Příprava a charakterizace formulací s obsahem kolagenního hydrolyzátu

Bc. Johanka Hornová

Diplomová práce
2024

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Bc. Johanka Hornová**
Osobní číslo:	**T22302**
Studijní program:	**N0711A130011 Biomateriály a kosmetika**
Forma studia:	**Prezenční**
Téma práce:	**Příprava a charakterizace formulací s obsahem kolagenního hydrolyzátu**

Zásady pro vypracování

1. Proveďte literární rešerši zaměřenou na charakteristiku kolagenu jako suroviny, jeho vlastnosti a možné zdroje jeho získání. Dále se zaměřte na způsoby úpravy kolagenu na jeho hydrolyzovanou formu, včetně možností jeho přečištění. V neposlední řadě popište možností využití kolagenního hydrolyzátu pro kosmetické aplikace. Získané poznatky kriticky zhodnoťte.
2. V praktické části se věnujte přípravě kosmetických vehikul s obsahem kolagenního hydrolyzátu živočišného původu. Následně také zjišťování jejich fyzikálních, bariérových a hydratačních vlastností na kůži.
3. Dosažené výsledky diskutujte.

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

Seznam doporučené literatury:

[1] Jayathilakan, K.; Sultana, K.; Radhakrishna, K.; Bawa, A.S. Utilization of by products and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: A review. *J. Food Sci. Technol.* 2012, *49*, 278–293.
[2] Ockerman, H.W.; Hansen C.I. *Animal By-product Processing and Utilization*, 1st ed.; CRC Press: London, Great Britain, 2000.
[3] Gómez-Guillén, M.C.; Giménez, B.; López-Caballero, M.E.; Montero, M.P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocoll.* 2011, *25*, 1813–1827.
[4] Arumugam, G.K.S.; Sharma, D.; Balakrishnan, R.M.; Ponnan Ettiyappan, J.B. Extraction, optimization and characterization of collagen sole fish skin. *Sustain. Chem. Pharm.* 2018, *9*, 19–26.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Pavlína Egner, Ph.D.**
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce: **9. února 2024**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORKY
DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou 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;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou 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);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové 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.

Prohlašuji,

- že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studentky: Johanka Hornová

.....
podpis studentky

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zaměřuje na kolagenní hydrolyzát a jeho využití v kosmetice. Kolagenní hydrolyzáty byly charakterizovány, účinnost enzymatické hydrolýzy byla vyšší při přípravě KH z kuřecích žaludků. Sušina všech kolagenních hydrolyzátů byla vyšší než 90 %. Nejnižší množství popelovin obsahoval jelení KH, nejvyšší naopak kapří KH. Nejnižší molekulovou hmotnost vykazoval kapří kolagenní hydrolyzát. U kapřího hydrolyzátu byla také pozorována nejvyšší antioxidační aktivita. Připravené emulzní formulace nebyly zhodnoceny jako mikrobiologicky bezpečné. Gelové formulace byly naopak označeny za bezpečné z mikrobiologického hlediska. U gelových formulací byl pozorován pozitivní vliv na TEWL, zatímco emulzní formulace pozitivně ovlivňovaly hydrataci. Senzorická analýza ukázala na rozdíly mezi vzorky z hlediska všech sledovaných znaků. Přídavek kolagenního hydrolyzátu ovlivňoval viskozitu.

Klíčová slova: enzymatická hydrolýza, kolagenní hydrolyzát, kosmetické formulace, hydratace, transepidermální ztráta vody, senzorická analýza, viskozita

ABSTRACT

This thesis focuses on collagen hydrolysate and its use in cosmetics. Collagen hydrolysates were characterized, the efficiency of enzymatic hydrolysis was higher for hydrolysis of chicken stomachs. The dry weight of all collagen hydrolysates was higher than 90%. Deer KH contained the lowest amount of ash, whereas carp KH contained the highest amount. Carp collagen hydrolysate had the lowest molecular weight. The highest antioxidant activity was also observed for carp hydrolysate. The prepared emulsion formulations were not evaluated as microbiologically safe. The gel formulations, on the other hand, were found to be microbiologically safe. The gel formulations were observed to have a positive effect on TEWL, while the emulsion formulations had a positive effect on hydration. Sensory analysis showed differences between the samples in terms of all observed traits. The addition of collagen hydrolysate influenced viscosity.

Keywords: enzymatic hydrolysis, collagen hydrolysate, cosmetic formulations, hydration, transepidermal water loss, sensory analysis, viscosity

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucí mé práce Ing. Pavlíně Egner, Ph.D. za cenné rady a věnovaný čas. Dále doc. Ing. Magdě Janalíkové, Ph.D. za pomocnou ruku během mikrobiologického testování a vyhodnocování a Ing. Anetě Prokopové za pomoc a cenné rady během procesu přípravy a charakterizace kolagenních hydrolyzátů. Mé díky patří také všem paním laborantkám za pomoc během praktické části. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým blízkým za podporu.

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

OBSAH

ÚVOD **10**
I TEORETICKÁ ČÁST **12**
1 KOLAGEN JAKO SUROVINA **13**
1.1 VLASTNOSTI A STRUKTURA KOLAGENU 13
1.2 FUNKČNÍ VLASTNOSTI KOLAGENU A ŽELATINY 14
1.3 BIOMEDICÍNSKÉ APLIKACE KOLAGENU 16
1.3.1 Kardiologické aplikace 16
1.3.2 Aplikace při hojení ran 16
1.3.3 Aplikace v tkáňovém inženýrství 16
1.4 POTRAVINÁŘSKÉ APLIKACE KOLAGENU 17
1.5 KOLAGEN V KOSMETICE 18
1.5.1 Zdroje kolagenu 18
1.5.2 Metody extrakce 19
1.5.3 Typy kolagenů v kosmetice 20
1.5.4 Modifikace kolagenu a jeho směsi s dalšími složkami 20
2 KOLAGENNÍ HYDROLYZÁT **21**
2.1 VYUŽITÍ 21
2.2 ŽIVOČIŠNÉ SUROVINY PRO VÝROBU HYDROLYZÁTŮ 22
2.2.1 Srst a kůže 23
2.2.2 Orgány a žlázy 23
2.2.3 Drůbež 24
2.2.4 Mořské plody a ryby 24
2.3 VÝROBA KOLAGENNÍHO HYDROLYZÁTU 24
2.3.1 Alkalická a kyselá hydrolýza 25
2.3.2 Enzymatická hydrolýza 25
3 METODY CHARAKTERIZACE HYDROLYZÁTŮ **27**
3.1 INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE 27
3.2 GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRAFIE 29
3.3 ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA 30
3.4 POVRCHOVÉ NAPĚTÍ A KONTAKTNÍ ÚHEL 31
4 METODY CHARAKTERIZACE KOSMETICKÝCH FORMULACÍ **33**
4.1 MIKROBIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ 33
4.2 *IN VIVO* CHARAKTERISTIKY KOSMETICKÝCH FORMULACÍ 35
4.2.1 Měření hydratace 36
4.2.2 Měření transepidermální ztráty vody 37
4.2.3 Měření pH 38
4.3 SENZORICKÁ ANALÝZA 39

4.4 VISKOZITA 40
II PRAKTICKÁ ČÁST 42
5 CÍLE PRÁCE 43
6 METODIKA 44
6.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE 44
6.2 POUŽITÉ POMŮCKY 45
6.3 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE 46
6.4 POUŽITÉ MIKROORGANISMY 47
6.5 PŘÍPRAVA BÍLKOVINNÝCH PRODUKTŮ Z TKÁNÍ BOHATÝCH NA KOLAGEN 48
6.5.1 Příprava čistého kolagenu 48
6.5.2 Demineralizace 49
6.5.3 Extrakce 49
6.5.4 Účinnost extrakce a bilanční chyba 51
6.6 CHARAKTERIZACE KOLAGENNÍCH HYDROLYZÁTŮ 51
6.6.1 Stanovení obsahu sušiny a popelovin 51
6.6.2 Čirost a pH roztoku 52
6.6.3 Infračervená spektroskopie 52
6.6.4 Gelová permeační chromatografie 53
6.6.5 Antioxidační aktivita 53
6.6.6 Povrchové napětí 54
6.6.7 Kontaktní úhel 55
6.7 PŘÍPRAVA FORMULACÍ S OBSAHEM KOLAGENNÍHO HYDROLYZÁTU 55
6.7.1 Příprava emulzních formulací 55
6.7.2 Příprava gelových formulací 56
6.8 CHARAKTERIZACE KOSMETICKÝCH FORMULACÍ K OBSAHEM KOLAGENNÍHO HYDROLYZÁTU 57
6.8.1 Příprava fyziologického roztoku pro mikrobiologické testování 57
6.8.2 Příprava živných půd pro mikrobiologické testování 57
6.8.3 Mikrobiologické testování 58
6.8.4 Příprava fyziologického roztoku a 0,5% roztoku SDS pro *in vivo* měření 59
6.8.5 *In vivo* měření kosmetických formulací 59
6.8.6 Senzorická analýza 61
6.8.7 Viskozita 63
7 VÝSLEDKY A DISKUZE 64
7.1 PŘÍPRAVA BÍLKOVINNÝCH PRODUKTŮ Z TKÁNÍ BOHATÝCH NA KOLAGEN 64
7.2 CHARAKTERIZACE KOLAGENNÍCH HYDROLYZÁTŮ 67
7.2.1 Stanovení obsahu sušiny a popelovin 67
7.2.2 Čirost a pH roztoku kolagenního hydrolyzátu 67
7.2.3 Infračervená spektroskopie 68
7.2.4 Gelová permeační chromatografie 70
7.2.5 Antioxidační aktivita 71

7.2.6 Povrchové napětí a kontaktní úhel 73
7.3 PŘÍPRAVA KOSMETICKÝCH FORMULACÍ 77
7.4 CHARAKTERIZACE KOSMETICKÝCH FORMULACÍ 77
7.4.1 Mikrobiologické testování 77
7.4.2 *In vivo* měření kosmetických formulací 87
7.4.3 Senzorická analýza 97
7.4.4 Měření viskozity 101
ZÁVĚR 103
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 106
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK 113
SEZNAM OBRÁZKŮ 117
SEZNAM TABULEK 119
SEZNAM PŘÍLOH 121

ÚVOD

Kolagen je jakožto nejrozšířenější bílkovina savců nepostradatelný. Hraje zásadní roli při zajišťování strukturální podpory různých tkání a orgánů v lidském těle. Zajišťuje jejich pevnost a pružnost. Mimořádná biokompatibilita kolagenu z něj činí ideální látku pro lékařské implantáty a kosmetické přípravky, čímž je minimalizováno riziko nežádoucích reakcí. Kolagen navíc vykazuje pozoruhodný regenerační potenciál, urychluje obnovu tkání a hojení ran a zároveň minimalizuje tvorbu jizev. Jeho zvlhčující vlastnosti mu umožňují přitahovat a udržovat vlhkost, což z něj činí vyhledávanou složku v přípravcích péče o pleť, které si kladou za úkol udržení hydratace a pružnosti pokožky. Všestrannost kolagenu navíc přesahuje tradiční použití a nachází uplatnění jak ve funkčních potravinách, tak farmaceutických přípravcích či scaffoldech pro tkáňové inženýrství. Právě jeho pozoruhodné vlastnosti již dlouho zajímají vědce a vedou k rozsáhlému zkoumání jeho využití v různých oblastech od potravinářství až po biomedicínu.

Jako jeho nejpřívětivější forma z hlediska kosmetických aplikací se jeví jeho hydrolyzát. Cesta k využití potenciálu kolagenního hydrolyzátu začíná jeho přípravou, což je proces, který nejčastěji zahrnuje enzymatickou nebo chemickou hydrolýzu surovin bohatých na kolagen. Suroviny pro výrobu kolagenního hydrolyzátu jsou živočišného původu, zkoumány jsou ale také rostlinné zdroje proteinů, které by vykazovaly vlastnosti podobné kolagenu. Z hlediska surovin je důležitá zásada cirkulární ekonomiky, díky které jsou využívány odpadní živočišné suroviny právě bohaté na kolagen. Každý ze zdrojů kolagenu má své výhody a využití nachází v různých odvětvích průmyslu. Hovězí a vepřový kolagen jsou často využívány ve farmacii a potravinářství. Drůbeží a rybí kolagen nachází častěji uplatnění v kosmetickém průmyslu, ale využívány jsou i v potravinářství. Jako alternativa pro specifické preference (halal či košer) se nabízí využití korýšů, medúz a dalších mořských živočichů, tento kolagen je označován jako mořský. Optimalizací výrobního procesu lze získat kolagenní hydrolyzáty s požadovanými funkčními vlastnostmi.

Především v kosmetice je kolagenní hydrolyzát ceněn pro svou schopnost zvyšovat její hydrataci, a tím pádem i omlazovat pleť a bojovat tak proti jejímu stárnutí. Nízká molekulární velikost kolagenního hydrolyzátu umožňuje jeho prostup pokožkou a podporuje syntézu kolagenu, která následně zlepší strukturu a pružnost pokožky. Navíc působí jako silný hydratační prostředek, zabraňuje ztrátě vlhkosti a udržuje hydrataci pleti. Díky svým schopnostem, jako je hojení ran či kompatibilita s různými přípravky, slouží hydrolyzát

kolagenu jako všestranná a účinná složka, která uspokojuje poptávku po přírodních řešeních péče o pleť.

I. TEORETICKÁ ČÁST

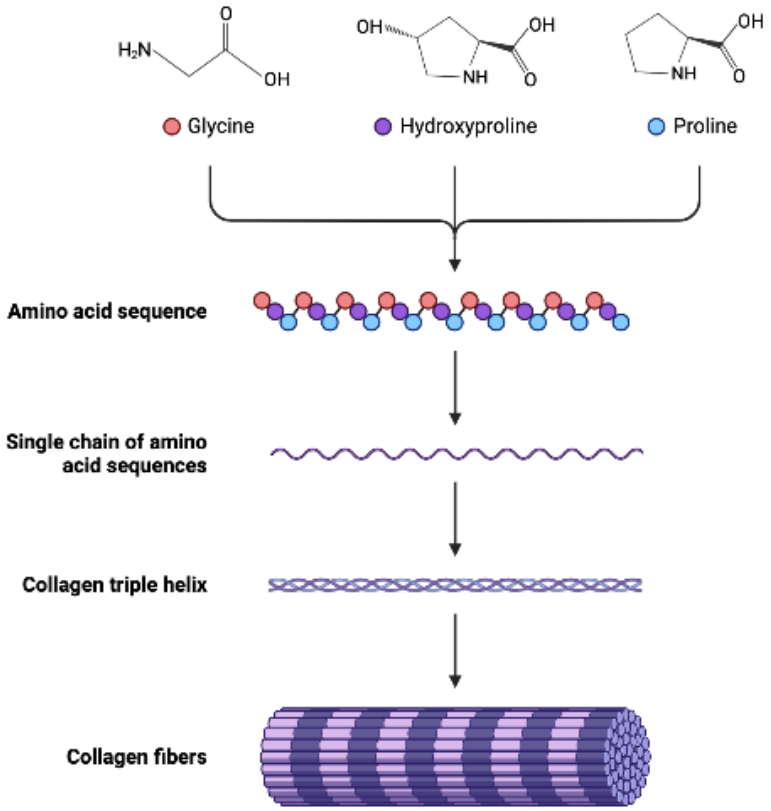
1 KOLAGEN JAKO SUROVINA

Kolagen lze zařadit mezi proteiny a z jejich celkového množství tvoří 25 %. Má svou vlastní rodinu proteinů, v rámci které se každý jeden liší charakteristikou a molekulární i prostorovou strukturou. Tyto rozdíly jsou výsledkem rozdílných post-translačních modifikací. Celkem je v dnešní době známo 29 typů kolagenů a označují se římskými číslicemi. V největší míře je kolagen obsažen v extracelulární matrix (ECM) neboli mezibuněčné hmotě savců. Je také stavební jednotkou kůže, kostí, kloubů, šlach, cév a dalších orgánů. Jeho biosyntéza je velice složitým a vícestupňovým procesem, který probíhá uvnitř i vně buňky. Začíná transkripcí genetické informace na jádře buňky, následně přechází na polyribozomy endoplazmatického retikula (ER), kde dojde k translaci genetické informace. Výsledkem je vznik prokolagenu, který má ve své struktuře fragment signálního peptidu, který slouží k identifikaci a k dopravě molekuly polypeptidu na správné místo v ER. Struktura prokolagenu obsahuje také terminální fragmenty, které se nacházejí na koncích polypeptidového řetězce a zajišťují správnou tvorbu α-šroubovice a také zabraňují předčasnému vzniku fibril. Prokolagen je nejčastěji přeměňován na kolagen typu I nebo III [1].

1.1 Vlastnosti a struktura kolagenu

Fyzikálně-chemické vlastnosti kolagenu jsou výsledkem jeho molekulární struktury. Jednou z jeho nejdůležitějších vlastností je pevnost v tahu, která jej chrání před poškozením a je podpořena jeho strukturou a také síťováním.

Specifická aminokyselinová sekvence Gly-X-Y je typická primární struktura kolagenu. Glycin je tedy nejvíce zastoupeným a objevuje se jako každá třetí aminokyselina (AMK). Na místech X a Y se nejčastěji vyskytují prolin (Pro), hydroxyprolin (Hyp), ale může se objevit také lysin (Lys), hydroxylysin (Hyl), alanin (Ala), kyselina asparagová (Asp), kyselina glutamová (Glu) či arginin (Arg). Základní strukturní jednotkou kolagenu je tropokolagen. Jedná se o α-helikální levotočivou molekulu, která je tvořena třemi polypeptidovými řetězci, které jsou k sobě vázány pomocí elektrostatických sil a vodíkových můstků. Agregací jednotlivých fibril dochází k síťování neboli tvorbě kovalentních či nekovalentních vazeb mezi jednotlivými vlákny a vzniká nadmolekulární struktura kolagenu. Na Obr. 1 je uveden popis jednotlivých struktur kolagenu [1] [2].



Obrázek 1 Struktura kolagenního vlákna [3]

1.2 Funkční vlastnosti kolagenu a želatiny

Želatina vzniká zahříváním kolagenu ve vodném prostředí, ke strukturálním a fyzikálně-chemickým změnám dochází při teplotě cca 60 °C. Přesněji dochází ke štěpení příčných kovalentních vazeb mezi jednotlivými fibrilami, následně molekula kolagenu denaturuje a v neposlední řadě jsou hydrolyticky štěpeny peptidické vazby mezi polypeptidy. Makroskopicky se tento přechod projeví smrštěním kolagenního vlákna. Z hlediska AMK složení je želatina velmi čistou formou kolagenu, není zde ale přítomna esenciální AMK tryptofan (Trp) a neesenciální cystein (Cys). Je zbavena nevláknitých bílkovin, tuků a mukopolysacharidů. V podstatě se jedná o částečně hydrolyzovaný kolagen o molekulové hmotnosti v rozmezí od 20 kDa do 250 kDa. Základními vlastnostmi kolagenu a želatiny je schopnost botnání a rozpouštění. Pro želatinu je základní vlastností přechod sol–gel ve vodném prostředí, ke kterému dochází při 28 °C a při 34 °C dojde naopak k přechodu gelu v sol. Další jejich vlastnosti lze rozdělit do dvou skupin. [4]

První z nich jsou vlastnosti spojené s jejich gelovatěním a mezi ně lze zařadit tvorbu gelu, zahušťování a schopnost vázat vodu. Právě tyto vlastnosti jsou vzájemně propojeny a jsou

závislé na struktuře, molekulové hmotnosti a teplotě systému. Během gelačního procesu kolagenu dochází k agregaci jeho molekul a tvorbě fibril vlivem iontové síly, pH a teploty. Během tzv. lag fáze dochází k nukleaci primárních agregátů (dimery a trimery molekul kolagenu). Následuje proces agregace postranních řetězců mikrofibril, který je dokončen dosažením rovnováhy. V případě gelace želatiny nedojde systém do rovnováhy. Oba tyto procesy jsou termoreverzibilní, ale v opačném směru, kolagenové gely tají snižováním teploty, zatímco ty želatinové zvyšováním teploty. Řetězce kolagenu a želatiny mohou ve vodných roztocích tvořit matrice schopné botnání a jsou označovány jako želatinové hydrogely. Tyto hydrogely jsou hydrofilní, ve vodě nerozpustné a po nabotnání jsou schopné si udržet svůj tvar. Při těchto procesech jsou využívána různá síťovací činidla jako například glutaraldehyd [5].

Druhou skupinou se označují vlastnosti spojené s jejich povrchovým chováním. Zde patří schopnost tvorby a stabilizace emulzí a pěn, adheze a koheze, ochranná funkce koloidů a schopnost tvorby filmu. Povrchové vlastnosti jsou závislé na přítomnosti nabitých skupin v postranních řetězcích proteinů a hydrofilnosti či hydrofobnosti přítomných AMK. Hydrofilní i hydrofobní části AMK mají tendenci migrovat směrem k povrchu vodných systémů, čímž mění povrchové napětí na rozhraní fází. Tvorba a stabilizace emulzí a pěn je závislá na koncentraci proteinu a jeho molekulové hmotnosti. Nerozpustný nativní kolagen o vysoké molekulové hmotnosti vykazuje nižší schopnost tvorby a stabilizace emulzí a pěn než kolagen hydrolyzovaný, který je rozpustný. Možnosti využití želatinových filmů jako obalového materiálu jsou sníženy hygroskopicitou želatiny, jelikož při kontaktu s vlhkostí dojde k jejich rozpuštění. Řešením by mohlo být využití želatin v kombinaci s biopolymery, například lipidy, izoláty sojových proteinů, polysacharidy (gellan, konjakový glukomannan), hydrofobními či hydrofilními změkčovadly, syntetickými polymery či síťovacími činidly. Obecně závisí schopnost tvorby filmu a jeho mechanické vlastnosti na distribuci molekulových hmotností a aminokyselinovém složení, tedy na původu želatin či kolagenu [5].

1.3 Biomedicínské aplikace kolagenu

Kolagen nachází využití při léčbě kloubních či kožních potíží. Z přírodních bílkovin má největší potenciál pro léčbu šlach. V dnešní době jsou na trhu dostupné komerční přípravky ve formě kolagenových peptidů, gelů, mastí, masek či dokonce pleťových vod, jejichž účinkem je zlepšovat stav poškozených tělesných tkání [6].

1.3.1 Kardiologické aplikace

Kolagen je součástí srdeční tkáně, přesněji endokardu, který tvoří výstelku srdce a srdečních chlopní. Některé studie prokázaly, že s přibývajícím věkem dochází ke zvyšování množství kolagenu a srdce se stává uzavřenějším a méně průchozím pro krev. Zvýšené množství srdeční tkáně se ale může objevit i u mladých lidí, s čímž jsou spojeny zdravotní problémy. V dnešní době je kolagen používán již při prevenci kardiovaskulárních onemocnění, jako je například infarkt či cukrovka. Dodáváním kolagenu do těla dojde ke zvýšení pružnosti stěny myokardu. V kardiologii jsou také využívány kolagenové implantáty obsahující gentamicin. Pro diagnózu fibrózy myokardu jsou využívány i bio-markery na bázi kolagenu [6].

1.3.2 Aplikace při hojení ran

Proces hojení ran zahrnuje nahrazování poškozených tkání nově vytvořenými tkáněmi. Zdravá kůže slouží jako bariéra proti poškození vnějším prostředím, když dojde k poškození této bariéry, je spuštěna sekvence biochemických dějů vedoucích k obnově tkání. Tyto biochemické děje lze označovat jako hojení ran a u kůže člověka se skládá tento proces ze čtyř na sebe vzájemně navazujících fází, homeostatické, zánětlivé, proliferační a remodelační. Péče o ránu urychluje její hojení a zabraňuje opakovaným poraněním či infekcím. Přídavek kolagenu například v obvazech na popáleniny způsobí vytvoření nové zdravé granulační tkáně a dojde tak k rychlejšímu zahojení [6].

1.3.3 Aplikace v tkáňovém inženýrství

Tkáňovým inženýrstvím se rozumí lékařský obor inženýrství, který využívá kombinaci buněk, organické chemie, materiálových procesů a inženýrství. Jeho cílem je nahrazovat poškozené či ztracené tkáně za živé tkáně nově vybudované. Syntetické zdroje nevykazovaly pozitivní účinky a z tohoto důvodu je výzkum zaměřen především na přírodní zdroje, nejčastěji biopolymery, mezi které se řadí i kolagen. Biomateriály na bázi kolagenu jsou v posledních letech hojně prozkoumávány, lze z nich sestavovat hydrogely s buňkami, které

jsou známé pod názvem bioinkousty. Pro životaschopnost buněk v takových materiálech je velmi důležitá koncentrace kolagenu, která také následně ovlivňuje modul pružnosti. Výhodou je nulová cytotoxicita. Z důvodu lepší biokompatibility a buněčné adheze je v dnešní době častěji využívaný hydrolyzovaný kolagen. Možností jsou také kombinace kolagenu s dalšími biopolymery jako je například chitosan, kyselina hyaluronová, fibrinogen či alginát. Kolagen je využíván v rámci mnoha oborů tkáňového inženýrství. V rámci klinických studií byl testován pro regeneraci periferních nervů. Scaffoldy na bázi kolagenu typu I nabízejí užitečnou strategii pro obnovu a opravu pojivových tkání. Pro obnovu kostí je ve formě scaffoldů, které napodobují přirozenou ECM, využíván kolagen v kombinaci s nano-anorganickými materiály. V zubním lékařství je využíván vstřebatelný kolagen ke kontrole krvácení či ošetřování ran v dutině ústní, zabraňuje migraci epitelu a umožňuje regeneraci buněk. Při léčbě rohovky je zkoumán účinek nanostrukturované matrice na bázi kolagenu, chitosanu a kyseliny hyaluronové. Využití nachází také v oblasti estetické chirurgie k redukci vrásek, které jsou jím injekčně vyplňovány. Obecně je jeho velkou výhodou, pro biomedicínské aplikace, vhodná stabilita a pevnost společně se schopností síťování. Nevýhodou může být omezené samostatné použití, vyšší cena z důvodu náročnosti jeho výroby, poměrně vysoká hydrofilita či enzymatická degradace [6].

1.4 Potravinářské aplikace kolagenu

Využití v potravinářském průmyslu nachází kolagen díky svým strukturálním, fyzikálně-chemickým a biologickým vlastnostem. Jsou využívány ke zlepšení nutričních hodnot, zvýšení stability, konzistence či pružnosti. Například v masných výrobcích jako jsou paštiky nebo párky je využíván kolagen či želatina ke zlepšení emulgační stability, pružnosti, pevnosti a schopnosti vázat vodu. U jogurtů je často využívána želatina z ryb, která zabraňuje shlukování syrovátky a zvyšuje viskozitu. Ve zmrzlinách a pěnách snižuje přídavek želatiny povrchové napětí a usnadňuje vznik pěny a zlepšuje její stabilitu. Při přípravě cukrářských výrobků je želatina jednou z nejvyužívanějších surovin, která ovlivňuje vzhled, texturu a stabilitu. Je nedílnou součástí gumových bonbonů a želé. U nápojů, jako jsou například džusy, pivo či víno, nachází své uplatnění při odstraňování zákalu a zvyšuje tedy atraktivitu výrobků. V pekárenských výrobcích lze využít želatinu pro zlepšení struktury a textury [7].

1.5 Kolagen v kosmetice

V kosmetickém průmyslu je kolagen velice zajímavou surovinou, především z hlediska svých vlastností, mezi kterými lze určitě zmínit biokompatibilitu, biodegradabilitu, dále pak také fakt, že není toxický. Řadí se také mezi přírodní humektanty a moisturizery, a to kvůli své schopnosti vázat vodu. V produktech kosmetické péče tedy slouží ke zvýšení hydratace a na kůži má zvlhčující účinky. Dále vykazuje filmotvorné účinky, díky kterým dochází ke snížení transepidermální ztráty vody (TEWL) a vytvořený okluzní film udržuje pokožku rozjasněnou a hladkou. Pro všechny tyto vlastnosti není využíván pouze v pečující pleťové kosmetice, ale také v přípravcích v péči o vlasy a tělo. Ve formě hydrogelu pak často nachází uplatnění v maskách na obličej, čímž by mělo dojít k obnově pružnosti pokožky a zlepšení stavu pleti z hlediska jejího stárnutí. Může být také využíván jako zahušťovadlo, jeho vysoká cena je ale značnou nevýhodou, proto je v tomto případě častěji využívána jeho levnější forma, tedy želatina [8].

1.5.1 Zdroje kolagenu

Dříve byly nejvíce využívaným zdrojem kolagenu a želatiny savci, přesněji hovězí, vepřové a drůbeží vedlejší produkty vznikající při porážce zvířat (jateční odpady). Například u drůbeže tvoří odpady až 35 % hmotnosti zvířete. Obecně mají tyto produkty vysokou nutriční hodnotu a obsahují velké množství kolagenu. Z hlediska ochrany životního prostředí se jednalo o výbornou cestu, jak snížit množství odpadu pocházejícího z kožedělného průmyslu nebo produkce masných výrobků. S těmito zdroji přichází ale jistá nevýhoda možné nákazy zvířat, které jsou následně přenosné na člověka (zoonózy – Creutzfeldtova-Jakobova choroba, nemoc šílených krav). Z tohoto důvodu byly hledány další možné zdroje a jedním z prvních byl tzv. mořský kolagen, jehož zdrojem jsou mořští živočichové. Prvními organismy studovanými z hlediska kolagenních struktur byly mořské houby *Chondrosia reniformis* a *Ircinia*. Dále byly zkoumány i rostlinné zdroje či mikroorganismy. Ze studovaných organismů byl jedním z nejvíce podobným savčím zdrojům kolagen získaný z medúzy, která je jím z 60 % tvořena. Tento kolagen ale vykazoval nízký obsah hydroxyprolinu, což mělo vliv na snížení denaturační teploty. Z mořských živočichů jsou ale nejslibnějším zdrojem ryby, které jsou tvořeny kolagenem ze 75 %. Nejčastěji zpracovávanou částí jsou kůže, ze kterých je získáván především kolagen typu I. Lze ale využít i kosti, hlavy, šupiny, ploutve a vnitřnosti. Jako zdroj kolagenu typu II mohou sloužit

chrupavky. Nejvyšší množství kolagenu poskytuje kapr stříbřitý, ropušnice hnědá, treska obecná a tilápie [8].

Obecně u živočišných zdrojů závisí na věku konkrétního organismu, protože rozpustnost získaného kolagenu se v čase snižuje, jelikož roste počet příčných vazeb. Z tohoto důvodu je nutné určit vlastnosti potenciálních zdrojů kolagenu pro jejich správný účinek a využití [8].

1.5.2 Metody extrakce

Způsoby získávání kolagenu z přírodních zdrojů jsou různé. Často tento proces sestává ze tří kroků, přípravy, extrakce a regenerace. Dle použité extrakce je pak výsledný kolagenní produkt rozpustný v kyselině, v neutrální soli nebo v pepsinu. U mladých organismů postačí extrakce neutrální solí, jelikož je zde nízký stupeň zesíťování kolagenu. Získaný materiál je následně čištěn pomocí dialýzy, srážení a odstřeďování. U starších organismů, kde je kolagen již poměrně zesíťovaný, a tedy méně rozpustný ve vodě, je třeba využít extrakci kyselinou, která je mnohonásobně účinnější. Používá se kyselina octová, chlorovodíková či mléčná. Nejčastěji využívanou surovinou pro extrakci kolagenu je rybí kůže, jakožto odpadní surovina. Proces začíná rozemletím vstupní suroviny, přidáním alkalického roztoku a mícháním po dobu 24 hodin, díky čemuž dojde k odstranění nekolagenních bílkovin. Následuje promývání na sítu z důvodu odstranění mechanických nečistot. Dalším krokem je míchání po dobu 24 hodin s kyselým roztokem, následné odstřeďování a sběr supernatantu. Zbylé pelety jsou znovu míchány s kyselým roztokem, následuje odstřeďování a další frakce supernatantu je sbírána. Výsledný produkt je rozpustný v kyselině. Déle může proces probíhat dvěma způsoby. První možností je opakovat míchání po dobu 24 hodin s pepsinem, odstředění a sběr supernatantu, který je následně míchán s alkalickým roztokem. Poté je suspenze supernatantu rozmíchána v pufru o určitém pH tak, aby výsledné pH bylo rovno 7,4. Následně je tato suspenze dialyzována ve stejném pufru a dále je odstředěna. Pokud jsou získané kolagenní produkty již výsledným produktem, je zapotřebí jej vysušit, často je využívána lyofilizace. Druhou možností je vynechat míchání s enzymem a přejít rovnou k míchání s alkalickým roztokem. Tento způsob je rychlejší, ale není tak účinný [8].

1.5.3 Typy kolagenů v kosmetice

V kůži je nejvíce obsažen kolagen typu I, objevují se zde ale také typ III a V. Tyto typy kolagenů jsou nejvíce zastoupeny také v mořském kolagenu, proto se jedná o nejvíce žádaný kolagen v kosmetice. Jeho nevýhodou je ale nízká teplota denaturace, díky které má omezená použití. Proto je častěji využívána jeho hydrolyzovaná forma, která je odolnější vůči vysokým teplotám, například při emulzifikaci [8].

1.5.4 Modifikace kolagenu a jeho směsi s dalšími složkami

Častou modifikací kolagenu je síťování, díky kterému je zvýšena odolnost vůči vysokým teplotám. Síťování lze provádět fyzikálně, chemicky i biologicky. Chemickými síťovacími činidly dojde k interakci s aminoskupinami a karboxylovými skupinami a vytvoří se chemická vazba. Využíván je například glutaraldehyd, karbodiimid (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), chitosan nebo dialdehyd škrobu (DAS). Jako nejúčinnější se ukázal glutaraldehyd, který má slibné využití v tkáňovém inženýrství. Dialdehydický škrob je připraven ze škrobu a kyseliny jodisté a vykazuje biologickou odbouratelnost a antivirové vlastnosti společně s nízkou toxicitou. Z kolagenu v kombinaci s fibroinem a chitosanem, který byl síťovaný právě DAS, byl vytvořen scaffold pro kostní tkáň. Chitosanem síťovaný kolagen nalezl uplatnění při podpoře růstu chondrocytů. Matrice kolagen/chitosan síťovaná EDC-NHS a 2-morfolinoetansulfonovou kyselinou (MES) byla využita pro umělá játra. Mezi fyzikální metody síťování lze zařadit ozařování, sušení či zahřívání, jejich velkou výhodou je fakt, že nezpůsobují potenciální poškození tkáně pacienta. Stabilizace materiálů může být prováděna také pomocí enzymů, například lysyloxidázy. V současné době je využívána mikrobiální transglutamináza (MTG), která zlepšuje fyzikální vlastnosti materiálů na bázi bílkovin a také životaschopnost fibroblastů, aniž by narušovala strukturu kolagenu. Vytváření směsí je důležité z hlediska tvorby filmu. Využíván je například polyvinylpyrrolidon (PVP) a polyvinylalkohol (PVA), které s ním vytváří vodíkové vazby. Častý je také přídavek chitosanu, fibroinu, elastinu, keratinu či kyseliny hyaluronové [8].

2 KOLAGENNÍ HYDROLYZÁT

Hydrolyzovaný kolagen je připravován hydrolýzou. Jedná se o formu kolagenu s nižší molekulovou hmotností, než má ve své nativní formě. Molekulová hmotnost nativního kolagenu se pohybuje okolo 300 kDa a během hydrolýzy dojde ke snížení desetkrát až stokrát. V podstatě se jedná o formu bioaktivních peptidů, kdy původní kolagenní vlákno je štěpeno na menší úseky. Díky této úpravě je hydrolyzovaný kolagen lépe stravitelný, vstřebatelný a rozpustný. Vstupní surovinou může být zvířecí kolagen, častěji je používána již připravená želatina. Jedná se totiž o levnější variantu, při které nemusí být použity speciální kolagenázy, které jsou finančně náročné [9].

2.1 Využití

Velmi časté je využití hydrolyzátů kolagenu v potravinářském průmyslu. Jsou dodávány jako tzv. natrávené bílkoviny a obsahují jejich štěpné produkty. Nejhojnější využití nachází jako kořenící směsi, kde je jejich funkcí zlepšit chuť, aroma a výživovou hodnotu. Hlavní složkou je kyselina glutamová. Dále mohou v potravinářství sloužit jako náhrada sušeného mléka v masových emulzích. Lze je také využít k regulaci viskozity ovocných nápojů nebo jako nosiče antioxidantů [10].

Pokud je původní kolagen hodně rozštěpen, může být výsledný kolagenní hydrolyzát o molekulové hmotnosti do 800 Da využit pro výrobu tenzidů. Hydrolyzáty jsou kondenzovány s chloridy mastných kyselin (později s alkylsulfochloridy, alkylsulfokyseliny a podobnými látkami) a vznikají tenzidy lameponového typu, které vykazují dobrou povrchovou aktivitu, vysoké detergenční schopnosti, nízkou kožní dráždivost a schopnost tvořit pěnu. Slouží jako přísady do pracích prášků, šamponů či jiných kosmetických přípravků (KP) [10].

V zemědělství jsou hydrolyzáty kolagenu využívány jako růstové stimulátory (hnojiva). Jejich výhodou je obsah mikroelementů (Cu, Zn, Mn, Mo, Ti atd.) podporujících růst rostlin, vykazují povrchově aktivní vlastnosti, omezují smývání z povrchu rostlin, jsou ekologicky nezávadné a netoxické, umožňují tvorbu reprodukčních orgánů rostlin a usnadňují příjem a distribuci minerálních živin. Mohou být v kapalné či pevné formě. Ty kapalné se používají k aktivizaci růstu obilnin, zeleniny, rostlin, trávníků, chmele či řepky. Mimo jejich podporu růstu mají také kladný vliv na půdní vlastnosti, jelikož jsou schopné aktivizace půdní mikroflóry. Pevné růstové stimulátory jsou využívány především k aktivizaci růstu zeleniny a okrasných rostlin. Díky své pevné formě jsou pohodlně dávkovány přímo ke kořenovému

systému rostliny. Kapalný koncentrát je smísen s vhodným substrátem a následně jsou formovány hnojivové tyčinky. Pro použití fungicidů, herbicidů, pesticidů či insekticidů je důležité vhodné dávkování, které může být dosaženo pomocí mikroenkapsulace. Ta zajistí vysokou selektivitu, zabrání předčasným ztrátám účinné látky a prodlouží dobu účinku. Vyžívány jsou mikrokapsule s polopropustnou membránou pro jejichž výrobu je vhodný kolagenní hydrolyzát [10].

V kosmetice jsou využívány přípravky z kolagenu především ve formě prášků, gelů, vláken nebo ve své rozpustné formě. Jejich využití je oblíbené z důvodu vysoké botnací schopnosti a také schopnosti zadržovat vodu, čímž přispívají k hydrataci pokožky. Rozpustný kolagen je využíván do krémů, mlék či mastí nebo jako podkožní injektáž. Získává se z kůže mladých zvířat extrakcí, při které jsou využívány roztoky solí při neutrálním pH či roztoky kyselin. Část kolagenu přejde do roztoku, jelikož kolagen z mladých zvířat neobsahuje vysoké množství příčných vazeb. Výtěžek v tomto případě ale není vysoký, proto jsou častěji používány hydrolyzáty kolagenu. Hydrolyzovaný kolagen má v kosmetice mnohé využití, především je ale součástí nejrůznějších KP od vlasové kosmetiky až po kosmetiku dekorativní. Vláknitý kolagen je využíván v pleťových maskách. Jeho příprava zahrnuje praní surových kůží vodou, loužení v roztoku $Ca(OH)_2$ + Na_2S, mechanické odstranění chlupů a podkožního vaziva. Takto připravená holina je znovu prána, rozmělněna a následně extrahována kyselinou. Kolagen je vysrážen a vysušen a jeho dialýzou jsou získána jemná kolagenní vlákna. Výsledná vláknitá disperze se suší mrazem a dále je rozmělněna na prášek. Mikroenkapsulace je využívána také v kosmetickém průmyslu, často pro vonné přísady přítomné v antiperspirantech a deodorantech. Díky porézní struktuře mikrokapsulí je zajištěno trvalé uvolňování, které je závislé na teplotě a vlhkosti. Dále se využívá také pro pěny a soli do koupele, šampony a kondicionéry na vlasy, balzámy na rty, pleťové vody a mléka [10].

2.2 Živočišné suroviny pro výrobu hydrolyzátů

Vysoký příjem masa v potravě lidí přirozeně zvyšuje množství zvířat chovaných na porážku, čímž roste také množství vedlejších produktů, které nejsou nijak spotřebovány a jsou často pouze spalovány nebo umístěny na skládku. V dnešní době naštěstí roste i příjem rostlinné stravy a sílí tak snahy o snížení plýtvání s ohledem ke zvířatům. V důsledku zpracování surovin se hromadí velké množství odpadu, který je nejčastěji zpracováván na krmné směsi pro zvířata či hnojiva. Vedlejší produkty živočišného původu, jako jsou například kosti,

kůže, chrupavky, vnitřnosti apod. mohou být zdrojem kolagenu, který nalézá širokou škálu využití, které byly již výše popsány. Problémem pro jejich zpracovávání může být nedostatečná biologická stabilita, vysoký obsah vody, možnost rychlé autooxidace, potenciální patogenní povaha a vysoká enzymová aktivita [11] [12].

2.2.1 Srst a kůže

Jedná se o jeden z nejcennějších vedlejších produktů, který nachází nejčastější využití v kožedělném průmyslu. I přes dnešní oblibu syntetické (tzv. veganské) kůže je stále poptávka po přírodní kůži vysoká, ať už pro výrobu obuvi, doplňků nebo koberců. Další využití nachází již zpracované kůže v potravinářském průmyslu, například jako střívko na uzeniny. Dále může být kolagen získaný z kůže aplikován v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Obecně je využívána především želatina, která je připravena z čerstvých surovin (kůže, ale i kosti) řízenou hydrolýzou. Chlupy jsou využívány například na výrobu štětců nebo z nich může být získáván keratin. Peřím jsou plněny polštáře, deky nebo bundy. Vlna může být použita pro zisk lanolinu nebo jako výplň do dek. Tuková část je využívána pro výrobu loje či sádla, které nachází další mnohá využití [11] [12].

2.2.2 Orgány a žlázy

Orgány a žlázy zvířat jsou v zemích jako je Čína, Indie či Japonsko využívány jako léky. Využívána jsou játra, plíce, hypofýza, štítná žláza, slinivka břišní, žaludek, ledviny, nadledviny, vaječníky a další. Pro použití ve farmaceutickém průmyslu jsou nejprve očištěny, je odstraněna přebytečná pojivová tkáň a tuk a jsou hluboce zamrazeny z důvodu zamezení bakteriálního růstu. Následně jsou rozmělněny a míseny s různými chemickými roztoky. Opracování může zahrnovat například odstranění tuku nebo přítomných anorganických sloučenin. Konečným krokem je sušení a mletí na prášky, popřípadě mohou být využívány ve formě roztoků nebo kapslí. Mozek, mícha a nervový systém jsou zdrojem cholesterolu, který může být využit jako kosmetický emulgátor. Z epifýzy je získáván melatonin. Z jater je získáván extrakt, který je výborným zdrojem vitaminu B12. Dále mohou játra sloužit k extrakci heparinu, který je využíván jako antikoagulant. Z vaječníků jsou extrahovány hormony estrogen a progesteron. Slinivka břišní poskytuje insulin či glukagon. Žaludek může být zdrojem enzymů jako je pepsin či trypsin [11] [12].

2.2.3 Drůbež

Peří je při svém procesu zpracování degradováno bakterií *Bacillus licheniformis*, dojde tak k přeměně na lyzát, který je lépe stravitelný a může být použit v krmných směsích. Enzym keratináza, který je produkován touto bakterií, se řadí mezi proteinázy a může být využita k hydrolýze kolagenu, elastinu a keratinu z peří. Z vajec je získáván albumin, který je využíván k výrobě barev, v kosmetickém průmyslu pro přípravu mýdel, šamponů a dalších KP, dále jako přísada do léků či mastí, k výrobě umělých vláken či cementu nebo jako protilátka proti jedům [11] [12].

2.2.4 Mořské plody a ryby

Odpad z mořských plodů a ryb je nejčastěji zdrojem minerálů, proteinů a tuků. V roce 2003 Khan et al. a Ohba et al. připravili enzymatickou hydrolýzou proteinový hydrolyzát z rybího odpadu a uvedli, že jej lze přeměnit na užitečné produkty, které je možné následně využít především v potravinářství. Další využití poskytují enzymy a bioaktivní peptidy připravené z kostí Kranase (yellowtail fish). Příprava hydrolyzátů či bioaktivních peptidů je možná i z rybích vnitřností za pomoci baterií mléčného kvašení. Alkalická hydrolýza byla využita pro přípravu proteinových hydrolyzátů z odpadu z jezer. Z krevet a schránek krabů byl získán chitosan, který lze uplatnit ve farmacii, ale i v kosmetice [12].

2.3 Výroba kolagenního hydrolyzátu

Odpady z jatek a kožedělného průmyslu pro výrobu hydrolyzátů kolagenu je možno rozdělit do tří skupin:

1. Odpady s nativním kolagenem, do kterých lze zařadit odřezky z kůží jatečných zvířat, šlachy či střeva.
2. Odpady z koželužen, kde patří odřezky holiny, usní a chromočiněné postružiny.
3. Odpady z obuvnictví a galanterní výroby, do které spadají již upravené a vyčiněné usně.

Nejjednodušší je výroba hydrolyzátů z odpadů z první skupiny, jelikož tyto odpady nejsou znečištěné a je možné využít i hydrolýzu želatiny a klihů. Dle použitých podmínek (specifické enzymy, teplota a pH) procesu hydrolýzy lze vyrobit hydrolyzáty o konkrétní distribuci molekulových hmotností. Výsledné hydrolyzáty mohou být působením peroxidu vodíku odbarveny a deodorovány, čímž je získán bílý prášek bez zápachu, který je

nejvhodnější pro další aplikace. Odpady z chormočiněných postružin jsou nejčastěji zpracovávány dvoustupňově. Nejprve je použit roztok KOH a MgO, čímž je získán podíl hydrolyzátu schopný tvořit gel a jeho střední molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí od 75 kDa do 200 kDa. V druhém kroku se přidá proteolytický enzym, udržuje se optimální hodnota pH, ve které je enzym nejúčinnější. Výsledný hydrolyzát má molekulovou hmotnost mezi 10 až 20 kDa [10].

Hydrolýzou proteinů dochází ke štěpení peptidů a vazeb mezi jednotlivými AMK a vznikají peptidové řetězce o různých velikostech. Jedná se o proces destrukce kolagenního vlákna. Hydrolýzy lze rozdělit do tří kategorií, tepelné, chemické a enzymatické hydrolýzy. Tepelné nejsou pro přípravu hydrolyzátů kolagenu a proteinů obecně téměř vůbec využívány. Lze získat nejen hydrolyzáty kolagenu, ale také elastinu či keratinu [10] [13].

2.3.1 Alkalická a kyselá hydrolýza

Chemická hydrolýza zahrnuje alkalickou i kyselou hydrolýzu. Tyto procesy poskytují produkty o nižší nutriční kvalitě, jejich průběh je obtížně kontrolovatelný, mohou vznikat toxické produkty a docházet k destrukci AMK. Z těchto důvodů je pro přípravu hydrolyzátů proteinů častěji využívána hydrolýza za pomoci enzymů. Alkalickou hydrolýzu je možno provádět u chromočiněných usní pomocí uhličitanu vápenatého a oxidu hořečnatého, při zvýšeném tlaku a teplotě. Kyselá hydrolýza probíhá kratší dobu než alkalická a nejčastěji je prováděna v přítomnosti kyseliny sírové. Obecně je součástí alkalicky či kysele připravených hydrolyzátů velké množství oxidu chromitého a draselných, sodných, vápenatých a hořečnatých solí, čímž je omezeno jejich použití [10] [13].

2.3.2 Enzymatická hydrolýza

Při enzymatické hydrolýze nedochází k destrukci AMK. Není zapotřebí extrémních teplot či hodnot pH, čímž zůstávají zachovány nutriční vlastnosti výsledných hydrolyzátů. Další výhodou může být její rychlost a specifičnost. Na průběh enzymatické hydrolýzy má vliv specificita enzymu, stupeň denaturace proteinu, koncentrace substrátu a enzymu, aktivita enzymu, pH, iontová síla, teplota, tlak a přítomnost inhibitorů [13].

Enzymy jsou bílkoviny katalyzující biochemické procesy v živých organismech. Mohou být jednoduché i složené. Zajišťují přísun energie a stavebního materiálu, čímž je umožněno jejich využití. Mezi první popsané enzymy patří *amylasa* a *pepsin* a prvním připraveným enzymem je *ureasa*. Každý enzym má své aktivní centrum, které umožňuje jeho katalytické

působení. Jejich další důležitou vlastností je specifita, která určí, jakou reakci budou katalyzovat (reakční specifita) a jaký substrát budou přeměňovat (substrátová specifita). Působí za mírných teplotních i tlakových podmínek a jsou vysoce účinné. Výhodou je také jejich netoxičnost. Od roku 1961 mají své systémové názvosloví. Jsou rozděleny do šesti tříd podle typu reakce, kterou katalyzují. Oxidoreduktázy katalyzují oxidačně-redukční přeměny, transferazy jsou schopné přenosu funkčních skupin, hydrolázy podporují hydrolytický rozklad, lyázy katalyzují nehydrolytické štěpení a vznik vazeb, isomerázy katalyzují přeměny isomerů a ligázy katalyzují vznik energeticky náročných vazeb za současného rozkladu ATP (adenosintrifosfátu). Společně se systémovým názvem je používáno i číselné označení enzymů nebo jejich triviální názvosloví. Pro měření koncentrace enzymu byla zavedena katalytická účinnost (aktivita), která je prakticky sledována například změnou barvy nebo viskozity vzorku. Tato aktivita je udávána v jednotách katal (kat), která představuje množství katalyzátoru, které za 1 sekundu přemění 1 mol substrátu. Co se týká struktury enzymů, lze je zařadit mezi globulární proteiny. Jsou převážně složeny z bílkovinné části (apoenzym), ale je přítomna i nebílkovinná část zvaná kofaktor. Kofaktor slouží k přenosu elektronů, atomů nebo jejich skupin. Mezi oběma částmi existuje vazba, která může být pevná nebo volná. Pokud je kofaktor k apoenzymu vázán pevně, nazývá se prostetickou skupinou. Je-li tato vazba reverzibilní, enzym nazývá se koenzymem. [13].

Jedním z přístupů k enzymatické hydrolýze kolagenu je využití proteolytických enzymů jako je trypsin, chymotrypsin či pepsin. Nejprve byly pozorovány změny ve viskozitě, což bylo způsobeno degradací nekolagenních nečistot a působením trypsinu došlo ke změně agregace kolagenu [13] [15].

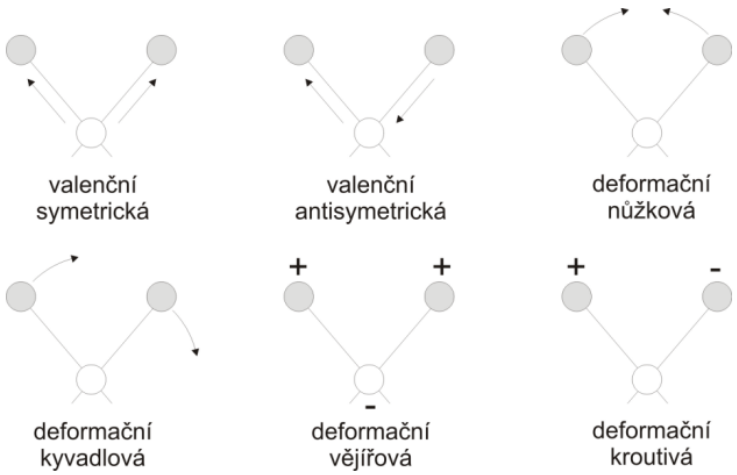
Další zpracování hydrolyzátů zahrnuje mnoho kroků. Jedním z nich může být tepelná inaktivace, která slouží k inaktivaci přítomných enzymů. Procesem ultrafiltrace jsou odstraněny vysokomolekulární proteiny. Použitím dalších specifických enzymů může být snížen obsah konkrétních AMK. Pro snížení hořké chuti je používána hydrolýza exoproteázami nebo reakce s aktivním uhlím. Absorpční chromatografií lze potom snížit obsah aromatických AMK [13].

3 METODY CHARAKTERIZACE HYDROLYZÁTŮ

V rámci této kapitoly bude popsán teoretický princip metod používaných k charakterizaci připravených kolagenních hydrolyzátů.

3.1 Infračervená spektroskopie

Metoda infračervené spektroskopie (IR) je založena na molekulárních vibracích a změnách dipólového momentu mezi nimi. Zkoumá interakce mezi vzorkem a elektromagnetickým zářením o vlnočtu 10–10 000 cm^{-1}. Energie takového záření je dostačující pro změny rotačních či vibračních stavů molekul. Pro aktivitu vibrace je důležitá symetrie molekul. Při valenčních vibracích vibrují atomy podél vazby, mění se vzdálenost jader atomů, ale valenční úhly jsou stejné. Rozeznávají se valenční vibrace symetrické a asymetrické. Při symetrické vibraci se obě vazby zkracují nebo prodlužují souměrně, při asymetrické vibraci dochází ke zkracování jedné vazby a prodlužování vazby druhé. Následně jsou rozlišovány dva typy vibrací. Naopak při deformačních vibracích zůstává konstantní vzdálenost jader atomů a mění se valenční úhly. Zde může docházet k nůžkové, kyvadlové, vějířové či kroutivé vibraci. Možnosti vibrací v infračervené oblasti jsou znázorněny na Obr. 2 [16].



Obrázek 2 Schématické znázornění vibrací v infračerveném spektru [17]

Měření probíhá na infračervených spektrometrech, nejčastěji dvoupaprskových přístrojích, které kompenzují absorpci vodní páry a oxidu uhličitého ze vzduchu i absorpci rozpouštědla. Základní sestavení spektrometru obsahuje vždy zdroj infračerveného záření, monochromátor, detektor a zařízení sbírající data. Dále může být obohacen o zrcadla

odrážející paprsky, mřížky či clony. Svazek paprsků je nejprve rozdělen na dva rovnocenné paprsky, z nichž jeden prochází měrnou kyvetou se vzorkem, druhý srovnávací kyvetou s rozpouštědlem. Kyvety jsou nejčastěji z NaCl, KBr nebo jejich směsí, které jsou schopny propouštět infračervené záření, ale jsou rozpustné ve vodě, alkoholech či kyselinách. Proto byly vyvinuty další materiály jako jen například ZnSe nebo směsný krystal jodidu a bromidu thallného označovaný jako KRS-5. Dále je využíván například bromid a jodid cesný. Vzorky mohou být mimo kapalné a plynné fáze měřeny také ve fázi pevné, konkrétně ve formě prášku, destičky, fólie, tablety, suspenze či filmu. Obecně lze metody infračervené spektrometrie rozdělit na dvě skupiny, transmisní a reflexní techniky. Právě metody transmisní využívají ke svému měření kyvet. Reflexní techniky jsou častěji používané a lze mezi ně zařadit například metodu zrcadlového odrazu, difúzní reflexe či zeslabené totální reflektance. Právě metoda zeslabené totální reflektance (attenuated total reflectance – ATR) je jednou z nejpoužívanějších IR metod vůbec. Jedná se o moderní metodu, která může být využita na nejrůznější vzorky, od kapalných, přes pasty či krémy až po prášky. Využívá krystal s vysokým indexem lomu, který je v těsné blízkosti se vzorkem. Díky krystalu dojde k totálnímu odrazu infračerveného záření, které postupně při odrazech slábne [16].

Infračervená spektroskopie je využívána ke kvalitativním i kvantitativním účelům. Při kvalitativní interpretaci jsou přiřazovány absorpční pásy charakteristickým vibracím molekuly. U kvantitativní IR je vyhodnocován vztah mezi koncentrací a měřenou veličinou. Největší využití nachází IR v oblasti chemické analýzy. Velkou výhodou jejího použití je, že během měření nedochází k destrukci vzorku a je zapotřebí jeho velmi malé množství. Jedná se o velice rychlou a poměrně přesnou metodu. Využívána je metoda IR s Fourierovou transformací (FTIR), která značí převedení infračerveného signálu pomocí matematické operace [16] [18].

Při měření bílkovin je problémem měření vzorků v kapalné fázi, tedy ve formě vodných roztoků. Důvodem je přítomnost kladně i záporně nabité skupiny na molekulách AMK. Proto jsou měřena spektra bílkovin v pevné krystalické fázi. Pro bílkoviny typické skupiny NH^{3+} a COO^{-} mají v IR spektrech své charakteristické pásy. Vibrace NH^{3+} skupiny se projeví poměrně široký pás v oblasti 3200–2400 cm^{-1}, deformační vibrace se projeví v oblasti 1610 cm^{-1} a 1510 cm^{-1}. Pro funkční skupinu COO^{-} jsou charakteristické pásy v oblasti 1587 a 1411 cm^{-1}.

3.2 Gelová permeační chromatografie

Gelovou permeační chromatografii (GPC – gel permeation chromatograhy) lze zařadit mezi metody kapalinové chromatografie. Při kapalinové chromatografii (LC – liquid chromatography) jsou látky děleny mezi pohyblivou (mobilní) a nepohyblivou (stacionární) fázi. Pohyblivou fází je zde kapalina. Podle principů dělení lze kapalinou chromatografii rozdělit na adsorpční, rozdělovací, afinitní, iontoměničovou či gelovou permeační. Obecně může chromatografie fungovat izokraticky či gradientově. Při gradientové eluci dochází v průběhu analýzy ke změně mobilní fáze, při izokratické eluci je naopak mobilní fáze stále stejná. [16]

Gelová permeační chromatografie je využívána nejčastěji analyticky pro separaci molekul na základě jejich velikosti a slouží ke zjištění průměrných molekulových hmotnosti vzorků nebo distribučních křivek. Dále může sloužit k přípravě frakcí o konkrétních molekulových hmotnostech. V průběhu měření jsou malé molekuly zachyceny v nepohyblivé části eluentu, tedy v pórech kolony nebo síťovité struktuře gelové náplně kolony. Jejich eluční objem je tedy pro malé molekuly nejvyšší, popřípadě je roven celkovému objemu eluentu v koloně. Naopak velké molekuly mají eluční objem nízký, nejsou totiž schopny se udržet v pórech či síťové struktuře kolony a s pohyblivou fázi protékají kolonou. Celý proces není závislý pouze na velikosti molekul, je také ovlivněn omezenou difúzí či adsorpcí. Náplň kolony (stacionární fáze) může být různá, nejčastěji jsou ale využívány náplně z polystyrenu, který je zesíťovaný divinylbenzenem, dále pak zesíťovaného polyvinylacetátu, zesíťovaného alkolovaného polydextranu, silikagelu či skla. Podle mechanických vlastností je lze dělit na tvrdé, polotvrdé a měkké. Tvrdost či měkkost gelu ovlivňují možnosti použití tlaků, u měkkých gelů se musí tlak omezit na 1–2 MPa, u polotvrdých se možnosti zvyšují na 5–15 MPa. U GPC není využívána metoda gradientové eluce, změna mobilní fáze zde není žádoucí, mohlo by totiž dojít ke smrštění či botnání organické náplně kolony, čímž by došlo k poškození a změně velikosti pórů. Analýzu ovlivňuje také možná adsorpce. Jako eluent (mobilní fáze) je často využíván tetrahydrofuran, také toluen nebo dichlormethan, ale využita může být také destilovaná voda. [16] [19].

3.3 Antioxidační aktivita

Teorie stárnutí vlivem oxidativního stresu zahrnuje dvě možnosti, které mohou ovlivňovat předčasné stárnutí, ale také vznik chronických onemocnění. Jednou z možností jsou poruchy homeostázy imunitního systému, druhou je akumulace oxidativních změn ve tkáních vlivem reaktivních forem kyslíku (ROS – reactive oxygen species), mezi které lze zařadit meziprodukty bez volných radikálů (H_2O_2) i s volnými radikály (superoxidový anion, hydroxylový radikál). Vznikají endogenním i exogenním způsobem. Z hlediska kosmetiky a ochrany kůže jsou důležité faktory exogenní, mezi které patří například expozice ionizujícímu záření, znečištěné ovzduší či infekce. Ve fyziologických koncentracích jsou ROS součástí udržování životně důležitých funkcí jako je proliferace, buněčná signalizace, syntéza proteinů a antimikrobiální ochrana. Pokud jsou hodnoty vyšší než fyziologické, způsobují ROS poškození biologických molekul jako je např. DNA či proteiny. Obecně je oxidativní stres vyvolán nerovnováhou mezi vznikajícími oxidanty a antioxidačními obrannými mechanismy. Jako indikátor oxidačního stresu je využíván poměr mezi celkovým stavem oxidantů a celkovou antioxidační kapacitou, který je označován jako index oxidačního stresu. Antioxidanty snižují schopnost oxidantů a oddalují, zabraňují či inaktivují účinky ROS. Dokáží neutralizovat volné radikály. U přírodních antioxidantů existují dva mechanismy, jak tohoto dosáhnout. První z nich je přenos vodíkového atomu, při kterém dojde nejprve k reakci s volným radikálem a následně k přenosu atomu vodíku homolytickým štěpením -OH vazby. Druhým je přenos elektronu z antioxidantu na radikál, při kterém dojde k ionizaci obou sloučenin [20] [21].

Antioxidanty lze rozdělit na syntetické a přírodní. Mezi často používané syntetické lze zařadit butylhydroxytoluen (BHT), butylhydroxyanisol (BHA), terc-butylhydroxychinon (TBHQ), nebo propylgalát (PG). Jsou hojně využívány v potravinářství. Častá je jejich kombinace s přírodními antioxidanty, mezi které lze zařadit polyfenoly, kyselinu citronovou (vitamin C), glutathion, vitamin E či melatonin. Polyfenoly jsou nejvýznamnější skupinou, podle své struktury jsou děleny do dvou skupin, flavonoidy a non-flavonoidy. Další možností rozdělení této početné skupiny zahrnující až 8000 sloučenin je do čtyř skupin, a to na flavonoidy, fenolové kyseliny, stilbeny a lignany [20] [22].

V dnešní době je často stanovována antioxidační aktivita nejrůznějších látek. Jednou z možností je stanovení pomocí 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH), dále pak za pomoci 2,2′-azino-bis(3-etylbenzothiazolin-6-sulfurátové kyseliny) (ABTS) nebo pomocí testu železité redukční antioxidační síly (FRAP – ferric reducing antioxidant power) [20] [21].

3.4 Povrchové napětí a kontaktní úhel

Povrchovou energií (σ) se rozumí termodynamická vlastnost, která představuje množství minimální práce potřebné na jednotku plochy k vytvoření většího povrchu. Jednotkou je $J \cdot m^{-2}$. Pokud se jedná o sílu působící na rozhraní na jednotku délky povrchu označuje se jako povrchové napětí (γ), jehož jednotkou je $N \cdot m^{-1}$ (popřípadě $mN \cdot m^{-1}$). Jedná se v podstatě o přebývající energii molekul na povrchu kapaliny z důvodu nerovnoměrného rozložení přitažlivých sil. Molekuly, které se nachází uvnitř kapaliny, mají naopak ve všech směrech rovnoměrné přitažlivé síly mezi molekulami, jejich povrchová energie (či povrchové napětí) je tedy nulová. Jedná se o veličiny, které jsou závislé na teplotě. Závislost je nepřímo úměrná, s rostoucí teplotou klesá povrchové napětí. Vždy je tedy udávána hodnota povrchového napětí při dané teplotě, například povrchové napětí destilované vody je při 20 °C rovno 72,8 $mN \cdot m^{-1}$. Pokud jsou systémem, na kterém se pozoruje povrchové napětí, dvě nemísitelné fáze, hovoří se o mezifázovém napětí [23].

Metody měření povrchového a mezifázového napětí lze rozdělit na metody statické a dynamické. Mezi nejčastěji používané statické patří metoda Wilhelmyho destičky či Du Noüyova prstence. Při metodě Wilhelmyho destičky je destička zavěšena na siloměrné váze a po jejím smočení je měřena síla, která působí na desku. Z podílu síly a obvodu desky je vypočtena hodnota povrchového napětí. Obdobný postup je aplikován při metodě Du Noüyova prstence, na který po smočení přilne měřená kapalina. Mírou povrchového napětí je následně maximální nárůst vertikálně působící síly. Mezi statické metody lze zařadit také metodu rotující či závěsné kapky nebo metodu kapilární elevace. Z dynamických metod je využívána metoda maximálního přetlaku v bublině [23].

S povrchovým napětím je spojeno také smáčení povrchu, které lze popsat Youngovou rovnicí (1):

$$\gamma_s = \gamma_{sl} + \gamma_l \cdot \cos\theta \tag{1}$$

kde:

γ_s – mezifázové napětí na rozhraní pevné a plynné fáze $[mN \cdot m^{-1}]$

γ_{sl} – mezifázové napětí na rozhraní pevné a kapalné fáze $[mN \cdot m^{-1}]$

γ_l – povrchové napětí na rozhraní kapalné a plynné fáze $[mN \cdot m^{-1}]$

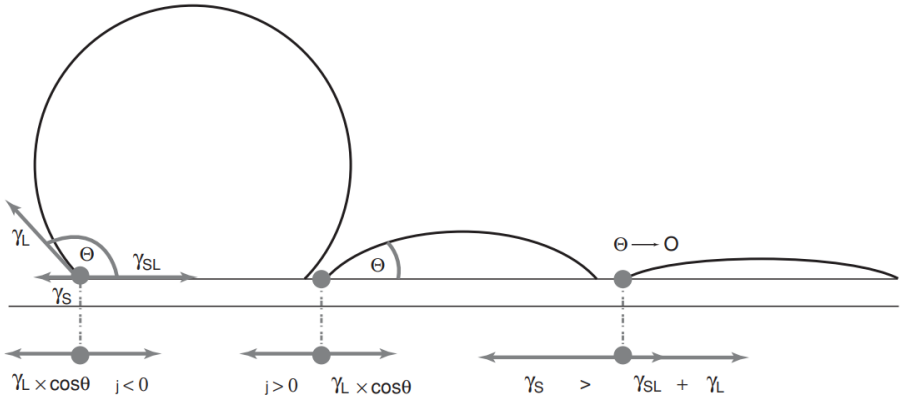
θ – kontaktní úhel [°]

Jedná se o schopnost kapaliny přilnout k povrchu některých pevných látek. Její mírou je právě kontaktní úhel θ, nazývaný také smáčecí úhel. Úhel smáčení je svírán tečnou k povrchu kapky vedenou v bodě styku kapky s rozhraním [23].

Dále lze definovat také smáčecí napětí j (2):

$$j = \gamma_s - \gamma_{sl} = \gamma_l \cdot \cos\theta \tag{2}$$

Pokud je kontaktní úhel roven 0° (mezní případ), dojde k dokonalému smáčení a kapka bude plně rozestřena. Je-li kontaktní úhel nižší než 90°, jedná se o kapku, která bude stále rozestřena a smáčí tedy povrch. Pro úhly vyšší než 90° je proces opačný, nedojde k rozestření kapky a povrch je tedy špatně smáčen nebo kapalinou není smáčen vůbec. Dalším mezním případem je, pokud je kontaktní úhel roven 180°. Tento případ se nazývá dokonalým nesmáčením. Možnosti smáčení povrchu kapalinou jsou uvedeny viz Obr. 3 [23] [24].



Obrázek 3 Schéma smáčení pevného povrchu kapalinou [23]

Kontaktní úhel je veličinou, která je přímo měřitelná. Výsledné hodnoty jsou měřitelné v mnoha průmyslových oblastech, především v oblasti barev a nátěrových hmot, kde je důležitou vlastností jistá adheze k povrchu. Další využití lze nalézt měření kontaktního úhlu například v textilním, stavebním či automobilovém průmyslu. V neposlední řadě také v kosmetice a ve zdravotnictví. Metody měření lze opět rozdělit do dvou skupin, tentokrát na přímé (goniometrické) a nepřímé (tenziometrické) metody. Mezi přímé metody lze zařadit měření na naklánějící se destičce, metodu přisedlé kapky nebo přilínající bubliny. K metodám nepřímým patří především metoda analýzy profilu kapky, která je prováděna nejčastěji video kamerou za pomoci výpočetního softwaru. Měřena je výška kapky, poloměr kapky v místě jejího styku s povrchem. Z těchto hodnot je následně spočítán kontaktní úhel. Další nepřímou metodou může být kapilární elevace na svislé destičce a lze využít také Wilhelmyho metodu [23] [24].

4 METODY CHARAKTERIZACE KOSMETICKÝCH FORMULACÍ

Kosmetické formulace mohou být charakterizovány mnoha postupy a metodami. Důležité jsou jejich mikrobiologické vlastnosti, přesněji jejich nezávadnost díky použitému konzervačnímu systému. Dále pak jejich účinky na kůži, které jsou nejčastěji zjišťovány na lidských dobrovolnících. Pro uživatele jsou důležité také senzorické vlastnosti kosmetického přípravku a z hlediska pohodlného a příjemného používání se charakterizace KP zaměřuje také na viskozitu. Obecně je důležitou charakteristikou také stabilita přípravku, která poskytne informace výrobci kosmetického přípravku v průběhu jeho vývoje a zajistí komfort a kvalitu jeho spotřebiteli. [25]

4.1 Mikrobiologické testování

Jednou z nejdůležitějších charakteristik KP je jeho mikrobiální stabilita. V roce 1946 byl nahlášen první případ kontaminace dětského pudru v důsledku čehož zemřeli 4 novorozenci. Případů kontaminace KP následně přibývalo a bylo nutné najít zdroje potenciální kontaminace a v budoucnu jim zabránit kontrolou čistoty surovin, správné výrobní praxe a konzervací finálního KP. Dalším krokem bylo nastavení přípustných limitů, kvantitativních i kvalitativních [25].

Mikrobiální osídlení lidského těla může být residentní či transientní. Residentním se rozumí mikroorganismy (MO), které se na různých částech těla běžně vyskytují. Například na kůži jsou typicky přítomny například *Acinetobacter*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus*, *Propionibacterium* a *Corynebacterium*. Tranzientní mikroflórou se zase rozumí mikroorganismy, které se na určitých místech vyskytují pouze přechodně, jejich schopnost množit se je omezena, jsou to původci infekcí. Mezi tranzientní MO lze zařadit například některé zástupce rodu *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Bacillus* či *Pseudomonas*. Mezi patogenní organismy na kůži lze zařadit *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Proto jsou často využívány jako modelové organismy při testování mikrobiologické nezávadnosti. Přítomnost *Staphylococcus aureus* způsobuje na kůži zánětlivá ložiska až pyodermie. Dále může být původcem Impetiga či atopické dermatitidy. Účinky *Streptococcus pyogenes* jsou obdobné. Ukazatelem fekálního znečištění je přítomnost *Escherichia coli* na kůži. *Pseudomonas aeruginosa* je často přenášena skrz oční kosmetiku a způsobuje záněty očí až slepotu. Z kvasinek je modelovým organismem nejčastěji *Candida albicans*, z plísní *Aspergillus niger*. [25] [26]

Mikrobiologická kontrola KP a vody začíná přípravou vzorků. Nejčastěji je připravován 10% homogenní roztok KP ve fyziologickém roztoku nebo pufru o pH 7, roztok může být dále ředěn a následně je ponechán ke kultivaci na vhodných médiích a jsou vyhodnocovány počty kolonií, které by měly být nulové. Čistota vody může být kontrolována kvantitativně i kvalitativně. Kvantitativní stanovení probíhá skrz bakteriologické filtry o porozitě 0,45 μm, filtry jsou následně kultivovány na Tryptic Soy agaru. Kvalitativní stanovení probíhá též skrz bakteriologické filtry, liší se ale kultivačním médiem. V tomto případě je využíván MacConkey agar pro kultivaci koliformních bakterií a Cetrimide agar pro bakterie rodu *Pseudomonas*. V obou případech je konečným krokem indentifikace přítomných kolonií [25].

Konzervace přináší kosmetickému přípravku nezávadnost a delší trvanlivost. Je ale nutné zkoumat stabilitu konzervačního systému. Nesmí dojít k infekci spotřebitele nebo snížení kvality KP v průběhu jeho používání. Konzervace ale neslouží k zakrytí špatných hygienických podmínek výrobního procesu, musí být dodržena správná výrobní praxe (SVP). Používané kosmetické (současně s potravinářskými) konzervanty mají mnoho možných způsobů dělení, nejčastěji se ale jedná o následující skupiny. Organické kyseliny, mezi které patří kyselina benzoová, salicylová, dehydrooctová či citronová. Další skupinou jsou alkoholy a fenoly, pod které spadají další skupiny. Nejznámější a nejpoužívanější z nich jsou parabeny, estery kyseliny para-hydroxybenzoové. Jejich výhodou je široké spektrum účinnosti již při nízkých koncentracích. Z důvodu existujících studií o jejich možné mutagenitě jsou v KP legislativně omezovány. Alkoholy jsou využívány především alifatické, například isopropanol či ethanol. Z aromatických alkoholů lze zmínit benzylalkohol. Z fenolů je nejpoužívanějším zástupcem fenoxyethanol. Další skupinou jsou deriváty isothiazolinonu, ke kterým patří methylisothiazolinon (MIT) a methylchloroisothiazolinon (MCI). Jako konzervant je využíván také formaldehyl, časté jsou ale jeho donory, například imidazolidinyl urea, diazolidinyl urea, DMDM hydantoin, bronopol či chlorfenesin. Dále mohou být používány kvartérní amoniové soli nebo biguanidy. Roste také množství přírodních konzervantů, kterými jsou nejčastěji esenciální oleje. Jejich nevýhodou je ale úzké spektrum účinnosti, kvůli čemuž jsou využívány v kombinaci s dalšími konzervanty, které jsou v přírodní certifikované kosmetice povoleny (např. organické kyseliny a jejich soli či alkoholy a jejich soli) a na trhu jsou v dnešní době dostupné komerční směsi konzervačních systémů [25].

4.2 *In vivo* charakteristiky kosmetických formulací

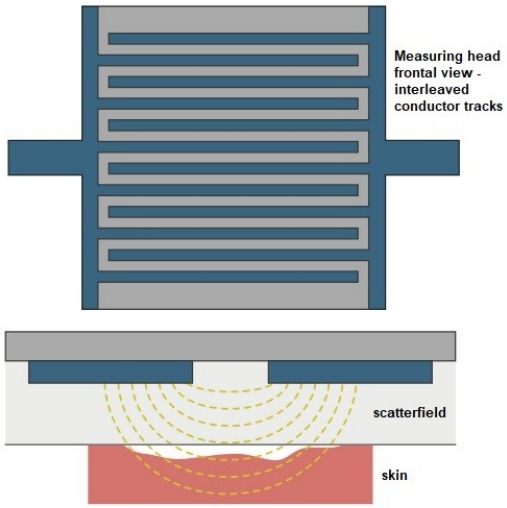
Kůže jakožto největší orgán lidského těla je zároveň jakousi bariérou a ochranou vrstvou lidského těla před vnějším prostředím. Kromě toho má spoustu dalších funkcí, mezi které lze zařadit smyslovou funkci, psychosociální a dále například termoregulační. S ohledem na kosmetické přípravky, které jsou aplikovány na kůži po celém těle je důležitým faktorem schopnost prostupu látek obsažených v KP neboli jejich schopnost penetrace. Tato schopnost je úzce spojena se strukturou kůže, kterou lze jednoduše rozdělit na tři vrstvy. *Epidermis*, která je nejsvrchnější a zároveň nejtenčí, dále následuje *dermis*, ve které jsou uloženy vlasové folikuly, mazové žlázy, nervová zakončení apod. Poslední vrstvou je *hypodermis* neboli podkožní vazivo. Z pohledu kosmetických přípravků je nejdůležitější vrstvou *epidermis*, skrze kterou právě KP prochází a dosahuje svých deklarovaných účinků. Struktura její nejsvrchnější vrstvy *stratum corneum* (SC) je často popisována jako tzv. cihly a malta. Cihly znázorňují korneocyty, kožní buňky, které se v první vrstvě *epidermis* nazývají keratinocyty a v průběhu svého života postupně dochází k jejich dozrávání a keratinizaci. Jako maltu si lze představit směs interceluárních lipidů složenou z ceramidů, cholesterolu, mastných kyselin atd., které vyplňují prostory mezi korneocyty. Kožní bariéra, a tedy prostupnost látek skrz kůži je ovlivněna například věkem, pohlavím, etnicitou nebo kožními problémy jedince. Funkčnost kožní bariéry je možné analyzovat měřením transepidermální ztráty vody (TEWL), která je ukazatelem množství difundované vody skrz povrch kůže, a tedy schopností kůže bránit tělo před vniknutím škodlivin a mikroorganismů. Existují 3 možnosti penetrace, a to skrz deriváty kůže (vlasový folikul, mazová či potní žláza), skrze intercelulární lipidy nebo skrz korneocyty. Množství látek, které jsou schopné takového prostupu SC není mnoho, a tak je nutné tuto propustnost zvýšit. Množnosti jsou chemické, fyzikální, mechanické a elektrické [27].

Důležitým krokem při hodnocení bezpečnosti a účinnosti KP je právě hodnocení kožní penetrace. Měření může probíhat *in silico*, *in vitro*, *ex vivo* a *in vivo*. Často jsou využívány kombinace více z těchto zmíněných možností. *In silico* využívá počítačové a matematické modely. *Ex vivo* metody jsou prováděny na živočišných tkáních, které již nejsou součástí organismu, jsou tedy tzv. mimo tělo. Z *in vitro* metod je nejznámější metoda Franzových difuzních komůrek známá již od roku 1978. Systém (Franzova komůrka) se skládá z horní donorové a dolní receptorové části, které jsou od sebe odděleny permeabilní membránou, na kterou je aplikován vzorek směrem k donorové části. Součástí dolní části je pufr, který je v průběhu měření míchán a v předem daných časových intervalech jsou odebírány jeho

vzorky, které jsou následně analyzovány. V dnešní době existuje spoustu modifikovaných Franzových komůrek. Další jsou *in vivo* studie, které jsou pro zkoumání kůže preferovány a od roku 2013 je lze za pomoci neinvazivních metod provádět na lidských dobrovolnících Jejich velkou nevýhodou je složité porovnávání výsledků mezi jedinci. Dále jsou často využívány zobrazovací metody jako například konfokální mikroskopie nebo multifotonová laserová skenovací tomografie (MPT). Využíváno je také stripování, což je jednoduchá metoda, která je velmi málo invazivní. Další využívané *in vivo* metody mohou být vasokonstrikční test či mikrodialýza [27].

4.2.1 Měření hydratace

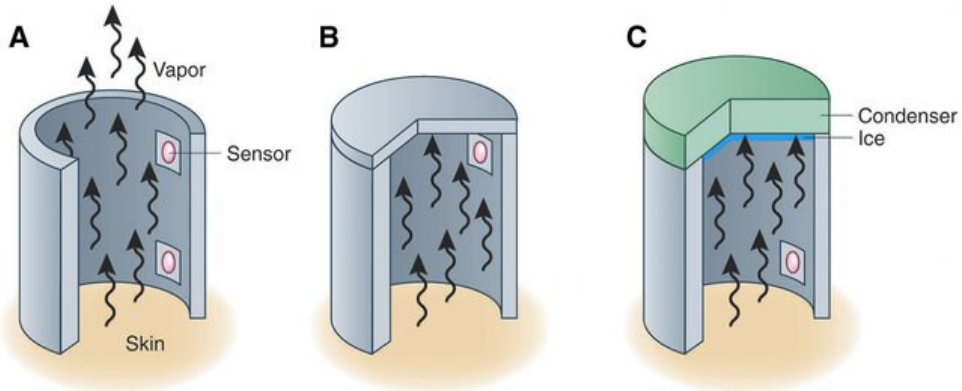
Pojmy hydratovaná či suchá pokožka jsou poměrně špatně definovatelné, lze ji ale rozpoznat již při pohledu na kůži. Pokud bude kůže suchá, bude se jevit jako, že jí schází voda, bude působit zašedle a šupinatě. Při hodnocení hydratace či suchosti je nutná reprodukovatelnost výsledků a statistická kontrola. Při klinických studiích je tedy nutné velké množství dobrovolníků. Důležitou součásti je také standardizace podmínek jako je například teplota a relativní vlhkost místnosti, ve které měření probíhá. Dále volba vhodné skupiny dobrovolníků s téměř totožnými charakteristikami jako je věk, etnicita, pohlaví, typ pokožky atd. Důležitá je také aklimatizace dobrovolníků minimálně 20 minut před samotným měřením. Mimo klinické studie jsou v dnešní době také často používány bioinženýrské metody. Může se jednat o metody přímé či nepřímé. Jsou aplikovány spektroskopické metody, měření mechanických vlastností kůže, nukleární magnetická rezonance (NMR) a dále například topografie povrchu kůže. Využívaná je korneometrie. Jedná se o metodu, kterou lze exaktně zjistit množství vody v SC. Nástrojem je korneometr, což je sonda, která je přikládána na pokožku. Součástí hlavice sondy jsou zlaté drážky, nad nimi je skleněná vrstva. Po přiložení je skleněná část v kontaktu s kůží a díky zlatým drážkám je vytvářeno elektrické pole, které prostupuje skrz kůži, kde měří změnu kapacitance dielektrika. S rostoucí hydratací se mění dielektrické vlastnosti. Měření je založeno na skutečnosti, že voda má vyšší dielektrickou konstantu než většina ostatních látek. Princip měření hydratace korneometrem je zobrazena na Obr. 4 [25] [26] [28].



Obrázek 4 Schéma korneometrického měření hydratace [28]

4.2.2 Měření transepidermální ztráty vody

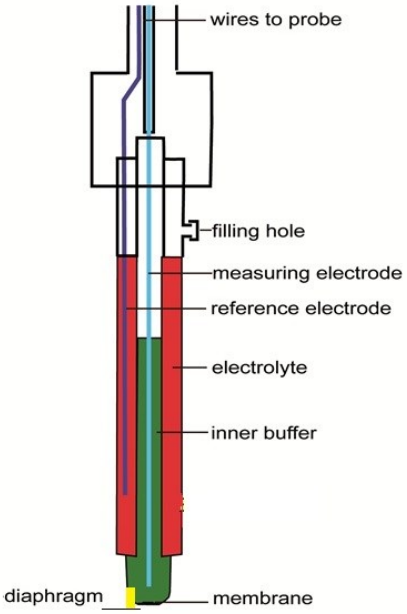
Transepidermální ztráta vody je ukazatelem funkčnosti SC jako bariéry. Jedná se o množství vody, které není spojeno s aktivním pocením. Pro její měření je možné využít mnoho metod, například metodu uzavřené komory, metodu ventilační komory či metodu otevřené komory. Jsou založené na hodnocení gradientu vodního tlaku nad povrchem kůže. Sonda obsahuje senzory relativní vlhkosti a teploty. Tewametr měří hustotní gradient odpařování vody za pomoci těchto senzorů umístěných v otevřené komůrce. Metody měření TEWL jsou schematicky znázorněny na Obr. 5 [27] [29].



Obrázek 5 Schéma měření TEWL, A = metoda otevřené komory, B = metoda uzavřené komory, C = metoda kondenzační komory [30]

4.2.3 Měření pH

Kyselé pH pokožky je nutné z důvodu ochrany před mikroorganismy a chemikáliemi (např. tenzidy – sodium lauryl sulfate). Je nedílnou součástí ochranné bariéry kůže a při posunutí pH hodnoty může dojít ke kožním komplikacím. Ovlivňuje například složení lipidů v SC a následně tak hydrataci. Zajišťuje vhodné prostředí pro funkci enzymů. Podporuje také opravný proces bariérové funkce. Hodnoty pH se lehce mění v závislosti na denní době, ročním období a na různých místech na těle. Uváděné hodnoty ideálního pH se pohybují mezi hodnotami 4,5–6. Jsou ovlivňovány ekrinními, mazovými a potními sekrety, hydratací, genetickými predispozicemi, pohlavím a věkem. Jeho měření je důležité z hlediska kontroly správné bariérové funkce. Používané metody jsou velmi jednoduché a rychlé. Potenciometrické měření pH je založeno na elektromotorickém napětí galvanického článku tvořeného dvěma elektrodami. První elektroda je srovnávací, jejíž konstantní elektrodový potenciál je známý. Nejčastěji je využívána argentochloridová elektroda. Druhá elektroda je měrná a závisí právě na pH neboli na aktivitě protonů. Tato elektroda bývá nejčastěji skleněná. Je naplněna roztokem o známém a konstantním pH, pufrem. Při kontaktu se vzorkem vzniká mezi stěnami skleněné elektrody potenciálový rozdíl, jehož velikost je mírou rozdílu pH vzorku a vnitřního roztoku. Elektrody a další součásti pH metru jsou vyobrazena viz Obr. 6 [27] [31].



Obrázek 6 Popis součástí pH metru [31]

4.3 Senzorická analýza

Senzorické testování produktů provádí spotřebitelé KP na denní bázi. Nevědomky je hodnocena vůně, viskozita, obal, pocit po použití apod. a nakupovány jsou pouze produkty, které jsou pro spotřebitele senzoricky příjemné. Jako hodnotící metoda by měly senzorické testy poskytnout platné a spolehlivé výsledky, díky kterým mohou být prováděny různé změny, například při jejich vývoji a výrobě. V dnešní době existují vyškolení hodnotitelé, díky kterým jsou dostupná spolehlivá data. Senzorické dotazníky jsou často součástí klinických studií, kde slouží jako ukazatel spotřebitelského pohledu [25].

Senzorické hodnocení je vlastně statistickou metodou, jedná se tedy o odhad. Zahrnuje různé možnosti testování jako například rozlišovací zkoušky, pořadové zkoušky nebo hodnocení využívající stupnice. Rozlišovací zkoušky slouží ke stanovení, zda existuje mezi dvěma vzorky statisticky významný rozdíl ve sledovaném senzorickém znaku. U rozlišovacích zkoušek je nutná odpověď, hodnotitelů by mělo být v rozmezí od 10 do 30 a měli by mít stejný stupeň proškolení. Rozlišovací zkoušky zahrnují párovou porovnávací zkoušku, test duo-trio a trojúhelníkovou zkoušku. Pořadové zkoušky slouží k roztřídění skupiny vzorků. Řazení může probíhat na základě intenzity, sledovaného senzorického znaku nebo dle preference hodnotitelů. Stupnicové zkoušky jsou složitější a nejsou velmi vhodné pro nezaškolené hodnotitele. Hodnotící metody jsou různé. Může se jednat o hodnocení jednoho znaku u jednoho výrobku, srovnávaní dvou kategorií jednoho znaku nebo více kategorií jednoho znaku, srovnávání znaku dvou a více výrobků (Wilcoxonův oboustranný a jednostranný test) nebo dokonce srovnání dvou a více znaků dvou a více výrobků [32] [33].

Základem pro všechna senzorická hodnocení je správné prostředí. Musí se jednat o místo oproštěné od zvukových a čichových vjemů. Každý hodnotitel musí mít svou hodnotící kóji, kde není nikterak rušen. Pokud nejsou kóje k dispozici, neměli by hodnotitelé sedět alespoň naproti sobě. Místnost a kóje by měli být v neutrálních barvách s dostatečným přístupem denního světla. Další součástí by měla být čekací místnost s pohodlným posezením v blízkosti hodnotící místnosti. Důležitým faktorem je také klima v místnosti. Teplota by se měla pohybovat mezi 20 až 22 °C. Relativní vlhkost v rozmezí od 50 do 55 %. Místnost by měla být dostatečně odvětrávána a měla by být oproštěna od čichových vjemů. V blízkosti hodnotícího prostředí je nutný také jistý přípravný prostor, do kterého ale nesmí mít vstup hodnotitelé. Vzorky by měly být označeny určitým kódem, který není hodnotitelům známý [32].

4.4 Viskozita

Reologie je vědním oborem, který zkoumá a popisuje deformaci a chování v toku. Materiály, které jsou zkoumány mohou být různé, vždy se ale jedná o tekutinu, tedy o kapalinu či plyn. Každý vzorek lze popsat jako ideálně viskózní, ideálně elastický nebo jako viskoelastický, který vykazuje jisté viskózní i elastické chování. Viskozitu lze popsat jako odpor toku způsobený vnitřním třením. Souvisí s faktem, že všechny kapaliny jsou složeny z molekul, které jsou při pohybu nuceny se po sobě posouvat. Čím větší jsou molekuly nebo částice, tím vyšší je také viskozita. Viskozitu η lze popsat Newtonovým zákonem (3), který popisuje vztah mezi smykovým napětím τ a rychlostí smykové deformace $\dot{\gamma}$.

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \tag{3}$$

kde

η – dynamická viskozita [Pa·s]

τ – smykové napětí [Pa]

$\dot{\gamma}$ – rychlost smykové deformace [s^{-1}]

Takto je popisována tzv. dynamická viskozita. Pokud je dynamická viskozita vztažena na hustotu, hovoří se o kinematické viskozitě ν, která je definována vztahem (4):

$$\nu = \frac{\eta}{\rho} \tag{4}$$

kde

ν – kinematické viskozita [$m^2 \cdot s^{-1}$]

η – dynamická viskozita [Pa·s]

ρ – hustota [$kg \cdot m^{-3}$]

Pokud lze tekutiny popsat Newtonovým zákonem, označují se jako newtonské. Pokud nikoliv, jedná se o látky s nenewtonským chováním. Tyto tekutiny nevykazují přímo úměrnou závislost rychlosti smykové deformace na smykovém napětí. Takovéto tekutiny lze rozdělit do tří skupin. U pseudoplastických tekutin viskozita s rychlostí smykové deformace klesá, u dilatantních naopak roste. Třetí skupinou jsou binghamské kapaliny, které tečou až po překonání určité prahové hodnoty napětí. Dalším možným dělením je dle časové závislosti na tixotropní a reopexní (reopektické). U tixotropních tekutin viskozita klesá s dobou působení napětí, u reopexních tekutin naopak viskozita stoupá [34] [35].

Metod měření viskozity je velké množství. Existují základní a velice jednoduché, ale také metody velice sofistikované a složité. Z jednoduchých lze zmínit testy za pomoci špachtle či prstu, při které je výsledek hodnocen pouze slovně jako hutný, řídký, pevný, hustý apod. Dále jsou používány průtokové pohárky, u kterých je měřen čas průtoku definovaného množství nízko-viskózních tekutin. Další možností je měření metodami padající kuličky či mikrokuličky. Využívány jsou také skleněné kapilární viskozimetry, rotační viskozimetry či oscilační reometry. Velmi často používané jsou právě rotační viskozimetry. Mohou být využívány spindly nebo další měřící systémy či geometrie. Každý spindl nese své označení a je vhodný pro určité rozmezí viskozit. Z geometrií lze zmínit systémy válec-deska, deska-deska či válec-válec [34] [35].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo popsat kolagen jako surovinu v průmyslu, jeho vlastnosti a aplikace. Dále byla práce zaměřena na kolagenní hydrolyzát, zdroje a možnosti jeho přípravy, také jeho aplikace, především pak ty kosmetické.

V praktické části připravit kolagenní hydrolyzát ze tří různých živočišných zdrojů, kuřecích žaludků, jeleních šlach a odpadu z kapra, za využití metody enzymatické hydrolýzy. Tento charakterizovat vybranými metodami a následně jej aplikovat do různých kosmetických vehikul. U takto připravených vzorků provést jejich základní charakterizaci a testování jejich mikrobiologické bezpečnosti.

6 METODIKA

6.1 Použité přístroje

- analytické váhy ALS 250–4A (Kern, Německo), SBC 32 (SCALTEC, Německo),
- laboratorní váhy EW 420–3NM (Kern, Německo)
- předvážky
- pH metr 526 (WTW, Německo)
- vertikální mixér 0010 Nová linie (ETA, ČR)
- kávový mlýnek TSM6A011W (Bosch, Německo)
- třepačka HS 501 (IKA, Německo)
- topná sestava s míchadlem C–MG HS7 (IKA, Německo)
- spektrofotometr Helios (Thermo Fisher Scientific, USA)
- centrifuga EBA 20 (Hettich, Německo)
- sušárna ULP 400 (Memmert, Německo), E28-TB1(Binder, Německo), VENTICELL 200I (MMM Medcenter, Německo)
- muflová pec L9/11 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- FTIR Alpha II (Bruker, Rakousko)
- magnetická míchačka s ohřevem MR Hei–Standard (Heidolph Instruments, Německo)
- vpichový pH metr PH60S-Z (Apera Instruments, USA)
- biohazard box EUROFLOW (Schoeller Instruments, ČR)
- spiral plater EDDY JET W2 (IUL Instruments, Španělsko)
- automatické počítadlo kolonií Sphere Flash (IUL Instruments, Španělsko)
- mikrobiologický inkubátor (Memmert, Německo)
- termostat BIO BT 120 (laboratorní přístroje Praha, ČR)
- vortexový mixér VX–200 (Labnet International, USA)

- densilometr Densi–LA–Meter II (Erba Lachema, ČR)
- MPA 10 (Courage & Khazaka electronics, Německo)
- korneometr CM 825 (Courage & Khazaka electronics, Německo)
- skin pH metr 905 (Courage & Khazaka electronics, Německo)
- tewametr TM 300 (Courage & Khazaka electronics, Německo)
- rotační viskozimetr Myr V2–L (Viscotech Hispania, Španělsko)
- tenziometr EasyDyne K20 (Krüss, Německo)
- Drop Angle Meter DM 300 (Courage & Khazaka electronics, Německo)
- HPLC Breeze 2414 s diferenciálním refraktometrem (Waters, USA)

6.2 Použité pomůcky

- laboratorní sklo
- lžičky
- síta
- plechy
- PA tkaniny
- hrnce
- PET láhve
- plynový kahan
- lednička s mrazničkou Samsung
- exsikátor
- laboratorní kleště
- žíhací kelímky
- kovové misky
- sterilní Petriho misky – plastové o velikosti 90 × 15 mm
- sterilní mikrozkumavky Eppendorf

- automatické mikropipety Thermo o objemu 100–1000 µl a 20–200 µl
- sterilní pipetovací špičky o objemu 1000 a 200 µl
- sterilní očkovací kličky
- sterilní plastové zkumavky pro měření na densilometru
- sterilní skleněné zkumavky
- sterilní kalíšky
- bezdrátový mini mixér NORPRO
- elastické náplasti z netkaného textilu Elastpore Batist
- plastové hokejky
- filtrační papír
- injekční stříkačky
- spindly L3, L4, PC, PE, PF pro měření viskozity
- Wilhelmyho destička PL21 pro měření povrchového napětí

6.3 Použité chemikálie

- destilovaná voda
- NaCl (Lach-Ner s. r. o., ČR)
- HCl (Ing. Petr Lukeš, ČR)
- NaOH (Sigma Aldrich, Německo), (Penta, ČR)
- petrolether/ethanol 1:1 (Ing. Petr Lukeš, ČR)
- enzym Protamex (BIOTECH s. r. o., Slovensko)
- DPPH (MedChem Express, USA)
- karbomer (Polygel CA, Sigma Aldrich, Německo)
- methylaparaben (Methyl 4-hydroxybenzoate, Labicom s.r.o., Olomouc)
- propylparaben (Propyl 4-hydroxybenzoate, Labicom s.r.o., Olomouc)

- BIO – bambucké máslo (www.nature-store.cz, INCI: Butyrospermum Parkii Butter, Ghana)
- BIO – kakaové máslo (www.nature-store.cz, INCI: Theobroma Cacao (Cocoa) Seed Butter, odrůda Criollo, Peru)
- včelí vosk (Kosmetické suroviny, ČR)
- mandlový olej, rafinovaný (Milan Libich, ČR)
- ricinový olej (Kosmetické suroviny, ČR)
- olivoil (INCI: Potassium Olivoyl Hydrolyzed Avena Protein, Cetearyl Alcohol, Glyceryl Oleate, Glyceryl Stearate, Potassium Hydoxide, Kosmetické suroviny, ČR)
- glycerol (Kosmetické suroviny, ČR)
- Dermosoft 1388 ECO (INCI: Aqua, Glycerin, Sodium Levulinate, Sodium Anisate, Evonik Dr. Straetmans GmbH, Německo)
- ethanol 96 % (VWR, Francie)
- sterilní fyziologický roztok (0,9 % NaCl, LACH–NER s.r.o., ČR)
- Plate Count Agar (HiMedia Laboratories, Indie)
- Chloramphenicol Yeast Glucose Agar (HiMedia Laboratories, Indie)
- Nutrient agar (HiMedia Laboratories, Indie)
- Agar Agar, Typ I (HiMedia Laboratories, Indie)
- Dodecylsulfát sodný (SDS, Sigma Aldrich, ČR)

6.4 Použité mikroorganismy

- *Pseudomonas aeruginosa*

6.5 Příprava bílkovinných produktů z tkání bohatých na kolagen

Pro praktickou část diplomové práce byly připravovány kolagenní hydrolyzáty ze tří různých surovin (kuřecí žaludky, jelení šlachy a rybí odpad). Příprava kuřecího hydrolyzátu se skládala ze 2 hlavních kroků, a to přípravy čistého kolagenu a extrakce hydrolyzátu. Stejně probíhalo i zpracování jeleních šlach. Příprava kolagenního hydrolyzátu z rybího odpadu byla navíc doplněna o krok demineralizace.

6.5.1 Příprava čistého kolagenu

Zmražená surovina (kuřecí žaludky, jelení šlachy, rybí odpad) byla nejprve ponechána při laboratorní teplotě 22 ± 1 °C k rozmrazení. Dále byla surovina vysypána na sítko a promývána studenou vodou z vodovodního řadu po dobu cca 2 minut za účelem odstranění albuminů. Následně byla ponechána ponořena ve studené vodě po dobu 5 minut a poté opět 2 minuty promývána studenou vodou z vodovodního řadu na sítku. Dalším krokem bylo opracování v roztoku NaCl o koncentraci 0,2 M, a to z důvodu odstranění globulinů. Potřebné množství NaCl pro 0,2M roztok bylo vypočítáno dle následujícího vzorce (5):

$$m = M \cdot c \cdot V \tag{5}$$

kde:

m – navážka [g]

M – molární hmotnost [g·mol^{-1}]

c – koncentrace výsledného roztoku [mol·l^{-1}]

V – objem výsledného roztoku [l]

Navážením 23,4 g NaCl a jeho rozpuštěním ve 2 l demineralizované vody byl připraven 0,2M roztok NaCl. Surovina byla s roztokem smíchána v poměru 1:6 a mírně třepána na třepačce HS 501 (IKA) při 50–60 kmitech za minutu po dobu 1,5 hodiny při laboratorní teplotě 22 ± 1 °C. Poté byla surovina promývána studenou vodou z vodovodního řadu na sítu cca minutu. Po opracování solí byla surovina opracovávána hydroxidem, a to 0,06M roztokem NaOH, který byl připraven navážením 4,8 g NaOH a rozpuštěním ve 2 litrech demineralizované vody. Výpočet navážky NaOH byl proveden dle vztahu (5). Surovina byla s roztokem hydroxidu smíchána opět v poměru 1:6 a byla ponechána na třepačce HS 501 po dobu 6–8 hodin, třepána byla při 50–60 kmitech za minutu. Následně byla surovina promývána cca 5 minut na sítu vodou z vodovodního řadu a opět ponechána v poměru 1:6 s 0,2M roztokem hydroxidu na třepačce HS 501, tentokrát přes noc (cca 12 hodin) při

50–60 kmitech za minutu. Po opracování hydroxidem sodným byla surovina promývána na sítku s vrstvami polyamidové (PA) tkaniny, tak aby bylo odstraněno co největší množství roztoku hydroxidu. Poté byla surovina s co nejmenším množstvím vody rozprostřena v tenkých vrstvách na plechy a sušena v sušárně VENTICELL při 35 ± 1 °C po dobu 24–36 hodin. Další krok vedl k odtučnění suroviny pomocí směsi rozpouštědel petrolether a ethanol v poměru 1:1. Surovina byla se směsí rozpouštědel smísena v poměru 1:9 a při laboratorní teplotě 22 ± 1 °C byla třepána na třepačce HS 501 při 50–60 kmitech za minutu po dobu 6–8 hodin. Po promytí byla tato opět třepána na třepačce HS 501 při 50–60 kmitech za minutu, po dobu cca 12 hodin. Po ukončení odtučňování byla surovina rozprostřena na plechy a v digestoři ponechána k odpaření rozpouštědel přes noc. Poté byla surovina (čistý kolagen) rozemleta na vertikálním mixéru ETA 0010 a dále byla skladována v sáčku při teplotě 22 ± 1 °C.

6.5.2 Demineralizace

Demineralizace byla uplatněna pouze při přípravě hydrolyzátu z rybího odpadu, neprobíhala tedy při přípravě kolagenního hydrolyzátu z kuřecích žaludků a jeleních šlach.

Demineralizace hydrolyzátu z rybího odpadu byla provedena tak, že čistý kolagen připravený v předchozím kroku byl smíchán s HCl o koncentraci 1 % v poměru 1:10. Na třepačce HS 501 byla surovina třepána při 50–60 kmitech za minutu cca 24 hodin, poté byla kyselina vyměněna za nově připravený 1% roztok HCl opět v poměru 1:10 se surovinou a pokračovalo se v třepání za stejných podmínek po dobu dalších 24 hodin. Následně byla surovina promyta vodou z vodovodního řadu na sítu s tkaninou. Dále rozprostřena v tenkých vrstvách na plechy a sušena v sušárně při 35 ± 1 °C po dobu 24–36 hodin. Demineralizovaná surovina byla opět rozemleta na vertikálním mixéru ETA 0010 a ponechána po dobu maximálně 10 dnů k dalšímu zpracování.

6.5.3 Extrakce

Prvním krokem extrakce bylo opracování suroviny (čistého kolagenu) enzymem Protamexem a to tak, že surovina (čistý kolagen) byla smísena s demineralizovanou vodou v poměru 1:10 a třepána na třepačce HS 501 při 50–60 kmitech za minutu po dobu 20 minut. Následně bylo upravováno pH pomocí 1% a 10% roztoku HCl a 20% roztoku NaOH na hodnotu 6,5–7 a přidán proteolytický enzym Protamex v množství 0,15 % z množství vstupní suroviny (přepočteno na sušinu suroviny, která byla 90,2 %). Surovina byla s enzymem třepána po dobu 30 hodin při teplotě 22 ± 1 °C. Během 1. a 2. hodiny byla

provedena kontrola a úprava pH pomocí 10% roztoku HCl a 20% roztoku NaOH opět do oblasti hodnot 6,5–7. Po uplynutí 30 hodin třepání bylo pH pouze zkontrolováno, ale již se neupravovalo. Následovala filtrace přes sítko s PA tkaninou. Filtrát byl jímán do kádinky a ihned zahříván na teplotu 85 ± 1 °C, která byla následně udržována po dobu 10 minut. Po zahřátí byl filtrát rozlit na plechy a filmy byly sušeny v sušárně ULP 400 při 60 ± 1 °C po dobu 1,5–2 dnů, čímž vznikl pevný film. Po vysušení byl film rozemlet pomocí kávového mlýnku TSM6A011W, zvážen a ponechán v uzavíratelném sáčku k dalšímu využití. Surovina zachycená na sítku s tkaninou byla promývána cca 2 minuty pod vodou z vodovodního řadu. Dále byla tato smíchána s 0,06M roztokem NaOH v dostatečném přebytku (v cca dvojnásobném množství oproti surovině) a intenzivně třepána na třepačce HS 501 při cca 100 kmitech za minutu po dobu 10 minut. Dále byla surovina přefiltrována přes sítko s tkaninou, promyta vodou z vodovodního řadu a opět intenzivně třepána v přebytku 0,06M hydroxidu po dobu 10 minut. Následovalo důkladné promývání suroviny na sítku pod vodou z vodovodního řadu pro odstranění hydroxidu. Dále byla surovina smíchána s přebytkem studené vody z vodovodního řadu a intenzivně třepána na třepačce HS 501 při cca 100 kmitech za minutu po dobu 10 minut. Následně opět promývána studenou vodou z vodovodního řadu, třepána na třepačce HS 501 při cca 100 kmitech za minutu a finálně promývána vodou z vodovodního řadu. Surovina zbavená vody byla přesypána do kádinky a smísena s demineralizovanou vodou v poměru 1:8 (počítáno z množství vstupní suroviny – čistého kolagenu). Byla zaznačena hladina vody a obsah kádinky byl za stálého míchání zahříván na teplotu 62,5 ± 1 °C. Při této teplotě byla po dobu 90 minut extrahována z kolagenu želatina. Následovala filtrace přes síto s tkaninou a opětovné zahřívání zachycené tekutiny na teplotu 85 ± 1 °C. Tato teplota byla udržována po dobu 10 minut. Želatinový roztok byl následně odstřeďován na odstředivce XY při 4000 otáčkách za minutu po dobu 4 minut. Vrchní část roztoku byla rozlita na plechy a ponechána v sušárně při 53 ± 1 °C po dobu 24–36 hodin. Vzniklé filmy byly následně rozemlety na kávovém mlýnku TSM6A011W, zváženy a ponechány v uzavíratelném sáčku ve tmě při laboratorní teplotě do doby dalšího zpracování. Spodní vrstva po odstředění byla tvořena drobnými částečkami nerozloženého podílu a pigmentu. Zbylá surovina na sítku byla sušena při 103 ± 1 °C přes noc a jednalo se o nerozložený podíl reakce.

6.5.4 Účinnost extrakce a bilanční chyba

Hodnota účinnosti extrakce (η) zjišťuje efektivitu výrobního procesu a je vypočítána dle následujícího vztahu (6):

$$\eta = \frac{x}{s} \cdot 100\ (\%) \tag{6}$$

x – hmotnost výstupní suroviny v sušině (kolagenních produktů) [g]

s – hmotnost vstupní suroviny (čistého kolagenu) [g]

K celkové účinnosti extrakce byla zjištěna bilanční chyba. Bilanční schéma (7) je následující:

$$m_{vstup} = m_{výstup} \tag{7}$$

Vstupní hmotnost zahrnuje odtučněné a vysušené suroviny (čistý kolagen připravený v prvním kroku přípravy hydrolyzátu). Výstupní hmotnost je součtem hmotností hydrolyzátu, želatiny (kolagenních produktů) a nerozloženého podílu.

Pro celkovou bilanci (B) platí: $$B = \frac{výstup}{vstup} \cdot 100\ (\%) \tag{8}$$

Pro bilanční chybu (BCH) platí: $$BCH\ (\%) = 100 - B \tag{9}$$

6.6 Charakterizace kolagenních hydrolyzátů

V této kapitole budou popsány postupy, kterými byly připravené kolagenní hydrolyzáty (KH) charakterizovány. Jedná se o metody, kterými se může hodnotit, jak se od sebe jednotlivé hydrolyzáty liší a v čem jsou naopak velmi podobné.

6.6.1 Stanovení obsahu sušiny a popelovin

Nejčastější charakterizací hydrolyzátů je stanovení obsahu sušiny a popelovin. Obsah sušiny slouží k prostému vyčíslení obsaženého množství vody a obsahem popelovin je stanoveno množství anorganických, a tedy nerozpustných složek hydrolyzátu.

Stanovení obsahu sušiny bylo prováděno v koželužských miskách dvakrát vedle sebe. Do dvou misek bylo naváženo vždy cca 1,3 g hydrolyzátů od každého ze vzorků. Následně byly

vzorky ponechány přes noc v sušárně při teplotě 103 ± 1 °C. Poté byly umístěny v exikátoru ke zchladnutí a váženy. Obsah sušiny bylo vypočítán dle vztahu (10):

$$S = \frac{m}{m_0} \cdot 100 \tag{10}$$

kde:

m – hmotnost vzorku po vysušení [g]

m_0 – hmotnost vzorku před sušením [g]

S – obsah sušiny ve vzorku [%]

Stanovení obsahu popelovin bylo prováděno dvakrát vedle sebe navážením cca 1,2 g z každého vzorku hydrolyzátu do žíhacích kelímků. Vzorky byly nad kahanem spalovány a následně byly na 3 hodiny umístěny do muflové pece a byly žíhány při 650 ± 1 °C. Po zchladnutí byly kelímky zváženy a podle následujícího vztahu (11) byl vypočítán obsah popelovin.

$$P = \frac{m}{m_0} \cdot 100 \tag{11}$$

kde:

m – hmotnost vzorku po žíhání [g]

m_0 – hmotnost vzorku před žíháním [g]

P – obsah popelovin ve vzorku [%]

6.6.2 Čirost a pH roztoku

Stanovení čirosti a pH roztoku bylo prováděno u 6,67% roztoku všech vzorků hydrolyzátu v demineralizované vodě. Připravené roztoky byly v kyvetách umístěny do spektrofotometru Helios (Thermo Fisher Scientific) a byla měřena jejich transmitance při 640 nm, tedy množství světla, které projde vzorkem. Měřena byla vždy jedna hodnota pH pomocí pH metru.

6.6.3 Infračervená spektroskopie

Infračervená spektroskopie byla prováděna metodou zeslabené totální reflektance (ATR – attenuated total reflectance) s platinovým krystalem na přístroj FTIR Alpha II (Bruker). Měření bylo prováděno tak, že bylo nasypáno na krystal vhodné množství vzorku (cca 0,5 g), přitlačeno pomocí páky. Měřeno bylo vždy 32 skenů. Vlnočty se pohybovaly

v rozmezí od 4000 cm^{-1} do 400 cm^{-1}. Výsledkem byla spektra s píky, typickými pro hydrolyzáty či želatiny.

6.6.4 Gelová permeační chromatografie

Z každého vzorku hydrolyzátu byly vždy naváženy 2 mg, ty byly dále rozpuštěny v 10ml kádince v 1 ml mobilní fáze (výsledná koncentrace činila vždy 2 $mg \cdot ml^{-1}$). Dále byly v uzavřené vialce ponechány po dobu 4 hodin při teplotě 22 ± 1 °C. Následovala analýza na přístroji HPLC Breeze (Waters). Pro zjištění distribuce molekulových hmotností byla využita metoda gelové permeační chromatografie s refraktometrickou detekcí (GPC-RID). Následně softwarem Empower byly zpracovány naměřené výsledky.

Podmínky měření:

analytický přístroj: Waters HPLC Breeze, diferenciální refraktometr (Waters, model 2414)

analytická kolona: OHpak SB-806M HQ (300 x 8 mm, 13 μm) + OHpak SB-804 HQ

(300 x 8 mm, 10 μm)

mobilní fáze: 0,1M fosfátový pufr pH 6,8

teplota: laboratorní teplota 22 ± 1 °C (poškozený thermostat)

objem nástřiku: 100 μl

průtok: 1 $ml \cdot min^{-1}$

kalibrace: pomocí standardů pullulanu v rozsahu 667 – 344 000 $g \cdot mol^{-1}$.

6.6.5 Antioxidační aktivita

Antioxidační aktivita (AA) připravených vzorků hydrolyzátů byla měřena metodou DPPH, která využívá 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl jako antioxidační činidlo, a následným spektrofotometrickým stanovením. Stanovení probíhalo tak, že do 10ml kádinek byly připraveny roztoky o objemu 4 ml. Jednalo se o koncentrační řadu v rozmezí 2–10 $mg \cdot ml^{-1}$ pro každý hydrolyzát (kuřecí, jelení, kapří). Pro každý vzorek hydrolyzátu bylo připraveno 5 koncentrací lišících se o 2 $mg \cdot ml^{-1}$, celkem tedy bylo připraveno 15 roztoků. Vzorky byly připraveny rozpuštěním příslušných navážek v destilované vodě a následným zahřátím na cca 45 °C do úplného rozpuštění. Dále byl připraven 1 l 0,2 mM roztoku DPPH rozpuštěním navážky v 1 l odměrné baňce v 96% ethanolu. Následně byla měřena absorbance roztoku DPPH při 517 nm na spektrofotometru Helios (Thermo Fisher Scientific). Pro samotné

měření absorbance byly připraveny roztoky z každého jednoho roztoku koncentrační řady. Do 10 ml kádinek byl pipetován vždy 1 ml roztoku hydrolyzátu o dané koncentraci (2, 4, 6, 8 a 10 $mg \cdot ml^{-1}$), dále 1 ml 96% ethanolu a 0,25 ml 0,2 mM roztoku DPPH. Kádinky byly následně po dobu 30 minut uschovány ve tmě. Po uplynutí této doby byla pro každý vzorek měřena absorbance na spektrofotometru Helios při vlnové délce 517 nm. Z výsledných hodnot absorbance byla podle následujícího vztahu vypočítána antioxidační aktivita (12):

$$AA = \frac{A_{DPPH} - A_{vz}}{A_{DPPH}} \cdot 100\ (\%) \tag{12}$$

kde:

A_{DPPH} – absorbance 0,2 mM roztoku DPPH v ethanolu [-]

A_{vz} – absorbance vzorku s ethanolem a DPPH po 30 minutách [-]

6.6.6 Povrchové napětí

Povrchové napětí bylo měřeno na tenziometru EasyDyne K20 (Krüss) na vzorcích tří připravených hydrolyzátů. Z každého vzorku hydrolyzátu byly připraveny dvě koncentrace (0,5 a 1,5 %) o objemu 20 ml. Vzorky byly připraveny navážením příslušného hydrolyzátu a přidáním demineralizované vody do objemu 20 ml. Následně byly míchány a zahřívány na magnetické míchačce, dokud nebyl hydrolyzát řádně rozpuštěn a poté ponechán v lednici. Před samotným měřením byly vzorky roztoků hydrolyzátů vytaženy z lednice a ponechány cca hodinu při teplotě 22 ± 1 °C. Tenziometr byl nejprve zapnut, následně kalibrován na demineralizovanou vodu, jejíž povrchové napětí činilo 72,30 ± 0,02 $mN \cdot m^{-1}$. Do misky byl přelit vzorek roztoku příslušného KH a byla umístěn na tenziometr, Wilhelmyho destička byla opláchnuta demineralizovanou vodou a následně acetonem, vyžíhána a ponechána k vychladnutí, následně byla umístěna na háček tenziometru. Po ustálení destičky byla šroubem s posuvem miska se vzorkem přisunuta tak, aby byla destička co nejblíže k hladině vzorku. Bylo změřeno povrchové napětí. Z displeje byly následně zapsány hodnoty povrchového napětí, chyba měření a teplota. Pro každý vzorek byly měřeny dvě hodnoty povrchového napětí, ze kterých byl následně vypočítán aritmetický průměr. Mezi všemi měřeními byla vždy řádně opláchnuta a vyžíhána Wilhelmyho destička.

6.6.7 Kontaktní úhel

Měření kontaktního úhlu probíhalo na přístroji Drop Angle Meter DM 300 (Courage & Khazaka electronics), kterým je možné měřit kosmetické formulace přímo na kůži. Vzorky, které byly pro měření kontaktního úhlu použity byly stejné jako ty při měření povrchového napětí (viz kapitola 5.6.6). Nejprve probíhalo zkušební měření kapky. Nastavilo se tak místo, do kterého byla vždy kápnuta kapka vzorku. Vzorek byl dávkován v množství 40 µl. V software Drop Angle Meter (Courage & Khazaka electronics) byla nastavena kritéria měření a také v něm byla vyfocena kapka příslušného vzorku. Ta byla společně s výslednými kontaktními úhly uložena.

6.7 Příprava formulací s obsahem kolagenního hydrolyzátu

Pro aplikaci kolagenních hydrolyzátů do kosmetických formulací byly vybrány dva typy formulací, přesněji emulzní a gelové. Přídavky kolagenních hydrolyzátů ve formulacích byly v obsahu 0,5 a 1,5 % pro každý druh kolagenního hydrolyzátu. Připraveny byly také gelové i emulzní formulce bez přídavku KH, které sloužily jako kontrola. Celkem bylo tedy připraveno 14 kosmetických formulací. Jejich příprava probíhala odlišným způsobem, který bude popsána dále.

6.7.1 Příprava emulzních formulací

Složení emulzních formulací je uvedeno viz Tab. 1. Prvním krokem bylo navážení jednotlivých tukových surovin do kovové misky a jejich umístění do vodní lázně, dokud nedošlo k jejich rozpuštění (cca 55 °C). Dále byly do kádinky o objemu 100 ml naváženy ostatní suroviny, které tvořily fázi vodnou a ty byly následně umístěny na magnetické míchadlo s ohřevem. Když dosáhla teplota rozpuštěných směsí 60 ± 1 °C, byla vodná fáze přimíchávána k tukové za stálého míchání ručním mini mixérem, dokud nedošlo ke zchladnutí celé emulze. Celkově byly emulze připravovány v navážce 100 g. Emulze byly následně přemístěny do uzavíratelných plastových kelímků a ponechány v lednici.

Tabulka 1 Rámcové složení emulzní formulace

surovina	obsah [%]
mandlový olej	10
bambucké máslo	4
včelí vosk	2
kakaové máslo	2
ricinový olej	2
olivoil	8
glycerol	4
dermosoft	2
methylparaben	0,2
propylparaben	0,1
kolagenní hydrolyzát	0,5/1,5
voda	ad 100

6.7.2 Příprava gelových formulací

Příprava gelových formulací se od přípravy formulací emulzních lišila. Rámcové složení všech gelových formulací je uvedeno v Tab. 2 a celková navážka činila 100 g. Příprava formulací s přídavkem kuřecího KH probíhala tak, že navážený karbomer (Polygel CA) byl ponechán s 60 % demineralizované vody v kádince o objemu 250 ml po dobu 24 hodin k dostatečnému nabotnání. Po 24 hodinách byla ke karbomeru přidána zbylá část demineralizované vody s rozpuštěným kolagenním hydrolyzátem, methylparabenem a propylparabenem. Tato směs byla promíchána tyčinkou a po kapkách k ní byl přidáván 5% roztok hydroxidu sodného. V průběhu přidávání roztoku hydroxidu sodného byly vpichovým pH metrem pozorovány změny v hodnotách pH. Přídavkem hydroxidu sodného došlo k posupnému tuhnutí gelu, dochází k síťování řetězců karbomeru vlivem zvyšujícího se pH. Po přidání veškerého roztoku NaOH byly formulace promíchány, bylo změřeno jejich pH pomocí vpichového pH metru a byly přemístěny v uzavíratelných plastových kelímcích do lednice. Postup s přídavky jeleního a kapřího hydrolyzátu byl odlišný z důvodu tvorby sraženin při dodržení postupu pro kuřecí KH. Při přípravě gelových formulací s přídavkem jeleního a kapřího KH byl navážen karbomer společně s KH a byl ponechán botnat po dobu 24 hodin s celým obsahem vody. Po 24 hodinách byly ke směsi přidány oba parabeny, směs byla promíchána a po kapkách k ní byl přidáván roztok hydroxidu do hodnot pH cca 6. V průběhu byly pozorovány změny pH pomocí vpichového pH metru. Vyrobené gelové formulace pak byly v uzavíratelných plastových kelímcích uschovány v lednici.

Tabulka 2 Rámcové složení gelové formulace

surovina	obsah [%]
polygel CA	0,6
methylparaben	0,2
propylparaben	0,1
kolagenní hydrolyzát	0,5/1,5
5% roztok NaOH	3
voda	ad 100

6.8 Charakterizace kosmetických formulací k obsahem kolagenního hydrolyzátu

Připravené kosmetické formulace s obsahem kolagenního hydrolyzátu byly testovány z hlediska mikrobiologického, dále dle účinků na kůži pozorovaných na volární straně předloktí u dobrovolníků, podle svých senzorických vlastností, viskozity a antioxidační aktivity.

6.8.1 Příprava fyziologického roztoku pro mikrobiologické testování

Fyziologický roztok byl připraven navážením 3,6 g NaCl do skleněné infuzní láhve o objemu 500 ml, doplněním demineralizované vody do objemu 400 ml. Láhev s povoleným víčkem byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

6.8.2 Příprava živných půd pro mikrobiologické testování

PCA půda byla připravena navážením 9,4 g Plate Count Agar do 500 ml skleněné láhve, doplněním destilované vody do objemu 400 ml. ChYGA byla připravena navážením 16 g Chloramhenicol Yeast Glucose Agar do 500 ml skleněné láhve, doplněním destilované vody do objemu 400 ml. Nutrient Agar byl připraven navážením 5,2 g Nutrient Broth a 6 g Agar Agar do 500 ml láhve a doplněním do objemu 400 ml destilovanou vodou. Uzavřené láhve byly autoklávovány a po vychladnutí na cca 60 °C byly nalévány na plastových Petriho misek, které byly po zatuhnutí uchovávány v lednici dnem vzhůru.

6.8.3 Mikrobiologické testování

Testování bylo rozděleno do dvou částí. První z nich bylo stanovení celkového počtu mikroorganismů (MO). Stanovení probíhalo tak, že jednotlivé vzorky emulzních i gelových formulací byly desítkově naředěny navážením 0,1 g vzorku do eppendorfovy zkumavky a poté bylo přidáno 900 µl fyziologického roztoku. Eppendorfovy zkumavky byly následně 4 minuty homogenizovány na vortexovém mixéru VX-200 při 3000 ot/min. Celý obsah eppendorfových zkumavek byl napipetován do sterilních kalíšků pomocí mikropipety. Tato suspenze byla následně dávkována pomocí Spiral Plateru (IUL Instruments) na dva druhy agarů, PCA – Plate Count Agar, který slouží ke sledování CPM (celkového počtu mikroorgasnimů), a ChYGA – Chloramphenicol Yeast Glucose Agar, na kterých je sledován počet kvasinek a plísní. Každý vzorek krému i gelu byl dávkován na dvě Petriho misky pro reprodukovatelnost výsledků. Kultivace Petriho misek s PCA agarem probíhala po dobu 48 hodin v termostatu BIO BT 120 při 30 ± 1 °C. Petriho misky s ChYGA agary byly kultivovány po dobu 5 dní při 25 ± 1 °C.

Druhým testem bylo přežívání bakterie *Pseudomonas aeruginosa* v připravených KP. Do sterilní zkumavky bylo naváženo 5 g vzorku, přidáno 50 µl připravené suspenze *P. aeruginosa* o hustotě $1{,}5 \cdot 10^8$ CFU/g a bylo asepticky homogenizováno. Následně bylo z každého vzorku ihned provedeno kultivační stanovení počtu životaschopných buněk. Vlastní stanovení probíhalo obdobně jako u výše popsaného stanovení CPM, tedy bylo odebráno cca 0,1 g do eppendorfovy zkumavky a bylo přidáno 900 µl fyziologického roztoku, homogenizováno na vortexovém mixéru VX-200 při 3000 ot/min po dobu 4 minut, inokulováno pomocí Spiral Plateru na půdy s Nutrient agarem. Každý vzorek krému i gelu byl dávkován na dvě Petriho misky pro reprodukovatelnost výsledků. Kultivace probíhala v termostatu Memmert při 37 ± 1 °C po dobu 24 hodin. Pro vyhodnocení počtu kolonií byl použit přístroj Sphere Flash (IUL Instruments), pokud byl počet kolonií nízký byly počítány pouhým okem. Vzorky inokulované bakterií *Pseudomonas aeruginosa* byly uschovávány při laboratorní teplotě a stanovení životaschopných bakterií bylo opakováno po 14 a po 60 dnech.

Všechny výsledné počty kolonií byly podle následujícího vztahu (13) přepočítány na jednotky CFU/g:

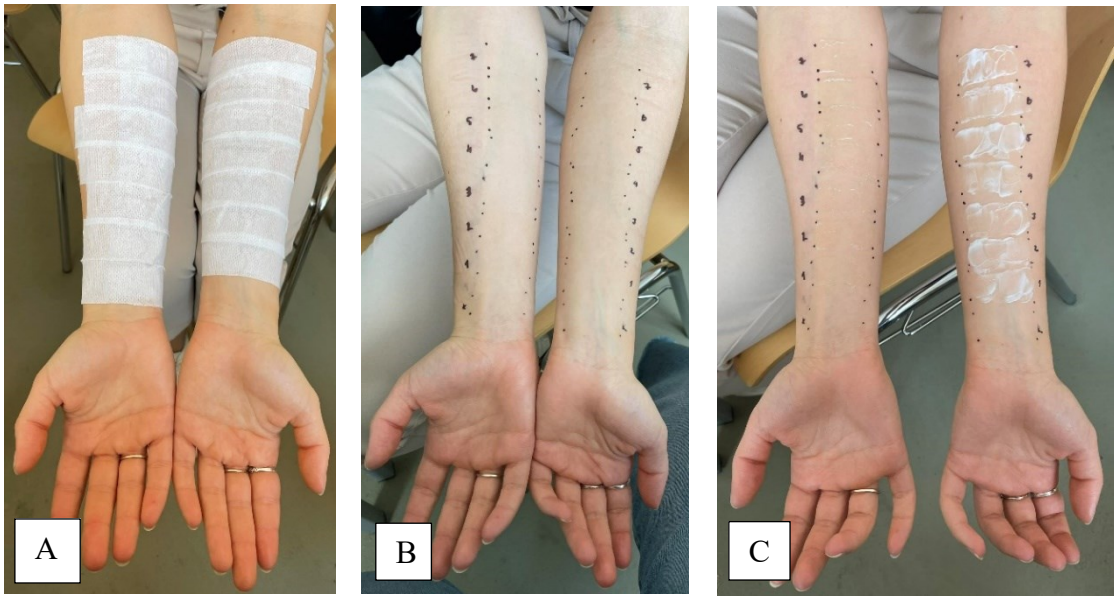
$$CFU/g = \frac{počet\ kolonií}{ředící\ faktor \times objem\ kultury\ [ml]} \tag{13}$$

6.8.4 Příprava fyziologického roztoku a 0,5% roztoku SDS pro *in vivo* měření

Fyziologický roztok byl připraven navážením 2,25 g NaCl, kvantitativním převedením do 250 ml odměrné baňky a doplněním po rysku demineralizovanou vodou. Následně bylo naváženo 1,25 g SDS, rozpuštěno v malém množství fyziologického roztoku, kvantitativně převedeno do 250 ml odměrné baňky a doplněno demineralizovanou vodou po rysku.

6.8.5 *In vivo* měření kosmetických formulací

Účinek připravených emulzních i gelových formulací s přídavkem KH na hydrataci, transepidermální ztrátu vody a pH byl zjišťován na skupině dobrovolníků. Soubor dobrovolníků byl tvořen 8 ženami ve věkovém rozmezí 24,1 ± 1,4 let. Před začátkem měření byly všechny dobrovolnice seznámeny s průběhem experimentu a s možnými riziky, vyplnily dotazník (Příloha I) zjišťující jejich zdravotní stav a podepsaly individuální informovaný souhlas (Příloha II). Měření probíhalo v klimatizované místnosti při teplotě 24 ± 1 °C a relativní vlhkosti 37 ± 4 % po dobu tří dnů. První den byla dobrovolnicím odmaštěna pokožka volární strany předloktí pomocí 0,5% roztoku SDS ve fyziologickém roztoku, který byl připraven dle postupu viz 6.8.4. Odmaštění volární strany předloktí bylo prováděno pomocí proužků filtračního papíru o rozměrech 4 × 2 cm, které byly napuštěny 0,5% roztokem SDS ve fyziologickém roztoku. Proužky byly položeny na volární stranu předloktí a přelepeny náplastí (Obr. 7A). Odmaštění probíhalo po dobu 4 hodin. Odmaštěna místa byla následně označena fixem (Obr. 7B). Na každé ruce bylo odmaštěno celkem 8 ploch. První místo na levé ruce sloužilo jako kontrolní a bylo pouze odmaštěno, dále na něj nebyl nanášen žádný ze vzorků a sloužilo jako kontrola obnovy stavu kůže po odmaštění. První místo na pravé ruce sloužilo jako kontrola přirozeného stavu kůže dobrovolnic a nebylo tedy ani odmaštěno. Dále byly vzorky nanášeny od těch s přídavkem kuřecího hydrolyzátu (2. a 3. místo), přes ty s přídavkem jeleního hydrolyzátu (4. a 5. místo) až po ty s přídavkem kapřího hydrolyzátu (6. a 7. místo). Nejprve vždy s 0,5% přídavkem, následně s 1,5% přídavkem KH. Na 8. místo každé ruky byla vždy nanesena formulace bez přídavku KH. Na levé ruce dobrovolnic byly nanášeny emulzní formulace, na pravé ruce byly nanášeny formulace gelové. (Obr. 7C).



Obrázek 7 Volární strana předloktí dobrovolnice v průběhu *in vivo* měření, A = zalepené části v průběhu odmašťování, B = označená místa pro nanášení formulací, C = po nanesení vzorků

Následovalo měření hydratace, transepidermální ztráty vody a pH pomocí MPA stanice. Byly využívány sondy měřící hydrataci, transepidermální ztrátu vody a pH. Hydratace byla měřena sondou Corneometr CM 825 a bylo vždy zaznamenáno 5 hodnot. Pro měření TEWL byl využit Tewametr TM 300 a měřeno bylo vždy 20 hodnot. Pomocí pH metru 905 byla vždy zaznamenána jedna hodnota pH. Vzorky připravených emulzí a gelů byly nabrány do injekční stříkačky a uloženy do exsikátoru. Následně byly aplikovány na vyznačené plochy (mimo první místa na každé ruce) injekční stříkačkou v objemu 0,1 ml a pomocí plastové hokejky byly rozetřeny po celé vyznačené ploše. Měření hydratace, TEWL a pH každé plochy bylo následně opakováno po 1, 2, 3, 4, 24 a 48 hodinách od aplikace vzorků. Výsledky byly následně zpracovávány pomocí softwareMicrosoft Office Excel. Z hodnot naměřených pro TEWL bylo prvních 5 zanedbáno pro zvýšení přesnosti měření. U hodnot naměřených pro hydrataci a pH byly dle Dean–Dixonova testu odstraněny odlehlé hodnoty. Ze všech měření byl vypočítán aritmetický průměr a směrodatná odchylka. Výsledné hodnoty hydratace, TEWL a pH byly porovnány se stupnicemi fyziologické hydratace, TEWL a pH, které jsou uvedeny v Tab. 3, 4 a 5.

Tabulka 3 Fyziologická stupnice hydratace pokožky

hodnoty hydratace [k. j.]	**označení stavu pokožky**
45 a vyšší	normální
30–40	suchá
29 a nižší	velmi suchá

Tabulka 4 Fyziologická stupnice TEWL pokožky

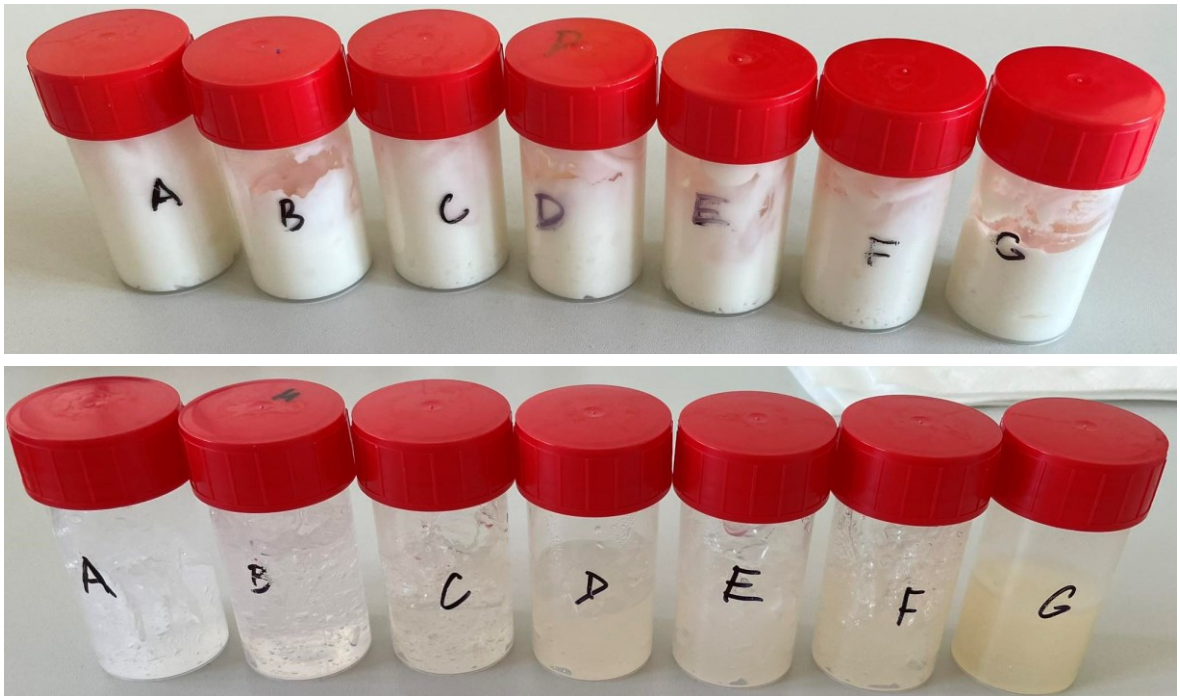
hodnoty TEWL [g·m^{-2}·h^{-1}]	**označení stavu pokožky**
9 a nižší	velmi dobrý
10–14	dobrý
15–25	normální
25 a vyšší	nepříznivý

Tabulka 5 Fyziologická stupnice pH pokožky

hodnoty pH [-]	**označení stavu pokožky**
3,5–4,3	kyselý
4,3–5,5	neutrální
5,5–6,5	zásaditý

6.8.6 Senzorická analýza

Senzorické hodnocení bylo prováděno v laboratorní místnosti při teplotě 24 ± 1 °C, při relativní vlhkosti 40 ± 5 %, za přístupu denního světla. Hodnotitelům byly připraveny vzorky (viz Obr. 8), tyčinky, sklíčko, ubrousky a senzorický dotazník (Příloha III) do kterého zaznamenávali výsledky zvlášť pro emulzní a gelové formulace. V obou souborech byly vzorky označeny A až G (vždy dvě koncentrace pro tři různé kolagenní hydrolyzáty + formulace bez KH) a byly porovnávány pořadovými zkouškami dle 5 různých faktorů, roztíratelnosti, vstřebatelnosti, barvy, vůně a celkové uživatelské preference.



Obrázek 8 Vzorky pro senzorické hodnocení, emulzní formulace v horní části, gelové v dolní části, označení formulací – A = 0,5 % kuřecího KH, B = bez přídavku KH, C = 0,5 % jeleního KH, D = 0,5 % rybího KH, E = 1,5 % kuřecího KH, F = 1,5 % jeleního KH, G = 1,5 % kapřího KH

Hodnotitelé vzorky posuzovali nanesením na hřbet ruky nebo na sklíčko a přiřazovaly vzorkům čísla od 1 do 7 podle vybraných znaků. Číslo 1 označoval nejlépe roztíratelný a vstřebatelný vzorek nejsvětlejší barvy, nejpříjemnější vůně a nejvíce preferovaný hodnotitelem. Číslo 7 naopak nejhůře roztíratelný a vstřebatelný vzorek nejtmavší barvy, nejméně příjemné vůně a nejméně preferovaný hodnotitelem. Všem vzorkům muselo být přiřazeno jedno z čísel, jelikož se jednalo o zkoušku s nucenou volbou. Přiřazené číselné hodnoty u jednotlivých vzorků byly následně zpracovávány v Microsoft Office Excel a byly podrobeny Friedmanovu testu, který posoudí, zda jsou mezi vzorky statisticky významné rozdíly. Pokud ano, Némenyiho metodou lze následně zjistit, jaké dvojice tyto statisticky významné rozdíly vykazují. Testovací kritérium Friedmanova testu (14):

$$FR = \frac{12}{n \cdot R \cdot (R+1)} \cdot \sum_{i=1}^{R} T_i^2 - 3 \cdot n \cdot (R+1) \qquad (14)$$

kde:

n – počet posuzovatelů

R – počet posuzovaných vzorků

T_i^2 – druhá mocnina sumy součtu pořadí

6.8.7 Viskozita

Měření viskozity připravených emulzních a gelových formulací probíhalo za pomoci rotačního viskozimetru Myr V2-L (Viscotech). Pro měření gelů byl používán speciální nástavec na gely a spindly nesoucí označení PF, PE a PC. Pro měření krémů byly využívány spindly L3 a L4. Vlastní měření probíhalo vždy tak, že vzorky byly před měřením vytaženy z lednice a cca jednu hodinu byly ponechány v laboratoři při teplotě 23 ± 1 °C, při které následně probíhalo měření viskozity. V software VISCOSOFTPLUS byly nastaveny podmínky měření a podle hodnoty točivého momentu, která se pohybovala v oblasti 40–70 %, byl zvolen počet otáček (RPM). Měření probíhalo v časovém intervalu 500 s a celkem bylo naměřeno 250 hodnot. Nulové hodnoty byly v souboru zanedbány. Naměřené hodnoty byly zpracovávány v Microsoft Office Excel a byla u nich počítána průměrná hodnota a směrodatná odchylka.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

Kolagenní hydrolyzáty ze tří živočišných zdrojů (kuřecí žaludky, jelení šlachy a kapří odpad) byly v rámci této diplomové práce připraveny a dále zkoumány za využití různých metod charakterizace, které přiblížily jejich strukturu a ukázaly, zda a jak se jednotlivé vzorky hydrolyzátů liší. Dále byly připraveny kosmetické formulace s přídavkem jednotlivých druhů KH, a to jak gelové, tak emulzní s různým obsahem KH (0,5 % a 1,5 %). Tyto byly následně také charakterizovány. Zjišťována byla jejich mikrobiologická stabilita, účinek na kůži, dále byla prováděna jejich senzorická analýza a stanovována jejich viskozita.

7.1 Příprava bílkovinných produktů z tkání bohatých na kolagen

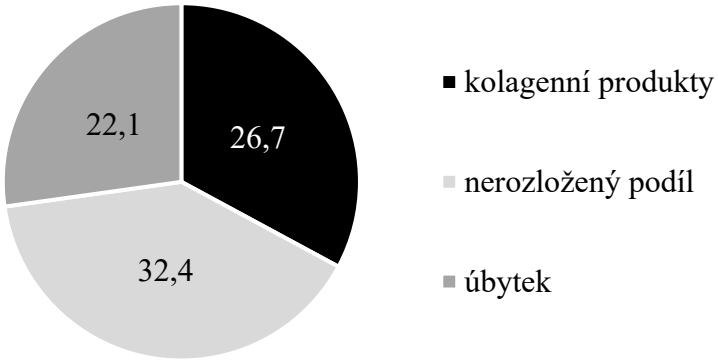
Příprava bílkovinných produktů z tkání bohatých na kolagen probíhala dle postupu popsaného viz 6.5.1–6.5.3. Využita byla metoda enzymatické extrakce (proteolytický enzym Protamex) při teplotě 62,5 °C pro 3 různé typy tkání, a to kuřecí žaludky, jelení šlachy a kapří odpad. Ve studii Ju et al. [36] byla připravena i vlákna nativního kolagenu z hovězích šlach. Využity byly dvě metody extrakce, enzymatická za pomoci pepsinu a kyselá pomocí kyseliny octové. Výsledná účinnost extrakce činila 65 % pro enzymatickou hydrolýzu a 57 % pro kyselou hydrolýzu. Enzymatická hydrolýza za použití enzymu Alcalase byla aplikována ve studii Halim a Sarbon [37] kde byl kolagen získáván z Hrdložábříka bílého (rýžového úhoře). Extrakce probíhala při teplotě 50 °C po dobu 84 minut, enzym byl přidáván v koncentraci 2,26 % na množství proteinu, pH bylo udržováno na hodnotě 7,89. Účinnost reakce činila 6,79 %. Akram a Zhang [38] zase ve své studii sledovali vliv ultrasonikace na účinnost extrakce kolagenu typu II z kuřecích chrupavek. Nejvyššího výtěžku bylo dosaženo ultrasonikací po dobu 36 minut a účinnost extrakce činila 84 %. Skenovací elektronovou mikroskopií (SEM) byla prokázána triple-helikální struktura. Změny sekundární struktury byly pozorovány při delší době ultrasonikace. Ve studii Kassem a El-Shemy [39] extrahovali proteinový hydrolyzát z činěných odpadů kůže. Využita byla metoda kyselé i alkalické extrakce. Hydrolyzát byl složen převážně z kolagenních vláken.

Celý proces přípravy našich kolagenních hydrolyzátů byl následně zhodnocen výpočtem účinnosti extrakce a bilanční chyby. Z důvodu nedostatku výchozí suroviny pro přípravu jeleního hydrolyzátu byl použit hydrolyzát již dříve připravený v rámci diplomové práce Bc. Jakuba Dvořáka a nebyla tedy u něj stanovována účinnost extrakce a bilanční chyba. Výsledné hodnoty pro hydrolyzát z kuřecích žaludků (označení kuřecí) a kapřího odpadu (označen kapří) jsou zaznamenány v Tab. 6.

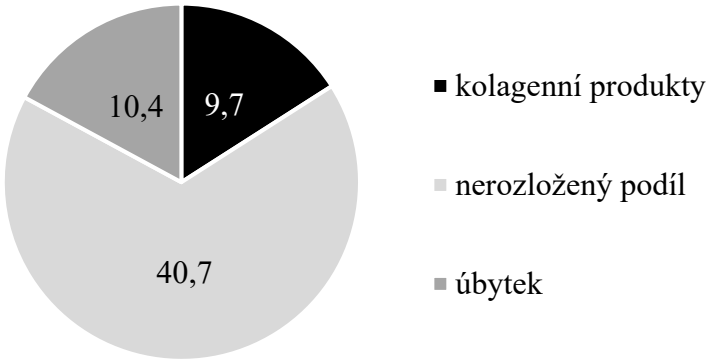
Tabulka 6 Hodnoty pro výpočet účinnosti extrakce a bilanční chyby

	hmotnost [g]				bilance B [%]	bilanční chyba BCH [%]	účinnost extrakce η [%]
	vstupní surovina	kolagenní produkty	nerozložený podíl	úbytek			
kuřecí	81,2	26,7	32,4	22,1	72,8	27,2	32,9
kapří	60,8	9,7	40,7	10,4	82,9	17,1	16,0

Účinnost extrakce byla v obou případech poměrně nízká, pro kuřecí KH činila 33 %, pro kapří KH 16 %. Tato skutečnost mohla být způsobena úbytky výchozí suroviny v průběhu přípravy KH (především během promývání), dále pak nedostatečným rozložením veškeré vstupní suroviny. U KH z kapřího odpadu došlo k velkému úbytku při finálním sušení filmů a také nedošlo k dostatečnému rozložení suroviny, jelikož se jednalo o směs zbytků ze zpracování kaprů (velké množství kostí, kůží apod.), z tohoto důvodu byla výsledná účinnost extrakce nižší než v případě KH z kuřecích žaludků. Bilanční chyba byla vyšší pro KH připravený z kuřecích žaludků, v průběhu přípravy došlo k velkému úbytku suroviny (22,1 %). Grafické znázornění bilanční chyby je na Obr. 9 a 10. Ve studii Prokopové et al. [40] je uvedena účinnost extrakce pro přípravu KH a želatin z kuřecích žaludků s výsledkem 9,2 % při použití enzymu Protamex v množství 0,15 % na vstupní surovinu v sušině a teplotě extrakce 62,5 °C. Bilanční chyba zde byla nižší, přesně 7,2 %. Účinnost extrakce a množství získaného kolagenního hydrolyzátu je závislé na typu a věku zvířete, ze kterého se surovina získává a také na stupni zesíťování kolagenu ve tkáni. Studie Chanmangkang et al. [41] uvádí hodnoty účinnosti extrakce kolagenních produktů pomocí tří různých metod, vždy za pomoci ultrazvuku. Metoda extrakce kolagenu octem vykazovala účinnost 9,80 ± 0,27 %. Metoda extrakce kolagenu kyselinou octovou vykazovala účinnost 11,00 ± 0,10 %. Nejvyšší účinnost vykazovala metoda extrakce kolagenu pepsinem, její hodnota činila 14,94 ± 0,05 %. Vidal et al. [43] získali kolagen typu I z ovčích a jehněčích vedlejších jatečních produktů. Účinnost extrakce činila pro extrakci z ovcí 18 % a pro extrakci z jehňat 12,5 %.



Obrázek 9 Graf hmotnostní bilance přípravy kolagenního hydrolyzátu z kuřecích žaludků



Obrázek 10 Graf hmotnostní bilance přípravy kolagenního hydrolyzátu z kapřího odpadu

Připravené kolagenní hydrolyzáty jsou zobrazeny viz Obr. 11.

Obrázek 11 Připravené kolagenní hydrolyzáty, KZ_1 = KH z kuřecích žaludků, JS_2 = KH z jeleních šlach, KO_3 = KH z kapřího odpadu

7.2 Charakterizace kolagenních hydrolyzátů

Vyrobené kolagenní hydrolyzáty byly charakterizovány pomocí následujících metod: stanovení obsahu sušiny a popelovin a měření čirosti roztoku. Dále také pH roztoku, antioxidační aktivita, povrchové napětí a kontaktní úhel roztoků, který se měří přímo na kůži. Hydrolyzáty jako sypké prášky byly zkoumány také metodou infračervené spektroskopie. Pro zjištění molekulové hmotnosti vzorků byla vybrána gelová permeační chromatografie. Teoretické pozadí těchto metod popisuje kapitola 3.

7.2.1 Stanovení obsahu sušiny a popelovin

Výsledné hodnoty obsahu sušiny a popelovin jsou shrnuty v Tab. 7. Množství sušiny bylo u všech vzorků vyšší než 90 %, nejvyšších hodnot sušiny vykazoval kapří hydrolyzát. Množství popelovin ukazuje na obsah anorganických látek extrahovaných z výchozí suroviny. Nejnižší obsah popelovin 0,66 ± 0,06 %vykazoval KH z jeleních šlach, jednalo se tedy o velice čistý materiál. Naopak nejvyšší obsah popelovin byl prokázán u KH z kapřího odpadu, a to 24,89 ± 0,09 %. Surovina pro výrobu kapřího hydrolyzátu byla směsí odpadních tkání, a které by mohly potenciálně způsobit problémy při dalším použití tohoto KH. Ve studii Kassem a El-Shemy [39] extrahovali proteinový hydrolyzát z činěných odpadů kůže metodami kyselé a alkalické extrakce. Množství popelovin činilo 10,28 %. Množství popelovin ve vzorcích hydrolyzátů z kuřecích žaludků ve studii Prokopové et al. [40] bylo při obdobných podmínkách (enzym Protamex – 0,15 %, teplota extrakce – 62,5 °C) stanoveno na 0,539 ± 0,007 %. Odlišnost hodnot může být způsobena jiným fyziologickým stavem zvířete (stářím apod.), ze kterého byla daná tkáň získávána.

Tabulka 7 Naměřené hodnoty obsahu sušiny a popelovin pro vzorky kolagenních hydrolyzátů

	množství sušiny [%]	chyba měření [%]	množství popelovin [%]	chyba měření [%]
kuřecí	92,36	0,12	8,10	0,05
jelení	92,9	0,09	0,66	0,06
kapří	95,87	0,02	24,89	0,09

7.2.2 Čirost a pH roztoku kolagenního hydrolyzátu

Čirost byla měřena u 6,67% roztoků příslušných kolagenních hydrolyzátů s využitím měření transmitance při vlnové délce 640 nm, kdy byly porovnávány vzorky KH před čištěním a po čištění. Čištění bylo provedeno povařením KH v destilované vodě a následným sušením.

Hodnoty transmitance jsou uvedeny v Tab. 8. Nejvyšší hodnota transmitance 5,3 % byla naměřena pro jelení hydrolyzát, vzorkem prošlo nejvíce světla a jedná se tedy o vzorek vykazující nejvyšší čirost. Po čištění došlo ke zvýšení transmitance o 1,5 %. Nejnižší transmitanci 0,9 % vykazoval vzorek kapřího KH, která se ale během čištění také zvýšila, konkrétně se jednalo o 1% nárůst transmitance.

Tabulka 8 Naměřené hodnoty transmitance pro vzorky KH

čirost – transmitance [%]		
druh KH	**před čištěním**	**po čištění**
kuřecí	2,8	3,6
jelení	5,3	6,8
kapří	0,9	1,9

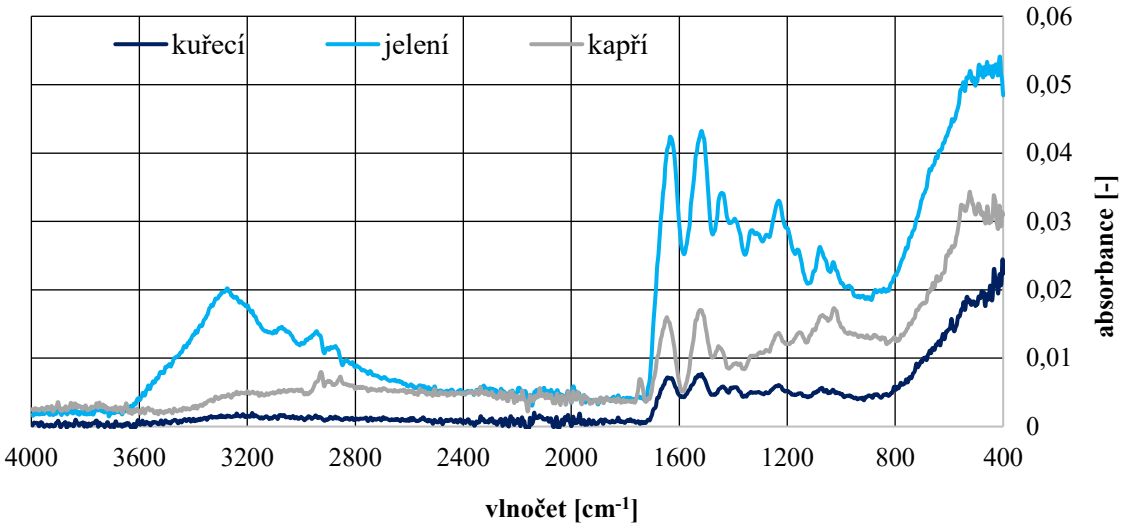
Hodnoty pH byly stanovovány na vzorcích využitích pro stanovení čirosti, tedy na 6,67% roztocích. Tyto hodnoty pH shrnuje Tab. 9. Nejvyšší pH vykazoval jelení KH, naopak nejnižší pH bylo zaznamenáno u vzorku kapřího KH. Všechny hodnoty pH se pohybovaly v rozmezí od 5 do 7,5, jedná se tedy o oblast lehce kyselého až neutrálního pH, které je pro pokožku přirozené. Nutno zde podotknout, že záměrem je využití KH v kosmetických emulzích, kde budou vždy přidávány v koncentracích nižších než 6,67 %.

Tabulka 9 Hodnoty pH pro 6,67% roztoky vzorků KH

pH	
kuřecí	6,72
jelení	7,08
kapří	5,21

7.2.3 Infračervená spektroskopie

Metoda infračervené spektroskopie analyzuje strukturu vzorků pomocí infračerveného světla. Vzorky byly pozorovány v oblasti 4000–400 cm^{-1}. Výsledkem měření jsou spektra zobrazující píky typické pro vibrace vazeb, které se ve vzorcích vyskytují. Mělo by se jednat o vazby typické pro bílkoviny, konkrétně pro kolageny. Tyto typické píky jsou pro kolagenní želatiny či hydrolyzáty označovány jako pásy Amid A, Amid B a Amid I–III a mají určité rozmezí vlnočtů, při kterých se ve spektru objeví. Objevují se i další píky, v oblasti 1440 cm^{-1} pík pro vazbu COO^-, dále pak okolo 1380 cm^{-1} píky typické pro CH_2 vazbu. V oblasti nižších hodnot, okolo 1150 vazba NH_3^+ a pro vazbu C–N se projevily píky v oblasti 1085 cm^{-1} a 1030 cm^{-1}. Naměřená spektra pro tři vzorky jsou zobrazeny na Obr. 12. Výrazné píky shrnuje Tab. 10.



Obrázek 12 Infračervené spektrum

Tabulka 10 Hodnoty vlnočtů pro píky přítomné v IR spektru

typický pás	rozmezí vlnočtů [cm^{-1}]	kuřecí KH		jelení KH		kapří KH	
		vlnočet [cm^{-1}]	vazba	vlnočet [cm^{-1}]	vazba	vlnočet [cm^{-1}]	vazba
Amid A	3440–3300	-		3285	-NH	-	
Amid B	3080–2800	-		2936	CH_2	2932	CH_2
		-		2864		2852	
Amid I	1750–1600	-		-		1737	C=O
		1603	C=O	1636	C=O	1653	
Amid II	1580–1500	1570	-NH	1521	-NH	1529	-NH
-		1436	COO^-	1442	COO^-	1447	COO^-
-		1389	CH_2	1397	CH_2	1370	CH_2
Amid III	1350–1200	-		1333	C–N, N–H	-	
		1238	C–N, N–H	1234	C–N, N–H	1238	C–N, N–H
-		1156	NH_3^+	1158	NH_3^+	1152	NH_3^+
-		1069	C–N	1082	C–N	1080	C–N
-		-		1034	C–N	1024	C–N

Z tabulky i grafu je patrné, že mezi jednotlivými vzorky existují rozdíly. Například pík 3285 cm^{-1} se projevil pouze u vzorku jeleního KH, u dalších dvou přítomen nebyl. Tato skutečnost je způsobena přípravou kolagenního hydrolyzátu. Jedná se o neřízenou hydrolýzu a procesy rozplétání kolagenních vláken a štěpení vazeb nejsou u všech vzorků stejné. Každý vzorek má tedy spektrum lehce odlišné a díky tomu se budou lišit i jejich molekulové hmotnosti. Ve studii Chanmangkang et al. [41] analyzovaly kolagenní hydrolyzát připravený extrakcí pomocí ultrazvuku ze šlach tuňáka. FTIR (infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací) analýza probíhala na přístroji Nicolet 6700FT-IR (Thermo Fisher Scientific,

USA) v oblasti 400–4000 cm^{-1} a bylo pořízeno 32 skenů. Byly rozeznány pásy píků typické pro kolagen (Amid A, B, I, II a III), které se téměř shodovaly s píky uvedenými v Tab. 10 a prokazují přítomnost triple-helixu kolagenního vlákna. Ahmad et al. [42] ve své studii využil analýzu FTIR ke stanovení přítomných vazeb hydrolyzátů kolagenu získaných z kůže Buvola domácího enzymatickou extrakcí papainem a bromelainem. Na přístroji FTIR 630 (Agilent Cary, USA) byla měřena IR spektra v rozmezí vlnočtů 450–4000 cm^{-1}. Využita byla metoda ATR (zeslabené totální reflektance). Výsledná spektra jsou shodná s našimi naměřenými, objevují se píky typické pro kolagen ve stejných pásmech vlnočtů.

7.2.4 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie slouží k zjištění molekulové hmotnosti. Z analýzy se získá hmotnostně průměrná molekulová hmotnost M_w a početně průměrná molekulová hmotnost M_n. Z jejich podílu byl následně vypočítán index polydisperzity (PDI), který ukazuje na neuspořádanost systému. Čím je vyšší, tím je systém více neuspořádaný. Veškeré hodnoty uvádí Tab. 11.

Tabulka 11 Hodnoty z GPC pro vzorky KH

Vzorek KH	M_w [g·mol^{-1}]	M_n [g·mol^{-1}]	PDI [-]
kuřecí	95400	5900	16,2
jelení	169000	28500	5,9
kapří	7500	1000	7,9

Pro hodnocení molekulové hmotnosti byla vybrána hmotnostně průměrná molekulová hmotnost. Nejvyšší hodnotu vykazoval jelení hydrolyzát, u kterého se molekulová hmotnost stále pohybovala v oblasti stovek tisíc, přesněji 169 000 g·mol^{-1} (169 kDa). Hydrolýzou tedy nedošlo k dostatečnému rozpletení a štěpení kolagenních vláken. Molekulová hmotnost kuřecího hydrolyzátu byla rovna 95 400 g·mol^{-1} (95,4 kDa), došlo tedy k většímu štěpení, hodnoty molekulové hmotnosti se ale stále pohybují poměrně vysoko. Nejnižších hodnot vykazoval hydrolyzát z kapřího odpadu, jehož molekulová hmotnost činila 7500 g·mol^{-1} (7,5 kDa). Metodou SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis – polyakrilamidová gelová elektroforéza s dodecylsulfátem sodným) byla stanovována molekulová hmotnost kolagenu získaného ze šlach tuňáka ve studii Chanmangkang et al. [41]. Vzorky kolagenu rozpustné v octu a kyselině octové vykazovaly přítomnost molekul o velikosti v rozmezí od 37 do 100 kDa. Vzorek kolagenu rozpustného v pepsinu vykazoval přítomnost molekulových hmotností vyšších než 50 kDa.Ve studii Vidal et al [43] byla

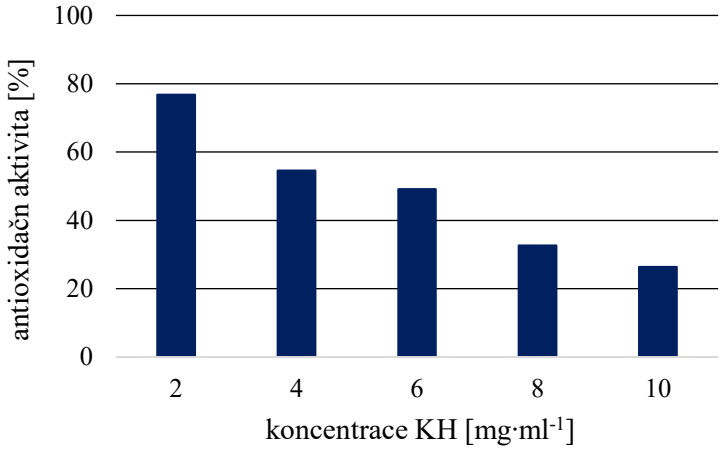
metodou SDS-PAGE zjišťována také molekulová hmotnost kolagenu typu I připraveného z ovčích a jehněčích jatečních odpadů. Výsledná molekulová hmotnost se pohybovala v rozmezí 5–100 kDa. Studie Xu et al. [44] analyzovala zase vlastnosti kolagenního hydrolyzátu získaného z jeleních šlach. Pro stanovení molekulové hmotnosti byla využita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Byla využita gelová kolona TSK G2000 SWXL o rozměrech 7.8 × 300 mm (Tosoh, Japonsko). Mobilní fází byl 45% acetonitril, který kolonou protékal rychlostí 0,5 $ml \cdot min^{-1}$. Detekce probíhala při 214 nm a teplota kolony činila 35 °C. Všechny vzorky obsahovaly největší množství frakcí s průměrnou hmotnostní molekulovou hmotností (M_w) v rozmezí od 1 do 3 kDa. Dále byly přítomny frakce M_w nižší než 1 kDa a vyšší než 3 kDa. Počet frakcí s M_w od 1 do 3 kDa byl působením ultrazvuku zvyšován, stejně jako počet frakcí o M_w nižší než 1 kDa. Ve studii Prokopová et al. [45] byla také zjišťována molekulová hmotnost pomocí gelové permeační chromatografie (GPC), kdy ve všech vzorcích byly nejvýše zastoupeny frakce molekulových hmotností v rozmezí 0–80 kDa.

7.2.5 Antioxidační aktivita

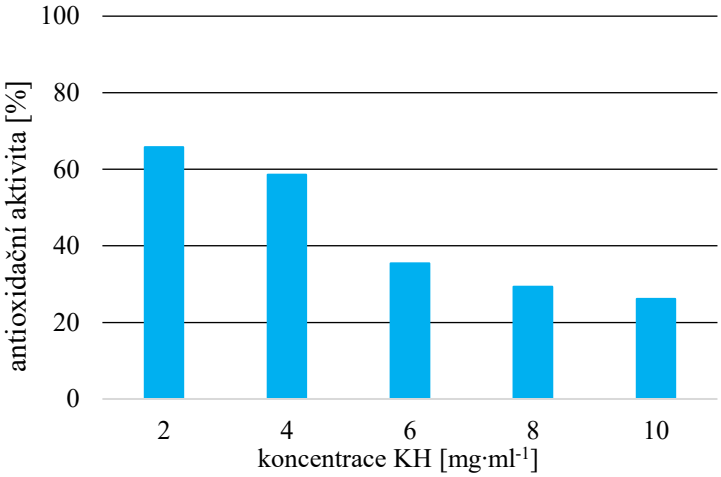
Antioxidační aktivita byla měřena dle postupu popsaném v kapitole 6.6.5. Absorbance 0,2mM roztoku DPPH činila 1,972. Naměřené hodnoty absorbance a vypočítaná antioxidační aktivita všech vzorků jsou uvedeny v Tab. 12. Dále jsou hodnoty antioxidační aktivity jednotlivých KH znázorněny v grafech viz Obr. 13, 14 a 15.

Tabulka 12 Hodnoty absorbance a antioxidační aktivity pro koncentrační řadu vzorků KH

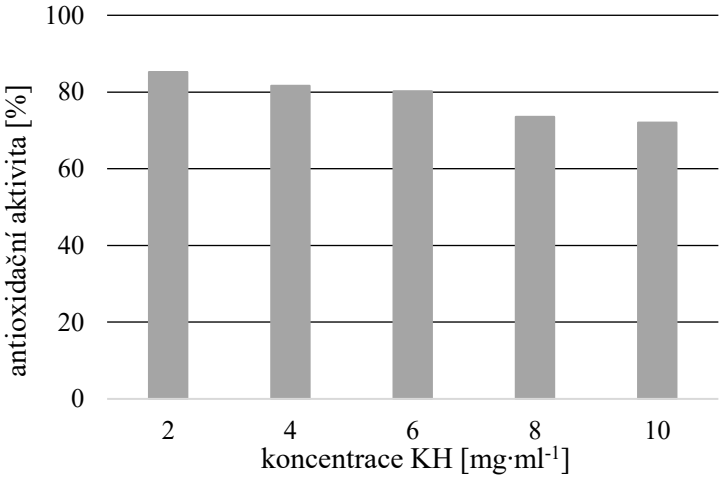
druh KH	$c_{vzorků}$ [mg/ml]	absorbance [-]	antioxidační aktivita [%]
kuřecí	2	0,457	76,83
	4	0,896	54,56
	6	1,002	49,19
	8	1,327	32,71
	10	1,451	26,42
jelení	2	0,675	65,77
	4	0,817	58,57
	6	1,273	35,45
	8	1,393	29,36
	10	1,457	26,12
kapří	2	0,291	85,24
	4	0,362	81,64
	6	0,391	80,17
	8	0,522	73,53
	10	0,551	72,06



Obrázek 13 Antioxidační aktivita vzorků kuřecího KH



Obrázek 14 Antioxidační aktivita vzorků jeleního KH



Obrázek 15 Antioxidační aktivita vzorků kapřího KH

Z výsledků je patrné, že nejvyšší antioxidační aktivitu vykazoval kapří kolagenní hydrolyzát při koncentraci 2 $mg \cdot ml^{-1}$, konkrétně 85 %. Kuřecí KH vykazoval nejvyšší antioxidační aktivitu (AA) také při nejnižší koncentraci a její hodnota činila 77 %. Nejnižší antioxidační aktivitu ze všech tří vzorků vykazoval vzorek jeleního KH, konkrétně 66 %. U všech vzorků se projevil stejný trend, a to, že se zvyšující se koncentrací KH docházelo ke snížení antioxidační aktivity. U vzorků kuřecího a jeleního KH se hodnota poslední, tedy nejvyšší, tj.10 $mg \cdot ml^{-1}$, koncentrace pohybovala okolo 26 %. Kapří hydrolyzát vykazoval pozvolnější snižování AA a antioxidační aktivita jeho nejvíce koncentrovaného vzorku činila 72 %. Ve studii Xu et al. [44] byla metodou DPPH bzjišťována také antioxidační aktivita roztoků kolagenního hydrolyzátu z jeleních šlach, a to v rozmezí koncentrací od 0,5 do 7,5 $mg \cdot ml^{-1}$. Nejvyšší AA byla naměřena pro vzorky, které byly ošetřovány ultrazvukem po dobu 60 minut. Se zvyšující se koncentrací byla zvyšována antioxidační aktivita v rozmezí od 20 (0,5 $mg \cdot ml^{-1}$) do 70 % (7,5 $mg \cdot ml^{-1}$). Ve studii Prokopová et al. [45] byla zjišťována antioxidační aktivita kolagenního hydrolyzátu z kuřecích žaludků metodou DPPH a ABTS. Měřeny byly roztoky kolagenních hydrolyzátů v koncentracích 2, 4, 6, 8 a 10 $mg \cdot ml^{-1}$. Metodou DPPH byly získány hodnoty AA v rozmezí od 70 do 77 %. Ke zvyšování AA docházelo se zvyšující se koncentrací kolagenního hydrolyzátu v roztoku. Metodou ABTS byly získány hodnoty od 82 do 95 %, zvyšování bylo opět závislé na zvyšování koncentrace hydrolyzátu v roztoku. Yu et al. [46] extrahoval kolagenní produkty z kůží ryb (okouna, amura a tilápie) s využitím 5 různých metod, a to solí za sucha, solí za mokra, pepsinem, kyselinou a pomocí teploty. Metodou DPPH a FRAP stanovili antioxidační aktivitu 10% roztoků hydrolyzátu v demineralizované vodě. Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazovaly kolagenní produkty extrahované solí za sucha, jejichž hodnoty se pohybovaly nad 75 %.

7.2.6 Povrchové napětí a kontaktní úhel

V Tab. 13 jsou zaznamenány hodnoty povrchového napětí pro jednotlivé vzorky KH.

Tabulka 13 Výsledné hodnoty povrchového napětí pro vzorky KH

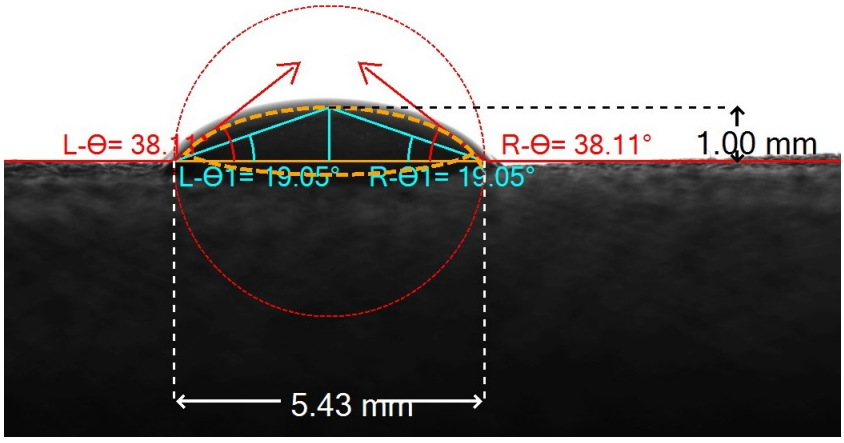
vzorek KH	koncentrace hydrolyzátu [%]	povrchové napětí [$mN \cdot m^{-1}$]	chyba měření [$mN \cdot m^{-1}$]
kuřecí	0,5	48,8	1,9
	1,5	47,1	0,7
jelení	0,5	41,3	0,2
	1,5	45,2	1,3
kapří	0,5	40,1	1,0
	1,5	37,3	0,5

Nejvyšší hodnota povrchového napětí 48,8 ± 1,9 $mN \cdot m^{-1}$ byla naměřena u 0,5% roztoku kuřecího KH. Se zvýšením koncentrace roztoku na 1,5 % došlo ke snížení povrchového napětí na 47,1 ± 0,7 $mN \cdot m^{-1}$. Podobné hodnoty vykazovaly i vzorky kapřího KH, u kterého došlo zvýšením koncentrace KH v roztoku také ke snížení povrchového napětí. U vzorků kuřecího a kapřího KH došlo tedy zvýšením koncentrace KH ke snížení povrchového napětí, u jeleního KH byla situace opačná a zvýšením koncentrace došlo ke zvýšení povrchového napětí z 41,3 ± 0,2 $mN \cdot m^{-1}$ na 45,2 ± 1,3 $mN \cdot m^{-1}$. Nejnižší naměřené povrchové napětí 37,3 ± 0,5 $mN \cdot m^{-1}$ vykazoval vzorek 1,5% roztoku kapřího hydrolyzátu.

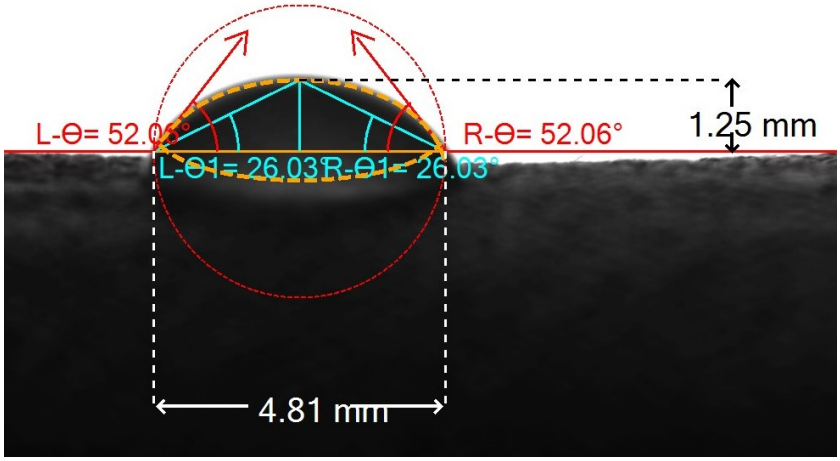
Měření kontaktního úhlu 0,5 a 1,5% roztoků vzorků KH probíhala na volární straně předloktí. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tab. 14. Pro každý vzorek jsou dále zobrazeny (Obr. 16–21) kapky i s naznačením naměřených výšek, šířek a kontaktních úhlů.

Tabulka 14 Hodnoty kontaktního úhlu, výšky a šířky kapky

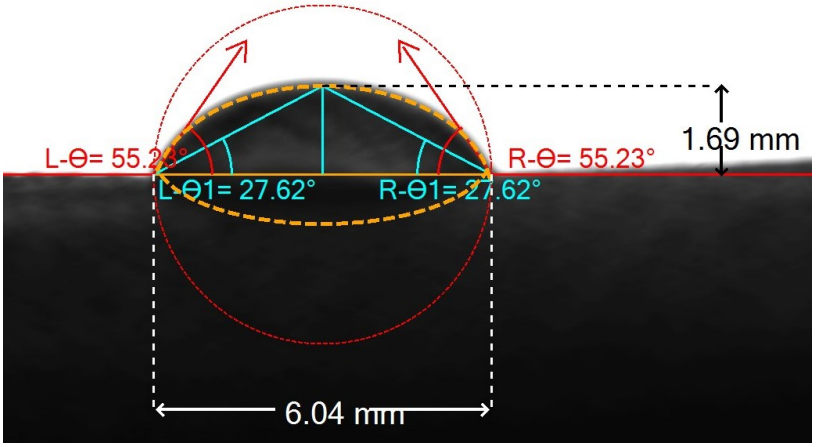
vzorek KH	koncentrace hydrolyzátu [%]	kontaktní úhly [°]				výška kapky [mm]	šířka kapky [mm]
		L-Θ [°]	L-Θ1 [°]	R-Θ [°]	R-Θ1 [°]		
kuřecí	0,5	38,1	19,1	38,1	19,1	5,4	1,0
	1,5	52,1	26,0	52,1	26,0	4,8	1,3
jelení	0,5	55,2	27,6	55,2	27,6	6,0	1,7
	1,5	53,7	26,9	53,7	26,9	7,4	2,0
kapří	0,5	63,0	31,5	63,0	31,5	5,6	1,8
	1,5	44,0	22,0	44,0	22,0	5,5	1,2



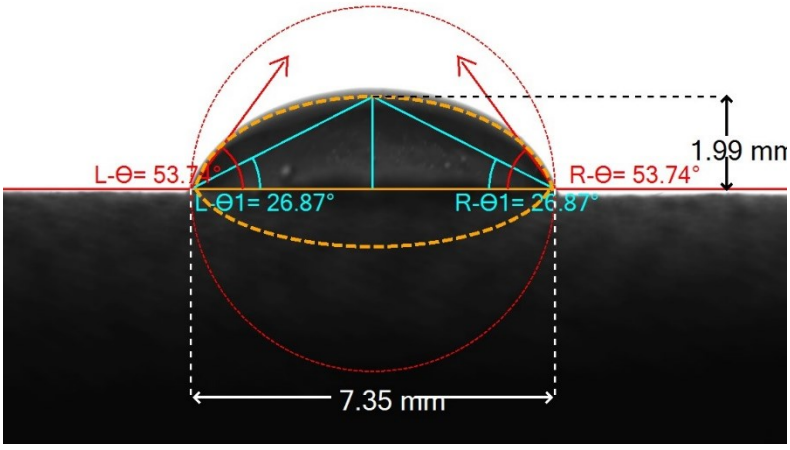
Obrázek 16 Kapka 0,5% roztoku kuřecího KH na volární části předloktí



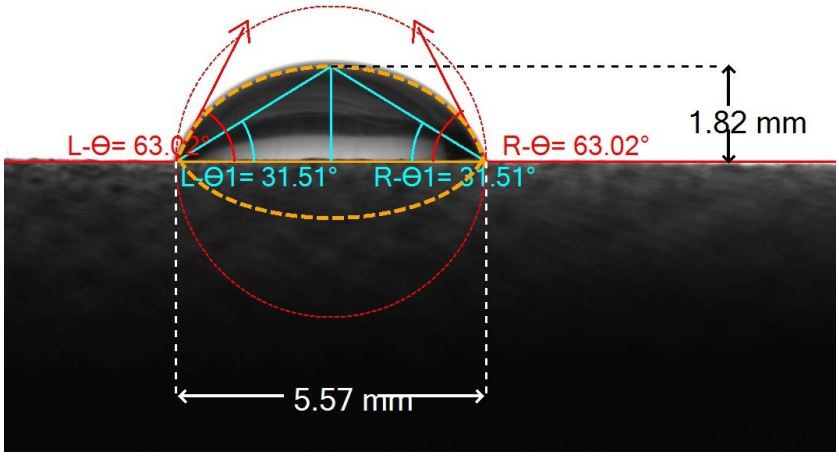
Obrázek 17 Kapka 1,5% roztoku kuřecího KH na volární části předloktí



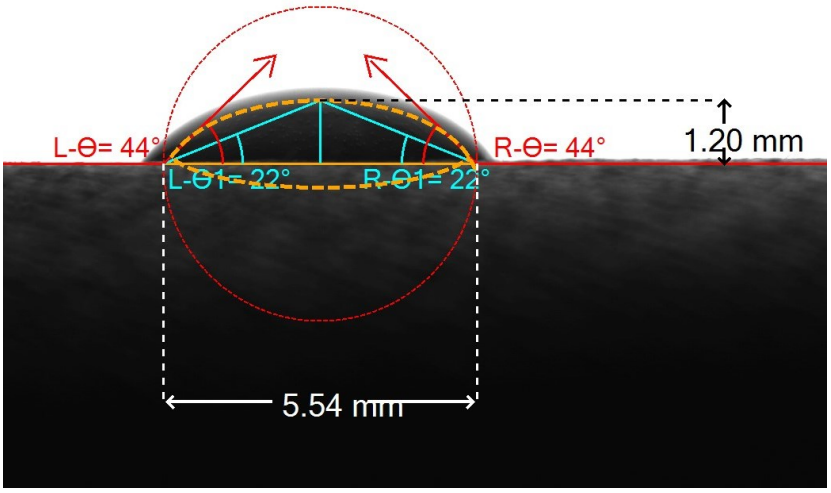
Obrázek 18 Kapka 0,5% roztoku jeleního KH na volární části předloktí



Obrázek 19 Kapka 1,5% roztoku jeleního KH na volární části předloktí



Obrázek 20 Kapka 0,5% roztoku kapřího KH na volární části předloktí



Obrázek 21 Kapka 1,5% roztoku kapřího KH na volární části předloktí

Nejširší a nejvyšší kapka byla na povrchu kůže volární strany předloktí vytvořena z 1,5% roztoku jeleního KH. Největší kontaktní úhel 63,0° vykazoval 0,5% roztok kapřího kolagenního hydrolyzátu, při vyšší koncentraci (1,5 %) byla naměřena hodnota nižší, čím byl tedy roztok kapřího KH koncentrovanější, tím byl naměřen i nižší kontaktní úhel. U kuřecího kolagenního hydrolyzátu byla situace opačná, zvýšením koncentrace byl zvýšen také kontaktní úhel z 52,1° na 38,1°. Vzorek 0,5% roztoku kuřecího KH vykazoval nejnižší naměřený kontaktní úhel a smáčí tedy povrch nejlépe ze studovaných vzorků. Jelení kolagenní hydrolyzát vykazoval v obou případech hodnoty velmi blízké lišící se pouze o 2,5°. Všechny naměřené kontaktní úhly jsou pod hodnotou 90° a jedná se tedy o roztoky, které smáčí povrch kůže.

7.3 Příprava kosmetických formulací

Postupy přípravy kosmetických formulací, tj. emulzí a gelů, jsou popsány v kapitole 6.7. U každé připravené formulace byla měřena výsledná hodnota pH, hodnoty jsou shrnuty v Tab. 15. U gelových formulací byly naměřeny výsledné hodnoty pH v rozmezí od 5,4 do 6,3. Hodnoty pH emulzních formulací byly lehce vyšší, a to konkrétně v rozmezí 6,0–6,6. Hodnoty pH obou připravených formulací lze označit za lehce kyselé, jedná se tedy o přípravky vhodné pro použití na kůži. Ve studii Dănilă et al. [47] byly zjišťovány hodnoty pH emulzních systémů olej ve vodě (o/w) s přídavkem niacinamidu a hydrolyzovaného kolagenu připraveného z hovězí *dermis* a výsledná pH byla v rozmezí od 5,10 do 6,02.

Tabulka 15 Hodnoty pH připravených formulací

vzorek KH	obsah KH [%]	gely	krémy
		pH [-]	pH [-]
kuřecí	0,5	6,3	6,0
	1,5	5,4	6,3
jelení	0,5	5,5	6,2
	1,5	5,4	6,5
kapří	0,5	6,3	6,1
	1,5	6,1	6,2
bez KH		5,7	6,6

7.4 Charakterizace kosmetických formulací

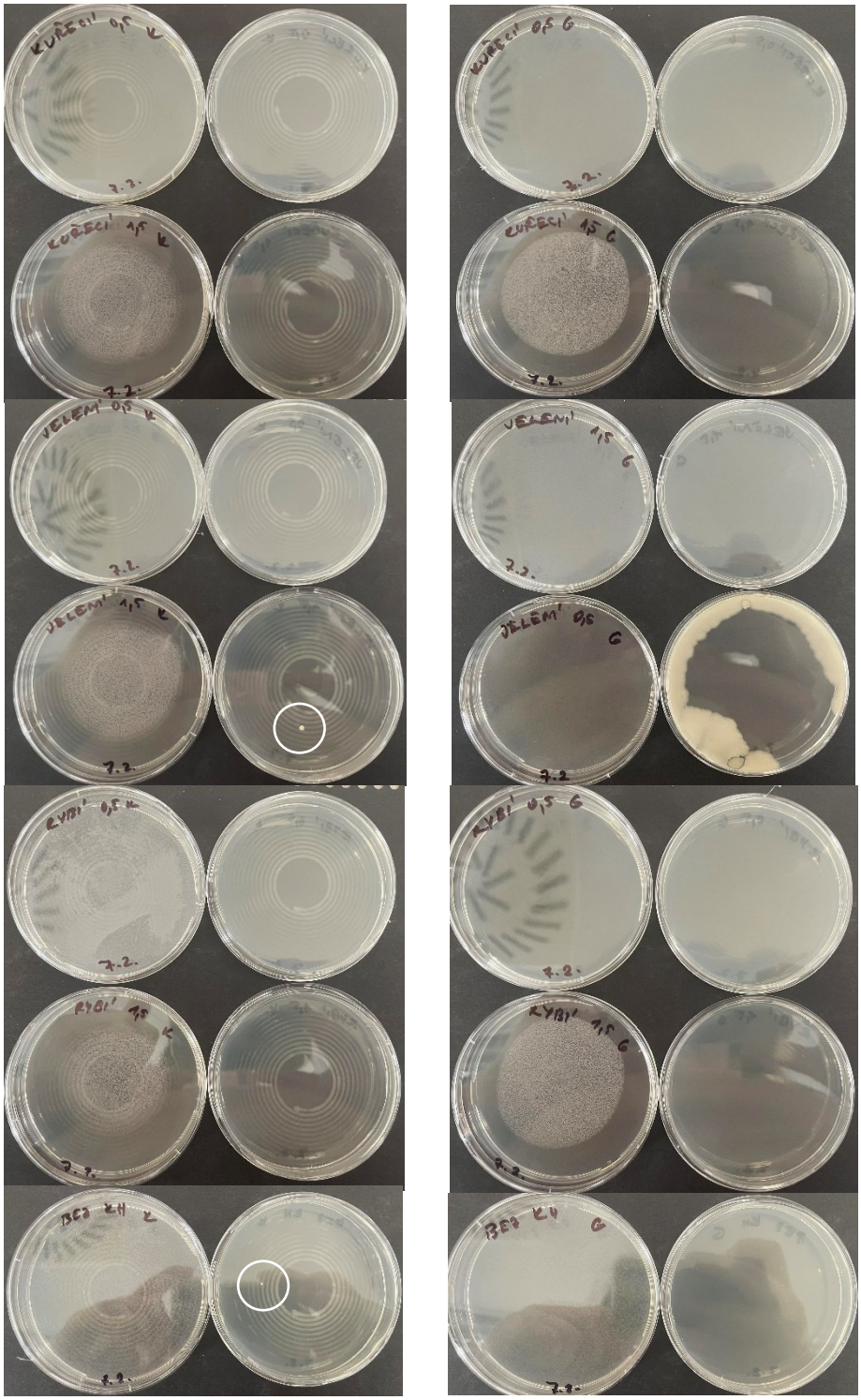
Pro charakterizaci námi vyrobených kosmetických formulací byly vybrány základní metody, a to mikrobiologický test a test stability, měření viskozity, charakterizace pomocí bioiženýrských neinvazivních metod, tedy měření hydratace, TEWL a pH kůže, a senzorická analýza.

7.4.1 Mikrobiologické testování

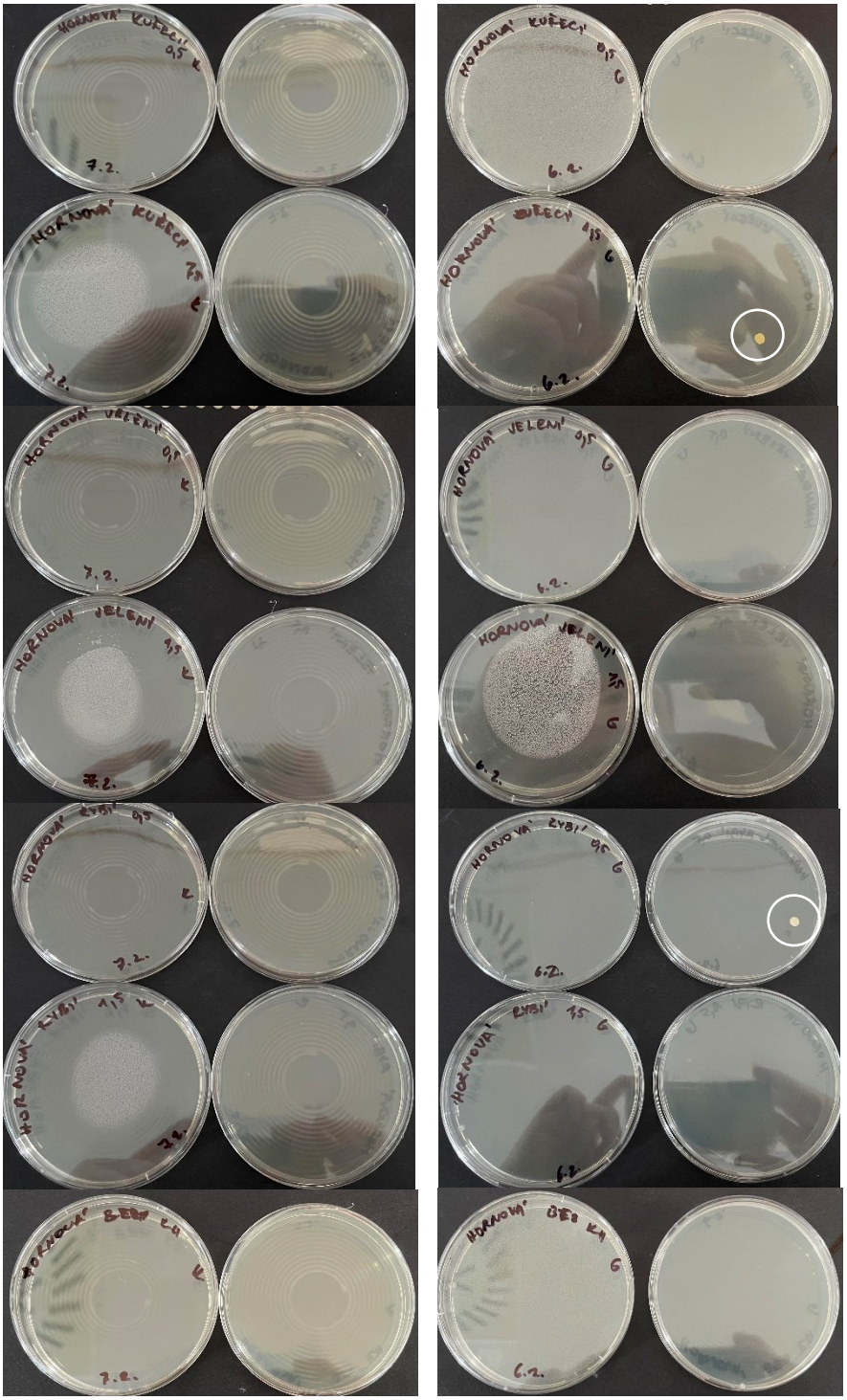
Prvním mikrobiologickým testem bylo stanovení obecné mikrobiální kontaminace, jejíž postup je popsán v kap. 5.8.1. Po kultivaci na půdách PCA (Obr. 22) a ChYGA (Obr. 23) byly kontrolovány Petriho misky pro nárůst bakterií, kvasinek a plísní. Nebyly pozorovány žádné mikroorganismy v rámci detekčního limitu $2 \cdot 10^2$ CFU/g použité metody. Na Obr. 22 jsou kroužkem označeny kolonie, které jsou díky své poloze označeny jako kontaminace z vnějšího prostředí, nejedná se o nárůst způsobený přítomností bakterií či plísní v krémech nebo gelech. Podobné výsledky byly pozorovány i při stanovení kvasinek a plísní (Obr. 23).

Vzorky kosmetických formulací jsou tedy z mikrobiologického hlediska bezpečné, neprojevila se přítomnost žádných mikroorganismů.

Kolagenní hydrolyzáty z kuřecích žaludků byly testovány na přítomnost mikroorganismů ve studii Prokopová et al. [45]. Využity byly různé živné půdy, konkrétně PCA (plate count agar), TSA (tryptic soy agar), SDA (sabouraud dextrose agar) a VRBL (violet red bile lactose) pro stanovení různých mikroorganismů a pro jejich identifikaci byla použita metoda MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight). Ve vzorcích byly detekovány bakterie *Brevibacillus agri*, *Bacillus flexus*, *Acinetobacter radioresistens*, *Acinetobacter baumanii*, *Enterococcus faecium* a *Staphylococcus hominis*. Vzhledem k obdobné přípravě hydrolyzátů i výchozí surovině (kuřecí žaludky) lze předpokládat přítomnost těchto mikroorganismů i ve vzorcích připravených viz kapitola 6.5. V potravinářských a kosmetických aplikacích nesmí být přítomny mikroorganismy jako je např. *Salmonella, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus cereus* nebo *Listeria monocytogenes*. Přítomnost těchto bakterií nebyla ve vzorcích hydrolyzátů studie Prokopová et al. prokázána [45]. V námi vyrobených emulzních a gelových formulacích byl tedy konzervačním systémem potlačen růst veškerých mikroorganismů, a tedy dle testu obecné kontaminace se jednalo o formulace mikrobiologicky bezpečné. Emulzní systémy s obsahem kolagenního hydrolyzátu byly mikrobiologicky testovány, a to na živných půdách SDA (sabouraud dextrose agar) a CSBDA (casein soya bean digest agar) na přítomnost aerobních bakterií, plísní a kvasinek také v rámci studie Dănilă et al. [47]. Byl zjištěn celkový počet kolonií a následně vypočítány hodnoty CFU/g. U dvou vzorků byla hodnota CFU/g aerobních bakterií rovna 3,33 a 6,66. Dle European pharmacopoeia (10. vydání) je limitem hodnota $1 \cdot 10^2$ CFU/g. Hodnoty jsou nižší než daný limit a jedná se tedy o vzorky bezpečné [47]. Přítomnost kvasinek či plísní se neprojevila. Nebyla prokázána ani přítomnost *S. aureus*, *E. coli* či *P. aeruginosa*.



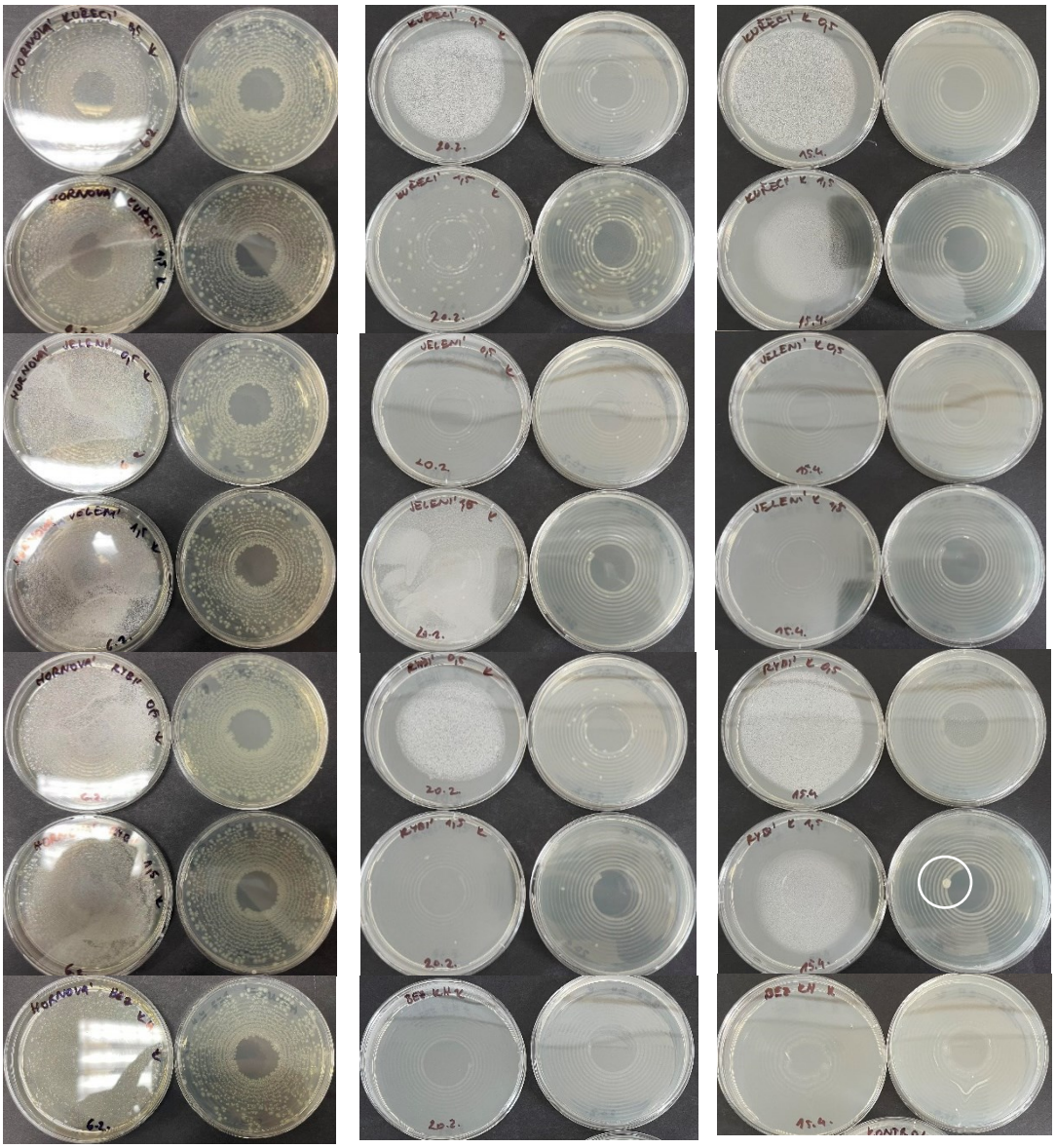
Obrázek 22 Petriho misky s PCA agarem a nanesenými vzorky po inkubaci, levý sloupec – emulzní formulace pod sebou seřazeny v pořadí 0,5% kuřecí KH, 1,5% kuřecí KH, 0,5% jelení KH, 1,5% jelení KH, 0,5% kapří KH, 1,5% kapří KH a vzorek bez KH, pravý sloupec – gelové formulace ve stejném pořadí



Obrázek 23 Petriho misky s ChYGA agarem a nanesenými vzorky po inkubaci, levý sloupec – emulzní formulace pod sebou seřazeny v pořadí 0,5% kuřecí KH, 1,5% kuřecí KH, 0,5% jelení KH, 1,5% jelení KH, 0,5% kapří KH, 1,5% kapří KH a vzorek bez KH, pravý sloupec – gelové formulace ve stejném pořadí

Druhým testem bylo přežívání bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Petriho misky po kultivaci jsou zobrazeny na Obr. 24 a 25. Výsledné hodnoty CFU/g pro emulzní formulace jsou uvedeny v Tab. 16. Ihned po zaočkování *P. aeruginosa* byl pozorován nárůst téměř u všech vzorků okolo hodnoty $5 \cdot 10^5$ CFU/g, pouze u vzorku emulze s 0,5% přídavkem kapřího KH byl nárůst o řád vyšší ($1{,}1 \cdot 10^6$ CFU/g). Po 14 dnech byl nárůst u všech vzorků nižší. Největší pokles byl zaznamenán u vzorku bez přídavku KH, a to až na hodnotu detekčního limitu, tudíž o více než pět řádů. U vzorků s přídavkem kapřího KH byl zaznamenán pokles o tři řády. Vzorky s přídavkem jeleního hydrolyzátu vykazovaly po 14 dnech snížení o 2 řády. Pro vzorek s 0,5% přídavkem kuřecího KH byl zaznamenán pokles o 2 řády. Vzorek s vyšším přídavkem kuřecího KH vykazoval pokles pouze o jeden řád. Vzorek bez KH již nevykazoval přítomnost bakterií, zatímco vzorky s přídavkem KH ano, lze tedy říci, že kolagenní hydrolyzát je významným faktorem ovlivňujícím růst a podporující přežívání *P. aeruginosa*. Při použití kolagenního hydrolyzátu z živočišných zdrojů je nutné zvýšit obsah konzervačního systému a poskytnout KP řádnou ochranu. Po 60 dnech nebyl pozorován nárůst u žádného ze vzorků, lze tedy konstatovat, že hodnota CFU/g byla nižší než $2 \cdot 10^2$. Tato hodnota byla vypočtena dle použité metody roztírání vzorků pomocí Spiral Plateru (IUL Instruments), pokud by byly vzorky roztírány jinou metodou, mohl by být limit nižší. Testování kosmetických přípravků pro účinnost jejich konzervačního systému popisuje ISO norma 11930 [48]. Další organizace jako CTFA (Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association), ASTM (American Society for Testing and Materials), AOAC (Association of Analytical Communities), JP (Japanese Pharmacopoeia) či EP/BP (European Pharmacopoeia/British Pharmacopoeia) vyvinuli další metodické postupy pro testování účinnosti konzervantů [49]. ISO 11930 popisuje metodiku testování účinnosti konzervantů a dále popisuje postup hodnocení celkové antimikrobiální ochrany KP, které nejsou hodnoceny jako nízkorizikové dle ISO 29621. Testovanými mikroorganismy jsou *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* a *Aspergillus brasiliensis*. Inokulum výše zmíněných mikroorganismů je zaočkováno do testovaného KP a v rámci definovaných intervalů po dobu 28 dnů je stanovován počet mikroorganismů, který je následně přepočítán na jednotku CFU/g či CFU/ml. Tyto jednotky jsou porovnány s minimálními přípustnými hodnotami. Pro *P. aeruginosa* musí být hodnota CFU/g nižší než 10 v intervalech 7, 14, 21 a 28 dní od zaočkování. Porovnáním s hodnotami v Tab. 16, je patrné že emulzní formulace nevyhovují tomuto kritériu a nelze je označit jako bezpečné z hlediska dostatečné ochrany před mikrobiálním rizikem. U emulzních

formulací by bylo nutno tedy zvýšit množství konzervantu a jeho mikrobiologickou účinnost testovat znovu.

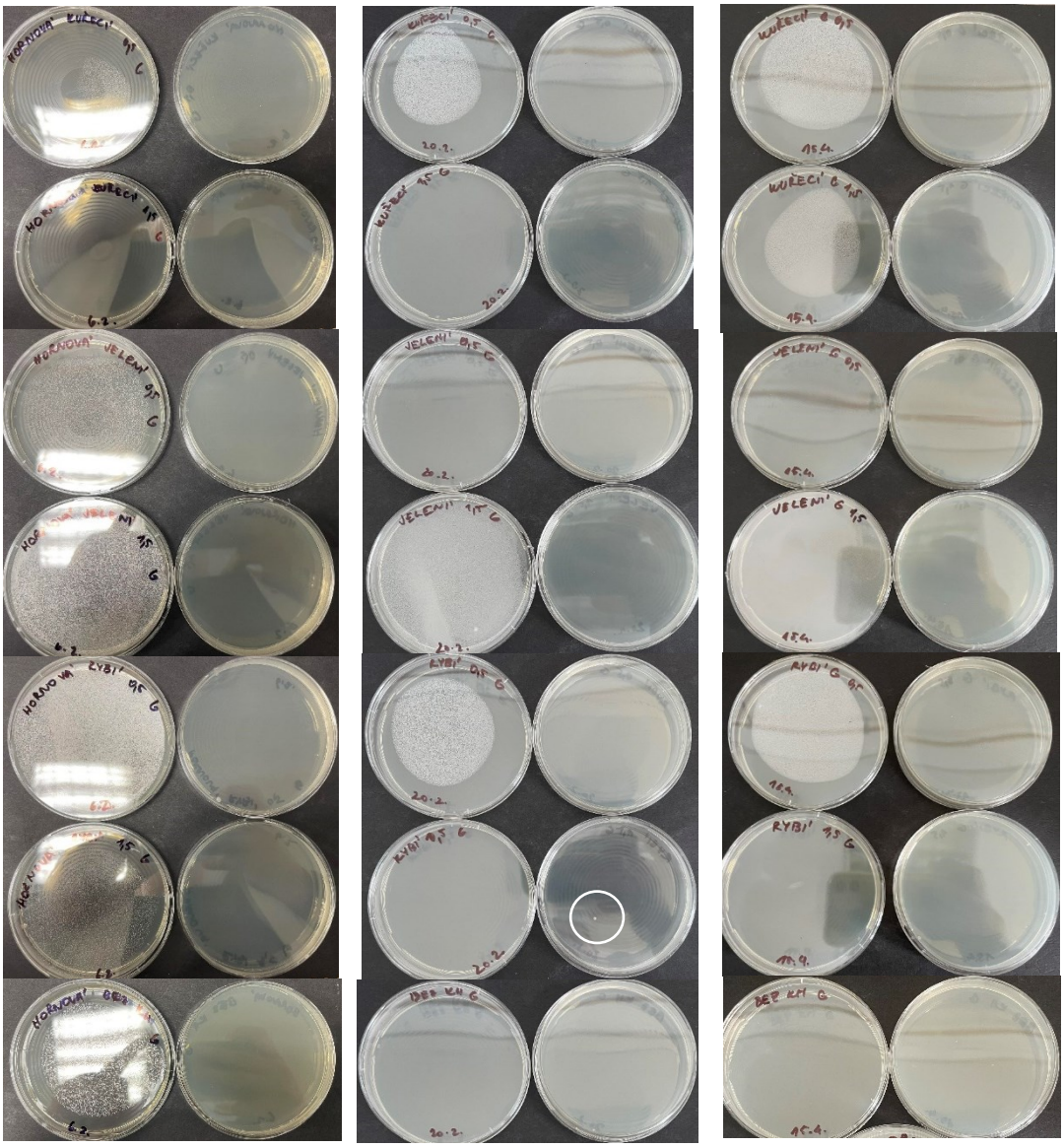


Obrázek 24 Petriho misky s nanesenými vzorky emulzí s *P. aeruginosa* v časech 0 (ihned po zaočkování, první sloupec), 14 (po 14 dnech, druhý sloupec) a 60 (po 60 dnech, třetí sloupec), seřazení vzorků po řádcích – 0,5% kuřecí KH, 1,5% kuřecí KH, 0,5% jelení KH, 1,5% jelení KH, 0,5% kapří KH, 1,5% kapří KH a vzorek bez KH

Tabulka 16 Hodnoty CFU/g pro emulze formulace se zaočkovanou *P. aeruginosa*

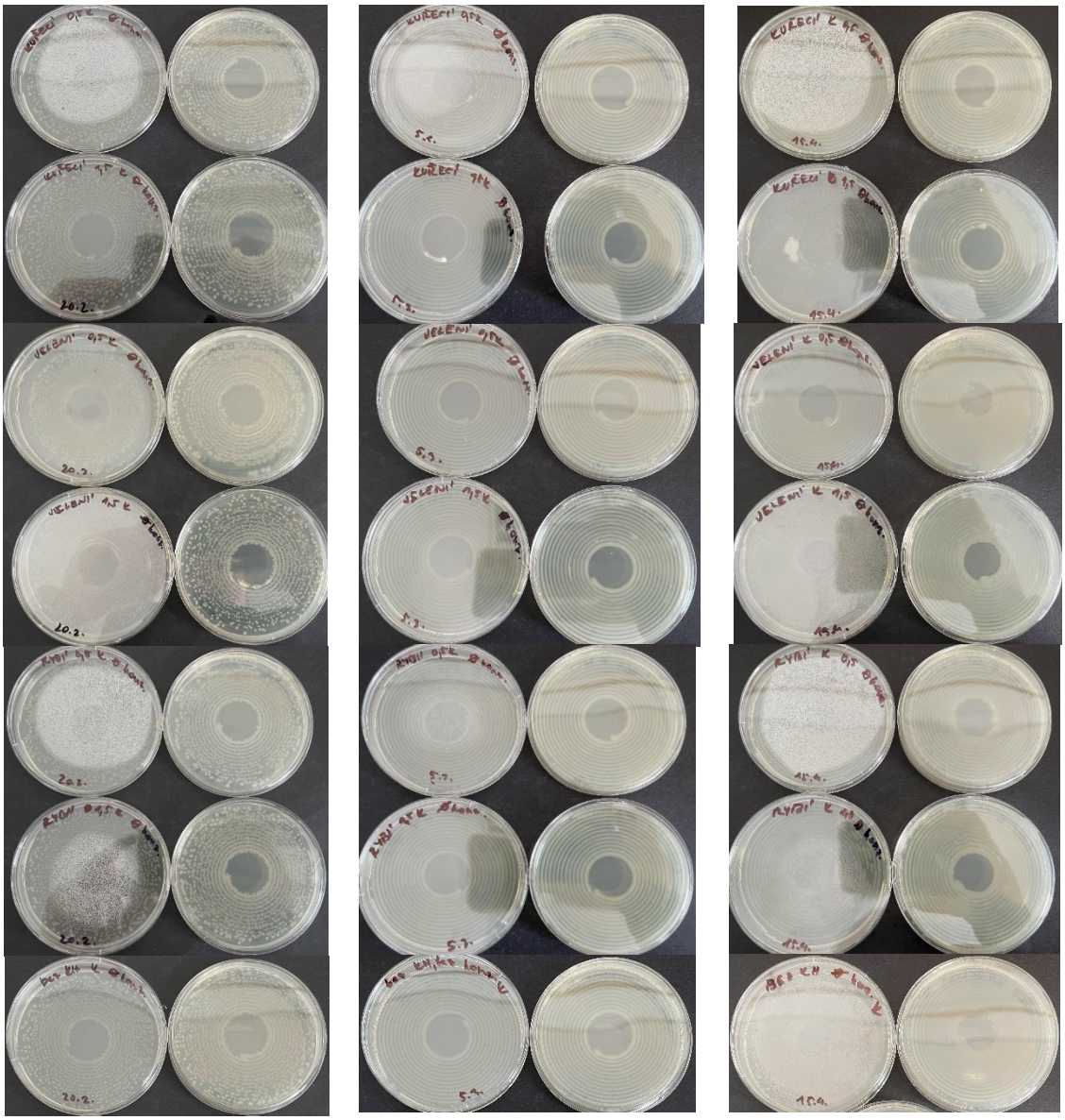
vzorek KH	c KH [%]	CFU/g v čase		
		ihned (0)	po 14 dnech (14)	po 60 dnech (60)
kuřecí	0,5	$5{,}5 \cdot 10^5$	$3{,}3 \cdot 10^3$	$< 2 \cdot 10^2$
	1,5	$6{,}3 \cdot 10^5$	$1{,}3 \cdot 10^4$	
jelení	0,5	$4{,}1 \cdot 10^5$	$1{,}2 \cdot 10^3$	
	1,5	$6{,}3 \cdot 10^5$	$1{,}1 \cdot 10^3$	
kapří	0,5	$1{,}1 \cdot 10^6$	$6{,}1 \cdot 10^3$	
	1,5	$8{,}9 \cdot 10^5$	$7{,}0 \cdot 10^2$	
bez KH	0	$5{,}2 \cdot 10^5$	$< 2 \cdot 10^2$	

Vzorky gelů na Petriho miskách jsou vyobrazeny níže na Obr. 25.Je patrné, že na gelových formulacích k nárůstu kolonií nedošlo v žádném testovaném čase, hodnoty CFU/g jsou nižší než $2 \cdot 10^2$. Jelikož ISO 11930 uvádí limitní hodnotu nižší než 10 CFU/g a limit použité metody stanovení životaschopných mikroorganismů je $2 \cdot 10^2$, nelze přesně vyhodnotit, zda jsou dle tohoto kritéria KP bezpečné. Pokud by byla použita jiná metoda, například roztěr hokejkou neředěného vzorku, byl by limit dostatečně snížen. Nicméně ve srovnání s emulzními vzorky je konzervační systém v gelových formulacích výrazně účinnější a je množné navrhnout dokonce snížení koncentrace konzervantů a následné testování se sníženým detekčním limitem pro zajištění požadavku dle ISO 11930.

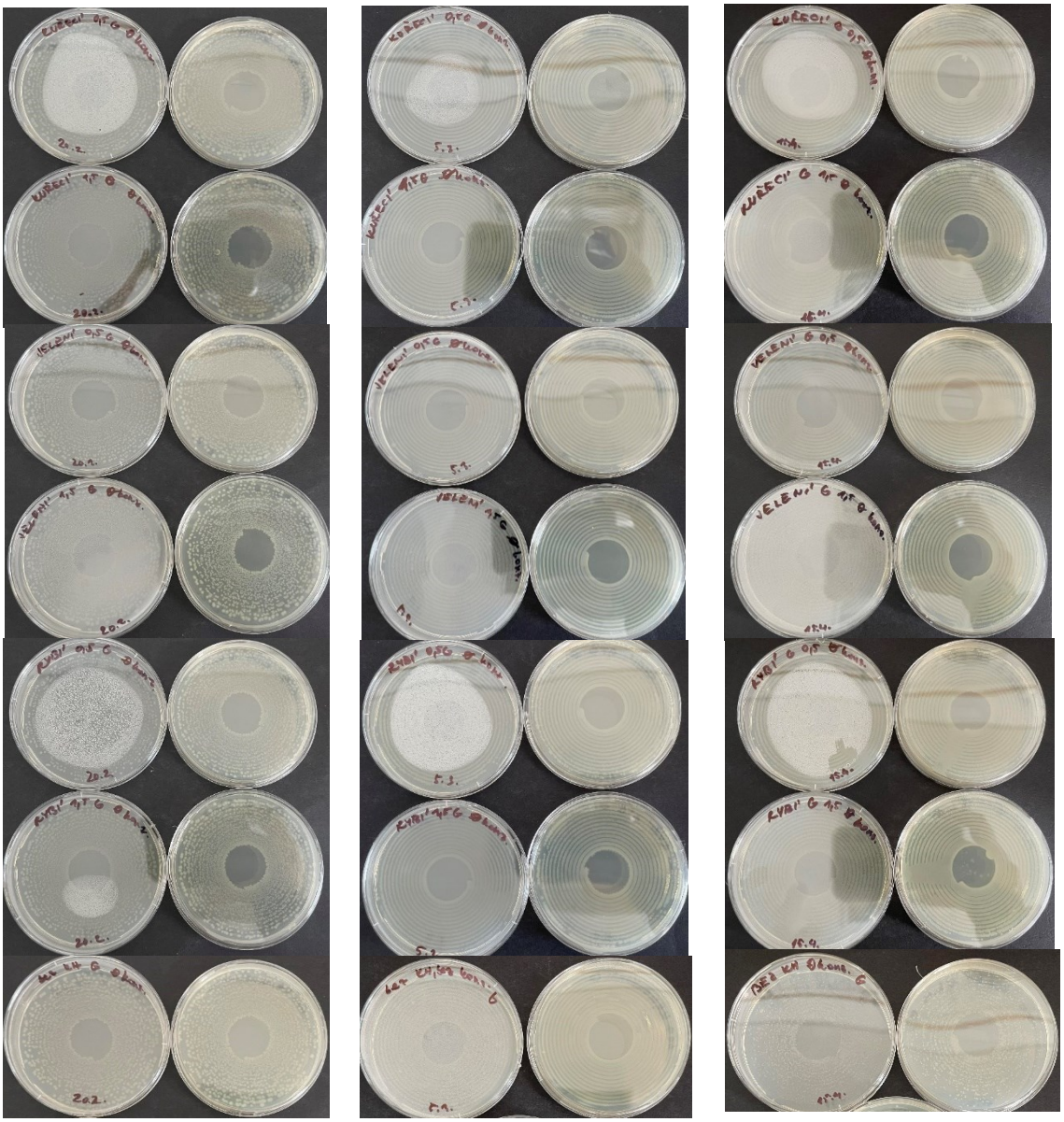


Obrázek 25 Petriho misky s nanesenými vzorky gelů s *P. aeruginosa* v časech 0 (ihned po zaočkování, první sloupec), 14 (po 14 dnech, druhý sloupec) a 60 (po 60 dnech, třetí sloupec), seřazení vzorků po řádcích – 0,5% kuřecí KH, 1,5% kuřecí KH, 0,5% jelení KH, 1,5% jelení KH, 0,5% kapří KH, 1,5% kapří KH a vzorek bez KH

Vzhledem k nulovému mikrobiologickému nárůstu u vzorků gelů byl zjišťován fakt, zda se jedná o účinnost konzervantů či o formu KP, která neumožňuje růst mikroorganismů. Proto byly připraveny formulace emulzí i gelů, které neobsahovaly žádné záměrně přidané konzervační složky a byly následně podrobeny stejnému testu přežívání *P. aeruginosa*. Petriho misky se vzorky emulzí bez přidaného konzervantu jsou zobrazeny na Obr. 26 a 27. Z obrázků je patrný masivní nárůst u obou typů formulací, který se navíc v průběhu následujících 60-ti dnů zvyšoval. Všechny naměřené hodnoty CFU/g lze tedy označit za vyšší než $1 \cdot 10^6$.



Obrázek 26 Vzorky emulzí bez konzervantů v čase 0 (první sloupec), 14 (druhý sloupec) a 60 (třetí sloupec), seřazení vzorků po řádcích – 0,5% kuřecí KH, 1,5% kuřecí KH, 0,5% jelení KH, 1,5% jelení KH, 0,5% kapří KH, 1,5% kapří KH a vzorek bez KH



Obrázek 27 Vzorky gelů bez konzervantů v čase 0 (první sloupec), 14 (druhý sloupec) a 60 (třetí sloupec), seřazení vzorků po řádcích – 0,5% kuřecí KH, 1,5% kuřecí KH, 0,5% jelení KH, 1,5% jelení KH, 0,5% kapří KH, 1,5% kapří KH a vzorek bez KH

Tímto experimentem bylo ověřeno, že zvolený konzervační systém je účinnější v rámci gelových formulací. Naopak u emulzních formulací by bylo nutné zvýšit množství parabenů, aby bylo dosaženo dostatečné bezpečnosti KP. Parabeny jsou rozpustné ve vodě, jejich rozpustnost klesá s délkou alkylového řetězce. Pokud se jedná o emulzní systém, parabeny jsou sice rozpuštěny ve vodné fázi během výroby emulze, ale posléze přejdou do fáze olejové a je tak snížena jejich účinnost, která je dále snižována během skladování takovéto emulze. Tento jev může být důvodem, proč byl ve vzorcích emulzí vyšší počet kolonií než u vzorků gelů. Parabeny byly tedy účinnější v gelových formulacích než v emulzních systémech [50].

7.4.2 *In vivo* měření kosmetických formulací

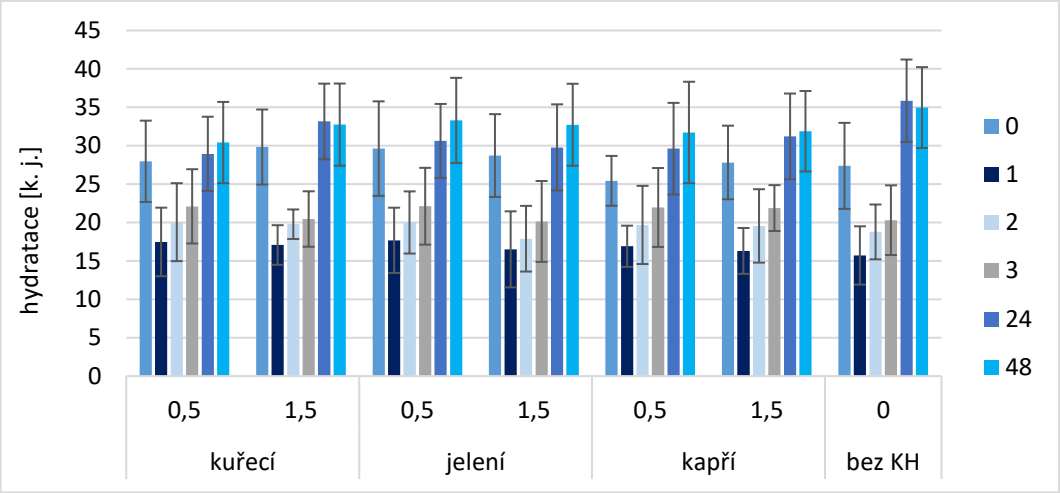
Pro *in vivo* stanovení byly hlavními měřenými parametry hydratace, transepidermální ztráta vody (TEWL) a pH kůže, a to na volární straně předloktí. Výše zmíněné veličiny byly stanovovány ihned po odmaštění (čas 0), a následně po aplikaci jednotlivých formulací na kůži po 1, 2, 3 24 a 48 hodinách. Hodnoty v tabulkách a grafech jsou průměrnými hodnotami celého souboru dobrovolníků.

Měření hydratace

Hydratace byla měřena korneometrem CM 625 (Courage & Khazaka Electronics) a výsledné hodnoty pro soubor dobrovolníků jsou uvedeny v následujících tabulkách a grafech. Měřena byla také hodnota přirozeného stavu kůže volární strany předloktí dobrovolnic, ze které byla následně také vypočítána průměrná hodnota, která činila pro tento soubor 34 k. j. a stav kůže lze ohodnotit jako suchý (dle Tab. 3). Vliv gelových formulací na hydrataci kůže volárního předloktí je znázorněn v grafu (Obr. 28). Přesné hodnoty hydratace naměřené v časových intervalech uvádí Tab. 17. V Tab. 18 jsou zaznamenány procentuální změny oproti hodnotám v čase 0. V prvních třech hodinách došlo u všech formulací k poklesu hydratace. Po 24 a 48 hodinách od aplikace vzorků na kůži se hydratace zvýšila. Nejvyšší nárůst hydratace byl pozorován u formulace bez přídavku KH.

Tabulka 17 Hodnoty hydratace po aplikaci gelových formulací s přídavkem KH

gely		**čas [h]**					
vzorek KH	**c KH [%]**	**0**	**1**	**2**	**3**	**24**	**48**
		hydratace [k. j.]					
kuřecí	0,5	28,0	17,5	20,0	22,1	28,9	30,4
	1,5	29,8	17,1	19,8	20,5	33,2	32,7
jelení	0,5	29,6	17,7	20,0	22,1	30,6	33,3
	1,5	28,7	16,5	17,9	20,1	29,8	32,7
kapří	0,5	25,4	16,9	19,7	22,0	29,6	31,7
	1,5	27,8	16,3	19,6	21,9	31,2	31,9
bez KH	0	27,4	15,7	18,8	20,3	35,9	35,0



Obrázek 28 Změna hydratace vlivem působení gelových formulací na kůži

Tabulka 18 Procentuální změny hydratace kůže po aplikaci gelových formulací po 1, 2, 3, 24 a 48 hodinách

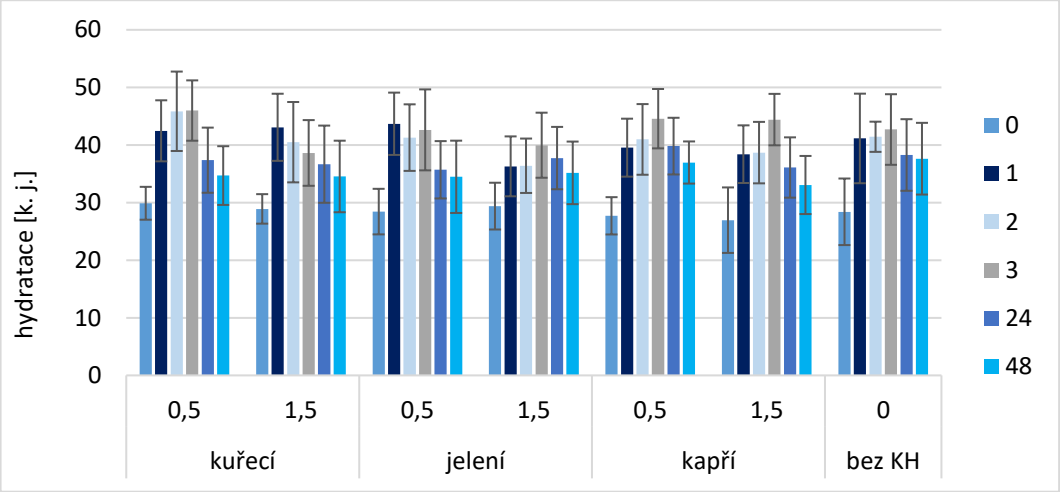
gely		**čas [h]**				
vzorek KH	**c KH [%]**	**1**	**2**	**3**	**24**	**48**
		změny hydratace [%]				
kuřecí	0,5	-38	-28	-21	3	9
	1,5	-43	-34	-31	11	10
jelení	0,5	-40	-32	-25	3	12
	1,5	-43	-38	-30	4	14
kapří	0,5	-34	-23	-14	16	25
	1,5	-41	-30	-21	12	15
bez KH	0	-43	-31	-26	31	28

Tab. 19 uvádí průměrné hodnoty hydratace po aplikaci emulzních formulací na kůži, Obr. 29 zase znázorňuje hodnoty hydratace graficky. V Tab. 20 jsou zaznamenány procentuální změny v hydrataci kůže v jednotlivých časových intervalech. Je zde viditelný nárůst hydratace vlivem aplikovaných formulací. Nejvyšší nárůst je po 1 hodině od nanesení vzorků, a to především u vzorku s 0,5% přídavkem jeleního KH, nejnižší nárůst vykazoval naopak vzorek s 1,5% přídavkem jeleního KH. Ostatní hodnoty hydratací jsou srovnatelné s nárůstem hydratace způsobenou emulzní formou vzorku bez přídavku KH. Po 2 hodinách vykazoval nejvyšší nárůst hydratace vzorek s 1,5% přídavkem kuřecího KH, nejnižší nárůst byl opět u vzorku s 1,5% přídavkem jeleního KH. Po 3 hodinách byla výrazně zvýšena hydratace vlivem formulace s přídavkem kapřího KH, a to v obou koncentracích. Jedná se o KH s nejnižší molekulovou hmotností 7,5 kDa, který je schopný prostupovat skrz pokožku. Po 24 a 48 hodinách od aplikace testovaných vzorků na kůži docházelo k postupnému

poklesu hydratace, a to u všech vzorků, nejvyšší hodnoty vykazoval dále vzorek s 0,5% přídavkem kapřího KH.

Tabulka 19 Hodnoty hydratace po aplikaci emulzních formulací s přídavkem KH

emulze		**čas [h]**					
vzorek KH	**c KH [%]**	**0**	**1**	**2**	**3**	**24**	**48**
		hydratace [k. j.]					
kuřecí	0,5	29,9	42,5	45,9	46,0	37,4	34,7
	1,5	28,9	43,1	40,5	38,6	36,7	34,5
jelení	0,5	28,4	43,7	41,3	42,6	35,7	34,5
	1,5	29,4	36,3	36,4	40,0	37,7	35,2
kapří	0,5	27,7	39,5	41,0	44,6	39,8	37,0
	1,5	26,9	38,4	38,7	44,4	36,1	33,1
bez KH	0	28,4	41,1	41,4	42,7	38,3	37,6



Obrázek 29 Změna hydratace vlivem působení emulzních formulací na kůži

Tabulka 20 Procentuální změny hydratace kůže po aplikaci emulzních formulací po 1, 2, 3, 24 a 48 hodinách

emulze		**čas [h]**				
vzorek KH	**c KH [%]**	**1**	**2**	**3**	**24**	**48**
		změny hydratace [%]				
kuřecí	0,5	42	53	54	25	16
	1,5	49	40	34	27	19
jelení	0,5	54	45	50	26	21
	1,5	23	24	36	28	20
kapří	0,5	43	48	61	44	33
	1,5	43	44	65	34	23
bez KH		45	46	50	35	32

Vliv gelu s 1% přídavkem kolagenního hydrolyzátu připraveného z kuřecích žaludků byl sledován v rámci studie Prokopová et al. [51]. Soubor dobrovolníků byl v této studii tvořen ženami ve věku 50 ± 9 let a gelová formulace jim byla aplikována na levou i pravou stranu periorbitální oblasti spánku po dobu 2 měsíců. Hydratace byla měřená pomocí korneometru CM 625 (Courage & Khazaka). Z výsledků vyplývá, že došlo ke zvýšení hydratace o 11,82 a 9,45 %. Studie Janssens-Böcker et al. [52] zase využila kolagen připravený z hovězí kůže pro přípravu pleťové masky. Byl sledován vliv na hydrataci 10 žen ve věku ≥ 30 let. Hydratace byla měřena na třech různých místech na obličeji před aplikací a 15 a 120 minut po aplikaci pleťové masky. Celková doba použití masky byla 20 minut. Po 15 minutách od ukončení aplikace byla hydratace zvýšena o 16 %, po 120 minutách došlo ke zvýšení hydratace oproti stavu před aplikací masky o 11 %. Změny hydratace pokožky orální suplementací nízkomolekulárního kolagenu získaného z šupin tilápie byly sledovány ve studii Seong et al. [53]. Jednalo se o randomizovanou, dvojitě zaslepenou, placebem kontrolovanou studii na 100 dobrovolnících ve věku od 35 do 60 let, z nichž polovina užívala kolagen typu I denně po dobu 12 týdnů a druhá polovina užívala placebo. Měření probíhala před jeho používáním a po 4, 8 a 12 týdnech od začátku používání. Výsledky ukázaly, že naměřená hydratace na volární straně předloktí se po 12 týdnech zvýšila o 2,5 %.

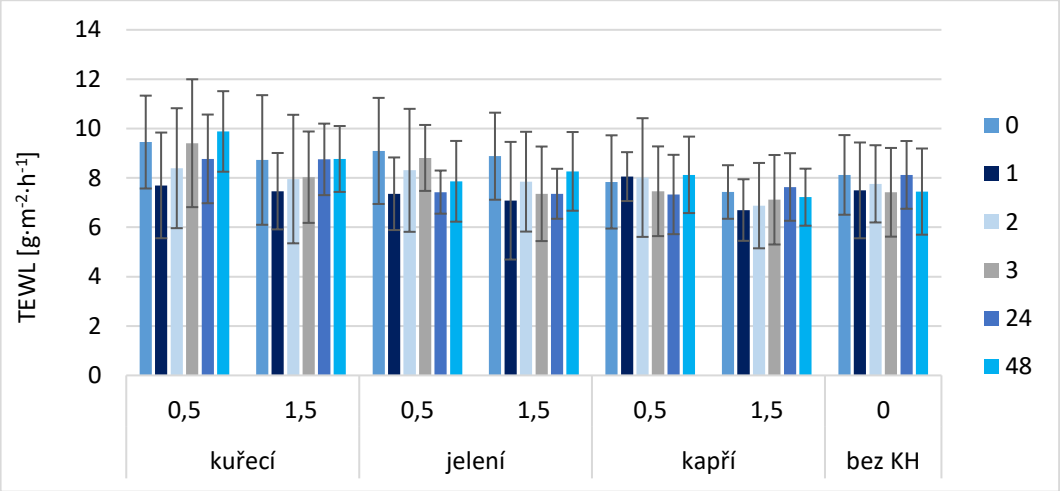
Měření TEWL

Transepidermální ztráta vody (TEWL) byla měřena pomocí tewametremu TM 300 (Courage & Khazaka Electronics). Byl sledován vliv testovaných vzorků (gelových a emulzních formulací) na TEWL po jejich aplikaci na volární stranu předloktí po 1, 2, 3, 24 a 48 hodinách od jejich aplikace a tyto hodnoty byly porovnávány s hodnotami naměřenými po odmaštění kůže (čas 0). Byla také naměřena hodnota kontrolního místa, které nebylo odmaštěno, jež popisuje přirozený stav pokožky. Tato hodnota činila 10,9 $g \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$ a dle stupnice viz Tab. 4 lze tento stav zhodnotit jako dobrý. Naměřené hodnoty pro TEWL jsou shrnuty v Tab. 21 a také na Obr. 30. V Tab. 22 jsou zaznamenány procentuální změny TEWL po aplikaci všech gelových formulací na volární stranu předloktí. Nejvyšší pokles TEWL byl pozorován u gelu s 1,5% přídavkem jeleního KH, nejmenší vliv na TEWL vykazovala formulace s 0,5% přídavkem kapřího hydrolyzátu, která po 1, 2 a 48 hodinách zvýšila hodnotu TEWL. Vyšší přídavek kapřího hydrolyzátu (1,5 %) vykazoval lepší výsledky, které jsou ale srovnatelné s formulací bez přídavku KH. Ostatní formulace

vykazovaly vyšší pokles TEWL než formulace bez KH. Účinek kolagenního hydrolyzátu v gelové formulaci na snížení transepidermální ztráty vody byl tedy prokázán.

Tabulka 21 Hodnoty TEWL po aplikaci gelových formulací s přídavkem KH

gely		**čas [h]**					
vzorek	**c KH [%]**	**0**	**1**	**2**	**3**	**24**	**48**
		TEWL [g·m^{-2}·h^{-1}]					
kuřecí	0,5	9,5	7,7	8,4	9,4	8,8	9,9
	1,5	8,7	7,5	8,0	8,0	8,8	8,8
jelení	0,5	9,1	7,4	8,3	8,8	7,4	7,9
	1,5	8,9	7,1	7,8	7,4	7,4	8,3
kapří	0,5	7,8	8,1	8,0	7,5	7,3	8,1
	1,5	7,4	6,7	6,9	7,1	7,6	7,2
bez KH	0	8,1	7,5	7,8	7,4	8,1	7,4



Obrázek 30 Změna TEWL vlivem působení gelových formulací na kůži

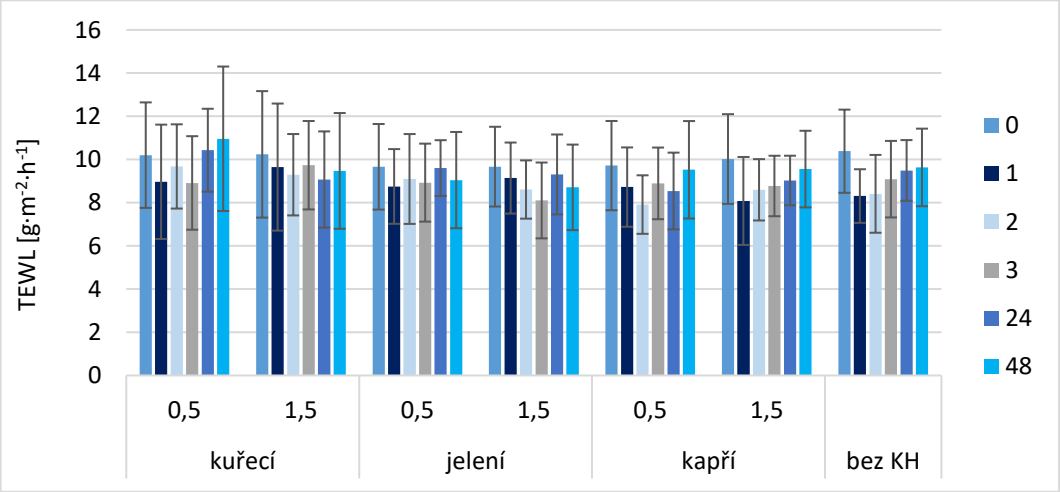
Tabulka 22 Procentuální změny TEWL po aplikaci gelových formulací po 1, 2, 3, 24 a 48 hodinách

gely		**čas [h]**				
vzorek	**c KH [%]**	**1**	**2**	**3**	**24**	**48**
		změny TEWL [%]				
kuřecí	0,5	-19	-11	0	-7	5
	1,5	-14	-9	-8	0	0
jelení	0,5	-19	-9	-3	-18	-14
	1,5	-20	-12	-17	-17	-7
kapří	0,5	3	2	-5	-6	4
	1,5	-10	-7	-4	3	-3
bez KH	0	-8	-4	-9	0	-8

Dále byl pozorován vliv emulzních formulací na TEWL. Hodnoty jsou shrnuty v Tab. 23 a graficky znázorněny na Obr. 31. Tab. 24 uvádí procentuální změny TEWL u emulzních formulací. Je patrný pokles u všech vzorků ve všech časech. Nejvyšší pokles se v krátkém časovém intervalu projevil u emulzí bez KH, dále pak u vzorků s přídavky kapřího hydrolyzátu. Ostatní vzorky vykazovaly pokles nižší než emulze bez přídavku KH a nebyl tak prokázán jejich účinek na TEWL kůže.

Tabulka 23 Hodnoty TEWL po aplikaci emulzních formulací s přídavkem KH

emulze		**čas [h]**					
vzorek KH	**c KH [%]**	**0**	**1**	**2**	**3**	**24**	**48**
		TEWL [g·m^{-2}·h^{-1}]					
kuřecí	0,5	10,2	9,0	9,7	8,9	10,4	11,0
	1,5	10,2	9,6	9,3	9,7	9,1	9,5
jelení	0,5	9,7	8,8	9,1	8,9	9,6	9,0
	1,5	9,7	9,1	8,6	8,1	9,3	8,7
kapří	0,5	9,7	8,7	7,9	8,9	8,5	9,5
	1,5	10,0	8,1	8,6	8,8	9,0	9,6
bez KH		10,4	8,3	8,4	9,1	9,5	9,6



Obrázek 31 Změna TEWL vlivem působení emulzních formulací na kůži

Tabulka 24 Procentuální změny TEWL po aplikaci emulzních formulací po 1, 2, 3, 24 a 48 hodinách

emulze		**čas [h]**				
vzorek KH	**c KH [%]**	**1**	**2**	**3**	**24**	**48**
		změny TEWL [%]				
kuřecí	0,5	-12	-5	-13	2	7
	1,5	-6	-9	-5	-11	-7
jelení	0,5	-9	-6	-8	-1	-6
	1,5	-5	-11	-16	-4	-10
kapří	0,5	-10	-19	-8	-12	-2
	1,5	-19	-14	-12	-10	-5
bez KH		-20	-19	-12	-9	-7

Studie Prokopová et al. [51] zjišťovala také vliv gelové formulace s 1% přídavkem kolagenního hydrolyzátu z kuřecích žaludků na TEWL. Soubor dobrovolníků vykazoval po 2 měsících používání gelu s obsahem KH snížení TEWL o 25,7 a 17,8 %. Ve studii Janssens-Böcker et al. [52] byl zkoumán vliv kolagenu z hovězí kůže v pleťové masce. Konkrétně byl sledován vliv na TEWL u souboru 28 žen ve věku 50–60 let. Masky byly aplikovány na stranu volárního předloktí ob den po dobu 28 dnů. Z výsledku bylo patrné, že změny transepidermální ztráty vody nebyly u testované pleťové masky s obsahem KH pozorovány. Lu et al. [54] zjišťoval účinky rybích kolagenních peptidů v rámci randomizované, dvojitě zaslepené, paralelně kontrolované studie po dobu 8 týdnů orálního užívání 25 ml nápoje WONDERLAB®. Soubor dobrovolníků byl tvořen 70 ženami. Polovina užívala místo kolagenního nápoje placebo složené z vody a dochucovadel. Největší zastoupení v rybím kolagenu vykazovaly frakce o molekulové hmotnosti $M_w \leq 2000$ Da. Z výsledků vyplývá, že po 8 týdnech užívání došlo ke snížení hodnot TEWL o 33,45 %.

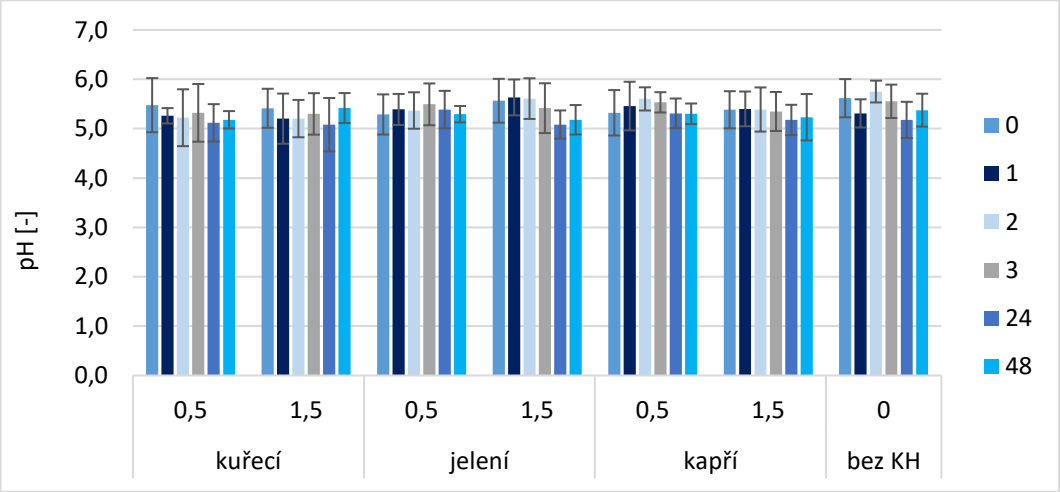
Měření pH

Hodnoty pH byly měřeny pH metrem skin pH 905 (Courage & Khazaka Electronics). V rámci měření byla změřena také hodnota kontrolní sloužící k popisu přirozeného stavu pokožky. Pro celý soubor dobrovolnic byla tato stanovena na hodnotu 5,17. Přirozený stav pokožky souboru dobrovolnic lze tedy popsat dle Tab. 5 jako neutrální. Vliv gelových formulací na pH je graficky znázorněn na Obr. 32 a exaktní hodnoty jsou uvedeny v Tab. 25. Dále, Tab. 26 uvádí procentuální změny pH v průběhu experimentu oproti hodnotě počáteční, tj. hodnotě v čase 0. Jsou zde patrné mírné poklesy a nárůsty hodnot pH, v některých případech ke změnám nedošlo. Gely s přídavky kuřecího KH a bez přídavku

KH vykazují obecně spíše pokles hodnot pH, zatímco vzorky s 0,5% přídavkem jeleního i kapřího KH vykazují spíše nárůst či stálost hodnot pH v průběhu celého měření. Obecně se ale průměrné hodnoty pH pro soubor dobrovolnic pohybují v rozmezí 5,1–5,6, jedná se tedy o pH přirozené pro pokožku a aplikací gelových kosmetických formulací nedošlo k narušení kožní bariéry či poškození pH kůže.

Tabulka 25 Hodnoty pH po aplikaci gelových formulací s přídavkem KH

gely		**čas [h]**					
vzorek KH	**c KH [%]**	**0**	**1**	**2**	**3**	**24**	**48**
		pH [-]					
kuřecí	0,5	5,5	5,3	5,2	5,3	5,1	5,2
	1,5	5,4	5,2	5,2	5,3	5,1	5,4
jelení	0,5	5,3	5,4	5,4	5,5	5,4	5,3
	1,5	5,6	5,6	5,6	5,4	5,1	5,2
kapří	0,5	5,3	5,5	5,6	5,5	5,3	5,3
	1,5	5,4	5,4	5,4	5,3	5,2	5,2
bez KH	0	5,6	5,3	5,8	5,6	5,2	5,4



Obrázek 32 Změna pH vlivem působení gelových formulací na kůži

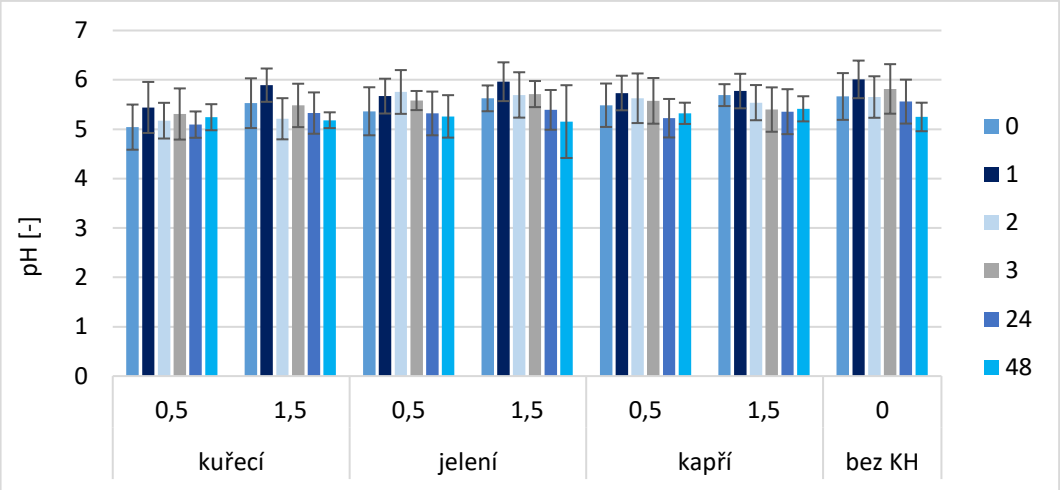
Tabulka 26 Procentuální změny pH po aplikaci gelových formulací po 1, 2, 3, 24 a 48 hodinách

gely		**čas [h]**				
vzorek	**c KH [%]**	**1**	**2**	**3**	**24**	**48**
		změny pH [%]				
kuřecí	0,5	-4	-5	-3	-7	-5
	1,5	-4	-4	-2	-6	0
jelení	0,5	2	2	4	2	0
	1,5	1	1	-3	-9	-7
kapří	0,5	3	5	4	0	0
	1,5	0	0	-1	-4	-3
bez KH	0	-5	2	-1	-8	-4

Hodnoty pH kůže naměřené na volární straně předloktí po aplikaci emulzních formulací shrnuje Tab. 27, graficky jsou zobrazeny na Obr. 33. Dále, Tab. 28 ukazuje procentuální změny pH v průběhu měření. Je patrné, že emulze s 0,5% přídavkem kuřecího KH lehce zvyšoval pH. U ostatních testovaných vzorků došlo vždy k mírnému zvýšení pH, po 2–3 hodinách od jejich aplikace na kůži naopak tyto hodnoty poklesly. Obecně lze říci, že hodnoty pH kůže po aplikaci všech vzorků se pohybovaly v rozmezí od 5 do 6, stále se tedy jednalo o pH pro pokožku přirozené a vlivem testovaných emulzních formulací nebyla narušena kožní bariéra.

Tabulka 27 Hodnoty pH po aplikaci emulzních formulací s přídavkem KH

emulze		**čas [h]**					
vzorek	**c KH [%]**	**0**	**1**	**2**	**3**	**24**	**48**
		pH [-]					
kuřecí	0,5	5,0	5,4	5,2	5,3	5,1	5,2
	1,5	5,5	5,9	5,2	5,5	5,3	5,2
jelení	0,5	5,4	5,7	5,8	5,6	5,3	5,3
	1,5	5,6	6,0	5,7	5,7	5,4	5,2
kapří	0,5	5,5	5,7	5,6	5,6	5,2	5,3
	1,5	5,7	5,8	5,5	5,4	5,4	5,4
bez KH		5,7	6,0	5,7	5,8	5,6	5,2



Obrázek 33 Změna pH vlivem působení emulzních formulací na kůži

Tabulka 28 Procentuální změny pH po aplikaci krémových formulací po 1, 2, 3, 24 a 48 hodinách

emulze		**čas [h]**				
vzorek	**c KH [%]**	**1**	**2**	**3**	**24**	**48**
		změny pH [%]				
kuřecí	0,5	8	3	5	1	4
	1,5	7	-6	-1	-4	-6
jelení	0,5	6	7	4	-1	-2
	1,5	6	1	2	-4	-8
kapří	0,5	5	3	2	-5	-3
	1,5	1	-3	-5	-6	-5
bez KH		6	0	3	-2	-7

7.4.3 Senzorická analýza

U vyrobených emulzních a gelových formulacích byla provedena i senzorická analýza. Využity byly pořadové zkoušky, kterými bylo sledováno 5 různých znaků, a to roztíratelnost, vstřebatelnost, barva, vůně a celková uživatelská preference. Vzorky byly pro hodnotitele označeny písmeny A až G.

Vzorek A = emulze/gel s přídavkem 0,5 % kuřecího KH

Vzorek B = emulze/gel bez přídavku KH

Vzorek C = emulze/gel s přídavkem 0,5 % jeleního KH

Vzorek D = emulze/gel s přídavkem 0,5 % kapřího KH

Vzorek E = emulze/gel s přídavkem 1,5 % kuřecího KH

Vzorek F = emulze/gel s přídavkem 1,5 % jeleního KH

Vzorek G = emulze/gel s přídavkem 1,5 % kapřího KH

Pro vyhodnocení pořadových zkoušek byl použit Friedmanův test. Byla stanovena nulová hypotéza H, která říká, že mezi vzorky neexistuje statisticky významný rozdíl. Dále byla stanovena alternativní hypotéza A, která neguje nulovou hypotézu a říká, že alespoň jeden vzorek se liší od jiného či jiných. Výsledkem Friedmanova testu byla testovací kritéria FR pro každý jeden znak hodnotící soubor krémů či gelů. Byla zvolena hladina významnosti $\alpha = 0{,}01$. Kritická hodnota FR_{krit} pro daný počet hodnotitelů a vzorků byla zjištěna v literatuře [34] a činila 15,89. Platilo-li, že $FR \geq FR_{krit}$, nulová hypotéza byla zamítnuta, alternativní hypotéza byla přijata. Hodnoty testovacích kritérií uvádí Tab. 29.

Tabulka 29 Kritické hodnoty pro sledované znaky senzorické analýzy

sledovaný znak	**testovací kritérium FR**	
	gely	**krémy**
roztíratelnost	28,05	83,72
vstřebatelnost	22,25	78,58
barva	60,23	29,98
vůně	46,64	48,41
celková uživatelská preference	28,79	75,97

Všechny hodnoty jsou vyšší než kritická hodnota a pro všechny sledované znaky u emulzních i gelových vzorků lze tedy zamítnout nulovou hypotézu a přijmout hypotézu alternativní. Platí tedy, že alespoň jeden vzorek se liší od jiného či jiných. Pro zjištění, které dvojice se liší byl využit Némenyiho test, který říká, že rozdíly vykazují vzorky, u kterých platí, že $|T_i - T_j| \geq q_{1-\alpha}$, kde T_i a T_j jsou součty pořadí z Friedmanova testu a $q_{1-\alpha}$ je testovací kritérium, které je dle tabulek pro $\alpha = 0{,}01$ [33] rovno 35,0. V následujících tabulkách (Tab. 30–39) jsou lišícími se dvojicemi ty, pro které je hodnota ≥ 35 (šedě podbarveny).

Tabulka 30 Hodnoty Némenyiho testu pro hodnocení gelů z hlediska roztíratelnosti

	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**
B	5					
C	20	25				
D	6	1	26			
E	1	6	19	7		
F	33	38	13	39	32	
G	8	3	28	2	9	41

Tabulka 31 Hodnoty Némenyiho testu pro hodnocení emulzí z hlediska roztíratelnosti

	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**
B	25					
C	44	19				
D	30	5	14			
E	26	1	18	4		
F	9	16	35	21	17	
G	6	31	50	36	32	32

Tabulka 32 Hodnoty Némenyiho testu pro hodnocení gelů z hlediska vstřebatelnosti

	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**
B	1					
C	13	14				
D	3	4	10			
E	1	2	12	2		
F	36	37	23	33	35	
G	3	2	16	6	4	39

Tabulka 33 Hodnoty Némenyiho testu pro hodnocení emulzí z hlediska vstřebatelnosti

	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**
B	34					
C	36	2				
D	36	2	0			
E	27	7	9	9		
F	4	30	32	32	23	
G	5	39	30	41	32	32

Tabulka 34 Hodnoty Némenyiho testu pro hodnocení gelů z hlediska barvy

	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**
B	11					
C	8	19				
D	30	41	22			
E	29	40	21	1		
F	38	49	30	9	9	
G	53	64	45	24	24	15

Tabulka 35 Hodnoty Némenyiho testu pro hodnocení emulzí z hlediska barvy

	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**
B	38					
C	33	5				
D	41	3	8			
E	28	10	5	13		
F	18	20	15	23	10	
G	1	39	33	42	29	29

Tabulka 36 Hodnoty Némenyiho testu pro hodnocení gelů z hlediska vůně

	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**
B	34					
C	23	11				
D	14	20	9			
E	11	45	34	25		
F	10	44	33	1	1	
G	12	46	35	1	1	2

Tabulka 37 Hodnoty Némenyiho testu pro hodnocení emulzí z hlediska vůně

	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**
B	19					
C	40	21				
D	35	16	5			
E	37	18	3	2		
F	3	16	37	32	34	
G	11	8	26	24	26	26

Tabulka 38 Hodnoty Némenyiho testu pro hodnocení gelů z hlediska celkové uživatelské preference

	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**
B	19					
C	4	15				
D	12	7	8			
E	6	25	10	18		
F	25	44	29	37	19	
G	18	37	22	30	12	7

Tabulka 39 Hodnoty Némenyiho testu pro hodnocení emulzí z hlediska celkové uživatelské preference

	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**
B	33					
C	39	6				
D	38	5	1			
E	28	5	11	10		
F	5	28	34	33	23	
G	7	40	27	45	35	12

Z hlediska roztíratelnosti se tedy liší dvojice gelů BF, DF a FG a lze konstatovat, že vzorek F je hůře roztíratelný než vzorky B, D a G. Z emulzních formulací se z hlediska roztíratelnosti projevily rozdíly mezi dvojicemi AC, CF a DG a vzorek C lze označit za lépe roztíratelný než vzorky A a F a vzorek D lépe roztíratelný než vzorek G.

Z hlediska vstřebatelnosti existuje rozdíl mezi dvojicemi gelů AF, BF, EF a FG z nichž lze vzorek F označit za hůře vstřebatelný než vzorky A, B, E a G. Z emulzních formulací se liší dvojice AC, AD, BG a DG z nichž je vzorek A hůře roztíratelný než vzorky C a D a vzorek G hůře roztíratelný než vzorky B a D.

Z hlediska barvy se liší dvojice gelových formulací AF, AG, BD, BE, BF, BG a CG. Vzorek B je světlejší než vzorky D, E, F, a G. Vzorek A je světlejší než vzorky F a G. Vzorek C je světlejší než vzorek G. Z krémových formulací existuje rozdíl mezi dvojicemi AB, AD, BG a DG. Vzorek A a G jsou tmavší než vzorky B a D.

Z hlediska vůně se existuje rozdíl mezi dvojicemi gelů BE, BF, BG a CG. Vzorek B byl z hlediska vůně hodnocen jako příjemnější než vzorky E, F a G. Vzorek C byl hodnocen jako příjemnější než vzorek G. Z emulzních formulací byly odlišné vzorky AC, AD, AE a CF. Vzorek A byl ohodnocen jako méně příjemný oproti vzorkům C, D a E. Vzorek C byl hodnocen jako příjemněji vonící než vzorek F.

Z hlediska celkové uživatelské preference se liší dvojice BF, BG a DF z gelových formulací. Vzorek B byl uživateli ohodnocen jako preferovanější než vzorky F a G. Z dvojice DF byl více preferovaný vzorek D. Rozdíly mezi emulzními formulacemi vykazovaly dvojice AC, AD, BG, DG a EG. Vzorek A byl označen jako méně preferovaný než vzorky C a D, vzorek G jako méně preferovaný než vzorky B, D a E.

7.4.4 Měření viskozity

Měření viskozity probíhalo při teplotě 23 ± 1 °C. Z naměřených 250 hodnot během 500 sekund byly vypočítány průměrné hodnoty viskozity, které jsou pro gelové formulace uvedeny v Tab. 40 a pro emulzní formulace v Tab. 41. Tabulky také uvádí použité spindly pro měření daných vzorků, počet otáček za minutu (RPM) a teplotu měření. Z gelových formulací vykazoval nejvyšší viskozitu vzorek s 1,5% přídavkem jeleního KH. Nejnižší viskozita byla naměřena u gelu s přídavkem 1,5 % kapřího KH. Porovnáním s hodnotou gelové formulace bez přídavku KH lze u formulací s přídavkem jeleního KH pozorovat zvýšení viskozity a u formulací s přídavkem kuřecího a kapřího KH naopak ke snížení. Z emulzních formulací lze označit jako nejméně viskózní vzorek s přídavkem 1,5 % kapřího KH, naopak nejvyšší viskozitu vykazovala emulze s 0,5% přídavkem KH z kuřecích žaludků. Porovnáním s emulzí bez přídavku KH lze pozorovat zvýšení u vzorků s přídavkem kuřecího KH a s 0,5% přídavkem jeleního KH. Snížení viskozity oproti emulzi bez přídavku KH vykazovaly formulace s přídavkem kapřího KH a s 1,5% přídavkem jeleního KH. U gelových i emulzních formulací s přídavky kuřecího a jeleního KH došlo vlivem zvýšení koncentrace KH ke zvýšení jejich viskozity. Zvýšení koncentrace kapřího KH v gelu i emulzi vedlo naopak ke snížení viskozity.

Tabulka 40 Hodnoty viskozity pro gelové formulace

vzorek KH	c KH [%]	viskozita [mPas]	typ spindlu	RPM
kuřecí	0,5	237736	PF	2
	1,5	303893	PF	1,5
jelení	0,5	788693	PF	1
	1,5	1207047	PF	0,5
kapří	0,5	23749	PE	12
	1,5	3833	PC	12
bez KH	0	346327	PF	2

Tabulka 41 Hodnoty viskozity pro emulzní formulace

vzorek KH	c KH [%]	viskozita [mPas]	typ spindlu	RPM
kuřecí	0,5	155447	L3	0,5
	1,5	107412	L4	3
jelení	0,5	104817	L3	1
	1,5	46989	L4	5
kapří	0,5	32791	L3	3
	1,5	30067	L3	3
bez KH	0	70064	L3	1

ZÁVĚR

Teoretická část diplomové práce se věnuje kolagenu jako surovině v různých odvětvích průmyslu, dále popisuje kolagenní hydrolyzát, možnosti jeho přípravy, živočišné zdroje pro jeho výrobu a jeho aplikace. V neposlední řadě je zaměřena na metody charakterizace kolagenních hydrolyzátů a také kosmetických formulací s jeho přídavkem.

V rámci praktické části byly připraveny kolagenní hydrolyzáty ze dvou různých surovin, kuřecích žaludků a kapřího odpadu. Byla využita enzymatická hydrolýza enzymem Protamex. Extrakce probíhala při 62,5 °C. Dále byla stanovena účinnost extrakce a bilanční chyba. Pro KH z kuřecích žaludků činila účinnost extrakce 32,9 % a bilanční chyba 27,2 %. Pro KH z kapřího odpadu činila účinnost extrakce 16,0 % a bilanční chyba 17,1 %. Pro charakterizaci KH byly použity ty připravené z kuřecích žaludků a kapřího odpadu a dále KH z jeleních šlach, který byl připraven v rámci DP Bc. Jakuba Dvořáka. Nejprve byl stanoven obsah sušiny a popelovin. Obsah sušiny všech vzorků byl vyšší než 90 %. Kuřecí KH obsahoval 8,10 ± 0,05 % popelovin, jelení KH 0,66 ± 0,06 % popelovin a kapří KH obsahoval 24,89 ± 0,09 % popelovin. Kapří hydrolyzát lze tedy označit za nejvíce znečištěný s nejvyšším obsahem anorganických látek. Dále byla stanovena čirost a pH 6,67% roztoků KH. Nejvyšší transmitance, a tedy čirost byla naměřena pro jelení KH a činila 6,8. Nejnižší transmitance byla naměřena pro roztok kapřího KH a činila 1,9. Roztok kuřecího KH vykazoval transmitanci 3,6. Hodnoty pH roztoků KH se pohybovaly v lehce kyselém až neutrálním pH. Nejvyšší hodnotu vykazoval roztok jeleního KH, přesně 7,08, roztok kuřecího KH vykazoval pH 6,72 a nejnižší hodnota byla naměřena pro roztok kapřího KH, přesně 5,21. Kolagenní hydrolyzáty byly dále pozorovány metodou infračervené spektroskopie, která ve výsledném spektru ukáže vazby přítomné ve vzorcích. Jelení hydrolyzát vykazoval pásy píků, které jsou pro kolagen typické a jsou označeny jako Amid A, B, I, II a III. U kuřecího a kapřího KH nebyly přítomny některé z píků, došlo u nich ke štěpení určitých vazeb. Tento fakt byl potvrzen také gelovou permeační chromatografií, která stanovila u vzorků molekulovou hmotnost. Nejvyšší molekulová hmotnost byla naměřena pro jelení KH a činila 169 kDa. Pro kuřecí KH byla naměřena molekulová hmotnost o hodnotě 95,4 kDa. Nejnižší molekulovou hmotnost vykazoval kapří KH a činila 7,5 kDa a má tady nejvyšší potenciál prostoupit skrz pokožku. Dále byla měřena antioxidační aktivita kolagenních hydrolyzátů. U všech vzorků byl pozorován trend snižování antioxidační aktivity se zvyšující se koncentrací KH. Nejvyšší antioxidační aktivitu 85 % vykazoval roztok kapřího KH o koncentraci 2 $mg \cdot ml^{-1}$. Pro roztok kuřecího KH

o koncentraci 2 $mg \cdot ml^{-1}$ byla naměřena antioxidační aktivita 77 %. Nejnižší antioxidační aktivitu roztoku o koncentraci 2 $mg \cdot ml^{-1}$ vykazoval jelení KH a jeho hodnota činila 66 %. V rozmezí všech koncentrací vykazoval nejvyšší antioxidační aktivitu vzorek kapřího KH, která se pohybovala od 72 do 85 %. Na 0,5 a 1,5% roztocích všech vzorků KH bylo měřeno povrchové napětí a dále byl měřen kontaktní úhel těchto roztoků na kůži. Nejvyšší povrchově napětí bylo naměřeno pro 0,5 % roztok kuřecího KH a činilo 48,8 ± 1,9 $mN \cdot m^{-1}$. Se zvýšením koncentrace došlo u roztoků kuřecího KH ke snížení povrchového napětí. U roztoků jeleního KH došlo se zvýšením koncentrace ke zvýšení povrchového napětí. Nejnižší hodnotu povrchového napětí vykazoval 1,5% roztok kapřího KH a jeho hodnota činila 37,3 ± 0,5 $mN \cdot m^{-1}$. Kontaktní úhly všech měřených roztoků byly nižší než 90° a lze je tedy označit za kapaliny, které smáčí povrch kůže.

Pro charakterizaci kolagenních hydrolyzátů v kosmetických aplikacích byly připraveny emulzní a gelové formulace s 0,5 a 1,5% přídavkem všech tří vzorků KH. Z hlediska mikrobiální bezpečnosti byly testovány na přítomnost mikroorganismů. Využity byly živné půdy PCA a ChYGA. Žádný ze vzorků kosmetických formulací nevykazoval nárůst po kultivaci. Dalším testem bylo zjišťováno přežívání *Pseudomonas aeruginosa*, které stanovilo, zda byl využit dostatečně účinný konzervační systém. Na vzorcích emulzních formulací došlo k nárůstu kolonií a ihned po zaočkování, po 14 dnech byl počet kolonií snížen a po 60 dnech nebyl pozorován žádný nárůst u žádného ze vzorků. Krémové formulace nelze tedy označit za bezpečné z mikrobiologického hlediska a je u nich třeba zvýšit obsah konzervačních látek. Gelové formulace nevykazovaly nárůst žádný a lze je tedy označit za bezpečné. Lze u nich dále testovat nižší obsah konzervantů. Vytvořené kosmetické formulace byly dále testovány *in vivo* na souboru dobrovolnic. Na volární straně předloktí byly v určitých časových intervalech od aplikace emulzí a gelů s přídavky KH měřeny hodnoty hydratace, transepidermální ztráty vody a pH. Pozitivní vliv na hydrataci byl pozorován u emulzních formulací. V porovnání s emulzí bez přídavku KH byly pozorovány lepší účinky vlivem přídavků kapřího KH (0,5 i 1,5 %) po 3 hodinách od aplikace. Vliv emulzí s přídavkem KH na transepidermální ztrátu vody byl u všech vzorků srovnatelný s vzorkem emulze bez KH. Zlepšení TEWL vykazovaly gelové formulace s přídavky jeleního KH. Hodnoty pH nebyly vlivem aplikace emulzí a gelů s přídavky KH výrazně změněny, stále se pohybovaly v rozmezí pH pro pokožku přirozených. V rámci senzorické analýzy byly hodnoceny emulzní i gelové formulace dle 5 různých znaků, a to roztíratelnost, vstřebatelnost, barva, vůně a celková uživatelská preference. Byly nalezeny

rozdíly mezi vzorky emulzí i gelů dle všech pozorovaných znaků. Měřena byla také viskozita připravených emulzních a gelových formulací. Z gelových formulací byla naměřena nejnižší viskozita pro vzorky s přídavky kapřího KH. Naopak přídavky jeleního KH viskozitu oproti vzorku bez přídavku viskozitu zvýšily. Z emulzních formulací vykazovaly nejnižší viskozitu opět vzorky s přídavky kapřího KH. Vlivem přídavku kuřecího KH v obou koncentracích a jeleního KH v koncentraci 0,5 % došlo ke zvýšení viskozity oproti vzorku bez přídavku KH.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] OWCZARZY, Aleksandra; KURASINSKI, Robert; KULIG, Karolina; ROGOZ, Wojciech; SZKUDLAREK, Agnieszka et al. Collagen – Structure, properties and application. Online. *Engineering of Biomaterials*. 2020, roč. 156, s. 17–23. Dostupné z: http://www.biomaterials.pl/Collagen-structure-properties-and-application,134140,0,2.html. [cit. 2024-02-29].

[2] SHOULDERS, Matthew D. a RAINES, Ronald T. Collagen structure and stability. Online. *Annu Rev Biochem*. 2009, roč. 78, s. 929–958. Dostupné z: https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833. [cit. 2024-02-29].

[3] SOBCZAK-KUPIEC, Agniezska; DRABCZYK, Anna; FLORKIEWICZ, Wioletta; GŁĄB, Magdalena; KUDŁACIK-KRAMARCZYK, Sonia et al. Review of the applications of biomedical compositions containing hydroxyapatite and collagen modified by bioactive components. Online. *Materials*. 2021, roč. 14, č. 2096. Dostupné z: https://www.mdpi.com/1996-1944/14/9/2096. [cit. 2024-03-01].

[4] PETERKOVÁ, P a LAPČÍK, L. Kolagen – vlastnosti, modifikace a aplikace. Online. *Chemické listy*. 2000, roč. 94, s. 371–379. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/archiv/2000-PDF/06-PDF/371-379.pdf. [cit. 2024-03-02].

[5] GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E. a MONTERO, M.P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. Online. *Food Hydrocolloids*. 2011, roč. 25, č. 8, s. 1813–1827. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X11000427?via%3Dihub. [cit. 2024-03-02].

[6] RUBEL ALAM, Md; ABDUS SHAHID, Md; ALIMUZZAMAN, Shah a NABI KHAN, Ayub. Sources, extractions and applications of bio-maker collagen – A review. Online. *Biomedical Engineering Advances*. 2022, roč. 100064, č. 4. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2667099222000408. [cit. 2024-03-02].

[7] IJAZ AHMAD, Muhammad; LI, Yonghui; PAN, Jinfeng; LIU, Fei; DAI, Hongjie et al. Collagen and gelatin: Structure, properties, and applications in food industry. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024, roč. 128037, č. 254. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014181302304936X?via%3Dihub. [cit. 2024-03-02].

[8] SIONKOWSKA, Alina; ADAMIAK, Katarzyna; MUSIAŁ, Katarzyna a GADOMSKA, Magdalena. Collagen based materials in cosmetic applications: a review. Online. *Materials*. 2020, roč. 13, č. 4217, s. 1–15. Dostupné z: doi:10.3390/ma13194217. [cit. 2024-03-02].

[9] PALAMUTOĞLU, Recep a PALAMUTOĞLU, Merve İnce. Beneficial health effects of collagen hydrolysates. Online. In: *Studies in Natural Products Chemistry*. 80. Elsevier, 2024, s. 477–503. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780443155895000141. [cit. 2024-03-18].

[10] MOKREJŠ, Pavel a LANGMAIER, Ferdinand. *Aplikace přírodních polymerů*. Skripta. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008.

[11] OCKERMAN, Herbert W. a HANSEN, Conly L. *Animal by-product processing & utilization*. CRC Press, 2000. ISBN 9781566767774.

[12] JAYATHILAKAN, K.; SULTANA, Khudsia; RADHAKRISHNA, K. a BAWA, A. S. Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. Online. *Journal of Food Science and Technology*. 2012, roč. 49, č. 3, s. 278–293. Dostupné z: https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-011-0290-7. [cit. 2024-03-22].

[13] MCCARTHY, Aoife L.; O'CALLAGHAN, Yvonne C. a O'BRIEN, Nora M. Protein Hydrolysates from Agricultural Crops—Bioactivity and Potential for Functional Food Development. Online. *Agriculture*. 2013, roč. 3, č. 1, s. 112–130. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/agriculture3010112. [cit. 2024-03-20].

[14] HOZA, Ignác; KRAMÁŘOVÁ, Daniela a BUDÍNSKÝ, Pavel. *Potravinářská biochemie*. Skripta. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2006.

[15] PIEZ, Karl A. Soluble collagen and the components resulting from its denaturation. In: RAMACHANDRAN. *Treatise on collagen*. 1. Academic Press, 1967, s. 208–252. ISBN 978-0125767804.

[16] ČŮTA, František; POPL, Milan; HEJTMÁNEK, Miloš; KARLÍK, Milan; KSANDR, Zbyněk et al. *Instrumentální analýza*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1986.

[17] KANIA, Patrik. *Infračervená spekroskopie*. Online, Prezentace. VŠCHT. Dostupné z: https://uanlch.vscht.cz/files/uzel/0012437/0007~~M9f1dAYA.pdf?redirected. [cit. 2024-04-16].

[18] HORÁK, Milan a PAPOUŠEK, Dušan. *Infračervená spektra a struktura molekul*. Praha: Academia, 1976.

[19] YAU, W. W.; KIRKLAND, J. J. a BLY, D. D. *Modern size-exclusion liquid chromatography*. New York: John Wiley, 1979. ISBN 0471033871.

[20] CONSTANTINESCU, Teodora a MIHIS, Alin Grig. Resveratrol as a privileged molecule with antioxidant activity. Online. *Food Chemistry Advances*. 2023, roč. 100539, č. 3. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2772753X2300360X?via%3Dihub. [cit. 2024-04-17].

[21] BOUYAHYA, Abdelhakim; BAKRIM, Saad; ABOULAGHRAS, Sara; EL KADRI, Kawtar; AANNIZ, Tarik et al. Bioactive compounds from nature: Antioxidants targeting cellular transformation in response to epigenetic perturbations induced by oxidative stress. Online. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2024, roč. 116432, č. 174. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332224003160?via%3Dihub. [cit. 2024-04-17].

[22] XIANG, Zedong; XUE, Qing; GAO, Peng; YU, Haitao; WU, Mingze et al. Antioxidant peptides from edible aquatic animals: Preparation method, mechanism of action, and structure-activity relationships. Online. *Food Chemistry*. 2023, roč. 134701, č. 404. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814622026632?via%3Dihub. [cit. 2024-04-17].

[23] FARN, Richard J. *Chemistry and Technology of Surfactants*. Blackwell Publishing, 2006. ISBN 978-14051-2696-0.

[24] KRONBERG, Bengt; HOLMBERG, Krister a LINDMAN, Björn. *Surface Chemistry of Surfactants and Polymers*. John Wiley, 2014. ISBN 978-1-119-96124-6.

[25] BAREL, André O.; PAYE, Marc a MAIBACH, Howard I. *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. Marcel Dekker, 2001. ISBN 0824702921.

[26] BAREL, André O.; PAYE, Marc a MAIBACH, Howard I. *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. 3. Informa Healthcare, 2009. ISBN 978-1-4200-6963-1.

[27] SAKAMOTO, Kazutami; LOCHHEAD, Robert Y.; MAIBACH, Howard I. a YAMASHITA, Yuji. *Cosmetic Science and Technology*. Elsevier, 2017. ISBN 978-0-12-802005-0.

[28] *Corneometer CM 825*. Online. Courage & Khazaka. Dostupné z: https://courage-khazaka.de/en/scientific-products/corneometer-cm-825. [cit. 2024-04-19].

[29] *Tewameter TM 300*. Online. Courage & Khazaka. Dostupné z: https://www.courage-khazaka.de/en/scientific-products/occupational-health/occupational-health/172-tewameter-e. [cit. 2024-04-19].

[30] ALEXANDER, Helen; BROWN, Sara J.; DANBY, Simon a FLOHR, Carsten. Research Techniques Made Simple: Transepidermal Water Loss Measurement as a Research Tool. Online. *Journal of Investigative Dermatology*. 2018, roč. 138, č. 11, s. 2295–2300. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.09.001. [cit. 2024-04-30].

[31] *Skin-pH-Meter PH 905*. Online. Courage & Khazaka. Dostupné z: https://courage-khazaka.de/en/scientific-products/efficacy-tests/skin?view=article&id=165&catid=16. [cit. 2024-04-19].

[32] LAWLESS, Harry T. a HEYMANN, Hildegarde. *Sensory evaluation of food*. 2. Springer, 2010. ISBN 978-1-4419-6487-8.

[33] KŘÍŽ, Oldřich; BUŇKA, František a HRABĚ, Jan. *Senzorická analýza potravin II.: Statistické metody*. Skripta. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2007.

[34] MEZGER, Thomas G. *Applied Rheology*. Anton Paar, 2014. ISBN 978-3-9504016-0-8.

[35] MEZGER, Thomas G. *The Rheology Handbook*. 4. Vincentz Network, 2014. ISBN 978-3-86630-842-8.

[36] JU, Haiyan; LIU, Xiuying; ZHANG, Gang; LIU, Dezheng a YANG, Yongsheng. Comparison of the Structural Characteristics of Native Collagen Fibrils Derived from Bovine Tendons Using Two Different Methods: Modified Acid-Solubilized and Pepsin-Aided Extraction. Online. *Materials*. 2020, roč. 13, č. 2. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/ma13020358. [cit. 2024-05-01].

[37] HALIM, N. R. A. a SARBON, N. M. Characterization of Asian swamp eel (Monopterus sp.) protein hydrolysate functional properties prepared using Alcalase® enzyme. Online. *Food Research*. 2020, roč. 4, č. 1, s. 207–215. Dostupné z: https://doi.org/10.26656/fr.2017.4(1).205. [cit. 2024-05-01].

[38] AKRAM, Ayesha Noreen a ZHANG, Chunhui. Effect of ultrasonication on the yield, functional and physicochemical characteristics of collagen-II from chicken sternal cartilage. Online. *Food Chemistry*. 2020, roč. 320, č. 125544. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125544. [cit. 2024-05-01].

[39] KASSEM, Sameh Taha a EL-SHEMY, Khaled Aly. Extracting chromium-free protein hydrolysatefrom leather tanning wastes. Online. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*. 2023, roč. 8, č. 6, s. 167–172. Dostupné z: https://doi.org/10.22161/ijeab. [cit. 2024-05-01].

[40] PROKOPOVÁ, Aneta; GÁL, Robert; MOKREJŠ, Pavel a PAVLAČKOVÁ, Jana. Preparation of Gelatin from Broiler Chicken Stomach Collagen. Online. *Foods*. 2023, roč. 12, č. 127. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/foods12010127. [cit. 2024-04-27].

[41] CHANMANGKANG, Sagun; MANEEROTE, Jirawan; SURAYOT, Utoomporn; PANYA, Atikorn; YOU, SangGuan et al. Physicochemical and biological properties of collagens obtained from tuna tendon by using the ultrasound-assisted extraction. Online. *Journal of Agriculture and Food Research*. 2024, roč. 15, č. 100984. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.100984. [cit. 2024-04-27].

[42] AHMAD, Tanbir; KUMAR, Yogesh; MUZADDADI, Armaan Ullah; KUMAR, Vikas; SINGHAL, Sumit et al. Extraction and Characterization of Collagen Hydrolysate from Buffalo (Bubalus Bubalis) Skin Including its Antioxidant Properties and Antiarthritic Effect. Online. *Waste and Biomass Valorization*. 2024. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s12649-024-02462-y. [cit. 2024-05-01].

[43] VIDAL, Alessandra Roseline; DUARTE, Letícia Pereira; SCHMIDT, Michele Mantelli; CANSIAN, Rogério Luis; FERNANDES, Ilizandra Aparecida et al. Extraction and characterization of collagen from sheep slaughter by-products. Online. *Waste Management*. 2020, roč. 1, č. 102, s. 838–846. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.12.004. [cit. 2024-05-01].

[44] XU, Xin; WANG, Dan; LI, Jiahui; ZENG, Xinglin; ZHANG, Zhiyi et al. Collagen hydrolysates from deer tendon: Preparation assisted with different ultrasound pretreatment times and promotion in MC3T3-E1 cell proliferation and antioxidant activities. Online. *Process Biochemistry*. 2023, roč. 133, s. 228–240. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.09.010. [cit. 2024-04-27].

[45] PROKOPOVÁ, Aneta; MOKREJŠ, Pavel; GÁL, Robert; PAVLAČKOVÁ, Jana a HURAJOVÁ, Anna. Characterization of Poultry Gelatins Prepared by a Biotechnological Method for Targeted Changes at the Molecular Level. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024, roč. 25, č. 916. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/ ijms25020916. [cit. 2024-04-27].

[46] YU, Ermeng; PAN, Chuanyan; LUO, Xu; RUAN, Qiufeng; CHEN, Weijie et al. Structural characteristics, component interactions and functional properties of gelatins from three fish skins extracted by five methods. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023, roč. 248, č. 125813. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125813. [cit. 2024-04-27].

[47] DĂNILĂ, Elena; KAYA, Durmus Alpaslan; ANUTA, Valentina; POPA, Lăcrămioara a CHELARU, Ciprian. Formulation and Characterization of Niacinamide and Collagen Emulsion and Its Investigation as a Potential Cosmeceutical Product. Online. *Cosmetics*. 2024, roč. 11, č. 2. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/cosmetics11020040. [cit. 2024-04-29].

[48] ISO. 11930, *Cosmetics — Microbiology — Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product*. 2. 2019.

[49] YABLONSKI, John I. a MANCUSO, Sharon E. Preservative Efficacy Testing: Accelerating the Process. Online. *Cosmetics & Toiletries*. 2007, roč. 122, č. 10, s. 51–62. Dostupné z: https://img.cosmeticsandtoiletries.com/files/base/allured/all/image/2020/05/ct.CT_122_10_051_091.pdf. [cit. 2024-04-28].

[50] SHIRASANGI, Rahulkumar; KOHLI, Himanshu P.; GUPTA, Smita a CHAKRABORTY, Mousumi. Separation of Methylparaben by emulsion liquid membrane: Optimization, characterization, stability and multiple cycles studies. Online. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2020, roč. 597, č. 124761. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.124761. [cit. 2024-04-28].

[51] PROKOPOVÁ, Aneta; PAVLAČKOVÁ, Jana; GÁL, Robert a MOKREJŠ, Pavel. Collagen Hydrolysate Prepared from Chicken By-Product as a Functional Polymer in Cosmetic Formulation. Online. *Molecules*. 2021, roč. 26, č. 7. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/molecules26072021. [cit. 2024-04-28].

[52] JANSSENS-BÖCKER, Ciska; WIESWEG, Karin a DOBERENZ, Claudia. Native collagen sheet mask improves skin health and appearance: A comprehensive clinical evaluation. Online. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2024, roč. 23, č. 5, s. 1685–1702. Dostupné z: https://doi.org/10.1111/jocd.16181. [cit. 2024-04-28].

[53] SEONG, Seol Hwa; LEE, Young In; CHOI, Sooyeon; KIM, In Ah; SUK, Jangmi et al. Low-molecular-weight collagen peptides supplement promotes a healthy skin: A randomized, double-blinded, placebo-controlled study. Online. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2024, roč. 23, č. 2, s. 554-562. Dostupné z: https://doi.org/10.1111/jocd.16026. [cit. 2024-04-28].

[54] LU, Shan; ZHANG, Silu; WANG, Yun; NI, Jiayi; ZHAO, Tiantian et al. Anti-skin aging effects and bioavailability of collagen tripeptide and elastin peptide formulations in young and middle-aged women. Online. *Journal of Dermatologic Science and Cosmetic Technology*. 2024, roč. 1, č. 2. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.jdsct.2024.100019. [cit. 2024-04-28].

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ECM	extracelulární matrix
ER	endoplazmatické retikulum
AMK	aminokyselina
Hyp	hydroxyprolin
Hyl	hydroxylysin
Lys	lysin
Ala	alanin
Asp	kyselina asparagová
Glu	kyselina glutamová
Arg	arginin
Trp	tryptofan
Cys	cystein
TEWL	transepidermální ztráta vody
$g \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$	jednotka TEWL
k. j.	korneometrická jednotka, jednotka hydratace
EDC	karboimid
NHS	N-hydroxysuccinimid
DAS	dialdehyd škrobu
MES	kyselina 2-morfolinoethansulfanová
MTG	mikrobiální transglutamináza
PVP	polyvinylpyrrolidon
PVA	polyvinylalkohol
KP	kosmetický přípravek
ATP	adenosintrifosfát
IR	infračervená spektroskopie
KRS-5	směsný krystal jodidu a bromidu thallného

ATR	zeslabená totální reflektance, metoda infračervené spektroskopie
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GPC	gelová permeační chromatografie
GPC-RID	gelová permeační chromatografie s refraktometrickou detekcí
LC	kapalinová chromatografie
kDa	jednotka molekulové hmotnosti
kat	katal, jednotka katalytické účinnosti enzymů
cm^{-1}	reciproký centimetr, jednotka vlnočtu infračervené spektroskopie
MPa	jednotka tlaku
ROS	reaktivní formy kyslíku
H_2O_2	peroxid vodíku
BHT	butylhydroxytoluen
BHA	butylhydroxyanisol
TBHQ	terc-butylhydroxychinon
PG	propylgalát
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
ABTS	2,2′-azino-bis(3-etylbenzothiazolin-6-sulfurátová kyselina)
FRAP	železitá redukční antioxidační síla
σ	povrchová energie [$J \cdot m^{-2}$]
γ	povrchové napětí [$N \cdot m^{-1}$]
θ	kontaktní úhel [°]
j	smáčecí napětí
MO	mikroorganismus
SVP	správná výrobní praxe
MIT	methyisothiazolinon
MCI	methylcholorisothiazolinon

SC	*stratum corneum*
MPT	multifotonová skenovací tomografie
NMR	nukleární magnetická rezonance
η	dynamická viskozita [Pa·s]
τ	smykové napětí [Pa]
$\dot{\gamma}$	rychlost smykové deformace [s^{-1}]
ν	kinematické viskozita [$m^2 \cdot s^{-1}$]
ρ	hustota [$kg \cdot m^{-3}$]
m	hmotnost [g]
M	molární hmotnost [$g \cdot mol^{-1}$]
c	koncentrace [$mol \cdot l^{-1}$]
V	objem [l]
PA	polyamid
η	účinnost extrakce
B	bilance
BCH	bilanční chyba
AA	antioxidační aktivita
A	absorbance
KH	kolagenní hydrolyzát
PCA	place count agar
ChYGA	chloramphenicol yeast glucose agar
TSA	tryptic soy agar
SDA	sabouraud dextrose agar
VRBL	violet red bile lactose agar
CSBDA	casein soya bean digest agar
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight

CPM	celkový počet mikroorganismů
M_w	hmotností průměr molekulové hmotnosti
M_n	početní průměr molekulové hmotnosti
PDI	index polydisperzity
CFTA	Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association
ASTM	American Society for Testing and Materials
AOAC	Association of Analytical Communities
JP	Japanese Pharmacopoeia
EP/BP	European Pharmacopoeia/British Pharmacopoeia
FR	testovací kritérium Friedmanova testu
FR_{krit}	kritická hodnota Friedmanova testu
T_i	součet pořadí Friedmanova testu
$q_{1-\alpha}$	testovací kritérium Némenyiho testu
α	hladina významnosti
RPM	počet otáček za minutu

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Struktura kolagenního vlákna [3] 14

Obrázek 2 Schématické znázornění vibrací v infračerveném spektru [17] 27

Obrázek 3 Schéma smáčení pevného povrchu kapalinou [23] 32

Obrázek 4 Schéma korneometrického měření hydratace [28] 37

Obrázek 5 Schéma měření TEWL, A = metoda otevřené komory, B = metoda uzavřené komory, C = metoda kondenzační komory [30] 37

Obrázek 6 Popis součástí pH metru [31] 38

Obrázek 7 Volární strana předloktí dobrovolnice v průběhu *in vivo* měření, A = zalepené části v průběhu odmašťování, B = označená místa pro nanášení formulací, C = po nanesení vzorků 60

Obrázek 8 Vzorky pro senzorické hodnocení, emulzní formulace v horní části, gelové v dolní části, označení formulací – A = 0,5 % kuřecího KH, B = bez přídavku KH, C = 0,5 % jeleního KH, D = 0,5 % rybího KH, E = 1,5 % kuřecího KH, F = 1,5 % jeleního KH, G = 1,5 % kapřího KH 62

Obrázek 9 Graf hmotnostní bilance přípravy kolagenního hydrolyzátu z kuřecích žaludků 66

Obrázek 10 Graf hmotnostní bilance přípravy kolagenního hydrolyzátu z kapřího odpadu 66

Obrázek 11 Připravené kolagenní hydrolyzáty, KZ_1 = KH z kuřecích žaludků, JS_2 = KH z jeleních šlach, KO_3 = KH z kapřího odpadu 66

Obrázek 12 Infračervené spektrum 69

Obrázek 13 Antioxidační aktivita vzorků kuřecího KH 72

Obrázek 14 Antioxidační aktivita vzorků jeleního KH 72

Obrázek 15 Antioxidační aktivita vzorků kapřího KH 72

Obrázek 16 Kapka 0,5% roztoku kuřecího KH na volární části předloktí 74

Obrázek 17 Kapka 1,5% roztoku kuřecího KH na volární části předloktí 75

Obrázek 18 Kapka 0,5% roztoku jeleního KH na volární části předloktí 75

Obrázek 19 Kapka 1,5% roztoku jeleního KH na volární části předloktí 75

Obrázek 20 Kapka 0,5% roztoku kapřího KH na volární části předloktí 76

Obrázek 21 Kapka 1,5% roztoku kapřího KH na volární části předloktí 76

Obrázek 22 Petriho misky s PCA agarem a nanesenými vzorky po inkubaci, levý sloupec – emulzní formulace pod sebou seřazeny v pořadí 0,5% kuřecí KH, 1,5% kuřecí KH, 0,5% jelení KH, 1,5% jelení KH, 0,5% kapří KH, 1,5% kapří KH a vzorek bez KH, pravý sloupec – gelové formulace ve stejném pořadí 79

Obrázek 23 Petriho misky s ChYGA agarem a nanesenými vzorky po inkubaci, levý sloupec – emulzní formulace pod sebou seřazeny v pořadí 0,5% kuřecí KH, 1,5% kuřecí KH, 0,5% jelení KH, 1,5% jelení KH, 0,5% kapří KH, 1,5% kapří KH a vzorek bez KH, pravý sloupec – gelové formulace ve stejném pořadí 80

Obrázek 24 Petriho misky s nanesenými vzorky emulzí s *P. aeruginosa* v časech 0 (ihned po zaočkování, první sloupec), 14 (po 14 dnech, druhý sloupec) a 60 (po 60 dnech, třetí sloupec), seřazení vzorků po řádcích – 0,5% kuřecí KH, 1,5% kuřecí KH, 0,5% jelení KH, 1,5% jelení KH, 0,5% kapří KH, 1,5% kapří KH a vzorek bez KH 82

Obrázek 25 Petriho misky s nanesenými vzorky gelů s *P. aeruginosa* v časech 0 (ihned po zaočkování, první sloupec), 14 (po 14 dnech, druhý sloupec) a 60 (po 60 dnech, třetí sloupec), seřazení vzorků po řádcích – 0,5% kuřecí KH, 1,5% kuřecí KH, 0,5% jelení KH, 1,5% jelení KH, 0,5% kapří KH, 1,5% kapří KH a vzorek bez KH 84

Obrázek 26 Vzorky emulzí bez konzervantů v čase 0 (první sloupec), 14 (druhý sloupec) a 60 (třetí sloupec), seřazení vzorků po řádcích – 0,5% kuřecí KH, 1,5% kuřecí KH, 0,5% jelení KH, 1,5% jelení KH, 0,5% kapří KH, 1,5% kapří KH a vzorek bez KH 85

Obrázek 27 Vzorky gelů bez konzervantů v čase 0 (první sloupec), 14 (druhý sloupec) a 60 (třetí sloupec), seřazení vzorků po řádcích – 0,5% kuřecí KH, 1,5% kuřecí KH, 0,5% jelení KH, 1,5% jelení KH, 0,5% kapří KH, 1,5% kapří KH a vzorek bez KH 86

Obrázek 28 Změna hydratace vlivem působení gelových formulací na kůži 88

Obrázek 29 Změna hydratace vlivem působení emulzních formulací na kůži 89

Obrázek 30 Změna TEWL vlivem působení gelových formulací na kůži 91

Obrázek 31 Změna TEWL vlivem působení emulzních formulací na kůži 92

Obrázek 32 Změna pH vlivem působení gelových formulací na kůži 94

Obrázek 33 Změna pH vlivem působení emulzních formulací na kůži 96

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Rámcové složení emulzní formulace 56
Tabulka 2 Rámcové složení gelové formulace 57
Tabulka 3 Fyziologická stupnice hydratace pokožky 61
Tabulka 4 Fyziologická stupnice TEWL pokožky 61
Tabulka 5 Fyziologická stupnice pH pokožky 61
Tabulka 6 Hodnoty pro výpočet účinnosti extrakce a bilanční chyby 65
Tabulka 7 Naměřené hodnoty obsahu sušiny a popelovin pro vzorky kolagenních hydrolyzátů 67
Tabulka 8 Naměřené hodnoty transmitance pro vzorky KH 68
Tabulka 9 Hodnoty pH pro 6,67% roztoky vzorků KH 68
Tabulka 10 Hodnoty vlnočtů pro píky přítomné v IR spektru 69
Tabulka 11 Hodnoty z GPC pro vzorky KH 70
Tabulka 12 Hodnoty absorbance a antioxidační aktivity pro koncentrační řadu vzorků KH 71
Tabulka 13 Výsledné hodnoty povrchového napětí pro vzorky KH 73
Tabulka 14 Hodnoty kontaktního úhlu, výšky a šířky kapky 74
Tabulka 15 Hodnoty pH připravených formulací 77
Tabulka 16 Hodnoty CFU/g pro emulze formulace se zaočkovanou *P. aeruginosa* 83
Tabulka 17 Hodnoty hydratace po aplikaci gelových formulací s přídavkem KH 87
Tabulka 18 Procentuální změny hydratace kůže po aplikaci gelových formulací po 1, 2, 3, 24 a 48 hodinách 88
Tabulka 19 Hodnoty hydratace po aplikaci emulzních formulací s přídavkem KH 89
Tabulka 20 Procentuální změny hydratace kůže po aplikaci emulzních formulací po 1, 2, 3, 24 a 48 hodinách 89
Tabulka 21 Hodnoty TEWL po aplikaci gelových formulací s přídavkem KH 91
Tabulka 22 Procentuální změny TEWL po aplikaci gelových formulací po 1, 2, 3, 24 a 48 hodinách 91
Tabulka 23 Hodnoty TEWL po aplikaci emulzních formulací s přídavkem KH 92
Tabulka 24 Procentuální změny TEWL po aplikaci emulzních formulací po 1, 2, 3, 24 a 48 hodinách 93
Tabulka 25 Hodnoty pH po aplikaci gelových formulací s přídavkem KH 94
Tabulka 26 Procentuální změny pH po aplikaci gelových formulací po 1, 2, 3, 24 a 48 hodinách 95
Tabulka 27 Hodnoty pH po aplikaci emulzních formulací s přídavkem KH 95
Tabulka 28 Procentuální změny pH po aplikaci krémových formulací po 1, 2, 3, 24 a 48 hodinách 96

Tabulka 29 Kritické hodnoty pro sledované znaky senzorické analýzy 97
Tabulka 30 Hodnoty Némenyiho testu pro hodnocení gelů z hlediska roztíratelnosti 98
Tabulka 31 Hodnoty Némenyiho testu pro hodnocení emulzí z hlediska roztíratelnosti 98
Tabulka 32 Hodnoty Némenyiho testu pro hodnocení gelů z hlediska vstřebatelnosti 98
Tabulka 33 Hodnoty Némenyiho testu pro hodnocení emulzí z hlediska vstřebatelnosti ... 99
Tabulka 34 Hodnoty Némenyiho testu pro hodnocení gelů z hlediska barvy 99
Tabulka 35 Hodnoty Némenyiho testu pro hodnocení emulzí z hlediska barvy 99
Tabulka 36 Hodnoty Némenyiho testu pro hodnocení gelů z hlediska vůně 99
Tabulka 37 Hodnoty Némenyiho testu pro hodnocení emulzí z hlediska vůně 100
Tabulka 38 Hodnoty Némenyiho testu pro hodnocení gelů z hlediska celkové uživatelské preference 100
Tabulka 39 Hodnoty Némenyiho testu pro hodnocení emulzí z hlediska celkové uživatelské preference 100
Tabulka 40 Hodnoty viskozity pro gelové formulace 102
Tabulka 41 Hodnoty viskozity pro emulzní formulace 102

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Dotazník pro účastníka měření

Příloha P II: Individuální informovaný souhlas

Příloha P III: Senzorický dotazník

PŘÍLOHA P I: DOTAZNÍK PRO ÚČASTNÍKA MĚŘENÍ

Dotazník pro účastníka měření
Jméno:
Příjmení:
Věk:
Pohlaví:
Kód pokusné osoby (evidenční číslo):

Současný zdravotní stav

Vyskytuje se u Vás nyní:	**ANO**	**NE**	**JAKÉ**
lupénka			----------
ekzém			----------
rakovina kůže			----------
jiné kožní problémy a onemocnění			
jizvy, mateřská znamínka, jiné vady kůže v místě testu			----------
zarudnutí kůže po slunění nebo z jiného důvodu v místě testu			----------
astma vyžadující denní příjem léků			----------
jiné chronické respirační onemocnění			
diabetes vyžadující léčbu inzulinem			----------
onemocnění imunitního systému			

Zdravotní stav v minulosti

Prodělal(a) jste:	**ano**	**ne**
transplantaci orgánů		
léčbu maligního nádoru v posledních 6 měsících		

Užívání léků

Berete či používáte pravidelně:	**ano**	**ne**	**jaké**
protizánětlivé léky (např. aspirin, ibuprofen, hydrokortizon, nebo jiné steroidy)			
imunosupresivní léky (např. cyklosporin A)			
jiné léky			

Alergologická léčba

Probíhá u vás v současné době:	**ano**	**ne**	**jaká**
alergologická léčba (kapky, injekce, apod.)			
dostali jste poslední dávku během minulého týdne			----------
očekáváte další dávky v průběhu studie			----------

Pouze pro ženy

Jste:	**ano**	**ne**
těhotná nebo kojící		

Alergie

Projevila se u vás někdy alergie na:	**specifikujte:**
detergenty a čisticí prostředky	
kosmetické přípravky a vůně parfémů	
přípravky do koupele a na mytí (šampón, mýdlo)	
pleťové krémy a mléka, lotiony	
antiperspiranty a deodoranty	
léky	
jiné materiály	

Doplňující údaje

Zdravotní stav:	**specifikujte:**
používáte pravidelně jakýkoliv přípravek pro léčbu kůže	
používáte pravidelně jakékoliv léčivo (na předpis, či volně prodejné)	
navštěvujete v současné době lékaře kvůli:	
alergiím	
kožním problémům	
z jiného důvodu	
máte nějaké jiné zdravotní potíže	

Účast v dalších studiích

Studie:	**Typ studie:**	**Datum poslední studie:**
účastnil(a) jste se někdy kožního testu	----------	
účastníte se v současné době jiné studie jakéhokoliv druhu		

podpis účastníka měření:
datum:

Pouze pro účely organizátora měření

Na základě zjištěných údajů je účastník a) přijat
b) nepřijat

Zdůvodnění:

Datum: Podpis organizátora:

PŘÍLOHA P II: INDIVIDUÁLNÍ INFORMOVANÝ SOUHLAS

Prohlášení účastníka

Souhlasím se svou účastí v testování modelových formulací s drůbežím, jelením a rybím kolagenem, které mi bylo popsáno a které bude garantováno pracovníky Ústavu technologie tuků, tenzidů a kosmetiky. Beru na vědomí, že experiment může zahrnovat riziko nežádoucích účinků na kůži. Toto riziko mi bylo detailně objasněno a mohl(a) jsem se informovat o všech podrobnostech experimentu.

Vím, že mohu kdykoliv odvolat svůj souhlas s účastí v experimentu a mohu kdykoliv odstoupit od své účasti.

Mohu si vyžádat další informace o experimentu a oznámit nežádoucí účinky u zodpovědného pracovníka.

Souhlasím, že data získaná během experimentu mohou být statisticky zpracována. Veškeré údaje o průběhu a výsledcích měření, které mne mohou identifikovat, zůstanou přísně důvěrné.

Prohlašuji, že toto poučení plně chápu a podepisuji ho při plném vědomí.

……

…….

plné jméno účastníka cvičení podpis účastníka cvičení

Ve Zlíně dne …….

PŘÍLOHA P III: SENZORICKÝ DOTAZNÍK

DOTAZNÍK PRO SENZORICKÉ HODNOCENÍ KRÉMŮ A GELŮ S PŘÍDAVKEM KOLAGENNÍHO HYDROLYZÁTU

Jméno a příjmení: Datum:

EMULZNÍ FORMULACE

Úkol č. 1:
Seřaďte jednotlivé vzorky podle **roztíratelnosti** (od nejlépe roztíratelného po nejhůře roztíratelný). Zkouška s nucenou volbou – každému vzorku musí být přiděleno jedno číslo. Vzorek si pomocí tyčinky naneste na hřbet ruky a pomocí prstu rozetřete (současně řešte i ostatní úkoly)

Vzorek	A	B	C	D	E	F	G
Roztíratelnost							

Úkol č. 2:
Seřaďte jednotlivé vzorky podle **vstřebatelnosti** (od nejlépe vstřebatelného po nejhůře vstřebatelný). Zkouška s nucenou volbou – každému vzorku musí být přiděleno jedno číslo.

Vzorek	A	B	C	D	E	F	G
Vstřebatelnost							

Úkol č. 3:
Seřaďte jednotlivé vzorky podle **barvy** (od nejsvětlejšího po nejtmavší). Zkouška s nucenou volbou – každému vzorku musí být přiděleno jedno číslo.

Vzorek	A	B	C	D	E	F	G
Barva							

Úkol č. 4:
Seřaďte jednotlivé vzorky podle **vůně** (od nejpříjemnější po nejméně příjemný). Zkouška s nucenou volbou – každému vzorku musí být přiděleno jedno číslo.

Vzorek	A	B	C	D	E	F	G
Vůně							

Úkol č. 5:
Seřaďte jednotlivé vzorky podle **celkové uživatelské preference** (od nejvíce preferovaného po nejméně preferovaný). Zkouška s nucenou volbou – každému vzorku musí být přiděleno jedno číslo.

Vzorek	A	B	C	D	E	F	G
Preference							

GELOVÉ FORMULACE

Úkol č. 1:
Seřaďte jednotlivé vzorky podle **roztíratelnosti** (od nejlépe roztíratelného po nejhůře roztíratelný). Zkouška s nucenou volbou – každému vzorku musí být přiděleno jedno číslo. Vzorek si pomocí tyčinky naneste na hřbet ruky a pomocí prstu rozetřete (současně řešte i ostatní úkoly)

Vzorek	A	B	C	D	E	F	G
Roztíratelnost							

Úkol č. 2:
Seřaďte jednotlivé vzorky podle **vstřebatelnosti** (od nejlépe vstřebatelného po nejhůře vstřebatelný). Zkouška s nucenou volbou – každému vzorku musí být přiděleno jedno číslo.

Vzorek	A	B	C	D	E	F	G
Vstřebatelnost							

Úkol č. 3:
Seřaďte jednotlivé vzorky podle **barvy** (od nejsvětlejšího po nejtmavší). Zkouška s nucenou volbou – každému vzorku musí být přiděleno jedno číslo.

Vzorek	A	B	C	D	E	F	G
Barva							

Úkol č. 4:
Seřaďte jednotlivé vzorky podle **vůně** (od nejpříjemnější po nejméně příjemný). Zkouška s nucenou volbou – každému vzorku musí být přiděleno jedno číslo.

Vzorek	A	B	C	D	E	F	G
Vůně							

Úkol č. 5:
Seřaďte jednotlivé vzorky podle **celkové uživatelské preference** (od nejvíce preferovaného po nejméně preferovaný). Zkouška s nucenou volbou – každému vzorku musí být přiděleno jedno číslo.

Vzorek	A	B	C	D	E	F	G
Preference							