

# **Příprava oxidovaného polysacharidu a posouzení jeho síťujícího účinku**

Anna Skočíková

---

Bakalářská práce  
2020

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

Akademický rok: 2019/2020

## **ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Anna Skočková**  
Osobní číslo: **T16382**  
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Polymerní materiály a technologie**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Příprava oxidovaného polysacharidu a posouzení jeho síťujícího účinku**

### **Zásady pro vypracování**

1. Zpracujte literární studii na zadané téma a zhodnotte ji s ohledem na praktickou část práce.
2. V praktické části připravte vybraný oxidovaný polysacharid a otestujte jeho síťující účinky na kolagenní bílkovinu, studujte vliv vybraných technologických podmínek.
3. Výsledky zpracujte tabelárně, graficky, proveďte diskusi.
4. Pokuste se navrhnout optimální podmínky síťování daného systému.

Forma zpracování bakalářské práce: **Tištěná/elektronická**

**Seznam doporučené literatury:**

- R. Schrieber, H. Gareis: *Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2007.  
A.J Varma, M.P Kulkarni: Oxidation of cellulose under controlled conditions. *Polymer Degradation and Stability*, 2002, 77, 1, 25-27.  
Li H et al.: Concomitant degradation in periodate oxidation of carboxymethyl cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 84, 3, 881-886.  
Mu Ch et al.: Preparation and properties of dialdehyde carboxymethyl cellulose crosslinked gelatin edible films. *Food Hydrocolloids*, 2012, 27, 1, 22-29.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Pavel Mokrejš, Ph.D.**  
Ústav inženýrství polymerů

Datum zadání bakalářské práce: **2. ledna 2020**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **22. května 2020**

L.S.

---

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

---

**doc. Ing. Tomáš Sedláček, Ph.D.**  
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 19. února 2020

## PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

### Prohlašuji,

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

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## **ABSTRAKT**

Tato bakalářská práce pojednává o přípravě oxidovaného polysacharidu, aldehyd celulózy (DAC) a posouzení jeho síťujícího účinku na želatinovém gelu. Bylo připraveno síťovadlo DAC. Produkty síťování byly zkoumány metodou faktorových pokusů. Zvolené faktory byly množství síťovadla (6-20 %) a doba síťování (48-120 h). Experimenty probíhaly při dvou pH (3,8 a 5,0). Byly stanoveny optimální podmínky pro pH 3,8 a pH 5,0. Při pH 3,8 je optimální doba síťování 110-120 hodin a optimální obsah síťovadla DAC je 6-8 %. Pro síťování želatinových gelů při pH 5,0 je optimální doba stanovena v rozmezí 78-93 hodin a obsah síťovadla je 12-14 %. Výsledky této práce prokazují síťující účinek dialdehydu celulózy a jeho možné použití pro modifikaci želatinových gelů ve farmaceutickém, zdravotnickém či kosmetickém průmyslu.

Klíčová slova: želatina, hydrogel, kolagen, dialdehyd celulóza, síťování

## **ABSTRACT**

This bachelor thesis deals with the preparation of oxidized polysaccharide, cellulose aldehyde (DAC) and assessment of its crosslinking effect on gelatin gel. A DAC crosslinker was prepared. The crosslinking products were investigated by the method of factor experiments. The factors chosen were the amount of crosslinker (6-20 %) and the crosslinking time (48-120 h). The experiments were expected at two pHs (3.8 and 5.0). Optimal conditions for pH 3.8 and pH 5.0 were determined. At pH 3.8, the optimal crosslinking time is 110-120 hours and the optimal DAC crosslinker content is 6-8 %. For crosslinking gelatin gels at pH 5.0, the optimal time is set at 78-93 hours and the crosslinker content is 12-14 %. The results of this work demonstrated the crosslinking effect of dialdehyde cellulose and possible use for the modification of gelatin gels in the pharmaceutical, medical or cosmetic industries.

Keywords: gelatin, hydrogel, collagen, dialdehyde cellulose, crosslinking

Ráda bych poděkovala vedoucímu bakalářské práce panu doc. Ing. Pavlu Mokrejšovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a čas, který mi věnoval. Poděkování také patří paní laborantce Miroslavě Žaludkové za odbornou pomoc v laboratoři. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své nejbližší rodině a přátelům za podporu, trpělivost a zázemí během studií.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské 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 BÍLKOVINY</b> .....	<b>11</b>
1.1 STRUKTURA BÍLKOVIN .....	11
1.1.1 Primární struktura.....	11
1.1.2 Sekundární struktura .....	13
1.1.3 Terciální struktura .....	13
1.1.4 Kvarterní struktura .....	13
<b>2 KOLAGENY</b> .....	<b>14</b>
2.1 STRUKTURA KOLAGENU .....	14
2.1.1 Primární struktura.....	14
2.1.2 Sekundární struktura .....	15
2.1.3 Terciální struktura .....	15
2.1.4 Kvarterní struktura .....	16
2.2 FYZIKÁLNĚ CHEMICKÉ VLASTNOSTI .....	17
2.2.1 Polyelektrolytický charakter .....	17
2.2.2 Denaturace a renaturace .....	17
2.2.3 Hydratace kolagenu.....	17
2.2.4 Hydrotermální stabilita.....	18
2.2.5 Botnění kolagenu .....	18
2.2.6 Přeměna na želatínu .....	18
2.3 POUŽITÍ KOLAGENU.....	19
2.3.1 Využití ve farmacii.....	19
2.3.2 Využití v potravinovém průmyslu .....	20
2.3.3 Využití v kosmetickém průmyslu .....	20
<b>3 ŽELATINA</b> .....	<b>21</b>
3.1 CHEMICKÉ SLOŽENÍ ŽELATINY .....	21
3.2 VÝROBA ŽELATINY .....	22
3.2.1 Kyselý proces výroby.....	22
3.2.2 Zásaditý proces výroby .....	23
3.3 FYZIKÁLNÍ A CHEMICKÉ VLASTNOSTI.....	23
3.3.1 Viskozita .....	23
3.3.2 Pevnost želatinového gelu – hodnota Bloom .....	24
3.3.3 Barva želatiny.....	24
3.3.4 Adhezní vlastnosti .....	24
3.3.5 Rozpustnost .....	24
3.3.6 Amfoterní chování želatiny .....	24
3.4 VYUŽITÍ .....	25
3.4.1 Využití ve fotografii.....	25
3.4.2 Využití ve farmacii.....	25

3.4.3	Využití v potravinářství.....	27
3.4.4	Využití v kosmetice.....	27
<b>4</b>	<b>SÍŤOVÁNÍ BÍLKOVIN-HYDROGELŮ .....</b>	<b>29</b>
4.1	HYDROGELY.....	29
4.1.1	Chemické síťování hydrogelů .....	29
4.1.2	Fyzikální síťování hydrogelů .....	30
4.1.3	Enzymatické síťování hydrogelů .....	30
4.2	VYUŽITÍ HYDROGELŮ .....	30
<b>5</b>	<b>PŘÍPRAVA OXIDOVANÉ CELULÓZY.....</b>	<b>31</b>
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST.....</b>	<b>32</b>
	<b>CÍL PRÁCE.....</b>	<b>33</b>
<b>6</b>	<b>POUŽITÉ PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE.....</b>	<b>34</b>
6.1	CHEMIKÁLIE.....	34
6.2	LABORATORNÍ SKLO A JINÉ POMŮCKY .....	34
6.3	PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ.....	34
<b>7</b>	<b>METODIKA PRÁCE.....</b>	<b>35</b>
7.1	METODIKA FAKTOROVÝCH POKUSŮ .....	35
<b>8</b>	<b>POSTUP PRÁCE .....</b>	<b>36</b>
8.1	PŘÍPRAVA DIALDEHYDU CELULÓZY (DAC).....	36
8.2	PŘÍPRAVA ŽELATINOVÉHO GELU SE SÍŤOVADLEM .....	37
8.3	STANOVENÍ ROZPUSTNOSTI GELU .....	37
<b>9</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>38</b>
9.1	VLASTNOSTI ŽELATINOVÉHO GELU PRO PH 3,8 BEZ SÍŤOVADLA .....	38
9.2	VLASTNOSTI ŽELATINOVÉHO GELU PRO PH 3,8 SE SÍŤOVADLEM .....	38
9.3	VLASTNOSTI ŽELATINOVÉHO GELU PRO PH 5,0 BEZ SÍŤOVADLA .....	41
9.4	VLASTNOSTI ŽELATINOVÉHO GELU PRO PH 5,0 SE SÍŤOVADLEM .....	41
<b>10</b>	<b>ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ A NÁVRH OPTIMÁLNÍCH PODMÍNEK .....</b>	<b>44</b>
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>45</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>46</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>50</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>51</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>52</b>



## ÚVOD

Hlavní charakteristickou vlastností želatinových gelů je jejich pevnost. Podle pevnosti dělíme želatinové gely do tří hlavních kategorií (nízké, střední, vysoké). Uplatnění nacházejí želatinové gely ve farmacii, zdravotnictví, potravinářství či kosmetice. Ve farmacii byla želatina využívána při výrobě lékových forem již od počátku 19. století. Dnes se běžně vyrábí z želatiny měkké želatinové kapsle, tvrdé kapsle, které se vyrábějí již od roku 1897, potahování tablet atd.

Většina lidí spojuje želatinu pouze s cukrárenským průmyslem (dezerty, dorty, ovocné žvýkačky), ale želatina hraje důležitou roli i v různých technických aplikacích. Je například šetrnou alternativou ve tkáňovém inženýrství jako zvláštní povrch pro kultivaci kmenových buněk, které jsou implantovány do lidského těla. Kmenové buňky se často kultivují i na materiálech, jako jsou latex a polystyren, avšak tyto materiály nejsou s lidskou tkání kompatibilní, tudíž při jejich možném rozkladu dochází k nežádoucím reakcím.

V budoucnosti bude želatina stále výchozím materiálem pro inovace ve velké škále odvětví s cílem udržitelně chránit zdraví, přírodu a životní prostředí. Využívá se také jako koloidní aplikace k vyčerezení vína, piva a dalších nápojů nebo mimo jiné k vytvoření hlavy zápalky. Díky široké škále vlastností a funkcí získávají koneční spotřebitelé výhody, které byly před stovkami let naprosto nepředstavitelné.

Aplikací vhodného síťovadla je možné želatinové gely upravit přímo na míru různým aplikacím. Proto je cílem bakalářské práce posouzení síťujícího účinku síťovadla a zaměření se na jeho potenciální využití v oblasti farmacie i kosmetiky.

# I. **TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 BÍLKOVINY

Proteiny jsou lineární polymery aminokyselin. Každá aminokyselina má jiný postranní řetězec. Díky tomu existuje široký výběr monomerů, a proto jsou proteiny extrémně všestranné se širokou škálou vlastností a schopností. Proteinů je několik druhů. Mohou to být proteiny katalytické neboli enzymy nebo to mohou být transportní nosiče přes membrány. Existují také proteiny strukturální bez katalytických nebo vazebných aktivit, regulační proteiny, pohybové a obranné [1][2]. Proteiny jsou tvořeny z různých trojrozměrných tvarů a struktur, které se skládají z několika úrovní struktur a chemických sil, které je drží [2].

## 1.1 Struktura bílkovin

V uspořádání bílkovin rozlišujeme několik strukturních úrovní.

### 1.1.1 Primární struktura

Primární struktura proteinů je dána pořadím aminokyselin. Aminokyseliny jsou tedy základními stavebními kameny bílkovin [1] a jsou vzájemně spojeny karboxyamidovou vazbou. Vazba vzniká mezi  $\alpha$ -karboxylovou skupinou (-COOH) jedné aminokyseliny a  $\alpha$ -aminoskupinou (-NH<sub>2</sub>) následující aminokyseliny za odštěpení vody (H<sub>2</sub>O). Tato vazba se jinak nazývá také peptidová vazba. Tento proces je pojmenován translace, a jsou tak vytvářeny polypeptidové řetězce [2]. Peptidové řetězce mají pouze jeden směr, a tím dva rozdílné konce: N-konec, který nese amoniovou skupinu, a C-konec, který je tvořen skupinou karboxylovou poslední aminokyseliny [3]. Bílkoviny zpravidla obsahují 100 až několik tisíc aminokyselin v řetězci [1].

V přírodě bylo doposud identifikováno více než 600 aminokyselin. V proteinech se vyskytuje 20 základních aminokyselin (AMK), z nichž devět aminokyselin je pro náš organismus nezbytných, používáme pro ně název esenciální aminokyseliny a řadíme mezi ně valin, leucin, izoleucin, methionin, fenylalanin, tryptofan, threonin, histidin, lyzin [1].

Podle struktury postranních řetězců dělíme aminokyseliny na:

**Alifatické:** V postranních řetězcích neobsahují heteroatomy ani žádný kruh. Řetězec je výrazně nepolární. Patří sem: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Izoleucin [3].

**Sirné:** Postranní řetězce obsahují atom síry a jsou také nepolární. Patří sem Cystein a Methionin. Cystein je schopen vytvářet disulfidové můstky, a proto je důležitý pro stabilizaci bílkovin.

**Aromatické:** Tyto aminokyseliny obsahují aromatické jádro. Fenylalanin je jedinou nepolární AMK. Tyrozin a Tryptofan jsou středně polární a Histidin je velmi polární.

**Neutrální:** V postranním řetězci se nachází hydroxylová skupina nebo amidová skupina. Patří sem: Serin, Threonin, Asparagin, Glutamin. Amidoskupiny asparaginu a glutaminu jsou polární [3].

**Kyselé:** Patří sem kyselina asparagová a glutamová [1].

**Zásadité:** Při fyziologickém pH jsou plně protonizované, jsou tedy kladně nabitě. Zásadité jsou zejména AMK Lyzin a Arginin.

Zvláštní skupinou je **cyklický prolin**, jehož postranní řetězec je tvořen pětičlenným řetězcem. Tato struktura způsobuje ohyby uvnitř peptidových řetězců, což je velmi důležité pro kolagen [3].

V kolagenu jsou nejvíce zastoupeny aminokyseliny glycin, prolin a hydroxyprolin, proto je zde uvedena jejich charakteristika.

**Glycin** neboli kyselina aminoctová je nejjednodušší aminokyselinou nevykazující optickou aktivitu. Vyskytuje se v glykoproteinu kolagenu, kde je typickou aminokyselinou společně s prolinem, lysinem a jejich hydroxyderiváty.

**Prolin** neboli pyrrolidin-2-karboxylová kyselina, na  $\alpha$ -uhlíku nemá primární aminoskupinu ( $-\text{NH}_2$ ), ale sekundární aminoskupinu ( $-\text{NH}-$ ) jako součást pyrrolidinového kruhu. Je hlavní aminokyselinou kolagenu, což je také příčinou sekundární struktury trojšroubovice tropokolagenu. Téměř polovina prolinových zbytků v kolagenu je posttranslačně hydroxylována na 4- nebo 3- hydroxyprolin. Prolin je obsažen také ve značném množství v kaseinu [1].

**Hydroxyprolin** je jednou z hlavních složek kolagenu všech typů. Vytváří se posttranslační modifikací prolinu enzymem 4-prolylhydroxylázy [4].

### 1.1.2 Sekundární struktura

Sekundární struktura proteinů nám udává prostorové uspořádání atomů v polypeptidovém řetězci [1]. Nejvýznamnějšími sekundárními strukturami jsou pravotočivý  $\alpha$ -helix a  $\beta$ -skládané listy [3]. Obě struktury vytváří maximální počet vodíkových vazeb, a proto jsou vysoce stabilní [2].

Pravotočivé  $\alpha$ -helixy jsou stabilizovány téměř lineárními vodíkovými můstky mezi -NH a -CO skupinami aminokyselinových zbytků peptidového řetězce, který je šroubovitě zavinut, a na každou jeho otáčku připadá 3,6 aminokyselinových zbytků [3], výška závitu je pak 0,57 nm [1]. Tyto závity stabilizují již zmíněné vodíkové můstky, které vedou svisle dolů a nahoru téměř rovnoběžně s osou šroubovice [2].

$\beta$ -skládaný list je téměř natažená konformace peptidového řetězce. Peptidové úseky jsou poskládány pravidelně do skládaného listu papíru. H-můstky se zde tvoří pouze mezi sousedními řetězci. Sousední řetězce mohou „běžet“ proti sobě, této konformaci pak říkáme antiparalelní  $\beta$ -skládaný list.  $\beta$ -skládaný list je díky téměř lineární konformaci energeticky výhodnější než  $\alpha$ -helix [3]. Tuto strukturu nenajdeme u řetězců obsahujících prolin, kolagen tedy se svým poměrně vysokým obsahem prolinu tuto strukturu nikdy nevytvoří [1].

### 1.1.3 Terciální struktura

Terciální struktura je tvořena ze sekundární struktury a tvoří trojrozměrnou konformaci bílkovin [3]. Tato struktura je výsledkem stabilizujících interakcí mezi postranními řetězci sekundárních struktur. Nejde o rovinné útvary, mohou být různě prohnuté, svinuté či navzájem spojené. U globulárních proteinů existují takřka samostatné kompaktní části, tzv. strukturální domény. Více strukturálních domén poté tvoří funkční domény [1]. Na stabilitě terciální struktury se podílejí jak kovalentní vazby (disulfidické můstky), tak ne vazebné interakce funkčních skupin aminokyselin (hydrofobní a elektrostatické interakce) [1].

### 1.1.4 Kvarterní struktura

Proteiny v terciální struktuře mohou dále tvořit na základě nekovalentních interakcí symetrické komplexy tzv. oligomery. Komponenty těchto oligomerních proteinů můžeme také označit jako monomery [3]. Monomery mohou být různé (hetero-) nebo naprosto identické (homo-) a ve většině případů jich bývá sudý počet [1], nejčastěji dva nebo čtyři. Termíny jako je dimer, trimer, tetramer, oligomer jsou tvořeny strukturami se dvěma, třemi, čtyřmi, několika a více monomery [2].

## 2 KOLAGENY

Kolagen je nejčastěji zastoupeným strukturálním proteinem u zvířat a lidí, představuje asi 30 % celkového obsahu tělesných bílkovin [5]. Dosud bylo identifikováno kolem 28 typů kolagenu s celkem 42 různými alfa řetězci. Kolagen má v těle několik funkcí, nejvýznamnější je však ta mechanická. Podílí se také na celé řadě funkcí tkání, včetně struktury, morfogeneze a opravy [6].

Kolagen typu I je nejrozšířenějším typem, který se nachází v extracelulární matrici, zejména v tkáních, jako jsou šlachy a kosti [7][8]. Kolageny typu II, IX a XI se vyskytují především v chrupavkách, typ X zejména v chrupavce hypertrofické [8]. Kolagen je díky své unikátní struktuře, jež je zodpovědná za vláknitou povahu, těžko degradovatelný [9].

### 2.1 Struktura kolagenu

Kolagenový protein má komplexní hierarchickou konformaci, která je složena z primární struktury (sled po sobě jdoucích aminokyselinových tripletů), sekundární struktury ( $\alpha$  helix), terciální struktury (triple helix) a kvarterní struktury [7].

#### 2.1.1 Primární struktura

Molekula kolagenu typu I má 3  $\alpha$  řetězce s asi 1014 aminokyselinami v každém řetězci. Tyto aminokyseliny se opakovaně obměňují po celém řetězci a následuje je sekvence – (Gly – X – Y)<sub>n</sub> –. Gly je zkratka aminokyseliny glycinu, který tvoří asi 30 % celkového obsahu aminokyselin v kolagenu. X nebo Y je jedna z aminokyselin s výjimkou Gly. Téměř 35 % neglycinových pozic je „zaplněno“ prolinem (X) a polohy Y jsou obsazeny zejména hydroxyprolinem [10]. Tyto AMK se podílejí na stabilitě díky tzv. efektu zámku, tj. vzájemným zapadnutím jejich struktur, a také díky tvorbě vodíkových můstků, kterých se účastní také hydroxylové skupiny hydroxylysinu, což je neobvyklá aminokyselina nacházející se v kolagenu [1] [9].

Hydroxylysin je tvořen z lysinu enzymatickou hydroxylací prostřednictvím lylyshydroxylázy. Hydroxyprolin je také tvořen enzymaticky z prolinu [9]. Běžně se nevyskytuje v žádných jiných proteinech. V kolagenu představuje téměř 50 % z celkového obsahu aminokyselin [7]. Hydroxyprolin zastává až 10 % aminokyselinové kompozice kolagenu, což můžeme použít ke kvantifikaci kolagenu nebo jeho degradovaných produktů v přítomnosti jiných proteinů [9].

Mezi polypeptidovými řetězci vznikají vodíkové vazby, van der Waalsovy síly a kovalentní vazby, kterých se účastní vždy dvě aminokyseliny [10]. Tvorba molekulárních vazeb je velmi důležitá jak ve struktuře triple helixu molekuly kolagenu, tak i v celkovém extracelulárním chování molekuly [10].

### 2.1.2 Sekundární struktura

Sekundární struktura kolagenu je levotočivá  $\alpha$  spirála, která je způsobena elektrostatickým odpuzováním mezi prolinem (X) a hydroxyprolinem (Y). Tato struktura je stabilní díky vodíkovým vazbám mezi AMK zbytky. Na konci řetězců se nacházejí nešroubovicové domény, tzv. C-konec a N-konec. C-konec iniciuje tvorbu trojitě spirály a N-konec se podílí na regulaci primárních vláken [7] [10].

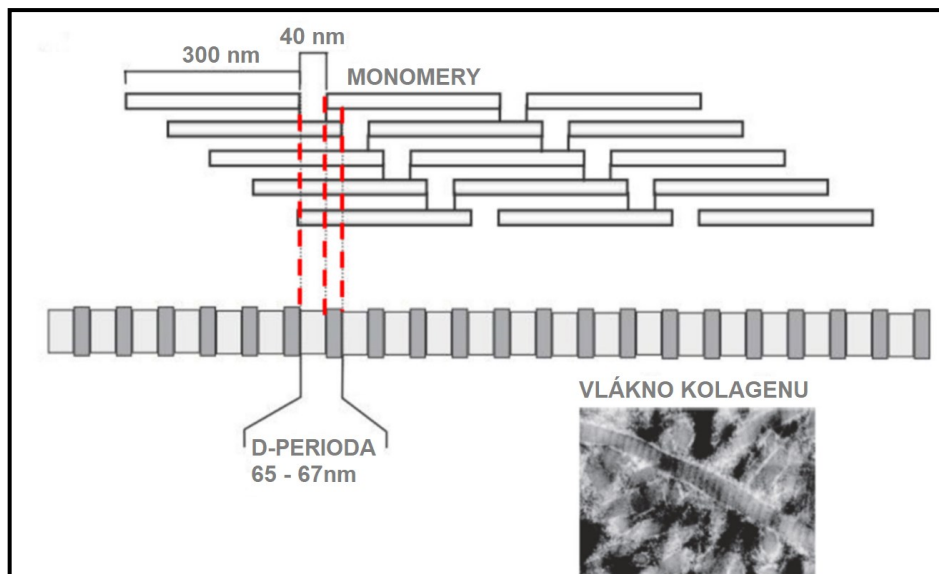
### 2.1.3 Terciální struktura

Ze tří levotočivých  $\alpha$ -helixů, dvou  $\alpha 1$ (I) řetězců a jednoho  $\alpha 2$  (II) řetězce je tvořena pravostranná trojitá spirála (tzv. Heterotrimer) kolagenu typu I. V trojitě šroubovici má každá třetí aminokyselina své zbytky umístěny kolem středové osy, zde je nejužší meziprostor. Proto je nejvýhodnější AMK v těchto místech Glycin díky svému minimálnímu objemu [10]. Přibližná délka tropokolagenu je 300 nm a průměr je přibližně 1,5 nm [7]. Vodíkové vazby mezi N-H skupinou Gly a sousedícím O=C (X) jsou hlavními stabilizačními interakcemi  $\alpha$ -trojitě šroubovice.

Stabilita této trojřetězcové konformace, biomechanických a fyziologických funkcí závisí na sekundárních vazbách mezi polypeptidovými řetězci a kovalentní vazbou generovanou aldolovým kondenzačním zesíťováním a aldehydovým aminovým zesíťováním [10].

### 2.1.4 Kvarterní struktura

Tropokolageny jsou spojeny v řadě a vyrovnány tak, aby tvořily stabilní mikrofibrily s mezerami, které jsou přibližně 64 nm nebo 67 nm široké, vizte Obrázek 1. Nerozpustné vlákno je vytvořeno díky intramolekulárním nebo intermolekulárním zesíťováním molekul kolagenu [10].



Obrázek 1 - Schematické znázornění struktury kolagenových vláken [10]

Telopeptidy, což jsou koncové části polypeptidu, respektive proteinu, mají délku asi 20 aminokyselin. Jsou velmi důležité ve fibrilogenezi a díky tvorbě zesíťení přispívají také ke stabilizaci zralých molekul kolagenu [7]. Toto zesíťení je zejména kovalentní a vyskytuje se především mezi lysinem a histidinem [10].

Kolagenové zesíťení je dvojího typu: Enzymatické zesíťení, které je zprostředkováno lysinhydroxylázou a lisyloxidázou, a neenzymatické zesíťení, nazýváno také glykační zesíťení. Tyto dva typy zesíťení se tvoří mezi aminovou postranní skupinou přítomnou v lysinových zbytcích a hydroxylysinovými zbytky v kolagenových telopeptidech, jež jsou přeměněny na aldehydy enzymem lysyl oxidázy a specifickými aktivními vazebnými místy přítomnými v sousedních trojitých helixech [7].



## 2.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti

### 2.2.1 Polyelektrolytický charakter

Kolagen má charakter amfoterního polyelektrolytu. Jeho iontové reakce probíhají v závislosti na pH prostředí. Část skupin postranních řetězců se ionizuje v alkalické a část v kyselé oblasti pH. Náboj kolagenové molekuly se mění se změnou pH. V silně kyselé oblasti má kladný náboj, v silně alkalické oblasti má náboj záporný. Izoelektrický bod nativního kolagenu je při pH 7. Mírnými účinky chemikálií se mění v rozsahu pH 4,5 až 8,0.

### 2.2.2 Denaturace a renaturace

Vlivem některých chemikálií nebo tepelným účinkem ztrácejí bílkoviny své původní nativní vlastnosti – denaturují. Denurací kolagenu vzniká želatina. Mechanismem denaturace tropokolagenu je dvoustupňový proces.

Nejdříve nastane zborcení trojitě spirály a makromolekula tropokolagenu se stáhne do statistického klubka, v němž jsou jednotlivé řetězce navzájem spojeny.

Ve druhém stupni se tato klubka rozpadávají na tři frakce: frakci  $\alpha$  tvořící jeden polypeptidický řetězec původní spirály, frakci  $\beta$  tvořící dva dosud spojené řetězce a frakci  $\gamma$ , kterou tvoří tři řetězce v nezměněné formě statistického klubka. Zůstane-li denaturovaný roztok tropokolagenu stát delší dobu při nízké teplotě, probíhá zčásti renaturace, tzn. dochází ke zpětné rekonstrukci spirálové konfigurace.

### 2.2.3 Hydratace kolagenu

Proteiny obsahují dva typy hydrofilních center schopných vázat vodu elektrostatickými silami a vodíkovými vazbami: 1) polární skupiny přítomné v bočních řetězcích některých AMK zbytků; 2) dusík a kyslík peptidické vazby.

Pro udržení fyzikálních vlastností kolagenu je nutná asociace určitého minimálního množství vody tvořícího přibližně 20 % jeho hmotnosti. V plně hydratovaném stavu kolagenu se uvolňuje pohybové omezení peptidových řetězců protofibril, typické pro suchý stav, čímž se vysvětluje elementární funkce vody pro fyzikální vlastnosti proteinu. Vzdálenost mezi sousedními polypeptidovými řetězci suchého kolagenu je 1 nm, hydratací se tato vzdálenost zvyšuje na 1,5 až 1,6 nm.

#### 2.2.4 Hydrotermální stabilita

Při zahřívání kolagenových vláken ve vodě dochází k jejich zkrácení asi o 1/3 vlákna ve směru osy. Tato termická kontrakce je charakterizována teplotou smrštění  $T_s$ . Příčinou smrštění je štěpení intermolekulárních příčných vazeb a rovněž intramolekulárních vazeb, které udržují trojitě spirály v nativním kolagenovém vlákně v nataženém stavu.  $T_s$  kolagenu se považuje za tání kolagenu v krystalických oblastech. Rovněž lyotropní činidla štěpící vodíkové vazby způsobují kontrakci kolagenového vlákna a snižují hodnoty  $T_s$ .

K určení stability trojhelikální struktury se využívá obvykle měření teploty  $T_d$ , tj. denaturační teploty přechodu kolagen – želatina. Hodnoty obou teplot lze v určitém rozsahu zvýšit zesíťováním kolagenu. Například u kolagenu vyčíněného glutaraldehydem jsou nacházeny hodnoty  $T_s$  kolem 70 °C, naproti tomu u nativního kolagenu se jedná o 37 °C.

#### 2.2.5 Botnání kolagenu

Jedna z nejdůležitějších vlastností kolagenů (přechodných koloidních soustav) je schopnost botnat. Po ponoření do vody vlákno kolagenu do jisté míry botná. Přitom dochází ke změně objemu, délky a pružnosti vlákna. Část vody obsažené v nabotnalém kolagenu tvoří tzv. botnací voda, kterou lze mechanickým účinkem odstranit. Druhou část tvoří voda hydratační, koloidně vázaná, odstranitelná pouze sušením.

#### 2.2.6 Přeměna na želatinu

Zahříváním kolagenu ve vodném prostředí vzniká želatina. Z teoretického hlediska přeměny kolagenu na želatinu rozeznáváme tři kroky: 1) Štěpení příčných kovalentních intermolekulárních vazeb na úrovni kvarterní struktury, 2) denuraci na úrovni terciální struktury, 3) hydrolytické štěpení peptidických vazeb polypeptidových řetězců na molekulární úrovni.

Zásah do struktury řetězce má charakter degradace, depolymerace je nežádoucím jevem: čím méně se rozštěpí vazeb, tím lepší vlastnosti želatina má. Typickou vlastností je přechod sol-gel. Gel želatiny je tixotropní, zahřátím na určitou teplotu „taje“ a přechází v sol.

Z hlediska složení AMK je možné želatinu považovat za chemicky velmi čistou formu kolagenu. Nevláknité bílkoviny, tuky a mukopolysacharidy jsou odstraněny. U alkalicky připravené želatiny dochází k poklesu koncentrace argininu, tyrosinu a amidicky vázaného dusíku. U kysele připravené želatiny se složení více blíží kolagenu [11].

## 2.3 Použití kolagenu

Největší zastoupení aplikace kolagenu se nachází ve farmaceutické a potravinářském průmyslu. Díky své výjimečné biokompatibilitě je vynikající jako biomateriál pro vývoj obvazových systémů a konstrukcí tkáňového inženýrství, má také velmi vysokou schopnost buněčné adheze a nízkou antigenitu [9].

Široce známé využití kolagenu je ve zlepšení hojení ran a omezení tvorby jizev. Kolagen se používá jak k lokální aplikaci pro zlepšení hojení ran (pomády), tak i k použití doplňků na kolagenové bázi alternativní cestou v kosmetickém a nutraceutickém oboru pro vzhled pokožky. Doplňková strava zahrnuje malé kolagenové peptidy nebo fragmenty, jež jsou výborně absorbovány střevní bariérou. Kolagenové peptidy přispívají ke vstřebávání vápníku a jiných minerálů nezbytných pro pevnost kostí, nehtů a vlasů. Mohou také stimulovat syntézu kolagenu v kostech, kloubech a kůži.

Při aplikaci v injekčních gelových přípravcích a doplňcích stravy snižují rizika zánětů a poškození kloubů. Představuje zdroj různých antimikrobiálních peptidů, u kterých bylo prokázáno, že inhibují růst širokého spektra bakterií s interakcí s aniontovými lipidy [5].

### 2.3.1 Využití ve farmacii

Kolageny jsou zpracovávány pro lékařské aplikace do různých forem, jako jsou pláty, síťoviny, trubice, filmy, houby, membrány, kompozity, injekční roztoky a disperze. Kolagen značně přispívá k růstu buněk, diferenciaci a regulaci růstu buněčných funkcí [9]. Tyto formy se využívají například pro reepitelizaci a rekonstrukci kůže [9] [5].

Existují nové studie, při kterých byl objeven kolagen z mořských živočichů, který má vysoký potenciál v oblasti hojení těžkých ran [5]. Kolagenový hydrogel je výborným kandidátem pro enkapsulaci buněk díky své botnavosti ve vodě, vhodným fyzikálním vlastnostem (gelovací schopnosti), vysokému obsahu vody usnadňujícímu transport a difuzi hmoty. Má také vynikající biologické vlastnosti a je náchylný k enzymatické degradaci [7].

Kolagenové membrány jsou využívány při řízené regeneraci kostních tkání. V současnosti se také používají v ústní a čelistní chirurgii, kde se mají využít jako bariérové membrány pro regeneraci periodontálních defektů kvůli biologické resorbovatelnosti, dále zabraňují epiteálnímu poklesu podél povrchů kořenů a během rané fáze hojení ran [7].

### 2.3.2 Využití v potravinovém průmyslu

S aplikací kolagenu se můžeme také setkat ve funkčních potravinách, nápojích, doplňcích stravy, cukrářství a dezertech, kde se používá jako přídatná látka pro zlepšení reologických vlastností potravin. Kolagenové filmy nebo povlaky se využívají k prodloužení trvanlivosti produktů nebo jako nosiče účinných látek [9].

Potraviny mají také vyšší výživovou i funkční vlastnost díky doplnění kolagenu, tato skutečnost vede taktéž ke zlepšeným zdravotním přínosům. Kolagenové doplňky pomáhají plnit požadavky těla, které vlivem stáří ztrácí schopnost syntézy kolagenu [9]. V potravinářství se využívá jak čistý kolagen, tak i ten ve formě želatiny [5].

### 2.3.3 Využití v kosmetickém průmyslu

Lidská kůže se skládá z epidermis, dermis a hypodermis (pokožka, škára a podkožní vazivo). Kolagen a elastin udržují v dermis určitou strukturu a elasticitu kůže. Tuto úlohu zaujímá především kolagen I. druhu, který tvoří až 80 % dermálního kolagenu.

V kosmetických přípravcích se používá kolagen hydrolyzovaný pro svou výbornou rozpustnost při neutrálním pH a taky pro jeho vlastnost vázat se na vodu, a tím lépe procházet dermou.

V procesu stárnutí má klíčovou roli tzv. oxidační stres, kterému zabraňují endogenní antioxidantní enzymy, a chrání tak kůži před zraněním. Kapacita těchto enzymů však s věkem klesá. Kolagen, želatina i peptidy aktivitu antioxidantních enzymů zvyšují, a tím i zmírňují oxidační stres kůže. Po perorálním příjmu hydrolyzátů kolagenu se v lidské krvi nacházejí malé peptidy odvozené od kolagenu. Tyto peptidy se pak přenášejí z krevních cév do integrálního systému. Tím stimulují dermální fibroblasty k syntéze kolagenu, elastických vláken a kyseliny hyaluronové [5].

### 3 ŽELATINA

Želatina je přírodní dusíkatý polymer, který je získáván částečnou hydrolyzou kolagenu z nejrůznějších živočišných zdrojů, jako jsou prasečí kůže, hovězí kůže a také z ryb [12] [13]. Množství a povaha kolagenu se liší od jednoho zvířete ke druhému, podle tohoto se liší i typ zvířecí tkáně. Při výrobě želatinového materiálu byl výběr zdroje kolagenu a jeho ošetření velmi podceňován [12]. Pro výrobu želatinových hydrogelů lze využít různých technologií výroby a jejich fyzikálních vlastností (izoelektrický bod, molekulová hmotnost [12]), pak je možné změnit vlastnosti produkovaných hydrogelů a jeho parametrů zesílení pro požadované účely [13].

#### 3.1 Chemické složení želatiny

Želatina má téměř totožné složení aminokyselin jako kolagen, ze kterého je vyráběna, vizte Tabulka 1 níže. Závisí tedy na procesu a způsobu výroby. Například izoelektrický bod je u želatin zpracovaných kyselým procesem v rozmezí 7-9,4, zatímco želatiny zpracované alkalicky mají izoelektrický bod o něco nižší, tj. 4,8-5,5. Kromě tohoto rozdílu mají alkalicky zpracované želatiny vyšší vnitřní viskozitu, a to především díky tomu, že kyselě zpracované želatiny mají méně příčných vazeb a jsou méně rozvětvené [14].

Aminokyselina	Kolagen I	Želatina typ A	Želatina typ B
Glycin	332	330	335
Prolin	115	132	124
Alanin	114	112	117
Hydroxyprlin	104	91	93
Arginin	51	49	48
Glutamine	48	48	
Serin	35	35	33
Aspartic acid	29	29	46
Lysin	28	27	28
Glutamic acid	25	25	72
Leucin	24	24	24
Valin	22	26	22
Threonin	17	18	18
Asparagine	16	16	
Phenylalanin	13	14	14
Isoleucin	11	10	11
Methionin	6	4	4
Histidin	4	4	4
Tyrosin	4	3	1

Tabulka 1 - Složení aminokyselin v kolagenu a želatině – zbytky aminokyselin na 1000 aminokyselinových zbytků

## 3.2 Výroba želatiny

Jak již bylo výše zmíněno, jako zdroj želatiny se využívají jak prasečí a hovězí kůže, kosti a chrupavky, tak i části ryb a drůbeže [12]. Přeměna surového kolagenu na želatinu probíhá v pěti krocích.

Nejprve je třeba suroviny promýt studenou vodou, a tím odstranit nečistoty rozpustné ve vodě. Poté je potřeba promytý materiál extrahovat. Extrakce se dělá dvěma způsoby, jeden je kyselým roztokem (želatina typu A), druhý roztokem zásaditým (želatina typu B) [13]. Tento krok je významný pro maximální výtěžek čisté želatiny a taky pro fyzikálně-chemické vlastnosti finální želatiny, které závisí na hodnotě pH, teplotě a době extrakce [12]. Extrakce kyselinou se používá zejména pro výrobu želatiny z prasat a je široce využívána ve Spojených státech amerických. V Evropě se jako hlavní zdroj využívá extrakce zásaditá, a to především na kůže a kosti [14].

Třetím krokem je želatina opět čištěna například ultrafiltrací, kdy se odstraňují nerozpustné látky a anorganické soli.

V dalším kroku se želatina koncentruje a sterilizuje za optimální teploty a v neposlední řadě se vysuší, tím se získá čistý želatinový prášek. Takto připravený prášek je posléze přesunut na kontrolu kvality, kde se testuje několik parametrů, jako jsou viskozita, složení a mikrobiologická aktivita [12].

### 3.2.1 Kyselý proces výroby

Kyselým procesem výroby se získává želatina typu A. Materiál promytý studenou vodou se v tomto procesu namočí do roztoku zředěné kyseliny o pH 1,5 až 3,0 (nejčastěji kyseliny chlorovodíkové, kyseliny sírové nebo kyseliny fosforečné). Toto louhování trvá 8-30 hodin. Za tuto dobu materiál botná na dvojnásobek či trojnásobek původního objemu. Po proběhlém procesu se materiál musí promýt tekoucí vodou, aby se odstranily přebytky kyseliny a materiál byl přibližně neutrální [12] [14].

Želatinový extrakt je poté sterilizován při teplotě (120-150 °C) po dobu asi 13 s, okamžitě chlazen a vytlačován do požadovaného tvaru (nudle nebo proužky). Gelovitá želatina se poté rozloží na pás a nechá se projít sušicí komorou, kde se řídí jak teplota, tak i vlhkost. Výsledný želatinový plát je rozdělen na malé kousky a rozemele se na želatinový prášek [12].

### 3.2.2 Zásaditý proces výroby

Zásaditým procesem výroby se získává želatina typu B [15]. Materiál, promytý vodou a zbaven nečistot, se nejprve ošetří kyselinou chlorovodíkovou, aby se demineralizovala koncentrace minerálů [12]. Promytý materiál se poté umístí do nádob spolu s vápennou vodou při pH 12 až 12,7 po dobu přibližně 15-20 dní [14].

Vápenná voda se často obnovuje, aby se odstranily již extrahované nečistoty, organické sloučeniny a mastnota [15]. Po dokončení alkalického procesu se materiál promývá vodou, zředěnou kyselinou a poté opět vodou, aby se dosáhlo neutrálního pH [14].

### 3.3 Fyzikální a chemické vlastnosti

Želatina je průhledná, pevná, křehká látka nažloutlé barvy. Je téměř bez chuti a bez zápachu [16]. Při normální teplotě a vlhkostních podmínkách obsahuje přibližně 9-10 % vody. Ve studené vodě se částice želatiny hydratují, a vzniknou tak nabotnalé oddělené částice, které při následném zahřátí přejdou do roztoku. Chování roztoku želatiny je ovlivněno teplotou, pH, tepelnou historií, koncentrací, způsobem výroby a také obsahem popela [17].

Tvorba gelu, viskozita a struktura jsou vlastnosti určené strukturou, molekulovou vlastností a teplotou systému. Želatiny tvoří tzv. koloidní roztoky neboli soly, které se po ochlazení převedou v gely a po zahřátí se opět vrátí v sol. Tato reverzibilita je jednou z nejdůležitějších technologických vlastností želatiny [18].

#### 3.3.1 Viskozita

Data o viskozitě jsou velmi důležitá. Komerční stanovení viskozity se provádí Ubbelohdeho viskozimetrem. Kapilární metody se spoléhají na tlak, pod kterým kapalina proudí, aby se vytvořilo smykové napětí. Je také velmi nutná přesná regulace teploty, neboť je na ní viskozita závislá, stejně jako je závislá na koncentraci [14].

### 3.3.2 Pevnost želatinového gelu – hodnota Bloom

Hodnota Bloom je analytickým měřítkem gelové síly. Je to hmotnost v gramech, která je požadována pro specifický píst, který stlačí povrch standardního termostatizovaného gelu do definované hloubky za standardních podmínek. Hodnota Bloom běžně užívaných želatin je v rozmezí 50-300 Bloom. Želatina s vyšší hodnotou Bloom má vyšší teploty tání a gelovatění a kratší doby gelovatění v konečném produktu. Silnější želatinační schopnost také znamená, že je zapotřebí menší množství želatiny k požadované pevnosti [18].

### 3.3.3 Barva želatiny

Barva neovlivňuje vlastnosti želatiny ani její účinnost. Závisí na povaze výchozí suroviny a zda se jedná o želatinu z první, druhé či další frakce. Vepřová želatina má méně sytou barvu [17].

### 3.3.4 Adhezní vlastnosti

Želatinové koncentrace o vysoké koncentraci jsou schopné pokrýt povrchové obrysy částic, a vytvářet tak adhezní síly. Jakmile se želatinový roztok nachází na spojovaných površích, začne po ochlazení gelovatět a zachová si svoji formu. Adhezní síla je tedy závislá na viskozitě roztoku a méně na jeho gelovacích schopnostech [18].

### 3.3.5 Rozpustnost

Želatina je rozpustná ve vodných roztocích vícesytných alkoholů například v glycerolu nebo propylenglykolu. Je také rozpustná ve vysoce polárních látkách nebo organických rozpouštědlech, jako jsou kyselina octová, trifluorethanol a formamid. V Benzenu, acetonu, dimethylformamidu a jiných méně polárních látkách želatina rozpustná není [17].

### 3.3.6 Amfoterní chování želatiny

Izoelektrický bod (IEP) má zásadní význam pro povrchovou aktivitu želatiny. Pokud je pH prostředí rovno IEP, želatina je neutrálně nabitá. Pokud je pH vyšší, želatina je nabitá záporně, a pokud nižší, je nabitá kladně. Pod pH 5,0 jsou všechny želatiny kladně nabitě a nad hodnotu 9,0 jsou nabitě záporně. Proteinová molekula má díky neutrálnímu náboji na svém IEP tzv. strukturu náhodných cívek. Pokud se pH posune pryč od IEP, změní se náboj na molekule. Tato strukturální změna ovlivňuje povrchově aktivní účinek želatiny. V případě nízkých koncentrací může dojít k zákalu a ztrátě pevnosti, pokud pH přesně



odpovídá IEP. IEP tak ovlivňuje kompatibilitu želatiny a je důležitým kritériem pro výběr typu želatiny [18].

### 3.4 Využití

Želatina je používána zejména při nízkých koncentracích ve vodě nebo vícesytných alkoholech při výrobě sladkostí a celé řady dezertů. Hlavními důvody, proč se v potravinářství využívá tak často, je, že poskytuje kvalitní gely ve zředěném roztoku, při vyšších koncentracích poskytuje elastické gumovité textury a je také účinným emulgačním a pěnotvorným činidlem.

Ve farmacii se využívá k vázání tablet, a pomáhá tak pomalému uvolňování aktivní složky či složek. Je využívána pro výrobu tvrdých i měkkých gelových kapslí obsahujících nejen léky ale i doplňky stravy.

Dále se želatina využívá ve fotografickém průmyslu k suspendování částic chloridu stříbrného a barviv citlivých na světlo bez aglomerace [14].

#### 3.4.1 Využití ve fotografii

V analogových fotografiích je želatina nenahraditelným potahovacím prostředkem. Využívá se jako pojivo a zabraňuje koagulaci halogenidů stříbra, které jsou citlivé na světlo [18]. Fotografické materiály bromidu stříbrného jsou složeny z emulzí, které obsahují želatinu na podkladu, jako je papír či film. Želatina zde vytváří pojivo pro bromid stříbrný, kdy po zahřátí a následném ochlazení vytváří gel, který po odpaření vody přejde v tenký film. Díky své schopnosti botnat zaručuje fotografickým lázním pronikání do emulze, a tím napomůže snadnějšímu oplachování chemikálií z fotografických materiálů [14]. K fotografickým účelům se používá želatina typu B pro emulzní využití a pro svrchní potahování a ponořování se využívá želatina typu A. Výroba surovin se pečlivě kontroluje, neboť je potřeba, aby měla želatiny požadované fotografické vlastnosti (stupně citlivosti či minimální zamlžovací schopnosti) [17].

#### 3.4.2 Využití ve farmacii

Želatina, díky svým výjimečným technologickým a farmaceutickým vlastnostem, je velmi důležitou všestrannou pomocnou látkou ve farmaceutických aplikacích. Využívá se jako zahušťovadlo v tekutých lékových formách, činidlo pro zvýšení adheze a viskozity produktů, gelová složka v dentálních produktech a jako pomocná látka při výrobě tablet.

Želatina je velmi dobře kompatibilní s lidským organismem, proto se využívá v urgentní medicíně jako součást krevní plazmy na bázi želatiny, v regenerativní medicíně či v invazivní chirurgii [18].

**Kapsle** patří k hlavnímu využití želatiny ve farmacii. Je hlavní složkou ve výrobě tvrdých i měkkých pouzder kapslí [19]. Tvrdá tobolka je složena ze dvou částí, víčka a těla, které mají válcovitý tvar s otevřeným koncem. Tyto části se vyrábí tak, že se studený kov v požadovaném tvaru namáčí do horkého roztoku želatiny. Po vytažení se vytvoří na kovu souvislý film, který se vysuší a po sejmutí z kovové formy se zkrátí na požadovanou délku. Po tomto procesu již nastává plnění, kdy se tyto dvě válcovité části naplní účinnými látkami a spojí se v konečnou lékovou formu. Tvrdé želatinové tobolky musí mít silné stěny a pevnost želatiny (Bloom) musí být vysoká. Kapsle je také možné vyrábět v různých barvách, avšak veškeré pigmenty používané pro tobolky jsou syntetického původu, neboť přírodní barviva nesplňují požadovanou intenzitu barvy, a jsou tak velmi drahá [14].

Měkké kapsle jsou uzavřené, bezešvé nebo s podélným švem. K výrobě, plnění i uzavření dochází v jednom kroku. Jsou vhodné především pro nevodné kapaliny a pasty. Textura měkkých tobolek nemusí být křehká či měkká. Měkké tobolky zpravidla obsahují změkčovadla, která zajišťují pružnost během procesu sušení a skladování. Změkčovadlo nesmí narušovat želatinovou stabilní síť ani nesmí interagovat s účinnými látkami v tobolce. Jako změkčovadlo se využívají zejména glycerol, sorbitol a jejich kombinace [18].

**Krevní náhrady** na želatinové bázi se využívají v urgentní medicíně jako náhrada krve a krevní plazmy. Využívají se do té doby, dokud není tělo schopné regenerovat či není k dispozici dostatečné množství vhodné krve k transfuzi [18]. U želatiny pro toto využití je nezbytná velmi vysoká čistota [14]. Želatinové roztoky musejí být vyrobeny tak, aby měly podobnou viskozitu jako krev, kromě toho je potřeba i snížit molární hmotnost. Želatinu je tedy třeba modifikovat pomocí reaktivních látek (Glyoxal, Anhydrid kyseliny jantarové, Fenyldiisokyanát), pomocí kterých se přemění molekulární struktura řetězců na globulární strukturu. Tato struktura má molekulovou hmotnost kolem 30 000 g/mol (původní molekulová hmotnost želatiny se pohybovala mezi 160-180 000 g/mol). Roztok modifikované želatiny je potřeba obohatit také o další prvky, jako jsou sodík, vápník, fosfát, chlorid, draslík a síran, čímž se vytvoří osmotický tlak totožný s osmotickým tlakem krve. Díky globulární struktuře želatina prochází pomaleji arteriálními stěnami [18]. V těle se také neukládá, je zcela rozložena a přirozeně vylučována [14].

**Želatinové houby** se využívají ve stomatologii a chirurgických aplikacích [18]. Mají vysokou absorpční schopnost a do vysoké míry vylučují alergické reakce s lidskou tkání. Absorbují krev a jiné tělní tekutiny. Při absorpci mohou dosáhnout až 50násobku své vlastní hmotnosti. Nedochází k jejich zapouzdření do tkání, jelikož je tělo dokáže bez problému rozložit. Díky svým vlastnostem se podílejí na migraci tkáňových buněk, a tím urychlují proces hojení. Hemostatické želatinové houby je možné modifikovat trombinem, antibiotiky, a dokonce i chemoterapeutickými látkami, což se využívá v technikách minimálně invazivních, jako je léčba myomů dělohy [17].

**Želatinové gely** se taktéž využívají mimo jiné i v mikrochirurgii jako lepidlo při implantaci srdečních chlopní či jako sonda zavádějící se do žaludku přes ústa až do tenkého střeva. Tato sonda se používá jako náhrada dřívější sondy s balónkem pro její lepší zavádění [14]. Dále jsou želatinové gely využívány jako bakteriální kultivační média, která využívají nutriční vlastnosti kolagenu, a tedy i želatiny [17].

### 3.4.3 Využití v potravinářství

Jedním z největších spotřebitelů želatiny je potravinářský průmysl. Je využívána jak pro termoreverzibilní vlastnosti, tak pro své stabilizační, vazebné a emulgační schopnosti. V ústech absorbuje vodu, tím klesá teplota tání a gel se roztaví. Je považována za jedinečné gelující činidlo [18]. Při výrobě cukrovinek je želatina velmi hojně využívána ke stabilizaci pěny (marshmallows) zvýšením viskozit podle vyžadované výsledné struktury. Želatiny taktéž snižují povrchové napětí, které usnadňuje tvorbu pěny [17]. Vlastností želatiny se využívá také při emulgaci oleje ve vodě, konkrétně trvalého začlenění mléčného tuku do produktu [18]. Mimo jiné se želatina využívá i v kombinaci s masnými výrobky. Například při konzervování šunek se želatina přidává před vařením k produktu, takže se při zahřívání rozpouští a vytvoří roztok, který po ochlazení vytvoří gel. Tento gel vyplní místo, jež se vytvoří po zmenšení masa, a zabrání tak mikrobiální kontaminaci či oxidaci [14].

### 3.4.4 Využití v kosmetice

Želatina v posledním desetiletí nachází stále větší uplatnění v kosmetickém průmyslu, kde se využívá k pasivní korekcím (barva) nebo aktivním reakcím s kůží, vlasy, nehty [17]. Využívají se želatinové hydrolyzáty, které jsou rozpustné ve vodě, jsou netoxické a také velmi dobře snášeny pokožkou.

Schopnost želatinového hydrolyzátu se adsorbovat na keratinovou strukturu vlasů a kůže je nazývána substantivitou. Substantivita se zvyšuje s molekulovou hmotností, avšak rozpustnost ve studené vodě se snižuje. Hydrolyzáty želatiny s molekulovou hmotností 3 000 g/mol mají vyšší substantivitu než hydrolyzáty s molekulovou hmotností nižší. Tato vlastnost je důležitým faktorem v péči o vlasy a pokožku, protože umožňuje hydrolyzáatům zůstat déle aktivní na kůži, díky čemuž jsou schopny vázat vodu po delší dobu. Perorálně podané hydrolyzáty želatiny zlepšují kvalitu kůže [14].

Želatinové hydrolyzáty se využívají ve vlasové kosmetice pro vytvoření filmu, většího lesku, snadné rozčesávání a také pro objem vlasů. Filmotvorné želatiny vytvářejí tenkou vrstvu kolem jednotlivých vlasů, čímž se zlepšují i další vlastnosti. Výrobky na barvené vlasy jsou schopny umožnit lepší vstřebávání barviva. Produktů na vlasy je celá řada od šamponů přes balzámy až po různé masky a každý produkt má jiné účinky [18].

Na trhu se můžeme setkat také s produkty určenými na stárnoucí pokožku, jako jsou různé krémy, pleťové vody, masky a séra. Tyto produkty jsou vhodné pro všechny typy pleti [19]. Příznaky stárnoucí kůže jsou zvýšená tvorba vrásek, ztráta elasticity a nepravidelná pigmentace s objevujícími se pigmentovými skvrnami. Jde o důsledek snížené schopnosti organismu obnovovat buňky ve vrstvách kůže, a tím i sníženou schopnost vázat vlhkost. Tvorba hlubokých vrásek probíhá v dermis. S vyšším věkem tvorba kolagenu trvá stále déle a v určitém bodě je ztráta kolagenu vyšší než jeho syntéza. V průběhu času se zmenšuje i pojivová tkáň, která pokožce dodává hladkost, napjatost a pružnost.

Proteinové povrchově aktivní látky želatinového hydrolyzátu a rostlinných mastných kyselin obsahují dermatologicky kompatibilní čisticí vlastnosti. Jako ochranné koloidy jsou schopny zlepšit kompatibilitu i jiných povrchově aktivních látek a také vytvářet emulgátory neobsahující dráždivé látky pro péči o pleť a vlasy [18].

## 4 SÍŤOVÁNÍ BÍLKOVIN-HYDROGELŮ

### 4.1 Hydrogely

Hydrogely jsou trojrozměrné zesítené struktury složené z hydrofilních polymerních systémů [20]. Absorbují a zadržují velmi velké množství vody, v některých případech až tisíckrát více vody než je jejich hmotnost v suchém stavu [21]. Hydrogely vykazují výjimečné vlastnosti. Jednou z nich je například mechanická pevnost, která je hojně využívána v biomedicínské oblasti. Struktura hydrogelů obsahuje kovalentní vazby mezi polymerními strukturami, kterých lze dosáhnout metodami zesíťování. Mezi metody síťování polymerních struktur patří fyzikální, chemická, enzymatická, fotochemická a metoda ozařováním vysokou energií [20]. Abychom tyto metody byli schopni použít, musí makromolekulární řetězce obsahovat: karboxylové kyseliny (COOH), hydroxylové skupiny (-OH), skupiny sulfonové kyseliny (SO<sub>3</sub>H) a amid/amido funkční skupiny (CONH<sub>2</sub>/CONH). Od funkčních skupin nacházejících se v řetězcích se odvíjejí specifické vlastnosti hydrogelů [22].

Pokud při nízkých či středních koncentracích vodných roztoků nedochází k podstatnému zesítení řetězců, pak tyto hydrogely vykazují newtonovské chování. Jestliže však dochází k proplétání mezi různými polymerními řetězci, tyto vytvořené sítě jsou viskoelastické až čistě elastické [23].

Přírodní hydrogely na bázi polymerů jsou z kolagenu, želatiny, hedvábí a polysacharidů (agar, alginát, karagenan, škrob, psyllium) [24]. Syntetické hydrogely mají dlouhou životnost, vysokou kapacitu vody a velmi dobrou gelovou pevnost. Lze je modifikovat tak, aby byly schopny přizpůsobit se funkčnosti [25].

#### 4.1.1 Chemické síťování hydrogelů

Při procesu vytváření zesítení chemickou vazbou vznikají kovalentní vazby mezi řetězci. Může se jednat o dva způsoby zesítení, a to takové, že zesítení proběhne současně s polymerizací nebo k zesítení dojde až po syntetizování lineárních řetězců polymeru [26].

Chemicky zesítené gely se získávají radikálovou polymerací monomerů s nízkomolekulárními síťujícími činidly. Polymery rozpustné ve vodě, obsahující hydroxylovou skupinu, mohou být zesíťovány glutaraldehydem. Toto zesítení proběhne pouze při nízkém pH a vysoké teplotě. Glutaraldehyd se využívá jako činidlo i při zesítení s polymery obsahujícími amin za mírnějších podmínek než polymery s (OH-), avšak

glutaraldehyd je toxická sloučenina vykazující inhibici růstu buněk. Proto se vyvíjejí jiné alternativy a od glutaraldehydu se upouští. Síťování lze provést i pomocí kondenzace či adiční reakce [23].

#### **4.1.2 Fyzikální síťování hydrogelů**

K fyzikálnímu zesítnění dochází pomocí vodíkové nebo iontové vazby. Tyto vazby mezi řetězci se snadno vytvářejí, ale zesítnění postrádá stabilitu kvůli přechodu sol-gel, který je způsoben změnami teploty, pH nebo změnou iontové síly. Například vodné roztoky želatiny se po ochlazení stanou gely, avšak po zvýšení teploty opět přejdou v sol. Takové gely se nazývají reverzibilními [26]. Fyzikální zesítnění pomocí vodíkových vazeb se tvoří pouze v případě, jsou-li karboxylové skupiny protonovány. Botnání těchto gelů je tedy výrazně závislé na pH [23].

#### **4.1.3 Enzymatické síťování hydrogelů**

Enzymatické síťování hydrogelů probíhá za mírných podmínek, jelikož kinetika gelace je řízena právě koncentrací použitého enzymu. Kinetika gelace taktéž závisí na struktuře a složení polymerního řetězce a na poměru reaktantu ke zmíněné koncentraci enzymu [23].

### **4.2 Využití hydrogelů**

Hydrogely jsou velmi důležité ve zdravotnickém a farmaceutickém průmyslu. Využívají se jako tablety, kontaktní čočky, vložky, tkáňové expandéry atd. Začátkem 21. století se začaly používat k dodávání léčiv s řízeným uvolňováním, kde jsou léčiva rozptýlena po celé matici hydrogelu [20]. Jsou zkoumány jako možné matrice pro enkapsulaci živých buněk či k zapouzdření labilních bioaktivních látek [23].

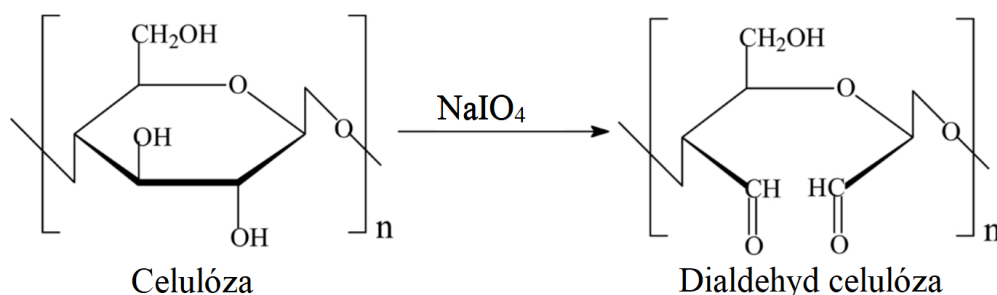
## 5 PŘÍPRAVA OXIDOVANÉ CELULÓZY

Oxidací celulózy můžeme připravit řadu polymerů s různými funkčními skupinami, jako jsou aldehydové a karboxylové skupiny, kromě již existujících primárních a sekundárních hydroxylových skupin. Díky oxidaci můžeme rozšířit rozsah použití celulózy. Oxidovaná celulóza (OC) byla například uznána jako velmi důležitý materiál v chromatografii. Celulózové diaminy z OC byly použity jako plniva do epoxidových matric, čímž se eliminovalo oddělení a směšování vytvrzovacího činidla, a zvýšila se tak rychlost vytvrzování. Kromě toho se tím zabránilo fázové separaci plniva. Oxidace celulózy změni strukturu a krystalinitu výsledné molekuly, což ovlivní její fyzikální i chemické vlastnosti. Bylo vyrobeno hned několik oxidovaných celulóz, jako jsou dialdehyd celulózy (DAC), dikarboxy celulóza (DCC), která se získá oxidací DAC, a dialdehyd karboxymethylcelulóza (DCMC) [27].

### Dialdehyd celulózy

Příprava dialdehydu celulózy se běžně provádí oxidací celulózy jodistanem sodným ( $\text{NaIO}_4$ ), což vede k rozrušení C-C vazby glukózy a tvorbě 2,3- dialdehyd celulózy [28] [27].

Podle studie (Kim a kol., 2000), která je zaměřená na krystalinitu oxidované celulózy, byl připraven dialdehyd celulózy jodistanem sodným při teplotě 20 °C [29]. Teplota, při které probíhá oxidace, je velmi důležitá, neboť se jodistan nad teplotou 50 °C rozkládá za uvolnění jódu [30].



Obrázek 2 - Reakce celulózy s jodistanem sodným za vzniku dialdehydu celulózy [28]

Oxidací celulózy můžeme zlepšit její vlastnosti. Například celulózový nanofibrilární materiál, který je zesíťován pomocí jodistanu sodného, vykazoval zvýšenou pevnost, výrazně vyšší stabilitu za mokra a také nízkou iontovou vodivost, což se uplatňuje u superkondenzátorů na bázi celulózy [31]. Dialdehyd celulózy v reakci s L-lysinem vykazuje velmi dobrou antibakteriální aktivitu. Tato báze DAC-Lys není toxická, proto je potenciální přísadou do antibakteriálních materiálů [28].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**



## CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo vypracovat literární studii zaměřenou na síťování želatin a konkrétně se zaměřit na síťovadlo dialdehyd celulózy (DAC). Dále byla vytvořena studie na využití těchto síťovaných želatin zejména ve farmaceutickém průmyslu a kosmetice. Cílem praktické části je příprava síťovadla DAC a posouzení jeho síťujícího účinku na potravinářské želatině. Síťující účinek bude zjišťován změnami pevnosti želatinového gelu podle standardní metodiky ASTM a také rychlostí rozpouštění želatinového gelu. Modelace a vyhodnocení experimentů síťování bude provedeno faktorovými experimenty. Taktéž budou navrženy optimální podmínky pro síťování želatinového gelu pomocí síťovadla DAC. Předpokladem je, že síťovadlo DAC zvýší pevnost želatinového gelu o 20 %.

## 6 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE

### 6.1 Chemikálie

Kyselina chlorovodíková – 5M HCl, jodistan sodný NaIO<sub>4</sub>, chlorid sodný NaOH, mikrokrystalická celulóza, destilovaná voda, potravinářská želatina, t – butylalkohol, pufr o pH 3,8 a 5,0.

### 6.2 Laboratorní sklo a jiné pomůcky

Erlenmayerovy baňky, odměrné válce, fritový kelímek S2 a S1, Petriho misky, alobal, kádinky, lodičky, lžičky, magnetická míchadla, nálevky, násypky, pipety, třecí miska, standardizovaná nádoba pro měření pevnosti gelu

### 6.3 Přístroje a zařízení

Analytické váhy – Kern 770 – 60, sušárna – Venticell, sušárna -UPL 400 memmert, vývěva, pH metr - WTW pH526, třepačka - LT2, inkubátor, centrifuga, vařič s magnetickým míchadlem - IKA C-MAG HS 7, lednice - ERF 2504 aow elektrolux, Stevens - texture Analyzátor LFRA



Obrázek 3 - Vařič s magnetickým míchadlem - IKA C-MAG HS 7



Obrázek 4 - Stevens texture Analyzátor LFRA

## 7 METODIKA PRÁCE

### 7.1 Metodika faktorových pokusů

Metodika faktorových pokusů (FP) je hojně využívána v případech, kdy je zkoumáno několik veličin najednou. Faktorové pokusy minimalizují náklady, jelikož umožňují snížení počtu pokusů. Jejich počet se stanovuje podle počtu vstupních proměnných a jejich hodnot. Schéma FP je na principu matice vzájemně kombinovaných hodnot určitého pokusu. Nejvíce se využívají pokusy typu  $N^P$ , kde N - počet úrovní a P - počet faktorů. Příkladem může být faktorový pokus  $2^3$ , tedy 2 úrovně a 3 faktory [32].

V této bakalářské práci byl využit faktorový pokus  $2^2$ , tedy 2 úrovně a 2 studované veličiny.

Klíčovými faktory jsou **množství síťovadla** vztaženého na celkovou navážku želatiny (**Faktor A**) a **doba celkového působení síťovadla** (**Faktor B**). Kombinace faktorů je znázorněna v Tabulce 2.

Dvou faktorovému testování jsou podrobeny dva želatinové gely. První želatinový gel má konstantní pH 3,8 a druhý testovaný želatinový gel je připraven při pH 5,0. Celkový počet provedených experimentů je 14 (10 experimentů proběhlo se síťovadlem a 4 experimenty byly slepé vzorky).

Č. experimentu	Faktor A - Množství síťovadla [%]	Faktor B - Doba síťující reakce [h]
1	6	48
2	6	120
3	20	48
4	20	120
5	13	84
6	0	48
7	0	120

Tabulka 2 - Technologické podmínky síťování pro pH 3,8 a 5,0

## 8 POSTUP PRÁCE

### 8.1 Příprava dialdehydu celulózy (DAC)

Do Erlenmayerovy baňky o objemu 500 ml bylo převedeno předem navážených 30 g mikrokrystalické celulózy společně s 250 ml 5N HCl. Tato směs se nechala zhydrolysovat při 80 °C po dobu 7,5 h v sušárně. Po uplynulé době se směs ochladila a přefiltrovala přes fritový kelímek S2. Celulóza zachycená na kelímku se převedla do vysoké Erlenmayerovy baňky o objemu 1 l společně s 200 ml vody, čímž se rozmíchaly velké kousky celulózy.

Do Erlenmayerovy baňky s celulózu rozmíchanou ve vodě se přidalo předem navážených 60 g NaIO<sub>4</sub>. Poté se u této směsi při míchání na magnetickém míchadle upravilo pH na 4,0 ± 0,2 pomocí 16 ml NaOH. Jelikož reakce s NaIO<sub>4</sub> probíhá ve tmě, byla Erlenmayerova baňka obalena alobalem a uzavřena zátkou taktéž z alobalu, aby vzniklé plyny mohly unikát. Poté se Erlenmayerova baňka se směsí umístila do inkubátoru, kde se směs třepala při 35 °C po dobu 48 h.

Poté, co proběhla oxidace, se směs odstředila ve velké centrifuze při 4000 otáček/min po dobu asi 6 minut. Tuhý podíl po odstředění obsahoval nezreagovaný zbytek celulózy, který se vyhodil. Kapalný podíl obsahoval stále drobné nezreagované zbytky celulózy, a proto se celý objem kapalného podílu přelil přes fritový kelímek S2.

Oxidovaná celulóza (DAC) se získala tak, že se kapalný podíl přidal do dvojnásobného objemu, tj. 450 ml t-buthylalkoholu za míchání na magnetickém míchadle při pokojové teplotě po dobu 10 min. Za tuto dobu se DAC vysrážela. Po vysrážení DAC se směs přelila přes fritový kelímek S1, na kterém se ještě třikrát prolila t-buthylalkoholem.

Vzniklá „pasta“ DAC se rozprostřela na Petriho misku a po krátkém odpaření t-buthylalkoholu se vysušila v sušárně při 35 °C po dobu 24 h. Vysušená DAC se poté roztřela ve třecí misce na prášek a uschovala ve skleněné lahvičce.

Srovnatelný postup výroby DAC můžeme nalézt také ve studii Varma a Kulkarni, která zkoumala hladinu oxidace celulózy při určité teplotě, koncentraci jodistanu a pH [30].

## 8.2 Příprava želatinového gelu se síťovadlem

Do kádinky o objemu 50 ml se odvážilo potřebné množství síťovadla DAC, vztaženo na hmotnost navažované želatiny, tj. 7,5 g a přidalo se 14,5 ml (z celkových 104,5 ml) pufru o daném pH. Směs se postupně zahřívala za stálého míchání magnetickým míchadlem. DAC se nejprve nerozpouštěla, avšak se vzrůstající teplotou rozpustnost stoupá. Pokud se DAC nerozpustí při 60 °C po cca 10 minutách, pak je možné teplotu postupně zvyšovat až do naprostého rozpuštění DAC. Pokud dojde k vypařování pufru, je potřeba jej doplňovat, aby po rozpuštění DAC byl objem roztoku 14,5 ml.

Standardizovaný postup na měření pevnosti želatinových gelů je rozpuštění 7,5 g želatiny ve 104,5 ml vody (pufru).

Do standardizované nádoby na měření pevnosti želatinového gelu bylo naváženo 7,5 g želatiny a přidáno 90 ml (ve zbylých 14,5 ml byla rozpuštěna DAC) předem připraveného pufru o daném pH (3,8 nebo 5,0). Želatina byla ponechána asi 1 h při pokojové teplotě, aby proběhlo botnání molekul. Poté byla směs zahřívána na 50-60 °C za stálého míchání po dobu 10 minut do úplného rozpuštění gelu.

K rozpuštěnému želatinovému roztoku se přidal roztok síťovadla (o objemu 14,5 ml) obsahující množství podle Faktoru A a pokračovalo se v míchání magnetickým míchadlem při stejné teplotě po dobu 2 minut.

Nádobka s roztokem se přikryla víkem a byla vložena do inkubátoru s teplotou 10 °C po dobu síťující reakce podle Faktoru B.

## 8.3 Stanovení rozpustnosti gelu

Další hodnoticí metodou byla rychlost rozpouštění gelu, kdy se připravený gel ve standardizované nádobě umístil do inkubátoru. Při teplotě 50 °C se sledovalo, zda dochází k jeho rozpuštění, a za jak dlouho gel přejde v sol. Tato doba se pak zaznamenala.

Rozpustnost gelu se posléze společně s jeho pevností zaznamenala do programu Minitab 19, kde se statisticky vyhodnotila.

## 9 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 9.1 Vlastnosti želatinového gelu pro pH 3,8 bez síťovadla

Nejprve byly připraveny vzorky želatinového gelu bez přidaného síťovadla DAC při pH 3,8. Tyto vzorky se umístily do inkubátoru a nechaly se po uvedené době (podle Faktoru B) síťovat. Po uplynutí této doby se změřila pevnost gelu a následně doba rozpouštění v inkubátoru za stálé teploty 50 °C.

Jak můžeme vidět v tabulce 3, pevnost želatinového gelu po 48 hodinách síťování činila 117 Bloom a pevnost želatinového gelu, který byl síťován po dobu 120 hodin, byla o něco vyšší a činila 129 Bloom. Doba rozpouštění se u želatinových gelů taktéž lišila. Želatinový gel síťován po dobu 48 hodin se rozpustil za 22 minut a gel síťován 120 hodin se rozpustil za 30 minut.

Č. vzorku	Faktor A Množství síťovadla [%]	Faktor B Doba síťující reakce [h]	Pevnost [Bloom]	Doba rozpouštění [min]
1	0	48	117	22
2	0	120	129	30

Tabulka 3 - Naměřené hodnoty želatinového gelu bez síťovadla při pH 3,8

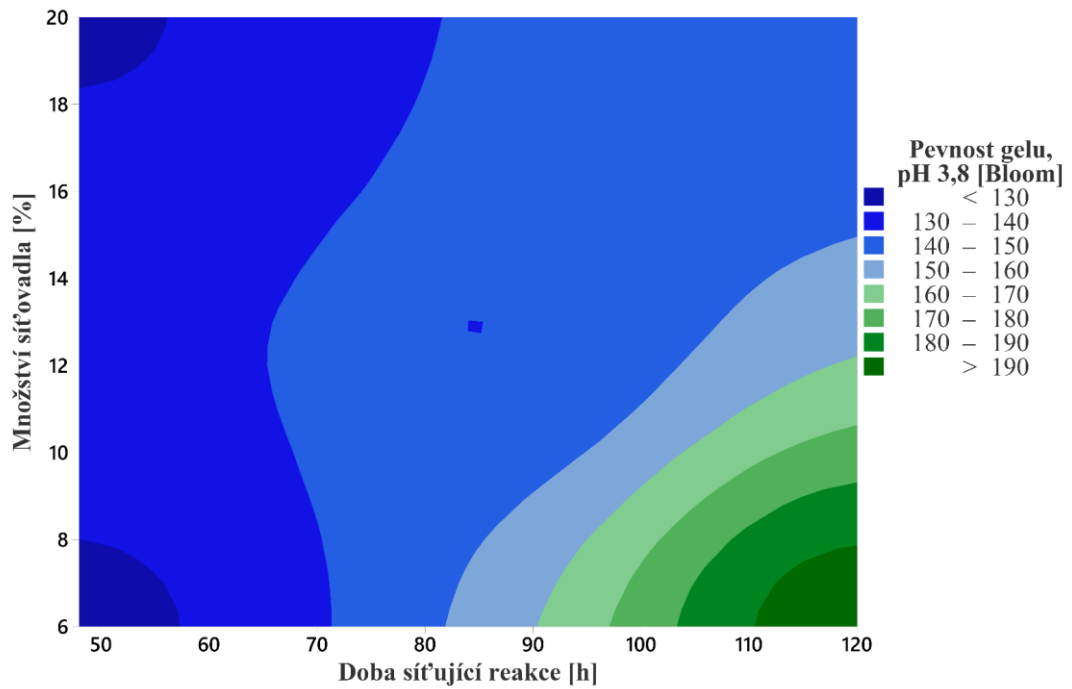
### 9.2 Vlastnosti želatinového gelu pro pH 3,8 se síťovadlem

Následně byly připraveny vzorky s obsahem síťovadla DAC podle Faktoru A při stejném pH. Tyto vzorky se stejně jako vzorky bez síťovadla umístily do inkubátoru a nechaly se síťovat po uvedené době (Faktor B). Poté se opět změřila pevnost gelu a doba rozpustnosti.

V tabulce číslo 4 jsou výsledné vlastnosti želatinového gelu síťovaném při pH 3,8. Můžeme pozorovat, že želatinový gel s obsahem síťovadla 6 %, u kterého byla doba síťující reakce 48 hodin, měl nejnižší pevnost, tj. 128 Bloom, a rozpouštěl se 25 minut. Nejvyšší pevnost 195 Bloom měl želatinový gel s obsahem síťovadla 6 %, který se síťoval po dobu 120 hodin. Tento gel se rozpouštěl 39 minut.

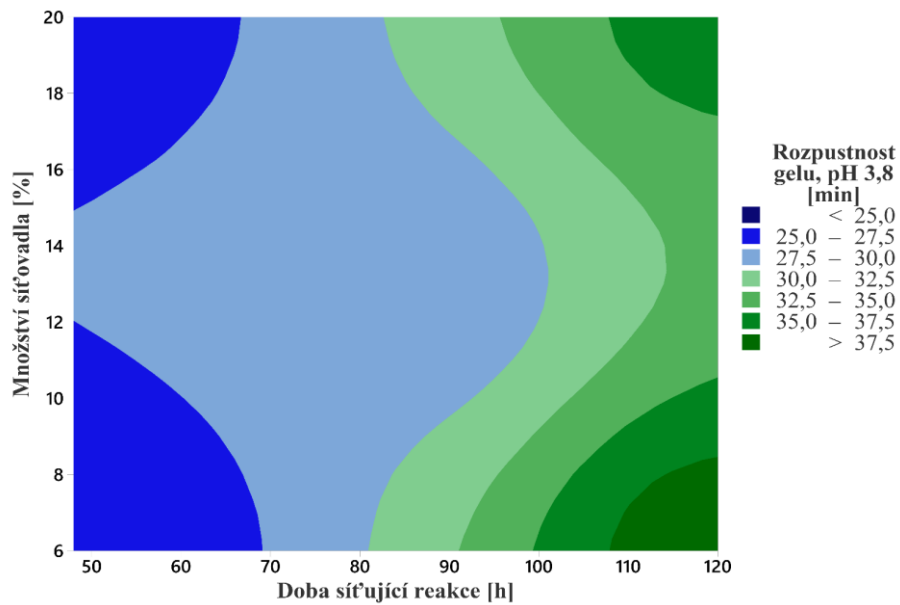
Č. vzorku	Faktor A Množství síťovadla [%]	Faktor B Doba síťující reakce [h]	Pevnost [Bloom]	Doba rozpouštění [min]
1	6	48	128	25
2	20	48	129	26
3	13	84	140	28
4	6	120	195	39
5	20	120	145	36

Tabulka 4 - Naměřené hodnoty želatinových gelů při pH 3,8



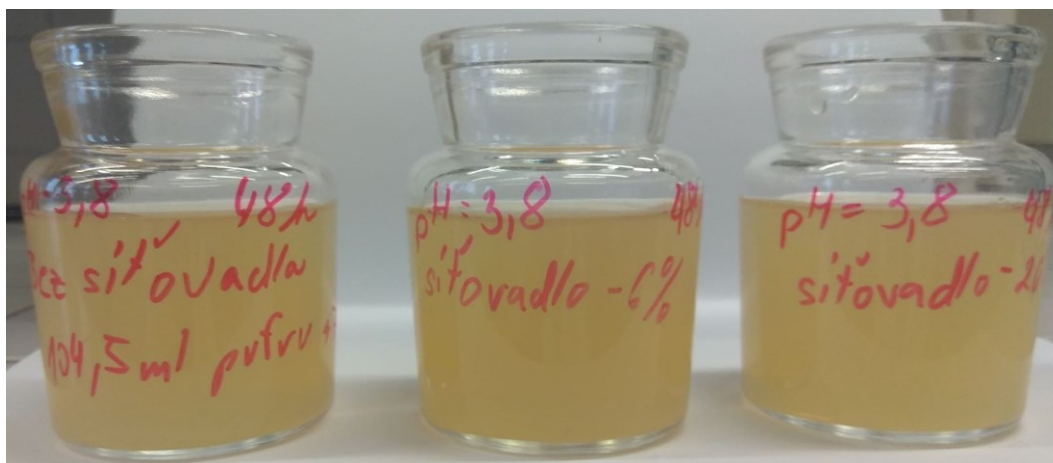
Obrázek 5 - Pevnost želatinového gelu, pH 3,8

Z obrázku 5 můžeme vyčíst, že vzorek želatinového gelu, který byl síťován DAC, vykazuje nejvyšší pevnost, více než 190 Bloom, při množství síťovadla 6 % a při době síťování 120 hodin.



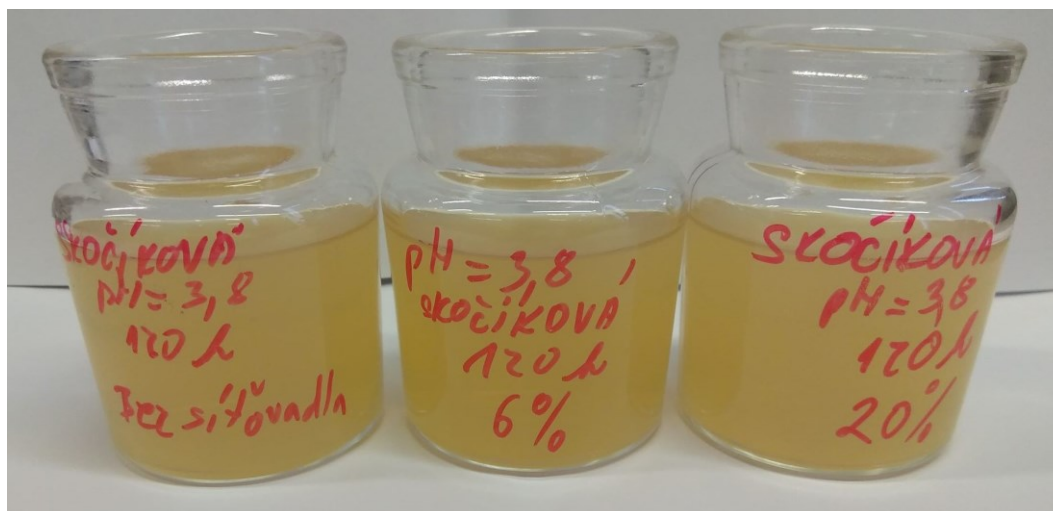
Obrázek 6 - Rozpustnost želatinového gelu, pH 3,8

Nejrychleji (méně než 27 min) se rozpouštěl želatinový gel s obsahem síťovadla 6 %, respektive 20 %, síťovaný po dobu 48 hodin. Nejdéle (více než 37 min) se rozpouštěl želatinový gel s obsahem síťovadla v rozmezí 6 %, respektive 20 %, síťovaný po dobu 120 hodin. Je tedy zřejmé, že želatinové gely síťované po kratší dobu, se rozpouštějí rychleji.



Obrázek 7 - Želatinové gely síťované po dobu 48 h při pH 3,8

Na obrázku 7 je srovnání želatinových gelů síťovaných po dobu 48 h při konstantním pH 3,8. Množství přidaného síťovadla je (zleva) 0 %, 6 % a 20 %.



Obrázek 8 - Želatinové gely síťované po dobu 120 h při pH 3,8

Obrázek 8 znázorňuje srovnání želatinových gelů při pH 3,8 síťovaných po dobu 120 hodin s množstvím síťovadla (zleva) 0 %, 6 %, 20 %. Můžeme pozorovat, že koncentrace síťovadla ani doba síťování nemají na barvu, respektive zakalení, vliv.



### 9.3 Vlastnosti želatinového gelu pro pH 5,0 bez síťovadla

Stejně jako u želatinového gelu při pH 3,8 byly nejdříve připraveny vzorky bez síťovadla i u pH 5,0. Tyto vzorky se umístily do inkubátoru a nechaly se síťovat po uvedené době (Faktor B). Poté se změřila pevnost gelu a doba rozpustnosti.

Pevnost želatinového gelu, který se síťoval po dobu 48 hodin, činila 141 Bloom a doba rozpustnosti byla 25 minut. Nicméně želatinový gel síťující se po dobu 120 hodin vykazoval pevnost 215 Bloom, což je o 74 Bloom více než u gelu, který se síťoval po dobu 48 hodin. I rozpustnost tohoto gelu byla delší, a to o 14 minut.

Č. vzorku	Faktor A Množství síťovadla [%]	Faktor B Doba síťující reakce [h]	Pevnost [Bloom]	Doba rozpouštění [min]
1	0	48	141	25
2	0	120	215	39

Tabulka 5 - Naměřené hodnoty želatinového gelu bez síťovadla při pH 5,0

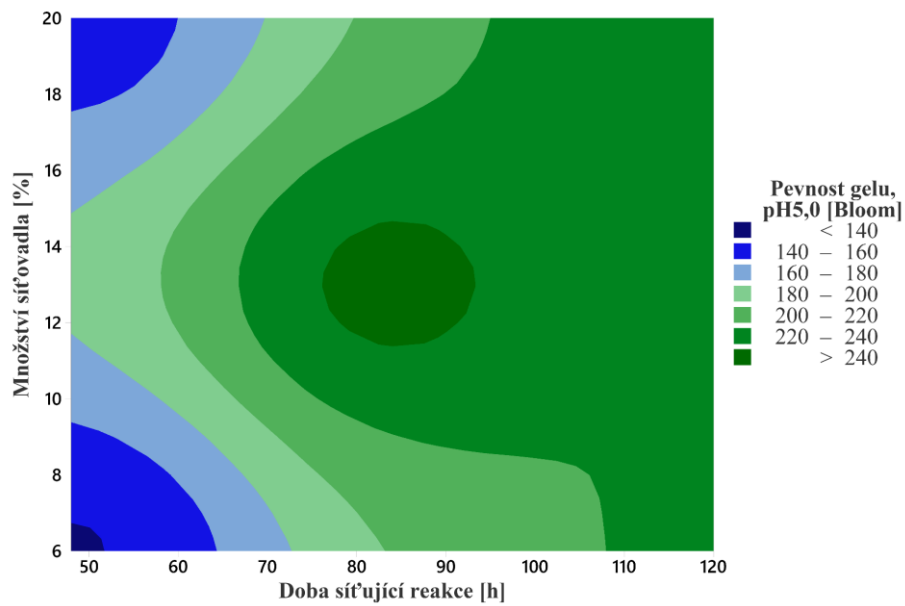
### 9.4 Vlastnosti želatinového gelu pro pH 5,0 se síťovadlem

V tabulce 6 jsou výsledné vlastnosti želatinového gelu síťovaném při pH 5,0 s použitým síťovadlem DAC, které byly připraveny stejným způsobem jako předchozí želatinové gely.

Lze vyčíst, že vzorek želatinového gelu obsahující 13 % síťovadla DAC má největší pevnost, tj. 246 Bloom, a také se rozpouštěl nejdéle po dobu 50 minut. Vzorek s nejnižší pevností 139 Bloom obsahoval 6 % síťovadla DAC a síťoval se 48 hodin. I jeho doba rozpustnosti je krátká, tj. 30 minut.

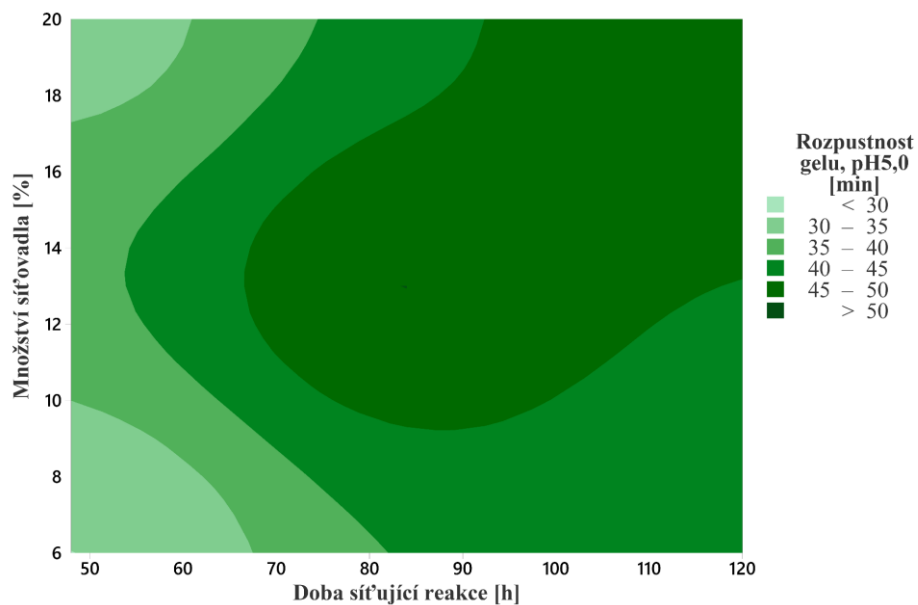
Č. vzorku	Faktor A Množství síťovadla [%]	Faktor B Doba síťující reakce [h]	Pevnost [Bloom]	Doba rozpouštění [min]
1	6	48	139	30
2	20	48	150	33
3	13	84	246	50
4	6	120	222	41
5	20	120	235	49

Tabulka 6 - Naměřené hodnoty želatinových gelů při pH 5,0



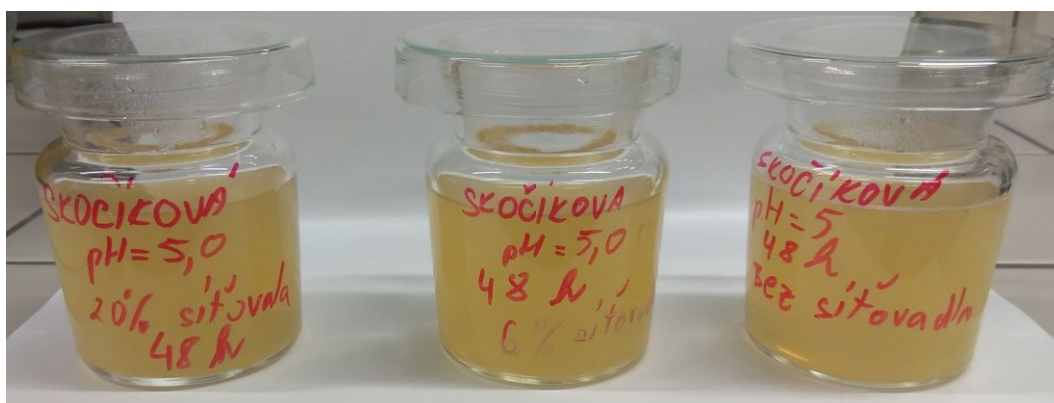
Obrázek 9 - Pevnost gelu při pH 5,0

Želatinový gel s nejvyšší pevností (>240 Bloom) lze při pH 5,0 připravit při době síťování 77-91 hodin s obsahem síťovadla 12–14 %. Zároveň můžeme říci, že i přes vysoký podíl síťovadla nelze vyrobit želatinový gel s vyšší pevností než 200 Bloom, pokud bude doba síťování nižší než 58 hodin.



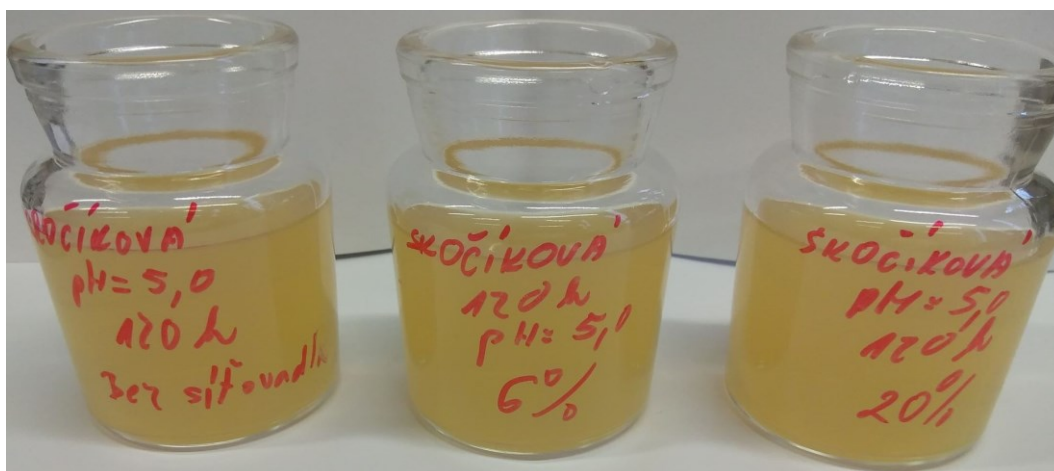
Obrázek 10 - Rozpustnost gelu při pH 5,0

Závislost rozpustnosti želatinového gelu při pH 5,0 na množství síťovadla a době síťování je téměř lineární. Nejrychleji se rozpouštěly želatinové gely, které se síťovaly po dobu nižší než 58 hodin při obsahu krajních hodnot síťovadla (6-8 %, 18-20 %). Můžeme taktéž pozorovat, že nejdéle se rozpouštěly želatinové gely s obsahem síťovadla 10-16 %, které se síťovaly více než 75 hodin.



Obrázek 11 - Želatinové gely síťované po dobu 48 h při pH 5,0

Na obrázku 11 pozorujeme želatinové gely síťované při konstantním pH 5,0 po dobu 48 hodin s obsahem síťovadla (zleva) 20 %, 6 %, 0 %.



Obrázek 12 - Želatinové gely síťované po dobu 120 h při pH 5,0

Obrázek 12 znázorňuje srovnání želatinových gelů při pH 5,0 síťovaných po dobu 120 hodin s množstvím síťovadla (zleva) 0 %, 6 %, 20 %. Můžeme opět konstatovat, že množství síťovadla ani doba síťování nemají vliv na barvu či zakalení želatinového gelu.

## 10 ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ A NÁVRH OPTIMÁLNÍCH PODMÍNEK

Maximální pevnost želatinového gelu při pH 3,8 vykazoval vzorek obsahující 6 % síťovadla dialdehyd celulózy, který byl síťován po dobu 120 hodin. Pevnost tohoto želatinového gelu byla 195 Bloom, což je, v porovnání s želatinovým gelem síťovaným po dobu 120 hodin, avšak bez síťovadla, o téměř 70 Bloom vyšší. Tento želatinový gel se také nejdéle rozpouštěl, doba rozpustnosti činila 39 minut, což je o 9 minut déle než u gelu bez síťovadla.

Minimální pevnost želatinového gelu při pH 3,8 vykazoval vzorek obsahující 6 % síťovadla DAC síťovaný po dobu 48 hodin. Při porovnání želatinového gelu bez síťovadla, který měl pevnost 117 Bloom po 48 hodinách síťování, a želatinového gelu s přídavkem síťovadla, který měl pevnost 128 Bloom po 48 hodinách síťování, je to nárůst o 11 Bloom. Tento gel se rozpouštěl o 3 minuty déle než vzorek bez síťovadla, který se rozpouštěl 22 minut.

Z uvedených hodnot můžeme navrhnout optimální podmínky pro síťování, kdy optimální doba síťující reakce při pH 3,8 je 110-120 hodin a optimální obsah síťovadla dialdehyd celulózy je 6-8 %.

U želatinového gelu při pH 5,0 vykazoval maximální pevnost vzorek obsahující 13 % síťovadla DAC, který byl síťován po dobu 84 hodin. Pevnost tohoto gelu byla 246 Bloom a doba jeho rozpustnosti byla nejdelší ze všech vzorků, činila 50 minut.

Při pH 5,0 měl nejmenší pevnost želatinový gel obsahující 6 % síťovadla, který byl síťován po dobu 48 hodin. Jeho pevnost byla pouze o 2 Bloom vyšší než vzorek bez síťovadla a doba rozpustnosti byla delší pouze o 5 minut.

Z těchto uvedených výsledků můžeme říci, že optimální doba síťující reakce při pH 5,0 činí 78-93 hodin a optimální obsah síťovadla dialdehyd celulózy je 12-14 %. Tyto hodnoty lze vyčíst z obrázku 10.

## ZÁVĚR

Tato Bakalářská práce s názvem příprava oxidovaného polysacharidu a posouzení jeho síťujícího účinku je rozdělena na teoretickou část a praktickou část.

V teoretické části jsou popsány bílkoviny a jejich struktura. Dále je kapitola zaměřená na strukturu kolagenu, jeho fyzikální a chemické vlastnosti a taktéž jeho využití ve farmacii, potravinářském a kosmetickém průmyslu. Další kapitola pojednává o chemickém složení želatiny, výrobě, chemických a fyzikálních vlastnostech a jejím využití ve farmaceutickém, zdravotnickém a technickém průmyslu. Teoretická část se zabývá taktéž síťováním hydrogelů chemickým, fyzikálním a enzymatickým procesem. Tato část práce je zakončena přípravou oxidované celulózy, konkrétně dialdehydu celulózy.

Cílem experimentální části bylo posouzení schopnosti síťování želatinových gelů oxidovaným polysacharidem dialdehydem celulózy (DAC). V této bakalářské práci byla využita metodika faktorových pokusů typu 2<sup>2</sup>, tedy dvě úrovně a dva faktory.

V experimentální části byla popsána příprava síťovadla dialdehydu celulózy DAC z mikrokrytalické celulózy reakcí s NaIO<sub>4</sub>. Po oxidaci s NaIO<sub>4</sub> byla oxidovaná celulóza vysrážena pomocí t-buthylalkoholu. Síťující účinky dialdehyd celulózy byly testovány při dvou různých pH (3,8 a 5,0) a obsahu síťovadla 6-20 % po dobu síťující reakce 48-120 hodin v inkubátoru při teplotě 10 °C. Poté byly změřeny pevnosti gelů s různým obsahem síťovadla a také byla změřena rychlost rozpustnosti síťovaných želatinových gelů v inkubátoru při 50 °C.

Následně byly stanoveny optimální podmínky pro síťování želatinových gelů pomocí DAC při pH 3,8 a 5,0. Optimální obsah dialdehydu celulózy při pH 3,8 činí 6-8 % při době síťující reakce 110-120 hodin. Při pH 5,0 je optimální obsah síťovadla dialdehyd celulózy v želatinovém gelu 12-14 % a optimální doba síťující reakce je 78-93 hodin.

Experiment dokázal, že dialdehyd celulózy síťuje lépe při pH 5,0 a je dobrým síťovadlem za definovaných optimálních podmínek. Mimo optimální podmínky se dialdehyd celulózy chová spíše jako plnivo. Účinky tohoto síťovadla by však měly být nadále testovány.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] HOZA, Ignác a Daniela SUMCZYNSKI, 2005. Potravinářská biochemie I. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. ISBN 978-80-7318-295-3.
- [2] CLARK, David P., Nanette J. PAZDERNÍK a Michelle R. MCGEHEE, 2019. Molecular Biology: Protein Structure and Function. Molecular Biology. 3ed edition. Academic Cell, s. 445-483. ISBN 9780128132883. Dostupné také z: (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128132883000148>)
- [3] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM, 2012. Barevný atlas biochemie. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [4] CUNDY, Timothy, Ian R. REID a Andrew GREY, 2014. Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects. 3er edition. Churchill Livingstone, s. 604-635. ISBN 9780702051401. Dostupné také z: (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702051401000316>)
- [5] SALVATORE, Luca a Paola LUNETTI et al., 2020. Marine collagen and its derivatives: Versatile and sustainable bio-resources for healthcare. Materials Science and Engineering [online]. 2020(113) [cit. 2020-05-04]. ISSN 0928-4931. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493119346892>
- [6] NEEL, Ensanya A. Abou, Laurent BOZEC et al., 2013. Collagen — Emerging collagen based therapies hit the patient. Advanced Drug Delivery Reviews. 2013(65), 429-456. ISSN 0169 - 409X. Dostupné také z: (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X12002542>)
- [7] FERREIRA, Ana Marina a Piergiorgio GENTILE et al., 2012. Collagen for bone tissue regeneration. Acta Biomaterialia. 2012(8), 3191-3200. ISSN 1742-7061. Dostupné také z: (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706112002620>)
- [8] MYLLYHARJU, Johanna a Kari I. KIVIRIKKO et al., 2004. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. Trends in Genetics. 2004(20), 33-43. ISSN 0168-9525. Dostupné také z: (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168952503003196>)
- [9] BHAGWAT, Prashant K. a Padma B. DANDGE et al., 2018. Collagen and collagenolytic proteases: A review. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2018(15),

- 43-55. ISSN 1878-8181. Dostupné také z: (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818118302147>)
- [10] LIU, Xinhua, Chi ZHENG et al., 2019. Recent advances of collagen-based biomaterials: Multi-hierarchical structure, modification and biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*. 2019(99), 1509-1522. ISSN 0928-4931. Dostupné také z: (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092849311831765X>)
- [11] PETERKOVÁ, Petra a Lubomír LAPČÍK, JR., Kolagen-vlastnosti, modifikace a aplikace. *Chemické listy*. 2000(94), 371 - 379.
- [12] SULTANA, Sharmin, Mohammad Nasir Uddin AHAMAD a Md. Eaqub ALI, 2018. Preparation and Processing of Religious and Cultural Foods: 11 - Gelatine, collagen, and single cell proteins as a natural and newly emerging food ingredients. Woodhead Publishing, s. 215-239. ISBN 9780081018927. Dostupné také z: (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081018927000110>)
- [13] MICHELINI, Laura, Luca PROBO a Silvia FARÈ, 2020. Characterization of gelatin hydrogels derived from different animal sources. *Materials Letters*. (272). ISSN 0167-577X. Dostupné také z: (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167577X2030570X>)
- [14] LEDWARD, D. A., 2000. Handbook of hydrocolloids.: Gelatin. Cambridge: Woodhead Publishing, s. 67-86. ISBN 1855735016.
- [15] OFORI, Rosmery Anima, 1999. Preparation of gelatin from fish skin by an enzyme aided process. Montreal. Department of Food Science and Agricultural Chemistry.
- [16] HRDOVÁ, Lenka, 2008. Želatina – vlastnosti, metody charakterizace a její použití v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Zlín. Bakalářská práce. UTB. Vedoucí práce Ing. Věra Kašpárková, CSc.
- [17] Gelatin handbook, 2019. Gelatin Manufactures Institute of America [online]. USA: GMIA [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: [http://www.gelatin-gmia.com/uploads/1/1/8/4/118450438/gmia\\_gelatin\\_manual\\_2019.pdf](http://www.gelatin-gmia.com/uploads/1/1/8/4/118450438/gmia_gelatin_manual_2019.pdf)
- [18] SCHRIEBER, Reinhard a Herbert GAREIS, 2007. Gelatine handbook: Theory and Industrial Practice. Weinheim: Wiley-VCH. ISBN 978-3-527-31548-2.
- [19] GME - Gelatine Manufacturers of Europe [online], 2020. Brusel: GME [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.gelatine.org>

- [20] NAYAK, Amit Kumar et al., 2020. Chapter 25 - Gum-based hydrogels in drug delivery. 9780128168974 [online]. Elsevier, s. 605-645 [cit. 2020-05-16]. Dostupné z: (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128168974000254>)
- [21] HOFFMAN, Allan S., 2012. Hydrogels for biomedical applications. Advanced Drug Delivery Reviews [online]. 2012(64), 18-23 [cit. 2020-05-16]. ISSN 0169 - 409X. Dostupné z: (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X12002700>)
- [22] ILOMUANYA, Margaret O., 2020. Chapter 23 - Hydrogels as biodegradable biopolymer formulations. ILOMUANYA, Margaret O. Biopolymer-Based Formulations: Chapter 23 - Hydrogels as biodegradable biopolymer formulations [online]. Elsevier, 2020, s. 561-585 [cit. 2020-05-16]. ISBN 9780128168974. ISSN 561-585. Dostupné z: (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128168974000230>)
- [23] HENNINK, W.E. a C.F. van NOSTRUM, 2012. Novel crosslinking methods to design hydrogels. Advanced Drug Delivery Reviews [online]. 2012(64), 223-236 [cit. 2020-05-16]. ISSN 0169- 409X. Dostupné z: (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X12002694>)
- [24] GANGULY, Sayan, Poushali DAS a Narayan Ch. DAS, 2020. Chapter 16 - Characterization tools and techniques of hydrogels. Hydrogels Based on Natural Polymers [online]. Elsevier, s. 481-517 [cit. 2020-05-16]. ISBN 9780128164211. Dostupné z: (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128164211000161>)
- [25] AHMED, Enas M., 2015. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. Journal of Advanced Research [online]. 2015(6), 105-121 [cit. 2020-05-16]. ISSN 2090-1232. Dostupné z: (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123213000969>)
- [26] OSADA, Yoshihito, 2001. Section 2 - Polymer gels: Crosslink formations. Gels Handbook [online]. Academic Press, s. 13-25 [cit. 2020-05-16]. ISBN 9780123946904. Dostupné z: (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123946904500761>)
- [27] VARMA, A.J. a V.B. CHAVAN, A study of crystallinity changes in oxidised celluloses. Polymer Degradation and Stability [online]. 1995(49), 245-250 [cit. 2020-05-13]. ISSN 0141-3910. Dostupné z: (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0141391095870067>)



- [28] ZHANG, Liming et al., 2020. Preparation and antibacterial activity of a cellulose-based Schiff base derived from dialdehyde cellulose and L-lysine. *Industrial Crops and Products* [online]. 2020(145) [cit. 2020-05-13]. ISSN 0926-6690. Dostupné z: (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092666902030042X>)
- [29] KIM, Ung-Jin et al., Periodate Oxidation of Crystalline Cellulose. *Biomacromolecules*. American Chemical Society, 2000(1), 488-492.
- [30] VARMA, A.J a M.P KULKARNI, Oxidation of cellulose under controlled conditions. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2002(77), 25-27 [cit. 2020-05-14]. ISSN 0141-3910. Dostupné z: (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391002000733>)
- [31] DAHLSTRÖM, C. et al., Ion conductivity through TEMPO-mediated oxidated and periodate oxidated cellulose membranes. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2020(223) [cit. 2020-05-14]. ISSN 0144-8617. Dostupné z: (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861720300035>)
- [32] ŠTRAUSOVÁ, Klára a Petr DOLEJŠ, 2010. W&ET TEAM. Faktorové plánování a hodnocení experimentů při úpravě vody: Sborník konference Pitná voda. České Budějovice, s. 95-100. ISBN 9788025468548.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

*	Esenciální aminokyseliny
Gly	Glycin
AMK	Aminokyselina
Pro	Prolin
Hyp	Hydroxyprolin
Lys	Lysin
$T_s$	Teplota smrštění
$T_d$	Denaturační teplota
IEP	Izoelektrický bod
DAC	Dialdehyd celulózy
DCC	Dikyrboxy celulóza
DCMC	Dialdehyd karboxymethyl celulóza

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 - Schématické znázornění struktury kolagenových vláken [10] .....	16
Obrázek 2 - Reakce celulózy s jodistanem sodným za vzniku dialdehydu celulózy [28] ...	31
Obrázek 3 - Varič s magnetickým míchadlem - IKA C-MAG HS 7 .....	34
Obrázek 4 - Stevens texture Analyzator LFRA .....	34
Obrázek 5 - Pevnost želatinového gelu, pH 3,8 .....	39
Obrázek 6 - Rozpustnost želatinového gelu, pH 3,8 .....	39
Obrázek 7 - Želatinové gely síťované po dobu 48 h při pH 3,8 .....	40
Obrázek 8 - Želatinové gely síťované po dobu 120 h při pH 3,8 .....	40
Obrázek 9 - Pevnost gelu při pH 5,0 .....	42
Obrázek 10 - Rozpustnost gelu při pH 5,0 .....	42
Obrázek 11 - Želatinové gely síťované po dobu 48 h při pH 5,0 .....	43
Obrázek 12 - Želatinové gely síťované po dobu 120 h při pH 5,0 .....	43

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 - Složení aminokyselin v kolagenu a želatině –.....	21
Tabulka 2 - Technologické podmínky síťování pro pH 3,8 a 5,0.....	35
Tabulka 3 - Naměřené hodnoty želatinového gelu bez síťovadla při pH 3,8 .....	38
Tabulka 4 - Naměřené hodnoty želatinových gelů při pH 3,8.....	38
Tabulka 5 - Naměřené hodnoty želatinového gelu bez síťovadla při pH 5,0 .....	41
Tabulka 6 - Naměřené hodnoty želatinových gelů při pH 5,0.....	41

