



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VALORIZACE SEKUNDÁRNÍCH PRODUKTŮ ZPRACOVÁNÍ TECHNICKÉHO KONOPÍ ZA ÚČELEM VYUŽITÍ V KOSMETICE

VALORIZATION OF SECONDARY PRODUCTS OF HEMP PROCESSING TO APPLICATION IN COSMETICS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Sarah Benková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2025

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP2039/2024 Akademický rok: 2024/25
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Sarah Benková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie bioaktivních látek
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

Název diplomové práce:

Valorizace sekundárních produktů zpracování technického konopí za účelem využití v kosmetice

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- 1) literární rešerše – základní charakteristika konopí, zpracování a frakcionace technického konopí; složení frakcí a hlavní aktivní látky
- 2) charakterizace odpadní vlákniny ze zpracování konopí; optimalizace stanovení obsahu kanabinoidů a dalších biologicky aktivních látek využitelných v kosmetice; možnosti extrakce a biotechnologické valorizace
- 3) příprava kosmetických emulzí a dalších typů přípravků (tonikum, micelární voda apod.) s přídavkem konopného extraktu
- 4) stanovení stability biologického účinku konopných preparátů, stability a senzorických vlastností.

Termín odevzdání diplomové práce: 16.5.2025:

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

Bc. Sarah Benková
studentka

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 3.2.2025

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Cílem této diplomové práce bylo zhodnotit sekundární produkty zpracování technického konopí, zejména vlákninovou frakci konopného koláče, jako perspektivní surovinu pro výrobu kosmetických přípravků obohacených o metabolity bakterií mléčného kvašení. Byla vyhodnocena enzymatická předúprava konopné vlákniny pomocí plísně *Aspergillus sojae* a její vliv na uvolnění fenolických látek, flavonoidů a sacharidů pro následnou kultivaci vybraných bakterií mléčného kvašení. Extrakty po fermentaci kmenů *Lactiplantibacillus plantarum*, *Bifidobacter bifidum*, jejich kombinaci a komerčně dostupného mixu bakterií mléčného kvašení na upravené i neupravené konopné vláknině byly charakterizovány a na základě výsledků byly z těchto extraktů formulovány tři typy kosmetických emulzí, které byly podrobeny testům stability na analytické centrifuze, senzoričkému hodnocení a měření účinku na pokožce. Práce ukazuje, že valorizace konopné vlákniny fermentací bakterií mléčného kvašení je slibnou strategií a tato pilotní studie by mohla být použita jako odrazový můstek pro další výzkum v této oblasti.

ABSTRACT

The aim of this thesis was to evaluate the secondary by-products of industrial hemp processing, particularly the fibre fraction of hemp cake, as a promising raw material to the production of cosmetic formulations enriched with metabolites of lactic acid bacteria. An enzymatic pretreatment of the hemp fibre using the fungus *Aspergillus sojae* was assessed for its ability to release phenolic compounds, flavonoids, and carbohydrates for subsequent cultivation of selected lactic acid bacteria. Extracts obtained after fermenting *Lactiplantibacillus plantarum*, *Bifidobacterium bifidum*, their combination, and a commercially available lactic acid bacteria mix on both treated and untreated hemp fibre were characterized. Based on these results, three types of cosmetic emulsions were formulated and subjected to stability testing by analytical centrifugation, sensory evaluation, and in-use skin performance measurements. This work demonstrates that valorising hemp fibre via lactic acid bacterial fermentation is a promising strategy, and this pilot study can serve as a springboard for further research in the field.

KLÍČOVÁ SLOVA

Technické konopí, konopné výlisky, konopná vláknina, bakterie mléčného kvašení, kyselina mléčná, kosmetické emulze

KEYWORDS

Technical hemp, hemp seed cake, hemp fibre, lactic acid bacteria, lactic acid, cosmetics emulsions

BENKOVÁ, Sarah. *Valorizace sekundárních produktů zpracování technického konopí za účelem využití v kosmetice*. Online, diplomová práce. Ivana MÁROVÁ (vedoucí práce). Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2025. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/162076>.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce prof. RNDr. Ivaně Márové CSc. za její odborné rady a podporu v průběhu práce. Dále bych chtěla poděkovat konzultantkám Ing. Pavlíně Sikorové a Ing. Pavlíně Sniegoňové za veškerou jejich pomoc v laboratoři i mimo ni. Velké díky patří mé rodině a příteli, kteří se mě v průběhu maximálně podporovali. A obrovské díky patří lidem, se kterými jsme zvládli pět let na fakultě a pro většinu z nás zde končí naše společná studijní cesta, ale stejně vždycky zůstaneme fikaní, famózní a fantastický.

OBSAH

1. ÚVOD	6
2. TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1. Konopí seté a technické konopí	7
2.1.1. Konopné frakce a jejich zpracování	7
2.1.2. Bioaktivní látky	9
2.1.3. Využití konopných frakcí v kosmetice	12
2.2. Bakterie mléčného kvašení	12
2.2.1. Metabolismus	13
2.2.2. Zástupci	15
2.2.3. Metabolity bakterií mléčného kvašení	16
2.2.4. Využití bakterií mléčného kvašení a jejich metabolitů v kosmetice	17
2.3. Houby rodu <i>Aspergillus</i>	19
2.3.1. Metabolity plísní rodu <i>Aspergillus</i>	19
2.3.2. Vybrané druhy	21
2.3.3. Využití metabolitů plísní rodu <i>Aspergillus</i> v kosmetice	22
2.4. Stavba a funkce kůže	23
2.4.1. Pokožka (<i>epidermis</i>)	24
2.4.2. Škára (<i>dermis, corium</i>)	25
2.4.3. Podkožní vazivo	26
2.5. Vybrané metody	26
2.5.1. UV/VIS spektrofotometrie	26
2.5.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	26
2.5.3. Analytická centrifuga	27
2.5.4. Stanovení antimikrobiální aktivity	28
3. CÍLE PRÁCE	29
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
4.1. Použité chemikálie a přístroje	30
4.1.1. Chemikálie	30
4.1.2. Přístroje	30
4.1.3. Použitý materiál pro kultivace	31
4.1.4. Použité mikroorganismy	31
4.2. Kultivace bakterií mléčného kvašení	32
4.2.1. Příprava kultivačního média a substrátu	32

4.2.2.	Očkování a kultivace.....	32
4.2.3.	Stanovení růstu kultury bakterií pomocí turbidimetrie.....	32
4.2.4.	Stanovení CFU pomocí plotnové metody.....	32
4.3.	Úprava konopné vlákniny pomocí plísně rodu <i>Aspergillus</i> pro kultivaci bakterií mléčného kvašení.....	33
4.3.1.	Kultivace <i>Asperigullus sojae</i>	33
4.3.2.	Kultivace bakterií mléčného kvašení.....	33
4.4.	Charakterizace extraktů získaných po odstředění kultur a extraktů	34
4.4.1.	Změna pH.....	34
4.4.2.	Stanovení koncentrace fenolických látek.....	34
4.4.3.	Stanovení koncentrace flavonoidů	34
4.4.4.	Stanovení antioxidační aktivity extraktů	35
4.4.5.	Stanovení celkových rozpustných sacharidů dle Duboise.....	35
4.4.6.	Stanovení koncentrace redukujících sacharidů dle Somogyi-Nelsona	35
4.4.7.	Stanovení koncentrace kyseliny mléčné pomocí HPLC.....	36
4.4.8.	Stanovení koncentrace kanabinoidů pomocí HPLC	36
4.4.9.	Stanovení antimikrobiální aktivity.....	37
4.5.	Příprava kosmetických emulzí.....	39
4.5.1.	Odstředivý test	39
4.5.2.	Hodnocení antioxidační aktivity	39
4.5.3.	Senzorické hodnocení	40
4.5.4.	Měření účinku na pokožce	40
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE	41
5.6.	Stanovení růstu kultury bakterií pomocí turbidimetrie.....	41
5.7.	Stanovení CFU pomocí plotnové metody.....	42
5.8.	Gravimetrické stanovení biomasy <i>A. sojae</i>	43
5.9.	Charakterizace extraktů získaných po odstředění kultur a substrátů.....	43
5.9.1.	Změna pH.....	43
5.9.2.	Stanovení koncentrace fenolických látek.....	44
5.9.3.	Stanovení koncentrace flavonoidů	45
5.9.4.	Stanovení antioxidační aktivity extraktů	46
5.9.5.	Stanovení celkových rozpustných sacharidů dle Duboise.....	46
5.9.6.	Stanovení koncentrace redukujících sacharidů dle Somogyi-Nelsona	47
5.9.7.	Stanovení koncentrace kyseliny mléčné pomocí HPLC.....	48
5.9.8.	Stanovení koncentrace kanabinoidů pomocí HPLC	49

5.9.9. Stanovení antimikrobiální aktivity.....	50
5.10. Příprava kosmetických emulzí.....	56
5.10.1. Odstředivý test	56
5.10.2. Hodnocení antioxidační aktivity	61
5.10.3. Senzorické hodnocení	63
5.10.4. Měření účinku na pokožce	65
6. ZÁVĚR	68
7. LITERATURA.....	70
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	78
9. PŘÍLOHY	79

1. ÚVOD

Jednotlivé frakce technického konopí jsou po staletí využívána člověkem v různých oblastech života. Využití konopných vláken se od výroby lan a pytloviny přesunulo na pole výroby kompozitních a stavebních materiálů. Konopné semeno je nejčastěji zpracováváno lisováním za studena pro získání konopného oleje. Zbytkový materiál po lisování oleje je označován jako konopný koláč a díky vysokému obsahu proteinů, vlákniny a dalších prospěšných látek je využíván v potravinářství jako doplněk stravy nebo v krmivářství. Pro podporu cirkulární ekonomiky je snaha nalézt uplatnění tohoto odpadního produktu i v dalších oblastech průmyslu.

Bakterie mléčného kvašení jsou díky schopnosti fermentace využívány zejména v potravinářství, kde dodávají fermentovaným potravinám chuť i strukturu a zároveň produkují antibakteriální látky inhibující růst patogenních bakterií. Jejich primární metabolit, kyselina mléčná, je také cennou složkou pro kosmetické přípravky, protože má hydratační účinky a působí také jako exfoliant.

Mezi plísně rodu *Aspergillus* patří kromě patogenních druhů i ty, které získali status GRAS a jsou využívány v potravinářství i biotechnologických produkcích. Tradičně je využíván *Aspergillus sojae* či *Aspergillus oryzae* při fermentační výrobě sójové omáčky nebo saké v japonské kultuře. Typickým rysem těchto plísní je produkce extracelulárních enzymů štěpících polysacharidy, jako jsou celulózy, pektinázy nebo lakázy. Rozmanitost produkovaných enzymů je možné využít pro předúpravu rostlinných substrátů pro následné mikrobiální fermentace.

V posledních letech se prosazuje koncept tzv. biokosmetiky. Jedná se o produkty, které kombinují přírodní suroviny s nejmodernějšími biotechnologickými procesy. Do popředí se dostávají fermentační extrakty, které jsou zdrojem cenných metabolitů, jako jsou organické kyseliny, polysacharidy, antioxidační a antimikrobiální látky. Díky fermentační biotechnologii je možné do kosmetických formulací zavést bioaktivní složky a zároveň splňovat požadavky na udržitelnost a minimalizaci chemických prostředků.

Předmětem diplomové práce je využití vlákninové frakce konopného koláče jako substrátu pro růst bakterií mléčného kvašení, zhodnocení efektu enzymatické předúpravy konopné vlákniny pomocí *Aspergillus sojae* pro následnou kultivaci bakterií mléčného kvašení a příprava kosmetického preparátu s přídavkem fermentovaného konopného extraktu. Je kladen důraz na propojení využití zbytkových produktů potravinářského průmyslu, enzymové biokonverze a fermentační biotechnologie.

2. TEORETICKÁ ČÁST

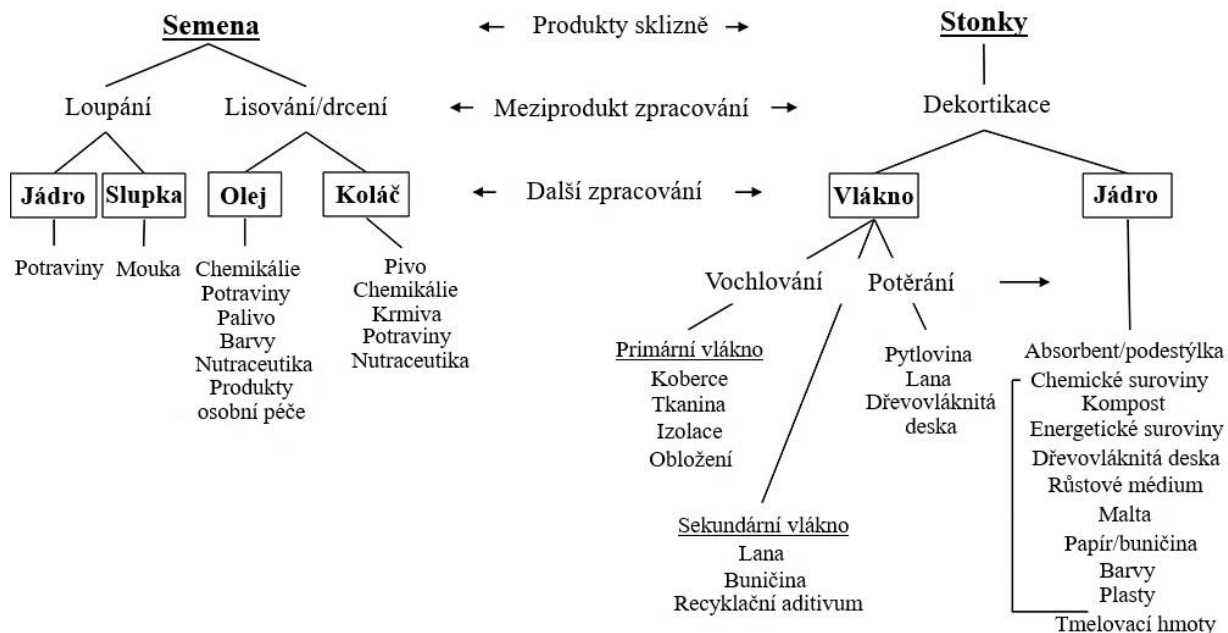
2.1. Konopí seté a technické konopí

Z pohledu genetiky, botaniky nebo biochemie je konopí seté (*Cannabis sativa*) velmi rozmanitým druhem rostliny, která je lidskou společností využívána již od 3. století před naším letopočtem. Po zániku římské říše se od léčebného používání rostliny upustilo a bylo později nahrazeno cíleným pěstováním pro konopné textilní vlákno. V moderní době s pokrokem analytických metod i průmyslových technologií je konopí využíváno v mnoha odvětvích průmyslu – od farmacie, přes potravinářství, až po automobilový průmysl [1], [2].

Konopí seté jako nejrozšířenější druh konopí s nízkým obsahem psychotropního kanabinoidu tetrahydrokanabinolu (THC) bylo použito pro vyšlechtění tzv. technického konopí. Technické konopí se vyznačuje koncentrací THC do 0,3 % [1].

2.1.1. Konopné frakce a jejich zpracování

Rostlina konopí byla v průběhu let šlechtěna pro zvýšení produkce vláken ve stoncích nebo semennou produkci. Lýková vlákna tvoří asi 35 % stonku a jsou bohatá na celulózu. Díky jejich délce a pevnosti jsou ceněna v oblasti výroby textilií nebo kompozitních materiálů. Zbylou část stonku tvoří dřevnaté jádro, označované jako pazdeří, které obsahuje vysoký podíl ligninu. Semena jsou bohatá na oleje, bílkoviny a sacharidy. Konopný olej má právě díky obsahu aktivních látek významné nutriční i farmaceutické využití [1]. Podrobnější schéma zpracování je uvedeno na Obrázek 1.



Obrázek 1: Zpracování jednotlivých konopných frakcí (upraveno) [6]

2.1.1.1. Konopné semeno

Na povrchu je konopné semeno obaleno tvrdou jedlou slupkou. Uvnitř se pak nachází měkké jádro. Celá semena v závislosti na podmínkách pěstování obsahují 20-25 % proteinů, 20-30 % sacharidů a 25-35 % tuku. Je prokázán i obsah prospěšných vitamínů a minerálních látek. Oloupané semeno se výrazně liší v zastoupení bioaktivních látek v porovnání se samotnou slupkou. Loupaná semena jsou bohatší na bílkoviny a tuky, ale ztrácejí většinu vlákniny obsažené ve slupkách. Toto rozdělení je závislé i na metodě procesu loupání. Samotné slupky mají vysoký obsah vlákniny a jsou tedy v rámci cirkulární ekonomiky hojně využívány jak doplněk stravy nebo krmivo pro zvířata [4].

2.1.1.2. Konopný olej

Lisováním semen za studena se získává konopný olej. Jeho předností je vysoký obsah nenasycených mastných kyselin (nad 70 %) a to zejména kyselin omega-3 a omega-6. Obsahuje také antioxidanty, jako jsou tokoferoly a fytoosteroly nebo fenolické látky [4].

2.1.1.3. Konopný koláč

Při extrakci oleje z konopných semen odchází z lisu kal nebo sediment a tzv. konopný koláč (z anglického *hemp seed cake*). Kal představuje směs kousků lisovaných semen a obalů, fosfolipidů, olejů, vosků a dalších složek. Lisovaný zbytek v podobě konopného koláče představuje vedlejší produkt extrakce oleje. Konopný koláč se po pomletí frakcionuje proséváním. Hrubá frakce má velikosti částic větší než 350 μm a obsahuje hlavně částice ze slupky semene. Jemná frakce pak obsahuje částice jádra. Rozdílná distribuce ve velikosti částic je způsobena chováním jádra a slupky při mletí. Slupky mají vyšší elasticitu díky většímu obsahu strukturálních sacharidů, což je činí odolnější vůči mletí. Hrubá a jemná frakce se liší i barvou, přičemž hrubá frakce je zbarvena do hněda a jemná frakce do zelena. Druhá zmíněná má oproti hrubé vyšší obsah oleje, který obsahuje chlorofyl, což zapříčiňuje změnu barvy. Obsah proteinů se u nejjemnější frakce pohybuje okolo 45 % a klesá s rostoucí velikostí částic [5].

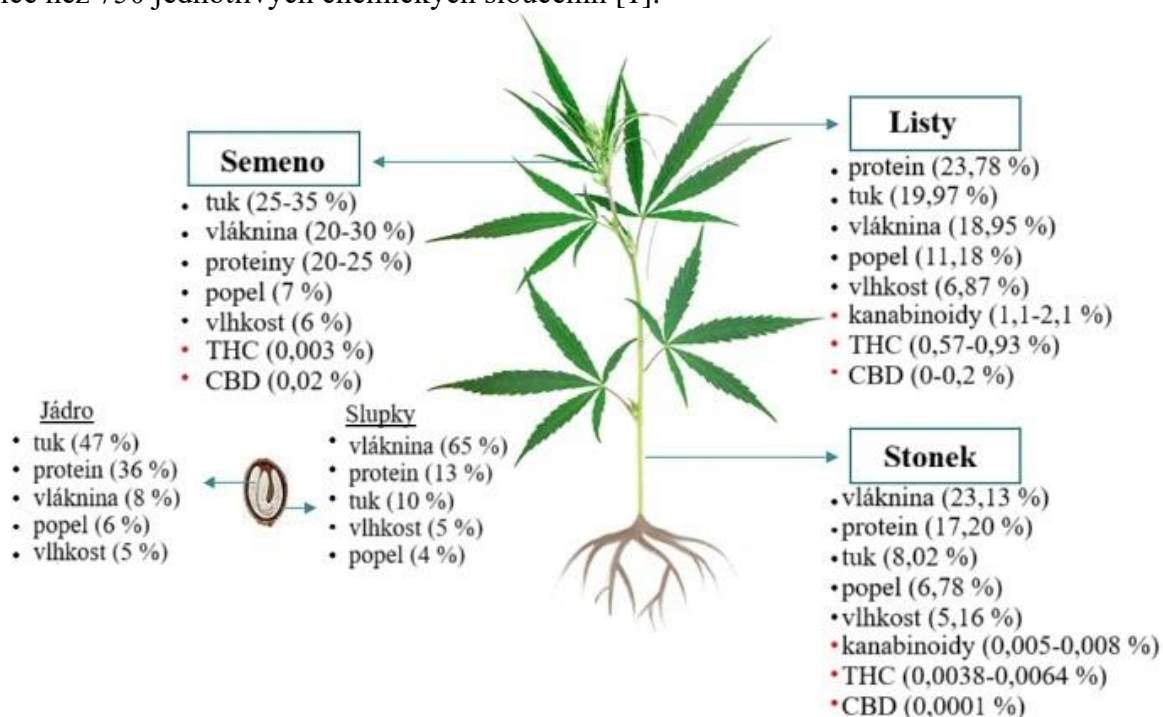
2.1.1.4. Konopné vlákno

Vlákna konopí jsou široce využívána v závislosti na jejich kvalitě. Primární lýková vlákna samostatně měří 5-40 mm, ale ve svazcích mohou dosahovat délky 1 až 5 m. Šlechtěním lze dosáhnout podílu vláken v kůře konopí na rozmezí 15-45 % a je možné také výrazně zredukovat dřevnaté jádro. Konopné vlákno je vyhledávané z důvodu dobrých mechanických a izolačních vlastností a také díky nižšímu dopadu na životní prostředí ve srovnání s vlákny na bázi skla a ropy. Přidáním do kompozitních materiálů nebo betonů lze zlepšit vlastnosti stavebních a izolačních materiálů používaných v automobilovém průmyslu a stavebnictví. Konopné kompozity lze v autech nalézt například ve výplních dveřních panelů a interiéru. Konopné betony postrádají bez předúpravy dostatečnou pevnost pro nosné konstrukce, ale osvědčil se jako prodyšný obal budovy nebo jako součást konstrukční kostry. Dlouhá vlákna, získávaná tradičním procesem máčení, jsou v textilním průmyslu využívána pro výrobu speciálních tkanin a jemných textilií. Jejich širšímu využití však brání vyšší náklady na jejich zpracování [6].

Papír vyrobený z konopí může dosahovat až dvojnásobné recyklovatelnosti ve srovnání s papíry ze dřeva [6].

2.1.2. Bioaktivní látky

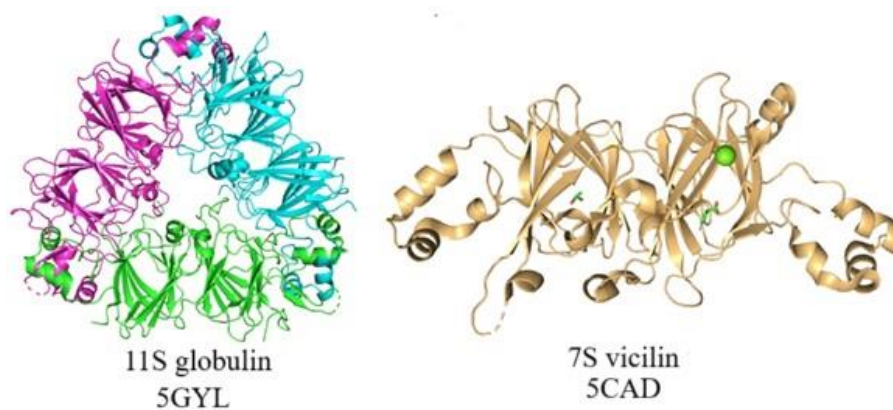
Konopí je pro nutriční a farmaceutický výzkum zajímavé z hlediska obsahu komplexní směsi bioaktivních látek. Kromě kanabinoidů je v rostlině obsaženo velké množství proteinů, mastných kyselin, sacharidů, terpenů, flavonoidů a dalších sloučenin. Celkem bylo popsáno více než 750 jednotlivých chemických sloučenin [1].



Obrázek 2: Složení jednotlivých konopných frakcí (upraveno) [3]

2.1.2.1. Proteiny

Pro semena rostlin jsou nejdůležitější zásobní proteiny poskytující nutné aminokyseliny pro jeho klíčení. Na základě rozpustnosti lze zásobní proteiny rozdělit do čtyř tříd – albuminy, globuliny, prolaminy a gluteliny. Albuminy jsou rozpustné ve vodě, globuliny v roztocích solí, prolaminy v roztocích alkoholů a gluteliny v alkalických nebo kyselých roztocích. Globuliny se dále rozdělují na základě sedimentačních koeficientů na tzv. 7S proteiny (viciliny) a 11S proteiny (leguminy) [7], [8]. Trojrozměrné struktury 11S globulinu a 7S vicilinu vytvořené pomocí programu PyMol jsou zobrazeny na Obrázek 3.



Obrázek 3: Struktura 11S globulinu a 7S vicilinu (upraveno) [9]

20-25 % proteinů vyskytujících se v konopných semenech jsou především ve formě albuminů a globulinů. Edestin, který je největším zastupitelem globulinů, má terciární strukturu a je tvořen šesti identickými monomery. Tyto monomery jsou tvořeny kyselou a bazickou podjednotkou, přičemž jsou vzájemně spojeny disulfidickým můstkem. Zařazují se do skupiny leguminů, tedy tzv. 11S proteinů [8].

Konopné proteiny jsou z výživového hlediska zdrojem všech esenciálních aminokyselin v dostatečném množství. Porovnáním aminokyselinového profilu globulinu a albuminu, je globulin bohatší na aromatické a sirné aminokyseliny. To však může vést ke snížení rozpustnosti proteinů, z důvodu zvýšení interakcí protein-protein. Proto se ke zvýšení stravitelnosti a zvýšení biologických účinků konopných proteinů využívá chemické nebo enzymatické hydrolyzy [10], [11], [12], [13].

2.1.2.2. Sacharidy

Celé konopné semeno obsahuje přibližně 28 % vlákniny, z které asi 22 % tvoří vláknina nerozpustná a zbytek vláknina rozpustná. V odpadech z průmyslového zpracování semen dosahuje obsah polysacharidů 10-15 %. Konopné polysacharidy vykazují velmi dobrou schopnost absorpce vody a tvorbu filmů. Disponují také pozoruhodným antioxidačním, protizánětlivým a tzv. „anti-ageing“ (omlazujícím) potenciálem. V listech a stoncích se nachází vysoký podíl celulózy (60-70 %), hemicelulózy (15-20 %) a ligninu (2-4 %). Semena obsahují glukózu, galaktózu, manózu, arabinózu a xylózu [14].

2.1.2.3. Mastné kyseliny

Konopný olej obsahuje polynenasycené mastné kyseliny α -linolenovou a linolovou, které jsou esenciální pro lidské tělo. Dále z esenciálních mastných kyselin obsahuje i kyselinou stearidonovou a γ -linolenovou. Je nezbytné udržovat vhodný poměr přijímaných mastných kyselin omega-3 a omega-6. Je to proto, že omega-6 kyseliny mají prozánětlivé účinky, zatímco omega-3 vykazují protizánětlivé účinky [15]. Polynenasycené mastné kyseliny v konopném oleji dosahují optimálního poměru mezi kyselinou linolovou (omega-6) a kyselinou α -linolenovou (omega-3) [16].

2.1.2.4. Fenolové látky

Jako jedny z nejhojněji vyskytujících se sloučenin v konopných semenech byly identifikovány flavonoidy. Jedná se o podtřídu fenolických sloučenin a řadíme mezi ně flavonony, flavonoly, flavanoly a isoflavony. U flavonoidů byly prokázány antioxidační, protirakovinné a protizánětlivé účinky [16].

2.1.2.5. Kanabinoidy

Fytokanabinoidy jsou produkovány trichomy, malými výrůstky vznikajícími z povrchových buněk na povrchu rostliny. Přestavují nejpočetnější skupinu chemických látek v konopí. Jedná se o sekundární metabolity z řady terpenofenolů s 21 nebo 22 uhlíky. Karboxylové kyseliny kanabinoidů hrají roli prekurzorů neutrálních kanabinoidů. Při skladování rostliny, vyšší teplotě a vystavení slunečnímu světlu dochází k neenzymové dekarboxylaci a z kyselých prekurzorů vznikají neutrální kanabinoidy. Z chemického hlediska se jednotlivé kanabinoidy od sebe liší resorcinolovým jádrem, postranními řetězci a prenylovými zbytky a rozdělují se do 11 podtříd (Tabulka 1). Nejznámějšími a nejvíce vyskytujícími se kanabinoidy jsou kanabidiol (CBD) a Δ 9-tetrahydrokanabinol (Δ 9-THC). Hojně se také vyskytují méně známé kanabinoidy kanabigerol (CBG), kanabichromen (CBC) a kanabinol (CBN) [1], [2].

Tabulka 1: Podtřídy kanabinoidů a známý počet sloučenin v jednotlivých typech [1]

podtřída	počet známých sloučenin
typ Δ 9-THC	23
typ Δ 8-THC	5
typ CBG	16
typ CBC	9
typ CBD	7
typ CBND	2
typ CBE	5
typ CBL	3
typ CBN	11
typ CBT	9
smíšený typ	30

2.1.2.6. Terpeny a terpenoidy

Kromě kanabinoidů jsou žlázami trichomů produkovány také terpeny. Jedná se o uhlovodíky, které jsou složeny z izoprenových jednotek. Jejich syntéza probíhá v cytosolu nebo v plazmidech. Terpenoidy vznikají chemickou modifikací methylových skupin terpenů nebo přidáním atomu kyslíku ke struktuře terpenů [1], [17]. Zapříčiňují typický zápach pro konopí. Kvůli těkavosti lze většinu terpenů najít pouze v čerstvém rostlinném materiálu. Nejhojněji jsou zastoupeny monoterpeny, a to především myrcen, limonen, terpinolen, α - a β -pinen a cis-ociomen. V menším zastoupení se pak vyskytují seskviterpeny [2].

V kombinaci s kanabinoidy mohou terpeny vykazovat synergický účinek působící na biologické aktivity, jako jsou poruchy spánku či úzkosti. Ovlivňují také, ať už pozitivně nebo negativně, protizánětlivé a antibakteriální účinky jiných složek konopí [2], [18].

2.1.2.7. Vitamíny a minerální látky

Kromě polynenasycených mastných kyselin obsahuje konopné semeno i velké množství tokoferolů, díky kterým je výborným zdrojem antioxidantů. Z tokoferolů je nejvíce zastoupen γ -tokoferol. Vitamíny skupiny B jsou nezbytné pro správnou funkci nervového systému a v konopném oleji jsou obsaženy vitamín B1 (1,3 mg/100 g) a vitamín B9 (18 mg/100 mg). Dále jsou v semenu obsaženy provitamíny D a A [16].

Minerály hrají roli v řadě fyziologických procesů a při udržování acidobazické rovnováhy v těle. Celé semeno má vyšší obsah vápníku, manganu a mědi na rozdíl od loupaného semene [16]. Fosfor je naopak přítomen ve větším množství v loupaném semenu. Ve významných množstvích jsou zastoupeny další minerály jako draslík, hořčík a zinek [16].

2.1.3. Využití konopných frakcí v kosmetice

Konopný olej nabízí dobrou alternativu k chemikáliím na bázi ropy, které jsou obsažené v mnoha kosmetických produktech. V kosmetice jsou konopné produkty cennou složkou díky vysokému obsahu oleje, který obsahuje látky spojenými s péčí o pokožku i terapeutickými účinky. Konopný olej obsahuje vysokou koncentraci mastných kyselin, minerálů a vitamínů. Mastné kyseliny jsou strukturními složkami fosfolipidů buněčných membrán a ovlivňují řadu funkcí těchto membrán [19]. Studie prokázaly zklidňující, změkčovací, hydratační a omlazující vlastnosti u kosmetických produktů s obsahem konopného oleje. Květy a horní listy rostliny obsahují esenciální oleje, které našly využití jako vonné látky v parfémeh, mýdlech a svíčkách. Rovněž vykazují antimikrobiální a insekticidní účinky, a tak mohou být kromě kosmetiky využity i v léčivých přípravcích [19].

2.2. Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení (LAB z anglického Lactic Acid Bacteria) jsou aerotolerantní, organotrofné a striktně fermentativní mikroorganismy ve formě tyčinek nebo koků, které produkují kyselinu mléčnou. Jedná se o grampozitivní nesporulující organismy, převážně nemotilní. Taxonomicky se zařazují do oddělení *Firmicutes*, přesněji do třídy *Bacilli* a řádu *Lactobacillales*. Do tohoto řádu patří čeledi *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* a *Streptococcaceae*. Rod *Bifidobacterium* je producentem kyseliny mléčné jako majoritního produktu, a přestože se řadí do větve *Actinomycetes*, je také zařazován pod souhrnné označení „bakterie mléčného kvašení“. Mohou být dále charakterizovány podle schopnosti fermentovat glukózu nebo pentózu, optimálnímu rozhraní teplot pro jejich růst, tvorby oxidu uhličitého a tvorby kyseliny mléčné jako majoritního produktu [20].

Profesor Orla-Jensen, který tuto skupinu bakterií poprvé popsal na začátku 20. století, dal vzniku tří hlavních podskupin na základě teploty růstu a biochemických procesů [20], [21]. Jednalo se o podskupiny *Thermobacteria*, *Streptobacteria* a *Betabacteria*. Taxonomie mikroorganismů se neustále opravuje a rozšiřuje, a proto došlo také ke změnám v označení podle Orla-Jensena, ale stále je možné na tyto názvy v literatuře narazit [20], [21].

Nejčastější spojení mléčných bakterií je s produkcí mléčných produktů, alkoholických nápojů, zeleniny a masných produktů, kde slouží jako startovací kultury. Vyznačují se statutem GRAS (Generally Recognised As Safe), což znamená, že jsou považovány za všeobecně bezpečné. V některých případech však mohou hrát roli kontaminantů produkcí chuťových látek, které při jsou při dané produkci nežádoucí. Kromě potravinářství mají využití i v medicíně, především pro posílení střevní mikroflóry [21].

2.2.1. Metabolismus

Bakterie mléčného kvašení jsou organismy, které k optimálnímu růstu potřebují komplexní živiny, jako jsou sacharidy, aminokyseliny, vitamíny a minerální látky. Pro některé druhy jsou nutné speciální růstové faktory. Tyto bakterie dokážou prostřednictvím různých metabolických drah rozkládat řadu sacharidů a dalších sloučenin. Metabolické dráhy jsou ovlivňovány zejména okolními podmínkami [21].

2.2.1.1. Fermentace glukózy

Bakterie mléčného kvašení jsou schopny převádět glukózu na různé izomery kyseliny mléčné. Pokud izomer stáčí rovinu polarizovaného světla doprava, označuje se jako pravotočivý (+) a pokud stáčí rovinu doleva, označuje se jako levotočivý (-). Pokud jsou přítomny oba izomery, používá se označení racemická směs [21].

Na základě primárních produktů fermentace se dělí na homofermentativní a heterofermentativní. Přesněji je lze také rozdělit na obligátně homofermentativní, fakultativně heterofermentativní a obligátně heterofermentativní. Majoritním produktem homofermentativních bakterií je kyselina mléčná. Heterofermentativní bakterie produkují kromě kyseliny mléčné i ethanol, oxid uhličitý a kyselinu octovou. Tento typ bakterií využívá metabolickou dráhu, která vychází z pentózového cyklu a je označována jako fosfoketolázová dráha nebo také hexózo-monofosfátový zkrat. Dochází k přeměně hexózu na pentózy a enzym fosfoketoláza štěpí xylulózu-5-fosfát na acetylfosfát a glyceraldehyd-3-fosfát. Acetylfosfát je poté přeměňován na ethanol a z glyceraldehyd-3-fosfátu vzniká přes pyruvát kyselina mléčná. Fakultativně heterofermentativní druhy jsou schopny fermentovat glukózu výhradně na kyselinu mléčnou pomocí glykolýzy, zatímco pentózy a příbuzné sloučeniny fermentují pomocí fosfoketolázové dráhy. Obligátně homofermentativní bakterie disponují enzymem aldolázou, ale postrádají fosfoketolázu. Obligátně heterofermentativní bakterie mají naopak fosfoketolázu a nedisponují aldolázou. Fakultativně heterofermentativní bakterie mají k dispozici oba tyto enzymy [21].

Mezi obligátně homofermentativní bakterie patří pouze některé druhy rodu *Lactobacillus*. Do druhé skupiny, tedy mezi fakultativně heterofermentativní se řadí rody *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* a některé druhy rodu *Lactobacillus*. Rody *Streptococcus* a *Lactococcus* produkují L(+) laktát a rod *Pediococcus* je navíc schopen produkovat i DL laktát. Do obligátně heterofermentativních mléčných bakterií se řadí rod *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* a některé druhy rodu *Lactobacillus*. Rod *Leuconostoc* produkuje D(-) laktát [21].

2.2.1.2. Fermentace pentóz

Odbourávání pentóz, např. arabinózy, ribózy nebo xylózy je schopnost mnoha bakterií mléčného kvašení. Jsou schopny metabolizovat i příbuzné sacharidy jako je glukonát. Pentózy jsou transportovány do buněk permeázami a metabolizovány fosfoketolázovou dráhou. *Lactobacillus vini* je schopen z arabinózy produkovat velké množství kyseliny mléčné a jen malé množství kyseliny octové a ethanolu. V tomto případě se využívá označení homolaktická fermentace pentóz. Tento typ fermentace je u *Lb. vini* důsledkem přítomnosti enzymů transketolázy a transaldolázy [21].

2.2.1.3. Fermentace disacharidů

Disacharidy jako je celobióza, laktóza, maltóza, melibióza, sacharóza a další, jsou transportovány přes buněčnou membránu ve formě volných cukrů nebo ve fosforylované podobě. Dále jsou štěpeny na dvě monosacharidové molekuly nebo na monosacharid a monosacharidfosfát. Přestože fermentace disacharidů se zdá být složitější ve srovnání s fermentací monosacharidů, tak je preferována některými druhy bakterií mléčného kvašení. Jako příklad lze uvést fermentaci laktózy mlékárenskými LAB nebo fermentaci maltózy využívanými v kvasu [21].

2.2.1.4. Nároky na aminokyseliny, vitamíny a minerály

Téměř všechny bakterie mléčného kvašení vyžadují následující aminokyseliny: L-glutamovou kyselinu, L-soleucin, L-leucin a L-valin. Velkým množstvím LAB je také vyžadována přítomnost aminokyselin, jako L-methionin, L-tyrosin a L-tryptofan. Do kultivačních médií se přidávají ionty kovů Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} a Zn^{2+} . Ionty Mn^{2+} obecně stimulují růst mléčných bakterií, avšak enterokoky je pro růst nevyžadují. Některé kmeny naopak nevyžadují ionty železa. Minerální látky jsou obvykle požadovány na enzymatické reakce, přesné požadavky však závisí na použitém kmenu [21].

2.2.1.5. Proteolýza a lipolýza

Některé mléčné bakterie disponují proteolytickými enzymy, které jim umožňují získávat aminokyseliny z mléčného kaseinu, neboť volných aminokyselin v mléce je málo. Na povrchu buňky proteináza degraduje bílkovinu na oligopeptidy, které jsou následně pomocí specifických transportních systémů převedeny do buňky. V buňce jsou dále odbourávány na kratší peptidy a aminokyseliny pomocí různým intracelulárních peptidáz. Geny pro proteinázy byly naklonovány např. z druhu *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus* nebo *Streptococcus thermophilus* [21].

Lipolýza je důležitá zejména u mléčných produktů, a to pro vývoj chuti při zrání sýra. U bakterií *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus thamnosus* byla zjištěna lipolytická aktivita. Lipolýza v sýrech probíhá obvykle prostřednictvím esterázových nebo lipázových systémů bakterií mléčného kvašení, kvasinek, propionových bakterií a plísní [21].

2.2.2. Zástupci

Historicky tvoří jádro skupiny rody *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Streptococcus*. Po taxonomických revizích těchto rodů a popisu nových rodů mohou LAB podle své široké fyziologické definice obsahovat přibližně 20 rodů. Avšak z praktického hlediska jsou za hlavní LAB považovány následující rody: *Lactobacillus*, *Aerococcus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* a *Weissella* [20].

2.2.2.1. Rod *Lactobacillus*

Zástupci rodu *Lactobacillus* jsou nesporulující, většinou nepohyblivé tyčinkovité bakterie. Jejich buňky jsou často uspořádány do řetězců. Optimální teplota pro jejich růst se pohybuje rozmezí 30-40 °C, ale jsou schopny přežít v celkovém teplotním rozsahu 2-53 °C. Rozsah pH prostředí pro růst se pohybuje mezi 3 a 8. Jedná se o fermentující bakterie, které tolerují kyslík, ale preferují anaerobní podmínky [21].

Fakultativně heterofermentativní skupina *Lactobacillus plantarum* je po fylogenetické stránce velmi homogenní a skládá se ze šesti druhů/poddruhů: *Lb. Plantarum subsp. plantarum*, *Lb. plantarum subsp. argentoratensis*, *Lb. paraplantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. fabifermentans* a *Lb. xiangfangensis*. Atypičnost *Lactobacillus plantarum* je v pseudokatalázové aktivitě a redukci dusičnanů [21].

Bakterie *Lactobacillus fermentum* se řadí do skupiny *Lactobacillus reuteri*, která čítá 14 platně pojmenovaných druhů. S výjimkou několika druhů se jedná o obligátně heterofermentativní bakterie [21].

Mezi bakteriemi mléčného kvašení zastávají laktobacily výsadní postavení, neboť je velmi mnoho druhů z tohoto rodu využíváno jako startovací kultury v potravinářských fermentacích. Některé kmeny se využívají také jako probiotika a jsou specificky spojovány s gastrointestinálním traktem nebo vaginální mikroflórou. Potenciální zdravotní účinky mají kmeny druhů jako *Lb. helveticus*, *Lb. casei* a *paraceti*, *Lb. platarum* a *Lb. fermentum* [21].

2.2.2.2. Rod *Bifidobacterium*

Členové tohoto rodu jsou gram-pozitivní, nesporulující, neprodukující plyn, nepohyblivé tyčinky. Obecně jsou anaerobní, ale některé druhy tolerují kyslík. Rozkladem sacharidů tvoří kyselinu octovou a mléčnou bez produkce CO₂. Bifidobakterie mohou fermentovat širokou škálu složitých polysacharidů. Většina druhů dokáže fermentovat D-galaktosamin, D-glukosamin, amylozu a amylopektin. *Bifidobacterium bifidum* výlučně fermentuje mucin [21].

Pro rod *Bifidobacterium* je unikátní přítomnost fruktóza-6-fosfát-fosfoketolázy (F6PPK), což je klíčový enzym bifidobakteriálního sacharolytického kvašení. Enzym F6PPK je přítomen pouze u rodu *Bifidobacterium* a dalších rodů z čeledi *Bifidobacteriaceae*, u jiných grampozitivních střevních bakterií se nevyskytuje [21].

Společně s rodem *Lactobacillus* je rod *Bifidobacterium* hojně používaný jako probiotický mikroorganismus kvůli svým prospěšným účinkům. Potravinářský průmysl začal přidávat kultury bifidobakterií do mléka a mléčných produktů a farmaceutičtí výrobci dodávají na trh stále více probiotických doplňků. Nejčastěji používané druhy jako probiotika jsou *Bif. bifidum*, *Bif. breve*, *Bif. longum* subsp. *infantis*, *Bif. longum* subsp. *longum* a *Bif. animalis* subsp. *lactis* [21].

2.2.3. Metabolity bakterií mléčného kvašení

Bližší výzkum LAB v posledních desetiletích odhalil jejich schopnost produkce antimikrobiálních látek různých struktur. Použití LAB a jejich metabolitů s antimikrobiálními vlastnostmi je jeden z rozvíjených alternativních způsobů k uchování potravin i kosmetických výrobků. Hlavními antimikrobiálními produkty LAB jsou organické kyseliny vznikající v procesu fermentace cukrů a díky rychlému okyselení prostředí zabraňují růstu dalších skupin mikroorganismů [22].

2.2.3.1. Nízkomolekulární antimikrobiální metabolity

Kromě kyseliny mléčné produkuje mnoho kmenů mléčných bakterií významné množství nespecifických nízkomolekulárních látek, jako jsou organické kyseliny, reuterin, peroxid vodíku, diacetyl a další [22].

Kyselina octová má ve srovnání s kyselinou mléčnou širší spektrum antimikrobiální aktivity a zároveň se mezi těmito kyselinami objevuje synergistický efekt. Na kyselost prostředí mohou různé mikroorganismy reagovat odlišně. Kyselina mléčná při pH pod 5,0 potlačuje růst bakterií tvořící spóry, ale neovlivňuje růst mikroskopických hub a kvasinek [22].

Za přítomnosti kyslíku mohou LAB produkovat také peroxid vodíku prostřednictvím enzymů NADH-oxidázy a superoxidodismutázy. Při nedostatku hemu neprodukuje LAB katalázu, a to vede k akumulaci peroxidů. Účinek peroxidu může být zesílen v přítomnosti laktoperoxidázy a thiokyanu, které se přirozeně vyskytují například v mléce. Akumulace peroxidů u rodů *Lactococcus* a *Lactobacillus* potlačuje růst bakterií rodu *Lactococcus* a gramnegativních *Pseudomonas* spp., které jsou zodpovědné za kontaminaci potravin [22]. Reuterin (β -OH-propionaldehyd) vzniká za anaerobních podmínek z glycerolu u bakterií *Lactobacillus reuteri*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. collinoides* a *L. corniformis*. Vykazuje antagonickou aktivitu proti mnoha patogenním mikroorganismům, jako jsou bakterie rodu *Clostridium*, *Staphylococcus* a *Listeria*, kvasinek rodu *Candida*, enterobakterií (*Salmonella* a *Shigella*) a prvoků rodu *Trypanosoma*. Široké spektrum účinků vychází ze schopnosti vázat se na SH-skupiny enzymů, a to včetně enzymu ribonukleotidreduktázy [22].

Diacetyl je primárně aktivní proti grampozitivním bakteriím rodu *Bacillus* a gramnegativním bakteriím z rodů *Salmonella*, *Yersinia*, *Escherichia* a *Aeromonas*. Tvoří se při přeměně citrátu na pyruvát a maximální tvorba je pozorována při mírně kyselém pH [22].

Lactobacillus casei ssp. *casei*, *L. casei* ssp. *pseudoplantarum* a některé další LAB produkuje pyrrolidon-5-karboxylovou kyselinu. Tato organická kyselina vykazuje baktericidní účinek proti *Bacillus subtilis* a *Enterobacter cloacae* [22].

2.2.3.2. Antifungální látky

Antifungální aktivita není typickou fyziologickou vlastností LAB, ale nedávné publikace zaznamenali produkci specifických antifungálních sloučenin některými kmeny LAB. Z antifungálních sloučenin produkovanými LAB jsou známy diketopiperaziny, hydroxyderiváty mastných kyselin, kyselina benzoová, methylhydantoin, mevalolakton, pentocin TV35b a reuterin [22], [23], [24].

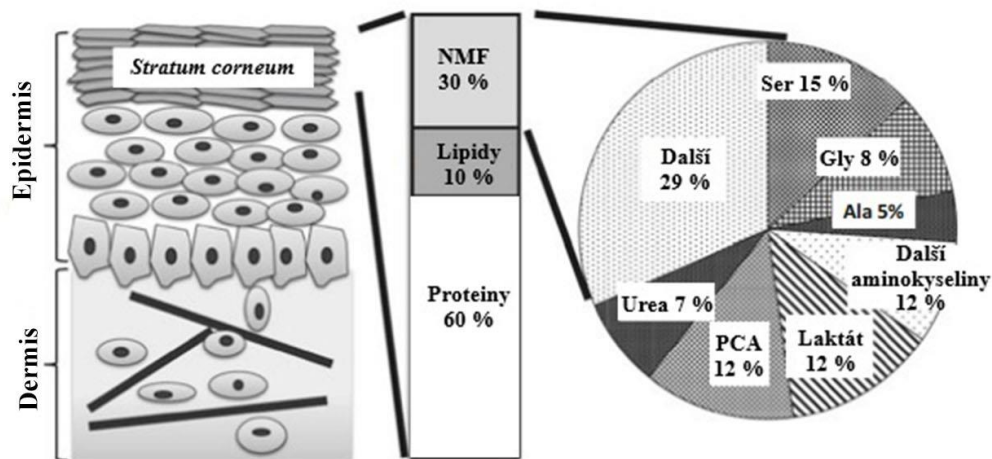
2.2.3.3. Bakteriociny

Bakteriociny jsou heterogenní antimikrobiální peptidy s různým spektrem aktivity, molekulární hmotností, fyzikálně-chemickými vlastnostmi a mechanismy účinků. Z LAB produkují bakteriociny zástupci rodů *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Streptococcus*. Syntéza bakteriocinů je kmenově specifická. Rozdíl bakteriocinů od ostatních antibiotik spočívá ve třech vlastnostech: mají specifické spektrum aktivity, jejich syntéza probíhá na ribozomech, a každý bakteriocin disponuje vlastním specializovaným imunitním proteinem. Podle chemické struktury se bakteriociny dělí do čtyř tříd – lantabiotika (třída I), bakteriociny bez modifikovaných aminokyselin (třída II), velké bakteriociny (třída III) a složité bakteriociny (třída IV) [22].

2.2.4. Využití bakterií mléčného kvašení a jejich metabolitů v kosmetice

Bakterie mléčného kvašení se tradičně používají jako startovací kultura pro fermentované potraviny, jako sýry, jogurty nebo nakládaná zelenina. Jako probiotika jsou tyto bakterie využívány pro modulaci imunitní odpovědi a pro léčbu různých onemocnění. V roce 2012 bylo v Japonsku představeno 79 kosmetických složek fermentovaných pomocí bakterií mléčného kvašení, čímž došlo k dalšímu rozšíření využití těchto bakterií [25], [27].

Pokožka se skládá z dermis a epidermis, kdy epidermis se dále rozděluje na živou epidermis a rohovou vrstvu (*Stratum corneum*). Rohová vrstva působí jako bariéra, která zabraňuje dehydrataci pokožky a obsahuje přibližně 30 % tzv. přirozený hydratační faktor (NMF z anglického natural moisturizing factor). NMF se skládá z 40 % aminokyselin, jako jsou serin, glycin, 12 % laktátu, který dokáže zadržovat vodu v rohové vrstvě, 7 % močoviny a dalších látek. Celé složení NMF je uvedeno v Obrázek 4. Složky NMF jsou vysoce účinná zvlhčovačla, která dokážou přitáhnout a vázat vodu z atmosféry a nasát ji do korneocytů. Pokud je NMF dostatečně hydratovaný, vytváří iontové interakce s keratinovými vlákny, díky čemuž snižuje mezimolekulární síly mezi vlákny a zvyšuje elasticitu rohové vrstvy. Zvýšením elasticity dochází k zdravě a pružně vypadající pokožce a nedochází k praskání nebo olupování v důsledku mechanického namáhání [25], [26].



Obrázek 4: Struktura pokožky a složení rohové vrstvy (upraveno) [25]

V buněčné stěně bakterií mléčného kvašení je přítomna proteináza, která zahajuje přeměnu extracelulárních proteinů na oligopeptidy. Díky této proteolytické aktivitě a katabolické produkci proteinů a peptidů jsou LAB schopny produkce aminokyselin ve fermentačním médiu. Fermentová složka tak obsahuje velké množství kyseliny mléčné a aminokyselin, které jsou součástí NMF a při aplikaci na pokožku vykazuje hydratační účinek [25].

Pro fermentaci lze využít například bakterie *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus spp.* nebo *Lactococcus spp.* Supernatant odstředěného mléka fermentovaného pomocí *S. thermophilus* prokázal hydratační, antioxidační a pH-udržující účinky. *S. thermophilus* YIT 2084 má schopnost produkovat i kyselinu hyaluronovou, která podporuje hojení ran a může vytvářet bariéru proti oxidačnímu stresu [25].

Aloe vera má antibakteriální, antivirové, antimykotické, hojivé i protizánětlivé účinky a jeho hydratační účinek lze zvýšit fermentací pomocí *Lactobacillus platarum*. Tato bakterie má schopnost přeměnit kyselinu jablečnou na kyselinu mléčnou pomocí malolaktické fermentace. Díky kombinaci fruktózy a kyseliny mléčné se zvyšuje obsah vody v pokožce [25].

Keratinocyty mají schopnost rozpoznat patogeny a odlišit je od komenzálních organismů běžně se vyskytujících na pokožce. UV záření aktivuje keratinocyty, které následně vyvolávají imunitní odpověď sekrecí prozánětlivých cytokinů. Probiotické bakterie mají imunosupresivní účinky, které souvisí s jejich schopností stimulovat buněčné signální dráhy spojené s receptory PRR (Pattern Recognition Receptor), které rozpoznávají vzory exprimované na řadě imunitních buněk a dalších tkáních. Imunitní odpověď probiotik je kmenově specifická. *L. plantarum* a *L. acidophilus* silně inhibují potenciální aktivitu zánětlivých mediátorů, cytokinů spojených se zánětem. *Lactobacillus paracasei* urychluje obnovení funkce kožní bariéry a potlačuje uvolňování TNF- α vyvolaného substancí P, což je polypeptid zvyšující motilitu tenkého střeva, kontrakce hladké svaloviny a neurotransmitter spojený s vnímáním bolesti. *Bifidobacterium infantis* zabraňuje imunitním abnormalitám, které jsou spojené s kožními poruchami a *Lactobacillus reuteri* dokáže chránit epidermální keratinocyty před stafylokokem [27].

Kyselina mléčná má mnohostranné využití v péči o pleť. Je známo, že egyptská královna Kleopatra se koupala v mléce v domnění, že jí pomůže udržet mladistvý vzhled [28]. Na počátku tohoto století výzkumníci z Univerzity v Marylandu potvrdili, že kyselina mléčná hraje zásadní roli při obnově pokožky. Dále bylo zjištěno, že má kyselina mléčná klíčový podíl na zesvětlení pokožky a má vliv na melaninový pigment, který je odpovědný za odstín barvy kůže [28]. Peelingy s obsahem kyseliny mléčné odstraňují povrchové vrstvy pokožky a zároveň podporují rychlejší obnovu kožních buněk. Při odstranění starých buněk může být stimulována tvorba elastinu a kolagenu, což napomáhá redukovat jemné vrásky. Kyselina mléčná může být použita na všechny typy pleti, včetně citlivé pokožky, akné a rosacey, avšak i přesto existuje riziko alergické reakce. Také se po aplikaci přípravku s obsahem kyseliny mléčné doporučuje nanést opalovací krém s SPF 15 nebo vyšším, neboť kyselina mléčná může činit pokožku citlivější na sluneční záření. Kyselinu mléčnou lze používat jako hydratační prostředek a při nepřetržitém používání může působit jako mikropeeling. Jako exfoliant je kyselina mléčná vhodnější pro suchou a citlivou pleť, neboť je jemnější na rozdíl od kyseliny glykolové [28].

2.3. Houby rodu *Aspergillus*

Druhy rodu *Aspergillus* patří mezi jedny z nejrozšířenějších hub ve světě. Tento druh obsahuje více než 340 jednotlivých rodů, které mohou být prospěšné i patogenní. Jsou velmi přizpůsobivé, co se týče podmínek růstu. Dokážou růst v širokém teplotním rozmezí (6-55 °C) i při relativně nízké vlhkosti. Například *Aspergillus penicilloides* je uváděn mezi nejvíce xerofilními houbami. Živí se širokou škálou substrátů, včetně lidské tkáně a trusu, ale nejčastěji se vyskytuje na rostlinných komplexních polymerech. Velký počet druhů je také oportunistický patogen zvířat a lidí, kdy mohou způsobovat invazivní aspergilózu, neinvazivní plicní aspergilom nebo alergickou bronchopulmonální aspergilózu. Existují ale druhy, které mohou být pro lidstvo prospěšné a mají označení GRAS [29], [30], [31].

2.3.1. Metabolity plísní rodu *Aspergillus*

Plísně rodu *Aspergillus* produkují rozmanitou škálu strukturálně heterogenních primárních i sekundárních metabolitů. Rod *Aspergillus* našel využití v biotechnologickém sektoru díky své vysoké produkci organických kyselin a extracelulárních enzymů. Mezi nejprodukovanější organické kyseliny patří kyselina citrónová, itakonová, glukonová a kojová, což je základem využití těchto hub v koji fermentaci rozšířené v celé východní Asii. Pro získání živin z prostředí vylučují aspergily například amylázy, xylanázy, pektinázy i elastázy. [31], [34].

2.3.1.1. Polyketidy

Polyketidy patří mezi nejrozšířenější sekundární metabolity u hub, přičemž u rodu *Aspergillus* jsou nejvíce zkoumány aflatoxiny a statiny. Aflatoxiny jsou toxické metabolity způsobující aspergilózu a představují tak hrozbu jak pro ostatní mikroorganismy, tak pro člověka a zvířata. V potravinách mohou setrvat neomezeně dlouho, jsou tepelně stabilní i mrazuvzdorné. Produkuje je pouze malá skupina druhů, přičemž neproblematičtější jsou *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*. Lovastatin, který patří mezi statiny, je silný inhibitor 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA a na trh vstoupil pro svou schopnost účinně snižovat syntézu cholesterolu v regulačním bodě jeho syntetické dráhy [31], [34].

2.3.1.2. Enzymy

Lipázy katalyzují hydrolýzu triacylglycerolů na diacylglyceroly a monoacylglyceroly, mastné kyseliny a glycerol. Mikrobiální lipázy se uplatňují v širokém spektru průmyslových aplikací díky vysoké stabilitě, specifické substrátové selektivitě a nižším výrobním nákladům. Plísně jsou považovány za nejlepší producenty lipáz, a v současném průmyslu jsou preferovaným zdrojem, protože produkují extracelulární lipázy, což usnadňuje jejich extrakci z fermentačního média [31].

Proteázy jsou skupina hydrolytických enzymů štěpící peptidové vazby mezi aminokyselinami. V současnosti představují proteázy získávané z mikroorganismů přibližně 40 % celosvětového trhu s enzymy. Pro vytváření proteolytických enzymů je jedním z nejdůležitějších parametrů použitý substrát [31], [35].

Celuláza štěpí glykosidové vazby ve vláknech celulózy a tím uvolňuje oligosacharidy, celobiózu a glukózu. Stejně jako u lipáz se pro průmyslovou produkci využívají právě houby, neboť produkují celulázy extracelulárně. Mikrobiální celulázy vykazují rozdílnou stabilitu a enzymatickou aktivitu v závislosti na fyzikálních faktorech, jako je pH nebo teplota [31], [36]. Amylázy patří mezi nejdůležitější průmyslové enzymy s vysokým biotechnologickým potenciálem. Jedná se o enzymy štěpící škrob a největší využití našli nejen v potravinářském průmyslu, ale i textilním nebo farmaceutickém sektoru. Pro produkci se nejčastěji využívá *Aspergillus oryzae* [31].

Pektinázy jsou enzymy, které štěpí pektin – strukturální polysacharid, který se nachází v buněčných stěnách rostlin, obilovin, ovoce a zelenině. Pro průmyslové získávání pektinázy je využíván *Aspergillus niger*, který produkuje pektinázy za účelem štěpení středních lamel v rostlinách a získáním živin z rostlinných tkání [31].

Laktázy patří mezi β -galaktosidázy, jež katalyzují hydrolýzu laktózy na glukózu a galaktózu. Jsou také využívány k získávání galaktooligosacharidů, které slouží jako probiotika a stimulují růst prospěšných bakterií. Pro biotechnologickou výrobu je nejčastěji využíván *Aspergillus oryzae* [31].

Lakáza je metalloprotein obsahující měď a podílí se na degradaci ligninu a odstranění toxických fenolických sloučenin. Průmyslové aplikace lakázy jsou velmi rozmanité, od výroby ethanolu, přes analýzu léčiv až po textilní průmysl. Tanináza katalyzuje hydrolýzu esterových vazeb v hydrolyzovatelných taninech za vzniku glukózy a kyseliny galové. Nejčastěji se využívá v potravinářství na čiření ovocných šťáv, odstranění taninů z potravin a dalších [31].

2.3.1.3. Organické kyseliny

Organické kyseliny hrají významnou ekonomickou roli díky široké škále aplikací a biotechnologická produkce organických kyselin pomocí vláknitých hub zastává zásadní roli. Mezi nejvyužívanější organické kyseliny, které produkují plísně rodu *Aspergillus*, patří kyselina citrónová, itakonová, kojová a glukonová [31].

Kyselina citrónová má status GRAS a její průmyslová výroba pomocí vláknitých hub sahá až do roku 1917, kdy byly optimalizovány podmínky pro povrchovou kultivaci [31]. Jedná se o trikarboxylovou kyselinu, která je meziproduktem Krebsova cyklu. Pro průmyslovou produkci je využíván *A. niger*. Přibližně 70 % jejího uplatnění představuje v potravinářství prostředek pro úpravu pH a zlepšení chuti. Našla si však cestu do farmacie a kosmetiky, kde se používá jako okyselovadlo a pro svou chelatační aktivitu vůči kovovým iontům [31], [37]. Kyselina itakonová byla poprvé získána destilací kyseliny citronové a od roku 1960 je vyráběna fermentačně pomocí *Aspergillus terreus*. Tato dikarboxylová kyselina má jednu karboxylovou skupinu konjugovanou s methylenovou skupinou a její biosyntéza probíhá přes metabolismus glukózy. Od využití v průmyslových lepidlech se její uplatnění v posledních letech přesouvá i do biomedicínských oblastí [31], [38].

Název kyseliny kojové byl odvozen od slova „Koji“, což představuje startovací inokulum používané při výrobě asijských potravin, jako jsou saké, shoyu, miso a ocet. Jako startovací inokula u těchto fermentačních výrob se využívají *A. oryzae*, *A. tamarii*, *A. parasiticus* a *A. flavus*, které právě vylučují kyselinu kojovou. Tato organická kyselina vykazuje slabě kyselé vlastnosti a neškodnou biodegradaci, která se zasloužila o její multifunkčnost [31].

Kyselina glukonová je vyráběna z glukózy reakcí katalyzovanou glukózaoxidázou, kdy dochází k dehydrogenační reakci a vzniku kyseliny glukonové z glukózy. V roce 1922 byla nalezena u *Aspergillus niger* a od té doby proběhlo mnoho studií podmínek a procesů vedoucích k vyšším výtěžkům fermentační produkce [31], [32], [33]. Kyselina glukonová našla uplatnění v potravinářském průmyslu a její deriváty jsou využívány jako doplňky stravy ve farmaceutickém i textilním průmyslu [31].

2.3.2. Vybrané druhy

2.3.2.1. *Aspergillus oryzae*

Aspergillus oryzae našel uplatnění jako biotechnologický nástroj v mnoha zemích světa, zejména v potravinářském průmyslu při výrobě fermentovaných potravin. Má schopnost produkovat velké množství amylázy a proteázy k přeměně proteinů a různých škrobů na aminokyseliny a sacharidy. Světová zdravotnická organizace (WHO) ji schválila jako GRAS. V posledních letech se mluví o *A. oryzae* jako o perspektivním probiotiku, neboť amylolytickými a proteolytickými enzymy usnadňuje rozklad suché hmoty a tím i získávání živin, které pak mohou posloužit jako substrát pro střevní bakterie rodu *Lactobacillus* a dalších. Za základě podmínek kultivace produkuje rozmanité sekundární metabolity, které patří do různých chemických tříd, jako jsou terpenoidy, organické kyseliny, kumariny, mastné kyseliny a oxylipiny. Mnohé z těchto metabolitů vykazují řadu biologických aktivit – od protinádorových a cytotoxické až po antimikrobiální, antihypertenzní a antivirové účinky [44].

2.3.2.2. *Aspergillus sojae*

Tento druh je příbuzný zejména *A. oryzae* a našel využití jako koji plíseň pro produkci fermentovaných produktů. Stejně jako *A. oryzae* nemá schopnost produkovat aflatoxiny a získal označení GRAS. Díky vysoké proteázové a leucinaminopeptidázové aktivitě se využívá zejména pro fermentaci sójových bobů [39], [45].

V Japonsku se využívá především pro výrobu shoyu (japonské sójové omáčky). Obecně se považuje *A. sojae* za domestikovaný kmen *A. parasiticus* na základě jejich morfologické podobnosti [39], [45].

2.3.2.3. *Aspergillus luchuensis*

Jedná se o černou koji plíseň používanou při výrobě tradiční japonské destilované pálenky Awamori, fermentaci meju (startovací kultura ze sójových bobů) a nuruku (startovací kultura z pšeničné mouky) v Koreji a čaje pu-erh v Číně [40], [41], [43]. Produkuje velké množství kyseliny citrónové, která zabraňuje mikrobiálnímu kažení v průběhu fermentaci a při skladování. V potravinářství se dále uvažuje o jeho potenciálním využitím jako probiotikum. Má vysokou toleranci vůči kyselinám a gastrointestinálním podmínkám, vysokou hydrofobicitu, adhezni potenciál a výraznou antimikrobiální a antioxidační aktivitu [42], [43].

2.3.3. Využití metabolitů plísni rodu *Aspergillus* v kosmetice

Kyselina kojová je ve vodě rozpustná organická kyselina produkovaná jako sekundární metabolit některými druhy rodu *Aspergillus*, například *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. tamarii* nebo *A. parasiticus*. V kosmetice se využívá jako prostředek pro zesvětlování pokožky při léčbě melasmy neboli hyperpigmentace. Kyselina kojová a její deriváty jsou využívány k blokování tvorby pigmentu melanocyty a řadí se mezi nejvíce využívané složky bělicích kosmetických přípravků. Má schopnost inhibice tyrozinázy, a může být využita jako ochranný faktor proti UV záření, které způsobuje řadu kožních lézí. Byly prokázány také její antioxidační, protizánětlivé a omlazující vlastnosti. Na rozdíl od hydrochinonu jako bělicího činidla nemá vedlejší účinky, a proto se stala vhodnou alternativou v kosmetických přípravcích. Koncentrace v topických přípravcích by měla pohybovat v rozmezí 1 % nebo méně. V těchto koncentracích vykazuje kyselina kojová efektivní a bezpečné vlastnosti [46]. Studie uvádějí, že různé deriváty kyseliny kojové, jako je ester, laureát nebo dipalmitát, jsou účinnější než samotná kyselina [46]. Byly představeny cheláty kyseliny kojové se zinkem a manganem, které slouží jako ochranná činidla proti radiovému a gama záření. Další deriváty mohou mít i antifungální a antibakteriální vlastnosti [47]. V posledních několika letech byly izolovány nové sloučeniny, označované jako kojikony A a B, které vykazovaly silné protizánětlivé účinky *in vitro* i *in vivo* a představují tak slibný zdroj protizánětlivých účinků pro farmaceutický a kosmetický průmysl [48].

Fenolické sloučeniny působí jako antioxidanty několika mechanismy, včetně zachycování volných radikálů, inhibice prooxidantních enzymů nebo chelace kovových iontů. Fenolické látky v rostlinách se vyskytují obvykle v konjugovaných formách prostřednictvím hydroxylových skupin. Pomocí hydrolytických enzymů, jako je β -glukosidáza, je možné zvýšit obsah fenolických látek i antioxidační aktivitu [47].

Obsah kyseliny citrónové ve fermentačních médiích může přispívat k antioxidační aktivitě extraktu díky její synergii s primárními antioxidanty. Elastáza je enzym schopný degradovat elastin – extracelulární protein zajišťující elasticitu pojivové tkáně kůže. Bylo prokázáno, že při opakované expozici UV záření je urychlována syntéza elastázy, což vede ke ztrátě elasticity a vzniku vrásek. V kosmetickém průmyslu získává rostlinná fermentace na popularitě, neboť fermentované extrakty získané z přírodních surovin a mikrobiálních kultur zlepšují mikroekologii povrchu kůže a posilují její přirozené fyziologické funkce [47], [49].

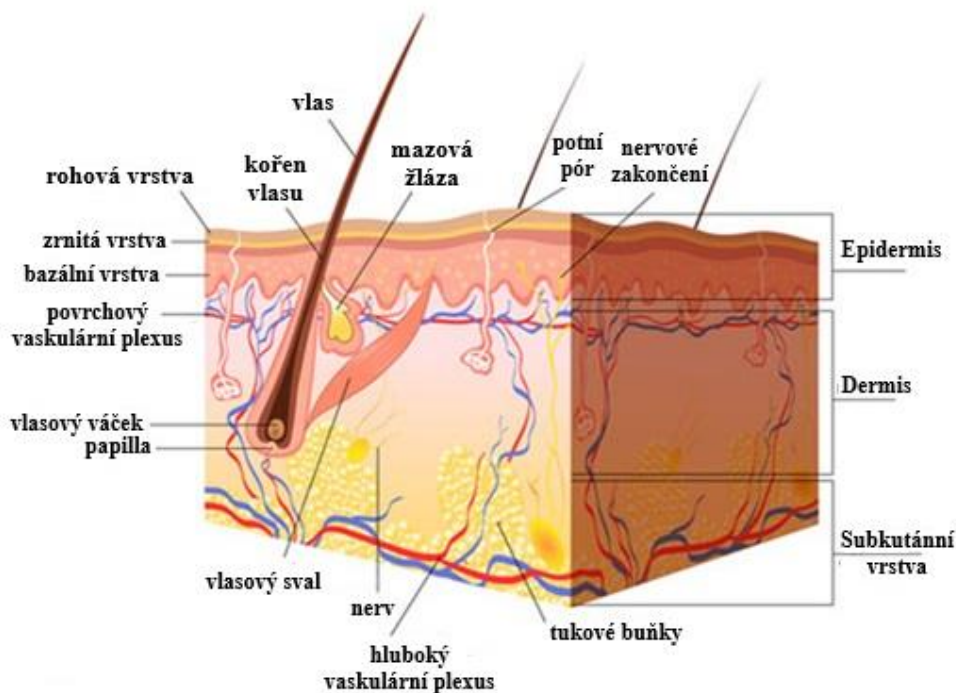
U extraktů rýžových otrub fermentovaných pomocí *A. oryzae* bylo kromě antioxidačních látek, fenolů a kyseliny citronové, detekováno také množství kyseliny ferulové a syringové, u nichž byly prokázány antielastázové vlastnosti a pravděpodobné synergické působení [47], [49].

Fermentací červené rýže pomocí *A. oryzae* byla získána řada látek prospěšných pro zdraví kůže. Byla prokázána významná proliferace fibroblastů a zvýšení mRNA exprese genů souvisejících s extracelulární matrix, která se podílí na omlazujících účincích a snižování tvorby kyslíkových radikálů [46], [50].

Kyselina citronová je v kosmetice používána jako regulátor pH, chelatační činidlo nebo jako složka vůně. Některé její soli jsou rovněž využívány jako chelatační činidla a kondicionační složka. Kyselina citronová se využívá téměř ve všech kategoriích kosmetických přípravků. U přípravků ponechávaných na kůži se její koncentrace dosahuje koncentrace až 4 %, u přípravků určených k opláchnutí 10 % a u produktů pro koupelové použití dosahuje 39 % [51].

2.4. Stavba a funkce kůže

Kůže (*cutis, derma*) je největší plošný orgán lidského těla a u dospělého člověka pokrývá plochu v průměru 1,5-1,8 m². Hmotnost kůže se pohybuje okolo 3 kg, pokud je kůže ztluštěná tukovým polštářem, může dosahovat hmotnosti až 20 kg. Tloušťka kůže činí 0,5-4 mm v závislosti na části těla. Představuje účinnou ochranu proti fyzikálním, chemickým i mikrobiologickým vlivům našeho okolí. Termoregulační systém je ovládán pomocí činnosti potních žláz a pomocí změn průtoku krve krevním řečištěm. Kůže se také účastní látkové výměny pomocí potních a mazových žláz, které představují exkreční orgán a nezanedbatelnou část se podílí na dýchání. Rozlišujeme tři hlavní vrstvy – pokožka, škára a podkožní vazivo [52], [53].

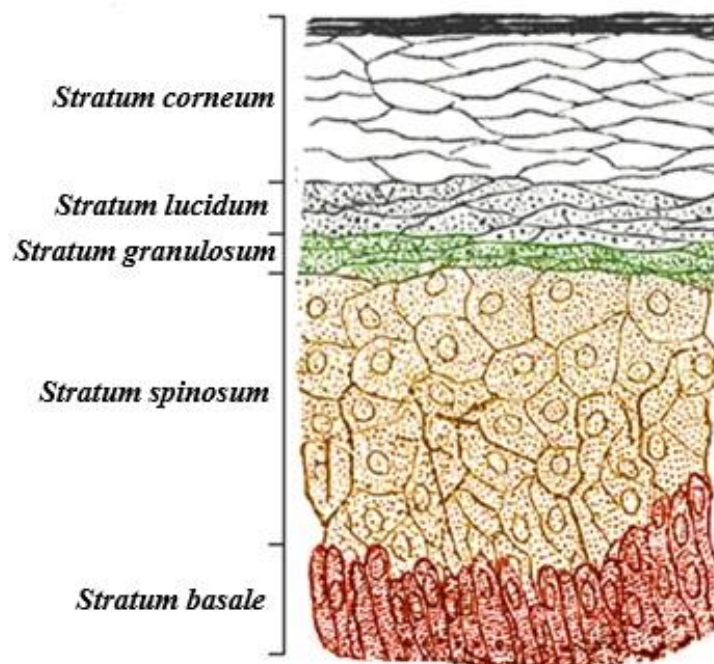


Obrázek 5: Stavba kůže [54]

2.4.1. Pokožka (*epidermis*)

Pokožka je tvořená dlaždicovým epitelem. Buňky ve vrchních vrstvách postupně odumírají, rohovatí a olupují se. Epitel tvoří několik vrstev až k *lamina basale* (bazální lamině), kde navazuje dermis. Bazální buňky zárodečné vrstvy (*stratum germinativum*) se mitoticky množí a tato vrstva se směrem k povrchu kůže mění na vrstvu rohovou (*stratum corneum*), která představuje bariéru organismu před vnějším prostředím. Mezi deriváty epidermis patří chlupy, nehty a kožní žlázy. V zárodečné vrstvě se rozlišují bazální vrstva (*stratum basale*) a ostnitá vrstva (*stratum spinosum*). V *stratum basale* probíhá buněčné dělení a vznik nových buněk. *Stratum spinosum* je nejtlustší vrstvou pokožky a je tvořena keratinocyty. Na *stratum spinosum* navazuje směrem k povrchu zrnitá vrstva (*stratum granulosum*), ve které se začínají vytvářet keratinohyalinová zrna, což je prekurzor keratinu. Mezi zrnitou vrstvou a rohovou vrstvou v tlustší epidermis se nachází lesklá vrstva (*stratum lucidum*) [52], [53].

Keratinocyty jsou buňky, jejichž specifickým produktem je keratin. Keratin je vláknitá bílkovina, kterou jsou vyplněny buňky ve *stratum corneum*. V bazální vrstvě se nachází melanocyty, ve kterých vzniká pigment melanin ve formě zrníček. Konkrétně vzniká z tyrosinu katalytickým působením enzymu tyrosinázy. Langerhansovy buňky jsou uloženy ve *stratum spinosum* a jedná se o imunokompetentní buňky. Mají funkce podobné makrofágům a nejspíš zprostředkovávají alergické reakce epidermis při kontaktu s alergenem. Merkelovy buňky se nachází řídky rozmístěné na bazální lamině a plní funkci mechanorecepční a neurosekreční [52], [53].



Obrázek 6: Jednotlivé vrstvy epidermis [55]

2.4.2. Škára (*dermis, corium*)

Dermis je vazivová část kůže s kolagenními a elastickými vlákny, která jsou spojená ve snopce. Její tloušťka se pohybuje v rozmezí od 0,5 do 2,5 mm. Povrchová vrstva (*stratum papillare*) je protkaná sítí kapilár a také obsahuje větší množství vazivových buněk fibrocytů a fibroblastů. Zato hlubší vrstvě (*stratum reticulare*) dominují husté svazky kolagenních fibril. Mezi elastickými a kolagenními vlákny se vyskytují také tukové buňky. Prochází zde krevní a mízní cévy a nervy. Ve výběžcích škóry jsou uložena nervová zakončení, která umožňují vnímat tah, tlak, teplo, chlad a bolest. Díky bohatému cévnímu zásobení může kůže poskytnout v případě potřeby krev jiným orgánům a odhaduje se, že v kožních cévách může být zadržován až 1 litr krve [52], [53].

Ve škáře jsou uloženy dva typy kožních žláz – potní a mazové. Potní žlázy jsou nerovnoměrně rozloženy a nejvíce se jich vyskytuje na dlaních, čele a plosce nohou. Pot se tvoří z tkáňového moku a jeho funkcí je exkrece odpadních látek a řízení tělesné teploty. V potu je obsažena především voda a chlorid sodný. Z organických látek se zde vyskytuje močovina, kyselina močová, mastné kyseliny, některé aminokyseliny a další. Mazové žlázy jsou uloženy vedle vlasů nebo chlupů a na rozdíl od potních žláz zcela chybí na dlaních a ploskách nohou. Produktem těchto žláz je kožní maz (*sebum*). Ten chrání proti smáčení a vysychání, a tak činí kůži vláčnou. Skládá se z triacylglycerolů, bílkovin a solí. Triacylglyceroly jsou v průběhu sekrece mazu štěpeny esterázami za vzniku volných mastných kyselin, které způsobují kyselé prostředí povrchu kůže [52], [53].

2.4.3. Podkožní vazivo

Podkožní vazivo (*tela subcutanea*) představuje spojení kůže s povrchovou fascií nebo s periostem. Mimo místo spojení je podkožní vazivo prorostlé tukovými kapénkami. Vazivo plní rozmanité funkce. Slouží jako ochranná a izolační složka v rámci termoregulace a na dlaních a chodidlech plní i mechanický význam [53].

2.5. Vybrané metody

2.5.1. UV/VIS spektrofotometrie

Metoda využívá absorpce UV a viditelného záření. Ultrafialové záření se pohybuje v oblasti 200-380 nm, viditelné záření navazuje v rozsahu délky 380-800 nm. Po absorpci elektromagnetického záření nastane excitace valenčních elektronů. Samotné měření spočívá v určení množství energie, kterou vzorek pohlcuje při průchodu zářením, což se projevuje snížením světelného toku. Odražené, rozptýlené a pohlcené záření snižují intenzitu světla, které projde vzorkem, přičemž odraz a rozptyl se běžně zanedbávají. Závislost absorbance na koncentraci analyzované látky a délce průchodu záření je popsána Lambert-Beerovým zákonem

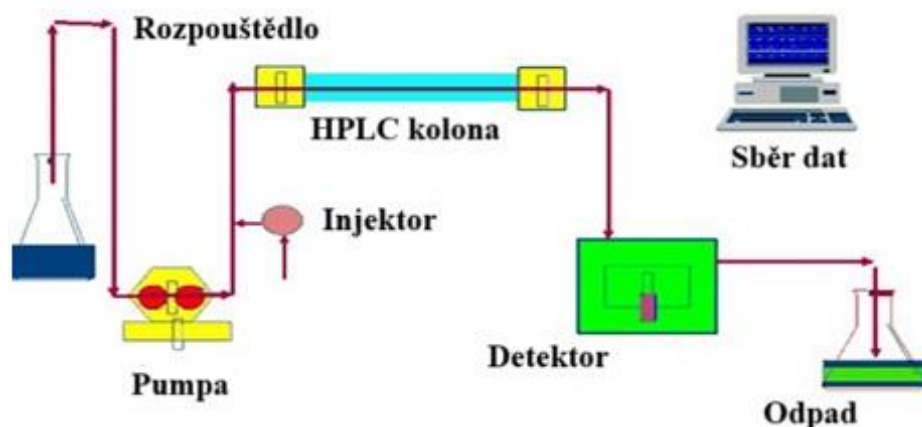
$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l, \quad (1)$$

A značí bezrozměrnou absorbanci, ε_{λ} představuje molární extinkční koeficient [$\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$], c je látková koncentrace v jednotkách $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a l udává tloušťku absorbující vrstvy v centimetrech. Tento zákon platí pouze pro zředěné roztoky, typicky do koncentrace přibližně $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ [56].

UV/VIS spektrofotometrie se využívá pro stanovení celkové koncentrace proteinů metodu Hartree-Lowryho, biuretovou metodou nebo metodou dle Bradfordové. Pro stanovení koncentrace sacharidů je využívána metoda dle Duboise a pro koncentraci redukujících cukrů metoda dle Somogyi-Nelsona. Mezi další rutinní použití patří stanovení celkových fenolických látek a flavonoidů, antioxidační aktivity či chlorofylů.

2.5.2. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Jedná se o rozšířenou separační techniku v oblasti analytické, farmaceutické a biomedicínské analýzy, neboť umožňuje účinné oddělení složek a poskytuje vysokou detekční citlivost. Obecně u chromatografických metod dochází k rozdělení zkoumané směsi pomocí pohybu mobilní pohyblivé fáze přes nepohyblivou stacionární fázi. Při HPLC je roztok vzorku vstříkovan do kolony s porézním materiálem (stacionární fáze), a kapalná fáze (mobilní fáze) díky vysokému tlaku protéká kolonou. Principem separace je adsorpce analytu na stacionární fázi na základě na základě afinity k této fázi [57].



Obrázek 7: Obecné schéma HPLC (upraveno) [57]

Při vývoji metody je třeba vybrat vhodný detektor, kolonu a mobilní fázi. Pouze správně zvolená kolona dokáže zajistit kvalitní oddělení složek analyzované směsi, a bude poskytovat přesnou a spolehlivou analýzu. Při výběru kolony se zohledňují rozměry kolony, retenční kapacita, velikost částic a chemie stacionární fáze. Hlavními složkami HPLC kolony jsou stacionární fáze, matrice a hardware [57].

Nejčastěji používanou maticí v HPLC kolonách je silikagel, která je chemicky stabilní vůči většině organických rozpouštědel. Povaha stacionární fáze určuje povahu mobilní fáze. Chromatografie na normálních fázích využívá polární stacionární fázi a nepolární mobilní fázi, a při separaci procházejí polární sloučeniny kolonou pomaleji než nepolární sloučeniny. Reverzní fáze funguje na opačném principu, a mezi běžně používané kolony reverzní fáze patří propylové (C3), butylové (C4) a pentylové (C5) fáze. Širší využití pak mají kolony C8 nebo C18. Pro stanovení malých organických molekul se využívá nejčastěji právě chromatografie na reverzní fázi [57].

Při gradientovém elučním režimu dochází k postupné změně složení mobilní fáze, zatímco u izokratické eluce zůstává složení mobilní fáze stejné. Nejčastěji používanými rozpouštědly pro mobilní fázi jsou methanol, acetonitril nebo tetrahydrofuran. Hodnota pH mobilní fáze umožňuje měnit retenci a selektivitu složek. Pro ionizovatelné analyty se vybírá pH mobilní fáze na základě hodnoty pK_a analytu [57].

Po chromatografickém oddělení je analyzovaná látka detekována pomocí vhodných detektorů. Komerčně využívanými detektory v kapalinové chromatografii patří UV detektory, fluorescenční detektory, elektrochemické detektory nebo detektory hmotnostní spektrometrie [57].

2.5.3. Analytická centrifuga

Pro analýzu hydrodynamických vlastností částic v disperzním systému je využívána analytická centrifuga. Hlavním principem pro měření je rozdílná sedimentační rychlost částic v odstředivém poli, které se liší svou velikostí a hustotou. Zabudovaný optický systém umožňuje sledovat pohyb vzorku v kyvetě, která prochází světelným paprskem. Intenzita procházejícího světla je měřena jako funkce času a polohy po celé délce vzorku současně a data jsou následně zobrazována jako funkce radiální polohy [58].

Chování vzorku v kyvetě při separaci je tedy analyzováno sledováním změn transmitance v libovolné části vzorku nebo pohybu libovolného fázového rozhraní [58].

2.5.4. Stanovení antimikrobiální aktivity

2.5.4.1. Disková difúzní metoda

Vybraná kultura je zaočkovaná na agarovou misku s vhodným médiem a následně jsou na misku pokládány disky z filtračního papíru, které jsou napuštěny aktivní látkou. Pomocí difuze proniká aktivní látka do agarového média a inhibuje růst testovaného mikroorganismu. Tato metoda nedokáže rozlišit bakteriostatické a bakteriocidní účinky, neboť inhibice růstu mikroorganismu neznamena jeho smrt. Metoda dokáže klasifikovat mikroorganismy jako citlivé, intermediární nebo rezistentní vůči testované aktivní látce. Z důvodu nemožnosti kvantifikace množství difundované antimikrobiální látky metoda není vhodná pro určování minimální inhibiční koncentrace (MIC) [59].

2.5.4.2. Bujónová diluční metoda

Metoda mikrodilučního nebo makrodilučního testu je jedna z nejzákladnějších metod pro testování citlivosti na antimikrobiální látky a stanovení minimální inhibiční koncentrace. Do tekutého růstového média ve zkumavkách s minimálním objemem 2 ml (makrodiluce) nebo v 96-jamkové mikrotitrační destičce (mikrodiluce) jsou přidány různé koncentrace testované látky. Poté je každá zkumavka nebo jamka na destičce inokulována mikrobiální kulturou zředěnou na hodnotu 0,5 stupně McFarlanda. Po promíchání se zkumavky nebo mikrotitrační destička inkubují za vhodných podmínek pro testovaný mikroorganismus. MIC je stanovena spektrofotometricky na základě změny zákalu, který indikuje nárůstu kultury [59].

3. CÍLE PRÁCE

Hlavními cíli diplomové práce zabývající se valorizací sekundárních produktů zpracování technického konopí za účelem využití v kosmetice jsou:

- literární rešerše týkající se charakteristiky, zpracování a frakcionace konopí, složení frakcí a jejich hlavní bioaktivní látky
- charakterizace odpadní vlákniny ze zpracování konopí, optimalizace stanovení kanabinoidů a dalších biologicky aktivních látek využitelných v kosmetice
- možnosti extrakce a biotechnologické valorizace
- příprava kosmetických emulzí a dalších typů přípravků s přídavkem konopného extraktu
- stanovení stability biologického účinku konopných preparátů, stability a sensorických vlastností

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použité chemikálie a přístroje

4.1.1. Chemikálie

ABTS, Sigma Aldrich (SRN)
Dusitan sodný, p.a., Lachema (ČR)
Ethanol pro UV-VIS, Lachema (ČR)
Fenol, p.a., LachNer (ČR)
Folin-Ciocalteu činidlo, Serva (SRN)
Glukóza monohydrát, p.a., LachNer (ČR)
Hydroxid sodný, p.a., LachNer (ČR)
Chlorid hlinitý, p.a., LachNer (ČR)
Katechin, Sigma Aldrich (SRN)
Kyselina gallová, Sigma Aldrich (SRN)
Kyselina sírová (96%), LachNer (ČR)
Trolox, Sigma Aldrich (SRN)
Uhličitan sodný, p.a., LachNer (ČR)
Vinan sodno-draselný tetrahydrát, Penta Chemicals (ČR)
Hydrogenuhličitan sodný, Penta (ČR)
Síran sodný, p.a., LachNer (ČR)
Síran měďnatý pentahydrát, LachNer (ČR)
Molybdenan amonný, LachNer (ČR)
Hydrogenarseničan sodný heptahydrát, LachNer (ČR)

4.1.2. Přístroje

Analytické váhy Boeco (SRN)
Centrifuga Z 36 HK, Hermle (SRN)
Předvážky Scout, Ohaus (USA)
Spektrofotometr UV-1600PC, VWR® (USA)
Magnetická míchačka, Lavat (ČR)
Vortex mini, Ohaus (USA)
Densiometr DEN-1, Grant-Bio (SRN)
HPLC sestava Ultimate 3000 s UV/VIS detektorem, ThermoFisher (USA)
Temperovaná třepačka, Heidoplh Inkubator 1000, Labicom (ČR)
Třepačka KS 4000 i control, IKA (SRN)
Stolní multimetr pH 700, Eutech Instruments (ČR)
Analytická centrifuga, LUMISizer (Německo)
ELISA Reader BioTek ELx808, Biotek (SRN)

4.1.3. Použitý materiál pro kultivace

Lactobacillus MRS Broth, HiMedia (ČR)
Konopná vláknina (Futura 75), Považský olej (SK)
Agar práškový bakteriologický, HiMedia (ČR)
Lysogeny Broth, Sigma Aldrich (SRN)
Brain Heart Infusion, HiMedia (ČR)
Sabouraud Dextrose Broth, Sigma Aldrich (SRN)

4.1.4. Použité mikroorganismy

V práci byly použity bakterie *Lactiplantibacillus plantarum* CCM 7039, *Bifidobacterium bifidum* CCM 3762, jejich kombinace (označeno jako „mix“) a komerčně dostupný mix bakterií mléčného kvašení. Složení komerčního mixu je uveden v Tabulka 2. Jako zástupce plísní rodu *Aspergillus* byly použit *Aspergillus sojae* CCM F-717. Pro testování antimikrobiální aktivity byly použity bakterie *Citibacterium acnes* CCM 3437, *Escherichia coli* CCM 3954, *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418 a *Candida glabrata* CCM 8270.

Tabulka 2: Složení komerčního mixu bakterií mléčného kvašení

<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>Bifidobacterium breve</i>
<i>Bifidobacterium longum subsp. infantis</i>
<i>Bifidobacterium longum subsp. longum</i>
<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Lacticaseibacillus casei</i>
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactobacillus crispatus</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>
<i>Lactobacillus johnsonii</i>
<i>Lactococcus cremoris</i>
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>
<i>Latilactobacillus curvatus</i>
<i>Ligilactobacillus salivarius</i>
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
<i>Limosilactobacillus reuteri</i>
<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii</i>
<i>Streptococcus salivarius subsp. thermophilus</i>

4.2. Kultivace bakterií mléčného kvašení

4.2.1. Příprava kultivačního média a substrátu

Pro kultivaci výše uvedených bakterií mléčného kvašení bylo použito kapalné médium MRS Broth a konopná vláknina. Médium MRS bylo připraveno dle pokynů výrobce, tedy 55,15 g práškového média na 1000 ml destilovaného vody. Pro přípravu vlákninového média byly smíchány 2 g konopné vlákniny s 40 ml destilované vody. Obě média byla sterilizována v tlakovém hrnci při 120 °C po dobu 25 minut.

4.2.2. Očkování a kultivace

Zásobní kultura použitých bakterií mléčného kvašení byla připravena do sterilních 15 ml plastových zkumavek s 12 ml sterilního MRS média v očkovacím boxu. Z kryo-zkumavek *L. plantarum* a *B. bifidum* byl odebrán 1 ml kultury, který byl přenesen do jednotlivých zkumavek. Pro přípravu mixu bylo z každé kryo-kultury odebráno 0,5 ml. Komerční mix ve formě lyofilizátu byl nabrán na špičku špachtle a přenesen do zkumavky s MRS médiem. Kultivace probíhala v inkubátoru při 37 °C 16 hodin a následně byly zásobní kultury skladovány při 4 °C.

V očkovacím boxu bylo sterilních plastových 50 ml zkumavek nalito 40 ml sterilního MRS média. Zkumavky s MRS médiem byly následně zaočkovány 2 ml zásobní kultury zředěné na 1° McF. Kultivace probíhala 16 hodin při 37 °C.

Ředění podle McFarlandových standardů je založeno na měření optické hustoty (turbidity) s použitím komerčních standardů. Densitometr je kalibrován komerčními standardy v rozmezí 0,5 až 4 McF, přičemž 0,5 McF odpovídá přibližně $1,5 \cdot 10^8$ CFU/ml bakteriálních buněk. Do densitometru je poté vložena zkumavka s vhodným kultivačním médiem, do které se přidává připravená bakteriální kultura do požadované hodnoty McF [61].

Substrát z konopné vlákniny byl převeden v očkovacím boxu do sterilní plastové 50 ml zkumavky. Substrát byl zaočkován 2 ml zředěné zásobní kultury a zkumavky byly vloženy do inkubátoru, kde probíhala kultivace při 37 °C po dobu 16 hodin. Spolu se zaočkovanými substráty byl inkubován i vlákninový substrát bez bakteriální kultury.

4.2.3. Stanovení růstu kultury bakterií pomocí turbidimetrie

Zkumavky s vlákninovým substrátem byly po ukončení kultivace promíchány a následně zcentrifugovány po dobu 2 minut při 4000 otáčkách, aby došlo k usazení konopné vlákniny. Nejprve byla stanovena hodnota zákalu v jednotkách McF u vlákninového substrátu bez bakteriální kultury tak, že byly odebrány 2 ml roztoku nad usazenou vlákninovou frakcí do zkumavky a změřen zákal. Posléze byly stejně změřeny i vlákninové substráty s bakteriálními kulturami. Hodnota zákalu byla stanovena jako rozdíl hodnoty stupně McF vlákniny s bakteriální kulturou a čistého substrátu.

4.2.4. Stanovení CFU pomocí plotnové metody

Pro porovnání s měřením turbidimetrie bylo využito i nepřímého stanovení počtu bakterií pomocí plotnové metody. Po kultivaci v MRS médiu i vlákninovém substrátu bylo pro každou bakteriální kulturu provedeno desítkové ředění v rozmezí 10^{-7} až 10^{-9} .

Z každé zředěné kultury bylo odebráno 100 µl a tento objem byl následně naočkován na misky s MRS agarem v triplikátech a rozetřen sterilní hokejkou. Misky byly inkubovány při 37 °C 48 hodin. Spočítáním narostlých kolonií na jednotlivých miskách a získáním jejich průměrné hodnoty byla stanovena hodnota CFU/ml (Colony Forming Unit, kolonie tvoří jednotky) pro každou kulturu.

4.3. Úprava konopné vlákniny pomocí plísně rodu *Aspergillus* pro kultivaci bakterií mléčného kvašení

4.3.1. Kultivace *Asperigullus sojæ*

Na základě výsledků za souběžně probíhající diplomové práce [62] zabývající se kultivací plísní *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus luchuensis* a *Aspergillus sojæ* na konopné vláknině byl pro úpravu konopné vlákniny jako substrátu pro bakterie mléčného kvašení vybrán *A. sojæ*. Postupy kultivace a zpracování byly provedeny podle zmíněné diplomové práce [62].

4.3.1.1. Příprava substrátu, očkování a kultivace

Do kultivačních lahví bylo naváženo přibližně 20 g konopné vlákniny, přičemž byla zaznamenána přesná hodnota navážky, a bylo přidáno 20 ml destilované vody.

Směs byla vysterilizována v autoklávu. V očkovacím boxu byla do kultivačních lahví přidána kultura *A. sojæ*, tak že kultura ve formě prášku byla nabrána na špičku špachtle. Kultivace probíhala 30 hodin při teplotě 37 °C. Po ukončení kultivace byl substrát s kulturou převeden do plastových zkumavek o objemu 50 ml a zkumavky byly uskladněny v mrazicím boxu při teplotě –80 °C do doby, než proběhla lyofilizace.

4.3.1.2. Gravimetrické stanovení biomasy *A. sojæ*

Pro stanovení množství narostlé biomasy byla použita gravimetrie. Lyofilizovaný substrát byl zvážen a od této hmotnosti byla odečtena hmotnost navážky konopné vlákniny před kultivací.

4.3.2. Kultivace bakterií mléčného kvašení

4.3.2.1. Příprava substrátu, očkování a kultivace

Do Erlenmeyerových baněk byly naváženo 2 g lyofilizovaného a pomletého vlákninového substrátu po kultivaci s *A. sojæ*. Do baněk bylo následně přilito 40 ml destilované vody a směs byla vysterilizována v tlakovém hrnci po dobu 60 minut při 120 °C.

Příprava zásobních kultur a jejich očkování i kultivace probíhala totožným způsobem jako pro vlákninový substrát bez úpravy postupem popsáným v kapitole 4.2.1.

4.3.2.2. Stanovení růstu kultury bakterií pomocí turbidimetrie

Příprava i samotné měření zákalu pro jednotlivé kultury probíhali totožně, jak je popsáno v kapitole 4.2.3.

4.3.2.3. Stanovení CFU pomocí plotnové metody

Desítkovým ředěním byly bakteriální kultury zředěny na 10^{-8} a 10^{-9} a takto zředěné kultury byly zaočkovány v triplikátech na misky s MRS agarem a ponechány 48 hodin při 37 °C. Hodnota CFU/ml byla získána z průměrné hodnoty počtu kolonií na jednotlivých miskách.

4.4. Charakterizace extraktů získaných po odstředění kultur a extraktů

Po ukončení kultivace byly 50 ml zkumavky s MRS médiem centrifugovány 15 minut při 9000 otáčkách. Zkumavky s vlákninovým substrátem byly centrifugovány 25 minut při 9500 otáčkách. Supernatanty byly odlity a uchovány pro další měření.

4.4.1. Změna pH

Hodnota pH byla změřena pomocí pH metru u každého supernatantu třikrát a vypočítána průměrná hodnota. Byl sledován pokles pH po kultivaci oproti čistému substrátu.

4.4.2. Stanovení koncentrace fenolických látek

Spektrofotometrická metoda pro stanovení koncentrace celkových fenolických látek je založena na redukci Folin-Ciocalteuova činidla a barevné změně na modrý produkt. Pro sestavení kalibrační křivky byl jako zástupce fenolických látek použit roztok kyseliny gallové o koncentraci 1 mg/ml. Kalibrační řada byla měřena v rozmezí 0,05-0,3 mg/ml.

Folin-Ciocalteuovo činidlo bylo zředěno v poměru 1:9 s destilovanou vodou. Ve zkumavce byl smíchán 1 ml zředěného činidla se 100 μ l kalibračního roztoku nebo vzorku supernatantu a 1 ml destilované vody. Pro získání slepého vzorku bylo použito 100 μ l destilované vody. Po vortexování byla směs ponechána při laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Do směsi byl poté přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného a po promíchání byla směs ponechána při laboratorní teplotě po dobu 15 minut. Následně byla změřena absorbance proti slepému vzorku při 750 nm. Absorbance jednotlivých vzorků byla změřena třikrát a z průměrné hodnoty byla pomocí rovnice kalibrační křivky vypočítána výsledná koncentrace fenolických látek, která byla následně přepočítána na 1 g suchého podílu. Rovnice kalibrační křivky je uvedena v Příloha 1.

4.4.3. Stanovení koncentrace flavonoidů

Stanovení flavonoidů se zakládá na spektrofotometrickém měření reakce hlinité soli a hydroxidu. Jako zástupce flavonoidů byl použit roztok katechinu o koncentraci 0,5 mg/ml z něhož byla připravena kalibrační řada v rozmezí 0,05-0,3 mg/ml. Ze závislosti absorbance a koncentrace kalibračních roztoků byla stanovena kalibrační křivka.

Do zkumavky bylo napipetováno 1,5 ml destilované vody, 0,2 ml 5% roztoku dusitanu sodného a 0,5 ml kalibračního roztoku, případně vzorku supernatantu a směs byla promíchána a vortexována při laboratorní teplotě 5 minut. Následně bylo přidáno 0,2 ml 10% roztoku chloridu hlinitého, směs byla promíchána a znovu inkubována 5 minut. Dále bylo přidáno 1 ml destilované vody a 1,5 ml 1M hydroxidu sodného a pro promíchání směsi proběhla inkubace po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí inkubační doby byla změřena absorbance proti slepému vzorku při vlnové délce 510 nm. Při měření byla absorbance pro všechny vzorky změřena třikrát.

Koncentrace flavonoidů byla vypočítána z rovnice kalibrační křivky, která je uvedena v Příloha 2, a průměrné hodnoty absorpance u jednotlivých vzorků. Tato koncentrace byla následně přepočítána na 1 g suchého podílu.

4.4.4. Stanovení antioxidační aktivity extraktů

Metoda spočívá ve schopnosti vzorku zhaset kation-radikál $ABTS^{\bullet+}$ a protože je srovnávána s antiradikálovou aktivitou Troloxu, je označována jako metoda TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Trolox je syntetický derivát vitamínu E. Zhášení radikálu je sledováno spektrofotometricky. Zásobní roztok kation-radikálu $ABTS^{\bullet+}$ byl připraven smícháním 7nM roztoku ABTS s 2,45 nM roztokem peroxodisíranu draselného. Takto připravený roztok byl před použitím ponechán ve tmě při laboratorní teplotě 12 hodin. Kalibrační křivka byla sestavena ze zásobního roztoku Troloxu v 60% ethanolu o koncentraci 1 mg/ml. Roztoky kalibrační řady byly připraveny v rozmezí koncentrací 50-400 $\mu\text{g/ml}$.

Těsně před měřením kalibrační řady nebo roztoků vzorků byl zásobní roztok $ABTS^{\bullet+}$ zředěn ethanolem pro UV/VIS na absorpance $0,70 \pm 0,02$ při vlnové délce 734 nm a dále bylo pracováno s tímto roztokem. Do kyvety bylo napipetováno 10 μl destilované vody a 1 ml zředěného roztoku $ABTS^{\bullet+}$ a změřena absorpance v čase 0.

Do další kyvety byl k 1 ml zředěného roztoku $ABTS^{\bullet+}$ přidán 10 μl kalibračního roztoku nebo vzorku supernatantu, směs byla promíchána a ponechána 10 minut ve tmě. Po uplynutí inkubační doby byla změřena absorpance v čase 10. Výsledná absorpance kalibračních roztoků a vzorků supernatantů byla vypočítána z rozdílu absorpance v čase 0 a čase 10. Po naměření absorpance byla hodnota antioxidační aktivity získána pomocí rovnice kalibrační křivky uvedené v Příloha 3 a přepočítána na 1 g suchého podílu.

4.4.5. Stanovení celkových rozpustných sacharidů dle Duboise

Principem této metody je dehydratace sacharidů ve vzorku pomocí koncentrované kyseliny sírové a kondenzace vzniklých derivátů s reakčním činidlem (např. fenol, orcinol nebo anthron) za vzniku barevných kondenzačních produktů. Barevná změna je měřena spektrofotometricky. Pro sestavení kalibrační křivky byl použit roztok glukózy o koncentraci 0,1 mg/ml. Kalibrační řada byla sestavena z kalibračních roztoků v rozmezí koncentrací 0,05-0,75 mg/ml.

K 1 ml kalibračního roztoku, případně vzorku supernatantu byl přidán 1 ml 5% roztoku fenolu a 5 ml koncentrované kyseliny sírové. Směs ve zkumavce byla promíchána a ponechána 30 minut při laboratorní teplotě. Absorpance byla měřena proti slepému vzorku při vlnové délce 490 nm. Z naměřených hodnot absorpance byla koncentrace získána pomocí rovnice kalibrační křivky uvedené v Příloha 4.

4.4.6. Stanovení koncentrace redukujících sacharidů dle Somogyi-Nelsona

Metoda je založena na chemické reakci, kdy redukující sacharidy za alkalických podmínek mají schopnost redukce měďnatých iontů (Cu^{2+}) na měďné (Cu^+). Vzniklý oxid měďný je stanovován spektrofotometricky při vlnové délce 720 nm. Metoda využívá celkem tři činidel a jejich složení je uvedeno v Tabulka 3. Pro přípravu kalibrační řady byl použit zásobní roztok glukózy o koncentraci 0,1 mg/ml. Roztoky pro sestavení kalibrační křivky byly připraveny v rozmezí koncentrací 0,01-0,1 mg/ml.

Do zkumavky k 1 ml roztoku kalibrační řady nebo vzorku supernatantu bylo přidáno 0,5 ml činidla I a 0,5 ml činidla II. Směs byla promíchána a povařena po dobu 10 minut ve vodní lázni. Po ochlazení směsi a přidání 0,5 ml činidla III byla směs vortexována do rozpuštění vzniklé sraženiny. Objem byl doplněn na 10 ml destilovanou vodou a byla změřena absorbance proti slepému vzorku při 720 nm. Výsledná koncentrace redukujících sacharidů byla vypočítána z naměřených absorbancí a rovnice kalibrační křivky, která je uvedena v Příloha 5.

Tabulka 3: Složení jednotlivých roztoků pro stanovení redukujících sacharidů dle Somogyi-Nelsona

SOMOGYI-NELSONOVO ČINIDLO I	
Na ₂ CO ₃ bezvodý	12 g
NaHCO ₃	8 g
Na ₂ SO ₄ bezvodý	72 g
vínan sodno-draselný	6 g
destilovaná voda	400 ml
SOMOGYI-NELSONOVO ČINIDLO II	
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	4 g
Na ₂ SO ₄	24 g
destilovaná voda	200 ml
SOMOGYI-NELSONOVO ČINIDLO III	
molybdenan amonný	25 g
konc. H ₂ SO ₄	21 ml
Na ₂ HAsO ₄ · 7 H ₂ O	3 g
destilovaná voda	475 ml

4.4.7. Stanovení koncentrace kyseliny mléčné pomocí HPLC

Pro stanovení koncentrace kyseliny mléčné byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází. Vzorky supernatantů byly napipetovány do 15 ml centrifugačních plastových zkumavek a zlyofilizovány. Lyofilizované vzorky byly rozpuštěny v minimálním objemu Milli-Q vody, zředěny a přefiltrovány přes nylonový filtr. Z takto připravených vzorků bylo do dávkovací smyčky pomocí mikrostříkačky nanášeno 70 µl. Jako mobilní fáze byla použita 5 mM kyselina sírová a měření probíhalo na HPLC sestavě UltiMate 3000 s kolonou Rezex ROA-Organic Acid H+ (8 %), New Column 250 mm x 4,6 mm při 30 °C a UV/VIS detektorem. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,6 ml/min a vlnová délka detektoru na 205 nm. V programu Chromeleon byla získána koncentrace kyseliny mléčné v jednotlivých vzorcích na základě kalibrační křivky standardu kyseliny mléčné s koncentrační řadou 0,2-5 mg/ml. Měření bylo pro každý vzorek provedeno dvakrát a z vypočteného průměru byla stanovena výsledná koncentrace kyseliny mléčné ve vzorku.

4.4.8. Stanovení koncentrace kanabinoidů pomocí HPLC

Obsah kanabinoidů byl stanoven pomocí HPLC. Lyofilizované vzorky supernatantů byly rozpuštěny ve směsi acetonitrilu a ethanolu v poměru 1:1, tak aby byla koncentrace roztoku lyofilizátů 1 mg/ml. Měření probíhalo na HPLC sestavě UltiMate 3000 s kolonou Arion Plus C18 3,0 µm 150 mm x 4,6 mm. Separace probíhala při teplotě 30 °C. Mobilní fázi A představoval acetonitril pro HPLC a mobilní fázi B byla Milli-Q voda.

Byla použita gradientová eluce s průtokem 1ml/min (Tabulka 4). Pomocí kalibrace standardů kanabinoidů (CBD, CBC, CBN, CBG) v koncentračním rozpětí 12,5-100 mg/ml, byla získána jejich koncentrace v měřených vzorcích. Rovnice kalibračních přímek pro jednotlivé kanabinoidy jsou uvedeny v Příloha 6. Vzorky byly celkem změřeny dvakrát a z průměrné hodnoty byla stanovena koncentrace kanabinoidů, která následně byla přepočítána na 1 g vlákninového substrátu.

Tabulka 4: Složení mobilních fází při gradientové eluci stanovení obsahu kanabinoidů

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0,0	30	70
0,3	30	70
2,3	100	0
5,3	100	0
8,3	30	70
11,0	30	70

4.4.9. Stanovení antimikrobiální aktivity

Antimikrobiální aktivita supernatantů byla sledována pro kultury mikroorganismů *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida glabrata* a *Cutibacterium acnes*. Jedná se o mikroorganismy běžně se vyskytující v kožní mikroflóře, popřípadě v těle člověka, které mohou být oportunními patogeny. Kultivační média používá pro jednotlivé mikroorganismy jsou uvedena v Tabulka 5. Před provedením antimikrobiálních testů byly kultury inkubovány v příslušném tekutém médiu 24 hodin při 37 °C.

Vzorky supernatantů byly před stanoveními zlyofilizovány a poté zředěny na koncentraci 1 mg/ml destilovanou vodou. Pro stanovení antimikrobiální aktivity byly použity takto připravené roztoky lyofilizátů.

Tabulka 5: Kultivační média pro testované mikroorganismy

Mikroorganismus	Kultivační médium
<i>Escherichia coli</i>	LB (Lysogeny Broth)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BHI (Brain Heart Infusion)
<i>Candida glabrata</i>	BHI (Brain Heart Infusion)
<i>Cutibacterium acnes</i>	SBD (Sabouraud Dextrose Broth)

4.4.9.1. Disková difúzní metoda

Pro stanovení antimikrobiální aktivity diskovou difúzní metodou byly nejprve připraveny agarové misky pro jednotlivé testované mikroorganismy. Kultivační média uvedená v Tabulka 5 byla rozpuštěna v destilované vodě podle pokynů výrobce a bylo přidáno 1,5 g agaru na 100 ml tekutého média. Média byla vysterilizována v tlakovém hrnci při teplotě 120 °C po dobu 20 minut a po ochlazení byla nalita do Petriho misek.

Předem připravené kultury testovacích mikroorganismů byly pomocí McFarlandových standardů naředěny na hodnotu 0,5 stupně McF. Na připravené agarové misky bylo nanášeno 50 µl příslušné zředěné bakteriální kultury, která byla sterilní hokejkou rozetřena po celé misce.

Na sterilní disky z filtračního papíru bylo napipetováno 10 µl příslušného roztoku lyofilizátu, kyseliny mléčné, pozitivní a negativní kontroly a pomocí sterilní pinzety byly disky položeny na misku s kulturou. Jako negativní kontrola byla použita destilovaná voda a jako pozitivní kontrola byl použit 70% ethanol. Agarové misky byly následně uchovány v inkubátoru při 37 °C po dobu 24 hodin a následně byl vyhodnocen inhibiční účinek změřením průměrů inhibičních zón vytvořených okolo disků.

4.4.9.2. Bujónová diluční metoda

Bujónový diluční test pro stanovení antimikrobiální aktivity supernatantů byl prováděn v mikrotitračních 96jamkových destičkách. Použité mikroorganismy s příslušnými kultivačními médii jsou uvedeny v Tabulka 5. Jako negativní kontrola byl použit 70 % ethanol.

Testované mikroorganismy byla 24 hodin předem zaočkovány do 50 ml příslušného média byly kultivovány při 37 °C. Následující den byl každý mikroorganismus zředěn pomocí čistého sterilního média na hodnotu 0,5 McF a poté ještě zředěn tisíckrát. Do vnějších jamek mikrotitrační destičky byla dokola napipetováno 200 µl sterilní destilované vody. Do všech zbývajících jamek bylo napipetováno 100 µl příslušného média. Rozložení vzorků a kontrol na mikrotitrační destičce je znázorněno na Schéma 1, jamky s destilovanou vodou jsou znázorněny bledě modrou barvou. Do první řady jamek byly přidány jednotlivé vzorky v objemu 100 µl. Pipetou byl obsah jamek promíchán a následně bylo odebráno 100 µl, které byly přesunuty do jamky v nižší řadě. Takto bylo na destičce vytvořena koncentrační řada s celkovým objemem 100 µl v každé jamce. Nakonec bylo do všech jamek, kromě jamek pro kontrolu média, napipetováno 100 µl předem zředěného testovaného mikroorganismu.

Připravené mikrotitrační destičky byly vloženy do ELISA readeru, kde byla změřena absorbance v čase 0. Vlnová délka měření byla nastavena na 630 nm. Přístroj provedl pro jednu destičku dvě měření. Po uzavření byly destičky kultivovány 24 hodin při 37 °C. Následně byla změřena absorbance po 24 hodinách, kdy měřený zákal odpovídá nárůstu mikroorganismu.

Schéma 1: Rozložení 96jamkové mikrotitrační destičky

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		Vzorek č.1		Vzorek č.2		Vzorek č.3		Vzorek č.4		Pozitivní kontrola		
C		↓ koncentrační řada		↓ koncentrační řada		↓ koncentrační řada		↓ koncentrační řada		Negativní kontrola		
D	Negativní kontrola											
E	Kontrola média											
F	Kontrola média											
G												
H												

4.5. Příprava kosmetických emulzí

Byly připraveny tři typy kosmetických emulzí s přidavkem supernatantu po kultivaci bakterií mléčného kvašení na neupravené vláknině. Složení jednotlivých emulzí je uvedeno v Tabulce 6. Složky olejové fáze (světlicový olej, cetearyl alkohol, Emulsan a glyceryl stearát citrát) byly naváženy v požadovaném množství do kádinky. Do druhé kádinky byla navážena vodná složka (příslušný supernatant a stearát sacharózy) a obě kádinky byly vloženy do vodní lázně vyhřáté přibližně na 80 °C. Obsahy obou kádinek byly míchány a po rozpuštění složek byly kádinky vyjmuty z vodní lázně. Do olejové fáze byla za míchání přidána vodná fáze. Kádinka s oběma fázemi byla vložena do chladicí lázně a míchána až do ochlazení, kdy byla přidána konzervační složka (Cosgard). Směs byla následně promíchávána 5 minut při vysokých otáčkách míchadla. Hotová emulze byla přenesena do kosmetické dózy.

Tabulka 6: Složení jednotlivých kosmetických emulzí

	Složka	Obsah [%]		Složka	Obsah [%]		Složka	Obsah [%]
Emulze č.1	Světlicový olej	25	Emulze č.2	Světlicový olej	25	Emulze č.3	Světlicový olej	25
	Supernatant	62,5		Supernatant	61,5		Supernatant	61
	Emulsan	6		Emulsan	6		Emulsan	6
	Cetearyl alkohol	6		Cetearyl alkohol	6		Cetearyl alkohol	6
	Konzervant	0,5		Konzervant	0,5		Konzervant	0,5
	Stearát sacharózy	0		Stearát sacharózy	1		Stearát sacharózy	1
	Glyceryl stearát citrát	0		Glyceryl stearát citrát	0		Glyceryl stearát citrát	0,5

4.5.1. Odstředivý test

Stabilita připravených emulzí byla testována na analytické centrifuze LUMISizer. Vzorky emulzí byly pomocí sterilní stříkačky s jehlou nadávkovány do kyvety z materiálu s označením PC 110-131XX po rysku. Měření probíhalo 5 hodin při teplotě 25 °C s odstředivým zrychlením 4000 otáček/min. Vlnová délka byla nastavena na hodnotu 865 nm a interval zaznamenávání signálu na 30 sekund. V programu byly vyhodnoceny transmittanční křivky, indexy nestability a teoretická stabilita pro jednotlivé emulze. Teoretická stabilita byla vypočítána podle následující rovnice

$$t \text{ (teoretická stabilita)} = \text{RCA} \cdot t \text{ (odstředivý test)} . \quad (2)$$

4.5.2. Hodnocení antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita připravených emulzí byla sledována v čase po dobu 11 dní. Měření probíhalo totožně jako měření antioxidační aktivity supernatantů po kultivacích jednotlivými kulturami bakterií mléčného kvašení popsaným v kapitole 4.4.4.

Pro výpočet antioxidační aktivity z naměřených hodnot absorbance byla použita rovnice kalibrační křivky uvedená v Příloha 3, přičemž následně byla koncentrace přepočítána na 1 g emulze. Pro každý vzorek byla absorbance změřena dvakrát a vypočítána její průměrná hodnota.

4.5.3. Senzorické hodnocení

Do senzorického hodnocení vytvořených emulzí bylo zapojeno 13 respondentů ve věkovém rozmezí 25-50 let. Byl hodnocena konzistence, roztíratelnost, pocit hydratace, parfemace, zanechání mastného nebo lepivého filmu po aplikaci. Respondenti hodnotili sledované parametry číselnou stupnicí od 1 (nejlepší) do 5 (nejhorší) do předložených dotazníků. Dotazník je uveden v Příloha 7.

4.5.4. Měření účinku na pokožce

Pomocí sondy Corneometer zapojené v systému MPA 5 Courage + Khazaka byla měřená hydratace pokožky po aplikaci vybraných emulzí v čase. Zároveň byla pomocí přístroje měřena deskvamace kůže pomocí přístroje Visioscope PC-35. Sonda Corneometer byla přiložena alespoň desetkrát a výsledná hodnota hydratace byla vypočtena z průměru naměřených hodnot. Deskvamace kůže byla měřena pomocí transparentních foliových pásků, přičemž fólie byla aplikována na měřené místo na kůži. Fólie byla po odebrání z měřeného místa připevněna na kameru Visioscopu, který pořizuje 2D mikroskopické a makroskopické snímky, které následně analyzuje.

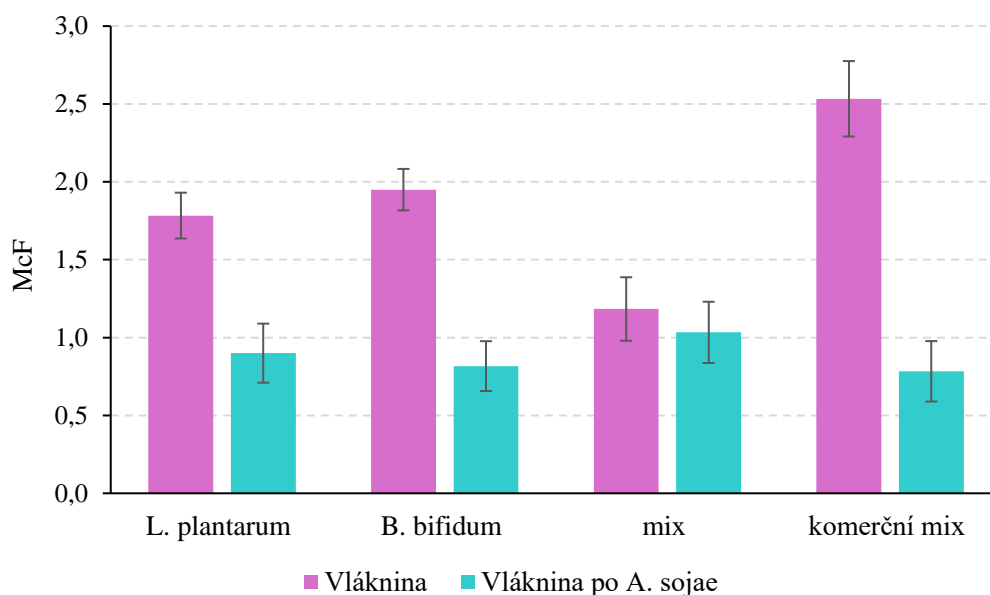
Měření probíhalo v oblasti předloktí, kdy byla označena 4 místa pro aplikaci emulzí a byla změřena hydratace a deskvamace před aplikací na těchto místech. Následně byla na tato místa aplikovány emulze a po 15 minutách byla změřena hydratace a deskvamace. Měření bylo dále opakováno po 1 hodině a 2 hodinách. Po 24 hodinách od prvního nanesení bylo opakováno, emulze byly aplikovány na stejná místa a po 15 minutách byla znovu změřena hydratace a deskvamace. Stejně bylo měření provedeno po 48 hodinách od první aplikace.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

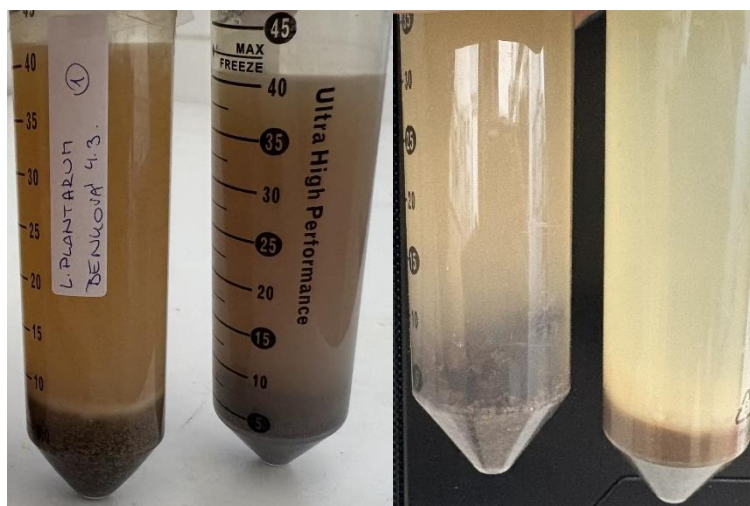
5.6. Stanovení růstu kultury bakterií pomocí turbidimetrie

Hodnota zákalu byla změřena podle postupu popsaného v kapitole 4.2.3. V Graf 1 jsou zobrazeny získané hodnoty zákalu. Hodnota stupně McF po ukončení kultivace bakterií mléčného kvašení na upravené vláknině pomocí *A. sojæ* je kromě mixu výrazně nižší oproti kultivaci na neupravené vláknině. Po kultivaci komerčního mixu na neupravené vláknině byla naměřena nejvyšší hodnota zákalu, a to 2,53 stupně McF. Na upravené vláknině byla naopak zjištěna nejmenší hodnota zákalu, 0,78 stupně McF. Zatímco na neupravené vláknině byla u mixu naměřena nejnižší hodnota zákalu (1,18 stupně McF), na upravené vláknině byl zákal nejvyšší (1,03 stupně McF)

Turbidimetrie i plotnová metoda potvrdily snížení nárůstu na upraveném substrátu *A. sojæ*. Výsledky mohly být ovlivněny celkovou barvou média po kultivacích. Na Obrázek 8 a Obrázek 9 je možné vidět rozdíly v barvách jednotlivých substrátů. Autoři studie [63] prokázali nízkou korelaci mezi měření zákalu s použitím McFarlandových standardů s hodnotou CFU/ml a podhodnocení i nadhodnocení počtu buněk až o 30-50 % v závislosti na druhu. Autoři proto doporučují kombinovat turbidimetrické stanovení s plotnovou metodou.



Graf 1: Hodnoty zákalu po jednotlivých kultivacích ve stupních McFarlanda

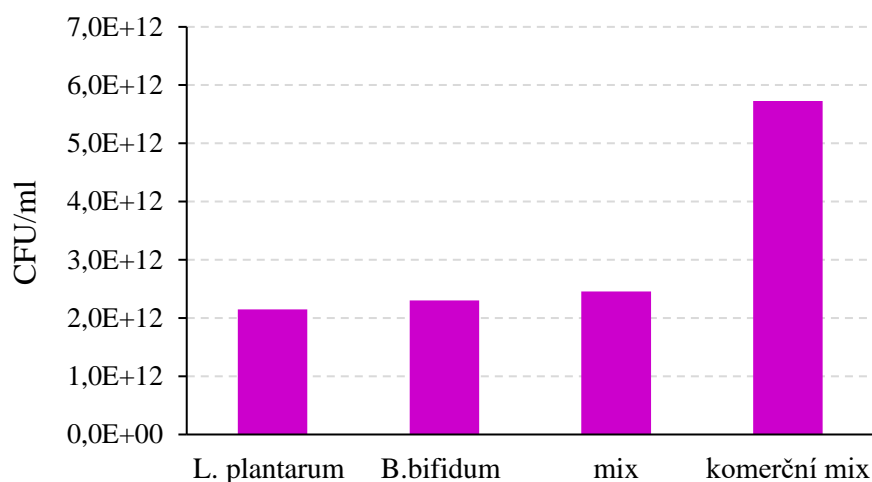


Obrázek 8 (vlevo): Vzhled substrátu po kultivaci *L. plantarum* na vláknině bez úpravy (vlevo substrát s kulturou, vpravo substrát bez kultury)

Obrázek 9 (vpravo): Vzhled substrátu po kultivaci *L. plantarum* na upravené vláknině pomocí *A. sojaj* (vlevo substrát bez kultury, vpravo substrát s kulturou)

5.7. Stanovení CFU pomocí plotnové metody

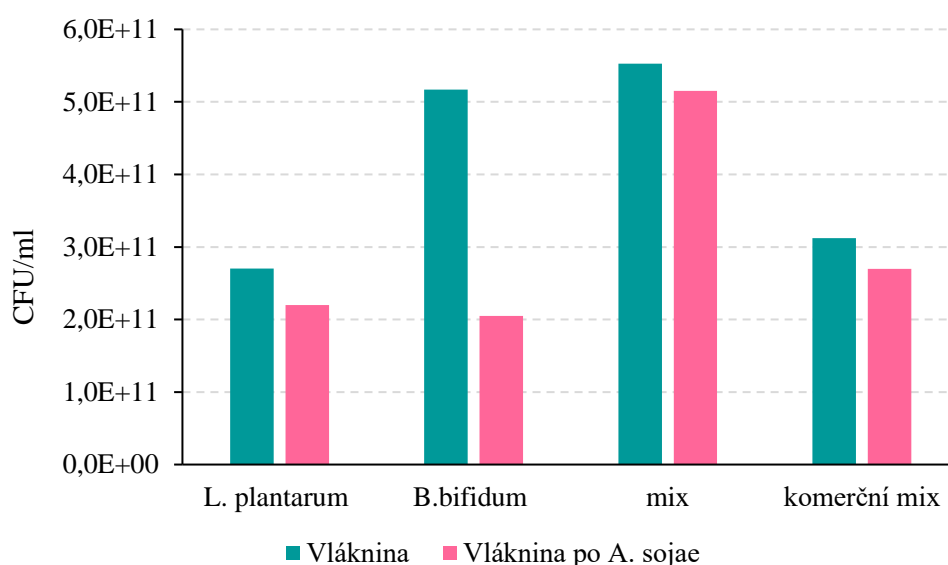
Výsledná hodnota CFU/ml byla získána ze stanovení průměrného počtu narostlých kolonií na miskách připravených podle postupu v kapitole 4.2.4 a 4.3.2.3. V MRS médiu (Graf 2) dosahovaly bakterie CFU/ml v řádu 10^{12} , kdy nejvyšší CFU/ml vykazoval komerční mix s $5,7 \cdot 10^{12}$ CFU/ml. U ostatních bakteriálních kultur se CFU/ml pohybovalo v rozmezí $2,2 \cdot 10^{12}$ až $2,5 \cdot 10^{12}$. Stanovení v MRS médiu sloužilo pro porovnání růstu vybraných bakterií v ideálním médiu a na vlákninovém substrátu. Z Graf 2 je patrné, že oba individuální kmeny LAB vykazovaly na MRS médiu při daném způsobu inokulace srovnatelné růstové charakteristiky. Zatímco směsná kultura vykazovala jen o něco vyšší růst než kmeny kultivované samostatně, komplexní komerční mix dosáhl za stejných inokulačních podmínek několikanásobně vyšší růstové charakteristiky.



Graf 2: Hodnota CFU/ml pro kultivaci v MRS médiu

V Graf 3 jsou zobrazeny hodnoty CFU/ml pro kultivace na čisté vlákninové frakci a na vlákninové frakci upravené pomocí *A. sojæ*. Všechny hodnoty CFU/ml se pohybují v řádu 10^{11} . Nejvyšší nárůst pro neupravenou i upravenou vlákninu vykazoval mix, kdy hodnota CFU/ml na čistém substrátu dosáhla $5,53 \cdot 10^{11}$ a na fermentované vláknině $5,15 \cdot 10^{11}$. S výjimkou kultury *B. bifidum* byl rozdíl v růstu na přírodní vláknině i na vláknině fermentované pomocí *A. sojæ* poměrně malý, oba substráty poskytují tedy většinu živin pro LAB podobně. V případě upravené vlákniny mohly být nižší hodnoty způsobeny tím, že houba přednostně spotřebovala složky substrátu, např. jednoduché cukry, které pak způsobily nižší nárůst na fermentované vláknině. V porovnání s hodnotami CFU/ml kultivací v MRS médiu, kde komerční mix vykazoval nejvyšší hodnotu nárůstu, ve vlákninovém substrátu dosáhl druhé nejmenší hodnoty, $3,12 \cdot 10^{11}$ CFU/ml.

CFU kvantifikuje živé, kultivovatelné buňky v substrátu a měla by tedy být v tomto případě vhodnějším ukazatelem nárůstu kultur oproti turbidimetrické metody.



Graf 3: Hodnota CFU/ml pro kultivace na vlákninových frakcích

5.8. Gravimetrické stanovení biomasy *A. sojæ*

Stanovení množství narostlé biomasy *Aspergillus sojæ* na konopné vláknině pomocí gravimetrie proběhlo podle postupu popsaného v kapitole 4.3.1.2. Hmotnost biomasy *A. sojæ* činila $1,91 \pm 0,09$ g. Procentuální nárůst biomasy dosáhl $9,4 \pm 0,6$ %.

5.9. Charakterizace extraktů získaných po odstředění kultur a substrátů

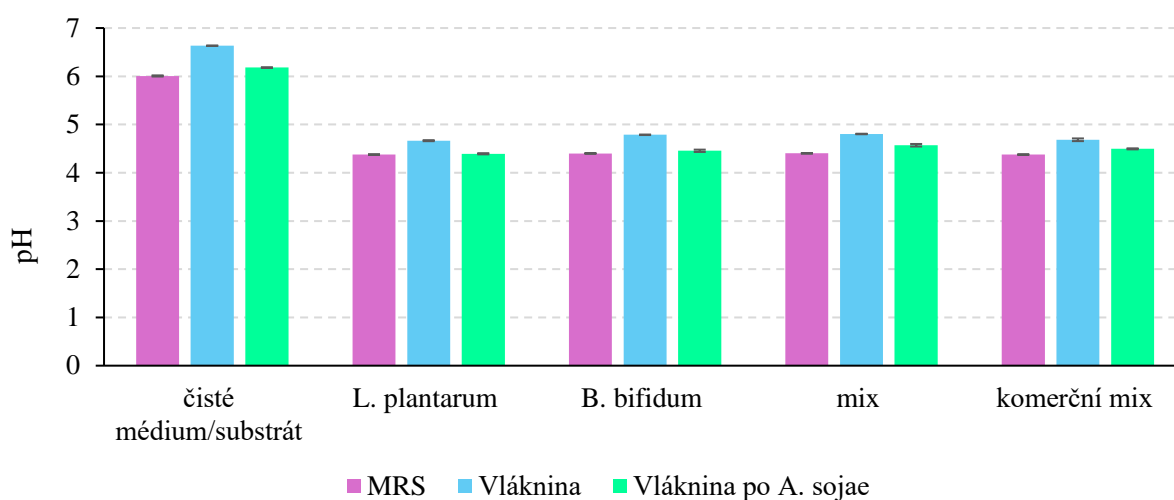
V následující části práce byly charakterizovány supernatanty získané po kultivaci vybraných bakterií mléčného kvašení na konopné vláknině bez úpravy a po fermentaci *A. sojæ*. Cílem bylo charakterizovat obsažené látky uvolněné ze substrátů a vyprodukované bakteriemi mléčného kvašení během simulované koji fermentace a u kontrolních kultivací.

5.9.1. Změna pH

Hodnota pH byla změřena u supernatantů po kultivacích vybraných kultur LAB v MRS médiu a na neupravené i upravené vlákninové frakci. Výsledné pH jsou zaznamenány v Graf 4.

Byl pozorován pokles pH oproti růstu v čistém MRS médiu a substrátů, zřejmě v závislosti na produkci kyseliny mléčné během fermentace.

Při všech kultivacích došlo ke snížení pH pod hodnotu 5. U vlákninové frakce kleslo pH průměrně o 1,9 oproti čisté vláknině (pH 6,6), u vlákniny upravené pomocí *A. sojae* hodnota klesala průměrně o 1,7 z původní hodnoty pH 6,2. V MRS médiu (pH 6) byl pokles v průměru o 1,6. Celkově nejnižší hodnoty pH byly naměřeny v MRS médiu, kde je obsaženo velké množství glukózy, která je snadno fermentovatelná na kyselinu mléčnou. V supernatantu samotné neupravené vlákniny je pH vyšší přibližně o 0,25-0,4, a to z důvodu odlišného obsahu dostupných sacharidů a nižšího množství vyprodukované kyseliny mléčné. Úprava *A. sojae* přispěla k snížení hodnoty pH oproti neupravené vláknině.

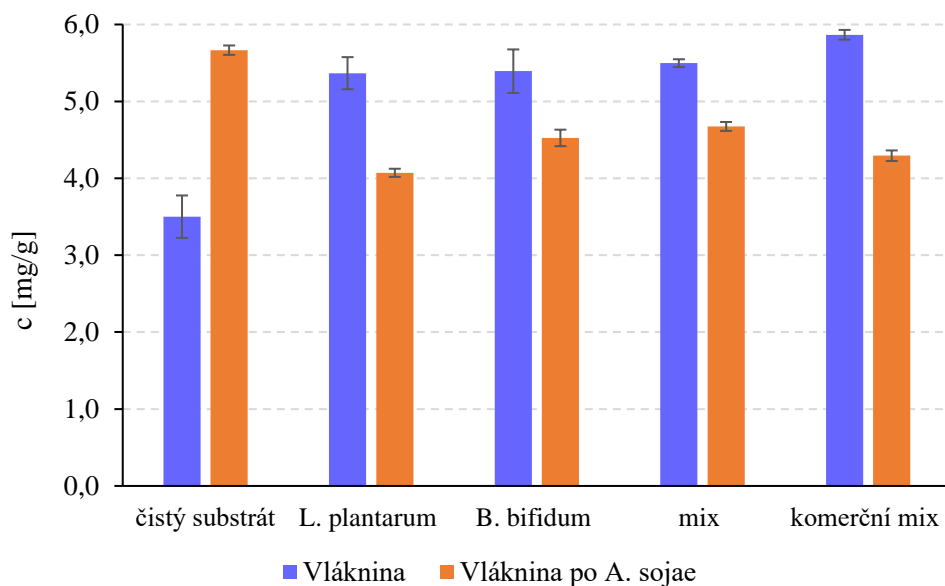


Graf 4: Hodnoty pH supernatantů

5.9.2. Stanovení koncentrace fenolických látek

Koncentrace fenolických látek byla provedena podle postupu popsaného v kapitole 4.4.2. V Graf 5 jsou zobrazeny výsledné koncentrace fenolických látek. Zatímco u kultivace bakterií mléčného kvašení na čisté vlákninové frakci došlo ke zvýšení fenolických látek oproti čisté vlákninové frakci, tak u vlákniny upravené kultivací *A. sojae* byla koncentrace snížena. Samotná kultivace *A. sojae* zvýšila obsah fenolů z $3,50 \pm 0,28$ mg/g na $5,67 \pm 0,06$ mg/g. Kultivací komerčního mixu na neupravené vláknině bylo dosaženo nejvyšší koncentrace fenolických látek, a to $5,87 \pm 0,06$ mg/g. Naopak nejnižší koncentrace byla zaznamenána u kultivace *L. plantarum* s koncentrací $5,37 \pm 0,21$ mg/g. U vlákniny upravené pomocí *A. sojae* byl největší pokles v koncentraci fenolů naměřen u bakterie *L. plantarum*, kdy koncentrace klesla z $5,67 \pm 0,06$ mg/g na $4,07 \pm 0,05$ mg/g. Nejmenší pokles v koncentraci vykazoval *B. bifidum*, kdy se koncentrace snížila na hodnotu $4,67 \pm 0,06$ mg/g.

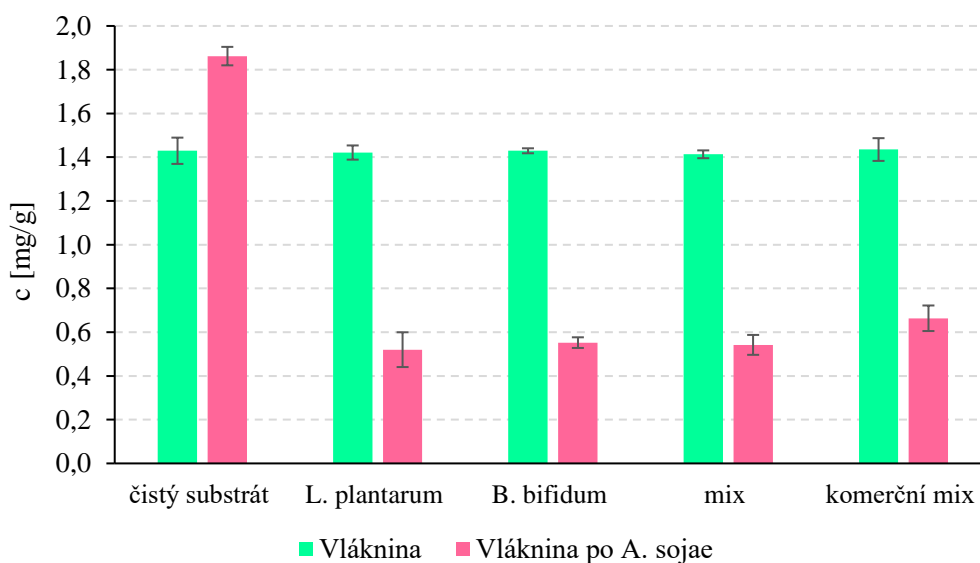
Bakterie mléčného kvašení mohou během fermentace využívat komplexnější fenolické látky, a proto mohlo dojít k poklesu jejich koncentrace [64]. Nejvyšší koncentrace u vlákninové frakce byla pozorována po kultivaci komerčního mixu. Pro upravenou vlákninu pomocí *A. sojae* byla nejvyšší koncentrace zaznamenána po kultivaci mixu.



Graf 5: Výsledná koncentrace fenolických látek po kultivacích

5.9.3. Stanovení koncentrace flavonoidů

Obsah flavonoidů byl stanoven podle postupu uvedeného v kapitole 4.4.3. Výsledné koncentrace flavonoidů v mg/g jsou uvedeny v Graf 6. U vlákniny bez úpravy zůstává koncentrace přibližně stejná a pohybuje se v hodnotách $1,41 \pm 0,02$ mg/g až $1,44 \pm 0,05$ mg/g. Kultivací *A. sojae* došlo ke zvýšení koncentrace flavonoidů z $1,43 \pm 0,06$ mg/g na $1,86 \pm 0,04$ mg/g. U vlákniny upravené pomocí *A. sojae* je stejně jako u celkových fenolických látek vidět výrazný pokles koncentrace flavonoidů. Nejmenší pokles v koncentraci flavonoidů byl pozorován u komerčního mixu, kdy z původní hodnoty 1,86 mg/g klesla koncentrace na $0,66 \pm 0,06$ mg/g. Nejvíce koncentrace klesla u *L. plantarum*, kde byla naměřena koncentrace $0,52 \pm 0,08$ mg/g.

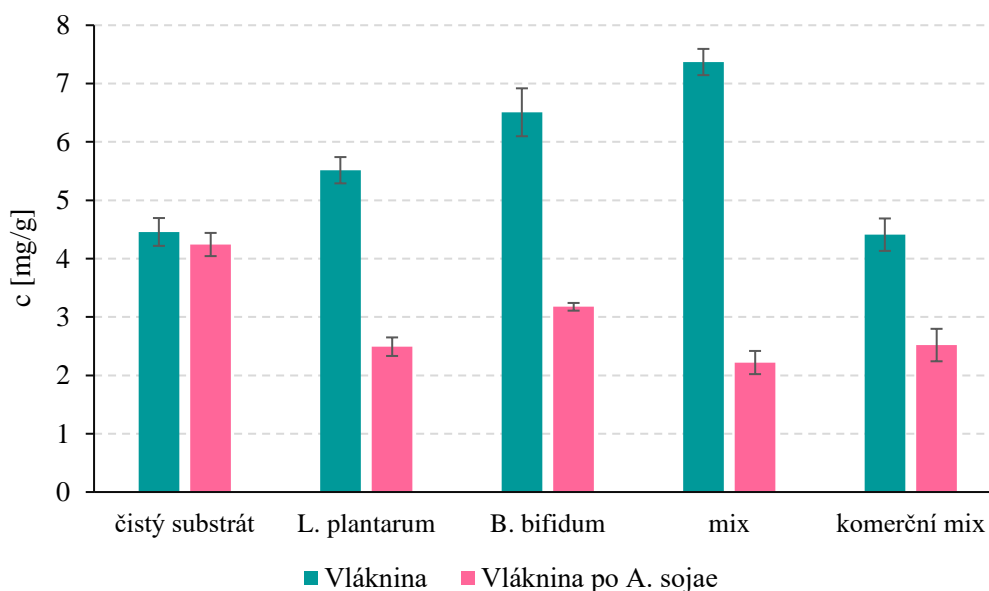


Graf 6: Výsledná koncentrace flavonoidů po kultivacích

5.9.4. Stanovení antioxidační aktivity extraktů

Antioxidační aktivita byla stanovena podle postupu uvedeného v kapitole 4.4.4. Výsledné hodnoty antioxidační aktivity po jednotlivých kultivacích jsou zobrazeny v Graf 7. Po kultivaci na vláknině bez úpravy došlo s výjimkou komerčního mixu ke zvýšení antioxidační aktivity. Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazoval supernatant po kultivaci mixu *L. plantarum* a *B. bifidum*, a to $7,4 \pm 0,2$ mg/g. Nejnižší antioxidační aktivita byla zjištěna u kultivace s komerčním mixem, kdy koncentrace dosáhla $4,41 \pm 0,28$ mg/g. Při použití upravené vlákniny pomocí *A. sojae* došlo k výraznému snížení antioxidační aktivity u všech použitých bakterií mléčného kvašení. Největší pokles je patrný u mixu, kdy antioxidační aktivita na neupravené vláknině dosáhla $7,37 \pm 0,23$ mg/g a při kultivaci na upravené vláknině pouze $2,22 \pm 0,20$ mg/g. Kultivací *B. bifidum* na neupravené vláknině bylo dosaženo druhé nejvyšší antioxidační aktivity, $6,51 \pm 0,41$ mg/g, a zároveň nejvyšší antioxidační aktivity po kultivaci na upravené vláknině, $3,17 \pm 0,07$ mg/g. Při kultivaci *B. bifidum* na upravené vláknině došlo k zachování přibližně poloviny antioxidační aktivity oproti kultivaci na neupravené vláknině. Nejnižší antioxidační aktivita na neupravené vláknině byla zaznamenána u kultivace komerčního mixu ($4,41 \pm 0,28$ mg/g). Kultivací komerčního mixu na upravené vláknině bylo dosaženo zachování přibližně 57 % antioxidační aktivity v porovnání s kultivací na neupravené vláknině.

Pokles antioxidační aktivity po kultivacích bakterií mléčného kvašení na vláknině upravené pomocí *A. sojae* mohl být způsoben právě rozkladem komplexnějších fenolických látek na jednodušší, který má vliv na celkovou antioxidační aktivitu [64]. Celkově lze říci, že hodnota antioxidační aktivity odpovídá částečně trendům v hodnotách fenolických látek, současně je však patrné, že do redoxní rovnováhy komplexních extraktů zasahují i další složky uvolněné z médií nebo produkované bakteriemi mléčného kvašení.

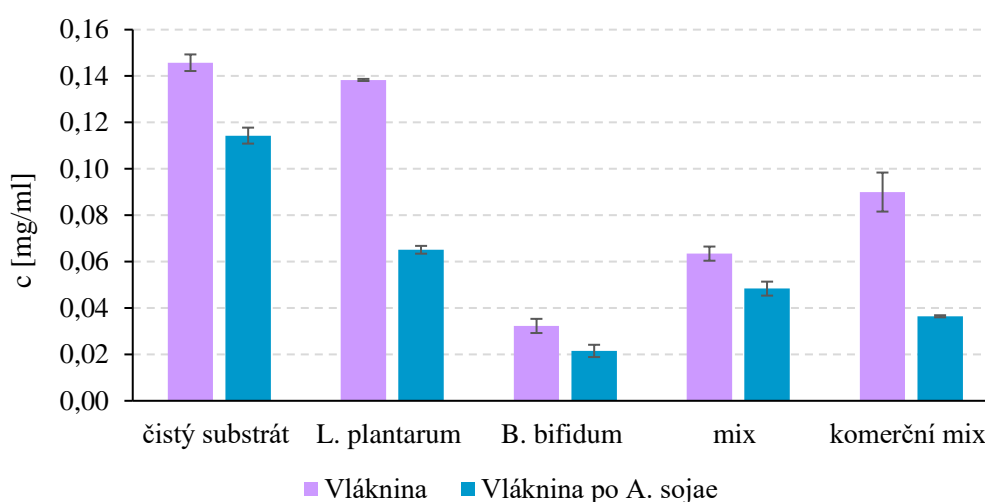


Graf 7: Výsledná antioxidační aktivita stanovená po kultivacích

5.9.5. Stanovení celkových rozpustných sacharidů dle Duboise

Obsah celkových rozpustných sacharidů byl stanoven podle postupu popsaného v kapitole 4.4.5. Výsledná koncentrace celkových rozpustných sacharidů je zobrazena v Graf 8.

Po úpravě vlákninové frakce kultivací *A. sojæ* došlo ke snížení celkových sacharidů z $0,146 \pm 0,004$ mg/ml na $0,114 \pm 0,003$ mg/ml, z důvodu využití sacharidů pro vlastní růst a metabolické potřeby. Při porovnání výsledných koncentrací celkových a redukujících sacharidů je patrné, že *A. sojæ* přeměňuje neredukující polysacharidy na redukující, které následně bakterie mléčného kvašení metabolizují [66]. Zatímco u neupravené vlákniny je procentuální snížení celkových sacharidů fermentací *L. plantarum* pouze o 5,1 %, předúpravou pomocí *A. sojæ* došlo ke snížení o 43,1 %. V případě *B. bifidum* a mixu jsou procentuální snížení pro oba substráty podobná. Po fermentaci vlákniny komerčním mixem došlo k poklesu celkových sacharidů o 33,8 %, předúpravou vlákninového substrátu došlo k poklesu o 68,1 %.



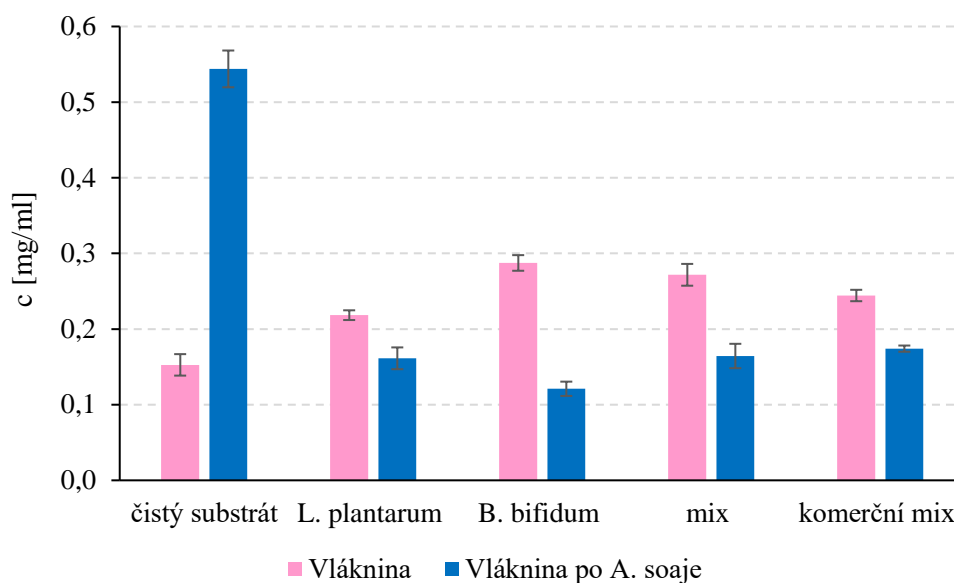
Graf 8: Výsledná koncentrace celkových sacharidů po kultivacích

5.9.6. Stanovení koncentrace redukujících sacharidů dle Somogyi-Nelsona

Koncentrace redukujících sacharidů byla stanovena tak, jak je popsáno v kapitole 4.4.6. Výsledné koncentrace redukujících sacharidů jsou uvedeny v Graf 9. Při kultivaci vybraných bakterií mléčného kvašení na neupravené vláknině došlo k zvýšení koncentrace redukujících sacharidů v supernatantu, přičemž nejvyšší dosažená koncentrace činila $0,287 \pm 0,010$ mg/ml při kultivaci *B. bifidum*.

Nejnižší nárůst byl zaznamenán po kultivaci *L. plantarum* ($0,218 \pm 0,006$ mg/ml). Zvýšení koncentrace redukujících sacharidů po kultivacích jednotlivými bakteriálními kulturami odpovídá snížení koncentrace celkových sacharidů stanovené v kapitole 5.9.5.

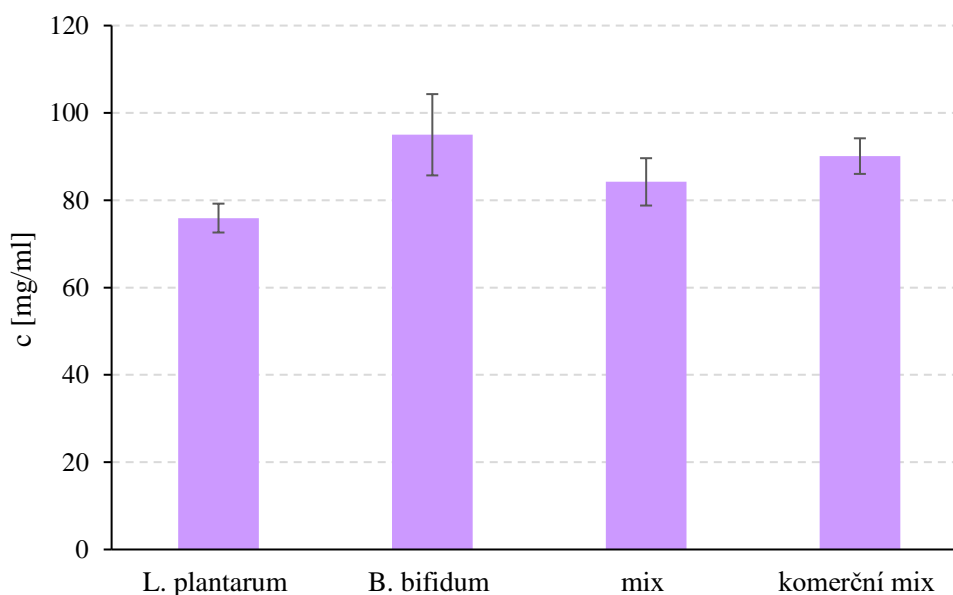
Z grafu je patrné, že úpravou vlákniny kultivací *A. sojæ* došlo ke zvýšení obsahu redukujících sacharidů přibližně trojnásobně, a to z $0,153 \pm 0,014$ mg/ml na $0,54 \pm 0,02$ mg/ml. Po kultivaci bakterií mléčného kvašení na takto upravené vláknině došlo k prudkému poklesu koncentrace redukujících sacharidů. Fermentací čisté vlákniny bakteriálními kmeny dochází tedy spíše k hydrolyze a tím zvýšení redukujících cukrů [65]. Naopak u upravené vlákniny mléčné bakterie uvolněné redukující cukry spotřebují. Kultura *B. bifidum* spotřebovala 78 % uvolněných redukujících cukrů a jejich koncentrace klesla na hodnotu 0,12 mg/ml, u ostatních kultur byla spotřeba přibližně 70 % a jejich koncentrace se pohybovala v rozmezí $0,161 \pm 0,014$ mg/ml až $0,174 \pm 0,004$ mg/ml.



Graf 9: Výsledná koncentrace redukujících sacharidů po kultivacích

5.9.7. Stanovení koncentrace kyseliny mléčné pomocí HPLC

Postup stanovení koncentrace kyseliny mléčné v supernatantech po kultivaci v MRS médiu a na vlákninových frakcích je uveden v kapitole 4.4.7. Rovnice kalibrační přímky měla tvar $y = 1,6491x - 0,024$. Koncentrace kyseliny mléčné v supernatantu MRS média se pohybovala v rozmezí $75,9 \pm 3,3$ mg/ml až $94,99 \pm 9,31$ mg/ml. Jednotlivé koncentrace jsou uvedeny v Graf 10 a významně se neliší u individuálních kmenů a směsí. Nejvyšší koncentrace kyseliny mléčné byla naměřena po kultivaci *B. bifidum* ($94,99 \pm 9,31$ mg/ml) a nejnižší u kultivace *L. plantarum* ($75,91 \pm 3,31$ mg/ml).

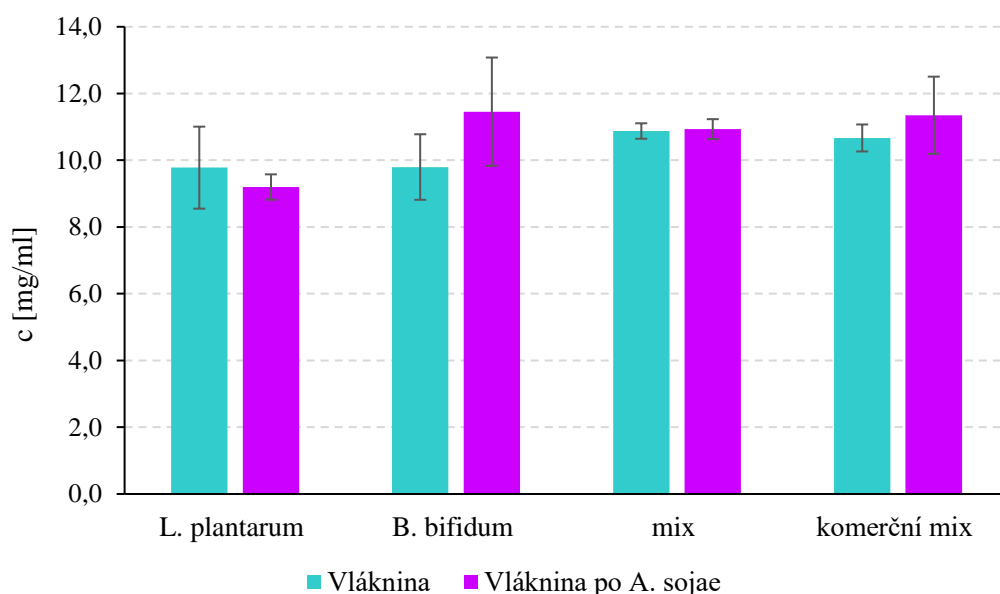


Graf 10: Koncentrace kyseliny mléčné po kultivaci v MRS médiu

Koncentrace kyseliny mléčné v supernatantech po kultivaci na vlákninových substrátech dosáhla v průměru 10,5 mg/ml. Nejvyšší koncentrace kyseliny mléčné na neupravené vláknině byla dosažena kultivací mixu, a to $10,9 \pm 0,2$ mg/ml. Kultivací *L. plantatum* bylo vyprodukováno nejméně kyseliny mléčné pro všechny substráty – v MRS dosáhla koncentrace $75,9 \pm 3,3$ mg/ml, na neupravené vláknině $9,8 \pm 1,2$ mg/ml a na upravené vláknině $9,2 \pm 0,4$ mg/ml.

V supernatantech po kultivaci *B. bifidum* a komerčního mixu na vláknině upravené pomocí *A. sojae* došlo k mírnému zvýšení obsahu kyseliny mléčné. Nižší koncentrace celkových sacharidů (kapitola 5.9.5) po kultivaci bakterií mléčného kvašení na vláknině upravené *A. sojae* koreluje s vyšší koncentrací kyseliny mléčné. Pokles redukujících sacharidů (kapitola 5.9.6) koreluje s vyšší produkcí kyseliny mléčné pouze u kultivace *B. bifidum*, kdy spotřeba redukujících sacharidů dosáhla přibližně 78 % a koncentrace kyselina mléčné byla stanovena na $11,5 \pm 1,6$ mg/ml. Koncentrace kyseliny mléčné po kultivaci mixu na upravené vláknině dosáhla s hodnotou $10,9 \pm 0,3$ mg/ml, téměř shodného výsledku jako při kultivaci na neupravené vláknině.

Nízká koncentrace kyseliny mléčné oproti kultivaci v MRS médiu byla způsobena nižším obsahem celkových sacharidů. Podle složení MRS média uvedeného na obalu je v tomto médiu obsaženo 20 mg/ml glukózy. V konopné vláknině bylo stanoveno $0,153 \pm 0,014$ mg/ml celkových rozpustných sacharidů (kapitola 5.9.5).



Graf 11: Koncentrace kyseliny mléčné po kultivaci na vlákninových substrátech

5.9.8. Stanovení koncentrace kanabinoidů pomocí HPLC

Koncentrace jednotlivých kanabinoidů byla naměřena podle postupu uvedeného v kapitole 4.4.8. Byla prokázána přítomnost CBD a CBG, je možná přítomnost i dalších kanabinoidů, ale v rámci použité metody jsme je nebyli schopni stanovit. Výsledné koncentrace přepočtené na 1 g konopné vlákniny jsou uvedeny v Tabulka 7 a Tabulka 8.

V čisté vlákninové frakci byla zjištěna koncentrace CBD $44,0 \pm 8,6$ $\mu\text{g/g}$ a CBG $20,5 \pm 7,6$ $\mu\text{g/g}$. Po kultivaci na neupravené vlákninové frakci byl stanoven obsah CBD pouze u *L. plantarum*, a to $14,1 \pm 2,8$ $\mu\text{g/g}$. U ostatních kultivací na neupravené vláknině koncentrace obou kanabinoidů nebyla detekována.

Ve vláknině upravené pomocí *Aspergillus sojae* byla zjištěna koncentrace CBD $19,1 \pm 2,6$ $\mu\text{g/g}$ a CBG $14,3 \pm 1,9$ $\mu\text{g/g}$. Obsah CBG u všech kultivací na upravené vláknině nebyl detekovatelný. CBD bylo stanoveno u kultivace mixu a jeho koncentrace dosáhla $11,3 \pm 3,3$ $\mu\text{g/g}$.

V konopných semenech kanabinoidy nejsou obsaženy a jejich případná přítomnost se vysvětluje jako kontaminace z okolních částí rostliny při sklizení a následném zpracování [67]. Ve studii [68] autoři zaznamenali v konopných výliscích 170 $\mu\text{g/g}$ CBD, zatímco ve studii [69] uvádějí autoři obsah CBD pod detekčním limitem. Koncentrace kanabinoidů v konopném koláči je ovlivněna jak použitou odrůdou rostliny, tak i následnou úpravou nebo typem extrakce.

Tabulka 7: Obsah kanabinoidů po kultivaci na konopné vláknině

	CBD [$\mu\text{g/g}$]	CBG [$\mu\text{g/g}$]
Čistý substrát	$44,0 \pm 8,6$	$20,5 \pm 7,6$
<i>L. plantarum</i>	$14,1 \pm 2,8$	-
<i>B. bifidum</i>	-	-
Mix	-	-
Komerční mix	-	-

Tabulka 8: Obsah kanabinoidů po kultivaci na vláknině upravené pomocí *Aspergillus sojae*

	CBD [$\mu\text{g/g}$]	CBG [$\mu\text{g/g}$]
Čistý substrát	$19,1 \pm 2,6$	$14,3 \pm 1,9$
<i>L. plantarum</i>	-	-
<i>B. bifidum</i>	-	-
Mix	$11,3 \pm 3,3$	-
Komerční mix	-	-

5.9.9. Stanovení antimikrobiální aktivity

Antimikrobiální aktivita lyofilizátů supernatantů byla stanovena pomocí difúzní diskové metody a bujonové diluční metody. Postupy práce jsou popsány v kapitole 5.9.9.1 (disková difúzní metoda) a kapitole 5.9.9.2 (bujonová diluční metoda). Pro oba typy antimikrobiálních testů byly použity kultury *Candida glabrata*, *Escherichia coli*, *Cutibacterium acnes* a *S. epidermidis*, které mohou souviset s případným kosmetickým využitím produktů fermentace.

5.9.9.1. Disková difúzní metoda

Přítomnost inhibičních zón pro vzorky lyofilizátů supernatantů po kultivaci na neupravené vlákninové frakci jsou zaznamenány v Tabulka 9. Pro kultivace na upravené vláknině pomocí *A. sojae* jsou záznamy uvedeny v Tabulka 10.

Měření inhibičních zón probíhalo pomocí pravítka. Všechny přítomné inhibiční zóny neměli v průměru více než 2 mm. Přítomnost inhibičních zón přibližně odpovídá zaznamenané antimikrobiální aktivitě jednotlivých vzorků pomocí bujonového dilučního testu (kapitola 5.9.9.2), ale rozdíl je v míře inhibice. Například pro komerční mix kultivovaný na neupravené vláknině byla stanovena antimikrobiální aktivita pro *C. acnes* přes 30 % (pro koncentraci lyofilizátu 1 mg/ml, Graf 15), při provedení diskové metody se objevila inhibiční zóna o průměru pouze 1,8 mm. Vzorek komerčního mixu po kultivaci na neupravené vláknině vykazoval inhibiční zóny u *E. coli*, *C. acnes* a *C. glabrata*. Vzorek mixu pouze u *C. acnes*. Čistá vlákninová frakce a vzorek po kultivaci *L. plantarum* nevykazovaly žádné inhibiční zóny vůči sledovaným mikroorganismům. U kultivací na upravené vláknině se inhibiční zóny vyskytovaly u vzorku komerčního mixu proti *E. coli* a *C. acnes*. Vzorky *L. plantarum* a *B. bifidum* nevykazovaly inhibiční zóny pro žádný z testovaných kultur. Kolem disku se vzorkem upravené vlákninové frakce vznikly inhibiční zóny pro kulturu *E. coli* a *C. acnes*. Vzhledem k výsledkům byla disková difuzní metoda pro stanovení antimikrobiální aktivity vzorků použita pouze jako orientační přehled, zda vzorek vykazuje alespoň minimální inhibiční aktivitu vůči sledované kultuře.

Tabulka 9: Výskyt inhibičních zón pro vzorky z kultivací LAB na vlákninové frakci (znaménko „+“ značí inhibiční zónu 1-2 mm a znaménko „-“ značí nulovou inhibiční zónu)

Mikroorganismus	Čistý substrát	<i>L. plantarum</i>	<i>B. bifidum</i>	mix	Komerční mix
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	-	+
<i>Cutibacterium acnes</i>	-	-	-	+	+
<i>Candida glabrata</i>	-	-	+	-	+

Tabulka 10: Výskyt inhibičních zón pro vzorky z kultivací LAB na vláknině upravené pomocí *A. sojae* (znaménko „+“ značí inhibiční zónu 1-2 mm a znaménko „-“ značí nulovou inhibiční zónu)

Mikroorganismus	Čistý substrát	<i>L. plantarum</i>	<i>B. bifidum</i>	mix	Komerční mix
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	-	+
<i>Cutibacterium acnes</i>	+	-	-	+	+
<i>Candida glabrata</i>	-	-	-	-	-

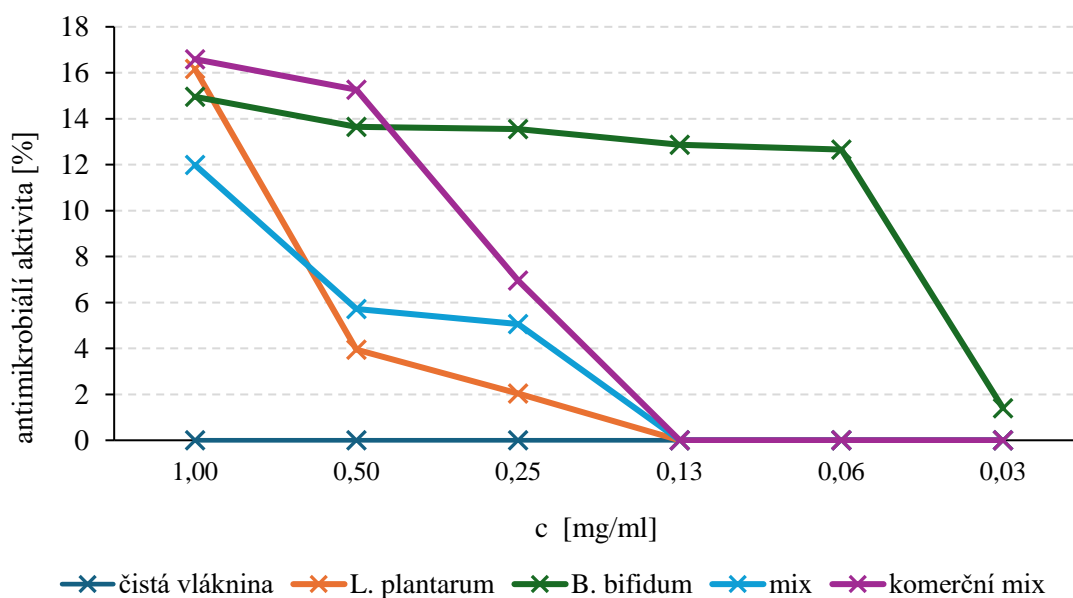
5.9.9.2. Bujonová diluční metoda

Antimikrobiální aktivita proti jednotlivým testovaným kulturám byla vypočtena z průměrné hodnoty nárůstů kultury v jamkách mikrotitrační destičky po 24 hodinách. Pro každou koncentraci vzorku byl odečten průměrný zákal po 24 hodinách inkubace a před inkubací.

Výsledný nárůst kultury byl stanoven porovnáním tohoto zákalu s hodnotou zákalu pozitivní kontroly, která představovala 100% nárůst. Nárůst kultury byl poté přepočítán na procentuální antimikrobiální aktivitu. Koncentrační řada jednotlivých vzorků se pohybovala v rozmezí 0,03-1 mg/ml.

V Graf 12 je znázorněna antimikrobiální aktivita vzorků po kultivaci bakterií mléčného kvašení na konopné vlákninové frakci proti kvasince *Candida glabrata*. Samotná vlákninová frakce nevykazovala žádnou antimikrobiální aktivitu, a tedy sama zřejmě neobsahuje antimikrobiální látky. Vzorek lyofilizátu supernatantu *L. plantarum* při počáteční koncentraci 1 mg/ml dosahoval antimikrobiální aktivity přibližně 16 %, která však s klesající koncentrací vzorku rychle klesala a od koncentrace 0,13 mg/ml byla nulová. Vzorek lyofilizátů supernatantu *B. bifidum* vykazoval nejsilnější a zároveň nejkonzistentnější antimikrobiální aktivitu, kdy koncentrace vzorku 1 mg/ml vykazovala aktivitu přibližně 15 %, do koncentrace 0,06 mg/ml jen mírně klesala na 12,6 % a při nejnižší koncentraci se snížila na hodnotu přibližně 1 %. Tento vzorek byl jediný, který vykazoval antimikrobiální aktivitu i při nejnižší koncentraci. Ostatní vzorky dosáhly nulové aktivity při koncentraci 0,13 mg/ml.

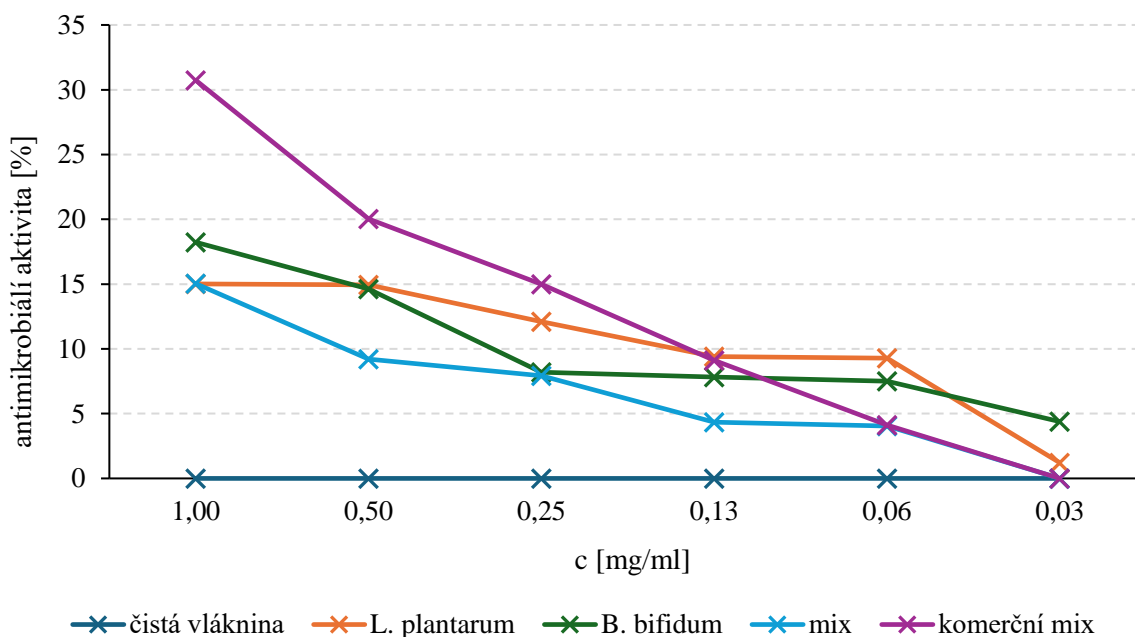
U lyofilizátů vzorků supernatantů po kultivaci bakterií mléčného kvašení na upravené vláknině pomocí *A. sojae* nebyla zjištěna žádná antimikrobiální aktivita. Předúprava substrátu pomocí této plísně mohla zapříčinit snížení látek dostupných pro metabolický vznik antimikrobiálních látek bakterií mléčného kvašení účinných proti testované kvasince. Samotná upravená vláknina měla také nulovou antimikrobiální aktivitu, *Aspergillus sojae* během růstu pravděpodobně nevyprodukoval antimikrobiální látky proti kvasince *C. glabrata*. Pokud by měla hlavní antimikrobiální účinek kyselina mléčná, je možné, že v komplexním fermentovaném konopném médiu byla částečně neutralizována jinými složkami (tomu odpovídají i hodnoty pH na komplexních médiích) a u kvasinek schopných dobré adaptace na kyslejší pH nebyl antimikrobiální efekt zaznamenán.



Graf 12: Antimikrobiální aktivita lyofilizátů supernatantů po kultivaci LAB na konopné vláknině proti *Candida glabrata*

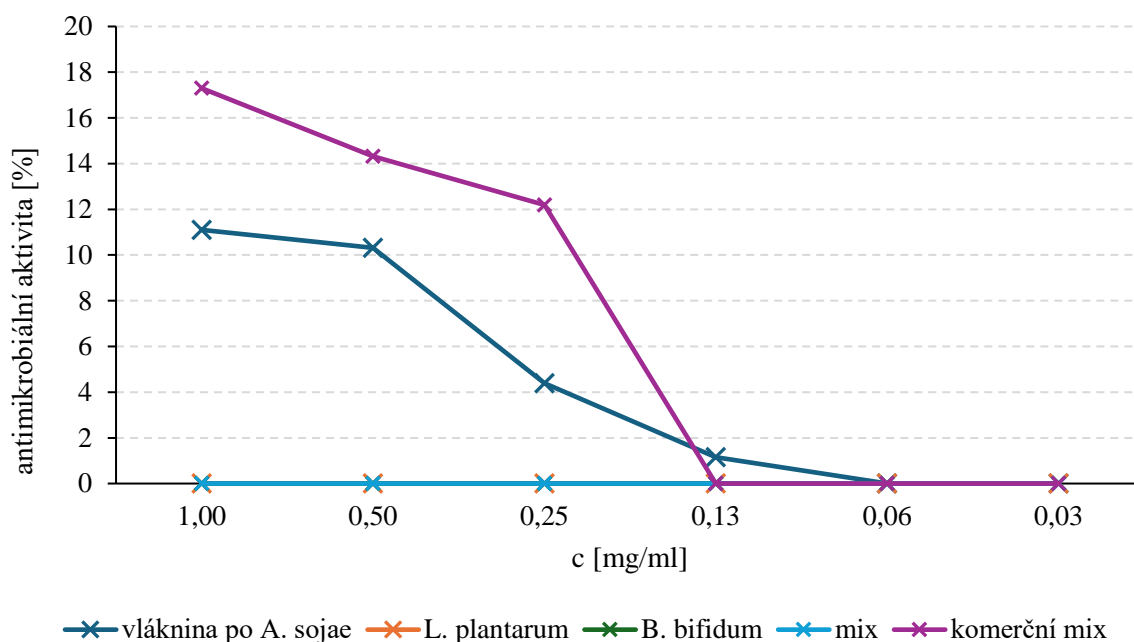
Graf 13 zobrazuje procentuální antimikrobiální aktivitu proti bakterii *Escherichia coli*. Stejně jako u *C. glabrata* nevykazoval čistý vlákninový substrát antimikrobiální aktivitu. Nejvyšší antimikrobiální aktivita u počáteční koncentrace byla stanovena u vzorku komerčního mixu, která dosáhla 30,7 %, následně však prudce klesala se snižující se koncentrací vzorku.

Vzorky ze supernatantů *L. plantarum* a *B. bifidum* nedosahovaly při počáteční koncentraci tak vysoké antimikrobiální aktivity, ale na právě na rozdíl od vzorku komerčního mixu a mixu vykazovaly malou antimikrobiální aktivitu i při nejnižší koncentraci. Vzorek *L. plantarum* při koncentraci 0,03 mg/ml dosáhl 1,2 % antimikrobiální aktivity a vzorek *B. bifidum* 4,4 %.



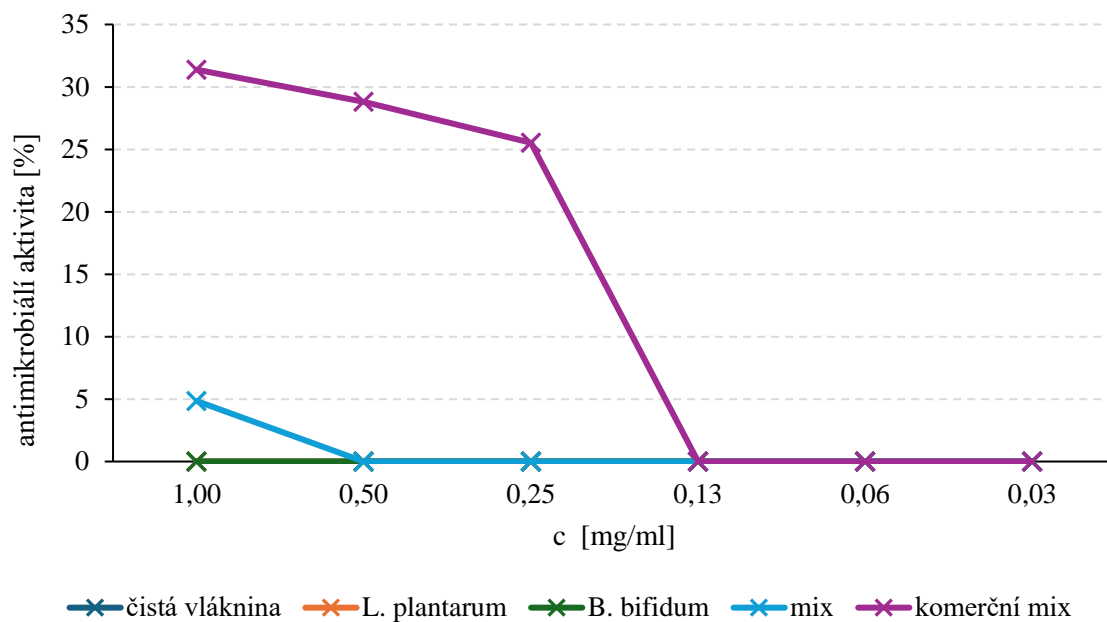
Graf 13: Antimikrobiální aktivita lyofilizátů supernatantů po kultivaci LAB na konopné vláknině proti *Escherichia coli*

Hodnoty antimikrobiální aktivity pro vzorky kultivací bakterií mléčného kvašení na upravené vláknině pomocí *A. sojæ* jsou zobrazeny v Graf 14. Antimikrobiální aktivita byla zjištěna pouze u substrátu upraveném plísní a po kultivaci komerčního mixu. *Aspergillus sojæ* tedy produkuje během růstu určité látky, které působí proti *E. coli* antimikrobiálně a při počáteční koncentraci vzorku bylo dosaženo aktivity 11 %. Antimikrobiální aktivita upravené vlákniny klesla na nulu až v koncentraci 0,06 mg/ml. Kultivací komerčního mixu docházelo k produkci více antimikrobiálních látek, protože počáteční aktivita dosahovala hodnoty 17,3 %. Při koncentraci vzorku 0,25 mg/ml byla antimikrobiální aktivita 12,2 %, s dalším ředěním však prudce klesla na nulu. Při kultivaci kultur *L. plantarum*, *B. bifidum* a jejich mixu nedocházelo k významné produkci antimikrobiálních látek a tyto vzorky nevykazovaly žádnou antimikrobiální aktivitu.

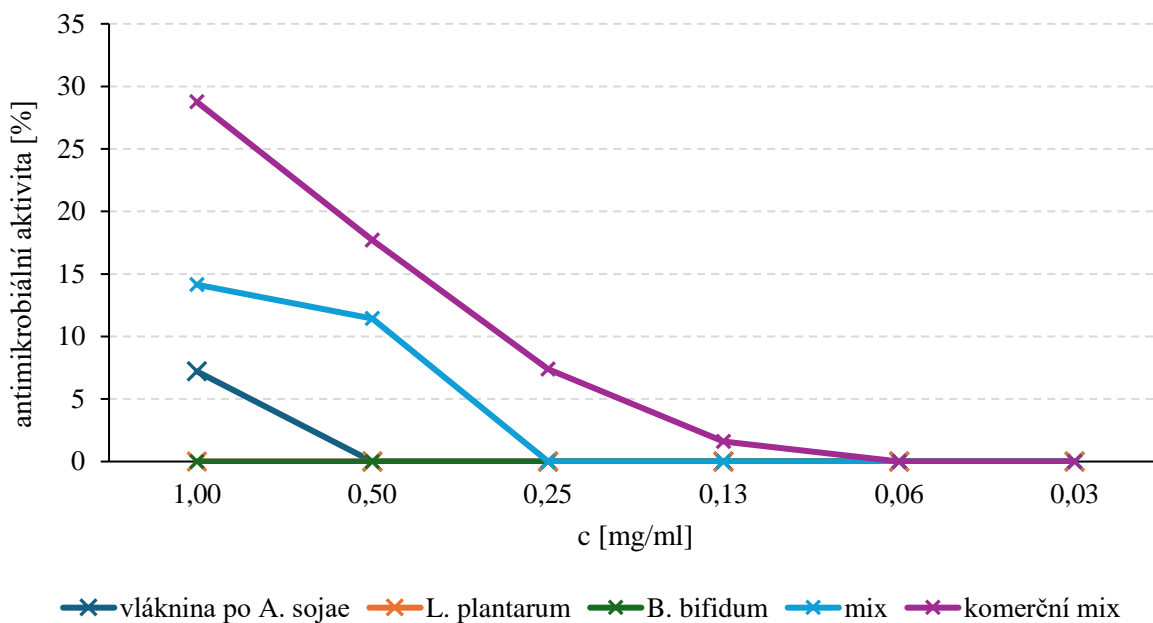


Graf 14: Antimikrobiální aktivita lyofilizátů supernatantů po kultivaci LAB na upravené vláknině pomocí *A. sojæ* proti *Escherichia coli*

Na Graf 15 je uvedena zjištěná antimikrobiální aktivita vzorků po kultivacích na čisté vlákninové frakci proti *Cutibacterium acnes*, Graf 16 zobrazuje vzorky po kultivacích na upravené vláknině pomocí *A. sojæ*. V obou případech dosáhl nejvyšší antimikrobiální aktivity vzorek komerčního mixu. Kultivací komerčního mixu na neupravené vláknině bylo dosaženo v počáteční koncentraci antimikrobiální aktivity 31,4 %. Aktivita mírně klesala se zvyšujícím se ředěním a v koncentraci vzorku 0,13 mg/ml prudce klesla na nulu. V případě upravené vlákniny do stejné koncentrace vzorku aktivita klesala téměř lineárně (z 28,8 % na 1,59 %) a nulové hodnoty dosáhla až při koncentraci 0,06 mg/ml. Na rozdíl od předchozích výsledků je zde možné pozorovat srovnatelný inhibiční efekt extraktu komerčního mixu na přírodním i fermentovaném substrátu, proti *C. acnes* zřejmě fermentovaný extrakt obsahuje další biologicky aktivní látky, které na tuto bakterii působí selektivně a vzorek by mohl mít potenciálně využití v kosmetice proti akné. Vzorek po kultivaci mixu na neupravené vláknině dosahoval antimikrobiální aktivity pouze v počáteční koncentraci lyofilizátů, a to přibližně 5 %. Na upravené vláknině byla jeho antimikrobiální aktivita vyšší a klesla na nulu až při koncentraci 0,25 %. Do tohoto rozdílu mohla přispět určitá antimikrobiální samotné upravené vlákniny pomocí *A. sojæ*, která při koncentraci vzorku 1 mg/ml dosahovala hodnoty 7,2 %. U neupraveného substrátu nebyla antimikrobiální aktivita pozorována. Kultivací kultury *L. plantarum* a *B. bifidum* nebylo ani v jednom případě dosaženo antimikrobiální aktivity proti *Cutibacterium acnes*.



Graf 15: Antimikrobiální aktivita lyofilizátů supernatantů po kultivaci LAB na konopné vláknině proti *Cutibacterium acnes*



Graf 16: Antimikrobiální aktivita lyofilizátů supernatantů po kultivaci LAB na upravené vláknině pomocí *A. sojae* proti *Cutibacterium acnes*

Pro kulturu *Staphylococcus epidermidis* byla pro všechny vzorky stanovena nulová antimikrobiální aktivita. *S. epidermidis* produkuje biofilm, který ho může chránit před exogenními antimikrobiálními látkami, a i když byla prokázána účinnost bakteriocinů proti tomuto kmeni [70], v této práci nebyla přítomnost bakteriocinů sledována. Je tedy možné, že vybrané kmeny neprodukovaly dostatek bakteriocinů účinných proti *S. epidermidis* a v další práci by bylo třeba se zaměřit na přítomnost antimikrobiálních látek v supernatantech, určit, o jaké jde látky a stanovit jejich koncentraci.

5.10. Příprava kosmetických emulzí

Postup přípravy emulzí je popsán v kapitole 4.5. Odlišný vzhled mezi připravenými emulzemi daný odlišným složením základu je možné pozorovat na Obrázek 10. Všechny emulze byly podrobeny odstředivému testu v analytické centrifuzě LUMISizer, dále byla sledována jejich antioxidační aktivita v delším časovém úseku. Emulze byly podrobeny senzoričkému hodnocení dvanácti respondenty, a nakonec byl změřen účinek vybraných emulzí na kůži.



Obrázek 10: Vzhled připravených emulzí (vlevo emulze č.1, uprostřed emulze č. 2, vpravo emulze č.3)

5.10.1. Odstředivý test

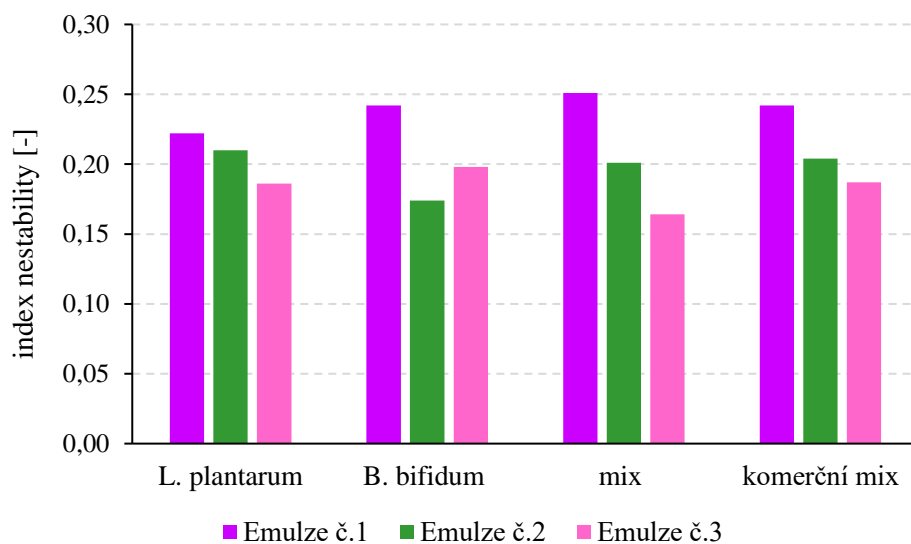
Průběh odstředivého testu na analytické centrifuzě LUMISizer a rovnice pro výpočet teoretické stability jednotlivých emulzí jsou popsány v kapitole 4.5.1. Grafické znázornění získaných indexů nestability je uvedeno na Graf 17. Index nestability se udává od 0 do 1, přičemž hodnoty blízké 0 ukazují na velmi stabilní emulzi, neboť během měření nedochází k sedimentaci nebo koalescenci. Naopak hodnoty blízké 1 jsou výsledkem rychlého a úplného rozvrstvení během měření velmi nestabilní emulze. Index nestability u testovaných emulzí se pohyboval od 0,16 do 0,25. Indexy mají, s výjimkou emulzí s přidavkem supernatantu *B. bifidum*, klesající trend od emulze č.1 k emulzi č.3. Základy emulzí se lišily v obsahu emulgátorů. Emulze č.1 byly stabilizovány jedním emulgátorem (cetearyl alkohol), emulze č.2 obsahovaly dva emulgátory (cetearyl alkohol a stearát sacharózy) a v emulzích č.3 byly přítomny tři emulgátory (cetearyl alkohol, stearát sacharózy a glyceryl stearát citrát). Vyšší obsah emulgátorů měl vliv na výsledný index nestability emulzí.

Emulze č.1 vykazovaly nejvyšší indexy nestability, kdy nejvíce nestabilní byla emulze s přidavkem supernatantu po kultivaci mixu s hodnotou indexu nestability 0,25. Nejnižší index nestability z těchto emulzí byl naměřen u emulze s přidavkem supernatantu po kultivaci *L. plantarum* (0,22). Emulze se supernatanty *B. bifidum* a komerčního mixu měly stejné indexy nestability, a to 0,24.

V rámci emulzí č.2 byl nejnižší index nestability naměřen u emulze s přidavkem supernatantu *B. bifidum* (0,17), zatímco nejvyšší index nestability byl zjištěn u emulze s přidavkem supernatantu *L. plantarum* (0,21).

Emulze č.3 byly celkově nestabilnější, s výjimkou emulze s přidavkem supernatantu *B. bifidum*. Nejnižší index nestability, s hodnotou 0,16, byl zjištěn u emulze s přidavkem supernatantu mixu.

Stearát sacharózy je emulgátor snižující povrchové napětí na rozhraní olej/voda a je možno ho kombinovat i s jinými emulgátory pro vylepšení stability emulzí [71]. V případě emulze č.2 s přidavkem supernatantu *B. bifidum* mohlo dojít k synergickému efektu extracelulárních produktů metabolismu kultury *B. bifidum* s tímto emulgátorem, a proto došlo k porušení trendu poklesu indexu nestability.



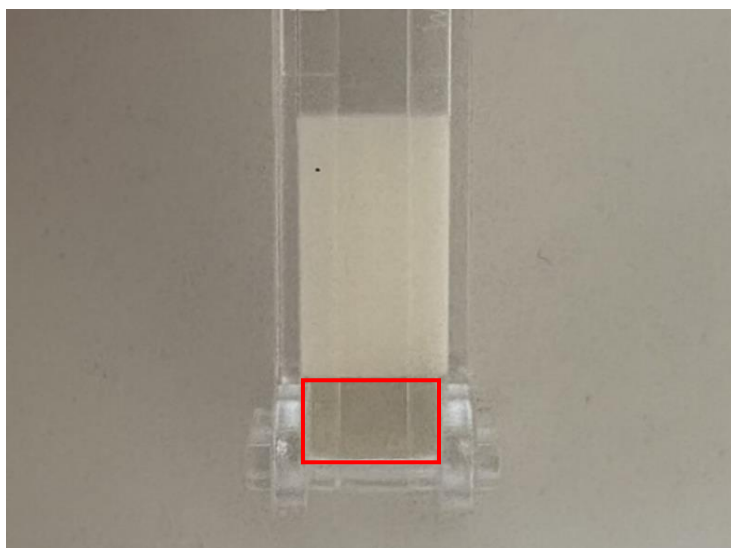
Graf 17: Indexy nestability připravených emulzí

V Tabulka 11 jsou uvedeny vypočítané teoretické stability emulzí. Průměrná stabilita emulzí byla stanovena na 444 dny \pm 2 dny. I přes nejvyšší index nestability má emulze č.1 s přidavkem supernatantu komerčního mixu po přepočtu nejvyšší teoretickou stabilitu (447 dní).

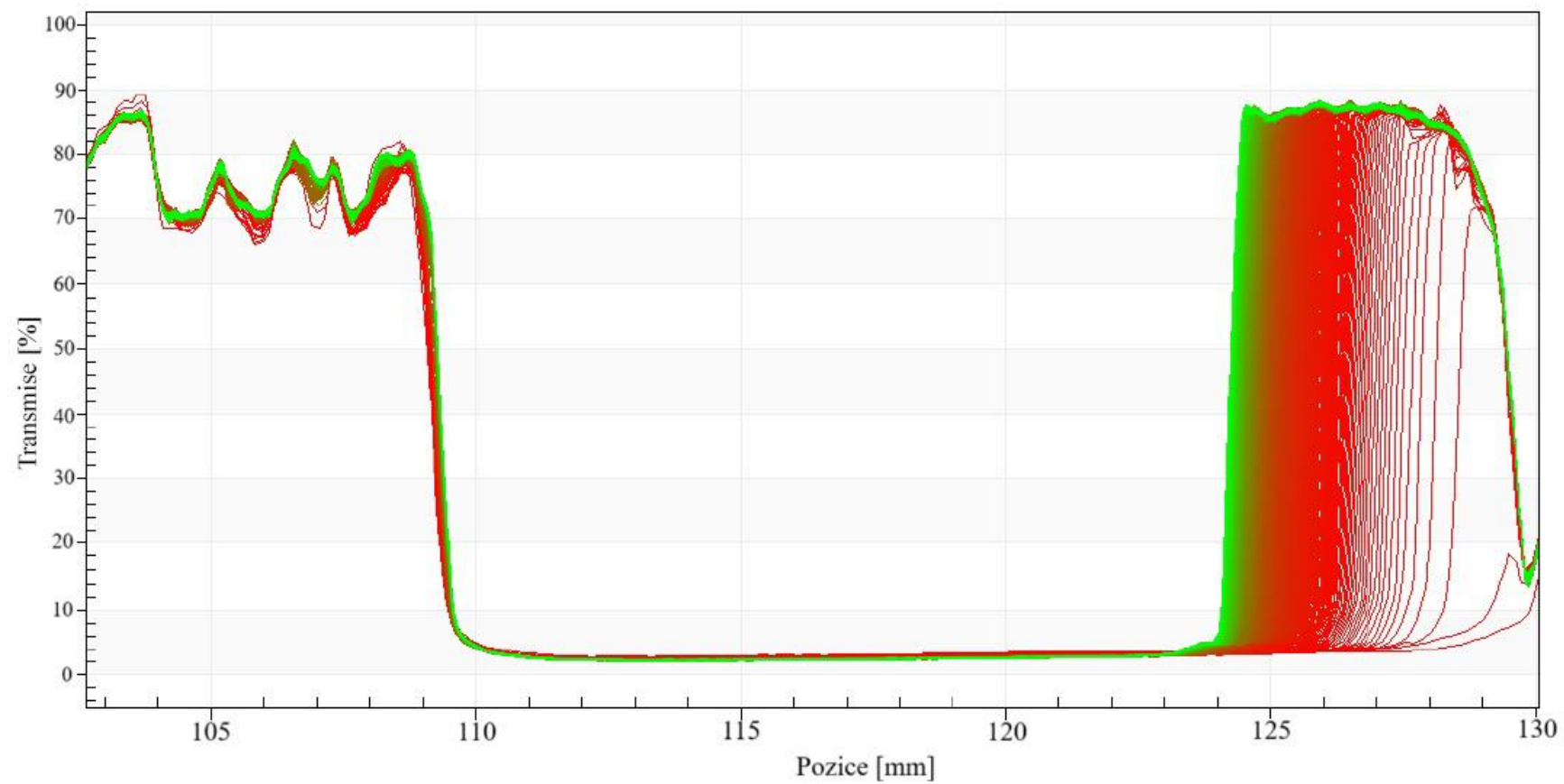
Tabulka 11: Vypočtené teoretické stability emulzí

Supernatant	Emulze č.	Teoretická stabilita [dny]
<i>L. plantarum</i>	1	442
	2	445
	3	445
<i>B. bifidum</i>	1	443
	2	441
	3	446
Mix	1	446
	2	444
	3	446
Komerční mix	1	447
	2	443
	3	443

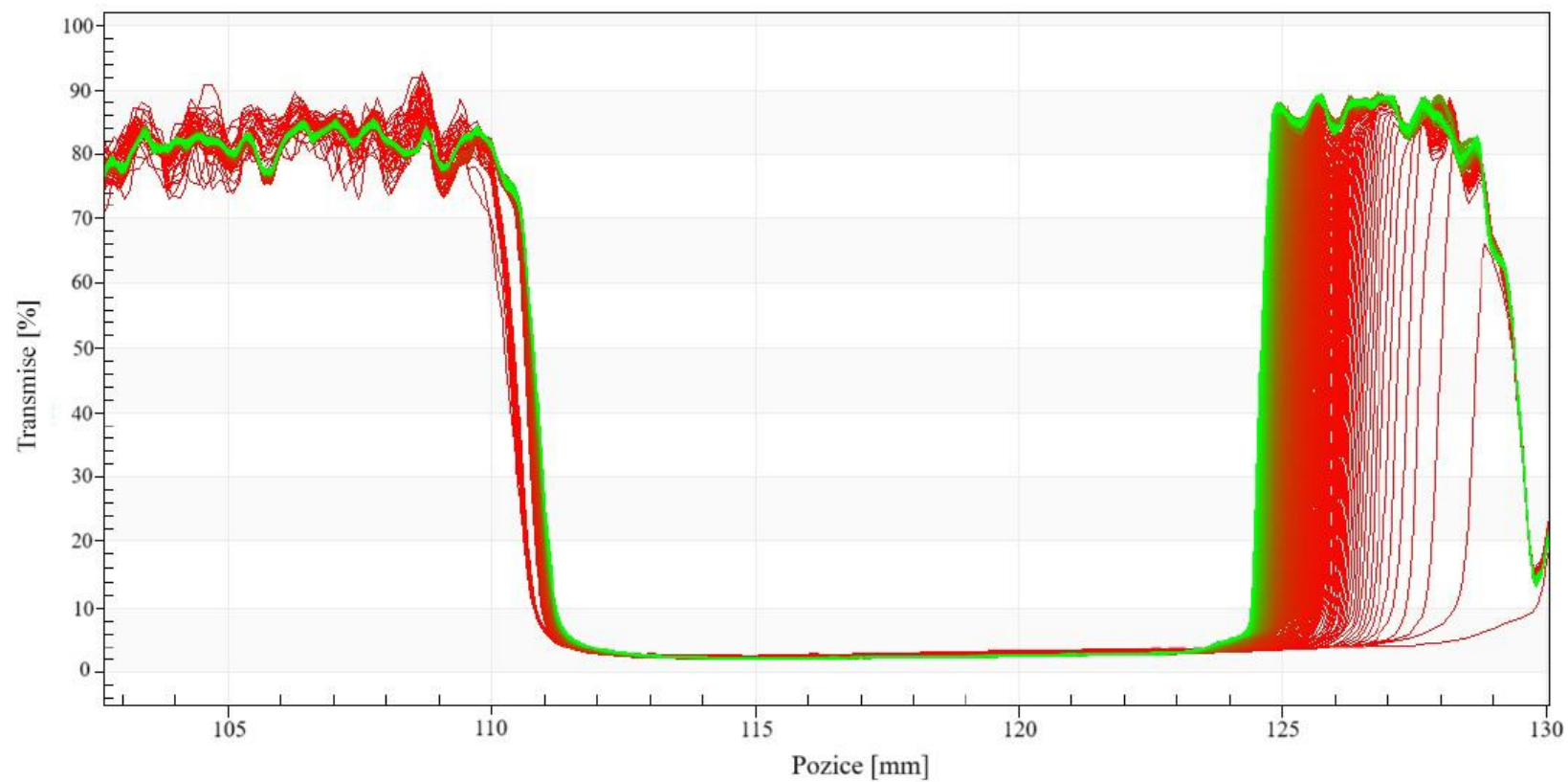
System analytické centrifugy kromě indexů nestability vyhodnotil i závislost transmise na poloze v kyvetě. Jako poloha je v tomto případě označována vzdálenost od osy otáčení. Maximální hodnota polohy v grafu, 130 mm, odpovídá dnu kyvety. Na Graf 18 je zobrazena závislost transmise na poloze vzorku emulze č.1 s přidavkem supernatantu *L. plantarum*. Graf 19 byl hodnocen v rámci měření emulze č.1 s přidavkem supernatantu mixu. Zelená barva v grafu odpovídá transmisi naměřené jako poslední, zatímco transmise naměřená před ní je zaznamenávána barvou červenou. Posunutí přechodu mezi oddělenou vodnou fází v kyvetě, jak je vidět na Obrázek 11, můžeme v grafech pozorovat v oblasti 124-130 mm. Proces krémování, při kterém dochází ke stoupání rozptýlených částic nebo kapek na hladinu, je možné v grafech pozorovat jako rozptyl křivek v levé části do pozice 110 mm a 111 mm.



Obrázek 11: Kyveta s emulzí po ukončení odstředivého testu (červeně zvýrazněna oddělená vodná fáze emulze)



*Graf 18: Závislost transmise na pozici v kyvetě pro vzorek emulze č.1 s přidavkem supernatantu *L. plantarum**



Graf 19: Závislost transmise na pozici v kyvetě pro vzorek emulze č.1 s přidavkem supernatantu mixu

5.10.2. Hodnocení antioxidační aktivity

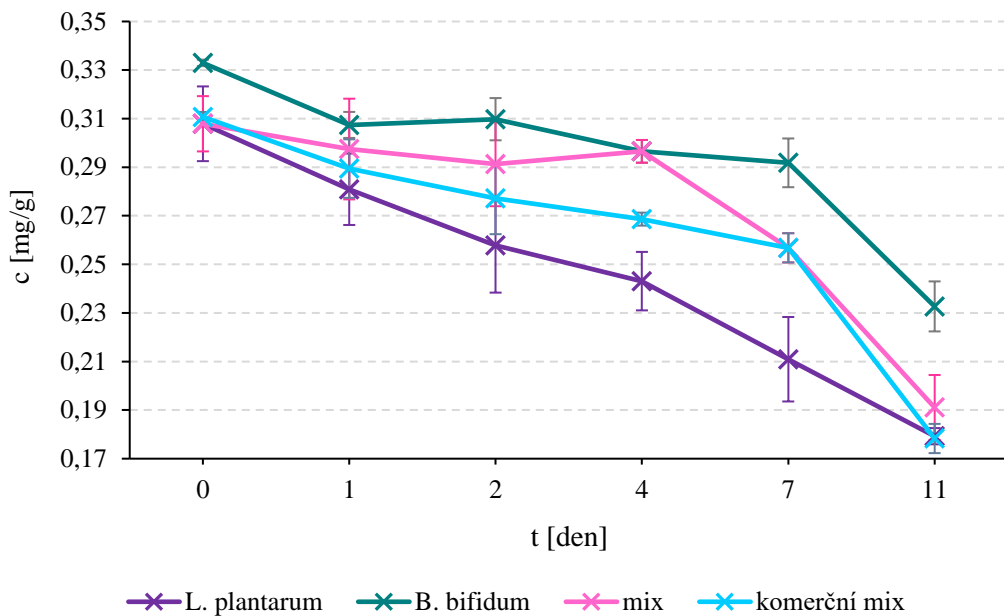
Měření antioxidační aktivity připravených emulzí probíhalo postupem popsáním v kapitole 4.5.2. V níže uvedených grafech jsou zobrazeny závislosti antioxidační aktivity jednotlivých emulzí měřené v časovém úseku 11 dní.

U emulzí č.1 (Graf 20) docházelo k nejstrmějším poklesům antioxidační aktivity v porovnání s dalšími emulzemi. Celkově nejvyšší antioxidační aktivita byla zjištěna u emulze s přídavkem supernatantu *B. bifidum*, kdy počáteční antioxidační aktivita $0,333 \pm 0,001$ mg/g postupně klesala na $0,233 \pm 0,010$ mg/g. U emulzí se supernatantem *B. bifidum* a komerčního mixu byl pozorován prudší pokles antioxidační aktivity mezi 7. a 11. dnem. V případě emulzí se supernatanty *L. plantarum* a mixu docházelo k poklesu již po čtvrtém dni.

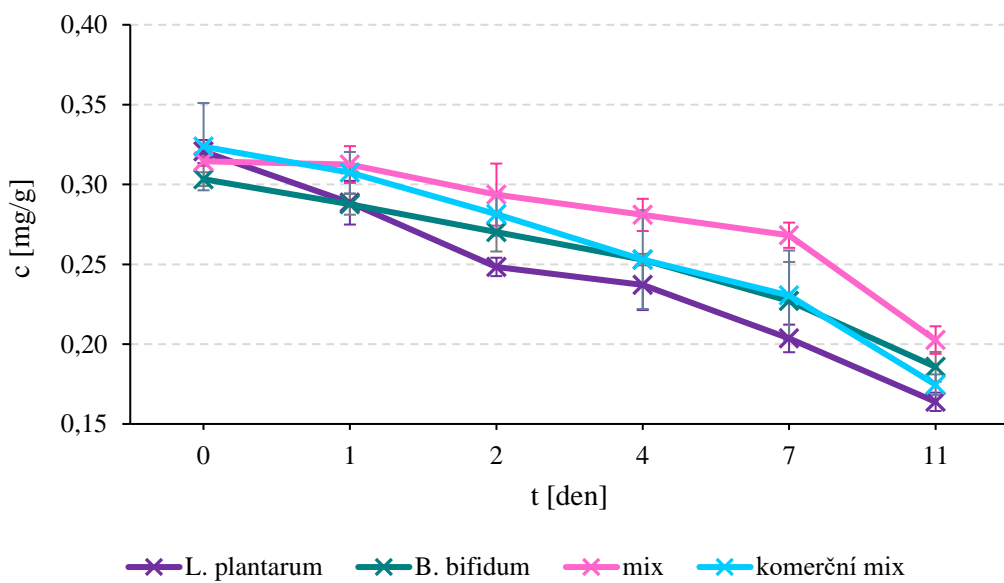
Antioxidační aktivita emulzí č.2 (Graf 21) začíná v užším rozmezí hodnot, $0,303-0,324$ mg/g. Při měření nebyl zaznamenán takový výkyv antioxidační aktivity mezi jednotlivými emulzemi, tak jako v případě emulzí č.1. Nejpomalejší degradaci antioxidační aktivity vykazovala emulze s přídavkem supernatantu komerčního mixu, kde byl sledován výraznější pokles od 7. dne ($0,23 \pm 0,03$ mg/g) do 11. dne ($0,175 \pm 0,006$ mg/ml).

Nejvyšší zůstatek antioxidační aktivity u emulzí č.3 (Graf 22) byl pozorován u emulze s přídavkem supernatantu *B. bifidum*, přičemž na začátku byla antioxidační aktivita $0,326 \pm 0,002$ mg/g a postupně klesala do 7. dne, kdy antioxidační aktivita klesla nejstrměji na hodnotu $0,249 \pm 0,010$ mg/g. Nejvyšší absolutní pokles byl zjištěn u emulze s přídavkem supernatantu *L. plantarum*, kdy rozdíl mezi počáteční ($0,355 \pm 0,006$ mg/g) a konečnou ($0,188 \pm 0,015$ mg/g) hodnotou antioxidační aktivity činil $0,167$ mg/g. V případě emulze s přídavkem supernatantu mixu se s hodnotou $0,070$ mg/g jednalo o nejmenší relativní pokles antioxidační aktivity.

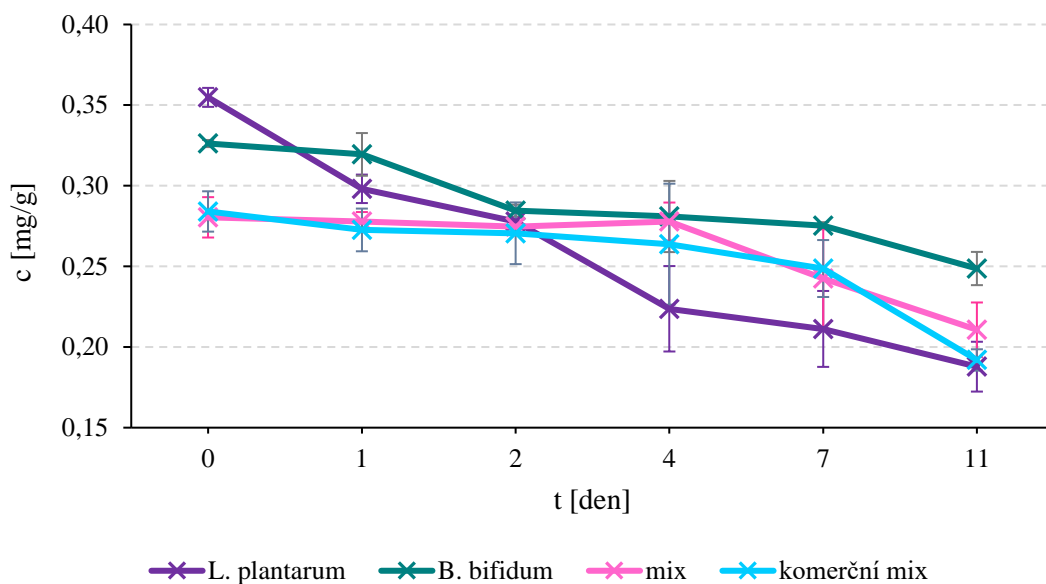
Celkově lze říci, že antioxidační aktivita byla ovlivněna přítomností různého počtu emulgátorů. Zatímco emulze č.1 obsahovaly jen jeden emulgátor a docházelo k nejrychlejší degradaci antioxidačních složek, tak v případě emulzí č.3 se třemi emulgátory byla pozorována nejpomalejší degradace. Pro dlouhodobější udržení antioxidační aktivity je tedy vhodné použít základ se třemi emulgátory, případně přidat do kosmetické formulace pomalu degradovatelné antioxidanty, jako je vitamin E.



Graf 20: Antioxidační aktivita emulzí č.1 v čase



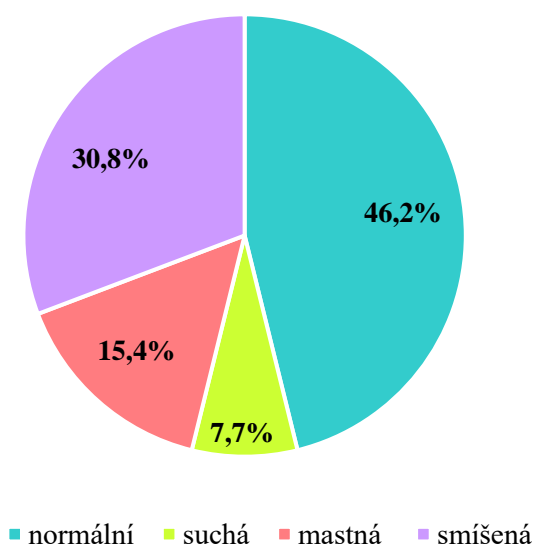
Graf 21: Antioxidační aktivita emulzí č.2 v čase



Graf 22: Antioxidační aktivita emulzí č.3 v čase

5.10.3. Senzorické hodnocení

Vytvořené emulze byly hodnoceny 13 respondenty, z nichž tři byli muži a zbytek ženy. 61,5 % z respondentů patřilo do věkové kategorie 25-30, ve věku 31-40 bylo 23,1 % respondentů a 15,4 % uvedlo věk v rozmezí 41-50 let. Respondenti hodnotili vlastnosti dvanácti připravených emulzí číselnou stupnicí od 1 (nejlepší hodnocení) do 5 (nejhorší hodnocení). Procentuální zastoupení typů pokožky, které byly uvedeny respondenty, je zobrazeno v Graf 23. Emulze č.1 s příslušnými supernatanty byly označeny jako vzorky 1-4, emulze č.2 jako vzorky 5-8 a emulze č.3 jako vzorky 9-12. Sensorická analýza proběhla za účelem vyhodnocení nejlepšího emulzního základu. Přídavek rozdílného supernatantu pro příslušný emulzní základ byl v tomto průzkumu vyhodnocen jako minimální a rozdílné výsledné hodnocení bylo pozorováno pouze v rámci typů emulzních základů.

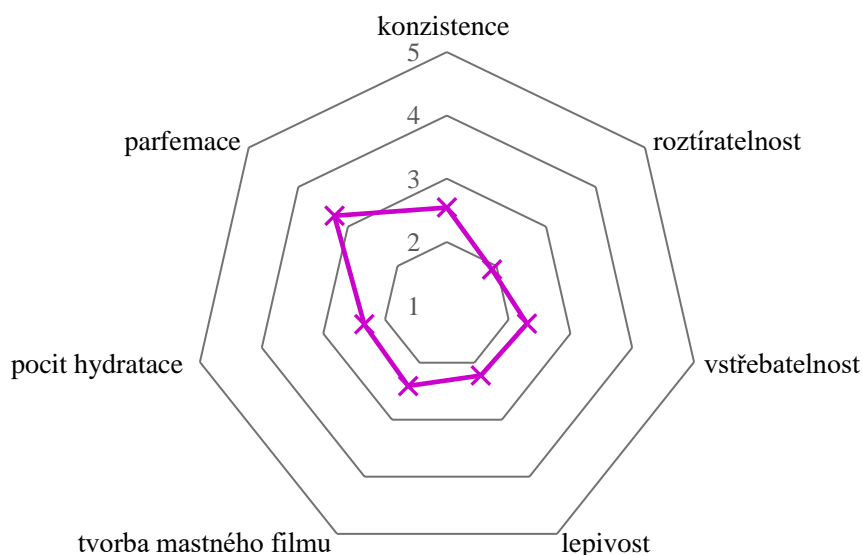


Graf 23: Zastoupení typů pokožky mezi respondenty

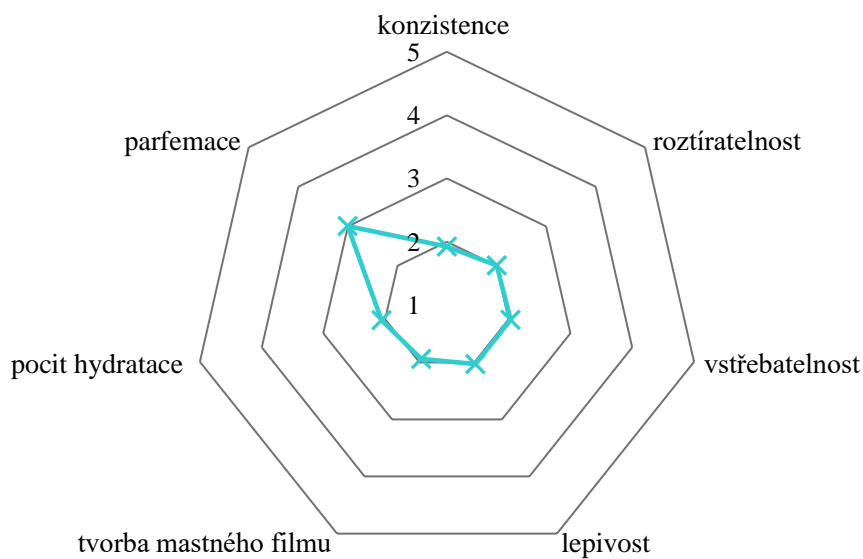
Průměrné hodnocení emulzí č.1 je zobrazeno v Graf 24. Nejlépe hodnocenou vlastností u těchto emulzí byla roztíratelnost, která dosáhla průměrné známky 1,9. Konzistence těchto emulzí byla v porovnání s ostatními dvě typy emulzí hodnocena jako nejhorší s průměrnou známkou 2,5. V otázce požadavku vylepšení či změny byla nejčastěji uváděna parfemace následovaná tvorbou mastného filmu a lepivostí. Do emulzí nebyly přidány žádné vonné látky, a tudíž všemi respondenty u všech testovaných vzorků byl uveden námět na zlepšení parfemace. Tvorba mastného filmu dosáhla průměrného hodnocení 2,4 a lepivost 2,2.

V Graf 25 je uvedeno průměrné hodnocení emulzí č.2, které je viditelně posunuto směrem ke středu grafu, tedy k lepším hodnocením. Až na parfemaci, která měla průměrné hodnocení 3, dosáhly všechny ostatní vlastnosti průměrné známky 1,9 nebo 2.

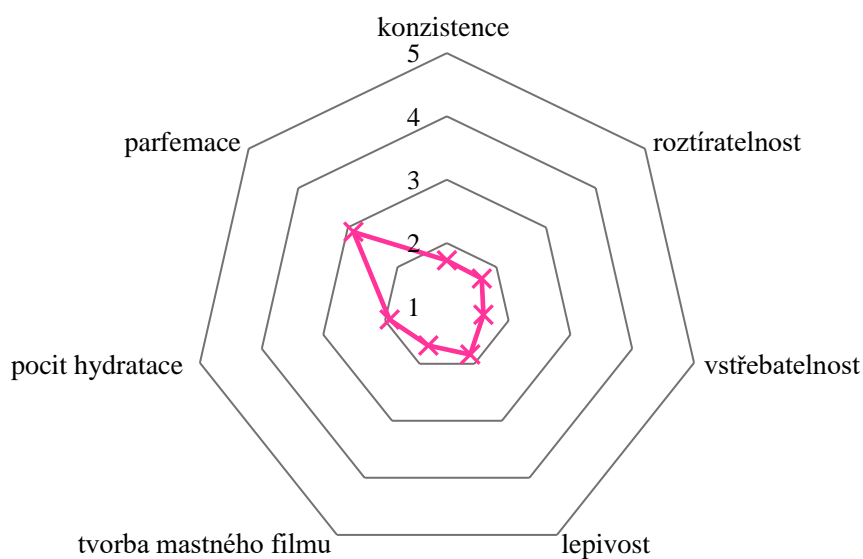
Průměrně nejlépe byly hodnoceny emulze č.3 (Graf 26), u kterých se s výjimkou parfemace pohybovaly známky v rozmezí 1,6-1,9. Právě vstřebatelnost byla ohodnocena průměrnou známkou 1,6, po ní následovala konzistence, tvorba mastného filmu a roztíratelnost se známkou 1,7. Vzhledem k nejlepšímu celkovému hodnocení byly emulze č.3 vybrány pro měření účinku na pokožce pomocí sondy Corneometer a přístroje Visioscope.



Graf 24: Průměrné hodnocení emulzí č.1



Graf 25: Průměrné hodnocení emulzí č.2



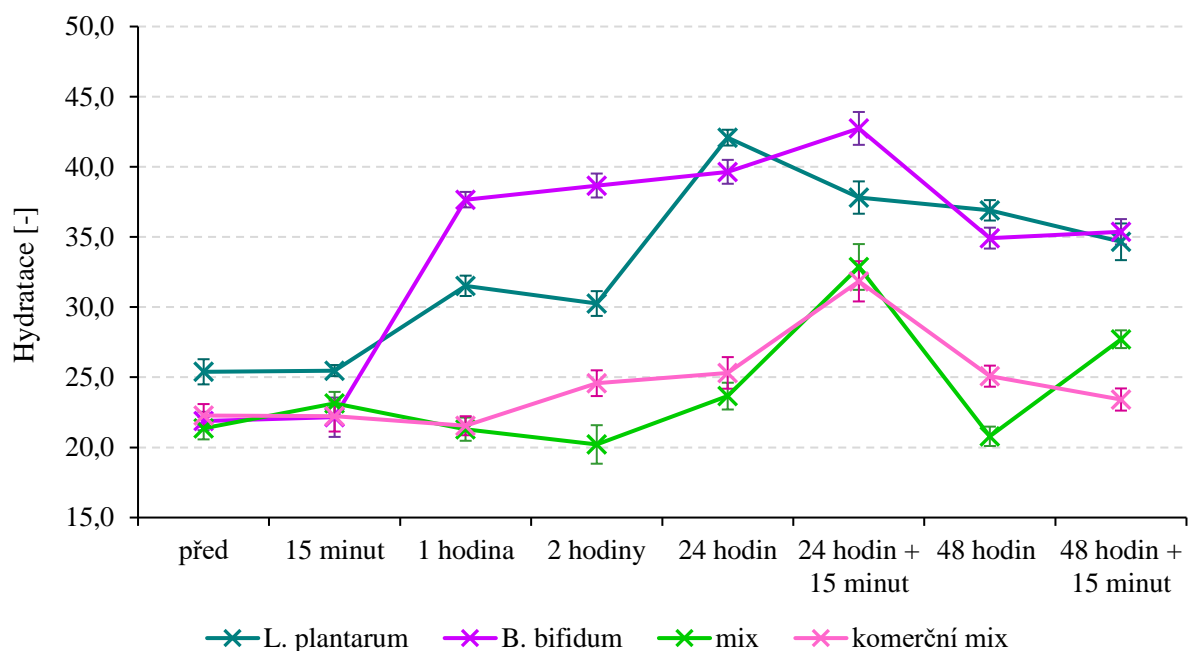
Graf 26: Průměrné hodnocení emulzí č.3

5.10.4. Měření účinku na pokožce

Pro měření účinku emulzí s jednotlivými supernatanty po kultivacích bakterií mléčného kvašení na neupravené vláknině byly vybrány emulze č.3, které byly nejlépe ohodnoceny v senzoričké analýze a také obsahovaly emulgátory (stearát sacharózy a glyceryl stearát citrát), které napomáhají hydratovat pokožku. Pomocí sondy Corneometer byla zjišťována hydratace v čase a její průběh je zobrazen v Graf 27.

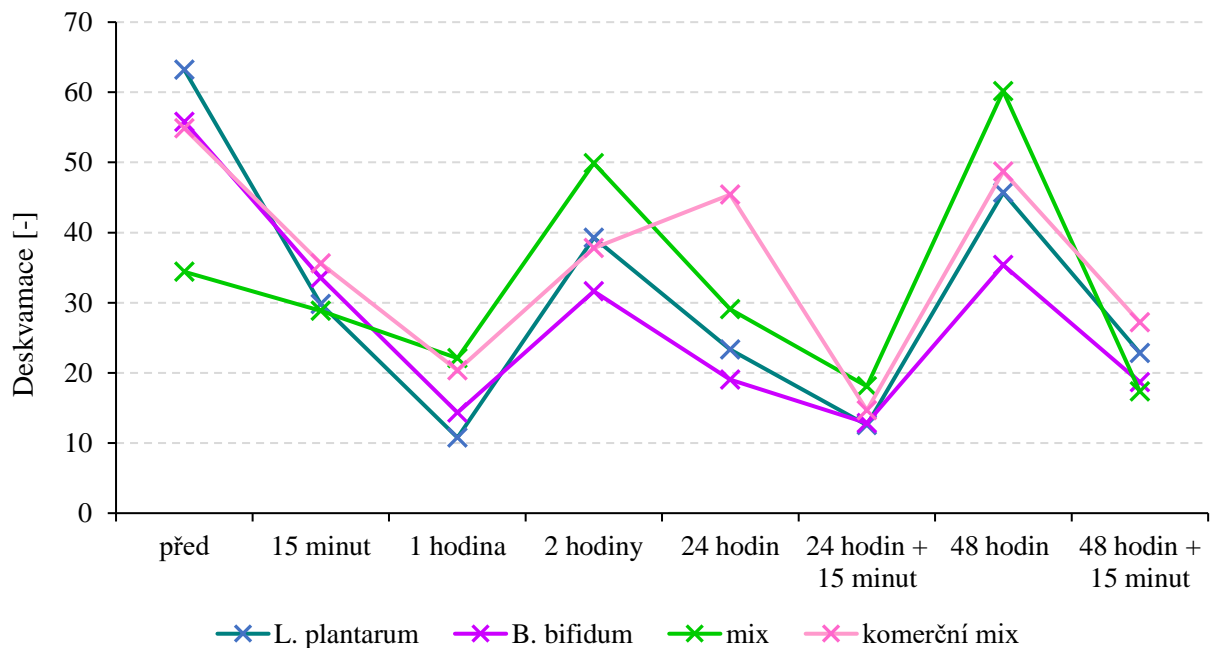
Jako další parametr byla sledována deskvamace pokožky v čase pomocí přístroje Visioscope PC-35, přičemž výsledné hodnoty jsou uvedeny v Graf 28. Průběh měření je popsán v kapitole 4.5.4.

Sondou Corneometer je vyhodnocena hydratace pokožky v relativních jednotkách. Hodnoty pod 30 se interpretují jako „velmi suchá pokožka“, rozmezí mezi 30-40 odpovídá „suché“ pokožce a pro naměřenou hodnotu vyšší než 40 je pokožka označována jako „dostatečně hydratovaná“. Před nanesením emulzí se hydratace pokožky pohybovala mezi $22,3 \pm 0,8$ až $25,4 \pm 0,9$, pokožka tedy byla velmi suchá. Po nanesení všech čtyř emulzí na pokožku nedošlo k výraznému navýšení hydratace. Prudké navýšení hydratace bylo pozorováno po 1 hodině od aplikace emulze s přídavkem supernatantu *B. bifidum*, kdy hodnota hydratace dosáhla $37,7 \pm 0,5$. Emulze s přídavkem supernatantu *L. plantarum* zvýšila po 1 hodině hydrataci na hodnotu $31,5 \pm 0,7$. Po dvou hodinách od nanesení emulzí hydratace u těchto dvou emulzí opět klesla. Při měření po 24 hodinách byla vyhodnocena hydratace pokožky, kde byla nanesena emulze *L. plantarum* (hodnota $42,1 \pm 0,6$) a emulze *B. bifidum* (hodnota $39,6 \pm 0,9$) jako dostatečně hydratovaná. Po opětovném nanesení emulzí vzrostla hodnota hydratace pouze u emulze *B. bifidum*, naopak u emulze *L. plantarum* hydratace klesla. Po 48 hodinách od prvotní aplikace emulzí došlo k poklesu hydratace výrazně pouze u emulze *B. bifidum* z hodnoty $42,7 \pm 1,2$ na hodnotu $34,9 \pm 0,7$. V případě emulze *L. plantarum* hydratace klesla minimálně, a to z hodnoty $37,8 \pm 1,2$ na hodnotu $36,9 \pm 0,7$. Po další aplikaci těchto emulzí bylo pozorováno výrazné zvýšení hydratace. Emulze s přídavkem supernatantů mixu a komerčního mixu vykazovaly zvýšenou hydrataci pokožky až jejich opětovné aplikaci po 24 hodinách a celkově jejich hydratační účinek byl nižší než u emulzí s přídavkem supernatantů *L. plantarum* a *B. bifidum*.



Graf 27: Hydratace pokožky v čase

Termín deskvamace označuje odlupování odumřelých kožních buněk (korneocytů) z povrchové vrstvy kůže. Vyšší deskvamace znamená obvykle sušší, šupinatější pokožku se slabší bariérou, a naopak nízká deskvamace svědčí o více hydratované pokožce. Před aplikací emulzí vykazovala pokožka vysokou deskvamaci, a po aplikaci se hodnota deskvamace snižovala až do první hodiny od nanesení. Nejnižší deskvamace bylo dosaženo v místě aplikace emulze *L. plantarum* (10,77), následované emulzí *B. bifidum* (14,33). Po dvou hodinách od aplikace deskvamace opět vzrostla. Vyšší hodnota deskvamace v porovnání s počáteční hodnotou před aplikací emulzí byla zjištěna pouze u emulze mixu, kdy na začátku byla deskvamace stanovena na 34,4 a po dvou hodinách na 49,9. Ostatní emulze nepřekročily hodnotu počáteční deskvamace. Po 24 hodinách od nanesení emulze deskvamace klesla, s výjimkou emulze komerčního mixu, která z hodnoty 37,8 vzrostla na hodnotu 45,4. Opětovnou aplikací krému došlo ke snížení deskvamace u všech emulzí na hodnoty v rozmezí 12,84-18,1. Po 48 hodinách od prvotní aplikace emulzí došlo k výraznému zvýšení deskvamace, u emulze s přídavkem komerčního mixu hodnota opět přesáhla původní deskvamaci. Dalším nanesením emulzí se deskvamace snížila.



Graf 28: Deskvamace pokožky v čase

Pro jednorázový a okamžitý efekt v rozmezí jedné hodiny byla vyhodnocena jako nejlepší emulze s přídavkem *L. plantarum*. Avšak pro udržení nižší deskvamace mezi aplikacemi vykazovala výhodnější výsledky emulze s přídavkem supernatantu *B. bifidum*. U emulzí mixu a komerčního mixu by bylo vyžadováno častější opakování nanášení pro stabilnější výsledek.

Oba typy měření jsou ovlivněny typem pokožky, celkovou hydratací organismu a dalšími faktory, a pro lepší interpretaci hydratačních účinků emulzí by bylo třeba je opakovat v delším časovém intervalu i pro více typů pokožky.

6. ZÁVĚR

V rámci diplomové práce bylo prokázáno, že vlákninová frakce konopného koláče může být perspektivní surovinou pro výrobu kosmetických přípravků obohacených o metabolity bakterií mléčného kvašení. Pro fermentační proces byly využity kultury *Lactiplantibacillus plantarum*, *Bifidobacter bifidum*, jejich kombinace v poměru 1:1 a komerčně dostupný mix bakterií mléčného kvašení.

Byla testována enzymatická předúprava konopné vlákniny pomocí plísně *Aspergillus sojae* pro následnou kultivaci vybraných kmenů bakterií mléčného kvašení. Při enzymatické předúpravě došlo ke zvýšení dostupnosti fenolických látek, flavonoidů a redukujících sacharidů, které následně bakterie mléčného kvašení využily pro svou metabolickou aktivitu. Spektrofotometrickými stanoveními byl sledován nárůst koncentrace fenolických látek, flavonoidů, antioxidační aktivity a redukujících cukrů po kultivaci *A. sojae*. Následnou kultivací kmenů LAB došlo k významnému poklesu sledovaných koncentrací, zřejmě v důsledku utilizace pomocí bakterií mléčného kvašení, případně snížením stability způsobené metabolity LAB.

V extraktech po kultivacích kmenů bakterií mléčného kvašení na upravené i neupravené vláknině byla stanovena koncentrace kyseliny mléčné. Pro referenci byly vybrané kmeny kultivovány v MRS médiu, které pro bakterie mléčného kvašení představuje ideální prostředí. V porovnání s produkcí kyseliny mléčné v MRS médiu dosáhla její produkce na čistém vlákninovém substrátu přibližně 12 % a na upravené vláknině 12,4 %. Dále byla zjišťována přítomnost kanabinoidů v jednotlivých extraktech, přičemž bylo stanoveno malé množství CBD a CBG v upravené i neupravené konopné vláknině. Přítomnost CBD byla prokázána i po kultivaci *L. plantarum* na neupravené vláknině a mixu na předupraveném substrátu.

Pro extrakty z kultivací na neupravené vlákninové frakci byly navrženy tři typy kosmetických emulzí lišících se v obsahu emulgátorů. Stabilitní testy na analytické centrifuze LUMISizer potvrdily, že nejvíce stabilní emulze byla s přidavkem tří emulgátorů (cetearyl alkohol, stearát sacharózy a glyceryl stearát citrát). Na základě senzorické analýzy provedené 13 respondenty byly emulze s obsahem tří emulgátorů testovány pro jejich účinek na pokožce pomocí sondy Corneometer měřící hydrataci pokožky a přístroje Vioscope PC-13, který sledoval deskvamaci pokožky. Z výsledků bylo možné určit, že pravidelné opakování aplikace emulze je efektivní ke stabilnějšímu udržení hydratace a integrity kožní bariéry.

Extrakty byly také testovány pro jejich antimikrobiální aktivitu vůči *Staphylococcus epidermidis*, *Cutibacterium acnes*, *Escherichia coli* a *Candida glabrata*. Disková difuzní metoda byla použita pouze jako orientační parametr, z důvodu výskytu malých inhibičních zón. Pro kvasinku *Candida glabrata* vykazoval největší antimikrobiální účinek extrakt po kultivaci *B. bifidum* na neupravené vláknině. Proti grampozitivní bakterii *S. epidermidis* nebyl stanoven žádný antimikrobiální účinek. Pro *C. acnes* byl stanoven antimikrobiální účinek pro extrakt kultivace komerčního mixu a mixu pro upravenou i neupravenou vlákninu. Na tuto bakterii vykazoval malý antimikrobiální účinek i samotný extrakt upravené vlákniny pomocí *A. sojae*. Za nejperspektivnější lze tedy považovat potenciální využití připravených extraktů v kosmetice proti akné.

Tato pilotní studie poukazuje na atraktivní možnost spojit udržitelnou valorizaci zemědělských odpadů s biotechnologickými postupy pro vytvoření funkčních kosmetických produktů. Pro budoucí práci je doporučováno navázat detailní analýzou produkovaných bakteriocinů i metabolitů přítomných po kultivaci *A. sojae*.

7. LITERATURA

- [1] CHANDRA, Suman; LATA, Hemant a ELSOHLI, Mahmoud A. (ed.). *Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology*. Online. Cham: Springer International Publishing, 2017. ISBN 978-3-319-54563-9. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6>.
- [2] KACZOROVÁ, D.; BÉRES, T.; ČAVAR ZELJKOVIĆ, S.; BJELKOVÁ, M.; KUCHAR, M. et al. O konopí bez předsudků. *Chemické listy*. 2020, roč. 114, č. 4, s. 277-284. Dostupné také z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/3586>.
- [3] XU, Jiabin; BAI, Miao; SONG, Hong; YANG, Lina; ZHU, Danshi et al. Hemp (*Cannabis sativa* subsp. *sativa*) Chemical Composition and the Application of Hempseeds in Food Formulations. Online. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2022, roč. 77, č. 4, s. 504-513. ISSN 0921-9668. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11130-022-01013-x>.
- [4] BURTON, Rachel A., Mike ANDRES, Martin COLE, James M. COWLEY a Mary Ann AUGUSTIN. *Industrial hemp seed: from the field to value-added food ingredients*. Dostupné z: doi:10.1186/s42238-022-00156-7
- [5] POJIĆ, Milica; MIŠAN, Aleksandra; SAKAČ, Marijana; DAPČEVIĆ HADNAĐEV, Tamara; ŠARIĆ, Bojana et al. Characterization of Byproducts Originating from Hemp Oil Processing. Online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014, roč. 62, č. 51, s. 12436-12442. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jf5044426>.
- [6] FIKE, John. Industrial Hemp: Renewed Opportunities for an Ancient Crop. Online. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2016, roč. 35, č. 5-6, s. 406-424. ISSN 0735-2689. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/07352689.2016.1257842>.
- [7] GURUPRASAD, Lalitha. Protein Structure. *Resonance*. 2019, 24(3), 327-338. ISSN 0971-8044. Dostupné z: doi:10.1007/s12045-019-0783-7
- [8] GIVONETTI, Annalisa, Chiara CATTANEO a Maria CAVALETTO. What You Extract Is What You Get: Different Methods of Protein Extraction from Hemp Seeds. *Separations*. 2021, 8(12). ISSN 2297-8739. Dostupné z: doi:10.3390/separations8120231
- [9] JAIN, Abha. Seed Storage Protein, Functional Diversity and Association with Allergy. Online. *Allergies*. 2023, roč. 3, č. 1, s. 25-38. ISSN 2313-5786. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/allergies3010003>.
- [10] SANTOS-SÁNCHEZ, Guillermo, Ana Isabel ÁLVAREZ-LÓPEZ, Eduardo PONCE-ESPAÑA, Antonio CARRILLO-VICO, Carlotta BOLLATI, Martina BARTOLOMEI, Carmen LAMMI a Ivan CRUZ-CHAMORRO. *Hempseed (Cannabis sativa) protein hydrolysates: A valuable source of bioactive peptides with pleiotropic health-promoting effects*. 2022, 127, 303-318. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2022.06.005
- [11] MALOMO, Sunday A., Rotimi E. ALUKO, Juha-Matti PIHLAVA, Jarkko HELLSTRÖM, Pirjo MATTILA, Merja EUROLA a Anne PIHLANTO. Conversion of a low protein hemp seed meal into a functional protein concentrate through enzymatic digestion of fibre coupled with membrane ultrafiltration. *Food Chemistry*. 2015, 31, 151-159. ISSN 14668564. Dostupné z: doi:10.1016/j.ifset.2015.08.004

- [12]ASHAOLU, Tolulope Joshua, Thanh-Do LE, Itthanan SUTTIKHANA, Opeyemi Joshua OLATUNJI a Mohamed A. FARAG. Hemp bioactive peptides: Nutrition, functional properties and action mechanisms to maximize their nutraceutical applications and future prospects. *Food Chemistry*. 2023, **414**. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2023.135691
- [13]MALOMO, Sunday A. a Rotimi E. ALUKO. A comparative study of the structural and functional properties of isolated hemp seed (*Cannabis sativa* L.) albumin and globulin fractions. *Food Hydrocolloids*. 2015, **43**, 743-752. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2014.08.001
- [14]JULAKANTI, Sharath; CHARLES, Anto Pradeep Raja; SYED, Rabia; BULLOCK, Fitzroy a WU, Ying. Hempseed polysaccharide (*Cannabis sativa* L.): Physicochemical characterization and comparison with flaxseed polysaccharide. Online. *Food Hydrocolloids*. 2023, roč. 143. ISSN 0268005X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108900>.
- [15]SIMOPOULOS, Artemis P. The omega-6/omega-3 fatty acid ratio: health implications. Online. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*. 2010, roč. 17, č. 5, s. 267-275. ISSN 1258-8210. Dostupné z: <https://doi.org/10.1051/ocl.2010.0325>.
- [16]TĂNASE APETROAEI, Virginia; PRICOP, Eugenia Mihaela; ISTRATI, Daniela Ionela a VIZIREANU, Camelia. Hemp Seeds (*Cannabis sativa* L.) as a Valuable Source of Natural Ingredients for Functional Foods—A Review. Online. *Molecules*. 2024, roč. 29, č. 9. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules29092097>.
- [17]BÖTTGER, Angelika; VOTHKNECHT, Ute; BOLLE, Cordelia; WOLF, Alexander; BÖTTGER, Angelika et al. Terpenes and Terpenoids. Online. In: *Lessons on Caffeine, Cannabis & Co*. Learning Materials in Biosciences. Cham: Springer International Publishing, 2018, s. 153-170. ISBN 978-3-319-99545-8. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-319-99546-5_10.
- [18]GALLILY, Ruth, Zhannah YEKHTIN a Lumír Ondřej HANUŠ. The Anti-Inflammatory Properties of Terpenoids from Cannabis. *Cannabis and Cannabinoid Research*. 2018, **3**(1), 282-290. ISSN 2378-8763. Dostupné z: doi:10.1089/can.2018.0014
- [19]CRINI, Grégorio; LICHTFOUSE, Eric; CHANET, Gilles a MORIN-CRINI, Nadia. Applications of hemp in textiles, paper industry, insulation and building materials, horticulture, animal nutrition, food and beverages, nutraceuticals, cosmetics and hygiene, medicine, agrochemistry, energy production and environment: a review. Online. *Environmental Chemistry Letters*. 2020, roč. 18, č. 5, s. 1451-1476. ISSN 1610-3653. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01029-2>.
- [20]SALMINEN, Seppo, WRIGHT, Atte von a OUWEHAND, Arthur C. (ed.). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3. vyd. Food science and technology. A series of monographs, textbooks, and reference books. New York: Marcel Dekker, 2004. ISBN 0-8247-5332-1.
- [21]HOLZAPFEL, Wilhelm H. a WOOD, Brian J.B. (ed.). *Lactic Acid Bacteria*. Online. Wiley, 2014. ISBN 9781444333831. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9781118655252>.

- [22]STOYANOVA, L. G.; USTYUGOVA, E. A. a NETRUSOV, A. I. Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: Their diversity and properties. Online. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2012, roč. 48, č. 3, s. 229-243. ISSN 0003-6838. Dostupné z: <https://doi.org/10.1134/S0003683812030143>.
- [23]RAMAN, Jegadeesh; KIM, Jeong-Seon; CHOI, Kyeong Rok; EUN, Hyunmin; YANG, Dongsoo et al. Application of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Sustainable Agriculture: Advantages and Limitations. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, roč. 23, č. 14. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms23147784>.
- [24]BROBERG, Anders; JACOBSSON, Karin; STRÖM, Katrin a SCHNÜRER, Johan. Metabolite Profiles of Lactic Acid Bacteria in Grass Silage. Online. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, roč. 73, č. 17, s. 5547-5552. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/AEM.02939-06>.
- [25]IZAWA, Naoki a SONE, Toshiro. Cosmetic Ingredients Fermented by Lactic Acid Bacteria. Online. In: ANAZAWA, Hideharu a SHIMIZU, Sakayu (ed.). *Microbial Production*. Tokyo: Springer Japan, 2014, s. 233-242. ISBN 978-4-431-54606-1. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-4-431-54607-8_20.
- [26]FOWLER, Joseph. Understanding the role of natural moisturizing factor in skin hydration. *Pract Dermatol*, 2012, 9: 36-40.
- [27]JEONG, Ji Hye; LEE, Chang Y. a CHUNG, Dae Kyun. Probiotic Lactic Acid Bacteria and Skin Health. Online. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2015, roč. 56, č. 14, s. 2331-2337. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.834874>.
- [28]ABD ALSAHEB, Ramzi A., et al. Lactic acid applications in pharmaceutical and cosmeceutical industries. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2015, 7.10: 729-735
- [29]ABDEL-AZEEM, Ahmed; ABU-ELSAOUD, Abdelghafar; DARWISH, Amira; BALBOOL, Bassem; ABO NOUH, Fatma et al. The Egyptian Ascomycota 1: Genus *Aspergillus*. Online. *Microbial Biosystems*. 2020, roč. 5, č. 1, s. 61-99. ISSN 2357-0334. Dostupné z: <https://doi.org/10.21608/mb.2020.100044>.
- [30]KRIJGSHELD, P.; BLEICHRODT, R.; VAN VELUW, G.J.; WANG, F.; MÜLLER, W.H. et al. Development in *Aspergillus*: Genus *Aspergillus*. Online. *Studies in Mycology*. 2013, roč. 74, č. 1, s. 1-29. ISSN 01660616. Dostupné z: <https://doi.org/10.3114/sim0006>
- [31]RODRIGUES, A.G. Secondary Metabolism and Antimicrobial Metabolites of *Aspergillus*. Online. In: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, 2016, s. 81-93. ISBN 9780444635051. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63505-1.00006-3>.
- [32]LU, Fei; PING, Kangkang; WEN, Ling; ZHAO, Wei; WANG, Zejian et al. Enhancing gluconic acid production by controlling the morphology of *Aspergillus niger* in submerged fermentation. Online. *Process Biochemistry*. 2015, roč. 50, č. 9, s. 1342-1348. ISSN 13595113. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.04.010>.

- [33]SINGH, O.; SHARMA, A. a SINGH, R. Optimisation of fermentation conditions for gluconic acid production by a mutant of *Aspergillus niger*. Online. *Indian journal of experimental biology*. 2001, roč. 39, č. 11, s. 1136-43. Dostupné z: <https://www.semanticscholar.org/paper/Optimisation-of-fermentation-conditions-for-acid-by-Singh-Sharma/a87289b48cb4a3fd5df8b8e8ceff3de409d7e1cb>.
- [34]DE VRIES, Ronald P.; BENOIT GELBER, Isabelle a ANDERSEN, Mikael Rørdam (ed.). *Aspergillus and Penicillium in the Post-genomic Era*. Online. Caister Academic Press, 2016. ISBN 9781910190395. Dostupné z: <https://doi.org/10.21775/9781910190395>.
- [35]NAVEED, Muhammad; NADEEM, Fareeha; MEHMOOD, Tahir; BILAL, Muhammad; ANWAR, Zahid et al. Protease—A Versatile and Ecofriendly Biocatalyst with Multi-Industrial Applications: An Updated Review. Online. *Catalysis Letters*. 2020, roč. 151, č. 2, s. 307-323. ISBN 978-981-15-2062-4. ISSN 1011-372X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10562-020-03316-7>.
- [36]BHARDWAJ, Nisha; KUMAR, Bikash; AGRAWAL, Komal; VERMA, Pradeep; ANWAR, Zahid et al. Current perspective on production and applications of microbial cellulases: a review. Online. *Bioresources and Bioprocessing*. 2012, roč. 8, č. 1, s. 307-323. ISBN 978-953-307-916-5. ISSN 2197-4365. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00447-6>.
- [37]BEHERA, Bikash Chandra. Citric acid from *Aspergillus niger*: a comprehensive overview. Online. *Critical Reviews in Microbiology*. 2020, roč. 46, č. 6, s. 727-749. ISSN 1040-841X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1828815>.
- [38]OKABE, Mitsuyasu; LIES, Dwiarti; KANAMASA, Shin; PARK, Enoch Y.; CONVERTI, Attilio et al. Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*. Online. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, roč. 84, č. 4, s. 597-606. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <https://doi.org/10.19026/crjbs.7.5205>.
- [39]KIM, Kyung Min; LIM, Jaeho; LEE, Jae Jung; HURH, Byung-Serk a LEE, Inhyung. Characterization of *Aspergillus sojae* Isolated from Meju, Korean Traditional Fermented Soybean Brick. Online. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2017, roč. 27, č. 2, s. 251-261. ISSN 1017-7825. Dostupné z: <https://doi.org/10.4014/jmb.1610.10013>.
- [40]BAL, Jyotiranjana; YUN, Suk-Hyun; SONG, Ha-Yeon; YEO, Soo-Hwan; KIM, Jae Hyun et al. Mycoflora dynamics analysis of Korean traditional wheat-based nuruk. Online. *Journal of Microbiology*. 2014, roč. 52, č. 12, s. 1025-1029. ISSN 1225-8873. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4620-0>.
- [41]JUNG, Ji Young; LEE, Se Hee a JEON, Che Ok. Microbial community dynamics during fermentation of doenjang-meju, traditional Korean fermented soybean. Online. *International Journal of Food Microbiology*. 2014, roč. 185, s. 112-120. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.003>.

- [42]HONG, Seung-Beom; LEE, Mina; KIM, Dae-Ho; VARGA, Janos; FRISVAD, Jens C. et al. ASPERGILLUS LUCHUENSIS, AN INDUSTRIALLY IMPORTANT BLACK ASPERGILLUS IN EAST ASIA. Online. *PLoS ONE*. 2013, roč. 8, č. 5. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063769>.
- [43]ZHANG, Xiyang; JIAO, Rui; LI, Hui; OU, Dexin; ZHANG, Danfeng et al. Probiotic Potential, Antibacterial, and Antioxidant Capacity of *Aspergillus luchuensis* YZ-1 Isolated From Liubao Tea. Online. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2024, roč. 16, č. 5, s. 1528-1540. ISSN 1867-1306. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10126-x>.

- [44]DABA, Ghoson M.; MOSTAFA, Faten A. a ELKHATEEB, Waill A. The ancient koji mold (*Aspergillus oryzae*) as a modern biotechnological tool. Online. *Bioresources and Bioprocessing*. 2021, roč. 8, č. 1, s. 574-584. ISSN 2197-4365. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00408-z>
- [45]CHANG, Perng-Kuang; MATSUSHIMA, Kenichiro; TAKAHASHI, Tadashi; YU, Jiujiang; ABE, Keietsu et al. Understanding nonaflatoxigenicity of *Aspergillus sojae*: a windfall of aflatoxin biosynthesis research. Online. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007, roč. 76, č. 5, s. 977-984. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1116-4>.
- [46]SAEEDI, Majid; ESLAMIFAR, Masoumeh a KHEZRI, Khadijeh. Kojic acid applications in cosmetic and pharmaceutical preparations. Online. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019, roč. 110, s. 582-593. ISSN 07533322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.006>.
- [47]RODRIGUES, Ana Paula D.; FARIAS, Luis Henrique S.; CARVALHO, Antonio Sérgio C.; SANTOS, Alberdan S.; DO NASCIMENTO, José Luiz M. et al. A Novel Function for Kojic Acid, a Secondary Metabolite from *Aspergillus Fungi*, as Antileishmanial Agent. Online. *PLoS ONE*. 2014, roč. 9, č. 3. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091259>.
- [48]LI, Tian-Xiao; LIANG, Jia-Xin; LIU, Lu-Lu; SHI, Feng-Cheng; JIA, Xue-Wei et al. Novel kojic acid derivatives with anti-inflammatory effects from *Aspergillus versicolor*. Online. *Fitoterapia*. 2021, roč. 154. ISSN 0367326X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2021.105027>.
- [49]ABD RAZAK, Dang Lelamurni; ABD RASHID, Nur Yuhasliza; JAMALUDDIN, Anisah; SHARIFUDIN, Shaiful Adzni; ABD KAHAR, Ainaa et al. Cosmeceutical potentials and bioactive compounds of rice bran fermented with single and mix culture of *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae*. Online. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 2017, roč. 16, č. 2, s. 127-134. ISSN 1658077X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2015.04.001>.
- [50]CHEN, Mo; SUN, Yi; ZHU, Le; LI, Lingyu a ZHAO, Ya. Study on the Skincare Effects of Red Rice Fermented by *Aspergillus oryzae* In Vitro. Online. *Molecules*. 2024, roč. 29, č. 9. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules29092066>.
- [51]FIUME, Monice M.; HELDRETH, Bart A.; BERGFELD, Wilma F.; BELSITO, Donald V.; HILL, Ronald A. et al. Safety Assessment of Citric Acid, Inorganic Citrate Salts, and Alkyl Citrate Esters as Used in Cosmetics. Online. *International Journal of Toxicology*. 2014, roč. 33, č. 2_suppl, s. 16S-46S. ISSN 1091-5818. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/1091581814526891>.
- [52]DYLEVSKÝ, Ivan. *Anatomie a fyziologie člověka: učebnice pro zdravotnické školy*. Olomouc: Epava, 1998. ISBN 80-901-6670-9.
- [53]ČIHÁK, Radomír. *Anatomie*. Třetí, upravené a doplněné vydání. Praha: Grada, 2011-2016. ISBN 978-80-247-5636-3.
- [54]Kůže. Online. In: Selavis. Dostupné z: <https://www.selavis.cz/kuze/>.

- [55] *Vrstvy epidermis živočichů*. Online. In: Wikipedia: the free encyclopedia. Dostupné také z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Poko%C5%BEka_%28%C5%BEivo%C4%8Dichov%C3%A9%29.
- [56] MANDRU, Alekhy; JYOTHI, Mane a RAMYA, Mandapati. A Review on UV-visible spectroscopy. Online. *Journal of Pharma Insights and Research*. 2023, roč. 1, č. 2, s. 91-96. Dostupné z: <https://doi.org/10.5281/zenodo.10232708>.
- [57] BHARDWAJ, Santosh Kumar; DWIVEDI, K. a AGARWAL, D. D. A Review: HPLC Method Development and Validation. Online. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015, roč. 5, č. 4, s. 76-81. ISSN 2231-5012. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/284717827_A_Review_HPLC_Method_Development_and_Validation.
- [58] LERCHE, Dietmar a SOBISCH, Titus. Consolidation of concentrated dispersions of nano- and microparticles determined by analytical centrifugation. Online. *Powder Technology*. 2007, roč. 174, č. 1-2, s. 46-49. ISSN 00325910. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2006.10.020>.
- [59] BALOUIRI, Mounyr; SADIKI, Moulay a IBNSOUDA, Saad Koraichi. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Online. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016, roč. 6, č. 2, s. 71-79. ISSN 20951779. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- [60] TEH, Chien Huey; NAZNI, Wasi Ahmad; NURULHUSNA, Ab Hamid; NORAZAH, Ahmad a LEE, Han Lim. Determination of antibacterial activity and minimum inhibitory concentration of larval extract of fly via resazurin-based turbidometric assay. Online. *BMC Microbiology*. 2017, roč. 17, č. 1. ISSN 1471-2180. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0936-3>.
- [61] Preparation of Routine Media and Reagents Used in Antimicrobial Susceptibility Testing. Online. In: LEBER, Amy L. (ed.). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington, DC, USA: ASM Press, 2016, 5.20.1.1-5.20.3.10. ISBN 9781683670766. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/9781555818814.ch5.20.1>.
- [62] BARANOVÁ, Barbora. *Možnosti využití konopných výlisků v potravinářství a krmivářství*. Online, diplomová práce. Ivana MÁROVÁ (vedoucí práce). Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2025. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/162077>.
- [63] LOZANO, Guzmán Eduardo; BEATRIZ, Santos Ramirez; CERVANTES, Flores Maribel; MARÍA, Guadalupe Nieto Pescador a FRANCISCO, Javier Moreno Cruz. Low accuracy of the McFarland method for estimation of bacterial populations. Online. *African Journal of Microbiology Research*. 2018, roč. 12, č. 31, s. 736-740. ISSN 1996-0808. Dostupné z: <https://doi.org/10.5897/AJMR2018.8893>.
- [64] ŁOPUSIEWICZ, Łukasz; WASZKOWIAK, Katarzyna; POLANOWSKA, Katarzyna; MIKOŁAJCZAK, Beata; ŚMIETANA, Natalia et al. The Effect of Yogurt and Kefir Starter Cultures on Bioactivity of Fermented Industrial By-Product from Cannabis sativa Production—Hemp Press Cake. Online. *Fermentation*. 2022, roč. 8, č. 10. ISSN 2311-5637. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/fermentation8100490>.

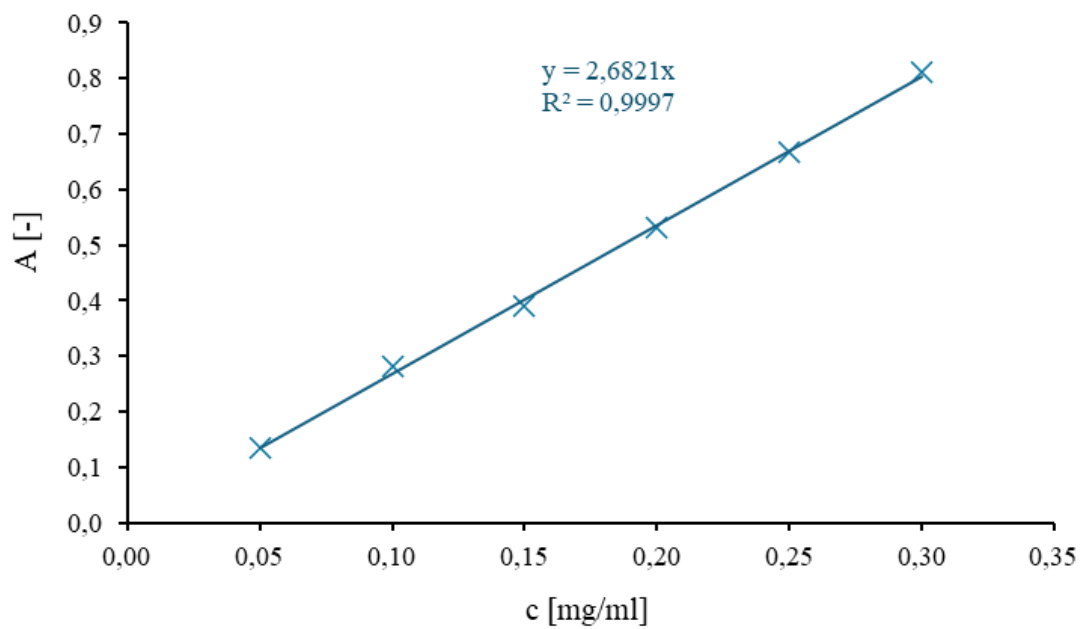
- [65]WANG, Yaqi; WU, Jiangtao; LV, Mengxin; SHAO, Zhen; HUNGWE, Meluleki et al. Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. Online. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021, roč. 9. ISSN 2296-4185. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>.
- [66]ITO, Kotaro a MATSUYAMA, Asahi. Koji Molds for Japanese Soy Sauce Brewing: Characteristics and Key Enzymes. Online. *Journal of Fungi*. 2021, roč. 7, č. 8. ISSN 2309-608X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/jof7080658>.
- [67]KOŁODZIEJCZYK, P.; OZIMEK, L. a KOZŁOWSKA, J. The application of flax and hemp seeds in food, animal feed and cosmetics production. Online. In: *Handbook of Natural Fibres*. Elsevier, 2012, s. 329-366. ISBN 9781845696986. Dostupné z: <https://doi.org/10.1533/9780857095510.2.329>.
- [68]STASTNIK, Ondrej; PAVLATA, Leos a MRKVICOVA, Eva. The Milk Thistle Seed Cakes and Hempseed Cakes are Potential Feed for Poultry. Online. *Animals*. 2020, roč. 10, č. 8. ISSN 2076-2615. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ani10081384>.
- [69]HALLE, Ingrid a SCHÖNE, Friedrich. Influence of rapeseed cake, linseed cake and hemp seed cake on laying performance of hens and fatty acid composition of egg yolk. Online. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. 2013, roč. 8, č. 3, s. 185-193. ISSN 1661-5751. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00003-013-0822-3>.
- [70]RYBAL'CHENKO, O. V.; BONDARENKO, V. M.; ORLOVA, O.G.; GUSLEVA, O. R.; LARIONOV, I. et al. [Disorganization of biofilms of clinical strains of staphylococci by metabolites of lactobacilli]. Online. *Journal of microbiology epidemiology immunobiology*. 2010, č. 6, s. 66-70. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21381381/>.
- [71]*Sucrose Stearate 50 g*. Online. In: Nature-Store. Dostupné z: <https://www.nature-store.cz/emulgatory/sucrose-stearate-50-g/>.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

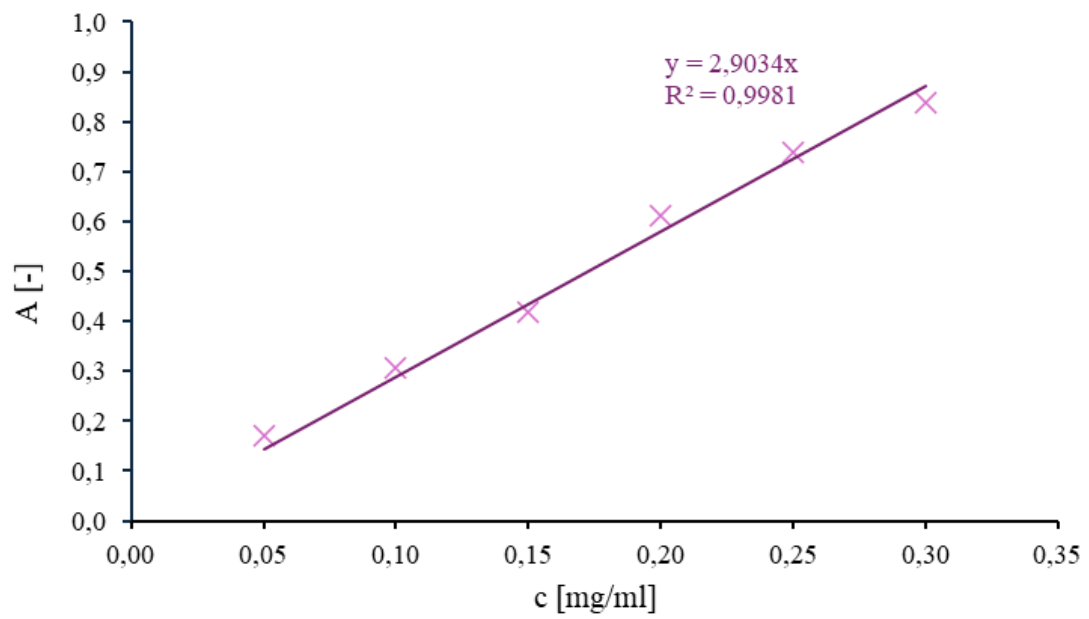
CBC	kanabichromen
CBD	kanabidiol
CBE	kanabielsoin
CBG	kanabigerol
CBL	kanabicyklol
CBN	kanabinol
CBND	kanabinodiol
CBT	kanabitriol/kanabicitran
CCM	Czech Collection of Microorganisms
CFU	kolonie tvořící jednotky (Colony Forming Unit)
GRAS	všeobecně považovaný za bezpečný (Generally Recognised As Safe)
LAB	bakterie mléčného kvašení (Lactic Acid Bacteria)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
McF	McFarlandova jednotka
NMF	přirozený hydratační faktor (Natural Moisturizing Factor)
PRR	receptory rozpoznávající vzory (Pattern Recognition Receptor)
THC	tetrahydrokanabinol
TNF- α	faktor nádorové nekrózy α (Tumor Necrosis Factor α)
UV	záření v ultrafialové oblasti spektra
VIS	záření ve viditelné oblasti světla

9. PŘÍLOHY

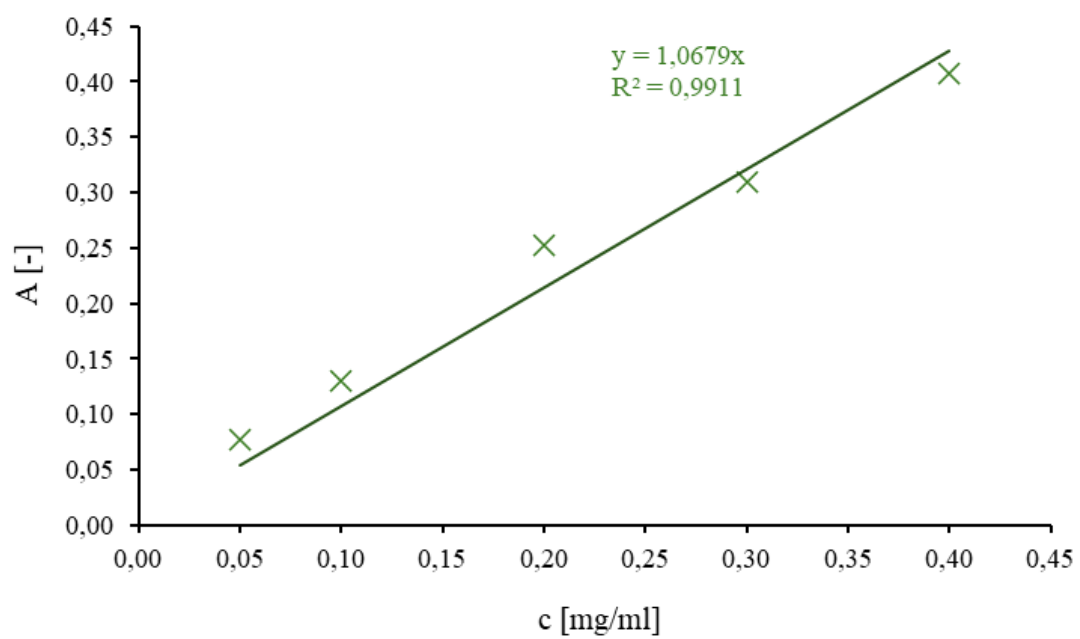
Příloha 1: Kalibrační křivka závislosti absorbance na koncentraci pro stanovení celkových fenolických látek



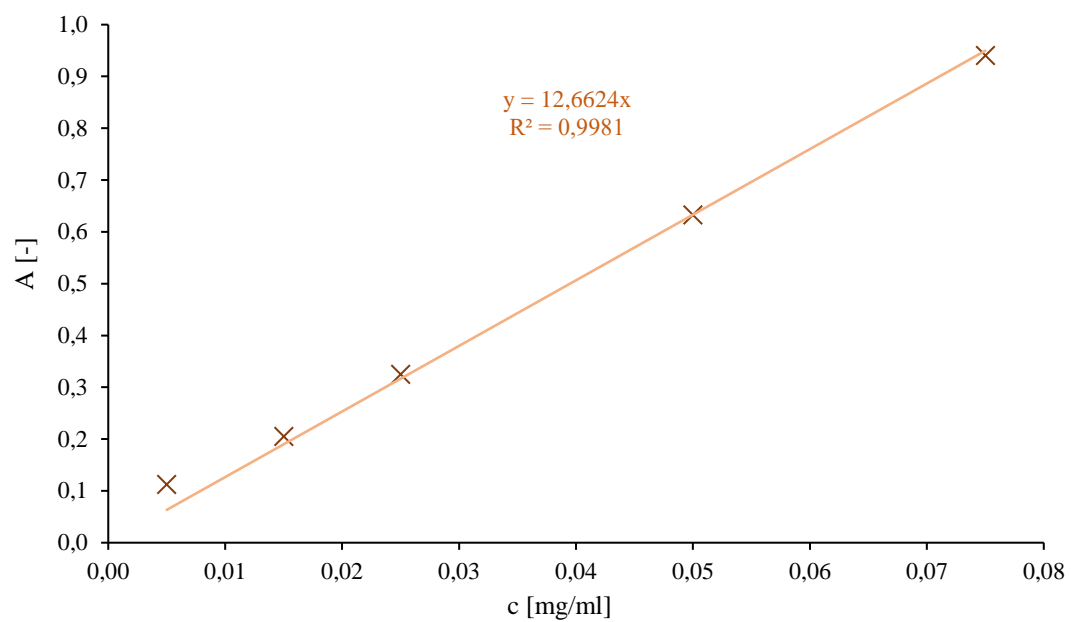
Příloha 2: Kalibrační křivka závislosti absorbance na koncentraci pro stanovení celkových fenolických látek



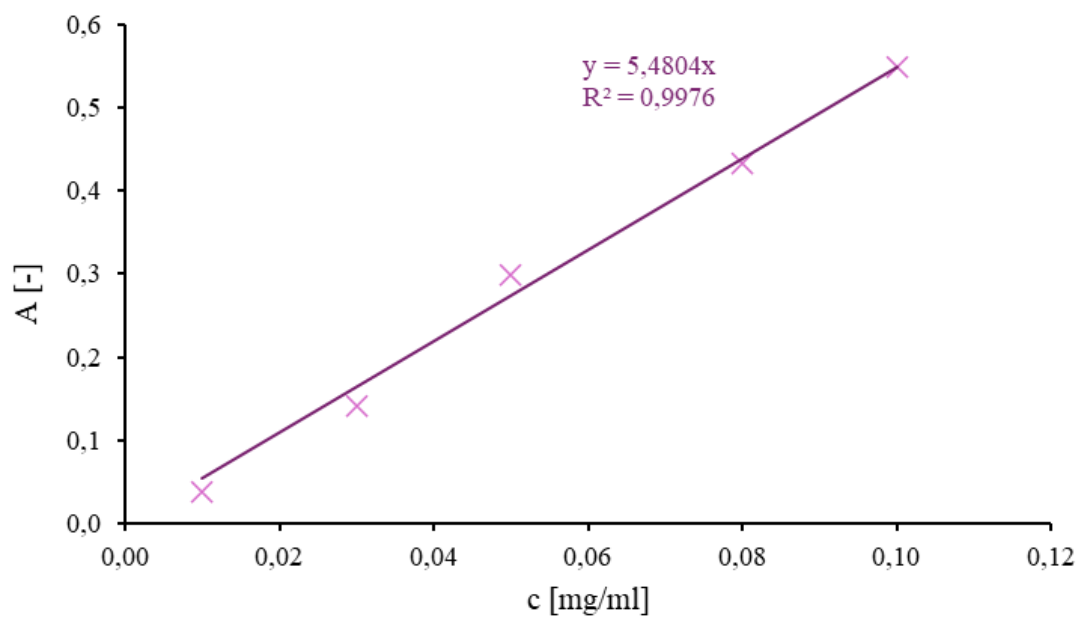
Příloha 3: Kalibrační křivka závislosti absorbance na koncentraci pro stanovení antioxidační aktivity



Příloha 4: Kalibrační křivka závislosti absorbance na koncentraci pro stanovení celkových sacharidů dle Duboise



Příloha 5: Kalibrační křivka závislosti absorbance na koncentraci pro stanovení redukujících sacharidů dle Somogyi-Nelsona



Příloha 6: Rovnice kalibračních křivek pro stanovení koncentrace kanabinoidů pomocí HPLC

Kanabinoid	Rovnice kalibrační přímky
CBG	$y = 1,2612 \cdot x$
CBD	$y = 1,3139 \cdot x$
CBN	$y = 1,1802 \cdot x$
CBC	$y = 0,72 \cdot x$

DOTAZNÍK K SENZORICKÉ ANALÝZE KOSMETICKÝCH EMULZÍ

Pohlaví:

žena muž

Věk:

25-30 31-40 41-50

Váš typ pokožky:

normální suchá mastná smíšená

Trápí Vás nadměrná dehydratace pokožky?

vůbec málo středně velmi

Používáte pravidelně hydratační produkty?

vůbec zřídka v případě potřeby pravidelně

Máte sklony k podráždění pokožky?

vůbec málo středně velmi

Potýkáte se s přecitlivělostí pokožky na určité složku/y kosmetických přípravků? Pokud ano, uveďte název složky.

ne

ano

HODNOCENÍ TESTOVANÝCH PRODUKTŮ

Jak jste byli spokojeni s aplikací emulzí na pokožku?

Pozn. Hodnoťte, jako ve škole, tzn. za nejlepší se považuje 1, za nejhorší 5.

Vzorek	1	2	3	4
Konzistence				
Roztíratelnost				
Vstřebatelnost				
Lepivost				
Tvorba mastného filmu				
Pocit hydratace				
Parfemace				
Vzorek	5	6	7	8
Konzistence				
Roztíratelnost				
Vstřebatelnost				
Lepivost				
Tvorba mastného filmu				
Pocit hydratace				
Parfemace				
Vzorek	9	10	11	12
Konzistence				
Roztíratelnost				
Vstřebatelnost				
Lepivost				
Tvorba mastného filmu				
Pocit hydratace				
Parfemace				

Co byste na testovaných produktech vylepšili nebo změnili?

Vzorek č. 1

konzistence

lepivost

vstřebatelnost

roztíratelnost

parfemace

hydratační schopnosti

tvorba mastného filmu

jiné:

nic

Vzorek č. 3

konzistence

lepivost

vstřebatelnost

roztíratelnost

parfemace

hydratační schopnosti

tvorba mastného filmu

jiné:

nic

Vzorek č. 2

konzistence

lepivost

vstřebatelnost

roztíratelnost

parfemace

hydratační schopnosti

tvorba mastného filmu

jiné:

nic

Vzorek č. 4

konzistence

lepivost

vstřebatelnost

roztíratelnost

parfemace

hydratační schopnosti

tvorba mastného filmu

jiné:

nic

Vzorek č. 5

konzistence

lepivost

vstřebatelnost

roztíratelnost

parfemace

hydratační schopnosti

tvorba mastného filmu

jiné:

nic

Vzorek č. 6

konzistence

lepivost

vstřebatelnost

roztíratelnost

parfemace

hydratační schopnosti

tvorba mastného filmu

jiné:

nic

Vzorek č. 7

konzistence

lepivost

vstřebatelnost

roztíratelnost

parfemace

hydratační schopnosti

tvorba mastného filmu

jiné:

nic

Vzorek č. 8

konzistence

lepivost

vstřebatelnost

roztíratelnost

parfemace

hydratační schopnosti

tvorba mastného filmu

jiné:

nic

Vzorek č. 9

konzistence

lepivost

vstřebatelnost

roztíratelnost

parfemace

hydratační schopnosti

tvorba mastného filmu

jiné:

nic

Vzorek č. 10

konzistence

lepivost

vstřebatelnost

roztíratelnost

parfemace

hydratační schopnosti

tvorba mastného filmu

jiné:

nic

Vzorek č. 11

konzistence

lepivost

vstřebatelnost

roztíratelnost

parfemace

hydratační schopnosti

tvorba mastného filmu

jiné:

nic

Vzorek č. 12

konzistence

lepivost

vstřebatelnost

roztíratelnost

parfemace

hydratační schopnosti

tvorba mastného filmu

jiné:

nic