

# **Zpracování odpadních bílkovin z kuřecího odkost'ovače na kolagenní produkty**

Bc. Daniel Krybus

---

Diplomová práce  
2019



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2018/2019

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Daniel Krybus**  
Osobní číslo: **T17296**  
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Inženýrství polymerů**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Zpracování odpadních bílkovin z kuřecího odkostovače na kolagenní produkty**

Zásady pro vypracování:

Student bude zpracovávat zbylý vedlejší produkt z výroby strojně odděleného masa, který je bohatý na kolagen. Cílem bude posoudit možnosti extrakce vysoce kvalitních hydrolysátů, respektive želatin. Výchozí surovina bude přečištěna od doprovodných nekolagenních složek a následně zpracována podmínkami obdobnými při průmyslové výrobě želatin. Budou studovány podmínky extrakce želatiny s vybranými procesními parametry. K plánování a vyhodnocování experimentů se využije metoda více-faktorových experimentů. Připravené produkty budou charakterisovány (pevnost gelu, obsah popelovin); dále bude sledován stupeň konverze.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

**Reinhard Schrieber, Herbert Gareis: Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2007.**

Vedoucí diplomové práce:

**doc. Ing. Pavel Mokrejš, Ph.D.**  
Ústav inženýrství polymerů

Datum zadání diplomové práce:

**2. ledna 2019**

Termín odevzdání diplomové práce:

**14. května 2019**

Ve Zlíně dne 18. února 2019

L.S.

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

doc. Ing. Tomáš Sedláček, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: Daniel Krybus.....Obor: IP.....**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 <sup>1)</sup>;
- 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 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> 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 <sup>3)</sup> 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 Zlíně 28.4.2019.....Daniel Krybus.....

<sup>1)</sup> 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 nevdělečně 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.

<sup>2)</sup> 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).

<sup>3)</sup> 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 přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## ABSTRAKT

Diplomová práce pojednává o zpracování kostí ze separace, které jsou bohaté na kolagen. Teoretická část pojednává o využití a výskytu jatečného odpadu. Dále je zde popisováno dělení pevného a kapalného jatečného odpadu. V teoretické části je zmíněn rovněž kolagen, jeho vlastnosti, typy a využití. Stručně je zde také popsána výroba želatiny, její vlastnosti a využití. Praktická část popisuje experimenty, v nichž byly použity drůbeží kosti ze separace na extrakci želatin po předchozím opracování proteolytickým enzymem. Hlavním cílem práce byla studie jednotlivých faktorů na celkovou účinnost extrakce a pevnost želatinového gelu. Sledované faktory byly: doba působení enzymu, teplota extrakce a doba extrakce. Byly nalezeny optimální podmínky pro získání kvalitních želatin o vysoké pevnosti gelu z drůbežích kostí ze separace. Vyhodnocování experimentu se provádělo faktorovými schématy.

Klíčová slova: želatina, odpad, kolagen, extrakce, gel, kostní separát, vedlejší produkty, strojně oddělené maso, opracování

## ABSTRACT

This master thesis deals with the processing of bones from separation, which are rich in collagen. The theoretical part deals with the usage and occurrence of slaughter waste. Furthermore, the separation of solid and liquid slaughter waste is described. Collagen, its properties, types and applications are also mentioned in the theoretical part. Also briefly described is the production of gelatin, properties and uses. Experimental part describes experiments in which poultry bones from separation for gelatin extraction were used after previous proteolytic enzyme treatment. The main aim of the thesis was studying the individual factors on the overall extraction efficiency and strength of the gelatin gel. The factors studied were: time of action of the enzyme, extraction temperature and extraction time. Optimal conditions for obtaining high-quality gel of high strength poultry gel from separation were found. Experiment evaluation was performed by factor schemes.

Keywords: gelatin, waste, collagen, extraction, gel, bone separation, by-products, mechanically separated meat, machining

Moc rád bych poděkoval doc. Ing. Pavlovi Mokrejšovi Ph.D. za výpomoc, ochotu, cenné rady a především za trpělivost, kterou mi věnoval při napsání diplomové práce. Dále bych rád poděkoval paní Miroslavě Žaludkové za odbornou pomoc v laboratoři a kolegům za ohleduplnost. Také bych chtěl poděkovat vlastní rodině za poskytnutí zázemí a trpělivosti.

Práce vznikla za finanční podpory interní grantové agentury Fakulty technologické UTB ve Zlíně IGA/FT/2019/003.

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

**OBSAH**

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 PRÁVNÍ PŘEDPISY PRO MANIPULACI S ŽIVOČIŠNÝM ODPADEM</b> .....	<b>12</b>
<b>2 VYUŽITÍ JATEČNÉHO ODPADU</b> .....	<b>14</b>
2.1 VÝSKYT .....	14
2.2 DĚLENÍ.....	16
2.3 VYUŽITÍ .....	16
2.4 PEVNÉ DRŮBEŽÍ ODPADY .....	17
2.4.1 Kůže .....	17
2.4.2 Kostí a šlachy .....	17
2.4.3 Vnitřnosti.....	18
2.4.4 Drůbeží běháky .....	18
2.4.5 Tuk .....	18
2.4.6 Peří .....	19
2.4.7 Kuřecí hlavy .....	19
2.5 KAPALNÉ DRŮBEŽÍ ODPADY .....	20
2.5.1 Krev .....	20
2.5.2 Olej.....	21
<b>3 KOLAGEN A ŽELATINA</b> .....	<b>22</b>
3.1 KOLAGEN .....	22
3.1.1 Složení kolagenu .....	22
3.1.2 Typy kolagenu.....	23
3.2 ŽELATINA.....	24
3.2.1 Získávání želatiny .....	25
3.2.2 Želatina typu A.....	26
3.2.3 Želatina typu B.....	26
3.2.4 Vlastnosti želatiny .....	27
3.2.5 Využití želatiny .....	28
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>32</b>
<b>4 CÍLE PRÁCE A METODIKA</b> .....	<b>33</b>
4.1 CÍLE PRÁCE .....	33
4.2 METODIKA .....	33
<b>5 PŘÍSTROJE, MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE</b> .....	<b>34</b>
<b>6 METODY</b> .....	<b>36</b>
<b>7 POSTUP PRÁCE</b> .....	<b>41</b>
7.1 PŘÍPRAVA ČISTÉHO KOLAGENU .....	41
7.2 EXTRAKCE ŽELATINY Z ČISTÉHO KOLAGENU.....	47
<b>8 VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>53</b>
8.1 PRIMÁRNÍ FÁZE EXPERIMENTU .....	53
8.1.1 Účinnost extrakce želatiny první frakce.....	57
8.1.2 Celková účinnost extrakce .....	59
8.1.3 Pevnost gelu želatiny první frakce .....	62



8.1.4	Obsah popelovin želatiny první frakce .....	64
8.2	OPTIMALIZAČNÍ FÁZE EXPERIMENTU .....	67
8.2.1	Účinnost extrakce želatiny první frakce .....	71
8.2.2	Celková účinnost extrakce .....	72
8.2.3	Pevnost gelu želatiny první frakce .....	74
8.2.4	Obsah popelovin želatiny první frakce .....	76
8.2.5	Teplota tání želatinového gelu .....	77
8.3	NAVRŽENÍ OPTIMÁLNÍCH PODMÍNEK PRO ZPRACOVÁNÍ .....	79
8.4	ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ A NÁVRH DALŠÍHO STUDIA .....	81
<b>ZÁVĚR .....</b>		<b>84</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>		<b>86</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>		<b>90</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>		<b>91</b>
<b>SEZNAM TABULEK .....</b>		<b>93</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH .....</b>		<b>94</b>

## ÚVOD

V dnešní době je celosvětově velký problém využití a likvidace odpadu. Na první pohled to nemusí být patrné, ale i odpadní surovina může posloužit, jako zdroj nového produktu pro opětovné využití. Na celém světě jsou kladeny větší a větší nároky na snižování odpadu, jak ze strany státu, různých organizací či podniků. Tyto odpady se musejí likvidovat, což je ekonomicky i ekologicky nevýhodné. V masném průmyslu je snaha tento odpad redukovat a to tak, že se odpadní surovina zpracuje a vznikne tak produkt, který se využije a ekonomicky sníží náklady. Vedlejší jateční produkty jsou například droby, kůže, krev, kosti a další. Tyto produkty jsou velice bohaté na kolagen. Želatina se připravuje z kolagenu kyselým způsobem (typ A) nebo alkalickým způsobem (typ B). Vedlejší produkty se zpracovávají na krmiva, krmné směsi, hnojiva. Je možné je také zpracovat pro farmaceutický, potravinářský či technický průmysl ve formě želatin, nebo pro restaurování nábytku v podobě klišu.

Teoretická část práce pojednává o využití a dělení jatečního odpadu. Dále je zde zmíněná výroba, vlastnosti, typy, využití želatiny. V této části práce je uveden i kolagen a jeho jednotlivé typy a vlastnosti. Na závěr této části jsou zmíněny právní předpisy pro manipulaci se živočišným odpadem.

Praktická část práce se zabývá možnostmi extrakce kvalitních želatin z kostí ze separace. Surovina byla přečištěna od doprovodných nekolagenních složek a tuku. Následně byla zpracována podmínkami obdobnými při průmyslové výrobě želatin. Byly sledovány podmínky extrakce želatiny s vybranými procesními podmínkami. Na závěr se udělala optimalizace a navrhly se optimální podmínky pro zpracování.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 PRÁVNÍ PŘEDPISY PRO MANIPULACI S ŽIVOČIŠNÝM ODPADEM

Jsou dány základní předpisy a nařízení Evropského parlamentu a Rady ES pro manipulaci a zacházení s živočišnými odpady. Hygienická pravidla pro vedlejší produkty živočišného původu a další vytěžené produkty v zákonu č. 1069/2009 a ty jsou určeny k lidské spotřebě. Také se musí účastníci řídit nařízením Komise EU ze dne 25.2.2011 č. 142/2011. Dále vyhláškou hygienických a veterinárních požadavků č. 94/2010. [1, 2]

Materiál z vedlejších živočišných produktů, je rozdělen to tří kategorií a to do materiálu kategorie 1, 2 a 3.

### **Materiál kategorie 1**

Do této kategorie spadají zejména části těl a celá těla, u kterých je podezření na infekci či jinou nákazu, nebo podávání zakázaných látek. Dále jsou zde zahrnuty živočišné odpady, které vznikly během úpravy odpadních vod během zpracovávání různých směsí materiálů kategorie 1 s materiálem kategorie 2 či kategorie 3, nebo zpracovávání samotného materiálu kategorie 1. [1, 2]

### **Materiál kategorie 2**

Do kategorie 2 spadají vedlejší živočišné odpady, jakými jsou například hnůj, trus (guáno), obsah žaludku a trávicího systému. Dále vedlejší živočišné odpady vzniklé během úpravy odpadních vod během zpracovávání různých směsí materiálů kategorie 1. Dále odpady z jatek, které obsahují kontaminované části nebo látky, které jsou nad povolené množství pro lidskou konzumaci a zvířata. Dále se zde řadí směsi materiálu kategorie 2 s materiálem 3 a jiné vedlejší živočišné odpady, které nespádají do kategorie 1 a 3. [1, 2]

### **Materiál kategorie 3**

Do kategorie číslo 3 jsou zahrnuty vedlejší živočišné produkty, které jsou zejména vhodné pro lidskou spotřebu, ale díky obchodnímu zapříčinění nejsou určeny k lidské spotřebě. Části těl nebo celá těla pochází ze zvířat poražených na jatkách a po veterinární prohlídce před poražením byla určena jako způsobilá k poražení k lidské spotřebě. Dále jatečná těla, která byla upravená a jsou nevhodná k lidské spotřebě, i když nemají žádné patogenní či jiné onemocnění, která by byla přenosná na člověka nebo zvířata. Spadají zde různé odřezky, jako jsou kůže,

---

části pokožky, drůbeží hlavy, končetiny, rohy, parohy, peří, štětiny prasečí, kaly ze separátorů, odtučněné kosti a separáty, odpady, které nejsou vhodné k lidské spotřebě, placenta, krev, vlna, rohovina, krmiva, která nejsou vhodná ke krmení zvířat, peří, srst, ulity korýšů a měkčů, tuková tkáň ze zvířat, která neměla nákazu, odpady z jídelen a stravovacích zařízení, vaječné skořápky a vedlejší produkt z vajec. [1, 2]

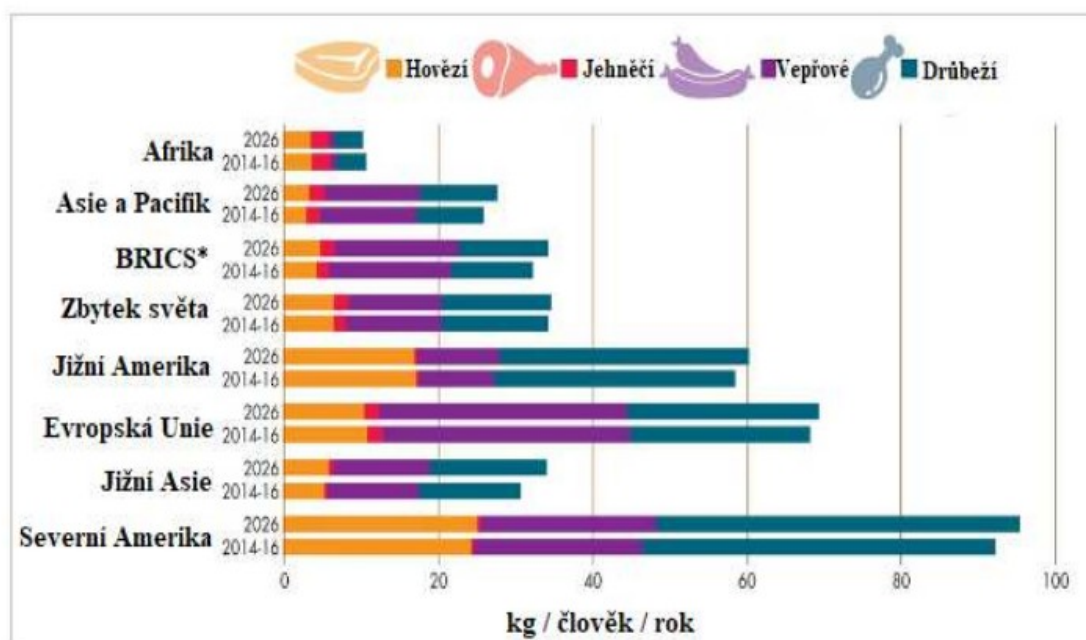
## 2 VYUŽITÍ JATEČNÉHO ODPADU

### 2.1 Výskyt

Při jatečném opracování zvířecích těl vzniká také velká část odpadů, které by se dále mohly zpracovat. Nalezly by využití jak pro zvířata, tak pro lidi, nejen jen v podobě masného výrobku. Odpad tvořený při jatečném opracování, tvoří přibližně 35 % hmotnosti zvířete. [3]

Části, které nejsou vhodné přímo ke konzumaci člověkem, se nazývají jako vedlejší produkty. Takovéto materiály mají vysokou nutriční hodnotu a proto je vhodné tyto materiály také zpracovávat. Musí se však dbát na vhodné opracování a dekontaminaci materiálu, aby nepředstavovalo riziko pro organismus člověka. Nakládání s vedlejšími produkty živočišné výroby, jsou řízeny podle předepsaných předpisů evropské legislativy podle 1069/2009 a 142/2011 EU. [4,5]

V dnešní době spotřeba masa se mění s pestrostí nabízených potravin a nároky spotřebitelů. Průměrná spotřeba masa na jednoho člověka byla v období 2014 – 2016 podle agentury PoultryTRENDS 34 kg. Na obrázku č. 1 lze vidět spotřebu masa na jednu osobu za rok v jednotlivých oblastech světa. Vůbec největší spotřeba je drůbežího masa. BRICS\* je označení společného hospodářství mezi zeměmi: Ruska, Brazílie, Číny, Indie a Jižní Afriky. [4, 6, 7]



Obrázek 1: Průměrná spotřeba masa v období 2014 – 2016 v jednotlivých částech světa a jeho porovnání s predikcí v roce 2026 [6]

Celosvětový trh s masným průmyslem hledá vhodné využití vedlejších produktů za účelem jeho zpeněžení. Hledá se cesta, jak zefektivnit tento cenný odpad, aby nebyl ztracen potenciální zdroj příjmu. Zároveň se také ušetří cena za likvidaci tohoto odpadu. Tato cena se pak odrazí od celkové ceny výsledného produktu. Zároveň si firma vybuduje novou klientelu a rozšíří oblast technologické části. [8]

Jako příklad můžou sloužit data z firmy Jatka Jarošov. Při porážení dobytka vepřového dochází k 20 % masného odpadu z celkové hmotnosti zvířete. Takovýto vzniklý odpad se pečlivě eviduje a musí se předat do kafilerie. V kafilerii je tento odpad spalován. Účtovaná cena za tuto službu je 8,50 Kč za 1 kg. U hovězího dobytka je tato cena ještě vyšší a významná natolik, že se promítne do celkové ceny masa. Zároveň u hovězího dobytka je podíl odpadu daleko větší a to až 50 % z celkové hmotnosti. Cena účtovaná kafilerii za likvidaci hovězího odpadu je proto 10 Kč za 1 kg. Pro představu je níže uvedena tabulka č. 1 vzniklého jatečního odpadu v ČR za rok 2011. [9, 10, 11]

Tabulka 1: Vzniklé množství jatečního odpadu v masném průmyslu v ČR v roce 2011 [10]

Druh zvířete	Počet poražených kusů	Průměrná živá hmotnost (kg)	Průměrná jatečná hmotnost (kg)	Celkové množství odpadu (t)	Celkové množství odpadu (%)*
Prasata	2 982 361	114,3	59,4	77 853	22,8
Ovce	10 169	36,2	15,6	209	56,8
Dospělý skot	238 278	516,4	88,2	62 439	46,7
Drůbež	–	–	–	58 688	25,7

\* vztaženo na hmotnost živého zvířete před poražením

Zpracování a upotřebení vedlejších živočišných jatečných produktů není zcela jednoduché. Odpad má nízkou biologickou stabilitu. Obsahuje velké množství patogenních látek, značnou část tvoří voda a také podléhá autooxidaci. Disponuje také vysokou enzymatickou aktivitou. Při opracování vznikají žádoucí produkty, nežádoucí produkty a odpadní produkty, které jsou specifické. Odpadní produkty, které jsou specifické, vznikají při extrakci surových materiálů. Případné využití těchto odpadů je díky vysokému obsahu dusíku a dalších látek v podobě

hnojiv nebo krmných směsí. Úsilí s nakládáním s takovými odpady v dnešní době v zemědělství udržuje rovnováhu mezi ekologickým a ekonomickým aspektem. Musí zároveň splňovat legislativní normy pro nakládání s takovými odpady. [12]

Získané množství těchto odpadních produktů je závislé také na technologii procesu. Zároveň se musí dodržovat přísná hygienická opatření, poněvadž živočišná tkáň obsahuje velké zastoupení mikrobakterií. Velké nebezpečí může proto představovat přítomnost plísní či jiných patogenů, což může mít za následek nepříjemný zápach. Obsah vlhkosti se pohybuje v rozmezí 60 – 95 % a to je také velký problém, při kontaminaci odpadní vody látkami organického původu, například tuky. Takto kontaminovaná voda velice zapáchá díky obsahu mastných kyselin. [12]

## 2.2 Dělení

Ve Spojených státech, ale i v Evropských zemích jsou za vedlejší živočišné odpadní produkty brány všechny části kromě masa. Jsou rozřazeny do dvou kategorií a to na nejedlé a jedlé. Nejedlé produkty jsou buď dále zpracovány nebo jsou odeslány do kafilerií ke zneškodnění. Jedlé živočišné vedlejší produkty jsou čištěny a sterilizovány. Dále jsou prodávány v obchodech a velkoobchodech. Jsou pod kontrolou US Meat Inspection Service. Například ve Spojeném království Velké Británie a Severního Irska jsou vedlejší produkty masné produkce rozděleny na: bílé (tuk), červené (játra, plíce, hlava, ocas, jazyk), bachor (žaludek), končetiny (nohy) a střevo. Díky rozšířenému výskytu BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy), neboli onemocnění šílených krav se již nezpracovává mozek a mícha, aby se zamezilo šíření nákaze. [12, 13]

## 2.3 Využití

Velkou část jatečního odpadu lze bez problému využít napřímo v gastronomii nebo kulinářství. Využívají se hojně například srdce, žaludek, ledviny, játra při zpracování a přípravě omáček a polévek nebo jiných pokrmů. Využívají se kupříkladu střívka u masných výrobků k formování tvaru. Krev se využívá za předpokladu, pokud dosáhla hygienického standardu a splnění hygienických kritérií například k obarvení, dochucení či zvýšení nutričních hodnot u masných výrobků. [14]



Jako příklad může posloužit nutriční hodnoty u kuřecích žaludků. Vše je stanoveno na 100 g nezpracované suroviny. Obsah vody 79,33 g, proteinu 17,66 g, tuk, 2,06 g, popeloviny 0,95 g. Složení popelovin: Mg 15 mg, Ca 11 mg, K 237 mg, Fe 2,49 mg, Cu 0,12 mg, Na 69 mg. [15]

## 2.4 Pevné drůbeží odpady

### 2.4.1 Kůže

Je jedním z nejvíce hodnotných vedlejších produktů živočišné výroby. Kůže po stáhnutí ze zvířete, by měla být pečlivě očištěna a zastabilizována. Zabráni se tak enzymatickému a bakteriálnímu napadení kůže. Pro zachování dobré kvality, by se měla vlhkost pohybovat v rozmezí 40 – 48 %. Z větší části je pokryta peřím, které poskytuje ochrannou funkci. Obsahuje pouze kostrční žlázu a žádné jiné. Skládá se ze dvou částí: kůže vlastní a podkožní. Kůže vlastní obsahuje vnější pokožku a škaru. Ta je složena z kolagenního vaziva. Tloušťka závisí na pohlaví, věku, druhu a na části kde se objevuje.[12, 16, 17]

Tabulka 2: Chemické složení stažené kůže (čerstvé) [12]

Složka	Obsah [hm. %]
Bílkoviny	33 – 35
Tuk	0,5 – 30
Voda	50 – 70
Minerální oleje	0,5 – 0,8

### 2.4.2 Kostí a šlachy

Tvoří přibližně až 12 % z hmotnosti zvířete. Velký odpad je zejména z masného průmyslu. V kostech je zastoupen značný podíl elastinu, který se dá vhodně použít v kosmetickém průmyslu. Využití nalezl i při výrobě želatin a klihu, které mají široké uplatnění. Další výroba z kostního odpadu je v podobě masokostní moučky, kostního klihu a uhlí. Nejčastěji se však používají pro krmné směsi, kde je zdrojem proteinů s esenciálními aminokyselinami, vitamínem B12 a minerály. Nalezla také uplatnění jako hnojivo. [18]

V dnešní době, je cílem masném průmyslu, získat co největší množství masa z kostí. Byly proto vytvořeny nové postupy a techniky za účelem získat strojně oddělené maso. Takto oddělené maso se prodává ve směsi či samostatně. Pokud se takovéto maso přidá k běžnému masu, lze vypořádat změnu barvy, zhorší chuť a to díky tomu, že obsahuje větší množství vody. Proto je přídavek strojně odděleného masa k masu mletému například u párků stanoven na 10 – 40 % a u hamburgerů 5 – 20 %. [12]

### 2.4.3 Vnitřnosti

Orgány a žlázy zvířat nabízí velké množství struktury a chuti. Mají také poměrně vysokou nutriční hodnotu, díky které jsou ceněny za účelem konzumace a to především v Asii. Spadá sem například: srdce, plíce, slezina, žaludek, bachor, děloha, játra, ledviny, slinivka, aj. Uplatnění orgánů našlo také v Indické, Čínské a Japonské medicíně. [19]

### 2.4.4 Drůbeží běháky

Kuřecí běháky jsou bohaté na bílkoviny. Jejich obsah se pohybuje kolem 85 % bílkovin, převážně v podobě kolagenu a tuku. Produkce kuřecích běháků se zvýšila, díky narůstající spotřebě drůbeže. V drůbežích běhácích lze nalézt kolagen typu I i kolagen typu II. Obsahují přibližně 11 % prolinu, 30 % glycinu, 10 – 12 % kyseliny glutamové a alaninu. [20]

### 2.4.5 Tuk

Tuk je vedlejším produktem maso-zpracujícího průmyslu. Pomocí extrakce se získává především z kuřecích vnitřností a orgánů. Obsahuje velké množství esenciálních aminokyselin. Obsah se pohybuje kolem 20 %. Vepřové a hovězí sádlo má světlejší barvu a je více kvalitní, než drůbeží sádlo. Sádlo se využívá na smažení, ale již se nahrazuje kapalnými oleji, které nenasakují do smaženého pokrmu. Využití našlo také při přípravě pečiva, výrobě párků a margarínů. [21]

### 2.4.6 Peří

Je zastoupeno až 7 % tělesné hmotnosti drůbeže a obsahuje až 90 % proteinu, kde velkou část tvoří keratin. Je také velkým zdrojem aminokyselin argininu, cysteinu a také treoninu. Kvalita se odvíjí od různých faktorů, jakými jsou například: věk zvířete, pohlaví, druh, aj. [22]

Peří lze rozdělit podle výskytu do kategorií: [21]

- Hřbetní peří: Je úzké, dlouhé a nachází se na zadní části hřbetu.
- Pírka: Jsou menší a disponují menším ostnem.
- Tvrdé peří: Tlustá, tvrdá a dutá brka, které mají charakteristické zabarvení.
- Prachové peří: Jsou chomáče chmýří.
- Chmýří: Má pevný ostn a je součástí trupu.

Odstraňuje se napařením, kdy teplota je závislá na druhu drůbeže. Mladá kuřata se budou napařovat při menší teplotě a kratším čase, než starší drůbež a vodní ptáci. Ti se budou napařovat při větší teplotě a delším čase. Mladá kuřata se napařují zhruba při teplotě 53 – 58 °C po dobu 120 sekund, zatím co u starší drůbeže a vodních ptáků je teplota napařování 63 °C a doba napařování 21 minut. Takto opracované peří se dále máčí v roztoku NaCl (chloridu sodném), HCl (kyseliny chlorovodíkové) a vody. Zbaví se tak zápachu a očistí se. Následně se propere a vysuší pro další zpracování v různých oborech. [21, 23]

### 2.4.7 Kuřecí hlavy

Drůbeží hlavy jsou nepoživatelné části, při zpracování jatečného těla drůbeže. Jsou využívány především pro výrobu želatiny, krmných pastí a dokrmování kožesíňové zvěře. [24]

Dle studie Du L. z roku 2013 se popisuje získávání želatiny z krůtích a drůbežích hlav ve dvou fázích. První fáze je předpřípravná fáze a za ní následuje již druhá fáze, což je extrakce želatiny. Předpřípravná fáze zahrnuje smíchání kuřecích a krůtích hlav s vodou ve vhodném poměru, který je 1:4 o teplotě 4 °C. Po 15 minutách se přefiltrují a vznikne čistý filtrát. Tento filtrát se dále smíchá s roztokem 15mM hydrogenuhličitanu sodného (NaHCO<sub>3</sub>) v poměru 1:4 při teplotě 4 °C. Tento roztok byl poté míchán po dobu 1 hodiny. Roztok byl poté odstředěn a tento krok se opakoval třikrát, dokud neobsahoval tuk. Po odtučnění následovalo smíchání s 0,1M roztokem hydroxidu sodného (NaOH) v poměru 1:10. Roz-

tok byl třepán 6 hodin, za předpokladu, že se NaOH roztok měnil po 2 hodinách. Poté byl smíchán s 0,05M kyselinou octovou ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) v poměru 1:10. Třepán po dobu 18 hodin při teplotě 4 °C. Na konec předpřípravné fáze se produkt promyl destilovanou vodou. Následná extrakce želatiny probíhala ve dvou stupních při dvou různých teplotách. Vytvořený vzorek v předpřípravné fázi byl smíchán s destilovanou vodou v požadovaném poměru 1:10. Bylo také třeba upravit pH na hodnotu 7,0 pomocí 0,1M roztoku NaOH. Následoval první stupeň extrakce při 50 °C po dobu 18 hodin. Vznikla tak kapalná frakce želatiny, která byla v druhé části extrakce získávána při teplotě 60 °C po dobu 6 hodin. Pokračovalo se přefiltrováním a následným sušením želatiny, aby byla podrobena následným analýzám. Takovým způsobem byly připraveny 4 typy želatiny. Při takových podmínkách byla celková výtěžnost u krůtích hlav 62,76 % z 1 kilogramu výchozí suroviny a u kuřecích hlav 52,29 % na 1 kilogram výchozí suroviny. [22]

## 2.5 Kapalně drůbeží odpady

### 2.5.1 Krev

Krev zvířat obsahuje velké množství proteinů, železa a dalších látek. Je jedním z mnoha významných vedlejších produktů při zpracování. Využívá se celosvětově k výrobě různých pochutin, jakými jsou například: párky, prejt, suchary a mnoho dalšího. Uplatnění našla také jako krmná směs, hnojiva či různá pojiva. Krev tvoří přibližně 2,4 – 8 % z celkové hmotnosti zvířete. Obsahuje přibližně 17 % proteinů a zastoupení aminokyselin je vyvážené. Při používání ve výrobcích značně ovlivní finální barvu a chuť konečného produktu, což v některých aplikacích není žádoucí. Může také sloužit v zemědělství jako náhrada mléka díky zastoupení proteinů, aminokyselin a minerálů. [12, 25]

Krev lze oddělit na několik částí. Jedna z hlavních částí je plazma, která tvoří přibližně 60 %. Je složena ze 4 % fibrinogenu, dále z 3,5 % albuminu a globulinu. Pro medicínské aplikace lze také izolovat z krve serotonin, fybrinolysin, plasminogen a imunoglobulin. Například albuminy z hovězího dobytka se využívají pro zvěř při ztrátě tělních tekutin nebo krve. Hlavním využitím plasmy je při zjištění Rh faktoru u pacientů. Uplatnění našlo i jako stabilizátor při vakcinaci. [26]

Dělí se na dvě skupiny a to na krev pro krmné účely a krev pro potravinářské účely. Krev pro krmné účely se při zpracování drůbeže zadržuje ve vykrvovacích žlabech, kde odtéká do sběrných nádrží samospádem. Může se také ukládat do chladících nádrží. Musí být chemicky konzervována či zamrazena, aby se nezkažila. Konzervace se provádí pomocí dusičnanu sodného, následně se krev suší a získá se tak krevní moučka či krevní vločky. Na krmné účely se zpracuje až 90 % krve. Druhá skupina je krev pro potravinářské účely, která musí mít původ ze zdravých zvířat. Podléhá přísným hygienickým podmínkám a musí být pro použití schválena veterinární kontrolou. Při špatném skladování krve se krev rychle kazí a organismy se rychle rozmnožují. [18]

### 2.5.2 Olej

Získává se povařením vedlejších jatečných produktů po opracování. Olej je značným zdrojem energie z potravinového hlediska. Přidává se především do zvířecích krmiv či kuřecích pokrmů za účelem vylepšení a zdůraznění chutí. [21]

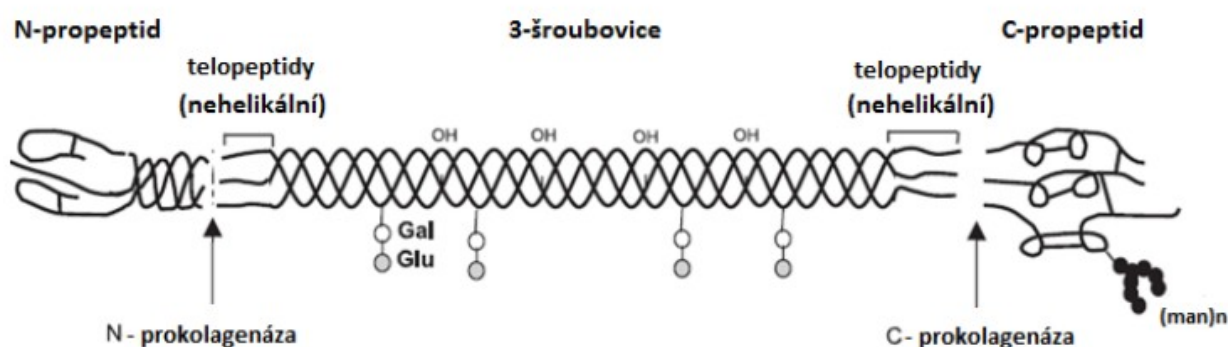
### 3 KOLAGEN A ŽELATINA

#### 3.1 Kolagen

Je hlavní složkou pojivových částí, jakými jsou například: svaly, chrupavky, kůže, šlachy, a jiné části. Je jednou z hlavních složek ECM (extracelulární matrice). Skládá se z nerozpustných mikrovláken, vláken, glykoproteinů a rozpustných proteinů. Ovlivňuje spojování buněk a jejich migrování ve tkáni. [27]

##### 3.1.1 Složení kolagenu

Je složen z 18 až 20 aminokyselin. Obsahuje značné složení prolinu, glycinu a hydroxyprolinu. Tvoří přibližně 30 % z celkového množství proteinu u bezobratlých živočichů i obratlovců. Je složen ze tří tropokolagenových levotočivých řetězců, které jsou vzájemně propleteny mezi sebou a spojeny vodíkovými můstky. Společně propletené tři polypeptidové řetězce tvoří superšroubovici, která je pravotočivá. Kombinace tří různých polypeptidových řetězců má za následek vznik různých druhů molekul tropokolagenu. Vláknata jsou ustálena itermolekulárním sesíťováním lysinem a hydroxyprolinem. Kolagen je utvořen ze tří šroubovic, které jsou složeny ze tří  $\alpha$  řetězců.  $\alpha$  řetězce obsahují levotočivou šroubovici, která je prodloužená. Hlavní roli zde hraje část glycinu. Ten se vyskytuje v polypeptidovém řetězci v opakující se formě  $(\text{Gly-X-Y})_n$ . Zbytky glycinu se vyskytují uprostřed šroubovice a zbylé aminokyseliny se vyskytují po stranách řetězce. Toto uspořádání má za následek, že stočení šroubovice kolem vlastní osy je těsné. Hlavním znakem všech kolagenů je tří-šroubovice, která se vyskytuje u vláknitých kolagenů. Domény, které jsou nekolagenní, hrají důležitou roli, protože jsou důležité stavební části pro tvorbu nových vazeb a funkčních míst. [28, 29]



Obrázek 2: Struktura kolagenního vlákna typu I. na molekulární úrovni [29]

### 3.1.2 Typy kolagenu

Do dnešní doby je známo 27 druhů kolagenu. Pro živé organismy kolagen představuje především podpůrnou funkci. Ve vyobrazené tabulce č. 3 jsou uvedeny vybrané stručné informace o kolagenu I – IV. [30, 31, 32, 33]

Tabulka 3: Porovnání typu kolagenu I, II, III, IV [30, 31, 32, 33]

Typ kolagenu	Struktura vlákn	Oblast kde se vyskytuje	Hlavní znaky	Způsob separace
I.	67 nm	Kůže, kosti, vazy, zuby	Druh rozpustnosti (NSC ISC ASC) Nejvíce rozšířený	Pepsinové štěpení (digesce)
II.	67 nm	Chrupavky	Obsahuje více hydroxylyzinu	Pepsinové štěpení (digesce)
III.	67 nm	V období embryonálního vývoje	S narůstajícím věkem je nahrazen kolagenem typu I.	Pepsinové štěpení (digesce)
IV.	Amorfní	Membrány bazálního epitelu	Nevytváří fibrily	Štěpení proteolytické pepsinem

#### Kolagen typu I

Je vůbec nejrozšířenějším typem kolagenu v organismu. V lidském těle je jeho zastoupení 90 % z celkového množství všech typů kolagenu. Struktura vlákn je triple helix a délka vlákn je přibližně 1 – 20  $\mu\text{m}$ . Vytváří polypeptidové řetězce, které mají velké zastoupení aminokyselin: prolinu, glycinu, hydroxylizin a hydroxyprolin. Chování v různých prostředích se liší, a proto ho lze podle druhu prostředí, kde se rozpouští rozdělit na: NSC (Natural salt soluble Collagen), ASC (Acid Soluble Collagen) a ISC (Insoluble collagen). NSC je rozpustný v neutrálních solích, ASC je rozpustný v kyselinách, ISC je z části nerozpustný a z části rozpustný při denaturaci. Oblast výskytu je v podobě šlach, kostí, zubů a pokožky. Využití je velice pestré. Uplatnění našel jako doplněk stravy při léčbě osteoporózy, v kosmetickém průmyslu, kde se využívá pro zmírnění stárnutí kůže a v chirurgii, k výrobě šicích nití. Další využití je v podobě stimulačních látek a může být použit jako nosič léčiva. Uplatnění ve far-

macii získal díky tomu, že je netoxický, vstřebatelný (biodegradabilní) a dost pružný. Lze ho využít i pro podklad na kultivaci tkáňových struktur a k zhotovení náhrad ze tkání. [30, 32]

### **Kolagen typu II**

Tento typ kolagenu obsahuje více postranních řetězců cukru a hydroxylyzinu. Skládá se ze třech  $\alpha 1$  polypeptidových řetězců. Celková délka vlákna je 67 nm. Plní podpůrnou funkci v extracelulární matrici. Využití našel jako pletivo (scaffold) ve tkáňovém inženýrství, protože má dobré vlastnosti pro růst chondrocytů a podporuje tedy obnovu chrupavkovité tkáně. K izolaci se využívá pepsinového štěpení. Tento typ kolagenu je nerozpustný, ale výjimkou je kolagen typu II embryonálního vývoje. Kolagen typu II nalezneme v chrupavkách, kde zaujímá přibližně 50 % objemové části. [31, 32]

### **Kolagen typu III**

Tento typ kolagenu má podpůrnou funkci v měkkých tkáních. Vytváří retikulární sítě, které se vyznačují pravidelným uspořádáním. Nachází se v nervových vláknech, svalových buňkách nebo také ve stěnách cév krevního řečiště. Obsahuje z větší části glykoproteiny, proteoglykany a disulfidické můstky, jinak je velice podobný kolagenu typu I. S nabývajícím věkem organismu tohoto typu kolagenu ubývá. [31, 32]

### **Kolagen typu IV**

Kolagen typu IV nevytváří vlákna ani fibrily. Je amorfní. Vytváří šroubovicovou (helikální) strukturu, ale má i části, které nejsou spirální. Takovéto uspořádání má za následek to, že struktura je z části narušena. Pro izolaci se využívá pepsin a proteolytického štěpení. Struktura je složena ze dvou řetězců  $\alpha 1$  a odlišného řetězce  $\alpha 2$ . Přezdívá se mu také jako kolagen bazálních membrán. [30]

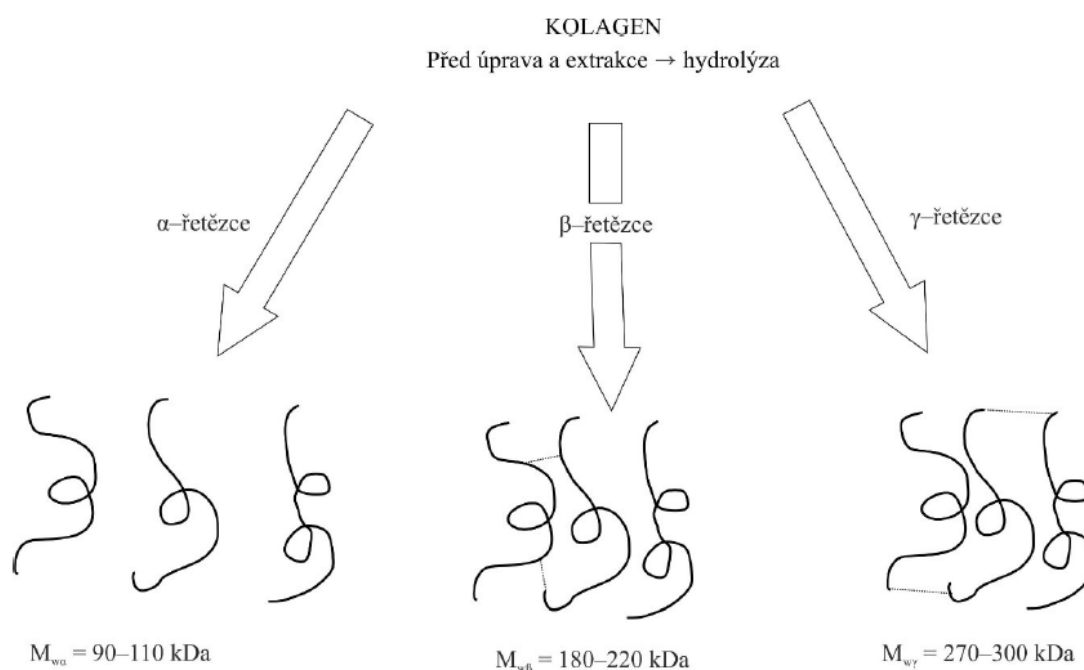
## **3.2 Želatina**

Je rozpustný protein ve vodě, který za určitých podmínek vytvoří gel. Získává se za tepla extrakcí v alkalickém nebo kyselém prostředí. Získává se z vepřové a hovězí kůže (75,4%), dále pak hovězích kostí (23,1 %). Přibližně 1,5 % představuje produkce želatiny z ryb. Želatiny z ryb se považovaly za málo kvalitní, ale platí to pouze pro ryby žijící v chladnějších vodách. Želatina získaná z ryb vyskytujících se v subtropickém a tropickém pásu je obdobná želatině ze savců. Vzniká denaturací kolagenu, což znamená jeho znehodnocování. Oddělují se tak



polypeptidové řetězce od sebe a kolagen se rozloží. V masě je zastoupeno také velké množství kolagenu, ale tato surovina je příliš cenná pro výrobu želatiny. [34, 35, 36]

Želatinu vytváří tři velice dominantní fragmenty. Nacházejí se v kolagenu volné  $\alpha$  řetězce a  $\beta$  řetězce. Spojené kovalentní vazbou jsou dva  $\alpha$  řetězce a dva  $\gamma$  řetězce nebo vzájemně tři  $\alpha$  řetězce. Řetězce  $\alpha$  které jsou volné, jsou depolymerizovány do sub -  $\alpha$  řetězců. Tyto řetězce mají nižší  $M_w$ , než samotný  $\alpha$  řetězec. Takovéto uspořádání řetězce může za to, že želatinový roztok není disperze proteinů. Proto všechny popisující parametry vlastnosti želatin, ať už to chemické nebo fyzikální jsou pouze průměrné hodnoty. [37]

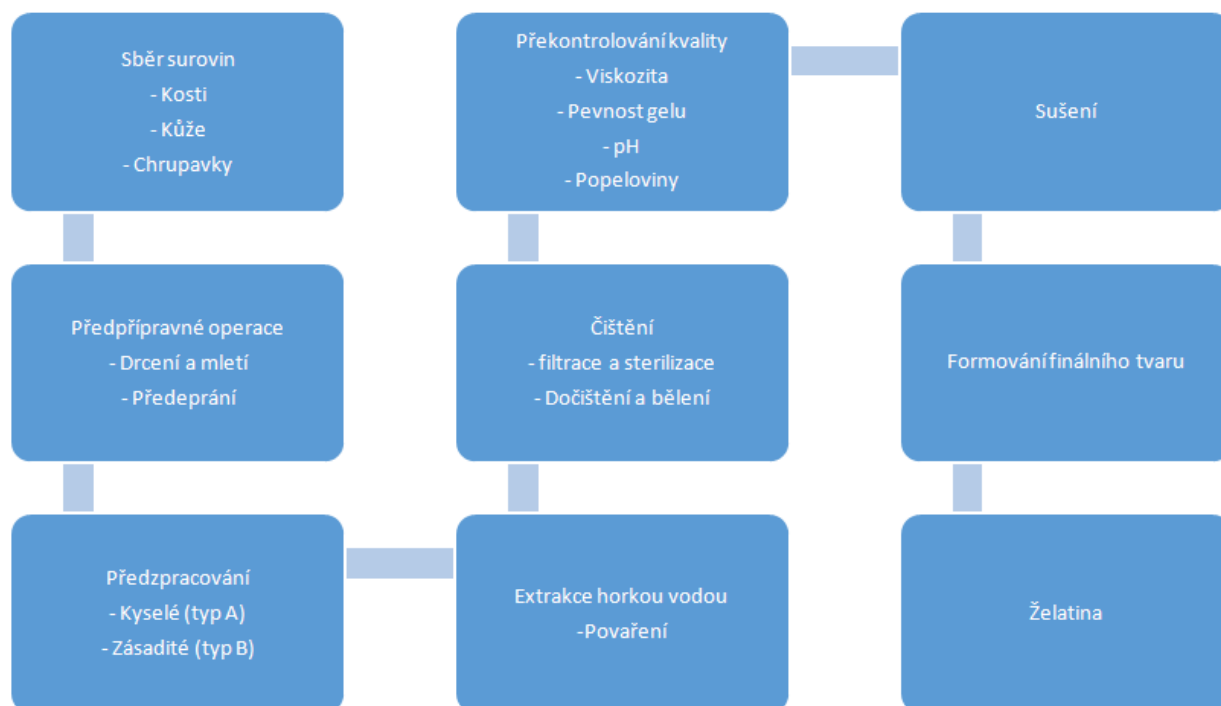


Obrázek 3: Želatina se skládá z různých směsí proteinových řetězců. Tyto řetězce mají rozdílnou molekulovou hmotnost. Proto není monodisperzní systém a vykazuje polydisperzitu. [37]

### 3.2.1 Získávání želatiny

Vstupní surový materiál, ze kterého je želatina získávána, je velice zesíťovaný, proto je třeba materiál předzpracovat, aby se příčné vazby rozrušily. Opracování se dělá kyselým nebo zásaditým způsobem. Samotná želatina se extrahuje ve více stupních. Nejvíce kvalitní želatiny jsou v první extrakci, při teplotě okolo 45 – 50 °C. Takovéto želatiny disponují velkou pevností gelu a mají větší molekulovou hmotnost. Naopak extrakce při vyšších teplotách poskytuje želatiny o menší kvalitě a mají nižší molekulovou hmotnost. Samotná extrakce se realizuje ve varnách, kde se při dosažení dostatečné teploty započne docházet k přetvoření kolagenu na klišový roztok. Čím více je vstupní materiál předpřipraven, tím k přeměně dochází snadněji.

Zhoršená vlastnost vzniklé želatiny je zapříčiněna větší degradací kolagenu během vaření (extrakci). Tento proces z pohledu fyzikálně-chemického je nazýván difuzní proces. [38]



Obrázek 4: Schéma vzniku želatiny

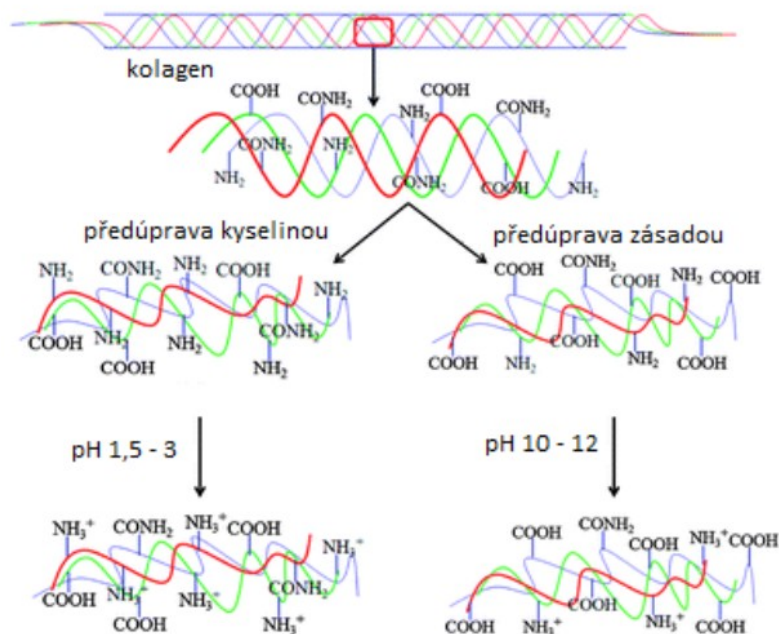
### 3.2.2 Želatina typu A

Vstupní surovina, která neobsahuje nečistoty, se vystaví působení naředěné minerální kyseliny. Její pH by se mělo pohybovat v rozmezí 1,5 – 3. Doba působení až 48 hodin. Klíčový parametr v tomto kroku je především tloušťka vstupního materiálu a velikost částic. V dalším kroku se materiál promyje čistou studenou vodou, aby se kyselina vymyla a pH bylo zhruba neutrální. Poté se želatina extrahuje vodou o teplotě zhruba 55 – 100 °C. Tento způsob přípravy je zejména vhodný pro materiály, které obsahují menší množství zesíťovaného kolagenu, což jsou vepřové kůže. [39, 40]

### 3.2.3 Želatina typu B

Při této metodě je materiál předzpracován v alkalickém prostředí, kde nejčastěji používaným roztokem je hydroxid vápenatý ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ). Roztok má pH přibližně 12 a surovina je vystavena 1 – 6 měsíců v této lázni. Doba je však závislá na tloušťce suroviny. Teplota při tomto procesu je do 24 °C. Po ukončení tohoto kroku se surovina promyje vodou, aby se odstranil zbytek zásady. Někdy se použije zředěná kyselina. Způsob takovéto přípravy je vhodný především pro zpracování hovězích kostí a kůží. [39]

Typ želatiny A i B mají rozdílné vlastnosti. Mají rozdílné fyzikální vlastnosti, liší se molekulovou hmotností, obsahem nečistot a někdy i vzhledem. Největší rozdíl je však v pH izoelektrického bodu. Želatina typu A má izoelektrický bod v rozmezí pH 7 – 9. Izoelektrický bod u želatiny typu B je v rozmezí pH 4,9 – 5,1. Takovéto úzké rozmezí izoelektrického bodu u želatiny typu B lze vysvětlit stupněm přeměny bočních amidových skupin aminokyseliny asparaginu a glutaminu na karboxylové kyseliny. U želatiny typu B, která se vyrábí alkalickým způsobem, je přeměna zcela úplná. [41]



Obrázek 5: Schematické znázornění předúpravy želatin [42]

### 3.2.4 Vlastnosti želatiny

Má čiré zbarvení až nažloutlou barvu, je průhledná a křehká látka. Je bez chuti, bez zápachu a netoxická. Dodává se v mnoha velikostech. Je to poměrně lehce stravitelná bílkovina. Jak od jemného prášku, tak po větší hrubé granule. Je možná také výroba tenkých filmů či plátek z želatiny. Hustota suché želatiny se pohybuje přibližně v rozmezí 1,3 – 1,4 g/cm<sup>3</sup>. Ve chladné vodě začne bobtnat a hydratovat. Ve vodném roztoku se chová amfoterně, proto se může chovat buď jako kyselina nebo jako zásada. Jednou z největších předností želatiny je to, že utváří tepelně reverzibilní gely. Pro výběr aplikace želatiny v praxi je klíčová pevnost gelu. Hodnota pevnosti gelu želatin, se vyjadřuje Bloom hodnotou. Samotné měření pevnosti želatinových gelů se provádí na přístroji zvaném Bloomův gelometr. [43]

Obsahuje téměř všechny aminokyseliny nezbytné pro život. Výjimkou je tryptofan a cystein. Složení se však může lišit na základě vstupní suroviny ve výrobním procesu. Jednotlivé zastoupení aminokyselin v želatině je vyobrazeno v tabulce č. 4. [41]

Tabulka 4: Jednotlivé zastoupení aminokyselin, ve 100 g želatiny [44]

Název aminokyseliny	g aminokyseliny ve 100 g želatiny	Název aminokyseliny	g aminokyseliny ve 100 g želatiny
Glycin	22,3	Leucin	2,8
Prolin	13,6	Valin	2,4
Hydroxyprolin	11,4	Fenylalanin	2,2
Kys. glutamová	9,6	Threonin	1,9
Alanin	9,1	Isoleucin	1,2
Arginin	7,7	Histidin	0,9
Kys. asparagová	5,7	Hydroxylisin	0,9
Lysin	3,5	Methionin	0,8
Serin	3,5	Tyrosin	0,5

### 3.2.5 Využití želatiny

Želatina našla využití jak v potravinářském, farmaceutickém, medicínském či fotografickém průmyslu. Pro potravinářský průmysl musí splňovat náležitá hygienická opatření. Pevnost gelu komerčně používaných želatín v potravinářství je rozmezí 50 – 300 Bloom. Obsah popelovin by měl být do 2 %, ale u vysoce kvalitní želatiny do 0,5 %. Vlhkost by se měla pohybovat v rozmezí 7 – 15 %. Výroba se skládá z následujících kroků: extrakce, přečištění, zahuštění, sušení, mletí, prosévání a zabalení. Uplatnění našla při výrobě různých zákusků, mlékařských výrobků, cukrovinek, pekařství, ve zmrzlinách jako pojiva, emulgátory, želírující látky a zahušřovadla. [34, 45]

### Medicínské a farmaceutické aplikace

Farmaceutická želatina je získávána převážně z vepřových nebo hovězích kůží. Jsou na ni kladeny vysoké nároky na čistotu a musí splňovat přísné kritéria. Nesmí obsahovat žádné těžké kovy ani patogenní mikroorganismy. Využívá se především k výrobě tablet a kapslí. Table-

ty jsou celistvé farmaceutické formy. Obsahují pojivo, léčivo, mazivo a rozpouštědlo. Výroba probíhá na lisovacích strojích, kde v první fázi dojde k namletí činné složky na požadovanou velikost částice. V následném kroku se přidají ostatní složky a směs se zhomogenizuje. V následujícím kroku se přimíchá želatina, která zde má funkci pojiva. Vytvoří se tak shluky, které dále utvoří tabletu. Finální tvar dostane tableta lisováním. Dostává tak svou velikost, tvar a hustotu. Na konec lze tabletu ještě potáhnout želatinou, kde získá požadovanou barvu a pozitivní chuť. Dalším typem jsou tvrdé želatinové kapsle. Tyto kapsle jsou silnostěnné, mají dobrou rozpustnost a oválný tvar. Jsou tvořeny dvěma částmi a to uzávěrem a tělem. Do těchto kapslí se doplňují barviva, antimikobiotika nebo tenzidy. Vyrábí se namáčením trnu do želatinového roztoku. Poté se směs ochladí a přesuší v sušárně, kde je teplota v rozmezí 22 – 28 °C. Takto zhotovené tělo kapsle se stáhne čelistmi. Požadovaná délka se zajistí oříznutím. Na konec se kapsle plní, uzavřou se a očistí. Posledním typem jsou měkké želatinové kapsle. Plní se převážně kapalinami, polopevnými látkami nebo suspenzemi. Jak již název napovídá, tak jsou měkké a to díky změkčovadlům, které se ke směsi přidají. Příkladem takového změkčovadla může být sorbitol nebo glycerin. Jsou jednokusové. Velkou výhodou je rychlejší uvolňování léčiva, než u tvrdých kapslí a zároveň maskuje nepříjemnou chuť léčivých látek. Lze vyrobit v dnešní době jakoukoli barvu i velikost tobolek. Velká nevýhoda je však to, že výroba je pomalejší, než je tomu u tvrdých tobolek. Zpracovává se na složitějším stroji a to na kontinuálně rotačním lisu. [34]

Díky biologické odbouratelnosti si biopolymery našly uplatnění v medicínské a farmaceutické oblasti. Jsou na bázi proteinů (želatina, kukuřičný zein, pšeničný gluten) a polysacharidu (škrobu). Díky své biokompatibilitě a netoxicitě lze je používat pro vývoj léku s cíleným uvolňováním a výrobu materiálů na regeneraci poškozených tkání. Zajímavostí je, že želatina typu A má odlišnou mikrostrukturu, než želatina typu B. Typ A vytváří porézní matici s nanovláknky, zatímco želatina typu B poskytne strukturu ve formě globulárních útvarů s většími dutinkami. Její další výjimečnou vlastností je to, že je velice dobře resorbovatelná. Tato vlastnost se využívá ve farmaceutické a medicínské oblasti k výrobě mikročástič, které setrvávají v organismu pouze určitou dobu. Uvolnění léčiva z takovéto dočasné matrice se děje pomocí enzymatické degradace samotné matrice. Matrice může také degradovat změnami podmínek v prostředí, jako je například změna pH, změna teploty, zvýšení iontové síly. Rychlost a samotná kinetika uvolňování částice závisí také na zesíťování částic, za což může síťovací činidlo glutaraldehyd, který se přidává, jakož to síťovací činidlo ve výrobě želatin.

Želatinové hydrogely jsou hojně používány při obnovování pokožky po těžkých popáleninách nebo jiných vážných poraněních. Produkce hydrogelů je řízena neutralizací vodného roztoku kyselého kolagenu za definovaných podmínek, jakými jsou pH, teplota, doba a velikost iontových sil. Tuhost, hustotu a pevnost takového hydrogelu lze řídit koncentrací kolagenu v roztoku. Je také možnost hydrogely síťovat. Síťováním se docílí lepší pevnosti a odolnosti proti nehostinnému biologickému prostředí. Hydrogely mají výborné hydratační účinky a zároveň poskytují vhodné růstové prostředí pro buňky. Funguje tak jako bariéra proti vnějšímu prostředí a zabraňuje proto infekci. [46]

Dalším uplatněním jsou **měkké (SGC) želatinové kapsle**. Jsou složeny z želatiny, vody, plastifikátorů a dalších pomocných látek. Pružnější strukturu mají díky přísadám změkčovadel (sorbitol, glycerol). Vyskytují se v mnoha různých tvarech kapslí: kulaté, oválné, trubkové či podélné. [47]

Druhou skupinou jsou **tvrdé (HGC) želatinové kapsle**. Jsou složeny z víčka a těla. Postup výroby je takový, že se do roztoku želatiny přimíchají barviva, plastifikační činidlo, maziva a smáčedla. Kovová forma (hroty) se pak ponoří do tohoto roztoku. Vznikne tak tělo kapsle. Víčko se vyrábí stejným způsobem, jen je tvaru o něco málo širší. Tělo a víčko se vzájemně překrývá a spoj je dokonale těsný. [47]

V dnešní době je možné také provádět 3D tisk z želatinových roztoků (3D bioprinting). Další využití je ve formě čípků, emulze z želatiny, expandéry plasmy, zdravotní bonbony, vnější aplikace léků, emulze a roztoky na uchování semene. [47, 48, 49]

### **Potravinářské aplikace**

Pro potravinářské účely se používá želatina o vysoké kvalitě a čistotě. Potravinářský průmysl je jedním z největších odběratelů želatiny. Uplatnění našla ve výrobě cukrovinek, jakož to želatinové bonbony, lekořice, maršmelou či karamely. Díky své viskozitě se používá i jako zahušťovadlo u výrobků s nízkým obsahem tuku. Uplatňuje se jako stabilizátor v dezertech a krémech. Nalezla využití i při výrobě šunek, aspiků a rybích výrobcích. Při konzumaci díky želatině pocítíme plnost v ústech, výrobky mají lákavý vzhled a konzistenci. [50]

### Technické aplikace

Pro technické aplikace se používá želatina o různé kvalitě a čistotě. Nejsou na ni kladeny takové nároky jako na želatinu potravinářskou a medicínskou. Uplatňuje se při výrobě fotografií, negativů a pozitivů. Tato metoda je známa již přibližně 100 let a pomohla tak rychlému vývoji ve fotografické oblasti. Využití našla i při restaurování obrazů, nábytků a jiných předmětů. Využívá se jejich adhezivních a kohezivních vlastností. Uplatnění našla i v podobě mikro kapslí inkoustu, kdy je třeba vytvořit kopii dokumentu. Využívá se i v agro odvětví, jako substrát co zadržuje vodu při setí a sázení rostlin, Jednou z výhod je, že želatina je plně biodegradabilní a netoxická, jak pro člověka, tak i pro zvířata. Musí mít minimální zákal a speciální fotochemické vlastnosti. Používá se také při výrobě papíru a finální potahování papírových výrobků. Používá se i jako stabilizátor v krémech v kosmetickém průmyslu. Další využití našla tato želatina při lepení etiket, známek, či při výrobě otisků. [34, 51]

## **PRAKTICKÁ ČÁST**



## 4 CÍLE PRÁCE A METODIKA

### 4.1 Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo zpracovat kosti ze separace, které jsou bohaté na kolagen. Bylo třeba posoudit možnosti extrakce kvalitních želatin. Výchozí surovina byla přečištěna od doprovodných nekolagenních složek a tuku. Následně byla zpracována podmínkami obdobnými při průmyslové výrobě želatin. Byly sledovány podmínky extrakce želatiny s vybranými procesními podmínkami. Pro plánování a vyhodnocování experimentu se metody více- faktorových experimentů. Připravené produkty byly charakterizovány (pevnost gelu, viskozita, obsah popelovin a další), byl také sledován stupeň konverze. Jeden z hlavních cílů diplomové práce byl návrh optimálních technologických podmínek zpracování kostí ze separace na želatinu a hydrolyzát. Na základě výsledků se navrhly finální podmínky pro opracování drůbežích kostí ze separace pro maximální výtěžnost kvalitních želatin.

### 4.2 Metodika

Metodika práce se použila taková, že pro podmínky studia základních podmínek extrakce se využily faktorové pokusy, 3 faktory na 2 úrovních + centrální experiment (1 opakování). Pro optimalizační část extrakce se použily schémata se 2 faktory na 2 úrovních + centrální experiment (1 opakování).

Strategie práce se rozdělila do tří částí, a to:

**I.** Odstranění tuku (a dalších nekolagenních složek) ze suroviny  
= příprava čistého kolagenu

**II.** Extrakce želatiny z čistého kolagenu – základní část.

Základní část, analyzují se vzorky želatin.

Na základě vyhodnocení základní části se navrhly podmínky optimalizační části.

**III.** Extrakce želatiny z čistého kolagenu – optimalizační část.

Provedla se optimalizační část a na základě výsledků v základní části a navrhly se optimální podmínky zpracování.

## 5 PŘÍSTROJE, MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE

**Použité přístroje** Magnetické míchadlo s topnou deskou IKA–C–Mag HS7, Stevens – LFRA texture analyser, Ubbelohdeho viskozimetr, elektrický mixér – ETA 0010, analytické váhy KERN 770, spektrofotometr Helios – 3, třepačka LT 3, DSC Mettler Toledo, muflová pec Nabertherm, muflová pec Labothem L9/11, elektrický vařič SCOTT GERATE GMBH, elektronické laboratorní váhy KERN 440-47, sušárna WTB BINDER E-28-TB1, sušárna Memmert ULP 400. Další drobné laboratorní vybavení (Erlenmeyerovy baňky, PET láhve, koželužské misky, laboratorní lžice, tyčinky, pipety, kádinky, plastová nádoba o objemu 2 l a 0,5 l pro odtučnění a pro enzymatické opracování suroviny, kovová kuchyňská síta, nůžky, váženky, laboratorní kleště, žihací kelímky, polyetylenové sáčky, odměrné válce, kádinky, exsikátor, kahan, PA tkanina, Petriho misky, aj.).

**Materiály a chemikálie** Kostí ze separace (Raciola, Uherský Brod)

Chlorid sodný NaCl ( $M_r = 58,44$  g/mol, běžná kuchyňská sůl)

Hydroxid sodný NaOH ( $M_r = 39,99$  g/mol, Penta Chrudim)

Aceton  $C_3H_6O$  ( $M_r = 58,08$  g/mol, Penta Chrudim)

Enzym Protamex je vyráběn dánskou firmou Novozymes. Tento enzym byl vyvinut pro hydrolyzu proteinů v potravinářském průmyslu a splňuje přísné požadavky, které jsou na tento průmysl kladeny. Představuje komplex *Bacillus* proteázy. (příloha – PI)

Enzym Lipolase je vyráběn dánskou firmou Novo-Nordisk. Tento enzym se využívá pro rekombinaci DNA v genovém inženýrství. Nejlepší účinnost vykazuje při pH kolem 12 a funguje při velkém rozmezí teplot. Nedráždí organismus ani pokožku. Lze ho odstranit obyčejnou vodou. Tento enzym lze použít v potravinářském průmyslu. (příloha – PII)

Firma Raciola s.r.o. Uherský Brod poskytla na tuto diplomovou práci drůbeží kosti ze separace. Kuřecí kosti byly rozemlety na průmyslové řezačce masa se čtyřramenným nožem. Mletí probíhalo ve dvou stupních. V prvním stupni se použila řezná deska ve tvaru ledvinky a ve druhém stupni ve tvaru kruhu o průměru 3 mm. Rozemletá a zhomogenizovaná surovina se uchovávala v mrazničce a proto bylo potřeba ji pozvolna rozmrazit v lednici 24 hodin před opracováním. Tabulka č. 5 vyobrazuje složení neopracované suroviny v sušině.

Tabulka 5: Složení vstupní suroviny v sušině

Obsah sušiny (%)	Obsah bílkovin (%)	Obsah tuku (%)	Obsah popelovin (%)	Obsah kolagenu (%)
38,2 ± 2,0	40,3 ± 0,5	26,0 ± 2,4	29,6 ± 3,1	79,9 ± 1,2

## 6 METODY

Želatiny a hydrolyzáty se testovaly podle Standardní testovací metody pro jeldé želatiny (Standard testing method for ebidle gelatin). [52]

### Měření pevnosti gelu

Do standardizované nádoby na měření pevnosti gelu se navázilo  $3,00 \pm 0,01$  g želatiny a přidalo se  $42 \pm 0,2$  g destilované vody při  $25 \pm 2$  °C. Nádobka se vzorkem se vložila do horké vodní lázně o teplotě 60 °C za míchání na magnetickém míchadle a nechal se vzorek rozpouštět. Po rozpuštění vzorku se nádobka se vzorkem inkubována při teplotě  $10,0 \pm 0,1$  °C po dobu 18 hodin v lednici. Pro měření se používal přístroj LFRA, který je vyobrazen na obrázku č. 6.



Obrázek 6: Stevens - LFRA texture analyser

Tabulka 6: Navážky želatiny, vody a příslušné přepočítávací koeficienty

Metoda	Navážka želatiny (g)	Navážka vody (g)	Přepočítávací koeficient
A	7,50	104,50	-
B	3,00	42,00	1,2627
C	1,50	21,00	1,6372

Pevnost želatinového gelu je hlavním měřítkem tuhosti gelu vytvořeného z 6,67 % roztoku. Připravil se podle předem stanovených podmínek. Bloom hodnota je měřítko váhy (síly), požadované pro stlačení předepsané plochy. Měření se provedlo podle metodiky GMIA. [28]

### Měření obsahu popelovin

Stanovení obsahu popelovin bylo prováděno tak, že navážka vzorku byla umístěna do porcelánového kelímku, který se pomalu spaloval nad kahanem do úplného zuhelnatění. Poté byl vzorek žhán 120 minut v muflové peci při  $650 \pm 4$  °C.

Výpočet pro obsah popelovin:

$$P = \frac{m_1}{m_2} \times 100 \quad (1)$$

kde: P – obsah popelovin ve vzorku [%]

$m_1$  – hmotnost vzorku po žhání [g]

$m_2$  – hmotnost vzorku před žháním [g]



Obrázek 7: Vzorky želatin před spalování pro zjištění obsahu popelovin



Obrázek 8: Vzorky želatin po spalování pro zjištění obsahu popelovin

### Měření obsahu sušiny

Stanovení obsahu bylo provedeno nepřímou metodou a to tak, že se vzorek sušil při teplotě  $103 \pm 1$  °C do konstantní hmotnosti. Každé stanovení bylo provedeno 3x, ze kterého se brala průměrná hodnota.

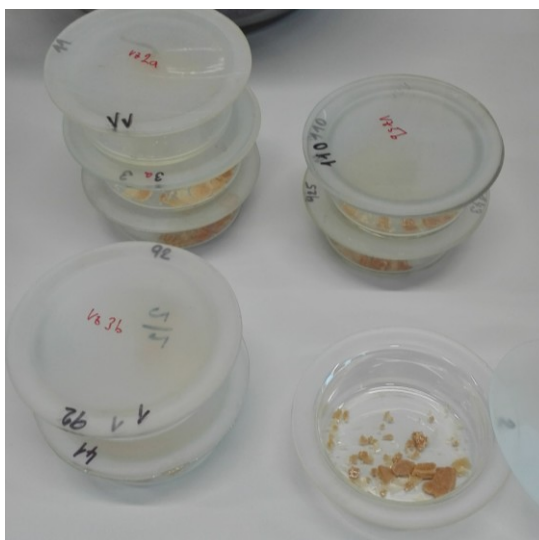
Výpočet pro obsah sušiny:

$$S = \frac{m_1}{m_2} \times 100 \quad (2)$$

kde: S – obsah sušiny ve vzorku [%]

m1 – hmotnost vzorku po sušení [g]

m2 – hmotnost vzorku před sušením [g]



Obrázek 9: Vzorky želatin pro zjištění obsahu sušiny

### Měření kinematické viskozity

Viskozita želatinových roztoků byla ihned měřena po měření pevnosti gelů želatin. Nádobka s gelem byla zahřívána při teplotě 60 °C, aby došlo k rozpuštění želatinového gelu. Tekutý roztok želatiny se poté nalil do Ubbelohdeho viskozimetru. Na základě rychlosti průtoku roztoku mezi ryskami se vypočetla kinematická viskozita dle vzorce:

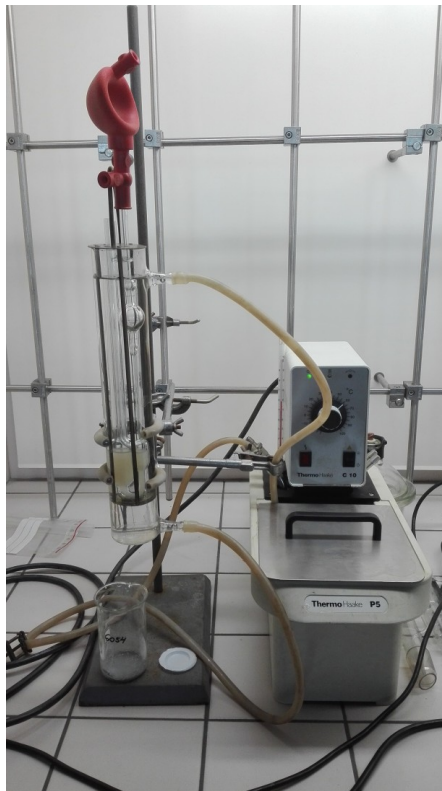
$$\nu = k * t - B/t \quad (3)$$

kde: - kinematická viskozita [ $\text{mm}^2/\text{s}$ ]

B - konstanta ke korekci na kinetickou energii určená z rozměru viskozimetru (2,8)

k - konstanta kapiláry viskozimetru (0,5002)

t - aritmetický průměr dob průtoku [s]



Obrázek 10: Ubbelohdeho viskozimetr

### Měření transmittance (čirosti) želatin

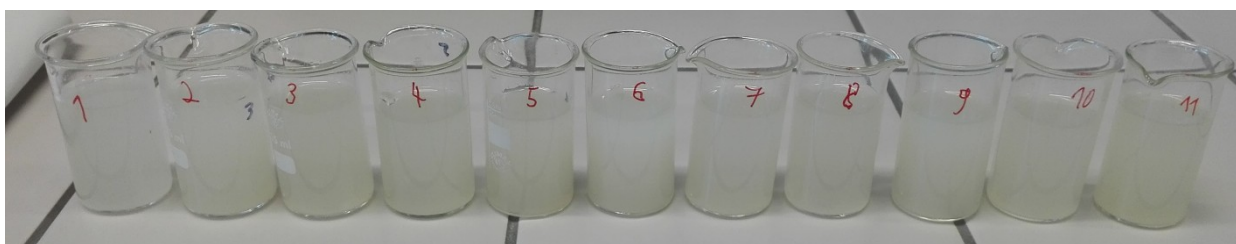
Na základě průchodu světla želatinovým roztokem byla změřena transmittance (čirost). Měření se provádělo při vlnové délce 640 nm. Kalibrace se provedla pomocí destilované vody. Měřilo se na spektrofotometru Helios – 3.



Obrázek 11: Spektrofotometr Helios – 3 pro měření transmittance (čirosti)

### Měření pH želatin

Připravily se želatinové roztoky o koncentraci 1,5 % při teplotě 30 °C. Poté se změřilo pH metrem hodnota pH.



Obrázek 12: Připravené 1,5 % želatinové roztoky

### Měření teploty tání želatinového gelu

Teplota tání želatinového gelu se určilo pomocí diferenčního skenovacího kalorimetru DSC. Měření se provádělo v hliníkových mističkách, kde se navázilo 15 až 30 mg vzorku želatiny. Miska se uzavřela hermeticky víčkem a vzorek se vložil do měřicí cely. V cele byl s měřeným vzorkem také referenční vzorek. Nejdříve se miska ochladila na 5 °C po dobu 10 minut. Poté se miska začala ohřívat rychlostí 5 °C za 1 minutu až na 50 °C. Přesná hodnota tání vzorku se vyobrazila v grafu endotermním píkem. Poté byl vzorek opět zchlazen na 5 °C. Získaná data byla poté zpracována.



## 7 POSTUP PRÁCE

Postup práce byl realizován pomocí faktorových experimentů. Tyto experimenty jsou výjimečné v to, že k plánování se využívá co nejmenšího počtu experimentů a více než jen jednou vstupní proměnnou. Poskytnou také rychlé řešení úkolu bez nutnosti složitého hledání různých variant a kombinací. Jsou uskupeny do strukturní matice a kombinují vstupní nastavené podmínky okrajové patřičných faktorů. Značení takových pokusů se značí  $N^P$ . N je počet jednotlivých úrovní faktorů a P je počet faktorů. [53]

Zvolily se 3 vstupní faktory na dvou úrovních:

Faktor A – Doba enzymového opracování (24 – 72 h)

Faktor B – Teplota extrakce želatiny 1. frakce (64 – 80 °C)

Faktor C – Doba extrakce želatiny 1. frakce (60 – 180 min)

Poté se zvolily další dva faktory pro podmínky extrakce želatiny 2. frakce:

Faktor D – Teplota extrakce želatiny 2. frakce (88 – 98 °C)

Faktor E – Doba extrakce želatiny 2. frakce (0,5 – 6 h)

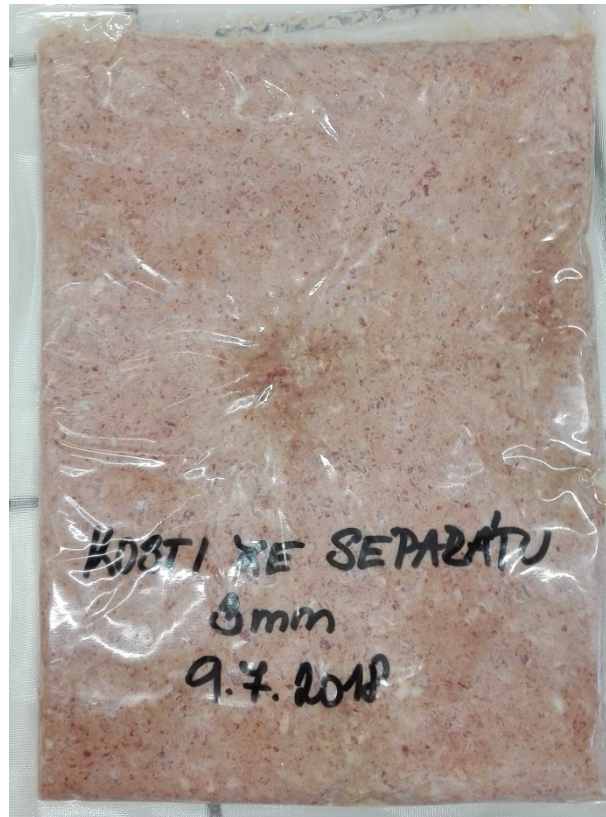
Dále byl proveden experiment bez přídavku enzymu (slepý pokus), který byl brát jako základní k porovnání.

### 7.1 Příprava čistého kolagenu

Bylo třeba odstranit ze suroviny doprovodné nekolagenní bílkoviny a tuk. Následně byl připraven izolovaný kolagen (obsahoval malý zbytek tuku), který se dále bude zpracovávat extrakcí na želatiny.

Nejprve bylo třeba vytáhnout surovinu z mrazničky a nechat rozmrazit. Jednalo se o zbytky (části kostí a chrupavek), které zůstaly z výroby strojně odděleného masa. Zbytky byly v rozemletém stavu o velikosti části 3 mm.

Složení kostí ze separace: obsah sušiny =  $38,2 \pm 2,0$  %, obsah tuku v sušině =  $26,0 \pm 2,4$  %, celkový obsah bílkovin v sušině =  $40,3 \pm 0,5$  %, obsah popelovin v sušině =  $29,6 \pm 3,1$  %.



Obrázek 13: Kosti ze separace po vytáhnutí z mrazáku

### **Opracování ve studené vodě**

V dalším kroku bylo třeba promýt surovinu studenou vodou. Surovina se vložila do kuchyňského síta a promývala se 2 minuty. Poté se nechala 5 minut ponořená ve studené vodě v sítu. Pak se surovina opět promývala studenou vodou po dobu 2 minut. V tomto kroku se z materiálu odstranily albuminy.

### **Opracování v 0,2 M NaCl**

Následovalo opracování v 0,2 M NaCl a to tak, že surovina se smíchala s 0,2 M NaCl v poměru 1:6 a nechala se mírně třepat při pokojové teplotě po dobu 1,5 hodiny. Poté se surovina přefiltrovala přes síto a promývala se studenou vodou po dobu 1 minuty. V této části postupu došlo k odstranění globulinu.



Obrázek 14: Odstranění albuminu



Obrázek 15: Odstranění globulinu

### Opracování v 0,03 M NaOH

Poté se surovina smíchala s 0,03 M NaOH v poměru 1:6 a nechala se mírně třepat po dobu 6 – 8 hodin. Pak se surovina přefiltrovala přes síto a promyla studenou vodou z kohoutku po dobu 1 minuty. Následně se tento postup opracování v 0,03 M NaOH opakoval. Surovina se třepala přes noc při pokojové teplotě. Poté následovala filtrace přes síto s jednou vrstvou PA tkaniny a následné promývání studenou vodou z kohoutku po dobu 2 minut. V tomto kroku se odstranily gluteiny ze suroviny.



Obrázek 16: Odstranění gluteinů

Mechanicky se surovina vymáčkala, aby se zbavila co největšího množství vody. Část vzorku se odebrala na stanovení sušiny pro stanovení přídatku enzymu Lipolase. Pokud by surovina nebyla ihned po tomto kroku zpracována, bylo nutné ji uzavřít do nádoby a vložit do lednice. Takto skladována mohla být ale pouze dva dny.

### Odtučnění enzymem Lipolase

V následujícím kroku se surovina odtučňovala za použití enzymu Lipolase. Tkáň se smísila s vodou v poměru 1:10, aby byla dostatečně smáčena. Poté se přidal enzym Lipolase v množství 5 %. Příklad byl vztažen na hmotnost přesušené suroviny z předešlého kroku. Směs s enzymem se nechala třepat při pokojové teplotě po stanovenou dobu v předepsaném počtu odtučňovacích cyklů (viz tabulka č. 7). Na počátku a na konci každého třepacího cyklu se měřilo pH. Následovala filtrace přes síto s jednou vrstvou PA tkaniny a poté promývání 2 minuty studenou vodou z kohoutku. Po ukončení se tkáň rozprostřela na Petriho misku a nechala se přesušit při 35 °C po dobu 18 – 35 hodin. Na závěr se zvažilo množství odtučněné tkáně.

Tabulka 7: Rozpis třepacích cyklů pro opracování enzymem Lipolase

Třepací cyklus	Den	Doba třepání (h)	pH		Poznámka
			na počátku	na konci	
1.	1.	7	11,41	11,62	neupraveno pH
2.	1. – 2.	17	10,81	10,85	neupraveno pH
3.	2.	7	9,81	10,22	neupraveno pH
4.	2. – 3.	17	9,07	9,12	neupraveno pH



Obrázek 17: Surovina na třepačce s enzymem Lipolase



Obrázek 18: Enzym Lipolase

### **Do-odtučnění suroviny acetonem**

Vysušená surovina se musela do-odtučnit. A to tak, že se surovina smíchala s acetonem v poměru 1:9 a nechala se třepat po dobu 6 – 9 hodin při pokojové teplotě. Poté se rozpouštědlo (aceton) vyměnil za čerstvý a nechala se směs odtučňovat přes noc. Po odtučnění se surovina zfiltrovala a rozprostřela na plech a umístila do digestoře, kde se nechala sušit přes noc. Zároveň se rozpouštědlo vypařilo. Přefiltrovaný aceton se nevytlákal, ale byl recyklován destilací pro opětovné použití.

### **Rozemletí a rozdělení suroviny**

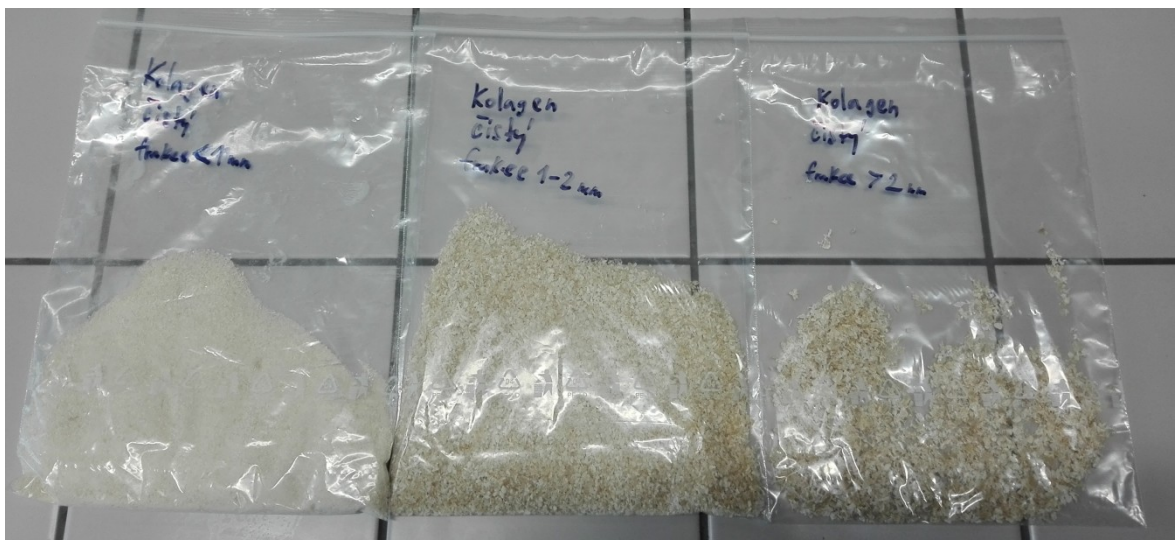
Vysušená surovina se dále musela rozemlít po menších dávkách na menší částice. K rozemletí se použil kuchyňský (vertikální) mixér a mlýnek na kávu, aby se docílilo perfektního rozemletí suroviny. Doba mletí byla přibližně 15 sekund, aby se surovina zbytečně nepřehřívala. Takto namletá surovina (čistý kolagen), byla uskladněna v uzavíratelné plastové lahvi při pokojové teplotě.



Obrázek 19: Vysušená surovina (čistý kolagen) před mletím

Surovina byla pomocí sít rozdělena do tří frakcí. V první frakci zůstal kolagen, které měl velikost částic větší než 2 mm. Ve druhé frakci zůstaly částice o velikosti 1 – 2 mm a v poslední třetí frakci zůstaly částice menší jak 1 mm.

Jak se později ukázalo, tak i velikost částic čistého kolagenu má vliv na celkovou účinnost extrakce kvalitních želatin. Proto bylo zapotřebí v průběhu práce tuto analýzu částic provést.



Obrázek 20: Surovina (čistý kolagen) po mletí a síťové analýze částic (vlevo: částice < 1mm, uprostřed: částice 1 – 2 mm, vpravo: částice > 2 mm)

## 7.2 Extrakce želatiny z čistého kolagenu

### Neutrální opracování enzymem

V prvním kroku se surovina nechala neutrálně opracovat enzymem a to tak, že se smíchalo 20 g suroviny s 200 ml destilované vody (poměr 1:10). Směs se dále nechala třepat 20 minut při pokojové teplotě. Poté se překontrolovala hodnota pH, která musela být v rozmezí 6,5 – 7,0. Hodnota pH byla v tomto intervalu hodnot a proto se nemusela upravovat.



Obrázek 21: Přídavek 1,0 % enzymu Protamex a kontrola pH

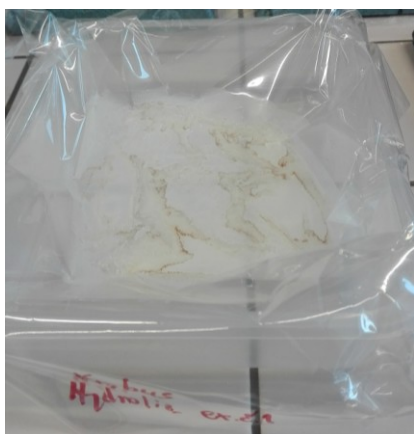
Mohl se tak přidat enzym Protamex v množství 1,0 % (vztaženo na sušinu suroviny) a směs nechat třepat při pokojové teplotě a době opracování podle Faktoru A. Zároveň se o dobu 4 hodin kontrolovalo pH, aby bylo znovu v rozmezí 6,5 – 7,0.



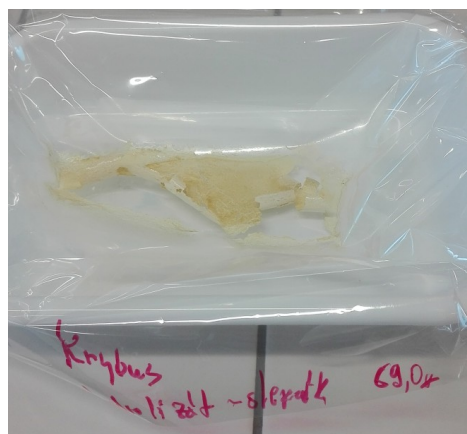
Obrázek 22: Surovina na třepacím zařízení

### Hydrolyzát

Po uplynutí této doby se směs přefiltrovala přes síto s 3 vrstvami PA tkaniny. Tekutá složka (hydrolyzát) se následně nechal povařit 5 minut, při teplotě 98 – 100 °C, aby se inaktivoval enzym Protamex. Celý objem hydrolyzátu se rozlil do mističky opatřené nepřilnavou PE folií. Hydrolyzát se nechal sušit při teplotě 60 °C po dobu 2 dnů. Vysušený hydrolyzát se poté zvážil a uchoval se v uzavíratelném sáčku.



Obrázek 23: Hydrolyzát exp. č. 8



Obrázek 24: Hydrolyzát exp. č. 11

Zbylá neutrálně opracovaná surovina byla promyta vodou, po dobu 2 minut, aby se enzym Protamex částečně inaktivoval. Následně se materiál smíchal s 0,03 M NaOH a nechal se intenzivně třepat na třepačce po dobu 10 minut. Pak následovala filtrace. Surovina se znovu smíchala s 0,03 M NaOH a postup se opakoval. Znovu zachycený materiál na sítu po filtraci se promyl destilovanou vodou po dobu 2 minut, aby se odstranil hydroxid. Poté se nechá materiál třepat po dobu 10 minut v destilované vodě. Materiál se poté zfiltruje přes síto.

### Želatina první (hlavní) frakce

Nyní následovala extrakce želatiny první (hlavní) frakce. Zfiltrovaný materiál se smíchal s destilovanou vodou v poměru 1:8. Smíchalo se přibližně o něco méně než 20 g suroviny (část se zachytila na sítu) s 160ml destilované vody. Nesmazatelným fixem se poznačila výška hladiny, jelikož docházelo při extrakci k odpařování vody a musela se proto dolévat. Systém se nechal zahřívát na teplotu podle Faktoru B a dobu podle Faktoru C (viz tabulka

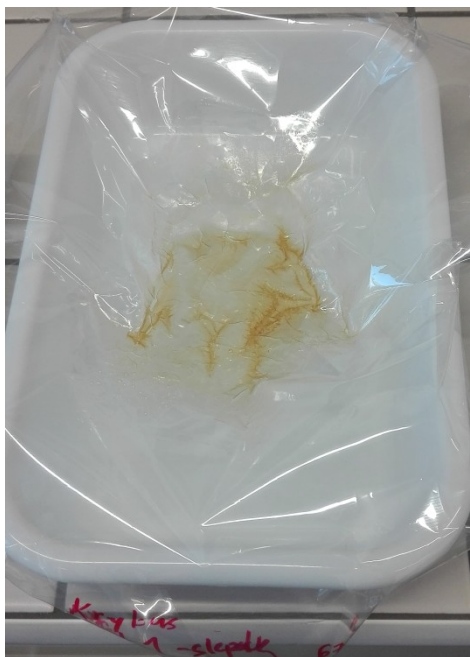


č. 8). Zároveň při extrakci se systém míchal na magnetickém míchadle s topnou deskou. Sledoval se také čas, než byla dosažena požadovaná teplota extrakce a byl v rozmezí 6 – 8 minut.

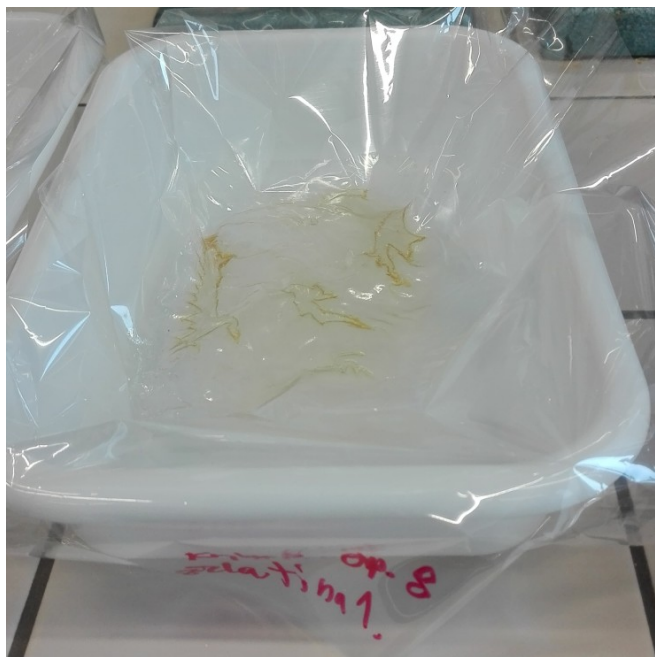


Obrázek 25: Extrakce želatiny

Po extrakci se směs přefiltrovala přes síto se třemi vrstvami PA tkaniny. Oddělená kapalina (želatina 1. frakce) se v kádince zahřála na teplotu 98 – 100 °C po dobu 5 minut, aby se inaktivoval enzym Protamex. Povařená kapalina se poté rozlila do misky opatřena nepřilnavou folií a nechala se sušit při teplotě 45 °C po dobu 2 dnů. Vysušená želatina se poté zvážila pro dopočítání bilance a seškrábala se do uzavíratelného sáčku pro analýzu.



Obrázek 27: Želatina první frakce u exp. č. 11



Obrázek 26: Želatina první frakce u exp. č. 8

### **Želatina druhé (vedlejší) frakce**

Se surovinou zachycenou na sítu se dále pracovalo za cílem získání želatiny druhé (vedlejší) frakce. Surovina se smíchala s destilovanou vodou v poměru 1: 7. O něco málo než 20 g suroviny se 140 ml destilované vody. Znovu se poznačila hladina vody, jelikož docházelo při vyšších teplotách k odpařování. Destilovaná voda se musela dolévat. Systém se dále umístil na magnetické míchadlo s topnou deskou a nechal se zahřívát na teplotu podle Faktoru D po dobu extrakce podle Faktoru E (viz tabulka č. 8). Po extrakci se směs přefiltrovala přes síto opatřené 3 vrstvami PA tkaniny. Oddělená kapalina (želatina 2. frakce) se v kádince zahřála na teplotu 98 – 100 °C po dobu 5 minut, aby se inaktivoval enzym Protamex. Povařená kapalina se poté rozlila do misky opatřena nepřilnavou folií a nechala se sušit při teplotě 45 °C po dobu 2 dnů. Vysušená želatina se poté zvažila pro dopočítání bilance a seškrábala se do uzavíratelného sáčku pro analýzu.



Obrázek 29: Želatina první frakce u exp. č. 11



Obrázek 28: Želatina první frakce u exp. č. 8

### Nerozložený tuhý podíl

Surovina, která zůstala zachycena na tkanině v sítu po extrakci želatiny 2. frakce, byl nerozložený zbytek kostní tkáně. Ten se zabalil do PA tkaniny, která byla použita při filtraci, a nechal se sušit v sušárně při teplotě 103 °C přes noc.

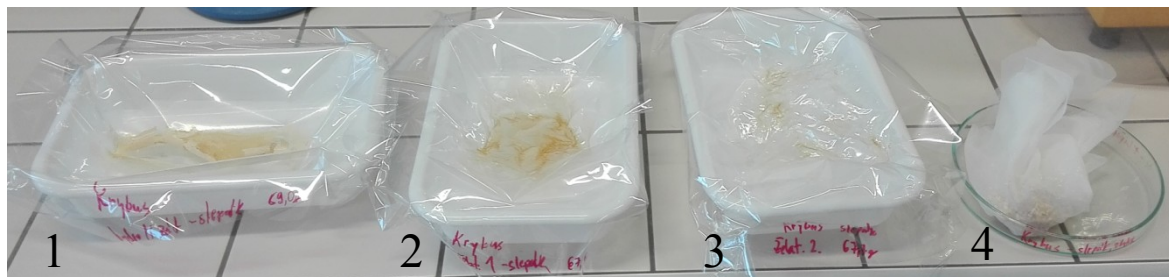


Obrázek 31: Vysušený tuhý podíl



Obrázek 30: Nevysušený tuhý podíl

Na základě získaných vzorků želatiny a ostatních podílů se provedla hmotnostní bilance (sušiny) a vypočetly se účinnosti extrakcí (viz tabulka č. 8).



Obrázek 32: Všechny složky extrakce: hydrolyzát (1), želatina hlavní frakce (2), želatina vedlejší frakce (3), nerozložený tuhý podíl (4).

## 8 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 8.1 Primární fáze experimentu

Celkem bylo provedeno 11 experimentů za pomoci faktorových pokusů (metodiky)  $2^3 + 2$  středové experimenty. Jeden z experimentů byl brán jako referenční a to byl bez přídavku 1 % enzymu Protamex. Tento experiment se nazývá jako slepý pokus.

Získané hydrolyzáty a želatiny o různé kvalitě získané extrakcí drůbežích kostí ze separace, které se opracovávaly pomocí enzymu, se dále porovnávaly pomocí různých testovacích metod. Jednotlivé výsledky zkoušek jsou uvedeny v následujících tabulkách. Hlavní sledované faktory extrakce patří: doba enzymového opracování (Faktor A), teplota extrakce hlavní želatinové frakce (Faktor B), doba extrakce hlavní želatinové frakce (Faktor C). Vedlejší sledované faktory extrakce: teplota extrakce vedlejší želatinové frakce (Faktor D), doba extrakce vedlejší želatinové frakce (Faktor E). Naměřené a vypočítané hodnoty výsledků jsou uvedeny v tabulkách č. 8 až č. 11 a v obrázcích č. 33 až č. 45. Všechny výsledky experimentů byly vyhodnoceny v programu MiniTab 18. Tento program je vhodný na zpracování statistického plánování.

V tabulce č. 8 jsou uvedeny jednotlivé experimenty extrakcí želatin spolu s vybranými technologickými podmínkami. Výsledky procesu se realizoval pomocí faktorových pokusů:  $2^3 + 2$  centrální experimenty + 1 experiment bez přídavku enzymu (slepý pokus). Výtěžek hydrolyzáatů byl v intervalu od 1,6 % do 6,8 %, výtěžek želatin první frakce byl v intervalu od 19,1 % do 33,7 %. Nejmenší výtěžnost měl experiment č. 11, který představoval slepý pokus bez přídavku enzymu Protamex, kdy nastavené podmínky extrakce želatiny první frakce byly: teplota 72 °C, doba extrakce 120 min. Naopak největší výtěžnost želatiny první frakce byla získána u experimentu č. 8 a to 32,3 %. Nastavené parametry této extrakce byly: teplota 80 °C, doba extrakce 180 min. Celkové účinnosti extrakcí se pohybovaly v rozmezí 26,5 % do 45,6 % s bilanční chybou v intervalech od 1,5 % až do 9,4 %.

Tabulka č. 9 popisuje jednotlivé experimenty s vybranými technologickými podmínkami. Jsou zde uvedeny také charakterizace želatin a hydrolyzátů, které vytvořily gel. Všechny připravené želatiny utvořily gel, ale experiment č. 11 měl velice malou pevnost gelu a hodnota činila pouze  $3 \pm 0$  Bloom. Tento experiment měl zároveň i nejmenší obsah popelovin a to  $2,1 \pm 0,3$  %. Největší pevnost gelu měl experiment č. 8, kdy měl takto nastavené technologické podmínky: doba enzymového opracování 72 hod, teplota extrakce  $80$  °C, doba extrakce 180 min. Hodnota pevnosti gelu u tohoto experimentu byla  $158 \pm 2$  Bloom. Hodnota pH 1,5 % želatinového roztoku želatin se pohybovala v intervalu 6,90 – 8,32. Nejmenší hodnotu viskozity měl vzorek č. 11 a jeho hodnota byla  $1,54 \pm 0,03$  [mPa.s]. Naopak největší viskozitu vykazoval vzorek č. 9 a jeho hodnota byla  $2,75 \pm 0,18$  [mPa.s]. Čírost byla v intervalu od  $1,243 \pm 0,006$  T do  $2,2324 \pm 0,0002$  T. Průměrný obsah sušiny ve vzorcích byl  $91 \pm 2$  %.

Tabulka 8: Rozpis jednotlivých experimentů pro primární část s vybranými technologickými podmínkami a jejich výsledky

Experiment č.	Technologické podmínky extrakce hlavní frakce želatiny			Technologické podmínky extrakce vedlejší frakce želatiny		Charakterizace procesu					
	Faktor A Doba enzymového opracování [h]	Faktor B Teplota extrakce želatiny 1 [°C]	Faktor C Doba extrakce želatiny 1 [min]	Faktor D Teplota ex- trakce želatiny 2 [°C]	Faktor E Doba extrak- ce želatiny 2 [h]	Výtěžek hydrolyzátu [%]	Výtěžek 1. želati- ny [%]	Výtěžek 2. želati- ny [%]	Množství tuhého podílu [%]	Celková účinnost extrakce [%]	Bilanční chyba [%]
1	24	64	60	88	0,5	6,8	21,6	2,6	62,2	31,0	6,8
2	24	64	180	88	1	4,2	22,1	2,6	64,7	28,9	6,4
3	24	80	60	98	0,5	3,2	23,7	3,7	60,5	30,6	8,9
4	24	80	180	98	1	4,7	24,7	3,1	59,1	32,5	8,4
5	72	64	60	88	2	3,2	26,3	2,1	62,4	31,6	6,0
6	72	64	180	88	4	6,3	22,8	2,6	66,8	31,7	1,5
7	72	80	60	98	2	4,7	21,1	2,6	65,4	28,4	6,2
8	72	80	180	98	4	6,8	32,3	6,3	46,4	44,4	8,2
9	48	72	120	88	6	4,2	31,1	3,2	52,1	38,5	9,4
10	48	72	120	98	6	5,8	31,7	5,8	52,3	45,3	4,4
11*	48	72	120	93	3	1,6	19,1	5,8	70	26,5	3,5

\* Experiment srovnávací bez přídavku 1 % enzymu Protamex

Tabulka 9: Rozpis jednotlivých experimentů pro primární část s vybranými technologickými podmínkami a jejich výsledky

Experiment č.	Technologické podmínky extrakce hlavní frakce želatiny			Charakterizace připravených hydrolyzátů/želatin					
	Faktor A Doba enzymového opracování [h]	Faktor B Teplota extrakce želatiny 1 [°C]	Faktor C Doba ex- trakce želatiny 1 [min]	Pevnost gelu [Bloom]	Obsah popela** [%]	pH [-]	Viskozita [mPa.s]	Čiřost [T]	Sušina [%]
1	24	64	60	8±1	3,23±0,14	8,10	2,43±0,14	1,7103±0,0016	91,3±0,7
2	24	64	180	28±3	4,21±0,09	8,12	1,96±0,08	1,909±0,008	92,2±0,4
3	24	80	60	59±2	6,1±0,7	7,95	2,11±0,17	1,243±0,006	91,0±2,0
4	24	80	180	76±2	4,9±0,2	7,50	1,91±0,15	1,926±0,004	92,2±0,2
5	72	64	60	42±1	6,7±0,4	6,90	2,13 ±0,03	1,542±0,002	91,4±2,1
6	72	64	180	54±0	5,52±0,13	7,65	1,43±0,12	1,724±0,007	92,0±2,0
7	72	80	60	61±1	6,3±0,4	7,32	1,75±0,14	1,976±0,008	90,2±0,5
8	72	80	180	158±2	4,24±0,16	7,93	2,17±0,08	2,172±0,002	91,0±2,0
9	48	72	120	120±1	6,3±0,7	7,43	2,75±0,18	1.818±0,002	89,9±0,3
10	48	72	120	115±2	5,47±0,06	8,32	2,16±0,12	1,263±0,008	91,0±1,0
11*	48	72	120	3±0	2,1±0,3	7,20	1,54±0,03	2,2324±0,0002	92,3±1,2

\* - Experiment srovnávací bez přídavku 1 % enzymu Protamex

\*\* - % v sušině vyextrahovaného produktu



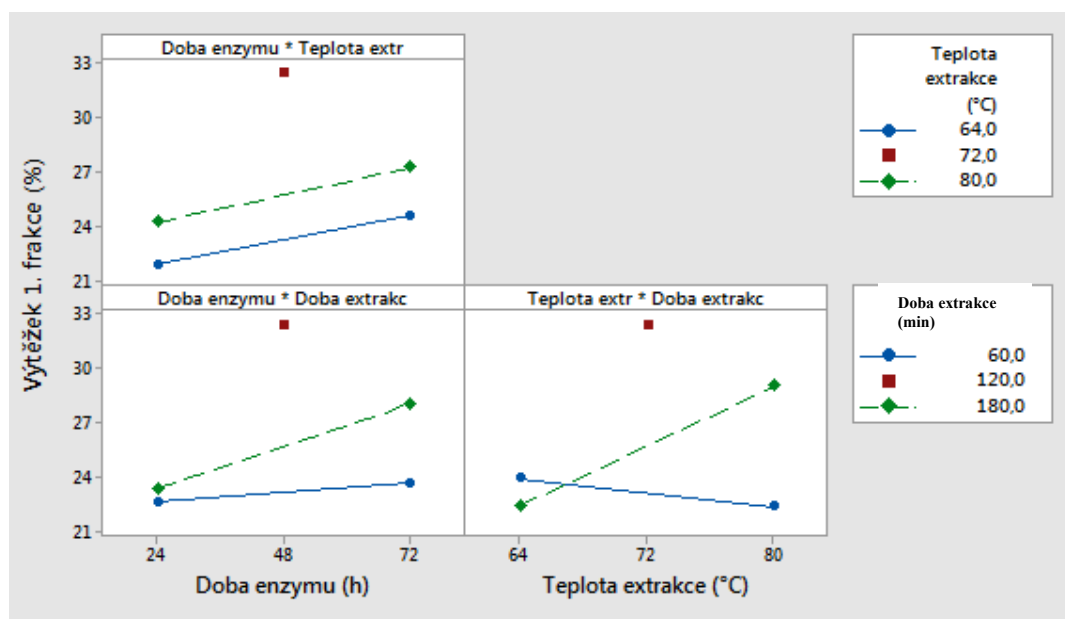
### 8.1.1 Účinnost extrakce želatiny první frakce

Rovnice účinnosti extrakce 1. frakce želatiny byla:

$$\text{Účinnost} = -73 + 1,9 \text{ Doba enzymu} + 1,35 \text{ Teplota} + 16,24 \text{ Doba extrakce}$$

Podle p-faktor bylo jak množství přidaného enzymu, tak teplota a doba extrakce nevýznamné. Hodnoty činily 0,936, 0,592 a 0,125. Hodnota  $R^2$  se rovnala 32,41%.

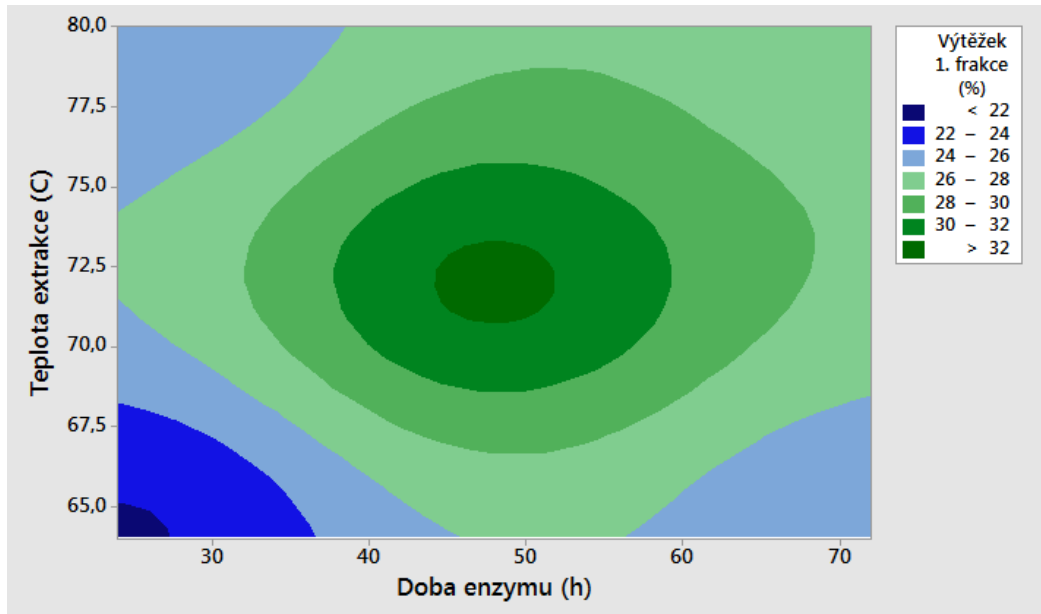
Obrázek č. 33 popisuje interakce mezi jednotlivými sledovanými faktory na účinnost extrakce želatiny první frakce. Jak je z obrázku patrné tak největší účinnost měl experiment středový a to při: doba enzymového opracování 48 hod, teplota extrakce 72 °C a doba extrakce 120 min. Z obrázku je patrné, že doba enzymu (Faktor A) nemá až takový význam při extrakci jako teplota (Faktor B) a doba extrakce (Faktor C). Účinnost extrakce roste se zvyšující se teplotou extrakce a s prodlužováním doby extrakce.



Obrázek 33: Interakce sledovaných faktorů na účinnost extrakce želatiny první frakce

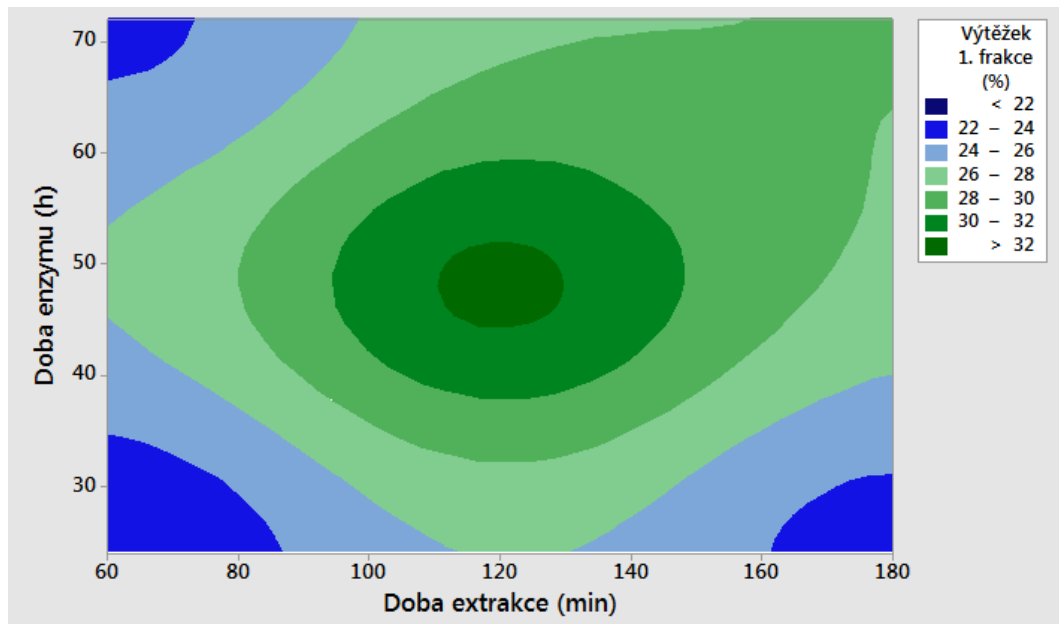
Obrázek č. 34 popisuje vliv faktorů A a B na účinnost extrakce želatiny první frakce. Lze si povšimnout, že nejlepší účinnost extrakce byla okolo středních teplot extrakce a to přibližně 72 °C. Nejvhodnější doba enzymového opracování suroviny je podle tohoto grafu přibližně okolo 48 hodin. Velice krátké doby opracování enzymem a i nízké teploty ex-

trakce, nemají příliš velkou účinnost. Naopak vysoké doby opracování enzymem jsou zbytečné a časově nepříjemné pro uvedení do praxe. Maximální výtěžnost byla 45,3 %.



Obrázek 34: Vrstvený graf vlivů faktorů A a B na účinnost extrakce želatiny první frakce

Na obrázku č. 35 lze vidět vliv faktorů A a C na účinnost extrakce želatiny první frakce. Zpracování je formou vrstevnatého grafu. Nejvíce optimální jsou střední doby extrakcí a to okolo 120 minut. Doba působení enzymu je také v oblasti středních hodnot a to okolo 48 hodin, jako tomu bylo v případě obrázku č. 34. Zároveň si lze všimnout, že vysoké a nízké doby působení enzymu nemají kladný vliv na účinnost extrakce. Krátké extrakce doby také nejsou vhodné na vysokou účinnost extrakce. Maximální účinnost extrakce byla 45,3 %, kde: doba enzymového opracování byla 48 hodin (Faktor A), teplota extrakce 72 °C (Faktor B), doba extrakce 120 minut (Faktor C).



Obrázek 35: Vrstvený graf vlivů faktorů A a C na účinnost extrakce želatiny první frakce

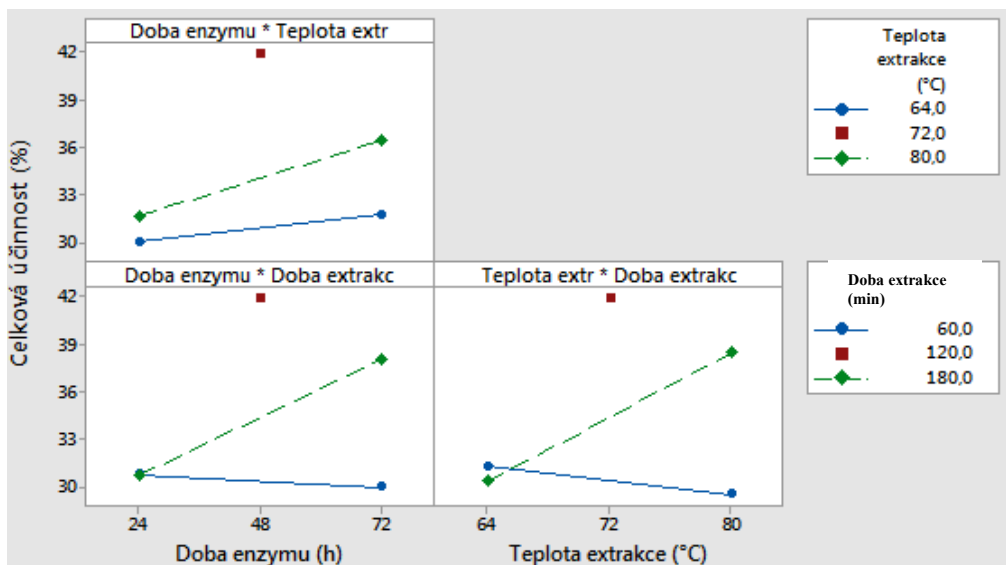
### 8.1.2 Celková účinnost extrakce

Rovnice celkové účinnosti extrakce byla:

$$\text{Účinnost} = -65,6 + 23,9 \text{ Doba enzymu} + 2,36 \text{ Teplota} + 1,24 \text{ Doba extrakce}$$

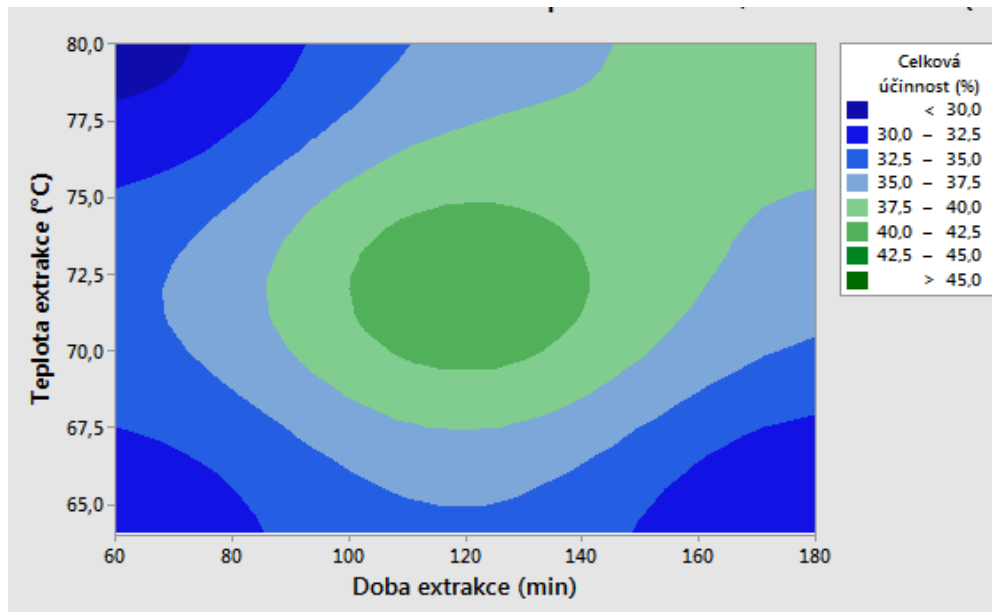
Podle p-faktor bylo opět jak množství přidaného enzymu, tak teplota a doba extrakce nevýznamné. Hodnoty činily 0,126, 0,185 a 0,802. Hodnota  $R^2$  se rovnala 42,78 %.

Na obrázku č. 36, který je vyobrazen níže, lze pozorovat vlivy jednotlivých interakcí faktorů A, B, a C na celkovou účinnost extrakce. Nejvyšší celkové účinnosti extrakce bylo dosaženo u experimentu č. 10 (viz tabulka č. 8), kdy jeho celková účinnost byla 45,3 %. Naopak nejmenší celkovou účinnost extrakce byla u experimentu č. 11, který představoval slepý pokus bez přídavku enzymu. Hodnota celkové účinnosti byla pouhých 26,5 %. Velkou část však u tohoto experimentu představoval tuhý zbylý podíl, který se při extrakci nerozložil. Množství zbylého podílu bylo 70 %, což byly zbylé kosti, které se při extrakci nerozložily.

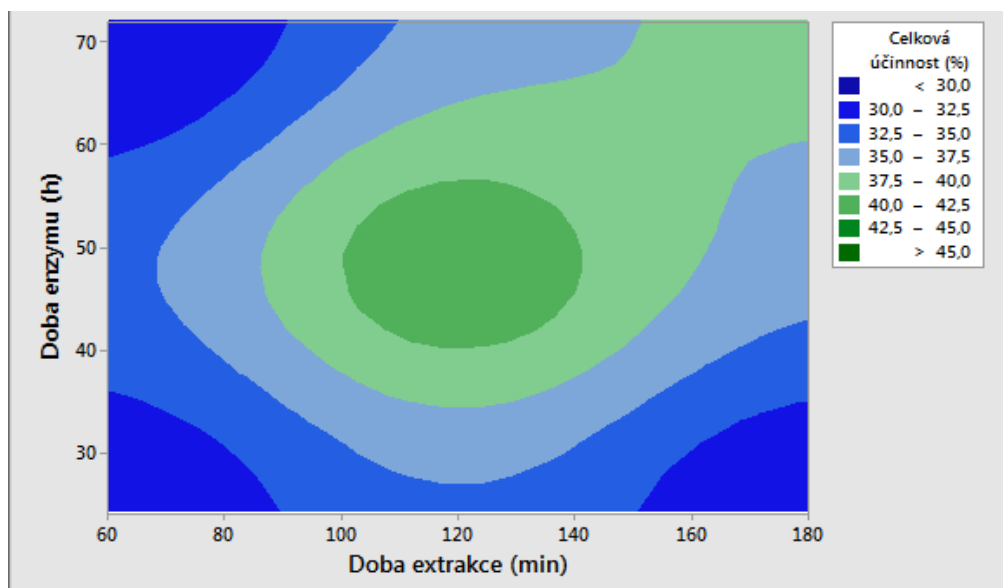


Obrázek 36: Interakce sledovaných faktorů na celkovou účinnost extrakce

Obrázek č. 37 vykresluje vrstvený graf vlivů faktorů B a C na celkovou účinnost extrakce. Se zvyšující se dobou a teplotou extrakce celková účinnost extrakce rostla. Největší však celková účinnost je v oblasti doby extrakce 120 – 140 minut. Nejvíce ideální teplota při extrakci je v rozmezí 68 – 74 °C. V této oblasti je celková účinnost extrakce nad 40 %. Nejvyšší celkové účinnosti extrakce bylo dosaženo u experimentu č. 10 (viz. tabulka č. 8), kdy jeho celková účinnost byla 45,3 %. Nejmenší celkovou účinnost extrakce byla u experimentu č. 11, který představoval slepý pokus bez přídavku enzymu. Hodnota celkové účinnosti byla pouhých 26,5 %.



Obrázek 37: Vrstvený graf vlivů faktorů B a C na celkovou účinnost extrakce



Obrázek 38: Vrstvený graf vlivů faktorů A a C na celkovou účinnost extrakce

Na obrázku č. 38 je vyobrazen graf vlivu faktorů A a C na celkovou účinnost extrakce. Nejlepší doba pro extrakci je v rozmezí 120 – 140 minut, kde byla celková účinnost extrakce nad 40 %. Nejvýhodnější doba působení enzymu na celkovou účinnost extrakce byla okolo 50 hodin.

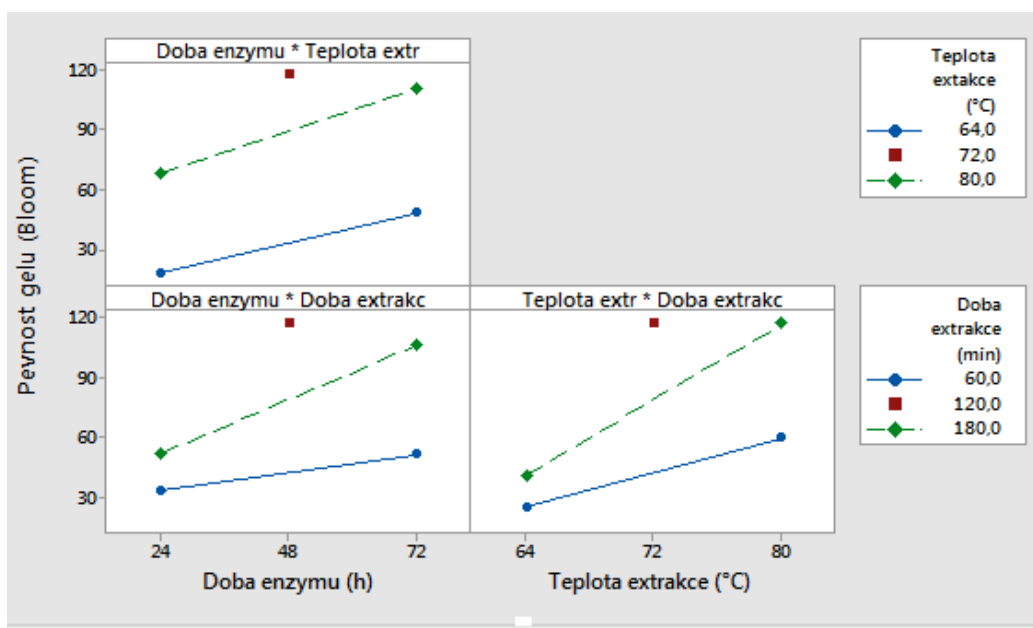
### 8.1.3 Pevnost gelu želatiny první frakce

Rovnice pevnosti gelu 1. frakce želatiny byla:

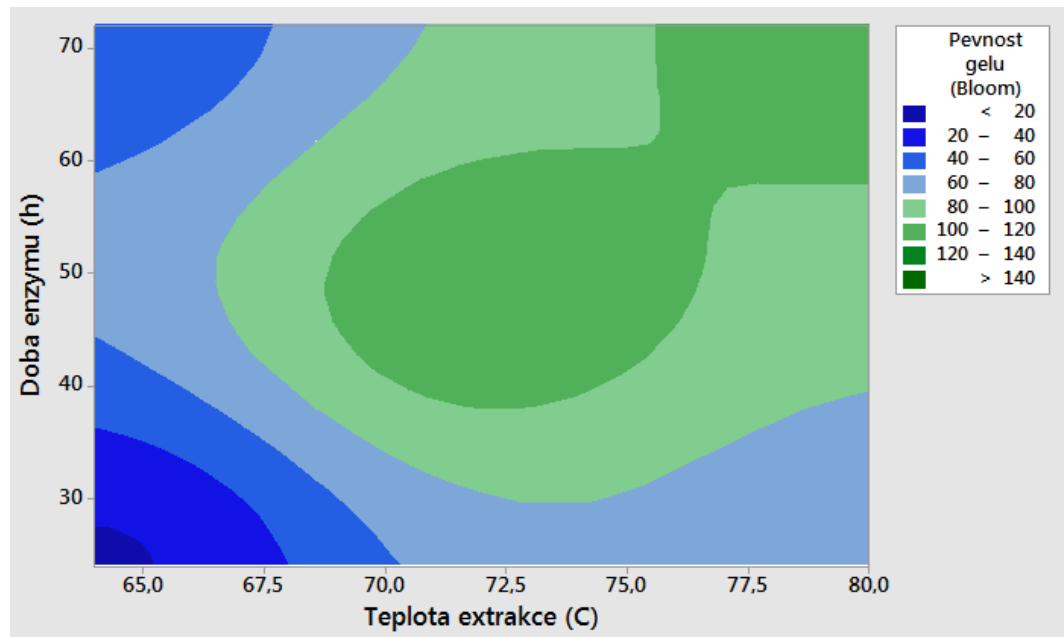
$$\text{Pevnost} = -162 + 24,2 \text{ Doba enzymu} + 3,45 \text{ Teplota} + 7,1 \text{ Doba extrakce}$$

Podle p-faktor bylo znova jak množství přidaného enzymu, tak teplota a doba extrakce nevýznamné. Hodnoty činily 0,695, 0,736 a 0,787. Hodnota  $R^2$  se rovnala pouhým 4,58 %.

V obrázku č. 39 vyobrazeném níže, jsou uvedeny vlivy interakcí sledovaných faktorů A, B a C na celkovou pevnost vytvořeného želatinového gelu. Z vyobrazených výsledků lze vyčíst, že pevnost gelu je hlavně závislá na teplotě extrakce a na době extrakce. Doba působení enzymu nemá zásadní vliv na celkovou pevnost želatinového gelu. Pro větší pevnosti gelu jsou vhodnější střední teploty extrakce okolo 72 °C a doby extrakce okolo 120 minut.



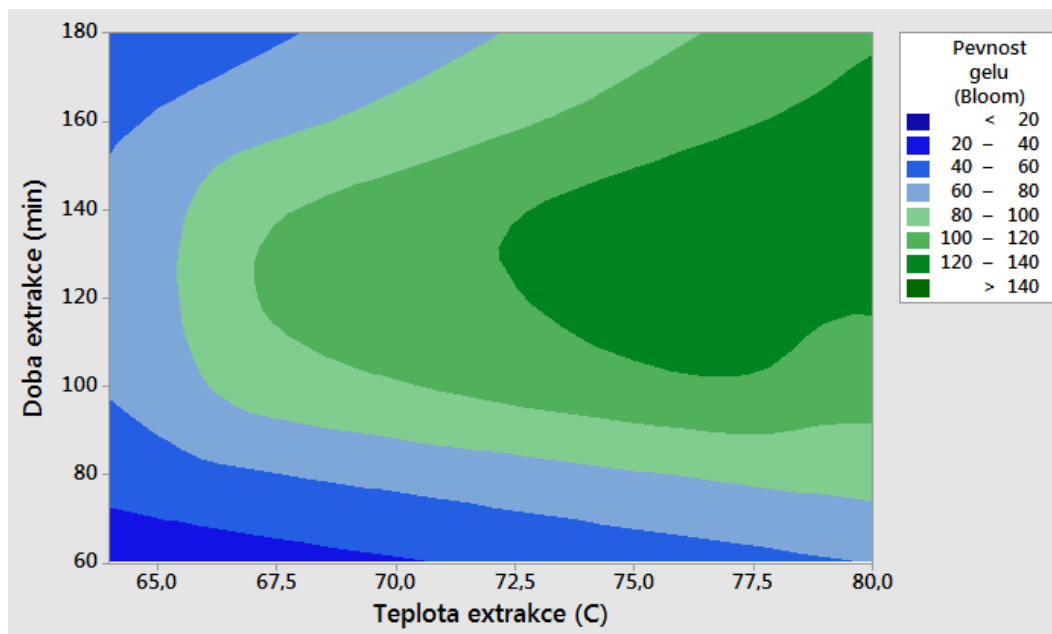
Obrázek 39: Vliv interakcí sledovaných faktorů na pevnosti gelu



Obrázek 40: Vrstvený graf vlivů faktorů A a B na pevnost gelu

Na obrázku č. 40 je vyobrazený vrstevnatý graf vlivů faktorů A a B na pevnost gelu. Je patrné, že se zvyšující se dobou enzymu pevnost gelu klesá a zároveň se snižující se teplotou extrakce taktéž pevnost gelu klesá. Nejvhodnější oblast teplot pro extrakce v závislosti na pevnost gelu je v rozmezí 70 °C – 80 °C. Doba působení enzymu na celkovou pevnost gelu je nejlepší v oblasti okolo 50 hodin. Nejlepší pevnost gelu vykazoval vzorek z experimentu č. 8, které měl nastavené faktory extrakce: doba enzymového opracování 72 hodin (Faktor A), teplota extrakce 80 °C (Faktor B), doba extrakce 180 minut (Faktor C). Pevnost takového vzniklého gelu měla hodnotu  $158 \pm 2$ . Naopak nejmenší pevnost gelu představoval experiment bez přídavku enzymu, zvaný slepý pokus. Tento experiment vykazoval pevnost gelu pouhých 3 Bloom.

Na níže uvedeném obrázku č. 41 je patrné, že nejvyšší pevnosti gelu bylo dosaženo při extrakci o oblasti teplot od 72,5 °C až do 80 °C. Pevnost takto vzniklého želatinového gelu měla hodnotu okolo 140 Bloom. Nízké teploty extrakce naopak vykazovaly malé pevnosti gelu. Hodnoty takto vzniklých želatinových gelů byly pouze okolo 10 Bloom. Nejvíce ideální doba působení enzymu pro dosažení vyšších pevností gelu by měla být okolo 120 až 140 minut.



Obrázek 41: Vrstvený graf vlivů faktorů B a C na pevnost gelu

#### 8.1.4 Obsah popelovin želatiny první frakce

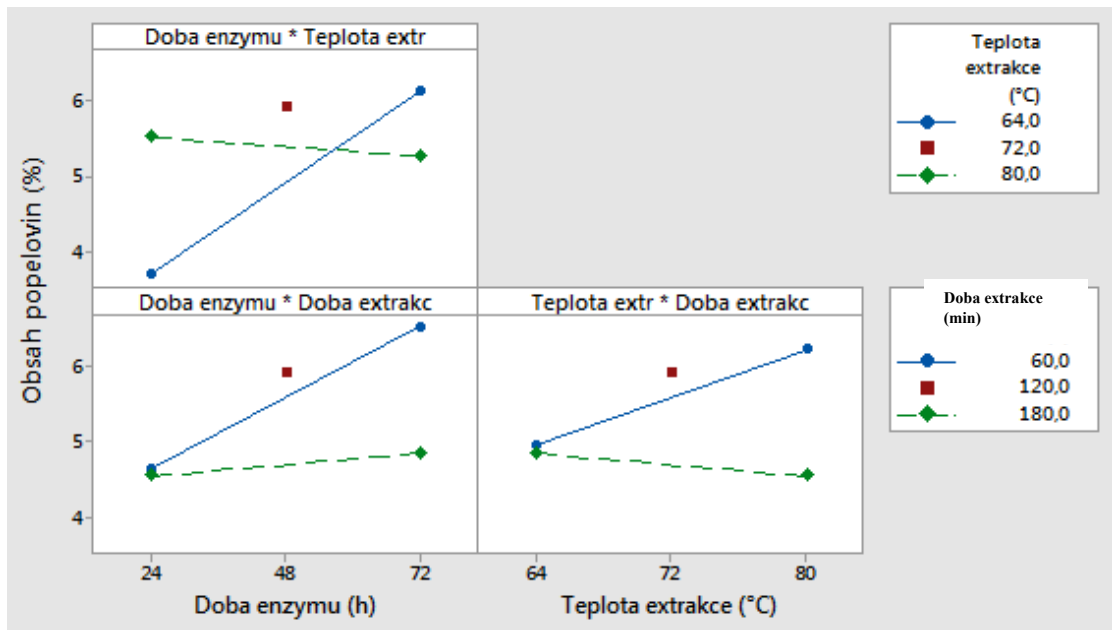
Rovnice obsahu popelovin 1. frakce želatiny byla:

$$\text{Popel} = 9,3 + 1,35 \text{ Doba enzymu} - 0,034 \text{ Teplota} - 0,462 \text{ Doba extrakce}$$

Podle p-faktor bylo jak množství přidaného enzymu, tak teplota a doba extrakce nevýznamné. Hodnoty činily 0,642, 0,844 a 0,736. Hodnota  $R^2$  se rovnala pouze 4,26 %.

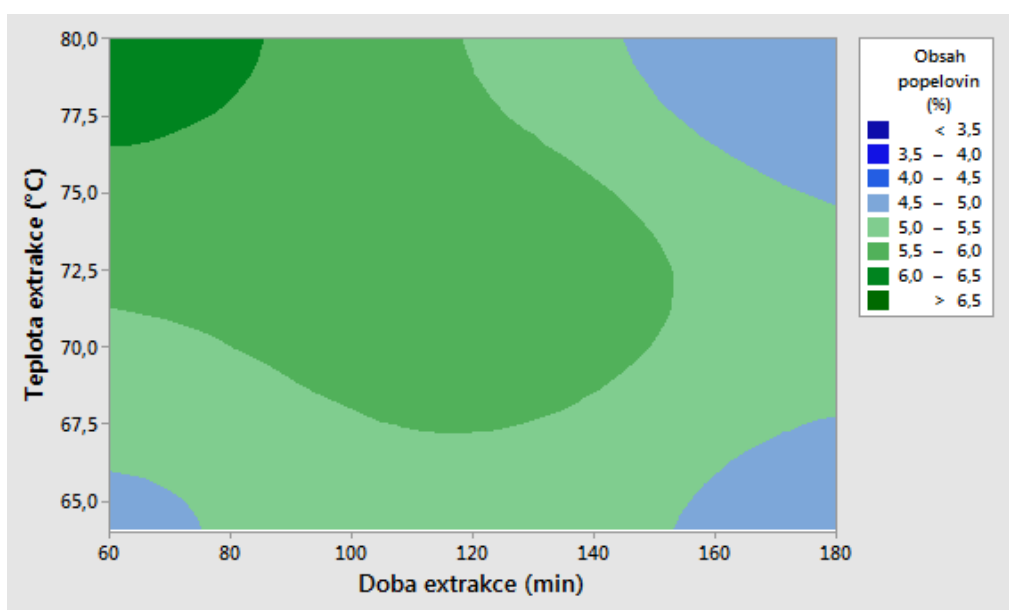
Na obrázku č. 42 je vyobrazen vliv interakcí sledovaných faktorů na celkový obsah popelovin ve vyextrahované želatině první frakce. Nejvyšší obsah popelovin byl zjištěn u experimentu č. 5 (viz tabulka č. 9). Obsah popelovin u tohoto vzorku byl  $6,7 \pm 0,4$  %. V lineární závislosti na teplotě je obsah popelovin větší při nižších teplotách extrakce a to okolo 64 °C. Při teplotách extrakce kolem 80 °C se obsah popelovin snižuje přibližně na 5 %. Doba extrakce má také vliv na obsah popelovin ve vzorku. Při době extrakce 60 minut se obsah popelovin pohybuje okolo 6 %. Naopak při delší době extrakce 180 minut se obsah popelovin u vzorku pohyboval okolo 4,5 %. Hodnoty popelovin všech vzorků jsou vyobrazeny v tabulce č. 9. Pohybují se v intervalu 2,1 % – 6,7 %.





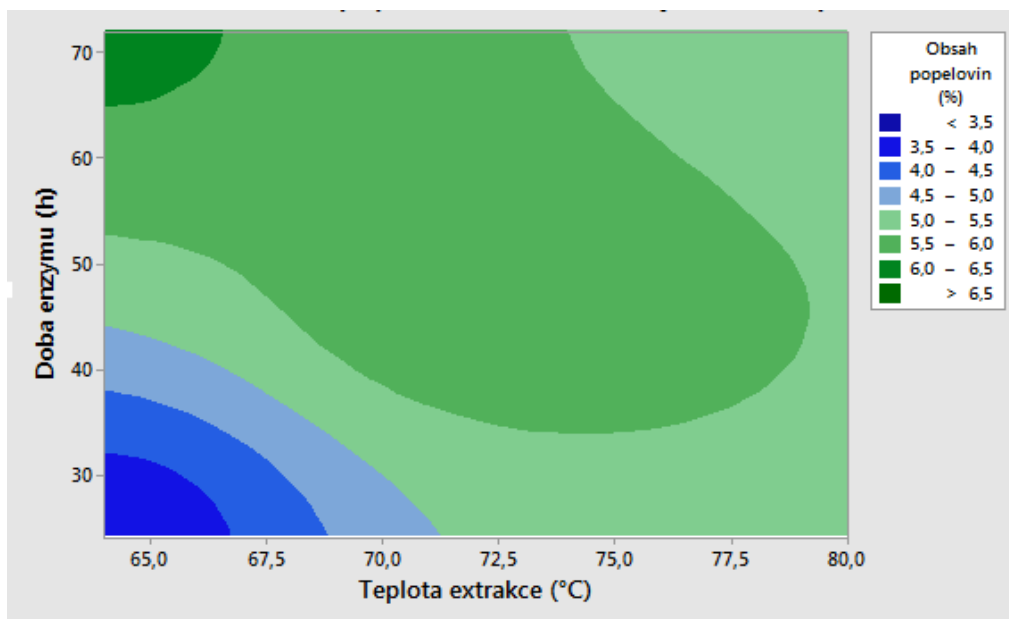
Obrázek 42: Vliv interakcí sledovaných faktorů na obsah popelovin

Na níže uvedeném obrázku č. 43 je znázorněn vrstvený graf vlivu faktoru B (teplota extrakce) a faktoru C (doba extrakce) na obsah popelovin. Je patrné, že při vyšších teplotách extrakce okolo 80 °C se vyextrahovalo želatiny s větším obsahem popelovin a to až kolem 6 %. Naopak delší doba extrakce měla tendenci obsah popelovin snižovat. Obsah popelovin při době extrakce 160 – 180 minut byl pouze kolem 4 %.

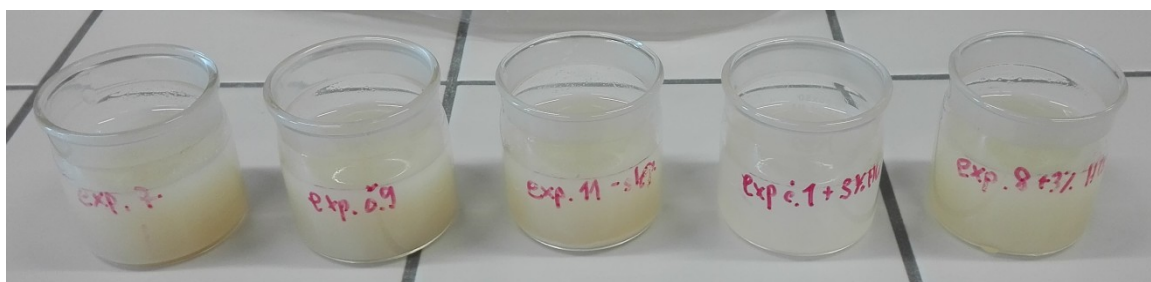


Obrázek 43: Vrstvený graf vlivů faktorů B a C na obsah popelovin

Na obrázku č. 44 je vyobrazen vrstvený graf vlivů faktorů A a B na obsah popelovin ve vyextrahovaných želatinách. Se zvyšující se dobou enzymového opracování roste obsah popelovin ve vyextrahované želatině. Při době opracování enzymem kolem 70 hodin se obsah popelovin pohyboval 6 % – 6,5 %. Naopak při krátkých dobách opracování enzymem, přibližně kolem 30 hodin se obsah popelovin pohyboval zhruba okolo 3,5 % – 4 %. Teplota extrakce měla také vliv na obsah popelovin ve vzorcích a to tak, že při nižších teplotách extrakce kolem 65 °C, byl obsah popelovin menší a to okolo 3,5 %. Při vyšších teplotách extrakce okolo 80 °C, byl obsah popelovin v intervalu 5 % – 5,5 %.



Obrázek 44: Vrstvený graf vlivů faktorů A a B na obsah popelovin



Obrázek 45: Znázornění odstínů želatin po měření čírosti

Na obrázku č. 45 jsou vyobrazeny vybrané želatinové roztoky po měření čírosti. Vzorky vykazovaly čírost v intervalu od 1,2 T do 2,2 T. Nejlepší čírost vykazoval experiment č. 3, kdy jeho hodnota čírosti byla 1,243 T. Naopak nejhorší čírost měl experiment č. 11, což

byl slepý pokus bez přídavku enzymu. Jeho hodnota čirosti byla 2,2324 T. Výsledky čirosti všech experimentů, jsou uvedeny v tabulce č. 9.

Bylo také provedeno měření pevnosti želatin druhé (vedlejší) frakce. Extrakce druhé frakce však neměla takovou výtěžnost želatiny, proto se smíchaly dohromady želatiny druhé frakce vyextrahované při stejné teplotě. Želatiny druhé frakce extrahované při teplotě 88 °C vytvořily gel o pevnosti 23 Bloom. Obsah popelovin byl  $4,24 \pm 0,11$  %. Želatiny druhé frakce vyextrahované při teplotě 98 °C vytvořily gel o pevnosti 29 Bloom s obsahem popelovin  $5,14 \pm 0,16$  %.

## 8.2 Optimalizační fáze experimentu

Po vyhodnocení primární fáze bylo zjištěno, že doba enzymového opracování (Faktor A) nemá, až takový vliv na kvalitu a výtěžnost při extrakci. Proto doba enzymového opracování se stanovila na 48 hodin. Provedení experimentů bylo již prováděno podle schématu  $2^2 + 1$  centrální (středový) experiment. V optimalizační části se proto soustředilo zejména na teplotu extrakce (Faktor A) a dobu extrakce (Faktor B) při extrakci želatiny první frakce. Faktor A byl v intervalu teplot 70 – 80 °C a Faktor B byl v intervalu dob 100 – 200 minut. Pro extrakci vedlejší želatinové frakce se navrhly dva faktory. Faktor C reprezentoval teplotu extrakce želatiny druhé frakce. Tato teplota byla stanovena na 90 °C. Faktor D reprezentoval dobu extrakce želatiny druhé frakce a byl v intervalu 0,5 – 6 hodin. Rozpis jednotlivých experimentů s technologickými podmínkami jsou uvedeny v tabulce č. 12.

V tabulce č. 10 jsou vyobrazeny výsledky účinnosti extrakcí i s bilanční chybou. Výtěžek želatiny první frakce se pohyboval u zvolených pěti experimentů v intervalu 21,74 % – 31,2 %. Nejvyšší výtěžnost želatiny první frakce měl experiment č. 4, při teplotě extrakce (Faktor A) 80 °C a době extrakce (Faktor B) 3 hodin. Celková účinnost tohoto experimentu byla 41,5 %. Nejmenší celkovou účinnost extrakce vykazoval experiment č. 1, kdy byla pouhých 28,7 %. Velkou část představoval nerozložený tuhý podíl po extrakci.

V tabulce č. 11 jsou uvedeny výsledky pevností gelu, obsah popelovin, pH 1,5 % roztoku, viskozita, čírost a sušina želatiny první frakce. Pohybovaly se v rozmezí 46 – 149 Bloom. Kdy největší pevnost gelu měl experiment č. 4 a to 149 Bloom, při teplotě extrakce 80 °C a době extrakce 20 minut. Nejnižší pevnost gelu vykazoval experiment č. 1, který měl nastavenou teplotu extrakce 70 °C a dobu extrakce 100 minut. Obsah popelovin se pohyboval v intervalu 2,93 – 4,12 %. Množství popelovin ve vzorku je vysoké například pro použití ve farmacii či v potravinářství, kde je vyžadován obsah popela do 2 % ve vzorcích.

Za větší obsah popelovin ve vzorcích může velké množství minerálních látek v kostní tkáni. Snížení obsahu popelovin by se docílilo lepší optimalizací postupu při přípravě suroviny k extrakci, nebo použitím iontoměníčů.

Tabulka 10: Rozpis jednotlivých experimentů pro optimalizační část s vybranými technologickými podmínkami a jejich výsledky

Experiment č.	Technologické podmínky extrakce 1. frakce želatin		Technologické podmínky extrakce 2. a 3. frakce želatin		Charakterizace procesu					
	Faktor A Teplota extrakce želatiny 1 [°C]	Faktor B Doba extrakce želatiny 1 [min]	Faktor C Teplota extrakce želatiny 2 [°C]	Faktor D Doba extrakce želatiny 2 [h]	Výtěžek hydrolyzátu [%]	Výtěžek 1. želatiny [%]	Výtěžek 2. želatiny [%]	Množství tuhého podílu [%]	Celková účinnost extrakce [%]	Bilanční chyba [%]
1	70	100	90	0,5	4,6	21,74	2,32	63,12	28,66	8,22
2	80	100	90	1	5,2	26,42	4,12	59,24	35,74	5,02
3	70	200	90	1,5	4,8	25,21	4,68	55,36	34,69	9,95
4	80	200	90	3	5,1	31,2	5,23	57,46	41,53	1,01
5	75	150	90	6	4,8	30,8	6,24	56,24	41,84	1,92

Tabulka 11: Rozpis jednotlivých experimentů pro optimalizační část s vybranými technologickými podmínkami a jejich výsledky

Experiment č.	Technologické podmínky extrakce 1. frakce hydrolyzátů/želatin		Charakterizace připravených hydrolyzátů/želatin					
	<b>Faktor A</b> Teplota extrakce želatiny 1 [°C]	<b>Faktor B</b> Doba extrakce želatiny 1 [min]	Pevnost gelu [Bloom]	Obsah popela * [%]	pH [-]	Viskozita [mPa.s]	Čírost [T]	Sušina [%]
1	70	100	46±2	3,42±0,15	8,12	2,38±0,11	1,912±0,002	91,35±0,06
2	80	100	68±4	4,12±0,06	8,03	2,96±0,06	2,122±0,003	92,0±2,0
3	70	200	126±3	2,93±0,13	7,78	2,58±0,18	2,171±0,005	90,4±0,3
4	80	200	149±6	3,63±0,11	8,02	3,01±0,08	2,541±0,008	92,36±0,01
5	75	150	82±2	3,2±0,2	7,96	2,27±0,17	2,253±0,002	92±1

\* - % v sušině vyextrahovaného produktu

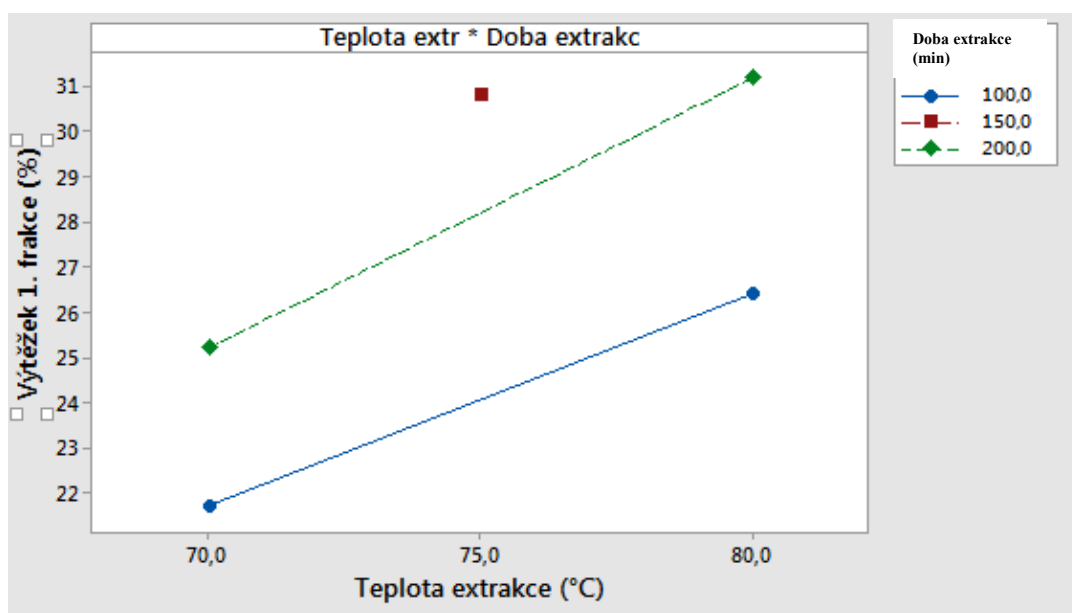
### 8.2.1 Účinnost extrakce želatiny první frakce

Rovnice účinnosti 1. hlavní extrakce byla:

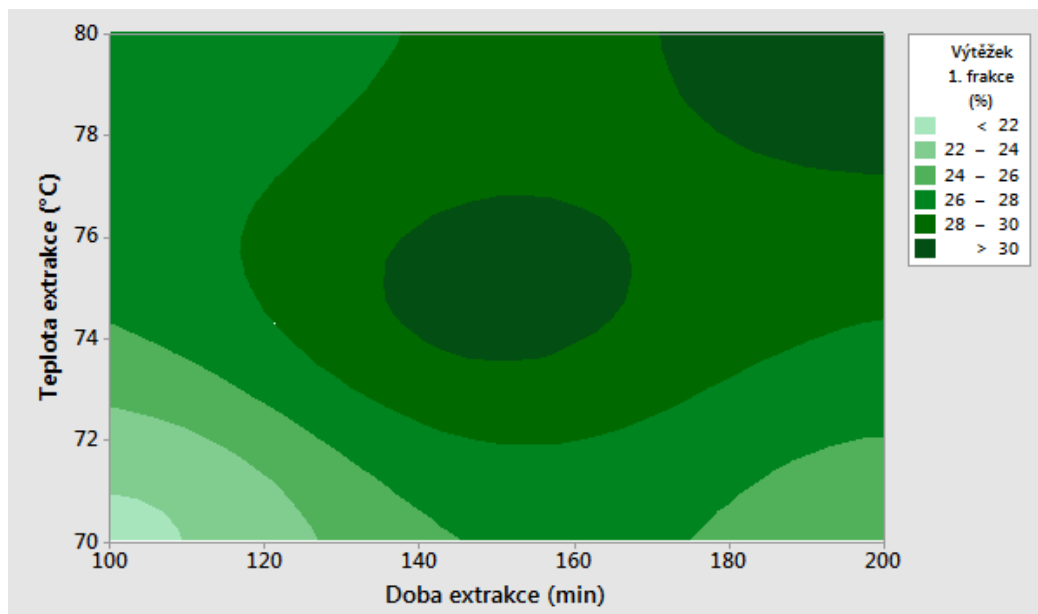
$$\text{Účinnost} = -5,7 + 210,9 \text{ Doba extrakce} + 0,203 \text{ Teplota extrakce}$$

Podle p-faktor bylo množství přidaného enzymu významné, činilo 0,004, ale teplota extrakce byla nevýznamná. Hodnota byla 0,822. Hodnota  $R^2$  se rovnala 92,45 %.

Na obrázku č. 46 vyobrazeném níže je znázorněn vliv faktoru B na účinnost extrakce želatiny první frakce. Lze vidět, že s delší dobou extrakce se zvětšuje účinnost extrakce, pro dobu extrakce 100 minut, tak i pro dobu extrakce 200 minut. Zároveň lze vypořadovat, že s větší teplotou extrakce narůstá účinnost extrakce želatiny první frakce. V tabulce č. 12 vidíme účinnosti extrakcí želatiny první frakce u jednotlivých experimentů. Nejmenší výtěžnost želatiny první frakce měl experiment č. 1 a to pouhých 21,7 %, při době extrakce 100 minut a teplotě extrakce 70 °C. Největší účinnost měl experiment č. 4 a to 31,2 %, při době extrakce 200 min a teplotě extrakce 80 °C.



Obrázek 46: Vliv faktoru A na účinnost 1. extrakce při různé době extrakce



Obrázek 47: Vrstvený graf vlivů faktoru A a B na účinnost 1. extrakce

Na obrázku č. 47 je znázorněný vrstvený graf vlivů faktor A a B na účinnost extrakce želatiny první frakce. Z grafu lze vyčíst, že oblast teplot pro vyšší účinnost extrakcí první frakce želatiny, se nachází okolo 73 – 80 °C. Doba extrakce pro želatinu první frakce je nejvhodnější v rozmezí 135 – 200 minut.

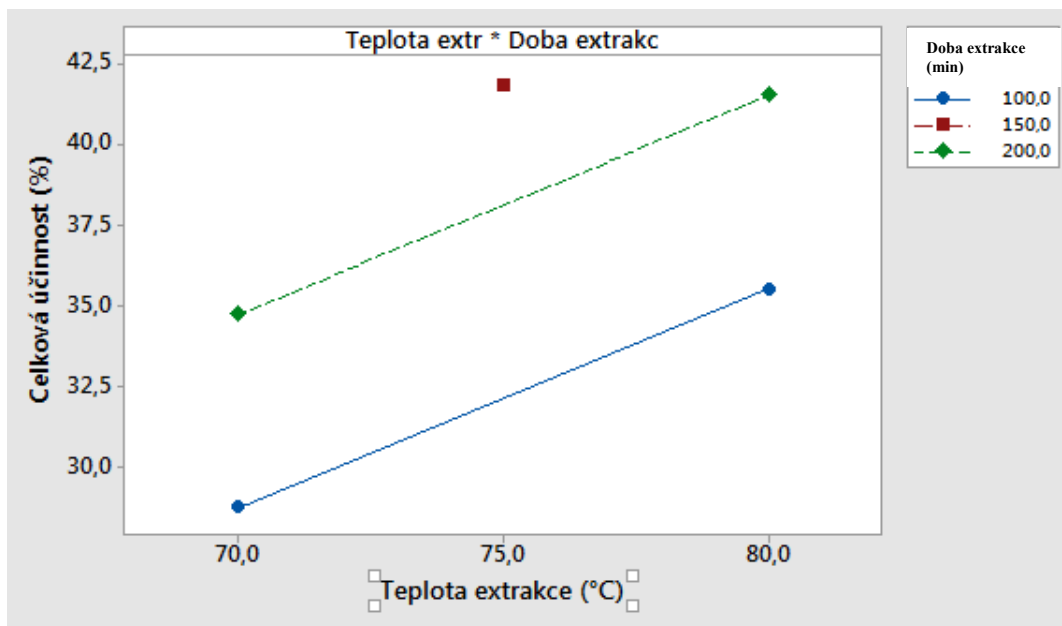
### 8.2.2 Celková účinnost extrakce

Rovnice celkové účinnosti extrakce byla:

$$\text{Účinnost} = 158 + 142,5 \text{ Doba extrakce} - 3,24 \text{ Teplota extrakce}$$

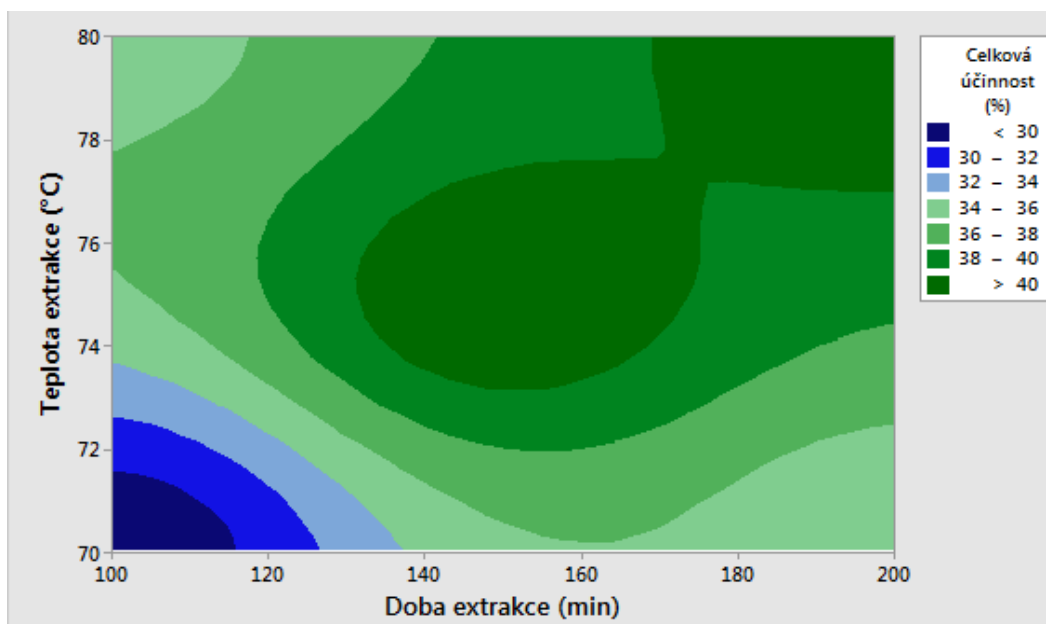
Podle p-faktor bylo množství přidaného enzymu významné, činilo 0,018, ale teplota extrakce byla nevýznamná. Hodnota byla 0,269. Hodnota  $R^2$  se rovnala 94,56 %.





Obrázek 48: Vliv faktoru A na celkovou účinnost extrakce při různé době extrakce

Obrázek č. 48 znázorňuje vliv faktorů A na celkovou účinnost extrakce při různé době extrakce. Na základě tohoto vyobrazeného grafu lze vyvodit závěr, že se vzrůstající teplotou extrakce a dobou extrakce se zvyšuje účinnost celkové extrakce. Nejvyšší celková účinnost byla u experimentu č. 5, což byl středový experiment. Tento experiment měl celkovou účinnost 41,8 %. Naopak nejmenší celkovou účinnost měl experiment č. 7 a to pouze 28,7 %. Celkové účinnosti experimentů jsou uvedeny v tabulce č. 12.



Obrázek 49: Vrstvený graf vlivů faktoru A a B na celkovou účinnost extrakce

Obrázek č. 49 popisuje vlivů faktoru A a B na celkovou účinnost extrakce. Největší celková výtěžnost je v oblasti doby extrakce 135 – 200 minut a teplotě extrakce 73 – 80 °C. Naopak malé výtěžnosti extrakce se dosahuje v oblasti menších teplot a to 70 °C a kratší době kolem 100 minut. Nejvíce však časově a energeticky výhodná oblast celkové výtěžnosti extrakce je okolo teploty 74 °C a doby 140 minut. Tyto podmínky se také potvrdily, jak je možno vidět v tabulce č. 10, kdy středový experiment měl při době extrakce 150 minut a teplotě extrakce 75 °C největší celkovou výtěžnost ze všech experimentů. Celková výtěžnost středového experimentu byla 41,8 %.

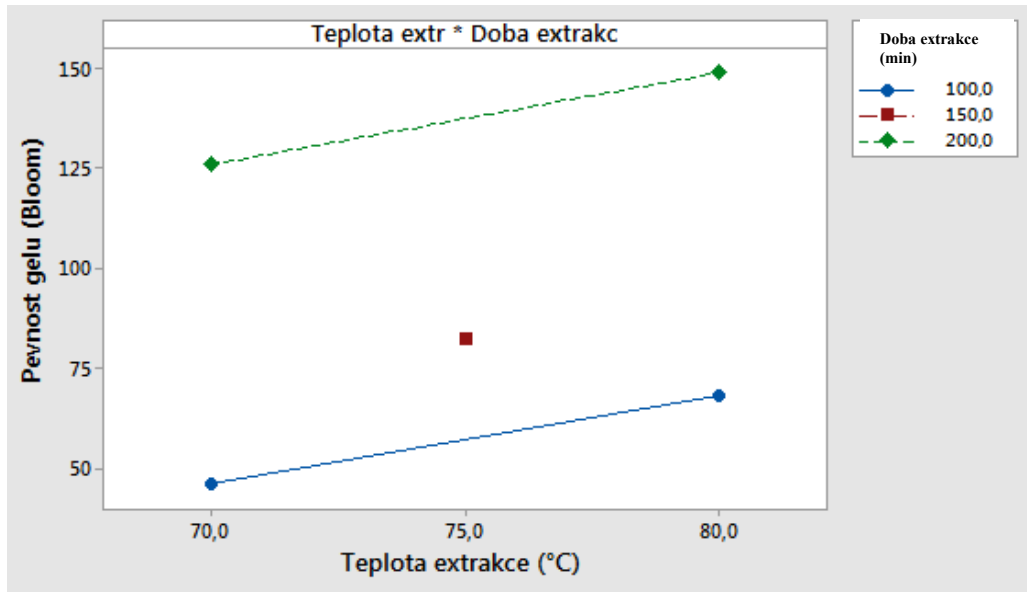
### 8.2.3 Pevnost gelu želatiny první frakce

*Rovnice pevnosti gelu 1. frakce želatiny byla:*

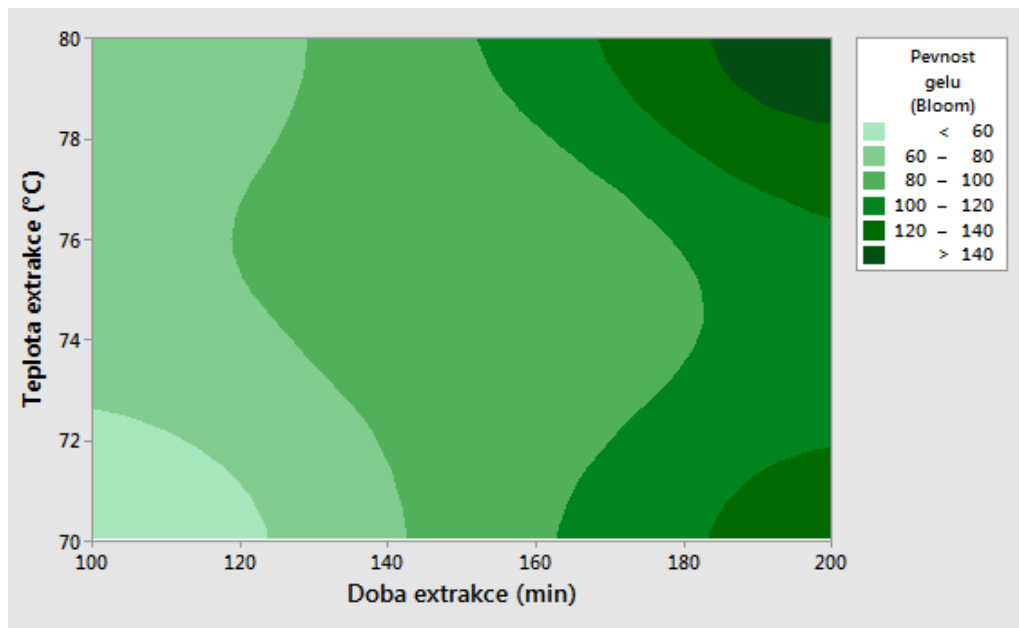
$$Pevnost = -989 - 1086 \text{ Doba extrakce} + 21,4 \text{ Teplota extrakce}$$

Podle p-faktor bylo množství přidaného enzymu a teplota extrakce nevýznamné. Hodnoty byly 0,092 a 0,295. Hodnota  $R^2$  se rovnala 92,64 %.

Na obrázku č. 50 vliv faktoru A na pevnost gelu při různé době extrakce. Z vyhodnocených dat lze vyčíst, že při větších teplotách extrakce narůstala pevnost želatinového gelu. Tato závislost je poměrně lineární. Zároveň se zjistilo, že při delších dobách extrakce narůstala pevnost želatinového gelu taktéž. Jak je z grafu patrné, tak i z tabulky č. 11, že při stejné teplotě extrakce, ale při delší době extrakce, je pevnost gelu vyšší. Lze si toho povšimnout, jak u teploty 70 °C, tak i u teploty 80 °C. Rozdíly mezi takovými želatinami v pevnosti gelu je přibližně 20 – 25 Bloom.



Obrázek 50: Vliv faktoru A na pevnost gelu při různé době extrakce



Obrázek 51: Vrstvený graf vlivů faktoru A a B na pevnost gelu

Obrázek č. 51 popisuje vrstevnatý graf vlivů faktoru A a B na pevnost gelu želatin po optimalizaci zpracovatelského procesu. Z grafu je zřejmé, že při delších dobách extrakcí se získaly želatiny o vyšší pevnosti gelu, než extrakce při krátkých dobách. Teplota při extrakci má také vliv na pevnost vzniklého želatinového gelu. Při teplotě extrakce 70 °C vznikaly želatiny o menší pevnosti gelu. V oblasti teplot extrakce okolo 80 °C a době extrakce 200 minut vznikaly želatiny o pevnosti gelu okolo 145 Bloom. V opačném případě v oblasti teplot okolo 70 °C a době extrakce 100 minut vznikaly želatiny o pevnosti gelu

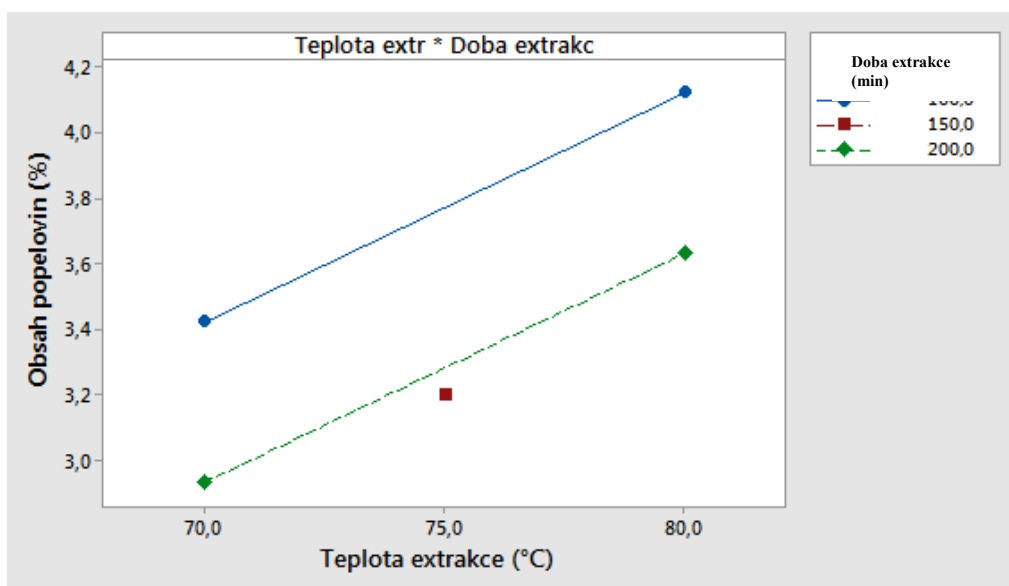
kolem 50 Bloom. Hodnoty pevnosti gelu u optimalizované části jsou uvedeny v tabulce č. 11.

#### 8.2.4 Obsah popelovin želatiny první frakce

Rovnice obsahu popela 1. frakce želatiny byla:

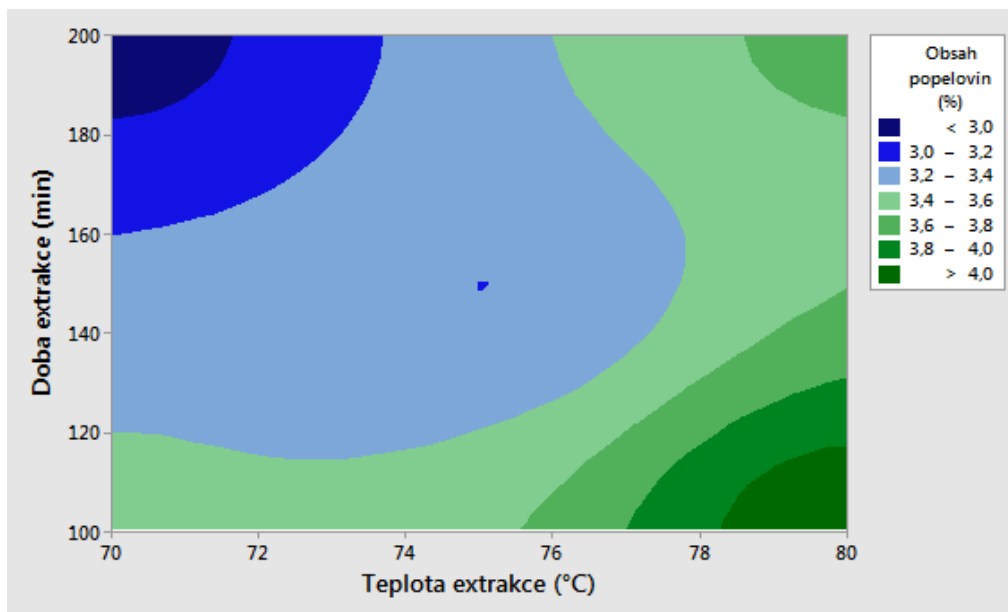
$$\text{Popel} = -4,142 - 2,234 \text{ Doba extrakce} - 0,0297 \text{ Teplota extrakce}$$

Podle p-faktor bylo množství přidaného enzymu významné a teplota extrakce byla nevýznamné. Hodnoty byly 0,006 a 0,078. Hodnota  $R^2$  se rovnala 96,48 %.



Obrázek 52: Vliv faktoru A na obsah popelovin při různé době extrakce

Obrázek č. 52 popisuje vliv faktoru A na obsah popelovin při různé době extrakce. Je zde znázorněn obsah popelovin, který se mění vzhledem k časové délce extrakce želatin. Nejmenší obsah popelovin byl zjištěn u experimentu č. 3, kdy obsah popela byl 2,93 %. Tato želatina se získala extrakcí při teplotě 70 °C a době extrakce 200 minut. Naopak největší obsah popelovin byl u experimentu č. 2, kdy obsah jeho popelovin byl 4,12 %. Tato želatina s velkým obsahem popelovin byla získána při teplotě extrakce 80 °C a době extrakce 100 minut. Přehledný obsah popelovin ve vzorcích želatin pro optimalizační část, je uveden v tabulce č. 11.

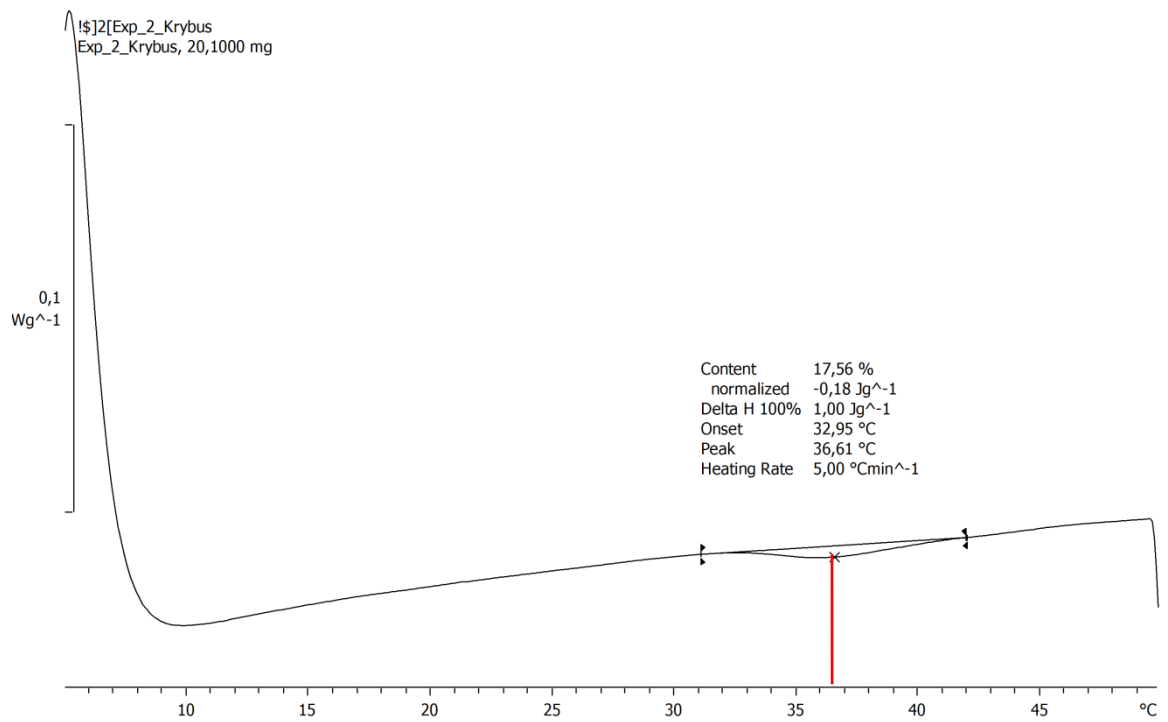


Obrázek 53: Vrstvený graf vlivů faktoru A a B na obsah popelovin

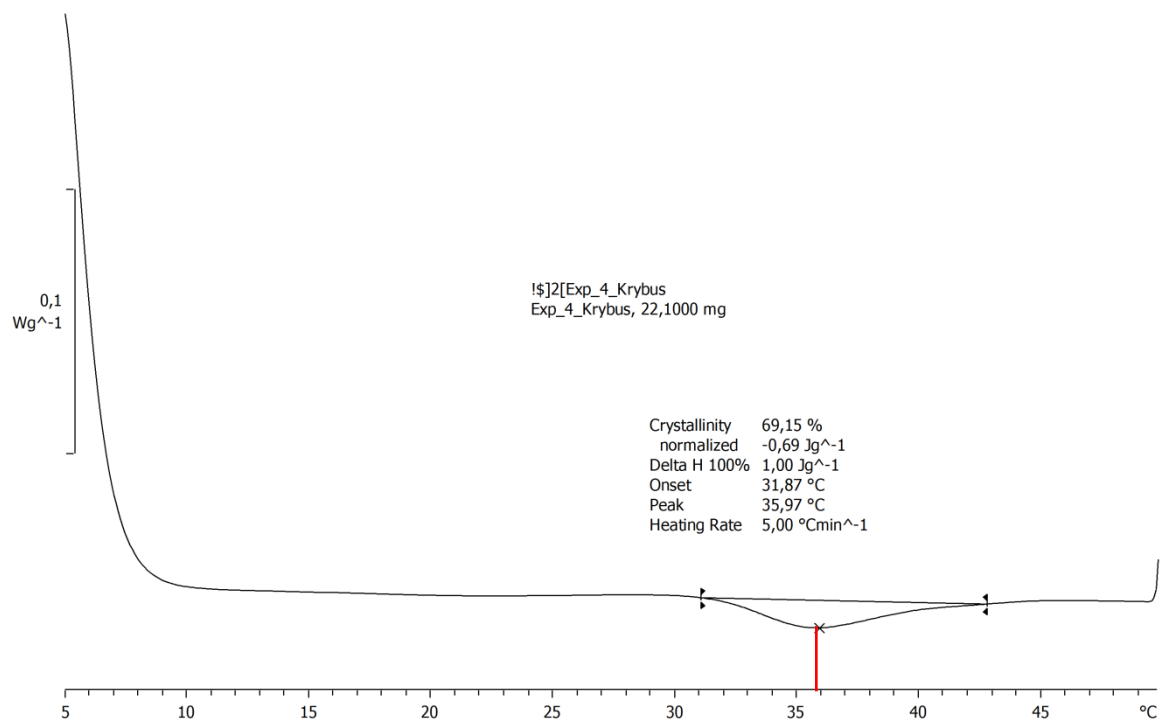
Obrázek č. 53 popisuje vrstvený graf vlivů faktoru A a B na obsah popelovin po optimalizaci zpracovatelského postupu. Z grafu lze vyčíst, že větší obsah popelovin u vzorků želatin se nachází v oblasti při vyšších teplotách extrakce a krátké době extrakce. Lze si tohoto trendu i povšimnout v tabulce č. 11, kde experiment č. 2, při teplotě 80 °C během extrakce a době extrakce 100 minut má obsah popelovin 4,12 %. Naopak delší doba během extrakce a nižší teplota má pozitivní vliv na nízký obsah popelovin ve vzorcích želatiny. Experiment č. 3 při teplotě extrakce 70 °C a době extrakce 200 minut měl obsah popelovin 2,93 % ve vzorku želatiny.

### 8.2.5 Teplota tání želatinového gelu

Obrázky č. 54 a č. 55 popisují naměřené DSC křivky teploty tání vybraných želatinových gelů. Teplota tání želatinového gelu u experimentu č. 2 je vyobrazena na obrázku č. 54. Tato želatina se extrahovala při teplotě 80 °C po dobu 100 minut. Výslednou pevnost gelu měla 68 Bloom a teplotu tání 36,6 °C. Teplota tání gelu u experimentu č. 2 je vyobrazena na obrázku č. 55. Tato želatina byla vyextrahována při teplotě 80 °C po dobu 200 minut. Pevnost u tohoto experimentu měla želatina 149 Bloom a teplotu tání 36,0 °C.



Obrázek 54: DSC křivka pro určení teploty tání želatinového gelu po optimalizaci u experimentu č. 2



Obrázek 55: DSC křivka pro určení teploty tání želatinového gelu po optimalizaci u experimentu č. 4



Obrázek 56: Porovnání želatinových roztoků po optimalizaci

Na obrázku č. 56 jsou vyobrazeny vybrané želatinové roztoky pro optimalizační část po měření čirosti. Vzorky vykazovaly čirost v intervalu od 1,9 T do 2,5 T. Nejlepší čirost vykazoval experiment č. 1, kdy jeho hodnota čirosti byla 1,912 T. Naopak nejhorší čirost měl experiment č. 4. Jeho hodnota čirosti byla 2,541 T. Výsledky čirosti všech experimentů, jsou uvedeny v tabulce č. 11.

### 8.3 Navržení optimálních podmínek pro zpracování

Cílem této diplomové práce bylo vytvořit a navrhnout podmínky pro zpracování drůbežích kostí ze separace po předešlém opracování surové suroviny enzymem, za účelem získat želatiny o co nejvyšší kvalitě. Pomocí pevnosti gelu se posoudila, jak moc je želatina kvalitní. Kvalita želatin je dána hlavně pevností gelu, ale rozhodují i fyzikálně-chemické vlastnosti, pH, obsah popelovin a jiné. Nejdříve se v primární části provedlo 11 experimentů na základě jejich vyhodnocení, se dále provedla optimalizační část s 5 experimenty, podle faktorových pokusů  $2^2 + 1$  středový (centrální) experiment. Na základě vyhodnocení optimalizačních experimentů se navrhly optimální podmínky pro zpracování kostí ze separace. Po vyhodnocení primární části se doba působení enzymu Protamex v optimalizační části stanovila na dva dny. Hlavními parametry při extrakci byla proto v optimalizační části teplota extrakce (Faktor A) a doba extrakce (Faktor B).

Nejlepší celkovou účinnost měl středový experiment při době působení 1 % enzymu Protamex, teplotě extrakce 75 °C a době extrakce 150 minut. Jeho celková účinnost byla 41,84 %. Nejvyšší výtěžnost želatiny první frakce měl však experiment č. 4, při době působení 1 % enzymu Protamex, teplotě extrakce 80 °C a době extrakce 200 minut. Výtěžnost byla 31,2 % s pevností gelu  $149 \pm 6$  bloom. Obsah popelovin se u želatin pohyboval v rozmezí 2,93 % – 4,12 %. Nejmenší obsah popelovin měl experiment č. 3, při době působení 1 % enzymu Protamex, teplotě extrakce 70 °C a době extrakce 200 minut. Pevnost u tohoto experimentu byla  $126 \pm 3$  Bloom. Naopak největší obsah popelovin měl experiment

č. 2, při době působení 1 % enzymu Protamex, teplotě extrakce 80 °C a době extrakce 100 minut. Tato želatina měla pevnost gelu  $68 \pm 4$  bloom. Nejmenší pevnost gelu vykazoval experiment č. 1, při době působení 1 % enzymu Protamex, teplotě extrakce 70 °C a době extrakce 100 minut. Jeho pevnost byla pouhých  $46 \pm 2$  Bloom a výtěžnost želatiny první frakce 21,74 %.

Nejvíce ideální podmínky pro extrakci želatiny z drůbežích kostí ze separace jsou u **experimentu č. 4** (působení 1 % enzymu Protamex, teplotě extrakce 80 °C a době extrakce 200 minut), která vytvořil gel o pevnosti  $149 \pm 6$  Bloom s obsahem popelovin  $3,63 \pm 0,11$  % a celkovou účinností extrakce 41,53 %. Dále je i ideální **experiment č. 3** (působení 1 % enzymu Protamex, teplotě extrakce 70 °C a době extrakce 200 minut). Vytvořil želatinový gel o pevnosti  $126 \pm 3$  Bloom s obsahem popelovin  $2,93 \pm 0,13$  % a celkovou účinností extrakce 34,69 %. Středový **experiment č. 5** (působení 1 % enzymu Protamex, teplotě extrakce 75 °C a době extrakce 150 minut), vytvořil gel o pevnosti pouze  $82 \pm 2$  Bloom a obsahem popelovin  $3,2 \pm 0,2$  %. Celkovou účinnost měl však jednu z nejvyšších a to 41,84 %.

Pro uplatnění v potravinářském a farmaceutickém průmyslu mají získané želatiny nadlimitní množství popelovin. Pro použití v této oblasti by měl být obsah popelovin do 2 % ve vzorcích. Optimalizací postupu při zpracování, by se však obsah popelovin dal snížit. Tedy pro výrobu želatin z drůbežích kostí ze separace, která nalezne uplatnění v **potravinářském průmyslu** navrhuji podmínky: působení 1 % enzymu Protamex, teplotě extrakce 70 °C a době extrakce 200 minut. Vytvořil želatinový gel o pevnosti  $126 \pm 3$  Bloom s obsahem popelovin  $2,93 \pm 0,13$  % a celkovou účinností extrakce 34,69 %. Viskozita byla  $2,58 \pm 0,18$  mPa.s, obsah sušiny  $90,4 \pm 0,3$  % a čírost  $2,171 \pm 0,005$  T. Takto připravená želatina by našla uplatnění při výrobě lékořice, cukrovinek, zahuštění nápojů, nebo při výrobě karamel. Pro **farmaceutický průmysl** navrhuji podmínky za použití drůbežích kostí ze separace: působení 1 % enzymu Protamex, teplotě extrakce 80 °C a době extrakce 200 minut. Vytvořil želatinový gel o pevnosti  $149 \pm 6$  Bloom s obsahem popelovin  $3,63 \pm 0,11$  % a celkovou účinností extrakce 41,53 %. Viskozita byla  $3,01 \pm 0,08$  mPa.s, obsah sušiny  $92,36 \pm 0,01$  % a čírost  $2,541 \pm 0,008$  T. Takto připravená želatina by našla uplatnění při výrobě tablet, obvazů a tvrdých tobolek. [54]



## 8.4 Zhodnocení výsledků a návrh dalšího studia

Želatina se získává za tepla extrakcí v alkalickém nebo kyselém prostředí. Získává se z vepřové a hovězí kůže (75,4%), dále pak hovězích kostí (23,1 %). Přibližně 1,5 % představuje produkce želatiny z ryb. Želatiny z ryb se považovaly za málo kvalitní, ale platí to pouze pro ryby žijící v chladnějších vodách. Želatina získaná z ryb vyskytujících se v subtropickém a tropickém pásu je obdobná želatině ze savců. Vzniká denurací kolagenu, což znamená jeho znehodnocování. Tato želatina má veliký potenciál v zemích, kde lidé nekonzumují hovězí či vepřové masné výrobky. [34, 35, 36]

Dle studie Du L. z roku 2013 se popisuje získávání želatiny z krůtích a drůbežích hlav ve dvou fázích. První fáze je předpřípravná fáze a za ní následuje již druhá fáze, což je extrakce želatiny. Předpřípravná fáze zahrnovala smíchání kuřecích a krůtích hlav s vodou, dále smíchání s roztokem 15mM hydrogenuhličitanu sodného ( $\text{NaHCO}_3$ ). Tento roztok byl poté odstředěn a tento krok se opakoval třikrát, dokud neobsahoval tuk. Po odtučnění následovalo smíchání s 0,1M roztokem hydroxidu sodného ( $\text{NaOH}$ ). Poté byla surovina smíchána s 0,05M kyselinou octovou ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ). Nakonec předpřípravné fáze se produkt promyl destilovanou vodou. Následná extrakce želatiny probíhala ve dvou stupních při dvou různých teplotách. Vznikla tak kapalná frakce želatiny, která byla v druhé části extrakce získávána při teplotě 60 °C po dobu 6 hodin. Při takových podmínkách byla celková výtěžnost u krůtích hlav 62,76 % z 1 kilogramu výchozí suroviny a u kuřecích hlav 52,29 % na 1 kilogram výchozí suroviny. [22]

V této diplomové práci se povedlo připravit želatiny šetrnějším způsobem, než ve studii Du L., díky opravování suroviny enzymem Proamex. Celková výtěžnost v diplomové práci byla v intervalu 28,66 % – 41,84 %, což je zhruba o 11 % méně, než ve studii Du L.. V diplomové práci se pevnost gelu pohybovala v intervalu od 46±2 Bloom do 149±6 Bloom. Duem a kol. želatinu extrahovali při teplotě 60 °C z kuřecích hlav s pevností gelu 248 Bloom a extrakcí krůtích hlav při teplotě 50 °C s pevností gelu 367 Bloom. [22]

V níže uvedené tabulce č. 12 jsou uvedeny dva experimenty s předúpravou v 200 ml kyselině chlorovodíkové (HCl). Postup práce během extrakcí byl stejný, ale před tím se čistá kolagenní surovina nechala třepat po dobu tří dnů v 3 % HCl, při čemž se po 12 hodinách vyměnila za čerstvou. Pro toto opracování byly vybrány experimenty č. 1 a č. 8 z tabulky č. 8. Zjistilo se, že hodnota pevnosti gelu se příliš neliší metody bez předúpravy kyselinou. Želatiny pouze vykazovaly tmavší zabarvení. Tento postup byl však časově příliš náročný a proto by vyžadoval další zkoumání.

V následující tabulce č. 13 popisuje experimenty č. 1 a č. 8 z tabulky č. 8, které se podrobily předúpravě 3 % kyselinou chlorovodíkovou. Lze si povšimnout, že pevnost gelu se zásadně neliší od pevnosti gelu stejných experimentů bez předúpravy kyselinou. Hodnota pH se také nijak neovlivnila touto metodou opracování a pohybovala se v rozmezí 8,01 – 8,05. Obsah sušiny, popelovin, viskozita a čírost se také neměnily nijak zásadně.

Do dalšího studia navrhuji kombinované opracování enzymem i kyselinou chlorovodíkovou. Mohla by se tak vylepšit účinnost extrakce kvalitních želatin z kostí ze separace.

Tabulka 12: Rozpis jednotlivých experimentů s vybranými technologickými podmínkami a jejich výsledky pro opracování v 3 % HCl

Experiment č.	Technologické podmínky extrakce hlavní frakce želatiny			Technologické podmínky extrakce vedlejší frakce želatiny		Charakterizace procesu					
	Faktor A Doba enzymového opracování [h]	Faktor B Teplota extrakce želatiny 1 [°C]	Faktor C Doba extrakce želatiny 1 [min]	Faktor D Teplota extrakce želatiny 2 [°C]	Faktor E Doba extrakce želatiny 2 [h]	Výtěžek hydrolyzátu [%]	Výtěžek 1. želatiny [%]	Výtěžek 2. želatiny [%]	Množství tuhého podílu [%]	Celková účinnost extrakce [%]	Bilanční chyba [%]
1*	24	64	60	88	0,5	4,6	5,6	9,1	70,9	19,3	9,8
2**	72	80	180	98	4	3,6	16,4	28,2	44,6	48,2	7,2

\* - Experiment č. 1 s před-opracováním v 3 % HCl

\*\* - Experiment č. 8 s před-opracováním v 3 % HCl

Tabulka 13: Rozpis jednotlivých experimentů s vybranými technologickými podmínkami a jejich výsledky pro opracování v 3 % HCl

Experiment č.	Technologické podmínky extrakce hlavní frakce želatiny			Charakterizace připravených hydrolyzátů/želatin						
	Faktor A Doba enzymového opracování [h]	Faktor B Teplota extrakce želatiny 1 [°C]	Faktor C Doba extrakce želatiny 1 [min]	Pevnost gelu [Bloom]	Obsah popela *** [%]	pH [-]	Viskozita [mPa.s]	Čírost [T]	Sušina [%]	
1*	24	64	60	10±2	3,43±0,17	8,05	2,34±0,12	1,7245±0,0013	91,4±0,6	
2**	72	80	180	152±4	4,31±0,11	8,01	2,15±0,06	2,122±0,004	92±2	

\* - Experiment č. 1 s před-opracováním v 3 % HCl

\*\* - Experiment č. 8 s před-opracováním v 3 % HCl

\*\*\* - % v sušině vyextrahovaného produktu

## ZÁVĚR

Tato diplomová práce s názvem zpracování odpadních bílkovin z kuřecího odkost'ovače na kolagenní produkty je rozdělena do dvou částí. Na část teoretickou a část praktickou.

V teoretické části se popisuje výskyt jatečního odpadu, jeho dělení a využití. V následující kapitole jsou popsány druhy a využití odpadu z drůbežáren. Tato kapitola je rozdělena na pevné drůbeží odpady a na kapalně drůbeží odpady. Další část je věnována kolagenu, jeho typům a želatině. Dále v teoretické části jsou právní předpisy pro manipulaci s živočišným odpadem a jeho dělení do tří kategorií. Teoretická část je zakončena využitím želatiny v medicínském, farmaceutickém, potravinářském a technickém průmyslu.

V experimentální části se zkoumá možnost extrakce želatin a hydrolyzátů z drůbežích kostí ze separace za pomoci předchozího opracování enzymem Protamex. Jedním z hlavních cílů bylo navrhnout optimální technologické podmínky ke zpracování drůbežích kostí ze separace. Cílem bylo maximalizovat účinnost extrakcí, aby výtěžek želatin byl co nejvyšší. Sledovaly se tři základní faktory: doba enzymového opracování 24 – 72 hodin (Faktor A), teplota extrakce 64 – 80 °C (Faktor B) a doba extrakce 60 – 180 minut (Faktor C). Samotná metodika práce spočívala u primárních experimentů byla podle faktorových pokusů  $2^3 + 2$  centrální (středové) experimenty + 1 slepý pokus. Následná optimalizační část byla podle faktorových pokusů  $2^2 + 1$  centrální experiment. Samotný postup práce byl založen na namletí drůbežích kostí ze separace a jejich následná homogenizace. Poté se odstranily nekolagenní doprovodné bílkoviny za pomoci NaCl a NaOH. Odtučnění se docílilo pomocí enzymu Lipolase s následným do-odtučením acetonem. Postup se dále pokračoval v opracování suroviny enzymem Protamex, extrakcí v horké vodě po definovaný čas a následným sušením vzniklé suroviny. Na získaných želatinách se dále provedly testy a metody na zjištění obsahu popelovin, sušiny, čirosti, viskozity, pH, teploty tání a pevnosti gelu. Následně se vypočítaly celkové i jednotlivé účinnosti extrakcí.

Nejprve bylo provedeno v primární části 11 experimentů. Celková výtěžnost se pohybovala v intervalu od 26,5 % (48 hodin bez opracování enzymem, 72 °C teplota extrakce, 120 minut doba extrakce) do 45,3 % (48 hodin opracování enzymem, 72 °C teplota extrakce, 120 minut doba extrakce). Pevnosti gelu byly v intervalu od  $3 \pm 0$  Bloom ((48 hodin bez opracování enzymem, 72 °C teplota extrakce, 120 minut doba extrakce) do  $158 \pm 2$  Bloom (72 hodin opracování enzymem, 80 °C teplota extrakce, 180 minut doba extrakce).

Obsah popelovin byl v intervalu od  $2,1\pm 0,3$  % (48 hodin bez opracování enzymem, 72 °C teplota extrakce, 120 minut doba extrakce) do  $6,7\pm 0,4$  % (72 hodin opracování enzymem, 64 °C teplota extrakce, 60 minut doba extrakce).

Po vyhodnocení výsledků u primárních experimentů se oblast extrakcí zúžila. Provedlo se pět optimalizačních experimentů podle schématu  $2^2 + 1$  centrální experiment. Doba působení přídatku 1 % enzymu Protamex byla stanovena z primární části na 48 hodin. Sledované faktory se teď zúžily na dva a to na teplotu extrakce (Faktor A) a dobu extrakce (Faktor B). Teplota extrakce se pohybovala v rozmezí 70 – 80 °C a doba extrakce 0,5 – 6 hodin. Postup práce zůstal zachován jak u 11 experimentů v primární fázi. Celkové účinnosti extrakcí se pohybovaly od 28,66 % (70 °C teplota extrakce, 100 minut doba extrakce) do 41,84 % (75 °C teplota extrakce, 150 minut doba extrakce). Hodnoty pevnosti gelu se pohybovaly v rozmezí od  $46\pm 2$  Bloom (70 °C teplota extrakce, 100 minut doba extrakce) do  $149\pm 6$  Bloom (80 °C teplota extrakce, 200 minut doba extrakce). Obsah popelovin byl v intervalu od  $2,93\pm 0,13$  % (70 °C teplota extrakce, 200 minut doba extrakce) do  $4,12\pm 0,06$  % (80 °C teplota extrakce, 100 minut doba extrakce).

Pro uplatnění ve farmaceutickém a medicínském průmyslu mají získané želatiny nadlimitní množství popelovin. Pro použití v této oblasti by měl být obsah popelovin do 2 % ve vzorcích. Optimalizací postupu při zpracování nebo pomocí iontoměníčů, by se však obsah popelovin dal snížit. Pro farmaceutický průmysl navrhuji podmínky za použití drůbežích kostí ze separace: působení 1 % enzymu Protamex, teplotě extrakce 80 °C a době extrakce 200 minut. Vytvořil želatinový gel o pevnosti  $149\pm 6$  Bloom s obsahem popelovin  $3,63\pm 0,11$  %.

Pro výrobu želatin z drůbežích kostí ze separace, která nalezne uplatnění v potravinářském průmyslu, navrhuji podmínky: působení 1 % enzymu Protamex, teplotě extrakce 70 °C a době extrakce 200 minut. Vytvořil želatinový gel o pevnosti  $126\pm 3$  Bloom s obsahem popelovin  $2,93\pm 0,13$  %. Tato želatina splňuje limitní množství popelovin v potravinářství do 3 %.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] Evropský parlament a rada evropské unie. *Nařízení Evropského parlamentu a rady (ES) č. 1069/2009*. EUR-Lex. [Online] 21. říjen 2009. [Citace 19. 4. 2019], <http://eur-lex.europa.eu/legal content/CS/ALL/?uri=CELEX:32009R1069>.
- [2] Nařízení komise (EU) č. 142/2011. EUR-Lex. [Online] 25. únor 2011. [Citace 19. 4. 2019], <http://eur-lex.europa.eu/legalcontent/CS/ALL/?uri=CELEX:32011R0142>.
- [3] CHEREMISINOFF, N., ROSENFELD, P. DAVLETSHIN, A.. *Meat Processing and Rendering*. Responsible Care: A New Strategy for roughPollution Prevention and Waste Reduction Th Environment Management. Elsevier, 2013, 6.5, strana 422 –424, ISBN: 9780127999852.
- [4] Dikeman, M., Devine C. *Encyclopedia Of Meat Sciences*, (2nd Edition), SanDiego: Elsevier Academic Press, 2014, 1487 str, ISBN 978-0-12-384731-7
- [5] OCKERMAN, H.W., HANSEN, C.I *Animal By-Product Processing & Utilization*, Lancaster, PA: Technomic Pub. Co., Inc., 2000, 523 str, ISBN: 1-56676-777-6
- [6] Alternative Sources: *A Review, Food Hydrocolloids*, 25, 1813-1827 str, 2011 Poultry Trends [ONLINE], dostupné z:<http://www.poultrytrends.com> [Citace 19. 4. 2019]
- [7] *BRICS Information portal*. [ONLINE], dostupné z: <http://infobrics.org/>, [Citace 19. 4. 2019]
- [8] OCKERMAN, H.W., HANSEN, C.I., *Animal by-product: processing & utilization*. Londýn. Woodhead Publishing. 2004. ISBN 978-1-84569-414-2
- [9] Informace poskytl Miroslav Chýla, vedoucí v provozu Jatka Jarošov. Jarošov, 2012
- [10] Český statistický úřad, *Výkazy*, sběr dat [online]. [Citace 19. 4. 2019]
- [11] PITK, P.; KAPARAJU, P.; VILU, R. *Methane potential of sterilized solid slaughterhouse wastes*. Bioresource Technology, 2012, DOI: 10.1016/j.biortech.2012.04.038, ISSN 09608524.
- [12] JAVATHILAKAN, K., A KOL.. *Utilization Of ByProducts And Waste Materials From Meat, Poultry And Fish Proces-sing Industries: A Review*, Journal of Food Science and Technology, 49, 278-293 str, 2012.
- [13] SCHRIBER, R., SEVBOLD, U. *Gelatine Production*, The Six Steps to Maximum Safety. Developments In Biology Standards 80, 195–198 str, 1993, ISSN:0301-5149
- [14] LINDEN, G., a LORIENT, D., *New Ingredients in Food Processing*. Sawston : Woodhead Publishing;, 1999. ISBN: 978-1-85573-443-2.
- [15] USDA. *United States Department of Agriculture*. [Online] 2015. [Citace 19. 4. 2019] <https://www.usda.gov>.

- [16] OREL, V., *Průmyslové zpracování jatečné drůbeže*, Praha, SNTL, 1962, 266 stran, ISBN 978-80-87719-27-5
- [17] HERBERT, W., A KOL., *Animal by-product processing and utilization*, 1st ed. Lancaster, PA: Technomic Pub. Co., Inc., c2000. ISBN 1566767776
- [18] INGR, I., *Produkce zpracování masa*, Mendelova univerzita v Brně, Brno, 2011, ISBN 978-80-7375-510-2
- [19] SULTANA, K., A KOL., *S. Utilization Of By Products And Waste Materials From Meat, Poultry And Fish Processing Industries: A Review*, Journal of Food Science and Technology, 2012, 49, 3, s. 278-293.
- [20] SARBON N. M., A KOL., *Preparation and characterisation of chicken skin gelatin as an alternative to mammalian gelatin*, Food Hydrocolloids, 30, s. 143-151, 2013.
- [21] MANIFI, M., *Poultry science*, InTech, 2017, 238 pages, ISBN 978-953-51-2945-5
- [22] MAREČEK, J., A KOL., *Technika pro zpracování živočišných produktů*, Mendelova Zemědělská a Lesnická Univerzita, Brno, ISBN 80-7157-183-0, 1996
- [23] BARBUT, SHABTAI, *Poultry product processing an industry guide*, Boca Raton, Fla.: CRC Press, 2002. ISBN 9781420031744. Dostupné také z: <http://marc.crcnetbase.com/isbn/9781420031744> [Citace 19. 4. 2019]
- [24] SIMENOVÁ, J., *Technologie drůbeže vajec a minoritních živočišných produktů*, Mendelova univerzita v Brně, Brno, 2013, ISBN 978-80-7375-891-2
- [25] GHOST, R. *Fractionating of biological macromolecules using carrier phase ultrafiltration*. Biotechnol Bioeng 74, s. 1–11, 2001
- [26] Del, P. H., A KOL., *Effect of processing on functional properties of animal blood plasma*. Meat Sci 78, s. 522–528, 2008
- [27] BODE. M., *Characterization of type I and type III collagens in human tissues*. Oulu, University of Oulu, 2000, ISBN 9514255534.
- [28] POPPE. J., *Gelatin in thickening and gelling agents for food*, Second., vyd. 1, no.1, A. P. Imeson, Ed. Springer US, 1997, s 144–168, ISBN 978-1-4615-2197-6
- [29] GELSE. K., A KOL., *Collagens—structure, function, and biosynthesis*, Adv. Drug Deliv. Rev., vyd. 55, č. 12, s 1531–1546, 2003, ISSN 0169409X
- [30] NIMNI, M. E., OLSEN, B. R., KANG, A.H., et al. *Collagen*, vol. I - III. Boca Raton, FL: CRC Press 1988 - 1992. ISBN 08-493-4600-2.
- [31] BLAŽEJ, A. et al. *Štruktúra a vlastnosti vláknitých bielkovín*. 1. vydání. Bratislava: Veda 1978. 453 s. ISBN 71-156-78.
- [32] *Co je to kolagen?* Hypro Otrokovice, a.s. [online]. 2012 [Citace 19. 4. 2019]

- Dostupné z: <http://www.hypro.cz/hyRubrIn.aspx?intRubrKis=1251&intLang=0>
- [35] TEPPNER, M., ADAM, M. et al. *Collagen hydrolysate and its relationship to joint health: A scientific compendium*. 1. ed. Berlin: Neunplus 1 2004. 120 s. ISBN 39-360-3314-5.
- [36] MOKREJŠ, P., LANGMAIER, F. *APLIKACE PŘÍRODNÍCH POLYMERŮ*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Zlín, 2008, ISBN 978-80-7318-674-6
- [37] 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, ISSN:0924-2244
- [38] GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; GIMÉNEZ, 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, ISSN:0268-005X
- [39] HAUG, I. J., a DRAGET, K. I., Gelatin. [autor knihy] G. O. PHILIPS a P. A. WILLIAMS. *Handbook of Food Proteins*. 1. Cambridge : Woodhead Publishing, 2011, 5, s. 92 – 113; ISBN 978-1-84569-758-7.
- [40] SCHRIBER, R., GAREIS, H. *Gelatine Handbook Theory And Industrial Practice*, Weinheim: Wiley-VCH-Verl, 2007, 334 s, ISBN 978-3-527-31548-2
- [41] PHILLIPS, G.O.; WILLIAMS, P.A. *Handbook of hydrocolloids*. Woodhead Publishing. 2009. 2nd Edition. ISBN 978-1-84569-414-2
- [42] KARIM, A. A.; BHAT, R. *Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins*. Food Hydrocolloids, 2009, 23, s. 563-576, ISSN:0268-005X
- [43] 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
- [44] “Collagen Peptide and Gelatin – Customized Building Blocks of Body Proteins,” [online]. Dostupný z www: <http://www.medgadget.com/2015/11/collagen-peptideand-gelatin-customized-building-blocks-of-body-proteins-2.html>, 2015.
- [45] KEENAN, T. R., “Gelatin,” in *Handbook of Biodegradable Polymers*, D. M. Wiseman, J. Kost, and A. J. Domb, Eds. CRC Press, 1997, ISBN 978-90-5702-153-4.
- [46] BLAŽEJ, A., a kol. *Technologie kuže a kožešin*. 1. vyd. Praha 1 : Nakladatelství technické literatury, n.p., 1984. 456s.



- [47] SCHRIEBER, R., GAREIS, H., *GELATINE HANDBOOK: THEORY AND INDUSTRIAL PRACTICE*, Wilwy.com, 2007, 347 s, ISBN 978-3-527-61097-6, [Citace 19. 4. 2019] Dostupné také z: <https://leseprobe.buch.de/images-adb/b5/ce/b5ce4b59-70b7-47ad-8401-43fac0bd93c5.pdf>
- [48] CHEW, S. A., HINOJOSA, V. A., ARRIAGA, M. A., *Bioresorbable polymer microparticles in the medical and pharmaceutical fields*. Jöns Hilborn Giuseppe Perale. Bioresorbable Polymers for Biomedical Applications. Cambridge : Woodhead Publishing, 2017, stránky 229 – 264. [Citace 19. 4. 2019] <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100262-9.09002-9>.
- [49] BRUCHI, M., *Gelatin capsules*. Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems. 1. Sawston : Woodhead Publishing, 2015, 6.; ISBN:9780081000922.
- [50] Gelatin manufacturers institute of America, inc.. *Gelatin*. 1st edition. New York: Gelatin manufacturers institute of America, inc., 1973. s. 5 – 24.
- [51] KOMÁREK, P., RABIŠOVÁ, M. *Technologie léku*. 3. přepracované vyd. Praha 5 : Galén, 2006. 399 s. ISBN 80 7262 432 7.
- [52] HAGES pro Českou republiku, *Želatina* [online]. 2005 [Citace 19. 4. 2019]. Dostupný z WWW: <<http://www.hages.cz/katalogy/zelatina.pdf>>.
- [53] SCHRIEBER, R., GAREIS, H., *Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice*. Weinheim: WILEYVCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007. ISBN: 978-3-527-61097-6.
- [54] Gelatin manufacturers institute of Amerika, [Online] 2013, [Citace 19. 4. 2019] <http://www.gelatin-gmia.com/>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

CH <sub>3</sub> COOH	Kyselina octová.
NaOH	Hydroxid sodný.
NaCl	Clorid sodný
C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	Aceton
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DSC	Diferenciální skenovací kalorimetr
PA	Polyamid
PET	Polyethyltereftalát
HCl	Kyselina chlorovodíková

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1: Průměrná spotřeba masa v období 2014 – 2016 v jednotlivých částech světa a jeho porovnání s predikcí v roce 2026 [3] .....	14
Obrázek 2: Struktura kolagenního vlákna typu I. na molekulární úrovni [31] .....	22
Obrázek 3: Želatina se skládá z různých směsí proteinových řetězců. Tyto řetězce mají rozdílnou molekulovou hmotnost. Proto není monodisperzní systém a vykazuje polydisperzitu. [45] .....	25
Obrázek 4: Schéma vzniku želatiny .....	26
Obrázek 5: Schematické znázornění předúpravy želatin [25] .....	27
Obrázek 6: Stevens - LFRA texture analyser .....	36
Obrázek 7: Vzorky želatin před spalování pro zjištění obsahu popelovin .....	37
Obrázek 8: Vzorky želatin po spalování pro zjištění obsahu popelovin .....	37
Obrázek 9: Vzorky želatin pro zjištění obsahu sušiny .....	38
Obrázek 10: Ubbelohdeho viskozimetr .....	39
Obrázek 11: Spektrofotometr Helios – 3 pro měření transmitance (čirosti) .....	40
Obrázek 12: Připravené 1,5 % želatinové roztoky .....	40
Obrázek 13: Kostí ze separace po vytáhnutí z mrazáku .....	42
Obrázek 14: Odstranění albuminu .....	43
Obrázek 15: Odstranění globulinu .....	43
Obrázek 16: Odstranění gluteinů .....	43
Obrázek 17: Surovina na třepačce s enzymem Lipolase .....	45
Obrázek 18: Enzym Lipolase .....	45
Obrázek 20: Surovina (čistý kolagen) po mletí a sítové analýze částic (vlevo: částice < 1 mm, uprostřed: částice 1 – 2 mm, vpravo: částice > 2 mm) .....	46
Obrázek 19: Vysušená surovina (čistý kolagen) před mletím .....	46
Obrázek 21: Přídavek 1,0 % enzymu Protamex a kontrola pH .....	47
Obrázek 22: Surovina na třepacím zařízení .....	47
Obrázek 23: Hydrolyzát exp. č. 8 .....	48
Obrázek 24: Hydrolyzát exp. č. 11 .....	48
Obrázek 25: Extrakce želatiny .....	49
Obrázek 27: Želatina první frakce u exp. č. 11 .....	50
Obrázek 26: Želatina první frakce u exp. č. 8 .....	50
Obrázek 29: Želatina první frakce u exp. č. 11 .....	51
Obrázek 31: Vysušený tuhý podíl .....	51
Obrázek 28: Želatina první frakce u exp. č. 8 .....	51
Obrázek 30: Nevysušený tuhý podíl .....	51

Obrázek 32: Všechny složky extrakce: hydrolyzát (1), želatina hlavní frakce (2), želatina vedlejší frakce (3), nerozložený tuhý podíl (4).....	52
Obrázek 33: Interakce sledovaných faktorů na účinnost extrakce želatiny první frakce .....	57
Obrázek 34: Vrstvený graf vlivů faktorů A a B na účinnost extrakce želatiny první frakce .....	58
Obrázek 35: Vrstvený graf vlivů faktorů A a C na účinnost extrakce želatiny 1 frakce.....	59
Obrázek 36: Interakce sledovaných faktorů na celkovou účinnost extrakce .....	60
Obrázek 37: Vrstvený graf vlivů faktorů B a C na celkovou účinnost extrakce.....	61
Obrázek 38: Vrstvený graf vlivů faktorů A a C na celkovou účinnost extrakce.....	61
Obrázek 39: Vliv interakcí sledovaných faktorů na pevnosti gelu .....	62
Obrázek 40: Vrstvený graf vlivů faktorů A a B na pevnost gelu .....	63
Obrázek 41: Vrstvený graf vlivů faktorů B a C na pevnost gelu .....	64
Obrázek 42: Vliv interakcí sledovaných faktorů na obsah popelovin.....	65
Obrázek 43: Vrstvený graf vlivů faktorů B a C na obsah popelovin .....	65
Obrázek 44: Vrstvený graf vlivů faktorů A a B na obsah popelovin .....	66
Obrázek 45: Znázornění odstínů želatin po měření čirosti .....	66
Obrázek 46: Vliv faktoru A na účinnost 1. extrakce při různé době extrakce .....	71
Obrázek 47: Vrstvený graf vlivů faktoru A a B na účinnost 1. extrakce .....	72
Obrázek 48: Vliv faktoru A na celkovou účinnost extrakce při různé době extrakce.....	73
Obrázek 49: Vrstvený graf vlivů faktoru A a B na celkovou účinnost extrakce.....	73
Obrázek 50: Vliv faktoru A na pevnost gelu při různé době extrakce .....	75
Obrázek 51: Vrstvený graf vlivů faktoru A a B na pevnost gelu .....	75
Obrázek 52: Vliv faktoru A na obsah popelovin při různé době extrakce .....	76
Obrázek 53: Vrstvený graf vlivů faktoru A a B na obsah popelovin .....	77
Obrázek 54: DSC křivka pro určení teploty tání želatinového gelu po optimalizaci u experimentu č. 2 .....	78
Obrázek 55: DSC křivka pro určení teploty tání želatinového gelu po optimalizaci u experimentu č. 4 .....	78
Obrázek 56: Porovnání želatinových roztoků po optimalizaci .....	79

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: Vzniklé množství jatečného odpadu v masném průmyslu v ČR v roce 2011 [38]	15
Tabulka 2: Chemické složení stažené kůže (čerstvé) [6]	17
Tabulka 3: Porovnání typu kolagenu I, II, III, IV [32, 33, 34, 35]	23
Tabulka 4: Jednotlivé zastoupení aminokyselin, ve 100 g želatiny [27]	28
Tabulka 5: Složení vstupní suroviny v sušině	35
Tabulka 6: Navážky želatiny, vody a příslušné přepočítávací koeficienty	36
Tabulka 7: Rozpis třepacích cyklů pro opracování enzymem Lipolase	44
Tabulka 8: Rozpis jednotlivých experimentů pro primární část s vybranými technologickými podmínkami a jejich výsledky	55
Tabulka 9: Rozpis jednotlivých experimentů pro primární část s vybranými technologickými podmínkami a jejich výsledky	56
Tabulka 10: Rozpis jednotlivých experimentů pro optimalizační část s vybranými technologickými podmínkami a jejich výsledky	69
Tabulka 11: Rozpis jednotlivých experimentů pro optimalizační část s vybranými technologickými podmínkami a jejich výsledky	70
Tabulka 12: Rozpis jednotlivých experimentů s vybranými technologickými podmínkami a jejich výsledky pro opracování v 3 % HCl	83
Tabulka 13: Rozpis jednotlivých experimentů s vybranými technologickými podmínkami a jejich výsledky pro opracování v 3 % HCl	83

## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha PI – materiálový list enzymu Protamex

Příloha PII – materiálový list enzymu Lipolase

# PŘÍLOHA P I: MATERIÁLOVÝ LIST ENZYMU PROTAMEX

Special Food / 2001-08284-03.pdf

## Product Sheet

Page 1:3



# Protamex<sup>®</sup>

### Description

Protamex is a *Bacillus* protease complex developed for the hydrolysis of food proteins.

### Product Properties

#### Product Type

Protamex is a light brown, free-flowing, non-dusting microgranulate with an average particle size of approximately 250-450 microns. The colour may vary from batch to batch and colour intensity is not an indication of product strength. The product is readily soluble in water.

#### Activity

Protamex is standardized in Anson Units per gram (AU/g).

Protamex.....Declared activity: 1.5 AU/g

See the Analytical Method for more information on the proteolytic analysis, which is based on the proteolysis of denatured haemoglobin.

#### Purity

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

#### Packaging

See the standard Packaging List for more packaging information.

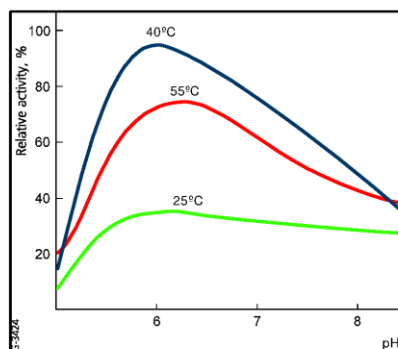
### Application

In contrast to many other endoproteases, Protamex will produce non-bitter protein hydrolysates even at low degrees of hydrolysis.

### Reaction Parameters

Optimal working conditions are at pH 5.5-7.5 and at 35-60°C (95-140°F) as determined by application trials.

In Figure 1 the activities shown are measured according to a modified Anson method in aqueous solutions without the stabilizing effect of proteinaceous matter. The stability of Protamex at a certain temperature is influenced by the type and concentration of the proteins present.



**Fig. 1. Influence of pH at various temperatures on the activity of Protamex.**

Method: AF 4  
Substrate: Denatured hemoglobin

### Inactivation

Protamex can be inactivated in 30 minutes at 50°C (122°F) or higher when the pH is 4, and in 10 minutes at 85°C (185°F) or higher when the pH is 8. However, the inactivation is very much dependent on the substrate (substrate concentration, pH, etc.). Thus, the documentation for efficient elimination of Protamex must be based on actual analysis for the detection of residual activity. See the Method for the detection of residual protease activity in protein hydrolysate for further information.

### Safety

Enzymes are proteins and inhalation of dust or aerosols may induce sensitization and may cause allergic reactions in sensitized individuals. Some enzymes may irritate the skin, eyes and mucous membranes upon prolonged contact.

The product is designed to resist some mechanical effects. However, excessive mechanical wear and tear or crushing may create dust.

All spills, even small spills, should be gently shovelled into plastic-lined containers. Use respiratory protection. Small spills and remains of large spills should be removed by vacuuming or flushing with water (avoid splashing). Vacuum cleaners and central vacuum systems should be equipped with HEPA filters.

When using the product for the production of protein hydrolysates, consumer safety in use is documented only if the production includes processing steps in which the product is removed and/or inactivated.

A Material Safety Data Sheet is supplied with all products. See the Safety Manual for further information regarding how to handle the product safely.



## Storage

Enzymes gradually lose activity over time depending on storage temperature. Cool conditions are recommended. When stored at 5°C (41°F), the product will maintain its declared activity for at least 1 year. When stored at 25°C (77°F), the product will maintain its declared activity for at least 3 months. Extended storage and/or adverse conditions, including higher temperatures or high humidity, may lead to a higher dosage requirement.

# PŘÍLOHA P II: MATERIÁLOVÝ LIST ENZYMŮ LIPOLASE

**EKOZYM**

## Product Sheet

### Lipolase™

#### Popis

Lipolase je lipáza používaná v recepturách detergentů k usnadnění odstranění skvrn obsahujících tuk a olej, jako jsou ty, které pochází z přepáleného oleje, salátového oleje, másla, omáček, polévek, kožního mazu a kosmetických přípravků. Skvrny, které obsahují tuk, je kvůli jejich hydrofobní povaze složité odstranit praním, především při nízkých teplotách a mírné alkalitě. Lipolase hydrolyzuje tuky rozštěpením esterových vazeb na 1 a 3 pozici triglyceridových molekul. Produkty hydrolyzy jsou mono- a diglyceridy, glycerol a volné mastné kyseliny, které jsou snadno rozpuštěny nebo dispergovány v pracím roztoku. Enzym má širokou substrátovou specifčnost podporující hydrolyzu široké škály tuků a olejů.

Lipolase je lipáza s *Thermomyces lanuginosus* produkovaná submerzní fermentací geneticky modifikovaného mikroorganismu *Aspergillus oryzae*.

#### Vlastnosti produktu

##### Typy produktu

Lipolase je k dispozici jak v granulované, tak i kapalné formě:

Lipolase 100 T	Deklarovaná aktivita: 100 KLU/g
Lipolase 100 L, Type EX	Deklarovaná aktivita: 100 KLU/g

##### Aktivita

Lipolytická aktivita je vyjádřena v Kilo Lipázových jednotkách (KLU). Lipolase neobsahuje žádné výrazné postranní aktivity. Lipolytická aktivita je stanovena vzhledem k enzymovému standardu za následujících podmínek:

Substrát:	tributyryn
Teplota	30 °C
pH	7,0

Novozymes používá pH-stat metodu pro měření standardizované aktivity Lipolase. Analytickou metodu lze získat na vyžádání.

#### Standardní balení

Granulovaný výrobek:	40 kg
Kapalný výrobek:	25 kg

#### Aplikace

Informace o aplikaci Lipolase jsou k dispozici v aplikačním listu: Lipolase – aplikace v detergentech pro domácí praní.

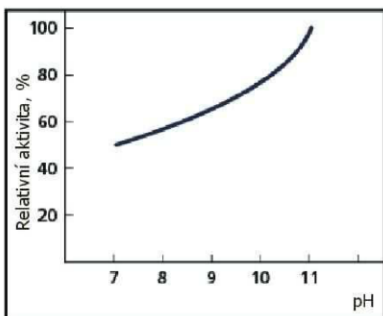
#### Vlastnosti enzymu

Lipolase je 1,3-specifická lipáza. Jinými slovy štěpí esterové vazby triglyceridu na pozicích 1 a 3.

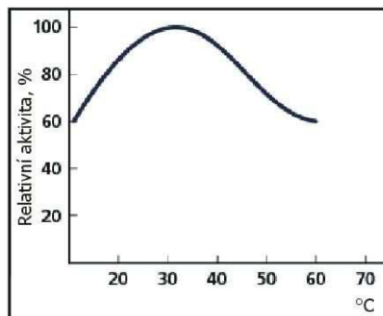
#### Aktivita ve vztahu k teplotě a pH

Jak ukazuje obrázek 1, je Lipolase aktivní při všech pH hodnotách běžně se vyskytujících v detergentech pro prádely. Jak je vidět na obrázku 2, je teplotní křivka velmi plochá, což znamená,

že teplota nemá dramatický vliv na aktivitu Lipolase v rozsahu největšího zájmu pro aplikaci detergentů.



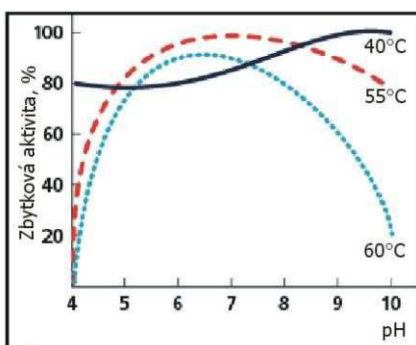
**Obr.1. Aktivita Lipolase při různých pH hodnotách.**  
Stanoveno podle SM-0095, ale s různými pH hodnotami.



**Obr.2. Aktivita Lipolase při různých teplotách.**  
Stanoveno podle SM-0095, ale s jinými teplotami.

## Stabilita

Obrázek 3 ukazuje, že je Lipolase velmi stabilní ve vodných roztocích při teplotách do 55 – 60 °C. Neočekává se žádná ztlačitelná ztráta aktivity během běžného kontaktního času v automatické pračce (10 - 30 minut) při teplotách pod 55 °C a pH hodnotách pod 11. Mělo by být zdůrazněno, že křivky aktivity odpovídají specifickým podmínkám používaným při laboratorních pokusech. Při jiných podmínkách a s jinými substráty jsou očekávány odchylky od těchto křivek.



**Obr.3. Zbytková aktivita Lipolase po dvou hodinách skladování při různých teplotách a pH hodnotách.**  
Koncentrace enzymu během skladování: 14 LU/ml  
Stanovení aktivity podle SM-0095

## Bezpečnost

Produkt je vyráběn za hygienických podmínek a je předmětem přísné kontroly kvality.

## Toxikologie

Produkt je vyráběn nepatogenním mikroorganismem a je klasifikován jako netoxický.

## Bioodbouratelnost

Výrobky jsou bioodbouratelné.

**Zacházení**

Enzymy jsou proteiny a vdechnutí prachu nebo aerosolu může vyvolat senzibilizaci a může být příčinou alergické reakce u citlivých jedinců. Některé enzymy mohou při déletrvajícím kontaktu dráždit kůži, oči a sliznice.

T-granuláty jsou vyvinuty tak, aby odolávaly mechanickým vlivům, avšak nadměrné mechanické namáhání nebo drčení může vytvořit prach. Velká rozsypaná množství granulátu by měla být jemně smetena do plastových obalů. Použijte respirační ochranu. Malá rozsypaná množství a zbytky velkých rozsypaných množství by měly být odstraněny vysáváním nebo spláchnuty vodou (vyhněte se stříkání). Vysavače a centrální vysávací systémy by měly být vybaveny HEPA filtry.

Kapalné enzymové produkty mohou vytvořit snadno vdechnutelné aerosoly, pokud jsou stříkány nebo intenzivně míchány. Rozlitý preparát může uschnout a vytvořit prach. Rozlitý preparát by proto měl být spláchnut vodou (vyvarujte se stříkání).

Bezpečnostní list enzymu je dodáván ke všem výrobkům.

**Skladování**

Enzymy postupně ztrácejí aktivitu v závislosti na teplotě skladování a vlhkosti. Doporučovány jsou suché a chladné podmínky. Pokud je enzymový preparát skladován v uzavřených obalech při teplotě 25 °C, uchová si svoji deklarovanou aktivitu po dobu nejméně 3 měsíců. Při nižší skladovací teplotě stabilita roste. Dlouhodobé skladování anebo zhoršené podmínky, zahrnující vyšší teploty nebo vysokou vlhkost, mohou vést k nutnosti vyššího dávkování.

Enzymové preparáty by neměly být delší dobu ponechány na přímém slunečním světle. Kapalné preparáty by neměly zmraznout.

**Registrace****Chemický katalog**

Složky Lipolase jsou zapsány v příslušných katalozích, např. EINECS a TSCA.

**CAS a EC čísla**

Lipolase je klasifikována v Chemical Abstracts Service Registry jako „Lipase, triacylglycose“ CAS číslo 9001-62-1. Odpovídající klasifikační číslo enzymu (Mezinárodní biochemická unie) je EC 3.1.1.3.

**EEC klasifikace**

V koncentrované formě jsou granulované a kapalné produkty Lipolase klasifikovány jako „senzitivizéry vdechnutím“ podle EEC direktivy 88/379.

Distributor: **Ekozym, s.r.o.**  
Říčanská 237, 763 12 Vizovice  
Tel. 577 001 014, Fax 577 001 033  
[www.ekozym.cz](http://www.ekozym.cz)  
[ekozym@ekozym.cz](mailto:ekozym@ekozym.cz)

*Zákony, předpisy a práva třetích stran mohou bránit zákazníkům v dovozu, zpracování, aplikaci anebo dalšímu prodeji určitých výrobků uvedeným způsobem. Je zodpovědnost zákazníků, že jejich specifické použití výrobků Novozymes neporuší odpovídající zákony a předpisy a dále, že neporuší patenty nebo jiná práva třetích stran.*

*Obsah tohoto dokumentu může být změněn bez předchozího oznámení.*

Výrobce: Novozymes A/S  
Krogshøjvej 36  
2880 Bagsvaerd  
Denmark  
Tel. +45 8824 9999  
[enzymes@novozymes.com](mailto:enzymes@novozymes.com)  
[www.novozymes.com](http://www.novozymes.com)