

Využití vedlejších jatečných bílkovinných produktů na výrobu želatin a hydrolysátů

Tomáš Plachý

Diplomová práce

2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Tomáš PLACHÝ
Osobní číslo: T10360
Studijní program: N 2808 Chemie a technologie materiálů
Studijní obor: Inženýrství polymerů

Téma práce: Využití vedlejších jatečných bílkovinných produktů na výrobu želatin a hydrolysátů

Zásady pro vypracování:

1. Vedlejší produkty jatečného zpracování masa a možnosti jejich využití
2. Výroba želatin, hydrolysátů a jejich průmyslové aplikace
3. Extrakce želatin/hydrolysátů z hovězích šlach jatečního dobytka
4. Posoudit vliv složení výchozí kolagenní suroviny a technologických podmínek extrakce na vlastnosti vyrobených želatin/hydrolysátů
5. Zpracování výsledků, diskuze a zhodnocení přínosu práce

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. Phillips, G.O.; Williams: Handbook of Hydrocolloids (2nd Edition). Woodhead Publishing 2009

2. Philips G.O.; Wiliams, Ockerman, H. et al.: Animal by-product:processing & utilization. London: CRC Press,Woodhead Publishing 2000, ISBN 978-1-84569-414-2

3. The United States Pharmacopeial Convention: Food Chemicals Codex (7th Edition, 2010, ISBN 978-1-889788-86-9

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Pavel Mokrejš, Ph.D.

Ústav inženýrství polymerů

Datum zadání diplomové práce:

10. února 2012


Termín odevzdání diplomové práce:

14. května 2012

Ve Zlíně dne 10. února 2012


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno:Tomáš Plachý..... Obor: ...Inženýrství polymerů.....

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně10.5.2012.....

.....Tomáš Plachý.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací;

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) *Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.*

(3) *Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.*

²⁾ *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, § 35 odst. 3:*

(3) *Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).*

³⁾ *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, § 60 Školní dílo:*

(1) *Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.*

(2) *Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.*

(3) *Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.*

ABSTRAKT

Diplomová práce je rozdělena na dvě části. Teoretická část se zabývá charakterizací vedlejších jatečných produktů a popisuje běžné nakládání s nimi. Druhá, experimentální část, popisuje experiment, ve kterém byly využity hovězí šlachy pro extrakci želatin/hydrolysátů za pomoci enzymu POLARZYME 6.0 T (Novozymes – Dánsko). Cílem práce bylo ohodnotit vliv různých typů šlach (jako vstupní suroviny) na extrakci želatin/hydrolysátů. Navíc, byl ohodnocen i vliv dvou sledovaných parametrů při extrakci (množství enzymu a teplota při extrakci) na výsledné vlastnosti získaných želatin/hydrolysátů. Bylo prokázáno, že volba vstupní suroviny ovlivňuje účinnost extrakce želatin/hydrolysátů a také jejich vlastnosti.

Klíčová slova: vedlejší jateční odpad, želatina, extrakce, hovězí šlachy, hydrolysát

ABSTRACT

The master thesis is divided into two parts. The theoretical part deals with characterization of slaughterhouse by-products and describes usual treatment of this material. The second, experimental part, describes the experiment, in which cattle tendons were utilized for extraction of gelatines/hydrolysates by use of enzyme POLARZYME 6.0 T (Novozymes – Denmark). The aim was to evaluate the factor of different tendons (as an entrance resource) on the extraction of gelatines/hydrolysates. Moreover, the influence of two parameters of interest during extraction (amount of enzyme and extraction temperature) on the properties of obtained gelatines/hydrolysates was evaluated. It was proved that the choice of the entrance resource affects the effect of extraction of gelatines/hydrolysates and also their properties.

Keywords: slaughterhouse by-products, gelatine, extraction, cattle tendons, hydrolysate

Rád bych zde poděkoval vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Pavlovi Mokrejšovi, Ph. D za ochotný přístup, cenné připomínky a návrhy a za bezmeznou trpělivost. Dále paní Miroslavě Žaludkové za obětavou pomoc a asistenci v laboratoři.

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

OBSAH

ÚVOD	10
TEORETICKÁ ČÁST	11
1 VEDLEJŠÍ PRODUKTY JATEČNÉHO ZPRACOVÁNÍ	12
1.1 CHARAKTERIZACE VEDLEJŠÍCH JATEČNÝCH PRODUKTŮ.....	12
1.2 PRÁVNÍ PŘEDPISY PRO NAKLÁDÁNÍ SE ŽIVOČIŠNÝM ODPADEM.....	15
1.2.1 Kategorizace živočišného odpadu dle č. ES 1069/2009	16
1.3 MOŽNOSTI VYUŽITÍ VEDLEJŠÍHO JATEČNÉHO ODPADU	18
1.3.1 Využití v energetice	18
1.3.2 Kompostování	21
1.3.3 Využití krve.....	21
1.3.4 Další využití	22
2 ŽELATINA	23
2.1 ZDROJE ŽELATINY	23
2.2 ZÍSKÁVÁNÍ ŽELATINY	24
2.2.1 Želatina typu A.....	24
2.2.2 Želatina typu B	25
2.2.3 Extrakce želatiny	25
2.3 SLOŽENÍ A VLASTNOSTI ŽELATINY	25
2.3.1 Pevnost gelu	26
2.3.2 Složení želatiny	26
2.4 VYUŽITÍ ŽELATIN	27
2.4.1 Potravinářský průmysl	27
2.4.2 Farmaceutický průmysl a využití v medicíně	28
2.4.3 Fotografická želatina	30
2.4.4 Technická želatina.....	31
PRAKTICKÁ ČÁST	33
3 CÍLE PRÁCE	34
4 HOVĚZÍ ŠLACHY	35
4.1 ODTUČŇOVÁNÍ ŠLACH.....	36
5 POUŽITÉ PŘÍSTROJE, POMŮCKY A CHEMIKÁLIE	37
5.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE	37
5.2 POMŮCKY.....	37
5.3 CHEMIKÁLIE.....	38
6 ANALYTICKÉ METODY	40
6.1 STANOVENÍ SUŠINY	40
6.2 STANOVENÍ POPELOVIN	40
6.3 STANOVENÍ OBSAHU DUSÍKU A BÍLKOVIN.....	41
6.4 STANOVENÍ OBSAHU HYDROXYPROLINU	42
6.5 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ AMINOSKUPIN	44
6.6 STANOVENÍ PEVNOSTI GELU DLE BLOOMA	45
7 POSTUP PRÁCE	47

7.1	FAKTOROVÉ POKUSY	47
7.2	POPIS EXPERIMENTU	47
7.3	STANOVENÍ SUŠINY V NAVÁŽCE ŠLACH.....	51
7.4	VÝPOČET PŘÍDAVKU ENZYMU	51
7.5	VÝPOČET ÚČINNOSTI EXTRAKCE	51
7.6	BILANCE OBSAHU LÁTEK V SUŠINĚ.....	52
8	VÝSLEDKY A DISKUZE	53
8.1	VYHODNOCENÍ ÚČINNOSTI EXTRAKCE	53
8.2	OBSAH POPELOVIN	58
8.3	OBSAH BÍLKOVIN	62
8.4	OBSAH KOLAGENU	64
8.5	OBSAH AMINOSKUPIN.....	68
8.6	PEVNOST GELU	71
8.7	STANOVENÍ VLHKOSTI V ŽELATINÁCH/HYDROLYSÁTECH.....	72
	ZÁVĚR	73
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	75
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	83
	SEZNAM OBRÁZKŮ	84
	SEZNAM TABULEK.....	85
	SEZNAM PŘÍLOH.....	86

ÚVOD

Archeologické poznatky ukazují, že již v dávné historii člověk využíval části ulovené zvěře, které nebyly určeny ke konzumaci. Zvířecí kůže sloužily jako pokrývky těla, kosti jako nejrozmanitější nástroje. Dnes funkci „lovce“ zastává jatečný průmysl, který generuje maso a jiné produkty určené pro spotřebu člověkem. Mimo žádaných produktů vznikají i vedlejší produkty, mezi které řadíme obecně jakoukoliv část zvířete a produkty živočišného původu včetně odpadní vody, které nejsou určeny pro lidskou konzumaci, ať už díky nevhodnosti či pro ně neexistuje v dané oblasti vhodný trh. Tyto jsou často nesprávně chápány jako odpad a jsou neefektivně likvidovány na skládkách či ve spalovnách.

Jejich možným využitím může být například zhodnocení suroviny v energetice (anaerobní digesce, spalování, výroba biopaliva), izolace hodnotných látek obsažených ve vedlejších jatečných produktech (bílkoviny, tuky, vitamíny, minerály), či řada jiných využití v různých průmyslových odvětvích.

Jedním z nejvýznamnějších produktů získávaných z vedlejšího jatečního odpadu je želatina. Želatina je parciální hydrolyzáta kolagenu a pro své výjimečné vlastnosti nachází řadu uplatnění, ve kterých doposud nebyl nalezen žádný alternativní materiál, který by byl plnohodnotnou náhradou želatiny. Želatina se běžně získává z vepřových kůží a hovězích kůží a kostí. Potenciálním zdrojem želatiny mohou být hovězí šlachy, které obsahují značné množství kolagenu.

Tato diplomová práce se zabývá právě zužitkováním hovězích šlach, izolovaných při porážení hovězího dobytka na jatkách, přeměnou na želatiny či hydrolyzáty.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VEDLEJŠÍ PRODUKTY JATEČNÉHO ZPRACOVÁNÍ

1.1 Charakterizace vedlejších jatečných produktů

Na jatkách jsou hospodářská zvířata porážena a zpracovávána pro zisk masa a jeho následnou konzumaci člověkem. Mimo tyto žádané masné výrobky vznikají vedlejší produkty, které nejsou určeny pro lidskou konzumaci [1]. Jatečný průmysl je znám již od nepaměti, ale potenciální riziko pro životní prostředí začal odpad vznikající při bourání masa představovat v posledních desetiletích díky polarizaci do velkých masokombinátů [2]. Vedlejší jatečné produkty tedy bývají považovány za odpad, podle čehož se řídí i nakládání s nimi. Avšak, vedlejší jatečné produkty jsou charakteristické svým vysokým obsahem hodnotných bílkovin a tuků [3]. Bílkovinný odpad vzniklý porážením dobytka na jatkách je tvořen zejména zbytky svalové a tukové tkáně, kostmi, šlachami a jinými pojivovými tkáněmi, kůží, chlupy. V Tab. 1 jsou zachyceny nezpracované části vzniklé na jatkách, pocházející z porážky jednoho prasete [4, 5].

Tab. 1. Vedlejší produkty vzniklé při porážce jednoho prasete [5]

Vedlejší produkt	%**	Množství (kg)
Krev	10,4	2,9
Chlupy	7,6	2,12
Odřezky se zbytky chlupů	0,1	0,03
Obsah střev	neuveдено	5*
Tuky, nevyužité masové frakce	26,7	7,45
Kosti	16,2	4,49
Hlava	neuveдено	2,78*
Hněj	10,7	2,99
Střevní tuk	0,5	0,14
Celkem	100	27,90

* odhadováno; ** procentuální podíl z celkového množství odpadu

V rybářenském průmyslu tvoří odpad zejména rybí hlavy, kosti, kůže (šupiny) a vnitřnosti [6]. Drůbežářský průmysl zaznamenal rostoucí poptávku u spotřebitelů, díky sníženému obsahu nenasycených tuků v drůbežím mase. S tím souvisí zvýšená produkce odpadního materiálu (bílkovinný odpad, tuky, peří) [7]. Hlavní složkou peří je hodnotná bílkovina keratin, která tvoří až 90 % celkové hmotnosti peří. Disulfidické můstky obsažené v keratinu jsou příčinou stálosti keratinu v běžných podmínkách životního prostředí. Potenciálním problémům lze zabránit například využitím peří jako krmiva nebo jako substrátu pro anaerobní digesci. Dochází tak k ekonomické úspoře jak za poplatky při likvidaci odpadu, tak i za krmivo [8]. Nejčastěji je však peří spalováno nebo ukládáno na skládkách [9].

Obecně, výše zmíněný biologický odpad může způsobit značné environmentální potíže díky organickému původu a možnosti růstu mikrobů. Zvyšující se náročnost při manipulaci s tímto odpadem musí být chápána jako důsledek řady právních omezení, což je provázáno nárůstem ceny při nakládání a zneškodňování živočišného odpadu [7].

Světový trh s masem z ekonomických důvodů nutně vyžaduje vhodné využívání (zpeněžení) vedlejších produktů vznikajících na jatkách, aby trh s hospodářskými zvířaty mohl zůstat ekonomicky konkurenci schopný se zdroji nemasných bílkovinných produktů. V případě neefektivního využití vedlejších jatečných produktů je ztracen potenciální zdroj příjmu, a navíc cena za likvidaci takového odpadu je následně promítnuta do ceny produktů masného průmyslu [10]. Pro ilustraci mohou posloužit údaje obdržené od pana Miroslava Chýly, jenž je zodpovědnou osobou ve vedení firmy Játka Jarošov. Z údajů firmy vyplývá, že při porážení vepřového dobytka dojde ke vzniku jatečného (masného) odpadu, který tvoří asi 20 % hmotnosti živého zvířete. Tento odpad je nutno podrobně evidovat a odevzdávat do kafilérií, kde je spalován, přičemž zpracování 1 kg odpadu z vepřového dobytka stojí 8,50 Kč. V případě hovězího dobytka představuje nakládání s masným odpadem ještě významnější faktor, který ovlivňuje finální cenu masa pro spotřebitele. Zde je podíl nevyužitého materiálu (odpadu) přibližně 50 % [11-13]. Zde je cena za předání 1 kg hovězího materiálu kafilériím 10 Kč [11].

Množství jatečného odpadu vzniklého na našem území z jednotlivých druhů zvířete za rok 2011 je uvedeno níže v Tab. 2.

Tab. 2. Množství vzniklého jatečného odpadu v ČR za rok 2011 [12]

Druh zvířete	Počet poražených kusů	Průměrná živá hmotnost (kg)	Průměrná jatečná hmotnost (kg)	Množství odpadu (%)*	Celkové množství odpadu (t)
Dospělý skot	238 278	561,4	299,4	46,7	62 439
Prasata	2 982 361	114,3	88,2	22,8	77 853
Ovce (včetně jehňat)	10 169	36,2	15,6	56,8	209
Drůbež	-	-	-	25,7	58 688

*vztaženo na hmotnost živého zvířete

Mezi odpady vznikající při bourání masa na jatkách je nutno zařadit i vedlejší tekuté produkty jako je zejména krev, ale i odpadní jatečná voda.

Odpadní voda

Jateční odpadní vody jsou velmi znečištěné a specifické [14]. Koncentrace a množství obsažených látek v nich se mohou lišit na základě typu porážené zvěře, zvoleného průmyslového procesu nebo množství vody spotřebované na jeden kus zvířete. Mezi organické nečistoty obsažené v odpadní vodě patří zejména zbytky krve, tuky, výkaly, sádlo, nejrůznější bílkovinné zbytky atd. [15, 16]. Před jejich postoupením do konvenčních čistíren vod, či prostým vypouštěním do povrchových vod, musí být řádně ošetřeny, aby došlo k eliminaci nepříznivých vlivů na životní prostředí nebo na lidské zdraví [14]. Nejčastějšími mechanismy využívanými na jatkách k čištění jatečních odpadních vod jsou systémy obsahující aktivované kaly, čistící laguny a anaerobní reaktory [2]. Je možné využít i aerobních procesů, u nich je ale značnou nevýhodou vyšší energetická spotřeba určena na provzdušňování materiálu a zároveň i vysoká produkce kalu [15]. Dále je možné i využití koagulace pro čištění jatečních odpadních vod [17].

Jia pracoval s jateční odpadní vodou a ve své práci uvádí i výsledky analýzy této vody [2]. Tab. 3 obsahuje hodnoty jednotlivých látek obsažených v jateční odpadní vodě analyzované Jiem, které jsou srovnány s emisními standardy dle nařízení vlády č. 61/2003 Sb. o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod [18].

Ze srovnání vyplývá nutnost ošetřit odpadní vodu, aby vyhovovala požadovaným bezpečnostním a právním předpisům. Emisní standardy byly ve všech sledovaných parametrech několikanásobně překročeny. Přípustné hodnoty uvedené v Tab. 3 jsou hodnoty vyžadované v případě odpadních vod při zpracování a konzervování masa a výrobě masných výrobků.

Tab. 3. Srovnání přípustných hodnot znečištění v odpadních vodách vypouštěných do povrchových vod při výrobě masných produktů a zpracování masa s hodnotami v neošetřené odpadní vodě z jatek [2, 18]

Parametr	Jateční odpadní voda	Přípustné hodnoty
CHSK [mg/l]	1900-2480	200
TMK [mg CHSK/l]	152-265	nespecifikováno
N _{CELK.} [mg/l]	186-215	30
N-NH ₄ ⁺ [mg/l]	102-126	20
P _{CELK.} [mg/l]	30-47	10

CHSK – chemická spotřeba kyslíku, TMK – těkavé mastné kyseliny, N_{CELK.} – celkový dusík, N-NH₄⁺ - amoniakální dusík, P_{CELK.} – celkový fosfor

Krev

Zvířecí krev je vedlejší produkt vznikající při porážení zvěře, který obsahuje proteiny s vysokou biologickou hodnotou a potenciálem využití v biotechnologickém průmyslu. Zvířecí krev se zpravidla skládá z bílkovin (18 %), vody (81 %), různých solí a nízkomolekulárních složek [19-21]. Ačkoliv je taková krevní plazma dobrým zdrojem proteinů s potenciálem využití v medicíně, je využívána především v potravinářském průmyslu, ať už jako stabilizátor, emulgátor, případně složka zvyšující nutriční hodnotu [22].

1.2 Právní předpisy pro nakládání se živočišným odpadem

V Evropské unii je každoročně vyprodukováno více než 15 miliónů tun vedlejších produktů živočišného původu, které jsou buď zneškodněny, případně zpracovány a využity v potravinářském, farmaceutickém, fotografickém či kosmetickém průmyslu, v medicíně, na výrobu usní a dalších technických aplikacích. Vedlejší produkty živočišného původu

představují jisté nebezpečí pro lidské zdraví a životní prostředí obecně. Evropská unie proto zavedla pravidla pro zacházení s odpadem živočišného původu. Jakékoliv zacházení s odpadem se řídí dle nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1069/2009 o hygienických pravidlech pro vedlejší produkty živočišného původu a získané produkty, které nejsou určeny k lidské spotřebě. Toto nařízení navazuje na nařízení č. 1774/2002 (nařízení o vedlejších produktech živočišného původu). Snahou nařízení je předejít řadě komplikací, které jsou spjaty právě s produkty živočišného původu. Konkrétně popisuje vedlejší produkty živočišného původu, které nejsou určeny k lidské spotřebě, jako potenciální zdroj rizik pro zdraví lidí a zvířat. Vedlejší produkty živočišného původu jsou evropskými právními předpisy definovány jako celá těla nebo části zvířat, produkty živočišného původu nebo jiné produkty získané ze zvířete, které nejsou určeny pro konzumaci člověkem, včetně vajíček, embryí a semene. Zároveň nařízení zmiňuje potravinovou krizi v 90. letech 20. století, kdy díky nevhodnému zacházení s odpadem živočišného původu došlo k prudkému rozšíření slintavky a kulhavky, bovinní spongiformní encefalopatie (BSE, známá též jako nemoc šílených krav) a k výskytu dioxinů v krmivech. Proto na základě nezávislých vědeckých expertíz bylo rozhodnuto, že vedlejší živočišné produkty, které nejsou určeny pro lidskou konzumaci, musí být vyřazeny z potravinového řetězce. Evropská právní nařízení nejen že definují a kategorizují vedlejší živočišný odpad, ale zároveň i objasňují podmínky, za kterých má být zpracován nebo zlikvidován (využití, případně likvidace odpadu). Právní předpisy také uvádějí některé možnosti využití vedlejších živočišných produktů mimo potravinový řetězec (kůže v koželužském průmyslu, sušené mléko pro krmení domácích či kožešinových zvířat) [23-25].

1.2.1 Kategorizace živočišného odpadu dle č. ES 1069/2009

Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1069/2009 dělí odpad do 3 kategorií, rozdělujících tento odpad podle potenciálního rizika pro lidi či životní prostředí. Stručně lze jednotlivé kategorie popsat následujícím způsobem [26]:

Materiál kategorie 1

Do této kategorie jsou řazena těla zvířat (případně jejich části), u kterých vzniklo podezření z infekce TSE (přenosná spongiformní encefalopatie; u hovězího dobytka známá jako BSE), případně byla infekce prokázána. Dále ostatky jiných než hospodářských zvířat a zvířat volně žijících (zvířata z cirkusů či ZOO, případně volně žijící zvěř, u které existuje podezření na infekční onemocnění). V neposlední řadě sem spadají i živočišné produkty

obsahující rezidua jiných látek a látek znečišťujících životní prostředí, případně odpadní vody ze zařízení nebo podniků zpracovávajících materiál kategorie 1. Mezi možná nakládání s odpadem spadajícím do této kategorie patří spalování (energetické využití), zpracování tlakovou sterilizací a následné zahrabání na povolené skládce, případně lze materiál použít k výrobě produktu, který je poté uváděn na trh. Metodika zpracování je volena na základě druhu vstupní suroviny (vedlejší živočišný produkt).

Materiál kategorie 2

Do kategorie 2 spadá hnůj, obsah trávicího traktu, zvířata, která uhynula jinak než za účelem lidské spotřeby (například zvěř zabita za účelem tlumení nákazy). Formy nakládání s tímto materiálem jsou stejné jako v předchozím případě. Avšak, jsou zde ještě alternativní možnosti využití materiálu z kategorie 2. Například k výrobě organických hnojiv nebo půdních přípravků, lze jej zkompostovat a přeměnit na bioplyn, v případě podestýlky hospodářských zvířat (hnoje atd.) lze tyto přímo použít ke hnojení půdy.

Materiál kategorie 3

Materiál kategorie 3 může obsahovat těla poražených zvířat (jejich části) určených k lidské konzumaci, avšak z obchodních důvodů nenacházejí uplatnění na trhu (drůbeží hlavy, peří, drůbeží nožky, vepřové štětiny, kůže, rohy, končetiny atd.). Řadí se sem také krev, tuková tkáň nebo syrové mléko ze zvířat, pokud u nich nebyla prokázána nákaza onemocněním přenosného tímto produktem na člověka či zvíře. Tato skupina materiálu představuje jednoznačně nejmenší riziko pro člověka nebo životní prostředí ze všech tří uvedených, což se podepisuje také na výčtu možností neškodného odstranění tohoto materiálu. Je zde samozřejmě také možnost materiál spalovat či uložit na skládku, ale za efektivnější řešení lze považovat využití materiálu jako hnojiva či pro výrobu krmiv. Možným energetickým zhodnocením tohoto materiálu je jeho využití jako substrátu pro anaerobní digesci. Dále z něj lze vyrábět různé produkty například pro potravinářský či farmaceutický průmysl. Materiál kategorie 3 je zároveň největší skupinou, co se týče do množství získaného odpadu [27].

1.3 Možnosti využití vedlejšího jatečního odpadu

Úspěšné zpracování jatečního odpadu vyžaduje komplexní a náročný proces. Pro efektivní zužitkování vedlejších produktů je potřeba splnit hned několik skutečností najednou:

- musí existovat proces, který by z dané suroviny vyrobil nový produkt;
- musí existovat potenciální trh, na kterém by se získaný produkt uplatnil;
- v dané lokalitě musí být dostatečné množství daného (jatečního) odpadu;
- v neposlední řadě je to přítomnost vhodných technických podmínek v dané problematice [10].

Doposud bylo vypracováno malé množství studií kvantifikujících a popisujících vhodné nakládání s vedlejšími jatečnými produkty [3].

1.3.1 Využití v energetice

Světová ekonomika se stala závislou na fosilních zdrojích energie (uhlí, ropa, zemní plyn), které tvoří nejvýznamnější vstupní surovinu při produkci paliv a chemikálií. Tyto zdroje však nejsou nevyčerpatelné a je proto nutné hledat alternativní suroviny a zdroje energie. Vhodným řešením by mohla být biomasa [28]. Na možnost přímé přeměny vedlejšího jatečního odpadu na energii poukazuje řada studií [5, 9, 13, 29].

Anaerobní digesce

Anaerobní digesce představuje možnou metodu pro odstraňování velkého množství typů organického odpadu, tedy i vedlejšího jatečního odpadu, bez přítomnosti kyslíku. Tento proces zneškodňuje nebezpečný odpad jeho přeměnou na energii ve formě metanu, a navíc zbylý digestát může být použit jako hnojivo v zemědělství [30, 31]. Díky zamezení přístupu vzduchu v průběhu procesu je v určité míře znemožněno vzniku dnes tolik diskutovaného oxidu uhličitého a jeho následného vypouštění do atmosféry [32].

Podstatou anaerobní digesce je funkce různorodých mikrobiálních kultur, které degradují organický materiál. Vlastní proces sestává ze čtyř základních kroků, a sice hydrolyzy, acidogeneze, acetogeneze a metanogeneze [30]. Díky značným specifickým v jednotlivých fázích je proces anaerobní digesce poměrně složitý. Jateční odpad, sám o sobě, není vhodným substrátem pro anaerobní digesci. Může za to obsah dlouhých mastných kyselin a velké množství bílkovinného podílu [5]. Zvýšený obsah dlouhých mastných kyselin má

za následek inhibici digesce v důsledku své toxicity pro acetogeny a metanogeny. V případě velkého množství bílkovinného podílu dochází při štěpení bílkovin k nadměrnému vzniku dusíku, který inhibuje anaerobní mikroorganismy [7, 13]. V případě využití jatečního odpadu pro anaerobní digesci je proto na místě jeho smíchání s jiným substrátem, za účelem zvýšit poměr uhlíku a dusíku (C/N) ve směsi. Nabízí se například smíchání s organickým komunálním odpadem či s organickým odpadem z nemasného průmyslu (ovoce, zelenina). Tímto dojde ke snížení podílu dusíku a tuků v substrátu. Zároveň, využitím různorodého substrátu byla v několika vědeckých studiích potvrzena vyšší výtěžnost bioplynu (metanu) [5, 7, 30].

Pitk a kol. vypracoval podrobnou práci, zabývající se zpracováním jatečního odpadu anaerobní digescí. Zaměřili se na efektivnost celého procesu. Pracovali s běžným jatečním odpadem obdrženým po porážce hovězího a vepřového dobytka (odpadní voda, hnůj, části určené pro lidskou spotřebu, zbytky masa a kostí). Nejprve tuhý jateční odpad sterilizoval (133 °C, 300 kPa, 20 minut). V práci uvádí, že došlo ke ztrátě 55 % hmotnosti díky odpaření těkavých podílů (vody a amoniaku). Vztaženo na 1 tunu vstupní suroviny, zbylých 450 kg bylo tvořeno 135 kg tuku, 275 kg masokostní moučky a 40 kg usazeného kalu, které tvoří pevný podíl po sterilizaci. Pitk popisuje, že na sterilizaci materiálu bylo spotřebováno $639,6 \text{ kWh}\cdot\text{t}^{-1}$ energie. V případě využití pevného podílu po sterilizaci společně s jateční odpadní vodou jako substrátu pro anaerobní digesci došlo k zisku energie, která byla 4,6x větší než energie vynaložená na sterilizaci. Dále uvádí možnost spalování samotného tuku po sterilizaci. Byla zjištěna výhřevnost $39,2 \text{ MJ}\cdot\text{t}^{-1}$ tuku. Takové množství by odpovídalo spotřebě $1,165 \text{ m}^3$ zemního plynu (výhřevnost $33,66 \text{ MJ}\cdot\text{m}^{-3}$) [13].

Využitím anaerobní fermentace lze zpracovat pouze materiály spadající do kategorie 2 a 3 (materiál kategorie 1 nesmí být zpracován kompostováním či fermentací) [26]. Tyto jateční odpady musí být často sterilizovány před samotným postoupením k anaerobní digesci. V případě materiálu kategorie 2 je nařízeno materiál vystavit teplotě 133 °C, tlaku 300 kPa po dobu alespoň 20 minut. Dojde tak k separaci tuku a vzniku masokostní moučky. Tuk je možno použít jako krmivo, surovinu pro chemický průmysl či biopalivo. U materiálu kategorie 3 jsou podmínky mírnější, a sice 70 °C po dobu 1 hodiny [5, 29]. Pitk a kol. ve své práci poukazuje na nutnost pečlivého třídění a sběru materiálu kategorie 1, aby nedošlo ke kontaminaci materiálů z kategorií 2 a 3 [13].

Spalování

Spalování je zřejmě nejúčinnější tepelná metoda pro likvidaci potenciálního infekčního rizika. Výchozí materiál je třeba nejprve vysušit, jelikož v případě vyššího obsahu vlhkosti je spalování neefektivní. U odpadu z drůbeže bylo dosaženo značné výhřevnosti $13,5 \text{ GJ}\cdot\text{t}^{-1}$ [29]. Přísnější právní předpisy mají za následek zvýšené množství nevyužité masokostní moučky v oblasti zemědělství. Dříve se využívala na výrobu krmiva pro hospodářská zvířata díky obsahu hodnotných proteinů. Dnes však již předpisy omezují užívání masokostní moučky pro výrobu krmiva (např. pro hovězí dobytek kvůli obavě možného šíření BSE) [33]. Možným řešením je spalování v cementárnách. Teploty zde dosahují až $1450 \text{ }^\circ\text{C}$, což je dostatečná teplota i pro využití materiálu kategorie 1. Taková teplota způsobuje úplnou destrukci veškerého organického materiálu včetně nebezpečných prionů. Výhřevnost masokostní moučky je v rozmezí $13\text{-}30 \text{ GJ}\cdot\text{t}^{-1}$ (výhřevnost černého uhlí je asi $33 \text{ GJ}\cdot\text{t}^{-1}$). Možným řešením je tedy i spalování v tepelných elektrárnách. Otázkou zůstává nakládání se zbylým popelem, kterého zůstane z 1 tuny spálené masokostní moučky 100-310 kg [34, 35].

Biopalivo

Paliva jako bioetanol či biodiesel mohou do jisté míry zmírnit závislost lidstva na fosilních zdrojích. Díky stoupajícím cenám ropy začali vědci hledat alternativu, která by pomohla omezit tuto závislost. Termín biopalivo je chápán jako pevné, tekuté či plynné palivo, které je získáno z obnovitelných zdrojů (biomasy). Biodiesel (metyléster) je palivo podobné dieselu získanému z ropy, jen je vyroben z rostlinného oleje, zvířecího tuku nebo z odpadního kuchyňského oleje [36]. Ve světě vznikají velké množství tučného odpadu po porážce jatečných zvířat či drůbeže. Možným efektivním zhodnocením suroviny může být právě výroba biodieselu z tuků [37]. Dříve se biodiesel získával z kvalitního rostlinného oleje. Tato surovina však není ekonomicky výhodná, a proto se novější studie zabývají využitím právě zvířecího tuku. Ten se hojně využíval jako doplněk krmiva pro hospodářská zvířata, od čehož se však upustilo z obavy šíření onemocnění.

Jako u anaerobní digesce, i zde v případě přeměny živočišných tuků na biodiesel hraje v neprospěch dlouhé mastné kyseliny. Ty s běžnými jednoduchými katalyzátory (alkálie) reagují za vzniku mýdel. Je nutno použít například silné kyseliny jako katalyzátory, což činí výrobu biodieselu ekonomicky náročnější.

Encinar a kol. ve své práci posuzoval možnost výroby biodieselu ze tří různých živočišných tuků a výsledky své práce poté porovnali s evropskými směnicemi pro metylestery mastných kyselin pro vznětové motory dle EN 14 214. Ve většině hlediscích získané biodiesely odpovídaly požadovaným normám. Potíž však nastala v případě teploty filtrovatelnosti motorových naft. Syntetizované biodiesely živočišného původu v tomto hledisku vykazovaly o něco vyšší teplotu než je přípustné. Autoři však zároveň nabízí řešení. Poukazují na možnost smíchání s jinými biodiesely (rostlinného původu) či s konvenčním dieselovým palivem získávaným z ropy. Možná je i přísada vhodných aditiv [38].

1.3.2 Kompostování

Kompostování je biotechnologický proces, kdy je díky různým mikroorganismům organický odpad převeden do stabilizované formy. Při kompostování je v substrátu pozorována zvýšená teplota díky biologické aktivitě. Díky zvýšené teplotě dochází k inhibici patogenů obsažených v kompostovaném materiálu. Kompostování je aerobní proces, pro který je nutný přístup kyslíku, optimální stupeň vlhkosti a vyvážené složení substrátu (C/N). V případě živočišného odpadu je vhodný poměr C/N asi 30-35:1. Ke kontrole procesu slouží hlavně teplota, která indikuje stav biologické aktivity. Délka samotného procesu se může lišit. Většinou se pohybuje se v řádu desítek dnů [27, 39]. Zbylý materiál po kompostování může být následně využit jako hnojivo nebo půdní kondicionér. Problém můžou představovat emise do okolního životního prostředí v průběhu samotného procesu [29].

1.3.3 Využití krve

Díky svým výborným funkčním vlastnostem a vysoké nutriční hodnotě je krev hojně využívána v potravinářském průmyslu (stabilizátor, emulgátor, nutriční hodnota) a při výrobě krmiv pro zvěř [19, 20]. Potenciální aplikace v potravinářství využívající určitý krevní protein byla představena Leem a Songem. Těm se podařilo z vepřové krve izolovat protein nesoucí železo. Odkazují se na skutečnost, že u mnoha vegetariánů je pozorován nedostatek železa, který má za následek například sníženou fyzickou výkonnost, jelikož železo má za úkol v lidském těle transportovat kyslík a elektrony. Tento izolovaný protein by mohl být přidáván do potravy a doplňovat tak chybějící minerál [20]. Dále je krev využívána v různých technických aplikacích, zemědělství (půdní kondicionér), biotechnologii (např. tkáňové inženýrství) a medicíně [10].

1.3.4 Další využití

Vedlejší jateční produkty lze rozdělit například na jedlé a nejedlé. Je možné využít nevyužité střevo při produkci střívek k balení uzenin [40]. Při zacházení s vepřovými kůžemi, hovězími kůžemi a kostmi je tento vedlejší materiál ve velké míře využíván pro produkci želatiny, která nachází uplatnění v celé řadě nejrůznorodějších aplikací (viz kapitola 2).

Dalším možným využitím je izolace bílkoviny a její následné využití ve specifické aplikaci. Příkladem je kolagen, který je dominantní bílkovinou v těle savců. Nenahraditelné vlastnosti kolagenu daly za vznik jeho užívání v kosmetickém průmyslu, kde z něj vyrobené krémy mají hydratační vlastnosti [41]. Stejně tak elastin, který je častou složkou kosmetických krémů. V kosmetice nachází své uplatnění i keratin. Je důležitou ingrediencí v některých v šampónech [42].

Skládkování

Skládkování je zřejmě tou nejneefektivnější formou nakládání s vedlejším jatečním odpadem. Nedochozí k zisku energie ani využitelného produktu. Materiál pro skládkování musí být nejdříve předzpracován (sterilizován). Celý proces je svázán přísnými právními předpisy, aby nedošlo ke kontaminaci podzemních či povrchových vod, k nežádoucím emisím do ovzduší nebo jakémukoliv jinému zásahu do okolního životního prostředí. Všechna tato opatření činí skládku značně nákladnou [29].

2 ŽELATINA

Želatina je průsvitná, pevná látka, která je bezbarvá nebo lehce nažloutlá [43]. Je to polypeptid o molekulové hmotnosti většinou v rozmezí 15 000-65 000 Da (v některých případech až 250 000 Da). Želatiny s nízkou molekulovou hmotností se souhrnně označují jako klihy [10, 44]. Želatina se získává hydrolyzou kolagenu, jde tedy o jeho parciální hydrolyzát. Mezi nejdůležitější vlastnosti želatiny, které určují její využití, se řadí její biokompatibilita, rozpustnost při zvýšené teplotě ve vodném prostředí a schopnost vytvářet gel [44]. Tato schopnost zároveň determinovala název želatiny. Jméno je odvozeno z latinského slova *gelata*, což znamená schopnost vytvářet gel ve vodě [45]. Světová produkce želatiny v roce 2007 činila 326 000 tun [46].

Vedle želatiny existují klihy. Klihy jsou si se želatinami fyzicky i chemicky podobné. Neexistuje přesně vymezená hranice mezi nimi, avšak některé literatury uvádí klihy jako želatiny s horšími mechanickými vlastnostmi (například klihy mohou vytvářet slabší gely). Jiné literatury zase uvádí, že hlavní rozdíl může spočívat v kontrole vstupní suroviny (želatina je produkována z čerstvé suroviny, splňující kritéria pro výrobu potravinářské želatiny) [10].

2.1 Zdroje želatiny

Želatina se v přírodě nevyskytuje, je získávána nabouráváním struktury bílkoviny kolagenu. Kolagen je nejrozšířenější bílkovinou u obratlovců. Jde o fibrilární bílkovinu řadící se mezi skleroproteiny (skupina ve vodě nerozpustných proteinů). Jeho molekula se skládá ze tří řetězců o podobné molekulové váze (95 kDa), které jsou zapleteny a vytváří helikální strukturu – tropokolagenovou molekulu. Molekulová hmotnost tropokolagenové molekuly je přibližně 285 kDa, délka jedné molekuly je přibližně 290 nm a průměr asi 1,5 nm [47, 48]. Stabilizace tropokolagenové molekuly je zajištěna zejména vodíkovými můstky a kovalentními vazbami. Počet těchto chemických vazeb závisí na stáří zvířete (čím mladší, tím méně vazeb). Jejich množství má vliv na vlastnosti získaných želatin a klihů [45]. Kolagenu je známo více druhů (dnes je známo 27 typů kolagenu) [49]. Typ kolagenu, ze kterého je želatina získána, má také vliv na vlastnosti želatiny [10]. Suverénně nejrozšířenějším je kolagen typu I, který tvoří až 30 % všech bílkovin v lidském těle. Kolagen typu I je možno

izolovat z různých částí zvířat (kuřecí nožky, hovězí a vepřové kůže, koňské šlachy, rybí šupiny, žraločí kůže atd.) [50].

Potencionálním zdrojem želatiny jsou tedy jakékoliv suroviny obsahující kolagen, který je dominantní bílkovinnou složkou v pojivových tkáních (např. šlachy, chrupavky, pochvy obklopující svaly a svalová vlákna, apod.). Avšak, dlouhodobě nejvyužívanější surovinou jsou vepřové kůže (46 %), dále hovězí kůže (29,4 %) a hovězí kosti (23,1 %). Zbýlé 1,5 % představují jiné zdroje, mezi nimiž jsou obsaženy i želatiny z ryb. Želatiny z ryb byly dlouhou dobu považovány za nekvalitní s nízkými mechanickými vlastnostmi. Toto tvrzení však platí pouze pro ryby vyskytující se v chladných vodách. Nejnovější studie poukazují na možnost získávání želatiny z ryb žijících v teplých vodách (tropický a subtropický pás), která je svými vlastnostmi srovnatelná se želatinou získanou ze suchozemských savců (pevnost gelu u želatin z těchto ryb běžně přesahuje 200 g ($g \cong$ Bloom)). Kolagen je obsažen i v mase. Tato surovina je ale příliš hodnotná, a proto se jí nevyužívá [46, 49].

2.2 Získávání želatiny

Želatina se z kolagenu získává extrakcí horkou vodou po předchozím zpracování výchozí suroviny v kyselém nebo zásaditém prostředí, při němž dojde k nabeurání sekundárních a vyšších struktur tropokolagenové molekuly (narušení vodíkových můstků držících helikální strukturu kolagenu pohromadě). Stupeň přeměny kolagenu na želatinu je dán mírou předzpracování suroviny a samotnou extrakcí želatiny, která je navíc závislá na pH, teplotě a délce extrakce. [10, 49, 51]. Dle způsobu zpracování výchozí kolagenové suroviny rozlišujeme želatinu typu A (kyselý způsob) a želatinu typu B (alkalický způsob) [45].

2.2.1 Želatina typu A

Výchozí surovina zbavená nečistot se vystaví účinku zředěné minerální kyseliny (pH=1,5-3) po dobu až 48 hodin. Doba tohoto kroku závisí zejména na tloušťce materiálu a jeho předzpracování (velikosti částic výchozí suroviny). Takto upravený materiál se následně pouze promývá čistou vodou za účelem vymytí kyseliny do přibližně neutrálního pH. Následuje extrakce želatiny vodou při teplotě 55-100°C. Kyselá extrakce je vhodná pro materiály obsahující méně zesíťovaného kolagenu. Používá se zejména při zpracování vepřových kůží [45, 52].

2.2.2 Želatina typu B

Při výrobě želatiny typu B je materiál obsahující kolagen předzpracován v alkalickém prostředí. Nejčastěji se používá nasycený roztok hydroxidu vápenatého ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, $\text{pH}=12$). Materiál je vystaven účinku nasyceného roztoku $\text{Ca}(\text{OH})_2$ po dobu 1-6 měsíců (běžně však 2-3 měsíce, závisí opět na tloušťce materiálu). Celý proces probíhá při teplotě do 24 °C. Po skončení procesu je materiál promýván vodou pro odstranění zbytku zásady a následně je použita zředěná kyselina. Účelem je, aby měl materiál navelek kyselou reakci. Tento postup je nejběžnější v Evropě a slouží pro zpracování hovězích kůží a kostí [45].

Želatinu typu A a typu B vykazují rozdíly ve fyzikálních vlastnostech, molekulových hmotnostech a obsahu nečistot. Jedním z nejdůležitějších rozdílů je rozdíl v hodnotách pH izoelektrických bodů. Izoelektrický bod želatiny typu A leží v rozmezí pH 7-9, zatímco želatiny typu B mají svůj izoelektrický bod mezi pH 4,9-5,1. Úzké rozmezí izoelektrického bodu pro želatiny získané alkalickou metodou lze lehce objasnit. Hodnota izoelektrického bodu u želatiny je dána stupněm přeměny bočních amidových skupin aminokyselin asparaginu a glutaminu na karboxylové kyseliny. U alkalického postupu dochází prakticky k úplné přeměně [47].

2.2.3 Extrakce želatiny

Předzpracovaný nabobtnalý materiál obsahující kolagen (vyčištěný, nařezaný na patřičnou velikost atd.) je exponován ve vodě o teplotě 55 °C. Extrakce probíhá obvykle 6-8 hodin, a poté následuje nová extrakce za vyšší teploty (voda je vyměněna za teplejší, např. 60-70 °C). Proces se opakuje až po poslední várku vody o teplotě přibližně kolem 100 °C. Platí, že čím nižší je teplota vody při extrakci, tím je želatina kvalitnější (vztaženo ke schopnosti želatiny vytvářet gel). Důvodem je menší účinek hydrolýzy na polypeptidové řetězce [45].

2.3 Složení a vlastnosti želatiny

Želatina je parciální hydrolyzátní produkt kolagenu, který je složkou různých tkání a orgánů živočichů. Výsledné vlastnosti hydrolyzátního produktu jsou proto ovlivňovány typem použité tkáně, věkem zvířete a typem kolagenu. V mnoha ohledech se želatina chová jako syntetické polymery a její vlastnosti jsou závislé na molekulové hmotnosti [47, 49].

2.3.1 Pevnost gelu

Jak již bylo uvedeno, nejvýznamnější vlastností želatiny je jejich schopnost vytvářet gel. Komerční cena dané želatiny je právě proto určena na základě pevnosti gelu želatiny. Pevnost gelu želatiny se stanovuje podle mezinárodně platné metodiky a udává se v jednotkách „Bloom“ (pevnost gelu dle Blooma), což odpovídá „g“ [45, 46, 49].

Důležitou vlastností gelu pro jeho využití (zejména v potravinářství) je jeho teplotní stabilita. Při 35-40 °C taje, což způsobuje jeho tání v ústech. Tvorba gelu a jeho tepelná stabilita jsou silně závislé na molekulárních vlastnostech želatiny, zejména na aminokyselinovém složení želatiny a distribuci molekulových hmotností [49].

2.3.2 Složení želatiny

Komerční želatiny obsahují zpravidla 7-15 % (běžně však 9-13 %) vlhkosti. Obsah vlhkosti se liší nejenom délkou sušení, ale i vlhkostí při skladování želatiny či propustností skladovacích kontejnerů pro vlhkost. Obsah popelovin bývá maximálně do 2 %. Je-li však vyžadována vysoce kvalitní želatina, obsah popelovin by neměl přesáhnout 0,5 %. Tohoto sníženého množství je možno dosáhnout např. za použití iontoměníčů [10].

Aminokyselinové složení želatiny je obdobné jako složení kolagenu. Dominantní aminokyselinou je glycin. Z 1000 aminokyselin v řetězci je přibližně 330 právě aminokyselina glycin [43]. V praxi to znamená, že každá třetí aminokyselina je glycin – primární strukturu želatiny lze poté zapsat jako Gly-X-Y, kde na 2. a 3. místě (X a Y) jsou nejčastěji zastoupeny aminokyseliny prolin, hydroxyprolin nebo alanin [49]. A právě množství prolinu a zejména hydroxyprolinu bývá spojováno se schopností želatiny tvořit gel. Některé práce uvádí, že množství obsaženého pyrrolidinu (je v obou zmíněných aminokyselinách) má zásadní vliv na teplotní stabilitu kolagenu, resp. tvorbu gelu u želatiny. U hydroxyprolinu obsahuje navíc pyrrolidin alkoholovou skupinu, která hraje klíčovou roli při stabilizaci molekul vodíkovými můstky. To vysvětluje i nižší kvalitu želatiny získaných z některých druhů ryb. Zatímco součet prolinu a hydroxyprolinu u ryb může být pouze 155 z 1000 aminokyselin, u komerčních želatiny (získaných ze savců) je tento obsah 221 z 1000 aminokyselin [45]. Želatina nemůže být označena za kompletní bílkovinu, jelikož neobsahuje esenciální bílkovinu tryptofan [43].

2.4 Využití želatin

Želatina nachází uplatnění v mnoha nejrůznějších aplikacích. Dle odvětví, ve kterém je využívána, se většinou želatina dělí na potravinářskou (největší spotřeba), fotografickou, technickou a farmaceutickou želatinu [45, 52].

2.4.1 Potravinářský průmysl

Rozsah využívání želatin v potravinářství dosáhl takové velikosti, že lze jen stěží vyhledat všechny její možné aplikace. Je to jeden z nejkvalitnějších výrobků v průmyslu zabývajícím se želatinou, jelikož musí splňovat řadu předpisů a její výroba je pod důkladným dohledem, aby nedošlo k ohrožení zdraví konzumentů [53].

Želatina plní více funkcí při výrobě pokrmů či jejich zpracování. V zásadě lze rozdělit vlastnosti želatin do dvou skupin, dle nichž nachází uplatnění v potravinářství. V první skupině je využíváno schopnosti želatin tvořit gel a s tím spojených vlastností (pevnost gelu, teplota tání, viskozita, schopnost vázat vodu atd.). Do druhé skupiny spadají aplikace spojené s povrchovými vlastnostmi. Využívá se jich například při tvoření emulzí a stabilizátorů, pěny, vytváření filmů a adheze. Žádný jiný hydrokoloid na trhu není schopen naplnit všechny zmíněné vlastnosti [54].

Nejčastější vlastností želatinou využívanou v potravinářství je schopnost vytvářet gel ve spojení s vodou, který při teplotě vyšší než 35 °C roztaje (tedy, taje v ústech). Želatina tak dostává unikátní organoleptické vlastnosti a schopnost zadržovat, a následně uvolňovat libovolnou náplň (esence, koření atd.). Jiné látky vytvářející gel, většinou jde o polysacharidy (agar, pektin, různé škroby), mají v tomto případě oproti želatině nevýhodu, jelikož tají při vyšších teplotách [54].

Želatina je přidávána do mražených krémů za účelem zabránění krystalizace ledu a cukru, stejný význam plní ve zmrzlině. Podstatné je i využití při výrobě nejrůznějších sladkých bonbonů a cukrovinek. Želatina zde plní dvě funkce. Obdobně jako u mraženého krému zabraňuje krystalizaci a navíc má význam při samotném zpracování, uchovávání, a při výrobě pěnových struktur. Zvyšuje totiž viskozitu systému a tím i jeho stabilitu. V mléčném průmyslu je přidávána do jogurtů, které jsou poté krémovější a tím i přitažlivější pro zákazníka [45].

V masném průmyslu se hojně využívá při výrobě konzervovaných výrobků. V hovězích a luncmeatových konzervách zadržuje vodu a tím i důležité masové šťávy.

Dále se do konzervářských výrobků přidává želatina za účelem zaplnění objemu konzervy po jejím vaření. Jednoduše lze říci, že v důsledku vaření dojde ke smrštění masového podílu a vytvoření volného prostoru. Zároveň se uvolňuje horká voda, která rozpouští želatinu a ta poté vytváří film, který vyplňuje volný prostor [45].

Želatina nachází své uplatnění také při čištění nápojů obsahujících tanin. Želatina reaguje s taniny a následně se směs vyčistí filtrací či sedimentací. Celosvětově se užívá při čištění piva, čiření vín a při klarifikaci v ovocných či zeleninových šťávách (zejména u jablečných a hruškových džusů) [43, 53].

Energetický obsah želatiny je přibližně 14,7 kJ v 1 g. Je-li připraven želatinový gel o koncentraci želatiny 2 %, energetický obsah systému poté je asi 30 kJ na 100 g. Želatina proto slouží také k přípravě nízkokalorických (dietních) cukrovinek. Zároveň je používána ve stravě pro diabetiky jako náhrada sacharidů. V souvislosti s nízkým obsahem kalorií a velkým obsahem bílkovin je želatina doporučována také pro přípravu nápojů s vysokým obsahem proteinů, vhodných zejména jako doplněk stravy při vykonávání zvýšené fyzické námahy (např. proteinové nápoje užívané při posilování) [52, 54].

2.4.2 Farmaceutický průmysl a využití v medicíně

Tento typ želatiny se svými vlastnostmi velmi podobá jedlé želatině a musí také splňovat přísná bezpečnostní kritéria. Z velkého výčtu se mezi nejdůležitější řadí nepřítomnost těžkých kovů [53], nepřítomnost patogenních a nepatogenních mikrobů (zdroje kolagenu musí být certifikované na tzv. „BSE Free“ – nepřítomnost daného prionu) [51]. Zároveň farmaceutický (medicínský) průmysl finančně nejvíce zhodnocuje želatinu (porovnání ceny výchozí suroviny a ceny výsledného produktu) [53].

Mezi běžné aplikace želatiny v medicíně patří tvorba měkkých a tvrdých kapslí, mikrokapslí a tablet pro dopravu aktivních látek do těla (případně ji lze využít i na výrobu injektovatelných mikročástic). Dále se využívá při výrobě obvazů a tampónu s vysokou absorpcí tekutin [52, 53]. Ze želatiny lze připravit i nanovlákná pomocí elektrostatického zvláknování. Díky své biokompatibilitě a biodegradabilitě mají značný potenciál uplatnění na poli regenerativní medicíny [51].

Želatinové kapsle

Želatina se využívá na výrobu kapslí již od 30. let 19. století. Želatina má výborné vlastnosti pro splnění kladených nároků v dané aplikaci (schopnost tvořit tenké, ale pevné a flexibilní filmy, rozpustnost při 37 °C, biokompatibilita atd.) [55]. Užívání kapslí jako média pro dopravu léku do organismu má před konvenčními tabletami řadu výhod. Želatinové kapsle jsou schopny zakrýt nepříliš příjemnou chuť medikamentu, lze je barvit a tím i odlišit, a navíc umožňují snížit množství dávek. I přes své nesporné výhody, kapsle nemají dominantní postavení na farmaceutickém trhu a společně s tabletami představují hlavní média pro dodávání léků do těla orální formou. Je to dáno zvýšenými náklady pro výrobu kapslí a hlavně nutností investice do potřebného vybavení [56]. Možnost je využít želatinové měkké nebo tvrdé kapsle [57].

Tvrdé želatinové kapsle mají před měkkými želatinovými kapslemi řadu výhod (např. jednodušší výroba, vyšší přípustná teplota při plnění, či fakt, že se při výrobě nepřidává velké množství plastifikátoru) [57]. Nezbytností pro výrobu tvrdých želatinových kapslí jsou želatiny s vysokou pevností gelu (větší než 200 Bloom). Jsou složeny ze dvou částí, které do sebe navzájem zapadají. Vyrábějí se ponořením studené kovové formy do horkého (45-55 °C) roztoku želatiny (obsah želatiny je obvykle 30-40 %). Po vytáhnutí formy želatina ochlazením vytvoří gel, vznikne okolo formy film, který je vysušen, odebrán z formy, nasekán na patřičné velikosti, aby mohly být dvě části spojeny do sebe [45]. Při výrobě tvrdých želatinových kapslí je nutné myslet na možné nežádoucí efekty, které mohou nastat při styku tvrdé želatinové kapsle s medikamentem, který má kapsle pojmout. Medikamenty jsou často obohacovány o hydrofilní rozpouštědla, jako jsou polypropylenglykol (PPG), polyetylen glykol 400 (PEG 400) a etanol. Tyto látky jsou přidávány v malé míře, aby zvýšily rozpustnost léčebné látky [57]. Styk s malým množstvím aldehydu, případně vystavení vlhkosti a zvýšené teplotě, může v želatině vytvořit příčné vazby (síťování). Taková želatina, která vznikne na povrchu tvrdých želatinových kapslí, tvoří vnější ve vodě těžce rozpustnou vrstvu. Tento jev může způsobit zásadní problémy při uvolňování léčiva z kapsle do organismu [58]. Na druhou stranu, tvrdé želatinové kapsle mohou být záměrně potahovány. Může to být například v případě, kdy není žádoucí, aby se lék uvolnil z kapsle dřív, než je vhodné. Například v případě skupiny léků, u kterých by při uvolnění v žaludku došlo k jeho podráždění [59]. Jinou skupinou mohou být aktivní látky, které se přednostně do těla vstřebávají až v následujících částech gastrointestinálního traktu (ve

střevech) [55]. K potahování tvrdých želatinových kapslí lze například využít sprejové sušení [59].

Pro výrobu měkkých želatinových tobolek se používá želatina s nižší pevností gelu než pro tvrdé tobolky, přibližně 150-200 Bloom. Navíc je zde použito změkčovadlo. Množství použitého změkčovadla se liší na základě volené aplikace (většinou okolo 30 %) [45]. Nejčastěji užívaným změkčovadlem je glycerol (jinými např. sorbitol, propylenglykol) [60]. Výroba měkkých želatinových kapslí je značně odlišná od výroby tvrdých kapslí, jelikož zde je tobolka vyrobena a plněna v jednom kroku. Princip výroby spočívá v přivádění želatinového filmu (se změkčovadlem) ze dvou stran mezi dva válce opatřené dezénem, jehož tvar odpovídá velikosti vyráběné tobolky. Jakmile jsou želatinové filmy přivedeny mezi válce, je mezi ně vstříknut medikament. Kapsle je následně hermeticky uzavřena a připravena k použití [53].

Želatinové obvazy a tampóny

Želatinové tampóny nám můžou být známy například z dentistických křesel. Jde o pěnové (houbovité) materiály mající za účel absorbovat tekutinu (krev) a pomoci zastavit krvácení. Tyto pěnové struktury jsou schopny absorbovat značné množství tekutiny a mimo to, vykazují velkou biokompatibilitu s tkáněmi lidského těla a nevykazují prakticky žádné alergické reakce pacienta [45].

Náhrada krevní plazmy

Želatina, jako bílkovinný koloidní roztok, je užívána i jako náhražka krevní plazmy. Pro tuto aplikaci je nezbytná vysoká čistota želatiny. Je nutné při infuzi použít želatinový roztok o patřičné koncentraci. Tato koncentrace je volena tak, aby vlastnosti výsledného roztoku odpovídaly vlastnostem krve (například aby měly shodnou viskozitu). Želatina má tu výhodu, že se následně v těle neukládá, ale je kompletně rozložena. Taková plazma je pak využívána k doplnění krve například po silném krvácení [45].

2.4.3 Fotografická želatina

Želatina je důležitým materiálem pro fotografické materiály obsahující halogenidy stříbra. Je součástí fotografické emulze. Nejčastěji je zde využívána želatina typu B, která je navíc síťována přísadkou jiných látek pro zvýšení pevnosti a stability. Želatina našla své uplatnění ve fotografických materiálech v celé kinematografické historii [61]. Je součástí celého fotografického procesu od samotné výroby emulze obsahující halogenidy stří-

bra až po samotné vyvolávání fotografie [62]. Jejím úkolem je kontrolovat růst krystalů halogenidů stříbra a zabránit jejich vysrážení. Želatina obsahuje látky, které ovlivňují fotografické vlastnosti materiálů citlivých na světlo, stabilizuje hydrofobní aditiva [63]. Byly snahy nahradit ji syntetickými polymery, ale žádný nedokázal želatinu plně nahradit. Výhodou želatiny je, že dokáže najednou zasáhnout více vrstev podkladu (podklad býval vyráběn z celulóзовých esterů, dnes je již tento podklad často vyráběn z polyetylen tereftalátu). Nejdůležitější vlastností želatiny pro její upotřebení ve fotografickém průmyslu je opět vysoká pevnost gelu [61]. Jelikož jde o biologicky rozložitelný polymer, byla vypracována řada studií zabývající se vlivem okolních mikroorganismů na její stabilitu a případné snížení mechanických vlastností [61-64].

2.4.4 Technická želatina

Mezi technické želatiny jsou nejčastěji řazeny želatiny s nižšími mechanickými vlastnostmi, případně želatiny, které jakýmkoliv způsobem nesplňují striktní kritéria pro předešlé typy aplikací (porušení pravidel při výrobě a jiné). V praxi se pro takové produkty používá termín klihy. Běžně jsou klihy využívány jako pojivový materiál pro výrobu překližek. Velké odbytiště zároveň nachází ve výrobě pogumovaných lepicích pásek, krabic a trubek. Dále lze zmínit například využití pro přenášení barviva na tapety, jako pojivový materiál při výrobě papíru (krabic) – zároveň zvyšuje i jejich potiskovací možnosti, při elektrometalurgických procesech za účelem dosažení jemnějšího povrchu, v litografii, jako adhezivum pro známky a štítky, a mnoho jiných dalších aplikací [10, 43].

Využití želatiny, zejména v oblasti potravinářství a medicíně (farmacii), by mohlo být ještě větší, avšak v některých případech se využívá různých náhražek. Je několik hlavních limitujících faktorů aplikací želatiny. Například některá náboženství přímo zakazují konzumaci jakéhokoliv produktu vepřového původu (konkrétně hinduismus a judaismus). Naproti tomu využití produktů ze skotu je zase nemyslitelné v Indii, kde je toto zvíře považováno za posvátné [52]. Významnou část lidské populace tvoří lidé hlásící se k vegetariánství, pro které je konzumace živočišných produktů nepřípustná. Údaje o počtu vegetariánů se liší, ale nejčastěji se mluví přibližně o 10 % populace (v Evropě nejčastěji v rozmezí 2-7 %, v Indii až k 20 %) [65]. Mimo jiné je stále v povědomí obava z bovinní spongiformní encefalopatie (BSE) z 80. a 90. let 20. století i přesto, že na základě výsledků výzkumu byly metody extrakce želatiny posouzeny za dostačující pro inhibici prionu BSE [54]. V neposlední řadě je také třeba v některých případech zmínit možnost výskytu alergie

na želatinu získávanou ze suchozemských savců. Tato vlastnost brání zejména využití želatiny v potravinářství a medicíně (tablety, kapsle). V novodobých studiích bylo poukázáno na možnost nahrazení dané želatiny želatinou získanou z ryb, bez negativních alergických následků u dané populace [49].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍLE PRÁCE

V teoretické části byly popsány vedlejší jatečné odpady, problémy s jejich zacházením a možná nakládání s nimi. Kdyby se zvýšil objem využitého odpadu a jatkám by připadla alespoň malá část z ceny výsledného produktu (případně odpadla povinnost platit kafilériím), znamenalo by to jednoznačné zvýšení konkurenceschopnosti na trhu. Při volbě nakládání s vedlejším živočišným odpadem je navíc třeba brát v úvahu taktéž sociální aspekty, které upřednostňují výrobu jiných hmotných produktů z těchto vedlejších živočišných masných produktů na úkor málo efektivního zhodnocení suroviny ve spalovnách (kafilériích) [10]. Jedním možným způsobem zužitkování těchto materiálů je izolace hodnotných látek v nich obsažených. Diplomová práce se zabývá možností extrakce želatin/hydrolysátů z hovězích šlach za pomoci enzymu POLARZYME 6.0 T.

Experiment byl proveden se čtyřmi různými typy hovězích šlach, kdy cílem bylo posoudit:

- a) vliv vstupní suroviny (složení) na účinnost extrakce a výsledné vlastnosti želatin/hydrolysátů;
- b) vliv vybraných faktorů při extrakci (množství enzymu – Faktor A, teplota při extrakci – Faktor B) na účinnost extrakce želatin/hydrolysátů.

Hodnocené veličiny

- a) Účinnost extrakce – množství vyextrahovaného středně-, resp. nízkomolekulárního podílu (želatiny/hydrolysátu)
- b) Vlastnosti extrahovaných želatin/hydrolysátů:
 - pevnost gelu
 - obsah bílkovin
 - obsah popelovin
 - obsah kolagenu
 - obsah aminoskupin

4 HOVĚZÍ ŠLACHY

K dispozici byly 4 vzorky hovězích šlach:

- Vazovice (dlouhé šlachy, obdrženy z jatek Filák - masná výroba spol. s.r.o. v roce 2011; Horní Lideč)
- Zadní šlachy (obdrženy z Jatek Lešany v roce 2010)
- Achillovy šlachy (obdrženy z jatek Filák - masná výroba spol. s.r.o. v roce 2011; Horní Lideč)
- Přední šlachy (obdrženy z Přerovských Jatek M.H. s.r.o. v roce 2009)

Obdržené šlachy byly vždy mechanicky očištěny, promyty vodou, nakrájeny a pomlety na mlýnku a odtučněny. Následně byly šlachy skladovány při teplotě -18 ± 2 °C v HDPE sáčkách [66]. Před každým jednotlivým experimentem byly šlachy vytaženy a ponechány v lednici při 6 ± 1 °C po dobu 24 hodin, aby rozmrzly. U všech typů byl jednotlivě zjištěn podíl sušiny, obsah bílkovin, popelovin a hydroxyprolinu (kolagenu). Naměřené hodnoty jsou shrnuty v Tab. 4. Stanovení bylo provedeno 2x a byl vypočten aritmetický průměr.

Tab. 4. Výsledky analýz hovězích šlach

Parametr	Vazovice	Zadní šlachy	Achillovy šlachy	Přední šlachy
	Obsah (%)			
Sušina	48,24±0,01	51,25±0,01	59,06±0,01	34,19±0,01
Popeloviny ^a	0,38±0,01	0,42±0,04	0,26±0,01	0,60±0,02
Bílkoviny ^a	98,83±0,56	98,36±0,36	100,17±0,41	98,92±0,27
Hydroxyprolin ^a	1,13±0,10	5,24±0,36	5,27±0,27	5,99±0,13
Kolagen ^a	9,04	41,92	42,16	47,92
Elastin ^{a,b}	89,79	56,44	57,84	51,00

^a vztaženo na sušinu vzorku; ^b vypočteno jako rozdíl obsahu bílkovin a kolagenu

Z údajů v Tab. 4 vyplývá, že všechny sledované hovězí šlachy mají srovnatelný podíl popelovin a bílkovin v sušině. Liší se však v podílu sušiny a navíc, vazovice (dlouhé šla-

chy) vykazovaly nízký obsah kolagenu (hydroxyprolinu). Ukázka namletých šlach je na Obr. 1.

4.1 Odtučňování šlach

Odtučňování šlach probíhalo ve 4 krocích. Byla použita směs rozpouštědel petroleter a etanol v poměru 1:1 (v/v). Celý proces probíhal při teplotě 6 ± 1 °C. Poměr šlach a rozpouštědla byl 1:5 (w/v). Směs se umístila na třepačku a byla intenzivně míchána. Doba odtučňování byla:

- 7 h (poté vyměněna směs rozpouštědla za novou)
- 17 h (poté vyměněna směs rozpouštědla za novou)
- 7 h (poté vyměněna směs rozpouštědla za novou)
- 20 h (poté byly šlachy promyty rozpouštědly).

Šlachy byly ponechány v digestoři (20 minut), aby došlo k odpaření zbylého rozpouštědla. Následně byly uloženy do mrazničky. Pro kontrolu bylo ještě u malého množství odtučněných šlach analytickou metodou (podle Soxhleta) stanoveno množství zbytkového tuku. Zbytkové množství tuku nepřekročilo v odtučněných šlachách 0,1 %.



Obr. 1. Hovězí šlachy

5 POUŽITÉ PŘÍSTROJE, POMŮCKY A CHEMIKÁLIE

5.1 Použité přístroje

- mlýnek na maso Moulinex HV6 (Francie)
- spektrofotometr HELIOS ϵ (Německo)
- muflová pec Nabatherm (Německo)
- mineralizační přístroj Digesdahl (USA)
- přístroj Parnas-Wagner
- inkubátor Lovibond (Liebherr, Německo)
- pH metr WTW pH 526 (Německo)
- třepací přístroj LT2 firmy Kavalier
- analytické váhy Kern 770
- laboratorní váhy Kern 440-47
- sušárna MEMMERT ULP 400
- sušárna WTB Binder E-28-TB1
- horkovzdušná trouba Mora
- topná deska Schott s magnetickým míchadlem
- magnetické míchadlo IKA LABORTECHNIK RCT BASIC s topením
- Sevens-LFRA analyzátor (určený pro stanovení pevnosti gelu)
- topné hnízdo LTHS 250 firmy Brněnská Drutěva v.a. (ČR)

5.2 Pomůcky

- 4x koželužská miska s víčkem
- lžíce
- exsikátor
- odměrná baňka 25 ml, 50 ml, 100 ml, 200 ml
- 3x PE láhev 2 l
- pipeta 0,5 ml, 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml
- odměrný válec 25 ml, 50 ml, 100 ml
- kádinka 50 ml, 75 ml, 1000 ml

- filtrační papír nízké hustoty – KA-1 (Filpap, ČR)
- kovový cedník
- stříčka s destilovanou vodou
- nůžky
- třecí miska s tloučkem
- kyveta (10 mm)
- PA tkanina (průměr pórů 100 μm)
- balónek
- 16x skleněná zkumavka
- navažovací lodička
- 3x silikonová miska (275 x 215 mm)
- 6x křemíkový kelímek
- 3x Petriho miska
- laboratorní kleště
- 2x mineralizační baňka
- nálevka
- 2x titrační baňka
- 5x baňka pro stanovení pevnosti gelu dle Blooma
- 2x plastová pipeta
- ampule k zatavení
- kladívko

5.3 Chemikálie

- destilovaná voda
- 0,5% roztok NaOH
- 96% H_2SO_4 (p.a.)
- 30% roztok NaOH
- 2% roztok H_3BO_3
- 0,05M H_2SO_4
- enzym POLARZYME 6.0 T (firma Novozymes – Dánsko)
- 30% peroxid vodíku

- 6M HCl
- 5M NaOH
- 0,1M NaOH
- 10% roztok p-dimethylaminobenzaldehydu v propanolu
- ninhydrin; čistota 97 % (dodavatel Aldrich)
- 96% etanol
- acetátový pufr (pH=5,5)
- chlorid cínatý
- 1M CH₃COOH
- pentahydrát síranu měďnatého
- Tashirův indikátor

6 ANALYTICKÉ METODY

6.1 Stanovení sušiny

Stanovení obsahu sušiny bylo provedeno v souladu s normou ČSN EN 14346 Charakterizace odpadů – Výpočet sušiny stanovením podílu sušiny nebo obsahu vody [67]. Sušina se stanovovala u vstupního materiálu (šlachy) a u produktů po extrakci (želatiny/hydrolysáty). Byla vždy provedena 3 stanovení, ze kterých se poté vytvořil průměr. Do předsušených misek bylo na analytických vahách naváženo přibližně 1,5 g rozmražených šlach s přesností na 4 desetinná místa. Misky byly poté vloženy do sušárny a sušeny při 103 ± 1 °C po dobu 7,5 h. Následně byly misky uloženy do exsikátoru a po vychladnutí zváženy. U stanovení sušiny želatin/hydrolysátů se postupovalo analogicky (s menší navázkou vzorku).

Výpočet sušiny se následně provedl dle následujícího vztahu:

$$S = \frac{m_1}{m_0} \cdot 100 (\%) \quad (1)$$

m_1 ...hmotnost vzorku po vysušení (g)

m_0 ...hmotnost vzorku před vysušením (g)

S...obsah sušiny ve vzorku (%).

6.2 Stanovení popelovin

Stanovení bylo vždy provedeno 2x pro jeden vzorek ze sušiny vzorku. Do vyžíhaného kelímku bylo s přesností na 4 desetinná místa naváženo 0,5 g vzorku. Vzorek v kelímku byl spalován nad kahanem v digestoři po dobu přibližně 1 hodiny. Následně byl kelímek umístěn na dobu 3 hodin do muflové pece předem vyhřáté na 600 °C. Po mírném ochlazení při pokojové teplotě byl vzorek vložen do exsikátoru, kde vychladl a byl zvážen [68].

Výpočet popelovin ve vzorku je pak stanoven dle následující rovnice:

$$P = \frac{m_3}{m_2} \cdot 100 (\%) \quad (2)$$

m_3 ...hmotnost vzorku po zpopelnění (g)

m_2 ...hmotnost navážky vzorku (g)

P...obsah popelovin ve vzorku (%).

6.3 Stanovení obsahu dusíku a bílkovin

Předlohou pro stanovení dusíku a bílkovin byla norma ČSN EN ISO 5983-2 Krmiva – Stanovení obsahu dusíku a výpočet hrubého proteinu – Část 2: Mineralizace v bloku a metoda destilace vodní parou [69]. Stanovení bylo provedeno z vysušeného vzorku při 103 ± 1 °C. Do mineralizační baňky (MB) bylo naváženo 0,5 g vzorku s přesností na 4 desetinná místa. Ke vzorku bylo přidáno 10 ml koncentrované H_2SO_4 . MB byla vložena do mineralizačního přístroje a obsah byl mineralizován 1 hodinu při teplotě 450 ± 3 °C. Po uplynutí doby bylo přes zpětný chladič do MB přidáno po kapkách přibližně 5 ml H_2O_2 . Po vyčechení vzorku se nechal obsah ještě 15 minut mineralizovat. Následně byl vzorek ochlazen a převeden do 100 ml odměrné baňky (OB), a ta byla doplněna po rysku. Do nálevky Parnas-Wagnerova přístroje bylo odpipetováno 25 ml vzorku z OB. Ke vzorku bylo přidáno 25 ml 30% roztoku NaOH. Do předlohy bylo nalito 50 ml 2% H_3BO_3 . Destilace probíhala 20 minut od počátku varu. Po ukončení destilace bylo do předlohy přidáno Tashirovo činidlo (pár kapek). Tento vzorek byl poté titrován 0,05M H_2SO_4 do slabého růžového zabarvení. Spotřeba při titraci byla použita při výpočtu obsahu dusíku (N), ze kterého se následně vypočetl obsah bílkovin ve vzorku (B) dle vztahu 4. U každého zmineralizovaného vzorku byly provedeny 2 stanovení.

Vztah pro výpočet obsahu dusíku je:

$$N = \frac{V_1 \cdot 0,0014}{m_4} \cdot \frac{V_2}{V_3} \cdot f \cdot 100 (\%) \quad (3)$$

V_1 ...spotřeba při titraci 0,05M H_2SO_4 (ml)

m_4 ...navážka vzorku do mineralizační baňky (g)

V_2 ...objem mineralizátu (tj. 100 ml)

V_3 ...pipetované množství mineralizátu ke stanovení (tj. 25 ml)

f...přepočítávací faktor titračního činidla 0,05M H_2SO_4 (1,0158)

N...obsah dusíku ve vzorku (%).

Ze zjištěného obsahu dusíku (N) byl vypočten obsah bílkovin ve vzorku (B):

$$B = N \cdot 6,25 (\%) \quad (4)$$

6.4 Stanovení obsahu hydroxyprolinu

Stanovení se provádí ze sušiny vzorku rozdrceného na jemný prášek. Do ampulky bylo naváženo 0,05 g vzorku s přesností na 4 desetinná místa. Do ampulky bylo odpipetováno 10 ml 6M HCl. Ampulka byla hermeticky uzavřena zatavením nad kahanem za použití kleští. Zatavená ampulka byla inkubovaná při 112 ± 2 °C po dobu 30 hodin. Po ochlazení ampulky na pokojovou teplotu se opatrně otevřela (v horní části za pomoci kleští či kladívečka) a obsah převedl do 50 ml odměrné baňky (OB). OB byla doplněna po rysku a obsah se promíchal. Obsah OB se přefiltroval přes filtrační papír nízké hustoty do 50 ml OB, již se však OB nedoplňovala po rysku (=zředěný hydrolysát). Z takto získaného hydrolysátu se odpipetovalo 10 ml roztoku do 50 ml kádinky a bylo přidáno 20 ml H₂O. pH směsi bylo upraveno na 6,3-6,8. Nejdříve se přidalo pár kapek 5M NaOH (přibližně do pH 2). Poté se po kapkách přidával 0,1M NaOH až do požadovaného rozmezí pH. Obsah kádinky byl převeden do 50 ml OB a doplněn po rysku (=pracovní roztok hydrolysátu).

Samotné stanovení hydroxyprolinu bylo provedeno 2x u každého pracovního hydrolysátu. Z pracovního roztoku hydrolysátu byl odpipetován 1 ml do zkumavky. Byl přidán 1 ml roztoku CuSO₄^A, 1 ml 2,5M roztoku NaOH a 1 ml roztoku H₂O₂^B. Na zkumavku byl nasazen uzávěr a obsah důkladně promíchán. Je nutné vždy po chvílce míchání opatrně sejmout uzávěr a nechat tak uniknout vzniklý přetlak. Následně byla místo zátky na zkumavku nasazena nálevka (jako zpětný chladič) a zkumavka byla zahřívána na předeřáté vodní lázni při teplotě 80 ± 1 °C po dobu 5 min. Po vyjmutí z vodní lázně byla zkumavka ochlazená a k obsahu byly přidány 4 ml 3M H₂SO₄. Obsah zkumavky byl promíchán. Byly přidány 2 ml roztoku p-dimethylaminobenzaldehydu, obsah byl opět promíchán. Zkumavka opatřená nálevkou jako zpětným chladičem, byla zahřívána na předeřáté vodní lázni o teplotě 70 ± 1 °C po dobu 16 minut. Po ochlazení zkumavky studenou vodou byla změřena absorbance červeného zbarvení na spektrofotometru oproti slepému pokusu při vlnové délce 550 nm. Měření na spektrofotometru je nutno provést do 15 minut. Slepý pokus byl připraven stejně jako samotný vzorek, pouze místo 1 ml pracovního roztoku hydrolysátu

^A Příprava použitého roztoku CuSO₄: 0,125 g CuSO₄·5 H₂O se rozpustí v destilované vodě v 50 ml odměrné baňce a doplní po rysku

^B Příprava roztoku H₂O₂: 5 ml 30% H₂O₂ se smíchá s 10 ml H₂O

byl použit 1 ml H₂O. Množství hydroxyprolinu bylo odečteno z kalibrační křivky hydroxyprolinu, která byla za tímto účelem sestavena.

Rovnice kalibrační křivky:

$$y = 13,813x + 0,0695; R^2 = 0,978 \quad (5)$$

y...absorbance

x...množství hydroxyprolinu (mg)

R²...korelační faktor

Po úpravě rovnice 5 získáme rovnici pro výpočet množství hydroxyprolinu ve vzorku (v pipetovaném množství):

$$x = \frac{y - 0,0695}{13,813} \text{ (mg)}. \quad (6)$$

Obsah hydroxyprolinu ve vzorku (W_{HYP}) se vypočte dle vztahu:

$$W_{\text{HYP}} = \frac{x V_4 V_6}{n V_5 V_7} \cdot 1000 \text{ (mg} \cdot \text{kg}^{-1}) \quad (7)$$

x...množství hydroxyprolinu odečtené z kalibrační křivky (mg)

n...navážka vzorku (g)

V₄...objem zředěného hydrolyzátu (tj. 50 ml)

V₅...objem pipetovaný ze zředěného hydrolyzátu (tj. 10 ml)

V₆...objem pracovního roztoku hydrolyzátu (tj. 50 ml)

V₇...objem pipetovaný z pracovního roztoku hydrolyzátu ke stanovení hydroxyprolinu (tj. 1 ml).

Pro vyjádření obsahu hydroxyprolinu ve vzorku v procentech (HYP) bylo použito následujícího vztahu:

$$\text{HYP} = \frac{W_{\text{HYP}}}{10000} \text{ (%).} \quad (8)$$

Ze stanoveného obsahu hydroxyprolinu bylo možno vyjádřit obsah kolagenu ve vzorku (K) [70]:

$$K = \text{HYP} \cdot 8 \text{ (%)} \quad (9)$$

Obsah elastinu (E) se vypočítal z rozdílu obsahu bílkovin (B) a kolagenu (K):

$$E = B - K (\%) \quad (10)$$

B...obsah čistých bílkovin ve vzorku (%)

K...obsah kolagenu ve vzorku (%)

6.5 Spektrofotometrické stanovení aminoskupin

Stanovení se provádělo [68] ze vzorku želatiny/hydrolyzátu vysušeného při 40 °C. Z každého vzorku byly připraveny 2 roztoky, a z každého se měření provádělo pouze jednou. Do 100 ml OB bylo naváženo přibližně 0,1 g vzorku s přesností na 4 desetinná místa (doporučuje se vzorek nejprve rozpustit v kádince s cca 50 ml vody a následně přelit do 100 ml OB). OB byla doplněna po rysku. Z připraveného roztoku bylo 10 ml odpipetováno do 50 ml OB a doplněno po rysku (=pracovní roztok). Roztok byl naředěn, aby výsledné naměřené absorbance byly v mezích kalibrační křivky. V průběhu příprav bylo připraveno ninhydrinové činidlo^C.

Do zkumavky byl odpipetován 1 ml z pracovního roztoku. K němu bylo přidáno 0,5 ml ninhydrinového činidla. Vzorek byl zamíchán a opatřen malou nálevkou (zpětný chladič). Zkumavka byla umístěna na předem vytemperovanou vodní lázeň o teplotě 95±1 °C po dobu 15 minut. Zkumavka byla ihned ochlazena a bylo do ní přidáno 5 ml 50% etanolu. Obsah zkumavky byl promíchán. Absorbance byla měřena na spektrofotometru při vlnové délce 570 nm oproti slepému pokusu. Slepý pokus je připraven stejným způsobem, pouze místo 1 ml pracovního roztoku je pipetován 1 ml H₂O. Množství aminoskupin se přepočítává z množství nalezeného glycinu. Nejprve proto byla sestrojena kalibrační křivka glycinu; její rovnice má tvar:

$$y = 0,0206g - 0,0629; R^2 = 0,9424 \quad (11)$$

y...absorbance

g...množství glycinu v pipetovaném množství (μg).

^C Příprava ninhydrinového činidla: 0,4 g ninhydrinu se rozpustí ve 30 ml 96% etanolu. Přidá se 10 ml acetátového pufru o pH 5,5. Nakonec se přidá 18 mg chloridu cínatého. Činidlo je nutné uchovávat v lednici a je použitelné pouze 1 týden.

Z rovnice kalibrační křivky lze vyjádřit množství glycinu v pipetovaném množství:

$$g = \frac{y + 0,0629}{0,0206} (\mu\text{g}). \quad (12)$$

Následující vztahy znázorňují přepočty glycinu v pipetovaném množství na množství glycinu v navážce, resp. obsah glycinu v 1 gramu sledované látky:

$$G_n = g \cdot \frac{V_8}{V_9} \cdot \frac{V_{10}}{V_{11}} (\mu\text{g}) \quad (13)$$

V_8 ...celkový objem roztoku (tj. 100 ml)

V_9 ...objem pipetovaný z celkového objemu roztoku (tj. 10 ml)

V_{10} ...objem zředěného roztoku (tj. 50 ml)

V_{11} ...objem pipetovaný ze zředěného roztoku (tj. 1 ml)

G_n ...množství glycinu v navážce ke stanovení aminoskupin (μg)

$$\text{GLY} = \frac{1}{n_g} \cdot G_n (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) \quad (14)$$

n_g ...navážka vzorku na stanovení aminoskupin

GLY...obsah glycinu v gramu sledované látky ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$).

Vztah (15) poté vyjadřuje přepočty z obsahu glycinu na obsah aminoskupin (X_{NH_2}):

$$X_{\text{NH}_2} = \frac{16,0225 \cdot \text{GLY}}{75,067 \cdot 1000} (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}). \quad (15)$$

Ve vztahu 15 hodnota 16,0225 představuje molární hmotnost aminoskupiny. Hodnota 75,067 představuje molární hmotnost glycinu. Hodnota 1000 znázorňuje převod jednotek z μg na mg [68].

6.6 Stanovení pevnosti gelu dle Blooma

Bloomova metoda spočívá ve vtláčování válečku o průměru 12,7 mm za přesně definovaných podmínek do připraveného gelu. Ke stanovení je připraven gel o koncentraci želatiny 6,67 % w/w (tzn. 7,5 g želatiny a 105 g destilované vody). Ten je skladován 16-18 hodin při teplotě 10 °C. Následně je takto připravený gel podroben zkoušce. Výsledkem měření je hodnota Bloom (gram), která určuje zátěž (sílu v gramech) potřebnou ke

stlačení gelu o 4 mm. U komerčních želatín jsou naměřené hodnoty zpravidla mezi 50-300 Bloom (g). Platí, že čím větší hodnota Bloom, tím kvalitnější želatína (gel) [10, 45].

V některých experimentech nebylo vyextrahováno dostatečné množství želatiny pro stanovení pevnosti dle Blooma (zejména v případě vazovic). V těchto případech bylo použito menších navážek želatiny, do nádob o menším objemu než standardní nádoby. Pro přenesení výsledků do standardních podmínek, byl proveden experiment s konvenční želatínou o známé pevnosti gelu. Tato želatína byla navažována v menších množstvích do váženek, doplněna vodou a následně po inkubaci při 10 °C měřena pevnost gelu. Byl stanoven přepočítávací koeficient, aby výsledky dosažené v jiných podmínkách odpovídaly výsledkům dosažených za standardních podmínek. Upravené podmínky jsou zaznamenány v Tab. 5.

Tab. 5. Podmínky při stanovování pevnosti gelu

Metoda	Navážka želatiny (g)	Navážka vody (g)	Nádoba	Přepočítávací faktor
A ^a	7,4667	104,5	standardní nádoba	-
B	3,0000	42	"nádoba o 1/2 objemu"*	1,2627
C	1,5000	21	"nádoba o 1/4 objemu"**	1,6372

^a standardizovaná metoda dle Blooma

* váženka s vnějším průměrem 50 mm, vnitřním 44 mm a výškou 50 mm

** váženka s vnějším průměrem 40 mm, vnitřním 35 mm a výškou 50 mm

7 POSTUP PRÁCE

Z dodaných vzorků šlach byly extrahovány želatiny/hydrolysáty. Sledovanými parametry při extrakci želatin/hydrolysátů bylo množství použitého enzymu (faktor A) a teplota při extrakci (faktor B). Pro odhad limit parametrů pro extrakci želatin/hydrolysátů byl nejprve proveden pokusný experiment.

7.1 Faktorové pokusy

Provádění experimentálních měření je podstatou při navrhování nových produktů, zavádění nové výroby či zdokonalování stávajících poměrů. Experiment nestačí pouze provést s maximální přesností dle přesného postupu, ale musí být i dobře navržen. Dobře navržený experiment je schopen rychle podat informace o sledovaných parametrech a také výrazně snížit náklady experimentu. Experimenty, kdy jsou sledovány jednotlivé parametry zvlášť, často nevedou k nalezení nejlepšího řešení a navíc nepokrývají možné interakce mezi jednotlivými faktory. I v případě, kdy neexistuje interakce mezi sledovanými parametry, tyto experimenty jsou mnohem nákladnější než faktorové pokusy [71]. Podstatou faktorových pokusů je sledování více parametrů během jednoho měření. Jsou stanoveny pro každý parametr 2 limitní hodnoty (dolní a horní), a je sledován vliv na výsledek při přechodu mezi nimi [72].

7.2 Popis experimentu

Organizace experimentů rozkladu šlach byla provedena dvouúrovňovými faktorovými schémata s jedním středovým experimentem. Sledovaly se dva proměnné parametry při rozkladu. Společně s jedním centrálním experimentem dohromady bylo pro každý typ šlach provedeno 5 experimentů (2^2+1). Rozpis experimentů při rozkladu šlach je uveden v Tab. 6.

Tab. 6. Hodnoty sledovaných faktorů při jednotlivých experimentech

Experiment č.	Faktor A: enzym (%)*	Faktor B: teplota extrakce (°C)
1	1	58
2	1	74
3	2	66
4	3	58
5	3	74

*vztaženo na hmotnost sušiny v navážených šlachách

Rozklad šlach byl prováděn ve třech stupních. V prvním stupni bylo do PE láhve naváženo 40 g šlach s přesností na 0,1 g. Ke šlachám bylo přilito 400 ml destilované vody o teplotě $20 \pm 0,2$ °C. Experiment tedy probíhal v poměru šlachy:voda = 1:10 (w/v). Bylo změřeno pH a následně PE láhev se šlachami byla umístěna na třepací přístroj v předem vytemperovaném inkubátoru na $20 \pm 0,2$ °C. Po 4 hodinách bylo změřeno pH a upraveno na hodnotu $8,5 \pm 0,2$ za pomoci 0,5% roztoku NaOH. pH tak bylo upravováno každou hodinu až do konce 1. stupně (délka 1. stupně byla 8 hodin). Mezitím byla stanovena sušina z použitých šlach (viz kapitola 6.1), aby bylo možno navázat přidavek enzymu (faktor A) ve 2. stupni experimentu.

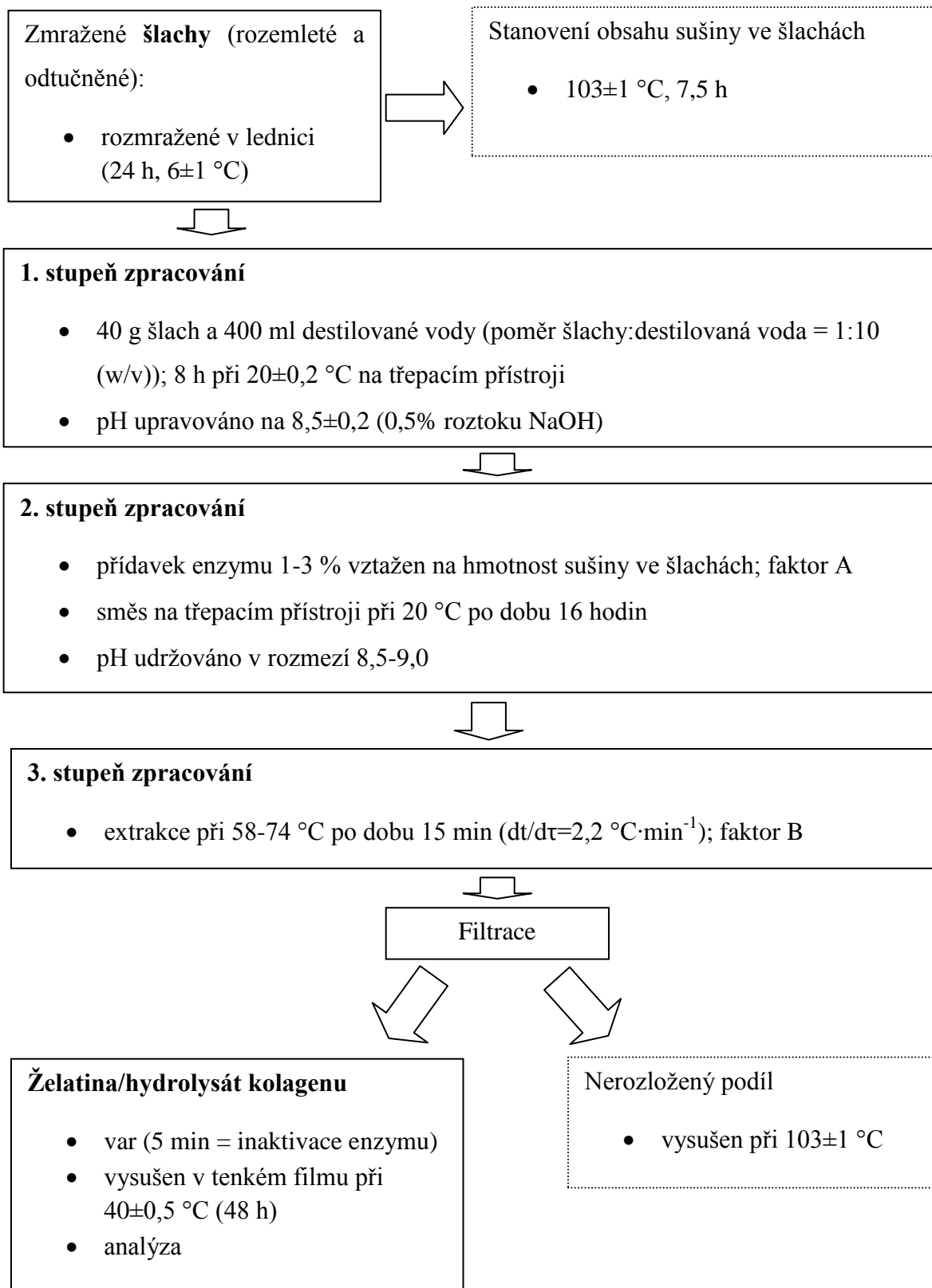
Ve 2. stupni bylo ke šlachám přidáno odpovídající množství enzymu POLARZYME 6.0 T dle Tab. 6 a láhev se umístila zpět do inkubátoru. Ukázkový výpočet přídatku enzymu je popsán v kapitole 7.1. Délka 2. stupně byla 16 hodin. Po 1. hodině se opět změřilo a upravilo pH na přibližně $8,5 \pm 0,2$. Po 2. hodině se pH upravilo na $9,0 \pm 0,2$ a PE láhev se šlachami se nechala na třepacím zařízení po zbytek 2. stupně.

Ve 3. stupni byl obsah PE láhve převeden do 1 l kádinky a byl zahříván za neustálého míchání na magnetickém míchadle s topením na teplotu extrakce odpovídající danému experimentu (faktor B) dle Tab. 5. Rychlost ohřevu ($dt/d\tau$) činila $2,2$ °C·min⁻¹. Dosažená teplota byla udržována po dobu 15 minut. Stav vzorku šlach před extrakcí a po ní je zachycen na Obr. 2. V levé části se nachází šlachy po 2. stupni zpracování. V pravé části jsou již

šlachy po 3. stupni zpracování, během kterého došlo k rozložení šlach. Zajímavostí je, že k nejvýraznějšímu rozkladu šlach docházelo při teplotě mezi 62-65 °C. Následně byl obsah kádinky za tepla přefiltrován přes dvojitou vrstvu předem zvážené PA tkaniny na kovovém cedníku. Zbytek na PA tkanině byl ještě promyt přibližně 60 ml destilované vody o příslušné teplotě dle faktoru B. Filtrační koláč (nerozložené šlachy) byl vysušen do konstantní hmotnosti při 103±1 °C, a poté byla zjištěna jeho hmotnost. Filtrát (hydrolysát) byl okamžitě po filtraci přiveden k varu a za neustálého míchání udržován 5 minut při varu, aby došlo k inaktivaci enzymu. Po mírném ochlazení (stání cca 5 minut při pokojové teplotě) byl hydrolysát přelit do silikonových misek a sušen v sušárně při 40±0,5 °C po dobu 48 hodin. Získaný film byl ve třetí misce rozdrcen na prášek a uchován v sáčku v exsikátoru pro další analýzy (viz kapitola 6). Na Obr. 3 je vyobrazeno blokové schéma obsahující postupu práce.



Obr. 2. Hovězí šlachy před 3. stupněm extrakce (nalevo) a po 3. stupněm extrakce (napravo)



Obr. 3. Blokové schéma přípravy želatin/hydrolyzáty ze šlach 3 stupňovým procesem

7.3 Stanovení sušiny v navážce šlach

Obsah sušiny ve šlachách (S) byl stanoven dle kapitoly 6.1. Následným přepočtem byl stanoven hmotnostní podíl sušiny v navážce šlach dle vzorce 15.

Výpočet sušiny v navážce šlach:

$$S_{\S} = m_5 \cdot \frac{S}{100} \text{ (g)} \quad (16)$$

m_5 ...navážka šlach pro experiment (g)

S...obsah sušiny ve šlachách (%)

S_{\S} ...hmotnostní podíl sušiny v navážce šlach pro experiment (g)

7.4 Výpočet přídatku enzymu

Množství enzymu přidávané ve 2. stupni bylo spjato s hmotnostním podílem sušiny v navážce šlach (S_{\S}).

Výpočet přídatku enzymu ve 2. stupni experimentu:

$$m_A = S_{\S} \cdot \text{Faktor A} \quad (17)$$

m_A ...přídavek enzymu ve 2. stupni experimentu (g)

Faktor A představuje množství enzymu v % a liší se v jednotlivých experimentech (viz Tab. 5). Je nutné dosazovat v případě experimentu množství bez procent, tzn. u experimentu 1-2 to bylo 0,01 atd.

7.5 Výpočet účinnosti extrakce

Množství rozložených šlach se stanovovalo z hmotnosti vysušeného filtračního koláče (103 ± 1 °C), díky náročnému zjišťování přesného množství získané želatiny/hydrolyzátu.

Výpočet účinnosti rozkladu hovězích šlach (η):

$$\eta = \frac{S_{\S} - m_f}{S_{\S}} \cdot 100 \text{ (%) } \quad (18)$$

S_s ...množství sušiny v navážce šlach

m_f ...hmotnost filtračního koláče po vysušení

η ...účinnost extrakce hovézích šlach (%)

7.6 Bilance obsahu látek v sušině

Jelikož šlachy byly již dříve odtučněny, měla by jejich sušina obsahovat pouze bílkoviny a popeloviny. Byla proto provedena procentuální bilance ze zjištěných výsledků obsahu sušiny ve zkoumaných šlachách a jejich želatin/hydrolysátů.

Výpočet bilance zjištěných látek obsažených v sušině:

$$OS = P + B + BCH \quad (19)$$

OS...představuje 100 %, které tvoří hmotnost sušiny

P...obsah popelovin (%)

B...obsah bílkovin (%)

BCH...bilanční chyba (%)

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

Celkem bylo provedeno 20 experimentů ($4 \times (2^2 + 1)$) a navíc z každého dílčího experimentu byly provedeny analýzy zmíněné v kapitole 6. Veškeré výsledky jsou uvedeny v následující kapitole. Jednotlivé produkty vzniklé extrakcí ze šlach jsou v následujících kapitolách srovnávány. Komplexní přehled výsledků analýz želatin/hydrolysátů z jednotlivých šlach je uveden v příloze I-IV.

8.1 Vyhodnocení účinnosti extrakce

Při extrakci želatin/hydrolysátů byly sledovány dva faktory (množství přidávaného enzymu – Faktor A, teplota při extrakci – Faktor B). Výsledky extrakce jsou vyjádřeny v Tab. 7.

Tab. 7. Účinnost extrakce hovězích šlach

Experiment č.	Vazovice	Zadní šlachy	Achillovy šlachy	Přední šlachy
Účinnost extrakce (%)				
1	20,30	44,96	59,74	51,18
2	21,03	81,82	68,91	56,52
3	29,69	94,59	96,68	91,38
4	31,96	65,14	72,79	40,78
5	32,46	95,64	95,02	89,09
Exp. č. 1...1 % enzymu/ 58 °C			Exp. č. 2...1 % enzymu/ 74 °C	
Exp. č. 3...2 % enzymu/ 66 °C			Exp. č. 4...3 % enzymu/ 58 °C	
Exp. č. 5...3 % enzymu/ 74 °C				

Z Tab. 6 vyplývá, že největší účinnost extrakce z hovězích šlach byla dosažena zpravidla v experimentech č. 3 a 5. Lze proto předpokládat, že ve středovém experimentu (2 % enzymu/ 66 °C) byly již dosaženy nutné podmínky k ideálnímu rozložení hovězích šlach. V případě volby vhodných podmínek pro extrakci želatin/hydrolysátů ze sledovaných hovězích šlach, za účelem maximální výtěžnosti, je na místě volit podmínky ve středovém experimentu. Podmínky zde nejsou tak drastické jako při maximálních hodnotách obou faktorů v exp. č. 5, a navíc dojde i k úspoře energie a enzymu. Obecně největší účinnost

rozkladu šlach byla zaznamenána v případě Achillových šlach. Zde byla dosažena i největší účinnost při extrakci v exp. č. 3, a sice 96,68 %. Nejmenších výtěžků bylo dosaženo (s výjimkou předních šlach) v případě exp. č. 1, kdy podmínky při extrakci byly nejmírnější. V případě vazovic byla účinnost extrakce při exp. č. 1 pouhých 20,3 %. Vazovice se ze sledovaných šlach rozkládaly nejméně. Účinnost rozkladu vazovic se pohybovala pouze v rozmezí 20,3-32,46 %. Ty si svou strukturu, na rozdíl od zbylých vzorků šlach, uchovávaly i po 2. stupni experimentu. Na ostatních šlachách bylo již po 2. stupni patrné značné nabobtnání a v některých případech se již začaly rozpadat na menší kusy. Byl to důsledek uvolnění vyšších struktur bílkovin v důsledku zániku nekovalentních interakcí (vodíkových můstků), které stabilizují dané řetězce pohromadě. Enzym poté snadněji difundoval do šlach a tím měl vyšší účinek při rozkládání šlach. Při následných analýzách jednotlivých vzorků šlach byl u vazovic zjištěn jednoznačně nejvyšší podíl elastinu ve srovnání s ostatními vzorky. Vysoký podíl elastinu na úkor kolagenu je logickým vysvětlením nízké účinnosti extrakce u vazovic. Elastin lépe odolává varu, či zředěným kyselinám nebo alkáliím [73]. U předních šlach při exp. č. 1 (1 % enzymu/ 58 °C) došlo k většímu rozložení šlach než v případě exp. č. 4 (3 % enzymu/ 58 C). Vyšší účinnost extrakce při mírnějších podmínkách může být důsledek změny navážky šlach při experimentu č. 1. Bylo naváženo 50 g šlach a smícháno s 500 ml vody (z důvodu zjištění nízkého podílu sušiny v předních šlachách). Větší objem vody mohl způsobit lepší smáčivost šlach a vyšší nabobtnání.

Analýza statistické významnosti (Tab. 8) sledovaných parametrů při účinnosti extrakce neoznačila ani jeden z parametrů za statisticky významný. V případě statistické významnosti by musela hodnota Fisherova testu přesáhnout $F_{\text{krit}(1;2)}^{95\%}=18,51$, a čím více by jej překročila, tím více by byl daný parametr signifikantní [74]. V případě vazovic dosáhl enzym hodnoty 15,92, což již značí jistou závislost účinnosti extrakce na dávce enzymu (potvrzená na Obr. 4a). P-hodnota označuje parametr za významný, jestliže nabývá hodnot menších než 0,05. V tomto případě je sledovaný parametr s 95 % pravděpodobností statisticky významný.

Tab. 8. Výsledky analýzy statistické významnosti sledovaných parametrů na účinnost extrakce

Faktor	Vazovice		Zadní šlachy		Achillovy šlachy		Přední šlachy	
	F-test	P-hodnota	F-test	P-hodnota	F-test	P-hodnota	F-test	P-hodnota
A: Enzym	15,92	0,1542	0,70	0,5646	0,94	0,5181	0,15	0,7679
B: Teplota	0,04	0,8722	2,74	0,3408	0,60	0,5862	0,88	0,5287
Interakce AB	0,00	0,9784	0,02	0,9034	0,10	0,8047	0,56	0,5964
		$F^{95\%}_{krit(1;2)}=18,51;$		$\alpha=0,05$				

Účinnost extrakce je popsána následující rovnicí:

$$y = k + Ax_1 + Bx_2 + ABx_1x_2 \quad (20)$$

k, x_1, x_2 ...regresní koeficienty

A, B...sledované faktory

AB...interakce mezi faktory.

Po dosažení regresních koeficientů do rovnice 20 nabývá rovnice účinnosti extrakce pro jednotlivé typy šlach tvaru:

vazovice: $y = 12,2 + 6,2125x_1 + 0,05x_2 - 0,00625x_1x_2$; korelační faktor: $R^2 = 0,941066$;

zadní šlachy: $y = -105,324 + 21,4688x_1 + 0,249687x_2 - 0,196875x_1x_2$; $R^2 = 0,775795$;

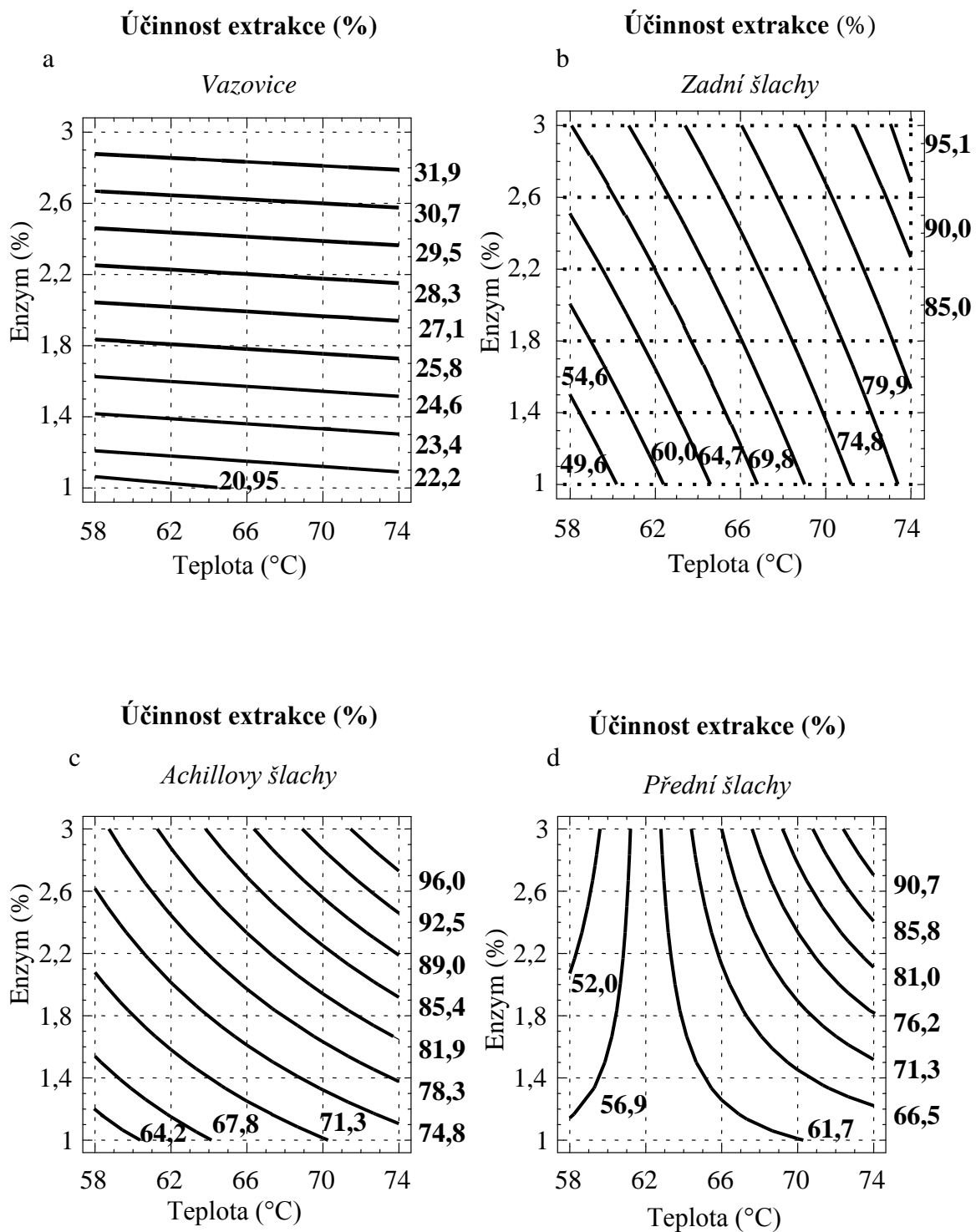
Achillovy šlachy: $y = 47,8825 - 17,0125x_1 + 0,16875x_2 + 0,040625x_1x_2$; $R^2 = 0,622187$;

přední šlachy: $y = 121,415 - 83,1012x_1 - 1,01062x_2 + 1,34312x_1x_2$; $R^2 = 0,614166$.

Důvodem nízkých korelačních faktorů může být výše popsáný efekt středového pokusu, který vycházel srovnatelně s pokusem v maximálních hodnotách sledovaných parametrů.

Obr. 4 prezentuje grafické vyjádření účinnosti extrakce na zkoumaných typech šlach v závislosti na dávce enzymu (Faktor A) a teplotě při extrakci (Faktor B). V případě vazo-

vic (Obr. 4a), kde došlo k nejmenšímu rozkladu šlach, je ze sklonu křivek patrná jednoznačná závislost na dávce přidávaného enzymu. Za předpokladu, že do šlach difunduje pouze část enzymu, je potom toto množství, v případě vazovic, určujícím parametrem při extrakci želatin/hydrolysátů. Vliv teploty na účinnost extrakce je velmi nízký (vrstevnice jsou téměř rovnoběžné s osou teploty), což je rovněž patrné z výsledků Fisherova testu – viz Tab. 8. Na Obr. 4b je popsána extrakce zadních hovězích šlach. Zde byla největší účinnost extrakce (95,64 %) v případě maximálních hodnot obou sledovaných faktorů. Ze sklonu křivek je zřejmá výrazná teplotní závislost na množství vyextrahovaných želatin/hydrolysátů. Obecně však lze říci, že čím vyšší byla teplota při extrakci a čím vyšší byl přírůstek enzymu, tím k většímu rozkladu šlach došlo. Achillovy šlachy (Obr. 4c) vykazují podobný výsledek jako šlachy zadní. Zde si lze však všimnout exponenciálního charakteru křivek s klesající teplotou. To opět odráží významný vliv teploty. Ke kompenzování klesající teploty je nutné dodat exponenciálně se zvyšující množství enzymu, aby bylo dosaženo stejné účinnosti při extrakci. Na Obr. 4d je znázorněna účinnost extrakce pro přední šlachy. Od teploty 62 °C je zjištěná závislost stejná jako v případě Achillových a předních šlach, tedy se zvyšující se teplotou a množstvím enzymu roste účinnost extrakce. Zároveň graf opět potvrzuje (s teplotou vyšší než 62 °C), že při zvyšující se teplotě je dosaženo stejných výsledků i se snižujícím se množstvím enzymu.



Obr. 4. Grafické vyjádření účinnosti extrakce želatin/hydrolysátů v závislosti na dávce enzymu (%) ve 2. stupni zpracování a teplotě extrakce (°C) ve 3. stupni zpracování

8.2 Obsah popelovin

Stanovení obsahu popelovin bylo provedeno u získaných želatin/hydrolysátů dle postupu popsaného v kapitole 6.2. Zjištěné výsledky jsou uvedeny v Tab. 9.

Tab. 9. Obsah popelovin (%) v získaných želatinách/hydrolysátech

Experiment	Vazovice	Zadní šlachy	Achillovy šlachy	Přední šlachy
č.	Obsah popelovin (%)			
1	7,91	2,54	2,02**	2,02**
2	7,23	1,31*	1,27*	5,78
3	7,65	2,2**	1,89	2,49**
4	8,78	3,69	2,58	2,08**
5	8,96	3,95	2,52	3,4
Exp. č. 1...1 % enzymu/ 58 °C			Exp. č. 2...1 % enzymu/ 74 °C	
Exp. č. 3...2 % enzymu/ 66 °C			Exp. č. 4...3 % enzymu/ 58 °C	
Exp. č. 5...3 % enzymu/ 74 °C				
*splňuje nejpřísnější kritéria pro požadavky na potravinářské a farmaceutické želatiny [10]				
** splňuje požadavky na potravinářské a farmaceutické želatiny v některých státech [43]				

Průmyslově získávané želatiny/hydrolysáty vykazují nižší obsah popelovin než u některých produktů, které byly vyextrahovány ze šlach (viz kap. 2.3.2). To souvisí např. s účinností extrakce. Čím je účinnost extrakce nižší, tím více popelovin výsledný produkt obsahuje. Vysvětlením může být vypírání suroviny, určené pro extrakci želatiny, po jednotlivých stupních předzpracování v průmyslové výrobě. Ve výše popsaném experimentu byly želatiny/hydrolysáty extrahovány přímo v médiu, které sloužilo k jejich předzpracování. Bylo to pro zjednodušení procesu.

Největší obsah popelovin byl zjištěn u želatin/hydrolysátů získaných z vazovic. Obsah popelovin se zde vyskytoval v rozmezí 7,23-8,96 % na sušinu hydrolysátu. Ve srovnání s konvenčními želatinami, kde je obsah popelovin do 2 %, u kvalitních dokonce méně než

0,5 %, jich obsahuje získaný produkt několikanásobně více. Příčinnou vysokého obsahu popelovin u získaných produktů z vazovic mohou být vyšší přídavky 0,5% NaOH při upravování pH v 1. a 2. stupni experimentu. Bylo zde přidáváno v celkovém součtu přes 5 ml 0,5 % NaOH, zatím co u ostatních šlach, bylo přidáváno v průběhu experimentu okolo 3 ml, někdy i méně. Želatiny/hydrolysáty získané z dalších typů šlach již vykazovaly obsah popelovin výrazně nižší. Vůbec nejnižšího obsahu popele u Achillových šlach v exp. č. 2 (1 % enzymu/ 74 °C) a zadních šlach za stejných podmínek, kdy obsah popelovin vztažen na sušinu činil 1,27 %, resp. 1,31 %. Napříč tomu u produktů z předních šlach byl zjištěn, za stejných podmínek extrakce, obsah popelovin 5,78 %, nejvyšší ze všech produktů získaných z jiných šlach než vazovic. Zároveň u tohoto experimentu byl v produktu zjištěn nižší obsah bílkovin (Tab. 11). Z Tab. 9 zároveň vyplývá, že vyšší obsah popelovin obsahovaly většinou želatiny/hydrolysáty při maximálním sledovaném přídavku enzymu (3 %), tj. exp. č. 4 a 5.

Z Tab. 10 vyplývá, že u Achillových šlach je dávka enzymu statisticky významným faktorem na množství obsažených popelovin. Hodnota F-testu zde byla 25,31, což je nad hranicí významnosti.

Tab. 10. Výsledky analýzy statistické významnosti sledovaných parametrů na obsah popelovin

Faktor	Vazovice		Zadní šlachy		Achillovy šlachy		Přední šlachy		
	F-test	P-hodnota	F-test	P-hodnota	F-test	P-hodnota	F-test	P-hodnota	
A: Enzym	8,27	0,2101	10,43	0,1885	25,31*	0,1232	2,81	0,3372	
B: Teplota	0,28	0,6931	0,56	0,5986	5,00	0,2639	13,20	0,1686	
Interakce AB	0,92	0,5217	1,54	0,4246	2,81	0,3372	2,81	0,3372	
		$F_{\text{krit}(1;2)}^{95\%}=18,51;$		$\alpha=0,05;$		*statisticky významný faktor			

Po dosažení regresních koeficientů do rovnice 20 nabývá rovnice obsahu popelovin v želatinách/hydrolysátech z daných šlach v závislosti na sledovaných parametrech extrakce následujícího tvaru:

vazovice: $y = 11,5137 - 1,18125x_1 - 0,071875x_2 + 0,028125x_1x_2$; korelační faktor:

$$R^2 = 0,904463;$$

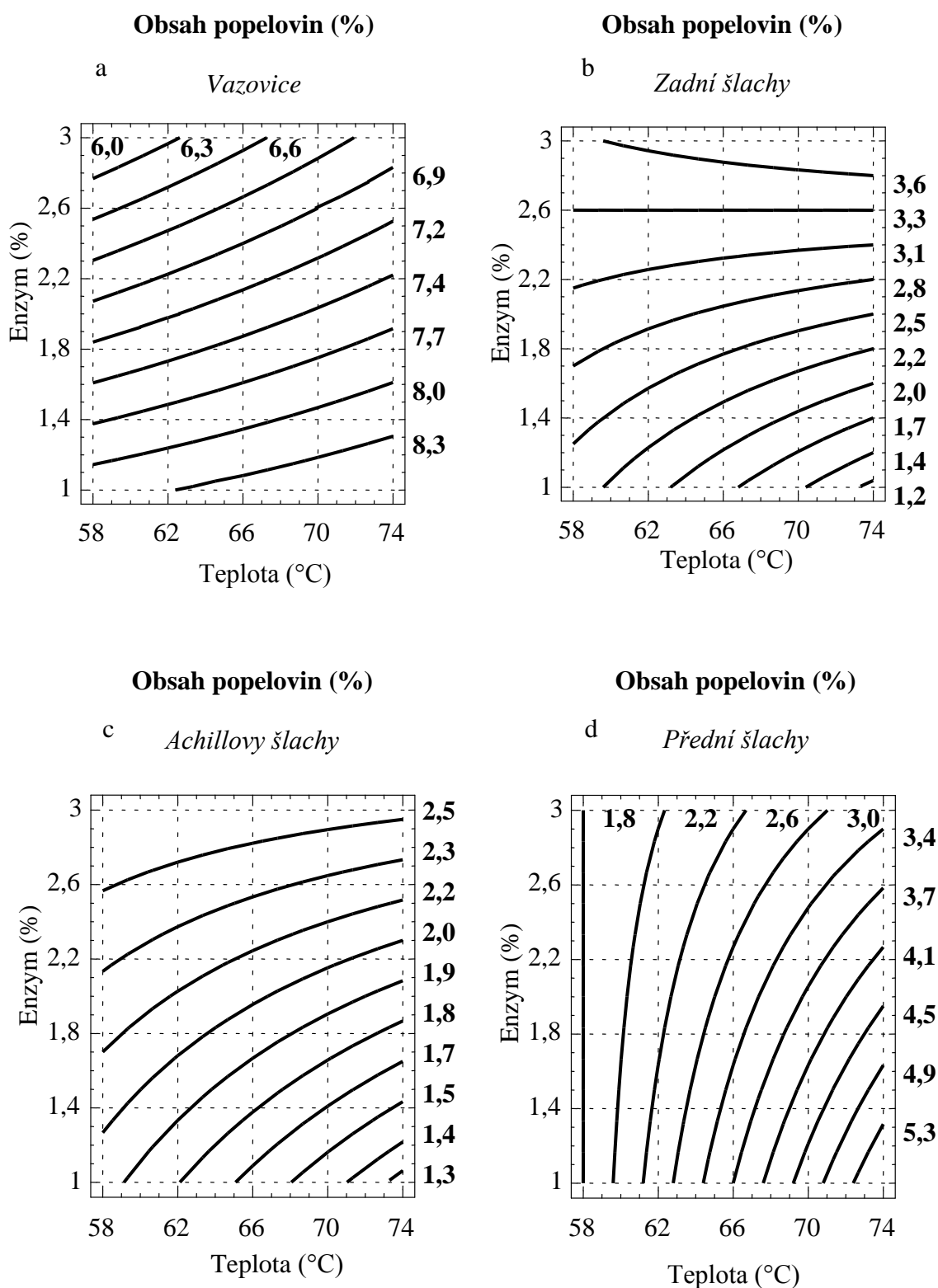
zadní šlachy: $y = 8,83375 - 2,11875x_1 - 0,121875x_2 + 0,046875x_1x_2$; $R^2 = 0,926095$;

Achillovy šlachy: $y = 5,285 - 0,7875x_1 - 0,0625x_2 + 0,01875x_1x_2$; $R^2 = 0,970696$;

přední šlachy: $y = -16,285 + 4,35x_1 + 0,3125x_2 - 0,075x_1x_2$; $R^2 = 0,949567$.

Obr. 5 vyobrazuje obsah popelovin u získaných želatin/hydrolysátů v závislosti na množství přidávaného enzymu a teplotě při extrakci. V případě hydrolysátů z vazovic (Obr. 5a), kde byl zjištěn největší obsah popelovin, obsah popelovin roste se zvyšující se teplotou při stejné dávce enzymu. Naopak se zvyšováním dávky enzymu a se snižující se teplotou klesá obsah popelovin. Na Obr. 5b je zachycen obsah popelovin v produktech ze zadních šlach. Zde ze sklonu křivek vyplývá značná závislost na množství přidávaného enzymu. Čím více jej bylo použito, tím je větší obsah popelovin v želatině/hydrolysátu. Při přídatku enzymu mezi 2-3 % teplota téměř nemá vliv na výsledný obsah popele. Analýza produktů z Achillových šlach (Obr. 5c) vykazuje velmi podobné vztahy jako v případě produktů ze zadních šlach. Tedy, s rostoucím množstvím přidaného enzymu a s klesající teplotou vzrůstá obsah popelovin. Naopak růst teploty má za následek snížení obsahu popelovin. V případě hydrolysátů z předních šlach (Obr. 5d) přidávání enzymu vede k nižšímu obsahu popelovin. Markantnější je však vliv teploty. S mírným zvýšením teploty (při konstantním množství enzymu) dochází k výraznému zvýšení obsahu popelovin ve finálním produktu.

Pro objektivnější posouzení vlivu sledovaných faktorů na obsah popelovin v hydrolysátech by bylo nutno ujednotit množství přidávaného NaOH pro úpravu pH. V případě potřeby snížit obsah popelovin v hydrolysátech by bylo možným řešením propírání šlach po konci 1. stupně a následné přidání enzymu bez další úpravy pH.



Obr. 5. Grafické vyjádření obsahu popele (%) v získaných želatinách/hydrolysátech v závislosti na dávce enzymu (%) ve 2. stupni zpracování a teplotě extrakce (°C) ve 3. stupni zpracování

8.3 Obsah bílkovin

Metoda na stanovení obsahu bílkovin byla popsána v kap. 6.3. Množství bílkovin v získaných želatinách/hydrolysátech je uvedeno v Tab. 11. Nejmenšího procentuálního obsahu bílkovin v získaném produktu bylo dosaženo při extrakci z vazovic, čemuž koresponduje zvýšený obsah popelovin u daných hydrolysátů. Zde byl nejmenší obsah bílkovin zaznamenán při exp. č. 4, kdy obsah bílkovin vztažený na sušinu vzorku činil 83,51 %. V analyzovaných vzorcích získaných z jiných typů šlach obsah bílkovin přesáhl vždy 90 %, přičemž většího obsahu bílkovin bylo většinou dosahováno s vyšší teplotou extrakce a vyšší dávkou enzymu. To lze vysvětlit jako důsledek větší účinnosti extrakce, kdy došlo k rozložení většího množství šlach, které se následně jako bílkovinná složka dostaly do hydrolysátů. Poměrně malé množství bílkovin bylo zjištěno také v případě hydrolysátu z předních šlach z exp. č. 2, avšak tento produkt zároveň vykazoval zvýšený obsah popelovin.

Tab. 11. Obsah bílkovin (%) v produktech získaných extrakcí z různých typů šlach

Experiment č.	Vazovice	Zadní šlachy	Achillovy šlachy	Přední šlachy
	Obsah bílkovin ¹ (%)			
1	84,79	97,30	92,53	94,87
2	87,02	97,67	94,98	90,40
3	85,65	96,04	93,63	96,95
4	83,51	98,38	94,91	96,71
5	86,27	100,30	96,45	95,06
Exp. č. 1...1 % enzymu/ 58 °C			Exp. č. 2...1 % enzymu/ 74 °C	
Exp. č. 3...2 % enzymu/ 66 °C			Exp. č. 4...3 % enzymu/ 58 °C	
Exp. č. 5...3 % enzymu/ 74 °C				

¹ vztaženo na sušinu vzorku

Tab. 12 popisuje analýzu statistické významnosti sledovaných parametrů při extrakci na obsah bílkovin v želatinách/hydrolysátech. Jediným statisticky významným parametrem, dle Fisherova testu, zde byla teplota ve 3. stupni zpracování v případě vazovic. Dosáhla značně vysoké hodnoty dle F-testu (86,81). Za zmínku stojí, že společně s teplotou i dávka enzymu ve 2. stupni zpracování dosáhla zvýšené hodnoty (13,89).

Tab. 12. Výsledky analýzy statistické významnosti sledovaných parametrů na obsah popelovin

Faktor	Vazovice		Zadní šlachy		Achillovy šlachy		Přední šlachy	
	F-test	P-hodnota	F-test	P-hodnota	F-test	P-hodnota	F-test	P-hodnota
A: Enzym	13,89	0,1646	1,51	0,4283	3,76	0,2989	1,78	0,4032
B: Teplota	86,81*	0,0672	0,05	0,8649	4,15	0,2863	1,57	0,4224
Interakce AB	1,25	0,4569	0,12	0,7869	0,20	0,7361	0,35	0,6634
		$F_{\text{krit}(1;2)}^{95\%}=18,51;$		$\alpha=0,05;$		*statisticky významný faktor		

Po dosazení regresních koeficientů do rovnice 20 nabývá rovnice obsahu bílkovin v želatinách/hydrolysátech z daných šlach v závislosti na sledovaných parametrech extrakce následujícího tvaru:

vazovice: $y = 78,6225 - 1,7375x_1 + 0,11875x_2 + 0,01875x_1x_2$; korelační faktor:

$$R^2 = 0,990286;$$

zadní šlachy: $y = 89,0287 - 6,15625x_1 - 0,090625x_2 - 0,065625x_1x_2$; $R^2 = 0,626688$;

Achillovy šlachy: $y = 80,3812 + 2,83125x_1 + 0,184375x_2 - 0,028125x_1x_2$; $R^2 = 0,890184$;

přední šlachy: $y = 116,114 - 4,35625x_1 - 0,371875x_2 + 0,090625x_1x_2$; $R^2 = 0,78714$.

8.4 Obsah kolagenu

Množství kolagenu bylo zjištěno přepočtem z množství nalezeného hydroxyprolinu (viz kap. 6.4). Obdržené výsledky jsou shrnuty v Tab. 13.

Tab. 13. Obsah kolagenu (%) v získaných želatinách/hydrolysátech

Experiment č.	Vazovice	Zadní šlachy	Achillovy šlachy	Přední šlachy
Obsah kolagenu ¹ (%)				
1	34,87	79,18	35,39	30,76
2	38,87	86,46	37,70	41,33
3	37,41	82,94	40,04	43,06
4	35,35	74,94	23,50	51,42
5	28,20	81,04	35,36	44,95
Exp. č. 1...1 % enzymu/ 58 °C			Exp. č. 2...1 % enzymu/ 74 °C	
Exp. č. 3...2 % enzymu/ 66 °C			Exp. č. 4...3 % enzymu/ 58 °C	
Exp. č. 5...3 % enzymu/ 74 °C				

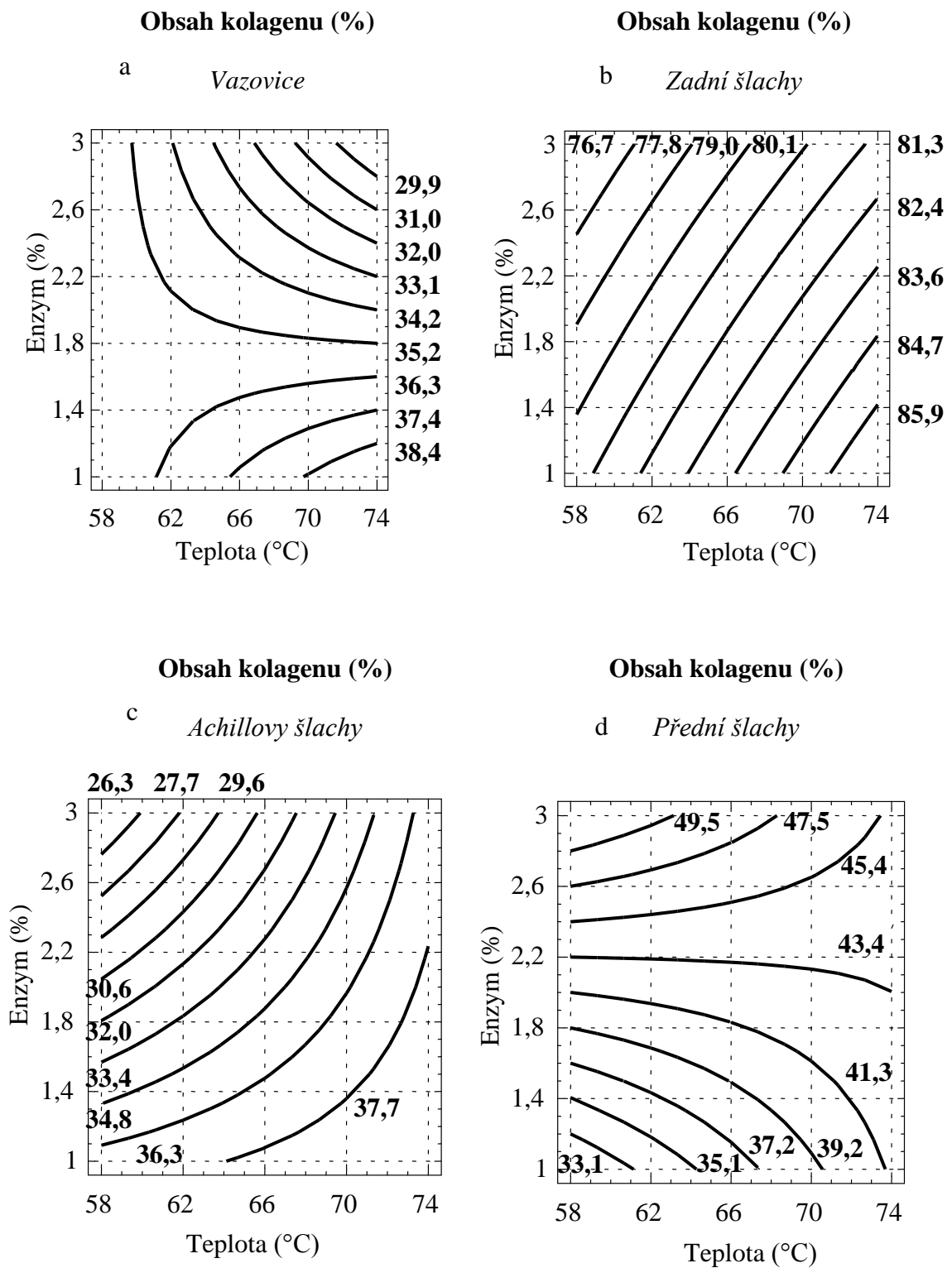
¹ vztaženo na sušinu vzorku

Z Tab. 13 je patrné, že, s výjimkou předních šlach, bylo nejnižšího obsahu kolagenu v želatinách/hydrolysátech dosaženo při experimentech č. 4, případně 5. To je důsledek drastičtějších podmínek při extrakci (kombinace maximálních hodnot faktorů), které způsobily rozklad i více odolného elastinu. Jednoznačně nejvyšší obsah kolagenu vykazují produkty získané ze zadních šlach. Konkrétně v exp. č. 2 (1 % enzymu/ 74 °C) bylo dosaženo maximálního obsahu kolagenu, který činil 86,46 %. Želatina získaná za těchto podmínek jako jediná vytvořila gel, což je v souladu s v teorii uvedeným faktem, že množství kolagenu má zásadní vliv na schopnost želatiny tvořit gel.

Obr. 6 graficky vyjadřuje obsah kolagenu (%) v želatinách a hydrolysátech získaných z různých typů šlach v závislosti na množství přídavku enzymu a teplotě při extrakci. Obr. 6a popisuje hydrolysáty získané z vazovic. Z grafu je patrné, že při stálé teplotě přidávání enzymu způsobí pokles obsahu kolagenu. S vyšší dávkou enzymu budou šlachy vystaveny vyšší zátěži, se kterou se bude zvyšovat i množství rozloženého elastinu. Teplota je komplikovanějším faktorem. Při nízkých navážkách přidávaného enzymu obsah kolagenu v hydrolysátech s rostoucí teplotou při extrakci roste. Avšak, při přidávání enzymu

více než 1,8 % hmotnosti sušiny šlach, začne poté s rostoucí teplotou obsah kolagenu v hydrolysátu klesat. Opět jako vysvětlení může posloužit vyšší množství rozloženého elastinu za drastičtějších podmínek extrakce. V případě hydrolysátů ze zadních šlach (Obr. 6b), kde byly zjištěny největší obsahy kolagenu, s rostoucí teplotou dochází k zvyšování podílu obsahu kolagenu. Elastin je odolnější vůči varu než kolagen, a proto se při stejné dávce enzymu, ale vyšší teplotě extrakce přednostně rozpadá kolagen. Naopak se zvyšující se dávkou enzymu obsah kolagenu klesá. Toto může být také zdůvodnění vytvoření gelu právě při exp. č. 2, tedy 1 % enzymu a 74 °C při extrakci. Hydrolysáty z Achillových šlach (Obr. 6c) vykazují podobné vlastnosti. V případě zvyšující se dávky enzymu dochází k poklesu obsahu kolagenu. Při uchování stejného množství přídavku enzymu je možno zvyšováním teploty při extrakci zaznamenávat vyšší obsah kolagenu v hydrolysátu. U extrakce želatiny/hydrolysátů z předních šlach (Obr. 6d) je popis vlivu přídavku enzymu a teploty při extrakci na obsah kolagenu poněkud náročnější. Nízké dávky enzymu při zvyšující se teplotě způsobují zvyšování obsahu kolagenu v hydrolysátu. Avšak, po překonání jisté hranice, přibližně 2,2 % enzymu na sušinu ve šlachách, již začne enzym v kombinaci se zvyšující se teplotou rozkládat i elastin, a podíl kolagenu se tak začne snižovat. Z grafu dále vyplývá, že v případě sledování stále teploty při extrakci se zvýšením dávky enzymu obsah kolagenu v rozloženém podílu bude zmenšovat.

I když zkoumané šlachy vazovíce vykazovaly jednoznačně nejmenší obsah kolagenu, jejich hydrolysáty již obsahují srovnatelné množství kolagenu na sušinu z hydrolysátů z Achillových a předních šlach. Vysvětlením by mohlo být přednostní odbourávání kolagenu u vazovic před odolnějším elastinem. V případě Achillových a předních šlach, kde byl obsah kolagenu ve šlachách vysoký, lze předpokládat jeho vysokou zesíťovanost. Proto došlo i k rozkladu značné části elastinu na úkor kolagenu.



Obr. 6. Grafické vyjádření obsahu kolagenu (%) v získaných želatinách/hydrolysátech v závislosti na dávce enzymu (%) ve 2. stupni zpracování a teplotě extrakce (°C) ve 3. stupni zpracování v získaných hydrolysátech

U předních šlach byla jako statisticky významný faktor vyhodnocena dávka enzymu (Tab. 14). Hodnota F-testu zde dosáhla 194,11. Zároveň zde hranici významnosti splňuje dávka enzymu i pro P-hodnotu (0,045). Dále je jako statisticky významná považována ještě i interakce mezi parametry u předních šlach.

Tab. 14. Výsledky analýzy statistické významnosti sledovaných parametrů na obsah kolagenu

Faktor	Vazovice		Zadní šlachy		Achillovy šlachy		Přední šlachy	
	F-test	P-hodnota	F-test	P-hodnota	F-test	P-hodnota	F-test	P-hodnota
A: Enzym	3,50	0,3081	4,43	0,2782	1,29	0,4526	194,11*	0,045
B: Teplota	0,34	0,6673	8,34	0,2093	1,29	0,4526	5,53	0,2524
Interakce AB	4,21	0,2844	0,08	0,8273	0,59	0,5901	93,89*	0,0646
		$F_{\text{krit}(1;2)}^{95\%}=18,51;$		$\alpha=0,05;$		*statisticky významný faktor		

Po dosazení regresních koeficientů do rovnice 20 nabývá rovnice obsahu kolagenu v želatinách/hydrolysátech z daných šlach v závislosti na sledovaných parametrech extrakce následujícího tvaru:

vazovice: $y = 0,46 + 20,55x_1 + 0,6x_2 - 0,35x_1x_2$; korelační faktor: $R^2 = 0,889539$;

zadní šlachy: $y = 52,9962 + 0,25625x_1 + 0,496875x_2 - 0,040625x_1x_2$; $R^2 = 0,927802$;

Achillovy šlachy: $y = 51,8125 - 23,35x_1 - 0,15625x_2 + 0,03x_1x_2$; $R^2 = 0,759598$;

přední šlachy: $y = -47,9988 + 40,9313x_1 + 1,18437x_2 - 0,528125x_1x_2$; $R^2 = 0,996605$.

8.5 Obsah aminoskupin

Tab. 15 obsahuje naměřené hodnoty pro získané želatiny/hydrolysáty z různých šlach.

Tab. 15. Obsah aminoskupin ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) v jednotlivých získaných hydrolysátech

Experiment	Vazovice	Zadní šlachy	Achillovy šlachy	Přední šlachy
č.	Obsah aminoskupin ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)			
1	8,2	10,1	11,7	9,9
2	8,6	8,1	11,7	8,2
3	7,3	9,1	10,3	7,7
4	5,7	9,8	10,9	6,3
5	6,7	8,2	10,7	7,0
Exp. č. 1...1 % enzymu/ 58 °C			Exp. č. 2...1 % enzymu/ 74 °C	
Exp. č. 3...2 % enzymu/ 66 °C			Exp. č. 4...3 % enzymu/ 58 °C	
Exp. č. 5...3 % enzymu/ 74 °C				

Z Tab. 15 je zřejmé, že množství volných aminoskupin závisí zejména na množství enzymu přidaného ve 2. stupni experimentu. Celkově největší množství aminoskupin vykazovaly hydrolysáty získané z Achillových šlach, konkrétně oba experimenty s minimální dávkou enzymu (1 %) vykazovaly shodně 11,7 mg/g volných aminoskupin. Naopak nejméně volných aminoskupin vykazovaly vazovice v exp. č. 4 (3 % enzymu/ 58 °C). Volné aminoskupiny představují potenciální místo navázání jiných skupin či látek a hrají proto velký význam při chemických modifikacích bílkovin. Jedním takovým využitím může být například síťování.

Na Obr. 7 je zachycen vliv přídavku enzymu a teplota při extrakci na množství volných aminoskupin obsažených v želatině/hydrolysátu. U hydrolysátů z vazovic (Obr. 7a) má teplota pouze malý vliv na výsledné množství volných aminoskupin. Zásadní vliv zde má enzym. Na Obr. 7b znázorněný vliv faktorů na množství volných aminoskupin v želatinách/hydrolysátech získaných ze zadních šlach zase jasně naznačuje teplotní závislost než vliv enzymu. Enzym zde prakticky nemá vliv a výsledné množství aminoskupin závisí pouze na teplotě při extrakci. U produktů z Achillových šlach (Obr. 7c) je zřejmá závislost

výsledného množství volných aminoskupin na množství enzymu. Vliv teploty se projevuje až při vyšších dávkách enzymu. V případě předních šlach (Obr. 7d), z nich získané hydrolyzáty dosahují vyššího počtu volných aminoskupin s nižšími dávkami enzymu. Zároveň při nízkých dávkách enzymu s rostoucí teplotou ubývá množství volných aminoskupin. Při vyšších dávkách enzymu (nad 2,2 %) se vliv teploty pomalu vytrácí.

Tab. 16. Výsledky analýzy statistické významnosti sledovaných parametrů na obsah aminoskupin

Faktor	Vazovice		Zadní šlachy		Achillovy šlachy		Přední šlachy	
	F-test	P-hodnota	F-test	P-hodnota	F-test	P-hodnota	F-test	P-hodnota
A: Enzym	8,27	0,2101	5,00	0,2639	1,12	0,4737	320*	0,0351
B: Teplota	0,28	0,6931	1620*	0,0156	0,01	0,9264	13,89	0,1646
Interakce AB	0,92	0,5217	20,00*	0,1381	0,01	0,9264	80*	0,0699
		$F^{95\%}_{krit(1;2)}=18,51;$		$\alpha=0,05;$		*statisticky významný faktor		

Z analýzy statistické významnosti vyplývá (Tab. 16), že u zadních šlach je statisticky významným faktorem teplota ve 3. stupni zpracování (F-test dosáhl výrazné hodnoty 1620). I P-hodnota splňuje podmínky statistické významnosti (0,0156). Interakce obou parametrů je zde dle F-testu také statisticky významná (20). U předních šlach je naproti tomu statisticky významným parametrem dávka enzymu (F-test 320, P-hodnota 0,0351). U předních šlach je statisticky významnou i interakce mezi oběma parametry (80).

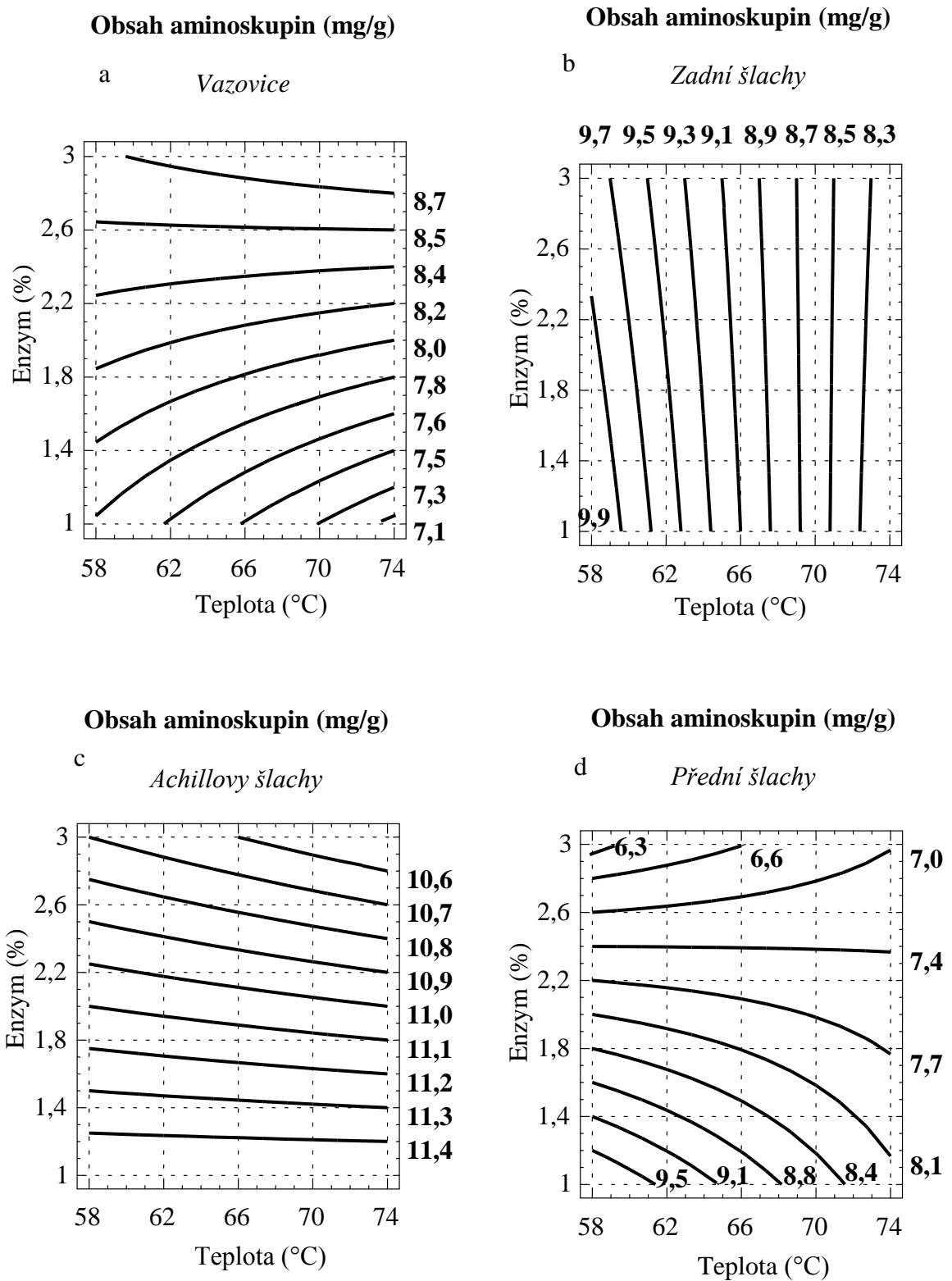
Po dosažení regresních koeficientů do rovnice 20 nabývá rovnice obsahu aminoskupin v želatinách/hydrolyzátech z daných šlach v závislosti na sledovaných parametrech extrakce následujícího tvaru:

vazovice: $y = 9,0875 - 2,3375x_1 + 0,00625x_2 + 0,02x_1x_2$; korelační faktor: $R^2 = 1$;

zadní šlachy: $y = 18,235 - 0,875x_1 - 0,1375 + 0,0125x_1x_2$; $R^2 = 0,999392$;

Achillovy šlachy: $y = 11,5475 - 0,0375x_1 + 0,00625 - 0,00625x_1x_2$; $R^2 = 0,534794$;

přední šlachy: $y = 22,1825 - 6,15x_1 - 0,18125 + 0,075x_1x_2$; $R^2 = 0,99759$.



Obr. 7. Grafické vyjádření množství aminoskupin (mg/g) v získaných želatinách/hydrolysátech v závislosti na dávce enzymu (%) ve 2. stupni zpracování a teplotě extrakce (°C) ve 3. stupni zpracování

8.6 Pevnost gelu

Pevnost gelu se stanovovala dle standardní, případně vhodně upravené metodiky, zmíněné v kap. 6.6. Ze získaných produktů extrakce byla získána pouze jedna želatina, která utvořila gel. Byla to želatina získána ze zadních šlach při podmínkách 1 % enzymu a teplotě extrakce 74 °C. Výsledná změřená pevnost gelu byla 105 Bloom. Z téhož vzorku šlach byla ještě připravena silně viskózní kapalina (za podmínek extrakce 1 % enzymu a 58 °C), ale nepřešla do gelové formy, takže pevnost gelu nemohla být změřena. Želatina, která vytvořila gel, obsahovala nejvíce kolagenu (86,46 %) ze všech získaných hydrolysátů a zároveň měla nízký obsah popelovin (1,31 %).

Důvodů, proč nebylo získáno více gelů, může být celá řada. Z výše uvedených například nízký obsah kolagenu a vysoký obsah elastinu (Tab. 13), případně vyšší obsah popelovin (Tab. 9). Věrohodným ukazatelem by také mohlo být měření molekulových hmotností, které úzce souvisí s tvorbou gelu u želatin. Avšak, toto stanovení nebylo součástí experimentu. Obr. 8 zachycuje vzorky vystavené 16 h při 10 °C (přední šlachy), za účelem vytvoření gelu. Ani jeden z vzorků gel nevytvořil. Kromě toho se na dně vytvořila vrstva usazeniny. Vše napovídá tomu, že tato bílá usazenina je pravděpodobně elastin. Jeho vysoký obsah v želatině může být důvod, proč získané hydrolysáty netvořily gely.



Obr. 8. Vzorky (získané z předních šlach) exponované 16 h při 10 °C s pravděpodobně usazeným elastinem

8.7 Stanovení vlhkosti v želatinách/hydrolysátech

Tab. 17 obsahuje naměřené vlhkosti získaných želatin/hydrolysátů. Stanovení byla prováděna zjištěním sušiny a následným přepočtem na podíl vlhkosti. Vlhkost v želatinách se nijak zásadně nelišila. Produktům extrakce byl vždy ponechán dostatečný čas k vysušení.

Tab. 17. Obsah vlhkosti (%) v získaných želatinách/hydrolysátech

Experiment	Vazovice	Zadní šlachy	Achillovy šlachy	Přední šlachy
	Vlhkost (%)			
1	6,97	6,99	7,52	6,67
2	7,23	7,12	7,33	6,75
3	6,89	7,34	8,11	8,2
4	6,74	7,1	6,96	6,98
5	7,18	7,57	7,03	7,15
Exp. č. 1...1 % enzymu/ 58 °C			Exp. č. 2...1 % enzymu/ 74 °C	
Exp. č. 3...2 % enzymu/ 66 °C			Exp. č. 4...3 % enzymu/ 58 °C	
Exp. č. 5...3 % enzymu/ 74 °C				

ZÁVĚR

Diplomová práce se skládá ze dvou částí – první teoretické částí a druhé praktické. Teoretická část charakterizuje vedlejší jatečné produkty, popisuje právní předpisy týkající se nakládání s jatečným odpadem a předkládá jejich možné využití. Dále se věnuje želatině, jakož to produktu ze surovin vznikajících při porážení dobytka. Popisuje její výrobu, vlastnosti a využití.

Praktická část popisuje experiment, jehož cílem bylo posoudit vliv vstupní suroviny na extrakci želatin/hydrolyzáátů ze šlach hovězího dobytka, a zároveň posoudit vliv sledovaných parametrů při extrakci na výsledné vlastnosti želatin/hydrolyzáátů.

Extrakce želatin/hydrolyzáátů probíhala 3 stupňovým procesem. V 1. stupni šlachy byly smíchány s destilovanou vodou v poměru 1:10. pH bylo udržováno v rozmezí 8,5-9,0 (0,5% NaOH); směs se třepala 8 h při 20 °C. Ve 2. stupni extrakce bylo přidáno ke šlachám 1-3 % enzymu vztaženo na množství sušiny ve šlachách (Faktor A); směs se třepala 16 h při 20 °C. Ve 3. stupni probíhala extrakce za zvýšené teploty 58-74 °C (Faktor B) po dobu 15 min. Experiment byl proveden faktorovými pokusy s kombinací minimálních a maximálních hodnot parametrů (2²) a jedním centrálním experimentem ve středových hodnotách.

Volba vstupní suroviny (hovězí šlach) jednoznačně ovlivňuje účinnost extrakce želatin/hydrolyzáátů. U vazovic, které obsahovaly nejméně kolagenu, bylo dosaženo účinnosti extrakce pouze v rozmezí 20,3-32,5 %. Naproti tomu u Achillových šlach se účinnost extrakce pohybovala v rozmezí 59,7-96,7 %. 96,68% účinnost extrakce byla zároveň nejvyšší dosaženou účinností vůbec. Jednalo se o centrální experiment ve středových hodnotách sledovaných parametrů (tj. 2 % enzymu, teplota při extrakci 66 °C). Obecně lze říci, že nejvyšší účinnosti bylo dosaženo vždy při centrálním experimentu spolu s experimenty v maximálních hodnotách obou faktorů.

Analýzou získaných želatin/hydrolyzáátů bylo u některých produktů zjištěn obsah popelovin nepřekračující 2 %, což vyhovuje přísným kritériím pro potravinářské či farmaceutické aplikace. Obsah popelovin u zadních a Achillových šlach u experimentu při 1 % enzymu a teplotě 74 °C činil 1,31 %, resp. 1,27 %.

Extrakcí hovězí šlach byla připravena jedna želatina tvořící gel. Jednalo se o experiment ze zadních šlach při 1 % enzymu a teplotě 74 °C. Pevnost gelu byla 105 Bloom, což

je dostačující pro mnohé farmaceutické a potravinářské aplikace. Analýzou byl u daného vzorku želatiny zjištěn vysoký obsah kolagenu (86,46 %), a zároveň nízký obsah popelovin (1,31 %). Vysoký obsah kolagenu (75-86 %) byl zjištěn pouze u hydrolysátů ze zadních šlach. Ostatní získané produkty obsahovaly značné množství elastinu (40-60 %) a netvořily gely. Tyto kolagen-elastinové hydrolysáty by mohly najít uplatnění zejména v kosmetice.

Výsledky prokázaly, že výběrem vstupní suroviny a volbou vhodných podmínek při zpracování lze připravit nízkomolekulární hydrolysáty, respektive želatiny, s takovým poměrem obsahu kolagenu a elastinu a s velmi nízkým obsahem popelovin, které budou vyhovovat požadavkům odběratelů z kosmetického či potravinářského průmyslu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BAYR, S.; RANTANEN, M.; KAPARAJU, P.; RINTALA, J. Mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion of rendering plant and slaughterhouse wastes. *Bioresource Technology*, 2012, 104, s. 28-36
- [2] JIA, Y.; GAO, CH.; ZHANG, L.; JIANG, G. Effects of pre-fermentation and influent temperature on the removal efficiency of COD, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and PO_4^{3-}P in slaughterhouse wastewater using SBR. *Energy Procedia*, 2012, 16, s. 1964-1971
- [3] PALATSI, J.; VINAS, M.; GUIVERNAU, M.; FERNANDEZ, B.; FLOTATS, X. Anaerobic digestion of slaughterhouse waste: Main process limitations and microbial community interactions. *Bioresource Technology*, 2011, 102, s. 2219-2227
- [4] LAWRIE, R.A.; LEDWARD, D.A. *Lawrie's meat science*. Woodhead Publishing. 2006. 7th Edition. ISBN 978-1-84569-159-2
- [5] HEJNFELT, A.; ANGELIDAKI, I. Anaerobic digestion of slaughterhouse by-products. *Biomass and Bioenergy*, 2009, 33, s. 1046-1054
- [6] WAHL, T. Hydrolysis process for raw materials from the fishing and slaughterhouse industries and tanks for use therein. IPC: AC12P21O6FI. Norsko [patent]
- [7] CUETOS, M.J.; GOMÉZ, X.; OTERO, M.; MORÁN, A. Anaerobic digestion of solid slaughterhouse waste (SHW) at laboratory scale: Influence of co-digestion with the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). *Biochemical Engineering Journal*, 2008, 40, s. 99-106
- [8] GRAZZIOTIN, A.; PIMENTEL, F.A.; DE JONG, E.V.; Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. *Animal Feed Science and Technology*, 2006, 126, s. 135-144
- [9] XIA, Y.; MASSÉ, D.I.; MCALLISTER, T.A.; BEAULIEE, C.; UNGERFELD, E. Anaerobic digestion of chicken feather with swine manure or slaughterhouse sludge for biogas production. *Waste Management*, 2012, 32, s. 404-409
- [10] OCKERMAN, H.W.; HANSEN, C.I. *Animal by-product: processing & utilization*. Londýn. Woodhead Publishing. 2000. ISBN 978-1-84569-414-2
- [11] Informace poskytl Miroslav Chýla, vedoucí v provozu Jatka Jarošov. Jarošov. 12. 02. 2012

- [12] ČESKÝ STATISTICKÝ ÚŘAD, Výkazy, sběr dat [online]. <ww.vykazy.cz> [cit. 2012-03-19]
- [13] PITK, P.; KAPARAJU, P.; VILU, R. Methane potential of sterilized solid slaughterhouse wastes. *Bioresource Technology*, 2012, DOI: 10.1016/j.biortech.2012.04.038
- [14] CAO, W.; MEHRVAR, M. Slaughterhouse wastewater treatment by combined anaerobic baffled reactor UV/H₂O₂ processes. *Chemical Engineering and Design*, 2011, 89, s. 1136-1143
- [15] DEL NERY, V.; DE NARDI, I.R.; DAMIANOVIC, M.H.R.Z.; POZZI, E., AMORIM, A.K.B.; ZAIAT, M. Long-term operating performance of a poultry slaughterhouse wastewater treatment plant. *Resources Conservation & Recycling*, 2007, 50, s. 102-114
- [16] DEBIK, E.; COSKUN, T. Use of the static granular bed reactor (SGBR) with anaerobic sludge to treat poultry slaughterhouse wastewater and kinetic modeling. *Bioresource Technology*, 2009, 100, s. 2777-2782
- [17] BAYRAMOGLU, M.; KOBYA, M.; EYVAZ, M.; SENTURK, E. Technical and economic analysis of electrocoagulation for the treatment of poultry slaughterhouse wastewater. *Separation and Purification Technology*, 2006, 51, s. 404-408
- [18] NAŘÍZENÍ VLÁDY č. 61/2003 Sb. o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech, ve znění nařízení vlády č. 229/2007 Sb. a nařízení vlády č. 23/2011 Sb. [online] [cit. 2012-04-30]
- [19] DÁVILA, E.; ZAMORA, L. M.; PLA, M.; CARRETERO, C.; PARÉS, D. Identification and antagonistic activity of lactic acid bacteria occurring in porcine blood from industrial slaughterhouses – a preliminary study. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 107, s. 207-211
- [20] LEE, S.-H.; SONG, K. B. Purification of an iron-binding nona-peptide from hydrolysates of porcine blood plasma protein. *Process Biochemistry*, 2009, 44, s. 378-381

- [21] TORRES, M.R.; MARÍN, F.R.; RAMOS, A.J., SORIANO, E. *Study of operating conditions in concentration of chicken blood plasma proteins by ultrafiltration*, 2002, 54, s. 215-219
- [22] HYUN, CH.-K.; SHIN, H.-K. Utilization of bovine blood plasma obtained from a slaughterhouse for economic production of probiotics. *Journal of fermentation and bioengineering*, 1998, 86, s. 34-37
- [23] EUROPA-SUMMARIES OF EUROPA LEGISLATION. *Animal by-products not intended for human consumption* [online]. [cit. 2012-04-02] <http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/animal_nutrition/f81001_en.htm>
- [24] EUROPA-SUMMARIES OF EUROPA LEGISLATION. *Animal by-products* [online]. [cit. 2012-04-02] <http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/animal_nutrition/sa0025_en.htm>
- [25] VALTA, J. *Praktický průvodce nakládáním s odpady a vedlejšími živočišnými produkty v potravinářském průmyslu*. Archivní výtisk č. 1. CENIA, česká informační agentury životního prostředí. 2007. [online] [cit. 2012-04-03] <http://eagri.cz/public/web/file/41226/prakticky_pruvodce_nakladanim_s_odpady_a_vzp.pdf>
- [26] NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1069/2009 o hygienických pravidlech pro vedlejší produkty živočišného původu a získané produkty, které nejsou určeny k lidské spotřebě. [online] [cit. 2012-04-02] <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:300:0001:01:CS:HTML>>
- [27] R. BARRENA, A. ARTOLA, F. VÁZQUEZ, A. SÁNCHEZ. The use of composting for the treatment of animal by-products: Experiments at lab scale. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 161, s. 380-386
- [28] HE, Y.; BAGLEY, D.M.; LEUNG, K.T.; LISS, S.N.; LIAO, B.-Q. Recent advances in membrane technologies for biorefining and bioenergy production. *Biotechnology Advances*, 2012, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2012.01.015

- [29] SALMINEN, E.; RINTALA, J. Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste – a review. *Bioresource Technology*, 2002, 83, s. 13-26
- [30] KHALID, A.; ARSHAD, M.; ANJUM, M.; MAHMOOD, T.; DAWSON, L. The anaerobic digestion of solid organic waste. *Waste management*, 2011, 31, s. 1737-1744
- [31] ALVAREZ, R.; LIDÉN, G. Semi-continuous co-digestion of solid slaughterhouse waste, manure, and fruit and vegetable waste. *Renewable Energy*, 2008, 33, s. 726-734
- [32] CALLAGHAN, F.J.; WASE, D.A.J.; THAYANITHY, K.; FORSTER, C.F. Continuous co-digestion of cattle slurry with fruit and vegetable wastes and chicken manure. *Biomass & Bioenergy*, 2002, 27, s. 71-77
- [33] CASCAROSA, E.; GEA, G.; ARAUZO, J. Thermochemical processing of meat and bone meal: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2012, 16, s. 942-957
- [34] COUTAND, M.; CYR, M.; DEYDIER, E.; GUILLET, R.; CLASTRES, P. Characteristics of industrial and laboratory meat and bone meal ashes and their potential applications. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 150, s. 522-532
- [35] CLIFFE, K.R.; PATUMSAWAD, S. Co-combustion of waste from olive oil production with coal in a fluidised bed. *Waste Management*, 2001, 21, s. 49-53
- [36] ADEMIRBAS, A. Biofuels securing the planet's future energy needs. *Energy Conversion and Management*, 2009, 50, s. 2239-2249
- [37] LIU, Y.; LOTERO, E.; GOODWIN JR., J.G.; MO, X. Transesterification of poultry fat with methanol using Mg-Al hydrotalcite derived catalysts. *Applied Catalysis A: General*, 2007, 331, s. 138-148
- [38] ENCINAR, J.M.; SÁNCHEZ, N.; MARTINÉZ, G.; GARCÍA, L. Study of biodiesel production from animal fats with high free fatty acid content. *Bioresource Technology*, 2011, 102, 10907-10914
- [39] KÁRA, J.; PASTOREK, Z.; JELÍNEK, A. Kompostování zbytkové biomasy. *Biom.cz*, 2002, ISSN: 1801-2655
<<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/kompostovani-zbytkove-biomasy>>

- [40] BHASKAR, N.; MODI, V.K.; GOVINDARAJU, K.; RADHA, C.; LALITHA, R.G. Utilization of meat industry by products: Protein hydrolysate from sheep visceral mass. *Bioresource Technology*, 2007, 98, s. 388-394
- [41] SECCHI, G. Role of protein in cosmetics. *Clinics in Dermatology*, 2008, 26, s. 321-325
- [42] FLICK, E.W. *Cosmetic and toiletry formulations, Vol. 5*. William Andrew Publishing/Noyes. 1996. 2nd Edition. ISBN 978-0-8155-1395-7
- [43] MARK, J.E. *Polymer data handbook*. Oxford University Press. 2009. 2nd Edition. ISBN 978-0-19-518101-2
- [44] ENDRES, H.-J.; SIEBERT-RATHS, A. *Engineering biopolymers – Markets, manufacturing, properties and applications*. Hanser Publisher. 2011. ISBN 978-1-56990-461-9
- [45] PHILLIPS, G.O.; WILLIAMS, P.A. *Handbook of hydrocolloids*. Woodhead Publishing. 2009. 2nd Edition. ISBN 978-1-84569-414-2
- [46] GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; PÉREZ-MATEOS, M.; GÓMEZ-ESTACA, J.; LÓPEZ-CABALLERO, E.; GIMÉNEZ, B.; MONTERO, P. Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. *Trends in Food Science & Technology*, 2009, 20, s. 3-6
- [47] BUSCHOW, J.K.H.; CAHN, R.W.; FLEMINGS, M.C.; ILSCHNER, B.; KRAMER, E.J.; MAHAJAN, S. *Encyclopedia of materials – Science and technology, Vol. 1-11*. Elsevier. 2001. ISBN 978-0-08-043152-9
- [48] RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. *Biomaterials science – An introduction to materials in medicine*. Elsevier. 2004. 2nd Edition. ISBN 978-0-12-582463-7
- [49] GOMÉZ-GUILLÉN, M.C.; GIMENÉZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; MONTERO, M. P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25, s. 1813-1827
- [50] LIN, Y.K.; LIU, D.CH. Comparison of physical-chemical properties of type I collagen from different species. *Food Chemistry*, 2006, 99, s. 244-251
- [51] PETRÁŠ, D.; KIMMER, D.; SOUKUP, K.; KLUSOŇ, P. Bezpečná vlákna. *Chemické listy*, 2009, 103, s. 1009-1016

- [52] KARIM, A.A.; BHAT, R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, 2009, 23, s. 563-576
- [53] MOKREJŠ, P.; LANGMAIER, F. *Aplikace přírodních polymerů*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. 2008. 1. vydání. ISBN 978-80-7318-674-6
- [54] KARIM, A.A.; BHAT, R. Gelatin alternatives for the food industry: recent, developments, challenges and prospects. *Trends in Food Science & Technology*, 2008, 19, a. 644-656
- [55] UCHEGBU, F.I.; SCHÄTZELIN, G.A. *Polymers in Drug Delivery*. Boca Raton, FL: CRC/Taylor & Francis. 2006. 1. vydání. ISBN 0-8493-2533-1
- [56] PODCZEK, F.; NEWTON, M.J. Powder filling into hard gelatine capsules on a tamp filling machine. *International Journal of Pharmaceutics*, 1999, 185, s. 237-254
- [57] MEI, X.; ETZLER, F.M.; WANG, Z. Use texture analysis to study hydrophilic solvent effects on the mechanical properties of hard gelatin capsules. *International Journal of Pharmaceutics*, 2006, 324, s. 128-135
- [58] MARCHAIS, H.; CAYZEELE, G.; LEGENDRE, J.-Y.; SKIBA, M.; ARNAUD, P. Cross-linking of hard gelatin carbamazepine capsules: effect of dissolution conditions on in vitro drug release. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003, 19, s. 129-132
- [59] MARTINS, G.Z.; SOUZA, R.F.; SHANKAR, T.J.; OLIVEIRA, W.P. Effect of process variables on fluid dynamics and adhesion efficiency during spouted bed coating of hard gelatine capsules. *Chemical Engineering and Processing*, 2008, 47, s. 2238-2246
- [60] ANDREICCETTI, C.; CARVALHO, R.A.; GROSSO, C.R.F. Gelatin-based films containing hydrophobic plasticizers and saponin from *Yucca schidigera* as the surfactant. *Food Research International*, 2010, 43, s. 1710-1718
- [61] ABRUSCI, C.; MARQUINA, D.; DEL AMO, A.; CORRALES, T.; CATALINA, F. A viscometric study of the biodegradation of photographic gelatin by fungi isolated from cinematographic films. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2006, 58, s. 142-149
- [62] ABRUSCI, C.; MARQUINA, D.; SANTOS, A.; DEL AMO, A.; CORRALES, T.; CATALINA, F. A chemiluminescence study on degradation of gelatine Biodeg-

- radation by bacteria and fungi isolated from cinematographic films. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2007, 185, s. 188-197
- [63] ABRUSCI, C.; MARTÍN-GONZÁLEZ, A.; DEL AMO, A.; CORRALES, T.; CATALINA, F. Biodegradation of type-B gelatine by bacteria isolated from cinematographic films. A viscometric study. *Polymer Degradation and Stability*, 2004, 86, s. 283-291
- [64] ABRUSCI, C.; MARQUINA, D.; DEL AMO, A.; CATALINA, F. Biodegradation of cinematographic gelatin emulsion by bacteria and filamentous fungi using indirect impedance technique. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2007, 60, s. 137-143
- [65] VEGETARIÁNI. *Vegetariánství*. [online] [cit. 2012-04-23] Dostupné z: <<http://vegetariani.asp2.cz/zdravi.aspx>>
- [66] FENYK, J.; MOKREJŠ, P. *Možnost zužitkování šlach jatečního dobytka*. CHISA, 56. Konference chemického a procesního inženýrství. 19.-22. 10. 2009, Srní
- [67] ČSN EN 14346 *Charakterizace odpadů – Výpočet sušiny stanovením podílu sušiny nebo obsahu vody*. 2007. s. 20. Třídící znak 8380 16.
- [68] DAVÍDEK, J. a kol. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. Praha. SNTL. 1981. 2.vyd. s. 718. ISBN 04-814-81
- [69] ČSN EN ISO 5983-2 *Krmiva – Stanovení obsahu dusíku a výpočet hrubého proteinu – Část 2: Mineralizace v bloku a metoda destilace vodní parou*. 2012. s. 16. Třídící znak 467035
- [70] VÁZQUEZ-ORTIZ, F.A.; GONZÁLEZ-MENDÉZ, N.F. Determination of collagen as a quality index in Bologna from Northwestern Mexico. *Journal of Food Composition and Analysis* [online], 1996, 9, s. 269-276 [cit. 2012-04-30]
- [71] BERGMAN, B.; KLEFSJÖ, B. *Quality from customer needs to customer satisfaction*. 2nd Edition. Studentlitteratur. Lund (Sweden). 2004. ISBN 91-44-04166-7
- [72] ALEXY, P.; VISELKA, M. *Základy plánovania a vyhodnocovania experimentov a Programový modul STATIS pre MS Excel 5.xx až 7.0*. Slovenská Technická Univerzita Bratislava. 1998.
- [73] KUČERA, T. *Pojiva. Mezibuněčná hmota-její tvorba a složení*. Univerzita Karlova v Praze. 2011. Přednášky k předmětu obecná histologie a obecná embryologie [online]

- [74] STŘÍŽ, P.; RYTÍŘ, V.; HOMOLKA, L.; KLÍMEK, P. *Metody statistické analýzy teoreticky a prakticky*. Nakladatelství Martin Stříž. Bučovice. 2009. ISBN 978-80-87106-27-3

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CHSK	chemická spotřeba kyslíku
TMK	těkavé mastné kyseliny
N _{CELK.}	celkový dusík
P _{CELK.}	celkový fosfor
BSE	bovinní spongiformní encefalopatie (známá jako nemoc šílených krav)
TSE	přenosná spongiformní encefalopatie
ES	Evropské společenství
C/N	poměr uhlíku a dusíku
(v/v)	objem vztažený na objem jiné látky
(w/v)	hmotnost vztažená na objem jiné látky
HDPE	vysokohustotní polyetylen
PE	polyetylen
PA	polyamid

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Hovězí šlachy.....</i>	<i>36</i>
<i>Obr. 2. Hovězí šlachy před 3. stupněm extrakce (nalevo) a po 3. stupněm extrakce (napravo).....</i>	<i>49</i>
<i>Obr. 3. Blokové schéma přípravy želatin/hydrolysátů ze šlach 3 stupňovým procesem</i>	<i>50</i>
<i>Obr. 4. Grafické vyjádření účinnosti extrakce želatin/hydrolysátů v závislosti na dávce enzymu (%) ve 2. stupni zpracování a teplotě extrakce (°C) ve 3. stupni zpracování</i>	<i>57</i>
<i>Obr. 5. Grafické vyjádření obsahu popele (%) v získaných želatinách/hydrolysátech v závislosti na dávce enzymu (%) ve 2. stupni zpracování a teplotě extrakce (°C) ve 3. stupni zpracování</i>	<i>61</i>
<i>Obr. 6. Grafické vyjádření obsahu kolagenu (%) v získaných želatinách/hydrolysátech v závislosti na dávce enzymu (%) ve 2. stupni zpracování a teplotě extrakce (°C) ve 3. stupni zpracování v získaných hydrolysátech.....</i>	<i>66</i>
<i>Obr. 7. Grafické vyjádření množství aminokupin (mg/g) v získaných želatinách/hydrolysátech v závislosti na dávce enzymu (%) ve 2. stupni zpracování a teplotě extrakce (°C) ve 3. stupni zpracování.....</i>	<i>70</i>
<i>Obr. 8. Vzorky (získané z předních šlach) exponované 16 h při 10 °C s pravděpodobně usazeným elastinem.....</i>	<i>71</i>

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Vedlejší produkty vzniklé při porážce jednoho prasete [5]</i>	12
<i>Tab. 2. Množství vzniklého jatečného odpadu v ČR za rok 2011 [12].....</i>	14
<i>Tab. 3. Srovnání přípustných hodnot znečištění v odpadních vodách vypouštěných do povrchových vod při výrobě masných produktů a zpracování masa s hodnotami v neošetřené odpadní vodě z jatek [2, 18]</i>	15
<i>Tab. 4. Výsledky analýz hovězích šlach</i>	35
<i>Tab. 5. Podmínky při stanovování pevnosti gelu</i>	46
<i>Tab. 6. Hodnoty sledovaných faktorů při jednotlivých experimentech.....</i>	48
<i>Tab. 7. Účinnost extrakce hovězích šlach.....</i>	53
<i>Tab. 8. Výsledky analýzy statistické významnosti sledovaných parametrů na účinnost extrakce</i>	55
<i>Tab. 9. Obsah popelovin (%) v získaných želatinách/hydrolysátech.....</i>	58
<i>Tab. 10. Výsledky analýzy statistické významnosti sledovaných parametrů na obsah popelovin</i>	59
<i>Tab. 11. Obsah bílkovin (%) v produktech získaných extrakcí z různých typů šlach</i>	62
<i>Tab. 12. Výsledky analýzy statistické významnosti sledovaných parametrů na obsah popelovin</i>	63
<i>Tab. 13. Obsah kolagenu (%) v získaných želatinách/hydrolysátech.....</i>	64
<i>Tab. 14. Výsledky analýzy statistické významnosti sledovaných parametrů na obsah kolagenu</i>	67
<i>Tab. 15. Obsah aminoskupin ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) v jednotlivých získaných hydrolysátech</i>	68
<i>Tab. 16. Výsledky analýzy statistické významnosti sledovaných parametrů na obsah aminoskupin.....</i>	69
<i>Tab. 17. Obsah vlhkosti (%) v získaných želatinách/hydrolysátech</i>	72

SEZNAM PŘÍLOH

- P I** Výsledky analýz želatin/hydrolysátů z vazovic
- P II** Výsledky analýz želatin/hydrolysátů ze zadních šlach
- P III** Výsledky analýz želatin/hydrolysátů z Achillových šlach
- P IV** Výsledky analýz želatin/hydrolysátů z předních šlach

PŘÍLOHA P I: VÝSLEDKY ANALÝZ ŽELATIN/HYDROLYSÁTŮ Z VAZOVIC

Experiment č.	Účinnost extrakce (%)	Obsah popelovin ¹ (%)	Obsah bílkovin ¹ (%)	Bilanční chyba ² (%)	Obsah kolagenu ¹ (%)	Obsah elastinu ^{1,3} (%)	Obsah aminoskupin (mg·g ⁻¹)	Obsah vlhkosti (%)
1	20,30	7,91	84,79	7,30	34,87	49,92	8,2	6,97
2	21,03	7,23	87,02	5,75	38,87	48,15	8,6	7,23
3	29,69	7,65	85,65	6,70	37,41	48,24	7,3	6,89
4	31,96	8,78	83,51	7,71	35,35	48,16	5,7	6,74
5	32,46	8,96	86,27	4,77	28,2	58,07	6,7	7,18
Exp. č. 1...1 % enzymu/ 58 °C			Exp. č. 2...1 % enzymu/ 74 °C		Exp. č. 3...2 % enzymu/ 66 °C			
Exp. č. 4...3 % enzymu/ 58 °C			Exp. č. 5...3 % enzymu/ 74 °C					
¹ vztaženo na sušinu vzorku								
² zjištěno ze součtu obsahu sušiny organického podílu (bílkoviny) a anorganického podílu (popeloviny)								
³ vypočteno jako rozdíl obsahu bílkovin a kolagenu								

PŘÍLOHA P II: VÝSLEDKY ANALÝZ ŽELATIN/HYDROLYSÁTŮ ZE ZADNÍCH ŠLACH

Experiment č.	Účinnost extrakce (%)	Obsah popelovin ¹ (%)	Obsah bílkovin ¹ (%)	Bilanční chyba ² (%)	Obsah kolagenu ¹ (%)	Obsah elastinu ^{1,3} (%)	Obsah aminoskupin (mg·g ⁻¹)	Obsah vlhkosti (%)
1	44,96	2,54	97,3	0,16	79,18	18,12	10,1	6,99
2	81,82	1,31	97,67	1,02	86,46	11,21	8,1	7,12
3	94,59	2,20	96,04	1,76	82,94	13,10	9,1	7,34
4	65,14	3,69	98,38	2,07	74,94	23,44	9,8	7,10
5	95,64	3,95	100,3	4,25	81,04	19,26	8,2	7,57
Exp. č. 1...1 % enzymu/ 58 °C			Exp. č. 2...1 % enzymu/ 74 °C			Exp. č. 3...2 % enzymu/ 66 °C		
Exp. č. 4...3 % enzymu/ 58 °C			Exp. č. 5...3 % enzymu/ 74 °C					
¹ vztaženo na sušinu vzorku								
² zjištěno ze součtu obsahu sušiny organického podílu (bílkoviny) a anorganického podílu (popeloviny)								
³ vypočteno jako rozdíl obsahu bílkovin a kolagenu								

PŘÍLOHA P III: VÝSLEDKY ANALÝZ ŽELATIN/HYDROLYSÁTŮ Z ACHILLOVÝCH ŠLACH

Experiment č.	Účinnost extrakce (%)	Obsah popelovin ¹ (%)	Obsah bílkovin ¹ (%)	Bilanční chyba ² (%)	Obsah kolagenu ¹ (%)	Obsah elastinu ^{1,3} (%)	Obsah aminoskupin (mg·g ⁻¹)	Obsah vlhkosti (%)
1	59,74	2,02	92,53	5,45	35,39	57,14	11,7	7,52
2	68,91	1,27	94,98	3,75	37,7	57,28	11,7	7,33
3	96,68	1,89	93,63	4,48	40,04	53,59	10,3	8,11
4	72,79	2,58	94,91	2,51	23,5	71,41	10,9	6,96
5	95,02	2,52	96,45	1,03	35,36	61,09	10,7	7,03
Exp. č. 1...1 % enzymu/ 58 °C			Exp. č. 2...1 % enzymu/ 74 °C			Exp. č. 3...2 % enzymu/ 66 °C		
Exp. č. 4...3 % enzymu/ 58 °C			Exp. č. 5...3 % enzymu/ 74 °C					
¹ vztaženo na sušinu vzorku								
² zjištěno ze součtu obsahu sušiny organického podílu (bílkoviny) a anorganického podílu (popeloviny)								
³ vypočteno jako rozdíl obsahu bílkovin a kolagenu								

PŘÍLOHA P IV: VÝSLEDKY ANALÝZ ŽELATIN/HYDROLYSÁTŮ Z PŘEDNÍCH ŠLACH

Experiment č.	Účinnost extrakce (%)	Obsah popelovin ¹ (%)	Obsah bílkovin ¹ (%)	Bilanční chyba ² (%)	Obsah kolagenu ¹ (%)	Obsah elastinu ^{1,3} (%)	Obsah aminoskupin (mg·g ⁻¹)	Obsah vlhkosti (%)
1	51,18	2,02	94,87	3,11	30,76	64,11	9,9	6,67
2	56,52	5,78	90,4	3,82	41,33	49,07	8,2	6,75
3	91,38	2,49	96,95	0,56	43,06	53,89	7,7	8,2
4	40,78	2,08	96,71	1,21	51,42	45,29	6,3	6,98
5	89,09	3,40	95,06	1,54	44,95	50,11	7,0	7,15
Exp. č. 1...1 % enzymu/ 58 °C			Exp. č. 2...1 % enzymu/ 74 °C		Exp. č. 3...2 % enzymu/ 66 °C			
Exp. č. 4...3 % enzymu/ 58 °C			Exp. č. 5...3 % enzymu/ 74 °C					
¹ vztaženo na sušinu vzorku								
² zjištěno ze součtu obsahu sušiny organického podílu (bílkoviny) a anorganického podílu (popeloviny)								
³ vypočteno jako rozdíl obsahu bílkovin a kolagenu								