



# Univerzita Tomáše Bati

## Fakulta technologická

Dizertační práce

### **Zpracování vedlejších bílkovinných produktů z porážky drůbeže**

**Processing of Poultry By-products from Slaughterhouses**

Autor: Ing. Petr Mrázek

Studijní program: P 2808 Chemie a technologie materiálů

Studijní obor: 2808V006 Technologie makromolekulárních látek

Školitel: prof. Ing. Pavel Mokrejš, Ph.D.

Oponenti: doc. Ing. Tomáš Sedláček, Ph.D.  
prof. Ing. Martina Lichovníková, Ph.D.

Zlín, 2023

Publikace byla vydána v roce 2023

*Klíčová slova: běháky, bíkovinný substrát, biopolymer, biotechnologie, chemická denaturace, drůbeží vedlejší produkty, enzym, extrakce, faktorové experimenty, funkční vlastnosti, hlavy, hydrolyzát, inovativní proces, kolagen, kůže, lipoláza, materiály III. kategorie, pevnost gelu, potravinářské aplikace, proteáza, předúprava, tepelná denaturace, tepelná stabilita, tuk, udržitelnost, vedlejší živočišné produkty, zpracování, želatina*

*Key words: animal by-products, biopolymer, biotechnology, chemical denaturation, collagen, enzyme, extraction, factorial design, fat, food applications, functional properties, gelatine, gel strength, heads, heat denaturation, hydrolyzate, innovative proces, lipolase, materials III. category, paw, poultry by-products, pre-treatment, processing, protease, protein substrate, skin, stomachs, sustainability, thermal stability*

Práce je dostupná v Knihovně UTB ve Zlíně.

## ABSTRAKT

Tato práce pojednává o možnostech využití vedlejších drůbežích produktů jako suroviny pro přípravu želatiny. Při porážce drůbeže a následném zpracování masa vzniká velké množství vedlejších živočišných produktů, např. kůže, kosti, hlavy a jiné, které jsou běžně zpracovávány v kafilériích na masokostní moučku a dále jako krmiva pro domácí mazlíčky. Jedná se o potenciální suroviny s vysokým obsahem bílkovin, zejména kolagenu, z něhož je možné připravit želatiny.

Tradičními zdroji želatin jsou hovězí či vepřové kůže nebo kosti. Želatinu je možné rovněž vyrobit i z alternativních zdrojů, jako jsou kuřecí kůže nebo běháky. Odpad vznikající během zpracování drůbeže může být problematický vzhledem ke svému biologickému původu. Jeho minimalizace a transformace na upotřebitelné produkty je tedy velmi žádoucí.

Příprava želatin z drůbežích vedlejších produktů zahrnuje několik fází. Nejprve je nutné surovinu rozemlít a odstranit doprovodné látky (pigmenty a nekolagenní bílkoviny), např. pomocí roztoků NaCl a NaOH. Další fází je separace tuků. K tomuto účelu je možné použít směs rozpouštědel, např. petrolether a ethanol. Následuje předúprava suroviny a extrakce želatiny. Běžně se využívá alkalická či kyselá předúprava; v této práci byl pro tento účel využit biotechnologický (enzymový) způsob z důvodu větší šetrnosti k životnímu prostředí. Extrakce želatin byla prováděna ve vodě při teplotách 40–80 °C po dobu 30–120 min. Množství enzymu během předúpravy suroviny bylo 0,2–0,8 %. Pro zlepšení efektivity procesu byly využity faktorové experimenty za účelem zjištění vlivu jednotlivých technologických faktorů na výtěžek a kvalitu želatiny.

U připravených vzorků želatin z běháků, hlav a kůží byly stanoveny výtěžky a testovány funkční vlastnosti, z nichž nejdůležitější je pevnost gelu. Bylo dosaženo pevnosti gelu až 350 Bloom, což je hodnota převyšující běžné komerční želatiny vyrobené z hovězích či vepřových tkání. Také výtěžek želatiny byl poměrně vysoký (cca 40 %). Byly testovány další vlastnosti výnamné zejména pro potravinářský průmysl, jako např. viskozita, čirost, vaznost vody a tuku, emulzifikační či pěnotvorná kapacita a stabilita, tepelná stabilita gelu, teplota tání a gelace a mikrobiální kontaminace želatin.

Výsledky studie ukázaly, že vlastnosti připravených želatin jsou srovnatelné, nebo v některých případech lepší, než vlastnosti komerčních želatin. Vyvinutý biotechnologický způsob přípravy želatin je konkurenceschopný k běžně používaným metodám v průmyslu. Želatina připravená z drůbežích vedlejších produktů může být alternativou k tradičním vepřovým či hovězím želatinám.

## ABSTRACT

This work deals with the possibilities of using poultry by-products as a raw material for the preparation of gelatine. Slaughter of poultry and processing of meat produces a large number of by-products, such as hides, bones, heads and others, which are commonly processed to meat-and-bone meal and as pet food. These are potential raw materials with a high protein content, especially collagen, from which it is possible to prepare gelatines.

Traditional sources of gelatine are beef or pork skins and bones. Gelatine can be prepared from alternative sources, such as chicken skins or feet. Waste generated during poultry processing can be problematic due to its biological origin. Its minimization and transformation into value-added products is therefore highly desirable.

The preparation of gelatine from poultry by-products involves several stages. First, it is necessary to grind the raw material and remove non-collagenous substances (pigments and non-collagenous proteins). This can be achieved using NaCl and NaOH solutions. The next stage is the separation of fats. A mixture of petroleum ether and ethanol solvents is appropriate for this purpose. This is followed by pre-treatment of the raw material and extraction of gelatine. Alkaline or acid pre-treatment is commonly used, but in this work a biotechnological (enzyme) method was used due to the greater environmental friendliness. Gelatine extraction was performed in water at temperatures between 40–80 °C for 30–120 min. The amount of enzyme at pre-treatment of the raw material was 0.2–0.8%. To improve the efficiency of the process, factorial experiments were used to determine the influence of individual technological factors on the yield and the quality of gelatine as well.

The yields of the prepared chicken feet, head and skin gelatine samples were determined and the functional properties were tested; the most important quality indicator is the strength of the gelatin gel. The gel strength of up to 350 Bloom was achieved, which is a higher value than conventional commercial bovine or porcine gelatines have. The yield of gelatine (approx. 40 %) was relatively high. Properties of particular importance to the food industry were tested, such as viscosity, clarity, water and fat binding, emulsifying or foaming capacity and stability, thermal stability of the gel, melting and gelling temperature, and microbial contamination of gelatines.

The results of this study showed that properties of prepared gelatines are comparable or in some cases better than the properties of commercial gelatines, which means that the biotechnological method of gelatine preparation is competitive with commonly used methods in industry, and gelatines prepared from poultry by-products may be an alternative to traditional pork or beef gelatines.

## OBSAH

1.	TEORETICKÝ RÁMEC.....	7
1.1	Kolagen .....	7
1.1.1	Typy kolagenu.....	7
1.1.2	Složení a struktura.....	7
1.1.3	Biosyntéza.....	9
1.1.4	Přeměna kolagenu na želatinu.....	10
1.2	Želatina.....	11
1.2.1	Složení a struktura.....	11
1.2.2	Surovinové zdroje .....	12
1.2.3	Komerční výroba.....	13
1.2.4	Enzymová hydrolýza.....	16
1.2.5	Vlastnosti.....	17
1.2.6	Aplikace .....	21
1.3	Želatinový hydrolyzát.....	24
2.	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	25
2.1	Vedlejší produkty maso-zpracujícího průmyslu.....	25
2.2	Drůbeží vedlejší produkty .....	26
3.	ZHODNOCENÍ SOUČASNÉHO STAVU POZNÁNÍ A CÍLE PRÁCE.....	30
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	32
4.1	Koncepce práce a plánování experimentů.....	32
4.2	Použité suroviny.....	32
4.3	Chemikálie a enzymy .....	33
4.4	Příprava přečištěného kolagenu.....	33
4.5	Biotechnologická předúprava a extrakce želatin.....	36
4.6	Příprava hydrolyzátů .....	39
4.7	Testování funkčních vlastností želatin .....	39
4.8	Testování mikrobiální kontaminace připravených želatin.....	45
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	47
5.1	Složení vstupních surovin .....	47
5.2	Příprava přečištěného kolagenu.....	47
5.3	Příprava želatin.....	49
5.3.1	Želatina z kuřecích kůží .....	49
5.3.2	Želatina z kuřecích hlav .....	66

5.3.3	Želatina z kuřecích běháků .....	71
5.4	Porovnání funkčních vlastností kuřecích a komerčních želatin.....	83
5.4.1	Želatina z kuřecích běháků .....	83
5.4.2	Želatina z kuřecích kůží.....	84
5.5	Hydrolyzáty .....	85
5.6	Mikrobiální kontaminace želatin .....	86
6.	PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI .....	90
7.	ZÁVĚR.....	91
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	93
9.	SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ .....	105
10.	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	107
11.	PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORA .....	108
12.	CURRICULUM VITAE .....	110

# 1. TEORETICKÝ RÁMEC

## 1.1 Kolagen

Želatina je získávána tepelnou denaturací a částečnou hydrolýzou tkání, které obsahují kolagen, což je ve vodě nerozpustný vláknitý protein důležitý pro zachování strukturní integrity a mechanické pevnosti živočišných tkání. Nachází se zejména v kůži, kostech, šlachách, cévách či chrupavkách. Kolagen patří do skupiny skleroproteinů a je to nejdůležitější protein mezi živočišnými bílkovinami a poskytuje ochranu kůže inhibicí absorpce toxinů a patogenů, má široké tkáňové funkce, jako je přežití buněk, proliferace a diferenciací, je zodpovědný za pružnost, pevnost, hydrataci kůže, pomáhá při hojení poškozených kostí nebo cév a tvoří 25–35 % všech živočišných bílkovin jak u obratlovců, tak i bezobratlých; je tedy nejrozšířenějším proteinem živočichů. Kolagen má významné vlastnosti, jako je vysoká pevnost v tahu, nízká antigenicita a dobrá biokompatibilita (Schmidt, 2016; Krishnamoorthi, 2017).

### 1.1.1 Typy kolagenu

Dosud bylo objeveno 29 typů kolagenu, které se liší sekvencí aminokyselin, molekulovými hmotnostmi, strukturou i funkcemi. Kolagen typu I, který se vyskytuje nejčastěji, se nachází zejména v pojivových tkáních, jako jsou kůže, kosti, zubní sklovina, vazivo, děloha, cévy, pouzdra orgánů, šlachy nebo rohovka. Kolagen typu II se vyskytuje v hyalinních a elastických chrupavkách, ploténkách a sklivci oka. Kolagen typu III se vyskytuje v kůži, střevě, cévách nebo děloze a souvisí s věkem: velmi mladá kůže může obsahovat až 50 %, ale postupem času klesá na obsah 5 až 10 %. Další typy kolagenu jsou přítomny pouze ve velmi malém množství. Kolagen typu IV se vyskytuje v bazálních membránách a neuromuskulárních spojeních. Kolagen typu V se nachází v kůži, embryonální tkáni, rohovkách nebo kostech. Kolagen typu VI obsahuje kůže, cévní systém, kosti, chrupavky či rohovka. Kolagen typu VII obsahuje kůže, amniotická membrána, močový měchýř, sliznice dutiny ústní, pupeční šňůra, nebo zpevňující fibrily. Kolagen typu VIII se nachází v kůži, bazálních membránách, cévách, kostech, chrupavkách nebo některých endotelických buňkách. Kolageny typu I, II, III, V, XI, XXIV a XXVII tvoří fibrily, zatímco ostatní typy tvoří vlákna, které neagregují do fibril. Nejčastěji se vyskytují typy tvořící vlákna, ale existují typy tvořící např. korálky, membrány s přerušením helixů, fibrily s přerušením helixů a multiplexy (Chagnot, 2012; Silvipriya, 2015; Subhan, 2017).

### 1.1.2 Složení a struktura

Struktura kolagenu typu I zahrnuje 1014 aminokyselinových zbytků, které jsou spojeny peptidovou vazbou. Peptidová vazba mezi jednotlivými

aminokyselinami vzniká kondenzací dvou různých aminokyselin a tvoří tak tzv.  $\alpha$ -řetězce s molekulární hmotností přibližně 100 kDa. Každý z  $\alpha$ -řetězců vytváří levotočivou šroubovici v konformaci polyprolin II. Tři  $\alpha$ -řetězce jsou vzájemně stočeny kolem sebe do výsledné pravotočivé super-šroubovice nazvané tropokolagen obsahující koncové globulární domény (telopeptidy), které se dále rozvíjejí. Molekuly tropokolagenu mají délku 300 nm, průměr 1,5 nm, molekulovou hmotnost 330 kDa, jsou stabilizovány hydrofobními a elektrostatickými interakcemi mezi řetězci, vytvářejí hustou síť kolagenních fibril (obr. 1) a tvoří základní stavební jednotky kolagenu. Postupné pravotočivé zatočení molekul umožňuje postranním aminokyselinovým skupinám různých velikostí začlenění do struktury kolagenu (Damodaran, 2010; Silva a Penna, 2012).



*Obr. 1. Fibrily kolagenu (SEM)*

V molekule kolagenu jsou zastoupeny 4 biogenní prvky: uhlík (51 %), kyslík (25 %), dusík (17 %) a vodík (7 %). Kolagen obsahuje celkem 20 typů aminokyselin, přičemž největší zastoupení má nejmenší aminokyselina glycin (35 %), dále prolin (15 %), hydroxyprolin (12,5 %) a alanin tvoří 11 % z obsahu aminokyselin v kolagenu. Často se opakují sekvence aminokyselin  $-(\text{Gly-X-Pro})-$ , nebo  $-(\text{Gly-X-Hyp})-$ , přičemž X je jiná aminokyselina. Glycin je nejmenší aminokyselina, její postranní skupina je tvořena jediným atomem vodíku, což umožňuje těsné šroubovicové uspořádání molekul, zatímco prolin a hydroxyprolin obsahují tuhé pyrrolidinové kroužky, které tvoří sterické zábrany, což přispívá k tuhosti a tepelné stabilitě řetězců (Darmanto, 2014; Nur Hanani, 2014).

Jednotlivé řetězce kolagenu jsou stabilizované hydrofobními, elektrostatickými a vodíkovými vazbami, přičemž vodíkových vazeb je několik typů: přímá vazba mezi CO a H glycinových zbytků dvou sousedních polypeptidových řetězců, nebo prostřednictvím molekul vody, které tvoří můstek mezi CO a OH skupinou hydroxyprolinu, nebo mezi OH skupinami dvou hydroxyprolinových zbytků. Avšak počet a typ vodíkových vazeb



v želatině není dosud jasně definován. Princip hydrofobních interakcí spočívá ve zvýšení elektrostatického odpuzování mezi nabitými náboji aminokyselinových zbytků v hydrofobních oblastech, čímž se umožňuje vznik struktury skládaného listu, která přispívá k prodloužení řetězců molekul. Elektrostatické interakce vznikají v důsledku přítomnosti kladně i záporně nabitých skupin v proteinu a jsou ovlivněny pH a koncentrací solí (Darmanto, 2014; Nur Hanani, 2014).

Zastoupení jednotlivých aminokyselin se může lišit podle druhu živočicha, avšak s výjimkou prolinu a hydroxyprolinu. Hydroxyprolin se téměř nevyskytuje v jiných proteinech (kromě elastinu, kde je jeho obsah velmi nízký) a proto na základě stanovení množství hydroxyprolinu lze zjistit obsah kolagenu v živočišné tkáni (vynásobením koeficientem 8). Hydroxyprolin má také důležitý význam při hydrataci a stabilizaci struktury kolagenu podporou tvorby vodíkových vazeb mezi i uvnitř jednotlivých  $\alpha$ -řetězců. Další aminokyseliny jsou zastoupeny ve výrazně menším množství (Brinckmann, 2005). Fibrily kolagenu jsou stabilizovány proti mechanickému namáhání kovalentním zesíťováním a mají schopnost botnat, ale nejsou rozpustné ve vodě, ani v roztocích solí, nebo slabých kyselin či zásad. K vysoké pevnosti fibril přispívají také další inter- a intramolekulární vodíkové, elektrostatické a hydrofobní interakce. Kolagen velmi mladých zvířat je rozpustný v teplé vodě, avšak s přibývajícím věkem živočicha dochází ke ztrátě této vlastnosti, neboť se zvyšuje stupeň příčného zesíťování kolagenních řetězců a současně dochází k poklesu schopnosti kolagenu vázat vodu, což se projevuje např. snížením elasticity kůže. Stupeň zesíťování se také souvisí s typem kolagenní tkáně. Toto zesíťování je u ostatních proteinů neobvyklé s výjimkou elastinu, což je další vláknatý protein (Nelson a Cox, 2005; Damodaran, 2010).

Molekuly kolagenu obsahují dvě centra schopné navázat molekuly vody elektrostatickými nebo vodíkovými vazbami: polární skupiny aminokyselinových zbytků a dusík a kyslík peptidové vazby. Voda tvoří přibližně 20 % hmotnosti kolagenu a je důležitá pro jeho fyzikální vlastnosti, neboť umožňuje uvolnění pohybového omezení peptidových řetězců a zvýšení vzdálenosti mezi sousedními řetězci (Lapčík a Peterková, 2000).

### 1.1.3 Biosyntéza

Peptidové řetězce vznikají na hraniční membráně ribozomů, kde dochází ke kondenzaci aminokyselin, vznikají  $\alpha$ -řetězce, které jsou transportovány do dutiny endoplasmatického retikula. Zde dochází k hydroxylaci prolinu a lysinu, glykosilaci vybraných hydroxylysinů, každý  $\alpha$ -řetězec se spojuje se dvěma dalšími a vzniká trojšroubovicová struktura (tropokolagen). Následuje vylučování kolagenních molekul do mimobuněčného prostoru, kde jsou prostřednictvím specifických proteolytických enzymů odštěpeny propeptidy (aminokyseliny vyskytující se na aminovém a karboxylovém konci kolagenního řetězce) a vznikají kolagenní molekuly, které obsahují nehelikální zakončení

řetězců (telopeptidy). Molekuly kolagenu se spojují a tvoří fibrily, které agregují a tvoří jednotlivá kolagenní vlákna, které vzájemně síťují prostřednictvím mimobuněčných enzymů (lysoxidázy), které způsobí oxidační deaminaci lysinu a hydroxylysínu, vzniká alysin a hydroxyalysin, které obsahují aldehydové skupiny reagující s lysinovými a hydroxylysinovými zbytky za tvorby dehydrohydroxylysinorleucinu a dehydrohydroxylysinohydroxynorleucinu - Shiffovy báze, které jsou však citlivé na působení tepla a kyselin. Výzkum naznačuje, že Shiffovy báze jsou pouze mezičlánek, který je postupně s přibývajícím věkem živočicha nahrazován tepelně i chemicky stabilnějším zesíťováním, což má za následek pokles rozpustnosti a schopnosti kolagenu botnat. Síťování také probíhá např. reakcí mezi dvěma allysinovými (lysin obsahující aldehydovou skupinu) zbytky, nebo důsledkem tvorby disulfidických vazeb mezi cysteinovými zbytky, či prostřednictvím transglutamináz mezi glutaminem a lysinem, aldolovým síťováním mezi dvěma lysiny a dalšími síťovacími mechanismy, avšak lysinové a hydroxylysinové zbytky a jejich aldehydové deriváty se nejvíce podílejí na intra- a intermolekulárním síťování kolagenních molekul. Síťování může probíhat i mezi různými typy kolagenu, což bylo potvrzeno u kolagenů typu I a III metodou Edmanova odbourávání. Síťování je zřejmě více specifické pro konkrétní tkáň než pro daný typ kolagenu (Alberts, 1983; Bailey a Light, 1989; Lapčák a Peterková, 2000; Baynes a Dominiczak, 2004; Eyre a Wu, 2005).

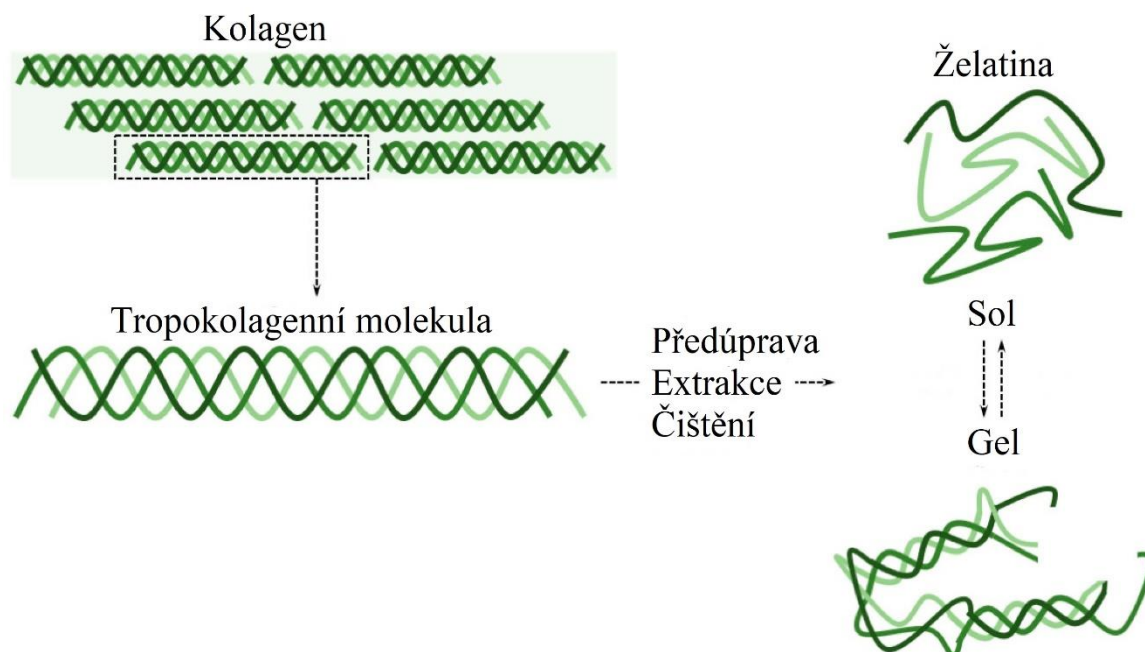
#### 1.1.4 Přeměna kolagenu na želatinu

Chemickým působením při teplotách nad 60 °C kolagen denaturuje, vznikají strukturální změny, narušují se intramolekulární vazby, vznikají fyzikálně-chemické změny a výsledkem je přeměna nativního kolagenu na kolagen rozpustný v teplé vodě (želatinu), jak je znázorněno na obr. 2.

K tomuto účelu se v průmyslu využívají alkálie nebo kyseliny. Chemická předúprava způsobí porušení intermolekulárního zesíťování a také může hydrolyzovat molekuly kolagenu na její fragmenty, tedy výsledná želatina obsahuje řetězce kolagenu s širokou distribucí molekulové hmotnosti. Při extrakci kolagenu dochází k přechodu proteinu z konformace označované jako helix, do stavu nazvaném klubko při teplotách kolem 36 °C. Želatina má nižší molekulovou hmotnost než nativní kolagen, protože je složena ze směsi polypeptidových kolagenních segmentů s molekulovou hmotností v rozmezí 16–150 kDa. Během tvorby želatinového gelu při teplotách pod 30 °C se mění konformace řetězců a vytváří se trojrozměrná síťová struktura velmi podobná nativnímu uspořádání kolagenu, dochází ke zpětnému přechodu z klubka na cívku, což lze sledovat např. pomocí širokoúhlé RTG difrakce (Harrington a Rao, 1970; Godard, 1978).

Byly navrženy dva základní modely uspořádání kolagenních řetězců: přechod z konformace klubko na cívku lokálním spojením tří různých řetězců, nebo

krystalizační mechanismus vedoucí k růstu vláken podobný modelu, který je znám u syntetických polymerů (Asghar a Henrickson, 1982).



Obr. 2. Přeměna kolagenu na želatinu

## 1.2 Želatina

Želatina je široce průmyslově využívaný multifunkční biopolymer, který byl díky svým pozitivním účinkům na lidské zdraví uznán jako funkční potravina. Aplikace želatiny sahá až do roku 4000 př. n. l., kdy staří Egypťané používali lepidlo založené na želatině pro spojení částí nábytku. V Anglii za vlády Jindřicha VIII byla želatina používána jako přísada do pokrmů na každé recepci. Koncem 17. století začala komerční výroba želatiny. Po více než sto letech byl výrobní proces vylepšen natolik, že byla vyrobena želatina s vysokou molekulovou hmotností, čímž byla dosažena její vysoká kvalita. V roce 1845 byl udělen patent na výrobu želatinových dezertů, kterých se v současnosti jenom v USA ročně prodá asi 300 milionů kusů (Schrieber a Gareis, 2007). V současné době je celosvětová roční produkce želatiny přibližně 600 000 tun (Grand View Research, 2019).

### 1.2.1 Složení a struktura

Želatina je protein s vysokou molekulovou hmotností, složený z 18 aminokyselin a obsahuje všechny esenciální aminokyseliny s jedinou výjimkou, tryptofanem. Želatina je získávána kontrolovanou hydrolýzou, která způsobuje částečnou denaturaci kolagenu. Obsah tohoto proteinu v želatině je 85–92 %, zbytek tvoří minerální soli, tuky a cukry, které navzdory čisticím operacím během produkce mohou být v želatině obsaženy. Tyto molekuly tvoří

interakce s proteinovými vlákny a mohou tvořit kovalentní vazby. Některé reakce s cukry, jako např. maillardovy reakce jsou příčinou hnědého zabarvení želatiny a mohou ovlivnit gelační vlastnosti želatiny. Želatina obsahuje také přibližně 8 % vody. Přeměna kolagenu na želatinu vede ke změnám ve složení molekul některých aminokyselin. Např. použití alkálií při procesu přípravy želatiny znamená deaminaci glutaminu na kyselinu glutamovou a asparaginu na kyselinu asparagovou (Zhou a Regenstein, 2006).

Během procesu výroby želatiny ztrácí kolagen nativní strukturu. Kolagenní vlákna mění konformaci vlivem tepelného působení a po ochlazení dochází k částečné obnově původní struktury. Molekuly vody jsou zachyceny uvnitř sítě kolagenních vláken a vzniká gelová struktura, ve které mají řetězce kolagenu odlišné prostorové uspořádání a interakce, což závisí na koncentraci želatiny ve vodném roztoku, teplotě a energii nezbytné pro tvorbu sekundární struktury (Guo, 2003).

Podle Coppoly a kol. (2012), který charakterizoval strukturu želatiny pomocí DSC, dospěl k závěru, že želatinový film (typ B) může mít tři různé strukturní stavy: amorfní stav, který má spirálovou strukturu s primárními řetězci; semikrystalický stav tvořený trojitými helixy a spirálovou strukturou a krystalický stav tvořený kombinací trojitých helixů a spirálové struktury. Tyto tři stavy závisí na rychlosti sušení želatinových filmů, což má vliv na prostorové uspořádání molekul. Výsledky jsou v souladu s dalšími studiemi (Coppola, 2012).

### 1.2.2 Surovinové zdroje

Surovinou pro výrobu želatiny mohou být pouze tkáně zvířat, která byla veterinárně vyšetřena a schválena jako vhodná pro lidskou spotřebu. Tradičními surovinami při výrobě želatiny jsou vepřové a hovězí kůže, avšak želatinu lze také připravit z alternativních zdrojů, jako je drůbež (Bichukale, 2018), ryby (Arumugam, 2018), kozí (Mad–Ali, 2017) nebo aligátoří kůže (Gómez–Guillén, 2011), chobotnice (Jridi, 2015), nebo dokonce hmyz (Mariod, 2011). Želatina získaná z vepřových kůží představuje 44 % produkce, z hovězích kůží 28 %, z hovězích kostí 27 % a pouze 1 % tvoří želatiny vyrobené z jiných zdrojů (Ahmad a Benjakul, 2011).

Konzumace vepřové želatiny je zakázána v Judaismu a Islámu a hovězí želatina je povolena pouze za předpokladu, že byla připravena v souladu s náboženskými požadavky. Hinduistům není dovoleno konzumovat vepřové produkty za žádných okolností. Indie nebo země východní Asie, kde je buddhismus velmi rozšířený, mají také určitá omezení, pokud jde o vepřové maso či želatinu (Kaewruang, 2013). Hovězí želatina může být také spojována s bovinní spongiformní encefalopatií nebo slintavkou či kulhalkou. Alternativní zdroje želatiny, např. vedlejší drůbeží nebo rybí produkty, jsou proto vysoce žádoucí pro produkci halal (v souladu s islámským učením) želatiny. Avšak nevýhodou rybí želatiny je její charakteristický silný rybí zápach a zejména v

případě želatin připravených ze studenomilných ryb horší termostabilita, gelační a reologické vlastnosti, omezená produkce a nízký výtěžek oproti želatinám připraveným ze suchozemských savců, takže rybí želatina dostatečně nesplňuje požadované aplikační parametry (Kim, 2012).

Želatina připravená z alternativních zdrojů tak nabývá na stále větším významu a pozornosti. Nedostatek tradičních surovin související s neustále se zvyšující spotřebou želatiny, rostoucí cena surovin, jakož i nemoci skotu či náboženské důvody vedly k hledání nových zdrojů želatiny. Proto byly kuřecí vedlejší produkty, jako např. kůže zkoumány jako potenciální alternativní náhrada tradičních surovin pro přípravu želatiny (Sarbon, 2015; Bichukale, 2017; Mrázek, 2019). Kuřecí kůže obsahuje přibližně 75 % kolagenu typu I a 15 % typu III (Abedin a Riemschneider, 1984) a zpracovávají se převážně na výrobu živočišné moučky, zatímco menší podíl se přidává do masových emulzí, nebo se používají jako zdroj tuku zejména při přípravě polévek (Cliché, 2003). Želatina připravená z kuřecí kůže vykazuje podobné vlastnosti jako běžná komerční želatina a obsahuje vysoký podíl aminokyselin prolin a hydroxyprolin, což má velký význam pro vlastnosti spojené s gelací želatiny jako např. pevnost gelu, což je nejdůležitější parametr, podle kterého se hodnotí kvalita želatiny (Wangtueai a Noomhorm, 2009).

### 1.2.3 Komerční výroba

Produkce želatiny zahrnuje několik navazujících kroků: příprava suroviny (čištění a mletí), demineralizace, předúprava chemickými látkami, extrakce v rozpouštědle, filtrace, koncentrace, sterilizace a finalizace (příprava práškové nebo listové želatiny).

Při průmyslové výrobě želatiny je živočišná tkáň opracována zředěnými roztoky kyselin či alkálií za účelem částečného štěpení molekul kolagenu, aby byl získán kolagen rozpustný v teplé vodě, tj. želatina (Schrieber a Gareis, 2007). Existují dva základní běžně používané typy chemické předúpravy (v želatinovém průmyslu je tato fáze nazývána kondicionování): kyselá (výsledkem je želatina typu A) trvající přibližně 1 den, k tomuto účelu jsou běžně využívány kyseliny HCl, sírová či fosforová; nebo alkalická (výsledná želatina je typu B) trvající v řádu dnů až měsíců s využitím např. NaOH nebo KOH. Kyselé opracování je často využíváno při extrakci želatiny z tkání mladých zvířat, jelikož kolagen je ještě méně zesíťovaný, jako např. vepřová nebo rybí kůže. Vepřové kůže, které obsahují relativně vysoké množství tuků, jsou vhodnější pro kyselé opracování, aby se zabránilo nežádoucí saponifikaci. Alkalickým způsobem jsou opracovávány naopak kolageny více zesíťované jako např. kůže, kosti či chrupavky dobytka. Základním principem opracování je odstranění nekolagenních bílkovin (albuminů, globulinů) a dalších nežádoucích látek, jako jsou pigmentů a tuků (Jridi, 2015). Při chemickém opracování také dochází k denaturaci a hydrolýze kolagenu, což výrazně přispívá k přiměřenému bobtnání a rozpouštění kolagenu během následné extrakce; narušují se jak

intramolekulární kovalentní vazby, tak intermolekulární zesíťování vodíkovými můstky, což vede k rozvinutí proteinové struktury a helix-coil (cívka-klubko) přechodu (viz obr. 2). Výsledkem je zlepšení konverze nerozpustného kolagenu na želatinu během následné extrakce (Haug a Draget, 2009).

Oba typy opracování vedou k různým fyzikálně-chemickým vlastnostem. Želatina typu A (90 % produkce) má izoelektrický bod při pH 8–9, naopak želatina typu B má izoelektrický bod při pH 4,8–5,5. Želatina typu A má širší distribuci molární hmotnosti; hlavní část frakce molární hmotnosti je cca 100 kDa.

Po předúpravě následuje extrakce želatiny při teplotách 50–100 °C, kdy je trojřoubovicová struktura nativního kolagenu denaturována horkou vodou za vzniku krátkých řetězců molekul kolagenu. Během této fáze procesu přípravy jsou důležité tři klíčové faktory: teplota, čas a pH. Vyšší teplota a delší doba působení teploty na surovinu akceleruje proces. Podobný vliv má rovněž použití silnějších kyselin či alkálií během hydrolyzy (předúpravy), avšak je nutné správně zvolit koncentraci, aby se zabránilo nadměrné degradaci proteinu. Doba extrakce je obvykle 4–7 h a používá se vícefázová extrakce, kdy je postupně zvyšována extrakční teplota. S každou další fází je výsledná želatina sytější zabarvena dožluta a klesá její kvalita. Provádí se také kontinuální extrakce, nebo semi-kontinuální extrakce (Ahmad a Benjakul, 2011).

Dalším krokem je čištění a filtrace želatinového roztoku, pro které se běžně využívá naplaveninová filtrační centrifuga. Lze použít membránové mikrofiltrační techniky v případě nízkomolekulárních typů želatiny. Následuje deionizace, jelikož obsah minerálních látek v želatině nesmí podle potravinářských předpisů překročit 2,0 % (FCC–Food Chemical Codex). Pro tento účel jsou využívány iontoměniče či ultrafiltrace. Dalším krokem je koncentrace, neboť želatinový roztok obsahuje více než 95 % vody. Koncentrace probíhá ve vakuových systémech, ve kterých dochází k odpařování vody při teplotě 52 °C. Pouze želatina s obsahem vody 10–12 % má požadovanou trvanlivost z mikrobiologického hlediska. Dalším krokem je sterilizace prostřednictvím deskových výměníků tepla nebo přímá parní sterilizace, která je citlivější k výslednému produktu. Např. hovězí želatina může být sterilizována při teplotě min. 138 °C po dobu 4 s. Závěrečnou fází procesu je ochlazení a extrudace želatiny ve formě nudliček, které jsou vysušeny a granulovány. Za účelem získání konstantní kvality želatiny je nutná standardizace dodatečným mletím a proséváním. Kromě granulované želatiny trh nabízí i listovou nebo instantní želatinu (Schrieber a Gareis, 2007).

Rozdílný stupeň hydrolyzy kolagenu při extrakci želatiny má za následek širokou distribuci molekulové hmotnosti obvykle mezi 65–300 kDa. Frakce kolagenu s nižší molekulovou hmotností nejsou považovány za želatinu ale za kolagenní hydrolyzát, který netvoří gel. Úroveň konverze kolagenu na želatinu závisí na věku zvířete, velikosti částic, typu použité předúpravy, na teplotě, pH a době při extrakci želatiny (Johnston–Bank, 1990).

Vědecká literatura zmiňuje různé postupy přípravy drůbeží želatiny. Nejrozšířenější je využití kyselého opracování během předúpravy surovin. Např. příprava rozpustného kolagenu 24-h opracováním slepičích běháků slabými kyselými roztoky (0,5 mol/l kyselinou octovou, citrónovou, mléčnou nebo HCl) a enzymem (pepsin) při teplotě 4 °C s relativně nízkými (5,6–8,4 %) výtěžky želatin (Cheng, 2009).

Rovněž byla popsána příprava želatiny z kuřecích běháků, které byly opracovány v kyselém prostředí s použitím mírně silnějších roztoků (1,5–4,5 %, v/v) kyselin (octová, citrónová nebo mléčná) při pokojové teplotě po dobu 16–18 h. Při použití mírných teplot extrakce (50–55 °C) a doby extrakce v rozmezí od desítek minut po několik hodin, byla připravena želatina s pevností gelu 120–300 Bloom (pevnost gelu je základní parametr určující kvalitu želatin), což je srovnatelný výsledek s komerčními vepřovými a rybími želatinami. Nevýhodou jsou relativně nízké výtěžky připravených želatin v rozmezí 6,0–4,5 %. (Chakka, 2017). Du a kol. (2013) aplikovali následující postup: běháky byly smíseny s 0,5 mol/l NaOH v poměru 1:10 (v/v) a směs byla protřepávána 6 h při teplotě 4 °C; alkalický roztok byl měněn každé 2 h. Výtěžek želatiny byl 38 %. Huda a kol. (2013) provedli přímou extrakci v 5% kyselině mléčné při velmi nízké teplotě 4–7 °C po dobu 24 h a k neutralizaci použili 1 mol/l NaOH po dobu 15 min při teplotě 10 °C. Výtěžek želatiny byl 28 %. Almeida s Lannesem (2013) opracovávali surovinu 4% kyselinou octovou po dobu 16 h s následnou extrakcí 6 h při teplotě 55 °C. V této studii bylo dosaženo pevnosti gelu 295 Bloom a výtěžku želatiny 8 %. Liu a kol. (2008) použili 5% roztoky různých kyselin (HCl, octové, citronové a mléčné) po dobu 12, 24, 36 a 48 h při teplotě 4–7 °C; následovala neutralizace 0,1 mol/l NaOH a sušení suroviny. Výtěžek želatin byl v rozmezí 8–31 % v závislosti na typu použité kyseliny a doby opracování, přičemž použití kyselin mléčné a octové přineslo velmi podobné výsledky (přibližně 30 %).

Také jsou dostupné studie zabývající se dalšími typy vedlejších drůbežích produktů, jako jsou např. kuřecí kůže nebo hlavy. Sarbon a kol. (2015) pro opracování kuřecí kůže použili 0,15% NaOH; 0,15% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,7% kyselinou citrónovou pokaždé po dobu 120 min. Následná extrakce byla provedena při teplotě 45 °C po dobu 24 h. Výtěžek želatiny byl 16 % a pevnost gelu 335 Bloom, což je více než pevnost gelu běžné komerční hovězí želatiny (250 Bloom). Du a kol. (2013) zpracovávali drůbeží hlavy 0,015 mol/l roztokem NaHCO<sub>3</sub> po dobu 3 h; 0,1 mol/l NaOH po dobu 6 h a 0,05 mol/l kyselinou octovou po dobu 18 h při teplotě 4 °C a extrahovali při teplotě 50 °C po dobu 18 h, nebo při vyšší teplotě 60 °C a kratší době 6 h. Výsledná želatina měla pevnost gelu 368 Bloom a výtěžek extrakce byl 38 %. Rafieian a kol. (2013) použili pro opracování zbytků z kuřecího separátoru 1% NaCl po dobu 30 min a 3–7% HCl po dobu 24 h při pokojové teplotě. Extrakce probíhala po dobu 4, 7 a 10 h při teplotách 60, 70 a 80 °C; pevnost gelu byla velmi vysoká (520 Bloom).

#### 1.2.4 Enzymová hydrolýza

Hydrolýza (předúprava) kolagenu může být také katalyzována pomocí enzymů, oproti běžně používanému kyselému či alkalickému způsobu. Enzymy jsou bílkoviny, které katalyzují biochemické přeměny ve všech živých organismech. Enzymy zvané peptidázy (dosud je známo přes 1000 typů) štěpí peptidovou vazbu mezi molekulami bílkovin. Existují dva základní druhy peptidáz, které se ještě dále dělí na další podskupiny: endopeptidázy a exopeptidázy. Zatímco exopeptidázy štěpí vazby uvnitř kolagenních řetězců, endopeptidázy štěpí vazby na koncích řetězců (Barrett, 2004).

Použití enzymů je preferováno před chemikáliemi kvůli relativně vyšší specifičnosti a snadnosti řízení procesu pro dosažení požadované transformace. Výhodou použití enzymů je také skutečnost, že neobsahují toxické látky a nezatěžují tak životní prostředí. Pro proces hydrolýzy kolagenu by měly být použity enzymy známé jako kolagenázy, protože většina enzymů používaných při štěpení proteinů není účinná při hydrolýze kolagenu (Nalinanon, 2008). Studie vedená Chobertem a kol. (1988) prokázala zlepšení funkčních vlastností proteinů enzymatickou hydrolýzou jako je rozpustnost, emulgační a pěnotvorné vlastnosti nebo biologická aktivita. Enzymy jako pepsin, trypsin, chymotrypsin, alkaláza, properáza E, pronáza, bromelain, papain, proktáza nebo neutráza byly použity ve studiích k izolaci kolagenu z různých tkání (Yang, 2008; Alemán, 2011; Lassoued, 2014).

Za specifických podmínek lze pomocí enzymů vyextrahovat relativně velké množství kolagenního materiálu. Např. vhodnou koncentrací pepsinu, správným poměrem mezi substrátem a enzymem, a použitím nízké extrakční teploty lze dosáhnout přibližně 30% výtěžku želatiny, jak ukázala studie Chomarata a kol. (1994). V další studii Chomarat použil proktázu (enzym izolovaný z bakterie *Aspergillus niger*) pro extrakci želatiny z hovězí kůže, ale s nízkým výtěžkem želatiny a současně s nízkou pevností želatinového gelu i viskozitou želatinového roztoku. Proteolytické enzymy z papájového latexu byly použity pro extrakci želatiny s vyšším výtěžkem, ale pevnost gelu byla rovněž relativně nízká (Pitpreecha, 2006). Papain byl použit k extrakci želatiny ve studii Damrongsakkula (2008). Ačkoli bylo dosaženo vyššího výtěžku želatiny, její funkční vlastnosti byly velmi nízké. Důvodem horších funkčních vlastností želatiny byla pravděpodobně nadměrná degradace kolagenních řetězců. Uvádí se, že želatina o vysoké molekulové hmotnosti (s méně degradovanými kovalentními vazbami) dosahuje lepších funkčních vlastností (Zhang, 2011). Z tohoto důvodu by měly být zkoumány nové typy enzymů, schopné štěpení dlouhých řetězců kolagenu pouze na určitých místech, aby byla získána vysoce kvalitní želatina (Ahmad, 2017).



### 1.2.5 Vlastnosti

Želatina disponuje širokou škálou vlastností založených na její specifické struktuře. Faktory ovlivňující fyzikálně-chemické vlastnosti želatiny závisí zejména na aminokyselinovém složení molekul kolagenu, jejich prostorovém uspořádání, obsahu  $\alpha$ -řetězců,  $\beta$  nebo  $\gamma$  komponent, molekulové hmotnosti a její distribuci, přítomností nízkomolekulárních fragmentů proteinu, okolních podmínkách, nebo reakcích s dalšími složkami. Dalšími faktory jsou např. typ suroviny, věk a druh zvířete, typ použité metody předúpravy nebo podmínky extrakce (zejména teplota a čas). Zvýšení teploty a prodloužení doby extrakce během procesu výroby želatiny obecně vede ke zlepšení výtěžku procesu, ale zároveň ke zhoršení zejména gelačních vlastností želatiny (Johnston-Banks, 1990; Gómez-Guillén, 2011; Kittiphattanabawon, 2012). Proto by měly být optimalizovány podmínky extrakce, zejména teplota a doba, za účelem dosažení vysokého výtěžku želatiny, a současně její kvality.

Mezi základní fyzikální vlastnosti želatiny patří průhlednost, bezbarvost, křehkost (v suchém stavu); želatina je jedlá, bez chuti a zápachu, ale nejdůležitější fyzikálních vlastností želatiny v komerčních aplikacích je schopnost navázat velké množství vody (více jak 10-násobek) a tvořit gel. Želatina se v širokém rozsahu pH chová jako polyamfolyt, obsahuje tedy kladně i záporně nabitě náboje i nenabitě hydrofilní a hydrofobní oblasti. Díky této skutečnosti je želatina snadno rozpustná ve vodě zahřátím na teploty kolem 40 až 50 °C, a také má schopnost být adsorbována na nabitě a hydrofobní povrchy (Howe, 2000). Podle studie Lin a kol. (2003), v 7% roztoku želatiny jsou aminokyseliny silně hydrofobní, což se projeví hydrofobními interakcemi na rozhraní vzduch/ voda.

Při teplotách pod 30 °C (v závislosti na konkrétním typu a kvalitě želatiny), pokud je koncentrace želatiny ve vodném roztoku dostatečně vysoká pro tvorbu sítě (stačí několik procent), dochází k přechodu solu na transparentní elastický gel (Kaur, 2002). Díky této vlastnosti se jedná o jedinečný biopolymer, pokud jde o smyslové aspekty, zejména uvolnění chuti. Přeměna želatinového roztoku na gel je termo-reverzibilní fyzikální proces, přičemž gel má jedinečnou schopnost „tát“ v ústech, což je v potravinářském průmyslu velmi žádoucí vlastnost. Další hydrokoloidy, např. alginát, pektin, agar nebo karagenaan také tvoří gely, ale tyto jsou reverzibilní pouze částečně, alginátové gely jsou čiré a elastické, ale „netají“ v ústech. Pektinové gely naopak nejsou elastické. Želatina nad ostatními hydrokoloidy vyniká také v mnoha dalších vlastnostech a poskytuje tak mnohem více možností výrobcům pro její aplikaci (Choi a Regenstein, 2000). Želatina vlastní rovněž tenzioaktivní vlastnosti, díky kterým může být využita jako surfaktant, což využívá např. potravinářský, nebo farmaceutický průmysl ke stabilizaci pěn a emulzí.

Funkční vlastnosti želatiny lze rozdělit do dvou skupin. První skupinu tvoří vlastnosti spojené s gelací, tj. pevnost gelu, gelační čas, teplota měknutí a tuhnutí gelu a viskozita želatinového roztoku. Druhá skupina se vztahuje k

povrchovému chování želatiny, např. pěnotvorná kapacita a stabilita, emulzifikační kapacita a stabilita, adhezivní vlastnosti nebo rozpustnost. Nejdůležitější vlastnosti, které jsou pro želatinu typické: tvorba gelu a textury, zvýšení viskozity tekutin a navázání vody, tvorba emulze, pěny a jejich stabilizace, tvorba filmu, ochranná koloidní funkce, adheze a koheze (Schrieber a Gareis, 2007).

Pevnost gelu je rozhodujícím faktorem při určování kvality želatiny a přímo souvisí s její cenou. Pevnost komerčních gelů připravených z vepřové a hovězí želatiny je mezi 50–300 Bloom, přičemž v aplikacích je nejvíce využívána pevnost 200–250 Bloom. Podle hodnoty pevnosti želatinového gelu (též Bloom hodnota), se želatina dělí na želatinu s nízkou (<150 Bloom), střední (150–220 Bloom) nebo vysokou pevností gelu (220–300 Bloom). Želatina s vysokou pevností gelu má typicky vyšší teplotu měknutí a gelace a kratší gelační časy, světlejší barvu a více neutrální chuť a aroma. Silnější gelační schopnost také znamená, že postačí menší množství želatiny pro dosažení požadované pevnosti výsledného gelu (Johnston–Bank, 1990). Liu a kol. (2008) prokázali, že pevnost gelu se výrazně zvyšuje, pokud želatina obsahuje vysoký podíl alfa-řetězců. Další studie zjistily, že rozdíl v pevnosti želatinového gelu je také ovlivněn množstvím iminokyselin (prolin a hydroxyprolin), které ovlivňují počet vodíkových vazeb ve struktuře kolagenu. Během tvorby gelu agregují molekuly kolagenu v oblastech bohatých na iminokyseliny; při ochlazení zaujmou spirálovou konformaci a dojde k posílení zón schopných navázat vodu vodíkovými vazbami za vzniku gelu (Arnesen a Gildberg, 2007). Množství iminokyselin se liší dle druhu výchozí suroviny a také technologických podmínek přípravy želatiny. Montero a Gómez–Guillén (2000) dospěli k závěru, že dalším faktorem, který hraje důležitou roli ve fyzikálních vlastnostech želatiny, zejména pevnosti gelu, je množství hydrofobních aminokyselin. Molekulová hmotnost a její distribuce má rovněž významný vliv na gelační vlastnosti želatiny (pevnost gelu, viskozita, teplota tání a gelace). Želatiny s nižší molekulární hmotností tvoří slabší gely, které jsou obecně používány v potravinářství, zatímco želatiny s vyšší molekulární hmotností tvoří pevnější gely využívané ve fotografickém nebo farmaceutickém průmyslu (Elharfaoui, 2007). Pevnost gelu může záviset také na dalších faktorech; např. koncentrace želatiny ve vodném roztoku, stáří a pohlaví zvířete použitého jako surovina, technologické podmínky přípravy želatiny (chemikálie použité pro předúpravu, extrakční teplota a čas) nebo podmínky okolního prostředí (pH roztoku, iontová síla a teplota). Teplota je nejdůležitější parametr ovlivňující pevnost gelu želatiny. Obecně platí, že pevnost gelu klesá se zvyšující se teplotou. Tepelná stabilita želatinového gelu je zvláště důležitá, pokud výrobky obsahující želatinový gel (např. dezerty) jsou vystaveny vyšším teplotám, např. v letním období, nebo v tropických či subtropických oblastech (Gimenez, 2005). Tepelná stabilita želatinových gelů při teplotách kolem 25 – 30 °C má význam např. u želatinových dezertů, nebo při kombinaci želatiny s jinými hydrokoloidy, např.

agar-agarové gely v ovocných želé, kde je možné udržet požadované texturní vlastnosti. S pevností želatinového gelu souvisí také teplota gelace želatinového roztoku, gelační čas a teplota měknutí želatinového gelu. Čím je vyšší pevnost gelu, tím vyšší je teplota gelace a měknutí. Bod gelace je důležitý např. při výrobě tvrdých želatinových kapsulí nebo fotografických filmů, kdy je žádoucí velmi krátký čas gelace. Tyto charakteristiky je možné jednoduše stanovit např. reologickým měřením (Schrieber a Gareis, 2007).

Pevnost gelu drůbeží želatiny je uváděna ve vědecké literatuře mezi 80–520 Bloom; naproti tomu běžná komerční hovězí nebo vepřová želatina má obvykle hodnoty mezi 200–240 Bloom. Nízká pevnost gelu (80 Bloom) byla naměřena u želatiny extrahované z kuřecích běháků (Widyasari, 2014); naopak u želatiny extrahované ze zbytků po mechanickém opracování drůbežího masa byly zaznamenány velmi vysoké hodnoty pevnosti gelu: 309–318 Bloom (Fonkwe, 1997). Vysoké pevnosti gelu byly také naměřeny v dalších studiích drůbežích želatin: 294 Bloom (Almeida, 2013), 338 Bloom (Du, 2014), 520 (Rafieian, 2015) a 355 Bloom (Ee, 2019).

V nedávné době byly provedeny studie tepelné stability kolagenu či želatiny. Losso a Ogawa (2013) stanovili tepelnou stabilitu kolagenu z kostí okra červeného. Pati a kol. (2010) izoloval a charakterizoval kolagen z rybích šupin. V obou studiích byla tepelná stabilita stanovena prostřednictvím teploty denaturace. Michon a kol. (1997) zkoumal vliv tepelné historie na stabilitu želatinových gelů metodou DSC (diferenční skenovací kalorimetrie). Rodriguez-Rodriguez a kol. (2019) zkoumal mimo jiné vývoj tepelné stability hydrogelových směsí želatina/chitosan/PVA. Ke stanovení tepelné stability želatin byla použita metoda DSC a reologické testy. Masutani a kol. (2014) prokázal zvýšení tepelné stability želatinových filmů UV indukovaným síťováním s glukózou. Síťování je jedna z možností, jak lze zvýšit tepelnou stabilitu želatin. Ve studii byla použita DSC metoda, SEM mikroskopie a UV spektrofotometrie. Rodriguez-castellanos a kol. (2014) studoval tepelnou stabilitu recyklované celulózy s podílem škrobu a želatiny. K testování byla použita SEM mikroskopie a TGA analýza.

Další funkční vlastnosti želatiny včetně viskozity, čirosti, vaznosti vody a tuku, emulgačních a pěnotvorných vlastností, jsou také velmi důležité, zejména pro potravinářský průmysl. Funkční vlastnosti želatiny primárně ovlivňují strukturu a vzhled konečných produktů (Schrieber a Gareis, 2007).

Viskozita je druhý nejdůležitější parametr želatiny. Viskozita proteinových roztoků závisí zejména na molekulové hmotnosti a její distribuci, či obsahu aminokyselin nebo povrchovém náboji. Viskozita želatiny je důležitá zejména při zpracování želatinového roztoku na finální produkty (např. želatinové kapsle). Vysoká viskozita je žádoucí např. při stabilizaci emulzí. V případě tvarovaných produktů např. v cukrárenství je naopak preferována želatina s nízkou viskozitou aby se zabránilo tzv. tailing efektu. Viskozita komerčních

želatin bývá obvykle v rozmezí 2–7 mPa.s, avšak speciální typy želatin dosahují viskozity až 13 mPa.s (Masuelli, 2011; Karayannakidis and Zotos, 2014).

Čírost želatinového roztoku je důležitá v případě produktů, u nichž se požaduje průhlednost. Je to významná organoleptická vlastnost a určuje hlavně přijatelnost konečných produktů. Zákal želatiny je způsoben anorganickými, proteinovými a mukosubstitučními kontaminanty, které zůstávají v želatině, pokud nebyly během přípravy dostatečně odfiltrovány (Zarai, 2012). Želatina může být zabarvena do hněda výsledkem Maillardových reakcí mezi proteinem a uhlovodíky. Intenzita závisí na době a teplotě, při níž je želatina extrahována (Dunconseille, 2015)

Vaznost vody (VV) je typická a žádaná vlastnost želatiny v potravinářských výrobcích včetně uzenin, krémů a těsta díky absorpci vody, a tím je dosaženo zahuštění a dosažení požadované viskozity produktů. Schopnost želatiny vázat vodu je jednou z nejvýznamnějších vlastností. VV je důležitým prvkem pro snížení ztrát vody v případě zmrazených ryb nebo masných výrobků během jejich vaření. Lepší VV může být spojena s větším množstvím hydrofilních skupin v želatině a ovlivněna mnoha faktory, jako je koncentrace proteinu nebo iontová síla. VV souvisí také s požadovanými reologickými a texturními charakteristikami a snížením dehydratace během skladování (Rawdkuen, 2013; Ninan, 2014; Simoes, 2014).

Vaznost tuku (VT) je požadovaná vlastnost, která přispívá k chutnosti a prodloužuje trvanlivost pečeného zboží, polévek a masných nebo cukrárenských výrobků. VT je dána schopností kolagenu vázat tuk prostřednictvím nepolárních řetězců. VT proteinů souvisí rovněž s hydrofobitou jejich povrchu a úrovní odhalení hydrofobních zbytků uvnitř molekuly. Může být ovlivněna také dalšími faktory, jako je např. stupeň hydrolýzy proteinu (Bhaskaracharya, 2009; George, 2010; Rawdkuen, 2013).

Emulzifikační kapacita (EK) a stabilita (ES) želatiny mají význam zejména v kosmetickém průmyslu při přípravě masť a krémů. Želatin a kolagenní hydrolyzáty jsou povrchově aktivní látky a podporují tvorbu emulzí typu olej ve vodě, protože jsou rozpustné ve vodě a mají funkční skupiny jak hydrofilní, tak i hydrofobní. Želatina snižuje povrchové napětí roztoků a vytvoří identicky nabitý film kolem složek dispergované fáze, což může být navíc posíleno tvorbou gelu. Obecně se předpokládá že emulzifikační vlastnosti želatin/hydrolyzáatů jsou pravděpodobně ovlivněny rozdíly v jejich peptidovém složení, molekulové hmotnosti a lipofilně-hydrofilním uspořádání (Wilding, 1984; Schrieber a Gareis, 2007; Li, 2009; Gómez-Guillén, 2011).

Schopnost tvorby stabilní želatinové pěny je rozhodující faktor při přípravě cukrárenských výrobků jako např. marshmallows nebo šlehaček. Tvorbu pěny lze vysvětlit pravděpodobnou přítomností velkých molekul peptidů v kolagenu, které mohou vytvářet stabilní filmy kolem bublin plynu. Za účelem vytvoření stabilní pěny na rozhraní voda-vzduch musí molekuly obsahovat hydrofobní oblasti, které se objevují během rozvinutí proteinů. Pěnotvorné vlastnosti

želatiny mohou být v pekárenském průmyslu velmi důležité, protože pomáhají stabilizovat napěněné výrobky, jako jsou koláče, chleba nebo dorty (Djagny, 2001; Souissi, 2007).

Teplota, při které dochází k přeměně želatinového gelu na roztok je definována jako bod tání, a naopak, teplota, při které dochází k přechodu roztoku na gel, je nazývána bodem gelace. Faktory ovlivňující bod tání a gelace jsou např. pevnost gelu, koncentrace, distribuce aminokyselin, zdroj kolagenu, nebo množství iminokyselin (Schrieber a Gareis, 2007).

Želatina se v širokém rozmezí hodnot pH chová jako amfoterní polyelektrolyt, obsahuje tedy jak kladně, tak záporně nabitě oblasti, a rovněž i nenabitě hydrofilní a hydrofobní skupiny, což se odráží v rozpustnosti želatiny ve vodě a také v její adsorbci na nabitých i hydrofobních površích (Howe, 2000).

Želatina je velmi efektivní ochranný koloid, který má schopnost zabránit agregaci krystalků a částic a tedy stabilizovat heterogenní suspence a disperze. Ve fotografickém průmyslu má želatina funkci nejen jako nosič a vázací činidlo látek citlivých na světlo, ale také jako ochranný koloid. Stejná funkce je aplikována v případě zmrzliny, kde želatina zlepšuje tvorbu velmi jemných krystalů a zabrání tak hrubé krystalizaci laktózy ve směsi. Adhezivní vlastnosti želatiny jsou už pravděpodobně známy přibližně 8000 let. V současnosti např. cereální tyčinky jsou vyráběny s využitím kolagenních hydrolyzátů jako vázacího činidla. Vysoce koncentrovaný roztok želatiny má schopnost pokrýt povrch částic, aby mohly být navzájem spojeny, a výsledkem jsou adhezivní síly. Adhezivní vlastnosti přímo souvisí s viskozitou roztoku, proto je vhodné použít želatinu se střední pevností gelu. Potravinářská či farmaceutická želatina musí splňovat limity na obsah minerálních látek či těžkých kovů a také nesmí dojít k mikrobiální kontaminaci. Podle potravinářských (Food Chemical Codex 10) a farmaceutických standardů (United States Pharmacopeia, European Pharmacopeia) nesmí obsah minerálních látek v želatině překročit 2,0 %. Želatina je také vhodné médium pro růst bakterií, proto jsou prováděny testy želatiny na celkový obsah aerobních bakterií a také je testována přítomnost konkrétních mikroorganismů, např. *Escherichia coli* a *Salmonella*, které negativně ovlivňují lidské zdraví, tvoří toxiny, mění vzhled produktu, konzistenci a aroma (Schrieber a Gareis, 2007).

### 1.2.6 Aplikace

Aplikační možnosti želatiny jsou díky jedinečným vlastnostem velmi široké v mnoha technologických aplikacích např. v potravinářství, farmacii, kosmetice či v dalších průmyslových odvětvích. Želatinové gely s vysokým podílem vody se často používají k výrobě filmů a povlaků s využitím jejich funkčních a reologických vlastností; naopak, gely s nízkým podílem vody se využívají ve tkáňovém a materiálovém inženýrství vzhledem k vysokým mechanickým vlastnostem (Hoque, 2010; Dash, 2013).

Podle analýzy trhu provedenou společností Grand View Research v roce 2019 je želatina nejvíce používána v potravinářství jako stabilizátor (238 000 tun/rok), zahušřovadlo (186 000 tun/rok) a gelotvorné činidlo (147 000 tun/rok).

V potravinářském průmyslu se želatina používá např. jako prostředek pro zlepšení elasticity, gelovitosti, krémovitosti, žvýkatelnosti, snížení obsahu tuků, viskozity či stability produktů, nebo jako stabilizátor emulzí, textury či pěny, dále jako zahušřovadlo, gelotvorné a pěnotvorné činidlo, adhezivum, biodegradabilní film či obal, vodu-vázací a mikroenkapsulační činidlo nebo emulgátor. V cukrovinkách poskytuje zlepšení žvýkatelnosti, stabilizaci textury či pěny; v nízkotučných pomazánkách zlepšuje stabilitu a texturu; v pečeném zboží zajišťuje emulgovatelnost, gelaci a stabilitu; v masných výrobcích navázání vody. V nízkotučných dezertech nebo zmrzlinách želatina např. kompenzuje ztrátu příjemného pocitu v ústech, který je často spojen s produkty s nízkým obsahem tuku. Želatinový medvídci jsou typickým produktem a ideálním příkladem unikátních gelačních vlastností želatiny. V ústech rychle absorbují vodu, gel se při teplotě lidského těla rozpouští a aroma a chuť jsou rychle uvolňovány. Takového chování v takovém rozsahu není schopen žádný jiný hydrokoloid. Dalšími produkty obsahující želatinu jsou např. slané či sladké tyčinky, lunchmeaty, želé, aspiky, majonézy, kečupy, pomazánky, sýry, omáčky, marshmallows, našlehané pěny, žvýkáci bonbóny, nugáty, zmrzliny, polevy, pudinky, tvarohy, sušenky, dortíky či jogurty.

Želatina je také využívána jako prostředek pro číření piva, vína nebo džusů či snížení obsahu polyfenolů jako je tannin nebo antokyanů. Želatina byla využívána pro číření vína už v době antiky. Děje se tak pomocí dvou mechanismů. Pozitivně nabitě molekuly želatiny reagují s negativně nabitými polyfenoly a antokyany, vytváří vodíkové vazby a vznikají komplexy, které se sráží a absorbují další látky, které způsobují zákal. Poté dochází k sedimentaci. Zároveň probíhá další reakce; tvorba komplexů mezi molekulami proteinů v nápoji a želatinou. Vznikají koloidní proteinové částice, které se vysráží, a poté jsou odfiltrovány. Tyto reakce jsou primárně reakce, při kterých dochází k vybití elektrického náboje; kladně nabitě molekuly želatiny neutralizují záporně nabitě koloidní částice proteinu. Výsledkem je, že odpuzující účinek mezi stejně nabitými koloidními částicemi proteinu je neutralizován (Schrieber a Gareis, 2007; Koli, 2012; Cebi, 2016).

Vzhledem ke svým cenným vlastnostem je želatina také využívána v biomedicíně a farmacii. Už v roce 1150 Hildegarda von Bingen, Benediktínská abatyšé a nadaná vědkyně doporučuje v díle *Physica* konzumaci vývaru z telecích nožek jako prostředek na zmírnění bolestí kloubů. V roce 1833 byl udělen patent na výrobu tvrdých želatinových kapslí. O téměř 100 let později byl zkonstruován stroj na automatickou kontinuální výrobu a plnění měkkých želatinových kapslí; následně se tento proces rychle rozšířil do celého světa. Výhodou měkkých a tvrdých želatinových kapslí je snadná rozpustnost ve vodě při teplotách nad 30 °C, a tedy rozpuštění léčivé látky v lidském zažívacím traktu

následkem teploty, pH a zaživacích enzymů. Želatina vlastní také antimikrobiální a antioxidační vlastnosti a má také schopnost působit jako antihypertenzivum prostřednictvím inhibice angiotensinu. Podle některých studií vykazují želatina a zejména želatinové hydrolyzáty regenerační účinky na lidskou kostru, míchu a klouby, dodává kůži mladiství vzhled, podporuje růst vlasů a nehtů, či reguluje obsah cukru v krvi. Želatina je využívána v inženýrství kostních tkání nebo při hojení poranění. Příklady dalších medicínských aplikací: adsorpční polštářky, matrice pro implantáty, injekční mikrosféry pro dodávání léčiv, stabilizátor virucidních vakcín, náhražka krevní plazmy, želatinové houby, intravenózní infuze, kompozity k léčbě kostních defektů nebo adhesivum při implementaci srdečních chlopní (Jongjareonrak, 2006; Gómez-Guillén, 2011; Nhari, 2012).

Želatina je lehce stravitelná a má vysoký obsah proteinů (cca 90 %), neobsahuje cukry, cholesterol ani tuky, proto je velmi vhodná jako doplněk bílkovin při speciálních dietách, nebo pro redukci sacharidů při léčbě cukrovky. Navíc obsahuje všechny esenciální aminokyseliny kromě tryptofanu a má velmi nízký alergenní potenciál. Bioaktivní peptidy na základě kolagenu nebo želatiny s antioxidačními vlastnostmi se v poslední době staly středem zájmu v oblasti zdravého stravování a zpracování/konzervování potravin (Kittiphattanabawon, 2012; Ranganathan, 2019).

Schopnost želatiny zadržovat molekuly vody se s výhodou využívá také v kosmetických či dermatologických přípravcích, např. v šamponech, kondicionérech, rtěnkách, nebo v péči o nehty či pleťových mastech a krémech. Kolagen a jeho deriváty jsou součástí zmíněných produktů, kde plní funkci jako prostředek, který dodává kůži vlhkost a redukuje transepidermální ztráty vlhkosti. Vlasům kolagenní hydrolyzáty poskytují lesk, objem, ochranný film a snadnost rozčesání. Studie také dokázaly, že konzumace želatiny či hydrolyzáatů zlepšuje strukturu a vzhled kůže, vlasů a nehtů (Kim a Wijesekara, 2012).

Želatina výrazně přispěla k popularizaci fotografického průmyslu. Od roku 1880 se staly dostupné fotografické desky potažené želatinovou emulzí, což umožnilo vyrobit negativ a pozitivy. Cena procesu se snížila a fotografování už nebylo omezeno jen pro bohatší vrstvy. (Schrieber a Gareis, 2007).

Dále má želatina, želatinové hydrolyzáty či klišé využití v mnoha technických aplikacích, např. při výrobě lepidla, zápalek, papíru, vlnité lepenky, brusných kotoučů, biodegradabilních čisticích prostředků, porézního betonu, PVC, při lepení časopisů, nábytku či hudebních nástrojů, restaurování historických dokumentů, mikroenkapsulaci s využitím komplexní koacervace (výroba propisovacího papíru, reklamních vzorků parfémů, potravních doplňků, pracích enzymů, displejů a další farmaceutické, potravinářské, zemědělské či technické aplikace), kultivaci mikroorganismů v mikrobiologii, dekontaminaci budov obsahujících azbest a v dalších aplikacích (Chatterjee a Bohidar, 2005). Aplikační možnosti želatiny, jak je vidět na mnoha zmíněných příkladech, jsou díky jejím jedinečným vlastnostem opravdu velmi široké.

### 1.3 Želatinový hydrolyzát

Želatinový hydrolyzát je technologicky i ekonomicky vhodnou alternativou např. arabské gumy nebo modifikovaných celulóзовých derivátů. Kolagenní řetězce jsou během výroby hydrolyzátu mnohem více štěpeny, než v případě želatiny, a jsou tak získány frakce s malou molekulovou hmotností od 2 do 20 kDa, které mají speciální technologické vlastnosti, využitelné zejména v potravinářství. Např. jsou snadno rozpustné ve studené vodě až do koncentrace 60 % nezávisle na pH a netvoří gel, ale další vlastnosti typické pro želatinu zůstávají zachovány. Chuť hydrolyzátu je mnohem více neutrální, neboť obsahuje velmi málo hořkých peptidů v porovnání s jinými hydrolyzovanými proteiny. Želatinový hydrolyzát snižuje povrchové napětí a umožňuje tak tvorbu pěny, kterou zároveň stabilizuje. Snadná mísitelnost hydrolyzátu s cukrem, náhražkami cukru, hydrokoloidy a proteiny z něj tvoří vhodnou látku pro zlepšení jiných pěnotvorných činidel jako např. hydrolyzovaného mléčného proteinu, kaseinu. Hydrolyzát také zlepšuje texturu např. u dezertů, nebo zvyšuje viskozitu roztoků, např. ovocných džusů. Další často využívaná vlastnost je vysoká emulzifikační kapacita, využívaná např. ve vitamínových tabletách. Hydrolyzát má excelentní adhezivní vlastnosti, které umožňují přípravu různých typů tyčinek, ať už sladkých či slaných. Další aplikací je čerění vína, piva nebo džusů, což je umožněno reakcí molekul hydrolyzátu s negativně nabitými částicemi pektinů a vytvoření aglomerátů, které lze snadno odfiltrovat. Také dojde ke zlepšení chuti odstraněním specifických komponent. Nedávné vědecké studie potvrdily ochranný efekt na kloubní chrupavky spojený s konzumací hydrolyzátu, což z něj tvoří ideální potravinový doplněk pro pacienty trpící osteoartridou a pro sportovce, u kterých jsou klouby nadměrně namáhány (Schrieber a Gareis, 2007).



## 2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Vedlejší produkty maso-zpracujícího průmyslu

V současnosti je velký význam kladen na maximální využití surovin a z toho vyplývající snižování odpadů napříč průmyslovými odvětvími. To platí zejména pro maso-zpracující průmysl, který stimuluje svůj růst produkcí mnoha lahůdkových produktů a poskytuje rovnováhu mezi zdroji bílkovin ze živočišných zdrojů. Takové produkty představují užitek pro spotřebitele i výrobce, ale také vedou k velkému množství vedlejších živočišných produktů, které běžně představují až 30 % z celkového objemu výroby. Tyto vedlejší produkty mohou být znovu využity maso-zpracujícím průmyslem k zajištění své konkurenceschopnosti oproti dodavatelům rostlinných bílkovin. Podle odhadů je ročně vyprodukováno 20–100 milionů tun potravinářských odpadů po celém světě. V EU při produkci ryb vzniká 5,2 milionů tun odpadů, maso-zpracující průmysl produkuje 16,5 milionů tun (Ryder, 2015; Ferraro, 2016).

Společnosti provozující jatečné podniky se musí zabývat vedlejšími produkty živočišného původu podle metod definovaných směrnicí EU/1069/2009/ES. Vedlejší produkty jsou podle směrnice rozděleny do 3 kategorií. Kategorie 1 zahrnuje např. těla zvířat nebo jejich části podezřelé nebo potvrzené infekcí TSE, těla hospodářských a volně žijících zvířat, pokusná zvířata a další zvířata podezřelá z nákazy chorobou přenosnou na člověka nebo zvířata obsahující specifikovaný rizikový materiál. Takové produkty je nutné odstranit spaláním či skládkováním po předchozí sterilizaci, nebo je možné jejich energetické využití.

Kategorie 2 zahrnuje např. hnůj, nemineralizované guáno a obsah trávicího traktu, vedlejší produkty živočišného původu shromážděné během čištění odpadních vod, vedlejší produkty živočišného původu obsahující zbytky kontaminujících látek přesahujících povolenou hladinu, produkty živočišného původu, které byly prohlášeny za nevhodné pro lidskou spotřebu z důvodu přítomnosti nečistot. Odstranění či použití těchto produktů je stejné jako u kategorie 1; navíc je možná výroba hnojiv a půdních přípravků, kompostování, nebo přeměna na bioplyn.

Kategorie 3 zahrnuje např. těla a části poražených zvířat, která jsou podle právních předpisů společenství vhodná k lidské spotřebě, ale nejsou určena k lidské spotřebě z komerčních důvodů, těla zvířat poražených na jatkách shledaných jako vhodná k lidské spotřebě, kůže, rohy, končetiny, peří, krev nebo tuková tkáň, nebo vedlejší produkty z drůbeže a zajícovců poražených na farmě, nevykazující známky nemoci přenosné na člověka. Odstranění či použití těchto materiálů: (viz kategorie 1 a 2) navíc je možná výroba krmiv, kosmetických, léčivých nebo zdravotnických prostředků v souladu s příslušnými směrnicemi.

Vedlejší produkty maso-zpracujícího průmyslu jsou např. krev, kosti, odřezky masa, kůže, tuková tkáň, rohy, hlavy, kopyta, končetiny nebo vnitřnosti. Ekologická likvidace takového odpadu je velmi nákladná. Ačkoli jsou některé vedlejší produkty tradičně konzumovány v některých zemích (např. v Asii),

v jiných jsou považovány za nepoživatelné. Vedlejší produkty obsahují důležité živiny, jako jsou bílkoviny, tuky, minerály či vitamíny, které mohou přinést určitý zisk maso-zpracovatelským firmám. Ve vyspělých zemích se vedlejší produkty drůbeže začleňují do krmiv pro domácí mazlíčky nebo doplňkových látek v krmivech pro hospodářská zvířata, naopak, v rozvojových zemích jsou bez užitku skládkovány. Vedlejší živočišné produkty jsou také využívány jako složka kompostu či hnojiv v zemědělství. Tyto produkty nacházejí uplatnění i jako součást potravin; kromě toho mohou být použity jako surovina při výrobě léčiv, biomolekul (např. bílkovinné hydrolyzáty, enzymy, extrakty s funkčními vlastnostmi a bioaktivní peptidy) a chemických látek (Martínez–Alvárez, 2015).

## 2.2 Drůbeží vedlejší produkty

Kuřecí maso je v současné době jedním z nejčastěji konzumovaných druhů masa a jeho spotřeba neustále roste v souvislosti s globálním populačním růstem. Celosvětová spotřeba kuřecího masa vzrostla z 66 milionů tun v roce 2000, 91 v roce 2009, 94 v roce 2013 na přibližně 100 milionů tun v roce 2019. Drůbežářský průmysl je tedy jedním z nejrychleji rostoucích zemědělsko-potravinářských odvětví na světě (FAO, 2019). Drůbeží maso představuje 5,5 % z celkové zemědělské produkce a 12,7 % z produkce maso-zpracujícího průmyslu v EU (Eurostat Statistics, Meat Production, 2017).

Celosvětová spotřeba kuřecího masa se tedy neustále zvyšuje. Tento vzrůst je následkem snížení ceny masa, technologickým pokrokem a zejména růstem populace. Odpad vznikající při zpracování drůbeže, skotu a vepřů způsobuje nadměrnou zátěž pro životní prostředí, pokud je prováděn neadekvátními metodami. Vznikají vážné environmentální problémy, které vedou k degradaci půdy a vody (Almeida, 2013). Příležitost snížit rostoucí objem nedostatečně využívaných vedlejších produktů a jejich ekonomické zhodnocení může být jejich další využití např. jako levné a dostupné alternativy k tradičním surovinám používaným pro výrobu želatiny. Drůbeží želatina má podobné aminokyselinové složení, sekundární strukturu a molekulovou hmotnost jako želatina vyrobená ze savčích zdrojů. V posledním desetiletí také vzrostla poptávka trhu o tento typ želatiny z důvodu nemoci dobytka (Abedinia, 2017).

Růst drůbežářského průmyslu znamená zvýšení objemu vedlejších produktů, které vznikají porážkou a zpracováním drůbeže. Jedná se např. o hlavy, nohy, kůže, vnitřnosti, kosti, krev nebo peří, které představují 22–33 % z objemu produkce (viz tab. 1). Tyto vedlejší produkty se považují za odpad běžně zpracováváný na masokostní moučku, výrobu krmiv pro domácí zvířata nebo hnojiva a jsou důležitými zdroji bílkovin, jako je keratin nebo kolagen, které lze také použít k výrobě hydrolyzátní bílkoviny, proteinových izolátů a želatiny (Martínez–Alvárez, 2015). Vedlejšími produkty jsou i podestýlka a hnůj (které lze využít jako hnojivo) a rovněž vedlejší produkty líhně, zejména vaječné skořápky, nevylihnutá vejce a mrtvá či vyřazená kuřata, která lze ve formě moučky přidávat v množství 3–5 % do krmiv (Jayathilakan, 2012).

Tab. 1. Vedlejší produkty drůbežářského průmyslu a jejich potenciální využití (Jayathilakan, 2012)

Typ produktu	≈ % živé váhy	Použití
hlavy	2,5	drůbeží moučka, želatina
krev	3,5	krevní moučka
žaludek	3,5	potravina, zdroj chitinolytického enzymu
končetiny	3,5	polévka, mazivo
peří	7,5	lůžkoviny, hnojivo, moučka z peří
střeva a žlázy	8,5	masová moučka, hormony, enzymy
kůže	7,0	masné výrobky, želatina
kosti	13,0	masokostní moučka

## Typy drůbežích vedlejších produktů

### Kosti

Po staletí jsou kosti využívány k přípravě polévek a vývarů. Kuřecí kosti obsahují asi 20 % tuku a kuřecí stehna obsahují asi 15 % tuku. V současnosti je snaha vyvinout techniky zvyšující podíl získaného masa při bourárenském zpracování. V mnoha zemích se používá mechanicky separované maso (tzv. separát) v masných produktech, ale podíl takto získaného masa bývá limitován (Waldron, 2009). Mechanická separace masa z kostí má za následek velké množství drůbežích zbytků, které průměrně obsahují 17 % bílkovin, zejména kolagenu (Jayathilakan, 2012).

### Kůže

Drůbeží kůže tvoří 4 až 15 % živé hmotnosti zvířete a jsou jedním z nejhodnotnějších vedlejších produktů. Obsahují velké množství tuku (až 70 %). Pokud mají být dále zpracovány na produkty s přidanou hodnotou pro potravinářský nebo kosmetický průmysl, jako je např. želatina, je nutné, aby byl obsah tuku co nejnižší, protože tuk je nežádoucí složkou v želatině (Sheu a Chen, 2002).

### Hlavy

Drůbeží hlavy představují přibližně 2,5 % z celkové produkce a používají se při výrobě krmiv nebo se zpracovávají na moučku. Jelikož mohou být potenciální surovinou pro výrobu želatiny, může se jejich hodnota pro drůbežářský průmysl v budoucnu zvyšovat (Jayathilakan, 2012).

### Vnitřnosti

Vnitřnosti představují produkt s vysokou nutriční hodnotou a jsou ceněné jako potraviny zejména v jihovýchodní Asii. V Číně, Japonsku a Indii se vnitřnosti využívají na výrobu léčiv v tradiční medicíně. Srdce, játra a žaludky

mají kulinářské využití; střeva a žlázy mohou být např. využity při výrobě hormonů a enzymů (Jayathilakan, 2012).

### **Krev**

Krev u dospělé drůbeže představuje asi 3,5 % z celkové hmotnosti a obsahuje přibližně 85 % vody; zbytek je tvořen proteiny, lipidy a minerály. Krev je získávána během vykrvování a je z nutričního hlediska velmi cenná, neboť je bohatým zdrojem proteinů, zejména hemoglobinu (Ofori a Hsieh, 2014). Krev je využívána v potravinářství např. jako emulzifikátor, stabilizátor, barvicí přísada či nutriční složka, avšak největší podíl zaujímá výroba krevní moučky v krmivářském průmyslu. Další aplikací jsou medicínské nebo farmaceutické produkty (Toldrá, 2016).

### **Tuk**

Tuk je také významným živočišným produktem a tradičně se používá při přípravě pokrmů. Využíván je rovněž při výrobě margarínů a ztužených tuků. Tradičním zpracováním tuků je výroba mýdel či maziv. Tuky jsou rovněž využívány jako přísada v kosmetických přípravcích (Jayathilakan, 2012).

### **Peří**

Drůbeží peří je významným zdrojem keratinu, který je v důsledku přítomnosti disulfidických můstků chemicky a mechanicky vysoce odolnou bílkovinou. Hydrolytickým štěpením chemických vazeb v keratinu lze připravit rozpustné produkty o různé molekulové hmotnosti (Grazziotin, 2007). Hydrolyzáty keratinu se využívají v potravinářském průmyslu jako nutriční doplňky, k úpravě viskozity mléčných výrobků, při výrobě energetických nápojů či ke stabilizaci emulzí. Významné využití mají v kosmetickém průmyslu. Přídavek do emulzí na ošetřování pokožky zlepšuje její bariérové a hydratační vlastnosti. V šamponech a kondicionérech přispívají k lepší struktuře a vlastnostem vlasů. (Mokrejš, 2017).

Ostatní vedlejší produkty a deriváty se obecně používají při výrobě krmiv a hnojiv pro hospodářská zvířata.

Maso-zpracující průmysl generuje díky rostoucí výrobě stále větší množství vedlejších živočišných produktů (až 100 milionů tun/rok celosvětově), které jsou běžně zpracovávány v kafilériích na masokostní moučku. Největší podíl zaujímají kuřecí vedlejší produkty (až 33 % produkce), neboť kuřecí maso je v současnosti nejvíce konzumovaným typem masa z důvodu nižší ceny oproti ostatním typům. Vedlejší kuřecí produkty (např. běháky, kůže nebo hlavy) mohou obsahovat významné množství kolagenu, a tedy mohou být potenciální surovinou pro přípravu želatiny, která se vyrábí zpracováním živočišných tkání obsahujících tento protein (zejména vepřové a hovězí kůže nebo kosti).

Zpracování vedlejších živočišných produktů na produkt s dalším komerčním využitím představuje další ekonomické zhodnocení suroviny, což zvyšuje konkurenceschopnost zpracovatelských firem. Kuřecí želatina může být alternativou k tradičním savcím želatinám díky podobným vlastnostem v závislosti na typu suroviny a metodě přípravy. Při zpracování tkání na želatinu jsou běžně využívány kyseliny a alkálie. Je tedy žádoucí nahrazení těchto chemikálií jinými látkami nezatěžující životní prostředí. Určitou alternativou mohou být enzymy, jejichž výhodou je také vyšší specifická, a tedy snadnější řízení procesu. Želatina má v současné době díky svým jedinečným vlastnostem (schopnost vázat vodu či tuk; tvorba emulze, filmu, termoreverzibilního gelu; stabilizace pěny, textury) široké aplikační možnosti v mnoha průmyslových odvětvích (potravinářství, kosmetika, farmacie, medicína). V současnosti také roste poptávka po jiných než savcích typech želatin vzhledem k nemocem skotu (BSE, FMD) či z náboženských důvodů (Islám, Hinduismus, Judaismus). Výroba želatiny z alternativních zdrojů použitím alternativního způsobu tedy představuje ideální využití vedlejších živočišných produktů jak z ekonomického, tak i z ekologického hlediska.

### 3. ZHODNOCENÍ SOUČASNÉHO STAVU POZNÁNÍ A CÍLE PRÁCE

Želatina je v současnosti průmyslově připravována z živočišných tkání s vysokým podílem kolagenu s využitím dvou základních typů chemické předúpravy: kyselé a alkalické. Kyselé opracování trvá přibližně jeden den a jsou k tomuto účelu nejčastěji využívány HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nebo H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Alkalické opracování trvá v řádu dnů až měsíců a jsou běžně používány NaOH nebo KOH. Výhodou je nízká cena těchto chemikálií, avšak nevýhodou je jejich toxicita; při uvolňování do životního prostředí představují riziko pro člověka i další živočichy. Proto byla zvolena alternativní biotechnologická metoda předúpravy suroviny, která spočívá v opracování suroviny enzymem, jehož cena je vyšší oproti běžně používaným chemikáliím, avšak použité množství je velmi nízké (v řádu desetin procent).

Na základě vyhodnocení literární rešerše byly zvoleny jednotlivé cíle práce, které vycházejí ze tří hlavních zjištění: neustále se zvyšující množství drůbežích vedlejších produktů; skutečnost, že tyto produkty mohou obsahovat významné množství kolagenu; neustále rostoucí celosvětová poptávka po želatině.

Cíle jsou rozděleny do 5 kapitol: příprava přečištěného kolagenu, příprava želatin, testování funkčních vlastností želatin, návrh optimálních podmínek přípravy želatin a zhodnocení přínosu práce pro vědu a praxi.

## **1. Příprava přečištěného kolagenu**

- Zvolit vhodné vedlejší drůbeží produkty vznikající při porážce drůbeže s vysokým potenciálem suroviny pro přípravu želatiny
- Stanovit a analyzovat složení vybraných tkání (zejména obsah bílkovin a podíl kolagenu) za účelem zjištění vhodnosti suroviny pro přípravu želatiny
- Navrhnout vhodný způsob přípravy tkání k dalšímu zpracování; zejména teplotní podmínky a způsob mělnění při homogenizaci suroviny
- Zvolený typ tkáně podrobit řízenému odbourávání nežádoucích složek (tuků, nekolagenních bílkovin a pigmentů) s cílem připravit přečištěný kolagen

## **2. Příprava želatin**

- Navrhnout postup zpracování přečištěného kolagenu na kolagen rozpustný v teplé vodě (želatinu) s využitím alternativního způsobu, při kterém by bylo využito minimální či žádné množství chemických látek tak, aby byl proces environmentálně přijatelný; zvolit vhodné technologické podmínky a provést extrakci želatin z vybraných vedlejších drůbežích produktů s využitím faktorových experimentů

## **3. Testování funkčních vlastností želatin**

- Testovat funkční vlastnosti připravených želatin ve vztahu k potravinářským aplikacím, tj. pevnost gelu a jeho tepelnou stabilitu, bod tání a gelace, viskozitu, čirost, vaznost vody, vaznost tuku, emulzifikační kapacitu a stabilitu, pěnotvornou kapacitu a stabilitu
- Otestovat funkční vlastnosti komerčně dostupných želatin a porovnat je s připravenými želatinami

## **4. Návrh optimálních podmínek přípravy želatin**

- Sledovat vliv jednotlivých technologických faktorů na výtěžek želatiny s využitím statistického softwaru
- Vyhodnotit vliv navržených faktorů na funkční vlastnosti želatin
- Navrhnout optimální technologické podmínky přípravy želatiny z vybraných vedlejších drůbežích produktů

## **5. Zhodnocení přínosu práce pro vědu a praxi**

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Koncepce práce a plánování experimentů

V této práci byly pro plánování experimentů využity tzv. faktorové experimenty, které lze využít pro zjištění významu vlivu jednotlivých technologických faktorů (doba a teplota extrakce, množství enzymu) na výtěžek a kvalitu (pevnost gelu, viskozitu, bod tání a gelace) připravených želatin za účelem optimalizovat proces přípravy želatiny a následně určit nejvhodnější technologické podmínky.

Použití této metody umožňuje zkoumat více než jeden faktor na dvou nebo více úrovních. Experimentální návrh obecně zahrnuje kombinace různých úrovní faktorů, což umožňuje vyhodnotit interakce mezi různými faktory, posoudit význam každého faktoru a nalézt nejefektivnější způsob řešení problému s využitím malého počtu experimentů. Faktorové experimenty využívají ortogonalitu, která umožňuje popis jevu bez nutnosti zkoumat všechny varianty řešení. K určení optimálních hodnot jednotlivých faktorů ovlivňujících proces lze tedy využít faktorové experimenty, které také umožňují provedení menšího počtu experimentů při dosažení velmi podobného výsledku (Kennedy a Kraus, 1999; Antony, 2014).

V současné době odborná literatura téměř nenabízí informace o využití faktorových experimentů při optimalizaci přípravy želatin. Potenciální aplikace však již byly popsány v technické praxi, např. v práci Štrause a Dolejše při problematice úpravy vody (Štraus a Dolejš, 2010). Nedávno byly publikovány další studie v oblasti farmacie či analýzy kvality (Fukuda, 2018; Borrows, 2017).

### 4.2 Použité suroviny

Byly vytipovány 3 druhy vedlejších drůbežích živočišných produktů (kuřecí běháky, kůže a hlavy (Raciola, Česká republika)) s potenciálem dalšího využití na komerční produkty, které bylo nejprve nutné charakterizovat za účelem zjištění jejich složení, tj. stanovit obsah sušiny; v sušině poté podíl bílkovin, tuků a minerálních látek, a také podíl kolagenu z obsahu bílkovin. Výsledky jsou uvedeny v tab. 2 (viz kapitola výsledky a diskuze). Obsah sušiny byl stanoven nepřímou metodou sušením vzorku po dobu 18 h při teplotě  $103 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (AOAC, 2000). Přítomné proteiny byly stanoveny Kjeldahlovou metodou (ISO 937–1978). Množství kolagenu bylo vypočteno z množství hydroxyprolinu (vynásobením hodnoty koeficientem 8) (ISO 3496–1994). Obsah tuku byl stanoven extrakcí dle Soxhleta s využitím dvoustupňového procesu a dvou rozpouštědel (chloroform a etanol). Obsah minerálních látek byl stanoven spálením vzorku a žiháním při teplotě  $650 \text{ }^{\circ}\text{C}$  v muflové peci po dobu nejméně 1 h a následným výpočtem (Nollet a Toldrá, 2015). Každý test byl proveden ve třech opakováních; výsledky jsou prezentovány jako aritmetický průměr se



směrodatnou odchylkou (SD). Pro porovnání vlastností připravených želatin s komerčními byly využity 4 typy komerčních želatin: vepřové D526 a D012119, hovězí D529 a halal (Via Naturae, Česká republika).

### 4.3 Chemikálie a enzymy

Chemikálie: NaCl, NaOH, HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, petrolether, ethanol, chloroform, acetonitril, Ehrlichovo činidlo (Verkon, Česká republika). Všechny chemikálie byly analytického typu. Enzymy: Lipozyme TL IL - enzym produkovaný imobilizací mikrobiální lipázy z *Thermomyces lanuginosus* na granulovaném nosiči ze siliky, lipáza je produkována submerzní fermentací geneticky modifikovaného organismu *Aspergillus oryzae*, deklarovaná aktivita 100 KPU/g (kiloproteázová jednotka/g), optimální pracovní teplota 70 °C a pH 6-9 (Novozymes, Dánsko); Lipex 100 L - lipáza produkována submerzní fermentací geneticky modifikovaného kmene *Aspergillus*, deklarovaná aktivita 100 KLU/g, optimální pracovní teplota 30 °C a pH 7 (Novozymes, Dánsko); Lipolase - lipáza s *Thermomyces lanuginosus* produkována submerzní fermentací geneticky modifikovaného mikroorganismu *Aspergillus oryzae*, deklarovaná aktivita 100 KPU/g, optimální pracovní teplota 30 °C a pH 11 (Novozymes, Dánsko); Polarzyme 6.0 T - proteolytická serinendoproteáza vyrobená fermentací mikroorganismů, které nejsou přítomny v konečném produktu s deklarovanou enzymatickou aktivitou 6 KPU/g, optimální pracovní teplota 10-60 °C a pH 7-11 (Novozymes, Dánsko). Plate Count Agar (PCA), Violet Red Bile Lactose Agar (VRBL), *Enterococcus* Selective Agar (ESA), Tryton Soya Agar (TSA) (Sigma-Aldrich, USA).

### 4.4 Příprava přečištěného kolagenu

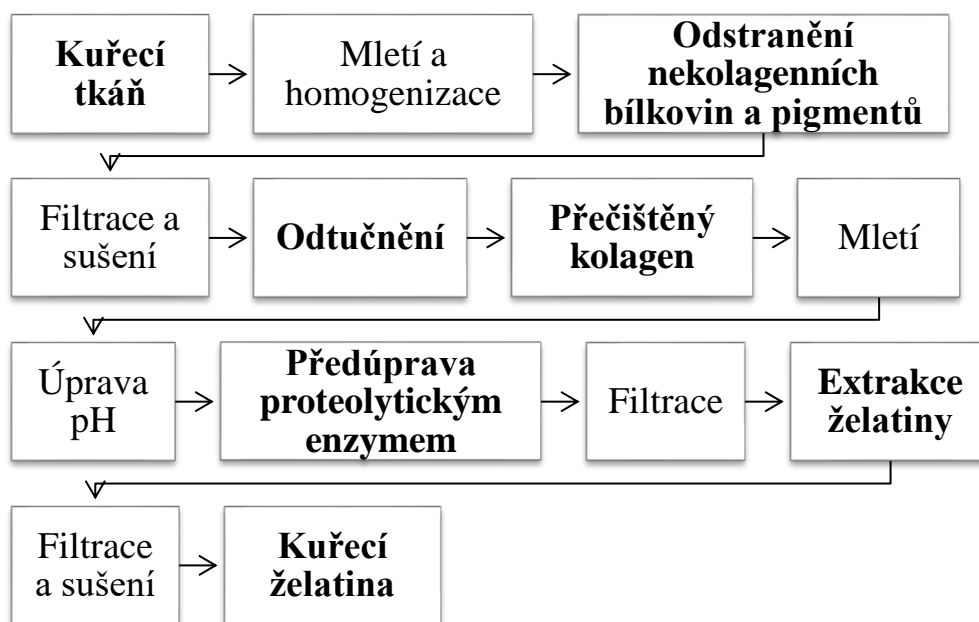
Na základě výsledků jednotlivých stanovení byly zvoleny vhodné suroviny (kuřecí běháky, kůže a hlavy) a navržen postup její přípravy pro další zpracování a následnou extrakci želatiny (obr. 3). Postup byl navržen na základě literární rešerše a předběžných experimentů. Suroviny dodala společnost RACIOLA, Uherský Brod.

Příprava tkáně z vedlejších jatečných produktů pro další zpracování na kolagenní produkty sestává z 3 hlavních fází: mletí a homogenizace, odstranění nekolagenních bílkovin a pigmentů a odtučnění suroviny, které jsou níže podrobněji popsány.

#### Mletí a homogenizace

V jatečném zařízení byla surovina očištěna, ochlazená, a následovalo skladování max. po dobu 36 h při teplotě 0–5,0 °C. Pro mletí a homogenizaci suroviny byl navržen dvoustupňový postup, pro který byla použita průmyslová řezačka masa. Surovina byla zmrazena na teplotu –4,0 až –2,0 °C; pro počáteční fázi mletí se ukázala jako vhodná řezací deska s prvky ve tvaru ledvin, zatímco

ve druhé fázi byla použita kruhová deska s prvky o průměru 3 mm. Poté byla surovina zabalena do PE obalů, prudce zmrazena na teplotu  $-36,0 \pm 2,0$  °C a skladována v mrazicím boxu při teplotě  $-20,0 \pm 2,0$  °C. Před dalším zpracováním byla surovina rozmrazena po dobu 12 h při teplotě  $10,0 \pm 2,0$  °C.



Obr. 3. Schématický postup přípravy želatiny z kuřecí tkáně

### Odstranění nekolagenních bílkovin a pigmentů

Tkáň obsahuje kromě kolagenu i nekolagenní bílkoviny (albuminy, globuliny) a pigmenty, které je nutné odstranit. Proces probíhal ve třech krocích s použitím destilované vody a dvou různých roztoků. Surová tkáň byla nejprve důkladně propláchnuta vodou po dobu 5 min. Během této fáze byly odstraněny albuminy. Poté byla surovina smísená s 1 mol/l roztokem NaCl v poměru 1:10 (w/v) a umístěna na třepačku, kde probíhalo opracování suroviny při teplotě  $5,0 \pm 2,0$  °C v inkubátoru. Doba třepání byla celkem 6 h, přičemž po 3 h byla surovina přefiltrována přes filtrační PA tkaninu a propláchnuta destilovanou vodou. Poté byla surovina znovu opracována po dobu 3 h 1 mol/l roztokem NaCl. V této fázi byly odstraněny globuliny. Po filtraci byla surovina smísená s 0,5% roztokem NaOH v poměru 1:10 (w/v) a následovalo další opracování rovněž při teplotě  $5,0 \pm 2,0$  °C po dobu 18 h. Nakonec byla surovina přefiltrována a propláchnuta. Tímto způsobem byly odstraněny pigmenty.

### Odtučnění

Jelikož suroviny obsahují poměrně velké množství tuků v závislosti na typu, byly pro účely odtučnění otestovány 3 potenciálně vhodné metody odstranění nežádoucích tuků: odtučnění roztokem  $\text{NaHCO}_3$ , lipolytickými enzymy a rozpouštědly. Pokud by bylo enzymové odtučnění dostatečně efektivní, znamenalo by to vyhnutí se toxickým chemickým rozpouštědlům.

Metody odtučnění byly testovány na dvou typech vedlejších drůbežích produktů: kuřecí běháky a kůže.

### **Odtučnění kuřecích běháků**

Experimenty byly provedeny podle metody popsané v práci Du a kol. (2013) s mírnou modifikací. Surovina byla smíšena se 150 mmol/l roztokem NaHCO<sub>3</sub> v poměru 1:5 (w/v) v Erlenmayerově baňce a třepán na třepačce 1 h při pokojové teplotě. Poté byla surovina přefiltrována na filtračním sítku; celý proces byl poté 4x opakován. Opracovaná surovina byla přesušena po dobu cca 24 h při teplotě 35 °C v sušárně s nucenou cirkulací vzduchu.

Dále byl otestován lipolytický enzym Lipolase 100 T, který lze využít pro štěpení vazeb mezi molekulami tuků. Účinnost odtučnění byla studována faktorovými schématy 2<sup>2</sup> s jedním centrálním experimentem a jedním opakováním, přičemž sledovanými faktory byly přídavek enzymu a doba odtučňování. 100 g suroviny bylo smíšeno v Erlenmayerově baňce s 500 ml destilované vody, byl přidán lipolytický enzym Lipolase 100 T<sup>®</sup> v množství podle rozpisu experimentů (faktor A - tab. 3, kapitola výsledky a diskuze). pH bylo upraveno na hodnotu 7,0±0,3 (optimální pH pro nejvyšší enzymovou aktivitu). Baňka byla umístěna na třepačku umístěnou v inkubátoru, který byl vytemperován na teplotu 12 °C (optimální teplota). Směs byla třepána po stanovenou dobu, viz rozpis experimentů (faktor B). Po 1., 2. a 5. hodině třepání byla prováděna kontrola pH a případná úprava na stanovenou hodnotu. Opracovaná surovina byla přefiltrována na sítu opatřeném 3 vrstvami PA tkaniny, umístěna na plech a sušena při teplotě 35 °C v sušárně s nucenou cirkulací vzduchu po dobu cca 24 h.

Při dalších experimentech bylo použito celkem 8 typů rozpouštědel (pentan, hexan, diethylether, butylakohol, aceton, chlorofom, petrolether, ethanol), rovněž byla testována kombinace 2 typů rozpouštědel (petrolether+ethanol, petrolether+aceton).

Surovina byla před experimenty přesušena při teplotě 35 °C v sušárně s cirkulací vzduchu po dobu cca 48 h a smíšena s rozpouštědlem, nebo jejich směsí v poměru 1:10 (w/v) v Erlenmayerově baňce; směs rozpouštědel byla připravena jejich smícháním v objemovém poměru 1:1. Směs suroviny s rozpouštědlem byla umístěna na třepačku. Třepání probíhalo celkem 32 h při pokojové teplotě ve čtyřech třepacích cyklech (3, 6, 15 a 8 h). Po každém cyklu následovala výměna použitého rozpouštědla za čerstvé. Rozpouštědlo (nebo jejich směs) bylo odfiltrováno a surovina poté byla rozprostřena na plech a min. 30 min ponechána v digestoři za účelem odpaření zbylého rozpouštědla. Výsledky jsou uvedeny v tab. 4 (viz kapitola výsledky a diskuze).

### **Odtučnění kuřecích kůží**

Surovina byla smíšena s 0,1 mol/l roztokem NaHCO<sub>3</sub> v poměru 1:5 (w/v) a třepána na třepačce po dobu 1 h při pokojové teplotě. Poté byla surovina

přefiltrována a celý proces byl 4x opakován. Opracovaná surovina byla přesušena cca 24 h při teplotě 35 °C v sušárně s nucenou cirkulací vzduchu.

Při enzymovém způsobu byly testovány 3 typy lipolytických enzymů dodaných firmou Novozymes (Dánsko): Lipex 100L<sup>®</sup>, Lipozyme TL IL<sup>®</sup> a Lipolase<sup>®</sup>. Surovina byla smíšena s destilovanou vodou v poměru 1:10 (w/v) a byl přidán enzym v množství 2,0 % (vztaženo na hmotnost sušiny suroviny, w/w) v případě enzymu Lipex 100 L<sup>®</sup>, 4,0 % (w/w) v případě enzymu Lipozyme TL IL<sup>®</sup> a 5,0 % (w/w) v případě enzymu Lipolase<sup>®</sup>. pH bylo upraveno na hodnotu 7,0±0,3 (Lipex 100 L<sup>®</sup> a Lipozyme TL IL<sup>®</sup>), nebo 11,0±0,3 (Lipolase<sup>®</sup>) za účelem dosažení optimální enzymové aktivity. Poté byla směs třepána při pokojové teplotě (Lipex 100 L<sup>®</sup>), respektive v inkubátoru vytemperovaném na teplotu 40,0±2,0 °C (Lipozyme TL IL<sup>®</sup>), nebo při teplotě 30,0±2,0 °C (Lipolase<sup>®</sup>) po dobu 72 h; 2x denně byla směs přefiltrována přes PA tkaninu a přidán čerstvý enzym. pH bylo pravidelně kontrolováno a dle potřeby upraveno na předepsanou hodnotu. Nakonec byla surovina propláchnuta a vysušena při teplotě 35,0±2,0 °C v sušárně s nucenou cirkulací vzduchu.

Při rozpouštědlovém způsobu byla surovina nejprve přesušena při teplotě 35,0±2,0 °C. Byl zvolen rozpouštědlový systém petrolether+etanol, jehož účinnost se osvědčila při zpracování kuřecích běháků. Směs rozpouštědel byla připravena smícháním v objemovém poměru 1:1. Surovina byla s rozpouštědly smíšena v poměru 1:10 (w/v) a třepána ve 3 cyklech po dobu 72 h při teplotě 23,0±2,0 °C. Po 24 a 48 h třepání byla použitá rozpouštědla odfiltrována a připravena čerstvá směs. Nakonec byla směs rozpouštědel odfiltrována.

U odtučněných surovin byl stanoven obsah zbytkového tuku metodou podle Soxhleta. Konečným produktem přípravné fáze zpracování suroviny byl kuřecí přečištěný kolagen, u kterého byl stanoven obsah sušiny a výsledek použit při výpočtu výtěžku připravených želatin. Výsledky jsou uvedeny v tab. 5 (viz kapitola výsledky a diskuze).

## 4.5 Biotechnologická předúprava a extrakce želatin

Poté co byl připraven kuřecí přečištěný kolagen, který byl podroben procesu mletí s využitím analytického laboratorního mlýnku na velikost částic v rozmezí 1–2 mm, proces pokračoval dalšími dvěma fázemi: předúpravou suroviny, po které následovala extrakce želatiny, jak znázorňuje postup uvedený na obr. 3 (str. 34). Pro odtučnění suroviny byla zvolena kombinace rozpouštědel petrolether a etanol, která se ukázala jako nejefektivnější během experimentů. Pro předúpravu byl navrhnout biotechnologický (enzymový) způsob, který zatím není v průmyslu používán. Výhodou této metody je, že nedochází k zatěžování životního prostředí chemickými látkami, dále velmi malé množství enzymu (desetiny %), nízká cena (při nízkém dávkování), mírné reakční podmínky (neutrální pH, pokojová teplota) a celková technologická nenáročnost procesu. Pro tento účel byl využit enzym Polarzym 6.0 T<sup>®</sup> (Novozymes, Dánsko); jedná se o kombinaci enzymů subtilisin získaného z bakterie *Bacillus subtilis* a

proteázy produkované fermentací kmene bakterie *Bacillus amyloliquefaciens*, které hydrolizují peptidové vazby na konci kolagenního řetězce, jedná se tedy o endopeptidázy. Tento enzym je široce využíván pro komerční i výzkumné účely (detergenty, kosmetika, potravinářství, organická chemie). Cena takového enzymu je 40 US dolarů za 1 kg.

Surovina (navážka 25 g) byla smíšena s destilovanou vodou v poměru 1:20 (w/v), pH směsi bylo upraveno na hodnotu  $7,5 \pm 0,3$  (optimální pH pro dosažení maximální účinnosti použitého enzymu) a byl přidán proteolytický enzym Polarzym 6.0 T<sup>®</sup> v konkrétním množství. Množství enzymu bylo vztaženo na sušinu suroviny. Poté byla směs třepána po stanovenou dobu, přefiltrována a surovina důkladně propláchnuta destilovanou vodou.

Po předúpravě následovala extrakce želatiny. Opracovaná surovina byla znovu smíšena s destilovanou vodou v poměru 1:20 (w/v) a směs zahřáta na stanovenou extrakční teplotu a po stanovenou dobu probíhala extrakce želatiny za stálého míchání suroviny. Po dokončení extrakce byla směs přefiltrována a poté byl získaný želatinový roztok znovu zahříván na teplotu  $100,0 \pm 1,0$  °C po dobu 5 min. Tento krok byl důležitý pro inaktivaci zbytkového množství enzymu, který byl použit při předúpravě suroviny. Následovalo sušení želatinového roztoku v tenké vrstvě v sušárně s nucenou cirkulací vzduchu při teplotě  $52,0 \pm 1,0$  °C po dobu cca 24 h. Hmotnost želatiny byla využita pro výpočet výtěžku želatiny. Výsledným produktem byl želatinový film. Želatinový prášek byl připraven rozemletím želatinového filmu na velikost částic 1–2 mm.

### **Faktorové experimenty**

První surovinou použitou pro extrakci želatiny byly kuřecí kůže. Nejprve byly provedeny předběžné experimenty, kdy byl otestován vliv teploty na výtěžek želatiny, pevnost gelu, čírost a viskozitu želatinového roztoku a další vlastnosti spojené s povrchovými efekty (vaznost vody a vaznost tuku, pěnotvorná a emulzifikační kapacita a stabilita). Byly testovány extrakční teploty 40, 50, 60, 70 a 80 °C při konstantní době enzymové předúpravy (20 h); množství enzymu během předúpravy bylo stanoveno na 0,5 %; doba extrakce byla stanovena na 60 min. Technologické podmínky byly navrženy na základě předběžných experimentů. Výsledky jsou uvedeny v tab. 6 a 7 (viz kapitola výsledky a diskuze).

Poté byly provedeny kombinované faktorové experimenty, při kterých byl sledován vliv 4 technologických faktorů (nezávisle proměnných) na dvou a více úrovních. Sledovanými technologickými parametry nezávisle proměnnými byly: faktor A – množství enzymu při předúpravě suroviny (min. hodnota: 0,2 a max. hodnota: 0,8 %), faktor B – teplota první extrakce (hodnoty: 50, 55, 60, 65, 70, 75 a 80 °C  $\pm 0,5$  °C), který je podle dosavadního výzkumu nejdůležitější faktor ovlivňující vlastnosti želatiny, proto bylo zkoumáno celkem 7 úrovní tohoto faktoru, faktor C – doba první extrakce (min. hodnota: 30 a max. hodnota: 120

minut) a faktor D – teplota druhé extrakce (60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 °C±0,5 °C). Studovanými závisle proměnnými veličinami byly pevnost a teplota tání želatinového gelu, teplota gelace a viskozita želatinového roztoku (vlastnosti želatiny spojené s gelací). Extrakce želatiny byla v tomto případě dvoustupňová, tak aby byla surovina efektivněji zpracována. Nejprve byla provedena první extrakce po dobu podle faktoru B; poté byl želatinový roztok odfiltrován a probíhala druhá extrakce, přičemž teplota extrakce byla zvýšena o 10 °C (faktor D). Doba druhé extrakce byla stanovena konstantní (60 min). Takový čas by podle předpokladů měl zajistit optimální poměr mezi výtěžkem a kvalitou želatiny. Pokud by opět byly sledovány dvě úrovně, znamenalo by to navýšení počtu experimentů na příliš vysoký počet. Výhodou faktorových experimentů je právě nízký počet experimentů nutných k dosažení požadovaných výsledků. Výsledky jsou uvedeny v tab. 6 a 7 (viz kapitola výsledky a diskuze).

Dále byla připravena želatina z kuřecích hlav. Byl studován vliv 3 faktorů: faktor A – množství enzymu (0,4 a 1,6 %), faktor B – doba enzymové předúpravy (18 a 48 h) a faktor C – doba 1. extrakce želatiny (1 a 4 h). Také byl proveden centrální experiment se středními hodnotami faktorů a experiment se středními hodnotami faktorů a nulovým množstvím enzymu (faktor A). Extrakční teplota byla konstantní: 80,0 °C±2,0 °C. Sledovanými závisle proměnnými veličinami byly výtěžek hydrolyzátu, výtěžek 1. extrakce želatiny, pevnost gelu, viskozita, teplota tání a množství minerálních látek. Výsledky jsou uvedeny v tab. 14 (viz kapitola výsledky a diskuze).

Další testovanou surovinou pro extrakci želatiny byly kuřecí běháky. Byly navrženy faktorové experimenty, kdy byly sledovanými 3 technologické faktory: faktor A – množství enzymu při předúpravě suroviny (0,2 a 0,8 %; vzhledem k sušině suroviny), faktor B – doba enzymové předúpravy suroviny (24 a 120 h) a faktor C – doba extrakce želatiny (1 a 4 h). Teplota extrakce byla konstantní (80,0 °C±2,0 °C). Nakonec byl proveden centrální experiment se středními hodnotami faktorů. Studovanými závisle proměnnými veličinami byly pevnost gelu, viskozita želatinového roztoku a množství minerálních látek v želatině. Technologické podmínky byly určeny na základě předběžných experimentů. Následovaly optimalizační experimenty, kdy byly upraveny hodnoty faktorů: množství enzymu bylo 0,1 a 0,4; doba extrakce byla 15 a 45 min. Množství enzymu bylo konstantní (20 h). Také byl proveden centrální experiment se středními hodnotami obou faktorů. Výsledky jsou uvedeny v tab. 17 (viz kapitola výsledky a diskuze).

Pro vyhodnocení vlivu jednotlivých technologických faktorů (extrakční čas a teplota, množství enzymu a doba enzymové předúpravy) na výtěžek a vlastnosti želatiny byl použit statistický program Minitab 18.

## 4.6 Příprava hydrolyzátů

Postup přípravy je složený z 6 dílčích operací: 1. Promytí kuřecích běháků ve studené vodě: dojde k odstranění zbytků krve, peří a nečistot. Poté rozemletí na řezače masa (velikost částic 6 mm). 2. Odstranění nekolagenních bílkovin, pigmentů a tuku smísením suroviny s 0,10% roztokem NaOH v poměru 1:8 (w/v), třepání 45 min při pokojové teplotě, filtrace a promytí vodou (opakování celého postupu 4x). Odtučnění suroviny smísením suroviny se směsí rozpouštědel ethanol + petrolether (1:1, v/v) v poměru 1:6 (w/v), třepání 34 h při pokojové teplotě (po 6, 12 a 24 h výměna rozpouštědla za nové). Výsledkem opracování je bílkovinný substrát. 3. První stupeň zpracování: smísení bílkovinného substrátu s vodou v poměru 1:8 (v/w), úprava pH na hodnotu  $7,5 \pm 0,3$ , enzymová předúprava (mikrobiální proteáza Protamex) 20-h třepáním při pokojové teplotě a přidavek enzymu dle faktoru A. 4. Filtrace: oddělení roztoku bílkovinného hydrolyzátu II. jakosti (vysušen při  $103,0 \pm 1,0$  °C v sušárně s nucenou cirkulací vzduchu) od bílkovinného substrátu zachyceného na filtru (proplach vodou). 5. Druhý stupeň zpracování: smísení bílkovinného substrátu s vodou v poměru 1:8 (v/w), ohřev na teplotu dle faktoru B, poté extrakce po dobu dle faktoru C při pomalém míchání směsi na magnetickém míchadle. 6. Filtrace: oddělení roztoku bílkovinného hydrolyzátu I. jakosti od bílkovinného substrátu, vysušení v tenkém filmu při  $50,0 \pm 0,5$  °C. Bílkovinný substrát je vysušen při  $103,0 \pm 1,0$  °C. Výsledky jsou uvedeny v tab. 29 (viz kapitola výsledky a diskuze).

## 4.7 Testování funkčních vlastností želatin

### Stanovení výtěžku a testování vlastností želatin

Poté, co byly připraveny a zváženy vzorky želatin, bylo možné vypočítat výtěžek želatinu podle následujícího vzorce:

$$\xi = \frac{m_1}{m_2} \cdot 100 \quad (1)$$

$\xi$  - výtěžek želatinu (%)

$m_1$  - hmotnost vysušené želatinu

$m_2$  - hmotnost sušiny přečištěného kolagenu

Připravené vzorky byly analyzovány za účelem porovnání funkčních vlastností želatin extrahovaných při různých podmínkách. Výsledky byly srovnány s dvěma typy potravinářských želatin (vepřovou a hovězí).

Byla testována pevnost gelu a tepelná stabilita, bod tání a gelace, čirost a

viskozita želatinového roztoku a další vlastnosti spojené s povrchovými efekty (vaznost vody a tuku, pěnotvorná a emulzifikační kapacita a stabilita). Tyto charakteristiky mají velký význam pro aplikace v potravinářském průmyslu, jako např. želé, polevy, aspiky, našlehané bonbóny a další produkty.

### **Pevnost gelu**

Z připravené kuřecí želatiny byl připraven gel postupem podle GMIA – Standardized Methods for the Testing of Edible Gelatine (2019): 7,5 g želatiny bylo smíseno se 105 ml destilované vody ve stanovené nádobce a ponecháno bobtnat po dobu 1–3 h. Následovalo zahřát na teplotu 60 °C po dobu max. 10 min; byl připraven 6,67% želatinový roztok, který byl ponechán vychladnout při pokojové teplotě a poté vychlazen při teplotě 10,0 °C±0,1 °C po dobu 16–18 h.



*Obr. 4. Vzorky kuřecích želatin pro stanovení pevnosti gelu*

Pevnost připravených gelů (obr. 4) byla změřena přístrojem Stevens LFRA Texture Analyzer (Leonard Farnell and Co Ltd., Anglie) (obr. 5). Pevnost (Bloom hodnota) je definována jako síla v gramech nutná k průniku pístu definovaného tvaru rychlostí 1 mm/s do hloubky 4 mm vzorku gelu.



*Obr. 5. Stevens LFRA Texture Analyzer*

### **Tepelná stabilita gelu**

Studie zabývající se tepelnou stabilitou želatiny jsou zaměřeny např. na měření reologických vlastností želatiny, jednu z termických analýz (DSC) nebo

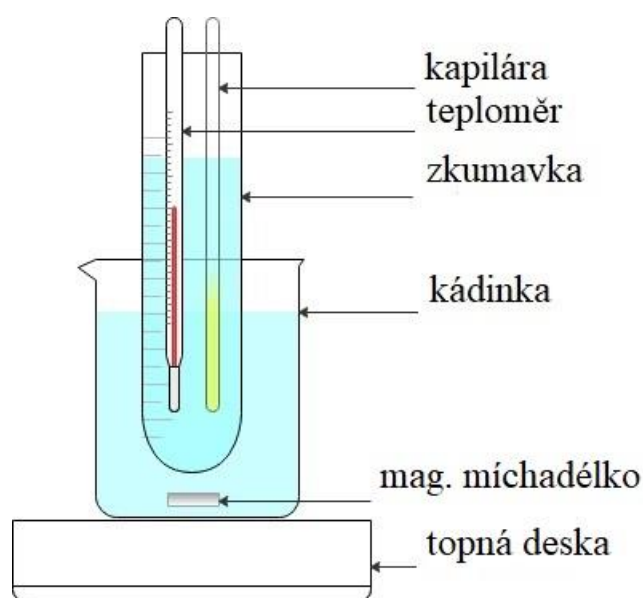


na měření aktivační energie nutné pro přechod želatiny ze stavu gelového do stavu tekutého. V žádných studiích nebyl hodnocen vliv teploty na pevnost gelu; proto byla navržena vlastní metodika: tepelná stabilita gelů byla testována při standardní pokojové teplotě  $23,0 \pm 0,1$  a při teplotách  $29,0 \pm 0,1$  a  $35,0 \pm 0,1$  °C s ohledem na modelování podmínek skladování produktů obsahujících želatinový gel během letních období nebo v tropických a subtropických oblastech. Po prvním měření byly vzorky udržovány při nastavené teplotě v inkubátoru s relativní vlhkostí 47 %. Pevnost gelu byla měřena každých 15 min, dokud nedošlo k přechodu želatinového gelu na roztok, nebo dokud nebyla ustálena Bloom hodnota. Výsledky měření byly vyjádřeny jako procentuální hodnota pevnosti gelu vztažená k pevnosti gelu na začátku měření. Touto metodikou byla měřena tepelná stabilita gelů připravených z kuřecích kůží.

Také byly provedeny testy tepelné stability želatinových gelů při zvýšených relativních vlhkostech (60 a 80 %), protože želatinové gely se běžně skladují v chladicích zařízeních s vlhkostí dosahující až 80 %. Tepelná stabilita byla sledována v časovém období 5 dnů. Pevnost gelu byla měřena každou hodinu během prvních 8 h a poté po 16, 23, 87, 93, 111 a 120 h. Tato metodika byla použita pro měření tepelné stability želatinových gelů připravených z kuřecích běháků. Výsledky jsou uvedeny v tab. 21–26 (viz kapitola výsledky a diskuze).

### Teplota tání

Teplota tání želatinového gelu byl stanoven na zařízení zobrazeném na obr. 6 dle mírně modifikované metody popsané Schrieberem a Gareisem (2007).



Obr. 6. Schéma zařízení ke stanovení bodu tání a gelace

Byl připraven 6,67% želatinový roztok (viz stanovení pevnosti gelu), který byl převeden do kapiláry s vnitřním průměrem 2 mm; výška sloupce želatiny byla 1

cm. Kapilára byla chlazená při teplotě 10 °C po dobu 3 h, poté umístěna do zkumavky (průměr 10 mm), která byla umístěna do kádinky vyhřívané na teplotu 55 °C (rychlostí 3,5 °C/min). Teplota tání želatiny byla stanovena v momentě kdy tlak vody vytlačil vzniklý želatinový roztok z kapiláry.

### **Teplota gelace**

Teplota gelace želatinového roztoku byla stanovena za použití stejného zařízení jako při stanovení teploty tání dle modifikované metody popsané Schrieberem a Gareisem (2007). Želatinový roztok byl připraven výše popsaným způsobem (viz stanovení pevnosti gelu), převeden do zkumavky (do poloviny výšky) a byla měřena jeho teplota. Jakmile teplota poklesla na 30 °C, byla do kádinky přidána voda ochlazená na 5 °C tak, aby byl želatinový vzorek zcela obklopen vodou. Poté byly do zkumavky vhazovány ocelové kuličky (hmotnost 0,10 g) při poklesu teploty o 0,5 °C. Teplota gelace byla stanovena když kulička uvízla uvnitř či na povrchu vytvořeného želatinového gelu.

### **Viskozita**

Viskozita želatinového roztoku byla měřena podle metody popsané v GMIA (2019). 6,67% roztok želatiny byl připraven stejným způsobem jako při měření pevnosti želatinového gelu a převeden do trubice Ubbelohdeho viskozimetru umístěné ve vodní lázni, kde byla udržována teplota 60,00±0,1 °C. Byl měřen čas potřebný pro průtok roztoku želatiny mezi dvěma body v kapilární trubici viskozimetru.

Viskozita vzorku želatiny byla vypočtena z následující rovnice:

$$\eta = (k \cdot t - B/t) \cdot \rho \quad (2)$$

$\eta$  - dynamická viskozita (mPa.s)

$k$  - viskozitní konstanta detekovaná kalibrační tekutinou (0,5)

$t$  - aritmetický průměr naměřených časů průtoku (s)

$B$  - korekční konstanta pro kinetickou energii stanovená z rozměrů viskozimetru (2,8)

$\rho$  - hustota roztoku želatiny (g.cm<sup>-3</sup>). Hustota (1,003 g.cm<sup>-3</sup>±0,005) byla stanovena pyknometrickou metodou.

### **Čiřost**

Čiřost želatinového roztoku byla stanovena podle metody popsané v GMIA (2019). Byl připraven želatinový roztok (viz měření viskozity), který byl zahříván ve vodní lázni na 45 °C a byla změřena propustnost při vlnové délce 640 nm na spektrofotometru Helios Epsilon (ThermoFisher Scientific, USA).

### **Vaznost vody**

Vaznost vody (VV) byla stanovena podle metody popsané Nasrinem a kol. (2015). Vzorek želatiny (1 g) byl rozdispergován v 25 ml destilované vody ve zkumavce vířením po dobu 5 min při pokojové teplotě. Poté byla směs odstředěna při 3000 ot/min po dobu 30 min. Supernatant byl zfiltrován a vzorek zvážen.

VV byla vypočtena podle vzorce:

$$VV = \frac{m_1}{m_0} \quad (3)$$

VV - vaznost vody ( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )

$m_1$  - hmotnost vzorku po analýze (g)

$m_0$  - hmotnost vzorku před analýzou (g)

### **Vaznost tuku**

Vaznost tuku (VT) byla stanovena podle metody Li a kol. (2009). Vzorek želatiny (0,1 g) byl rozdispergován v 10 ml slunečnicového oleje ve zkumavce a promíchán vířením po dobu 1 min a ponechán stát 30 min při pokojové teplotě. Poté byla směs odstředěna při 3000 ot/min po dobu 30 min. Volný olej byl dekantován a VT byla vypočtena následujícím vzorcem:

$$VT = \frac{m_1}{m_0} \quad (4)$$

VT - vaznost tuku ( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )

$m_1$  - hmotnost vzorku po analýze (g)

$m_0$  - hmotnost vzorku před analýzou (g)

### **Emulzifikační vlastnosti**

Emulzifikační kapacita a stabilita byly stanoveny podle metody Neto a kol. (2001). 5 ml želatinového roztoku (připraveného zahřátím při teplotě 45 °C) v koncentraci 10  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  bylo homogenizováno s 5 ml slunečnicového oleje po dobu 1 min. Poté byla směs odstředěna při 1100 ot/min po dobu 5 min. Emulzifikační kapacita byla stanovena podle vzorce:

$$EK = \frac{V_1}{V_0} \cdot 100 \quad (5)$$

EK - emulzifikační kapacita (%)

$V_1$  - výška vrstvy emulze v odměrném válci (mm)

$V_0$  - výška celého objemu kapaliny v odměrném válci (mm)

Poté byla emulze zahřáta ve vodní lázni na teplotu 55 °C a následovalo odstředění při 1100 ot/min po dobu 5 min.

Emulzifikační stabilita byla vypočtena vzorcem:

$$ES = \frac{V_2}{V_1} \cdot 100 \quad (6)$$

ES - emulzifikační stabilita (%)

$V_2$  - výška vrstvy emulze po zahřátí (mm)

$V_1$  - výška vrstvy emulze v odměrném válci (mm)

### **Pěnotvorné vlastnosti**

Pěnotvorné vlastnosti byly stanoveny podle metody popsané Sathem a kol. (1982). 0,6 g želatiny a 30 ml destilované vody bylo smíseno ve zkumavce o objemu 100 ml a zahřáto na teplotu 60 °C. Pěna byla připravena homogenizací roztoku při 10 000 ot/min po dobu 5 min pomocí desintegrátoru IKA T 25 Digital Ultra-Turray (IKA-Werke, Německo).

Napěněný želatinový roztok byl převeden do 250 ml odměrného válce a pěnotvorná kapacita (PK) byla vypočtena pomocí vzorce:

$$PK = \frac{V_1 - V_0}{V_0} \cdot 100 \quad (7)$$

PK - pěnotvorná kapacita (%)

$V_1$  - objem napěněné kapaliny (ml)

$V_0$  - původní objem kapaliny (ml)

Poté byla stanovena pěnotvorná stabilita. Princip je založen na měření objemu napěněného roztoku želatiny po 30 min; pěnotvorná stabilita (PS) byla vypočtena podle vzorce:

$$PS = \frac{V_2 - V_0}{V_0} \cdot 100 \quad (8)$$

PS - pěnotvorná stabilita (%)

$V_2$  - objem napěněné kapaliny po 30 min (ml)

$V_0$  - původní objem kapaliny (ml)

### **Obsah minerálních látek**

Obsah minerálních látek v želatině byl stanoven spálením vzorku (1 g) nad kahanem a žíháním při teplotě 650 °C v muflové peci po dobu minimálně 1 h. Obsah minerálních látek byl vypočten gravimetricky (Nollet a Toldrá, 2015).

## 4.8 Testování mikrobiální kontaminace připravených želatin

Tento specializovaný výzkum nemohl být proveden na UTB, která nedisponuje potřebným vybavením. Z tohoto důvodu byla navázána spolupráce ze Slovenskou poľnohospodárskou univerzitou v Nitře v rámci zahraniční stáže.

Cílem bylo otestovat vzorky připravených kuřecích želatin připravených v laboratoři z běháků a hlav za různých technologických podmínek (čas a teplota extrakce) a komerčních želatin (vepřových a hovězích) (viz tab. 25) na přítomnost mikroorganismů a vzájemné srovnání výsledků. Výzkum zpracování drůbežích vedlejších produktů na kolagenní produkty byl tak rozšířen o další aspekt.

### Pracovní postup

Nejprve byla připravena směs 5 mg vzorku želatiny a 45 ml 0,87% sterilního fyziologického roztoku. Poté se směs nechala botnat po dobu 1 h a následně probíhalo třepání směsi po dobu 30 min. Na Petriho misky byly připraveny 3 typy živných půd za účelem stanovení celkového počtu bakterií (Plate Count Agar - PCA), izolace coliformních bakterií (Violet Red Bile Lactose Agar – VRBL) a izolace enterokoků (*Enterococcus* Selective Agar – ESA). Živné půdy byly naočkovány 100  $\mu$ l připraveného roztoku. Inkubace probíhala po dobu 24 – 48 h při teplotě 37,5 st C. Poté proběhlo přeočkování za účelem izolování jednotlivých bakteriálních kolonií na TSA (Trypton Soya Agar) a probíhala inkubace dalších 24 – 48 h při teplotě 37,5 st C. Byl spočítán počet organismů – kolonií tvořících jednotek na Petriho misce, které byly vynásobeny ředícím faktorem a objemem inokula v ml. Výsledek je vyjádřen v logaritmech na 1 ml. (viz tab. 30). Do 1 ml zkumavky bylo nadávkováno 300  $\mu$ l destilované vody, poté byl přidán vzorek bakteriální kolonie vyrostlé na agarové půdě pomocí očkovací smyčky a zkumavka byla doplněna 600  $\mu$ l ethanolu. Následovalo důkladné promíchání obsahu zkumavky, odstředění směsi a dekantace. Poté byla zkumavka doplněna 30  $\mu$ l CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30  $\mu$ l acetonitrilu.

Následovalo promíchání a odstředění obsahu zkumavky. Poté byl nanesen 1  $\mu$ l vzorek připravené směsi na mikrotitrační destičku a následně zakápnut 1  $\mu$ l kyseliny skořicové a vysušen při pokojové teplotě. Identifikace mikroorganismů probíhala metodou hmotnostní spektrometrie MALDI TOF (Matrix Assisted Desorption Ionization – Time of Flight) jejímž principem je stanovení molekulové hmotnosti zkoumaného vzorku ionizací laserem za přítomnosti matrice v kombinaci s detekcí doby letu. Vzorkem v tomto případě je jednotlivá bakteriální kolonie nebo kvasinka či vláknitá houba vyrostlá na povrchu agarové půdy.

Pracovní destička byla vložena do hmotnostního spektrometru LT MALDI-TOF LT (Bruker Daltonik, Německo). Směs matrice a vzorku na nosiči byla poté zasažena nanosekundovým pulzem laseru, přičemž došlo k ionizaci molekul vzorku. Vzniklé ionty byly urychleny silným elektrickým polem a

proletí trubicí detektoru rychlostí úměrnou jejich hmotnosti a náboji. Zaznamenala se celková doba letu částic od aplikace laseru po dopad na detekční destičku. Výsledkem celého procesu bylo hmotnostní spektrum, které je druhově specifické pro jednotlivé mikroorganismy. Naměřené spektrum bylo následně srovnáno s profily v referenční databázi a vyhodnoceno (Kacaniova a kol., 2017).

### **Statistická analýza**

Všechny analýzy byly provedeny třikrát; lineární regrese, 1-sample a 2-sample t-testy na hladině významnosti  $p = 0,05$  byly aplikovány s využitím statistického softwaru Minitab 18 pro Windows.

## 5. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Složení vstupních surovin

V této kapitole jsou popsány výsledky charakterizace 3 typů vedlejších drůbežích produktů (kuřecí kůže, hlavy a běháky). Byl stanoven obsah sušiny v surovině; v sušině byl stanoven obsah proteinů, podíl kolagenu, dále obsah tuků a minerálních látek. Výsledky jsou uvedeny v tab. 2. Detailnější informace popisuje patent Mokrejše a kol., z roku 2019 a články Mrázka a kol., z roku 2018 a 2020 (kap. 11G, 11K a 11M).

Tab. 2. Složení kuřecích kůží, hlav a běháků

Typ kuřecí tkáň	Sušina (%±SD)	Proteiny (%±SD) <sup>a</sup>	Kolagen <sup>b</sup> (%±SD) <sup>a, b</sup>	Tuk (%±SD) <sup>a</sup>	Min. látky (%±SD) <sup>a</sup>
kůže	53,6±1,5	16,5±1,3	92,6±0,1	85,0±2,4	0,90±0,3
hlavy	23,0±0,1	51,3±0,5	88,8±1,0	33,9±0,4	16,8±0,1
běháky	35,5±3,0	48,3±0,4	82,8±0,7	34,8±0,8	16,1±0,2

<sup>a</sup> vztaženo na sušinu suroviny <sup>b</sup> z celkového obsahu proteinů

### 5.2 Příprava přečištěného kolagenu

Tato kapitola popisuje další zpracování vybraných surovin (kuřecích běháků a kůží), u kterých byla provedena separace nekolagenních bílkovin a pigmentů a poté bylo otestováno několik způsobů odtučnění suroviny. Detailnější informace popisuje článek Mrázka a kol., z roku 2018 (kap. 11H).

Kuřecí běháky byly odtučněny s využitím 3 způsobů: roztokem NaHCO<sub>3</sub>, enzymově (Lipolase 100 T<sup>®</sup>) a rozpouštědly.

Při použití roztoku NaHCO<sub>3</sub> zbytkový obsah tuku v surovině přesahuje 25 % a je tedy pro další využití suroviny neefektivní. Výsledky a rozpis experimentů enzymového způsobu odtučnění jsou uvedeny v tab. 3. faktor A představuje množství použitého enzymu (%) a faktor B je doba odtučňování (h).

Tab. 3. Rozpis experimentů a obsah zbytkového tuku v kuřecích běhácích

	Faktor A*	Faktor B	Tuk (%)
1	1,0	18	26,5
2	1,0	48	28,5
3	2,5	18	26,1
4	2,5	48	26,0
5	1,75	33	23,8

\* vztaženo na hmotnost sušiny suroviny

Při experimentech byly využity jednoduché faktorové experimenty podle schématu 2<sup>2</sup> s jedním centrálním experimentem a jedním opakováním. Z výsledků experimentů je patrné, že enzym Lipolase 100 T<sup>®</sup> vykazuje jen velmi malou účinnost odtučnění, neboť množství zbytkového tuku bylo u všech provedených experimentů v rozmezí 24 až 28 %, což jsou velmi vysoké hodnoty vzhledem k původnímu obsahu tuku v surovině (cca 35 %). Množství přidaného enzymu, ani doba opracování neměly výraznější vliv na účinnost procesu.

Posledním způsobem bylo použití rozpouštědel. Tab. 4 znázorňuje výsledky experimentů. Nejvyšší účinnosti odtučnění suroviny bylo dosaženo při použití směsi petroletheru a etanolu v objemovém poměru 1:1, při kterém bylo zjištěno přibližně 5 % zbytkového tuku v surovině. Projevil se zde tzv. synergický efekt směsi rozpouštědel, jelikož účinnost odtučnění při použití čistého petroletheru byla přibližně 1,5x nižší (téměř 8 % zbytkového tuku) a účinnost u čistého etanolu byla cca 4x nižší (≈ 21 % zbytkového tuku).

Tab. 4. Typy rozpouštědel a podíl zbytkového tuku v kuřecích běhácích

<b>Rozpouštědlo (směs)</b>	<b>Tuk (%)</b>	<b>Rozpouštědlo</b>	<b>Tuk (%)</b>
petrolether+etanol	4,97	butylalkohol	7,66
petrolether+aceton	6,41	aceton	7,74
pentan	6,67	petrolether	7,93
hexan	6,95	choroform	8,42
diethylether	7,56	etanol	21,3

Kuřecí kůže byly odtučňovány roztokem NaHCO<sub>3</sub>, enzymově (Lipozyme TL IL<sup>®</sup>, Lipex 100 L<sup>®</sup>, Lipolase<sup>®</sup>), rozpouštědly a kombinací enzymů a rozpouštědel. Výsledky jsou znázorněny v tab. 5.

Tab. 5. Metody odtučnění a podíl zbytkového tuku v kuřecích kůžích

<b>Způsob odtučnění</b>	<b>Tuk (%±SD)</b>
0,1 mol/l roztok NaHCO <sub>3</sub>	81,2±3,3
Lipex 100 L <sup>®</sup> (přídavek 2 %)	62,0±2,9
Lipozyme TL IL <sup>®</sup> (přídavek 4 %)	68,7±4,1
Lipolase <sup>®</sup> (přídavek 5 %)	48,3±4,7
petrolether+ethanol	14,5±3,8
Lipex 100 L <sup>®</sup> (přídavek 2 %)+aceton	18,1±3,5
0,1 mol/l roztok NaHCO <sub>3</sub> +Lipolase <sup>®</sup> (přídavek 1 %)	70,3±4,3

První testovanou metodou bylo použití 0,1M roztoku NaHCO<sub>3</sub>. Výsledek ukázal, že tato metoda není vhodná pro tento typ tkáně, neboť obsah zbytkového tuku byl více jak 80 %. Dále byly testovány 3 typy lipolytických enzymů. Efektivita odtučnění byla velmi nízká, jelikož obsah tuku byl snížen z původních



cca 85 % na 68,7 % (Lipozyme TL IL<sup>®</sup>), respektive 62,0 % (Lipex 100 L<sup>®</sup>) a 48,3 % (Lipolase<sup>®</sup>). Další metodou bylo odtučnění rozpouštědly (směs petroletheru a etanolu), která se ukázala jako nejefektivnější u kuřecích běháků. Bylo dosaženo nejvyšší účinnosti odtučnění kůží. Obsah zbytkového tuku byl 14,4 %, což je přijatelná hodnota pro další zpracování kolagenu. Poslední metodou byly kombinované způsoby: kombinace enzymu (Lipex<sup>®</sup>) a rozpouštědla (aceton); hodnota zbytkového tuku byla 18,1 % a kombinace roztoku NaHCO<sub>3</sub> a enzymu (Lipolase<sup>®</sup>), kde byl obsah zbytkového tuku 70,3 %.

## 5.3 Příprava želatin

### 5.3.1 Želatina z kuřecích kůží

Tato kapitola popisuje výsledky studie přípravy želatiny z kuřecích kůží, detailnější informace popisují články Mrázka a kol., z roku 2018 až 2020 (kap. 11A, 11F, 11J a 11L).

Nejprve byly provedeny základní experimenty, kdy byl sledován vliv extrakční teploty na výtěžek a kvalitu želatin. Bylo provedeno 5 základních experimentů, ve kterých byla zvolena extrakční teplota 40–80 °C. Čas extrakce byl konstantní 60 min. Sledované veličiny byly vliv teploty na výtěžek želatiny, pevnost gelu a viskozitu (základní ukazatele kvality želatiny), čirost a povrchové vlastnosti želatiny (vaznost vody a tuku, a emulzifikační a pěnotvornou kapacitu a stabilitu). Výsledky jsou uvedeny v tab. 6 a 7.

Tab. 6. Výtěžek a funkční vlastnosti želatin z kuřecí kůže extrahovaných při různých teplotách

	<b>ET</b> (°C)	<b>PG±SD</b> (Bloom)	<b>V±SD</b> (mPa.s)	<b>Č±SD</b> (%)	<b>VV±SD</b> (g/g)	<b>VT±SD</b> (g/g)
1	40	354±3	5,2±1,5	1,51±0,51	3,85±0,30	0,97±0,20
2	50	352±1	4,4±1,9	1,95±0,75	3,99±0,15	1,15±0,25
3	60	252±4	2,7±0,1	1,45±0,35	4,59±0,19	1,26±0,22
4	70	312±1	3,0±0,2	1,61±0,31	5,00±0,19	1,06±0,07
5	80	306±2	5,7±0,1	1,95±0,55	5,58±0,18	0,87±0,08
<i>p</i> -hodnota		1,000	0,939	0,558	0,002	0,622

ET–extrakční teplota, V–viskozita, Č–čirost, VV–vaznost vody, VT–vaznost tuku

### Vliv extrakční teploty na funkční vlastnosti želatin

U vzorků želatin připravených během základních experimentů byly otestovány další funkční vlastnosti. Tab. 5 uvádí získané hodnoty pevnosti gelu, viskozity, čirosti, vaznosti vody, vaznosti tuku, emulzifikační kapacity a stability a pěnotvorné kapacity a stability želatin připravených při různých extrakčních teplotách. V tabulce jsou rovněž uvedeny *p*-hodnoty, které jsou

významné ze statistického hlediska. Pokud je p-hodnota nižší než 0,05, pak je výsledek statisticky významný na hladině významnosti  $\alpha=0,05$ .

Tab. 7. Funkční vlastnosti želatin z kuřecí kůže extrahovaných při různých teplotách

	<b>ET</b> (°C)	<b>EK±SD</b> (%)	<b>ES±SD</b> (%)	<b>PK±SD</b> (%)	<b>PS±SD</b> (%)
1	40	50,00±7,86	72,50±3,54	48,89±1,92	38,89±3,91
2	50	43,27±1,65	87,50±0,85	35,56±3,85	33,33±3,25
3	60	37,50±5,89	81,67±2,36	17,78±2,09	8,89±0,94
4	70	36,84±0,87	85,71±0,91	20,00±1,77	4,44±0,19
5	80	35,09±2,48	84,52±1,68	61,11±3,62	5,56±0,62
<i>p</i> -hodnota		0,019	0,290	0,904	0,030

ET–extrakční teplota, EK–emulzifikační kapacita, ES–emulzifikační stabilita, PK–pěnotvorná kapacita, PS–pěnotvorná stabilita

Vliv extrakční teploty na pevnost gelu není statisticky významný ( $p>0,05$ ). Při všech experimentech byly zaznamenány vysoké hodnoty pevnosti gelu kuřecích želatin. Pevnost klesala s rostoucí teplotou extrakce s výjimkou teploty 60 °C, kdy byl zaznamenán náhlý pokles pevnosti gelu. Tato skutečnost může být způsobena vyšší teplotou extrakce, která má za následek zkrácení délky kolagenních řetězců, což se projeví nižší molekulovou hmotností želatin. Pokles při 60 °C může rovněž souviset s velmi vysokým výtěžkem extrakce, jelikož se obecně předpokládá souvislost mezi pevností gelu a výtěžkem extrakce: vyšší výtěžek extrakce, nižší pevnost gelu. Vyšší výtěžek extrakce je pravděpodobně způsoben vyšší úrovní hydrolyzy, což vede ke snížení pevnosti gelu. Nejvyšší pevnost (352 Bloom) mezi testovanými želatinami byla zaznamenána u želatin extrahované z kuřecí kůže při teplotě 40 °C.

Vztah mezi viskozitou a teplotou extrakce není statisticky významný ( $p>0,05$ ). Viskozita mírně klesala se zvyšující se extrakční teplotou. Viskozita klesala mezi teplotami 50 °C a 60 °C. Při teplotě 60 °C hodnoty dosáhly minima. Mezi teplotami 60 °C a 70 °C byl pozorován vzestupný trend. Při 80 °C však viskozita vzrostla mírně nad hladinu registrovanou při 40 °C. Viskozita želatinových roztoků byla nejvyšší při teplotě 80 °C a nejnižší při 60 °C. Tento jev lze vysvětlit předpokladem, že při teplotě 60 °C je úroveň hydrolyzy nejvyšší a kolagenní řetězce mají nejnižší molekulovou hmotnost, což vede k nižší viskozitě. Tato domněnka byla prokázána nejvyšším výtěžkem želatinou zjištěným při této extrakční teplotě. Ninan a kol. (2014) zaznamenali viskozitu želatin z kůže kaprů 7,07 mPa.s. Rafieian a kol. (2011) uvedli viskozitu kuřecí želatin vyrobenou ze zbytků z kuřecího mechanického odkostovače 5,85 mPa.s, což je hodnota srovnatelná s výsledkem experimentu č. 5. (5,7 mPa.s). Bichukale a kol. (2018) zjistili viskozitu želatin z drůbeží kůže a kostí

v rozmezí 3,83–9,10 mPa.s. Viskozita želatin připravených z kuřecí kůže je tedy srovnatelná s údaji jiných studií.

Nebyl pozorován žádný významný vliv extrakční teploty na čírost želatinového roztoku ( $p > 0,05$ ). Hodnoty čírosti byly v rozmezí 1,5–1,9 %, což představuje velmi nízkou úroveň čírosti. To lze připsat zbytkovým nečistotám v želatině. Mad–Ali a kol. (2017) uvádí zákal (opak čírosti) želatinového roztoku 1,8–2,0 % v závislosti na metodě sušení.

Vliv extrakční teploty na vaznost vody (VV) je statisticky významný ( $p < 0,05$ ). VV rostla téměř lineárně se zvyšující se extrakční teplotou. VV želatiny byla v posledních několika letech testována. Omar a Sarbon (2016) studovali vliv metody sušení na funkční vlastnosti a antioxidační aktivitu hydrolyzátu připraveného z želatiny z kuřecí kůže a zaznamenali hodnotu VV 8,4 ml.g<sup>-1</sup>. Dhakal a kol. (2018) zkoumali optimální podmínky extrakce kolagenu z kuřecích běháků s využitím enzymové hydrolýzy (papain) a stanovili VV 1,9 ml.g<sup>-1</sup>. Jain a Anal (2016) optimalizovali extrakci funkčních proteinových hydrolyzátů z membrány vaječných skořápek pomocí ultrazvukem modifikované extrakce a enzymatické hydrolýzy a uvádějí hodnoty VV v rozmezí 1,9–2,9 ml.g<sup>-1</sup> v závislosti na typu předúpravy. Výsledky této studie se tedy významně neliší oproti výsledkům jiných studií.

Vztah mezi vazností tuku (VT) a extrakční teplotou není statisticky významný ( $p > 0,05$ ). VT rostla se zvyšující se extrakční teplotou, dokud nedosáhla vrcholu při 60 °C; pak klesala na mírně nižší hodnotu, než byla pozorována při teplotě 40 °C. To může pramenit ze skutečnosti, že při teplotě extrakce 60 °C je rychlost hydrolýzy nejvyšší, což má za následek více hydrofobních zbytků vystavených vazbám s molekulami tuku. Bylo provedeno několik studií za účelem stanovení VT želatiny. Li a kol. (2009) zkoumali složení aminokyselin a funkční vlastnosti želatiny z jačích (*Bos grunniens*) kostí a uvedly VT pouze 0,21–0,29 ml.g<sup>-1</sup>, což je výrazně méně než v této studii. Dhakal a kol. (2018) uvádějí VT 5,3 ml.g<sup>-1</sup>, což je naopak výrazně více než v této studii. Jain a Anal (2016) určili VT v rozmezí 2,5–4,4 ml.g<sup>-1</sup>.

Vliv teploty extrakce na EK je statisticky významný ( $p < 0,05$ ). Obr. 14 ukazuje, že mezi extrakčními teplotami 40 °C a 60 °C dochází ke snížení EK. EK však zůstává téměř stabilní od 60 °C do 80 °C. Tento trend může být způsoben změnami struktury želatiny, které jsou ovlivněny nárůstem teploty. Průměrná ES byla významně vyšší než průměrná EK ( $p < 0,001$ ). ES stoupá mezi teplotami 40 °C a 50 °C a kolísá od 50 °C do 80 °C. Nejvyšší emulzifikační kapacita a stabilita byly zaznamenány při extrakčních teplotách 40 °C a 50 °C. Bylo provedeno několik studií pro stanovení emulgačních vlastností. Li a kol. (2009) uvedli EK 57,3 %, což je mírně vyšší než EK želatiny z kuřecí kůže extrahované při teplotě 40 °C. Shahidi a kol. (1995) zkoumali přípravu a vlastnosti proteinových hydrolyzátů z capelinu (*Mallotus villosus*) a uvedli EK lyofilizovaných hydrolyzátů proteinů capelinu 50,9 % a ES 92 %, což je srovnatelné s touto studií. Omar a Sarbon (2016) se zabývali vlivem metody

sušení na funkční vlastnosti a antioxidační aktivitu hydrolyzátu želatiny z kuřecí kůže a zjistili EK a ES želatiny 56 %, což je velmi podobné výsledkům Li a kol. (2009).

Vztah mezi PK a teplotou extrakce není statisticky významný ( $p > 0,05$ ). Z tab. 7 vyplývá, že mezi extrakčními teplotami 40 a 60 °C dochází k prudkému poklesu PK. Od 60 °C do 70 °C zůstává PK stabilní a následuje prudký nárůst mezi 70 a 80 °C. Toto chování lze vysvětlit skutečností, že úroveň hydrolyzy je pravděpodobně nejvyšší při teplotě 60 °C (jak již bylo zmíněno); proto kolagenní molekuly obsahují kratší řetězce a nejsou schopny vytvořit stabilní pěnu. Průměr PS se významně neliší od průměru PK ( $p = 0,141$ ); účinek extrakční teploty na PS je však statisticky významný ( $p < 0,05$ ). Hodnoty FS byly mírně nižší při 50 °C ve srovnání s PK; pokles PS je však patrnější při 40 °C, 60 °C a 70 °C ve srovnání s PK a velmi výrazný rozdíl byl zaznamenán při teplotě 80 °C. Je zřejmé, že zvyšující se teplota způsobuje pokles PS. Nejvhodnější teplota extrakce pro nejlepší pěnotvorné vlastnosti se ukázala teplota 40 °C vzhledem k velmi vysoké hodnotě PK a nejvyšší hodnotě PS. Bylo provedeno několik studií za účelem zkoumání pěnotvorných vlastností. Haddar a kol. (2011) studovali fyzikálně-chemické a funkční vlastnosti želatiny z kostí tuňáka (*Thunnus thynnus*) a uvádějí PK od 64 do 80 % a PS od 41 do 60 % v závislosti na koncentraci želatiny, což je více, než v této studii. Jain a Anal (2016) zkoumali optimalizaci extrakce funkčních proteinových hydrolyzátů z membrány vaječných skořápek pomocí ultrazvukem asistované extrakce a enzymové hydrolyzy a uvedli PK proteinového hydrolyzátu připraveného z vaječných membrán v rozmezí od 21,7 % do 28,3 % a PS od 8,3 až 25 % v závislosti na použité metodě přípravy, což jsou srovnatelné hodnoty s některými experimenty provedenými v této studii. Dhakal a kol. (2018) uvedly PK 16,7 % a PS 11,7 %, což je srovnatelný výsledek s exp. 3 v této studii.

### Testování tepelné stability želatinového gelu

Pro srovnání vlastností byly opět použity 2 typy komerčních vepřových (P212 a P288) a hovězích želatin (B266 a B273).

Tab. 8. Výchozí pevnost gelu hovězích, vepřových a kuřecích želatin

Typ želatiny/Bloom hodnota±SD								
B266	B273	P212	P288	CS40	CS50	CS60	CS70	CS80
266±3	273±2	212±2	288±4	355±2	352±1	250±4	312±1	305±2

B266, B273–hovězí želatiny, P212, P288–vepřové želatiny, CS40, CS50, CS60, CS70, CS80–želatiny z kuřecí kůže extrahované při teplotách 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C a 80 °C

Otestováno bylo všech 5 kuřecích kožních želatin připravených během základních experimentů. Výchozí hodnoty pevnosti gelu želatin jsou uvedeny v tab. 8. Nejvyšší pevnost (355 Bloom) byla naměřena u CS40 a nejnižší 212

Bloom u Pork212. Je zřejmé, že připravené želatiny vykazovaly srovnatelné (CS60) nebo významně vyšší (CS40 a CS50) hodnoty pevnosti gelu oproti hovězím nebo vepřovým želatinám. Aykin-Dincer a kol. (2017) zveřejnili výsledky měření pevnosti gelu želatiny z kůží brojlerů 167 Bloom, což je výrazně nižší hodnota, než pevnost želatin z kuřecí kůže v této studii. Tento rozdíl lze vysvětlit odlišnými použitými postupy extrakce želatin, nebo věkem zvířat. Bichukale a kol. (2018) uvedly výsledky studie extrakce želatin z kuřecí kůže (při teplotách 40, 45, 50, 55 a 60 °C) pevnost gelu 258, 274, 265, 263 a 260 Bloom, což je mírně vyšší výsledek, než hodnota CS60, ale nižší pevnosti gelu dalších připravených kuřecích želatin. Rozdíl může být způsoben odlišnou teplotou i dobou extrakce. Tumerkan a kol. (2019) studovali želatinu z kuřecí kůže a publikovali hodnotu 352 Bloom, což je stejná hodnota jako u CS50. Výsledky měření tepelné stability kuřecích, hovězích a vepřových želatin testovaných při teplotách 23, 29 a 35 °C jsou uvedeny v tab. 9 až 11. Změny v pevnosti gelu jsou vyjádřeny jako Bloom index v %; počáteční hodnota pevnosti gelu na začátku měření je vyjádřena jako 100%.

Tab. 9 znázorňuje výsledky měření tepelné stability želatin při teplotě 23 °C. Podle předpokladů klesala pevnost želatinových gelů s přibývajícím časem. U komerčních želatin byl nejnižší pokles pevnosti gelu zjištěn u B266 ve všech měřeních. Poklesy ostatních komerčních želatin byly velmi podobné a současně vyšší, než u B266. Při posledním měření byl zjištěn přibližně 90% pokles pevnosti gelu u všech komerčních želatin. U CS byl po 15 minutách nejnižší pokles pevnosti gelu zaznamenán u CS70 a CS80, zatímco u ostatních CS byly poklesy mírně vyšší. Při dalším měření byl nejnižší pokles u CS70, zatímco u CS 80 byl pokles mírně vyšší. Poklesy ostatních CS byly velmi podobné a mírně vyšší, než u CS80. Další 2 měření opět ukázaly nejnižší pokles pevnosti gelu u CS70, kdežto poklesy ostatních CS byly mírně vyšší. V dalších měřeních byl nejnižší pokles opět u CS70, mírně vyšší hodnoty poklesů byly zjištěny u CS40 a CS50, vyšší u CS60 a nejvyšší pokles pevnosti gelu byl naměřen u CS80. Po 75 minutách došlo k přibližně 50% poklesu pevnosti gelu u všech CS. Při posledním měření byly zaznamenány poklesy pevnosti gelů v rozmezí 64 až 84%. Výsledky ukázaly, že u CS došlo k nižším, anebo srovnatelným poklesům pevnosti želatinových gelů oproti komerčním želatinám při všech měřeních.

Tab. 10 ukazuje tepelnou stabilitu želatin při teplotě 29 °C. Při této teplotě došlo k výrazně vyššímu poklesu pevnosti gelů oproti teplotě 23 °C. U komerčních želatin byly nejnižší poklesy pevnosti gelů zjištěny u hovězích želatin ve všech měřeních. Poklesy P288 byly mírně vyšší a nejvyšší poklesy byly naměřeny u P212. Po 30 minutách byly zjištěny přibližně 55% poklesy pevnosti gelů a po 75 minutách byly poklesy pevnosti přibližně 90%. Při posledním měření P212 netvořila gel, zatímco pokles pevnosti ostatních komerčních želatin byl téměř 100%. V případě C došlo po 15 minutách k nejnižším poklesům u CS60, CS80 a CS50, jejichž hodnoty byly velmi podobné a nejvyšším u CS40 a CS70. V dalších měřeních byly nejnižší poklesy

zaznamenány u CS50, zatímco poklesy ostatních CS byly vyšší a současně srovnatelné. Po 45 minutách došlo k poklesu pevnosti gelů CS v rozmezí 43 až 55% a po 90 minutách v rozmezí 71 až 83%. Při posledním měření došlo k 87 až 95% poklesům CS. Stejně jako při teplotě 23 °C, i při 29 °C byly poklesy pevností gelů CS výrazně nižší, anebo srovnatelné, než u komerčních želatin.

Tab. 9. Tepelná stabilita hovězích, vepřových a kuřecích želatinových gelů při teplotě 23 °C

<b>Typ želatiny/Bloom index (%)</b>									
<b>Čas (min)</b>	<b>B266</b>	<b>B273</b>	<b>P212</b>	<b>P288</b>	<b>CS40</b>	<b>CS50</b>	<b>CS60</b>	<b>CS70</b>	<b>CS80</b>
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
15	88	73	77	76	84	82	86	91	91
30	76	64	65	61	70	71	73	80	76
45	52	47	46	45	62	62	60	69	60
60	46	41	40	40	56	54	52	62	53
75	37	34	30	32	49	47	50	53	45
90	32	28	24	26	45	43	39	51	35
105	27	24	20	23	41	40	35	48	32
120	25	22	18	20	39	38	32	45	29
195	21	16	13	15	34	33	26	41	22
420	16	13	10	12	30	30	22	36	16

Tab. 11 znázorňuje tepelnou stabilitu želatin při teplotě 35 °C. Při této teplotě byl zaznamenán nejvyšší a nejrychlejší pokles pevnosti želatinových gelů. Jak u hovězích želatin, tak i u vepřových byly naměřeny velmi podobné hodnoty poklesů pevnosti gelů. Hovězí želatiny nejprve vykazovaly mírně nižší hodnoty poklesů pevnosti; avšak po 60 minutách už byly naměřené hodnoty poklesů komerčních želatin téměř srovnatelné. Po 30 minutách byly poklesy pevnosti v rozmezí 55 až 62%, po 45 minutách 83 až 87% a po 105 minutách byl naměřen 100% pokles pevnosti gelů u všech komerčních želatin. V případě CS byl po 15 minutách naměřen nejnižší pokles pevnosti u CS80, poklesy CS40, CS50 a CS60 byly srovnatelné a současně vyšší, než CS80 a nejvyšší pokles byl zjištěn u CS70. Po 30 minutách byl nejnižší pokles u CS40, mírně vyšší u CS80 a CS50, výrazně vyšší u CS60 a nejvyšší opět u CS70. Po 45 minutách byl nejnižší pokles opět u CS40, vyšší u CS50, výrazně vyšší u CS80 a CS50 a nejvyšší pokles byl zjištěn opět u CS70. V dalších měřeních byla situace velmi podobná. V čase měření 30 minut došlo k poklesu pevností CS gelů v rozmezí 44 až 61%. V čase 105 minut byl zjištěn 100% pokles pevností gelů u CS60, CS70 a CS80; zatímco u CS50 došlo k 97% poklesu a u CS40 k 93% poklesu pevnosti gelů. Při posledním měření byl zjištěn 98% pokles pevnosti u CS50 a

94% u CS40. Výsledky opět ukázaly, že pokles pevnosti gelu CSG želatin byl nižší, anebo srovnatelný s komerčními želatinami.

Tab. 10. Tepelná stabilita hovězích, vepřových a kuřecích želatinových gelů při teplotě 29 °C

<b>Typ želatiny/Bloom index (%)</b>									
<b>Čas (min)</b>	<b>B266</b>	<b>B273</b>	<b>P212</b>	<b>P288</b>	<b>CS40</b>	<b>CS50</b>	<b>CS60</b>	<b>CS70</b>	<b>CS80</b>
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
15	94	96	89	91	82	92	94	86	93
30	54	57	52	56	61	76	66	65	68
45	34	34	25	32	45	57	46	48	50
60	17	18	11	17	32	42	30	33	34
75	11	11	7	10	25	35	23	26	27
90	7	7	4	6	21	29	17	20	21
105	5	5	3	4	18	23	14	16	17
120	4	4	2	3	16	22	12	14	15
195	3	3	0	1	9	15	7	8	8
420	2	2	0	1	9	13	5	5	5

Tab. 11. Tepelná stabilita hovězích, vepřových a kuřecích želatinových gelů při teplotě 35 °C

<b>Typ želatiny/Bloom index (%)</b>									
<b>Čas (min)</b>	<b>B266</b>	<b>B273</b>	<b>P212</b>	<b>P288</b>	<b>CS40</b>	<b>CS50</b>	<b>CS60</b>	<b>CS70</b>	<b>CS80</b>
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
15	81	83	76	74	81	80	79	66	91
30	45	42	38	38	56	52	46	39	53
45	17	17	13	14	38	31	23	16	26
60	6	6	3	4	29	20	13	6	13
75	3	3	2	1	23	13	7	4	7
90	2	2	1	1	18	10	6	2	4
105	0	0	0	0	15	8	3	2	3

Po základních experimentech následovaly faktorové experimenty, kdy byla připravena želatina 2-stupňovou extrakcí a byl sledován vliv 4 technologických faktorů (množství enzymu během předúpravy, extrakční teploty v prvním a druhém stupni extrakce a extrakční doby) na výtěžek a vlastnosti kuřecí kožní želatiny (CSG) spojené s gelací (pevnost gelu, viskozita, teplota tání a teplota gelace). Výsledky a rozpis experimentů jsou uvedeny v tab. 12. Výsledky statistického vyhodnocení jsou uvedeny v tab. 13.

Statistická významnost faktorů zpracování byla vyhodnocena pomocí analýzy rozptylu a p-hodnot pro 95% úroveň spolehlivosti. Pro použitý faktorový návrh je kritická hodnota  $F = 5,32$ , takže čím vyšší je tato hodnota nad kritickou, tím více procesní faktory ovlivňují sledované proměnné. Podobně faktory s hodnotou  $p < 0,05$  mají větší vliv na proměnné s 95% pravděpodobností.

Tab. 13 ukazuje výsledky analýzy rozptylu pro výtěžek želatiny, pevnost gelu, viskozitu, bod tání gelace. Jak je patrné, s výjimkou faktorů A (množství enzymu) a C (doba extrakce) v případě viskozity byl vliv všech technologických faktorů statisticky významný.



Tab. 12. Rozpis a výsledky faktorových experimentů přípravy želatin z kůží

	A	B	C	1. VŽ	1. PG	1. V	1. T <sub>m</sub>	1. T <sub>g</sub>	D	2. VŽ	2. PG	2. V	2. T <sub>m</sub>	2. T <sub>g</sub>
1	0,2	50	30	16,8	190	4,06	38,3	20,5	60	5,21	175	2,71	34,9	15,0
2	0,2	55	30	17,2	189	3,76	38,1	20,0	65	5,35	172	2,65	34,8	14,5
3	0,2	60	30	17,5	187	3,18	37,8	19,5	70	5,62	171	2,43	34,4	14,5
4	0,2	65	30	17,8	172	3,92	37,3	19,0	75	5,71	170	2,15	35,1	14,5
5	0,2	70	30	17,1	163	3,38	37,2	19,0	80	6,01	159	2,16	33,9	14,0
6	0,2	75	30	18,2	163	3,12	37,1	18,5	85	8,42	120	2,13	33,1	14,0
7	0,2	80	30	18,5	162	3,54	36,5	18,0	90	7,63	111	2,45	32,1	13,0
8	0,2	50	120	17,1	182	3,53	37,3	19,5	60	3,71	153	2,51	33,5	14,5
9	0,2	55	120	17,8	178	3,82	37,0	19,0	65	3,72	133	2,71	32,9	14,5
10	0,2	60	120	18,1	145	4,02	37,1	18,5	70	3,91	137	2,39	31,7	14,0
11	0,2	65	120	18,5	134	3,51	37,0	18,0	75	4,13	111	2,51	31,5	14,0
12	0,2	70	120	19,3	134	3,91	37,0	18,0	80	4,37	95	2,73	31,3	13,5
13	0,2	75	120	19,5	133	4,02	36,2	17,0	85	6,91	83	2,49	31,3	13,0
14	0,2	80	120	19,8	126	3,40	35,1	16,5	90	6,79	81	2,39	30,1	12,0
15	0,8	50	30	17,9	145	4,03	37,8	18,5	60	3,18	125	2,93	31,2	14,0
16	0,8	55	30	18,0	139	4,01	37,5	18,5	65	3,72	122	2,88	30,1	14,0
17	0,8	60	30	18,5	135	3,21	36,8	17,5	70	5,23	105	2,77	29,9	13,5
18	0,8	65	30	19,0	130	3,53	35,2	17,0	75	6,02	95	2,39	29,2	13,5
19	0,8	70	30	19,1	127	3,51	35,1	17,0	80	7,06	91	2,12	26,8	13,0
20	0,8	75	30	20,8	125	3,22	34,7	16,0	85	7,91	75	2,33	26,1	13,0
21	0,8	80	30	22,7	117	3,03	34,5	15,0	90	8,81	77	2,27	25,7	12,0
22	0,8	50	120	18,6	110	3,94	36,3	17,5	60	3,52	67	1,75	30,9	13,0
23	0,8	55	120	19,9	107	3,02	35,7	17,0	65	3,11	63	1,73	29,5	13,0
24	0,8	60	120	20,1	91	3,91	35,3	17,0	70	3,53	67	1,81	29,1	13,0
25	0,8	65	120	20,7	87	3,18	35,0	16,5	75	4,43	57	1,65	28,7	12,5
26	0,8	70	120	22,4	85	3,15	34,7	15,0	80	7,15	51	1,61	26,3	12,0
27	0,8	75	120	22,2	80	3,13	34,5	14,0	85	6,47	50	1,51	25,1	12,0
28	0,8	80	120	23,6	75	2,31	34,2	13,5	90	7,69	52	1,41	25,1	11,5

A–faktor A (množství enzymu–%), B–faktor B (extrakční teplota 1. stupně extrakce–°C), C–faktor C (doba extrakce 1. stupně extrakce–min), D–faktor D (extrakční teplota 2. stupně extrakce–°C), 1. VŽ–výtěžek želatiny 1. stupně extrakce (%), 1. PG–pevnost gelu želatiny extrahované v 1. stupni extrakce (Bloom), 1. V–viskozita želatiny extrahované v 1. stupni extrakce (mPa.s), 1. T<sub>m</sub>–bod tání želatiny extrahované v 1. stupni extrakce (° C), 1. T<sub>g</sub>–bod gelace želatiny extrahované v 1. stupni extrakce (° C), 2. VŽ–výtěžek želatiny 2. stupně extrakce, 2. PG–pevnost gelu želatiny extrahované ve 2. stupni extrakce, 2. V–viskozita želatiny extrahované ve 2. stupni extrakce, 2. T<sub>m</sub>–bod tání želatiny extrahované ve 2. stupni extrakce, 2. T<sub>g</sub>–bod gelace želatiny extrahované ve 2. stupni extrakce

Tab. 13. Analýza rozptylu pro výtěžek želatiny, pevnost gelu, viskozitu, teplotu tání a gelace

	Stupeň volnosti	Součet čtverců	Průměr čtverců	F-hodnota	P-hodnota
odezva: $V\check{Z} = 9,078 + 3,607 A - 0,1105 B - 0,01468 C$ ; $R^2 = 88,02$					
Faktor A	1	32,79	32,7889	73,01	0,000
Faktor B	6	34,21	34,2108	76,18	0,000
Faktor C	1	12,22	12,2232	27,22	0,000
Chyba	24	10,78	0,5163		
Celkem	27	90,00			
odezva: $PG = 289,3 - 83,93 A - 1,275 B - 0,3786 C$ ; $R^2 = 95,31$					
Faktor A	1	17751	17750,9	284,90	0,000
Faktor B	6	4552	4551,7	73,02	0,000
Faktor C	1	8126	8126,0	130,42	0,000
Chyba	24	1496	62,3		
Celkem	27	31925			
odezva: $V = 5,232 - 0,474 A - 0,02221 B - 0,00052 C$ ; $R^2 = 39,87$					
Faktor A	1	0,56573	0,56573	3,82	0,065
Faktor B	6	1,38173	1,38173	11,20	0,003
Faktor C	1	0,015556	0,01556	0,13	0,726
Chyba	24	2,96066	0,12336		
Celkem	27	4,292367			
odezva: bod tání = $43,240 - 2,583 A - 0,07643 B - 0,00913 C$ ; $R^2 = 89,82$					
Faktor A	1	16,817	16,8175	94,01	0,000
Faktor B	6	16,356	16,3557	91,43	0,000
Faktor C	1	4,723	4,7232	26,40	0,000
Chyba	24	4,293	0,1789		
Celkem	27	42,190			
odezva: bod gelace = $17,317 + 3,631 A - 0,10625 B - 0,01389 C$ ; $R^2 = 95,11$					
Faktor A	1	33,223	33,2232	204,47	0,000
Faktor B	6	31,609	31,6094	194,54	0,000
Faktor C	1	10,938	10,9375	67,32	0,000
Chyba	24	3,900	0,1625		
Celkem	27	79,670			

V $\check{Z}$ –výtěžek želatiny, PG–pevnost gelu, V–viskozita, faktor A–množství enzymu, faktor B–extrakční teplota, faktor C –doba extrakce

### **Vliv faktorů na výtěžek želatiny**

Výtěžek želatiny při 1. extrakci je v rozmezí 16,8–23,6 %, přičemž nejnižší výtěžek byl zaznamenán při min. úrovních faktorů (množství enzymu 0,2; teplota extrakce 50 °C; doba extrakce 30 min), a naopak nejvyšší byl zjištěn při max. úrovních faktorů (0,8 %/80 °C/120 min). Výsledky tak byly podle předpokladů, protože hladina hydrolyzy kolagenu je při mírnějších podmínkách nižší (dochází tedy k menšímu narušení a uvolnění kolagenních řetězců, které jsou pak k dispozici pro extrakci) a naopak. Rozdíl ve výtěžku mezi min. a max. podmínkami je 6,8 %. Zvýšení teploty extrakce z 50 na 80 °C znamená zvýšení výtěžku želatiny o 1,7–5 %. Zvýšení množství enzymu z 0,2 na 0,8 % během předúpravy představuje zvýšení výtěžku v rozmezí 1,1–3,8 % a prodloužení doby extrakce zvyšuje výtěžek v rozmezí 0,3–3,3 %.

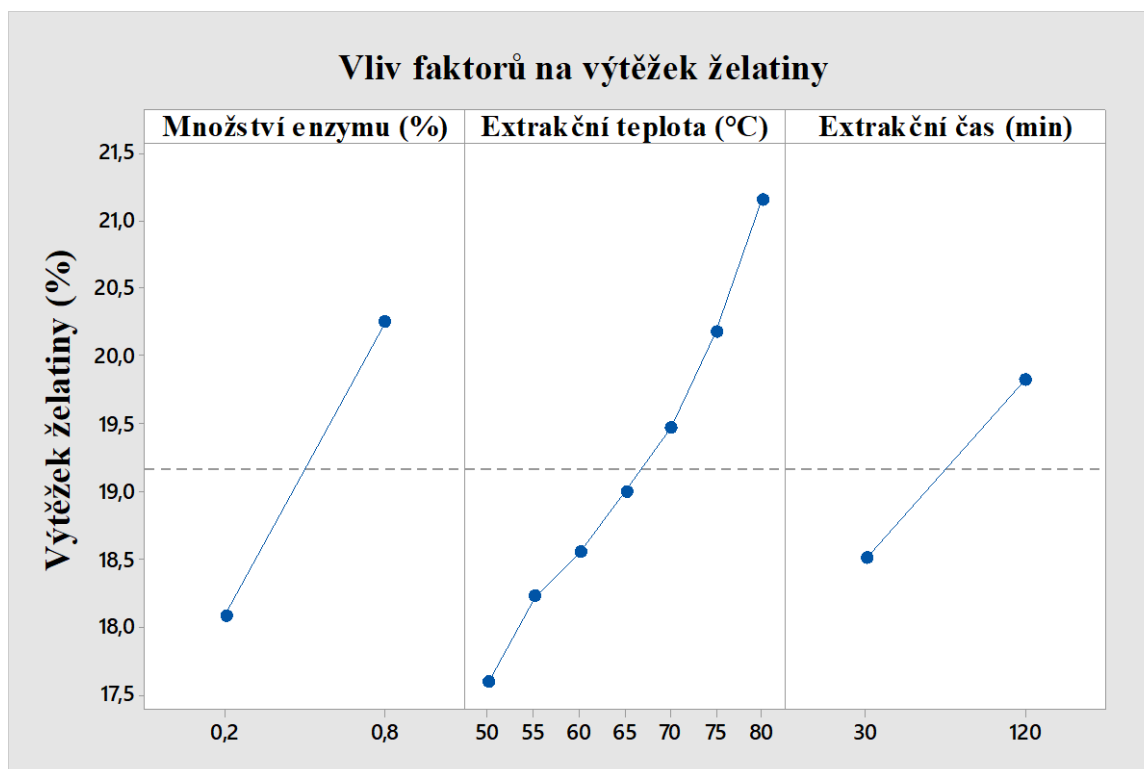
Vliv faktorů na výtěžek CSG při 1. extrakci znázorňuje obr. 7. Nejvyšší vliv na výtěžek má faktor B (teplota extrakce), přičemž závislost výtěžku na teplotě je téměř lineární; avšak rozdíl v hodnotách je relativně nízký. Výtěžek želatiny při 2. extrakci se pohybuje v rozmezí 3,11–8,81 %. Rozdíl mezi hodnotami je 5,7 %, tedy o něco nižší než při 1. extrakci. Součet výtěžků 1. a 2. extrakce je v rozmezí 20,8 (exp. č. 8) až 31,5 % (exp. č. 21). To znamená, že v závislosti na podmínkách s využitím 2-stupňové extrakce lze získat velké množství CSG.

V nedávné době bylo provedeno několik studií zabývajících se vlivem technologických podmínek na výtěžek kuřecí želatiny. Sompie a Triasih (2018) testovali vliv extrakční teploty na výtěžek a vlastnosti želatiny z kuřecích steh s výsledkem 12,3 až 14,1 %, což je méně než v této studii. Byla použita 4-stupňová extrakce za použití extrakčních teplot 50, 55, 60 a 65 °C po dobu 5 h v každém extrakčním stupni. Delší doba extrakce vedla k vyššímu výtěžku želatiny až v dalších extrakčních stupních. Taufik a kol. (2010) provedl výzkum vlivu extrakční teploty na výtěžek želatiny z kuřecích steh s výsledkem mezi 15,3 až 16,5 %, což je srovnatelné s exp. č. 1 v této studii. Taufik použil extrakční teploty 45, 50 a 55 °C po dobu 24 h. Du a kol. (2013) studoval vlastnosti želatiny z kuřecích hlav s výtěžkem 24,8 %, což je srovnatelné s exp. č. 28. Želatina byla extrahována při 50 °C po dobu 18 h. Sarbon a kol. (2013) připravil želatinu z kuřecí kůže s výtěžkem 16,1 %, což je srovnatelné s exp. č. 1 v této studii. Extrakční teplota byla 45 °C a doba 8 h. Ve všech studiích byla použita podobná extrakční teplota, avšak mnohem delší čas extrakce se srovnatelnými výsledky. Ukázal se významným vliv enzymu, který nebyl použit v žádné ze srovnávaných studií. Spotřeba energie procesu použitého v této studii je proto výrazně nižší.

### **Vliv faktorů na pevnost gelu**

Pevnost gelu CSG (kuřecí kožní želatina) při 1. extrakci je v rozmezí 190–75 Bloom, přičemž nejvyšší pevnost byla měřena při exp. č. 1 a nejnižší při exp. č. 28. Podle předpokladů pevnost gelu klesá s vyššími hodnotami faktorů. Tento trend je tedy v přímém kontrastu k výtěžku želatiny. Tyto podmínky

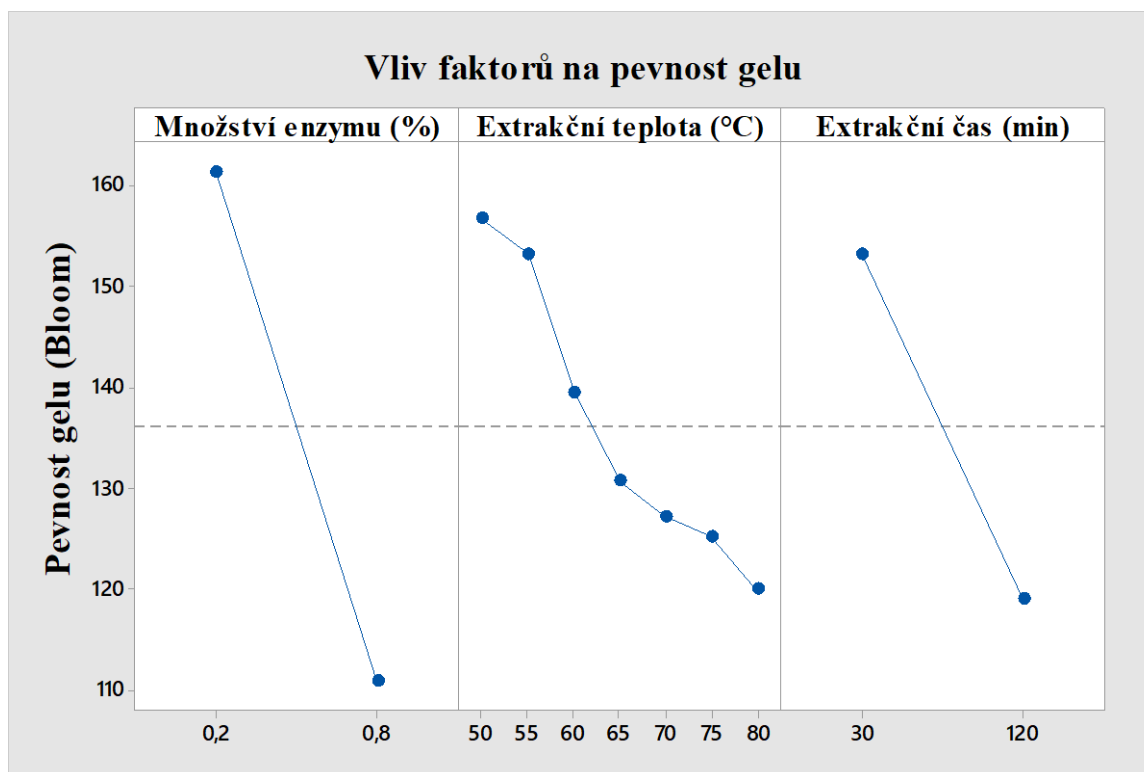
pravděpodobně způsobily vyšší úroveň hydrolyzy, tedy snížení molekulové hmotnosti kolagenových řetězců, což ve srovnání s řetězcí s vyšší molekulovou hmotností vytváří méně organizovanou gelovou strukturu; vzniká méně zapletenin a uzlových bodů; výsledkem je nižší pevnost gelu (Finer et al., 1975). Zvýšení množství enzymu z 0,2 na 0,8 % znamená snížení pevnosti gelu o 36–72 Bloom. Zvýšení teploty extrakce z 50 na 80 °C představuje pokles o 28–56 Bloom a prodloužení doby extrakce z 30 na 120 minut znamená snížení o 8–48 Bloom.



Obr. 7. Vliv faktorů na výtěžek želatiny v 1. extrakci

Vliv jednotlivých technologických faktorů na pevnost gelu CSG extrahované při 1. extrakci představuje obr. 8. Nejvyšší vliv na pevnost má faktor A (množství enzymu), přičemž efekt ostatních faktorů je mírně nižší a zároveň srovnatelný. Pevnost gelu je výrazněji ovlivněna změnou technologických podmínek než výtěžek, rozdílem mezi min. a max. výtěžkem je 6,8 %, zatímco pokles pevnosti gelu za nejnáročnějších podmínek je až 39,5 %.

Pevnost gelu CSG připravené při 2. extrakci je v rozmezí 175–52 Bloom. Druhá extrakce tedy představuje snížení pevnosti gelu o 15 až 51 Bloom. S menším množstvím enzymu (exp. č. 1–11), nebo kratší extrakční dobou a nižší teplotou (15–17) je možné 2. extrakci připravit další kvalitní CSG se střední pevností gelu.



*Obr. 8. Vliv faktorů na pevnost gelu želatiny v 1. extrakci*

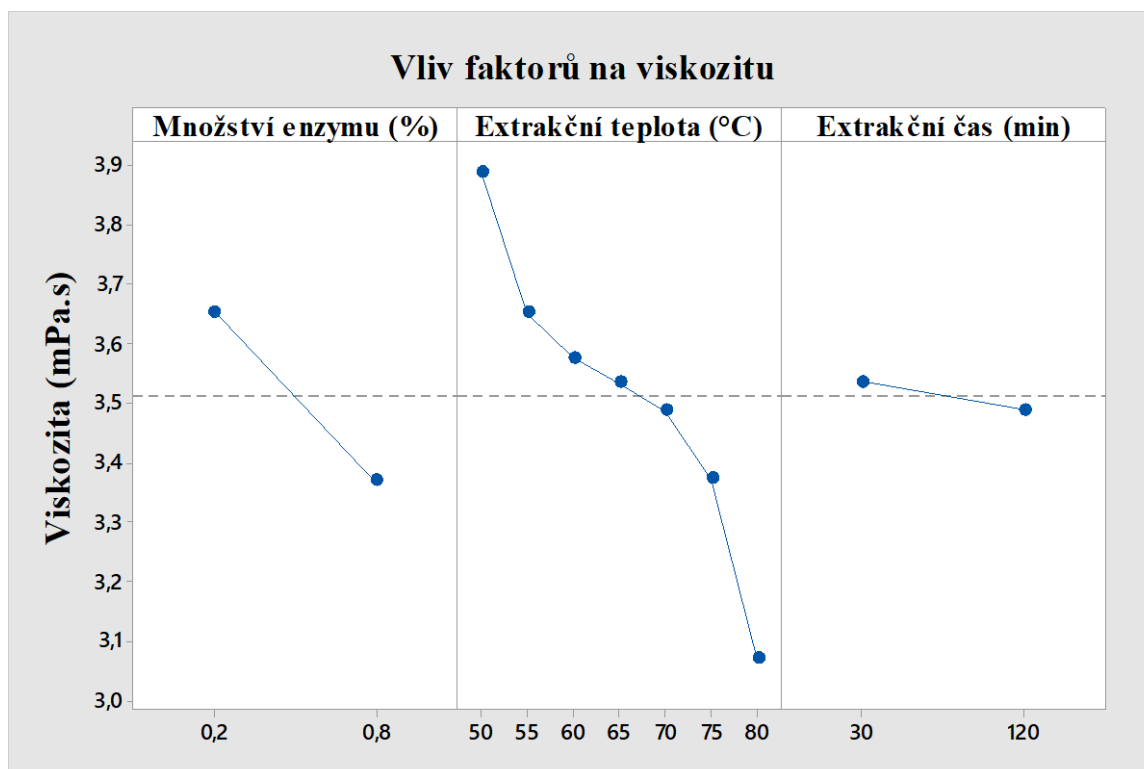
Pevnost gelu drůbeží želatiny byla nedávno studována a je uváděna v rozmezí od 185 do 355 Bloom. Kim a kol. (2012) připravil želatinu z kuřecí kůže a stanovil pevnost gelu 218–270 Bloom, extrakční podmínky byly 75 a 100 °C po dobu 60 min. Vyšší pevnost gelu ve srovnání s touto studií byla dosažena za použití mnohem delší doby extrakce. Widyasari a kol. (2014) extrahoval želatinu z kuřecích běháků s pevností gelu 185 Bloom, což je hodnota srovnatelná s exp. č. 3 této studie, kdy byly extrakční podmínky 60 °C a 30 min. Nicméně; Widyasari použil energeticky náročnější podmínky: 70 °C a 90 min. Almeida a Lannes (2013) extrahovali želatinu z kuřecích běháků s pevností gelu 295 Bloom, což je vyšší hodnota než v této studii. Vyšší pevnost gelu byla dosažena při extrakční teplotě 55 °C a čase 6 h, tedy mnohem delší doba extrakce než v této studii. Du a kol. (2013) extrahoval želatina z kuřecích hlav s výsledkem 248 Bloom, tedy opět vyšší pevností gelu; želatina však byla opět extrahována po mnohem delší dobu (18 h) a teplota extrakce byla 55 °C. A Ee a kol. (2019) extrahoval želatina z kuřecích hlav s výsledkem 355 Bloom, tedy s velmi vysokou pevností gelu s extrakčními podmínkami 70 °C a 3 h. I v této studii byla použita delší doba extrakce, což znamená vyšší energetickou náročnost procesu.

### **Vliv faktorů na viskozitu**

Viskozita želatinového roztoku je v rozmezí 4,06–2,31 mPa.s v 1. stupni extrakce. Stejně jako u pevnosti gelu byla tedy naměřena nejvyšší hodnota viskozity při exp. č. 1 a nejnižší při exp. č. 28; pokles viskozity s náročností extrakčních podmínek však není tak zřetelný jako v případě pevnosti gelu. Pro

viskozitu však platí podobná hypotéza. Delší řetězce kolagenu jsou schopné vytvářet komplikované zapleteniny s větší odolností vůči toku.

Vliv jednotlivých technologických faktorů na viskozitu CSG extrahovanou při 1. extrakci je vidět na obr. 9. Viskozita klesá s vyššími hodnotami technologických faktorů, podobně jako pevnost gelu, což znamená, že existuje určitá spojitost. Velmi výrazný vliv má extrakční teplota, vliv množství enzymu je méně významný a doba extrakce má velmi malý vliv na viskozitu želatiny.



Obr. 9. Vliv faktorů na viskozitu želatiny v 1. extrakci

Viskozita CSG při 2. extrakci je mezi 2,99–1,15 mPa.s, což znamená, že použití většího množství enzymu v kombinaci s delší extrakční dobou (exp. č. 22–28) představuje želatinu s velmi nízkou viskozitou. Důvodem je pravděpodobně rozsáhlé narušení kolagenních molekul a snížení molární hmotnosti; kratší řetězce molekul nevytváří komplexní zapleteniny, které způsobují odpor proti toku (Gresham, 2008).

Sompie a Triasih (2018) stanovili viskozitu želatiny z kuřecích stehen v rozmezí 6,52–7,02 mPa.s, což je více ve srovnání s touto studií. Nicméně; doba extrakce byla delší, což pravděpodobně mělo vliv na vyšší viskozitu, nicméně odlišný způsob předúpravy použité suroviny mohl mít také významný účinek (kyselina octová po dobu 24 h). Taufik a kol. (2010) uvádí viskozitu želatiny z kuřecích běháků 6,5–7,7 mPa.s, což jsou srovnatelné výsledky s prací Sompie a Triasih. Taufik rovněž použil delší dobu extrakce (24 h) a jiný způsob předúpravy (hydroxid sodný 40 min a kyselina citronová 40 min. Rafienian a kol. (2015) extrahoval želatinu ze zbytků kuřecího vykostovače a zveřejnil viskozitu želatiny 5,85 mPa.s, což je ve srovnání s touto studií opět vyšší

hodnota. K předběžnému zpracování byla použita HCl a extrakce probíhala za těchto podmínek: 86,8 °C po dobu 1,95 h, což jsou srovnatelné podmínky s exp. č. 14 a 28 této studie.

### **Vliv faktorů na teplotu tání a gelace**

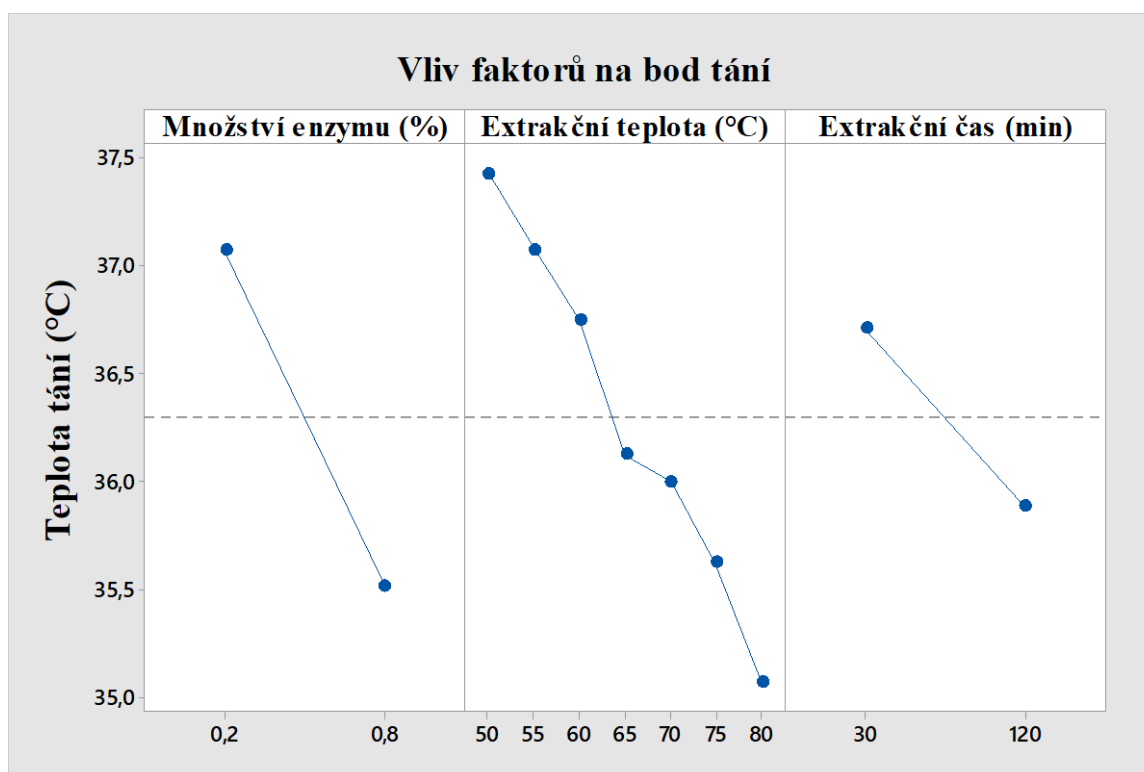
Teplota tání je mezi 38,3–34,2 °C při první extrakci. Opět došlo k poklesu teploty tání s náročností parametrů procesu, ale pokles je velmi nízký. Želatiny s nižší pevností gelu mají tedy nižší teplotu tání a naopak. Uspořádanější gelová struktura (jemnější síť kolagenových vláken), která se tvoří při mírnějších procesních podmínkách úzce souvisí s vyšší pevností struktury, která tak taje při vyšších teplotách. Vyšší množství enzymu znamená pokles o 0,5–2,4 °C. Zvýšení teploty extrakce z 50 na 80 °C představuje pokles v rozmezí 1,8–3,3 °C. Prodloužení doby extrakce má za následek pokles o 0,2–1,8 °C.

Vliv jednotlivých technologických faktorů na teplotu tání CSG extrahované při 1. extrakci je znázorněn na obr. 10. Teplota tání podle předpokladů klesá s náročností podmínek extrakce, stejně jako s pevností gelu a viskozitou, neboť se jedná o další parametr spojený s gelovačnými vlastnostmi želatiny. Extrakční teplota má velmi významný vliv, podobně jako množství enzymu, a vliv doby extrakce má méně výrazný vliv na teplotu tání želatiny. Rozdíl mezi min. a max. hodnotou je však relativně malý (38,3 vs 34,2 °C), takže teplota tání není na rozdíl od pevnosti nebo viskozity neí tak výrazně ovlivněna technologickými podmínkami extrakce.

Teplota tání CSG při 2. extrakci je v rozmezí 34,9–25,1 °C, přičemž pokles oproti 1. extrakci je 2,2–9,4 °C, přičemž pokles byl výraznější při vyšších hodnotách procesních faktorů. Důvodem je pravděpodobná souvislost s tepelnou historií vzorku v první extrakci. Avšak, zvýšení teploty o 10 °C v druhé extrakci má pravděpodobně významnější vliv, jelikož kolagen v kuřecí kůži je velmi mladý (35 dnů) a tudíž velmi citlivý na změny teploty. Stupeň sesíťování je velmi nízký, v porovnání např. s hovězí kůží (Elharfaoui et al., 2007). Druhá extrakce má tedy výrazně vyšší účinek na teplotu tání želatiny než extrakce první.

Teplota tání byla studována např. v práci Bichukale a kol. (2018), který připravil CSG s bodem tání 31,9–33,0 °C, což je srovnatelné s CSG extrahovanou při 2. extrakci v exp. č. 6–12 této studie. Všechny CSG extrahované při 1. extrakci mají vyšší teplotu tání. Bichukale použil pro předúpravu zásady a kyseliny a extrahoval při 40, 45, 50, 55 a 60 °C přes noc. Výrazně delší doba extrakce pravděpodobně způsobila nižší teplotu tání CSG. Xin a kol. v současné studii (2021) zkoumal gelační vlastnosti želatiny a stanovil bod tání želatiny z kůže tilápie (31 °C) a CSG (38 °C), což je srovnatelné s nejlepšími výsledky této studie. Bod tání rybí želatiny je srovnatelný s některými CSG extrahovanými při 2. extrakci v této studii. Xin použil kombinovanou předúpravu alkalicko-kyselou a extrahoval želatinu po dobu 3 h při 55 °C, tedy po mnohem delší dobu. Rahman a kol. (2012) uvádí teplotu tání

želatiny z kuřecích běháků (CFG) 26,7 °C, což je výrazně nižší hodnota ve srovnání s výsledky této studie a srovnatelná pouze se želatinami extrahovanými při 2. extrakci při náročnějších technologických podmínkách. Rahman použil alkalickou předúpravu a extrahoval po dobu 5 h při 60 °C, což je výrazně delší doba extrakce ve srovnání se současnou studií, což mělo zřejmě negativní vliv na teplotu tání. Choe a Kim (2018) také extrahoval CFG při různých teplotách (65, 75, 85 a 95 °C) s výsledky 38,5, 37,8, 36,5 a 36,4 °C. CFG byla připravena s použitím kyselé předúpravy a 120-minutové extrakce, tedy srovnatelných podmínek použitých v některých experimentech této studie, což je důvodem pro srovnatelné výsledky s touto studií. Kyselá předúprava ve studii Choe a Kim má tedy na teplotu tání podobný účinek jako předúprava enzymem v této studii.



Obr. 10. Vliv faktorů na teplotu tání želatiny v 1. extrakci

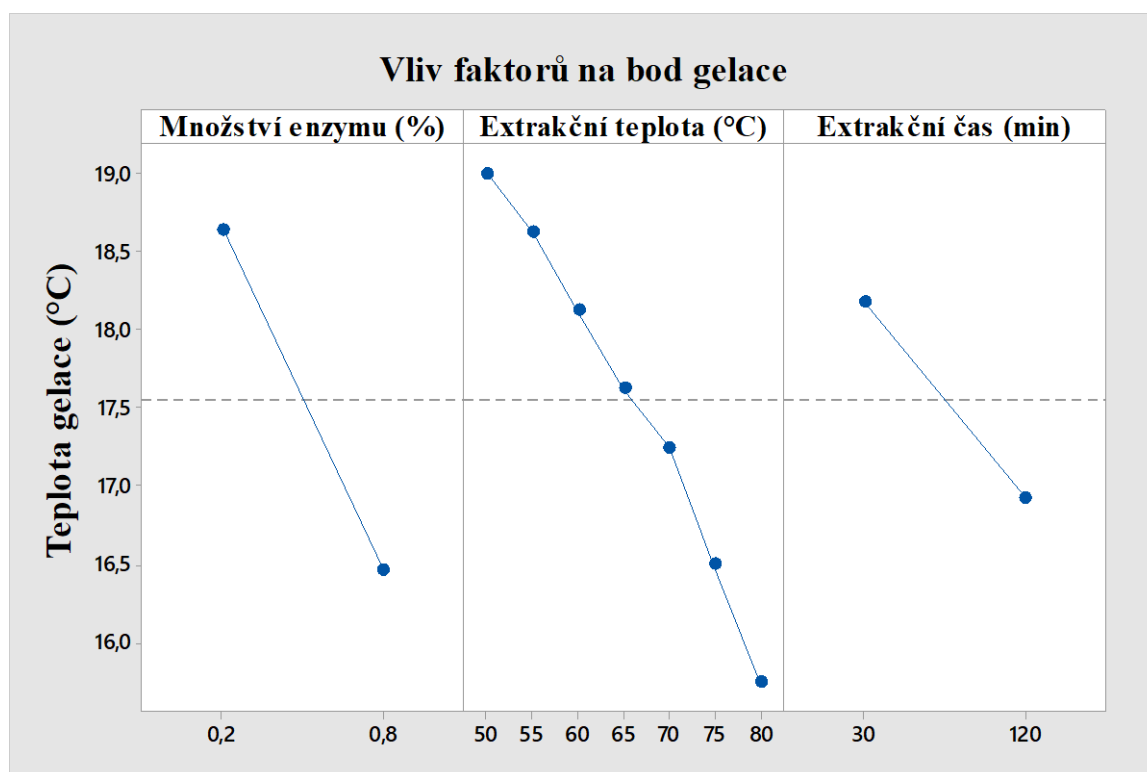
Teplota gelace želatiny z 1. extrakce je 20,5–13,5 °C. Stejně jako u předchozích stanovení dochází k poklesu, který je výraznější ve srovnání s bodem tání. Pro bod gelace platí podobná hypotéza jako pro bod tání. Při mírnějších podmínkách extrakce je želatina pravděpodobně tvořena organizovanější sítí vláken a má schopnost tvořit gel ve vodném roztoku při vyšší teplotě okolí než želatina připravená při náročných podmínkách extrakce. Vyšší množství enzymu má za následek pokles o 1,5–3,0 °C. Zvýšení extrakční teploty z 50 na 80 °C představuje pokles v rozmezí 2,5–4,0 °C a prodloužení doby extrakce pokles o 0,5–2,0 °C.

Vliv jednotlivých technologických faktorů na bod gelace CSG extrahované při 1. extrakci je znázorněn na obr. 11. Teplota gelace i teplota tání s náročností extrakčních podmínek klesá. Extrakční teplota má nejvýznamnější účinek,



podobně jako množství enzymu a doba extrakce má méně výrazný vliv na bod gelace CSG. Vliv technologických faktorů je tedy velmi podobný jako u teploty tání.

Teplota gelace CSG při 2. extrakci je v rozmezí 15,0–11,5 °C. Druhá extrakce má tedy méně významný vliv na bod gelace CSG než první, což znamená nižší pokles mezi 1. a 2. extrakcí v rozmezí 2,0–5,5 °C.



Obr. 11. Vliv faktorů na bod gelace želatiny v 1. extrakci

Teplota gelace CSG byl studována například v práci Sarbona a kol. (2013) s výsledkem 25 °C. Sarbon použil alkalicko-kyselou předúpravu a extrahoval CSG přes noc při 45 °C. Mírně nižší teplota extrakce měla pravděpodobně pozitivní vliv na bod gelace CSG. Nedávná studie vedená Xin a kol. (2021) zkoumá bod gelace CSG a tilápie s výsledky 22 a 14,5 °C, tedy srovnatelnou hodnotu s nejlepším výsledkem této studie. Bod gelace rybí želatiny je výrazně nižší a srovnatelný s CSG extrahovanou při 2. extrakci v této studii, což obecně potvrzuje horší gelační vlastnosti rybí želatiny. Kuan a kol. (2016) určili bod gelace želatiny kachních běháků na 20,5 °C, což je přesně stejná hodnota jako v exp. č. 1 této studie. Byl však použit jiný způsob přípravy želatiny: kyselá předúprava, 12-h extrakce při 55 °C. Výrazně delší doba extrakce tedy neměla na výsledek jeho studie ani pozitivní, ani negativní vliv.

### Návrh optimálních podmínek pro přípravu želatiny z kuřecích kůží

Nejvyšší výtěžek (31,5 %) byl dosažen za následujících podmínek: enzym 0,8 %, teplota 80 °C, čas 30 min (1. extrakce) a 0,8 % / 90 °C / 60 min (2. extrakce). Nejvyšší pevnost gelu (190 Bloom), viskozita (4,1 mPa.s), teplota tání (38,3 °C)

a gelace (20,5 °C) byly dosaženy při 0,2 % / 50 °C / 30 min (1. extrakce). Takové podmínky lze označit za optimální pro přípravu želatin z kuřecí kůže.

### 5.3.2 Želatina z kuřecích hlav

Tato kapitola popisuje výsledky studie přípravy želatin z kuřecích hlav. Detailnější informace jsou popsány v článku pana Gála a kol., z roku 2020 (kap. 11B). Rozpis a výsledky experimentů jsou znázorněny v tab. 14.

Tab. 14. Rozpis a výsledky faktorových experimentů přípravy želatin z hlav

	<b>A<sup>a</sup></b> (%)	<b>B</b> (h)	<b>C</b> (h)	<b>VŽ</b> (%)	<b>PG±SD</b> (Bloom)	<b>V±SD</b> (mPa.s)	<b>ML±SD</b> (%)	<b>T<sub>m</sub></b> (° C)
1	0,4	18	1	20,4	355±2	9,5±0,1	2,3±0,02	41,5
2	0,4	18	4	27,7	211±3	4,210,1	2,9±0,03	38,8
3	0,4	48	1	26,6	248±1	5,8±0,2	2,5±0,01	39,3
4	0,4	48	4	28,8	219±3	3,8±0,1	3,5±0,03	42,2
5	1,6	18	1	29,9	207±2	2,0±0,2	2,8±0,02	38,6
6	1,6	18	4	34,2	162±2	1,4±0,1	3,3±0,02	34,9
7	1,6	48	1	28,4	135±1	1,9±0,1	3,0±0,01	37,5
8	1,6	48	2,5	35,8	113±1	6,8±0,1	2,4±0,01	35,4
9	1	33	2,5	29,7	245±2	5,4±0,3	2,1±0,02	34,5
10	0	33	2,5	19,7	246±3	5,4±0,3	2,1±0,03	38,8

a–vztaženo na hmotnost sušiny suroviny, A–faktor A (množství enzymu), B–faktor B (doba enzymové předúpravy), faktor C (doba extrakce želatiny), VŽ–výtěžek želatiny, PG–pevnost gelu, V–viskozita, ML–obsah minerálních látek, T<sub>m</sub>–bod tání želatiny

#### Vliv faktorů na výtěžek želatiny

Ukázalo se, že doba enzymové předúpravy nemá významný vliv na výtěžek želatiny ( $p=0,589$ ; viz tab. 15). U srovnávacího pokusu (19,7 %) byl výtěžek želatiny o 10 % nižší než u centrálního pokusu (29,7 %), což napovídá, že i bez přídavku enzymu lze získat poměrně značné množství želatiny z dané suroviny. Největší vliv na účinnost extrakce mělo množství enzymu (faktor A;  $p<0,05$ ) a doba extrakce (faktor C;  $p<0,05$ ), které byly statisticky významné. Obr. 12 znázorňuje, že větší množství enzymu i delší doba extrakce způsobují zvýšení výtěžku želatiny. Výtěžek první frakce želatiny byl v rozmezí 19,7–35,8 % a rostl s delší dobou extrakce, což je v souladu se studií Taufika a kol. (2010), který se zabýval vlivem extrakční teploty na vlastnosti CFG s výtěžkem mezi 15,3–16,5 %, tedy nižší oproti současné studii; to může být způsobeno nižší extrakční teplotou.

Cho a kol. (2006) naproti tomu zkoumal vliv procesních podmínek na vlastnosti želatiny připravené z kůže rejnoka (*Raja Kenojei*) a dospěl rovněž ke stejnému trendu. Výtěžek (11,9–16,8 %) byl podobný jako ve studii Taufika. Extrakční teplota byla v rozmezí 40 až 70 °C. DU et al. (2013) se

zabýval jako jeden z mála studiím vlastností želatin extrahovaných z kuřecích a krůtích hlav s 31,2 % výtěžkem první frakce želatin (krůtí hlavy) a 24,8 % výtěžkem (kuřecí hlavy); srovnatelně s touto studií. Nicméně, ve své studii použil odlišné technologické podmínky pro přípravu želatin, než v současné studii. Surovina byla odtučněna 0,015M NaHCO<sub>3</sub>; pro předúpravu suroviny byl použit 0,1M NaOH a 0,05M CH<sub>3</sub>COOH, tedy kombinace alkalického a kyselého způsobu. Želatiny byly extrahovány ve dvou stupních při dvou extrakčních teplotách: 50 °C po dobu 18 h a 60 °C po dobu 6 h. Sarbon a kol. (2013), který zkoumal želatinu připravenou z kuřecí kůže, zaznamenal výtěžek pouze 16,1%, tedy méně, než v této studii. Extrakční teplota byla 45 °C, a mohla být tedy jedním z důvodů nižšího výtěžku želatin. Podle Widyasari a Rawdkuen (2014) je výtěžek chicken feet gelatine only 12,6 %; opět se tak potvrdil vliv i extrakční doby, která byla v této studii 90 min. Rozdílné výsledky ve výtěžcích lze připsat např. rozdílné struktuře použitých tkání, stejně jako i odlišným technologickým podmínkám použitých v procesech příprav želatin, zejména extrakční teploty a doby extrakce.

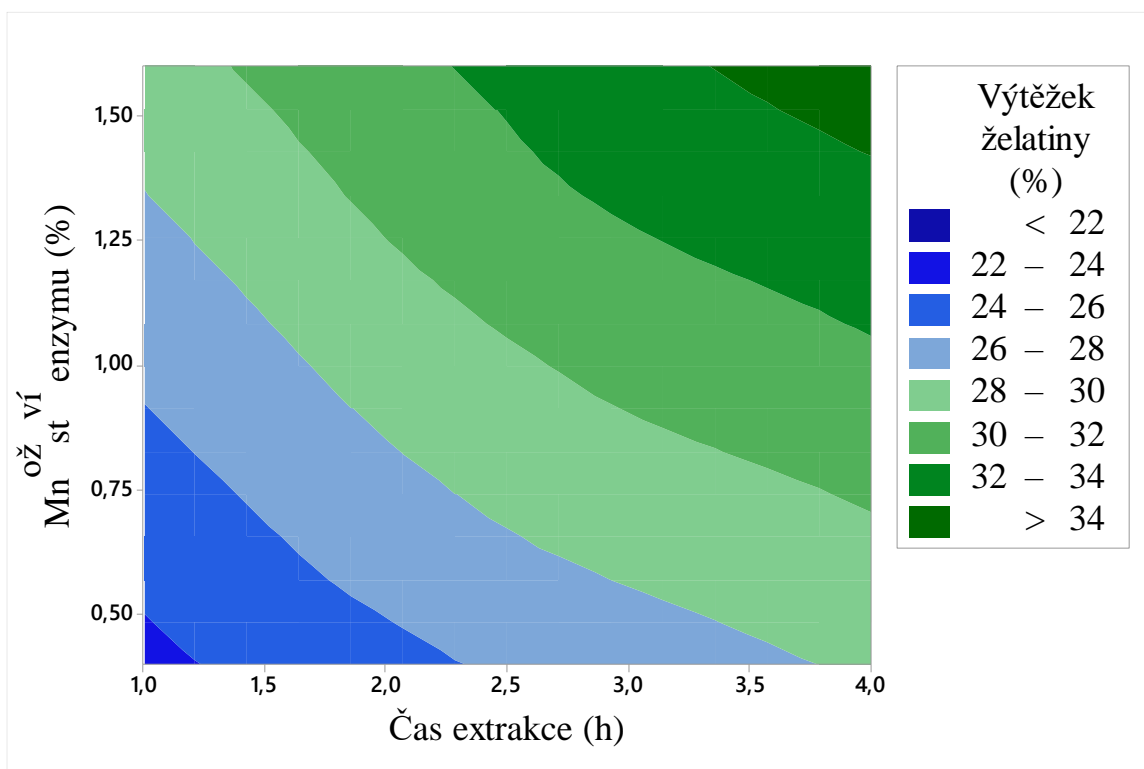
Tab. 15. Analýza rozptylu pro výtěžek želatin, pevnost gelu a viskozitu

	<b>Stupeň volnosti</b>	<b>Součet čtverců</b>	<b>Průměr čtverců</b>	<b>F-hodnota</b>	<b>P-hodnota</b>
Odezva: $V\check{Z} = 17,44 + 5,17 A + 0,0617 B + 1,767 C$					
Faktor A	1	76,880	76,880	23,36	0,005
Faktor B	1	6,845	6,845	2,08	0,209
Faktor C	1	56,180	56,180	17,07	0,009
Odezva: $PG = 407,7 - 86,7 A - 01,833 B - 20,00 C$					
Faktor A	1	216321	21632	17,34	0,009
Faktor B	1	6050	6050	4,85	0,079
Faktor C	1	7200	7200	5,77	0,061
Odezva: $\text{viskozita} = 10,62 - 3,29 A - 3,09 B - 0,0485 C$					
Faktor A	1	27,528	27,528	8,33	0,055
Faktor B	1	4,234	4,234	1,28	0,309
Faktor C	1	7,290	7,290	2,40	0,182

V $\check{Z}$ –výtěžek želatin, PG–pevnost gelu, Faktor A–množství enzymu, faktor B–doba enzymové předúpravy, faktor C –doba extrakce

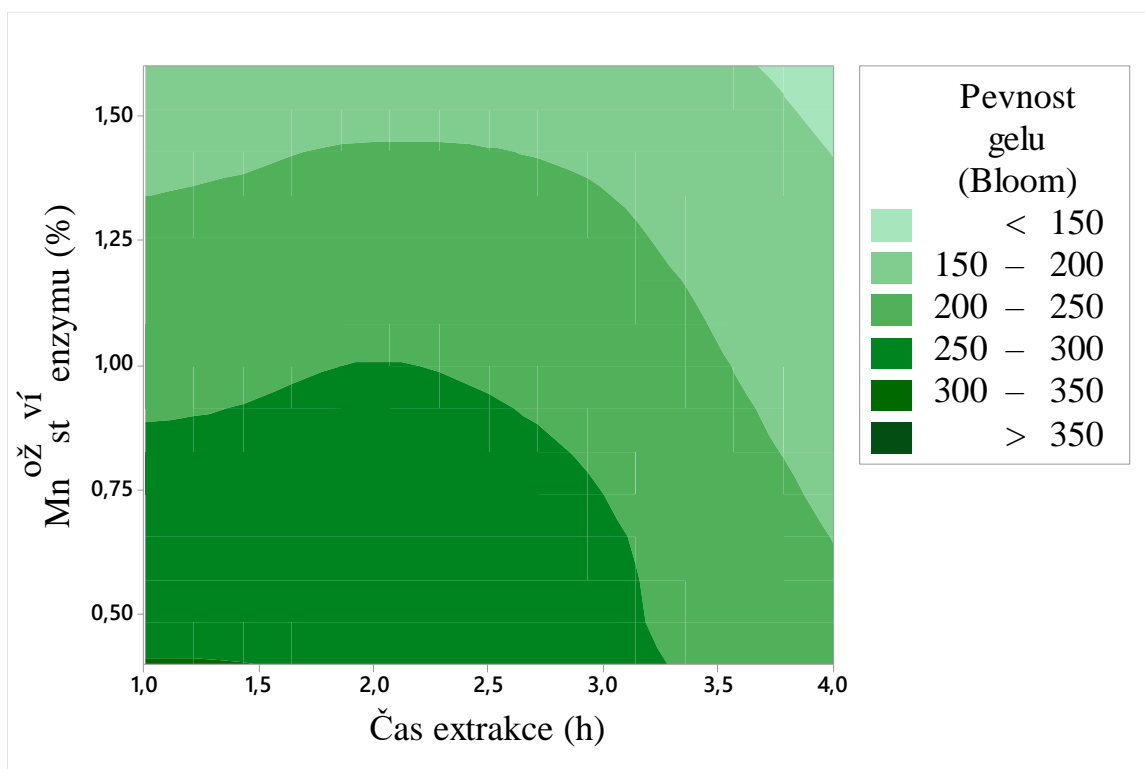
### **Vliv faktorů na pevnost gelu**

Na pevnost gelu má nejvýraznější vliv množství enzymu, zatímco doba extrakce má vliv méně významný, jak ukazuje obr. 13. Nicméně, pevnost gelu klesá se zvyšujícími se hodnotami všech sledovaných faktorů. Vliv množství enzymu na pevnost gelu byl statisticky významný ( $p < 0,05$ ), zatímco vliv doby enzymové předúpravy nebyl statisticky významný ( $p > 0,05$ ), stejně jako vliv doby extrakce ( $p > 0,05$ ).



Obr. 12. Vliv množství enzymu a doby extrakce na výtěžek želatiny

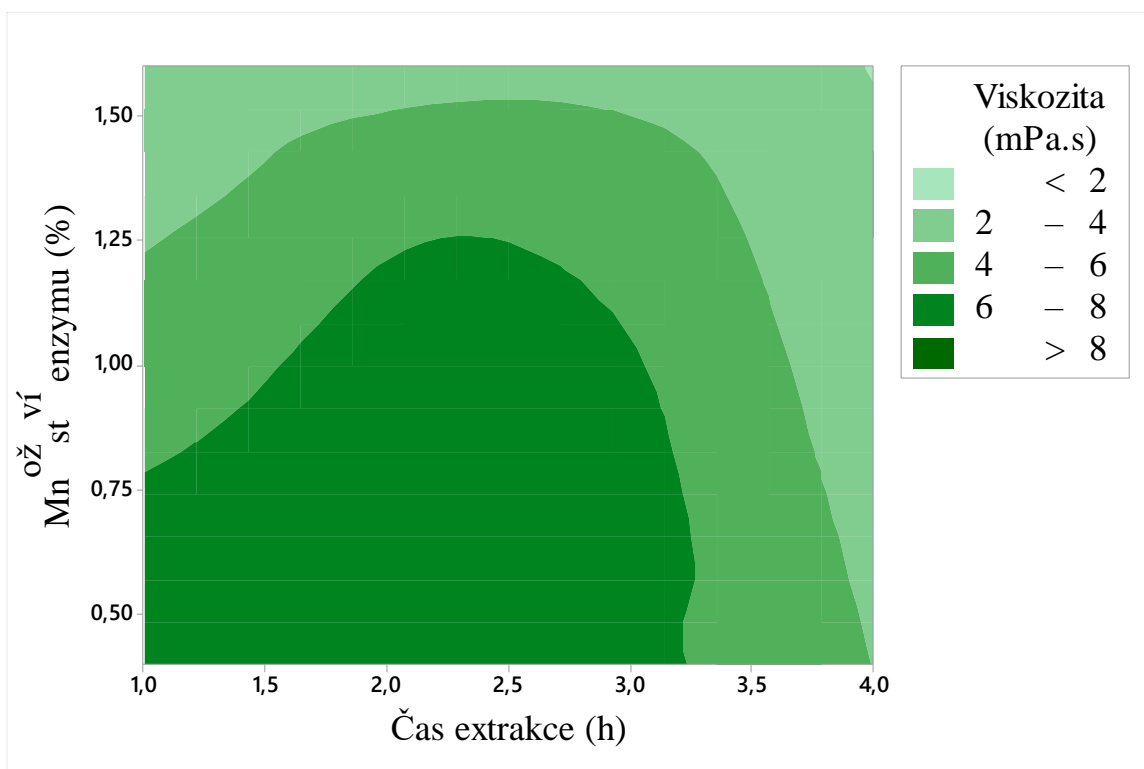
Výsledky naznačují, že snížení pevnosti gelu je zřejmě způsobeno štěpením peptidových vazeb v molekulách kolagenu během enzymové předúpravy suroviny i extrakce želatiny. Vyšší množství enzymu také nejspíš přispívá k zintenzivnění tohoto procesu. Tímto štěpením dochází ke snížení molekulové hmotnosti, což se projeví zeslabením gelové sítě. Nejvyšší pevnost gelu (355 Bloom) byla naměřena u exp. č. 1, což je o 110 Bloom více než u srovnávacího pokusu. V experimentu s horními limity faktorů (č. 8) byla naopak zaznamenána nejhorší pevnost gelu (113 Bloom). V ostatních experimentech byla pevnost gelu v rozmezí 135 až 248 Bloom, což představuje kvalitní želatiny se střední až vysokou pevností gelu. Pevnost gelu byla ve studii Du a kol. (2013) v případě krutí želatiny 369 Bloom, což je srovnatelný výsledek s experimentu č. 1 (355 Bloom) v současné studii. Pevnost gelu kuřecí želatiny byla 248 Bloom, tedy srovnatelná s výsledkem experimentu č. 3 současné studie. Sarbon a kol. (2013) dosáhli hodnotu pevnosti gelu kuřecí kožní želatiny 355 Bloom, tedy srovnatelnou s exp. č. 1 současné studie. Sompie a Triasih (2018) naěřil pevnost želatiny z běháků 78 Bloom, tedy výrazně méně než v této studii. Důvodem nízké pevnosti gelu může být, mimo jiné, delší doba extrakce (5 h) oproti současné studii (1 až 4 h). Widyasari a Rawdkuen (2014) studovali pevnost gelu želatiny z kuřecích běháků s výsledky 79 a 185 Bloom v závislosti na extrakčních podmínkách, tedy opět nižší hodnoty, než v současné studii.



Obr. 13. Vliv množství enzymu a doby extrakce na pevnost gelu

#### Vliv faktorů na viskozitu

Nejvyšší viskozita byla naměřena, stejně jako nejvyšší pevnost gelu, u exp. č. 1 (9,45 mPa.s). To naznačuje, že pevnost gelu i viskozita jsou charakteristiky, které spolu úzce souvisí. Viskozita klesá s rostoucími hodnotami všech faktorů, avšak žádný z faktorů nebyl statisticky významný ( $p > 0,05$ ). Podobný trend byl zaznamenán i v případě pevnosti želatinového gelu. Želatina s vyšší viskozitou pravděpodobně obsahuje delší kolagenní řetězce způsobující zvýšení odporu proti toku, než želatina s nižší viskozitou. Nejnižší viskozita želatiny byla naměřena u experimentu č. 7 (1,41 mPa.s). Obr. 14 znázorňuje, že vyšší množství enzymu i doba extrakce mají negativní vliv na viskozitu želatinového roztoku. Sompie a Triasih (2018) released gelatine viscosity of chicken leg skin gelatine with the value of 6,52 mPa.s, tedy srovnatelná se současnou studií. Rafieinan a kol., (2011), který se zabýval optimalizací procesu extrakce želatiny z kuřecího odkostovače naměřil viskozitu 5,85 mPa.s, tedy opět podobná hodnota, která byla dosažena i v této studii (exp. č. 3). Viskozita je ovlivněna molekulovou hmotností i distribucí molekulové hmotnosti extrahovaného proteinu Sompie a kol., 2015; Rafieian a kol., (2011). Taufik a kol. (2010) stanovil viskozitu želatiny z běháků 6,29 až 7,22 mPa.s, což jsou srovnatelné hodnoty s podobnými studiemi.



Obr. 14. Vliv množství enzymu a doby extrakce na viskozitu želatiny

### Vliv faktorů na další parametry želatin

Množství anorg. pevných látek v želatině bylo v rozmezí 2,12–3,92 %, Pro použití želatiny v potravinářství je stanoven obsah minerálních látek max. 3 %, takže pouze u 3 experimentů byly mírně překročeny tyto standardy, ale další snížení podílu těchto látek je možné např. použitím iontoměníčů (Food Chemical Codex, 2019). Du a kol. (2013) naproti tomu dosáhl extrémně nízkého obsahu anorganických pevných látek (0,03 u kuřecích a 0,06 % u krůtích hlav). Sarbon a kol. (2013) hlásil obsah 0,4%, tedy opět výrazně méně než v této studii, což může být v obou případech způsobeno např. menší koncentrací NaOH použitého při procesu předúpravy suroviny. Připravené želatinové roztoky vykazovaly pH v rozsahu 7,02 až 7,17, což splňuje standardy pro komerční želatinu (3,8 až 7,6; European Pharmacopoeia, 2016). Widyasari and Rawdkuen (2014) naměřili pH mírně nižší (6,13 až 6,49), což je zřejmě způsobeno použitím kyselá předúpravy suroviny při procesu přípravy želatiny. Technologické podmínky tedy neměly téměř žádný vliv na tento parametr. Teplota tání želatinového gelu byla obecně vyšší u vzorku s nižším obsahem enzymu (0,4 %) a byla v rozmezí 39 až 42 °C, naopak při použití enzymu v množství 1,6 % byla teplota tání v rozmezí přibližně 35 až 39 °C, tedy mírně nižší, což může naznačovat, že vyšší množství enzymu způsobuje rozsáhlejší narušení peptidových vazeb. Důsledkem je tání želatiny při nižších teplotách. Druhá extrakce poskytla poměrně dobré výtěžky v rozmezí 5,55 až 10,6 %; kvalita želatin byla však nižší, než kvalita želatin z první extrakce, což se projevilo horší pevností gelu (<150 Bloom) a viskozitou (<2,85 mPa.s).

### Návrh optimálních podmínek pro přípravu želatiny z kuřecích hlav

Pro navržení optimálních podmínek se vycházelo z vlivu faktorů na efektivitu procesu a pevnost gelu. Cílem bylo připravit želatinu s vysokou pevností gelu ( $\geq 220$  Bloom), a z nižší pevností gelu ( $\leq 150$  Bloom). Jako konstantní faktory byly zvoleny doba enzymové předúpravy (24 h) a množství enzymu při předúpravě (0,8 %). Doba první extrakce byla 45 a 120 min. Teplota první extrakce byla opět konstantní 80 °C. Doba druhé extrakce byla 1 a 4 h a teplota 95 °C, stejně jako u základních experimentů. U připravených vzorků byly stanoveny nejdůležitější ukazatele kvality želatiny, a sice pevnost gelu a viskozita želatinového roztoku. Tab. 16 znázorňuje výsledky optimalizačních experimentů. Tyto výsledky potvrdily význam doby extrakce na kvalitu připravených želatin, jelikož pevnost gelu připraveného z želatiny extrahované po dobu 45 min byla 277 Bloom, zatímco při době extrakce 120 min byla pevnost gelu pouze 140 Bloom. Výtěžek extrakce byl o 7% nižší při 45-minutové extrakci v porovnání s 120-min. extrakcí. Výtěžky z druhé extrakce byly více jak 10 %, což potvrzuje vysoký vliv teploty na výtěžnost želatiny.

Tab. 16. Rozpis optimalizačních experimentů a výsledky výtěžku, pevnosti gelu a viskozity

	<b>A<sup>a</sup></b> <b>(%)</b>	<b>B</b> <b>(h)</b>	<b>C</b> <b>(h)</b>	<b>VŽ</b> <b>(%)</b>	<b>PG±SD</b> <b>(Bloom)</b>	<b>V±SD</b> <b>(mPa.s)</b>
11	0,8	24	45	22,6	277±2	9,5±0,1
12	0,8	24	120	29,9	211±3	2,6±0,1

a–vztaženo na hmotnost sušiny suroviny, A–faktor A (množství enzymu), B–faktor B (doba enzymové předúpravy), faktor C (doba extrakce želatiny), VŽ–výtěžek želatiny, PG–pevnost gelu, V–viskozita

### 5.3.3 Želatina z kuřecích běháků

V této kapitole jsou popsány výsledky studie přípravy želatiny z kuřecích běháků. Detailnější informace popisuje článek pana Mokrejše a kol., z roku 2019 (kap. 11C).

Pro přípravu želatiny z kuřecích běháků byly využity faktorové experimenty typu  $2^3$  s jedním centrálním experimentem a jedním opakováním (tab. 17). Studovanými technologickými faktory byly: množství enzymu vztažené na hmotnost sušiny suroviny (faktor A–min. hodnota 0,2 % (w/w), střední hodnota 0,5 % (w/w) a max. hodnota 0,8 % (w/w)); doba enzymové předúpravy (faktor B–24 h, 72 h a 120 h) a doba extrakce želatiny (faktor C–1 h, 2,5 h a 4 h). Extrakční teplota byla konstantní 80 °C, která byla zvolena na základě předběžných experimentů. Sledovanými závisle proměnnými veličinami byly výtěžek želatiny (procentuální konverze výchozí suroviny na želatinu), pevnost gelu, viskozita želatinového roztoku a množství minerálních látek v želatině (základní parametry určující kvalitu želatin).

Tab. 17. Rozpis a výsledky faktorových experimentů přípravy želatin z běháků

	<b>A<sup>a</sup></b> (%)	<b>B</b> (h)	<b>C</b> (h)	<b>VŽ</b> (%)	<b>PG±SD</b> (Bloom)	<b>V±SD</b> (mPa.s)	<b>ML±SD</b> (%)
1	0,2	24	1	20,1	295±2	6,9±0,1	1,35±0,02
2	0,2	24	4	27,4	273±3	6,5±0,1	0,61±0,03
3	0,2	120	1	24,1	266±1	5,9±0,2	1,66±0,01
4	0,2	120	4	33,5	263±3	5,2±0,1	0,88±0,03
5	0,8	24	1	36,5	241±2	5,1±0,2	0,93±0,02
6	0,8	24	4	37,9	235±2	4,7±0,1	0,77±0,02
7	0,8	120	1	38,3	228±1	3,7±0,1	1,61±0,01
8	0,8	120	4	39,1	206±1	3,1±0,1	1,32±0,01
9	0,5	72	2,5	35,4	249±2	6,5±0,3	1,53±0,02

a–vztaženo na hmotnost sušiny suroviny, A–faktor A (množství enzymu), B–faktor B (doba enzymové předúpravy), faktor C (doba extrakce želatiny), VŽ–výtěžek želatiny, PG–pevnost gelu, V–viskozita, ML–obsah minerálních látek

### Vliv faktorů na výtěžek a kvalitu želatin

Všechny připravené želatiny obsahovaly velmi malé množství minerálních látek (0,61–1,66 %) a tudíž splňují povolené limity pro potravinářské a farmaceutické želatiny.

Byla vyhodnocena statistická významnost studovaných technologických faktorů s využitím standardního F-testu významnosti a P-hodnot na hladině významnosti 95 %. Pro navržené faktorové schéma je kritická hodnota  $F=10,13$ , takže čím vyšší je F-hodnota nad turokritickou hodnotou, tím větší je vliv konkrétního technologického faktoru. Podobně byly vyhodnoceny výsledky pro P-hodnoty; faktory s hodnotou nižší než 0,05 mají na sledované proměnné vliv s 95% pravděpodobností, a čím nižší je P-hodnota, tím vyšší je vliv technologického faktoru (Stange, 1971). Tab. 18 ukazuje výsledky analýzy rozptylu pro výtěžek želatiny, pevnost gelu a viskozitu želatinového roztoku.

Výsledky ukázaly, že pro výtěžek želatiny je statisticky významný pouze faktor A (množství enzymu). Účinek faktorů A a C (množství enzymu a doba extrakce želatiny) na výtěžek želatiny je znázorněn na obr. 15. Je patrné, že se zvyšujícím se přídatkem enzymu a současně prodloužením doby extrakce roste výtěžek želatiny. Tento trend je patrný zejména u použití nižšího množství enzymu (0,4 %) a kratší doby extrakce (2,5 h). Množství enzymu nad 0,5 %, nebo doba extrakce delší než 2,5 h nepřináší významný nárůst výtěžku. Minimálního výtěžku (21 %) je dosaženo na dolních limitech faktorů, tj. 0,2% množství enzymu a doba extrakce 1 h. Maximální výtěžek (38 %) pak odpovídá přibližně 0,7% množství enzymu a době extrakce 2,5 h. Další prodloužení doby extrakce nevede k nárůstu výtěžku. Výtěžky želatin jsou srovnatelné s podobně zaměřenými studiemi. Almeida a kol. (2013) extrahovali kuřecí běháky a dosáhli výtěžku 36 %. Du a kol. (2013) zpracovávaly kuřecí a krocení hlavy a



dosáhly výtěžků 31 % (kuřecí hlavy) a 38 % (krocaní hlavy). Sarbon a kol. (2013) dosáhl pouze 16% výtěžku želatiny z kuřecí kůže.

Tab. 18. Analýza rozptylu pro výtěžek želatiny, pevnost gelu a viskozitu

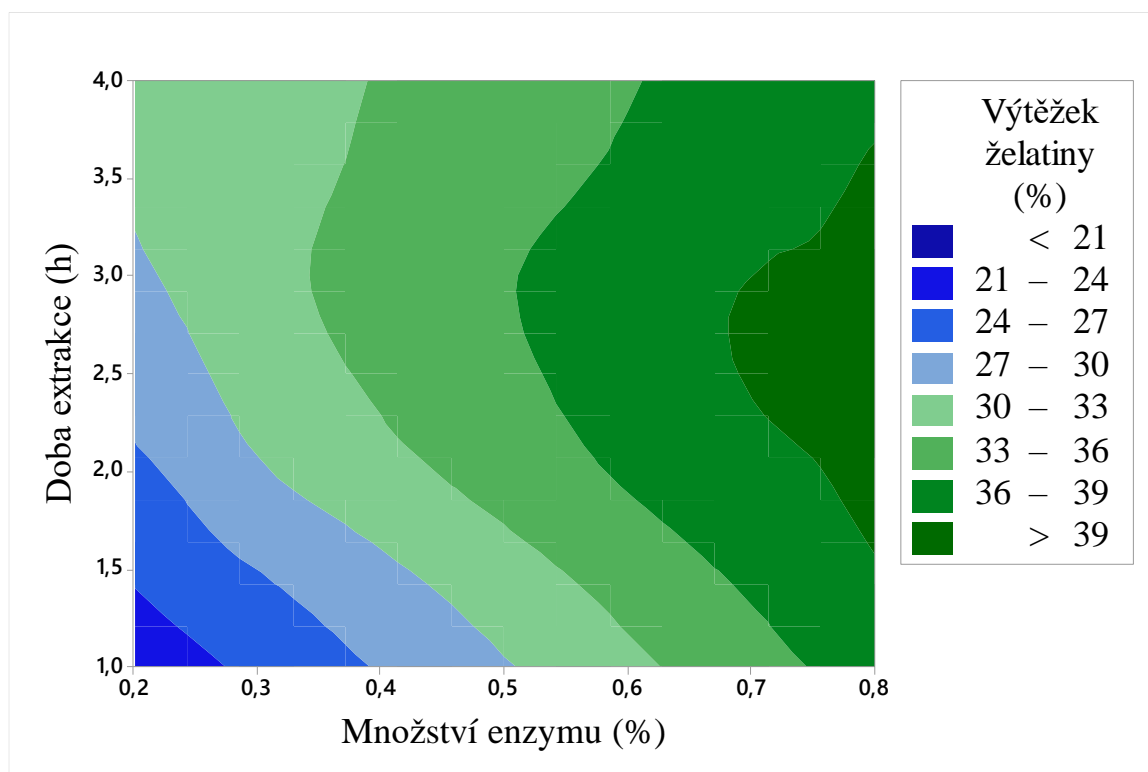
	Stupeň volnosti	Součet čtverců	Průměr čtverců	F-hodnota	P-hodnota
Odezva: VŽ = 16,35+19,46 A+0,0341 B+1,575 C; R <sup>2</sup> = 88,65					
Faktor A	1	272,61	272,611	31,42	0,002
Faktor B	1	21,45	21,451	2,47	0,177
Faktor C	1	44,65	44,651	5,15	0,073
Chyba	5	43,38	8,676		
Celkem	8	382,10			
Odezva: PG = 315,85–77,92 A–0,2109 B–4,42 C; R <sup>2</sup> = 97,20					
Faktor A	1	4371,1	4371,13	136,92	0,000
Faktor B	1	820,1	820,12	25,69	0,004
Faktor C	1	351,1	351,13	11,00	0,021
Chyba	5	159,6	31,93		
Celkem	8	5702,0			
Odezva: viskozita = 8,37–3,29 A–0,0138 B–0,175 C; R <sup>2</sup> = 87,18					
Faktor A	1	7,80	7,801	22,35	0,005
Faktor B	1	3,51	3,551	10,16	0,025
Faktor C	1	0,55	0,551	1,58	0,264
Chyba	5	1,72	0,349		
Celkem	8	13,61			

VŽ–výtěžek želatiny, PG–pevnost gelu, Faktor A–množství enzymu, faktor B–doba enzymové předúpravy, faktor C –doba extrakce

Podle výsledků statistického vyhodnocení mají všechny 3 faktory statisticky významný vliv na pevnost gelu. Vliv faktoru A (množství enzymu) a faktoru B (doba enzymového opracování) na pevnost gelu je znázorněn na obr. 16. Je zřejmé, že při použití navržených technologických parametrů lze dosáhnout vysoké pevnosti gelu u všech připravených želatin (220 až 280 Bloom). Na dolním limitu sledovaných faktorů lze připravit želatinu s pevností 280 Bloom a výtěžkem 21 %. Téměř dvojnásobného výtěžku (38 %) a horními limity faktorů (0,8% množství enzymu a 120-h enzymová předúprava suroviny) nedojde k významnému poklesu pevnosti gelu (220 Bloom).

Výsledky podobných výzkumů nabízejí srovnatelné, nebo lepší výsledky pevnosti želatinových gelů. Almeida a kol. (2013) dosáhly pevnosti gelu 295 Bloom u želatiny vyrobené z kuřecích běháků. Du a kol. (2013) připravili želatinu z kuřecích hlav z pevností 333 až 368 Bloom. Želatina připravená z kuřecích kůží ve studii Sarbon a kol. (2013) měla pevnost 355 Bloom. Faktor A (množství enzymu) a faktor B (doba enzymového opracování) mají statisticky

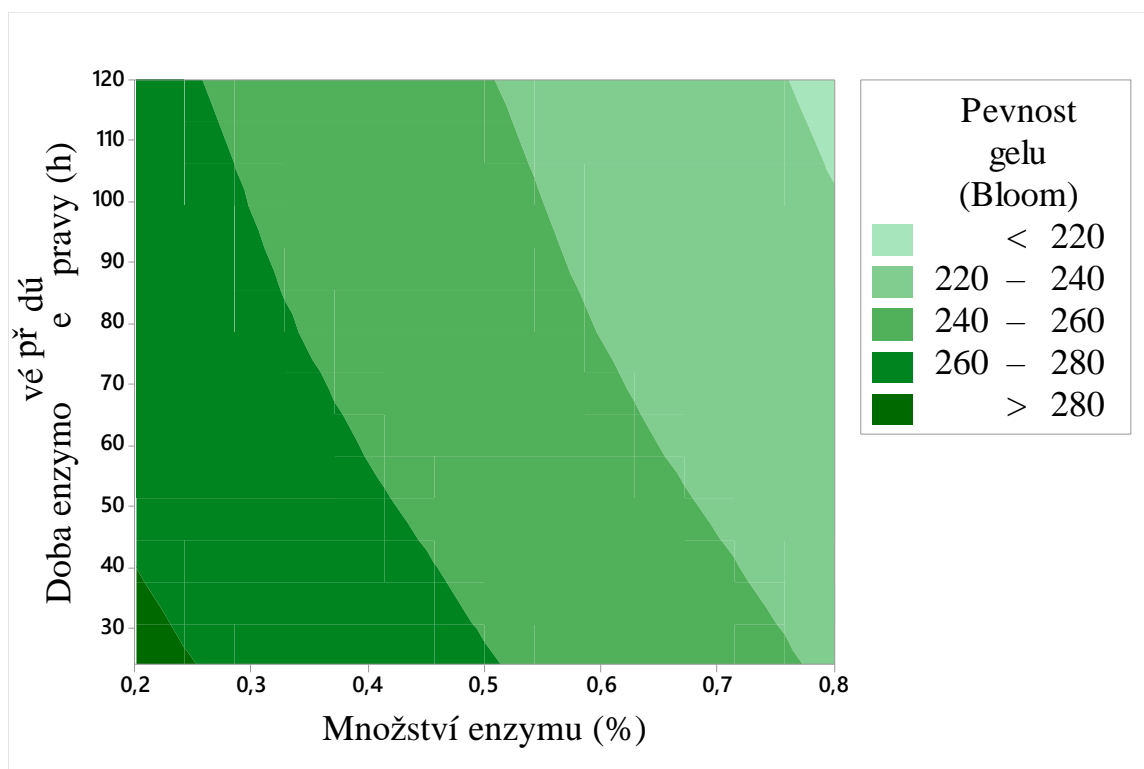
významný vliv na viskozitu želatinového roztoku. Vliv těchto faktorů je znázorněn na obr. 17. Je zřejmé, že nejvyšší hodnota viskozity (6,5 mPa.s) není ovlivněna změnou technologických faktorů při použití nízkého množství enzymu (0,2–0,3 %) a krátké doby enzymové předúpravy (30–90 h). Je také patrné, že zvýšení množství enzymu (nad 0,4 %) a doby enzymové předúpravy přináší postupný pokles viskozity až na 3,5 mPa.s. Želatiny s viskozitou 1,7–7,5 mPa.s jsou běžně využívány v průmyslu. Želatiny s vysokou viskozitou (4,5–6,5) jsou vhodné pro výrobu tvrdých želatinových kapslí, zatímco pro měkké želatinové kapsle postačuje viskozita 2,5–4,5 mPa.s a pro tablety 1,7–3,5 mPa.s.



Obr. 15. Vliv množství enzymu a doby extrakce na výtěžek želatiny

### Návrh optimálních podmínek pro přípravu želatiny z kuřecích běháků

Studie vlivu technologických faktorů na výtěžek a kvalitu želatin přinesly následující výsledky: vyšší množství enzymu (faktor A) a delší doba extrakce (faktor C) má za následek zvýšení výtěžku želatiny; vyšší množství enzymu (faktor A) a delší doba enzymové předúpravy (faktor B) naopak představuje pokles pevnosti gelu; nejvyšší pevnost gelu byla sledována při použití dolních limitů faktorů (0,2% množství enzymu, doba enzymové předúpravy 24 h a doba extrakce 1 h). bylo tedy možné předpokládat, že pevnost gelu bude vyšší při nízkém množství enzymu a krátkých dobách enzymové předúpravy a extrakce. Cílem optimalizace procesu bylo připravit želatinu s velmi vysokou pevností (min 300 Bloom). Doba enzymové předúpravy byla nastavena konstantní (20 h) a byl sledován vliv množství enzymu (0,1 a 0,4 %) a doby extrakce (15 a 45 min) na kvalitu a výtěžek připravených želatin. Byly použity faktorové experimenty typu 2<sup>2</sup>; jejich rozpis a výsledky jsou znázorněny v tab. 18.

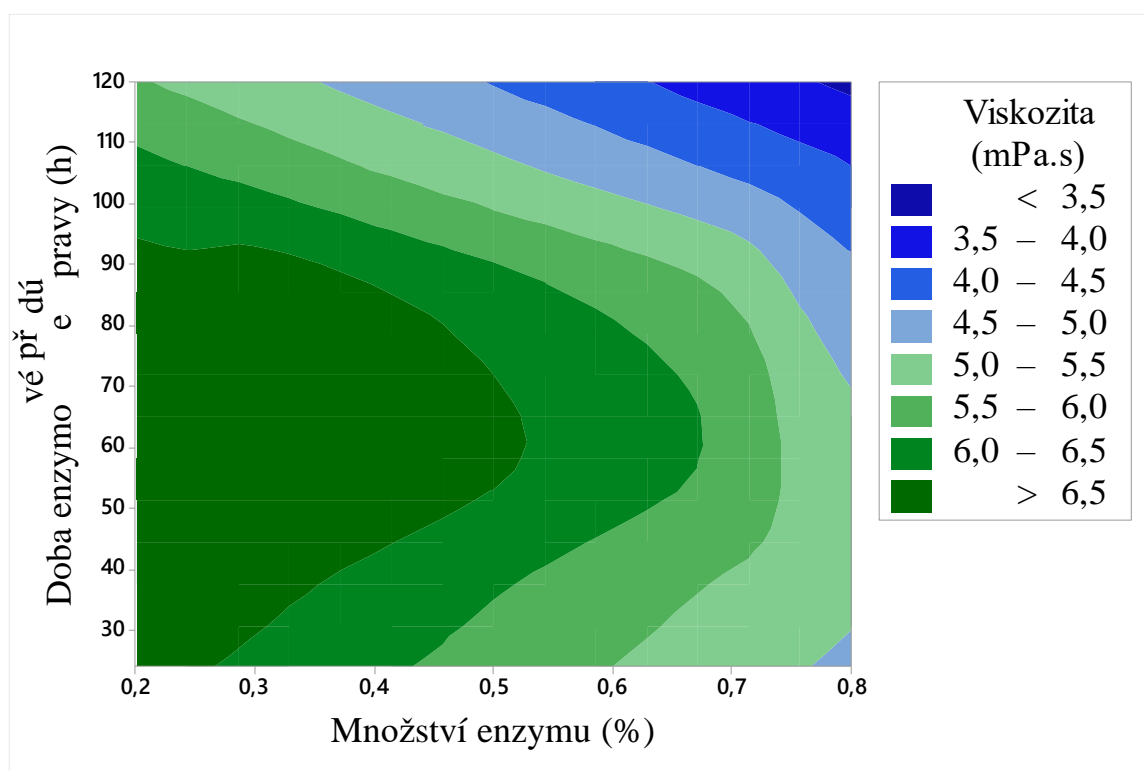


Obr. 16. Vliv množství enzymu a doby enzymového opracování na pevnost gelu

### Návrh optimálních podmínek pro přípravu želatiny z kuřecích běháků

Studie vlivu technologických faktorů na výtěžek a kvalitu želatin přinesly následující výsledky: vyšší množství enzymu (faktor A) a delší doba extrakce (faktor C) má za následek zvýšení výtěžku želatiny; vyšší množství enzymu (faktor A) a delší doba enzymové předúpravy (faktor B) naopak představuje pokles pevnosti gelu; nejvyšší pevnost gelu byla sledována při použití dolních limitů faktorů (0,2% množství enzymu, doba enzymové předúpravy 24 h a doba extrakce 1 h). bylo tedy možné předpokládat, že pevnost gelu bude vyšší při nízkém množství enzymu a krátkých dobách enzymové předúpravy a extrakce. Cílem optimalizace procesu bylo připravit želatinu s velmi vysokou pevností (min 300 Bloom). Doba enzymové předúpravy byla nastavena konstantní (20 h) a byl sledován vliv množství enzymu (0,1 a 0,4 %) a doby extrakce (15 a 45 min) na kvalitu a výtěžek připravených želatin. Byly použity faktorové experimenty typu  $2^2$ ; jejich rozpis a výsledky jsou znázorněny v tab. 19.

Obsah minerálních látek ve vzorcích želatin připravených při optimalizačních experimentech v rozmezí 1,23–1,94 %, což splňuje standarty pro povolený obsah minerálních látek. Viskozita želatin byla v rozmezí 6,8–7,3 mPa.s, což znamená, že připravené želatiny lze využít např. v potravinářství pro výrobu marshmallows, nebo povlaků na potraviny.



Obr. 17. Vliv množství enzymu a doby enzymové předúpravy na viskozitu

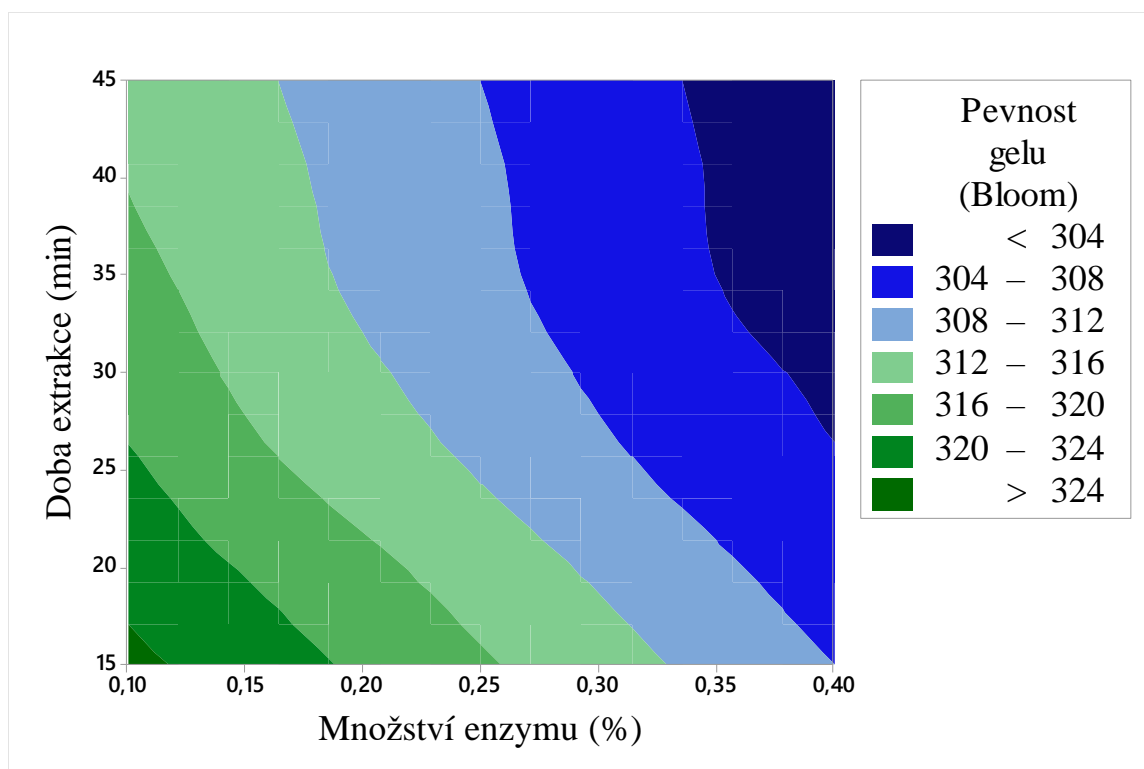
Tab. 19. Rozpis a výsledky optimalizačních experimentů přípravy želatiny z běháků

	<b>A<sup>a</sup></b> (%)	<b>C</b> (min)	<b>VŽ</b> (%)	<b>PG±SD</b> (Bloom)	<b>V±SD</b> (mPa.s)	<b>ML±SD</b> (%)
10	0,1	15	17,0	325±2	7,3±0,1	1,31±0,02
11	0,1	45	18,9	315±3	7,2±0,1	1,23±0,03
12	0,4	15	20,6	308±1	6,9±0,2	1,94±0,01
13	0,4	45	21,2	301±3	6,8±0,1	1,58±0,03
14	0,25	30	19,8	310±2	6,9±0,3	1,45±0,02

a–vztaženo na hmotnost sušiny suroviny, A–faktor A (množství enzymu), C–faktor C (doba extrakce želatiny), VŽ–výtěžek želatiny, PG–pevnost gelu, V–viskozita, ML–obsah minerálních látek

Jak ukazuje obr. 18, želatinu s velmi vysokou pevností gelu lze připravit vhodnou volbou množství enzymu (faktor A) a doby extrakce želatiny (faktor C). Pokud se použije nízké množství enzymu (0,15 %) a krátký extrakční čas (20 minut), je možné připravit vysoce kvalitní želatinu v rozsahu 320–325 Bloom s výtěžkem 17,5–18 % (obr. 19). Zvýšením množství enzymu na horní limit (0,4 %) a prodloužením doby extrakce (45 minut) dochází ke zvýšení výtěžku želatiny na 21 % při současně dostatečně vysoké pevnosti gelu (cca 300 Bloom). Takové podmínky lze označit jako optimální pro přípravu želatiny z tohoto typu tkáně (kuřecí běháky).

Jak ukazuje obr. 18, želatinu s velmi vysokou pevností gelu lze připravit vhodnou volbou množství enzymu (faktor A) a doby extrakce želatiny (faktor C). Pokud se použije nízké množství enzymu (0,15 %) a krátký extrakční čas (20 minut), je možné připravit vysoce kvalitní želatinu v rozsahu 320–325 Bloom s výtěžkem 17,5–18 % (obr. 19). Zvýšením množství enzymu na horní limit (0,4 %) a prodloužením doby extrakce (45 minut) dochází ke zvýšení výtěžku želatiny na 21 % při současně dostatečně vysoké pevnosti gelu (cca 300 Bloom). Takové podmínky lze označit jako optimální pro přípravu želatiny z tohoto typu tkáně (kuřecí běháky).



Obr. 18. Vliv množství enzymu a extrakčního času na pevnost gelu

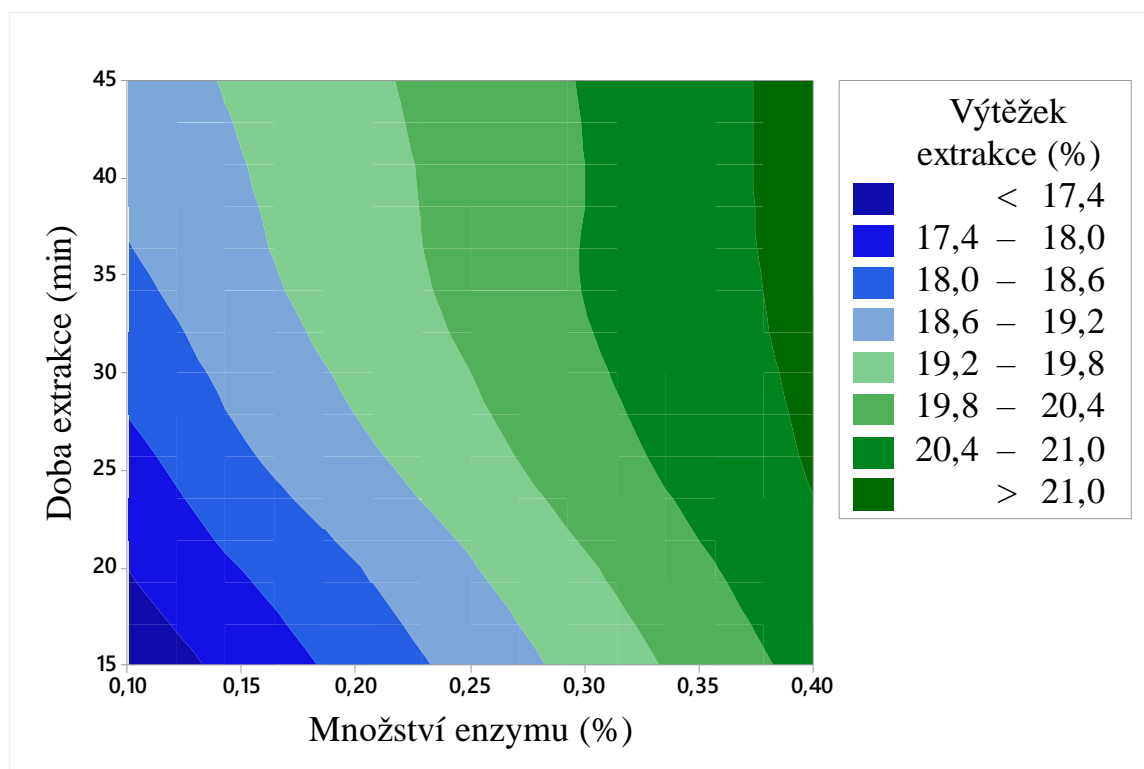
### Testování tepelné stability želatinového gelu

Tepelná stabilita želatinového gelu je důležitá u produktů obsahujících želatinu zejména v teplých letních měsících. Aby bylo možné srovnání připravené želatiny s komerčními, byly otestovány 2 typy vepřové a 2 typy hovězí želatiny. Pro testování byla zvolena želatina připravená z kuřecích běháků za následujících podmínek: množství enzymu 0,8 %, doba enzymového opracování 24 h, teplota extrakce 80 °C a doba extrakce 60 min. Tyto podmínky zaručují vysoký výtěžek želatiny i poměrně vysokou pevnost gelu.

Tab. 20 zobrazuje výchozí hodnoty pevnosti gelu komerčních vepřových (P212 a P288), hovězích (B266 a 273) a kuřecí želatiny připravené z kuřecích běháků (CFG). Nejvyšší pevnost gelu vykazovala P288 a nejnižší P212. Pevnost gelu CFG byla 240 Bloom.

Výsledky stanovení tepelné stability hovězích, vepřových a kuřecí želatiny testovaných při teplotách 23, 29 a 35 °C a relativní vlhkosti 60 a 80 % jsou

uvedeny v tab. 21–26. Výchozí hodnoty pevnosti gelu jsou vyjádřeny jako 100 %. Změny v pevnosti gelu (poklesy) jsou vyjádřeny jako Bloom index v %.



Obr. 19. Vliv množství enzymu a doby extrakce na výtěžek želatiny

Tab. 20. Výchozí hodnoty pevnosti gelu vepřových, hovězích a želatiny z kuřecích běháků

Typ želatiny/Bloom hodnota±SD				
B266	B273	P212	P288	CFG240
266±3	273±2	212±2	288±4	240±3

B266 a Bf273...hovězí želatiny, P212 a P288...vepřové želatiny, CFG...želatina z kuřecích běháků

Tab. 21 ukazuje výsledky tepelné stability želatin při teplotě 23 °C a vlhkosti 60 %. Pevnost gelu podle očekávání postupně klesala. Po jedné hodině měření byl nejmenší pokles zaznamenán u CFG240 a nejvyšší u Beef273. Pokles pevnosti gelu u jiných typů želatin byl přibližně 25 %; rozdíly však nebyly statisticky významné ( $p > 0,05$ ). Podobné trendy byly pozorovány také v následujících měřeních s poklesem pevnosti gelu mezi 30 a 65 %. Nejmenší pokles pevnosti gelu byl zaznamenán u CFG240, zatímco nejvýznamnější pokles byl zaznamenán u Beef273 (3–5 h měření) následované Pork212 (87–120 h měření). Během posledních dvou měření (po 111 a 120 hodinách) nebyly zjištěny žádné další změny v pevnosti gelu. Největší pokles pevnosti gelu byl sledován u Beef266 (více než 90 %), zatímco nejmenší u CFG240 (přibližně 75 %); tento trend tato želatina vykazovala po celou dobu měření. Pokles pevnosti

gelu u jiných typů želatin byl přibližně 85 % se statisticky nevýznamnými rozdíly ( $p > 0,05$ ).

Tab. 21. Tepelná stabilita hovězích, vepřových a kuřecí želatiny při teplotě 23 °C a relativní vlhkosti 60 %

Doba měření (h)	Typ želatiny/Bloom index (%)				
	B266	B273	P212	P288	CFG240
0	100	100	100	100	100
1	77	61	76	75	87
2	50	35	47	50	68
3	35	27	33	37	57
4	28	26	24	29	51
5	24	25	21	26	49
6	23	24	20	25	45
8	22	22	18	23	44
16	21	21	18	20	40
23	20	20	17	18	39
87	8	14	15	16	28
111	8	13	14	15	23
120	8	13	14	15	23

V tab. 22 jsou výsledky měření tepelné stability želatin při teplotě 23 °C a vlhkosti 80 %. Připravená kuřecí želatina CFG240 poskytla hodnoty se statisticky nevýznamnými rozdíly ( $p > 0,05$ ) zaznamenané při obou úrovních vlhkosti (60 a 80 %). Avšak u komerčních želatin byl během prvních 6 h měření zaznamenán vyšší pokles pevnosti gelu se statisticky významnými rozdíly ( $p < 0,05$ ) při vlhkosti 80 % oproti 60 %. V následujících měřeních byly statisticky významné ( $p < 0,05$ ) naopak menší poklesy pevnosti gelu komerčních želatin při vlhkosti 80 oproti 60 %. Po 1 h měření byl nejmenší pokles pevnosti želatinového gelu zjištěn u Pork288 a nejvýraznější u Beef273. Ve všech následujících měřeních vykazovala CFG240 nejmenší pokles. Po dvou hodinách testování byl pokles pevnosti gelu v rozmezí 33 až 64 %. Nejvýraznější pokles po 2, 3 a 4 h měření byl zaznamenán u Beef273, zatímco u dalších měření byl nejvýznamnější pokles zjištěn u Pork212. Nicméně, během měření po 111 a 120 h nebyly naměřeny žádné další změny v pevnosti gelu s konečným poklesem pevnosti přibližně 80%. Připravená želatina z kuřecích běháků měla srovnatelnou nebo lepší tepelnou stabilitu při vlhkosti 60 i 80 % ve srovnání s komerční hovězí a vepřovou želatinou.

Tab. 22. Tepelná stabilita hovězích, vepřových a kuřecí želatiny při teplotě 23 °C a relativní vlhkosti 80 %

Doba měření (h)	Typ želatiny/Bloom index (%)				
	B266	B273	P212	P288	CFG240
0	100	100	100	100	100
1	82	70	82	87	85
2	58	46	56	62	67
3	45	37	42	49	57
4	37	32	34	41	50
5	34	31	30	37	48
6	32	31	25	35	46
8	30	30	24	32	43
16	29	29	24	32	40
23	29	24	24	32	38
87	19	20	18	22	25
120	19	20	18	22	23

Výsledky měření tepelné stability želatin při teplotě 29 °C a vlhkosti 60 % jsou uvedeny v tab. 23. Na rozdíl od měření při vlhkosti 60 %, byl významně vyšší ( $p < 0,05$ ) pokles pevnosti gelu všech želatin sledován při měření v čase 2 h a dále. Po 1 h byl nejmenší pokles zjištěn u Beef266, a obou vepřových želatin, zatímco u CFG240 a Beef273 bylo zaznamenáno nejvyšší snížení pevnosti gelu. V dalších měřeních byl nejmenší pokles naměřen u Beef266 a Pork288 (63 %), vyšší u Pork212 a CFG240 (65 %) a nejvýznamnější pokles u Beef273 (72 %). Po 3 a 4 h měření byl nejmenší pokles zaznamenán u Beef266, Pork288 a CFG240 a nejvyšší u Beef273 a Pork212. Po 5, 6, 7 a 8 h vykazovala želatina CFG240 nejmenší pokles, přibližně o 90 %, zatímco jiné typy želatin vykazovaly mírně vyšší, přesto statisticky nevýznamné ( $p > 0,05$ ) poklesy pevnosti želatinového gelu. Podobný trend byl pozorován při dalších měřeních a po 87 h měření žádná želatina nevykazovala změnu pevnosti gelu. Konečný pokles pevnosti gelu byl téměř 100 %.



Tab. 23. Tepelná stabilita hovězích, vepřových a kuřecí želatiny při teplotě 29 °C a relativní vlhkosti 60 %

Doba měření (h)	Typ želatiny/Bloom index (%)				
	B266	B273	P212	P288	CFG240
0	100	100	100	100	100
1	76	63	77	75	66
2	37	28	33	37	33
3	21	16	16	21	20
4	14	12	11	14	15
5	11	10	8	10	13
6	9	9	7	9	11
8	7	7	5	6	7
16	4	5	4	4	6
23	3	4	3	4	5
120	3	4	3	3	3

Tab. 24 znázorňuje výsledky měření tepelné stability želatin při teplotě 29 °C a vlhkosti 80 %. Při této vlhkosti byl u komerčních želatin sledován mírně vyšší pokles pevnosti gelu než při 60% vlhkosti; zatímco u želatiny kuřecí nebyly zaznamenány žádné statisticky významné rozdíly ( $p > 0,05$ ), podobně jako při teplotě 23 °C. Po 1 h měření byl nejmenší pokles zaznamenán u Beef266, mírně vyšší u vepřových želatin a nejvyšší u Beef273 a CFG240. Naproti tomu po 2 h měření byl nejmenší pokles cca 70 % u CFG240, mírně vyšší u Beef266 a Pork288, a nejvýznamnější snížení přibližně 80 % u Beef273. Po 3 h byl nejmenší pokles u CFG240, podobně jako při dalších měřeních, zatímco komerční želatiny vykazovaly mírně vyšší pokles pevnosti gelu. Další měření ukázala trend postupného poklesu pevnosti gelu; komerční želatiny vykazovaly statisticky významný ( $p < 0,05$ ) vyšší pokles pevnosti gelu ve srovnání s želatinou CFG240. Po 87 h byl sledován téměř 100% pokles pevnosti gelu u všech želatin. Výsledky ukázaly, že kuřecí želatina má srovnatelné, nebo dokonce lepší vlastnosti než komerční želatiny s ohledem na tepelnou stabilitu pevnosti želatinového gelu.

Tab. 25 uvádí výsledky měření tepelné stability želatin při teplotě 35 °C a vlhkosti 60%. U všech želatin došlo při této teplotě k prudkému poklesu pevnosti želatinového gelu. Po 1 h měření se pokles pohyboval mezi 38 a 43%, přičemž nejmenší pokles byl u CFG240 a nejvyšší u Beef266 a Pork212. V dalších měřeních byl zaznamenán dramatický pokles pevnosti gelu v rozmezí od 83 do 90 %. Nejmenší pokles byl stanoven u Beef266 a nejvyšší u Beef273. Po 3 h měření byl nejmenší pokles o více než 90% u CFG240, zatímco všechny komerční želatiny vykazovaly pokles o 97%. Po 4 h byl pokles téměř u všech želatin téměř 100% a po 5 h měření žádná želatina nevytvořila gel.

Tab. 24. Tepelná stabilita hovězích, vepřových a kuřecí želatiny při teplotě 29 °C a relativní vlhkosti 80 %

Doba měření (h)	Typ želatiny/Bloom index (%)				
	B266	B273	P212	P288	CFG240
0	100	100	100	100	100
1	74	64	71	69	64
2	30	22	26	31	33
3	14	12	11	14	19
4	8	8	6	8	15
5	6	7	4	6	13
6	5	6	3	5	11
8	3	4	2	3	8
16	2	3	2	2	6
120	2	3	2	2	4

Tab. 25. Tepelná stabilita hovězích, vepřových a kuřecí želatiny při teplotě 35 °C a relativní vlhkosti 60 %

Doba měření (h)	Typ želatiny/Bloom index (%)				
	B266	B273	P212	P288	CFG240
0	100	100	100	100	100
1	57	58	57	61	62
2	17	11	15	12	15
3	3	3	3	3	7
4	2	2	1	2	3
5	0	0	0	0	0

Výsledky měření tepelné stability želatin při teplotě 35 °C a vlhkosti 80 % jsou uvedeny v tab. 26. Údaje se příliš neliší od výsledků při vlhkosti 60%. Po 1 h měření se pokles pevnosti gelu pohyboval od 36 do 42 %, což nepředstavuje žádné statisticky významné rozdíly ( $p > 0,05$ ) mezi experimenty při vlhkosti 80 a 60 %. Nejmenší pokles pevnosti gelu byl zjištěn u CFG240 a Pork288, zatímco nejvyšší byl zaznamenán u Beef266, stejně jako při vlhkosti 60 %. Po 2 h měření vykazovala kuřecí želatina nejmenší pokles (75 %) a Pork212 spolu s dalšími hovězími želatinami největší pokles (85 %). Po 3 h došlo u CFG240 k poklesu pevnosti gelu o více než 91 % a u komerčních želatin o 97 %. Po 4 h měření byl zaznamenán téměř 100% pokles pevnosti gelu u všech želatin. Stejně jako v předchozích experimentech byl při teplotě 35 °C zaznamenán srovnatelný pokles pevnosti želatinového gelu jak u kuřecích, tak u komerčních želatin.

Tab. 26. Tepelná stabilita hovězích, vepřových a kuřecí želatiny při teplotě 35 °C a relativní vlhkosti 80 %

Doba měření (h)	Typ želatiny/Bloom index (%)				
	B266	B273	P212	P288	CFG240
0	100	100	100	100	100
1	58	60	60	64	64
2	15	15	15	19	25
3	3	3	3	3	9
4	2	2	2	2	3
5	0	0	0	0	0

## 5.4 Porovnání funkčních vlastností kuřecích a komerčních želatin

Kapitola ukazuje výsledky srovnání připravených s komerčními želatinami; detailnější informace jsou popsány v článku Mrázka a kol., (2020 - kap. 11E a 11I). Tab. 27 a 28 zobrazují naměřené hodnoty viskozity, čirosti, vaznosti vody a tuku, a pěnotvorné a emulzifikační vlastnosti přip. želatin z kuřecích běháků (CFG) a kůží (CSG) a komerčních želatin hovězí (B288) a vepřové (P273).

### 5.4.1 Želatina z kuřecích běháků

Želatina extrahovaná při teplotě 80 °C po dobu 45 min byla zvolena jako výchozí pro srovnání s komerční vepřovou a hovězí želatinou, neboť tyto podmínky zajistily dostatečně vysoký výtěžek extrakce při zachování vysoké pevnosti gelu i viskozity želatinového roztoku. Pevnost gelu komerčních želatin je 273 Bloom (hovězí) a 288 Bloom (vepřová). Je patrné, že hodnota viskozity CFG (želatina z kuřecích běháků) je téměř 4-násobně vyšší oproti vepřové želatině a více jak 2-násobná oproti hovězí želatině. VV (vaznost vody) je srovnatelná s hodnotou hovězí želatiny a VT (vaznost tuku) je mírně nižší oproti vepřové želatině.  $T_m$  (teplota tání) CFG je o několik stupňů vyšší oproti komerčním želatinám a  $T_g$  (teplota gelace) je srovnatelná. Byly naměřeny srovnatelné hodnoty EK (emulzifikační kapacita) CFG oproti komerčním želatinám. ES (emulzifikační stabilita) CFG je mírně nižší, než v případě hovězí želatiny. Hodnota PK (pěnotvorná kapacita) je výrazně vyšší, avšak CFG nevykazovala vůbec žádnou PS (pěnotvorná stabilita). Čirost CFG je výrazně nižší oproti komerčním želatinám. Tuto skutečnost lze připsat problematickému procesu filtrace v laboratorních podmínkách.

Tab. 27. Pevnost gelu, viskozita, vaznost vody (VV), vaznost tuku (VT), teplota tání (T<sub>m</sub>) a gelace (T<sub>g</sub>) komerčních a kuřecích želatin

Želatina	PG (Bloom)	V±SD (mPa.s)	VV±SD (g/g)	VT±SD (g/g)	T <sub>m</sub> ±SD (°C)	T <sub>g</sub> ±SD (°C)
B273	273	3,54±0,17	6,42±0,26	0,71±0,06	33,5±0,1	19,5±0,2
P288	288	2,43±0,05	4,43±0,26	0,42±0,11	32,2±0,3	19,0±0,1
CFG	301	9,09±2,29	6,11±0,14	0,32±0,05	37,0±0,1	19,0±0,3
CSG	354	5,15±1,51	3,85±0,30	0,97±0,20	36,1±0,2	20,5±0,2

B273–hovězí želatina (pevnost gelu 273 Bloom), P288–vepřová želatina (pevnost gelu 288 Bloom), CFG–želatina z běháků, CSG–želatina z kůží

Tab. 28. Emulzifikační kapacita (EK), emulzifikační stabilita (ES), pěnotvorná kapacita (PK) a pěnotvorná stabilita (PS) a čírost komerčních a kuřecích želatin

Želatina	EK±SD (%)	ES±SD (%)	PK±SD (%)	PS±SD (%)	Č±SD (%)
B273	57,67±4,04	88,89±11,11	55,10±1,71	13,17±0,23	86,17±4,31
P288	30,67±4,04	94,44±9,62	62,23±3,87	14,40±1,91	65,33±0,47
CFG	48,51±3,51	81,25±8,79	87,91±1,71	0	21,53±0,23
CSG	50,00±7,86	72,50±3,54	48,89±1,92	38,89±11,71	1,51±0,51

#### 5.4.2 Želatina z kuřecích kůží

Želatina extrahovaná při teplotě 40 °C (CSG) po dobu 60 min byla zvolena jako výchozí želatina pro srovnání s komerční potravinářskou hovězí a vepřovou želatinou, protože tato želatina má vysokou pevnost gelu, emulzifikační kapacitu, pěnotvornou kapacitu a stabilitu i viskozitu. Viskozita CSG je o 53 % a 31 % vyšší než viskozita želatin vepřové a hovězí. T<sub>m</sub> (teplota tání) CSG je mírně vyšší oproti komerčním želatinám a T<sub>g</sub> (teplota gelace) je srovnatelná. Podobný trend byl zjištěn i v případě CFG. VV želatiny CSG je o 67 % a 15 % nižší než VV hovězí a vepřové želatin. VT CSG je vyšší o 57 % a 27 % než VT vepřové a hovězí želatin. EK CSG je o 15 % nižší oproti želatině hovězí, zatímco je o 39 % vyšší, než hodnota vepřové želatin, což jsou srovnatelné výsledky. ES želatiny CSG je o 30 % nižší než ES vepřové želatin a o 23 % nižší než u hovězí želatin. FK CSG želatin je o 27 % a 13 % nižší než PK vepřové a hovězí želatin; zatímco PS je vyšší o 63 % a 66 % oproti vepřové a hovězí želatině, což jsou vynikající výsledky. Kromě toho je PS v komerčních želatinách 4,3-krát nižší než PK, zatímco u CSG je pouze 1,3-krát nižší. Čírost CSG je výrazně nižší než čírost komerčních savčích želatin.

## 5.5 Hydrolyzáty

Tato kapitola ukazuje výsledky přípravy hydrolyzátů; detailnější informace jsou popsány v článku Mokrejše a kol., z roku 2019 (kap. 11D).

Souhrnné výsledky zpracování bílkovin kuřecích běháků na želatiny a hydrolyzáty dvouúrovňovými faktorovými schémata se třemi sledovanými faktory jsou uvedeny v tab. 29. Po 1. stupni zpracování byly filtrací získány roztoky bílkovinných hydrolyzátů obsahující v sušině 21–30 % minerálních látek, výtěžek bílkovinného substrátu byl 11–18 %. Výtěžek hydrolyzátu byl vypočten z hmotnosti hydrolyzátu připraveného po 1. stupni zpracování, resp. z hmotnosti želatiny/hydrolyzátu připravených po 2. stupni zpracování a hmotnosti vztažené na navážku substrátu. Také byl vypočten celkový výtěžek (součet výtěžků po 1. a 2. stupni).

Tab. 29. Rozpis faktorových experimentů a výsledky přípravy hydrolyzátů a želatin z kuřecích běháků

	<b>A<sup>a</sup></b> (%)	<b>B</b> (°C)	<b>C</b> (h)	<b>V1</b> (%)	<b>ML1</b> (%)	<b>V2</b> (%)	<b>ML2</b> (%)	<b>PG</b> (Bloom)	<b>V</b> (%)
1	1	60	1	11,3	22,0	23,5	1,06	0	34,8
2	1	60	4	11,6	20,8	37,7	0,99	0	49,3
3	1	90	1	11,5	27,9	34,0	1,23	167	45,5
4	1	90	4	11,8	22,8	38,9	0,67	56	50,7
5	5	60	1	17,7	28,3	48,2	1,41	0	65,9
6	5	60	4	17,3	27,7	54,4	0,58	0	71,7
7	5	90	1	17,5	29,2	39,0	0,99	105	56,5
8	5	90	4	17,9	30,2	45,6	0,58	78	63,5
9	3	75	2,5	13,6	25,4	38,5	1,17	148	52,1

a–vztaženo na hmotnost sušiny suroviny, A–faktor A (množství enzymu), B–faktor B (teplota extrakce), faktor C (doba extrakce), V1–výtěžek hydrolyzátu po 1. stupni, V2–výtěžek hydrolyzátu po 2. stupni, ML1–obsah min. látek po 1. stupni, ML2–obsah min. látek po 2. stupni, PG–pevnost gelu, V–celkový výtěžek hydrolyzátu

Z tab. 29 je patrné, že zvyšující se množství enzymu při konstantní teplotě zvyšuje výtěžek. Při dolním limitu extrakční teploty (60 °C) a při přidavku enzymu > 3 % je stupeň konverze vyšší, než u horního limitu extrakční teploty (90 °C), delší doba extrakce (4 h) má vyšší vliv na stupeň konverze, než kratší doba extrakce (1 h), se zvyšující se extrakční teplotou při extrakční době 1 h je stupeň konverze stejný a po 4-h extrakci mírně klesá. Dále je zřejmé, že se zvyšujícím se přidavkem enzymu při 60 °C nebyly připraveny želatiny (0 Bloom). Při horním limitu extrakční teploty (90 °C) pevnost želatinových gelů mírně klesá s rostoucím přidavkem enzymu. Nejvyšší pevnost gelu (cca 150

Bloom) byla dosažena při centrálním experimentu (3 % enzymu a 75 °C). Po 1-h extrakci pevnost gelu mírně klesá se zvyšujícím se přídatkem enzymu, přičemž je vyšší, než po 4 h extrakci, kde naopak se zvyšujícím se přídatkem enzymu se pevnost mírně zvyšuje. U obou limitních hodnot doby extrakce (1 a 4 h) pevnost gelu roste se zvyšující se teplotou – z nulových hodnot při 60 °C až na cca 70 Bloom po 4-h extrakci, resp. na cca 135 Bloom po 1-h extrakci. Připravené želatiny/hydrolyzáty mají velmi nízký obsah min. látek, 0,58–1,41 % (vztaženo na sušinu), čímž jsou splněny požadavky na potravinářské a farmaceutické produkty.

## 5.6 Mikrobiální kontaminace želatin

Tab. 30 znázorňuje výsledky testování mikrobiální kontaminace 4 typů komerčních vepřových a hovězích (vzorky A-D) želatin, 5 typů připravených kuřecích (vzorky F-J) želatin a hydrolyzátu připraveného z kuřecích běháků (vzorek E). Dále byla otestována želatina připravená z kuřecích hlav, která byla sterilizována při teplotě 95 °C po dobu 5 min. Pro testování byly použity 3 typy živných pūd: TSA (Trypton soya agar), XLD (Xylose Lysine Deoxycholate Agar) a VRBL (Violet Red Bile Agar with Lactose).

Byly připraveny 4 vzorky želatin extrahovaných z kuřecích hlav za odlišných podmínek extrakce (teplota a čas), u kterých byla změřena pevnost gelu. Dále byl připraven vzorek želatiny vyextrahované z kuřecích běháků a vzorek hydrolyzátu z kuřecích běháků.

Podle nařízení Evropské komise, Evropského lékopisu a GME nesmí být v želatině přítomna bakterie *Salmonella* (Tab. 31). Evropská komise nestanovila povolené limity pro další typy bakterií, kvasinek nebo plísni ani pro celkový obsah aerobních bakterií. Podle EF a GME nesmí želatina také obsahovat *E. coli* a celkový obsah aerobních bakterií max 1000 CFU (colony-forming unit)/g. EF stanovila povolený obsah kvasinek a plísni na max 100 CFU/g a podle GME byl stanoven povolený limit pro anaerobní spóry redukující siřičitany na max 10 CFU/g. Pouze jeden vzorek želatiny nebyl mikrobiálně kontaminovaný (vzorek D - komerční vepřová želatina – pevnost gelu 260 Bloom). 6 vzorků z 12 obsahovalo bakterii *Acinetobacter baumannii*. Jedná se o multirezistentní gramnegativní kmen bakterie, vyskytující se zcela běžně v přírodě ve vodě, půdě, či v zdravotnických zařízeních. Pro zdravého člověka nepředstavuje zdravotní nebezpečí, u oslabených, či starých jedinců může vyvolat zápal plic, sepsi a záněty. Tato bakterie byla detekována v obou komerčních hovězích želatinách i jako jediná ve vysterilizované želatině, což znamená, že sterilizace nebyla účinná z důvodu mírných podmínek. Vzorek A (Halal hovězí želatina) obsahoval kromě *Acinetobacter baumannii* také *Bacillus cereus*, což je endemická, fakultativně anaerobní, grampozitivní, beta-hemolytická bakterie z čeledi *Bacillaceae*. *Bacillus cereus* je častý kontaminant potravin a může způsobovat otravu jídlem.

Tab. 30. Výsledky testování mikrobiální kontaminace

Vzorek	Typ živné půdy/počet kolonií			Vyizolovaný druh bakterie
	TSA	ESA	VRBL	
želatina A	1,12±0,10	0,00	0,00	<i>Acinetobacter Baumannii</i> , <i>Bacillus Cereus</i>
želatina B	2,06±0,02	0,00	0,00	<i>Acinetobacter Baumannii</i>
želatina C	0,00	4,32±0,06	0,00	<i>Salmonella Sp.</i> ,
želatina D	0,00	0,00	0,00	
Kuřecí hydrolyzát E	4,46±0,11	0,00	1,37±0,03	<i>Bacillus Cereus</i> , <i>Pseudomonas Putida</i>
Kuřecí želatina F	1,45±0,08	0,00	0,00	<i>Acinetobacter Baumannii</i>
Kuřecí želatina G	4,68±0,12	0,00	4,47±0,03	<i>Brevibacillus Agri</i>
Kuřecí želatina H	4,77±0,15	1,31±0,06	4,51±0,06	<i>Acinetobacter Baumanii</i> , <i>Salmonella Sp.</i>
Kuřecí želatina I	4,60±0,2	0,00	0,00	<i>Exiguobacterium Sp</i>
Kuřecí želatina J	4,63±0,15	0,00	1,30±0,06	<i>Exiguobacterium Sp</i>
Sterilní želatina	0,00	0,00	1,32±0,09	<i>Acinetobacter Baumanii</i>

A-Halal (komerční hovězí želatina, pevnost gelu: 260 Bloom), B-D529 (komerční hovězí želatina, 260 Bloom), C-D526 (komerční vepřová želatina, 200 Bloom), D-DO12 119 (komerční vepřová želatina, 260 Bloom), E-CFH (hydrolyzát z kuřecích běháků) - 45 °C, 60 min, 0B (podmínky extrakce, pevnost gelu), F-CFG (želatina z kuřecích běháků) - 80 °C, 45 min, 250B, G-CHG (želatina z kuřecích hlav) - 60 °C, 1h, 100B, H-CHG (želatina z kuřecích hlav) - 85 °C, 4h, 82B (2. extrakce), I-CHG (želatina z kuřecích hlav) - 65 °C, 4h, 21B J-CHG - 85 °C, 2h, 15B (2. extrakce)

Vyskytuje se zejména na rýži či v těstovinách. V případě, že se nakažené potraviny nedostatečně tepelně opracují (méně nebo rovno 100 °C), začnou spóry bakterií důsledkem tepelného šoku klíčit. Tato bakterie byla také zjištěna ve vzorku E (hydrolyzát z kuřecích běháků) společně s *Pseudomonas putida*, což je gramnegativní saprotrofní půdní bakterie ve tvaru tyčinky z rodu Pseudomonáda. V přírodě jsou velice hojné a díky své přizpůsobivosti osídlují velmi rozmanitá místa. Některé druhy způsobují i onemocnění rostlin a živočichů včetně člověka; nejnebezpečnějším původcem lidských onemocnění mezi nimi je *Pseudomonas aeruginosa*. Co se týká vlastností, jsou pohyblivé a tyčinkovitého tvaru, obvykle aerobní a netvořící spory. Tato bakterie nebyla obsažena v dalších vzorcích. Vzorek G (želatina připravená z kuřecích hlav)

obsahoval jako jediný *Brevibacillus agri*, což je bakterie z rodu *Brevibacillus*. Jendá se o rod grampozitivních bakterií z čeledi *Paenibacillaceae*. Vzorky I a J (želatina připravená z kuřecích hlav) obsahovaly jako jediné pouze *Exiguobacterium sp.* *Exiguobacterium* je rod bacilů a člen kmene *Firmicutes*. Byly nalezeny v oblastech pokrývajících široký rozsah teplot (-12 až 55 °C), včetně ledovců v Grónsku a horkých pramenech v Yellowstone, a byly izolovány v permafrostu na Sibíři. Některé kmeny kromě schopnosti dynamické tepelné adaptace jsou také halotolerantní, mohou růst v širokém rozmezí hodnot pH (5 až 11), tolerovat vysoké úrovně UV záření a působení těžkých kovů (včetně arsenu).

Tab. 31. Maximální povolené mikrobiální limity v želatině podle nařízení Evropské komise, Evropského lékopisu a GME (Gelatine Manufacturer of Europe) (GME Monografie 2020)

	<b>Potravinářská směrnice EC/2073/2005</b>	<b>Evropský lékopis (Ph. Eur. 11th Edition.)</b>	<b>GME nařízení pro potravinářskou želatinu</b>
Celkový počet aerobních bakterií	-	max1000 CFU/g	<1000 CFU/g
<i>E.coli</i>	-	Absence/g	Absence/10g
Anaerobní sulfit-redukující spóry	-	-	<10 CFU/g
Plísňe a kvasinky	-	max100 CFU/g	-
<i>Salmonella</i>	(n=5) Absence/25g	Absence/10g	Absence/25g

CFU – Colony forming unit (jednotky tvořící kolonie)

Vzorek H (želatina připravená z kuřecích hlav) obsahoval kromě *Acinetobacter baumannii* také *Salmonella sp.* *Salmonella* je rod gramnegativních bakterií z čeledi Enterobacteriaceae, jehož zástupci způsobují onemocnění člověka a zvířat. Jedná se o gramnegativní, fakultativně anaerobní, nesporotvorné, většinou pohyblivé, rychle rostoucí bakterie, nenáročné na podmínky. Mezi nejvýznamnější onemocnění člověka způsobené salmonelami patří břišní tyfus, břišní paratyfus a salmonelóza z potravin. Zjištění této nebezpečné bakterie znamená, že tento vzorek želatiny nesplňuje stanovený limit Evropské komise, Evropské farmakopéi i GME a je tedy zdravotně závadný. Tato bakterie byla zjištěna i ve vzorku C (komerční vepřová želatina,



pevnost gelu 200 Bloom). Doyle a kol. (2019); Adams (2015); Willey a kol. (2022).

Výsledky ukázaly, že žádná z testovaných želatin neobsahuje bakterii *E. Coli*, což znamená, že jedna podmínka nezávadnosti byla splněna. Druhá podmínka: absence bakterie *Salmonella* nebyla splněna u jednoho vzorku připravené želatiny (vzorek H) a u jednoho vzorku komerční želatiny (vzorek C). Pouze jeden vzorek (komerční želatina – vzorek D) neobsahovala žádný mikroorganismus. Plísně či kvasinky nebyly nalezeny v žádném ze vzorků. Vzorek vysterilizované kuřecí želatiny také obsahoval jeden kmen bakterie (*Acinetobacter baumannii*), což znamená, že podmínky sterilizace nebyly dostatečně účinné. Limit celkového počtu aerobních bakterií (max. 1000 CFU/g) byl překročen v případě 4 ze 7 vzorků kuřecích želatin i u kuřecího hydrolyzátu. Jeden vzorek komerční želatiny také obsahoval větší než povolený limit celkového počtu aerobních bakterií, konkrétně Salmonelly.

## 6. PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI

Vedlejší drůbeží produkty, které vznikají při porážce a zpracování drůbežího masa jsou produkovány v neustále se zvyšujícím množství, vzhledem k rostoucí poptávce po drůbežím mase související s globálním růstem populace. Takové produkty (např. kuřecí kůže, běháky či hlavy) obsahují bílkovinu kolagen, kterou lze vhodným postupem z tkáně vyextrahovat a připravit tak želatinu. Želatina je produkt s přidanou hodnotou s širokými možnostmi uplatnění např. v potravinářském, farmaceutickém nebo kosmetickém průmyslu. Tradičně je želatina vyráběna z vepřových nebo hovězích zdrojů, v poslední době je na trhu k dispozici také rybí želatina, zatímco drůbeží želatinu evropský či americký trh nenabízí. Zatímco hovězí nebo vepřová želatina není akceptována některými náboženstvími, drůbeží želatina nemá v tomto směru žádná omezení. Rovněž nemoci skotu mohou způsobovat jisté obavy spotřebitelů. Při výrobě želatiny jsou tradičně využívány chemické látky, jako jsou alkálie či kyseliny, které zatěžují životní prostředí. Využití biochemického procesu při přípravě želatiny, při kterém jsou chemikálie nahrazeny enzymem, představuje oproti tomu moderní ekologickou alternativu výroby želatiny. Další výhodou oproti velmi rozšířenému alkalickému opracování suroviny, které trvá v řádu několika dnů až měsíců, je enzymové opracování výrazně kratší. I přes relativně vyšší ceny enzymů je tento proces levnější, neboť je použito pouze velmi malé množství enzymu. Jak ukázaly dosavadní výsledky této studie, připravené kuřecí želatiny nabízejí srovnatelné vlastnosti s běžnými komerčními želatinami, a tudíž mohou najít uplatnění na trhu. Při studii byly využity faktorové experimenty, které umožňují nalezení ideálních technologických parametrů použitých při extrakci želatiny, jako je např. doba nebo teplota extrakce, a tedy navržení optimálních technologických podmínek procesu tak, aby bylo dosaženo optimální kvality želatiny a současně výtěžku.

## 7. ZÁVĚR

Práce se zabývá využitím drůbežích vedlejších produktů a jejich přeměnou na komerčně využitelný produkt, konkrétně želatinu, která je pro své výjimečné gelační, emulgační, pěnotvorné a další vlastnosti hojně využívána v mnoha průmyslových odvětvích, např. v potravinářství, farmacii či kosmetice. Bylo vytipováno několik druhů vedlejších produktů s potenciálem vysokého obsahu kolagenu, proteinu, který je základní surovinou pro přípravu želatiny. Konkrétně se jedná o kůže, běháky, hlavy, u kterých byly provedeny testy za účelem zjištění obsahu sušiny, obsahu bílkovin, tuků a minerálních látek v sušině a podílu kolagenu z obsahu bílkovin. Pro detailnější studium dalšího zpracování a testování byly zvoleny kuřecí běháky (nízký obsah tuku, snadnost zpracování) a kůže (nízký obsah minerálních látek, vhodnost pro potravinářské aplikace), u kterých bylo nejprve nutné provést separaci doprovodných látek (nekolagenní bílkoviny, pigmenty a tuky).

Na základě rešerší byl navržen proces přečištění kolagenu odstraněním pigmentů a nekolagenních bílkovin z tkáně opracováním v roztocích NaCl a NaOH; následně byly testovány možné metody odtučnění, např. využití rozpouštědel nebo lipolytických enzymů. Jako nejúčinnější se ukázal proces odtučnění pomocí směsi rozpouštědel petrolether a ethanol v poměru 1:1. Poté co bylo provedeno přečištění suroviny, následovala předúprava tkáně s využitím proteolytických enzymů, a nakonec finální extrakce želatiny ve vodě při zvýšené teplotě. Kvalita připravených kuřecích želatin byla hodnocena zejména podle pevnosti želatinového gelu, ale také byly testovány další funkční vlastnosti želatin: vaznost vody a tuku, emulzifikační a pěnotvorné vlastnosti, viskozita želatinového roztoku a čírost.

S využitím faktorových experimentů byly připraveny želatiny z kuřecích běháků (CFG); byl sledován vliv množství enzymu při předúpravě, doby předúpravy a doby extrakce na pevnost gelu, viskozitu a obsah minerálních látek. Byly navrženy optimální technologické podmínky (množství enzymu 0,4 %, doba předúpravy 20 h, doba extrakce 45 min při teplotě extrakce 80 °C) zajišťující vysokou pevnost gelu (cca 300 Bloom) i viskozitu (cca 7 mPa.s) želatin při poměrně vysokém výtěžku (cca 20 %). Obsah minerálních látek <2 % splňuje farmaceutické standardy pro čistotu želatin. U CFG připravené podle optimálních podmínek byly otestovány další funkční vlastnosti (vaznost vody a tuku, emulzifikační/pěnotvorná kapacita/stabilita, čírost, teplota tání a teplota gelace). Rovněž byla otestována tepelná stabilita CFG gelu při různých teplotách a relativních vlhkostech. Byly rovněž otestovány běžně dostupné komerční savčí želatiny (vepřové a hovězí) a výsledky byly porovnány. S výjimkou čírosti byly při všech měřeních zjištěny srovnatelné anebo lepší hodnoty CFG v porovnání s komerčními želatinami.

Další část výzkumu probíhala na kuřecích hlavách (CHG). Byl sledován vliv 3 faktorů: doby enzymové předúpravy, množství enzymu a doby extrakce na

výtěžek a vlastnosti želatin. Teplota extrakce byla 80 °C. Byly navrženy optimální technologické podmínky (množství enzymu 0,8 %, doba předúpravy 24 h, doba extrakce 45 min při teplotě extrakce 80 °C) zajišťující vysokou pevnost gelu (cca 277 Bloom) i viskozitu (cca 9,5 mPa.s) při výtěžku 23 %.

Poté byl výzkum zaměřen na přípravu želatin z kuřecích kůží (CSG). Nejprve byly provedeny základní experimenty, ve kterých byl sledován vliv extrakční teploty (40–80 °C) na funkční vlastnosti želatin. Nejvyšší vaznost tuku byla dosažena při teplotě 60 °C (1,26 g/g), zatímco nejvyšší pevnost gelu byla dosažena při teplotě 40 °C a 50 °C (cca 350 Bloom). Naopak nejvyšší viskozita (5,7 mPa.s), čirost (1,95 %), vaznost vody (5,58 g/g) a pěnotvorná kapacita (61,2 %) byly dosaženy při teplotě 80 °C. Byly provedeny testy tepelné stability CSG gelu a výsledky porovnány s komerčními želatinami, přičemž byly naměřeny vyšší, nebo srovnatelné hodnoty CSG a komerčních želatin.

V další fázi byly navrženy kombinované faktorové experimenty, ve kterých byla připravena CSG 2-stupňovou extrakcí a byl sledován vliv 4 faktorů (množství enzymu během předúpravy, extrakční teploty v prvním a druhém stupni extrakce a extrakční doby) na výtěžek a vlastnosti CSG spojené s gelací (pevnost gelu, viskozita, teplota tání a teplota gelace). Nejvyšší výtěžek (31,5 %) byl dosažen za následujících extrakčních podmínek: enzym 0,8 %, teplota 80 °C, čas 30 min (1. extrakce) a 0,8 % / 90 °C / 60 min (2. extrakce). Nejvyšší pevnost gelu (190 Bloom), viskozita (4,1 mPa.s), teplota tání (38,3 °C) a gelace (20,5 °C) byly dosaženy při 0,2 % / 50 °C / 30 min (1. extrakce). Takové podmínky se dají označit za optimální pro přípravu želatin z kuřecí kůže. Byly rovněž porovnány vlastnosti připravených kuřecích želatin (CSG), komerčních želatin, i želatin připravených v podobně zaměřených studiích, přičemž byly zjištěny vlastnosti CSG minimálně srovnatelné s komerčními i laboratorně připravenými želatinami (s výjimkou čirosti).

Výsledky studie ukázaly, že biotechnologický způsob přípravy kuřecí želatiny může být vhodnou alternativou k tradičním způsobům předúpravy (kyselá nebo alkalická) používanými při výrobě želatin. Vedlejší drůbeží produkty (např. kuřecí běháky nebo kůže) je možné využít jako suroviny pro přípravu produktů s potenciálem dalšího komerčního využití, konkrétně želatin s vlastnostmi, které jsou srovnatelné s komerčními želatinami, a tudíž mohou najít uplatnění zejména v potravinářství, nebo v kosmetickém průmyslu či farmacii. Za určitých podmínek lze připravit hydrolyzáty (nulová pevnost gelu), které mohou mít využití ve fotografickém průmyslu při přípravě emulzí, v zemědělství do krmiv pro hospodářská zvířata nebo jako růstový stimulant v zemědělství.

Další výzkum by se měl zaměřit např. na přípravu želatin z dalších kuřecích vedlejších produktů (např. žaludků nebo kostí), vedlejších produktů z jiných druhů drůbeže či ryb. Pozornost by také měla být zaměřena na způsob filtrace připravené želatiny, tak aby bylo dosaženo její větší čirosti, testování dalších typů enzymů, vhodných pro použití v procesu výroby želatin jak při předúpravě, tak i při odtučnění výchozí suroviny.

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABEDINIA, A., NAFCHI, A. Extraction and characterization of gelatin from the feet of peking duck (*Anas platyrhynchos domestica*) as affected by acid, alkaline, and enzyme pretreatment. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, vol. 96, p. 586–594. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.139>

ABEDIN, M. Z. RIEMSCHEIDER, R. Chicken skin collagen molecular diversity and susceptibility to neutral proteinases. *Pharmaceutical Industry*, 1984, vol. 46, p. 532–535.

ADAMS, M.M. Food Microbiology. *Royal Society of Chemistry*, 2015, p. 562, ISBN: 9781849739603

AHMAD, M., BENJAKUL, S. Characteristics of gelatin from the skin of *Unicorn leatherjacket* (*Aluterus monoceros*) as influenced by acid pretreatment and extraction time. *Food Hydrocolloids*, 2011, vol. 3, p. 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.12.008>

AHMAD, T. et al. Recent advances on the role of process variables affecting gelatin yield and characteristics with special reference to enzymatic extraction: a review. *Food Hydrocolloids*, 2017, vol. 63, p. 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.007>

ALBERTS, B. et al. Molecular biology of the cell. Garland Publishing, New York and London, 1983, p. 146, ISBN 0-8240-7282-7282-0

ALEMÁN, A. et al. Enzymatic hydrolysis of fish gelatin under high pressure treatment. *International Journal of Food Science and Technology*, 2011, vol. 46, p. 1129–1136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02590.x>

ALMEIDA, P.F., LANNES, S.C.S. Extraction and physicochemical characterization of gelatin from chicken by-product, *Journal of Food Processing Engineering*, 2013, vol. 36, p. 824. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12051>

ALMEIDA, P.F.D. et al. Production of a product similar to gelatine from chicken feet collagen. *Engenharia Agrícola*, 2013, vol. 33, p. 1289–1300. <https://doi.org/10.1590/S0100-69162013000600021>

ANTONY, J. Design of experiments for engineers and scientists, 1st ed.; Butterworth-Heinemann: Oxford, UK, 2003, p. 54–70. ISBN 978-0-7506-4709-

AOAC–Determination of moisture content. In: Official methods of analysis. The Association of Official Analytical Chemists, 17th ed., Gaithersburg, Md, USA, 2000, ISBN-13 978-093558467-7

ARNESEN, J. A., GILDBERG, A. Extraction and characterisation of gelatine from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin. *Bioresource Technology*, 2007, vol. 98, p. 53–57. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.11.021>

ARUMUGAM, G.K.S. et al. Extraction, optimization and characterization of collagen from sole fish skin. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 2018, vol. 9, p. 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2018.04.003>

ASGHAR, A., HENRICKSON, R.L. Chemical, biochemical, functional, and nutritional characteristics of collagen in food systems. *Advances in Food Research*, 1982, vol. 28, p. 231–372. [https://doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60113-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60113-5)

AYKIN–DINCER, E., et al. Extraction and physicochemical characterization of broiler (*Gallus gallus domesticus*) skin gelatin compared to commercial bovine gelatin. *Poultry Science Volume*, vol 96, p. 4124–4131. <https://doi.org/10.3382/ps/pex237>

BAILEY, A.J. Connective tissue in meat and meat products, 19<sup>th</sup> ed., Elsevier Applied Science, 1989, ISBN 1851662847.

BARRETT, A.J. et al., Handbook of proteolytic enzymes, 2<sup>nd</sup> ed., Boston: Elsevier Academic Press, 2004, ISBN 0120796139.

BAYNES, J., DOMINICZAK, M.H. The extracellular matrix, *Medical biochemistry*, 2004, p. 712.

BHASKARACHARYA, R.K. et al. Selected applications of ultrasonics in food processing. *Food Engineering Reviews*, 2009, vol. 1, p. 31–49. <https://doi.org/10.1007/s12393-009-9003-7>

BORROWS, N.D., HARVEY, S., IDESIS, F.A., MURPHY C.J. Understanding the seed-mediated growth of gold nanorods through a fractional design of experiments. *Langmuir*, 2017, vol. 33, p. 1891–1907, <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b03606>

BICHUKALE, A.D. et al. Functional properties of gelatin extracted from poultry skin and bone waste. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 2018, vol. 6, p. 87–101. <http://dx.doi.org/10.18782/2320-6768>

BRINCKMANN, J. et al. Collagen - topics in current chemistry. Springer, Berlin, Heidelberg, 2005, vol 247, p. 1–6. <https://doi.org/10.1007/b103817>

CEBI, N. et al. An evaluation of Fourier transforms infrared spectroscopy method for the classification and discrimination of bovine, porcine and fish gelatines. *Food Chemistry*. 2016, vol. 190, p. 1109–1115. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.065>

CHAGNOT, C. Bacterial adhesion to animal tissues: protein determinants for recognition of extracellular matrix components, *Cellular Microbiology*, 2012, vol. 14, p. 1687–1696. <https://doi.org/10.1111/cmi.12002>

CHATTERJEE, S., BOHIDAR, H.B. Effect of cationic size on gelation temperature and properties of gelatin hydrogels, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2005, vol. 35, p. 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2005.01.002>

CHAKKA, A.K. et al. Poultry processing waste as an alternative source for mammalian gelatin: Extraction and characterization of gelatin from chicken feet using food grade acids. *Waste and Biomass Valorization*, 2017, vol. 8, p. 2583–2593. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9756-1>

CHENG, F.Y. et al. Effect of different acids on the extraction of pepsin-solubilised collagen containing melanin from silky fowl feet. *Food Chemistry*, 2009, vol. 113, p. 563–567. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.043>

CHOBERT, J.M. Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1988, vol. 36, p. 883–892. <https://doi.org/10.1021/jf00083a002>

CHOE, J., KIM, H.Y. Effects of chicken feet gelatin extracted at different temperatures and wheat fiber with different particle sizes on the physicochemical properties of gels. *Poultry Science Journal*, 2018, vol. 97, p. 1082–1088. <https://doi.org/10.3382/ps/pex381>

CHOI, S.S., REGENSTEIN, J.M. Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatine. *Journal of Food Science*, 2000, vol. 65, p. 194–199. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb15978.x>

CHOMARAT, N. et al. Comparative efficiency of pepsin and proctase for the preparation of bovine skin gelatin. *Enzyme and Microbial Technology*, 1994, vol. 16, p. 756–760. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90032-9](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90032-9)

CLICHÉ, S. et al. Extraction and characterization of collagen with or without telopeptides from chicken skin. *International Journal of Poultry Science*, 2003, vol. 82, p. 503–509. <https://doi.org/10.1093/ps/82.3.503>

COPPOLA, M. Unified phase diagram of gelatin films plasticized by hydrogen bonded liquids, *Polymer*, 2012, vol. 53, p. 1483–1493. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2012.02.016>

DAMODARAN, S., PARKIN, K.L. *Química de alimentos de fennema*. 2018, Artmed Editora, p. 1120. ISBN: 9788582715451

DAMRONGSAKKUL, S. et al. Enzymatic hydrolysis of rawhide using papain and neutrase. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2008, vol. 14, p. 202–206. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2007.09.010>

DARMANTO, Y.S. et al. The effect of fish bone collagens in improving food quality. *International Food Research Journal*, 2014, vol. 21, p. 891–896.

DASH, R. et al. Improving the mechanical and thermal properties of gelatin hydrogels cross-linked by cellulose nanowhiskers. *Carbohydrate Polymers*, 2013, vol. 91, p. 638–645. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.080>

DHAKAL, D. et al. Optimization of collagen extraction from chicken feet by papain hydrolysis and synthesis of chicken feet collagen based biopolymeric fibres. *Food Bioscience*, 2018, vol. 23, p. 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.03.003>

DJAGNY, K.B. et al. Gelatin: a valuable protein for food and pharmaceutical industries: Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2001, vol. 4, p. 481–492. <https://doi.org/10.1080/20014091091904>

DOYLE, M.P. et al. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 5th Edition. 2019, American Sociaty for Microbiology, p. 1093, ISBN: 9781683670476

DU, L. et al. Physicochemical and functional properties of gelatins extracted from turkey and chicken heads. *Poultry Science*, 2013, vol. 92, p. 2463–2474. <https://doi.org/10.3382/ps.201303161>

DUNCONSEILLE, A. et al. Gelatine structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review. *Food Hydrocolloids*, 2015, vol. 43, p. 360–376. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.06.006>

EE, S. et al. Properties of chicken head gelatins as affected by extraction method. *International Food Research Journal*. 2019, vol. 26, p. 499–508. <http://psasir.upm.edu.my/id/eprint/68872/>

EYRE, D.R. Collagen cross-links Topics in Current Chemistry, 2005, vol. 247 p. 207–229.

ELHARFAOUI, N. et al. Molecular weight influence on gelatin gels: structure, enthalpy and rheology. *Macromolecular Symposia*, 2007, vol. 256, p. 149–157. <https://doi.org/10.1002/masy.200751017>

European Pharmacopoeia 9.0. European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care, Edom: Strasbourg, France, 2017, ISBN 978-3-7692-7453-0

Eurostat Statistics Explained, *Meat Production Statistics*. [cit. 2017-03-13] dostupné z: [http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Meat\\_production\\_statistics#Poultry\\_meat](http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Meat_production_statistics#Poultry_meat)

FAOSTAT (Food and Agricultural Organization: Livestock statistics, [cit. 14. 3. 2019]. dostupné z: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>.

FERRARO, V. et al. The “sisters”  $\alpha$ -helices of collagen, elastin and keratin recovered from animal by-products: functionality, bioactivity and trends of application. *Trends In Food Science & Technology*, 2016, vol. 51, p. 65–75.

FINER, E.G. et al. Gel formation from solutions of single-chain gelatin. *Biopolymers*, 1975, vol. 14, p. 1995–2005. <https://doi.org/10.1002/bip.1975.360141002>

FONKWE, L.G., SINGH, R.K. Production and characterization of gelatinous protein extracts from turkey deboner residue. *Process Biochemistry*, 1997, vol. 32, p. 309–318. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(96\)00087-8](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(96)00087-8)

FUKUDA, I.M., PINTO, C.F.F., MOREIRA, C.D.S., SAVIANO, A.M., LOURENCO, F.R. Design of Experiments (DoE) applied to pharmaceutical and analytical quality by design (QbD). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, vol. 54, p. 121–135. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902018000001006>

GEORGE, N. et al. Physical, mechanical, and barrier properties of carp and mammalian skin gelatin films. *Journal of Food Science*, 2010, vol. 9, p. 620–626. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01851.x>.

GIMENEZ, B. et al. Storage of dried fish skins on quality characteristics of extracted gelatin. *Food Hydrocolloids*, 2005, vol. 19, p. 958–963. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.12.012>



GME Monograph. Standardised Methods for the Testing of Edible Gelatine. 2020. version 15 [cit. 2021-11-10]. Dostupné z: [https://www.gelatine.org/fileadmin/user\\_upload/gme\\_content/GME\\_Statements/GME\\_gelatine\\_Monograph-version\\_15\\_-\\_October\\_2020\\_-\\_short\\_version.pdf](https://www.gelatine.org/fileadmin/user_upload/gme_content/GME_Statements/GME_gelatine_Monograph-version_15_-_October_2020_-_short_version.pdf)

GMIA–Standard Testing Methods for Edible Gelatin. 2019. [cit. 2020-11-26]. Dostupné z: [http://www.gelatingmia.com/uploads/1/1/8/4/118450438/gmia\\_official\\_methods\\_2019.pdf](http://www.gelatingmia.com/uploads/1/1/8/4/118450438/gmia_official_methods_2019.pdf)

GODARD, P. et al. Crystallization and melting of aqueous gelatin. *Journal of Polymer Science: Polymer Physics edition*, 1978, vol. 16, p. 1817–28. <https://doi.org/10.1002/pol.1978.180161009>

GÓMEZ–GUILLÉN, M.C. et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: a review. *Food Hydrocolloids*, 2011, vol. 25, p. 1813–1827. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>

Grand View Research. 2019. Gelatin Market Size, Share & Trends Analysis Report by Raw Material (Pig Skin, Cattle Bones), by Function (Stabilizer, Gelling Agent), By Application (Photography, Food & Beverage), and Segment Forecasts, 2019–2025, p. 300. Report Id: 978-1-68038-110-8

GRAZZIOTIN, A. et al. Production of feather protein hydrolysate by keratinolytic bacterium *Vibrio* sp. strain KR2. *Bioresource Technology*, 2007, vol. 98, p. 3172–3175. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.034>

GRESHAM, R.M. Viscosity: A fluid resistance to flow, *Tribology and Lubrication Technology*, 2008, vol 64, p. 55. <https://www.proquest.com/docview/226962231/fulltextPDF/3DCC02447C7C4962PQ/1?accountid=15518GUO>,

GUO, L. et al. Kinetics of triple helix formation in semidilute gelatin solutions *Macromolecules*, 2003, vol 36, p. 9999–10008. <https://doi.org/10.1021/ma034264s>

HADDAR, A., et al. Alkaline proteases produced by *Bacillus licheniformis* rpl grown on shrimp wastes: application in chitin extraction, chicken feather degradation and as a dehairing agent. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2011, vol. 16, p. 669–678. <https://doi.org/10.1007/s12257-010-0410-7>

HARRINGTON, W.F., RAO, N.V. Collagen structure in solution. I. Kinetics of helix regeneration in single-chain gelatins. *Biochemistry*, 1970, vol. 19, p. 3714–24. <https://doi.org/10.1021/bi00821a010>

HAUG, I.J., DRAGET, K.I. Gelatin. in: Handbook of hydrocolloids. Phillips GO, Williams PA (eds). Woodhead Publishing, Cambridge, England, 2009, p. 142–163. ISBN: 9781845695873

HOQUE, M.S. et al. Effect of heat treatment of film-forming solution on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. *Journal of Food Engineering*, 2010, vol. 96, p. 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.06.046>

HOWE, A.M. Some aspects of colloids in photography. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 200, vol. 5, P. 288–300. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(00\)00068-6](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(00)00068-6)

HUDA, N. et al. Preliminary study on physicochemical properties of duck feet collagen. *International Journal of Poultry Science*, 2013, vol. 12, p. 615. <https://doi.org/10.3923/ijps.2013.615.621>

ISO Standard 937–1978: *Meat and meat products - Determination of nitrogen content*.

ISO Standard 3496–1994: *Meat and meat products - Determination of L(-) hydroxyproline content (Reference method)*.

JAIN, S., ANAL, A.K. Optimization of extraction of functional protein hydrolysates from chicken egg shell membrane (ESM) by ultrasonic assisted extraction (UAE) and enzymatic hydrolysis. *LWT - Food Science and Technology*, 2016, vol. 69, p. 295–302. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.057>

JAYATHILAKAN, K. et al. Utilization of by-products and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 2012, vol. 49, p. 278–293. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0290-7>

JOHNSTON–BANK, F.A. From tannery to table: an account of gelatin production. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 1983, vol. 68, p. 141–145.

JONGJAREONRAK. A. et al. Skin gelatin from bigeye snapper and brownstripe red snapper: chemical compositions and effect of microbial transglutaminase on gel properties. *Food hydrocolloids*, 2006, vol. 20, 1216–1222. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.01.006>

JRIDI, M. et al. Chemical and biophysical properties of gelatins extracted from the skin of octopus (*Octopus vulgaris*). *LWT-Food Science and Technology*, 2015, vol. 60, p. 881–889. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.057>

KACANIOVA, M. et. al. Rapid identification of enterobacteriaceae in milk and dairy products with the matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*, 2017, vol. 50, p. 41–46. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12729>

KAERUANG, P. et al. Physicochemical and functional properties of gelatin from the skin of *Unicorn leatherjacket (Aluterus monoceros)* as affected by extraction conditions. *Food Bioscience*, 2013, vol. 2, p. 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2013.03.002>

KARAYANNAKIDIS, P.D., ZOTOS, A. Fish processing byproducts as a potential source of gelatine: A review. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2014, 25, vol. 1, p. 65–92 <https://doi.org/10.1080/10498850.2013.827767#.U8TpaV6KDIU>

KAUR, M. et al. Determining the molar mass of a plasma substitute succinylated gelatin by size exclusion chromatography multi-angle laser light scattering, sedimentation equilibrium and conventional size exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2002, vol. 957, p. 139–148. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00350-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00350-3)

KENNEDY, M., KROUSE, D. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1999, vol. 23, p. 456–75. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02087>

KITTIPHATTANABAWON, P. et al. Gelatin hydrolysate from blacktip shark skin prepared using papaya latex enzyme: antioxidant activity and its potential in model systems. *Food Chemistry*, 2012, vol. 135, p. 1118–1126. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.080>

KIM, H.W. et al. Effect of duck feet gelatin concentration on physicochemical, textural, and sensory properties of duck meat jellies. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 2014, vol. 34, p. 387–394. <http://dx.doi.org/10.5851/kosfa.2014.34.3.387>

KIM, S.K., WIJESEKARA, I. Industry perspectives and commercial trends for food proteins and biopeptides. In: *Food proteins and peptides: chemistry, functionality, interactions and commercialization*. CRC Press, 2012, p. 413-415. ISBN 9780429147241

KOLI, J.M. Functional characteristics of gelatin extracted from skin and bone of *Tiger toothed croaker (Otolithes ruber)* and *Pink perch (Nemipterus japonicus)*. *Food and Bioproducts Processing*, 2012, vol. 90, p. 555–562. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.08.001>

KRISHNAMOORTHY, J. et al. Isolation and partial characterization of collagen from outer skin of *Sepia Pharaonis* from puducherry coast. *Biochemistry and Biophysics*, 2017, vol. 10, p. 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.02.006>

KUAN, Y-H. et al. Comparison of physicochemical and functional properties of duck feet and bovine gelatins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, vol. 5, p. 1663–1671. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7970>

LAPČÍK, L., PETERKOVÁ, P. Collagen - properties, modifications and applications. *Chemické listy*, 2000, vol. 94, p. 371.

LASSOUED, M. et al. Characteristics and functional properties of gelatin from thornback ray skin obtained by pepsin-aided process in comparison with commercial halal bovine gelatin. *Food Hydrocolloids*, 2014, vol. 41, p. 309–318. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.04.029>

LI, F. Amino acid composition and functional properties of collagen polypeptide from Yak (*Bos grunniens*) bone. *LWT-Food Science and Technology*, 2009, vol. 42, p. 945–949. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.12.005>

Lin, S.H. Interfacial dynamics of a gelatin solution with surfactant *Macromolecules*, 2003, vol. 36, p. 8786–8795. <https://doi.org/10.1021/ma034853y>

LIU, H. et al. Rheological properties of channel catfish gelatine from fish skins preserved by different methods. *LWT-Food Science and Technology*, 2008, vol. 41, p. 1425–1430. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.09.006>

LOSSO, J. N., OGAWA, M. Thermal stability of chicken keel bone collagen. *Journal of Food Biochemistry*, 2013, vol. 38, p. 345–351. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12059>

MAD-ALI, S. et al. Characteristics and gelling properties of gelatin from goat skin as affected by drying methods. *Journal of Food Science and Technology*, 2017, vol. 54, p. 1646–1654. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2597-5>

MARIOD, A.A. et al. Preparation and characterisation of gelatin from two Sudanese edible insects. *Journal of Food Science and Engineering*, 2011, vol. 1, p. 45–55.

MARTÍNEZ-ALVÁREZ, O. et al. Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. *Food Research International*, 2015, vol. 73, p. 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.005>

MASUELLI, M.A. Viscometric study of pectin. effect of temperature on the hydrodynamic properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2011, vol. 48, p. 286–291. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.11.014>

MASUTANI, E. et al. Increasing thermal stability of gelatin by uv-induced cross-linking with glucose. *International Journal of Biomaterials*, 2014, vol. 2014, p. 9. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/979636>

MICHON, C. et al. Influence of thermal history on the stability of gelatin gels. *International Journal of Biological macromolecules*, 1997, vol. 20, p. 259–264. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(97\)00024-X](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(97)00024-X)

MOKREJŠ, P. et al. Chicken paws by-products as an alternative source of proteins. *Oriental Journal of Chemistry*, 2017, vol. 33, p. 2209–2216. <http://dx.doi.org/10.13005/ojc/330508>

MONTERO, P., GÓMEZ-GUILLÉN, M.C. Extracting conditions for megrim (*lepidorhombus boschii*) skin collagen affect functional properties of the resulting gelatine. *Journal of Food Science*, 2000, vol. 65, p. 434–438. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb16022.x>

MRÁZEK, P. et al. Chicken skin gelatine as an alternative to pork and beef gelatines. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 2019, vol. 13, p. 224–233. <https://doi.org/10.5219/1022>

NALINANON, S. et al. Improvement of gelatin extraction from bigeye snapper skin using pepsin-aided process in combination with protease inhibitor. *Food Hydrocolloids* 2008, vol. 22, p. 615–622. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.01.012>

NASRIN, T.A.A. Physico-chemical characterization of culled plantain pulp starch, peel starch and flour. *International Journal of Food Properties*, 2015, vol. 18, p. 165–177. <https://doi.org/10.1080/10942912.2013.828747>

NELSON, D.L., COX, M.M. Lehninger's principles of biochemistry. 4th ed. New York : WH Freeman and Co., 2005, p. 1100, ISBN 0-7167-4339-6.

NETO, V.Q. Functional properties of raw and heat processed cashew nut (*Anacardium Occidentale* l.) kernel protein isolates. *Nahrung/Food*, 2001, vol. 45, p. 258–262. [https://doi.org/10.1002/1521-3803\(20010801\)45:4<258:AID-FOOD258>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1521-3803(20010801)45:4<258:AID-FOOD258>3.0.CO;2-3)

NHARI, R.M.H.R. et al. Analytical methods for gelatin differentiation from bovine and porcine origins and food products. *Journal of Food Science*, 2012, vol. 71, p. R42–R46. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02514.x>

NINAN, G.A. Comparative study on the physical, chemical and functional properties of carp skin and mammalian gelatins. *Journal of Food Science and Technology*, 2014, vol. 51, p. 2085–2091. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0681-4>

NOLLET, M.L., TOLDRÁ, F. Handbook of food analysis. Third edition. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2015, p. 1568. ISBN 1466556587

NUR HANANI, Z.A. et al. Use and application of gelatine as potential biodegradable packaging materials for food products. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, vol. 71, 94–102 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.04.027>

OFORI, J.A., HSIEH, Y-H.P. Issues related to the use of blood in food and animal feed. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2014, vol. 54, 687–697. <https://doi.org/697.10.1080/10408398.2011.605229>

OMAR, W., SARBON, N. Effect of drying method on functional properties and antioxidant activities of chicken skin gelatin hydrolysate. *Journal of Food Science and Technology*, 2016, vol. 53, p. 3928–3938. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2379-5>

PATI, F. et al. Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. *Bioresource Technology*, 2010, vol. 101, p. 3737–3742. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.133>

PITPREECHA, S., DAMRONGSAKKUL, S. Hydrolysis of raw hide using proteolytic enzyme extracted from papaya latex. *Korean Journal of Chemistry Engineering*, 2006, vol. 23, p. 972–976. <https://doi.org/10.1007/s11814-006-0017-z>

RAFIENIAN, F. et al. Optimization of gelatin extraction from chicken deboner residue using rsm method. *Journal of Food Science and Technology*, 2013, vol. 50, p. 374–380. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0355-7>

RAFIEIAN, F. et al. Physicochemical properties of gelatin extracted from chicken deboner residue. *LWT - Food Science and Technology*, 2015, vol. 64, p. 1370–1375. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.050>

RAHMAN, M.N.A.; JAMALULAIL, S.A.S.K.A. Extractions, physicochemical characterizations and sensory quality of chicken feet gelatin. *Biomedical Journal of Scientific And Technical Research*, 2012, vol. 30, p. 1–13.

RANGANATHAN, S. et al. Chitosan and gelatin-based electrospun fibers for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, vol. 133, p. 354–364. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.115>

RAWDKUEN, S. et al. Preparation and functional characterisation of fish skin gelatin and comparison with commercial gelatin. *International Journal of Food Science & Technology*. 2013, vol. 48. p. 1093–1102. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12067>

Regulation (EC) No 1069/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 Laying Down Health Rules as Regards Animal By-Products and Derived Products not Intended for Human Consumption and Repealing Regulation (EC) No 1774/2002 (Animal by-products Regulation) OJ L 300, 14.11.2009, 1-33. [cit. 2020-11-26]. Dostupné z: <http://data.europa.eu/eli/reg/2009/1069/oj> downloaded 17. 6. 2020

Robins, S.P. et al. The chemistry of collagen cross-links: age related changes in the reducible components of intact bovine collagen fibres. *Biochemical Journal*, 1973, vol. 131, p. 771–80. <https://doi.org/10.1042/bj1310771>

RODRIGUEZ-CASTELLANOS, W. et al. Nanomechanical properties and thermal stability of recycled cellulose reinforced starch-gelatin polymer composite. *Journal of Applied Polymer Science*, 2014, vol. 132, p. 1–7. <https://doi.org/10.1002/app.41787>

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, R. et al. Development of gelatin/chitosan/PVA hydrogels: thermal stability, water state, viscoelasticity, and cytotoxicity assays. *Journal of Applied Polymer Science*, 2019, vol. 136, p. 1–9. <https://doi.org/10.1002/app.47149>

RYDER, K. et al. Characterisation of novel fungal and bacterial protease preparations and evaluation of their ability to hydrolyse meat myofibrillar and connective tissue proteins. *Food Chemistry*, 2015, vol. 172, p. 197–206. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.061>

SARBON, N.M. et al. Effect of chicken skin gelatin and whey protein interactions on rheological and thermal properties. *Food Hydrocolloids*, 2015, vol. 45, p. 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.10.008>

SATHE, S.K. Functional properties of lupin seed (*Supinus mutabilis*) proteins and protein concentrates. *Journal of Food Science*, 1982, vol. 7, p. 191–197. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1982.tb10110.x>

SCHMIDT, M.M. et al. Collagen extraction process. *International food Research Journal*. 2016, vol. 23, p. 913–922.

SCHRIEBER, R., GAREIS, H. Gelatine handbook: theory and industrial practice. Weinheim: Wiley-VCH, Verlag, 2007, p. 347, ISBN 978-3-527-31548-2.

SHAHIDI, F., et al. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, 1995, vol. 53, p. 285–293. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)93934-J](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)93934-J)

SHEU, K.S., CHEN, T.C. Yield and quality characteristics of edible broiler skin fat as obtained from five rendering methods. *Journal of Food Engineering*, 2002, vol. 55, p. 263–269. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00100-0](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00100-0)

SILVA, T.F., PENNA, A.L.B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 2012; vol. 71, p. 530–539.

SILVIPRIYA, K.S. et al. Collagen: animal sources and biomedical application. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol. 5, p. 123–127. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50322>

SIMÕES, G.S. et al. Optimum conditions for extracting collagen from the tunica albuginea of immunologically castrated pig testes and the functional properties of the isolated collagen. *Meat Science*, 2014, vol. 96, p. 1460–1468. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.10.038>

SOMPIE, M., TRIASIH, A. Effect of extraction temperature on characteristics of chicken legskin. In proceedings of IOP conference series: earth and environmental science 2017 [Online] Semarang, Indonesia, 26–27. September 2018, p. 12089.

SOUISSI, N. et al. Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. *Food Technology and Biotechnology*, 2007, vol. 45, p. 187–194. <http://www.ftb.com.hr/73-volume-45-issue-no-2/345-biochemical-and-functional-properties-of-sardinella-sardinella-aurita-by-product-hydrolysates>

STANGE, K. *Angewandte statistik teil 2: mehrdimensionale probleme*. Springer: Heidelberg, Germany, 1971, p. 469–495. ISBN-13 : 978-3540052975.

STRAUS, K., DOLEJS, P. Factor planning and evaluation of experiments in water treatment [in Czech] Proceedings of Pitná voda 2010 České Budějovice, Czech Republic, p. 95–100

SUBHAN, F. et al. Fish scale collagen peptides protect against cocl2/tnf-  $\alpha$ -induced cytotoxicity and inflammation via inhibition of ROS, MAPK, and NF-K B pathways in hacat cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, vol. 1, p. 1–17. <https://doi.org/10.1155/2017/9703609>

TAUFIK, M. et al. Effect of broiler age and extraction temperature on characteristic chicken feet skin gelatin. In proceedings of the 5th international seminar on tropical animal production, Yogyakarta, Indonesia, 19–22 October 2010; Faculty of Animal Science, Universitas Gadjah Mada: Yogyakarta, Indonesia, p. 649–656.

TÜMERKAN, E.T.A. et al. Physiochemical and functional properties of gelatin obtained from tuna, frog and chicken skins. *Food Chemistry*, 2009, vol. 287, p. 273–279. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.088>

United States Pharmacopoeia 35 NF 30. 35th revision, United States Pharmacopoeial Convention: Rockville, MD, USA, 2011, ISBN: 9781936424009 1936424002

WALDRON, K. Handbook of waste management and co-product recovery in food processing, vol 2., Cambridge: Woodhead Publishing, 2009, p. 627, ISBN 978-1-84569-391-6

WANGTUEAI, S., NOOMHORM, A. Processing optimization and characterization of gelatin from lizardfish (*Saurida* spp.) scales. *LWT - Food Science and Technology*, 2009, vol. 42, p. 825–834. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.11.014>

WIDYASARI, R., RAWDKUEN, S. Extraction and characterization of gelatine from chicken feet by acid and ultrasound assisted extraction. *Food and Applied Bioscience*, 2014, vol. 1, p. 85–97. <https://doi.org/10.14456/fabj.2014.7>

WILDING, P. et al. Functional properties of proteins in foods. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 1984, vol. 34, p. 182. <https://doi.org/10.1002/jctb.280340307>

WILLEY, J. et al. ISE Prescott's Microbiology. *McGraw-Hill Education*, 2022, p. 1024, ISBN:1265123039

XIN, Y. et al. Comparative study on the gel properties and nanostructure of gelatins from chicken, porcine, and tilapia skin. *Journal of Food Science*. 86, vol. 5, p. 1936–1945. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15700>

YANG, J. et al. Characteristic and antioxidant activity of retorted gelatin hydrolysates from *Cobia (Rachycentron canadum)* skin. *Food Chemistry*, 2008, vol. 110, p. 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.072>

ZARAI, Z. et al. Process for extracting gelatin from marine snail (*Hexaplex trunculus*): chemical composition and functional properties. *Process Biochemistry*, 2012, vol. 47, p. 1779–1784. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.06.007>

ZHANG, F. et al. Pre-treatment optimization and properties of gelatin from freshwater fish scales. *Food Bioproduction Process*, 2011, vol. 89, p. 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.05.003>

ZHOU, P., REGENSTEIN, J.M. Determination of total protein content in gelatin solutions with the Lowry or Biuret assay, *Journal of Food Science*, 2006, vol. 7, p. 474–479. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00151.x>



## 9. SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ

Tab. 1. Vedlejší produkty drůbežářského průmyslu a jejich potenciální využití (Jayathilakan, 2012) .....	27
Tab. 2. Složení kuřecích kůží, hlav a běháků .....	47
Tab. 3. Rozpis experimentů a obsah zbytkového tuku v kuřecích běhácích .....	47
Tab. 4. Typy rozpouštědel a podíl zbytkového tuku v kuřecích běhácích .....	48
Tab. 5. Metody odtučnění a podíl zbytkového tuku v kuřecích kůžích.....	48
Tab. 6. Výtěžek a funkční vlastnosti želatin z kuřecí kůže extrahovaných při různých teplotách .....	49
Tab. 7. Funkční vlastnosti želatin z kuřecí kůže extrahovaných při různých teplotách .....	50
Tab. 8. Výchozí pevnost gelu hovězích, vepřových a kuřecích želatin.....	52
Tab. 9. Tepelná stabilita hovězích, vepřových a kuřecích želatinových gelů při teplotě 23 °C.....	54
Tab. 10. Tepelná stabilita hovězích, vepřových a kuřecích želatinových gelů při teplotě 29 °C.....	55
Tab. 11. Tepelná stabilita hovězích, vepřových a kuřecích želatinových gelů při teplotě 35 °C.....	55
Tab. 12. Rozpis a výsledky faktorových experimentů přípravy želatin z kůží ..	57
Tab. 13. Analýza rozptylu pro výtěžek želatin, pevnost gelu, viskozitu, teplotu tání a gelace.....	58
Tab. 14. Rozpis a výsledky faktorových experimentů přípravy želatin z hlav ..	66
Tab. 15. Analýza rozptylu pro výtěžek želatin, pevnost gelu a viskozitu .....	67
Tab. 16. Rozpis optimalizačních experimentů a výsledky výtěžku, pevnosti gelu a viskozity .....	71
Tab. 17. Rozpis a výsledky faktorových experimentů přípravy želatin z běháků .....	72
Tab. 18. Analýza rozptylu pro výtěžek želatin, pevnost gelu a viskozitu .....	73
Tab. 19. Rozpis a výsledky optimalizačních experimentů přípravy želatin z běháků .....	76
Tab. 20. Výchozí hodnoty pevnosti gelu vepřových, hovězích a želatin z kuřecích běháků .....	78
Tab. 21. Tepelná stabilita hovězích, vepřových a kuřecí želatin při teplotě 23 °C a relativní vlhkosti 60 % .....	79
Tab. 22. Tepelná stabilita hovězích, vepřových a kuřecí želatin při teplotě 23 °C a relativní vlhkosti 80 % .....	80
Tab. 23. Tepelná stabilita hovězích, vepřových a kuřecí želatin při teplotě 29 °C a relativní vlhkosti 60 % .....	81
Tab. 24. Tepelná stabilita hovězích, vepřových a kuřecí želatin při teplotě 29 °C a relativní vlhkosti 80 % .....	82
Tab. 25. Tepelná stabilita hovězích, vepřových a kuřecí želatin při teplotě 35 °C a relativní vlhkosti 60 % .....	82

Tab. 26. Tepelná stabilita hovězích, vepřových a kuřecí želatiny při teplotě 35 °C a relativní vlhkosti 80 % .....	83
Tab. 27. Pevnost gelu, viskozita, vaznost vody (VV), vaznost tuku (VT), teplota tání (Tm) a gelace (Tg) komerčních a kuřecích želatin.....	84
Tab. 28. Emulzifikační kapacita (EK), emulzifikační stabilita (ES), pěnotvorná kapacita (PK) a pěnotvorná stabilita (PS) a čirost komerčních a kuřecích želatin .....	84
Tab. 29. Rozpis faktorových experimentů a výsledky přípravy hydrolyzátů a želatin z kuřecích běháků .....	85
Tab. 30. Výsledky testování mikrobiální kontaminace .....	87
Tab. 31. Maximální povolené mikrobiální limity v želatině podle nařízení Evropské komise, Evropského lékopisu a GME (Gelatine Manufacturer of Europe) (GME Monografie 2020).....	88
Obr. 1. Fibrily kolagenu (SEM) .....	8
Obr. 2. Přeměna kolagenu na želatinu.....	11
Obr. 3. Schématický postup přípravy želatiny z kuřecí tkáně.....	34
Obr. 4. Vzorky kuřecích želatin pro stanovení pevnosti gelu .....	40
Obr. 5. Stevens LFRA Texture Analyzer .....	40
Obr. 6. Schéma zařízení ke stanovení bodu tání a gelace .....	41
Obr. 7. Vliv faktorů na výtěžek želatiny v 1. extrakci .....	60
Obr. 8. Vliv faktorů na pevnost gelu želatiny v 1. extrakci .....	61
Obr. 9. Vliv faktorů na viskozitu želatiny v 1. extrakci .....	62
Obr. 10. Vliv faktorů na teplotu tání želatiny v 1. extrakci.....	64
Obr. 11. Vliv faktorů na bod gelace želatiny v 1. extrakci.....	65
Obr. 12. Vliv množství enzymu a doby extrakce na výtěžek želatiny .....	68
Obr. 13. Vliv množství enzymu a doby extrakce na pevnost gelu .....	69
Obr. 14. Vliv množství enzymu a doby extrakce na viskozitu želatiny .....	70
Obr. 15. Vliv množství enzymu a doby extrakce na výtěžek želatiny .....	74
Obr. 16. Vliv množství enzymu a doby enzymového opracování na pevnost gelu .....	75
Obr. 17. Vliv množství enzymu a doby enzymové předúpravy na viskozitu .....	76
Obr. 18. Vliv množství enzymu a extrakčního času na pevnost gelu .....	77
Obr. 19. Vliv množství enzymu a doby extrakce na výtěžek želatiny .....	78

## 10. SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

BSE	bovinní spongiformní encefalopatie
CFU	colony forming unit (kolonie tvořící jednotka)
DSC	diferenční skenovací kalorimetrie
EU	Evropská unie
EK	emulzifikační kapacita
ES	emulzifikační stabilita
FMD	slintavka a kulhavka
Gly	glycin
HCl	kyselina chlorovodíková
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	kyselina sírová
Hyp	hydroxyprolin
KOH	hydroxid draselný
NaCl	chlorid sodný
NaOH	hydroxid sodný
NaHCO <sub>3</sub>	hydrogenuhličatn sodný
PA	polyamid
PK	pěnotvorná kapacita
Pro	prolin
PS	pěnotvorná stabilita
PVC	polyvinylchlorid
RTG	rentgen
SD	směrodatná odchylka
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
TSE	transmisivní spongiformní encefalopatie
VT	vaznost tuku
VV	vaznost vody
v/v	objem/objem
w/v	hmotnost/objem
w/w	hmotnost/hmotnost

## 11. PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORA

### 1. Vědecké články s IF abstrahované v databázi WoS

A) MRÁZEK, P., MOKREJŠ, P., GÁL, R., ORSAVOVÁ, J., JANÁČOVÁ, D. Biotechnological preparation of chicken skin gelatine using factorial design of experiments. *Food Bioscience*, 2022, vol. 47, <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101702>

B) GÁL, R., MOKREJŠ, P., MRÁZEK, P., PAVLAČKOVÁ, J., JANÁČOVÁ, D., ORSAVOVÁ, J. Chicken heads as a promising by-product for preparation of food gelatins. *Molecules*, 2020, vol. 25, p. 494, <https://doi.org/10.3390/molecules25030494>

C) MOKREJŠ, P., MRÁZEK, P., GÁL, R., PAVLAČKOVÁ, J. Biotechnological preparation of gelatines from chicken feet. *Polymers*, 2019, vol. 11, p. 1060. <https://doi.org/10.3390/polym11061060>

D) MOKREJŠ, P., GÁL, R., PAVLAČKOVÁ, J., JANÁČOVÁ, D., MRÁZEK, P. Využití vedlejších kolagenních produktů z porážky drůbeže k přípravě želatin a hydrolyzátů. *Chemické listy*, 2019, vol. 113, p. 121–125, ISSN:0009-2770

### 2. Vědecké články abstrahované v databázi Scopus

E) MRÁZEK, P., GÁL, R., MOKREJŠ, P., KREJČÍ, O., ORSAVOVÁ, J. Thermal stability of prepared chicken feet gelatine gel in comparison with commercial gelatines. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 2020, vol. 14, p. 535–543, <https://doi.org/10.5219/1297>

F) MRÁZEK, P., MOKREJŠ, P., GÁL, R., ORSAVOVÁ, J. Chicken skin gelatine as an alternative to pork and beef gelatines. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 2019, vol. 13, p. 224–233, <https://doi.org/10.5219/1022>

G) MRÁZEK, P., GÁL, R., MOKREJŠ, P., PAVLAČKOVÁ, J., JANÁČOVÁ, D. Proposal of processing chicken by-products tissues into food-grade collagen. *Waste Forum*, 2020, vol. 4, p. 217–227.

H) MRÁZEK, P., MOKREJŠ, P., GÁL, R., KREJČÍ, O. Preparation of collagen concentrate from chicken feet. *Waste Forum*, 2018, vol. 4, p. 444–451, <https://doi.org/10.3966/199115992018122906009>

### 3. Výstupy z mezinárodních konferencí abstrahované na WoS

I) MRÁZEK, P., MOKREJŠ, P., GÁL, R., ORSAVOVÁ, J., JANÁČOVÁ, D. Thermal stability of chicken skin gelatine gels in comparison with commercial gelatines. *Proceedings of 26th International PhD Students Conference (MENDELNET 2019)*, 2020, p. 368–373

J) MRÁZEK, P., MOKREJŠ, P., GÁL, R. Assessment of possibilities of food grade gelatines preparation from chicken skin. *Proceedings of 25th International PhD Students Conference (MENDELNET 2018)*, 2019, p. 290–295

#### **4. Patent**

**K)** MOKREJŠ, P., GÁL, R., MRÁZEK, P. *Biotechnologický způsob výroby potravinářské želatiny z drůbežního jatečného odpadu*. Úřad průmyslového vlastnictví, Česká republika. Patentový spis, CZ 307665 B6. 2019-01-12

#### **5. Výstupy z ostatních konferencí**

**L)** MRÁZEK, P., MOKREJŠ, P., GÁL, R. Poultry by-products as a raw-material for preparing food-grade collagen. *Bezpečnost a kontrola potravin*, Piešťany, Slovensko, 22.–23. 3. 2018

**M)** MRÁZEK, P., MOKREJŠ, P., GÁL, R. Poultry by-products as a novel source of collagen. *Týden výzkumu a inovací pro praxi a životní prostředí*, Hustopeče u Brna, 6.–8. 3. 2018

#### **6. VŠ kvalifikační práce**

MRÁZEK, P. *Optimalizace technologických podmínek získávání želatiny z vedlejších bílkovinných produktů z drůbežáren*, Diplomová práce 2017

MRÁZEK, P. *Možnosti zpracování odpadů z plněných polymerů*, Bakalářská práce 2015

#### **7. Řešené projekty**

IGA/FT/2018/008

Příprava, optimalizace, modifikace a využití vlastností přírodních i syntetických polymerních materiálů – hlavní řešitel.

IGA/FT/2019/003

Příprava a charakterizace želatin/kolagenních hydrolyzátů z drůbežích vedlejších produktů – hlavní řešitel.

IGA/FT/2020/002

Příprava želatin/ hydrolyzátů z vedlejších drůbežích produktů, testování jejich vlastností a návrh aplikací – hlavní řešitel.

IGA/FT/2021/007

Příprava, charakterizace a aplikace polymerů – člen řešitelského týmu.

FV20088

Vývoj nových receptur za účelem modifikace asfaltových směsí při využití recyklátu polyvinylbutyralu – člen řešitelského týmu na CPS Zlín.

## 12. CURRICULUM VITAE

### **Osobní údaje:**

Jméno a příjmení: Ing. Petr Mrázek  
Datum narození: 28. 7. 1979  
Kontaktní adresa: Hložkova 1817, Otrokovice  
E-mail: p\_mrazek@utb.cz

### **Dosažené vzdělání:**

2017 – dosud Doktorský stupeň  
Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická,  
Studijní obor: technologie makromolekulárních látek

2015 – 2017 Magisterský stupeň  
Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická  
Studijní obor: chemie a technologie materiálů – inženýrství polymerů

2012 – 2015 Bakalářský stupeň  
Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická  
Studijní obor: chemie a technologie materiálů – polymerní materiály a technologie

1997 – 1999 Střední škola s maturitou  
COP Elektro Otrokovice  
Obor/specializace: provozní elektrotechnik

### **Počítačové znalosti:**

pokročilý uživatel: MS Windows/Office

### **Řidičský průkaz:**

skupina B

Petr Mrázek

## **Zpracování vedlejších bílkovinných produktů z porážky drůbeže**

Processing of Poultry By-products from Slaughterhouses

Dizertační práce

Náklad: vyšlo elektronicky

Sazba: autor

Publikace neprošla jazykovou ani redakční úpravou.

Rok vydání 2023