

Zpracování odpadů masné výroby (hovězích šlach) na kolagenní hydrolyzát

Bc. Monika Hlavenková

Diplomová práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Monika HLAVENKOVÁ**
Studijní program: **N 2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Technologie a management**

Téma práce: **Zpracování odpadů masné výroby (hovězích šlach)
na kolagenní hydrolyzát**

Zásady pro vypracování:

1. Odpady masné výroby (rozdělení, klasifikace, nakládání a zpracování)
2. Kolagen (druhy, vlastnosti, způsoby získávání kolagenního hydrolyzátu a aplikace)
3. V experimentální části příprava kolagenního hydrolyzátu
4. Sledování parametrů při výrobě kolagenního hydrolyzátu (teplota, čas a koncentrace enzymu)
5. Zpracování výsledků, diskuze a zhodnocení přínosu práce



Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. Park, J. et al. **Biomaterials**. Boca Raton: CRC Press, 2003.

2. Ockerman, H. et al. **Animal by-product: procesing & utilization**. London: CRC Press, 2000.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Pavel Mokrejš, Ph.D.

Ústav inženýrství polymerů

Datum zadání diplomové práce:

15. února 2010

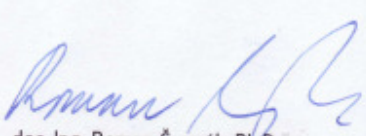
Termín odevzdání diplomové práce:

14. května 2010

Ve Zlíně dne 15. února 2010


doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan




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

ABSTRAKT

Diplomová práce je rozdělena do dvou částí, na část teoretickou a experimentální. Teoretická část pojednává o pevných a kapalných bílkovinných odpadech masného průmyslu. Dále je popsáno využití odpadů masného průmyslu (energetika, zemědělství, potravinářství, lékařství, farmaceutický průmysl a ostatní odvětví). V experimentální části diplomové práce jsem se zabývala rozkladem hovězích šlach 3-stupňovou enzymovou hydrolyzou ve vodném prostředí a ve vodném prostředí s přidavkem 1 % (w/w) KOH na kolagenní hydrolyzát. Sledoval se vliv vybraných technologických podmínek na účinnost rozkladu šlach a jejich vliv na kvalitu připravených kolagenních hydrolyzátů (obsah kolagenu, elastinu, popelovin).

Klíčová slova: elastin, hovězí šlachy, hydrolyzát, kolagen, masný průmysl, odpady

ABSTRACT

Diploma thesis is divided into two parts - the theoretical and experimental ones. The theoretical part deals with solid and liquid protein by-products of the meat-processing industry. Utilisation of the meat-processing industry by-products is described (power industry, agriculture, food industry, medicine, pharmaceutical industry and other industrial branches). In the experimental part, degradation of beef tendons through three-stage enzyme hydrolysis in water environment and in water environment with addition of 1%(w/w) KOH into collagen hydrolysate was investigated. The influence of selected technological conditions on the beef tendons breakdown efficiency and their effect on the quality of prepared collagen hydrolysate (collagen, elastin and ashes content) was also studied.

Key words: beef tendons, by-products, collagen, elastin, hydrolysate, meat-processing industry


Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Pavlu Mokrejšovi, Ph.D., za jeho ochotný přístup, cenné rady a připomínky. Dále můj velký dík patří paní laborantce Miroslavě Žaludkové za velkou pomoc při práci v laboratoři. V neposlední řadě děkuji své nejbližší rodině za její podporu.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji 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 21. 5. 2010


.....

⁴¹ 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 nevyjádřeně 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 nahlázení 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.

⁴² 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 nezahnuje 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).

⁴³ 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 užit 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 výdělků jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídí k výši výdělků dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 ODPADY MASNÉHO PRŮMYSLU	12
1.1 DEFINICE A LEGISLATIVNÍ VYMEZENÍ MASNÝCH ODPADŮ	12
1.2 TŘÍDĚNÍ MASNÝCH ODPADŮ.....	12
1.3 ASANAČNÍ ÚSTAVY.....	14
1.4 ODPADNÍ VODY	16
1.4.1 Odpadní vody z asanačních ústavů.....	16
1.4.2 Odpadní vody od zpracovatelů masa.....	16
2 VYUŽITÍ ODPADŮ MASNÉHO PRŮMYSLU	18
2.1 VYUŽITÍ PEVNÝCH ODPADŮ MASNÉ VÝROBY	18
2.1.1 Energetika.....	18
2.1.2 Zemědělství	19
2.1.2.1 Rostlinná výroba	19
2.1.2.2 Živočišná výroba	20
2.1.3 Potravinářství.....	22
2.1.4 Lékařství a farmaceutický průmysl.....	23
2.1.5 Ostatní využití.....	24
2.2 VYUŽITÍ KAPALNÝCH ODPADŮ MASNÉ VÝROBY.....	24
2.2.1 Využití odpadních vod.....	24
2.2.2 Využití krve	25
3 HOVĚZÍ ŠLACHY	26
3.1 SLOŽENÍ.....	26
3.2 KOLAGEN	26
3.2.1 Chemické složení a struktura.....	27
3.2.2 Vlastnosti kolagenů	28
3.2.3 Použití kolagenů	28
3.2.3.1 Potravinářství	29
3.2.3.2 Lékařství a farmaceutický průmysl	29
3.2.3.3 Kosmetický průmysl.....	30
3.3 ELASTIN.....	30
3.4 KOLAGENNÍ HYDROLYZÁT.....	31
3.4.1 Hydrolýza	31
3.4.2 Rozdělení kolagenních hydrolyzátů.....	32
II PRAKTICKÁ ČÁST	34
4 CÍLE PRÁCE	35
5 MATERIÁLY A METODY	36

5.1	HOVĚZÍ ŠLACHY	36
5.2	PŘÍSTROJE.....	36
5.3	POMŮCKY	37
5.4	CHEMIKÁLIE	38
5.5	PLÁNOVÁNÍ A VYHODNOCOVÁNÍ EXPERIMENTŮ	38
5.6	POSTUP PRÁCE	41
5.6.1	Příprava šlach	41
5.6.2	Odtučňování šlach	41
5.6.3	Hydrolytické zpracování šlach na kolagenní hydrolyzát	41
5.6.3.1	Pokusný experiment enzymového rozkladu šlach.....	41
5.6.3.2	Enzymová hydrolyza šlach ve vodném prostředí	42
5.6.3.3	Enzymová hydrolyza šlach ve vodném prostředí s přídavkem 1 % (w/w) KOH.....	45
5.7	ANALYTICKÉ METODY	45
5.7.1	Stanovení sušiny hydrolyzátu	45
5.7.2	Stanovení obsahu dusíku a čistých bílkovin v hydrolyzátu	47
5.7.3	Stanovení obsahu hydroxyprolinu, výpočet obsahu kolagenu a elastinu v hydrolyzátu	48
5.7.3.1	Příprava pracovního roztoku hydrolyzátu pro stanovení obsahu hydroxyprolinu	48
5.7.3.2	Stanovení hydroxyprolinu	48
5.7.3.3	Výpočet obsahu kolagenu a elastinu v hydrolyzátu	50
5.7.4	Stanovení obsahu popelovin v hydrolyzátu	51
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	53
6.1	ENZYMOVÁ HYDROLÝZA ŠLACH VE VODNÉM PROSTŘEDÍ.....	53
6.1.1	Účinnost rozkladu.....	53
6.1.2	Charakterizace kolagenních hydrolyzátů.....	57
6.2	ENZYMOVÁ HYDROLÝZA ŠLACH VE VODNÉM PROSTŘEDÍ S PŘÍDAVKEM 1 % (w/w) KOH	60
6.2.1	Účinnost rozkladu.....	60
6.2.2	Charakterizace kolagenních hydrolyzátů	64
6.3	SROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ ENZYMOVÉ HYDROLÝZY ŠLACH.....	67
	ZÁVĚR.....	69
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	70
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	75
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	77
	SEZNAM TABULEK.....	78

ÚVOD

Potravinářský průmysl můžeme klasifikovat jako průmyslový obor, který se zabývá zpracováním potravinářských surovin rostlinného a živočišného původu za účelem výroby potravin. Nejdůležitější součástí potravinářského průmyslu (vedle zpracování obilovin) je průmysl masný. Jeho hlavní funkcí je zpracování hospodářských zvířat a jejich masa pro lidskou spotřebu. Důležitost masného průmyslu názorně dokládají statistiky, které okomentoval Patrick J. Moore na Mezinárodním semináři k masu a masným výrobkům konaného v květnu 2008 v Pekingu. Bylo zjištěno, že celková výroba masa roste ročně o 2,5 % (za období 1998-2008), přičemž nejvíce se na této produkci podílí maso vepřové a drůbeží. Spolu s předpokládaným nárůstem obyvatel naší planety je tedy zřejmé, že masný průmysl bude nadále představovat velice signifikantní odvětví potravinářského průmyslu. S růstem jeho významu je nicméně potřeba věnovat zvýšenou pozornost jak jeho vstupům, tak výstupům, a to zejména těm odpadním. Odpady masného průmyslu nemusí vytvářet jen ekologickou zátěž, ale také mohou být potencionálním zdrojem cenných surovin, které se mohou dále zpracovávat.

Předložená diplomová práce je ve své literární studii zaměřena na klasifikaci odpadů masné výroby a na současné způsoby využití odpadů masné výroby. Na základě zhodnocení současného stavu využití pevných bílkovinných odpadů masného průmyslu je praktická část diplomové práce zaměřena na zpracování hovězích šlach jatečného dobytka, které jsou zdrojem poměrně čistého kolagenu a které nejsou v současné době adekvátně využity.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ODPADY MASNÉHO PRŮMYSLU

1.1 Definice a legislativní vymezení masných odpadů

Za odpady masného průmyslu se považují celá těla uhynulých zvířat či části jejich těl a produkty živočišného původu vznikající na jatkách, výrobnách či v masnách, které nejsou určeny k lidské spotřebě [1, 2]. Jednotlivé druhy hospodářských zvířat pak představují rozdílné procentuální množství vyprodukovaného odpadu.

Likvidace odpadů živočišného původu a jejich využití v rámci naší republiky je legislativně vymezena nejrůznějšími zákony, nařízeními a vyhláškami. Jako příklad můžeme uvést:

- Zákon 185/2001 Sb., o odpadech, ve znění zákona č. 106/2005 Sb.
- Vyhláška č. 381/2001 – Katalog odpadů
- Vyhláška č. 383/2001, o podrobnostech pro nakládání s odpady
- Zákon o krmivech 91/1996 Sb. a jeho prováděcí vyhláška č. 451/2001

V rámci Evropské unie (EU) je likvidace tohoto materiálu řešena směrnicí EU č. 1774/2002 Evropského parlamentu a Rady. Tato směrnice platí od 3. 10. 2002 a slouží jako nástroj pro vyloučení mrtvých zvířat a nežádoucího materiálu z potravního řetězce a pro bezpečné zpracování a likvidaci. Dále dává jasné pokyny pro manipulaci s vyřazeným materiálem, uvádí identifikační a dohledatelný systém, podle něhož musí být označeny určité produkty (jako je např. masokostní moučka a tuky určené pro likvidaci) tak, aby se vyloučilo riziko proniknutí neschválených produktů do potravního a krmného řetězce. Směrnice se týká i alternativních postupů zpracování odpadů, jako je produkce bioplynu, kompostování, společné spalování a další [1].

1.2 Třídění masných odpadů

Materiály živočišného původu můžeme rozdělit podle výše zmíněné směrnice EU do tří základních skupin [1, 6]:

I. Materiály kategorie 1 = SRM (specifikovaný rizikový materiál)

Do této kategorie se řadí materiál, který je rizikový z pohledu možného přenosu tzv. nemoci šílených krav (BSE). Jedná se o lebku včetně mozku, očí a mandlí (tonzily), dále míchu včetně míšních kanálů z přežvýkavců (skotu, ovcí a koz) starších 12 měsíců, úsek tenkého střeva - ileum skotu staršího 12 měsíců a slezina ovcí a koz všech věkových kategorií. Dále sem spadají produkty ze zvířat, kterým byly podávány zakázané látky a produkty živočišného původu obsahující rezidua látek znečišťujících životní prostředí. Je důležité podotknout, že celou tuto skupinu odpadů je nutno skladovat, přepravovat a zpracovávat odděleně tak, aby nedocházelo ke kontaminaci ostatních materiálů.

Od července 1994 Evropská unie zakázala krmení dobytka pomocí těchto surovin a od prosince 2000 zakázala i import a export takového materiálu do a ze zemí EU. Také bylo uvedeno v platnost nařízení, že vzniklé produkty je nezbytné likvidovat přímým spalováním a to při dostatečně vysoké teplotě (cca 1000 °C) a při dostatečném množství kyslíku tak, aby došlo ke zničení všech nežádoucích patogenů [3, 4].

II. Materiály kategorie 2

Tato skupina zahrnuje živočišný odpad pocházející z dobytka, který obsahuje zbytky léčiv, případně sem spadají konfiskáty obsahující zbytky nestrávené potravy (tzn. obsah tenkého, tlustého střeva a bachorů). Také zahrnuje veškerou podestýlku hospodářských zvířat včetně výkalů (pevných i tekutých) a těla uhynulých hospodářských zvířat.

III. Materiály kategorie 3

Do poslední a nejméně rizikové skupiny spadají části jatečných zvířat, která nebyla napadena nějakou chorobou, a kdy tyto části nejsou vhodné k lidské spotřebě. Jedná se o kůže, kosti, rohy, kopyta, peří, vlna, chlupy, prasečí štětiny, skořápky, vedlejší produkty z líhni, krev získaná z jiných zvířat než z přežvýkavců (zvířata musejí být označena veterinářem za zdravá) a další. Co se týče velikosti jednotlivých kategorií, tak právě tato skupina je tou největší. Jako důkaz můžeme uvést statistiku z roku 2008, kdy Francie v tomto roce vyprodukovala přes 2,8 miliónů tun odpadů masného průmyslu a z toho až 1,8 miliónů tun byl materiál 3. kategorie [5].

Přibližné množství odpadů v jednotlivých kategoriích z jednoho kusu poraženého dospělého zvířete nám shrnuje Tab. 1. Toto shrnutí je podloženo odhadem pracovníků jatek v Lešanech u Prostějova.

Tab. 1: Shrnutí průměrného množství odpadů jednotlivých kategorií z jednoho kusu dospělého zvířete

Druh zvířete	Množství odpadu materiálu kategorie 1 (kg)	Množství odpadu materiálu kategorie 2 (kg)	Množství odpadu materiálu kategorie 3 (kg)
hovězí	45	15	7
vepřové	-	1-2; (3,5)*	2-3
* 1-2 kg: v případě, že se tenká střeva dále využívají na výrobu masných produktů, 3,5 kg: v případě, že se tenká střeva dále nevyužívají			

Další možností třídění odpadů masné výroby je jejich rozdělení podle skupenství. Zde rozlišujeme dvě kategorie:

I. Pevné odpady masného průmyslu

V této kategorii najdeme vnitřnosti jednotlivých zvířat, kosti, šlachy, kůže, rohy, kopyta, paznehty, ocasy, nožiny, čumáky, uši a jiné.

II. Kapalně odpady masného průmyslu

Zde se jedná především o krev poražených zvířat.

1.3 Asanační ústavy

Předmětem činnosti asanačních podniků je sběr, svoz a neškodná likvidace odpadů živočišného původu, výroba masokostních mouček a kafilerních tuků [1].

Již zpracovatel má za povinnost veškerý odpad pečlivě třídít, evidovat jeho množství a sbírat jej do označených plastových kontejnerů. Ty se následně převáží do asanačních ústavů, kde dochází k opětovné kontrole hmotnosti, pečlivému zaevidování a dalšímu zpracování. Nad výběrkou a kontrolou vstupní suroviny dozoruje technický dozor podniku, veterinární lékař podniku a státní veterinární dozor [1].

Každý asanační podnik zajišťuje asanaci odpadů živočišného původu v určeném regionu. Na regionální úrovni se provádí tzv. velký svoz a terénní asanace. Technicky je velký svoz zajišťován prostřednictvím ramenových nakladačů a vleků. Přeprava menší suroviny je pak zajišťována prostřednictvím speciálních kafilerních vozidel s těsnou kovovou karosérií, aby nedocházelo k únikům tekuté části při přepravě a tudíž ke škodlivému působení na

životní prostředí. Svoz specifikovaného rizikového materiálu (SRM) je prováděn zásadně odděleně. S těly uhynulých zvířat, z nichž bude odebírán SRM, je nakládáno též odděleně [1].

V České republice v současné době provádí veterinární asanační činnost 9 společností. Jedná se o tyto subjekty:

- VAPO, spol. s.r.o. - Podbořany
- SAP Mimoň spol. s r.o. – Mimoň
- VETAS České Budějovice s.r.o.
- ASAVET a.s. - Biřkov
- A S A P s.r.o. - Věž
- R E C, spol. s r.o. - Mankovice
- MAT, spol. s r.o. - Otrokovice
- AGRIS spol. s r.o. – Medlov
- A S A N A C E spol. s r.o. - Němčičky u Židlochovic

Při zpracování konfiskátů v každém asanačním podniku jsou používány stroje a zaručené, státem kontrolované výrobní postupy. Asanační podnik provede jejich sterilizaci a zpracování na neškodné produkty obsahující cenné přírodní zdroje proteinů, minerálů a energie, které mohou nalézt další využití v jiných odvětvích [1].

Zpracování je pevně dáno podle již zmíněných zákonů a vyhlášek a dovezená surovina musí projít následujícím procesem: Nejdříve se musí odpady pečlivě rozdrtit na částice menší než 50 mm a následně se sterilizují v destruktoech při minimální teplotě 133 °C a tlaku 300 kPa po dobu minimálně 20 minut. Údaje o sterilizaci jsou povinně registrovány a archivovány pro účely kontroly po dobu 2 let. Tímto procesem vzniká tzv. masokostní kaše. Poté dochází k odpařování vody z masokostní kaše v diskových sušárnách na obsah vody cca 4 % a k oddělení tuku pomocí lisování nebo extrakce. Díky těmto procesům získáváme dva produkty: masokostní moučku a kafilerní tuk, který se čistí na dekantérech a je dále odveden do skladu tuků. Masokostní moučka je dopravována do chladiče a následně na prosévačku, ze které je část o požadované zrnitosti transportována do skladových sil.

Využití masokostní moučky a kafilerního tuku bude zmíněno v pozdějších kapitolách

I přesto, že je v procesu aplikována tepelně - tlaková sterilizace, která zničí beze zbytku veškeré známé původce onemocnění lidí i zvířat, provádí se denní odběr vzorků výrobků pro kontrolu v nezávislé státní veterinární laboratoři [1].

1.4 Odpadní vody

1.4.1 Odpadní vody z asanačních ústavů

Při úpravě konfiskátů vznikají i odpadní vody, které můžeme rozdělit na odpadní vody technologické, oplachové a splaškové. Tyto odpadní vody jsou v první fázi předčištěny pomocí lapačů tuků a homogenizovány v homogenizační nádrži. Lapač tuku je tvořen velkou nádrží se zařízením na prosycení odpadní vody vzduchem, který vynáší tuk na hladinu. Tento tuk je následně shrabován do zásobní jímky. Poté jsou vody čerpány k flotaci (při příliš velkém znečištění) nebo k biologickému čištění. Následně dochází k procesům, které vedou k odstraňování dusíku pomocí systému nitrifikací a denitrifikací. Tímto způsobem vzniká tzv. aktivovaný kal, který se pak od vyčištěné odpadní vody separuje v dosazovacích nádržích. Vyčištěná odpadní voda se pak může vypouštět do tzv. biologického rybníku [1].

1.4.2 Odpadní vody od zpracovatelů masa

Odpadní vody nevznikají jen v již zmíněných asanačních centrech, ale už i při samotném procesu zpracovávání masa. Tyto vody obsahují velké množství dusíku, fosforu, tuků, proteinů a různých mikroorganismů. Nehledě na tyto skutečnosti, odpadní voda se vyznačuje silným zápachem, má červenou až hnědou barvu a případně pění nebo zahnívá. [7-9].

Při vzrůstající spotřebě masa dochází samozřejmě i k nárůstu množství odpadní vody, tudíž bylo nutné vymyslet vhodné řešení, jak nakládat s tak velkým množstvím odpadní vody. Jednou z možností je klasické vypouštění vody do kanalizace nebo do povrchových vod. Zde je nutno podotknout, že již z důvodu výše zmíněných kontaminací je důležité vodu upravovat [9]. Množství odpadní vody vypouštěné do kanalizace je vždy upravené

dohodou mezi zpracovateli masa a jednotlivými orgány státní správy. Přípustné hodnoty znečištění pro odpadní vody vypouštěných do povrchových vod nám shrnuje Tab. 2. Dohoda mezi zpracovateli a orgány státní správy je ovlivněna nejen velikostí přidružené čističky odpadních vod (ČOV) a velikostí zpracovatele, ale i schopností ČOV zvládnout úpravu dohodnutého množství odpadní vody [10].

Tab. 2: Přípustné hodnoty znečištění pro odpadní vody z výroby masa a masných výrobků vypouštěné do povrchových vod [10]

Ukazatel	Přípustné hodnoty [mg/l]
CHSK _{Cr}	200
BSK ₅	50
NL	80
N-NH ₄ ⁺	20
N-NH ₄ ⁺ (Z)	36
N _{anorg.}	30
N _{anorg.} (Z)	50
P _{celk.}	10

CHSK_{Cr} – chemická spotřeba kyslíku dichromanovou metodou

BSK₅ - biochemická spotřeba kyslíku pětidenní s potlačením nitrifikace

NL – nerozpuštěné látky

N-NH₄⁺ - amoniakální dusík

P_{celk.} – celkový fosfor

Z – hodnota platí pro období, ve kterém je teplota odpadní vody na odtoku z biologického stupně nižší než 12 °C; teplota odpadní vody se pro tento účel považuje za nižší než 12 °C, pokud z 5 měření provedených v průběhu dne byly alespoň ve 2 měřeních zjištěny teploty nižší než 12 °C.

2 VYUŽITÍ ODPADŮ MASNÉHO PRŮMYSLU

Odpady masného průmyslu mají velký potenciál využití, a to jak z důvodu jeho množství, tak i z důvodu vlastností tohoto materiálu. Využití masných odpadů jde samozřejmě ruku v ruce s postupným vývojem a technologií. Přes 49 % těchto odpadů se momentálně využívá v energetice, 21 % na výrobu krmiva pro domácí mazlíčky, 17 % využívá ropný průmysl, 5 % se používá pro výkrm ostatních hospodářských zvířat, 3 % odpadů se dá ještě využít k výrobě pokrmů pro člověka, 2 % slouží k výrobě hnojiv a ze zbytku se vyrábí ostatní věci běžného užívání [5].

2.1 Využití pevných odpadů masné výroby

2.1.1 Energetika

Do konce minulého století se jako hlavní zdroj energie pro dopravní prostředky používala paliva derivovaná z ropy. Lidé si však uvědomili skutečnost, že fosilní paliva budou časem vyčerpána, a tudíž je potřeba najít nějaký jiný zdroj energie a také to, že nový zdroj energie by měl zároveň snížit produkci tzv. skleníkových plynů. Například snahou EU je snížení emisních skleníkových plynů do roku 2020 až o 20 % a předpokládá se, že v tomtéž roce by měly desetinu veškerého paliva do automobilů tvořit biopříměsy. Dnes se podíl biopaliv pohybuje v jednotkách procent. V Česku činí podíl biosložky v naftě cca 2 % [14-17].

Biopaliva se vyrábějí z nejrůznějších plodin (obilí, cukrová třtina a další). Neméně důležitou složkou pro výrobu biopaliv je i skupina tuhých a kapalných zemědělských odpadů, včetně odpadů z masného průmyslu. Z této kategorie se pak vyrábí tzv. bionafta. Konkrétním vhodným odpadním produktem masného průmyslu, který je vhodný k výrobě bionafty, je živočišný tuk [15, 18]. Tento tuk se získává buď z jatek, nebo se může alternativně použít i olej z ryb. Podle Světové organizace pro výživu a zemědělství (FAO) bylo v roce 2006 vyloveno přes 142 miliónů tun ryb, z toho 50-75 % je určeno pro lidskou spotřebu a zbylých 25-50 % je odpad tvořený z částí ryb nevhodných ke konzumaci a z rybích tuků [18, 19].

Je nutné podotknout, že na vývoji biopaliv v kategorii dopravního průmyslu pracuje celá řada vědců ze všech koutů světa a názor na jejich výrobu a využití není zcela jednoznačný.

Jedna skupina tvrdí, že biopaliva mohou nahradit doposud používaný benzín či naftu, druhá skupina oponuje jednak kvalitou takového paliva a také faktem, že jejich výroba v tak velké míře může způsobit spoustu dalších environmentálních problémů. Velmi sporné je například deklarované snižování emisí CO₂. Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD) spočítala, že i kdyby podíl biopaliv v benzínu a naftě vystoupal v roce 2050 celosvětově na 13 %, snížily by se emise CO₂ jen o pouhé 3 % [14].

Odpady masného průmyslu, konkrétně odpady kategorie 1, mají v rámci energetiky i další možné využití. Vzhledem k nařízení EU o likvidaci těchto materiálů se začaly cíleně využívat jako zdroj paliva pro výrobu cementů. Výhodou je fakt, že výroba probíhá při teplotě kolem 1450 °C a při dostatečném množství kyslíku, tudíž dochází ke zničení všech nežádoucích patogenů. Dále tyto odpady mají značně vysokou výhřevnost, která se pohybuje v rozmezí 13-30 MJ/kg. Jako zdroj alternativního paliva se tak odpady masného průmyslu využívají v čím dál větší míře. Například ve Francii se při výrobě cementu v roce 2000 využilo více než 205 000 tun odpadů, v roce 2001 to bylo 260 000 tun, v roce 2002 to bylo 350 000 tun a v roce 2003 to bylo více než 400 000 tun tohoto odpadu [20].

2.1.2 Zemědělství

2.1.2.1 Rostlinná výroba

K dobrému růstu rostlin je třeba zajistit nejen světlo, teplo, dostatečnou závlivku a vhodné stanoviště, ale také správný poměr živin. Obecně hnojiva dělíme do dvou kategorií - hnojiva anorganická a hnojiva organická. Hlavní výhodou anorganických hnojiv je, že jsou levnější a v případě potřeby nutného „zásahu“ působí rychleji než hnojiva organická. Organická hnojiva ovšem celkově zlepšují kvalitu půdy, působí na oživení půdních mikroorganismů a podporují její absorpční schopnosti i růst rostlin. Živiny se z nich uvolňují postupně a rostliny si tak mohou samy „vybrat“, co právě potřebují. Další výhodou je fakt, že nespotřebované živiny zůstávají vázané v půdě [21, 22].

Za organická hnojiva považujeme nejen výkaly hospodářských či jiných zvířat, ale i některé části těl živočichů, které jsou již dále nezpracovatelné pro produkty lidské výživy. Můžeme hovořit o rohové, krevní, kostní a masokostní moučce.

Rohová moučka se vyrábí z rohů a kopyt, které se melou na drobný prášek. Čím více rozemletý materiál, tím se v půdě lépe rozkládá a rychleji uvolňuje potřebné živiny. Rohová hnojiva obsahují vedle dusíku především fosfor a vápník.

Kostní moučky se k hnojení používají již od konce 18. století, kdy tuto možnost mezi prvními využili francouzští vinaři. Rozšíření hnojení moučkou z rozdrčených kostí zvířat se dá datovat k roku 1825, kdy ve Skotsku vznikly první speciální mlýny. Koncem 19. století došlo k úpadku využívání kostních mouček jako hnojiv a to z důvodu výroby tzv. superfosfátu. Díky novým trendům ve výživě a touze spotřebitelů kupovat biovýrobky jsou ovšem kostní moučky jako hnojiva dnes opět na vzestupu. Registrace mouček za účelem jejich zavádění do oběhu jako hnojiv se provádí podle zákona č. 156 / 1998 sb., o hnojivech, ve znění pozdějších předpisů. Do roku 2007 bylo tímto způsobem zaregistrováno pouze 5 mouček [25].

Dalším možným využitím odpadů masného průmyslu k hnojení je proces kompostování. Jedná se o aerobní proces (tzn. je potřeba přítomnost kyslíku), při kterém je pomocí organismů přeměněna organická hmota na stabilnější formu. Kompostování by mělo probíhat při minimální teplotě 70 °C, po dobu 60 minut. Při této teplotě by mělo dojít ke zničení všech patogenů, které by mohly způsobit jakékoli onemocnění [6]. Kompostovat lze jak živočišné moučky, tak i přímo jednotlivé zbytky živočišných těl spadajících do 3. kategorie materiálů živočišného původu [6, 13]. Nejjednodušší a nejrychlejší způsob kompostování je odvoz vnitřností (jde převážně o žaludky a předžaludky hovězího dobytka) na pole a jejich následné zaorávání přímo do půdy [36].

2.1.2.2 Živočišná výroba

Celá výroba krmiv je postavena na dodávkách odpadů z masného průmyslu, jakožto výborného, levného a hlavně na množství dostačujícího zdroje. Krmiva se vyrábějí pod přísným veterinárním dohledem a výrobci krmiv mohou používat jen suroviny živočišného původu, které pochází z těl zvířat použitelných k lidské spotřebě, avšak nejsou vhodná pro člověka. Jedná se o uši, kosti, šlachy, kůže, plíce, játra a další [26].

Domácí zvířata (převážně kočky a psi) tvoří nedílnou součást našeho běžného života. Podle údajů Unie výrobců krmiv dosahovala v Československu roční produkce krmiv do roku

1989 maximálně 200 tun. Oproti tomu výroba krmiv pro domácí zvířata v samotné ČR v roce 2008 dosáhla objemu 150 000 tun. Podle nejrozumnějších studií bude trend výroby neustále stoupat, a to přibližně o 5 % ročně [26].

Správné krmivo pro psy a kočky by mělo být složeno z bílkovin, které jsou důležité pro růst a obnovu tělesných tkání. Dále musí obsahovat tuky, a to nejen jako zdroj energie, ale také jako funkční dochucovadlo. Sacharidy, vitamíny a minerály jsou také nedílnou součástí stravy psů a koček [26].

Krmiva můžeme rozdělit do tří základních skupin [26, 28]:

1. Krmiva suchá neboli granulovaná

Tato skupina krmiv je v dnešní době hlavní segmentem výroby krmiv pro domácí zvířata. Suchá krmiva se vyznačují nejmenším podílem vody, a to obvykle méně než 11 %. Vyrábí se nejčastěji extruzí. Tento proces výroby je hodně podobný výrobě snídaňových cereálií. Všechny složky daného krmiva se nadrolí, smíchají, vloží do extrudéru a při teplotě 100-200 °C a tlaku 3,445-3,749 MPa extrudují. Tlak a vysoké teploty zajišťují sterilizaci krmiva. Následně se extrudovaná směs odvádí na upínací desky, kde se pomocí nožů naseká na finální tvar krmiva, které se pak vysušuje na požadovanou vlhkost.

2. Polovlhká krmiva

Tato krmiva obsahují 25-35 % vody. Výroba je podobná výrobě suchých krmiv s tím rozdílem, že se do směsi přidávají stabilizátory vlhkosti. Díky zvýšené vlhkosti jsou tato krmiva náchylnější ke zkáze, která může být způsobena různými plísněmi.

3. Vlhká krmiva

Do této skupiny můžeme zařadit různé konzervy, taštičky a jiné pamlsky pro naše domácí mazlíčky. Obvykle obsahují 60-87 % vody a k tomu, aby byla dosažena jejich správná konzistence, je třeba různých přísad, jako jsou např. škrob nebo gelotvorné látky.

Z gelotvorných látek se často používá sušená zvířecí plazma, která má za úkol udržovat vzájemné vazby mezi jednotlivými složkami vyrobené potravy. Je to zejména kvůli zvýšenému obsahu vody a zároveň velkému obsahu tuků. Vyrábí se z krve sesbírané na jatkách. Po hygienické a veterinární kontrole se ke krvi přidávají antikoagulanty a následně se celý systém zamrazí až do zpracování v centrifuze. Tam se oddělují krvinky a plazma,

kteřá se následně suší na velmi jemný prášek, kde velikost částic nepřesahuje více než 0,4 mm [27].

Výroba konzerv s krmivem je podobná výrobě masových konzerv pro člověka. Připraví se směs, která se vaří a následně plní do plechovek, které se pak sterilizují při teplotě 121 °C po dobu minimálně 3 minut. Pokud bychom chtěli porovnat množství masa v jednotlivých krmivech, tak právě tato skupina ze tří jmenovaných by měla obsahovat jeho největší podíl [27].

Odpady z masokombinátů se také mohou zpracovávat na nejrůznější pamlsky pro psy a kočky. Jako příklad můžeme uvést různé žvýkací kosti nebo kůže a jiné „dobroty“ [27, 31].

Jako krmivo pro ostatní hospodářská zvířata může sloužit peří nebo odpady z masokombinátů jakožto velmi bohatý zdroj bílkovin. Takový odpad se opracuje a vzniklá hmota se smíchá s okopaninami či jinými rostlinnými koncentráty. Tento typ krmiv pak příznivě ovlivňuje růst a vývin zvířete [31].

2.1.3 Potravinářství

Odpady masného průmyslu jsou z části zpracovatelné i pro další konzumaci. Jedná se především o střeva jatečných zvířat, která se používají jako obal některých masných výrobků. Výhodou přírodních střev je fakt, že jsou lehce stravitelná, udávají výrobku finální tvar, chrání výrobek před okolním prostředím a prodlužují trvanlivost výrobku. Za nevýhodu můžeme považovat skutečnost, že mají různou délku a průměr, což poněkud zhoršuje automatizaci výroby. Před použitím je nutno tato střeva důkladně vyčistit, odtučnit, proprat a samozřejmě musí projít veterinární kontrolou. Dále se odřezky hovězích nebo vepřových kůží mohou zpracovávat na želatinu, která se přidává do salámů, tlačenek a jiných masných produktů [31, 36].

Kosti se také často využívají pro výrobu polévkových bujónů nebo pro výrobu potravinářské želatiny. Pro výrobu jedlé želatiny se mohou použít také šlachy a chrupavky [36].

V potravinářství se využívá i tuk jatečných zvířat, který se pak může používat jako sádlo na smažení či k výrobě škvarek. Také se využívá vepřová kůže, která se přidává ke směsi na výrobu tlačenek a jiných masných produktů [36].

2.1.4 Lékařství a farmaceutický průmysl

Odpady masného průmyslu se ve velké míře využívají i v lékařství a farmaceutickém průmyslu. V těchto odvětvích se nacházejí využití zejména vnitřní orgány poražených živočichů. Jejich užití musí jít samozřejmě ruku v ruce s kvalitou a čistotou použitých živočišných částí těl. Například krční tepny hovězího dobytka o délce nad 55 cm a šířce 9 - 11 mm se užívají jako tepenné implantáty [30].

Za významný zdroj cholesterolu, který je důležitý pro syntézu vitamínů D a steroidních hormonů v lidském těle, se považují mozky všech jatečných zvířat (cholesterol tvoří zhruba 15 % suché váhy mozku). Dalším možným zdrojem cholesterolu může být tuk izolovaný z peří kuřat nebo z ovčí vlny [30].

V chirurgii se využívají vepřové srdeční chlopně jako implantáty do lidských srdcí. Tyto implantáty se užívají přednostně oproti chlopním umělým. Je to z toho důvodu, že umělé chlopně vyžadují velkou dávku antikoaguantů, aby nedocházelo ke vzniku krevních sraženin, což u živočišných není potřeba v tak velké míře. Dalším důvodem je skutečnost, že u pacienta může dojít ke komplikacím v důsledku implantování chlopně. V případě, že potíže nastanou v přítomnosti zvířecí chlopně, pacient cítí dopředu varovné signály, díky kterým pak může dojít k rychlé reoperaci. Pokud pacient vlastní chlopeň umělou, nemusí případné komplikace vůbec pociťovat [30].

Dalším možným využitím zvířecích vnitřností je izolace heparinu. Ten se izoluje z tenkého střeva, z plic a jater. Heparin se užívá nejen v lékařství, ale i v potravinářském průmyslu, kde se užívá např. ke sterilizaci mléka při výrobě sýrů [30].

Jako zdroj hormonů (progesteronu a estrogeneru) se využívají vepřová ovaria.

Z vepřových žaludků se izolují proteiny a enzymy, ze kterých se pak vyrábějí přípravky pro usnadnění trávení či podpůrné přípravky pro snížení kyselosti žaludečních šťáv [30].

2.1.5 Ostatní využití

Po porážce se zpracovává kůže jednotlivých zvířat (nejčastěji kůže hovězí a vepřové, méně často telecí, kozí a ovčí) a zvířecí srst v kožešnickém a kožedělném průmyslu. Při výrobě usní se odstraňují z kůže všechny útvary pokožky, naopak při výrobě kožešin se pokožka zachovává i s chlupy. Ze srstí se používají například kozí a zaječí srst na výrobu plstí. Zaječí srst se dále využívá i v kloboučnictví. Ovčí vlna je velmi dobrou a vyhledávanou surovinou v koželužském průmyslu. V kartáčnictví se používají vepřové štětiny nebo koňské hřívy. Na výrobu malířských štětců se pak používají chlupy z ušních boltců krav. K výrobě uměleckých a řezbářských předmětů se používá rohovina z hovězích rohů nebo koňských kopyt nebo nejrůznější kosti. Rozemletím rohoviny můžeme také získat moučku, která se používá jako hnojivo. Peří z drůbeže se používá na výrobu pokrývek, spacích pytlů nebo teplého oblečení. Různě barevná pera, například pera bažantů, jsou používána na výrobu dekorativních předmětů. Pera drůbeže mají své opodstatnění i ve výrobě sportovních potřeb - například na výrobu košíků na badminton, na výrobu křídel hracích šipek nebo na výrobu umělých návnad pro rybaření. Na tyto výroby se pera přebírají pouze ručně. Z kostí se dále mohou vyrábět knoflíky či hřebeny. Hovězí lopatky, pánve a čelisti mohou sloužit k výrobě fotoželatiny. Keratin izolovaný z rohů zvířat se přidává do přípravků na péči o vlasy. Dále se mohou využívat i skořápky vajec, jejichž váha je přibližně 11 % celkové váhy drůbežního vejce. Skořápky obsahují zhruba 94 % uhličitanu vápenatého, 1 % uhličitanu hořečnatého, 1 % fosforečnanu vápenatého a zbytek je organická hmota. Skořápky se extrudují se sojovou moučkou a tato směs se používá jako další krmivo pro dobytek. [30-36, 47].

2.2 Využití kapalných odpadů masné výroby

2.2.1 Využití odpadních vod

V oblastech, kde je suché podnebí a málo srážek, se využívá možnosti použití odpadních vod z masného průmyslu jako vody k zavlažování. Samozřejmostí je fakt, že tato voda se musí upravit, a to z důvodu možné kontaminace půdy příliš velkými obsahy dusíku, fosforu a ostatních látek - převážně kationtů. Například sodíkového kationtu, který se v půdě shromažďuje a následně snižuje její propustnost, a tudíž snižuje schopnost půdy dále přijímat odpadní vodu a nakládat s ní běžným způsobem [11, 12].

Při úpravách odpadní vody vzniká již zmíněný kal, který je bohatý na organické látky a může se pomocí biologických nebo chemických procesů upravit na materiál, který se pak přidává do suchého krmiva pro krmení zvířat. Faktem však je, že úprava odpadní vody musí být přizpůsobena tomu, že se z kalu bude vyrábět krmivo [9].

2.2.2 Využití krve

Krev jatečných zvířat má širokou škálu využití. Využívá se hlavně v potravinářském průmyslu, kde se používá jako stabilizátor (např. při výrobě sýrů), emulgátor (při výrobě másla) a v neposlední řadě jako barvivo při výrobě masných produktů.

Při výrobě krmiv pro hospodářská zvířata je využívána také krevní moučka, která se využívá jako zdroj důležitých aminokyselin, převážně lysinu. Výroba krevní moučky spočívá ve vaření krve, odstranění přebytku vody a následném vysoušení.

Zvířecí krev dále nalézá uplatnění při výrobě překližek, obkladových materiálů, plastů, lepidel aj. Také se může objevit v přípravcích proti hmyzu, houbám a plísním, dále v pěnových hasících přístrojích a v porézních betonech. Ve velké míře se také používá jako stabilizátor biologického materiálu a léčiv a v hematologických laboratořích, kde se využívá například jako standardní roztok pro kalibraci přístrojů [30].

Krevní moučka je též skvělým dusíkatým hnojivem (zvířecí krev obsahuje kolem 13,8 % dusíku). Například na Novém Zélandu, kde se ročně zpracovává k lidské spotřebě přes 48 miliónů kusů zvířat, se prováděly experimenty s využitím odpadní krve, kostí a vnitřností zvířat k výrobě hnojiv. Tato hnojiva se nejdříve zkoušela použít ke hnojení pastvin, jejichž rostliny mají mělký kořenový systém [23,13]. Možnou nevýhodou využití krevní moučky se ovšem ukázal fakt, že takto pohnojená půda pak přitahuje různou havěť a krysy [30].

3 HOVĚZÍ ŠLACHY

3.1 Složení

Vazivové tkáně šlach jsou složeny ze tří základních složek. Jedná se o buňky, které tvoří tkáň a reprezentují vlastní živou hmotu vaziva. Druhou složkou jsou vlákna, která jsou tvořena fibrilárními bílkoviny (kolagen, elastin, retikulín), a poslední složkou je mezibuněčná základní hmota, která je složena z dalších bílkovinných složek, vody a elektrolytů, ve kterých jsou zakotvena vlákna [47].

3.2 Kolagen

Kolagen můžeme považovat za nejrozšířenější bílkovinu živočišné říše. Jedná se o základní strukturní materiál všech obratlovců, u savců tvoří 20-30 % všech proteinů. Vyskytuje se v kůži kostech, šlachách, rohovkách, dentině, dásních, některých cévách, orgánech a jiných částech těl živočichů. V lidském organismu hraje kolagen velkou roli, konkrétně ovlivňuje pružnost pokožky, pevnost a pružnost vlasů a nehtů, stav našich chrupavek a pružnost šlach i cévních stěn. Je nezbytný zejména v dětství a dospívání pro tvorbu kostí, protože vytváří síť pro ukládání vápníku. V dospělosti chrání klouby před artrózou [36, 42, 43].

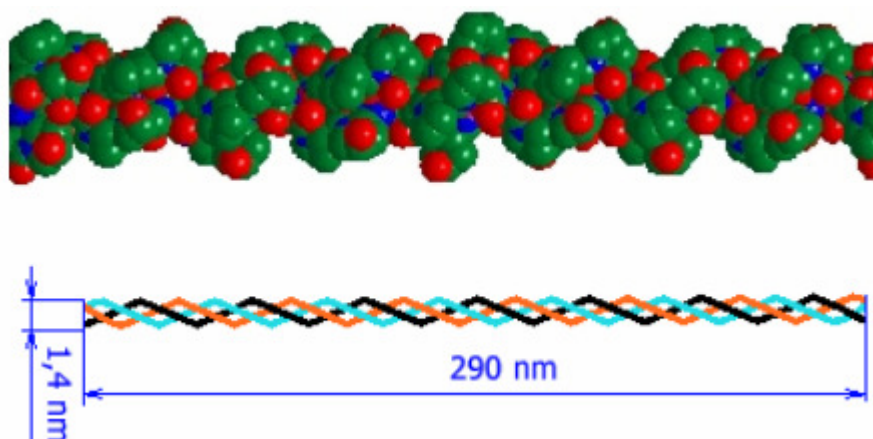
Rozlišujeme přibližně 27 typů kolagenů a v každé části živočišného těla existuje jiný typ kolagenu, přesně tak, jak naznačuje Tab. 3. Nejrozšířenějším typem kolagenu je typ I, který představuje až 90 % celkového množství kolagenu v organismech. Kolagen typu I byl izolován z nejrůznějších částí těl živočichů - jako příklad můžeme uvést ptačí nožky, hovězí, vepřová, žabí či žraločí kůže, koňské šlachy, rybí šupiny nebo mořské ježovky [42-44].

Tab. 3: Rozdělení typů kolagenů dle výskytu[43]

Typ kolagenu	Výskyt
I	kůže, šlachy, kosti, rohovky, dentin, cévy
II	hyalinní chrupavky, sklivec oka
III	cévy, kůže, děloha, srdeční chlopeč
IV	bazální membrány
V	rohovka, kosti, cévy, hyalinní chrupavky
VI	kůže, srdeční sval
VII	kůže, plíce, chrupavky

3.2.1 Chemické složení a struktura

Kolagen, jako každá jiná bílkovina, je tvořen asi z 20 základních aminokyselin, z nichž se nejvíce vyskytuje glycin (26-28 %), prolin (nad 15 %), hydroxyprolin (13-14 %) a hydroxylysin; ostatní již méně často. Jednotlivé aminokyseliny se skládají do řetězců (tzv. α řetězce), které obsahují více než 1000 aminokyselin. Ty pak tvoří trojitou pravotočivou spirálu, která je zobrazena na Obr. 1 a je označována jako tropokolagen, tedy jako základní stavební jednotka. Molekula tropokolagenu je dlouhá asi 290 nm a má v průměru přibližně 1,4 nm. V této molekule drží všechny tři řetězce pomocí vodíkových vazeb [43, 45, 46].



Obr. 1: Model molekuly kolagenu [45]

Jakmile jsou vytvořeny molekuly tropokolagenu, dochází k jejich podélnému a bilaterálnímu uspořádání a vytváří se tak mikrofibrily a následně fibrily. Fibrily pak mohou mít v průměru od 10 do 500 nm, v závislosti na typu a využití daného vlákna. Kolagen přítomný ve šlachách, kůži a kostech vytváří poměrně tlusté fibrily, které se dále spojují do objemných vláknitých svazků. Naproti tomu kolagen chrupavky vytváří jemné sítě z tenkých fibril [45, 46].

3.2.2 Vlastnosti kolagenů

Mnoho studií naznačuje, že fyzikální a chemické vlastnosti kolagenů jsou závislé jak na jejich typu, tak i na skutečnosti, z jakého druhu zvířete kolagen pochází [44]. Obecně můžeme kolagen charakterizovat jako ve vodě nerozpustný skleroprotein. Jeho největší charakteristikou je pevnost, která vychází ze struktury tropokolagenu (trojřetězcová šroubovice).

Z chemického hlediska je kolagen amfoterní polyelektrolyt, tudíž je schopen současně odštěpovat i přijímat proton. To znamená, že má povahu jak slabé kyseliny, tak i slabé báze a jeho iontové reakce probíhají v závislosti na pH. Náboj kolagenu se mění se změnou pH. V kyselé oblasti má náboj kladný, v alkalické oblasti naopak záporný náboj. Izoelektrický bod nativního kolagenu je při pH 7 [47].

Kolagenní vlákno je také schopno v přítomnosti vody bobtnat, kdy dochází ke změnám objemu, délky vlákna a pružnosti. Bobtnání kolagenů je opět závislé na pH [47].

Při přítomnosti denaturačních činidel jako jsou kyseliny, zásady, tenzidy, organická rozpouštědla či jiná specifická denaturační činidla (močovina, aj.) může docházet k denaturaci kolagenu. Denaturace může být jak vratná, tak i nevratná a můžeme ji vypořádat změnou řady veličin, jako je např. viskozita, optická rotace a jiné [47].

3.2.3 Použití kolagenů

Využití kolagenů vzhledem k jejich množství a druhům je značně široké. Největší část se využívá v potravinářství, lékařství a při výrobě nejrůznějších kosmetických či technických výrobků. Je však důležité mít na paměti, že pro každou aplikaci musí kolagen splňovat požadavky na čistotu a nezávadnost.

3.2.3.1 *Potravinářství*

V potravinářském průmyslu má kolagen velké využití. Jako příklad můžeme uvést jedlé obaly a filmy na potraviny, převážně masné produkty, které chrání potravinu před okolím, zadržují masové šťávy, omezují vznik nežádoucích mikroorganismů, omezují ztráty aromatických látek a v neposlední řadě zvyšují nutriční hodnotu a zlepšují celkový vzhled výrobku. Také se může přidávat do masných výrobků jako pojídlo a stabilizátor tvaru nebo také jako nosič vonných extraktů, případně se přidává jako modifikátor struktury pekárenských výrobků. Dalším možným způsobem využití je výroba jedlých identifikačních štítků na potraviny a jedlé želatiny, ze které se produkují převážně cukrářské výrobky - například želé na dorty a zákusky, gumoví medvídci nebo pěnové bonbóny (komerčně pojmenované jako Marshmallows), mléčné a pekárenské výrobky. Také se používá k čiření piva nebo vína. V ovocnářství se kolagen může využívat na zlepšení vzhledu plodů, nejčastěji citrusových, případně se používá jako povlak na zrající ovoce tak, aby zpomalil jeho zrání [31, 51].

3.2.3.2 *Lékařství a farmaceutický průmysl*

V lékařství má kolagen velmi významné postavení, které je způsobeno jeho vláknitou strukturou, vysokou pevností v tahu, kontrolovatelnému síťování a možností jeho rozkladu pomocí enzymů lidského těla. Nejčastěji se využívá jako ochranný štít a nosič léčiv ve formě 0,01-0,5 mm širokého filmu v očním lékařství. Vzhledem k podobnosti molekuly kolagenu lidského a vepřového oka. Kolagen pro tento medicínský obor se vyrábí z vepřových bělm [42].

Dále se využívají kolagenové podušky / houby na popáleniny či otevřené rány. Dokáží lehce přilnout k ráně, jsou schopny absorbovat vyloučené látky z rány a chránit tkáň před možnou bakteriální infekcí. Vyrábí se i tzv. práškový kolagen, který je k dispozici nejčastěji ve formě spreje a používá se jako postřík při bandážování ran [31, 42].

Jiným možným využitím kolagenu v medicíně je kolagen jako doplněk stravy ve formě prášků nebo tablet či kolagenová, lidským tělem resorbovatelná vlákna, která slouží jako chirurgické nitě. Součástí náhrad krevních cév a srdečních chlopní a hemostatikum pak představuje další praktické využití. Kolagen se rovněž využívá v plastické chirurgii a vyrábí se z něj i nejrůznější kosmetické preparáty [42].

V neposlední řadě bychom měli zmínit použití želatin (vyrobených z kolagenu získaného z hovězích nebo vepřových kůží) ve farmaceutickém průmyslu [31].

Obecně je kolagen lidským tělem velmi dobře snášen, avšak v ojedinělých případech se může objevit zarudnutí kůže nebo otoky po plastických operacích, ve dvou případech byla zaznamenána alergická reakce na hovězí kolagen při operaci očí [42].

3.2.3.3 Kosmetický průmysl

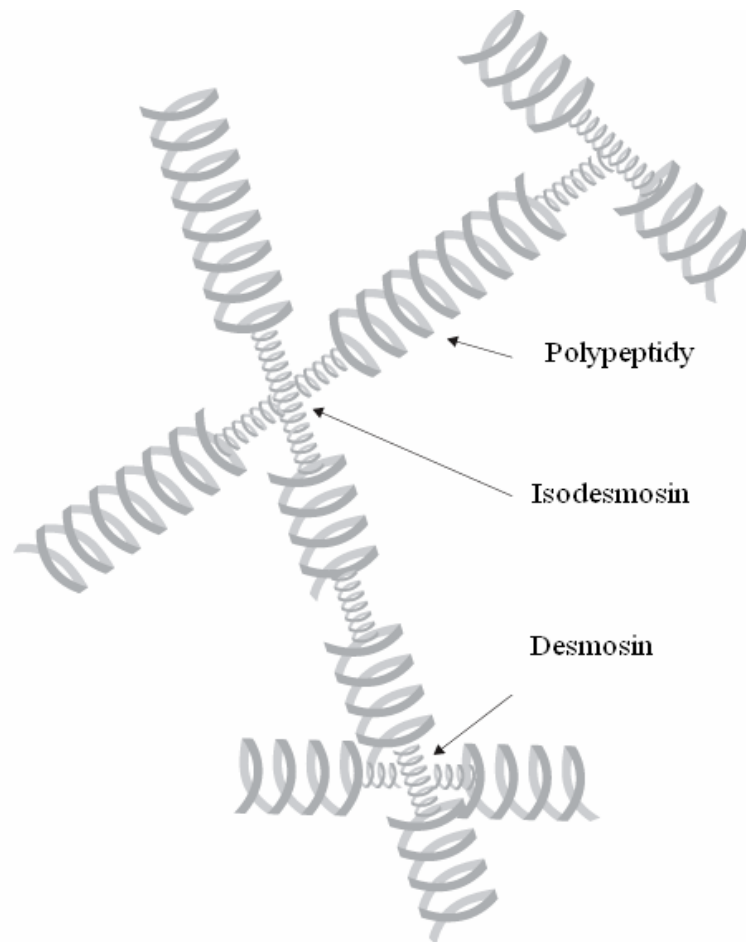
Jak již bylo zmíněno, kolagen má výbornou schopnost zadržovat velké množství vody (schopnost bobtnání). Další využitelnou vlastností pro kosmetický průmysl je schopnost kolagenu hojit rány a také schopnost brzdit proces stárnutí pokožky. Využívá se jak rozpuštěného kolagenu z mladých zvířat, tak i hydrolyzátu kolagenu [31].

3.3 Elastin

Elastin je řazen mezi vláknité bílkoviny. Vyskytuje se jak u vyšších, tak i biologicky nižších organismů. Je obsažen ve žluté elastické pojivové tkáni, která se vyskytuje v plicích, kůži, šlachách, ve stěnách velkých cév, např. v aortě, kde je jeho obsah v rozmezí 30-57 %. Největší množství - 78 až 80 % - elastinu je v týlním vazuu. Jedná se o protein s elastickými vlastnostmi, jehož vlákna lze několikanásobně natáhnout. Protahuje se vratně v širokých mezích a bez větší ztráty energie ve formě tepla. Elastinová vlákna se skládají ze dvou základních částí, a to z amorfního elastinu a z mikrofibril, které jsou 10-12 nm široké. Množství elastinových vláken v jednotlivých tkáních je proměnlivé v závislosti na jejich využití [31, 34, 36 -40].

Elastin má, jako každá jiná bílkovina, své specifické aminokyselinové složení. Je tvořen z jedné třetiny glycinem, další třetinu tvoří alanin a valin a zhruba zbytek je prolin. Pro elastin je typické, že obsahuje málo hydroxyprolinu a prakticky žádný hydroxylysin. Naopak obsahuje, jako jediná bílkovina, příčně síťující bílkoviny desmosin a isodesmosin, a to tak, jak je zobrazeno na Obr. 2. Obě tyto bílkoviny byly objeveny v roce 1963 a mají za následek žluté zbarvení elastinu [34, 36].

Využití elastinu není příliš velké. Jateční produkty, které obsahují velká množství elastinu, nejsou pro svou špatnou stravitelnost vhodným krmivem. Hlavní využití elastinu je v kožedělném průmyslu a v průmyslu kosmetickém [31, 37].



Obr. 2: Struktura molekuly elastinu [35]

3.4 Kolagenní hydrolyzát

3.4.1 Hydrolýza

Hydrolýza je nejčastěji užívaná metoda k rozkladu polymerů. V praxi se užívají tři druhy hydrolýz [31, 32]:

1. enzymová hydrolýza - při tomto procesu je třeba dodržovat optimální teplotu hydrolýzy, dobu hydrolýzy a optimální pH (podle zvoleného druhu enzymu)
2. kyselá hydrolýza - k hydrolýze se používají zředěné kyseliny, nejčastěji kyselina sírová, chlorovodíková nebo fosforečná
3. alkalická hydrolýza - k hydrolýze se používají roztoky hydroxidů, nejčastěji hydroxidu sodného, draselného či barnatého

3.4.2 Rozdělení kolagenních hydrolyzátů

Kolagenní hydrolyzáty můžeme rozdělit podle původu materiálu, ze kterého se daný hydrolyzát získává [31, 32].

1. Odpady z nativního kolagenu

Do této kategorie můžeme zařadit šlachy, vnitřnosti (střeva, atd.) a odřezky z kůží jatečných zvířat. Výroba kolagenních hydrolyzátů z této kategorie odpadů je jednodušší, protože výchozí materiál se nemusí pracně čistit. Jako nejčastější metoda výroby kolagenního hydrolyzátu se používá enzymová hydrolyza. Podmínky enzymové hydrolyzy se dají upravovat tak, aby vznikl produkt s požadovanými vlastnostmi (např. molekulová hmotnost, obsah dusíku aj.) Při použití peroxidu vodíku je možné získat bezbarvé hydrolyzáty bez zápachu. Hydrolyzáty tohoto typu nacházejí uplatnění v potravinářském průmyslu.

2. Odpady z koželužen, obuvnické a galanterní výroby

V rámci této skupiny se používají k výrobě kolagenního hydrolyzátu odpady z koželužské prvovýroby (nečiněný a činěný bílkovinný materiál) a z kožedělné druhowýroby (činěný a upravený bílkovinný materiál). K myšlence zpracování těchto odpadů vedla skutečnost, že při jejich skládkování může docházet k uvolňování chromu (III), který může být za jistých okolností oxidován na sloučeniny Cr(VI), které mají karcinogenní účinky. Odpady z kožedělného a koželužského průmyslu mohou být zpracovávány všemi třemi způsoby hydrolyz (kyselá, alkalická či enzymová). Po alkalické hydrolyze vzniká žlutohnědá tekutina sirupovité konzistence. Po kyselá hydrolyze vzniká produkt, který obsahuje značné množství oxidu chromitého, který se pak složitě separuje. Nejzajímavějším typem hydrolyzy je enzymová hydrolyza, a to z důvodu nízkých požadavků na spotřebovanou energii. Hydrolyzáty tohoto typu pak nachází uplatnění v technických aplikacích [38, 48].

Kolomazník a spol. vyvinuli a patentovali technologii dvoustupňové enzymové hydrolyzy chromočiněných usňových odpadů, kdy v prvním stupni se nechává na materiál působit roztok KOH a MgO při zvýšené teplotě a tlaku. V tomto kroku dochází k rozrušení zesíťované proteinové matrice, která je poté rozložena v druhém stupni. V prvním stupni se tedy získává vysokomolekulární proteinová frakce (75 - 200 kDa) a filtrační koláč. Do druhého stupně zpracování se využívá již jen filtrační

koláč, na který působí proteolytický enzym, což má za následek oddělení 2 frakcí. Konkrétně se jedná o chromitý kal a požadovaný kolagenní hydrolyzát, jehož molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 10-20 kDa v závislosti na podmínkách hydrolýzy [31, 32, 49].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍLE PRÁCE

Pro praktickou část diplomové práce byly stanoveny následující cíle:

1. Zpracování hovězích šlach 3-stupňovou hydrolýzou ve vodném prostředí a v mírně alkalickém prostředí za přídavku enzymu na kolagenní hydrolyzát
2. Sledování vlivu vybraných technologických podmínek při hydrolýze (doba, přídavek enzymu a teplota) na množství rozložených šlach
3. Sledování vlivu prostředí a technologických podmínek při hydrolýze na kvalitu získaného kolagenního hydrolyzátu (obsah kolagenu, elastinu, popelovin a čistých bílkovin)

5 MATERIÁLY A METODY

5.1 Hovězí šlachy

Krátké výsekové hovězí šlachy byly dodány z jatek v Přerově. Tab. 4 charakterizuje základní složení dodaného materiálu [53].

Tab. 4: Složení používaných hovězích šlach

Parametr	Hodnota (%)	Směrodatná odchylka	Variační koeficient
Sušina	34,44	0,14	0,08
Popel ⁽¹⁾	1,35	0,05	3,70
Tuk ⁽¹⁾	3,21	0,20	6,23
Dusík ⁽¹⁾	15,36	0,66	0,68
Čisté bílkoviny ⁽¹⁾	96,00	-	-
Obsah hydroxyprolinu ⁽¹⁾	11,00	0,14	0,01
Obsah kolagenu ⁽¹⁾	88,00	-	-
Obsah elastinu ⁽²⁾	8	-	-
⁽¹⁾ vztaženo na sušinu šlach ⁽²⁾ vypočteno z rozdílu čistých bílkovin a obsahu kolagenu			

5.2 Přístroje

- sušárna MEMMERT ULP 400 (Německo)
- magnetické míchadlo Ikamag RCT Basic (Německo)
- magnetická míchadélka (8 x 40 mm)
- třepačka LT 2 (ČR)
- elektronické předvážky KERN 440 – 47 (Německo)
- elektronické analytické váhy KERN 770 (Německo)
- exsikátor (s vysušeným silikagelem)
- pH metr WTW pH 526 (Německo)
- inkubátor WTB Binder (Německo)
- inkubátor Liebherr FKU 1800 (Německo)

- elektrický vařič ETA 2107 (ČR)
- lednička s mrazničkou Samsung Calex
- kovový kuchyňský cedník (velikost pórů 1 mm)
- PAD tkanina na filtraci (velikost pórů 150 μm)
- mlýnek na maso Moulinex HV 6 (Francie)
- muflová pec Nabatherm (Německo)
- mineralizátor Digesdahl (Německo)
- Parnas-Wagnerův destilační přístroj
- spektrofotometr Helios (Německo)

5.3 Pomůcky

- 25 ml, 100 ml, 500 ml odměrné válce
- Büchnerova nálevka
- 250 ml Erlenmayerovy baňky s gumovými zátkami
- nálevky
- filtrační papírky Filpap KA 1 (ČR)
- hliníkové misky do sušárny
- Petriho misky
- krystalizační misky
- pipety + balónky
- navažovací lodička
- 50 ml odměrné baňky
- kádinky
- mineralizační baňky
- žihací kelímky

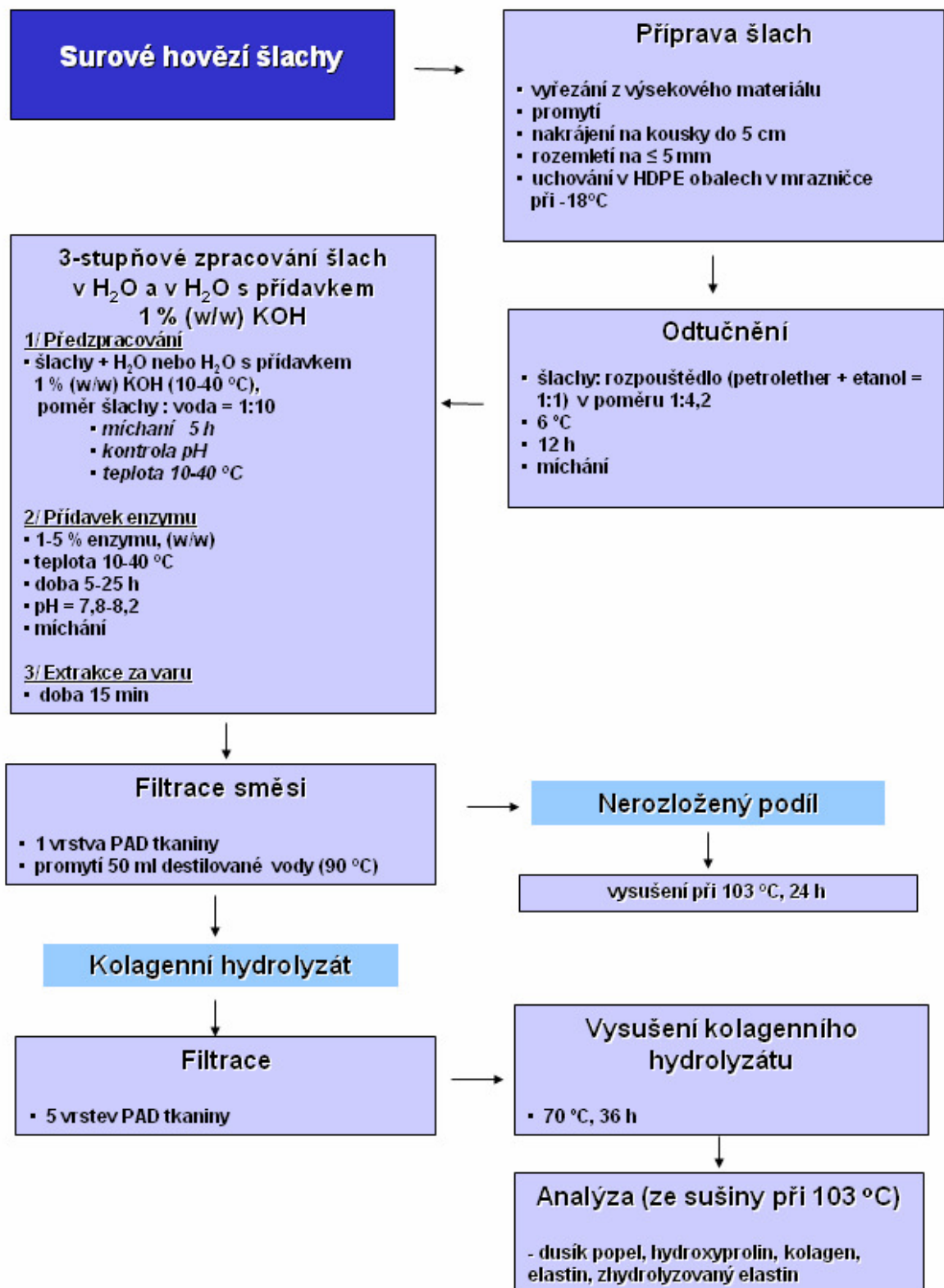
- titrační baňky
- zatavovací ampulky

5.4 Chemikálie

- destilovaná voda
- 1% roztok NaOH
- enzym POLARZYME 6.0 T (proteáza v práškové formě) – Novozymes (Dánsko)
- 30% H₂O₂ (p.a.)
- 95% H₂SO₄ (p.a.)
- 2% H₃BO₃ (p.a.)
- 30% NaOH (p.a.)
- 1% H₃PO₄ (p.a.)
- 0,05 mol / l H₂SO₄
- Tashirovo činidlo
- 6 M HCl
- 1 M, 5 M NaOH
- roztoku CuSO₄ (0,125 g CuSO₄ · 5 H₂O + 50 ml H₂O)
- 2,5 mol.l⁻¹ NaOH
- roztok H₂O₂ (5 ml 30% H₂O₂ + 10 ml H₂O)
- roztok p-dimethylaminobenzaldehydu (10% roztok p-dimethylaminobenzaldehyd v propanolu)

5.5 Plánování a vyhodnocování experimentů

Hovězí šlachy byly zpracovány na kolagenní hydrolyzát kombinovaným 3-stupňovým procesem, který zahrnoval v 1. stupni předzpracování odtučněných šlach ve vodě, ve 2. stupni působení proteolytického enzymu a ve 3. stupni var směsi po krátkou dobu. Celkový postup zpracování surových šlach na kolagenní hydrolyzát je znázorněn na Obr. 3.



Obr. 3: Celkový postup zpracování surových šlach na kolagenní hydrolyzát

K hydrolyze byl použit komerčně dostupný enzym POLARZYME 6.0 T. Přídavek enzymu byl stanoven na 1, 3 a 5 % (w/w). Tento enzym vykazuje maximální účinnost v rozmezí teplot 5-60 °C a optimální pH se pohybuje od 7 do 9.

Aby bylo možné sledovat vliv sledovaných faktorů při hydrolyze (teplota, doba hydrolyzy a přídavek enzymu) na účinnost hydrolyzy, byly experimenty naplánovány metodou faktorových pokusů. Byly použity faktorové pokusy 2^3 (3 sledované faktory na dvou úrovních – minimální a maximální) se dvěma opakováními ve středu experimentu.

Sledovanými faktory byly: *faktor A* = doba hydrolyzy (dolní limit byl stanoven na 5 h a horní limit na 25 h); *faktor B* = přídavek enzymu (dolní limit 1 % a horní limit 5 %, vztaženo na navážku vysušených šlach); *faktor C* = teplota při hydrolyze (dolní limit 10 °C a horní limit 40 °C). Přehled organizace faktorových pokusů hydrolyzy ve vodném prostředí i ve vodném prostředí s přídavkem 1 % (w/w) KOH je sumarizován v Tab. 5.

Tab. 5: Přehled organizace faktorových pokusů hydrolyzy

Podmínky enzymového rozkladu hovězích šlach			
Experiment č.	Faktor A: doba hydrolyzy (h)	Faktor B: teplota (°C)	Faktor C: přídavek enzymu (%)^A
1	5	10	1
2	5	10	5
3	5	40	1
4	5	40	5
5	15	25	3
6	15	25	3
7	25	10	1
8	25	10	5
9	25	40	1
10	25	40	5
^A vztaženo na sušinu rozmražených a odtučněných šlach			

Vyhodnocení dat bylo provedeno ve statistickém programu STATGRAPHICS (Statistical Graphics System - version: 6,0 Manugistic, Inc. and Statistical Graphics Corporation, USA, 1992).

5.6 Postup práce

5.6.1 Příprava šlach

Šlachy byly pomocí nože mechanicky vyřezány z výsekového materiálu, byly promyty vodou a nakrájeny na menší kousky. Následně byly rozemlety na mlýnku na maso Moulinex HV6 na velikost ≤ 5 mm. Takto připravený materiál se mícháním homogenizoval, dále byl rozdělen po menších dávkách do HDPE obalů a ty byly pak uchovány v mrazničce při teplotě -18 ± 2 °C [53].

5.6.2 Odtučňování šlach

Šlachy byly rozmrazeny v ledničce (při 5 °C po dobu 24 hodin) a odtučněny. Odtučnění se provádělo podle postupu, který navrhl Ing. Fenyk [53], avšak s drobnou úpravou. Rozmražené šlachy byly smíchány s vytemperovanou (6 °C) směsí rozpouštědel petrolether a etanol (1:1 objemových dílů) v poměru 1 : 4,2 (620 g šlach + 2600 ml rozpouštědla). Takto připravená směs se umístila na magnetické míchadlo v chladícím inkubátoru při teplotě 6 ± 1 °C na dobu 12 hodin. Poté se daná směs přecedila přes kuchyňský cedník s velikostí pórů 1 mm a ještě jednou promyla polovičním objemem směsi rozpouštědel, která byla opět vytemperována na teplotu 6 ± 1 °C. Odtučněné šlachy byly zanechány v digestoři po dobu 15 minut, aby se odstranilo zbylé rozpouštědlo. Odtučněné šlachy byly následně rozděleny do sáčků po cca 65 g a opět zmrazeny pro další použití.

5.6.3 Hydrolytické zpracování šlach na kolagenní hydrolyzát

5.6.3.1 Pokusný experiment enzymového rozkladu šlach

Odtučněné zmražené šlachy byly vytaženy z mrazničky 24 hodin před dalším použitím. Rozmrazování probíhalo v lednici při teplotě 5 ± 1 °C. Poté bylo naváženo 50 g (s přesností na 0,01 g) odtučněných a rozmražených šlach a smícháno v kádince s destilovanou vodou, vytemperovanou na potřebnou teplotu (25 ± 1 °C). Poměr šlach a vody byl stanoven na 1 : 8,50 g šlach a přidalo se 400 ml destilované vody. Směs byla promíchána a bylo změřeno a zaznamenáno její pH, které činilo 8,25. Následně bylo k směsi přidáno míchadélko a směs se míchala po dobu 5 hodin při sledované teplotě (25 ± 1 °C) v inkubátoru. Po této době došlo ke zbobtnání výchozího materiálu.

Po 5-ti hodinách míchání bylo opět změřeno a zaznamenáno pH směsi (pH=8,25). Následně bylo ke směsi přidáno 8 % enzymu, který se vážil s přesností na 0,0001 g na navažovací lodičce. Dále byla takto připravená směs v Erlenmayerově baňce zpět vložena na magnetickou míchačku a se směsí bylo mícháno při 25 °C po dobu 15 hod. Během prvních 2 hodin hydrolýzy bylo kontrolováno pH. Po první hodině bylo pH = 8,26 a po druhé hodině bylo již na hodnotě 7,95.

Po uplynutí 15-ti hodin bylo opět provedeno měření pH (pH = 7,95). Dále byla provedena dvojí filtrace. První byla provedena přes PAD tkaninu o velikosti pórů 150 μm a kovový cedník, kdy byl oddělen nerozložený tuhý podíl a filtrát (hydrolyzát). Pevná fáze byla ještě promyta 100 ml destilované vody, vytemperované na sledovanou teplotu (25±1 °C). Filtrát s promývací vodou byl následně přefiltrován přes filtrační papír KA-1 pomocí Büchnerovy nálevky. V poslední řadě byla provedena inaktivace enzymu ve filtrátu - filtrát byl zahřát na teplotu 80±2 °C na dobu 5 minut. Takto inaktivovaný filtrát byl vysušen při 103±1 °C. Nerozložený tuhý podíl byl také vysušen při 103±1 °C.

Bylo zjištěno, že účinnost hydrolýzy za těchto podmínek je jen 4,0 %. Vzhledem k tak nízkému procentu rozložených šlach bylo rozhodnuto upravit technologický postup rozkladu. Také bylo zjištěno, že míchání směsi pomocí magnetického míchadla a míchačky není nejvhodnější, protože docházelo k namotávání lehce zbobtnalých šlach na míchadélko které se neustále zastavovalo.

5.6.3.2 Enzymová hydrolýza šlach ve vodném prostředí

Zpracování hovězích šlach ve vodném prostředí na kolagenní hydrolyzát 3-stupňovým procesem je uvedeno na Obr. 3.

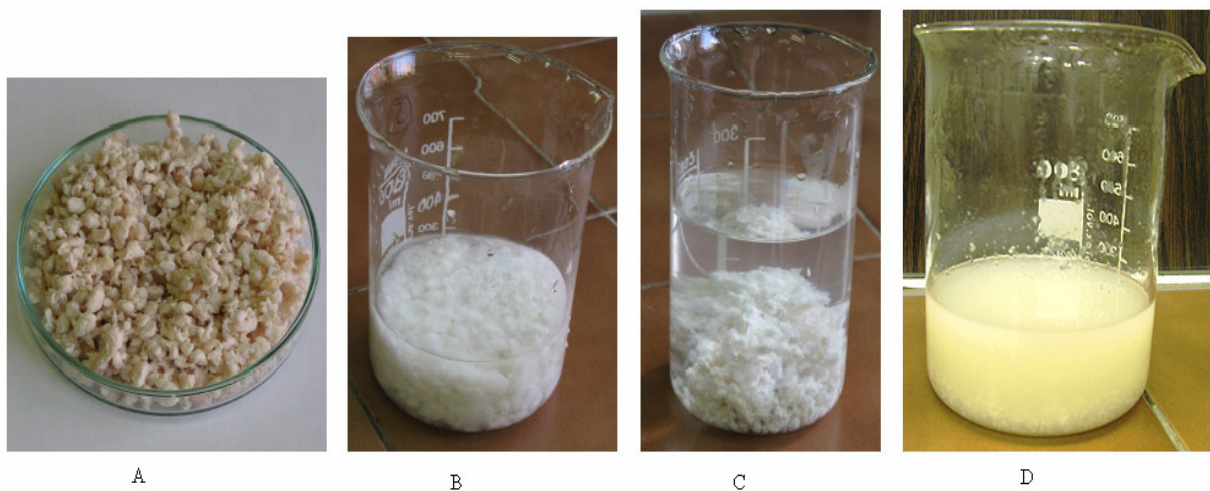
Odtučněné zmražené šlachy byly vytaženy z mrazničky 24 hodin před dalším použitím. Rozmrazování probíhalo v lednici při teplotě 5±1 °C. Poté bylo naváženo 25 g (s přesností na 0,01 g) odtučněných a rozmražených šlach a smícháno v 500 ml kádince s destilovanou vodou, vytemperovanou na potřebnou teplotu - faktor B (10, 25, 40 ±1 °C). Poměr šlach a vody byl stanoven na 1 : 10, konkrétně bylo naváženo 25 g šlach a bylo přidáno 250 ml destilované vody. Směs byla promíchána a bylo změřeno a zaznamenáno její pH, které se pohybovalo v rozmezí 7,8-8,37. Následně byla směs umístěna na třepačku a bylo třepána po dobu 5 hodin při sledované teplotě v inkubátoru. Po této době došlo ke zbobtnání výchozího materiálu (1. stupeň zpracování). Po 5-ti hodinách míchání bylo opět

změřeno a zaznamenáno pH směsi. V tomto případě se pH pohybovalo v rozmezí 7,90-8,54.

Ve 2. stupni zpracování bylo ke směsi přidáno sledované množství enzymu (faktor C - viz. Tab.5), který se vážil s přesností na 0,0001 g na navažovací lodičce. Dále byla takto připravená směs v kádince zpět vložena na třepačku a se směsí bylo mícháno při stanovené teplotě (10, 25, 40 ±1 °C) po předepsanou dobu - faktor A (5, 15 a 25 h.). Během prvních 2 hodin hydrolýzy bylo opět kontrolováno pH. U experimentů při 10±1 °C bylo pH v rozmezí 8,29-8,79, při 25±1 °C bylo 8,04-8,40 a při 40±1 °C bylo 7,85-8,04.

Po uplynutí stanovené doby hydrolýzy bylo opět provedeno měření pH. U experimentů při 10±1 °C bylo pH v rozmezí 8,22-8,26, při 25±1 °C bylo 7,73-7,89 a při 40±1 °C bylo 7,64-7,79.

Dále byla kádinka s obsahem umístěna na vařič a směs byla rychle uvedena k varu a takto udržována po dobu 15 minut (3. stupeň zpracování). V rámci tohoto kroku došlo rovněž k inaktivaci použitého enzymu. Na Obr. 4 jsou fotografie odtučněných šlach před zpracováním a v průběhu 3-stupňového zpracování na kolagenní hydrolyzát.



Obr. 4: Fotografie šlach a směsi při 3-stupňovém zpracování. A - surové hovězí šlachy, B - šlachy po 5-ti hod. míchání (1. stupeň), C - šlachy po 15-ti hod. působení enzymu (2. stupeň), D - šlachy po 15-ti minutovém povaření (3. stupeň)

Po 3. stupni následovala filtrace, která byla provedena přes jednu vrstvu PAD tkaniny o velikosti pórů 150 µm a kovový cedník, kdy byl oddělen nerozložený tuhý podíl a filtrát (hydrolyzát). Tuhý podíl byl ještě promyt 50 ml destilované vody přehřáté na cca 90 °C

a zbytek kapaliny byl opatrně vymačkán. Takto promytý nerozložený podíl byl vysušen na Petriho miskách v sušárně při 103 ± 1 °C po dobu minimálně 20 hodin. Obr. 5 znázorňuje nerozložený podíl šlach po zpracování.



A



B

Obr. 5: Nerozložený podíl šlach po zpracování. A - před vysušením, B - po vysušení

Filtrát s promývací vodou byl ještě přefiltrován přes pět vrstev PAD tkaniny na kuchyňském cedníku a vysušen (na krystalizační misce) při 70 ± 5 °C po dobu 36 hodin. Na Obr. 6 je znázorněn kolagenní hydrolyzát před a po vysušení.



A



B



C

Obr. 6: Kolagenní hydrolyzát. A - roztok kolagenního hydrolyzátu, B - film z kolagenního hydrolyzátu, C - prášek kolagenního hydrolyzátu

Vysušený hydrolyzát byl zvážen, a byly u něho provedeny analýzy (stanovení obsahu dusíku, hydroxyprolinu a popelovin) a byla stanovena účinnost rozkladu šlach (η) podle vztahu:

$$\eta = 100 - \left(\frac{NP}{n} * 100 \right) (\%) \quad (1)$$

NP hmotnost nerozloženého podílu (g)

n navážka vzorku (g)

5.6.3.3 Enzymová hydrolyza šlach ve vodném prostředí s přidavkem 1 % (w/w) KOH

Zpracování hovězích šlach ve vodném prostředí s přidavkem 1 % (w/w) KOH na kolagenní hydrolyzát 3-stupňovým procesem je uvedeno na Obr. 3.

Experimenty probíhaly shodně jako experimenty ve vodném prostředí s rozdílem přidavku 1 % (w / w) KOH v 1. stupni zpracování. Díky přidavku KOH v 1. stupni zpracování došlo k posunu pH do alkalické oblasti, které se na počátku experimentů pohybovalo v rozmezí 11,24-11,98. Po 5-ti hodinovém míchání pH lehce kleslo na hodnoty 10,63-11,42. Před 2. stupněm zpracování se pH upravilo pomocí 1% kyseliny fosforečné na pH 7,80-8,35. Průměrná spotřeba kyseliny fosforečné byla 1,8 ml. Po enzymovém rozkladu bylo naměřeno u experimentů při 10 °C pH v rozmezí 8,14-8,94, při 25 °C pH = 8,15-8,80 a při 40 °C bylo pH = 8,15-8,51.

5.7 Analytické metody

Kolagenní hydrolyzát byl nejdříve vysušen při 103 °C a ze sušiny se pak stanovil obsah dusíku, popelovin, hydroxyprolinu a vypočetl se obsah kolagenu, elastinu a zhydrolyzovaného elastinu.

5.7.1 Stanovení sušiny hydrolyzátu

Ke stanovení obsahu sušiny byla použita nepřímá metoda. Vzorek byl vysušen v sušárně Memmert s cirkulací vzduchu při teplotě 103±1 °C po dobu 24 hodin do konstantní hmotnosti. Vzorek byl navážen s přesností na čtyři desetinná místa do hliníkové misky s víčkem, která byla předem vysušena a zvážena. Navážka vzorku byla zvolena kolem 1 g.

Po vysoušení byla hliníková miska se vzorkem vložena do exsikátoru, následně zvážena a poté byl vypočítán obsah sušiny ve vzorku. Obsah sušiny (S) byl přepočítán podle vztahu:

$$S = \frac{m_2 - m_1}{n} * 100 \text{ (\%)} \quad (2)$$

m_1 hmotnost hliníkové misky s víčkem před stanovením (g)

m_2 hmotnost hliníkové misky s víčkem včetně vzorku po vysušení (g)

n navážka vzorku (g)

Pro každé stanovení bylo pracováno se dvěma navážkami a sušina tak byla stanovena jako aritmetický průměr těchto dvou stanovení.

Před dalším stanovením byla provedena tzv. bilance hmoty, která byla stanovena podle vztahů:

$$\text{VSTUP (sušina šlach)} = \text{VÝSTUP (H+NP)} + \text{BCH} \quad (3)$$

$$S = H + NP + BCH \quad (4)$$

S sušina navážených šlach (g)

H kolagenní hydrolyzát (g)

NP nerozložený podíl (g)

BCH bilanční chyba (%)

Bilanční chyba (BCH) byla vypočítána podle vztahu:

$$BCH = \left(\frac{S - (NP + H)}{S} \right) * 100 \text{ (\%)} \quad (5)$$

S sušina navážených šlach (g)

NP hmotnost nerozloženého podílu (g)

H hmotnost kolagenního hydrolyzátu (g)

5.7.2 Stanovení obsahu dusíku a čistých bílkovin v hydrolyzátu

Stanovení bylo prováděno podle ČSN 57 6023 [54] ze sušiny (při 103 ± 1 °C). Do mineralizační baňky bylo naváženo 0,5 g vzorku s přesností na 0,0001g. Poté bylo přidáno 12 ml 95% kyseliny sírové a mineralizační baňka byla vložena do mineralizátoru. Mineralizace probíhala 1,5 hodiny při 450 ± 3 °C. Po této době bylo přidáno 5 ml 30% H_2O_2 , aby došlo k rychlejšímu vyčeření vzorku. Po ukončení mineralizace byl obsah mineralizační baňky převeden do 50 ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou.

Do předlohy Parnas-Wagnerova přístroje bylo nalito 50 ml 2% H_3BO_3 , do nálevky bylo odpipetováno 20 ml mineralizátu a 25 ml 30% NaOH. Destilace byla prováděna od počátku varu po dobu 20 minut a uvolněný amoniak byl s vodní parou jímán do předlohy. Po dokončení destilace bylo do předlohy přidáno pár kapek Tashirova činidla a takto připravený vzorek byl titrován $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ roztokem kyseliny sírové. Množství použité na titraci bylo zaznamenáno. Stanovení bylo provedeno dvakrát u stejného vzorku. Množství dusíku ve vzorku (N) bylo vypočteno podle následujícího vztahu:

$$N = \frac{V_1 * 0,0014}{n_H} * \frac{V_2}{V_3} * f * 100 \text{ (%)}$$
 (6)

V_1 objem odměrného roztoku H_2SO_4 ($c = 0,05 \text{ mol.l}^{-1}$) spotřebovaný na titraci (ml)

V_2 celkový objem mineralizátu (ml)

V_3 objem mineralizátu pipetovaný na stanovení (ml)

f přepočítávací faktor odměrného roztoku H_2SO_4 ($c = 0,05 \text{ mol.l}^{-1}$)

n_H navážka hydrolyzátu vysušeného při 103°C (g)

Z vypočteného množství dusíku, vynásobením faktorem 6,25 [54], bylo zjištěno množství čistých bílkovin (B) ve vzorku.

$$B = N * 6,25 \text{ (\%)} \quad (7)$$

5.7.3 Stanovení obsahu hydroxyprolinu, výpočet obsahu kolagenu a elastinu v hydrolyzátu

Stanovení obsahu hydroxyprolinu bylo provedeno podle metody popsané Davídkem [54] a podle metody pro posuzování shody a detekci falšování potravin [55]. Výpočet obsahu kolagenu byl proveden podle Vázquez-Ortiz [56].

5.7.3.1 Příprava pracovního roztoku hydrolyzátu pro stanovení obsahu hydroxyprolinu

Do zatavovací ampulky bylo naváženo 0,05 g vzorku (s přesností na 0,0001 g) a přidáno 10 ml 6 M HCl. Ampulka byla zatavena a inkubovala se v sušárně po dobu 30 ± 1 hodin při teplotě 112 ± 2 °C. Po té byla vyjmuta, ochlazená studenou vodou a její obsah byl převeden do 50 ml odměrné baňky, která byla doplněna destilovanou vodou po rysku. S obsahem bylo zamícháno a následně byl přefiltrován přes filtrační papír s nízkou hustotou do další 50 ml odměrné baňky. V tomto případě již nedošlo k doplnění vody po rysku a vznikl tak tzv. „zředěný hydrolyzát“. Z tohoto roztoku bylo odpipetováno 10 ml roztoku do 75 ml kádinky a bylo k ní přidáno 20 ml destilované vody. Dále bylo upraveno pH takto připraveného roztoku nejdříve pomocí 5 M roztoku NaOH ≈ 3 a poté pomocí 1 M roztoku NaOH na pH = 6,3-6,8. Po úpravách pH byl obsah z kádinky převeden do 50 ml odměrné baňky, doplněn po rysku vodou a promíchán (pracovní roztok hydrolyzátu) [54-56].

5.7.3.2 Stanovení hydroxyprolinu

Do zkumavky bylo odpipetováno 1 ml pracovního roztoku hydrolyzátu. K němu bylo napipetováno 1 ml roztoku CuSO₄ (0,125 g CuSO₄ · 5 H₂O + 50 ml H₂O), 1 ml roztoku NaOH (c = 2,5 mol.l⁻¹) a 1 ml roztoku H₂O₂ (5 ml 30% H₂O₂ + 10 ml H₂O). S touto směsí bylo mícháno po dobu 5 minut. Po té byla ke zkumavce přidána nálevka, která byla využita jako zpětný chladič, a celá tato sestava byla vložena do vodní lázně a zahřívána po dobu 5 minut při teplotě 80 ± 1 °C. Následně byla zkumavka ochlazená vodou na cca 20 °C a bylo k ní přidáno 4 ml roztoku H₂SO₄ (c = 3 mol.l⁻¹) a směs byla promíchána. Díky tomuto kroku došlo k rozpuštění hnědé sraženiny. Pak byly přidány 2 ml roztoku

p-dimethylaminobenzaldehydu (10% roztok p-dimethylaminobenzaldehyd v propanolu) a opět promícháno. Zkumavka s touto směsí byla poté temperována ve vodní lázni při teplotě 70 ± 1 °C po dobu 16 minut. Po ochlazení zkumavky na pokojovou teplotu byla změřena absorbance červeného zbarvení na spektrofotometru při vlnové délce 550 nm oproti slepému vzorku. Množství hydroxyprolinu ve vzorku hydrolyzátu (HYP) bylo vypočteno podle vztahů [54-0] :

$$HYP = \frac{m_3}{n_H} * \frac{V_4}{V_5} * \frac{V_6}{V_7} * \frac{1}{1000} * 100 \text{ (\%)} \quad (8)$$

m_3 množství hydroxyprolinu odečtené z kalibrační křivky (mg)

n_H navážka hydrolyzátu vysušeného při 103°C (g)

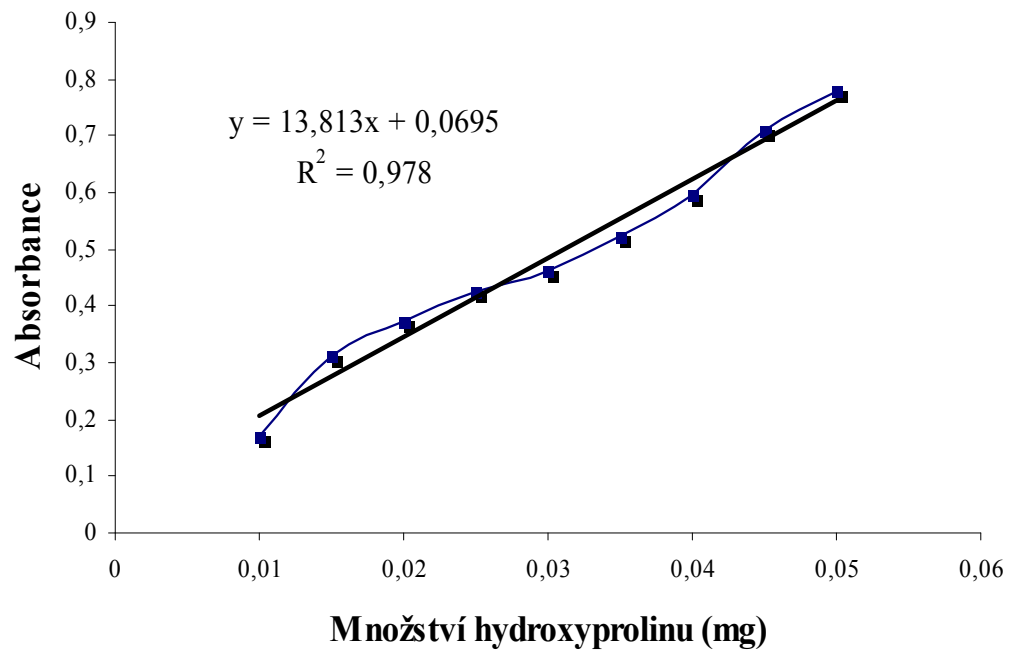
V_4 objem zředěného hydrolyzátu (tj. 50 ml)

V_5 objem pipetovaného zředěného hydrolyzátu (tj. 10 ml)

V_6 objem pracovního roztoku hydrolyzátu (tj. 50 ml)

V_7 objem pipetovaného pracovního roztoku hydrolyzátu na stanovení hydroxyprolinu (tj. 1 ml)

Na Obr. 7 je kalibrační křivka hydroxyprolinu.



Obr. 7: Kalibrační křivka hydroxyprolinu

Množství hydroxyprolinu (m_3) bylo vypočteno z rovnice přímky [53]:

$$m_3 = \frac{A - 0,0695}{13,813} \text{ (mg)} \quad (9)$$

A absorbance

5.7.3.3 Výpočet obsahu kolagenu a elastinu v hydrolyzátu

Obsah kolagenu v hydrolyzátu (K) byl stanoven podle vzorce [55, 56] :

$$K = HYP * 8 \text{ (%) } \quad (10)$$

HYP obsah hydroxyprolinu v hydrolyzátu (%)

Pro výpočet obsahu elastinu v hydrolyzátu (E) byl použit vztah:

$$E = B - K \quad (\%) \quad (11)$$

B obsah čistých bílkovin v hydrolyzátu (%)

K obsah kolagenu v hydrolyzátu (%)

Dále byl stanoven obsah zhydrolyzovaného elastinu (Ez), k jehož stanovení byl použit vztah:

$$Ez = \frac{m_{EH}}{m_{ES}} * 100 = \frac{H * f_E}{S * f_S} * 100 \quad (\%) \quad (12)$$

m_{EH} množství elastinu v hydrolyzátu (g)

m_{ES} množství elastinu v sušině šlach (g)

f_E podíl elastinu v hydrolyzátu ($f_E = \frac{E}{100}$)

f_S podíl elastinu v sušině šlach (obsah elastinu ve šlachách = 8 % - viz Tab. 4

=> $f_S=0,08$)

H hmotnost kolagenního hydrolyzátu (g)

S sušina navážených šlach (g)

5.7.4 Stanovení obsahu popelovin v hydrolyzátu

Stanovení bylo prováděno ze sušiny (při 103 ± 1 °C). Navážka vzorku byla umístěna do křemičitého, žáruvzdorného kelímku a byla pomalu spalována. Navážka na stanovení popela se volila podle množství vzorku v rozsahu 1-2,5 g. První etapa spalování byla prováděna nad kahanem 1,5 hodiny až do svého zuhelnatění. Ve druhé etapě byl vzorek vyžihán v muflové peci Nabatherm při 650 ± 4 °C po dobu 45-60 minut [54]. Poté byl žihací kelímek se vzorkem vychlazen v exsikátoru a bylo zváženo a přepočítáno množství popelovin ve vzorku. Množství popelovin (P) bylo přepočítáno podle vztahu :

$$P = \frac{m_5 - m_4}{n_H} * 100 \text{ (\%)} \quad (13)$$

m_4 hmotnost žíhacího kelímku bez vzorku (g)

m_5 hmotnost žíhacího kelímku včetně vzorku po vyžihání (g)

n_H navážka hydrolyzátu vysušeného při 103 °C (g)

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato kapitola je rozdělena do tří podkapitol, jež se zabývají výsledky při enzymové hydrolýze hovězích šlach ve vodném prostředí, ve vodném prostředí s přídavkem 1 % (w/w) KOH a v poslední řadě srovnáním výsledků enzymové hydrolýzy šlach v obou prostředích.

6.1 Enzymová hydrolýza šlach ve vodném prostředí

6.1.1 Účinnost rozkladu

Sumarizované výsledky účinnosti rozkladu hovězích šlach 3-stupňovým zpracováním ve vodném prostředí jsou uvedeny v Tab. 7. Bylo zjištěno, že účinnost rozkladu šlach se pohybovala od 13,17 % u experimentu č.1 (tzn. 5 h / 10 °C / 1 % přídavek enzymu) až po 55,66 % u experimentu č. 5 (tzn. 15 h / 25 °C / 3 % přídavek enzymu).

Množství rozložených šlach (y) je popsáno následující nelineární rovnicí:

$$y = k + x_1.A + x_2.B + x_3.C + x_{12}.AB + x_{13}.AC + x_{23}.BC \quad (14)$$

A,B,C sledované faktory při hydrolýze

AB, AC, BC interakce faktorů

k, x_1 , x_2 , x_3 , x_{12} , x_{13} , x_{23} regresní koeficienty

Při rozkladu šlach ve vodném prostředí má regresní rovnice tvar:

$$y = 2,18429 + 0,796458A + 0,369583B + 9,10979C - 0,0121333AB - 0,118375AC - 0,0134167BC$$

Korelační faktor: $R^2 = 0,738535$

Dále bylo pomocí Fischerova testu zjištěno, že žádný ze tří sledovaných faktorů není statisticky významný. Avšak za nejvýznamnější faktor můžeme považovat faktor C, tzn. přídavek enzymu, jak vyplývá z Tab. 6.

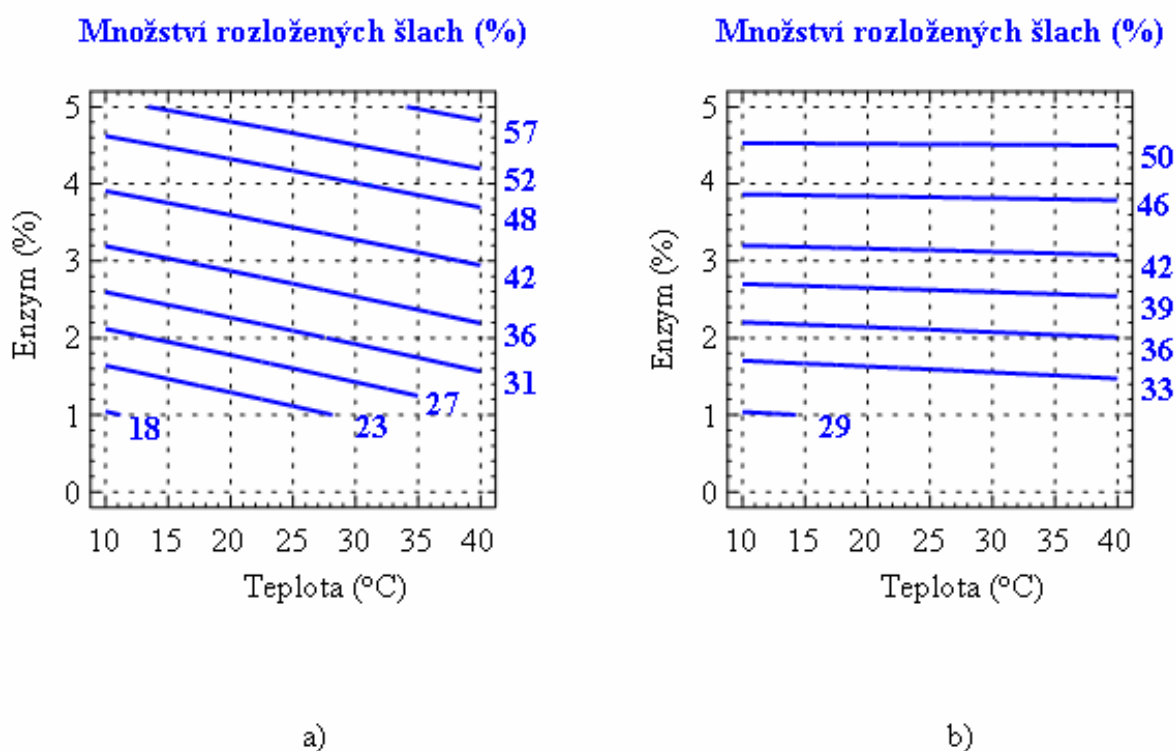
Tab. 6: Výsledky analýzy rozptylu a Fischerova testu statistické významnosti sledovaných faktorů na množství rozložených šlach ve vodném prostředí

Sledované faktory	3-stupňová hydrolýza hovězích šlach	
	Součet čtverců	F-hodnota
Faktor A: doba hydrolýzy	15,24	0,08
Faktor B: teplota	39,07	0,20
Faktor C: přídavek enzymu	1567,44	7,84
Interakce: AB	26,50	0,13
AC	44,84	0,22
BC	1,29	0,01
Celková chyba:	599,87	
Celková chyba (kor.):	2294,25	
$F_{\text{krit}}^{95\%} (1;3) = 10,13$		

Tab. 7: Výsledky rozkladu šlach ve vodném prostředí

Exp. č.	Balance sušiny ^A				η [účinnost rozkladu] (%)	Analýza hydrolyzátu ^B						
	Vstup S [sušina navěz šlach] (g)	Výstupy H [hydrolyzát] (g)	NP [nerozlož. podíl] (g)	H + NP [součet výstupů] (g)		BCH [bilanční chyba] (%)	N [obsah dusíku] (%)	B [obsah čistých bákovin] (%)	P [obsah popelovin] (%)	HYP [obsah hydroxyproli- nu] (%)	K [obsah kolagenu] (%)	F [obsah elastinu] (%)
1	8,73	1,29	7,58	8,87	13,17	14,22	88,87	10,82	9,39	75,09	13,78	23,35
2	8,73	4,06	4,54	8,60	47,92	14,75	92,19	7,18	9,10	72,80	19,39	100,00 ^C
3	9,13	1,90	7,01	8,91	23,25	15,10	94,37	6,24	9,66	77,27	17,10	39,07
4	9,13	5,04	4,20	9,25	53,96	14,27	89,16	6,31	9,24	73,91	15,25	92,34
5	9,06	4,70	4,02	8,72	55,66	15,31	95,71	5,16	9,81	78,47	17,24	98,69
6	9,06	4,40	4,09	8,49	54,87	15,77	98,56	5,31	9,99	79,95	18,61	99,78
7	8,89	2,18	6,62	8,81	25,52	15,16	94,76	5,25	9,78	78,27	16,49	45,53
8	8,89	4,08	4,59	8,67	48,37	14,98	93,60	9,47	9,47	75,74	17,86	92,14
9	8,99	1,96	6,66	8,63	25,89	15,08	94,26	5,27	9,61	76,84	17,42	42,36
10	8,99	4,76	4,53	9,30	49,56	15,11	94,45	6,94	9,58	76,68	17,72	100,00 ^C
^A stanoveno při 103 °C												
^B vztážno na sušinu (při 103 °C)												
^C vypočtem zjištěná hodnota byla v rámci analytické chyby nad 100 %												
Podmínky enzymového rozkladu hovězích šlach:												
Exp. č. 1 ... 5h / 10°C / 1% enzymu						Exp. č. 2 ... 5h / 10°C / 5% enzymu						
č. 3 ... 5h / 40°C / 1% enzymu						č. 4 ... 5h / 40°C / 5% enzymu						
č. 5 ... 15h / 25°C / 3% enzymu						č. 6 ... 15h / 25°C / 3% enzymu						
č. 7 ... 25h / 10°C / 1% enzymu						č. 8 ... 25h / 10°C / 5% enzymu						
č. 9 ... 25h / 40°C / 1% enzymu						č. 10 ... 25h / 40°C / 5% enzymu						

Grafická prezentace vlivu sledovaných faktorů na množství rozložených šlach při hydrolyze ve vodném prostředí je uvedena na Obr. 8 a Obr. 9. Obr. 8 je vrstevnicový graf znázorňující vliv teploty hydrolyzy a přidavku enzymu na množství rozložených šlach po 5-ti hodinách působení enzymu (Obr. 8a) a po 25-ti hodinách působení enzymu (Obr. 8b). Z grafů je patrné, že při 5-ti hodinovém působení enzymu je účinnost hydrolyzy v rozmezí 18-57 %, při působení enzymu po dobu 25 hodin je účinnost nižší, a to jen v rozmezí 29-50 %. Z tohoto faktu vyplývá, že hydrolyza ve vodném prostředí je účinnější při kratší době působení enzymu. Dále je zřejmé, že při 5-ti hodinovém působení má vliv na účinnost rozkladu šlach i teplota, při které se rozklad provádí (Obr. 8a), kdežto při 25-ti hodinovém působení teplota již nemá tak zásadní vliv (Obr. 8b).



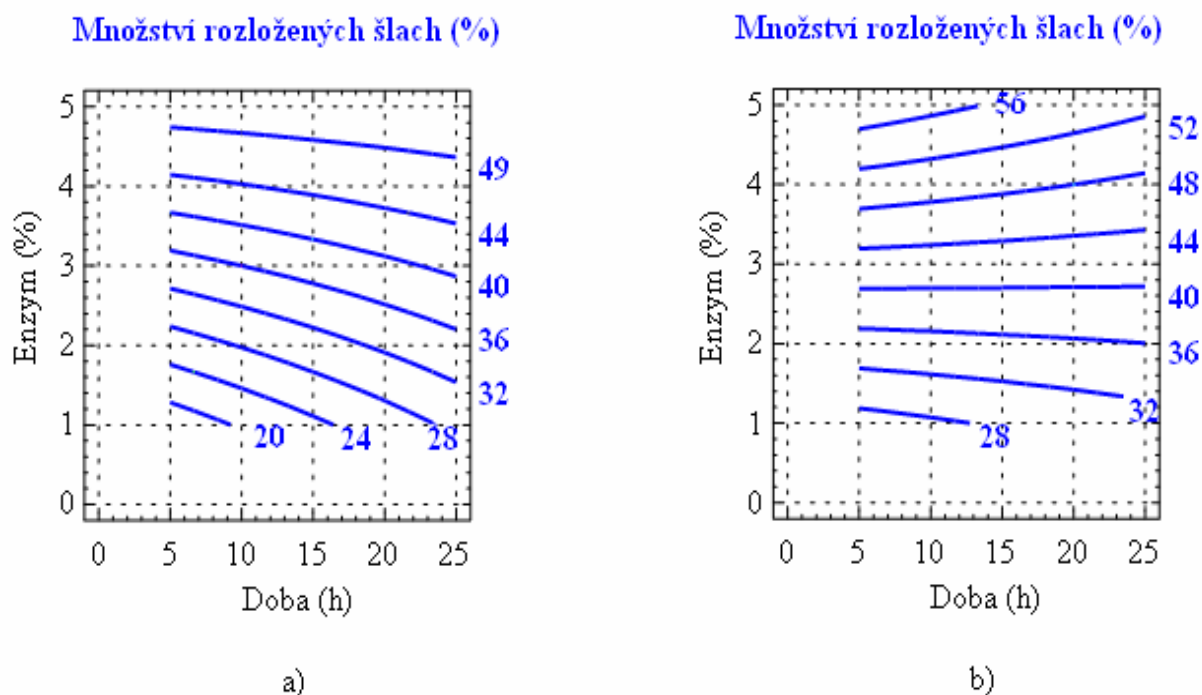
Obr. 8: Vliv teploty a přidavku enzymu na množství rozložených šlach

při experimentech ve vodném prostředí

a) po 5-ti hodinách působení enzymu b) po 25-ti hodinách působení enzymu

Na Obr. 9 je vrstevnicový graf znázorňující vliv doby hydrolyzy a přidavku enzymu na množství rozložených šlach při 10 °C (Obr. 9a) a při 40 °C (Obr. 9b). Z Obr. 9a je zřejmé, že čím kratší dobu hydrolyzy zvolíme, tím musí být vyšší přidavek enzymu, abychom

dosáhli požadovaného procentuálního rozkladu. Kdežto u hydrolýzy při 40 °C (Obr. 9b) je tento fakt pravdivý jen při nižším množství rozložených šlach (do 36%) a u rozkladů šlach nad 44 % je tendence vlivu doby a přídavku enzymu zcela opačná. Výjimku tvoří zhruba 40 % rozložených šlach, kde můžeme na šlachy působit zhruba 2,5 % přídavkem enzymu různě dlouho a výsledek rozkladu šlach bude stále shodný.



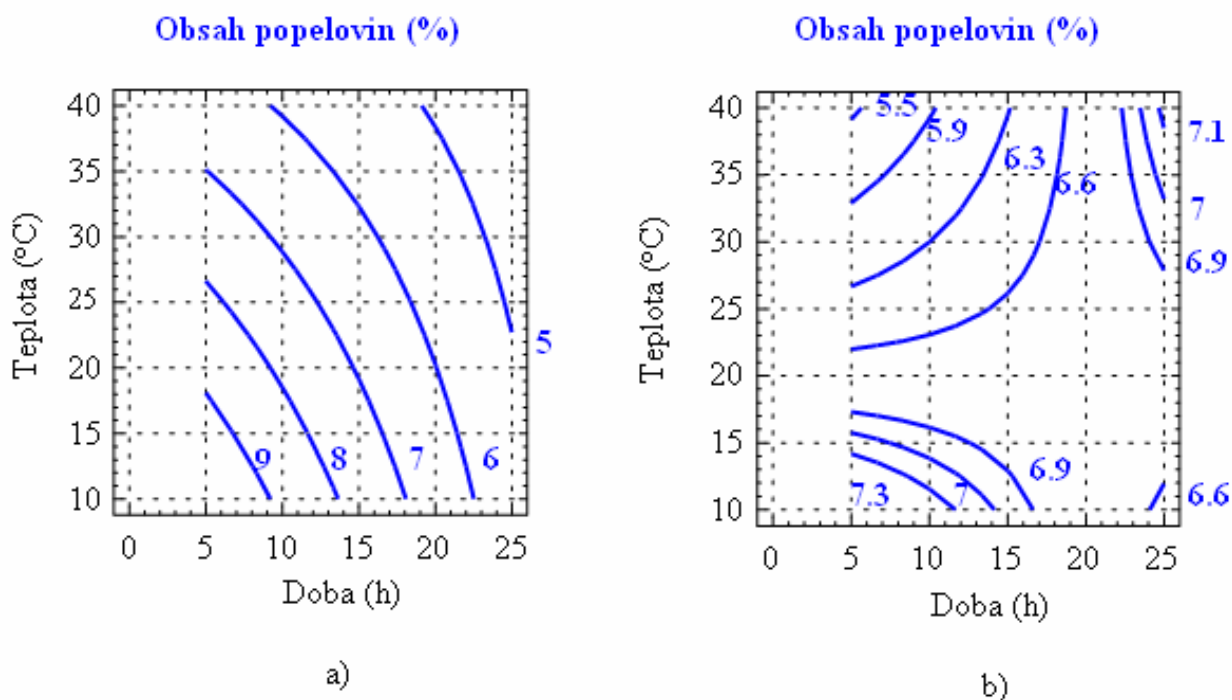
Obr. 9: Vliv doby a přídavku enzymu na množství rozložených šlach
při experimentech ve vodném prostředí
a) při teplotě 10 °C b) při teplotě 40 °C

6.1.2 Charakterizace kolagenních hydrolyzátů

V Tab. 7 (str. 53) jsou obsaženy rovněž výsledky bilance hmoty a analýz kolagenních hydrolyzátů, tj. stanovení obsahu dusíku a obsah čistých bílkovin, dále obsah popelovin, hydroxyprolinu, kolagenu, elastinu a rovněž obsah zhydrolyzovaného elastinu.

Minimální obsah dusíku v kolagenním hydrolyzátu byl roven 14,22 % (u experimentu č.1), maximální obsah dusíku byl 15,77 % u experimentu č. 6. S obsahem dusíku souvisí i obsah čistých bílkovin, který byl u experimentu č.1 roven 88,87 % a u experimentu č. 6 98,56 %.

V případě minimálního obsahu popelovin v kolagenním hydrolyzátu vyhovuje experiment č. 5 (5,16 % obsah popelovin), což současně odpovídá maximálnímu obsahu bílkovin (95,71 % obsah bílkovin). Více než dvojnásobný obsah popelovin v kolagenním hydrolyzátu (10,82 %) byl zaznamenán u experimentu č. 1. Grafická prezentace vlivu doby a teploty na množství popelovin při hydrolyze ve vodném prostředí je uvedena na Obr. 10. Obr. 10a je vrstevnicový graf znázorňující vliv sledovaných faktorů na obsah popelovin při přidavku 1 % enzymu a při 5 % přidavku enzymu zobrazuje Obr. 10b. Z Obr. 10a vyplývá, že s prodlužující se dobou a současně zvyšující se teplotou se množství popelovin v kolagenním hydrolyzátu snižuje. Při 5 % přidavku enzymu vliv doby hydrolyzy a teploty na obsah popelovin již není tak jednoznačně daný. Každopádně, pokud bychom požadovali nejnižší obsah popelovin (kolem 5 %), pak je nutné zvolit nejkratší dobu hydrolyzy (5 h) s nejvyšší teplotou (40 °C).

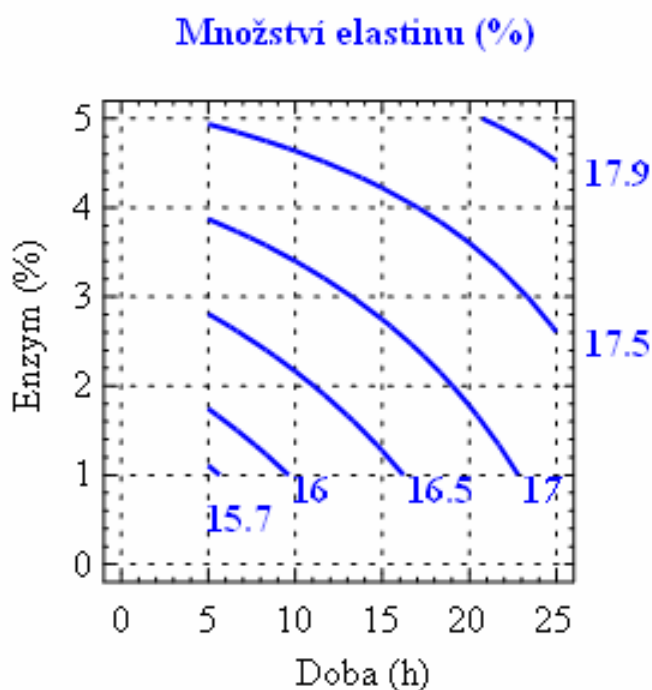


Obr. 10: Vliv doby a teploty na obsah popelovin

při experimentech ve vodném prostředí

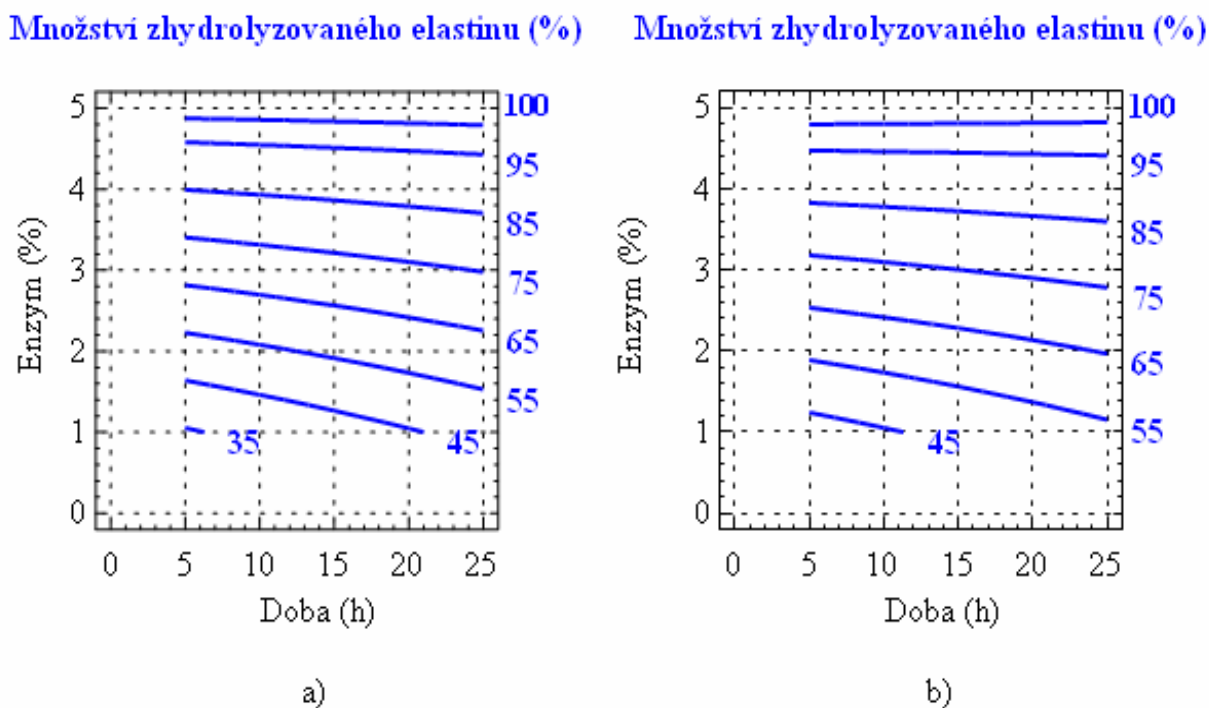
a) při 1 % přidavku enzymu b) při 5 % přidavku enzymu

Nejvyšší obsah kolagenu v kolagenním hydrolyzátu, 79,95 %, byl zaznamenán u experimentu č. 6. Naopak nejnižší obsah kolagenu v kolagenním hydrolyzátu byl zjištěn u experimentu č. 2 (72,8 %), což u tohoto experimentu je i nejvýše zaznamenaný obsah elastinu (19,39 %). Nejnižší obsah elastinu se vyskytoval u experimentu č. 1, kde činil 13,78 %. Na Obr. 11 je znázorněn vrstevnicový graf, který znázorňuje vliv přídavku enzymu a doby působení enzymu na obsah elastinu v kolagenním hydrolyzátu při 25 °C.



*Obr. 11: Vliv doby a přídavku enzymu na množství elastinu
při experimentech ve vodném prostředí a teplotě 25 °C*

Na Obr. 12 jsou vrstevnicové grafy znázorňující vliv doby hydrolyzy a přídavku enzymu na množství zhydrolyzovaného elastinu (vztaženo na původní obsah ve šlachách) při 10 °C (Obr. 11a) a při 40 °C (Obr. 11b). Množství zhydrolyzovaného elastinu se může pohybovat v případě nejnižší teploty (10 °C) od 35 % (minima sledovaných faktorů) až po 100 % (maxima sledovaných faktorů), přičemž nebyl zaznamenán výrazný vliv doby hydrolyzy. Při nejvyšší teplotě hydrolyzy (40 °C) to bylo od 45 % až do 100 % zhydrolyzovaného elastinu.



Obr. 12: Vliv doby a přídavku enzymu na množství zhydrolyzovaného elastinu při experimentech ve vodném prostředí

a) při 10 °C b) při 40 °C

6.2 Enzymová hydrolýza šlach ve vodném prostředí s přídavkem 1 % (w/w) KOH

6.2.1 Účinnost rozkladu

Sumarizované výsledky účinnosti rozkladu hovězích šlach 3-stupňovým zpracováním ve vodném prostředí jsou uvedeny v Tab. 9. Bylo zjištěno, že účinnost rozkladu šlach se pohybovala od 23,63 % u experimentu č.1 (tzn. 5 h / 10 °C / 1 % přídavek enzymu) až po 58,12 % u experimentu č. 10 (tzn. 25 h / 40 °C / 5 % přídavek enzymu).

Množství rozložených šlach (y) je popsáno následující nelineární rovnicí:

$$y = k + x_1.A + x_2.B + x_3.C + x_{12}.AB + x_{13}.AC + x_{23}.BC \quad (15)$$

A,B,C sledované faktory při hydrolýze

AB, AC, BC interakce faktorů

$k, x_1, x_2, x_3, x_{12}, x_{13}, x_{23}$ regresní koeficienty

Při rozkladu šlach ve vodném prostředí má regresní rovnice tvar:

$$y = 16,5436 + 0,068125A + 0,3505B + 5,50229C - 0,00085.AB + 0,113625AC - 0,0674167BC$$

Korelační faktor: $R^2 = 0,899025$

Dále bylo pomocí Fischerova testu zjištěno, že statisticky významný je faktor C, tzn. přídavek enzymu, jak vyplývá z Tab. 8.

Tab. 8: Výsledky analýzy rozptylu a Fischerova testu statistické významnosti sledovaných faktorů na množství rozložených šlach ve vodném prostředí s přídavkem 1 % (w/w) KOH

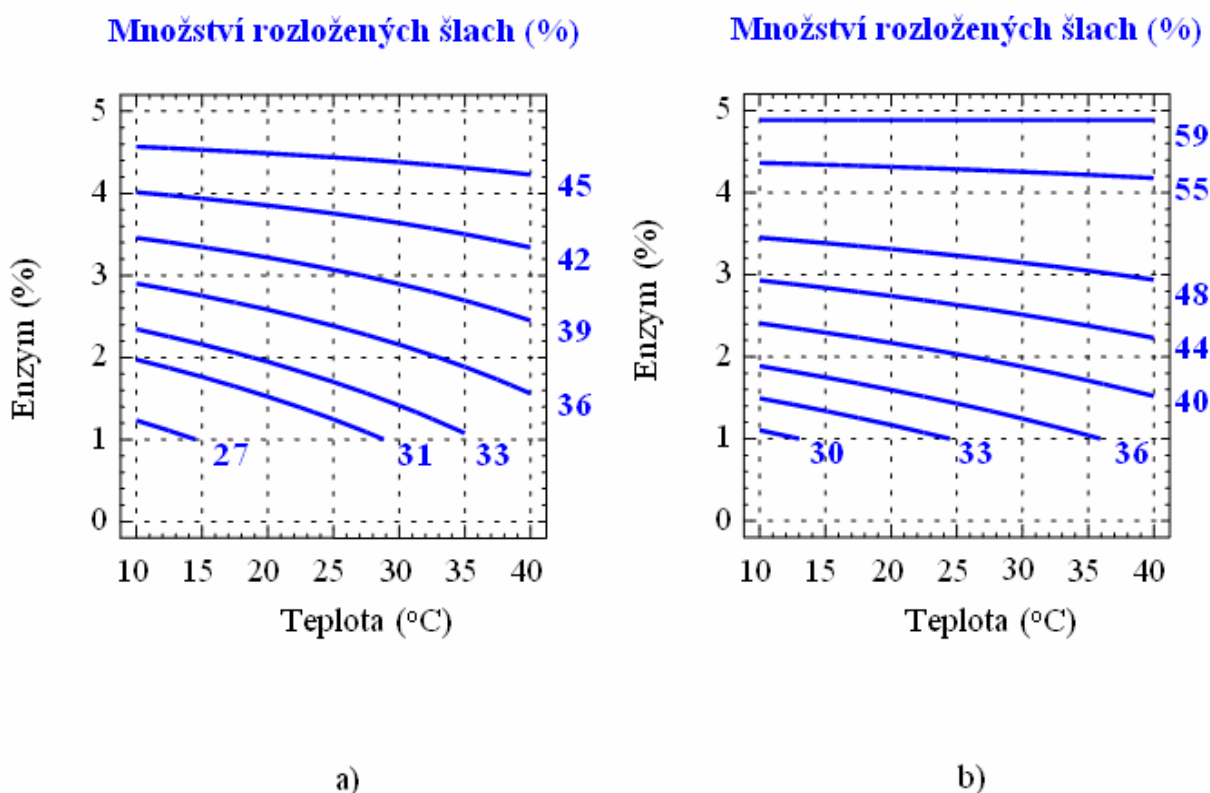
Sledované faktory		3-stupňová hydrolýza hovězích šlach	
		Součet čtverců	F-hodnota
Faktor A:	doba hydrolýzy	120,28	2,67
Faktor B:	teplota	33,05	0,73
Faktor C:	přídavek enzymu	975,49	21,66 *
Interakce:	AB	0,13	0,00
	AC	41,31	0,92
	BC	32,72	0,73
Celková chyba:		135,12	
Celková chyba (kor.):		1338,11	
$F_{\text{krit}}^{95\%} (1;3) = 10,13$ * statisticky významný faktor			

Tab. 9: Výsledky rozkladu šlach ve vodném prostředí s přidavkem
1 % (w/w) KOH

Exp. č.	Bilance sušiny ^A			Analýza hydrolyzátu ^B										
	Vstup S [sušina navěš. šlach] (g)	Výstupy H [hydrolyzát] (g)	NP [nerozlož. podíl] (g)	H + NP [součet výstupů] (g)	BCH [bilanční chyba] (%)	η [účinnost rozkladu] (%)	N [obsah dusíku] (%)	B [obsah bílkovin] (%)	P [obsah popeloviny] (%)	HYP [obsah hydroxyproli- nu] (%)	K [obsah kolagenu] (%)	E [obsah elastinu] (%)	Ez [obsah zhydrolyzované- ho elastinu] (%)	
1	9,15	1,90	6,99	8,89	2,87	23,63	12,65	79,07	11,06	7,56	60,44	18,63	42,27	
2	9,15	4,10	4,96	9,06	0,99	45,80	13,36	83,48	10,29	9,34	74,69	8,79	43,05	
3	8,97	2,75	6,05	8,79	1,93	32,58	12,95	80,96	10,48	8,15	65,24	15,72	53,77	
4	8,97	4,23	4,89	9,12	1,66	45,49	14,47	90,46	10,19	9,99	79,93	10,53	55,40	
5	9,72	4,55	4,37	8,92	4,07	50,82	14,71	91,92	5,83	9,93	79,42	12,50	60,24	
6	9,72	4,16	4,77	8,93	6,02	48,89	14,83	92,68	6,95	9,94	79,55	13,13	57,88	
7	9,11	2,54	4,07	6,61	0,19	27,68	15,35	95,93	8,09	7,91	63,26	32,67	99,93	
8	9,11	5,17	3,85	9,02	1,02	57,77	14,38	89,87	7,40	9,18	73,43	16,44	100,00	
9	9,72	3,25	6,32	9,57	1,49	34,95	14,54	90,87	7,31	9,66	77,29	13,58	46,78	
10	9,72	5,11	4,07	9,18	5,51	58,12	14,81	92,53	8,00	10,34	82,74	9,79	53,02	
^A stanoveno při 103 °C													^B vztaženo na sušinu (při 103 °C)	
^C vypočtem zjištěná hodnota byla v rámci analytické chyby nad 100 %														
Podmínky enzymového rozkladu hovězích šlach:														
Exp. č. 1 ... 5h / 10°C / 1% enzymu														
Exp. č. 2 ... 5h / 10°C / 5% enzymu														
Exp. č. 3 ... 5h / 40°C / 1% enzymu														
Exp. č. 4 ... 5h / 40°C / 5% enzymu														
Exp. č. 5 ... 15h / 25°C / 3% enzymu														
Exp. č. 6 ... 15h / 25°C / 3% enzymu														
Exp. č. 7 ... 25h / 10°C / 1% enzymu														
Exp. č. 8 ... 25h / 10°C / 5% enzymu														
Exp. č. 9 ... 25h / 40°C / 1% enzymu														
Exp. č. 10 ... 25h / 40°C / 5% enzymu														

Grafická prezentace vlivu sledovaných faktorů na množství rozložených šlach při hydrolyze ve vodném prostředí s přidavkem 1 % (w/w) KOH je uvedena na Obr. 13 a Obr. 14.

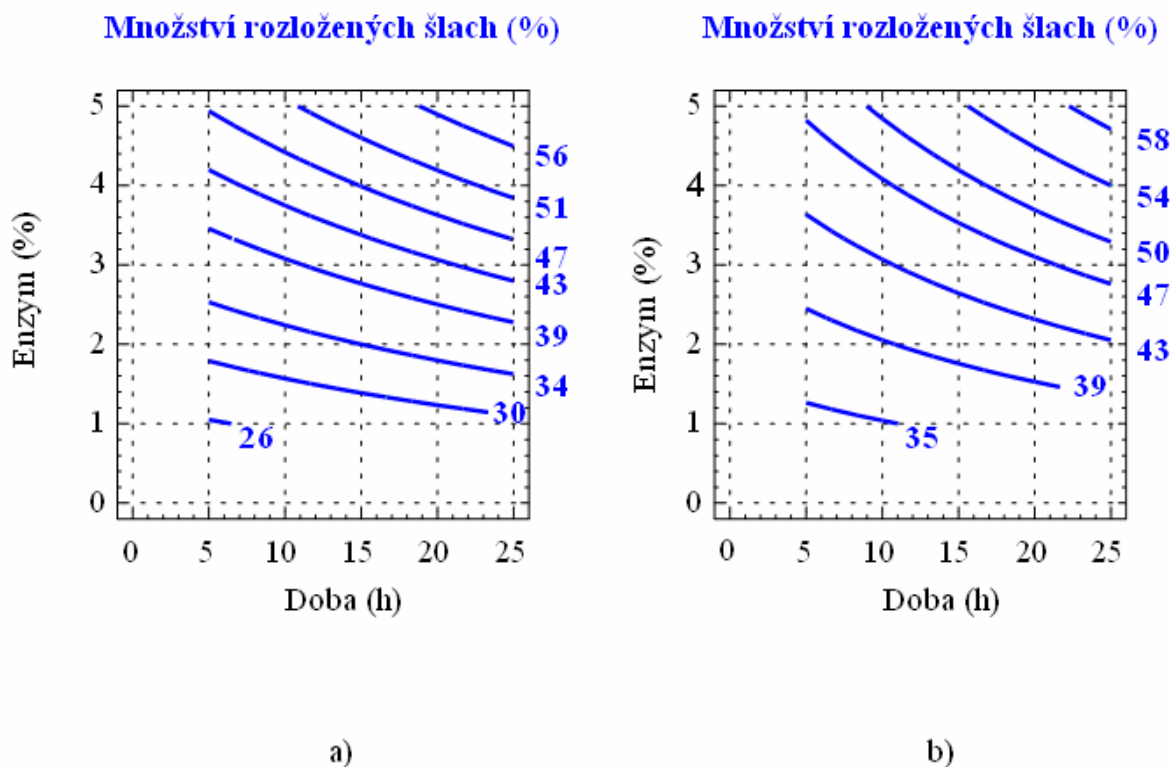
Obr. 13 je vrstevnicový graf znázorňující vliv teploty hydrolyzy a přidavku enzymu na množství rozložených šlach po 5-ti hodinách působení enzymu (Obr. 13a) a po 25-ti hodinách působení enzymu (Obr. 13b). Z grafů je patrné, že při 5-ti hodinovém působení enzymu je účinnost hydrolyzy v rozmezí 27-45 %, při působení enzymu po dobu 25 hodin je účinnost vyšší, a to v rozmezí 30-59 %. Z tohoto faktu vyplývá, že hydrolyza ve vodném prostředí s přidavkem 1 % KOH (w/w) je účinnější při delší době působení enzymu (oproti hydrolyze ve vodném prostředí). Dále je zřejmé, že při 25-ti hodinovém působení s největším přidavkem enzymu (tzn. 4,5-5 %) nemá vliv na účinnost rozkladu teplota, což u ostatních rozkladů šlach tak jednoznačně potvrdit nelze (Obr. 13b).



Obr. 13: Vliv teploty a přidavku enzymu na množství rozložených šlach při experimentech ve vodném prostředí s přidavkem 1 % (w/w) KOH

a) po 5-ti hodinách působení enzymu b) po 25-ti hodinách působení enzymu

Na Obr. 14 je vrstevnicový graf znázorňující vliv doby hydrolýzy a přidavku enzymu na množství rozložených šlach při 10 °C (Obr. 14a) a při 40 °C (Obr. 14b). Z obou obrázků je patrné, že čím kratší dobu hydrolýzy zvolíme, tím musí být vyšší přidavek enzymu abychom dosáhli požadovaného procentuálního rozkladu.



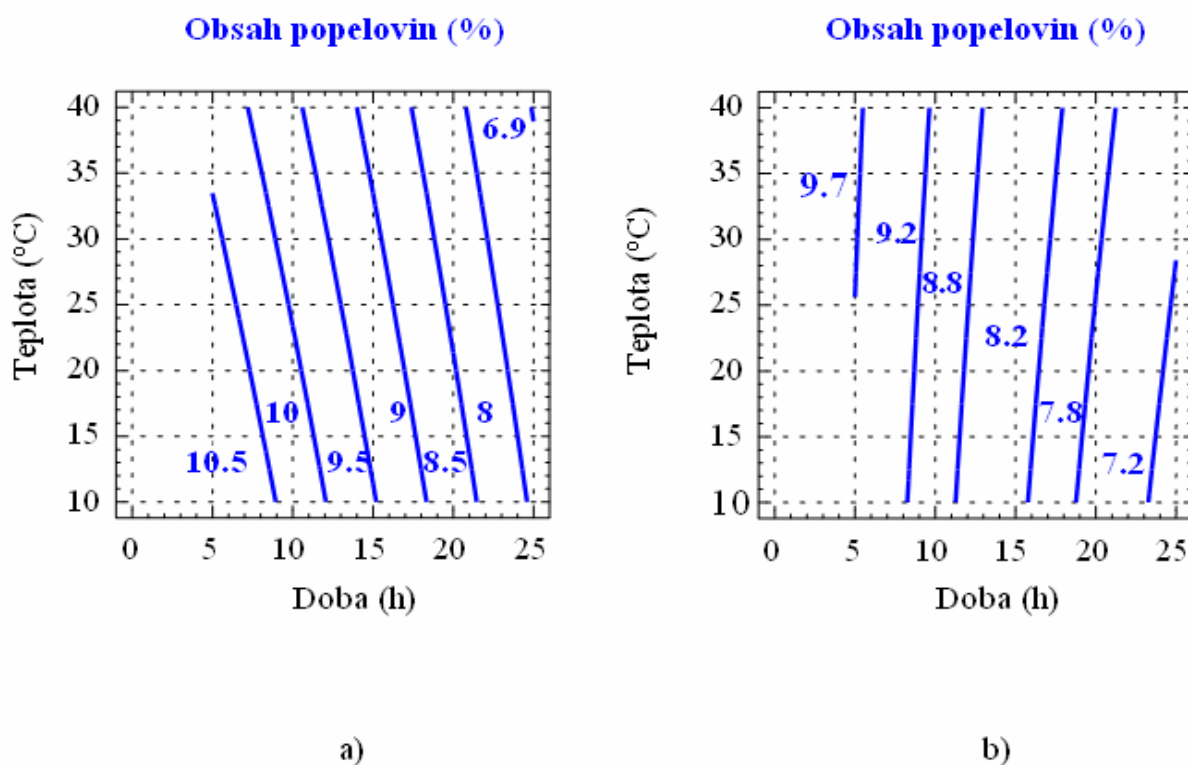
Obr. 14: Vliv doby a přidavku enzymu na množství rozložených šlach při experimentech ve vodném prostředí s přidavkem 1 % (w/w) KOH
a) při teplotě 10 °C b) při teplotě 40 °C

6.2.2 Charakterizace kolagenních hydrolyzátů

V Tab. 9 (str. 60) jsou obsaženy rovněž výsledky bilance hmoty a analýz kolagenních hydrolyzátů, tj. stanovení obsahu dusíku a obsah čistých bílkovin, dále obsah popelovin, hydroxyprolinu, kolagenu, elastinu a rovněž obsah zhydrolyzovaného elastinu.

Minimální obsah dusíku v kolagenním hydrolyzátu byl roven 12,65 % (u experimentu č.1), maximální obsah dusíku byl 15,35 % u experimentu č. 7. S obsahem dusíku souvisí i obsah čistých bílkovin, který byl u experimentu č. 1 roven 79,07 % a u experimentu č. 6 95,93 %.

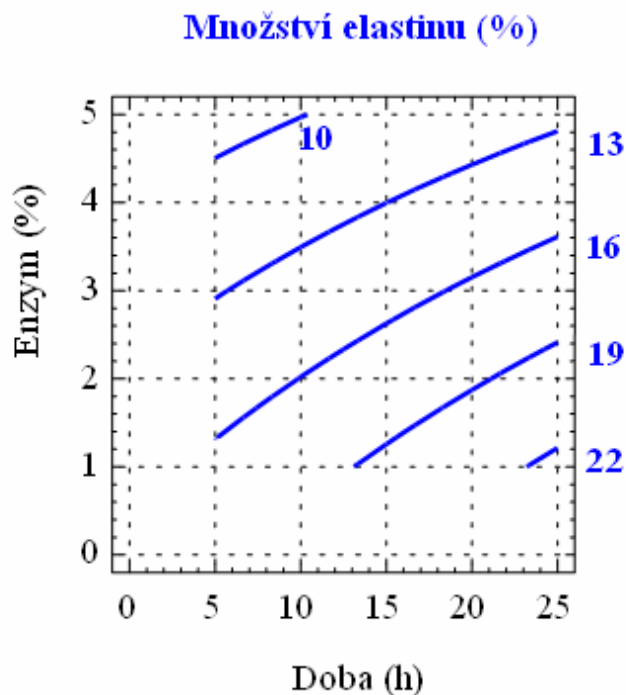
V případě minimálního obsahu popelovin v kolagenním hydrolyzátu vyhovuje experiment č. 5 (5,83 % obsahu popelovin). Více než dvojnásobný obsah popelovin v kolagenním hydrolyzátu (11,06 %) byl zaznamenán u experimentu č.1. Grafická prezentace vlivu doby a teploty na množství popelovin při hydrolýze ve vodném prostředí je uvedena na Obr. 15. Obr. 15a je vrstevnicový graf znázorňující vliv sledovaných faktorů na obsah popelovin při přidavku 1 % enzymu a při 5 % přidavku enzymu to zobrazuje Obr. 15b. Z Obr. 15a vyplývá, že s prodlužující se dobou a současně zvyšující se teplotou se množství popelovin v kolagenním hydrolyzátu snižuje. Z Obr. 15b vyplývá, že s prodlužující se dobou a naopak snižující se teplotou se množství popelovin v kolagenním hydrolyzátu snižuje.



*Obr. 15: Vliv doby a teploty na obsah popelovin
při experimentech ve vodném prostředí s přidavkem 1 % (w/w) KOH
a) při 1 % přidavku enzymu b) při 5 % přidavku enzymu*

Nejvyšší obsah kolagenu v kolagenním hydrolyzátu, 82,74 %, byl zaznamenán u experimentu č. 10. Naopak nejnižší obsah kolagenu v kolagenním hydrolyzátu byl zjištěn u experimentu č. 1 (60,44 %). Nejnižší obsah elastinu se vyskytoval u experimentu č. 2, kde činil

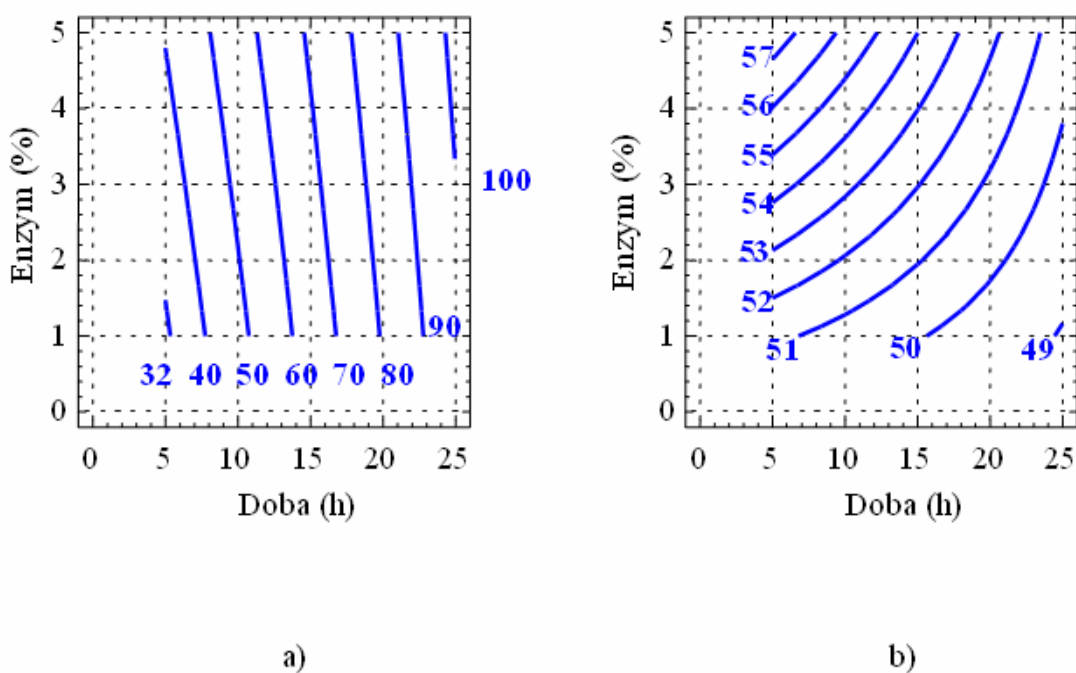
8,79 %, naopak nejvyšší obsah elastinu byl zaznamenán u experimentu č.7 (32,67 %). Na Obr. 16 je znázorněn vrstevnicový graf, který znázorňuje vliv přidavku enzymu a doby působení enzymu na obsah elastinu v kolagenním hydrolyzátu při teplotě 25 °C.



Obr. 16: Vliv doby a přidavku enzymu na množství elastinu při experimentech ve vodném prostředí s přidavkem 1 % (w/w) KOH a teplotě 25 °C

Na Obr. 17 jsou vrstevnicové grafy znázorňující vliv doby hydrolyzy a přidavku enzymu na množství zhydrolyzovaného elastinu (vztaženo na původní obsah ve šlachách) při 10 °C (Obr. 17a) a při 40 °C (Obr. 17b). Množství zhydrolyzovaného elastinu se může pohybovat v případě nejnižší teploty (10 °C) od 32 % (minima sledovaných faktorů) až po 100 % (maxima sledovaných faktorů), přičemž nebyl zaznamenán výrazný vliv doby hydrolyzy. Při nejvyšší teplotě hydrolyzy (40 °C) to bylo od 49 % až do 100 % zhydrolyzovaného elastinu a lze pozorovat vliv doby hydrolyzy.

Množství zhydrolyzovaného elastinu (%) Množství zhydrolyzovaného elastinu (%)



Obr. 17: Vliv doby a přídavku enzymu na množství zhydrolyzovaného elastinu při experimentech ve vodném prostředí s přídavkem 1 % (w/w) KOH

a) při 10 °C b) při 40 °C

6.3 Srovnání výsledků enzymové hydrolýzy šlach

Při enzymové hydrolýze šlach ve vodném prostředí byla maximální účinnost rozkladu šlach (55,66 %) při těchto podmínkách hydrolýzy: 15 hodin hydrolýzy, 3 % přídavek enzymu a teplota 25 °C (středový experiment). Ve vodném prostředí s přídavkem 1 % (w/w) KOH byla zaznamenána mírně vyšší účinnost hydrolýzy (57,77 %) při těchto podmínkách: 25 hodin hydrolýzy, 5 % přídavek enzymu a teplota 10 °C. Nepatrně vyšší účinnost rozkladu šlach je ale z ekonomického pohledu sporná (o 10 hodin delší hydrolýza; o 2 % vyšší přídavek enzymu a potřeba chladit směs na 10 °C).

Obsah popelovin v kolagenním hydrolyzátu je možné do jisté míry ovlivnit jednak volbou prostředí a jednak volbou technologických podmínek při hydrolýze. Obecně nižší obsah popelovin v kolagenním hydrolyzátu byl při hydrolýze šlach ve vodném prostředí, kde hodnota obsahu popelovin pouze při minimech sledovaných faktorů (5 hodin, 1 % přídavek enzymu a 10 °C) překročila hodnotu 10 %. Ve všech ostatních případech byl obsah

popelovin v kolagenním hydrolyzátu menší než 7,5 %; nejméně to bylo při středových experimentech (15 hodin hydrolyzy, 3 % přídavek enzymu a teplota 25 °C), kdy obsah popelovin v kolagenním hydrolyzátu byl cca 5,3 %. Při hydrolyze šlach ve vodném prostředí s přídavkem 1 % (w/w) KOH byl obsah popelovin v kolagenním hydrolyzátu větší než 10 % v případě experimentů při dolním limitu doby hydrolyzy (tj. 5 hodin). Minimální obsah popelovin v kolagenním hydrolyzátu (6-7 %) byl zaznamenán při středových experimentech (15 hodin hydrolyzy, 3 % přídavek enzymu a teplota 25 °C).

Množství zhydrolyzovaného elastinu při hydrolyze šlach se pohybuje od cca 23 do 100 % při hydrolyze ve vodném prostředí, respektive od cca 42 do 100 % při hydrolyze ve vodném prostředí s přídavkem 1 % (w/w) KOH. Nicméně množství zhydrolyzovaného elastinu ve vodném prostředí je výrazně ovlivněno přídavkem enzymu, neboť bylo prokázáno, že rozdíl mezi dolním a horním limitem přídavku enzymu znamená 2-5 násobné zvýšení zhydrolyzovaného elastinu. Ve vodném prostředí s přídavkem 1 % (w/w) KOH nebyl zaznamenán žádný výrazný vliv přídavku enzymu.

ZÁVĚR

Diplomová práce je rozdělena do dvou částí, na část teoretickou a experimentální. Teoretická část pojednává o pevných a kapalných bílkovinných odpadech masného průmyslu. Dále je popsáno využití odpadů masného průmyslu (energetika, zemědělství, potravinářství, lékařství, farmaceutický průmysl a ostatní odvětví). Součástí teorie byla také charakterizace vstupního materiálu experimentální části - hovězích šlach.

V experimentální části diplomové práce jsem se zabývala rozkladem hovězích šlach 3-stupňovou enzymovou hydrolyzou ve vodném prostředí a ve vodném prostředí s přídavkem 1 % (w/w) KOH na kolagenní hydrolyzát. V 1. stupni byly odtučněné šlachy inkubovány ve zvoleném prostředí po dobu 5-ti hodin v poměru 1 : 10 (šlachy : prostředí). Ve 2. stupni se ke směsi přidal proteolytický enzym a ve 3. stupni zpracování se směs zahřála k varu na 15 minut. Sledoval se vliv doby 2. stupně hydrolyzy (5-25 h), přídavku enzymu (1-5 % přídavek) a teploty v 1. a 2. stupni hydrolyzy (10-40 °C) na množství rozložených šlach.

Maximální účinnosti rozkladu hovězích šlach (55 %) ve vodném prostředí bylo dosaženo za těchto podmínek rozkladu: 15 h hydrolyzy / 25 °C / 3 % přídavek enzymu. Ve vodném prostředí s 1 % (w/w) přídavkem KOH to bylo 57 % rozložených šlach za podmínek: 25 h hydrolyzy / 10 °C / 5 % přídavek enzymu. U kolagenních hydrolyzátů byl stanoven obsah dusíku, popelovin, hydroxyprolinu a vypočten obsah kolagenu, elastinu a zhydrolyzovaného elastinu. Při enzymové hydrolyze šlach ve vodném prostředí byl nejvyšší obsah čistých bílkovin (cca 95 %, z toho téměř 80 % kolagenu) zaznamenán u kolagenního hydrolyzátu připraveného za těchto podmínek rozkladu: 15 h hydrolyzy / 25 °C / 3 % přídavek enzymu; obsah popelovin byl v tomto případě cca 5 %. Při enzymové hydrolyze šlach ve vodném prostředí s 1 % (w/w) přídavkem KOH byl nejvyšší obsah čistých bílkovin (cca 93 %, z toho téměř 80 % kolagenu) se současně nejnižším obsahem popelovin (cca 7 %) zaznamenán u experimentu za stejných podmínek rozkladu. Bylo zjištěno, že kombinovaná enzymová hydrolyza ve vodném prostředí s 1 % (w/w) přídavkem KOH nemá zásadní vliv na účinnost rozkladu; obsah čistých bílkovin v kolagenním hydrolyzátu je srovnatelný s hydrolyzátem připraveným pouze ve vodném prostředí, ale obsah popelovin je o 40 % vyšší. Připravené kolagenní hydrolyzáty by mohly najít uplatnění v potravinářském, farmaceutickém či kosmetickém průmyslu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Regulation (EC) No 1774/2002 of the European Parliament and of the Council of 3 October 2002 laying down health rules concerning animal by-products not intended for human consumption. [online]. [cit. 2009-13-10].
Dostupné z:
http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/specific_themes/f81001_en.htm
2. Účast zástupce OEÚ na mezinárodním semináři k masu a masným výrobkům konaný v [online]. [cit. 2009-20-10]. Dostupné z:
http://www.mzv.cz/beijing/cz/obchod_a_ekonomika/prehled_akci_uskutecnenych/ucast_zastupce_oeu_na_mezinarodnim.html
3. CONESA, J. A., FULLANA, A., FONT, R. Thermal decomposition of meat and bone meal. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2003, roč. 70, s. 619-630.
4. SKODRAS, G. , GRAMMELIS, P., BISINAS, P., KALCIA, S., KAKARAS, E., SAKELLAROPOULOS, G.P. A kinetic study on the devolatilisation of animal derived byproducts. *Fuel Processing Technology*, 2007, roč. 88, s. 787-794.
5. SHARROCK, P., FIALLO, M., NZIHO, A., CHKIR, M. Hazardous animal waste carcasses transformation into slow release fertilizers. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, roč.167, s. 119-123.
6. BARRENA, R., ARTOLA, A., VÁZQUEZ, F., SÁNCHEZ, A. The use of composting for the treatment of animal by-products: Experiments at lab scale. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, roč. 161, s. 380–386.
7. SROKA, E., KAMIŃSKI, W., BOHDZIEWITZ, J. Biological treatment of meat industry wastewater. *Desalination*, 2004, roč. 162, s. 85-91.
8. BOHDZIEWITZ, J., SROKA, E. Treatment of wastewater from the meat industry applying integrated membrane systemes. *Process Biochemistry*, 2004, roč. 40, s. 1339- 1346.
9. URBANIAK, M., SAKSON, G. Preserving sludge from meat industry waste waters through lactic fermentation. *Process Biochemistry*, 1999, roč. 34, s. 127–132.
10. Nařízení vlády č. 61 o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech. [online]. [cit. 2009-15-10].
Dostupné z: <http://www.vakinfo.cz/legislativa/pravni-predpisy-pro-vodni-hospodarstvi-v-aktualnim-zneni/narizeni-vlady-c-61-2003-sb>.
11. LUO, J., LINDSEY, S., XUE, J. Irrigation of meat processing wasteater onto land. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2004, roč.103, s.123-148.

12. MANIOS, T., GAKI, E., BANOU, S., KLIMATHIANOU, A., ABRAMAKIS, N. , SAKKAS, N. Closed wastewater cycle in a meat producing and processing industry. *Resources, Conservation and Recycling*, 2003, roč. 38, s. 335–345.
13. ABBAS, S. G. , CHOUDHARY, M. A. Effects of shallow soil-injected animal blood on pasture growth and soil nitrogen. *Bioresource Technology*, 1995, roč. 53, s. 73–78.
14. PRAŽÁK, V. *Motorová paliva a biopaliva* [online]. [cit. 2009-20-10]. Dostupné z: http://www.ceskarafinerska.cz/data/publications/motorova_paliva_a_biopaliva.pdf.
15. TASHTOUSH, G. M, AL-WIDYAN, M. I., AL-JARRAH, M. M. Experimental study on evaluation and optimization of conversion of waste animal fat into biodiesel. *Energy Conversion and Management*, 2004, 45, s. 2697-2711.
16. REIJNDERS, L., HUIJBREGTS, M. A. J. Life cycle emissions of greenhouse gases associated with burning animal wastes in countries of the European Union. *Journal of Cleaner Production*, 2005, roč. 13, s. 51–56.
17. GÜRÜ, M., DOĞLU, B., KESKIN, A., KOCA, A. Biodiesel production from waste animal fat and improvement of its characteristics by synthesized nickel and magnesium additive. *Energy Conversion and Management*, 2009, roč. 50, s. 498–502.
18. WIGGERS, V. R., WISNIEWSKI JR., A., MADUREIRA, L. A. S. , CHIVANGA BARROS, A. A., MEIER, H. F. Biofuels from waste fish oil pyrolysis: Continuous production in a pilot plant. *Fuel*, 2009, roč. 88, s. 2135–2141.
19. WISNIEWSKI JR. ET AL. Biofuels from waste fish oil pyrolysis: Chemical composition. *Fuel* (2009), doi:10.1016/j.fuel.2009.07.017
20. COUTAND, M., CYR, M., DEYDIER, E., GUILLET, R., CLASTRES, P. Characteristic of industrial and laboratory meat and bone meal ashes and their potential applications. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, roč. 150, s. 522-532.
21. MARTIŠKOVÁ, P. *Hnojiva šetrná k přírodě* [online]. [cit. 2009-20-10]. Dostupný z: <http://biom.cz/cz/zpravy-z-tisku/hnojiva-setrna-k-prirode>
22. Citace článku *Organické hnojení*, [online]. [cit. 2009-20-10]. Dostupné z: http://www.agrobio.cz/files/aktuality/09_20_Brozura_Hnojiva.pdf
23. Citace článku *Organická hnojiva* [online]. [cit. 2009-20-10]. Dostupné z: <http://www.garten.cz/a/cz/3247-organicka-hnojiva/>
24. KOLOMAZNÍK, K., ADÁMEK, M., ANDĚL, L., UHLÍŘOVÁ, M. A. Leather waste - - Potential threat to human health, and a new technology of its treatment. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, roč. 160, s. 514-520.

25. Citace článku, [online]. [cit. 2009-20-10].
Dostupné z http://www.mze.cz/attachments/Studie_FINAL.pdf
26. RIVERA, J. A., SEBRANEK, J. G., RUST, R. E., TABATABAI, L. B. Composition and protein fractions of different meat by-products used for petfood compared with mechanically separated chicken (MSC). *Meat Science*, 2000, roč. 55, s. 53–59.
27. ZIEKER, S. C. Evaluating pet foods: How confident are you when you recommend a commercial pet food? *Topics in Companion Animal Medicine*, 2008, roč. 23, s. 121–126
28. RIVERA, J. A., SEBRANEK, J. G., RUST, R. E. Functional properties of meat by-products and mechanically separated chicken (MSC) in a high-moisture model petfood system. *Meat Science*, 2000, roč. 55, s. 61–66.
29. POLO, J., RODRÍGUEZ, C., SABORIDO, N., RÓDENAS, J., Functional properties of spray-dried animal plasma in canned petfood. *Animal Feed Science and Technology*, 2005, roč. 122, s. 331–343.
30. OCKERMAN, H. W., HANSEN, C. L. *Animal by-product processing & utilization*. CRC Press LLC, 2000, s. 523, ISBN 1-56676-777-6
31. MOKREJŠ, P., LANGMAIER, F. *Aplikace přírodních polymerů*. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008, 90 s., ISBN 978-80-7318-674-6.
32. MOKREJŠ, P., JANÁČKOVÁ, D., MLÁDEK, M., KOLOMAZNÍK K., LANGMAIER F., VASEK, V. Studying solubility of biodegradable films prepared from collagen hydrolysate. *Research Journal of Chemistry and Environment*, 2008, roč. 12, s. 17–22.
33. BLAŽEJ, A., GALATÍK, A., GALATÍK, J., MLÁDEK, M. *Technologie kůže a kožešin*. 1. vyd. Praha: SNTL, Bratislava: ALFA, vydavatelství technické a ekonomické literatury, 1984, s. 451.
34. VOET, D., VOETOVÁ, J. G. *Biochemie*. 1. vyd. 1995, Praha: VICTORIA PUBLISHING a.s., s. 1325, ISBN 80-85605-44-9.
35. Citace článku *Elastin*, [online]. [cit. 2010-15-3].
Dostupný z: <http://www.vivaligne.com/en/kappa-elastin/elastin>
36. Blažej, A., Deyl, Z., Adam, M., Galatík, A., Michlík, I., Smejkal, P. *Štruktúra a vlastnosti vláknitých bielkovín*. Bratislava: VEDA, 1978, s. 454, ISBN 71-156-78
37. DEBELLE, L., TAMBURRO, A. M. Elastin: molecular description and function. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 1999, roč. 31, 261–272.
38. MOKREJŠ, P., JANÁČKOVÁ, D., MLÁDEK, M., KOLOMAZNÍK K., LANGMAIER, F. Modifikace enzymové hydrolyzy proteinových odpadů s cílem optimalizace filtračního procesu. *Chemické listy* 8, 2006, roč. 100, s. 561–776.

39. DAAMEN, W. F., VEERKAMP, J. H., VAN HEST, J. C. M., VAN KUPPEVELT, T. H. Elastin as a biomaterial for tissue engineering. *Biomaterials*, 2007, roč. 28, s. 4378-4398.
40. DEBELLE, L., ALIX, A. J. P. The structures of elastins and their function. *Biochemie*, 1999, roč. 81, 981-994.
41. Přednášky z předmětu Odpady potravinářské výroby, distribuce a prodeje potravin z Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, [online]. [cit. 2010-15-3]. http://fvhe.vfu.cz/adresa/sekce_ustavy/uvozpz/Tezeprednasek_Odpady.pdf
42. LEE, CH. H., SINGLA, A., LEE, Y. Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, roč. 221, s. 1-22.
43. FRIESS, W., Collagen - biomaterial for drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 1998, roč. 45, s. 113-136.
44. LIN, Y. K., LIU, D. CH. Comparison of physical-chemical properties of type I collagen from different species. *Food Chemistry*, 2006, roč. 99, s. 244-251.
45. Citace článku *Kolageny*, [online]. [cit. 2010-20-3].
Dostupné z <http://www.hypro.cz/hyRubrIn.aspx?intRubrKis=1251&intLang=0>
46. PARK, J. B, BRONZINO, J. D., *Biomaterials : principles and applications*. 1. vyd., CRC Press LLC, 2003, s. 250, ISBN: 0-8493-1491-7, 2002.
47. MLÁDEK, M., BLAŽEJ, A., JANSKÝ, K., LANGMAIER, F., LUDVÍK, J., MAZÁNEK, M., NĚMEC, B., PIVOŇKA, V., SUCHOMEL A. *Zpracování odpadů kožedělného průmyslu*. 1. vyd. Brno: SNTL, 1971, 324 s., ISBN 04-837-71.
48. MOKREJŠ, P., MLÁDEK, M., JANÁČKOVÁ, D., LANGMAIER F., KOLOMAZNÍK K. Využití chromitého koláče k přípravě činících břechek. In *Odpadové fórum 2006: Sborník přednášek 3*, 24. -26.4. 2006, Milovy, ČR, s. 3298-3301, ISBN 80-02-01792-7.
49. MOKREJŠ, P., KOLOMAZNÍK, K., MLÁDEK M., LANGMAIER, F. Enzymatická hydrolýza manipulačních usňových odpadů. *Odpadové fórum*, 2002, roč. 12, s.19-21
50. FENYK, J., MOKREJŠ, P. Zpracování netradičních zdrojů kolagenních bílkovin - literární studie, In *Odpadové fórum 2009: Aprochem 2009*, 22. - 24.4. 2006, Milovy, ČR, s. 3556-3560.
51. WASZKOWIAK, K., DOLATA, W. The application of collagen preparations as carriers of rosemary extract in the production of processed meat. *Meat Science*, 2007, roč. 75, s. 178-183.
52. MOKREJŠ, P., LANGMAIER, F., MLÁDEK, M., JANÁČKOVÁ, D., KOLOMAZNÍK, K., VAŠEK, V. Extraction of collagen and gelatine from meat industry by-products for food and non food uses. *Waste Management & Research*, 2009, roč. 27, s. 31-37.

53. FENYK, J., MOKREJŠ, P. Možnost zužitkování šlach jatečního dobytka, *CHISA* 2009,19. - 22.10.201, Smí, ČR, s. 116-122.
54. DAVÍDEK J. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. 2. vyd., Praha: SNTL, 1981, s. 718.
55. Citace článku Sborník metodik vypracovaný v rámci řešení projektu č.EP9179 Metody pro posuzování shody a detekci falšování potravin, [online]. [cit. 2010-1-3].
Dostupné z:
http://www.agronavigator.cz/attachments/Sbornik_metodik_projektu_EP9179.pdf
56. VÁZQUEZ-ORTIZ, F., GONDÁLEZ-MÉNDEZ, N. F. Determination of collagen as a quality index in Bologna from northwestern Mexico. *Journal of food and analysis*, 1996, roč. 9, s. 269-276.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

EU	Evropská unie
SRM	specifikovaný rizikový materiál
BSE	Bovinní spongiformní encefalopatie (nemoc šílených krav)
ČOV	čistička odpadních vod
FAO	Světová organizace pro výživu a zemědělství (Food and Agriculture Organization)
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (Organization for Economic Co-operation and Development)
HYP	hydroxyprolin
m_1	hmotnost hliníkové misky s víčkem před stanovením (g)
m_2	hmotnost hliníkové misky s víčkem včetně vzorku po vysušení (g)
m_3	množství hydroxyprolinu odečtené z kalibrační křivky (mg)
m_4	hmotnost žíhacího kelímku bez vzorku (g)
m_5	hmotnost žíhacího kelímku včetně vzorku po vyžihání (g)
HYP	množství hydroxyprolinu (%)
H	hydrolyzát (g)
NP	nerozložený podíl (g)
P	množství popelovin (%)
n	navážka vzorku (g)
n_H	navážka hydrolyzátu vysušeného při 103°C (g)
η	účinnost hydrolýzy (%)
BCH	bilanční chyba (%)
B	obsah čistých bílkovin ve vzorku (%)
N	obsah dusíku (%)
V_1	objem odměrného roztoku H_2SO_4 ($c = 0,05 \text{ mol.l}^{-1}$) spotřebovaný na titraci (ml)

V_2	celkový objem mineralizátu (ml)
V_3	objem mineralizátu pipetovaný na stanovení (ml)
V_4	objem zředěného hydrolyzátu (tj. 50 ml)
V_5	objem pipetovaného zředěného hydrolyzátu (tj. 10 ml)
V_6	objem pracovního roztoku hydrolyzátu (tj. 50 ml)
V_7	objem pipetovaného pracovního roztoku hydrolyzátu na stanovení HYP
f	přepočítávací faktor odměrného roztoku H_2SO_4 ($c = 0,05 \text{ mol.l}^{-1}$)
B	množství čistých bílkovin (%)
A	absorbance
K	množství kolagenu (%)
E	množství elastinu (%)
Ez	množství zhydrolyzovaného elastinu (%)
m_{EH}	množství elastinu v hydrolyzátu (g)
m_{ES}	množství elastinu v sušině šlach (g)
f_E	podíl elastinu v hydrolyzátu
f_S	podíl elastinu v sušině šlach

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1 Model molekuly kolagenu
- Obr. 2 Struktura molekuly elastinu
- Obr. 3 Celkový postup zpracování surových šlach na kolagenní hydrolyzát
- Obr. 4 Fotografie šlach a směsi při 3-stupňovém zpracování
- Obr. 5 Nerozložený podíl šlach po zpracování
- Obr. 6 Kolagenní hydrolyzát
- Obr. 7 Kalibrační křivka hydroxyprolinu
- Obr. 8 Vliv teploty a přídavku enzymu na množství rozložených šlach při experimentech ve vodném prostředí
- Obr. 9 Vliv doby a přídavku enzymu na množství rozložených šlach při experimentech ve vodném prostředí
- Obr. 10 Vliv doby a teploty na obsah popelovin při experimentech ve vodném prostředí
- Obr. 11 Vliv doby a přídavku enzymu na množství elastinu při experimentech ve vodném prostředí a teplotě 25 °C
- Obr. 12 Vliv doby a přídavku enzymu na množství zhydrolyzovaného elastinu při experimentech ve vodném prostředí
- Obr. 13 Vliv teploty a přídavku enzymu na množství rozložených šlach při experimentech ve vodném prostředí s přídavkem 1 % (w/w) KOH
- Obr. 14 Vliv doby a přídavku enzymu na množství rozložených šlach při experimentech ve vodném prostředí s přídavkem 1 % (w/w) KOH
- Obr. 15 Vliv doby a teploty na obsah popelovin při experimentech ve vodném prostředí s přídavkem 1 % (w/w) KOH
- Obr. 16 Vliv doby a přídavku enzymu na množství elastinu při experimentech ve vodném prostředí s přídavkem 1 % (w/w) KOH a teplotě 25 °C
- Obr. 17 Vliv doby a přídavku enzymu na množství zhydrolyzovaného elastinu při experimentech ve vodném prostředí s přídavkem 1 % (w/w) KOH

SEZNAM TABULEK

- Tab. 1 Shrnutí množství odpadů jednotlivých kategorií z jednoho kusu zvířete
- Tab. 2 Příпустné hodnoty znečištění pro odpadní vody z výroby masa a masných výrobků vypouštěné do povrchových vod
- Tab. 3 Rozdělení typů kolagenů dle výskytu
- Tab. 4 Složení používaných hovězích šlach
- Tab. 5 Přehled organizace faktorových pokusů hydrolýzy
- Tab. 6 Výsledky analýzy rozptylu a Fischerova testu statistické významnosti sledovaných faktorů na množství rozložených šlach ve vodném prostředí
- Tab. 7 Výsledky rozkladu šlach ve vodném prostředí
- Tab. 8 Výsledky analýzy rozptylu a Fischerova testu statistické významnosti sledovaných faktorů na množství rozložených šlach ve vodném prostředí s přídavkem
- Tab. 9 Výsledky rozkladu šlach ve vodném prostředí s přídavkem 1 % (w/w) KOH