PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

307 399

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/726	(2006.01)
A61K 31/728	(2006.01)
A61K 31/737	(2006.01)
A61K 38/01	(2006.01)
A61K 38/02	(2006.01)
A61K 31/195	(2006.01)
C08B 37/08	(2006.01)
C07K 1/12	(2006.01)
C07C 211/00	(2006.01)

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2016-788**
(22) Přihlášeno: **13.12.2016**
(40) Zveřejněno: **25.07.2018**
(Věstník č. 30/2018)
(47) Uděleno: **13.06.2018**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **25.07.2018**
(Věstník č. 30/2018)

(56) Relevantní dokumenty:
KURKOVÁ Š.: „Izolace biologicky aktivních látek z odpadních produktů živočišného původu", Bakalářská práce, VŠCHT Praha, červen 2015; NAKANO T. et al.: „Extraction, isolation and analysis of chondroitin sulfate from broiler chicken biomass", Process Biochemistry, vol. 47, no. 12, 2012, str. 1909 – 1918, ISSN: 1359-5113; FONKWE L. G. et al.:"Protein Recovery from Mechanically Deboned Turkey Residue by Enzymic Hydrolysis", Process Biochemistry, vol. 31, no. 6, 1996, str. 605 – 616), ISSN: 0032-9592; NIKOLAEV I V. et al.: „Biocatalytic conversion of poultry processing leftovers: Optimization of hydrolytic conditions and peptide hydrolysate", Food Chemistry, vol. 197, duben 2016, str. 611 - 621, ISSN: 0308-8146; LASEKAN A. et al.: „Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources", Waste Management, vol. 33, no. 3, 2013, str. 552 - 565, E-ISSN: 1879-2456; BRANDELLI A. et al.: „Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products", Food Research International, vol. 73, 2015, str. 3 – 12, ISSN: 0963-9969.
WO 2012 143 324.

(73) Majitel patentu:
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 6, CZ
EcoFuel Laboratories s.r.o., Praha 9 - Libeň, CZ
RABBIT Trhový Štěpánov a.s., Trhový Štěpánov, CZ

(72) Původce:
prof. Ing. Kateřina Demnerová, CSc., Praha 13, CZ
doc. Ing. Petra Lovecká, Ph.D., Praha 6, CZ
Ing. Hana Stiborová, Ph.D., Praha 6, CZ
Ing. Petr Kaštánek, Ph.D., Praha 2, CZ
Ing. Olga Kromusová, Praha 5, CZ
Ing. Tomáš Fulín, Divišov, CZ
Ing. Zdeněk Jandejsek, CSc., Loket, CZ

(54) Název vynálezu:

Využití zbytku po strojním oddělení drůbežího masa pro přípravu směsi obsahující bioaktivní látky

(57) Anotace:
Hlavním významem vynálezu je využití odpadu vzniklého v drůbežářském průmyslu po strojním oddělení drůbežího masa k přípravě směsi bioaktivních látek obsahující chondroitin sulfát, kyselinu hyaluronovou, nízkomolekulární peptidy a volné aminokyseliny. Výše zmíněný odpad obsahuje jednak zbytky chrupavek, které jsou bohatým zdrojem chondroitin sulfátu, dále pak kůži, která je bohatá na kyselinu hyaluronovou, chondroitin sulfát, kolagen, a současně obsahuje zbytky masa (bílkovin), které pak jsou zdrojem bioaktivních peptidů a aminokyselin vznikajících během hydrolýzy pomocí enzymů s proteolytickou aktivitou. Ve výsledném produktu je bohaté zastoupení uvedených bioaktivních komponentů. Výchozí surovina je odpadem, resp. vedlejším produktem průmyslové výroby a jako vstupní surovina tak představuje minimální finanční náklady. Na výsledný směsný produkt bioaktivních látek je zpracována v jednom kroku představujícím hydrolýzu jedním enzymem.

CZ 307399 B6

Využití zbytku po strojním oddělení drůbežího masa pro přípravu směsi obsahující bioaktivní látky

Oblast techniky

Vynález se týká využití zbytků po strojním oddělení drůbežího masa pro přípravu produktu obsahujícího bioaktivní látky – kyselinu hyaluronovou, chondroitin sulfát, nízkomolekulární peptidy a volné aminokyseliny, využitelného pro přípravu výrobků s chondroprotektivními, regeneračními a posilujícími účinky.

Dosavadní stav techniky

Strojně oddělené maso (SOM) je definováno v nařízení 853/2004/ES (příloha I, čl. 1.14) jako produkt získaný strojním oddělováním masa, které zbylo po vykostění na kostech nebo z celých těl poražené drůbeže tak, že se ztratí nebo změní struktura svalových vláken. Po strojním oddělení masa vzniká tzv. separát (SOM) a zbytek po strojním oddělení masa (ZSOM), který obsahuje převážně chrupavky, kosti, kůži a menší množství tuku. ZSOM je potravinářský odpad s minimální přidanou hodnotou, v současné době se především využívá do krmiv, především pro psy [1] nebo jako hnojiva [2]. Cena za jeden kilogram odpadu po mechanické separaci masa se pohybuje v rozmezí 2 až 4 Kč. Proto další využití ZSOM k izolaci a přípravě směsi bioaktivních látek s vysokou přidanou hodnotou může významně přispět k zefektivnění ekonomiky drůbežářských provozů.

Chondroitin sulfát má u obratlovců centrální roli v biologických procesech; podílí se na regulaci růstových faktorů, cytokinů, chemokinů, adhesi molekul a lipoproteinů skrz specifické interakce [3]. Izolace chondroitin sulfátu byla popsána z různých živočišných zdrojů, ačkoliv komerční preparáty obsahující chondroitin sulfát jsou založeny na jeho separaci především z hovězí průdušnice, prasečí nosní přepážky, kuřecích prsních chrupavek, žralocích ploutví a rybích chrupavek [4]. Příklady patentů popisující izolaci chondroitin sulfátu z těchto zdrojů jsou např. (GB 19710027157, CN 105440158, WO 2012/159655). Chondroitin sulfát se používá především k léčbě osteoartrózy.

Kyselina hyaluronová je lineární polysacharid tvořený disacharidem obsahujícím N–acetyl–D–glucosamin a kyselinu glukuronovou. Je součástí synoviální tekutiny a tvoří jednu z hlavních složek mezibuněčné hmoty. Kyselina hyaluronová má široké uplatnění v biomedicíně, jako jsou oftalmologie, otolaryngologie, ortopedická aplikace a revmatologie, estetická medicína a plastická chirurgie, ale nachází uplatnění také v kosmetice [5]. Biotechnologická výroba kyseliny hyaluronové je založena především na mikrobiální kultivaci bakterií rodu *Streptococcus* (např. patenty US 7575914 B2; US 4517295 A) a izolaci z kohoutích hřebínků (US 4141973 B1).

V celém světě se zvyšuje poptávka po proteinových hydrolyzátech, protože obsahují peptidy se specifickými biologickými vlastnostmi, které jsou snáze stravitelné bez negativní imunologické odezvy, zejména pro děti. Výhodné jsou zejména hydrolyzáty z živočišných zdrojů, protože obsahují všechny esenciální aminokyseliny, které se u hydrolyzátu z rostlin musí do formulací doplňovat [6]. Proteinové hydrolyzáty jsou lépe stravitelné, než intaktní proteiny a využití nacházejí například i ve výživě sportovců [7]. Během hydrolýzy proteinů dochází k uvolnění i volných aminokyselin. Proteinový hydrolyzát získaný z drůbeží suroviny je zejména vhodný u jedinců s netolerancí k mléčné bílkovině nebo alergií k sójové bílkovině [8, 9].

Směsný produkt obsahující bioaktivní látky jako je chondroitin sulfát, kyselina hyaluronová, volné aminokyseliny, peptidy a postup jejich izolace je popsán v patentech WO 2012/143324 A1 a US 6780841 B2. V případě obou zmíněných patentů je výchozí surovinou čistá kuřecí prsní chrupavka, která však nereprezentuje přímý odpadní materiál při zpracování drůbeže. Získání

čisté kuřecí chrupavky je časově a finančně náročný proces. Naopak zde předkládané řešení je založeno na přímém využití vedlejšího odpadního produktu, zbytku po strojním oddělení masa (ZSOM), který vzniká při výrobě separátu. Zbytek po strojním oddělení masa je produkován ve velkém množství a tvoří cca 4 až 6% váhy kuřete. Naopak prsní chrupavka (výchozí produkt patentů WO 2012/143324 A1 a US 6780841 B2) není z kostry kuřete oddělena mechanicky (strojově), ale musí se nákladně separovat, což není předmětem dvou výše uvedených patentů. Kuřecí prsní chrupavka, jako výchozí surovina, rovněž představuje pouze cca 0,3 % váhy kuřete, což je 13 až 20krát méně ve srovnání s množstvím ZSOM. U výše dvou zmíněných patentů tak nejsou ostatní chrupavky a povázky, coby potenciální suroviny pro enzymatickou produkci kyseliny hyaluronové a chondroitin sulfátu, využity.

Využití ZSOM k izolaci chondroitin sulfátu bylo v nedávné době popsáno [10], ale výsledný produkt obsahoval pouze chondroitin sulfát.

Podstata vynálezu

Principem vynálezu je využití vedlejšího živočišného produktu (odpadu), zbytků po strojním oddělení drůbežího masa, pro přípravu produktu obsahující směs bioaktivních látek – kyseliny hyaluronové, chondroitin sulfátu, peptidů o molekulové hmotnosti menších než 5000 Da a volných aminokyselin.

Produkt připravený dle předkládaného vynálezu obsahuje nejen chondroitin sulfát, ale i další účinné látky, jako jsou kyselina hyaluronová, peptidy a volné aminokyseliny (Tab. 2), které zvyšují využitelnost preparátu vedle chondroprotektivních také na regenerační a posilující účinky na organismus.

Podstatou předkládaného vynálezu je způsob přípravy směsného produktu obsahujícího kyselinu hyaluronovou, chondroitin sulfát, nízkomolekulární peptidy a volné aminokyseliny, v němž se zbytky po strojním oddělení drůbežího masa podrobí sekvenci kroků: a) vytvoření směsi zbytků po strojním oddělení masa s vodou či roztokem pufru, b) zahřátí směsi, c) enzymatická hydrolýza směsi pomocí papainu, d) inaktivace enzymu, e) separace směsného produktu ze směsi po hydrolýze.

Hlavní výhodou tohoto řešení je skutečnost, že zbytky po strojním oddělení drůbežího masa obsahují jednak zbytky chrupavek, které jsou bohatým zdrojem chondroitin sulfátu, dále pak kůži, která je bohatá na zastoupení kyseliny hyaluronové, ale obsahuje rovněž chondroitin sulfát a kolagen [11], a současně zbytky masa (bílkovin), které jsou zdrojem bioaktivních peptidů a aminokyselin vznikajících hydrolýzním postupem dle předloženého vynálezu. Z těchto důvodů je výsledný produkt bohatý na zastoupení všech těchto bioaktivních komponentů. Další výhodou je, že výchozí surovina je běžným odpadem, resp. vedlejším produktem z průmyslové výroby a vstupní surovina tak představuje minimální finanční náklady a na výsledný směsný bioaktivní produkt je zpracována v jednom hydrolýzním kroku jedním enzymem.

Výhody přímého využití ZSOM podle předkládaného vynálezu oproti použití čisté kuřecí chrupavky (dokumenty WO 2012/143324 A1 a US 6780841 B2) k izolaci bioaktivních látek jsou tedy především v i) nulových finančních nákladech k přípravě vstupní suroviny (ZSOM je přímý odpad vznikající při strojním oddělení masa, naopak prsní chrupavka není při zpracování kuřat z kostry kuřete oddělována mechanicky) a v ii) několikanásobně vyšším váhovém podílu vstupní suroviny z celkové váhy kuřete (ZSOM reprezentuje 13 až 20krát vyšší podíl než při využití pouze prsní chrupavky).

Objasnění výkresů

Obr. 1 znázorňuje příklad procesu izolace bioaktivních látek ze ZSOM.

Obr 2: závislost množství hydrolyzátu (jako % hmotn. z ZSOM) v závislosti na množství pufru a době hydrolýzy.

Obr 3: závislost množství hydrolyzátu (jako % hmotn. z ZSOM) v závislosti na množství pufru a koncentraci enzymu.

Obr. 4 ve 3D projekci znázorňuje závislost doby hydrolýzy a množství pufru na množství vzniklého hydrolyzátu.

Příklady uskutečnění vynálezu

Podle navrženého postupu vynálezu se ZSOM, tvořící typicky částice o velikosti pod 30 mm, podrobí buď přímo, nebo po namletí, kupř. na frakci pod 5 mm, sekvenci kroků: 1) vytvoření směsi zbytků po strojním oddělení masa s vodou či roztokem pufru, 2) zahřátí směsi, 3) enzymatická hydrolýza směsi papainem při teplotě odpovídající použitému enzymu papainu, 4) inaktivace enzymu a 5) separace směsného produktu ze směsi po hydrolýze.

Typické zastoupení bílkovin a tuků v ZSOM je uvedeno v tab. 1.

Tab. 1 Zastoupení bílkovin a tuků ve zbytku po strojním oddělení masa

Sušina (% hmotn.)	Bílkoviny (% hmotn.)	Tuk (% hmotn.)
	Ve vzorku	
37,67	21,09	9,07
V sušině	55,99	24,08

Vytvoření směsi ZSOM s vodou či roztokem pufru je s výhodou provedeno s použitím fosfátového pufru o pH 7. Vhodný poměr ZSOM : vodě či roztoku pufru je kupř. 1: 0,5 až 2.

Ohřev vzniklé směsi je realizován na teplotu kupř. v rozsahu 80 až 121 °C po dobu typicky 10 až 30 minut. Vzhledem k potenciální kontaminaci ZSOM mikroorganismy, zejména bakteriemi *Salmonela* sp., je vhodné provést ohřev na sterilizační teplotu, kupř. 121 °C a udržovat tuto teplotu po dobu 15 min.

Následně je provedena enzymatická hydrolýza proteolytickým enzymem papainem v poměru kupř. 0,01 až 0,5 dílu enzymu na 100 dílu ZSOM. Případek enzymu je realizován po ochlazení směsi na teplotu vhodnou pro vysokou aktivitu enzymu, typicky kupř. na teplotu 50 až 55 °C. Enzymatická hydrolýza je poté, s výhodou za míchání směsi, realizována po doby potřebnou pro dosažení požadované konverze na směsný produkt, s výhodou kupř. po dobu 3 až 24 hodin.

Pro ukončení hydrolýzy je, enzym inaktivován, kupř. ohřevem směsi, s výhodou na teplotu kupř. 80 až 95 °C po dobu kupř. 1 až 20 min.

Po inaktivaci enzymu je z kapalné směsi izolován směsný hydrolytický produkt, obsahující chondroitin sulfát, kyselinu hyaluronovou, nízkomolekulární peptidy a volné aminokyseliny. Izolace směsného produktu může být kupř. realizována sekvencí kroků: separace velkých fragmentů kostí přes síto – odstředění kostní drtě a nehydrolyzovaného podílu – gravitační separace tuku – filtrace kapalného podílu, s výhodou na filtru s nanesenou křemelinou – zahuštění na odparce či membránovými procesy – sušení, s výhodou sprejové či lyofilizace

finálního produktu. V závislosti na čistotě a způsobu využití finálního produktu je možno některé kroky vynechat, kupř. filtraci kapalného podílu, nebo naopak přidat, kupř. ultrafiltraci či dialýzu kapalného podílu pro odstranění solí a nízkomolekulárních látek (Obr. 1). Vzhledem k tomu, že se výchozí surovina může měnit dle toho, zda dochází k separaci masa ze hřbetů, krků, koster nebo jejich vzájemné kombinace, liší se i poměry obsahu bioaktivních látek v produktu dle výchozího složení použité suroviny.

Průmyslově se nejčastěji využívá směs hřbetů, krků a koster. Jelikož je výchozí surovina odpadní produkt z živočišné výroby, může se výtěžnost jednotlivých bioaktivních látek měnit. V tabulce 2 jsou uvedeny typické hodnoty získané zpracováním různých šarží ZSOM.

Tab. 2 Charakteristika výsledného produktu

Specifikace produktu	
Rozpustnost	Rozpustný ve vodě
pH	7 až 8
Vzhled	Bílý/krémový
Vůně	Bez zápachu či s vůní kuřecího bujonu
Typický obsah bioaktivních látek	**mg/g lyofilizovaného produktu**
Chondroitin sulfát	60 až 170
Kyselina hyaluronová	55 až 150
Peptidy (< 5000 Da)	200 až 700
Volné aminokyseliny	9 až 26
Mikrobiologická analýza	
E. coli	negativní
Salmonella	negativní

Příklad 1

500 g zbytků po strojním oddělení masa tvořeném směsí hřbetů, koster a krků, s velikostí částic do 30 mm, bylo bez další mechanické úpravy smícháno s 0,5 L fosfátového pufru o pH 7,57, připraveného smísením s $Na_2HPO_4.12H_2O$ a KH_2PO_4 v 500 ml demineralizované vody. Směs byla autoklávována 15 min při 121 °C a po ochlazení na 55 °C přidáno 250 mg papainu (Profix 500, Kerry Food Ingredients (Cork) Ltd), směs poté míchána při 500 rpm při teplotě 50 °C po dobu 24 h. Poté byl enzym inaktivován zahřátím směsi na teplotu 90 °C, směs přelita přes sítko a odděleny hrubé kosti, jejichž hmotnost po vysušení činila 30,5 g. Bylo získáno 823 ml kapalné frakce, která byla odstřeďována po dobu 10 min při 4000 rpm, čímž došlo k oddělení tuhé frakce (nehydrolyzovaný podíl a kostní sekvestry, o celkové suché hmotnosti 31,1 g), tukové fáze (31,0 g) a vodné fáze. Vodní fáze hydrolyzátu byla dále přefiltrována přes filtr Whatman 54, po přídavku 8 g křemeliny. Bylo získáno 573 g filtrátu se sušinou 98,7 g/l, který byl následně zahuštěn na vakuové odparce při teplotě 60 °C na 89 g medovité substance, která po lyofilizaci poskytla 59 g práškovitého produktu béžové barvy a slabé vůně kuřecího bujónu. Analýza tohoto produktu prokázala obsah 8 % hmotn. kyseliny hyaluronové, 12 % hmotn. chondroitin sulfátu, 47 % hmotn. peptidů a 2,6 % hmotn. volných aminokyselin. Distribuce molekulových hmotností peptidů se pohybovala do 3500 Da; převládal výskyt nízkomolekulárních peptidů od 700 do 1500 Da. Zvolných aminokyselin bylo v produktu zastoupeno více než 40 % esenciálních zahrnujících fenylalanin, isoleucin, leucin, methionin, valin, threonin, tryptofan, histidin a lysin.

Příklad 2

Byla provedena optimalizace podmínek hydrolýzy s tím, že bylo realizováno 14 pokusů, při nichž bylo 840 g ZSOM důkladně rozemleto na částečky pod 1 mm a v hnětači důkladně

homogenizováno, aby byl minimalizován vliv heterogenity suroviny. V každém ze 14 experimentů pak bylo hydrolyzováno 60 g homogenizovaného ZSOM. Pro optimalizaci byly zvoleny 3 nezávislé parametry, a to množství pufru (36 až 84 ml), množství papainu (14,4 až 60 mg) a doba hydrolýzy (3 až 15 h). Experimenty byly navrženy metodou centrálních kompozitních plánů. Jako závislé proměnné byly měřeny koncentrace kyseliny hyaluronové, chondroitin sulfátu, peptidů a volných aminokyselin v hydrolyzátu, jakož i množství hydrolyzátu. Ostatní podmínky a postup zpracování byl použit stejný jako v příkladu 1. Podmínky jednotlivých experimentů i složení produktu (práškovitého produktu po hydrolýze) uvádí tabulka 3.

Tab. 3: Podmínky pokusů a výsledky

Podmínky pokusu				Složení produktu hydrolýzy					
Pokus č.	ml pufru	mg papainu	doba hydrolýzy (h)	kys. hyaluronová HA (g)	chondroitin sulfát (g)	peptidy (g)	volné aminokyseliny (g)	výtěžek směsi (% hm)	obsah HA ve směsi (% hm)
1	36	37,2	9	0,35	0,51	1,81	0,083	4,59	12,66
2	60	37,2	9	0,16	0,45	3,2	0,125	6,56	4,01
3	84	60	3	0,31	0,56	3,88	0,121	8,12	6,35
4	84	14,4	15	0,59	0,9	5,95	0,222	12,77	7,66
5	36	14,4	3	0,31	0,54	2,4	0,076	5,54	9,42
6	60	37,2	9	0,47	0,64	4,12	0,104	8,88	8,78
7	36	60	15	0,62	0,72	2,03	0,057	5,72	18,06
8	60	37,2	9	0,58	0,77	3,28	0,088	7,88	12,29
9	60	37,2	15	0,96	1,23	3,29	0,102	9,29	17,26
10	60	37,2	9	0,46	0,57	3,71	0,091	8,04	9,45
11	84	37,2	9	0,48	0,62	3,15	0,111	7,27	10,98
12	60	14,4	9	0,39	0,65	2,4	0,101	5,9	11
13	60	60	9	0,62	0,7	6,1	0,145	12,59	8,15
14	60	37,2	3	0,28	0,36	3,25	0,088	6,63	6,96

Experimenty byly následně vyhodnoceny statisticky pomocí programu Expert Design 8 a pro jednotlivé analyty v produktu byly vyhodnoceny závislosti na podmínkách pokusu. Příklad závislosti obsahu směsi účinných látek (kyseliny hyaluronové, chondroitin sulfátu, peptidů a volných aminokyselin) na množství pufru, době hydrolýzy a množství enzymu je uveden na Obr. 2 a Obr 3.

Na základě získaných závislostí byla provedena numerická optimalizace podmínek hydrolýzy ZSOM, při nichž by byla maximalizována produkce hydrolyzátu tak, aby hydrolyzátu vznikalo min. 10 % vztaženo na hmotnost původního ZSOM a současně aby hydrolyzát obsahoval minimálně 10 % hmotn. kyseliny hyaluronové. Na Obr. 4 jsou v 3D projekci znázorněny reakční podmínky, za nichž je předpoklad dosažení těchto požadavků na produkt, a to při optimální koncentraci papainu 60 mg/l při zpracování 60 g ZSOM. Z této optimalizace vyplývá, že při zvýšené koncentraci enzymu a zvýšení množství pufru na 84 ml na 60 g ZSOM je možno zkrátit dobu hydrolýzy z 24 na 15 hodin.

Reference:

[1] S.M. Murray, A.R. Patil, G.C. Fahey, N.R. Merchen, D.M. Hughes, Raw and rendered animal by–products as ingredients in dog diets, Journal of animal science, 75 (1997) 2497–2505.

[2] K. Jayathilakan, K. Sultána, K. Radhakrishna, A.S. Bawa, Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review, Journal of Food Science and Technology, 49 (2012) 278–293.

[3] C. Malavaki, S. Mizumoto, N. Karamanos, K. Sugahara, Recent Advances in the Structural Study of Functional Chondroitin Sulfate and Dermatan Sulfáte in Health and Disease, Connective Tissue Research, 49 (2008) 133–139.

[4] C. Schiraldi, D. Cimini, M. De Rosa, Production of chondroitin sulfáte and chondroitin, Applied Microbiology and Biotechnology, 87 (2010) 1209–1220.
[5] G. Kogan, L. Šoltés, R. Stern, P. Gemeiner, Hyaluronic acid: A natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications, Biotechnology Letters, 29 (2007) 17–25.
[6] N. Bhaskar, V.K. Modi, K. Govindaraju, C. Radha, R.G. Lalitha, Utilization of meat industry by products: Protein hydrolysate from sheep visceral mass, Bioresource Technology, 98 (2007) 388–394.
[7] A.H. Manninen, Protein hydrolysates in sports nutrition, Nutrition & Metabolism, 6 (2009) 38–38.
[8] S. Freier, B. Kletter, I. Gery, E. Lebenthal, M. Geifman, Intolerance to milk protein, The Journal of Pediatrics, 75 (1969) 623–631.
[9] D. Mittag, S. Vieths, L. Vogel, W.–M. Becker, H.–P. Rihs, A. Helbling, B. Wuthrich, B.K. Ballmer–Weber, Soybean allergy in patients allergic to birch pollen: Clinical investigation and molecular characterization of allergens, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 113 (2004) 148–154.
[10] T. Nakano, Z. Pietrasik, L. Ozimek, M. Betti, Extraction, isolation and analysis of chondroitin sulfáte from broiler chicken biomass, Process Biochemistry, 47 (2012) 1909–1918.
[11] K. Kondo, N. Seno, K. Anno, Mucopolysaccharides from chicken skin of three age groups, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects, 244 (1971) 513–522.

Patenty:
US 7575914 B2 – Microorganism producing hyaluronic acid and purification method of hyaluronic acid
US 4517295 A – Hyaluronic acid from bacterial culture
US 4141973 B1 – Ultrapure hyaluronic acid and the use thereof
GB19710027157 19710419 – Pharmaceutical preparation comprising chondroitin sulphates A and C
CN105440158 – Method for extracting chondroitin sulfate in pig nasál bones through dilute alkali and concentrated salt method
CN20151879984 – Method for extracting chondroitin sulfáte from pig nasál bone through ultrasonic method
WO2012159655 – Shark–like chondroitin sulphate and process for the preparation thereof

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob přípravy směsného produktu obsahujícího kyselinu hyaluronovou, chondroitin sulfát, nízkomolekulární peptidy a volné aminokyseliny, **vyznačující s tím**, že zbytky po strojním oddělení drůbežího masa se podrobí sekvenci kroků: a) vytvoření směsi zbytků po strojním oddělení masa s roztokem pufru, výhodně fosfátového pufru o pH 7,57, b) zahřátí směsi, c) enzymatická hydrolýza směsi enzymem papainem, d) inaktivace enzymu, e) separace směsného produktu ze směsi po hydrolýze.

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující s tím**, že zbytky po strojním oddělení drůbežího masa jsou tvořeny směsí hřbetů, koster a krků.

3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující s tím**, že směs zbytků po strojním oddělení masa s roztokem pufru má pH v rozmezí 7 až 8.

4. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, **vyznačující s tím**, že směs zbytků po strojním oddělení masa s roztokem pufru je zahřáta na teplotu zajišťující pasteraci či sterilizaci směsi.

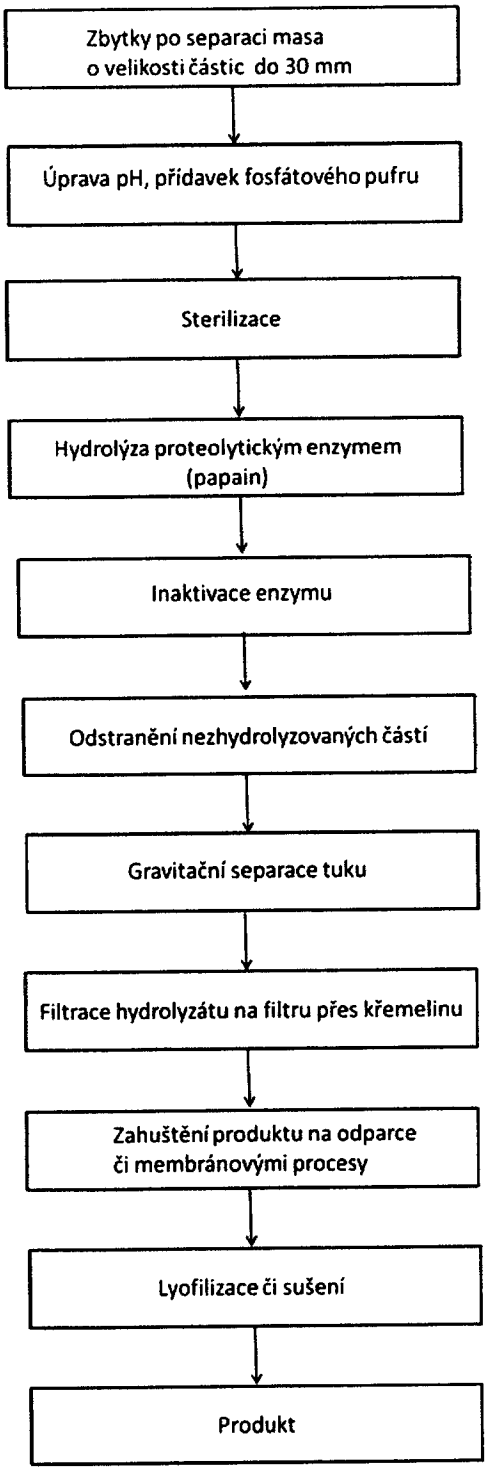
5. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, **vyznačující s tím**, že po enzymatické hydrolýze je ze směsi separován produkt obsahující kyselinu hyaluronovou, chondroitin sulfát, nízkomolekulární peptidy a volné aminokyseliny.

6. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, **vyznačující s tím**, že separace produktu po enzymatické hydrolýze je realizována sekvencí kroků separace velkých fragmentů kostí přes síto - odstředění kostní drtě a nehydrolyzovaného podílu – gravitační separace tuku – filtrace kapalného podílu – zahuštění filtrátu – sušení.

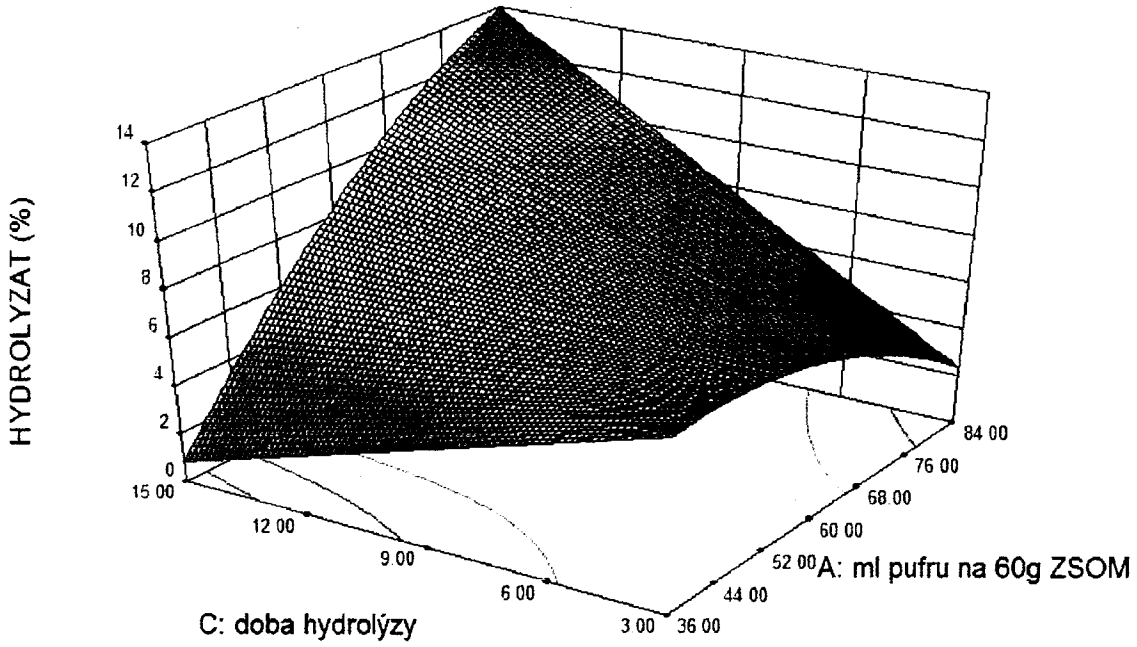
7. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, **vyznačující s tím**, že vzniklý směsný produkt obsahuje min 8 % hmotn. kyseliny hyaluronové.

8. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, **vyznačující s tím**, že vzniklý směsný produkt obsahuje min 10 % hmotn. kyseliny hyaluronové.

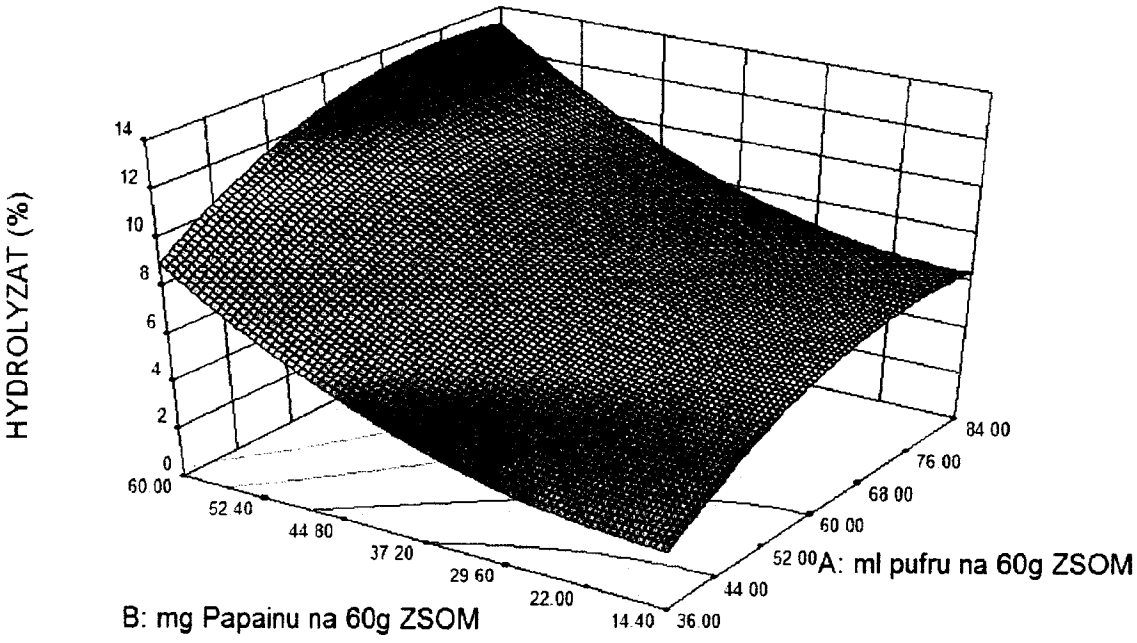
3 výkresy


Zbytky po separaci masa
o velikosti částic do 30 mm
Úprava pH, přídavek fosfátového pufru
Sterilizace
Hydrolýza proteolytickým enzymem
(papain)
Inaktivace enzymu
Odstranění nezhydrolyzovaných částí
Gravitační separace tuku
Filtrace hydrolyzátu na filtru přes křemelinu
Zahuštění produktu na odparce
či membránovými procesy
Lyofilizace či sušení
Produkt

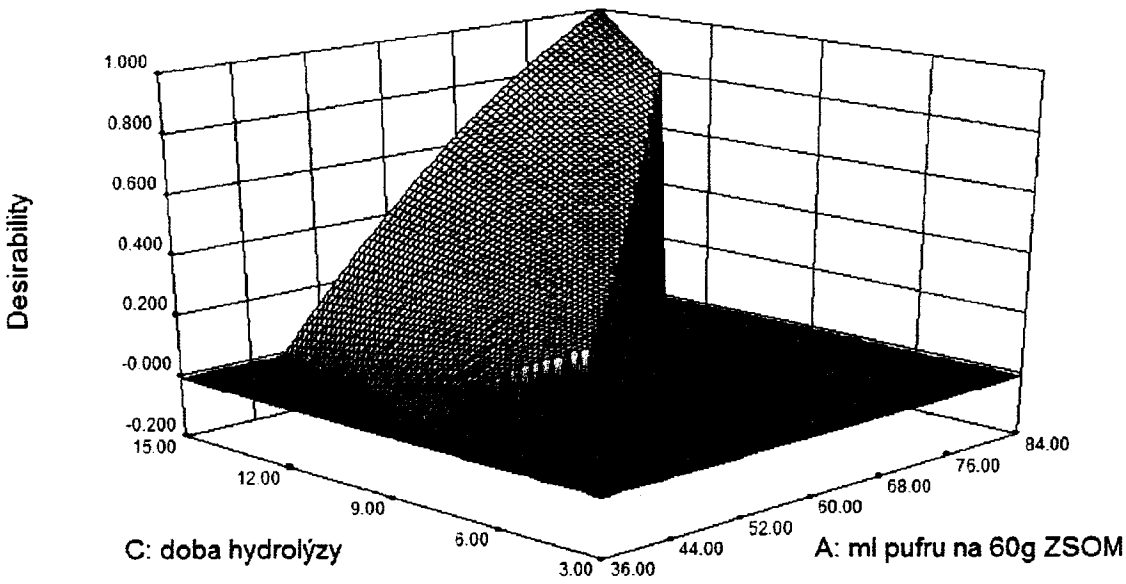
Obr. 1


HYDROLYZAT (%)
14
12
10
8
6
4
2
0
15 00
12 00
9.00
6 00
3 00
C: doba hydrolýzy
36 00
44 00
52 00
60 00
68.00
76 00
84 00
A: ml pufru na 60g ZSOM

Obr. 2


HYDROLYZAT (%)
14
12
10
8
6
4
2
0
60 00
52.40
44 80
37 20
29 60
22.00
14.40
B: mg Papainu na 60g ZSOM
36.00
44 00
52 00
60 00
68 00
76 00
84 00
A: ml pufru na 60g ZSOM

Obr. 3



Obr. 4

Konec dokumentu