



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

**MODIFIKACE LIGNINU IZOLOVANÉHO Z ODPADU Z
VINAŘSTVÍ**

MODIFICATION OF SODA LIGNIN ISOLATED FROM WINERY WASTE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Martin Chovanec

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1567/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Martin Chovanec**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Modifikace ligninu izolovaného z odpadu z vinařství

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše zaměřená na dané téma.
2. Porovnání izolace ligninu z matolin pomocí konvenční laboratorní aparatury a v reaktoru.
3. Testování vlivu modifikace ligninu částicemi stříbra na výsledné antibakteriální vlastnosti.
4. Vyhodnocení výsledků a diskuse.

Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2020:

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

Martin Chovanec
student(ka)

doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Modifikácia lignínu izolovaného z vinárenského odpadu

ABSTRAKT

V tejto bakalárskej práci boli skúmané antimikrobiálne vlastnosti soda lignínu izolovaného z hroznových výliskov. Na izoláciu lignínu sa použila laboratórna metóda na prípravu soda lignínu pomocou rozpúšťania v alkalickom roztoku hydroxidu sodného. Lignín bol izolovaný dvoma spôsobmi: 1) konvenčne pomocou laboratórnej aparatúry za atmosférického tlaku pri teplote 110°C a 2) pomocou hydrotermálneho autoklávu vyrobeného pre túto bakalársku prácu za zvýšeného tlaku a pri teplote 110 °C. Obe izolácie boli porovnané hlavne s ohľadom na výťažnosť a čistotu lignínu. Izolácia pomocou hydrotermálneho autoklávu bola efektívnejšia než izolácia v reakčnej fľaši a umožnila pripraviť 36,35 g lignínu zo 100 g hroznových výliskov. Analýza pomocou infračervenej spektroskopie preukázala vyššiu čistotu lignínu izolovaného v hydrotermálnom reaktore. Lignín izolovaný v reakčnej fľaši bol kontaminovaný hemicelulózami a celulózu.

Antibakteriálne testy ukázali, že lignín izolovaný z hroznových výliskov nemal antimikrobiálne vlastnosti. Antimikrobiálna aktivita sa dosiahla až po modifikácii lignínu časticami striebra in situ. Antibakteriálna aktivita bola testovaná na *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Saccharomyces cerevisiae* a *Candida glabrata*. Bolo zistené, že komplex lignín/striebró vykázal antibakteriálnu aktivitu voči všetkým testovaným baktériám, ale nevykazoval žiadnu antimikrobiálnu aktivitu voči kvasinkám.

ABSTRACT

This bachelor thesis provides research on the antibacterial activity of lignin isolated from grape pomace. To separate lignin from grape pomace was used soda lignin isolation method. This method helps to dissolve lignin in the solution of sodium hydroxide. Two isolation procedures were used: 1) isolation by using a conventional laboratory set-up at atmospheric pressure and a temperature of 110 °C and 2) isolation by using a hydrothermal autoclave at increased pressure and a temperature of 110 °C. The hydrothermal autoclave was explicitly developed for this bachelor thesis. Both separations methods were compared from the viewpoint of lignin yields and lignin purity. The lignin yield obtained by using the hydrothermal autoclave was much higher compared to the conventional laboratory set-up, yielding about 36.4 g of soda lignin per 100 g of grape pomace. The infrared spectroscopy analysis of both lignins showed that lignin received by using the conventional laboratory set-up was mixed with hemicelluloses and cellulose. The isolation by using the hydrothermal autoclave enabled to prepare lignin with higher purity.

Lignin isolated from grape pomace did not show any antimicrobial activity. The antimicrobial activity was reached after modification of lignin with silver particles in situ. Antimicrobial activity was tested against *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida glabrata*. The lignin/silver compound showed the antibacterial activity against all tested bacteria, however no antimicrobial activity against yeasts.

KLÚČOVÉ SLOVÁ/KEY WORDS

Soda lignín, priemyselný odpad, antimikrobiálne vlastnosti, strieborné častice, hybridné materiály z lignínu

Soda lignin, industrial waste, antimicrobial properties, silver partical, lignin hybrid materials

CHOVANEC, Martin. *Modifikace ligninu izolovaného z odpadu z vinařství* [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-07-27]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123868>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Adriána Kovalčík.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracoval samostatne, a že všetky použité literárne zdroje sú správne a úplne citované. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom iba so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Chcel by som poďakovať vedúcej mojej bakalárskej práce doc. Ing. Adriáne Kovalčík Ph.D. za jej veľmi cenné rady, čas, ochotu a trpezlivosť pri vypracovávaní tejto bakalárskej práce.

Ďalej by som chcel poďakovať Ing. Vojtěchovi Enevovi Ph.D. za pomoc s metodikou a analýzami vzoriek, Ing. Ive Pernicovej za pomoc s metodikou práce a v neposlednej rade firme ENSECO s.r.o. za pomoc s konštrukciou hydrotermálneho autoklávu.



Jihomoravský kraj



SO-MO-PRO

OBSAH

ABSTRAKT	4
Abstract	4
KLÚČOVÉ SLOVÁ/KEY WORDS	4
PREHLÁSENIE	5
POĎAKOVANIE	5
1 ÚVOD	8
2 TEORETICKÁ ČASŤ	9
2.1 Hrozno a vinársky priemysel	9
2.2 Lignín 10	
2.2.1 Štruktúra lignínu	11
2.2.2 Rozdelenie lignínov	13
2.3 Použitie lignínov	16
2.4 Vlastnosti lignínov	16
2.4.1 Fyzikálne a chemické vlastnosti	16
2.4.2 Antimikrobiálne vlastnosti	18
2.4.3 Antioxidačné vlastnosti	19
2.5 Modifikácie lignínu	19
2.5.1 Komplexy lignín-striebro	20
3 CIEĽ PRÁCE	21
4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	22
4.1 Použité mikroorganizmy, chemikálie a materiály	22
4.1.1 Chemikálie pre izoláciu a modifikáciu lignínu	22
4.1.2 Pomôcky pre izoláciu a modifikáciu lignínu	22
4.1.3 Mikroorganizmy	22
4.1.4 Chemikálie pre kultiváciu mikroorganizmov	24
4.1.5 Pomôcky pre kultiváciu mikroorganizmov	24
4.2 Prístrojové vybavenie	24
4.3 Izolácia lignínu	25
4.3.1 Izolácia a precipitácia lignínu v reakčnej fľaši	25
4.3.2 Izolácia a precipitácia lignínu v hydrotermálnom autokláve	25
4.4 Výroba komplexu lignínu a častíc striebra	26
4.4.1 Príprava komplexu oxid kremičitý/soda lignín s časticami striebra	26
4.4.2 Príprava komplexov soda lignínu s časticami striebra	27
4.5 Kultivácia mikroorganizmov	27
4.5.1 Príprava kultivačných médií	27
4.6 Stanovenie antimikrobiálnej aktivity látok	28
4.6.1 Jamková difúzna metóda	29
4.7 Analýza vzoriek	29
4.7.1 Elementárna analýza	29
4.7.2 Infračervená spektrometria	29
5 VÝSLEDKY A DISKUSIA	30

5.1	Porovnanie izolácie lignínu z hroznových výliskov pomocou konvenčnej laboratórnej aparatury a v reaktore.	30
5.2	Antibakteriálna účinnosť izolovaného a modifikovaného lignínu	32
6	ZÁVER.....	36
7	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV	37
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK.....	42

1 ÚVOD

V súčasnej dobe sa kladie dôraz na odbúravanie a nahrádzanie ťažko rozložiteľných plastov, pretože práve tieto predstavujú najväčšiu záťaž pre životné prostredie. Popri plastoch sa však produkuje aj veľké množstvo odpadu hlavne z potravinárskeho priemyslu. Pre tento odpad nebolo doposiaľ takmer žiadne využitie. Čiastočne sa používal ako palivo, krmivo či hnojivo. Európska únia stále apeluje na pokročilejšie spracovanie organického odpadu a z tohto dôvodu prebieha množstvo výskumov ako napríklad využitie lignocelulóзовých materiálov pre výrobu etanolu alebo srvátky na výrobu polylaktidov.

Táto bakalárska práca sa venuje spracovaniu odpadu z vinárskeho priemyslu, keďže je jedným z najviac rozvinutých po celej Európe, vrátane Českej republiky. Samotná Česká republika sa radí medzi najväčších producentov vína, a to hlavne Južná Morava, kde sa nachádzajú vinárske podoblasti Znojemska, Velkopavlovická, Mikulovská a Slovácka. V Čechách sa nachádzajú podoblasti Mělnická a Litoměřická. Produkcia vína je spojená s veľkým množstvom odpadu, ktorý, tak ako iné potravinárske odpady, nemá veľké využitie. Pre účely vinárskeho priemyslu sa ročne vyprodukuje až $67,1 \cdot 10^6$ t hrozna. Najväčší podiel odpadu tvoria hroznové výlisky (hlavne šupky a semená), ktoré predstavujú až 18-20 hm. % z celkovej hmotnosti hrozna, čo je približne $13,4 \cdot 10^6$ t, tým pádom ide o lacný a obnoviteľný zdroj.

Hroznové výlisky z najväčšej časti obsahujú sacharidy a polyfenoly. Prítomnosť polyfenolov spôsobuje ich antioxidačné vlastnosti. Väčšina polyfenolov obsiahnutých v hroznových výliskoch sú ligníny, ktoré sú hlavným predmetom skúmania v tejto bakalárskej práci.

Ligníny sú aromatické biopolyméry s amorfnou štruktúrou, ktorá okrem aromatických jadier obsahuje hydroxylové, karbonylové a karboxylové funkčné skupiny. Ligníny, tak ako mnohé iné polyfenoly, majú antioxidačné účinky a pre niektoré boli zistené aj antimikrobiálne vlastnosti. Vďaka týmto vlastnostiam našli uplatnenie ako aditíva do polymérov, hlavne pre modifikáciu ich náchylnosti voči oxidácii. Táto práca sa zaoberá možnosťou dosiahnutia antibakteriálneho účinku lignínu pomocou tvorby komplexu so striebrom. Takto modifikovaný lignín by potom adíciou do rôznych polymérov mohol slúžiť v obalových materiáloch ako antibakteriálne aditívum.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Hrozno a vinársky priemysel

Víno je jedným zo svetovo najpredávanějších a najviac produkovaných alkoholických nápojov. Krajiny, ktoré sú najväčšími producentmi vína sú najmä v Európe a sú nimi Francúzsko, Španielsko a Taliansko. Avšak v Európe má takmer každá krajina minimálne jednu vinársku oblasť. Pri výrobe vína však vzniká veľké množstvo vedľajších produktov, hlavne lignocelulózových odpadov. Iba v Európe je ročne produkovaných až 14,5 miliónov ton vinárskeho odpadu. [1] [2]

V Českej republike je pestovanie hrozna bežné najmä na Morave, kde sa nachádza väčšina českých vinárskych oblastí. Údaje z roku 2011 ukazujú, že bolo nazbieraných až 91 253 ton hrozna (Réva vínna), pre cca $390 \cdot 10^5$ litrov vína. Pri produkcii 1,3 až 1,5 kg odpadu na liter vína je množstvo odpadu približne 54 tisíc ton ročne. Tento odpad sa potom používa väčšinou ako hnojivo alebo krmivo. [1-4]

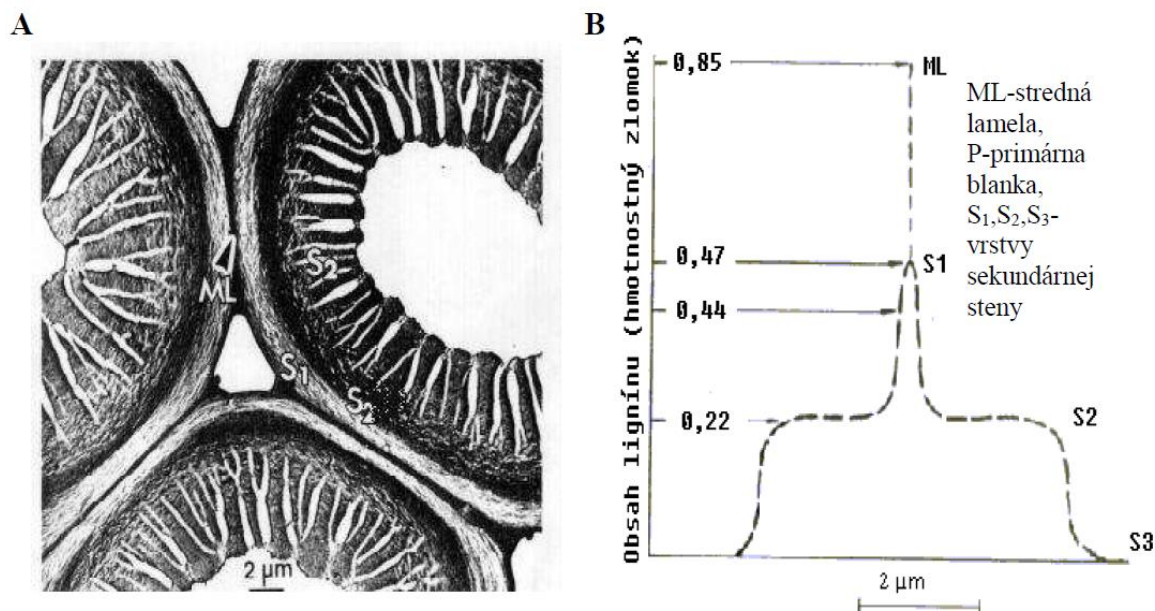


Obr. 1 Réva vínna [5]

2.2 Lignín

Ligníny sú biopolyméry, ktoré sú po celulóze a hemicelulóze najrozšírenejšie na Zemi. Ide o aromatické biopolyméry, ktoré sa nachádzajú v bunkových stenách rastlín vo forme komplexu s celulórou a hemicelulózami, čím vytvárajú vyššie usporiadané štruktúry rastlinných orgánov/pletív. Názov lignín pochádza z latinského slova „*lignum*“, čo zjednodušene znamená drevo. [6] Lignín je amorfný polymér zložený z fenypropánových jednotiek s alifatickými reťazcami, ktoré sú substituované s rôznymi funkčnými skupinami. Najčastejšie sa tu vyskytujú hydroxylové (OH), karbonylové (C=O) a karboxylové (COOH) skupiny. [7] Prítomnosť lignínu v bunkovej stene drevnatých rastlín zvyšuje ich odolnosť voči mechanickému poškodeniu, zároveň zabraňuje úniku vody a mikrobiálnej degradácii polysacharidov. Tvorba lignínu, tzv. lignifikácia v rastlinách môže byť vyvolaná aj stresom, napr. pri mechanickom poranení, pri nepriaznivých poveternostných podmienkach, a pod. [8]

Obsah, typ a koncentrácia lignínu v rastlinách závisí na druhu rastliny, orgáne, či na časti orgánu a tiež prostredí odkiaľ sa rastlina získala. Pomocou UV mikroskopu a konfokálneho laserového mikroskopu bolo možné pozorovať časti orgánov, ktoré sú viac či menej lignifikované (Obr. 2). Najvyššia koncentrácia lignínu je v bunkách ihličnatých a listnatých, kde sa nachádza v množstve 15 – 36 %, ale v menších množstvách sa nachádza aj v nižších rastlinách. [6] Vysoký obsah lignínu bol nameraný v hrozne, ktoré v sušine obsahuje až takmer 36 % lignínu. [9]



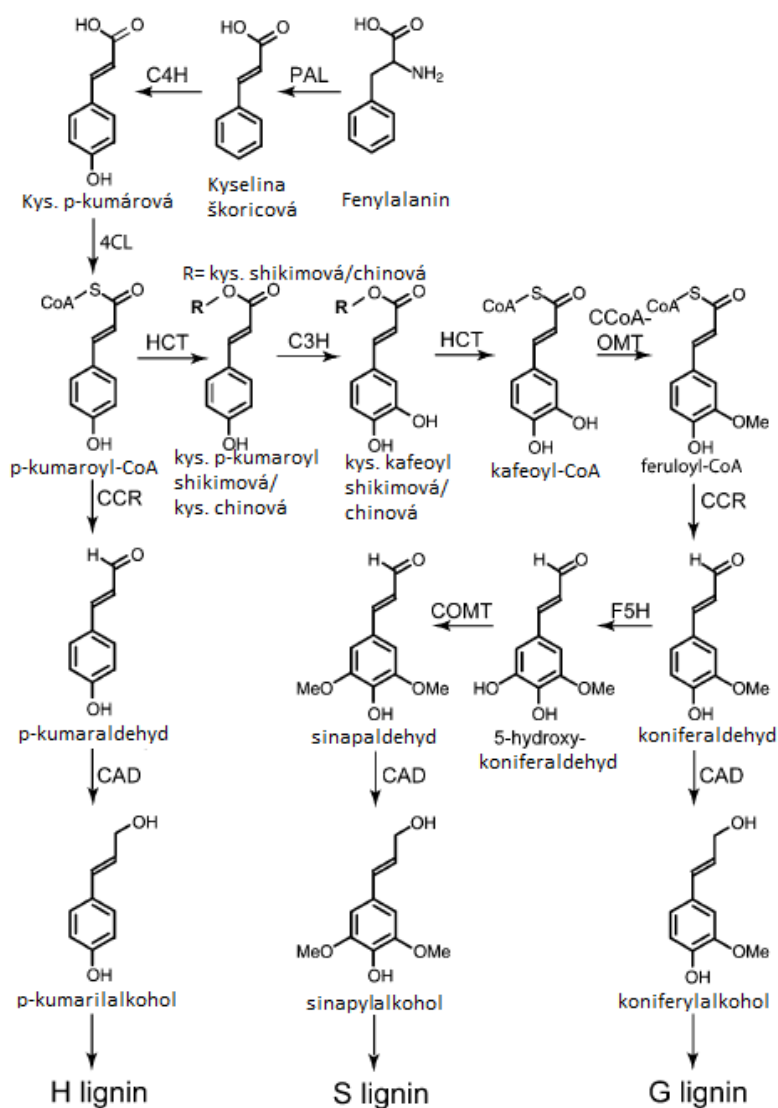
Obr. 2 Lignifikácia rastlinných buniek [10]

2.2.1 Štruktúra lignínu

Hlavnými stavebnými jednotkami lignínu sú monoméne jednotky na báze koniferylalkoholu, sinapylalkoholu a *p*-kumarylalkoholu. Tieto monoméne jednotky vznikajú z fenylalanínu pomocou fenylpopanoid-monolignolovej dráhy, ktorá prebieha v plastidoch (Obr. 3). [8] Tieto podjednotky sú potom polymerizované, čím vzniká finálna štruktúra lignínu a v nej sa nazývajú guaiacyl (G), syringyl (S) a *p*-hydroxyfenyl (H).

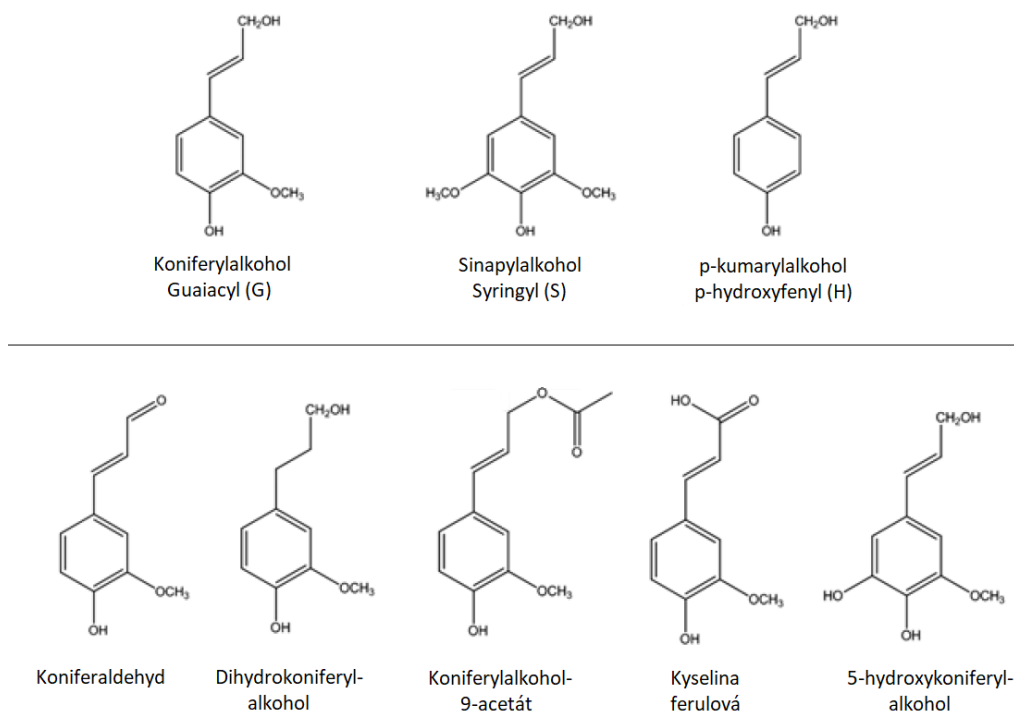
Dá sa povedať, že ligníny vznikajú v procese nazývanom lignifikácia, čo je enzymaticky iniciovaná dehydrogenačná polymerizácia monolignolov, ktoré sa viažu buď C-C väzbami, alebo esterickými väzbami. Tie sa však viažu náhodne a preto sú ligníny definované ako heteropolyméry. Pretože štruktúra lignínov je veľmi heterogénna (mení sa v závislosti od zdroja lignínu, druhu izolácie a prípadnej modifikácie), je veľmi náročné až nemožné určiť celkovú chemickú štruktúru. Doterajšie teoretické modely lignínov sú iba hypotetické, takže nezobrazujú skutočnú štruktúru. [11] Pre stanovenie usporiadania podjednotiek v ligníne sa ako najlepšia metóda javí nukleárna magnetická rezonancia (NMR). Jeden príklad štruktúry lignínu izolovaného z topol'a, navrhnutý pomocou NMR je uvedený na Obr. 5. [8] Čo sa týka molekulovej hmotnosti lignínov, literatúra uvádza rôzne hodnoty. Tieto hodnoty majú široké spektrum od nízkomolekulových až po vysokomolekulové ligníny pre viaceré dôvody, ako je zmena štruktúry počas izolácie, obmedzená rozpustnosť lignínov a vplyv použitej metódy testovania. [7]

Stavebné jednotky lignínov sa nazývajú guaiacyl (G), syringyl (S) a *p*-hydroxyfenyl (H). Ich pomer vo finálnom ligníne závisí hlavne na druhu či časti rastliny, z ktorej bol lignín izolovaný. Napríklad v štruktúre lignínu v gymnosperme nahosemenných rastlín sa nachádzajú iba guaiacylové monoméry, kdežto lignín v angiosperme pozostáva z guaiacylových, aj syringylových monomérov. Ligníny s obsahom *p*-hydroxyfenylových monomérov sa vyskytujú v mäkkom dreve alebo v jednoročných rastlinách (napr. tráva). [8]

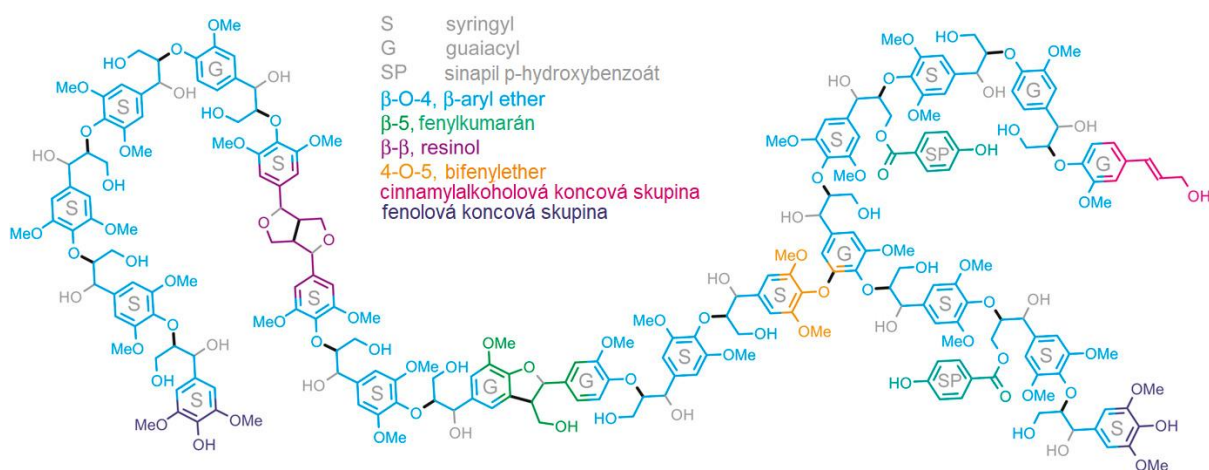


Obr. 3 Syntéza hydroxycinnamylalkoholov z fenylalanínu [8]

V menšom počte sa v lignínoch nachádzajú aj iné stavebné podjednotky ako sú napr. koniferaldehyd, dihydrokoniferylalkohol, koniferylalkohol-9-acetát, kyselina ferulová a 5-hydroxykoniferylalkohol (Obr. 4). [11]



Obr. 4 Podjednotky nachádzajúce sa v ligninoch [11]



Obr. 5 Modelová štruktúra ligninu izolovaného z topoľa (pomocou NMR) [8]

2.2.2 Rozdelenie lignínov

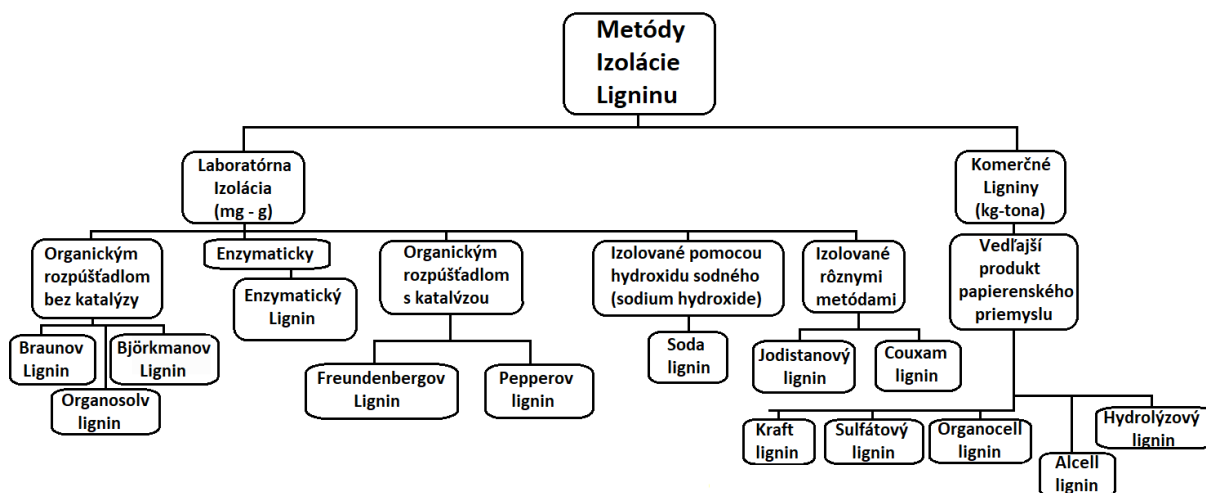
Ligníny je možné rozdeliť podľa rôznych kritérií, ale najmä podľa ich pôvodu a spôsobu izolácie. Ligníny sa delia podľa pôvodu na tri skupiny:

1) **Ligníny mäkkého dreva (Softwood)** – známe aj ako guaiacylové (G-) ligníny, pozostávajú hlavne z koniferylalkoholových derivátov (až 90%). Zvyšných 10% tvoria hlavne p-kumarylalkoholové deriváty. Nachádzajú sa napr. v borovici.

2) **Ligníny tvrdého dreva (Hardwood)** – známe ako guaiaciovo-syringylové (G- a S-) ligníny, obsahujú kofenylalkoholové a sinapylalkoholové deriváty. Nachádzajú sa napr. v javore.

3) Ligníny jednoročných rastlín (Grass) – Obsahujú zmes všetkých G-, S- a H-jednotiek. [7]

Ligníny sa delia aj podľa spôsobu izolácie, pretože ako bolo spomenuté v predchádzajúcich kapitolách, izolácia zásadne ovplyvňuje ich štruktúru a výsledné vlastnosti. Rozdelenie lignínov podľa izolácie je schematicky uvedené na Obr. 6.



Obr. 6 Rozdelenie lignínov podľa izolácie [11]

Priemyselné ligníny, vznikajú ako vedľajšie produkty procesu rozvlákňovania (tzv. delignifikácii) dreva v papierenskom priemysle. Patria sem hlavne lignosulfáty a Kraft lignín, ktoré sú v dnešnej dobe bežne dostupnými komerčnými lignínmi. Ich ročná produkcia v krajinách západného sveta sa odhaduje na približne $8 \cdot 10^5$ ton. Produkcia lignosulfátov sa v poslednej dobe znižuje, naopak produkcia Kraft lignínu sa stále zvyšuje, závisí to od toho, aká metóda papierenskej výroby prevažuje. V minulosti medzi rozšírený priemyselný lignín, patril aj organosolv lignín, ktorý vznikal pri rozvlákňovaní dreva alkoholom. Tento spôsob rozvlákňovania sa už dnes nepoužíva, preto sa tento druh lignínu radí medzi izolované v laboratóriu. [12]

Lignosulfáty

Lignosulfáty, taktiež nazývané lignín sulfonáty alebo sulfidy lignínov, vznikajú pri sulfátovom rozvlákňovaní mäkkého dreva, ktorého princípom je rozpustenie dreva pomocou suflonácie hlavne v benzylakohole, benzylaryl éteri a pod. Zároveň dochádza k demethylácii, čo spôsobuje vznik katecholov a kyseliny sulfónovej. Lignín je počas tohto procesu fragmentovaný a sulfonovaný, čo zlepšuje jeho rozpustnosť vo vode. Sulfonové kyseliny sú navyše silné kyseliny, čo vedie k tomu, že po naviazaní na lignín, pri určitom pH tvorí polyanión. V závislosti na použitej báze vznikajú potom lignosulfáty s obsahom vápnika, sodíka, horčíka, či amoniaku. Molekulová hmotnosť lignosulfátov sa

pohybuje od 1000 do 60 000, pričom nižšie hmotnosti majú ligníny tvrdého dreva. Ligníny mäkkého dreva dosahujú vyššie hmotnosti. [12] [13]

Izolácia lignosulfátov sa potom priemyselne robí hlavne Howardovým procesom, kedy je vápenatý lignosulfát precipitovaný z roztoku pridaním nadbytku vápna. Týmto spôsobom je možné získať výťažok lignínu až okolo 95 % (počítané na teoretický obsah lignínu vo vzorke). Menej často sa používa ultrafiltrácia alebo iónové vylučovanie (ion-exclusion). Z laboratórnych metód sa používa napr. dialýza, elektro dialýza, iónové vylučovanie, precipitácia v alkohole alebo je možné ich pripraviť aj zo soda lignínu. Lignosulfonáty sa prejavujú ako hydrofóbne a zároveň hydrofilné. Sú rozpustné vo vode a pomocou modifikácií sulfonátovými skupinami, karbohydrátmi a malým množstvom extraktov z dreva je možné doceliť rozpustnosť aj v organických rozpúšťadlách. [12] [13] [14]

Kraft ligníny

Kraft ligníny, nazývané aj alkalické ligníny, alebo sulfátové ligníny, sú ligníny izolované rastlinných buniek (prevažne z dreva) povarením v roztoku $\text{Na}_2\text{S}/\text{NaOH}$ pri teplote 155-175 °C. Fázy vzniknutej zmesi sa následne odseparujú, pričom získame celulózu a tzv. čiernu tekutinu alebo výluh (black liquid). Lignín sa z nej potom izolovaný z čiernych výluhov zrážaním kyselinou sírovou alebo chlorovodíkovou. Vyzrážaný Kraft lignín je následne oddelený filtráciou a vysušený. [12] [15]

Kraft ligníny sú hydrofóbne a sú rozpustné v alkalických roztokoch, dioxáne, acetóne a dimethylfomamide. Naopak nerozpustné sú vo vode s neutrálnym, alebo kyslým pH. Ich molekulové hmotnosti sa pohybujú od 2000-3000. [12] [15] [16]

Soda ligníny

Soda ligníny alebo aj alkali ligníny, vznikajú pri procese rozvlákňovania pomocou hydroxidu sodného. Tento proces sa v Európe používa len málo, avšak v Číne je naopak veľmi častý. Je spojený s veľkým znečistením odpadových vôd preto pomaly ustupuje z praxe a nahrádzajú ho iné, ekologickejšie, varianty. [17]

Organosolv ligníny

Organosolv ligníny vznikajú pri organosolvovom procese rozvlákňovania, ktorý je založený na opakovanom preváraní tvrdého dreva vo vodnom roztoku ethanolu alebo methanolu pri primeraných teplotách a pH. Týmto postupom sa do roztoku rozpustí lignín, hemicelulóza a ostatné komponenty dreva, okrem celulózy, čím vznikne tzv. čierna tekutina. Z nej je potom lignín precipitovaný a je oddelený centrifugáciou. Molekulová hmotnosť organosolv lignínov je spravidla nižšia ako 1000. [12]

2.3 Použitie lignínov

Ligníny sú lacným a znovuobnoviteľným prírodným zdrojom, a tak prebiehalo množstvo výskumov, vďaka ktorým majú dnes ligníny širokospektrálne využitie. Ich polyfenolová štruktúra umožňuje absorpciu UV žiarenia, preto je možné ich aplikovať ako UV filtre v polyméroch. Ďalej sa využívajú ako výplňový materiál do polymérov, ako aditíva do polyuretánov, pre vytváranie filmov škrob-lignín, na výrobu dusíkatých hnojív, alebo sú ligníny použité ako zdroj uhlíka pre uhlíkové vlákna. Tabuľka 1 zobrazuje použitie rôznych lignínov do ako aditíva do rôznych polymérov. [18-27]

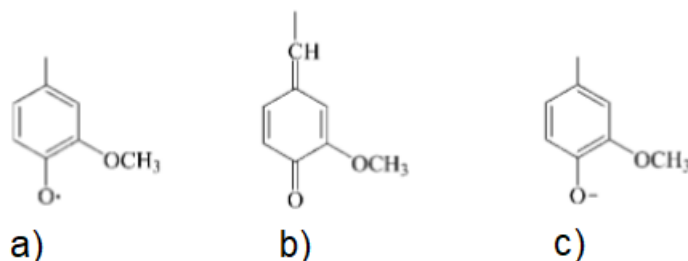
Príkladom využitia lignínu ako aditíva môže byť jeho interkorporácia do štruktúry polypropylénu. V tomto prípade je potrebné použiť nízkomolekulárne ligníny s nízkym obsahom hydroxylových skupín, pre zvýšenie ich kompatibility s polypropylénom. Takto upravený polypropylén je potom menej náchylný k oxidácii, avšak disponuje mierne horšími mechanickými vlastnosťami. [28]

2.4 Vlastnosti lignínov

2.4.1 Fyzikálne a chemické vlastnosti

Ligníny sú amorfne prášky, žltej až tmavo hnedej farby s relatívnou molekulovou hmotnosťou $10^2 - 10^6$, a rôznou polydisperzitou. Rozpustnosť lignínu v kvapalinách závisí od jeho štruktúry.

Na lignínoch môže prebiehať množstvo reakcií ako sú oxidácia, redukcia, odfarbovanie, hydrolýza a iné chemické alebo enzymatické reakcie. Princípom väčšiny reakcií je schopnosť fenolových hydroxylových skupín tvoriť reaktívne intermediáty ako napríklad peroxidový radikál (a), chinonmethid (b) a peroxidový anión (c), ktorých štruktúra je uvedená na Obr. 7. [12] Aby bolo ligníny možné pridávať ako aditíva do plastov, je nutné ich chemicky alebo fyzikálne modifikovať. Niektoré vybrané modifikácie sú uvedené v Tabuľke 1.



Obr. 7 Príklady intermediátov fenolových hydroxylových skupín [12]

Tabuľka 1 Modifikácie lignínov pre ich adíciu do polymérov

Druh lignínu podľa izolácie	Modifikácia	Aditívum/kompatibilizér	Polymér	Zmenená vlastnosť	Literatúra
Alcel organosolv hardwood lignín	Hydroxyproplovaný	-	Thermoplastic elastomer polyuretane (TPU)	Zvýšenie výťažku pri karbonizácii, menej prázdnych miest v štruktúre	[18]
Kraft Hardwood lignín					
Non-wood soda lignín	-	MAPE	HDPE	Zvýšenie pevnosti v ťahu a ohybe	[19]
Soda lignín	Esterifikácia	-	PBAT	Zamedzenie priepustnosti UV (280 – 400 nm) pričom neboli zmenené mech. vlastnosti	[20]
Organosolv Corn stover lignín (čistota 96%)	Acetylácia	-	PLA	Porovnateľné alebo rovnaké mechanické vlastnosti ako čisté PLA	[21]
Organosolv lignín	-	-	Nenasýtený polyester	Menší objemový úbytok	[22]
	Allyltrimethoxy silane			Zlepšené ťahové a nárazové vlastnosti; väčší objemový úbytok	
Alkali lignín		Hexamethylen diisokyanát	PCL	Flexibilný biofilm, rozťažnosť 246,36%, UV ochrana	[23]
Alkali lignín	γ -divinyl-3-aminopropyltriethoxysilane	Polyfosfát amónny	PLA	Zvýšenie termostability, pevnosti v ťahu; zlepšenie samozhášavosti	[24]

2.4.2 Antimikrobiálne vlastnosti

Ako bolo spomenuté v predchádzajúcich kapitolách, ligníny v rastlinných bunkách plnia hlavne ochrannú funkciu proti mechanickému poškodeniu, avšak ich syntéza je podmienená aj rôznymi stresovými faktormi, ako sú napríklad mikrobiálne infekcie, alebo mechanické poranenie. Zo skutočnosti, že sú hlavne syntetizované v procese rastliny v boji proti rôznym mikrobiálnym infekciám sa dá predpokladať, že ligníny môžu vykazovať isté antimikrobiálne účinky. [8]

V rastlinách sa však nachádzajú aj iné látky, ktoré pôsobia antimikrobiálne. Z dôvodu, že väčšina štúdií zameraných na antimikrobiálne vlastnosti sa zaoberá väčšinou rastlinnými extraktami a nie čistými izolovanými lignínmi, nie sú antibakteriálne vlastnosti lignínu dobre preskúmané. Antimikrobiálne vlastnosti lignínov boli väčšinou skúmané iba na modelových zlúčeninách a tieto výsledky sa môžu výrazne odlišovať od izolovaných lignínov kvôli ich odlišným fyzikálnym a chemickým vlastnostiam. Z dostupných výsledkov v literatúre je známe, že antimikrobiálne vlastnosti lignínu sú závislé hlavne na podmienkach počas rastu rastliny a na spôsobe ich izolácie. [11]

Výskumom lignínov z rôznych zdrojov boli zistené nasledovné poznatky: [30]

1. Na modelových zlúčeninách obsahujúcich guaiacylové a syringylové stavebné podjednotky bola preukázaná nízka antibakteriálna a protiplesňová aktivita hydroxycinnamylalkoholov a na druhej strane vysoká antibakteriálna a protiplesňová aktivita hydroxycinnamylaldehydov a tiež vysoká antibakteriálna a nízka protiplesňová aktivita kyseliny hydroxyškoricovej.
2. Na Kraft ligníne izolovaného z biomasy boli preukázané inhibičné účinky pre gram-pozitívne baktérie a kvasinky pri alkoholovom kvasení, avšak pre gram-negatívne baktérie boli inhibičné účinky nulové.
3. Kraft lignín z papierenského priemyslu rozpustný v methanole ihneď inhiboval rast patogénnych baktérií a navyše sa zistilo, že konverziou aldehydových a ketónových skupín na alkoholické a následnou acetyláciou sa zvyšuje antibakteriálna aktivita.
4. Zvýšená teplota a prídavok aditív zvyčajne nepriaznivo vplyva na antibakteriálne vlastnosti.

Mechanizmus antibakteriálnej aktivity lignínov nie je zatiaľ dobre známy, predpokladá sa, že lignín interaguje s cytoplazmatickou membránou gram-pozitívnych a gram-negatívnych baktérií. [11] Ligníny sú schopné inhibovať rastovú aktivitu baktérií a húb a navyše štúdie zameriavajúce sa na cytotoxicitu preukázali, že ligníny a komplexy lignín-karbohydrátov nie sú škodlivé pre zvieratá. Kvôli týmto vlastnostiam sa ďalej skúma ich využitie v medicíne, farmácii či kozmetike. [30]

2.4.3 Antioxidačné vlastnosti

Výskumy zamerané na žltnutie dreva preukázali, že ligníny inhibujú radikálovú peroxidáciu a teda majú antioxidačné účinky. Fenolové modelové zlúčeniny vyskytujúce sa v lignínoch majú významné antioxidačné účinky, ktoré ďalej závisia na tom, či vedľajší propylový reťazec obsahuje konjugovaný systém dvojitych väzieb. Štruktúry, ktoré majú vo vedľajšom propylovom reťazci konjugovaný systém dvojitych väzieb majú približne dvakrát silnejšie antioxidačné účinky ako tie, ktoré majú nasýtený vedľajší reťazec alebo sú v ňom prítomné izolované dvojité väzby. Dimérne a tetramérne fenolové modelové zlúčeniny majú omnoho silnejšie antioxidačné účinky. Tetramérne modelové zlúčeniny majú približne rovnaké antioxidačné účinky ako di-*terc*-butylhydrogvanizol, ktorý je známy ako komerčný antioxidant. [31]

Ligníny majú širokospektrálne využitie ako náhrada syntetických aditív proti radikálovej oxidačnej degradácii materiálov. Mnohé z nich je možné použiť v potravinárstve alebo v kozmetike na ochranu pred oxidáciou mastných kyselín a lipidov, v priemysle napr. ako tužidlá do gúm a pri výrobe sklenej vaty, kde sa vo forme amóniovej soli pridáva do rozpusteného skla a zlepšuje tak ohybnosť vlákien. [7]

2.5 Modifikácie lignínu

V poslednej dobe prebieha výskum v oblasti využitia lignínov ako aditív do plastov, kvôli tomu, že sú považované za biodegradovateľné (za určitých podmienok v prítomnosti špeciálnych húb) a biokompatibilné látky, a navyše sa získavajú z priemyselných odpadov. Môžu byť použité či už modifikované alebo nemodifikované, záleží na cieľovej aplikácii. Problémom nemodifikovaných lignínov je hlavne ich nízka rozpustnosť v organických rozpúšťadlách a následne vysoká viskozita v roztoku. V prípade použitia lignínov ako plniva pre plasty, je problémom ich nízka kompatibilita s väčšinou polymérov. Nemodifikované ligníny môžu byť priamo inkorporované do polymérnej matrice pre zníženie výrobných nákladov a zlepšenie vlastností. Do polymérov sa však môže pridať iba malé množstvo lignínu (do 5%), pretože väčšie množstvá spôsobia zhoršenie mechanických vlastností a často aj zníženie termostability. Z tohto dôvodu sa hľadajú vhodné modifikácie na zvýšenie ich kompatibility s rôznymi polymérmi. Zvolená modifikácia závisí od chemickej štruktúry polyméru, do ktorého sa lignín plánuje pridať. Výhodou lignínov je, že obsahujú veľké množstvo rôznych funkčných skupín, ktoré je možné rôzne modifikovať. V Tabuľke 1 je možné vidieť použitie rôznych lignínov a modifikácií pre zlepšenie vlastností polymérov. Medzi najčastejšie modifikácie lignínov patrí esterifikácia, alkylácia, hydroxyalkylácia a pod. [18-27]

2.5.1 Komplexy lignín-striebro

Striebro sa vďaka jeho silným redoxným a antimikrobiálnym vlastnostiam v praxi používa veľmi často. Má rozsiahle využitie v medicíne a v kozmetike, kde sa využíva koloidné striebro na liečenie vonkajších poranení ako ochrana proti infekciám. Ďalej sa aplikuje vo forme rôznych masťí alebo pri popáleninách na urýchlenie hojenia rán. Medicínske vybavenie sa taktiež pokrýva striebrom, aby bolo znížené riziko infekcie. Z finančných a ekologických dôvodov sa však hľadajú efektívnejšie varianty využitia striebra.

V štúdiu vedenej Man Li, bol s použitím nanočastíc striebra a lignosulfátu vytvorený hydrogél s dobrou biokompatibilitou za použitia pomerne nízkej koncentrácie striebra (0,1 ml 0,05M AgNO_3). Tento hydrogél vykazoval antimikrobiálny účinkok voči *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Navyše mal tento hydrogél dobré mechanické vlastnosti. [34] Ďalšie výskumy boli zamerané na inkorporáciu nanočastíc striebra do Kraft lignínu. Takto modifikované ligníny vykazovali antibakteriálne vlastnosti proti gram pozitívnym a gram-negatívnym baktériám. Kalle Lintinen a kol. pripravil komplex lignín-striebro, v ktorom striebro zostalo stabilne zakomponované v demineralizovanej vode, avšak vo fyziologických podmienkach sa striebro hneď uvoľnilo. Z tohto dôvodu bolo potrebné takto modifikovaný lignín použiť ihneď po príprave. V ďalšej práci publikovanej Lukasz Klapiszewski a kol. zostalo striebro v ligníne stabilné aj po dlhšom čase. Dôvodom bol iný postup práce, ktorý zahrňoval prípravu komplexu povrchovo modifikovaného oxidu kremičitého a lignínu. Tieto komplexy boli schopné adsorbovať farbivá, enzýmy, ťažké kovy či iné škodlivé látky, čo bolo ďalším ich atribútom. Tento materiál tak získal potenciál pre rôzne medicínske aplikácie. [35-36]

3 CIEĽ PRÁCE

Cieľom práce tejto bakalárskej práce bolo pripraviť antibakteriálny lignín izoláciou z hroznových výliskov získaných z vinárstva Vavříček. Táto práca bola súčasťou väčšieho európskeho projektu Somopro, ktorý bol riešený doc. Kovalčík. Dôležitým bodom tejto práce bolo získať lignín v dostatočnom množstve, zistiť jeho antibakteriálne vlastnosti a tie ďalej zvýšiť modifikáciou so striebrom.

Jednotlivé ciele boli zadane nasledovne:

1. Literárna rešerš zameraná na danú tému.
2. Porovnanie izolácie lignínu z hroznových výliskov pomocou konvenčnej laboratórnej aparatury a v reaktore.
3. Testovanie vplyvu modifikácie lignínu časticami striebra na výsledné antibakteriálne vlastnosti.
4. Vyhodnotenie výsledkov a diskusia.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité mikroorganizmy, chemikálie a materiály

4.1.1 Chemikálie pre izoláciu a modifikáciu lignínu

Sušené hroznové výlisky (Vavříček, Břeží u Mikulova, ČR, zber jeseň 2018, mix odrody Veltlínske zelené a Sauvignon Blanc)

Destilovaná voda (FCH VUT v Brně $0,7 \mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$)

Hydroxid sodný (p.a.)

Kyselina sírová (96 %)

Peroxid vodíka (35%)

Oxid kremičitý (kremelina)

Vinyltrimethyloxysilan

Jodistan sodný (98 %)

Dusičnan strieborný (p.a.)

Polyvinylpyrrolidon (PVP K12, 2000-3000 g/mol)

Tetrahydroboritan sodný ($\geq 97\%$)

Citrát sodný p.a.

4.1.2 Pomôcky pre izoláciu a modifikáciu lignínu

Kávový mlynček

Reakčné fľaše (SIMAX)

Hydrotermálny autokláv (Vyrobený na zákazku firmou ENSECO s.r.o., Nitra, Slovensko)

Sušiareň

Mixér

Magnetická miešačka s automatizovaným ohrevom

Laboratórne sklo

Lyofilizátor

Laboratórne váhy

Analytické váhy

Dialyzačné membrány

4.1.3 Mikroorganizmy

Pre stanovenie antimikrobiálnej aktivity jamkovou difúznou metódou boli použité štyri druhy baktérií a dva druhy kvasiniek. Ako zástupcovia gram-pozitívnych baktérií boli použité druhy *Bacillus subtilis* (CCM 1999) a *Micrococcus luteus* (CCM 1569) a zo skupiny gram-negatívnych baktérií boli použité druhy *Escherichia coli* (CCM 3954) a *Serratia marcescens* (CCM 8587). Z kvasiniek boli použité druhy *Candida glabrata* (CCM 8270) a *Saccharomyces cerevisiae* (CCM 8191). Všetky použité kultúry mikroorganizmov sú z Českej zbierky mikroorganizmov Masarykovej univerzity v Brne.

Bacillus subtilis

Bacillus subtilis je fakultatívne anaeróbna chemoorganotrofná gram-pozitívna sporulujúca baktéria tyčinkovitého tvaru rôznych dĺžok. Endospóry sú veľmi rezistentné voči nepriaznivým podmienkam. Metabolizmus *Bacillus subtilis* je kvasný alebo respiračný. Bežne sa vyskytuje v pôde, ale bola preukázaná aj v tráviacom trakte človeka. [33-35]

Micrococcus luteus

Micrococcus luteus je striktne aeróbna chemoorganotrofná gram-pozitívna nesporulujúca koková baktéria guľatého až sférického tvaru. Bežne sa vyskytuje v dvojiciach, štvoriciach alebo nepravidelných zhlukoch. *Micrococcus luteus* má respiračný metabolizmus a produkuje žltý pigment. Vyskytuje sa na koži cicavcov a ústnej dutine človeka. [33,34]

Escherichia coli

Escherichia coli je fakultatívne anaeróbna chemoorganotrofná gram-negatívna baktéria tyčinkovitého tvaru. Je jedným z najdôležitejších druhov črevnej mikroflóry stavovcov a jej prítomnosť je potrebná pre správne fungovanie tráviacich procesov v črevách. Niektoré kmene *E.coli* sú pôvodcami ochorení tráviacej a vylučovacej sústavy. Zároveň sú indikátorom fekálneho znečistenia vody. [33,34]

Serratia marcescens

Serratia marcescens je fakultatívne anaeróbna chemoorganotrofná gram-negatívna pohyblivá baktéria tyčinkovitého tvaru s respiračným aj kvasným charakterom metabolizmu. Vyskytuje sa vo vode a pôde, jej kolónie majú charakteristické červené sfarbenie. Je rezistentná voči niekoľkým antibiotikám, čo spôsobuje prítomnosť R-faktorov. U človeka je pôvodcom infekcií močových a dýchacích ciest a zriedkavo môže vyvolať zápal vnútornej strany srdca, zápal pľúc, sepsu a pod. [33,34,36]

Candida glabrata

Candida glabrata patrí medzi kvasinky rodu *Candida*, ktorý sa radí do triedy Fungi Imperfecti. V malom počte sa prirodzene vyskytuje v tráviacom trakte alebo na koži človeka. U človeka môže vyvolať pľúcnu hubovú infekciu, kandidózu, kandidémiu a často sa nachádza v urogenitálnom trakte. [37]

Saccharomyces cerevisiae

Saccharomyces cerevisiae je kvasinka voľne sa vyskytujúca na ovocí, kvetoch alebo v kôre stromov. Je využívaná v mnohých priemyselných odvetviach (výroba liehu, piva, vína), ďalej ako modelový organizmus pre výskum eukaryot, v medicíne ako probiotikum a pod. Pri premnožení v organizme môže spôsobovať ochorenia pohlavnej a tráviacej sústavy. [38]

4.1.4 Chemikálie pre kultiváciu mikroorganizmov

Nutrient Broth

Yeast Extract Powder

Monohydrát glukózy

Peptone

Agar Powder

4.1.5 Pomôcky pre kultiváciu mikroorganizmov

Laboratórne váhy

Laminárny box Airstream

Tlakový hrniec

Mikropipety

Laboratórne sklo

Sklenený korkotvor

Eppendorf ampulky

Vortex

4.2 Prístrojové vybavenie

Prehľad prístrojového vybavenia použitého pre izoláciu, modifikáciu a charakterizáciu lignínu.

Hydrotermálny autokláv

Hydrotermálny autokláv bol vyrobený na zakázku priamo pre túto bakalársku prácu v spolupráci s firmou ENSECO s.r.o. (obr. 9). Tento autokláv bol použitý pre izoláciu lignínu z hroznových výliskov pri teplote 110 °C.

Lyofilizátor

Lyofilizátor bol použitý pre sušenie vzoriek, kvôli ich nožnej nízkej tepelnej stabilite.

Elektrická pec

Elektrická pec bola použitá pre stanovenie popola vo vzorkách.

Elementárna analýza

Elementárnou analýzou bol vo vzorkách stanovený obsah uhlíka, vodíka, dusíka a síry pomocou CHNS analyzátora Euro Vector EA 3000.

Spektrometer

Pre zistenie infračerveného spektra bol použitý FTIR spektrometer Nicolet i550 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

4.3 Izolácia lignínu

4.3.1 Izolácia a precipitácia lignínu v reakčnej fľaši

Bolo navážených 10 gramov vzorky hroznových výliskov, ktoré boli následne nasypané do primeraného množstva 1,5 M roztoku NaOH v reakčnej fľaši tak, aby vznikla zmes hroznových výliskov k roztoku NaOH v pomere 1:10. Zásobný roztok NaOH (1,5 M) bol pripravený rozpustením 60 g NaOH v 1 l destilovanej vody.

Reakčná fľaša bola umiestnená do olejového kúpeľa rozohriateho na 110 °C na 1 hodinu a 10 minút. Počas reakcie bolo občas potrebné odokrývať veko reakčnej fľaše, kvôli zníženou penenia. Po reakcii bola vzniknutá zmes prefiltrovaná filtráciou za zníženého tlaku.

Filtrát bol preliaty do dialyzačnej membrány. Dialýza prebiehala do neutrálneho až slabo bázického pH, pričom bola každý deň vymieňaná voda v dialyzačnej nádobe. Po ukončení dialýzy bola suspenzia preliata do lyofilizačnej nádoby, zamrazená a zlyofilizovaná. Týmto spôsobom bola izolovaná frakcia č.1.

Filtračný koláč bol prevedený späť do reakčnej fľaše a zmiešaný s 1,1 M roztokom NaOH tak, aby vznikla zmes filtračného koláča k roztoku NaOH v pomere 1:5. Zásobný roztok NaOH (1,1 M) bol pripravený rozpustením 44 g NaOH v 1 l destilovanej vody. Reakčná fľaša bola následne umiestnená do olejového kúpeľa rozohriateho na 155 °C na 3 hodiny a 10 minút. Po prebehnutí reakcie bola vzniknutá zmes prefiltrovaná filtráciou za zníženého tlaku.

Filtrát bol precipitovaný 72 % kyselinou sírovou. Po precipitácii bola suspenzia preliata do dialyzačnej membrány. Dialýza prebiehala do neutrálneho až slabo bázického pH, pričom bola každý deň vymieňaná voda v dialyzačnej nádobe. Po ukončení dialýzy bola suspenzia preliata do lyofilizačnej nádoby, zamrazená a zlyofilizovaná. Týmto spôsobom bola izolovaná frakcia č.2. Obe frakcie boli zmiešané dokopy a označili sa ako lignín (L_F). Vzorka bola potom analyzovaná pomocou elementárnej analýzy a infračervenej spektrometrie (IČ).

4.3.2 Izolácia a precipitácia lignínu v hydrotermálnom autokláve

Zmes hroznových výliskov v 1,5 M roztoku NaOH bola dôkladne premiešaná a preliata do hydrotermálneho autoklávu (Obr. 8), ktorý bol po utesnení vložený do sušiarne vyhriatej na 110 °C. Zmes sa nechala reagovať po dobu 4 h s 10 minútami navyše pre zahriatie. Po ochladení bol obsah prefiltrovaný filtráciou za zníženého tlaku.



Obr. 8 Hydrotermálny autokláv navrhnutý v spolupráci s firmou ENSECO s.r.o., Nitra, Slovensko

Filtrát bol precipitovaný 72% kyselinou sírovou až do pH 1-2. Po precipitácii bola suspenzia preliata do dialyzačnej membrány. Dialýza prebiehala do neutrálneho až slabo bázičného pH (7-8), pričom bola každý deň vymieňaná voda v dialyzačnej nádobe. Po ukončení dialýzy bola suspenzia preliata do lyofilizačnej nádoby, zamrazená a lyofilizovaná. Týmto spôsobom bola izolovaná vzorka soda lignínu L_R . Vzorka bola potom analyzovaná pomocou IČ.

4.4 Výroba komplexu lignínu a častíc striebra

Pre prípravu komplexu lignínu s časticami striebra boli použité tri postupy.

4.4.1 Príprava komplexu oxid kremičitý/soda lignín s časticami striebra

Príprava komplexu oxid kremičitý/soda lignín

Pre zvýšenie afinity oxidu kremičitého k soda lignínu bolo potrebné modifikovať povrch oxidu kremičitého pomocou vinyltrimethyloxysilanu podľa Teofila Jeionowskeho a kol. Pre aktiváciu molekúl lignínu bola navážka soda lignínu dispergovaná v roztoku dioxán:voda (9:1) a bol pridaný roztok jodistanu sodného. Po 30 minútach bol do vzniknutej zmesi pridaný modifikovaný oxid kremičitý a zmes bola miešaná 2 hodiny bez prístupu svetla. Vzniknutý komplex oxid kremičitý/soda lignín bol potom odfiltrovaný, niekoľkokrát premytý pre odbúranie nečistôt a vysušený a označený ako SiL_R . Pripravená vzorka SiL_R bola potom dispergovaná vo vode a boli pridané častice striebra. Po 30 minútach bol vzniknutý komplex odfiltrovaný, niekoľkokrát premytý a vysušený a bol označený ako $AgSiL_R$. [35]

4.4.2 Príprava komplexov soda lignínu s časticami striebra

Metóda 1

Príprava častíc striebra

Roztok A bol pripravený rozpustením dusičnanu strieborného v 5% vodnom roztoku PVP tak, aby výsledná koncentrácia AgNO_3 bola 500 ppm. Roztok B bol pripravený rozpustením NaBH_4 v 5% roztoku PVP tak, aby výsledná koncentrácia NaBH_4 bola 1000 ppm. Roztok bol počas rozpúšťania NaBH_4 chladený. Roztoky boli potom zmiešané v pomere 1:1 (v/v) a reakcia sa nechala bežať 15 minút. Vzniknuté častice striebra boli potom skladované pri 4 °C. [35]

Príprava komplexov soda lignínu s časticami striebra

Strieborné častice boli priamo zmiešané so soda lignínom. Reakcia sa nechala bežať cez noc a na druhý deň bol produkt odfiltrovaný filtráciou za zníženého tlaku. Vzorka bola vysušená pri teplote 85 °C a označená ako AgL_R-1 .

Metóda 2

Častice striebra boli pripravené podľa protokolu Angela Pinedo-Flores a kol. Na konci tejto metódy (asi po 10 minútach) sa pridal lignín a zmes sa nechala miešať pri laboratórnej teplote 12 hodín. Získaná zmes bola prefiltrovaná za zníženého tlaku, získaný materiál sa vysušil pri 85°C 24 hodín a označil ako AgL_R-2 . [45]

4.5 Kultivácia mikroorganizmov

Pre stanovenie antibakteriálnych vlastností lignínov L_R , AgSiL_R , AgL_R-1 , AgL_R-2 boli zvolené bakteriálne kmene *Micrococcus luteus* a *Bacillus subtilis*, ako zástupcovia gram-pozitívnych baktérii, *Serratia marcescens* a *Escherichia coli* ako zástupcovia gram-negatívnych baktérii. Ďalej boli použité kmene kvasiniek *Candida glabrata* a *Saccharomyces cerevisiae*.

Práca s mikrobiálnymi kultúrami prebiehala v sterilnom boxe Airstream a kultúry boli očkované do kvapalných a tuhých médií. Pred kultiváciu mikroorganizmov boli kultivačné médiá vysterilizované v tlakovom hrnci pri teplote 120 °C na 30 minút. Kultivácia v kvapalnom médiu prebiehala v 100 ml Erlemeyerových bankách, pričom mikrobiálna kultúra bola do kvapalného média zaočkovaná z pevného média. Inkubácia takto pripravených tuhých aj kvapalných médií prebiehala pri 30 °C po dobu 24 hodín.

4.5.1 Príprava kultivačných médií

Na prípravu kvapalného média pre bakteriálne kultúry bolo použité živné médium Nutrient Broth w/1% peptone (NB), so zložením:

Nutrient Brot	25 g/l
---------------	--------

Príprava prebiehala rozpustením požadovaného množstva NB pre prípravu potrebného objemu kultivačného média. Po dôkladnom premiešaní bol roztok sterilizovaný v tlakovom hrnci.

Pre prípravu tuhého kultivačného média bol navyše do roztoku pridaný agar v množstve 20 g/l. Na prípravu 100 ml tuhého kultivačného média (6-8 Petriho misiek) bolo teda potrebné rozpustiť 2,5 g NB a 2 g agaru v 100 ml destilovanej vody. Po sterilizácii v tlakovom hrnci bol ešte horúci roztok vyliaty do Petriho misiek v sterilnom boxe, kde sa nechal 20 minút tuhnúť. Následne boli takto pripravené Petriho misky prelepené parafilmom, aby sa zabránilo prípadnej kontaminácii živného média cudzorodými baktériami. Takto pripravené Petriho misky boli potom skladované obrátené hore dnom v chladničke.

Pre prípravu kvapalného média pre kvasinkové kultúry bolo použité živné médium Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD), so zložením

Yeast Extract	10 g/l
Peptone	20 g/l
Dextrose	20 g/l

Na prípravu 100 ml média bol rozpustený 1 g kvasinkového extraktu, 2 g peptónu a 2 g dextrózy v 100 ml vody. Po dôkladnom premiešaní bol roztok sterilizovaný v tlakovom hrnci.

Pre prípravu tuhého kultivačného média bol k roztoku YPD pridaný agar, v množstve 20 g/l. Na prípravu 100 ml tuhého kultivačného média bolo teda použitých 100 ml roztoku YPD, ku ktorému boli pridané 2 g agaru. Vzniknutý roztok bol sterilizovaný v tlakovom hrnci a následne za horúca vylievaný do Petriho misiek v sterilnom boxe, kde sa nechal 20 minút tuhnúť. Následne boli takto pripravené Petriho misky prelepené parafilmom, aby sa zabránilo prípadnej kontaminácii živného média cudzorodými baktériami. Takto pripravené Petriho misky boli potom skladované obrátené hore dnom v chladničke.

4.6 Stanovenie antimikrobiálnej aktivity látok

Antimikrobiálna aktivita bola stanovená pomocou jamkovej difúznej metódy na tuhom agarovom kultivačnom médiu. Stanovenie prebiehalo pre vzorky lignínov L_R, AgSiL_R, AgL_R-1 a AgL_R-2 .

Úprava vzoriek lignínov pre testovanie antibakteriálnych vlastností

Vzorky boli pripravené v Eppendorf ampulkách rozsuspendovaním pomocou vortexu v destilovanej sterilnej vode. Boli pripravené suspenzie vzoriek v koncentráciách 1250 a 2500 ppm. Tieto vzorky boli použité ihneď po ich príprave a pred vyliatím boli znovu vortexované.

4.6.1 Jamková difúzna metóda

Na Petriho misky s tuhým médiom NB pre baktérie alebo YPD pre kvasinky bolo napipetovaných 100 μl tekutého média s obsahom danej mikrobiálnej kultúry. Následne bola napipetovaná kvapka rozotretá sterilnou hokejkou dôkladne po celom povrchu agarovej platničky. Po rozotretí boli misky ponechané cca 20 minút stáť. Následne boli do Petriho misiek pomocou sterilného skleného korkovrtu vyrezané 4 jamky. Do jednej jamky bolo vždy pipetovaných 100 μl čistého rozpúšťadla. Do zvyšných troch jamiek bolo pipetovaných 100 μl vzorky alebo bola rozsupendovaná vzorka vyliata do jamky priamo z Eppendorf ampulky. Pre každú kultúru a riedenie bol postup zopakovaný dvakrát. Pripravené Petriho misky boli potom inkubované pri 37 °C po dobu 24 hodín. Po inkubácii bola zmeraná veľkosť inhibičných zón a zhotovená fotodokumentácia jednotlivých Petriho misiek.

4.7 Analýza vzoriek

4.7.1 Elementárna analýza

Elementárne zloženie vzorky lignínu L_F bolo zistené pomocou CHNS analyzátora Euro Vector EA 3000. Vzorky boli uzavreté do cínových kapsúl po 0,5 – 1,5 mg a boli umiestnené do spaľovacej pece pri 980 °C s kyslíkom ako spaľovacím plynom a héliom ako nosným plynom. Elementárne zloženie bolo určené pomocou tepelne vodivostného detektora (TDC). Kalibračné krivky C, H, N a S boli zmerané pre štandardizačnú vzorku sulfanilamidu. Percentuálne zastúpenie kyslíka bolo vypočítané z rozdielu zastúpenia CHPS a popola vo vzorke po stanovení obsahu popola. [46]

4.7.2 Infračervená spektrometria

Infračervené spektrum vzoriek bolo zmerané infračervenou spektroskopiou s Fourierovou transformáciou meraním na ATR diamantovom kryštáli pomocou spektrometra Nicolet i550 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Malé množstvo vysušenej vzorky bolo umiestnené na ATR kryštál. ATR spektrá boli potom zaznamenávané v rozmedzí 4000 – 400 cm^{-1} pri rozlíšení 8 cm^{-1} a priemerne 32 scanoch. [46]

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 Porovnanie izolácie lignínu z hroznových výliskov pomocou konvenčnej laboratórnej aparatury a v reaktore.

Bol skúmaný rozdiel vo výťažnosti medzi izoláciou soda lignínu v reakčnej fľaši a v hydrotermálnom autokláve z hroznových výliskov. Izoláciou lignínu v reakčnej fľaši bola dosiahnutá výťažnosť 16,79 g soda lignínu na 100 g hroznových výliskov (16,79 %). Tento spôsob izolácie bol však časovo veľmi náročný a reakčnú zmes bolo potrebné neustále sledovať kvôli častému peneniu. Časť reagujúcej zmesi kvôli peneniu dostala do olejového kúpeľa, ktorý začal búrlivo vriť a znížila sa jeho teplota. Takto kontaminovaný olej nebolo pre ďalšiu izoláciu možné použiť. Zároveň k dochádzalo k odparovaniu vody zo zmesi, čo zvyšovalo koncentráciu NaOH, čo mohlo viesť k degradácii časti lignínu. Metóda bola kvôli nízkej výťažnosti a vysokej časovej náročnosti nahradená metódou izolácie lignínu pomocou hydrotermálneho autoklávu.

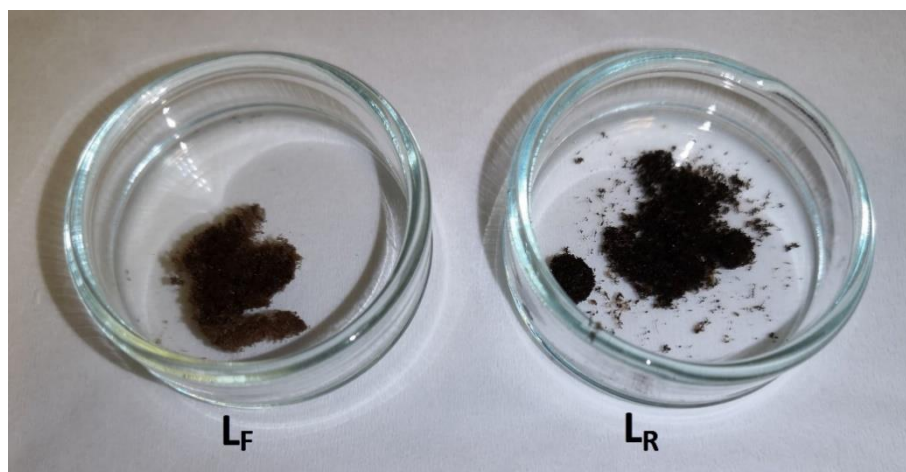
Kvôli nízkej efektívnosti izolácie lignínu v reakčnej fľaši bol v spolupráci so spoločnosťou ENSECO s.r.o., Nitra, Slovensko navrhnutý hydrotermálny autokláv (Obr. 8), ktorý je schopný udržať tlak do 10 MPa, vydrží vysoké teploty a zároveň nereaguje s reakčnou zmesou. Z dôvodu vysokých teplôt nebolo možné použiť plast, pretože by sa pri 110 °C a vysokom tlaku deformoval. Preto bola použitá antikorová oceľ. Ako tesnenie bola použitá teflónová guma, taktiež kvôli vysokej tepelnej odolnosti. V tomto hydrotermálnom autokláve bolo potom možné dosiahnuť výťažnosť až 36,35 g soda lignínu na 100 g hroznových výliskov (36,35 %), čo je viac ako dvojnásobná výťažnosť oproti izolácii v reakčnej fľaši. Navyše nie je potrebná prítomnosť počas priebehu izolácie. Jedinou nevýhodou je, že reaktor pozostáva z pomerne hrubých kusov antikorovej ocele – až 20 mm hrubá obruba – kvôli čomu je potrebné ho po dokončení izolácie dlho chladiť. Zároveň je pomerne ťažký, preto sa s ním obtiažne manipuluje.

Výsledky oboch izolácií aj s elementárnou analýzou vzorky L_F ukazuje Tabuľka 2. Elementárne zloženie vzorky L_R nebolo stanovené z časových dôvodov. Na Obr. 9 sú uvedené vzorky L_F a L_R pre vizuálne porovnanie. Vzorky sa od seba odlišujú farebne aj štruktúrne. Vzorka lignínu L_F má vlákňitú štruktúru, zatiaľ čo vzorka L_R má štruktúru práškovú.

Tabuľka 2 Výťažnosť, elementárna analýza a stanovenie popola

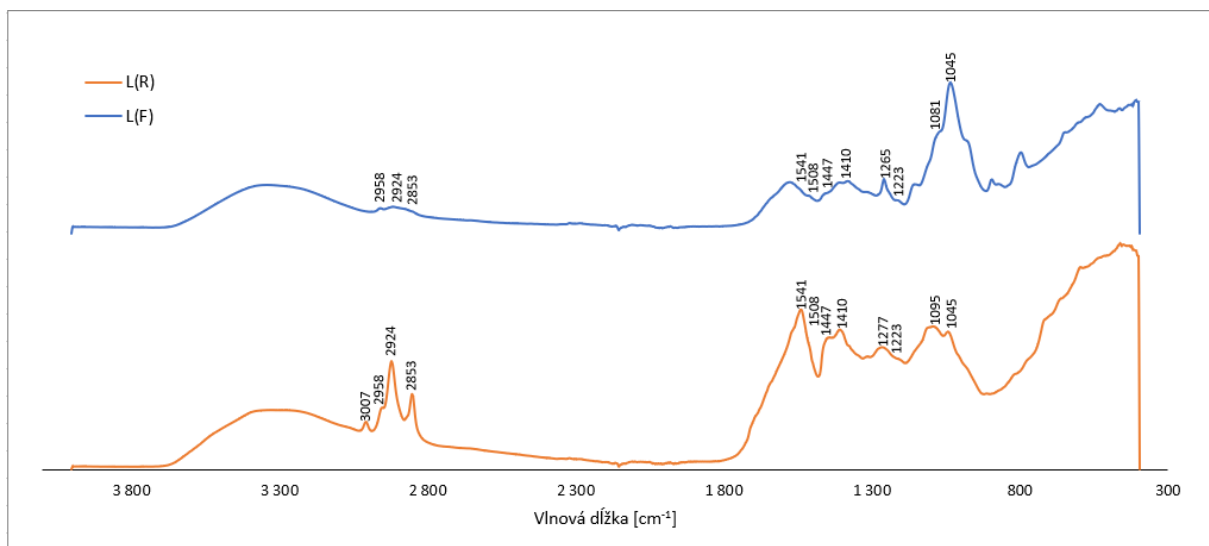
Vzorka	Hmotnosť na 100 g [g]	Výťažnosť [%]	Obsah [%]					Popol
			C	H	N	O	S	
L _F	16,79	16,79	41,3	8,1	2,6	27,4	0	20,7
L _R	36,35	36,35	n	n	n	n	n	n

n- nebolo stanovené



Obr. 9 Výsledné vzorky L_F a L_R

Štruktúra lignínu bola určená pomocou infračervenej spektrometrie s Fourierovou transformáciou (FTIR). Bolo preukázané, že oba ligníny, L_F aj L_R, sú alifaticko-aromatické polyméry. Infračervené spektrum vzoriek L_F aj L_R je uvedené na Obr. 10. Obe vzorky lignínov vytvárali vibrácie pret'ahovania väzieb C – H na aromatických jadrách v rozmedzí 3 070 – 3 010 cm⁻¹, zároveň s deformačnými vibráciami C – H v rozmedzí 900 – 820 cm⁻¹. To, že vzorky sú zároveň alifatické preukazujú vibrácie v rozmedzí 3 000 – 2800 cm⁻¹, kde vlnové dĺžky 2924 cm⁻¹ a 2853 cm⁻¹ sú charakteristické pre kmity C – H väzieb v CH₂ skupinách. Vlnová dĺžka 2958 určuje vibrácie v CH₃ väzbách. Vlnové dĺžky 1541 cm⁻¹, 1508 cm⁻¹ a 1447 cm⁻¹ indikujú prítomnosť aromatického kruhu vo vzorke. Vlnové dĺžky 1265 cm⁻¹ a 1277 cm⁻¹ sú typické pre C – O väzbu karbonylov (~1280 cm⁻¹). Vlnová dĺžka 1223 cm⁻¹ je charakteristická pre vibrácie C-C, C-O a C=O valenčné (stretching) väzby v aromatickom G kruhu lignínu. Vibrácie pri 1081 cm⁻¹ a 1095 cm⁻¹ charakterizujú C – O strech väzby sekundárnych alkoholov a alifatických eterov. Najvyšší pík v spektre L_F, ktorý sa nachádza aj v spektre L_R pri vlnovej dĺžke 1045 cm⁻¹ je charakteristický pre C-O väzby primárnych alkoholov, čo indikuje kontamináciu polysacharidmi. Pre vzorku lignínu izolovaného v reakčnej fľaši je daný pík najvyšší, čo znamená, že je polysacharidmi do značnej miery kontaminovaný. Spektrá boli vyhodnotené podľa literatúry. [46] [47]



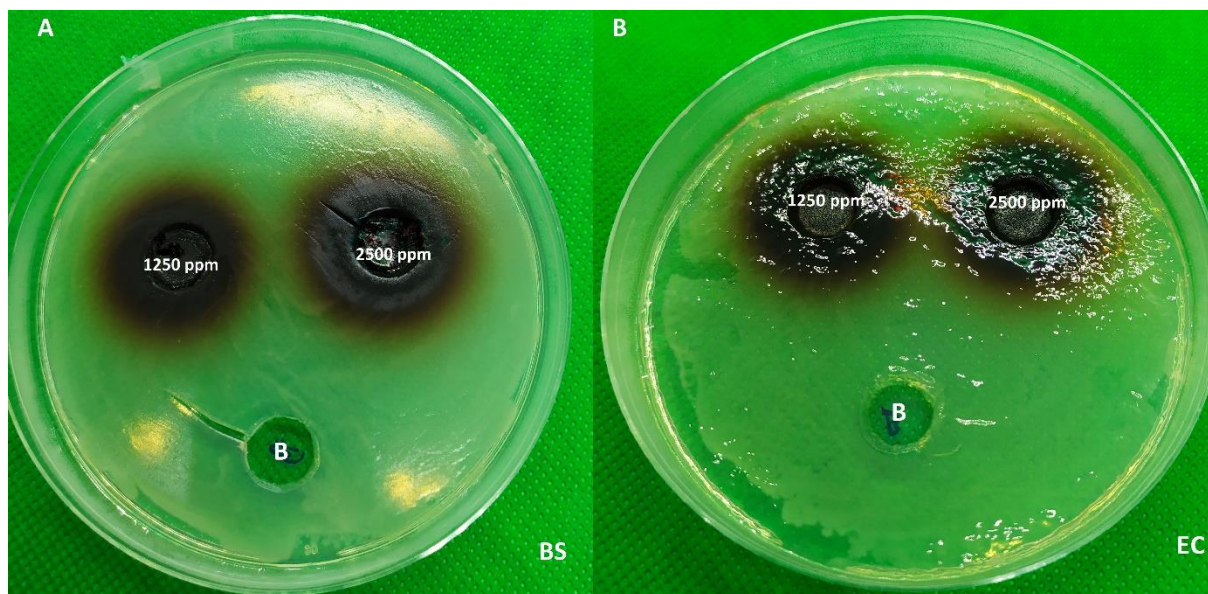
Obr. 10 Infračervené spektrum vzoriek L_F a L_R

Podľa tohto experimentu je efektívnejšou metódou pre izoláciu soda lignínu z hroznových výliskov metóda pomocou hydrotermálneho autoklávu, pretože je možné vyizolovať väčšie množstvo materiálu a to jednoduchším spôsobom bez nutnej neustálej asistencie operátora. Táto metóda má omnoho vyššiu výťažnosť, je menej časovo náročná a lignín, ktorý je pomocou nej izolovaný je čistejší. Z tohto dôvodu bola vzorka L_R použitá pre všetky ďalšie postupy.

5.2 Antibakteriálna účinnosť izolovaného a modifikovaného lignínu

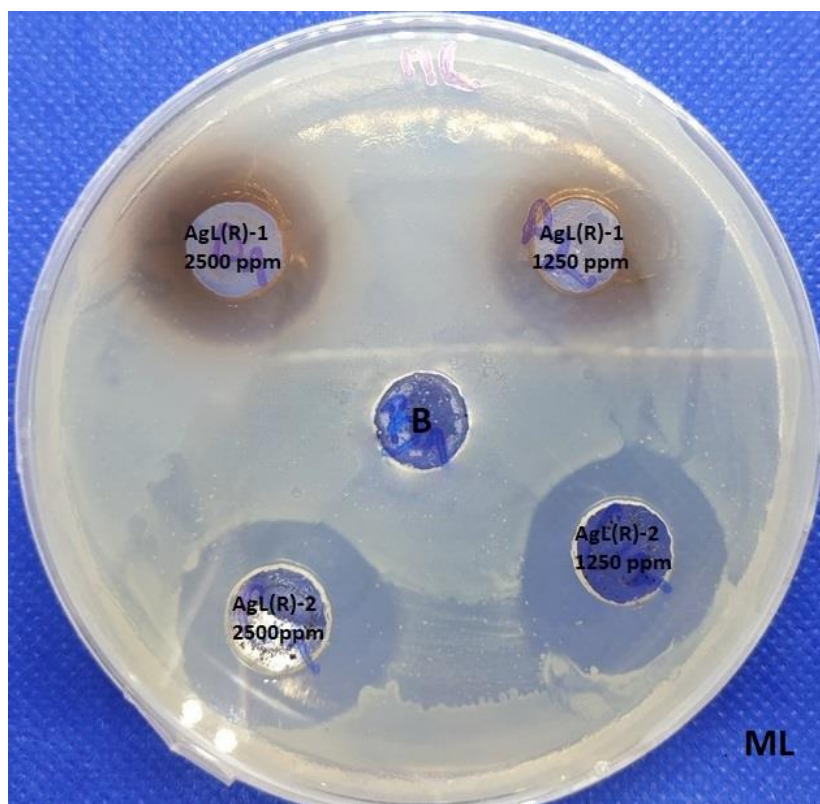
Antimikrobiálna aktivita bola stanovená pre 4 vzorky: soda lignín (L_R), komplex oxid kremičitý/soda lignín s nanočasticami striebra ($AgSiL_R$) a komplexy soda lignínu s časticami striebra (AgL_R -1, AgL_R -2). Stanovenie prebiehalo jamkovou difúznou metódou a pre každý mikroorganizmus bolo stanovenie zopakované dvakrát. Po zmeraní veľkostí inhibičných zón boli výsledky zaznamenané do tabuliek 3-6. Pri žiadnej zo vzoriek neboli zaznamenané antimikrobiálne vlastnosti voči kvasinkám.

Vzorka soda lignínu izolovaného pomocou hydrotermálneho reaktora (L_R) pri jamkovej difúznej metóde tvorila inhibičné zóny pre *E. coli* 1,5 mm pri koncentrácii 2500 ppm a *Bacillus subtilis* 1,8 mm pri rovnakej koncentrácii (Obr. 11, A). Pri opakovaných skúškach však k tvorbe inhibičných zón nedošlo, preto boli skúšky považované za negatívne. Pre vzorku $AgSiL_R$ nevznikla inhibičná zóna pre žiadny zo skúmaných mikroorganizmov (Obr. 11, B). Vo výskume vedenom Lukaszom Klapiszewskim mal takto modifikovaný lignín antibakteriálne vlastnosti bakteriálnym kmeňom gram-pozitívnych aj gram-negatívnych baktérii. Skutočnosť, že mnou vytvorený komplex nemal antibakteriálne vlastnosti môže byť spôsobená použitým oxidom kremičitým. V článku bol použitý oxid kremičitý s veľmi veľkým povrchom, ktorý som nemal k dispozícii a bol modifikovaný iným silanom. Neboli známe ani pomery v akých sa látky pridávali počas modifikácie lignínu či oxidu kremičitého, vďaka čomu mohlo tiež dôjsť k chybe. Zároveň nebol vzniknutý komplex z časových dôvodov analyzovaný, takže je možné, že striebro nebolo efektívne naviazané na povrchu lignínu. [35]



Obr. 11 Antimikrobiálne testy vzoriek L_R (A – pozitívna vzorka na BS) a $AgSiL_R$ (B)

Najlepšie antimikrobiálne vlastnosti vykazuje vzorka AgL_R -2 (Obr. 12), ktorá pôsobila antibakteriálne pre všetky použité bakteriálne druhy, ďalej AgL_R -1 (Obr. 12), ktorá pôsobila antimikrobiálne voči druhom *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* a *E. coli*. Výsledky antimikrobiálnych testov sú uvedené v tabuľkách 3 – 6.



Obr. 12 Antimikrobiálny test pre vzorky AgL_R -1 a AgL_R -2

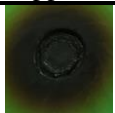
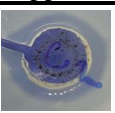
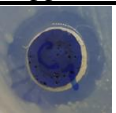
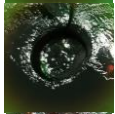
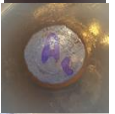
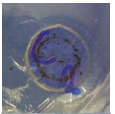
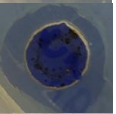
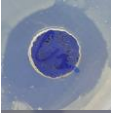
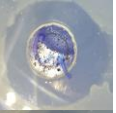
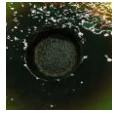
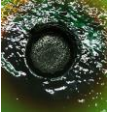
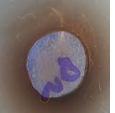
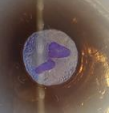
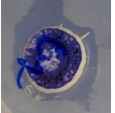
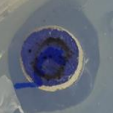
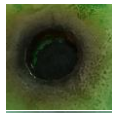
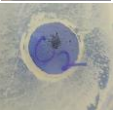
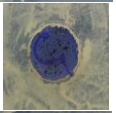
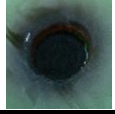
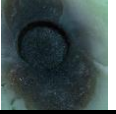
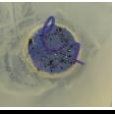
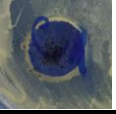
Tabuľka 3 Výsledky antimikrobiálnych testov pre koncentráciu vzoriek 2500 ppm

Gram-poz.	<i>Bacillus subtilis</i>			<i>Micrococcus luteus</i>		
Vzorka	1	2	priemerná hodnota	1	2	Priemerná hodnota
L _R	1,8	-	N	-	-	N
AgSiL _R	-	-	N	-	-	N
AgL _R -1	0,9	0,8	0,8	5,3	4,8	5,0
AgL _R -2	3,5	3,7	3,6	6,0	5,6	5,8
Gram-neg.	<i>Escherichia coli</i>			<i>Serratia marcescens</i>		
L _R	1,5	-	N	-	-	N
AgSiL _R	-	-	N	-	-	N
AgL _R -1	1,0	1,5	1,2	-	-	N
AgL _R -2	3,0	3,8	3,4	3,7	3,3	3,5
Kvasinky	<i>Candida glabrata</i>			<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
L _R	-	-	N	-	-	N
AgSiL _R	-	-	N	-	-	N
AgL _R -1	-	-	N	-	-	N
AgL _R -2	-	-	N	-	-	N

Tabuľka 4 Výsledky antimikrobiálnych testov pre koncentráciu vzoriek 1250 ppm

Gram-poz.	<i>Bacillus subtilis</i>			<i>Micrococcus luteus</i>		
Vzorka	1	2	preiomer	1	2	priemer
L _R	-	-	N	-	-	N
AgSiL _R	-	-	N	-	-	N
AgL _R -1	-	-	N	4,3	4,4	4,3
AgL _R -2	2,4	2,3	2,3	5,3	5,0	5,1
Gram-neg.	<i>Escherichia coli</i>			<i>Serratia marcescens</i>		
L _R	-	-	N	-	-	N
AgSiL _R	-	-	N	-	-	N
AgL _R -1	-	-	N	-	-	N
AgL _R -2	2,0	2,2	2,2	2,3	2,2	2,2
Kvasinky	<i>Candida glabrata</i>			<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
L _R	-	-	N	-	-	N
AgSiL _R	-	-	N	-	-	N
AgL _R -1	-	-	N	-	-	N
AgL _R -2	-	-	N	-	-	N

 Tabuľka 5 Jamková difúzna metóda vzoriek L_R, AgL_R-1 a AgL_R-2

Vzorka Mikroorganizmus	L _R		AgL _R -1		AgL _R -2	
	1250 ppm	2500 ppm	1250 ppm	2500 ppm	1250 ppm	2500 ppm
<i>Bacillus subtilis</i>						
<i>Serratia marcescens</i>						
<i>Micrococcus luteus</i>						
<i>Escherichia coli</i>						
<i>Saccharomyces cer.</i>						
<i>Candida glabrata</i>						

6 ZÁVER

V tejto bakalárskej práci bola študovaná efektivita izolácie lignínu z hroznových výliskov konvenčnou laboratórnou metódou v reakčnej fľaši a pomocou hydrotermálneho autoklávu. Izolácia soda lignínu konvenčnou laboratórnou metódou je vysoko neefektívna kvôli vysokej časovej náročnosti a nízkej efektivite. Výťažnosť tohto procesu je 16,79 g soda lignínu na 100 g hroznových výliskov, čo je veľmi nízka výťažnosť v porovnaní s výťažnosťou izolácie pomocou hydrotermálneho autoklávu, ktorá je 36,35 g na 100 g výliskov. Efektivita hydrotermálneho autoklávu je teda viac ako dvojnásobná oproti reakčnej fľaši. Navyše sa takto získaný lignín javí ako čistejší, i keď štruktúru lignínu izolovaného v tejto bakalárskej práci bude ešte treba hlbšie preštudovať a stanoviť napríklad metódou NMR a SEC-MALLS.

V tejto práci boli úspešne pripravené komplexy lignínu a častíc striebra. Antimikrobiálne vlastnosti boli skúmané pre nemodifikovaný soda lignín (L_R) a pre vzorky lignínu modifikovaného časticami striebra ($AgSiL_R$, AgL_R-1 a AgL_R-2), pričom najvyššiu antimikrobiálnu aktivitu vykazovala vzorka lignínu modifikovaného striebornými časticami získanými metódou 2 podľa protokolu od Angela Pinedo-Flores a kol. (AgL_R-2). [45] Táto vzorka pôsobila antibakteriálne proti všetkým použitým gram-pozitívnym a gram-negatívnym bakteriálnym kultúram už pri koncentrácii 1250 ppm. Vzorka AgL_R-1 bola pri koncentrácii 1250 ppm aktívna len voči *M. luteus*. Pri zvýšení jej koncentrácie na 2500 ppm bola jej antibakteriálna aktivita zvýšená ale s výnimkou *S. marcescens*. [35] Vzorky L_R a $AgSiL_R$ nemali žiadne antimikrobiálne vlastnosti. Žiadna z testovaných vzoriek nepôsobila antimikrobiálne voči kvasinkám.

Pre ďalší výskum by bolo zaujímavé stanoviť stabilitu lignín/striebro komplexov za rôznych podmienok a pokúsiť sa ocharakterizovať spôsob tvorby komplexu a jeho možnú toxicitu na bunky.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] ZACHAROF, Myrto-Panagiota. Grape Winery Waste as Feedstock for Bioconversions: Applying the Biorefinery Concept. *Waste and Biomass Valorization* [online]. 2017, **8**(4), 1011-1025 [cit. 2020-07-22]. DOI: 10.1007/s12649-016-9674-2. ISSN 1877-2641. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12649-016-9674-2>
- [2] MAICAS, Sergi a José Juan MATEO. Sustainability of Wine Production. *Sustainability* [online]. 2020, 12(2) [cit. 2020-07-22]. DOI: 10.3390/su12020559. ISSN 2071-1050. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2071-1050/12/2/559>
- [3] PAVLOUŠEK, Pavel a Pavla BUREŠOVÁ. *Vše, co byste měli vědět o víně: --a nemáte se koho zeptat* Praha: Grada, 2015. ISBN 978-80-247-4351-6.
- [4] *Vína z Moravy, vína z Čech* [online]. Brno: Vinařský fond, 2004 [cit. 2020-07-18]. Dostupné z: <https://www.wineofczechrepublic.cz>
- [5] Réva vinná, réva skalní, réva pobřežní... ale která je ta pravá? In: *Www.hledamvino.cz* [online]. [cit. 2020-07-22]. Dostupné z: <https://www.hledamvino.cz/rev-a-vinna-eva-skalni-eva-pobrezni-ktera-ta-prava/>
- [6] HATAKEYAMA, Hyoe a Tatsuko HATAKEYAMA. Lignin Structure, Properties, and Applications. ABE, Akihiro, Karel DUSEK a Shiro KOBAYASHI, ed. *Biopolymers* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010, 2009-8-26, s. 1-63 [cit. 2019-04-17]. 8 Advances in Polymer Science. DOI: 10.1007/12_2009_12. ISBN 978-3-642-13629-0. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/12_2009_12
- [7] NASEEM, Amina, Shazia TABASUM, Khalid Mahmood ZIA, Mohammad ZUBER, Muhammad ALI a Aqdas NOREEN. Lignin-derivatives based polymers, blends and composites: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2016, **93**, 296-313 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.08.030. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813016311692>
- [8] VANHOLME, Ruben, Brecht DEMEDTS, Kris MORREEL, John RALPH a Wout BOERJAN. Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiology* [online]. 2010, **153**(3), 895-905 [cit. 2019-12-18]. DOI: 10.1104/pp.110.155119. ISSN 0032-0889. Dostupné z: <http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.110.155119>
- [9] YEDRO, Florencia M., Juan GARCÍA-SERNA, Danilo A. CANTERO, Francisco SOBRÓN a M. José COCERO. Hydrothermal fractionation of grape seeds in subcritical water to produce oil extract, sugars and lignin. *Catalysis Today* [online]. 2015, **257**, 160-168 [cit. 2020-07-22]. DOI: 10.1016/j.cattod.2014.07.053. ISSN 09205861. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092058611400577X>

- [10] Sarkanen K.V., Ludwig C.H. Lignins occurrence, formation, structure and reactions. John Wiley & Sons, Inc. New York 1971: 51, 433- 478, 697, 729-732.
- [11] GREGOROVA, Adriana. Lignin: Antibacterial Properties. Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials [online]. Taylor & Francis, 2015, 2016-01-27, s. 4328-4334 [cit. 2019-12-18]. DOI: 10.1081/E-EBPP-120050006. ISBN 1-4398-9879-0. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1081/E-EBPP-120050006>
- [12] Encyclopedia of Polymer Science and Technology [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2002 [cit. 2019-12-18]. ISBN 0471440264.
- [13] FREDHEIM, Guro E. a Bjørn E. CHRISTENSEN. Polyelectrolyte Complexes: Interactions between Lignosulfonate and Chitosan. *Biomacromolecules* [online]. 2003, **4**(2), 232-239 [cit. 2020-07-23]. DOI: 10.1021/bm020091n. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm020091n>
- [14] ABDULKHANI, Ali, Elaheh AMIRI, Aghil SHARIFZADEH, Sahab HEDJAZI a Peyman ALIZADEH. Concurrent production of sodium lignosulfonate and ethanol from bagasse spent liquor. *Journal of Environmental Management* [online]. 2019, **231**, 819-824 [cit. 2020-07-23]. DOI: 10.1016/j.jenvman.2018.10.032. ISSN 03014797. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301479718311666>
- [15] HU, Jianjun, Quanguo ZHANG a Duu-Jong LEE. Kraft lignin biorefinery: A perspective. *Bioresource Technology* [online]. 2018, **247**, 1181-1183 [cit. 2020-07-23]. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.08.169. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852417314839>
- [16] Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2000 [cit. 2019-12-18]. ISBN 0471238961.
- [17] ZHAO, Jian, Xuezhi LI, Yinbo QU a Peiji GAO. Xylanase pretreatment leads to enhanced soda pulping of wheat straw. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2002, **30**(6), 734-740 [cit. 2019-12-18]. DOI: 10.1016/S0141-0229(02)00050-9. ISSN 01410229. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022902000509>
- [18] CULEBRAS, Mario, Anne BEAUCAMP, Yan WANG, Manuel M. CLAUSS, Erik FRANK a Maurice N. COLLINS. Biobased Structurally Compatible Polymer Blends Based on Lignin and Thermoplastic Elastomer Polyurethane as Carbon Fiber Precursors. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* [online]. 2018, **6**(7), 8816-8825 [cit. 2019-09-29]. DOI: 10.1021/acssuschemeng.8b01170. ISSN 2168-0485. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acssuschemeng.8b01170>
- [19] Sameni, J., Jaffer, S. A., & Sain, M. (2018). Thermal and mechanical properties of soda lignin/HDPE blends. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*. doi:10.1016/j.compositesa.2018.09.016
- [20] Xing, Q., Ruch, D., Dubois, P., Wu, L., & Wang, W.-J. (2017). Biodegradable and High-Performance Poly(butylene adipate-co-terephthalate)–Lignin UV-Blocking Films.

ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 5(11), 10342–10351.

doi:10.1021/acssuschemeng.7b02370

- [21] GAO, Yiwei, Wangda QU, Yang LIU, Hui HU, Eric COCHRAN a Xianglan BAI. Agricultural residue-derived lignin as the filler of polylactic acid composites and the effect of lignin purity on the composite performance. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2019, **136**(35) [cit. 2019-09-29]. DOI: 10.1002/app.47915. ISSN 0021-8995. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/app.47915>
- [22] YEO, Jun-Seok, Ji-Hoon LEE a Seok-Ho HWANG. Effects of lignin on the volume shrinkage and mechanical properties of a styrene/unsaturated polyester/lignin ternary composite system. *Composites Part B: Engineering* [online]. 2017, **130**, 167-173 [cit. 2019-09-29]. DOI: 10.1016/j.compositesb.2017.07.084. ISSN 13598368. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359836817303268>
- [23] Zhang, Y., Wang, J., Fang, X., Liao, J., Zhou, X., Zhou, S., ... Peng, S. (2019). High solid content production of environmentally benign ultra-thin lignin-based polyurethane films: Plasticization and degradation. *Polymer*, 178, 121572. doi:10.1016/j.polymer.2019.121572
- [24] Song, Y., Zong, X., Wang, N., Yan, N., Shan, X., & Li, J. (2018). Preparation of γ -Divinyl-3-Aminopropyltriethoxysilane Modified Lignin and Its Application in Flame Retardant Poly(lactic acid). *Materials*, 11(9), 1505. doi:10.3390/ma11091505
- [25] GARCÍA, Danny E., Johannes GAVINO, Danilo ESCOBAR a Rodrigo A. CANCINO. Maleinated polyflavonoids and lignin as functional additives for three kinds of thermoplastics. *Iranian Polymer Journal* [online]. 2017, **26**(4), 295-304 [cit. 2019-09-29]. DOI: 10.1007/s13726-017-0519-z. ISSN 1026-1265. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13726-017-0519-z>
- [26] Graupner, N., Fischer, H., Ziegmann, G., & Müssig, J. (2014). Improvement and analysis of fibre/matrix adhesion of regenerated cellulose fibre reinforced PP-, MAPP- and PLA-composites by the use of Eucalyptus globulus lignin. *Composites Part B: Engineering*, 66, 117–125. doi:10.1016/j.compositesb.2014.05.002
- [27] CIOBANU, C., M. UNGUREANU, L. IGNAT, D. UNGUREANU a V.I. POPA. Properties of lignin–polyurethane films prepared by casting method. *Industrial Crops and Products* [online]. 2004, **20**(2), 231-241 [cit. 2019-12-18]. DOI: 10.1016/j.indcrop.2004.04.024. ISSN 09266690. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669004000755>
- [28] HU, Thomas Q., ed. *Chemical Modification, Properties, and Usage of Lignin* [online]. Boston, MA: Springer US, 2002 [cit. 2019-12-18]. DOI: 10.1007/978-1-4615-0643-0. ISBN 978-1-4613-5173-3.

- [29] Fengel D., Wegener G. Wood chemistry, ultrastructure, reactions. Walter de Gruyter 1984: 132-181,305.
- [30] ESPINOZA-ACOSTA, José Luis, Patricia Isabel TORRES-CHÁVEZ, Benjamín RAMÍREZ-WONG, Carmen María LÓPEZ-SAIZ a Beatriz MONTAÑO-LEYVA. Antioxidant, Antimicrobial, and Antimutagenic Properties of Technical Lignins and Their Applications. *BioResources*[online]. 2016, **11**(2), 5452-5481 [cit. 2019-12-18]. DOI: 10.15376/biores.11.2. ISSN 1930-2126. Dostupné z: <http://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/8447>
- [31] BUCKLEY, John D. a Danny D. EDIE. *Carbon-carbon materials and composites*. Park Ridge, N.J., U.S.A.: Noyes Publications, c1993. ISBN 0-8155-1324-0.
- [32] HARRIS, J. Milton, Nancy E. MARTIN a Marlene MODI. Pegylation. *Clinical Pharmacokinetics*[online]. 2001, **40**(7), 539-551 [cit. 2019-12-18]. DOI: 10.2165/00003088-200140070-00005. ISSN 0312-5963. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.2165/00003088-200140070-00005>
- [33] PERKINS, Kedar M., Chetali GUPTA, Emily N. CHARLESON a Newell R. WASHBURN. Surfactant properties of PEGylated lignins: Anomalous interfacial activities at low grafting density. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*[online]. 2017, **530**, 200-208 [cit. 2019-12-18]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2017.07.061. ISSN 09277757. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775717307203>
- [34] LI, Man, Xingxing JIANG, Dan WANG, Zeyu XU a Minghui YANG. In situ reduction of silver nanoparticles in the lignin based hydrogel for enhanced antibacterial application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*[online]. 2019, **177**, 370-376 [cit. 2019-12-18]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.02.029. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776519301110>
- [35] KLAPISZEWSKI, Łukasz, Tomasz RZEMIENIECKI, Magdalena KRAWCZYK, et al. Kraft lignin/silica–AgNPs as a functional material with antibacterial activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*[online]. 2015, **134**, 220-228 [cit. 2019-12-18]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.06.056. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776515300278>
- [36] SEDLÁČEK, Ivo. Taxonomie prokaryot. Brno: Masarykova univerzita, 2006 [cit. 2020-07-14]. ISBN 80-210-4207-9
- [37] MOSIO, Petra. Atlas bakterií. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2012 [cit. 2020-07-14]. ISBN 978-80-7395-467-3

- [38] HONG, Huynh A., Reena KHANEJA, Nguyen M.K. TAM, et al. *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract. *Research in Microbiology* [online]. 2009, **160**(2), 134-143 [cit. 2020-07-14]. DOI: 10.1016/j.resmic.2008.11.002. ISSN
- [39] HEJAZI, A. a F. R. FALKINER. *Serratia marcescens*. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 1997, 46(11), 903-912 [cit. 2020-07-14]. DOI: 10.1099/00222615-46-11-903. ISSN 0022-2615. Dostupné z: <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/00222615-4611-903>
- [40] FIDEL, Paul L., Jose A. VAZQUEZ a Jack D. SOBEL. *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Review* [online]. 1999, **12**(1), 80-96 [cit. 2020-07-14]. DOI: 10.1128/CMR.12.1.80. ISSN 1098-6618. Dostupné z: <https://CMR.asm.org/content/12/1/8009232508>. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923250808002027>
- [41] ANOOP, Valar, Sever ROTARU, Philip S. SHWED, Azam F. TAYABALI, George ARVANITAKIS a Jens NIELSEN. Review of current methods for characterizing virulence and pathogenicity potential of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains towards humans. *FEMS Yeast Research* [online]. 2015, **15**(6) [cit. 2020-07-14]. DOI: 10.1093/femsyr/fov057. ISSN 1567-1364. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1093/femsyr/fov057>
- [42] LINTINEN, Kalle, Sanna LUIRO, Patrícia FIGUEIREDO, et al. Antimicrobial Colloidal Silver–Lignin Particles via Ion and Solvent Exchange. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* [online]. 2019, **7**(18), 15297-15303 [cit. 2019-12-18]. DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b02498. ISSN 2168-0485. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acssuschemeng.9b02498>
- [43] SVÄRD, Antonia, Rosana MORIANA, Elisabet BRÄNNVALL a Ulrica EDLUND. Rapeseed Straw Biorefinery Process. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* [online]. 2018, **7**(1), 790-801 [cit. 2020-03-25]. DOI: 10.1021/acssuschemeng.8b04420. ISSN 2168-0485. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acssuschemeng.8b04420>
- [44] JESIONOWSKI, Teofil, Filip CIESIELCZYK a Andrzej KRYSZTAFKIEWICZ. Influence of selected alkoxysilanes on dispersive properties and surface chemistry of spherical silica precipitated in emulsion media. *Materials Chemistry and Physics* [online]. 2010, **119**(1-2), 65-74 [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2009.07.034. ISSN 02540584. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0254058409004490>
- [45] PINEDO-FLORES, Angela, Bryan ALCÁZAR a Juan Carlos F RODRIGEZ.REYES. Protocol for the synthesis of silver nanoparticles using sodium

citrate and sodiumborohydride as reducing agents. Lima, 2018. Protokol. Universidad de ingeniería y tecnología - UTEC.

- [46] VOSTREJS, Pavel, Dana ADAMCOVÁ, Magdalena Daria VEVERKOVÁ, et al. Active biodegradable packaging films modified with grape seeds lignin. RSC Advances **In press**.
- [47] SAMMONS, Rhea J., David P. HARPER, Nicole LABBÉ, Joseph J. BOZELL, Thomas ELDER a Timothy G. RIALS. Characterization of Organosolv Lignins using Thermal and FT-IR Spectroscopic Analysis. BioResources2013, **2013**(8), 2752-2767.

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

G	Guaiacyl
S	Syringyl
H	<i>p</i> -hydroxyfenyl
NMR	Nukleárna magnetická rezonancia
HDPE	High density polyethylene
PBAT	Polybutylene adipate terephthalat
PLA	Polylaktát
PCL	Polycaprolactone
PVP	Polyvinylpyrrolidon
NB	Nutritient Brot
YPD	Yeast extrat, peptone, dectrose
FTIR	Infračervená spektrometria s Fourierovou transformáciou
L _F , L _R , AgSiL _R	Vzorky
AgL _R -1, AgL _R -2	