

# Rybí kolagen jako netradiční surovina pro přípravu želatin a hydrolysátu

Barbora Nesládková

---

Bakalářská práce  
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Akademický rok: 2023/2024

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Barbora Nesládková**  
Osobní číslo: **T21189**  
Studijní program: **B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin**  
Specializace: **Potravinářské biotechnologie a aplikovaná mikrobiologie**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Rybí kolagen jako netradiční surovina pro přípravu želatin a hydrolysátů**

## Zásady pro vypracování

- V literární studii se zaměřte na současný stav řešené problematiky a kriticky jej zhodnoťte.
- Navrhněte technologický postup zpracování vybraných rybích kolagenních tkání na kolagenní produkty (želatiny/hydrolysáty).
- Vyhodnoťte stupeň konverze suroviny na připravené produkty. Zaměřte se na charakterisaci připravených produktů. Navrhněte optimální procesní podmínky zpracování rybiho kolagenu na želatiny, respektive hydrolysáty.
- Výsledky měření zpracujte vhodným softwarem, proveďte diskusi a zhodnoťte přínos práce pro vědu a praxi.

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

Seznam doporučené literatury:

Schrieber, R.; Gareis, H. *Gelatine Handbook – Theory and Industrial Practice*, 1st ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2007.  
Karim, A.A.; Bhat, R. 2008. Gelatin alternatives for the food industry: recent developments, challenges and prospects. *Trends Food Sci. Technol.* 2008, 19, 644–656.

Alipal, J.; Mohd Pu'ad, N.A.S.; Lee, T.C.; Nayan, N.H.M.; Sahari, N.; Basri, H.; Idris, M.I.; Abdullah, H.Z. A review of gelatin: properties, sources, process, applications, and commercialization. *Mater. Today: Proc.* 2021, 42, 240–250.

Badway, H.M.R.; Abd El-Moniem, S.M.; Soliman, A.M.; Rabie, M.A. Physicochemical properties of gelatin extracted from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Nile perch (*Lates niloticus*) fish skins. *Zagazig J. Agric. Res.* 2019, 46, 1529–1537.

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

Datum zadání bakalářské práce: **2. ledna 2024**

Termín odevzdání bakalářské práce: **17. května 2024**

L.S.

---

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

---

**Ing. Jaroslav Filip, Ph.D.**  
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 6. února 2024

## **PROHLÁŠENÍ AUTORKY BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

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

### **Prohlašuji,**

- že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studentky:

.....  
podpis studentky

## **ABSTRAKT**

Spotřeba želatiny se každoročně zvyšuje v řádech desítek tun celosvětově. Kromě samotné spotřeby se zvyšuje i poptávka po alternativních zdrojích, neboť tradiční zdroje, jako jsou vepřové a hovězí kůže a skelety, jsou stále častěji odmítány s ohledy na kulturní, zdravotní i výživové aspekty. V této práci jsme se zaměřili na optimalizaci extrakčního procesu želatiny s myšlenkou zužít odpadní produkty potravinářského průmyslu. Z aktuálně testovaných metody byla pro práci zvolena extrakce po enzymatické předúpravě materiálu. Výsledky ukázaly, že enzymatické opracování a následná extrakce želatin horkou vodou si žádá striktní dodržování předepsaných podmínek, neboť jejich nedodržení by v praxi vedlo k produkci nízkomolekulárních produktů o charakteristických vlastnostech pro jiné než zamýšlené použití.

Klíčová slova: želatina, rybí želatina, kolagen, alternativní zdroje, extrakční podmínky, extrakce, enzym.

## **ABSTRACT**

Gelatin consumption has been rising in units of tons annually. As well as the general consumption, demand for alternative sources have been growing too. Traditional sources, like bovine and pork skins or skeletons, are rejected more often by the cultural, health or even nutritional aspect. The aim of this thesis was to optimise extraction conditions, which would allow us to reuse food industries byproducts. Of the currently tested methods, extraction after enzymatic pre-treatment was chosen for this work. The results have shown, that enzymatic pre-treatment followed by hot water extraction of fish gelatin requires strict compliance with the prescribed extraction condition. Otherwise it would lead to production of product with low molecular weight with characteristic properties for different field of use than intended.

Keywords: gelatin, fish gelatin, collagen, alternative sources. extraction conditions, extraction, enzyme.

Nikdy není dost pozdě na to začít později.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD A MOTIVACE .....</b>	<b>1</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>2</b>
<b>1 PŘEDSTAVENÍ PROBLEMATIKY KOLAGENU A ŽELATINY .....</b>	<b>3</b>
1.1 CELOSVĚTOVÁ PRODUKCE ŽELATINY .....	3
1.2 KULTURNÍ IMPULZ PRO PRODUKCI ŽELATINY Z ALTERNATIVNÍCH – RYBÍCH ZDROJŮ .....	4
1.3 KOLAGENNÍ STRUKTURY .....	6
1.4 STRUKTURA A CHEMICKÉ SLOŽENÍ ŽELATINOVÉHO GELU.....	7
1.4.1 Aminokyselinové složení želatinového gelu z ryb v porovnání se savčí želatinou .....	8
<b>2 FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI ŽELATIN .....</b>	<b>10</b>
2.1 PEVNOST GELU .....	10
2.2 VIZKOZITA .....	10
2.3 TEPLOTA TUHNUTÍ GELU .....	11
2.4 TEPLOTA TÁNÍ GELU .....	11
<b>3 METODY EXTRAKCE ŽELATINY Z RYBÍHO MATERIÁLU.....</b>	<b>12</b>
3.1 EXTRAKCE TEPLOU VODOU .....	12
3.2 ENZYMATICKÁ EXTRAKCE .....	13
3.3 DRY SALTING .....	14
3.4 WET SALTING.....	15
3.5 KYSELÁ METODA .....	15
3.6 SROVNÁNÍ VLASTNOSTÍ ŽELATIN.....	15
<b>4 VYUŽITÍ RYBÍCH ŽELATIN.....</b>	<b>18</b>
4.1 APLIKACE RYBÍCH ŽELATIN V SOUČASNÉ DOBĚ.....	18
4.2 POTENCIÁLNÍ BUDOUCÍ APLIKACE .....	19
<b>5 SWOT ANALÝZA ŽELATIN A HYDROLYZÁTŮ Z RYB.....</b>	<b>21</b>
5.1 SILNÉ STRÁNKY (STRENGTHS) .....	21
5.2 SLABÉ STRÁNKY (WEAKNESSES) .....	21
5.3 PŘÍLEŽITOSTI (OPPORTUNITIES) .....	22
5.4 ÚSKALÍ (THREATS) .....	22
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>24</b>
<b>6 CÍLE PRAKTICKÉ ČÁSTI PRÁCE .....</b>	<b>25</b>
<b>7 PŘÍPRAVA ŽELATIN .....</b>	<b>26</b>
7.1 MECHANICKÉ OPRACOVÁNÍ MATERIÁLU .....	26



7.2	TESTOVÁNÍ EFEKTIVITY ROZPOUŠTĚDEL .....	27
7.2.1	Výsledky testování efektivity rozpouštědel .....	30
7.2.2	Diskuse výsledků .....	31
7.3	OPTIMALIZACE EXTRAKČNÍHO PROCESU .....	31
7.3.1	Pilotní experimenty optimalizace.....	32
7.3.2	Optimalizační experimenty – 1. úprava .....	35
7.3.3	Optimalizační experimenty – 2. úprava .....	38
<b>8</b>	<b>STANOVENÍ FUNKČNÍCH VLASTNOSTÍ ŽELATIN.....</b>	<b>40</b>
8.1	METODY VYUŽÍVANÉ K CHARAKTERIZACI FUNKČNÍCH VLASTNOSTÍ ŽELATIN.....	40
8.1.1	Pevnost gelu .....	40
8.1.2	Viskozita .....	41
8.1.3	Teplota tání gelu.....	42
8.1.4	Teplota tuhnutí gelu .....	42
<b>9</b>	<b>SOUHRNNÉ VÝSLEDKY A VÝZNAM PRO PRAXI .....</b>	<b>44</b>
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>47</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>49</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>51</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>52</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>53</b>

## ÚVOD A MOTIVACE

Želatiny jsou polymery čím dál častěji využívané ve všech odvětvích průmyslu – od medicíny, přes farmacii, potravinářskou technologii, obalové technologie, až například po průmysl zabývající se vyvoláváním analogových fotografií. Neustálé zvyšování poptávky po želatině se odráží i v nárůstu poptávek po alternativních zdrojích tohoto polymeru, neboť přibývá skupin obyvatel, kteří se tradičním zdrojům z náboženských, dietních, zdravotních, lifestyleových důvodů nebo jen osobního přesvědčení vyhýbají.

Rybí kolagen obsažený v kůžích a neočištěných skeletech sladkovodních i mořských ryb poutá stále vyšší pozornost vědců, neboť jeho obsah ve zmíněných částech rybích těl je poměrně vysoký. Vzhledem k faktu, že rybí skelety jsou v současné době ve velké míře pouze odpadním produktem rybí produkce, jsou také zdrojem snadno dostupným. Pro přímořské státy, jejichž ekonomika ve velké míře závisí na rybolovu a dalším zpracování jeho produktů, by se rybí skelety mohly stát primárním zdrojem kolagenu pro výrobu želatiny a hydrolyzátů, umožňující snížit nutnost dovozu želatin a bílkovinných zdrojů ze zahraničí, nebo naopak zefektivnit jejich odpadovou ekonomiku.

Hlavní překážkou zabráňující komerčnímu využívání rybí želatiny je nedostatečné prověření metod jejího získávání z kolagenu. Kvůli stavbě molekul kolagenu v rybích tkáních nelze použít stejné podmínky extrakce jako při extrakci želatiny z tkání vepřových či hovězích. Rybí želatiny získané stejným extrakčním procesem jako tradiční zdroje nedosahují stejných funkčních vlastností. Problematika optimalizace extrakčního procesu je v aktuální době často omílaným tématem, přičemž výzkumné instituce po celém světě testují rozdílné technologie.

S myšlenkou zavést nové zdroje želatin a hydrolyzátů je třeba zvážit otevřenost veřejnosti k netradičním zdrojům. Právě názor společnosti na výzkum a budoucí možné použití rybích želatin je neopomenutelným faktorem, který v budoucnu může silně ovlivnit vstup želatin z těchto netradičních zdrojů na trh. Zvyšování povědomí o využití vedlejších a odpadních produktů může vstup na trh usnadnit.

V rámci této práce byly pro práci použity skelety dvou druhů sladkovodních, v českých rybnících běžně žijících ryb – Kapra obecného a Amura bílého.

# **I. TEORETICKÁ ČÁST**

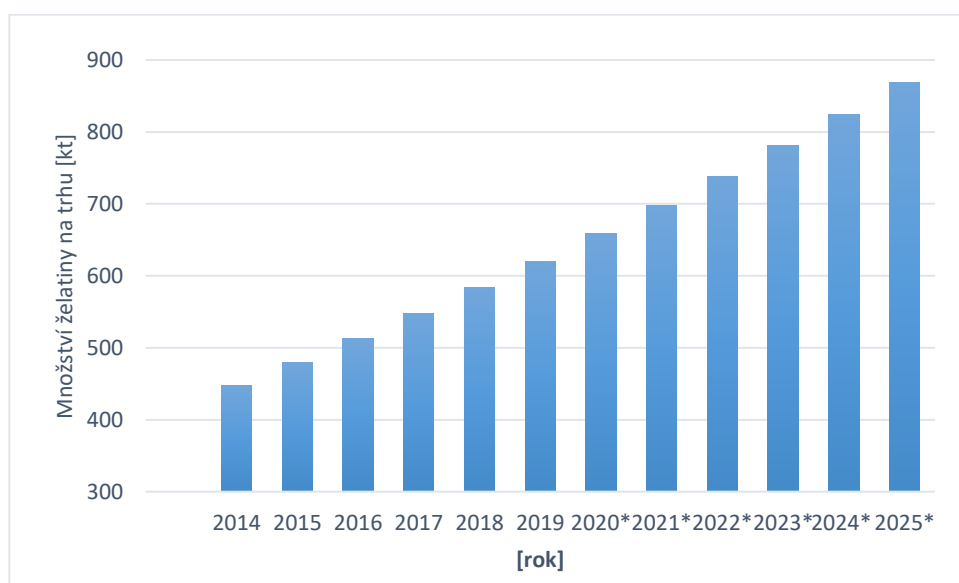
# 1 PŘEDSTAVENÍ PROBLEMATIKY KOLAGENU A ŽELATINY

Pro pochopení důvodu k výzkumu extrakce želatin z ryb je nutno se podívat na aktuální stav světového trhu s želatinou a jaké mezery v nabídce je třeba vyplnit. Pro vědeckou činnost je pak nutno pochopit strukturu kolagenu a želatiny, abychom byli schopni vyvodit změny v těchto molekulách v důsledku extrakce. Tato kapitola je zaměřena na uvedení do kontextu, který je třeba znát, než se můžeme prakticky této problematice věnovat.

## 1.1 Celosvětová produkce želatiny

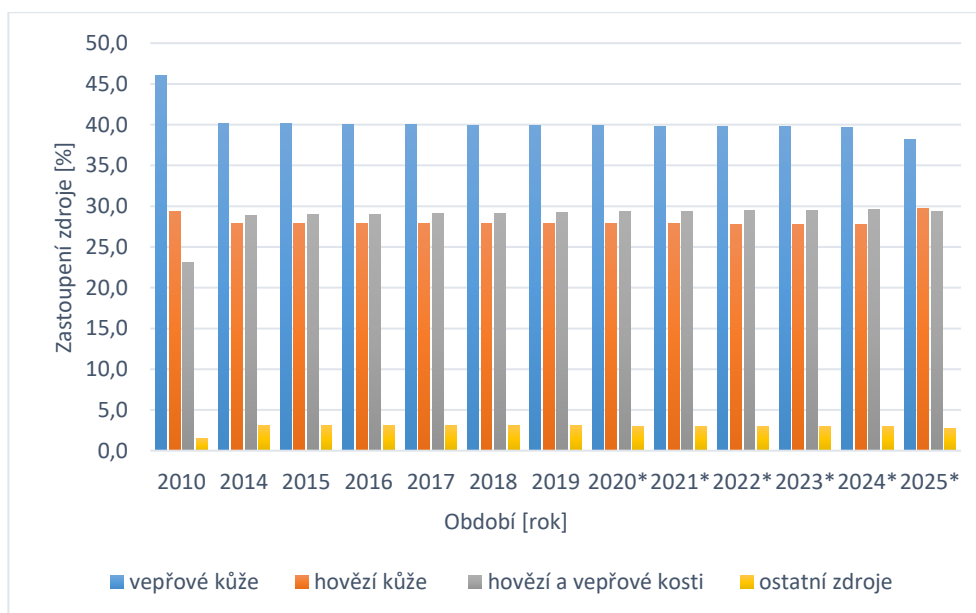
Běžně se želatina získává z kosterních, kožních či vazebných materiálů zvířat [1], nejčastěji se můžeme setkat s želatinami vepřovými a hovězími [2][3]. Právě tyto dva zdroje zastupují největší část ze všech dnes používaných surovin.

Tento kolagenní polymer je využíván v širokém spektru průmyslových odvětví – od potravinářského průmyslu, přes farmaceutické, medicínální či v kosmetice. Uplatnění nalezneme například jako ztužovací složku potravin či kosmetických přípravků, jako stabilizátor vodní aktivity, obalový materiál, matrix pro orgánové implantáty či jako stabilizátor pěny a pro úpravu textury [1][4]. Díky svým vlastnostem je želatina velmi univerzální a relativně dostupný materiál, jehož produkce rapidně roste.



Obrázek 1; Množství využití želatiny v letech 2014-2019 s předpokladem do roku 2025. [18]

Jak již bylo zmíněno výše, želatina je získávána z živočišných zdrojů, zejména z vepřových a hovězích kůží a kostí. Tyto zdroje dohromady tvoří více než 80 % celosvětové produkce. Zbýlá procenta zastupují suroviny jako například drůbeží běhy, drůbeží kostry, nebo právě rybí materiál.



Obrázek 2; Procentuální zastoupení jednotlivých zdrojů v letech 2010-2025\* [18]

Jak lze vyčíst z grafu č. 1, poptávka po želatině v posledních letech výrazně stoupá. Zdroje želatiny se však v posledních letech mění – bezkonkurenčně převažuje jako primární zdroj želatiny vepřová kůže. Od roku 2020 nicméně její zastoupení začíná pomalu klesat a nahrazuje ji kůže hovězí a alternativní zdroje, v nichž jsou v grafu č. 2 zastoupeny i rybí skelety a kůže. Právě rybí kostry, kůže a ploutve tvořily v roce 2020 1,5 % [1][5] z celkové váhy výchozího materiálu. Se vzrůstající poptávkou po alternativních zdrojích, včetně rybích skeletů, se očekává, že k roku 2025 bude již rybí želatina stabilní alternativou za běžně používané savčí želatiny [1].

## 1.2 Kulturní impulz pro produkci želatiny z alternativních – rybích zdrojů

Pro výzkum izolace rybí, či jiné alternativní, želatiny bylo nutno najít dostatek pádných důvodů, proč se odklánět od tradičních surovin, jako je hovězí nebo vepřová kůže. Ačkoli

jsou tradiční zdroje dostatečně kvalitní a svými vlastnostmi vyhovují prakticky všem odvětvím využití, nejsou z kulturního kontextu oblíbené zejména v určitém spektru společenských komunit. Právě náboženské skupiny, následující pravidla své víry, zpravidla odmítají výrobky s obsahem tradiční želatiny. [1] [3] [4]

Zástupci židovské či islámské víry mají zakázáno požívat vepřové a jakékoli výrobky z něj, stejně tak jako cokoli vyrobeno z jakékoli části prasete. Na druhé straně hinduisté mají svou vírou zakázané hovězí [4], neboť právě skot je pro hinduisty symbolem života a měl by být chráněn, nikoli požíván.

Impulzy pro hledání alternativních zdrojů však nevycházejí pouze z náboženských skupin. Trendy ve stravování za poslední dvě dekády přispívají k nárůstu vyznavačů flexitariánské stravy. Právě flexitariánská strava se vyznačuje majoritní konzumací výrobků rostlinného původu, nicméně maso, převážně rybí, je do jídelníčku zahrnuto ve velmi malé frekvenci. De facto by se dalo mluvit o ne tak striktní vegetariánské stravě. Právě tato skupina konzumentů, která v dnešní době převládá nad tradiční vegetariánskou stravou, je další velmi početnou komunitou volající po produktech s použitím želatin z alternativních zdrojů.

Po využití alternativních zdrojů volají i skupiny enviromentálního zaměření. Právě ryby jsou dle nich velmi slibnou alternativou [4]. Výroba potravin z ryb je velkým producentem odpadu. Celková rybí produkce, respektive výlov ryb, dosáhla v roce 2018 179 milionům tun [5], z čehož 47 % z této hmotnosti bylo využito v potravinářském průmyslu, a zbylých 53 % tvořil průmyslový odpad [1] – kůže, ploutve a skelety, které jsou pro další potravinové zpracování již nevyužitelné. Své využití nacházejí minoritně v rámci výroby krmiva pro ryby. Avšak právě tyto části obsahují velké množství kolagenu – u některých mořských druhů je v těchto zbytcích obsah kolagenu až 51,4 % [1; 4]. Právě tento podíl by mohl být v budoucnu využit k produkci želatiny, která by částečně mohla nahradit želatinu tradičních zdrojů.

Další významný impulz pro nalezení vhodných alternativ k tradiční želatině z hovězích zdrojů přinesla epidemie bovinní spongiformní encefalopatie [1][3][4], která byla problémem především ve Velké Británii v 80. a 90. letech minulého století. Onemocnění jinak zvané také jako nemoc šílených krav postihovalo v tomto období chovná stáda skotu určeného na porážku pro masný průmysl. Jde o prionové onemocnění, které primárně postihuje skot, avšak se v minulosti zmutovaná varianta tohoto onemocnění přenesla na

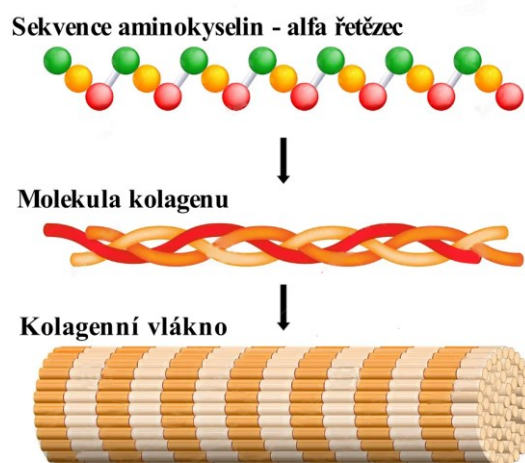
člověka, z čehož se rozšířila nová verze onemocnění, postihující primárně lidskou populaci – Creutzfeldtova-Jakobova choroba. Onemocnění postihující mozek a nervovou soustavu vyvolalo v nemalé části populace obavy z konzumace hovězího masa nebo výrobků jakkoli spojených s hovězí produkcí. Například hovězí želatina mohla pro populaci představovat potenciální transmittér. Právě v období největšího rozšíření nemoci se začal klást důraz na hledání nového bezpečného zdroje pro výrobu želatiny.

Všechny výše zmíněné argumenty zvýšily poptávku po vývoji procesu izolace rybí želatiny, jako slibného zdroje pro budoucí využití.

### 1.3 Kolagenní struktury

Želatina je třírozměrná síť biopolymeru tvořená do určité míry degradovanými fibrilárními vlákny kolagenu – proteinu přítomného v živočišných tkáních, nejvíce v kůži, kostech, šlachách a vazech [4]. Vyznačuje se tuhou gelovou konzistencí, nemá výrazné zbarvení ani zápach, neboť jde o proteinovou strukturu. [1]

Kolagenní vlákna jsou fibrilárními proteiny tvořenými molekulami kolagenu. Tyto molekuly jsou tvořeny třemi peptidovými řetězci stočenými do levotočivé šroubovice vzájemně spojeny intramolekulárními H-můstky [2]. Kolagenní molekuly bývají u většiny tkání 300 nm dlouhé jejich průměr je přibližně 1,5 nm. Právě tato kolagenní vlákna jsou v procesu extrakce degradována na menší a kratší fragmenty, které tvoří želatinový roztok.



Obrázek 3; Struktura stavby kolagenních vláken [13]

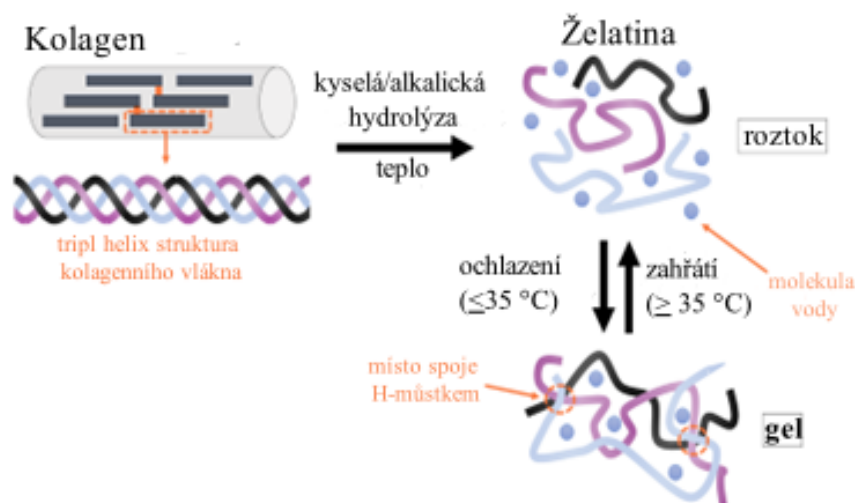
Dle stupně degradace molekuly kolagenu se v želatinovém roztoku nachází menší fragmenty, tj.  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -řetězce.  $\alpha$ -řetězcem se rozumí pouze jedna samostatná molekula

kolagenu,  $\beta$ -řetězcem se rozumí dva spojené  $\alpha$ -řetězce,  $\gamma$ -řetězci analogicky rozumíme tři vzájemně spojené  $\alpha$ -řetězce [1], a tedy kratší fragment molekuly kolagenu.

Kolagen je nejvíce zastoupeným proteinem v živočišných, respektive savčích, tkáních, kostech, vazech a šlachách. Právě tento protein tvoří 25-35 % celkové váhy živočicha [1].

#### 1.4 Struktura a chemické složení želatinového gelu

V procesu extrakce želatiny z opracovaného kolagenu je vysokou teplotou, tlakem a případně hydrolytickými enzymy částečně rozbita struktura kolagenních vláken a molekul, a volné  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -řetězce jsou uvolněny do okolního roztoku. Za postupného chladnutí roztoku spolu řetězce opět tvoří vodíkové můstky a vystavují 3D strukturu. Takto reformovaná struktura nikdy není shodná s původní strukturou molekuly kolagenu, neboť řetězce tvoří můstky s vhodnými, tedy blízkými řetězci. Výsledkem je tuhý gel, jehož pevnost závisí na stupni rozbití původní molekuly [2]. Je-li želatina vystavena zdrojům rozpadu příliš dlouhou dobu, ztratí želatina schopnost tvořit pevný gel, čímž snižuje výslednou funkční pevnost gelu.



Obrázek 4; Rozpad nativní struktury kolagenu a opětovné vytvoření struktury želatiny [14]

Z chemického hlediska je želatina téměř čistě proteinovým gelem [1], v konkrétním zastoupení 85-92 % proteinu. Kolagenní molekuly jsou molekulami fibrilárních proteinů, a jsou tedy složeny z aminokyselin. Kolagen je složen ze 20 různých aminokyselin, přičemž 18 z nich je proteinogenních – pouze cystein a tryptofan zastoupen není. Největší zastoupení



má glycin (33 %) a prolin a hydroxyprolin (22 %) [1]. Prolin a hydroxyprolinem jsou zároveň zodpovědné za sekundární strukturu kolagenu.

Konkrétní procentuální zastoupení jednotlivých typů aminokyselin se liší v závislosti na typu kolagenu. Je známo 27 typů kolagenu, které se diferencují dle svého umístění a funkce v organismu, věku, samotného aminokyselinového složení a dalších faktorů.

#### **1.4.1 Aminokyselinové složení želatinového gelu z ryb v porovnání se savčí želatinou**

Savčí želatiny obecně mají zastoupení aminokyselin velmi podobné. Produkty derivované ze savčího kolagenu neobsahují cystein ani tryptofan a mají velmi malý obsah histaminu, tyrosinu a methioninu. Naopak glycin a prolin jsou zastoupeny nejvíce. V rybích želatinách je toto složení velmi podobné, ne-li téměř totožné. Primární struktura kolagenu u ryb je udávána častou několikanásobnou repeticí sekvence Glycin-X-Y, kdy X a Y jsou mnohdy zastoupeny prolinem nebo hydroxyprolinem [3].

Lepší představu o zastoupení aminokyselin v rybích želatinách podává tabulka č. 1; Treska obecná, Treska pestrá a Štikozubec obecný jsou zástupci ryb obývajících studené vody, zatímco Kambala průsvitná a Tilápie jsou rybami obývajícími teplé vodní plochy.

Podíl aminokyselin, jak lze vyčíst z tabulky, není v přímé závislosti na teplotě vody, v níž ryby žijí. Nicméně teplota vody, v níž ryby žijí, signalizuje nižší teploty funkčních faktorů želatinového gelu (viz Fyzikálně chemické funkční vlastnosti želatin – Teplota tání gelu, Teplota tuhnutí gelu). V porovnání s vepřovou želatinou jsou rozdíly patrné.

Obecně je podíl glycinu a methioninu v rybích želatinách vyšší, podobně je tomu u threoninu nebo argininu. Opačně, tedy vyšší podíly aminokyselin ve vepřové želatině oproti rybí, je tomu u prolinu a hydroxyprolinu. Právě nižší podíl prolinu a hydroxyprolinu, které výrazně ovlivňují konformaci sekundární struktury, může být zodpovědný za nutně mírnější podmínky extrakce či nižší teploty tání a tuhnutí želatinového gelu oproti savčím želatinám [5].

Tabulka 1; Zastoupení aminokyselin v rybích želatinách v porovnání s želatinou vepřovou (vyjádřeno jako množství rezidujících/1000 celkových reziduí aminokyselin) [3] [4]

	<b>Kůže Tresky pestré</b>	<b>Štikozubec obecný</b>	<b>Kambala průsvitná</b>	<b>Kůže Tilápie</b>	<b>Amur bílý</b>	<b>Vepřová kůže</b>
<b>Alanin</b>	108	119	123	123	129	112
<b>Arginin</b>	51	54	54	47	50	49
<b>Asparagin</b>	51	49	48	48	47	46
<b>Cystein</b>	0	-	-	0	1	0
<b>Glutamin</b>	74	74	72	69	77	72
<b>Glycin</b>	358	331	350	347	367	330
<b>Histidin</b>	8	10	8	6	5	4
<b>Hydroxylysin</b>	6	5	5	8	-	6
<b>Hydroxyprolin</b>	55	59	60	79	70	91
<b>Isoleucin</b>	11	9	8	8	10	10
<b>Leucin</b>	20	23	21	23	21	24
<b>Lysin</b>	26	28	27	25	25	27
<b>Methionin</b>	16	15	13	9	13	4
<b>Fenylalanin</b>	12	15	14	13	13	14
<b>Prolin</b>	95	114	115	119	87	132
<b>Serin</b>	63	49	41	35	39	35
<b>Threonin</b>	25	22	20	24	25	18
<b>Tryptofan</b>	0	-	-	0	-	0
<b>Tyrosin</b>	3	4	3	2	4	3
<b>Valin</b>	18	19	18	15	18	26

## 2 FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI ŽELATIN

Želatinové gely o stejné koncentraci nejsou univerzálně použitelné pro všechny potřebné aplikace. Jejich použití je stanoveno na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností, na které má konkrétní použití specifické požadavky. Základními sledovanými charakteristikami je pevnost gelu, viskozita, teplota tání a teplota tuhnutí gelu. Pro podrobnější charakterizaci jsou u želatin stanovované i veličiny jako například obsah popelovin, stravitelnost, pěnivost, kapacita nebo vaznost vody. S této práci byla charakterizace gelů omezena na výše zmíněné 4 základní veličiny.

### 2.1 Pevnost gelu

Pevnost želatinového gelu je veličina udávající hmotnost v gramech potřebnou pro průnik sondy do gelu o definované koncentraci v nádobě o předem definovaném rozměru [6]. Jednotka Bloom udává sílu, která je potřebná k narušení povrchu gelu do hloubky 4 mm rychlostí 1 mm/s. Jde o veličinu technologicky významnou, neboť často determinuje následující průmyslové využití želatiny. Komerčně využívané želatiny disponují pevností gelu v rozmezí 50-300 Bloom. Pro potravinářské využití je toto rozmezí přibližně 150-300 Bloom. Hodnoty pevnosti gelu jsou často v korelaci s teplotou tání a tuhnutí gelu. Obecně vzato, gel, který má vysoké hodnoty pevnosti, má také vyšší teploty tání a tuhnutí. [6]

Pevnost gelu je v průběhu získávání želatiny ovlivněna mnoha faktory, jako například pH roztoku, extrakční teplota, množství extrakčního enzymu atd. Přímo závislá je na stupni degradace kolagenních molekul. Čím více jsou původní molekuly degradovány (tj. zaniklo více intramolekulárních H-můstků), tím méně pevný je výsledný gel.

### 2.2 Viskozita

Viskozita želatiny je veličinou měřenou plně v kapalném skupenství na rozdíl od zbylých stanovovaných charakteristik. Z fyzikálního hlediska nám želatina udává poměr mezi tečným napětím a změnou rychlosti v závislosti na vzdálenosti mezi sousedními vrstvami proudící kapaliny – zjednodušeně vnitřní tření kapaliny. Viskozita má pro zpracování želatiny podstatný technologický význam, neboť její hodnoty determinují reologii želatiny a tím i její využití. Viskozita želatiny se obvykle pohybuje v rozmezí 1,5 – 7,5 mPa·s. [15]

### 2.3 Teplota tuhnutí gelu

Teplota tuhnutí, v některých studiích uváděna také jako teplota gelovatění, je veličina udávající teplotu, při níž viskózní želatinový roztok tuhne v gel. Na tuto charakteristiku je kladen důraz zejména ve farmaceutickém průmyslu při výrobě kapslí a obalů na léky.

Tyto teploty jsou u gelů z rybích želatin často výrazně nižší než u tradičně využívaných želatin, což může být pro průmyslové použití značným problémem, neboť teploty tuhnutí některých rybích želatin se pohybují i v hodnotách 8-10 °C, a tedy za pokojové teploty nejsou stabilní ani tuhé.

### 2.4 Teplota tání gelu

Analogicky vůči teplotě tuhnutí je teplota tání gelu teplotou, při níž gel přechází z pevné do viskózní kapalné fáze. Na její význam je kladen důraz zejména v potravinovém průmyslu, kdy dle funkce želatiny je třeba, aby za pokojové teploty zůstávala v pevném stavu.

V potravinářství, v souvislosti s teplotou tání želatiny, existuje termín „melt-in-mouth temperature“. V praxi jde o to, aby se gel, který je za pokojové teploty v pevném stavu, rozpustil ve chvíli, kdy se v ústech konzumenta zahřeje na tělesnou teplotu, a tím uvolní chuťové a aromatické látky, které jsou v gelu rozpuštěny. [7] Rybí želatiny mají obecně nižší teploty tání, čímž jsou slibnou alternativou k savčím želatinám převážně v potravinářském průmyslu. Ovšem i v rámci druhové diferenciaci se teplota tání želatinového gelu liší na základě druhu, respektive teploty vody, v níž daný druh ryby žije. Gely připravené z ryb žijících v chladnějších vodách mají nižší teploty tání gelu oproti gelům z ryb obývajících teplé vody, hlavně kvůli sníženému obsahu prolinu [1].

### 3 METODY EXTRAKCE ŽELATINY Z RYBÍHO MATERIÁLU

V současné době je k extrakci želatiny využíváno, resp. testováno několik metod. Používají se hydrolytické metody za působení tepla, enzymů či s využitím louhů a kyselin, tj. pomocí kyselých či alkalických hydrolyz. Použitá metoda má vliv na strukturní a funkční vlastnosti získané želatiny, a tedy želatina ze stejného zdroje se může svými vlastnostmi lišit pouze díky použité metodě jejího zisku [8]. V kontextu současného získávání rybí želatiny jsou v této kapitole popsány vybrané metody nalezené v literatuře zabývající se touto problematikou. Uvedené metody byly publikovány ústavy působícími při agrikulturních či technologických fakultách v různých zemích světa. Země se vzájemně diferencují zastoupením náboženských skupin, dietních trendů či dostupných zdrojů potravy. Zmíněné faktory mohou vést k rozdílnému přístupu k extrakci želatiny ze stejného zdroje.

Ačkoli se samotná extrakce želatiny může v metodice lišit, celkový proces má ve většině zdrojů stejný základní technologický postup práce: opracování surového materiálu (promytí, odstranění doprovodných látek, čištění kolagenu), extrakce a purifikace kolagenu a sušení získané želatiny [3]. Tento postup je uplatňován ve všech níže popsaných metodách a uplatněno bylo i v praktické části práce.

#### 3.1 Extrakce teplou vodou

Metoda vyvíjená na Fakultě agrikultury při Univerzitě v Zagazig v Egyptě, publikována v článku v roce 2019 [9], byla testována na kostrách sladkovodních ryb, a to konkrétně na Tlamounu nilském (*Oreochromis niloticus*) a Robalu nilskému (*Lates niloticus*). Želatina byla extrahována do vody působením tepla, bez použití enzymů.

Rybí materiál, v tomto případě kůže z *Oreochromis niloticus* nebo *Lates niloticus*, byl zvážěn a ponechán po dobu 1 hodiny v kohoutkové vodě. Následovalo opracování v 0,4% roztoku NaOH po dobu 4 hodin, promytí vodou po dobu 1 hodiny, opracování 0,4% roztokem HCl po dobu 4 h. Materiál byl nakonec promýván kohoutkovou vodou do doby, dokud jeho pH nebylo neutrální (pH 7). Samotná extrakce se sestávala z materiálu smíchaného v poměru 1:2 s destilovanou vodou a působení tepla (70 °C) po dobu 1,5 hodiny. Výsledný roztok s extrahovanou želatinou byl přefiltrován, zahuštěn odpařením a vysušen při 50 °C. Získaná želatina byla následně skladována v exsikátoru až do charakterizace želatinového gelu.

Tato metoda extrakce poskytovala výtěžek 3,80 % (w/w) z *Lates niloticus* a znatelně vyšší výtěžek 8,65 % (w/w) z *Oreochromis niloticus*.

### 3.2 Enzymatická extrakce

Článek [2] sepsaný na Institutu přírodních věd a technologií při Státní technické univerzitě v Murmansk v Rusku, publikovaný v roce 2022 popisuje postup extrakce želatiny z kůže Tresky atlantské (*Gadus morhua*), obývající studené vody, s využitím biotechnologie – za pomoci enzymatické extrakce. Studie argumentuje využití materiálu z *Gadus morhua* zvýšením celkového vyloveného množství ryb o 4 % v posledních letech, a to na 400 000 tun ryb ročně. Z tohoto množství se velká část filetuje, z čehož vzniká velké množství vedlejších produktů, tj kůží a kostí.

Jako extrakční enzymy jsou ve článku uváděny Protosubtilin a Pankreatin. Jedná se o směsi enzymů. Protosubtilin G3x je směs enzymů bakteriálního původu složená z neutrálních proteáz, alkalických proteáz, alfa-amylázy, beta-glukanázy, xylanázy a celulázy. Tato enzymatická směs nachází optimum při neutrálních podmínkách (pH 6,5-7,5) a teplotách 40-55 °C. Pancreatin je směsí enzymů získanou ze slinivky břišní savců. Tato směs se sestává z proteázy, amylázy a lipázy. Optimální podmínky pro působení této enzymatické směsi jsou v lehce zásaditém prostředí při pH 7,4-8,5 a při teplotě 40-50 °C. Rybí materiál je v tomto experimentu po rozmrazení promyt vodou, rozmělněn na kousky o velikosti přibližně 0,5 × 0,5 cm a smíchán s destilovanou vodou v poměru 1:6. V destilované vodě byl materiál za stálého míchání ponechán 1 hodinu při teplotě 20 °C. Tato směs byla přefiltrována skrze 3 vrstvy gázy, načež byl zachycený materiál opět smíchán s destilovanou vodou, v níž probíhala extrakce. Koncentrace enzymu je udávána na 0,025 g enzymu na 1 kilogram surového materiálu, přičemž směsi enzymů byly použity v separovaných vzorcích ve stejném množství. Extrakce probíhala při pH směsi 7,0-7,5 a při teplotě 40 ± 1 °C po dobu 3 hodin. Směs byla následně zahřáta na 85-90 °C na 5 minut s cílem deaktivovat enzym. Směs byla po deaktivaci přefiltrována přes filtrační tkaninu a odstředována na centrifuze po dobu 40 min při 5000 ot/min a teplotě 20 °C. Nakonec byla směs vysušena mrazem při -50 °C a uchovávána při teplotách nepřesahujících 5 °C.

Výtěžek z tohoto experimentu tvořil 60 % (w/w) při použití enzymatické směsi Protosubtilin G3x a 58 % (w/w) při použití směsi Pancreatin. Krom dalších stanovovaných charakteristik se u těchto vzorků testovalo i složení aminokyselin. To se nepatrně lišilo, avšak velmi málo na to, aby se jednalo o rozhodující faktor pro výběr konkrétní enzymatické

směsi. Oproti surovému materiálu došlo u obou vzorků k drastickému úbytku methioninu a tyrosinu. Použití extrakčních enzymů mělo dle experimentu vliv na molekulární hmotnost želatinových řetězců. V referenčním vzorku želatiny, získaném za stejných podmínek, pouze bez přítomnosti enzymu, je molekulová hmotnost stanovena na 158,8 kDa, zatímco ve vzorcích získaných za pomoci enzymatických směsí je průměrná hmotnost řetězců stanovena na 138,9 kDa pro vzorek s použitím Protosubtilinu a výrazně menší hmotnost 97,1 kDa pro vzorek získaný za pomoci Pancreatinu.

### 3.3 Dry salting

Metoda dry saltingu je společně s dalšími 5 metodami (viz wet salting, kyselá metoda; nepopsané metody extrakce teplem, Pepsinem a Trypsinem) popsána v článku sepsaném na Akademii rybích věd v Guangxi v provincii Nanning v Číně [8].

Pro testování všech těchto metod byly vstupními surovinami kůže ze žraloka a hadohlavce. Tyto kůže byly mechanicky odděleny od skeletu a zbytků pruhované svaloviny, promyty vodou a uchovávány při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  až do doby samotného testování. Kůže byly rozmrazeny na pokojovou teplotu a promyty vodou. Materiál byl následně smíchán s roztokem NaOH o koncentraci 0,25 mol/l v poměru 2:5 po dobu 12 hodin. Poté byl materiál promyt vodou a smíchán s roztokem bezvodé kyseliny octové o koncentraci 0,1 mol/l v poměru 2:5 na dobu 3 hodin. Po samotném opracování danou metodou byl materiál s roztokem obsahujícím extrahovanou želatínu zahřát na vodní lázni na  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  a při této teplotě ponechán přes noc. Následně byl přefiltrován přes 4 vrstvy tkaniny. Získaný filtrát byl centrifugován při 6000 ot/min při pokojové teplotě po dobu 20 minut pro získání želatiny. Získaná želatína byla nakonec vysušena mrazem.

Tyto přípravné a závěrečné postupy byly využity pro zde popsané metody dry saltingu, wet saltingu a kyselou metodu.

Pro získání želatiny za pomoci dry saltingu byl materiál smíchán s NaCl v množství 3,75 %, vztaženo na hmotnost materiálu. Směs byla promíchána a ponechána přes noc. Směs byla další den smíchána s destilovanou vodou v poměru 4:5 a zhomogenizována. Želatína byla z filtrátu získána postupem popsaným výše v této sekci.

### **3.4 Wet salting**

Metoda wet saltingu je společně s dalšími 5 metodami (viz. dry salting, kyselá metoda; nepopsané metody extrakce teplem, Pepsinem a Trypsinem) popsána v článku sepsaném na Akademii rybích věd v Guangxi v provincii Nanning v Číně [8]. Materiál byl před samotnou extrakcí opracován postupem zmíněným v sekci popisující metodu dry saltingu.

Metoda wet saltingu je obdobou dry saltingové metody. Materiál byl smíchán s destilovanou vodou v poměru 4:5 a NaCl v množství 3,75 % (w/w). Tato suspenze byla důkladně promíchána a ponechána přes noc. Želatina byla ze suspenze získána postupem popsáním v sekci popisující metodu dry saltingu.

### **3.5 Kyselá metoda**

Kyselá metoda extrakce želatiny je společně s dalšími 5 metodami (viz. dry salting, wet salting; nepopsané metody extrakce teplem, Pepsinem a Trypsinem) popsána v článku sepsaném na Akademii rybích věd v Guangxi v provincii Nanning v Číně [8]. Materiál byl před samotnou extrakcí opracován postupem zmíněným v sekci popisující metodu dry saltingu.

Materiál byl umístěn na vodní lázeň o teplotě 50 °C na dobu 1 h. Poté byl smíchán s roztokem kyseliny citronové o koncentraci 0,05 mol/l v poměru 4:5 a důkladně promíchán. Želatina byla poté izolována postupem popsáním v sekci popisující metodu dry saltingu.

### **3.6 Srovnání vlastností želatin**

Pro lepší představu o výsledných vlastnostech želatin, získaných výše popsány metodami, jsou v tabulce č. 2, srovnané jednotlivé vlastnosti deklarované samotnými studiemi.



Tabulka 2; Vlastnosti želatin získaných metodami extrakce teplem a enzymatické extrakce

	Výtěžek [%]	Pevnost gelu [Bloom]	Viskozita [mPa×s]	Vodu zadržující kapacita [%]	Pěnotvorná kapacita [%]
1.1	8,65	N	6,02	637,18	2,45
1.2	3,80	N	5,96	687,97	2,37
2.1	60 ± 1	N	N	N	N
2.2	58 ± 1	N	N	N	N
3.1	31,1 ± 1,01	295	2,70	9,90	79,5 m <sup>2</sup> /g
3.2	33,9 ± 1,60	260	2,77	9,25	80,5
4.1	31,6 ± 1,02	287	2,73	9,60	78
4.1	32,2 ± 1,24	191	2,80	8,80	78
5.1	22,7 ± 1,58	328	2,28	8,50	66,2
5.2	25,3 ± 1,34	297	2,28	6,90	60,76
	Stabilita pěny [%]	Teplota tání gelu [°C]	Teplota tuhnutí gelu [°C]	Čiřost [%]	
1.1	2,04	28,47	17,12	1,074	
1.2	1,90	21,4	19,90	1,490	
2.1	N	11,4	1,5	N	
2.2	N	10,1	-0,3	N	
3.1	N	N	N	N	
3.2	N	N	N	N	
4.1	N	N	N	N	
4.1	N	N	N	N	
5.1	N	N	N	N	
5.2	N	N	N	N	

Pozn.: 1.1 – Extrakce teplem, *Oreochromis niloticus*      1.2 – Extrakce teplem, *Lates niloticus*  
 2.1 – Enzymatická extrakce, Protosubtilin;      2.2 – Enzymatická extrakce, Pancreatin  
 3.1 – Dry salting, žralok;      3.2 – Dry salting, hadohlavec  
 4.1 – Wet salting, žralok,      4.2 – Wet salting, hadohlavec  
 5.1 – Kyselá metoda, žralok;      5.2 – Kyselá metoda, hadohlavec

Srovnáním výsledků z výše uvedených experimentů může být jednoznačně vyvozen závěr, že extrakce želatiny s využitím enzymů má nezanedbatelný vliv na výtěžnost procesu (výtěžek vyšší skoro o 50 %) a zároveň snižuje dobu extrakce o 2 hodiny oproti extrakci horkou vodou. Želatina extrahovaná za pomoci biotechnologie obsahovala dle uvedených zdrojů více bílkovin, nicméně na celkový obsah bílkovin v želatinovém gelu má vliv několik faktorů, například rozdílné druhy ryb jakožto výchozí materiál extrakcí. Nezanedbatelný vliv enzymů na gel ve srovnání s horkou vodou můžeme vidět na srovnání teplot tání a tuhnutí. Enzymy dle výsledků silně narušují strukturu molekul kolagenu a pro reformaci pevného gelu je třeba nezanedbatelně nižších teplot. Naproti tomu je extrakce horkou vodou šetrnější a pravděpodobně vhodnější pro získání komerčně využívaných želatin.

## 4 VYUŽITÍ RYBÍCH ŽELATIN

V současné době je rybí želatina využívána velmi zřídka, její produkce činila v roce 2020 pouze 1,5 %, z čehož i vyplívá její nízké využití. Avšak přesto lze najít několik různých, aktuálních, a i do budoucna možných využití.

### 4.1 Aplikace rybích želatin v současné době

V aktuální době se již želatina extrahovaná z rybího materiálu využívá k emulzifikaci průmyslových polév či omáček. Jejím přídavkem jakožto emulzifikačního činidla je prodloužena doba trvanlivosti potraviny a zvýšený podíl hydroxyprolinu přispívá k udržení vody v potravíně. Svě využití nachází želatina z ryb i při výrobě zmrzlin, kde krátké řetězce kolagenu zabraňují růstu ledových krystalků. Zároveň dochází ke stabilizaci elektrostatických a H-vazeb v krystalové struktuře vytvořené peptidovými řetězci. [7]

Očekávaným polem uplatnění je přídavek želatiny jako přídatné suroviny do produktů z ryb či mořských plodů, kde by použitím rybí želatiny nedocházelo k druhovému křížení. Toho je využíváno při výrobě surimi, surimi tyčinek, často pojmenovávaných i jako rybí či krabí tyčinky. Pod pojmenováním surimi rozumíme pastu či drť z rybího masa, která je často zpracovávána do podoby tyčinek [10]. Při výrobě surimi se používá hydrolyzát z *Carcharhinus limbatus*, který zde podporuje hydrofobicitu povrchu a zvyšuje množství disulfidových vazeb výrobku, čímž zabraňuje denaturaci myofibrilárních proteinů ve výrobku [7]. Krom prevence před denaturací má přídavek želatiny pozitivní vliv i na texturní vlastnosti výrobku, kdy přídavek 10 % rybí želatiny zvyšuje vodu vázající kapacitu výrobku o 35 %, čímž se želatina ve výrobku, který je primárně skladován při mrazírenských teplotách, stává hlavním kryoprotektivem. Dále také zmírňuje žvýkavost a tuhost výrobku [7]. Na úkor protein protektivní aktivity a kryoprotektivní aktivity má vliv i na nutriční hodnotu surimi výrobků, která je přídavkem rybí želatiny na úkor želatiny vepřové snížena [7]. Xantanem modifikovaná rybí želatina byla testována jako přídavek do jogurtu, kdy jí byla upravena vodu vázající kapacita, viskozita a konzistence [7].

Rybí želatina je využívána i v nápojovém průmyslu. V oblasti pivovarnictví a vinárenství, kde je komerčně nejvíce využívána hovězí želatina používána jakožto adsorbent při čiření nápojů, se ukázala být konkurenceschopnou. Želatina extrahovaná ze sumce nejenže vykazovala stejné adsorpční vlastnosti, ale dokonce i vykazovala vyšší efektivitu [7].

Při číření ovocných džusů a šťáv vykazovala želatina extrahovaná z kůží *Raja clavata* vyšších čířících schopností se současným zachováním stejných nutričních hodnot jako při použití hovězí želatiny [7].

Naopak nevhodná je rybí želatina v současné době jako stabilizátor pěny, v tomto ohledu kvůli své sekundární struktuře, která zde zaostává za strukturou a stabilizačními schopnostmi hovězí želatiny [7].

## 4.2 Potenciální budoucí aplikace

V rámci tkáňového inženýrství má rybí želatina do budoucna potenciál jakožto opora při darování buněk, kdy želatina slouží jako biodegradabilní zdroj buněk a proteinů. Tato opora má za úkol mimo jiné i podpořit buněčné interakce podporující úchyt buněk. Rybí želatina se jeví jako potenciálně vhodný materiál, jelikož splňuje základní požadavky na materiál v rámci tkáňového inženýrství: 1) materiál je biokompatibilní a je možno ho modelovat do požadovaného tvaru; 2) interakce materiál-hostitelská buňka musí splňovat tkáňově specifické strukturní a metabolické požadavky; 3) účinnost materiálu by měla být otestována in vitro i in vivo za použití kvantitativních molekulárních a histologických metod. Rybí želatina splňuje všechny tyto požadavky svými biokompatibilními a biodegradabilními vlastnostmi a nízkou antigenitou [3].

Konkrétním příkladem je využití želatiny z *Cyprinus carpio* jakožto matricí podporující tvorbu vazeb mezi dárcovskými buňkami a hostitelským organismem. Zvýšení množství vazeb zde snižuje imunitní odpověď na dárcovské buňky, a tím zvyšuje šanci jejich uchycení. Nedostatkem využití této želatiny je nízká míra proliferace dárcovských buněk [3]. V celkovém kontextu využití rybích želatin v oblasti tkáňového inženýrství je limitací obecně nízká teplota tání rybích želatin, která se pohybuje pod bazální tělesnou teplotou [3]. Z tohoto důvodu by pro potenciální aplikaci bylo třeba využívat modifikované rybí želatiny, která bude disponovat hustším síťováním ve své struktuře.

Účinky rybí želatiny jsou zkoumány nejen v souvislosti s tkáňovým inženýrstvím, ale i s léčbou onemocnění postihujících kosti; například prodloužení trvání účinků léčby osteoporózy. V aktuální době není účinek léčby osteoporózy trvalý, nicméně bylo již dříve prokázáno, že vysoký obsah kolagenu v potravě má pozitivní vliv na dobu, po kterou účinky léčby tohoto onemocnění působí. V roce 2005 bylo navíc zjištěno, že perorální užívání želatiny ze žraločích kůže obsahující určité peptidy zvyšuje tvorbu kostní tkáně a produkci

kolagenu typu I v kostech. Nicméně tento mechanismus byl zkoumán zatím pouze u kastrovaných potkanů. [3]

Své uplatnění může želatina najít i při léčbě hypertenze. Nejrozšířeněji používané léky na hypertenzi obsahují ACE (angiotension-converting enzyme) inhibitory. Aktuálně využívané syntetické inhibitory na trhu mají řadu vedlejších účinků, nicméně bioaktivní peptidy obsažené v rybích želatinách mají stejné účinky a mohou se tak stát bezpečnějším zdrojem [3].

Konkurenci by v budoucnu mohla rybí želatina tvořit virovým vektorům v rámci genové terapie pro léčbu rakoviny. Přenos DNA do buněk je v aktuální době v rámci využití želatin zastoupen želatinou vepřovou, nicméně rybí želatina s vlastnostmi podobnými vepřové by zde své uplatnění v budoucnu mohla najít také [3].

Nutno podotknout, že rybí želatiny obsahují mimo jiné i bioaktivní peptidy s antimikrobiálními vlastnostmi (dále jako AMP). Tyto peptidy hrají roli jakožto obranný mechanismus široké škály organismů proti mikrobiálnímu napadení. AMP peptidy rybích želatin jsou schopné velmi rychlé difuze a neutralizace patogenu. Jedná se o krátké sekvence kationové povahy o zhruba 50 aminokyselinách, obsahující vysoký podíl histidinových, lyzinových a argininových reziduí, která umožňují AMP vytvořit hydro-neutrální strukturu a bez problému tak projít skrze buněčnou membránu prokaryot, kterou tak naruší. Další možné mechanismy účinku jsou inhibice syntézy buněčné stěny, inhibice syntézy proteinů, inhibice syntézy nukleových kyselin nebo například stimulace autolytických enzymů, které zajistí lyzi bakteriální buňky. [3]

S antimikrobiální aktivitou je spojeno potenciálně nadějně využití rybích želatin jakožto obalového materiálu na potraviny a výživové doplňky. Doplněním rybích filmů dalšími sloučeninami (sorbát draselný, katechin, karvakrol, esenciální oleje z oregana - *Origanum vulgare*, thymín), podporujícími pevnost a trvanlivost filmu mohou prodloužit dobu použitelnosti a bezpečnosti výrobku z hlediska obrany před oxidativními účinky kyslíku, mikrobiálními vlivy či vysycháním [3]. Těchto vlastností jakožto obalového materiálu je již v současné době využíváno.

## 5 SWOT ANALÝZA ŽELATIN A HYDROLYZÁTŮ Z RYB

SWOT analýza představuje nástroj pro zhodnocení aktuální situace problematiky a navržení strategie pro úspěšné řešení. Jedná se analytický model využívaný firmami i vědeckými institucemi, který hledá silné a slabé stránky problematiky, možná úskalí, která může problematika představovat, ale i příležitosti pro další rozvoj.

### 5.1 Silné stránky (Strengths)

Mezi silné stránky hydrolyzátů z rybiho materiálu lze jednoznačně zařadit dostupnost a cenu výchozího materiálu. Jelikož kolagenní vlákna nacházíme nejvíce v kůžích a vazech okolo skeletu, považujeme tento materiál jako dále nevyužitelný pro potravinářskou výrobu. Od tohoto faktu se odvíjí nízká nákupní cena materiálu, za který by producent musel přinejmenším zaplatit asanační poplatek kafilerii za zpracování biologického odpadu. V České republice se aktuálně asanační poplatek pohybuje v hodnotě 12-13 Kč/kg [11]. Možnost prodeje vedlejších produktů by se pro majitele zpracovatelského závodu stala výdělečnějším řešením než kafilerie, a pro producenta hydrolyzátů by nákupní cena neměla být ekonomickým problémem.

Volné místo na trhu pro rybí želatiny aktuálně stále tvoří skupiny s náboženským či výživovým přesvědčením, které se vyhýbají právě tradičním zdrojům. Jelikož rybí želatina nabízí podobné nutriční hodnoty a benefity jako želatina hovězí či vepřová, a zároveň není v rozporu s vírou, je její odbyt na trhu pravděpodobný. Ačkoli by lidé mohli jako alternativu používat rostlinné agary, želatiny mají oproti agarům charakteristické senzorycké vlastnosti, které agary v aktuální době nahradit nedokážou [7].

### 5.2 Slabé stránky (Weaknesses)

Poměrně velkou překážkou pro produkci rybiích želatin je nestabilní složení výchozího materiálu. Ačkoli může být materiál odebírán se stejného zdroje, bude-li se jednat o skelety a kůže z ryb odchycených z volného lovu, bude jejich chemické složení patrně kolísat s ohledem na dostupnost potravy v mořích, čistotu a vlastnosti vody, v níž ryby žijí. U ryb z akvakultur by tento problém mohl být snížen do jisté míry kontrolovanou stravou a kvalitou vody, avšak odchylky s ohledem na prakticky neexistující možnost plně kontrolovat stav vody, v níž ryby žijí, musí být brán v potaz. Pokud by se navíc výrobce rybiích želatin nezaměřoval na výrobu z jednoho druhu ryb, pak by se vlastnosti a složení želatin lišilo i v rámci podílu jednotlivých druhů.

Další překážkou je nutnost velmi šetrných podmínek pro extrakci. Jak lze vyčíst i z praktické části této bakalářské práce, příliš drsné podmínky extrakce mají negativní vliv na pevnost gelů, které při nešetrné extrakci netuhnou. Ačkoli by tedy extrakce za vyšších teplot nebo za vyšších dávek enzymů poskytovaly vyšší výtěžky, bylo by to na úkol kvality želatiny.

### **5.3 Příležitosti (Opportunities)**

Výzkum rybích hydrolyzátů sám o sobě nabízí pro vědecká střediska spektrum příležitostí. Díky druhové variabilitě lokálních druhů ryb v různých částech světa je možné pro jednotlivé státy hledat vlastní zdroje bez nutnosti dovozu materiálu ze zahraničí. Otevřená možnost cirkulární ekonomiky tak ze socioekonomického hlediska nabízí nové pracovní pozice, vybudování nových tržních konexí, a v neposlední řadě zohledňuje využití vedlejších, jinak prakticky odpadních materiálů.

Argument nedostatku informací a charakterizace želatin tvoří další příležitost. Jelikož se i dnes jedná o málo prozkoumané téma, pro vědecké instituce mohou rybí želatiny tvořit příležitost pro další bádání s vidinou slibné budoucí aplikace výsledků.

### **5.4 Úskalí (Threats)**

Jednoznačným úskalím rybích želatin je v současné době nedostatek informací. Jelikož je využívání rybích želatin méně atraktivním odvětvím, dostává se jí pozornosti výzkumných institucí velmi málo. Zájem o rybí hydrolyzáty stoupl převážně v posledních 15 letech. To ústí k málo informacím o jejich vlastnostech, možnostech využití či úskalích. Aktuálně dostupné zdroje podávají v zásadě téměř identické informace, což ačkoli je v aktuální době úskalím s ohledem na používání rybích želatin, je to zároveň širokou škálou příležitostí pro další výzkum.

Dalším kamenem úrazu by pro rybí želatiny mohla být alergie spotřebitelů na ryby mořské plody. V aktuální době je alergie na ryby 3. nejčastější potravinovou alergií v Evropě [12], přičemž tato alergie nejčastěji vzniká opakovanou senzibilizací v dětství a ve většině případů je doživotní. Vyšší procenta alergie na ryby se objevují v přímořských oblastech, kde ryby zatupují větší část jídelníčku. V rámci Evropy je nejvyšší procento alergiků na ryby ve Finsku, kde 7 % alergiků v populaci zároveň dosahuje i na největší

procento alergiků na světě, v Německu o něco nižších 2,9 %, v Řecku pouze 1,5 % a ve Španělsku je to dokonce jen 0,5 % populace. Celoevropský průměr ukazuje, že 0,2 % evropské populace je alergická na ryby. Druhou nejvíce alergickou národností jsou pak Japonci, kde jsou 4,4 % populace alergická [12]. Vysoká procenta alergiků v populaci znamenají i vyšší riziko pro uplatnění rybích hydrolyzátů v dané oblasti, neboť spotřebitelé budou častěji sahat po produktech obsahující jiné zdroje želatin. Některé studie uvádí, že riziko alergie na želatinu z ryb je mnohem nižší než riziko alergie na ryby samotné [3]. Pro stanovení bezpečnosti by používané želatiny musely být pravidelně prověřovány analytickými metodami.



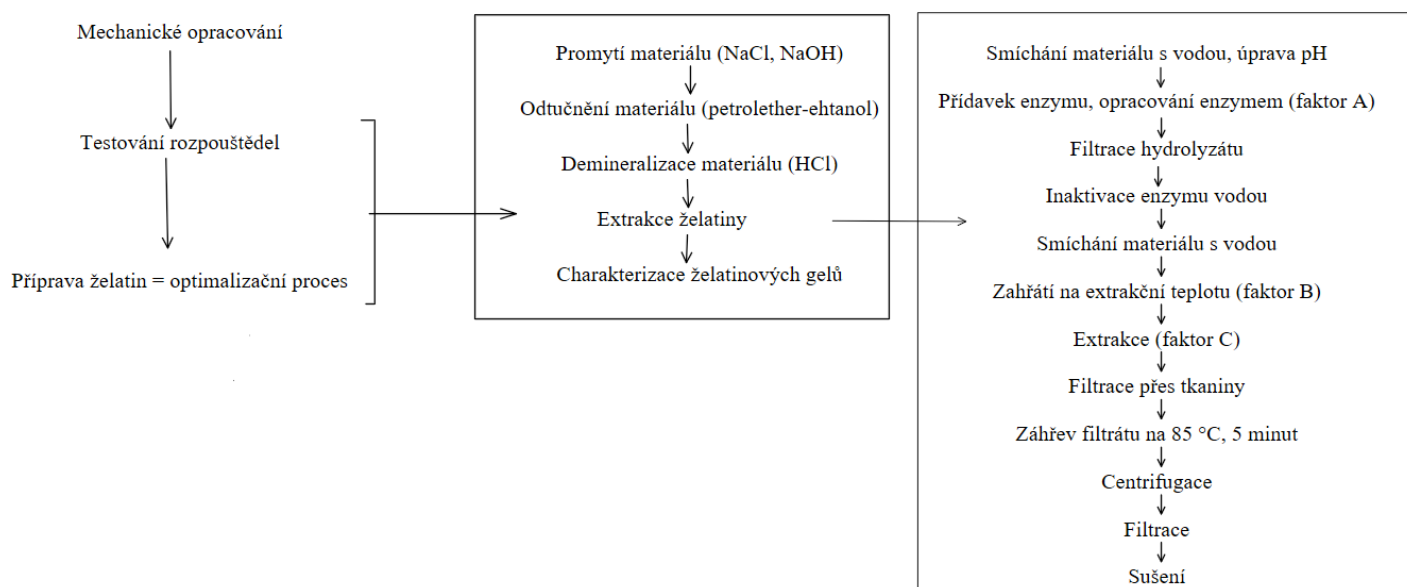
## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 6 CÍLE PRAKTICKÉ ČÁSTI PRÁCE

V experimentální části bakalářské práce byla práce zaměřena na optimalizaci procesu extrakce kolagenu z rybího materiálu a následného testování kvality želatin, připravených z extrahovaného kolagenu. Optimalizace probíhala ve dvou částech – testování efektivity rozpouštědel a optimalizace samotného extrakčního procesu. Průběžně byly u získaných želatin testovány jejich funkční vlastnosti v rámci charakterizace želatin, a to za účelem další optimalizace. Vstupním materiálem byly opracované kostry Kapra obecného (*Cyprinus carpio*) a Amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*).

Na kostrách *Cyprinus carpio* byla otestována efektivita rozpouštědel a jejich vliv na výtěžnost želatin z frakcí při daných podmínkách. Na základě míry odtučnění a výtěžnosti byly ve vybraném nejefektivněji odtučňujícím rozpouštědle obdobně opracovány kostry *Ctenopharyngodon idella*, na nichž probíhala optimalizace vícestupňového extrakčního procesu. Charakterizace želatin probíhala průběžně na vybraných frakcích vytěžených ve všech fázích procesu. Průběžná charakterizace sloužila jako kontrolní mediátor, který stanovoval další úpravy procesu extrakce.

Hlavním cílem bylo nalezení takových podmínek extrakčního procesu, při kterých získaná želatina měla funkční použitelnou pevnost gelu a optimální teplotu tání a tuhnutí želatinového gelu, aby byla želatina uplatnitelná v průmyslových odvětvích.



Obrázek 5; Schéma technologického postupu práce

## 7 PŘÍPRAVA ŽELATIN

V následující kapitole je podrobně popsán postup práce, dle kterého z rybích skeletů získány želatiny pro přípravu gelů.

### 7.1 Mechanické opracování materiálu

Materiál byl v obou případech ryb získán v podobě opracované rybí kostry (viz obrázek 4A). Z koster byly nůžkami odstraněny hřbetní, řitní, ocasní a tukové ploutve a velké tukové vrstvy včetně zbylé kůže a šupin ryby. Tyto odpadní materiály nebyly nijak dále v procesu extrakce využity.



A



B



C

Obrázek 6; A - *Cyprinus carpio* před prvotním opracováním; B – mechanicky odstraněné části; C - *Cyprinus carpio* po odstranění ploutví

Takto opracované kostry byly zhomogenizovány na mlýnku s šajbou o velikosti 15 mm.



Obrázek 7; Vnitřní část mlýnku použitá k homogenizaci rybího materiálu.

Se zhomogenizovanými směsmi se postoupilo k testování vhodného rozpouštědla k odstranění přebytečného tuku.



A



B

Obrázek 8; Zhomogenizovaná směs z koster o velikost 15 mm; A – *Cyprinus carpio*, B – *Ctenopharyngodon idella*.

## 7.2 Testování efektivity rozpouštědel

V první etapě práce byla otestována 3 rozpouštědla, jež byla použita na odstranění přebytečného, v tomto případě odpadního, tuku z koster. Testována byla následující polární rozpouštědla:

- směs petrolether-ethanol v poměru 1:1,
- aceton,
- směs 2-propanol-hexan v poměru 1:1.

Rozpouštědla byla všechna otestována na zhomogenizované kosterní směsi *Cyprinus carpio*, na níž byla následně provedena i extrakce za účelem zjištění výtěžnosti reakce.

Kostry byly nejprve zbaveny přebytečných krevních bílkovin. Směs byla na sítu promyta studenou vodou, čímž byly odstraněny albuminy. Následně byl materiál v kýblu smíchán v poměru 1:6 s roztokem NaCl o koncentraci 0,2 mol/l. Takto smíchaná směs byla v roztoku ponechána 1,5 hodiny, a poté důkladně znovu promyta na sítu. Následně byla kosterní směs smíchána v poměru 1:6 s roztokem NaOH o koncentraci 0,03 mol/l; v tomto roztoku byla směs ponechána 45 minut, než byla promyta. Směs byla roztoku NaOH o stejné koncentraci vystavena ještě třikrát. Surovina zbavená krevních bílkovin byla důkladně promyta na sítu s tkaninou a vysušena v sušárně s cirkulací vzduchu při 35 °C do kompletního vysušení.

Vysušená kosterní surovina byla smíchána v poměru 1:6 s daným rozpouštědlem a odtučňována na třepačce za laboratorní teploty 1,5 dne. Samotné rozpouštědlo bylo v tomto časovém intervalu dvakrát vyměněno, aby se dosáhlo co nejlepšího výsledku. Hmotnostní úbytek byl roven přibližně 20 % (w/w). Tuk z rozpouštěla se pro další využití nijak neizoloval.

Odtučněná surovina byla rozemleta na menší částice na kuchyňském mixéru a demineralizována v 1% (w/w) roztoku HCl. Surovina byla smíchána v poměru 1:10 s 1% roztokem HCl a demineralizována na třepačce za laboratorní teploty po dobu 48 hodin, přičemž po 24 hodinách byla kyselina vyměněna za novou. Hmotnostní úbytek po demineralizaci se pohyboval okolo 50 % (w/w). Demineralizovaná a vysušená surovina byla nadále podrobena vícestupňovému extrakčnímu procesu. Sledován byl vliv rozpouštědel na množství extrahovaného kolagenu, proto byly podmínky extrakce pro suroviny odtučněné různými rozpouštědly stejné.

Materiál byl nejprve smíchán s destilovanou vodou v poměru 1:10, promíchán a jeho pH bylo upraveno na optimální teplotu pH hydrolytické směsi enzymů Protamex (pH 6,5-7). Do této směsi byl přidán enzym Protamex na množství 0,1 % (w/w), přičemž sušina tvořila 90 % (sušina byla v tomto bodě práce stanovena odhadem). V tomto bodě měl být materiál hydrolyzován po dobu 4 hodin, nicméně došlo k hrubé chybě a materiál byl v případě všech rozpouštědel ponechán v roztoku po dobu 24 hodin. Po uplynutí 24 hodin byl materiál přefiltrován přes sítu s tkaninami a roztok (hydrolyzát) byl vysušen při 70 °C.

Materiál byl promyt pod tekoucí vodou, a poté byla zahájena vícestupňová extrakce. Materiál byl smíchán s vodou v poměru 1:10 a zahříván na požadovanou extrakční teplotu.

Po dosažení extrakční teploty byla extrakce prováděna po určenou dobu pro danou frakci. Po uplynutí této doby byl materiál přefiltrován přes síto s tkaninami, a získaný roztok byl rychle zahřát na teplotu 85 °C, a při této byl udržován 10 minut. Po uplynutí 10 minut byl roztok želatiny odstředěn na centrifuze při 4000 ot/min po dobu 4 minut. Odstředěný roztok byl přefiltrován přes tkaninu, kde se zachytil přebytečný tuk. Odstředěný roztok želatiny byl rozlit na plech a vysušen při 40 °C přes noc, přičemž se další den teplota zvedla na 65 °C do úplného vysušení. Po odstředění ve zkumavkách zůstal pouze pigment. Ten byl vysušen při 60 °C přes noc.

Stejným postupem byly provedeny všechny 4 frakce želatiny, přičemž se lišily pouze extrakční teploty a doby extrakce pro každou frakci (viz Tabulka 3).

Tabulka 3; Teploty a doby frakcí vícestupňové extrakce

	<b>Teplota extrakce [°C]</b>	<b>Doba extrakce [min]</b>
<b>1. frakce</b>	40	5
<b>2. frakce</b>	50	20
<b>3. frakce</b>	70	20
<b>4. frakce</b>	90	20

Po provedení 4. frakce extrakce byl materiál ještě jednou smíchán s vodou a zahřát na teplotu 95 °C, kdy extrakce trvala 30 minut. V této části se extrahoval z materiálu kliš. Tento roztok již nebyl odstředován, pouze přefiltrován a také vysušen, stejně jako frakce želatin.

Nerozložený podíl z materiálu byl vysušen při 103 °C přes noc.

### 7.2.1 Výsledky testování efektivity rozpouštědel

Tabulka 4; Hmotová bilance experimentu

	Výtěžek [%]		
	Petrolether-ethanol	Aceton	2-propanol-hexan
<b>1. frakce</b>	6	19	4,86
<b>2. frakce</b>	31	20	13,47
<b>3. frakce</b>	4	4,07	4,03
<b>4. frakce</b>	1,4	2,10	1,94
<b>Pigment z 1. frakce</b>	0,33	0,99	0,14
<b>Pigment ze 2. frakce</b>	1,67	1,36	0,42
<b>Pigment ze 3. frakce</b>	0,11	0,62	0,42
<b>Pigment ze 4. frakce</b>	0,11	0,25	0,12
<b>Hydrolyzát</b>	11,77	14,20	28,88
<b>Klih</b>	1,22	1,11	1,11
<b>Zbytkový tuk</b>	0,01	0,12	0,11
<b>Nerозložený podíl</b>	39,64	29,01	37,5



Obrázek 9; Tuk ulpěný na pigmentu po odstředění

### 7.2.2 Diskuse výsledků

Jak je názorně vidět v tabulce 4, nejvyšší výtěžek želatin (45,17 %) byl z materiálu odtučněného v acetonu. Velmi podobný, o něco nižší výtěžek 42,2 % byl z materiálu odtučňovaného směsí petrolether-ethanol. Nicméně aceton se ukázal být velmi špatným rozpouštědlem pro odstranění tuku. Ačkoli v hmotnostní bilanci tvoří zbytkový tuk jen 0,12 %, tento zbytek je tvořen tukem, který byl zachycen na tkanině při filtraci po odstředění. Viditelné množství tuku ulpělo na pigmentu ve zkumavce (viz obrázek 11), a jeho hmotnost tedy byla započítána do hmotnosti pigmentu, nikoli tuku.

Výtěžek želatiny z materiálu opracovaného směsí 2-propanol-hexan byl v porovnání se zbylými výtěžky velmi malý, pouze 24,3 %, proto byl z výběru vyřazen, ačkoli materiál byl odtučněn bez zbytků tuku.

Pro přesné stanovení vhodného rozpouštědla by musely být zahrnuty ještě výsledky charakterizace želatinových gelů, nicméně žádný z připravených želatinových gelů neztuhl, a proto nemohly být tyto charakteristiky zahrnuty. Kritéria výběru rozpouštědla pro další postup proto tvořil pouze výtěžek a stupeň odtučnění materiálu.

Pro další postup, tj. optimalizaci procesu extrakce, byla jako odtučňovací činidlo vybrána směs petrolether-ethanol.

## 7.3 Optimalizace extrakčního procesu

Jak již bylo zmíněno v úvodu, optimalizace extrakčního procesu byla prováděna na opracovaných kostrách *Ctenopharyngodon idella*. Postup opracování probíhal obdobně jak v první fázi práce – rozemleté kostry byly promyty vodou na sítu s cílem odplavení krevních proteinů. Následné louhování – opracování roztokem NaCl o koncentraci 0,2 mol/l po dobu 1,5 hodiny a roztokem NaOH o koncentraci 0,03 mol/l po dobu 45 minut za účelem odplavení globulinů a albuminů proběhlo zcela totožně. Za stejných podmínek, tedy za stejného poměru rozpouštědla ku surovině, teplotě, době odtučnění, proběhlo i odtučnění materiálu. Jako rozpouštědlo organického živočišného tuku byla použita směs 1:1 petrolether-ethanol zvolená testováním v první fázi. Odtučnění probíhalo za stejných podmínek, tj. vysušený materiál byl smíchán v poměru 1:6 s rozpouštědlem. Směs byla odtučňována na třepače za laboratorní teploty po dobu 1,5 dne, přičemž rozpouštědlo bylo



dvakrát vyměněno za nové. Po uplynulí doby byl materiál ponechán v digestoři za účelem odpaření zbytků rozpouštědla.

Prvním rozdílem v postupu byla změna teploty během procesu demineralizace. Vysušený odtučněný materiál byl smíchán s 1% HCl v poměru 1:10 a demineralizován po dobu 48 hodin v chladícím boxu na automatické třepače při teplotě 10 °C, přičemž po 4 hodinách byl materiál ručně promíchán. Po 24 hodinách byla kyselina vyměněna za novou a opět byl po 4 hodinách materiál ručně promíchán. Nižší teplota zpomaluje proces demineralizace, jelikož kyselina není při takových podmínkách schopna dobře rozpouštět minerální látky z kosterní matrice. Po demineralizaci byl materiál vysušen v sušárně. V následujícím kroku bylo přistoupeno k samotnému extrakčnímu procesu.

### **7.3.1 Pilotní experimenty optimalizace**

V dalším postupu byly 1. frakce experimentů prováděny za podmínek daných předepsaným rozpisem experimentů (viz tabulka 5). Podmínky byly v procesu optimalizace průběžně upravovány na základě výsledků charakterizace získaných želatin. Zbylé 3 frakce probíhaly pro všechny experimenty za stejných podmínek:

- 2. frakce: extrakční teplota 60 °C, doba extrakce 30 minut;
- 3. frakce: extrakční teplota 80 °C, doba extrakce 40 minut;
- 3. frakce: extrakční teplota 95 °C, doba extrakce 60 minut.

Tabulka 5; Předepsané experimenty; hodnoty proměnných faktorů A, B a C

<b>Číslo experimentu</b>	<b>Faktor A, Množství enzymu (%)</b>	<b>Faktor B, Teplota 1. extrakce (°C)</b>	<b>Faktor C, Doba 1. extrakce (min)</b>
1	0,05	40	20
2	0,05	40	40
3	0,05	50	20
4	0,05	50	40
5	0,15	40	20
6	0,15	40	40
7	0,15	50	20
8	0,15	50	40
9	0,10	45	30
10	0	45	30

Vlastní postup experimentu je popsán na experimentu č. 1:

Vstupní násada 60 gramů materiálu byla smíchána v poměru 1:10 s destilovanou vodou a 20 minut třepána při pokojové teplotě. Po uplynutí stanovené doby bylo pH suspenze upraveno na hodnotu 6,5-7 pomocí 20% NaOH, a k materiálu bylo přidáno množství hydrolytického enzymu Protamex dle faktoru A, vztažené na hmotnost sušiny. Hmotnost sušiny byla odhadem stanovena na 90 %. Směs byla při teplotě 10 °C třepána 4 hodiny. Během této doby působil na intramolekulární vazby kolagenu. Po uplynutí doby působení enzymu byl roztok filtrace oddělen, a vysušen při 70 °C. Zachycený zbytek byl studenou vodou promýván po dobu 5 minut, čímž se částečně vymyl a inaktivoval zbytek enzymu. Promytý materiál byl smíchán s destilovanou vodou v poměru 1:10 a zahříván na plotně na teplotu 40 °C. Po dosažení teploty byla želatina extrahována po dobu 20 minut. Po provedení extrakce byla suspenze přefiltrována a filtrát byl neprodleně zahřát na 85 °C, při které byl držen po dobu 4 minut. Takto přehřátý filtrát byl rozdělen do zkumavek a zcentrifugován při 4000 ot/min po dobu 4 minut. Ve zkumavce se oddělil pigment, který ulpěl na dně zkumavky a tuk, který se od roztoku želatiny oddělil filtrace přes sedmkrát přehnutou tkaninu. Přefiltrovaná želatina byla vysušena při 45 °C přes noc, a poté ještě při 60 °C do úplného vysušení. Oddělené komponenty byly taktéž vysušeny; pigment byl

vysušen při 40 °C přes noc, tuk byl vysušen při 120 °C přes noc. Zbylé 3 frakce želatiny byly provedeny identickým postupem, teploty a časy extrakcí byly pro všechny experimenty stejné, a to dané hodnotami výše v této sekci (7.3.1). Opětovný záhřev filtrátu na 85 °C byl proveden vždy pouze u 1. a 2. frakce. Po provedení extrakce poslední frakce byl nerozložený podíl vysušen při 121 °C přes noc.

Jako první byly dle tohoto postupu provedeny experimenty č. 1 a č. 8. Z vyextrahovaných želatin byly připraveny gely (viz kapitola 8 – Stanovení funkčních vlastností želatin) a otestovány jejich funkční vlastnosti.

### 7.3.1.1 Výsledky a diskuse pilotních experimentů (experimenty č. 1 a č. 8)

Tabulka 6; Výtěžky z frakcí, experiment č. 1 a 8

Experiment	1. frakce [%]	2. frakce [%]	3. frakce [%]	4. frakce [%]
<b>1</b>	4,81	17,22	4,81	2,96
<b>8</b>	22,96	12,04	3,15	1,3

Tabulka 7; Pevnost želatinového gelu z 1. a 2. frakce; experiment č. 1 a 8

Experiment	Frakce	Pevnost gelu [Bloom]
<b>1</b>	1.	Neztuhl
	2.	10,1
<b>8</b>	1.	Neztuhl
	2.	Neztuhl

Prvním faktorem vypovídajícím o působení enzymu na kolagenní struktury byla vlastní výtěžnost želatiny z jednotlivých frakcí. Procentuální výtěžky byly vztaženy na hmotnost sušiny demineralizovaného materiálu, která byla odhadem stanovena na 90 % celkové vstupní hmotnosti.

Z experimentu č. 1 byl celkový výtěžek želatiny ze všech 4 frakcí 29,81 %. Oproti tomu celkový výtěžek z experimentu č. 8 činil 39,44 %. Tento výrazný rozdíl nasvědčuje tomu, že minimální a maximální hodnoty všech 3 proměnných faktorů extrakce mají na celkovou výtěžnost značný vliv. Právě v experimentu č. 1, ve kterém jsou proměnné faktory rovny hodnotám: A – 0,05 %, B – 40 °C a C – 20 min, je vidět, že množství želatiny je nižší, a tedy podmínky nenarušily strukturu tolik, jako podmínky experimentu č. 8, kde byly

hodnoty: A – 0,15 %, B – 50 °C, C – 40 min. Pro vyšší výtěžnost se tedy zdály vyšší hodnoty vhodnější.

Rozhodujícími faktory pro další práci nebyly hodnoty výtěžků, ale funkční vlastnosti želatin. Testovány byly vždy gely připravené z želatiny vytěžené z 1. a 2. frakce. Kontrolním faktorem, stanovujícím úpravu podmínek, byla pevnost želatinového gelu.

Jak je vidět v tabulce 7, želatina z 1. frakce experimentu č. 1 nevykazovala přílišné známky tuhnutí. Gel se jevil spíše jako vysoce viskózní kapalina. Oproti tomu gel z 2. frakce jevil aspoň nějaké známky tuhnutí. Pevnost gelu byla stanovena dle metody C a dosahovala hodnoty 10,1 Bloom. Gel byl i přesto nestabilní a vykazoval známky tečení. Pro aplikaci v potravinářském průmyslu by proto byl nevhodný.

Gely připravené z frakcí experimentu č. 8 nebyly testovány nijak, neboť gely připravené z 1. ani z 2. frakce neztuhly. Oba nevykazovaly známky jakéhokoli znovuvytvoření struktur, tedy nativní struktura kolagenu musela být enzymem narušena až příliš.

Z celkového zhodnocení vstupních experimentů bylo možno usoudit, že podmínky původních 10 plánovaných experimentů (viz tabulka 5) jsou pro získání aplikovatelné želatiny nevhodné, neboť jsou pro nativní strukturu příliš invazivní. Struktura kolagenu byla narušena i při nejnižších hodnotách faktorů A, B a C, a proto byla dalším krokem úprava celkového plánu.

Jelikož množství enzymu bylo již tak velmi nízké, stejně jako extrakční teploty, bylo přistoupeno ke zkrácení doby působení enzymu ještě před zahájením samotné extrakce. Z původních 4 hodin byla doba působení zkrácena na pouhou hodinu, přičemž enzym i nadále působil při teplotě 10 °C na třepačce. Dle očekávání měl enzym narušit strukturu mnohem méně, a tedy zajistit vyšší pevnost želatinového gelu.

### **7.3.2 Optimalizační experimenty – 1. úprava**

S úpravou podmínek procesu byly znovu provedeny 2 experimenty – dle původního plánu byl s úpravou doby působení enzymu zopakován experiment č. 1 – teď označený jako experiment č. 1.1, a nulový experiment, tedy experiment č. 10.1. Ke zvolení nulového

experimentu namísto experimentu č. 8.1 bylo přistoupeno po zhodnocení faktu, že vysoké hodnoty proměnných faktorů A, B a C nejsou pro získání kvalitní želatiny z rybího materiálu vhodné. Z toho důvodu byl zvolen nulový experiment bez přídavku enzymu, aby došlo k zjištění vlastností želatinového gelu bez narušení hydrolytických vazeb invazivním způsobem.

Postup extrakčního procesu byl identický s postupem pilotních experimentů, s výjimkou zmíněného krácení působení dobrého enzymu. U experimentu č. 10 byl materiál hodinu třepán při teplotě 10 °C, aby byly zajištěny totožné podmínky. Hodnoty proměnných faktorů A, B a C zůstaly stejné, jako u původních experimentů.

### 7.3.2.1 Výsledky a diskuse optimalizačních experimentů (experimenty č. 1.1 a č. 10.1)

Tabulka 8; Výtěžky z frakcí, experiment č. 1.1 a experiment 10.1

Experiment	1. frakce [%]	2. frakce [%]	3. frakce [%]	4. frakce [%]
1.1	10,19	7,78	4,63	4,26
10.1	4,26	4,26	6,48	6,67

Tabulka 9; Pevnost želatinového gelu z 1. a 2. frakce; experiment č. 1.1 a experiment 10.1

Experiment	Frakce	Pevnost gelu [Bloom]
1.1	1.	Neztuhl
	2.	80
10.1	1.	496
	2.	522

S úpravou podmínek procesu se očekávalo, že výtěžky z jednotlivých frakcí u experimentu č. 1.1 klesnou oproti původnímu experimentu 1; a výtěžky z experimentu č. 10.1 budou ještě nižší z důvodu absence enzymu. Tento předpoklad byl potvrzen, jelikož celkový výtěžek želatin ze všech 4 frakcí pro experiment č. 1.1 činil 26,85 %, což činí výtěžek o 2,96 % nižší, výtěžek z experimentu č. 10.1 pak 21,67 %. V porovnání s experimentem 1.1 výtěžek nižší o 5,19 %.

Výraznější změna byla pozorována v přemístění největšího výtěžku. V experimentu č. 1 bylo nejvíce želatiny získáno z 2. frakce. Optimalizační experiment č. 1.1 naopak vykazoval nejvyšší zisk ve frakci 1, s každou další frakcí se výtěžek úměrně snižoval. U experimentu č. 10.1 tento postup pozorován nebyl, naopak 1. a 2. frakce vykazovaly totožný výtěžek, frakce 3. a 4. dosahovaly podobných výsledků, vyšších než u předchozích frakcí. Po přezkoumání výtěžků z jednotlivých frakcí byl stanoven závěr, že doba působení enzymu nemá vliv na množství uvolněné želatiny v jednotlivých frakcích.

Úprava podmínek měla největší vliv na funkční vlastnosti želatin. Stejně jako u experimentu č. 1, ani u experimentu č. 1.1 gel připravený z želatiny z 1. frakce neztuhl, čímž zanikla možnost stanovit pevnost gelu. 2. frakce tohoto experimentu na druhou starnu vykazovala podmínky znatelně přijatelnější – u želatinového gelu byla naměřena pevnost 80 Bloom. Takto pevný gel je již možno aplikovat v potravinářském průmyslu.

U nulového experimentu 10.1 bylo tuhnutí gelu zpozorováno již v gelu z 1. frakce. Želatinové gely z obou testovaných frakcí vykazovaly známky tuhnutí. Gel z 1. frakce disponoval pevností 496 Bloom. Tato pevnost je pro potravinářské aplikace již nevhodná, jelikož se s takto pevnými gely se již špatně manipuluje. Gel připravený z frakce 2. vykazoval pevnost ještě o něco vyšší, konkrétně pevnost 522 Bloom. Gely vykazovaly pevnost tak vysokou, že by bylo pro další postupy třeba pracovat s méně koncentrovaným gelem. U těchto gelů byla zpozorována přítomnost nerozpustitelných částic želatinového charakteru (viz Kapitola 8 – Stanovení funkčních vlastností želatin).



Obrázek 10; Nerozpustitelné částice v gelu ze 2. frakce, exp. 10.1

S ohledem na pozitivní výsledky po úpravě extrakčních podmínek bylo přistoupeno k další úpravě, a to k úpravě času extrakce jednotlivých frakcí. Doposud byla doba extrakce první frakce dána původním rozpisem faktoru C (viz tabulka 5); pro zbylé frakce nezměněno, tedy dle rozpisu popsaného v sekci 7.3.1. Pro další postup byly časy všech frakcí pro každý experiment sjednoceny na 20 minut. S touto úpravou bylo očekáváno menší narušení nativní struktury kolagenu v důsledků dlouhé expozice vysoké teplotě.

### 7.3.3 Optimalizační experimenty – 2. úprava

Díky sjednocení extrakční doby na 20 minut pro všechny frakce všech experimentů došlo k vyřazení proměnného faktoru C, čímž zároveň došlo k vyřazení několika experimentů z původního rozpisu (viz tabulka 5). Z toho důvodu byl vytvořen plán nový, operující pouze se dvěma faktory, popsaný tabulkou 10.

Tabulka 10; Rozpis experimentů po 2. úpravě extrakčních podmínek

Číslo experimentu	Faktor A	Faktor B
	Množství enzymu (%)	Teplota extrakce (°C)
1.2	0,05	40
2.2	0,05	50
3.2	0,15	40
4.2	0,15	50
5.2	0,10	45

#### 7.3.3.1 Výsledky a diskuse optimalizačních experimentů (experimenty č. 1.2 a 2.2)

Tabulka 11; Výtěžky z frakcí, experiment 1.2 a 2.2

Experiment	1. frakce [%]	2. frakce [%]	3. frakce [%]	4. frakce [%]
1.2	4,26	9,44	5	3,33
2.2	11,48	5,19	2,41	1,85

Tabulka 12; Pevnost želatinového gelu z 1. a 2. frakce; experiment č. 1.2 a experiment 2.2

<b>Experiment</b>		<b>Pevnost gelu [Bloom]</b>
<b>1.2</b>	1. frakce	Neztuhl
	2. frakce	191,5
<b>2.2</b>	1. frakce	Neztuhl
	2. frakce	78,6

S ohledem na velmi nízkou pevnost gelu z druhé frakce exp. č. 2.2, nebyl proveden zbytek experimentů z rozpisu. Pevnost gelu 78,6 Bloom je pro komerční využití želatiny jako gelu malá, a tedy neuplatnitelná. Z předchozího pozorování bylo usouzeno, že vyšší podmínky proměnných faktorů by nebyly přínosem.

Pevnost gelu ze druhé frakce exp. č. 1.2 nicméně vykazuje pevnost 191,5 Bloom, což je již pevnost použitelná například pro zlepšení pěnotvorných vlastností či stabilizaci pěny.



## 8 STANOVENÍ FUNKČNÍCH VLASTNOSTÍ ŽELATIN

Funkční vlastnosti (pevnost gelu, viskozita, teplota tání a teplota tuhnutí) klíčové pro komerční uplatnění želatiny byly stanoveny předepsanými metodami. Všechny 4 měřené vlastnosti byly pro jeden vzorek stanoveny vždy zároveň v průběhu jednoho dne, aby se předešlo odchylce v případě stanovení dvou různě koncentrovaných gelů. Všechny testované gely byly připravovány následujícím postupem:

Pro stanovení byl připraven gel z 1. a 2. frakce z každého experimentu o koncentraci 6,67 %. Želatina i voda byly naváženy, smíchány v nádobce o předepsaných rozměrech a ponechány po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě, aby želatina nabobtnala. Poté byla směs na vodní lázni o teplotě 45 °C zahřívána po dobu nezbytně nutnou k vytvoření gelu. Vytvořený gel byl chvíli ponechán při laboratorní teplotě, poté přesunut do lednice, kde byl při teplotě 10 °C přes noc ponechán k ztuhnutí.

### 8.1 Metody využívané k charakterizaci funkčních vlastností želatin

#### 8.1.1 Pevnost gelu

Pevnost gelu byla stanovena na zařízení Stevens-LFRA Texture Analyser. Vzorek gelu v předem dané nádobě byl po vytažení z lednice ihned přesunut na zařízení, kde byla změřena pevnost gelu ve středu plochy povrchu gelu, poté kontrolní měření v jiném bodě. Metoda stanovení pevnosti gelu byla volena dle dostupného množství daného vzorku želatiny dle následující tabulky:

Tabulka 13; Metody stanovování pevnosti gelu

Metoda	Navážka želatiny [g]	Navážka vody [g]	Rozměr nádoby			
			Vnější průměr [mm]	Vnitřní průměr [mm]	Výška [mm]	Faktor přepočtu
A	7,5	104,5	66	59	85	/
B	3	42	50	44	50	1,2627
C	1,5	21	40	35	50	1,6272
D	0,9	13	32	29	40	2,5300

Byla-li pevnost stanovována metodou jinou, než A, byl z výsledné hodnotě použit následující přepočítávací vzorec:

$$\text{pevnost gelu [Bloom]} = x_1 \times f_p,$$

kde:

$x_1$  ..... hodnota stanovená přístrojem Stevens-LFRA Texture Analyser [Bloom],

$f_p$  ..... přepočítávací faktor zvolený dle použité metody.

### 8.1.2 Viskozita

Viskozita želatinového gelu probíhá na Ubbelohdeho viskozimetru za standardních podmínek, kdy je želatinový gel rozehrán do kapalné fáze. Stanovení probíhalo při teplotě 60 °C ve standardizované kapiláře, kdy se měřila doba, za níž kapalný gel proteče vyznačenou oblastí.



Obrázek 11; Aparatura pro stanovení viskozity

Naměřená doba průtoku byla pro získání kinematické viskozity dosazena do vzorce:

$$v \left[ \frac{\text{mm}^2}{\text{s}} \right] = K \times t - \frac{B}{t},$$

kde:

$v$  ... kinematická viskozita [ $\text{mm}^2/\text{s}$ ],

$K$  ... konstanta viskozimetru zjištěná ověřenou kalibrační kapalinou (0,5),

$t$  ... aritmetický průměr změřených průtokových dob [s],

B ... konstanta ke korekci na kinetickou energii určená z rozměrů viskozimetru (2,8).

Dynamická viskozita byla z kinematické viskozity vypočítána dle následujícího vzorce:

$$\eta [mPa \times s] = \nu \times \rho ,$$

kde:

$\eta$  ..... dynamická viskozita [mPa×s],

$\nu$  ..... kinematická viskozita,

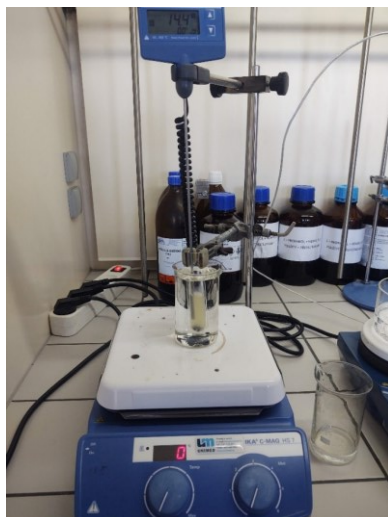
$\rho$  ..... hustota želatinového roztoku (1,005 g/cm<sup>3</sup>).

### **8.1.3 Teplota tání gelu**

Teplota tání byla stanovována v kapilárách. Před rozehrátím gelu pro stanovení viskozity byl gel odebrán do 3 kapilár a umístěn do lednice k řádnému opětovnému ztuhnutí. Po vytažení z lednice byla kapilára umístěna do aparatury, konkrétně do kádinky se studenou vodou společně s teplotním čidlem. Topná deska byla zapnuta na maximální výkon a sledovala se teplota, při níž se gel v kapiláře pohne směrem nahoru. Tato teplota byla stanovena jako teplota tání gelu.

### **8.1.4 Teplota tuhnutí gelu**

Teplota tuhnutí byla stanovována s rozehrátým želatinovým roztokem ihned po stanovení viskozity. Želatinový roztok byl přelit do zkumavky, která byla umístěna do držáku v kádince. Do zkumavky s želatinovým roztokem bylo zavedeno teplotní čidlo. Do kádinky, v níž byla zkumavka zanořena byla nalita vychlazená voda. Do zkumavky byly s klesající teplotou vhažovány kovové kuličky. S klesající teplotou se sledovalo, při jaké teplotě kuličky nedopadnou na dno zkumavky, nýbrž uvíznou v gelu. V tu chvíli byla odečtena teplota tuhnutí gelu.



Obrázek 12; Aparatura pro stanovení teploty tuhnutí želatinového gelu

## 9 SOUHRNNÉ VÝSLEDKY A VÝZNAM PRO PRAXI

Tabulka 14; Naměřené hodnoty pevnosti gelu, dynamické viskozity, teplot tání a teplot tuhnutí gelů vykazujících známky tuhnutí

Experiment	Frakce	Výtěžek [%, w/w]	Souhrnný výtěžek Všechny frakce [%, w/w]	Pevnost gelu [Bloom]	Dynamická viskozita [mPa×s]	Teplota tání gelu [°C]	Teplota tuhnutí gelu [°C]
1	2.	17,22	29,8	10,1	1,2	/	/
1.1	2.	7,78	26,86	80	1,49	19	14
10.1	1.	4,26	21,67	496	/	/	/
	2.	4,26		522	/	32	15
1.2	2.	9,44	22,03	191,5	1,74	28	12,2
2.2	2.	5,19	20,93	78,6	1,53	28	8

V rámci posuzování výsledků byla hodnocena mimo jiné i výtěžnost jednotlivých experimentů. Ta se pohybovala nejčastěji v rozmezí 20-30 % v souhrnu všech 4 frakcí. Ve srovnání s tabulkou 2 jsou námi získané výtěžky v průměru o polovinu nižší, vezmeme-li v potaz výtěžky z experimentů využívajících enzymatické extrakce. Separovaně pak byl srovnáván výtěžek z nulového experimentu č. 10.1, který byl srovnáván s výtěžky z experimentů využívajících k extrakci horkou vodu. Zde byl náš výtěžek vyšší o více než 10 %.

U gelů, které neztuhly, nebylo možné změřit jejich pevnost ani teplotu tání a tuhnutí. Takové gely nebyly dále zkoumány, jelikož nevyhovovaly hledaným parametrům. Prakticky se tak jednalo o veškeré gely připravené z 1. frakcí. Fakticky může jít o gely z takového kolagenu, který už v nativní formě nebyl soudržnou molekulou, a proto byl degradován již v první frakci. Zde se odráží nižší podíl prolinu a hydroxyprolinu v nativní struktuře. Výjimku tvořila 1. frakce exp. 10.1 (nulový experiment), jejíž gel vykazoval pevnost 496 Bloom. Druhé frakce oproti tomu vykazovaly v závislosti na podmínkách extrakce různé pevnosti. Pevnost gelu se zvyšovala se snížením doby působení a množství enzymu a snížením extrakční teploty. Nejvyšší pevnosti dosahoval gel ze 2. frakce exp. 10.1, kde byla naměřena pevnost 522 Bloom. Společně s gelem z 1. frakce tohoto experimentu jsou tyto gely již komerčně nevyužitelné, neboť pevnost gelů je příliš vysoká. Využitelné by nicméně

mohly být gely o nižších koncentracích. Optimální komerčně využitelnou, pevnost gelu vykazoval gel připravený ze 2. frakce exp. 1.2 a 2.2. Své využití by tyto gely našly například jako stabilizátory pěny. Srovnání s experimenty probíranými v teoretické části práce (viz. Kapitola 3) nebylo možné, jelikož použité zdroje neuváděly pevnost připravených želatinových gelů.

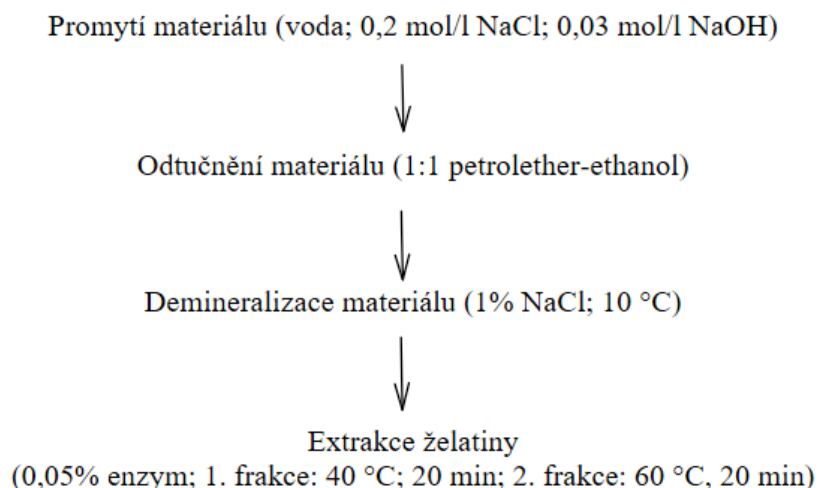
Dynamická viskozita vykazovala lehkou závilost na podmínkách. Čím šetrnější byly podmínky extrakce, tím byla dynamická viskozita vyšší, nicméně nelze brát výsledky zcela relevantně, jelikož pro posouzení nebylo získáno dostatek dat.

Teplota tání kolísala již v závislosti na době extrakce (např. rozdíl 11 °C mezi experimenty 1.1 a 1.2, kdy rozdíl v metodice byl pouze o 20 minut delší čas extrakce v případě experimentu 1.1) Teplota tání vykazovala rostoucí tendenci s umírněním podmínek extrakce. Nejlepšího výsledku dosáhl nulový experiment 10.1, kdy byla teplota tání stanovena na 32 °C, tedy pouze o 5 °C nižší, než je tělesná teplota člověka. Tento gel by byl teplotou tání vhodný pro potravinářské aplikace. Poměrně uspokojivých výsledků dosáhly i gely z exp. 1.2 a 2.2, kdy obě druhé frakce vykazovaly teplotu tání 28 °C, a tedy závilost teploty tání na teplotě extrakce zde byla vyloučena. V porovnání s literaturou (viz. tabulka 2; exp. č. 2.1 a 2.2) je námi stanovena teplota tání gelu výrazně nižší, i více než o 15 %. Důvodem tak výrazného rozdílu jsou proměnlivé hodnoty faktorů A, B a C.

Teplota tuhnutí gelu se ve většině případů nedostala pod 10 °C, s výjimkou exp. 2.2, kdy byla teplota tuhnutí stanovena na 8 °C. Příčina takového skoku nebyla objasněna a je možným námětem na další výzkum. Ve srovnání s literaturou (viz. tabulka 2) jsou námi stanovené hodnoty teplot tuhnutí a tání v korelaci, neboť i teplota tuhnutí gelu je výrazně vyšší oproti studii.

Zhodnocením funkčních vlastností gelů bylo dospěno k závěru, že k technologickému využití by byl vhodný pouze gel připravený z 2. frakce experimentu 1.2. Díky své pevnosti gel by byl uplatnitelný jako vodu vázající médium v jogurtech, ztužovač pěny či zahušťovadlo mléčných výrobků.

Jedním z cílů bakalářské práce bylo navrhnout optimální podmínky a technologický postup zpracování rybích skeletů na želatiny a hydrolyzáty. Na základě vyhodnocení 2. frakce exp. 1.2 jako nejvhodnější, byl optimální technologický postup získání želatiny navržen dle postupu jejího získání.



Obrázek 13; Schéma postupu práce pro získání želatiny o námi požadovaných vlastnostech (dle exp. 1.2)

Materiál promytý roztoky NaCl a NaOH byl následně odtučňován po dobu 1,5 dne ve směsi rozpouštědel petrolether-ethanol v poměru 1:1. Toto rozpouštědlo vykazovalo nejlepší výsledky v rámci odstranění přebytečného tuku a zároveň nemělo negativní vliv na výtěžnost experimentů. Odtučněný materiál je nadále demineralizován v roztoku kyseliny chlorovodíkové a v poslední fázi je z vyčištěného kolagenu extrahována želatina za následujících podmínek: Materiál smíchan s enzymem o koncentraci 0,05 % (w/w), enzym na materiál působil po dobu 1 hodiny při teplotě 10 °C. Extrakce první frakce probíhala při 40 °C 20 minut, frakce druhá při 60 °C také 20 minut. První frakce nevykazovala žádné známky tuhnutí a výtěžek z ní tvořil pouhých 4,26 %. Druhá frakce již měla fyzikálně-povrchové vlastnosti vhodné pro aplikaci v potravinářském průmyslu – pevnost gelu 191,5 Bloom, přičemž výtěžek z této konkrétní frakce tvořil 9,44 %.

## ZÁVĚR

Problematika ryb, jakožto alternativního zdroje hydrolyzátů, je a v následujících letech ještě bude tématem spíše vědeckých institucí než veřejnosti. Produkce rybí želatiny se však již dnes meziročně zvyšuje a nově testované metody mohou produkci ještě zvýšit. Postup extrakce želatiny, popsany v praktické části této práce, bude v budoucnu třeba dále optimalizovat. Právě optimalizace za účelem zvýšení výtěžnosti, hledání využití vedlejších produktů extrakce či snížení energetických nákladů na extrakci, může být předmětem navazujících prací, stejně tak jako podrobnější charakterizace a hledání nejvhodnější aplikace získaných želatin a hydrolyzátů. Například pigment získaný při extrakci by mohl být zužitkován v kosmetickém průmyslu či jako přírodní pigment pro nátěrové hmoty. Separovaný tuk získaný při odtučňování materiálu by mohl být po purifikaci využit jako součást doplňků stravy pro domácí mazlíčky, kdy je již v současnosti hojně rybí tuk ze sladkovodních ryb využíván.

Práce také potvrdila jednu ze slabých stránek rybího kolagenu jako zdroje želatiny – nutnost velmi šetrných podmínek extrakce za účelem zisku využitelné želatiny na úkor výtěžku. Na tuto problematiku bychom se zaměřili v další práci. Zároveň tak přispíváme k rozšíření informací o tomto alternativním zdroji. Zvýšení dostupnosti informací může zájem nejen dalších výzkumných institucí ale i veřejnosti. Práce však i potvrdila silnou stránku, a to využití jinak odpadních produktů. Pokud by se v budoucnu našlo i využití pro veškeré vedlejší produkty z výroby želatiny, procento konverze vstupního materiálu na využitelné produkty by se zvýšilo a skutečně odpadním produktem by tak mohly být pouze odplavené sérové bílkoviny a nerozložený podíl po extrakci všech frakcí. Otázka využití vedlejších produktů tímto vytváří další místo pro výzkum. Z hlediska příležitostí, které rybí želatina nabízí, práce potvrdila fakt o využitelnosti lokálních zdrojů, a tedy snížení odpadních produktů, jelikož i z lokálních druhů ryb, jako jsou Kapr obecný (*Cyprinus carpio*) a Amur bílý (*Ctenopharyngodon idella*) jsme byli schopni vytvořit želatiny o použitelných hodnotách jejich technologicky významných vlastností.

V neposlední řadě je nutné podotknout, že ani gely a hydrolyzáty získané v praktické části práce, které nevyhovovaly požadovaným parametrům, nepříjdou vniveč. Své využití najdou dle svých charakteristických vlastností. Gely, které vykazovaly příliš vysoké hodnoty pevnosti by mohly být snadno uplatnitelné v jiné koncentraci případně po další úpravě extrakčních podmínek. Vysoké pevnosti gelu, mezi 200-275 Bloom [15] jsou vyhledávány



na výrobu měkkých kapslí na léky ve farmacii. Na opačné straně škály mohou být frakce, které nevykazovaly dostatečnou pevnost, využity jako čířidlo nápojů. [15] Zcela nevyužitelné by nebyly ani frakce nevykazující žádné známky tuhnutí, které by mohly své uplatnění nalézt jako přídatný zdroj bílkovin do potravin, či po elektroforetické separaci na jednotlivé aminokyseliny jako doplňky stravy a suplementy.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ZETTERBERG, V.; HEMAR, L.; YANG, Z.; KUMOSA, L.S. et. al. A review of gelatin: Properties, sources, process, applications, and commercialisation. *Materials Today*. 2021, roč. 41, č. 2021, s. 240-250. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214785320406406>.
- [2] DERKACH, Svetlana R; KOLOTOVA, Daria S.; KUCHINA, Yuliya A. a SHUMSKAYA, Nadethda V. Characterization of Fish Gelatin Obtained from Atlantic Cod Skin Using Enzymatic Treatment. *Polymers*. 2022, roč. 14, č. 751. Dostupné také z: <https://www.mdpi.com/2073-4360/14/4/751>.
- [3] LV, Lin-Chen; HUANG, Qing-Yun; DING, Wen a XIAO, Xing-Hua. Fish gelatin:: The novel potential applications. *Journal od Functional Foods*. 2019, roč. 63, č. 103581. Dostupné také z: [https://www.researchgate.net/publication/337662674\\_Fish\\_gelatin\\_The\\_novel\\_potential\\_applications](https://www.researchgate.net/publication/337662674_Fish_gelatin_The_novel_potential_applications).
- [4] ASHER, D.M.; ARNESEN, J.A.; SILVA, Roberto S.G.; ASGHAR, A.; ASHER, D.M. et al. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*. 2009, roč. 23, č. 3, s. 563-576. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X08001446>.
- [5] DERKACH, Svetlana; VORON'KO, Nicolay G.; KUCHINA, Yuliya A. a KOLOTOVA, Daria S. Polymers Modified Fish Gelatin as an Alternative to Mammalian Gelatin in Modern Food Technologies. *Polymers*. 2020, roč. 12, č. 3051. Dostupné také z: [https://www.researchgate.net/publication/347552133\\_Polymers\\_Modified\\_Fish\\_Gelatin\\_as\\_an\\_Alternative\\_to\\_Mammalian\\_Gelatin\\_in\\_Modern\\_Food\\_Technologies](https://www.researchgate.net/publication/347552133_Polymers_Modified_Fish_Gelatin_as_an_Alternative_to_Mammalian_Gelatin_in_Modern_Food_Technologies).
- [6] SCHRIEBER, Reinhard a Herbert GAREIS. Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice. In: *Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practise*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2007, s. 51-54. ISBN 978-3-527-31548-2. Dostupné také z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9783527610969>
- [7] LI, Yonghui; PAN, Jinfeng; LIU, Fei; DAI, Hongjie; FU, Yu et al. Collagen and gelatin: Structure, properties, and applications in food industry. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024, roč. 254, Part 3, č. 128037. Dostupné také z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37963506/>.
- [8] REZAEI, M.; ABDOLLAHI, M.; T. AHMAD, A. Ismail; AHMAD, M.; ISMAIL, A. et al. Gelatin from specific freshwater and saltwater fish extracted using six different methods: Component interactions, structural characteristics, and functional properties. *LWT - Food Science and Technology*. 2024, roč. 191, č. 115656. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643823012355>.
- [9] BADWAY, Hala M.R.; ADB EL-MONIEM, Somia M.; SOLIMAN, A. M. a RABIE, M. A. Physicochemical properties of gelatin extracted from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Nile perch (*Lates niloticus*) fish skins. *Food, Dairy and Home Economic Research*. 2019, roč. 46, č. 5, s. 1529-1537. ISSN 1110-0338. Dostupné z: <https://doi.org/doi:10.21608/zjar.2019.48170>.

- [10] FRANK, Miroslav. *Surimi*. Online. MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ. Bezpečnost potravin. Dostupné z: <https://bezpecnostpotravin.cz/termin/surimi/>. [cit. 2024-03-21].
- [11] *Ceník za svoz a likvidaci VPŽP*. Online. VAPO, SPOL. S R.O. Vapo-podborany.cz. 2023. Dostupné z: <http://www.vapo-podborany.cz/Cenik-sluzeb.html>. [cit. 2024-04-05].
- [12] SUN, Yaobin; LUO, Yeqing; CHEN, Jiao; LIU, Xin; GAO, Jinyan et al. : A Review of Clinical Characteristics, Mechanism, Allergens, Epitopes, and Cross-Reactivity. *ACS Food Science & Technology*. 25.1. 2024n. 1., roč. 4, č. 3, s. 304-315. Dostupné také z: [https://www.researchgate.net/publication/377719407\\_Fish\\_Allergy\\_A\\_Review\\_of\\_Clinical\\_Characteristics\\_Mechanism\\_Allergens\\_Epitopes\\_and\\_Cross-Reactivity](https://www.researchgate.net/publication/377719407_Fish_Allergy_A_Review_of_Clinical_Characteristics_Mechanism_Allergens_Epitopes_and_Cross-Reactivity).
- [13] *Collagen. Molecular structure. Collagen fiber, molecule, and Amino acid sequence. Molecular structure. Three polypeptides coil to form tropocollagen. Tropocollagens bind together to form a fibril. Many fibrils bind together form a collagen fibre. Vector diagram for educational, medical, biological and science use. Connective tissue*. Online. In: Dreamstime. Dostupné z: <https://www.dreamstime.com/collagen-fiber-molecule-amino-acid-sequence-molecular-structure-three-polypeptides-coil-to-form-tropocollagen-tropocollagens-image128770034>. [cit. 2024-04-09].
- [14] FEGAN, Katie. *Gelatin: Denaturation of collagen produces thermoreversible gelatin. At the sol-gel transition temperature, water molecules in the gelatin solution become trapped within the gelatin network, forming a semi-rigid gel*. Online. In: ChemBAM. Dostupné z: <https://chembam.com/resources-for-students/the-chemistry-of-gelatin/>. [cit. 2024-04-09].
- [15] *Rousselot Gelatin*. Online. In: ROUSSELOT. Rousselot. 2014. Dostupné z: <file:///C:/Users/42070/Downloads/Rousselot%20Gelatin.pdf>. [cit. 2024-04-24].
- [16] MARIOD, Abdalbasit Adam a ADAM, Hadia Fadol. Review: Gelatin, source, extraction and industrial applications. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 2013, roč. 12, č. 2, s. 135-147. ISSN 1889-9594.
- [17] *Gelatin Handbook*. Online. In: GELATIN MANUFACTURERS INSTITUTE OF AMERICA. Gelatin-gmia.com. 2012. Dostupné z: [http://www.gelatin-gmia.com/uploads/1/1/8/4/118450438/gmia\\_gelatin\\_manual\\_2019.pdf](http://www.gelatin-gmia.com/uploads/1/1/8/4/118450438/gmia_gelatin_manual_2019.pdf). [cit. 2024-04-13].
- [18] DA SILVA, Roberto S. G. a PINTO, Luiz A. A. Physical Cross-linkers: Alternatives to Improve the MEchanical Properties of Fish Gelatin. Online. *Food Engineering Reviews*. 2012, č. 4, s. 165-170. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12393-012-9054-z>. [cit. 2024-04-13].
- [19] GRAND VIEW RESEARCH. *Gelatin Market Analysis Segment Forecasts Till 2025*. Excel. 2019.

## **SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

NaCl chlorid sodný

NaOH hydroxid sodný

HCl kyselina chlorovodíková

Exp experiment

AMP antimikrobiální peptid; peptid s antimikrobiálními vlastnostmi

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1; Množství využití želatiny v letech 2014-2019 s předpokladem do roku 2025. [18].....	3
Obrázek 2; Procentuální zastoupení jednotlivých zdrojů v letech 2010-2025* [18].....	4
Obrázek 3; Struktura stavby kolagenních vláken [13].....	6
Obrázek 4; Rozpad nativní struktury kolagenu a opětovné vytvoření struktury želatiny [14] .....	7
Obrázek 5; Schéma technologického postupu práce .....	25
Obrázek 6; A - <i>Cyprinus carpio</i> před prvotním opracováním; B – mechanicky odstraněné části; C - <i>Cyprinus carpio</i> po odstranění ploutví.....	26
Obrázek 7; Vnitřní část mlýnku použitá k homogenizaci rybího materiálu. ....	27
Obrázek 8; Zhomogenizovaná směs z koster o velikost 15 mm; A – <i>Cyprinus carpio</i> , B – <i>Ctenopharyngodon idella</i> . ....	27
Obrázek 9; Tuk ulpěný na pigmentu po odstředění .....	30
Obrázek 10; Nerozpustitelné částice v gelu ze 2. frakce, exp. 10.1 .....	37
Obrázek 11; Aparatura pro stanovení viskozity .....	41
Obrázek 12; Aparatura pro stanovení teploty tuhnutí želatinového gelu .....	43
Obrázek 13; Schéma postupu práce pro získání želatiny o námi požadovaných vlastnostech (dle exp. 1.2) .....	46

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1; Zastoupení aminokyselin v rybích želatinách v porovnání s želatinou vepřovou (vyjádřeno jako množství rezidujících/1000 celkových reziduí aminokyselin) [3] [4] .....	9
Tabulka 2; Vlastnosti želatin získaných metodami extrakce teplem a enzymatické extrakce .....	16
Tabulka 3; Teploty a doby frakcí vícestupňové extrakce .....	29
Tabulka 4; Hmotová bilance experimentu .....	30
Tabulka 5; Předepsané experimenty; hodnoty proměnných faktorů A, B a C .....	33
Tabulka 6; Výtěžky z frakcí, experiment č. 1 a 8 .....	34
Tabulka 7; Pevnost želatinového gelu z 1. a 2. frakce; experiment č. 1 a 8 .....	34
Tabulka 8; Výtěžky z frakcí, experiment č. 1.1 a experiment 10.1 .....	36
Tabulka 9; Pevnost želatinového gelu z 1. a 2. frakce; experiment č. 1.1 a experiment 10.1 .....	36
Tabulka 10; Rozpis experimentů po 2. úpravě extrakčních podmínek .....	38
Tabulka 11; Výtěžky z frakcí, experiment 1.2 a 2.2 .....	38
Tabulka 12; Pevnost želatinového gelu z 1. a 2. frakce; experiment č. 1.2 a experiment 2.2 .....	39
Tabulka 13; Metody stanovování pevnosti gelu .....	40
Tabulka 14; Naměřené hodnoty pevnosti gelu, dynamické viskozity, teplot tání a teplot tuhnutí gelů vykazujících známky tuhnutí .....	44