

Návrh a ověření receptury kosmetického přípravku s obsahem bioaktivních proteinů stabilizovaných v hydrofilní polymerní matrici

Bc. Lucie Nogolová

Diplomová práce
2016



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky
akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Nogolová**
Osobní číslo: **T14505**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Návrh a ověření receptury kosmetického přípravku s obsahem bioaktivních proteinů stabilizovaných v hydrofilní polymerní matici**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Vypracujte literární rešerši k problematice kosmetických přípravků obsahujících biologicky aktivní látky na bázi proteinů.
2. Zaměřte se na aplikace proteinů pocházejících z mléka a z fermentačních produktů syrovátky.
3. V rámci teoretické části také zohledněte i zpracovatelská specifika výše uvedených systémů a legislativní aspekty pro uvádění kosmetických přípravků na trh EU.

II. Praktická část

1. Navrhněte recepturu kosmetického přípravku obsahující nisin stabilizovaný v matici polyetylen glykolu (PEG).
2. Experimentálně ověřte stabilitu a antimikrobiální účinnost připraveného systému.
3. Proveďte vyhodnocení fyzikálně-chemických vlastností připravených vzorků.
4. Získané poznatky přehledně zpracujte a diskutujte s dostupnými literárními zdroji.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] ALAM Murad, GLADSTONE Hayes B., TUNG Rebecca C.: Cosmetic Dermatology, Northwestern University, Chicago, 2009, 368 s. ISBN 978-0-7020-3143-4.

[2] BARAN Robert, MAIBAC Howard: Textbook of Cosmetic Dermatology, London, 2010, 540 s. ISBN 13: 9781841847009.

[3] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích.

[4] Český lékopis 2009: Pharmacopea bohemica 2009, Praha, Grada, 2009, 1168s ISBN 978-80-247-4679-1.

[5] Časopisecké a knižní zdroje dostupné prostřednictvím knihovny UTB ve Zlíně.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Zuzana Kolářová Rašková, Ph.D.

Fakulta technologická

Datum zadání diplomové práce:

20. ledna 2016

Termín odevzdání diplomové práce:

18. května 2016

Ve Zlíně dne 20. ledna 2016

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



Ing. Martina Černeková, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: *Bc. Mozolová Lucie*.....

Obor: *TTDK*.....

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně *11.5.2016*.....

Lucie Mozolová
.....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá návrhem receptury kosmetického produktu, který by mohl sloužit jako podpůrný kosmetický prostředek při léčbě atopického ekzému a stafylokokových infekcí. V teoretické části je shrnuta problematika legislativního nařízení pro kosmetické přípravky a požadavky pro jejich konzervaci a mikrobiologické testování. Důležitou součástí této práce je pojednání o využitelnosti proteinů jako biologicky aktivních látek, kde je věnována pozornost mléčným bílkovinám, dále pak bakteriocinu zvaný nisin. Praktická část této práce se zabývá návrhem receptury kosmetického přípravku obsahující extrakt nisinu stabilizovaného v hydrofilní polymerní matici a jejím ověřením. Je zde zkoumána celková stabilita kosmetického přípravku, kde je kladen důraz především na stabilitu mikrobiologickou a také na antimikrobní účinek použitého konzervačního systému.

Klíčová slova: Kosmetický přípravek, bioaktivní protein, mléčná bílkovina, nisin, polyetylenglykol, mikrobiologické testování, stabilita kosmetického přípravku

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on recipe design of the cosmetic product which can serve as supportive skin care formulation, that could be suitable for the treatment of atopic eczema and *Staphylococcus* infections. The theoretical part of this diploma thesis summarizes the issue of legislative regulations for cosmetic products and requirements for preservative systems and microbiological testing. An important part of this thesis is aimed on the proteins as biologically active substances and the special attention paid to milk proteins and also to the bacteriocin – nisin. The experimental part of this work is focused on the recipe design of nisin containing cosmetic product. In this formulation, nisin is stabilized in the hydrophilic polymer matrix. The stability of our cosmetic product is verified. The main focus is on the microbiological stability of the product and antimicrobial efficacy of used preserving system.

Keywords: Cosmetic product, bioactive protein, milk protein, nisin, polyethyleneglycol, microbiological testing, stability of cosmetic product

Touto cestou bych ráda poděkovala především své vedoucí diplomové práce Ing. Zuzaně Kolářové Raškové, Ph.D. za její odborné vedení, čas a poskytnutou pomoc při zpracování a vyhodnocení mé práce. Zároveň bych chtěla poděkovat také doc. Ing. Vladimíru Sedláříkovi, Ph.D., nejen za jeho cenné rady, ale také za ochotu a čas strávený nad vypracováním této práce.

Rovněž děkuji Ing. Daniele Veselé za její pomoc a rady při práci v mikrobiologické laboratoři.

Poděkování patří také mým rodičům a příteli, kteří mě při psaní práce podporovali a umožnili mi studium na vysoké škole.

Tato práce vznikla za podpory Ministerstva zemědělství ČR v rámci projektu QJ1310254.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 KOSMETICKÉ PŘÍPRAVKY	12
1.1 LEGISLATIVA KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVKŮ	12
1.1.1 Požadavky na kosmetické přípravky a povinnosti odpovědné osoby	13
1.2 KOSMETICKÁ VEHIKULA	14
1.3 POLOTUHÁ EXTERNA	14
1.3.1 Masti.....	14
1.3.2 Krémy.....	15
1.3.3 Gely	16
1.4 KONZERVACE KP	17
1.4.1 Faktory ovlivňující působení konzervačních látek	17
1.4.2 Požadavky na konzervační systém KP.....	18
1.4.3 Konzervační látky používané v KP.....	18
2 PROTEINY JAKO BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKY V KOSMETICE	22
2.1 MLÉČNÉ BÍLKOVINY	22
2.1.1 Kaseinové bílkoviny.....	23
2.1.2 Syrvátkové bílkoviny	23
2.2 PRODUKCE BIOAKTIVNÍCH LÁTEK	26
2.2.1 Bakterie mléčného kvašení	26
2.3 BAKTERIOCINY.....	27
2.3.1 Mechanismus účinku bakteriocinů.....	28
2.3.2 Klasifikace bakteriocinů.....	29
2.4 VYUŽITÍ BAKTERIOCINŮ V KOSMETICE.....	32
3 NISIN	34
3.1 MECHANISMUS ÚČINKU NISINU	34
3.2 PRODUKCE NISINU	34
3.3 APLIKACE NISINU	36
3.3.1 Využití nisinu v potravinářském průmyslu	36
3.3.2 Klinická aplikace nisinu	37
3.3.3 Využití nisinu v kosmetice.....	37
4 MIKROBIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ KOSMETICKÝCH PRODUKTŮ	38
4.1 METODY TESTOVÁNÍ ÚČINNOSTI KONZERVACE KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVKŮ	38
4.1.1 Zkouška účinnosti konzervace dle Českého lékopisu	39
5 CÍLE PRÁCE	42
II PRAKTICKÁ ČÁST	43
6 POUŽITÉ MATERIÁLY A ZAŘÍZENÍ	44
7 PŘÍPRAVA VZORKŮ	46

7.1	SLOŽENÍ A POPIS POUŽITÝCH KOSMETICKÝCH ZÁKLADŮ	46
7.2	PŘÍPRAVA NISINU V POLYMERNÍ MATRICI.....	48
7.3	PŘÍPRAVA KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVKŮ	49
8	TESTOVÁNÍ PŘIPRAVENÝCH VZORKŮ	52
8.1	ANTIMIKROBIÁLNÍ TESTOVÁNÍ KOSMETICKÝCH PRODUKTŮ	52
8.1.1	Difuzní agarový test	52
8.1.2	Zkouška účinnosti konzervace kosmetických přípravků	52
8.2	TESTOVÁNÍ STABILITY KOSMETICKÉHO PŘÍPRAVKU	55
8.2.1	Stanovení koncentrace nisinu metodou RP-HPLC	55
8.2.2	Stanovení peroxidového čísla	57
8.2.3	Sledování fyzikální stability kosmetického přípravku	58
9	VÝSLEDKY A DISKUSE	60
9.1	VLIV MOLEKULOVÉ HMOTNOSTI PEG NA ANTIMIKROBNÍ ÚČINEK NISINU	60
9.2	ZKOUŠKA ÚČINNOSTI KONZERVACE KOSMETICKÉHO PŘÍPRAVKU.....	62
9.3	SLEDOVÁNÍ STABILITY NISINU V ZÁVISLOSTI NA TEPLOTNÍ ZÁTĚŽI	67
9.4	STANOVENÍ PEROXIDOVÉHO ČÍSLA V ČASOVÝCH INTERVALECH PŘI TEPLOTNÍ ZÁTĚŽI.....	70
9.5	STANOVENÍ STABILITY VZHLEDEM K FYZIKÁLNÍM VLASTNOSTEM	72
	ZÁVĚR	74
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	76
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	84
	SEZNAM OBRÁZKŮ	86
	SEZNAM TABULEK.....	87

ÚVOD

V současné době je předmětem zájmu využití mléčných proteinů pro získání přírodních bioaktivních peptidů a jejich použití v kosmetickém či jiném průmyslu.

V potravinářství či kosmetice se velmi často uplatňují biologicky aktivní látky, které jsou získávány ze zbytkových (odpadních) materiálů. Jedná se tedy o materiál, který je zpracováván až po primární produkci rostlinných či živočišných výrob. Pro tuto práci jsou nejvýznamnější bioaktivní látky živočišného původu, které jsou získány z odpadních produktů mlékárenského průmyslu při výrobě sýru – syrovátky. Mezi takto získané látky patří nisin. Díky jeho produkci pomocí fermentace odpadní syrovátky může přispět k ekonomicky výhodné a bezpečné konzervaci kosmetického přípravku.

Nisin je polycyklický antimikrobní peptid, složený z 34 aminokyslin, který patří mezi nejvíce probádaná a nejvíce používaná lantibiotika. Jedná se o přírodní látku, která působí antibakteriálně, zejména proti gram pozitivním bakteriím. Je přirozeně syntetizován některými bakteriemi mléčného kvašení, především bakterií *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Nisin je bakteriocin, který má antibiotický účinek a je povolen jako konzervační aditivum do potravin (E234), avšak neúčinkuje jako plnohodnotný konzervant. Proto je nutné, pro zesílení jeho účinku, přidat do systému ještě další vhodnou konzervační látku.

V této studii je zkoumáno využití tohoto bakteriocinu v kosmetice a jeho aplikace spolu s dalšími látkami mající protimikrobní vlastnosti za účelem zjištění případného synergického účinku a zajištění dostatečné konzervace kosmetického přípravku.

Na území Evropského společenství podléhají všechny kosmetické přípravky legislativě Evropské unie a jsou řízeny stejnými zákony, které kladou požadavky pro jejich uvedení na trh a stanovují řadu omezení.

Přísné nároky jsou rovněž kladeny na mikrobiologické testování kosmetického přípravku, jelikož napadení produktu mikroorganismy je jedna z nejčastějších příčin jeho kažení a ohrožení spotřebitele. Existuje mnoho organizací, které uvádějí kritéria pro zajištění dostatečné a bezpečné konzervace kosmetického přípravku a pomocí těchto požadavků je nutno postupovat při testování konzervace kosmetického přípravku a vypracování zprávy o jeho bezpečnosti.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KOSMETICKÉ PŘÍPRAVKY

Slovo kosmetika vzniklo odvozením z řeckého *kosmétiké*, což znamená umění zkrášlit. Archeologické nálezy dokládají používání zkrášlovacích přípravků již od pravěku, kdy šlo především o dekorativní kosmetiku využívanou zejména pro rituální účely. Používání kosmetických přípravků (KP) se rozvíjelo s vývojem lidské civilizace, neboť tento průmysl patří vedle farmaceutického k nejdynamičtěji rozvíjejícímu se a nejziskovějšímu odvětví vůbec [1, s. 9].

V současné době se kosmetika stává předmětem zájmů specialistů (kosmetologů), kteří se zabývají kosmetologií jako vědním oborem, zasahujícím nejen do estetiky a medicíny, ale také i do chemie [1, s. 9].

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích definuje KP jako „*jakoukoli látku nebo směs určenou pro styk s vnějšími částmi lidského těla (pokožkou, vlasovým systémem, nehty, rty, vnějšími pohlavními orgány) nebo se zuby a sliznicemi ústní dutiny, výhradně nebo převážně za účelem jejich čištění, parfemace, změny jejich vzhledu, jejich ochrany, jejich udržování v dobrém stavu nebo úpravy tělesných pachů*“ [2].

Aby KP zajistil správnou funkci, je složen z více složek a na všechny tyto komponenty jsou kladeny přísné nároky. KP nesmí být dráždivý a musí být především bezpečný. Proto téměř všechny státy světa legislativně upravují požadavky na KP, zřizují řadu různých omezení a kladou požadavky na jejich uvedení na trh [3, s. 3-29].

1.1 Legislativa kosmetických přípravků

Regulační systém, kterému podléhají KP, se značně liší mezi jednotlivými státy světa, tudíž je prakticky nemožné, aby se v celosvětovém měřítku mohl prodávat stejný výrobek na všech trzích [3, s. 3].

Všechny KP na území Evropských společenství podléhají legislativě Evropské unie (EU) a jsou podmíněny stejným zákonům. Samotný legislativní průběh je velice složitý proces, na kterém se účastní řada orgánů EU, různých mezinárodních i národních organizací a sdružení [3, s. 3-29], [4].

Základní závazný předpis, kterým se musí řídit všechny KP uváděné na trh je Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích. Toto

nařízení vymezuje oblast působnosti, stanovuje jednotné definice vztahující se na KP, požadavky na jejich vlastnosti, dokumentaci a značení a v neposlední řadě také práva a povinnosti odpovědných osob. Tento předpis také zajišťuje dozor nad KP a spolupráci orgánů dozoru ostatních členských států [2].

Dalšími závaznými předpisy pro KP například jsou [5], [6], [7]:

- nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, o zřízení Evropské agentury pro chemické látky – REACH (registrace, evaluace a autorizace chemických látek),
- zákon č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví,
- vyhláška č. 494/2005 Sb., kterou se stanoví analytické metody kontroly složení KP.

1.1.1 Požadavky na kosmetické přípravky a povinnosti odpovědné osoby

K současným požadavkům na kvalitu kosmetických přípravků určených k aplikaci na kůži se řadí správná výrobní praxe a odpovídající parametry zdravotní bezpečnosti – KP musejí být bezpečné za běžných podmínek použití a mít minimální schopnost vyvolat nežádoucí účinky a to i při dlouhodobé a opakované aplikaci [2], [8, s. 43-44]. Posouzení bezpečnosti a následné vypracování zprávy o bezpečnosti KP musí zajistit odpovědná osoba, kterou může být výrobce, dovozce, popř. distributor [2].

Tyto požadavky mají přímou souvislost také s účinností KP a klamáním spotřebitele. Jsou prováděny kontroly ať už jednotlivých složek nebo kontroly celého KP [2].

O KP je odpovědná osoba povinná uchovávat následující údaje [2], [8, s. 43-44]:

- název a specifikaci surovin, kritéria kvality a mikrobiologické čistoty,
- zprávu o bezpečnosti KP,
- záznamy o správné výrobní praxi,
- údaje o nežádoucích účincích na osoby používající KP,
- doklady o deklaraci účinku KP,
- záznamy o jakýchkoli zkouškách KP či jeho ingrediencí na zvířatech.

Dalšími požadavky, které stanovuje nařízení 1223/2009, jsou, že kosmetický přípravek nesmí být deklarován jako léčivo a při aplikaci nesmí být inhalován, vpichován ani polykán. Na obale nesmí být uvedeno, že „léčí“, „hojí“ atp. O zařazení produktu mezi KP, léčivo nebo zdravotní prostředek rozhoduje Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL) [2].

Odpovědná osoba musí vždy před uvedením KP na trh notifikovat tento přípravek Evropské Komisi, a to elektronicky pomocí on-line portálu pro oznamování kosmetických přípravků [2].

1.2 Kosmetická vehikula

Kosmetická vehikula neboli základy tvoří hlavní a nezbytnou součást všech kosmetických výrobků. Tyto vehikula mají řadu funkcí a příznivých účinků na naši pokožku. Může se jednat o přímý účinek, o dodání účinku a v neposlední řadě také o dopravu účinných látek na určené místo [9, s. 62-69].

Vehikula v kosmetice mohou obsahovat pouze aktiva, která se aplikují na vnější vrstvu pokožky a jejich aplikací jsou transportovány do určeného cílového místa (hlouběji do pokožky) [9, s. 62-69].

Do kosmetických základů bývají zakomponovány aktivní látky nebo další složky (konzervační látky, kosmetická barviva, vonné látky, antioxidanty, surfaktanty a další přídatné látky) za vzniku extern, která jsou aplikovatelná na pokožku [10, s. 93]. Tato externa by měla splňovat kritéria společenské únosnosti, a to zejména svou vůní, barvou, nebo např. úměrou pohmatové mastnosti [8, s. 43-44]. Dermatologická externa mohou být tuhé, polotuhé či tekuté konzistence [10, s. 93].

1.3 Polotuhá externa

Mezi externa, která mají polotuhou konzistenci a kterými se práce zabývá, jsou řazeny masti, krémy, gely a pasty. Tyto externa jsou rozlišována dle možnosti přijímání vody na hydrofilní a hydrofobní [11, s. 59].

1.3.1 Masti

Kosmetická vehikula, která se používají k výrobě mastí, mohou být živočišné či rostlinné povahy a mohou být přírodního či syntetického původu. Masťové základy jsou nesmyvatelné vodou. Masti snižují transepidermální ztrátu vody, brání výdeji tepla a tím zvyšují teplotu na kožním povrchu [11, s. 59].

Existují dvě formy mastí, a to masť hydrofobní a masť hydrofilní [11, s. 59].

Hydrofobní masti

Hydrofobní masťové základy váží vodu velmi omezeně nebo jí neváží vůbec, a proto neobsahují emulgátory. Tyto masti jsou schopny macerovat kůži. Nevýhodou těchto mastí je však rychlé žluknutí, proto je nutné přidat do kosmetického základu konzervační látky. Mezi zástupce patří např. vazelína bílá a žlutá (*vaselinum album* a *flavum*), které mají vysoce okluzivní účinek [11, s. 59]. Obě vazelíny jsou tvořeny čistěnými směsí polotuhých nenasyčených uhlovodíků z nafty [8, s. 47].

Dále zde mohou být řazeny vosky a oleje (přírodní nebo syntetické) [11, s. 59]. Neužívanějším voskem v kosmetice je *cera lanæ*, neboli lanolin [8, s. 47].

Některé hydrofobní masťové základy jsou schopny vázat omezené množství vody. Mezi tyto zástupce je řazen např. Synderman, který je schopen vázat vodu až do 20 %. Dalším příkladem může být Pontin nebo Excipial unguentum [11, s. 59].

V praktické části této práce je navržena podobná receptura masti jako je Synderman. Synderman je komerčně dostupný masťový základ složený z *vaselinum album*, *adeps lanæ*, *cera alba*, *paraffinum liquidum*, *paraffinum solidum*, *monoglycerides of palm oil*, *ceresinum* [12].

Dalším zástupcem, rovněž hojně využívaným pro přípravu masti, může být Pontin, který se skladá z *vaselinum flavum*, *adeps lanæ*, *paraffinum solidum*, *paraffinum perliquidum*, *aluminii stearan* [13].

Hydrofilní masti

Hydrofilní masťové základy jsou tvořeny z polyetylenglykolů, neboli makrogolů [11, s. 59]. Makrogoly se mísí s vodou v neomezeném poměru a jsou vhodné pro aplikaci do ochlupených oblastí [8, s. 48]. Jedná se o vehikula známá jako makrogolová mast. Tyto masti působí bakteriocidně, jsou vhodné i na exsudativní dermatózy, nemacerují pokožku a jsou netoxické [11, s. 59].

1.3.2 Krémy

Krémy představují emulze masťového základu s vodou a k jejich výrobě je potřeba emulgátor. Dělí se na emulzi typu olej ve vodě (o/v) – hydrokrémy a na emulzi typu voda v oleji (v/o) – oleokrémy [11, s. 59].

Hydrokrémy

Hydrokrémy představují převážně denní krémy. Voda činí 50 až 90 % celkové své hmotnosti. Tyto krémy se lehce omývají vodou, nezanechávají mastný film na pokožce ani nešpiní prádlo a působí chladivým dojmem. Vzhledem k vysokému obsahu vody je potřeba přidavku konzervačních látek. Mezi zástupce těchto krémů řadíme Ambiderman, Cremor leniens, Neoaquasorb, Cremor neoaquasorb [11, s. 59].

Ambiderman je polymerový gel s rozptýlenou tukovou fází, určený pro přípravu emulze typu o/v. Tento krémový základ je složen z *paraffinum liquidum*, *paraffinum solidum*, *alcohol stearilicus*, *propylenglycolum*, *slovasol*, *carbomera*, *trolaminum*, *methylparabenum*, *propylparabenum*, *aqua purificata* [14].

Neoquasorb představuje hydrofilní základ, který je schopen na sebe navázat až 150 % vody [8, s. 47]. Jeho receptura je *paraffinum perliquidum*, *paraffinum solidum*, *acidum stearicum*, *alcohol cetylstearylicus*, *slovasolum*, *glyceroli monostearas*, *methylparabenum*, *propylparabenum*, *glycerolum*, *aqua purificata* [15].

Oleokrémy

Oleokrémy jsou mastné noční krémy s obsahem 15 až 60 % vody. Kapičky vody jsou rozptýleny v oleji či tuku a tím je docíleno snížení odpařování vody z krému. Oleokrémy se dobře vstřebávají a působí rovněž chladivým dojmem. Příkladem mohou být Unguentum leniens, Cremor leniens, Cremor refrigerant [11, s. 59-60].

1.3.3 Gely

Gely obsahují botnající látku a tekuté vehikulum. Tato formulace dostatečně hydratuje pokožku, avšak jejich častá aplikace může vést k přesušení pokožky a k zánětlivým či svědivým kožním projevům. Gely jsou děleny na hydrogely a oleogely [11, s. 60].

Hydrogely

Hydrogely vznikají smísením gelotvorné látky a hydrofilního rozpouštědla. Látky tukové povahy neobsahují ani v malé míře. U hydrogelů je díky obsahu vody častá mikrobiální kontaminace, proto je nutné přidávat do této směsi vhodné konzervační látky [11, s. 60].

Gely mohou být připraveny rozpuštěním gelotvorných látek na dostatečně koncentrovaný roztok, kdy rosolovatění nastává až po následném ochlazení, nebo se nechá tato gelotvorná látka dostatečně nabobtnat v rozpouštědle. Speciálním případem jsou tzv. karbopolové gely, u kterých dochází k rosolovatění až po následné neutralizaci roztoku [1, s. 130].

Nejčastěji využívané gelotvorné látky v kosmetice jsou karbomery. Na trhu existuje široká škála komerčních přípravků na bázi karbomerů. Jedná se např. o Carbopol, Acrypol, Optasense, Tego Carbomer, Polygel CA, Synthalen. Za těmito názvy se často objevuje číslo, které udává molární hmotnost (např. Carbopol 940) [16], [17, s. 117].

Oleogely

Oleogely jsou vytvářeny mísením botnající látky a oleofilním vehikulem. Jejich použití je téměř minimální [11, s. 60].

1.4 Konzervace KP

Konzervací KP se rozumí použití kombinace látek, která je výhradně nebo převážně určena k potlačení růstu mikroorganismů v kosmetickém přípravku [11, s. 60]. Mikrobiologická stabilita patří mezi důležité aspekty KP. Jedná se jak o prodloužení trvanlivosti KP, tak o prevenci poškození zdraví spotřebitelů. V současné době je výběr konzervačních látek omezen a řízen legislativním nařízením [18, s. 18]. Seznam povolených konzervačních látek a jejich nejvyšší možnou koncentraci uvádí Nařízení č. 1223/2009, příloha V. Toto nařízení také uvádí seznam nedovolených konzervačních látek pro použití v KP [2].

Doba, po kterou si výrobek zachovává své antimikrobiální vlastnosti, je nazývána dobou minimální trvanlivosti a tuto dobu stanovuje výrobce. Pokud má výrobek dobu trvanlivosti kratší než 30 měsíců, musí výrobce vždy uvést na obal datum minimální trvanlivosti, a to zřetelně ve formě roku, měsíce a dne (popř. roku a měsíce). Dále jsou dle potřeby doplněny informace jak daný výrobek skladovat, aby bylo co nejvíce zabráněno mikrobiologickému napadení. Pokud má výrobek trvanlivost vyšší než 30 měsíců, musí být spotřebitel informován, jakou dobu může KP používat po otevření výrobku. Tento údaj musí být uveden na obale symbolem otevřeného kelímku, u kterého bude uvedena informace o době použití měsícem nebo rokem [2].

1.4.1 Faktory ovlivňující působení konzervačních látek

Abychom zajistili dostatečnou antimikrobiální ochranu KP, nestačí pouze přidat konzervační látku do systému. Účinnost a stabilita konzervačních látek je závislá na řadě fyzikálních a chemických vlastnostech KP. Volba vhodné konzervační látky je ovlivňována např. formulací kosmetického základu, pH a kompatibilitou s ostatními složky systému [19, s. 169-170], [20, s. 143].

Hodnota pH je důležitým faktorem ovlivňující konzervaci KP. Bakteriím se nejlépe daří v neutrálním nebo slabě alkalickém pH, kvasinky preferují kyselější prostředí a plísně nevyžadují specifické pH, mohou růst při pH v rozmezí 1,2 – 11 [21, s. 173-174].

Jelikož většina dějů v živé buňce je schopna jen za předpokladu přítomnosti dostatečného množství vody, je dalším důležitým faktorem, ovlivňující napadení KP mikroorganismy, aktivita vody (a_w). Bakterie jsou schopny se rozmnožovat při a_w 0,99 až 0,93. Tato hodnota ale není pravidlem a mohou se vyskytovat výjimky. Např. bakterie rodu *Staphylococcus* se rozmnožuje při a_w 0,80 nebo bakterie rodu *Pseudomonas* při a_w 0,90. Kvasinky vyžadují pro množení a_w 0,91 – 0,88 a plísně daleko nižší a_w než bakterie či kvasinky [19, s. 168].

Další neméně důležitým faktorem je rozpustnost konzervační látky. Existují látky rozpustné ve vodě a látky rozpustné v olejích. Jelikož se mikroorganismy množí jen ve vodné fázi je nutno vybírat látky rozpustné ve vodě [22, s. 71-72].

1.4.2 Požadavky na konzervační systém KP

Ideální konzervační látka by měla působit proti rozsáhlé škále mikroorganismů, nejlépe při co nejnižší koncentraci. Dále by měla splňovat vlastnosti, jako je rozpustnost ve vodě, nerozpustnost v oleji, stabilita při daném pH a teplotě a měla by být slučitelná s ostatními složkami KP. Mělo by se jednat o bezbarvou látku, která je bez zápachu, netoxická, nedráždivá, nefotosenzibilizující, chemicky stabilní, finančně dostupná a lehce stanovitelná. Jelikož neexistuje látka, která by splňovala všechny tyto požadavky, zakomponovávají se do systému konzervační směsi (místo jedné konzervační látky), které se snaží co nejvíce přiblížit těmto podmínkám. Snahou je dosáhnout požadované konzervace s co možná nejmenší koncentrací použité konzervační směsi. Při tomto výběru je nutné volit ze dvou možných koncentrací. Stanovuje se buď minimální inhibiční koncentrace (MIC), která zabraňuje viditelnému růstu bakterií za 24 hodin, nebo minimální bakteriocidní koncentrace (MBC), která musí být schopna usmrtit mikroorganismy vyskytující se v KP [3, s. 212].

1.4.3 Konzervační látky používané v KP

Konzervační látky lze podle původu rozdělit na syntetické a přírodní. Dnešní výrobci mohou vybírat z bohaté škály povolených syntetických látek lišící se původem, účinkem, způsobem užití a chemickou strukturou [19, s. 169-170]. Ačkoli se používají častěji látky syntetického původu (organické kyseliny, parabeny, alkoholy a další), v dnešní době

stoupá zájem i o látky přírodního původu. Jedná se hlavně o esenciální oleje (např. levandulový, hřebíčkový, tymiánový nebo rozmarýnový olej) a rostlinné extrakty (např. extrakt z grapefruitových semen) [23, s. 232].

Organické kyseliny

Mezi nejznámější a nejrozšířenější organické kyseliny jsou řazeny kyselina sorbová, benzoová, dehydrooctová a jejich soli. Organické kyseliny jsou účinné pouze v kyselějším pH (< 5), kdy přecházejí do méně kyselé cytoplazmy buňky, tam disociují a uvolní proton. Tímto dějem dojde ke snížení intracelulárního pH. Buňka má však snahu udržet protonový gradient a proto odčerpává další protony ven z buňky, což je energeticky náročné a v podstatě dojde k usmrcení buňky hladem [20, s. 169].

Parabeny

Parabeny (alkylestery kyseliny p-hydroxybenzoové) a jejich soli se řadí mezi často využívané konzervační látky v kosmetice, farmacii i potravinářství. Jsou to bezbarvé látky bez zápachu, které jsou stabilní a dobře účinné v rozmezí pH 3 – 9,5. U jedinců se zdravou kůží nejsou iritační ani senzitivizující. Pouze u jedinců, kteří mají poškozenou kůži, může nastat problém se senzibilizací, která by mohla vést k dermatitidě [24, s. 84].

Parabeny jsou součástí mnoha každodenně využívaných KP. Používají se jako konzervační systém v šamponech, sprchových gelech, mýdlech, emulzích, krémech, antiperspirantech a deodorantech [24, s. 84].

Ačkoliv jsou parabeny považovány za prakticky netoxické, jejich každodenní užívání může u citlivých jedinců způsobit rozvoj alergie či jiný zdravotní problém. Mezi nejvýznamnější parabeny patří metylparaben, etylparaben, propylparaben a butylparaben [24, s. 85].

Alkoholy

Do KP mohou být jako konzervační látky přidávány také alkoholy. Mezi nejčastěji užívaný alkohol patří etanol, který však vyžaduje vyšší koncentraci k zabránění růstů bakterií a plísní. Často se jedná o koncentraci vyšší než 4 % celkové své hmotnosti. Dalším častým konzervačním činidlem může být propylenglykol, který využívá svého synergického účinku s parabeny. Ačkoli etanol i propylenglykol mohou být využívány v kosmetice, nejčastěji nacházejí uplatnění v potravinářství a farmacii. Pro KP je mnohem obvyklejší použití fenoxyetanolu a benzyl alkoholu. Mechanismus účinku těchto alkoholů může být

dvojího charakteru. Jedná se buď o porušení propustnosti buněčné membrány, nebo o inaktivaci základních enzymů buňky [20, s. 167].

Fenoxyetanol je využíván pro své konzervační, antiseptické a dezinfekční vlastnosti, a to nejčastěji v kosmetickém či farmaceutickém průmyslu. Nejčastěji se objevuje v pleťových vodách, krémech, maskách, šamponech, deodorantech a make-upech. Fenoxyetanol má vysokou činnost v širokém rozmezí pH. V přítomnosti s aniontovými nebo kationovými detergenty je stabilní, naopak v přítomnosti s neionogenními tenzidy dochází k jeho rozpadu a deaktivaci. V přípravcích se často používá v kombinaci s kyselinou sorbovou, dehydrooctovou nebo také s parabeny [19, s. 232-333], Jeho maximální povolená koncentrace pro použití do KP je 1 % [2].

Esenciální oleje a rostlinné silice

Jako přírodní konzervační látky se mohou používat esenciální oleje nebo další extrakty z rostlin, které jsou zdrojem biologicky aktivních sloučenin. Esenciální oleje mohou mít antibakteriální, antivirové a protiplísňové vlastnosti. Některé působí také insekticidně a antioxidantně [25, s. 1-2].

V kosmetice a lékařství byly aromatické rostliny a jejich nálevy využívány už v roce 1000 n.l., kdy byl vynalezen proces destilace, tak jako jej známe dnes. Esenciální oleje jsou těkavé, organické prvky rostliny, které dodávají produktům vůni nebo chuť. Zdrojem těchto složek nejsou celé rostliny, ale pouze jejich určitá část. Jedná se např. o květy, listy, kůru, dřevo, kořen, oddenky, suché plody nebo semena [26].

I přesto, že jsou tyto extrakty přírodního původu, není zaručena jejich bezpečnost. Při dlouhodobém užívání některých olejů může nastat u citlivějších jedinců rozvoj alergické reakce eventuálně fytotoxická a fotoalergická reakce. Mezi tyto rizikové oleje jsou řazeny např. bergamotový olej, olej z bazalky, nebo olej z kůry skořicovníku [26]. Esenciálními oleji, které mohou vyvolat kožní reakci (tzv. fotodermatózu), jsou oleje, které obsahují přírodní heterocyklické sloučeniny furokumariny. Furokumariny jsou obsaženy např. v rostlinách čeledi *Umbelliferae* – andělka, karotka, petržel, celer, a další, nebo v čeledi *Rutaceae* – bergamot, citrus a další. Tyto extrakty zcitlivují kůži na záření nejen při topickém, ale i při perorálním použití. Mezi oleje užívané v kosmetice, které mají fotosenzibilizační účinky, se řadí olej levandulový, bergamotový, pomerančový, citrónový nebo skořicový [27, s. 385-387].

Esenciální oleje obsahují řadu alergenních látek a jejich použití musí být vyznačeno na obale jako samostatná složka pokud je obsah alergenů větší než 0,01 % u oplachové kosmetiky nebo 0,001 % u neoplachové kosmetiky [2].

2 PROTEINY JAKO BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKY V KOSMETICE

První zmínky o využívání proteinů pro kosmetické účely sahají do starověku, kdy byly tyto složky získávány z obilné mouky, zvířecí krve, mléka a vaječných bílků. Tyto látky byly přímo aplikovatelné na pokožku bez větších úprav. Až v roce 1950 bylo zaznamenáno racionálnější využití proteinů v kosmetologii [28, s. 321-322].

Kosmetický přípravek může obsahovat velké množství přídatných bioaktivních látek. V mnoha studiích se hovoří o příznivých účincích látek bohatých na bílkoviny. Proteiny jsou hojně využívány pro jejich blahodárny účinek k udržení zdravé a hydratované pokožky [28, s. 321-322].

Proteiny hrají dominantní roli v mnoha biologických procesech. Jejich hlavní funkcí je přenos a hromadění malých molekul a iontů, jsou součástí mechanické bariéry a podílejí se na imunitní ochraně pokožky. Jejich další schopností je výroba a přenos nervových vzruchů a napomáhají růstu a diferenciaci buněk pokožky [28, s. 321-322]. Pro využití nejen v kosmetice, ale i v potravinářství jsou důležité jejich vlastnosti. Jedná se o látky mající antimikrobiální aktivitu nebo se mohou využívat jako antioxidační činidla, mají také schopnost zabránit tvorbě rakovinných buněk a šíření nádorů, snížit hladinu cholesterolu a bojovat tak proti obezitě. Některé peptidy dokážou snižovat krevní tlak a mají příznivé účinky při hypertenzi [29, s. 1-22]. Z kosmetického hlediska jsou nejdůležitější jejich antimikrobiální a antioxidační vlastnosti.

Pro kosmetické produkty se využívají hlavně proteiny získané z nízkomolekulárních bílkovin [28, s. 321]. V současnosti je předmětem zájmu at' již v kosmetice, či jiném odvětví, využití mléčných a syrovátkových proteinů.

2.1 Mléčné bílkoviny

Mléčné bílkoviny jsou považovány za jeden z nejdůležitějších zdrojů, ze kterých lze získat biologicky aktivní peptidy mající antimikrobiální, antioxidační, imunomodulační, antitrombotické a antihypertenzní vlastnosti. Více než 200 biologicky aktivních peptidových sekvencí bylo identifikováno z kaseinů a syrovátkových proteinů. Tyto bioaktivní proteiny jsou v mateřské molekule neaktivní a pro jejich aktivaci musí být z této molekuly uvolněny. Existuje několik způsobů jak tento peptid uvolnit. Jedná se například o hydrolýzu trávicích enzymů, fermentaci mléka proteolytickou startovací kulturou nebo

mikrobiální proteolýzu. Velké množství těchto biologicky aktivních peptidů bylo identifikováno ve fermentovaných mléčných výrobcích, jako je jogurt, kysané mléko a určité druhy sýrů [29, s. 70].

2.1.1 Kaseinové bílkoviny

Mezi kaseinové bílkoviny, které působí antimikrobiálně, řadíme Isracidin, Kappacin a Casocidin-I [29, s. 71].

Isracidin vzniká štěpením α 1-kaseinu pomocí chymosinu. Tento peptid je účinný proti *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes* a *Candida albicans*. U Isracidinu v kombinaci s antibiotikem (penicilin nebo streptomycin) byl zaznamenán synergický účinek proti *S. aureus* [30, s. 2358].

Dalším enzymem, který štěpí kasein je trypsin. Tento enzym štěpí α 2-kaseinu a vzniká antimikrobiální peptid zvaný Casocidin-I, který působí proti řadě grampozitivních a gramnegativních bakterií [29, s. 71].

Kappacin je fosforylovaná forma caseinomakropeptidu původně odvozená od κ -kaseinu. Tento peptid je rovněž účinný proti některým mikroorganismům, jako je *S. aureus*, *E. coli* nebo například *Listeria innocua* [30, s. 2358].

2.1.2 Syrovátkové bílkoviny

Syrovátka je žlutozelená kapalina, která vzniká jako vedlejší produkt při výrobě sýrů. Složení a vlastnosti syrovátky jsou závislé na kvalitě použitého mléka a na technologii výroby konečného produktu. Syrovátka představuje zhruba 93 % vody. Zbytek je tvořen laktózou, vitamíny a minerálními látky. Méně než 1 % celkového obsahu představují proteiny [31, s. 257].

V mnoha studiích bylo zjištěno, že syrovátkové bílkoviny vykazují biologickou aktivitu. Díky tomuto faktu lze nacházet uplatnění syrovátky nejenom v potravinářském průmyslu, ale také ve zdravotnictví, farmacii a kosmetickém průmyslu [32, s. 1637], [33, s. 48].

Syrovátkové proteiny se dělí na albuminy a globuliny. Jedná se o globulární molekuly, které tvoří přibližně 17 – 20 % celkových bílkovin kravského mléka. Je zde přítomných několik frakcí, které vykazují biologickou aktivitu [32, s. 1637], [34, s. 9].

β -Laktoglobulin (β -Lg)

β -Laktoglobulin je nejvíce převládajícím proteinem syrovátky (50–60 %), který je bohatý na esenciální aminokyseliny. Svou schopností modulovat lymfatické odpovědi se jeví jako obranná látka proti infekcím a šíření nádorů [34, s. 14].

α -Laktalbumin (α -La)

Tato bílkovina má druhé nejrozšířenější zastoupení mezi proteiny v syrovátce (25 %). α -Laktalbumin vykazuje rovněž biologickou aktivitu, která se projevuje v širokém spektru oblastí. Napomáhá vstřebávání minerálních látek, má antibakteriální a imunomodulační účinky, zlepšuje hojení ran a podporuje imunitní systém. Bylo zjištěno, že zlepšuje kvalitu spánku a má uklidňující účinky při psychickém vyčerpání. Tato bílkovina má rovněž protirakovinné účinky [34, s. 14], [35, s. 1-4].

Glykomakropeptid (GMP) a proteozo-peptony

Tyto frakce mají nižší zastoupení než β -laktoglobuliny a α -laktalbuminy, ale i zde je známa jistá biologická aktivita těchto proteinů [34, s. 15].

Imunoglobuliny

Imunoglobuliny zahrnují skupinu proteinů IgG, IgM, IgA a sekreční IgA. Podporují imunologickou aktivitu a mohou být přínosné při léčbě průjemových onemocnění [34, s. 14], [35, s. 1-4].

Laktoferin

Laktoferin je antibakteriální, fungicidní a antivirová bílkovina, která má imunomodulační, antioxidační a protizánětlivou aktivitu. Množení bakterií zabraňuje tím, že jim odebírá železo, díky němuž se většina bakterií množí. Laktoferin umožňuje transport odebraného železa, váže na sebe toxiny a působí příznivě na střevní mikroflóru. Má hepatoprotektivní účinky, které byly využity při léčbě jaterního onemocnění [36, s. 3281-3291].

Laktoferin, stejně jako lysozym, je považován za antibiotikum savců. Aktivovaný protein je zlepšenou formou přírodního izolovaného laktoferinu a jeví se jako silný inhibitor patogenní mikroflóry na povrchu produktu. Aktivovaný laktoferin lze aplikovat a využívat zejména v potravinářství a živočišné výrobě. Díky svým imunomodulačním vlastnostem se však o laktoferinu může uvažovat jako o léčivu [37, s. 220-221].

Studie [38, s. 4137-4142] se zabývá vlastnostmi enzymatických hydrolyzátů hovězího laktoferinu. Tyto hydrolyzáty byly získány štěpením laktoferinu prasečím pepsinem, pepsinem tresky nebo kyselou proteázou *Penicillium duponti*. Všechny hydrolyzáty štěpeny těmito enzymy vykazovaly silnou aktivitu proti *Escherichia coli* O111. Naopak hydrolyzáty získané jinými enzymy (tripsyn, papain, aj.) byly proti této bakterii aktivní mnohem méně. Nízkomolekulární peptidy produkované prasečím pepsinem inhibují růst řady gramnegativních i grampozitivních bakterií, a to i ty, které jsou rezistentní k nativnímu laktoferinu. Tato studie připouští možné využití těchto produktů jako konzervační přísady v kosmetických přípravcích.

Kromě těchto bílkovinných frakcí syrovátky mají značné zastoupení i látky nebílkovinné povahy, jejichž biologická aktivita je neméně důležitá. Přehled všech těchto látek je uveden v *Tab. 1*.

Tab. 1. Zastoupení biologicky aktivních látek v syrovátce [39, s. 1197-1211].

Složka syrovátky	Koncentrace [mg/l]
β -Laktoglobulin	3,2
α -Laktalbumin	1,2
Glykomakropeptid	1,2
Proteozo-peptonová frakce	1,1
Imunoglobulin G	0,7
Bovinní sérum albumin	0,4
Laktoferin	0,06
Imunoglobulin A	0,04
Imunoglobulin M	0,04
Laktoperoxidáza	0,03
Lysozym	0,0004

2.2 Produkce bioaktivních látek

Antimikrobiální peptidy lze získávat různými cestami. Může se jednat jak o peptidy, které jsou produkovány mikroorganismy, tak o peptidy rostlinného či živočišného původu nebo o peptidy přirozeně se tvořící v lidském těle [40, s. 93-100].

Přírodní peptidy mohou být získávány primárně jako bioaktivní látky obsažené v rostlinách. V přírodě se mohou vyskytovat také ve formě sekundárních metabolitů rostlin. Rostliny mají svůj vrozený imunitní systém, který do značné míry závisí na produkci antimikrobiálních peptidů. Tyto peptidy mají protiinfekční účinky, mohou se jevit jako účinná antimykotika nebo působit proti virovému napadení [40, s. 93-95].

Antimikrobiální peptidy živočišného původu lze izolovat jak z bezobratlých živočichů (hmyz) tak z obratlovců (žabí kůže, savci). Zdrojem bioaktivních peptidů může být také člověk. Přestože lidský epitel a leukocyty mají značné množství antimikrobiálních peptidů, jejich využití nebylo dostatečně zkoumáno a zatím je známo jen pár látek, které by mohly mít potenciální využití v oblasti léčiv [40, s. 98].

Kromě získávání peptidů přímou cestou mohou být tyto látky produkovány mikroorganismy jako hlavní složka obranného systému hostitele. V minulosti byla objevena mnohá peptidová antibiotika, která byla dělena do dvou tříd. Jednalo se o neribozomálně syntetizované peptidy (např. gramicidin) nebo o ribozomální syntetizované (přírodní) peptidy [40, s. 93-100].

2.2.1 Bakterie mléčného kvašení

Mezi mikroorganismy, které produkují antimikrobiální látky využitelné v kosmetice, patří bakterie mléčného kvašení (BMK). Jejich potenciální využití může být založeno na jejich schopnosti vytvářet látky s rozdílnými strukturami mající antimikrobiální účinek. Jedná se především o látky nízkomolekulární, jako je kyselina mléčná, oxid uhličitý, diacetyl, peroxid vodíku a bakteriocin [41, s. 63].

Bakterie mléčného kvašení jsou především grampozitivní bakterie se stejným metabolismem, fyziologickou funkcí a morfologickou stavbou. Jedná se o heterogenní skupinu mikroorganismů, která tvoří tyčinky a koky, nesporuluje, je aerotolerantní či anaerobní a je také acidotolerantní [42, s. 1-2].

Mezi BMK se řadí rody *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*

a *Weissella*. Rod *Bifidobacterium* patřící mezi jednobuněčné organismy rodu aktinomycet je mezi BMK je řazen díky analogii fenotypu [42, s. 1-2].

Bakterie mléčného kvašení patří mezi probiotické bakterie, které v poslední době získaly velkou pozornost. Probiotika jsou živé mikroorganismy, které jsou využívány pro svůj příznivý vliv na zdraví hostitele. Probiotické bakterie produkují užitečné sloučeniny, jako jsou bakteriociny, polysacharidy, krátké řetězce mastných kyselin, volné aminokyseliny, bioaktivní peptidy, trávicí enzymy, vitamíny a imunomodulační sloučeniny [43, s. 306-308].

Společným znakem všech BMK je schopnost zkvašovat cukry a získávat tak kyselinu mléčnou. Díky této kyselině dokážou snížit pH suroviny [43, s. 306-308]. Z biochemického hlediska můžeme v závislosti na jejich produkci dělit tyto bakterie na homofermentativní a heterofermentativní. Homofermentativní BMK fermentují jednoduché sacharidy za vzniku kyseliny mléčné jako primárního produktu. Naopak heterofermentativní mají schopnost kromě kyseliny mléčné produkovat i řadu dalších látek, např. oxid uhličitý, etanol a další [42, s. 1-2], [44, s. 7-10].

2.3 Bakteriociny

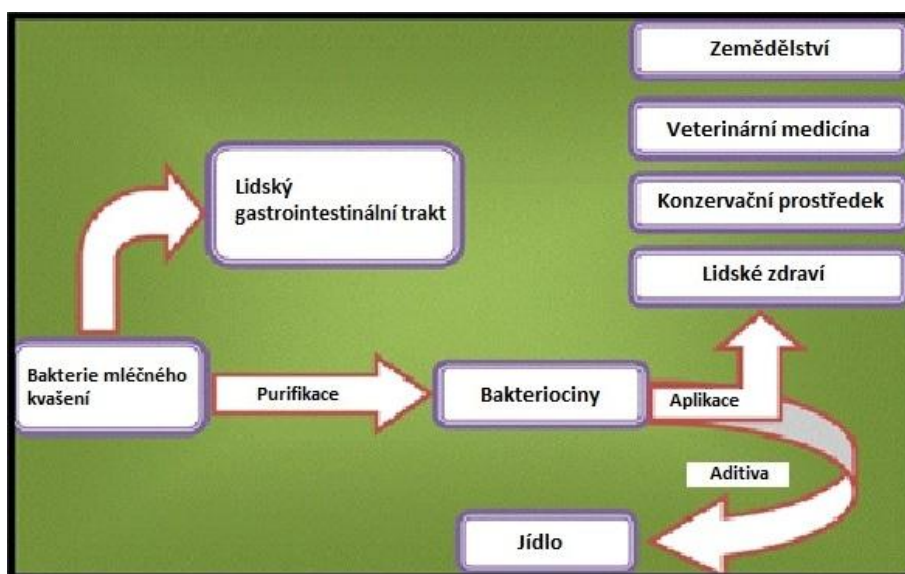
Během fermentace jsou BMK schopny produkovat látky zvané bakteriociny, které jsou hojně využívány pro své bakteriocidní a bakteriostatické účinky a mají rozsáhlé využití pro další odvětví. Tyto bakterie mohou produkovat jeden či více bakteriocinů a na základě jejich biochemických a genetických vlastností jsou řazeny do různých kategorií [43, s. 306-308].

Bakteriociny jsou proteiny (peptidy), které vznikají ribozomální syntézou a obvykle obsahují 30 – 60 aminokyselinových zbytků. Tyto antimikrobiální látky působí proti dalším bakteriím, mnohdy úzce příbuzným k producentovi. Obě bakterie (producent antimikrobiálního peptidu i bakterie, která je tímto peptidem inhibována) jsou grampozitivní [45, s. 577-592]. Gramnegativní buňky mají vnější membránu, která je před bakteriociny chrání. Pokud je tato vnější membrána narušena, mohou bakteriociny působit i proti gramnegativním bakteriím [46, s. 131-149], [47, s. 82-100].

Mikroorganismy, které produkují bakteriociny, jsou často izolovány z čerstvých a fermentovaných surovin, jelikož při nízkém pH je aktivita bakteriocinů nejvyšší. Tyto bakterie mohou být součástí startovacích kultur pro fermentaci potravin, anebo se k těmto

kulturám mohou přidávat za záměrem zlepšení jakosti a bezpečnosti potravin [46, s. 131-149].

Bakteriociny mají rozsáhlé spektrum využití (*Obr. 1*). Mohou se využívat v potravinářství jako konzervační látky nebo aditivní látky. Dále se mohou uplatnit ve zdravotnictví, veterinářství či zemědělství (hnojiva a pesticidy) [43, s. 306-308], [47, s. 82-100].



Obr. 1. Přehled využití bakteriocinů produkovaných BMK [43, s. 306-308].

2.3.1 Mechanismus účinku bakteriocinů

Bakteriociny grampozitivních bakterií jsou schopny rozpoznat specifický receptor v cytoplazmatické membráně cílových bakteriálních buněk, tuto vnější membránu naruší a vytvoří póry ve fosfolipidové dvojvrstvě [48, s. 3-5]. Tato schopnost tvořit póry má za následek vytékání draselných iontů z buňky, ztrátu membránového potenciálu a zamezení příjmu aminokyselin. Zánik buňky je tedy zapříčiněn neúčinným cyklem příjmu draslíku za pomoci adenosintrifosfátu (ATP). Tento děj způsobil bakteriocin, který pomocí ATPasy zprostředkoval uvolnění draslíku v kombinaci se zvýšenou hydrolýzou ATP [45, s. 577-592]. Kromě tohoto byly popsány i další mechanismy účinku. Může se jednat například o inhibici proteosyntézy, která zabraňuje tvorbě těchto důležitých peptidů nebo o interferenci s Na^+/K^+ transportem [48, s. 5].

Pokud je vnější membrána gramnegativních buněk narušena fyzikálním či chemickým faktorem nebo je vystavena stresovým podmínkám, stává se tato membrána propustná pro bakteriociny BMK a i gramnegativní bakterie jsou tímto bakteriocinem inhibovány [48,

s. 3-6]. U těchto bakterií byl prokázán synergický efekt bakteriocinu a kyseliny etylendiamintetraoctové (EDTA). Bylo zjištěno, že EDTA je účinná pouze u gramnegativních bakterií a to tím, že narušuje cytoplazmatickou membránu cílové bakterie a umožní tak přístup bakteriocinu do buňky [49, s. 321-329].

2.3.2 Klasifikace bakteriocinů

Bakteriociny grampozitivních bakterií jsou rozděleny do čtyř hlavních kategorií [45, s. 578], [48, s. 5].

Bakteriociny I. třídy – lantibiotika

Lantibiotika jsou peptidické látky, které patří mezi skupinu antibiotik. Tato skupina představuje malé molekuly (2 až 3 kDa) s netypickou strukturální stavbou. Obsahují jednak polycyklickou thioeterovou aminokyselinu (lanthionin či metyllanthionin) a zároveň nenasycenou aminokyselinu dehydroalanin a kyselinu 2-aminoisomáselnou [43, s. 306-308].

Jsou syntetizována jako prekurzorové peptidy s N-koncovým peptidem a C-koncovou oblastí, ve které jsou posttranslačně modifikovány zbytky specifických aminokyselin [50, s. 1068].

Tyto bakteriociny byly rozděleny do dvou skupin na základě strukturální podobnosti. První skupina (např. nisin a epidermin) je tvořena podlouhlými, flexibilními, kladně nabitými peptidy, které vytvářejí póry v cytoplazmatické membráně grampozitivních bakterií, a tím může dojít k bakteriolyze. Druhá skupina (např. mersacidin, actagardin) je tvořena globulárními peptidy těžší struktury, které mají buď záporný, nebo neutrální náboj. Jejich působení je založeno na tvorbě komplexů s membránou pomocí specifických enzymů [43, s. 306-308], [51, s. 1-6].

Mezi zástupce této třídy patří např. nisin. Nisin je produkován kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a v kyselějším pH má široké spektrum inhibice grampozitivních bakterií. Působí také proti řadě patogenních mikroorganismů. Dalším zástupcem je Lacticin 3147, který má antimikrobiální účinek i v neutrálním prostředí, čím se odlišuje od nisinu [46, s. 131-149].

Bakteriociny II. třídy – nelantobiotika

Do této třídy patří nízkomolekulární, nemodifikované, aktivní a relativně stabilní peptidy (< 10 kDa). Jedná se o kationaktivní a hydrofobní peptidy, které jsou děleny do tří podskupin [43, s. 306-308], [47, s. 82-100], [52, s. 545-555]:

- II(a) – pediocinové bakteriociny se silným účinkem proti *Listerii*. Zástupcem je např. pediocin PA-1 a enterocin A,
- II(b) – tato podskupina je tvořena souborem dvou různých bakteriocinů a jejich účinnost je závislá na činnosti těchto odlišných peptidů. Patří zde např. lacticin F, plantaricin EF a další,
- II(c) – sekundární peptidy (sekrety bakteriocinů), které jsou transportovány vedoucími peptidy. Do této skupiny se řadí např. plantaricin A, lactococcin A.

Bakteriociny III. A IV. třídy

Bakteriociny III. třídy představují vysokomolekulární peptidy (> 30 kDa), které jsou teplotně nestabilní. Mezi zástupce této třídy patří např. helveticin J a acidifilicin A [43, s. 306-308].

Skupina bakteriocinů IV. třídy je tvořena látkami, které mají ve své molekule kromě proteinové části i jinou (nebílkovinnou) složku. Patří sem glykoproteiny nebo lipoproteiny [43, s. 306-308].

Přehled nejdůležitějších bakteriocinů, které produkují BMK je uveden v *Tab. 2*.

Tab. 2. Přehled bakteriocinů produkovaných BMK [43, s. 307].

Bakteriocin	Produkční organismus
Lacticin 3147	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>
Nisin	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>
Lacto cocain B	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> <i>cremons</i>
Lencocin A	<i>Leuconostoc gelidium</i>
Entrocin A	<i>Enterococcus faecium</i>
Pediocin A	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
Pediocin F	<i>Pediococcus acidilactici</i>
Pediocin PA-1	<i>Pediococcus acidilactis</i>
Pediocin ACH	<i>Pediococcus Acidilactis</i>
Mesertericin Y105	<i>Leuconostoc mgerteroids</i>
Curvalicin	<i>Lactobacillus curvatus</i>
Acidocin J1132 β	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Plantaricin S β	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Bakteriocin J46	<i>Lactococcus lactis</i>
Lacticin 481	<i>Lactococcus lactis</i> subsp (<i>Streptococcus lactis</i>)
Lactocin-705	<i>Lactobacillus paracasei</i>
Plantaricin C19	<i>Lactobacillus plantar</i>
Lactocin-S	<i>Lactobacillus sake</i>
Lactococcin MMFII	<i>Lactococcus lactis</i> subsp (<i>Streptococcus lactis</i>)
Curvacin-A	<i>Lactobacillus curvatus</i>
Sakacin-A, Sakacin-P	<i>Lactobacillus sakei</i>
Reuterin	<i>Lactobacillus reuteri</i>
Acidocin B (AcdB)	<i>Plantaricin 1.25 β Lactob</i>

Kromě bakterií mohou produkovat antimikrobiální peptidy také houby. Z půdních druhů plísň byl izolován Plectasin, který je velmi účinný proti kmeni *Streptococcus* [40, s. 93-100].

2.4 Využití bakteriocinů v kosmetice

Zdravá lidská kůže představuje kromě fyzické bariéry i bariéru chemickou. Tato bariéra obsahuje, mimo jiné látky, i antimikrobiální peptidy, které pokožku chrání a zabraňují mikrobiálním infekcím. Pokud je tato bariéra jakkoliv narušena, může docházet ke kožním infekcím a dalším onemocněním kůže. Abychom těmto chorobám předešli, je vhodné používat přípravky s obsahem antimikrobiálních peptidů. Tímto způsobem může být řešena ať už prevence vzniku infekcí tak i jejich samotná léčba [40, s. 93-100].

V poslední době je stále více bakterií odolnějších proti antimikrobiálním látkám, a to vedlo ke snaze najít alternativní látky, které by svůj antimikrobiální účinek mohly uplatnit jak v konzervaci potravin, tak ve farmaceutickém či kosmetickém průmyslu [53, s. 1-9].

Využití bakteriocinů v kosmetice není tak rozsáhlé jako je tomu v potravinářství, avšak možné využití tady je. Konkrétním příkladem použití bakteriocinu v kosmetickém průmyslu mohou být některé patentované kosmetické přípravky. Jedním z nich je kosmetická formulace, u které byly použity fermentační metabolity produkované směsnou kulturou BMK. Jedná se o humektant určen pro suchou a podrážděnou pokožku [54]. Dalším příkladem může být patent, který se týká využití kosmetického přípravku obsahující alespoň jedno prebiotikum spolu s alespoň jedním bakteriocinem [55] nebo přípravek obsahující alespoň jeden bakteriocin určený ke snížení tělesných pachů, zejména pachů v podpaží [56].

Studie [57, s. 552-559] se zabývá využitím bakteriocinu produkovaného bakterií *Lactococcus* sp. HY 449 proti bakteriím způsobující zánět kůže, jako jsou *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* a *Propionibacterium acnes*. Pomocí tvorby inhibičních zón při antimikrobiálním testování byla zaznamenána inhibice růstu těchto bakterií. Bakteriocin velmi rychle inaktivoval kmen *P. acnes* a při testování na lidech bylo zjištěno, že nedrážní pokožku ani nezpůsobuje žádné alergické reakce. Díky těmto aspektům, může být bakteriocin produkovaný *Lactococcus* sp. HY 449 využíván jako užitečná antimikrobiální látka zabraňující tvorby akné a zánětu kůže.

V jiné studii [58, s. 275-282] byl zkoumán vliv antimikrobiálních peptidů, které byly odvozeny od peptidů žabí kůže. Tyto peptidy ([D4k]ascaphin 8, [G4K]XT 7, [T5k]temporin-DRa, brevinin-2GU a B2RP-ERa) rovněž působí proti kmeni *Propionibacterium acnes* a vykazují značné protizánětlivé účinky. Všechny peptidy vykazují inhibici růstu *P. acnes* avšak jako nejlepší se jevil [D4k]ascaphin 8. Díky

uvolňování protizánětlivých cytokinů mohou tyto peptidy najít terapeutické využití při léčbě chronicky zánětlivého onemocnění *acne vulgaris*.

Další výzkum [53, s. 1-9], který může mít potenciál v kosmetickém průmyslu se zabýval izolací a charakterizací antibakteriálních lipopeptidů produkovaných kmenem *Citrobacter* a *Enterobacter*. Pomocí analýzy HPLC byla u izolátů různých druhů těchto bakterií zjištěna přítomnost mnoha antimikrobiálních lipoproteinů, které se lišily svou molekulovou hmotností. Tyto kmeny se schopností produkovat více antimikrobiálních lipopeptidů mohou mít využití v biotechnologických odvětvích, jako je farmaceutický či kosmetický průmysl.

3 NISIN

Nisin je antimikrobiální peptid syntetizován některými bakteriemi mléčného kvašení, především bakterií *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* [59, s. 199]. Tento bakteriocin o molekulové hmotnosti 3500 Da se skládá z 34 aminokyselin, byl objeven v roce 1928 a patří mezi nejvíce probádaná a nejvíce používaná antibiotika. Je tolerantní ke kyselému prostředí, je teplotně stabilní při nízkých hodnotách pH a má specifický bakteriocidní účinek. Jedná se o přírodní látku, která působí antibakteriálně, zejména proti grampozitivním bakteriím. Někdy však může inhibovat i gramnegativní bakterie, spory bacilů a klostridií [60, s. 146].

Existuje několik forem nisinu. Nisin A, Z, F a Q, které jsou produkovány kmenem *Lactococcus lactis* a nisin U a U2, které produkuje kmen *Streptococcus* sp. [61, s. 1]. Nejčastěji se vyskytuje ve dvou přirozených variantách (nisin A, nisin Z). Jejich odlišnost je dána zastoupením rozdílné aminokyseliny (AMK) v poloze 27. U nisinu A se v této poloze vyskytuje histidin a u nisinu Z je tato AMK nahrazena asparaginem. Tato rozdílná struktura způsobuje pouze to, že nisin Z se jeví jako lépe rozpustný v neutrálním pH a má lepší difúzní vlastnosti. Na antimikrobiální aktivitu nemá vliv žádný [62, s. 775]. Rozpustnost nisinu A je dána hodnotou pH. Při pH 2 je nisin stabilní a ve vodě rozpustný. Naopak při pH 6 nebo v neutrálním prostředí je nisin téměř nerozpustný [60, s. 147].

3.1 Mechanismus účinku nisinu

Antimikrobiální účinek nisinu je dán jeho působím na cytoplazmatickou membránu cílených grampozitivních bakterií, kde vytváří póry. Vznik pórů vede ke zvýšené propustnosti této bakteriální membrány a dochází k úniku iontů, aminokyselin a ATP. Kombinace ztráty životně důležitých látek a ATP, tedy vyčerpání energie, vede k zániku buňky [62, s. 776].

Účinek nisinu proti sporám je způsoben vazbou proteinu se sulfhydrylovými skupinami na povrchu spor s následným mechanickým prasknutím [62, s. 776].

3.2 Produkce nisinu

Nisin se vyrábí fermentací mléka nebo syrovátky pomocí BMK (např. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*). Výsledný fermentační produkt je dále koncentrován, sušen a rozemlet do malých částic. Tyto částice obsahují hodně soli a pevných látek z mléčných bílkovin.

Přesněji se jedná o 74,4 % NaCl, 23,8 % sacharidy, 2,5 % nisinu a 1,7 % vlhkosti [60, s. 146].

Vzhledem k vysokým nákladům na výrobu nisinu je třeba snížit výrobní náklady a hledat levnější způsoby výroby s větší výtěžností [60, s. 146]. Aby byla produkce nisinu co největší, může být živné médium upraveno přidavkem různých látek. Ke snížení nákladů rovněž přispěje zpracování odpadních produktů (např. syrovátka jako odpadní produkt při výrobě sýrů) a jejich použití jako média pro fermentaci [62, s. 775-777].

Produkce nisinu je ovlivněna několika faktory. Jedná se o typ použitého bakteriálního kmene, živiny v použitém médiu, pH a teplotu prostředí a další faktory, jako jsou například inhibiční látky v médiu, adsorpce nisinu do produkčních buněk nebo enzymatická degradace [60, s. 145-146].

Rozpustnost, stabilita a biologická aktivita nisinu je závislá na pH prostředí. Při fermentačním procesu se více než 80 % nisinu uvolňuje do prostředí při pH lehce pod 6. Naopak při pH nad 6 se nisin uvolňuje velmi málo [60, s. 145-146]. Největší produkce nisinu byla zaznamenána v rozmezí pH 5,9 – 6,1. Díky vzniku kyseliny mléčné však dochází k velkému snížení pH média a to může mít za následek inhibici růstu *Lactococcus lactis* a snížení výtěžku nisinu. Proto se do fermentačního procesu mohou přidávat pufovací činidla k úpravě tohoto pH. Jako pufovací činidlo může být použit dihydrogenfosforečnan draselný [62, s. 777].

Dále bylo zjištěno, že výtěžek nisinu je závislý na počáteční koncentraci použitého sacharidu v kultivačním mediu. Nejčastějším sacharidem pro produkci nisinu je glukóza. Kromě glukózy je možno použít řadu dalších cukrů, jako je například sacharóza, xylóza, laktóza a jiné. Bylo dokázáno, že i sacharóza jako disacharid je schopna rychle tvořit tento bakteriocin a výtěžek nisinu je rovněž závislý na počáteční koncentraci tohoto cukru [62, s. 777].

Kromě těchto látek je možno do systému přidat ještě další složky jako jsou dusíkaté látky, u kterých byl ve studii [62] zaznamenán lepší výtěžek nisinu, nebo tween 80. Tween 80 se používá jako dispergační činidlo. Nisin má tendenci zůstávat v buněčných membránách díky své amfifilní povaze, a proto může být do média přidáván Tween 80, který má za následek uvolnění nisinu do prostředí a zvýšení tak jeho výtěžnosti [62, s. 777].

Ve studii [62] byla zkoumána produkce nisinu pomocí kmene *Lactococcus lactis* ATCC 11454 v živné MRS půdě při různém pH. Cílem bylo optimalizovat parametry

růstového média, aby se zvýšila produktivita nisinu ve fermentačních procesech. K tomuto účelu byla přidána do tohoto média různá koncentrace sacharózy, asparaginu (jako zdroj dusíkatých látek), dihydrogenfosforečnanu draselného a Tweenu 80 a byl pozorován výtěžek nisinu takto upravených půd.

Ve studii [63] byla sledována produkce nisinu v bujónu M 17 a MRS s přidavkem nejen sacharózy, fosforečnanu draselného a asparaginu, ale také s přidavkem odstředěného mléka v poměru 1:1. Bylo zjištěno, že nejlepší aktivitu vykazoval nisin v kultivačním médiu s mlékem.

3.3 Aplikace nisinu

3.3.1 Využití nisinu v potravinářském průmyslu

Nisin je využíván jako antimikrobiální látka, která je komerčně dostupná a je povolena jako konzervační aditivum (E234) do potravin. Jeho použití upravuje Nařízení komise č. 1129/2011, které uvádí maximální povolenou koncentraci a vymezuje výrobky, ve kterých může být tato přídatná látka použita [61, s. 1]. Úspěšně se používá pro zvýšení doby skladovatelnosti u tavených sýrů, mléka, mléčných dezertů, masa, ryb, potravinových konzerv a alkoholických nápojů [62, s. 776].

Antimikrobiální aktivita nisinu v potravinářství závisí na mnoha faktorech. Některé faktory, jako např. nízká aktivita vody, nízké teploty, ochranná atmosféra, nízké pH a přítomnost jiných konzervačních látek mohou zvýšit antimikrobiální účinek nisinu a mají s tímto bakteriocinem synergický efekt. Naopak některé přídatné látky mohou mít antagonistický efekt s nisinem. Mezi tyto látky patří disiřičitan sodný a oxid titaničitý. V potravinách, které nebyly (nebo byly jen minimálně) tepelně ošetřené může dojít k degradaci nisinu proteolytickými enzymy. Na druhou stranu také v potravinách, které byly vystaveny delšímu tepelnému opracování, dochází rovněž ke snížení koncentrace nisinu. Např. u tavených sýrů v procesu tavení může dojít až k 20 – 25% ztrátě nisinu [48, s. 71].

Nisin může být dále uplatněn v oblasti zpracování polymer jako konzervační prostředek v obalovém materiálu potravin, nebo může být ve formě prášku či povlaku aplikován na povrch potravin [64, s. 368-379].

3.3.2 Klinická aplikace nisinu

Kromě potravinářství nachází nisin uplatnění i v řadě dalších odvětví. V současné době je studováno využití nisinu pro jejich terapeutické, medicínské, farmaceutické a kosmetické účely [60, s. 152].

Existuje několik studií, které byly s nisinem provedeny v rámci těchto odvětví.

Výzkum [65, s. 65-70] ukázal antimikrobiální aktivitu nisinu F při infekcích způsobené bakterií *Staphylococcus aureus* postihující dýchací cesty. Tato studie se však zabývala působením nisinu na zvířecím modelu. Příznivé účinky tohoto peptidu k léčbě respiračních infekcí u člověka jsou nadále zkoumány.

Dále je možno zmínit studii [66, s. 311-316], která se zabývá aplikací nisinu jako alternativou k antibiotikům pro léčení stafylokokové mastitidy u žen během kojení.

Další zajímavou farmaceutickou aplikací nisinu můžeme najít v publikaci [67, s. 333-338], která se zabývá vývojem antikoncepce pro ženy. Studie ukázala že nisin se jeví jako účinný inhibitor spermií a může být označen za spolehlivý antikoncepční prostředek. Rovněž nebyla prokázána toxicita a jeví se jako profylaktická antikoncepce zabráňující přenosu pohlavních nemocí. Z této studie vyplývá, že nisin by se svými antibakteriálními a spermicidními účinky mohl být v budoucnu využíván jako antikoncepce [67, s. 333-338].

3.3.3 Využití nisinu v kosmetice

V kosmetickém průmyslu je použití nisinu zatím málo prozkoumáno. Nisin může být do kosmetiky zakomponován díky svému antibakteriálnímu účinku. Tento bakteriocin však neúčinkuje jako plnohodnotný konzervant, proto je nutné, pro zesílení jeho účinku, přidat do systému ještě další vhodnou konzervační látku.

Je zde několik studií, které dokazují možnou aplikaci nisinu v kosmetické oblasti.

Studie [68, s. 988-991] se zabývá terapeutickým využitím nisinu jako přírodní látky pro zmírnění atopické dermatitidy. Atopická dermatitida je způsobena bakterií *Staphylococcus aureus*, která způsobuje infekční onemocnění zdravé kůže. Výsledky ukazují, že nisin, jako netoxické a nedráždivé lantibiotikum, může být aplikováno při oštrování této dermatitidy a může být použito jako alternativa běžných antibiotik k léčbě těchto stafylokokových infekcí.

Jako další studie může být zmíněna studie [69], která zkoumá a zabývá se využitím nisinu k redukci infekcí v dutině ústní. Je zde také diskutováno jeho využití při léčbě zubního kazu či infekce kanálku a kořene zuby.

4 MIKROBIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ KOSMETICKÝCH PRODUKTŮ

Napadení KP mikroorganismy je jedna z nejčastějších příčin kažení kosmetického produktu. Konzervace KP je nutná jednak pro ochranu výrobku před rozkladem a znehodnocením, které je způsobeno činností přítomných kontaminujících mikrobů a jednak pro ochranu spotřebitele používající tento přípravek [70].

Výrobce vždy musí zhodnotit mikrobiologické riziko svých výrobků a u těch výrobků, které nebyly posouzeny jako nerizikové, musí přípravek zabezpečit vhodnou a účinnou konzervací a zajistit mikrobiologické zkoušení jejich čistoty [70].

Pro zajištění žádoucí konzervace (zvláště u přípravků obsahující vodu) jsou používány konzervační látky, u kterých je nutno kontrolovat maximální přípustnou dávku. Nadbytečné množství těchto konzervačních látek by mohlo vyvolat riziko vzniku alergií [70], [71].

Účinnost konzervace je ovlivněna druhem aktivní látky, celkovým složením a také typem obalu či uzávěru přípravku [71].

4.1 Metody testování účinnosti konzervace kosmetických přípravků

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích přikazuje, aby pro každý KP byla vypracována zpráva o bezpečnosti, ve které budou uvedeny výsledky konzervačních testů. Toto nařízení však neudává způsob provedení ani princip těchto testů [2].

Pro zjištění účinnosti konzervace jsou prováděny standardní tzv. zátěžové neboli přeživací testy, které jsou vyhotoveny před uvedením KP na trh, příp. již ve stádiu vývoje. Jediným pracovištěm v České republice, které toto testování provádí je Národní referenční laboratoř pro mikrobiologii potravin, předmětů běžného užívání a prostředí [70].

Existuje několik metod, které specifikují požadavky pro testování protimikrobní konzervace [72, s. 44].

Vědecký výbor pro bezpečnost spotřebitele, Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), udává požadavky pro tyto zátěžové testy u hotových KP, kosmetických ingrediencí a hodnocení jejich bezpečnosti v rámci Evropské Unie (EU). Nařizuje povinnosti pro provádění konzervačních testů u KP, které by mohly být (při skladování

a používání za vhodných podmínek) napadeny mikroorganismy, nebo při vystavení KP riziku infekce a ohrožení tak zdraví spotřebitele [72, s. 44].

Státy EU se mohou řídit také Českou technickou normou ČSN EN ISO 11930 o antimikrobiální ochraně kosmetického výrobku [73]. Ve srovnání s jinými metodami stanovuje tato norma celkové zhodnocení antimikrobiální stability kosmetické formulace. ISO 11930 je určena především pro ve vodě rozpustné či ve vodě mísitelné výrobky. V příloze A je uveden rozhodovací diagram pro posouzení mikrobiologického rizika na základě nepříznivého složení přípravku pro růst mikrobů, specifických výrobních podmínek nebo typu obalu či podmínek použití [72, s. 44], [73, s. 19]. Tato norma také odkazuje na ČSN EN ISO 29621, která určuje pokyny pro posouzení rizika a identifikaci mikrobiologicky málo rizikových výrobků [73, s. 18], [74]. ISO 29621 stanovuje za málo rizikové výrobky např. produkty, které mají $\text{pH} \leq 3,0$ či $\geq 10,0$, obsah etanolu nebo jiného alkoholu $\geq 20 \%$ nebo $a_w \leq 0,75$. U těchto výrobků se nemusí provádět zkoušky konzervační účinnosti [74, s. 6].

Kromě norem se mikrobiologické testování reguluje také lékopisy. Účinnost antimikrobiálního působení se v České republice provádí zkouškou účinnosti protimikrobiální konzervace (5.1.3.) dle Českého lékopisu (ČL) [71] nebo se může řídit požadavky uvedenými v Evropském lékopisu. Pro světovou produkci KP existuje lékopis Spojených států či lékopisy dalších příslušných zemí [72, s. 44-52].

Dalšími organizacemi, které stanovují povinnosti pro provádění testů, mohou být např. Asociace jihovýchodních asijských národů (ASEAN), Sdružení pro kosmetické, toaletní a vonné látky (CTFA) nebo stanovení mikrobiologické bezpečnosti pomocí schůlke KoKo testu [72, s. 44-52].

Všechny tyto metody udávají sbírky kmenů, se kterými je testování prováděno a jejich parametry pro vyhodnocení protimikrobiální účinnosti [72, s. 44-52].

4.1.1 Zkouška účinnosti konzervace dle Českého lékopisu

Při vyhodnocení konzervační účinnosti KP v praktické části mé práce byla zvolena metoda dle Českého lékopisu. Tato metoda je úzce spojena s postupem dle normy ČSN EN ISO 11930. Tyto dvě metody jsou principiálně stejné, liší se ve výběru kmenů mikroorganismů, se kterými jsou zkoušky prováděny a ve vyhodnocení požadavků protimikrobiální účinnosti, kdy ČL má tyto nároky přísnější [71], [73].

Mezi kmeny, se kterými jsou testy uskutečňovány dle ČL, patří: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* a *Aspergillus niger*. ČL doporučuje pro perorální přípravky provést testy také s kmeny *Escherichia coli* a *Zygosaccharomyces rouxii* [71].

Norma ČSN EN ISO 11930 udává pro testování kmeny následující: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* a *Aspergillus brasiliensis* (dříve *A. niger*) [73].

Pro porovnání jsou uvedeny požadavky pro hodnocení protimikrobní účinnosti přípravků určených k místní aplikaci dle ČL v Tab. 3. [71] a pro hodnocení dle normy ČSN EN ISO 11930 v Tab. 4. [73].

Tab. 3. Požadavky pro hodnocení protimikrobní účinnosti přípravků určených k místní aplikaci dle ČL [71].

MO	Kritérium	Logaritmické snížení počtu zárodků			
		24 h	7 d	14 d	28 d
Bakterie	A	2	3	-	NI*
	B	-	-	3	NI
Houby	A	-	-	2	NI
	B	-	-	1	NI

* NI: bez zvýšení počtu od předchozího intervalu

Tab. 4. Požadavky pro hodnocení protimikrobní účinnosti dle ČSN EN ISO 11930 [73].

MO	Kritérium	Logaritmické snížení počtu zárodků		
		7 d	14 d	28 d
Bakterie	A	≥ 3	$\geq 3 + \text{NI}^*$	$\geq 3 + \text{NI}$
	B	-	≥ 3	$\geq 3 + \text{NI}$
<i>C. albicans</i>	A	≥ 1	$\geq 1 + \text{NI}$	$\geq 1 + \text{NI}$
	B	-	≥ 1	$\geq 1 + \text{NI}$
<i>A. brasiliensis</i>	A	-	≥ 0	≥ 1
	B	-	≥ 0	$\geq 0 + \text{NI}$

* NI: bez zvýšení počtu od předchozího intervalu

Vyhodnocení protimikrobní účinnosti je vyjádřeno v logaritmickém snížení životaschopných mikroorganismů proti hodnotám opatřeným pro čerstvě naočkovaný vzorek [71].

Přípravky jsou rozlišovány podle kritéria A a B. Za přípravky spadající do kritéria A jsou považovány takové přípravky, které vyjadřují doporučenou účinnost, které má být

dosaženo a u kterých je mikrobiologické riziko tolerovatelné. Tento přípravek je chráněn před mikrobiologickým bujením, které by znamenalo potenciální riziko pro spotřebitele. Naopak přípravky spadající do kritéria B jsou takové přípravky, které nesplňují požadavky doporučené účinnosti bez dalších zavedených faktorů a mají zvýšené riziko nežádoucích účinků. Tyto přípravky musejí mít ochranné zařízení pro snížení daného rizika, např. ochranný obal a dávkování pomocí čerpadla [71], [72, s. 47-48], [73].

Provedení zkoušky účinnosti konzervace

Zkoušky se provádějí samostatně s každým kmenem zvlášť [71]. Kultury se obnovují dle postupu, který poskytuje dodavatel referenčního kmene. Tyto kmény jsou uchovávány v laboratoři podle normy ČSN EN 12353 nebo v souladu s jinou přijatelnou metodou [73].

Z referenčních kultur se mikroorganismy přeočkují na povrch vhodných živných půd a nechají se kultivovat při předepsaných podmínkách (bakterie 18 – 20 hod při 30 – 35 °C, kvasinky 48 hod při 20 – 25 °C a plísně 1 týden při 20 – 25 °C). Z narostlých kmenů se připraví mikrobiální suspenze, ze kterých se odeberou vzorky ke stanovení počtu jednotek tvořících kolonie (cfu) v 1 ml jednotlivých suspenzí. Tato hodnota je důležitá pro stanovení velikosti inokula a je východiskem pro provedení zkoušky [71].

Testovaný přípravek je naočkován touto suspenzí zkušebního kmene tak, aby suspenze inokula nepřekročila 1 % objemu vzorku. Pro dosažení stejnosměrného rozptýlení inokula se vzorek důkladně promísí [71].

Naočkovaný vzorek se uchovává ve tmě při teplotě 20 – 25 °C a odebírá se z něj v předepsaných intervalech 1 g pro stanovení počtu živých mikroorganismů a to metodou stanovení počtu na pevných půdách či pomocí metody membránové filtrace [71].

5 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce bylo navrhnout vhodnou recepturu kosmetického produktu s obsahem nisinu jako bioaktivní složky, který by mohl sloužit jako podpůrný KP při léčbě atopického ekzému a stafylokokových infekcí. Účelem bylo vytvořit teplotně stabilní formulaci, do které bude možno zpracovat vodnou fázi obsahující tento bakteriocin, stabilizovaný v hydrofilní polymerní matici – polyethylenglykolu (PEG).

Hlavním úkolem této práce bylo experimentálně ověřit antimikrobiální účinnost připraveného systému a zajistit dostatečnou a vhodnou konzervaci KP, a to s možností využití synergického efektu nisinu s jinými protimikrobiálními látkami.

Dále bylo součástí práce ověřit stabilitu KP, ke které nezbytně patří stanovení koncentrace nisinu s využitím metody RP-HPLC. V rámci sledování stability bylo také měřeno peroxidové číslo a další fyzikální vlastnosti KP, jako je hodnota pH a viskozita systému.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 POUŽITÉ MATERIÁLY A ZAŘÍZENÍ

Použité chemikálie

- *Vaselinum album, adeps lanae, cera flava, paraffinum solidum, paraffinum perliquidum*, Ercarel MM, Ercawax GMS (Topvet, Brno)
- Amfifilní emulze (Topvet, Brno)
- Carbopol 940 (M&H s.r.o.)
- Kyselina chlorovodíková (Ing. Petr Lukeš)
- Kyselina mléčná (Penta s.r.o., Ing. Petr Švec)
- Hydroxid sodný (Ing. Petr Lukeš)
- Sladká syrovátka (Střední průmyslová škola mlékárenská, Kroměříž)
- Laktoza (Penta s.r.o.)
- Tween 80 (HiMedia)
- Polyetylglykol – PEG 2050 (Sigma-Aldrich s.r.o.)
- Síran amonný p.a. (Ing. Petr Lukeš)
- Nisin získaný extrakcí po fermentaci syrovátky za použití kmene *Lactococcus lactis lactis* CCDM 731 (Lactofora, Milcom a.s.)
- Fenoxyetanol (M&H s.r.o.)
- Citronová silice (Topvet, Brno)
- Pomerančová silice (Topvet, Brno)
- Grepová silice (Topvet, Brno)
- Soyabean Casein Digest Agar (Tryptone Soya Agar) (HiMedia)
- Sabouraud Chloramphenicol Agar (HiMedia)
- Lecitin natural (Mogador s.r.o.)
- Chlorid sodný p.a. (MikroCHEM s.r.o.)
- Acetonitril pro HPLC (Chem-Lab)
- Kyselina trifluoroctová pro HPLC (Sigma Aldrich)
- Kyselina octová ledová (MikroCHEM)
- Methanol (Penta s.r.o., Ing. Petr Švec)
- Nisin from *Lactococcus Lactis* (Sigma Aldrich)
- Chloroform (MikroCHEM)
- Jodid draselný p.a. (Ing. Petr Lukeš)

- Thiosíran sodný p.a. (Ing. Petr Lukeš)

Použité přístroje

- Shaking incubator S1500 (Stuart)
- Multifuge X1R (Thermo scientific)
- Lyofilizátor ScanVac CoolSafe 110-4 (LaboGene ApS)
- Climacell (BMT, MMM-Group)
- Ultrasonic cleaner (2 Theta)
- Waters 1525 Binary HPLC Pump
- Waters 717 plus Autosampler
- Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector
- Waters kolona XSelect CSH C18, 130 °A, 5 μ l, 4,6x250 mm
- Watrex předkolona ReproSil-Pur Basic-C18, 5 μ l, 100A°, 50x4 mm
- pH metr SenzoDirect 150 (Lovibond)
- pH metr Oakton Waterproof (Geotech)
- Vibro viscometer SV-10 (A&D Company)
- Haake Viscotester 6 plus (Thermo scientific)

7 PŘÍPRAVA VZORKŮ

7.1 Složení a popis použitých kosmetických základů

Masťový základ

Pro přípravu masťového základu byla zvolena následující receptura dle *Tab. 5*.

Tab. 5. Složení masťového základu

Ingredience	Množství [% hm.]
<i>Vaselineum album</i>	33,80
<i>Adeps lanae</i>	18,40
<i>Cera flava</i>	1,60
<i>Paraffinum solidum</i>	5,60
<i>Paraffinum perliquidum</i>	20,20
Ercarel MM	0,15
Ercawax GMS	0,25
<i>Aqua</i> (0,02M HCl)	add 100

Všechny složky tukové fáze byly roztaveny ve vodní lázni při teplotě 70 °C. Poté byla postupně zapracovávána vodní fáze (0,02M HCl) a tato směs byla homogenizována při vysokých otáčkách po dobu 20 minut. Takto připravený základ se nechal vychladnout na laboratorní teplotu za občasných promíchání.

Krémový základ

Krémový základ (amfifilní emulze) používaný pro přípravu vzorků a jeho postup zhotovení byl dodán firmou Topvet, Brno. Jeho složení je uvedeno v *Tab. 6*.

Tab. 6. Složení krémového základu

Ingredience	Množství [% hm.]
Fáze 1	
<i>Aqua</i>	add 100
Carbomer	0,1
Fáze 2	
<i>Paraffinum liquidum</i>	4,0
Ethylhexyl stearate	3,5
Cetearyl alcohol	3,0
Glyceryl stearate	1,5
Ceteareth-20	0,5
PEG-40 hydrogenated castor oil	0,5
Fáze 3	
Glycerin	4,0
Polyacrylamide, C13-14 isoparaffin, laureth-7	0,7
Phenethyl alcohol, ethylhexylglycerin	1,0
Triethanolamine	Q.S.

Technologický postup pro přípravu krémového základu, který uvádí firma Topvet: fáze 1 a fáze 2 byly odděleně zahřány na 75 – 80 °C přičemž fáze 1 byla po tomto zahřátí okonzervována. Obě fáze byly spojeny a homogenizovány cca 20 minut. Po ochlazení pod 40 °C byly přidány suroviny fáze 3 a pomocí triethanolaminu bylo upraveno pH na požadovanou hodnotu.

Hydrogelový základ

Pro hydrogelový základ bylo ponecháno botnat následující množství carbomeru zaznamenané v Tab. 7.

Tab. 7. Složení hydrogelového základu

Ingredience	Množství [% hm.]
<i>Aqua</i>	add 100
Carbopol 940	1,0

Potřebné množství carbomeru bylo vpraveno do vody za občasného promíchání. Takto připravená disperze byla ponechána botnat při laboratorní teplotě cca 24 hodin. Poté bylo pomocí 10% NaOH upraveno pH na 6,5 a došlo tak k navýšení viskozity systému.

7.2 Příprava nisinu v polymerní matrici

Pro produkci nisinu (*Obr. 2.*) byla použita čerstvá sladká syrovátka jako základní médium obohacená laktózou (20 g/l) a Tweenem 80 (0,5 %). Takto upravená nesterilizovaná syrovátka byla naočkována (v poměru 10:1) oživenými lyofilizáty bakteriálních kmenů *Lactococcus lactis lactis* 731 získané v MRS bujónu. U tohoto roztoku bylo upraveno pH na hodnotu 5,5 – 6. Inokulované médium bylo inkubováno při 36 °C za stálého třepání v Shaking incubatoru (180 rpm) po dobu 24 – 36 hodin v pevně uzavřených reagenčních lahvích.

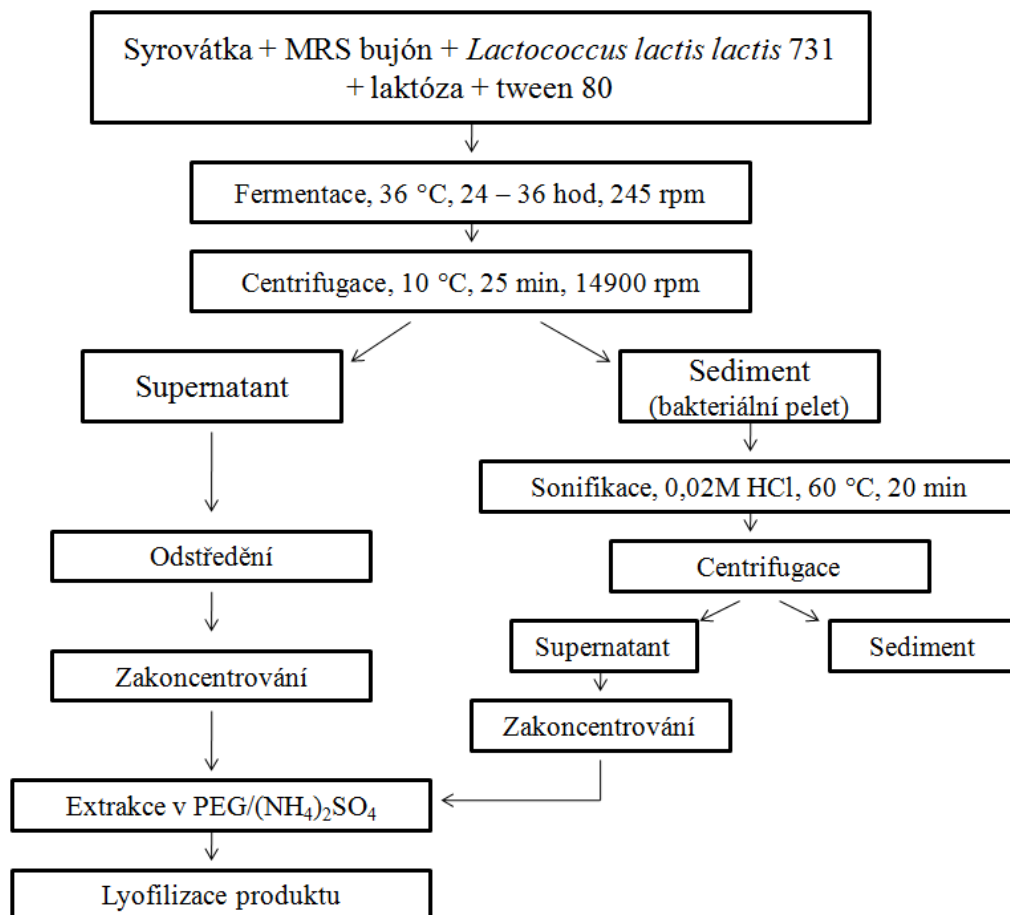
Fermentovaný produkt byl centrifugován při 14900 rpm a 10 °C po dobu 25 minut a byl získán supernatant (fáze A) a sediment (fáze B). Pro izolaci nisinu byly použity obě fáze a byla použita metoda dvoufázové extrakce PEG/(NH₄)₂SO₄. Na základě účinností extrakce, která byla ověřována i mikrobiologickými testy byl zvolen polyetylen glykol s molekulovou hmotností 2050 g/mol (PEG 2050).

Supernatant (A) byl odstředěn a následně lyofilizován. Lyofilizát byl poté rozpuštěn v polovičním množství destilované vody (vztaženo k původnímu množství fermentátu daného k lyofilizaci).

Pro izolaci nisinu byl zpracován i sediment (B) neboli bakteriální pelet, ze kterého byl nisin získán sonifikací pomocí 0,02M HCl.

Před extrakcí bylo pomocí 10% NaOH upraveno pH na hodnotu 6,0. Toto pH zajistí extrakci většiny proteinů s bakteriociny do horní hydrofobní fáze.

Pro samotnou extrakci bylo použito 15 % hm. PEG 2050 a 13 % hm. (NH₄)₂SO₄. Takto upravený vzorek byl míchán ve vodní lázni při teplotě 60 °C po dobu 5 – 10 minut. Po ochlazení a oddělení hydrofilní a hydrofobní fáze byla ponechána pouze horní fáze obsahující nisin. Tento výsledný produkt byl lyofilizován a zlyofilizovaný prášek byl použit pro výrobu kosmetických přípravků s obsahem bioaktivní látky – nisinem. Obsah nisinu v prášku byl stanoven pomocí HPLC.



Obr. 2. Schéma výroby nisinu v polymerní matrici

7.3 Příprava kosmetických přípravků

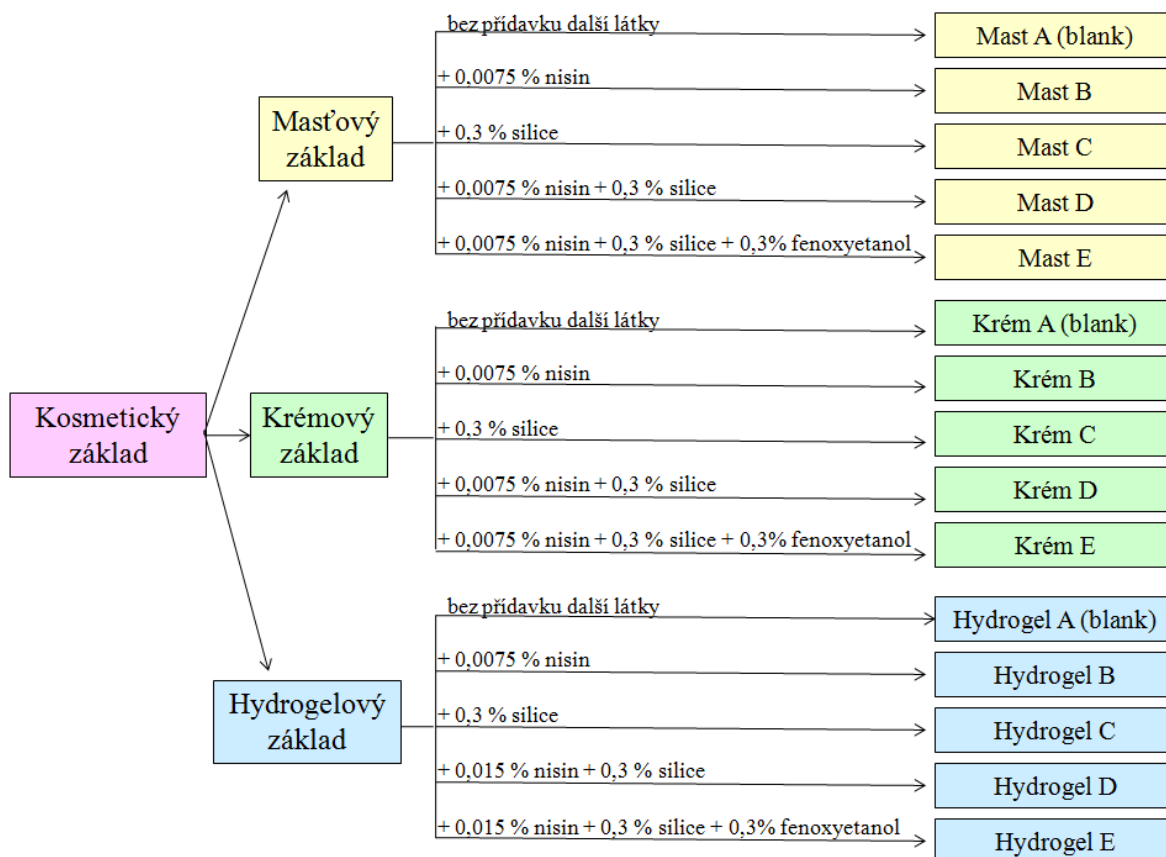
Do připravených kosmetických základů byly přidávány další látky podílející se na antimikrobní účinnosti systému (Tab. 8.). Jako látky mající protimikrobní vlastnosti byly použity nisin, silice citrusových plodů (kombinace citronové, pomerančové a grepové silice) a fenoxietanol jako konzervační činidlo.

Tab. 8. Látky s antimikrobními účinky přidávané do KP

Ingredience	Množství [% hm.]
Nisin	0,015 (0,0075)*
Silice	0,3
Fenoxietanol	0,3

*Pro přípravu mastí a krémů byla použita koncentrace nisinu 0,0075 %, pro přípravu hydrogelů byla použita (vzhledem k vyšší aktivitě vody) koncentrace nisinu dvojnásobná, tedy 0,015 %.

Na základě přidavků těchto látek (v různých kombinacích) do jednotlivých kosmetických základů byly vyrobeny kosmetické přípravky, jejichž přehled a složení je uvedeno na Obr. 3.



Obr. 3. Přehled a složení vyrobených kosmetických přípravků

Technologický postup přípravy masti

Při přípravě mast'ového základu bylo rozpuštěno odpovídající množství lyofilizovaného produktu (extraktu nisin/PEG) v 0,02M HCl. Tato vodná fáze, jak již bylo zmíněno, byla postupně zapracována do roztavené tukové části. Výsledný produkt se nechal vychladnout na teplotu 35 °C a následně byla přidána silice, popř. fenoxietanol. Výsledné pH přípravku bylo u vzorků obsahující nisin okyseleno pomocí 0,02M HCl na hodnotu 4,7 – 5,0.

Technologický postup přípravy krému

Amfifilní emulze dodaná firmou Topvet byla zahřána ve vodní lázni na 60 °C a následně do ní bylo přidáno požadované množství lyofilizovaného produktu (extraktu nisin/PEG). Směs se odstavila ze zdroje tepla a za stálého míchání se nechala vychladnout na laboratorní teplotu. U krému došlo vlivem přidavku extraktu nisin/PEG k velkému poklesu

viskozity a výsledný produkt měl konzistenci spíše mléka než krému. Do takto připraveného přípravku byla přimíchána silice popř. fenoxyetanol. Pomocí 0,02M HCl bylo opět u výrobku s nisinem upraveno pH na hodnotu 4,7 – 5,0.

Technologický postup přípravy hydrogelu

Při přípravě hydrogelového základu (pro přípravek s obsahem nisinu) bylo použito poloviční množství carbomeru než je pro tento základ žádoucí. Do takto modifikovaného hydrogelového základu byl vpraven lyofilizovaný produkt (extrakt nisin/PEG) rozpuštěný v malém množství 0,02M HCl. Díky tomu kleslo pH přípravku z 6,5 na 4,5 – 5,0 a způsobilo tak poklesnutí viskozity a zborcení pevné struktury gelu. V tuto chvíli byla přidána druhá polovina carbomeru a systém se ponechal 60 minut v klidu. Nabotnění přidaného carbomeru způsobilo opětovné navrácení pevné struktury gelu. Do takto připraveného systému byla rovněž přidána silice a fenoxyetanol.

8 TESTOVÁNÍ PŘIPRAVENÝCH VZORKŮ

Veškeré testování bylo provedeno s čerstvě připravenými KP a s přípravky po (popř. během) provedení simulace stárnutí. Všechny vzorky byly vystaveny teplotní zátěži v klimatizační komoře Climacell (BMT, Czech rep.), kde byly simulovány změny klimatických podmínek. Byla nastavena cyklizace teplot: ohřev na 40 °C (24h), poté ochlazen na 25°C (12h), 1 cyklus trval 36h. Celková doba setrvání vzorků v této komoře byla 100 cyklů.

8.1 Antimikrobiální testování kosmetických produktů

8.1.1 Difuzní agarový test

Princip testování

Tento test se využívá pro stanovení citlivosti kmene mikroorganismů (MO) ke zkoumané látce. Tato metoda je založena na měření průměru inhibičních zón a vyhodnocení tak antimikrobní aktivity účinné složky.

Použité živné média

- Mueller Hinton agar

Použité mikroorganismy

- *Staphylococcus aureus* CCM 4516

Postup testování

Na živnou půdu byla pomocí sterilního vatového tampónu nanесena bakteriální suspenze o koncentraci $10^7 - 10^8$ cfu/ml. Po zaschnutí byl do tohoto agaru vykrojen kulovitý útvar o průměru 1 cm. Do tohoto otvoru byl nanесen 1 g přípravku a to paralelně 2 krát vedle sebe. Naočkované živné půdy byly inkubovány dnem dolů 24 hodin při 35 °C.

8.1.2 Zkouška účinnosti konzervace kosmetických přípravků

Princip testování

Zkušební postup této zkoušky byl prováděn dle Českého lékopisu 2009. Podstatou zkoušky je naočkování přípravku mikroorganismy zvolených zkušebních kmenů a to nejlépe do výrobku v jeho konečném obale. Takto naočkovaný přípravek je uchováván při předepsané teplotě a po dobu 28 dnů dochází v určitých časových intervalech k odběru vzorků

a stanovení počtu mikroorganismů v 1 g tohoto přípravku. Jestliže se počet mikroorganismů při testování v těchto předepsaných časech a teplotě nezvýší nebo podstatně klesne, jsou konzervační vlastnosti přípravků dostačující. Požadavky na pokles mikroorganismů se liší podle typu přípravku a míry žádané ochrany [71].

Použitá živná média

- Soyabean Casein Digest Agar (Tryptone Soya Agar) – pro bakterie
- Sabouraud Chloramphenicol Agar – pro kvasinky a plísně

Použitá roztoky

- sterilní fyziologický roztok – vodný roztok NaCl (9 g/l) – pro bakterie a kvasinky
- sterilní fyziologický roztok s tweenem – vodný roztok NaCl (9 g/l) a tweenu 80 (0,5 g/l) – pro plísně
- sterilní neutralizátor – vodný roztok tweenu 80 (30 g/l) a lecitinu (3 g/l)

Použitá mikroorganismy

- *Staphylococcus aureus* CCM 4516
- *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961
- *Candida albicans* CCM 8215
- *Aspergillus niger* CCM 8222

Postup testování

Byla připravena mikrobiální suspenze zkušebních kmenů MO, ze které byla stanovena koncentrace inokula (metodou zalévání do agaru – pro bakterie a kvasinky a metodou očkování na povrch agarové půdy – pro plísně). Tyto koncentrace pro čerstvě připravené vzorky a pro vzorky po teplotní zátěži jsou uvedeny v *Tab. 9*.

Pro inokulaci vzorku bylo aplikováno 0,1 ml mikrobiální suspenze do 10 g vzorku a takto naočkovaný vzorek byl pečlivě promíchán, aby bylo docíleno rovnoměrného rozptýlení inokula a byl uchováván ve tmě a při laboratorní teplotě po celou dobu testování.

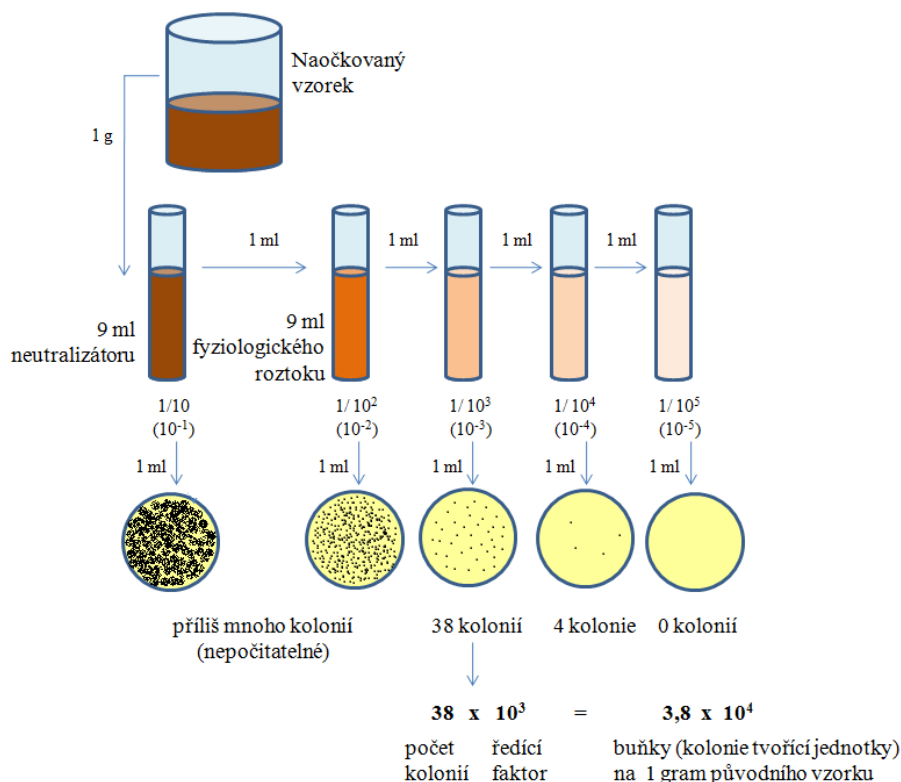
Odběr vzorku pro testování byl prováděn v den naočkování, 24 hodin po naočkování a dále po 7, 14 a 28 dnech. Z naočkováného KP byl odvážen vždy 1 g přípravku, který byl 10 krát zředěn neutralizátorem (z důvodu odstranění zbytkové protimikrobní účinnosti). Z takto vzniklého roztoku byl odpipetován 1 ml suspenze, který byl převeden na Petriho misku a zalit příslušnou živnou půdou, příp. naočkováno 0,1 ml suspenze na povrch živné půdy

v případě plísní. Z této suspenze byla provedena další řada ředění a to do 10^{-4} , ze kterých byl opět převeden 1 ml (0,1 ml) na Petriho misku (Obr. 4.). Každé stanovení bylo provedeno paralelně 2 krát vedle sebe.

Poté byly, po stanovené době inkubace, na miskách spočítány narostlé kolonie (cfu/ml). Inkubace probíhala dnem vzhůru a u kmenů *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* trvala 24 hod při 35 °C a u kmenů *Aspergillus niger* a *Candida albicans* 5 dnů při 25 °C.

Tab. 9. Koncentrace inokula zkušebních kmenů MO

Zkušební kmen MO	Koncentrace inokula pro vzorky před Climacellem [cfu/ml]	Koncentrace inokula pro vzorky po Climacellu [cfu/ml]
	Pro masti	
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516	$1,73 \cdot 10^8$	$1,04 \cdot 10^8$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961	$1,84 \cdot 10^8$	$2,24 \cdot 10^8$
<i>Candida albicans</i> CCM 8215	$1,10 \cdot 10^7$	$8,50 \cdot 10^6$
<i>Aspergillus niger</i> CCM 8222	$3,90 \cdot 10^6$	$5,70 \cdot 10^6$
	Pro krémy	
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516	$1,04 \cdot 10^8$	$2,10 \cdot 10^7$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961	$3,13 \cdot 10^8$	$3,00 \cdot 10^8$
<i>Candida albicans</i> CCM 8215	$1,10 \cdot 10^7$	$2,10 \cdot 10^7$
<i>Aspergillus niger</i> CCM 8222	$7,00 \cdot 10^6$	$6,50 \cdot 10^6$
	Pro hydrogely	
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516	$2,55 \cdot 10^7$	$4,10 \cdot 10^7$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961	$5,85 \cdot 10^7$	$1,84 \cdot 10^8$
<i>Candida albicans</i> CCM 8215	$1,85 \cdot 10^7$	$2,47 \cdot 10^7$
<i>Aspergillus niger</i> CCM 8222	$9,35 \cdot 10^6$	$3,95 \cdot 10^6$



Obr. 4. Ředění roztoku a jeho následné naočkování do živné půdy

8.2 Testování stability kosmetického přípravku

8.2.1 Stanovení koncentrace nisinu metodou RP-HPLC

Princip stanovení

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) patří mezi nejčastěji využívané chromatografické metody pro separaci analytů. Tato metoda je založena na izolaci stanovovaných látek na základě jejich distribuce mezi mobilní a stacionární fází.

Při chromatografii na reverzních fázích (RP-HPLC) je mobilní fáze polární a stacionární fáze má nepolární charakter. Mobilní fáze je většinou směs polárních organických rozpouštědel (acetonitril, alkoholy, nebo méně polární tetrahydrofuran) s vodnou složkou (voda, zředěné vodné roztoky kyselin či bází, pufrů). Stacionární fáze je obvykle tvořena dlouhými uhlíkatými řetězci, které jsou navázané na povrch nosiče (silikagel, oxidy kovů). Mezi nejčastěji využívané fáze patří chemicky navázaný uhlíkový řetězec C_{18} .

Při samotné analýze je vzorek, pomocí nástřikového ventilu, dávkován do neustále proudící mobilní fáze (její proud chromatografickým systémem je zajištěn pomocí čerpadla). V koloně (kde je pevně ukotvená stacionární fáze) pak dochází k separaci látek.

Eluát, který obsahuje separovaný vzorek, vytéká ven z kolony a následně prochází detektorem, který kontinuálně měří některou z fyzikálních vlastností eluátu. Existuje široká škála typů používaných detektorů. Metoda RP-HPLC často využívá např. spektrofotometrický detektor (UV-VIS), refraktometrický detektor (RI) nebo fluorescenční detektor [75, s. 134-140], [76, s. 374-378].

Ke stanovení koncentrace nisinu v KP metodou RP-HPLC na koloně C18 byla použita gradientová metoda se směsí dvou mobilních fází.

Mobilní fáze

(A): acetonitril + 0,05% kyselina trifluoroctová

(B): demineralizovaná voda + 0,05% kyselina trifluoroctová

Gradient

0-5 minut: 20 % (A) + 80 % (B)

5-20 minut: 80 % (A) + 20 % (B)

20-25 minut: 20 % (A) + 80 % (B)

25-40 minut: 20 % (A) + 80 % (B) – ekvilibrace

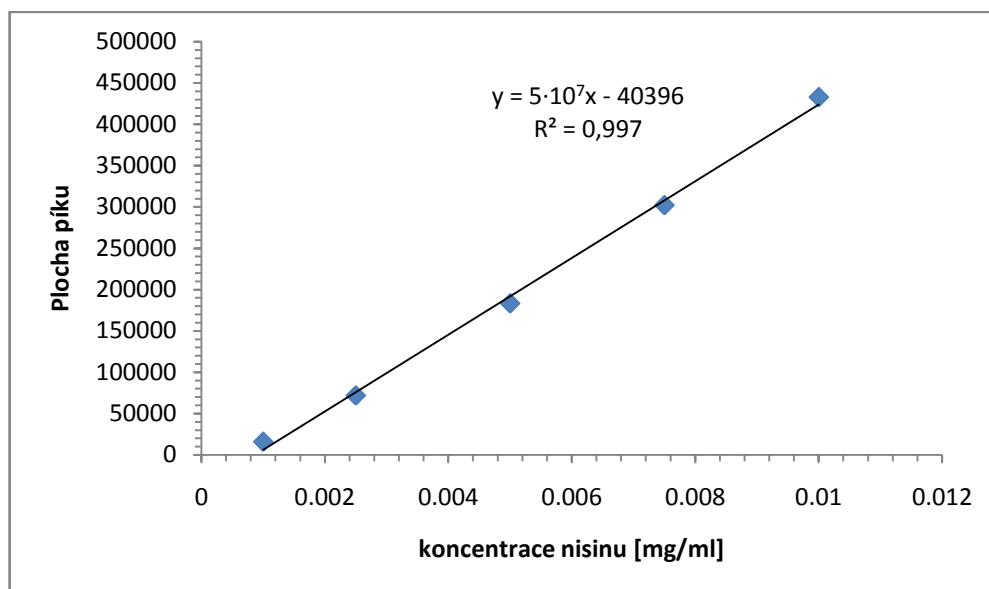
Sestrojení kalibrační přímky

Použitý vzorek pro kalibraci

- Nisin from *Lactococcus Lactis* (Sigma Aldrich), 2,5% (mléčné sušiny k chloridu sodnému), obsah nisinu $\geq 1\ 000\ 000$ IU/g.

Příprava kalibračních roztoků

Standard byl rozpuštěn v 0,02M HCl a byl přefiltrován přes stříkačkový filtr s průměrem pórů 0,22 μm . Následně byla z tohoto standardního roztoku připravena řada kalibračních roztoků o různých koncentracích. Pomocí stříkačky se do nástřikového ventilu se smyčkou o objemu 25 μl postupně dávkuje jednotlivé kalibrační standardy nisinu a to od nejnižší koncentrace po nejvyšší. Ze získaných dat byla vytvořena kalibrační závislost mezi koncentrací nisinu a plochou píků zaznamenanou UV detektorem (*Obr. 5.*). Z této závislosti byla sestrojena rovnice kalibrační přímky, která byla použita pro stanovení koncentrace nisinu ve vzorcích KP.



Obr. 5. Závislost plochy píku na koncentraci nisinu a sestavení rovnice kalibrační přímky

Postup stanovení

Před samotným stanovením byla pro tyto účely u připravených vzorků KP provedena extrakce nisinu extrakčním puforem (1M NaCl, 0,1M kyselina octová:MeOH v poměru 1:1). Cca 0,5 g vzorku bylo smícháno s 10 ml pufru a směs byla sonifikována při 50 °C po dobu 15 minut. Tato extrakce proběhla opakovaně třikrát.

Poté byla provedena chromatografická analýza, kdy nástřík vzorku na kolonu činil 25 µl a stanovení analytu bylo provedeno využitím duálního UV detektoru (výpočty byly prováděny z vlnové délky 200 nm).

8.2.2 Stanovení peroxidového čísla

Princip stanovení

Při stanovení peroxidového čísla se vycházelo z Českého lékopisu. Peroxidové číslo udává obsah primárních oxidačních produktů tuků, tedy množství aktivního kyslíku v miliekvivalentech obsažené v peroxidové formě v 1000 g látky [71].

Postup stanovení

Bylo převedeno 3 – 5 g zkoušené látky do 250 ml baňky. K této látce bylo přidáno 20 ml chloroformu a 30 ml kyseliny octové ledové a směs byla třepána do úplného rozpuštění látky. Následně byl přidán 1 ml nasyceného roztoku jodidu draselného, baňka se uzavřela a třepala přesně minutu. Poté se nechala v temnu po dobu 5 minut. Po uplynuté době bylo

přidáno do směsi 50 ml vody a po promíchání 0,5 ml škrobového mazu. Takto připravený vzorek byl titrován 0,01M thiosíranem sodným, který byl pomalu přidáván za silného třepání do odbarvení roztoku. Pro každý vzorek byl proveden i slepý pokus a peroxidové číslo bylo následně vypočítáno dle vztahu (1):

$$X_p = \frac{(V_1 - V_0) \cdot c \cdot 1000}{m} \quad (1)$$

kde:

V_1spotřeba 0,01M thiosíranu sodného při titraci vzorku [ml]

V_0spotřeba 0,01M thiosíranu sodného při slepém pokusu [ml]

ckoncentrace thiosíranu sodného [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]

mhmotnost vzorku [g]

8.2.3 Sledování fyzikální stability kosmetického přípravku

Stanovení hodnoty pH

Průměrná hodnota pH pokožky se díky slabě kyselému ochrannému filmu pohybuje v rozmezí 5,0 – 6,0. Tato hodnota je tedy v kosmetickém průmyslu považována za neutrální pH a hotové KP by se měly pohybovat v rozmezí těchto hodnot.

Vzhledem k faktu, že účinnost některých aktivních látek je závislá na pH prostředí ve kterém se nachází, může být tato hodnota modifikována. Jelikož nisin působí v kyseléjší oblasti, bylo pH kosmetického přípravku upraveno na 4,7 – 5,0 a tato hodnota byla sledována v časovém rozmezí. Pokud by došlo ke změně hodnoty pH, s největší pravděpodobností by došlo ke změně složení KP a taktéž i k přerušení účinnosti bioaktivní látky [1, s. 112-113].

Ke stanovení pH byl pro krémy a gely zvolen digitální pH metr SenzoDirect 150 a pro masti byl kvůli tužší konzistenci zvolen vpichovací pH metr Oakton Waterproof.

Stanovení viskozity

Viskozita je fyzikální veličina, která charakterizuje vliv kohezních sil v kapalině, jejichž působením kladou molekuly této kapaliny odpor při pohybu a způsobují tak vnitřní tření [1, s. 117-118].

Pro stanovení viskozity krémů a gelů byl použit vibrační viskozimetr SV-10, který měří hodnoty budícího elektrického proudu (Pa·s) potřebného pro rezonanci dvou snímacích destiček ponořených do zkoumaného vzorku. Vzhledem k pevnější konzistenci připravených mastí byl pro změření jejich viskozity zvolen rotační Haake viscotester 6 plus (R7 spindle, 20 rpm), který měří odpor dané látky pomocí kroutícího momentu vřetena.

9 VÝSLEDKY A DISKUSE

9.1 Vliv molekulové hmotnosti PEG na antimikrobní účinek nisinu

Pomocí diskové difuzní metody byly testovány masťové základy s přidavkem extraktu nisinu stabilizovaného v polyetylenglykolu různých molekulových hmotností (PEG 400, 1500, 2050, 4000 a 6000). Rovněž byly ověřeny také masťové základy s přidavky těchto samotných polyetylenglykolů jako blank. Toto testování bylo provedeno v rámci tvorby kosmetického základu, z důvodu zjištění nejvhodnější formy PEGu (z hlediska mikrobiální účinnosti) pro výrobu kosmetického přípravku. Pro toto zjištění byl testován pouze masťový základ, jelikož byla ověřována využitelnost metody pro hydrobovní matrice. Výsledky čerstvě připravených vzorků pro toto testování jsou uvedeny v *Tab. 10*.

Tab. 10. Výsledky diskových difuzních testů před teplotní zátěží v Climacellu

Vzorek	Šířka inhibiční zóny [mm]
Masťový základ + nisin/PEG 400	0
Masťový základ + nisin/PEG 1500	1
Masťový základ + nisin/PEG 2050	1 – 1,5
Masťový základ + nisin/PEG 4000	0,5
Masťový základ + nisin/PEG 6000	0,5
Masťový základ + PEG 400	0
Masťový základ + PEG 1500	0
Masťový základ + PEG 2050	0
Masťový základ + PEG 4000	0
Masťový základ + PEG 6000	0

Z *Tab. 10* je zřejmé, že samotný polyetylenglykol nejeví žádnou antimikrobní aktivitu.

Stejně testování bylo provedeno i po simulaci stárnutí vzorků (*Tab. 11*).

Tab. 11. Výsledky diskových difuzních testů po teplotní zátěži v Climacellu

Vzorek	Šířka inhibiční zóny [mm]
Masťový základ + nisin/PEG 400	< 1
Masťový základ + nisin/PEG 1500	< 1
Masťový základ + nisin/PEG 2050	1,5 – 2
Masťový základ + nisin/PEG 4000	0
Masťový základ + nisin/PEG 6000	0
Masťový základ + PEG 400	0
Masťový základ + PEG 1500	0
Masťový základ + PEG 2050	0
Masťový základ + PEG 4000	0
Masťový základ + PEG 6000	0

Z Tab. 10 a Tab. 11 vyplývá, že jako nejvhodnější varianta PEG pro antimikrobiální účinnost nisinu se jeví polyetylenglykol s molekulovou hmotností 2050 g/mol (PEG 2050). Na základě tohoto zjištění, byl tento PEG zvolen pro stabilizaci nisinu, který byl přidáván jako účinná látka do konečného kosmetického produktu.

9.2 Zkouška účinnosti konzervace kosmetického přípravku

Tab. 12. Zkouška účinnosti konzervace masti dle ČL před teplotní zátěží v Climacellu

Vzorek	Počet cfu/ml					Počet cfu/ml				
	Č. N.	Po 24 hod.	Po 7 dn.	Po 14 dn.	Po 28 dn.	Č. N.	Po 24 hod.	Po 7 dn.	Po 14 dn.	Po 28 dn.
	<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516					<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961				
Mast A	$2,80 \cdot 10^3$	$2,60 \cdot 10^1$	0	0	0	$7,55 \cdot 10^1$	0	0	0	0
Mast B	$1,65 \cdot 10^3$	$3,95 \cdot 10^2$	0	0	0	$8,75 \cdot 10^1$	0	0	0	0
Mast C	$1,24 \cdot 10^4$	$5,05 \cdot 10^1$	0	0	0	$2,65 \cdot 10^1$	0	0	0	0
Mast D	$1,78 \cdot 10^3$	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mast E	$5,15 \cdot 10^1$	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Candida albicans</i> CCM 8215					<i>Aspergillus niger</i> CCM 8222				
Mast A	$9,30 \cdot 10^2$	$1,57 \cdot 10^3$	$1,16 \cdot 10^3$	$1,23 \cdot 10^3$	$1,03 \cdot 10^2$	$7,90 \cdot 10^2$	$9,50 \cdot 10^1$	$1,70 \cdot 10^2$	$1,40 \cdot 10^2$	$9,00 \cdot 10^1$
Mast B	$2,03 \cdot 10^3$	$1,08 \cdot 10^3$	$9,90 \cdot 10^2$	$1,05 \cdot 10^3$	$4,23 \cdot 10^3$	$9,95 \cdot 10^2$	$1,60 \cdot 10^2$	$2,80 \cdot 10^2$	$1,13 \cdot 10^3$	$8,70 \cdot 10^2$
Mast C	$1,59 \cdot 10^3$	$4,45 \cdot 10^2$	$8,30 \cdot 10^2$	$8,95 \cdot 10^2$	$3,80 \cdot 10^1$	$3,75 \cdot 10^2$	$2,35 \cdot 10^2$	$2,10 \cdot 10^2$	$2,20 \cdot 10^2$	$1,30 \cdot 10^2$
Mast D	$2,44 \cdot 10^3$	$7,35 \cdot 10^2$	$7,25 \cdot 10^2$	$6,50 \cdot 10^2$	$3,14 \cdot 10^2$	$4,30 \cdot 10^2$	$8,50 \cdot 10^1$	$1,40 \cdot 10^2$	$1,25 \cdot 10^2$	$1,05 \cdot 10^2$
Mast E	$2,09 \cdot 10^3$	< 5	0	0	0	$5,20 \cdot 10^2$	$1,10 \cdot 10^2$	0	0	0

Tab. 13. Zkouška účinnosti konzervace masti dle ČL po teplotní zátěži v Climacellu

Vzorek	Počet cfu/ml					Počet cfu/ml				
	Č. N.	Po 24 hod.	Po 7 dn.	Po 14 dn.	Po 28 dn.	Č. N.	Po 24 hod.	Po 7 dn.	Po 14 dn.	Po 28 dn.
	<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516					<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961				
Mast A	$6,25 \cdot 10^4$	$1,46 \cdot 10^4$	< 5	0	0	$6,80 \cdot 10^2$	$1,85 \cdot 10^1$	0	0	0
Mast B	$2,70 \cdot 10^4$	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mast C	$1,15 \cdot 10^5$	$3,40 \cdot 10^3$	0	0	0	$1,89 \cdot 10^2$	0	0	0	0
Mast D	$4,35 \cdot 10^3$	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mast E	$4,00 \cdot 10^4$	$3,45 \cdot 10^2$	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Candida albicans</i> CCM 8215					<i>Aspergillus niger</i> CCM 8222				
Mast A	$1,76 \cdot 10^3$	$2,09 \cdot 10^3$	$1,62 \cdot 10^3$	$2,45 \cdot 10^3$	$5,60 \cdot 10^1$	$1,45 \cdot 10^3$	$8,30 \cdot 10^2$	$8,40 \cdot 10^2$	$5,70 \cdot 10^2$	$1,51 \cdot 10^3$
Mast B	$2,78 \cdot 10^3$	0	0	0	0	$1,58 \cdot 10^3$	<10	0	<10	$1,40 \cdot 10^2$
Mast C	$2,64 \cdot 10^3$	$2,75 \cdot 10^3$	$1,19 \cdot 10^3$	$1,13 \cdot 10^2$	$5,80 \cdot 10^1$	$7,75 \cdot 10^2$	$4,25 \cdot 10^2$	$5,25 \cdot 10^2$	$3,10 \cdot 10^2$	$6,75 \cdot 10^2$
Mast D	$6,80 \cdot 10^2$	0	0	0	0	$4,90 \cdot 10^2$	0	0	0	0
Mast E	$1,77 \cdot 10^3$	< 5	0	0	0	$1,15 \cdot 10^3$	$5,70 \cdot 10^2$	$4,50 \cdot 10^1$	<10	< 5

Z Tab. 12. a Tab. 13. lze vidět, že všechny připravené vzorky vykazovaly značnou redukci mikroorganismů u kmene *Staphylococcus aureus* CCM 4516 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961. V obou těchto případech neměla na redukci MO vliv teplotní zátěž v Climacellu, neboť působení nisinu proti těmto bakteriím je obdobné. V případě *S. aureus* se nevyskytovaly žádné bakteriální kolonie již po 7 dnech inokulace vzorku ve všech připravených mastí, přičemž po teplotní zátěži se u mastí s přídavkem nisinu nevyskytovaly tyto kolonie již po 24 hodinách (kromě masti E, kde byl k nisinu přidán také fenoxietanol). Můžeme tedy říci, že samotný nisin působí proti *S. aureus* lépe než v kombinaci s fenoxietanolem. U kmene *P. aeruginosa* nerostly bakteriální kolonie již po 24 hodinách, v některých případech ani v den naočkování vzorku.

Značný rozdíl v působení nisinu podrobenému teplotní zátěži byl vidět u kmene *Candida albicans* CCM 8215 a *Aspergillus niger* CCM 8222. Před simulací stárnutí mastí rostly tyto kmeny ve všech připravených mastí (kromě masti E s přídavkem fenoxietanolu) i po 28 dnech po inokulaci vzorku. Avšak po vystavení vzorků vysokým teplotám se redukce MO pomocí nisinu výrazně zlepšila. V mastech s obsahem tohoto bakteriocinu téměř nerostly kolonie těchto kmenů již po 24 hodinách. V případě *A. niger* toto tvrzení opět neplatí pro mast E. Můžeme tedy rovněž dospět k závěru, že proti plísním má samotný nisin lepší účinnost než v kombinaci s fenoxietanolem. Naopak za synergický efekt může být označeno působení nisinu spolu se silicí, která v případě plísní účinkovala nejlépe.

Vynikající účinky nisinu s ohledem na teplotní zatížení byly zjištěny u krémů (Tab. 14. a Tab. 15.) a hydrogelů (Tab. 16. a Tab. 17.). V obou těchto případech lze vidět, že vystavení vzorků teplotní námaze v Climacellu nemělo žádný vliv na antimikrobní působení aktivních látek a KP jsou tedy mikrobiologicky stabilní.

Výborné působení samotného nisinu v krémech lze pozorovat u *S. aureus* a *P. aeruginosa*, kde nebyl zaznamenán výskyt bakteriálních kolonií ani v den naočkování vzorku. Skvělé výsledky rovněž vykazuje působení proti kvasinkám, kdy se kolonie netvořily již po 24 hodinách a u plísní, kdy nárůst nebyl zpozorován po 7 dnech. Vzhledem k výborné stabilitě a působení i krému A (blank) jsou s největší pravděpodobností tyto výsledky přisuzovány přídavku látky firmou Topvet, která může působit konzervačně. V tomto případě se nedokázal prokázat synergický efekt nisinu spolu s další aktivní látkou, jelikož výsledky samotného nisinu a nisinu v kombinaci se silicí nebo fenoxietanolem byly téměř totožné.

Tab. 14. Zkouška účinnosti konzervace krému dle ČL před teplotní zátěží v Climacellu

Vzorek	Počet cfu/ml			Počet cfu/ml		
	Č. N.	Po 24 hod.	Po 7 dn.	Č. N.	Po 24 hod.	Po 7 dn.
	<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961		
Krém A	$4,05 \cdot 10^3$	0	0	0	0	0
Krém B	0	0	0	0	0	0
Krém C	$7,50 \cdot 10^2$	0	0	0	0	0
Krém D	0	0	0	0	0	0
Krém E	0	0	0	0	0	0
	<i>Candida albicans</i> CCM 8215			<i>Aspergillus niger</i> CCM 8222		
Krém A	$4,60 \cdot 10^3$	< 5	0	$6,75 \cdot 10^3$	$2,20 \cdot 10^3$	0
Krém B	$3,50 \cdot 10^3$	0	0	$5,65 \cdot 10^3$	$1,70 \cdot 10^3$	0
Krém C	$3,00 \cdot 10^3$	0	0	$5,45 \cdot 10^3$	$1,70 \cdot 10^3$	0
Krém D	$4,75 \cdot 10^3$	0	0	$4,85 \cdot 10^3$	$1,35 \cdot 10^3$	0
Krém E	$1,65 \cdot 10^3$	0	0	$4,35 \cdot 10^3$	$4,50 \cdot 10^1$	0

Tab. 15. Zkouška účinnosti konzervace krému dle ČL po teplotní zátěží v Climacellu

Vzorek	Počet cfu/ml			Počet cfu/ml		
	Č. N.	Po 24 hod.	Po 7 dn.	Č. N.	Po 24 hod.	Po 7 dn.
	<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961		
Krém A	$3,30 \cdot 10^2$	0	0	0	0	0
Krém B	0	0	0	0	0	0
Krém C	$1,73 \cdot 10^3$	0	0	0	0	0
Krém D	0	0	0	0	0	0
Krém E	0	0	0	0	0	0
	<i>Candida albicans</i> CCM 8215			<i>Aspergillus niger</i> CCM 8222		
Krém A	$1,14 \cdot 10^4$	0	0	$7,85 \cdot 10^3$	$5,20 \cdot 10^3$	0
Krém B	$9,60 \cdot 10^3$	0	0	$6,95 \cdot 10^3$	$4,35 \cdot 10^3$	0
Krém C	$9,65 \cdot 10^3$	0	0	$7,40 \cdot 10^3$	$5,30 \cdot 10^3$	0
Krém D	$6,85 \cdot 10^3$	0	0	$6,85 \cdot 10^3$	$3,00 \cdot 10^3$	0
Krém E	$2,29 \cdot 10^3$	0	0	$6,00 \cdot 10^3$	$1,70 \cdot 10^3$	0

Tab. 16. Zkouška účinnost konzervace hydrogelu dle ČL před teplotní zátěží v Climacellu

Vzorek	Počet cfu/ml			Počet cfu/ml		
	Č. N.	Po 24 hod.	Po 7 dn.	Č. N.	Po 24 hod.	Po 7 dn.
	<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961		
Hydrogel A	$6,90 \cdot 10^4$	$1,19 \cdot 10^4$	$1,77 \cdot 10^3$	$4,56 \cdot 10^3$	$3,71 \cdot 10^4$	$7,11 \cdot 10^5$
Hydrogel B	0	0	0	0	0	0
Hydrogel C	$4,00 \cdot 10^4$	0	0	0	0	0
Hydrogel D	0	0	0	0	0	0
Hydrogel E	0	0	0	0	0	0
	<i>Candida albicans</i> CCM 8215			<i>Aspergillus niger</i> CCM 8222		
Hydrogel A	$9,35 \cdot 10^3$	$1,29 \cdot 10^4$	$1,34 \cdot 10^4$	$5,35 \cdot 10^3$	$4,20 \cdot 10^3$	$8,20 \cdot 10^3$
Hydrogel B	0	0	0	$8,45 \cdot 10^2$	0	0
Hydrogel C	$8,35 \cdot 10^1$	0	0	$4,95 \cdot 10^3$	$3,40 \cdot 10^3$	$2,15 \cdot 10^3$
Hydrogel D	0	0	0	$9,70 \cdot 10^2$	0	0
Hydrogel E	0	0	0	$2,25 \cdot 10^3$	0	0

Tab. 17. Zkouška účinnost konzervace hydrogelu dle ČL po teplotní zátěží v Climacellu

Vzorek	Počet cfu/ml			Počet cfu/ml		
	Č. N.	Po 24 hod.	Po 7 dn.	Č. N.	Po 24 hod.	Po 7 dn.
	<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961		
Hydrogel A	$5,45 \cdot 10^5$	$8,55 \cdot 10^2$	< 5	$2,10 \cdot 10^4$	$2,86 \cdot 10^5$	$3,34 \cdot 10^5$
Hydrogel B	$3,40 \cdot 10^4$	0	0	< 5	0	0
Hydrogel C	$4,50 \cdot 10^5$	0	0	$1,70 \cdot 10^1$	0	0
Hydrogel D	< 5	0	0	0	0	0
Hydrogel E	$1,55 \cdot 10^5$	0	0	0	0	0
	<i>Candida albicans</i> CCM 8215			<i>Aspergillus niger</i> CCM 8222		
Hydrogel A	$6,20 \cdot 10^4$	$2,37 \cdot 10^5$	$1,62 \cdot 10^5$	$4,70 \cdot 10^3$	$3,90 \cdot 10^3$	$4,35 \cdot 10^3$
Hydrogel B	$8,95 \cdot 10^3$	0	0	$3,80 \cdot 10^3$	0	0
Hydrogel C	$1,85 \cdot 10^4$	$4,30 \cdot 10^3$	$1,62 \cdot 10^3$	$3,80 \cdot 10^3$	$3,05 \cdot 10^3$	$4,20 \cdot 10^3$
Hydrogel D	$8,10 \cdot 10^2$	0	0	$2,90 \cdot 10^3$	0	0
Hydrogel E	$2,48 \cdot 10^4$	0	0	$4,10 \cdot 10^3$	0	0

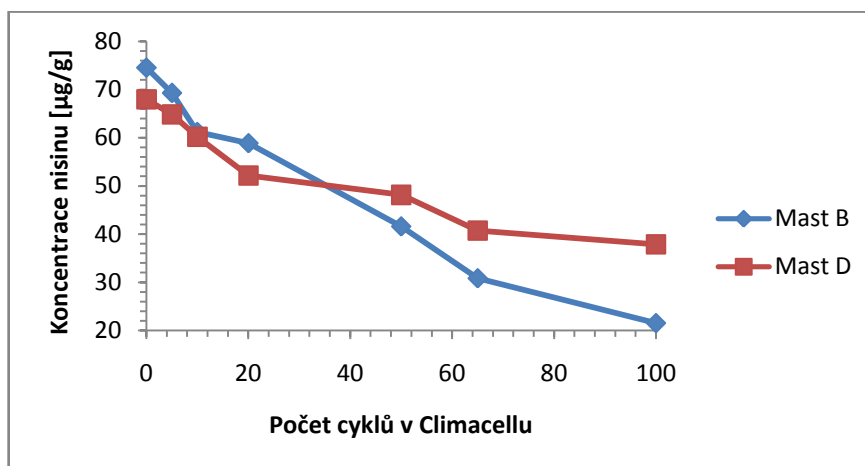
Stejně jako u krémů tak i u hydrogelů byly zaznamenány vynikající výsledky samotného nisinu, kdy po 24 hodinách nebyl zaznamenán výskyt žádných kolonií MO. Působení samotného nisinu a nisinu spolu se silicí bylo téměř shodné, opět se nedokázal prokázat synergický vliv silice. Naopak v případně spojení nisinu s fenoxyetanolem bylo zjištěno, že tato kombinace má menší redukci MO než sám nisin. Pro stabilizaci systému tedy postačí požití samotného nisinu.

9.3 Sledování stability nisinu v závislosti na teplotní zátěži

Pro sledování stability koncentrace nisinu v KP byla použita metoda RP-HPLC, kterou bylo stanovení prováděno v určitých časových intervalech při vystavení vzorku klimatizačním podmínkám v Climacellu. Pro tyto účely byly sledovány KP se samotným nisinem a KP s kombinací nisinu a silice.

Tab. 18. Koncentrace nisinu v masti v průběhu teplotního zatížení

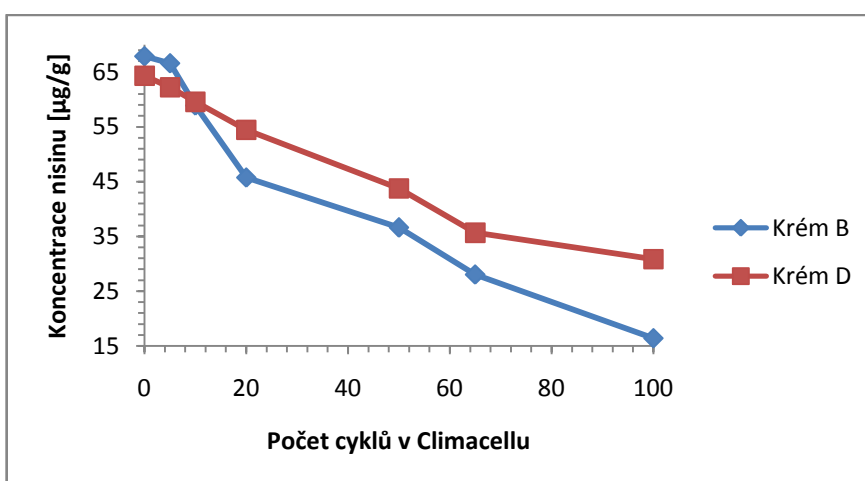
Počet cyklů v Climacellu	Koncentrace nisinu v masti B [$\mu\text{g/g}$]	Koncentrace nisinu v masti D [$\mu\text{g/g}$]
0	74,52	67,95
5	69,25	64,85
10	61,20	60,20
20	58,85	52,15
50	41,60	48,15
65	30,85	40,75
100	21,55	37,90



Obr. 6. Pokles koncentrace nisinu v masti v závislosti na počtu cyklů v klimatizační komoře

Tab. 19. Koncentrace nisinu v krému v průběhu teplotního zatížení

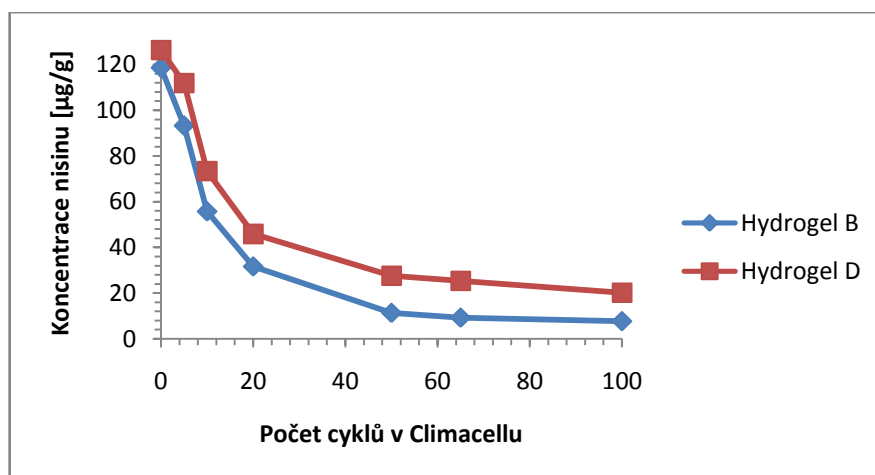
Počet cyklů v Climacellu	Koncentrace nisinu v krému B [µg/g]	Koncentrace nisinu v krému D [µg/g]
0	67,88	64,32
5	66,60	62,20
10	58,90	59,55
20	45,75	54,45
50	36,60	43,75
65	28,05	35,65
100	16,40	30,85



Obr. 7. Pokles koncentrace nisinu v krému v závislosti na počtu cyklů v klimatizační komoře

Tab. 20. Koncentrace nisinu v hydrogelu v průběhu teplotního zatížení

Počet cyklů v Climacellu	Koncentrace nisinu v hydrogelu B [$\mu\text{g/g}$]	Koncentrace nisinu v hydrogelu D [$\mu\text{g/g}$]
0	118,56	126,30
5	93,20	111,90
10	55,80	73,42
20	31,70	45,90
50	11,40	27,67
65	9,32	25,40
100	7,76	20,25



Obr. 8. Pokles koncentrace nisinu v hydrogelu v závislosti na počtu cyklů v klimatizační komoře

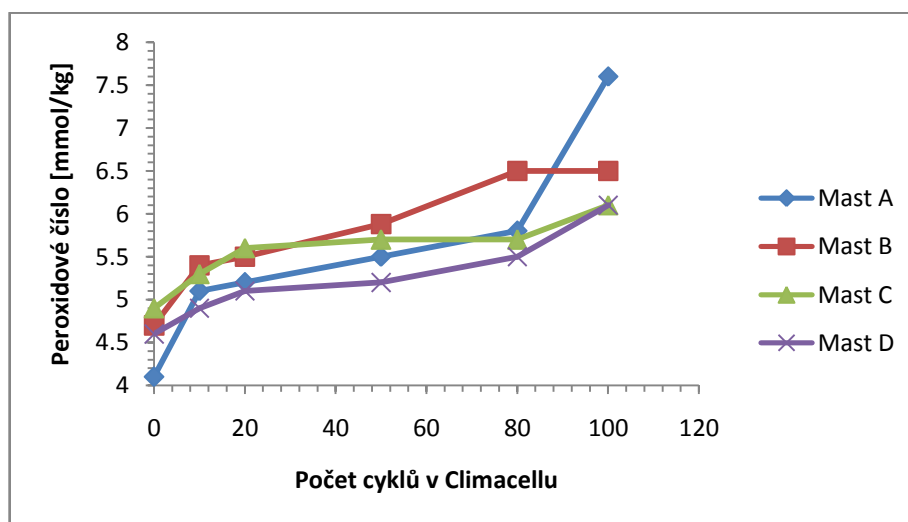
Z Tab. 18., 19., 20. a Obr. 6., 7., 8. je patrné, že koncentrace nisinu ve všech případech značně klesá v závislosti na době vystavení teplotní námaze. Je vidět, že KP obsahující směs nisinu a silice mají o něco lepší stabilitu, jelikož úbytek koncentrace je vždy menší, než u KP obsahující samotný nisin. Vzhledem k tomu, že směrodatná odchylka byla v těchto případech menší než 5 %, není ve výsledcích zohledňována.

9.4 Stanovení peroxidového čísla v časových intervalech při teplotní zátěži

V závislosti na možné oxidaci tukové fáze (žluknutí) KP bylo u mastí a krémů stanovováno peroxidové číslo a to opět v časových intervalech při teplotní zátěži. Peroxidové číslo bylo sledováno u KP se samotným nisinem, se samotnou silicí a u kombinace nisinu a silice. Peroxidové číslo pro masti je uvedeno v *Tab. 21* a na *Obr. 9*.

Tab. 21. Stanovení peroxidového čísla u mastí v průběhu teplotní zátěže

Počet cyklů v Climacellu	Peroxidové číslo masti A [mmol/kg]	Peroxidové číslo masti B [mmol/kg]	Peroxidové číslo masti C [mmol/kg]	Peroxidové číslo masti D [mmol/kg]
0	4,1 ± 0,3	4,7 ± 0,3	4,9 ± 0,4	4,6 ± 0,3
10	5,1 ± 0,4	5,4 ± 0,3	5,3 ± 0,4	4,9 ± 0,3
20	5,2 ± 0,4	5,5 ± 0,3	5,6 ± 0,4	5,1 ± 0,3
50	5,5 ± 0,4	5,88 ± 0,16	5,7 ± 0,4	5,2 ± 0,3
80	5,8 ± 0,4	6,5 ± 0,3	5,7 ± 0,4	5,5 ± 0,4
100	7,6 ± 0,3	6,5 ± 0,3	6,1 ± 0,3	6,1 ± 0,4



Obr. 9. Růst peroxidového čísla u mastí v závislosti na počtu cyklů v klimatizační komoře

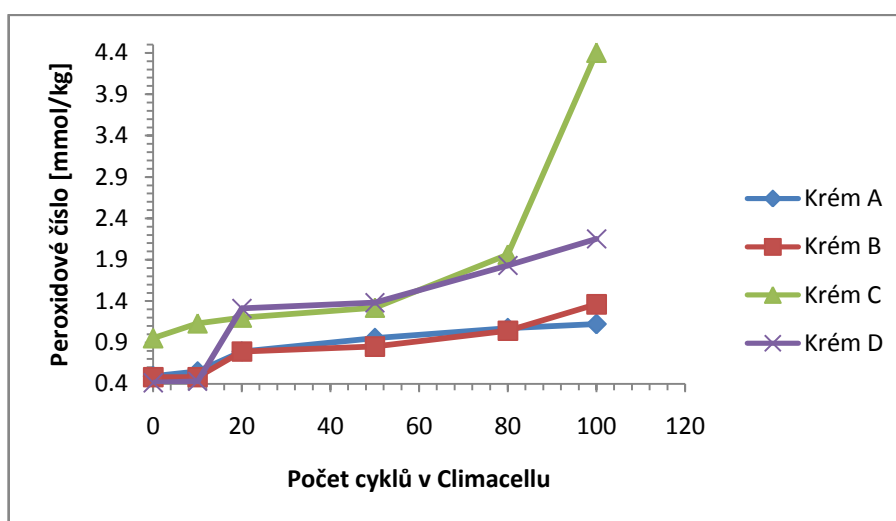
Z *Tab. 21* a *Obr. 9* je patrné, že peroxidové číslo se v závislosti na čase mírně zvyšuje. Je vidět, že přípravky s obsahem nisinu mohou mít vliv na mírnější vzestup peroxidového

čísla, jelikož u masti A, která neobsahuje nisin a představuje blank, je strmější nárůst těchto hodnot.

Výsledky naměřených peroxidových čísel pro krémy jsou zaznamenány v *Tab. 22* a na *Obr. 10*.

Tab. 22. Stanovení peroxidového čísla u krémů v průběhu teplotní zátěže

Počet cyklů v Climacellu	Peroxidové číslo krému A [mmol/kg]	Peroxidové číslo krému B [mmol/kg]	Peroxidové číslo krému C [mmol/kg]	Peroxidové číslo krému D [mmol/kg]
0	0,49 ± 0,04	0,48 ± 0,03	0,95 ± 0,08	0,413 ± 0,017
10	0,55 ± 0,04	0,48 ± 0,03	1,13 ± 0,09	0,429 ± 0,018
20	0,79 ± 0,05	0,79 ± 0,05	1,2 ± 0,1	1,31 ± 0,06
50	0,95 ± 0,06	0,85 ± 0,05	1,32 ± 0,11	1,38 ± 0,06
80	1,07 ± 0,07	1,04 ± 0,06	1,96 ± 0,16	1,83 ± 0,08
100	1,12 ± 0,08	1,36 ± 0,08	4,4 ± 0,4	2,15 ± 0,09



Obr. 10. Růst peroxidového čísla u krémů v závislosti na počtu cyklů v klimatizační komoře

Stejně jako u mastí, tak i u krémů se peroxidové číslo zvyšuje s počty cyklů vystavení v Climacellu. Je zřejmé, že rovněž krémy s obsahem nisinu mohou mít za zásluhu mírnější vzestup peroxidového čísla. Tento fakt může být vysvětlen díky krému C, který ve svém složení obsahuje pouze silici a jeho zvýšení je daleko výraznější než u ostatních vzorků.

Vzhledem k nízkým hodnotám peroxidového čísla u krémů lze říci, že testované krémy vykazují velice nízký stupeň oxidace, který by mohl způsobit degradaci složek obsažených v tukové části.

Je předpokládáno, že vzhledem k vyššímu obsahu tukové fáze u mastí, budou hodnoty peroxidového čísla vyšší než u krémů. Riziko vzniku primárních oxidačních produktů je zde tedy vyšší a na tento fakt by měl být brán ohled při zacházení a skladování KP.

9.5 Stanovení stability vzhledem k fyzikálním vlastnostem

Z hlediska zkoumání fyzikální stability KP bylo sledováno pH jednotlivých přípravků před a po teplotní zátěži v klimatizační komoře. Tyto hodnoty jsou zaznamenány v *Tab. 23*, *Tab. 24* a *Tab. 25*

Tab. 23. Hodnoty pH mastí před a po teplotní zátěži v Climacellu

Počet cyklů v Climacellu	pH masti A	pH masti B	pH masti C	pH masti D
0	5,48 ± 0,03	4,787 ± 0,019	5,520 ± 0,012	4,683 ± 0,013
100	5,49 ± 0,03	4,74 ± 0,05	5,507 ± 0,009	4,667 ± 0,018

Tab. 24. Hodnoty pH krémů před a po teplotní zátěži v Climacellu

Počet cyklů v Climacellu	pH krému A	pH krému B	pH krému C	pH krému D
0	5,530 ± 0,006	4,957 ± 0,004	5,533 ± 0,007	4,973 ± 0,004
100	5,537 ± 0,004	4,947 ± 0,004	5,530 ± 0,006	4,983 ± 0,007

Tab. 25. Hodnoty pH hydrogelů před a po teplotní zátěži v Climacellu

Počet cyklů v Climacellu	pH hydrogelu A	pH hydrogelu B	pH hydrogelu C	pH hydrogelu D
0	6,673 ± 0,004	4,793 ± 0,004	6,637 ± 0,007	4,763 ± 0,007
100	6,667 ± 0,004	4,817 ± 0,004	6,627 ± 0,007	4,737 ± 0,009

Bylo zjištěno, že teplotní zátěž nemá vliv na výsledné hodnoty pH těchto přípravků. Oblast pH se v závislosti na čase měnila jen nepatrně a téměř se zanedbatelným rozdílem.

Dalším sledovaným faktorem pro zjištění fyzikální stability byla viskozita KP. Naměřené hodnoty viskozity před a po vystavení Climacellu jsou uvedeny v *Tab. 26*, *Tab. 27* a *Tab. 28*.

Tab. 26. Hodnoty viskozit mastí před a po teplotní zátěži v Climacellu

Počet cyklů v Climacellu	Viskozita masti A [Pa·s]	Viskozita masti B [Pa·s]	Viskozita masti C [Pa·s]	Viskozita masti D [Pa·s]
0	97200 ± 300	77300 ± 300	97100 ± 500	64100 ± 400
100	89000 ± 800	81700 ± 400	90300 ± 600	66800 ± 300

Tab. 27. Hodnoty viskozit krémů před a po teplotní zátěži v Climacellu

Počet cyklů v Climacellu	Viskozita krému A [Pa·s]	Viskozita krému B [mPa·s]	Viskozita krému C [Pa·s]	Viskozita krému D [mPa·s]
0	2,95 ± 0,06	61,8 ± 0,3	2,98 ± 0,05	52,5 ± 0,3
100	2,807 ± 0,019	59,9 ± 0,5	2,86 ± 0,03	59,1 ± 0,4

Tab. 28. Hodnoty viskozit hydrogelů před a po teplotní zátěži v Climacellu

Počet cyklů v Climacellu	Viskozita Hydrogelu A [Pa·s]	Viskozita Hydrogelu B [Pa·s]	Viskozita Hydrogelu C [Pa·s]	Viskozita Hydrogelu D [Pa·s]
0	2,007 ± 0,013	1,253 ± 0,013	1,94 ± 0,03	1,15 ± 0,03
100	1,943 ± 0,019	1,420 ± 0,018	1,83 ± 0,03	1,08 ± 0,03

Stejně jako u hodnoty pH přípravku i při sledování viskozity bylo zjištěno, že vystavení KP vysokým teplotám a časovému intervalu nemá vliv na změnu konzistence přípravku. I zde byly rozdíly viskozit před a po Climacellu prakticky nepodstatné.

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce byla příprava receptury kosmetického produktu s obsahem nisinu získaného z odpadní syrovátky, který ve stabilizované formě jako součást hydrofilní polymerní matrice přispívá k jeho vhodné a dostatečné konzervaci a napomáhá k úspěšné léčbě stafylokokových infekcí.

Teoretická část popisuje legislativní požadavky týkající se kosmetických přípravků a kritéria pro mikrobiologické testování. Další důležitou součástí je zpracování poznatků o využitelnosti biologicky aktivních peptidů, získaných z mléčných bílkovin a jejich aplikace nejen v kosmetickém průmyslu. Všechny tyto získané poznatky byly nápomocny pro následné zhotovení vzorků kosmetických produktů a k provedení jejich stabilitní studie.

Byly navrženy tři typy kosmetických přípravků (mast, krém a hydrogel), do kterých byl zapracován extrakt nisinu stabilizovaný v polyetylglykolu. Pro tyto účely byl testován polyetylglykol různých molekulových hmotností. Na základě mikrobiologického testování pomocí diskové difuzní metody proti kmenu *Staphylococcus aureus*, byl zvolen PEG 2050, který byl následně použit pro další testování a sledování stability kosmetického přípravku.

Pro ověření teplotní stability byly všechny přípravky vystaveny zátěžovému testu v klimatizační komoře Climacell a veškeré testování proběhlo před i po této teplotní námaze.

Zkouška účinnosti konzervace KP byla provedena dle Českého lékopisu proti kmenům *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* a *Aspergillus niger*. Aplikačně zajímavý se jevil synergický účinek při použití silice a nisinu, kdy pro dosažení mikrobiologické stability KP nebylo potřeba přídavku konzervantu. Zajímavým zjištěním je fakt, že ve většině případů došlo k úplné redukci mikroorganismů při použití samotného nisinového extraktu z fermentátu. Můžeme tedy říci, že přídavek nisinu ať už samotného, či v kombinaci se silicí, zajistí dostatečnou ochranu a konzervaci KP. Pro srovnání byly ověřovány také KP konzervované fenoxetanolem, kde všechny tyto vzorky vykazovaly dobrou mikrobiologickou stabilitu proti všem testovaným mikroorganismům.

V rámci ověření stability kosmetického produktu bylo provedeno stanovení koncentrace nisinu v KP metodou RP-HPLC. Bylo zjištěno, že s rostoucím časem a teplotní zátěží

koncentrace nisinu ve všech vzorcích značně klesá. Vzhledem k předchozímu zjištění, je však tato koncentrace i nadále vhodná pro zajištění dostatečné mikrobiologické stability. I zde může být poukázáno na synergický vliv silice. Rozdíl v úbytku koncentrace nisinu je sice nepatrný, ale i přes to byl v použití kombinace nisin-silice o něco menší než při použití samotného nisinu.

Pro KP obsahující tukovou fázi (masti, krémy) hrozí riziko oxidace této fáze, tedy žluknutí tuků. Toto riziko bylo zjišťováno pomocí stanovení peroxidového čísla. U krémů byly zaznamenány nízké hodnoty tohoto čísla, které svědčí o nízkém nebezpečí vzniku primárních oxidačních produktů a následné degradaci složek obsažených v tukové části. U mastí byly stanoveny hodnoty peroxidového čísla vyšší, a to vzhledem k vyššímu obsahu tuku než u krémů. Oxidace je tedy pravděpodobnější a v závislosti na tomto zjištění by měl být brán ohled při jejich zacházení a skladování.

Při hodnocení fyzikálních vlastností (pH přípravku a viskozita) se ukázalo, že jsou všechny výsledné hodnoty téměř totožné před a po časové a teplotní námaze. Můžeme tedy říci, že zátěžový test nemá vliv na změnu či rozpad konzistence a ani neovlivňuje hodnotu pH. Zajímavým poznatkem je vysoký pokles viskozity krému při přidavku extraktu nisinu/PEG. Tento fakt musí být zohledněn ve finální fázi výroby KP, kdy při balení produktu musí být zvolena vhodná nádoba s dávkovací pumpičkou či jiný přijatelný obal výrobku.

Ze všech získaných výsledků je patrné, že se podařilo navrhnout stabilní a účinnou recepturu kosmetického přípravku. Nejvhodnějším řešením je využití synergického efektu nisinu spolu s kombinací silic citrusových plodů. Jejich výhodou je, že se jedná o přírodní konzervační systém a zároveň mohou posloužit jako parfemace výrobku. Pokud není použití silice žádoucí, může být uvažováno o aplikaci samotného nisinového extraktu, který se v této studii jevil jako dostačující.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] FEŘTEKOVÁ, Vlasta. *Kosmetika v teorii a v praxi*. 4., aktualizované vydání. Praha: Maxdorf, 2005, 341 s. ISBN 80-7345-046-1.
- [2] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích. [online]. [cit. 2015-11-23]. Dostupný z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:02009R1223-20150818>.
- [3] SALVADOR, Amparo a Alberto CHISVERT SANÍA. *Analysis of cosmetic product*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 2007, 487 s. ISBN 978-0-444-52260-3.
- [4] BAREL, André O, Marc PAYE a Howard MAIBACH. *Handbook of cosmetic science and technology*. Fourth edition. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Grup, 2014, 711 s. ISBN 978-1-84214-564-7.
- [5] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, o zřízení Evropské agentury pro chemické látky. [online]. [cit. 2015-12-05]. Dostupný z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1907&from=en>.
- [6] Zákon č. 258/2000 Sb. o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů. [online]. [cit. 2015-12-05]. Dostupný z: <http://www.zakonyprolidi.cz/cs/2000-258>.
- [7] Vyhláška č. 494/2005 Sb., kterou se stanoví analytické metody kontroly složení kosmetických prostředků. [online]. [cit. 2015-12-05]. Dostupný z: <http://www.zakonyprolidi.cz/cs/2005-494>.
- [8] ZAHEJSKÝ, Jiří. *Zevní dermatologická terapie a kosmetika: pohledy klinické, fyziologické a biologické*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006. 133 s. ISBN 80-247-1551-1.
- [9] DRAELOS, Zoe Kocecioglu. *Cosmetic dermatology: products and procedurs*. Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell, 2010, 532 s. ISBN 978-1-4443-1765-7.
- [10] RŮŽIČKOVÁ JAREŠOVÁ, Lucie. Dermatologická externa tekutá. *Dermatologie pro praxi*. 2009, 3 (2), s. 93-97.

- [11] RŮŽIČKOVÁ JAREŠOVÁ, Lucie. Dermatologická externa polotuhé konzistence. *Dermatologie pro praxi*. 2010, 4 (1), s. 59-61.
- [12] Synderman. [online]. © 2015 [cit. 2015-11-05]. Dostupné z: <http://www.drkulichpharma.cz/drkulichpharmacz/eshop/3-1-farmacie/10-2-VYRABENE-LECIVE-PRIPRAVKY/5/2710-SYNDERMAN-CH-1000gHEO>.
- [13] Pontin. [online]. © 2015 [cit. 2015-11-05]. Dostupné z: <http://www.drkulichpharma.cz/drkulichpharmacz/eshop/0/3/5/2164-PONTIN-1000gHEO>.
- [14] Ambiderman. [online]. © 2015 [cit. 2015-11-05]. Dostupné z: <http://www.drkulichpharma.cz/drkulichpharmacz/eshop/0/3/5/148-AMBIDERMAN-1000gHEO>.
- [15] Cremor neoaquasorb. [online]. © 2015 [cit. 2015-11-05]. Dostupné z: <http://www.drkulichpharma.cz/drkulichpharmacz/eshop/0/3/5/529-CREMOR-NEOAQUASORB-1000gVAF>.
- [16] SpecialChem. *INCI Directory: Carbomer* [online]. © 2014 [cit. 2015-12-04]. Dostupné z: <http://cosmetics.specialchem.com/inci/carbomer?id=2254>.
- [17] VÉGH, Roman. *Farmaceutická technologie*. 1. vyd. Brno: Computer Press, 2011, 232 s. ISBN 978-80-251-3319-4.
- [18] STOFFELS, Karin M. Modern and safe antimicrobial stabilization of cosmetic products. *Household and Personal Care today*. 2012, 1, s. 18-21.
- [19] GEIS, Philip A. *Cosmetic microbiology: a practical approach*. 2nd ed. New York, 2006, 295 s. ISBN: 08-493-1453-4.
- [20] BRANNAN, Daniel K. *Cosmetic Microbiology: A Practical Handbook*. 1st ed. Boca Raton: CRC Press, 1997, 323 s. ISBN 0849337135.
- [21] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3. [i.e. 4.], opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. [i.e. 2. vyd.]. Praha: Academia, 2008, 363 s. ISBN 978-80-200-1703-1.
- [22] ORTH, Donald S. *Cosmetic and drug microbiology*. New York: Informa Healthcare, 2006, 375 s. ISBN 0-8493-7266-6.

- [23] HERMAN, Anna, Andrzej HERMAN, Beata DOMAGALSKA and Andrzej MIYNARCZYK. Essential Oils and Herbal Extracts as Antimicrobial Agents in Cosmetic Emulsion. *Indian Journal of Microbiology*. 2013, 53 (2), s. 232-237.
- [24] HON, Zdeněk. Skrytá nebezpečí parabenů. *Prevence úrazů, otrav a násilí*. 2007, 3 (1), s. 84-87.
- [25] PRABUSEENIVASAN, Seenivasan, Manickkam JAYAKUMAR and Savarimuthu IGNACIMUTHU. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2006, 39 (6), s. 1-8.
- [26] BENDOVIÁ, H. *Esenciální oleje v kosmetických přípravcích*. 2015. [mluvené slovo]. [cit. 2015-10-8].
- [27] DITRICHOVÁ, Dagmar. Fotosenzitivní potenciál léčiv pro zevní i celkové použití. *Medicína pro praxi*. 2008, 5 (10), s. 385-387.
- [28] SECCHI, Gianfranco. Role of protein in cosmetics. *Clinics in Dermatology*. 2008, 26, s. 321–325.
- [29] HETTIARACHCHY, Navam 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.
- [30] RIZZELO, C. G., I. LOSITO, M. GOBBETTI, T. CARBONARA, M. D. DE BARI and P. G. ZAMBONIN. Antibacterial activities of peptides the water-soluble extracts of Italian cheese varieties. *Journal of Dairy Science*. 2005, 88 (7), s. 2348-2360.
- [31] JELIČIĆ, Irena, Rajka BOŽANIĆ and Ljubica TRATNIK. Whey Based Beverages-New Generation of Dairy Products. *Mljekarstvo*. 2008, 58 (3), s. 257-274.
- [32] YALCIN, A. S. Emerging Therapeutic Potential of Whey Proteins and Peptides. *Current Pharmaceutical Design*. 2006, 12 (13), s. 1637-1643.

- [33] PRAZERES, Ana R., Fátima CARVALHO and Javier RIVAS. Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*. 2012, 110, s. 48-68.
- [34] SUKOVÁ, Irena. *Syrovátka v potravinářství*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2006, 60 s. Potravinářské informace. ISBN 80-7271-173-3.
- [35] WALZEM, Rosemary L., 1999: *Health Enhancing Properties of Whey Proteins and Whey Fractions*. 1999, Texas A & M University, USA, s. 1-8.
- [36] TUNG, Yu-Tang, Ting-Yu TANG, Hsiao-Ling CHEN, Shang-Hsun YANG, Kowit Yu CHONG, Winston T. K. CHENG and Chuan-Mu CHEN. Lactoferrin protects against chemici-induced rat liver fibrosis by inhibiting stelete cell activation. *Journal of Dairy Science*. 2014, 97 (6): s. 3281–3291.
- [37] OPLETAL, Lubomír, Věra SKŘIVANOVÁ. *Přírodní látky a jejich biologická aktivita*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2010, 653 s. ISBN 978-80-246-1801-2.
- [38] TOMITA, Mamoru, Wayne BELLAMY, Mitsunori TAKASE, Koji YAMAUCHI, Hiroyuki WAKABAYASHI and Kouzou KAWASE. Potent Antibacterial Peptides Generated by Pepsin Digestion of Bovine Lactoferrin. *Journal of Dairy Science*. 1991, 74 (12), s. 4137-4142.
- [39] MADUREIRA, Ana R., Cláudia I. PEREIRA, Ana M. P. GOMES, Manuela E. PINTADO and F. Xavier MALCATA. Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Research International*. 2007, 40 (10), s. 1197-1211.
- [40] SCHRÖDER, Jens-M and Jürgen HARDER . Antimicrobial peptides in skin disease. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*. 2006, vol. 3, s. 93-100.
- [41] ATANASSOVA, M., Y. CHOISSET, M. DALGALARRONDO, J. M. CHOBERT, X. DOUSSET, I. IVANOVA and T. HAERTLÉ. Isolation and Partial Biochemical Characterization of a Proteinaceous Anti-bacteria and Anti-yeast Compound Produced by *Lactobacillus Paracasei Subsp. Paracasei* Strain M3. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, 87 (1-2), s. 63-67.

- [42] STILES, Michael E. and Wilhelm H. HOLZAPFEL. Lactic Acid Bacteria of Foods and Their Current Taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. 1997, 36 (1), s. 1-29.
- [43] EVANGELIN Y., T. C. VENKATESWARULU, D. JOHN BABU and K. KASTURI. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria and Its Potential Applications. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2015, 32 (1), s. 306-309.
- [44] SALMINEN, Seppo, Atte von WRIGHT a Arthur OUWEHAND. *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. 3rd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker, 2004, 633 s. ISBN 08-247-5332-1. Chapter 1. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology.
- [45] GARNEAU, Sylvie, Nathaniel I. MARTIN and John C. VEDERAS. Two-peptide Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. *Biochimie*, 2002, 84 (5), s. 577-592.
- [46] CAPLICE, Elizabeth and Gerald F. FITZGERALD. Food Fermentations: Role of Microorganisms in Food Production and Preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 1999, 50 (1), s. 131-149.
- [47] AND, Chen H. and D. G. HOOVER. Bacteriocins and Their Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2002, 2 (3), s. 82-100.
- [48] LACROIX, Christophe. *Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation*. Oxford: Woodhead Publishing, 2011. ISBN: 9780857090522.
- [49] CASTRO, M. P., N. Z. PALAVECINO, C. HERMAN, O. A. GARRO and C. A. CAMPOS. Lactic Acid Bacteria Isolated from Artisanal Dry Sausages: Characterization of Antibacterial Compounds and Study of the Factors Affecting Bacteriocin Production. *Meat Science*. 2011. 87 (4), s. 321-329.
- [50] GILLOR, Osnat, Lisa NIGRO and Margaret RILEY. Genetically Engineered Bacteriocins and Their Potential as the Next Generation of Antimicrobials. *Current Pharmaceutical Design*. 2005, 11 (8), s. 1067-1075.

- [51] BRÖTZ, Heike and Hans-Georg SAHL. New Insights into the Mechanism of Action of Lantibiotics-Diverse Biological Effects by Binding to the Same Molecular Target. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2000, 46 (1), s. 1-6.
- [52] HÉCHARD, Yann a Hans-Georg SAHL. Mode of Action of Modified and Unmodified Bacteriocins from Gram-positive Bacteria. *Biochimie*. 2002, 84 (5-6), s. 545-557.
- [53] MANDAL, Santi M., Shalley SHARMA, Anil Kumar PINNAKA, Annu KUMARI and Suresh KORPOLE. Isolation and Characterization of Diverse Antimicrobial Lipopeptides Produced by Citrobacter and Enterobacter. *BMC Microbiology*. 2013, 13 (152), s. 1-9.
- [54] HISAYASU, Sonoda, Nosaka YOSHIHIRO and Hasebe KOHEI. Humectant and Cosmetic Composition Comprising Lactic Acid Fermentation Metabolite. Patent, JP2003081808 (A). 2003-03-19.
- [55] SIMONNET, Jean-Thierry and Roxanne GAVILLON. Bacteriocin- and Prebiotic-based Cosmetic or Dermatological Compositions. Patent, WO2011073437 (A2). 2011-06-23.
- [56] SIMONNET, Jean-Thierry and Roxanne GAVILLON. Cosmetic Method for Treating Body Odours Using a Bacteriocin Based Composition. Patent, WO2011073438 (A2). 2011-06-23.
- [57] OH Sejong, Young Jun KIM, Kwang Soo KIM, Sae-Hun KIM, Yong KO, Jae-Hun SIM, Seung-Hwa LEE and Sungsu PARK. Effect of Bacteriocin Produced by Lactococcus Sp. HY 449 on Skin-inflammatory Bacteria. *Food and Chemical Toxicology*. 2006, 44 (4), s. 552-559.
- [58] POPOVIC, Suzana, Edit URBÁN, Miodrag LUKIC and J. Michael CONLON. Peptides with Antimicrobial and Anti-inflammatory Activities That Have Therapeutic Potential for Treatment of Acne Vulgaris. *Peptides*. 2012, 34 (2), s. 275-282.
- [59] QIAO, M., M. J. OMAETXE BARRIA, R. RA, I. ORUETXE BARRI and P. E. J. SARIS. Isolation of a Lactococcus lactis strain with high resistance to nisin and increased nisin production. *Biotechnology Letters*. 1997, 19 (2), s. 199-202.

- [60] DE ARAUZ, Luciana Juncioni, Angela Faustino JOZALA, Priscila Gava MAZZOLA and Thereza Christina VESSONI PENNA. Nisin Biotechnological Production and Application: A Review. *Trends in Food Science and Technology*. 2009, 20 (3-4), s. 146-154.
- [61] KUNOVÁ, Gabriela, Vladimír SEDLAŘÍK, Marcela KLIMEŠOVÁ, Zuzana RAŠKOVÁ, Ivana HYRŠLOVÁ, Alexandra ŠALAKOVÁ a Vladimír DRÁB. Využití syrovátky jako růstového média pro nisin produkční kmeny laktokoků. *Mlékařské listy*. 2014, 25 (146), s. 1-4.
- [62] PENNA, Thereza and Dante MORAES. Optimization of Nisin Production by *Lactococcus Lactis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2002, 98 (1), s. 775-789.
- [63] PENNA, Thereza, Angela JOZALA, Letícia DE LENCASTRE NOVAES, Adalberto PESSOA JR and Olivia CHOLEWA. Production of nisin by *Lactococcus lactis* in media with skimmed milk. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2005, 122 (1), s. 619-637.
- [64] SINGH, Preeti, Sven SAENGERLAUB, Ali ABAS WANI and Horst-Christian LANGOWSKI. Role of Plastics Additives for Food Packaging. *Pigment and Resin Technology*. 2012, 41 (6), s. 368-379.
- [65] DE KWAADSTENIET, M., K. T. DOESCHATE and L. M. T. DICKS. Nisin F in the Treatment of Respiratory Tract Infections Caused by *Staphylococcus Aureus*. *Letters in Applied Microbiology*. 2009, 48 (1), s. 65-70.
- [66] FERNÁNDEZ, Leonides, Susana DELGADO, Helena HERRERO, Antonio MALDONADO and Juan M. RODRÍGUES. The Bacteriocin Nisin, an Effective Agent for the Treatment of Staphylococcal Mastitis During Lactation. *Journal of Human Lactation*. 2008, 24 (3), s. 311-316.
- [67] ARANHA, Clara, Sadhana GUPTA and K. V. R. REDDY. Contraceptive Efficacy of Antimicrobial Peptide Nisin: In Vitro and in Vivo Studies. *Contraception*. 2004, 69 (4), s. 333-338.
- [68] VALENTA, Claudia, Andreas BERNKOP-SCHNÜRCH and Hans Peter RIGLER. The Antistaphylococcal Effect of Nisin in a Suitable Vehicle:

- A Potential Therapy for Atopic Dermatitis in Man. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1996, 48 (9), s. 988-991.
- [69] TONG, Zhongchun; Longxing NI and Jungi LING. Antibacterial Peptide Nisin: A Potential Role in the Inhibition of Oral Pathogenic Bacteria. *Peptides*. 2014, 60, s. 32-40.
- [70] Státní zdravotní ústav [online]. © [cit. 2016-01-21]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/ucinnost-konzervace-kosmetiky?highlightWords=zkou%C5%A1ky+%C3%BA%C4%8Dinnosti+konzervace>.
- [71] Český lékopis 2009: Pharmacopea bohemica 2009, Praha, Grada, 2009, s. 1168, ISBN 978-80-247-4679-1.
- [72] SIEGERT, W. ISO 11930 – A Comparison to other Methods to Evaluate the Efficacy of Antimicrobial Preservation. *SOFW-Journal*. 2012, 138 (7), s. 44-52.
- [73] ČSN EN ISO 11930. *Kosmetika – Mikrobiologie – Hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického přípravku*. Český normalizační institut, 2012. Třídící znak 68 1561.
- [74] ČSN EN ISO 29621. *Kosmetika – Mikrobiologie – Pokyny pro posuzování rizika a identifikaci mikrobiologicky málo rizikových výrobků*. Český normalizační institut, 2011. Třídící znak 68 1560.
- [75] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal Douša. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha, 2013, 299 s. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [76] ETTRE, Leslie S. and John V. HINSHAW. *Chapters in the Evolution of Chromatography*. Hackensack: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, 2008, 473 s. ISBN 1-86094-943-6.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

KP	Kosmetický přípravek
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
o/v	Emulze typu „olej ve vodě“
v/o	Emulze typu „voda v oleji“
a_w	Aktivita vody
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MBC	Minimální baktericidní koncentrace
GMP	Glykomakropeptid
Ig	Imunoglobulin
BMK	Bakterie mléčného kvašení
ATP	Adenosintrifosfát
EDTA	Kyselina etylendiamintetraoctová
Da	Dalton
Subsp.	Poddruh (<i>subspecies</i>)
AMK	Aminokyselina
SCCS	Vědecký výbor pro bezpečnost spotřebitele
ČSN	Česká technická norma
ISO	International Organization of Standardization
ČL	Český lékopis
ASEAN	Asociace jihovýchodních asijských národů
CTFA	Sdružení pro kosmetické, toaletní a vonné látky
CFU	Jednotky tvořící kolonie
PEG	Polyetylenglykol
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

RP-HPLC	HPLC na reverzních fázích
MM	Myristyl myristát
GMS	Glyceryl stearát
rpm	Otáčky za minutu (Revolutions per minute)
MO	Mikroorganismus

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Přehled využití bakteriocinů produkovaných BMK.....</i>	<i>28</i>
<i>Obr. 2. Schéma výroby nisinu v polymerní matrici</i>	<i>49</i>
<i>Obr. 3. Přehled a složení vyrobených kosmetických přípravků.....</i>	<i>50</i>
<i>Obr. 4. Ředění roztoku a jeho následné naočkování do živné půdy</i>	<i>55</i>
<i>Obr. 5. Závislost plochy píku na koncentraci nisinu a sestrojení rovnice kalibrační přímky</i>	<i>57</i>
<i>Obr. 6. Pokles koncentrace nisinu v masti v závislosti na počtu cyklů v klimatizační komoře</i>	<i>68</i>
<i>Obr. 7. Pokles koncentrace nisinu v krému v závislosti na počtu cyklů v klimatizační komoře</i>	<i>68</i>
<i>Obr. 8. Pokles koncentrace nisinu v hydrogelu v závislosti na počtu cyklů v klimatizační komoře</i>	<i>69</i>
<i>Obr. 9. Růst peroxidového čísla u mastí v závislosti na počtu cyklů v klimatizační komoře</i>	<i>70</i>
<i>Obr. 10. Růst peroxidového čísla u krémů v závislosti na počtu cyklů v klimatizační komoře</i>	<i>71</i>

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Zastoupení biologicky aktivních látek v syrovátce</i>	<i>25</i>
<i>Tab. 2. Přehled bakteriocinů produkovaných BMK</i>	<i>31</i>
<i>Tab. 3. Požadavky pro hodnocení protimikrobní účinnosti přípravků určených k místní aplikaci dle ČL.....</i>	<i>40</i>
<i>Tab. 4. Požadavky pro hodnocení protimikrobní účinnosti dle ČSN EN ISO 11930</i>	<i>40</i>
<i>Tab. 5. Složení masťového základu.....</i>	<i>46</i>
<i>Tab. 6. Složení krémového základu.....</i>	<i>47</i>
<i>Tab. 7. Složení hydrogelového základu</i>	<i>47</i>
<i>Tab. 8. Látky s antimikrobními účinky přidávané do KP</i>	<i>49</i>
<i>Tab. 9. Koncentrace inokula zkušebních kmenů MO.....</i>	<i>54</i>
<i>Tab. 10. Výsledky diskových difuzních testů před teplotní zátěží v Climacellu</i>	<i>60</i>
<i>Tab. 11. Výsledky diskových difuzních testů po teplotní zátěží v Climacellu</i>	<i>61</i>
<i>Tab. 12. Zkouška účinnost konzervace masti dle ČL před teplotní zátěží v Climacellu</i>	<i>62</i>
<i>Tab. 13. Zkouška účinnost konzervace masti dle ČL po teplotní zátěží v Climacellu</i>	<i>63</i>
<i>Tab. 14. Zkouška účinnost konzervace krému dle ČL před teplotní zátěží v Climacellu.....</i>	<i>65</i>
<i>Tab. 15. Zkouška účinnost konzervace krému dle ČL po teplotní zátěží v Climacellu</i>	<i>65</i>
<i>Tab. 16. Zkouška účinnost konzervace hydrogelu dle ČL před teplotní zátěží v Climacellu</i>	<i>66</i>
<i>Tab. 17. Zkouška účinnost konzervace hydrogelu dle ČL po teplotní zátěží v Climacellu..</i>	<i>66</i>
<i>Tab. 18. Koncentrace nisinu v masti v průběhu teplotního zatížení</i>	<i>67</i>
<i>Tab. 19. Koncentrace nisinu v krému v průběhu teplotního zatížení.....</i>	<i>68</i>
<i>Tab. 20. Koncentrace nisinu v hydrogelu v průběhu teplotního zatížení</i>	<i>69</i>
<i>Tab. 21. Stanovení peroxidového čísla u mastí v průběhu teplotní zátěže</i>	<i>70</i>
<i>Tab. 22. Stanovení peroxidového čísla u krémů v průběhu teplotní zátěže</i>	<i>71</i>
<i>Tab. 23. Hodnoty pH mastí před a po teplotní zátěží v Climacellu</i>	<i>72</i>
<i>Tab. 24. Hodnoty pH krémů před a po teplotní zátěží v Climacellu.....</i>	<i>72</i>
<i>Tab. 25. Hodnoty pH hydrogelů před a po teplotní zátěží v Climacellu</i>	<i>72</i>
<i>Tab. 26. Hodnoty viskozit mastí před a po teplotní zátěží v Climacellu.....</i>	<i>73</i>
<i>Tab. 27. Hodnoty viskozit krémů před a po teplotní zátěží v Climacellu</i>	<i>73</i>
<i>Tab. 28. Hodnoty viskozit hydrogelů před a po teplotní zátěží v Climacellu</i>	<i>73</i>