁ SLOVA

inteligentní balení, indikátor pH, chitosan, vanilin, anthokyaniny, amoniak, balené potraviny

ABSTRACT

The aim of this diploma thesis was to design an intelligent indicator of pH value for food packaging. Intelligent packaging is a new group of packaging that is able to provide costumers real-time information on the quality of packaged food through various indicators. In the theoretical part, a search was made on the topic of intelligent packaging with emphasis on freshness indicators. A smaller part was devoted to the issue of food spoilage. Emphasis was also placed on the description of the main components of the functional layer, and on the issue of chitosan crosslinking. In the experimental part, the crosslinking of chitosan with the addition of polyvinylalcohol using vanilin was studied. Prepared layers were monitored for their solubility and degree of crosslinking, which was determined using the ninhydrin method. To create a colorimetric pH indicator, an anthocyanin extract obtained by extraction from red cabbage was incorporated into the composition. A total of 3 anthocyanin extracts were prepared, for which the total anthocyanin concentration was determined by the difference method. The color of the prepared layers was evaluated spectrophotometrically under the action of various concentrations of the ammonia gas. The stability of the layers over time was also monitored. The last part of the experiment was the application of the prepared layers in a package with real meat.

KEYWORDS

intelligent packaging, pH indicator, chitosan, vanilin, anthocyanins, ammonia, packaged food

VALÍKOVÁ, Michaela. *Tištěný indikátor pH pro balené potraviny*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138961>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Mária Veselá.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně, a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce RNDr. Márii Veselé, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a věnovaný čas. Dále bych chtěla poděkovat všem kolegům z laboratoře fotochemie, především vedoucímu laboratoře prof. Ing. Michalovi Veselému, CSc. za veškerou pomoc a poskytnutí laboratorní techniky. Poděkování patří i mé rodině, která mě během studia vždy plně podporovala.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Kažení potravin.....	8
2.1.1	Kažení masa	8
2.1.2	Bakterie	9
2.1.3	Plísně.....	10
2.1.4	Kvasinky	11
2.1.5	Mikroorganismy vyvolávající alimentární infekce	11
2.2	Detekce plynů	11
2.3	Produkce biogenních aminů.....	11
2.3.1	Celkový těkavý zásaditý dusík (TVB-N).....	12
2.4	pH masa	12
2.5	Funkce obalu.....	12
2.6	Žádoucí funkční vlastnosti obalu	13
2.7	Inteligentní balení	13
2.7.1	Senzory a indikátory času a teploty	13
2.7.2	Senzory vlhkosti.....	15
2.7.3	Senzory kyslíku.....	15
2.7.4	Senzory pH.....	16
2.8	Typy inteligentního balení	17
2.8.1	Filmy	17
2.8.2	Čárové kódy	17
2.8.3	Štítky	18
2.9	Aplikace inteligentního balení	19
2.9.1	Mořské plody	19
2.9.2	Maso.....	19
2.9.3	Mléčné výrobky	20
2.9.4	Ovoce, zelenina a další potraviny	21
2.10	Legislativa inteligentních obalů.....	21
2.11	Kompozice tištěného indikátoru	22
2.11.1	Chitosan	22
2.11.2	Síťování chitosanu	24
2.11.3	Polyvinylalkohol	27
2.11.4	Anthokyaniny.....	27
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	32
3.1	Použité chemikálie.....	32
3.2	Přístroje.....	32
3.3	Použitý software	33
3.4	Izolace anthokyanů	33
3.5	Příprava pufrů	33
3.6	Měření absorpčních spekter	34
3.7	Stanovení celkové koncentrace anthokyanů	34

3.8	Příprava základních roztoků	35
3.9	Příprava filmů	36
3.10	Stanovení rozpustnosti	36
3.11	Stanovení stupně zesíťení	37
3.12	Přetisk vrstev	38
3.13	Měření stability filmů v čase	39
3.14	Měření barevnosti	40
3.15	Měření barevnosti vrstev po kontaktu s amoniakem	43
3.16	Příprava experimentů s masem	44
3.16.1	Experiment s rybou	44
3.16.2	Experiment s kuřecím masem	45
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	46
4.1	Absorpční spektra anthokyanových extraktů	46
4.2	Celková koncentrace anthokyanů v extraktech	47
4.3	Stanovení rozpustnosti	48
4.4	Stanovení stupně zesíťení	48
4.5	Úprava pH připravených filmů	49
4.6	Měření stability filmů v čase	50
4.7	Měření barevnosti vrstev po kontaktu s amoniakem	53
4.8	Výsledky experimentů s masem	59
4.8.1	Experiment s rybou	59
4.8.2	Experiment s kuřecím masem	61
5	ZÁVĚR	64
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	65
7	SEZNAM ZKRATEK A POUŽITÝCH SYMBOLŮ	78

1 ÚVOD

Balení potravin je jedním z klíčových prvků produktu z pohledu spotřebitele, a hraje velmi důležitou roli při moderním komerčním obchodování. Obal zachovává kvalitu a bezpečnost potravin, usnadňuje přepravu, zabraňuje poškození a ztrátám produktu, snižuje ekonomické ztráty a pomáhá při marketingu produktu [1].

V posledních desetiletích si spotřebitelé stále více uvědomují, co jedí. Kromě toho, že požadují minimálně zpracované a vysoce výživné potraviny, požadují také chemicky a mikrobiologicky bezpečnější potraviny se zvýšenou trvanlivostí. Všechny tyto potřeby spotřebitelů vedou potravinářský průmysl k vývoji nových typů obalových materiálů, které jsou kromě ochrany potravin před vnějším prostředím navíc schopny zvýšit skladovatelnost produktu (aktivní balení) nebo komunikovat se spotřebitelem z hlediska bezpečnosti a čerstvosti produktu (inteligentní balení) [2]. Za tímto účelem jsou dnes široce vyvíjeny inteligentní balicí systémy, založené na kolorimetrických indikátorech. Tyto indikátory jsou schopny poskytovat spotřebitelům informaci o kvalitě balených potravin v reálném čase prostřednictvím senzorů nebo indikátorů, a to zejména indikátorů pH [1].

Když se určitá potravina začne kazit, dojde ke změně pH, a tuto změnu lze sledovat pomocí indikátoru pH, který je zabudován na pevném nosiči nebo na samotném obalovém materiálu. Při využití kolorimetrického indikátoru se změna v indikátoru pH promítne do změny barvy, kterou následně spotřebitel pozoruje. Takové indikátory jsou často využívány pro syrové ryby nebo masné výrobky, protože během procesu hniloby zvyšují své pH v důsledku růstu mikroorganismů, které produkují sloučeniny dusíku.

Ačkoli většina indikátorů čerstvosti založených na indikaci změn pH využívá syntetická barviva, v posledních letech se výzkum zaměřuje na možnosti náhrady syntetických barviv za přírodní indikátory pH, převážně pak na extrakty anthokyanů získaných z rostlin. Kromě přírodního původu mají anthokyany oproti syntetickým barvivům i řadu dalších výhod – jsou netoxické, v přírodě široce distribuované, tedy snadno dostupné, a jejich získávání je poměrně levné [2].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kažení potravin

Téma bezpečnosti potravin úzce souvisí s veřejným zdravím. Kvůli častým otrávám potravinami a šíření nemocí přenášených potravinami, mají lidé ohledně bezpečnosti potravin obavy. Tyto incidenty vedly nejen k obrovským ekonomickým ztrátám, ale staly se také skrytým nebezpečím, které ohrožuje veřejné zdraví [3].

Zkažení potravin je definováno jako změna kvality potravin, která je činí nevhodnými ke konzumaci, ať už lidmi nebo zvířaty. Indikátorem znehodnocení potravin může být nežádoucí zápach a změna struktury či vzhledu. Jedná se o složitý proces způsobený různými příčinami, které lze obecně rozdělit na mikrobiologické, chemické, nebo fyzikální.

Mikroorganismy jsou všudypřítomné a jsou nejčastější příčinou kažení potravin. Jelikož jsou příliš malé pro pozorování pouhým okem (s výjimkou plísní), může napadení potravin bakteriemi či kvasinkami zůstat bez povšimnutí. Kolonizace potravin kazícími mikrobi probíhá různými způsoby, v závislosti na druhu jídla. Potraviny s vysokým obsahem vody, jako je maso, mléko a mořské plody, se snadno zkaží bakteriemi, na rozdíl od potravin s nízkým obsahem vody, které bývají znehodnoceny obvykle plísněmi [4].

Existuje mnoho zdrojů mikrobiálních invazí v potravinách. V první řadě je to přírodní prostředí, včetně půdy, vzduchu, vody atd. Dále jsou to patogenní organismy, které parazitují na lidech, zvířatech a rostlinách, a mohou kontaminovat potraviny, což může způsobit otravu, nebo dokonce i nemoci lidí a zvířat. Například skupina bakterií *Salmonella spp.*, která je v přírodě široce přítomná, je jedním z hlavních patogenů přenášejících se potravinami. Uvádí se, že každý rok je až 16 milionů případů otravy jídlem způsobeno salmonelou [3].

2.1.1 Kažení masa

Kažení masa je komplexní děj, při kterém se kombinuje řada biologických a chemických dějů, které činí produkt nepříjemným pro lidskou spotřebu. Kromě oxidace lipidů a autolytických enzymatických reakcí lze kažení masa považovat za výsledek mikrobiální aktivity široké škály mikroorganismů. Složení masa, jeho pH (5,5–6,5), a vysoký obsah vlhkosti umožňují růst a přežití velkého rozsahu mikroorganismů.

Maso patří kvůli vysoké koncentraci živin a vysoké aktivitě vody mezi potraviny, které rychle podléhají zkáze. Čerstvé maso může být kontaminováno širokou škálou mikroorganismů, přičemž vždy závisí na vlastnostech masa a způsobu jeho zpracování a skladování [5, 6]. Dobou použitelnosti masa a masných výrobků se rozumí doba skladování až do bodu zkažení. Bod znehodnocení může být definován určitou maximální přijatelnou bakteriální úrovní, nebo nepříjemnou vůní či vzhledem. Doba použitelnosti pak závisí na počtu a typech mikroorganismů, převážně původně přítomných bakterií a jejich následném růstu [7].

Hlavními skupinami zodpovědných za znehodnocení masa za různých skladovacích podmínek jsou čeledi *Enterobacteriaceae*, bakterie mléčného kvašení, *Pseudomonas spp.*, *Clostridium spp.* a *Brochothrix thermosphacta*. Teplota a dostupnost kyslíku se jeví jako

nejdůležitější faktory ovlivňující mikrobiologii čerstvého masa a převládající mikrobiální skupiny [5].

Během zpracování masa na jatkách mohou být jatečně upravená těla kontaminována kůží, výkaly, obsahem střev, vodou, personálem nebo zařízením. Nejběžnějšími mikrobiálními rody izolovanými z čerstvého masa jsou *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Brochothrix*, *Flavobacterium*, *Psychrobacter*, *Moraxella*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, bakterie mléčného kvašení a *Enterobacteriaceae*. Avšak pouze 10 % těchto bakterií se může replikovat za podmínek skladování v chladu, a vyvolat tak zkažení masa [4].

2.1.2 Bakterie

2.1.2.1 Rod *Pseudomonas*

Rod *Pseudomonas* se skládá z gramnegativních pohyblivých tyčinek, které netvoří spory [8]. Tento rod bakterií je spojován se znehodnocováním čerstvého masa kvůli jeho rychlému růstu za aerobních podmínek a produkci sloučeniny síry [9]. Jakmile dosáhne populace pseudomonád na úroveň $10^7 - 10^8$ KTJ/g, objeví se typický sliz a pach. V praxi se tyto vlastnosti projeví, když pseudomonády vyčerpají hlavní substráty přítomné v mase, kterými jsou glukóza a laktát, a začnou metabolizovat dusíkaté sloučeniny, jako jsou aminokyseliny [10]. Pseudomonasy jsou navíc převládajícími mikroorganismy způsobujícími kažení masa za aerobních podmínek při skladování v chladu, protože jiné bakteriální druhy, jako jsou *Acinetobacter*, *Psychrobacter* a *Moraxella* s nimi nejsou schopné konkurovat [8].

2.1.2.2 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení jsou skupinou mikroaerofilních mikroorganismů převládajících ve vakuově baleném mase. Jejich hlavním substrátem je glukóza, a v závislosti na finálním produktu její fermentace se tyto bakterie dělí na homofermentativní a heterofermentativní typy. Homofermentativní produkují pouze kyselinu mléčnou, která je zodpovědná za kyselou chuť. Heterofermentativní tvoří sloučeniny spojené s kažením masa, včetně ethanolu, kyseliny máselné, sulfidů, laktátu a acetátu. Kyselinu máselnou lze poznat podle žluklé chuti [11]. *Lactobacillus sakei* produkuje sulfan, který přeměňuje myoglobin na zeleně zbarvený sulfomyoglobin. Sulfan se tvoří z cysteinu při omezeném množství glukózy a kyslíku [7]. Jakmile je glukóza vyčerpána, začne *L. sakei* hydrolyzovat arginin, což vede k tvorbě amoniaku a biogenních aminů, jako je putrescin a spermin [12].

2.1.2.3 *Brochothrix thermosphacta*

Psychrotrofní druh *Brochothrix thermosphacta* představuje významnou část kazící se mikrobiální flóry u aerobně nebo vakuově skladovaného masa v chlazených podmínkách. Hlavním substrátem je glukóza, která za aerobních podmínek produkuje *B. thermosphacta* kyselinu octovou, izomáselnou, isovalerovou, 3-methylmáselnou a 3-hydroxybutanon, což se projeví nepříjemným zápachem. Oproti tomu anaerobní metabolismus poskytuje jako konečné produkty hlavně kyselinu mléčnou a ethanol. Z tohoto důvodu se maso rychleji kazí při aerobním skladování [13, 14].

2.1.2.4 Rod *Clostridium*

Některé druhy rodu *Clostridium* bývají často zodpovědné za znehodnocení vakuově baleného masa. Tyto psychrofilní bakterie fermentují glukózu za vzniku kyseliny máselné, butanolu, oxidu uhličitého a vodíku, což má za následek změnu barvy masa. Balené maso je navíc většinou obklopeno velkým množstvím plynu se silným nepříjemným zápachem a maso má měkkou konzistenci. Hovězí maso napadené klostridiemi je charakteristické sirným, ovocným a rozpouštědlovým silným zápachem [15, 16]. U jehněčího masa se může objevit nepříjemný pach sýra a mléka [17].

2.1.2.5 Čeleď *Enterobacteriaceae*

Tato skupina se často vyskytuje u čerstvého a mraženého hovězího a vepřového masa. *Enterobacteriaceae* tolerantní k chladu se v menším množství vyskytuje i u chlazeného masa skladovaného aerobně. Ačkoli je obecně věnována větší pozornost patogenním vlastnostem konkrétních čeledí *Enterobacteriaceae* (např. *Salmonella*), některé členové této čeledi mohou hrát významnou roli v znehodnocování masa. *Hafnia alvei* a *Serratia liquefaciens* produkují zapáchající diaminy (putrescin a kadaverin), a s růstem těchto dvou organismů je spojováno i zelené zabarvení masa [18].

2.1.2.6 Rod *Shewanella*

Shewanella je rod blízce příbuzný rodu *Pseudomonas*, a byl nalezen v široké škále svalových potravin. Bylo zjištěno, že společně s *Pseudomonasami* významně přispívá ke zkažení potravin živočišného původu. *Shewanella putrefaciens* se vyznačuje schopností produkovat zapáchající sloučeniny, například sulfan, který v kombinaci se svalovým pigmentem poskytuje zelené zbarvení masa. Konkrétně *S. putrefaciens* je považována za primární příčinu zkažení chlazeného masa skladovaného ve vakuu a masa s vysokým pH [19].

2.1.3 Plísně

Plísně jsou běžnými kontaminanty masa a masných výrobků. Způsobují buď znehodnocení masa tvorbou černých, bílých nebo modrozelených skvrn na povrchu, nebo produkci mykotoxinů, takže infikované maso je nebezpečné ke konzumaci. *Aspergillus flavus* a *Aspergillus niger* jsou převládajícími druhy, které se vyskytují v jatečně upravených tělech skotu [20]. *Aspergillus* a *Penicillium* byly izolovány z více než 70 % konzervovaných vzorků hovězího a drůbežího masa [21]. Tyto druhy mohou růst na povrchu sušených masných výrobků díky jejich toleranci k nízkému pH a vysokým koncentracím solí. Například šunka San Daniele obsahuje chlorid sodný v koncentraci 10–20 % sušiny a její výroba trvá 13 až 18 měsíců. Ačkoli takto vysoká hladina soli brání růstu mnoha mikroorganismů, dlouhé období zrání usnadňuje povrchový růst plísní, dobře přizpůsobených tomuto prostředí.

Některé povrchové plísně jsou důležité z hlediska kvality produktu, zejména během zrání, kdy přispívají k rozvoji specifických vůní a chutí sušených masných výrobků. Krom toho plísně působí antioxidačně a zabráňují nadměrnému vysychání povrchu. Povrchové plísně navíc chrání produkt před patogenními nebo kazícími mikroorganismy. Pokud však použité kmeny plísní při výrobě těchto produktů nejsou pečlivě kontrolovány, mohou se rozrůst nežádoucí a toxigenní plísně, které způsobují znehodnocení produktu.

Za jedny z nejdůležitějších mykotoxinů v sušených masech se považují aflatoxiny B1, B2, G1 a G2. Jsou to vysoce toxické, teratogenní, mutagenní a karcinogenní metabolity [22].

2.1.4 Kvasinky

Kvasinky rostou v potravinách s vysokým obsahem cukru a organických kyselin, nebo s nízkou aktivitou vody a nízkým pH. Kontaminace kvasinkami často snižuje trvanlivost potravin kvůli vznikajícím plynům a nepříjemnému zápachu [23]. Nejčastěji izolované druhy z čerstvého masa jsou *Candida*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces* a *Trichosporon spp.* Ačkoli v některých případech je růst kvasinek ve spojení s masnými výrobky žádoucí, ve většině případů je nežádoucí. Kvasinky znehodnocují produkt bobtnáním u balených masných výrobků tvorbou slizu a zabarvením povrchu uzenin. Z hlediska bezpečnosti potravin je navíc znepokojující, že některé kvasinky metabolizují organické kyseliny a dusitan sodný, přičemž dusitan sodný je do potravin přidáván za účelem konzervace a tvorby růžového pigmentu [24].

2.1.5 Mikroorganismy vyvolávající alimentární infekce

Jak již bylo zmíněno, mikroorganismy kontaminující maso mohou být buď kazitvorné, nebo patogenní. Zatímco kazitvorné mikroby jsou odpovědné za konec doby použitelnosti, ohledně potravinářských patogenů jsou mnohem větší obavy kvůli riziku pro bezpečnost potravin. Mezi převládající patogeny související s masem patří *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Clostridium perfringens* a *Campylobacter jejuni*. *Listeria monocytogenes* se objevuje u krůtího masa, šunky a pečeného hovězího masa. *Staphylococcus aureus* kontaminuje povrch zejména mletého masa během zpracování a manipulace v důsledku špatné hygieny [25].

2.2 Detekce plynů

Maso se skládá z vody, bílkovin, tuků a některých sacharidů, přičemž bakterie a enzymy rozkládají maso na těkavé plyny. Protein se rozloží na amoniak, sulfan a ethanthiol. V průběhu kažení masa se koncentrace těchto plynů postupně zvyšuje. Jelikož byla nalezena úzká souvislost mezi biologickým znehodnocováním potravin a zvýšením koncentrace dusíkatých sloučenin, lze pomocí detekce plynů hodnotit čerstvost masa [26].

2.3 Produkce biogenních aminů

Biogenní aminy vznikají enzymatickou dekarboxylací aminokyselin. Zatímco tyramin a histamin, pocházející z tyrosinu a histidinu, jsou z hlediska bezpečnosti důležité, jiné biogenní aminy způsobují znehodnocení potravin. Zejména putrescin a kadaverin, které jsou toxické pouze ve velkých dávkách, jsou zodpovědné za znehodnocování masa kvůli hnilobnému zápachu, který způsobují. Jejich vznik během skladování různých masných výrobků je spojován s růstem bakterií a závisí na podmínkách skladování, zejména na plyné atmosféře použité pro balení [27].

2.3.1 Celkový těkavý zásaditý dusík (TVB-N)

Součet primárních, sekundárních a terciárních aminů ve formě těkavých aminů a toxických sloučenin dusíku se označuje jako TVB-N (Total volatile basic nitrogen) [28]. Mírné hladiny biogenních aminů jsou nezbytné a prospěšné pro regulaci fyziologických aktivit v lidském těle, např. spermin, spermidin a kadaverin hrají důležitou roli v regulaci růstu a serotonin je zásadní pro nervový přenos. Existují však toxické prahové hodnoty pro biogenní aminy, neboť jejich větší množství může způsobit široké spektrum nemocí, včetně silných bolestí hlavy a břicha, hypertenze, alergenních reakcí a u závažných případů i úmrtí [29].

Hladiny TVB-N po usmrcení zvířete závisí na úrovni mikrobiálních a enzymatických aktivit, které vedou ke znehodnocení produktu, proto se TVB-N používá jako index čerstvosti masa a bezpečnosti potravin. Histamin, putrescin a kadaverin byly navrženy jako indikátory znehodnocení čerstvých potravin, především ryb a masných výrobků, protože jejich přítomnost úzce souvisí s přítomností gramnegativních bakterií. Tyramin se pak obvykle nachází ve fermentovaných a dlouho zralých potravinách, jako jsou sušené klobásy. Profil biogenních aminů by tedy mohl být důležitým indexem při zjišťování kvality zpracovaných masných výrobků [30].

2.4 pH masa

U nestresovaných zvířat se konečné pH masa pohybuje okolo 5,5. Degradací procesy během skladování vedou k produkci amoniaku, aminů a organických sulfidů, čímž se zvyšuje pH. Zvýšení pH ovlivňuje rychlost biochemických procesů, a poskytuje lepší podmínky růstu pro mikrobiální populaci masa. U zvířat, která byla před porážkou ve stresu, lze pozorovat tmavé, pevné a suché maso, které je doprovázeno vysokým pH masa. Takové maso pak podléhá rychlejšímu znehodnocování, protože mikroorganismy jsou schopny rychle napadat a hydrolyzovat aminokyseliny.

Bylo zjištěno, že nárůst pH během postmortálního skladování silně koreluje s koncentrací TVB-N, což souvisí s příznivým prostředím pro proliferaci specifických kázících se mikrobů při vyšším pH. Vysoké pH usnadňuje přechod od glykogen-dependentních bakterií k protein-degradujícím bakteriím [4], [29]. Mikrobiálním a endogenním enzymům působícím na sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností, jako jsou aminokyseliny, se při vysokém pH daří, a rozkládají alkalické sloučeniny amoniaku, čímž se opět zvyšuje pH masa [31].

2.5 Funkce obalu

Balení potravin je zásadní pro zachování kvality a bezpečnosti potravin během jejich skladování, přepravy a prodeje. Tradiční obalové materiály jsou primárně určeny k ochraně potravin před mechanickým zneužitím, škodlivým světelným zářením a plyny, které podporují nežádoucí reakce. Obal navíc zabraňuje kontaminaci a znehodnocení patogenními mikroorganismy nebo toxickými látkami [32].

Obaly potravin však mohou hrát i řadu dalších rolí, jako je poskytování informací o povaze a stavu potravin uvnitř. Text a grafika na obalových materiálech obvykle poskytují spotřebitelům informace o typu, původu, složení a nutričním obsahu potravin, a také o jejich

ekologické udržitelnosti. Balení potravin může být také navrženo tak, aby usnadnilo manipulaci s potravinami např. tím, že se snadno otevírají a uzavírají. U některých potravin může být potřebné navrhnout obalové materiály tak, aby odolávaly například vaření, pečení nebo ohřívání v mikrovlnné troubě. V důsledku toho musí být obalové materiály potravin vysoce univerzální, musí být zpracovatelné do různých velikostí a tvarů, a také mít různé funkční vlastnosti [33].

2.6 Žádoucí funkční vlastnosti obalu

Hlavním předpokladem potravinového obalu je, že musí být vyroben z látek, které nezpůsobují zdravotní problémy např. v důsledku vyluhování toxických chemikálií z obalu do potravinářského produktu během skladování. Důležité jsou také mechanické vlastnosti obalového materiálu, jako je modul pružnosti, mez pružnosti, prodloužení při přetržení, ohebnost a roztážitelnost. Obalové materiály by navíc měly mít vhodné bariérové vlastnosti, tzn. schopnost omezit tok tekutin (voda nebo olej) nebo plynů (voda, kyslík, oxid uhličitý...). Materiály určené pro výrobu obalů by také měly být odolné vůči podmínkám prostředí (světlo, vlhkost, teplota a kyslík), aby si zachovaly svou integritu a požadované funkční vlastnosti po celou dobu životnosti produktu [33].

2.7 Inteligentní balení

Evropská unie definuje inteligentní obalové materiály jako „materiály a předměty, které monitorují stav balených potravin nebo prostředí obklopující potraviny“. Tyto materiály tak mohou spotřebitelům poskytnout informace o kvalitě a bezpečnosti potravin, což jim může pomoci při rozhodování o nákupu a spotřebě. Vývoj takových inteligentních materiálů vyžaduje propojení různých oborů, včetně potravinářské vědy, materiálové vědy, mikrobiologie a senzorové technologie.

Neustálé sledování stavu potravin pomocí inteligentních obalových materiálů může zvýšit kvalitu potravin, snížit plýtvání potravinami a chránit spotřebitele před otravou jídlem [34].

2.7.1 Senzory a indikátory času a teploty

Čas a teplota jsou klíčové faktory ovlivňující kvalitu většiny potravin. Téměř všechny potraviny mají dobu použitelnosti, ale je velmi obtížné určit, zda nedošlo ke zkrácení této doby z důvodu vystavení některým faktorům životního prostředí. Proto je velmi přínosné monitorovat čas a teplotu v potravinovém řetězci v reálném čase [35].

Princip činnosti indikátoru času a teploty je založen na různých reakcích mezi dvěma nebo více látkami v procesu změn času a teploty, což vede k nevratnému zabarvení indikátoru [36]. Indikátory času a teploty lze rozdělit podle pracovních principů na chemický, fyzikální, enzymatický, mikrobiální a ostatní.

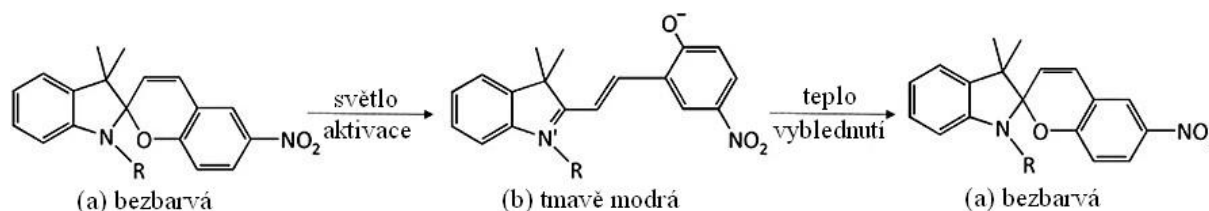
Chemické indikátory zahrnují systémy založené na polymeraci, fotochromismu a redoxní reakci. Indikátor založený na polymeraci využívá 1,4–adiční polymerační reakci polymerních monomerů při stimulaci vysokou teplotou, což vede k tvorbě polydiacetylenových sloučenin. Tato reakce je nevratná, a její rychlost se zvyšuje s rostoucí teplotou. Indikátor na bázi

fotoluminiscence funkce na principu tepelně indukovaného vyblednutí v reverzní reakci fotoluminiscenčních sloučenin. Rychlost reakce a stupeň vyblednutí se mění s akumulací času a teploty, což může přímo indikovat změnu trvanlivosti potravin. U indikátoru na bázi redoxní reakce dochází ke změně barvy při redoxní reakci nebo světlem indukované redoxní reakci mezi sloučeninou v indikátoru a kyslíkem ve vzduchu, přičemž rychlost reakce také souvisí s akumulací času a teploty.

Příkladem indikátoru na bázi fotochromismu je indikátor OnVu, který lze vidět na obrázku (Obrázek 1). Tento indikátor je navržen ve tvaru jablka s barevným jádrem a méně barevným okolím. V jádru jablka je umístěn inkoustový pigment, který může existovat ve dvou stavech, viz Obrázek 2. Při aktivaci UV zářením se fotochromní sloučenina změní z bezbarvé na tmavě modrou. Se změnou teploty následně barva určitou rychlostí bledne. Pokud je barva středu světlejší než referenční barva, znamená to, že produkt již nelze konzumovat [37].



Obrázek 1: Indikátor OnVu [37]



Obrázek 2: Vzájemná konverze mezi stavem (a) a (b) indikátoru OnVu [37]

Fyzikální indikátory jsou založené na difúzi, nanočásticích a elektronech. Princip difúzního indikátoru je založen na teplotě závislé difúzní reakci nebo teplotně závislém fázovém přechodu barevných látek (z pevné látky do kapaliny) s časovou nebo teplotní změnou [37]. Indikátory na bázi nanočástic obsahují nanočástice s termochromními vlastnostmi. Při pohlcování tepla se mění povrchová morfologie kovových nanočástic, což má za následek pohyb vlnového čísla do viditelné oblasti a následně změnu barvy [38]. Třetím typem jsou elektronové indikátory, které převádí teplotní signál na elektrický prostřednictvím tepelného senzoru a poté převádí elektrický signál na vizuální výstup.

Enzymatické indikátory jsou založené na hydrolytické reakci mezi enzymem a substrátem, což vede ke změně barvy, přičemž stupeň enzymatické reakce je řízen kombinací času a teploty [37]. Úpravou typů a koncentrací různých enzymů a substrátů, a použitím různých aktivátorů nebo inhibitorů je možné sledovat změny kvality širokého spektra potravin [39].

Mikrobiální indikátory využívají především metabolity produkované mikroorganismy za určitých časových a teplotních podmínek. V důsledku toho pak dojde ke změně barvy indikátoru [37]. V současnosti se běžně využívají kvasinky a bakterie mléčného kvašení k produkci kyseliny, díky níž dojde ke změně pH, což má za následek barevnou změnu [40].

2.7.2 Senzory vlhkosti

Potraviny s vysokou aktivitou vody, mezi které patří maso, ryby, ovoce, zelenina a jiné čerstvé produkty, při nízké vlhkosti v obalu ztrácí vlhkost a vysychají. Naopak potraviny s nízkou aktivitou vody, jako jsou sušené nebo práškové potraviny, vlhkost absorbují a zhoršují se jejich vlastnosti, pokud je vlhkost v obalu příliš vysoká [41]. V současnosti existuje několik přístupů pro monitorování vlhkosti.

Jedním z možností je využití měření změn dielektrických vlastností. Často se používají pro přípravu takových inteligentních obalů proteiny, protože jejich dielektrické vlastnosti jsou citlivé na vlhkost. Změny relativní vlhkosti balených potravin byly sledovány například pomocí nanokompozitních filmů na bázi želatiny, jejíž dielektrické vlastnosti závisí na obsahu vlhkosti, a vrstvě oxidu zinečnatého, která funguje jako polovodič poskytující detekovatelný signál [42]. Podobně byl využit například pšeničný lepek, kdy podobně jako u želatiny, jeho změny dielektrických vlastností závisí na obsahu vlhkosti [43].

Změny vlhkosti lze také detekovat pomocí senzorů zabudovaných do obalových materiálů potravin. Příkladem je použití senzoru vlhkosti s interdigitálními elektrodami vytištěnými na různé biologické materiály. V těchto zařízeních fungují biologicky odbouratelné materiály jako indukční vrstva. Dielektrická konstanta materiálu se zvyšuje, když materiál absorbuje vlhkost z atmosféry, takže kapacita mezi elektrodami je funkcí relativní vlhkosti prostředí [44].

2.7.3 Senzory kyslíku

Mnoho potravin po vystavení vysokým hladinám kyslíku po delší dobu podléhá nežádoucí chemické degradaci. Příkladem takových potravin mohou být nenasycené oleje nebo různé pigmenty. V důsledku toho jsou obalové materiály často realizovány tak, aby byl kyslík z balených potravin odstraněn. Odstranění se dosahuje vypláchnutím obalu a nahrazením kyslíku inertním plynem, jako je dusík, nebo vytvořením vakua. Přesto se však může kyslík do balených potravin dostat, pokud není obalový materiál zcela nepropustný, nebo pokud je poškozen, což by mohlo vést ke snížení kvality potravin. Z tohoto důvodu vznikl zájem o vývoj inteligentních obalových materiálů, které dokážou detekovat hladinu kyslíku v potravinách. V současné době se využívají ke sledování koncentrace kyslíku dva hlavní přístupy – kolorimetrické senzory na bázi redoxních reakcí a senzory na bázi fosforescence [45].

Kolorimetrický senzor je založen na principu změny barviv redoxních barviv jako je methylenová modř za přítomnosti nebo nepřítomnosti kyslíku [45]. Tyto senzory mají však dva hlavní problémy. Jedním omezením je, že musí být vyrobeny a skladovány za anaerobních podmínek, protože jsou náchylné k reakci se vzduchem. Druhým problémem je, že senzory přestanou fungovat během několika hodin v důsledku vyčerpání redukčních činidel. K vyřešení tohoto problému je zkoumána výroba a aplikace různých kolorimetrických redoxních barviv aktivovaných UV zářením [46].

Fosforescenční senzory pro kyslík jsou připravovány zachycením barviv citlivých na kyslík do vhodné matrice, která je propustná pro kyslík [47]. Mezi běžně používaná barviva citlivá na kyslík patří komplexy přechodných kovů a Pt(II)-porfyrinů, které vykazují relativně dlouhou

životnost při pokojové teplotě a jsou zhašeny kyslíkem v závislosti na koncentraci. Fosforescenční senzory mohou monitorovat hladiny kyslíku v balených potravinách nedestruktivním, vysoce výkonným a rychlým způsobem [48].

2.7.4 Senzory pH

Změna kvality u mnoha potravin je doprovázena změnami jejich pH. Příkladem může být produkce těkavých aminů v mořských plodech a masných výrobcích, nebo růst a množení mikroorganismů v mléce, což vede ke změně pH. Měření pH v potravinách během skladování může tedy poskytnout velmi cenné informace o jejich čerstvosti, kvalitě a bezpečnosti [49]. V současné době je většina senzorů založena na dvou hlavních přístupech:

- a) Změna elektrochemického potenciálu látek v souvislosti se změnou pH
- b) Změna barvy látky v souvislosti se změnou pH

Senzor pH založený na elektrochemickém potenciometru je vybaven pH snímacími elektrodami. Když se změní pH prostředí, elektrochemický potenciál generovaný elektrodami se přemění na modulovanou frekvenci a přenesení se do bezdrátové čtečky, kde se získá signál související se změnou pH. Hlavní nevýhodou této metody pro široké použití je její cena a potřeba sofistikovaného vybavení [50].

Oproti tomu pH senzory založené na použití syntetických nebo přírodních barviv, jejichž barva je závislá na pH prostředí, jsou mnohem levnější a jednodušší na použití. Zpočátku se jako barevné indikátory využívaly syntetická barviva, jako je methylová červen, kresolová červen, bromkresolová červen, bromthymolová modř a další [51, 52]. Existují však určité obavy, že syntetická barviva se mohou do potravin vyluhovat a způsobovat toxicitu [53]. Z tohoto důvodu jsou středem zájmu velké části výzkumu právě přírodní barviva citlivá na pH. Mezi přírodní barviva, která lze použít jako indikátory pH, můžeme zařadit anthokyaniny [54], kurkumin [55], alizarin [56] nebo například betalain [57]. Anthokyaniny jsou jedním z nejpoužívanějších přírodních barviv pro tento účel, protože mají schopnost měnit svou barvu v širokém rozsahu hodnot pH [52].



Obrázek 3: Příklad indikátoru na bázi anthokyaninů pro sledování čerstvosti krevet – ihned po zabalení (A), po 2 dnech (B) a po 4 dnech (C) skladování při 4 °C [58]

2.8 Typy inteligentního balení

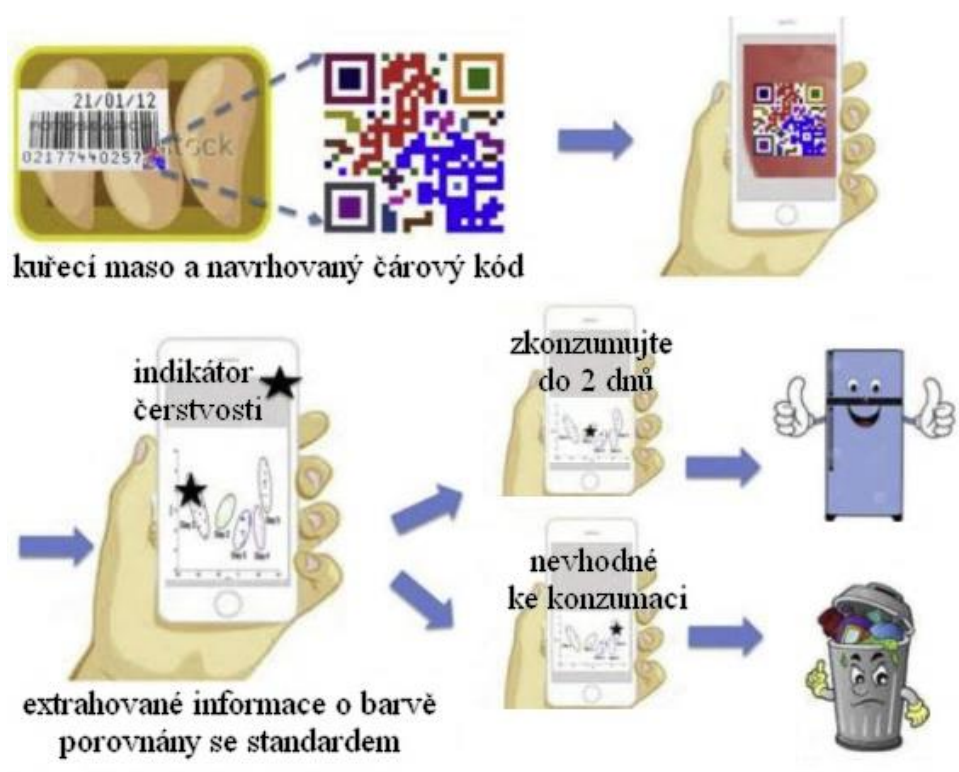
2.8.1 Filmy

Fólie jsou nejjednodušší a nejlevnější způsob vývoje inteligentních obalů potravin. Do této kategorie patří jak směsné, tak potahové fólie. Směsné filmy se připravují smícháním senzoru s filmotvorným materiálem, kterým je obvykle syntetický nebo přírodní polymer. Je proto důležité, aby měl použitý senzor dobrou kompatibilitu s polymerní matricí. K přípravě směsných filmů se využívají tři hlavní metody – lití do roztoku, termokomprese a extruze. Metoda lití do roztoku je nejběžnější metodou využívanou ve vědeckém výzkumu, protože je levná, jednoduchá a rychlá na laboratorní provedení. Obvykle je však méně vhodná pro ekonomickou výrobu filmů pro komerční aplikace ve velkém měřítku [33]. Takto byly připraveny například inteligentní obaly potravin citlivé na pH smícháním anthokyanů (senzor) s filmotvornými roztoky želatiny. Tento roztok byl poté nalit na talíř a usušen [59]. Metoda termokomprese dokáže připravit filmy rychleji než metoda lití, a je vhodnější pro velkosériovou výrobu. V tomto případě je získaný směsný film zhutněn v horkém lisu po dobu několika minut [60]. Metoda extruze zahrnuje smíchání všech složek uvnitř extrudéru pomocí vhodné teploty, tlaku a rychlosti šneku, a následné vytlačování výsledného materiálu do fólie pomocí lisu za tepla. Tato metoda je však nevhodná pro přípravu některých inteligentních obalů, protože může způsobit tepelnou degradaci tepelně labilních barviv. Bylo zjištěno, že molekuly citlivé na pH v extraktu z borůvek ztratily po začlenění do filmu z kukuřičného škrobu svou schopnost reagovat na změnu pH, což bylo přičítáno právě chemické degradaci při vysokých použitých teplotách [61].

Potahové fólie jsou další běžnou formou inteligentního obalového materiálu. V tomto případě je indikátor umístěn na povrchu fólie (není rozptýlen po celé fólii). Potahové filmy se obvykle připravují smícháním senzoru s vhodným disperzním médiem, a poté se toto médium natahuje nebo tiskne na povrch polymerního filmu [33].

2.8.2 Čárové kódy

Čárový kód je strojově čitelný vzor, který může být jednorozměrný nebo dvourozměrný, přičemž obsahuje informace o produktu [62]. Jednorozměrné čárové kódy uchovávají informace ve formě jednoduchého lineárního uspořádání černých svislých pruhů různé šířky a polohy na bílém pozadí. Dvourozměrné čárové kódy využívají k ukládání informací geometrickou kombinaci bílých a černých čtverců různých velikostí a umístění [36]. Čárové kódy jsou v poslední době součástí výzkumů pro jejich potenciální použití v inteligentních obalových materiálech určených pro potraviny. Byly vyvinuty například fotosenzitivní tiskové barvy jakožto indikátory pH na čárových kódech. Princip je založen na snížení, nebo zvýšení intenzity jedné nebo více černých čar při změně pH, což lze poté odečíst pomocí vhodné čtečky čárových kódů a vztáhnout tak ke změně pH [35]. Dále byl vyvinut například čárový kód pro detekci zhoršení kvality kuřete, který sestával z kuliček oxidu křemičitého a tří barviv – nilské červeně, tetrafenylporfyrinu a methylové červeně. Čárový kód bylo poté možno přečíst pomocí aplikace v telefonu a vyhodnotit tak kvalitu kuřete v reálném čase [63].



Obrázek 4: Schéma navrhovaného čárového kódu pro detekci zhoršení kvality kuřete [63]

2.8.3 Štítky

Tradiční etikety potravin poskytují spotřebitelům informace o povaze potraviny, místě původu, datu výroby, předpokládané době trvanlivosti a nutričním profilu. U inteligentních obalových materiálů mohou být tyto informace doplněny o data poskytovaná senzory, které reagují na změny kvality, zralosti nebo bezpečnosti potravin. Příkladem jsou etikety obsahující barviva, která podléhají barevným změnám při kontaktu s metabolity produkovány při kažení potravin. Tyto kolorimetrické štítky lze využít k vizuálnímu sledování kvality potravin v reálném čase bez spoléhání se na externí zařízení, což je velmi výhodné pro komerční aplikace [64].

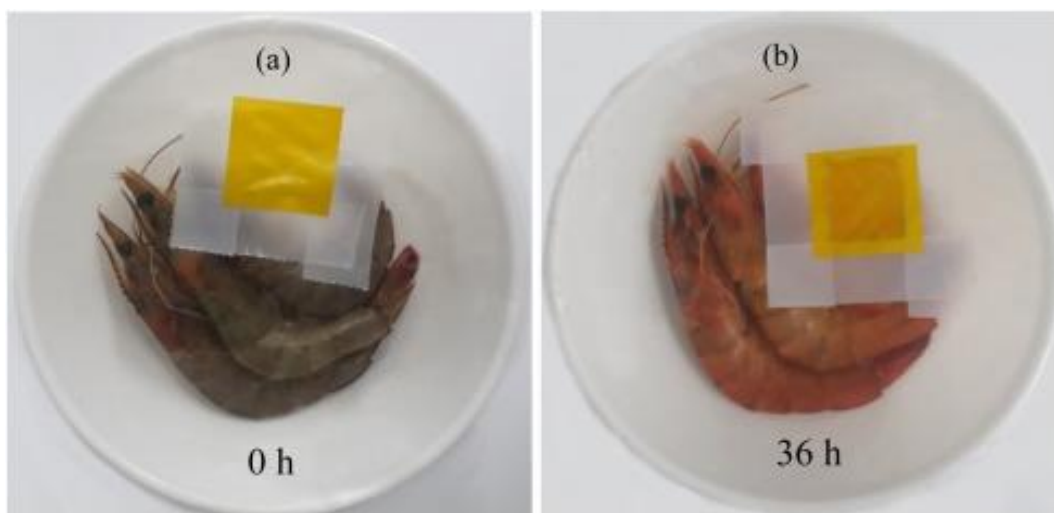
Radiofrekvenční identifikační štítky (RFID) jsou štítky, které využívají k identifikaci a sledování produktů rádiové vlny. Systém RFID se skládá ze tří základních součástí: štítku, čtečky a softwaru [65]. Radiofrekvenční štítky jsou považovány za vhodné k použití v řízení potravinářského řetězce, protože umožňují ukládání dat až do velikosti 1 MB a mají schopnost sbírat data v reálném čase bezkontaktním a neviditelným způsobem [66]. RFID štítky lze využít pro monitorování změn vlhkosti [67] nebo například produkci biogenních aminů [68].

2.9 Aplikace inteligentního balení

2.9.1 Mořské plody

Mořské plody, jako jsou ryby, krevety, krabi a humři, jsou důležitým zdrojem polynenasycených mastných kyselin, vitamínů a minerálů, které jsou prospěšné pro lidské zdraví [58]. Tyto potraviny však velmi rychle podléhají zkáze a jsou náchylné k chemickému a mikrobiálnímu znehodnocení během skladování. Existuje proto značný zájem o vývoj inteligentních obalových materiálů pro sledování čerstvosti, kvality a bezpečnosti produktů z mořských plodů po celou dobu jejich životnosti.

Kvalita mořských plodů se zhoršuje vlivem kažení, které je způsobeno tvorbou produktů kažení, především pak těkavých složek, jako je amoniak, methylamin, dimethylamin, trimethylamin a další podobné sloučeniny známé jako celkový těkavý bazický dusík. Vznik těchto látek vede ke změnám pH produktů mořských plodů. Z tohoto důvodu mnoho výzkumníků navrhuje inteligentní balení, které je citlivé na změny pH nebo tvorbu produktů TVB-N [69]. Příkladem je film připravený z želatiny, polyvinylalkoholu a anthokyanovým extraktem z moruše určený pro sledování čerstvosti ryb. Autoři tohoto filmu uvádí, že se vzrůstající dobou skladování se barva filmu měnila z fialové před šedofialovou až po tmavě zelenou, což svědčilo o zkažení ryb [70]. Další film reagující na pH byl autory vyroben začleněním kurkuminu a nanočástic síry do pektinové matrice. Takový film poté reagoval na změnu v kvalitě během skladování krevet, přičemž barva filmu se měnila ze žluté do oranžové [55].

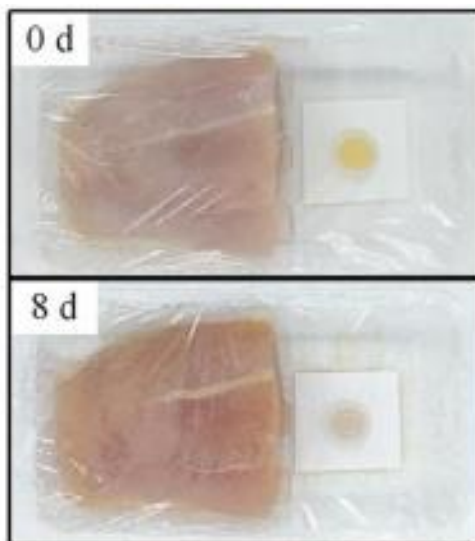


Obrázek 5: Změna barvy filmu z pektinu, kurkuminu a nanočástic síry před (a) a po skladování (b) balených krevet při 25 °C po dobu 36 hodin [55]

2.9.2 Maso

Maso, stejně jako ryby, je potravina bohatá na bílkoviny a bude tak docházet k vysoké produkci celkového těkavého zásaditého dusíku a ke změnám pH působením mikroorganismů. Z tohoto důvodu lze pro sledování změn kvality masa použít obdobné inteligentní obalové materiály jako pro potraviny z rybích produktů. Lze tedy využít obalových materiálů obsahujících barviva citlivá na pH [71]. Kažení masa je navíc možné detekovat i pomocí dalších těkavých látek,

vytvářených mikroorganismy, jako je sirovodík a oxid uhličitý. Příkladem je kolorimetrický sirovodíkový senzor na bázi nanočástic stříbra potažených gelanovou gumou pro sledování čerstvosti kuřecího masa v reálném čase. Tento typ senzoru využívá silnou vazebnou afinitu stříbra k sirovodíku za vzniku sulfidu stříbrného, což má za následek změnu barvy ze žluté na bezbarvou [72].



Obrázek 6: Změna barvy sirovodíkového senzoru na bázi gelanové gumy a nanočástic stříbra před (0 d) a po skladování (8 d) kuřecích prsou při 4 °C po dobu 8 dní [72]

2.9.3 Mléčné výrobky

Mléčné výrobky jsou jedny z nejoblíbenějších potravin na světě, včetně mléka, sýrů atd. Mléko je výživná potravinová složka složená z vody, bílkovin, lipidů, vitamínů, minerálů a dalších stopových látek [73]. Mléko, zejména pasterizované, je však náchylné ke kažení během skladování [74]. Kažení je doprovázeno změnami pH, koncentrací mikrobů a koncentrací plynů. Pro přípravu inteligentních balení ke sledování čerstvosti mléka jsou tak používány různé anthokyaniny citlivé na pH a další pigmenty extrahované z rostlin, které jsou přidávány do polymerních matic [75]. Další autoři vyvinuli kolorimetrický senzor založený na nanočásticích oxidu křemičitého a Schiffovu činidlu pro monitorování těkavých organických sloučenin, které vznikají při růstu rozkládajících bakterií v pasterizovaném mléce [76]. V další studii byl aplikován polydiacetylen a oxid zinečnatý, kdy docházelo ke změně barvy indikátoru na základě změny koncentrace kyseliny mléčné při znehodnocování mléka [77]. Kromě mléka se další autoři zaměřili také na sledování čerstvosti sýrů. Byly tak vyvinuty nálepky pH na bázi esenciálního oleje a anthokyanů pro sledování změn kvality v procesu skladování sýrů [78].



Obrázek 7: Kolorimetrický senzor z polydiacetyleny a oxidu zinečnatého [77]

2.9.4 Ovoce, zelenina a další potraviny

Vyvinuty byly také inteligentní obalové materiály pro ovoce, zeleninu a různé další potravinářské produkty. Sledována byla například čerstvost guavy pomocí kolorimetrického filmu, který se skládal z bromfenolové modři a bakteriální celulózy. Tento film změnil barvu z modré na zelenou, když guava přezrála, což bylo přičítáno tvorbě těkavých organických sloučenin (např. kyselina octová), které snižovaly pH [79]. Další indikátorový štítek byl vyvinut pro sledování čerstvosti zelené papriky. Tento štítek citlivý na pH obsahoval methylenovou červen a bromthymolovou modř, přičemž ke změně barvy docházelo při změně pH v důsledku změny koncentrace oxidu uhličitého, který vznikl v důsledku znehodnocení zelené papriky [80].

2.10 Legislativa inteligentních obalů

Zákon o obalech č. 477/2001 Sb. stanovuje práva a povinnosti pro osoby uvádějící obal na trh. Osoba je povinna zajistit, aby měl obal co nejmenší hmotnost a byl opakovaně použitelný, případně využitelný v procesech recyklace. Dále musí být obal v souladu s právními předpisy ohledně obsahu nebezpečných látek a suma koncentrací těžkých kovů (olovo, kadmium, rtuť a chrom s oxidačním číslem IV) nesmí překročit hodnotu 100 µg/g. Tento zákon se zabývá také značením obalů. Hlavním účelem tohoto zákona je předcházet vzniku odpadů z obalů a tím chránit životní prostředí [81].

Účelem vyhlášky č. 38/2001 Sb. o hygienických požadavcích na výrobky určené pro styk s potravinami a pokrmami je ochránit lidské zdraví před riziky, která by mohla vyplývat z orálního kontaktu s výrobky. Tato vyhláška definuje požadavky na složení výrobků určených pro styk s potravinami [82].

Pravidla pro materiály a předměty přicházející do styku s potravinami určuje nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1935/2004. Toto nařízení se vztahuje na všechny materiály určené pro styk s potravinami, nebo na materiály u kterých se předpokládá, že při jejich běžném použití dojde k přenosu jejich složek do potravin. Vztahuje se i na aktivní a inteligentní materiály. Hlavní podmínkou použití materiálů je, že obal nesmí uvolňovat své složky do potravin v množstvích, která by mohla ohrozit zdraví lidí, způsobit nepříjemnou

změnu ve složení potravin, nebo způsobit zhoršení organoleptických vlastností potravin. U aktivních obalů nesmí docházet k takovým změnám, které by například zakrývaly kažení potravin. U inteligentních obalů nesmí dojít k tomu, že by informace o stavu potravin byla pro spotřebitele jakkoli zavádějící [83].

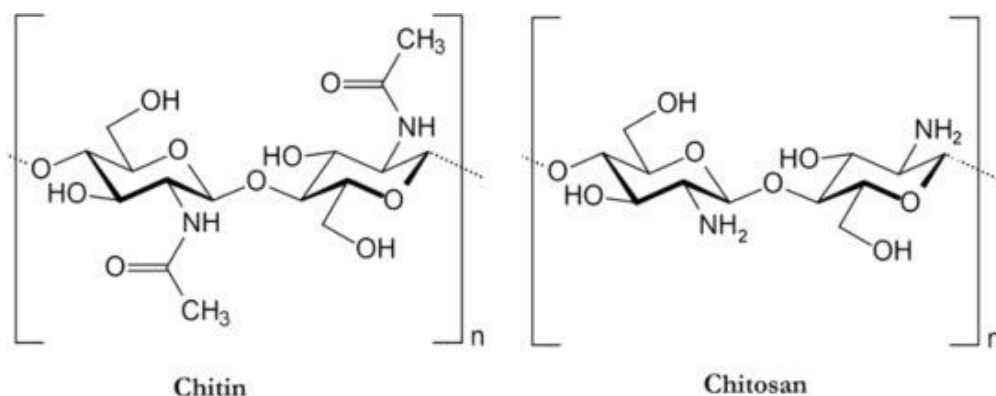
Nařízení Komise (ES) č. 450/2009 o aktivních a inteligentních materiálech a předmětech určených pro styk s potravinami poskytuje seznam látek, které mohou být při výrobě aktivních a inteligentních obalů použity a které nikoli. Toto nařízení je doplňující k Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1935/2004 [84].

2.11 Kompozice tištěného indikátoru

2.11.1 Chitosan

Chitosan a jeho deriváty jsou biologicky odbouratelné polysacharidy, které jsou netoxické, biokompatibilní, antimikrobiální a antifungální. Díky svým mimořádným filmotvorným vlastnostem je chitosan zkoumán pro použití především v potravinářském, biomedicíně a chemickém průmyslu [85].

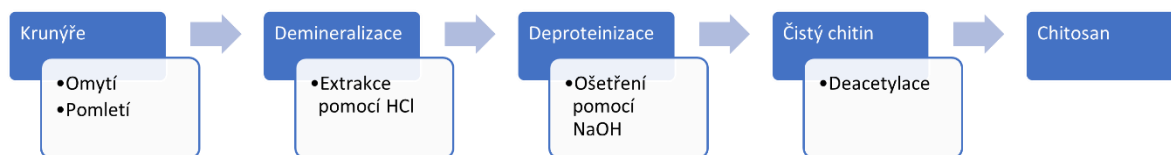
Syntéza chitosanu je prováděna deacetylací chitinu, což je druhý nejrozšířenější biopolymer hned po celulóze. Je to strukturní polymer, který je součástí buněčné stěny hub a kosterní složky korýšů. Lze jej získat z více obnovitelných zdrojů, zejména pak z odpadu z mořského průmyslu, což jej činí levným a komerčně dostupným polysacharidem [86].



Obrázek 8: Struktura chitinu a chitosanu [87]

Primárním zdrojem biomasy pro průmyslovou výrobu chitinu a chitosanu jsou odpadní materiály ze zpracování krabů a krevet. Schránka korýšů je složena z bílkovin, anorganických solí, lipidů a až z 20–30 % z chitinu. Nejprve jsou krabí kůry pomlety na menší velikost. Následně se odstraňují minerály (převážně uhličitan vápenatý) extrakcí zředěnou kyselinou chlorovodíkovou s následným mícháním při laboratorní teplotě, kdy dojde k vysrážení chloridu vápenatého. Proteiny se odstraňují pomocí zředěného roztoku hydroxidu sodného, a při tomto procesu dochází k nahodilé hydrolýze N-acetylových skupin v hlavním řetězci polymeru. K odstranění barvy může být zařazen krok odbarvování. Chitosan se následně získává deacetylací chitinu v 40–45 % hydroxidu sodném při 120 °C po dobu 1–3 hodin bez přístupu

kyslíku. O rozsahu deacetylace pak rozhodují 3 parametry – koncentrace alkálie, čas a teplota [87].



Obrázek 9: Schéma přípravy chitin a chitosanu [86]

Chitosan, jakožto částečně deacetylovaný produkt chitin, je kopolymer skládající se z jednotek β -(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetoamido-D-glukózy a β -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-D-glukózy. Tento biopolymer je glukosaminoglykan a je složen ze dvou běžných cukrů – glukosaminu a N-acetylglukosaminu, jejichž podíl závisí na alkalické úpravě. Chitosan má jeden primární amin a dvě volné hydroxylové skupiny pro každý monomer [86]. Na rozdíl od jiných hojně se vyskytujících polysacharidů obsahující uhlík, vodík a kyslík, chitin a chitosan navíc obsahují dusík (6,89 %) [88]. Chitin i chitosan mají reaktivní hydroxylové a aminoskupiny, ale chitosan je obvykle méně krystalický než chitin, což jej pravděpodobně činí dostupnějším pro činidla [86].

Chitosan je kvůli přítomnosti acetylové skupiny s hydrofobní povahou špatně rozpustný ve vodě a nerozpustný v mnoha organických rozpouštědlech. Na rozdíl od toho je snadno rozpustný v různých zředěných roztocích organických kyselin, jako je kyselina octová a mravenčí [87], [89]. Rozpustnost chitosanu souvisí hlavně s aminoskupinami v jeho řetězci. Za kyselých podmínek při pH nižších než 6 jsou tyto aminoskupiny plně protonovány, díky čemuž je chitosan vysoce rozpustný. Se zvýšením pH nad 6 může být rozpustnost chitosanu postupně snižována kvůli deprotonaci jeho aminoskupin a ztrátě kladného náboje. Úplná deprotonace aminoskupin pod vyšším pH (nad 6) vede k náhlé precipitaci chitosanu [90], [91]. Rozpustnost může být také ovlivněna stupněm deacetylace a molekulovou hmotností. Celkově vyšší stupeň deacetylace v chitosanu vede k vyššímu počtu protonovaných aminoskupin poskytujících více kladných nábojů. Vyšší obsah kationtových aminoskupin pak usnadňuje rozpouštění chitosanu. Chitosan s vyšší molekulovou hmotností může tvořit velký počet inter- a intramolekulárních vodíkových vazeb mezi řetězci chitosanu, což má za následek tvorbu vysoce propletených molekulárních řetězců a to ztěžuje jejich rozpouštění [91], [92].

Při uchování potravinářských produktů hrají důležitou roli bariérové vlastnosti. Nejvíce studovaná je propustnost vodních par, která udává množství vody, které pronikne za jednotku plochy a času. Vzhledem k hydrofilní povaze chitosanu mají připravené filmy nízké bariérové vlastnosti pro vodu. Propustnost vodních par závisí na několika faktorech, jako je molekulová hmotnost, stupeň deacetylace a koncentrace chitosanu. V případě přidavku fenolických sloučenin lze pozorovat převládající trend účinku těchto sloučenin na permeabilní vlastnosti. Přítomnost fenolických sloučenin totiž obecně vede ke snížení hodnot propustnosti vodních par. K tomu dochází například při přidavku extraktu z kurkuminu, zeleného čaje, spiruliny, borůvek, ostružin a dalších. Vodíkové a kovalentní interakce mezi chitosanovou sítí a vlastními fenolickými sloučeninami extraktu snižují dostupnost hydrofilních skupin, a snižují tak afinitu matrice chitosanu k molekulám vody [85].

2.11.2 Síťování chitosanu

Ačkoli vykazuje chitosan vynikající filmotvorné vlastnosti, při srovnání s nebiodegradovatelnými plasty na petrochemické bázi má relativně špatné mechanické a bariérové vlastnosti pro vodu, což omezuje jeho využití v průmyslu balení potravin. Jedním způsobem, jak tyto negativní vlastnosti vylepšit, je modifikace jeho fyzikálních vlastností pomocí chemických, enzymatických nebo fyzikálních úprav, které indukují jak inter-, tak intramolekulární chemické vazby. Tyto úpravy v podstatě modifikují polymerní síť zesíťováním polymerních řetězců a tím zlepšují funkčnost filmu. Používají se různé síťovací metody a činidla v závislosti na druhu biopolymeru. Mezi běžná síťovací činidla patří glutaraldehyd, glyoxal nebo formaldehyd. Tyto látky jsou však považovány za zdravotně rizikové a je proto snaha nahradit je přírodními netoxickými síťovacími činidly [93].

S ohledem na typ použitého síťovacího činidla může proces síťování probíhat prostřednictvím kovalentních nebo iontových vazeb. Kovalentní síťování chitosanu je chemická reakce, jejímž výsledkem je vytvoření stabilních kovalentních vazeb mezi síťovacím činidlem a polysacharidovými řetězci. Jakákoli sloučenina s alespoň dvěma funkčními skupinami schopnými kondenzační reakce s polymerem může sloužit jako síťovací činidlo. Nejběžněji využívaným kovalentním činidlem je již zmíněný glutaraldehyd [94].

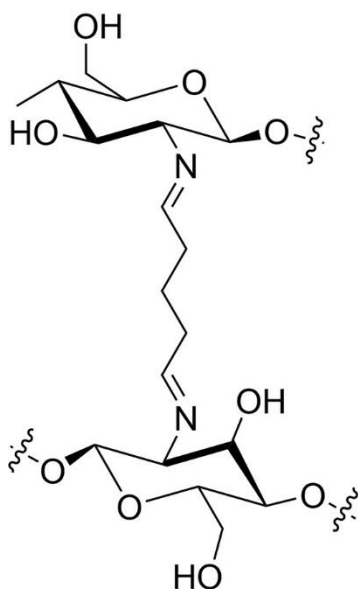
Druhým způsobem zesíťování je tzv. iontové zesíťování, které vede k vytvoření iontových vazeb mezi síťujícím činidlem a řetězci chitosanu. Ve vodném roztoku je náboj iontového síťovacího činidla opačný než náboj modifikovaného polymeru a elektrostatická přitažlivost polymeru k iontovému činidlu indukuje účinek zesíťování. Teoreticky může být chitosan síťován jakoukoli chemickou sloučeninou, která má alespoň dvě funkční skupiny generující ve vodě záporný náboj. Mezi nejčastěji používaná iontová síťovadla patří citráty a polyfosfáty, ale také kyselina šťavelová. Ve srovnání s chitosanem síťovaným kovalentními vazbami je iontově síťovaný chitosan méně stabilní v kyselých roztocích (rozpouští se při $\text{pH} < 3$) [94].

2.11.2.1 Glutaraldehyd

Glutaraldehyd je jedním nejběžněji používaným síťovacím činidlem pro chitosan. Mechanismus síťování chitosanu tímto dialdehydem však není příliš jasný. Pro pochopení mechanismu působení bylo provedeno mnoho studií a byly zjištěny 3 možné mechanismy:

- a) jedna Schiffova báze se tvoří s jednou aldehydovou skupinou a druhá aldehydová skupina zůstává volná pro následnou reakci
- b) dvě Schiffovy báze jsou vytvořeny s oběma aldehydovými skupinami glutaraldehydu a dvěma chitosanovými jednotkami
- c) řada molekul glutaraldehydu polymeruje za vzniku většího zesíťujícího řetězce.

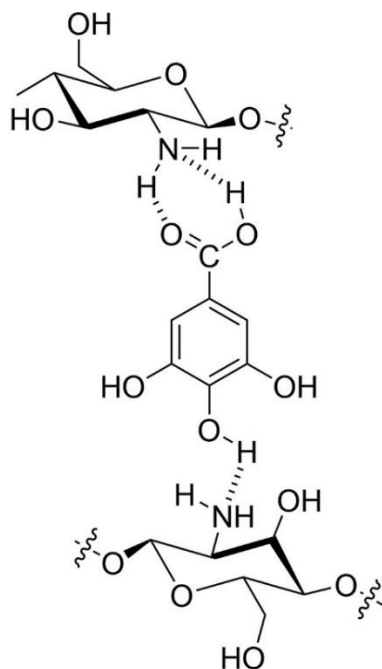
Chemické zesíťování mezi chitosanem a glutaraldehydem je znázorněno na obrázku (Obrázek 10). Největší nevýhodou glutaraldehydu je však jeho toxicita, která omezuje jeho použití pro balení potravin [95].



Obrázek 10: Schéma chemického zesítní mezi chitosanem a glutaraldehydem [95]

2.11.2.2 Kyselina taninová

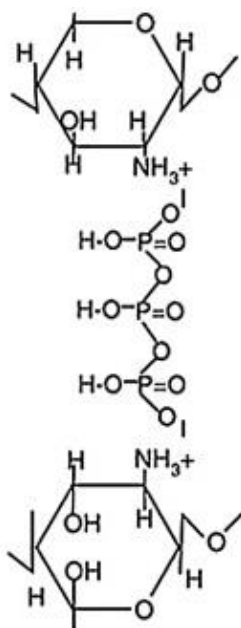
K překonání omezení, která mají síťovací činidla na bázi dialdehydu, byla pro stabilizaci několika přírodních polymerů zavedena kyselina taninová jakožto přírodní síťovadlo. Kyselina taninová je druh přírodní polyfenolové sloučeniny, který se široce vyskytuje v různých rostlinách a lze ji tak snadno extrahovat. Byla schválena úřadem pro kontrolu potravin a léčiv ve Spojených státech a má schopnost interagovat s biopolymery jako je albumin, chitosan, kolagen a želatina pomocí nekovalentních interakcí. S chitosanem může interagovat prostřednictvím hydrofobních interakcí a vodíkových vazeb. Schéma chemického zesítní chitosanu kyselinou taninovou lze pozorovat na obrázku (Obrázek 11) [95, 96].



Obrázek 11: Schéma chemického zesítnění chitosanu kyselinou taninovou [95]

2.11.2.3 Tripolyfosfát sodný

Jako alternativa k toxickým a nebezpečným síťovacím činidlům by mohl být tripolyfosfát sodný, což je zdravotně nezávadný a levný síťovací prostředek [97]. Tripolyfosfát sodný je polyanion, který může interagovat s kladně nabitými aminoskupinami chitosanu prostřednictvím elektrostatických sil za vzniku iontově zesíťovaných sítí [98]. Schéma zesítnění je zobrazeno na obrázku (Obrázek 12).

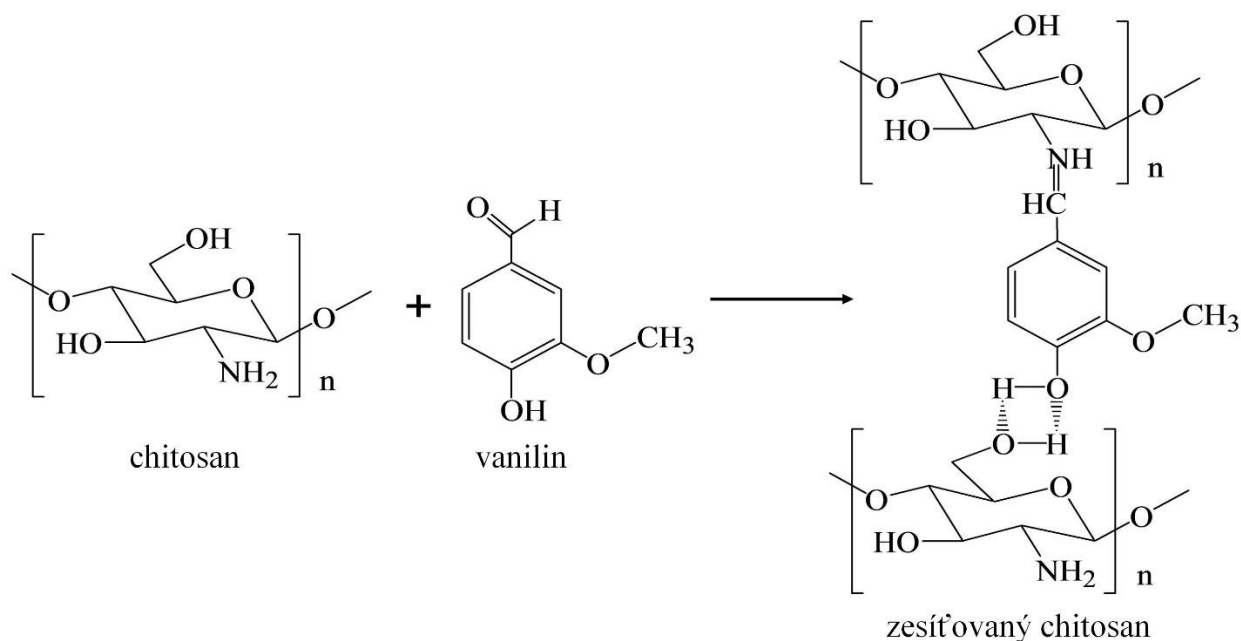


Obrázek 12: Schéma zesítnění chitosanu tripolyfosfátem sodným [97]

2.11.2.4 Vanilin

Vanilin, vyskytující se v luscích vanilky (*Vanilla planifolia*), je jednou z nejrozšířenějších přísad a je široce využíván jako ochucovadlo a konzervační činidlo v potravinách, nápojích, parfumerii a farmaceutickém průmyslu. Jedná se o významný monomer, který vykazuje protinádorové, protizánětlivé, antioxidační a antimutagenní vlastnosti

Vanilin lze díky jeho aldehydové skupině použít jako přirozené síťovadlo. Aldehydová skupina tvoří vazbu s aminoskupinami chitosanu za tvorby Schiffovy báze. Hydroxylová skupina tohoto síťovadla navíc může tvořit vodíkovou vazbu s aminoskupinami nebo hydroxylovými skupinami další molekuly chitosanu [99].



Obrázek 13: Schéma zesíťení chitosanu vanilinem [100]

2.11.3 Polyvinylalkohol

Přirozená křehkost většiny filmů na bázi polysacharidů omezuje jejich použití. K překonání tohoto omezení může být účinné použití biokompatibilního a neantigenního kopolymeru, jako je polyvinylalkohol. Správné množství polyvinylalkoholu přispívá ke zlepšení pružnosti a prodloužení chitosanových filmů a eliminuje tak nutnost použití změkčovadel [99].

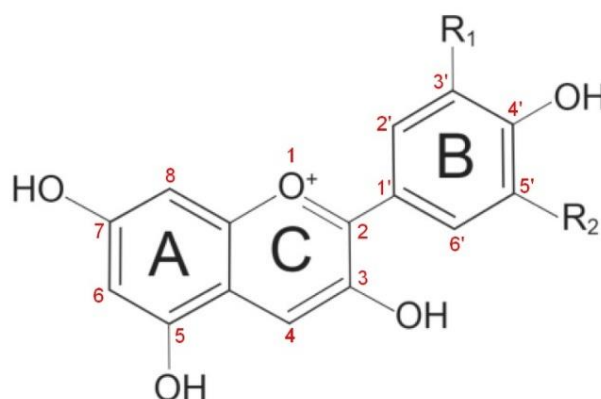
Polyvinylalkohol je ve vodě rozpustný syntetický polymer s vynikajícími filmotvornými, emulgačními a adhezivními vlastnostmi. Nabízí výjimečnou odolnost vůči olejům, mastnotám a rozpouštědlům, navíc vysokou pevnost v tahu, pružnost a vysokou bariérovou odolnost proti kyslíku a aromatům. Samotný polyvinylalkohol se však pro balení potravin nepoužívá [101].

2.11.4 Anthokyany

Anthokyany (z řeckého anthos = květ a kyanos = modrá) tvoří největší a pravděpodobně nejdůležitější skupinu ve vodě rozpustných rostlinných pigmentů. Patří do rozšířené flavonoidní skupiny polyfenolů, které jsou zodpovědné za modrou, fialovou a červenou barvu mnoha rostlinných pletiv. Hrají důležitou roli při přitahování zvířat, čímž podporují šíření

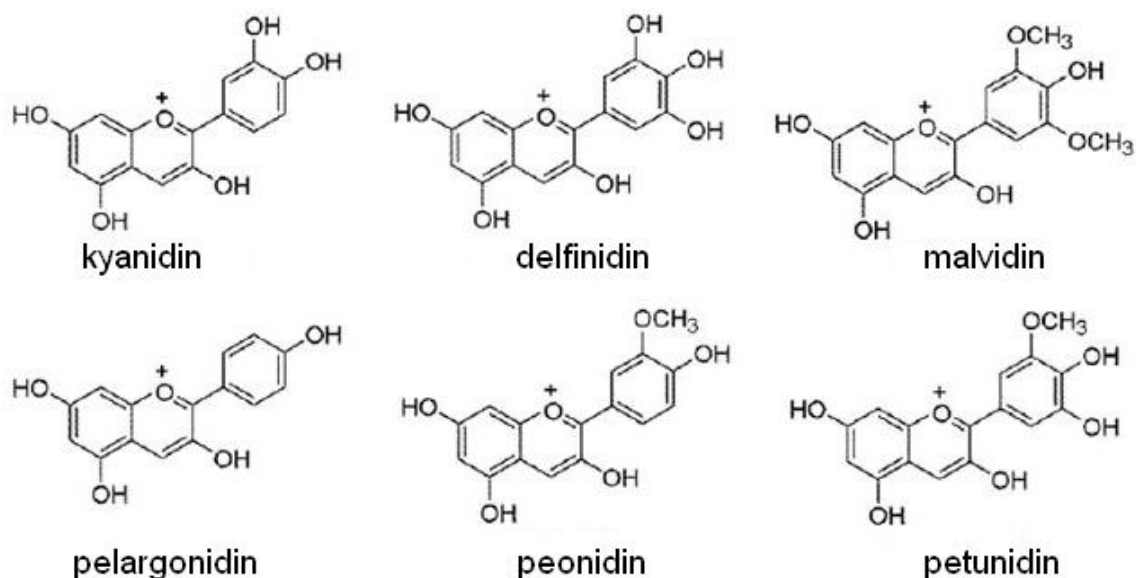
semen a opylování a tím, že absorbují světlo, přispívají k ochraně rostlin před poškozením ultrafialovým zářením [102].

Anthokyany patří do skupiny flavonoidů, ale mají formu flavyliových kationtů, což je odlišuje od ostatních typů flavonoidů. Chemická forma anthokyanů je založena na glykosidech flavyliových (2-benzopyryliových) solí, viz Obrázek 14. Existuje však spousta strukturálních variací v počtu hydroxylových skupin, stupni methylace hydroxylových skupin a povaze a počtu cukerných skupin připojených k molekule. Struktura anthokyanů se navíc mění v závislosti na poloze, povaze a počtu alifatických nebo aromatických kyselin připojených k cukrům. Obecně mají anthokyany jednu glukosidovou jednotku, ale existují různé typy anthokyanů se dvěma nebo více cukry připojenými ve více pozicích nebo připojenými jako oligosacharidové postranní řetězce [103, 104].



Obrázek 14: 2-fenylbenzopyryliový kation flavyliové soli [105]

Intenzita a typ barvy anthokyanů jsou závislé na přítomnosti hydroxylových a methoxylových skupin. Přítomnost mnoha hydroxylových skupin mění barvu na namodralý odstín, zatímco přítomnost více methoxylových skupin způsobuje větší zarudnutí. Anthokyaninové pigmenty se skládají z glykosylované struktury anthokyaninu a anthokyanidinu, kde glykosidovou formou je anthokyanin a aglykon představuje anthokyanidin. V rostlinách se vyskytuje převážně šest typů anthokyanidinů, jako je kyanidin (50 %), delphinidin (12 %), pelargonidin (12 %), peonidin (12 %), malvidin (7 %) a petunidin (7 %). Chemické struktury těchto anthokyanidinů jsou vyobrazeny na obrázku (Obrázek 15) [52].



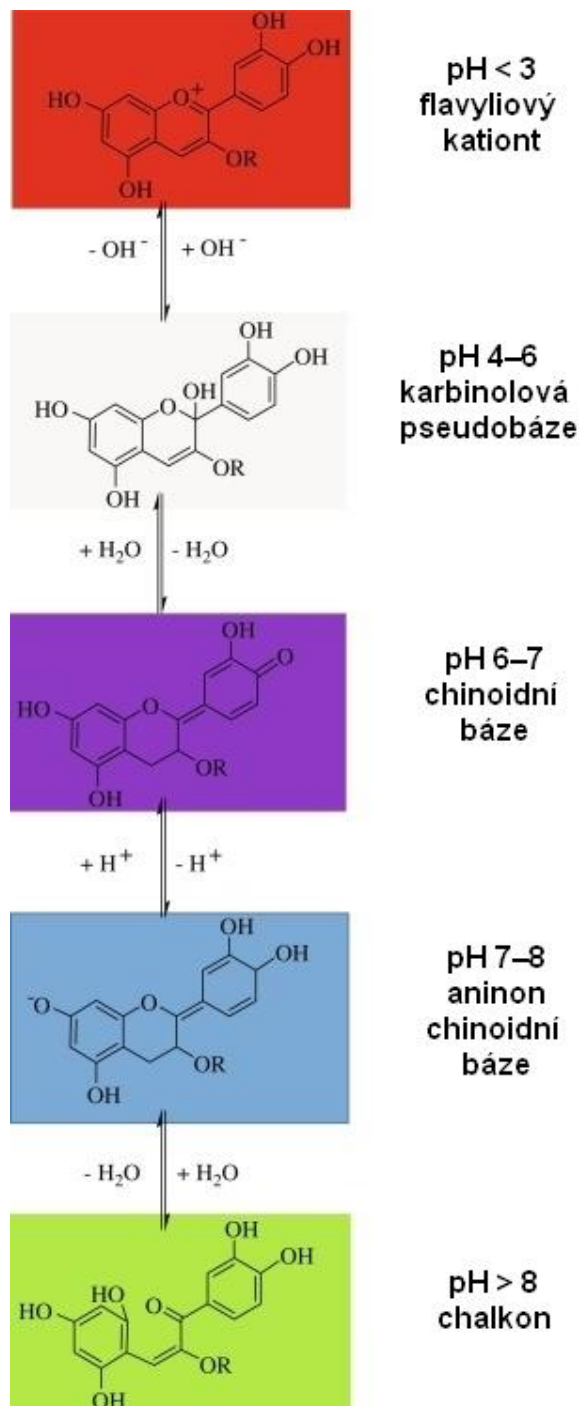
Obrázek 15: Chemické struktury nejznámějších anthokyanidinů [106]

Kyanidin je purpurově načervenalý pigment a nachází se hlavně v bobulích a zelenině s červenou barvou, jako je fialová kukuřice, sladké brambory apod. Delphinidin je červeno-modrý pigment vyskytující se v rostlinách, a obvykle je tomuto pigmentu přisuzována modrá barva květů. Pelargonidin je červenooranžový a vyskytuje se hlavně v červených plodech a oranžových květech. Peonidin je methylovaný anthokyanidin a dodává bobulím a hroznům purpurovou barvu. Malvidin je také purpurově zbarvený a vyskytuje se hlavně v modře zbarvených květech, například v červeném víně. Petunidin je tmavě červeně zbarvený pigment, vyskytující se hlavně ve fialových okvětních lístcích květů a v černém rybízu [52].

Anthokyaniny jsou polární, takže jsou rozpustné v polárních rozpouštědlech, jako je methanol, ethanol a voda. Anthokyaniny jsou obecně bez zápachu a mají svíravou chuť [103].

Tyto přírodní sloučeniny se běžně vyskytují v lidské stravě, zejména v červeném, modrém nebo fialovém ovoci a zelenině, ve kterých se běžně vyskytují v koncentracích od 0,1 do 1,0 % sušiny. Denní příjem anthokyanů u člověka je značně proměnlivý a vysoce závislý na stravovacích návycích [107].

Anthokyaniny vykazují změny barvy specifické pro pH. Při hodnotách pH pod 3 je převládající formou anthokyanů červený flavyliový kation. V oblasti pH 4–6 převládá bezbarvá karbinolová pseudobáze. Zvýšením pH na 6 se struktura změní na neutrální chinoidní bázi, což má za následek změnu barvy na fialovou. Při zvýšení pH nad hodnotu 7 se barva roztoku anthokyanů změní na modrou v důsledku přítomnosti aniontové chinoidní báze. Zvýšením pH nad 8 se tvoří chalcon, který zbarví roztok na zeleno-žlutou [108].



Obrázek 16: Barevné změny anthokyanů podle pH [109]

2.11.4.1 Anthokyan y a inteligentní balení

Anthokyan y jsou v posledních letech zkoumány pro aplikace inteligentního balení, kde díky svým schopnostem měnit barvu v celém spektru pH zastávají funkci barevného indikátoru. Aby takový indikátor správně fungoval, je potřeba, aby byl extrakt anthokyanů kompatibilní s polymerem. Dále musí být schopen reagovat na změny čerstvosti potravin během jejich skladování a distribuce. Protože jsou indikátory založeny na barevných změnách, musí být barevné změny jednoznačné, snadno čitelné pro spotřebitele a maloobchodníky, a měly by vždy

souviset se změnami kvality balených potravin. Klíčové jsou také další vlastnosti anthokyanů, jako je voděodolnost a jejich stabilita [2].

Výběr rostliny použitý jako zdroj anthokyanů je zásadní pro vývoj indikátoru založeného na anthokyanech, protože určí typ převládajícího anthokyanu. Extrakty získané z různých rostlin vykazují různé barevné variace při různém pH. Nejčastěji používanými rostlinami pro tento účel jsou červené zelí a fialové batáty, které tvoří více než 35 % všech studií, kvůli jejich vysokému obsahu kyanidinů a peonidinů v jejich monoacylovaných a diacetylovaných formách [2]. Tyto anthokyaniny mají vylepšené vlastnosti tepelné, vlastnosti fotostability, a ve srovnání s neacylovanými anthokyaniny vykazují širší barevné spektrum závislé na pH [110]. Z tradičních zdrojů anthokyanů se využívají například hrozny nebo ostružiny, z těch netradičních extrakty ze semen černé sóji, slupky fialového a černého lilku a další.

Koncentrace extraktu anthokyanů v indikátoru je zásadním faktorem, který by měl být pro správnou funkci vhodně upraven. Bylo prokázáno, že příliš nízké koncentrace anthokyanů způsobují méně rozlišitelné barevné změny, zatímco příliš vysoké koncentrace mají nižší výrazné odchylky, což lze přičíst interferenci způsobené barvou samotného anthokyaninu [2].

Několik prací zkoumalo indikátory pH nebo senzory na bázi anthokyanů jakožto přírodních barviv. Příkladem jsou indikátorové pH filmy na bázi anthokyanů extrahovaných z fialových sladkých brambor pro sledování čerstvosti vepřového masa. Další indikátory byly připraveny z anthokyanů extrahovaných z hroznů, červeného zelí, černých sójových bobů. Pro sledování kažení pasterizovaného mléka byl vyvinut kolorimetrický indikátor pH s extraktem z černé mrkve [111].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

- Chitosan vysokomolekulární, Sigma-Aldrich
- Polyvinylalkohol 8–88, Fluka
- Polyvinylalkohol 10–98, Fluka
- Polyvinylbutyral, REGNAL
- Hydroxid sodný, pecky, čistý, PENTA
- Kyselina citronová bezvodá, PENTA
- Kyselina chlorovodíková 35% p.a., PENTA
- Kyselina octová 98%, CHEMAPOL
- Chlorid draselný p.a., CHEMAPOL
- Ethanol absolutní p.a., PENTA
- Ethanol 96%, PENTA
- Dusičnan vápenatý p.a., LACHEMA
- Vanilin 99%, Sigma-Aldrich
- Fosforečnan sodný dihydrát, LACHEMA
- Ninhydrin, Sigma-Aldrich
- 1-methoxy-2-propanol, Carl Roth
- Chlorid cínatý 98%, Sigma-Aldrich
- Duvilax (Tužidlo KT), InoTEX
- Chlorid amonný čistý, CHEMAPOL
- Síran zinečnatý heptahydrát krystalický, CHEMAPOL

3.2 Přístroje

- Analytické digitální váhy Sartorius Entris 224I – 1S
- Ultrazvuk – Ultrasonic compact cleaner PS 02000A
- Hřidelová míchačka IKA, EUROSTAR 20 digital
- Magnetická míchačka
- Automatický aplikátor filmu TQC, Gamin s.r.o
- Bakerovo natahovací pravítko
- Sušárna Venticell, MBT Medical Technology s.r.o.
- Spektrofotometr Eye-One Pro
- Spektrofotometr Helios α
- Spektrofotometr USB 650 UV, Ocean Insight
- Lyofilizátor LABCONCO
- 3D tiskárna 3D WOX 1, Sindoh, Korea
- Odstředivka Hettich EBA 30
- Inkubátor IP 100-U, LTE Scientific Ltd

3.3 Použitý software

- Key Wizard, Gretag Macbeth
- Microsoft Excel
- Microsoft Word
- Vision V3.50
- Ocean View
- Adobe Photoshop CS2

3.4 Izolace anthokyanů

Jako zdroj anthokyanů pro přípravu extraktu byla využita hlávka červeného zelí, která byla zakoupena v obchodním řetězci. Čerstvé zelí bylo nakrájeno a nastrouháno nahrubo pomocí kuchyňského struhadla. Extrakce byla prováděna třemi různými rozpouštědly – 96% ethanolem, destilovanou vodou a mixem těchto rozpouštědel v poměru 1:1. Bylo odváženo 500 g nastrouhaného zelí, které bylo zalito 500 ml rozpouštědla. Tato směs byla poté po dobu 1 hodiny míchána pomocí hřídelové míchačky Eurostar. Následně byl anthokyanový extrakt oddělen od pevných částic zelí pomocí sítka do čisté nádoby, a získaná suspenze byla filtrována přes filtrační papír Smith 150 mm. Filtrát byl poté zahuštěn na vakuové odparce na nižší objem a následně zbaven dalších nečistot odstředěním v centrifuze při 4000 ot/min po dobu 10 minut. Supernatant byl slit do lyofilizační nádoby a předán k lyofilizaci. Získaný lyofilizovaný prášek byl skladován ve vzduchotěsné plastové nádobě v mrazáku.

3.5 Příprava pufrů

Prvním krokem přípravy pufrů byla příprava zásobních roztoků. Pro přípravu pufrů bylo nejdříve potřeba připravit zásobní roztoky 0,2M kyseliny chlorovodíkové, 0,2M chloridu draselného, 0,2M fosforečnanu sodného, 0,1M kyseliny citronové, 0,1M glycinu a 0,1M hydroxidu sodného. Do 100 ml odměrné baňky bylo kvantitativně převedeno navážené množství (v případě kyseliny chlorovodíkové byl potřebný objem nabit pipetou), viz Tabulka 1. Odměrná baňka byla poté doplněna po rysku destilovanou vodou a obsah byl promíchán.

Tabulka 1: Navážky (g) pro přípravu 100 ml zásobních roztoků

Kyselina chlorovodíková	Chlorid draselný	Fosforečnan sodný dihydrát	Kyselina citronová	Glycin	Hydroxid sodný
2,0827	1,4920	3,5600	2,1008	0,7510	0,3999

Pufry v rozmezí pH 3–12 byly připraveny přímým smícháním daných objemů dle údajů v Tabulka 2. Při přípravě pufrů pH 1–2 bylo nutné pufry napipetovat do odměrných baněk a následně baňky doplnit po rysku destilovanou vodou.

Tabulka 2: Potřebné objemy (ml) zásobních roztoků pro přípravu 100 ml pufrů

pH	Kyselina chlorovodíková (0,2 M)	Chlorid draselný (0,2 M)	Fosforečnan sodný (0,2 M)	Kyselina citronová (0,1 M)	Glycin (0,1 M)	Hydroxid sodný (0,1 M)
1,0	48,50	25,00	-	-	-	-
2,0	5,30	25,00	-	-	-	-
3,0	-	-	20,55	79,45	-	-
4,0	-	-	38,55	61,45	-	-
4,6	-	-	46,75	53,25	-	-
5,0	-	-	51,50	48,50	-	-
6,0	-	-	63,15	36,85	-	-
7,0	-	-	82,35	17,65	-	-
8,0	-	-	97,25	2,75	-	-
9,0	-	-	-	-	89,00	11,00
10,0	-	-	-	-	62,50	37,50
11,0	-	-	-	-	51,20	48,80
12,0	-	-	-	-	46,00	54,00

3.6 Měření absorpčních spekter

U všech připravených extraktů anthokyanů byla změřena absorpční spektra. Lyofilizované extrakty byly rozpuštěny v destilované vodě v poměru 1:10 a poté byl roztok odstředěn při 5500 ot/min po dobu 5 minut. V kyvetě byly smíchány 3 ml daného pufru (viz kapitola 3.5) a 100 μ l odstředěného roztoku. Následně byla pomocí spektrofotometru Helios α měřena absorpční spektra v oblasti 300–800 nm proti destilované vodě.

**Obrázek 17: Měřené roztoky anthokyanového extraktu v pufrech v rozmezí pH 1–12**

3.7 Stanovení celkové koncentrace anthokyanů

Pro stanovení celkové koncentrace anthokyanů v získaných extraktech byla využita metoda pH difference. Lyofilizát byl vždy rozpuštěn v destilované vodě v hmotnostním poměru 1:9 a získaný roztok byl odstředěn při 5500 ot/min po dobu 5 min. Pufry o hodnotě pH 1 a pH 4,6 potřebné pro stanovení byly připraveny dle postupu popsáního v kapitole 3.5.

V křemenné kyvetě bylo 60 µl připraveného roztoku extraktu smícháno s 3 ml pufru pH 1 nebo pH 4,6. Postup byl shodný pro všechny lyofilizáty. Následně byla změřena absorbance těchto roztoků při vlnové délce 530 a 700 nm proti destilované vodě. Podle následujících rovnic (1) a (2) byla vypočítána celková koncentrace anthokyanů.

$$\text{koncentrace anthokyanů (mg/l)} = \frac{\Delta A \cdot M_r \cdot F \cdot 1000}{\varepsilon \cdot L} \quad (1)$$

$$\Delta A = (A_{530} - A_{700})_{\text{pH } 1} - (A_{530} - A_{700})_{\text{pH } 4,6} \quad (2)$$

ΔA – změna absorbance při 530 a 700 nm v pufrech pH 1 a pH 4,6

M_r – molární hmotnost kyanidu-3-glukosidu (449,2 g/mol)

F – faktor zředění

ε – molární absorpční koeficient kyanidu-3-glukosidu ($26900 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

L – optická dráha (cm)

1000 – faktor pro převedení gramů na miligramy

3.8 Příprava základních roztoků

Anthokyany byly izolovány z červeného zelí dle postupu popsaného v kapitole 3.4. Lyofilizovaný prášek byl následně rozpuštěn ve vodě v poměru 1:1 a rozpuštěná směs byla odstředěna při 5500 ot/min po dobu 5 minut. Takto připravený roztok byl používán k přípravě filmů. Do dalšího použití byl roztok skladován v lednici.

Pro přípravu základního roztoku chitosanu byl navážen 1 g vysokomolekulárního chitosanu. Do kádinky bylo přidáno 49 g 2% roztoku kyseliny octové a obsah kádinky byl zahřát na magnetické míchačce s ohřevem na cca 60 °C. Navážený chitosan byl pomalu přidáván k zahřátému roztoku kyseliny octové, který byl neustále míchán pomocí hřídelové míchačky Eurostar. Po přidání celého množství chitosanu byla směs míchána další hodinu. Kvůli možnému odparu při zahřívání byl nakonec obsah kádinky doplněn do 50 g, aby celková koncentrace chitosanu odpovídala 2 %. Připravený roztok chitosanu byl do dalšího použití skladován v lednici.

Pro přípravu základního roztoku polyvinylalkoholu bylo naváženo 7,5 g polyvinylalkoholu. Do kádinky bylo přidáno 42,5 g destilované vody a obsah kádinky byl zahřát na magnetické míchačce s ohřevem na cca 70 °C. Navážený polyvinylalkohol byl pomalu přidáván k zahřáté destilované vodě, která byla neustále míchána pomocí hřídelové míchačky Eurostar. Po přidání celého množství polyvinylalkoholu byla směs míchána další hodinu. Kvůli možnému odparu při zahřívání byl nakonec obsah kádinky doplněn do 50 g, aby celková koncentrace polyvinylalkoholu odpovídala 15 %. Připravený roztok polyvinylalkoholu byl do dalšího použití skladován v lednici.

Základní roztok vanilinu byl připraven rozpuštěním 1 g v 10 ml čistého ethanolu, aby celková koncentrace vanilinu činila 10 %. Do dalšího použití byl tento roztok skladován v lednici.

3.9 Příprava filmů

Byl připraven indikátor pH skládající se z chitosanu, polyvinylalkoholu, vanilinu a extraktu anthokyanů. Příprava filmů probíhala v malé kádince na magnetické míchačce. Nejdříve bylo do kádinky naváženo dané množství zásobního roztoku chitosanu (CS) a polyvinylalkoholu (PVA) v určitém poměru. Byly testovány poměry CS:PVA 1:1, 1:3 a 3:1. Poté byla kádinka přesunuta na magnetickou míchačku, kde byl za stálého míchání přidán roztok anthokyanů. Na 1,5 g celkové kompozice bylo přidáváno 450 μ l roztoku anthokyanů, což odpovídá 30 % celkové kompozice. Následně byl přidáván roztok vanilinu, přičemž byl testován přídavek 10, 15 a 20 % vanilinu na sušinu chitosanu. Na 1,5 g celkové kompozice bylo tedy přidáváno 23, 34 a 44 μ l připraveného 10% roztoku vanilinu.

Po přidání všech výše zmíněných komponent byl roztok míchán další 2 minuty a poté byl pomocí Pasteurovy pipety nadávkován před Bakerovo pravítko na PET folii. Pomocí TQC aplikátoru byly nanášeny filmy o definované tloušťce 60 μ m. Filmy byly ponechány 30 minut zaschnout při laboratorní teplotě a následně byly dosušeny v sušárně při 70 °C po dobu 15 minut.



Obrázek 18: Aplikátor filmů TQC a Bakerovo pravítko

3.10 Stanovení rozpustnosti

Stanovení rozpustnosti připravených filmů probíhalo tak, že byla PET folie před nanesením vrstvy zvážena na analytických vahách a byla tak získána hmotnost m_1 . Poté byl nanesen film viz kapitola 3.9 a po vysušení v sušárně byla folie s nanesenou vrstvou vložena na 15 minut do exsikátoru, kde byla díky nasycenému roztoku dusičnanu vápenatého udržována relativní vlhkost 50 %. Po uplynutí 15 minut byla folie s nanesenou vrstvou zvážena a byla tak získána hmotnost m_2 . Poté byla folie ponořena na 1 minutu do misky s vodou a následně vysušena v sušárně při teplotě 100 °C. Po vysušení byla folie znovu vložena na 15 minut do exsikátoru a následně zvážena na analytických vahách pro získání hmotnosti m_3 . Stanovení bylo provedeno pro každý vzorek 3 $\times$. Rozpustnost byla vypočítána dle vztahu (3).

$$\text{rozpustnost (\%)} = 1 - \left(\frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \right) \cdot 100 \quad (3)$$

Nejdříve byla rozpustnost stanovována u vzorků připravených v poměru CS:PVA 1:1 a lišících se v koncentraci vanilinu (10, 15, a 20 %). Pro další experimenty byla vybrána koncentrace vanilinu 15 % a byly testovány různé poměry chitosanu a polyvinylalkoholu (CS:PVA 1:1, 1:3 a 3:1).

3.11 Stanovení stupně zesíťení

Stupeň zesíťení připravených filmů byl hodnocen ninhydrinovým testem s kvantitativním stanovením poměru spotřebovaných aminoskupin reakcí s vanilinem k volným aminoskupinám v nezesíťených filmech. Pro přípravu ninhydrinového činidla byl smíchán roztok A (1,05 g kyseliny citronové, 0,4 g hydroxidu sodného a 0,04 g chloridu cínatého rozpuštěno v 25 ml destilované vody) s roztokem B (1 g ninhydrinu v 25 ml 1-methoxy-2-propanolu). Smíchané roztoky byly dále míchány po dobu 45 minut, poté bylo připravené činidlo do dalšího použití uskladněno v tmavé lahvi.

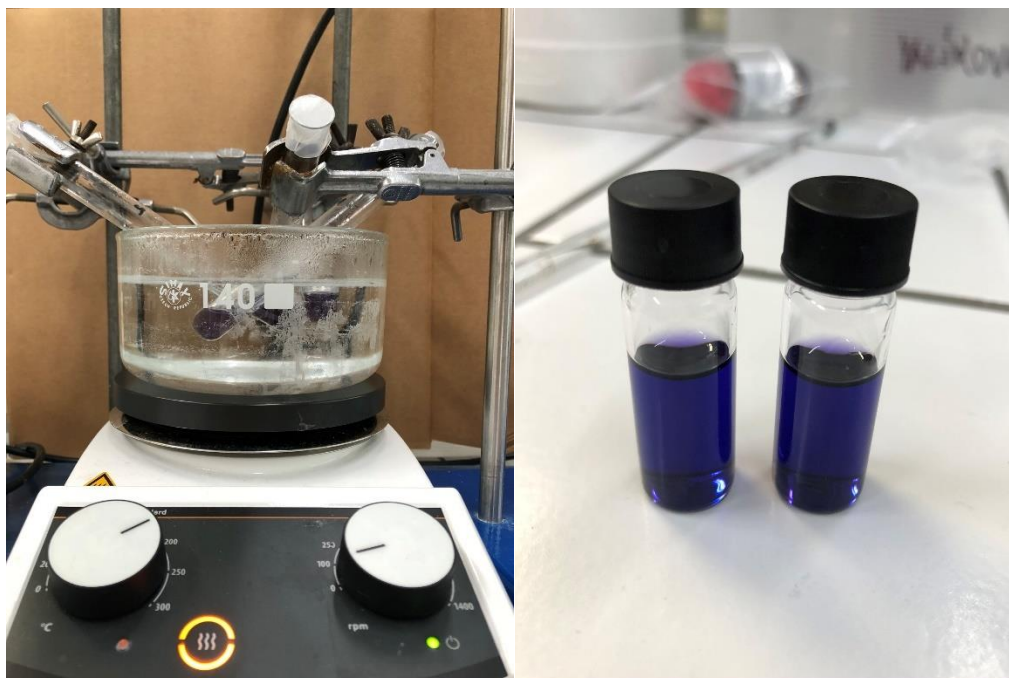
Testované filmy byly nařezány na šířku folie 1 cm, která byla vložena do zkumavky umístěné šikmo ve vroucí vodní lázni. Do zkumavky byly přidány 2 ml ninhydrinového činidla, hrdlo zkumavky bylo překryto parafilmem, aby nedocházelo k odparu a takto připravené zkumavky byly ponechány ve vodní lázni při 100 °C po dobu 30 minut. Stejným způsobem byla testována i nanesená samotná vrstva 2% chitosanu. Současně byl připraven slepý vzorek, který sestával z čisté PET folie, která byla stejně jako vzorky umístěna do zkumavky společně s 2 ml ninhydrinového činidla a ponechána ve vodní lázni při 100 °C po dobu 30 minut. Po uplynutí 30 minut byly zkumavky ochlazeny na teplotu místnosti. Poté byl obsah zkumavek přelit do menších vialek, kde byly roztoky zředěny 1 ml 50% ethanolu. Následně byla zaznamenána absorbance při 570 nm pomocí UV spektrofotometru. Každý vzorek byl stanovován 3×, přičemž byly testovány různé koncentrace vanilinu (10, 15 a 20 %) a různé poměry chitosanu a polyvinylalkoholu (CS:PVA 1:1, 1:3, 3:1). Stupeň zesíťení byl vypočítán podle vztahu:

$$\text{stupeň zesíťení (\%)} = 100 - \left(\frac{A_Z - A_B}{A_{CS} - A_B} \cdot 100 \right) \quad (4)$$

A_Z – absorbance zesíťované vrstvy (nm)

A_{CS} – absorbance chitosanové vrstvy (nm)

A_B – absorbance slepého vzorku (nm)



Obrázek 19: Aparatura pro stanovení zesítní ninhydrinovou zkouškou (vlevo) a získané roztoky pro spektrofotometrické měření (vpravo)

3.12 Přetisk vrstev

U připravených vrstev dle postupu popsaneho v kapitole 3.9 byl proveden přetisk pomocí některých polymerů s obsahem hydroxidu sodného. Polymery zvolené pro přetisk byly duvilax, polyvinylalkohol 10–98 a polyvinylbutyral.

Jelikož změna barvy anthokyanového extraktu z fialové do modré probíhá při přibližném pH 9, bylo nutné zjistit, jaké množství hydroxidu je potřeba do duvilaxu vpravit pro nastavení takového pH. Do naváženého množství duvilaxu byla vpravena kapka 1% roztoku fenolftaleinu, následně byl postupně přidáván 3% roztok hydroxidu sodného až do růžového zbarvení roztoku. Při přípravě kompozice pro přetisk vrstvy byl duvilax odvážen pomocí analytických vah do malé kádinky a na magnetickém míchadle bylo přidáno předem zjištěné množství 3% roztoku hydroxidu sodného. Pomocí síta 77/195-48Y byla takto připravená kompozice přetisknuta na vrstvy, přičemž koncentrace hydroxidu byla postupně zvyšována pro dosažení větší barevné změny.

Z polyvinylalkoholu 10–98 byl připraven 15% roztok tak, že navážených 7,5 g bylo vmícháno do 42,5 g destilované vody a kádinka pak byla ponechána při 60 °C přes noc v sušárně, aby polyvinylalkohol nabobtnal. Druhý den byl pak obsah kádinky doplněn do 50 g, aby koncentrace polymeru činila 15 %. Nabobtnaný polyvinylalkohol byl poté rozmíchán pomocí hřídelové míchačky Eurostar při mírném zahřívání na magnetické míchačce. Takto připravený zásobní roztok byl do dalšího použití skladován v ledničce. Při přípravě kompozice pro přetisk vrstvy byl roztok polyvinylalkoholu odvážen na analytických vahách do malé kádinky a na magnetickém míchadle bylo přidáno předem určené množství 3% roztoku hydroxidu sodného. Pomocí síta 77/195-48Y byla takto připravená kompozice přetisknuta

na vrstvy, přičemž koncentrace hydroxidu byla postupně zvyšována pro dosažení větší barevné změny.

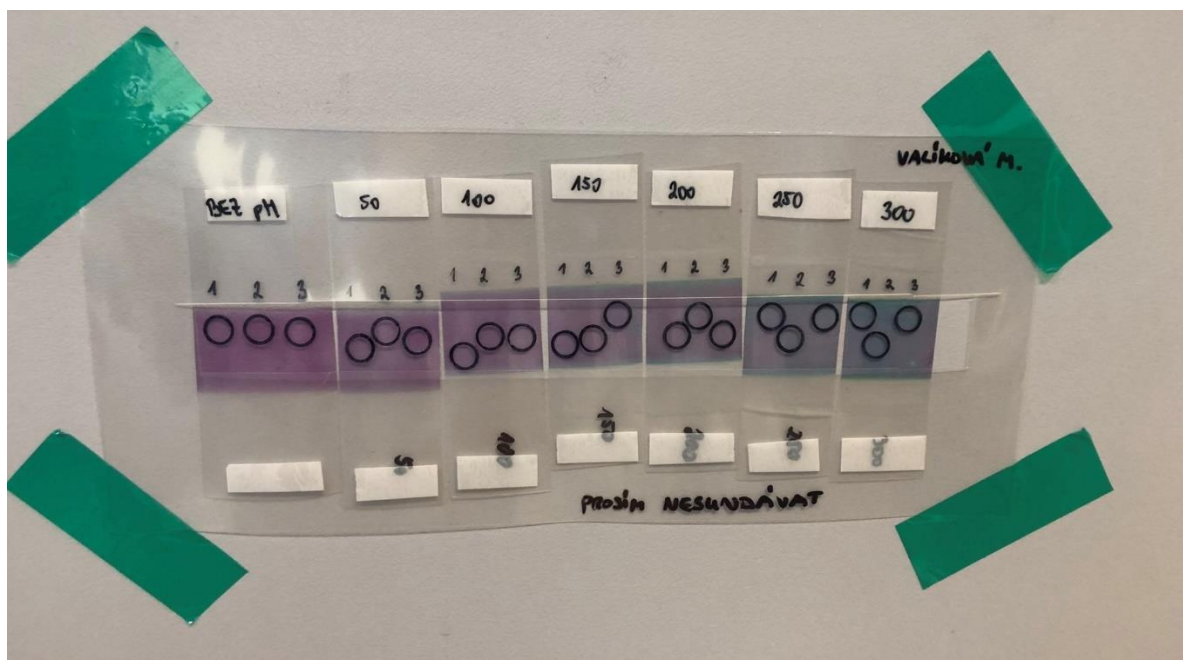
Byl připraven 10 % polyvinylbutyralu. Navážených 5 g bylo pomalu vmícháváno do 45 g absolutního ethanolu. Celý obsah kádinky byl celou dobu míchán pomocí hřídelové míchačky Eurostar. Takto připravený zásobní roztok byl do dalšího použití skladován v ledničce. Při přípravě kompozice pro přetisk vrstvy byl roztok polyvinylbutyralu odvážen na analytických vahách do malé kádinky a na magnetickém míchadle bylo přidáno předem určené množství 10% roztoku hydroxidu sodného. Pomocí síta 120/305-34Y byla takto připravená kompozice přetisknuta na vrstvy, přičemž koncentrace hydroxidu byla postupně zvyšována pro dosažení větší barevné změny.

3.13 Měření stability filmů v čase

Připravené vrstvy dle postupu popsaného v kapitole 3.9 byly přetisknuty 10% polyvinylbutyralem viz kapitola 3.12. Přetisknuté proužky byly nastříhány a na každém byly vždy vyznačeny lihovou fixou 3 místa, na kterých bylo následně měreno odrazové spektrum. Proužky byly nalepeny na PET folii s vyříznutým středem, která byla nalepena na skříň v laboratoři. Vrstvy byly ponechány působení denního světla po dobu 30 dní a ze skříně byly sundávány pouze pro účely měření. Intenzita světelné expozice byla v průběhu jednoho dne měřena pomocí detektoru XD-9502-4, který je schopný měřit intenzitu ozáření (mW/m^2) i osvětlení (lux). Naměřené hodnoty jsou zobrazeny v tabulce (Tabulka 3). Pomocí spektrofotometru X-rite I1 byla v rozmezí vlnových délek 380–730 nm měřena spektra v daných časových intervalech (0., 1., 2., 4., 8., 16. a 30. den).

Tabulka 3: Naměřené hodnoty světelné expozice

Čas	Intenzita záření [mW/m^2]	Intenzita osvětlení [lux]
8:00	12,0	280
10:00	13,0	302
12:00	13,9	311
14:00	11,9	271
16:00	11,8	268



Obrázek 20: Vrstvy pro měření časové stability nalepené na skříní laboratoře

3.14 Měření barevnosti

Abychom byli schopni barvy objektivně popsat, využíváme k tomu kolorimetrii, která popisuje barvy pomocí jistých spojitých funkcí. K objektivnímu vyhodnocení barev musíme nejdříve definovat tři základní elementy barevného vidění – objekt, zdroj světla a pozorovatele.

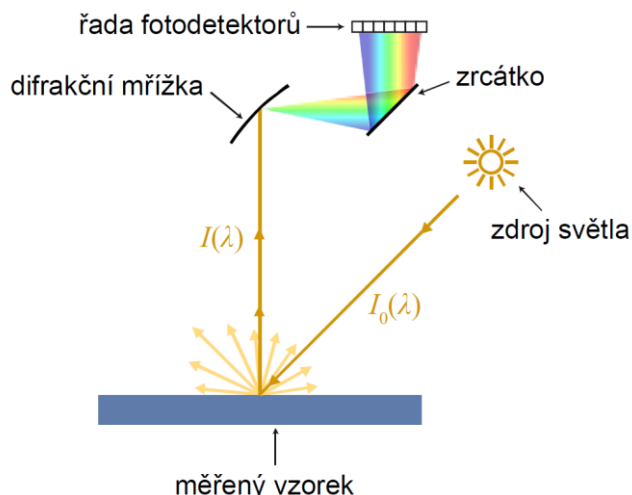
Každý světelný zdroj je charakterizován spektrální intenzitou vyzařování $M_e(\lambda)$, přičemž tento parametr nám říká, jak který zdroj na určité vlnové délce vyzařuje. Mezinárodní komise pro osvětlení CIE (Commission internationale de l'éclairage) definuje několik standardizovaných zdrojů – pro denní osvětlení jsou to zdroje D50, D65 a D75, přičemž číslo určuje teplotu chromatičnosti.

Intenzitu dopadajícího světla charakterizujeme na každé vlnové délce $I_0(\lambda)$. Při odražení světla od objektu bude mít pak světlo intenzitu $I(\lambda)$. Pokud světlo ze světelného zdroje dopadá na objekt, tak se některé složky v objektu pohltí (méně se odráží) a jiné se nepohltí (více se odráží). Poměr intenzity odraženého světla od objektu k intenzitě dopadajícího světla na objekt je parametr reflektance $R(\lambda)$.

$$R(\lambda) = \frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)} \quad (5)$$

Reflektance vyjadřuje, jak moc objekt světlo o dané vlnové délce odráží. Zjištěním tohoto parametru v intervalu vlnových délek 380–750 nm získáme reflexní spektrum, které charakterizuje objekt. K měření se používá reflexní spektrofotometr, jehož obecné schéma je zobrazeno na obrázku (Obrázek 21). Ke zjištění intenzity odraženého světla při jednotlivých vlnových délkách je potřeba světlo rozložit pomocí difrakční mřížky. Rozložené světlo pak dopadá na řadu fotodetektorů, kde dojde k přeměně světla na elektrický signál. Před měřením

je vždy nutné přístroj kalibrovat na absolutní bílou změřením dokonale bílé plochy, která žádné světlo nepohlcuje [112].



Obrázek 21: Schéma odrazového spektrofotometru [112]

Definice pozorovatele je nejsložitější, jelikož vjem barvy vzniká až v našem mozku analýzou jistých podnětů. V lidském oku jsou přítomny fotoreceptory a čípky. Fotoreceptory, nazývané též tyčinky, v podstatě vidí černobíle, protože jsou zodpovědné za vnímání jasu. Čípky slouží k barevnému vidění, přičemž máme tři druhy čípků – ρ , γ , β . Tyto čípky jsou citlivé na červenou, zelenou a modrou oblast viditelného záření.

Mezinárodní komise pro osvětlení CIE definuje dva standardizované pozorovatele a to dvoustupňového (2°) a desetistupňového (10°). Každý je definován pomocí trichromatických členitelů $\bar{x}$, $\bar{y}$, $\bar{z}$. Tyto tři funkce byly získány experimentálně a vyjadřují citlivost pozorovatele [112].

Barvu lze jednoznačně definovat pomocí trichromatických hodnot X , Y a Z , které lze vypočítat ze spektrální reflektance $R(\lambda)$, spektrální distribuce osvětlení $\Phi^0(\lambda)$ a funkcí trichromatických členitelů $\bar{x}$, $\bar{y}$, $\bar{z}$ podle vztahů (6), (7), (8) a (9) [113].

$$X = K \sum_{380}^{730} \phi^0(\lambda) \cdot R(\lambda) \cdot \bar{x}(\lambda) \quad (6)$$

$$Y = K \sum_{380}^{730} \phi^0(\lambda) \cdot R(\lambda) \cdot \bar{y}(\lambda) \quad (7)$$

$$Z = K \sum_{380}^{730} \phi^0(\lambda) \cdot R(\lambda) \cdot \bar{z}(\lambda) \quad (8)$$

$$K = \frac{100}{\phi^0(\lambda) \cdot \bar{y}(\lambda)} \quad (9)$$

Tyto parametry lze pomocí složitějších funkcí, viz rovnice (10), (11) a (12), převést na souřadnice barvového prostoru CIE $L^*a^*b^*$. Parametr L^* představuje měrnou světlost, na ose a^* jsou barvy od zelené po červenou a na ose b^* se nachází barvy od modré po žlutou. X_n , Y_n a Z_n jsou trichromatické hodnoty bílého bodu, podle zvolených pozorovacích podmínek. Prostor $L^*a^*b^*$ je znázorněn na obrázku (Obrázek 22).

$$L^* = 116 \cdot (Y/Y_n)^{1/3} - 16 \quad (10)$$

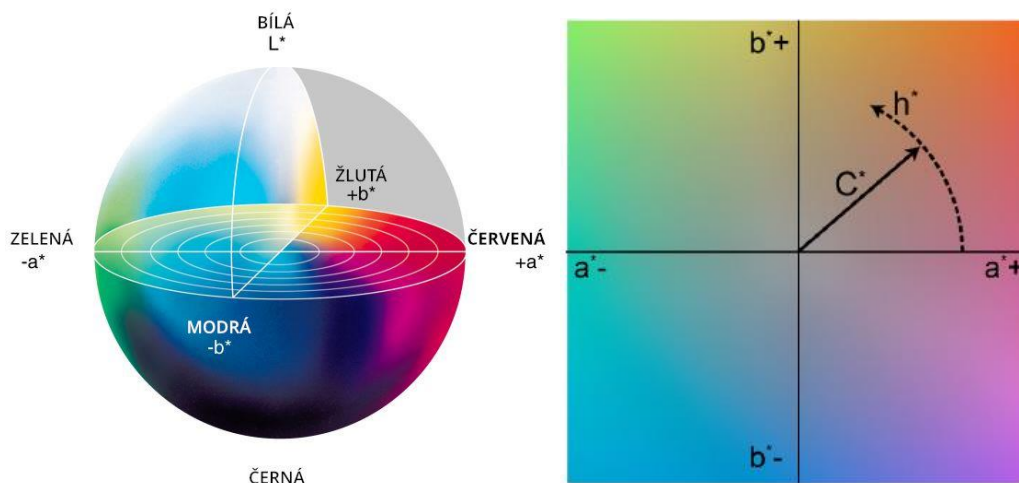
$$a^* = 500 \cdot [(X/X_n)^{1/3} - (Y/Y_n)^{1/3}] \quad (11)$$

$$b^* = 200 \cdot [(Y/Y_n)^{1/3} - (Z/Z_n)^{1/3}] \quad (12)$$

Ze souřadnic a^* a b^* lze vypočítat i další atributy barev – chromu a odstín. Chroma C^* představuje měrnou čistotu barevného tónu a vyjadřuje vzdálenost od achromatického bodu k bodu barvy. Čím větší je chroma, tím pestřejší je barva. Odstín h^* je označován jako měrný úhel barevného tónu a je určen úhlem mezi úsečkou chromy a osou $+a^*$. Chromu a odstín lze vypočítat dle vztahů (13) a (14) [114].

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (13)$$

$$h^* = \arctan(b^*/a^*) \quad (14)$$



Obrázek 22: Barvový prostor CIE $L^*a^*b^*$ (vlevo) [115] a řez tímto prostorem pro jedno L^* , s vyznačením měrného úhlu barevného tónu a měrné čistoty barevného tónu (vpravo) [112]

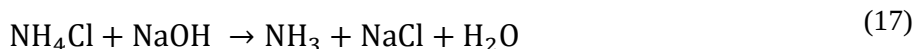
Pro porovnání barev mezi sebou můžeme vypočítat barvovou odchylku ΔE^* podle rovnice (15). Tato veličina zohledňuje rozdíl světlosti i rozdíl v chromatické rovině, a proto je vhodná k posuzování rozdílů a odchylek barev. Mezi další veličinu patří odchylka odstínu ΔH^* , jejíž výpočet je uveden v rovnici (16) [114].

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (15)$$

$$\Delta H^* = \sqrt{(\Delta E^*)^2 - (\Delta C^*)^2 - (\Delta L^*)^2} \quad (16)$$

3.15 Měření barevnosti vrstev po kontaktu s amoniakem

U filmů připravených dle postupu popsaného viz kapitola 3.9 byla měřena barevná změna po kontaktu vrstvy s plynným amoniakem. Při kažení masa je totiž ve značné koncentraci kromě jiných plynů uvolňován právě amoniak. Ten byl vyvíjen reakcí chloridu amonného s hydroxidem sodným dle reakce (17).



Pro experiment byla navržena speciální měřicí komora o objemu 550 ml, která byla vytisknuta na 3D tiskárně 3D WOX 1. Z boku měřicí komory byla vsunuta jehla, která byla napevno přilepena chemoprenem pro zajištění těsnosti. Ve čtvercových otvorech byla stejným způsobem nalepena sklíčka. Skrz díru ve víčku byla zasunuta měřicí sonda od spektrometru USB 650 UV, která směřovala na vzorek pod úhlem 45 °. Vzorky byly připraveny vystřihnutím rozměru 1,5 × 1,5 cm a nalepením na bílou destičku ze slinutého oxidu hlinitého o velikosti 26 × 76 × 0,635 mm.

Před měřením byl na dno měřicí komory nalit přesycený roztok heptahydrátu síranu zinečnatého, který při experimentech udržoval relativní vlhkost 90 %. Dále byl připraven 8% roztok hydroxidu sodného. Do malé kádinky byl navážen chlorid amonný. Navážky jsou zobrazeny v tabulce (Tabulka 4).

Tabulka 4: Navážky chloridu amonného pro vyvíjení daných koncentrací amoniaku

Navážka chloridu amonného (g)	Množství amoniaku (mg)	Koncentrace plynného amoniaku (mol/l)
0,0471	15	0,0016
0,0314	10	0,0011
0,0157	5	0,0005
0,0094	3	0,0003
0,0063	2	0,0002
0,0031	1	0,0001

Kádinka s naváženým chloridem amonným byla pomocí pinzety vložena do měřicí komory. Z vnitřní strany víčka byla pod sondu nalepena bílá porcelánová destička a provedlo se vynulování na bílou barvu. Následně byla bílá destička odstraněna a na její místo byla nalepena destička se vzorkem. Měřicí komora byla zašroubována víčkem.



Obrázek 23: Měřicí komora s víčkem a nalepeným vzorkem (vlevo), celá aparatura připravená k měření (vpravo)

V programu Ocean View byly zaznamenány hodnoty L^* , a^* , b^* a současně také C^* a h^* , přičemž tyto hodnoty odpovídaly času 0 minut. Přes připevněnou jehlu bylo do uvnitř umístěné kádinky s chloridem amonným vstříknuto 5 ml předem připraveného 8% roztoku hydroxidu amonného. V tuto chvíli byly spuštěny stopky a bylo započato měření. L^* , a^* , b^* , C^* a h^* hodnoty byly zaznamenávány v dalších předem určených časových intervalech. Současně bylo automaticky každý 30. sken ukládáno odrazové spektrum. Celý experiment trval celkem 30 minut. Ze získaných L^* , a^* a b^* hodnot byla pomocí programu Adobe Photoshop CS2 provedena barevná vizualizace průběhu experimentu.

3.16 Příprava experimentů s masem

Byl proveden experiment s kuřecím masem a rybou, který měl sloužit k ověření schopnosti vytvořeného indikátoru reagovat na změny v čerstvosti balených potravin.

3.16.1 Experiment s rybou

Pro experiment s rybou byl v rybárně zakoupen čerstvý pstruh o hmotnosti 340 g, který byl prodejcem zabit a vykuchán. Pstruh byl důkladně umyt, vysušen a následně vložen do vakuovací fólie Maxxo. Následně byl na vnitřní hladkou stranu sáčku pomocí oboustranné pásky nalepen připravený indikátor o stejných velikostech jako při měření reakce na amoniak, tedy $1,5 \times 1,5$ cm. Funkční vrstva indikátoru směřovala dovnitř obalu. Vakuovací sáček byl poté bez vakuace zataven pomocí vakuovací svářečky Maxxo VM Profi. Připravený sáček s rybou byl vložen do termostatu, kde byla udržována teplota 26 °C. Každý den byl sáček vyndán z termostatu na dobu nezbytnou k pořízení fotek.

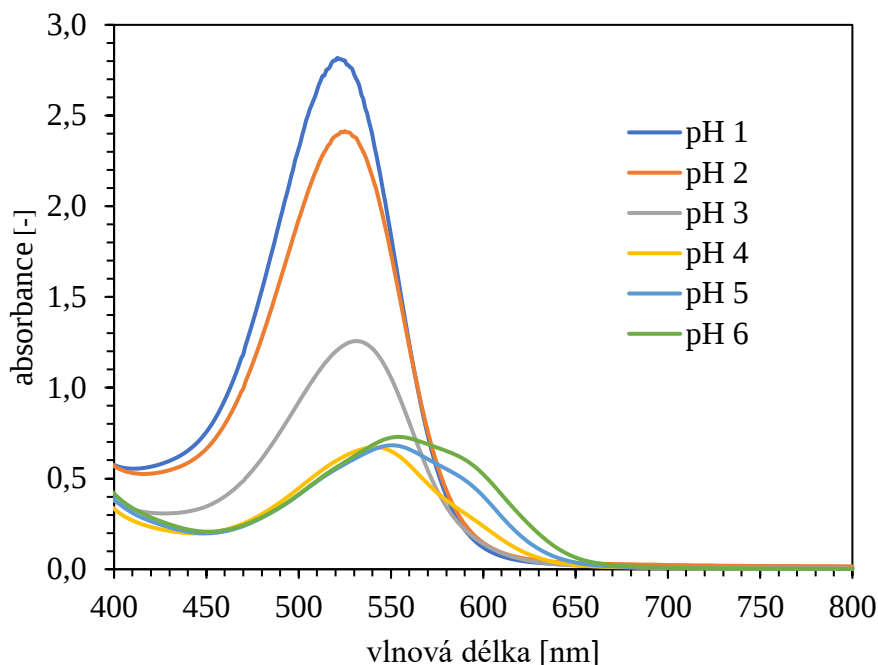
3.16.2 Experiment s kuřecím masem

Pro experiment s kuřecím masem byly v obchodním řetězci zakoupeny kuřecí prsní plátky. Použito bylo stejné množství jako při experimentu s rybou, to znamená 340 g. Maso bylo důkladně umyto, vysušeno a následně vloženo do vakuovací fólie Maxxo. Následně byl na vnitřní hladkou stranu sáčku pomocí oboustranné pásky nalepen připravený indikátor o stejných velikostech jako při měření reakce na amoniak, tedy $1,5 \times 1,5$ cm. Funkční vrstva indikátoru směřovala dovnitř obalu. Vakuovací sáček byl poté bez vakuace zataven pomocí vakuovací svářečky Maxxo VM Profi. Připravený sáček s kuřecím masem byl vložen do termostatu, kde byla udržována teplota 26 °C. Každý den byl sáček vyndán z termostatu na dobu nezbytnou k pořízení fotek.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

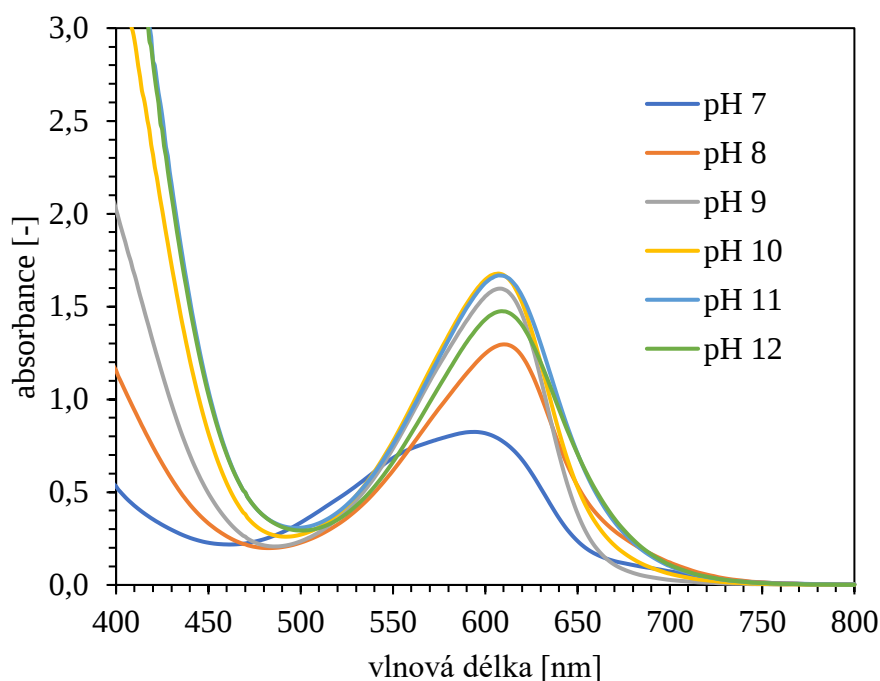
4.1 Absorpční spektra anthokyanových extraktů

Měření absorpčních spekter bylo provedeno dle postupu popsaného v kapitole 3.6. První graf (Obrázek 24) zobrazuje absorpční spektrum ethanolového extraktu v kyselé oblasti pH. Roztoky v rozmezí pH 1–3 vykazují poměrně vysokou absorbanci. Mezi hodnotami pH 4–6 pak absorbance prudce klesá a roztoky se projevují maximem absorbance při vlnové délce přibližně 550 nm a vykazují tak světle purpurovou barvu.



Obrázek 24: Absorpční spektra ethanolového extraktu anthokyanů v kyselé oblasti pH

Na druhém grafu (Obrázek 25) je vyobrazeno absorpční spektrum ethanolového extraktu v zásadité oblasti pH. Lze pozorovat, že při zvýšení pH se maximum absorbance posouvá za 600 nm a převládá tak modrá barva roztoku. Při překročení pH nad hodnotu 10 pak začíná roztok přecházet do žluté formy chalkonu.



Obrázek 25: Absorpční spektra ethanolového extraktu anthokyanů v zásadité oblasti pH

4.2 Celková koncentrace anthokyanů v extraktech

U třech různých extraktů anthokyanů z červeného zelí, získaných dle postupu popsaného v kapitole 3.4, byla zjištěna celková koncentrace anthokyanů metodou difference popsané v kapitole 3.7. Koncentrace anthokyanů se u jednotlivých extraktů lišila, přičemž nejvyšší koncentrace byla naměřena u ethanolového extraktu. U extraktu získaného při použití směsi ethanol–voda byla koncentrace anthokyanů naměřena pouze o 11,5 % menší než při použití čistého ethanolu. Vodní extrakt obsahoval anthokyanů nejméně. Při porovnání těchto tří extraktů se zdá ekonomicky nejvýhodnější využít k extrakci směs ethanol–voda a případně změnit poměr těchto činidel na 6:4 nebo 7:3. Výsledky stanovení jsou zobrazeny v tabulce (Tabulka 5).

Tabulka 5: Výsledky stanovení celkové koncentrace anthokyanů

extrakční činidlo	celková koncentrace [mg/l]
voda	7 569
ethanol	11 640
ethanol–voda 1:1	10 302

4.3 Stanovení rozpustnosti

Rozpustnost byla u jednotlivých filmů stanovována dle postupu popsaného v kapitole 3.10. Nejmenší rozpustnost vykazovala vrstva s 15 % vanilinu, proto byla tato koncentrace vybrána jako nejvhodnější pro další experimenty. Výsledky tohoto stanovení jsou viditelné v tabulce (Tabulka 6).

Tabulka 6: Výsledky rozpustnosti vrstev s různou koncentrací vanilinu

% vanilinu ve vzorku	průměrná rozpustnost [%]
10	42
15	21
20	29

Další stanovení rozpustnosti bylo provedeno u vrstev obsahujících 15 % vanilinu, ale lišících se v poměru chitosanu a polyvinylalkoholu. Zkoumány byly poměry CS:PVA 1:1, 1:3 a 3:1. Výsledky tohoto stanovení se od sebe příliš neliší, nejméně se rozpouštěla vrstva v poměru CS:PVA 1:1, nejvíce vrstva 1:3. Výsledky tohoto stanovení jsou zobrazeny v tabulce (Tabulka 7).

Tabulka 7: Výsledky rozpustnosti vrstev o různém poměru CS:PVA a 15 % vanilinu

poměr CS:PVA ve vzorku	průměrná rozpustnost [%]
1:1	16
1:3	22
3:1	20

4.4 Stanovení stupně zesíťení

Stupeň zesíťení chitosanu byl u připravených vrstev zjištěn pomocí ninhydrinové metody, popsané v kapitole 3.11. Nejdříve byl stanovován stupeň zesíťení u chitosanových filmů s rozdílnou koncentrací vanilinu. Nejméně byl zesíťován vzorek s 10 % vanilinu, kdy bylo zesíťováno 42 % chitosanu. Přídavek vanilinu v celkové koncentraci na sušinu chitosanu 15 a 20 % vyšlo velmi podobně, stupeň zesíťení se pohyboval okolo 48 %. Výsledky stanovení jsou zobrazeny v tabulce (Tabulka 8).

Tabulka 8: Výsledky stupně zesítnění vrstev s různou koncentrací vanilinu

% vanilinu ve vzorku	stupeň zesítnění [%]
10	42,1
15	47,9
20	48,7

Další stanovení stupně zesítnění bylo provedeno u vrstev lišících se v poměru chitosanu a polyvinylalkoholu, avšak se stejnou koncentrací vanilinu, která činila 15 % na sušinu chitosanu. Z těchto výsledků je patrné, že při větším množství chitosanu ve vzorku 3:1 vyšel stupeň zesítnění nejmenší a to okolo 30 %. Je to způsobeno tím, že s větším množstvím chitosanu se pojí také větší množství volných aminoskupin, které mohly zůstat nezesíťované. Naopak u blendu 1:3, který obsahoval malé množství chitosanu, vyšel stupeň zesítnění téměř 82 %. Výsledky stanovení jsou zobrazeny v tabulce (Tabulka 9).

Tabulka 9: Výsledky stupně zesítnění vrstev o různém poměru CS:PVA a 15 % vanilinu

poměr CS:PVA ve vzorku	stupeň zesítnění [%]
1:1	74,3
1:3	81,8
3:1	30,2

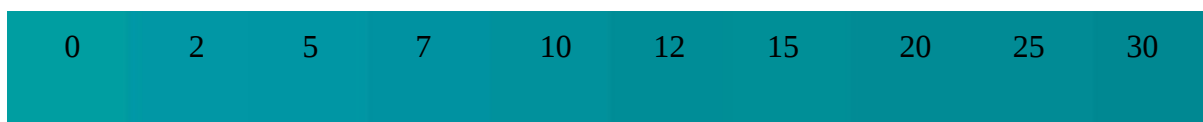
4.5 Úprava pH připravených filmů

Při přípravě filmů byla snaha o zvýšení pH zvolené kompozice, při které by došlo k posunutí barvy vrstvy z fialové do modré. Při přípravě kompozice byl tedy postupně do míchaného roztoku přidáván 3% roztok hydroxidu sodného a byla sledována barevná změna roztoku. Tento postup však nemohl být použit, protože při přidávání hydroxidu se vytvořila sraženina a kompozice tak nemohla být rovnoměrně nanesena pomocí Bakerova pravítka.

Vzhledem k nemožnosti úpravy pH vpravením hydroxidu přímo do kompozice byl zvolen jiný postup. Po nanesení a uschnutí vrstev byly tyto vrstvy přetisknuty pomocí vhodné zvolené síta a kompozice obsahující určité množství hydroxidu. První testovanou kompozicí byl Duvilax s určitým množstvím hydroxidu sodného. Pomocí experimentu s fenolftaleinem bylo zjištěno, že pro barevnou změnu anthokyanové vrstvy je na 1 g Duvilaxu nutno přidat přibližně 75 µl 3% roztoku hydroxidu sodného. Duvilax byl však nevhodný pro daný účel, jelikož je přirozeně bílý, v suché vrstvě transluscentní, barevná změna po přetisknutí nebyla dobře pozorovatelná.

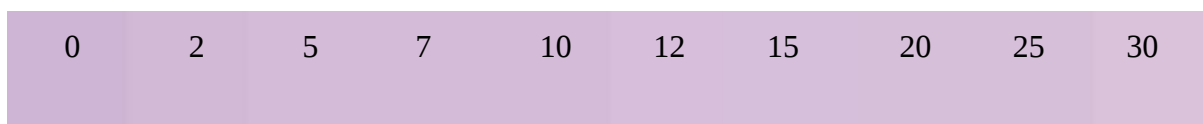
Po neúspěchu s Duvilaxem byl pro přetisk zvolen nový polymer a to polyvinylalkohol 10-98. Polyvinylalkohol po nanesení na vrstvu hodně pěnil, přetisknutá vrstva obsahovala hodně bublinek a nanesená vrstva nebyla po zaschnutí rovnoměrná.

Dalším polymerem testovaným pro přetisk vrstev byl polyvinylbutyral. Pomocí tohoto polymeru byla původně fialová vrstva úspěšně přetisknuta až do tyrkysového zbarvení. U takto přetisknuté vrstvy byla následně změřena reakce při působení 15 mg plynného amoniaku. Na obrázku (Obrázek 26) lze pozorovat barevnou vizualizaci průběhu experimentu pro vrstvu, která byla přetisknuta 10% polyvinylbutyralem s přidavkem 10 % NaOH v množství 250 $\mu\text{l/g}$ přes síto 90/230-48Y. Při experimentu byla pozorována pouze nepatrná změna barvy, a to především stále v modrých tónech. Očekávaný přechod do zelené formy anthokyanů nebyl pozorován.



Obrázek 26: Barevná vizualizace průběhu experimentu ve vybraných časových intervalech (min) při působení 15 mg NH_3 pro vrstvu přetisknutou 10% PVB s přidavkem hydroxidu

Vzhledem k výsledkům předchozího pokusu byl proveden experiment s vrstvou, která byla přetisknuta čistým polyvinylbutyralem bez přidavku hydroxidu. Toto měření mělo ověřit, zda polyvinylbutyral propouští amoniak. Jak lze pozorovat z barevné vizualizace (Obrázek 27), tato přetisknutá vrstva nereagovala na vzniklý amoniak jasnou změnou barvy z fialové do modré, jako tomu bylo při měření nepřetisknuté vrstvy viz Obrázek 37. Dá se tedy předpokládat, že polyvinylbutyral není propustný pro amoniak.



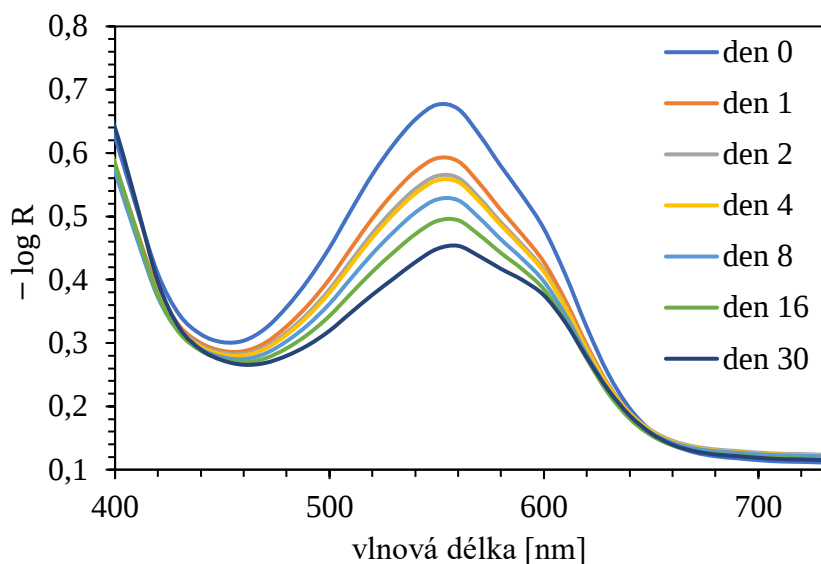
Obrázek 27: Barevná vizualizace průběhu experimentu ve vybraných časových intervalech (min) při působení 15 mg NH_3 pro vrstvu přetisknutou čistým 10% PVB

4.6 Měření stability filmů v čase

U připravené vrstvy dle postupu popsáního v kapitole 3.9 a u přetisknutých vrstev polyvinylbutyralem viz kapitola 3.12 byla sledována časová stabilita při expozici dennímu světlu po dobu 30 dní. Celý postup měření je popsán v kapitole 3.13.

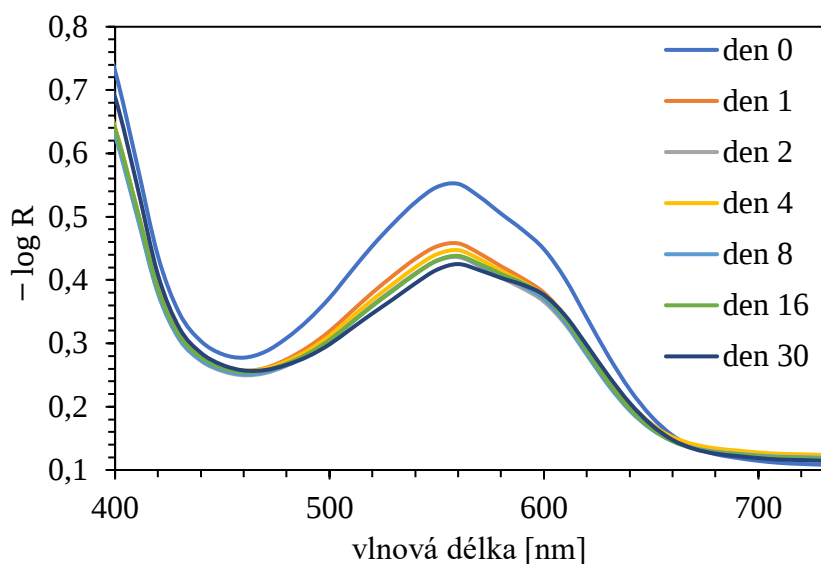
V časových intervalech (0., 1., 2., 4., 8., 16. a 30. den) byla pomocí spektrofotometru X-rite II naměřena odrazová spektra v rozmezí vlnových délek 380–730 nm. Následující obrázky zobrazují závislost spektrální optické hustoty na vlnové délce.

Na obrázku (Obrázek 28) lze vidět závislost spektrální optické hustoty na vlnové délce pro vrstvu bez přetisku, tzn. bez úpravy pH. Tato vrstva postupem času ztrácela barvu, což se projevilo snížením spektrální optické hustoty. Největší pokles nastal hned další den po nanesení. Další dny už pokles nebyl tak razantní. I přesto však vrstva i po 30 dnech působení denního světla stále vykazovala spektrální optickou hodnotu 0,45.



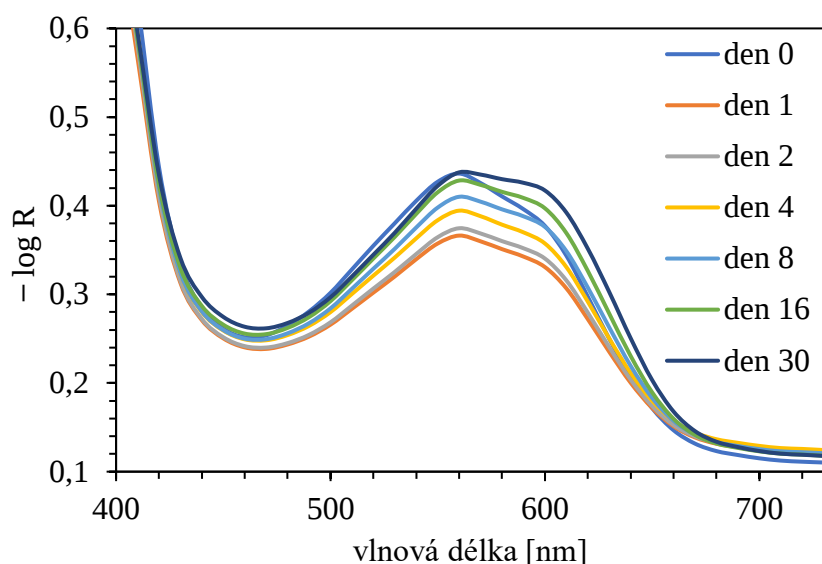
Obrázek 28: Grafické znázornění závislosti spektrální optické hustoty na vlnové délce, bez přetisku

Obrázek 29 představuje závislost spektrální optické hustoty na vlnové délce pro vrstvu, která byla přetisknuta 10% polyvinylbutyralem s obsahem 10% hydroxidu sodného 100 $\mu\text{l/g}$. Hlavní pokles lze opět, stejně jako u předchozího obrázku (Obrázek 28), pozorovat první den po nanesení vrstvy. Další dny se však spektrální optická hustota již téměř nemění.



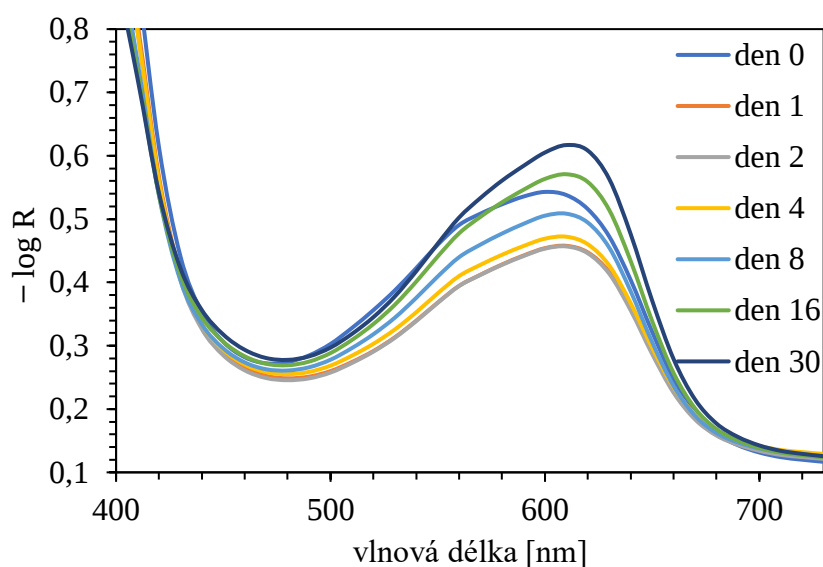
Obrázek 29: Grafické znázornění závislosti spektrální optické hustoty na vlnové délce pro přetisknutou vrstvu pomocí PVB s přidavkem 10 % NaOH v množství 100 $\mu\text{l/g}$

Na obrázku (Obrázek 30) je vyobrazena závislost spektrální optické hustoty na vlnové délce pro vrstvu, která byla přetisknuta 10% polyvinylbutyralem s obsahem 10% hydroxidu sodného 200 $\mu\text{l/g}$. První den po nanesení nastal pokles spektrální optické hustoty, avšak hned další den se hodnota začala opět zvyšovat, až nakonec 16. den vykazovala stejnou hodnotu jako v den nanesení.



Obrázek 30: Grafické znázornění závislosti spektrální optické hustoty na vlnové délce pro přetisknutou vrstvu pomocí PVB s přísávkem 10 % NaOH v množství 200 µl/g

Obrázek 31 zobrazuje grafickou závislost spektrální optické hustoty na vlnové délce pro vrstvu, která byla přetisknuta 10% polyvinylbutyralem s obsahem 10% hydroxidu sodného 300 µl/g. Obdobně jako u předchozího obrázku, vrstva první den po nanesení lehce vybledla, avšak další dny se spektrální optická hustota začala zvyšovat, až se od 16. dne zvýšila nad hodnotu naměřenou v den nanesení. Nejvyšší hodnotu lze pozorovat dokonce až 30. den měření. Ke zvýšení spektrální optické hustoty v průběhu časového experimentu došlo pravděpodobně z toho důvodu, že nanesený hydroxid postupně difundoval vrstvou a stále více zvyšoval její pH. Vrstva přetisknutá 10% polyvinylbutyralem s obsahem 10% hydroxidu sodného 300 µl/g vykazovala již lehce modré zbarvení a její pH tak mohlo být přibližně 7. Postupným difundováním hydroxidu se však pH vrstvy mohlo posunout směrem k pH 8, což se projevilo zvýšením absorpance a lehkým posunem maxima k vyšším vlnovým délkám viz Obrázek 25.



Obrázek 31: Grafické znázornění závislosti spektrální optické hustoty na vlnové délce pro přetisknutou vrstvu pomocí PVB s přísávkem 10 % NaOH v množství 300 µl/g

4.7 Měření barevnosti vrstev po kontaktu s amoniakem

U vrstev připravených z chitosanu, polyvinylalkoholu, vanilinu a extraktu anthokyanů dle postupu popsaného v kapitole 3.9 byla měřena jejich barevná reakce v přítomnosti různých koncentrací amoniaku. Měření probíhalo vždy po dobu 30 minut. Postup měření byl popsán v kapitole 3.14. Při měření byla snímána odrazová spektra, ze kterých byly vytvořeny grafy, které zobrazují závislost záporného dekadického logaritmu reflektance na vlnové délce, tedy spektrální optické hustoty. V grafech je vždy zobrazeno spektrum před a po 30 minutách působení daného množství amoniaku. Zároveň byly v určitých intervalech získávány hodnoty L^* , a^* , b^* pomocí kterých byla v programu Adobe Photoshop CS2 provedena barevná vizualizace průběhu experimentu. Další snímané hodnoty byly C^* a h^* . Z naměřených hodnot byl vypočítán jejich rozdíl v čase 0 minut od hodnot v čase 30 minut. Dále byla vypočítána barvová odchylka ΔE_{ab}^* a odchylka odstínu ΔH^* .

Tabulka 10 zobrazuje, jak se s časem a různým množstvím amoniaku měnila hodnota a^* . Tato hodnota definuje barvu na ose zelená ($-a^*$) až červená ($+a^*$). Původní vrstva byla fialová, což znamená, že se hodnoty a^* pohybovaly v kladných číslech. Při malých množstvích uvolněného amoniaku (1 a 2 mg) lze pozorovat pouze velmi malou změnu hodnoty a^* , vrstvy tedy i po 30 minutách expozice amoniaku zůstávaly stále fialové. Od množství amoniaku 5 mg a výš již lze pozorovat výraznou změnu. Při 10 a 15 mg navíc hodnota a^* klesla do záporných hodnot, což dokazuje přítomnost modrého zbarvení. U vrstvy vystavené 15 mg amoniaku docházelo k prudké změně hodnoty a^* již během 1. minuty měření, zatímco ostatní vrstvy začaly vykazovat pozorovatelnou změnu až při 5. minutě.

Tabulka 10: Naměřené hodnoty a^* při působení různého množství amoniaku

čas (min)	množství NH_3 [mg]					
	1	2	3	5	10	15
0	17	15	19	20	20	16
1	16	14	17	19	18	6
2	16	14	16	19	17	-1
3	16	13	15	18	14	-2
5	16	13	14	16	7	-2
7	15	13	13	14	3	-2
10	15	12	12	9	0	-5
12	15	12	12	7	-1	-5
15	15	12	12	5	-2	-6
17	14	12	11	5	-2	-6
20	13	12	11	5	-2	-6
25	13	11	11	6	-2	-9
30	13	11	11	7	-2	-7

Hodnota b^* definuje barvu na ose modrá ($-b^*$) až žlutá ($+b^*$). Naměřené hodnoty změny hodnoty b^* v průběhu působení různých koncentrací amoniaku lze vyčíst z tabulky (Tabulka 11). Původní vrstva vykazovala hodnotu b^* v záporných hodnotách. Pouze u vrstvy vystavené 1 mg amoniaku nastalo lehké zvýšení hodnoty b^* , při působení 2 a 3 mg nenastala žádná změna na této ose. Od množství amoniaku 5 mg a výše začalo b^* klesat, přičemž největší změnu lze pozorovat u působení 15 mg.

Tabulka 11: Naměřené hodnoty b^* při působení různého množství amoniaku

	množství NH_3 [mg]					
čas (min)	1	2	3	5	10	15
0	-16	-13	-15	-15	-16	-13
1	-14	-12	-15	-14	-15	-13
2	-13	-13	-14	-14	-16	-14
3	-15	-12	-14	-14	-14	-15
5	-14	-12	-14	-14	-16	-16
7	-14	-14	-14	-14	-18	-17
10	-13	-12	-14	-15	-18	-17
12	-14	-14	-15	-17	-18	-17
15	-15	-13	-15	-16	-19	-18
17	-14	-13	-14	-17	-19	-18
20	-13	-13	-15	-17	-20	-19
25	-14	-13	-15	-18	-21	-19
30	-13	-13	-15	-18	-20	-21

V tabulce (Tabulka 12) jsou zobrazeny změny hodnoty měrné světlosti L^* v průběhu působení amoniaku. Při vyvíjení 1, 2, 3 a 5 mg amoniaku se hodnota L^* téměř neměnila. Vliv amoniaku se ukázal až při vyšších koncentracích, kdy při působení 10 a 15 mg vrstvy lehce zesvětlaly.

Tabulka 12: Naměřené hodnoty L^* při působení různého množství amoniaku

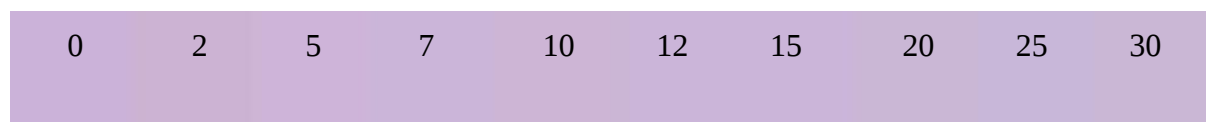
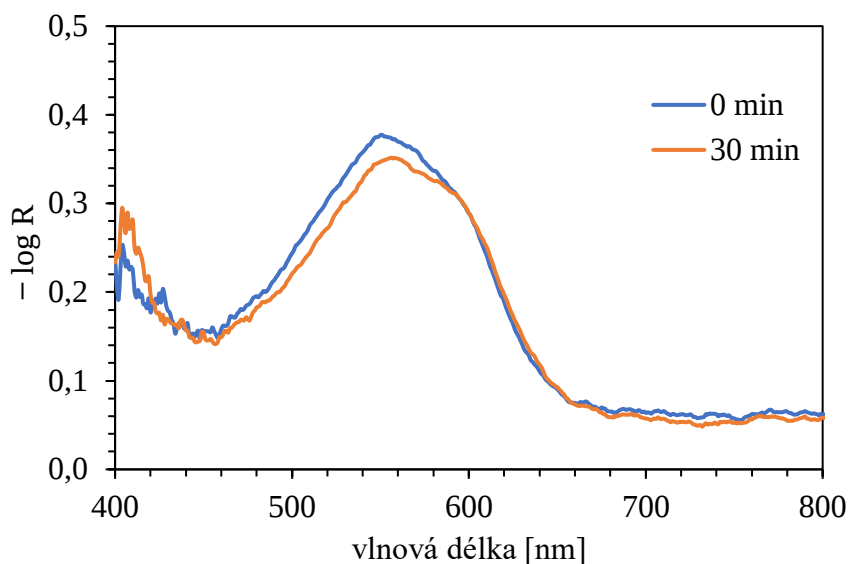
	množství NH_3 [mg]					
čas (min)	1	2	3	5	10	15
0	76	76	74	72	72	76
1	76	76	74	73	73	75
2	76	77	74	73	73	75
3	77	76	74	73	73	74
5	77	76	74	73	72	73
7	77	77	74	73	71	73
10	77	77	74	72	70	72
12	77	77	74	72	70	71
15	77	76	74	72	69	71
17	77	76	73	71	69	71
20	77	76	73	71	68	70
25	77	76	73	71	68	69
30	77	76	73	71	67	69

Další sledovanou hodnotou byla chroma C^* , která vyjadřuje pestrost barvy. Naměřené hodnoty chromy jsou zobrazeny v tabulce (Tabulka 13). Při působení 1, 2 a 3 mg amoniaku C^* kontinuálně klesala, po 30 minutách byla tedy barva vrstvy méně pestrá. U měření 5, 10 a 15 mg chroma zprvu lehce klesla, u 15 mg byl tento pokles viditelný již během 1. minuty působení amoniaku. Následně však hodnota C^* znovu stoupala. U 5 a 10 mg však chroma již nevystoupala na původní hodnotu a výsledná barva vrstvy vykazovala menší pestrost barvy. U 15 mg se naopak hodnota C^* zvýšila nad hodnotu v čase 0 minut.

Tabulka 13: Naměřené hodnoty C^* při působení různého množství amoniaku

čas (min)	množství NH_3 [mg]					
	1	2	3	5	10	15
0	24	20	24	25	26	20
1	21	18	22	24	24	14
2	21	19	21	24	23	14
3	22	18	20	23	20	15
5	21	17	20	22	18	16
7	21	19	19	20	19	17
10	20	17	19	18	18	18
12	21	18	19	18	18	18
15	21	17	19	17	19	18
17	20	18	18	17	19	19
20	18	18	18	18	20	20
25	19	17	19	19	21	21
30	19	17	18	19	20	22

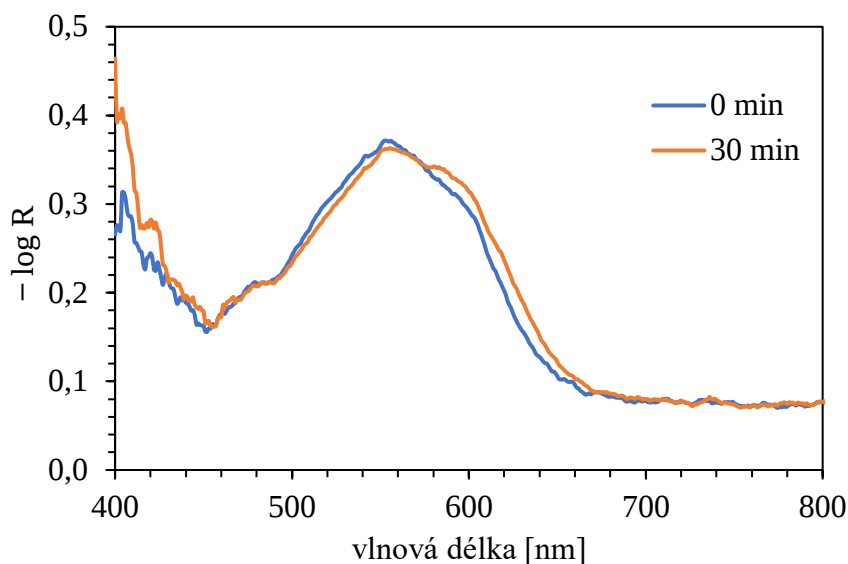
Na obrázku (Obrázek 32) lze pozorovat odrazové spektrum naměřené při působení 1 mg amoniaku a příslušnou vizualizaci průběhu experimentu. Při této koncentraci nedocházelo k výrazné změně barvy a během 30 minut došlo pouze k malému poklesu spektrální optické hustoty. Připravená vrstva tedy nebyla citlivá na množství 1 mg (0,0001 mol/l) amoniaku.



Obrázek 32: Odrážecí absorpční VIS spektrum při působení 1 mg NH_3 a příslušná vizualizace

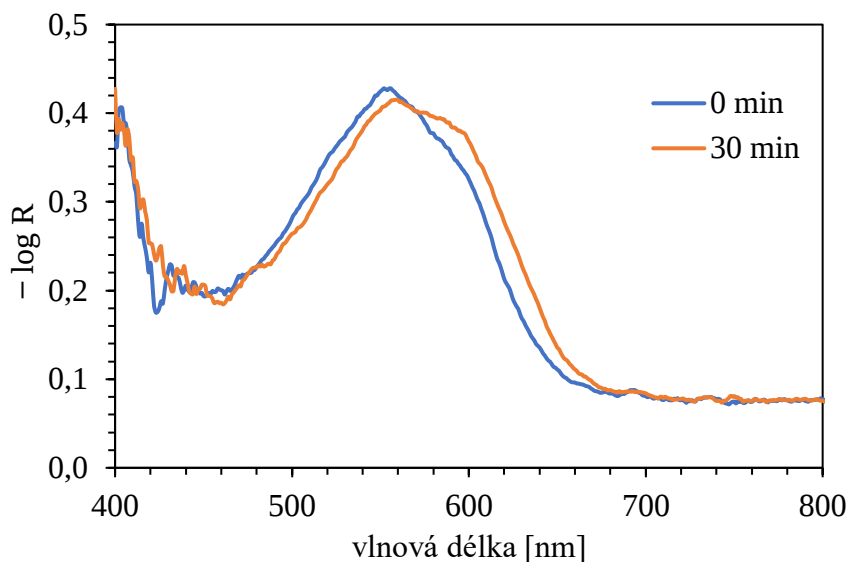
Obrázek 33 představuje odrazové spektrum a příslušnou vizualizaci experimentu při působení 2 mg amoniaku (koncentrace 0,0002 mol/l). Po 30 minutách, kdy byla vrstva vystavena této koncentraci, lze již pozorovat mírný posun maxima spektrální optické hustoty směrem k vyšším vlnovým délkám. Barva indikátoru již začínala přecházet z fialové do modré,

avšak tento přechod stále nebyl dobře pozorovatelný pouhým okem, což lze vidět i na příslušné vizualizaci.



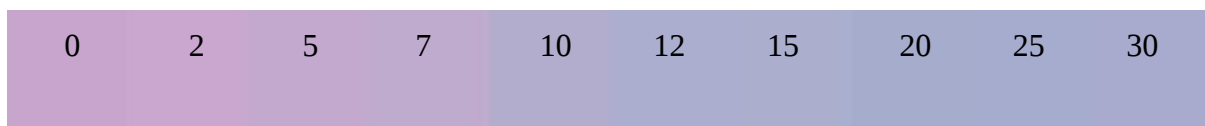
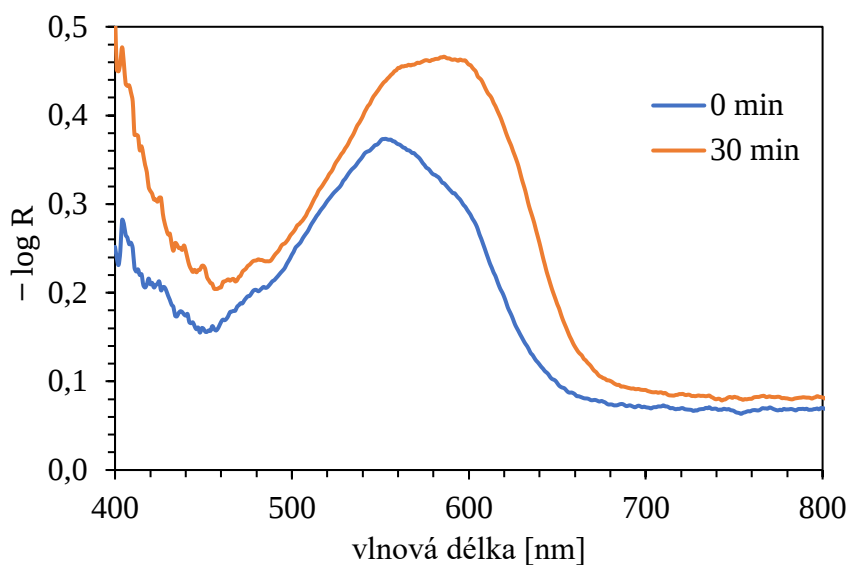
Obrázek 33: Odražové absorpční VIS spektrum při působení 2 mg NH_3 a příslušná vizualizace

Na obrázku (Obrázek 34) lze pozorovat odrazové spektrum při působení 3 mg amoniaku, což odpovídá koncentraci 0,0003 mol/l. Oproti nižším koncentracím (1 a 2 mg) je zde již patrný posun maxima spektrální optické hustoty směrem k vyšším vlnovým délkám.



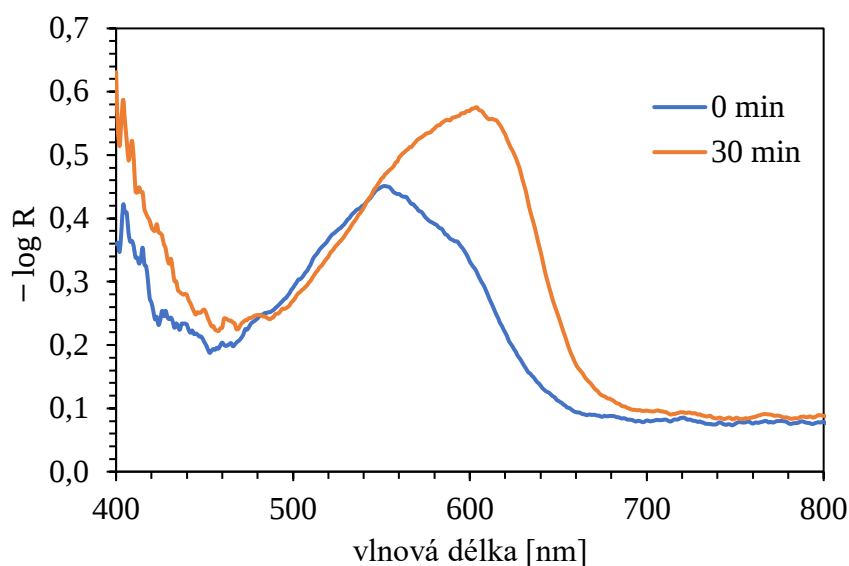
Obrázek 34: Odražové absorpční VIS spektrum při působení 3 mg NH_3 a příslušná vizualizace

Obrázek 35 představuje odrazové spektrum a příslušnou vizualizaci při působení 5 mg amoniaku (koncentrace 0,0005 mol/l). Při této koncentraci již docházelo k barevné změně, která byla postřehnutelná okem. Přejít z fialové do modré nastal již při 10. minutě expozice vrstvy plynnému amoniaku, což lze pozorovat z barevné vizualizace průběhu experimentu. V odrazovém spektru lze vidět zvýšení maxima spektrální optické hustoty z hodnoty 0,36 při vlnové délce 557 nm na hodnotu 0,46 při vlnové délce 590 nm, což značí přechod do modré části spektra. Toto zvýšení a posunutí maxima spektra kopíruje trend v grafu viz Obrázek 24 a Obrázek 25 při změně pH anthokyanů z hodnoty 4 do hodnoty 7.



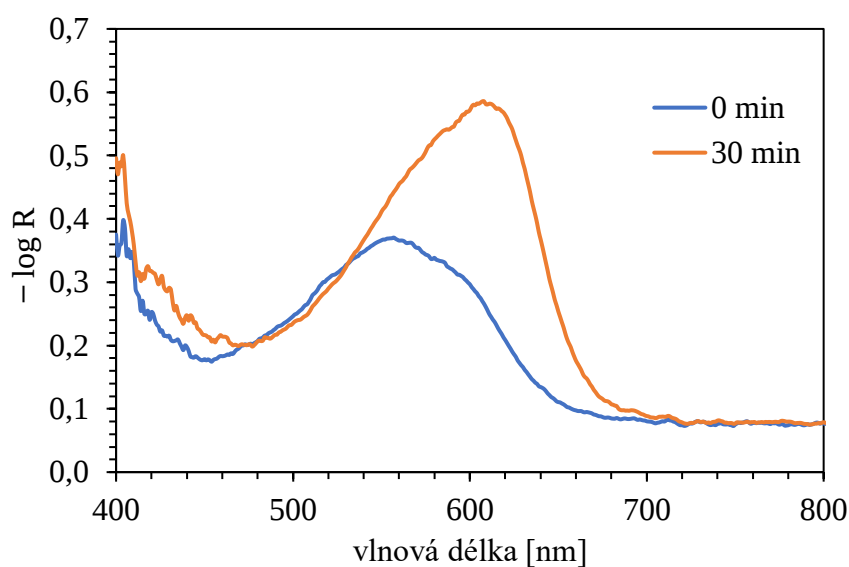
Obrázek 35: Odrazové absorpční VIS spektrum při působení 5 mg NH_3 a příslušná vizualizace

Na obrázku (Obrázek 36) je zobrazeno odrazové spektrum a příslušná vizualizace při expozici připravené vrstvy 10 mg amoniaku (koncentrace 0,0011 mol/l). Již během 5. minuty experimentu lze pozorovat změnu barvy indikátoru z fialové do modré, přičemž po 30 minutách je vybarvení již velmi intenzivní. Původní vrstva vykazovala absorpční maximum při vlnové délce 550 nm, zatímco na konci měření je maximum pozorovatelné při 605 nm. Podobně jako při působení 5 ml amoniaku lze i zde sledovat zvýšení spektrální optické hustoty, což koreluje s grafem viz Obrázek 24 a Obrázek 25, jelikož docházelo ke změně pH vrstvy z původní hodnoty 4 na pH 7.



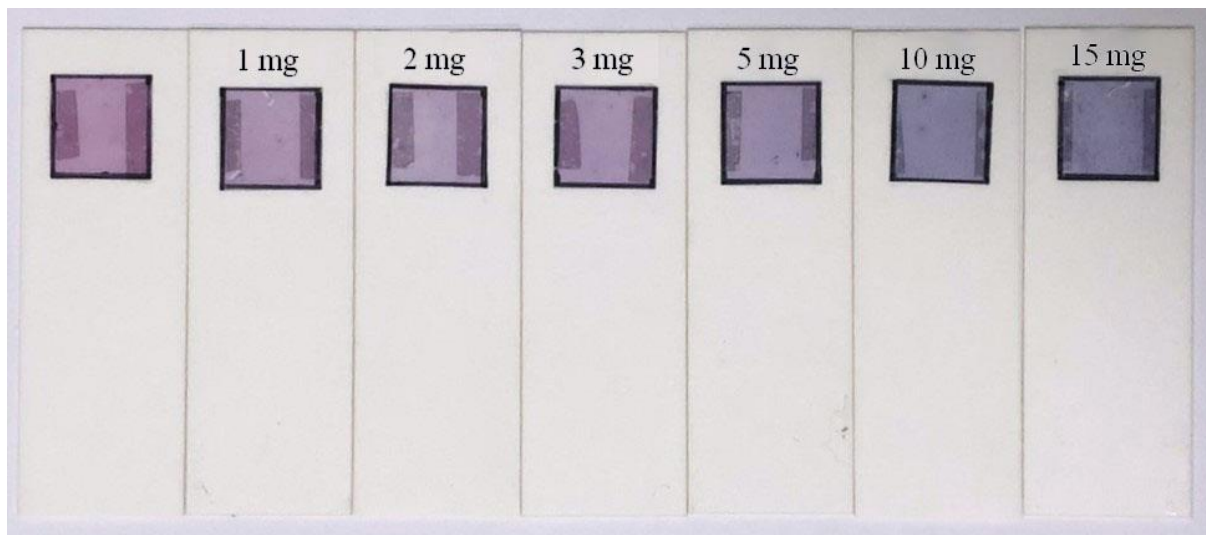
Obrázek 36: Odražové absorpční VIS spektrum při působení 10 mg NH_3 a příslušná vizualizace

Obrázek 37 zobrazuje odrazové spektrum a příslušnou vizualizaci při působení nejvyššího množství měřeného amoniaku, tzn. 15 mg (0,0016 mol/l). Připravená vrstva reagovala na tuto koncentraci velmi rychlou změnou barvy, jak lze pozorovat na barevné vizualizaci. Přechod z fialové do modré nastal totiž již při 2. minutě měření. Původní fialová vrstva vykazovala maximum absorpce při 560 nm, avšak v 30. minutě lze pozorovat posun maxima na vlnovou délku 615 nm. Z porovnání spekter v grafech (Obrázek 24 a Obrázek 25) lze usoudit, že konečné pH vrstvy bylo okolo pH 8.



Obrázek 37: Odražové absorpční VIS spektrum při působení 15 mg NH_3 a příslušná vizualizace

Z naměřených hodnot lze konstatovat, že připravené vrstvy z chitosanu, polyvinylalkoholu, vanilinu a extraktu anthokyanů byly schopny reagovat na vyvíjený plynný amoniak. K barevné změně, která by byla postřehnutelná pouhým okem, docházelo až od koncentrace 5 mg a více. Při nejvyšší měřené koncentraci (15 mg) došlo k vybarvení indikátoru do modré již během 2. minuty experimentu, zatímco u vrstev vystavených expozici 10 mg byla tato změna pozorovatelná při 5. minutě, a u 5 mg dokonce až po uplynutí 10 minut.



Obrázek 38: Vrstvy nalepené na destičce ze slinutého oxidu hlinitého po kontaktu s různým množstvím plynného amoniaku

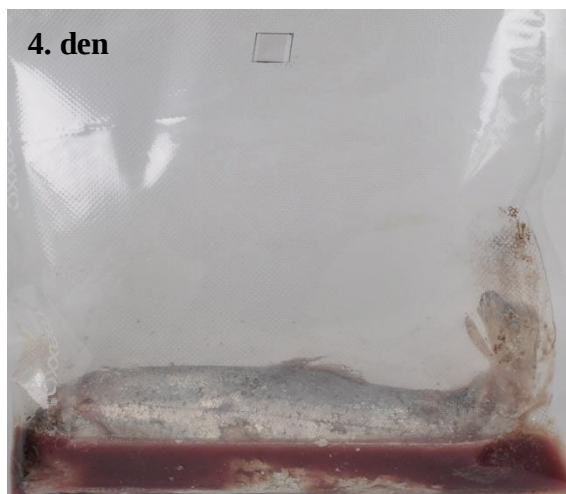
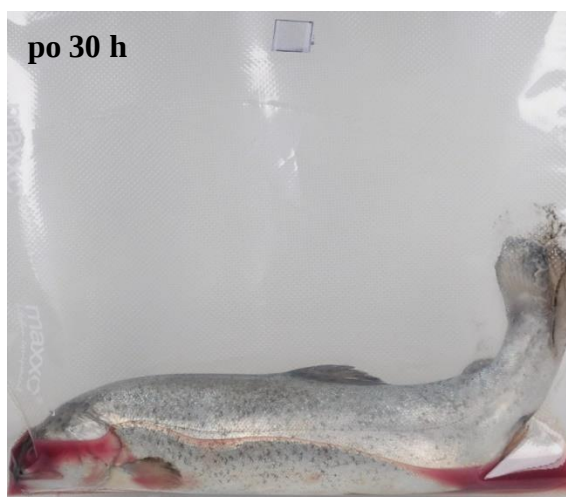
4.8 Výsledky experimentů s masem

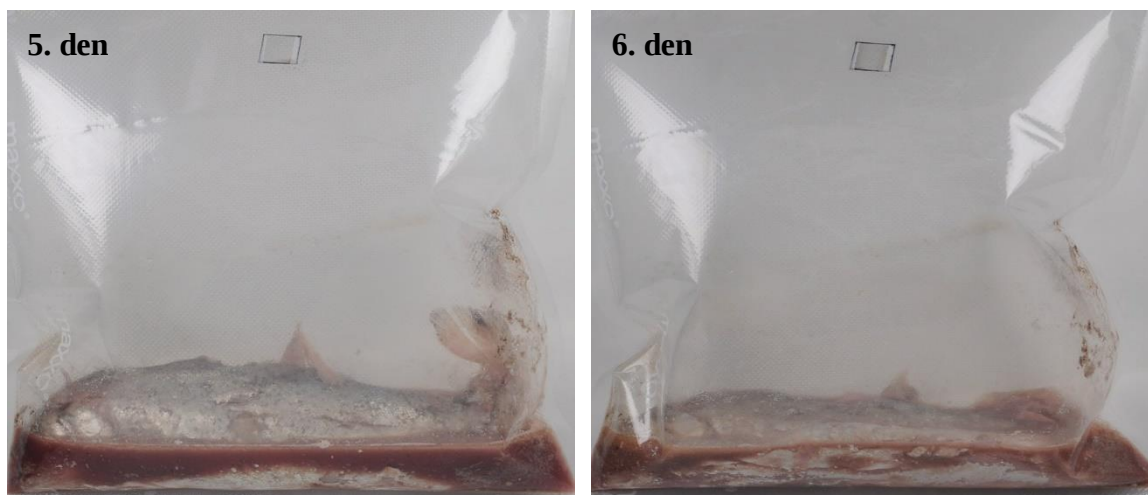
Pro hodnocení funkčnosti indikátoru při reálném využití pro balené potraviny byl proveden experiment s rybou a masem. Připravené vrstvy byly zabaleny spolu s masem a ponechány v termostatu při teplotě 26 °C. Při experimentu bohužel nebylo možné korektně měřit změnu barvy spektrofotometrem, protože indikátor nemohl být podložen bílou destičkou, či jiným standardním podkladem. Bylo tedy nutné se spolehnout pouze na vizuální pozorování barvy indikátoru v průběhu experimentu a z pořízených fotografií. Vizuální porovnání bylo provedeno s výsledky naměřenými spektrofotometrem na vzorcích, viz kapitola 4.7.

4.8.1 Experiment s rybou

Pro experiment s rybou byl zvolen čerstvý pstruh, postup přípravy experimentu byl popsán v kapitole 3.16.1. Sáček s rybou a připraveným indikátorem byl skladován v termostatu při teplotě 26 °C po dobu celkem 6 dní. V průběhu prvních 24 hodin nedošlo k žádné viditelné změně v barvy indikátoru. Ryba i po 24 hodinách vypadala relativně čerstvě. První okem pozorovatelná změna nastala po 30 hodinách, kdy se vrstva zbarvila do modra, viz změna odpovídající Obrázek 35 při 12 minutách. To znamená, že se jednalo o přechod do pH většího než 8, kdy došlo k uvolnění takového množství amoniaku, že už byla ryba nepoživatelná. V průběhu 3. dne začala ryba vypadat zkaženě, přičemž vrstva se odbarvila do bezbarvé. Příčinou odbarvení mohl být vznik kyselých produktů, například sirovodíku. Smísením kyselých a zásaditých plynů mohlo dojít k posunutí indikátoru do pH 5–6. Při tomto pH

se anthokyany vyskytují ve formě karbinolové pseudobáze, viz Obrázek 16. Sáček se také v důsledku uvolňování plynů začal postupně nafukovat. Další dny jevil pstruh jasné známky rozkladu a vybarvení indikátoru zůstalo neměnné až do konce experimentu. Poslední den byl sáček již zcela naplněn plyny a experiment byl z důvodu evidentního rozkladu ryby ukončen.

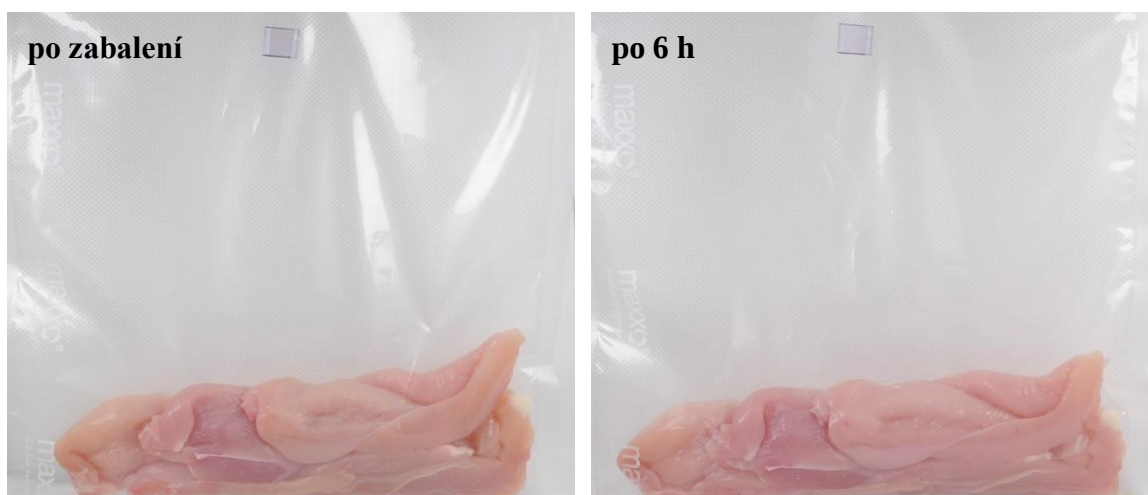


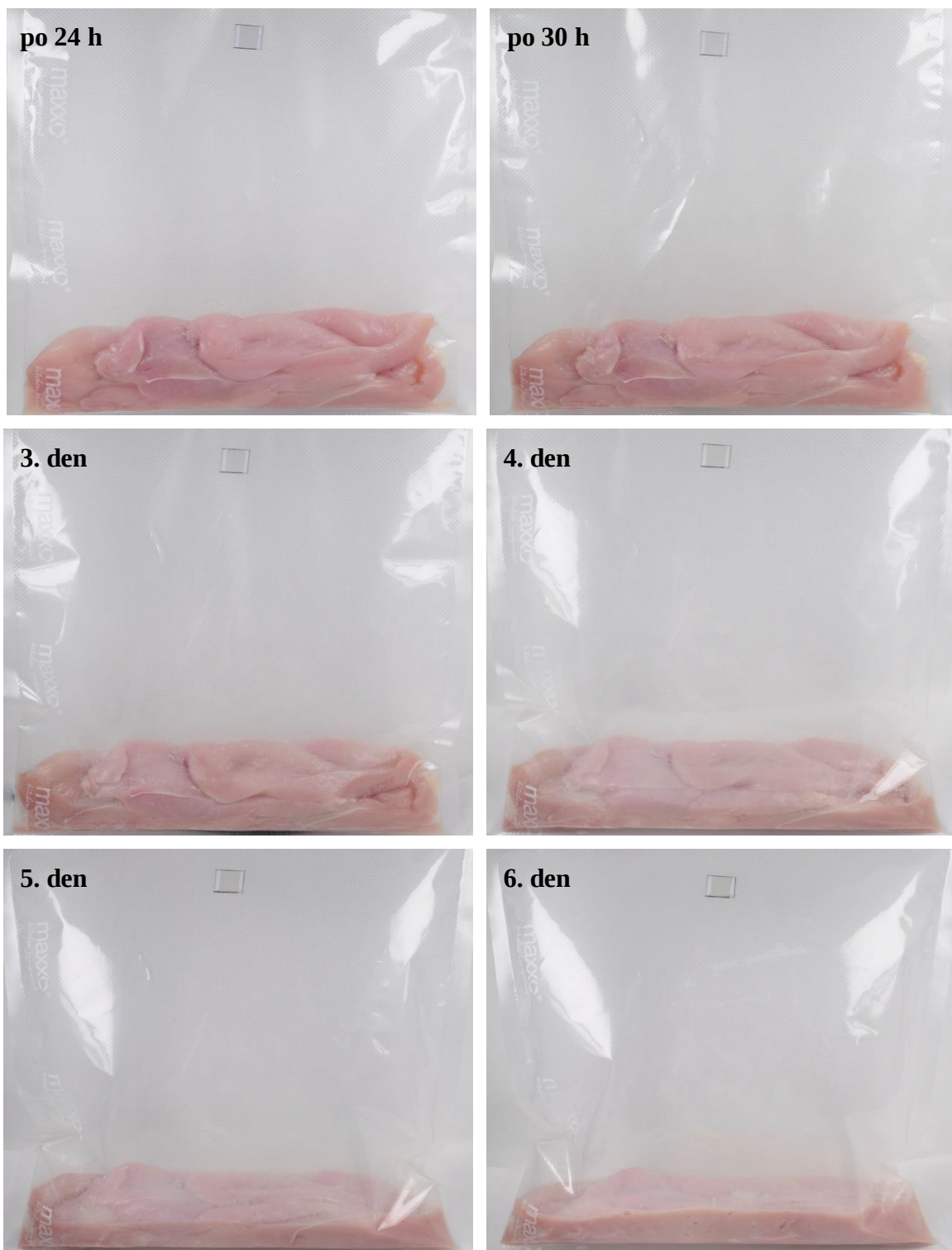


Obrázek 39: Fotografie pořízené v průběhu experimentu s rybou

4.8.2 Experiment s kuřecím masem

Pro experiment s masem byly zvoleny kuřecí prsní plátky, které byly zabaleny podle postupu popsaného v kapitole 3.16.2, a následně skladovány po dobu 6 dní při teplotě 26 °C v termostatu. Podobně jako u sáčku s rybou, i zde prvních 24 hodin nenastala téměř žádná barevná změna a maso vypadalo stále čerstvě. První viditelné zbarvení nastalo po 30 hodinách skladování, kdy ale na rozdíl od experimentu s rybou došlo k přímému vybarvení z fialové do bezbarvé a přechod přes modrou barvu nebyl pozorován. Při kažení masa zřejmě vznikalo více kyselých produktů, což posunulo pH filmu do hodnot pH 4–6 rychleji než při kažení pstruha. Po 24 hodinách skladování maso začalo pouštět šťávu a od 4. dne se začala měnit struktura masa, až se maso zcela rozpadlo. Sledována byla také barva masa, kdy maso ihned po zabalení vykazovalo krásně růžovou barvu a v průběhu experimentu postupně šedlo. Stejně jako u experimentu s rybou se sáček postupně naplňoval vznikajícími plyny a poslední den byl již zcela naplněn. Z důvodu jasně identifikovatelného zkažení masa byl experiment 6. den ukončen.





Obrázek 40: Fotografie pořízené v průběhu experimentu s kuřecím masem

Jelikož na intenzitu vybarvení má značný vliv množství přidaného extraktu anthokyanů, bylo by pro lepší vizualizaci vhodné zvýšit jejich množství ve vrstvě a připravené vrstvy znovu kalibrovat.

Pro vývoj indikátoru založeného na anthokyanech je zásadní výběr rostliny pro zdroj anthokyanů, jelikož extrakty získané z různých rostlin vykazují jiné barevné změny. Několik prací se zaměřilo na studium indikátorů pH na bázi anthokyanů jakožto přírodních barviv.

Studie [58] se zabývala vývinem inteligentního indikátoru citlivého na pH založeném na anthokyanech extrahovaných z květů *Echium amoenum* začleněných do filmu z bakteriální celulózy. Připravené filmy byly vloženy do balení s krevetami. Během skladování při teplotě 4 °C byla sledována barevná změna indikátoru spolu s tím, jak se balené krevety kazily. Když byly krevety čerstvé, indikátor byl fialový. Poté následoval přechod barvy do šedé a při zkažení krevet vykazoval indikátor žluté zbarvení.

V další studii [70] byly připraveny indikátorové filmy na bázi želatiny, polyvinylalkoholu a anthokyanových extraktů získaných z moruše. Tyto vrstvy byly následně použity pro sledování čerstvosti ryb. Příčnoustka chutná byla zabalena společně s připravenou folií a celé balení bylo skladováno při 25 °C. Na začátku experimentu vykazoval film fialovou barvu. Po 18 hodinách se barva změnila na šedofialovou a po 24 hodinách na tmavě zelenou.

Dle studie [71] byly připraveny indikátory založené na škrobu, polyvinylalkoholu a extraktu anthokyanů z ibišku. Tento film byl následně zabalen společně s vepřovým masem a balení bylo skladováno při 25 °C v inkubátoru. Indikátor byl ze začátku červený, postupně se po 60 hodinách změnil do zelené a po 72 hodinách vykazoval žluté zbarvení.

5 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo připravit tištěný indikátor pH pro balené potraviny schopný barevné reakce při expozici různým koncentracím plynného amoniaku. Nosným prvkem indikátoru byly dva polymery – 2% vysokomolekulární chitosan a 15% polyvinylalkohol 8–88, přičemž byla využívána jejich směs v poměru 3:1. Jako síťovací činidlo byl využit vanilin, který byl přidáván v koncentraci 15 % na sušinu chitosanu. Poslední nutnou komponentou byl extrakt anthokyanů získaný extrakcí z červeného zelí.

První část měření byla zaměřena na hledání vhodných komponent a poměrů polymerní matrice, kdy byl studován vliv poměru chitosanu a polyvinylalkoholu, a také koncentrace vanilinu na rozpustnost vrstvy. Pomocí ninhydrinové metody byl také zkoumán stupeň zesítení. Následně byla u připravených vrstev měřena změna barvy při kontaktu s plynným amoniakem, a to v množství 1–15 mg amoniaku (0,0001–0,0016 mol/l). Další částí experimentu byl přetisk připravených vrstev různými polymery s přidavkem hydroxidu sodného pro nastavení požadovaného pH. Studována byla také stabilita vrstev v čase. Poslední část měření sestávala z reálného testu funkčnosti indikátoru při balení masa a ryby.

Bylo zjištěno že:

1. Pro získání největšího množství anthokyanů je nejlepší využít k extrakci z červeného zelí ethanol, případně směs ethanol–voda.
2. Po smíchání roztoku chitosanu, polyvinylalkoholu, vanilinu a extraktu anthokyanů výsledná formulace dobře smáčí polyethylenftalátovou folii a vytváří celistvé vrstvy.
3. Připravené vrstvy jsou citlivé na plynný amoniak v rozmezí od množství 3–15 mg (0,0003–0,0016 mol/l) amoniaku a reagují barevnou změnou z fialové do modré, přičemž rychlost barevné odezvy je závislá na koncentraci amoniaku.
4. Přetiskem vrstev pomocí polyvinylbutyralu se dá dosáhnout změny pH vrstvy, ale tato vrstva pak není schopna propouštět amoniak.
5. Připravené i přetisknuté vrstvy jsou stabilní i při delším skladování při působení denního světla.
6. Při aplikaci připraveného indikátoru do balení s reálným masem dochází ke změně barvy přes modrou do bezbarvé, která je viditelná pouhým okem. Rychlost barevného přechodu se lišila při skladování masa a ryby.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] ALIZADEH-SANI, Mahmood, Esmail MOHAMMADIAN, Jong-Whan RHIM a Seid Mahdi JAFARI. PH-sensitive (halochromic) smart packaging films based on natural food colorants for the monitoring of food quality and safety. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2020, 105, 93-144 [cit. 2022-05-05]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2020.08.014
- [2] BECERRIL, Raquel, Cristina NERÍN a Filomena SILVA. Bring some colour to your package: Freshness indicators based on anthocyanin extracts. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2021, 111, 495-505 [cit. 2022-02-23]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2021.02.042
- [3] ZHANG, Xinrui, Xiaofang LIU, Chunguang YANG, Tong XI, Jinlong ZHAO, Lichu LIU a Ke YANG. New strategy to delay food spoilage: Application of new food contact material with antibacterial function: Application of new food contact material with antibacterial function. *Journal of Materials Science & Technology*. 2021, 70, 59-66. ISSN 1005-0302. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.jmst.2020.08.045
- [4] ODEYEMI, Olumide, Oluwadara ALEGBELEYE, Mariyana STRATEVA a Deyan STRATEV. Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2020, 19(2), 311-331 [cit. 2021-04-12]. ISSN 1541-4337. Dostupné z: doi:10.1111/1541-4337.12526
- [5] HÚNGARO, Humberto, Magdevis CATURLA, Cláudia HORITA, Marianna FURTADO a Anderson SANT'ANA. Blown pack spoilage in vacuum-packaged meat: A review on clostridia as causative agents, sources, detection methods, contributing factors and mitigation strategies. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2016, 52, 123-138 [cit. 2021-04-12]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2016.04.010
- [6] HUIS IN'T VELD, Jos H.J. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1996, 33(1), 1-18 [cit. 2021-04-15]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/0168-1605(96)01139-7
- [7] BORCH, Elisabeth, Marie-Louise KANT-MUERMANS a Ylva BLIXT. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1996, 33(1), 103-120 [cit. 2021-04-12]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/0168-1605(96)01135-X
- [8] MOHAREB, Fady, Maite IRIONDO, Agapi DOULGERAKI, Angela VAN HOEK, Henk AARTS, Michael CAUCHI a George-John NYCHAS. Identification of meat spoilage gene biomarkers in *Pseudomonas putida* using gene profiling. *Food Control* [online]. 2015, 57, 152-160 [cit. 2021-04-13]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2015.04.007
- [9] HOLM, E.S., A. SCHÄFER, A.G. KOCH a M.A. PETERSEN. Investigation of spoilage in saveloy samples inoculated with four potential spoilage bacteria. *Meat*

- Science [online]. 2013, 93(3), 687-695 [cit. 2021-04-13]. ISSN 03091740. Dostupné z: doi:10.1016/j.meatsci.2012.11.016
- [10] NYCHAS, George-John, Panos SKANDAMIS, Chrysoula TASSOU a Konstantinos KOUTSOUMANIS. Meat spoilage during distribution. Meat Science [online]. 2008, 78(1-2), 77-89 [cit. 2021-04-13]. ISSN 03091740. Dostupné z: doi:10.1016/j.meatsci.2007.06.020
- [11] JONES, Rhys J. Observations on the succession dynamics of lactic acid bacteria populations in chill-stored vacuum-packaged beef. International Journal of Food Microbiology [online]. 2004, 90(3), 273-282 [cit. 2021-04-14]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-1605(03)00310-6
- [12] CASABURI, Annalisa, Paola PIOMBINO, George-John NYCHAS, Francesco VILLANI a Danilo ERCOLINI. Bacterial populations and the volatiles associated to meat spoilage. Food Microbiology [online]. 2015, 45, 83-102 [cit. 2021-04-15]. ISSN 07400020. Dostupné z: doi:10.1016/j.fm.2014.02.002
- [13] RUSSO, F., D. ERCOLINI, G. MAURIELLO a F. VILLANI. Behaviour of *Brochothrix thermosphacta* in presence of other meat spoilage microbial groups. Food Microbiology [online]. 2006, 23(8), 797-802 [cit. 2021-04-14]. ISSN 07400020. Dostupné z: doi:10.1016/j.fm.2006.02.004
- [14] PENNACCHIA, Carmela, Danilo ERCOLINI a Francesco VILLANI. Development of a Real-Time PCR assay for the specific detection of *Brochothrix thermosphacta* in fresh and spoiled raw meat. International Journal of Food Microbiology [online]. 2009, 134(3), 230-236 [cit. 2021-04-14]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.005
- [15] ADAM, Katharine, Steve FLINT a Gale BRIGHTWELL. Reduction of spoilage of chilled vacuum-packed lamb by psychrotolerant clostridia. Meat Science [online]. 2013, 93(2), 310-315 [cit. 2021-04-15]. ISSN 03091740. Dostupné z: doi:10.1016/j.meatsci.2012.09.011
- [16] DAINITY, Richard, Robert EDWARDS a Christine HIBBARD. Spoilage of vacuum-packed beef by *aclostridium* sp. Journal of the Science of Food and Agriculture [online]. 1989, 49(4), 473-486 [cit. 2021-04-15]. ISSN 00225142. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.2740490410
- [17] BRODA, Dorota, Karen DELACY, R.Graham BELL a Nicholas PENNEY. Association of psychrotrophic *Clostridium* spp. with deep tissue spoilage of chilled vacuum-packed lamb. International Journal of Food Microbiology [online]. 1996, 29(2-3), 371-378 [cit. 2021-04-15]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/0168-1605(95)00071-2
- [18] DOULGERAKI, Agapi, Spiros PARAMITHIOTIS a George-John NYCHAS. Characterization of the Enterobacteriaceae community that developed during storage of minced beef under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. International Journal of Food Microbiology [online]. 2011, 145(1), 77-83 [cit. 2021-04-24]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.030

- [19] DOULGERAKI, Agapi, Danilo ERCOLINI, Francesco VILLANI a George-John NYCHAS. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2012, 157(2), 130-141 [cit. 2021-04-24]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.020
- [20] ISMAIL, M.A., A.-H. ABOU ELALA, A. NASSAR a D.G. MICHAIL. Fungal contamination of beef carcasses and the environment in a slaughterhouse. *Food Microbiology* [online]. 1995, 12, 441-445 [cit. 2021-04-15]. ISSN 07400020. Dostupné z: doi:10.1016/S0740-0020(95)80128-6
- [21] NASSER, Laila A. Molecular identification of isolated fungi, microbial and heavy metal contamination of canned meat products sold in Riyadh, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences* [online]. 2015, 22(5), 513-520 [cit. 2021-04-19]. ISSN 1319562X. Dostupné z: doi:10.1016/j.sjbs.2014.08.003
- [22] PIZZOLATO MONTANHA, Francisco, Amanda ANATER, Javier BURCHARD, Fernando LUCIANO, Giuseppe MECA, Lara MANYES a Cláudia PIMPÃO. Mycotoxins in dry-cured meats: A review. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2018, 111, 494-502 [cit. 2021-04-19]. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2017.12.008
- [23] MONU, Emefa, Chayapa TECHATHUVANAN, Audra WALLIS, Faith CRITZER a P. DAVIDSON. Plant essential oils and components on growth of spoilage yeasts in microbiological media and a model salad dressing. *Food Control* [online]. 2016, 65, 73-77 [cit. 2021-04-19]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2016.01.018
- [24] NIELSEN, Dennis, Tomas JACOBSEN, Lene JESPERSEN, Anette KOCH a Nils ARNEBORG. Occurrence and growth of yeasts in processed meat products – Implications for potential spoilage. *Meat Science* [online]. 2008, 80(3), 919-926 [cit. 2021-04-19]. ISSN 03091740. Dostupné z: doi:10.1016/j.meatsci.2008.04.011
- [25] RAWDKUEN, S., N. PUNBUSAYAKUL a D.S. LEE. Antimicrobial Packaging for Meat Products. *Antimicrobial Food Packaging: Monitoring Techniques for Detecting the Microbial Quality and Spoilage in Meat* [online]. Elsevier, 2016, s. 229-241 [cit. 2021-04-23]. ISBN 9780128007235. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800723-5.00017-6
- [26] MATINDOUST, Samaneh, Ali FARZI, Majid BAGHAEI NEJAD, Mohammad SHAHROKH ABADI, Zhuo ZOU a Li-Rong ZHENG. Ammonia gas sensor based on flexible polyaniline films for rapid detection of spoilage in protein-rich foods. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics* [online]. 2017, 28(11), 7760-7768 [cit. 2021-04-15]. ISSN 0957-4522. Dostupné z: doi:10.1007/s10854-017-6471-z
- [27] TOLDRÁ, Fidel. *Lawrie's Meat Science* [online]. 8. Cambridge: Woodhead Publishing, an imprint of Elsevier, 2017 [cit. 2021-04-24]. ISBN 9780081006979. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpLMSE0011/lawries-meat-science/lawries-meat-science>

- [28] LI, Huanhuan, Quansheng CHEN, Jiewen ZHAO a Mengzi WU. Nondestructive detection of total volatile basic nitrogen (TVB-N) content in pork meat by integrating hyperspectral imaging and colorimetric sensor combined with a nonlinear data fusion. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2015, 63(1), 268-274 [cit. 2021-04-19]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2015.03.052
- [29] BEKHIT, Alaa, Benjamin HOLMAN, Stephen GITERU a David HOPKINS. Total volatile basic nitrogen (TVB-N) and its role in meat spoilage: A review. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2021, 109, 280-302 [cit. 2021-04-19]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2021.01.006
- [30] SACCANI, G., E. TANZI, P. PASTORE, S. CAVALLI a M. REY. Determination of biogenic amines in fresh and processed meat by suppressed ion chromatography-mass spectrometry using a cation-exchange column. *Journal of Chromatography A* [online]. 2005, 1082(1), 43-50 [cit. 2021-04-19]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2005.05.030
- [31] CAO, Yumin, Weigang GU, Jinjie ZHANG, Yin CHU, Xingqian YE, Yaqin HU a Jianchu CHEN. Effects of chitosan, aqueous extract of ginger, onion and garlic on quality and shelf life of stewed-pork during refrigerated storage. *Food Chemistry* [online]. 2013, 141(3), 1655-1660 [cit. 2021-04-24]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2013.04.084
- [32] WANG, Haixia a Lijuan WANG. Developing a bio-based packaging film from soya by-products incorporated with valonea tannin. *Journal of Cleaner Production* [online]. 2017, 143, 624-633 [cit. 2022-02-19]. ISSN 09596526. Dostupné z: doi:10.1016/j.jclepro.2016.12.064
- [33] CHENG, Hao, Hao XU, David JULIAN MCCLEMENTS, Long CHEN, Aiquan JIAO, Yaoqi TIAN, Ming MIAO a Zhengyu JIN. Recent advances in intelligent food packaging materials: Principles, preparation and applications. *Food Chemistry* [online]. 2022, 375 [cit. 2022-01-16]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2021.131738
- [34] SOHAIL, Muhammad, Da-Wen SUN a Zhiwei ZHU. Recent developments in intelligent packaging for enhancing food quality and safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2018, 58(15), 2650-2662 [cit. 2022-01-16]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2018.1449731
- [35] ZHANG, Xiaoshuan, Gege SUN, Xinqing XIAO, Yuanrui LIU a Xiaoping ZHENG. Application of microbial TTIs as smart label for food quality: Response mechanism, application and research trends. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2016, 51, 12-23 [cit. 2022-01-16]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2016.02.006
- [36] SOLTANI FIROUZ, Mahmoud, Khaled MOHI-ALDEN a Mahmoud OMID. A critical review on intelligent and active packaging in the food industry: Research and development. *Food Research International* [online]. 2021, 141 [cit. 2022-01-16]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2021.110113

- [37] WANG, Shaodong, Xinghai LIU, Mei YANG, Yu ZHANG, Keyu XIANG a Rong TANG. Review of Time Temperature Indicators as Quality Monitors in Food Packaging. *Packaging Technology and Science* [online]. 2015, 28(10), 839-867 [cit. 2022-01-16]. ISSN 08943214. Dostupné z: doi:10.1002/pts.2148
- [38] LIM, Seokwon, Sundaram GUNASEKARAN a Jee-Young IMM. Gelatin-Templated Gold Nanoparticles as Novel Time-Temperature Indicator. *Journal of Food Science* [online]. 2012, 77(9), 45-49 [cit. 2022-01-16]. ISSN 00221147. Dostupné z: doi:10.1111/j.1750-3841.2012.02872.x
- [39] SIDDIQUI, Junaid, Mahtab TAHERI, Arif ALAM a M. DEEN. Nanomaterials in Smart Packaging Applications: A Review. *Small* [online]. 2022, 18(1) [cit. 2022-01-16]. ISSN 1613-6810. Dostupné z: doi:10.1002/sml.202101171
- [40] LEE JU, Seung a Won JUNG. Time-temperature indicator, method for manufacturing the time-temperature indicator, quality guarantee system using the time-temperature indicator, and quality guarantee method using the quality guarantee system. USA. US9476083B2. Uděleno 25. 10. 2016.
- [41] GAIKWAD, Kirtiraj, Suman SINGH a Abdellah AJJI. Moisture absorbers for food packaging applications. *Environmental Chemistry Letters* [online]. 2019, 17(2), 609-628 [cit. 2022-01-17]. ISSN 1610-3653. Dostupné z: doi:10.1007/s10311-018-0810-z
- [42] PEREIRA, Pamela, Paulo PICCIANI, Veronica CALADO a Renata TONON. Gelatin-Based Nanobiocomposite Films as Sensitive Layers for Monitoring Relative Humidity in Food Packaging. *Food and Bioprocess Technology* [online]. 2020, 13(6), 1063-1073 [cit. 2022-01-17]. ISSN 1935-5130. Dostupné z: doi:10.1007/s11947-020-02462-5
- [43] BIBI, Fabien, Carole GUILLAUME, Arnaud VENA, Nathalie GONTARD a Brice SORLI. Wheat gluten, a bio-polymer layer to monitor relative humidity in food packaging: Electric and dielectric characterization. *Sensors and Actuators A: Physical* [online]. 2016, 247, 355-367 [cit. 2022-01-17]. ISSN 09244247. Dostupné z: doi:10.1016/j.sna.2016.06.017
- [44] WAWRZYNEK, Emma, Carol BAUMBAUER a Ana ARIAS. Characterization and Comparison of Biodegradable Printed Capacitive Humidity Sensors. *Sensors* [online]. 2021, 21(19) [cit. 2022-01-17]. ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s21196557
- [45] WON, Keehoon, Nan JANG a Junsu JEON. A Natural Component-Based Oxygen Indicator with In-Pack Activation for Intelligent Food Packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2016, 64(51), 9675-9679 [cit. 2022-02-14]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jafc.6b04172
- [46] VU, Chau a Keehoon WON. Novel water-resistant UV-activated oxygen indicator for intelligent food packaging. *Food Chemistry* [online]. 2013, 140(1-2), 52-56 [cit. 2022-02-14]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2013.02.056
- [47] PAPKOVSKY, Dmitri a Ruslan DMITRIEV. Biological detection by optical oxygen sensing. *Chemical Society Reviews* [online]. 2013, 42(22) [cit. 2022-02-14]. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/c3cs60131e

- [48] BANERJEE, Swagata, Caroline KELLY, Joseph KERRY a Dmitri PAPKOVSKY. High throughput non-destructive assessment of quality and safety of packaged food products using phosphorescent oxygen sensors. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2016, 50, 85-102 [cit. 2022-02-14]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2016.01.021
- [49] POURJAVAHER, Simin, Hadi ALMASI, Saeed MESHKINI, Sajad PIRSA a Ehsan PARANDI. Development of a colorimetric pH indicator based on bacterial cellulose nanofibers and red cabbage (*Brassica oleraceae*) extract. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2017, 156, 193-201 [cit. 2022-01-17]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2016.09.027
- [50] HUANG, Wen-Ding, Sanchali DEB, Young-Sik SEO, Smitha RAO, Mu CHIAO a J. CHIAO. A Passive Radio-Frequency pH-Sensing Tag for Wireless Food-Quality Monitoring. *IEEE Sensors Journal* [online]. 2012, 12(3), 487-495 [cit. 2022-01-17]. ISSN 1530-437X. Dostupné z: doi:10.1109/JSEN.2011.2107738
- [51] MUSSO, Yanina, Pablo SALGADO a Adriana MAURI. Gelatin based films capable of modifying its color against environmental pH changes. *Food Hydrocolloids* [online]. 2016, 61, 523-530 [cit. 2022-01-17]. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2016.06.013
- [52] ROY, Swarup a Jong-Whan RHIM. Anthocyanin food colorant and its application in pH-responsive color change indicator films. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2021, 61(14), 2297-2325 [cit. 2022-01-17]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2020.1776211
- [53] EL-WAHAB, Hanan a Gehan MORAM. Toxic effects of some synthetic food colorants and/or flavor additives on male rats. *Toxicology and Industrial Health* [online]. 2013, 29(2), 224-232 [cit. 2022-01-17]. ISSN 0748-2337. Dostupné z: doi:10.1177/0748233711433935
- [54] CHOI, Inyoung, Jun LEE, Monique LACROIX a Jaejoon HAN. Intelligent pH indicator film composed of agar/potato starch and anthocyanin extracts from purple sweet potato. *Food Chemistry* [online]. 2017, 218, 122-128 [cit. 2022-01-17]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2016.09.050
- [55] EZATI, Parya a Jong-Whan RHIM. PH-responsive pectin-based multifunctional films incorporated with curcumin and sulfur nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2020, 230 [cit. 2022-01-17]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2019.115638
- [56] EZATI, Parya, Hossein TAJIK a Mehran MORADI. Fabrication and characterization of alizarin colorimetric indicator based on cellulose-chitosan to monitor the freshness of minced beef. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2019, 285, 519-528 [cit. 2022-01-17]. ISSN 09254005. Dostupné z: doi:10.1016/j.snb.2019.01.089
- [57] KANATT, Sweetie R. Development of active/intelligent food packaging film containing Amaranthus leaf extract for shelf life extension of chicken/fish during

- chilled storage. *Food Packaging and Shelf Life* [online]. 2020, 24 [cit. 2022-01-17]. ISSN 22142894. Dostupné z: doi:10.1016/j.fpsl.2020.100506
- [58] MOHAMMADALINEJHAD, Samira, Hadi ALMASI a Mehran MORADI. Immobilization of Echium amoenum anthocyanins into bacterial cellulose film: A novel colorimetric pH indicator for freshness/spoilage monitoring of shrimp. *Food Control* [online]. 2020, 113 [cit. 2022-01-16]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2020.107169
- [59] MUSSO, Yanina, Pablo SALGADO a Adriana MAURI. Smart gelatin films prepared using red cabbage (*Brassica oleracea* L.) extracts as solvent. *Food Hydrocolloids* [online]. 2019, 89, 674-681 [cit. 2020-03-28]. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2018.11.036
- [60] URANGA, Jone, Alaitz ETXABIDE, Pedro GUERRERO a Koro DE LA CABA. Development of active fish gelatin films with anthocyanins by compression molding. *Food Hydrocolloids* [online]. 2018, 84, 313-320 [cit. 2022-02-19]. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2018.06.018
- [61] GUTIÉRREZ, Tomy a Vera ALVAREZ. Bionanocomposite films developed from corn starch and natural and modified nano-clays with or without added blueberry extract. *Food Hydrocolloids* [online]. 2018, 77, 407-420 [cit. 2022-02-19]. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2017.10.017
- [62] KALPANA, S., S.R. PRIYDARSHINI, M. Maria LEENA, J.A. MOSES a C. ANANDHARAMAKRISHNAN. Intelligent packaging:Trends and applications in food systems. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2019, (93), 145-157 [cit. 2019-12-05]. Dostupné z: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0924224418307313?token=22F6A549E0DE7BC13AFBDE71C15F5CE6295D2C5B5FEF78B6DAFB154627F82F2319C7F371B4189B07C86E623B2E8EE2C4>
- [63] CHEN, Yu, Guoqing FU, Yael ZILBERMAN, Weitong RUAN, Shideh Kabiri AMERI, Yu Shrike ZHANG, Eric MILLER a Sameer R. SONKUSALE. Low cost smart phone diagnostics for food using paper-based colorimetric sensor arrays. *Food Control* [online]. 2017, 82, 227-232 [cit. 2022-02-23]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2017.07.003
- [64] LEE, Kaeun, Seunghye BAEK, Dowan KIM a Jongchul SEO. A freshness indicator for monitoring chicken-breast spoilage using a Tyvek® sheet and RGB color analysis. *Food Packaging and Shelf Life* [online]. 2019, 19, 40-46 [cit. 2022-02-23]. ISSN 22142894. Dostupné z: doi:10.1016/j.fpsl.2018.11.016
- [65] LEE, Seung Yuan, Seung Jae LEE, Dong Soo CHOI a Sun Jin HUR. Current topics in active and intelligent food packaging for preservation of fresh foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2015, 95(14), 2799-2810 [cit. 2022-02-23]. ISSN 00225142. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.7218

- [66] MÜLLER, Patricia a Markus SCHMID. Intelligent Packaging in the Food Sector: A Brief Overview. *Foods* [online]. 2019, 8(1) [cit. 2019-11-28]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods8010016
- [67] FENG, Yi, Li XIE, Qiang CHEN a Li-Rong ZHENG. Low-Cost Printed Chipless RFID Humidity Sensor Tag for Intelligent Packaging. *IEEE Sensors Journal* [online]. 2015, 15(6), 3201-3208 [cit. 2022-02-23]. ISSN 1530-437X. Dostupné z: doi:10.1109/JSEN.2014.2385154
- [68] FIDDES, Lindsey K., James CHANG a Ning YAN. Electrochemical detection of biogenic amines during food spoilage using an integrated sensing RFID tag. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2014, 202, 1298-1304 [cit. 2022-02-23]. ISSN 09254005. Dostupné z: doi:10.1016/j.snb.2014.05.106
- [69] DUDNYK, Iuliia, Emma-Rose JANEČEK, Joanne VAUCHER-JOSET a Francesco STELLACCI. Edible sensors for meat and seafood freshness. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2018, 259, 1108-1112 [cit. 2022-01-16]. ISSN 09254005. Dostupné z: doi:10.1016/j.snb.2017.12.057
- [70] ZENG, Ping, Xiong CHEN, Ya-Ru QIN et al. Preparation and characterization of a novel colorimetric indicator film based on gelatin/polyvinyl alcohol incorporating mulberry anthocyanin extracts for monitoring fish freshness. *Food Research International* [online]. 2019, 126 [cit. 2022-01-16]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2019.108604
- [71] ZHANG, Junjun, Xiaobo ZOU, Xiaodong ZHAI, XiaoWei HUANG, Caiping JIANG a Mel HOLMES. Preparation of an intelligent pH film based on biodegradable polymers and roselle anthocyanins for monitoring pork freshness. *Food Chemistry* [online]. 2019, 272, 306-312 [cit. 2022-01-16]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2018.08.041
- [72] ZHAI, Xiaodong, Zhihua LI, Jiyong SHI et al. A colorimetric hydrogen sulfide sensor based on gellan gum-silver nanoparticles bionanocomposite for monitoring of meat spoilage in intelligent packaging. *Food Chemistry* [online]. 2019, 290, 135-143 [cit. 2022-01-16]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2019.03.138
- [73] ROY, Swarup a Jong-Whan RHIM. Preparation of Gelatin/Carrageenan-Based Color-Indicator Film Integrated with Shikonin and Propolis for Smart Food Packaging Applications. *ACS Applied Bio Materials* [online]. 2021, 4(1), 770-779 [cit. 2022-01-16]. ISSN 2576-6422. Dostupné z: doi:10.1021/acsabm.0c01353
- [74] MIRZA ALIZADEH, Adel, Mohammad MASOOMIAN, Mahsa SHAKOOIE, Maryam ZABIHZADEH KHAJAVI a Mehdi FARHOODI. Trends and applications of intelligent packaging in dairy products: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2022, 62(2), 383-397 [cit. 2022-01-16]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2020.1817847
- [75] MOAZAMI GOODARZI, Mohsen, Mehran MORADI, Hossein TAJIK, Mehrdad FOROUGH, Parya EZATI a Bambang KUSWANDI. Development of an easy-to-use colorimetric pH label with starch and carrot anthocyanins for milk shelf life

- assessment. International Journal of Biological Macromolecules [online]. 2020, 153, 240-247 [cit. 2022-01-16]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.03.014
- [76] ZIYAINA, Mohamed, Barbara RASCO, Todd COFFEY, Gülhan ÜNLÜ a Shyam SABLANI. Colorimetric detection of volatile organic compounds for shelf-life monitoring of milk. Food Control [online]. 2019, 100, 220-226 [cit. 2022-01-16]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2019.01.018
- [77] WESTON, Max, Rhiannon KUCHEL, Mustafa CIFTCI, Cyrille BOYER a Rona CHANDRAWATI. A polydiacetylene-based colorimetric sensor as an active use-by date indicator for milk. Journal of Colloid and Interface Science [online]. 2020, 572, 31-38 [cit. 2022-01-16]. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcis.2020.03.040
- [78] BANDYOPADHYAY, Smarak, Nabanita SAHA, Oyunchimeg ZANDRAA, Martina PUMMEROVÁ a Petr SÁHA. Essential Oil Based PVP-CMC-BC-GG Functional Hydrogel Sachet for 'Cheese': Its Shelf Life Confirmed with Anthocyanin (Isolated from Red Cabbage) Bio Stickers. Foods [online]. 2020, 9(3) [cit. 2022-01-16]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods9030307
- [79] KUSWANDI, Bambang, Chrysnanda MARYSKA, JAYUS, Aminah ABDULLAH a Lee HENG. Real time on-package freshness indicator for guavas packaging. Journal of Food Measurement and Characterization [online]. 2013, 7(1), 29-39 [cit. 2022-01-16]. ISSN 2193-4126. Dostupné z: doi:10.1007/s11694-013-9136-5
- [80] CHEN, Hui-zhi, Min ZHANG, Bhesh BHANDARI a Zhimei GUO. Applicability of a colorimetric indicator label for monitoring freshness of fresh-cut green bell pepper. Postharvest Biology and Technology [online]. 2018, 140, 85-92 [cit. 2022-01-16]. ISSN 09255214. Dostupné z: doi:10.1016/j.postharvbio.2018.02.011
- [81] Zákon o obalech a o změně některých zákonů (zákon o obalech). In: . ročník 2001, číslo 477. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2001-477/zneni-20180101>
- [82] Vyhláška č. 38/2001 Sb. - Vyhláška Ministerstva zdravotnictví o hygienických požadavcích na výrobky určené pro styk s potravinami a pokrmů. In: . 1. 2. 2001. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2001-38>
- [83] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1935/2004 - O materiálech a předmětech určených pro styk s potravinami. In: . 27. 10. 2004. Dostupné také z: <https://www.potravinainfo.cz/33/1935-2004-narizeni-evropskeho-parlamentu-a-rady-es-o-materialech-a-predmetech-urcenych-pro-styk-s-potravinami-k-27-3-2021-uniqueidmRRWSbk196FNf8-jVUh4EstVtRjpnQxZgG5kfbxTMd5rJfTGJxQmQ/>
- [84] Nařízení Komise (ES) č. 450/2009 - O aktivních a inteligentních materiálech a předmětech určených pro styk s potravinami. In: . 29. 5. 2009. Dostupné také z: <https://www.potravinainfo.cz/33/450-2009-narizeni-komise-es-c-450-2009-o-aktivnich-a-inteligentnich-materialech-a-predmetech-urcenych-pro-styk-s-potravinami-uniqueidmRRWSbk196FNf8-jVUh4EstVtRjpnQxZTcXGGIzq0ysMO6VlftQMFg/>

- [85] FLÓREZ, María, Esther GUERRA-RODRÍGUEZ, Patricia CAZÓN a Manuel VÁZQUEZ. Chitosan for food packaging: Recent advances in active and intelligent films. *Food Hydrocolloids* [online]. 2022, (124) [cit. 2022-01-14]. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2021.107328
- [86] BAKSHI, Prasanna, D. SELVAKUMAR, K. KADIRVELU a N.S. KUMAR. Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, 150, 1072-1083 [cit. 2022-01-14]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.10.113
- [87] YOUNES, Islem a Marguerite RINAUDO. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Marine Drugs* [online]. 2015, 13(3), 1133-1174 [cit. 2022-01-14]. ISSN 1660-3397. Dostupné z: doi:10.3390/md13031133
- [88] XIA, Wenshui, Ping LIU, Jiali ZHANG a Jie CHEN. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids* [online]. 2011, 25(2), 170-179 [cit. 2022-01-14]. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2010.03.003
- [89] WANG, Yanbo, Congnan CEN, Jian CHEN a Linglin FU. MgO/carboxymethyl chitosan nanocomposite improves thermal stability, waterproof and antibacterial performance for food packaging. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2020, 236 [cit. 2022-02-19]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2020.116078
- [90] IBRAHIM, H.M. a E.M.R. EL-ZAIRY. Chitosan as a Biomaterial — Structure, Properties, and Electrospun Nanofibers. BOBBARALA, Varaprasad, ed., Varaprasad BOBBARALA. *Concepts, Compounds and the Alternatives of Antibacterials* [online]. Káhira, Egypt: InTech, 2015 [cit. 2022-02-19]. ISBN 978-953-51-2232-6. Dostupné z: doi:10.5772/61300
- [91] MORAN, Hannah, Joanna TURLEY, Mats ANDERSSON a Ed LAVELLE. Immunomodulatory properties of chitosan polymers. *Biomaterials* [online]. 2018, 184, 1-9 [cit. 2022-02-19]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2018.08.054
- [92] WANG, Chenjie, Tong CHANG, Shuang DONG, Dongliang ZHANG, Chengye MA, Shanfeng CHEN a Hongjun LI. Biopolymer films based on chitosan/potato protein/linseed oil/ZnO NPs to maintain the storage quality of raw meat. *Food Chemistry* [online]. 2020, 332 [cit. 2022-02-19]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2020.127375
- [93] TOMADONI, B., A. PONCE, M. PEREDA a M.R. ANSORENA. Vanillin as a natural cross-linking agent in chitosan-based films: Optimizing formulation by response surface methodology. *Polymer Testing* [online]. 2019, 78 [cit. 2022-01-15]. ISSN 01429418. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymertesting.2019.105935
- [94] JÓŹWIAK, Tomasz, Urszula FILIPKOWSKA, Paula SZYMCZYK, Joanna RODZIEWICZ a Artur MIELCAREK. Effect of ionic and covalent crosslinking agents on properties of chitosan beads and sorption effectiveness of Reactive Black 5

- dye. *Reactive and Functional Polymers* [online]. 2017, 114, 58-74 [cit. 2022-03-01]. ISSN 13815148. Dostupné z: doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2017.03.007
- [95] ACHARYA, Veena, Aritri GHOSH, Amit Roy CHOWDHURY a Pallab DATTA. Tannic acid-crosslinked chitosan matrices enhance osteogenic differentiation and modulate epigenetic status of cultured cells over glutaraldehyde crosslinking. *Soft Materials* [online]. 2022, 20(2), 149-160 [cit. 2022-03-07]. ISSN 1539-445X. Dostupné z: doi:10.1080/1539445X.2021.1933032
- [96] FENG, Xiaofan, Xiuling HOU, Congjing CUI, Shibin SUN, Sahiya SADIK, Shaohua WU a Fang ZHOU. Mechanical and antibacterial properties of tannic acid-encapsulated carboxymethyl chitosan/polyvinyl alcohol hydrogels. *Engineered Regeneration* [online]. 2021, 2, 57-62 [cit. 2022-03-07]. ISSN 26661381. Dostupné z: doi:10.1016/j.engreg.2021.05.002
- [97] BABAKHANI, Ataollah a Majid SARTAJ. Removal of Cadmium (II) from aqueous solution using tripolyphosphate cross-linked chitosan. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [online]. 2020, 8(4) [cit. 2022-03-18]. ISSN 22133437. Dostupné z: doi:10.1016/j.jece.2020.103842
- [98] NASUTION, T I, R ASROSA, I NAINGGOLAN, M BALYAN, R INDAH a A WAHYUDI. Sodium tripolyphosphate cross-linked chitosan based sensor for enhancing sensing properties towards acetone. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* [online]. 2018, 309 [cit. 2022-03-18]. ISSN 1757-8981. Dostupné z: doi:10.1088/1757-899X/309/1/012083
- [99] KARAKURT, Ilkay, Kadir OZALTIN, Elif VARGUN et al. Controlled release of enrofloxacin by vanillin-crosslinked chitosan-polyvinyl alcohol blends. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2021, 126 [cit. 2022-01-15]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2021.112125
- [100] LI, Pu-Wang, Guang WANG, Zi-Ming YANG, Wei DUAN, Zheng PENG, Ling-Xue KONG a Qing-Huang WANG. Development of drug-loaded chitosan–vanillin nanoparticles and its cytotoxicity against HT-29 cells. *Drug Delivery* [online]. 2016, 23(1), 30-35 [cit. 2022-03-07]. ISSN 1071-7544. Dostupné z: doi:10.3109/10717544.2014.900590
- [101] PARK, S.Y., S.T. JUN a K.S. MARSH. Physical properties of PVOH/chitosan-blended films cast from different solvents. *Food Hydrocolloids* [online]. 2001, 15(4-6), 499-502 [cit. 2022-01-15]. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/S0268-005X(01)00055-8
- [102] CASTAÑEDA-OVANDO, Araceli, Ma. PACHECO-HERNÁNDEZ, Ma. PÁEZ-HERNÁNDEZ, José RODRÍGUEZ a Carlos GALÁN-VIDAL. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* [online]. 2009, 113(4), 859-871 [cit. 2022-02-21]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2008.09.001
- [103] KHOO, Hock, Azrina AZLAN, Sou TANG a See LIM. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential

- health benefits. *Food & Nutrition Research* [online]. 2017, 61(1) [cit. 2022-02-21]. ISSN 1654-6628. Dostupné z: doi:10.1080/16546628.2017.1361779
- [104] BALBINOT-ALFARO, Evellin, Débora CRAVEIRO, Karina LIMA, Helena COSTA, Danielle LOPES a Carlos PRENTICE. Intelligent Packaging with pH Indicator Potential. *Food Engineering Reviews* [online]. 2019, 11(4), 235-244 [cit. 2022-02-21]. ISSN 1866-7910. Dostupné z: doi:10.1007/s12393-019-09198-9
- [105] LI, Shiyu, Binning WU, Wenyi FU a Lavanya REDDIVARI. The Anti-inflammatory Effects of Dietary Anthocyanins against Ulcerative Colitis. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2019, 20(10) [cit. 2022-03-01]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20102588
- [106] YUAN, Bo, Masahiko IMAI, Hidetomo KIKUCHI et al. Cytocidal Effects of Polyphenolic Compounds, Alone or in Combination with, Anticancer Drugs Against Cancer Cells: Potential Future Application of the Combinatory Therapy. NTULI, Tobias, ed. *Apoptosis and Medicine* [online]. London: InTech, 2012 [cit. 2022-03-01]. ISBN 978-953-51-0701-9. Dostupné z: doi:10.5772/50218
- [107] SMERIGLIO, Antonella, Davide BARRECA, Ersilia BELLOCCO a Domenico TROMBETTA. Chemistry, Pharmacology and Health Benefits of Anthocyanins. *Phytotherapy Research* [online]. 2016, 30(8), 1265-1286 [cit. 2022-03-18]. ISSN 0951418X. Dostupné z: doi:10.1002/ptr.5642
- [108] GHAREAGHAJLOU, Nazila, Somayeh HALLAJ-NEZHADI a Zahra GHASEMPOUR. Red cabbage anthocyanins: Stability, extraction, biological activities and applications in food systems. *Food Chemistry* [online]. 2021, 365 [cit. 2022-03-18]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2021.130482
- [109] HABTEMARIAM, Solomon. Bilberries and blueberries as potential modulators of type 2 diabetes and associated diseases. *Medicinal Foods as Potential Therapies for Type-2 Diabetes and Associated Diseases* [online]. London: Elsevier, 2019, s. 135-175 [cit. 2022-02-21]. ISBN 9780081029220. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-102922-0.00007-9
- [110] STRAUCH, Renee C., Molla F. MENGIST, Kevin PAN, Gad G. YOUSEF, Massimo IORIZZO, Allan F. BROWN a Mary Ann LILA. Variation in anthocyanin profiles of 27 genotypes of red cabbage over two growing seasons. *Food Chemistry* [online]. 2019, 301 [cit. 2022-02-23]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2019.125289
- [111] KUSWANDI, Bambang, Ni P.N. ASIH, Dwi K. PRATOKO, Nia KRISTININGRUM a Mehran MORADI. Edible pH sensor based on immobilized red cabbage anthocyanins into bacterial cellulose membrane for intelligent food packaging. *Packaging Technology and Science* [online]. 2020, 33(8), 321-332 [cit. 2022-02-23]. ISSN 0894-3214. Dostupné z: doi:10.1002/pts.2507
- [112] PANÁK, O. Věda pro papírové artefakty (VEPA). CZ.1.07/2.3.00/20.0236.
- [113] HUNT, R. W. G. *Measuring colour: fundamentals and applications*. 3rd. Kingston-upon-Thames: Fountain, 1998. ISBN ISBN 08-634-3387-1.

- [114] STANČÍK, J. Studium procesu degradace inkoustového tisku na tenké vrstvě polyvinyl-alkoholu. Brno, 2007. Diplomová práce. Vysoké učení technického v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Michal Veselý.
- [115] Barevný prostor LAB. In: Kopina [online]. 2018 [cit. 2022-05-03]. Dostupné z: <https://kopina.cz/terminologie/36958/lab/>

7 SEZNAM ZKRATEK A POUŽITÝCH SYMBOLŮ

KTJ/g	kolonie tvořících jednotek na 1 gram
TVB-N	total volatile basic nitrogen
RFID	Radio Frequency Identification
$I(\lambda)$	intenzita světla
$M_e(\lambda)$	spektrální intenzita vyzařování
$R(\lambda)$	spektrální reflektance barevného vzorku
$\Phi^0(\lambda)$	spektrální distribuce osvětlení
$\bar{x}, \bar{y}, \bar{z}$	trichomatičtí členitelé
CIE	Mezinárodní komise pro osvětlování
L^*	měrná světlost
a^*	osa zelená – červená
b^*	osa modrá – žlutá
X_n, Y_n, Z_n	trichromatické složky použitého světla
ΔE^*	barvová odchylka
ΔH^*	odchylka odstínu
h^*	měrný úhel barevného tónu
C^*	měrná čistota barevného tónu
ΔA	změna absorbance
M_r	relativní molární hmotnost
ε	molární absorpční koeficient
L	optická dráha
PET	polyethylentereftalát