



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



Technologie přírodních polymerů

Ing. Ondřej Krejčí, Ph.D.

*„Tento výstup lze užít v souladu s licenčními podmínkami Creative Commons BY 4.0 International
(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode>).“*



Obsah

Obsah	2
Úvod	3
1 Úloha č. 1 – Analýza polysacharidů	4
1.1 Stanovení polysacharidického podílu ve dřevě podle Wise	4
1.2 Stanovení obsahu ligninu silnou minerální kyselinou	6
1.3 Stanovení obsahu vlhkosti ve dřevě	7
1.4 Stanovení extrahovatelných látek ve dřevě	8
2 Úloha č. 2 – Analýza usní a kolagenního hydrolyzátu	10
2.1 Stanovení vodou vyloužitelných látek, pH a diferenčního čísla usní	10
2.2 Stanovení těkavých látek v usních	12
2.3 Stanovení teploty smrštění usní	12
2.4 Stanovení Hydroxyprolinu v kolagenním hydrolyzátu	13
3 Úloha č. 3 – Analýza tuků	16
3.1 Stanovení cholesterolu spektrofotometrickou metodou	16
3.2 Stanovení thiobarbiturového čísla	18
3.3 Stanovení čísla kyselosti	19
3.4 Stanovení těkavých látek a orientační stanovení minerálních olejů	20
4 Úloha č. 4 – Příprava želatin	22
4.1 Stanovení sušiny vzorku	22
4.2 Odtučnění a úprava suroviny	23
4.3 Odstranění nekolagenních bílkovin a botnění suroviny	23
4.4 Extrakce želatiny	24
5 Úloha č. 5 – Analýza želatin	26
5.1 Stanovení celkového dusíku a bílkovin	26
5.2 Stanovení obsahu těkavých látek	28
5.3 Stanovení obsahu popela	29
5.4 Stanovení pevnosti gelu	30
6 Úloha č. 6 – Reologie želatinových roztoků a gelů	32
6.1 Stanovení kinematické a dynamické viskozity	32
6.2 Stanovení hustoty želatinových roztoků	33
6.3 Reologické charakteristiky želatinových roztoků	34
Literatura	36
Seznam obrázků	38
Seznam tabulek	39

Úvod

Laboratorní cvičení z předmětu Technologie přírodních polymerů jsou praktickým doplněním přednášek a seminářů, kde posluchači získávají a rozšiřují své vědomosti o polymerních látkách vytvářených přírodou. Zejména jde o porozumění technologiím používaným v průmyslu pro přípravu, izolaci a zpracování přírodních polymerů.

Mezi nejvíce rozšířené přírodní polymery, se kterými se lze setkat patří zejména polysacharidy, jejichž analýze je věnována první kapitola těchto návodů. V další kapitole se poté studenti seznámí s několika postupy analýzy usňových materiálů a dalších upravených kolagenních produktů. Tuky a oleje jsou, kromě vlhkosti, nejběžnější doprovodnou složkou přírodních materiálů a je tedy nutné jim věnovat část pozornosti, proto je třetí kapitola zaměřena právě na analýzu tuků. Poslední tři kapitoly jsou věnovány přípravě želatin, jejich analýze a hodnocení reologických vlastností.

Je nutné si uvědomit, že za staletí výzkumu přírodních polymerů bylo vyvinuto, modifikováno a sepsáno mnoho stovek analýz a zkoušek, které by bylo možné v laboratorních cvičeních provádět. Vybrané laboratorní úkoly a analýzy jsou tedy jen malou částí, která má dát studentům základní povědomí o technologiích a možnostech přípravy, izolace, analýzy a zpracování přírodních materiálů. Jednotlivé úkoly byly vybrány a modifikovány tak, aby bylo možné je zdárně zpracovat ve vymezeném čase a poskytl studentům možnost práce jak s léty ověřenými tak s moderními metodami analýzy a hodnocení přírodních polymerů.

1 Úloha č. 1 – Analýza polysacharidů

Cílem práce úkolu je stanovení základních složek dřeva. První část úkolu se zabývá zjištěním množství polysacharidického podílu (holocelulózy) ve vzorku dřeva. Druhým úkolem je analýza množství ligninu. V poslední části je potřeba analyzovat obsah vlhkosti a množství extrahovatelných nízkomolekulárních látek ve vzorku.

1.1 Stanovení polysacharidického podílu ve dřevě podle Wise

Metoda stanovení polysacharidického podílu tzv. holocelulózy je založena na principu odstranění doprovodných látek, zejména ligninu, oxidačními činidly a následném gravimetrickém stanovení vysušeného zbytku. Holocelulózou zde nazýváme nerozpuštěný podíl dřeva, který se zachytí na filtru po oxidační delignifikaci. Jako oxidační činidla je možné použít např. oxid chloričitý, kyselinu peroxyoctovou, chloristan sodný a jiné. Při delignifikaci dochází v malé míře také k rozpuštění části hemicelulózové složky dřeva, proto se metody delignifikace snaží izolovat co největší podíl holocelulózy s co nejméně narušenou strukturou. Principem metody stanovení holocelulózy podle Wise je odstranění ligninu chloristanem sodným v prostředí kyseliny octové. Izolovaná holocelulóza má bílou nebo mírně nažloutlou barvu. Metoda je použitelná pro všechny druhy dřeva. Jehličnaté druhy musí být pře analýzou vyextrahovány v etanolu a éteru a následně vysušeny. (Melcer a kol., 1976; Wise a kol., 1946)

1.1.1 Pomůcky

Erlenmayerova baňka 250 ml (2x), lžička, nálevka, Büchnerova nálevka, Petriho miska (2x), kádinka 400 ml, odsávačka hřidelové míchadlo (2x), váženka (2x), vodní lázeň, odměrné válce 25, 50, 250 ml, sušárna s nastavitelnou teplotou a nuceným oběhem vzduchu, analytické váhy, exsikátor, filtrační papír střední hustoty KA2, vaříč.

1.1.2 Vzorky a chemikálie

Dřevěné piliny
Chloristan sodný
Ledová kyselina octová
Aceton

1.1.3 Postup práce

Stanovení se provádí 2x u jednoho vzorku.

Veškeré operace se provádí v digestoři!!!

1. Nejprve si na analytických vahách zvážíme suchou a čistou Erlenmayerovu baňku.
2. Do Erlenmayerovy baňky navážíme asi 1,5 g dřevěných pilin na analytických vahách.
3. Následně přidáme 170 ml vroucí vody, 2,5 ml ledové kyseliny octové a 2,5 g chloristanu sodného a baňku umístíme na vroucí vodní lázeň.
4. Piliny mícháme hřídelovým míchadlem a zahříváme 50 minut.
5. Po uplynutí času přidáme opět 2,5 ml ledové kyseliny octové a 2,5 g chloristanu sodného, opět vaříme a mícháme 50 minut.
6. Naposled přidáme 2,5 ml ledové kyseliny octové a 2,5 g chloristanu sodného a vaříme posledních 50 minut za stálého míchání.
7. Po skončení delignifikace je třeba obsah baňky ochladit proudem studené vody.
8. Směs přefiltrujeme přes předem zvážený filtrační papír (na analytických vahách), propláchneme 50 ml studené vody a poté ještě 20 ml acetonu.
9. Izolovanou holocelulózu (bílá či mírně nažloutlá barva) i s papírem sušíme na zvážené Petriho misce v sušárně při teplotě 105 °C do konstantní hmotnosti.
10. Po vychladnutí v exsikátoru zvážíme na analytických vahách a spočítáme výtěžek podle následujících rovnic.

1.1.4 Výpočet

Obsah holocelulózy ve dřevě se vypočte podle vzorce:

$$H = \frac{V}{n} 100 \quad (\%)$$

V ... hmotnost vysušeného vláknitého materiálu (holocelulózy) na filtru v g

n ... navážka vzorku dřeva v g

Obsah holocelulózy ve dřevě přepočtený na sušinu dřeva se vypočte podle vzorce:

$$H_s = H \cdot f \quad (\%)$$

f ... přepočítávací faktor na sušinu

$$f = \frac{100}{100 - v}$$

v ... vlhkost dřeva (zjištěná podle stanovení 1.3) v %

1.2 Stanovení obsahu ligninu silnou minerální kyselinou

Stanovení obsahu ligninu patří mezi běžné metody analýzy lignocelulózových materiálů, zejména pro zjišťování chemických, fyzikálních a biologických vlastností dřeva a dřevoviny (Dence, 1992). Lignin je makromolekulární polyfenolická sloučenina vyskytující se ve všech druzích dřeva, kde je, spolu s polysacharidy, důležitým stavebním prvkem buněk. Oproti polysacharidům je nerozpustný v běžných rozpouštědlech. Většina metod analýzy ligninu je založena na chemickém odbourání polysacharidického podílu, následné izolaci ligninu a jeho gravimetrickém stanovení. Takto připravený lignin je oproti čistému nativnímu ligninu chemicky pozměněn a v literatuře se označuje jako „izolovaný“ nebo „pseudolignin“ (Melcer a kol., 1976). Metoda podle Komarova (Bamford & Campbell, 1936) je založena na rozkladu polysacharidů 72% kyselinou sírovou a následné separaci izolovaného ligninu, který má po reakci tmavě hnědou barvu. Metoda je vhodná pro všechny druhy dřeva, které byly předem vyextrahovány organickými rozpouštědly a vysušeny.

1.2.1 Pomůcky

Skleněná navažovačka 50 ml se zábrusovým víčkem (2x), sušárna s nastavitelnou teplotou a nuceným oběhem vzduchu, nálevka, odměrné válce 25 ml, 250 ml, kádinka 100 ml, lžička, analytické váhy, exsikátor, filtrační kelímek hustoty S1 (2x), varná baňka 500 ml (2x), zpětný chladič (2x), vařič, topné hnízdo 500 (2x), tyčinka.

1.2.2 Vzorky a chemikálie

Dřevěné piliny – předem vyextrahované
72% kyselina sírová

1.2.3 Postup práce

Stanovení se provádí 2x u jednoho vzorku.

1. Čistou a suchou skleněnou navažovačku nejprve zvážíme na analytických vahách.
2. Do navažovačky navážíme 1 g rozmělněných dřevěných pilin.
3. Přilijeme 15 ml 72% H_2SO_4 , přikryjeme víčkem a necháme stát 2 hodiny při pokojové teplotě.
4. Vždy po 30 minutách vzorek zamícháme, aby se netvořily hrudky a hydrolýza byla co nejrovnoměrnější.
5. Směs poté přelijeme do 500 ml varné baňky se 150 ml vody a navažovačku opakovaně vymyjeme 25 ml vody (2x), kterou přidáme ke směsi do varné baňky.
6. Varnou baňku vaříme pod zpětným chladičem 1 hodinu.
7. Po krátkém ochlazení lignin (tmavohnědý prášek) přefiltrujeme přes předem zvážený filtrační kelímek a poté propláchneme 50 ml horké vody.

8. Izolovaný lignin na filtračním kelímku sušíme při teplotě 105 °C do konstantní hmotnosti a po vychladnutí v exsikátoru zvážíme.

1.2.4 Výpočet

Obsah ligninu ve dřevě se vypočte podle vzorce:

$$L = \frac{V_L}{n} 100 \quad (\%)$$

V_L ... hmotnost ligninu na filtračním kelímku v g

n ... navážka vzorku dřevěných pilin v g

1.3 Stanovení obsahu vlhkosti ve dřevě

Přírodní dřevo může obsahovat velmi rozmanité množství vody od 50 do 200 % (vztaženo na hmotnost absolutně suchého dřeva). Čerstvě uřezané dřevo obvykle má obsah vody mezi 30 a 60 %, který se v průběhu času snižuje až na hodnoty kolem 5 až 10 % u vzduchosuchého dřeva. Voda je ve dřevě obsažena jako volná (vyplňuje prostor mezi vlákny) a vázaná (obsažená ve vláknech). Obsah vázané vody je maximálně kolem 30 %, je závislý na teplotě okolí a málo závislý na druhu dřeva. Obsah volné vody je naopak velmi závislý na druhu dřeva. Na základě rozdílů mezi vodou volnou a vázanou se rozlišuje obsah vlhkosti ve dřevě (voda volná) a obsah vody ve dřevě (volná i vázaná voda). Mezi nejběžnější postupy stanovení obsahu vlhkosti ve dřevě se řadí metoda sušením při teplotě 103±2 °C. Vlhkost dřeva se vypočítá jako rozdíl mezi hmotnostmi před a po sušení vzorku. (Melcer a kol., 1976; ÚNMZ, 1979)

1.3.1 Pomůcky

Analytické váhy, vysoké skleněné váženky s víčkem (2x), sušárna s nastavitelnou teplotou a nuceným oběhem vzduchu, exsikátor, lžička.

1.3.2 Vzorky a chemikálie

Dřevěné piliny

1.3.3 Postup práce

Stanovení se provádí 2x u jednoho vzorku.

Postup práce je realizován dle normy ČSN 490103.

1. Nejprve zvážíme suchou a čistou navažovačku (včetně víčka) na analytických vahách.
2. Na analytických vahách poté navážíme do navažovačky asi 1 g dřevěných pilin.
3. Otevřenou navažovačku vložíme do sušárny s nastavenou teplotou 103±2 °C a sušíme alespoň 2 hodiny.
4. Následně necháme uzavřenou navažovačku vychladnout na pokojovou teplotu v exsikátoru a zvážíme.

5. Vysoušení, chlazení a vážení opakujeme (po 30 minutových intervalech) tak dlouho, dokud nebude mít vysušený vzorek konstantní hmotnost.

1.3.4 Výpočet

Vlhkost ve vzorku dřeva se vypočte podle vzorce:

$$v = \frac{B - C}{B - A} 100 \quad (\%)$$

A ... hmotnost prázdné navažovačky v g

B ... hmotnost navažovačky se vzorkem před vysušením v g

C ... hmotnost navažovačky se vzorkem po vysušení v g

1.4 Stanovení extrahovatelných látek ve dřevě

Mezi extrahovatelné látky dřeva můžeme zařadit velmi různorodé skupiny organických sloučenin, které lze ze dřeva izolovat různými metodami. Složení těchto látek je závislé na druhu dřeva, podnebí, ročním období, stáří stromu a mění se také uvnitř mikrostruktury dřeva. Mezi extraktivní látky můžeme zařadit např. různé aromatické či alifatické uhlovodíky, dále pak prchavé kyseliny, éterické a mastné oleje, přírodní barviva, smoly, tuky, fytosteroly, rozpustné polysacharidy, třísloviny, glykosidy, proteiny, bílkoviny, alkaloidy a další sloučeniny. Obvykle tvoří kolem 5 – 10 % hmotnosti suchého dřeva, ale u některých druhů mohou dosahovat až 30 hm. %. Extraktivní látky tak ovlivňují mechanické, chemické i biologické vlastnosti dřeva. Většina druhů dřeva obsahuje jednu specifickou skupinu extrahovatelných látek, které jsou pro daný druh dominantní, a žádný druh dřeva neobsahuje všechny uvedené skupiny extrahovatelných látek. Různé skupiny lze ze dřeva izolovat různými metodami extrakce. Mezi nejběžnější patří extrakce organickými rozpouštědly, studenou nebo horkou vodou a 1% roztokem NaOH. (Melcer a kol., 1976)

1.4.1 Pomůcky

Soxhletův extrakční přístroj, topné hnízdo 250, extrakční patrona, exsikátor, vata, 250 ml destilační baňka, analytické váhy, pryžový podstavec na baňku, lžička, pinzeta, skleněné kuličky, Petriho miska, 100 ml odměrný válec.

1.4.2 Vzorky a chemikálie

Dřevěné piliny

Chloroform

1.4.3 Postup práce

Stanovení se provádí 1x u jednoho vzorku.

1. Do extrakční patrony odvážíme na analytických vahách cca 2 g pomletých dřevěných pilin a patronu uzavřeme malým kouskem vaty.

2. Zvážíme na analytických vahách extrakční baňku s několika skleněnými kuličkami a poté naplníme baňku 150 ml chloroformu.
3. Z baňky a extraktoru sestavíme aparaturu, do které umístíme patronu se vzorkem.
4. Na extraktor připojíme zpětný chladič a otevřeme přepouštěcí kohout.
5. Pustíme vodu do chladiče, zapneme topné hnízdo a vzorek extrahujeme rozpouštědlem po dobu 2,5 hodiny.
6. Po uplynutí extrakční doby nejprve uzavřeme přepouštěcí kohout nad extraktorem a oddestilujeme většinu rozpouštědla do zásobního prostoru.
POZOR! – nesmí se odpařit veškeré rozpouštědlo z extrakční baňky, jinak dojde ke znehodnocení vzorku.
7. Po ochlazení odpojíme nejprve chladič od extraktoru a vyjmeme pinzetou patronu.
8. Následně od extrakční baňky oddělíme extraktor a zastavíme chladicí vodu.
9. Vyextrahované látky se zbytkem rozpouštědla dosušíme v sušárně při teplotě 85 ± 3 °C do konstantní hmotnosti.
9. Extrakční baňku poté necháme vychladnout v exsikátoru a zvážíme.

Poznámky: Piliny z extrakční patrony vysypeme na Petriho misku a necháme odpařit rozpouštědlo v digestoři; patrona se uchová k dalšímu stanovení. Chloroform vypustíme zpět do zásobní láhve.

1.4.4 Výpočet

Obsah extraktivních látek dřeva rozpustných v rozpouštědle se vypočte podle následujícího vzorce:

$$O_{E_{ROZP}} = \frac{(J_2 - J_1)}{K} 100 \quad (\%)$$

J_1 ... hmotnost extrakční baňky v g

J_2 ... hmotnost extrakční baňky s extraktem v g

K ... navážka vzorku dřeva v g

Obsah extraktivních látek rozpustných v rozpouštědle přepočtený na sušinu dřeva se vypočte podle vzorce:

$$O_{ES_{ROZP}} = O_{E_{ROZP}} f \quad (\%)$$

f ... přepočítávací faktor na sušinu

$$f = \frac{100}{100 - v}$$

v ... vlhkost dřeva (zjištěná podle stanovení 1.3) v %

2 Úloha č. 2 – Analýza usní a kolagenního hydrolyzátu

Úloha se v první části zabývá stanovením několika kvalitativních ukazatelů jakosti usní, kterými lze snadno zjistit některé případné chyby v technologii výroby usní. Druhá část úkolu je zaměřena na kvantitativní stanovení aminokyseliny hydroxyprolinu v hydrolyzátu kolagenu, který lze připravovat z odpadů kožedělného průmyslu.

2.1 Stanovení vodou vyloužitelných látek, pH a diferenčního čísla usní

Usně jsou chemicky a mechanicky vylepšené přírodní produkty, jejichž největší část (50 až 75 % hmotnosti) pochází ze zvířecích kůží. Stejně jako mnoho jiných produktů je i kvalita usní hodnotitelná na základě standardizovaných metod (Heidemann, 1993). Metoda analýzy vodou vyloužitelných látek je založena na gravimetrickém stanovení odparku výluhu z usní. Hmotnost odparku je dána zejména přítomností ve vodě rozpustných organických a anorganických látek (nevázané vyčiňující látky, barviva, soli apod.) v usních. Vysoký obsah vodou vyloužitelných látek může signalizovat chybu technologie, špatnou fixaci činící látky nebo umělé zvyšování hmotnosti usní. Dalšími metodami hodnocení kvality usní je pH výluhu a diferenční číslo usní, které jsou ukazatelem množství kyselin v usních. Kyseliny se při výrobě usní běžně používají a proto je možné je v usních běžnými metodami zjistit. Používají se kyseliny jak silné tak slabé a v usních je můžeme najít jak ve volné formě tak i vázané, které se mohou stárnutím usně postupně uvolňovat. Volné kyseliny, zejména silné, mohou způsobovat destrukci kožních vláken v usních, čímž dochází k výraznému poklesu pevnostních charakteristik usní. Metoda zjištění diferenčního čísla je založena na rozdílu pH vodného výluhu usně a výluhu 10x zředěného. (Mládek, 1988)

2.1.1 Pomůcky

Třepačka, nůžky, Erlenmayerova baňka 1000 ml (2x) se zátkou, sušárna, pipeta 30 ml, porcelánová miska (2x), odměrný válec 250 ml, odměrná baňka 100 ml (2x), nálevka velká (2x), kádinky 10 ml a 800 ml (2x), pipeta 10 ml, filtrační papír nízké hustoty, velké hodinové sklíčko, pH metr kalibrovaný do kyselé oblasti.

2.1.2 Vzorky a chemikálie

Useň

2.1.3 Postup práce

Stanovení se provádí 2x u jednoho vzorku.

1. Useň rozstříháme na kousky o velikosti cca 5 x 5 mm (asi 20 g).
2. Do velké Erlenmayerovy baňky poté na předvážkách navážíme přibližně 10 g ($\pm 0,1$ g) rozstříhaného vzorku usně.

3. Ke vzorku přilijeme 500 ml vody o pokojové teplotě a baňku uzavřeme.
4. Vzorek usně v baňce třepeme na třepačce při polovičním výkonu 2,5 hodiny.
5. Dáme si přesušit porcelánové misky na 20 minut do sušárny vyhřáté na 150 až 200 °C, následně je po ochlazení v exsikátoru zvážíme na analytických vahách.
6. Po ukončení třepání přefiltrujeme vzorek do kádinky a filtrát nevytléváme!
7. Do misky (dříve přesušené a zvážené) odpipetujeme z filtrátu přesně 30 ml.
8. Misku s filtrátem sušíme při 150 °C do konstantní hmotnosti a poté necháme zchladnout v exsikátoru.
9. Nakonec misku s odparkem zvážíme na analytických vahách.
10. Do zbylého filtrátu ponoříme elektrodu pH metru (předem opláchnutou destilovanou vodou) a necháme ustálit.
11. Následně zaznamenáme pH hodnotu výluhu (pH₀).
12. Do 100 ml odměrné baňky pipetou odměříme přesně 10 ml výluhu, doplníme destilovanou vodou po značku a promícháme.
13. Zředěný výluh nalijeme do 100 ml kádinky a ponoříme elektrodu pH metru (předem opláchnutou destilovanou vodou), po ustálení zapíšeme hodnotu pH výluhu 10x zředěného (pH₁₀).

2.1.4 Výpočet

Celkové vyloužitelné látky (CVL) v hm. % se vypočítají podle vzorce:

$$CVL = \frac{m_1}{n} \cdot z \cdot 100$$

m_1 ... hmotnost odparku v g

n ... navážka vzorku usně na stanovení v g

z ... stupeň zředění (celkový objem / pipetovaný objem)

Celkové vyloužitelné látky v sušině vzorku usně (CVL_s) se vypočítají podle vzorce:

$$CVL_s = CVL \cdot f$$

f ... přepočítávací faktor na sušinu

$$f = \frac{100}{100 - v}$$

v ... obsah těkavých látek (zjištěný podle stanovení 2.2) v %

pH výluhu usně je hodnota zjištěná po filtraci heterogenní směsi (pH₀)

Diferenční číslo (D) se vypočítá ze vztahu:

$$D = pH_{10} - pH_0$$

pH₀ ... pH původního výluhu usně

pH₁₀ ... pH výluhu 10x zředěného

2.2 Stanovení těkavých látek v usnách

Největší část těkavých látek v usnách tvoří voda, která svou přítomností ovlivňuje řadu fyzikálně-mechanických vlastností usní (tloušťku, pružnost, propustnost pro plyny a páry, izolační vlastnosti apod.). Množství vlhkosti v usnách je závislé zejména na teplotě a vlhkosti okolí, dále pak na struktuře a chemickém složení usní a také na způsobu jejich úpravy. Obsah těkavých látek je dán úbytkem hmotnosti vzorku usně během sušení při teplotě 103 ± 2 °C. (Mládek, 1988)

2.2.1 Pomůcky

Koželužské misky (2x), analytické váhy, lžička, sušárna, exsikátor.

2.2.2 Vzorky a chemikálie

Useň

2.2.3 Postup práce

Stanovení se provádí 2x u jednoho vzorku.

Postup práce je realizován dle normy ČSN 56 0116-3.

1. Zvážíme si suché koželužské misky, do kterých poté odvážíme 1 g nastříhaného vzorku usně (na analytických vahách).
2. Koželužské misky se vzorkem sušíme 2,5 h v sušárně s teplotou 103 °C.
3. Následně necháme misky zchladnout v exsikátoru a opět zvážíme na analytických vahách.
4. Sušení a vážení opakujeme do konstantní hmotnosti.

2.2.4 Výpočet

Obsah těkavých látek v % se vypočítá podle vztahu:

$$v = \frac{m_1 - m_2}{m_1} 100$$

m_1 ... hmotnost zkušební vzorku před sušením v g

m_2 ... hmotnost zkušební vzorku po sušení v g

2.3 Stanovení teploty smrštění usní

Teplotou smrštění usně se rozumí taková teplota, při které se zkušební těleso ponořené ve vodě začne viditelně smršťovat. Tato teplota poté charakterizuje hydrotermickou stabilitu usně, tzn. odolnost usně proti teplé vodě. Podle teploty smrštění lze usuzovat na použitou metodu činění usně (chromočiněné usně 90–110 °C, tříslučiněné usně 75–85 °C, kolagen 55–65 °C). Principem měření teploty smrštění usní je pomalé zahřívání vzorku (definovanou rychlostí ohřevu) ve vodě a zaznamenání teploty, při které dojde ke smrštění vzorku nejméně o 0,3 % původní délky. (Mládek, 1988; Heidemann, 1993)

2.3.1 Pomůcky

Pravítko, teploměr, nůžky, vyřezávací podložka, drátky a závaží, kádinka vysoká 400 ml a 150 ml, vaříč, stojan, svorky, průbojník, kladívko, tloušťkoměr.

2.3.2 Vzorky a chemikálie

Usně

Směs glycerol : voda (40 : 60)

2.3.3 Postup práce

Stanovení se provádí 2x u dvou vzorků.

1. Z usní vyřízneme zkušební tělíska ve tvaru obdélníku o rozměrech:
 - 50 x 7 mm pro usně o tloušťce do 2,5 mm
 - 50 x 6 mm pro usně o tloušťce nad 2,5 mm
2. Zkušební tělesa před zkouškou ponoříme do kádinky s vodou o teplotě 20 až 25 °C na 30 minut.
3. Zkušební těleso uchytlíme do stojanu a do kádinky nalijeme směs glycerinu a vody o teplotě cca 60 °C, vhodíme 4 až 5 varných kuliček a uchytlíme teploměr tak aby byl ponořený blízko zkušebního tělesa.
4. Zapneme vaříč a ohříváme rychlostí asi 2 °C.min⁻¹.
5. Sledujeme zkušební těleso a v okamžiku jeho smrštění zaznamenáme teplotu.
6. Po ukončení zkoušky směs glycerinu s vodou nevyléváme, ale po vychladnutí uchováme pro další měření.

2.4 Stanovení Hydroxyprolinu v kolagenním hydrolyzátu

Výroba kolagenních hydrolyzátů je jednou z metod zpracování odpadů kožedělného a masného průmyslu. Mezi neperspektivnější metody přípravy kolagenních hydrolyzátů patří zejména enzymová a kombinovaná (alkalicko-enzymová) hydrolýza (Mokrejš, 2008). Hydroxyprolin je jednou ze specifických aminokyselin kolagenu, která je v něm obsažena v poměrně vysokém množství (kolem 13 %). Analýzou množství hydroxyprolinu tak lze nepřímo stanovit obsah kolagenních bílkovin ve vzorku. Metody stanovení kolagenu lze rozdělit do dvou hlavních skupin, první je založena na imunochemických technikách a do druhé skupiny patří vše ostatní včetně analýzy hydroxyprolinu (Ignat'eva a kol, 2007). Principem této metody je nejprve hydrolyticky uvolnit hydroxyprolin, který se poté oxiduje peroxidem vodíku na kyselinu 3-hydroxy-4-amino-1,3-dienvalerovou, která dává s p-dimethylaminobenzaldehydem červené zabarvení. Intenzitu zbarvení je možné změřit spektrofotometricky a srovnat s kalibrační křivkou (Príběla, 1991; Dubravický a kol., 1989).

2.4.1 Pomůcky

Spektrofotometr, kádinky 25 ml, 100 ml, 600 ml, magnetické míchadlo, analytické váhy, vodní lázeň s regulací teploty, odměrné baňky 25 ml, 100 ml, zkumavky s uzávěrem (10x), odměrné válce 5 ml, 10 ml, dělené pipety 1 ml, 5 ml, nálevka, časovací hodiny.

2.4.2 Vzorky a chemikálie

Kolagenní hydrolyzát

H₂O₂ 30%

Roztok CuSO₄: 0,125 g CuSO₄ · 5 H₂O se rozpustí a doplní do 50 ml destilovanou vodou

Roztok NaOH, (c=2,5 mol.l⁻¹): 5,5 g NaOH se rozpustí a doplní do 50 ml destilovanou vodou

Roztok H₂O₂ (čerstvě připravený): 5 ml 30% peroxidu se smíchá s 10 ml vody; uchovává se v uzavřené 25 ml odměrné baňce

Roztok H₂SO₄, (c=1,5 mol.l⁻¹): 4,2 ml 96% H₂SO₄ se pomalu a za míchání přidává do 50 ml odměrné baňky s cca 35 ml vody; po ochlazení se baňka doplní vodou po značku a promíchá se

10% roztok p-dimethylaminobenzaldehydu v propanolu (čerstvě připravený zásobní roztok v tmavé láhvi, je možné uchovávat max. 1 týden!)

Standardní roztok hydroxyprolinu (čerstvě připravený): 100 mg hydroxyprolinu rozpustíme v destilované vodě, doplníme ve 100 ml odměrné baňce po značku a důkladně promícháme

2.4.3 Postup práce

Stanovení se provádí 2x u jednoho vzorku. Zahřívání vzorků, slepého pokusu a kalibrační křivky je nutné provádět zároveň.

1. Do malé kádinky navážíme na analytických vahách 1,25 g kolagenního hydrolyzátu, rozpustíme ve vodě a doplníme v odměrné baňce na objem 25 ml, nakonec důkladně promícháme.
2. Na stanovení nejprve do zkumavky napipetujeme 0,5 ml připraveného roztoku hydrolyzátu a přidáme stejné množství vody (celkový objem bude 1 ml).
3. Přidáme 1 ml roztoku CuSO₄, 1 ml roztoku NaOH, 1 ml roztoku H₂O₂ a nasadíme uzávěr.
4. Obsahem zkumavky opatrně třepeme (cca 5 minut), přičemž několikrát během protřepávání přestaneme a opatrně uvolníme zátku (k úniku vzniklého přetlaku).
5. Zkumavku (bez uzávěru) s malou nálevkou zahříváme na vodní lázni při 80 °C přesně 5 minut.
6. Zkumavku ochladíme ve vodě a po ochlazení na cca 20 °C přidáme 4 ml 1,5 mol.l⁻¹ roztoku H₂SO₄ a promícháme tak aby došlo k rozpuštění hnědé sraženiny.

7. Přidáme 2 ml roztoku p-dimethylaminobenzaldehydu a opět promícháme.
8. Zkumavku temperujeme při 70 °C na vodní lázni po dobu 16 minut.
9. Po ochlazení zkumavky změříme (v průběhu 30 minut) absorbanci červeného zbarvení na spektrofotometru při vlnové délce 550 nm oproti slepému pokusu.
10. Množství hydroxyprolinu v mg odečteme z kalibrační křivky, kterou si sestojíme podle následujících instrukcí.

Kalibrační křivka

- a) Z připraveného roztoku hydroxyprolinu pipetujeme do jednotlivých zkumavek 0,05 – 0,1 – 0,2 – 0,3 – 0,4 – 0,5 – 0,6 ml a doplníme vodou na objem 1 ml.
- b) Dále postupujeme jako při stanovení hydroxyprolinu v roztoku hydrolyzátu (tzn. body 3 – 9).

Slepý pokus se provede stejným způsobem s tím rozdílem, že se místo roztoku hydrolyzátu do zkumavky odpipetuje pouze 1 ml destilované vody.

Poznámka: Je-li změřená absorbance mimo rozsah kalibrační křivky, pipetujeme do zkumavky upravené množství připraveného roztoku hydrolyzátu.

2.4.4 Výpočet

Obsah hydroxyprolinu v mg.kg^{-1} vzorku se vypočte podle vztahu:

$$w_{HYPRO} = \frac{m}{n} \cdot \frac{V_1}{V_2} \cdot 1000$$

m ... množství hydroxyprolinu odečtené z kalibrační křivky v mg

n ... navážka vzorku hydrolyzátu na stanovení v g

V_1 ... objem roztoku hydrolyzátu v ml

V_2 ... objem hydrolyzátu pipetovaného na stanovení v ml

3 Úloha č. 3 – Analýza tuků

Tuky a oleje jsou přírodní organické látky souhrnně označované jako lipidy. Jsou to látky převážně neutrálního charakteru a podle složení je lze rozdělit do několika skupin (jednoduché homolipidy, složené heterolipidy, lipoproteidy apod.) (Mokrejš, 2008/2). Tuky a oleje jsou přirozenou a důležitou součástí většiny surovin živočišného původu. Obsah tuku v surovině nebo výrobku je pak jedním z hlavních kritérií hodnocení kvality daného materiálu (Dubravický a kol., 1989).

3.1 Stanovení cholesterolu spektrofotometrickou metodou

Cholesterol je nenasycený steroidní alkohol odvozený od cholestanu (10,13-dimethyl-17-isooktylsteran). Patří do skupiny látek nazývané steroly, které jsou jako doprovodné složky přítomné v živočišných lipidech. Cholesterol je běžnou součástí lidských buněk, kde je obsažen v biomembránách a je nezbytný pro správné fungování mnoha biologických reakcí. Nadměrné množství cholesterolu v těle má za následek jeho ukládání v cévách, čímž dochází k zužování cév, ke ztrátě flexibility a v krajním případě až k ucpání. Z tohoto důvodu je nutné sledovat obsah cholesterolu v tucích, zejména v těch, které jsou určeny pro potravinářský průmysl. (Mokrejš, 2008)

Principem metody spektrofotometrického stanovení cholesterolu je jeho reakce s acetanhydridem a kyselinou sírovou v prostředí etylacetátu za tvorby zeleně zbarveného komplexu. Absorbance tohoto komplexu při 625 nm je poté úměrná množství cholesterolu ve vzorku. (Dubravický a kol., 1989)

3.1.1 Pomůcky

Spektrofotometr, odměrné baňky 50 ml a 25 ml, kádinka 100 ml, kádinky 50 ml (14x), dělené pipety 1 ml a 10 ml, vodní lázeň, nálevky malá a střední, odměrný válec 25 ml, magnetické míchadlo, analytické váhy.

3.1.2 Vzorky a chemikálie

Stolní olej

Octan ethylnatý

Anhydrid kyseliny octové

Kyselina sírová koncentrovaná

Standardní roztok cholesterolu (čerstvě připravený): 25 mg cholesterolu rozpustíme v asi 30 ml octanu ethylnatém ve 100 ml kádince, poté přelijeme a doplníme v odměrné baňce 50 ml po značku (octanem ethylnatým) a důkladně promícháme.

3.1.3 Postup práce

Stanovení se provádí 2x u jednoho vzorku. Veškerá manipulace s rozpouštědly se provádí v digestoři. Odpad vyléváme pouze do připravené nádoby.

1. Vzorek připravíme tak, že do 50 ml kádinky odvážíme 2 g vzorku na analytických vahách a přidáme 15 ml octanu ethylnatého.
2. Obsahem kádinky mícháme (případně zahřejeme) a vzorek necháme rozpustit.
3. Vzorek poté přelijeme do 25 ml odměrné baňky a doplníme po rysku octanem ethylnatým.
4. Do 50 ml kádinky pipetou odměříme 4 ml octanu ethylnatého, 4 ml anhydridu kyseliny octové a po kapkách přidáme 0,8 ml H_2SO_4 (ochranný štít na oči, resp. ochranné brýle!).
5. Obsahem kádinky zamícháme (ochranný štít na oči, resp. ochranné brýle!) a poté během 10 minut ochladíme na vodní lázni na teplotu 20 °C.
6. Do kádinky následně přidáme pipetou 5 ml roztoku vzorku, opět mícháme (ochranný štít na oči, resp. ochranné brýle!) a chladíme 5 minut na vodní lázni.
7. Souběžně si připravíme slepý vzorek a roztoky pro kalibrační křivku.
8. Po uplynutí 30 minut měříme absorbanci připraveného roztoku na spektrofotometru při vlnové délce 625 nm oproti slepému pokusu.
9. Sestrojíme si kalibrační křivku, ze které následně odečteme množství cholesterolu odpovídající změřené absorbanci vzorku.

Zhotovení kalibrační křivky cholesterolu:

- a) Z připraveného roztoku cholesterolu odpipetujeme do 50 ml kádinek postupně 1 – 2 – 3 – 4 – 5 – 6 – 7 – 8 – 9 ml a vždy doplníme na objem 9 ml octanem ethylnatým.
- b) Následně přidáme 4 ml anhydridu kyseliny octové a 0,8 ml H_2SO_4 (ochranný štít na oči, resp. ochranné brýle!).
- c) Obsah kádinek zamícháme na magnetickém míchadle (ochranný štít na oči, resp. ochranné brýle!) a v průběhu 10 minut zchladíme ve vodní lázni.
- d) Po 30 minutách změříme absorbanci roztoků na spektrofotometru při vlnové délce 625 nm oproti slepému pokusu.

Slepý pokus: Do kádinky pipetujeme 9 ml octanu ethylnatého, 4 ml anhydridu kyseliny octové a 0,8 ml koncentrované H_2SO_4 (ochranný štít na oči, resp. ochranné brýle!), promícháme a ochladíme ve vodní lázni.

Poznámka: Je-li naměřená hodnota absorbance mimo rozsah kalibrační křivky, připravíme směs s větším či menším množstvím roztoku vzorku (podle toho následně upravíme množství octanu ethylnatého).

3.1.4 Výpočet

Množství cholesterolu X (v mg/g) se vypočte podle vztahu:

$$X = \frac{a}{n} \frac{V_1}{V_2}$$

a ... množství cholesterolu odečtené z kalibrační křivky v mg

n ... navážka vzorku na stanovení v g

V₁ ... objem roztoku vzorku v ml

V₂ ... objem vzorku pipetovaný na stanovení v ml

3.2 Stanovení thiobarbiturového čísla

Thiobarbiturové číslo je kvantitativní ukazatel, kterým lze zjistit množství sekundárních oxidačních produktů vzniklých při oxidaci (žluknutí) tuků. Používá se jako jedna z metod pro hodnocení kvality tuků v průběhu jejich stárnutí. Pro komplexnější zhodnocení kvality tuků je potřeba thiobarbiturové číslo doplnit o další ukazatele (např. peroxidové číslo pro primární oxidační produkty). Stanovení thiobarbiturového čísla je založeno na principu reakce malondialdehydu, vzniklého oxidací dvojných vazeb kyseliny linolové, s kyselinou 2-thiobarbiturovou v kyselém prostředí. Výsledný roztok má oranžovo-červené zbarvení, jehož intenzita se změní fotometricky při 538 nm. Thiobarbiturové číslo poté udává intenzitu zbarvení reakčních produktů kyseliny 2-thiobarbiturové s oxidačními produkty tuků přepočtené na koncentraci malondialdehydu v mg/g. (Mokrejš, 2008; Příbela, 1991)

3.2.1 Pomůcky

Topné hnízdo 250, zkumavky se zátkami (3x), Liebigův chladič s příslušenstvím, 250 ml destilační baňka, kádinka 50 ml, odměrný válec 100 ml, pipeta 5 ml, vodní lázeň (vaříč s nádobou), laboratorní předvážky, lžička, spektrofotometr, špachtle.

3.2.2 Vzorky a chemikálie

Máslo, margarín nebo sádlo

Roztok kyseliny chlorovodíkové, c = 3 mol.l⁻¹ (zásobní roztok)

Roztok kyseliny 2-thiobarbiturové, c = 0,02 mol.l⁻¹ (zásobní roztok)

3.2.3 Postup práce

Destilace se provede jednou a navazující stanovení se provádí 2x u jednoho vzorku. Vzorek i slepý pokus je nutné zahřívat současně.

1. Do destilační baňky navážíme 10 g tuku s přesností na 0,01 g.
2. Ke vzorku přilijeme 100 ml vody a 5 ml roztoku HCl, obsah promícháme, očistíme zábrus a přidáme několik varných kamínků.

3. Z destilační baňky, Liebigova chladiče, kádinky a topného hnízda sestavíme destilační aparaturu a směs začneme zahřívat.
4. Zahříváme takovou rychlostí, aby se za 5 minut stihlo predestilovat asi 25 ml destilátu, který jímáme do připravené předlohy.
5. Destilát důkladně promícháme a poté z něj napipetujeme 5 ml do zkumavek.
6. Přidáme 5 ml roztoku kyseliny 2-thiobarbiturové, zkumavky uzavřeme a obsah promícháme.
7. Zkumavky bez zátek umístíme na vroucí vodní lázeň a zahříváme 35 minut.
8. Po skončení záhřevu zkumavky ihned ochladíme v proudu studené vody.
9. Ihned (do 2 minut) na spektrofotometru změříme absorbanci roztoku (růžové až červené zabarvení) při vlnové délce 538 nm proti slepému pokusu.

Slepý pokus se připraví obdobným způsobem s tím rozdílem, že se pipetuje 5 ml destilované vody místo vzorku.

3.2.4 Výpočet

Obsah malondialdehydu (TBČ) se vypočítá z následujícího vztahu a výsledek se vyjádří v mg malondialdehydu v 1 g tuku:

$$c_{MA} = \frac{78 A}{b n}$$

A ... absorbance měřeného roztoku

b ... tloušťka kyvety v mm

n ... navážka vzorku v g

3.3 Stanovení čísla kyselosti

Číslo kyselosti udává množství volných mastných kyselin, které lze ve vzorku zjistit reakcí s KOH. Uvádí se jako množství KOH v mg, které je potřebné pro neutralizaci volných organických kyselin (zejména mastných kyselin) v 1 g vzorku. Principem metody je rozpuštění tuku v etanolu nebo jeho směsi s jiným rozpouštědlem a titrační stanovení potřebného objemu KOH na fenolftalein za horka. Číslo kyselosti se běžně uvádí jako jeden ze základních ukazatelů kvality a složení tuků. (Mládek, 1988; Příbela, 1991)

3.3.1 Pomůcky

Vaříč, laboratorní předvážky, kovová špachtle, byreta, odměrný válec 100 ml (2x), Erlenmayerova baňka 250 ml (2x), kádinka 250 ml, lžička, nálevka.

3.3.2 Vzorky a chemikálie

Máslo, margarín, olej nebo sádlo

Etanol 96%

Chloroform

3% etanolický roztok KOH (zásobní roztok)

Etanolický roztok KOH, $c = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ (zásobní roztok)

1% roztok fenolftaleinu v etanolu (zásobní roztok)

3.3.3 Postup práce

Stanovení se provádí 2x u jednoho vzorku.

1. Do Erlenmayerovy baňky navážíme na předvážkách 20 g vzorku.
2. Pro každý vzorek se připraví 100 ml směsi stejných objemových dílů etanolu a chloroformu, směs se poté zneutralizuje na fenolftalein do **slabě růžového** zabarvení 3% etanolickým roztokem KOH.
3. Připravený rozpouštěcí systém nalijeme ke vzorku a obsah baňky se opatrně zahřeje k varu (**pracujeme v digestoři**).
4. Po důkladném zamíchání se přidá asi 5 kapek indikátoru fenolftalein.
5. Ihned (za horka) a za míchání se titruje $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ etanolickým roztokem KOH do růžovofialového zabarvení, které vydrží alespoň 30 sekund.

3.3.4 Výpočet

Číslo kyselosti (ČK) se vyjádří jako množství KOH (v mg) potřebné k neutralizaci 1 g vzorku podle následujícího vztahu:

$$\text{ČK} = \frac{a \cdot c \cdot M}{n}$$

a ... spotřeba odměrného roztoku KOH ($c = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$) v ml

c ... koncentrace odměrného roztoku KOH ($c = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$)

M ... molární hmotnost KOH v g.mol^{-1}

n ... navážka vzorku v g

Kyselost tuku se někdy také vyjadřuje stupněm kyselosti (SK), který udává spotřebu roztoku KOH v ml potřebného k neutralizaci volných kyselin ve 100 g tuku. Mezi SK a ČK platí tento vztah:

$$\text{SK} = \frac{100 \cdot \text{ČK}}{56,11} = 1,7825 \cdot \text{ČK}$$

3.4 Stanovení těkavých látek a orientační stanovení minerálních olejů

Mezi těkavé látky obsažené v tucích můžeme zařadit zejména malé množství vlhkosti, dále pak mohou být obsaženy minerální oleje, kterými byl tuk uměle nastaven. Obsah vlhkosti a množství těkavých látek se stanovuje gravimetricky po vysušení vzorku při $103 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$ do konstantní hmotnosti. Principem orientační zkoušky přítomnosti minerálních olejů je poté analýza tukové skvrny na filtračním papíře po zahřátí. (Mládek, 1988)

3.4.1 Pomůcky

Koželužské misky (2x), Petriho misky (2x), filtrační papír, lžička, analytické váhy, sušárna, exsikátor.

3.4.2 Vzorky a chemikálie

Stolní olej

3.4.3 Postup práce

Stanovení se provádí 2x u jednoho vzorku.

1. Zvážíme suché a čisté koželužské misky a do nich odvážíme na analytických vahách 3 g vzorku.
2. Misky se vzorkem sušíme v sušárně s teplotou 103 ± 2 °C po dobu 3 h.
3. Následně misky umístíme do exsikátoru a po vychladnutí zvážíme.
4. Sušení a vážení opakujeme v 20 minutových intervalech do konstantní hmotnosti vzorku.
5. Do Petriho misky umístíme filtrační papír a doprostřed kápneme malou kapku oleje, kterou necháme rozpít a označíme okraj.
6. Misky umístíme na 30 minut do sušárny při 103 ± 2 °C.
7. Po vytažení ze sušárny zhodnotíme, zda se skvrna zvětšila nebo zmenšila. Zmenšení skvrny ukazuje na přítomnost minerálních olejů, které při zvýšené teplotě vyprchají.

3.4.4 Výpočet

Obsah těkavých látek (v) v % (hmot.) se vypočítá podle vztahu:

$$v = \frac{m_1 - m_2}{m_1} 100$$

m_1 ... hmotnost zkušebního vzorku před sušením v g

m_2 ... hmotnost zkušebního vzorku po sušení v g

4 Úloha č. 4 – Příprava želatin

Želatina je bílkovinná látka vzniklá částečnou hydrolýzou kolagenu. Je to ve vodě rozpustný protein, obvykle bezbarvý nebo mírně nažloutlé barvy, který je schopen z roztoku (solu) po ochlazení vytvořit gel. (Daintith & Martin, 2010)

Kolagen je výchozí složkou pro přípravu želatin, jedná se o fibrilární bílkovinu vyskytující se zejména v pojivových tkáních (kůže, chrupavky, kosti). Kolagenní vlákna jsou tvořena molekulami tropokolagenu (tři vzájemně stočené šroubovice kolagenu, M_r asi 30 kDa). Kolagen je nerozpustný ve studené vodě, při teplotě kolem 60 – 65 °C však dochází ke smrštění kolagenních vláken. Při dalším zvýšení teploty až k 90 °C pak dochází k porušení struktury molekul, rozpadu vazeb mezi polypeptidovými řetězci a vzniká sol rozpustné želatiny. Po ochlazení solu za určitých podmínek (koncentrace, teplotní gradient) vzniká znovu organizovaná struktura (gel). (Velíšek, 1999)

4.1 Stanovení sušiny vzorku

Vstupním materiálem pro výrobu želatiny budou odpady masného průmyslu, které byly vyprány, pomlety a zmrazeny. Po rozmrazení tyto materiály obsahují velké množství vody a dalších těkavých látek. Pro přesné dávkování chemikálií v dalších krocích je tak nezbytné stanovit obsah sušiny vzorku. Principem metody je vysušení vzorku při teplotě 103 ± 2 °C do konstantní hmotnosti a gravimetrické stanovení zbytku po vysušení.

4.1.1 Pomůcky

Koželužské misky (2x), analytické váhy, lžička, sušárna, exsikátor.

4.1.2 Vzorky a chemikálie

Kuřecí běháky

4.1.3 Postup práce

Stanovení se provádí 2x u jednoho vzorku.

Postup práce je realizován dle normy ČSN 56 0116-3.

1. Asi 1 g pomletého vzorku navážíme na analytických vahách do suchých a předem zvážených koželužských misek.
2. Misky se vzorkem umístíme do sušárny s teplotou 103 °C na 2,5 h.
3. Po vysušení necháme misky vychladnout v exsikátoru.
4. Poté zvážíme na analytických vahách.
5. Sušení, chlazení a vážení dále opakuje ve 20 minutových intervalech až do konstantní hmotnosti vzorku.

4.1.4 Výpočet

Obsah sušiny vzorku v % se vypočítá podle vztahu:

$$S = \frac{m_2}{m_1} \times 100$$

m_1 ... hmotnost zkušební vzorku před sušením v g

m_2 ... hmotnost zkušební vzorku po sušení v g

4.2 Odtučnění a úprava suroviny

Odtučnění materiálu je prvním technologickým krokem před vlastní extrakcí želatiny. Tuhy jsou nejběžnější doprovodnou složkou živočišných materiálů, kde jsou spolu s kolagenem přítomny téměř ve všech částech těla. Principem metody je rozpuštění tuku ve vhodném organickém rozpouštědle a následné odfiltrování pevného odtučněného podílu. (Mokrejš a kol., 2017)

4.2.1 Pomůcky

Erlenmayerovy baňky velké (2x) se zátkou, lžička, třepačka, laboratorní předvážky, odměrný válec 500 ml, sítko, tkanina, sušárna, plech.

4.2.2 Vzorky a chemikálie

Kuřecí běháky

Rozpouštědlo (etanol, petroléter, chloroform nebo aceton)

4.2.3 Postup práce

Odtučnění se provádí 2x u jednoho vzorku.

1. Do Erlenmayerovy baňky navážíme 150 g pomletého vzorku a přidáme tolik ml vybraného rozpouštědla, aby vznikla směs v poměru 1:5 (vztaženo na sušinu vzorku).
2. Baňku umístíme na třepačku a mírně třepeme 4 hodiny.
3. Po ukončení třepání vyměníme rozpouštědlo za nové a necháme stát při pokojové teplotě do příštího cvičení (**DÁLE POKRAČUJEME S DŘÍVE PŘIPRAVENÝM VZORKEM!**).
4. Odtučněný materiál poté přefiltrujeme přes sítko s tkaninou a necháme na plechu vysušit při 60 °C asi 30 minut.
5. Vysušený vzorek zvážíme a uskladníme pro další použití, veškeré rozpouštědla přelijeme do odpadní nádoby.

4.3 Odstranění nekolagenních bílkovin a botnání suroviny

Odpady masného průmyslu mohou být dobrým zdrojem pro přípravu želatin a jiných proteinových hydrolyzátů. Kuřecí běháky např. obsahují téměř 50 % bílkovin, z nichž většinu představuje využitelný kolagen. Pro úspěšnou izolaci

kolagenu je však nutné odstranit zbylé nekolagenní bílkoviny a následně nechat materiál důkladně nabotnat (loužit) tak aby došlo k narušení struktury kolagenových vláken. (Mokrejš a kol., 2017)

4.3.1 Pomůcky

Erlenmayerovy baňky 500 ml (2x) se zátkou, lžička, třepačka, laboratorní předvážky, odměrný válec 250 ml, sítko, tkanina, pH metr, koželužské misky s víčkem, exsikátor (2x).

4.3.2 Vzorky a chemikálie

Kuřecí běháky – odtučněné

3% roztok NaOH

4.3.3 Postup práce

Provádíme 2x u jednoho vzorku.

1. Do Erlenmayerovy baňky navážíme 50 g odtučněného a vysušeného vzorku a přidáme 250 ml roztoku NaOH.
2. Baňky umístíme na třepačku a mírně třepeme 2 hodiny.
3. Po ukončení třepání vyměníme roztok hydroxidu za čerstvý (pH směsi by mělo být vyšší než 12) a necháme stát při pokojové teplotě do příštího cvičení (**DÁLE POKRAČUJEME S DŘÍVE PŘIPRAVENÝM VZORKEM!**).
4. Vzorek odfiltrujeme přes sítko s tkaninou a důkladně promyjeme vodou.
5. Z promytého vzorku odebereme asi 2,5 g do koželužské misky, vysušíme při 103 °C a po ochlazení zvážíme.
6. Zbylý promytý vzorek uskladníme a použijeme pro extrakci želatiny.

4.4 Extrakce želatiny

Želatina se z kolagenního materiálu nejčastěji získává extrakcí horkou vodou v několika stupních, kdy v každém stupni se zvyšuje teplota vody a získává se želatina s kratšími řetězci. Počáteční teplota bývá 40 °C a roste až do 90 °C. Podle způsobu předchozího opracování se rozlišují želatiny typu A (kyselé prostředí) a typu B (alkalické prostředí). Zejména pro farmaceutické a potravinářské účely je nutné extrahovat želatiny s vysokou čistotou a průzračností, tedy při nižších teplotách extrakce. (Mokrejš & Langmaier, 2008)

4.4.1 Pomůcky

Kádinka 600 ml (2x), lžička, odměrný válec 250 ml, sítko, tkanina, sušárna, magnetické míchadlo s ohřevem, laboratorní předvážky, Petriho misky velké, plech.

4.4.2 Vzorky a chemikálie

Kuřecí běháky – předzpracované

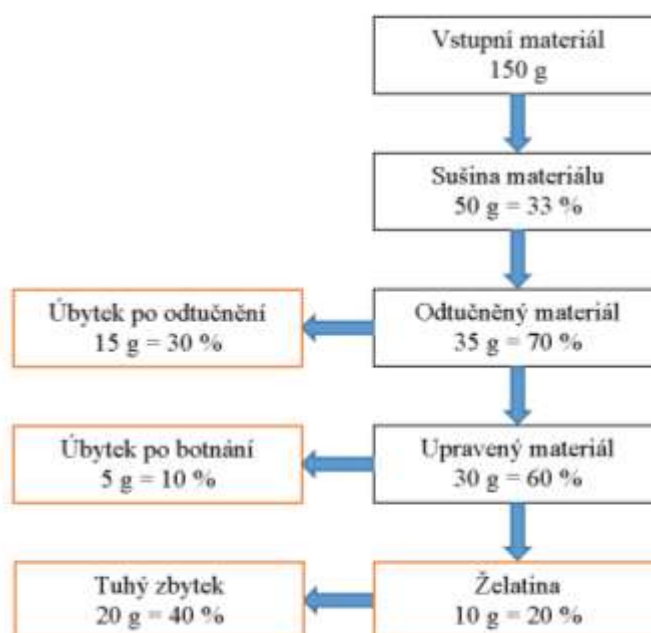
4.4.3 Postup práce

Provádíme 2x u jednoho vzorku.

1. Do kádinky odvážíme celý podíl předzpracovaného a promytého vzorku a přidáme tolik destilované vody, aby byl dosažen poměr složek 1:5.
2. Kádinku umístíme na magnetické míchadlo a za stálého míchání ohřejeme směs na 80 °C, poté extrahujeme 2 hodiny.
3. Následně pevný podíl odfiltrujeme přes sítko s tkaninou.
4. Pevný podíl necháme na Petriho miskách vysušit při 103 °C do konstantní hmotnosti a po ochlazení v exikátoru zvážíme.
5. Roztok želatiny necháme vysušit v sušárně při 60 °C a následně uskladníme pro další použití.

4.4.4 Výpočet

Ze získaných hmotností z předchozích částí vytvoříme bilanční schéma výroby želatiny podle obrázku 1.



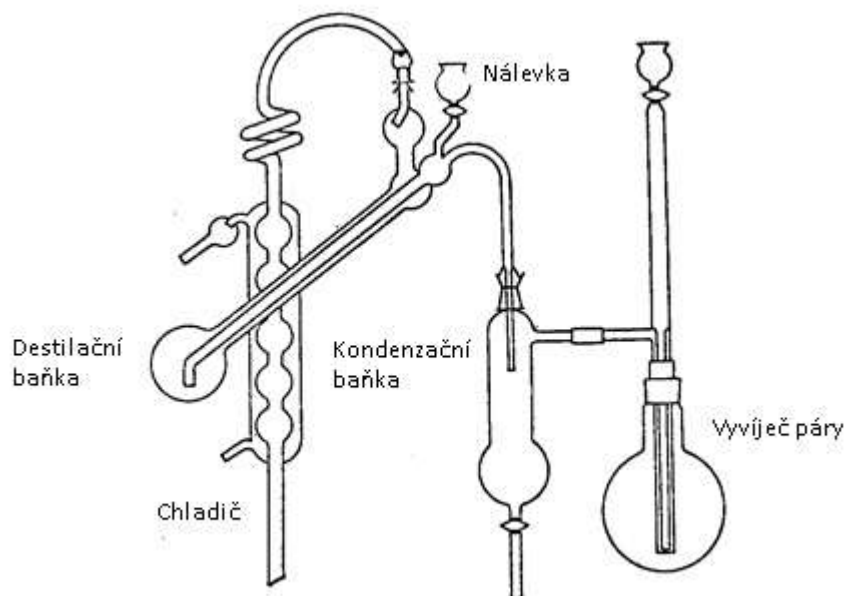
Obrázek 1 Příklad bilančního schématu výroby želatiny

5 Úloha č. 5 – Analýza želatin

Želatinou jsou nazývány parciální hydrolyzáty kolagenu získané převážně alkalickou nebo kyselou úpravou kolagenních materiálů (kůže, kosti, apod.). Želatiny však vznikají také při tepelné úpravě masa a stupeň želatiny je dán převážně počátečním množstvím příčných vazeb v materiálu a také způsobem přípravy. Želatiny mají široké uplatnění v potravinářském, farmaceutickém a fotografickém průmyslu zejména pro svou schopnost tvořit stabilní gely. (Velíšek, 1999)

5.1 Stanovení celkového dusíku a bílkovin

Bílkoviny jsou přírodní makromolekulární sloučeniny, jejichž výchozí složkou jsou α -aminokyseliny. Ty mají na α -uhlíku jak aminovou tak karboxylovou skupinu a v bílkovinách se nachází především 20 základních aminokyselin. Jednotlivé aminokyseliny se poté liší navázaným radikálem na α -uhlíku. Vzájemnou reakcí aminové a karboxylové skupiny vznikají nejprve dipeptidy, oligopeptidy až polypeptidy, jenž se liší množstvím aminokyselin a jejich sekvencí v řetězci. Množství organického dusíku vázaného v bílkovinných řetězcích lze stanovit metodou podle Kjeldahla, kdy je dusík varem s kyselinou sírovou převeden na síran amonný, který je po rozkladu hydroxidem vydestilován vodní parou a jímán do slabého roztoku kyseliny. Následně je titračně stanoven silnější kyselinou na směsný indikátor. (Mládek, 1988/1)



Obrázek 2 Parnas-Wagnerova destilační aparatura pro stanovení dusíku

5.1.1 Pomůcky

Mineralizační aparatura, titrační baňka 250 ml, mineralizační baňka, analytické váhy, odměrná baňka 100 ml, nálevka (2x), pipeta 20 ml, odměrné válce 10 ml, 25 ml, 50 ml, destilační přístroj na stanovení dusíku podle Parnase-Wagnera (viz. Obrázek 2).

5.1.2 Vzorky a chemikálie

Želatina

96% H_2SO_4

2% roztok H_3BO_3 (zásobní roztok)

33% H_2O_2

30% roztok NaOH (zásobní roztok)

Směsný katalyzátor

Odměrný roztok kyseliny sírové, $c = 0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ (titrační zásobní roztok)

Tashiro indikátor (zásobní roztok)

5.1.3 Postup práce

Mineralizace se provede 1x a destilace se provádí 2x u jednoho vzorku.

Postup práce je realizován podle normy ČSN ISO 1871.

1. Na analytických vahách navážíme do mineralizační baňky cca 1 g želatiny, opatrně přilijeme 10–12 ml konc. H_2SO_4 (**dbáme zásad bezpečnosti, ochranný kryt na oči!**) a přidáme směsný katalyzátor.
2. Na mineralizační baňku připojíme příslušenství a umístíme ji do mineralizační aparatury, kde budeme mineralizovat při teplotě 450 °C tak dlouho, než bude obsah baňky čirý; ke zkrácení doby mineralizace se po 30 minutách přidá 33% peroxid vodíku (**při jakékoliv obsluze přístroje a manipulaci dbáme zásad bezpečnosti, ochranný kryt na oči!**).
3. Následně necháme mineralizační baňku vychladnout (cca 15 min – nejprve v aparatuře, poté na vzduchu) a poté opatrně přilijeme malé množství destilované vody (stříčkou, cca 10 ml), za stálého míchání a chlazení stěn mineralizační baňky pod tekoucí vodou (**dbáme zásad bezpečnosti, ochranný kryt na oči!**).
4. Převádíme veškerý roztok do 100 ml odměrné baňky a po vypláchnutí mineralizační baňky nakonec odměrnou baňku doplníme destilovanou vodou po značku a důkladně promícháme (**mineralizát**).
5. Začneme vyhřívat Parnas-Wagnerův destilační přístroj a spustíme chladič. Do předlohy (titrační baňka) připravíme 50 ml 2% roztoku H_3BO_3 , kterou umístíme tak, aby konec chladiče byl pod hladinou kyseliny; do nálevky odpipetujeme 20 ml připraveného mineralizátu a přidáme 25 ml 30% roztoku NaOH.
6. Uvolněný amoniak je nutné vydestilovat vodní parou do předlohy – od počátku varu vody destilujeme 20 minut.

7. Po skončení destilace opláchneme konec chladiče destilovanou vodou (do titrační baňky).
8. K destilátu přidáme cca 5 kapek Tashirova směsného indikátoru a za stálého míchání titrujeme 0,05 mol.l⁻¹ roztokem kyseliny sírové do slabě růžového zabarvení.
9. Po částečném ochlazení aparatury vypláchneme destilační baňku alespoň 2x 50 ml destilované vody.

5.1.4 Výpočet

Obsah celkového organického dusíku v % se vypočítá podle následující rovnice:

$$N = \frac{V_1}{n} \cdot \frac{0,0014}{100} \cdot \frac{V_2}{V_3} \cdot f$$

V₁ ... objem odměrného roztoku H₂SO₄ spotřebovaný na titraci v ml

V₂ ... celkový objem mineralizátu v ml

V₃ ... objem mineralizátu pipetovaný na stanovení v ml

f ... přepočítávací faktor odměrného roztoku H₂SO₄ (c = 0,05 mol.l⁻¹)

n ... navážka vzorku v g

Obsah čistých bílkovin v % se vypočte vynásobením obsahu dusíku přepočítávacím faktorem (viz. Tabulka 1):

$$B = N \cdot F$$

Faktor F	Vzorek
5,55	Želatina, kliš
6,25	Univerzální faktor
5,70	Obiloviny, mouky, pečivo, těstoviny
6,38	Mléko, mléčné výrobky, sýry, tvaroh, sušené mléko
6,62 – 5,85	Usně
5,30	Ořechy

Tabulka 1 Přepočítávací faktory pro stanovení obsahu bílkovin

5.2 Stanovení obsahu těkavých látek

Obsah těkavých látek v želatině je dán zejména množstvím vzdušné vlhkosti ve vzorku. Je závislý jak na postupu přípravy a skladování želatiny tak také na okolním prostředí. Principem metody je vysušení vzorku při teplotě 103 ± 2 °C a gravimetrické zjištění rozdílu hmotností. (Mokrejš, 2008)

5.2.1 Pomůcky

Sušárna s nuceným oběhem vzduchu, koželužská miska (2x), lžička, exsikátor, analytické váhy.

5.2.2 Vzorčky a chemikálie

Želatina

5.2.3 Postup práce

Stanovení se provádí 2x u jednoho vzorku.

Postup práce je realizován dle normy ČSN 56 0116-3.

1. Nejprve zvážíme suché koželužské misky s víčkem na analytických vahách.
2. Do misek poté odvážíme asi 1,5 g želatiny.
3. Otevřené misky sušíme při 103 ± 2 °C v sušárně po dobu 2,5 h.
4. Poté misky zakryjeme víčkem a umístíme do exsikátoru, po vychladnutí je zvážíme na analytických vahách.
5. Sušení, chladnutí a vážení dále opakujeme (po 20 minutových intervalech) do té doby, než bude dosaženo konstantní hmotnosti vzorku.

5.2.4 Výpočet

Obsah těkavých látek v hm. % se vypočítá podle vztahu:

$$v = \frac{m_1 - m_2}{m_1} 100$$

m_1 ...hmotnost vzorku želatiny před sušením v g

m_2 ...hmotnost vzorku želatiny po sušení v g

5.3 Stanovení obsahu popela

Popelovinami nazýváme nespalitelné anorganické látky, které zůstanou po zpopelnění vzorku nad kahanem nebo v peci. V potravinách bývají obsaženy minerální látky přímo ve vstupní surovině, nebo se do vzorku dostanou při technologických operacích. Množství popela ve výrobcích potravinářského a farmaceutického průmyslu bývá stanoveno normou a je jedním z ukazatelů kvality. (Príbela, 1991; Mládek, 1988)

5.3.1 Pomůcky

Muflová pec, kahan s příslušenstvím, žíhací kelímek (2x), lžička, exsikátor, analytické váhy.

5.3.2 Vzorčky a chemikálie

Želatina

5.3.3 Postup práce

Stanovení se provádí 2x u jednoho vzorku.

1. Nejprve v muflové peci přežeháme kelímky, které po vychladnutí zvážíme.
2. Na analytických vahách poté do kelímku odvážíme asi 1,5 g želatiny.

3. Vzorek velmi opatrně spálíme nad plamenem (zpočátku v kleštích na mírném plameni) a poté přesuneme do muflové pece na 45 minut s teplotou nad 550 °C (**dbáme zásad bezpečnosti, rukavice a kleště!**).
4. Po vyžhání necháme kelímek nejprve vychladnout na kovové síťce (cca 5 min) a poté jej dochladíme v exsikátoru; následně jej zvážíme.
5. Žhání v peci, chlazení a vážení opakujeme (po 15 minutových intervalech) tak dlouho, dokud nebude mít popel konstantní hmotnost.

5.3.4 Výpočet

Obsah popela P v hm. % se vypočte podle vzorce:

$$P = \frac{m_P}{n} 100$$

m_P ... hmotnost popela v g

n ... navážka vzorku želatiny v g

Obsah popela přepočtený na sušinu želatiny (P_s) se vypočte podle vzorce:

$$P_s = P \cdot f$$

f ... přepočítávací faktor na sušinu

$$f = \frac{100}{100 - v}$$

v ... obsah těkavých látek želatiny v % (zjištěný v kapitole 5.2)

5.4 Stanovení pevnosti gelu

Pevnost gelu je pro želatiny jednou ze základních charakteristik a určuje následnou využitelnost želatiny v průmyslu. Pro potravinářský průmysl se běžně používají želatiny s pevností asi 200–300 Bloom. Metoda je založena na principu vtlačování válce o průměru 12,7 mm do normou stanoveného gelu za definovaných podmínek. Nejběžnější metodou pro stanovení pevnosti gelu je AOAC 948.21 (AOAC INTERNATIONAL, 2016), kde se stanovuje pevnost 6,67% želatinového gelu na analyzátoru v jednotkách Bloom (udává hodnotu síly potřebnou k vtlačení válce do gelu). (Bourne, 2002)

5.4.1 Pomůcky

Laboratorní předvážky, standardní nádoba (2 x), lžička, magnetické míchadlo s ohřevem.

5.4.2 Vzorky a chemikálie

Želatina

5.4.3 Postup práce

Stanovení se provádí 1x u dvou vzorků.

1. Připravíme 6,67% roztok želatiny tak, že si nejprve na vahách navážíme 7,5 g želatiny do standardní nádoby.
2. Poté přidáme 104,5 g destilované vody a necháme želatinu 30 minut botnat.
3. Nádoby zahřejeme na 60 °C a mícháme, dokud se želatina nerozpustí.
4. Roztok želatiny necháme zchladnout a poté umístíme do lednice.
5. Pevnost gelu změříme na přístroji LFRA Texture Analyzer po 24 hodinách.

6 Úloha č. 6 – Reologie želatinových roztoků a gelů

Jelikož je želatina hojně využívanou surovinou pro výrobky v potravinářském, farmaceutickém a biomedicínském průmyslu, je důležité kromě její kvality a složení sledovat také její reologické chování, které ovlivňuje zejména její zpracovatelské vlastnosti. Ve většině případů se želatina používá kvůli schopnosti tvořit gely (při koncentracích roztoků 1–50 %). Viskozita těchto roztoků je poté ovlivněna jak složením želatiny (původní surovina, molární hmotnost, AMK složení, množství příčných vazeb, apod.) tak také koncentrací roztoku a teplotou. Komerční želatiny mívají viskozitu v rozmezí 2–7 mPa.s, ale pro některé aplikace může být až 13 mPa.s. (Ahmed, 2016)

6.1 Stanovení kinematické a dynamické viskozity

Viskozita je veličina určující velikost vnitřního tření mezi vrstvami tekoucí kapaliny, je tedy mírou odporu proti toku. Mezi vrstvami tekoucí kapaliny při toku vzniká smykové napětí (σ) v důsledku třecích sil. Pro Newtonské kapaliny při laminárním toku platí, že smykové napětí roste spolu s rychlostí pohybu jednotlivých vrstev. Gradient rychlosti mezi jednotlivými vrstvami nazýváme rychlostí smykové deformace ($\dot{\gamma}$) a podíl smykového napětí a rychlosti smykové deformace nám udává hodnotu dynamické viskozity (η). Podělíme-li hodnotu dynamické viskozity hustotou kapaliny, získáme hodnotu kinematické viskozity (ν). Tento vztah platí i pro opačný případ a lze tak jednoduše zjistit obě viskozitní veličiny. Principem měření kinematické viskozity bude stanovení času průtoku kapaliny kapilárním viskozimetrem za definovaných podmínek. (Malkin & Isayev, 2017)

6.1.1 Pomůcky

Laboratorní předvážky, kádinky 150 ml (4 x), lžička, magnetické míchadlo s ohřevem, Ubbelohdeho viskozimetr s příslušenstvím.

6.1.2 Vzorky a chemikálie

Želatina

6.1.3 Postup práce

1. Připravíme si 100 g roztoků želatiny o čtyřech různých koncentracích (1%, 6,67%, 10% a 20%).
2. Nejprve si do kádinky navážíme spočítané množství želatiny, poté přidáme odpovídající množství destilované vody a necháme želatinu 30 minut nabobtnat.
3. Následně na magnetickém míchadle zahřejeme směs na 50–60 °C, a za míchání necháme želatinu rozpustit.
4. Do vytemperovaného viskozimetru nalejeme takové množství roztoku, aby jeho hladina v zásobní části byla mezi ryskami.

5. Poté nasajeme roztok do měřicí části viskozimetru nad horní rysku a připravíme si stopky pro měření.
6. Po uvolnění tlaku necháme roztok protékat kapilárou a měříme čas průtoku kapaliny mezi horní a dolní ryskou měřicí části.
7. Měření opakujeme nejméně 3x pro každou koncentraci při jedné zvolené teplotě.
8. Roztoky z viskozimetru nalijeme zpět do kádinek a uchováme pro další měření.

6.1.4 Výpočet

Kinematickou viskozitu ($\text{mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) vypočítáme z následující rovnice:

$$\nu = t \cdot K$$

t ... čas průtoku kapaliny mezi ryskami viskozimetru v s

K ... konstanta viskozimetru daná výrobcem v $\text{mm}^2 \cdot \text{s}^{-2}$

Dynamickou viskozitu ($\text{mPa} \cdot \text{s}$) vypočítáme z rovnice:

$$\eta = \nu \cdot \rho$$

ρ ... hustota roztoku zjištěná podle postupu v kapitole 6.2 v $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$

6.2 Stanovení hustoty želatinových roztoků

Hustota je fyzikální veličina popisující hmotnost objemové jednotky dané látky. Vypočítat ji můžeme jako poměr hmotnosti a objemu dané látky. Jelikož se při změně teploty změní objem látky, je i hustota závislá na zvolené teplotě. Pro měření hustoty lze použít několika postupů (hustoměr, pyknometr, apod.).

6.2.1 Pomůcky

Analytické váhy, pyknometr (2x), magnetické míchadlo s ohřevem, kádinka 50 ml.

6.2.2 Vzorky a chemikálie

Želatinové roztoky připravené podle kapitoly 6.1

6.2.3 Postup práce

Stanovení se provede 2x u všech koncentrací roztoků.

1. Nejprve je nutné stanovit přesný objem pyknometru při zadané teplotě tak, že zvážíme na analytických vahách prázdný a suchý pyknometr.
2. Poté jej naplníme vodou o dané teplotě a ihned zvážíme.
3. Pyknometr dále plníme jednotlivými roztoky (od nejnižší koncentrace po nejvyšší) o zadané teplotě a ihned vážíme.
4. Roztoky z pyknometru nevyléváme, ale nalijeme zpět do kádinek pro další měření.

6.2.4 Výpočet

Hustotu roztoků v g/cm³ spočítáme podle následujícího postupu:

$$\rho = \frac{m}{V}$$

m ... hmotnost roztoku želatiny v g

V ... přesný objem pyknometru v ml zjištěný následovně

$$V = \frac{m_v}{\rho_v}$$

m_v ... hmotnost vody při dané teplotě v g

ρ_v ... hustota vody při dané teplotě v g/cm³

6.3 Reologické charakteristiky želatinových roztoků

Viskozita kapalin je jednak velmi závislá na teplotě, tak také na způsobu měření a zejména na smykovém napětí a rychlosti smykové deformace. Pro měření viskozity lze využít mnoha různých postupů, mezi něž patří zejména kapilární viskozimetry a rotační reometry různých konstrukcí. Zejména na rotačních (případně oscilačních) reometrech lze naměřit velké množství různých charakteristik a závislostí popisujících reologické chování kapalin. Pro roztoky je zejména vhodné rotační měření typu válec-válec. U tohoto typu reometru je smykové napětí počítáno z točivého momentu a rychlost smykové deformace z rychlosti otáčení. (Malkin & Isayev, 2017)

6.3.1 Pomůcky

Reometr Malvern Kinexus, odměrný válec 25 ml.

6.3.2 Vzorky a chemikálie

Želatinové roztoky připravené podle kapitoly 6.1

6.3.3 Postup práce

Cílem práce je naměřit na reometru Kinexus závislost dynamické viskozity na rychlosti smykové deformace při různých teplotách a koncentracích roztoků.

1. Nejprve je nutné pustit kompresor a otevřít ventil přívodu vzduchu do přístroje.
2. Zapneme přístroj a počítač, odstraníme krytku rotoru.
3. Na přístroji nachystáme geometrii typu válec-válec včetně rotoru a spustíme chlazení.
4. V softwaru nastavíme šterbinu rotoru přes povel „Zero gap“ (postupujeme podle jednotlivých kroků daných v programu).
5. Nyní přes povel „Load sample“ připravíme asi 18 ml roztoku vzorku k měření.
6. Nastavíme v programu novou sérii měření a přes povel „Viscosimetry – Table of shear rates“ nadefinujeme měření.

7. Teplotu nastavíme v rozsahu 10–50 °C, rychlost smykové deformace (shear rate) nastavíme 0,1–10 s⁻¹, počet vzorků za dekádu nastavíme na 5.
8. Nyní počkáme na vyrovnaní teploty a spustíme měření.
9. Po ukončení měření opakujeme body 7. a 8. pro další teplotu.
10. Změnu vzorku provedeme nejprve uvolněním rotoru a poté přes příkaz „Unload sample“, následně důkladně vyčistíme přístroj.
11. Pokračujeme od bodu 5. pro další koncentraci roztoku.
12. Po ukončení měření vyexportujeme data ve formě obrázků a tabulek v Excelu pro vyhodnocení.
13. Vyčištěný přístroj vypneme a místo rotoru umístíme krytku, následně vypneme přívod vzduchu a kompresor.

Literatura

Ahmed, J. (2016). Rheological properties of gelatin and advances in measurement. In: Ahmed, J., Ptaszek, P. & Basu, S. (Eds.), *Advances in food rheology and its applications* (s. 377–404). Cambridge: Woodhead Publishing.

AOAC INTERNATIONAL (2016). *Jelly strength of gelatin* (AOAC 948.21).

Bamford, K. F. & Campbell, G. C. (1936). The determination of lignin in the analysis of woods. *Biochemical Journal*, 30(3), 419–428.

Bourne, M. (2002). *Food texture and viscosity: Concept and measurement*. New York: Elsevier Academic Press.

Daintith, J. & Martin, E. (2010). *Dictionary of science (6th Edition)*. New York: Oxford University Press.

Dence, C. W. (1992). The Determination of Lignin. In: Lin, S. Y., Dence, C. W. (Eds.), *Methods in lignin chemistry* (s. 33–61). Berlin: Springer.

Dubravický, J., Smirnov, V. & Šimko, P. (1989). *Laboratórium oboru II – Technológia živočíšnych neúdržných potravín*. Bratislava: SVŠT.

Heidemann, E. (1993). *Fundamentals of leather manufacturing*. Darmstadt: Roether KG.

Ignat'eva, N. Y., Danilov, N. A., Averkiev, S. V., Obrezkova, M. V., Lunin, V. V., Sobol', E. N. (2007). Determination of hydroxyproline in tissues and the evaluation of the collagen content of the tissues. *Journal of Analytical Chemistry*, 62(1), 51–57.

Malkin, A. & Isayev, A. (2017). *Rheology – Concepts, methods and applications (3rd edition)*. Toronto: ChemTec Publishing.

Melcer, I., Blažej, A. & Šutý, L. (1976). *Analytická chémia dreva*. Bratislava: ALFA.

Mládek, M. (1988). *Kontrolní a zkušební metody I*. Brno: VUT.

Mládek, M. (1988). *Kontrolní a zkušební metody II*. Brno: VUT.

Mokrejš, P. (2008). *Zpracování průmyslových odpadů obsahujících bílkoviny*. Zlín: UTB ve Zlíně.

Mokrejš, P. (2008). *Přírodní polymery a procesy zpracování přírodních polymerů*. Zlín: UTB ve Zlíně.

Mokrejš, P. & Langmaier, F. (2008). *Aplikace přírodních polymerů*. Zlín: UTB ve Zlíně.

Mokrejš, P., Gal, R., Janacova, D., Plskova, M., Zacharova, M. (2017). Chicken paws by-products as an alternative source of proteins. *Oriental Journal of Chemistry*, 33(5), 2209–2216.

Príbel, A. (1991). *Analýza potravín*. Bratislava: STU.

Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví (1979). *Drevo. Zisťovanie vlhkosti pri fyzikálnych a mechanických skúškach* (ČSN 490103).

Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví (1995). *Metody zkoušení pekařských výrobků. Část 3: Stanovení obsahu vody* (ČSN 560116-3).

Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví (2010). *Potraviny a krmiva - Obecné pokyny pro stanovení dusíku metodou podle Kjeldahla* (ČSN ISO 1871).

Velíšek, J. (1999). *Chemie potravin 1*. Tábor: OSSIS.

Wise, L. E., Murphy, M., D'Addieco, A. A. (1946). Chlorite holocellulose, its fractionation and bearing on summative wood analysis and studies on the hemicelluloses. *Paper Trade Journal*, 122(2), 35–43.

Seznam obrázků

<i>Obrázek 1 Příklad bilančního schématu výroby želatiny.....</i>	<i>25</i>
<i>Obrázek 2 Parnas-Wagnerova destilační aparatura pro stanovení dusíku</i>	<i>26</i>

Seznam tabulek

<i>Tabulka 1 Přepočítávací faktory pro stanovení obsahu bílkovin</i>	28
--	----