

# Optimalizace přípravy želatin z kuřecího kostního odpadu

Bc. Milan Dujka

---

Diplomová práce  
2021



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Milan Dujka**  
Osobní číslo: **T19435**  
Studijní program: **N0722A130001 Inženýrství polymerů**  
Studijní obor: **Inženýrství polymerů**  
Forma studia: **Kombinovaná**  
Téma práce: **Optimalisace přípravy želatin z kuřecího kostního odpadu**

## Zásady pro vypracování

1. Zpracujte literární studii o technologických podmínkách extrakce želatin z různých surovinových zdrojů, vlastnostech želatin, zpracovatelských technikách a aplikacích želatin.
2. Na základě předchozích výsledků při řešení problematiky zpracování kuřecího kostního separátu proveďte optimalisaci procesních podmínek přípravy želatin.
3. Zaměřte se detailní charakterisaci připravených želatin, zejména na vlastnosti želatin, které jsou důležité pro zpracovatelské techniky polymerů a pro konečné vlastnosti produktů vyrobených z želatin, zejména v potravinářském a farmaceutickém průmyslu.
4. Výsledky měření zpracujte vhodným softwarem, proveďte diskusi a zhodnotte přínos práce pro praxi.

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

**Seznam doporučené literatury:**

Schrieber R.; Gareis H.: *Gelatine Handbook. Theory and Industrial Practice*. Wiley-VCH, Weinheim 2007.

Ockerman H. W.; Hansen C. I.: *Animal By-Product. Processing & Utilization*. Woodhead Publishing, London 2000.

Sarboň, Mhd.N.; Badii, F.; Howell, K.N. Preparation and characterisation of chicken skin gelatin as an alternative to mammalian gelatin. *Food Hydrocoll.* 2013, 30, 143-151.

Widyasari, R.; Rawdkuen, S. Extraction and characterization of gelatin from chicken feet by acid and ultrasound assisted extraction. *Food Applied Biosci. J.* 2014, 2, 83-95.

Vedoucí diplomové práce: **prof. Ing. Pavel Mokrejš, Ph.D.**  
Ústav inženýrství polymerů

Datum zadání diplomové práce: **1. února 2021**

Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2021**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**Ing. Jana Navrátilová, Ph.D.**  
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 1. dubna 2021

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

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

### **Prohlašuji,**

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce se zabývá zpracováním bílkovinného odpadu z výroby strojně odděleného kuřecího masa a výrobou želatiny biochemickým procesem. Teoretická část pojednává o výrobě želatin s tím, že ji rozšiřuje o popis demineralizace. Dále je zde popisována extrakce želatin z alternativních zdrojů vstupních surovin. V práci jsou zmíněny i charakteristické funkční vlastnosti želatin a jejich vliv na použití při různých aplikacích. Praktická část se věnuje želatinám, které byly připraveny demineralizací kuřecího kostního separátu a jeho následným kondicionováním enzymem Protamex. Zabývá se studiem vlivu jednotlivých sledovaných faktorů, kterými v této práci jsou doba a teplota extrakce v rozmezí 20 až 60 minut a 42 až 50°C, na účinnost extrakce. Dále se zaměřuje na analýzy zabývajícími se funkčními vlastnostmi. Výsledky jsou konfrontovány s dalšími literárními studiemi. Diplomová práce prokázala, že vhodnou volbou technologických podmínek lze vyrobit z této vstupní suroviny kvalitní želatinu či hydrolyzát. Pevnost gelu připravených želatin dosahovala až 390Bloom.

Klíčová slova: kuřecí kostní separát, želatina, enzymové kondicionování, demineralizace, extrakce

## **ABSTRACT**

The diploma thesis considers the processing of protein waste from the production of mechanically separated chicken meat and the gelatin production by a biochemical process. The theoretical part deals with the production of gelatin, the description of a demineralization process is also included. Furthermore, the extraction of gelatin from the alternative sources of raw materials is described here. The work also mentions the characteristic functional properties of gelatin and their influence on the use in various applications. The practical part is focused on gelatin, which was prepared by demineralization of separated chicken bones and their subsequent conditioning with the enzyme Protamex. It deals with the study of the influence of the individual monitored factors, which in this work were the extraction time and temperature in the range of 20 to 60 minutes and 42 to 50°C, on the extraction efficiency. It is also focused on the subsequent analyses dealing with functional properties. The results were confronted with other literary studies. The diploma thesis proved that a suitable choice of technological conditions can lead to a high-quality gelatin or hydrolyzate production. The gel strength of the prepared gelatin reached up to 390 Bloom.

Keywords: chicken bone separator, gelatin, enzymatic conditioning, demineralization, extraction

Velmi rád bych poděkoval vedoucímu mé diplomové práce prof. Ing. Pavel Mokrejš, Ph.D., za odborné rady, vstřícný přístup a trpělivost. Dále děkuji paní laborantce Miroslavě Žaludkové a paní laborantce Petře Elšíkové za ochotu a asistenci při práci v laboratoři. Děkuji i paní Ing. Anetě Prokopové za pomoc s vypracováním stravitelnosti želatin. Také bych chtěl poděkovat mojí rodině za veškerou pomoc a podporu při studiu.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
<b>1 VÝROBA A EXTRAKCE ŽELATINY</b> .....	<b>11</b>
1.1 VÝROBA ŽELATINY .....	11
1.2 EXTRAKCE ŽELATINY .....	14
1.3 ŽELATINA Z ALTERNATIVNÍCH ZDROJŮ .....	15
<b>2 FUNKČNÍ VLASTNOSTI ŽELATINY</b> .....	<b>25</b>
2.1 ŽELÍROVÁNÍ A VÁZÁNÍ VODY .....	27
2.2 POVRCHOVÉ VLASTNOSTI.....	29
2.3 FILMOTVORNÉ VLASTNOSTI .....	30
2.4 MIKROKAPSLE.....	31
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>33</b>
<b>3 CÍLE PRÁCE A VĚDECKÉ HYPOTÉZY</b> .....	<b>34</b>
<b>4 MATERIÁLY A POSTUP PRÁCE</b> .....	<b>35</b>
4.1 KUŘECÍ KOSTNÍ SEPARÁT .....	35
4.2 PŘÍSTROJE, POMŮCKY, CHEMIKÁLIE .....	35
4.3 ZPRACOVÁNÍ KUŘECÍHO KOSTNÍHO SEPARÁTU.....	36
4.3.1 Příprava čistého kolagenu .....	37
4.3.2 Příprava demineralizovaného kolagenu .....	37
4.3.3 Příprava želatin.....	38
4.4 ANALÝZY MEZIPRODUKTŮ A KONEČNÝCH PRODUKTŮ .....	39
4.4.1 Stanovení obsahu sušiny .....	39
4.4.2 Stanovení zbytkového množství tuku dle Soxhleta .....	39
4.4.3 Stanovení bilanční chyby .....	39
4.4.4 Stanovení účinnosti extrakce.....	40
4.4.5 Stanovení pevnosti gelu želatin.....	40
4.4.6 Stanovení dynamické viskozity želatiny .....	40
4.4.7 Stanovení čírosti želatiny .....	41
4.4.8 Stanovení teploty tání želatinového gelu .....	41
4.4.9 Stanovení teploty tuhnutí želatinového gelu .....	41
4.4.10 Vodu zadržující kapacita .....	42
4.4.11 Tuk vázací kapacita .....	42
4.4.12 Pěnotvorné vlastnosti .....	43
4.4.13 Emulgační vlastnosti .....	43
4.4.14 Stanovení obsahu popela .....	44
<b>5 VÝSLEDKY A DISKUSE</b> .....	<b>45</b>
5.1 PILOTNÍ EXPERIMENT .....	45
5.2 STUDIUM VLIVŮ PROCESNÍCH FAKTORŮ .....	46
5.2.1 Výtěžky želatin.....	51
5.2.1.1 Výtěžek 1. frakce .....	51
5.2.1.2 Výtěžek 2. frakce .....	52
5.2.1.3 Výtěžek 3. frakce .....	53
5.2.1.4 Celková účinnost extrakce a porovnání výtěžku s literaturou .....	55

5.2.2	Pevnost gelu želatin 2. frakce.....	56
5.2.3	Viskozita a čírost.....	58
5.2.4	Teplota tání gelu.....	58
5.2.5	Teplota tuhnutí gelu .....	60
5.2.6	Vodu zadržující kapacita.....	60
5.2.7	Tuk vázací kapacita.....	61
5.2.8	Pěnotvorná kapacita a stabilita pěny .....	61
5.2.9	Emulsifikační kapacita a stabilita emulze .....	61
5.2.10	Stanovení popela a obsah tuku .....	62
5.2.11	Stravitelnost.....	62
5.3	NÁVRH OPTIMÁLNÍCH PODMÍNEK .....	63
5.4	ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ A VÝZNAM PRO PRAXI.....	65
<b>ZÁVĚR .....</b>		<b>71</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>		<b>74</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>		<b>81</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>		<b>82</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>		<b>84</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>		<b>85</b>



## ÚVOD

Želatina je jedním z nejvšestrannějších biopolymerů a díky svým funkčním vlastnostem má široké uplatnění v mnoha průmyslových odvětvích. Nejčastěji se používá v potravinářském průmyslu, kde se využívá jejích vlastností při výrobě cukrovinek, zákusků, masných výrobků, ale také při výrobě jogurtů, sýrů, zmrzliny a mnoha dalších produktů. Uplatňuje se i ve farmacii, kde se používá například při výrobě tablet, nebo ve fotografickém průmyslu, lékařství či kosmetice. Je dokonce možno ji najít i u zkoušek zbraní, respektive balistických střel, kde nahrazuje dříve používané biologické tkáně. Tato širší použití se odráží také v přibližně 400 000 tunách želatiny vyrobených ročně po celém světě.

Želatinu je možné izolovat částečnou hydrolýzou téměř z jakéhokoliv zdroje obsahujícího kolagenní strukturu. Tradičními zdroji jsou vepřové, hovězí kůže a kosti, alternativními zdroji jsou drůbež a ryby. S rostoucí spotřebou drůbežního masa ve světě, by mohla vzrůst výroba želatiny i z tohoto zdroje. Takto získaná želatina by mohla být v pořádku i s ohledem na využití v různých kulturách a náboženstvích. Navíc v současnosti zůstávají velké části drůbeže nevyužité. Jde především o hlavy, kosti, běháky a nepoživatelné vnitřnosti, jejichž zpracování je velmi problematické. V podstatě jde o odpad, který končí v kafilerách, na skládkách, nebo se spaluje. Tímto vznikají producentům masa další náklady, a navíc likvidace odpadů představuje nemalou ekologickou zátěž pro životní prostředí.

Tato diplomová práce navazuje na dřívější bakalářskou práci, která se zabývala zpracováním bílkovinného odpadu z výroby strojně odděleného kuřecího masa. Pokračuje v tom, co již bylo vysledováno a rozšiřuje zpracovatelské podmínky o demineralizaci suroviny pomocí kyseliny chlorovodíkové. Zabývá se optimalizací procesů extrakce vstupní suroviny, kondicionované pomocí enzymu Protamex a následnou charakterizací vlastností želatin, které jsou důležité pro zpracovatelské techniky a použití samotné želatiny v průmyslu.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 VÝROBA A EXTRAKCE ŽELATINY

## 1.1 Výroba želatiny

Samotná výroba želatiny je několikastupňový proces. Surový materiál, který se používá k získání želatiny, je vysoce zesíťovaný, což vyžaduje použití takových metod opracování, které způsobí dostatečné rozrušení příčných vazeb, což dovolí samotnou extrakci. Opracování se provádí při vysokých anebo nízkých hodnotách pH. Typ a stupeň zesíťování závisí na věku zvířete. Výrobce želatiny proto musí upravit parametry procesu a následné podmínky extrakce přesně podle zpracovávané suroviny, aby mohl získat želatinu s požadovanými vlastnostmi. V zásadě by se příčné vazby mohly štěpit procesem pomalého „vaření“, což je metoda používaná po staletí při přípravě aspiku, avšak vystavení materiálu delšímu období vyšších teplot má za tendenci negativně ovlivňovat všechny parametry, které ovlivňují kvalitu [1].

Naproti tomu, díky jemnému chemickému štěpení je možné dosáhnout mnohem lepší kvality želatiny. Z tohoto důvodu se používají pouze vysoce zředěné kyseliny a zásady. Tímto způsobem zůstávají řetězce kolagenového proteinu v podstatě neporušené, ale příčné vazby jsou odštěpeny. V tomto případě dochází pouze k částečné hydrolyze. U starších zvířat je upřednostňováno intenzivnější alkalické ošetření, zatímco u mladších se používá pouze krátké období předúpravy velmi zředěnou kyselinou. Kromě štěpení kyselinami a zásadami se používají i enzymy nebo kombinace enzymů a chemikálií pro štěpení zesíťování. Výrobce tak může vybrat výrobní proces v souladu s požadovanými vlastnostmi želatiny, která má být vyrobena. S určitým rozsahem je tedy možné vyrábět „přizpůsobenou“ želatinu pro specifické aplikace [1].

### **Kyselá předúprava surovin**

Při současných metodách chovu prasat jsou zvířata porážena v pěti až sedmi měsících. Důsledkem toho je, že kolagen v jejich kůži je relativně mírně zesíťovaný, a proto se k jeho opracování nejčastěji používají slabé roztoky kyseliny sírové nebo kyseliny chlorovodíkové při pokojové teplotě a pH roztoku je asi 1,5-3,0. Surovina je v tomto roztoku ponořena po dobu 8-30 hodin (většinou 24 hodin) v závislosti na tloušťce a stupni rozmělnění suroviny. Během této doby materiál zroztne na 2 až 3násobný objem. Po kyselém opracování se zbytky kyseliny odstraní promytím vodou, vodou se promývá tak dlouho, dokud není pH roztoku

neutrální. Pokud se provede kyselé opracování, musí být materiál dále extrahován také v kyselině [2].

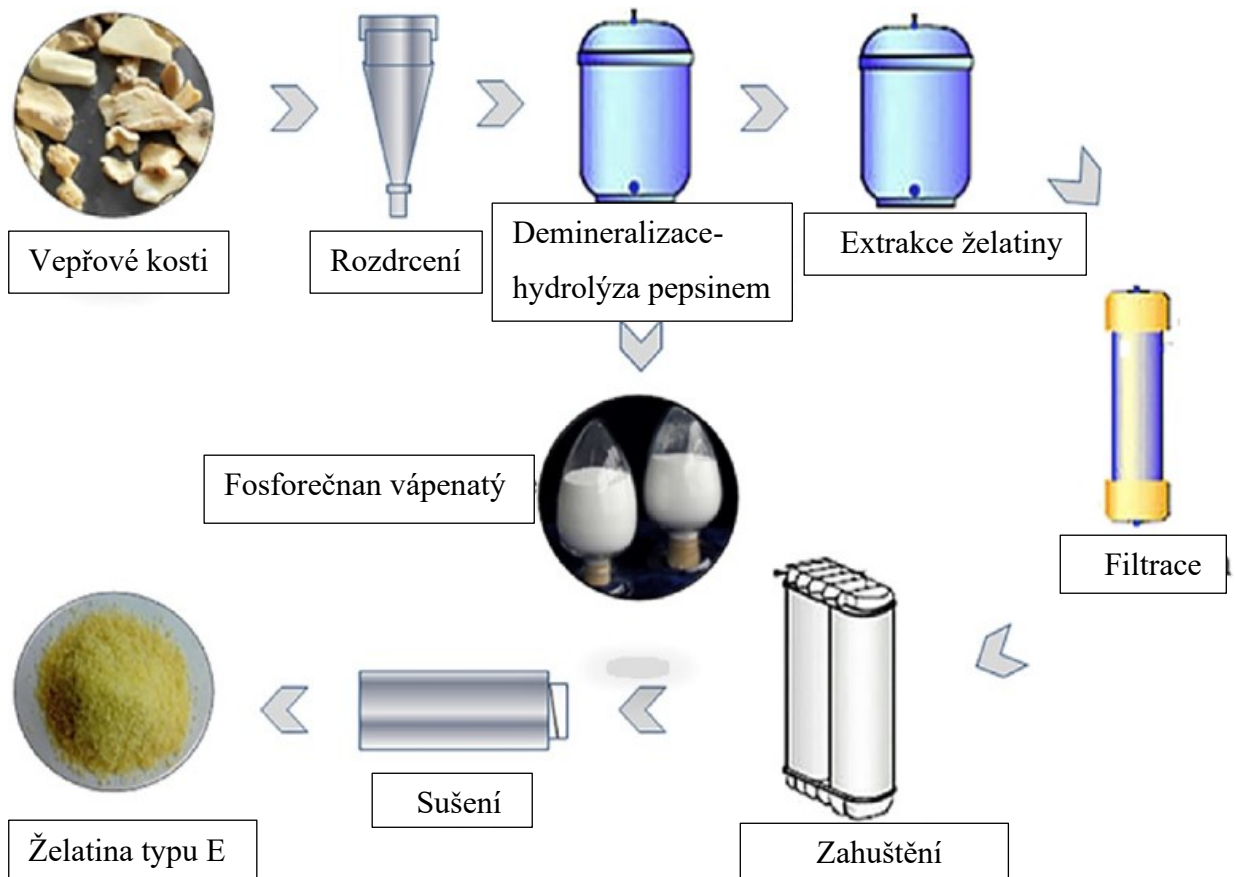
### **Zásaditá předúprava surovin**

Prvotně upravená surovina se zpracovává v kombinaci s alkalickými látkami. Nejčastěji se jedná o roztok nasyceného hydroxidu vápenatého, kdy se surovina ponoří do nádrže (s mícháním nebo bez míchání) s hydroxidem vápenatým, a to při  $\text{pH} \approx 12$ , teplotě nižší než  $24^\circ\text{C}$  a po dobu 1-6 měsíců. Určení doby závisí na tloušťce a druhu suroviny, nejčastěji se však používá doba 4 měsíců. Přestože se může zdát, že proces s hydroxidem vápenatým je na první pohled poněkud neefektivní, má řadu technologických výhod. Kvůli nízké rozpustnosti hydroxidu vápenatého je udržován konstantní stupeň relativně slabé alkality, a to zároveň pomáhá vyrovnávat určité rozdíly v surovinách, tímto lze zabránit i nežádoucím ztrátám výtěžku. Během tak dlouhého procesu dochází k žádoucímu rozpuštění nekolagenních látek (například mukopolysacharidy, sloučeniny síry, albuminy a globuliny, které se v surovině vyskytují vždy). Získáme tak účinně vyčištěný roztok, ten se poté několikrát promyje vodou, aby se odstranil přebytek vápna, a dále se neutralizuje nejčastěji zředěnou kyselinou chlorovodíkovou. Mytí vodou se provádí, dokud není  $\text{pH}$  roztoku neutrální. [1,2] Kombinace teploty, času a koncentrace hydroxidu má dopad na hodnotu pevnosti gelu a viskozitu. Větší koncentrace roztoku hydroxidu vede k získání želatiny o vyšší viskozitě, takto získaná želatina je obvykle rozpustná i ve studené vodě [2].

### **Předúprava kostí**

Mezi suroviny používané k výrobě želatiny patří i kosti. Kostní materiál je štípan na krychle o velikosti asi 0,5 cm a poté je odmašťován promýváním ve vodě o teplotě  $85-90^\circ\text{C}$  po dobu 30 minut za stálého míchání. Tento proces zcela odstraní veškerou zbytkovou kůži a maso s kostí. Následně se takto upravené kosti suší suchým vzduchem v kontinuálních sušičkách. Kosti se poté prosévají a třídí podle velikosti částic. Různě velké částice se následně zpracovávají samostatně. Velmi důležitým krokem, který se při této úpravě používá, je demineralizace neboli macerace. Kostní štěpky, které byly uvolněny pro další zpracování na želatinu, jsou ošetřeny zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (4-6%) v protiproudu v soustavě nádrží po dobu asi jednoho týdne při teplotě  $10-20^\circ\text{C}$ . Během tohoto procesu dochází k přeměně nerozpustného fosforečnanu vápenatého a uhličitanu vápenatého obsaženého v kostech na jejich rozpustnou formu, ta je poté oddělena vysrážením viz obrázek 1. Po maceraci

získáme pouze proteinovou strukturu kostního materiálu, která je dále ošetřena v solném roztoku a následně kyselinou [2].



Obrázek 1: Postup výroby želatiny demineralizací kostí pomocí hydrolyzy pepsinem [6]

V posledních letech využívají jednotliví výrobci při předúpravě kostí také tlakovou hydrolyzu, což je způsob výroby želatiny ze surové kosti, který funguje bez nutnosti macerace. Materiál kostních štěpků je po částech zpracováván v autoklávech ve vodném médiu za podmínek extrakce při asi 140°C po dobu 20 minut. V důsledku procesních podmínek tlakové hydrolyzy se proces extrakce řídí základním pravidlem: čím menší je velikost částic, tím kratší je proces. Během tohoto procesu se kolagenní protein rozpustí postupně. Výsledkem je želatina se silnou barvou, chutí a zápachem, která navíc vykazuje velmi nízkou schopnost gelovatět. Tyto vlastnosti však značně omezují její použitelnost [2].

## 1.2 Extrakce želatiny

Želatina se extrahuje ve více stupních. Nejvíce kvalitní želatiny jsou v první extrakci, při teplotě okolo 45-50°C. Takovéto želatiny disponují velkou pevností gelu a mají větší molekulovou hmotnost. Naopak extrakce při vyšších teplotách poskytuje želatiny o menší kvalitě a mají nižší molekulovou hmotnost. Samotná extrakce se realizuje ve varnách, kde po dosažení dostatečné teploty započne docházet k přetvoření kolagenu na klišový roztok. Čím více je vstupní materiál předpřipraven, tím k přeměně dochází snadněji.

Tradiční metoda extrakce želatiny probíhá v extraktorech, kde je želatina extrahována vodou, a to ve více stupních. K extrakci se používá pitná voda v rozmezí teplot 50 až 100 °C po dobu 4-7 hodin pro každý ze stupňů extrakce, kdy při každém dalším stupni se teplota zvyšuje. Každou extrakcí se získá 2-4% roztok želatiny, který se před přidáním další vody o vyšší teplotě odstraní z extraktoru. Se zvyšující se dobou a teplotou extrakce se získávají méně kvalitní želatiny, protože při vyšších teplotách dochází k rozsáhlejší hydrolyze peptidových řetězců. Vzniklé želatiny mají sníženou schopnost tvorby gelu, nebo tvoří velmi slabé gely a v mnoha případech vznikají až hydrolyzáty. Doba a teplota extrakce má vliv i na zbarvení želatiny, kdy déle extrahované želatiny mají vyšší zbarvení v důsledku Maillardových reakcí mezi aminokyselinou a zbytky redukcujících sacharidů v surovině. V některých případech se může použít bělení želatin pomocí peroxidu vodíku nebo oxidu siřičitého [2].

Kontinuální metoda probíhá také v extraktoru jako tradiční metoda. Na rozdíl od tradiční metody je však surovina přiváděna do extraktoru v protiproudu s extrakční vodou v pravidelných intervalech, přičemž je rychlost extrakce postupně zvyšována. Při této metodě se želatina extrahuje při nízkém pH ( $\text{pH} \approx 2,0-3,0$ ) a během procesu se extrahují různé druhy želatiny. Na začátku získáváme želatiny vysoké kvality a na konci želatiny o kvalitě nižší. Výsledná želatina má vysokou pevnost gelu, nízkou viskozitu a nízkou barevnost. Při kontinuální metodě musí být spodní část extraktoru pravidelně čistěna, lze tak pravidelně odstraňovat nerozpustné části ze suroviny [2].

Dalším možným extrakčním procesem je polokontinuální proces, kdy je do extraktoru přidávána surovina v dávkách a je extrahována vodou. Teplota vody se postupně zvyšuje. Během extrakce jsou želatiny o různé kvalitě odstraňovány z extraktoru, kdy se zvyšujícím se stupněm extrakce získáváme jako v předchozím způsobu nižší hodnoty pevností gelu želatiny a zároveň se zvyšuje barevnost želatiny [2].

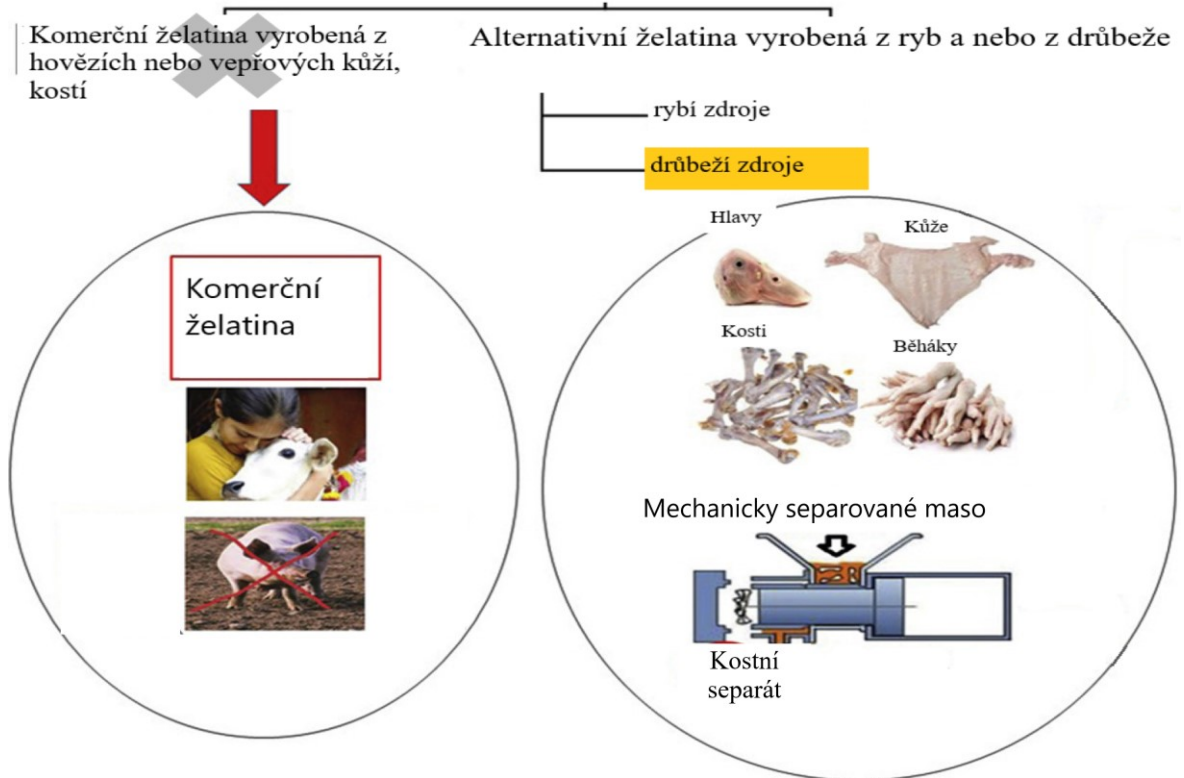
Extrakci lze provádět i tlakovou hydrolyzou. Jedná se o optimalizovanou kontinuální extrakci, která je modifikována snížením velikosti částic suroviny, tlakem, snížením pH a zvýšením teploty. Želatina tak může být extrahována během několika minut. Teoreticky lze získat tímto způsobem všechnu želatinu ve vysoké kvalitě, a to při teplotě 50°C. Aby bylo dosaženo takovéhoho výtěžku, musely by být hydrolyzované částice co možná nejvíce homogenní [2].

### 1.3 Želatina z alternativních zdrojů

Studie ukazují 30% nárůst poptávky po všech druzích potravinářských a nepotravinářských želatin na světě. Největší objem výroby želatiny pochází z tradičních zdrojů. V poslední době se však konzumace želatiny z tradičních zdrojů jeví do určité míry problematická s ohledem na zdravotní, kulturní a náboženské důvody. To vedlo vědce k hledání jiných než tradičních zdrojů, které se však velmi podobají žádoucím fyzikálně-chemickým, funkčním a senzorickým vlastnostem tradičních želatin viz obrázek 2. V potravinářském průmyslu by mohly začít získávat na důležitosti i jiné než tradiční želatiny, a to například z vedlejších produktů ať už z drůbeže nebo z ryb. Za poslední desetiletí se produkce drůbeže zvýšila asi o téměř 40%. Drůbeží vedlejší produkty mají dobrý potenciál nahradit tradiční zdroje pro extrakci želatiny [3].

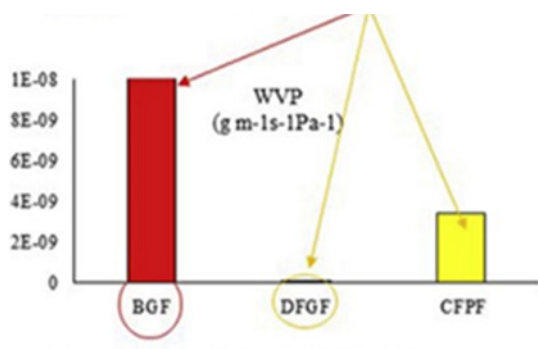
Další z možností je využití rybích želatin, jejichž hlavní nevýhodou je, že gely na nich založené mají tendenci být méně stabilní a mají horší reologické vlastnosti než tradiční želatiny, což může omezit jejich oblast použití. Obecně to platí v případě studenodrodních druhů, jako je treska obecná, treska aljašská atd. Nicméně relativně nedávné studie poukazují na to, že tropické a subtropické druhy mohou mít podobné reologické vlastnosti a termostabilitu jako tradiční želatina v závislosti na druhu ryb, druhu suroviny a podmínkách zpracování. Ačkoli přesné srovnání je obtížné, protože metodiky se mohou mezi jednotlivými pracemi značně lišit, obecně platí, že želatiny z ryb, které pocházejí ze studených vod, jsou charakterizovány jako ty, jež mají nízké teploty gelovatění a tání (~4-12°C a <17°C), na rozdíl od údajů uváděných pro druhy žijící v teplých vodách, u kterých jsou teploty vyšší (~18-19°C a ~24-29°C). Druhy žijící ve studených vodách dosahují hodnot pevnosti gelu 100 Bloom nebo dokonce i nižší, zatímco želatiny z druhů žijících v teplých vodách obvykle zaznamenávají hodnoty vyšší než 200 Bloom. Jako referenční bod se uvádějí komerční želatiny dosahující hodnoty pevnosti gelu v rozmezí 200-300 Bloom a teploty tání vyšší než 30°C. Počet ryb či mořských druhů studovaných pro těžbu želatiny však neustále roste [6].

### Hlavní zdroje k výrobě želatin



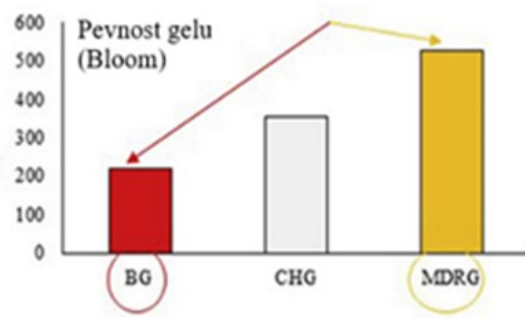
#### Porovnání propustnosti vodní páry u želatinových filmů

BGF: film z komerční želatiny  
 DFGF: film ze želatiny z kachních nohou  
 CFPF: film ze želatiny z kuřecích běháků



#### Porovnání pevnosti gelů

BG: hovězí želatina  
 CHG: želatina z kuřecích hlav  
 MDRG: želatina z kostního separátu



Obrázek 2: Znázornění vlastností drůbežích želatin v porovnání s komerčními želatinami [3]

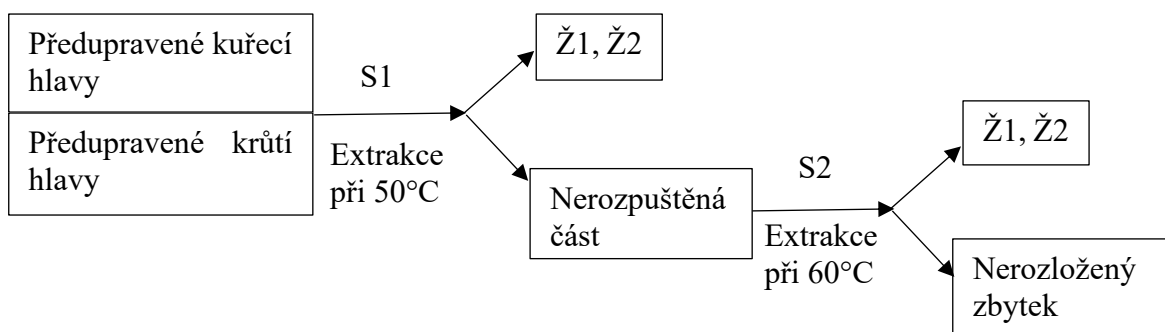


Želatinu lze obecně extrahovat z různých částí drůbeže, které obsahují významné množství bílkovin, včetně hlav s obsahem bílkovin 16% [24], kostí s 23-24% [25], z kuřecích a kachních nohou, kde je obsah kolagenu až 30,74% [26] a také z rybího odpadu, k němuž patří kůže, kosti a ploutve s průměrem 50% [27]. Suroviny získané z ryb a drůbeže jsou na trhu stále nové, a proto musí výrobci želatiny přesně upravit parametry procesu předúpravy a extrakce, aby získali produkt s maximálními požadovanými vlastnostmi [3].

V této oblasti výzkumu již byla prezentována celá řada literárních studií, které se zabývají alternativní vstupní surovinou a její extrakcí, a některé z nich jsou zde popsány.

### Želatina z kuřecích a krůtích hlav

Želatina byla extrahována podle metody evropských výrobců želatiny [7] s některými modifikacemi. Mleté kuřecí a krůtí hlavy byly odděleně smíchány s destilovanou vodou. Po zamíchání byly filtrovány. Čistý vzorek pak byl zpracován s  $\text{NaHCO}_3$ . Roztok byl míchán a následně odstředěn s použitím vysoce výkonné odstředivky. Tento krok byl opakován ještě 3krát, dokud nebyl v supernatantu pozorován žádný tuk. Čistý odtučněný vzorek byl poté zpracován s  $\text{NaOH}$  po dobu 6 hodin. Alkalický roztok byl měněn každé 2 hodiny. Alkalicky upravené vzorky byly promyty destilovanou vodou a smíchány roztokem  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Po 18 hodinách se surovina kondicionovaná v kyselinou promyla destilovanou vodou. Kondicionování se provádělo při  $4^\circ\text{C}$ . Surovina z takto předupravených drůbežích hlav byla smíchána s destilovanou vodou a pH bylo upraveno na 7,0 a následně extrahována ve 2 stupních při 2 různých teplotách viz obrázek 3 [4]. Gál a kol. při extrakci stejné vstupní suroviny navíc použili ke kondicionování enzym [14].



Obrázek 3: Vývojový diagram kroků extrakce želatiny. S1: první fáze; S2: druhá fáze. Ž1: želatina extrahovaná z kuřecích hlav v S1. Ž1: želatina extrahovaná z kuřecích hlav v S2. Ž2: želatina extrahovaná z krůtích hlav v S1. Ž2: želatina extrahovaná z krůtích hlav v S2 [4]

### **Želatina z kuřecího kostního separátu**

Z materiálu byly odstraněny nečistoty jako tuk a krev, poté byl promyt vodou z vodovodu a přefiltrován. Následovala demineralizace, kdy byla surovina zpracovávána v roztoku HCl po dobu 24 hodin při 10°C. Po demineralizaci byl materiál nejprve promyt vodou z vodovodu a poté také destilovanou vodou. Nakonec byl promytý materiál filtrován. Během fáze alkalického kondicionování byl promytý a filtrovaný zbytek opračován roztoky NaOH o různých koncentracích po dobu 48 hodin při teplotě místnosti. Po alkalickém kondicionování byla surovina několikrát promyta vodou z vodovodu, poté bylo pH suspenze upraveno na 4,0 pomocí roztoku H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Nakonec byla surovina promyta alespoň dvakrát destilovanou vodou a přefiltrována. Extrakce byly prováděny při různých teplotách a dobách. Po extrakci byla směs přefiltrována a roztok odstředěn. Po odstředění byl získán čistý želatinový roztok a ten byl sušen 48 hodin při 42°C [5].

### **Želatina z kuřecích běháků**

Kuřecí běháky byly rozmrazeny a poté promyty vodou z vodovodu. Vyčištěné kuřecí běháky byly namočeny v HCl při 18°C po dobu 24 hodin. Po kyselém kondicionování bylo pH neutralizováno po dobu 48 hodin tekoucí vodou z vodovodu. Pro extrakci při různých teplotách byly běháky umístěny do polyetylenových pytlů, vakuově zabaleny a poté zahřívány při různých teplotách po dobu 2 hodin. Extrahovaná želatina byla zmrazena při -70°C a sušena při -40°C lyofilizací [8].

### **Želatina z kachních kůží**

Kachní kůže byly umyty pomocí vody z vodovodu, aby se odstranil viditelný tuk a následně byly namočeny v různých roztocích HCl, NaOH a destilované vody, které měly pH v rozmezí 1 až 14. Vzorky kůží byly takto namočeny po dobu 24 hodin v 5násobném objemu při 18°C. Namočené vzorky kůží byly poté pro neutralizaci promyty vodou z vodovodu při 18°C po dobu 48 hodin. Želatina byla extrahována pomocí následujících metod: (1) metoda extrakce ve vodní lázni při 60°C po dobu 10 minut, (2) metoda extrakce ultrazvukem při 60°C a 40 kHz po dobu 10 minut, (3) metoda extrakce přehřátou párou při teplotě páry 150°C po dobu 10 minut a (4) metoda mikrovlnné extrakce při 2450 MHz a výkonu 200 W po dobu 10 minut. Roztavené kachní kůže byly filtrovány, aby se odstranily všechny nečistoty. Filtrát byl ochlazen a koagulován při 4°C po dobu 12 hodin. Po izolování tuku byla koagulovaná želatina zmrazena na -70°C a sušena lyofilizací při -40°C [9].

### **Želatina z kachních nohou**

Postupy želatinové extrakce byly prováděny kyselým, alkalickým a enzymatickým způsobem. Vyčištěné kachní nohy byly kondicionovány podle způsobu následné extrakce buď  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , anebo  $\text{NaOH}$  při pokojové teplotě po dobu 3 hodin. Po ošetření byly nohy neutralizovány promýváním. Pro enzymatický postup kondicionování byly alkalicky očištěné nohy namočený do  $\text{CH}_3\text{COOH}$  s pepsinem. Směs byla míchána při  $4^\circ\text{C}$  po dobu 3 hodin. Poté se hodnota pH směsi zvýšila na 7,5 za použití  $\text{NaOH}$  a směs byla míchána 1 hodinu při  $4^\circ\text{C}$ , čímž došlo k inaktivaci pepsinu. Takto předupravené kachní nohy byly opláchnuty vodou z vodovodu. Kachní nohy z všech výše popsáných postupů úpravy byly namočený v destilované vodě po dobu 12 hodin při teplotě  $65^\circ\text{C}$  za stálého míchání. Po uplynutí této doby došlo k filtraci a následné lyofilizaci želatiny [10].

### **Želatina z kuřecích kůží**

Kuřecí kůže byly přes noc rozmrazeny. Po důkladném opláchnutí vodou sloužícím k odstranění nečistot byl i viditelný tuk na kuřecích kůžích odstraněn před nočním uskladněním v sušárně při  $40^\circ\text{C}$ . Zcela vysušené kůže byly rozmělněny a poté odtučněny pomocí metody Soxhlet [13]. Želatina byla extrahována způsobem popsáným viz [12] s určitou modifikací. Odtučněné sušené kuřecí kůže byly rozpuštěny v  $\text{NaOH}$ . Roztok byl dobře protřepán a míchán 30 minut při teplotě místnosti a poté se 10 minut centrifugován při 3500 ot/min. Toto se opakovalo třikrát. Následovalo opracování v  $\text{H}_2\text{SO}_4$  při stejných podmínkách opět třikrát, a nakonec to stejné v  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ . Poté byly pelety promyty destilovanou vodou, aby se odstranily zbytkové soli a znovu centrifugovány. Konečná extrakce probíhala přes noc ve vodní lázni při  $45^\circ\text{C}$ . Výsledná směs byla filtrována, následně byl roztok zahuštěn a poté lyofilizován [11].

### **Želatina z brojlerových kostí**

Brojlerové kosti byly předem ošetřeny namočením do 5%  $\text{NaOH}$  po dobu 2 dnů. Ossein (předem ošetřená kost) byl neutralizován vodou z vodovodu a 5%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  a postupně extrahován vodou při třech různých teplotách po dobu 4 hodin. Všechny želatiny byly sušeny a poté byly identifikovány pomocí FTIR spektroskopie. Čištění želatiny bylo prováděno srážením  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  v různých koncentracích (40-70%). Směs byla za kontinuální míchání ponechána přes noc při teplotě  $4^\circ\text{C}$ . V následném kroku byla centrifugována, aby byla získána částečná čistá želatinová sraženina. Želatina byla dále čištěna dialýzou za použití celofánové membrány. Želatinová sraženina byla rozpuštěna ve fosfátovém pufru o pH 7, a potom se

suspenze umístila do celofánové membrány. Membrána byla ponořena do fosfátového pufru a byla míchána po dobu 12 hodin při 4°C [15].

### **Želatina z kostí a kůží černého kuřete**

Kuře Cemani není na trhu ani dnes běžnou záležitostí. Občas se mu přezdívá „Lamborghini mezi kuřaty“. Za jeden kus zaplatíte více než 60 tisíc Kč. Jde tedy o exkluzivní a drahou pochoutku. Extrakce želatiny byla provedena podle metody navržen viz [12] s malými úpravami. Nejprve byly odtučněné kůže nebo nohy předem ošetřeny smícháním s roztoky NaOH o různých koncentracích a pomalu míchány 80 minut při 23°C. Následně byly směsi odstředěny, propláchnuty destilovanou vodou a znovu odstředěny. Takto předupravená surovina byla kondicionována roztokem H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, nejprve byla směs míchána pomalu 40 minut a poté rychle v centrifuze. Získaná surovina pak byla smíchána s roztokem C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> a po 40 minutách byla provedena centrifugace. Tento krok se několikrát opakoval. Následovalo opláchnutí suroviny destilovanou vodou a poté odstředění. Při extrakci byla surovina po dobu 15 hodin míchána s destilovanou vodou o teplotě 45°C. Po uplynutí doby extrakce byla surovina ochlazená na 23°C, smíchána s aktivním uhlím a poté přefiltrována. Následně byla surovina koncentrována vakuovým odpařením pomocí rotační odparky. Koncentrovaná surovina byla sušena lyofilizací a poté rozemleta, tímto způsobem byla získána želatina [16].

### **Želatina z tlamouna nilského**

Kousky kůže byly namočený v roztoku NaOH po dobu 1 hodiny, aby došlo k odstranění všech nekolagenních proteinů a následně byly důkladně omyty vodou. Po těchto předúpravách byly kousky kůže kondicionovány třemi různými způsoby: (1) CH<sub>3</sub>COOH: surovina byla opracována v CH<sub>3</sub>COOH po dobu 3 hodin při teplotě místnosti. Kousky kůže byly opláchnuty demineralizovanou vodou, dokud nebyla voda neutrální, (2) horkou vodou: surovina byla opracována v destilované vodě, (3) pepsinem: surovina byla namočena v destilované vodě, potom bylo pH vody upraveno na 2,0 pomocí roztoku CH<sub>3</sub>COOH, a byl přidán enzym pepsin. Surovina byla opracovávána ve vodní lázni při konstantní teplotě 37°C po dobu 1,5 hodiny. V dalším kroku byly vzorky opracovávány při 90°C po dobu 10 minut, aby se inaktivoval enzym, a poté byly pomalu ochlazeny na teplotu místnosti a pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 7,0. Roztoky byly extrahovány ve vodní lázni při konstantní teplotě 55°C po dobu 6 hodin a následně filtrovány. Nakonec byla želatina vakuově sušena [17].

### **Želatina z katly obecné**

Plynové měchýře byly nařezány na malé kousky a použity pro extrakci. Tyto kousky měchýřů byly ošetřeny roztokem NaOH a poté roztokem H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Kyselinou ošetřené měchýře byly opakovaně promývány vodou, dokud nebylo pH promývací vody neutrální. Plynové měchýře byly poté ošetřeny C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>. Ošetření C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> a opláchnutí vodou se opakovalo, přičemž konečné pH promývací vody muselo být opět neutrální. V dalším kroku byly plynové měchýře extrahovány destilovanou vodou pomocí vodní lázně o konstantní teplotě. Získaný želatinový roztok byl deionizován za použití pryskyřice [7]. K filtrovanému roztoku byla přimíchána pryskyřice a roztok byl udržován ve vodní lázni. Po ochlazení byla vodivost kaše měřena pomocí vodoměru. Proces byl opakován, dokud nebyla získána požadovaná vodivost. PH filtrátu bylo změřeno a upraveno pomocí roztoku H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Výsledný filtrát byl zahuštěn v rotační odparce, aby se snížil objem. Koncentrovaný roztok byl sušen v sušárně, dokud nebyly získány suché želatinové listy [18].

### **Želatina z kostí a šupin pražmy**

Rozmrazené šupiny byly opracovány NaCl po dobu 30 minut a NaOH po dobu 1 hodiny, aby se odstranily nekolagenové proteiny. Po alkalickém ošetření byly třikrát opracovány v isobutylalkoholu po dobu 30 minut, aby se odstranil tuk, s promytím destilovanou vodou mezi jednotlivými kroky. Minerální obsah byl částečně odstraněn pomocí EDTA po dobu 12 hodin. V další fázi byly promyty a po dobu 3 hodin kondicionované 99% CH<sub>3</sub>COOH. Konečná extrakce byla provedena v destilované vodě při 60°C po dobu 12 hodin ve vodní lázni. Extrakt byl filtrován a sušen 18 hodin při 45°C. Při opracování kostí byly k odstranění přebytečných zbytků použity dva různé postupy. Kostí byly demineralizovány pomocí 37% HCl po dobu 18 hodin v prvním z postupů, zatímco v druhém postupu byly podrobeny enzymatické hydrolyze s Alcalasou po dobu 55 minut. Po demineralizaci HCl nebo Alcalasou byly kosti promyty a ošetřeny třikrát v isobutylalkoholu po dobu 30 minut, aby se odstranil tuk, mezi jednotlivými kroky byly promyty destilovanou vodou. Minerální obsah byl z kostí částečně odstraněn pomocí EDTA po dobu 12 hodin. Poté byly promyty a kondicionovány CH<sub>3</sub>COOH po dobu 21 hodin. Konečná extrakce byla provedena v destilované vodě při 60°C po dobu 12 hodin. Extrakty byly filtrovány a sušeny při teplotě 45°C po dobu 18 hodin v sušárně [19].

### **Želatina z hlav sumečka tečkovaného**

Suchý kostní prášek byl opracován roztokem HCl při 23°C za mírného míchání. Roztok kyseliny byl v pravidelných intervalech obměňován. Po odstranění kyselého roztoku byl kostní prášek promýván roztokem NaOH, dokud pH nebylo zásadité, následně byla surovina ošetřena Ca(OH)<sub>2</sub>, a nakonec promyta vodou. Takto připravená surovina byla extrahována při odpovídajícím pH třemi sekvenčními kroky. První kostní želatina byla extrahována v roztoku o pH 4,0, druhá a třetí želatina byla extrahována roztokem o pH 2,5 respektive pH 3,0. Extrahovaný roztok byl filtrován a následně zahuštěn v rotační odparce [20].

### **Želatina z kůže tří kultivovaných sladkovodních ryb**

Pro extrakci želatiny z kůže a kostí savců byl speciálně navržen proces vápnění, který obvykle trvá několik dní až čtyři měsíce v závislosti na použité koncentraci a teplotě [2]. Nicméně, v roce 2002 byl patentován zdokonalený alkalický způsob přípravy typu B rybí želatiny [74]. Tento nový proces spočíval v počátečním extrakčním kroku vápněním po dobu 42 dnů, po kterém může následovat proces kyselé extrakce [28]. Kvalita želatiny s ohledem na pevnost a viskozitu může být výsledkem vztahu mezi koncentrací alkalického roztoku, teplotou a dobou kondicionování. Silnější kondicionování vápněním obvykle vede k vyšší viskozitě [1]. Rybí kůže byly promyty pod tekoucí vodou z vodovodu, aby byly odstraněny nadbytečné materiály. Promyté kůže byly usušeny a namočeny v nasyceném roztoku Ca(OH)<sub>2</sub> při 23°C po dobu 14 dnů. Po namočení byly kůže promyty teplou vodou z vodovodu, aby se odstranil nadbytek Ca(OH)<sub>2</sub>. Kůže byly udržovány na hodnotě pH 10,0. Takto připravené kůže byla namočeny v teplé destilované vodě přes noc, aby se vyextrahovala želatina. Roztok byl poté filtrován, a následně prošel silně kyselou katexovou pryskyřicí, která snížila pH želatiny na přibližně 5,0. Filtráty byly poté lyofilizovány [21].

### **Želatina z velbloudích kostí**

Nejprve byla provedena předúprava a poté samotná demineralizace. Proces demineralizace byl proveden namočením odtučněných drcených kostí v různých koncentracích roztoků HCl, při různé době trvání a to mezi 1 až 5 dny za 23°C. Vzorky demineralizovaných kostí byly odstředěny, promyty destilovanou vodou, a potom sušeny při 50°C po dobu 24 hodin. Takto upravené velbloudí kosti byly kondicionovány v 6% HCl po dobu 3 dnů při 23°C. Kyselina byla důkladně odstraněna opláchnutím vzorků vodou z vodovodu a destilovanou vodou. Želatina byla extrahována za různých podmínek. Želatinový roztok byl filtrován a poté lyofilizován [22].





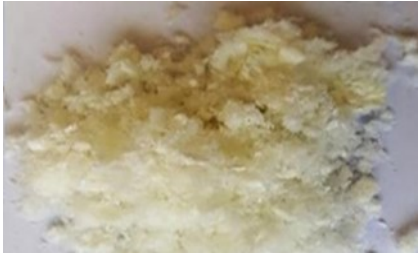

### **Želatina z kůží tuňáků, žab a kuřat**

Kůže z tuňáků, kuřat a žab byly rozřezány na kousky a promyty studenou vodou z kohoutku. Želatina z tuňáků byla extrahována podle podmínek viz [75] s drobnými úpravami. Pro odstranění nadbytečného materiálu a snížení obsahu tuku byly rozmrazené kůže promyty a ošetřeny teplou vodou z vodovodu. Před extrakcí byly kůže namočeny v roztoku NaOH při 23°C po dobu 2 hodin a následně promyty. Poté byly neutralizované kůže namočeny do roztoku CH<sub>3</sub>COOH při 4°C po dobu 12 hodin a pomalu míchány. V dalším kroku byly neutralizovány destilovanou vodou. Pro konečnou extrakci byly kůže namočeny v destilované vodě při 45°C po dobu 12 hodin [23].

Želatina z žabích kůží byla připravena úpravou postupu podle podmínek viz [76]. Žabí kůže byly namočeny v roztoku NaOH při 4°C po dobu 1,5 hodiny a následně neutralizovány. Kůže byly poté za stálého míchání namočeny v roztoku CH<sub>3</sub>COOH po dobu 3 hodin při 23°C. Neutralizace byla znovu provedena pomocí vody z vodovodu. Konečná extrakce byla prováděna za míchání v destilované vodě po dobu 12 hodin při 45°C [23].

Extrakce želatiny z kuřecích kůží byla provedena podle podmínek viz [77] s malými úpravami. Viditelný tuk na kůžích byl odstraněn a opláchnut ve vodě. Kůže pak byly sušeny před odtučněním za použití 30% isopropanolu při 23°C po dobu 2 hodin a při nepřetržitém třepání [78]. K odstranění alkalicky rozpustných proteinů odtučněných kuřecích kůží byly vzorky namočeny v alkalickém roztoku NaCl za mírného míchání po dobu 30 minut při 23°C. Hodnota pH směsi byla upravena na 10,5-10,7 pomocí roztoku NaOH. Poté byla směs zfiltrována a následně namočena v 5% HCl po dobu 24 hodin při 23°C a opláchnuta tekoucí vodou z vodovodu do získání neutrálního pH. Finální extrakce vodou byla provedena ve vodní lázni. Extrakční teplota se postupně zvýšila z asi 45 na 65°C a udržovala se tam po dobu 15 hodin. Všechny extrakty byly skladovány při -80°C před filtrací po dobu maximálně 14 dnů [23].

Na obrázku 4 pak můžeme vidět obrázky všech tří vstupních surovin a jednotlivých želatin z nich získaných spolu s důležitými kvalitativními a funkčními parametry.

					
Kuřecí kůže		Kůže z tuňáka		Žabí kůže	
Výsledné želatiny z jednotlivých kůží					
					
<b>Kvalitativní parametry</b>	Obsah bílkovin		Tuk vázací kapacita		<b>Funkční parametry</b>
	Obsah hydroxyprolinu		Vodu zadržující kapacita		
	Pevnost gelu		Pěnotvorná kapacita		
	Viskozita		Stabilita pěny		
	Teplota tání		Emulzifikační kapacita		
	Teplota tuhnutí		Stabilita emulze		
	Barva a pH		Texturní vlastnosti		

Obrázek 4: Vstupní surovina a následná vyextrahovaná želatina s popisem jednotlivých důležitých parametrů [23]



## 2 FUNKČNÍ VLASTNOSTI ŽELATINY

Dosud bylo identifikováno asi 27 typů kolagenu. Kolagen typu I se nachází v pojivové tkáni, jako jsou kosti, kůže a šlachy. Kolagen typu II se vyskytuje prakticky jen v tkáních chrupavky. Kolagen typu III silně souvisí s věkem, velmi mladá pokožka obsahuje až 50%, čím je pokožka starší tak ho ubývá. Jiné typy kolagenu, které je pouze a často orgánově specifické, jsou k dispozici v omezeném množství. Želatina je ve vodě rozpustný materiál získaný z vláknitého proteinového kolagenu, který je hlavní složkou zvířecích kostí, kůže a pojivových tkání. Zdroj, typ kolagenu a věk živočišného druhu jsou tedy faktory, které ovlivňují vlastnosti želatiny. Částečná hydrolýza nativního kolagenu vytváří želatinu, která je kombinací opakujících se vláknem tripletů Gly-X-Y, kde X je často prolin a Y hydroxyprolin, který stabilizuje strukturu kolagenu, respektive kombinací Gly-Pro-Y, Gly-X-Hyp a Gly-Pro-Hyp, přičemž přechodová teplota  $(\text{Gly-X-Hyp})_n$  je vyšší než teplota  $(\text{Gly-Pro-Y})_n$  [2].

Lze tedy říci, že kvalitu želatiny pro konkrétní aplikaci do značné míry ovlivňují její reologické vlastnosti. Kromě základních fyzikálně-chemických vlastností, kterými jsou složení, rozpustnost, průhlednost, barva, zápach a chuť, jsou hlavními atributy, které nejlépe definují celkovou komerční kvalitu želatiny, pevnost gelu a tepelná stabilita (teploty gelovatění a teploty tání). Pro účely standardizace se měření síly gelu stanoví pomocí tak zvaného Bloomova testu. Jak síla gelu, tak termostabilita jsou do značné míry závislé na molekulárních vlastnostech želatiny, zejména s ohledem na dva hlavní faktory: (1) složení aminokyselin, které je druhově specifické, a (2) distribuce molekulové hmotnosti, která závisí hlavně na podmínkách zpracování, za jakých je extrakce prováděna, záleží tedy například na pH, teplotě nebo čase [33]. Kvalita aminokyselin v želatině určuje jedinečné vlastnosti, funkčnost želatiny a způsobuje rozdíly mezi želatinami, které jsou hlavně způsobeny odlišným složením aminokyselin, jakož i obsahem prolinů a hydroxyprolinu (imino kyselina). Hydroxyprolin je derivát prolinů a oba jsou odpovědné za stabilitu struktury kolagenu tvorbou vodíkových vazeb v jeho struktuře. Obsah imino kyselin je také zodpovědný za teploty tání a gelovatění želatiny. Čím nižší je obsah imino kyselin, tím nižší jsou teploty tání a gelovatění želatiny, takže množství obsahu aminokyselin rozlišuje a identifikuje různé typy zdrojů želatiny [29] viz tabulka 1. Množství imino kyseliny v želatině získané z kůže drůbeže [12] je vyšší než u savců [30] a ryb [31]. Různé typy želatiny mají různé fyzikálně-chemické vlastnosti, které ovlivňují tepelné a reologické vlastnosti, včetně například pevnosti či teploty tání, tuhnutí gelů [32].

Tabulka 1: Obsah aminokyselin v různých typech želatin [3]

Aminokyselina	Vepřová želatina <sup>1</sup> (%)	Kachní želatina <sup>2</sup> (%)	Kuřecí želatina <sup>3</sup> (%)	Krutí želatina <sup>4</sup> (%)	Kachní želatina <sup>5</sup> (%)	Kuřecí želatina <sup>6</sup> (%)
Alanin	8,30	9,84	10,08	12,99	8,12	10,11
Arginin	8,50	7,87	5,57	5,74	5,67	N
Kys. asparagová	6,00	4,81 <sup>7</sup>	2,11	5,82	2,72 <sup>8</sup>	4,24
Cystein	0,20	0,02	0,16	N	N	N
Kys. glutamová	10,50	10,63 <sup>9</sup>	5,84	8,66	5,53 <sup>10</sup>	3,13
Glycin	20,20	26,04	33,70	35,14	29,81	31,51
Histidin	0,80	0,97	0,30	0,58	0,70	N
Hydroxylysin	1,20	N	N	N	N	2,25
Hydroxyprolin	10,80	12,78	12,13	N <sup>11</sup>	10,70	9,24
Isoleucin	1,30	1,10	1,15	2,35	1,14	N
Leucin	2,90	2,70	2,63	1,36	2,50	3,47
Lysin	4,00	2,88	4,66	2,99	1,75	2,41
Methionin	1,10	1,34	0,07	0,89	1,47	1,12
Fenylalanin	2,10	2,19	1,77	1,65	1,84	3,16
Prolin	13,40	8,84	13,42	13,87	10,68	17,60
Serin	3,60	2,50	2,20	2,57	3,75	1,43
Threonin	1,90	2,94	1,01	2,10	2,37	N
Tryptofan	N	N	0,04	N	N	1,23
Tyrosin	0,80	0,72	1,22	0,43	0,46	0,96
Valin	2,40	1,85	1,94	2,24	2,00	1,30
Imino kyselina	24,20	21,62	25,55	N	21,39	26,50

1. Želatina z vepřových kůží [30].
  2. Želatina z kachních kůží extrahované CH<sub>3</sub>COOH [34].
  3. Želatina z kuřecích kůží extrahované za použití roztoku NaOH, pak H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [12]
  4. Želatina z krutího kostního separátu extrahované HCl při 7°C [35]
  5. Želatina z kachních nohou extrahované za použití CH<sub>3</sub>COOH [36]
  6. Želatina z kuřecích běháků extrahované za použití CH<sub>3</sub>COOH [37]
  7. Kyselina asparagová.
  8. Kyselina glutamová.
  9. Kyselina asparagová + Asparagin
  10. Kyselina glutamová + Glutamin
  11. Obsahu hydroxyprolinu 11,2% v želatině extrahované z krutí hlavy [4]
- N – nedetekováno

Fyzikální vlastnosti želatiny ovlivňují její kvalitu a potenciální aplikaci, protože se vztahují ke struktuře želatiny [38]. Strukturální vlastnosti želatiny byly studovány různými metodami, jakými jsou například reologie [39], skenovací a transmisní elektronová mikroskopie (SEM a TEM) [40], infračervená spektroskopie Fourierovy transformace (FTIR) [41], nebo diferenciální skenovací kalorimetrie [43]. V poslední době se věnovala ve vědě o potravinách velká pozornost studiu struktury na úrovni nanorozměrů. V této oblasti byla mikroskopie atomové síly úspěšně aplikována na studium struktury želatiny získané ze savčích zdrojů [39] a v poslední době i z rybích kůží [38]. Klasická potravinářská, fotografická, kosmetická a farmaceutická aplikace želatiny je založena především na gelových a viskoelastických vlastnostech. V souladu s rostoucím trendem nahradit syntetická činidla přírodnějšími, bylo zejména v potravinářském průmyslu nalezeno použití pro želatiny ve výrobcích, jako jsou emulgátory, pěnicí činidla, koloidní stabilizátory, čerící prostředky, biologicky rozložitelné obalové materiály a mikroenkapsulační činidla. V mnoha případech jsou tyto studie navíc zaměřeny na používání kolagenu a želatiny z alternativních zdrojů. Enzymem hydrolyzovaný kolagen hraje stále důležitější roli v různých produktech a aplikacích, pro které ještě před deseti lety nebyl známý [42].

Kromě základních hydratačních vlastností, jako je bobtnání a rozpustnost, lze nejdůležitější vlastnosti želatiny rozdělit do dvou skupin: I) vlastnosti spojené s jejich gelovacím chováním, tj. Tvorba gelu, texturizace, zahušťování a schopnost vázat vodu a II) vlastnosti související s jejich povrchovým chováním, které zahrnují tvorbu a stabilizaci emulze a pěny, adhezi a soudržnost, funkci ochranného koloidu a schopnost tvorby filmu [2].

## 2.1 Želírování a vázání vody

Tvorba gelu, viskozita a struktura jsou úzce související vlastnosti určené hlavně strukturou, molekulovou velikostí a teplotou systému. Nejrozšířenější jednorázové použití želatiny v potravinářských výrobcích je v dezertech, a to především díky její jedinečné schopnosti vytvořit tuhou fázi, která se pomalu rozpouští v ústech. Některé další hydrokoloidy mají také termo-reverzibilní vlastnosti, ale obecně se taví při vyšších teplotách. Želatinové dezerty vyrobené z různých želatin mají rozmanitou strukturu a vyznačují se různorodými vlastnostmi při tání gelu, což nabízí velké možnosti pro vývoj produktů [42]. Ukázalo se například, že dezerty vyrobené ze želatiny pocházející z rybí kůže jsou velmi podobné dezertům z želatiny pocházející z vepřové kůže s vysokou hodnotou Bloom. Navíc nižší teplota tání v gelových dezertech vyrobených z rybích želatin může urychlit uvolnění chuti. Nové textury a vzhled,

kteří nabízejí širokou všestrannost ve vývoji produktů, lze zajistit zavedením plynné fáze do produktů na bázi želatiny, jako jsou ovocné želé nebo marshmallows. Kromě toho rozptýlený vzduch způsobuje, že části jsou méně kalorické [44].

Želatinové nebo kolagenové řetězce v roztoku mohou být kovalentně zesílené za vzniku matic schopných botnání v přítomnosti vodných roztoků, čímž se vytvoří to, co je obecně známé jako želatinové hydrogely. Hydrogely, které se vyznačují svou hydrofilností a nerozpustností ve vodě, mají schopnost botnat na rovnovážný objem při zachování jejich tvaru. Použitými chemickými zesilovacími činidly mohou být buď relativně malé bifunkční molekuly nebo polyfunkční makromolekuly, jako je například glutaraldehyd, což v současné době nabývá na významu v oblasti medicíny, farmacie, zemědělství a biodegradovatelných potravin [45]. Želatina je zvláště atraktivní pro vytváření hydrogelových obalů, protože je relativně levná, biologicky rozložitelná a její struktura usnadňuje vícenásobné kombinace molekulárních interakcí. Bylo prokázáno, že vlastnosti želatin-pektinových hydrogelů silně závisí na pH v reakční směsi a na rovnováze náboje (určeno poměrem želatina-pektin), což ovlivní stupeň elektrostatických asociací a iontových interakcí v gelujícím systému [46].

Velmi dobré botnavé vlastnosti želatinových hybridních hydrogelů, vyrobených smícháním ze syntetickými polymery byly zkoumány, zejména s ohledem na jejich botnavost, rychlost degradace a kontrolované uvolňování léčiv [47]. Vysoká schopnost botnání a vázání vody z solubilizovaného kolagenu a želatiny z nich činí vhodné materiály pro snížení ztráty kapek a zvýšení šťavnatosti ve zmrazených rybách nebo masných výrobcích při rozmrazování nebo vaření, lze ji tedy využít všude tam kde denaturovaný protein utrpěl částečnou ztrátu své schopnosti zadržovat vodu. Kolagenního materiálu z lyofilizované kůže platýse byl například použit ke zlepšení sensorických vlastností a schopnosti zadržovat vodu tresky během skladování [48]. Zlepšení sensorických charakteristik bylo způsobeno nejen prevencí ztráty kapek, ale také tím, že po zahřátí se kolagenní materiál želatinoval, což mu poskytlo mnohem více žádoucí texturu než části bez tohoto materiálu.

Teplotu gelovatění a tání ovlivňují především takové vlastnosti jako jsou průměrná molekulová hmotnost a zejména distribuce  $\alpha$ ,  $\beta$  nebo  $\gamma$  řetězců. Tyto charakteristiky mají dopad na fyzikální vlastnosti výsledné želatiny. Například jakákoli želatina obsahující vyšší množství  $\alpha$ -řetězců vykazuje větší gelovou odolnost. [33]

Viskozitu ovlivňují některé faktory během výroby většinou v souvislosti s molekulovou hmotností, distribucí velikosti molekul a pH želatiny, takže nejnižší viskozita byla pozorována při pH 6,0 až 8,0. Pokud bylo pH během výroby mimo tento rozsah, viskozita se zvýšila. Větší množství zesíťovaných sloučenin, jako je  $-\beta$  a  $-\gamma$  v želatině, zvyšuje viskozitu a Bloom [49].

## 2.2 Povrchové vlastnosti

Povrchové vlastnosti kolagenu a želatiny jsou založeny na přítomnosti nabitých skupin v proteinových postranních řetězcích a na určitých částech kolagenové sekvence obsahující buď hydrofilní nebo hydrofobní aminokyseliny. Jak hydrofobní, tak hydrofilní části mají tendenci migrovat směrem k povrchům, čímž se snižuje povrchové napětí vodných systémů a vytváří se požadovaný identicky nabitý film kolem složek dispergované fáze, který může být navíc zesílen tvorbou gelu [2].

Pozoruhodné vlastnosti aktivního povrchu želatiny z něj činí vhodného kandidáta na pěnicí, emulgační (emulgátor v emulzích olej ve vodě) a zvlhčovací činidlo v potravinářských, farmaceutických a lékařských a technických aplikacích. [42]. Emulgační a pěnicí vlastnosti želatiny jsou výsledkem existence hydrofobních segmentů na jejích peptidových řetězcích [50]. Vzhledem k tomu, že vlastnosti želatinového emulgátoru jsou nižší než u běžných povrchově aktivních látek, jako jsou globulární proteiny a arabská guma, vytvářejí velké kapky, pokud jsou použity samostatně v procesu homogenizace [51]. Vlastností želatinového emulgátoru mohou být modifikovány dvěma způsoby, a to buď modifikací hydrofobních spojení nepolárních postranních pásem, anebo použitím ve spojení s aniontově povrchově aktivními látkami [52].

Zejména v případech, jakými jsou emulgované prášky je za potřebí emulsifikačních a pěnotvorných vlastností želatin [37]. V takových prášcích se během procesu emulgace pro tento účel úspěšně využívají jak povrchově aktivní vlastnosti, tak tvorba želatinového filmu. Požadované vlastnosti želatiny včetně gelace a stabilizace se používají v následných zapouzdřovacích procesech. Během ochlazování marshmallows se gelatinující vlastnosti želatin aplikují ke stabilizaci pěny. U želatinou napěněných potravin, jako je zmrzlina, se jedinečné chování gelu roztaví při teplotním rozmezí 10-30°C, což způsobí roztavení želatinových gelů v ústech. Vlastnosti, díky které je želatina jedinečnou přísadou pro většinu aplikací, jsou nejen její aktivní povrchové vlastnosti, ale taktéž kombinace povrchových, reologických a chemických vlastností [53].

Želatiny typu A s relativně vysokým izoelektrickým bodem jsou vhodné pro vytváření emulzí typu olej ve vodě s kladným nábojem v širším rozmezí hodnot pH, než je možné u konvenčních proteinových emulgátorů, jako je sója, kasein nebo syrovátkové proteiny [54]. Želatina a rozpustný kolagen vykazují vhodné pěnové vlastnosti i bez gelovatění, protože jsou schopny snížit povrchové napětí na rozhraní kapalina / vzduch zvýšením viskozity vodné fáze [2]. Pěnové vlastnosti do značné míry závisí na vlastnostech suroviny. Důvodem pro významně vyšší stabilitu pěny želatiny z kuřecí kůže, než hovězí želatiny jsou vyšší hydrofobní aminokyseliny, jako je prolin, fenylalanin, leucin a isoleucin.[55]

### 2.3 Filtrovací vlastnosti

Želatina byla taktéž studována z důvodu její schopnosti tvořit film a její užitečnosti jako vnějšího filmu pro ochranu potravin před sušením a vystavením světlu a kyslíku. Kromě toho existuje významný trend ve prospěch využívání biologicky rozložitelných filmů vyrobených z jedlých biopolymerů z obnovitelných zdrojů pro boj proti dopadům plastového odpadu na životní prostředí [56]. Vysoce hygroskopická povaha želatiny je její hlavní nevýhoda při zvažování použití želatinových filmů jako ochranných bariér, protože mají tendenci botnat nebo se rozpouštět při kontaktu s povrchem potravin s vysokým obsahem vlhkosti. Současný trend v navrhování biologicky rozložitelných materiálů na bázi želatiny pro balení potravin nebo biomedicínských aplikací je proto zaměřen na vývoj filmů se zlepšenými mechanickými a vodoodpudivými vlastnostmi kombinací želatiny s biopolymerem s různými vlastnostmi, jako jsou lipidy [57], polysacharidy jako gellan [58], pektiny [46], nové hydrofobní nebo hydrofilní změkčovadla [59], syntetické polymery, jako je polyvinylalkohol [60] nebo polyethylen ([61], jakož i zesilující činidla, jako je glutaraldehyd [62], transglutaminasa nebo 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) karbodiimidu (EDC) [63].

Rovněž se předpokládá, že distribuce molekulové hmotnosti a složení aminokyselin, které jsou hlavními faktory ovlivňujícími fyzikální a strukturální vlastnosti želatiny, hrají klíčovou roli v mechanických a bariérových vlastnostech výsledných filmů. Pokud želatiny pocházejí z různých druhů, je třeba věnovat pozornost také složení aminokyselin, zejména složení nejcharakterističtějších aminokyselin Gly, Pro a Hyp. Nedávná studie srovnávala filmy vyrobené ze želatiny z tuňáka a želatiny z hovězí kůže a zjistilo se, že filmy ze želatiny tuňáka, které mají nižší množství zbytků Pro + Hyp (185 vs 210), vykazovaly hodnoty deformace přibližně 10krát vyšší než hodnoty pro želatinové filmy z hovězí kůže [64].

Obohacení želatinových filmů přírodními antioxidanty, anebo antimikrobiálními látkami rozšíří funkční vlastnosti těchto biologicky rozložitelných filmů a poskytne aktivní obalový bio materiál. Na základě své schopnosti indukovat nedisulfidové kovalentní interakce s želatinovými polypeptidovými řetězci byly oxidované fenoly z okysličených extraktů z mořských řas navrženy jako přírodní netoxická zesít'ující činidla pro zlepšení dloužení filmů z rybí želatiny [65].

## 2.4 Mikrokapsle

Želatinové koacerváty s aniontovými polymery ve formě mikrokapslí jsou zvláště zajímavé, protože mohou zachycovat funkční složky v nosiči a poskytovat ochranu proti oxidaci nebo degradaci během skladování. Navíc zapouzdření mohou být použita k řízenému uvolňování funkčních složek z potravinářského výrobku nebo z bioaktivního obalu při požití v těle. Koacerváty se tvoří, když se směsný zředěný roztok želatiny a aniontového polyelektrolytu upraví na pH, při kterém mají polyelektrolyty opačné náboje. Za těchto podmínek se roztok rozdělí na vysoce koncentrovanou koacervátovou fázi ve formě mikročástic a zředěnou objemovou fázi. Kapalný koacervát obaluje buď pevné částice nebo kapky, které jsou přítomny v roztoku, a zapouzdřuje je v mikro-měřítku; proto termín „mikroenkapsulace“ [2].

Použití komplexních systémů a přírodních zesít'ovacích činidel bylo také popsáno jako prostředek pro posílení želatinových mikrokapslí. V tomto ohledu bylo prokázáno, že polyfenoly a flavonoidy pocházející z rostlin (obsažené v instantní kávě a hroznové šťávě) reagují s mikročásticemi na bázi želatiny a pektinu za oxidačních podmínek za vzniku kovalentních zesíťení. Výsledné mikročástice mají strukturu s větší mechanickou pevností a tepelnou stabilitou a menší kapacitou pro expanzi a absorpci vody, což by mohlo najít praktické uplatnění jako redukce kalorického tuku nebo pojivo s příchutí [66]. Komplexní koacervační mikrokapsle se používá k zapouzdření oleje na pečení, aby se zlepšila stabilita zmrazených pečených potravin po zahřátí díky regulaci rychlosti uvolňování oleje [67].

Lycopenový extrakt z rajčatové buničiny je vysoce citlivý na oxidační a izomerizační reakce, a pokud by byl mikroenkapsulován tak by mohl být použit i při výrobě funkčních potravinových přípravků. Uvolňování lycopenu z mikrokapslí probíhalo rychle při pH 5,5 a 7,0, zatímco žádný lycopen nebyl uvolňován při pH 2,0 a 3,5, což znamená, že nestabilní složky mohou zůstat neporušené v žaludku a poté uvolněny do střeva v celém rozsahu fyziologických hodnot pH [68].

Začlenění probiotických bakterií do funkčních potravinářských výrobků se stává stále populárnějším trendem, protože mají schopnost mít příznivé účinky na střevní mikroflóru [69]. Pro zlepšení přežití bakterií mléčného kvašení [70] a bifidobakterií byly také vyvinuty mikrokapsle na bázi želatiny, které využívají při výrobě technologii vytlačování a sprejového sušení, slouží jako ochrana proti agresivním podmínkám žaludku [71].

Dále by technologie zapouzdření mohla být použita pro vývoj aktivních obalových materiálů sloužících jako matrice pro bioaktivní sloučeniny, například rostlinné polyfenolické extrakty do želatinových filmů. Kromě ochrany aktivního potenciálu přírodního extraktu a modulace jeho uvolňování do zakrytého potravinového produktu může být zapouzdření užitečné pro účely maskování chuti a vůně, protože rostlinné extrakty mají často velmi silné aroma. Byly například včleněny nanočástice chitosanu obsahující čajový polyfenol do želatinových filmů z rybí kůže, aby jim poskytly antioxidační kapacitu, a zjistilo se, že oxidace rybího oleje je při balení s tímto kompozitním materiálem účinně zpomalena. Nanočástice velmi snížily pevnost v tahu a propustnost kyslíku ve výsledných filmech, ale zvýšily jeho propustnost pro vodní páru [72]. Kompozice želatina / (PLLA) byla navržena pro výrobu homogenních a dobře tvarovaných nanovláken pomocí elektrostatického zvláknění s použitím želatiny extrahované z rybí kůže, jako první krok ve vývoji nového materiálu s aplikacemi v biomedicínské praxi. Přidání PLLA významně zvýšilo průměry e-zvlákněných želatinových vláken, jakož i pevnost a elastické chování kompozitního vláknitého materiálu [73].



## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

### 3 CÍLE PRÁCE A VĚDECKÉ HYPOTÉZY

Kosti ze separace masa se v dnešní době považují za odpad, a proto je s nimi i takto nakládáno. Pouze v malém množství a za splnění určitých podmínek jimi můžou chovatelé krmit zvířata, ale drtivá většina končí v kafileriiích, kde dochází následně ke spálení. Přitom se jeví jako velmi slibný materiál, který by mohl být použitý k výrobě želatiny a mohl by konkurovat komerční želatině. V současné době je velmi málo literárních studií zabývajících se touto vstupní surovinou. Nalezeny byly pouze 3 literární práce, které se zabývaly opracováním pomocí demineralizace, a to A. Erge, Ö. Zorba [5], Rafieian a kol. [79], Rammaya a kol. [80], a pouze Mokrejš a kol. [81] se zabývají enzymatickým opracováním. Kombinace obou těchto postupů prozatím nebyla vůbec zkoumána. Cílem této diplomové práce nebylo tedy jen navázat na předchozí bakalářskou práci [94], ale hlavně ji rozšířit o postup demineralizace a následně takto získané jednotlivé frakce želatiny podrobit řadě analýz, důležitých pro posouzení jejich použití v průmyslu. K optimalizaci podmínek extrakce byla použita metoda Taguchi design, což je metoda více faktorových experimentů, která se využívá i v průmyslu a umožňuje snížení nákladů tím, že minimalizuje počet potřebných experimentů na takové množství, abychom byly schopni ze získaných výsledků popsat jednotlivé vlivy zkoumaných faktorů. Po předchozím studiu byly v této práci jako stěžejní faktory určeny doba a teplota extrakce, a to na třech úrovních. Na základě literárních studií a již dříve zmíněné bakalářské práce [94], která se zabývala výrobou želatiny z kostí ze separace masa pomocí enzymu, a při které byl velký procentuální podíl nerozložené suroviny. Bylo předpokládáno, že přidáním demineralizace kostí do postupu opracování suroviny, by mělo mít za následek snížení procentuálního podílu nerozložené suroviny a s tím i zvýšení celkového výtěžku extrakce. Dalším předpokladem vyzorovaným u všech předchozích prací bylo, že použití enzymu, teplota a doba extrakce ovlivňují výtěžek a samotné vlastnosti želatiny, bylo předpokládáno, že by želatina mohla dosahovat střední kvality pevnosti gelů.

Cíle práce: studium procesních podmínek na výtěžek želatin a následné analýzy kvalitativních parametrů želatin, jakými jsou pevnost gelu, viskozita, teplota tání a tuhnutí, vodu a tuk zadržující kapacita, pěnotvorná kapacita a stabilita pěny, emulsifikační kapacita a s ní spojená stabilita emulze.

## 4 MATERIÁLY A POSTUP PRÁCE

### 4.1 Kuřecí kostní separát

Kuřecí kostní separát byl poskytnut podnikem Raciola s.r.o. Uherský Brod. Jedná se o zbytky (části kostí a chrupavek), které zůstanou z výroby strojně odděleného masa. Zbytky byly v rozemletém stavu o velikosti přibližně 3 mm, což je velikost síta. Byly skladovány v mrazničce a před pokusy byly rozmrazeny.

Tabulka 2: Složení vstupní suroviny (v sušině)

Obsah sušiny (%)	Obsah bílkovin (%)	Obsah tuku (%)	Obsah popelovin (%)	Obsah kolagenu (%)
38,15	40,3	26,0	28,59	79,85

### 4.2 Přístroje, pomůcky, chemikálie

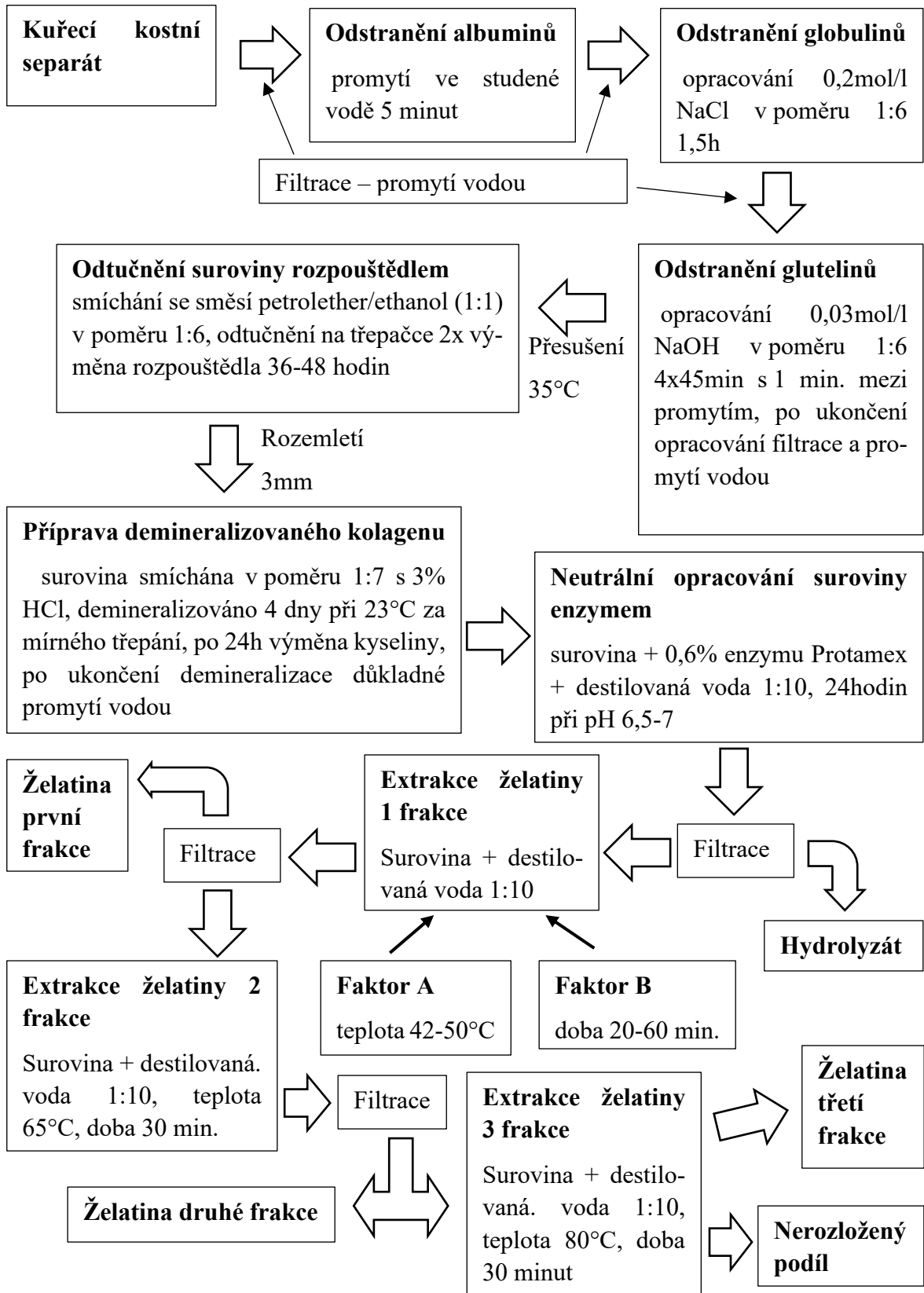
Sušárna WTB Binder, třepačka LT 3, pH metr WTW 526, elektronické analytické váhy KERN 770, elektronické laboratorní váhy 440-47, varná deska s termostatem a magnetickým míchadlem Schott a IKA C MAG HS7, Muflova pec Nabertherm, lednička, mixéry Eta a Bosch, stopky, exsikátor, plynový kahan, Sevens - LFRA analyzátor, Termostat Thermo Hauke, Ůbeleho viskozimetr, Thermo spektronick Helios  $\epsilon$ , destilační aparatura, extrakční aparatura, odstředivky firmy Hettich Zentrifugen Rotina 35 a EBA 20, vysokootáčkové míchadlo IKA T25;

Koželužská miska, odměrný válec, odměrné baňky, pipety a balónky, Petriho misky, zkumavky, tyčinky, lžičky, PA tkanina na filtraci, kuchyňské sítko, žíhací kelímky, kádinky, PE lahve, kleště, LDPE samo uzavíratelné sáčky;

0,2mol/l NaCl, 0,03mol/l NaOH, směs petrolether/ethanol, 3% HCl, enzym Protamex, sójový olej. Enzym Protamex je vyráběný Dánskou firmou Novozymes, a jedná se o komplex proteázy Bacillus vyvinutý pro hydrolýzu potravinových proteinů. Optimální pracovní podmínky jsou při pH 5,5- 7,5 a teplotě 35-60°C, enzym se dá inaktivovat za 10 minut při teplotě 85°C více viz příloha materiálový list enzymu Protamex.

### 4.3 Zpracování kuřecího kostního separátu

Blokové schéma zpracování kostního separátu na želatinu je znázorněno na obrázku 5



Obrázek 5: Zpracování kuřecího kostního separátu na želatiny

### 4.3.1 Příprava čistého kolagenu

Výchozí surovina byla vytažena z mrazničky, rozmrazena a cca 2 minuty promývána studenou vodou z kohoutku na kuchyňském sítu. Poté na 5 minut ponořena do studené vody. Po uplynutí 5 minut byla surovina opět promývána 2 minuty studenou vodou (odstranění albuminů). K surovině byl přidán 0,2 mol/l roztok NaCl v poměru 1:6 a při laboratorní teplotě za občasného míchání opracováván 1,5 hodiny. Poté byla surovina odfiltrována přes kuchyňské síto a promývána minutu studenou vodou (odstranění globulinů). K takto přichystané surovině, byl přidán 0,03mol/l roztok NaOH v poměru 1:6 a při laboratorní teplotě za občasného míchání opracováván 45 minut. Takto opracovaná surovina byla zfiltrována přes síto a minutu promývána studenou vodou. Poté byla surovina opět smíchána spolu s čerstvým 0,03mol/l roztokem NaOH a celý postup včetně promytí byl prováděn ještě 3x. Následovala filtrace suroviny přes síto s 1 vrstvou PA tkaniny a promytí cca 5 minut studenou vodou. Mechanickým vymačkáním byla surovina zbavena co největšího množství vody (odstranění glutelinů). Následně byla surovina přesušena v sušárně při teplotě 35°C po dobu 24 až 36 hodin. Surovina byla smíchána se směsí rozpouštědel petrolether/ethanol (smíchaných v poměru 1:1) v poměru 1:6. Za mírného třepání se surovina odtučňovala 1,5 až 2 dny při laboratorní teplotě, při odtučňování došlo ještě dvakrát k výměně rozpouštědla za nové. Po ukončení a odfiltrování se surovina nechala volně v digestoři k do-odpaření rozpouštědla. Takto připravená surovina byla zlehka rozemleta na vertikálním mlýnku na původní jemnost přibližně 3 mm. V tomto stavu mohla být skladována v uzavřené nádobě v temnu.

### 4.3.2 Příprava demineralizovaného kolagenu

Surovina připravená v předchozím kroku byla smíchána v poměru 1:7 s 3% HCl. Demineralizace probíhala 4 dny za mírného třepání při laboratorní teplotě. Po 24 hodinách docházelo k výměně kyseliny. Po demineralizaci byla surovina na sítku důkladně promyta tekoucí vodou a následně přesušena v sušárně při teplotě 35°C po dobu 24-36 hodin.



Obrázek 6: Demineralizovaný kolagen

### 4.3.3 Příprava želatin

Surovina získaná po předchozích krocích opracování byla smíchána s destilovanou vodou v poměru 1:10. Poté bylo doupraveno pH na hodnotu v rozmezí 6,5 až 7, byl přidán proteolytický enzym Protamex v množství 0,6% (vztaženo k sušině suroviny). Takto připravená byla mírně třepána 24 hodin za laboratorní teploty, po půlhodině bylo překontrolováno pH a případně znovu doupraveno. Toto bylo opakováno do ustálení pH na danou hodnotu. Po 24 hodinách byla surovina přefiltrována přes sítko s 3 vrstvami PA tkaniny. Kapalina – hydrolyzát byla rozlita na plech a sušena při 70°C. Materiál zachycený na sítku byl důkladně promyt studenou vodou z kohoutku, aby bylo odstraněno co největší množství enzymu. Promytý materiál se smíchal s destilovanou vodou v poměru 1:10. Extrahovalo se při teplotě podle Faktoru A, po dobu podle Faktoru B. Během extrakce bylo obsahem mícháno. Po ukončení extrakce byl materiál přefiltrován přes sítko s PA tkaninou. Želatinový roztok byl rychle zahřát na teplotu 85°C a držen po dobu 10 minut. Poté byl rozlit na plech, nejprve byl dán do lednice na 30 minut, pak přemístěn do sušárny nastavené na 40°C a sušen přes noc a nakonec dosušen 8 hodin při teplotě 65°C. Takto byla získána 1. frakce želatiny. Nerozložený materiál zachycený na sítku byl znovu smíchán s destilovanou vodou v poměru 1:10. Extrahovalo se při teplotě 65°C po dobu 30 minut. Poté byl přefiltrován a s želatinovým roztokem bylo zacházeno stejně jako již bylo popsáno dříve. Takto byla získána 2. frakce želatiny. U 3. frakce byl postup extrakce totožný jenom teplota byla 80°C a po přefiltrování už nebyl želatinový roztok zahříván, sušení probíhalo za stejných podmínek jako u předchozích dvou frakcí. Nerozložený podíl zachycený na PA tkanině byl vysušen při 103°C.



Obrázek 7: Želatina 2. frakce po vysušení

## 4.4 Analýzy meziproductů a konečných produktů

Analýza meziproductů a konečných produktů byla prováděna dle standardních zkušebních metod pro jedlé želatiny Institutu GMIA z roku 2013 [9].

### 4.4.1 Stanovení obsahu sušiny

Do zvážené koželužské misky bylo naváženo 1,5g vzorku. Koželužská miska se zvážila se vzorkem před i po vysušení. Následně se koželužská miska se vzorkem sušila v sušárně při teplotě  $103 \pm 1^\circ\text{C}$  a to do konstantní hmotnosti. Stanovení S [%] bylo provedeno 2x a vypočítáno dle vzorce.

$$S = \frac{m_1}{m_2} \times 100$$

S – obsah sušiny ve vzorku [%]

$m_1$  – hmotnost vzorku po vysušení [g]

$m_2$  – hmotnost vzorku před vysušením [g]

### 4.4.2 Stanovení zbytkového množství tuku dle Soxhleta

Do předem zvážené patrony se s přesností na 4 desetinná místa navážilo asi 2 g vzorku. Následovala extrakce 8–14 hodin v chloroformu, poté bylo rozpouštědlo oddestilováno a vzorek byl extrahován v etanolu po dobu 6–8 hodin. Množství vyextrahovaného tuku bylo zjištěno gravimetricky a přepočítáno na procentuální množství zbylého tuku ve vzorku.

### 4.4.3 Stanovení bilanční chyby

U všech vzorků byla stanovena bilanční chyba  $B_{Ch}$  [%], která byla vypočítána podle následujících vzorců.

$$B_{Ch} = 100 - B$$

$B_{Ch}$  – bilanční chyba [%]

B – celková bilance [%]

B – celková bilance [%]

$m_1$  – hmotnost sušiny vztažena na hmotnost

kuřecích kostí ze separace po opracování [g]

$m_2$  – součet získaných výtěžků H, N, Z [g]

H – hydrolyzát [g]

N – nerozložený podíl [g]

Z – želatiny [g]

$$B = \frac{m_2}{m_1} \times 100$$

#### 4.4.4 Stanovení účinnosti extrakce

Účinnost extrakce  $\eta$  [%] byla stanovena u všech vzorků a byla zjištěna podle následujícího vzorce.

$$\eta = \frac{K}{m_1} \times 100$$

$\eta$  – účinnost extrakce [%]

$m_1$  – hmotnost sušiny vztažena na hmotnost  
kuřecích kostí ze separace po opracování [g]

$K$  – kapalný podíl (želatina/hydrolyzát) [g]

#### 4.4.5 Stanovení pevnosti gelu želatin

Byl připraven vzorek gelu v předepsané nádobě o koncentraci 6,67 % (w/w). Vzorek byl umístěn do vodní lázně s teplotou  $\pm 45$  °C, dokud nedošlo k vytvoření želatinového roztoku. Následovalo vychlazení v lednici při teplotě 10 °C. Měření bylo provedeno po 16–18 h na přístroji Stevens LFRA. Byla měřena síla nutná k penetraci povrchu vzorku sondou do hloubky 4 mm rychlostí 1 mm/s.

#### 4.4.6 Stanovení dynamické viskozity želatin

Viskozita 6,67% želatinového roztoku byla stanovena měřením doby průtoku roztoku standardizovanou pipetou při teplotě 60 °C. Měření bylo provedeno na Ubbelohdeho viskozimetru a naměřená doba průtoku byla přepočítána na kinematickou viskozitu  $\nu$  [mm<sup>2</sup>/s] dosazením do níže uvedeného vzorce.

$$\nu = (k \times t - B/t)$$

$\nu$  – kinematická viskozita [mm<sup>2</sup>/s]

$k$  – konstanta viskozimetru zjištěna ověřenou kalibrační  
kapalinou

$B$  – konstanta korelace na kinetickou energii určená z  
rozměrů viskozimetru

$t$  – aritmetický průměr změřených průtokových dob [s]

Dynamická viskozita  $\eta$  [mPa.s] se vypočte podle následujícího vzorce.

$$\eta = \nu \cdot \rho$$

$\eta$  – dynamická viskozita [mPa.s]

$\nu$  – kinematická viskozita [mm<sup>2</sup>/s]

$\rho$  – hustota želatinového roztoku [g.cm<sup>-3</sup>]



#### 4.4.7 Stanovení čirosti želatiny

6,67% roztok želatiny se, po stanovení kinematické viskozity, nechal zchladnout na cca 45–50°C a v kyvetě byla změřena jeho transmitance při vlnové délce 640nm. Kalibrace byla prováděna destilovanou vodou.

#### 4.4.8 Stanovení teploty tání želatinového gelu

Vzorek byl odebrán do kapiláry s vnitřním průměrem 2-4 mm, s výškou sloupce želatiny 1,0-1,5 cm, z gelu připraveného pro stanovení pevnosti. Takto připravené kapiláry byly nechány v lednici při teplotě 10°C. Pro samotné měření byla kapilára ponořena do zkumavky s destilovanou vodou společně s teploměrem. Kádinka se zahřívala na teplotu 55 °C od laboratorní teploty do okamžiku teploty tání, během této doby byl měřen čas a poté byla rychlost ohřevu z těchto údajů vypočtena. Jakmile bylo dosaženo teploty tání želatiny, želatina se rozpustila a tlak vody ji vytlačil z kapiláry – v tomto okamžiku se odečetla teplota tání želatinového gelu.



Obrázek 8: Aparatura k měření teploty tání gelu

#### 4.4.9 Stanovení teploty tuhnutí želatinového gelu

Bylo použito analogické zařízení, jako u stanovení teploty tání gelu, ideální je použít zkumavku o vnitřním průměru 1,5-2,0 cm, čím bude zkumavka „širší“, tím méně přesné bude určení teploty, protože při chlazení okolní studenou vodou nebude docházet k dostatečnému prostupu chladu do jádra zkumavky. Roztok želatiny (po stanovení viskozity) byl nalit do

zkumavky (cca do poloviny výšky zkumavky), vsunut teploměr (čidlo) a dán do sestavy s kádinkou. V okamžiku, kdy měl roztok ve zkumavce teplotu 30 °C, byla do kádinky nalita voda (vychlazená v lednici na 4-6 °C, voda musela sahat nad vzorek ve zkumavce, tj. ideálně do 3/4 výšky zkumavky). Poté byly vhažovány ocelové kuličky (váha 0,10 g) při poklesu o 1 °C, v okamžiku, kdy klička uvízla ve vrstvě či na povrchu, byla odečtena teplota tuhnutí gelu.

**Důležité**-pro níže uvedené skupiny 4 zkoušek bylo nutné, aby vzorky želatin byly rozemlety na jemný prášek (ideálně 0,8-1,2 mm). Jakákoliv výraznější výchylka ve velikosti způsobuje odlišné výsledky zkoušek. V této práci byla velikost zrn rozemletých vzorků v následujícím průměrném procentuálním zastoupení: pod 125μm 9%, v rozmezí od 125 do 250μm 26%, mezi 250μm až 1mm 60% a nad 1mm bylo 5%.

#### 4.4.10 Vodu zadržující kapacita

Podle metody Nasrina a kol. [90] byla stanovena vodu zadržující kapacita (WHC), kdy 1,00 g vzorku byl rozptýlen v 25 ml destilované vody a zamíchán 5 minut při 23°C, odstředěn při 5000 ot/min, po dobu 30 minut, odstranění supernatantu, zvážení absorbované vody; respektive zvážení supernatantu a dopočtem. WHC [g/g] byla určena jako hmotnost absorbované vody na 1,0 g vzorku.

$$WHC = 25 - m_s$$

WHC – vodu zadržující kapacita [g/g]  
m<sub>s</sub> – hmotnost supernatantu [g]

#### 4.4.11 Tuk vázací kapacita

Podle metody Li a kol. [91] byla stanovena kapacita vázání tuků (FBC), kdy 0,10g vzorku bylo rozptýleno v 10 ml sójového oleje a důkladně zamícháno, poté stál vzorek 30 minut při 23°C, následovalo odstředění při 2500 ot/min, po dobu 30 minut, odstranění supernatantu, zvážení absorbovaného oleje; respektive zvážení supernatantu a dopočtem. Pro výpočet se musí objem vynásobit hustotou, která je 0,926 g.cm<sup>-3</sup>. FBC [g/g] byla určena jako hmotnost absorbovaného oleje na 1,0g vzorku.

$$FBC = 9,26 - m_s$$

FBC – tuk zadržující kapacita [g/g]  
m<sub>s</sub> – hmotnost supernatantu [g]

#### 4.4.12 Pěnotvorné vlastnosti

Podle metody Sathe a kol. [92] byla stanovena pěnotvorná kapacita a stabilita pěny. Zkouška byla prováděna v kalibrovaném odměrném válci, ve kterém byl rozpuštěn 1,0 g želatiny při 60°C v 50 ml vody. Po rozpuštění následovalo našlehání hřídelovým míchadlem při 10000 ot/min po dobu 5 minut. Výpočet FC [%] a FS [%] byl proveden podle následujících vzorců.

$$FC = \frac{V_1 - V_0}{V_0} \times 100$$

FC – pěnotvorná kapacita [%]

$V_1$  – objem napěněné kapaliny [ml]

$V_0$  – počáteční objem kapaliny [ml]

$$FS = \frac{V_2 - V_0}{V_0} \times 100$$

FS – stabilita pěny [%]

$V_2$  – objem napěněné kapaliny po 30 min [ml]

$V_0$  – počáteční objem kapaliny [ml]

#### 4.4.13 Emulgační vlastnosti

Podle metody Neta a kol. [93] byla stanovena emulgační kapacita a stabilita. Byl připraven 5,0 ml vodný roztok želatiny v koncentraci 10 mg/ml, poté byl homogenizován s 5 ml palmového oleje 1 minutu, následovalo odstředění emulze při 1000 ot/min, po dobu 5 minut. Výška vrstvy emulze a celkový obsah byl měřen jako emulzifikační kapacita. Poté byl vzorek zahřátý a držen 5 minut na teplotě 55°C, následovalo odstředění při 2000 ot/min, po dobu 5 minut a pak byla měřena stabilita. Výpočet EC [%] a ES [%] pak byl proveden dle následujících vzorců.

$$EC = \frac{H_1}{H_c} \times 100$$

EC – emulzifikační kapacita [%]

$H_1$  – výška vrstvy emulze [mm]

$H_c$  – celková výška obsahu [mm]

$$ES = \frac{H_2}{H_1} \times 100$$

ES – stabilita emulze [%]

$H_2$  – výška vrstvy emulze po zahřátí [mm]

$H_1$  – výška vrstvy emulze před zahřátím [mm]

#### 4.4.14 Stanovení obsahu popela

Nejprve byly žíhací kelímky předžihány v muflové peci rozežřáté na 650°C po dobu asi 10 minut. Po vychladnutí byl na analytických vahách zvážen vyžiháný kelímek a poté do něj byl navážen 1g vzorku. Kelímek se vzorkem byl nejprve umístěn nad plynový kahan, kde byl vzorek v kelímku spálen na popel a poté byl kelímek s popelem žihán v muflové peci při 650°C do konstantní hmotnosti. Po vychladnutí byl žíhací kelímek zvážen. Obsah popela  $P$  [%] byl vypočten podle vzorce.

$$P = \frac{m_p}{n} \times 100$$

$P$  – obsah popela [%]

$m_p$  – hmotnost popela [g]

$n$  – navážka vzorku [g]

Obsah popela přepočtený na sušinu  $P_s$  [%] se vypočítá podle vzorce.

$$P_s = P \times f$$

$P_s$  – obsah popela přepočtený na sušinu [%]

$P$  – obsah popela [%]

$f$  – přepočítávací faktor pro sušinu

Výpočet přepočítávacího faktoru.

$$f = \frac{100}{100 - v}$$

$f$  – přepočítávací faktor pro sušinu

$v$  – obsah vody [%]

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 5.1 Pilotní experiment

Na základě literárních studií a předchozí bakalářské práce byly stanoveny podmínky extrakce 1. frakce takto: extrakční teplota v rozmezí 60 až 80°C a doba extrakce 60 až 120 minut. 2. frakce se měla extrahovat při 90°C po dobu 90 minut a 3. frakce za varu taktéž 90 minut. Při prvním pilotním experimentu, kdy želatina byla extrahována za podmínek 60°C a 60 minut došlo k velkému rozložení kolagenu, přičemž bylo pozorováno, že k rozkladu začalo docházet kolem 40°C. Proto byl čas následujících extrakcí 2. a 3. frakce snížen na dobu 30 minut se zachováním extrakčních teplot. Výsledná surovina se jevila spíše jako hydrolyzát než želatina. Po vysušení byl z jednotlivých frakcí připraven želatinový roztok o koncentraci 6,67% na stanovení pevnosti gelu, ale ani v ledničce po 18 hodinách nedošlo ke ztuhnutí. S ohledem na toto zjištění byl navržen experiment pro určení nových podmínek extrakce. Bylo při něm použito menší množství navážky, která byla následně po opracování enzymem rozdělena na 3 části. Teplota extrakce 1. frakce byla snížena v rozmezí 45 až 55°C a to na základě pozorování prvního experimentu a doba extrakce byla stanovena na 60 minut. U 2. frakce se snížila teplota na 65°C a doba byla ponechána na 30 minut. Opět byla samotná extrakce pozorována a bylo zjištěno, že už i při teplotě 45°C po méně než 20 minutách dochází k rozkladu kolagenu. Při teplotě extrakce 50°C docházelo již k velkému rozkladu kolagenu, a proto byla teplota u 3 experimentu upravena z původních 55°C na 47°C. Z vyextrahovaných želatin 1. a 2. frakce byl po vysušení opět připraven roztok pro stanovení pevnosti gelu. Tentokrát došlo ke ztuhnutí a následné výsledky pevnosti viz tabulka číslo 3 byly taktéž dobré. Proto podle tohoto experimentu byly stanoveny nové podmínky extrakce a to takto: teplota extrakce 1. frakce v rozmezí 42 až 50°C a doba opracování od 20 do 60 minut. U 2. frakce byla teplota 65°C, u 3. frakce 80°C a doba u obou 30 minut.

Tabulka 3: Výsledky pevnosti gelu 1. a 2. frakce želatiny při jednotlivých teplotách extrakce

Extrakční teplota 1.frakce želatiny (°C)	Pevnost gelu (Bloom)	Extrakční teplota 2.frakce želatiny (°C)	Pevnost gelu (Bloom)
45	116	45	326
47	62	47	78
50	215	50	413

## 5.2 Studium vlivů procesních faktorů

Bylo provedeno celkem 10 experimentů podle faktorové metodiky  $3^2+1$ . Pro zjištění účinnosti enzymatického opracování byl proveden ještě experiment bez přídavku enzymu. Hydrolyzáty a želatiny získané extrakcí kolagenu, který byl opracován proteolytickým enzymem Protamex za různých podmínek, jsou v následující kapitole popsány a porovnány. Mezi sledované faktory patří teplota extrakce – faktor A, a doba extrakce – faktor B. Veškeré zjištěné, naměřené a vypočítané výsledky analýz vzniklých produktů jsou uvedeny v tabulkách 4 až 7. Výsledky důležitých experimentů byly zpracovány v softwaru MiniTab 19, který slouží pro statické zpracování získaných dat. Výsledky jednotlivých experimentů byly hodnoceny pomocí p-hodnoty. Faktory s hodnotou nižší než  $\alpha = 0,05$  mají vliv na hodnocené proměnné až s 95% pravděpodobností. Čím nižší je p-hodnota, tím větší je vliv procesního faktoru [83]. Graficky byly účinky studovaných procesních faktorů, kterými byly teplota extrakce (faktor A), doba extrakce (faktor B), hodnoceny Paretovými diagramy a vrstvenými grafy. Posuzovala se jejich vzájemná interakce na hodnocené proměnné, kterými byl výtěžek želatiny, síla želatinového gelu a teplota tání gelu, obrázky 10 až 19.

V tabulce 4 je uveden rozpis experimentů s technologickými podmínkami a charakterizací procesu podle faktorového schématu  $3^2+1$  experiment bez přídavku enzymu (slepý pokus). Výtěžek hydrolyzátu byl průměrně kolem 11,3%. Výtěžek želatiny 1. frakce se pohyboval v intervalu od 6,18 do 48,36 %. Nejnižší zjištěná hodnota odpovídá experimentu číslo 1 prováděného při (42°C, 20 minut). Nejvyšší hodnota patří experimentu číslo 6 prováděného při (46°C, 20 minut). V této práci bylo pozorováno, jak velký vliv na následující frakce želatiny má tepelná historie opracování kolagenu, neboť jak již bylo výše popsáno doba a teplota extrakce 2. a 3. frakce byla totožná pro všechny experimenty, avšak přitom docházelo k velkým rozdílům, a to jak ve výtěžku, tak i v pevnosti gelu. Výtěžek želatiny 2. frakce se pohyboval v rozmezí od 14,4 po 52,83 %. Nejnižší hodnoty dosahoval experiment číslo 9 prováděný při podmínkách extrakce 1. frakce (50°C, 60 minut) a nejvyšší hodnoty dosahoval experiment číslo 5 prováděný při podmínkách extrakce 1. frakce (46°C, 40minut). Výtěžek želatiny 3. frakce se pohyboval v rozmezí 2,06 po 9,03 %. Nejnižší hodnoty bylo dosaženo v experimentu číslo 2 a nejvyšší v experimentu číslo 1 při podmínkách extrakce 1. frakce (42°C, 40 minut) respektive (42°C, 20 minut). Bylo zjištěno, že celková účinnost extrakce se pohybovala v intervalu od 55,98 až do 90,32 %. Dále z této tabulky lze vyzkoušet, jak velký vliv na celkovou výtěžnost má přídavek enzymu, neboť je vidět, že slepý pokus má celkovou účinnost pouze 11,44%.

Následují tabulky 5 a 6, kdy u tabulky 6 jde o analýzy 3. frakce, respektive o mix 3. frakcí, neboť u této frakce již nebyly takové výtěžky, aby bylo možno provést všechny analýzy, proto bylo použito mixu, kdy byly smíchány 3. frakce získané za stejné teploty, ale jiné doby extrakce. Výsledky ukázaly, že lepší v pevnosti gelu je mix získaný z 3. frakcí vyrobených při teplotě extrakce 1. frakce 50°C a to s hodnotou 233 Bloom a z hodnotou 88 Bloom byl druhý mix 3. frakcí získaný při teplotě extrakce 1. frakce 42°C, u mixu 3. frakcí získaných při teplotě extrakce 1. frakce 46°C gel vůbec nevznikl, proto u tohoto mixu byly provedeny až analýzy, které souvisí s vlastnostmi povrchu želatin. Výsledky jednotlivých analýz byly podobné, je ale vidět, že vodu zadržující kapacita je o něco nižší než u 2. frakce a taktéž, že stabilita pěny je 0% s výjimkou experimentu 2, který dosahoval 12%. U tabulky 5 se jedná o analýzy 1. frakce související taktéž pouze s vlastnostmi povrchu želatin, neboť jak již bylo napsáno výše tato 1. frakce nevytvořila gel. Jde vždy o experiment získaný při době opracování 40 minut. Analýzy jednotlivých experimentů jsou si velmi podobné, jediný rozdíl je v pěnotvorné kapacitě a stabilitě pěny, kde nejvyšší pěnotvorné kapacity, která byla podobná jako u 3. frakce, dosáhl první a třetí experiment a to 8 % a stabilita pěny se pohybovala v rozmezí 0 až 4%.

V tabulce 7 jsou zobrazeny výsledky jednotlivých analýz 2. frakce. Tvorba gelů je jednou z nejvýznamnějších vlastností želatiny, a protože u žádné 1. frakce nevznikl gel, což bylo proti všem předpokladům, neboť i většina dosavadních literárních studií uvádí jako lepší první frakci. Toto zjištění bychom mohli přisoudit tomu, že se jedná o neprozkoumaný postup opracování vstupní suroviny. Proto bylo rozhodnuto vypracovat všechny analýzy pro 2. frakci, protože ta u všech experimentů gel vytvořila. Byl zde opět vidět již dříve zmíněný vliv tepelné historie opracování kolagenu, neboť jednotlivé želatiny dosahovaly různých výsledků. Nejlepšího výsledku pevnosti gelu u 2. frakcí bylo dosaženo při slepém pokusu a to 466 Bloom, ale s ohledem na výtěžek pouze 2,4%, bychom jako nejlepší mohli považovat experiment číslo 9, který byl získán za podmínek extrakce 1. frakce (50°C, 60 minut) a to 390 Bloom, nejhorší výsledek byl dosažen během experimentu číslo 2 získaný za podmínek extrakce 1. frakce (42°C, 40 minut) a to 80 Bloom. Jednotlivé následné analýzy viskozity a teploty tání kopírovaly hodnotu pevnosti gelu., kdy je vidět, že vyšších hodnot dosahují želatiny s vyšší pevností gelu. U dalších analýz už není možné pozorovat nějaký zásadní rozdíl mezi jednotlivými želatinami, výjimkou je stabilita pěny, kde opět želatiny s vyšší pevností gelu dosahovaly lepší stability.

Tabulka 4: Rozpis experimentů s technologickými podmínkami extrakce a jejich výsledky

Experiment číslo	Technologické podmínky extrakce želatiny 1.frakce		Charakterizace procesu						
	<b>Faktor A,</b> Extrakční teplota [°C]	<b>Faktor B,</b> Extrakční doba [min.]	Výtěžek hydrolyzátu [%]	Výtěžek 1.frakce želatiny [%]	Výtěžek 2.frakce želatiny [%]	Výtěžek 3. frakce želatiny [%]	Nerozložený podíl [%]	Celková účinnost extrakce [%]	Bilanční chyba [%]
1	42	20	6,65	6,18	43,73	9,03	32,64	65,59	1,77
2	42	40	13,63	25,35	49,28	2,06	8,87	90,32	0,81
3	42	60	10,59	24,49	46,77	3,16	14,22	85,01	0,77
4	46	20	11,98	48,36	24,18	2,88	11,76	87,40	0,84
5	46	40	9,21	18,19	52,83	3,95	15,56	84,18	0,26
6	46	60	12,42	40,37	30,39	3,99	12,20	87,17	0,63
7	50	20	14,70	29,11	30,78	7,21	17,75	81,80	0,45
8	50	40	13,31	30,78	26,06	8,32	21,07	78,47	0,46
9	50	60	8,87	25,51	14,40	7,2	41,87	55,98	2,15
10*	46	40	3,32	1,29	2,40	4,43	88,40	11,44	0,16

\*Slepý pokus kondicionování proběhlo bez přidavku enzymu



Tabulka 5: Rozpis jednotlivých kvalitativních analýz želatiny 1. frakce

Želatina 1. frakce									
Experiment číslo	Extrakční teplota [°C]	Doba extrakce [min]	Obsah popela [%]	Vodu zadržující kapacita [g/g]	Tuk vázací kapacita [g/g]	Pěnotvorná kapacita [%]	Stabilita pěny [%]	Emulsifikační kapacita [%]	Stabilita emulze [%]
1	42	40	1,17	2,29	8,4	8	0	46,7	92,9
2	46	40	0,88	2,19	10,9	6	2	47,6	93,3
3	50	40	1,02	2,47	12,1	8	4	48,4	94,9

Tabulka 6: Rozpis jednotlivých kvalitativních analýz želatiny 3. frakce

Želatina 3. frakce												
Extrakční teplota 80°C							Doba extrakce 30 minut					
Experiment číslo	Obsah popela [%]	Pevnost gelu [Bloom]	Viskozita [mPa.s]	Teplota tání gelu [°C]	Teplota tuhnutí gelu [°C]	Čírost [%]	Vodu zadržující kapacita [g/g]	Tuk vázací kapacita [g/g]	Pěnotvorná kapacita [%]	Stabilita pěny [%]	Emulsifikační kapacita [%]	Stabilita emulze [%]
1	0,81	88	1,9	30,8	15,3	0,9	6,8	12,2	8	0	48,4	96,7
2	–	–	–	–	–	–	2,2	10,6	20	12	48,4	96,7
3	0,48	233	2,6	34,8	16,5	2,1	7,3	11,3	16	0	48,3	96,6

Tabulka 7: Rozpis jednotlivých kvalitativních analýz 2. frakce

Želatina 2 frakce												
Extrakční teplota 65°C						Doba extrakce 30 minut						
Experiment číslo	Obsah popela [%]	Pevnost gelu [Bloom]	Viskozita [mPa.s]	Teplota tání gelu [°C]	Teplota tuhnutí gelu [°C]	Čírost [%]	Vodu zadržující kapacita [g/g]	Tuk vázací kapacita [g/g]	Pěnotvorná kapacita [%]	Stabilita pěny [%]	Emulsifikační kapacita [%]	Stabilita emulze [%]
1	0,66	274	2,2	35,3	16,6	5,5	9,32	9,8	20	16	47,5	93,1
2	0,35	80	1,6	28,9	15,0	3,5	10,1	13,1	18	8	45,8	92,6
3	0,34	125	1,8	32,3	15,3	3,6	9,73	13,9	18	10	45,8	92,6
4	0,43	143	1,9	32,8	15,5	5,4	9,46	10,7	22	18	47,5	92,9
5	0,36	105	2,0	30,4	14,9	1,8	9,56	11,7	20	8	50,8	89,7
6	0,45	262	2,9	36,8	17,1	4,8	9,61	12,3	20	16	47,5	92,9
7	0,43	269	2,6	35,1	16,4	10,1	9,92	14,7	20	18	49,2	90,0
8	0,46	284	2,7	37,9	16,7	9,5	9,81	12,5	20	16	46,6	92,6
9	0,70	390	6,8	38,4	17,6	2,3	10,9	14,6	36	24	51,6	92,1
10*	0,54	466	–	35,1	26,8	0,6	–	–	–	–	–	–

\*Slepý pokus – nebyly provedeny všechny analýzy, kvůli nedostatečnému množství vzorku

### 5.2.1 Výtěžky želatin

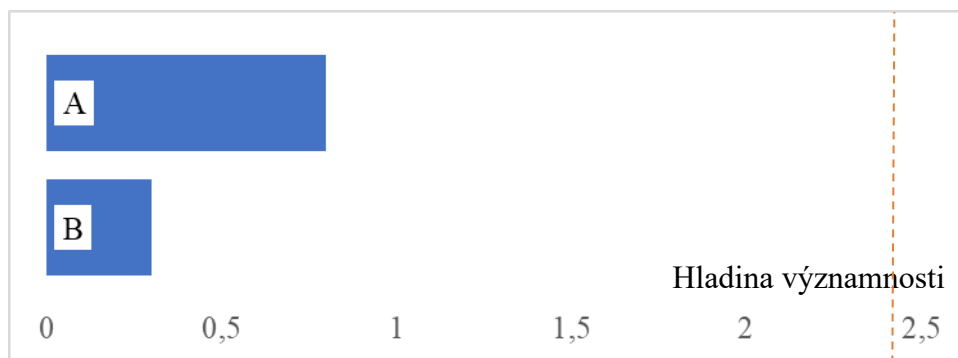
Faktor A teplota extrakce (°C), Faktor B doba extrakce (min)

#### 5.2.1.1 Výtěžek 1. frakce

Regresní rovnice výtěžku 1. frakce želatiny byla:

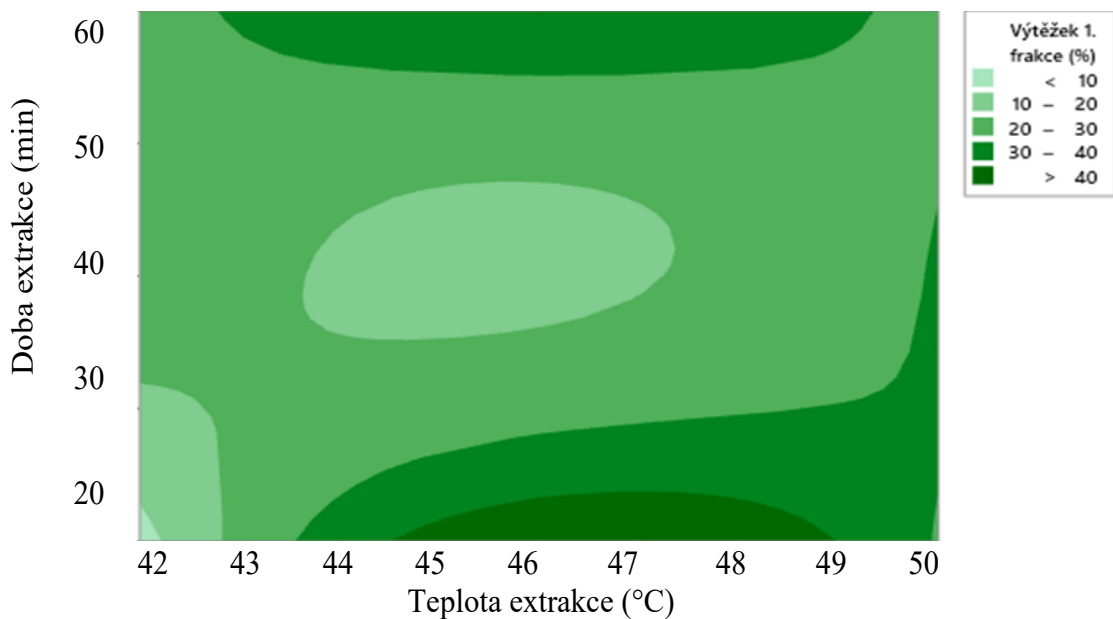
$$\text{Výtěžek 1. frakce (\%)} = -30,8 + 1,22 A + 0,056 B$$

Podle p-faktoru byla jak teplota, tak doba extrakce nevýznamné. Hodnoty činily 0,395 a 0,841.



Obrázek 9: Diagram zobrazující významnost jednotlivých faktorů na výtěžek 1. frakce

Z obrázku 9 je zřejmé, že ani jeden z parametru nedosahuje hladiny významnosti, ale je vidět, že mírně větší vliv na výtěžnost 1. frakce má teplota extrakce.



Obrázek 10: Vrstvený graf vlivů faktorů A a B na výtěžek extrakce želatiny 1. frakce

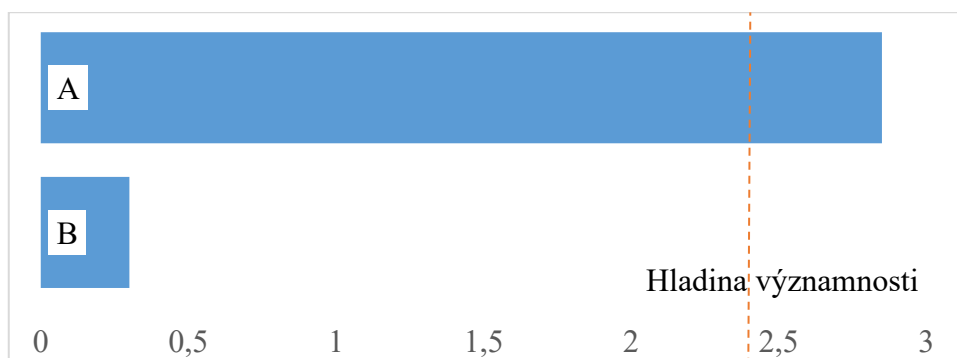
Na obrázku 10 lze vidět vrstvený graf vlivu faktorů A a B na účinnost extrakce želatiny 1. frakce. Je na něm vidět, že výtěžek želatiny roste rozmezí v teploty od 43 do 49°C a doby extrakce kolem 20 nebo poté kolem 60 minut. Nejvyššího výtěžku bylo dosaženo při experimentu číslo 4, kdy byla doba extrakce 20 minut a teplota 46°C, a to 48,36%. Dále můžeme na obrázku 10 pozorovat, že při době extrakce v rozmezí přibližně 30 až 55 minut má vliv teploty extrakce převážně opačný charakter, to znamená, že dochází spíše k poklesu výtěžku. Nejnižšího výtěžku bylo dosaženo při experimentu číslo 1, kdy doba extrakce byla 20 minut a teplota 42°C, a to 6,18%. Tento efekt bychom zřejmě mohli přisuzovat tomu, že surovina byla opracována enzymem Protamex. I když došlo k jeho důkladnému vymytí, tak se zřejmě část z něj nevymyla, a tím dochází k tomuto efektu, kdy zbylý enzym různě reaguje s kolagenem při různé době, a teplotě a tím ovlivňuje výtěžek.

### 5.2.1.2 Výtěžek 2. frakce

Regresní rovnice výtěžku 2. frakce byla:

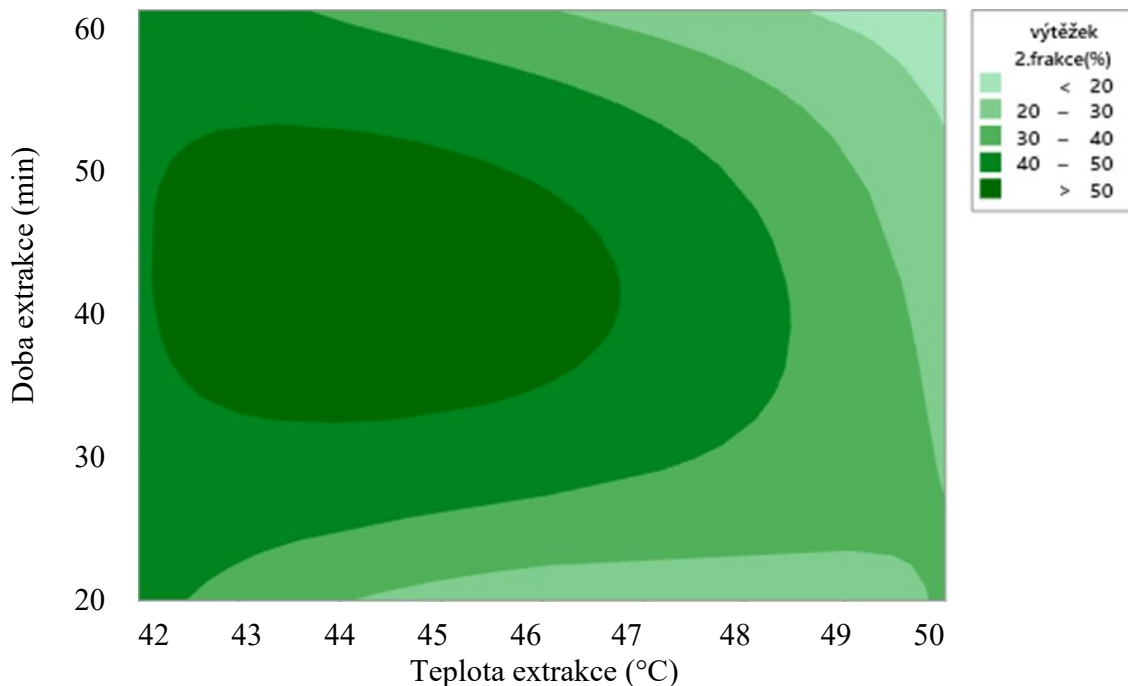
$$\text{výtěžek 2.frakce (\%)} = 169,0 - 2,85 A - 0,059 B$$

Podle p-faktoru doba extrakce nebyla významná, ale teplota extrakce byla významná při výtěžku. Hodnoty činily 0,782 a 0,032.



Obrázek 11: Diagram zobrazující významnost jednotlivých faktorů na výtěžek 2. frakce

Na obrázku 11 je vidět, jak teplota extrakce významně ovlivňuje výtěžek 2. frakce. Teplota i doba extrakce byly v tomto experimentu vztaženy k extrakci 1. frakce, takže je vidět, jak významná je tepelná historie opracování kolagenu. V porovnání s obrázkem číslo 9 by se dalo říci, že v následujících extrakcích je teplota extrakce ještě daleko významnější faktor než u první extrakce.



Obrázek 12: Vrstvený graf vlivů faktorů A a B na výtěžek extrakce želatiny 2. frakce

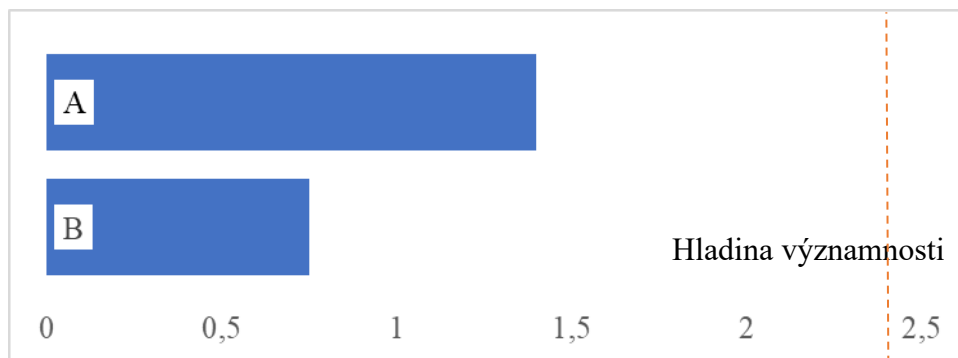
Obrázek 12 znázorňuje vrstvený graf s vlivem faktorů A a B na celkový výtěžek 2. frakce želatiny. Je na něm vidět, že oblast s největším výtěžkem, který byl získán při experimentu číslo 5 a jehož hodnota byla 52,8%, je v rozmezí 42 až 46°C a době extrakce od 30 do 50 minut. Pokud bychom tento vrstvený graf porovnávali s obrázkem 10, na němž je vrstvený graf výtěžku 1. frakce želatiny, viděli bychom, že v oblasti, kdy doba extrakce byla přibližně od 30 do 55 minut a teplota od 42 do 48°C, byl výtěžek 1. frakce malý a naopak tady v této oblasti byl výtěžek 2. frakce vysoký. Samozřejmě to platí i opačně, pokud byl v některé oblasti výtěžek 1. frakce vyšší, tady je nižší.

### 5.2.1.3 Výtěžek 3. frakce

Regresní rovnice výtěžku 3. frakce byla:

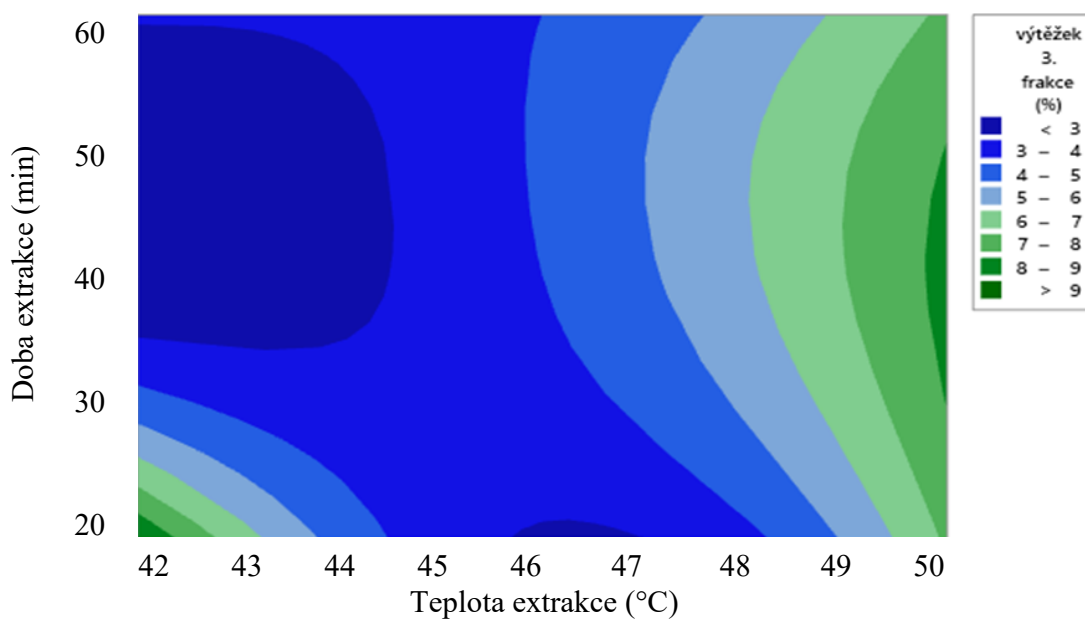
$$\text{výtěžek 3. frakce (\%)} = -9,2 + 0,350 A - 0,0392 B$$

Podle p-faktoru byla doba extrakce i teplota extrakce nevýznamná. Hodnoty činily 0,476 a 0,223.



Obrázek 13: Diagram zobrazující významnost jednotlivých faktorů na výtěžek 3. frakce

Na obrázku 13 je vidět, že ani jeden ze sledovaných faktorů nedosahuje hladiny významnosti. Je na něm vidět, že oproti předchozím obrázkům 10 a 12, je o něco významnější doba extrakce. Ale stejně jako už u výtěžku 2. frakce jsou jednotlivé faktory vztažené k extrakci 1. frakce.



Obrázek 14: Vrstvený graf vlivů faktorů A a B na výtěžek extrakce želatiny 3. frakce

Na obrázku 14 máme vrstvený graf s vlivem faktorů A a B na výtěžek extrakce želatiny 3. frakce. Tento obrázek vrstveného grafu už spíše jen dokresluje dva předchozí obrázky vrstvených grafů 11 a 13. V podstatě jen ukazuje okrajové oblasti, ve kterých v předchozích dvou případech došlo k menšímu výtěžku, tak zde je výtěžek o něco vyšší.

#### 5.2.1.4 Celková účinnost extrakce a porovnání výtěžku s literaturou

Celková účinnost extrakce se pohybovala v rozmezí od 55,98 až do 90,32 %. Pokud budeme výsledky celkové účinnosti porovnávat s literaturou, zjistíme, že se o ní nezmiňují, spíše v ní popisují výtěžek 1. frakce želatiny. V této práci bude porovnáván výtěžek 2. frakce, který se pohyboval v rozmezí od 14,4 po 52,83%, protože, jak již bylo několikrát zmiňováno výše, 1. frakce neutvořila gel.

Gál a kol. zkoumali extrakci kuřecích hlav pomocí proteolytického enzymu Polarzyme 6.0 T. Kdy nejprve byla surovina opračována 0,1% NaOH v poměru 1: 8 a poté odtučněna směsí petroletheru a ethanolu (1:1), následovalo přidání enzymu a poté extrakce při extrakční teplotě 1. frakce 80°C a době extrakce od 1 do 4 hodin, přičemž dosáhli výtěžku 1. frakce v rozmezí od 19,7% do 35,8% [14]. Dalším, kdo se zabýval ve své práci extrakcí kuřecích a krůtích byl Du a kol., kteří surovinu odtučnili 0,015 mol/l NaHCO<sub>3</sub> a předem ošetřili 0,1 mol / l roztoku NaOH a 0,05 mol/l CH<sub>3</sub>COOH. To tedy kombinuje jak alkalické, tak kyselé procesy. Želatina byla extrahována ve dvou stupních při dvou extrakčních teplotách: při 50°C po dobu 18 hodin a 60°C po dobu 6 hodin, výtěžek 1. frakce byl v tomto případě 31,2% u krůtích hlav a 24,8% u kuřecích hlav [4]. Erge a Zorba se ve své práci zabývali extrakcí mechanicky vykostěného zbytku z kuřecího masa pomocí alkalické předúpravy. Nejprve byla surovina zbavena nekolagenních zbytků pomocí destilované vody. Poté byla surovina demineralizována v roztoku 3% HCl v poměru 1:2 po dobu 24 hodin. Následovalo alkalické opračování pomocí roztoku NaOH o různých koncentracích od 1,8 do 4,2% v poměru 1:4 po dobu 48 hodin. Takto získaná surovina byla smíchána v poměru 1:3 s destilovanou vodou a následně extrahována při různých teplotách a dobách v rozmezí od 58 do 82°C respektive od 30 do 250 minut. Nejvyšší výtěžek takto vyextrahované želatiny byl 15,34% [5]. Rafieian a kol. pro demineralizaci použily opět HCl, ale při optimální podmínkách byla koncentrace kyseliny 6,73% a extrakce byla prováděna při 87°C 2 hodiny. Takto byl získán výtěžek 16,9% [79]. Podobného výtěžku želatiny 16,0% dosáhli i Rammaya a kol., kteří demineralizovali výchozí materiál 3% HCl 24 hodin, alkalicky opračovávali 4,0% NaOH, 72 hodin při 23°C a extrahovali ve vodě při pH 4,0 a 80°C po dobu 2 hodin [80]. Mokrejš a kol. nejprve mechanicky vykostěné maso opračovali v 0,2 mol/l NaCl a poté po dobu 15 hodin při 23°C v 0,03 mol/l NaOH, roztok NaOH byl měněn po 5 hodinách. Surovina byla poté v prvním kroku smíchána v poměru 1:10 s vodou, lipolytický enzym Lipoláza 100 T byl přidán v dávce 5,0% (na základě hmotnosti suroviny). Takto byla surovina opračována po dobu 48 hodin při pokojové teplotě, voda s novou dávkou enzymu byla měněna v intervalech po 12

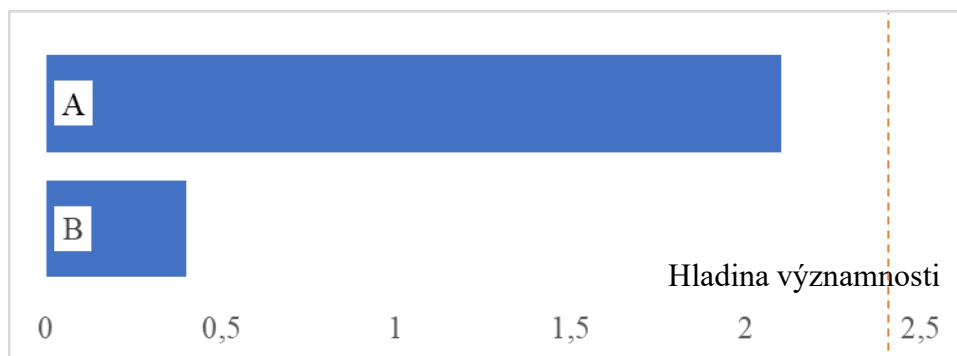
hodinách. Po filtraci a promytí studenou vodou byla surovina sušena při teplotě 35°C po dobu 24 hodin. Ve druhém kroku byla surovina smíchána v poměru 1:9 se směsí rozpouštědel etherem a ethanolem (poměru 1:1) po dobu 20 hodin při pokojové teplotě, po 12 hodinách bylo rozpouštědlo měněno. V dalším kroku byla surovina podrobena kondicionování s proteolytickým enzymem Protamex. Surovina byla smíchána s vodou v poměru 1:10 pH směsi upraveno na 6,5-7,0. Poté byla přidána endoproteáza Protamex v dávce 1,0% (na základě hmotnosti suroviny). Za optimálních podmínek zpracování 48-72 h doby kondicionování enzymem, teplotě extrakce v rozmezí 73-78°C a době extrakce od 100 do 150 minut bylo dosaženo výtěžku 1. frakce 30-32% [81]. Z tohoto porovnání lze vysledovat, že při postupu opracování použitého v této práci bylo dosaženo v nejlepším výtěžku a to až 52,83%, což je nejvíce z porovnávaných prací.

### 5.2.2 Pevnost gelu želatin 2. frakce

Regresní rovnice pevnosti gelu želatin 2. frakce byla:

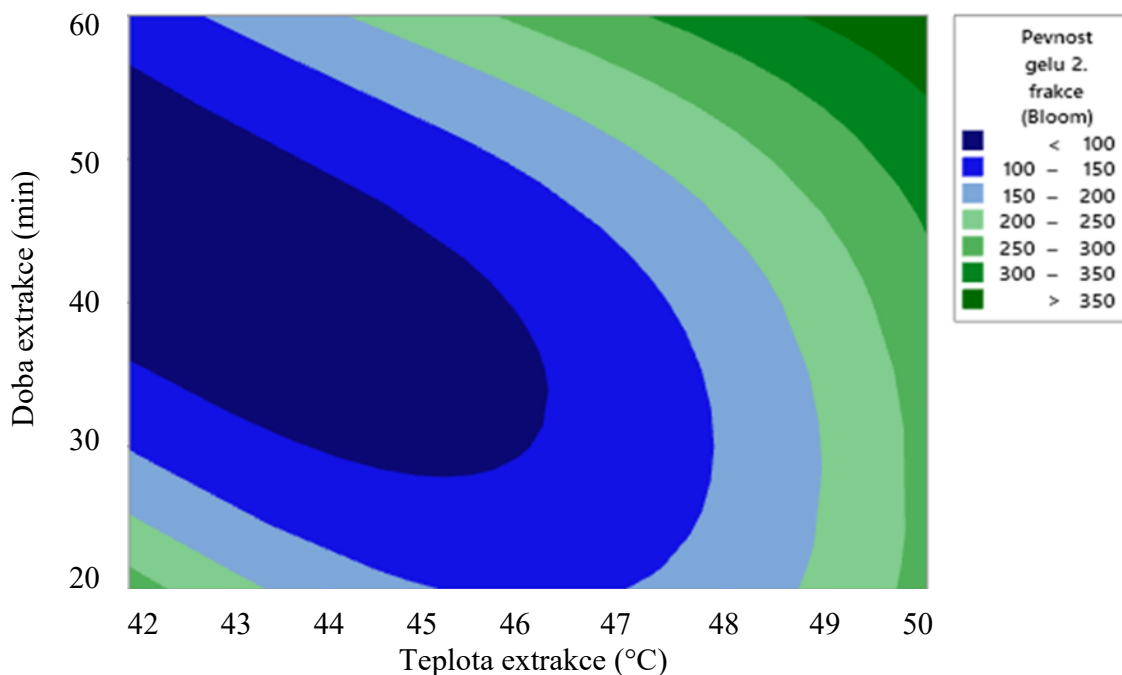
$$\text{Pevnost gelu 2. frakce (Bloom)} = -705 + 19,33 A + 0,76 B$$

Podle p-faktoru byla doba extrakce i teplota extrakce nevýznamná. Hodnoty činily 0,699 a 0,084.



Obrázek 15: Diagram zobrazující významnost jednotlivých faktorů na pevnost gelu 2. frakce. Na obrázku 15 je vidět, že i když ani jeden z faktorů nedosahuje úplně hladiny významnosti, tak teplota, respektive tepelná historie opracování ovlivňuje daleko významněji výslednou pevnost gelu.





Obrázek 16: Vrstvený graf vlivů faktorů A a B na pevnost gelu želatiny 2. frakce

Obrázek 16 nám představuje vrstvený graf vlivů faktorů na pevnost gelu. Dalo by se podle něj usuzovat, že s rostoucí teplotou a dobou extrakce 1. frakce roste i výsledná pevnost gelu 2. frakce. Nejvyšší pevnosti gelu 390 Bloom bylo dosaženo při teplotě extrakce 50°C a době 60 minut. Celkově se pevnost gelu pohybovala od 80 po 390 Bloom.

Pokud bychom tyto výsledky porovnávali s literaturou tak zjistíme, že námi zvolený postup nedosahuje nejvyšších hodnot pevnosti želatinového gelu 280-1170 Bloom, kterých bylo dosaženo postupem Erge a Zorba [5]. Je ale srovnatelný při nejlepší výsledku s taktéž vysokými hodnotami 320 až 370 Bloom, kterých dosáhli Rafieian a kol. [79]. Je vyšší než hodnoty, kterých Rammaya a kol. dosáhli při svém postupu, a to pevnosti gelu kolem 60 Bloom [80]. Mokrejš a kol. dosáhli při extrakci enzymaticky opracovaného kolagenu pevnosti gelu v rozmezí od 20 Bloom po maximálně 140 Bloom [81]. Pokud bychom se podívali na jiné části kuřete tak Gal a kol. při enzymatickém opracování vstupní suroviny, kterou byly kuřecí hlavy tak dosáhl pevnosti gelu od 113 do 355 Bloom [14]. A například AL-Kahtani a kol., kteří dosáhli při demineralizaci kostí z velblouda a následné extrakci při optimálních podmínkách pevnosti gelu 206 Bloom [22]. S toho lze vidět, že námi zvolený postup opracování a extrakce dosahuje velmi slušných hodnot pevnosti gelu i v porovnání se želatinami získaných z jiných částí kuřete, či jiných zvířat.

### 5.2.3 Viskozita a čírost

Hodnoty viskozity se pohybovaly v rozmezí od 1,6 po 6,8 mPa.s. Vyšších hodnot viskozity bylo dosaženo při vyšší hodnotě teploty extrakce 1. frakce. Z dostupné literatury se viskozitou kostí ze separace zabývali pouze Rafieian a kol. dosáhli hodnoty 5,9 mPa.s [79] a Mokrejš a kol. a ti dosáhli hodnot v rozmezí od 2,50 do 2,75 mPa.s. Gál a kol. u kuřecích hlav dosáhl hodnot viskozity v rozmezí od 1,4 do 9,5 mPa.s. a J. Choe, H.Y. Kim, kteří želatinu extrahovali z kuřecích nohou dosáhli hodnot viskozity v rozmezí od 5,1 do 7,6 mPa.s. [8]. Viskozita želatinových roztoků je částečně řízena molekulovou hmotností a polydisperzitou. Nižší viskozita želatiny může být způsobena přítomností peptidových řetězců s nízkou molekulovou hmotností v důsledku nadměrné hydrolyzy kolagenu během kroku předúpravy [82].

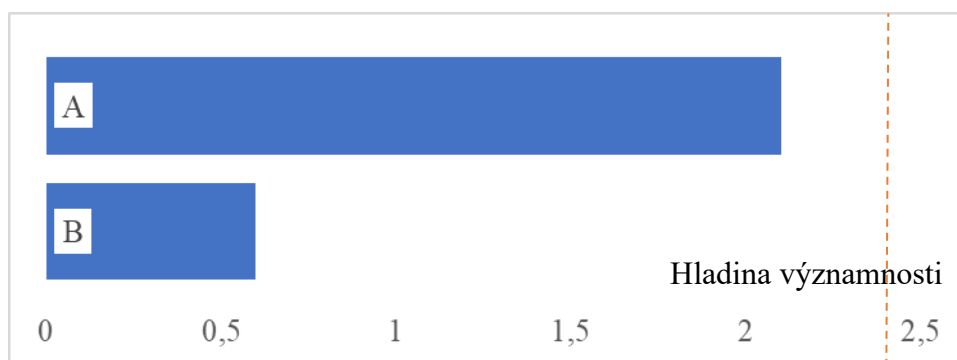
Čírost želatinového gelu je důležitá hlavně z estetického hlediska a také v závislosti na aplikaci, pro kterou je želatina určena. Hodnota čírosti byla v rozmezí 1,8 až 10,1%. Literatura se o čírosti mnoho nezmiňuje pouze Rafieian a kol. uvádí, že dosáhli 5,9% [82].

### 5.2.4 Teplota tání gelu

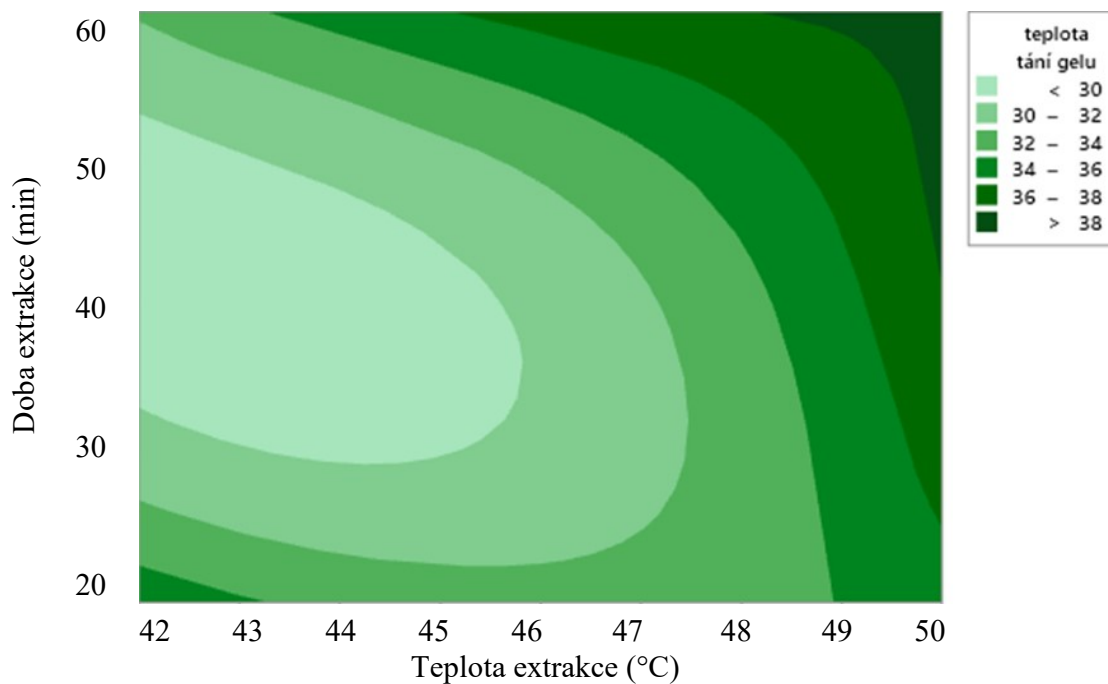
Regresní rovnice teploty tání gelu želatin 2. frakce byla:

$$\text{teplota tání gelu (}^{\circ}\text{C)} = 4,2 + 0,621 A + 0,0358 B$$

Podle p-faktoru byla doba extrakce i teplota extrakce nevýznamná. Hodnoty činily 0,558 a 0,075.



Obrázek 17: Diagram zobrazující významnost jednotlivých faktorů na teplotu tání 2 frakce. Na obrázku 17 je vidět, že hladiny významnosti nedosahuje ani jeden z faktorů, je na něm ovšem vidět, že tepelná historie extrakce 1. frakce významněji ovlivňuje výslednou teplotu tání gelů 2. frakce.



Obrázek 18: Vrstvený graf vlivů faktorů A a B na teplotu tání gelu želatiny 2. frakce

Na obrázku 18 vidíme vrstvený graf a vliv faktorů na teplotu tání gelu. Mohli bychom z něj říci, že vyšší teploty tání je dosaženo s vyšší teplotou extrakce 1. frakce. Je zde opět vidět, jako již několikrát před tím, jak tepelná historie extrakce ovlivňuje následné vlastnosti želatiny. Pokud bychom porovnali tento graf s obrázkem číslo 16, což je vrstvený graf pevnosti gelu, viděli bychom, že se v podstatě kopírují. Neboli s vyšší pevností gelu bylo dosahováno vyšší teploty tání gelu a naopak. Teplota tání gelu se pohybovala v rozmezí od 28,9°C získaného při experimentu číslo 2 a hodnotě pevnosti gelu 80 Bloom až do 38,4°C získaného při experimentu 9 a hodnotě pevnosti gelu 390 Bloom. V porovnání s literaturou, Erge a Zorba dosáhli nejlepší teploty tání želatinového gelu 33,7°C [5]. Další porovnání musí být s jinými vstupními zdroji želatiny, neboť další literární práce se při stejné surovině teplotou tání nezabývaly. Sarbon a kol., kterými byly k extrakci želatiny jako vstupní surovina použity kuřecí kůže, dosáhli teploty 33,6°C [12]. Kim a kol., kterými byly extrahovány kachní kůže pomocí různých metod zahřívání, a to vodní lázeň, sonikátor, přehřátá pára, mikrovlnná trouba, dosáhli následujících teplot tání gelu: 33,9°C, 33,3°C, 31,3°C, 32,8°C [9]. Obecně lze tedy říci, že čím je vyšší pevnost gelu tím je vyšší i teplota tání gelu, což bylo vidět i v této práci.

### 5.2.5 Teplota tuhnutí gelu

Hodnoty teploty tuhnutí se pohybovaly v rozmezí od 14,9 do 17,6°C. Nižších hodnot dosahovaly želatiny s nižší pevností gelu, ale je vidět, že rozdíl mezi jednotlivými hodnotami není příliš vysoký. V literatuře se uvádí, že Erge a Zorba dosáhli při svém experimentu teploty tuhnutí gelu 25,15°C [5]. Sarbon a kol., kteří extrahovali kuřecí kůže, dosáhli hodnoty tuhnutí gelu 24,9°C [12]. Fazilah a kol., kteří použili k extrakci jako vstupní surovinu kachní nohy, dosáhli teploty tuhnutí vzorků 26,65°C, 21,67°C, 26,1°C pro kyselé, alkalické a enzymatické opracování suroviny. Rozdíl v teplotě tuhnutí gelu vysvětluje vnitřní rozdíl ve struktuře bílkovin a různé předběžné úpravy používané při výrobě želatiny [10].

### 5.2.6 Vodu zadržující kapacita

Vodu zadržující kapacita označuje schopnost proteinu nasávat vodu a zadržovat ji proti gravitační síle v proteinové matici. Interakce vody s bílkovinami jsou v potravinářských systémech velmi důležité kvůli jejich účinkům na strukturu a chuť potravin. Hodnoty vody zadržující kapacity byly v rozmezí od 9,32 do 10,9 g/g u 2. frakce želatiny, u vybraných experimentů 1. frakce v rozmezí od 2,19 do 2,47 a u želatin 3. frakce v rozmezí od 6,8 do 7,3 g/g. V porovnání s literaturou, kde Rafieian a kol. dosáhli hodnoty 8,6 g/g [82], jsou hodnoty v této práci trochu lepší. I ve srovnání s výzkumem Shyni a kol., kteří k extrakci želatiny použili rybí kůže tuňáka pruhovaného, *Scoliodon sorrakowah* a *Labeo rohita*, byly výsledky v této práci lepší, neboť těmi bylo dosaženo hodnot ještě mnohem menších a to 2,6, 1,4 a 2,1 g/g. Při jejich výzkumu byla kůže nejprve alkalicky opracována 0,1 mol/l NaOH a poté kondicionována v 0,2 mol/l CH<sub>3</sub>COOH po dobu 24 hodin při teplotě 4°C kdy byl roztok po 12 hodinách vyměněn. Samotná extrakce probíhala při 45°C 12 hodin. [84].



Obrázek 19: Gel v horní části zkumavky po odsátí supernatantu při vodě zadržující kapacitě

### 5.2.7 Tuk vázací kapacita

Kapacita vázání tuků je funkční vlastnost, která úzce souvisí s texturou a dalšími vlastnostmi kvality potravin prostřednictvím interakce mezi olejem a dalšími složkami. Schopnost bílkovin absorbovat a zadržovat tuky a interagovat s lipidy je důležitá v potravinářských formulacích a její důležitost závisí na typu potraviny. Tato vlastnost je ovlivněna zdrojem bílkovin, podmínkami zpracování, složením přísady, velikostí částic a teplotou [82]. Hodnoty tuk vázací kapacity v této práci byly u želatiny 2. frakce v rozmezí od 9,8 do 14,7 g/g, u želatiny 1. frakce od 8,4 do 12,1 g/g a u želatiny 3. frakce od 10,6 do 12,2. Je tedy vidět, že v podstatě všechny želatiny mají stejnou tuk vázací kapacitu. Rafieian a kol. dosáhli hodnoty 0,7 g/g, kteří své experimenty taktéž srovnávali i s komerční želatinou, u které dosáhli 1,3 g/g [82]. Dále Shyni a kol. dosáhli hodnot 3,5, 3,6 a 4,5 g/g podle vstupní suroviny v pořadí tuňák pruhovaný, Scoliodon sorrakowah a Labeo rohita [84]. Je tedy vidět, že v této práci bylo dosaženo daleko vyšších hodnot, než uvádí literatura.

### 5.2.8 Pěnotvorná kapacita a stabilita pěny

Želatina se běžně používá jako pěnidlo v běžně používaných potravinách, jako jsou marshmallows a druhy předem namíchaných kávových nápojů. Díky tomu je schopnost tvorby pěny a stabilita pěny důležitá pro rozšířené aplikace. Pěnové vlastnosti proteinu mohou být ovlivněny zdrojem proteinu, vnitřními vlastnostmi proteinu, jeho složením a konformací v roztoku a na rozhraní vzduch/voda [85]. V této práci dosahovaly hodnoty pěnotvorné kapacity 2. frakce želatiny od 18 do 36% a stability pěny od 8 do 24%. Pěnotvorná kapacita u zbylých dvou frakcí želatiny byla nízká u 3. frakce dosahovala hodnot od 8 do 16% přičemž stabilita pěny byla 0% a u 1. frakce pěnotvorná kapacita od 6 do 8% a stabilita pěny byla 0, 2 a 4%. V porovnání s literaturou byly výsledky v této práci obdobné jako v práci Shyni a kol., kteří dosáhli hodnot pěnotvorné kapacity v pořadí vstupní suroviny tuňák pruhovaný, Scoliodon sorrakowah a Labeo rohita 21,5, 17,4 a 19,2%, respektive stability pěny 17,6, 10,5 a 14,4% [84]. Oproti tomu Rafieian a kol. dosáhli hodnot až 220% pěnotvorné kapacity, stabilita pěny byla 44% [82].

### 5.2.9 Emulsifikační kapacita a stabilita emulze

Hodnoty, kterých bylo v této práci dosaženo u 2. frakce želatin, byly emulsifikační kapacity v rozmezí od 45,8 do 51,6% respektive stability emulze od 89,7 do 92,9%. U 1. a 3. frakce

byly také velmi podobné hodnoty emulzifikační kapacity se pohybovaly kolem 47% a stability emulze kolem 95%. Rasli a Sarbon, kteří ve své práci extrahovali kuřecí kůži, došli k výsledku emulzifikační kapacity 56,5% a stability emulze 55,8% [86]. Je vidět, že emulzifikační stability jsou velmi podobné, ale v této práci byla stabilita téměř dvojnásobná.

### 5.2.10 Stanovení popela a obsah tuku

U všech želatin připravených v této práci byl obsah popela pod 2% nejvíce dosáhl 1,17%. Byla vytvořena posloupnost obsahu popela v surovině, po demineralizaci byl obsah 0,27%, po následné úpravě pH pomocí roztoku NaOH a opracování enzymem Protamex byl obsah popela v hydrolyzátu v průměru 24,75%, což nám ukazuje, že úpravou pH jsme do systému zanesli minerální látky. Následovalo důkladné promytí, poté samotná extrakce 1. frakce a obsah popela se snížil, přičemž nejvyšší hodnota popela u 1. frakce byla pouze 1,17%. Po následné extrakci 2. frakce želatiny byl obsah popela v rozmezí od 0,35 do 0,7%. Ve 3. frakci želatiny byl popel 0,48 a 0,81% a u nerozloženého podílu dosahoval v průměru 0,48%. Což ukazuje, že demineralizací jsme se zbavili téměř všech minerálních látek a samotná želatina je použitelná jak pro potravinářské, tak farmaceutické účely, u kterých musí být obsah minerálních látek pod 2% [95,96].

Obsah extrahovatelných látek byl po odtučnění 5,76% a po extrakci klesl u 2. frakce na hodnotu 3,41% což není příliš vysoké číslo a ukazuje to na dostatečnou metodu odtučnění.

### 5.2.11 Stravitelnost

Ve spolupráci s Ústavem analýzy a chemie potravin byla provedena u tří vzorků 2. frakce a jednoho vzorku 1. frakce analýza zaměřená na stravitelnost v této práci připravených želatin. Vzorky byly nejprve vysušeny 1 hodinu při 105°C a poté byly naváženy do sáčků, které byly předem propláchnuty v acetonu a vysušeny v digestoři. Takto byly uchovány přes noc v exikátoru. Na druhý den byly sáčky se vzorky vloženy do inkubační láhve s pepsinem rozpuštěným v 0,1 mol/l HCl, takto připravené láhve byly vloženy do inkubátoru Daisy při teplotě 37°C po dobu 4 hodin. Poté byly sáčky vyjmuty a propláchnuty destilovanou vodou. Po propláchnutí byly sáčky opět umístěny do inkubační láhve s pankreatinem, který byl rozpuštěn ve fosfátovém pufru o pH 7,45. Tyto láhve se nechaly inkubovat 24 hodin při teplotě 37°C. Po uplynutí 24 hodin byly inkubační láhve umístěny do sušárny na 30 minut při teplotě 80°C. Poté byly sáčky vyjmuty propláchnuty destilovanou vodou a sušeny 24 hodin při 105°C. Následovalo jejich vychladnutí v exsikátoru a po vychladnutí

byly sáčky vyžíhaný při 550°C po dobu 5 hodin po vychladnutí byl zvážen popel stráveného vzorku. Želatinu všech čtyř vzorků dosahovaly stavitelnosti přes 99%.

### 5.3 Návrh optimálních podmínek

Po vyhodnocení první fáze bylo zjištěno, že velký vliv na výsledné vlastnosti a výtěžnost 2. frakce má hlavně teplota extrakce 1. frakce. Proto byla teplota extrakce 1. frakce želatiny stanovena podle experimentu číslo 7 na 50°C a doba na 20 minut. V následné extrakci 2. frakce želatiny, bylo pozorováním zjištěno, že v rozmezí teplot 56 až 57°C dochází k výrazné změně struktury kolagenu a jeho rozpuštění viz obrázek 20. Proto bylo rozhodnuto i o změně teploty druhé extrakce a to na 60°C a doba extrakce byla zkrácena na 5 minut. Bohužel vzhledem k nastalé epidemiologické situaci nemohl být tento experiment proveden.



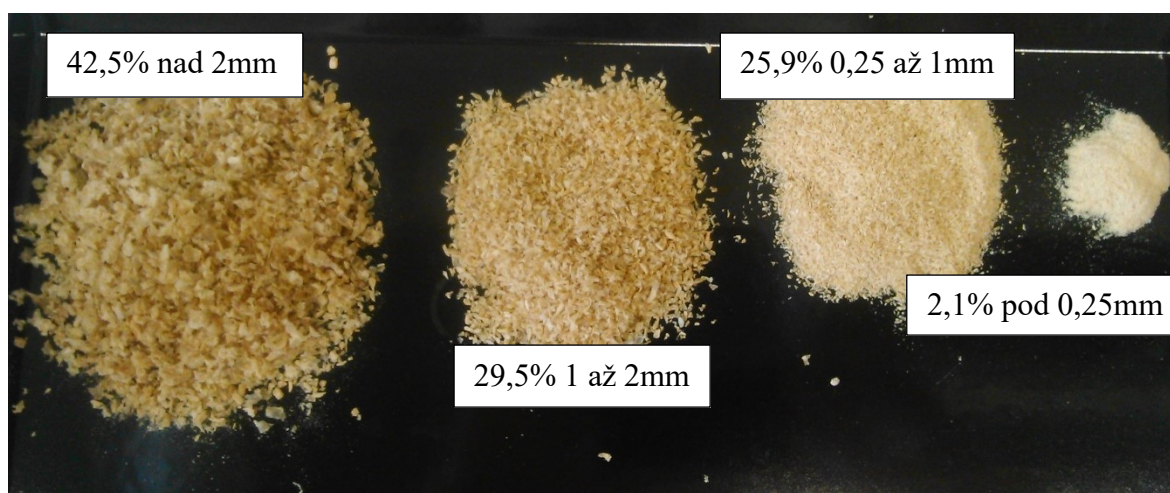
Obrázek 20: Změna struktury kolagenu v závislosti na teplotě (°C)

### Vliv doby zrání suroviny po demineralizaci

Vzhledem k výše popsaným problémům, kdy nemohl být proveden optimalizovaný experiment ihned, došlo k tomu, že surovina po demineralizaci zrála 3 měsíce. Což jak se ukázalo při pokusu o optimalizovaný experiment byla již velmi dlouhá doba zrání, a to i přestože byla surovina umístěna v temnotě při konstantní teplotě 23°C. Ani velikost zrn již nebyla 3mm, ale už byla více rozdrobená. Procentuální zastoupení jednotlivých velikostí zrn je vidět na obrázku 21. K rozkladu kolagenu došlo již při 44°C u extrakce 1. frakce. Místo toho, aby se povedlo vyrobit želatinu byl výsledným produktem vysoký výtěžek velmi kvalitního hydrolyzátu, jehož hodnoty jsou vidět v tabulce 8. Z toho plyne i doporučení na menší dobu zrání, respektive nevyrábět surovinu do zásoby, ale co nejdříve ji po demineralizaci zpracovávat, pokud není cílem vyrobit hydrolyzát.

Tabulka 8: Analýza kvalitativních parametrů hydrolyzátu

Výtěžek [%]	Obsah popela [%]	Pevnost gelu [Bloom]	Viskozita [mPa.s]	Teplota tání gelu [°C]	Teplota tuhnutí gelu [°C]	Čírost [%]	Vodu zadrž. kap. [g/g]	Tuk váz. kapacita [g/g]	Pěnotvorná kapacita [%]	Stabilita pěny [%]	Emulsif. kapacita [%]	Stabilita emulze [%]
74,2	0,6	–	–	–	–	–	2,7	12,8	16	4	48,4	96,7



Obrázek 21: Procentuální zastoupení velikosti jednotlivých zrn



## 5.4 Zhodnocení výsledků a význam pro praxi

V potravinářském, farmaceutickém, kosmetickém a fotografickém průmyslu je aplikace želatiny založena především na gelových a viskoelastických vlastnostech. Velká část literárních studií se zaměřuje na výrobu želatiny z alternativních zdrojů, je to dáno zřejmě i tím, jak roste poptávka po želatině, neboť v poslední době a zejména v potravinářském průmyslu, se objevuje rostoucí trend nahradit syntetická činidla přírodními, a proto zde bylo nalezeno uplatnění želatiny ve výrobcích, jako jsou emulgátory, pěnicí činidla, koloidní stabilizátory, čerčící prostředky, biologicky rozložitelné obalové materiály a mikroenkapsulační činidla. Navíc na rozdíl od komerční želatiny, u které je v podstatě zpracováno celé zvíře, u těchto alternativních zdrojů, ať už jde o ryby či drůbež, by se k výrobě želatiny používaly části považované v současnosti za odpad. A i tato práce se zabývá zpracováním kuřecích kostí ze strojně odděleného masa, tedy surovinou, která je v současnosti z největší části likvidována v kafileriích. Literární studie, kromě možnosti proveditelnosti extrakce dané suroviny, se zaměřují i na stanovení jednotlivých fyzikálně-chemických vlastností. Většinou je však stanovení vlastností zúžené na pevnost gelu a maximálně viskozitu. Tato práce se však zabývá větším množstvím analýz vlastností, jako jsou schopnosti zadržovat vodu a vázat tuky, emulgační a pěnové vlastnosti, které jsou důležité při dalším zpracování želatin zejména v potravinářském průmyslu. Tabulka 9 ukazuje porovnání jednotlivých provedených analýz v této práci s dalšími pracemi zabývající se stejnou vstupní surovinou, ale jiným opracováním, dále pak i vybrané práce s jinými vstupními surovinami, ve kterých bylo provedeno větší množství analýz. V tabulce jsou zobrazeny nejvyšší naměřené hodnoty jednotlivých prací. Na tuto tabulku pak navazuje tabulka 10, která popisuje vstupní surovinu a parametry kondicionování a extrakce jednotlivých prací.

Tabulka 9: Porovnání jednotlivých analýz s dalšími literárními studiemi

Reference	Výtěžek [%]	Pevnost gelu [Bloom]	Viskositá [mPa.s]	Teplota tání gelu [°C]	Teplota tuhnutí gelu [°C]	Čírost [%]	Vodu zadržující. kapacita. [g/g]	Tuk vázací kapacita [g/g]	Pěnotvorná kapacita [%]	Stabilita pěny [%]	Emulsifikační kapacita [%]	Stabilita emulze [%]	
DP	a	52,8	390	6,8	38,4	17,6	10,1	10,9	14,7	36	24	51,6	93,1
	b	9,03	233	2,6	34,8	16,5	2,1	7,3	12,2	16	0	48,3	96,6
	c	48,4	–	–	–	–	–	2,5	12,1	8	4	48,4	94,9
5	15,3	1170	–	33,7	25,1	–	–	–	–	–	–	–	–
79	16,9	370	5,9	–	–	–	8,6	0,7	220	44	–	–	–
80	16,0	60	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
81	32,0	140	2,8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
84	a	11,3	177	4,4	24,2	18,7	18,4	2,1	4,5	19	14	–	–
	b	19,7	206	5,6	25,8	20,8	18,3	2,6	3,5	22	18	–	–
	c	17,2	124	2,5	18,2	13,8	5,4	1,6	3,6	17	11	–	–
87	a	4,1	268	–	33,4	25,7	–	10,2	8,8	57	43	–	–
	b	18,8	96	–	28,7	18,5	–	10,4	43,7	49	42	–	–
88	72	354	5,7	–	–	1,9	5,6	1,3	61	39	50	87,5	

Tabulka 10: Popis vstupní suroviny a parametry kondicionování, extrakce jednotlivých prací

Reference	Autor	Vstupní surovina	Podmínky opracování, kondicionování, extrakce
DP a-2.frakce b-3.frakce c-1.frakce	Dujka	Kuřecí kostní separát	Demineralizace 3% HCl, 96 hodin při 23°C, kondicionování proteolytickým enzymem Protamex, extrakce při teplotách 42-50°C a době 20 až 60 minut.
5	Erge a Zorba	Kuřecí kostní separát	Demineralizace 3% HCl, 24 hodin při 10°C, alkalické kondicionování NaOH 1,8 až 4,2% 48 hodin při 23°C, extrakce od 58 do 82°C, doba 30 až 250minut
79	Rafieian a kol.	Kuřecí kostní separát	Demineralizace a zároveň kyselá kondicionování 6,73% HCl 24 hodin při pokojové teplotě, extrakce želatin při 87°C 2 hodiny
80	Rammaya a kol.	Kuřecí kostní separát	Demineralizace 3% HCl 24 hodin při 10°C, alkalické kondicionování 4,0% NaOH 72 h při pokojové teplotě a extrahována vodou při pH 4,0 při 80 °C po dobu 2 hodin
81	Mokrejš a kol.	Kuřecí kostní separát	Opracování 0,03 mol/l NaOH 15 hodin následované lipolytický enzym Lipoláza 48 hodin a poté odtučnění s etherem a ethanolem 20 hodin, kondicionování s proteolytickým enzymem Protamex 24 až 72 hodin všechny kroky při pokojové teplotě. Extrakce při teplotě 64-80°C a době 60-180 min.
84 a-tuňák pruh. b-Scol. sorrak c-Labeo rohita	Shyni a kol.	Kůže tuňáka pruhovaného, Scoliodon sorrakowah a Labeo rohita	Opracování 0,1 mol/l NaOH 2 hodiny při -27°C, kyselá kondicionování 0,2 M CH <sub>3</sub> COOH 24 hodin při 4°C, extrakce při 45°C 12 hodin.
87 a-srdce b-nerozložený podíl	Roy a kol.	Hovězí srdce	Opracování 0,5 mol/l NaOH 30 minut, extrakce při 80°C 4 až 6 hodin.  Nerozložený podíl po extrakci kondicionován enzymem pepsinem v 0,5 mol/l CH <sub>3</sub> COOH 24 hodin, extrakce při 80°C 2 hodiny.
88	Mrázek a kol.	Kuřecí kůže	Opracování 0,5% NaOH, odtučnění petroletherem a ethanolem, kondicionování proteolytickým enzymem Polarzyme, extrakce při teplotě 40 až 80°C 60 minut.

Porovnáním jednotlivých výše v tabulce uvedených želatin je vidět, že například výtěžky u kyselého a alkalického kondicionování jsou si velmi podobné, pohybují se v rozmezí u kyselého od 11,3 do 19,7% a u alkalického v rozmezí od 4,1 do 16%, větších výtěžků dosahuje kondicionování enzymatické, které bylo v rozmezí od 18,8 do 72%, přičemž nejvyšší hodnoty bylo dosaženo v práci Mrázek a kol., kde byl ke kondicionování použit proteolytický enzym Polarzyme [88]. Výsledný výtěžek byl u 2. frakce, která tvořila gel v rozmezí od 14,4 do 52,8%, což je v nejvyšší hodnotě o dost více než u většiny ostatních literárních studiích, jedinou výjimkou je výše zmíněná práce Mrázek a kol. [88]. Celkový výtěžek by byl ještě vyšší, neboť ten se pohyboval v rozmezí od 56 do 90,3%, protože i 1. frakce, která sice neutvořila gel, by se dala v průmyslu použít hydrolyzát. 3. frakce již bylo málo, proto bylo použito mixu želatin vyextrahovaných za stejných teplot, ale při různých časech a taktéž ta ve dvou případech ze tří utvořila gel.

Pevnosti gelu želatin bylo v této práci dosaženo od 80 do 390 Bloom. Při porovnání je vidět, že nejvyšší hodnoty pevnosti gelu bylo dosaženo v práci Erge a Zorba, kteří se pohybovali v rozmezí od 200 až do 1170 Bloom [5]. Další práce se stejnou vstupní surovinou dosahovaly pevnosti gelu v rozmezí od 60 do 370, kdy 60 Bloom bylo dosaženo v práci Rammaya a kol. [80] a 370 Bloom v práci Rafieian a kol. [79], v práci Mokrejš a kol. bylo dosaženo pevnosti 140 Bloom [81]. Mrázek a kol. zpracovávající kuřecí kůže se pohybovali v rozmezí od 252 do 354 Bloom [88]. V práci Roy a kol., kteří zpracovávali hovězí srdce, bylo dosaženo hodnot od 96 do 268 Bloom [87]. Při zpracování kůží z několika druhů ryb v práci Shyni a kol. bylo dosaženo nejvyšších hodnot u jednotlivých ryb od 124 do 206 Bloom [84].

Viskozita želatin se pohybovala v rozmezí od 1,6 po 6,8 mPa.s u ostatních prací, kde byla tato hodnota sledována se pohybovala v rozmezích od 2,5 mPa.s u práce Shyni a kol. a vstupní suroviny získané z kůží ryby *Labeo rohita* [84] až po 5,9 mPa.s u práce Rafieian a kol., kde vstupní surovinou byly kuřecích kostí ze separace [79].

Teplota tání želatin se pohybovala v rozmezí od 28,9 do 38,4°C. Při stejné vstupní surovině dosáhli ve své práci Erge a Zorba hodnoty 33,7°C [5]. Obdobných hodnot teploty tání želatin bylo získáno i v práci Roy a kol., kteří jako vstupní surovinu použili hovězí srdce, dosáhli hodnot v rozmezí od 28,7 do 33,4°C [87]. Například, ale u želatin získaných z kůží ryb bylo v práci Shyni a kol. dosaženo hodnot od 18,2 do 25,8°C podle druhu ryby, což je ale méně než u této práce [84].

Teplota tuhnutí se pohybovala v rozmezí od 14,9 do 17,6°C, což je velmi podobné rybí želatině, kde bylo v práci Shyni a kol. dosaženo hodnot v rozmezí od 13,8 do 20,8°C [84], je ale nižší než u práce Erge a Zorba 25,1°C [5] či práce Roy a kol. 25,7°C [87].

Čiřost byla u této práce v rozmezí od 1,8 až po 10,1%, což v nejnižší hodnotě je totožné jako u práce Mrázek a kol. [88], ti dosáhli 1,9%, ale je to méně než u rybí želatiny neboť v práci Shyni a kol. dosáhli až 18,4% u tuňáka pruhovaného [84].

Vodu zadržující kapacita se pohybovala v rozmezí od 9,3 do 10,9g/g což je velmi podobné hodnotám 10,2 respektive 10,4g/g, kterých dosáhli ve své práci Roy a kol. zpracovávající jako vstupní surovinu hovězí srdce [87] a není to mnoho víc, než je hodnota 8,6g/g, které dosáhli ve své práci Rafieian a kol., kde vstupní surovinou byly kuřecí kosti ze separace [79]. Ostatní práce již dosahovaly nižších hodnot, pohybovaly se v rozmezí od 1,6 [84] do 5,6g/g [88] a tyto hodnoty jsou spíše srovnatelné s 1. a 3. frakcí želatiny ta se pohybovala v rozmezí od 2,2 u 1. frakce po 7,3g/g u 3. frakce.

Tuk vázací kapacita se napříč jednotlivými frakcemi pohybovala v rozmezí od 8,4 po 14,7g/g je to daleko více, než dosahovaly ostatní práce. Ty se pohybovaly v rozmezí u kuřecí želatiny od 0,7g/g [79] do 1,3g/g [88] a u rybí želatiny od 3,5 po 4,5g/g [84]. Pouze Roy a kol. získali u želatiny z hovězího srdce srovnatelnou hodnotu a to 8,8g/g a dokonce u nerozloženého podílu z první extrakce, který následně kondicionovali pepsinem v 0,5 mol/l CH<sub>3</sub>COOH, dosáhli hodnotu 43,7g/g [87].

Pěnotvorná kapacita a stabilita pěny se pohybovala u 2. frakce želatiny v rozmezí od 18 do 36%, u pěnotvorné kapacity a u stability v rozmezí od 8 do 24%, což je podobné práci Shyni a kol., u kterých se výsledky pohybovaly podle druhu ryby v rozmezí od 17 do 22% u pěnotvorné kapacity a u stability v rozmezí od 11 do 18% [84]. Ostatní porovnávané práce dosahovaly vyšší pěnotvorné kapacity, ta se pohybovala v rozmezí od 49 [87] do 61% [88] a dokonce Rafieian a kol. ve své práci dosáhli 220% [79]. Stabilita se pohybovala v rozmezí od 39 [88] po 44% [79]. 1. a 3. frakce želatiny dosahovali nižších hodnot pěnotvorné kapacity, a to v rozmezí od 6% u první do 16% u 2. frakce a u stability u obou frakcí od 0 do 12%.

Emulsifikační kapacita a stabilita emulze se pohybovaly u všech tří frakcí v podobných hodnotách, a to u emulsifikační kapacity v rozmezí od 45,8 do 51,6% a u stability od 89,7 do 96,7%. Což je prakticky stejné jako hodnoty u emulsifikační kapacity 50% respektive u stability 87,5%, kterých dosáhli Mrázek a kol. ve své práci [88].

Jak je vidět z tohoto porovnání, tak se díky zvolení vhodných technologických podmínek povedlo v této práci připravit želatiny, které jsou srovnatelné s nejlepšími výsledky želatin ostatních porovnávaných prací, ale přitom většinu vysoce převyšují výtěžkem.

Použití v praxi u želatin / hydrolyzátů vyrobených v této práci je velmi široké i díky nízkému obsahu popela, který je známkou toho, že se v této želatině nebo hydrolyzátu nachází jen velmi malé množství minerálních látek. Pro použití ve farmacii musí být pod 2% což všechny frakce splňují [95,96]. V potravinářství je velmi důležitou vlastností vodu zadržující kapacita, neboť tato vlastnost je žádoucí v potravinách, jako jsou klobásy, krémy a těsto, protože želatiny mohou nasávat vodu bez rozpuštění proteinů, a tím dosáhnout zahuštění a viskozity produktu a je důležitým prvkem pro snížení ztráty vody a šřavnatosti zmrazených ryb nebo masných výrobků během jejich vaření [89]. Taktéž schopnost vázat tuky se v potravinářství využívá na příklad při výrobě mletého masa, ve kterém pomáhá zachovat chuť a prodlužuje i trvanlivost pečiva, polévek a masných výrobků. Emulsifikační kapacita a stabilita emulze jsou důležité v kosmetickém průmyslu, kde se jich využívá zejména při přípravě masť a krémů. V této práci byly pěnotvorná kapacita a stabilita pěny o něco nižší, proto není úplně zřejmé, zda by se tato želatina hodila i při výrobě marshmallows. Želatinu s nižší hodnotou pevnosti můžeme použít při výrobě gumových medvídků, nebo při výrobě sekaných, konzerv a sýrů jako pojivo. Želatina s vyšší hodnotou pevnosti nalezne použití při výrobě aspiků, želé bonbónů či výrobě jogurtů a v mnoha dalších aplikacích. Ve farmacii lze takto připravené želatiny použít při výrobě jak tvrdých kapslí, tak měkkých kapslí. Taktéž hydrolyzát vyrobený v této práci můžeme použít v potravinářství buď jako přísadu do nízkotučných produktů, nebo jako přídavek při výrobě dezertů. Dále by bylo možné ho použít do ovocných nápojů k zvýraznění sladkých a ovocných chutí a také například k číření piva či vína. V kosmetice se může použít při výrobě krémů pečující o pokožku. Ve farmacii by šel použít k výrobě kapslí a implantátů. V lékařství by mohl být využit při výrobě energetických, dietních a léčivých doplňků.

Další výzkum spojený s tímto materiálem, by se měl zaměřit na dvě možné úpravy tohoto postupu. Bylo by vhodné zaměřit se na faktory spojené s extrakcí 2. frakce a také na to, jak by zkrácení doby demineralizace ovlivnilo kvalitu a výtěžek želatin.

## ZÁVĚR

Diplomová práce s názvem Optimalizace přípravy želatin z kuřecího kostního odpadu je rozdělena na dvě části, teoretickou a praktickou.

Teoretická část se zaměřuje na popis výroby želatiny, přičemž je zde zmíněna i demineralizace, což je předúprava spojená se vstupní surovinou, ve které jsou obsaženy kosti. Dále je v ní popisována předúprava a extrakce z alternativních vstupních zdrojů, neboť tyto suroviny jsou na trhu stále nové a procesní podmínky jednotlivých studií jsou velmi rozdílné. Poslední část je zaměřena na popis funkčních vlastností želatin, ať už se jedná o vlastnosti spojené se želírováním či s vázáním vody, o povrchové vlastnosti, anebo v neposlední řadě o filmotvorné vlastnosti či tvorbu mikrokapslí.

Experimentální část se zabývá možností extrakce želatiny a hydrolyzátů ze vstupní suroviny, kterou byl kuřecí kostní odpad získaný jako vedlejší produkt při strojním opracování masa. Tato surovina byla nejprve demineralizována 3% kyselinou chlorovodíkovou a to po dobu 96 hodin. Následovalo kondicionování 0,6% proteolytické enzymu Protamex při pH 6,5 až 7 po dobu 24 hodin, což je postup, který měl zlepšit výtěžek želatiny, ale který byl v této práci u této vstupní suroviny, alespoň podle dostupných informací, použit úplně poprvé. Cílem této práce tedy bylo studium procesních podmínek za účelem zdokonalení výtěžku želatiny a následné analýzy kvalitativních parametrů želatin. Za tímto účelem byly sledovány dva faktory týkající se extrakce želatin. Těmito faktory byly faktor A teplota extrakce a faktor B doba extrakce. Nejdříve byl proveden pilotní experiment, neboť jak již bylo zmíněno výše, byl tento postup přípravy suroviny použit poprvé. Toto se odrazilo i na stanovení faktorů, ty byly na základě předchozí bakalářské práce a literárních studií nejprve nastaveny na teplotu od 60 do 80°C a době extrakce od 60 do 120 minut, ale již po prvním pilotním experimentu, který probíhal při teplotě 60°C po dobu 60 minut, došlo k téměř úplnému rozkladu suroviny. Takto získaná želatina neutvořila gel. Jelikož cílem bylo vyextrahovat želatinu, došlo na základě pozorování pilotního experimentu k úpravě faktorů a to následovně: doba extrakce se snížila na rozmezí od 20 do 60 minut a teplota extrakce 1. frakce byla snížena v rozmezí od 42 do 50°C.

Metodika práce byla stanovena na základě faktorové metody Taguchi design, a to podle faktorů takto 3<sup>2</sup>+1 slepý experiment, který byl bez přídavku enzymu. Na tímto způsobem získaných želatinách byly provedeny analýzy kvalitativních parametrů. Zde se opět projevilo, že jde o dosud nevyzkoušený postup opracování, protože proti všem předpokladům nedošlo

ani u jednoho experimentu k přeměně želatiny 1. frakce na gel, ale bylo toho docíleno až u 2. frakce, a proto byly analýzy prováděny až u želatiny 2. frakce. U jednotlivých experimentů se ukázalo, jaký vliv má tepelná historie opracování, protože faktory byly měněny jen u 1. frakce, ale vlastnosti i výtěžky se měnily i u 2. frakce, a to dokonce dle statistického programu MiniTab 19 v daleko větší významnosti než u 1. frakce. 3. frakce byla taktéž ovlivněna tepelnou historií. Výtěžek 2. frakce se pohyboval od 14,4 do 52,8% a pevnost gelu od 80 po 390 Bloom. Nejnižšího výtěžku bylo dosaženo při experimentu 9 kdy teplota extrakce 1. frakce byla 52°C a doba extrakce byla 60 minut, ale tento experiment dosahoval nejvyšší pevnosti gelu a to 390 Bloom. Nejvyššího výtěžku bylo dosaženo při experimentu 5 kdy teplota extrakce byla 46°C a doba extrakce 40 minut. Nejnižší pevnosti gelu bylo dosaženo v experimentu 2 kdy teplota extrakce byla 42°C a doba extrakce 40 minut. Úplně nejnižšího výtěžku 2. frakce, a to 2,40%, bylo dosaženo při experimentu 10, kdy ke kondicionování nebyl použit enzym. Při tomto experimentu bylo dosaženo i celkově nejvyšší pevnosti gelu a to 460 Bloom, ale jak je vidět, přídavek enzymu velmi výrazně ovlivní výtěžek želatiny, byť za cenu snížení pevnosti gelu. Celková výtěžnost se pohybovala v rozmezí od 56 do 90,3%, musí se totiž brát v potaz i to, že 1. frakce sice nebyla želatina, ale hydrolyzát avšak velmi kvalitní. Nejvyšší hodnota obsahu popela byla 1,17%. Analýzy teploty tání gelu ukázaly, že tato teplota v podstatě kopíruje pevnost gelu. Nejvyšší hodnoty 38,4°C bylo dosaženo u experimentu 9 tedy pevnosti gelu 390 Bloom a nejnižší 28,9°C u experimentu 2 tedy pevnosti gelu 80 Bloom. Teplota tuhnutí gelu se pohybovala od 14,9 do 17,6°C. Vodu zadržující kapacita se pohybovala ve velmi úzkém intervalu a to od 9,3 do 10,9g/g. Tuk vázací kapacita byla při nejnižší hodnotě 9,8 a nejvyšší 14,7g/g. Pěnotvorná kapacita byla od 18 do 36% a stabilita pěny od 8 do 24%. Emulsifikační kapacita se pohybovala v rozpětí od 46,6 do 51,6% a stabilita emulze byla od 89,7 do 93,1%. Analýzám byly taktéž podrobeny želatina/hydrolyzát 1. frakce a želatina 3. frakce. Výsledky těchto analýz byly velmi podobné analýzám 2. frakce jenom s tím rozdílem, že u první se neprováděly analýzy spojené s želírovacími vlastnostmi. Dalšími rozdíly byly, že vodu zadržující kapacita byla u 1. frakce v intervalu od 2,19 do 2,47g/g, což je nižší než u 2. frakce, 3. frakce se pohybovala od 2,2g/g, což bylo u mixu želatin získaných z experimentech vyrobených při teplotě extrakce 46°C. O něco nižší byly i pěnotvorná kapacita a stabilita emulze, ty byly u kapacity u 1. frakce od 6 do 8% respektive u druhé od 8 do 20%, stabilita byla u první od 0 do 4% a u třetí byla dvakrát 0% a v jednom případě u mixu želatin získaných z experimentů při teplotě extrakce 46°C byla 12%.



Po prozkoumání jednotlivých procesních parametrů a výsledných analýz kvalitativních parametrů byl pro optimalizovaný pokus vybrán experiment 7, který byl extrahován při teplotě 50°C a době 20 minut. Tento experiment dosahoval výtěžku 2. frakce 30,8%. Pevnost gelu byla 269 Bloom. Při extrakcích 2. frakce byla pozorována změna struktury kolagenu v rozmezí teplot 56 až 57°C, tomu byl přizpůsoben i optimalizovaný pokus. Vlivem pandemické situace však nebylo možné provést extrakci optimalizovaného pokusu v krátké době po demineralizaci, surovina tedy zrála po dobu 3 měsíců, což se ukázalo jako velmi dlouhá doba zrání a výsledkem nebyla želatina, ale byl jím vysoký výtěžek hydrolyzátu, který činil 74,2%.

Vstupní surovina připravená tímto způsobem splnila předpoklady, že díky demineralizaci by mohlo být dosaženo větších výtěžků želatiny/hydrolyzátu. Byla vyrobena želatina/hydrolyzát, která díky svým vlastnostem, jako je pevnost gelu, teplota tání gelu nebo vodu zadržující kapacita, tuk zadržující kapacita či emulsifikační kapacita může mít široké pole působnosti při různých aplikacích v průmyslu. Díky nízkému obsahu popela může najít želatina/hydrolyzát použití ve farmaceutickém nebo potravinářském průmyslu a nemusí se podrobovat další úpravě. Navíc zkouška stavitelnosti prokázala více jak 99% stravitelnost. Tento způsob přípravy suroviny splňuje principy bezodpadového hospodářství, neboť i fosforečnan vápenatý, který byl získán při demineralizaci kostí, může být použit například v zemědělství jako hnojivo. Tato želatina by navíc měla splňovat i přísné limity spotřeby potravin stanovené náboženskými zákony. V této práci bylo prokázáno, že vhodnou volbou technologických podmínek lze z kuřecího kostního separátu, jakožto vedlejšího živočišného produktu při strojním oddělení masa, získat vysoce kvalitní želatiny, které mohou být zároveň alternativou k želatinám vyrobených z klasických zdrojů.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] M. Sebastian, *Industrial Gelatin Manufacture-Theory and Practice*, 2014, academia.edu
- [2] R. Schrieber, H. Gareis, *Gelatine Handbook, Theory and Industrial Practice*, Wiley-VCH Verlag, 2007, ISBN 978-3-527-31548-2.
- [3] A. Abedinia, A. M. Nafchi, M. Sharifi, P. Ghalambor, N. Oladzadabbasabadi, F. Ariffin, N. Hudah, *Trends in Food Science & Technology*, 2020, Vol. 104, pp. 14-26, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.08.001>
- [4] L. Du, Z. Khiari, Z. Pietrasik, M. Bett, *Poultry Science*, 2013, Vol. 92, No. 9, pp. 2463-2474, <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03161>
- [5] A. Erge, Ö. Zorba, *LWT*, 2018, Vol. 97, pp. 205-212, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.057>
- [6] Y. Ma, X. Zeng, X. Ma, R. Yang, W. Zhao, *Journal of Cleaner Production*, 2019, Vol. 209, pp. 916-926, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.313>
- [7] GME dostupné online na <https://www.gelatine.org/en/gme.html>
- [8] J. Choe, H.Y. Kim, *Poultry Science*, 2018, Vol. 97, No. 3, pp. 1082-1088, <https://doi.org/10.3382/ps/pex381>
- [9] T. K. Kim, Y. K. Ham, D. M. Shin, H. W. Kim, H. W. Jang, Y. B. Kim, Y. S. Choi, *Poultry Science*, 2020, Vol.99, No. 1, pp. 590-596, <https://doi.org/10.3382/ps/pez519>
- [10] A. A. Fazilah, A. N. Hudab, A. M. Nafchi, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, Vol. 98, pp. 586-594, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.139>
- [11] P.Y. Soo, N. M. Sarbon, *Food Packaging and Shelf Life*, 2018, Vol. 15, pp. 1-8, <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.12.009>
- [12] N. M. Sarbon, F. Badii, N. K. Howell, *Food Hydrocolloids*, 2013, Vol. 30, No. 1, pp. 143-151, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.05.009>
- [13] AOAC dostupné na <https://www.aoac.org/about-aoac-international/>
- [14] R. Gál, P. Mokrejš, P. Mrázek, J. Pavlačková, D. Janáčková, J. Orsavová, *MDPI-Molecules*, 2020, Vol. 25, No. 3, pp. 494, <https://doi.org/10.3390/molecules25030494>
- [15] D. Yuliani, D. R. Awalsasi, A. Jannah, *Alchemy - Journal of Chemistry*, 2019, Vol. 7, No 1, <https://doi.org/10.18860/al.v7i1.7437>

- [16] S. Saenmuang, S. Phothiset, Ch. Chumnanka, *Food Science and Biotechnology*, 2020, Vol. 29, pp.469–478, dostupné na <https://link-springer-com.proxy.k.utb.cz/article/10.1007/s10068-019-00696-4>
- [17] T. Zhang, R. Sun, M. Ding, L. Tao, L. Liu, N. Tao, X. Wang, J. Zhong, *Food Chemistry*, 2020, Vol. 328, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127114>
- [18] M. V. Chandra, B. A. Shamasunda, *Food Hydrocolloids*, 2015, Vol. 48, pp. 47-54, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.022>
- [19] Y. Akagündüz, M. Mosquera, B. Giménez, A. Alemán, P. Montero, M. C. Gómez-Guillén, *LWT-Food Science and Technology*, 2014, Vol. 55, No. 2, pp. 579-585, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.026>
- [20] H. Y. Liu, J. Han, S. D. Guoab, *LWT-Food Science and Technology*, 2009, Vol. 42, No. 2, pp. 540-544, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.07.013>
- [21] B. Jamilaha, K. W. Tana, M. R. Umi Hartinab, A. Azizah, *Food Hydrocolloids*, 2011, Vol. 25, No. 5, pp. 1256-1260, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.11.023>
- [22] H. A. AL-Kahtani, I. Jaswir, E. A. Ismail, M. A. Ahmed, A. M. Hamed, S. Olorunnisola, F. Octavianti, *International Journal of Food Properties*, 2017, VOL. 20, NO. 11, pp. 2559–2568, <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1244543>
- [23] E. T. A. Tümerkan, Ü. Cansu, G. Boran, J. M. Regenstein, F. Özoğula, *Food Chemistry*, 2019, Vol. 287, pp.273-279, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.088>
- [24] Đ. Okanović, M. Ristić, Š. Kormanjoš, S. Filipović, B. Živković, *Biotechnology in Animal Husbandry*, 2009, Vol. 25, No. 1-2, pp. 143-152
- [25] Fu-Yuan Cheng, Yu-Tse Liu, Tien-Chun Wan, Liang-Chuan Lin, R. Sakata, *Animal Science Journal*, 2008, <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2007.00507.x>
- [26] N. Huda, E.K. Seow, M.N. Normawati, N.M. Nik Aisyah, *International Journal of Poultry Science*, 2013, Vol. 12, No. 10, pp.615-621, DOI: 10.3923/ijps.2013.615.621
- [27] T. Nagai, N. Suzuki, *Food Chemistry*, 2000, Vol. 68, No. 3, pp. 277-281, [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00188-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00188-0)
- [28] H. Ockerman, W. Hansen, Conly L. *Animal By-Product & Utilizati-on*. Boca Raton: CRC Press, 2000. ISBN 1-56676-777-6.
- [29] I. J. Haug, K. I. Draget, O. Smidsrød, *Food Hydrocolloids*, 2004, Vol. 18, No. 2, pp. 203-213, [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00065-1](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00065-1)

- [30] J. Eysturskarð, J. I. Haug, N. Elharfaoui, M. Djabourov, K. I. Draget, *Food Hydrocolloids*, 2009, Vol. 23, No. 7, pp. 1702-1711, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.01.008>
- [31] L. Lin, J. M. Regenstien, S. Lv, J. Lu, S. Jiang, *Trends in Food Science & Technology*, 2017, Vol. 68, pp. 102-112, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.012>
- [32] C. S. Cheow, M.S. Norizah, Z.Y. Kyaw, N.K. Howell, *Food Chemistry*, 2007, Vol. 101, No. 1, pp. 386-391, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.046>
- [33] M. C. Gómez-Guillén, J. Turnay, M. D. Fernández-Díaz, N. Ulmo, M. A. Lizarbe, P. Montero, *Food Hydrocolloids*, 2002, Vol. 16, No. 1, pp. 25-34, [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00035-2](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00035-2)
- [34] S. J. Lee, Y.S. Kim, J. W. Hwang, E. K. Kim, S. H. Moon, B. T. Jeon, T. J. Jeone, J. M. Kim, P. J. Park, *Food Research International*, 2012, Vol. 49, No. 1, pp. 285-295, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.017>
- [35] L. G. Fonkwe, R. K. Singh, *Process Biochemistry*, 1997, Vol. 32, No 4, pp. 309-318, [https://doi-org.proxy.k.utb.cz/10.1016/S0032-9592\(96\)00087-8](https://doi-org.proxy.k.utb.cz/10.1016/S0032-9592(96)00087-8)
- [36] Y. H. Kuan, A. M. Nafchi, N. Huda, F. Ariffin, A. A Karim, *Journal of the Science of Food Agriculture*, 2017, Vol.97, No. 5, pp. 1663-1671, <https://doi.org/10.1002/jsfa.7970>
- [37] A. K. Chakka, A. Muhammed, P. Z. Sakhare, N. Bhaskar, *Waste and Biomass Valorization*, 2017, Vol. 8, pp. 2583–2593
- [38] H. Yang, Y. Wang, *Food Hydrocolloids*, 2009, Vol. 23, No. 3, pp. 577-584, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.04.016>
- [39] B. Jamilah, K. G. Harvinder, *Food Chemistry*, 2002, Vol. 77, No. 1, pp. 81-84, [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00328-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00328-4)
- [40] A. Saxena, K. Sachin, H. B. Bohidar, A. K. Verma, *Colloids and Surfaces B: Bio-interfaces*, 2005, Vol. 45, No. 1, pp. 42-48, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.07.005>
- [41] J. H. Muyonga, C. G. B. Cole, K.G. Duodu, *Food Chemistry*, 2004, Vol. 86, No. 3, pp. 325-332, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.038>
- [42] M. C. Gómez-Guillén, B. Giménez, M. E. López-Caballero, M. P. Montero, *Food Hydrocolloids*, 2011, Vol. 25, No. 8, pp. 1813-1827, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>
- [43] F. Badii, N. K. Howell, *Food Hydrocolloids*, 2006, Vol. 20, No. 5, pp. 630-640, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.06.006>

- [44] P. Zhou, J. M. Regenstein, *Journal of Food Science*, 2007, Vol. 72. No. 4, pp. 196-201, <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00320.x>
- [45] J. A. Deiber, M. L. Ottone, M. V. Piaggio, M. B. Peirotti, *Polymer*, 2009, Vol. 50, No. 25, pp. 6065-6075, <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2009.10.046>
- [46] S. Farris, K. M. Schaich, L. S. Liu, L. Piergiovanni, K. L. Yam, *Trends in Food Science & Technology*, 2009, Vol. 20, No. 8, pp. 316-332, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.04.003>
- [47] M. J. Zohuriaan-Mehr, A. Pourjavadi, H. Salimi, M. Kurdtabar, *Polymers for Advanced Technologies*, 2009, Vol. 20, No. 8, pp. 655-671, <https://doi.org/10.1002/pat.1395>
- [48] J. Borderías, M. A. Martí, P. Montero, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 1994, Vol. 199, pp. 255–261
- [49] M. Ogawa, R. J. Portier, M. W. Moody, J. Bell, M. A. Schexnayder, J. N. Losso, *Food Chemistry*, 2004, Vol. 88, No. 4, pp. 495-501, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.006>
- [50] T. Huang, Z. Tu, H. Wang, X. Shangguan, Lu Zhang, N. Zhang, N. Bansal, *Carbohydrate Polymers*, 2017, Vol. 156, pp. 294-302, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.040>
- [51] T. Huang, Z. Tu, Z. Zou, X. Shangguan, H. Wang, N. Bansal, *Food Hydrocolloids*, 2020, Vol. 102, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105552>
- [52] J. Surh, Y. S. Gu, E. A. Decker, D. J. McClements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, Vol. 53, No. 10, pp. 4236–4244, <https://doi.org/10.1021/jf047944i>
- [53] F.A.de Wolf, *Progress in Biotechnology*, 2003, Vol. 23, pp. 133-218, [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(03\)80005-9](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(03)80005-9)
- [54] E. Dickinson, G. Lopez, *Journal of Food Science*, 2001, Vol. 66, No. 1, pp. 118-123, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb15592.x>
- [55] H. I. Rasli, N. M. Sarbon, *International Food Research Journal*, 2015, Vol. 22, No. 2, pp. 584-592
- [56] R. N. Tharanathan, *Trends in Food Science & Technology*, 2003, Vol. 14, No. 3, pp. 71-78, [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00280-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00280-7)
- [57] K. Limpisophon, M. Tanaka, K. Osako, *Food Chemistry*, 2010, Vol. 122, No. 4, pp. 1095-1101, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.090>

- [58] K.Y. Lee, J. Shim, H.G. Lee, *Carbohydrate Polymers*, 2004, Vol. 56, No. 2, pp. 251-254, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2003.04.001>
- [59] C. Andreuccetti, R.A. Carvalho, C.R.F. Grosso, *Food Research International*, 2009, Vol. 42, No. 8, pp. 1113-1121, <https://doi-org.proxy.k.utb.cz/10.1016/j.foodres.2009.05.010>
- [60] R. A. Carvalho, T. M. C. Maria, I. C. F. Moraes, P. V. A. Bergo, E. S. Kamimura, A. M. Q. B. Habitante, P. J. A. Sobral, *Materials Science and Engineering C*, 2009, Vol. 29, No. 2, pp. 485-491, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.08.030>
- [61] A.A. Haroun, H.H. Beherei, M.A. Abd El-Ghaffar, *Journal of Applied Polymer Science*, 2010, Vol.116, No. 4, pp. 2083-2094, <https://doi.org/10.1002/app.31714>
- [62] A. Bigi, G. Cojazzi, S. Panzavolta, K. Rubini, N. Roveri, *Biomaterials*, 2001, Vol. 22, No. 8, pp. 763-768, [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00236-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00236-2)
- [63] I. Kołodziejska, B. Piotrowska, *Food Chemistry*, 2007, Vol. 103, No. 2, pp. 295-300, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.049>
- [64] M.C. Gómez-Guillén, M. Pérez-Mateos, J. Gómez-Estaca, E. López-Caballero, B. Giménez, P. Montero, *Trends in Food Science & Technology*, 2009, Vol. 20, No. 1, pp. 3-16, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.10.002>
- [65] S. Rattaya, S. Benjakul, T. Prodpran, *Journal of Food Engineering*, 2009, Vol. 95, No. 1, pp. 151-157, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.04.022>
- [66] G. Strauss, S.M. Gibson, *Food Hydrocolloids*, 2004, Vol. 18, No 1, pp. 81-89, [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00045-6](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00045-6)
- [67] Y. Yeo, E. Bellas, W. Firestone, R. Langer, D. S. Kohane, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, Vol. 53, No. 19, pp. 7518-7525, <https://doi.org/10.1021/jf0507947>
- [68] Y. T. Chiu, C. P. Chiu, J. T. Chien, G. H. Ho, J. Yang, B. H. Chen, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, Vol. 55, No. 13, pp. 5123–5130, <https://doi.org/10.1021/jf0700069>
- [69] M. Gobbetti , R. Di Cagno , M. de Angelis, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* , 2010, Vol. 50, No. 8, pp. 716-727, <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.499770>
- [70] X. Y. Li, X. G. Chen, D. S. Cha, H. J. Park, C. S. Liu, *Journal of Microencapsulation*, 2009, Vol. 26, No. 4, pp. 315-324, <https://doi.org/10.1080/02652040802328685>
- [71] W. Lian, H. Hsiao, C. Chou, *International Journal of Food Microbiology*, 2002, Vol. 74, No. 1–2, pp. 79-86, [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00733-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00733-4)

- [72] S. Bao, S. Xu, Z. Wang, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2009, Vol. 89, No. 15, pp. 2692-2700, <https://doi.org/10.1002/jsfa.3775>
- [73] K. An, H. Liu, S. Guo, D.N.T. Kumar, Q. Wang, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010, Vol. 47, No. 3, pp. 380-388, <https://doi.org/10.1016/j.ijbio-mac.2010.06.002>
- [74] F. D. Stanley, Improved alkaline process for preparing type B fish gelatin, World Intellectual Property Organization, 2002, WO/2002/094959
- [75] M. Gudmundsson, H. Hafsteinsson, *Journal of Food Science*, 1997, Vol. 62, No. 1, pp. 37-39, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb04363.x>
- [76] A. Jongjareonrak, S. Benjakul, W. Visessanguan, T. Prodpran, M. Tanaka, *Food Hydrocolloids*, 2006, Vol. 20, No. 4, pp. 492-501, <https://doi.org/10.1016/j.food-hyd.2005.04.007>
- [77] L. G. Fonkwe, R. K. Singh, *Process Biochemistry*, 1997, Vol. 32, No. 4, pp. 309-318, [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(96\)00087-8](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(96)00087-8)
- [78] T. Sae-leaw, Y. C. O'Callaghan, S. Benjakul, N. M. O'Brien, *International Journal of Food Science and Technology*, 2016, Vol. 51, No. 7, pp. 1545-1551, <https://doi.org/10.1111/ijfs.13123>
- [79] F. Rafieian, J. Keramat, M. Kadivar, *Journal of Food Science and Technology*, 2013, Vol. 50, No.2, pp. 374-380
- [80] K. Rammaya, V.Q. Ying, A.S. Babji, *International Journal of Food, Nutrition & Public Health*, 2012, Vol. 5 No. 1/2/3
- [81] P. Mokrejš, R. Gál, J. Pavlačková, D. Janáčková, *Molecules*, 2021, Vol. 26, No. 2, <https://doi.org/10.3390/molecules26020349>
- [82] F. Rafieian, J. Keramat, M. Shahedi, *LWT-Food Science and Technology*, 2015, Vol. 64, No. 2, pp. 1370-1375, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.050>
- [83] S. N. Politis, P. Colombo, G. Colombo, D. M. Rekkas, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2017, Vol. 43, pp. 889-901, <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1291672>
- [84] K. Shyni, G. S. Hema, G. Ninan, S. Mathew, C. G. Joshy, P. T. Lakshmanan, *Food Hydrocolloids*, 2014, Vol. 39, pp. 68-76, <https://doi.org/10.1016/j.food-hyd.2013.12.008>
- [85] R. N. R. M. Hafidz, C. M. Yaakob, I. Amin, A. Noorfaizan, *International Food Research Journal*, 2011, Vol. 18, pp. 813-817

- [86] H. I Rasli, N. M.Sarbon, International Food Research Journal, 2015, Vol. 22, No 2, pp. 584-592
- [87] B. C. Roy, Ch. Das, Hui Hong, M. Betti, H. L. Bruce, Food Bioscience, 2017, Vol. 20, pp. 116-124, <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.09.004>
- [88] P. Mrázek, P. Mokrejš, R. Gál, J. Orsavová, Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences, 2019, Vol. 13, No. 1, doi: <https://doi.org/10.5219/1022>
- [89] S. Rawdkuen, N. Thitipramote, S. Benjakul, International Journal of Food Science and Technology, 2013, Vol. 48, No. 5, pp. 1093-1102, <https://doi.org/10.1111/ijfs.12067>
- [90] T.A.A. Nasrin, A. Noomhorm, A.K. Anal, International Journal of Food Properties, 2015, Vol. 18, pp. 165-177, <http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2013.828747>
- [91] F. Li, D. Jia, K. Yao, LWT-Food Science and Technology, 2009, Vol. 42, No. 5, pp. 945-949, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.12.005>
- [92] S. K. Sathe, S. S. Deshpande, D. K. Salunkhe, Journal of Food Science, 1982, Vol. 47, No. 2, pp. 491-497, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1982.tb10110.x>
- [93] V. Q. Neto, N. Narain, J. B. Silva, P. S. Bora, Food / Nahrung, 2001, Vol. 45, No. 4, pp 258-262, [http://dx.doi.org/10.1002/1521-3803\(20010801\)45:4<258::AID-FOOD258>3.0.CO;2-3](http://dx.doi.org/10.1002/1521-3803(20010801)45:4<258::AID-FOOD258>3.0.CO;2-3)
- [94] M. Dujka, Zpracování bílkovinného odpadu z výroby strojně odděleného masa, bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 2019
- [95] European Pharmacopoeia 9.0. European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care, 2017, dostupné online: <https://www.edqm.eu/en/news/shutdown-european-pharmacopoeia-9th-edition>
- [96] Food Chemical Codex 12, 2020, dostupné online: <https://www.foodchemicals-codex.org>



**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

NaOH	hydroxid sodný
HCl	kyselina chlorovodíková
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	kyselina sírová
CH <sub>3</sub> COOH	kyselina octová
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	kyselina citrónová
Ca(OH) <sub>2</sub>	hydroxid vápenatý
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	kyselina fosforečná
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	síran amonný
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctovou
NaHCO <sub>3</sub>	hydrogenuhličitan sodný
Gly	glycin
Pro	prolin
Hyp	hydroxyprolin
PLLA	kyselina polymléčná
FTIR	infračervená spektroskopie Fourierovy transformace

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1: Postup výroby želatiny demineralizací kostí pomocí hydrolyzy pepsinem [6] .....	13
Obrázek 2: Znázornění vlastností drůbežích želatin v porovnání s komerčními želatinami [3].....	16
Obrázek 3: Vývojový diagram kroků extrakce želatiny. S1: první fáze; S2: druhá fáze. Ž1: želatina extrahovaná z kuřecích hlav v S1. Ž1: želatina extrahovaná z kuřecích hlav v S2. Ž2: želatina extrahovaná z krůtích hlav v S1. Ž2: želatina extrahovaná z krůtích hlav v S2 [4].....	17
Obrázek 4: Vstupní surovina a následná vyextrahovaná želatina s popisem jednotlivých důležitých parametrů [23] .....	24
Obrázek 5: Zpracování kuřecího kostního separátu na želatiny .....	36
Obrázek 6: Demineralizovaný kolagen.....	37
Obrázek 7: Želatina 2. frakce po vysušení.....	38
Obrázek 8: Aparatura k měření teploty tání gelu.....	41
Obrázek 9: Diagram zobrazující významnost jednotlivých faktorů na výtěžek 1. frakce .....	51
Obrázek 10: Vrstvený graf vlivů faktorů A a B na výtěžek extrakce želatiny 1. frakce .....	51
Obrázek 11: Diagram zobrazující významnost jednotlivých faktorů na výtěžek 2. frakce .....	52
Obrázek 12: Vrstvený graf vlivů faktorů A a B na výtěžek extrakce želatiny 2. frakce .....	53
Obrázek 13: Diagram zobrazující významnost jednotlivých faktorů na výtěžek 3. frakce .....	54
Obrázek 14: Vrstvený graf vlivů faktorů A a B na výtěžek extrakce želatiny 3. frakce .....	54
Obrázek 15: Diagram zobrazující významnost jednotlivých faktorů na pevnost gelu 2. frakce .....	56
Obrázek 16: Vrstvený graf vlivů faktorů A a B na pevnost gelu želatiny 2. frakce...57	57
Obrázek 17: Diagram zobrazující významnost jednotlivých faktorů na teplotu tání 2 frakce .....	58

---

Obrázek 18: Vrstvený graf vlivů faktorů A a B na teplotu tání gelu želatiny 2. frakce .....	59
Obrázek 19: Gel v horní části zkumavky po odsátí supernatantu při vodě zadržující kapacitě.....	60
Obrázek 20: Změna struktury kolagenu v závislosti na teplotě (°C).....	63
Obrázek 21: Procentuální zastoupení velikosti jednotlivých zrn.....	64

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: Obsah aminokyselin v různých typech želatin [3].....	26
Tabulka 2: Složení vstupní suroviny (v sušině).....	35
Tabulka 3: Výsledky pevnosti gelu 1. a 2. frakce želatiny při jednotlivých teplotách extrakce .....	45
Tabulka 4: Rozpis experimentů s technologickými podmínkami extrakce a jejich výsledky.....	48
Tabulka 5: Rozpis jednotlivých kvalitativních analýz želatiny 1. frakce .....	49
Tabulka 6: Rozpis jednotlivých kvalitativních analýz želatiny 3. frakce .....	49
Tabulka 7: Rozpis jednotlivých kvalitativních analýz 2. frakce.....	50
Tabulka 8: Analýza kvalitativních parametrů hydrolyzátu.....	64
Tabulka 9: Porovnání jednotlivých analýz s dalšími literárními studii .....	66
Tabulka 10: Popis vstupní suroviny a parametry kondicionování, extrakce jednotlivých prací .....	67

## SEZNAM PŘÍLOH

PI materiálový list proteolytický enzym Protamex

# PŘÍLOHA P I: MATERIÁLOVÝ LIST PROTEOLYTICKÝ ENZYM PROTAMEX

Special Food / 2001-08284-03.pdf

## ProductSheet

Page 1:3



# Protamex<sup>®</sup>

## Description

Protamex is a *Bacillus* protease complex developed for the hydrolysis of food proteins.

## Product Properties

### Product Type

Protamex is a light brown, free-flowing, non-dusting microgranulate with an average particle size of approximately 250-450 microns. The colour may vary from batch to batch and colour intensity is not an indication of product strength. The product is readily soluble in water.

### Activity

Protamex is standardized in Anson Units per gram (AU/g).

Protamex.....Declared activity: 1.5 AU/g

See the Analytical Method for more information on the proteolytic analysis, which is based on the proteolysis of denatured haemoglobin.

## Purity

The product complies with the recommended purity specifications for foodgrade enzymes issued by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) and the Food Chemicals Codex (FCC).

## Packaging

See the standard Packaging List for more packaging information.

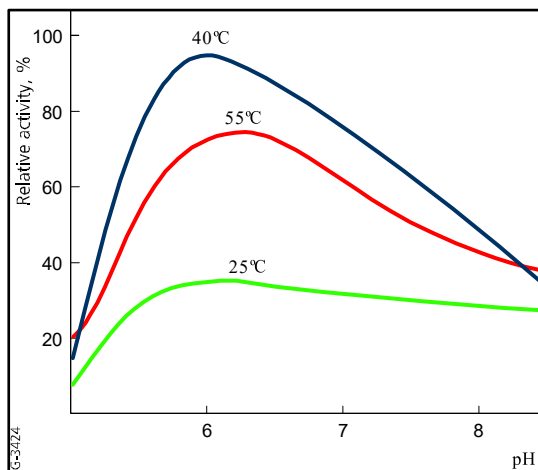
## Application

In contrast to many other endoproteases, Protamex will produce non-bitter protein hydrolysates even at low degrees of hydrolysis.

## Reaction Parameters

Optimal working conditions are at pH 5.5-7.5 and at 35-60°C (95-140°F) as determined by application trials.

In Figure 1 the activities shown are measured according to a modified Anson method in aqueous solutions without the stabilizing effect of proteinaceous matter. The stability of Protamex at a certain temperature is influenced by the type and concentration of the proteins present.



### **Fig. 1. Influence of pH at various temperatures on the activity of Protamex.**

Method: AF 4

Substrate: Denatured hemoglobin

#### **Inactivation**

Protamex can be inactivated in 30 minutes at 50°C (122°F) or higher when the pH is 4, and in 10 minutes at 85°C (185°F) or higher when the pH is 8. However, the inactivation is very much dependent on the substrate (substrate concentration, pH, etc.). Thus, the documentation for efficient elimination of Protamex must be based on actual analysis for the detection of residual activity. See the Method for the detection of residual protease activity in protein hydrolysate for further information.

#### **Safety**

Enzymes are proteins and inhalation of dust or aerosols may induce sensitization and may cause allergic reactions in sensitized individuals. Some enzymes may irritate the skin, eyes and mucous membranes upon prolonged contact.

The product is designed to resist some mechanical effects. However, excessive mechanical wear and tear or crushing may create dust.

All spills, even small spills, should be gently shovelled into plastic-lined containers. Use respiratory protection. Small spills and remains of large spills should be removed by vacuuming or flushing with water (avoid splashing). Vacuum cleaners and central vacuum systems should be equipped with HEPA filters.

When using the product for the production of protein hydrolysates, consumer safety in use is documented only if the production includes processing steps in which the product is removed and/or inactivated.

A Material Safety Data Sheet is supplied with all products. See the Safety Manual for further information regarding how to handle the product safely.



## Storage

Enzymes gradually lose activity over time depending on storage temperature. Cool conditions are recommended. When stored at 5°C (41°F), the product will maintain its declared activity for at least 1 year. When stored at 25°C (77°F), the product will maintain its declared activity for at least 3 months. Extended storage and/or adverse conditions, including higher temperatures or high humidity, may lead to a higher dosage requirement.



**Novozymes A/S**  
**Krogshøjvej 36**  
**2880 Bagsvaerd**  
**Denmark**

**Tel. +45 8824 9999**  
**Fax +45 8824 9998**  
**info@novozymes.com**  
**www.novozymes.com**

*Laws, regulations and third party rights may prevent customers from importing, processing, applying and/or reselling certain products in a given manner. It is the responsibility of the customers that their specific use of products from Novozymes does not infringe relevant laws and regulations and, furthermore, does not infringe patents or other third party rights. The contents of this document are subject to change without further notice.*

2001-08284-03 Maj 2003 © Novozymes A/S