

# **Příprava želatin a hydrolyzátů z kuřecího kolagenu a možnosti jejich aplikací**

Ing. Aneta Prokopová, Ph.D.

Teze disertační práce



**Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně**  
**Fakulta technologická**

Teze disertační práce

**Příprava želatin a hydrolyzátů z kuřecího kolagenu  
a možnosti jejich aplikací**

**Preparation of gelatins and hydrolysates from chicken collagen  
and possibilities of their applications**

Autor: **Ing. Aneta Prokopová, Ph.D.**

Studijní program: Chemie a technologie materiálů (P2808)

Studijní obor: Technologie makromolekulárních látek (2808V006)

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

Oponenti: Doc. Ing. Tomáš Sedláček, Ph.D.  
Prof. Ing. David Zapletal, Ph.D.

Zlín, červen 2024

© Aneta Prokopová

Vydala **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně** v edici **Teze disertační práce.**

Publikace byla vydána v roce 2024

*Klíčová slova: biotechnologické opracování, makromolekulární látka, želatina, pevnost gelu, enzymatická hydrolýza, kuřecí žaludky, kolagen, kolagenní hydrolyzát, viskozita, inovace, biomateriály, potravinářský odpad, antioxidační aktivita, funkční skupiny, mikrobiální populace, molekulová hmotnost, kosmetická gelová formulace, stárnutí, hydratace, transepidermální ztráta vody, elasticita, reliéf pokožky*

*Key words: biotechnological processing, macromolecular substance, gelatin, gel strength, enzymatic hydrolysis, chicken stomachs, collagen, collagen hydrolyzate, viscosity, innovation, biomaterials, food waste, antioxidant activity, functional groups, microbial population, molecular weight, cosmetic gel formulation, aging, hydration, transepidermal water loss, elasticity, skin relief*

Práce je dostupná v Knihovně UTB ve Zlíně.

ISBN 978-80-7678-261-7

## ABSTRAKT

S rostoucí spotřebou drůbežního masa ve světě se nabízí možnosti využití kuřecích žaludků na kolagenní produkty. Tyto odpady vznikají na jatkách ve velkém množství a vzhledem k jejich biologické povaze je nutné s nimi zacházet tak, aby nedocházelo ke znečišťování životního prostředí. Kolagen z drůbežích žaludků je perspektivním surovinovým zdrojem pro výrobu želatin a hydrolyzátů. Biotechnologickou metodou za použití proteolytických enzymů vyrobených submerzní fermentací geneticky modifikovaných mikroorganismů lze připravit vysoce kvalitní kolagenní produkty. Drůbeží želatiny mají podobné aminokyselinové složení jako komerční kolageny, avšak odlišné reologické a gelové vlastnosti. Volbou vhodných procesních podmínek lze dosáhnout na molekulární úrovni kolagenu takových změn, které umožní následně připravit produkty s cílenými vlastnostmi pro pokročilé kosmetické, farmaceutické, medicínské či potravinářské aplikace.

Disertační práce se zabývá inovativní přípravou kolagenních produktů z netradiční suroviny, a to z kuřecích žaludků zpracovaných enzymatickou hydrolyzou. V literární rešerši je zhodnocen současný stav řešené problematiky a možnosti aplikací kolagenních produktů. Na základě rešerše byly vytyčeny cíle výzkumu *i)* za zvolených procesních podmínek vícestupňové extrakce vyextrahovat želatiny; *ii)* připravit želatiny s pevností gelu kolem 150 Bloom; *iii)* kolagenní produkty budou vhodné pro aplikaci v potravinářském a kosmetickém průmyslu.

Nejprve bylo nutné vyextrahovat modelové vzorky kolagenních produktů, charakterizovat jejich vlastnosti a dále navrhnout optimální podmínky zpracování. Experimenty byly modelovány pomocí Taguchiho designu s 2 faktory na 3 úrovních. Za faktor A bylo zvoleno množství přidaného enzymu (0,10; 0,15 a 0,20 %) a jako faktor B teplota extrakce (55,0; 62,5 a 70,0 °C). Data byla statisticky zpracována a analyzována na hladině významnosti 95 %.

Na modelových vzorcích kuřecích kolagenních produktů byla stanovena *i)* antioxidační aktivita (pomocí DPPH a ABTS); *ii)* distribuce molekulových hmotností metodou GPC–RID analýzy; *iii)* funkční skupiny a konfigurace polypeptidových řetězců související s vlastnostmi na molekulární úrovni s využitím FTIR metody; *iv)* metodou MALDI vyhodnoceny mikrobiologické vlastnosti na mikrobiálních populacích.

Biofyzikální účinnost získaných kolagenních produktů byla ověřována u připravených kosmetických modelových formulací *in vivo* v periorbitální oblasti obličeje u souboru dobrovolnic – probandů. Pomocí neinvazivních

diagnostických metod byl monitorován vliv na hydrataci pokožky, fungování kožní bariéry, elasticita a reliéf pokožky.

Výzkum ukázal, že enzymová předúprava výchozí suroviny je environmentálně vhodnou alternativou ke kyselému nebo zásaditému způsobu výroby, který je tradičně používán při výrobě želatin. Kolagenní produkty připravené z drůbežích vedlejších produktů mohou být vhodnou alternativou k produktům vyrobených z hovězích nebo vepřových kolagenních tkání. Výsledky provedených dílčích studií naznačují potenciál pro pokročilé aplikace. Kolagenní hydrolyzát ověřovaný *in vivo* studií lze hodnotit jako biokompatibilní s pokožkou. Během provedeného experimentu nebyla evidována žádná iritační nebo alergická reakce.

## ABSTRACT

With the growing consumption of poultry meat in the world, there are opportunities to use chicken stomachs for collagen products. These wastes are generated in slaughterhouses in large quantities and, due to their biological nature, it is necessary to handle them in such a way that they do not pollute the environment. Collagen from poultry stomachs is a promising raw material source for the production of gelatins and hydrolysates. High-quality collagen products can be prepared by a biotechnological method using proteolytic enzymes produced by submerged fermentation of genetically modified microorganisms. Poultry gelatins have a similar amino acid composition to commercial collagens, but different rheological and gel properties. By choosing suitable process conditions, such changes can be achieved at the molecular level of collagen, which will enable the subsequent preparation of products with targeted properties for advanced cosmetic, pharmaceutical, medical or food applications.

The dissertation deals with the innovative preparation of collagen products from non-traditional raw materials, namely from chicken stomachs processed by enzymatic hydrolysis. The literature review evaluates the current state of the problem and the application possibilities of collagen products. Based on the research, the research objectives were set *i)* to extract gelatins under the chosen process conditions of multi-stage extraction; *ii)* prepare gelatins with a gel strength of around 150 Bloom; *iii)* collagen products will be suitable for application in the food and cosmetic industry.

First, it was necessary to extract model samples of collagen products, characterize their properties, and then propose optimal processing conditions. Experiments were modeled using a Taguchi design with 2 factors at 3 levels. The amount of added enzyme (0.10, 0.15 and 0.20%) was chosen as factor A and the extraction temperature (55.0, 62.5 and 70.0 °C) as factor B. The data were statistically processed and analyzed at a significance level of 95%.

On model samples of chicken collagen products, *i)* antioxidant activity (using DPPH and ABTS) was determined; *ii)* distribution of molecular weights by the GPC–RID analysis method; *iii)* functional groups and configuration of polypeptide chains related to properties at the molecular level using the FTIR method; *iv)* microbiological properties of microbial populations evaluated using the MALDI method.

The biophysical effectiveness of the obtained collagen products was verified with prepared cosmetic model formulations *in vivo* in the periorbital area of the face in a group of female volunteers - probands. Using non-invasive diagnostic

methods, the effect on skin hydration, the functioning of the skin barrier, elasticity and relief of the skin was monitored.

Research has shown that enzyme pretreatment of the starting raw material is an environmentally suitable alternative to the acidic or alkaline production method that is traditionally used in the production of gelatin. Collagen products prepared from poultry by-products may be a suitable alternative to products made from bovine or porcine collagen tissues. The results of the sub-studies carried out indicate the potential for advanced applications. Collagen hydrolyzate verified by an *in vivo* study can be evaluated as biocompatible with the skin. No irritation or allergic reaction was recorded during the experiment.

# OBSAH

<b>Poděkování</b> .....	9
<b>1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	10
1.1 Biopolymery .....	10
1.2 Enzymová hydrolýza .....	10
1.3 Princip výroby želatin .....	12
1.4 Kolagenní produkty .....	14
1.4.1 Kolagenní hydrolyzát .....	14
1.4.2 Želatiny .....	15
1.5 Drůbeží tkáň .....	16
1.6 Aplikace kolagenních produktů .....	17
<b>2. ZHODNOCENÍ SOUČASNÉHO STAVU A CÍLE PRÁCE</b> .....	18
<b>3. METODIKA ŘEŠENÍ</b> .....	20
3.1 Zpracování drůbežích tkání na kolagenní produkty .....	20
3.1.1 Enzymatická předúprava drůbežích tkání .....	20
3.1.2 Extrakce želatin z drůbežích tkání .....	20
3.2 Zpracování výsledků .....	21
3.2.1 Charakteristika kolagenních produktů .....	22
3.2.2 Testování kolagenních produktů .....	25
<b>4. VÝSLEDKY DISERTAČNÍ PRÁCE</b> .....	29
4.1 Výtěžek kolagenních frakcí .....	29
4.2 Charakteristika kolagenních produktů .....	30
4.2.1 Gelotvorné a jiné vlastnosti .....	30
4.2.1 Antioxidační aktivita .....	32
4.2.2 Stanovení distribuce molekulových hmotností .....	34
4.2.3 Infračervená spektrofotometrie s Fourierovou transformací .....	36
4.3. Aplikace kolagenních produktů .....	37
4.3.1 Stravitelnost kolagenních produktů .....	37
4.3.2 Mikrobiologické vlastnosti .....	39



4.3.3 Testování gelové kosmetické formulace .....	40
<b>5. PŘÍNOS DISERTAČNÍ PRÁCE PRO PRAXI .....</b>	<b>44</b>
<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>46</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>47</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>54</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>55</b>
<b>PUBLIKAČNÍ ČINNOST A DALŠÍ AKTIVITY AUTORA .....</b>	<b>56</b>
<b>CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>58</b>

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucímu disertační práce panu prof. Ing. Pavlovi Mokrejšovi, Ph.D. a konzultantům disertační práce paní Ing. Janě Pavlačkové, Ph.D. a Ing. Robertu Gálovi, Ph.D. za ochotný přístup, odborné vedení a velmi cenné rady. Dále děkuji paní laborantce Miroslavě Žaludkové a Petře Elšíkové za asistenci a trpělivost v laboratoři.

Moje poděkování patří i Ústavu inženýrství polymerů Fakulty technologické Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně za poskytnutí finanční podpory a prostoru k vědecké činnosti.

Chtěla bych také poděkovat své rodině za trpělivost a motivaci.

# 1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Drůbežářský průmysl je jedním z nejrychleji rostoucích zemědělsko-potravinářských odvětví na světě. Výsledkem tak velkého zpracování drůbeže na jatkách je několik vedlejších odpadů. Drůbeží žaludky jsou v některých zemích světa považovány za nevyužitý vedlejší produkt, který ovlivňuje znečištění životního prostředí. Jelikož drůbeží žaludky obsahují ve své struktuře kolagen a ekologické zpracování jatečných odpadů představuje jeden z nejzávažnějších problémů ze strany zpracovatelského průmyslu, je snaha tyto odpady opětovně využít, např. na extrakci kolagenních produktů [1–3].

## 1.1 Biopolymery

Biopolymerem se obecně rozumí látka, která vznikla v živém organismu kondenzací z více stejných anebo odlišných makromolekulárních látek. Tyto látky jsou biodegradabilní a jsou považovány za nejrozšířenější organické sloučeniny v ekosystému. Z chemického hlediska se jedná o bílkoviny, nukleové kyseliny a polysacharidy [5–7]. Kolagen patří do skupiny nerozpustných bílkovin, do tzv. skleroproteinů, a tvoří základní stavební hmotu všech typů pojivových tkání [6,7]. Kolagen představuje extracelulární nosnou kostru a je zodpovědný za pružnost a pevnost pojivových tkání; primárně plní funkci ochrannou a opěrnou [4,5].

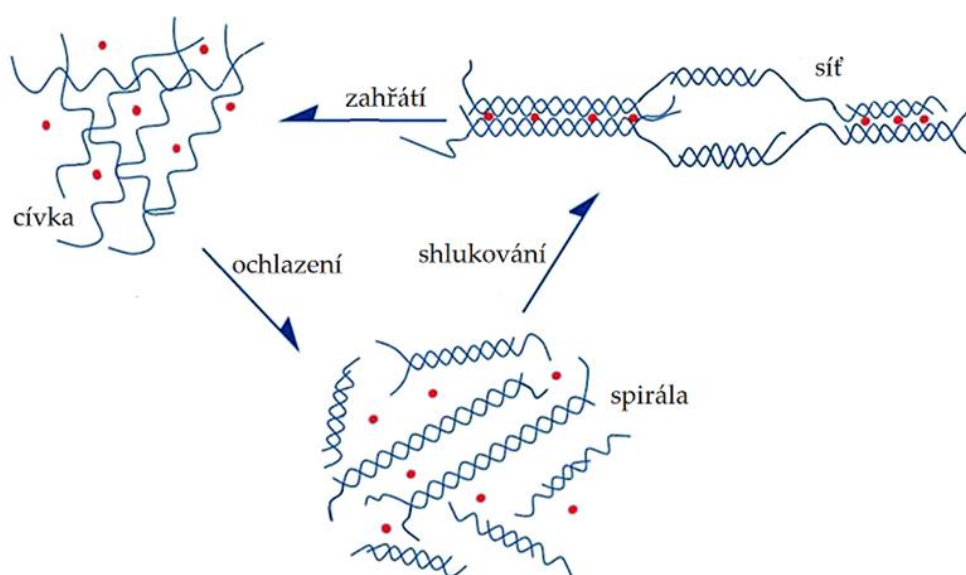
Pevnostní vlastnosti kolagenu jsou ovlivněny původem a zdrojem [8]. Drůbeží kolagen obsahuje převážně kolageny tvořící fibrily typu I a III, které se na molekulární bázi vyznačují nepřerušenou šroubovicí se střídajícími se polárními a nepolárními doménami. Stabilita a struktura kolagenu je ovlivněna vodíkovými můstky mezi polárními zbytky 4–hydroxyprolinu a 5–hydroxylysinu a dále je stabilita a struktura kolagenu ovlivněna tvorbou hydratačních sítí a elektrostatickými interakcemi v molekule kolagenu [4,5,7,8].

## 1.2 Enzymová hydrolýza

Enzymy jsou bílkovinné makromolekulární látky, které katalyzují biochemické přeměny v živém systému a tím určují povahu a rychlost všech chemických reakcí. Podle bílkovinné povahy se dělí na jednoduché a složené [9,10]. Na bílkovinnou část enzymu jsou navázány další molekuly, tzv. kofaktory. Kofaktor je k enzymu většinou vázán nekovalentní vazbou, ale může být vázán i vazbou kovalentní; poté se jedná o prostetické skupiny, které mají funkci přenašeče atomů během chemické reakce. Aktivita enzymu závisí především na koncentraci substrátu, teplotě, pH a přítomnosti aktivátorů nebo inhibitorů [9–11].

Enzymy pracují na principu snížení aktivační energie systému. V prvním kroku dojde k vytvoření komplexu enzym–substrát (E–S). Jelikož je substrát v mimořádně reaktivní formě, probíhá reakce velmi rychle a je reverzibilní. V druhém kroku se výchozí substrát za katalýzy pomocí enzymu přemění v konečný produkt. Z komplexu E–S tak vzniká komplex enzym–produkt (E–P), který se rozpadá za uvolnění produktu a enzymu. Současně dochází i ke snižování aktivační energie potřebné na přeměnu substrátu. Reakce E–P je pomalá a ireverzibilní [12,13]. Aktivační energie potřebná k vytvoření každého meziprojektu a k následné přeměně komplexu E–S na komplex E–P je nižší než při přímé přeměně substrátu na produkt bez použití enzymu, přestože celková  $\Delta G$  obou reakcí je stejná [14,15].

Enzym Protamex® je komplex Bacillus proteázy, komplex proteázy bakteriálního původu. Jak již bylo řečeno, tepelně denaturovaný kolagen lze hydrolyzovat enzymy pepsin nebo trypsin, ale také enzymem Protamex® [16,17,18,19]. V první fázi dochází k narušení molekul kolagenu v kolagenové síti (pomocí enzymu a teploty) a k přerušení vazeb mezi polypeptidovými řetězci. V druhé fázi dochází k uvolnění molekul tropokolagenu do vodného roztoku a tím vzniká SOL rozpustné želatiny. Při ochlazení se náhodně obnovují a agregují vazby mezi původními řetězci, které zachycují značné množství vody a tím vzniká želatinový GEL indukovaný iontovými a vodíkovými vazbami [20,21]. Na Obr. 1.1 můžeme pozorovat enzymovou hydrolyzu tepelně denaturovaného kolagenu [21].



Obr. 1.1: Enzymová hydrolyza tepelně denaturovaného kolagenu [21]

Hydrolyza je rozklad vazeb chemické látky pomocí vody. Jedná se o skupinu solvolytických reakcí, které fungují jako inverzní reakce, a dochází u nich ke kondenzaci (spojování dvou a více molekul za odštěpení nízkomolekulárního produktu ve formě vody). Hydrolyza proteinů zahrnuje štěpení peptidových vazeb za vzniku peptidů různých velikostí a různého aminokyselinového složení. Při enzymatické hydrolyze enzymy katalyzují štěpení chemických vazeb (zejména C–C, C–O a C–N) za účasti vody. Reakční mechanismus je založen na přenosu radikálu z hydrolyzovaného substrátu na vodu. Enzymy tedy působí na specifické peptidové vazby a dochází ke vzniku jednodušších látek [12,13,16,17].

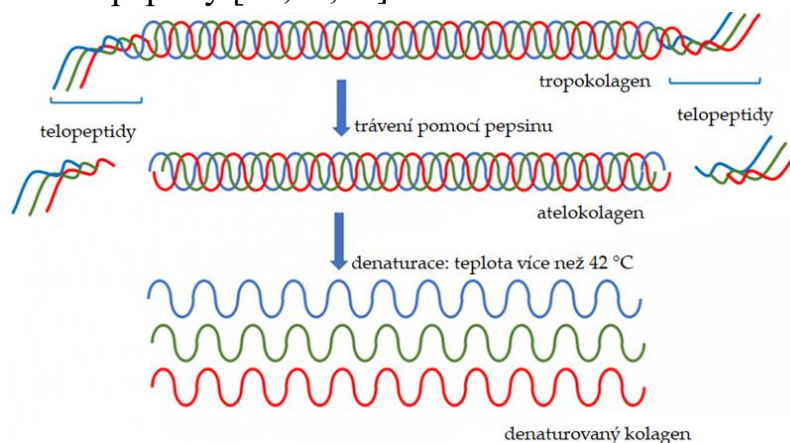
Rychlost a stupeň hydrolyzy závisí na množství vody v systému, katalyzátoru a pH reakční směsi. V kyselém prostředí se předpokládá elektrofilní mechanismus hydrolyzy a v alkalickém prostředí nukleofilní mechanismus hydrolyzy [18]. Standardně lze tepelně denaturovaný kolagen hydrolyzovat enzymy trypsin nebo pepsin. Molekuly tropokolagenu se uvolní do vodného roztoku za želatiny. Dochází k narušení nekovalentních vazeb v materiálu a následně k rozvinutí proteinových struktur. Po strukturní stránce dochází k přechodu ze složité spirály na cívku. Při nižší teplotě jsou obnovovány některé vazby mezi řetězci za vzniku želatinového gelu. Enzymatická hydrolyza kolagenu je ekologická vůči životnímu prostředí, nedochází k narušení kolagenu pomocí silných kyselin a zásad, které agresivně zasahují do ekosystému. Současně při enzymové hydrolyze zůstávají neovlivněny vlastnosti hydrolyzátu [16–18].

### **1.3 Princip výroby želatin**

Při zahřátí hydratovaného kolagenu na teplotu  $> 60\text{ }^{\circ}\text{C}$  dochází k výrazným strukturním změnám, jedná se o transformaci prvního řádu, tj. přeměnu krystalické modifikace biopolymeru (uspořádaná struktura) na modifikaci amorfní (neuspořádaná struktura) [22]. Dochází ke vzniku funkčních polymerů, tzv. kolagenních hydrolyzáků. Výroba želatiny zahrnuje tři kroky zpracování: předúprava suroviny, proces tepelné extrakce a regenerace. Výtěžek želatiny závisí na zdroji kolagenu a počtu kovalentních zesíťovaných vazeb. Kvalita je poté ovlivněna druhem, věkem, pohlavím živočišného zdroje a také technologickými podmínkami přípravy – teplotou a pH reakční směsi. Při komerční výrobě se provádí kyselý (typ A) a zásaditý (typ B) proces extrakce s hodnotou izoelektrického bodu želatiny 7–9 (obsahují v molekule navíc další aminovou skupinu, většinou AMK lysin, arginin a histidin), resp. 4,7–5,4 (obsahují v molekule navíc další karboxylovou skupinu, většinou AMK asparagovou a glutamovou, asparagin a glutamin). To má za následek ztrátu trojitě

helikálního uspořádání nativních kolagenových řetězců, které jsou nabobtnalé, ale stále nerozpustné. Ke konečné přeměně dochází během tepelného procesu v důsledku štěpení vodíkových a kovalentních vazeb. Avšak opracováním suroviny v kyselině nebo zásadě je trojitá molekula kolagenu hydrolyzována na strukturu s jednořetězovým  $\alpha$ -helixem způsobem, který je méně šetrný vůči životnímu prostředí; enzymatická úprava suroviny je více environmentálně vhodnou variantou k běžným procesům výroby [4,11,16]. Finální vlastnosti želatiny jsou předurčeny procentuálním zastoupením aminokyselin glycinu, prolinu a hydroxyprolinu, nejhojněji zastoupených AMK. Množství glycinu (%) je v hovězí, vepřové, drůbeží a rybí želatině: 34,2; 33,0; 33,7; resp. 34,7. Množství prolinu (%) je v hovězí, vepřové, drůbeží a rybí želatině: 12,7; 13,2; 13,4; resp. 11,9 a množství hydroxyprolinu (%) je v hovězí, vepřové, drůbeží a rybí želatině: 8,3; 9,1; 12,1; resp. 7,9. Můžeme vidět, že množství glycinu a prolinu je mezi želatinami velmi podobné, avšak při prozkoumání množství hydroxyprolinu (%) je u drůbeží želatiny nárůst AMK ve struktuře o zhruba 3,0 % [1–3,23,24].

Na Obr. 1.2 je znázorněno enzymatické štěpení telopeptidické části molekul tropokolagenu za vzniku atelokolagenu a následně vznik třech  $\alpha$ -řetězců při teplotě  $> 42\text{ }^{\circ}\text{C}$  [25]. Pokud je protein (polypeptid) s koncovými částmi telopeptidy, tzv. tropokolagen, vystaven působení enzymů, dojde k vytvoření atelokolagenu, tedy polypeptidu, který ztratí své koncové telopeptidy. Pokud se atelokolagen vystaví působení teploty  $> 42\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dojde k denuraci a ztrátě trojité šroubovice, čímž se kolagen rozloží na tři  $\alpha$ -řetězce. Vnitřní zesíťování mezi  $\alpha$ -řetězci nelze reformovat procesem renaturace, což brání reformování přirozeného kolagenu ve tkáních. Denaturace kolagenu je tedy nevratná. Kromě toho je kolagen vysoce odolný vůči většině proteinázových nebo peptidázových aktivit. Jakmile je však kolagen denaturován, stává se vysoce citlivým na mnoho proteináz a je snadno rozložitelný na kratší peptidy [23,26,27].



Obr. 1.2: Enzymatické štěpení telopeptidické části molekul tropokolagenu za vzniku atelokolagenu a následně vznik třech individuálních  $\alpha$ -řetězců [25]

## 1.4 Kolagenní produkty

Kolagen vykazuje tři různé frakce:  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  řetězce.  $\alpha$ -řetězec se skládá z jednoho polymerního řetězce o molekulové hmotnosti 80–125 kDa,  $\beta$ -řetězec se skládá ze dvou  $\alpha$ -řetězců, dimery  $\alpha$ -řetězců, o molekulové hmotnosti 160–250 kDa a  $\gamma$ -řetězec se skládá ze tří  $\alpha$ -řetězců, trimery  $\alpha$ -řetězců, o molekulové hmotnosti 240–375 kDa. Jednotlivé řetězce jsou mezi sebou navzájem propojeny kovalentními a vodíkovými vazbami. Jednotlivé kolagenové frakce jsou ovlivněny procesem výroby želatiny, neboť proces může ovlivňovat aminokyselinovou strukturu (např. deaminace asparaginu na kyselinu asparagovou nebo deaminace glutaminu na kyselinu glutamovou) a následné uspořádání řetězců v konečném kolagenu [28–31]. Propojení tří  $\alpha$ -řetězců umožní vznik monomerního kolagenu neboli atelokolagenu (jedno trojitě vlákno tvořeno  $\alpha$ -řetězci) a následným propojením tří monomerních kolagenů, atelokolagenů, se utvoří kolagenní vlákno neboli polymerní kolagen. Vlákno se vyznačuje svými výbornými mechanickými vlastnostmi, především ohebností a odolností [25].

### 1.4.1 Kolagenní hydrolyzát

Kolagenní hydrolyzát se vyrábí z tkání živočichů, které obsahují ve své struktuře značné množství kolagenu [32]. Molekulová hmotnost se obvykle pohybuje v intervalu od 2 000 do 6 000 Da, hydrolyzát je netoxický a dermatologicky vhodný pro aplikaci v kosmetickém průmyslu [33]. Hydrolyzát je rozpustný i ve studené vodě, má povrchově aktivní vlastnosti a neutrální pH s dobrými biologickými vlastnostmi [34]. Hydrolyzáty se poté práškují a vlivem působení peroxidu vodíku se získávají produkty světlé až bílé barvy bez zápachu. Peptidové řetězce kolagenu jsou pomocí hydrolytické metody štěpeny na menší řetězce s nižší molekulovou hmotností. Metoda závisí na druhu použitého enzymu, na podmínkách prostředí a rozsahu hydrolyzy. Hydrolyzát se extrahuje ze zvířecího kolagenu, ale může být vyrobený i z již dříve připravené želatiny. Jelikož při extrakci hydrolyzátu ze zvířecí tkáně musí být použity speciální kolagenázy, které jsou poměrně finančně nákladné, je častější způsob výroby hydrolyzátu z již připravené želatiny [34,35].

Bioaktivní proteiny s antioxidačními vlastnostmi vyrobené řízenou enzymovou hydrolyzou z živočišných tkání se využívají ve výzkumu účinnosti látek proti stárnutí, ve vývoji nových léčiv, hemostatických činidel a na výrobu obalových a povlakových materiálů nejen ve farmaceutickém, ale také v kosmetickém, medicínském a v potravinářském průmyslu na jedlé obaly

a povlaky [36–38]. Antioxidanty jsou molekuly schopné zhášet reaktivní formy kyslíku a současně inhibovat oxidaci molekul, které mohou produkovat volné radikály [29,36–38]. Právě volné radikály jsou hlavními faktory, které mohou urychlit glykaci. Glykace je proces, při kterém se na různé sérové bílkoviny váží molekuly glukózy. Tyto molekuly mohou způsobit také oxidační stres a vyvolat další nežádoucí reakce [28,29,38].

### 1.4.2 Želatiny

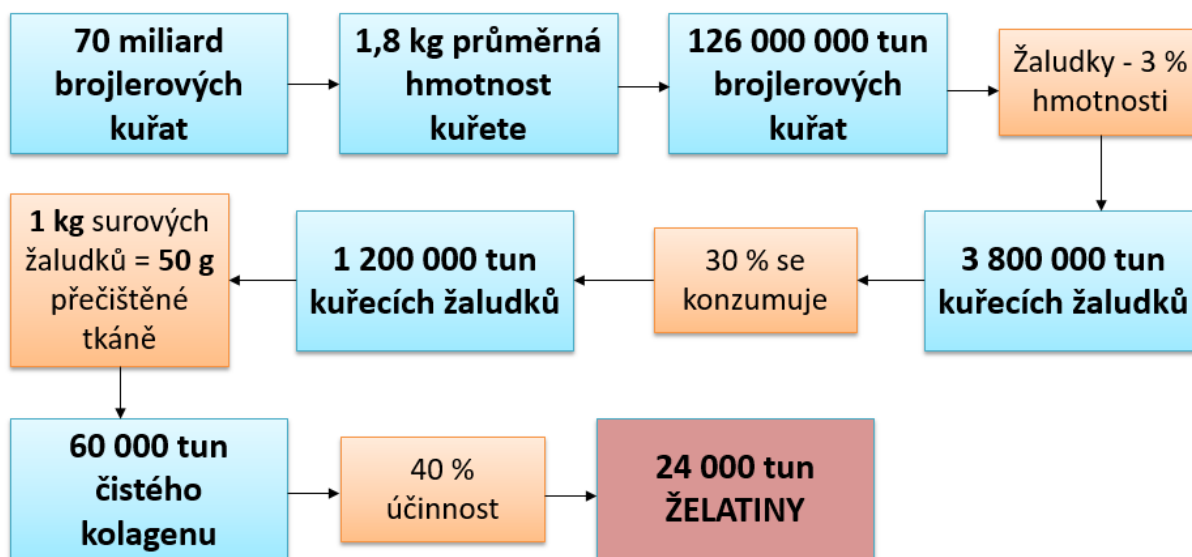
Želatina je částečný hydrolyzát kolagenu vyextrahovaný z živočišného zdroje řízenou kyselou nebo alkalickou hydrolyzou [8,34]. V současné době se většina dostupných želatin vyrábí ze savců. Zdroji komerční želatiny jsou vepřové kůže (cca 46 %), hovězí kůže (cca 29 %), hovězí kosti (cca 23 %) a zbytek tvoří alternativní zdroj, např. drůbeží kůže, kosti a rybí kůže. Právě o alternativní zdroje surovin roste velký zájem, zejména o použití drůbežího nebo rybího odpadu, který může představovat až 30 %, resp. 75 % z celkové hmotnosti původní živočišné suroviny. Hlavní nevýhodou rybích želatin jsou špatné fyzikálně–chemické vlastnosti ve srovnání s komerčními zdroji [1–3,39]. Při porovnání drůbeží a rybí želatiny jsou vlastnosti kolagenu ovlivněny koncentrací iminokyselin (prolin a hydroxyprolin) a distribucí molekulové hmotnosti, kdy drůbeží želatiny vykazují lepší viskoelastické a reologické vlastnosti [1–3,8,39]. Kvalita želatiny je definována jako funkce faktorů souvisejících s její mikrobiologickou bezpečností, vzhledem, zápachem, barvou a chutí, ale také s jejími fyzikálně–chemickými, reologickými a funkčními vlastnostmi a závisí primárně na zdroji a typu kolagenu [17]. Nejdůležitějším parametrem pro určení kvality želatiny je pevnost želatinového gelu, která je ovlivněna vodíkovými vazbami mezi molekulami vody a volnou karboxylovou skupinou aminokyselinových skupin. Pevnost gelu je také ovlivněna velikostí proteinového řetězce, extrakční teplotou, koncentrací a distribucí molekulových hmotností. Většinou je nejkvalitnější želatina extrahována při nižší extrakční teplotě a nižší koncentraci, protože při nižších hodnotách dochází k menší hydrolýze polypeptidových řetězců a tím k menšímu rozpadu želatinových řetězců [1–3,6]. Želatiny jsou mezi hydrokoloidy jedinečné, protože mají schopnost vázat velké množství vody a vytvářet termo–reverzibilní gely a filmy s body tání, které se blíží teplotě lidského těla (cca 35–40 °C) [5,40].



## 1.5 Drůbeží tkáň

Ročně je na světě poraženo kolem 70 miliard brojlerových kuřat na maso [41]. Droby reprezentují až 8 % z živé hmotnosti drůbeže, z toho žaludky tvoří 3 %. Jelikož kuřecí žaludky obsahují ve své struktuře velké procento bílkovin (myofibrilární, sarkoplazmatické a stromatické), vitaminů (A, D, E, K, B1 až B12 a C), lipidů (triacylglycerol), sacharidů (jednoduché a složené), minerálních látek (Ca, K, Na a Mg) a také enzymy, je snaha žaludky kvalitněji zužitkovat.

Teoretické celkové množství vyextrahovaných kolagenních produktů z čistého kolagenu z roční produkce jatečných žaludků ukazuje Obr. 1.3 [1–3,23,41–51].



Obr. 1.3: Teoretické celkové množství vyextrahovaných kolagenních produktů z čistého kolagenu z roční produkce jatečných žaludků [1–3,23,41–51]

Podle statistiky se za rok 2023 vyprodukovalo přes 700 000 tun vepřové a hovězí želatiny. Želatina z kuřecích žaludků by představovala necelé 4 %, tedy kolem 24 000 tun. Nicméně, vepřová a hovězí želatina není přijímána židovskými a muslimskými komunitami, a proto je extrakce drůbeží želatiny vhodnou a inovativní alternativou. Současně se předpokládá, že s rostoucím množstvím populace poroste spotřeba drůbežího masa i poptávka po želatině, která se pro rok 2025 odhaduje na 870 000 tun. Do budoucna se dále předpokládá, že každoročně vzroste spotřeba o 8 %. V roce 2035 bude poptávka želatiny vyšší téměř o 80 % (poptávka bude cca 1 600 000 tun). V tento okamžik již produkce hovězí a vepřové želatiny nemusí pokrýt světový trh a je vhodné komerční zdroje želatiny doplnit o zdroje alternativní [1,2,5,45,47].

## 1.6 Aplikace kolagenních produktů

Želatina je velmi univerzální biopolymer s širokou škálou průmyslových aplikací. Lze ji využít nejen v potravinářském průmyslu na výrobu cukrovinek, ale také jde o biomateriál, který představuje vysoký potenciál pro výrobu jedlých filmů, které mohou prodloužit trvanlivost čerstvých potravin anebo pro výrobu farmaceutických kapslí na ochranu bioaktivních živin. Nově se želatina využívá v biomedicínské oblasti na návrh a vývoj skafoldů pro hojení a regeneraci ran, popř. pro výrobu bioinkoustů do 3D tiskárnen, v nutriční oblasti a pro výrobu antioxidantů a antimikrobiálních výrobků [8,31]. Dále může být použita jako stabilizační a zahušťovací látka, složka pro zvýšení viskozity a zlepšení elasticity, především potravinářských výrobků [5]. Potravinářská želatina je velmi kvalitní výrobek, který může být použit i jako funkční nebo výživová složka potravin [1,8,31].

Želatina představuje biologicky rozložitelný materiál, který se vyznačuje svou dobrou filmotvornou schopností, netoxicitou, biokompatibilitou, transparentností a může být použit i jako nosič léčiv [8,36,37,51,52]. Dále se filmy na bázi proteinu vyznačují vynikajícími bariérovými vlastnosti pro kyslík, oxid uhličitý a těkavé sloučeniny ve srovnání se syntetickými fóliemi, a to je další důvod k tomu, aby se syntetické materiály nahradily bioplasty [36,37,53]. Želatinové filmy jsou od přírody jedinečné a jejich jediná negativní vlastnost je, že jsou hydrofilní. Tento jev může být upraven zavedením hydrofóbní látky do struktury, jako jsou plastifikátory, lipidy, mastné kyseliny, vosk. Díky hydrofóbním látkám dojde ke zlepšení bariérových a antioxidantních vlastností, které ovlivňují především trvanlivost výrobků [36,37,54,55].

## 2. ZHODNOCENÍ SOUČASNÉHO STAVU A CÍLE PRÁCE

### Zhodnocení současného stavu

Zpracování drůbežích odpadů, jako jsou kosti [56,57], kůže [58], běháky [23], játra [59] a mechanicky separované maso [24,60], je již známo. Avšak v současné době odborná literatura neuvádí opracování drůbežích žaludků na želatiny/hydrolyzáty pomocí proteolytických enzymů vyrobených submerzní fermentací geneticky modifikovaných mikroorganismů.

Obsah tuku, resp. obsah minerálních látek se mezi jednotlivými drůbežími produkty velmi liší. Žaludky obsahují  $21,70 \pm 0,01$  %, resp.  $3,900 \pm 0,005$  %; běháky obsahují  $34,8 \pm 0,8$  %, resp.  $16,1 \pm 0,2$  % a drůbeží kůže  $85 \pm 2$  %, resp.  $16,1 \pm 0,2$  %. Proto drůbeží žaludky představují atraktivnější surovinu pro extrakci kolagenních produktů, neboť obsahují nejmenší množství tuku a nejmenší zastoupení anorganických látek z drůbežích tkání [23,24,58,60].

Biotechnologickou metodou lze za použití proteolytických enzymů připravit vysoce kvalitní kolagenní produkty, želatiny a hydrolyzáty.

### Cíle disertační práce

Hlavním cílem disertační práce bylo ověřit procesní podmínky přípravy enzymatické želatiny z drůbežích žaludků a sledovat vliv vybraných procesních parametrů na výtěžnost želatinových frakcí.

Dílčí cíle práce:

- Připravit modelové vzorky želatin a hydrolyzáatů
- Navrhnout optimální podmínky zpracování drůbežích žaludků na kolagenní produkty
- Charakterizovat vlastnosti kolagenních produktů:
  - Základní vlastnosti: pevnost gelu, dynamickou viskozitu, teplotu tání a tuhnutí, čírost a obsah popela
  - Antioxidační aktivitu, molekulovou hmotnost, infračervenou spektrofotometrii s Fourierovou transformací (FTIR), mikrobiologické složení a stravitelnost
- Připravit a otestovat gelovou kosmetickou formulaci a objektivně zhodnotit vliv na pokožku pomocí neinvazivních bioinženýrských metod
  - Sledovanými parametry pokožky byly: hydratace, transepidermální ztráta vody (TEWL), elasticita, změna reliéfu (vliv na redukci vrásek a drsnost pokožky)

***Vědecká hypotéza:*** Předpokládá se, že za zvolených procesních podmínek vícestupňové extrakce kuřecích žaludků se podaří připravit želatinové frakce. Dále se předpokládá, že kolagenní produkty budou mít takové biofyzikální vlastnosti na molekulární úrovni, které bude možné využít v kosmetologii, farmacii (měkké a tvrdé želatinové tobolky) a potravinářství. Předpokládá se, že přidavkem kolagenního hydrolyzátu do kosmetické matrice, při osmitýdenní pravidelné aplikaci (ráno a večer) kosmetické gelové formulace s 1 % kuřecího kolagenního hydrolyzátu v periorbitální oblasti, dojde ke zlepšení stavu pokožky.

### 3. METODIKA ŘEŠENÍ

Zdroj kolagenu pocházel ze svaloviny drůbežích žaludků, které byly zhomogenizovány na průmyslové řezačce masa. Výchozí surovina byla poskytnuta výrobní firmou (RACIOLA Uherský Brod, s.r.o.).

#### 3.1 Zpracování drůbežích tkání na kolagenní produkty

##### 3.1.1 Enzymatická předúprava drůbežích tkání

Enzymatická předúprava kuřecích žaludků, příprava čistého kolagenu, byla následující. Žaludky byly důkladně promyty pod tekoucí studenou vodou (cca 10 min), tím došlo k odstranění albuminů a nečistot z tkáně. Následně byla směs opracovávána v 0,2 M roztoku NaCl v poměru 1:6 při laboratorní teplotě a době 1,5 h (došlo k odstranění globulinů ze struktury). V dalším kroku byl systém opracováván v 0,06 M roztoku NaOH v poměru 1:6 opět při laboratorní teplotě a době 8 h, poté se vyměnil roztok NaOH za čerstvý a provedlo se stejné opracování po dvojnásobnou dobu, tedy 16 h. V tomto bodě došlo k odstranění nekolagenních rozpustných podílů z kuřecí tkáně. Současně se při opracování odstranil i pigment. Následovalo přesušení suroviny při teplotě  $35,0 \pm 1,0$  °C po dobu 36 h. Poté se provedlo odtučnění za použití směsí rozpouštědel petrolether/ethanol (smísených v poměru 1:1) v poměru 1:9 po dobu 36 h, během této doby bylo dvakrát vyměněno rozpouštědlo za čerstvé. Přesušená tkáň se rozemlela na vertikálním mixéru na částice o velikosti kolem 1 mm.

##### 3.1.2 Extrakce želatin z drůbežích tkání

Extrakce želatiny z čistého kolagenu představovala další stupeň zpracování výchozí tkáně na kolagenní produkt. Před samotnou extrakcí se provedlo neutrální opracování suroviny enzymem Protamex®; surovina a destilovaná voda se smíchala v poměru 1:10. Roztok byl mírně třepán cca 20 min a poté se upravilo pH na hodnotu  $6,5 \pm 0,5$  pomocí zředěných roztoků kyselin nebo hydroxidů. Po úpravě pH byl ke směsi přidán proteolytický enzym v množství podle *faktoru A* (množství je vztaženo na sušinu přečištěné suroviny, která činila 90,2 %). Směs se třepala 24 h při laboratorní teplotě a během prvních 4 h byla kontrolována a upravována hodnota pH. Po době třepání se provedla filtrace přes síto opatřené PA tkaninou, tím se získal první kolagenní produkt ve formě hydrolyzátu. Hydrolyzát byl zahřát na teplotu  $85,0 \pm 1,0$  °C (inaktivace enzymu) a sušen v tenké vrstvě (cca 4 mm) při teplotě  $60,0 \pm 1,0$  °C po dobu 48 h.

Neutrálně opracovaná výchozí surovina byla důkladně (cca 10 min) promývána pod studenou tekoucí vodou, aby došlo k vymytí přítomného enzymu a směs se

mohla podrobit dalšímu stupni opracování. Samotná extrakce 1. frakce želatiny probíhala v destilované vodě v poměru 1:8 při teplotě podle *faktoru B* po dobu 45 min. Poté byla želatina odfiltrována od žaludků (vznikl roztok želatiny 1. frakce) a žaludky byly podrobeny další extrakci v destilované vodě v poměru 1:7 při teplotě  $80,0 \pm 1,0$  °C po dobu 45 min a poté poslední extrakci v destilované vodě v poměru 1:7 při teplotě  $90,0 \pm 1,0$  °C po dobu 45 min. Veškeré roztoky želatin 1., 2. a 3. frakce byly zahřáty na teplotu  $85,0 \pm 1,0$  °C, při které byly udržovány po dobu 10 min a tím došlo k inaktivaci možného přítomného zbytku enzymu. Roztoky želatiny byly rozlity na plech a sušeny v tenkém filmu (cca 4 mm) při teplotě  $53,0 \pm 1,0$  °C po dobu 24 h. Nerozložený tuhý podíl byl sušen při teplotě  $103,0 \pm 2,0$  °C po dobu 24 h.

Byla vypočtena účinnost extrakce pomocí hmotnostní bilance (vzorce 1–4), kde  $\eta$  je účinnost extrakce (%),  $L$  je sušina kapalného podílu (g),  $DMS$  je hmotnost vzorku vztažena na hmotnost drůbežích žaludků po opracování (g),  $VSTUP$  je sušina kolagenu (g),  $VÝSTUP$  je součet stanovených hodnot dané frakce zahrnující hydrolyzát, 1., 2. a 3. frakci želatiny a nerozložený tuhý podíl (g). Následně byla stanovena CELKOVÁ BILANCE ( $\Sigma_{BILANCE}$ ) v % a BILAČNÍ CHYBA MĚŘENÍ ( $\Sigma_{CHYBA\ MĚŘENÍ}$ ) v %.

$$\eta = \frac{L}{DMS} \cdot 100 \quad (1) \quad VSTUP = VÝSTUP \quad (2)$$

$$\Sigma_{BILANCE} = \frac{VÝSTUP}{VSTUP} \cdot 100 \quad (3) \quad \Sigma_{CHYBA\ MĚŘENÍ} = 100 - \Sigma_{BILANCE} \quad (4)$$

### 3.2 Zpracování výsledků

Výsledky analýz, jež byly prováděny podle standardních zkušebních metod pro jedlé želatiny, GMIA – Standard Testing Methods for Edible Gelatin, byly zpracovány v programu Microsoft Office Excel (Denver, USA, 2010) a následně vyhodnoceny podle statistického programu Minitab® 19.Ink (Fujitsu Ltd., Tokyo, Japan) [61]. Podle p-faktoru byla stanovena hladina významnosti s 95 % pravděpodobností. Plánování experimentu umožňuje nalézt faktory, které nejvýznamněji ovlivňují výrobní proces i jeho výstupy, a stanovit optimální hodnoty těchto faktorů. Jedná se v podstatě o matematický nástroj, který umožňuje kvantifikovat významnost vstupů, které jsou na počátku experimentu vytipovány jako pravděpodobně vlivné. Plánování experimentu dále určí, jak nastavit vstupy, aby proces dosahoval požadovaných výstupů při minimální variabilitě a odolnosti před nepředvídatelnými negativními vlivy na výrobní proces; využívá se tedy matematická statistika a teorie pravděpodobnosti [62].

Experimenty byly provedeny na základně Taguchiho designu – 2 faktory na 3 úrovních. Taguchi design je metoda vícefaktorových experimentů, která umožňuje prozkoumání minimálního počtu potřebných měření pro statistické vyhodnocení a současně minimalizuje náklady na procesní podmínky. Bylo provedeno celkem 10 experimentů, z toho 9 experimentů podle Taguchiho designu + 1 kontrolní experiment bez přídavku enzymu [6,62,63]. *Faktor A* představoval množství enzymu (%) a *faktor B* teplotu extrakce (°C). Doba extrakce kolagenních produktů a doba opracování výchozí suroviny enzymem byly konstantní, 45 min, resp. 24 h.

### 3.2.1 Charakteristika kolagenních produktů

#### *Obsah sušiny a obsah popela*

Obsah sušiny byl stanoven v koželužských miskách, kde bylo na analytických vahách naváženo 1,000 g vzorku. Tkáň byla umístěna do sušárny s cirkulací vzduchu při teplotě  $103,0 \pm 2,0$  °C a sušena do konstantní hmotnosti. Zjištění obsahu sušiny bylo provedeno podle vzorce (5), kde *DMS* je obsah sušiny ve vzorku (%),  $m_1$  je hmotnost vzorku po vysušení (g) a  $m_2$  je hmotnost vzorku před vysušením (g) [61].

Obsah popela byl stanoven následovně; nejprve byly žíhací kelímky předžíhány v muflové peci ( $650,0 \pm 5,0$  °C, 10 min) a po vychladnutí bylo na analytických vahách naváženo 1,000 g vzorku. Kelímek byl vyžíhán v muflové peci ( $650,0 \pm 5,0$  °C, 4 h). Po ochladnutí byl kelímek zvážen a byl vypočítán obsah popela ve vzorcích podle vztahu (6), kde *AS* je obsah popelovin (%),  $m_A$  je hmotnost popela (g) a  $m$  je navážka kolagenního vzorku (g) [61].

$$DMS = \frac{m_1}{m_2} \cdot 100 \quad (5) \quad AS = \frac{m_A}{m} \cdot 100 \quad (6)$$

#### *Stanovení pevnosti gelu, dynamické viskozity a čírosti*

Stanovení pevnosti gelu spočívalo v přípravě 6,67% roztoku želatiny v předepsané nádobě pro stanovení Bloom hodnoty. Želatina byla nejprve nabotnána a následně rozpuštěna při teplotě  $60,0 \pm 1,0$  °C ve vodní lázni. Roztok byl ochlazen na laboratorní teplotu a umístěn do ledničky ( $10,0 \pm 1,0$  °C, 24 h). Na vychlazeném gelu byla stanovena Bloom hodnota podle přístroje Stevens LFRA Texture Analyzer [61].

Stanovení dynamické viskozity: viskozita 6,67% želatinového roztoku byla stanovena měřením doby průtoku standardizovanou pipetou. Měření probíhalo při teplotě  $60,0 \pm 1,0$  °C na Ubbelohdeho viskozimetru a naměřená doba průtoku byla přepočítána na dynamickou viskozitu dosazením do vzorce (7), kde  $v$  je

kinematická viskozita ( $\text{mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ );  $c$  je konstanta viskozimetru zjištěna ověřenou kalibrační kapalinou (0,5);  $B$  je konstanta korelace na kinetickou energii určená z rozměrů viskozimetru (2,8);  $t$  je aritmetický průměr změřených průtokových dob (s) a  $\rho$  je hustota želatinového roztoku ( $1,005 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ) [61].

$$v = (c \cdot t) - \frac{B}{t} \cdot \rho \quad (7)$$

Stanovení čirosti želatiny na 6,67% roztoku se provedlo ihned po měření viskozity. V kyvetě byla změřena absorbance při vlnové délce 640 nm. Před měřením byla provedena kalibrace na destilovanou vodu [61].

### ***Stanovení teploty tání a tuhnutí***

Stanovení teploty tání želatinového gelu. Vzorek gelu byl odebrán do kapiláry s vnitřním průměrem 2,0–4,0 mm a výškou sloupce 1,0–1,5 cm. Takto připravené kapiláry byly ponechány v ledničce při teplotě  $10,0 \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . Pro samotné měření byla kapilára ponořena do zkumavky s destilovanou vodou společně s teploměrem. Následně se kádinka pozvolna zahřívala na teplotu  $55,0 \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . Jakmile bylo dosaženo teploty tání želatiny, tak se želatina v kapiláře rozpustila a tlak vody vytlačil želatinu z kapiláry ven; v tomto okamžiku se odečetla teplota tání želatinového gelu [1,24,60].

Stanovení teploty tuhnutí gelu. Bylo použito analogické zařízení jako pro stanovení teploty tání. Byla použita zkumavka o vnitřním průměru 1,5–2,0 cm, do které byl po stanovení viskozity nalit roztok želatiny (cca do poloviny zkumavky). Do roztoku byl vsunut teploměr a dán do sestavy s kádinkou. V okamžiku, kdy měl roztok ve zkumavce teplotu  $30,0 \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$ , se do kádinky nalila vychlazená voda z lednice tak, aby sahala od  $\frac{3}{4}$  zkumavky. Od tohoto okamžiku byly do zkumavky vhazovány ocelové kuličky s váhou 0,10 g při poklesu o  $1,0 \text{ }^\circ\text{C}$  až do okamžiku, kdy kulička uvízla ve vrstvě či na povrchu vzorku; v tomto okamžiku byla odečtena teplota tuhnutí želatinového gelu [1,24,60].

### ***Antioxidační aktivita***

Antioxidační aktivita spočívala v přípravě různých koncentrací vzorků želatin v destilované vodě. Bylo připraveno celkem 5 koncentračních roztoků pro každou želatinovou frakci (2, 4, 6, 8 a  $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Samotná příprava roztoku směsi na měření spočívala ve smíchání 500  $\mu\text{l}$  roztoku vzorku želatin s 500  $\mu\text{l}$  95% etanolu a 125  $\mu\text{l}$  0,2 mM roztoku DPPH nebo ABTS. Následně se změřila absorbance vzorků při vlnové délce 517 nm. Výpočty antioxidační aktivity DPPH a ABTS



(%) jsou uvedeny ve vzorcích (8); resp. (9): kde: *AS* představuje absorbanci vzorků želatin v destilované vodě, *AC* představuje kontrolní vzorek (pouze absorbance roztoku DPPH bez vzorků želatin) a *AB* představuje absorbanci vzorků želatin s etanolem a destilovanou vodou bez přídavku DPPH; resp. kde: *AS* představuje absorbanci vzorků želatin v destilované vodě, *AD* představuje kontrolní vzorek (pouze absorbance roztoku ABTS bez vzorků želatin) a *AE* představuje absorbanci vzorků želatin s etanolem a destilovanou vodou bez přídavku ABTS. Veškerá data byla zpracována pomocí Microsoft Office Excel (Denver, USA, 2010) [36–38,63].

$$DPPH = \frac{AC+AB-AS}{AB} \cdot 100 \quad (8) \quad ABTS = \frac{AD+AE-AS}{AE} \cdot 100 \quad (9)$$

### ***Stanovení distribuce molekulových hmotností***

Stanovení distribuce molekulových hmotností vzorků želatin bylo provedeno pomocí gelové permeační chromatografie s refraktometrickou detekcí (GPC–RID). Analytická metoda spočívala v odvážení sypkého vzorku kolagenu, který byl rozpuštěn v 0,1 M fosfátového pufru o hodnotě pH 6,8 v uzavřené vialce. Výsledná koncentrace analytu v roztoku byla 2 mg·ml<sup>-1</sup>. Do přístroje bylo nastříknuto 100 μl vzorku, proces měření probíhal při teplotě 40 ± 1 °C a průtoku roztoku byl 1 ml/min. Celý systém byl kalibrován pomocí standardů pullulanu v rozsahu 667–344 000 g/mol. Byly zjišťovány hmotnosti *M<sub>p</sub>* (g·mol<sup>-1</sup>) molekulová hmotnost v maximu píku; *M<sub>w</sub>* (g·mol<sup>-1</sup>) číselný průměr molekulové hmotnosti; *M<sub>n</sub>* (g·mol<sup>-1</sup>) průměrná molekulová hmotnost a index polydisperzity neboli PDI (–). Veškerá data byla zpracována pomocí softweru Empower (Colorado, USA, 2014) [51,63].

### ***Infračervená spektrofotometrie s Fourierovou transformací (FTIR)***

U jednotlivých práškových vzorků želatin byla pomocí FTIR změřena spektra. Měření bylo provedeno metodou ATR s platinovým krystalem orientovaným vždy na stranu k lampě při fotoexpozici. Jako kontrolní vzorek byl použit pouze background bez vzorku želatiny. Vzorky byly vystaveny infračervenému světlu v intervalu vlnových délek od 400 cm<sup>-1</sup> do 4000 cm<sup>-1</sup>. Celkově bylo během jednoho měření pořízeno 32 skenů. Charakteristické FTIR vrcholové vibrační oblasti pro práškové želatiny jsou Amid A (3440–3300 cm<sup>-1</sup>), Amid B (3080–2899 cm<sup>-1</sup>), Amid I (1700–1600 cm<sup>-1</sup>), Amid II (1580–1500 cm<sup>-1</sup>) a Amid III (1350–1200 cm<sup>-1</sup>) [33,44]. Veškerá data byla zpracována pomocí Microsoft Office Excel (Denver, USA, 2010) [63].

### 3.2.2 Testování kolagenních produktů

#### *Stravitelnost kolagenních produktů*

Pro zjištění stravitelnosti byla použita metoda [1], ve které jsou želatiny rozemlety na jemný prášek. Před samotným měřením stravitelnosti bylo nutné zjistit obsah sušiny a popela ve vzorku. Sáčky na stavitelnost byly proprány v acetonu a odvětrány v digestoři. Do sáčků byla navážena želatina a připravené sáčky byly vloženy do inkubační láhve a zality  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  HCl a pepsinem. Láhve byly umístěny do inkubátoru na 2 a 4 h. Po uplynutí doby byly sáčky důkladně promyty a pro některé sáčky experiment skončil a zbylé sáčky byly opět vloženy do inkubační láhve, kde byly zality fosfátovým pufrům o pH 7,45 a k pufru byl přidán pankreatin. Láhev se nechala inkubovat po dobu 24 h. První inkubace simuluje proces trávení v žaludku za 2, resp. 4 h a druhá inkubace simuluje proces trávení ve střevě po dobu 24 h. Po inkubacích byly sáčky vyjmuty, vysušeny, zváženy a následně spáleny kvůli zjištění obsahu popela ve vzorcích.

Stravitelnost sušiny vzorku DMD (%) byla vypočtena podle vzorců (10–12), kde *DMR* je hmotnost vzorku bez sáčku po inkubaci a vysušení (g); *DM* je obsah sušiny ve vzorku (g);  $c_1$  je korekce hmotnosti sáčku po hydrolyze (g);  $m_1$  je hmotnost sáčku (g);  $m_2$  je hmotnost vzorku (g);  $m_3$  je hmotnost vysušeného sáčku se vzorkem po inkubaci (g); *S* je obsah sušiny ve vzorku (%) a  $m_S$  je hmotnost vzorku na stanovení sušiny (g). Pro hodnotu stravitelnosti organické hmoty vzorku OMD (%) platí následující vzorce (13–15), kde *AR* je hmotnost popela vzorku bez sáčku (g); *OM* je obsah organické hmoty v sušině vzorku (g);  $c_2$  je korekce sáčku po spálení (g);  $m_1$  je hmotnost sáčku (g);  $m_2$  je hmotnost vzorku (g);  $m_4$  je hmotnost popela vysušeného sáčku se vzorkem po inkubaci (g); *S* je obsah sušiny ve vzorku (%) a *AS* je obsah popela ve vzorku (%). Veškerá data byla zpracována pomocí Microsoft Office Excel (Denver, USA, 2010).

$$DMD = 100 - \frac{100 \cdot DMR}{m_2 \cdot DM} \quad (10) \quad OMD = 100 - \frac{100 \cdot (DMR - AR)}{m_2 \cdot DM \cdot OM} \quad (13)$$

$$DMR = m_3 - m_1 \cdot c_1 \quad (11) \quad AR = m_4 - m_1 \cdot c_2 \quad (14)$$

$$DM = \frac{S \cdot m_S}{100} \quad (12) \quad OM = \frac{S - AS}{100} \quad (15)$$

#### *Mikrobiologické složení kolagenních produktů*

Postup práce vychází ze studie Gál et al. s částečnými modifikacemi [43,44]. Do skleněných lahví bylo naváženo požadované množství v gramech PCA, SDA, TSA a VRBL. Směs byla zhomogenizována a následně rozlita do Petriho misek, které se nechaly do druhého dne vychladnout. Následně byly připraveny želatinové roztoky, které byly nastříknuty na živné půdy a očkovací hokejkou byl roztok rozetřen po celé ploše živných půd. Vzorky SDA byly kultivovány při

teplotě  $25,0 \pm 0,5$  °C po dobu 7 dní, vzorky PCA byly kultivovány při teplotě  $30,0 \pm 0,5$  °C po dobu 24 h, vzorky TSA a VRBL byly kultivovány po dobu 24 h při teplotě  $37,0 \pm 0,5$  °C. V laminárním boxu Lambda Life došlo k přeočkování vyrostlých mikroorganismů. Veškeré přeočkované vzorky byly opět kultivovány. Po 24 h, resp. po 7 dnech SDA (kvasinky), byla do ependorfeek napipetována voda, etanol a vzorek vyrostlých mikroorganismů. Vzniklý roztok byl v ependorfkách odstředěn a po odstranění supernatantu byly sraženiny rozpuštěny v 70% kyselině mravenčí a 100% acetonitrilu. Provedlo se další odstředění a následně byl supernatant a roztok matrice (kyselina  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová) napipetován na aplikační destičku MALDI, která se podrobila identifikaci mikroorganismů v hmotnostním spektrometru.

Použitá identifikační kritéria pro vyhodnocení dat jsou: 2300–300 velmi pravděpodobná druhová identifikace, 2000–2299 bezpečná rodová identifikace, 1700–1999 pravděpodobná identifikace rodu a  $< 1700$  nespolehlivá identifikace. Hmotnostní spektra byla generována automaticky pomocí hmotnostního spektrometru, který pracoval v lineárním pozitivním módu v hmotnostním rozsahu od 2 000 do 20 000 Da. Před samotným měřením byl přístroj kalibrován pomocí Bruker Bacterial Test Standard [43,44].

### ***Testování gelové kosmetické formulace***

Veškeré vysušené filmy hydrolyzátu byly v třecí misce rozmělněny na velmi jemný prášek a do karbopolového gelu byl přidán kuřecí kolagenní hydrolyzát tak, aby vznikla homogenizací 1% gelová kosmetická formulace. Experimentálního měření se zúčastnilo 10 dobrovolnic ve věku  $50 \pm 9$  let. Měření probíhalo v periorbitální oblasti, tedy na pravém a levém spánku. Výběr dobrovolnic a postup testování byl v souladu s mezinárodními etickými principy biomedicínského výzkumu s lidskými účastníky [64]. První měření biofyzikálních parametrů pokožky neboli 0. měření, bylo provedeno před používáním kosmetické gelové formulace za konstantních podmínek laboratoře (teplota, vlhkost) a před delším měřením byly dobrovolnice ponechány 15 min v klidu v laboratoři kvůli aklimatizaci. Druhé a třetí měření proběhlo po 4. a po 8. týdnu pravidelné dvoudenní aplikace za stejných podmínek.

### ***Hydratace pokožky a transepidermální ztráta vody z pokožky (TEWL)***

Hydratace pokožky byla zjištěna pomocí korneometrické sondy, kdy bylo naměřeno 5 hodnot na každém iritovaném místě (pravý i levý spánek). Stupnice korneometru dle hodnot dělí pokožku na extrémně suchou ( $< 30$  k.j.), suchou (30–45 k.j.) a normální ( $> 45$  k.j.) [65].

TEWL byla monitorována pomocí tewametrické sondy, kdy bylo naměřeno celkem 15 hodnot na každém iritovaném místě (opět pravý i levý spánek). Tewametrická sonda TM 300 slouží k měření množství vypařené vody z pokožky. Děj je popisován Fickovým zákonem [66]. Stav bariérové funkce pokožky podle přístroje odpovídá následující stupnici: velmi dobrá ( $0-10 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ), dobrá ( $10-15 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ), normální ( $15-25 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ), napjatá ( $25-30 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ) a kritická ( $> 30 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ) [67].

### ***Elasticita pokožky a množství vrásek***

Pomocí reviskometru RV 600 lze měřit elasticitu pokožky, kterou přístroj vyhodnotí pomocí rychlosti šíření akustické vlny povrchem kůže. Měření probíhá otáčením sondy v úhlech po  $30^\circ$ . Získané výsledky závisí jak na izotropii, tak na anizotropii kůže, která je ovlivněna stárnutím kůže. Předpokladem je zvýšení elasticity pokožky po pravidelné aplikaci kosmetické gelové formulace. Zároveň dojde k vyrovnání kožního reliéfu pleti. Princip měření spočívá na jemném přitlaku dvou senzorů na pokožku, kdy jeden senzor vydává rázovou vlnu a druhý senzor ji přijímá. Pro každý úhel pootočení byl určen aritmetický průměr a směrodatná odchylka [68,69].

Množství vrásek bylo snímáno pomocí unikátní kamery Visioscope s polarizačními filtry, kdy byly pořízeny snímky pokožky s třicetinásobným zvětšením. Jedná se o rychlou a jednoduchou analýzu reliéfu pokožky, postačí pouze vytvoření snímku a poté okamžitá analýza vrásek v dané oblasti v % [3].

### ***Reliéf pokožky***

Pro sledování změn reliéfu pokožky byla využita metoda na měření profilu (topografie) otisků snímaného kožního povrchu. Pro měření byl používán systém, který pracuje na principu měření intenzity světelného záření (transmise světla) propuštěného silikonovou replikou pokožky. Princip měření je založen na průchodu světla velmi tenkou průsvitnou speciální silikonovou replikou modré barvy. Množství absorbovaného světla ( $\phi_{ex}$ ) je určeno Lambert–Beerovým zákonem (16), kde  $\phi_{in}$  je množství vstupujícího světla,  $e$  je Eulerovo číslo,  $k$  je absorpční konstanta a  $d$  je délka optické dráhy.

$$\phi_{ex} = \phi_{in} \cdot e^{-kd} \quad (16)$$

Silikon obsahuje konstantní koncentraci modrého pigmentu schopného absorbovat záření a výsledkem jsou 2D či 3D obrazy kožního reliéfu. Měření probíhá vložením repliky mezi světelný zdroj a paralelně s ním umístěnou CCD kamerou, kterou se snímá prošlé světelné spektrum. Světlo je poté absorbováno

v závislosti na tloušťce repliky, v závislosti na intenzitě světla a na délce optické dráhy světelného paprsku, resp. na hloubce vrásky. CCD kamera měří světlo procházející replikou v úrovních šedi a získaný obraz je zobrazen v jednotlivých souřadnicích X, Y a Z, kdy X a Y popisují výšku a Z poté hloubku, kterou lze stanovit v rozmezí od 20 do 300  $\mu\text{m}$ . Měření mikroreliefu pokožky a ověření změn po aplikaci modelových formulací je z kosmetického hlediska zajímavým výstupem, neboť je snadno použitelný a ekonomicky přínosný pro výzkumné a vývojové laboratoře a instituce zabývající se účinností produktů proti stárnutí [3].

## 4. VÝSLEDKY DISERTAČNÍ PRÁCE

### 4.1 Výtěžek kolagenních frakcí

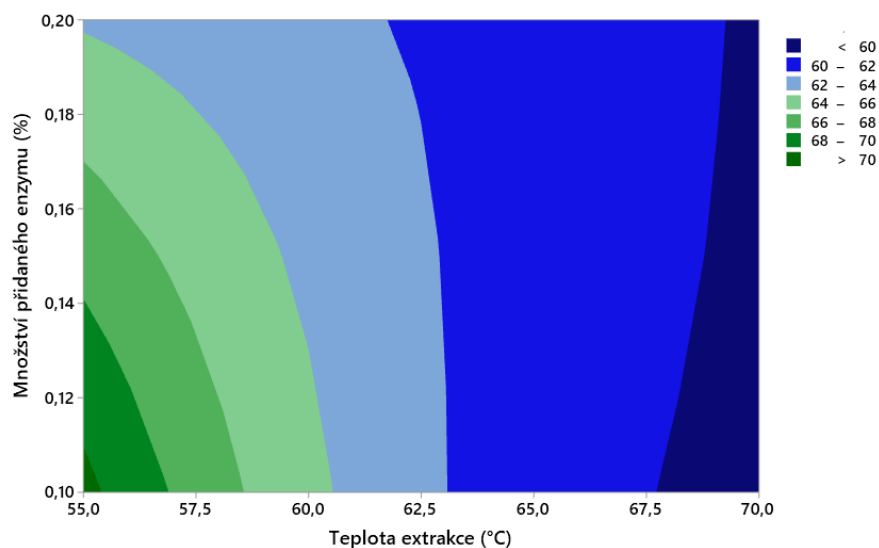
Z Tab. 4.1 je patrné, že množství drůbežního hydrolyzátu bylo v intervalu od 8,2 do 9,8 %. Nejnižší hodnota, tedy 8,2 %, byla získána experimentem č. 8 a 9 a naopak nejvyšší hodnota (9,8 %) u exp. č. 1. U slepého pokusu, exp. č. 10, bylo množství hydrolyzátu pouze 1,7 %. Hodnoty výtěžku hydrolyzátu jsou velmi podobné, lze tedy říci, že opracování výchozí suroviny enzymem má na drůbeží tkáň stejný vliv, neboť u exp. č. 10 (zde nebyl použit enzym k opracování výchozí suroviny) byl výtěžek hydrolyzátu zanedbatelný. Výtěžek želatiny první frakce byl mezi hodnotami 59,8–70,6 %. Nižší hodnota byla vyextrahována u exp. č. 3, 6 a 9, naopak nejvyšší hodnota byla zjištěna u exp. č. 1. Opět nízký výtěžek 7,4 % u slepého exp. č. 10 potvrdil, že opracování enzymem má vliv na výtěžek kolagenních frakcí. Průměrný výtěžek druhých frakcí byl  $6,5 \pm 0,8$  % a třetích frakcí želatin byl  $3,0 \pm 1,0$  %. Slepým pokusem bylo dosaženo výtěžku želatin pouze 5,4 a 0,1 %. Bilanční chyba měření ( $\Sigma_{\text{CHYBA MĚŘENÍ}}$ ) se pohybovala od 1,4 do 3,8 %.

Tabulka 4.1 Rozpis experimentů s technologickými podmínkami a charakterizací procesu podle Taguchiho designu včetně výtěžků jednotlivých kolagenových frakcí a bilanční chyby měření

Exp. č.	Faktor A (%)	Faktor B (°C)	Výtěžek hydro. (%)	Výtěžek 1. frak. (%)	Výtěžek 2. frak. (%)	Výtěžek 3. frak. (%)	$\Sigma_{\text{CHYBA MĚŘENÍ}}$ (%)
1	0,10	55,0	9,8	70,6	5,2	1,4	1,4
2	0,10	62,5	9,4	62,4	6,2	3,6	3,6
3	0,10	70,0	9,2	59,8	6,4	3,8	3,8
4	0,15	55,0	9,4	67,4	5,8	1,8	1,8
5	0,15	62,5	9,2	62,2	6,4	3,6	3,6
6	0,15	70,0	9,2	59,8	6,8	3,8	3,8
7	0,20	55,0	8,6	63,8	6,6	1,8	1,8
8	0,20	62,5	8,2	61,8	7,2	3,6	3,6
9	0,20	70,0	8,2	59,8	7,8	3,8	3,8
10	0,00	62,5	1,7	7,4	5,4	0,1	0,1

Z Obr. 4.1 je patrné, že množství vyextrahované želatiny první frakce je ovlivněno jak množstvím přidaného enzymu, tak teplotou extrakce. Platí, že čím je větší množství přidaného enzymu nebo čím je vyšší teplota extrakce, tím nižší je výtěžek želatiny první frakce. Tento jev je zřejmě způsoben vyšší denaturací

kolagenu, tedy vyšším stupněm rozpadu vazeb. Pokud chceme vyextrahovat želatinu s co nejvyšším výtěžkem opracování výchozí suroviny na kolagenní produkt, je žádoucí použít co nejmenší množství enzymu a želatinu extrahovat při nižší extrakční teplotě. Z grafu vyplývá, že při použití 0,10 % enzymu a 55,0 °C je účinnost extrakce více než 70,0 %.



Obr. 4.1: Vrstevnicový graf vlivů množství přidaného enzymu (%) a teploty extrakce (°C) na výtěžek želatiny první frakce

## 4.2 Charakteristika kolagenních produktů

### 4.2.1 Gelotvorné a jiné vlastnosti

V Tab. 4.2 jsou znázorněny naměřené hodnoty. U obsahu popela platí, čím je nižší obsah popeloviny, tím je želatina kvalitnější a pro aplikaci v potravinářském a medicínském průmyslu je potřeba, aby byl obsah popela nižší než 2 %. Jak můžeme vidět, u všech vzorků byla tato podmínka splněna. Obsah popela se pohyboval od  $0,44 \pm 0,02$  do  $0,81 \pm 0,02$  %, u směsí želatiny druhé a třetí frakce bylo podle vzorce (6) vypočteno množství popela  $0,937 \pm 0,016$ , resp.  $1,08 \pm 0,02$  %. I přes tyto vyšší získané hodnoty obsahu popela se jedná o velmi kvalitní želatinu, které lze aplikovat i ve farmaceutickém průmyslu. Dalším důležitým ukazatelem kvality želatiny je pevnost želatinového gelu. U některých želatin byla zjištěna poměrně nízká pevnost gelu ( $25 \pm 1$  Bloom; exp. č. 7) a u některých zase poměrně vysoká pevnost gelu ( $439 \pm 6$  Bloom; exp. č. 6). Průměrně byla pevnost gelu prvních želatinových frakcí  $241 \pm 4$  Bloom, pevnost gelu směsí druhých a třetích frakcí byla  $172 \pm 3$ , resp.  $244 \pm 5$  Bloom. U slepého pokusu (exp. č. 10) nebyla naměřena žádná pevnost gelu, jedná se o hydrolyzát, a proto na tomto vzorku nebyly provedeny ani následné analýzy. Mezi další zjišťované parametry

patřila viskozita, teplota tání a teplota tuhnutí a čírost. Dynamická viskozita se pohybovala v intervalu od  $1,0 \pm 0,4$  do  $3,4 \pm 0,3$  mPa·s. Nejnižší hodnota viskozity byla zjištěna u exp. č. 7 a naopak nejvyšší hodnota dynamické viskozity u exp. č. 3 a 6. U směsi želatin druhé frakce byla viskozita  $1,8 \pm 0,2$  a u třetí frakce  $2,2 \pm 0,2$  mPa·s. Teplota tuhnutí prvních želatinových frakcí byla průměrně  $19 \pm 2$  °C, nejvyšší naměřená hodnota byla  $22 \pm 2$  (exp. č. 3) a  $22 \pm 1$  °C (exp. č. 6) a nejnižší teplota tuhnutí byla zjištěna u exp. č. 7, a to  $14 \pm 2$  °C. U směsi druhé želatinové frakce byla teplota tuhnutí  $20 \pm 1$  °C a u třetí frakce  $17 \pm 1$  °C. Teplota tání prvních želatinových frakcí byla průměrně  $32 \pm 1$  °C, nejvyšší naměřená hodnota byla  $37 \pm 1$  (exp. č. 3) a  $37 \pm 2$  °C (exp. č. 6) a nejnižší teplota tání byla zjištěna u exp. č. 7, a to  $28 \pm 1$  °C. U směsi želatin druhé frakce byla teplota  $32 \pm 1$  °C a u třetí frakce  $33 \pm 1$  °C. Čírost se pohybovala v intervalu od  $0,880 \pm 0,020$  do  $2,059 \pm 0,008$ . Nejnižší hodnota čírosti byla zjištěna u exp. č. 3 a naopak nejvyšší hodnota čírosti u exp. č. 7. U směsi želatin druhé frakce byla čírost  $1,946 \pm 0,004$  a u směsi třetí frakce byla čírost  $1,760 \pm 0,090$ .

Tabulka 4.2 Rozpis experimentů s charakterizací připravených kolagenních produktů (obsah popela, pevnost gelu, viskozita, teplota tuhnutí a tání a čírost)

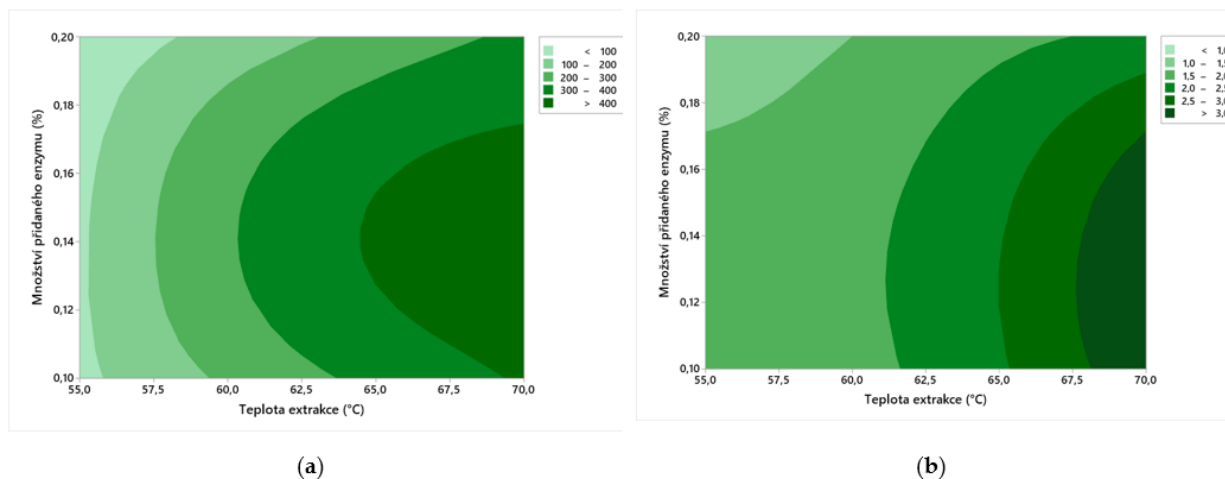
Exp. č.	Obsah popela (%)	Pevnost gelu (Bloom)	Viskozita (mPa·s)	Teplota tuhnutí (°C)	Teplota tání (°C)	Čírost
1	$0,440 \pm 0,020$	$76 \pm 4$	$1,6 \pm 0,3$	$15 \pm 1$	$29 \pm 2$	$1,514 \pm 0,017$
2	$0,477 \pm 0,002$	$275 \pm 4$	$2,1 \pm 0,1$	$18 \pm 2$	$33 \pm 2$	$1,007 \pm 0,004$
3	$0,510 \pm 0,020$	$409 \pm 6$	$3,4 \pm 0,3$	$22 \pm 2$	$37 \pm 1$	$0,880 \pm 0,020$
4	$0,533 \pm 0,007$	$82 \pm 3$	$1,7 \pm 0,2$	$16 \pm 1$	$29 \pm 1$	$1,523 \pm 0,005$
5	$0,539 \pm 0,007$	$356 \pm 4$	$2,1 \pm 0,2$	$21 \pm 2$	$34 \pm 1$	$1,171 \pm 0,010$
6	$0,720 \pm 0,020$	$439 \pm 6$	$3,4 \pm 0,3$	$22 \pm 1$	$37 \pm 2$	$0,991 \pm 0,007$
7	$0,769 \pm 0,009$	$25 \pm 1$	$1,0 \pm 0,4$	$14 \pm 2$	$28 \pm 1$	$2,059 \pm 0,008$
8	$0,796 \pm 0,006$	$188 \pm 2$	$1,7 \pm 0,3$	$20 \pm 2$	$31 \pm 2$	$1,544 \pm 0,007$
9	$0,810 \pm 0,020$	$322 \pm 7$	$2,1 \pm 0,2$	$21 \pm 1$	$33 \pm 1$	$1,059 \pm 0,015$
10	$0,360 \pm 0,020$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$
11	$0,937 \pm 0,016$	$172 \pm 3$	$1,8 \pm 0,2$	$20 \pm 1$	$32 \pm 1$	$1,946 \pm 0,004$
12	$1,080 \pm 0,020$	$244 \pm 5$	$2,2 \pm 0,2$	$17 \pm 1$	$33 \pm 1$	$1,760 \pm 0,090$

Na Obr. 4.2 (a) můžeme pozorovat vrstvený graf vlivů faktorů A a B na pevnost želatinového gelu. Zde je patrný růst pevnosti gelu v Bloom s rostoucí teplotou extrakce, tedy při  $70,0$  °C byly vyextrahovány kolagenní produkty s pevností gelu více než 400 Bloom. Vliv enzymu na pevnost gelu má tendenci jak stoupat, tak klesat. Platí, že při množství enzymu  $0,15$  % byla pevnost gelu



neoptimálnější. Pokud začneme množství enzymu Protamex® přidávat nebo ubírat dojde k poklesu pevnosti gelu. Tento jev může být způsoben zkrácením délky kolagenního řetězce želatiny a tím snížení molekulové hmotnosti kolagenu a zkrácení délky řetězce aminokyselin, což má za následek snížení pevnosti gelu. Současně vyšší pevnost gelu souvisí s vyšším podílem zesíťovaných složek řetězce  $\alpha$  a  $\beta$ . Vyšší pevnost gelu může být způsobena i přítomností hydroxyprolinu v kolagenu, který způsobuje lepší stabilitu vodíkových vazeb mezi molekulami vody a volnými hydroxylovými skupinami AMK v želatině. Nejlepší pevnosti gelu,  $439 \pm 6$  Bloom, bylo naměřeno při nejvyšší extrakční teplotě ( $70,0$  °C) a střednímu přídatku enzymu Protamex® ( $0,15$  %).

Na Obr. 4.2 (b) můžeme pozorovat vrstvený graf vlivů faktorů A a B na dynamickou viskozitu. Z grafu je patrné, že s rostoucím množstvím enzymu klesala dynamická viskozita, ale s rostoucí extrakční teplotou dynamická viskozita rostla. Viskozita je přímo úměrná pevnosti gelu, tedy čím je vyšší pevnost gelu, tím je vyšší i viskozita, která je ovlivněna molekulovou hmotností, délkou AMK řetězce a vyšším podílem zesíťovaných složek řetězce  $\alpha$  a  $\beta$ . Želatina s nízkou viskozitou se vyznačuje křehkými gely, zatímco želatina s vysokou viskozitou tvrdšími gely. Nízká viskozita želatiny souvisí s nadměrnou a nežádoucí hydrolyzou kolagenu. Nejvyšší viskozita byla naměřena u exp. č. 3 a 6 (hodnoty byly stejné, a to  $3,4 \pm 0,3$  mPa.s) a v obou případech byla pevnost gelu více jak 400 Bloom.



Obr. 4.2: Vrstvenicové grafy vlivů množství přidaného enzymu (%) a teploty extrakce (°C); (a) na pevnost želatinového gelu želatiny první frakce, (b) na dynamickou viskozitu želatiny první frakce

#### 4.2.2 Antioxidační aktivita

V Tab. 4.3 jsou uvedeny výsledky vychytávaných volných radikálů DPPH/ABTS pro jednotlivé koncentrace (2, 4, 6, 8 a  $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) vzorků želatin. Kuřecí želatiny umožňují efektivnější vychytávání volných radikálů za

přítomnosti zbytkových volných  $\text{NH}_2$  aminoskupin ve své struktuře, čímž vytváří stabilnější makromolekulu s vyšší pevností gelu a vyšší viskozitou. Čím vyšší % vychytávání volných radikálů, tím lepší antioxidační aktivita. U antioxidační aktivity se předpokládá, že s nižší pevností gelu, nižší viskozitou a nižší molekulovou hmotností poroste množství vychytávaných volných radikálů a tím i antioxidační aktivita. Obecně platí, že s rostoucí koncentrací roztoku (2–10  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) rostla i antioxidační aktivita. Hodnoty vychytávaných volných radikálů u želatinového roztoku o koncentraci 2  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  byly pro DPPH a ABTS průměrně  $71 \pm 1$ , resp.  $82 \pm 1$  %. Hodnoty vychytávaných volných radikálů u želatinového roztoku o koncentraci 4  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  byly pro DPPH a ABTS průměrně  $75 \pm 1$ , resp.  $86 \pm 1$  %. Hodnoty volných radikálů u roztoku o koncentraci 6  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  byly pro DPPH a ABTS průměrně  $80 \pm 1$ , resp.  $90 \pm 1$  %. Hodnoty vychytávaných volných radikálů u želatinového roztoku o koncentraci 8  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  byly pro DPPH a ABTS průměrně  $84 \pm 1$ , resp.  $92 \pm 1$  % a hodnoty vychytávaných volných radikálů u želatinového roztoku o koncentraci 10  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  byly pro DPPH a ABTS průměrně  $87 \pm 1$ , resp.  $95 \pm 1$  %. Současně platí, že s nižší pevností gelu a nižší viskozitou byla antioxidační aktivita u jednotlivých vzorků vyšší.

Tabulka 4.3 Hodnoty vychytávaných volných radikálů pro DPPH/ABTS u želatinových roztoků o koncentracích 2, 4, 6, 8 a 10  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$

Exp. č.	DPPH (%)					ABTS (%)				
	Koncentrace želatiny ( $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ )									
	2	4	6	8	10	2	4	6	8	10
1	$72 \pm 1$	$76 \pm 1$	$82 \pm 1$	$85 \pm 2$	$87 \pm 2$	$84 \pm 2$	$87 \pm 2$	$91 \pm 2$	$93 \pm 1$	$97 \pm 1$
2	$71 \pm 1$	$72 \pm 2$	$80 \pm 1$	$82 \pm 1$	$87 \pm 1$	$83 \pm 2$	$85 \pm 1$	$88 \pm 2$	$93 \pm 1$	$94 \pm 1$
3	$71 \pm 2$	$76 \pm 2$	$82 \pm 1$	$82 \pm 2$	$86 \pm 1$	$80 \pm 1$	$85 \pm 1$	$88 \pm 1$	$93 \pm 2$	$95 \pm 1$
4	$72 \pm 2$	$77 \pm 2$	$82 \pm 1$	$85 \pm 2$	$87 \pm 1$	$84 \pm 1$	$88 \pm 2$	$91 \pm 1$	$93 \pm 2$	$96 \pm 1$
5	$69 \pm 1$	$76 \pm 1$	$77 \pm 2$	$82 \pm 1$	$85 \pm 1$	$80 \pm 2$	$87 \pm 2$	$90 \pm 2$	$91 \pm 1$	$96 \pm 1$
6	$69 \pm 1$	$74 \pm 1$	$78 \pm 1$	$84 \pm 1$	$87 \pm 2$	$82 \pm 1$	$84 \pm 2$	$91 \pm 1$	$90 \pm 1$	$95 \pm 1$
7	$71 \pm 1$	$77 \pm 1$	$82 \pm 2$	$84 \pm 1$	$87 \pm 1$	$84 \pm 2$	$88 \pm 1$	$90 \pm 1$	$93 \pm 2$	$95 \pm 1$
8	$72 \pm 1$	$76 \pm 2$	$79 \pm 2$	$84 \pm 1$	$87 \pm 2$	$82 \pm 1$	$88 \pm 2$	$90 \pm 2$	$93 \pm 1$	$95 \pm 2$
9	$70 \pm 1$	$74 \pm 2$	$77 \pm 1$	$84 \pm 1$	$87 \pm 2$	$80 \pm 1$	$86 \pm 1$	$88 \pm 1$	$92 \pm 1$	$94 \pm 1$
10	$69 \pm 1$	$72 \pm 2$	$82 \pm 1$	$85 \pm 1$	$87 \pm 1$	$81 \pm 2$	$85 \pm 1$	$88 \pm 2$	$91 \pm 2$	$97 \pm 1$
11	$72 \pm 2$	$73 \pm 1$	$79 \pm 2$	$85 \pm 1$	$86 \pm 1$	$84 \pm 2$	$85 \pm 2$	$91 \pm 1$	$90 \pm 2$	$94 \pm 2$
12	$72 \pm 1$	$72 \pm 1$	$77 \pm 1$	$85 \pm 1$	$86 \pm 1$	$81 \pm 1$	$87 \pm 1$	$89 \pm 2$	$93 \pm 2$	$95 \pm 1$
$x \pm SD$	$71 \pm 1$	$75 \pm 1$	$80 \pm 1$	$84 \pm 1$	$87 \pm 1$	$82 \pm 1$	$86 \pm 1$	$90 \pm 1$	$92 \pm 1$	$95 \pm 1$

### 4.2.3 Stanovení distribuce molekulových hmotností

V Tab. 4.4 jsou uvedeny hodnoty molekulových hmotností u jednotlivých vzorků želatin, včetně indexu polydisperzity (PDI). Hodnoty molekulové hmotnosti maxima píku ( $M_p$ , kDa) jsou v intervalu od 17,5 (exp. č. 7) do 57,5 (exp. č. 6) kDa. Hodnoty hmotnostně průměrné molekulové hmotnosti ( $M_w$ , kDa) byly velmi odlišné. Pro vzorky č. 1, 4, 7 a 8 byly hodnoty  $>50,0$  kDa a pro vzorky č. 2, 3, 5, 6 a 9 byly hodnoty  $<50,0$  kDa. Nejvyšší  $M_w$  105,1 kDa byla naměřena u vzorku č. 6 a nejnižší  $M_w$  24,4 kDa byla naměřena u vzorku č. 7. Hodnoty číselně průměrné molekulové hmotnosti ( $M_n$ , kDa) byly v intervalu od 5,3 (exp. č. 7) do 9,6 (exp. č. 6) kDa. Index polydisperzity vyjadřuje rozdělení molekulových hmotností v daném vzorku želatiny. Jedná se o neuniformitu velikosti částic a platí:  $D=1$  monodisperzní systém a  $D>1$  polydisperzní systém. Z Tab. 4.4 je patrná polydisperzita všech vzorků želatin. U vzorků č. 3 a 6 byla zjištěna nejvyšší polydisperzita (průměrně  $PDI=11,05 \pm 0,07$ ), naopak u vzorků č. 1 a 7 (průměrně  $PDI=4,50 \pm 0,14$ ) byla zjištěna nejnižší polydisperzita. Tedy u vzorku č. 3 a 6 byla vyšší neuniformita velikosti částic než u vzorků č. 1 a 7. Pro ostatní vzorky byla zjištěna PDI v intervalu od 5,1 do 9,0.

Tabulka 4.4 Hodnoty molekulových hmotností u jednotlivých vzorků želatin, včetně indexu polydisperzity (PDI)

Exp. č.	$M_p$ (kDa)	$M_w$ (kDa)	$M_n$ (kDa)	PDI (-)
1	18,4	24,5	5,6	4,4
2	41,0	65,1	8,3	7,9
3	44,1	94,9	8,6	11,1
4	18,8	30,5	6,0	5,1
5	19,2	57,3	6,4	9,0
6	57,5	105,1	9,6	11,0
7	17,5	24,4	5,3	4,6
8	18,7	45,8	7,0	6,5
9	38,7	74,0	8,3	8,9

V Tab. 4.5 je uvedeno jednotlivé procentuální zastoupení molekulových hmotností ve vzorcích želatin rozdělených na tři základní typy řetězců v kolagenních produktech:  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ -řetězce. Hodnoty  $M_L$  (%) reprezentují hodnoty molekulových hmotností 0–80 kDa. Hodnoty  $M_\alpha$  (%) reprezentují hodnoty molekulových hmotností 80–160 kDa, typické pro  $\alpha$ -řetězce. Hodnoty  $M_\beta$  (%) reprezentují hodnoty molekulových hmotností 160–250 kDa, typické pro  $\beta$ -řetězce. Hodnoty  $M_\gamma$  (%) reprezentují hodnoty molekulových hmotností 250–380

kDa, typické pro  $\gamma$ -řetězce a hodnoty  $M_H$  (%) reprezentují hodnoty molekulových hmotností >380 kDa. U veškerých vzorků želatin byly nalezeny všechny typické řetězce;  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ -řetězce. Ve vzorcích jsou nejvíce zastoupeny nižší kolagenové frakce o hodnotách 0–80 kDa s průměrným procentuálním zastoupením  $65 \pm 5$  %. U vzorků č. 1, 2, 7 a 9 bylo nalezeno >10 %  $\alpha$ -řetězců, u vzorků 3, 4, 5, 6 a 8 bylo nalezeno <10 %  $\alpha$ -řetězců. Želatina č. 1 a 2 obsahovala nejvíce  $\beta$ -řetězců (8,3, resp. 8,2 %) a nejvíce  $\gamma$ -řetězců bylo detekováno u želatiny č. 4 (8,4 %). Taktéž u téměř všech vzorků želatin (kromě vzorku č. 1) byly nalezeny kolagenové frakce >380 kDa s průměrným procentuálním zastoupením  $12 \pm 6$  %. Molekulová hmotnost a její distribuce je částečně ovlivněna viskozitou a pevností gelu. Nejnižší viskozita i pevnost gelu byla zjištěna u exp. č. 7 a nejvyšší viskozita, včetně nejvyšší pevnosti gelu, byla zjištěna u vzorků č. 3 a 6. Všechny typy řetězců  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ -řetězce, ovlivňují konečnou vlastnost želatiny. Čím kvalitnější řetězce, tím kvalitnější uspořádání peptidů a tím kvalitnější gel. Pokud chybí  $\beta$  nebo  $\gamma$ -řetězce, popř. pokud jsou řetězce v želatině obsaženy v malém množství, je to dané vlivem hydrolýzy a štěpením peptidových vazeb. Vzorek č. 1, 4, 7 a 8 vykazuje nižší molekulové hmotnosti. Při porovnání s viskozitou a pevností gelu byla u těchto vzorků želatin zjištěna i nižší pevnost gelu a nižší viskozita. Tento jev může být způsoben vyšší degradací  $\alpha$  a  $\beta$ -řetězců vlivem enzymatické hydrolýzy. Želatiny s nízkou molekulovou hmotností díky vlivu enzymatického štěpení jsou méně kvalitní na rozdíl od želatin č. 2, 3, 5, 6 a 9 s vyšší pevností gelu, vyšší viskozitou i vyšší molekulovou hmotností.

Tabulka 4.5 Hodnoty molekulových hmotností (%) u jednotlivých želatin

Exp. č.	$M_L$ (%)	$M_\alpha$ (%)	$M_\beta$ (%)	$M_\gamma$ (%)	$M_H$ (%)
1	76,2	11,7	8,3	3,8	0,0
2	64,7	10,1	8,2	6,1	10,9
3	60,3	9,3	6,7	6,7	17,0
4	67,8	9,5	7,4	8,4	6,9
5	62,2	9,6	7,9	6,9	13,4
6	59,9	9,3	6,5	7,4	16,9
7	64,6	10,4	7,0	7,9	10,1
8	63,4	9,5	7,5	6,7	12,9
9	58,3	10,4	7,9	6,5	16,9
$x \pm SD$	$65 \pm 5$	$10 \pm 1$	$7 \pm 1$	$7 \pm 1$	$12 \pm 6$

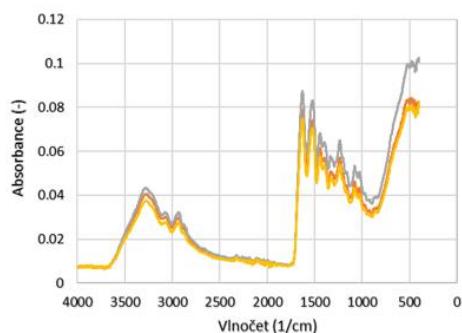
#### 4.2.4 Infračervená spektrofotometrie s Fourierovou transformací

Obr. 4.3 (a) ukazuje FTIR spektra pro želatiny 1 a 3 ve srovnání s želatinou 2. Obr. (b) ukazuje, že nejvyšší absorbance byla zjištěna u želatiny 6 ve srovnání s želatinou 4 a 5. Obr. (c) ukazuje, že nejvyšší absorbance byla zjištěna u želatiny 7 ve srovnání s želatinou 8 a 9. Pro želatiny 1, 2 a 3 byly vlnočty nižší než ty, které jsou uvedeny v literatuře [33,44]. Tento trend ukazuje, že ve vzorcích želatin bylo přítomno méně aminoskupin, a to pravděpodobně souvisí s nižší degradací, ke které docházelo během enzymatického štěpení. Pík Amidu B souvisí s asymetrickým natahováním  $-\text{CH}_2$  skupiny. Naměřené hodnoty odpovídají hodnotám z literatury a platí, že hodnota amidového B pásma byla nižší se zvyšující se extrakční teplotou; to naznačuje interakce mezi  $\text{NH}_3^+$  skupiny v peptidovém řetězci kolagenu. Rozšíření  $\text{C}=\text{O}$  spojené s  $\text{CN}$  protahováním,  $\text{CCN}$  deformací a ohýbáním  $\text{NH}$  v rovině poskytuje vibrační režim Amid I. Pás je typický pro šroubovicovou strukturu želatiny. Všechny naměřené hodnoty souhlasí s literárními zprávami. Mezifázová kombinace prodloužení  $\text{CN}$  vazeb a ohyb  $\text{N}-\text{H}$  peptidové skupiny určuje Amid II. V porovnání s literárními hodnotami jsou naměřené hodnoty v požadovaném intervalu. Pás Amid III představuje prodloužení  $\text{CN}$  a  $\text{N}-\text{H}$  deformaci amidových vazeb. Pokud jde o charakteristické oblasti vibračních píků, které byly nalezeny ve vzorcích želatiny 4, 5, 6, 7, 8 a 9, platí stejné závěry [33,44]. V Tab. 4.6 můžeme pozorovat jednotlivé výsledky FTIR oblasti píku pro kuřecí želatiny. Jednotlivé hodnoty vrcholových oblastí píků Amid A, B a Amid I, II a III jsou velmi podobné a srovnatelné s literárními zdroji [33,44]. Želatiny z kuřecích žaludků jsou kvalitní a vhodnou alternativou ke komerčně dostupným zdrojům kolagenních produktů.

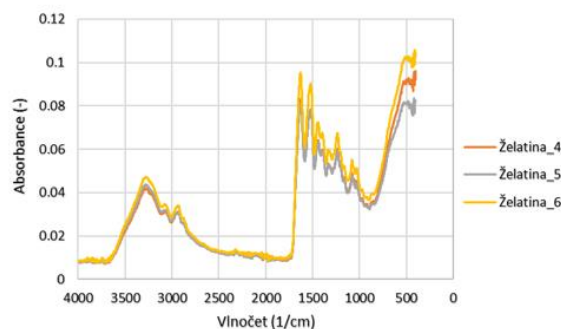
Tabulka 4.6 Jednotlivé výsledky FTIR oblasti píku pro kuřecí želatiny

Pík	Exp. č.	Vlnočť ( $\text{cm}^{-1}$ )	Exp. č.	Vlnočť ( $\text{cm}^{-1}$ )	Exp. č.	Vlnočť ( $\text{cm}^{-1}$ )
Amid A	1	3282	4	3289	7	3276
	2	3275	5	3272	8	326
	3	3290	6	3277	9	3290
Amid B	1	2937	4	2938	7	2936
	2	2933	5	2932	8	293
	3	2927	6	2929	9	2925
Amid I	1	1640	4	1636	7	1641
	2	1644	5	1643	8	1645
	3	1639	6	1637	9	1644

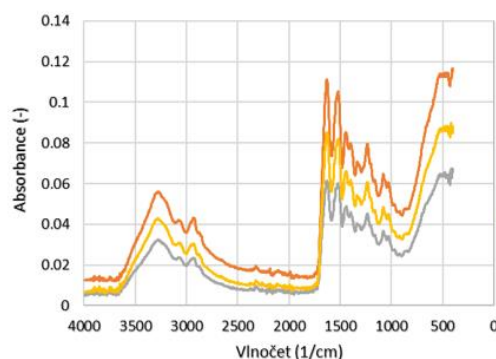
Pík	Exp. č.	Vlnčet (cm <sup>-1</sup> )	Exp. č.	Vlnčet (cm <sup>-1</sup> )	Exp. č.	Vlnčet (cm <sup>-1</sup> )
Amid II	1	1515	4	1515	7	1519
	2	1517	5	1522	8	1525
	3	1510	6	1517	9	1525
Amid III	1	1241	4	1236	7	1245
	2	1240	5	1240	8	1242
	3	1238	6	1238	9	1235



(a)



(b)



(c)

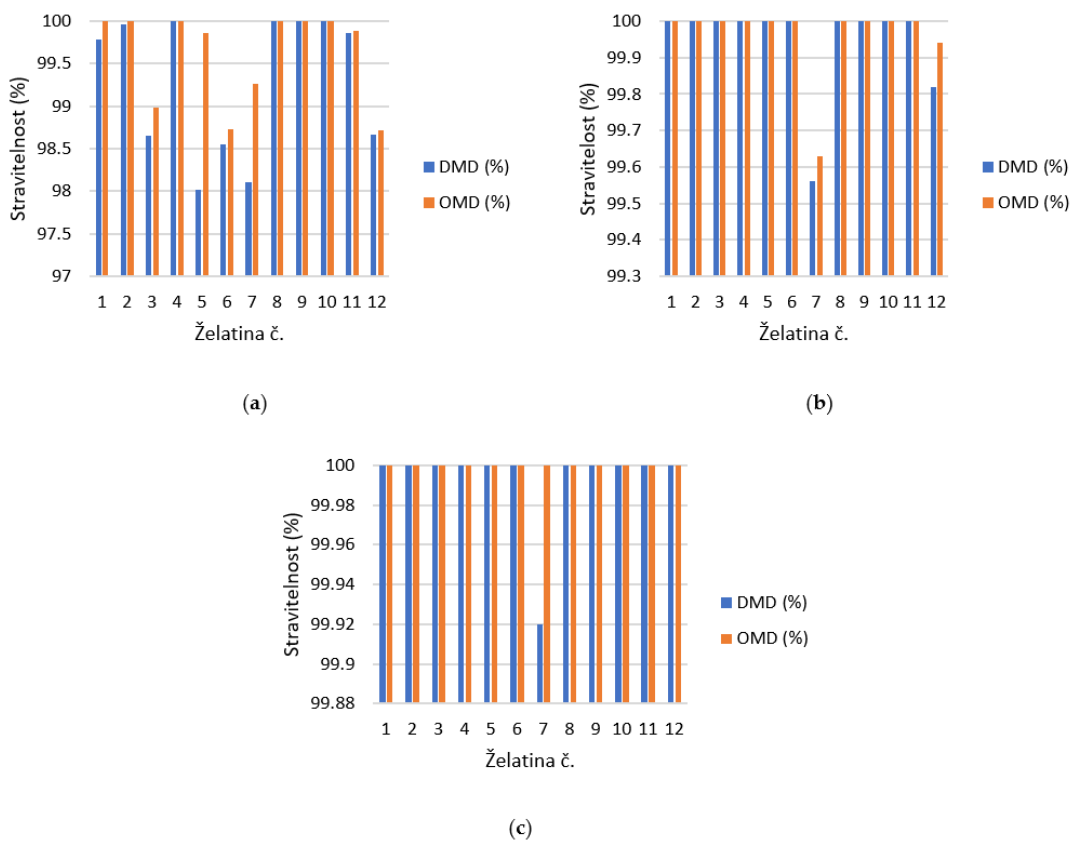
Obr. 4.3: Charakteristické FTIR spektra; (a) pro želatiny 1, 2 a 3, (b) pro želatiny 4, 5 a 6, (c) pro želatiny 7, 8 a 9

### 4.3. Aplikace kolagenních produktů

#### 4.3.1 Stravitelnost kolagenních produktů

Na Obr. 4.4 jsou zobrazeny výsledky stravitelnosti želatin prvních frakcí, včetně stravitelnosti hydrolyzátu a směsi želatin druhé a třetí frakce. Nejprve se provedlo opracování v pepsinu, které simuluje proces trávení v žaludku. Provedlo se opracování jak po dobu 2 h, tak po dobu 4 h. Jelikož u některých želatin nedošlo k úplnému strávení, tak se udělala další analýza, a to opracování jak v pepsinu (simulace procesu trávení v žaludku po dobu 4 h), tak navazující opracování v pankreatinu simulující proces trávení ve střevě po dobu 24 h.

Při opracování kolagenních produktů v pepsinu při 2 h simulaci procesu trávení v žaludku došlo u želatin 4, 8 a 9 (a hydrolyzátu, exp. č. 10) ke 100,00% trávení vzorku podle hodnot DMD neboli podle hodnot sušiny vzorku. Avšak podle hodnot OMD, tedy stravitelnosti organické hmoty, došlo ke 100,00% trávení i u želatin 1 a 2. Jelikož tento první stupeň nezpůsobil 100,00% trávení u všech želatin, provedla se simulace s dvojnásobnou dobou opracování, tedy po dobu 4 h. Výsledkem jsou 100,00% hodnoty trávení podle DMD u všech želatin a hydrolyzáatů, kromě želatiny 7. I směs želatin druhé frakce představuje 100,00% trávení a u směsi želatiny třetí frakce byly hodnoty sušiny vzorku 99,82%. V tomto případě jsou hodnoty OMD shodné s hodnotami DMD. Jelikož i po 4 h procesu nedošlo k úplnému trávení, provedla se simulace jak v žaludku (po dobu 4 h), tak ve střevě (po dobu 24 h). Jediná želatina č. 7 nebyla 100,00 % trávena podle hodnot DMD, avšak při přepočítání na organickou hmotu OMD došlo i u této želatiny ke 100,00% trávení. Je to zřejmě způsobené tím, že má želatina poměrně vysokou molekulovou hmotnost. Celkově lze tedy říci, že želatiny vyextrahované z drůbežích žaludků po předchozím opracování v proteolytickém enzymu jsou velmi kvalitní a pro organismus nezatěžující. Jejich stravitelnost je 100,00%.



Obr. 4.4: Stravitelnost želatin; (a) simulace procesu trávení po dobu 2 h, (b) simulace procesu trávení po dobu 4 h, (c) simulace procesu trávení po dobu 4 h a následně po dobu 24 h

### 4.3.2 Mikrobiologické vlastnosti

V Tab. 4.7 jsou uvedeny jednotlivé vzorky želatin a v nich zjištěné mikroorganismy; jsou uvedeny hodnoty bakterií >1700, protože hodnoty bakterií <1700 jsou klasifikovány jako nespolehlivá identifikace. Hodnota identifikace 2300–3000 znamená vysoce pravděpodobnou druhovou identifikaci. Hodnota identifikace 2000–2299 znamená bezpečnou rodovou identifikaci, pravděpodobnou druhovou identifikaci a hodnota identifikace 1700–1999 znamená pravděpodobnou identifikaci rodu.

Tabulka 4.7 Zjištěné mikroorganismy ve vzorcích želatin včetně hodnoty skóre identifikace k danému mikroorganismu

Exp. č.	Mikroorganismus	Skóre	Exp. č.	Mikroorganismus	Skóre
1	<i>Brevibacillus agri</i>	1997	7	<i>Bacillus cereus</i>	2239
	<i>Bacillus cereus</i>	1755		<i>Aci. radioresistens</i>	1758
2	<i>Brevibacillus agri</i>	1995	8	<i>Aci. baumannii</i>	2359
	<i>Bacillus cereus</i>	2265	9	<i>Aci. baumannii</i>	2121
	<i>Bacillus flexus</i>	2093		<i>Brevibacillus agri</i>	2012
3	<i>Aci. radioresistens</i>	2431	10	<i>Pseu. oryzihabitans</i>	1729
	<i>Aci. baumannii</i>	2004		<i>Bacillus flexus</i>	2114
4	<i>Enteroco. faecium</i>	2065		<i>Aci. baumannii</i>	2347
	<i>Bacillus flexus</i>	1835		11	<i>Ralstonia pickettii</i>
	<i>Brevibacillus agri</i>	1708	<i>Bacillus cereus</i>		2463
5	<i>Aci. baumannii</i>	2071		<i>Aci. radioresistens</i>	2144
	<i>Staphy. hominis</i>	1801		<i>Aci. baumannii</i>	2232
	<i>Bacillus cereus</i>	2106	12	<i>Aci. radioresistens</i>	2352
6	-	-		<i>Aci. baumannii</i>	2482

V žádném vzorku nebyly detekovány bakterie *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* ani *Escherichia coli*. Ve vzorku č. 4 byla detekována jiná koliformní bakterie rodu *Enterococcus*, a to konkrétně *Enterococcus faecium*. Také nebyl v žádném vzorku želatiny detekován *Staphylococcus aureus*, ale ve vzorku č. 5 byla nalezena bakterie ze stejného rodu *Staphylococcus*, *S. hominis*. Bakterie *Bacillus cereus* byla nejvíce zastoupená, byla nalezena ve vzorcích č. 1, 2, 5, 7 a 11. Ve vzorku č. 1 byla navíc detekována bakterie *Brevibacillus agri*. Ve vzorku č. 2 bakterie *Brevibacillus agri* a *Bacillus flexus*. Ve vzorku č. 3 byly nalezeny dva typy bakterií *Acinetobacter*: *radioresistens* a *baumannii*. Ve vzorku



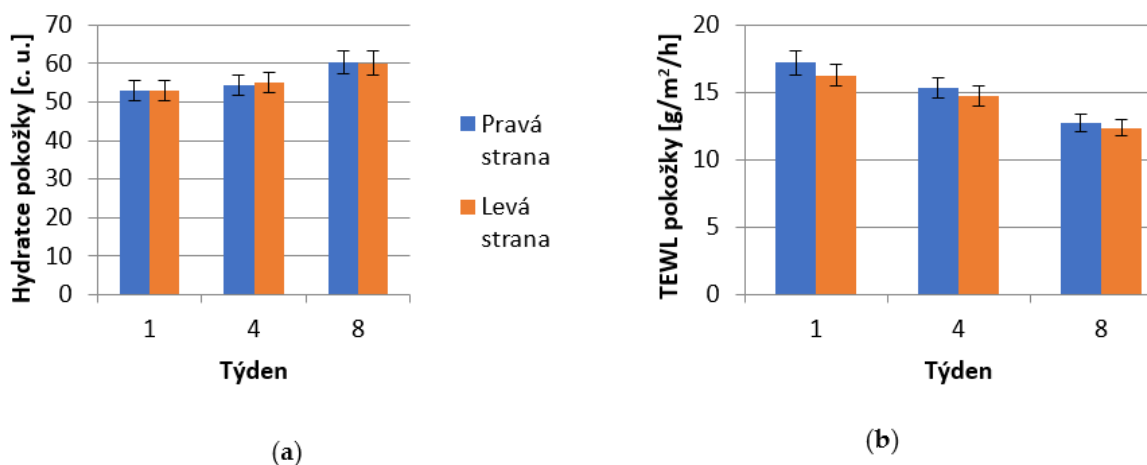
č. 4 byly nalezeny další dvě bakterie *Bacillus flexus* a *Brevibacillus agri*. Vzorek č. 5 kromě *Staphylococcus hominis* a *Bacillus cereus* obsahoval navíc *Acinetobacter baumannii*. Ve vzorku č. 6 nebyly nalezeny žádné mikroorganismy s hodnotou >1700. *Acinetobacter radioresistens* byla bakterie nalezena ve vzorku č. 7. Ve vzorcích č. 8 a 9 byly nalezeny bakterie *Acinetobacter baumannii*, navíc ve vzorku č. 9 byla bakterie *Brevibacillus agri*. Vzorky č. 10, 11 a 12 byly nejvíce kontaminovány bakteriemi *Pseudomonas oryzae*, *Bacillus flexus*, *Acinetobacter baumannii*, *Ralstonia pickettii*, *Bacillus cereus* a *Acinetobacter radioresistens*. Kvasinky a plísně nebyly detekovány. Došlo k částečnému nárůstu na půdách, hodnoty kvasinek a plísní byly <1700, tedy v hodnotách nespolehlivé identifikace.

### 4.3.3 Testování gelové kosmetické formulace

#### *Hydratace a TEWL*

Z Obr. 4.5 (a) vyplývá, že při dlouhodobé aplikaci se zlepšuje hydratace pokožky jak na pravém, tak levém spánku. Hodnoty hydratace před aplikací kosmetické gelové formulace s kuřecím kolagenním hydrolyzátem (0. týden) vypovídají o normální kondici pokožky na začátku experimentu. Z uvedených dat vyplývá, že hodnoty hydratace pokožky v periorbitální oblasti vzrostly na pravém spánku z  $54 \pm 8$  k.j. na  $61 \pm 19$  k.j. a na levém spánku z  $53 \pm 12$  k.j. na  $60 \pm 19$  k.j. Z dat také vyplývá, že došlo k celkovému zlepšení stavu pokožky o 11,82 %, resp. o 9,45 %. Bylo tedy prokázáno, že při interakci kosmetického produktu s povrchem kůže se může hydratace pokožky zvýšit.

Z Obr. 4.5 (b) vyplývá, že při dlouhodobé aplikaci kosmetické gelové formulace se zlepšují bariérové vlastnosti pokožky v periorbitální oblasti, tedy snižuje se propustnost vody přes pokožku, z čehož vyplývá, že kuřecí kolagenní hydrolyzát má pozitivní účinek nejen na hydrataci, ale také na TEWL. Stejně jako u hydratace, tak u TEWL platí, že čím delší je působení kosmetické gelové formulace po aplikaci, tím úbytek vody klesá. Zpočátku, tedy 0. týden, byl změřen TEWL před aplikací kosmetické gelové formulace s kuřecím kolagenním hydrolyzátem. Podle stupnice měly všechny dobrovolnice normální stav pokožky, neboť průměrné hodnoty TEWL byly  $17,2 \pm 0,6$  a  $16,3 \pm 0,6$   $\text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  (pravý a levý spánek). Ve 4., ale i v 8. týdnu docházelo k dalšímu poklesu hodnot TEWL, tedy ke zlepšení bariérových funkcí pokožky, a to o 9,8 % a 25,7 % na pravém spánku a o 5,0 % a 17,8 % na levém spánku.



Obr. 4.5: Stav pokožky u souboru dobrovolnic v periorbitální oblasti; (a) hodnoty hydratace pokožky; (b) hodnoty TEWL

### **Elasticita pokožky a množství vrásek**

Elasticita pokožky uvádí průměrné hodnoty rezonančních časů (RRT) se směrodatnými odchylkami v jednotlivých úhlech otočení sondy pro pravou, resp. pro levou oblast spánku. Nejprve bylo v 0. týdnu provedeno počáteční měření před aplikací kolagenu a následně byla provedena kontrola měření po pravidelné aplikaci (ráno a večer) ve 4. a 8. týdnu. U všech úhlů otočení došlo zaznamenán pokles RRT (85 %), což se projevilo zvýšením elasticity pokožky. Nejméně efektivní snížení elasticity se projevilo ve směru otočení sondy o 120° a 150°. Při úhlu 120° došlo ke snížení průměrných RRT (pravá a levá spánková oblast) z  $323 \pm 60$  a.j. na  $179 \pm 30$  a.j. ve 4. týdnu měření. Při úhlu 150° došlo ke snížení průměrných RRT v periorbitální oblasti z  $354 \pm 45$  a.j. na  $196 \pm 40$  a.j. (4. týden).

U redukce množství vrásek v 0., 4. a 8. týdnu aplikace kosmetické gelové formulace s kuřecím kolagenním hydrolyzátem bylo prokázáno, že s rostoucí dobou aplikace byl evidován pokles vrásek o 3,4 % na pravé straně a o 2,5 % na levé straně sledované oblasti. Hodnoty poklesly z  $15,6 \pm 0,3$  na  $12,2 \pm 0,1$  % (pravá oční oblast) a z  $15,2 \pm 0,3$  na  $12,7 \pm 0,2$  % (levá oční oblast). Při pravidelné aplikaci matrice s kuřecím kolagenním hydrolyzátem lze očekávat redukci množství vrásek v periorbitální oblasti. Ověřovaný anti-aging účinek reprezentuje vizualizace povrchu pokožky viz Obr. 4.6 u dobrovolnice ve věku 50 let, úbytek z 17,7 % na 16,6 % byl zaznamenán na obou spáncích.



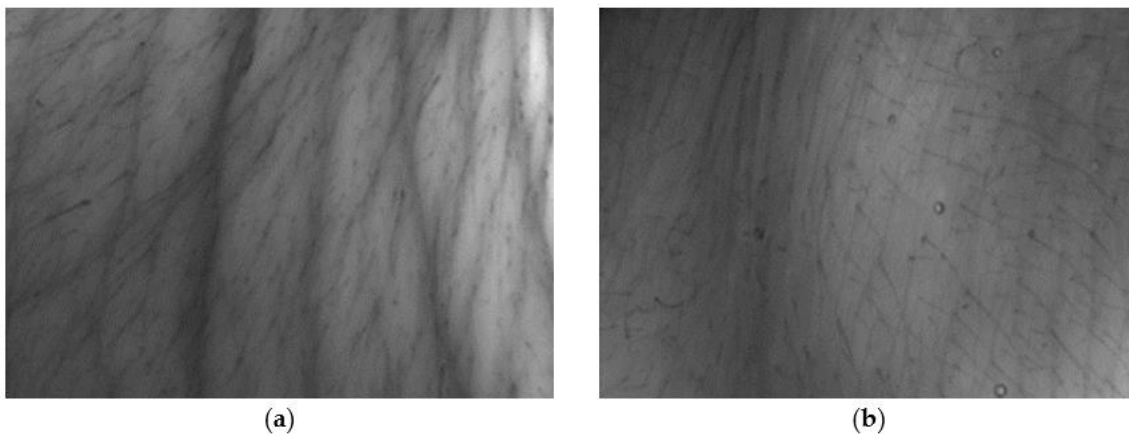
Obr. 4.6: Vizualizace redukce vrásek, žena 50 let; (a) před aplikací gelové kosmetické formulace, (b) po 8týdenní aplikaci gelové kosmetické formulace

### **Reliéf pokožky**

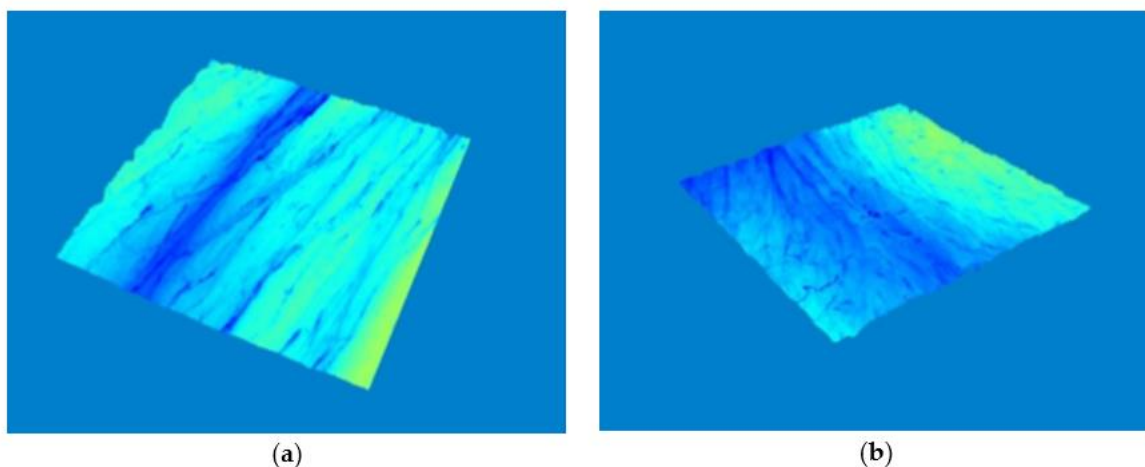
Vlivem aplikace kosmetické gelové formulace s kuřecím kolagenním hydrolyzátem došlo ke změnám kožního reliéfu. Průměrné hodnoty vypočtené z hodnot pravé a levé spánkové oblasti jsou následující; parametr drsnosti R1 (vzdálenost mezi nejvyšší a nejnižší hodnotou reliéfu vrásek) klesl o 38,0 %, parametr drsnosti R2 (maximální parametr) poklesl o 42,5 %, parametr drsnosti R3 (průměrná drsnost) se snížil o 38,5 %, parametr drsnosti R4 (hloubka drsnosti) poklesl o 34,0 % a parametr drsnosti R5 (aritmetický průměr drsnosti) poklesl o 38,5 %. Průměrná redukce vrásek neboli průměrný pokles všech parametrů drsnosti byl na pravé straně 35,4 % a na levé straně 41,2 %. Pro pokles parametrů drsnosti platí předpoklad  $R1 \geq R2 \geq R3 \geq R4 \geq R5$ . Nejprůkaznější změny Nejintenzivnější změny reliéfu jak na pravém, tak levém spánku byly vyhodnoceny u parametru R1 a R2. U parametru R1 došlo k poklesu jak na pravém, tak levém spánku z  $0,209 \pm 0,023$  na  $0,130 \pm 0,012$  mm; u R2 na pravém i levém spánku klesly hodnoty z  $0,162 \pm 0,015$  na  $0,131 \pm 0,013$  mm. Parametr drsnosti R3 byl monitorován se změnou z  $0,115 \pm 0,010$  mm na  $0,071 \pm 0,006$  mm. U parametru R4 došlo k průměrnému poklesu z  $0,087 \pm 0,005$  mm na  $0,057 \pm 0,006$  mm (pravá i levá oblast). U parametru R5 došlo k poklesu z  $0,032 \pm 0,006$  mm na  $0,020 \pm 0,004$  mm.

Na Obr. 4.7 je prezentováno srovnání zhotovených replik snímaného kožního povrchu před aplikací a po osmítýdenní aplikaci kosmetické gelové formulace na pokožku u dobrovolnice ve věku 50 let. Redukce vrásek je patrná zmenšením až eliminací prohlubní a zároveň viditelným dosažením hladšího povrchu pokožky díky odlišné propustnosti světla silikonovým materiálem repliky. Stejně repliky

byly převedeny softwarovým algoritmem na 3D vizualizaci (viz Obr. 4.8) u stejné dobrovolnice.



*Obr. 4.7: Porovnání 2D snímků kožního povrchu, žena 50 let; (a) před aplikací gelové kosmetické formulace, (b) po 8týdenní aplikaci gelové kosmetické formulace*



*Obr. 4.8: Porovnání 3D snímků kožního povrchu, žena 50 let; (a) před aplikací gelové kosmetické formulace, (b) po 8týdenní aplikaci gelové kosmetické formulace*

## 5. PŘÍNOS DISERTAČNÍ PRÁCE PRO PRAXI

Řešením rostoucí poptávky po želatinách a současně v rámci konceptu cirkulární ekonomiky je nabídnout další alternativní surovinový zdroj drůbeží kolagen. Výtěžek želatiny byl v rámci studie průměrně  $63 \pm 4$  %. Pevnost gelu (Bloom hodnota) se pohybovala od  $25 \pm 1$  do  $439 \pm 6$  Bloom. Obsah popelovin byl od  $0,44 \pm 0,02$  do  $0,81 \pm 0,02$  % a teplota tání želatinového gelu byla průměrně  $32 \pm 3$  °C. Na základě srovnání účinnosti extrakce, pevnosti gelu, teploty tání a obsahu popelovin je pro výrobu potravinářské želatiny z kuřecích žaludků nejvhodnější použití 0,10 % enzymu při extrakční teplotě 62,5 °C. Želatina by mohla nalézt uplatnění na výrobu tradičních cukrovinek, na výrobu aspiků, mléčných výrobků a na řadu dalších aplikací. Následně na základě srovnání účinnosti extrakce, pevnosti gelu, teploty gelovatění a obsahu popelovin je pro výrobu farmaceutické želatiny nejoptimálnější použít 0,10 % enzymu s teplotou extrakce 70,0 °C. Takto připravená želatina by se mohla použít na výrobu tvrdých želatinových kapslí, měkkých želatinových tobolek nebo kolagenních filmů, které lze použít jako popáleninové krytí.

Při porovnání jednotlivých vzorků želatin byla naměřena antioxidační aktivita pro vzorky DPPH více než 71 % a pro vzorky ABTS více než 82 %. Biomolekuly se silnými antioxidačními vlastnostmi mohou být široce využity např. v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Zde může být kolagen použit ve výzkumu matric proti stárnutí, ve vývoji nových léčiv, hemostatických činidel a na výrobu obalových a povlakových materiálů. Výhoda vyšší antioxidační aktivity umožňuje aplikaci želatiny z kuřecích žaludků na jedlé obaly a povlaky. Při porovnání jednotlivých vzorků želatin a molekulové hmotnosti bylo zjištěno, že u vzorků o nižší pevnosti gelu a nižší viskozitě byla stanovena i nižší molekulová hmotnost. Současně bylo prokázáno, že kuřecí želatiny obsahují typické  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  řetězce. FTIR spektroskopie potvrdila všechny charakteristické vrcholové oblasti: Amid A a B, Amid I, II a III, které jsou typické pro želatiny. Současně všechny vrcholové píky byly v charakteristických vibračních oblastech. FTIR spektroskopie potvrdila, že kuřecí želatiny jsou velmi kvalitní kolagenní produkty.

Obecně platí a je důležité brát v potaz, že permeační schopnost látek závisí na různých faktorech, jakými jsou jejich fyzikálně–chemické vlastnosti, molekulová hmotnost, časový rozsah permeace, integrita, tloušťka kůže, kožní metabolismus, místo, doba aplikace a množství použité kosmetické formulace. Zpracování kuřecích vedlejších produktů na kolagenní hydrolyzát s aplikací v kosmetickém průmyslu na výrobu kosmetických matric doposud žádná literatura nezmiňuje.

Výhodou zpracování nevyužitých drůbežích odpadů na kolagenní hydrolyzát je dán potřebou zpracování těchto vedlejších surovin z hlediska udržitelnosti. Biotechnologický proces zpracování kuřecích žaludků představuje ekologickou a ekonomickou valorizaci výchozí suroviny na kolagenní hydrolyzát s pozitivními účinky na pokožku.

Kuřecí želatiny jsou vhodné téměř pro všechny průmyslové zpracovatelské technologie. V potravinářském průmyslu se kuřecí želatina používá k výrobě výrobků pomocí technologie odlévání/lití (gumové bonbóny, aspiky), extruze (marshmallow, pěnové bonbóny) a povlakování/vstříkávání (ovoce, zelenina, maso). Ve farmaceutickém průmyslu může být kuřecí želatina používána k výrobě dávkovacích matric pomocí technologie máčení (tvrdé nebo měkké želatinové kapsle a tobolky), vytlačování (měkké želatinové kapsle) či povlakování a vstříkávání (tablety). Současně lze kuřecí želatiny zpracovávat metodou zvlákňování a využít je pro výrobu bioinkoustů do 3D tiskáren.

V práci byl prokázán vysoký potenciál dosažení podpory cirkulární ekonomiky, kdy optimalizovanou kombinací technologických podmínek lze získat z kuřecích žaludků, jakožto vedlejších živočišných odpadů z drůbežáren, vysoce kvalitní kolagenní produkty v podobě želatin a hydrolyzátů, které mohou nalézt široké uplatnění téměř ve všech průmyslových odvětvích. Pevnost gelu a viskozita jednoznačně ovlivňují kvalitu želatiny a jsou předurčujícím faktorem pro její aplikace. Želatiny s pevností gelu >350 Bloom jsou vhodné k aplikacím ve farmaceutickém a medicínském průmyslu, želatiny s pevností gelu 100–350 Bloom v potravinářském průmyslu a želatiny s pevností gelu <100 Bloom pro technické aplikace. Nižší molekulová hmotnost je způsobena vyšší degradací řetězců v kolagenu vlivem enzymatické hydrolýzy.

## ZÁVĚR

Disertační práce se zabývá biotechnologickým procesem zpracování kuřecích žaludků na kolagenní produkty; želatiny a hydrolyzáty. Výchozí surovina byla opracovávána proteolytickým enzymem z druhu mikrobiálních endoproteáz. Hlavním cílem práce bylo ověřit procesní podmínky přípravy želatiny a sledovat vliv vybraných procesních parametrů na maximální výtěžnost. Byly sledovány předem vybrané procesní faktory na celkovou účinnost a kvalitu vyextrahovaných želin; množství přidaného enzymu a teplota extrakce při konstantní době extrakce a době enzymového opracování. Připravily se modelové vzorky želin, byla charakterizována pevnost želinového gelu a stanoven obsah popelovin, teplota tání a tuhnutí, dynamická viskozita a čirost a byly ověřeny možné aplikace kolagenních produktů v kosmetickém průmyslu. Následně byly vzorky zkoumány na molekulární úrovni pomocí antioxidační aktivity, byla stanovena distribuce molekulových hmotností, infračervená spektrofotometrie s Fourierovou transformací (FTIR), mikrobiologické složení a stravitelnost jednotlivých kolagenových frakcí.

Studie je velmi inovativní, neboť vhodnými technologickými parametry lze vyextrahovat velmi kvalitní drůbeží želatiny. Želatinu a hydrolyzáty připravené z kuřecích žaludků lze využít v různých odvětvích průmyslu pomocí běžných technologií zpracování. Proces zpracování kuřecích odpadů valorizuje výchozí surovinu a současně naplňuje podmínky a parametry cirkulární ekonomiky pro využití vedlejších produktů z jatek. Proces přípravy kolagenních produktů je navíc ekologický, a dokonce i ekonomicky výhodný, a je tedy vhodnou alternativou k tradiční kyselé a zásadité extrakci z komerčních zdrojů.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] PROKOPOVÁ, A., GÁL, R., MOKREJŠ, P. and PAVLAČKOVÁ, J. Preparation of gelatin from broiler chicken stomach collagen. *Foods*. 2023. vol. 12, no. 127. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12010127>.
- [2] POLAŠTÍKOVÁ, A., GÁL, R., MOKREJŠ, P. and ORSAVOVÁ, J. Preparation of protein products from collagen-rich poultry tissues. *Slovak Journal of Food Sciences*. 2019. vol. 14, pp. 713-720. DOI: <https://doi.org/10.5219/1319>.
- [3] PROKOPOVÁ, A., PAVLAČKOVÁ, J., MOKREJŠ, P. and GÁL, R. Collagen hydrolysate prepared from chicken by-products as a functional polymer in cosmetic formulation. *Molecules*. 2021. vol. 26, no. 7. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26072021>.
- [4] TAMBIR, A., AMIN, I., SITI, A., KHALILAH, A.K., TEIK, K.L., ELMUTAZ, A.A., JURHAMID, C.I. and AWIS, Q.S. Effects of ultrasound assisted extraction in conjugation with aid of actinidin on the molecular and physicochemical properties of bovine hide gelatin. *Molecules*. 2018. vol. 23, no. 4, pp. 730. DOI: [10.3390/molecules23040730](https://doi.org/10.3390/molecules23040730).
- [5] FATEMEH, R., JAVAD, K. and MAHDI, K. Optimization of gelatin extraction from chicken deboner residue using RSM method. *Journal of Food Science and Technology*. 2013, vol. 50, pp. 374–380.
- [6] SOMPIE, M. and TRIASIH, A. *Effect of extraction temperature on characteristics of chicken legskin gelatin*. In Proceedings of IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Proceedings of International Symposium on Food and Agro-Biodiversity (ISFA) 2017, Semarang, Indonesia, 26–27 September 2017; IOP Publishing Ltd.: Beijing, China, 2017; pp. 12089.
- [7] SACHCHIDANAND, S.G., VIVEK, M., MAUMITA, D.M., PARVEEN, S. and KUMAR, R.R. Amino acid derived biopolymers: Recent advances and biomedical applications. *International Journal Biological Macromolecules*. 2021. vol. 188, pp. 542–567. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.036>.
- [8] DÍAZ-CALDER, P., FLORES, E., GONZALEZ-MUNOZ, A., PEPCZYNSKA, M., QUERO, F. and ENRIONE, J. Influence of extraction variables on the structure and physical properties of salmon gelatin. *Food hydrocolloids*. 2017. vol. 71, pp. 118-128. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.004>.
- [9] ROBINSON, P.K. Enzymes: Principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*. 2015. vol. 59, pp. 1–41. DOI: [10.1042/bse0590001](https://doi.org/10.1042/bse0590001).



- [10] HOLLIDAY, G.L., FISCHER, J.D., MITCHELL, J.B.O. and THORNTON, J.M. Characterizing the complexity of enzymes on the basis of their mechanisms and structures with a bio-computational analysis. *The FEBS Journal*. 2011. vol. 278, pp. 3835–3845. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08190.x>.
- [11] LITWACK, G. *Human Biochemistry*, 1st ed.; Academic Press: Los Angeles, CA, USA, 2017; pp. 63–129.
- [12] VALENTA, T. Enzymatická hydrolýza sacharidů a proteinů [online]. Zlín, 2009 [cit. 2024-02-28]. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav potravinářského inženýrství. Školitel Holko, Ivan. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/10563/10015>.
- [13] MIKOVÁ, K. Enzymová hydrolýza bramborových proteinů a možnosti frakcionace získaných peptidových fragmentů [online]. České Budějovice, 2016 [cit. 2024-02-27]. Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích. Fakulta zemědělská, Zemědělské inženýrství / Zemědělská biotechnologie. Školitel doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D. Dostupné z: <https://theses.cz/id/auah1p/?lang=sk>.
- [14] ANCAJIMA, R.L. Stanovení inhibičních aktivit vybraných Schiffových bází enzymů [online]. Pardubice, 2019 [cit. 2024-02-25]. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Speciální chemické a biologické programy / Bioanalytik. Školitel doc. Ing. Vladimír Pejchal, Ph.D. Dostupné z: <https://theses.cz/id/ncztbw/?lang=en>.
- [15] SOROKINA, I. MUSHEGIAN, A.R., KOONIN, E.V. Is Protein Folding a Thermodynamically Unfavorable, Active, Energy-Dependent Process? *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. vol. 23(1): 521. DOI: 10.3390/ijms23010521.
- [16] GÓMEZ-GUILLÉN, M.C., GIMÉNEZ, B., LÓPEZ-CABALLERO, M.E. and MONTERO, M.P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*. 2011. vol. 25, pp. 1813–1827. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>.
- [17] SÁNTIZ-GÓMEZ, M.A., MAZORRA-MANZANO, M.A., RAMÍREZ-GUERRA, H.E., SCHEUREN-ACEVEDO, S.M., NAVARRO-GARCÍA, G., PACHECO-AQUILAR, R. and RAMÍREZ-SUÁREZ, J.C. Effect of acid treatment on extraction yield and gel strength of gelatin from whiptail stingray skin. *Food Science and Biotechnology*. 2019. vol. 28, pp. 751–757.
- [18] KRISTOFFERSEN, K.A., AFSETH, N.K., BÖCKER, U., DANKEL, K.R., RøNNINGER, A., LISLELID, A., OFSTATD, R., LINDBERG, D. and WUBSHET S.G. Post-enzymatic hydrolysis heat treatment as an essential unit operation for collagen solubilization from poultry by-products. *Food*

- Chemistry*. 2022. vol. 382, pp. 132201. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132201>.
- [19] NOVOZYMES, Promatex [online]. Bezpečnostní list [cit. 2024-02-28]. Dostupné z: <https://www.novozymes.com/en/products/plant-based-foods/plant-based-ingredients/protamex>.
- [20] FLANAGAN, J. FITZGERALD, R.J. Functionality of *Bacillus* proteinase hydrolysates of sodium caseinate. *International Dairy Journal*. 2002. vol 12 (9), no. 737–748. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00067-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00067-5).
- [21] XINKUN, L. CHAN, CH.Y., LEE, K.I., NG, P.F., FEI, B., XIN, J.H., FU, J. Super-tough and thermo-healable hydrogel - Promising for shape-memory absorbent fiber. *Journal of Materials Chemistry B*. 2023. vol 2(43). DOI:10.1039/C4TB01289E.
- [22] SLEZÁK, R. a RYŠKA, A. *Kouření a dutina ústní*. 1st ad., Praha: Havlíček Brain Team.
- [23] MOKREJŠ, P., MRÁZEK, P., GÁL, R. and PAVLAČKOVÁ, J. Biotechnological preparation of gelatines from chicken feet. *Polymers*. 2019. vol. 11, no. 6. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym11061060>.
- [24] MOKREJŠ, P., GÁL, R. and PAVLAČKOVÁ, J. Enzyme conditioning of chicken collagen and taguchi design of experiments enhancing the yield and quality of prepared gelatins. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. vol. 24, no. 4. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24043654>.
- [25] CHONDREX, INC. Dostupné z: <https://www.chondrex.com/blog/type-i-type-ii-collagen-structure-influences-staining-patterns> [cit. 2024-02-08].
- [26] BLAŽEJ, A. a GALATÍN, A. *Technologie kůže a kožešin*. Praha 1, 1. vydání, Nakladatelství technické literatury, 1984, st. 456, ISBN 04-817-84.
- [27] HAGES. <https://www.hages.cz/katalogy/zelatina.pdf>. [cit. 2024-01-14].
- [28] HERAWATI, E., AKHSANITAQWIM, Y., AGNESIA, P., LISTYAWATI, S., PANGASTURI, A. and RATRIYANTO, A. *In Vitro* Antioxidant and Anti-Aging Activities of Collagen and Its Hydrolysate from Mackerel Scad Skin (*Decapterus macarellus*). *Marine Drugs*. 2022. vol. 20, no. 8, pp. 516. DOI: <https://doi.org/10.3390/md20080516>.
- [29] NURILMALA, M., HIZBULLAH, H.H., KARNIA, E., KUSUMANUNGTYAS, E. and OCHIAI, Y. Characterization and Antioxidant Activity of Collagen, Gelatin, and the Derived Peptides from Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) Skin. *Marine Drugs*. 2020. vol. 18, pp. 98. DOI: 10.3390/md18020098.
- [30] SORAYA, S., SUPHATTA, P. and CHULEEPORN, CH. Extraction and characterization of gelatin from black-bone chicken by-products. *Food Science*

- and Biotechnology*. 2019. vol. 29. no. 4, pp. 469-478. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00696-4>.
- [31] LIN-CHEN, L., QING-YUN, H., WEN, D., XING-HUA, X., HONG-YAN, Z. and LI-XIA, X.. Fish gelatin: The novel potential applications. *Journal of Functional Foods*. 2019. vol. 63, pp. 103581. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103581>.
- [32] RODRÍGUEZ, M.I.A., BARROSO, L.G.R. and SÁNCHEZ, M.L. Collagen: A Review on its Sources and Potential Cosmetic Application. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2018. vol. 17, pp. 20–26. DOI: 10.1111/jocd.12450.
- [33] McCARTHY, A.L., O'CALLAGHAN, Y.C. and O'BRIEN, N.M. Protein Hydrolysates from Agricultural Crops – Bioactivity and Potential for Functional Food Development. *Agri*. 2013. vol. 3, pp. 112–130. DOI: 10.3390/agriculture3010112.
- [34] SCHRIEBER, R. and GAREIS, H. *Gelatine Handbook—Theory and Industrial Practice*, 1st ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2007; pp. 45–309.
- [35] AL-MOUSILLY, M.M., ALAJELI, I.S. and RAHMAN, L. Study the healing effect of collagen hydrolysate for the treatment of bone tail fracture in mice. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014, vol. 6, no. 6, pp. 67-71.
- [36] TONGNUANCHAN, P., BENJAKUL, S. and PRODPRAN, T. Physico-chemical properties, morphology and antioxidant activity of film from fish skin gelatin incorporated with root essential oils. *Journal of Food Engineering*. 2013. vol. 117, pp. 350–360. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.03.005>.
- [37] TONGNUANCHAN, P., BENJAKUL, S. and PRODPRAN, T. Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils *Food Chemistry*. 2012. vol. 134, pp. 1571–1579. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.094>.
- [38] YONG-LIANG, Z., LI-PING, S., XUE, Z., HU, H. and BA-FANG, L. Investigation of Gelatin Polypeptides of Jellyfish (*Rhopilema esculentum*) for Their Antioxidant Activity *in vitro*. *Food Technology and Biotechnology*. 2010. vol. 48, no. 2, pp. 222–228.
- [39] SINTHUSAMRAN, S., BENJAKUL, S. and KISHIMURA, H. Characteristics and gel properties of gelatin from skin of seabass (*Lates calcarifer*) as influenced by extraction conditions. *Food Chemistry*. 2014. vol. 152, pp. 276-284. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.11.109.
- [40] SUDERMAN, N. and SARBON, N.M. Optimization of chicken skin gelatin film production with different glycerol concentrations by response surface

- methodology (RSM) approach. *Journal of Food Science Technology*. 2020. vol. 57, no. 2, pp. 463–472. DOI: 10.1007/s13197-019-04074-0.
- [41] STATISTICA. <https://www.statista.com/statistics/237637/production-of-poultry-meat-worldwide-since-1990/>. [cit. 2024-01-08].
- [42] AGRIFARMING. <https://www.agrifarming.in/poultry-farming-guide-beginners>. [cit. 2024-01-08].
- [43] GÁL, R., GALOVIČOVÁ, L. PROKOPOVÁ, A. and KAČÁNIOVÁ, M. Antimicrobial effect of *Salvia officinalis* essential oil against *Listeria monocytogenes* in beef sous vide meat during storage. *Foods*. 2023. vol. 12, no. 11, pp. 2201. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12112201>.
- [44] GÁL, R., MOKREJŠ, P., MRÁZEK, P., PAVLAČKOVÁ, J., JANÁČKOVÁ, D. and ORSAVOVÁ, J. Chicken heads as a promising by-product for preparation of food gelatins. *Molecules*. 2020. vol. 25, no. 3. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25030494>.
- [45] THE BUSINESS RESEARCH COMPANY. Dostupné z: <https://www.thebusinessresearchcompany.com/report/poultry-global-market-report>. [cit. 2024-01-08].
- [46] THE SPRUCE EATS. Dostupné z: <https://www.thespruceeats.com/chicken-4162452>. [cit. 2024-01-08].
- [47] THE WORLD BANK. Dostupné z: <https://www.worldbank.org/en/topic/urbandevelopment/brief/solid-waste-management>. [cit. 2024-01-08].
- [48] MARTINEK, J., GÁL, R., MOKREJŠ, P., SUCHÁČKOVÁ, K., PAVLAČKOVÁ, J. and KALEDOVÁ, A. The effect of application of chicken gelatin on reducing the weight loss of beef sirloin after thawing. *Polymers*. 2022. vol. 14, no. 15. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym14153094>.
- [49] MRÁZEK, P., MOKREJŠ, P., GÁL, R. and ORSAVOVÁ, J. Chicken skin gelatine as an alternative to pork and beef gelatines. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*. 2019. vol. 13, no. 1, pp. 224-233. DOI: <https://doi.org/10.5219/1022>.
- [50] ZARKADAS, C.G. and MALONEY, S. Assessment of the Protein Quality of the Smooth Muscle Myofibrillar and Connective Tissue Proteins of Chicken Gizzard. *Poultry Science*. 1998. vol. 77, pp. 770–779. DOI: <https://doi.org/10.1093/ps/77.5.77>.
- [51] RAZALI, A. N., AMIN, A. M. and SARBON, N. M. Antioxidant activity and functional properties of fractionated cobia skin gelatin hydrolysate at different molecular weight. *International Food Research Journal*. 2015. vol. 22, no. 2, pp. 651-660.

- [52] RATHER, J.A., AKHTER, N., ASHRAF, Q.S., MIR, S.A., MAKROO, H.A., MAJID, D., BARBA, F.J. and KHANEGHAH, A.M. A comprehensive review on gelatin: Understanding impact of the sources, extraction methods, and modifications on potential packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*. 2022. vol. 34, pp. 100945. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100945>.
- [53] DAI-HUNG, N., ZHOUNG-JI, Q., BO, M.R., JAE, W.P. and SE-KWON K. In vitro antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. *Journal of functional foods*. 2010. vol. 2, pp. 107-117. DOI: [doi:10.1016/j.jff.2010.02.001](https://doi.org/10.1016/j.jff.2010.02.001).
- [54] FATIMA, S., MIR, M.I., KHAN, M.R., SAYYED, R.Z., MEHNAZ, S., ABBAS, S., SADIQ, M.B. and MASIH, R. The Optimization of Gelatin Extraction from Chicken Feet and the Development of Gelatin Based Active Packaging for the Shelf-Life Extension of Fresh Grapes. *Sustainability*. 2022, vol. 14, pp. 7881. DOI: <https://doi.org/10.3390/su14137881>.
- [55] ROUSSELOT GELATIN. Dostupné z: <https://www.rousselot.com/functional/rousselot-gelatins>. [cit. 2024-01-17].
- [56] DONG, X.B., LI, X., ZHANG, CH.H., WANG, J.Z., TANG, CH.H., SUN, H.M., JIA, W., LI, Y. and CHEN, L.I. Development of a novel method for hot-pressure extraction of protein from chicken bone and the effect of enzymatic hydrolysis on the extracts. *Food Chemistry*. 2014. vol. 157, pp. 339-346. DOI: [10.1016/j.foodchem.2014.02.043](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.043).
- [57] DONG, Z.Y., LI, M.Y., TIAN, G., ZHANG, T.H., REN, H. and QUEK, S.Y. Effects of ultrasonic pretreatment on the structure and functionality of chicken bone protein prepared by enzymatic method. *Food Chemistry*. 2019. vol. 299, pp. 125103. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125103>.
- [58] RAZAVIZADEH, R.S., FARMANI, J. and MOTAMEDZADEGAN, A. Enzyme-assisted extraction of chicken skin protein hydrolysates and fat: Degree of hydrolysis affects the physicochemical and functional properties. *The Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2022. vol. 99, pp. 621-632. DOI: [10.1002/aocs.12591](https://doi.org/10.1002/aocs.12591).
- [59] HUANG, J., LU, F., WU, Y., WANG, D., XU, W., ZOU, Y. and SUN, W. Enzymatic extraction and functional properties of phosphatidylcholine from chicken liver. *Poultry Science*. 2022. vol. 101, no. 6, pp. 101689. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101689>.
- [60] MOKREJŠ, P., GÁL, R., PAVLAČKOVÁ, J. and JANÁČOVÁ, D. Valorization of a by-product from the production of mechanically deboned chicken meat for preparation of gelatins. *Molecules*. 2021. vol. 26, no. 2. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26020349>.

- [61] Standard Testing Methods for Edible Gelatin. Official Procedure of the GelatinManufacturers Institute of America, Inc. Dostupné z: [http://www.gelatin-gmia.com/images/GMIA\\_Official\\_Methods\\_of\\_Gelatin\\_Revised\\_2013.pdf/](http://www.gelatin-gmia.com/images/GMIA_Official_Methods_of_Gelatin_Revised_2013.pdf/) [cit. 2024-01-05].
- [62] ZICHOVÁ, J. *Plánování experimentů a predikční vícerozměrná analýza*. 2008. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-1407-6.
- [63] PROKOPOVÁ, A., MOKREJŠ, P., GÁL, R., PAVLAČKOVÁ, J., HURAJOVÁ, A. Characterization of poultry gelatins prepared by a biotechnological method for targeted changes at the molecular level. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024. vol 25(2):916. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms25020916>.
- [64] CIOMS. Dostupné z: <https://cioms.ch/publications/product/international-ethical-guidelines-for-biomedical-research-involving-human-subjects-2/>. [cit. 2024-01-19].
- [65] COURAGE-KHAZAKA. Dostupné z: <https://www.courage-khazaka.de/en/?view=article&id=183:corneometer-e&catid=16:alle-produkte>. [cit. 2024-02-27].
- [66] ZGHAIBI, N., OMAR, R., KAMAL, S.M.M., BIAK, D.R.A. and HARUN, R. Kinetics Study of Microwave-Assisted Brine Extraction of Lipid from the Microalgae *Nannochloropsis* sp. *Molecules*. 2020. vol. 25, no. 4. DOI:10.3390/molecules25040784.
- [67] COURAGE-KHAZAKA. Dostupné z: <https://www.courage-khazaka.de/en/?view=article&id=172:tewameter-e&catid=16:alle-produkte>. [cit. 2024-02-27].
- [68] WÓJCIK, A., BARTNICKA, E., ROTSZTEJN, H. Reviscometer Evaluation of the Skin Condition after Applying Retinol and Vitamin C Complex in Menopausal Women. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*. 2016. vol 6, no. 4. DOI:10.4236/jcdsa.2016.64019.
- [69] PAYE, M., MAC-MARY, S., ELKHYAT, A., TARRIT, C., MERMET, P. and HUMBERT, P.H. Use of the Reviscometer for measuring cosmetics-induced skin surface effects. *Skin Research and Technology*. 2007. vol. 14, no. 4, pp. 343-349. DOI: 10.1111/j.1600-0846.2007.00236.x.

## SEZNAM POUŽITÝCH SYMOBLŮ A ZKRATEK

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina
AMK	aminokyselina/aminokyseliny
AR	hmotnost popela vzorku bez sáčku (g)
AS	obsah popelovin (%)
ATR	Attenuated Total Reflection
CCD	Charge-Coupled Device
DM	obsah sušiny ve vzorku (g)
DMD	stravitelnost sušiny vzorku (%)
DMR	hmotnost vzorku bez sáčku po inkubaci a vysušení (g)
DMS	hmotnost vzorku vztažena na hmotnost drůbežích žaludků po opracování (g)
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
E-P	enzym produkt
E-S	enzym substrát
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
$\Delta G$	Gibbsova volná energie
GMIA	Gelatin Manufacturers Institute of America
GPC-RID	gelová permeační chromatografie s refraktometrickou detekcí
HCl	kyselina chlorovodíková
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization
$M_n$	průměrná molekulová hmotnost (g/mol)
$M_p$	molekulové hmotnost v maximu píku (g/mol)
$M_w$	číselný průměr molekulové hmotnosti (g/mol)
NaCl	chlorid sodný
NaOH	hydroxid sodný
OM	obsah organické hmoty v sušině vzorku (g)
OMD	stravitelnost organické hmoty vzorku (%)
PCA	Plate Count Agar
PDI	index polydisperzity
RRT	hodnoty rezonančních časů
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
TEWL	transepidermální ztráta vody
TSA	Trypticase Soya Agar
VRBL	Violet Red Bile Lactose

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1.1: Enzymová hydrolýza tepelně denaturovaného kolagenu [21] .....	11
Obr. 1.2: Enzymatické štěpení telopeptidické části molekul tropokolagenu za vzniku atelokolagenu a následně vznik třech individuálních $\alpha$ -řetězců [25] .....	13
Obr. 1.3: Teoretické celkové množství vyextrahovaných kolagenních produktů z čistého kolagenu z roční produkce jatečných žaludků [1–3,23,41–51] .....	16
Obr. 4.1: Vrstevnicový graf vlivů množství přidaného enzymu (%) a teploty extrakce (°C) na výtěžek želatiny první frakce .....	30
Obr. 4.2: Vrstevnicové grafy vlivů množství přidaného enzymu (%) a teploty extrakce (°C); (a) na pevnost želatinového gelu želatiny první frakce, (b) na dynamickou viskozitu želatiny první frakce .....	32
Obr. 4.3: Charakteristické FTIR spektra; (a) pro želatiny 1, 2 a 3, (b) pro želatiny 4, 5 a 6, (c) pro želatiny 7, 8 a 9 .....	37
Obr. 4.4: Stravitelnost želatin; (a) simulace procesu trávení po dobu 2 h, (b) simulace procesu trávení po dobu 4 h, (c) simulace procesu trávení po dobu 4 h a následně po dobu 24 h .....	38
Obr. 4.5: Stav pokožky u souboru dobrovolnic v periorbitální oblasti; (a) hodnoty hydratace pokožky; (b) hodnoty TEWL pokožky .....	41
Obr. 4.6: Vizualizace redukce vrásek, žena 50 let; (a) před aplikací gelové kosmetické formulace, (b) po 8.týdenní aplikaci gelové kosmetické formulace .....	42
Obr. 4.7: Porovnání 2D snímků kožního povrchu, žena 50 let; (a) před aplikací gelové kosmetické formulace, (b) po 8.týdenní aplikaci gelové kosmetické formulace .....	43
Obr. 4.8: Porovnání 3D snímků kožního povrchu, žena 50 let; (a) před aplikací gelové kosmetické formulace, (b) po 8.týdenní aplikaci gelové kosmetické formulace .....	43



## PUBLIKAČNÍ ČINNOST A DALŠÍ AKTIVITY AUTORA

### Příspěvky v časopisech abstrahovaných na WoS

**PROKOPOVÁ, A., GÁL, R., MOKREJŠ, P., PAVLAČKOVÁ, J.** Preparation of gelatin from broiler chicken stomach collagen. *Foods*. 2023. vol. 12(1). DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12010127>

**PROKOPOVÁ, A., MOKREJŠ, P., GÁL, R., PAVLAČKOVÁ, J., HURAJOVÁ, A.** Characterization of poultry gelatins prepared by a biotechnological method for targeted changes at the molecular level. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024. vol. 25(2):916. DOI: [10.3390/ijms25020916](https://doi.org/10.3390/ijms25020916)

**PROKOPOVÁ, A., PAVLAČKOVÁ, J., MOKREJŠ, P., GÁL, R.** Collagen hydrolysate prepared from chicken by-product as a functional polymer in cosmetic formulation. *Molecules*. 2021. vol. 26(7). DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26072021>

**GÁL, R., ČMIKOVÁ, N., PROKOPOVÁ, A., KAČÁNIOVÁ, M.** Antilisterial and antimicrobial effect of *Salvia officinalis* essential oil in beef sous-vide meat during storage. *Foods*. 2023. vol. 12(11). DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12112201>

### Příspěvek v časopise uvedený v databázi Scopus

**POLAŠTÍKOVÁ, A., GÁL, R., MOKREJŠ, P. and ORSAVOVÁ, J.** Preparation of protein products from collagen-rich poultry tissues. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*. 2020. vol. 14, pp. 713-720. DOI: <https://doi.org/10.5219/1319>.

### Příspěvky na mezinárodních konferencích abstrahované na WoS

**POLAŠTÍKOVÁ, A., GÁL, R., MOKREJŠ, P. and KREJČÍ, O.** Preparation of protein products from collagen-rich poultry tissues. *Proceedings of 26th International PhD Students Conference (MENDELNET 2019)*, 2020, pp. 392-397.

**POLAŠTÍKOVÁ, A., PAVLAČKOVÁ, J., GÁL, R., MOKREJŠ, P. and ORSAVOVÁ, J.** The use of chicken collagen hydrolyzate as a functional polymer in cosmetics. *Proceedings of 27th International PhD Students Conference (MENDELNET 2020)*, 2021, pp. 372-377.

**PROKOPOVÁ, A., PAVLAČKOVÁ, J., GÁL, R. and MOKREJŠ, P.** Effects of a preparation based on a functional collagen polymer on the skin in the periorbital area. *Proceedings of 28th International PhD Students Conference (MENDELNET 2021)*, 2022, pp. 307-312.

**Příspěvek ve sborníku z konference**

**POLAŠTIKOVÁ, A., MOKREJŠ, P., GÁL, R. a BAĐUROVÁ, J.** Využití vedlejších bílkovinných produktů z porážky drůbeže na přípravu kolagenu. *Bezpečnost a kontrola potravin*. 2019. ISBN 978-80-552-1978-3.

**Vedoucí a konzultant bakalářských a diplomových prací**

HORNOVÁ, J. Účinek kolagenního hydrolyzátu na pokožku. UTB/FT/TUTTTK, 2022 (úspěšně obhájeno v roce 2022).

KRYVORUCHKO, Y. Kolagenový hydrolyzát jako funkční polymer v kosmetické formulaci. UTB/FT/TUTTTK, 2022 (studium ukončeno před obhajobou bakalářské práce).

HORNOVÁ, J. Příprava a charakterizace formulací s obsahem kolagenního hydrolyzátu. UTB/FT/TUTTTK, 2024 (obhajoba květen/červen 2024).

**Spoluřešitelka (řešitelka) vědeckých a pedagogických projektů**

IGA/FT/2019/003 – Příprava a charakterizace želatin/kolagenních hydrolyzátů z drůbežích vedlejších produktů.

IGA/FT/2020/002 – Příprava želatin/hydrolyzátů z vedlejších drůbežích produktů, testování jejich vlastností a návrh aplikací.

IGA/FT/2021/007 – Příprava, charakterizace a aplikace polymerů.

IGA/FT/2022/003 – Přírodní a syntetické polymery – jejich příprava, vlastnosti a použití.

IGA/FT/2023/008 – Studium polymerních systémů – příprava a evaluace vlastností.

Projekt IKAROS VĚDA UTB (Institucionální Kvalita a Rozvoj Strategie vědy na UTB ve Zlíně - Rozvoj výzkumně zaměřených studijních programů na Univerzity (2020-2021).

# **CURRICILUM VITAE**

## **Osobní údaje**

Jméno s příjmením: Aneta Prokopová, roz. Polaščíková  
Titul: Ing.  
Datum narození: 15.06.1993  
Kontaktní adresa: Míškovice 153, 768 52 Míškovice u Holešova  
Email: anetapolastikova@seznam.cz

## **Vzdělání**

2019 – doposud Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, fakulta technologická, Ústav inženýrství polymerů – Technologie makromolekulárních látek  
2017 – 2019 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, fakulta technologická, Ústav inženýrství polymerů – Polymerní materiály a technologie  
2015 – 2017 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav inženýrství polymerů – Polymerní materiály a technologie  
2009 – 2013 Gymnázium Ladislava Jaroše v Holešově, všeobecné vzdělání

## **Zahraniční stáž**

červenec – srpen 2022 Odborná stáž Slovensko  
Slovenská poľnohospodárska Univerzita v Nitre

## **Znalosti**

Počítačové znalosti: MS Windows, Internet, MS Office – pokročilý uživatel  
Řidičský průkaz: sk. B



Aneta Prokopová

**Příprava želatin a hydrolyzátů z kuřecího kolagenu a  
možnosti jejich aplikací**

Preparation of gelatins and hydrolysates from chicken collagen and  
possibilities of their applications

Teze disertační práce

Vydala Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně,  
nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín.

Náklad: vyšlo elektronicky

Sazba: Aneta Prokopová

Publikace neprošla jazykovou ani redakční úpravou.

Rok vydání 2024

Pořadí vydání: první

ISBN 978-80-7678-261-7

