

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2017

Radka Puškárová



# 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

## VYUŽITÍ ANTIMIKROBIÁLNÍCH PRODUKTŮ ŽIVOČIŠNÉHO PŮVODU V KOSMETICE

USE OF ANTIMICROBIAL PRODUCTS OF ANIMAL ORIGIN IN COSMETICS

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Radka Puškárová

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2017

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1114/2016  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Radka Puškárová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie  
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**  
Akademický rok: 2016/17

### Název bakalářské práce:

Využití antimikrobiálních produktů živočišného původu v kosmetice

### Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) přehled a charakterizace živočišných produktů s potenciálním antimikrobiálním účinkem
- 2) příprava a charakterizace extraktů z živočišného materiálu (př. kysané mléčné výrobky)
- 3) enkapsulace extraktů
- 4) testování antimikrobiálního účinku extraktů ve volné a enkapsulované formě

### Termín odevzdání bakalářské práce: 26.5.2017

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

-----  
Radka Puškárová  
student(ka)

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **Abstrakt**

Tato bakalářská práce se zabývá charakterizací a využitím syrovátky v její volné a enkapsulované formě a její aplikací do kosmetického průmyslu. Teoretická část se zaměřuje převážně na charakterizaci syrovátky, hlavně na její antimikrobiální vlastnosti a dále na využití těchto vlastností k aplikaci do kosmetické chemie. Také zde byly popsány metody enkapsulace a charakterizace částic.

V experimentální části byla syrovátka testována na antimikrobiální vlastnosti dvěma různými metodami, dále byla enkapsulována do třech typů částic: liposomů, alginátových a chitosanových částí. U částic byla testována dlouhodobá koloidní stabilita v čase jeden a tři týdny v modelových podmínkách. Na závěr byly připraveny krémy s přídatkem syrovátky. Krémy byly pomocí analytické centrifugace také testovány na sedimentační stabilitu.

## **Klíčová slova:**

Syrovátka, lysozym, laktoferin, kyselina mléčná, enkapsulace, kosmetika

## **Abstract**

The Bachelor thesis deals with characterization of whey in free and encapsulated form and its application to cosmetic industry. The theoretical part is focused on characterization of whey, especially on its antimicrobial properties, and use of this effect in selected cosmetics preparatives. Further, methods of encapsulation and particles characterization were described.

In the experimental part, antimicrobial properties of whey were tested by two different methods. Whey was encapsulated into three different types of particles: liposomes, alginate and chitosan. Long-term colloid stability of particles during one and three weeks of storage in model conditions was tested. Further, particles were added into model skin creams. Long-term sedimentation stability of these emulsions was analyzed by analytical centrifuge.

## **Keywords:**

Whey, lysozyme, lactoferrin, lactic acid, encapsulation, cosmetics

PUŠKÁROVÁ, R. *Využití antimikrobiálních produktů živočišného původu v kosmetice*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. XY s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..

#### PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkanem FCH VUT.

.....

podpis studenta

#### PODĚKOVÁNÍ:

Zde bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za její odborné vedení. Dále bych ráda poděkovala Ing. Viliamu Hlaváčkovi za pomoc a ochotu při práci v laboratoři a také Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za cenné rady, ochotu a hlavně trpělivost při mé práci v laboratoři, na experimentální části a při zpracování výsledků.

# Obsah

1	Úvod	8
2	Teoretická část	9
2.1	Syrovátka	9
2.2	Složení syrovátky	9
2.2.1	Mléčné bílkoviny	9
2.2.2	Bílkoviny v syrovátce	9
2.2.2.1	<i>Aminokyseliny</i>	10
2.2.3	Vitaminy	10
2.2.4	Organické kyseliny	10
2.2.5	Popeloviny	10
2.2.6	Tuky	11
2.2.7	Laktóza	11
2.3	Význam syrovátky	11
2.4	Antimikrobiální účinky syrovátky	12
2.4.1	Laktoferin	12
2.4.2	Laktoperoxidáza	12
2.4.3	Lysozym	12
2.4.4	Kyselina mléčná	12
2.5	Další vybrané přírodní látky s antimikrobiálním účinkem	13
2.5.1	Nisin	13
2.6	Kůže	13
2.6.1	Stavba kůže	13
2.6.1.1	<i>Pokožka</i>	13
2.6.1.2	<i>Škára</i>	13
2.6.1.3	<i>Podkožní vazivo</i>	13
2.6.2	Typy pleti	13
2.6.2.1	<i>Normální pleť</i>	14
2.6.2.2	<i>Smíšená pleť</i>	14
2.6.2.3	<i>Mastná pleť</i>	14
2.6.2.4	<i>Suchá pleť</i>	14
2.7	Syrovátka v kosmetice	14
2.8	Antimikrobiální testy	14
2.8.1	Agarová difúzní metoda	14
2.8.2	Bujónová diluční metoda	15
2.9	Používané testovací mikroorganismy	15

2.9.1	<i>Micrococcus luteus</i> .....	15
2.9.2	<i>Serratia marcescens</i> .....	15
2.10	Metody využívané k izolaci a charakterizaci antimikrobiální složky.....	16
2.10.1	Hartree-Lowryho metoda .....	16
2.10.2	Ultrafiltrace.....	16
2.10.3	SDS-PAGE .....	16
2.10.4	Kapalinová chromatografie HPLC .....	16
2.11	Enkapsulace .....	17
2.11.1.1	<i>Hydrogely</i> .....	18
2.11.1.2	<i>Emulze</i> .....	18
2.11.1.3	<i>Fluidní vrstva</i> .....	18
2.11.1.4	<i>Sprejové sušení a chlazení</i> .....	18
2.11.1.5	<i>Liposomy</i> .....	18
2.12	Enkapsulace v kosmetice .....	19
2.13	Kosmetické emulze.....	19
2.13.1	Stabilita emulzí.....	19
2.13.2	Výroba emulzí .....	19
2.13.3	Analýza emulzí analytickou centrifugace.....	20
3	Cíle práce .....	21
4	Experimentální část.....	22
4.1	Použité chemikálie .....	22
4.2	Použité přístroje a pomůcky.....	22
4.3	Použité materiály .....	23
4.4	Použité mikroorganismy .....	23
4.5	Charakterizace syrovátky.....	23
4.5.1.1	<i>Příprava vzorků na kapalinovou chromatografii</i> .....	23
4.5.2	Stanovení koncentrace sacharidů a kyseliny mléčné pomocí HPLC s RI detekcí	24
4.5.3	Stanovení koncentrace bílkovin .....	24
4.6	Fracionace syrovátkových bílkovin .....	24
4.7	Ultrafiltrace.....	24
4.8	Elektroforéza PAGE-SDS.....	25
4.8.1	Postup pro přípravu roztoků .....	25
4.8.2	Postup pro přípravu polyakrylamidového gelu .....	25
4.8.3	Postup pro přípravu vzorků .....	25
4.8.4	Postup pro provedení elektroforézy.....	25

4.8.5	Postup pro barvení gelu Coomassie brilliantovou modří .....	25
4.9	Antimikrobiální testy .....	26
4.9.1	Kultivace mikroorganismů .....	26
4.9.2	Agarová difúzní metoda .....	26
4.9.3	Bujónová diluční metoda .....	26
4.10	Enkapsulace .....	26
4.10.1	Příprava liposomů .....	26
4.10.2	Příprava alginátových částic .....	26
4.10.3	Příprava chitosanových částic .....	26
4.11	Stanovení enkapsulační účinnosti .....	27
4.12	Stanovení dlouhodobé stability částic .....	27
4.13	Příprava krémů .....	27
4.14	Analýza emulzí pomocí analytické centrifugace .....	27
5	Výsledky a diskuze .....	28
5.1	Charakterizace syrovátky .....	28
5.1.1	Stanovení obsahu sacharidů pomocí HPLC/RI .....	28
5.1.2	Stanovení obsahu kyseliny mléčné .....	28
5.1.3	Stanovení obsahu bílkovin .....	29
5.2	Úprava syrovátky .....	29
5.2.1	Fracionace bílkovin syrovátky .....	29
5.2.2	Charakterizace bílkovin pomocí PAGE-SDS .....	30
5.3	Enkapsulace .....	31
5.3.1	Enkapsulace syrovátky .....	31
5.3.2	Dlouhodobá stabilita připravených částic .....	33
5.4	Příprava kosmetických krémů .....	37
5.4.1	Stanovení stability pomocí analytické centrifugace .....	37
5.5	Antimikrobiální testy .....	40
5.5.1	Antimikrobiální účinek vybraných produktů .....	40
5.5.2	Antimikrobiální účinek lysozymu a nisinu .....	41
5.5.3	Antimikrobiální účinek kyseliny mléčné .....	43
5.5.4	Antimikrobiální účinek syrovátky v různých úpravách .....	43
5.5.5	Antimikrobiální účinek připravených částic a krémů .....	47
6	Závěr .....	48
7	Zdroje .....	50
8	Přílohy .....	53



# 1 ÚVOD

V dnešní době se stále častěji mluví o rezistenci mikroorganismů na řadu antibiotik, antimikrobiálních léčiv a různých prostředků včetně kosmetických. Proto se čím dál tím více objevuje snaha nahradit tyto látky přírodními, popřípadě je zkoumána možnost kombinace těchto přírodních složek s méně účinnými antibiotiky pro opětovné zvýšení jejich antimikrobiálních účinků. Zkoumání těchto přírodních produktů je zaměřeno na možnosti využití jejich pozitivních vlastností v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu.

V této práci se zaměříme na přípravu, stabilizaci a testování antimikrobiálních účinků přírodních látek živočišného původu. Jako hlavní testovaný materiál byla zvolena syrovátka. Jedná se o odpadní produkt při výrobě sýrů, jeho cena je tedy velmi nízká. Dále navíc obsahuje také řadu aktivních látek, které mohou být pro naše tělo a zdraví prospěšné nejen při aplikaci v potravinářském průmyslu, ale rovněž v kosmetice.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Syrovátka

Syrovátka je žlutozelená tekutina, která zůstává po sražení mléka. Je odpadním produktem při výrobě sýrů, tvarohů a kaseinu. Její složení je ovlivněno složením mléka, tepelným zahřátím v pasterizaci, zředěním syrovátky vodou a stupněm fermentace laktózy [1].

Syrovátka obsahuje 0,8–1,1 % dusíkatých látek, tuku 0,3–0,7 %, laktózy 4,5–5 %, kyselinu mléčnou a 0,6–0,8 % popelovin [1].

Sladká syrovátka vzniká při výrobě sýrů, kdy dojde ke sražení bílkovin pomocí enzymového syřidla (pH 5-6). Kyselá syrovátka vzniká při výrobě tvarohu, kdy dochází ke srážení po okyselení (pH nižší než 5,1)[2].

Tabulka 1: Složení sladké a kyselé syrovátky [3]

složka	sladká syrovátka (%)	kyselá syrovátka (%)
sušina	6,0-6,5	5,0-6,0
laktóza	4,5-5,0	3,8-4,3
kyselina mléčná	stopy	až 0,8
tuk	0,05-0,2	0,05-0,2
čistá bílkovina	0,55	0,55
nebílkovinný dusík	0,18	0,18
popeloviny	0,5	0,8

### 2.2 Složení syrovátky

#### 2.2.1 Mléčné bílkoviny

V mléce je nejvýznamnější bílkovinou složkou kasein (80 %), který se sráží pomocí kyselin nebo pomocí syřidla. Dále jsou v mléce ve formě koloidního roztoku přítomny sérové bílkoviny, které pak při zpracování ve velké míře zůstávají v syrovátce [2].

Kasein se vyskytuje ve čtyřech typech. Varianty se od sebe liší chemickou strukturou i vlastnostmi. Některé mohou způsobit i alergii na mléko. Kasein je velmi termostabilní, což znamená, že můžeme mléko vařit, aniž by došlo k jeho sražení [4]. Kasein se v mléce shlukuje do micel. Molekuly kaseinu tak obsahují jak hydrofilní, tak hydrofobní části. Hydrofobní jsou orientovány do středu micel, hydrofilní části se nacházejí na vnějších částech. Sráží se dvěma způsoby: kysele a sladce. Kyselá srážení se využívá pro výrobu tvarohů. Snižováním hodnoty pH dochází k porušení povrchových struktur kaseinových micel, což způsobí jeho denaturaci. Není již rozpustný a tvoří sraženinu. Sladké srážení se využívá pro výrobu sýrů. Je uskutečněno pomocí enzymů syřidel [5].

#### 2.2.2 Bílkoviny v syrovátce

Na obsahu bílkovin v syrovátce se podílí kasein (5,5 - 10 %) a sérové bílkoviny (90 - 94,5 %). V syrovátce zůstává většina sérových bílkovin obsažených v mléce. Obsah závisí na tepelném ošetření mléka a dalších podmínkách výrobního procesu [2]. Díky rozdílnému srážení existují rozdíly ve složení sladké a kyselé syrovátky. Syrovátkové bílkoviny jsou vysoce citlivé na teplo a srážejí se, když jsou vystaveny vysokým teplotám [6].

Sérové bílkoviny bývají rozdělovány na albuminy a globuliny. Kromě nich minoritní podíl tvoří laktoferin, krevní transferin, laktolin, proteosy, laktoperoxidasa a peptony.

Albuminy a globuliny denaturují teplem, peptony a albumózy nendenaturují ani teplem ani působením kyselin. Mezi albuminy se řadí laktalbumin a sérový albumin. Mezi globuliny patří laktoglobulin. Laktoglobulin je malá kulovitá bílkovina přecházející do mléka pravděpodobně z krve. Jeho podíl se pohybuje mezi 50 – 60 %. Je nerozpustný ve vodě a v zředěných kyselinách. Má vysokou nutriční hodnotu, z aminokyselin zde převažuje lysin, valin, cystein a cystin. K denuraci u něj dochází už při 65 °C a způsobuje tak větší vaznost vody. Maximální koagulace nastává při pH = 4,78 – 4,8. Pro svůj ochranný charakter se označuje také jako imunoglobulin.  $\alpha$ -laktalbumin je malý, kyselý, vázající  $\text{Ca}^{2+}$  protein. Jeho podíl v syrovátce je asi 25 %. Je rozpustný ve vodě, slabých zásadách a kyselinách a dokonce i v roztocích solí. Úplného vysrážení lze dosáhnout při pH = 4,75 – 4,8 a teplotě nad 72 °C. Mléčný albumin je podobný s vaječným a krevním albuminem, obsahuje stejné aminokyseliny, ale neobsahuje fosfor [6].

Tabulka 2: Sérové bílkoviny v mléce [2]

	<b>obsah bílkovin na (g/kg) mléka</b>	<b>hmotnostní podíl bílkovin (%)</b>
<b><math>\alpha</math>-laktalbumin</b>	1,2	3,7
<b><math>\beta</math>-laktoglobulin</b>	3,2	9,8
<b>sérový albumin</b>	0,4	1,2
<b>imunoglobuliny</b>	0,7	2,1
<b>ostatní</b>	0,8	2,4
<b>veškeré sérové bílkoviny</b>	6,3	19,3
<b>membránové bílkoviny</b>	0,4	1,2

#### 2.2.2.1 Aminokyseliny

Syrovátkové bílkoviny obsahují všechny esenciální aminokyseliny ve vyváženém poměru z hlediska potřeb organismu. Obsahují více aminokyselin s rozvětveným řetězcem oproti jiným zdrojům bílkovin, které zpomalují nástup únavy. Obsahují nedostatkové sřné aminokyseliny jako methionin a cystin. Jsou rovněž zdrojem glutaminu, který podporuje imunitu a růst svalové tkáně [2].

#### 2.2.3 Vitaminy

Do syrovátky přechází z mléka převážný podíl vitamínů rozpustných ve vodě a jen menší množství těch rozpustných v tucích. Obsah vitamínu zde není zanedbatelný. Syrovátka obsahuje celou řadu vitamínů, převážně vitaminy skupiny B ( $\text{B}_1, \text{B}_2, \text{B}_6, \text{B}_{12}$ ), dále pak vitaminy E, C, A, kyselinu pantotenovou, listovou, biotin a kobalamin [2].

#### 2.2.4 Organické kyseliny

V syrovátce se vyskytují především kyseliny citrónová, mléčná, propionová, octová a mravenčí. Nejvyšší obsah kyselin je v kyselé syrovátce a jejich složení závisí na aktivitě a složení mikroflóry. Nejvyšší je obsah kyseliny citrónové (150 mg/100 g) a kyseliny mléčné (40-120 mg/100 g) Při výrobě kaseinu může do syrovátky přecházet i nepatrné množství minerálních kyselin (kyselina chlorovodíková) [2].

#### 2.2.5 Popeloviny

V syrovátce jsou obsaženy převážně soli kyseliny fosforečné, mléčné, uhličitě, citrónové. Největší podíl tvoří draselné a vápenaté soli. Při sření dochází k navázání části vápníku na kasein a ten přechází do sřra. Při výrobě tvarohu naopak přechází z kaseinu do syrovátky ve formě nerozpustné soli. Proto je kyselá syrovátka bohatší na vápník[7].

Kromě draslíku a vápníku popel syrovátky obsahuje také sodík (42 mg/100 g), hořčík (8 mg/kg), zinek (0,3 mg/100g) a dále v minoritních podílech železo, jód a měď[2]

### 2.2.6 Tuky

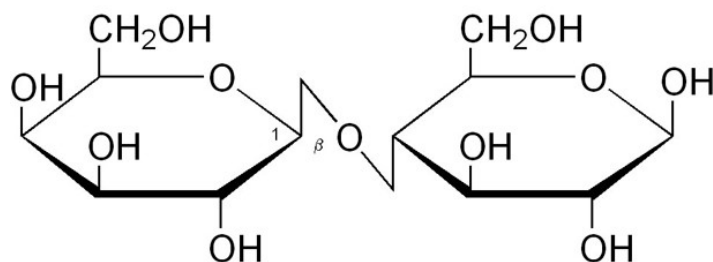
Tuk je přítomen v nepatrném množství, popřípadě se nevyskytuje vůbec.[2] Mléčný tuk obsahuje estery mastných kyselin s jednomocnými nebo vícemocnými alkoholy. Jsou dobře rozpustné v některých organických rozpouštědlech, a naopak nerozpustné ve vodě. Dělí se na jednoduché a složité. Ty jednoduché jsou estery mastných kyselin a glycerolu. Složité mají kromě kyslíku, vodíku a dusíku v sobě navázaný i jiných prvek. Dělí se na fosfatidy (navíc je tam kyselina fosforečná), cerebrosidy (glykolipidy) a sulfatidy (obsahují síru)[3] [7].

### 2.2.7 Laktóza

Laktóza se vyskytuje téměř jen v mléce savců a tvoří hlavní složku syrovátky (70-80 %). Je redukující disacharid, skládající se z D-galaktózy a D-glukózy spojených glykosidickou vazbou. Při trávení se glukóza vstřebává přímo, galaktóza až po přeměně na glukózu. Laktóza je v syrovátce obsažena téměř ve stejném množství jako v mléce. Při tepelném ošetření reaguje s aminoskupinami bílkovin za vzniku hnědých barviv. Tyto reakce závisejí silně na pH [2].

Má mírně sladkou chuť, ale její výživová hodnota je velmi vysoká. Dobře se rozpouští v teplé vodě, ale ne v ethanolu. Nejdůležitější vlastností je, že má schopnost se přeměnit pomocí mikroorganismů na organické kyseliny, a to kyselinu mléčnou při mléčném kvašení. Mikroorganismy mohou vytvářet také enzym laktázu, katalyzující přeměnu laktózy na jednoduché sacharidy [8].

Laktóza se využívá ve farmaceutickém průmyslu, chemickém průmyslu, v pekařství a při výrobě cukrovinek [7]. Laktóza je přirozeným pomocníkem při trávení a znovuvytvoření střevní mikroflóry po infekcích, terapii antibiotiky a po chorobách střev [2].



Obrázek 1: Laktóza [9]

## 2.3 Význam syrovátky

Syrovátka má řadu příznivých vlivů: reguluje hmotnost, krevní tlak, zvyšuje imunitu, zmírňuje metabolický stres, zlepšuje svalovou funkci, absorpci živin, fyzickou sílu. Je nízkokalorická, obsahuje mnoho vitamínů a minerálů, působí detoxikačně, obnovuje střevní mikroflóru, podporuje činnost ledvin, mléčné kyseliny zlepšují příjem vápníku, omezují záněty žaludku a střev a má vliv na hladinu cholesterolu v krvi [5]

## 2.4 Antimikrobiální účinky syrovátky

### 2.4.1 Laktoferin

Patří do skupiny transferinů. Je to glykoprotein existující ve třech isoformách laktoferin- $\alpha$ , který jako jediný dokáže vázat železo, laktoferin- $\beta$  a laktoferin- $\gamma$ , které schopnost vázat železo postrádají, ovšem naopak vykazují ribonukleázovou aktivitu. Se snížením pH klesá i schopnost vázat železo. Slouží k transportu řady důležitých látek metabolismu (transportuje železo). Díky schopnosti vázat železo disponuje nepřímou antibakteriální aktivitou vůči bakteriím, které železo vyžadují. Typickým příkladem je bakterie *E. coli*.

Má antimikrobiální účinky proti gram pozitivním i gram negativním bakteriím, může být i imunomodulační látkou. Je tepelně stabilní při pH snese pasterizaci při 72 °C [10].

Kromě antimikrobiálního účinku působí antioxidačně, imunomodulačně a protizánětlivě. V některých zemích se přidává do mléčné kojenecké výživy [5].

### 2.4.2 Laktoperoxidáza

Laktoperoxidáza je enzym vyskytující se v syrovátce, je přirozeným antimikrobiálním prostředkem. Inhibuje růst stafylokoků, streptokoků a dalších patogenních mikroorganismů. Používá se také ve výrobcích pro zubní hygienu k omezení kazivosti zubů [10].

### 2.4.3 Lysozym

Lysozym je enzym, který se mimo jiné vyskytuje i ve slinách, krevní plazmě, mateřském mléce, granulech neutrofilů a nosním hlenu. Je značně termostabilní. Lysozym je glukosidáza, která má baktericidní účinky a je schopná štěpit glykosidické vazby v buněčné stěně gram pozitivních bakterií. Gram negativní bakterie nejsou náchylné k působení lysozymu, díky chránění peptidoglykanové vrstvy vnější membránou [10]. Antimikrobiální vlastnosti v závislosti na teplotě se ale ztrácí dlouhodobým skladováním [11].

### 2.4.4 Kyselina mléčná

Kyselina mléčná (LA) je jedna z nejrozšířenějších karboxylových kyselin nacházejících se v přírodě. Můžeme ji připravit buď chemickou syntézou, nebo fermentačním procesem. V těle vzniká z glykogenu ve svalech a vyplavuje se do krve [12]. LA je bezbarvá viskózní kapalina nebo také bílá krystalická látka. Je středně silnou kyselinou a vykazuje optickou aktivitu. Vyskytuje se ve dvou enantiomerech, D(-) a L(+) [13]. Používá se převážně v chemickém a potravinářském průmyslu jako aroma a inhibitor růstu bakterií v balených jídlech. V malém množství se používá na úpravu pH roztoků či při výrobě detergentů. Také se využívá při výrobě přípravků na akné a v různých krémech [14].



Obrázek 2: kyselina mléčná [18]

## 2.5 Další vybrané přírodní látky s antimikrobiálním účinkem

### 2.5.1 Nisin

Nisin je nejznámějším a nejvíce studovaným bakteriocinem. Je produkován bakteriemi *Lactococcus lactis*. Působí zejména na gram pozitivní bakterie a zvláště na *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* a *Clostridium botulinum*. Je to způsobeno dostatečnou propustností buněčné stěny pro nisin. Ten vytváří kanálky procházející cytoplazmatickou membránou. Ty jsou propustné pro veškeré látky a tím dojde ke ztrátě řady důležitých látek nebo také membránového potenciálu [15]. Má velmi malou nebo žádnou působnost proti gram negativním bakteriím a plísním [16]. Skládá se z 34 aminokyselin. Jako jediný z bakteriocinů byl schválen jako potravinářské konzervační aditivum [15].

## 2.6 Kůže

Kůže je největším plošným orgánem lidského těla. Plocha je tvořena u dospělého člověka přibližně 1,5 – 2 m<sup>2</sup>. Tvoří také asi 16 % hmotnosti těla. Tloušťka kůže je nerovnoměrná, nejmenší je na víčkách, pod očima a na ušních boltcích asi 0,005 mm, největší na patách a dlaních 0,6 – 1 cm. Tloušťka kůže také závisí na pohlaví (ženy mají tenčí), na věku (nejtenčí ji mají děti a starci), na rase, ale také na klimatu [17][19].

Funkcí kůže je ochrana těla před škodlivými látkami, mikroorganismy a UV zářením, dále udržování stálé tělesné teploty, vylučovací funkce, kdy maz a pot díky kyselé reakci omezují růst mikroorganismů, smyslová funkce, resorpční nebo skladovací [17].

### 2.6.1 Stavba kůže

#### 2.6.1.1 Pokožka

Pokožka je povrchovou vrstvou kůže. Je tvořena mnoha vrstvami dlaždicového epitelu. Její nejsvrchnější buňky rohovatějí, odumírají a odlupují se. Jsou nahrazovány buňkami z hlubších vrstev. Celá pokožka se takto obmění asi za 3 týdny. Pokožka neobsahuje cévy, ale obsahuje pigment melanin, ten ji chrání před působením UV záření. Také obsahuje bílkovinu keratin a díky tomu je kůže prakticky nepropustná pro vodu [17][19].

#### 2.6.1.2 Škára

Škára je pevná a pružná vrstva kůže. Skládá se z vazivových buněk a elastických vláken. Obsahuje cévy, nervy, žlázy a kožní deriváty (vlasy, chlupy, nehty) a receptory. Nacházejí se zde Meissnerova tělíska (čidla dotyku), Krauseova tělíska (receptory chladu) a Ruffiniho tělíska (receptory tepla) [19].

#### 2.6.1.3 Podkožní vazivo

Je nejhlubší vrstvou kůže. Obsahuje tukové buňky, které slouží jako zásobárna energie. Funkcí podkožního vaziva je izolace a ochrana svalů. Tuková vrstva určuje hmotnost těla a u žen bývá silnější. Nachází se zde Vater-Paciniho tělíska, které jsou receptory tlaku a tahu [19].

### 2.6.2 Typy pleti

Rozlišujeme 4 základní typy pleti. Typ pleti je dán hlavně geneticky, ale celkový stav pleti je odrazem působení různých faktorů, vnějších i vnitřních, kterým je pleť vystavena [20].

### **2.6.2.1 Normální pleť**

Normální typ pleti je ideálním typem pleti a u dospělých se vyskytuje zřídka. Je měkký na dotek, nejeví žádné známky nedokonalosti. Nemá nadměrnou produkci kožního mazu [21].

### **2.6.2.2 Smíšená pleť**

Má podobné vlastnosti jako pleť normální s výjimkou T zóny, což je zóna vedoucí od čela, k nosu až k bradě. Zde dochází k zvýšené sekreci kožního mazu. Tento typ pleti je nejrozšířenějším [21].

### **2.6.2.3 Mastná pleť**

Tato pleť je odolnější vůči vnějším vlivům, vrásky se objevují později, ale snadno se na ni vytváří akné. Vše díky zvýšené sekreci mazových žláz, které pokryjí pleť hydrolipidickým filmem [21].

### **2.6.2.4 Suchá pleť**

Tento typ pleti má sníženou tvorbu kožního mazu a je méně odolný vůči vnějším vlivům. Vrásky jsou na ní výraznější a jsou důsledkem nedostatku hydratace. Pleť je hrubá a matná, může praskat a loupat se [21].

## **2.7 Syrovátka v kosmetice**

Pro využití v kosmetice jsou velmi důležité vlastnosti, které daná látka má. Například proteiny se do kosmetiky přidávají hlavně díky antimikrobiálním a antioxidačním vlastnostem, mohou také zabránit tvorbě rakovinných buněk. Používají se hlavně nízkomolekulární bílkoviny [22].

Syrovátkové bílkoviny nahrazují v krémech pro citlivou pokožku syntetické povrchově aktivní látky, a to díky jejich přírodnímu původu a vlastnostem jako rozpustnost, tvorba pěny, vytváření gelu, zvyšování viskozity a emulgační vlastnosti. Tyto vlastnosti jsou velmi atraktivní pro kosmetický průmysl. Syrovátka může být součástí řady výrobků, jako jsou mýdla, tělová mléka, sprchové gely, pěny do koupele, šampóny nebo prací prášky [23].

V syrovátce obsažená kyselina mléčná se používá v kosmetice hlavně pro svoje exfoliační účinky (má schopnost rozpouštět látky, které drží pohromadě odumřelé kožní buňky). Dokáže redukovat první známky stárnutí. Kyselá syrovátka, která obsahuje více kyseliny mléčné, je vhodnější na výrobu šampónu, a to díky schopnosti upravovat pH pro příznivější účinky na pokožku. Prostředky s kyselinou mléčnou se díky jejím hydratačním, antibakteriálním a protizánětlivým účinkům využívají také k léčbě akné [24].

Laktoferin a jeho antibakteriální účinky jsou využívány v přípravcích proti akné. V kombinaci s enzymy lysozymem a laktoperoxidázou zvyšuje antibakteriální vlastnosti slin a je tak součástí zubních past, ústních vod a také žvýkaček [23].

## **2.8 Antimikrobiální testy**

Metody, pomocí kterých můžeme sledovat antimikrobiální účinek látek, lze rozdělit do dvou skupin, na metody difúzní a diluční.

### **2.8.1 Agarová difúzní metoda**

Provádíme ji na pevném agaru, na jeho povrch je naočkován mikroorganismus a testovaná látka je dávkována do jamek vyhloubených do ztuhlého agaru. Podstatou je difúze

testované látky z jamky do okolního média. Pokud je na testovanou látku mikroorganismus citlivý, dochází k vytvoření inhibiční zóny kolem jamky, tedy zóny bez nárůstu buněk [25].

### 2.8.2 Bujónová diluční metoda

Podstatou této metody je přidání přesného množství testované látky do kultivačního média. Lze ji provádět ve zkumavkách i v mikro-modifikaci s použitím mikrotitračních destiček. Tato sterilní destička, která obsahuje v jednotlivých jamkách různé koncentrace inhibičních látek, je inokulována suspenzí sledovaných bakterií a také inkubována za optimální teploty. Po inkubaci se zjišťuje nejnižší koncentrace antibakteriální látky, která zbránila růstu mikroorganismu. Zhodnocení můžeme provádět vizuálně nebo pomocí měření absorbance. Sledujeme absorbanci okamžitou a po 24 hodinách [25].

## 2.9 Používané testovací mikroorganismy

### 2.9.1 *Micrococcus luteus*

Doména: *Bacteria*; Kmen: *Actinobacteria*; Třída: *Actinobacteria*; Řád: *Actinomycetales*; Čeleď: *Micrococcaceae*; Rod: *Micrococcus*

*Micrococcus luteus* je gram pozitivní bakterie o velikosti 0,9-1,8  $\mu\text{m}$ . Je chemoorganotrofní aerobní organismus s kulovitými nepohyblivými buňkami uspořádanými v tetradách. Optimální teplota pro jeho kultivaci je 25-37 °C [26]. Na kultivačních médiích tvoří žluté až bílé kolonie. Na potravinách tvoří kolonie žluté až oranžové [27].

Vyskytuje se ve vzduchu, půdě, na potravinách a i na kůži lidí nebo zvířat. Dobře roste v prostředí s malým výskytem vody, v přítomnosti nízkých koncentrací solí (v 5 % NaCl roste velmi dobře, při 15% koncentraci už neroste). Je častou vzdušnou kontaminací [27].



Obrázek 3: *Micrococcus luteus* [28]

### 2.9.2 *Serratia marcescens*

Doména: *Bacteria*; Kmen: *Proteobacteria*; Třída: *Gammaproteobacteria*; Řád: *Enterobacteriales*; Čeleď: *Enterobacteriaceae*; Rod: *Serratia*

*Serratia marcescens* je gramnegativní bakterie o velikosti 0,9-2,0 x 0,5-0,8  $\mu\text{m}$ . Je chemoorganotrofní, fakultativně anaerobní mikroorganismus, pohybující se pomocí bičků. Tvarově se jedná o rovné tyčinky. Jeho optimální kultivační teplota je 37 °C [29]. Vyskytuje se běžně ve vodě, půdě, na rostlinách a v zažívacím traktu živočichů. Vyvolává meningitidu a infekce močových a dýchacích cest [27].





Obrázek 4: *Serratia marcescens* [30]

## 2.10 Metody využívané k izolaci a charakterizaci antimikrobiální složky

### 2.10.1 Hartree-Lowryho metoda

Tato metoda patří k nejcitovanějším v biochemii. Její stanovení je kolorimetrické, založené na dvousložkovém činidle. První složkou je biuretové činidlo a druhou je Folin-Ciocalteau činidlo. Jsou to polykyseliny fosfomolybdenové a fosfowolframové, které se redukuje tyrozinovými zbytky proteinů a barví se modře. Dochází tedy k vzniku intenzivního zbarvení a stanovení je lineárním v širším rozsahu koncentrací [31].

### 2.10.2 Ultrafiltrace

Od běžné filtrace se odlišuje pouze velikostí částic, které jsou separovány. Filtrace se používá pro částice větší než 1  $\mu\text{m}$ , ultrafiltrace pro částice v rozmezí 2 až 1000 nm. Prakticky to znamená, že při filtraci se oddělují jemné a hrubé částice a při membránových procesech dochází k dělení na úrovni molekulových hmotností. Slouží k oddělování makromolekulárních látek a koloidů z roztoku. Molekuly rozpouštědla jsou působením zvýšeného tlaku tlačeny přes membránu. Makromolekuly a koloidy membránou neprocházejí [32].

### 2.10.3 SDS-PAGE

Pomocí gelové elektroforézy, neboli pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu se látky separují pouze na základě jejich molekulové hmotnosti. Váže se na bílkoviny v poměru 1,4 g SDS na 1 g bílkoviny a tím jim udílí uniformní náboj. Předpokládá se micelární struktura, uvnitř které dochází k nekovalentním interakcím mezi uhlovodíkovými řetězci dodecylsulfátu a hydrofobními oblastmi bílkoviny.

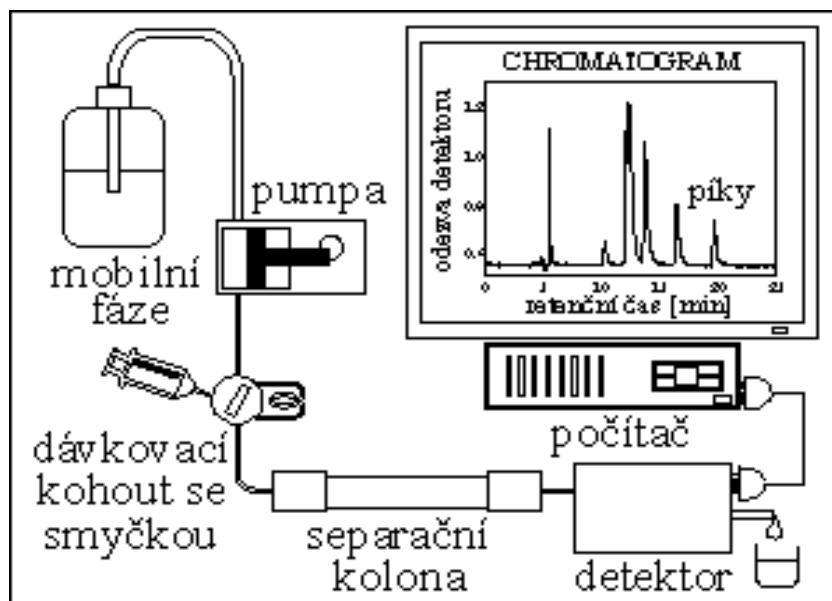
Nabití skupiny na povrchu micely jsou pak v kontaktu s pufrem. Celkový náboj částice je přitom záporný. Aby tyto komplexy mohly vzniknout, je nutné rozštěpit disulfidové můstky mezi řetězci bílkovin, nebo uvnitř těchto řetězců pomocí látek redukujících tyto můstky. Nevýhodou této metody je, že nepodává informace o bílkovině v nativním stavu [33].

### 2.10.4 Kapalinová chromatografie HPLC

Pro analýzu účinnosti enkapsulace pomocí stanovení koncentrace volné a zapouzdřené látky lze využít vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie se řadí mezi nejčastěji používané separační metody, díky její vysoké účinnosti, dobré opakovatelnosti a robustnosti. Je používána za

účelem stanovení koncentrace jednotlivých složek, stanovení jejich přítomnosti a případně i k izolaci jednotlivých složek směsi. Je založena na existenci fázového rozhraní dvou fází, mobilní a stacionární [32].



Obrázek 5: Schéma zařízení pro HPLC [34]

Po nanesení vzorku na kolonu je vzorek unášen mobilní fází, která obtéká tu stacionární. Dochází k různé retenci jednotlivých analytů na základě interakcí se stacionární a mobilní fází. Každý analyt je registrován detektorem v určitém čase, který je pro danou látku typický. Tento čas se nazývá retenční čas a podle něho poznáme, o jakou látku se jedná. Je tedy nutné použít známých standardů pro určení retenčních časů. Separací proces může být ovlivněn výběrem stacionární fáze, parametry kolony, složením mobilní fáze, průtokem a teplotou.

Přístroj pro HPLC se skládá ze zásobníku mobilní fáze, směšovače, čerpadla, dávkovače vzorku, kolony a předkolony, detektoru, odpadu a vyhodnocovací jednotky [32].

## 2.11 Enkapsulace

Enkapsulace (neboli zapouzdření) může být definována jako proces, při kterém dochází k zachycení jedné látky (aktivní látky) druhou (materiál stěny). Enkapsulovanou látku můžeme nazvat jádrem nebo vnitřní fází. Látka, která enkapsuluje jádro, se nazývá povlak, membrána, skořápka, nosný materiál, kapsule nebo vnější fáze. Materiály, použité na výrobu vnější fáze, musí být biologicky odbouratelné, schopné tvořit bariéru mezi vnitřní fází a jejím okolím, musí udržet aktivní látky uvnitř kapsle, nesmí reagovat s enkapsulovaným materiálem a musí mít dobré reologické vlastnosti. Mohou mít různé vlastnosti a mohou být různého typu. Většina používaných materiálů jsou biomolekuly. Nejčastěji používané jsou polysacharidy. Enkapsulace může být využita jak na kapalné, tak na plynné a pevné látky. Částice mají průměr od nm až po mm. Důvodem použití enkapsulace je například regulace uvolňování obsahu aktivních látek po delší časový úsek, nebo imobilizace buněk a enzymů v potravinářství. Dále se také používá k zabránění reakce mezi aktivní látkou a složkami v jejím okolí, například kyslíkem nebo vodou [32].

K zapouzdření látek existuje řada metod. Enkapsulované částice se velmi často nachází v kapalném prostředí, a proto je mnoho metod zaměřeno na sušení, například sprejové sušení, sprejové chlazení, mražení, fluidní vrstva, liposomové zachycení a další [32].

#### **2.11.1.1 Hydrogely**

Hydrogely jsou nerozpustné ve vodě. Dokáže ve své struktuře držet až 99 % vody. Tvoří síť vláken spojených kovalentními i nekovalentními vazbami. Pro přípravu se používají kationtové a aniontové polymery chitosan a karagenan. Většina hydrogelů je velmi křehkých [32].

#### **2.11.1.2 Emulze**

Tuto metodu používáme, pokud je aktivní látka rozpustná ve vodě. Emulze je heterogenní směs dvou kapalin, které se samovolně nesměšují. Je tvořena disperzním prostředím a dispergovanou látkou. Rozlišujeme dva základní typy emulzí: voda v oleji a olej ve vodě. Složitější typ voda v oleji se používá nejčastěji k výrobě kapslí. Takto vyrobené kapsle se vyznačují dobrou stabilitou, která lze umocnit vysušením aktivní látky před zabalením [32].

#### **2.11.1.3 Fluidní vrstva**

Tato technika kombinuje výhody plynu a kapaliny. Práškové částice jsou zastaveny v proudění vzduchu a jsou postříkány atomizovaným materiálem pro potažení. Tento materiál by měl být teplotně stabilní s dobrou viskozitou [32].

#### **2.11.1.4 Sprejové sušení a chlazení**

Sušení rozprašováním je nejstarší a zároveň nejrozšířenější technika zapouzdření. Vzduch dosahuje vysoké teploty, ale teplota materiálu se výrazně nemění. Výtěžek se pohybuje okolo 20-50 %. Chlazení je obdobné jako sušení, ale nedochází při něm ke ztrátě vody ze vzorku. Používá se na výrobu lipidových částic s vůní [32].

#### **2.11.1.5 Liposomy**

Liposomy jsou mikroskopické útvary s velikostí od 25 nm do 10 000 nm. Jsou to transportní systémy zabezpečující průnik látek v nich obsažených do pokožky i hlubších vrstev. Složením se velmi podobají lipidové dvojvrstvě. Obsahují fosfolipidy, zejména lecithin a cholesterol. Podstatou je hydrofilní a hydrofobní interakce mezi molekulami vody a fosfolipidy. Jsou tedy schopny zapouzdřit obě hydrofilní i hydrofobní látky ve vodném prostředí. Malé liposomy mohou dopravit látky až do krevního oběhu. Z toho vyplývá, že čím větší a méně stabilní liposom je, tím se hloubka jeho průniku zmenšuje [32][35].

Připravují se z esterů kyseliny fosfatidové s alkoholem. Pro přípravu se používá lecithin a k němu se přidává cholesterol. Mezi základní metody přípravy patří ultrasonifikace, odpařování na tenké vrstvě a metoda reverzních fází [32].

- ultrasonifikace neboli ultrazvuková enkapsulace: základní materiál je směs fosfolipidů a cholesterolu v roztoku enkapsulované složky. Směs je opakovaně dispergována pomocí ultrazvukových vln.
- Odpařování na tenké vrstvě: směs fosfolipidu a cholesterolu je rozpuštěna v organickém rozpouštědle. Dochází k odpařování rozpouštědla, suchý lipidový film je přichycen na stěnách a je hydratován přidáním vodného roztoku enkapsulované složky.
- Metoda reverzních fází: obdobné připravování jako u odpařování na tenké vrstvě. Lipidový film po odpaření prvního rozpouštědla se rozpustí v druhém organickém rozpouštědle. Poté je přidán vodný roztok enkapsulované složky a organické rozpouštědlo a znovu dochází k odpaření [35].

K analýze částic a jejich obsahu můžeme využít například vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, metodu dynamického rozptylu světla, analýzu pomocí zeta potenciálu nebo UV-VIS spektrometrii [35].

## **2.12 Enkapsulace v kosmetice**

Hlavním problémem antimikrobiálních látek je jejich transport přes buněčnou membránu a jejich nízká intracelulární aktivita, která vede ke snížení účinnosti. Řešením tohoto problému je enkapsulace, která jednak zlepšuje dostupnost aktivních látek a také umožňuje postupné uvolňování, anebo transport přímo do buněk. Výhodou takto připravených látek je i to, že jejich pomocí můžeme dosáhnout dlouhotrvajícího účinku. Tohoto lze využít například při léčbě infekcí [36].

V kosmetickém průmyslu se využívají převážně liposomy díky tomu, že mají schopnost prostupu přes neporušené povrchové struktury a tím pádem schopnost vnášet aktivní látky do hlubších vrstev kůže. Liposomy mají také schopnost hydratace, což můžeme využít při péči o suchou kůži [37].

## **2.13 Kosmetické emulze**

Emulze je termodynamicky nestabilní dvoufázový systém, který tvoří alespoň dvě navzájem nemísitelné nebo omezeně mísitelné kapaliny, z nichž je jedna rozptýlena ve formě kapek v té druhé. Jsou zde přítomny emulgační činidla, které brání rozpadu systému. Dispergovaná kapalina je označována jako fáze vnitřní, disperzní medium nese název vnější nebo kontinuální fáze [38].

Emulze dělíme podle polaritý disperzního prostředí a dispergované látky na emulze typu „olej ve vodě“ a „voda v oleji“. Přímou emulzi o/v tvoří organická nepolární látka, rozptýlená v polárním rozpouštědle. Obrácená fáze je tvořena kapičkami vodné fáze rozptýlené ve fázi organické [38].

Emulze byly vybrány z důvodu použití v kosmetice, kde patří mezi nejpoužívanější kosmetické výrobky. Krém je emulze v polotuhém stavu, kapalný charakter má pleťová voda [38].

### **2.13.1 Stabilita emulzí**

Emulze jsou nestálé systémy. Jejich vznik je spojen se zvětšením plochy fázového rozhraní a je provázen vzrůstem Gibbsovy energie systému. Jejich nestabilita se projevuje krémováním, flokulací nebo koalescencí. Krémování je založeno na gravitační sedimentaci. Je to pohyb složek emulgované fáze nahoru v důsledku nižší hustoty. Můžeme tak pozorovat dělení fází. Flokulace a koalescence jsou děje založené na agregaci dispergovaných kapek [39][40]. Aby emulze měla dostatečnou životnost, je nutné zajistit její stabilizaci, například pomocí emulgátorů. Ty mají schopnost snižovat povrchové napětí mezi olejovou a vodnou fází. Zabraňují nebo také zpomalují zánik kapek dispergované fáze tak, že na fázovém rozhraní vytvoří bariéru, která brání kapkám ve flokulaci a koalescenci [40].

### **2.13.2 Výroba emulzí**

Pro kosmetický průmysl je výroba emulzí nepostradatelná, protože jsou základem pro řadu kosmetických přípravků.

K vytvoření emulze je potřebná voda, olej, povrchově aktivní látka a energie. Ke smíchání veškerých komponentů vytvoření makroemulze se používá vysokorychlostní míchadlo. Do vodné fáze se smíchají všechny ve vodě rozpustné látky. Do olejové se

smísí hydrofobní látky (olej, tuky, vosky). Následuje zahřátí na teplotu 50 – 80 °C a smíchání obou fází za současného míchání a homogenizace [38][40].

### **2.13.3 Analýza emulzí analytickou centrifugací**

Analytická centrifugace je velmi účinná technika, která umožňuje charakterizovat chování makromolekul přímo v roztoku. Analytická centrifuga je vybavena speciálním optickým systémem pro sledování průběhu sedimentace a nepoužívá se tedy na rozdíl od ultracentrifug k separačním účelům.

Jak už bylo řečeno v předchozích kapitolách, jedním z hlavních důvodů koloidní nestability emulzí je separace fází podle měrných hmotností. Pomocí analytické centrifugy můžeme charakterizovat sedimentující částice, jejich molekulové hmotnosti, sedimentační koeficient a další hydrodynamické vlastnosti [41].

### **3 CÍLE PRÁCE**

Cílem práce je příprava, stabilizace a testování antimikrobiálních účinků vybraných přírodních látek živočišného původu.

- A) Přehled a charakterizace živočišných produktů s potenciálním antimikrobiálním účinkem
- B) Příprava a charakterizace extraktů z živočišného materiálu
- C) Enkapsulace těchto extraktů
- D) Testování antimikrobiálního účinku extraktů ve volné a enkapsulované formě.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité chemikálie

Agar Powder, Himedia (India)  
Akrylamid – Serva (SRN)  
Alginát sodný - Sigma-Aldrich (SRN)  
Bisakrylamid – Serva (SRN)  
Bromfenolová modř – Serva (SRN)  
 $\beta$ -merkaptoethanol – Serva (SRN)  
Coomassie brilliantová modř – Serva (SRN)  
Dodecylsírán sodný – Serva (SRN)  
Folin-Ciocalteu činidlo – Penta (ČR)  
Galaktóza – Lach-Ner (ČR)  
Glukóza – Lach-Ner (ČR)  
Glycerol – Lach-Ner (ČR)  
Glycin – Serva (SRN)  
Hexakynoželezitan draselný – Lach-Ner (ČR)  
Hydroxid sodný – Lach-Ner (ČR)  
Chitosan - Sigma-Aldrich (SRN)  
Chlorid vápenatý – Lach-Ner (ČR)  
Cholesterol – směs hydroxy-5-cholestenu a cholesten-3 $\beta$ -olu - Serva (SRN)  
Kyselina chlorovodíková – Lach-Ner (ČR)  
Kyselina mléčná - Sigma-Aldrich (SRN)  
Kyselina octová – Lach-Ner (ČR)  
Kyselina sírová – Lach-Ner (ČR)  
Laktóza – Lach-Ner (ČR)  
Lecithin ze sóje - Serva (SRN)  
Lysozym - Sigma-Aldrich (SRN)  
Methanol– Lach-Ner (ČR)  
N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin(TEMED) - Sigma-Aldrich (SRN)  
Nisin z *Lactococcus lactis* - Sigma-Aldrich (SRN)  
Nutrient broth, Himedia (India)  
Octan zinečnatý – Lach-Ner (ČR)  
Persírán amonný - Sigma-Aldrich (SRN)  
Propanol – Lach-Ner (ČR)  
Sírán amonný – Lach-Ner (ČR)  
Sírán mědnatý, pentahydrát – Lach-Ner (ČR)  
Tripolyfosfát - Sigma-Aldrich (SRN)  
Tris(hydroxymethyl)aminomethan – Serva (SRN)  
Uhličitan sodný – Lach-Ner (ČR)  
Vínan sodno-draselný – Lach-Ner (ČR)

### 4.2 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy, Boeco (SRN)  
Předvážky Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH (SRN)  
Vortex, TK3S, Kartell spa (USA)  
Vortex: Genius 3, IKA Vortex (SRN)

Mikrocentrifuga – Mikro 200, Hettich Zentrifugen (SRN)  
 Centrifuga, Sartorius, Biotech (ČR)  
 Centrifuga Boeco U-32R, Hettich Zentrifugen (SRN)  
 Magnetická míchačka s ohřevem, Lavat – Verkon (ČR)  
 Koloidní DLS analyzátor ZetaSizer Nano ZS - Malvern (UK)  
 ELISA Reader BioTek ELx808, Biotek (SRN)  
 Ultrazvukový homogenizátor - Bandelin Sonoplus HS3200 - Sonorex Technik (SRN)  
 Spektrofotometr – Helios δ, Unicam (UK)  
 Temperovaná třepačka, Heidolph Inkubator 1000, Labicom (ČR)  
 Optický mikroskop Intraco Micro LM 666 PV/∞ LED (ČR)  
 Biohazard box, model Airstream, třída II -ESCO, Biotech (ČR)  
 Sestava HPLC/PDA/RI Thermo Fisher Scientific (USA):

- Programátor gradientu UltiMate 3000
- Fotometrický detektor: UltiMate 3000 DAD
- Refraktometrický detektor: RefractoMax 520
- Pumpa: LPG-3400SD
- Termostat - LCO 101, Column Oven (ECOM, ČR)
- Vyhodnocovací software: Chromeleon 7

Automatické pipety v různém rozsahu objemu – Discovery (SRN) a Biohit (SRN)  
 Elektroforetická aparatura BioLogic LP, Bio-Rad (USA)  
 Ultrafiltrační aparatura KrosFlo, Spectrum Labs (USA)  
 LUMiSizer – Dispersion analyzer – Lum (USA)  
 Lyofilizátor – BenchTop 4K ZL, VirTis (USA)

### 4.3 Použité materiály

Syrovátka

Domácí Kefír

Kefírové mléko nízkotučné, Mlékárna Valašské Meziříčí (ČR)

Acidofilní mléko plnotučné, Mlékárna Valašské Meziříčí (ČR)

### 4.4 Použité mikroorganismy

K testování antimikrobiální aktivity byly používány kultury *Micrococcus luteus* CCM 1569 a *Serratia marcescens* CCM 8587. Obě použité bakteriální kultury byly získány z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

### 4.5 Charakterizace syrovátky

#### 4.5.1.1 Příprava vzorků na kapalinovou chromatografii

Vzorky byly nejprve po dobu 20 minut zahřívány při 80°C. Následně byly centrifugovány 10 minut při 1200 rpm. K odebranému supernatantu bylo přidáno 5% Carrezova činidla I a II, vzorky byly důkladně promíchány a opět zcentrifugovány. Na závěr byly vzorky zfiltrány přes membránový filtr s porozitou 0,45 μm a analyzovány.

- Složení Carrezovo činidlo I: 26,5 g hexakynoželezitanu draselného bylo doplněno destilovanou vodou na objem 250 ml.
- Složení Carrezovo činidlo II: 65,5 g octanu zinečnatého a 30 ml kyseliny octové bylo doplněno destilovanou vodou na objem 250 ml.



#### 4.5.2 Stanovení koncentrace sacharidů a kyseliny mléčné pomocí HPLC s RI detekcí

Vzorky s obsahem laktózy, glukózy a galaktózy byly analyzovány na koloně Phenomenex naplněné reversní fází ROA Organic Acid 8 % (300 x 7,8 mm) při 60 °C. Aplikace na kolonu byla provedena pomocí nástřiku do dávkovacího ventilu o objemu smyčky 20 µl. Eluce probíhala izokraticky při průtoku mobilní fáze 1 ml·min<sup>-1</sup>. Jako mobilní fáze byl použit 5 mM roztok kyseliny sírové. Vzorky byly detekovány na refraktometrickém detektoru. Z chromatogramů o různých koncentracích laktózy, glukózy a galaktózy byly zjištěny plochy píku a byla sestavena kalibrační křivka pro kvantitativní stanovení koncentrace kyseliny mléčné, laktózy, glukózy a galaktózy ve vzorcích.

#### 4.5.3 Stanovení koncentrace bílkovin

Pro stanovení koncentrace proteinů byla u všech testovaných vzorků použita metoda Hartree-Lowryho. Do každé zkumavky bylo k 1 ml roztoku vzorku pipetováno 0,9 ml Hartree-Lowryho činidla A, zkumavky byly následně inkubovány ve vodní lázni při 50 °C po dobu 10 min. Po ochlazení zkumavek bylo přidáno 0,1 ml Hartree-Lowryho činidla B. Zkumavky byly dále opět inkubovány po dobu 10 min, tentokrát však při laboratorní teplotě. Nakonec byly přidány 3 ml Folin-Ciocalteauova činidla a zkumavky byly ještě jednou 10 min inkubovány ve vodní lázni při 50 °C. Zkumavky byly poté ochlazeny a následně byla změřena absorbance při 650 nm proti blanku, kde byl roztok vzorku nahrazen destilovanou vodou. Pro sestavení kalibrační křivky byl použit roztok albuminu o koncentraci 1 mg/ml. Z tohoto roztoku byla připravena kalibrační řada o koncentraci 0,05 až 0,2 mg/ml.

- Složení činidlo A: na přípravu 100 ml činidla A bylo připraveno a smícháno následující množství chemikálií: 10 g uhličitanu sodného; 1 g vlnanu sodno-draselného (tetrahydrátu) a 50 ml hydroxidu sodného o koncentraci 1 M. Po rozpuštění uhličitanu a vlnanu v hydroxidu byla směs doplněna na 100 ml destilovanou vodou.
- Složení činidlo B: na přípravu 100 ml činidla B bylo připraveno a smícháno následující množství chemikálií: 1 g pentahydrátu síranu měďnatého; 2 g vlnanu sodno-draselného (tetrahydrátu) a 10 ml hydroxidu sodného o koncentraci 1 M. Po rozpuštění skalice a vlnanu v hydroxidu byla směs doplněna na 100 ml destilovanou vodou.
- Složení činidlo C: na přípravu činidla C bylo potřeba naředit komerční Folin-Ciocalteau činidlo s vodou v poměru 1:16.

#### 4.6 Frakcionace syrovátkových bílkovin

Syrovátka byla zcentrifugována po dobu 10 minut, při 7000 otáčkách a 4 °C. Supernatant byl postupně vysrážen do 30%, 50% a 70% nasycení síranem amonným. Jednotlivé získané frakce i vysrážené odcentrifugované bílkoviny byly uschovány pro další analýzy.

#### 4.7 Ultrafiltrace

Ultrafiltrace byla prováděna přes membránu o velikosti 1 kDa s roztokem získaným vysrážením syrovátky síranem amonným do 50 % nasycení.

## 4.8 Elektroforéza PAGE-SDS

### 4.8.1 Postup pro přípravu roztoků

Elektrodový pufr: 30,3 g Tris, 144 g glycinu a 10 g SDS, doplnit destilovanou vodou na 1 000 ml, (roztok je desetkrát koncentrovanější, před použitím je tedy nutno jej zředit).

Gelový pufr: 18,2 g Tris, 2,8 ml 32% kyseliny chlorovodíkové, doplnit destilovanou vodou na 100 ml.

Vzorkovací pufr: 3,55 ml destilované vody, 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl pufru pH 6,8, 2,5 ml glycerolu, 2 ml 10% SDS a 0,2 ml 0,5% bromfenolové modři, k 950  $\mu$ l takto připraveného vzorkovacího pufru bylo dále přidáno 50  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptoethanolu a použito při přípravě vzorků.

Barvicí roztok: 25 ml kyseliny octové, 100 ml methanolu, 125 ml destilované vody a 0,5 g Coomassie briliantové modři.

Odbarvovací roztok: 25 ml kyseliny octové, 100 ml methanolu a 125 ml destilované vody.

6% stacking gel: 5,2 ml destilované vody, 2 ml akrylamidu, 2,5 ml Tris-HCl pufru pH 6,8, 100  $\mu$ l 10% SDS, 100  $\mu$ l APS, 10  $\mu$ l TEMED.

### 4.8.2 Postup pro přípravu polyakrylamidového gelu

Pro elektroforézu byl použit 20% gel. Do kádinky bylo napipetováno 1 ml redestilované vody, 10,67 ml 30% akrylamidu, 4 ml gelového pufru, 160  $\mu$ l 10% SDS, 16  $\mu$ l TEMED a 160  $\mu$ l 10% APS. Připravená směs byla opatrně zamíchána a napipetována asi do tří čtvrtin do prostoru mezi dvěma skly v nalévacím stojanu, do zbývající čtvrtiny byl napipetován 6% stacking gel. Mezi skla byl vložen plastový hřebínek za účelem vytvoření jamek pro nanášení vzorků. Gel byl ponechán k polymeraci po dobu 1 hod.

### 4.8.3 Postup pro přípravu vzorků

Vzorky byly smíchány se vzorkovacím pufrem v poměru 1:1 a dány na 4 min povařit.

### 4.8.4 Postup pro provedení elektroforézy

Po ztuhnutí gelu byl odstraněn plastový hřebínek a skla s gelem byla pečlivě upevněna do aparatury tak, aby elektrodový pufr nevytékal z elektrodového prostoru. Poté byl elektrodový pufr nalit. Do vytvořených jamek byly naneseny vzorky v množství 20  $\mu$ l a standardy Precision Plus Protein™ Dual Color v množství 10  $\mu$ l. Aparatura byla přikryta průhledným víkem, dobře utěsněna a připojena ke zdroji. Následně byly nastaveny parametry měření (120 V, 400 mA, 60 min) a elektroforéza byla spuštěna.

### 4.8.5 Postup pro barvení gelu Coomassie briliantovou modří

Po ukončení elektroforézy byl gel pomocí stříčky spláchnut do misky a zalit barvicím roztokem. Poté byl gel ponechán 15 min na třepačce a následně byl barvicí roztok slit. Dále byl gel zalit roztokem odbarvovacím. Odbarvený gel byl opatrně přenesen mezi dvě fólie a pomocí standardů Precision Plus Protein™ Dual Color o známé molekulové hmotnosti byla určena velikost fragmentů separovaných proteinů.

## 4.9 Antimikrobiální testy

### 4.9.1 Kultivace mikroorganismů

Pro kultivaci mikroorganismů (*Micrococcus luteus* a *Serratia marcescens*) bylo dle návodu na obalu připraveno médium Nutrient Broth (NB). Vždy bylo připraveno 50 ml média do 100 ml Erlenmayerovy baňky a sterilizováno 60 min v tlakovém hrnci. Zaočkované médium bylo kultivováno 24 hodin v termostatu při 37°C za stálého třepání. Takto připravená inokula byla následně použita pro stanovení antimikrobiální aktivity.

### 4.9.2 Agarová difúzní metoda

Na Petriho misky s tuhým NB médiem byla naočkována 24 hodinová kultura bakteriálních buněk. Na agarovou plotnu bylo napipetováno vždy 100 µl buněk a následně rozetřeno sterilní hokejkou. Misky byly poté ponechány stát po dobu 20 minut. Na závěr byly na připravený povrch nanášeny testované pevné vzorky a krémy. Při testování tekutých vzorků byly nejprve v agaru vyhloubeny jamky, do kterých bylo poté napipetováno 70 µl příslušného vzorku. Vyhodnocení bylo provedeno po 24 hodinách kultivace, kdy byly pozorovány vzniklé inhibiční zóny kolem pevných vzorků nebo kolem jamek.

### 4.9.3 Bujónová diluční metoda

Tato metoda využívá měření zákalu, díky kterému je sledován růst mikroorganismů na mikrotitrační destičce. K testování byly použity bakteriální buňky z 24 hodinové kultivace, buňky byly před použitím desetkrát zředěny sterilním NB médiem. Zředěné buňky byly napipetovány po 150 µl do každé jamky. K buňkám bylo dále přidáno 50 µl testovaného vzorku. Jako blank byla používána kultura (150 µl) s přídatkem 50 µl vody. Růst bakterií a absorbance byla měřena v čase 0 a po 24 hodinách kultivace.

## 4.10 Enkapsulace

### 4.10.1 Příprava liposomů

Do 10 ml vzorku určeného k enkapsulaci bylo přidáno 180 mg lecithinu a 20 mg cholesterolu. Směs byla poté pomocí tyčového ultrazvuku intenzivně míchána minimálně 1 minutu do vzniku liposomů.

### 4.10.2 Příprava alginátových částic

Roztok vzorku určený k enkapsulaci byl smíchán s 2% roztokem alginátu v poměru 1:1. Vzniklá směs byla převedena do zásobní láhve a pomocí enkapsulátoru s využitím trysky o velikosti 200, 300 nebo 450 µm byly připraveny částice polymerizací v 2 % roztoku chloridu vápenatého.

### 4.10.3 Příprava chitosanových částic

Roztok vzorku určený k enkapsulaci byl smíchán s 2% roztokem chitosanu v poměru 1:1. Vzniklá směs byla převedena do zásobní láhve a pomocí enkapsulátoru s využitím trysky o velikosti 200, 300 nebo 450 µm byly připraveny částice polymerizací v 2 % roztoku tripolyfosfátu.

#### 4.11 Stanovení enkapsulační účinnosti

Po přípravě liposomů byly vzorky zcentrifugovány při 11 000 ot/min po dobu 60 minut. Poté bylo v supernatantu stanoveno množství volných bílkovin či kyseliny mléčné, stejným postupem byla stanovena koncentrace bílkovin či kyseliny mléčné i v roztoku před enkapsulací. Z rozdílu koncentrace v roztoku před a po enkapsulaci byla následně stanovena enkapsulační účinnost. U alginátových a chitosanových částic bylo postupováno shodným postupem, pouze centrifugace byla nahrazena filtrací.

#### 4.12 Stanovení dlouhodobé stability částic

Dlouhodobá stabilita částic byla sledována v prostředích s různým obsahem olejové fáze, a to 0, 10 a 50 %. Vzorek byl vždy připraven v poměru 1: 3 (částice:prostředí). Vzorky byly uchovány při teplotě 5°C. Po týdnu a po třech týdnech skladování bylo ve vzorcích stanoveno množství uvolněných bílkovin.

#### 4.13 Příprava krémů

Pro výrobu krému bylo nutné připravit si dvě fáze: vodnou a olejovou.

Tabulka 3: Složení vodné fáze u jednotlivých krémů

složení vodná fáze				
krém 1:	krém 2:	krém 3:	krém 4:	krém 5/6:
42 ml vody	42 ml syrovátky	21 ml vody	42 ml vody	42 ml vody
1,5 ml 86,5% glycerinu	1,5 ml 86,5% glycerinu	21 ml syrovátky	1,5 ml 86,5% glycerinu	1,5 ml 86,5% glycerinu
0,25 ml germabenu II	0,25 ml germabenu II	1,5 ml 86,5% glycerinu	0,25 ml germabenu II	0,25 ml germabenu II
		0,25 ml germabenu II	0,48 g syrovátky	0,5 g alginátových/ chitosanových částic

Obě fáze, vodná i olejová, byly zahřáty na 75°C. Poté byla olejová fáze postupně za neustálého míchání přidávána do fáze vodné. V případě krémů s obsahem částic, byly částice dodány až po tomto kroku. Na závěr byly vzniklé emulze intenzivně míchány do úplného vychladnutí.

#### 4.14 Analýza emulzí pomocí analytické centrifugace

Před analytickou centrifugací byly vzorky napipetovány do kyvet určených pro analytickou centrifugaci, následně byly nastaveny vhodné otáčky v kombinaci s dobou centrifugace (2000 ot/min, 5 hodin a 25 °C) a bylo spuštěno měření. Při centrifugaci pak byla snímána měnící se transmitance vzorku v kyvetě.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce byla zaměřena na studium antimikrobiálních vlastností vybraných přírodních látek živočišného původu. Antimikrobiální testy byly prováděny vůči grampozitivním i gramnegativním bakteriálním kmenům.

K analýze byl vybrán kefir, acidofilní mléko a především syrovátka. Surovátka byla charakterizována a následně v několika úpravách, včetně enkapsulace, použita k testování antimikrobiálních vlastností. Antimikrobiální účinek testovaných vzorků byl následně rovněž srovnáván s účinkem standardů - antimikrobiálního enzymu lysozymu, bakteriocinu nisinu a kyseliny mléčné.

Na závěr byly připraveny kosmetické krémy s obsahem enkapsulované i neenkapsulované syrovátky a podrobeny analýze. Testován byl především jejich antimikrobiální účinek a stabilita za použití analytické centrifugace.

### 5.1 Charakterizace syrovátky

Nejprve byla u syrovátky provedena základní charakteristika, stanoven byl obsah sacharidů a kyseliny mléčné, dále byl sledován obsah bílkovin.

#### 5.1.1 Stanovení obsahu sacharidů pomocí HPLC/RI

Při stanovení koncentrace sacharidů byly nejdříve sestaveny příslušné kalibrační závislosti, následně byla provedena analýza vzorků. Stanovení bylo provedeno dle postupu uvedeného v kapitole 4.5.2. Sledován byl obsah laktózy, glukózy a galaktózy. Měření probíhalo pro každou látku dvakrát a poté byl vypočítán průměr hodnot.

Koncentrace sacharidů byla vypočítána podle rovnice regrese:

$$\text{Galaktóza: } y = 3,0103x - 0,136$$

$$\text{Glukóza: } y = 2,5755x + 2,4054$$

$$\text{Laktóza: } y = 3,1322x + 0,7132$$

Tabulka 4: Stanovení obsahu cukrů

vzorky	laktóza (g/l)	retenční čas	glukóza (g/l)	retenční čas	galaktóza (g/l)	retenční čas
syrovátka	125,008	5,343	0,909	6,260	3,504	6,662

#### 5.1.2 Stanovení obsahu kyseliny mléčné

Při stanovení koncentrace kyseliny mléčné byla nejdříve proměřena kalibrační závislost, následně byla provedena analýza vzorků. Stanovení probíhalo dle postupu uvedeného v kapitole 4.5.2. Měření probíhalo dvakrát a poté byl vypočítán průměr ze získaných hodnot.

Koncentrace kyseliny mléčné byla vypočítána podle rovnice regrese:

$$y = 2,9212x - 0,2561$$

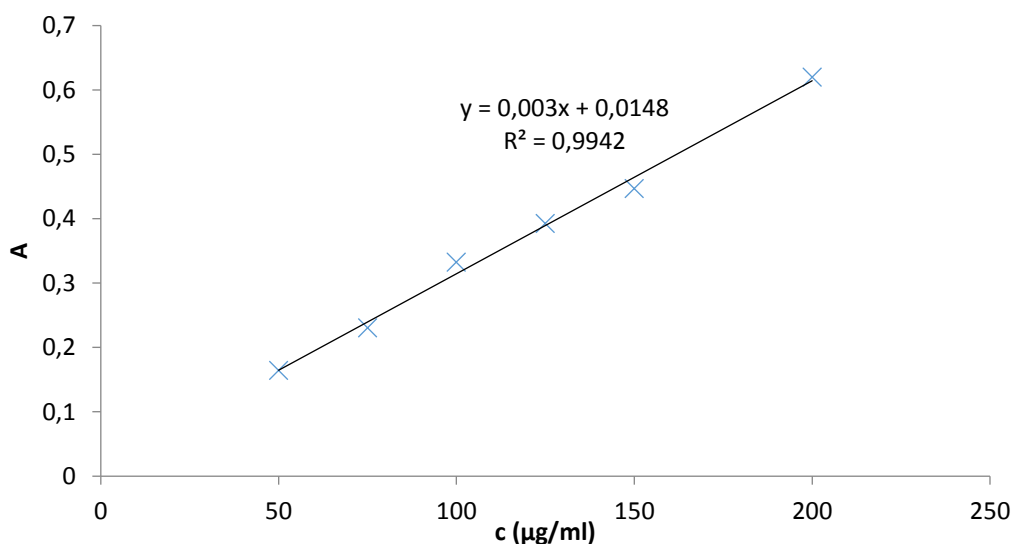
Tabulka 5: Stanovení obsahu kyseliny mléčné

vzorky	kys.mléčná (g/l)	retenční čas
syrovátka	5,289	8,545

### 5.1.3 Stanovení obsahu bílkovin

Při stanovení koncentrace bílkovin byla rovněž nejdříve sestavena kalibrační křivka. Stanovení bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 4.5.3. Měření probíhalo pro každou látku třikrát a poté byl vypočítán průměr.

Dle změřených absorbancí byla sestavena kalibrační křivka závislosti koncentrace albuminu na absorbanci. Tato kalibrační křivka poté byla využita ke všem výpočtům koncentrací bílkovin.



Graf 1: Kalibrační křivka

Dále byly proměřeny vzorky a na základě rovnice regrese byla vypočítána koncentrace bílkovin v nich obsažených.

Tabulka 6: Stanovení obsahu bílkovin

vzorky	bílkovina (g/l)
syrovátka	8,6

## 5.2 Úprava syrovátky

V další části práce byla provedena frakcionace bílkovin syrovátky, získané bílkoviny byly charakterizovány pomocí PAGE-SDS. Získané frakce byly v další části práce podrobeny rovněž analýze antimikrobiálního účinku.

### 5.2.1 Frakcionace bílkovin syrovátky

Syrovátka byla před použitím zcentrifugována dle postupu uvedeném v kapitole 4.6. Supernatant byl následně vysrážen do 30%, 50% a 70% nasycení síranem amonným. Jednotlivé získané frakce byly podrobeny analýze stanovení koncentrace bílkovin.

Roztok získaným vysrážením syrovátky síranem amonným do 50 % nasycení, u kterého byla zaznamenána nejvyšší antimikrobiální aktivita, byl dále zakoncentrován ultrafiltrací přes membránu o velikosti 1 kDa a rovněž analyzován na obsah bílkovin. Výsledky jsou zaznamenány v tabulce 7.

Tabulka 7: Koncentrace bílkovin ve zkoumaných vzorcích

vzorky	filtrát 50%	koncentrát 50%	30%	50%	70%	syrovátka
c (mg/ml)	0,056	2,19	0,060	0,091	0,149	8,6

Tabulka 8: Stanovení obsahu cukrů

vzorky	laktóza (g/l)	retenční čas	glukóza (g/l)	retenční čas	galaktóza (g/l)	retenční čas
syrovátka	125,008	5,343	0,909	6,260	3,504	6,662
filtrát 50%	24,933	5,352	0,218	6,265	0,656	6,670
koncentrát 50%	23,836	5,298	0,253	6,247	0,456	6,627

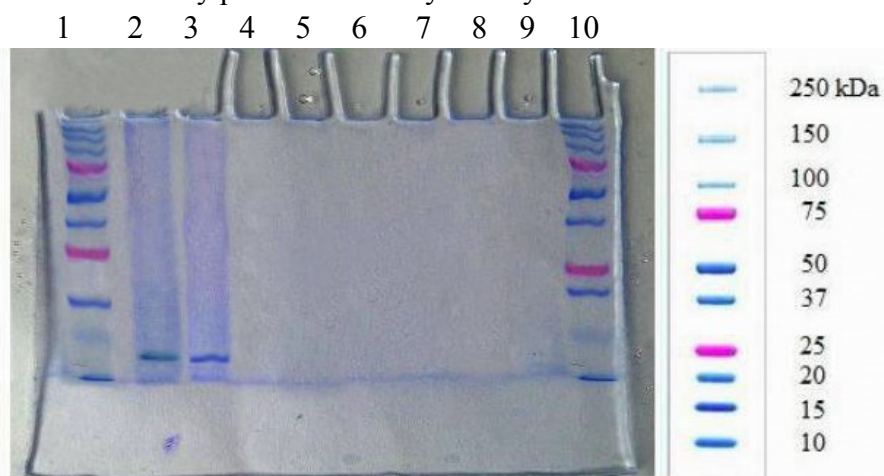
Tabulka 9: Stanovení obsahu kyseliny mléčné

vzorky	kys.mléčná (g/l)	retenční čas
syrovátka	5,289	8,545
filtrát	1,376	8,555
koncentrát	2,639	8,545

Byl zjištěn i obsah cukrů a kyseliny mléčné v syrovátce neupravené a poté upravené ultrafiltrací nebo vysrážené síranem amonným. Obsah laktózy neupravené syrovátky byl 125,008 g a po úpravě ultrafiltrací byl obsah u filtrátu a koncentrátu dohromady jen 48,769 g. Je tedy možné, že dlouhodobým skladováním, častým rozmrazováním a manipulací se vorkem došlo k úbytku nejen laktózy a ostatních cukrů, ale i kyseliny mléčné.

### 5.2.2 Charakterizace bílkovin pomocí PAGE-SDS

Podle postupu uvedeného v kapitole 4.8 byl připraven gel, vzorky a byla provedena elektroforéza. Byly testovány vzorky po 0, 30, 50 a 70% vysrážením síranem amonným a filtrát a koncentrát vzniklý po ultrafiltraci syrovátky.



Obrázek 6: Výsledek elektroforézy

Popis obrázku: 1 – standard, 2 – 0% vysrážení syrovátky, 3 – 30% vysrážení syrovátky, 4 – 50% vysrážení syrovátky, 5 – 70% vysrážení syrovátky, 6 – filtrát, 7 – koncentrát, 8 – prázdná, 9 – koncentrát, 10 – standard.

Na základě různé velikosti se proteiny pohybují gelem různou rychlostí, menší pronikají póry rychleji. Po uplynutí určité doby jsou proteiny rozděleny na základě molekulové hmotnosti, ty menší proteiny postoupí dále než větší, ty jsou blíže k počátku, kde došlo k aplikaci vzorku. Jak je patrné z Obrázku 6, tak v 0% a 30% vysrážení syrovátky vyskytovaly proteiny o nízké molekulové hmotnosti (linie 2,3). Ve zbylých vzorcích se

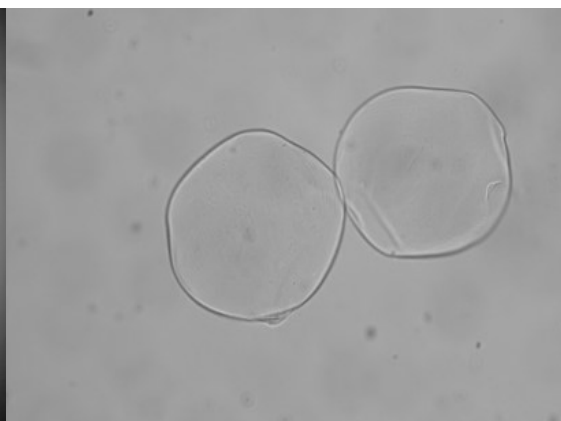
tyto bílkoviny nevyskytovaly. Došlo tedy zřejmě k jejich vysrážení síranem amonným. Po srovnání vzorku se standardem byla molekulová hmotnost určena na 15 kDa. Lysozym má molekulovou hmotnost asi 14,5 kDa. Z tohoto se dá usuzovat, že protein obsažený ve vzorcích byl právě lysozym.

### 5.3 Enkapsulace

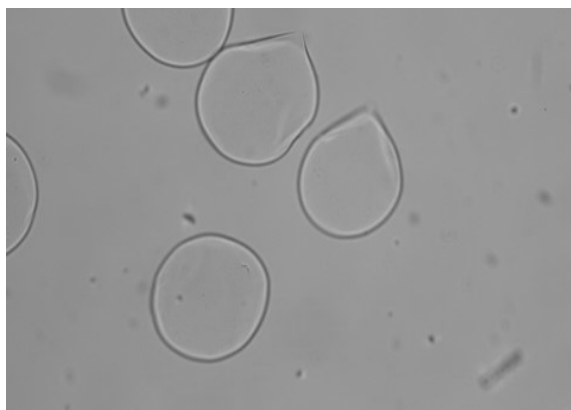
Podle postupu, který je uveden v kapitole 4.10, byly připraveny liposomové, alginátové a chitosanové částice. Do částic byla enkapsulována syrovátka, lysozym a kyselina mléčná. U připravených částic byla dále sledována jejich velikost, stabilita, enkapsulační účinnost a dlouhodobá stabilita.



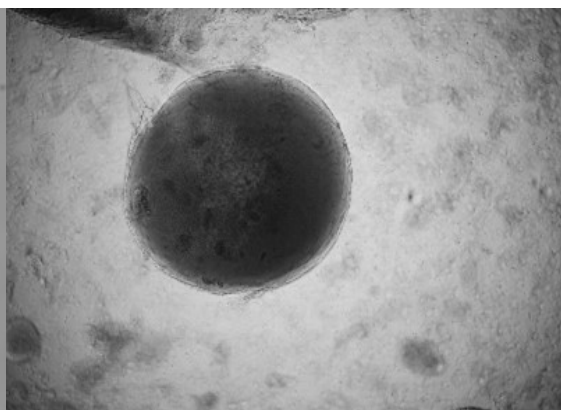
Obrázek 7: Alginátové částice o velikosti 450  $\mu\text{m}$



Obrázek 8: Alginátové částice o velikosti 300  $\mu\text{m}$



Obrázek 9: Alginátové částice o velikosti 200  $\mu\text{m}$



Obrázek 10: Chitosanové částice o velikosti 450  $\mu\text{m}$  s enkapsulovanou syrovátkou

Enkapsulované částice jednak alginátové i chitosanové byly pozorovány pod různým zvětšením pod optickým mikroskopem. Byla pozorována nejen jejich velikost, ale i tvar a struktura. U alginátových částic byly připraveny tři různé velikosti 200, 300 a 450  $\mu\text{m}$ , u chitosanových pouze 450  $\mu\text{m}$ , protože částice neprošly při enkapsulaci přes trysku s menším průměrem.

#### 5.3.1 Enkapsulace syrovátky

Dle postupu z kapitoly 4.110 byly připraveny liposomové a polysacharidové částice. Po přípravě liposomů byly vzorky zcentrifugovány při 11 000 ot/min po dobu 60 minut. Poté



bylo v supernatantu stanoveno množství volných bílkovin či kyseliny mléčné, stejným postupem byla stanovena koncentrace bílkovin či kyseliny mléčné i v roztoku před enkapsulací. Z rozdílu koncentrace v roztoku před a po enkapsulaci byla následně stanovena enkapsulační účinnost. U alginátových a chitosanových částic bylo postupováno shodným postupem, pouze centrifugace byla nahrazena filtrací. Každý vzorek byl proměřen celkem dvakrát a z hodnot byl vypočítán průměr. Dosažené výsledky jsou zaznamenány v tabulce 10 a 11 pro přehledné srovnání enkapsulačních účinností byl také sestaven graf 2.

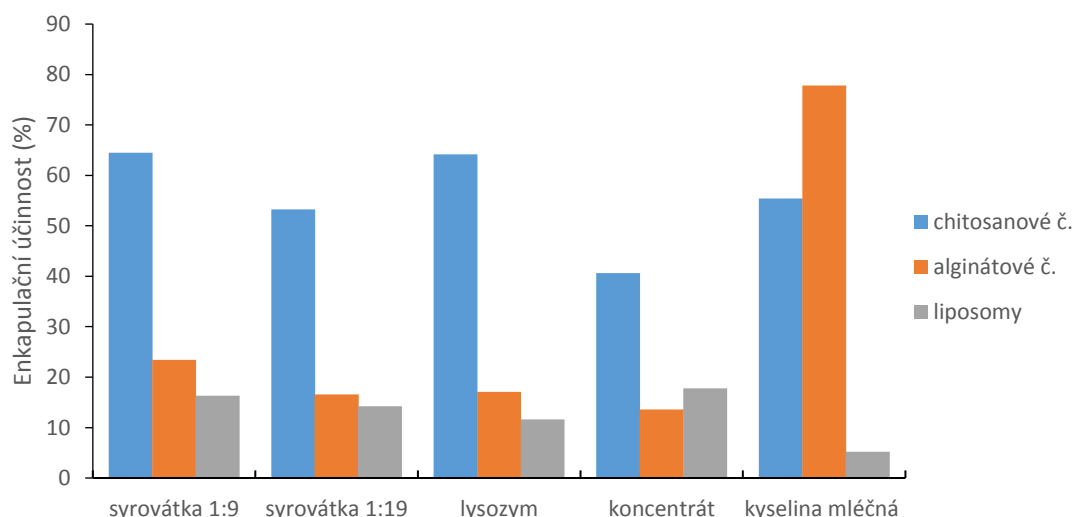
Na obrázku 11 je chromatogram syrovátky po enkapsulaci v chitosanových částicích, kde jsou patrné retenční časy látek. Další chromatogramy jsou umístěny v Příloha 2.

Tabulka 10: Enkapsulační účinnosti vzorků - bílkoviny

vzorky	C <sub>chitosan</sub> (mg/ml)	enkapsulační účinnost (%)	C <sub>alginát</sub> (mg/ml)	enkapsulační účinnost (%)	C <sub>liposom</sub> (mg/ml)	enkapsulační účinnost (%)
syrovátka 1:9	12,195	64,517	26,317	23,427	28,756	16,332
syrovátka 1:19	16,057	53,280	28,666	16,593	29,476	14,237
lysozym	36,257	64,200	83,978	17,079	89,488	11,639
konzentrát frakce syrovátky	1,299	40,598	1,889	13,594	1,798	17,768

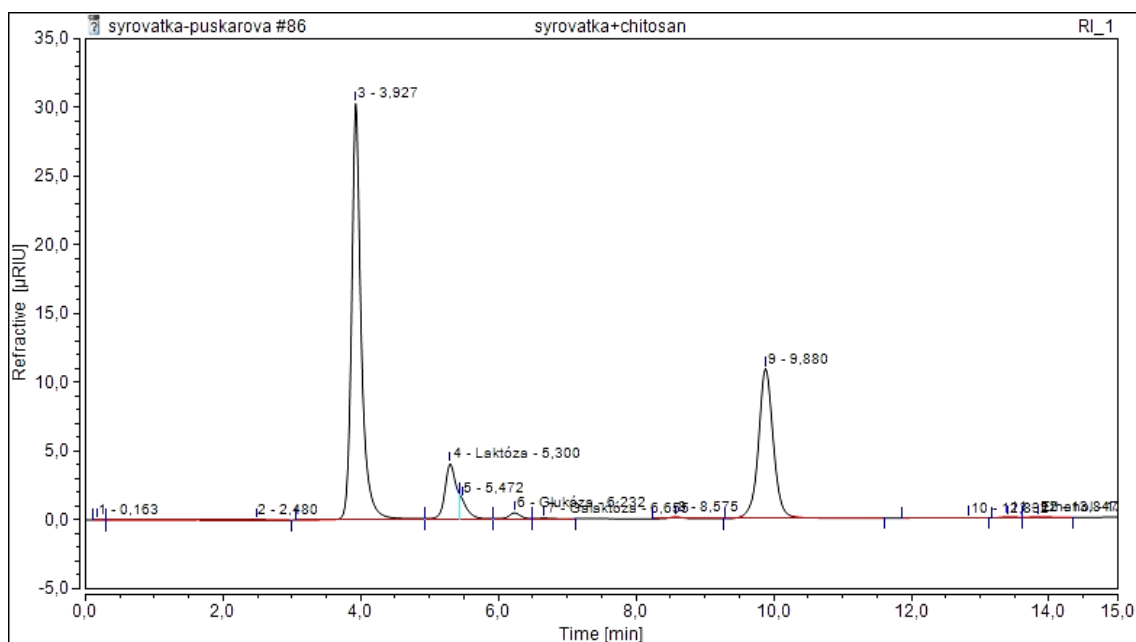
Tabulka 11: Enkapsulační účinnosti vzorků – kyselina mléčná

vzorky	C <sub>chitosan</sub> (mg/ml)	enkapsulační účinnost (%)	C <sub>alginát</sub> (mg/ml)	enkapsulační účinnost (%)	C <sub>liposom</sub> (mg/ml)	enkapsulační účinnost (%)
kyselina mléčná	4,583	55,419	2,282	77,804	9,743	5,225



Graf 2: Srovnání enkapsulační účinnosti

Jak je patrné z grafu a tabulek, největší účinnost enkapsulace z hlediska enkapsulovaných bílkovin byla stanovena v případě chitosanových částic, a to u všech zkoumaných vzorků. Nejmenší enkapsulační účinnost byla naopak zaznamenána až na vzorek koncentrátu u liposomů, což vzhledem k rozdílné velikosti částic byl očekávaný výsledek. Kyselina mléčná se pak nejlépe enkapsulovala do alginátových částic.



Obrázek 11: Chromatogram pro filtrát po enkapsulaci syrovátky v chitosanových částicích

### 5.3.2 Dlouhodobá stabilita připravených částic

Podle postupu, který se nachází v kapitole 4.12, byla stanovena dlouhodobá stabilita částic. Tato stabilita byla stanovována pro alginátové, chitosanové i liposomové částice. Po týdnu a třech týdnech byl zjišťován obsah uvolněných bílkovin a kyseliny mléčné ve vzorcích. Každý vzorek byl stanovován dvakrát a následně byl vypočítán průměr těchto vzorků.

Tabulka 12: Množství uvolněných složek v modelových prostředích po týdnu

vzorky	enkapsulováno	uvolněno - týden		
	c (mg/ml)	c <sub>voda</sub> (mg/ml)	c <sub>10%</sub> (mg/ml)	c <sub>50%</sub> (mg/ml)
syrovátka <sub>a</sub>	0,123	0,023	0,061	0,113
syrovátka <sub>ch</sub>	0,595	0,037	0,046	0,101
syrovátka <sub>lip</sub>	0,281	0,036	0,059	0,120
lysozym <sub>a</sub>	0,202	0,020	0,039	0,082
lysozym <sub>ch</sub>	0,750	0,157	0,199	-
lysozym <sub>lip</sub>	0,589	0,091	0,117	0,186
kys.mléčná <sub>a</sub>	0,205	0,007	0,116	0,134
kys.mléčná <sub>ch</sub>	0,563	-	0,042	0,057
kys.mléčná <sub>lip</sub>	0,027	-	0,003	0,012

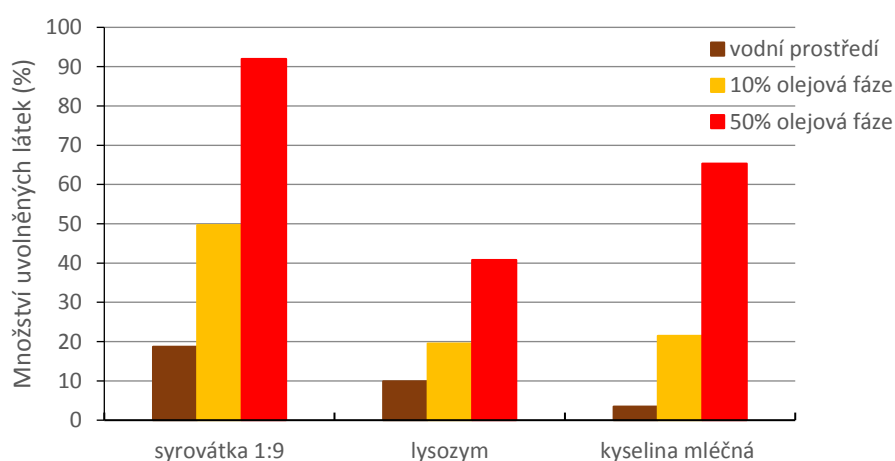
Tabulka 13: Množství uvolněných složek v modelových prostředích po třech týdnech

vzorky	enkapsulováno	uvolněno - tři týdny		
	c (mg/ml)	c <sub>voda</sub> (mg/ml)	c <sub>10%</sub> (mg/ml)	c <sub>50%</sub> (mg/ml)
syrovátka <sub>a</sub>	0,123	0,031	0,070	0,120
syrovátka <sub>ch</sub>	0,595	0,074	0,096	0,146
syrovátka <sub>lip</sub>	0,281	0,058	0,077	0,154
lysozym <sub>a</sub>	0,202	0,028	0,053	0,082
lysozym <sub>ch</sub>	0,750	0,191	0,266	-
lysozym <sub>lip</sub>	0,589	0,156	0,197	0,300
kys.mléčná <sub>a</sub>	0,205	0,014	0,150	0,162
kys.mléčná <sub>ch</sub>	0,563	-	0,072	0,104
kys.mléčná <sub>lip</sub>	0,027	-	0,010	0,017

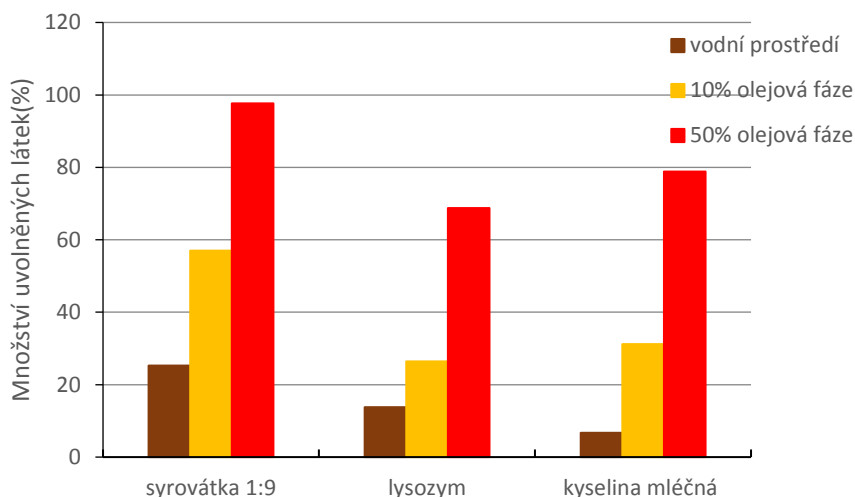
Po porovnání bylo zjištěno, kolik procent bílkovin a kyseliny mléčné se uvolnilo v průběhu pozorování do modelových prostředí.

Tabulka 14: Procentuální uvolňování látek z alginátových částic za čas

ALGINÁTOVÉ ČÁSTICE						
vzorky	týden			tři týdny		
	c <sub>voda</sub> (%)	c <sub>10%</sub> (%)	c <sub>50%</sub> (%)	c <sub>voda</sub> (%)	c <sub>10%</sub> (%)	c <sub>50%</sub> (%)
syrovátka 1:9	18,676	49,663	91,999	25,239	56,991	97,698
lysozym	9,939	19,514	40,811	13,736	26,448	68,782
kyselina mléčná	3,451	21,468	65,309	6,707	31,227	78,821



Graf 3: Procentuální množství uvolněných složek z alginátových částic po týdnu skladování

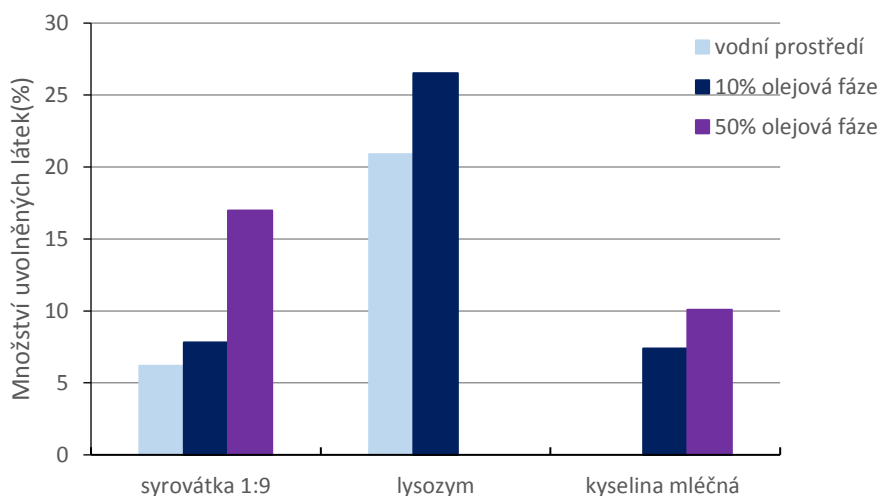


Graf 4: Procentuální množství uvolněných látek z alginátových částic po třech týdnech skladování

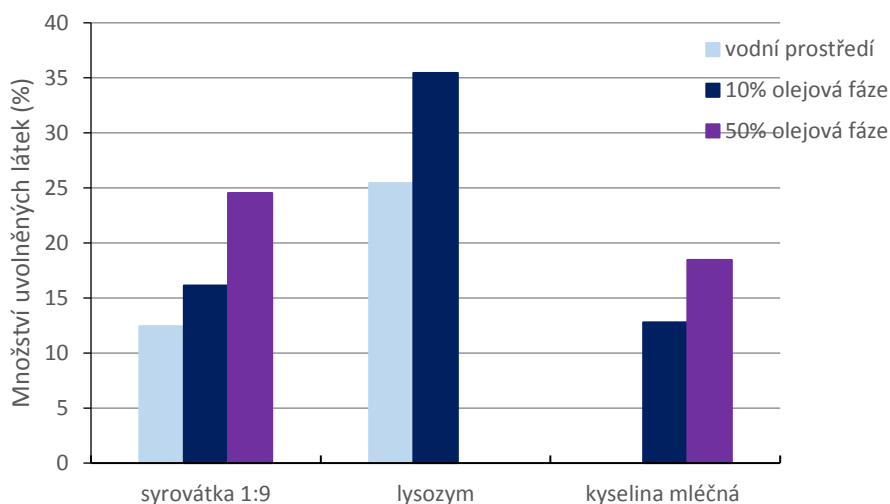
Z tabulky a z diagramů (graf 3,4) vyplývá, že docházelo k postupnému uvolňování obsahu částic ve všech třech prostředích. Nejméně se uvolnilo kyseliny mléčné ve vodném prostředí, a to jen 3,45 %. Nejvíce potom syrovátky v prostředí 50% olejové fáze, kde se jí uvolnilo 91,99 %. Po třech týdnech se obsah bílkovin a kyseliny mléčné v prostředí zvýšil, a to nejvíce v prostředí 50% olejové fáze. U lysozymu došlo k více jak polovičnímu navýšení obsahu bílkovin, uvolněné množství vzrostlo ze 40,81 % na 68,78%.

Tabulka 15: Procentuální uvolňování látek z chitosanových částic za čas

CHITOSANOVÉ ČÁSTICE						
vzorky	týden			tři týdny		
	c <sub>voda</sub> (%)	c <sub>10%</sub> (%)	c <sub>50%</sub> (%)	c <sub>voda</sub> (%)	c <sub>10%</sub> (%)	c <sub>50%</sub> (%)
<b>syrovátka 1:9</b>	6,181	7,808	16,980	12,441	16,139	24,545
<b>lysozym</b>	20,890	26,516	-	25,449	35,455	-
<b>kyselina mléčná</b>	-	7,384	10,078	-	12,778	18,458



Graf 5: Procentuální množství uvolněných látek z chitosanových částic po týdnu skladování



Graf 6: Procentuální množství uvolněných látek z chitosanových částic po třech týdnech skladování

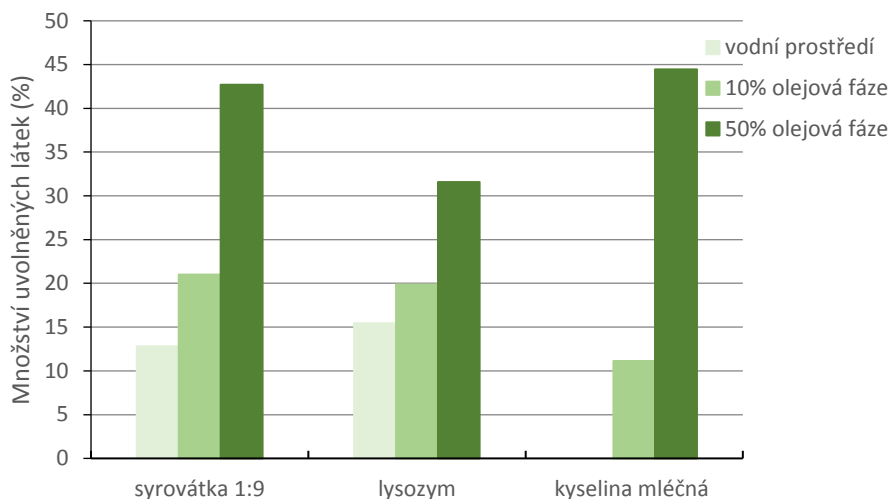
U chitosanových částic došlo po týdnu k největšímu uvolnění bílkovin u lysozymu v prostředí 10% olejové fáze, uvolnilo se 20,89%. Nejmenší uvolnění nastalo u syrovátky ve vodném prostředí, kdy se uvolnilo pouze 6,18 %. Po třech týdnech došlo ke zvýšení obsahu bílkovin a kyseliny mléčné ve všech prostředích. Nejvíce, a to víc jak dvojnásobně, se zvýšila koncentrace syrovátky v prostředí vodném a 10% olejové fáze, kdy došlo ke zvýšení obsahu bílkovin na 12,44 % a 16,14 %.

Při porovnání stability obou typů částic v modelových prostředích se jako stabilnější částice jeví chitosanové. U nich nedocházelo k velkému zvýšení koncentrace uvolněných látek v prostředí po týdnu a ani po třech týdnech.

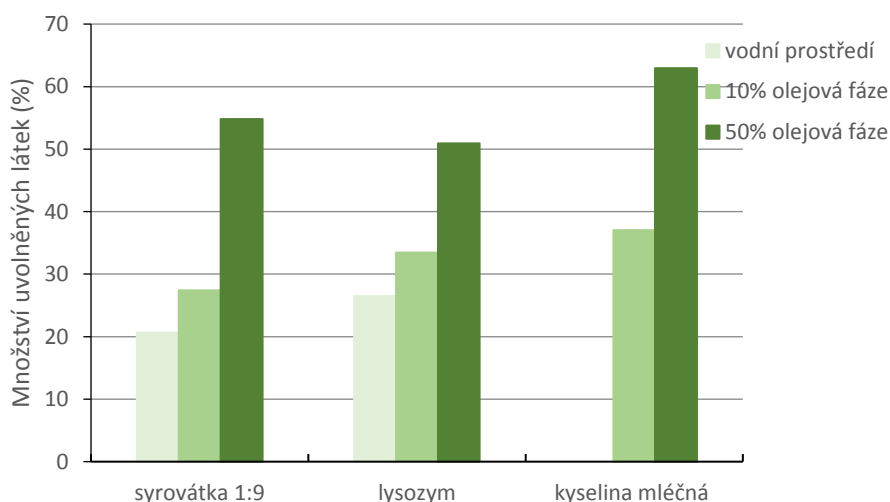
Liposomové částice se ukázaly být poměrně stabilní ve vodném prostředí i v prostředí 10% olejové fáze, kdy se procentuální uvolnění látek pohybovalo víceméně v rozmezí 15-20 %. K největšímu uvolnění došlo u kyseliny mléčné v prostředí 50% olejové fáze, uvolnilo se 44,44 %. Nejmenší uvolnění nastalo u také kyseliny mléčné v prostředí 10% olejové fáze, kdy se uvolnilo pouze 11,11 % (Tab.16).

Tabulka 16: Procentuální uvolňování látek z liposomových částic za čas

LIPOSOMY						
vzorky	týden			tři týdny		
	Cvoda (%)	c10% (%)	c50% (%)	Cvoda (%)	c10% (%)	c50% (%)
syrovátka 1:9	12,811	20,996	42,705	20,641	27,402	54,804
lysozym	15,450	19,864	31,579	26,486	33,447	50,934
kyselina mléčná	-	11,111	44,444	-	37,037	62,963



Graf 7: Procentuální množství uvolněných látek z liposomových částic po týdnu skladování



Graf 8: Procentuální množství uvolněných látek z liposomových částic po třech týdnech skladování

Po třech týdnech došlo ke zvýšení obsahu bílkovin a kyseliny mléčné ve všech prostředích. Nejvíce se zvýšila koncentrace kyseliny mléčné v prostředí 10% olejové fáze, kdy došlo k navýšení o více jak 25 %.

Při porovnání stability částic v modelových prostředích se jako stabilnější částice jeví chitosanové. U nich nedocházelo k velkému zvýšení koncentrace látek v prostředí po týdnu a ani po třech týdnech. Také u liposomů nebyl výrazný rozdíl mezi stabilitou po jednom týdnu a po třech.

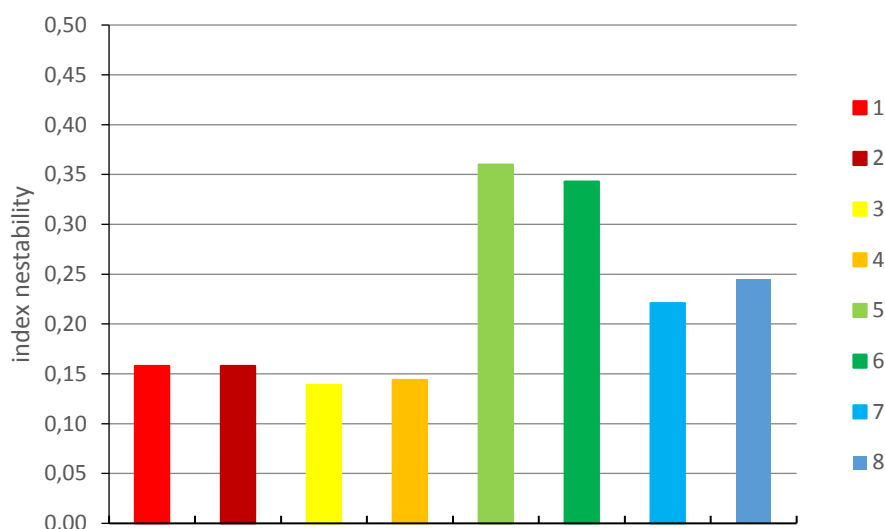
## 5.4 Příprava kosmetických krémů

### 5.4.1 Stanovení stability pomocí analytické centrifugace

Pomocí analytické centrifugy byla zjištěna stabilita vytvořených krémů se syrovátkou a částicemi. Stanovení stability emulzí bylo provedeno na analytické centrifuze podle postupu popsáno v kapitole 4.14

Tabulka 17: Indexy nestability

vzorek	index nestability	RCA (g)	čas (s)
syrovátka <sub>100 %1</sub>	0,158	530,3	499,7
syrovátka <sub>100 %2</sub>	0,158	530,6	499,9
syrovátka <sub>50 %1</sub>	0,139	530,5	490,2
syrovátka <sub>50 %2</sub>	0,144	530,8	490,4
chitosanové č.1	0,36	530,9	499,8
chitosanové č.2	0,343	533,7	490,1
syrovátka <sub>lyof1</sub>	0,221	530,8	490,3
syrovátka <sub>lyof2</sub>	0,245	531,1	490,5

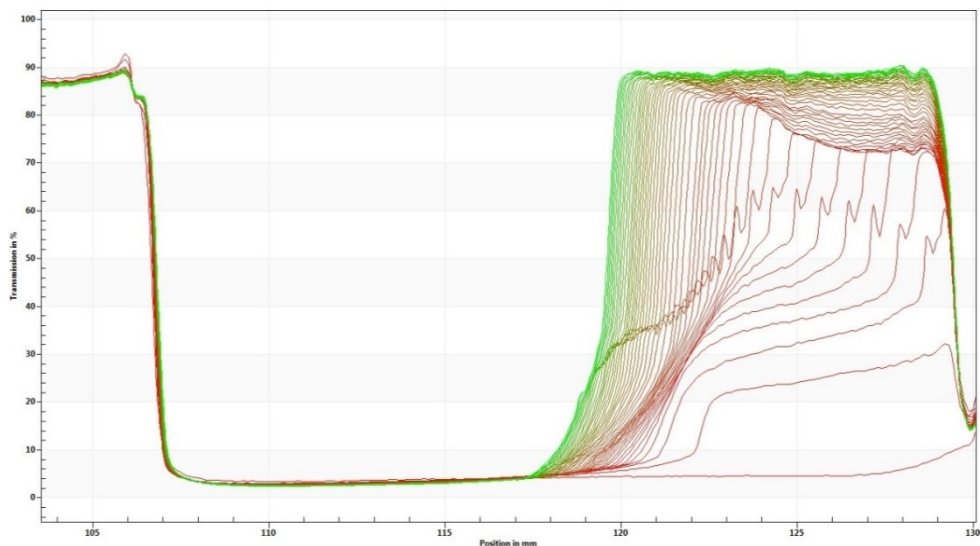


Graf 9: Porovnání indexů nestability u jednotlivých vzorků

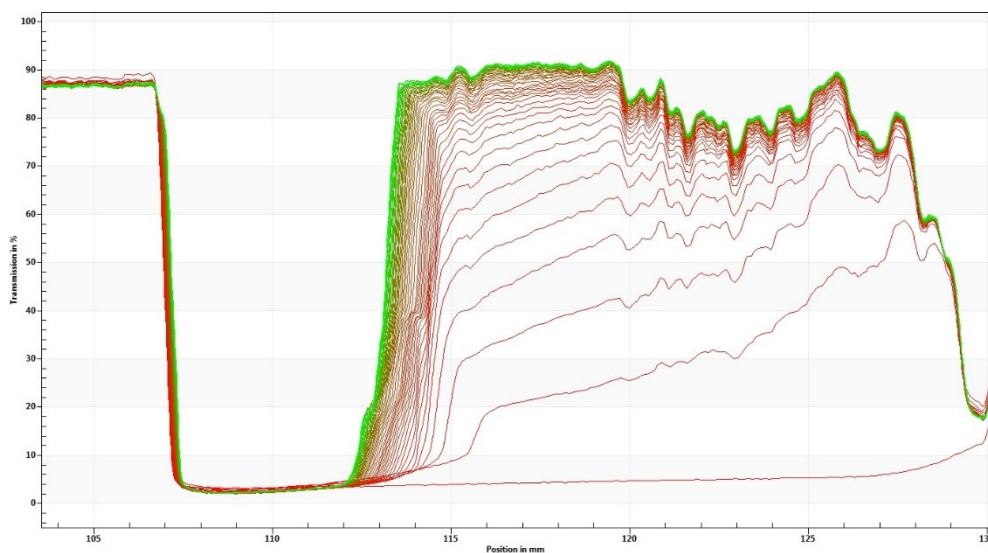
Popisky dat: 1-2: emulze, ve které byla voda nahrazena syrovátkou ze 100 %, 3-4: emulze, ve které byla voda nahrazena syrovátkou z 50 %, 5-6: emulze obohacená o chitosanové částice, 7-8: emulze obohacená o lyofilizovanou syrovátku.

Z tabulky 17 a také z grafu 9 vyplývá, že nejstabilnější vzorkem je vzorek číslo 3, tedy emulze, ve které byla voda z vodné fáze nahrazena syrovátkou z 50 %. Poznáme to díky jeho nejnižšímu indexu nestability. Čím je index nestability větší, tím je systém méně stabilní. Naopak nejvíce nestabilní je vzorek 5, což je emulze obohacená o chitosanové částice.

Z pozorování už během procesu centrifugace bylo možné zjistit, že ani jeden ze zkoumaných krémů nevydrží tuto zátěž. Proto by ani jeden nebyl vhodný k použití do kosmetických krémů.



*Graf 10: Graf závislosti transmittance u nejstabilnějšího vzorku z 50 % syrovátky (vz.3)s krokem po 20 s*

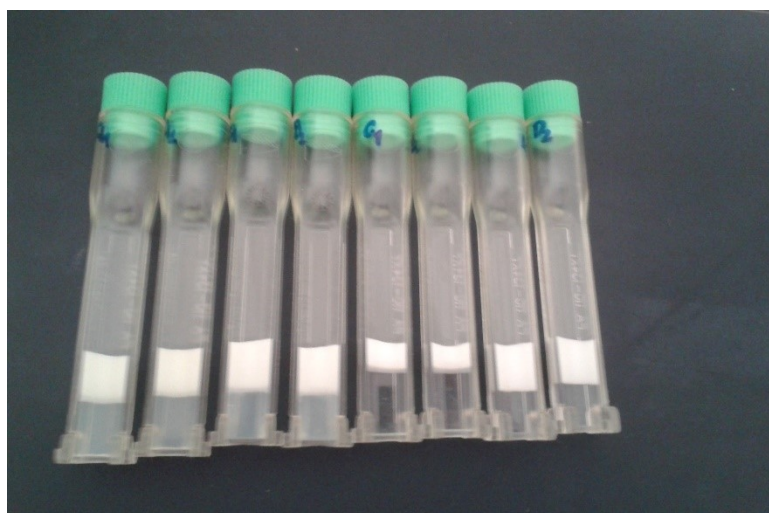


*Graf 11: Graf závislosti transmittance u nejméně stabilního vzorku s chitosanovými částicemi (vz.5)s krokem po 20 s*

Na grafech 10 a 11 na ose y je vyobrazena transmittance vzorku, na ose x je umístěna pozice v kyvetě, kdy nejméně napravo je dno kyvety. Červené křivky jsou počátek centrifugace a ty zelené značí její konec. U všech zkoumaných vzorků docházelo velmi rychle k sedimentaci velkých částic.

Grafy 10 a 11 zobrazují nejvíce a nejméně stabilní zkoumané krémy. Ostatní grafy vzorků jsou umístěny v Příloha 1.





Obrázek 12: Kyvety se vzorky podrobenými analytické centrifugaci

## 5.5 Antimikrobiální testy

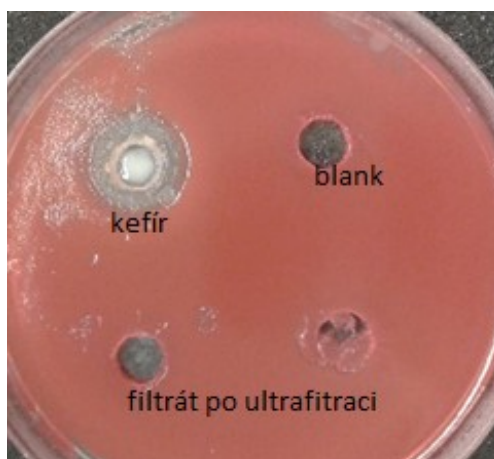
Antimikrobiální aktivita vzorků byla testována na dvou kmenech bakterií, a to vůči grampozitivnímu kmeni *Micrococcus luteus* (ML) a gramnegativnímu kmeni *Serratia marcescens* (SM). Prováděny byly dva druhy antimikrobiálních testů – diluční metoda dle postupu v kapitole 4.9.3 a difúzní metoda, která byla provedena dle postupu v kapitole 4.9.2.

### 5.5.1 Antimikrobiální účinek vybraných produktů

Porovnáním inhibičních zón lze zjistit, že nejlepší antimikrobiální vlastnosti má z testovaných vzorků domácí vyrobený kefir. Komerční dostupné produkty mají tyto vlastnosti minimální. Tyto jejich vlastnosti se zřejmě ztrácejí už při jejich výrobě a poté při skladování.

Tabulka 18

produkty	ML	SM
Kefír domácí	1,2 cm	1 cm
Kefír komerční	0,5 cm	0,1 cm
Acidofilní mléko	0,2 cm	0 cm



Obrázek 13: Inhibiční zóna kefiru na kmenu *Serratia marcescens*

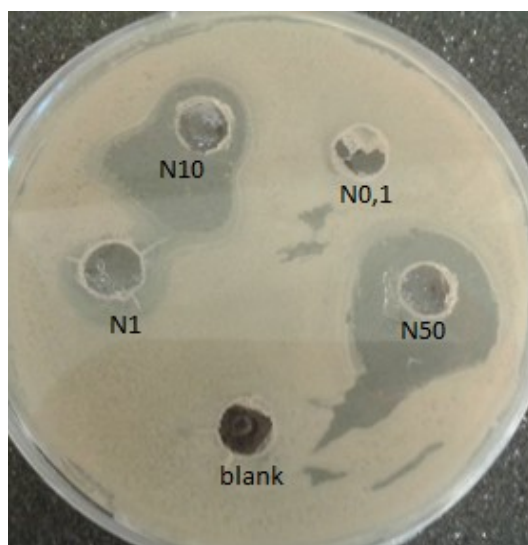
Také je možné si povšimnout, že domácí kefir tvoří inhibiční zónu na kmeni *Serratia marcescens* (obrázek 13). Je to způsobeno vyšším obsahem kyseliny mléčné v tomto kefiru.

### 5.5.2 Antimikrobiální účinek lysozymu a nisinu

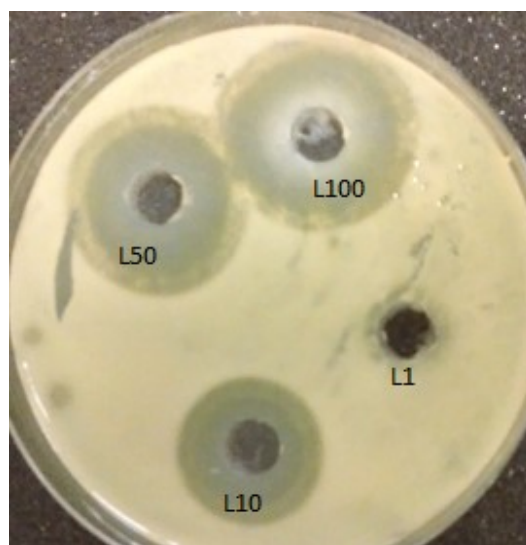
Dle postupu z kapitol 4.9.2 a 4.9.3 byl stanoven antimikrobiální účinek lysozymu a nisinu. Byly připraveny roztoky těchto dvou látek o různých koncentracích (1-100 mg/ml). Z výsledků inhibičních zón (Tabulka 19) je možné pozorovat, že lepší antimikrobiální účinek má lysozym, který na gram pozitivní bakterie působí velmi dobře, ale na gram negativní bakterie nemá téměř žádný účinek.

Tabulka 19: Inhibiční zóny pro lysozym a nisin

c (mg/ml)	ML		SM	
	lysozym	nisin	lysozym	nisin
100	2,6 cm	1,5 cm	0,4 cm	0,2 cm
50	2 cm	1,2 cm	0,2 cm	0,1 cm
10	1,5cm	1 cm	0 cm	0 cm
1	0,5 cm	0,3 cm	0 cm	0 cm



Obrázek 14: Inhibiční zóny nisinu na kmenu *Micrococcus luteus*



Obrázek 15: Inhibiční zóny lysozymu na kmenu *Micrococcus luteus*

Popisky obrázků: L1-100 – lysozym o příslušné koncentraci v mg/ml, N0,1-50 – nisin o příslušné koncentraci v mg/ml

Také na obrázcích 14 a 15 můžeme pozorovat, že už je na první pohled zřejmé, že při baktericidním účinku jsou inhibiční zóny lysozymu větší než u nisinu, nakopak z tabulky 20 vyplývá, že inhibiční účinek á větší nisin.

Tabulka 20: Srovnání inhibičního a baktericidního účinku

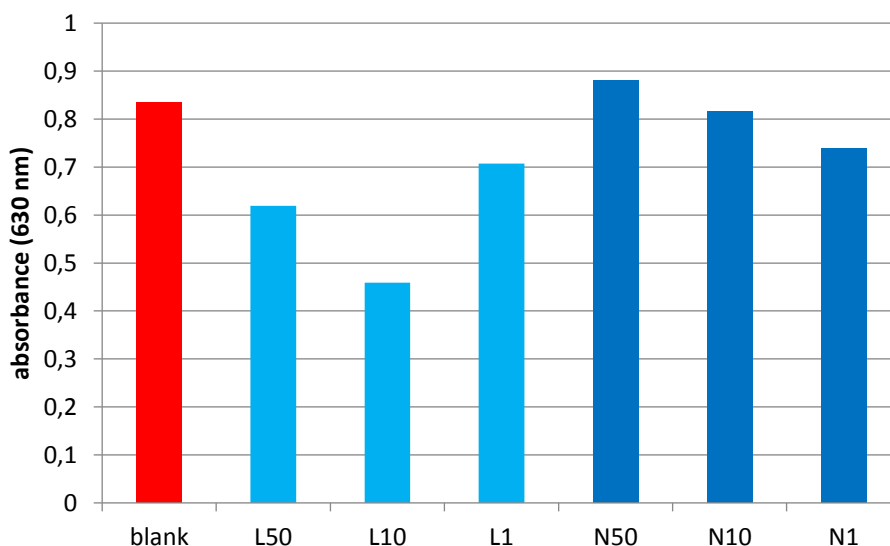
Baktericidní účinek			Inhibiční účinek	
	nisin	lysozym	nisin	lysozym
c (mg/ml)	inhibiční zóna (cm)		inhibiční zóna (cm)	
1	0,3	0,4	0,7	0,8
10	0,7	0,9	1,4	1,2
50	1	1,2	2,1	1,5
100	1,2	1,5	2,6	1,8

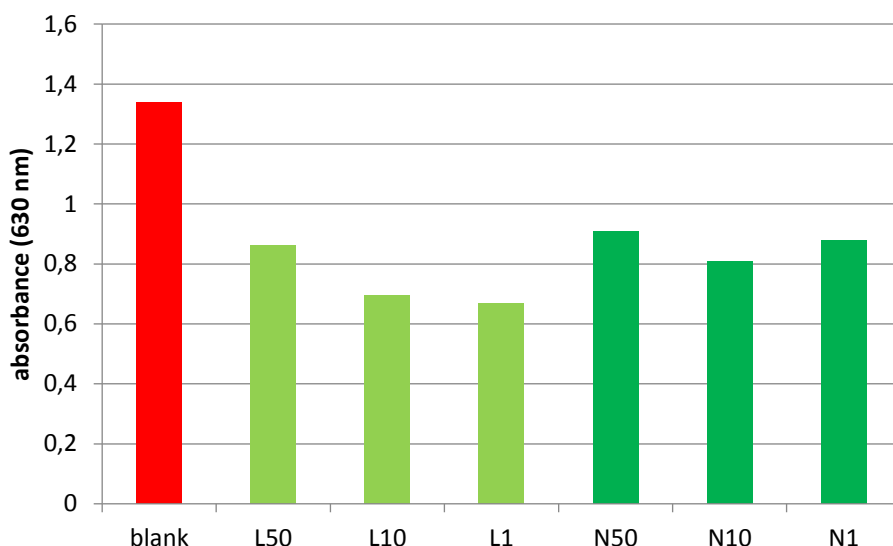
Z porovnání z baktericidního a inhibičního účinku (Tabulka 20) je patrné, že pro tyto látky je mnohem snadnější předcházet růstu bakterií, než už narostlé zabít viz. kapitola 4.9.2. Antimikrobiální účinek lysozymu a nisinu byl potvrzen také pomocí dilučního testu na mikrotitrační destičce (tabulka 21, graf 12 a 13).

Tabulka 21: Porovnání rozdílů absorbancí u zkoumaných látek z času 0 a 24 hodin

	blank	L50	L10	L1	N50	N10	N1
ML	0,835	0,619	0,459	0,707	0,881	0,816	0,738
SM	1,338	0,863	0,695	0,669	0,908	0,808	0,878

L1-50 – lysozym o příslušné koncentraci v mg/ml, N1-50 – nisin o příslušné koncentraci v mg/ml.





Graf 13: Antimikrobiální test *Serratia marcescens* – lysozym a nisin

### 5.5.3 Antimikrobiální účinek kyseliny mléčné

Byla sestavena koncentrační řada kyseliny mléčné o koncentracích 1, 5, 10, 50 mg/ml.

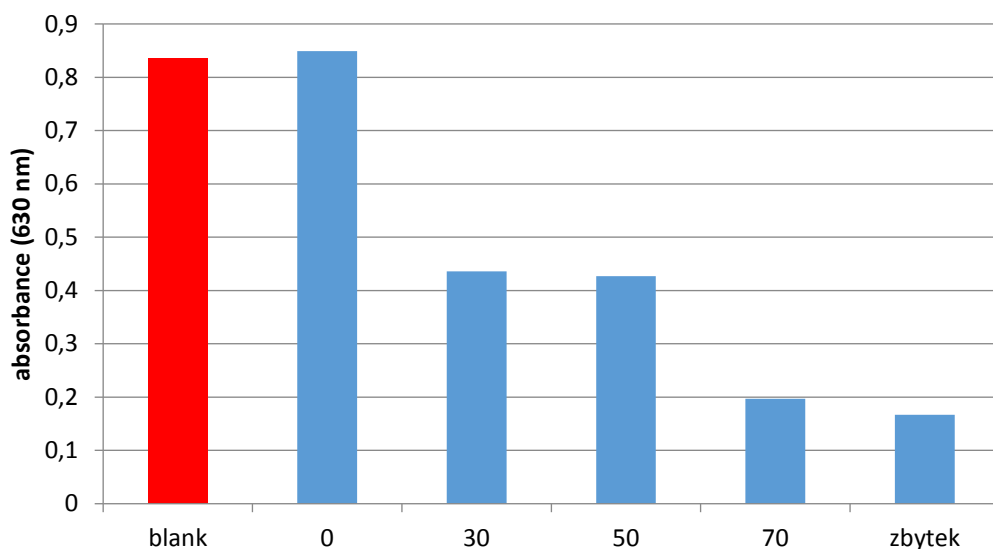
Tabulka 22: Inhibiční zóny kyseliny mléčné

c (mg/ml)	ML	SM
	inhibiční zóny (cm)	
50	1,8	1,4
10	1,3	1
5	0,6	0,6
1	0,4	0,3

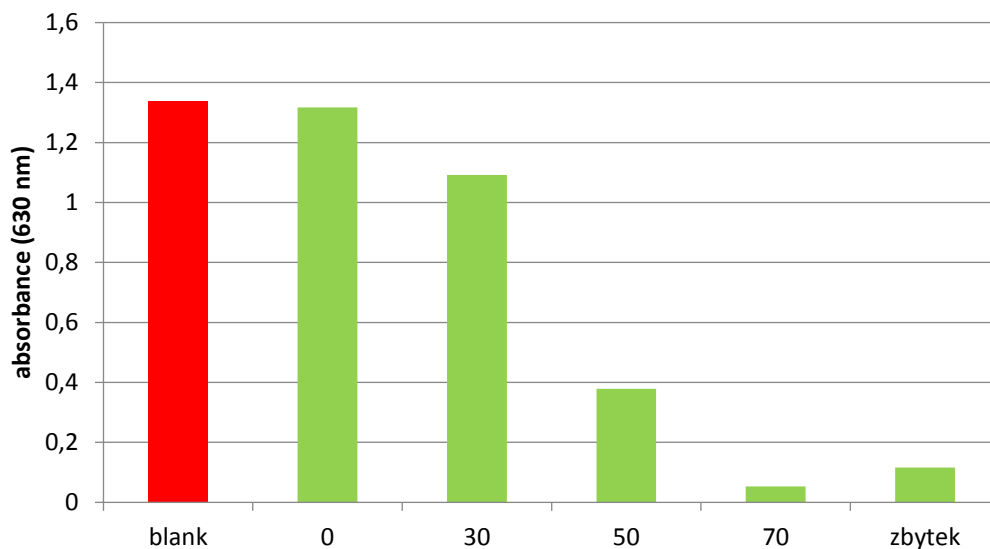
Bylo zjištěno, že kyselina mléčná působí proti gram pozitivním bakteriím a na rozdíl od lysozymu a nisinu má i účinek proti gram negativním bakteriím díky tomu, že snižuje pH a způsobuje permeabilizaci vnitřní membrány, což umožňuje přístup antimikrobiálních látek k cytoplazmatické membráně [42].

### 5.5.4 Antimikrobiální účinek syrovátky v různých úpravách

Z dosažených výsledků vyplývá, že syrovátka po úpravách vysrážením síranem amonných vykazuje antimikrobiální vlastnosti, a to jak u kmene *Micrococcus luteus*, tak i u kmene *Serratia marcescens*. Účinky na gram negativní kmen *Serratia marcescens* jsou patrně způsobeny kyselinou mléčnou.



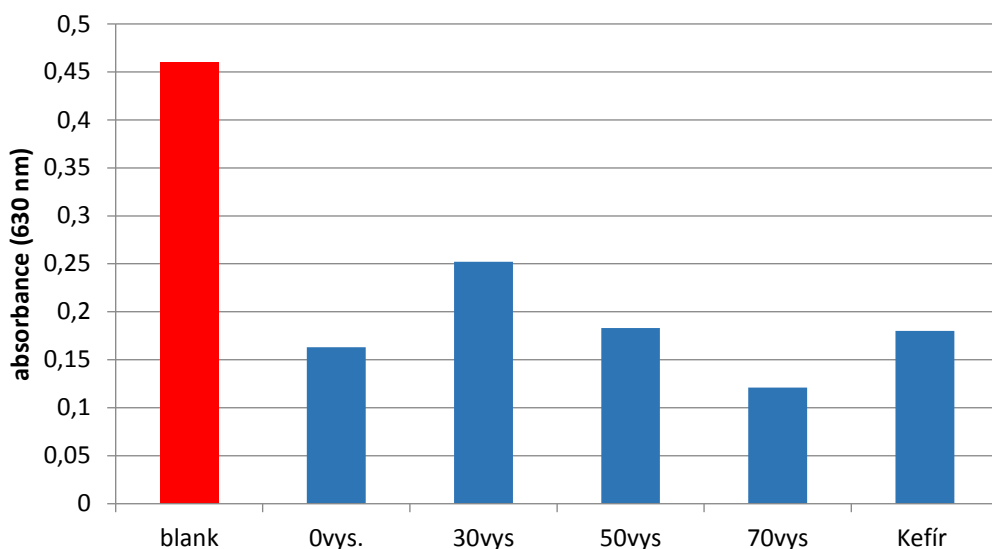
Graf 14: Antimikrobiální test *Micrococcus luteus* – frakce syrovátky



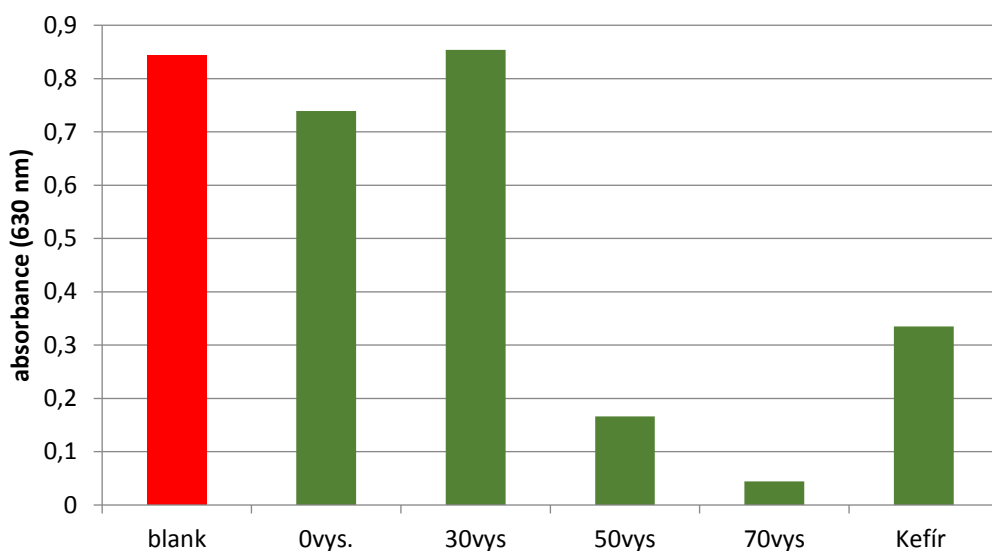
Graf 15: Antimikrobiální test *Serratia marcescens* – frakce syrovátky

Popisky grafů 14 a 15: 0, 30, 50, 70 – znamená procentuální vysrážení syrovátky síranem amonným

Z grafů 14 a 15 vyplývá, že čím více je syrovátka vysrážena, tím menší je rozdíl absorbancí v čase 0 a 24 hodin. Syrovátka zabraňuje množení bakterií v jamce destičky a zákal je nižší, protože kultura nadále neroste.



Graf 16: Antimikrobiální test *Micrococcus luteus* – syrovátkové bílkoviny a kefir



Graf 17: Antimikrobiální test *Serratia marcescens* – syrovátkové bílkoviny a kefir  
 Popisky grafu 16 a 17: 0vys., 30vys, 50vys, 70vys – vysrážené zbytky bílkovin po centrifugaci

Tabulka 23: Porovnání rozdílů absorbancí u zkoumaných látek z času 0 a 24 hodin

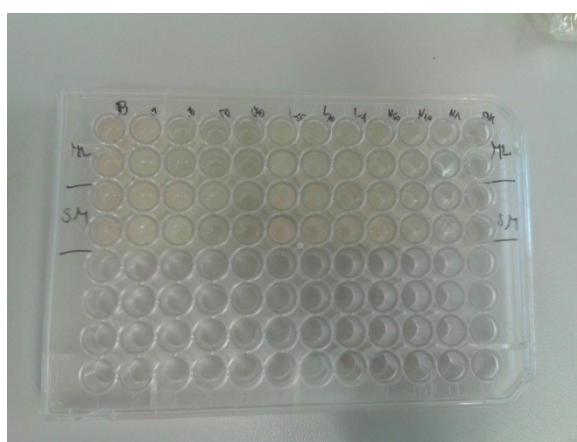
	blank	0	30	50	70	zbytek
ML	0,835	0,849	0,436	0,427	0,197	0,167
SM	1,338	1,317	1,092	0,379	0,053	0,116
	blank	0 <sub>vys.</sub>	30 <sub>vys</sub>	50 <sub>vys</sub>	70 <sub>vys</sub>	Kefír
ML	0,460	0,163	0,252	0,183	0,121	0,180
SM	0,844	0,739	0,854	0,166	0,044	0,335

Popisky: 0, 30, 50, 70 – znamená procentuální vysrážení syrovátky síranem amonným, 0<sub>vys.</sub>, 30<sub>vys</sub>, 50<sub>vys</sub>, 70<sub>vys</sub> – vysrážené zbytky bílkovin po centrifugaci

Tabulka 24: Inhibiční zóny syrovátky

syrovátka	ML	SM
	inhibiční zóny (cm)	
lyofilizovaná	1,2	0
neupravená	1,5	0,6
zředěná 1:1	1,0	0,1
zředěná 1:9	0,6	0

Z tabulky 24 vyplývá, že největší antimikrobiální účinek má syrovátka nijak neupravená, jak na gram pozitivní, tak na gram negativní kmeny bakterií. Syrovátka upravená lyofilizací má dobrý účinek na kmen *Micrococcus luteus*, avšak na kmen *Serratia marcescens* nemá účinek žádný.



Obrázek 16: Mikrotitrační destička se zkoumanými vzorky a mikroorganismy

Popis obrázku: číslování bylo zleva do prava: 1 – blank, 2 – 0% vysrážení syrovátky, 3 – 30% vysrážení syrovátky, 4 – 50% vysrážení syrovátky, 5 – 70% vysrážení syrovátky, 6 – L1, 7 – L10, 8 – L50, 9 – N1, 10 – N10, 11 – N50, 12 – zbytek po vysrážení.

Popisky: L1-50 – lysozym o příslušné koncentraci v mg/ml, N1-50 – nisin o příslušné koncentraci v mg/ml.

### 5.5.5 Antimikrobiální účinek připravených částic a krémů

Testování antimikrobiálního účinku proběhlo také s enkapsulovanými částicemi a krémy. Na Petriho misku s médiem a mikrobiálním kmenem bylo nanášeno přibližně stejné množství částic a krémů.

Tabulka 25: Inhibiční zóny enkapsulovaných částic a krémů

<b>chitosanové částice</b>	<b>ML</b>	<b>SM</b>
<b>vzorek</b>	<b>inhibiční zóna (cm)</b>	
<b>koncentrát</b>	1,2	1
<b>kyselina mléčná</b>	1,7	1,1
<b>syrovátka 1:9</b>	1,3	0,7
<b>syrovátka 1:19</b>	0	0
<b>lysozym</b>	3	0,2
<b>krém s 50% syrovátkou</b>	0	0
<b>krém s 100% syrovátkou</b>	0	0,5
<b>krém s lyof. syrovátkou</b>	0	0,1
<b>alginátové částice</b>	<b>ML</b>	<b>SM</b>
<b>vzorek</b>	<b>inhibiční zóna (cm)</b>	
<b>koncentrát</b>	0,6	0
<b>kyselina mléčná</b>	0,2	0,2
<b>syrovátka 1:9</b>	0,5	0
<b>syrovátka 1:19</b>	0,2	0
<b>lysozym</b>	1,3	0

Z výsledků uvedených v Tab.19 je patrné, že největší antimikrobiální účinek po enkapsulaci má lysozym, který má v chitosanových částicích větší účinek, než ve volné formě. Dále je patrný antimikrobiální účinek kyseliny mléčné, syrovátky ředěné v poměru 1:9 a syrovátkového koncentrátu.

Naopak bylo zjištěno, že krémy obsahující syrovátku nemají téměř žádný antimikrobiální účinek. To bylo nejspíš způsobeno dlouhodobým skladováním syrovátky a krémů. A alginátové částice mají účinek také minimální, anebo výrazně menší než částice chitosanové.

Z výsledků z tabulky 19 je tedy možné vyčíst, že lepší antimikrobiální účinek mají částice, které byly enkapsulovány v chitosanu, a to z toho důvodu, že chitosan je sám o sobě antimikrobiální látkou.



## 6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývá charakterizací a využitím syrovátky v její volné a enkapsulované formě a jejím použitím v kosmetickém průmyslu. V teoretické části byla charakterizována syrovátka, její antimikrobiální složky a možné využití v kosmetice. Dále byly popsány využívané metody charakterizace a metody enkapsulace.

V části experimentální byla syrovátka nejprve charakterizována. Při stanovení cukrů a kyseliny mléčné pomocí HPLC/RI bylo zjištěno, že nejvíce zastoupeným sacharidem v syrovátce je laktóza, která se zde vyskytovala v množství 125,008 g/l. Nejméně zastoupená byla glukóza s koncentrací 0,909 g/l. Kyselina mléčná se zde vyskytovala v množství 5,289 g/l. Pomocí metody Hartree-Lowry byl stanoven i obsah bílkovin v syrovátce. Bylo zjištěno, že obsah bílkovin je 8,6 g/l. Dále byla syrovátka upravena vysrážením síranem amonným do 30, 50 a 70% nasycení. Všechny získané frakce byly také podrobeny charakterizaci. Vzorek získaný 50% nasycením, který vykazoval nejvyšší antimikrobiální účinek, byl rovněž zakonzentrován ultrafiltrací.

V další části práce byly vybrané vzorky syrovátky, lysozym a kyselina mléčná enkapsulovány do tří typů částic. Připraveny byly liposomové, alginátové a chitosanové částice. U připravených částic byla dále sledována jejich velikost, stabilita, enkapsulační účinnost a dlouhodobá stabilita.

Kyselina mléčná vykazovala nejvyšší enkapsulační účinnost v alginátových částicích - až 77,8 %. Chitosanové částice byly vhodnou formou pro enkapsulace syrovátkových bílkovin a lysozymy, enkapsulační účinnost se zde pohybovala okolo 50 %. Nejmenší enkapsulační účinnost pak měly ve všech případech liposomové částice. Malá účinnost je nejspíš způsobena jejich velikostí, kdy ve srovnání s částicemi chitosanovými a alginátovými jsou nejmenší.

U jednotlivých částic byla dále sledována dlouhodobá stabilita v modelových prostředích s různým obsahem olejové fáze, a to po týdnu a po třech týdnech skladování. Modelová prostředí byla vybrána tak, aby mohla být potencionálně využitelná v kosmetice. Po týdnu vykazovaly částice největší stabilitu ve vodném prostředí, nejmenší poté v prostředí 50% olejové fáze. Po třech týdnech se nejméně změnila stabilita u alginátových částic v prostředí 10% olejové fáze, u chitosanových částic ve vodné fázi a u liposomů také ve vodném prostředí. Z hlediska dlouhodobé stability je tak nejvhodnějším prostředím pro alginátové částice 10% olejová fáze a pro chitosanové a liposomové vodná fáze.

Dále byla syrovátka testována ve volné i enkapsulované formě na antimikrobiální vlastnosti proti grampozitivním i gramnegativním bakteriálním kmenům. Antimikrobiální aktivita vzorků byla porovnána s účinkem lysozymu, bakteriocinu nisinu a kyseliny mléčné. Nejvyšší antimikrobiální aktivitu pak vykazovaly vzorky syrovátkou enkapsulovanou v chitosanu, měly větší antimikrobiální účinek než volné formy i než vzorky enkapsulované v alginátových částicích. To může být zapříčiněno antimikrobiálním účinkem samotného chitosanu.

V práci byly připraveny také krémy se syrovátkou volnou i enkapsulovanou a rovněž byly podrobeny analýze. Krémy s obsahem chitosanových částic vykazovaly antimikrobiální účinky i vůči gramnegativnímu kmeni, ale z hlediska testování stability analytickou centrifugací nedosahovaly testované krémy vhodné stability pro kosmetické aplikace. Ostatní krémy vykazovaly navíc téměř nulový antimikrobiální účinek.

Celkově je tedy možno konstatovat, že za účelem dosažení co největšího antimikrobiálního účinku, je vhodné vzorky enkapsulovat, a to nejlépe do chitosanových částic, které mají vyšší stabilitu než ostatní částice a také znásobují antimikrobiální vlastnosti látek. Prozatím se nejvíce jeví jako vhodná alternativa přidávat tyto částice do krémů, jelikož stabilita připraveného modelového krému byla velmi nízká a částice jsou navíc poměrně velké a rozpoznatelné hmatem, což u krémů nebývá žádoucí. Pravděpodobně by bylo vhodnější tyto částice aplikovat jako součást peelingu, kde je větší velikost částic pro abrazivní efekt vyžadována, nebo do různých gelových přípravků.

## 7 ZDROJE

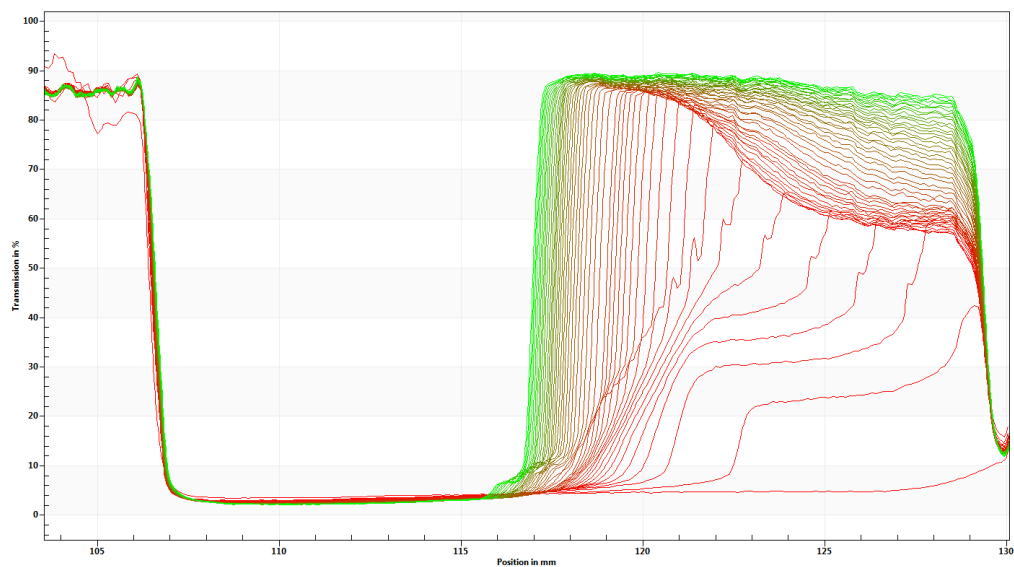
- [1] ČEPIČKA, J. a kol.: *Obecná potravinářská technologie*, VŠCHT Praha, 1.vyd., 1995, 246 s., ISBN 80-7080-239-1.
- [2] SUKOVÁ, I.: *Syrovátka v potravinářství*. Informační přehledy ÚZEI [online]. 2006, 46770, [cit. 2016-12-28]. Dostupný z WWW: <[http://www.agronavigator.cz/attachments/Sukova\\_Syrovatka.pdf](http://www.agronavigator.cz/attachments/Sukova_Syrovatka.pdf)>.
- [3] KADLEC, P. a kol.: *Technologie potravin II*, vyd. VŠCHT, Praha, 1. vyd., 2008, 236 s., ISBN 978-80-7080-510-7.
- [4] HORNE, David S. Casein Interactions: Casting Light on the Black Boxes, the Structure in Dairy Products. *International Dairy Journal* [online]. Elsevier Ltd, 1998, **8**(3), 171-177 [cit. 2016-12-28]. DOI: 10.1016/S0958-6946(98)00040-5. ISSN 0958-6946.
- [5] LUO, Yangchao, Kang PAN a Qixin ZHONG. Physical, chemical and biochemical properties of casein hydrolyzed by three proteases: Partial characterizations. *Food Chemistry* [online]. Elsevier Ltd, 2014, **155**, 146-154 [cit. 2016-12-28]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.01.048. ISSN 0308-8146.
- [6] SNEŽANA JOVANOVIĆ, MIROLJUB BARAĆ a OGNJEN MAČEJ. Whey proteins-Properties and Possibility of Application. *Mljekarstvo* [online]. 2005, **55**(3), 215-233 [cit. 2016-12-28]. ISSN 0026-704X
- [7] FORMAN, L., MERGL, M. a kol. *Syrovátka - její užití v lidské výživě a ve výživě zvířat*. Praha: VÚPP, 1979. 343s
- [8] BALCAR, a kol.: *Výroba sušených a zahuštěných mléčných výrobků*, vyd. SNTL, Praha, 1978, 328 s., 04-824-78.
- [9] [http://www.1sg.sk/www/data/01/projekty/2015\\_2016/falcons/vyrobcovia/Projekt\\_Bozie\\_dary/Mlieko\\_text.html](http://www.1sg.sk/www/data/01/projekty/2015_2016/falcons/vyrobcovia/Projekt_Bozie_dary/Mlieko_text.html)  
LIUW, HANSENJN. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990;56(8):2551-2558
- [10] HILGENFELD, R.; KLEMM, D. *The crystal structure of a bacterial lysozyme at atomic resolution : Dissertation*. Chemisch – Geowissenschaftlichen Fakultät der Fridrich – Schiller – Universität Jena. 2005. 131 str.
- [11] MCKENZIE HA, WHITE FH (1991). "Lysozyme and alpha-lactalbumin: structure, function, and interrelationships". *Adv. Protein Chem.* **41**: 173–315. doi:10.1016/s0065-3233(08)60198-9. PMID 2069076
- [12] BLACKBURN, R.S., et al. *Biodegradable and sustainable fibres*. [s.l.] : [s.n.], 2005. 464 s. ISBN 1 85573 916 X
- [13] SVOBODA, Jiří, et al. *Organická chemie I*. 1. vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2005. ISBN 80-7080-561-7. s. 65-66.
- [14] NARAYANAN, Niju, Pradip K. ROYCHOUDHURY a Aradhana SRIVASTAVA. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2004, 7(2): -. DOI: 10.2225/vol7-issue2-fulltext-7. ISSN 0717-3458
- [15] VLIV KULTIVAČNÍCH PODMÍNEK NA TVORBU NISINU PŘI FERMENTACI SYROVÁTKY KMENY LAKTOKOKŮ. *Mlékařské listy* [online]. 2015, (153) [cit. 2016-12-29]. Dostupné z: <http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2015/153-xiv-xix.pdf>
- [16] BAIRD, R. M. a S. F. BLOOMFIELD. *Microbial quality assurance in cosmetics, toiletries and non-sterile pharmaceuticals*. 2nd ed. Bristol, PA: Taylor, c1996. ISBN 978-074-8404-377.)
- [17] <http://www.wikiskripta.eu/images/b/b0/Ml%C3%A9k%C4%8Dn%C3%A1-k.jpg>

- [18] KŘIVÁNKOVÁ, M. HRADOVÁ, M. *Somatologie*. Praha: Grada, 2009 ISBN 978-80-247-2988-6
- [19] FRANK H. Netter *Anatomický atlas člověka* Praha: Grada Publishing a.s., 2003. ISBN 80-247-0517-6
- [20] ZÁHEJSKÝ, Jiří. *Zevní dermatologická terapie a kosmetika: pohledy klinické, fyziologické a biologické*. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1551-1.
- [21] FRANTIŠEK, Novotný. *Obecná dermatologie*. 1. Praha: Avicenum, 1989
- [22] HETTIARACHCHY, Nawvam S., Kenji SATO, Maurice R. MARSHALL and Arvind KANNAN. *Bioactive Food Proteins and Peptides: Applications in Human Health*. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Grup, 2012, 354 s. ISBN: 978-1-4200-9314-8.
- [23] FANUN, M., 2010: *Colloids in Biotechnology*. CRC Press, USA, 547s.
- [24] Cosmetics in acne and rosacea. *Semin Cutan Med Surg*. 2001, **20**(3), 209-14.
- BLACKBURN, R.S., et al. *Biodegradable and sustainable fibres* . [s.l.] : [s.n.], 2005. 464 s. ISBN 1 85573 916 X
- [25] URBÁŠKOVÁ, P. *Rezistence bakterií k antibiotikům. Vybrané metody*. Praha, Trios, 1998.
- [26] <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/micr.htm>
- [27] NĚMEC, Miroslav a Dagmar MATOULKOVÁ. *Základy obecné mikrobiologie*. Ilustrace Magdalena Martínková. Brno: Masarykova univerzita, 2015, 255 stran. ISBN 978-80-210- 7923-6.
- [28] <http://en.citizendium.org/images/a/a1/Micrococculuteus.jpg>
- [29] <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/serr.htm>
- [30] <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/images/bakterie/kolonie/smarc-mpa.jpg>
- [31] KÁŠ J., KODÍČEK M., VALENTOVÁ O.: *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2006. Str. 114. ISBN 80-7080-586-2
- [32] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 1996, 203 s. ISBN 80-902155-0-5
- [33] PEČ P. a kol.: *Laboratorní cvičení z biochemie*. Skriptum, UP Olomouc, 2000.
- [34] <https://web.natur.cuni.cz/~pcouf>
- [35] SOMMER, L. *Základy analytické chemie II*. Vyd. 1. Brno: VUTIUM, 2000, 347 s. ISBN 80-214-1742-0
- [36] ZHAI, Y. a G. ZHAI. Advances in lipid-based colloid systems as drug carrier for topic delivery. *Journal of Controlled Release*. 2014, 193: 90-99. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.05.054. ISSN 01683659.
- [37] LASIC, D. D.. *Applications of liposomes. Handbook of biological physics*, 1995, 1: 491-519
- [38] *Handbook of cosmetic science and technology*. 2nd ed. Editor André O Barel, Marc Paye. New York: Marcel Dekker, 2001, 886 s. ISBN 08-247-0292-1.
- [39] CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 107, 2-3, s. 125-155. DOI: 10.1016/S0001-8686(03)00115-5.
- [40] BARTOVSKÁ Ludmila, ŠIŠKOVÁ Marie: *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav* [online]. Version 1.0. Praha : VŠCHT Praha, 2005 [cit. 2017-05-02]. Available from www: <[http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_isbn-80-7080-579-X/pages-img/obalka-1.html](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-579-X/pages-img/obalka-1.html)>. ISBN 80-7080-579-X
- [41] ANALYTICKÁ ULTRACENTRIFUGA A JEJÍ VYUŽITÍ V BIOCHEMICKÉ LABORATOŘI. *Chemické listy*. 2010, **104**, 1155–1162.

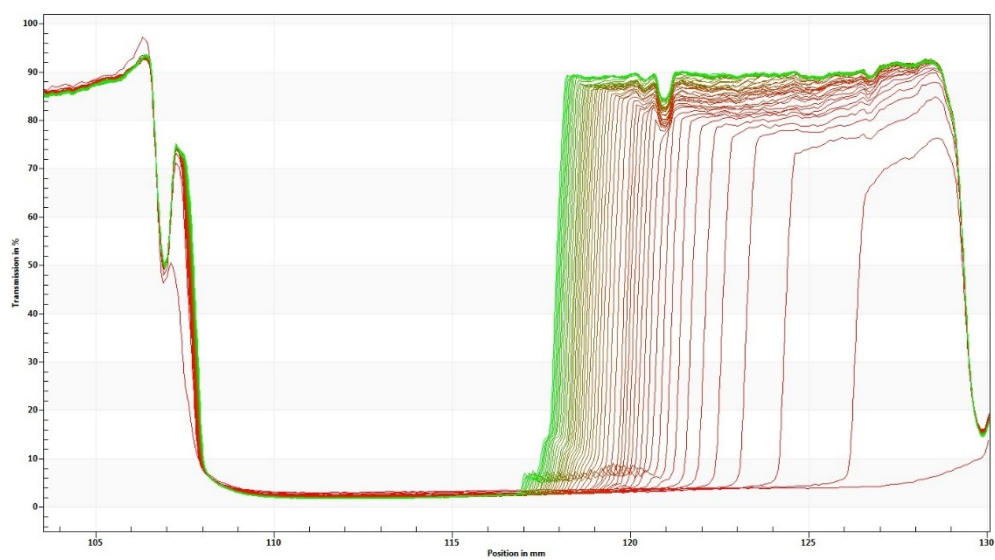
- [42] SALAM A. I., YANG H., SEO C. W. (2008): Antimicrobial activity of lactic acid and copper on growth of Salmonella and Escherichia coli O157:H7 in laboratory medium and carrot juice. *Food Chem* 190:137-143.

## 8 PŘÍLOHY

### Příloha 1: Záznamy z analytické centrifugace

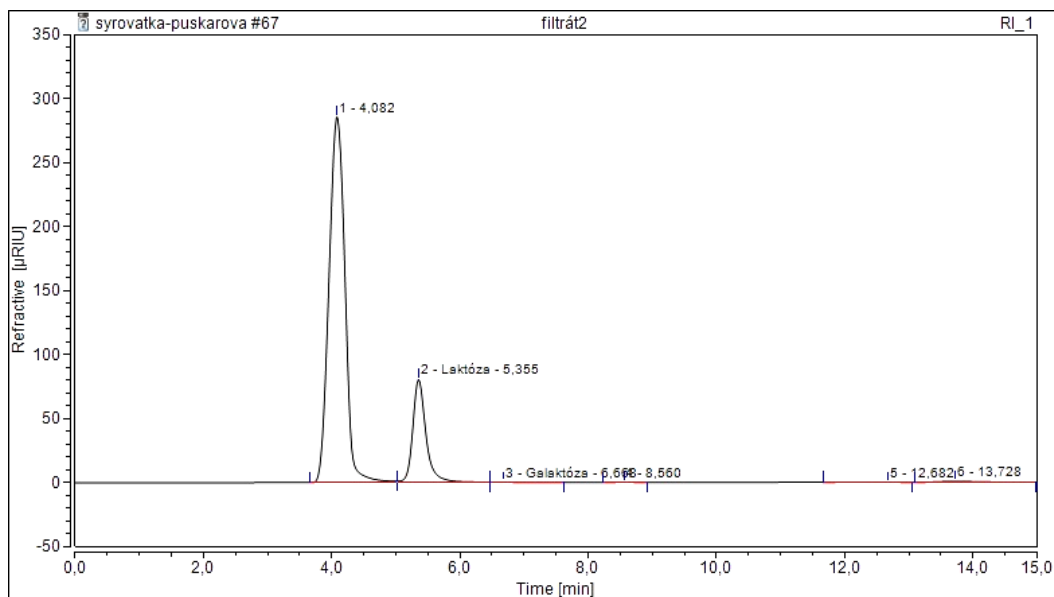


IA: Graf závislosti transmitance u vzorku ze 100 % syrovátky (vz.1) s krokem po 20 s

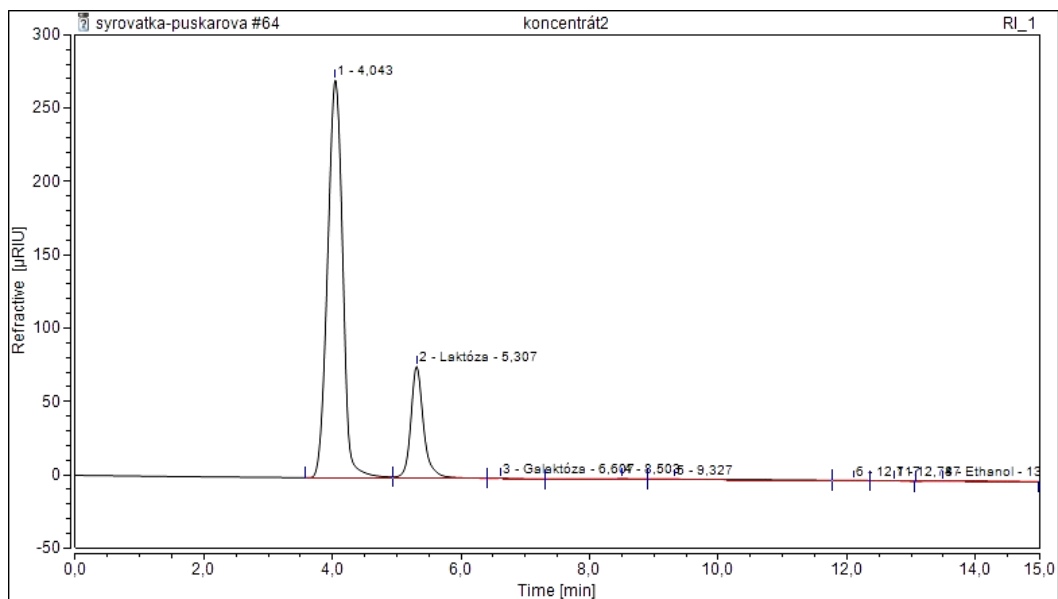


IB: Graf závislosti transmitance vzorku z lyofilizované syrovátky (vz.7) s krokem po 20 s

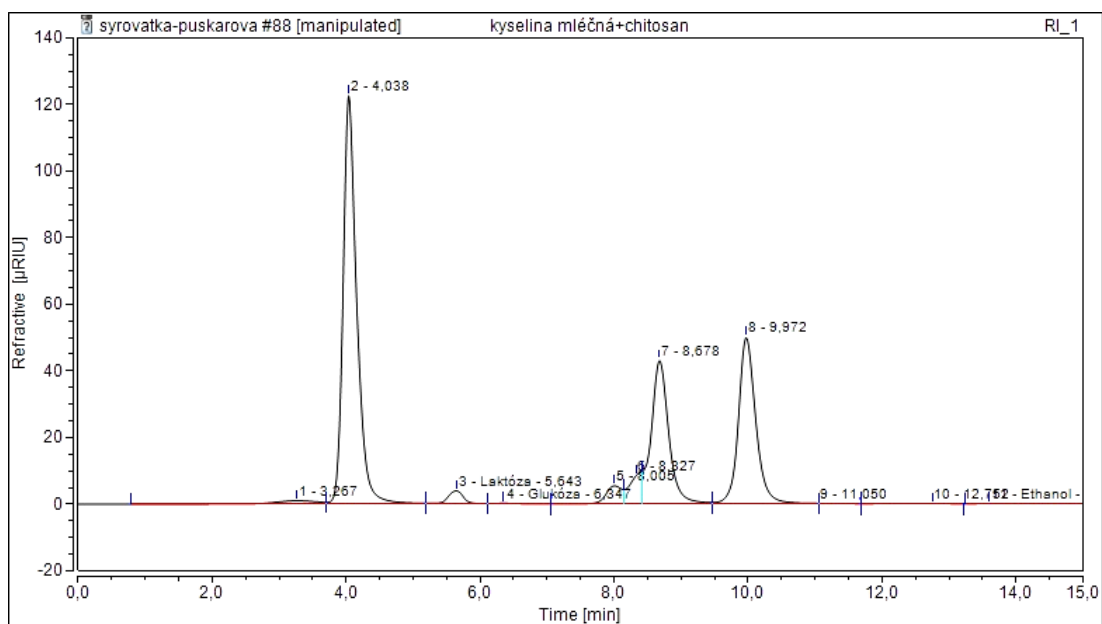
## Příloha 2: Záznamy z analýzy syrovátky a kyseliny mléčné pomocí HPLC/RI



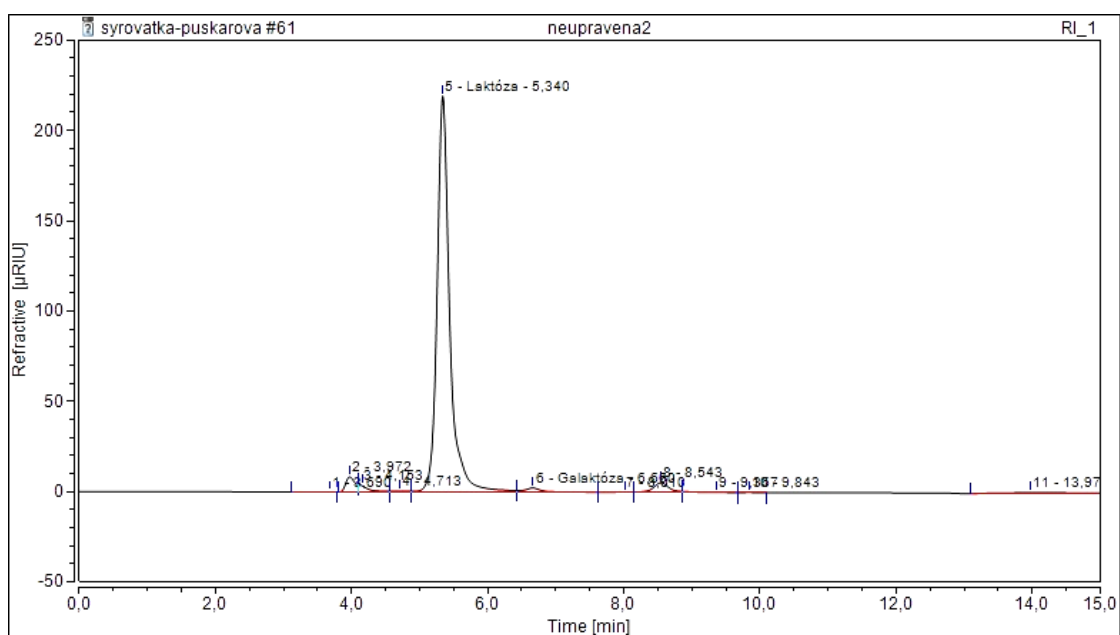
2A: Chromatogram filtrátu po ultrafiltraci syrovátky



2B: Chromatogram koncentrátu po ultrafiltraci syrovátky

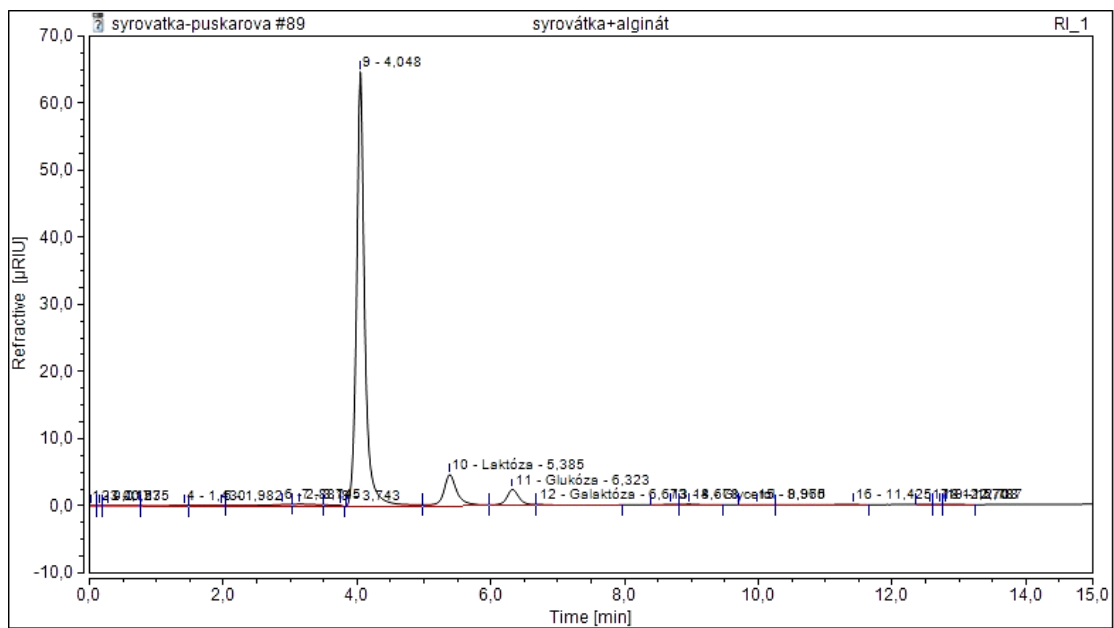


2C: Chromatogram pro filtrát po enkapsulaci kyseliny mléčné v chitosanových částicích



2D: Chromatogram neupravené syrovátky





2E: Chromatogram syrovátky enkapsulované v alginátových částicích