


Fotodegradace želatinových filmů

Bc. Lucie Polomíková

Diplomová práce
2023

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická
Ústav inženýrství polymerů

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Polomíková**
Osobní číslo: **T21549**
Studijní program: **N0722A130001 Inženýrství polymerů**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Fotodegradace želatinových filmů**

Zásady pro vypracování

Použití želatinových filmů připravených z dosud nevyužitých tkání bohatých na kolagen (vznikajících při zpracování drůbeže) jako obalů na potraviny se jeví jako velmi perspektivní. Obal má zajišťovat ochranu zabalené potraviny a také prodlužovat její trvanlivost. To samozřejmě klade na želatinové filmy jisté nároky, zejména vhodné mechanické či bariérové vlastnosti. Neméně důležitá je také dostatečná životnost filmu, včetně odolnosti proti UV-záření. Diplomová práce bude zaměřena zejména na analýzu degradačních změn želatinových filmů způsobených UV-světlem; filmy budou připraveny litím.

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

Seznam doporučené literatury:

1. A. Torikai, H. Shibata. Effect of ultraviolet radiation on photodegradation of collagen. *Journal of Applied Polymer Science*, 1999, 73, 1259–1265, DOI: 10.1002/(SICI)1097-4628(19990815)73:7%3C1259::AID-APP20%3E3.0.CO;2-%23.
2. A. Sionkowska. Effects of solar radiation on collagen and chitosan films. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2006, 82, 1, 9–15, DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2005.08.003.
3. B. G. Ranby, J. F. Rabek. *Photodegradation, Photo-oxidation and Photostabilization of Polymers: Principles and Applications*. London: John Wiley, 1975, 573 s., ISBN 0471707880.
4. A. Etxabide, J. Uranga, P. Guerrero, K. de la Caba. Development of active gelatin films by means of valorisation of food processing waste: A Review. *Food Hydrocolloids*, 2017, 68, 192-198. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2016.08.021.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Jana Navrátilová, Ph.D.**
Ústav inženýrství polymerů

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2023**
Termín odevzdání diplomové práce: **12. května 2023**

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

Ing. Jana Navrátilová, Ph.D. v.r.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 10. února 2023

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta: Lucie Polomíková

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá fotodegradací želatinových filmů, které jsou vyrobeny z dosud nevyužitých tkání bohatých na kolagen, které vznikají při jatečném zpracování drůbeže. Využití želatinových filmů za účelem získání obalových materiálů na potraviny se jeví jako velmi perspektivní. V teoretické části jsou popsány vedlejší produkty jatečné výroby a jejich využití, kolagen, želatina a z ní vyrobené filmy. Nechybí ani popis výroby, vlastností a degradace těchto filmů. Připravenými vzorky byly želatinové filmy s přídavkem glycerolu jako změkčovadla, kdy želatina byla získána z kuřecích běháků. V experimentální části byly testovány vlastnosti želatinových filmů před i po fotodegradací a hodnoceny jejich změny. Získané výsledky naznačují probíhající síťování při expozici UV záření na želatinové filmy. Využití UV-záření pro úpravu vlastností želatinových obalů na potraviny se jeví jako perspektivní.

Klíčová slova: kuřecí běháky, želatina, želatinové filmy, fotodegradace, síťování

ABSTRACT

This master thesis deals with the photodegradation of gelatin films prepared from unused collagen-rich tissues produced as waste during poultry slaughtering. The use of gelatin films to obtain food packaging materials appears to be very promising. The theoretical part describes the by-products of slaughterhouse production and their use, collagen, gelatin and films made from gelatin. The production, properties and degradation of these film are also described. The prepared samples were gelatin films with the addition of glycerol as a plasticizer. The gelatin was obtained from chicken feet. In the experimental part, the properties of gelatin films before and after photodegradation were tested and their changes in properties were evaluated. The obtained results suggest ongoing crosslinking during UV radiation exposure on gelatin films. The use of UV radiation for the modification of the properties of gelatin-based food packaging appears perspective.

Keywords: chicken feet, gelatin, gelatin films, photodegradation, crosslinking

Obrovské poděkování patří především Ing. Janě Navrátilové, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, obdržené cenné rady, odborný dohled, trpělivost a věnovaný čas. Dále bych chtěla poděkovat doktorandovi na Fakultě technologické Ing. Michalovi Kudláčkovi za rady a informace, které mi pomohly při měření a vyhodnocování experimentů.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 VEDLEJŠÍ PRODUKTY Z JATEČNÍ VÝROBY A JEJICH VYUŽITÍ ..	12
1.1 PEVNÉ ODPADY	12
1.1.1 Běháky.....	12
1.1.2 Hlavy	13
1.1.3 Kůže	13
1.1.4 Peří	13
1.1.5 Kostí, chrupavky a šlachy	13
1.1.6 Vnitřnosti.....	14
1.2 KAPALNÉ ODPADY.....	14
1.2.1 Krev	14
1.3 ZPRACOVÁNÍ A VYUŽITÍ ODPADŮ Z JATEČNÍ VÝROBY	15
2 KOLAGEN	17
2.1 STRUKTURA	17
2.2 BIOSYNTÉZA	18
2.3 FYZIKÁLNĚ CHEMICKÉ VLASTNOSTI	19
2.3.1 Polyelektrolytický charakter	19
2.3.2 Botnění	19
2.3.3 Denaturace a renaturace	20
2.3.4 Hydrotermální stabilita.....	20
2.3.5 Hydratace kolagenu.....	21
2.3.6 Přeměna na želatínu	21
2.4 TYPY	21
2.4.1 Kolagen typu I.....	22
2.4.2 Kolagen typu II	23
3 ŽELATINA	24
3.1 VÝROBA.....	24
3.1.1 Kyselý způsob úpravy	25
3.1.2 Alkalický způsob úpravy.....	25
3.1.3 Enzymatický způsob úpravy	26
3.2 VLASTNOSTI.....	27
3.3 VYUŽITÍ ŽELATINY	28
3.3.1 Potravinářství	29
3.3.2 Farmacie a medicína	30
3.3.3 Technická želatina.....	31
3.3.4 Fotografická želatina	31
4 ŽELATINOVÉ FILMY	33

4.1	PŘÍPRAVA.....	33
4.1.1	Lití.....	33
4.2	MODIFIKACE	34
4.2.1	Změkčovadla	34
4.2.2	Sít'ovadla	35
5	FOTODEGRADACE	39
5.1	ENERGIE ZÁŘENÍ	39
5.2	ABSORPCE ZÁŘENÍ.....	40
5.3	FOTOCHEMIE	41
5.4	FOTODEGRADACE ŽELATINOVÝCH FILMŮ.....	42
II	PRAKTICKÁ ČÁST.....	45
6	CÍLE PRÁCE	46
7	PŘÍPRAVA ŽELATINOVÝCH FILMŮ.....	47
7.1	POUŽITÝ MATERIÁL.....	47
7.2	PŘÍPRAVA ŽELATINY	47
7.3	CHARAKTERIZACE ŽELATINY	49
7.4	PŘÍPRAVA ŽELATINOVÝCH FILMŮ.....	50
7.5	OZNAČENÍ VZORKŮ	50
8	METODY CHARAKTERIZACE ŽELATINOVÝCH FILMŮ	51
8.1	URYCHLENÉ STÁRNUTÍ.....	51
8.2	ROZPUSTNOST A BOTNÁNÍ.....	52
8.3	PAROPRUPUSTNOST	52
8.4	SPEKTROFOTOMETRIE	53
8.5	INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE S FOURIEROVOU TRANSFORMACÍ.....	54
8.6	DIFERENCIÁLNÍ SKENOVACÍ KALORIMETRIE.....	54
8.7	TERMOGRAVIMETRICKÁ ANALÝZA.....	55
9	VÝSLEDKY A DISKUZE	56
9.1	PEVNOST BLOOM	56
9.2	ROZPUSTNOST A BOTNÁNÍ.....	57
9.3	PAROPRUPUSTNOST	60
9.4	SPEKTROFOTOMETRIE	64
9.5	INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE S FOURIEROVOU TRANSFORMACÍ.....	66
9.6	DIFERENCIÁLNÍ SKENOVACÍ KALORIMETRIE.....	70
9.7	TERMOGRAVIMETRICKÁ ANALÝZA.....	73
	ZÁVĚR	78

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	80
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	87
SEZNAM OBRÁZKŮ	88
SEZNAM TABULEK.....	90
SEZNAM PŘÍLOH.....	91

ÚVOD

Náš každodenní život je úzce spojen s využitím syntetických polymerů, které nám slouží od lékařství přes průmyslové aplikace až k obalům na potraviny. U většiny plastů trvá úplné rozložení v přírodě někdy i stovky let. Proto jsou tyto materiály označovány jako biologicky nerozložitelné.

V současné době je stále více vyžadováno snižování množství biologicky neodbouratelných plastů, které mohou mít negativní dopad na životní prostředí. Zároveň roste poptávka a rozvíjí se výzkum v oblasti syntézy biologicky rozložitelných filmů a obalů z přírodních obnovitelných zdrojů. Tyto materiály by měly garantovat netoxičnost a ekologickou nezávadnost. Surovinovými zdroji filmů a obalů jsou polymerní materiály odvozené z biomasy – proteiny, polysacharidy, lipidy nebo jejich kombinace.

Želatina je protein řazený mezi biopolymery, který je možno získat ze zvířecích kůží, kostí, chrupavek, šlach a jiných tkání obsahujících kolagen. Je poměrně levným materiálem a díky mnoha skvělým vlastnostem se pyšní širokým aplikačním potenciálem především v oblasti potravinářství a lékařství.

Rozpuštěním želatiny v destilované vodě je možno litím želatinového roztoku s následným vysušením vytvořit želatinové filmy, které by mohly nacházet využití jako obalové materiály pro potraviny. Výjimečnou vlastností želatinových filmů je dobrá bariérová vlastnost pro kyslík, oxid uhličitý a těkavé sloučeniny při nízké relativní vlhkosti. Nedostatky želatiny spočívají ve špatných mechanických vlastnostech a odolnosti vůči vodě. Proto se při výrobě želatinových filmů modifikují vlastnosti pomocí přidání změkčovadla nebo síťování.

Nejčastěji využívanými změkčovadly jsou polyoly, především pak glycerol a sorbitol. Dále je možno využít monosacharidy – např. glukózu a fruktózu. Existují tři typy síťování želatiny. Vedle enzymatického a chemického sesíťování je možno iniciovat tvorbu sítě fyzikálními vlivy, například použitím UV-záření. Využití fotodegradace neboli vystavení filmů UV-záření se řadí u biopolymerů mezi účinné možnosti vytvoření sítě.

Cílem této diplomové práce je příprava dvou sérií želatinových filmů z kuřecích běháků, které jsou vedlejšími produkty jatečné výroby. Jednotlivé série se liší obsahem změkčovadla. Úkolem je zhodnocení jejich mechanických a bariérových vlastností na základě dvou parametrů – odlišné koncentrace změkčovadla a různého časového intervalu expozice UV-záření.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VEDLEJŠÍ PRODUKTY Z JATEČNÍ VÝROBY A JEJICH VYUŽITÍ

Hlavním cílem veškeré výroby je vyřešit problém obrovského množství vznikajících odpadů. Každým dnem dochází k vyprodukování zpracovatelských odpadů o hmotnosti milionů tun. Nejlepším řešením je zabránit samotnému vzniku odpadu, popřípadě pro něj najít další možnost zpracování nebo jej recyklovat. Součástí jatečného zpracování drůbeže je vznik produktů, které jsou považovány za odpad. Množství vyprodukovaného odpadu se pohybuje obvykle okolo 30 % z celkové porážkové hmotnosti zvířete. V současné době není pro jatečnou výrobu praktické vedlejší produkty a odpady likvidovat, protože většina z nich disponuje vysokým ekonomickým potenciálem. Vznikající produkty se prvotně dělí na hlavní nebo vedlejší. Hlavní produkty slouží k lidské výživě nebo využití v masném průmyslu. Všechny ostatní vzniklé odpady jsou považovány za vedlejší produkty, u kterých dále rozlišujeme, jestli jsou požitelné nebo nepožitelné. Mezi požitelné produkty patří především kůže, krev, kosti a vnitřnosti získané z jatečných zvířat. Do skupiny nepožitelných produktů řadíme všechny další produkty nevyužité v masné výrobě a lidské výživě. To jsou například hlavy, běháky, peří, plíce a ostatní odpadní části drůbežích těl. [1, 2, 3, 4]

Dělení odpadů v potravinářském průmyslu probíhá podle jeho skupenství na:

- pevné – běháky, kůže, peří, hlavy, droby, kosti aj.,
- kapalné – krev,
- plynné – NH_3 vznikající při zpracování siláže. [4]

1.1 Pevné odpady

1.1.1 Běháky

Běháky představují vzhledem k celkové hmotnosti drůbeže asi 5 %. Běháky drůbeže jsou řazeny mezi pevný odpad, který nenalézá využití v lidské výživě, a proto je určen k likvidaci v kafilériích. Vzhledem k požadavkům redukce vznikajících odpadů je v současné době část vyprodukovaných kuřecích běháků ponechávána a mražena pro produkci potravinářské želatiny. Avšak stále majoritní zpracování běháků probíhá v kafilériích, kde vzniká masokostní moučka, která slouží jako krmivo. [4, 5]

1.1.2 Hlavy

Drůbeží hlava je další odpadní částí drůbežního těla, která je řazena mezi nepoživatelné vedlejší produkty. Tvoří asi 3 % živé hmotnosti drůbeže. Zpracování hlav probíhá především v kafilériích, kde se produkuje masokostní moučka, která slouží k výrobě zvířecích krmiv. Další možnosti zpracování jsou použití hlav jako výchozích surovin pro extrakci želatiny a výroba psích krmných past, které obsahují mleté drůbeží hlavy. [4]

1.1.3 Kůže

Kůže představuje 7 až 10 % hmotnosti drůbežního těla a je požitelným vedlejším produktem jatečného zpracování. Tvoří ochrannou bariéru těla, která ho brání před nežádoucími vlivy okolí. Tloušťka kůže se odvíjí od vybraného druhu drůbeže. Dále závisí na pohlaví, věku a části těla. Součástí drůbeží kůže jsou papily, ve kterých dochází k růstu a uchycení peří. Kromě žlázy kostrční se v ní nenachází žádné jiné sekreční žlázy. Kůže je z důvodu své tenkosti a jemnosti velmi poddajná. Drůbež má dva typy kůže, a to kůži vlastní a podkožní. Vlastní kůži tvoří pokožka a škára, která je složena z kolagenního vaziva a je bohatá na nervová zakončení a cévy. Kůži tvoří především dva typy kolagenů, a to kolagen typu I a III. Využívá se především v potravinářství, farmacii a pro výrobu kličů a želatin. [4, 6]

1.1.4 Peří

Peří se svým obsahem liší podle druhu drůbeže, ale jeho hmotnost se pohybuje okolo 7 % z celkové hmotnosti těla. Surové peří je ze 70–80 % tvořeno bílkovinami. Vedle bílkovin je v peří zastoupena i řada aminokyselin, kdy se ve velkém množství jedná o cystein, arginin a treonin. Naopak malé zastoupení mají aminokyseliny metionin, tryptofan, histidin a lysin. Kvalitu peří ovlivňuje věk, pohlaví, druh drůbeže a umístění. Peří získané z druhů hrabavé drůbeže není zpravidla následně zpracováno a jeho cesta vede rovnou do kafilérie, kde je z něj vytvořena péřová moučka, která bývá součástí zvířecích krmných směsí. Jiné využití spočívá ve výrobě výplní ložního prádla, hnojiv, sportovního vybavení a dekorací. [4, 5]

1.1.5 Kostí, chrupavky a šlachy

Kostí vzhledem k jejich vzniklému množství představují velkou část pevných odpadů. U živého zvířete tvoří asi 12 % hmotnosti. Obsahu tuku, bílkovin a minerálních látek zajišťuje kostem výživovou hodnotu. Kostí jsou vzhledem k následnému využití děleny na výsekové a technické. Technické kostí jsou využívány k produkci masokostní moučky, kostního kliču

nebo technické želatiny. Kosti výsekové lze využívat pro výrobu vývarů, tedy pro lidskou výživu. Vedle kostí lze využít i chrupavky a šlachy. Tyto části jsou bohaté na elastin a jejich využití je při výrobě klišů a želatin. [4, 5, 7]

1.1.6 Vnitřnosti

Za vnitřnosti jsou považovány všechny orgány ze soustavy dýchací, oběhové, nervové, trávicí a vylučovací. Tvoří zhruba 30 % ze všech vzniklých vedlejších produktů. Některé z orgánů jsou často určeny k přímé konzumaci, protože disponují dobrými nutričními hodnotami. Vnitřnosti a části těl, které jsou požitelné, se nazývají droby. Mezi droby se řadí srdce, žaludek, ledviny, játra a krk. Žaludek je složen ze žláznaté a svalnaté části, kdy druhá zmíněná je požitelná. Játra, která tvoří asi 2 % hmotnosti živého zvířete, jsou plná vitamínů, společně s ledvinami mají vysoký obsah řady minerálních látek a stopových prvků. Avšak naopak se vyznačují vysokým obsahem cholesterolu. Střeva, která jsou součástí trávicího traktu nalézají využití při výrobě obalů masných výrobků, při šití kůže či při produkci strun. Nezpracované droby jsou přidávány do krmiv pro zvířata. [4, 5]

1.2 Kapalné odpady

1.2.1 Krev

Příkladem kapalného odpadu vznikajícího při jatečném opracování je krev. U dospělých jedinců tvoří krev 7 až 10 % celkové tělesné hmotnosti. Složení krve je z 80 až 85 % voda, zbylých 15 až 20 % se rozdělí mezi ostatní nutričně bohaté látky, kterými jsou bílkoviny, lipidy, vitamíny a minerální látky. Krev je získávána procesem vykrvování při jatečném zpracování, kdy je zachycována do vykrvovacích žlabů. Po vykrvení je nutné získanou krev stabilizovat ochlazením, konzervací či defibrilací, jinak by docházelo k jejímu sražení. Stabilizovaná krev je dále zpracována sušením ve sprejových, válcových či bubnových sušárnách. Během sušení mění svou podobu a vzniká krevní moučka, šrot či vločky. Své využití krev nalézá především v krmném průmyslu a farmacii, menší využití pak v potravinářství, kde jsou na ni kladeny vysoké hygienické nároky. Jelikož získávání hygienicky čisté krve, která by splňovala veškeré požadavky, je velmi obtížné a je nutno na tento proces vynaložit více financí. Do krmných směsí je sušená krev přidávána pro vysoký obsah živin, především pak vitamínů a minerálních látek. [8, 9, 10]

Vzniklé odpady z jateční výroby mohou být znovu zpracovány na ekonomicky užitečné produkty, které mohou nalézt široké využití v oblastech lidské či zvířecí výživy, farmaceutik, výroby hnojiv, bionafty a bioplynu. [3]

1.3 Zpracování a využití odpadů z jateční výroby

Jakékoliv zacházení s odpady živočišné výroby je řízeno předpisy, kdy platí základní nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1069/2009 ze dne 21. října 2009 o hygienických pravidlech pro vedlejší produkty živočišného původu a získané produkty, které nejsou určeny k lidské spotřebě. Toto nařízení pak mění, opravuje a provádí Komise (EU) č. 294/2013 ze dne 14. března 2013. V České republice se zacházení s vedlejšími produkty řídí zákonem č. 302/2017 Sb., který změnil zákon č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon). Vedle něj platí vyhláška č. 291/2012 Sb., která změnila vyhlášku č. 94/2010 Sb., o některých veterinárních a hygienických požadavcích na přepravu a zpracování vedlejších živočišných produktů. [11, 12, 13]

Vedlejší produkty po jatečném zpracování zvířat se dále dělí do třech kategorií, které vypovídají u těchto produktů o možném riziku a jeho úrovni pro lidské a zvířecí zdraví. V nařízení (ES) č. 1069/2009 v oddílu 4 s názvem Kategorizace. [12]

Dle nařízení (ES) č. 1069/2009 se vedlejší produkty živočišného původu dělí na [12]:

- materiál kategorie 1 (celá těla či části těl infikovaných, pokusných, nezákonně ošetřených či jiných než hospodářských a volně žijících zvířat, vedlejší živočišné produkty, které přišly do kontaktu s odpadními vodami při zpracování materiálů kategorie 1 a směsi materiálu kategorie 1 s materiálem kategorie 2, 3 nebo obou kategorií),
- materiál kategorie 2 (hnůj, nemineralizované guáno či obsah trávícího traktu, vedlejší živočišné produkty, které přišly do kontaktu s odpadními vodami při zpracování materiálů kategorie 2, živočišné produkty s obsahem cizích těles nebo kontaminantů, které jsou nevhodné k spotřebě člověkem, celá těla nebo části těl zvířat uhynutých mimo porážku, plody, embrya, sperma a drůbež odumřelá ve vejci a směsi materiálu kategorie 2 s materiálem kategorie 1, 3 či obou kategorií),
- materiál kategorie 3 (těla a jejich části, jenž nejsou z komerčních důvodů určeny ke spotřebě člověkem a části těl z jatečně poražených zvířat, která k ní byla shledána

jako nezpůsobilá po kontrole před porážkou, těla a jejich části právně prohlášeny za nezpůsobilé k lidské spotřebě, aniž by vykazovala jakékoliv na člověka či zvířata přenosné onemocnění, dále pak drůbeží hlavy, peří, odřezky a plátky kůže či kožek, zvířecí končetiny a další vznikající vedlejší produkty při jatečném zpracování drůbeže, krmiva dále neurčená ke krmným účelům, krev i vedlejší produkty vznikající na místech určených k líhni, dále pak vejce, skořápky a jednodenní kuřata, která byla usmrcena pro obchodní účely, peří, kůže a kožky, paznehty a srst z mrtvých zvířat bez příznaků přenosných onemocnění a odpady vzniklé v zařízeních určených ke stravování).

2 KOLAGEN

Kolagen je řazen mezi proteiny, které se u obratlovců považují za hlavní strukturální složky vláknitých pojivových tkání jejich orgánů, kterými jsou kůže, šlachy, kosti, chrupavky, cévy a svaly. Ze všech proteinů v živých tkáních tvoří kolagen přibližně 25 až 30 %. Jeho unikátním fyzikálním vlastnostem sekunduje uniformita, biokompatibilita s biodegradovatelností, stabilita a nerozpustnost fibril, pružnost a pevnost v tahu. Díky těmto vlastnostem nalézá široké spektrum využitelnosti v čele s tkáňovým inženýrstvím a výrobou implantátů a obvazů využívaných v chirurgii. Dále je skvělým materiálem kapslových matric, využívá se jako pojivo ve farmacii a také slouží k výrobě gelů a filmů v potravinářském průmyslu. [14]

Celosvětově jsou hlavními zdroji kolagenu a želatiny kůže, kosti a kopyta skotu a prasat. Avšak vzhledem ke stále zvyšující se spotřebě a náboženským zákazům se snaží společnost nahrazovat právě hovězí a vepřové výrobky kolageny a želatinami z jiných zdrojů. Proto se jako velmi výhodný jeví zisk kuřecího kolagenu a želatiny. Vedle toho je další výhodou, že se právě pro jeho výrobu využívají vedlejší produkty jatečného zpracování drůbeže, kterými jsou drůbeží kosti, hlavy, běháky a kůže. [14, 15]

2.1 Struktura

Molekulární oblast je u kolagenu formována z fibril, které obsahují souvislou šroubovicovou oblast, ve které dochází ke střídání nepolárních a polárních domén. Kolagen je protein, jehož struktura může nabývat vysoké strukturní rozmanitosti. Avšak u všech typů nalezneme jednu společnou charakteristickou vlastnost a to, že struktura je vytvořena ze tří polypeptidových řetězců, jež jsou formovány do tvaru pravotočivé šroubovice nazývané tropokolagen vyskytující se v mezibuněčné hmotě neboli extracelulární matrici. Trojšroubovice může být složena ze tří totožných řetězců (kolagen typu II, III, VII, VIII a další) nebo ze dvou a více lišících se řetězců (kolagen typu I, IV, V, VI, IX a XI). [14, 16]

Každý z polypeptidických řetězců je sestaven z tisíců aminokyselin, které zaujímají základní opakující se sekvenci Gly-X-Y. Glycin se vyskytuje vždy na třetí pozici a pozice X a Y je obsazována jinými aminokyselinami. Pozici X pak nejčastěji obsazuje prolin či lysin a pozici Y pak hydroxyprolin či hydroxylysin. Podle typu kolagenu dochází k výskytu specifických lysinových a prolinových zbytků. Alfa řetězce zaujímají kolem centrální osy rozestavení tak, že vždy zbytek nejmenší aminokyseliny glycinu je ve středu trojšroubovice a ostatní aminokyselin s objemnějšími postranními řetězci zaujímají vnější pozice. [14, 16]

Stabilita a struktura kolagenu spočívá především v tvorbě vodíkových vazeb mezi polárními zbytky 4-hydroxyprolinu a 5-hydroxylysinu. Při této interakci dohází ke vzniku hydratační sítě na základě elektrostatického působení. [14, 16, 17]

U kuřecího kolagenu dochází k menšímu zesíťování z důvodu provedené porážky mezi 6 a 7 týdny života. Pro srovnání u skotu probíhá porážka po 18 až 36 měsících. Vysvětlení souvisí s faktem, že s vyšším věkem zvířete dochází k vytvoření vyšší úrovně kovalentního zesíťování, které je iniciováno pomocí enzymu známého pod jménem lysyl oxidáza. [14]

V obecném měřítku obsahují savčí proteiny vysoké množství prolinu, hydroxyprolinu a hydroxylysinu. Je možné, že u kolagenu získaného z drůbeže se obsah imino kyselin podobá nebo je mírně nižší než u savčího kolagenu. Rybí kolagen vykazuje nižší zastoupení prolinu s hydroxyprolinem a oproti savčímu se vyznačuje vyšším množstvím aminokyselin threoninu, methioninu a serinu. Obsah imino kyselin ovlivňuje stabilitu kolagenních vláken, jejich smrštění a teplotu, při které dochází k denuraci. Pokud kolagen obsahuje vysoké množství imino kyselin, je ovlivněno mnoho funkčních vlastností v čele s rozpustností, odolností teplotnímu působení a schopností tvořit síť. Proto takový kolagen nalézá rozmanitější využití v potravinářství. [17]

2.2 Biosyntéza

Počátek kolagenní biosyntézy nastává přepisem genetické informace v jádru buňky. Ukončena je shlukováním kolagenových heterotrimerů, které tvoří velké fibrily. Celá syntéza kolagenu je velmi složitým víceúrovňovým procesem s mnoha posttranslačními intra- i extracelulárními úpravami. Nejvíce je ho vytvářeno buňkami nacházejícími se v pojivových tkáních. Prekurzorová molekula nazývaná preprokolagen, která bude zahajovat syntézu kolagenu, vzniká na ribozomech, které se nacházejí na endoplazmatickém retikulu. [16]

Součástí prekurzorů jsou signální peptidy, které slouží k transportu proteinů vylučovaných na endoplazmatickém retikulu. Vedle nich obsahují propeptidy neboli aminokyseliny vyskytující se na N- a C-koncích řetězce. Na Golgiho aparátu probíhají posttranslační modifikace aminokyselin prolinu a lysinu, kdy se z nich vytváří hydroxyprolin a hydroxylysin. Po odštěpení signálního peptidu a modifikací aminokyselin dochází k vytvoření vodíkových vazeb mezi třemi α -řetězci a vytvoří se trojšroubovicová struktura s názvem prokolagen. Po transportu do mezibuněčného prostoru dochází hydrolýzou k odstranění propeptidů a k přeměně fibrilárních kolagenů na molekuly kolagenu. [18]

2.3 Fyzikálně chemické vlastnosti

Jelikož je kolagen řazen mezi bílkoviny, nabývá mnoha typických vlastností právě pro ně. Avšak vedle nich nalezneme u kolagenu i několik specifických vlastností, které vznikly v závislosti na struktuře jeho makromolekul.

2.3.1 Polyelektrolytický charakter

Pro kolagen, stejně jako pro ostatní bílkoviny, platí charakteristické chování amorfního polyelektrolytu. To znamená závislost probíhajících iontových reakcí na pH, kdy ionizace některých skupin jeho postranních částí řetězců probíhá v alkalické a ionizace zbytku skupin v kyselé pH oblasti. Proto s každou změnou pH se mění i náboj kolagenové molekuly. V silně alkalické oblasti nabývá záporného náboje, naopak v silně kyselé má náboj kladný. Při pH 7 nastává u nativního kolagenu izoelektrický bod, ale při mírném působení chemikálií se může pohybovat mezi pH 4,5 a 8,0. [19]

2.3.2 Botnání

Z fyzikálně-chemického hlediska se řadí kolagen mezi přechodné koloidní soustavy neboli gely, u kterých se mezi nejdůležitější vlastnosti řadí botnací schopnost. Vedle toho mohou díky gelům útvary získávat značnou pevnost a pružnost. Mohou také nabývat vlastností, které je chováním přibližují ke kapalinám a zajišťují jim schopnost pohybu a vzniku vzájemné interakce látek rozpuštěných v gelu. Když dojde k ponoření do vody, kolagenní vlákno omezeně botná a mění svůj objem, pružnost a délku. Do nabotnalého kolagenu se dostává voda botnací, kterou jsme schopni při mechanickém působení odstranit, a voda hydratační, u které dochází ke koloidnímu navázání a jsme schopni odstranění pouze vysušením. [19]

Vzhledem k mechanismu se rozlišují dva typy botnání – osmotické neboli nábojové a lyotropní. U osmotického botnání dochází k proniknutí vody skrz styčnou plochu mezi působícím rozpouštědlem a pevnou látkou za působení gradientu osmotického tlaku. Ten je způsoben koncentračním spádem pohyblivých iontů v gelu a roztoku. Po uplynutí určité doby nastává Donnanova membránová rovnováha. V tu chvíli dochází vykompenzování botnacího tlaku pomocí pevnosti makromolekulární sítě. Pokud na stabilizující vazby působí extrémní hodnoty pH nebo lyotropní činidla, dochází ke snížení protitlaku pevné fáze vůči pronikání vody. Rovnováha poté nastává při vyšší míře nabotnání, což se nazývá lyotropní

botnání. Při tomto druhu botnání mají sloučeniny schopnost rozštěpovat vodíkové můstky, při nastolení extrémních podmínek dokonce rozpouštět kolagen. [19]

2.3.3 Denaturace a renaturace

Při působení vyšší teploty či některých chemikálií dochází u bílkovin ke ztrátě jejich původních nativních vlastností neboli dochází k jejich denaturaci. Denaturaci u bílkovin zajišťují např. kyseliny a zásady, močovina, tenzidy či jiná organická rozpouštědla. Když nastane denaturace, dochází u molekuly kolagenu ke změně chemické konfigurace v molekule a kolagen se tak přeměňuje na želatinu. Produktem, který vzniká po denaturaci tropokolagenního vodného roztoku, jsou dva štěpy s odlišnou molekulovou hmotností – komponenty značené α a β , kdy β -komponent může být rozštěpen dále ještě na dva α -komponenty. Dochází tedy ke vzniku tří komponentů, které odpovídají počáteční trojšroubovici kolagenu. [19]

Denaturační mechanismus spočívá ve dvoustupňovém procesu. Prvním stupněm je rozpad trojšroubovice kolagenu a svinutí tropokolagenní makromolekuly do struktury statistického klubka, kdy se navzájem spojí jednotlivé řetězce. Poté následuje druhý stupeň, kdy dochází k rozpadu klubek na tři části. Frakce α původní spirály je vytvořena z jednoho polypeptidického řetězce, vedle ní vznikají frakce β složená ze dvou řetězců, které jsou vzájemně spojeny a frakce γ , která je složená ze tří řetězců ve formě nezměněného statistického klubka. Jestliže dojde ke dlouhodobému stání denaturovaného roztoku kolagenu za působení nízké teploty, nastává částečný proces navrácení do spirálové konfigurace zvaný renaturace. [19]

2.3.4 Hydrotermální stabilita

Pokud dochází ve vodě k zahřívání vláken kolagenu nebo za působení lyotropního činidla, nastává termická kontrakce, kdy se zkracují vlákna asi o 1/3 svého objemu směrem k ose. Smrštění kolagenních vláken nastává z důvodu štěpení příčných vazeb mezi molekulami i vazeb uvnitř molekul, které mají za úkol udržení trojitě šroubovice vlákna kolagenu v přirozeně nataženém stavu. Teplota smrštění vláken kolagenu se vyznačuje jako tání krystalických oblastí kolagenu. Pokud se použijí lyotropní činidla, dojde ke snížení teploty smršťování. Pro určení stability trojhelikální struktury kolagenu se zjišťuje denaturační teplota, při jejímž dosažení nastává přeměna kolagenu na želatinu. Tento přechod je fázovou

přeměnou prvního řádu. Hodnoty obou teplot je možné do určité míry zvýšit zesíťováním. [19]

2.3.5 Hydratace kolagenu

Jsou dva typy hydrofilních center, která zajišťují proteinům schopnost vázat na sebe vodu pomocí vodíkových můstků a elektrostatických sil. Jedním typem jsou polární skupiny, které jsou přítomné v bočních řetězcích některých zbytků aminokyselin. Druhým typem jsou dusík a kyslík peptidické vazby. Pro zachování fyzikálních vlastností je u kolagenu nezbytná asociace potřebného minima vody, což je asi 20 % jeho celkové hmotnosti. Po dosažení plně hydratovaného stavu se začínají pohybovat peptidové řetězce proteofibril. Omezení jejich pohybu je typické v suchém stavu, čímž u fyzikálních vlastností proteinů dostáváme vysvětlení elementární funkce vody. U suchého kolagenu je vzdálenost sousedních řetězců 1 nm, při hydrataci kolagenu se zvyšuje až na 1,6 nm. [19]

2.3.6 Přeměna na želatinu

Přeměna kolagenu na želatinu nastává v případě, kdy se ve vodném prostředí necháme zahřívat. U této přeměny se rozlišují tři situace, kdy první je štěpení příčných kovalentních mezimolekulárních vazeb kvartérní struktury. Druhým pochodem je denaturace terciární struktury a třetím je štěpení peptidických vazeb řetězců pomocí hydrolýzy na molekulové úrovni. Jakýkoliv zásah a změna struktury řetězce je považována za degradaci či depolymeraci, tudíž je nežádoucím jevem. S menším počtem rozštěpených vazeb má želatina lepší fyzikální a chemické vlastnosti. [19]

Co se týká složení aminokyselin, kyselé připravená želatina je vzhledem ke kolagenu jeho chemicky velmi čistou formou. Nastává odstranění tuků, nevláknitých bílkovin a mukopolysacharidů. U alkalické přípravě želatiny nastává pokles obsahu argininu, tyrosinu a amidicky vázaného dusíku. [19]

2.4 Typy

V současné době je známo 26, ale některé zdroje uvádějí až 28 geneticky se lišících typů kolagenu. Pro přehlednost jsou kolageny označovány podle typu římskou číslicí I–XXVIII. Kolageny lze u obratlovců rozdělit do dvou hlavních kategorií – fibrilární neboli vláknité a nefibrilární. Největším rozdílem u jednotlivých typů kolagenů je složení v nich obsažených aminokyselin. [16, 17]

U fibrilárních kolagenů se dále ještě rozlišuje typ majoritní (kolagen typu I, II a III) a minoritní (kolagen typu V a XI). Tyto typy vytváří protáhlé pruhované fibrilární struktury, u kterých se nachází výrazná periodicitu (64–67 nm) a mají důležitou funkci mechanické podpory a rozměrové stability. [20]

Nefibrilární kolageny jsou schopny tvořit odlišné supramolekulární struktury, kterými jsou různě topologické sítě (kolageny typu IV, VIII a X), koráلكová (kolagen typu VI, XXVI a XXVIII) a kotvící vlákna (kolagen typu VII). U některých z nich dochází k navázání na povrch kolagenních vláken či transmembránovými proteiny. [20]

Ve studii José C. C. Santana et al. (2020) [21] se věnovali přípravě želatinových biofilmů z kuřecích běháků. Po naměření FTIR spektra vzorků kuřecí želatiny metodou ATR vyplývá, že obsah kolagenu byl více než 70,90 %, kdežto u komerčních želatin z kravské kůže je obsah pouze 35 %.

Ve studii D. C. Liu a kol. (2001) [22] bylo pro rozlišení různých typů kolagenu obsažených v kuřecích běhácích využito SDS (sodná sůl dodecylsulfátu) polyakrylamidového gelu. V této studii byl jako marker použit kolagen typu II z důvodu obsahu tří $\alpha 1$ -řetězců. Z výsledků studie bylo podle složení pásem na elektroforetogramu zjištěno, že kolagen získaný z kuřecích běháků se zřejmě skládá pouze ze dvou typů kolagenu – typu I a II.

2.4.1 Kolagen typu I

Kolagen typu I je nejrozšířenějším typem kolagenu v těle savců, a představuje přibližně 90 % všech kolagenů v lidském těle. Tento typ kolagenu se nachází zejména v kostech, šlachách, kůži, zubech a vazivech. Jeho hlavní funkcí je poskytovat strukturální podporu těmto tkáním a chránit je před deformací a poškozením. Dále má také vliv na regeneraci a růst těchto tkání. [16, 23]

Kolagen typu I je tvořen třemi řetězci $\alpha 1$, které se vzájemně vážou do trojvláknové struktury. Vlákna kolagenu typu I jsou velmi pevná, pružná a odolná vůči tahovým silám. Výroba kolagenu typu I je ovlivněna řadou faktorů – věkem, stravou, hormony a zdravotním stavem, ale může být ovlivněna i některými chorobami. Správná produkce a dostatečná hladina kolagenu typu I je klíčová pro udržení zdravých kostí, kůže a vaziv a může být podpořena vhodnou stravou, doplňky stravy nebo specifickými léčebnými postupy. [16, 23]

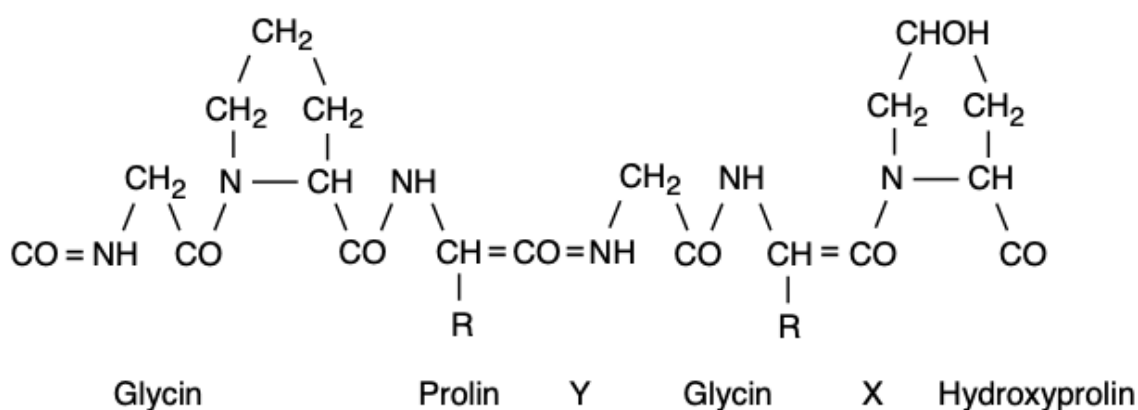
2.4.2 Kolagen typu II

Kolagen typu II je speciálním typem kolagenu, který se nachází převážně v chrupavkách. Jedná se o hlavní složku extracelulární matrix chrupavky, která zajišťuje její pevnost, pružnost a odolnost vůči tlaku. Kolagen typu II se opět skládá z tří řetězců $\alpha 1$, které vytvářejí trojvláknovou strukturu podobně jako u kolagenu typu I. [23, 24]

Tento typ kolagenu se podílí na tvorbě nové chrupavky během embryonálního vývoje a na regeneraci a opravě chrupavky v průběhu života. Kolagen typu II se také podílí na ochraně kloubů před poškozením. Zhoršená tvorba kolagenu typu II může vést k rozvoji artritidy, která je charakterizována degenerací a zánětem kloubů. Podpora tvorby a regenerace kolagenu typu II může být stejně také zajištěna vhodnou stravou a případně i doplňky stravy. [23, 24]

3 ŽELATINA

Želatina (Obrázek 1) je vzhledem k velkému množství využití v různých oblastech jedním z nejvíce univerzálních biopolymerů. Název je odvozen ze slova „gelata“ latinského původu, které popisuje schopnost vytvořit ve vodě gel, což je u želatiny její nejcharakterističtější vlastností. Želatina je odvozena od její mateřské bílkoviny kolagenu procesem, kdy pomocí hydrolyzy dochází k rozkladu sekundární a vyšší struktury peptidového základu. Poměry a sekvence obsažených aminokyselin se v želatině získané z kolagenu neliší, avšak fyzikální vlastnosti obou zmíněných bílkovin jsou značně odlišné. [25]



Obrázek 1: Chemická struktura želatiny

Pro výrobu želatiny je možné použít mnoho různých živočišných zdrojů, kterými jsou jak obratlovci, tak ryby, hlavonožci či hmyz. Fyzikální i chemické vlastnosti jednotlivých želatin se liší, avšak velmi záleží i na výrobním postupu. [25]

3.1 Výroba

Želatinu je možno získat z částí těla, která jsou bohatá na kolagen. Celá příprava je soustavou na sebe navazujících procesů. Nejdříve je nutno vyčistit zdrojovou surovinu a provést jednotlivé kroky předúpravy. Předupravená surovina je podrobena kyselému nebo alkalickému předzpracování a poté extrahována. Po dokončené extrakci je provedena filtrace s možnou úpravou koncentrace. Posledním krokem přípravy je vysušení a rozemletí na požadovanou velikost částic pro jednotlivé aplikace. [25]

Surovinu zvolenou pro extrakci želatiny (např. kuřecí běháky) je nutno v prvním kroku pořádně vyčistit od zbytkové krve a nečistot pomocí chladné vody. Pokud je surovina dodávána vcelku, je nutno ji ještě pomlít na části o velikosti cca 3 až 6 mm. Po přípravu

čistého kolagenu je nutno surovinu postupně zbavit nekolagenních bílkovin, pigmentů i tuků. [26]

Nekolagenní bílkoviny a pigmenty je možno odstranit pomocí třepání v 0,1M roztoku hydroxidu sodného (NaOH) v poměru 1:8 (váha suroviny na objem NaOH) a následném filtrování, kdy celý proces je opakován třikrát. Materiál je následně v tenké vrstvě sušen v sušárně při teplotě 35 °C. Odtučnění probíhá pomocí extrakce provedené za studena ve směsi ethanol/petrolether v poměru 1:1 nebo v n-hexanu. Rozpouštědlo se při extrakci přidává v poměru 1:6, opět vztaženo na váhu suroviny. Směs se nechá třepat po dobu 36 hodin, kdy je v intervalu 6, 12 a 24 hodin vždy vyměněno rozpouštědlo. Odtučněná surovina se filtruje a ponechána v digestoři při pokojové teplotě pro odpaření zbylého rozpouštědla. Získaný izolát je možno skladovat v temnu při pokojové teplotě. [26]

3.1.1 Kyselý způsob úpravy

Použitím kyselého způsobu výroby se získává želatina typu A. Tento postup se volí pro materiály s menším zesíťováním, výchozími surovinami jsou například kosti skotu či rybí nebo vepřové kůže. Hydratovaný surový materiál se nejdříve omyje a následně se ponoří do studené ředěné (maximálně 5%) minerální kyseliny o pH 1,5 až 4,5 po dobu 8 až 48 hodin. Parametry se volí dle tloušťky a velikosti výchozího materiálu. Po nabotnění suroviny kyselinou se materiál opět omyje vodou a neutralizuje do dosažení extrakčního pH. Pro tento způsob se nejčastěji používají kyseliny chlorovodíková, fosforečná či sírová. [25, 27]

3.1.2 Alkalický způsob úpravy

Finálním produktem vznikajícím po alkalickém způsobu přípravy je želatina typu B. Výchozí surovina, kterou jsou kůže, kosti či běháky, se omyje a společně se zásaditým roztokem o pH 12 až 13 se umístí do nádrže. Teplota je udržována do 24 °C a směs je pravidelně promíchána pomocí tyčí. Proces alkalického opracování trvá mezi 20 dny a 6 měsíci, obvykle se volí délka 2 až 3 měsíce. Během působení alkálií dojde ke zmýdelnění tuků a narušení až zničení rohoviny spolu s botněním kožní hmoty. Podmínky se opět volí vzhledem k druhu, tloušťce a velikosti výchozího materiálu. Po dokončení se opracovaný materiál omývá vodou do dosažení neutrálních podmínek. Následně se ošetří ještě ředěnou kyselinou (např. kyselinou chlorovodíkovou) pro dosažení ideálního extrakčního pH. U tohoto způsobu lze využít mnoha zásaditých látek, nejběžnější látkou k alkalickému ošetření je nasycený vápencový roztok ($\text{Ca}(\text{OH})_2$ s pH 12,0). Vedle něj se hojně využívá také hydroxid sodný (NaOH). [25]

3.1.3 Enzymatický způsob úpravy

Tento způsob předúpravy zahrnuje využití mnoha přirozeně vyskytujících se enzymů. Nejprve se izolát proteinu smíchá s vodou v poměru 1:8, následně se změří jeho pH a popřípadě upraví na hodnotu 7. Po ustálení hodnoty pH se přidá enzym a celá směs se třepe při pokojové teplotě po dobu cca 24 hodin. Poté se provede filtrace a promytí opracované suroviny, kdy dochází k částečné inaktivaci enzymu.

Po všech třech typech úpravy následuje extrakce ve vodě při zvýšené teplotě 55–100°C po dobu 2 až 8 hodin. Obvykle se provádí tři až pět za sebou následujících cyklů lišících se teplotou. Během extrakce se materiál ve vodě pomalu promíchává. Každým extrakčním cyklem se získá 3–7% želatinový roztok, s každým dalším dochází ke zvyšování extrakční teploty a současně se snižuje pevnost gelu. [25, 28]

Po získání želatinového roztoku pomocí extrakce je nutno získaný produkt podrobit důkladnému čištění, které může být provedeno více způsoby, kterými jsou filtrace, deionizace, zahuštění, sterilace a sušení. [28]

Při filtraci dochází nejdříve k separaci tří složek – nerozpustných pevných látek, tuků a vodného želatinového roztoku. Tuk je možno repurifikovat a dále využít. Želatinový roztok je pro požadovanou průhlednost několikrát filtrován. Je možno filtraci provést pomocí centrifugy přes perlit či diatomovou zeminu, častěji je však prováděna pomocí celulózových filtrů. Pro nízkomolekulární želatinu se používá mikrofiltrace pomocí membrán s pórovitostí cca 1 μm , která propouští lineární molekuly želatiny, nikoliv pak částice tukové a pevné. [28]

Ani po kondicionování a neutralizaci není želatina zbavena veškerých minerálních solí a popela, proto je nutno provést deionizaci, která toto množství sníží alespoň na povolené limity pro dané aplikace. Jinak by docházelo ke zvýšení zákalu, zhoršení fyzikálních a senzorických vlastností. Je provedena pomocí iontových výměníků nebo ultrafiltrací. [28]

Úprava koncentrace vody v želatinovém roztoku z více než 95 % sušením na cca 10 až 12 % se nazývá zahuštění. Sušená želatina má z mikrobiologické stránky neomezenou trvanlivost a snadněji se skladuje i přepravuje. Proces se provádí jednostupňovým (teplota 50 °C) nebo vícestupňovým (50–100 °C) vakuovým vypařováním. Zahušťováním, které se provádí za zvýšené teploty, se mohou v roztoku vysrážet rozpuštěné albuminy a globuliny, proto je nutno opět provést filtraci. [28]

Dalším výrobním krokem je sterilizace, která se provádí nepřímo deskovými výměníky tepla nebo přímo parou a slouží k odstranění mikrobiologických nečistot. [28]

Finálním krokem celé přípravy je sušení. Nejdříve se po sterilizaci výměníkem tepla chladí roztok, který se mění na tyčinky. Sušícím procesem dochází k šetrnému odstranění zbytkové vody působením filtrovaného čistého vzduchu o teplotě nejdříve 30 °C, která postupně roste až na 60 °C. Následně se již jen rozdrťí či rozemelou na požadovanou velikost. [28]

3.2 Vlastnosti

Želatina je křehká, sklovitá látka jemně žluté barvy bez chuti a zápachu. Je možno ji získat v mnoha formách a velikostech, které jsou od hrubých větších granulích přes tenké pláty po velmi jemný prášek. Většinou obsahuje mezi 8 až 13 % vlhkosti a její relativní hustota je v rozmezí 1,3–1,4 g.cm⁻³. Pokud dojde ke styku želatiny s chladnou vodou, dochází k hydrataci a oddělení nabotnalých částic. Když dojde k ohřevu, nabotnalé částice se rozpouští a vzniká želatinový roztok. Veškeré vlastnosti a chování roztoků želatiny je ovlivňováno teplotou a teplotní historií, obsahem popela, zvoleným způsobem výroby, pH a koncentrací. [29]

Mezi nejdůležitější vlastnosti želatiny se řadí rozpustnost ve vodě, která vzniká přítomností aminokyselin s nábojem. To vše řadí želatinu mezi povrchově aktivní hydrokoloidy. Dále je rozpustná ve vodném roztoku alkoholů např. glycerolu či propylenglykolu. Mezi silně polární rozpouštědla želatiny se řadí kyselina octová a trifluoretanol. Po rozpuštění může ochlazením dojít k zatuhnutí a vytvoření gelu, kdy po opětovném zahřátí se znovu rozpouští v tekutou látku. Naopak nerozpustná je v méně polárních rozpouštědlech, kterými jsou aceton, primární alkoholy a benzen. [29]

Pokud dochází k dlouhodobému skladování želatiny v hermeticky uzavřených nádobách za pokojové teploty, její vlastnosti se nemění. Jestliže se suchá želatina ohřeje nad 45 °C na vzduchu s relativní vlhkostí nad 65 %, želatina začne postupně ztrácet bobtnací a rozpouštěcí schopnost. U sterilního roztoku želatiny je zajištěna nekonečná stabilita pouze do doby, kdy by došlo ke zvýšení teploty. Teprve poté začíná být tento roztok náchylný k hydrolýze a nastává počátek štěpení peptidických vazeb, který je spjat se zvýšením množství volných aminových koncových skupin. Při dlouhodobém udržování teploty želatinového roztoku nad 40 °C se snižuje pevnost tvořeného gelu a viskozita želatiny. Degradace želatiny může být značně ovlivněna extrémními výkyvy pH či působením proteolytických enzymů. [29]

Želatina není jednosložkovou látkou, ale směsí frakcí složených z aminokyselin, které jsou spojeny peptidickými vazbami, tvořící polymer o molekulové hmotnosti mezi 15 000 až 400 000 Da. Želatinu tvoří následující prvky – uhlík (50,5 %), kyslík (25,2 %), dusík (17 %) a vodík (6,8 %). [29]

Vlastnosti, kterými se želatina vyznačuje lze dále rozdělit na amfoterní a koloidní. Fakt, že je želatina amfoterní znamená možnost jejího chování jako kyselina i zásada, vždy v závislosti na pH roztoku. Kyselý roztok způsobí kladný náboj želatiny, kdy bude v elektrickém poli proudit jako kation. V bazickém roztoku tomu bude přesně naopak. Pokud nastane situace izoelektrického bodu, pohyb částic i náboj budou nulové. [29]

Mezi koloidní vlastnosti patří viskozita, Bloom hodnota pevnosti, ochrana koloidního roztoku, zrnitost, koacervace a teplota tání či tuhnutí. Viskozita je důležitá z výrobního hlediska při odlévání želatinových bonbónů či kapslí. Bloom hodnota vypovídá o síle a pevnosti vzniklého želatinového gelu. Hodnota odráží průměrnou molekulovou hmotnost želatinových složek. Běžně se pohybuje od 30 do 300 Bloom (<150 pro nízkou, 150 až 220 pro střední a 220 až 300 pro vysokou pevnost gelu). Pro různé aplikace je vyžadována odlišná Bloom hodnota. [29, 30, 31]

Ochrana koloidního roztoku je spojena s Zsigmondyho zlatým číslem, které je u želatiny jako hydrofilního koloidu úplně nejnižší, a proto nám pro hydrofilní koloidy může sloužit jako stabilizátor. Zrnitost nám značí velikost částic želatiny, koacervace spočívá v tvorbě druhé kapalně fáze oddělením částic z roztoku a teplota tání udává přechod ze stavu želé do roztoku, opačnou situaci popisuje teplota tuhnutí. [29, 30]

U želatiny jsou dále posuzovány zákal, barva a obsah popela. Želatina může na cizí látky nebo látky nerozpustné působit jako ochranný koloid a stabilizovat je. Důsledkem je pak vyšší zákal, který u želatiny obvykle naznačuje sníženou kvalitu. Barva je pouze odrazem použitého výchozího materiálu a pořadí extrakce. Na rozdíl od jiných, nám vepřové kůže poskytují ve většině případů želatinu světlejší. Avšak platí, že želatina není barvou nijak ovlivňována. Množství obsažených popelovin je závislé na výchozí surovině a typu přípravy. [29, 30]

3.3 Využití želatiny

Jak už bylo zmíněno v předchozí kapitole, želatina je univerzálním hydrokoloidem, který nachází své využití v mnoha různorodých oblastech a průmyslových odvětvích v čele

s potravinářstvím a za ním následující farmacií a kosmetickými či medicínskými aplikacemi. Vedle nich se dále používá pro výrobu technické a fotografické želatiny a pro mnoho dalších aplikací. Každé z jednotlivých odvětví se následně v praxi ještě rozdělí na řadu dalších podskupin, kdy je na želatinu vždy kladeno jiných speciálních požadavků. [25]

Mezi nejdůležitější posuzované vlastnosti vzhledem k oblasti použití se dle Haunga a Drageta řadí [25]:

- termoreverzibilita tvorby gelu,
- schopnost texturování,
- kapacita navázání vody,
- schopnost zahušťování,
- tvorba a stabilizace emulzí,
- tvorba pěny,
- ochranná koloidní funkce,
- adheze/koheze.

3.3.1 Potravinářství

Potravinářský průmysl patří stále k předním spotřebitelům želatiny. U želé a želatinových dezertů se využívá termoreverzibilní tvorby gelu a tzv. rozplývající se textury. U některých mléčných výrobků a pečiva se přidává pro zvýšení kvality skladovatelných výrobků. Pokud se přidá želatinu do mléčných výrobků, zlepši se jejich emulgační schopnosti, protože dojde ke snížení povrchového napětí ve vodné fázi z důvodu interakce molekul želatiny s povrchem tukových kapek. Dále se přidává pro navázání syrovátky a zabránění vylučování vodné syrovátky u tvarohů, jogurtů a smetanových sýrů. U zmrzliny je přidáním želatiny regulována velikost a rozložení ledových krystalů, čímž se ovlivňuje její chuť, textura a stabilita nášlehu. U vína a ovocných šťáv může sloužit želatina jako čířící prostředek. [30]

Při průmyslovém zpracování masných výrobků se přidává želatina hned z několika důvodů, kterými je schopnost navázat vodu, masné šťávy, dále také pro povrchovou úpravu, zabránění rozpadu a zajištění správné textury a chuti. Přidává se především do šunek, paštik, aspiků a dekoračních želé. [25]

Široké využití nalézá želatina také v potravinách s nízkým obsahem tuků, kde slouží jako jejich náhrada, a u potravin s nízkým obsahem sacharidů, kde slouží jako vazební činidlo. [25]

V současné době se zkoumá využití želatiny pro tvorbu jedlých filmů a obalů na potraviny. Použití nalézají u masa, ryb a jiných čerstvých potravin, u kterých účinně zabraňují zhoršování kvality, inhibují růst mikroorganismů, mají antioxidační činnost a udržují senzorycké vlastnosti. Dále mají velký potenciál pro zvýšení trvanlivosti a kvality ovoce a zeleniny tím, že snižují postupnou ztrátu hmotnosti vysušením, udržují barvu a zpomalují zrání, které probíhá při působení etylenu. [32]

3.3.2 Farmacie a medicína

Ve farmaceutických a medicínských aplikacích je želatina velmi důležitou všestrannou látkou. Využití želatiny v léčivech a medicínských aplikacích je dáno především jejími vlastnostmi. Želatina je netoxická, nealergenní, biokompatibilní, vysoce kvalitní a čistá látka, která nabývá statusu GRAS (je obecně považována za bezpečnou) a je považována za farmaceutickou pomocnou látku s nízkou imunologickou aktivitou. [25]

Želatina slouží jako náhrada plazmy v nouzové medicíně a chirurgii, je součástí pastilek, tablet a obalů vitamínů, používá se na potahování tablet a mikroinkapsulaci. Využívá se jí také při výrobě pastových obvazů, houbiček, globulí a formulací nových vakcín. [25, 33]

Nejvíce se želatina ve farmacii využívá pro výrobu tvrdých a měkkých kapslí a jako pojivo účinných látek při výrobě tablet. Tvrdá želatinová kapsle je jednotkovou pevnou dávkovací formou. Sestává ze dvou částí – víčka a těla, které jsou ve tvaru otevřených válců a navzájem do sebe zapadají. Kapsle jsou plněny léčivem, nejčastěji ve formě prášku, a obě části jsou spojeny a uzamčeny. Naopak měkké želatinové kapsle jsou zcela uzavřené jednotky s viditelným podélným švem nebo zcela bezešvé. Tyto kapsle jsou vyrobeny, naplněny a uzavřeny v jednom kroku. Želatinové kapsle obsahují změkčovadla či plastifikátory (glycerol nebo sorbitol), které brání ztuhnutí materiálu kapsle. Převážně jsou využívány pro bezvodé kapaliny a pasty. [25, 30]

U potahování kapslí a tablet je mířeno nejen na snížení prašnosti, zakrytí nepříjemné chuti, ale také pro umožnění tisků či nanesení barevného povrchu pro snadnější identifikaci. Typický tabletový potah je látka schopná tvořit film, složená z želatiny, cukru a pigmentu. Při výrobě čípků je u želatiny využíváno glycerinované formy jako nosiče, který je následně zaváděn do těla. Základem je želatina, která je netoxická, šetrná ke sliznicím, kompatibilní

s různými léčivými a má při skladování stabilní bázi, která je po zavedení rozpustná v tělních tekutinách. [27]

Želatinu je možno využívat k výrobě mikroenkapsulovaných olejů, kterých se využívá jak ve farmacii, tak v potravinářství. Koacervace je metoda, kdy dochází k inkapsulaci dispergovaného oleje pomocí želatiny na rozhraní mezi vodnou a bezvodou fází. Příkladem jsou také potravinové, vitaminové či multivitaminové doplňky. [29]

3.3.3 Technická želatina

Největším rozdílem mezi technickou a potravinářskou či farmaceutickou želatinou jsou nižší požadavky a větší tolerance jejich vlastností. Z velké části jsou želatiny technické velmi podobné jako ty potravinářské. Pro jednotlivé aplikace lze využít jak typu A, tak typu B, kdy jeden druh může být pro různé aplikace upřednostňován před druhým. [29]

Prvním využitím technické želatiny je potahování a impregnace vláken, čímž se zvyšuje jejich pevnost, stabilita tvaru a odolnost vůči oděru, zároveň dochází také k minimalizaci lámání. To je způsobeno dobrou pevností a především rozpustností želatinového filmu. [29]

Pro povrchové úpravy a nátěry papíru se nanáší želatina pro vytvoření hladkého povrchu. Nátěr je nanášen samostatně nebo zároveň s jinými nátěrovými materiály. Nejdůležitější je, aby došlo k výplni všech nedokonalostí na papírovém povrchu. Díky tomu se u plakátů, časopisů, karet či tapet dosahuje kvalitnější reprodukce tisku. [27]

Další možnosti využití spočívají ve funkci ochranného koloidu pro odstraňování velmi jemných nefiltrovatelných částic z chemických roztoků, stabilizaci emulzí voděodolných látek v podobě regulace velikosti a agregace částic nebo funkci zjasňovací, pojivové či adhezivní. [29]

3.3.4 Fotografická želatina

V moderním fotografickém průmyslu došlo díky digitálním technologiím k nahrazení klasických fotografií, proto je využití želatiny už spíše historií. Výjimku lze nalézt u umělců, kteří tento typ fotografií stále využívají. Pro fotografický průmysl se pro přípravu emulzí využívá spíše želatina typu B, avšak i typ A má omezené využití pro vnější nátěry a podkladové vrstvy. [29]

Fotografické materiály moderní doby se stříbro-bromidem fungují na bázi vytvoření emulze, která obsahuje želatinu na nějakém podpurném materiálu, nejčastěji papíru nebo filmu.

Želatina zde působí jako pojivo pro fotosenzitivní stříbro-bromid. Při výrobě emulze musí při zahřívání docházet k botnání želatiny ve vodě za následného vytvoření roztoku s přídavkem halogenových solí a dusičnanu stříbrného, který po ochlazení přechází do gelové formy a vysušením pak do ztvrdnutého trvanlivého stavu. Botnací schopnost želatiny zajišťuje, že fotografické koupele, které se využívají pro průběh potřebných chemických reakcí během práce s vyvolanými fotografiemi, dokážou proniknout do emulze a mohou být snadno opláchnutím odstraněny zbytky ve vodě rozpustných solí. Následujícím krokem je opětovné rozpuštění a vytvoření gelu s přídavkem další želatiny, stabilizátorů, tužidel, senzibilátorů a barviv, které získané emulzi zvyšují citlivost k jednotlivým pásům spektra. Posledním krokem přípravy je konečné dozrávání a zajištění maximální citlivosti. Toho se docílí při zvýšení teploty nad 70 °C. Takto připravená emulze je připravena k nanesení na papír, film či kov. [25, 29]

4 ŽELATINOVÉ FILMY

Želatina se vedle všech svých vlastností, které byly popsány v kapitole 3.2, vyznačuje také schopností tvořit filmy. Mnohé studie pro přípravu jedlých či biodegradovatelných filmů využívají čisté želatiny nebo směsi s jinými biopolymery – např. proteiny, polysacharidy či lipidy. Biologicky rozložitelné filmy by mohly nacházet využití například jako ochranný vnější obal potravin. Také by mohly částečně či zcela nahradit tradiční biologicky nerozložitelné plastové obaly. Obal by měl zajišťovat nejen ochranu před světlem či kyslíkem, ale následně prodlužovat její trvanlivost a čerstvost. Proto želatinové filmy připravené za tímto účelem musí vykazovat mechanické a bariérové vlastnosti, ale také být odolná vůči okolním vlivům, jakými je vlhkost či UV záření. [34, 35, 36]

4.1 Příprava

Filmy a obaly lze připravit pomocí několika technik, kterými je lití roztoku, extruze, natírání či vrstvení. Nejčastěji používanou metodou, která je velmi jednoduchá a relativně ekonomicky nenáročná, je lití roztoku. Při tomto procesu dochází k vytvoření polymerní struktury tvorbou mezimolekulárních elektrostatických a vodíkových vazeb. Extruze poskytuje rychlejší zpracování s nižší spotřebou energie, avšak tato metoda ještě není pro tvorbu želatinových filmů dostatečně prozkoumána. Natírání a následné vrstvení je možno provést tak, že mezi jednotlivé vrstvy nebo do struktury polyelektrolytu jsou přidány jednotlivé aktivní látky. [32]

4.1.1 Lití

Lití je hojně užíváno v potravinářském průmyslu k přípravě želatinových nebo kompozitních filmů na bázi želatiny. Tato metoda spočívá v tvorbě roztoku rozpuštěním biopolymerů a jejich smícháním se změkčovadly, síťovadly či jinými přísadami. [32]

V různých studiích je provedeno lití želatinových filmů různým způsobem.

Ve studii Maira Thomazine et al. (2006) [34] byly filmy získány sušením filmotvorných roztoků (FFS), které obsahovaly 2 g želatiny na 100 ml vody a 25 nebo 55 g směsi plastifikátorů na 100 g želatiny při přirozeném pH roztoku 6,3. Směs plastifikátoru byla připravena z glycerolu a sorbitolu v poměru 0:100, 20:80, 40:60, 60:40, 80:20 a 100:0. Další postup byl odkazován na studii Sobral et al. (2001), kde byla želatina nejdříve umístěna do kádinky s vodou při teplotě místnosti a následně rozpouštěna ve vodní lázni při teplotě 55 °C. Po úplném rozpuštění byla přidána směs rozpouštědel a za mírného míchání byla

ponechána ve vodní lázni po dobu 30 minut. Tento FFS byl naléván na desku z plexiskla polymethylmetakrylátu (11,8x11,8 cm) a sušen v sušárně s cirkulací vzduchu o teplotě 30 °C a pokojové relativní vlhkosti 55–65 % po dobu 18 až 20 hodin. Filmy byly následně umístěny na 4 dny do exsikátoru s teplotou 21 °C a relativní vlhkostí 58 %. Po kondicionaci byly filmy dále testovány. [37]

V práci Jian-Hua Li et al.(2013) [38] byla želatina nejprve smíchána s vodou pro v 3% poměru (hmotnost želatiny na objem vody). Následně byla za neustálého míchání želatina ve vodě rozpuštěna a vznikl filmotvorný roztok (FFS). Do tohoto roztoku bylo přidáno 30 % glycerolu, vztaženo na hmotnost želatiny. Mimo změkčovadlo se do roztoku přidalo pět druhů různých antioxidantů (extrakt ze zeleného čaje, dva druhy extraktu z hroznových semen, zázvorový extrakt a extrakt z ginko biloby) v různých koncentracích. Pro srovnání byly připraveny také filmy bez antioxidantů. Směsi byly pro získání homogenního roztoku dále míchány při 45 °C po dobu 30 minut. Následně byly pomocí ultrazvuku odstraněny bubliny a 20 ml roztoku bylo postupně rozléváno na plechovou desku (12x8x4 cm). Pro získání filmu s rovnoměrnou tloušťkou byla deska umístěna na 36 hodin do sušárny o teplotě 22 °C. Po vysušení byly umístěny do exsikátoru, kde byly do otestování uchovávány.

4.2 Modifikace

Želatina tvoří trojrozměrnou síť se zónami mezimolekulárních mikrokrytalických vazeb, které při dehydrataci zajišťují filmu vysokou křehkost a propustnost pro vodní páry. Proto jsou želatinové filmy podrobeny modifikacím přidávkem změkčovadel či síťovadel. [35]

4.2.1 Změkčovadla

Přidání změkčovadel zajišťuje snížením mezimolekulárních sil snížení inherentní křehkosti filmu, tím se naopak zvyšuje jeho flexibilita, pružnost i zpracovatelnost. Schopnost interakce změkčovadla a želatinových řetězců ovlivňuje složení, velikosti i forma molekul změkčovadla. Menší, vysoce polární skupiny molekuly poskytují vyšší plastifikaci. Proto je vždy pro jednotlivé aplikace důležitý výběr vhodného, kompatibilního a trvanlivého plastifikátoru. [34, 35, 39]

Vhodnými účinnými látkami pro plastifikaci želatinových filmů se jeví polyoly, které jsou schopny jak snížit mezimolekulární vodíkové vazby, tak zvýšit mezimolekulární prostor. Z tohoto důvodu se často využívá především glycerol a sorbitol, dále etylenglykol nebo xylitol. [35, 39]

Glycerol i sorbitol jsou považovány za velmi dobrá změkčovadla pro želatinové filmy, proto se často používají v různých studiích. Nicméně při použití glycerolu jsou filmy velmi citlivé na přítomnost vody a při vyšší relativní vlhkosti může nastat migrace změkčovadla na povrch filmu. Sorbitol při svém použití může začít při nízké teplotě a střední relativní vlhkosti krystalizovat. [35]

Dalšími možnými látkami se změkčujícím účinkem pro želatinu jsou monosacharidy – glukóza, manóza, fruktóza a sacharóza či disacharidy nebo oligosacharidy. Mohou se použít také mastné kyseliny. Všechna tato uvedená změkčovadla jsou hydrofilní. Potenciálním hydrofobním změkčovadlem pro biodegradabilní látky jsou citrátové estery odvozené od kyseliny citronové, avšak pro filmy se běžně nepoužívají. [39]

Změkčovadly je tedy pozitivně ovlivněna především struktura filmu, dochází ke zlepšení mechanických vlastností. Avšak s vylepšením tahové pevnosti a prodloužení filmu s sebou použití změkčovadel nese snížení bariérových vlastností proti pronikání vody. Proto jsou do želatinových filmů přidávána síťovadla. [39]

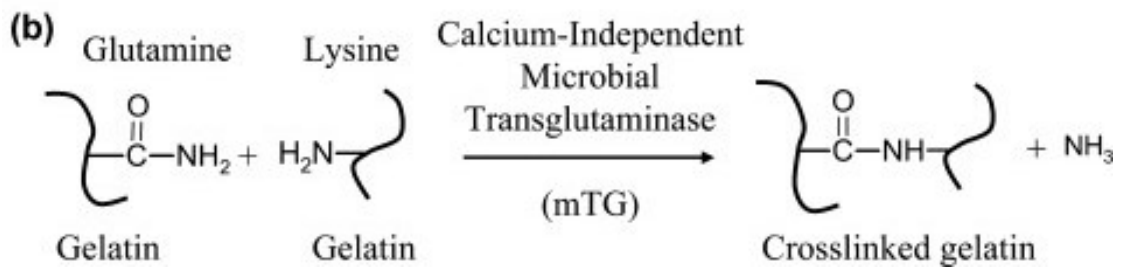
4.2.2 Síťovadla

Pro zajištění uspořádané struktury a vytvoření pevných iontových nebo kovalentních vazeb mezi řetězci je nutné, aby došlo k zesíťování želatinových filmů. Po vytvoření sítě jsou ovlivněny nejen mechanické vlastnosti, kdy dochází ke zvýšení napětí v tahu a snížení prodloužení při přetržení, ale i vlastnosti bariérové, kdy je snížena propustnost pro vodní páry, oxid uhličitý i kyslík. Dále ovlivňují i barvu a rozpustnost želatinových filmů. [40]

Síťování je možno provést enzymaticky (transglutamináza), chemicky (formaldehyd, glutaraldehyd) nebo fyzikálně (UV nebo gamma záření). [41]

4.2.2.1 Enzymatická

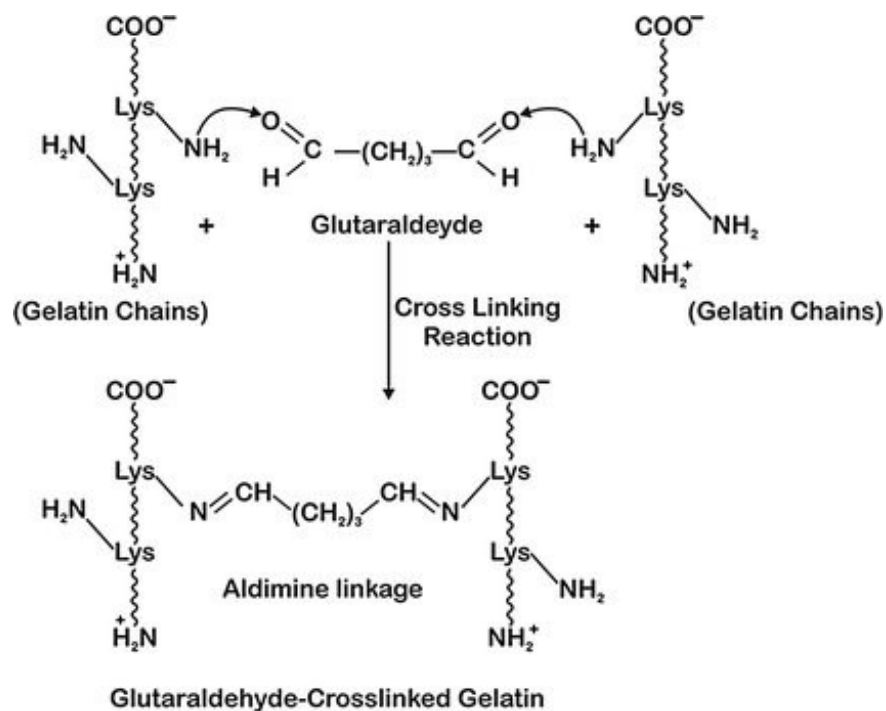
Transglutamináza (TGA) jako síťovací činidlo poskytuje filmům vyšší odolnost vůči vodě, zlepšené mechanické, bariérové i tepelné vlastnosti (Obrázek 2). Může katalyzovat vznik isopeptidové vazby mezi γ -karboxamidovou skupinou zbytků glutaminu (donor acylu) a ϵ -aminoskupinou zbytků lysinu (akceptor acylu). Vznik vazeb probíhá intra i intermolekulárně. Mimo to jsou filmy modifikované transglutaminázou stravitelné pro lidský organismus. [40]



Obrázek 2: Enzymatické síťování želatiny [42]

4.2.2.2 Chemická

U aldehydů, mezi které se řadí například glutaraldehyd či formaldehyd, byla také prokázána schopnost reagovat s proteiny. Reakcí želatiny s glutaraldehydem probíhá tvorba sítě, která je způsobena vznikem Schiffovy báze, kondenzací formylových skupin aldehydů a ϵ -aminoskupin lysinu a hydroxylysinu, které jsou přítomny v želatině (Obrázek 3). Glutaraldehyd je hojně využíván především pro svoji nízkou cenu, netoxicitu, krátkou dobu reakce a vynikající síťovací účinek u kolagenů a želatin. Síťování glutaraldehydu se želatinou se vyznačuje jiným průběhem v kyselém a alkalickém prostředí. Hydroxylové skupiny reagují v kyselém prostředí s aldehydovými skupinami pomocí protonace ϵ -aminoskupin, zatímco v přítomnosti alkálií vzniká více volných aminoskupin pro vznik Schiffovy báze. U formaldehydu nastávají jisté nevýhody, které především spočívají v toxicitě, zápachu a obtížné kontrole probíhající reakce. [43, 44]



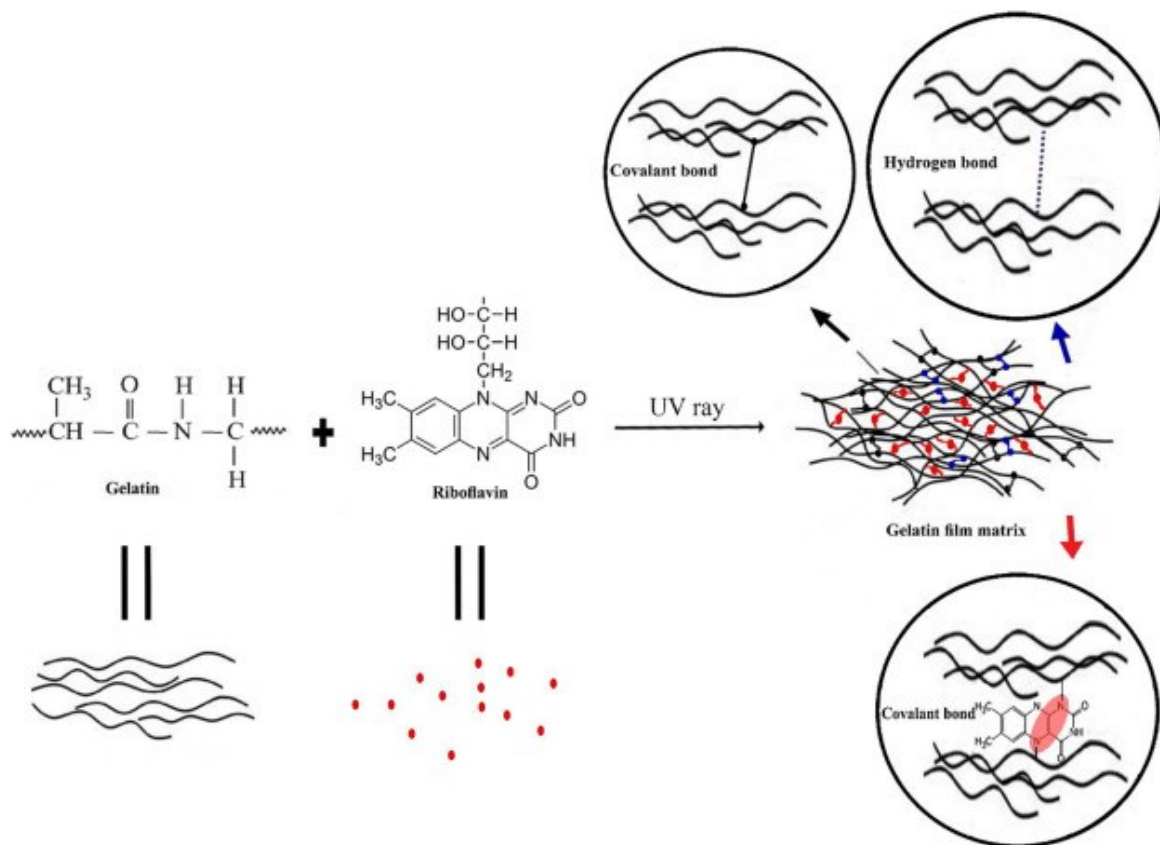
Obrázek 3: Chemické síťování želatiny [45]

4.2.2.3 Fyzikální

Polymerace mezi funkčními skupinami polymerních řetězců, která je aktivovaná expozicí světla za přítomnosti či bez fotoiniciátorů se nazývá fotochemické síťování, které je velmi účinným procesem pro vytvoření správné interakce mezi biopolymery. Tento typ se vyznačuje snadno ovladatelnými parametry, kterými jsou intenzita světla, doba expozice a vzdálenost ozařování. Dochází při něm ke generování vysoko reaktivních volných radikálů vznikajících fotoštěpením. Vznikající volné radikály jsou intra- nebo mezimolekulárně vázány kovalentními vazbami s molekulami v biopolymeru. Pokud jsou přítomny fotoiniciátory, dochází k absorpci fotonů světla a přeměně světelné energie na chemickou. [41, 46]

Světlem iniciované reakce probíhají po aktivaci funkčních skupin, kdy napomáhají k síťování polymerů, modifikaci povrchů a imobilizaci látek v biopolymerech. Tento typ lze využít jak pro dvoudimenzionální, tak pro trojdimenzionální struktury s vysokou selektivitou a účinností bez vzniku toxických nebo reaktivních vedlejších produktů. [46]

Dle studie Masoumeh Taghizadeh et al. (2018) [41] je nutno fyzikální síťování provádět za přítomnosti UV fotosenzitizujících látek v biopolymeru. Po UV ozáření dochází k tvorbě různých radikálových sloučenin – kyslík, senzibilizátor a želatina (více popsáno v kapitole 5). Tato reakce vznikajících radikálů umožňuje tvorbu vazeb mezi řetězci želatiny či mezi řetězcem želatiny a senzibilizátorem. Ve fotooxidaci je užívanou látkou senzitivní na UV záření riboflavin (Obrázek 4). Kontrolními vzorky jsou poté vzorky zesíťované pomocí UV záření bez riboflavinu.



Obrázek 4: Fyzikální síťování želatiny [41]

5 FOTODEGRADACE

Při působení okolního prostředí může docházet u jednotlivých polymerů ke zhoršování vlastností neboli degradaci materiálu. Změny mohou nastávat u barevnosti, mechanických vlastností nebo se mohou u polymerů začít objevovat praskliny či trhliny na povrchu materiálu. [47]

Degradace makromolekul mohou zahrnovat fyzikální (rekrytalizace nebo denaturace proteinů) nebo chemické procesy. Chemické procesy spojené s degradací mohou vést ke snížení molekulové hmotnosti štěpením vazeb mezi makromolekulami nebo ke zvýšení molekulové hmotnosti důsledkem síťování řetězců, které vede ke snížení rozpustnosti. [48]

Existuje mnoho druhů degradace – termodegradace (působení zvýšené teploty), mechanodegradace (působením mechanického napětí), chemodegradace (působení reakčních kapalin a plynů), biodegradace (působení enzymů a mikroorganismů), radiační (působení elektromagnetickým zářením kratších vlnových délek) a fotodegradace (působení UV záření). Jak již bylo uvedeno, fotodegradace probíhá interakcí materiálu a slunečního světla, kterého je UV záření součástí. [47]

Sluneční radiace, která dosahuje na zemský povrch, je složena především z radiace elektromagnetického spektra, konkrétně pak oblasti viditelného, infračerveného a ultrafialového záření. Okolo 40 % z celkového slunečního světla patří do infračerveného spektra. Vyznačuje se vlnovou délkou větší než 700 nm a při působení dochází u většiny materiálů pouze k ohřevu. Dalších cca 50 % je v oblasti viditelného spektra s vlnovou délkou 400 až 700 nm. Působením dochází opět k ohřevu materiálu, ale navíc může docházet k iniciaci fotochemických reakcí. Zbylých 10 % je součástí ultrafialového spektra o vlnové délce 290 až 400 nm. Spodní hranice je určena filtrujícím účinkem ozonové vrstvy v atmosféře, která má za úkol zabraňovat UV záření v proniknutí k zemskému povrchu. V laboratorních podmínkách se může provádět urychlené stárnutí pomocí různých zdrojů záření, kterými jsou xenonová a rtuťová výbojka nebo výkonné lasery. [47, 49]

5.1 Energie záření

Infračervené záření, viditelné světlo, UV světlo, rentgenové a gama záření jsou složky elektromagnetického záření. Každá zvlášť je samostatnou formou, která se šíří v prostoru jako vlny elektrických a magnetických polí. Elektromagnetické vlny v závislosti na svých frekvencích nesou určité množství energie. [49]

Toto množství energie je možno vypočítat pomocí Planckova zákona [49]:

$$E = h \cdot f \quad (1)$$

E ... energie záření [J]

h ... Planckova konstanta [J·s]

f ... frekvence [$1 \cdot s^{-1}$]

Frekvence záření je závislá na podmínkách, za kterých vzniká. Platí, že při zvyšování teploty se celé světelné spektrum posouvá doleva a dochází k vyzařování více UV a viditelného světla. [49]

5.2 Absorpce záření

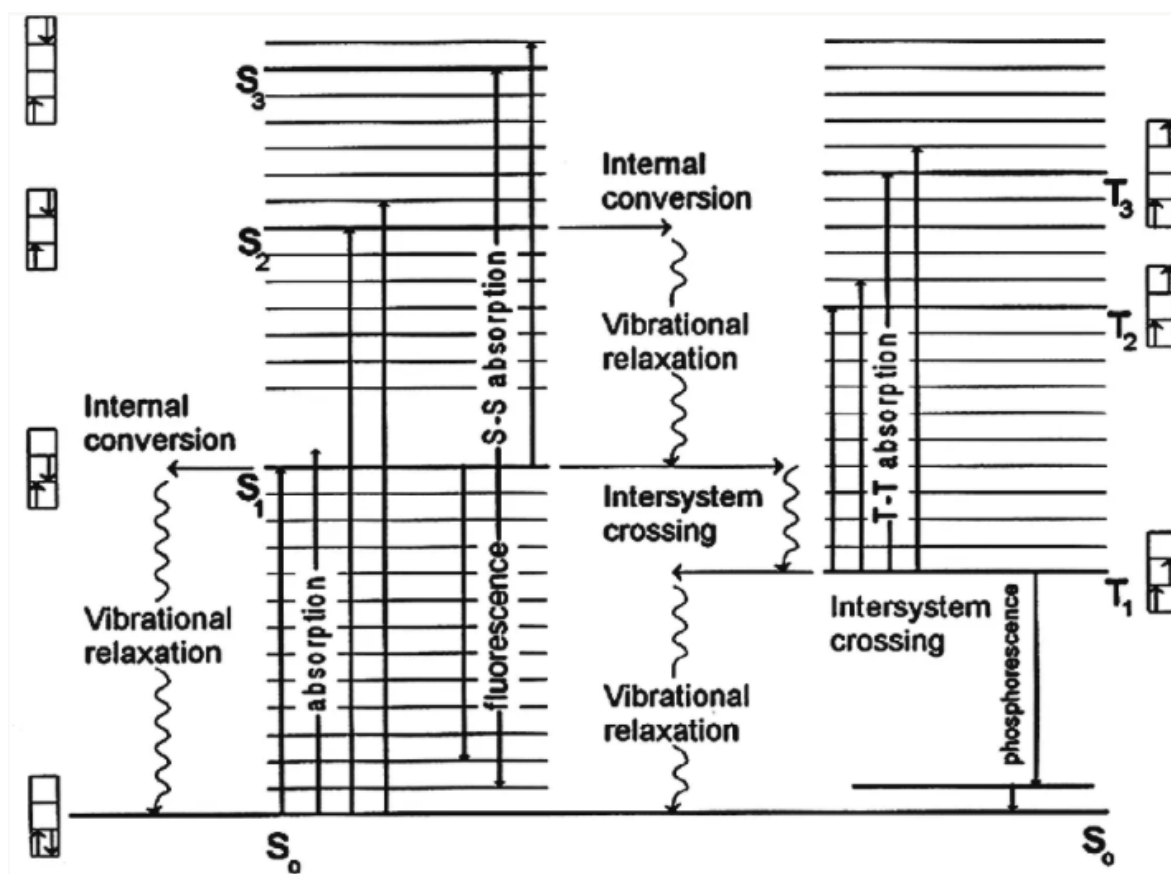
Předpokladem pro vznik fotochemických reakcí je absorpce světla. Vystavení materiálů slunečnímu záření zajišťuje příjem široké škály energie. Absorpce příchozí energie probíhá v jednom stupni tak, že veškerá energie jednoho fotonu je buď pohlcena nebo odmítnuta. Pokud dochází k pohlcení UV záření, nastává u molekuly excitovaný stav. Tento stav nastává pouze tehdy, když se rozdíl energií před a po absorpci fotonu rovná hodnotě hf . O tom, zda dojde k rozrušení vazeb mezi atomy, rozhoduje množství přijaté energie. [47, 50]

Absorpci světla dobře vyjadřuje Jablonskeho diagram (Obrázek 5). Nejdříve dochází k absorpci energie elektrony v molekule polymeru. V závislosti na energii, která byla molekulou absorbována, dochází k přesunu elektronu ze základního energetického stavu do vyšší hladiny. Dochází buď k disipaci pohlcené energie na vyzáření pomocí fluorescence či fosforescence nebo u neradiativních procesů k přeměně pohlcené energie. Neradiativní proces, který je závislý na rovnováze molekulové energie a chemické struktury excitované molekuly, může vést k různým procesům závislým na prostředí (štěpení na volné radikály, abstrakce vodíkového atomu, fotosenzibilizace, rozklad na dvě nebo více molekul, fotodimerizaci, fotoizomerizaci, přestavbě uvnitř molekuly či zesíťování). Tyto primární reakce jsou často následovány sekundárními, což je reakce s kyslíkem, ozonem nebo fotooxidace. [47, 50]

Přesnější vysvětlení diagramu spočívá v počátečním základním stavu (S_0), který zaujímá za normálních podmínek velká většina organických molekul. V této situaci se v molekulách vyskytují spárované elektrony s opačným spinem. To znamená, že se nachází v singletovém stavu, který se vyznačuje nejnižší energií. Jablonského diagram vyznačuje všechny možné výsledky, které mohou nastat po absorpci energie. Molekuly se mohou nacházet buď

v singletovém nebo tripletovém stavu s paralelními spiny. Přechod ze základního stavu (S_0) do tripletového stavu není možný, přechod do tripletového stavu může proběhnout pouze po vzniku excitovaného singletového stavu. [50]

Podle množství pohlcené energie dochází ke změně základního stavu na jeden ze stavů S_1 , S_2 nebo S_3 , které mají vyšší energii. Bez ohledu na energetický stav může probíhat disipace molekul, izomerizace či kombinace obou. Při vyšších energetických stavech (S_2 a S_3) se stává molekula náchylnější k radiaci konverzí a naopak se stává nepravděpodobné, že u ní dojde k fluorescenci. Stejně jako pro singletový, u tripletového stavu může dojít po další absorpci energie k posunutí do stavu s vyšší energií, kdy opět probíhá disociace a izomerizace. [50]



Obrázek 5: Jablonskeho diagram [50]

5.3 Fotochemie

Chromofory jsou funkční skupiny, které jsou schopny pohlcovat UV záření. Fotochemická reakce je zahájena právě tehdy, pokud se v polymerech chromofory vyskytují. Probíhající reakce může způsobit štěpení polymerních řetězců nebo naopak jejich zesíťování. [48, 51]

Mezi nejčastěji vyskytující se chromofory řadí [52]:

- nenasycené vazby,
- karbonylové skupiny,
- karboxylové skupin.

5.4 Fotodegradace želatinových filmů

V práci Marieli Rosseto et al. (2020) [52] se provádělo urychlené stárnutí filmů vyrobených z kukuřičného škrobu a želatiny. Cílem studie bylo zjištění účinku enzymatického ošetření transglutaminázou na degradační chování filmů. Byly připraveny filmy s přídavkem enzymu a filmy bez enzymu, které sloužily jako kontrolní vzorky. Charakterizace filmů v této studii zahrnovala rozpustnost ve vodě, propustnost pro vodní páry, měření mechanických vlastností, tloušťky, aktivity vody, tepelných vlastností a přítomnosti funkčních skupin. Následně byly filmy po dobu 64 hodin vystaveny třem typům urychleného stárnutí – tepelnému stárnutí, ultrafialovému záření a vlhkosti.

Před stárnutím byly filmy s i bez enzymu otestovány. Filmy s přídavkem transglutaminázy vykazovaly před ozářením nižší tloušťku, lepší mechanické vlastnosti, nižší rozpustnost ve vodě a propustnost pro vodní páry, aktivita vody byla téměř totožná. Avšak pro porovnání s touto diplomovou prací jsou důležité výsledky bez přidaného enzymu. [52]

Při vystavení filmů urychlenému stárnutí (0 až 64 h) pomocí UV záření docházelo s delší dobou stárnutí u vzorků bez enzymu k následujícím změnám mechanických vlastností [52]:

- snížení pevnosti v tahu o 68 %,
- nárůst prodloužení při přetržení o 13 %.

Z FTIR spektroskopie je z grafu patrné, že vzorky bez enzymu vykazovaly větší změny v konformaci. Během UV ozáření mohlo docházet k rozpadu vazeb mezi $-CN=$ a $-CH_2$ skupinami a mohlo tak dojít k tvorbě radikálů. Tato skutečnost se projevila snížením intenzity píku v rozmezí $3\ 500$ a $2\ 980\ \text{cm}^{-1}$. U filmů došlo k dalšímu poklesu centralizovaného pásu mezi $1\ 542$ a $1\ 538\ \text{cm}^{-1}$, tato změna odpovídá oblasti amidu II, což znamená změnu sekundární struktury proteinu. [52]

Z křivky termogravimetrické analýzy vyplývá, že u filmů byly pozorovány tři stádia dekompozice. První fáze ztráty hmotnosti probíhala okolo $100\ ^\circ\text{C}$ a značila ztrátu povrchové i uvnitř navázané vody spojenou s rozpadem vodíkových můstků. Druhý pokles hmotnosti

začínal při 250 °C a byl spojený s degradací méně stabilních komponentů – glycerolu a želatiny. V tuto chvíli začala molekulární modifikace komponentů přítomných ve filmu. Třetí fáze okolo 300 °C znamenala degradaci proteinu depolymerací želatinových makromolekul. [52]

Studie Cheng-Kuo Wu (2019) [53] se zabývala účinkem UV záření na pevnost gelu, tepelné vlastnosti, molekulární hmotnost bílkovin a funkční skupiny komerčně dostupných vzorků rybí želatiny. Test byl prováděn na prášku rybí želatiny z kůže tilapie, který byl vystaven UV záření po dobu 0 až 6 hodin. Výsledky ukázaly, že barva prášku se po ozáření postupně měnila z jasně bílé na mírně nažloutlou. Pevnost gelu a teplota tání želatiny se výrazně zvýšila, ale nejvyšší hodnoty dosáhla po dvouhodinovém ozáření. Když došlo k delšímu ozáření než 2 hodiny, nebylo už pozorováno žádné další významné zvýšení pevnosti gelu a teploty tání, avšak vzorky žloutly. Proto byla jako optimální doba ozáření stanovena 2 hodiny.

Elektroforéza gelu a optické spektrální analýzy ukazovaly, že s vyšší dávkou UV záření došlo k degradaci želatinových makromolekul a k jejich hromadění u dna. FTIR a Ramanova spektra tato zjištění potvrdila. U FTIR spektra byly pozorovány nepatrné změny u amidu I, II a III. S dávkou záření došlo také k posunutí vrcholu amidu B. Tato situace je ve výzkumu vysvětlena možným zesíťováním, které může nastat u želatiny po vystavení UV záření. [53]

Studie Masoumeh Taghizadeh et al. (2018) [41] zkoumala metodu zesíťování indukovaného pomocí fotosenzibilizátoru (riboflavinu) ke zlepšení strukturních a chemicko-fyzikálních vlastností u potravinářských filmů na bázi želatiny s různou koncentrací glycerolu (25 a 50 %) při různých dobách expozice UV záření (2,4 a 6 hodin). Jako kontrolní vzorky byly připraveny filmy s 25 % glycerolu, které neobsahovaly riboflavin, kdy jedna série kontrolních vzorků nebyla ozářena a druhá byla vystavena UV záření.

Výsledky studie po vystavení filmů UV záření byly následující [41]:

- vyšší množství glycerolu zvyšuje rozpustnost ve vodě,
- rozpustnost a propustnost pro vodní páry s delší dobou ozáření klesala,
- pevnost v tahu s delší dobou ozáření rostla,
- prodloužení při přetržení bylo po ozáření vyšší než u kontrolního vzorku,
- s vyšším obsahem glycerolu klesala pevnost v tahu a rostlo prodloužení při přetržení,

- u FTIR spektra byla u ozářených vzorků (6 h) bez riboflavinu zaznamenána vyšší intenzita peaků,
- UV záření způsobilo také posunutí peaků amidu A, II a III – pravděpodobnost zesíťování mezi funkčními skupinami želatiny.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce byla příprava a charakterizace želatinových filmů s přídavkem glycerolu a studium vlivu UV-záření na vlastnosti. Želatina pro výrobu filmů byla připravena z kuřecích běháků, které jsou řazeny mezi vedlejší produkty jateční výroby a jsou často bez dalšího využití. Želatinové filmy by při splnění dostatečných mechanických a bariérových vlastností mohly nalézt perspektivní využití jako obaly na potraviny. Velmi důležitá je také trvanlivost obalu a jeho stabilita např. při vystavení venkovním podmínkám, zejména UV-záření. Použitý obal by měl potravině poskytovat především dostatečnou ochranu a přispívat k prodloužení její trvanlivosti.

V této diplomové práci byly vytyčeny následující cíle:

- Příprava dvou sérií želatinových filmů, které se liší v koncentraci změkčovadla v podobě glycerolu – 30 a 40 %;
- Testování vlastností připravených želatinových filmů bez vystavení UV-záření;
- Fotodegradace želatinových filmů pomocí xenonové komory a UV-záření v různých časových intervalech (1 až 16 hodin);
- Testování, analýza a porovnání vlivu UV záření a rozdílné koncentrace změkčovadla na želatinové filmy.

7 PŘÍPRAVA ŽLATINOVÝCH FILMŮ

7.1 Použitý materiál

Výchozím materiálem byly kuřecí běháky, které byly dodány v surovém zmraženém stavu. Po důkladném opracování byla z běháků extrahována želatina, která byla použita na přípravu želatinových filmů.

7.2 Příprava želatiny

I. Příprava čistého kolagenu

Promytí ve studené vodě

V tomto kroku dochází k odstranění albuminů ze suroviny. Na kuchyňském sítu se nejdříve surovina promývala studenou vodou po dobu 2 minut, poté byla na 5 minut vložena do nádoby se studenou vodou. Následně se opět promývala na sítu po dobu 2 minut.

Opracování v 0,2M NaCl

Promytá surovina se smíchala s 0,2M NaCl v poměru 1:6. V Erlenmayerově baňce se umístila na třepačku a byla opracovávána při pokojové teplotě po dobu 90 minut. Poté se přefiltrovala přes kuchyňské síto s jednou vrstvou polyamidové tkaniny a byla promývána po dobu 1 minuty. V tomto kroku došlo k odstranění globulinů.

Opracování v 0,03M NaOH

Po promytí se surovina umístila do 0,03M NaOH v poměru 1:6, který slouží k odstranění glutelinů. V Erlenmayerově baňce se opět umístila na třepačku a při pokojové teplotě byla třepána po dobu 45 minut a poté filtrována přes síto s jednou vrstvou polyamidové tkaniny. Tento postup byl proveden dohromady čtyřikrát. Po posledním opracování se surovina promyla studenou vodou po dobu jedné minuty.

Přesušení

Surovina byla poté rozprostřena na plech a sušena při 35 °C po dobu 48 hodin.

Odtučnění suroviny rozpouštědlem

Vysušená surovina se smíchala se směsí rozpouštědla (petrolether/ethanol v poměru 1:1) v poměru cca 1:6. Odtučnění trvalo tři dny, kdy každý den bylo vyměněno rozpouštědlo. Po dokončení posledního třepání se surovina přefiltrovala a na plechu ponechala přes noc v digestoři pro odpaření zbylého rozpouštědla.

Rozemletí čistého kolagenu

Surovina se rozemlela pomocí laboratorního mlýnku na jemnost cca 1 mm. V temnu a uzavřené nádobě je trvanlivost suroviny kolem jednoho měsíce.

II. Extrakce želatiny z čistého kolagenu

Neutrální opracování suroviny enzymem

Rozemletá surovina se v poměru cca 1:10 smíchala s destilovanou vodou a mírně se míchala po dobu 20 minut. Požadované pH tohoto roztoku je 6,5 až 7,0, proto se na tuto hodnotu upravila pomocí 10% roztoku HCl. Po dosažení ideálního pH se přidalo 0,4 % proteolytického enzymu Protamex vztaženo na sušinu suroviny (cca 90 % původní hmotnosti suroviny před smícháním s destilovanou vodou). Tento roztok se umístil na třepačku a třepal se za pokojové teploty po dobu 15 hodin. Enzymaticky opracovaná surovina se přefiltrovala přes sítko s třemi vrstvami polyamidové a dvěma vrstvami polyesterové tkaniny.

Promytí

Hydrolyzát se vylil a surovina se promývala studenou vodou po dobu 5 minut do odstranění co největšího množství enzymu.

Extrakce první (hlavní) frakce želatiny

Promytý materiál se opět smíchal s destilovanou vodou (poměr 1:10), probíhalo míchání po dobu 5 minut a následně se změřilo pH. Poté se za stálého míchání provedla první extrakce při teplotě 70 °C po dobu 2 hodin. Po ukončení extrakce se provedla filtrace přes sítko se třemi vrstvami polyamidové tkaniny. Přefiltrovaný roztok se přivedl k varu a držel se při něm po dobu 5 minut pro inaktivaci enzymu. Převařený želatinový roztok se rozlil na plechy a byl sušen při teplotě 53 °C po dobu 36 hodin. Po vysušení byla první frakce želatiny zvážena.

Extrakce druhé (vedlejší) frakce želatiny

K nerozloženému podílu se přidala destilovaná voda v poměru 1:10. Směs se míchala po dobu 5 minut a následně se znovu změřilo pH. Poté se provedla druhá extrakce za stálého míchání při teplotě 85 °C po dobu 2 hodin. Po ukončení extrakce se surovina filtrovala přes sítko se třemi vrstvami polyamidové tkaniny. Přefiltrovaný roztok se přivedl k varu a držel se při něm po dobu 5 minut pro inaktivaci enzymu. Převařený želatinový roztok se rozlil na plechy a sušil při teplotě 53 °C po dobu 36 hodin. Vysušené množství se zvážilo.

Nerozložený podíl

Nerozložený podíl po ukončení druhé extrakce se vysušil při 103 °C přes noc a zvažil.

7.3 Charakterizace želatiny

Připravená želatina byla charakterizována pomocí pevnosti Bloom.

Pevnost želatinového gelu dle Blooma spočívá ve vtlačení válečku s průměrem 1,27 cm do připraveného gelu za přesně definovaných laboratorních podmínek. Nejdříve je želatina rozpuštěna v destilované vodě pro vznik gelu s koncentrací 6,67 %. Při použití speciální kádinky o výšce 5,5 cm s vnějším průměrem 6,6 cm a vnitřním 5,9 cm je pro vznik gelu o požadované koncentraci naváženo 7,5 g želatiny na 105 g destilované vody. Želatina je v destilované vodě nechána nejdříve nabobtnat a poté je za stálého míchání rozpuštěna ve vodní lázni o teplotě 35 °C. Roztok je umístěn na 24 hodin do lednice. Po uplynutí doby je kádinka s gelem vyjmuta z lednice a podrobena testu pevnosti gelu.

Výsledná hodnota pevnosti je v jednotkách Bloom, a značí zátěž neboli sílu v gramech, kterou je nutno vyvinout k tomu, aby došlo ke stlačení testovaného želatinového gelu o 4 mm.

V této práci byly použity kádinky o výšce 5 cm s vnějším průměrem 4 cm a vnitřním průměrem 3,5 cm, proto byla získaná hodnota z přístroje Stevens-LFRA Texture Analyzer (Obrázek 6) vydělena přepočítávacím faktorem 1,64.



Obrázek 6: Analyzátor textury; Mechtric Stevens-LFRA Texture Analyzer

7.4 Příprava želatinových filmů

Želatinové filmy byly připraveny litím roztoku do silikonových forem. Byly připraveny dvě série filmů lišící se obsahem změkčovadla, kterým byl glycerol. Nejdříve byla navážena želatina pro vznik 20% roztoku. Na každý film byla použita samostatná silikonová forma o rozměrech 7x12,5 cm, proto ideální množství roztoku bylo 20 ml, které vzniklo navážením 4 g želatiny na 16 ml demineralizované vody. Takto připravené roztoky byly rozlišeny do dvou sérií, kdy k první sérii bylo přidáno 30 % a k druhé 40 % změkčovadla glycerolu. Jeho množství bylo vztaženo na hmotnost želatiny, proto 30 % představovalo 1,2 g a 40 % 1,6 g. Želatina, glycerol i demineralizovaná voda byly převedeny do kádinky a ve vodní lázni o teplotě 35 °C byla směs míchána do rozpuštění. Roztok byl následně litím převeden do silikonového rámečku a sušen při teplotě 35 °C po dobu 24 hodin.

7.5 Označení vzorků

Připravené vzorky byly před vystavením urychlenému UV-stárnutí označeny v závislosti na dvou parametrech – koncentraci glycerolu a době ozáření. Přehled značení testovaných vzorků zobrazuje Tabulka 1.

Tabulka 1: Značení testovaných vzorků

Označení vzorku	Koncentrace glycerolu [%]	Doba ozáření [h]
30_0	30	0
30_1	30	1
30_2	30	2
30_4	30	4
30_8	30	8
30_16	30	16
40_0	40	0
40_1	40	1
40_2	40	2
40_4	40	4
40_8	40	8
40_16	40	16

8 METODY CHARAKTERIZACE ŽELATINOVÝCH FILMŮ

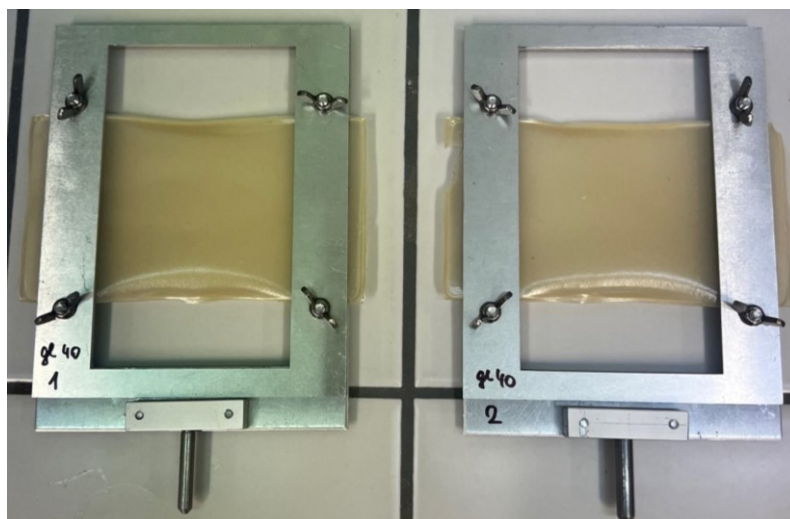
8.1 Urychlené stárnutí

K urychlenému UV-stárnutí neboli fotodegradaci byl použit Xenotest ALPHA+ (Obrázek 7). Vzorčky byly ozařovány xenonovou lampou při teplotě 35 °C a relativní vlhkosti 50 %. Expozice UV záření za 1 hodinu byla 215 kJ/m².



Obrázek 7: Xenonová komora ATLAS Xenotest ALPHA+

Filmy byly umístěny do speciálních kovových držáků (Obrázek 8) a vystaveny UV záření, a to pouze z jedné strany. Vzorčky byly odebírány v intervalech 0, 1, 2, 4, 8 a 16 hodin. Každý vzorek byl následně testován.



Obrázek 8: Uchycení želatinových filmů v xenonové komoře

8.2 Rozpustnost a botnání

Rozpustnost vzorků ve vodě byla pozorována pomocí schopnosti vzorků bobtnat. Zároveň byl sledován interval, po který je vzorek schopen vydržet ve vodě, aniž by se začal rozpadat.

Nejprve byly sušeny vzorky při 35 °C po dobu 24 hodin. Vysušené vzorky byly zváženy, umístěny do destilované vody a po určitých intervalech (0,5, 1, 2, 4, 10, 24, 36, 48 a 60 hodin) byly vytaženy a zváženy. Vzorky byly obkresleny na milimetrový papír, vypočítána jejich plocha. Byla změřena také tloušťka nabotnalého vzorku pro získání objemu.

Stupeň nabotnání neboli botnavost byl vypočítán jako nárůst objemu nabotnalého vzorku vztažen na objem původního nenabotnalého vzorku v procentech pomocí rovnice:

$$\text{botnavost} = \left(\frac{V_0}{V_t} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

kde:

V_0 ... počáteční objem nenabotnalého vzorku [mm^3]

V_t ... objem vzorku po určitém intervalu botnání [mm^3]

8.3 Paropropustnost

Pro měření propustnosti pro vodní páry byly připraveny vzorky filmů s průměrem cca 3,8 cm. Vzorky nebyly nijak sušeny, byly po ukončení fotodegradace pouze umístěny do exikátoru a ponechány v něm do provedení testu. Do kalíšku s otvorem bylo naváženo ± 25 g vysušeného silikagelu a následně položen vzorek upevněný mezi dvě gumová těsnění tak, aby překrýval celý otvor. Kalíšek byl uzavřen víčkem s otvorem. Silikagel byl sušen při teplotě 150 °C po dobu 20 hodin. Pro každý čas degradace byl připraven jeden vzorek.

Připravené kalíšky byly vloženy do klimatické komory, která byla nastavena na teplotu 37 °C s relativní vlhkostí 50 %. Vzorky byly z komory vyjmuty a váženy v časovém intervalu 24 hodin, kdy byl pozorován přírůstek jejich hmotnosti.

Naměřené výsledky byly vyneseny do grafu závislosti hmotnosti na čase v klimatické komoře. Propustnost pro vodní páry q byla vypočítána podle rovnice:

$$q = \frac{240 \cdot \Delta m}{S \cdot \Delta t} \quad (3)$$

kde:

q ... propustnost pro vodní páry [$\text{g} \cdot \text{m}^{-2}$]

Δm ... rozdíl hmotnosti za dobu měření [mg]

S ... plocha testovaného vzorku [cm²]

Δt ... doba měření [h]

8.4 Spektrofotometrie

Pomocí spektrofotometru HunterLab UltraScan Pro D65 (Obrázek 9) byly u jednotlivých vzorků měřeny barevné souřadnice, index žlutosti YI (podle normy ASTM E313) a zákal (podle normy ASTM D1003), a to metodou na průchod. Barva vzorků byla vyjádřena ve stupnici CIE Lab jako hodnoty L^* , a^* a b^* .

Následně byly vyhodnoceny celkové rozdíly v barvě jednotlivých vzorků od standardu (počátečního vzorku před ozáření) s 30 % glycerolu a hodnotami – $L^* = 89,62$, $a^* = -0,85$ a $b^* = 12,17$ a standardu s 40 % glycerolu – $L^* = 88,91$, $a^* = -0,33$ a $b^* = 12,26$.

Rozdíl barevnosti byl vypočítán dle rovnice:

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (4)$$

kde:

ΔE^* ... rozdíl v barvě mezi vzorkem a standardem

ΔL^* ... rozdíl mezi barevným parametrem L^* vzorku a standardu

Δa^* ... rozdíl mezi barevným parametrem a^* vzorku a standardu

Δb^* ... rozdíl mezi barevným parametrem b^* vzorku a standardu



Obrázek 9: Spektrofotometr HunterLab UltraScan Pro D65

8.5 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

U jednotlivých filmů byla pomocí infračerveného spektroskopu s Fourierovou transformací Bruker ALPHA (FTIR, Obrázek 10) změřena spektra metodou ATR s platinovým krystalem, a to vždy na straně orientované směrem k lampě při fotoexpozici. Jako kontrolní vzorek byl použit film bez UV ozáření. Vzorky byly vystaveny infračervenému světlu v intervalu vlnových délek od 400 cm^{-1} do 4000 cm^{-1} . Celkově bylo během jednoho měření pořízeno 32 snímků.



Obrázek 10: Infračervený spektroskop s Fourierovou transformací Bruker ALPHA II

8.6 Diferenciální skenovací kalorimetrie

Diferenciální skenovací kalorimetr Mettler Toledo DSC1 (Obrázek 11) se využil pro sledování tepelných vlastností připravených vzorků. Sledovanými parametry při analýze jsou teplota skelného přechodu a teplota tání. Pro testování byly připraveny vzorky s hmotností cca 5 mg, které se umístily do hliníkových misek. Jako reference se použila prázdná miska. Měření probíhalo v atmosféře dusíku s průtočným množstvím 20 ml/s.

Teplotní profil měření se skládal z:

- setrvání na 25 °C po dobu 5 minut;
- první ohřev – z -25 °C na 120 °C rychlostí 10 °C/min ;
- chlazení – ze 120 °C na -20 °C rychlostí 10 °C/min ;
- druhý ohřev – z -20 °C na 120 °C rychlostí 10 °C/min .



Obrázek 11: Diferenciální skenovací kalorimetr Mettler Toledo DSC 1

8.7 Termogravimetrická analýza

Z jednotlivých filmů byly připraveny vzorky o hmotnosti cca 10 mg, které byly podrobeny termogravimetrii (TGA) neboli měření úbytku hmotnosti v závislosti na teplotě. Testování probíhalo na přístroji Netzsch STA449 F1 Jupiter (Obrázek 12) v simultánním tepelném analyzátoru, ve kterém je soustava dvou misek, kdy první referenční miska je prázdná a do druhé je umístěn vzorek. Samostatné měření probíhalo konstantním ohřevem rychlostí 10 °C/min z teploty 25 na 600 °C v atmosféře argonu.

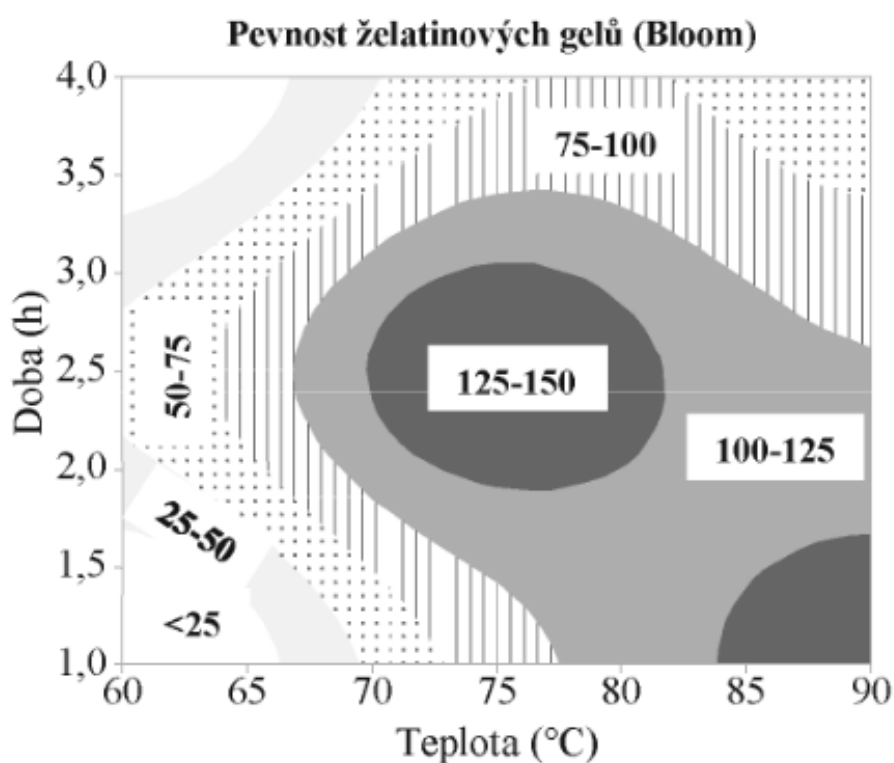


Obrázek 12: Termický analyzátor Netzsch STA 449 F1 Jupiter

9 VÝSLEDKY A DISKUZE

9.1 Pevnost Bloom

Ve studii P. Mokrejše et al. (2019) [54] se provádělo měření pevnosti želatinových gelů využitím metodiky AOAC 948.21. V této práci se uvádí, že při provedení biotechnologického procesu složeného ze dvou stupňů a zvolení ideálního extrakčního času a teploty je možno získat želatinu s pevností gelu až 170 Bloom. Obrázek 13 vyobrazuje získané pevnosti gelu (v jednotkách Bloom) v závislosti na dvou faktorech – době a teplotě extrakce. [54]



Obrázek 13: Vrstevnicový graf vlivu teploty a doby extrakce na pevnost želatinových gelů (Bloom) [54]

Tabulka 2: Přehled pevností gelu 1. a 2. frakce želatiny

	Naměřená pevnost gelu [Bloom]	Přepočtená/skutečná pevnost gelu [Bloom]
1. frakce	182	111
2. frakce	263	160

Podmínky první extrakce provedené pro získání želatiny z kuřecích běháků byly v rámci této diplomové práce zvoleny následovně – 70 °C po dobu dvou hodin. V rámci druhé extrakce

byla teplota zvýšena na 85 °C a držena po dobu dvou hodin. Naměřené hodnoty pevnosti gelu želatin z první a druhé extrakce uvádí Tabulka 2. V porovnání získaných pevností gelu a grafu (Obrázek 13) ze studie P. Mokrejše et al. (2019) [54] hodnota první extrakce odpovídá hodnotě v grafu. Při druhé extrakci se v rámci této diplomové práce povedlo získat želatinu s vyšší pevností gelu než byla získána při stejných podmínkách ve studii, avšak po vysušení bylo získané množství mnohem menší než v případě první frakce želatiny. Proto byla pro výrobu filmů použita první extrahovaná frakce.

9.2 Rozpustnost a botnání

Rozpustnost byla u želatinových filmů zkoumána jako doba, po kterou jsou schopny bez mechanického namáhání odolat vodě, tedy udržet tvar aniž by se rozpadaly. V tabulkách zobrazujících intervaly do rozpuštění vzorků s 30 (Tabulka 3) a 40 % (Tabulka 4) glycerolu lze vidět, že významný vliv, kromě množství změkčovadla, hraje délka expozice UV záření. Šedá barva znamená čas, kdy už byl vzorek rozpuštěn, tedy nedržel tvar. S rostoucí dobou UV ozáření se snižuje u vzorků rozpustnost, a to v případě obou sérií vzorků. Již po jedné hodině expozice UV-záření se výrazně prodloužila doba do rozpuštění vzorku. Snižování rozpustnosti může být způsobeno síťováním působením UV-světla, neboli tvorbou nových vazeb.

Tabulka 3: Hodnota nabotnění a doba do rozpuštění vzorků s 30 % glycerolu s intervaly ozáření 0–16 hodin (šedá barva znamená rozpuštění vzorku)

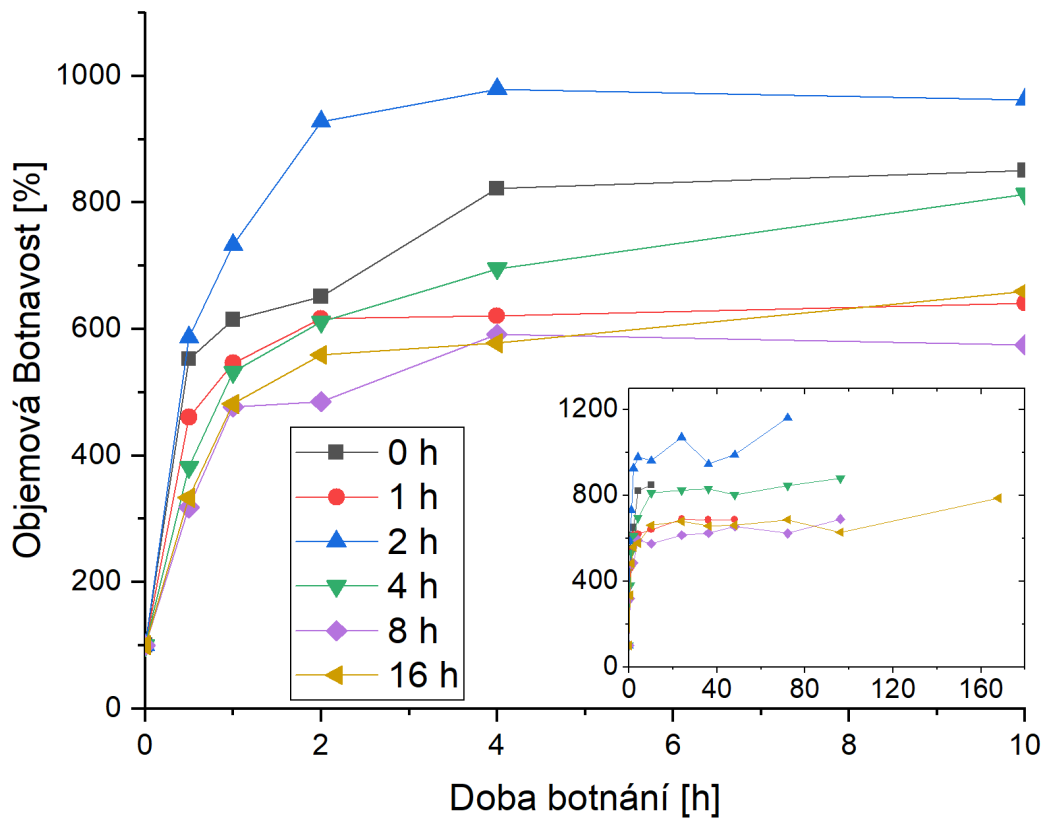
Čas [h]	Botnavost [%]					
	30_0	30_1	30_2	30_4	30_8	30_16
0	100	100	100	100	100	100
0,5	552	460	586	382	318	333
1	615	546	733	532	477	482
2	651	616	928	611	485	559
4	822	621	979	695	592	578
10	850	641	962	813	575	660
24		689	1071	824	615	679
36		686	947	830	625	657
48		688	991	804	655	661
72			1163	846	624	687
96				881	690	628
168						787
216						

Tabulka 4: Hodnota nabotnutí a doba do rozpuštění vzorků s 40 % glycerolu s intervaly ozáření 0–16 hodin (šedá barva znamená rozpuštění vzorku)

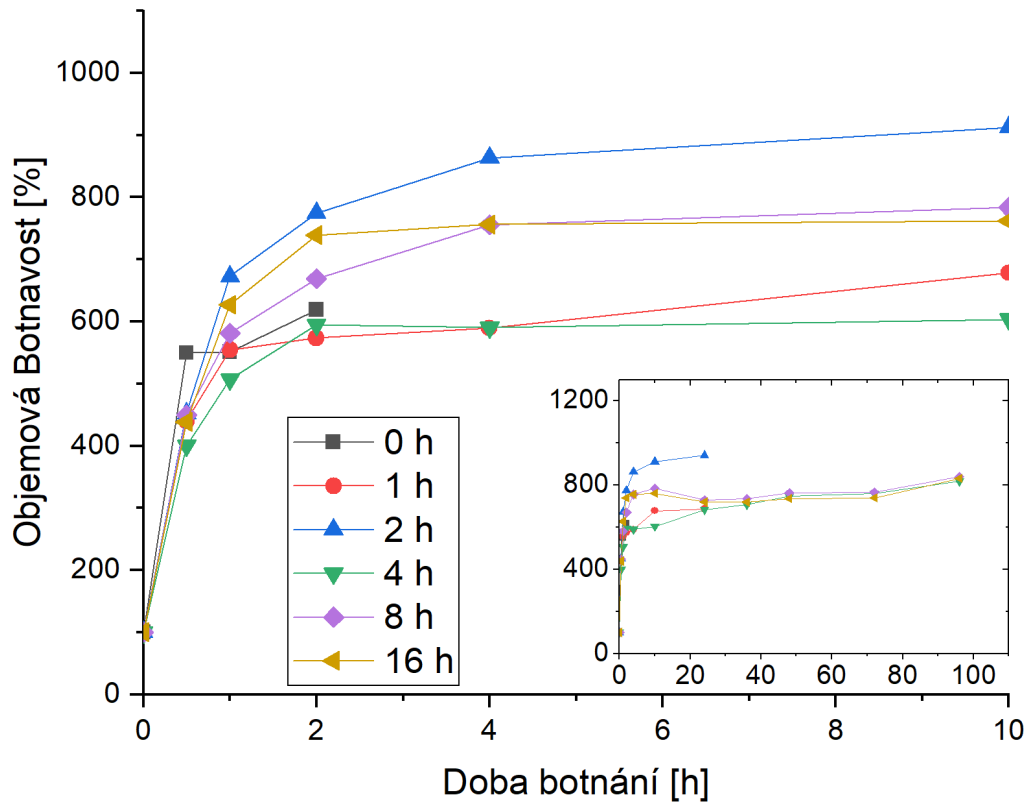
Čas [hod]	Botnavost [%]					
	40_0	40_1	40_2	40_4	40_8	40_16
0	100	100	100	100	100	100
0,5	549	440	452	400	449	439
1	551	554	673	507	581	627
2	618	573	774	595	669	739
4		590	863	591	756	756
10		678	912	604	783	762
24		686	943	683	729	720
36				707	736	719
48				746	762	737
72				759	767	740
96				819	839	832
168						
216						

Rozpustnost korelovala se schopností vzorku nabotnat. Vzhledem k hydrofilní povaze glycerolu dokážou filmy s vyšší koncentrací této látky navázat do své struktury více vody. Percentuální nárůst objemu vzorků způsobený nabotnutím znázorňuje Obrázek 14 (s 30 % glycerolu) a Obrázek 15 (s 40 % glycerolu). Pokles v hodnotě botnavosti v některých případech může být způsoben rozpuštěním či odpadnutím části vzorku.

Z výsledků želatiny s obsahem 30 % glycerolu lze pozorovat, s výjimkou vzorku ozářeného 2 hodiny, že UV-expozice vede ke snížení stupně nabotnutí. Vzorek vystavený UV-světlu po 2 hodiny vykazuje nečekané chování a může se jednat o chybu, např. při přípravě filmu. Tento vzorek by bylo dobré porobit analýze znovu. Ve všech případech délky ozáření bylo dosaženo rovnovážného stavu nabotnutí po cca 4 dnech, poté už se hodnoty příliš neměnily. V případě želatinového filmu s obsahem 40 % glycerolu je situace dost podobná, včetně vybočujícího chování vzorku ozářeného 2 hodiny. Neozářený vzorek vykazovat nejvyšší nabotnutí již po půl hodině v rozpouštědle, prodloužení času pak už pravděpodobně vedlo k rozpouštění či odpadávání částí vzorku, proto jsou přírůstky malé a velmi brzy (po 4 hodinách) již vzorek vůbec nedržel tvar a nebylo možné s ním manipulovat. Proto hodnoty nabotnutí v časech 1 a 2 hodiny mohou být zavádějící. I v případě těchto filmů bylo dosaženo rovnovážného stupně nabotnutí cca po 4 dnech.



Obrázek 14: Objemová botnavost vzorků s 30 % glycerolu s intervaly ozáření 0–6 hodin



Obrázek 15: Objemová botnavost vzorků s 40 % glycerolu s intervaly ozáření 0–6 hodin

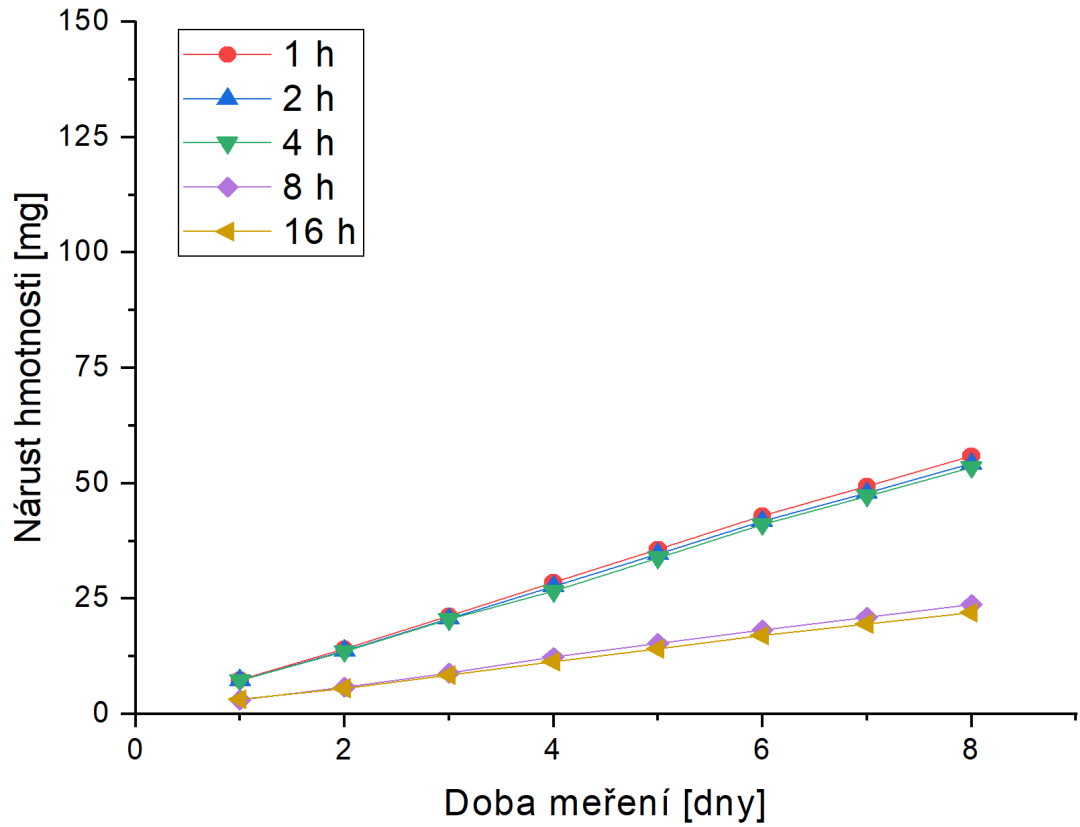
Vzhledem k potenciální aplikaci jako obaly na potraviny je důležitou vlastností odolnost rozpuštění. Ze všech vzorků dokázal nejdéle odolávat působení vody vzorek 30_16 (30 % glycerolu, interval ozáření 16 hodin). Tento vzorek dokázal vydržet 168 hodin a zvětšil svůj objem na 787 % původního objemu. Při zvýšení koncentrace glycerolu o 10 % vykazují nejdelší dobu do rozpuštění (96 hodin) shodně 3 vzorky – 40_4, 40_8 a 40_16 (40 % glycerolu, interval ozáření 4, 8 a 16 hodin). Jejich nabotnutí bylo 818, 839 a 832 %.

9.3 Paropropustnost

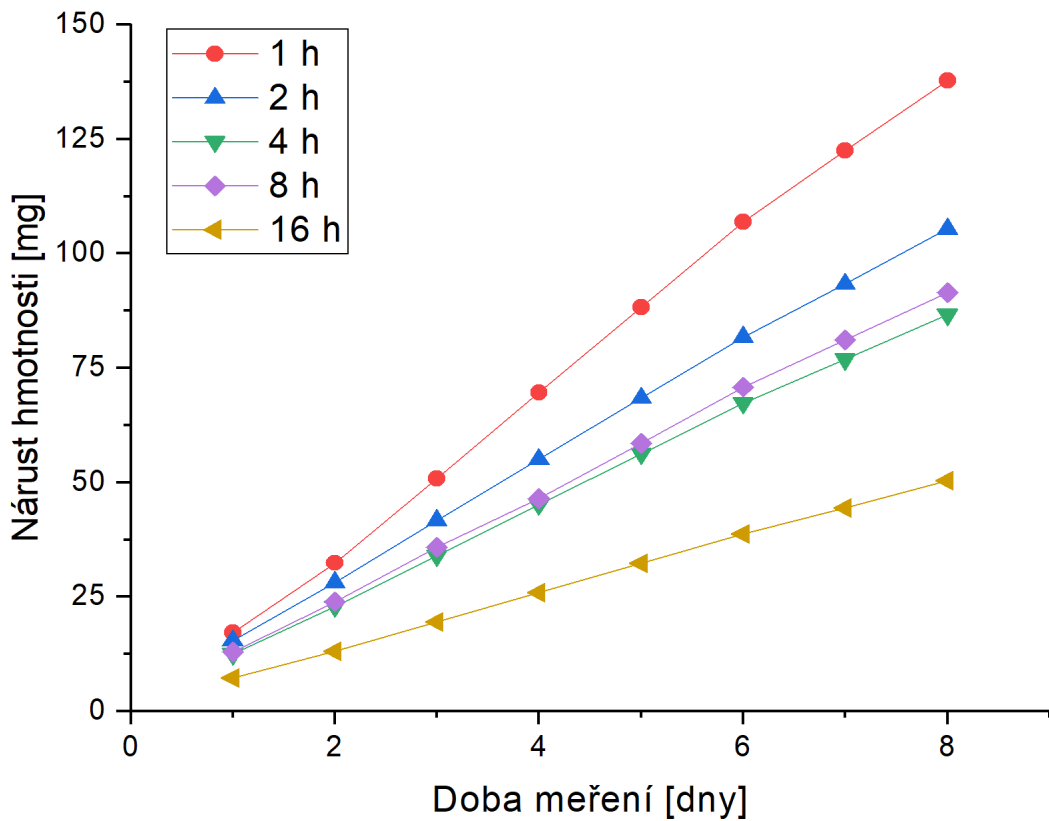
Propustnost pro vodní páry závisí především na struktuře polymerů a tloušťce filmu. Želatina i glycerol jsou hydrofilní látky. Pokud dochází k vystavení UV-záření, snižuje se volný objem a mezi jednotlivými řetězci želatiny dochází ke vzniku vazeb. Zesiluje se struktura želatinového filmu a snižuje se jeho křehkost a propustnost pro vodní páry.

Vzhledem k velké počáteční křehkosti a nerovnému povrchu želatinového filmu se nepodařilo nedegradovaný film do kalíšku určeného k měření umístit. Z tohoto důvodu je srovnáván pouze vliv různé koncentrace glycerolu a doby UV-záření.

Vzorky před analýzou byly kondicionovány v sušárně při stejných podmínkách: 35 °C po dobu 24 hodin. Propustnost pro vodní páry byla měřena v klimatické komoře (37 °C, relativní vlhkost 50 %) na kalíscích s vysušeným silikagelem. Každý z kalíšků byl uzavřen pomocí testovacího vzorku. Testování probíhalo postupným vážením kalíšku a sledování příbytku hmotnosti, který představoval vlhkost, která byla schopna navázat se na želatinový film nebo projít skrz a být pohlcena silikagelem. Z grafu pro vzorky s 30 % (Obrázek 16) a 40 % glycerolu (Obrázek 17) lze pozorovat konstantní nárůst hmotnosti u všech vzorků po dobu šesti dní. Poté začal být růst méně strmý a při delším měření by nejspíše nastala rovnováha.

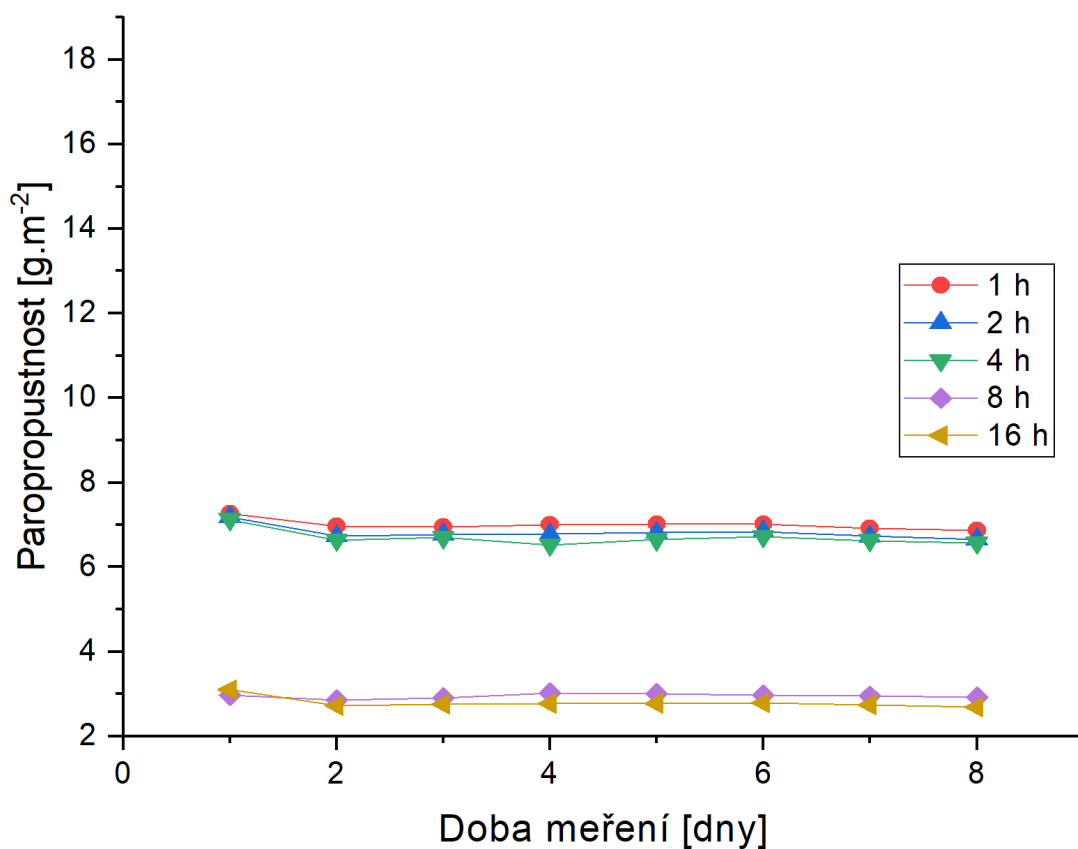


Obrázek 16: Nárůst hmotnosti testovacích kalíšku uzavřených filmem s 30 % glycerolu s intervaly 1–16 hodin ozáření pro měření paropropustnosti

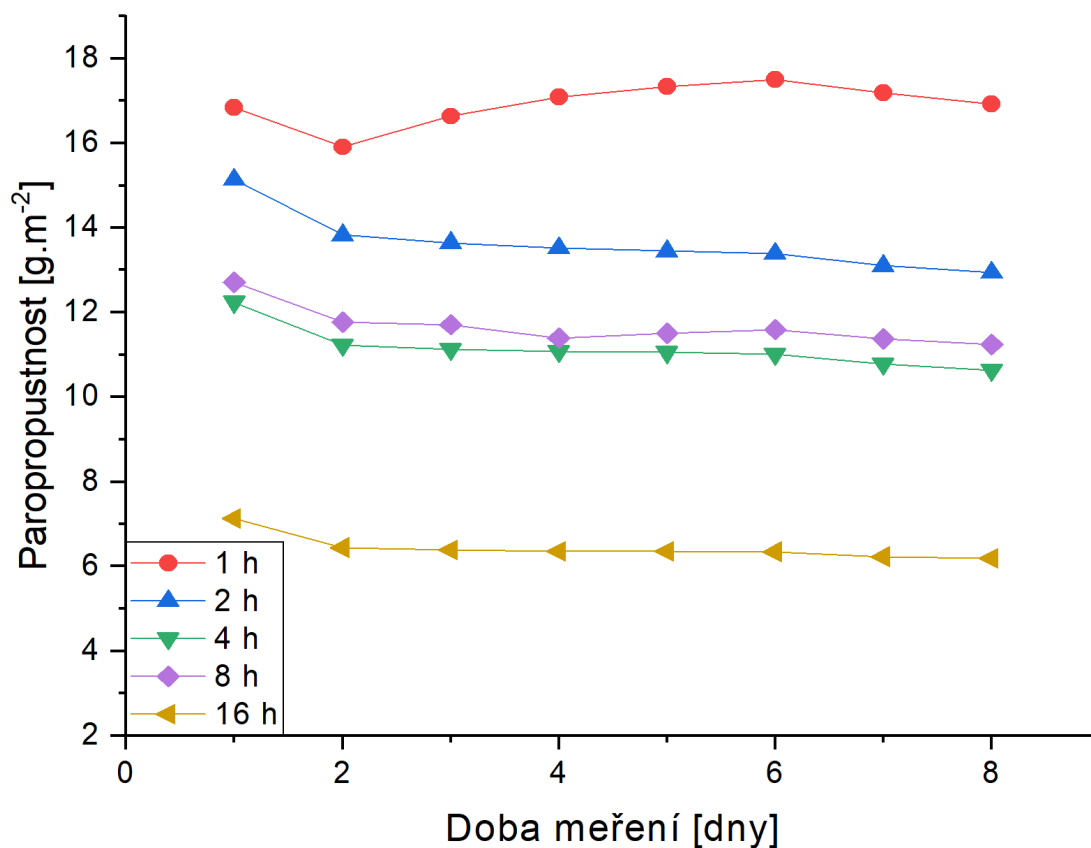


Obrázek 17: Nárůst hmotnosti testovacích kalíšku uzavřených filmem s 40 % glycerolu s intervaly 1–16 hodin ozáření pro měření paropropustnosti

Jak lze vidět z výsledků pro želatinové filmy s 30 % glycerolu (Obrázek 18) a 40 % glycerolu (Obrázek 19) zvyšující doba expozice UV záření snižovala propustnost pro vodní páry, zřejmě z důvodu sesíťování struktury. Bohužel není možné určit, jak se snížila paropropustnost po jedné hodině UV-expozice vzhledem k neozářenému filmu, protože tyto filmy se nepodařilo bez poškození umístit do testovacího kalíšku. Propustnost vodních par byla vyšší pro vzorky s vyšší koncentrací glycerolu. Tato skutečnost platila při všech intervalech ozáření. Trend je pravděpodobně způsoben zvýšením pohyblivosti a větším mezerám mezi polymerními řetězci polymeru po přidání většího množství změkčovadla.



Obrázek 18: Paropropustnost vzorků s 30 % glycerolu po intervalu ozáření 1–6 hodin



Obrázek 19: Paropropustnost vzorků s 40 % glycerolu po intervalu ozáření 1–6 hodin

Hodnoty propustnosti pro vodní páry znázorňuje Tabulka 5. Nárůst hmotnosti byl více méně lineární pro všechny vzorky až do doby 6 dnů. Po této době byla paropropustnost nejvyšší u vzorků 40_1 (40 % glycerolu, interval ozáření 1 hodina), a to $18,33 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$. Naopak nejnižší propustnost pro vodní páry $2,81 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ vykazuje vzorek s 30 % glycerolu po 16 hodinách ozáření. Jelikož byly výsledky měřeny pouze na jednom vzorku pro každou koncentraci a dobu UV-expozice, je možné, že vzorky mohly z důvodu nedostatečné homogenizace obsahovat různé množství glycerolu. Zajímavé je, že vzorek 40_4 vykazoval nižší paropropustnost než vzorek 40_8, tedy vzorek ozařovaný delší dobu.

Tabulka 5: Hodnoty propustnosti pro vodní páry pro vzorky s 30 a 40 % glycerolu v intervalech ozáření 1–16 hodin

Interval UV-ozáření [h]	30 % glycerolu	40 % glycerolu
	Propustnost pro vodní páry po 6 dnech měření [g.m ⁻²]	Propustnost pro vodní páry po 6 dnech měření [g.m ⁻²]
1	7,05	18,33
2	6,93	13,06
4	7,07	10,83
8	2,86	12,04
16	2,82	6,29

9.4 Spektrofotometrie

Pomocí spektrofotometru byly změřeny hodnoty barevných souřadnic, žlutosti a zákalu jednotlivých želatinových filmů s různým obsahem glycerolu a intervaly UV-záření. Hodnota L* značí míru od bílé do černé. Pokud je hodnota L* 0–50, vzorek je označován za tmavý. Od 51–100 je vzorek považován za světlý. Číslo na stupnici a* vypovídá o červené nebo zelené barvě vzorku. Kladné hodnoty představují červenou, záporné barvu zelenou. Stupnice b* značí přechod mezi žlutou a modrou barvou. Kladné hodnoty jsou spojeny se žlutou, záporné pak s modrou barvou.

Před měřením byly vzorky kondicionovány v sušárně při stejných podmínkách: 35 °C po dobu 24 hodin. Z naměřených hodnot pro vzorky s 30 % glycerolu (Tabulka 6) lze pozorovat, že hodnota L* po ozáření mírně klesá. Tato změna znamená, že film se stává tmavším. Hodnota b* roste a barva se tak mění do žluta, ovšem velmi mírně. Hodnota a* zůstává více méně beze změny. Index žlutosti také roste, což koreluje s posunutím hodnoty b* do vyšších hodnot. Zákal filmů po hodinovém ozáření mírně vzroste, avšak následně se již nemění.

Tabulka 6: Naměřené hodnoty barevných souřadnic, žlutosti a zákalu pro vzorky s 30 % glycerolu po jednotlivých intervalech UV ozáření

	L*	a*	b*	Žlutost	Zákal [%]
30_0	89,62	-0,85	12,17	22,41	91,2
30_1	89,39	-0,83	13,12	24,15	94,0
30_2	89,05	-0,81	13,69	25,16	93,9
30_4	88,73	-0,82	14,30	26,36	93,6
30_8	87,94	-0,80	14,37	26,64	94,1
30_16	87,66	-0,82	15,00	27,92	94,3

Výše zmíněné hodnoty vzorků se 40 % glycerolu (Tabulka 7) se po ozáření mění stejným trendem jako u vzorků s 30 % glycerolu. Film se stává světlejší a více žlutý.

Tabulka 7: Naměřené hodnoty barevných souřadnic, žlutosti a zákalu pro vzorky s 40 % glycerolu po jednotlivých intervalech UV ozáření

	L*	a*	b*	Žlutost	Zákal [%]
40_0	88,91	-0,33	12,26	23,13	93,6
40_1	88,69	-0,30	13,03	24,91	93,9
40_2	88,53	-0,42	13,27	25,11	94,1
40_4	88,27	-0,26	13,98	25,63	93,6
40_8	88,01	-0,82	14,30	26,36	94,5
40_16	87,92	-0,28	14,95	28,11	93,7

Následně byla pro želatinové filmy vypočtena barevná změna. Ta vypovídá o tom, zda se mezi dvěma měřeními barva filmu změnila tak, abychom tuto změnu byly schopni rozpoznat lidským okem. Aby byla změna barevnosti viditelná lidským okem, musí hodnota E^* přesáhnout 0,4. V následujících tabulkách jsou uvedeny hodnoty barevné změny pro vzorky s 30 % (Tabulka 8) a 40 % (Tabulka 9) glycerolu. Z tabulek lze vidět, že u obou typů vzorků nastává po ozáření barevná změna, výraznější je v případě želatiny s nižším obsahem glycerolu.

Tabulka 8: Barevná změna vzorku s 30 % glycerolu

	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*
30_0				
30_1	-0,23	0,02	0,95	0,978
30_2	-0,57	0,04	1,52	1,624
30_4	-0,89	0,03	2,13	2,309
30_8	-1,68	0,05	2,2	2,769
30_16	-1,96	0,03	2,83	3,443

Tabulka 9: Barevná změna vzorku s 40 % glycerolu

	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*
40_0				
40_1	-0,22	0,03	0,77	0,801
40_2	-0,38	0,01	1,01	1,079
40_4	-0,64	0,07	1,72	1,837
40_8	-0,90	0,01	2,04	2,230
40_16	-0,99	0,05	2,69	2,867

9.5 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

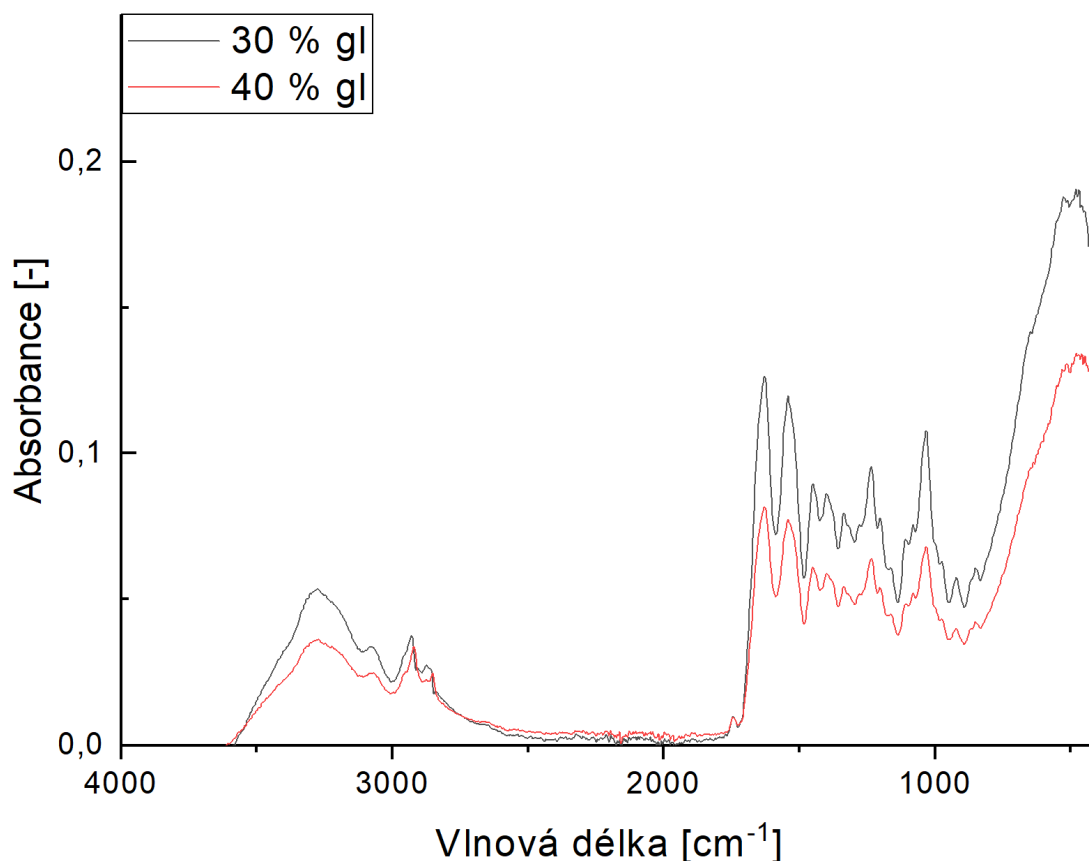
Pomocí FTIR spektrometru byl zkoumán účinek UV-záření na funkční skupiny v želatinových filmech s přídavkem glycerolu jako změkčovadla. Naměřené spektrum nedegradovaného vzorku (Obrázek 20) ukazuje jednotlivé vznikající píky.

Vrcholy ve spektru, které filmu poskytuje želatina se nacházejí v pásech okolo 3 288, 1 631, 1 544 a 1 243 cm^{-1} odpovídající amidu A (natahování a kmitání N-H), amidu I (kmitání a natahování C=O a C-N vazeb), amidu II (ohyb N-H) a amidu III (ohyb N-H vazeb). Pokud je do filmu přidán glycerol, dochází ke vzniku dalšího charakteristického vrcholu okolo 1045 cm^{-1} a jeho intenzita se zvyšuje s vyšším množstvím glycerolu. [55, 56]

Pík v oblasti amidu A by také měl dle studie M. H. M. Nor et al. (2016) [56] být intenzivnější, širší a měl by ostřeji růst s vyšším obsahem glycerolu. Tato skutečnost by měla být nejspíše spojena se skupinou -OH, která se do filmu dostává přídavkem změkčovadla. [55]

Růst intenzity píku amidu I s přídavkem glycerolu je důsledkem snadného vytvoření mezimolekulárních vodíkových můstků mezi skupinami C=O a N-H s O-H z glycerolu. Tento pás je složen z napínavých vibrací C=O (70–85 %) a C-N (10–20%) vazeb. Amid I je považován za nejúčinnější vrchol pro analýzu proteinové struktury pomocí infračervené spektroskopie. Přesná poloha pásu amidu I závisí na vodíkových můstcích a konformaci struktury bílkoviny. Obecně pak většina bílkovin má zároveň více druhů sekundární struktury (α -helix, β -skládaný list nebo náhodnou strukturu), takže pík v pásu amidu I často ukazuje několik ramen. [55]

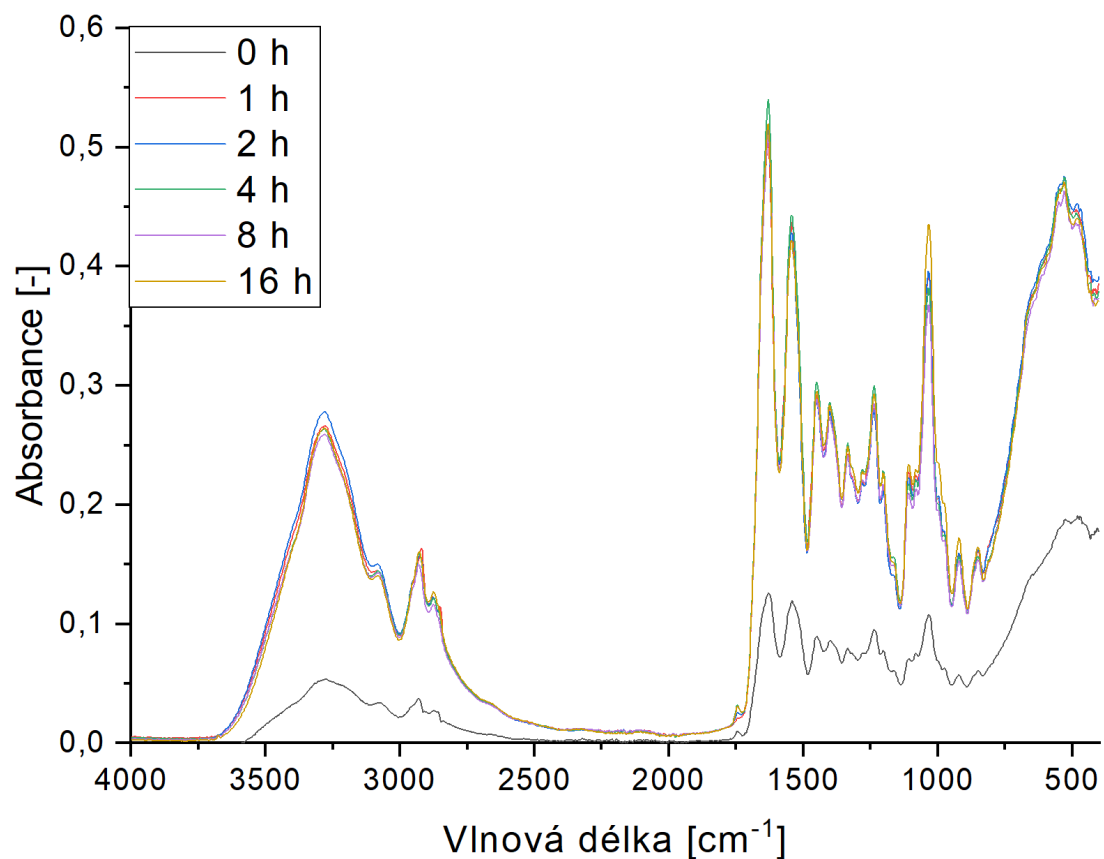
Rozmezí a intenzita vrcholu amidu II je obecně mnohem citlivější na hydrataci než na změny sekundární struktury. Přestože byly filmy sušeny 24 hodiny při 35 °C, rozdíly mohly vzniknout rozdílným obsahem vody. Pík okolo 1 045 cm^{-1} je pravděpodobně spojen s interakcí glycerolu a struktury filmu. [56]



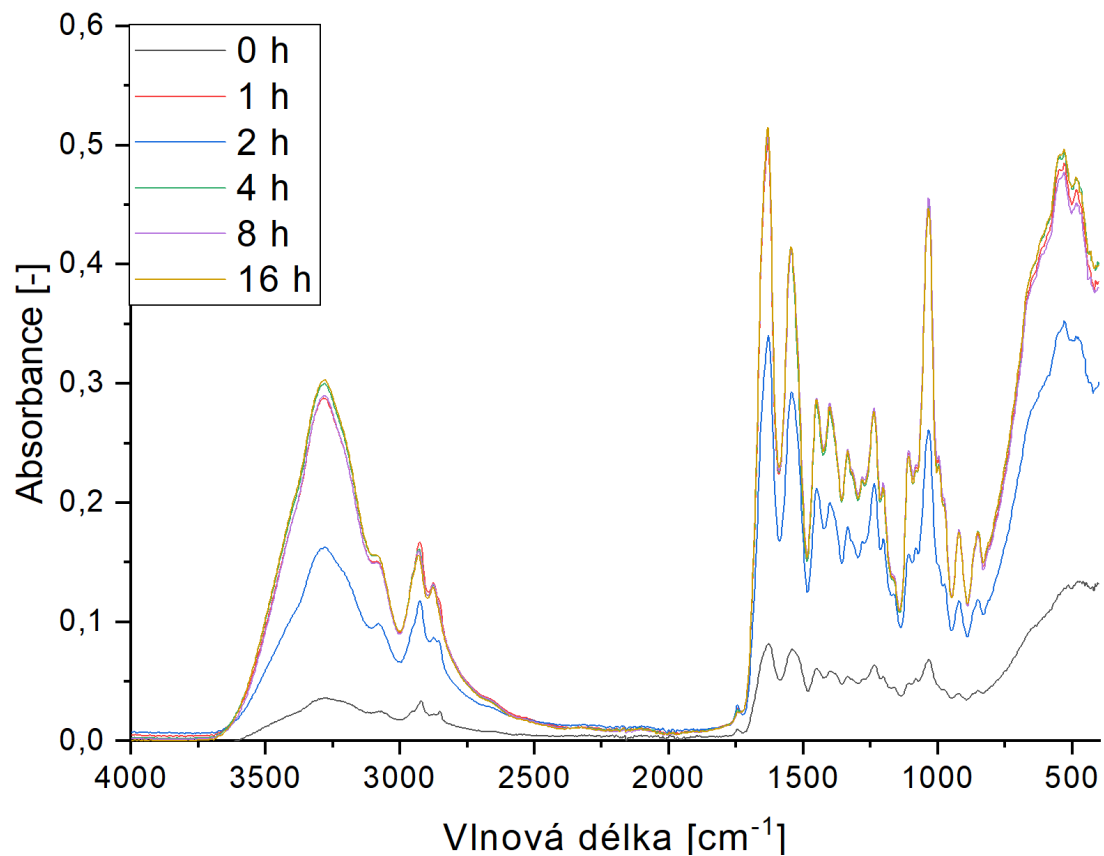
Obrázek 20: FTIR spektra nedegradovaných filmů s rozdílným množstvím glycerolu

FTIR spektra želatinový filmů s 30 % glycerolu (Obrázek 21) a 40 % glycerolu (Obrázek 22) po UV ozáření v různých časových intervalech ukazují zvýšení intenzity všech píků. Zvýšení intenzity znamená vznik a přítomnost více vazeb, které jsou charakterizovány určitými vlnovými délkami. Tato skutečnost může značit zesíťování vzorků po jejich expozici UV-zářením. Zajímavé je, že k dramatickému zvýšení intenzity došlo po jedné hodině UV-expozice a s jejím prodlužováním se již intenzita výrazně nemění. Výjimku tvoří vzorek se 40 % glycerolu ozařovaný 2 hodiny, tady by bylo vhodné provést kontrolní měření a ověřit tak jeho správnost.

Z naměřených grafů vyplývá, že nedošlo ke vzniku žádných nových píků. Všechny připravené filmy vykazují píky ve stejných oblastech vlnových délek bez ohledu na koncentraci změkčovadla i délku expozice UV záření, liší se jen intenzitou.



Obrázek 21: FTIR spektra želatinových filmů s 30 % glycerolu po 0–16 hodinách ozáření

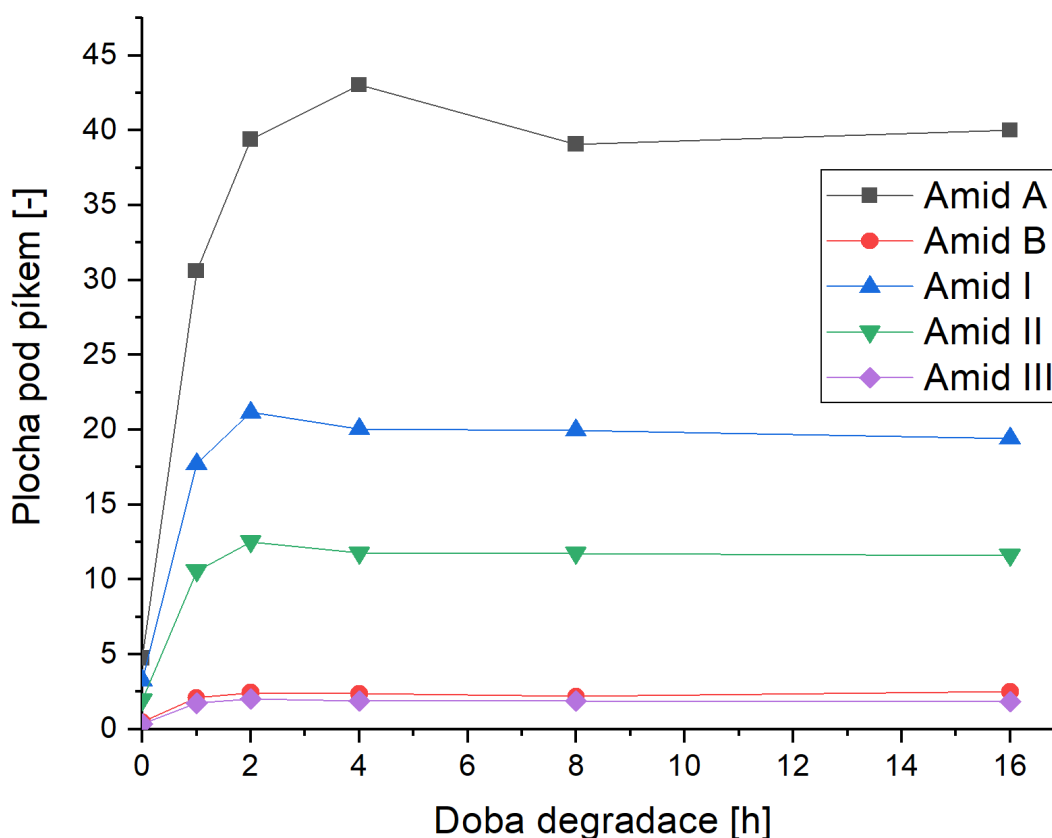


Obrázek 22: FTIR spektra želatinových filmů s 40 % glycerolu po 0–16 hodinách ozáření

Tabulky zobrazující plochy pod jednotlivými píky amidu A, B, I, II a III po želatinové filmy s 30 % glycerolu (Tabulka 10) a 40 % glycerolu (Tabulka 11) vypovídají o zvětšení plochy všech píků po expozici vzorku UV záření. Graf růstu velikostí ploch pod píky po jednotlivých intervalech ozáření znázorňuje Obrázek 23 (30 % glycerolu) a Obrázek 24 (40 % glycerolu). Po ozáření po dobu 1 hodiny dochází k největšímu nárůstu všech pozorovaných píků, poté už je nárůst pozvolnější, případně se hodnoty příliš neliší. V případě vzorku 40_2 jsou opět vidět anomálie.

Tabulka 10: Plochy píků amidu A, B, I, II a III vzorků s 30 % glycerolu před a po UV ozáření

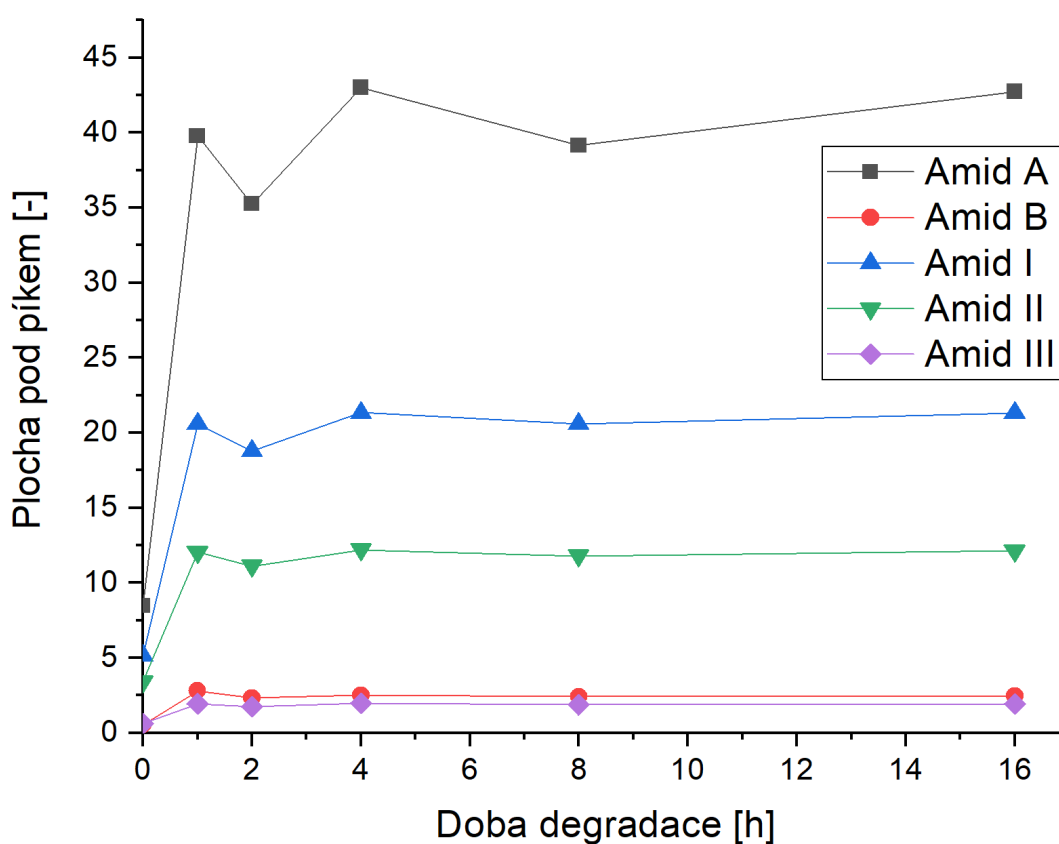
	Amid A	Amid B	Amid I	Amid II	Amid III
30_0	4,725	0,469	3,244	1,944	0,334
30_1	30,605	2,098	17,726	10,58	1,734
30_2	39,379	2,44	21,15	12,51	2,026
30_4	43,027	2,361	20,067	11,756	1,89
30_8	39,056	2,191	19,978	11,746	1,898
30_16	39,999	2,505	19,425	11,608	1,861



Obrázek 23: Grafické zobrazení ploch pod jednotlivými píky želatinových filmů s 30 % glycerolu po 0–16 hodinách ozáření

Tabulka 11: Plochy píků amidu A, B, I, II a III vzorků s 40 % glycerolu před a po UV ozáření

	Amid A	Amid B	Amid I	Amid II	Amid III
40_0	8,455	0,548	5,132	3,417	0,627
40_1	35,246	2,351	18,808	11,111	1,759
40_2	39,778	2,81	20,605	12,055	1,944
40_4	42,994	2,515	21,341	12,208	1,978
40_8	39,138	2,439	20,59	11,807	1,864
40_16	42,717	2,493	21,326	12,121	1,94



Obrázek 24: Grafické zobrazení ploch pod jednotlivými píky želatinových filmů s 30 % glycerolu po 0–16 hodinách ozáření

9.6 Diferenciální skenovací kalorimetrie

Tepelné vlastnosti želatin mají praktický význam při použitelnosti obalových materiálů. Pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) byly získány charakteristické teploty – T_g (teplota skelného přechodu) a T_m (teplota tání), viz Tabulka 12 a Tabulka 13. Před analýzou byly vzorky sušeny při 35 °C po dobu 24 hodin.

První ohřev vzorků s 30 % uvádí Obrázek 25 a s 40 % glycerolu Obrázek 26. Jsou zde vidět dva důležité přechody, a to zejména teplota skelného přechodu, která je charakterizovaná změnou polohy základní linie (změna tepelné kapacity), v tomto případě s endotermickým zotavením (skelný přechod a relaxace). Po T_g následuje endotermický pík, který odpovídá teplotě tání spirálové struktury. Na vzorcích byl proveden i druhý sken po kontrolním, který by měl zobrazovat teploty skelného přechodu nižší než u prvního skenu, avšak v našem případě z druhého skenu nebylo možné takovou teplotu vyčíst.

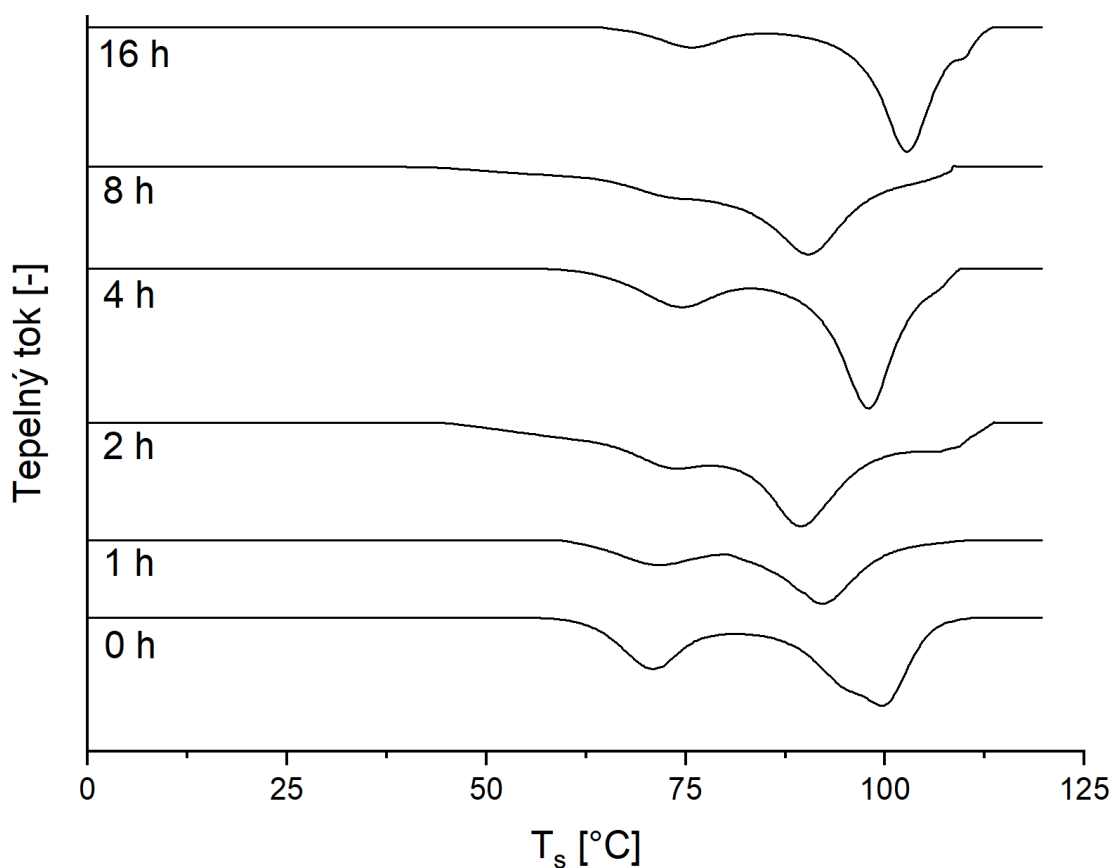
Při prvním ohřevu se mezi T_g a T_m stává film pružným a obsahuje semikrystalickou strukturu vznikající přítomností trojšroubovic. Nad T_m nastává roztavení všech šroubovic a film přechází do viskózního kapalného stavu s minimem rozpouštědla. Při chlazení vzorku rychlostí 10 °C/min nejsou schopny šroubovice opět formovat krystalickou fázi, proto je želatina během druhého ohřevu pouze v čistě amorfním stavu. Příčinou rozdílů a posunů T_g může být voda imobilizována mezi peptidovými řetězci vzorku tvořícími trojšroubovici během prvního ohřevu. [57]

Ve studii M. Coppola et al. (2008) [57] bylo zjištěno, že vzorky s vyšším obsahem změkčovadla (glycerolu) vykazují nižší teplotu skelného přechodu. Stejná skutečnost platí i u teploty tání, která opět klesá s vyšším přídatkem glycerolu.

Z naměřených křivek byl sestaven přehled teplot skelného přechodu a tání vzorků s 30 % (Tabulka 12) a 40 % (Tabulka 13) glycerolu před a po jednotlivých intervalech ozáření. U většiny vzorků lze pozorovat, že s vyšším obsahem glycerolu vykazuje vzorek nižší teplotu tání a zpravidla i nižší teplotu skelného přechodu. Tato skutečnost souhlasí se studií M. Coppola et al (2008) [57]. Rozdíly či nesouhlasící hodnoty mohly vznikat z důvodu nedostatečné homogenizace vzorků. Pro každý čas UV-záření se použil jiný vzorek filmu, což mohlo způsobit některé anomálie při charakterizaci. Jedná se např. o vzorek 40_2, který vykazoval vybočující chování i v případě FTIR analýzy a testu botnavosti.

Tabulka 12: Přehled teplot skelného přechodu (T_g) a teplot tání (T_m) jednotlivých vzorků s 30 % glycerolu před a po ozáření

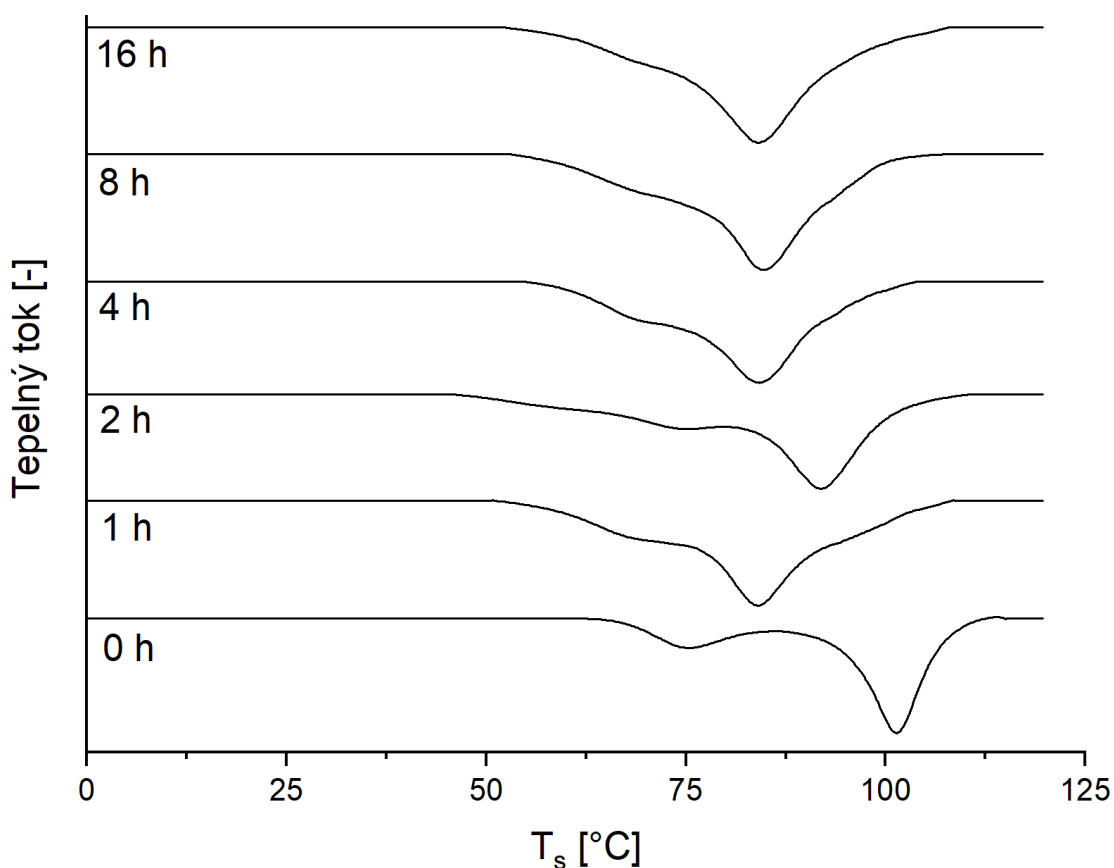
	T_g [°C]	T_m [°C]
30_0	65,46	99,65
30_1	66,51	92,39
30_2	67,83	89,49
30_4	69,09	97,97
30_8	65,88	90,54
30_16	70,11	102,64



Obrázek 25: DSC křivky ohřevu želatinových filmů s 30 % glycerolu po ozáření v intervalech 0–16 hodin

Tabulka 13: Přehled teplot skelného přechodu (T_g) a teplot tání (T_m) jednotlivých vzorků s 40 % glycerolu před a po ozáření

	T_g [°C]	T_m [°C]
40_0	69,46	95,18
40_1	62,93	84,02
40_2	67,63	92,01
40_4	63,84	84,19
40_8	63,07	84,86
40_16	62,51	84,02



Obrázek 26: DSC křivky ohřevu želatinových filmů s 40 % glycerolu po ozáření v intervalech 0–16 hodin

Testovací vzorky byly před měřením vysušeny při 35 °C po dobu 24 hodin, ale vzhledem k nižší teplotě sušení mohly vzorky vykazovat jiný obsah vody. Rozdíly mohly také vzniknout nedostatečnou homogenizací filmu a jiným obsahem glycerolu a želatiny v testovacím vzorku.

9.7 Termogravimetrická analýza

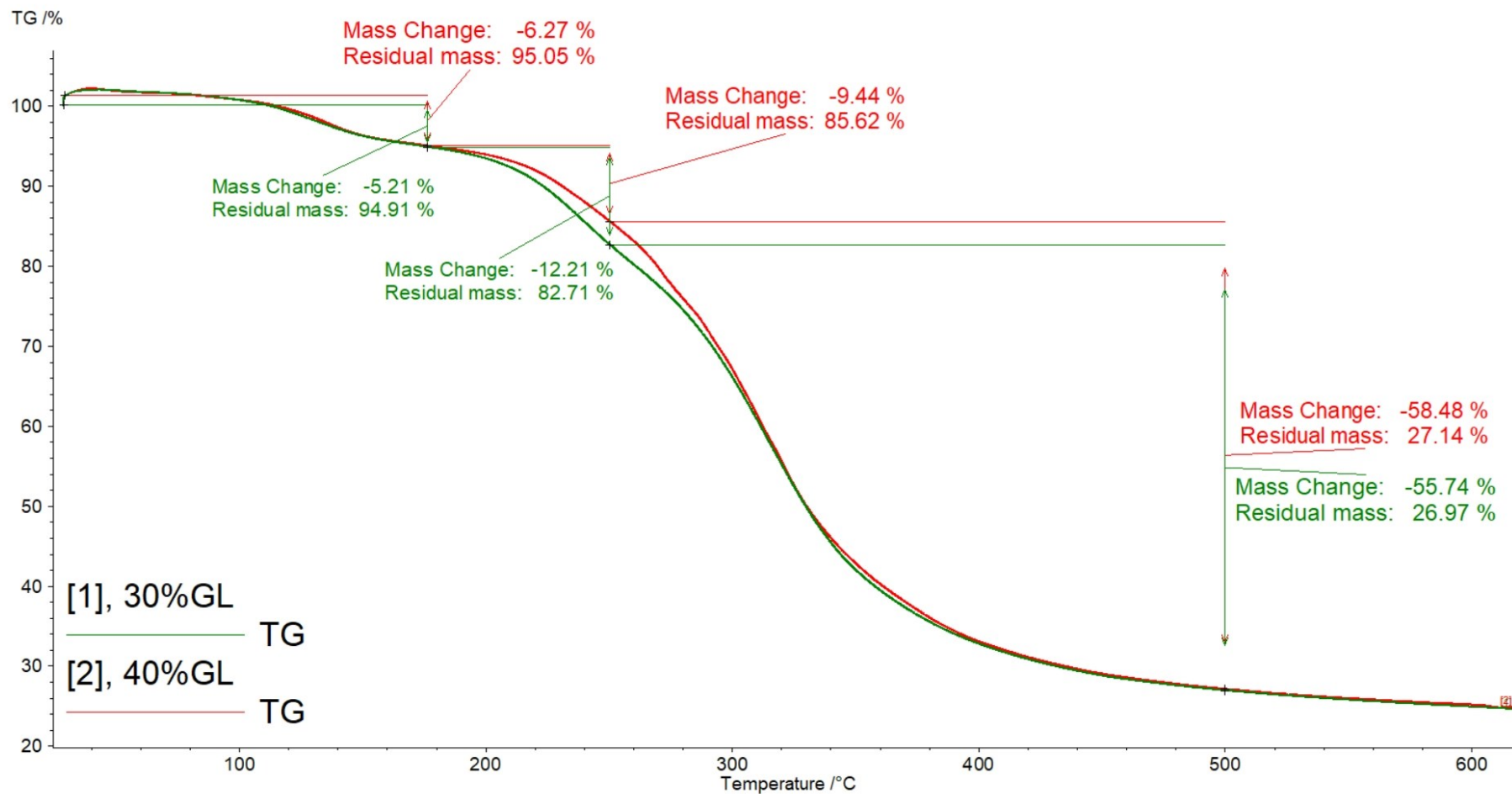
Termogravimetrická analýza (TGA) dává informace o tepelné stabilitě vzorků pomocí vztahu mezi úbytkem hmotnosti a teplotou. Pro lepší vyhodnocení a vizualizaci byla zobrazena derivace (DTG) křivky zobrazující teploty, při kterých došlo k největší degradaci vzorku. Výsledné křivky všech vzorků uvádí Obrázek 27, Obrázek 28a Obrázek 29. [52]

Jak již bylo zmíněno v kapitole 5.4, křivka TGA a její derivace vykazuje tři oblasti dekompozice. První stádium je spojeno s rozpadem vodíkových můstků a s tím spojenou ztrátou povrchové i uvnitř vázané vody. Lze ho pozorovat okolo teploty 100 °C. Druhá fáze dekompozice začínala okolo teploty 250 °C, v tuto chvíli nastává degradace a molekulární

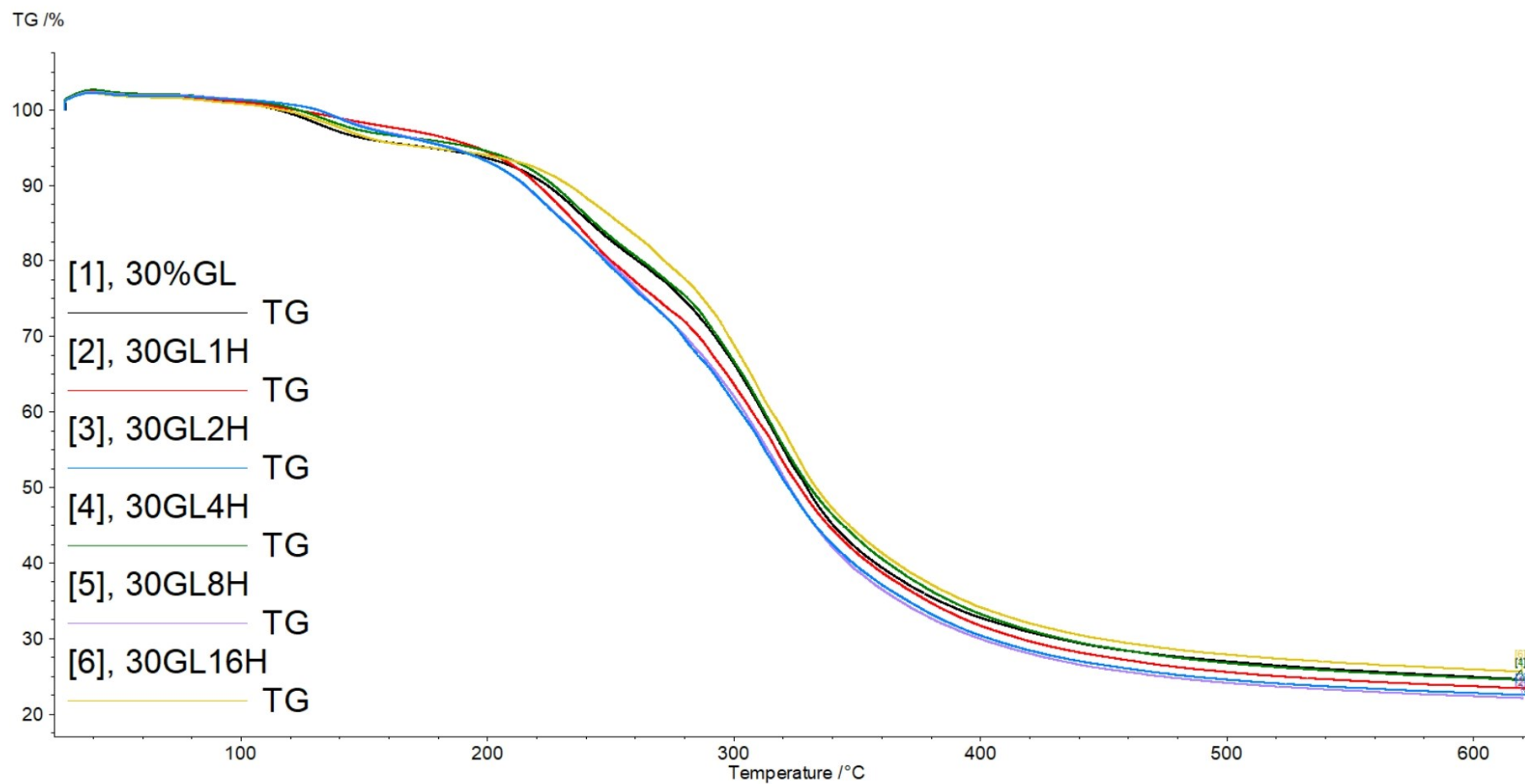
modifikace komponentů v želatinovém filmu – glycerolu a méně stabilních kratších řetězců želatiny. Poslední fáze nastává okolo teploty 300 °C a značí depolymeraci delších želatinových makromolekul. [52]

Naměřené výsledky nedegradovaných vzorků s 30 a 40 % glycerolu (Obrázek 27) vykazují stejný trend jak je zmíněn výše. První stádium do cca 180 °C je spojeno s odstraněním zbytkové vody, která činila pro vzorek s 30 % glycerolu 6,27 % a u vzorku s 40 % glycerolu 5,21 %. V oblasti počátku degradace glycerolu a kratších řetězců želatiny okolo 250 °C je možné vidět, že vzorek s vyšším obsahem glycerolu vykazuje o 3 % větší zbytkové množství hmotnosti. Třetí stádium rozkladu dlouhých želatinových řetězců trvalo až do teploty cca 500 °C. Dosáhnutím teploty 600 °C nastal konec měření. Reziduální množství bylo u obou vzorků cca 24 %. V tomto množství se nacházely uhlíkové zbytky, které se nejsou schopny při této teplotě v argonu rozložit. Pokud by byl vzorek vystaven kyslíku, dokázaly by shořet i tyto uhlíkové zbytky a zůstal by pouze obsah popelovin.

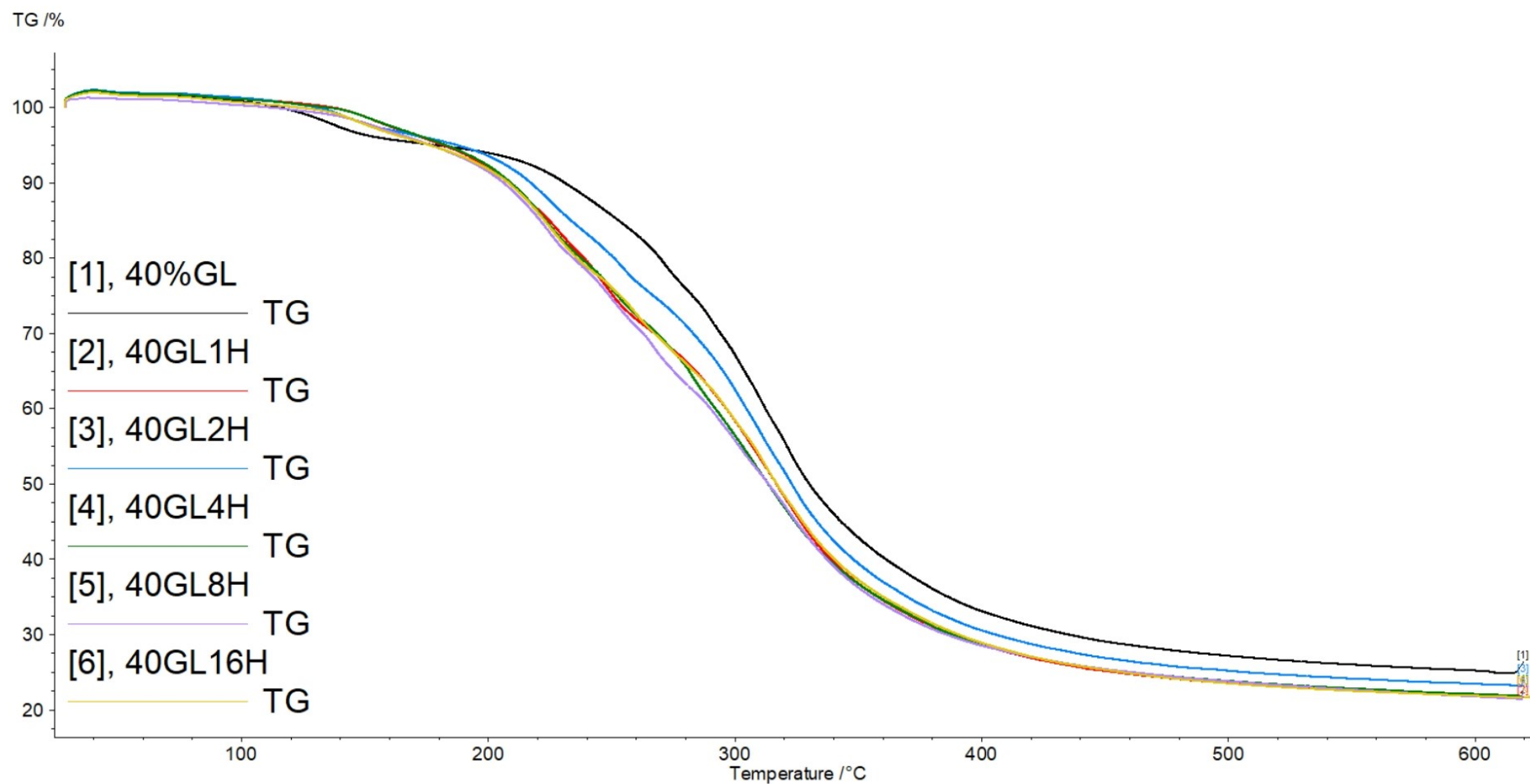
Při porovnání vzorků před a po ozáření vykazují křivky vzorků s 30 % (Obrázek 28) i křivky se 40 % glycerolu (Obrázek 29) po ozáření velmi podobný průběh jako ty neozářené. Opět lze pozorovat tři stádia poklesu v okolí stejných teplot. Tepelná stabilita se zdá být podobná u všech vzorků.



Obrázek 27: Křivka termické analýzy pro nedegradované vzorky s 30 % a 40 % glycerolu



Obrázek 28: Křivka termické analýzy pro vzorky s 30 % glycerolu s intervaly UV ozáření 0–6 hodin



Obrázek 29: Křivka termické analýzy pro vzorky s 40 % glycerolu s intervaly UV ozáření 0–6 hod

ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývala vlivem fotodegradace na připravené želatinové filmy. Želatina pro výrobu filmů byla získána z kuřecích běháků, které se řadí mezi vedlejší produkty jatečné výroby. Želatinové filmy byly z důvodu vysoké křehkosti modifikovány pomocí změkčovadla, kterým byl glycerol. Použity byly dvě rozdílné koncentrace glycerolu – 30 a 40 %. Obě série připravených filmů byly podrobeny fotodegradaci v intervalech 1, 2, 4, 8 a 16 hodin. U filmů před a po fotodegradaci byly provedeny testy rozpustnosti a propustnosti pro vodní páry. Dále byly vzorky analyzovány pomocí spektrofotometru, infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací, diferenciální skenovací kalorimetrie a termického analyzátoru.

Rozpustnost filmů je ovlivněna množstvím přidaného změkčovadla, kdy s vyšší koncentrací glycerolu je u vzorků zaznamenána vyšší rozpustnost. S rostoucí dobou UV ozáření se snižuje rozpustnost filmů. Po jedné hodině expozice UV-záření se výrazně prodloužila doba do rozpuštění – u vzorků s 30 % glycerolu o 38 hodin a vzorků s 40 % o 32 hodin. Po 16 hodinách ozáření se prodloužila rozpustnost filmů o 158 hodin (30 % glycerolu) a o 92 hodin (40 % glycerolu).

Propustnost pro vodní páry byla vyšší pro vzorky s vyšší koncentrací glycerolu a s delším intervalem ozáření se propustnost pro vodní páry snižovala.

U obou sérií filmů lze ze změn hodnot barevnosti filmů po ozáření zjistit, že film tmavne a mění se velmi mírně do žluta, což souhlasí s růstem indexu žlutosti. Zákal filmů po hodinovém ozáření mírně vzroste, ale následně se již nemění. U vzorků nastává po ozáření barevná změna, avšak výraznější je u série s nižším obsahem glycerolu.

FTIR naměřená spektra nevykazují posunutí ani vznik nových píků po UV-ozáření, které by znamenaly vznik nových vazeb. Došlo pouze ke zvýšení intenzity píků a plochy pod nimi bez ohledu na množství změkčovadla i délku ozáření. Největší změna nastává po ozáření v délce jedné hodiny, poté už je zaznamenán pozvolnější nárůst. Větší naměřená plocha pod píkem nám dávala informaci o vzniku více vazeb, což indikuje sesíťování.

Z křivek diferenciální skenovací kalorimetrie lze u většiny vzorků pozorovat, že s vyšším obsahem glycerolu vykazuje vzorek nižší teplotu tání a zpravidla i nižší teplotu skelného přechodu. UV-expozice vede k mírnému snížení hodnot charakteristických teplot.

Termogravimetrická analýza zobrazila v argonu tři stádia dekompozice. První stádium bylo zaznamenáno do 180 °C a spojeno s odstraněním povrchové a zbytkové vody. Následovalo druhé, které započalo okolo teploty 250 °C, spojené s degradací glycerolu a kratších řetězců želatiny. Poslední třetí stádium trvalo do teploty 500 °C a znamenalo rozklad dlouhých želatinových řetězců. Reziduálním zbytkem byly uhlíkové sloučeniny, které je možno rozložit pouze v kyslíku. Délka expozice UV-světlu neměla zásadní vliv na tepelný rozklad želatin.

Získané výsledky ukazují, že po vystavení vzorků UV-záření dochází u želatinových filmů k síťování. Největší rozdíl ve vlastnostech nastal po jedné hodině UV- ozáření, po delší expozici vykazovaly všechny měřené vlastnosti další změny, ovšem ne v takovém měřítku. Délka UV-ozáření měla vliv na míru sesíťování a ovlivňovala tak vlastnosti připravených filmů. Vliv na vlastnosti má také zvolená koncentrace změkčovadla v želatinových filmech.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] CHEREMISINOFF, Nicholas, Paul ROSENFELD a Anton DAVLETSHIN, 2008. *The food and Dairy Industry*. In: *Responsible Care: A New Strategy for Pollution Prevention and Waste Reduction through Environmental Management*. 1st Edition. Texas, Gulf Publishing Company, 2008, 393-434. ISBN 978-1-933762-16-6
- [2] OREOPOULOU, Vasso a Winfried RUSS, 2007. *Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry*. In: Kristbergsson, Kristberg, ISEKI-FOOD SERIES. Volume 3. Německo, Springer Science+Business Media, LLC. 209-232. ISBN: 978-0-387-35766-9
- [3] TOLDRÁ, Fidel et al., 2012. Innovations in value-addition of edible meat by-products. *Meat Science*. 92(3), 290-296. ISSN 03091740. Dostupné z: doi:10.1016/j.meatsci.2012.04.004
- [4] ZEMEK, Jan, 2017. *Průmyslové zpracování hrabavé drůbeže z hlediska tvorby a nakládání s odpady*. Uherské Hradiště. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Dostupné z: https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/41196/zemek_2017_dp.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- [5] HAVELKOVÁ, Adéla, 2016. *Kuřecí běháky jako netradiční surovina pro přípravu želatin a hydrolyzátů*. Zlín. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Dostupné z: https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/37586/havelková_2016_dp.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- [6] IRSHAD, A. a B. D. SHARMA, 2015. Abattoir by-Product Utilization for Sustainable Meat Industry: A Review. *Journal of Animal Production Advances*. 5(6), 681-696. ISSN 2251-7677. Dostupné z: doi:10.5455/japa.20150626043918
- [7] BARBUT, Shai, 2015. *The Science of Poultry and Meat Processing*. Guelph : University of Guelph. ISBN: 978-0-88955-626-3
- [8] SIMEONOVÁ, Jana, 2013. *Technologie drůbeže, vajec a minoritních živočišných produktů*. Vyd. 2., nezměn. Brno: Mendelova univerzita v Brně. ISBN 978-80-7375-891-2.
- [9] INGR, Ivo, 2011. *Produkce a zpracování masa*. Vyd. 2., nezměn. V Brně: Mendelova univerzita. ISBN 978-80-7375-510-2.

- [10] JAYATHILAKAN, K. et al., 2012. Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. *Journal of Food Science and Technology*. 49(3), 278-293. ISSN 0022-1155. Dostupné z: doi:10.1007/s13197-011-0290-7
- [11] BUREŠ, Ladislav, 2018. *Využití vedlejších bílkovinných produktů z porážky drůbeže na přípravu kolagenu*. Zlín. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Dostupné z: https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/42364/bures_2018_dp.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- [12] EVROPSKÝ PARLAMENT A RADA EVROPSKÉ UNIE. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1069/2009. In: EUR-Lex. [Online] 21. říjen 2009. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX:32009R1069>.
- [13] Nařízení Komise (EU) č. 294/2013. EUR-Lex. [Online] 14. březen 2013. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2013/294/oj?locale=cs>.
- [14] OECHSLE, Anja Maria et al., 2016. Microstructure and physical-chemical properties of chicken collagen. *Food Structure*. 7, 29-37. ISSN 22133291. Dostupné z: doi:10.1016/j.foostr.2016.02.001
- [15] SEIDAVI, A.R., H. ZAKER-ESTEGHAMATI a C.G. SCANES, 2019. Chicken processing: impact, co-products and potential. *World's Poultry Science Journal*. 75(1), 55-68. ISSN 0043-9339. Dostupné z: doi:10.1017/S0043933918000764
- [16] GELSE, K, 2003. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 55(12), 1531-1546. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2003.08.002
- [17] HASHIM, Puziah et al., 2015. Collagen in food and beverage industries. *International Food Research Journal*. 22(1), 1-8. Dostupné z: https://www.academia.edu/32084313/Collagen_in_food_and_beverage_industries.
- [18] NOVOTNÁ, Tereza, 2022. *Perspektivy vývoje, výroby a aplikace želatiny do játrových paštik*. Zlín. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Dostupné z: https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/51498/novotna_2022_dp.pdf?sequence=-1.
- [19] PETERKOVÁ, Petra a Lubomír LAPČÍK, 2000. Collagen – Properties, Modifications and Applications. *Chemické Listy*. 94(6), 371-379. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2501>

- [20] PARRY David A.D a John M. SQUIRE, 2017. Fibrous Proteins - Structures and Mechanisms. In: Harris J. Robin, Subcellular biochemistry. Volume 82. Německo, Springer International Publishing AG. ISBN 978-3-319-49674-0
- [21] SANTANA, José C. C. et al., 2020. *Valorization of Chicken Feet By-Product of the Poultry Industry: High Qualities of Gelatin and Biofilm from Extraction of Collagen*. *Polymers*. 12(3). ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12030529
- [22] LIU, D. C., Y. K. LIN a M. T. CHEN, 2001. *Optimum Condition of Extracting Collagen from Chicken Feet and its Characteristics*. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 14(11), 1638-1644. ISSN 1011-2367. Dostupné z: doi:10.5713/ajas.2001.1638
- [23] NAOMI, Ruth, Pauzi Muhd RIDZUAN a Hasnah BAHARI, 2021. Current Insights into Collagen Type I. *Polymers*. 13(16). ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym13162642
- [24] VON DER MARK, KLAUS, 2006. Structure, Biosynthesis and Gene Regulation of Collagens in Cartilage and Bone. *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*. Elsevier, 3-40. ISBN 9780120885626. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012088562-6/50002-9
- [25] HAUG I. J. a K. I. DRAGET, 2009. In: Phillips G. O. a P. A. Williams, *Handbook of hydrocolloids*. Second edition. Cambridge, Woodhead Publishing Limited. 142-163. ISBN: 978-1-84569-587-3
- [26] MOKREJŠ, Pavel et al., 2017. *Chicken Paws By-products as an Alternative Source of Proteins*. *Oriental Journal of Chemistry*. 33(5), 2209-2216. ISSN 0970020X. Dostupné z: doi:10.13005/ojc/330508
- [27] ALIPAL, J. et al., 2021. *A review of gelatin: Properties, sources, process, applications, and commercialisation*. *Materials Today: Proceedings*. 42, 240-250. ISSN 22147853. Dostupné z: doi:10.1016/j.matpr.2020.12.922
- [28] SCHRIBER Reinhard a Herbert GAREIS, 2007. *Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. ISBN: 9783527610969
- [29] Gelatin manufacturers intitute of America, inc.. *Gelatin*. 1st edition. New York: Gelatin manufacturers intitute of America, inc. 1973. 5-22. Dostupné z: http://www.gelatin-gmia.com/uploads/1/1/8/4/118450438/gmia_gelatin_manual_2019.pdf
- [30] Hages pro Českou republiku: *Želatina*. 2005. [online] [1-5-2023] Dostupné z: <https://www.hages.cz/katalogy/zelatina.pdf>

- [31] NUR HANANI, Z.A., Y.H. ROOS a Joe P. KERRY, 2012. *Use of beef, pork and fish gelatin sources in the manufacture of films and assessment of their composition and mechanical properties*. Food Hydrocolloids. 29(1), 144-151. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2012.01.015
- [32] LU, Yanan et al., 2022. *Application of Gelatin in Food Packaging: A Review*. Polymers. 14(3). ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym14030436
- [33] MARIOD, Abdalbasit Adam, FADUL, Hadia, 2013. *Review: gelatin, source, extraction and industrial applications*. Acta Sci.Pol. Technol. Aliment., 12.2: 135-147. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/236735648_Review_Gelatin_source_extraction_and_industrial_applications
- [34] THOMAZINE, Maira, Rosemary A. CARVALHO a Paulo J.A. SOBRAL, 2005. *Physical Properties of Gelatin Films Plasticized by Blends of Glycerol and Sorbitol*. Journal of Food Science. 70(3), E172-E176. ISSN 00221147. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2621.2005.tb07132.x
- [35] SUDERMAN, Norafidah a Norizah Mhd SARBON, 2020. *Optimization of chicken skin gelatin film production with different glycerol concentrations by response surface methodology (RSM) approach*. Journal of Food Science and Technology. 57(2), 463-472. ISSN 0022-1155. Dostupné z: doi:10.1007/s13197-019-04074-0
- [36] SANCAKLI, A. et al., 2021. *Effects of bovine gelatin viscosity on gelatin-based edible film mechanical, physical and morphological properties*. SN Applied Sciences. 3(1). ISSN 2523-3963. Dostupné z: doi:10.1007/s42452-020-04076-0
- [37] SOBRAL, P.J.A. et al., 2001. *Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films*. Food Hydrocolloids. 15(4-6), 423-432. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/S0268-005X(01)00061-3
- [38] LI, Jian-Hua et al., 2014. *Preparation and characterization of active gelatin-based films incorporated with natural antioxidants*. Food Hydrocolloids. 37, 166-173. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2013.10.015
- [39] SUDERMAN, N., M.I.N. ISA a N.M. SARBON, 2018. *The effect of plasticizers on the functional properties of biodegradable gelatin-based film: A review*. Food Bioscience. 24, 111-119. ISSN 22124292. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbio.2018.06.006

- [40] LIU, Fei et al., 2017. *Study of combined effects of glycerol and transglutaminase on properties of gelatin films*. Food Hydrocolloids. 65, 1-9. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2016.10.004
- [41] TAGHIZADEH, Masoumeh et al., 2018. *Photosensitizer-induced cross-linking: A novel approach for improvement of physicochemical and structural properties of gelatin edible films*. Food Research International. 112, 90-97. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2018.06.010
- [42] LIU, Yi et al., 2009. Biomimetic sealant based on gelatin and microbial transglutaminase: An initial in vivo investigation. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. 91B(1), 5-16. ISSN 15524973. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.b.31368
- [43] CHAIBI, Samira et al., 2015. *The role of crosslinking on the physical properties of gelatin based films*. Colloid and Polymer Science. 293(10), 2741-2752. ISSN 0303-402X. Dostupné z: doi:10.1007/s00396-015-3660-2
- [44] LIN, Junjie et al., 2019. *The modification of gelatin films: Based on various cross-linking mechanism of glutaraldehyde at acidic and alkaline conditions*. 7(12), 4140-4146. ISSN 2048-7177. Dostupné z: doi:10.1002/fsn3.1282
- [45] PAL, Anjali, Jaya BAJPAI a A. K. BAJPAI, 2018. Easy fabrication and characterization of gelatin nanocarriers and in vitro investigation of swelling controlled release dynamics of paclitaxel. *Polymer Bulletin*. 75(10), 4691-4711. ISSN 0170-0839. Dostupné z: doi:10.1007/s00289-018-2291-4
- [46] MOON, Seo Hyung et al., 2023. *Photocrosslinkable natural polymers in tissue engineering*. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 11. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2023.1127757
- [47] SCHNABEL, Wolfram, 1981. *Polymer degradation: principles and practical applications*. München: Hanser. ISBN 34-461-3264-3.
- [48] YOUSIF, Emad a Raghad HADDAD, 2013. *Photodegradation and photostabilization of polymers, especially polystyrene: review*. SpringerPlus. 2(1). ISSN 2193-1801. Dostupné z: doi:10.1186/2193-1801-2-398

- [49] HRABALOVÁ, Marta, 2007. *Photodegradation of beta-nucleated polypropylene: the effect of structure parameters*. Zlín, Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Dostupné z: <https://theses.cz/id/izxk9m/>
- [50] WYPYCH, George, 2018. *Handbook of Material Weathering*. 6th Edition, ChemTec Publishing, 2018, 982 p, ISBN 978-1-927885-31-4
- [51] HE, Yuanxin et al., 2021. *Polymer Degradation: Category, Mechanism and Development Prospect*. E3S Web of Conferences. 290. ISSN 2267-1242. Dostupné z: doi:10.1051/e3sconf/202129001012
- [52] ROSSETO, Marieli et al., 2021. *Accelerated Aging of Starch-Gelatin Films with Enzymatic Treatment*. Journal of Polymers and the Environment. 29(4), 1063-1075. ISSN 1566-2543. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-020-01938-x
- [53] WU, Cheng-Kuo, Jenn-Shou TSAI a Wen-Chieh SUNG, 2019. *Functional Characteristics of Ultraviolet-Irradiated Tilapia Fish Skin Gelatin*. Molecules. 24(2). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24020254
- [54] MOKREJŠ, Pavel et al., 2019. Využití vedlejších kolagenních produktů z porážky drůbeže k přípravě želatin a hydrolyzátů. *Chemické listy*. 113(2), 121-125. ISSN 009-2770. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/3292/3254>
- [55] PEÑA-RODRIGUEZ, Cristina et al., 2015. *Functional properties and in vitro antioxidant and antibacterial effectiveness of pigskin gelatin films incorporated with hydrolysable chestnut tannin*. Food Science and Technology International. 21(3), 221-231. ISSN 1082-0132. Dostupné z: doi:10.1177/1082013214525429
- [56] NOR, M. H. M., N. N. M. NAZMI a N. M. SARBON, 2017. Effects of plasticizer concentrations on functional properties of chicken skin gelatin films. *International Food Research Journal*. 24(5), 1910-1918. ISSN 1985-4668. Dostupné z: [http://www.ifrj.upm.edu.my/24%20\(05\)%202017/\(10\).pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/24%20(05)%202017/(10).pdf)
- [57] COPPOLA, Mara, Madeleine DJABOUROV a Maria FERRAND, 2008. *Phase Diagram of Gelatin Plasticized by Water and Glycerol*. Macromolecular Symposia. 273(1), 56-65. ISSN 10221360. Dostupné z: doi:10.1002/masy.200851308

[58]Protamex®, CAS No. 9014-01-1, Version No: 3, Novozymes A/S, Denmark, 14-02-2020, Dostupné z:

https://www.univarsolutions.com/documents/file/view/code/sds_file/id/16179267/

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

NH ₃	amoniak
(ES)	Evropské společenství
EU	Evropská unie
č.	číslo
Sb.	sbírka zákonů
Gly-	glycin
N-konec	dusíkový konec
C-konec	uhlíkový konec
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
ATR	Attenuated Total Reflexion, zeslabená totální reflexe
SDS	sodná sůl dodecylsulfátu
NaOH	hydroxid sodný
Ca(OH) ₂	hydroxid vápenatý
g.cm ⁻³	gram na centimetr krychlový
Da	Dalton
GRAS	Generally Regarded As Safe, obecně považovaný za bezpečný
°C	stupeň Celsia
UV	ultrafialové
g	gram
ml	mililitr
FFS	filmotvorný roztok
cm	centimetr
TGA	termogravimetrická analýza
DSC	diferenciální skenovací kalorimetrie

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Chemická struktura želatiny.....	24
Obrázek 2: Enzymatické síťování želatiny [42]	36
Obrázek 3: Chemické síťování želatiny [45]	36
Obrázek 4: Fyzikální síťování želatiny [41]	38
Obrázek 5: Jablonskeho diagram [50]	41
Obrázek 6: Analyzátor textury; Mechtric Stevens-LFRA Texture Analyzer	49
Obrázek 7: Xenonová komora ATLAS Xenotest ALPHA+	51
Obrázek 8: Uchycení želatinových filmů v xenonové komoře.....	51
Obrázek 9: Spektrofotometr HunterLab UltraScan Pro D65	53
Obrázek 10: Infračervený spektroskop s Fourierovou transformací Bruker ALPHA II	54
Obrázek 11: Diferenciální skenovací kalorimetr Mettler Toledo DSC 1	55
Obrázek 12: Termický analyzátor Netzsch STA 449 F1 Jupiter	55
Obrázek 13: Vrstevnicový graf vlivu teploty a doby extrakce na pevnost želatinových gelů (Bloom) [54]	56
Obrázek 14: Objemová botnavost vzorků s 30 % glycerolu s intervaly ozáření 0–6 hodin	59
Obrázek 15: Objemová botnavost vzorků s 40 % glycerolu s intervaly ozáření 0–6 hodin	59
Obrázek 16: Nárůst hmotnosti testovacích kalíšku uzavřených filmem s 30 % glycerolu s intervaly 1–16 hodin ozáření pro měření paropropustnosti	61
Obrázek 17: Nárůst hmotnosti testovacích kalíšku uzavřených filmem s 40 % glycerolu s intervaly 1–16 hodin ozáření pro měření paropropustnosti	61
Obrázek 18: Paropropustnost vzorků s 30 % glycerolu po intervalu ozáření 1–6 hodin.....	62
Obrázek 19: Paropropustnost vzorků s 40 % glycerolu po intervalu ozáření 1–6 hodin.....	63
Obrázek 20: FTIR spektra nedegradovaných filmů s rozdílným množstvím glycerolu.....	67
Obrázek 21: FTIR spektra želatinových filmů s 30 % glycerolu po 0–16 hodinách ozáření	68
Obrázek 22: FTIR spektra želatinových filmů s 40 % glycerolu po 0–16 hodinách ozáření	68
Obrázek 23: Grafické zobrazení ploch pod jednotlivými píky želatinových filmů s 30 % glycerolu po 0–16 hodinách ozáření	69
Obrázek 24: Grafické zobrazení ploch pod jednotlivými píky želatinových filmů s 30 % glycerolu po 0–16 hodinách ozáření	70
Obrázek 25: DSC křivky ohřevu želatinových filmů s 30 % glycerolu po ozáření v intervalech 0–16 hodin.....	72
Obrázek 26: DSC křivky ohřevu želatinových filmů s 40 % glycerolu po ozáření v intervalech 0–16 hodin.....	73
Obrázek 27: Křivka termické analýzy pro nedegradované vzorky s 30 % a 40 % glycerolu	75

Obrázek 28: Křivka termické analýzy pro vzorky s 30 % glycerolu s intervaly UV ozáření 0–6 hodin	76
Obrázek 29: Křivka termické analýzy pro vzorky s 40 % glycerolu s intervaly UV ozáření 0–6 hod	77

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Značení testovaných vzorků	50
Tabulka 2: Přehled pevností gelu 1. a 2. frakce želatiny	56
Tabulka 3: Hodnota nabotnění a doba do rozpuštění vzorků s 30 % glycerolu s intervaly ozáření 0–16 hodin (šedá barva znamená rozpuštění vzorku)	57
Tabulka 4: Hodnota nabotnění a doba do rozpuštění vzorků s 40 % glycerolu s intervaly ozáření 0–16 hodin (šedá barva znamená rozpuštění vzorku)	58
Tabulka 5: Hodnoty propustnosti pro vodní páry pro vzorky s 30 a 40 % glycerolu v intervalech ozáření 1–16 hodin	64
Tabulka 6: Naměřené hodnoty barevných souřadnic, žlutosti a zákalu pro vzorky s 30 % glycerolu po jednotlivých intervalech UV ozáření	64
Tabulka 7: Naměřené hodnoty barevných souřadnic, žlutosti a zákalu pro vzorky s 40 % glycerolu po jednotlivých intervalech UV ozáření	65
Tabulka 8: Barevná změna vzorku s 30 % glycerolu	65
Tabulka 9: Barevná změna vzorku s 40 % glycerolu	65
Tabulka 10: Plochy píků amidu A, B, I, II a III vzorků s 30 % glycerolu před a po UV ozáření	69
Tabulka 11: Plochy píků amidu A, B, I, II a III vzorků s 40 % glycerolu před a po UV ozáření	70
Tabulka 12: Přehled teplot skelného přechodu (T_g) a teplot tání (T_m) jednotlivých vzorků s 30 % glycerolu před a po ozáření	71
Tabulka 13: Přehled teplot skelného přechodu (T_g) a teplot tání (T_m) jednotlivých vzorků s 40 % glycerolu před a po ozáření	72

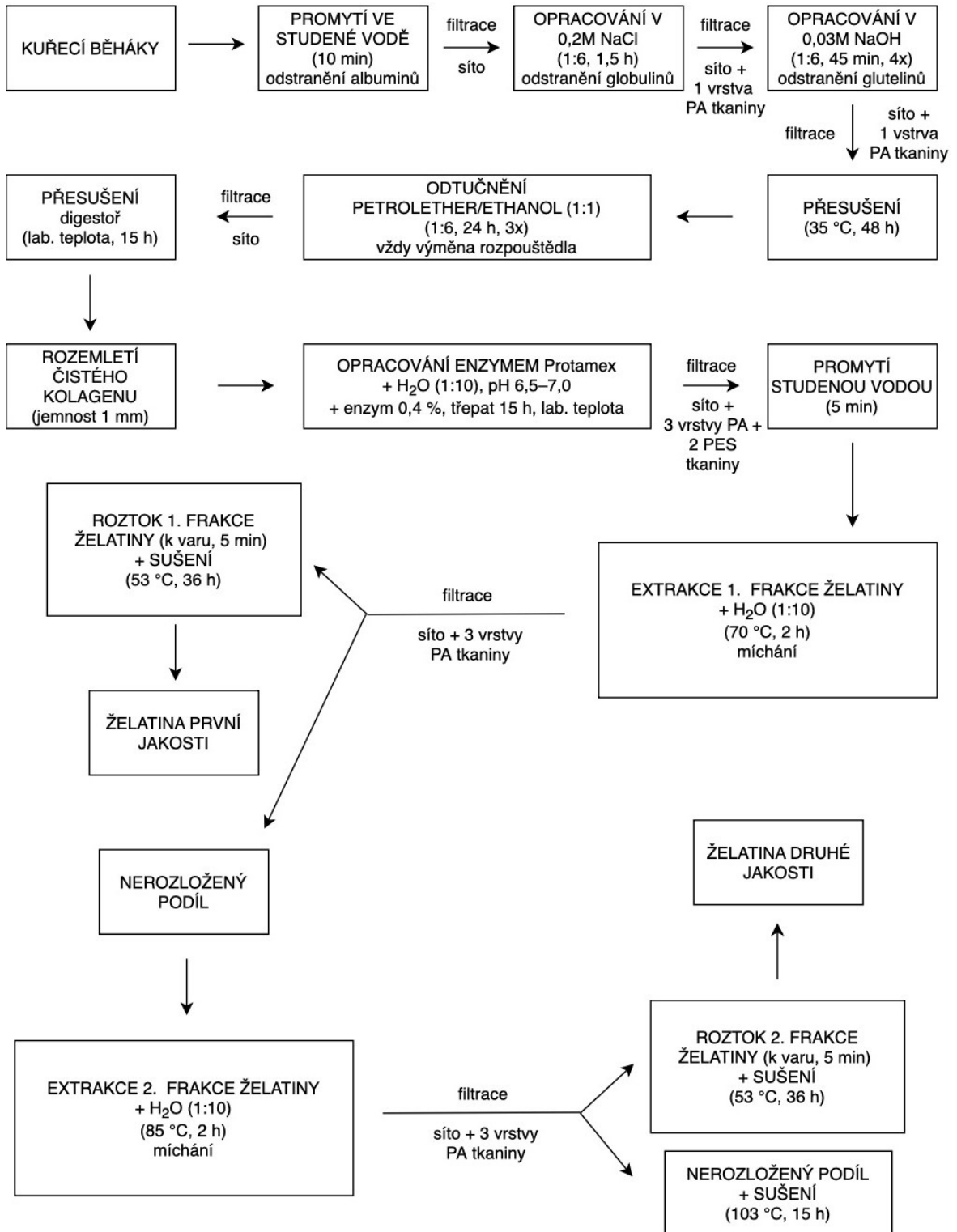
SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Schéma extrakce želatiny

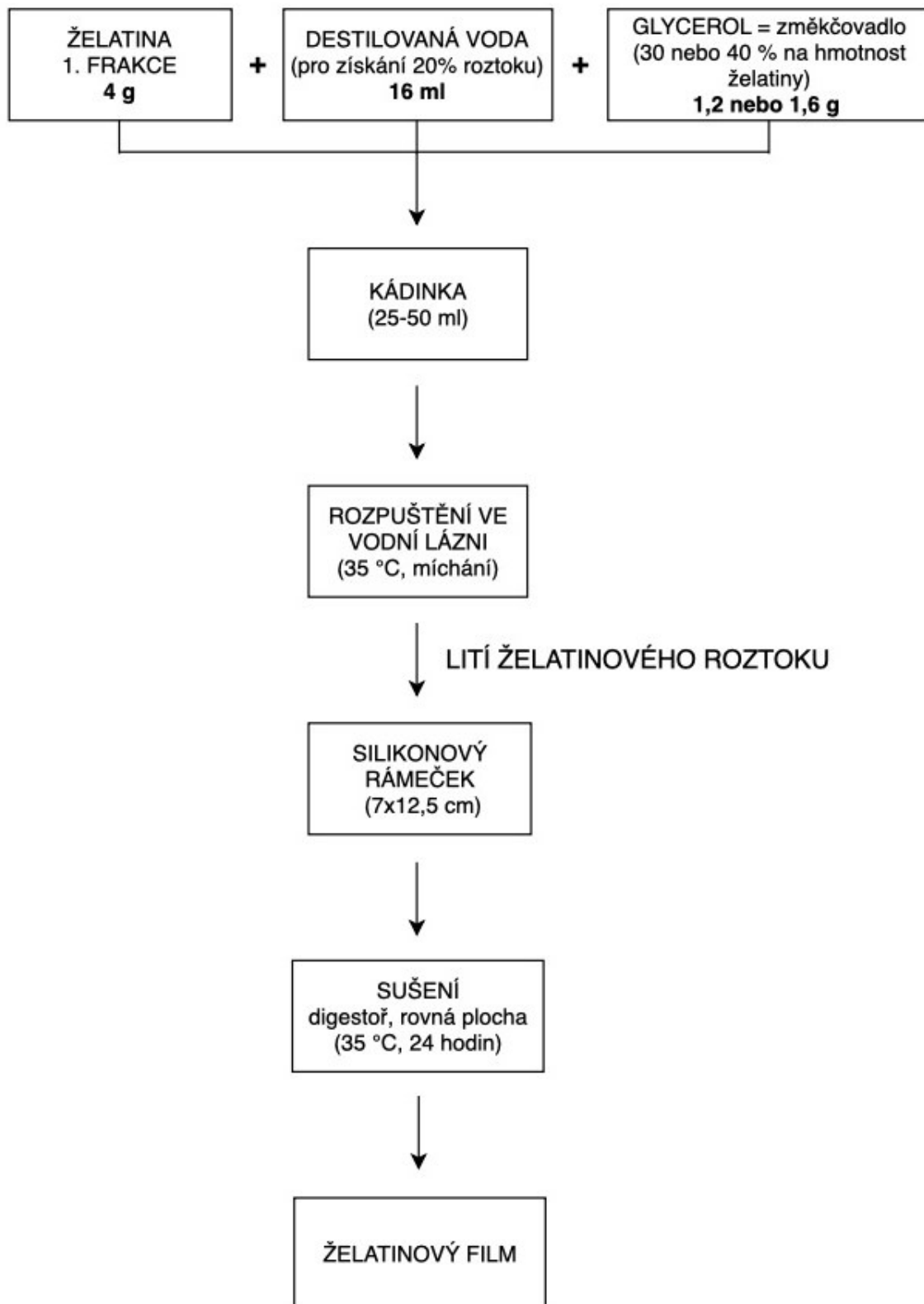
Příloha P II: Schéma přípravy želatinových filmů

Příloha P III: Enzym Protamex – materiálový list

PŘÍLOHA P I: SCHÉMA EXTRAKCE ŽELATINY



PŘÍLOHA P II: SCHÉMA PŘÍPRAVY ŽELATINOVÝCH FILMŮ



PŘÍLOHA P III: ENZYM PROTAMEX – MATERIÁLOVÝ LIST

SAFETY DATA SHEET

Revision date: 2020/02/14

Version No: 3

Compliant with 29 CFR §1910.1200 HCS 2012

Compliant with HPR WHMIS 2015

Protamex®

1. PRODUCT AND COMPANY IDENTIFICATION

Product Name	Protamex®
Chemical Name	Enzyme preparation
Declared activity	Protease (Subtilisin)

Use of the substance/ preparation

Novozymes' enzyme preparations are biocatalysts used in a variety of industrial processes within food manufacturing

Supplier's details

Novozymes North America, Inc.
77 Perry Chapel Church Rd., Box 576
Franklinton, NC 27525
Email: SafetyDataSheet@novozymes.com
www.novozymes.com

Information Telephone Number

1-919-494-3000, 8 am - 4:30 pm EST M-F

Emergency Telephone Number

1-800-424-9300 (Chemtrec) 24 hours every day

Rethink Tomorrow

novozymes 

SAFETY DATA SHEET

Protamex®
Version No: 3
Revision date: 2020/02/14

Page 2 / 7

2. HAZARD(S) IDENTIFICATION

Classification
Classification of the chemical in accordance with 29CFR §1910.1200
WHMIS Classification

Respiratory sensitization Category 1

Label elements

Danger

Hazard statements
H334 - May cause allergy or asthma symptoms or breathing difficulties if inhaled

Precautionary Statements - Prevention
P261 - Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapors/spray
P284 - In case of inadequate ventilation wear respiratory protection
Precautionary Statements - Response
P304 + P340 - IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing
P342 + P311 - If experiencing respiratory symptoms: Call a POISON CENTRE or doctor/physician



Hazards not otherwise classified (HNOC)

1	Health
1	Flammability
0	Reactivity
X	Protective Equipment



3. COMPOSITION/INFORMATION ON INGREDIENTS

Chemical name	CAS No	IUB No.	Weight-%
Protease (neutral) (aep)	9080-56-2	3.4.24.28	1 - 5
Protease (Subtilisin) (aep)	9014-01-1	3.4.21.62	0.1- < 1

aep (active enzyme protein) contributes to the GHS classification.

4. FIRST AID MEASURES

Rethink Tomorrow

novozymes 

SAFETY DATA SHEET

Protamex®
Version No: 3
Revision date: 2020/02/14

Page 3 / 7

In case of unintended overexposure, the following measures apply

Inhalation	
Effects	May cause allergic respiratory reaction.
Symptoms	Shortness of breath, wheezing and coughing. The effect of inhalation may be delayed.
First Aid	Remove person to fresh air. If signs/symptoms continue, get medical attention. Show this safety data sheet to the doctor in attendance.
Skin Contact	
Effects	May cause slight irritation.
Symptoms	Slight irritation.
First Aid	Remove and wash contaminated clothing before re-use. Wash off immediately with plenty of water. If symptoms persist, call a doctor. Show this safety data sheet to the doctor in attendance.
Eye Contact	
Effects	May cause slight irritation.
Symptoms	Slight irritation.
First Aid	Hold eye open and rinse slowly and gently with water for 15-20 min. Remove contact lenses, if present, after the first five minutes, then continue rinsing eye. If symptoms persist, call a doctor. Show this safety data sheet to the doctor in attendance.
Ingestion	
Effects	Ingestion may cause gastrointestinal irritation, nausea, vomiting and diarrhea.
Symptoms	Irritation.
First Aid	Rinse mouth with water and drink plenty of water. If symptoms persist, call a doctor. Show this safety data sheet to the doctor in attendance..

5. FIRE-FIGHTING MEASURES

Flammable Properties	Slightly flammable according to HMIS criteria.
Suitable Extinguishing Media	Use water spray, alcohol-resistant foam, dry chemical or carbon dioxide.
Unsuitable Extinguishing Media	None.
Hazardous Combustion Products	None.

Specific Hazards Arising from the Chemical May cause allergic respiratory reaction

Protective Equipment and Precautions for Self-contained breathing apparatus and standard turn-out apparel
Firefighters

6. ACCIDENTAL RELEASE MEASURES

Personal Precautions	For personal protection see section 8
Environmental Precautions	Collect spillage.
Methods for cleaning up	Avoid formation of dust and aerosols. Spilled preparation should be removed immediately to avoid formation of dust from dried preparation. Take up by mechanical means preferably by a vacuum cleaner equipped with a HEPA (High Efficiency Particulate Air) filter. Flush remainder carefully with plenty of water. Avoid splashing, high pressure washing or compressed air cleaning to avoid formation of aerosols. Ensure sufficient ventilation. Wash contaminated clothing.

Rethink Tomorrow

novozymes 

SAFETY DATA SHEET

Protamex®
Version No: 3
Revision date: 2020/02/14

Page 4 / 7

Other Information For personal protection see section 8.

7. HANDLING AND STORAGE

Handling Avoid formation of dust and aerosols.
Ensure adequate ventilation.
This product is formulated to prevent formation of dust
However, inappropriate handling may release dust

Storage Keep tightly closed in a dry and cool place. The product can be transported at ambient temperature.
Following delivery, the product should be stored as recommended. Temperature 0-25 °C(32-77 °F)

8. EXPOSURE CONTROLS / PERSONAL PROTECTION

Chemical name	ACGIH TLV
Protease (Subtilisin) (aep)	Ceiling: 0.00006 mg/m ³ Ceiling (as crystalline active enzyme, listed under Subtilisins)

Chemical name	DNEL Dermal Acute Local (Workers)	DMEL Inhalation Long term Local (Workers)
Protease (neutral) (aep)	-	DMEL = 60 ng/m ³
Protease (Subtilisin) (aep)	DNEL = 0,2% in mixutre (W/W)	DMEL = 60 ng/m ³

Derived No Effect Level (DNEL)
Derived Minimal Effect Level (DMEL)

Occupational exposure controls
Engineering Controls Ensure adequate ventilation, especially in confined areas.
Maintain good conditions of industrial hygiene. Some processes may require enclosures, local exhaust ventilation, or other engineering controls to control airborne levels. Additional handling and healthy/safety information is available upon request

Personal Protective Equipment
Respiratory protection In case of insufficient ventilation wear suitable respiratory equipment that meets HEPA/P100 specifications

Eye Protection Wear safety glasses with side shields (or goggles)

Skin and body protection Wear protective gloves and protective clothing

General Hygiene Considerations Handle in accordance with good industrial hygiene and safety practice

Environmental exposure controls Local authorities should be advised if significant spillages cannot be contained

9. PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

Information on basic physical and chemical properties

Physical State	granulate
Color	Off-white and brown
Odor	Slight fermentation odor
pH	Not relevant
Melting point / freezing point	No information available
Initial boiling point and boiling range	Not determined

Rethink Tomorrow

novozymes 

SAFETY DATA SHEET

Protamex®
Version No: 3
Revision date: 2020/02/14

Page 5 / 7

Flash Point	Not determined
Evaporation rate	Not available
Flammability (solid, gas)	Not determined
Upper/lower flammability or explosive limits	Not available
Vapor Pressure	No data available
Vapor density	Not available
Density (g/ml)	1.1
Solubility	Active component is readily soluble in application-relevant solutions at all levels of concentration, temperature and pH which may occur in normal usage
Partition Coefficient (n-octanol/water)	No data available
Autoignition temperature	Not available
Decomposition temperature	Not available
Viscosity	Not available
Other information	No information available

10. STABILITY AND REACTIVITY

Reactivity	Not relevant
Chemical stability	Stable under recommended storage conditions
Possibility of hazardous reactions	None under normal processing
Conditions to Avoid	Avoid destruction of granulate
Incompatible materials	None
Hazardous Decomposition Products	None

11. TOXICOLOGICAL INFORMATION

Information on toxicological effects

Repeated inhalation of enzyme dust or aerosols resulting from improper handling may induce sensitization and may cause allergic type 1 reactions in sensitized individuals

Mild skin irritation
Mild eye irritation

Chemical name	Acute oral toxicity	Acute inhalation toxicity	Skin corrosion/irritation	Serious eye damage/eye irritation
Protease (neutral) (aep)	LD50: > 2000 mg/kg bw (OECD TG 401)		irritating (OECD TG 404)	Slightly irritating (OECD TG 405)
Protease (Subtilisin) (aep)	LD50: 1800 mg/kg bw (OECD TG 401)	Exposure based waiving	Slightly irritating (OECD TG 404)	Slightly irritating (OECD TG 405)

Chemical name	Specific target organ toxicity (single exposure)	Genetic toxicity	Skin sensitization	Respiratory sensitization
Protease (neutral) (aep)		No indication of mutagenic effects (OECD TG 471, 473)		Sensitizer (Human experience)
Protease (Subtilisin) (aep)	Irritating, respiratory tract (ACGIH 2001)	No indication of mutagenic effects (OECD TG 471, 473, 476)		Sensitizer (Human experience)

Rethink Tomorrow

novozymes 

SAFETY DATA SHEET

Protamex®
Version No: 3
Revision date: 2020/02/14

Page 6 / 7

12. ECOLOGICAL INFORMATION

Toxicity

Chemical name	Daphnia, acute	Algae, acute	Fish, acute
Protease (neutral) (aep)	EC50 (48 hours): 3.24 mg aep/l (OECD TG 202)	ErC50 (72 hours): 0.518 mg aep/l (OECD TG 201)	LC50 (96 hours): >18.4 mg aep/l (OECD TG 203)
Protease (Subtilisin) (aep)	EC50 (48 hours): 586 µg aep/l (OECD TG 202)	ErC50 (72 hours): 830 µg aep/l (OECD TG 201)	LC50 (96 hours): 8.2 mg aep/l (OECD TG 203)

Persistence/Degradability

Chemical name	Persistence and degradability	Partition coefficient (n-octanol/water)
Protease (neutral) (aep)	Readily biodegradable (OECD 301)	LogPow: <0
Protease (Subtilisin) (aep)	Readily biodegradable (OECD TG 301B)	LogPow: <0

Chemical name	Bioaccumulative Potential
Protease (neutral) (aep)	Does not bioaccumulate
Protease (Subtilisin) (aep)	Does not bioaccumulate

Mobility in soil Not relevant
Other adverse effects No information available

13. DISPOSAL CONSIDERATIONS

Disposal of wastes Dispose of in accordance with local regulations.
Contaminated Packaging Dispose of wastes in an approved waste disposal facility.

14. TRANSPORT INFORMATION

Transport Regulations
No dangerous goods according to transport regulations
No special precautions required

UN-No Not applicable
Proper Shipping Name Not applicable
Hazard Class Not applicable
Packing Group Not applicable
Reportable Quantity (RQ) Not applicable
Marine Pollutant Not applicable

15. REGULATORY INFORMATION

The product complies with the recommended purity specifications for food-grade enzymes given by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) and the Food Chemical Codex (FCC).

USA, Federal Regulations

TSCA Inventory

The active ingredient and all components of the enzyme preparation are listed on the TSCA inventory
SARA 313

Section 313 of Title III of the Superfund Amendments and Reauthorization Act of 1986 (SARA). This product does not contain any chemicals

Rethink Tomorrow

novozymes 

SAFETY DATA SHEET

Protamex®
Version No: 3
Revision date: 2020/02/14

Page 7 / 7

which are subject to the reporting requirements of the Act and 40 CFR Part 372.

SARA 311/312 Hazardous Categorization

Acute Health Hazard	No
Chronic Health Hazard	No
Fire Hazard	No
Sudden Release of Pressure Hazard	No
Reactive Hazard	No

USA, State Regulations

California Proposition 65
This product does not contain any Proposition 65 chemicals

Canada

DSL/NDSL
Does not Comply

WHMIS Statement

This product has been classified in accordance with the hazard criteria of the Hazardous Products Regulations (HPR) and the SDS contains all the information required by WHMIS 2015.

16. OTHER INFORMATION

Training advice Details on the safe handling of this product are located in the Novozymes Customer Center Document Library on www.mynovozymes.com

GHS-Classification The GHS calculation method has been used for classification of this mixture.

Disclaimer The information provided on this SDS is correct to the best of our knowledge, information and belief at the date of its publication. The information given is designed only as a guide for safe handling, use, processing, storage, transportation, disposal and release and is not to be considered as a warranty or quality specification. The information relates only to the specific material designated and may not be valid for such material used in combination with any other material or in any process, unless specified in the text. Furthermore, as the conditions of use are beyond the control of Novozymes, it is the responsibility of the customer to determine the conditions of safe use of these products.

End of Safety Data Sheet

Version No: 3 / ANSI / 2020/02/14

Rethink Tomorrow

novozymes 