Příprava a charakterizace filmů z hydrolyzátů keratinu

Bc. Lucie Vyškovská

Diplomová práce
2015

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství polymerů
akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Bc. Lucie VYŠKOVSKÁ**
Osobní číslo:	**T13388**
Studijní program:	**N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor:	**Inženýrství polymerů**
Forma studia:	**prezenční**
Téma práce:	**Příprava a charakterizace filmů z hydrolyzátů keratinu**

Zásady pro vypracování:

Cílem teoretické části práce bude rešerše o možnostech přípravy filmů z keratinových hydrolyzátů a možnostech jejich využití. Cílem experimentální části práce bude příprava keratinového hydrolyzátu a jeho následné využití pro přípravu filmů. U připravených filmů budou dále studovány a posuzovány jejich vlastnosti.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

WOOL, Richard P. Bio-based polymers and composites. Amsterdam: Elsevier Academic Press, c2005, 620 s. ISBN 01-276-3952-7.
SIMPSON, W a G CRAWSHAW. Wool: science and technology. Cambridge, England: Woodhead, c2002, 368 s. ISBN 08-493-2820-9.
GENNADIOS, Aristippos. Protein-based films and coatings. Boca Raton: CRC Press, 2002, 650 s. ISBN 15-871-6107-9.
DALEV, Pencho G. Utilisation of waste feathers from poutry slaughter for production of a protein concentrate. Bioresource Technology. 1994, 48(3), 265-267.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Ondřej Krejčí**
Ústav inženýrství polymerů

Datum zadání diplomové práce: **16. ledna 2015**

Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2015**

Ve Zlíně dne 2. března 2015

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

L.S.

UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ
Fakulta technologická

Ing. Lubomír Beníček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Vyškovská Lucie Obor: Inženýrství polymerů

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 9. 5. 2015 .....

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

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

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

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

[2)] zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

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

[3)] zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

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

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

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

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá možným využitím odpadního materiálu obsahujícího protein keratin. Teoretická část zahrnuje dosavadní stav poznání o keratinu, přípravě keratinových hydrolyzátů a jejich následné využití v praxi. Rovněž jsou v práci uváděny možné síťovací účinky používaných síťovadel spojovaných s tímto proteinem. Praktická část diplomové práce se poté zabývá přípravou keratinových hydrolyzátů z odpadní ovčí vlny alkalicko-enzymovou hydrolýzou. Dále popisuje přípravu filmů s přídavky diethylesteru kyseliny vinné (DET) a glycerolu s následným vyhodnocením jejich vlastností na základě provedených analytických a instrumentálních zkoušek.

Klíčová slova: vlna, keratinový hydrolyzát, filmy, síťování, DET

ABSTRACT

This master thesis is focused on the possible use of the waste material containing the protein keratin. The theoretical part comprises current state of knowlege of keratin, preparation of keratin hydrolyzate and their following use in practice. This thesis also presents possible crosslinking effects used crosslinking agents associated with this protein. The practical part of master thesis is focused on preparation of keratin hydrolyzate from waste sheep wool by alkali-enzymatic hydrolysis. It also describes the preparation of films with addition of tartaric acid diethyl ester (DET) and glycerol with subsequent evaluation of their properties on the basis of the analytical and instrumental examinations.

Keywords: wool, keratin hydrolyzate, films, crosslinking, DET

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému vedoucímu diplomové práce panu Ing. Ondřeji Krejčímu, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, čas a ochotu při experimentální části, který mi věnoval.

V neposlední řadě děkuji paní laborantce Miroslavě Žaludkové za vstřícnost při provádění výzkumné části a paní Mgr. Michaele Bařinové, Ph.D. za poskytnuté odborné konzultace.

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

OBSAH

ÚVOD **10**

I TEORETICKÁ ČÁST **11**

1 VLNA **12**

1.1 HISTOLOGICKÉ SLOŽENÍ VLNY 13

1.2 FYZIKÁLNĚ – MECHANICKÉ VLASTNOSTI VLNY 14

2 KERATIN **16**

2.1 SLOŽENÍ KERATINU 16

2.2 STRUKTURA KERATINU 18

3 HYDROLYZÁTY KERATINU **23**

3.1 CHEMICKÁ REAKCE KERATINU 23

3.2 PŮSOBENÍ VODY A TEPLA 23

3.3 ALKALICKÁ HYDROLÝZA 24

3.4 KYSELÁ HYDROLÝZA 24

3.5 OXIDAČNÍ A REDUKČNÍ HYDROLÝZA 25

3.6 ENZYMOVÁ HYDROLÝZA 26

4 VYUŽITÍ KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ V PRAXI **27**

4.1 VYUŽITÍ KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ V KOSMETICE 27

4.2 VYUŽITÍ KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ V POTRAVINÁŘSTVÍ 28

4.3 VYUŽITÍ KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ V ZEMĚDĚLSTVÍ 28

4.4 VYUŽITÍ KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ V MEDICÍNĚ 29

5 CHARAKTERIZACE KERATINOVÝCH FILMŮ **30**

5.1 PLASTIFIKÁTORY 30

5.2 SÍŤOVADLA 31

5.2.1 Aldehydy 31

5.2.2 Enzymy 33

5.2.3 Činidla odvozená od organických kyselin 33

II PRAKTICKÁ ČÁST **35**

STANOVENÍ CÍLŮ PRÁCE **36**

6 POUŽITÉ MATERIÁLY A METODY STANOVENÍ **37**

6.1 POUŽITÉ MATERIÁLY 37

6.1.1 Vstupní surovina - vlna 37

6.1.2 Použité enzymy 38

6.1.3 Použité síťovadlo 38

6.2 ANALYTICKÉ HODNOCENÍ 39
6.2.1 Mikrochemické stanovení dusíku – Micro-Kjeldahova metoda AOAC 960.52 39
6.2.2 Stanovení obsahu síry srážením roztokem chloridu barnatého AOAC 955.48 40
6.2.3 Stanovení obsahu tuku 41
6.2.4 Stanovení obsahu popelovin 42
6.2.5 Stanovení rozpustnosti 42
6.3 POŽITÉ INSTRUMENTÁLNÍ METODY 43
6.3.1 Termogravimetrická analýza (TGA) 43
6.3.2 Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) 44
6.3.3 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) 44
7 PŘÍPRAVA KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ A TVORBA FILMŮ 46
7.1 ROZKLADNÝ PROCES OVČÍ VLNY 47
7.2 SEPARACE A ČIŠTĚNÍ 48
7.3 TVORBA KERATINOVÝCH FILMŮ 50
8 ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ 51
8.1 ÚČINNOST ALKALICKO-ENZYMOVÉ HYDROLÝZY 51
8.2 ZHODNOCENÍ ZESÍŤOVANÝCH KERATINOVÝCH FILMŮ 51
8.3 VÝSLEDKY U ZVOLENÝCH ANALYTICKÝCH METOD 53
8.3.1 Výsledky stanovení obsahu dusíku Micro-Kjeldahovou metodou 53
8.3.2 Výsledky stanovení obsahu síry srážením roztokem chloridu barnatého 54
8.3.3 Výsledky stanovení obsahu popelovin 54
8.3.4 Výsledky stanovení rozpustnosti 55
8.4 VÝSLEDKY U ZVOLENÝCH INSTRUMENTÁLNÍCH METOD 57
8.4.1 Termogravimetrická analýza (TGA) 57
8.4.2 Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) 60
8.4.3 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) 64
ZÁVĚR 68
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 70
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK 79
SEZNAM OBRÁZKŮ 80
SEZNAM TABULEK 81
SEZNAM PŘÍLOH 82

ÚVOD

Ovčí vlna je unikátním materiálem využívající se především v textilním průmyslu. Našla své uplatnění z důvodu velmi dobrých fyzikálně-mechanických vlastností. Nevýhodou této suroviny je však značná každoroční produkce velkých zemí. Proto je využívána pouze vlna o nejvyšší jakosti, přičemž značnější část je brána jako odpadový materiál. Příkladem tomu mohou být statistiky, jež poukazují na vysoké procenta produkce odpadů v jednotlivých zemích světa.

Značná nevýhoda odstraňování nejen tohoto živočišného produktu, ale také zrohovatělých materiálů vede ke ztrátě základní suroviny – keratinu. Proto jednou z možných variant je tyto odpady převést pomocí chemické, popř. enzymatické hydrolýzy na dále využitelný produkt – keratinový hydrolyzát. Tyto hydrolyzáty poté mají pro své získané vlastnosti využití v mnoha odvětvích průmyslu. Dosavadní použití je spatřováno především v potravinářství, zemědělství, lékařství či kosmetice. Jednou z případných možností je tvorba keratinových filmů.

Tvorba těchto filmů je prozatím v počátcích výzkumu. Nynější dostupná literatura uvádí vhodnou tvorbu filmů pomocí síťovadel na bázi aldehydů (glutaraldehyd). Nicméně využití vytvořených filmů především v medicínském, potravinářském či kosmetickém průmyslu není zcela vhodné pro známou cytotoxicitu zmiňovaného síťovadla.

Pro uplatnění těchto filmů je nutno dalšího zkoumání. Proto se tato práce zabývá vhodnou tvorbou keratinového hydrolyzátu pomocí dvoustupňové alkalicko-enzymové hydrolýzy, tvorbou filmů z tohoto hydrolyzátu a také síťovacími účinky netoxického síťovadla (diethylesteru kyseliny vinné).

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VLNA

Vlna má nezastupitelnou roli v nejrůznějších typech odvětví. Ovšem největší využití se pojí s textilním průmyslem. Je to dáno především jejími charakteristickými vlastnostmi, jako je tvárnost, hřejivost a pružnost. Mezi přednostně využívanou patří ovčí vlna. Typ a kvalita vlny bývá závislá na určitých aspektech, mezi něž patří:

a) Typ plemene zvířete.

b) Původ vlny (např. australská, jihoamerická, novozélandská, anglická).

c) Stáří a pohlaví ovcí (jehněčí, beránčí, ovčí).

d) Způsob získání vlny (stříhaná, kažárenská, jatečná, mrtvá).

e) Jemnost vlasu (kadeřavost, délka, jemnost). [1, 2]

Vlna získávána z ovcí bývá označovaná jako rouno. Není pravdou, že v jednotlivých částech kůže je vlna stejné kvality: největší jemnost se nachází na lopatkách předních noh, naopak nejhrubší je na nohou a ocase. Také lze konstatovat, že čím je vlas delší, tím bývá zpravidla hrubší. Příkladem rozdílů ve vlastnostech vlny u různých typů ovcí mohou být:

a) Merinová vlna – tvoří jemné, husté, měkké a dlouhé vlákna (25 – 100 mm), jemnost 10 – 24 μm.

b) Křížená vlna (z ovcí po křížení merinové ovce lincolského berana): délka vlákna – 80 – 200 mm, jemnost 25 – 40 μm.

c) Hrubá vlna – zisk především z valašských a karakulských ovcí, délka vlny 150 - 500 mm, jemnost 41 – 86 μm.

Po chemické stránce je vlna bílkovinné vlákno (tvořena z 97 % bílkovin, 2 % připadá na lipidy a zbylé 1 % tvoří minerální soli, nukleové kyseliny a sacharidy), jejíž významnou částí je protein keratin. Spojením řetězců příčnými vazbami (tj. zesíťování) opatřuje aminokyselina cystin. Lze hovořit o vazbě: $-CH_2-S-S-CH_2-$. Zastoupení cystinu ve vlně činí 10 – 20 %. [3]

1.1 Histologické složení vlny

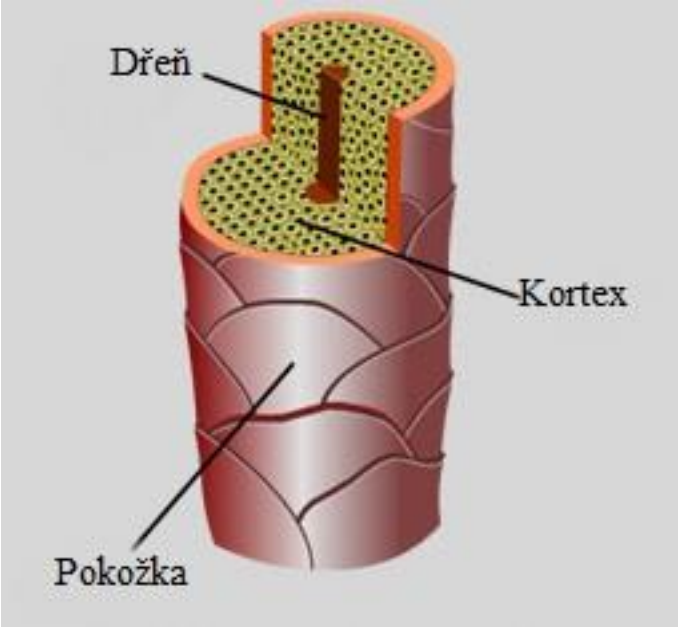
Z histologického hlediska lze živočišné vlákna na bázi keratinu rozdělovat na tři morfologické složky: kutikula, jádrová část a dřeň.

Kutikula (pokožka) je tvořena plochými zrohovatělými buňkami šupinového tvaru (velikost 30 μm), které svým uložením dokáží určovat hladkost povrchu, tření a plstnitelnost samotného vlákna. Jednotlivé šupiny se překrývají a volné konce šupinek směřují ke špičce vlasu. Tyto volné okraje mají nepravidelně vlnité obrysy. Kutikula obsahuje mimo zkeratinizované buňky také tuky a mukopolysacharidy, které způsobují její větší odolnost proti účinku alkálií a enzymů. [2]

Jádrová část (cortex = kůrová část) vlny se skládá z podlouhlých buněk polygonálního průřezu. Buňky jsou tvořeny z podélně orientovaných fibril, mikrofibril, amorfní mezifibrilové látky a buňkového jádra. Tyto buňky se dokáží udržet spolu ve vlákně pomocí keratinového tmelu, který se rozkládá působením daných enzymů a alkálií. Dochází tak k oddělování buněk od sebe s následnou izolací v poměrně nerozrušené formě. Dvojitý kortex je přitom šroubovitě stočen a poměr mezi parakortexem a orthokortexem určuje zkadeření vlněného vlasu. [2, 4]

Dřeň (medula) se může skládat pouze z jedné, ale i více řad odumřelých buněk, které seschly po zrohovatění. Mezi těmito buňkami se nachází prostory, jež jsou vyplněny vzduchem. V případě, že bude docházet k značnému zastoupení dřeně ve vlákně, pak pružnost vlákna se bude snižovat (menší podíl síry). Mrtvá vlna může obsahovat až 90% dřeně. Medula je nápadněji rozvinuta v silnějších chlupech i u jemnozrnných zvířat (např. ovce merino), u některých kožešinových zvířat může zcela chybět. [2,4]

Růst živočišných vláken postupuje v jednotlivých etapách. První etapou je tvorba papily a kořene, dále se pokračuje v etapě keratinizace (ve škáře) a posledním kroku vytláčení mrtvého keratinového útvaru z pokožky. [2]



Obr. 1 Řez a struktura vlasu vlny [5]

1.2 Fyzikálně – mechanické vlastnosti vlny

Fyzikální a mechanické vlastnosti vláken jsou značně významné z hlediska následujícího zpracování vlny a jejich užitkových vlastností. Mezi hlavní ukazatele těchto vlastností bývá pružnost, pevnost, délka, tloušťka, barva, plstivost, hydroskopičnost a elektrické, či termické vlastnosti:

Barva vlasu

Vůbec nejcennější barva vlny pro průmyslové odvětví je bílá. Své uplatnění mohou také získat barvy hnědé či černé. Zabarvení vlny je dáno pigmentací, ale také tloušťkou i morfologickou strukturou chlupu.

Délka vlasu

Je přirozeně rozdílná u různých typů zvířat. Délka vlasu se pohybuje v rozmezí 5 – 100 mm, lze ji určovat dvěma způsoby a to v přirozené formě – kde dochází k měření vlasu ve stavu obloučkovitém, nebo skutečné formě – kdy měření probíhá za stavu nataženého vlasu.

Pružnost vlasu

Samotná pružnost vlasu vlny je značná (z přírodních vláken nejvyšší). Taktéž tažnost vlasu je poměrně vysoká. Při působení deformačních sil je dalším kritériem ovlivnění teplotou, vlhkostí, a rychlosti zatížení. Za sucha je tažnost 40 %, za mokra je 50 % a více.

Pevnost vlasu

Její úměra je vztahována k obsahu disulfidických vazeb. Pokud dochází k poklesu cystinu, pak i pevnost chlupu značně klesá. Dalším ukazatelem je délka hlavního polypeptidického řetězce. Štěpením tohoto řetězce vede opět k poklesu pevnosti vlákna. Suché vlákna mají vyšší pevnost než vlákna mokrá.

Hydroskopičnost vlasu

Vlna je známá také svou vysokou nasákavostí, kdy dokáže pojmout až 40 % vlhkosti. Tato vlastnost se však může změnit chemickým opracováním popř. intenzivním sušením.

Elektrické a tepelné vlastnosti

Vlákno vlny nemá dobrou elektrickou vodivost. Není však zcela nulová. Může být odvislá od různých chemických úprav, ale i na možné přítomnosti vlhkosti. Avšak při běžném česání vláken dochází ke tření a tím vzniku elektrického náboje. Nicméně tento náboj je špatně odváděn jen málo vodivou srstí. Tím dochází ke slepování jednotlivých vláken s ulpíváním prachu a jiných nečistot. Termické vlastnosti jsou závislé na skladbě vlákna a na množství vzduchu nacházející se v mikrokapilárním systému vlákna. [2]

U vlny jsou také zajímavé její chemické vlastnosti. Odolává organickým rozpouštědlům, slabým i silným kyselinám (kromě kyseliny sírové). Její porušení vzniká díky silným alkáliím. Také ji lze dobře barvit a bělit v závislosti na druhu a kvalitě vlny.

Vlna je klasickým materiálem pro výrobu vysoce kvalitních textilií. Má dostatečnou tvarovatelnost, plný hřejivý omak i nízkou mačkavost. Speciální úpravou lze zabránit plstění vlny a tím zvýšit odolnost proti molům, jež dokáží díky vysoké koncentraci merkaptanů rozpouštět daný typ výrobků. Často se vlna zpracovává se střížemi syntetických vláken.

V kožedělném průmyslu se vlna, a z ní vytvořené textilie, využívají nejhojněji jako svrškový materiál, potahy, podšívky aj. [1, 4]

2 KERATIN

Keratin je základním fibrilárním (vláknitým) proteinem vyskytujícím se u většiny vyšších obratlovců. Tvoří převážnou část pokožky, z níž vystupují útvary ve formě vlasů, chlupů, peří, kopyt, nehtů apod. Zrohovatělá tkáň má zvláštní místo v tkáňové struktuře obratlovců, neboť pokrývá povrch zvířat a tím představuje přirozené rozhraní mezi organismem a vnějším prostředím. Keratiny se nachází pouze v epiteliálních buňkách. Jsou charakteristické svou fyzikálně – chemickou a mechanickou stabilitou. Nelze je rozpouštět ve slabých kyselinách, louzích, vodě a organických rozpouštědlech. Naopak možnost rozpuštění lze spatřovat v roztocích obsahující denaturační činidla (např. močovina). Nerozpustnost je dána především disulfidickými můstky, jež vytváří silnou a pevnou síť ve struktuře proteinu. [6, 7]

Keratiny lze rozdělit:

- α – keratiny – výskyt u savců,
- β – keratiny – výskyt u plazů a ptáků. [7]

2.1 Složení keratinu

Podle dosavadních poznatků je zřejmé, že keratin je tvořen 21 aminokyselinovými (AMK) zbytky.

Společným znakem keratinových bílkovin jsou jejich polypeptidové řetězce, které se síťují cystinem. Mají vysoký obsah thioaminokyselin a přibližně stejné množství histidinu, lyzinu a argininu v poměru 1 : 4 : 12. Dále obsahují vyšší procento tyrozinu a do 1 % tryptofanu. Keratiny se vyznačují také obsahem 10 % AMK se zásaditou skupinou $–NH_2$ a 15 %-ním zastoupením AMK se skupinou –COOH v bočním řetězci. Existuje také rozdíl v AMK složení jednotlivých keratinů. Největší variabilita se vyskytuje v obsahu cystinu a tyrozinu. Vlna je touto variabilitou typická. Nachází se u dvou morfologických složek – kutikuly a jádra, kde se liší v obsahu cystinu. Kutikula obsahuje 18,1 – 20,3 hm. %, oproti jádru 10 – 12 hm. % cystinu. Skupinové rozdělení AMK ve vlně lze vidět v tabulce č. 1. [2]

Kromě keratinových bílkovin obsahuje keratinové útvary také doprovodné látky, jako jsou ovčí tuk lanolín, nekeratinové bílkoviny a mukopolysacharidy. [2]

Tab. 1 Skupinové rozložení AMK vlny [2]

Skupina AMK	Aminokyselina	Obsah AMK v µmol.g^{-1}
Kationtová	Arginin	570
	Lyzin	228
	Histidin	66
Aniontová	Kyselina asparagová	772
	Kyselina glutamová	
Alkoholový hydroxyl	Serin	888
	Treonin	528
Fenolový hydroxyl	Tyrozin	300
Síra	Cystein	24
	Cystin	500
	Metionin	29
	Kyselina cystein-sulfonová	15
Polární	Asparagin	822
	Glutamin	
Hydrofobní	Alanin	438
	Valin	487
	Leucin	643
	Izoleucin	275
	Prolin	570
	Fenylalanin	239
	Tryptofan	32
	Glycin	749

α – keratiny se mohou také tradičně rozdělit na měkké a tvrdé. Rozdělení je založeno na rozdílech v chemických i fyzikálních vlastnostech, ale také na množství AMK cystinu a tedy i koncentraci příčných sirných vazeb, které obsahují:

a) Měkký typ – je možno lépe degradovat. Nachází se ve spodní vrstvě pokožky a ve vlasovém jádru.

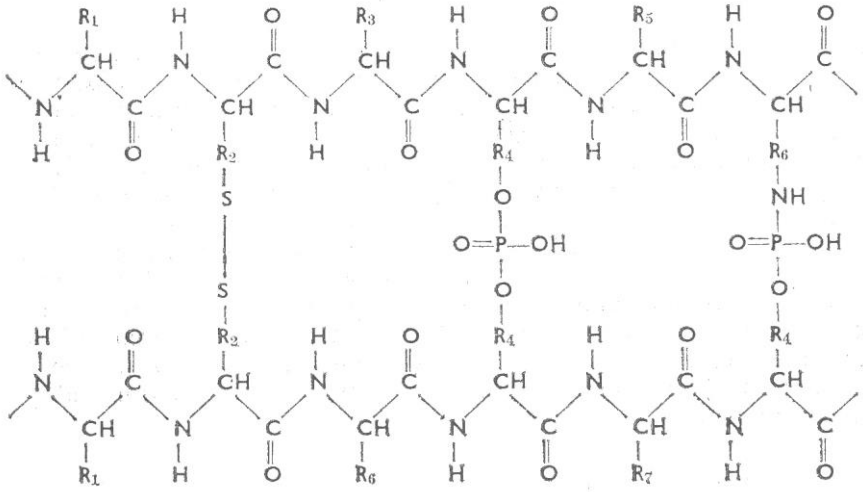
b) Tvrdý typ keratinu – má vysoké množství síry (až 22 %) čím dokáže více tvořit vazbu -S-S-, odolnost vůči chemickým změnám je značná. Tvoří především vlasy, nehty a rohovinu. [8, 9]

2.2 Struktura keratinu

Kvantitativní zastoupení jednotlivých AMK s následným pořadím ve struktuře proteinu je velmi rozmanité. Tím jsou dány rozlišné makroskopické rozdíly ve vlastnostech jednotlivých proteinů, s jejich následnou biologickou funkcí. U keratinu je diferencováno několik možných typů struktur. [10]

Primární struktura je charakterizována polypeptidovým řetězcem, jenž obsahuje více než 10^2 AMK zbytků. Struktura je udávána přesným uspořádáním AMK v řetězci makromolekuly. AMK jsou mezi sebou propojovány kovalentními peptidovými vazbami (–CO–NH–). Mimo tento typ vazby vznikají také další druhy vazeb. Je to dáno vzájemnou reakcí mezi funkčními skupinami bočních řetězců AMK. Mezi tyto vazby patří disulfidová (nacházející se mezi dvěma molekulami cysteinu), esterová a amidová vazba. U posledních dvou vazeb dochází prostřednictvím kyseliny fosforečné ke spojení molekul např. serinu, argininu, lyzinu aj. (viz obrázek č. 2). Veškeré vyšší typy struktur vyplývají z této primární struktury proteinu. Vazby, jež zachovávají peptidové řetězce, popřípadě jejich části v dané prostorové orientaci se uplatňují pouze tehdy, pokud umožní primární struktura blízký kontakt atomů, mezi kterými se tyto vazby realizují. [11, 12]

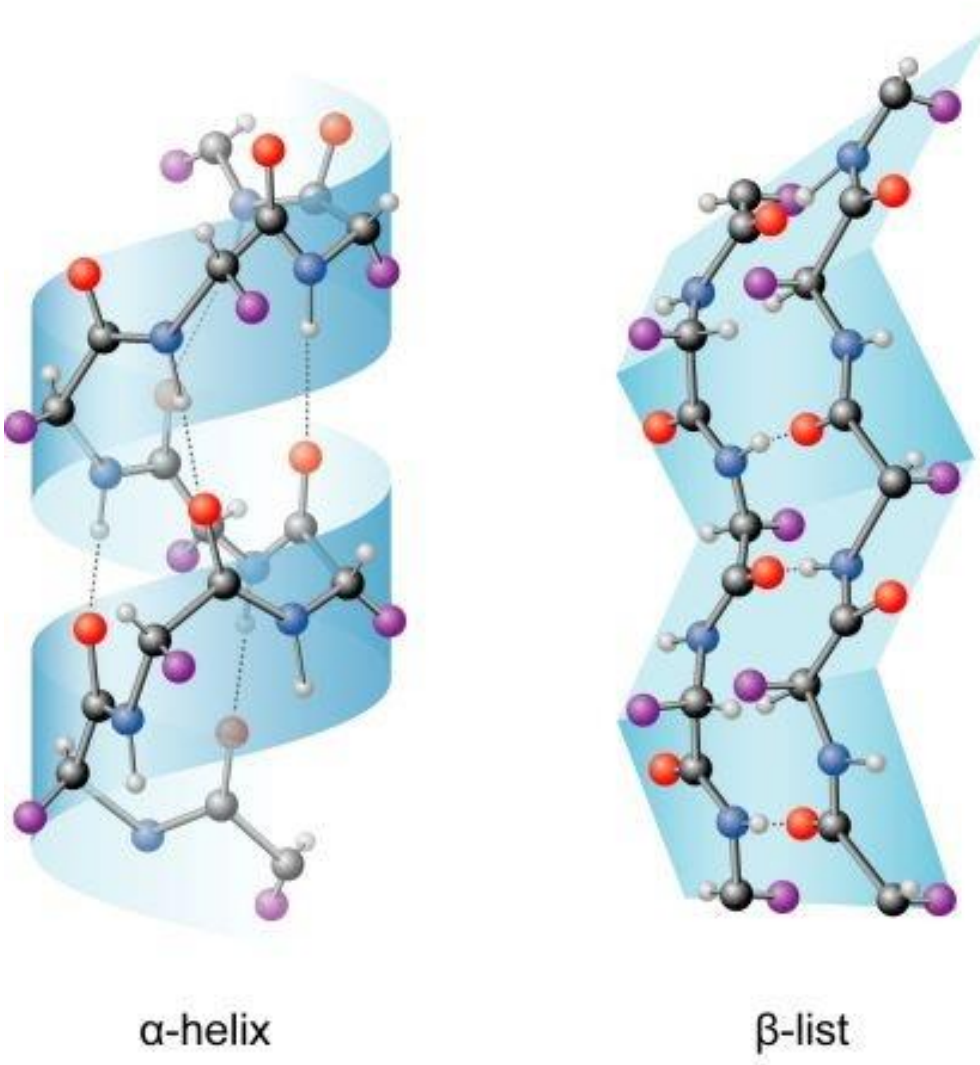
V případě keratinu je pravidelný výskyt cysteinu. Proto thiolové skupiny, které působí spíše jako oxidační systém, dokáží vytvářet po oxidaci intramolekulární i mezimolekulární disulfidové vazby (–S–S–) ve struktuře proteinu. [13]



Obr. 2 Příčné vazby mezi řetězci polymerů
R_2 – jednotky cysteinu, R_4 – serinu, R_5 – lyzinu, $R_{1,3,5,7}$ – dalších AMK [11]

Sekundární struktura se vyznačuje lokálním sbalením polypeptidového řetězce v důsledku vzniku vodíkových vazeb mezi imidovými a karbonylovými skupinami hlavního polymerního řetězce. U proteinů se nacházejí dva typy sekundární struktury: α – helix a β - skládaný list. [14]

Fibrilární proteiny, u nichž se vodíkové vazby tvoří mezi jednotlivými peptidovými řetězci, mohou mít dvojí možnou strukturu: antiparalelní (protisměrné) a paralelní uspořádání vodíkových vazeb mezi dvěma peptidovými řetězci. V případě antiparalelního uspořádání je značnější tvorba těchto vazeb. Následkem je nerovinná struktura, kde musí být zachovány úhly mezi vazbami na Cα (110°) přičemž také boční řetězce AMK by se překrývaly. Leží proto ve dvou rovinách s tvarem β – skládaného listu. Pokud je však směr paralelní (u keratinu), dochází po vytvoření vodíkových vazeb poměrně k nestabilní struktuře. Z tohoto důvodu se energeticky snaží dostat do výhodnější pozice a to do šroubovice α – helix. Prostorové uspořádání zbytkových bočních řetězců se opakuje vždy po 18 AMK (po pěti závitech). Tvorba α – helixu je uskutečňována nejrůznějšími typy AMK. Tato šroubovice je chirální strukturou. Stabilní strukturou proteinu je tedy pravotočivá α – šroubovice. [11, 12]



Obr. 3 Sekundární struktura fibrilárních proteinů [15]

Terciární struktura vzniká z identifikovatelných, pravidelně se opakujících jednotek dovolených konformací polypeptidu [10]. Šroubovice i skládané listy se navzájem spojují slabšími interakcemi, jako jsou – Van der Waalsovy interakce, vodíkové můstky, iontové síly, popřípadě elektrostatické a hydrofobní síly. Terciární struktura tak udává molekule definitivní prostorovou formu a udává také její biologický význam. [11, 16]

Podle terciární struktury lze rozlišovat dva typy bílkovin:

- Globulární – např. serové bílkoviny
- Fibrilární – např. keratin, fibroin

Kvartérní struktura je tvořena identickými podjednotkami uspořádávajících se do vyššího molekulárního celku. Toto spojení bývá umocněno intermolekulárními nekovalentními vazbami. [14]

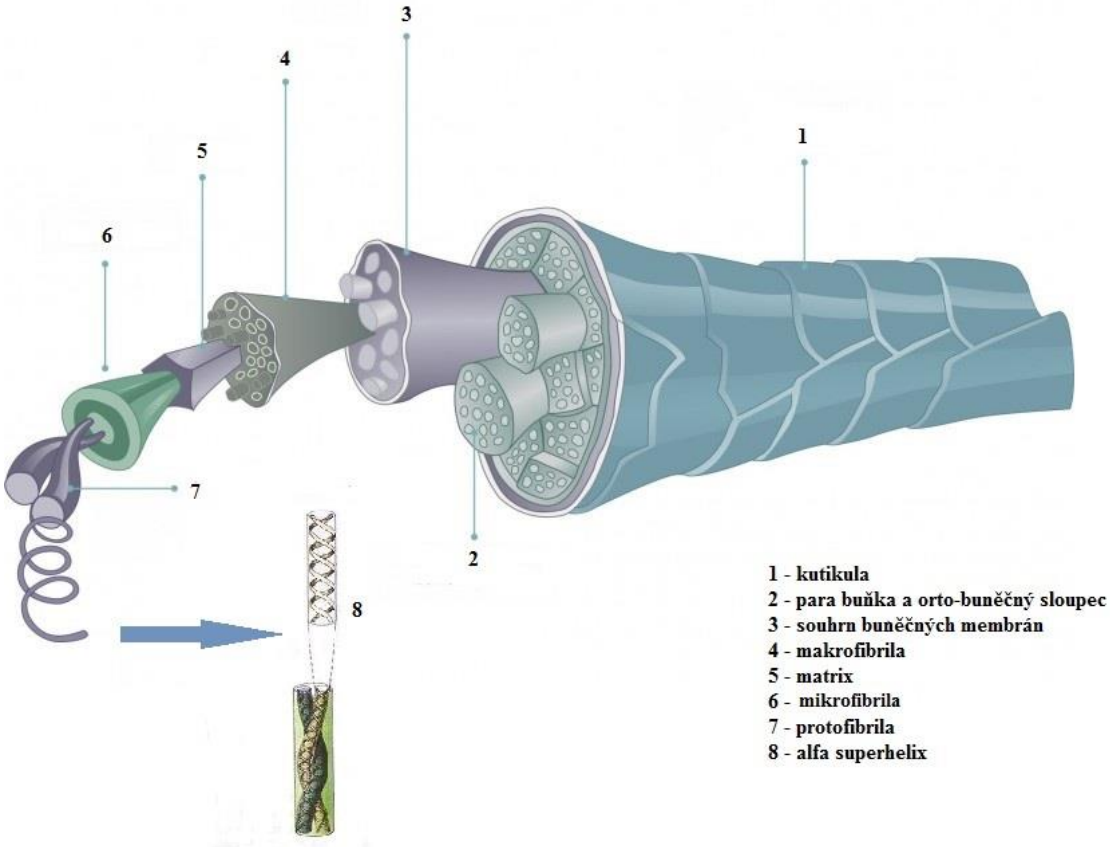
α – keratin

Tento typ keratinu má jako základ sekundární strukturu α – šroubovice. Tyto přirozená vlákna nejsou pouhým svazkem šroubovic, ale jejich stavba má podstatně složitější charakter. U těchto dvou nebo tří souběžně točících se šroubovic dochází ke stáčení do levotočivého trojpramenného „kabelu“ – protofibrila (průměr 2 nm). Protofibrily dokáží vytvářet tzv. mikrofibrily (průměr 8 nm). Mikrofibrily se skládají tedy z protofibril přičemž devět protofibril je uspořádáno po obvodu mikrofibrily a zbylé dvě tvoří jádro. Nešroubovicové konce v řetězci dokáží spojovat dohromady 10 až 12 mikrofibril do svazku propojovaných vysokým obsahem síry – makrofibrila. Takto vytvořená struktura je zpevňována amidovými vazbami mezi postranními řetězci lysinu a glutamové kyseliny. Jednotlivé spirálové a další útvary jsou navzájem propojovány příčnými vazbami spolu s tmelovou substancí matrixem.

α – keratiny jsou typické pro vlasy. Při navlhčení a zahřátí tohoto makroskopického vlákna dochází k jeho natažení na dvojnásobek původní délky. Je to dáno uvolněním vodíkových můstků ve struktuře biopolymeru s následným přechodem na β – keratinovou strukturu. [7, 12, 17]

β – keratin

Oproti α – keratinu je tento typ bílkoviny tvořen strukturou skládaného listu. Typickým zástupcem této skupiny je fibroin (z hedvábí). Má vysoký obsah zbytků aminokyselin – glycin, alanin, serin; což umožňuje pravidelné prostorové uspořádání rovinných útvarů. Jeho struktura je tedy tvořena antiparalelně (se střídavým směrem vazeb CO–NH). [12, 17]



Obr. 4 Makroskopické složení vlákna vlny [7,18]

3 HYDROLYZÁTY KERATINU

Jak již bylo zmíněno v předešlé kapitole, keratiny jsou známy jako velmi stabilní látky a to především díky zesíťovaní disulfidovými můstky. K tomu, aby byl získán rozpustný keratin, je nutné využívat poměrně vysoké koncentrace chemikálií s přídavkem vysokých teplot, popř. tlaku. Takto zpracovaný keratin má poté značně snížené množství některých AMK (např. lysin, methionin, tryptofan). Mezi nejznámější typy hydrolýz, z nichž je tento keratinový hydrolyzát (KH) získáván, patří: alkalická, kyselá hydrolýza, nebo také oxidační, či redukční hydrolýza. V dnešní době je taktéž značně využívána enzymová, podporována enzymy vytvářených bakteriemi popř. houbami. Pro snadnější a efektivnější rozklad je však možné tyto jednotlivé hydrolýzy kombinovat. Cílem chemické či enzymatické hydrolýzy je rozštěpit peptidové řetězce do menších peptidů o nižší molekulové hmotnosti. [19-21]

3.1 Chemická reakce keratinu

Chemická struktura keratinu umožňuje řadu chemických reakcí. Je to dáno vazbami i postranními skupinami AMK zbytků ve struktuře keratinu. Jednou z možností jsou vazby (zpravidla solné) se skupinami $–NH_2$ a –COOH. Dále lze hovořit o reakci s –S–S– cystinu, které umožňují štěpení struktur s následkem změn chemických i fyzikálních vlastností. Reakce s postranními skupinami nemívají obvykle vliv na základní stavbu polypeptidových řetězců. Jejich štěpení může vzniknout až při silnějším hydrolytickém působení. [22]

3.2 Působení vody a tepla

Jak již bylo řečeno, keratinová vlákna dokáží botnat. Botnání vzniká narušením elektrovalentních a vodíkových vazeb s následným vznikem vody, která difunduje do uvolněné fibrilární struktury. Tím dochází k poklesu koheze fibril. Sorpce vody tedy závisí na přítomnosti hydrofilních skupin ($–NH_2$, –COOH, –OH) v keratinu. [23]

Zbotnání keratinu je důležitý předpoklad pro většinu reakcí, chemikálie dokáží totiž lépe difundovat do nabotnalého gelu keratinu. Pokud se k tomuto ději připočítá termické působení (teplota nad 80 °C) nabývá určité odbourání, které v přítomnosti solí kovů Cu, Cd, Ag, Mn vyvolá pokles obsahu síry. Pokud teplota sahá k hodnotě 100 °C, nastává ště-

pení cystinu a částečná hydrolýza $–NH_2$ skupin s přechodem α – struktury na konfiguraci β. [22, 23]

3.3 Alkalická hydrolýza

Je vůbec nejstarším typem z uvedených hydrolýz. Působení alkálií na keratin je účinnější oproti kyselé hydrolýze. Avšak míra této účinnosti závisí především na teplotě, pH i době působení. Nejvíce se využívají alkálie typu NaOH, KOH, $Ca(OH)_2$. [23-25]

Za běžných teplot do pH 10 působí alkálie poměrně málo. Avšak při zvyšování teploty dochází k poměrně značnému rozkládání vlny. V případě silných roztoků alkálií dochází k štěpení polypeptidových řetězců. Pokud jsou použity mírnější zásady, pak struktura keratinu je zachována. V tomto případě dochází k hydrolýze peptidové vazby s následným rozštěpením –S–S– vazby. [22]

U tohoto typu hydrolýzy je možné získat vysokou výtěžnost KH. Pro zisk takto značné výtěžnosti KH je vhodné využívat teplot v rozmezí od 60 – 100 °C. Nevýhodou této metody však může být změna AMK složení proteinu. [26]

Příklad:

Možný příklad alkalické hydrolýzy lze uvést podle předlohy autora Coward-Kellyho a kol., který využíval jako výchozí surovinu peří a kravskou srst. Promyté a vysušené suroviny byly rozemlety na laboratorním mlýnu a následně prosety přes 2 mm síto. Samotné hydrolytické působení probíhalo v autoklávu při teplotách 50 – 150 °C po dobu 300 minut s rychlostí otáček 1000 ot./min. Jako alkálie bylo použito $Ca(OH)_2$ v přídavku 0,4 g/1 g suroviny. Poté při zvolené teplotě 105 °C bylo po době 25 minut rozpuštěno 80 % peří. Po zvolené 3 hod. době došlo až k 95%-mu rozkladu za vzniku KH. [27]

3.4 Kyselá hydrolýza

Keratin je proti působení kyselin značně odolnější ve srovnání se zásadami. Je to dáno značnější stálostí disulfidických vazeb v kyselém prostředí. Kyselé hydrolýzy se provádí pomocí minerálních kyselin (H_2SO_4, HCl) u nichž se vyžaduje vyšší koncentrace s delším termickým působením. U této hydrolýzy dochází k reakci keratinových řetězců se silnou kyselinou. Poté nastává štěpení peptidové vazby za vzniku $–COO^-$ a $–NH_2^+$ iontů. Během

této hydrolýzy dochází k částečné oxidaci cysteinu (na kyselinu cysteinovou) i cystinu za neúplného rozštěpení můstků –S–S–. [20, 22]

Tuto rozkladnou reakci je možné podnítit 5 – 6 M HCl, popř. 3 M H_2SO_4 při teplotě 110 °C po dobu 24 hodin. Další možností je také použití kyseliny octové či peroxooctové. [23, 24]

Příklad:

Jako příklad kyselé hydrolýzy uvedl Kurbanoglu a kol., kde vstupní keratinová surovina (beraní rohy) byla přetransformována na KH. K tomuto ději se využila rohovina z jatek, která prošla procesem promývání, sušení a mletí (5 mm síto). 50 g tohoto rohového prášku bylo odebráno a smícháno s 3 M H_2SO_4. Tato směs byla inkubována po dobu 24 hodin při teplotě 70 °C. Na konci této doby došlo ke smísení roztoku se 100 ml demineralizované vody s následným vyhřátím na dalších 130 °C po dobu 4 hodin. Následně byl tento roztok ochlazen s přidáním 2,5 M $Mg(OH)_2$ pro úpravu pH na 7. Na konci tohoto děje došlo k filtraci, jejímž výsledkem se stal čirý filtrát. [28]

3.5 Oxidační a redukční hydrolýza

Hydrolýza keratinu může být doprovázena také oxidačním či redukčním způsobem. Prostředky, jež se využívají na tento typ hydrolýzy, jsou např. 2-merkaptoethanol, močovina, kyselina thioglykolová, peroxid vodíku, aj. [24]

Tyto typy hydrolýz probíhají poměrně stejně s tím rozdílem, že u oxidačního způsobu je využíváno oxidačního činidla – př. siřičitan sodný, u nějž dochází k oxidaci ketatinu ze vzniku cysteinu (RSH) a cysteinu-sulfonátu (RSSO3H). Tento děj pak nese označení sulfitolýza. [29]

Příklad:

Přípravou KH se zabývá taktéž Kakkar a kol., který poukazuje na možnost využití potenciálního materiálu získaného z kopyt hovězího dobytka pro biomedicínské aplikace. Tato metodika získání keratinu v redukované podobě byla částečně přejata z již dobře zavedeného způsobu vytvořeného Yamauchi a kol. Keratin byl získán ve formě vodného roztoku, kde byla využita odtučněná vstupní surovina s přídavky 7 M močoviny, 2-merkaptoethanolu a SDS při 60 °C. Proces následoval extrakcí při hodnotách pH 6 – 8. Trvanlivost tohoto redukovaného keratinu je až 1 rok (teplota 20 – 24 °C). [30]

3.6 Enzymová hydrolýza

V současnosti došlo poměrně k značnému rozmachu využívání enzymů produkovaných bakteriemi i houbami. Výhodou této metody jsou obzvláště nízké reakční podmínky ve srovnání s chemickým způsobem hydrolýzy. Také zde dochází k nižšímu využití proteáz. Celý děj probíhá navíc za atmosférického tlaku a nižších teplot. Přídavkem toho je cenová dostupnost enzymů na takové úrovni, že celý děj může být levnější než u chemických hydrolýz. Naopak za nevýhodu této metody se však považuje obtížná manipulace s bakteriemi a udržení vhodných podmínek pro tento děj. Také čas samotné hydrolýzy je poměrně zdlouhavý ve srovnání s chemickými typy hydrolýz. U enzymů probíhá reakce po dobu několika dnů (3 – 7 dnů) zatímco kyselé či alkalické hydrolýzy probíhají v řádech hodin. [20]

V současné době se vyskytuje značné množství bakterií produkující enzymy využitelné pro tento typ hydrolýzy. Jedním z možných typů je rod *Bacillus*. Příkladem tomu může být *Bacillus subtilis* tvořící enzym Neutrázu, *Bacillus licheniformis* tvořící Alkalázu, nebo *Bacillus lentus* a z něj těžící proteázu Esperazu, která je využita v praktické části diplomové práce. [31, 32]

Příklad

Dostupné zdroje současné odborné literatury uvádějí příklady enzymové hydrolýzy, při níž v zásadě dochází k obdobným způsobům provádění s odlišností využitých enzymů v kombinaci s přídavnými složkami (reaktanty). Avšak model této hydrolýzy popisuje i Grazziotin a kol., u nějž dochází k rozkladu kuřecího peří právě touto metodou. V tomto případě využitá vstupní surovina zprvu podléhala odtučnění s následným sušením. Keratin byl následně podroben rozkladu keratinolytické bakterie *Vibrio* při teplotách 30 °C. [20, 33]

V případě zmiňovaných hub lze uvést opět modely rozkladu keratinového materiálu. Touto problematikou se zabýval také Mussallam a kol., z Kuvajtské univerzity. Zde bylo využito termofilního kmene *Coprinopsis* sp., jež rozkládal opět upravené kuřecí peří pomocí proteáz při zvolené inkubační době 14, 21, 28 a 35 dnů. Výsledkem bylo efektivní postupné uvolňování rozpustných AMK do média, což mělo za následek snížení hmotnosti sušiny substrátu. Zvolená teplota inkubace činila 20,4 °C a pH 9. [34]

4 VYUŽITÍ KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ V PRAXI

Je zřejmé, že v současnosti vzniká značné množství odpadu z průmyslu. Příkladem tomu může být odpad ve formě vlny z textilního průmyslu, rohy a kopyta z jatek, zvířecí chlupy z koželužen apod. Jelikož je problematické likvidovat keratinový odpad skládkováním či spalováním (z důvodu energetické náročnosti a CO_2), jednou z možných variant je tyto odpady převést na už zmiňovaný dále využitelný produkt – keratinový hydrolyzát. Tyto hydrolyzáty poté mají pro své získané vlastnosti využití v mnoha odvětvích průmyslu. Dosavadní využití je spatřováno především v potravinářství, zemědělství, lékařství či kosmetice. Avšak značného rozmachu v oblasti využití těchto hydrolyzátů spatřuje i obalový průmysl ve formě jedlých filmů. [35]

4.1 Využití keratinových hydrolyzátů v kosmetice

Obecně bílkovinné hydrolyzáty jsou využívaným efektivním regulátorem v procesech v péči o vlasy i pleť. [21, 36]

KH jsou v dnešní době využívány v kosmetickém průmyslu jako přídavné složky řasenek, šamponů, kondicionérů, odlakovačů aj. Svou nízkou molekulovou hmotností (menší než 500 Da) vytváří ideální formu pro kosmetické použití. [36]

Vlasová péče

V případě vlasů se KH dokáže vázat na strukturu vlákna a vyhlazuje jeho povrch s dočasným efektem zpevnění. Je to dáno možným rozpuštěním v alifatických alkoholech s následným vytvořením filmu nebo nátěru na vlas. Z tohoto důvodu je cílenou složkou v regeneračních maskách, lacích, ale i gelech pro zpevnění účesu. Používané množství v těchto preparátech je avšak 0,2 – 2 %. [36,37]

Dermální péče

U podpory pokožky z pohledu hydrolyzátů je prioritně upřednostňována kožní hydratace s dostatečnou elasticitou. Nedávné studie poukazují na možné doplnění hydrolyzátu mezi lipoidní látky pokožky, které jsou podstatné právě v přirozené hydrataci. Vše ale závisí přirozeně na molekulové hmotnosti, chemickém složení a schopnosti složek začleňovat se do pokožky s dostatečnou poskytující výživou. [38]

4.2 Využití keratinových hydrolyzátů v potravinářství

Keratin lze využívat i v potravinářském průmyslu ve formě ochranných folií na potraviny či jedlých povlaků. I přesto, že z využívaných proteinů v potravinářství je keratin nejlevnější, jeho zpracovatelská náročnost je nejznačnější. Oproti glutenu, nebo kaseinu má značně nižší mechanické vlastnosti. Naopak výhodou povlaků z něj vytvořených je vysoká odolnost proti relativní vlhkosti, proto se také dají využít jako ochranné obaly pro uchování svěžesti potravin. [6]

KH se také uplatňují v tzv. enkapsulaci, kde tvoří opět svrchní vrstvu mikrokapsule. V této částici se nachází aktivní látky ve formě ochucovadel, olejů, tuků, ale také vůní, či léčiv. Díky tomuto povlaku pak lze řídit uvolňování aktivní složky do cíleného místa v časovém rozmezí od několika minut až do řádu několika měsíců. [3]

4.3 Využití keratinových hydrolyzátů v zemědělství

KH se používají v zemědělství jako přídatná komponenta dusíkatých hnojiv, růstových stimulátorů, chelatačních činidel potřebných k odstranění kovů z půdy i krmných směsí pro zvířata. [20]

Potenciál KH v oblasti organických hnojiv vede k dosavadním intenzivním studiím (vztaženo na metabolismus rostlin). Jelikož odpadní produkty obsahují 75 – 80 % ve vodě rozpustných látek: peptidy, AMK, soli, barviva, lipidy a draselné ionty, zdá se pravděpodobné, že KH by mohl působit jako neškodné a hodnotné hnojivo v zemědělství. Avšak v současnosti průmysl vytváří organická hnojiva obsahující značné množství dusíku (odpady – 15 % N), které má dvojí účel a to zlepšení růstu se zintenzivněním mikrobiální aktivity půdy. Kvalita růstu je také dána možným pozvolným uvolňováním dusíku do půdy. [40-42]

V minulých letech byl keratin v podobě druhotných surovin průmyslu využíván jako krmná moučka pro zvířata. Docházelo zde ke strukturálním úpravám, jež jsou provedeny v polypeptidových a disulfidických vazbách ke zvýšení stravitelnosti. Tato moučka získaná z rozemletých živočišných odpadů (za vysokých teplot) sloužila jako zdroj proteinů v doplňku krmné směsi. Nyní je v zemích EU zakázána z důvodu některých chorob souvisejících s priony (BSE, Creutzfeldt - Jakobova choroba, aj.). [25, 42]

4.4 Využití keratinových hydrolyzátů v medicíně

V současnosti se stále více zkoumají vlastnosti KH pro následné uplatnění v lékařství či farmacii. Největší rozmach se však spatřuje v tkáňovém inženýrství v podobě buněčného lešení a filmů. Uplatňuje se také jako nosič léčebných látek. [43]

Mezi proteiny, které jsou zkoumány jako vhodné biomateriály (kolagen, albumin, fibroin), patří i keratin. Z dosavadních výsledků je patrná vhodnost tohoto proteinu díky biologické kompatibilitě, biologické rozložitelnosti, mechanické odolnosti a zisku suroviny z nevyužitých zdrojů. [44]

Jak bylo dříve zmíněno, keratiny jsou hlavním strukturálním proteinem všech typů epiteliálních buněk. Proto je výzkum soustředěn na možnou inovaci v problematice hojení ran. Žádoucím ukazatelem pro hojení mokvajících či nehojících se ran je možnost vytvořit obvaz, jež chrání poškozené tkáně, udržuje vhodné prostředí, je propustný pro vodu, snadně použitelný, netoxický a poskytuje účinné léčebné látky do rány. Tyto vlastnosti spatřuje Blanchard a kol., který vytvořil hydrogel získaného oxidací z lidských vlasů a zvířecí srsti. Hydrogel má skupiny sulfonové kyseliny, které jsou hydrofilní a tím dokáží vázat vodu do struktury. Počet skupin sulfonové kyseliny odpovídá stupni oxidace keratinu. Následně může být využit jako první fáze při léčbě popálenin. Uplatnění také směřuje k léčbě špatně se hojících bércových vředů u diabetických pacientů v podobě aplikace keratinového hydrogelu, popř. filmu z něj vytvořeného. Důvod této slibné aplikace je schopnost vytvořeného filmu se navázat na postiženou tkáň a vytvořit tak matrici pro následný růst buněk (buněčné lešení). Avšak do struktury hydrogelu lze aplikovat i antibakteriální přísady nebo růstové faktory ovlivňující následnou léčbu postižené tkáně. Zmíněné filmy lze také využívat jako difuzní membrány, implantabilní povlaky zařízení i buněčné zapouzdřovací látky. [45, 46]

5 CHARAKTERIZACE KERATINOVÝCH FILMŮ

V dnešní době dochází k značnému vývoji biologických filmů z proteinů, jež jsou dále využívány jako obalový materiál či komopozit. Tyto keratinové filmy získaly popularitu díky snadné dostupnosti suroviny, obnovitelných zdrojů přírody a biologické rozložitelnosti proteinů. Zhotovování těchto filmů bývá uskutečňováno nejčastěji fyzikálním (tepelným působením a ozařováním) nebo chemickým síťováním. Vzhledem k tomu, že se zabývám v praktické části diplomové práce výhradně problematikou tvorby keratinových filmů chemickým síťováním, teoretická část popisuje pouze tento způsob přípravy. [47]

Přírodní filmy bývají převážně tvořeny ze třech základních částí – proteinu, polysacharidu a lipidu. K tomuto složení bývají také přidávány další komponenty jako změkčovadla, jež napomáhají zvyšování houževnatosti filmu, nebo také antioxidanty či povrchově aktivní látky. [3, 48]

Samotná příprava keratinových filmů bývá mnohdy podrobena metodou odlévání vodných roztoků do připravené dutiny formy. Vodné roztoky obsahují keratinové hydrolyzáty spolu s vyššími alkoholy (sorbitol, glycerol) a vodou. Vysušený povlak lze poté sejmout jako kontinuální film. Avšak pro lepší mechanické a fyzikální vlastnosti je využívána metoda síťování, při níž se uplatňují síťovací činidla jako např. glutaraldehyd, formaldehyd, nebo glyoxal. Výsledné funkční vlastnosti keratinových filmů pak závisí nejen na přídavku změkčovadla, ale také na teplotě vytvrzování a času trvání tohoto procesu. [49]

5.1 Plastifikátory

Jak již bylo zmíněno v úvodu této kapitoly, proteinové vrstvy a také povlaky musí mít dostatečnou požadovanou pevnost a pružnost, aby se zabránilo jejich popraskání při manipulaci a skladování. Z tohoto uvedeného důvodu je nutné dodávat plastifikátory (o relativně nízké molekulové hmotnosti) do filmotvorného produktu pro zvýšení pružnosti a zjemnění struktury vytvořeného filmu. Obecnou vlastností těchto změkčovadel je jejich proniknutí do struktury polymerního řetězce, přičemž fyzikálně-chemicky se sdružují s polymerem a současně se rozšiřují a měkčí strukturu vznikajícího filmu. Mimo tyto kladné vlastnosti mají změkčovadla také negativní dopad na filmy a to především snižování bariérových vlastností pro plyny a vlhkost. Nejčastěji dodávané změkčovadla jsou sorbitol a glycerol. Mezi hydrofilní molekuly, jež jsou vyzkoušeny pro měkčící účinek je triethy-

lenglykol, polyethylenglykol a propylenglykol. Přidávané množství plastifikátorů do filmotvorných produktů činí 10 – 60 hm. %. [50]

5.2 Síťovadla

Metody chemického síťování využívají značné rozmanitosti dostupných síťovacích činidel, které se liší v chemické funkčnosti, reaktivitě a velikosti. Obecně, aby došlo k zesíťování proteinových filmů s následnou tvorbou sítě, musí reaktant (síťovadlo) obsahovat alespoň jednu reaktivní skupinu. Výhodou jsou však bifunkční síťovací činidla, které dokáží nést dvě reaktivní skupiny na cílové proteiny a to ve stejném nebo různém funkčním složení. Mezi tyto síťovadla patří nejpravděpodobněji glutaraldehyd. Kromě toho existují také multifunkční síťovací činidla, která mohou být využity pro spojení více než dvou funkčních skupin současně. Proteinové zesítění bi- a multifunkčními síťovadly vede k začlenění molekulárních distančních skupin o definované délce a složení mezi reakčními partnery. Naopak monofunkční síťovací činidla (např. formaldehyd) reagují také s reaktivní částí proteinu s výjimkou nefunkčnosti dalších částí. [51, 52]

Výhodnými reaktivními skupinami jsou vybrány skupiny ze sestávajících epoxidových, izokyanátových a karboxylových skupin. Však mezi nejvhodnější typy síťovacích činidel patří diepoxidy, diisokyanáty a dikarboxyláty včetně anhydridů a jejich hydrolyzovaných dikyselin. [52]

Jak již bylo zmíněno, nejhojnější AMK v lidských vlasech i zvířecí srsti je cystein, který se nachází ve formě cystinových skupin spojovaných disulfidickými můstky. Tato skupina může být převedena na síru obsahující zbytky, zejména pak na thiol. Tyto thioly mohou poté teoreticky interagovat s reaktivními konci síťovadla pomocí určených chemických technik. Kromě cysteinu se zde nachází i další AMK obsahující dusík nebo kyslík, které mohou být také užitečné v síťovacím procesu jako boční skupiny. Jedná se tak o Arg, Ser, Thr, Lys, Asp, Glu, Tyr, Trp a His. [52]

5.2.1 Aldehydy

Z dosud uvedené odborné literatury zabývající se síťovacím procesem keratinových filmů, je patrné, že prozatím dochází k slibnému síťování převážně aldehydy. A to především formaldehydem a glutaraldehydem.

Formaldehyd

Reakce formaldehydu s ovčí vlnou byla předmětem několika studií z důvodu schopnosti dobrého zavedení molekuly tohoto aldehydu do struktury vlny, jeho snadnému šíření a interakcí s patřičnými funkčními skupinami vlny. Mimo jiné zde hrál význam i cenové dostupnosti této suroviny. V uvedených studiích byla uvedena poměrně dobrá interakce formaldehydu s postranními řetězci keratinu – Arg, Lys, Tyr, Trp, His a Cys. Kromě toho, že formaldehyd dokáže tvořit methylenové sítě, také má sklon ke kondenzaci. Proto může tvořit také oxomethylenové zesítění. [53]

Glutaraldehyd

Největší potenciál síťovacích účinků z dosud studovaných aldehydů má glutaraldehyd. Mimo jiné našel také uplatnění díky dobré obchodní dostupnosti a nižší cenové relaci. Proto se v současnosti nejvíce uplatňuje v průmyslu. Nejvíce pak v textilním, kosmetickém průmyslu ale i v odvětví zdravotnictví. Tato látka vyráběná jako kapalina je dobře rozpustná ve vodě, alkoholu i organických rozpouštědlech. Dokáže dobře interagovat s aminokyselinami v okolí neutrálního prostředí, přičemž je účinnější než jiné aldehydy při tepelně a chemicky stabilních můstků. V případě keratinu dokáže glutaraldehyd interagovat s Lys za účinkem tvorby pevné trojrozměrné sítě. Nevýhodou tohoto aldehydu je jeho potenciální toxicita, jež odrazuje od dalšího zkoumání síťování proteinových filmů využitých pro kosmetický, potravinářský a zdravotnický průmysl. Proto dochází ke zkoumání dalších síťovadel, i když síťování nedosahuje takových výsledků jako v případě glutaraldehydu. [53, 54]

Dialdehyd škrobu (DAS)

Také dialdehyd škrobu byl posuzován jako možné síťovací činidlo keratinových filmů využívaných v biomedicíně. Podle studie Dou,Y. a kol., zabývající se vytvořením a charakterizací keratinových filmů založených na KH (z peří), DAS a glycerolu, byl účinek síťovadla slibnou alternativou glutaraldehydu. Testování vytvořených filmů bylo rozmanité. Zjišťovanými parametry byla mikrostruktura, krystalizace chování, propustnost světla a vlhkosti, rozpustnost, mechanické vlastnosti, ale také bariérové vlastnosti pro vodní páru a cytotoxicita filmů. Ze zjištěných dat byla patrná kompaktní mikrostruktura filmů, vysoká transparentnost (průhlednost < 2) přičemž filmy byly zcela amorfní. Konečné výsledky poukazovaly, že zvýšený přídavek DAS zvyšuje hodnotu transparentnosti a současně snižuje roz-

pustnost. Díky těmto vlastnostem a především odolnosti filmů KF proti vodě rozšiřuje dále upatnění nejen v biomedicíně, ale také v balení potravin. [55]

5.2.2 Enzymy

Transglutamináza

Jeden z enzymů odizolovaný z bakterií (rod. *Streptoverticillium mobaraense*), jež je zkoumán pro síťovací účinky filmů a gelů vytvořených z keratinových hydrolyzátů, se nazývá transglutamináza. Tento enzym nacházející se ve většině tkání a tělních tekutinách se podílejí na řadě biologických procesů, včetně hojení ran, srážlivosti krve, epidermální keratinizace apod. Průmyslově se používá především ke zlepšení textury a stabilitě potravinářských výrobků, avšak uplatnění je spatřováno také ve farmacii a výrobcích pro péči o spotřebitele. [56]

Síťovacím principem tohoto enzymu je transamidační reakce vyvolaná transglutaminázou. Enzym napomáhá interakci aminokyselin Glutaminu s Lysinem za tvorby pevných isopeptidových vazeb. Aktivita tohoto enzymu je dána řadou faktorů, včetně pH a teploty. Proto enzymová stabilizace je jedním z hlavních problémů v optimalizaci biokatalytických procesů tohoto enzymu. Vytvořené keratinové filmy lze přirozeně využít jako součást komerčních přípravků, ale také mohou poskytnout platformu pro aktivní látky, které dodávají aktuální ošetření na tkané i netkané vlněné tkaniny. [56, 57]

5.2.3 Činidla odvozená od organických kyselin

Diethylester kyseliny vinné (DET)

Síťovací účinky v případě esterů odvozených od organických kyselin nejsou dosud příliš známy. Nicméně jsou také zkoumány v síťovacích procesech, především pro jejich netoxické chování a tím vhodné využití v průmyslu tvořící produkty pro běžné užívání konzumenta (potraviny, kosmetika, léčiva).

Tento diethylester byl také zkoumán jako možný potenciální plastifikátor pro keratinový materiál. Studie probíhala v kanadské univerzitě pod vedením Ullaha, A.. Ze zjištěných dat bylo rozpoznáno, že DET působil vzhledem ke své velikosti relativně hůře než jiné typy změkčovadel. Naopak měl vliv na mechanické vlastnosti a pevnost daných keratinových

vzorků. Z těchto poznatků lze říci, že DET má v tomto případě stabilizační, či přímo síťovací účinky. [58]

V poslední době byly vyvinuty také činidla odvozená od organických kyselin – vinné, jablečné a citrónové. Tyto síťovadla obsahují substituované karboxylové skupiny organické kyseliny s aktivními estery, jež interagují s biopolymerem. Tyto činidla byla prozatím testována v kombinaci s želatinou, jež by mohla být v budoucnu využita v klinické praxi. Nyní želatina pro klinickou aplikaci není zcela použitelná, z důvodu želatinových roztoků, jež mají sol-gel přechodový bod okolo lidské tělesné teploty. Různé chemické síťovadla jako je glutaraldehyd, epoxy sloučeniny ani karbodiimid, které byly použity k překonání tohoto problému, nejsou zcela vhodné kvůli jejich cytotoxicitě a možným chronickým zánětům v těle. Proto jako možná alternativa jsou určena činidla odvozená od organických kyselin, které podle dosavadního testování vykazují vhodné vlastnosti. [59]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

STANOVENÍ CÍLŮ PRÁCE

Hlavní myšlenkou výzkumného problému bylo vytvoření filmu se zvoleným přídavkem síťovadla diethylesteru kyseliny vinné a změkčovadla. Následně se u vytvořených filmů zjišťovali jejich užitné vlastnosti s případným využitím v praxi.

Na základě tohoto námětu byly v praktické části diplomové práce vytyčeny čtyři hlavní cíle:

První cíl – příprava keratinového hydrolyzátu metodou dvoustupňové alkalicko-enzymové hydrolýzy ze získané vstupní suroviny – odpadní ovčí vlna typu Merino, přičemž tento získaný hydrolyzát byl následně podroben dialyzačnímu procesu napomáhajícímu k dostatečné minimalizaci zbylých anorganických podílů v získaném hydrolyzátu.

Druhý cíl – vymezení tvorby keratinových filmů ze získaného keratinového hydrolyzátu spolu s různým procentuálním přídavkem síťovadla (diethylester kyseliny vinné) a také plastifikátoru (glycerolu).

Třetí cíl – vytvoření filmů, vstupní suroviny a také samotného keratinového hydrolyzátu. Pro toto testování byly zvoleny jak analytické, tak instrumentální metody.

Závěrečným cílem praktické části bylo shrnutí a zhodnocení vlivu zvoleného síťovadla a plastifikátoru na výsledné vlastnosti keratinových filmů.

6 POUŽITÉ MATERIÁLY A METODY STANOVENÍ

V této kapitole jsou popsány materiály, jež byly použity při rozkladných reakcích vlny, k tvorbě keratinových filmů a také chemikálie využité pro analytické hodnocení daných surovin. Pro vyhodnocování vlastností surové vlny, jejího nerozloženého podílu po rozkladné reakci, keratinových hydrolyzátů a filmů z nich vytvořených byly využity dvě oblasti stanovení. První z nich je analytické stanovení, jež napomáhá diagnostikovat přítomnost anorganických podílů ve vzorcích, tuk a také rozpustnost vytvořených filmů. Druhou oblastí jsou pak přístrojové metody, u nichž byly vybrány – diferenciální skenovací kalorimetrie, termogravimetrická analýza a také infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací.

6.1 Použité materiály

6.1.1 Vstupní surovina - vlna

Jako vstupní surovina byla použita surová vlna typu Merino od soukromého chovatele z Obce Nevšová. Tento materiál prošel značným množstvím úprav, o nichž je zmíněno v následujících částech této diplomové práce. Mechanicky očištěná surová vlna, která se dále využívala pro tvorbu keratinových hydrolyzátů, byla podrobena analytickému i instrumentálnímu testování. Postupy analytických zkoušek jsou uvedeny v níže popsané kapitole. Stanovené analytické hodnoty pro vstupní surovinu lze spatřit v tabulce č. 2.

Tab. 2 Zanalyzované hodnoty zjišťovaných elementů u vstupního materiálu

Stanovovaná jednotka	**Dusík**	**Síra**	**Popelovina**	**Tuk**
Obsah [%]	14,32	0,16	0,77	7,97
Směrodatná odchylka [%]	0,23	-	0,12	-

6.1.2 Použité enzymy

Níže zmíněné enzymy využité pro rozkladnou reakci vlny a také odtučnění byly získány od firmy Novozymes sídlící v Dánsku.

Lipex 100T

Označení Lipex 100T získal hydrolytický enzym lipáza, který je odizolován z bakterií kmene *Aspergillus*. Tento enzym lze tedy vyžít jako biokatalyzátor pro hydrolýzu olejů za vzniku mastných kyselin a glycerolu, které lze následně zcela rozpustit.

Savinase 6.0T

Savináza je zástupcem skupiny subtilisinu (serinové proteázy), jež bývá vylučována alkalofilní bakteriií *Bacillus lentus*. Vymezuje se vysokou stabilitou v rozmezí pH 7-12. Savináza patří mezi typické endo-proteázy, jež dokáží štěpit určitou aminokyselinu (v tomto případě serin) přímo uvnitř bílkovinného řetězce. Využití má proto jak v potravinářských, tak i v průmyslových odvětvích.

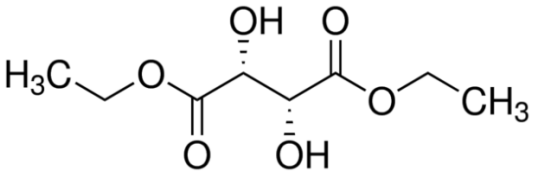
Esperase 6.0T

Tak jako v případě Savinázy i tento enzym je tvořen alkalofilní bakteriií *Bacillus lentus*. Proto má velmi podobné vlastnosti jako v předešlém případě. Vyznačuje se opět vysokou stabilitou při značných teplotách i hodnotách pH. Z tohoto důvodu ho lze v praxi využít na robustní čištění při vysokých teplotách a značné zásaditosti.

6.1.3 Použité síťovadlo

Zvolená látka použitá pro síťovací proces keratinového filmu byl diethylester kyseliny vinné (DET; Sigma-Aldrich, Francie). V následující tabulce č. 3 lze shlédnout její základní charakteristiku.

Tab. 3 Uvedené charakteristiky DET dle výrobce

Diethylester kyseliny vinné	
Sumární vzorec	$C_8H_{14}O_6$
Strukturní vzorec	
Molekulová hmotnost	206,19 g/mol
Bod varu	280 °C
Bod vzplanutí	93 °C
Synonymum	(+)-Diethyl L-tartrate, L-(+)-Tartaric acid diethyl ester

6.2 Analytické hodnocení

6.2.1 Mikrochemické stanovení dusíku – Micro-Kjeldahova metoda AOAC 960.52

Vstupní materiál o hmotnosti 0,2 g byl navážen pomocí analytických vah KERN 770 (Německo) s přesností měření 0,0001 g. Tento materiál byl spolu s 5,6 ml H_2SO_4 (Lukeš, ČR), 20 ml 0,02 M HCl (Lukeš, ČR) a tabletou katalyzátoru (Thomson & Capper, Velká Británie) převeden do mineralizační baňky. Takto připravená směs následně podléhala procesu mineralizace při teplotě 480 °C 1,5 h. Po úplném vyčeření došlo k ochlazení mineralizační baňky, do níž bylo následně převedeno malé množství vody z důvodu rozpuštění pevných částic vytvořených po chladící době. Vytvořený roztok byl převeden do 50 ml odměrné baňky doplněnou zbylým objemem vody.

Přichystaný roztok byl podroben destilaci. Do destilační baňky Parnas-Wagnerova aparatury bylo odpipetováno 25 ml vzorku s 20 ml $Na_2S_2O_3$. 5 H_2O + NaOH. Do titrační baňky byla odměřena 2% kyselina boritá (Lukeš, ČR) o objemu 15 ml s následným umístěním pod chladič. Destilace probíhala vždy 20 minut od doby bodu varu vody. Po ukončení

destilace proběhla titrace pomocí roztoku 0,02 M HCl. Tento postup stanovení byl vždy hodnocen u každého vzorku 2x.

Výpočet pro stanovení obsahu dusíku ve vzorku:

$$N = \frac{V.c.14{,}007.100.2}{m.10^{-3}}[\%] \quad (1)$$

Kde:

- N – obsah dusíku v analyzovaném vzorku [%],
- V – objem spotřeby HCl při titraci [ml],
- c – koncentrace HCl [c_{HCl} = 0,02 M],
- m – hmotnost navážky vzorku [g].

6.2.2 Stanovení obsahu síry srážením roztokem chloridu barnatého AOAC 955.48

Do Kjeldahovy baňky byl odvážen 1 g vzorku s přidáním 50 ml konc. HNO_3 (Lukeš, ČR). Tato směs se nechala provařovat nad kahanem po dobu 2 hodin, přičemž co 15 minut bylo přidáno 3 ml H_2O_2 (Lukeš, ČR). Po zmineralizování byl vzorek ochlazen, přelit do 200 ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku. Takto vytvořený roztok se přefiltroval přes střední filtr KA2 (Filpap, ČR), přičemž byl zahříván k teplotě varu za současného přidávání 120 ml horkého roztoku 10 % $BaCl_2$ (Lachema, ČR). Po hodinovém provařování se směs nechala odležet v digestoři 24 hodin.

Vzniklá sraženina se nejprve samovolně přefiltrovala přes hustý filtrační papír, kde poté byla promývána horkou destilovanou vodou, dokud nebyly odstraněny veškeré chloridy. Přítomnost chloridů byla zjišťována pomocí přídavku $AgNO_3$ (Lukeš, ČR). Poté se filtrační papír spolu se sraženinou vysoušel při teplotě 103 °C. Vysušený vzorek byl následně podroben procesu zpopelnění s následným žíháním v muflové peci Labotherm L9/11/S27 (Nabertherm, Německo) po dobu 2 hodin při teplotě 800 °C.

Výpočet pro stanovení obsahu síry ve vzorku:

1. Množství síranů v %:

$$c_{(SO_4^{2-})} = \frac{m.0{,}412.100}{n}[\%] \quad (2)$$

Kde:

- m – hmotnost sraženiny $BaSO_4$ [g],
- n – navážka vzorku na stanovení [g],
- 0,412 – přepočítávací faktor (z $BaSO_4$ na SO_4^{2-}) [-].

2. Množství síry v %:

$$c_{(S)} = \frac{M_{(S)}}{M_{(SO_4^{2-})}} . c_{(SO_4^{2-})} [\%] \tag{3}$$

Kde:

- $M_{(S)}$ – molární hmotnost síry [M = 32,06 g/mol],
- $M_{(SO_4^{2-})}$ – molární hmotnost síranů [M = 96,056 g/mol].

6.2.3 Stanovení obsahu tuku

Pro stanovení obsahu tuku ve vlně byl využit Soxhletův extrakční přístroj. Před začátkem měření byla na analytických vahách (přesnost 0,0001 g) odvážena vlna do extrakční patrony o hmotnosti 2 g. Do předem zvážené extrakční baňky (s několika skleněnými kuličkami) bylo vlito 100 ml Petroléter-Etanolu (poměr 1:1, Lukeš, ČR). Takto připravená baňka byla vložena do topného hnízda LTHS „250“ (Brněnská drutěva, ČR). Extrakční patrona byla následovně uzavřena vatou a vložena do extraktoru. Extrakce probíhala po dobu 8 hodin od doby varu zvoleného rozpouštědla. Po této stanovené době extrakce došlo k oddestilování většiny rozpouštědla do zásobního prostoru. Po destilaci byla extrakční baňka s vyextrahovanými látkami a zbylým množstvím rozpouštědla umístěna do sušárny (Memmert ULP 400, Německo) při teplotě 80±2 °C. V posledním kroku byla extrakční baňka vložena do exsikátoru a poté zvážena. Obsah tuku byl stanoven pomocí následujícího vzorce:

$$EA = \frac{(m_2 - m_1)}{n} 100 [\%] \tag{4}$$

Kde:

- m_1 – hmotnost extrakční baňky [g],
- m_2 – hmotnost extrakční baňky s extraktem [g],
- n – navážka vzorku [g].

6.2.4 Stanovení obsahu popelovin

Pro stanovení přítomnosti anorganického podílu, vyskytující se v keratinovém hydrolyzátu i po dialyzačním procesu, probíhalo testování na obsah popelovin. Pomocí analytických vah (přesnost 0,0001 g) byla změřena hmotnost suchých předem vyžíhaných žáruvzdorných kelímků. Do těchto kelímků bylo odváženo 0,5 g vzorku. Tato navážka byla spálena nad kahanem v přítomnosti kyslíku, přičemž vzniklá popelovina se nechala dále žíhat přibližně 30 minut. Kelímek se spáleným vzorkem byl následně vložen do muflové pece a žíhán při teplotě 600 °C po dobu 2 hodin. V posledním kroku došlo k ochlazení vzorku v exsikátoru a stanovení celkového obsahu popelovin:

$$P = \frac{m_P}{n}.100[\%] \tag{5}$$

Kde:

- m_P – hmotnost popela [g],
- n – navážka vzorku [g].

6.2.5 Stanovení rozpustnosti

Do předem zvážených váženek bylo odváženo malé množství vzorku z keratinových filmů. Tyto vzorky byly následně zality 30 ml destilované vody a vloženy do sušárny při udržované teplotě 30 °C. Doba rozpouštění byla zvolena na 3 až 25 minut. Po stanovené době došlo k slití přebytečné vody a vzorek se nechal dosušit do konstantní hmotnosti.

6.3 Požité instrumentální metody

6.3.1 Termogravimetrická analýza (TGA)

Termogravimetrická analýza (TGA) se řadí mezi základní metody termické (materiálové) analýzy. Jedná se o experimentální metodu zkoumající změnu hmotnosti vzorku při jeho termickém ohřevu (popř. chlazení) převážně probíhající konstantní rychlostí, vše pod dohledem teplotního programu. Tento druh analýzy lze rozdělovat podle způsobu ohřevu vzorku na statický (působení konstantní teploty) a dynamický (řízené změny teplot). Výsledkem tohoto měření je pak termogravimetrická křivka znázorňující závislost hmotnosti na teplotě nebo čase. Z této křivky lze poté získat informace o rozkladu vzorku, jeho stabilitě, popř. údaje o nespalitelných anorganických částí vznikajících z tohoto procesu. Od této metody se dále odvozuje derivační termogravimetrie (DTG), přičemž výsledná křivka poukazuje na rychlost hmotnostní změny v závislosti na teplotě. Termogravimetrickou analýzu lze tak využít jak pro kvalitativní (identifikace děje) tak i kvantitativní hodnocení (odečtení velikosti daných změn) vzorku. Tuto metodu lze tak využít nejen v klasických vědních oborech (analytická, anorganická chemie, biochemie aj.), ale také v oblasti polymerů a farmakologie. [60, 61]

Ve výzkumné části této diplomové práce byly naměřeny termogravimetrické křivky u surové vlny, nerozloženého podílu vlny, hydrolyzátu a vytvořených filmů obsahujících různé množství přidaného síťovadla. Vzorek o hmotnosti 10 – 15 mg byl vystaven tepelnému působení v rozmezí 25 až 800 °C při rychlosti ohřevu 20 °C/min. Toto měření probíhalo za přísunu inertního plynu (helium). Při dosažení 800 °C byla přepnuta atmosféra z helia na vzduch, jež napomohl k oxidaci zbylých částí daného vzorku a tím naměření přítomnosti popelovin přítomných ve vzorku. Stanovená rychlost průtoku plynu helia činila 100 ml/min a poté vzduch 100 ml/min. Získané výsledky lze nalézt v kapitole 8 Zhodnocení výsledků. Veškeré testování probíhalo pomocí termogravimetru TGA Q 50 (TA Instruments, USA).

6.3.2 Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC)

Tato metoda byla vytvořena na základě poznatků termické analýzy (DTA). Principem DSC je udržení shodné teploty studovaného a referenčního vzorku, které jsou lineárně souběžně zahřívány. Proto, aby bylo dosaženo nulového teplotního rozdílu, je důležité dodávat energii do vzorku (endotermní děj), popř. do referenční látky (exotermní děj). Toto měření se uskutečňuje pomocí dvou typů DSC přístrojů – DSC s kompenzací příkonu a DSC s tepelným tokem. V našem případě bylo využito druhého typu tohoto přístroje (DSC 1 Star Systém, Mettler Toledo, CHE), který se vyznačuje společnou kalorimetrickou celou, do níž je umístěna reference a měřený vzorek. Oba tyto vzorky jsou usazeny na samostatných teplotních čidlech. Zkoumaný materiál je navíc uložen v kovové nebo keramické misce (tzv. pánvičce). Tyto vodivé materiály jako kov, či keramika jsou upřednostňovány z důvodu dokonalého kontaktu s topným tělískem a teplotními čidly. Dle stanovených typů vzorků bývá volena ohřívací rychlost (nejčastěji 10 °C.min^{-1}) a také teplota v rozmezích teplot (-150 °C až 1500 °C). Organické látky (především tak ve farmaceutickém průmyslu) se standardně měří do laboratorních teplot 300 °C. [62]

Z důvodu toho, aby nedocházelo k nežádoucím reakcím vzorku s okolním ovzduším při měření, bylo využito dusíkové atmosféry o rychlosti průtoku 20 ml/min. V našem případě rychlost ohřevu činila 10 °C/min s rozsahem teplot 25 – 300 °C. Výstupem tohoto měření jsou DSC snímky opět ze vstupní suroviny, keratinového hydrolyzátu a filmů z něj vytvořených (viz kapitola 8).

6.3.3 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR)

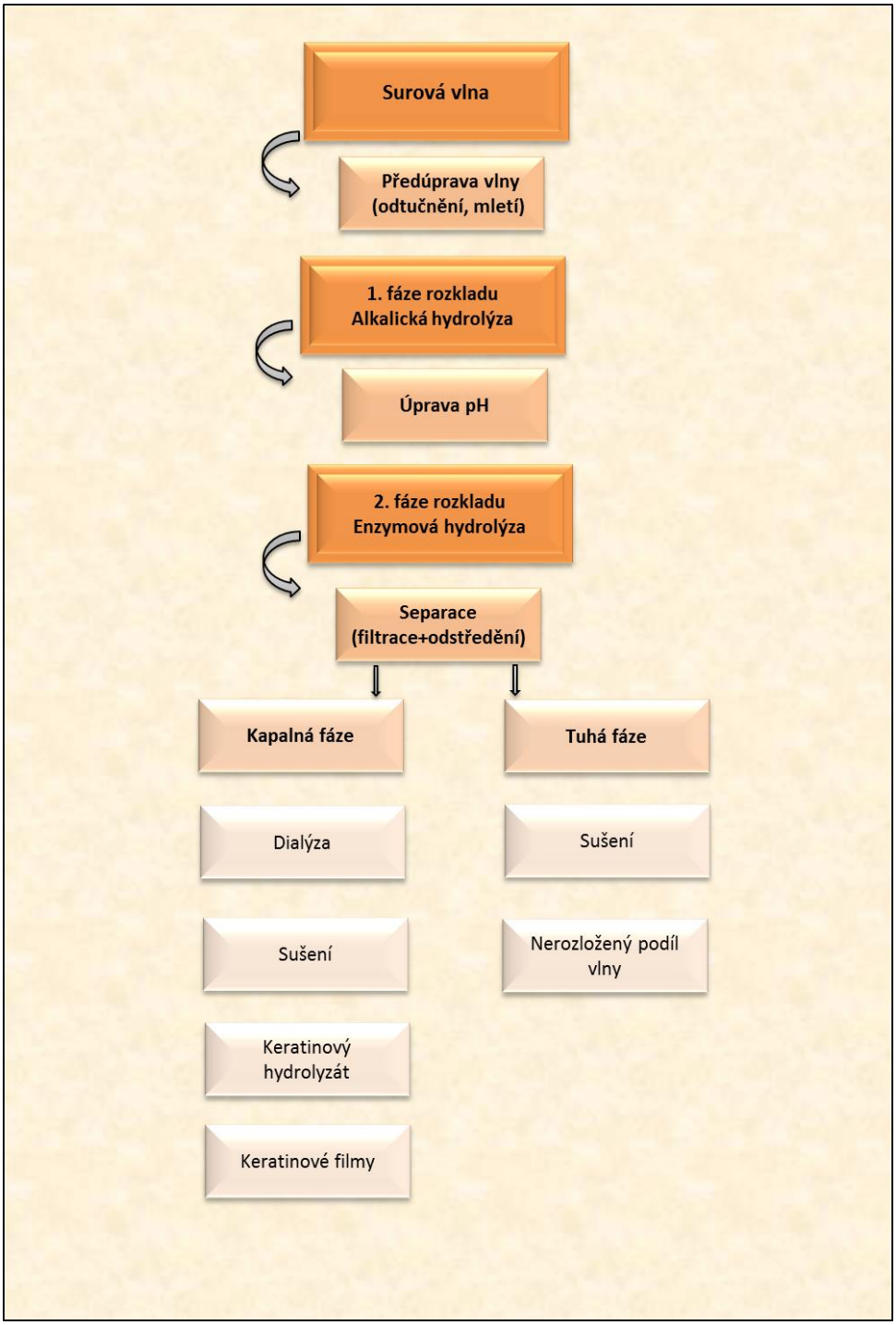
Infračervená spektroskopie je nedestruktivní analytická metoda, při níž není zkoumaný vzorek nijak poškozen a přitom poskytuje dostatečné informace o svém složení (identifikace a charakterizace organických i anorganických látek). Výsledné hodnoty jsou dány získanými vibračními energiemi souvisejícími se stabilitou chemických vazeb a molekulovou strukturou. Tedy podstatou této metody je interakce dopadajícího paprsku v infračervené oblasti se zkoumaným vzorkem. Infračerveným zářením se rozumí elektromagnetické záření v rozsahu vlnočtů 12 500 až 20 cm^{-1} a současně vlnových délek 800 nm až 0,5 mm. Analytickým výstupem se poté stává infračervené spektrum. Jelikož dochází u běžných spektrometrů s mřížkovým monochromátorem k nepřesnostem měření a nízké citlivosti, došlo k využití přístrojů s Fourierovou transformací. Tyto přístroje dokáží měřit

interferogram modulovaného svazku záření po průchodu paprsku vzorkem. Výhodou je pak dopad celého svazku záření na detektor, což umožňuje měřit experimenty se silnou absorpcí paprsku. Tyto stroje umožňují měřit kromě pevných vzorků také kapaliny a plyny, což bylo využito i v případě diplomové práce.

Měření probíhalo u veškerých vzorků keratinových filmů, keratinových hydrolyzátů a také vstupního síťovadla nacházející se v kapalné fázi. Měření probíhalo pomocí spektrofotometru typu Avatar FT-IR 320 (Nicolet, ČR) při zvolených vlnočtech 4000 – 400 cm^{-1} a počtu scanů 32. [63]

7 PŘÍPRAVA KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ A TVORBA FILMŮ

Pro počáteční představivost rozkladu ovčí vlny s následným vznikem keratinového hydrolyzátu bylo vytvořeno toto výchozí schéma:



Obr. 5 Postup alkalicko-enzymové hydrolýzy se vznikem keratinového hydrolyzátu

Odpadní vlna nejprve prošla mechanickou očistou ve vlažné vodě pro odstranění hrubých nečistot. Jako látka minimalizující mastnotu ve vlně byl využit saponát, jež po dostatečném působení musel být odstraněn opět vypíráním vlny ve vodě.

Po vyčištění vlny nastala fáze odtučňování. Očištěná vlna byla smísena s destilovanou vodou v poměru 1:50. Takto přichystané vlně bylo upraveno pH na hodnotu 8±0,1 pomocí 5 M NaOH. Úprava pH proběhla za přítomnosti pHmetru WTW pH 526 (Německo). K odtučnění vlny byl použit enzym Lipex 100T v 1% přídavku vztahující se na hmotnost odtučňované vlny. Zvolené parametry pro správné odtučnění: 1) teplota 40±2 °C, 2) čas 24 hodin. V průběhu tohoto procesu docházelo k občasnému promíchávání směsi. Po tomto ději došlo k opakovanému promytí vodou a sušení v horkovzdušné sušárně při teplotě 103±2 °C.

Takto upravená vlna byla v posledním kroku pomleta na nožovém mlýně Pulverisette 19 (FRITSCH, Německo) s velikostí ok síta 1 mm.

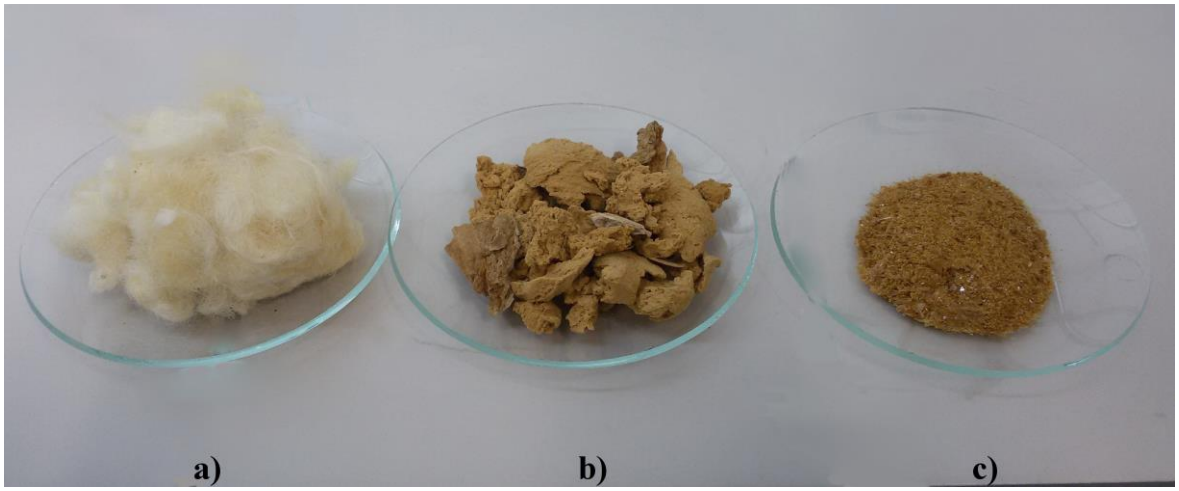
7.1 Rozkladný proces ovčí vlny

Upravená vlna prošla procesem dvoustupňové alkalicko-enzymové hydrolýzy. V prvním stupni hydrolýzy došlo k smísení vlny s alkálií $Ca(OH)_2$ (Lukeš, ČR) a destilovanou vodou tak aby vznikl 0,6% roztok. Takto připravená směs byla následně podrobena 48 hodinám hydrolýzy (při teplotě 80±2 °C), přičemž v prvních šesti hodinách docházelo k intenzivnímu promíchávání směsi, pomocí pračky Romo (ČR). Ve zbylém čase se vzorek nechal inkubovat bez možnosti míchání při totožně zvolené teplotě.

Před započetím druhého stupně hydrolýzy došlo k snížení teploty směsi na 60 °C a také k úpravě pH pomocí 5 M roztoku NaOH na hodnotu 9±0,1. Bezprostředně po úpravě kyselosti směsi byl přidán enzym Esperasa 6.0T v 5% přídavku na navážku rozkládané vlny. Tak jako v případě alkalické hydrolýzy došlo k promíchávání směsi po dobu 6 hodin s kratší dobou inkubace 18 hodin. Teplota směsi byla udržována na 60 °C. Po zvoleném čase rozkladné reakce došlo k inaktivaci enzymu zahřátím kapalné fáze na 90 °C po dobu 10 minut.

7.2 Separace a čištění

Odseparování keratinového hydrolyzátu od nerozloženého podílu vlny bylo realizováno nejdříve pomocí filtrace přes 16 vrstev polyamidové tkaniny o velikosti ok 150 μm. Tuhý podíl byl následně sušen po dobu 24 hodin při teplotě 90±2 °C (po vyjmutí ze sušárny ochlazen a zvážen). Z důvodu značného množství nerozložených mikročástic vlny ve filtrátu prošlé přes tkaninu, bylo zapotřebí odstřeďovat filtrát pomocí přístroje Universal 32 (Hettich Universal, Německo) při rychlosti otáčení 4000 ot/min po dobu 10 minut. Pro úplnou čistotu získaného keratinového hydrolyzátu a snížení přítomného množství anorganických podílů vlny byla provedena dialýza, která probíhala na principu propouštění analyticky disperzních látek přes celulózovou semipermeabilní membránu s propustností částic menších než 12 kDa (Sigma-Aldrich, USA). Tato membrána byla naplněna vždy 500 ml hydrolyzátu, sevřena na obou koncích svorkami a poté vložena do 5 l destilované vody. Během tohoto procesu docházelo k výměně obsahu vody vždy po dvou dnech. Celková doba dialýzy činila 7 dnů. Takto získaný kapalný keratinový hydrolyzát byl následně nalit na plech a sušen při teplotě 60±2 °C po dobu 24 hodin.



Obr. 6 Vstupní surovina (a) a produkty alkalicko-enzymové hydrolýzy – nerozložený podíl vlny (b) a keratinový hydrolyzát (c)

V průběhu provádění praktické části diplomové práce byl zkoumán také další vytvořený keratinový hydrolyzát získaný z předešlých výzkumných studií na UTB ve Zlíně. Výroba tohoto hydrolyzátu byla obdobná, avšak jsou zde patrné menší odlišnosti. Především pak u použitých chemikálií (pro úpravu pH) a enzymu využitého na rozklad vstupní suroviny. Postup přípravy je uveden níže:

1. **Fáze (alkalická hydrolýza)**

Před počátkem této hydrolýzy došlo k smísení surového materiálu s 0,6 % roztokem KOH. Připravená směs byla následně vyhřáta na 90±2 °C, přičemž se udržovala v této teplotě 48 hodin. Opět v prvních 6 hodinách docházelo k občasnému promíchávání směsi.

2. **Fáze (enzymová hydrolýza)**

Po ukončení první fáze byla provedena úprava pH směsi na hodnotu 9±0,1 přidáním koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Na navážku biologického materiálu byl do směsi přidán 5% přídavek enzymu Savinase 6.0T. Bezprostředně po přidání enzymu došlo k vyhřátí směsi na 60 °C a na této termické hodnotě byla udržována opět 24 hodin s opětovným mícháním v prvních 6 hodinách.

3. **Fáze**

V této poslední fázi byla směs zahřáta na 95±2 °C po dobu 10 min., tak aby došlo k úplné deaktivaci enzymu. Jako v předešlém případě i zde byla směs filtrována na bavlněné tkanině (o různé propustnosti). Zachycený nerozložený podíl výstupního materiálu byl vysušen v komorové sušárně při teplotě 80±2 °C za přítomnosti vakua. Posléze došlo k zvážení tohoto podílu pro vyhodnocení účinnosti alkalicko-enzymové hydrolýzy. Vytěžený keratinový hydrolyzát se zahustil a následně vysušil na nerezovém plechu v komorové sušárně při teplotě 80±2 °C. V posledním kroku byl vysušený keratinový hydrolyzát rozdrcen na jemný prášek (v třecí misce).

7.3 Tvorba keratinových filmů

Keratinové filmy byly tvořeny ze získaných keratinových hydrolyzátů spolu s dalšími přídatnými látkami. Vždy docházelo k smísení změkčovadla glycerolu (Lukeš, ČR), síťovadla diethylesteru kyseliny vinné (DET; Sigma-Aldrich, Francie), destilované vody a KH v jednotlivých hmotnostních poměrech (viz tabulka č. 4). Větší zastoupení změkčovadla bylo zvoleno u filmů Esperase 6.0T z důvodu jejich značné křehkosti v nižších přídavcích a tím nemožnosti testování. Směs byla důsledně promíchána pomocí magnetické míchačky IKa – RTC Basic (Německo) a poté přelita do přichystaných silikonových forem o rozměru 12,5 cm x 7 cm x 0,3 cm. Sušení těchto filmů trvalo 24 hodin při teplotě 60±2 °C. Vysušené vzorky poté byly podrobovány zmiňovaným zkouškám.

Tab. 4 Vytvořené filmy v s procentuálním přídavkem DET a glycerolu

Typ	**KH Esperase 6.0T**		**KH Savinase 6.0T**	
přídavky	**DET [%]**	**Glycerol [%]**	**DET [%]**	**Glycerol [%]**
1. Film	0	40	0	40
2. Film	10	40	10	40
3. Film	15	60	15	40
4. Film	20	60	20	40

8 ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

8.1 Účinnost alkalicko-enzymové hydrolýzy

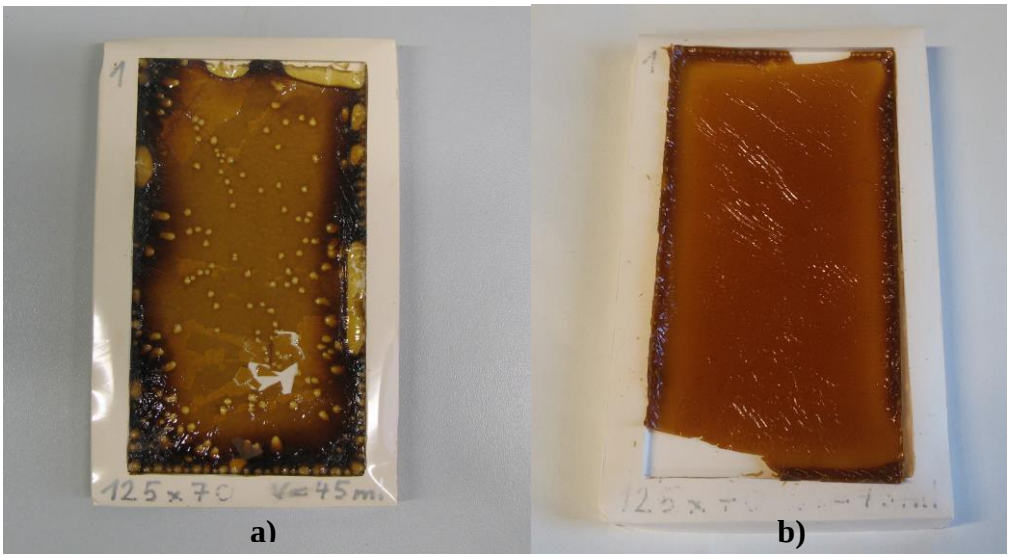
Dle předlohy rozkladného procesu vlny v kapitole 7.2 byl zvážen nerozložený podíl a poté spočtena účinnost uvedené hydrolýzy. Původní navážka předem upravené vlny činila 800 g. Po rozkladném ději byla hodnota nerozloženého podílu vlny 230 g. Zbylé množství přešlo na keratinový hydrolyzát. Z těchto hmotností lze tedy určit účinnost hydrolýzy na 71,25 %.

Hmotnost získaného keratinového hydrolyzátu (vysušený) po dialýze připravovaný enzymem Esperase 6.0T činila 74,59 g. Tento produkt byl po vizuální stránce hnědo-zlatý, s nepatrným štiplavým zápachem.

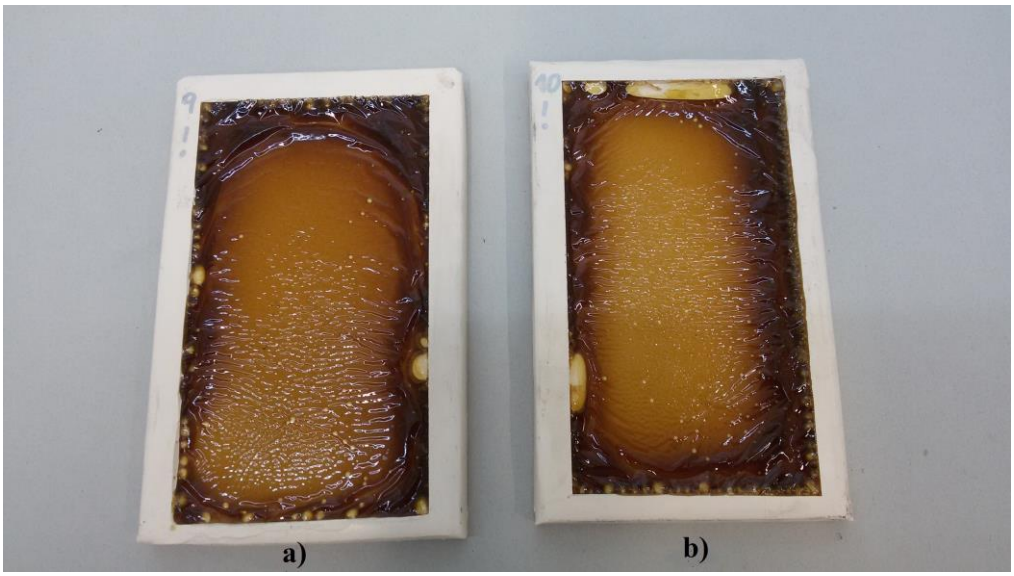
8.2 Zhodnocení zesíťovaných keratinových filmů

Zesíťované filmy s přídavkem DET, uvedené v kapitole 7.3, i filmy tvořené bez síťovadla měly rozměry 12,5 cm x 7 cm. Tloušťka filmu se pohybovala v rozmezí 0,08 - 0,1 cm. Po optickém zhodnocení byly veškeré filmy zlatavě hnědé (přirozeně díky barvě KH). Avšak filmy vytvořené z KH Esperase 6.0T měly světlejší zabarvení se zvýšenou transparentností oproti KH Savinase 6.0T. Přesto rovnoměrná hladkost filmů byla pravidelnější u KH Savinase 6.0T (viz obrázek 8).

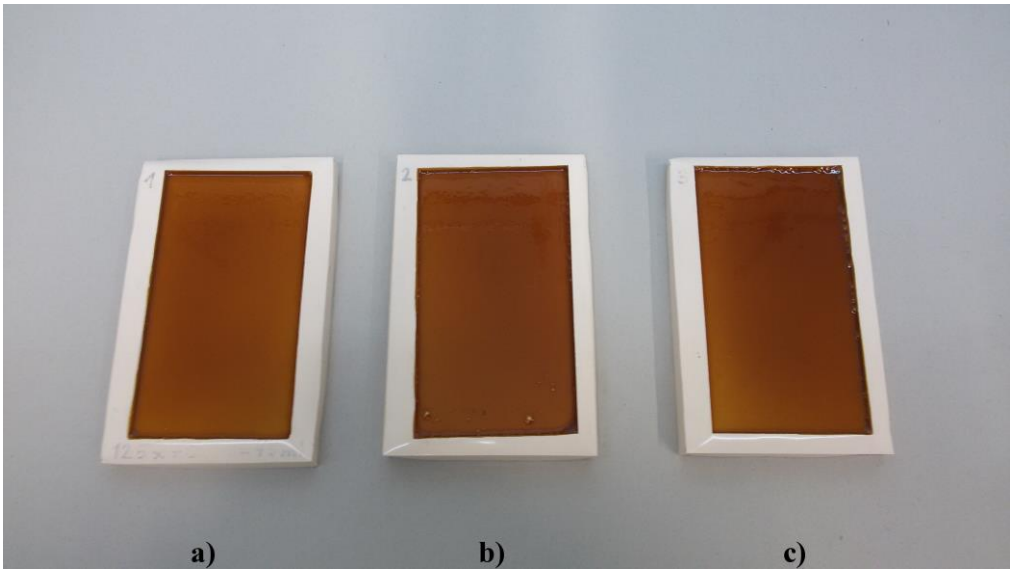
Folie, jež obsahovaly vyšší množství glycerolu než 60 %, byly vysoce lepivé, a tudíž nešly volně vyjmout z forem. Tento úkaz znemožnil další práci s těmito filmy. Také byl zkoušen přídavek 30 % plastifikátoru, avšak toto množství vedlo k značné křehkosti vzorku a tudíž nemožnosti manipulace. Proto byl zvolen přídavek glycerolu 40 – 60 %. Správné provedení síťovaných folií vedlo k jejich dostatečné ohebnosti bez možnosti rozlomení. Tento jev splňovaly spíše folie KH Savinase 6.0T oproti KH Esperase 6.0T. Je to dáno nejen zvoleným plastifikátorem, ale také síťovacím činidlem se kterým KH interaguje. V případě síťovaných filmů docházelo po delší době k částečné lepivosti povrchu. U KH Savinase 6.0T obsahující 40 % plastifikátoru byla tato lepivost značnější po delší době manipulace a při vyšších teplotách.



Obr. 7 Vytvořené filmy: a) KH Esperase 6.0T, b) KH Savinase 6.0T



Obr. 8 Vytvořené filmy z KH Esperase 6.0T v procentuálním přídavku: a)15 %, b) 20 % DET



Obr. 9 Vytvořené filmy z KH Savinase 6.0T v procentuálním přídavku:

a) 10 %, b) 15 %, c) 20 % DET

8.3 Výsledky u zvolených analytických metod

Zhodnocení výsledků analytické části proběhl u vstupní suroviny, nerozloženého podílu vlny, keratinových hydrolyzátů a u filmů z nich vytvořených. Jednotlivé výsledky jsou individuálně posouzeny v následujících kapitolách.

8.3.1 Výsledky stanovení obsahu dusíku Micro-Kjeldahovou metodou

Stanovení obsahu dusíku poukazující na přítomnost proteinu ve vybrané surovině bylo provedeno u surové vlny, výstupů alkalicko-enzymové hydrolýzy a veškerých vytvořených filmů ze získaných hydrolyzátů. Testování u zmiňovaných vzorků proběhlo vždy dvakrát, u nichž je vždy uvedena směrodatná odchylka. Výsledky tohoto stanovení jsou představovány v následujících tabulkách.

Tab. 5 Výsledné hodnoty obsahu dusíku surové vlny a výstupů uvedené hydrolýzy

Surovina	Surová vlna	Nerozložený podíl	KH Esperase 6.0T	KH Savinase 6.0T
Stanovení N [%]	14,32	10,72	14,17	10,72
Směrodatná odchylka	0,24	2,19	1,82	0,10

Tab. 6 Výsledné hodnoty obsahu dusíku u vytvořených filmů

Přídavek síťovadla [%]	KH Esperase 6.0T	směrodatná odchylka	KH Savinase 6.0T	směrodatná odchylka
0	8,91	1,31	8,30	0,04
10	8,26	0,39	8,46	0,04
15	7,76	0,16	8,03	0,02
20	8,35	0,08	7,56	0,12

Jak lze vidět v tabulce č. 5 vstupní surovina (ovčí vlna) obsahovala 14,32 % dusíku, což odpovídá průměrným hodnotám v proteinech. Keratinový hydrolyzát, který byl připravován z této vlny, obsahoval nepatrně nižší množství 14,17 %. V porovnání s tabulkou č. 6 je patrné, že konečné hodnoty u filmů obsahují nižší podíl dusíku a to průměrně 8 % ve srovnání s oběma typy KH. Tento pokles je dán přídavkem plastifikátoru a síťovadla.

8.3.2 Výsledky stanovení obsahu síry srážením roztokem chloridu barnatého

Stanovení obsahu síry bylo provedeno u všech surovin s výjimkou zesíťovaných keratinových filmů. Výsledné hodnoty v tabulce č. 7 poukazují na snížení množství síry u keratinového hydrolyzátu Esperase 6.0T oproti hodnotě vztahující se k surové vlně. Tento jev ukazuje na kvalitní provedení alkalicko-enzymové hydrolýzy, jež napomáhá narušení pevných disulfidových vazeb a tím podporuje produkci KH.

Tab. 7 Výsledné hodnoty obsahu síry surové vlny a výstupů uvedené hydrolýzy

Surovina	Surová vlna	Nerozložený podíl	KH Esperase 6.0T	KH Savinase 6.0T
Stanovení S [%]	0,17	0,66	0,04	2,52

8.3.3 Výsledky stanovení obsahu popelovin

Stanovení obsahu popelovin bylo provedeno u vstupní suroviny spolu s výstupy hydrolýzy metodou žíhání, jež je detailněji popsána v předchozí kapitole. V případě keratinových filmů byl obsah popelovin zjišťován pomocí TGA analýzy. Posouzení výsledků u těchto filmů je provedeno v kapitole: Zhodnocení výsledků instrumentálních metod – TGA viz 8.4.1.

Tab. 8 Zjištěné hodnoty obsahu popelovin u daných vzorků

Surovina	Surová vlna	Nerozložený podíl	KH Esperase 6.0T	KH Savinase 6.0T
Stanovení popelovin [%]	0,77	10,48	4,57	17,52
Směrodatná odchylka	0,10	1,26	0,24	0,18

V tabulce č. 8 lze spatřit obsah popelovin nacházející se ve stanovených vzorcích. Původní množství popelovin u surové vlny činilo 0,77 %. Což je poměrně nízká hodnota oproti nerozloženému podílu vlny a také keratinovému hydrolyzátu. Vyšší procentuální zastoupení těchto složek je dáno množstvím přidávaných alkálií v průběhu procesu alkalicko-enzymové hydrolýzy, jež pronikají do struktury vlákna vlny a následně interagují s aktivními konci aminokyselin. V případě nerozloženého podílu vlny nedocházelo k žádnému dodatečnému upravování, proto obsah popelovin činil výsledných 10,48 %. Díky využití dialýzy došlo u keratinového hydrolyzátu (připravované enzymem Esperase 6.0T) k patřičnému poklesu anorganických příměsí, které nejsou pro keratinový hydrolyzát zcela vhodné na konečných 4,57 %. Z těchto výsledků lze říci, že byl proveden vhodný dialyzační proces vztahující se ke KH Esperase 6.0T. V případě KH Savinase 6.0T nebyla provedena dialýza, proto hodnota obsahu popelovin je vyšší ve srovnání s druhým typem hydrolyzátu.

8.3.4 Výsledky stanovení rozpustnosti

Ze všech vytvořených filmů byly odebrány vzorky na testování rozpustnosti. Interakce mezi vodou jako rozpouštědlem a zhotovenými vzorky filmů, byla značná. Proto zvolený čas pro rozkladný děj filmů byl volen v rámci minut. V případě filmů připravených z KH Savinase 6.0T s procentuálním přídavkem DET doba rozpouštění činila 25 minut. V případě KH Esperase 6.0T byly filmy opět rozpouštěny v průběhu 25 minut. Naopak nejkratší doba rozpustnosti byla zjištěna u filmů bez přítomnosti síťovadla. Doba rozpouštění byla u těchto filmů 15 minut. Je tomu dáno nepřítomností síťovací složky napomáhající mezimolekulovým interakcím s následným zesítěním v daném filmu.

Tab. 9 Naměřené hodnoty rozpustnosti pro filmy KH Esperase 6.0T

Surovina	Přídavek síťovadla [%]	Čas rozpouštění [min]	Úbytek hmotnosti [%]
KH Esperase 6.0T	0	3	31,52
		15	91,59
KH Esperase 6.0T	10	5	60,42
		25	98,39
KH Esperase 6.0T	15	5	42,87
		25	52,26
KH Esperase 6.0T	20	5	58,35
		25	63,28

V tomto případě je rozpustnost nesítěného filmu s přibývajícím časem značně vysoká. Již po 15 minutách došlo k rozpuštění 91,59 % z původní navážky vzorku. Také 10% přídavek DET není dostačující pro udržení mírnější rozpustnosti filmu. Nejpomalejší průběh rozpouštění má však film s 15% přídavkem DET. Po 25 minutách došlo k rozpuštění pouze 52,26 % vzorku.

Tab. 10 Naměřené hodnoty rozpustnosti pro filmy KH Savinase 6.0T

Surovina	Přídavek síťovadla [%]	Čas rozpouštění [min]	Úbytek hmotnosti [%]
KH Savinase 6.0T	0	3	59,27
		15	87,26
KH Savinase 6.0T	10	5	63,65
		25	86,77
KH Savinase 6.0T	15	5	55,31
		25	83,02
KH Savinase 6.0T	20	5	53,40
		25	80,29

Jak lze vidět v tabulce č. 10 procentuální úbytek filmu bez přídavku DET byl v porovnání se síťovanými filmy značně vyšší (vzhledem k stanovenému času). Také je patrné, že s vyšším přídavkem síťovadla DET dochází k pomalejšímu úbytku hmotnosti vzorku se zvyšující se dobou rozpustnosti.

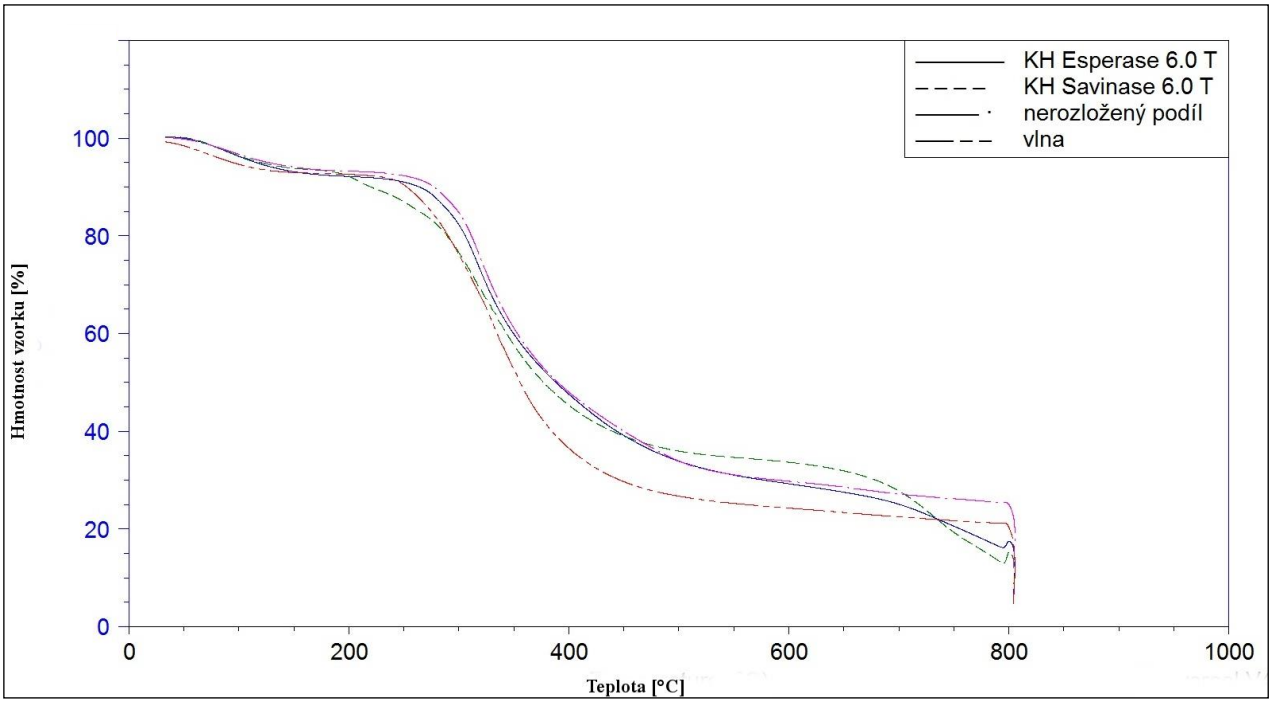
Také si lze všimnout, že v této zkoušce dochází u filmů tvořených z KH Savinasa 6.0 T k pomalejším úbytkům hmotnosti oproti KH Esperase 6.0T.

8.4 Výsledky u zvolených instrumentálních metod

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, zvolené metody pro zhodnocení vlastností vzorků filmů i hydrolyzátů spolu se vstupní surovinou, byly použity – TGA, FTIR a DSC. Posuzování probíhalo vždy pro film nezesíťovaný síťovacím činidlem oproti filmům s rozdílným přídavkem síťovadla a také vstupní surovinu proti KH a nerozloženému podílu vlny.

8.4.1 Termogravimetrická analýza (TGA)

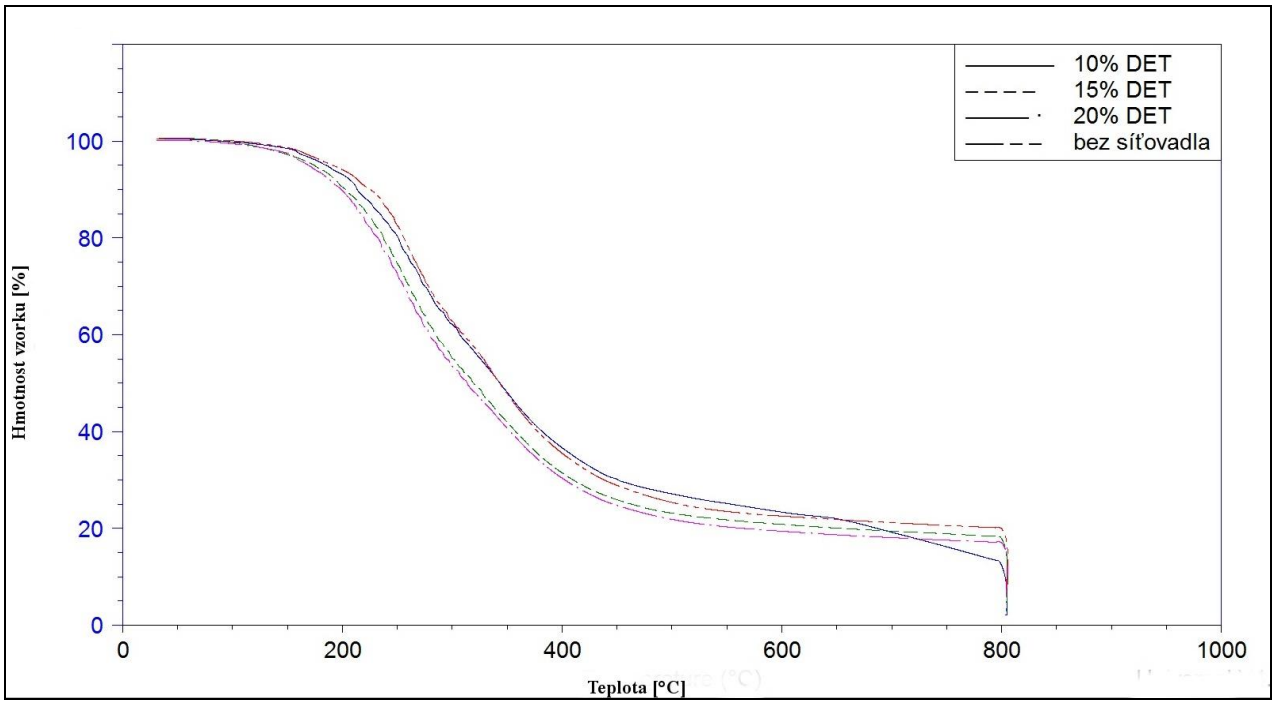
TG měření bylo realizováno pomocí přístroje TA Instruments TGA Q50 dle postupu v kapitole 6. Naměřené TG křivky lze vidět na obrázcích 9 – 11. Na jednotlivých snímcích jsou porovnávány filmy ze získaných keratinových hydrolyzátů s procentuálním přídavkem DET oproti nesíťovanému filmu. Také jsou zde posuzovány keratinové hydrolyzáty oproti nerozloženému podílu vlny a vstupní surovině.



Obr. 10 TG křivky vstupní suroviny a výstupů alkalicko-enzymové hydrolýzy

Na obrázku č. 9 jsou patrné čtyři TG křivky znázorňující úbytek hmotnosti vzorku v závislosti na teplotě. V tomto případě lze vidět křivku pro vlnu, nerozložený podíl vlny a také připravené KH. V případě vlny došlo v průběhu zvyšující se teploty k největšímu procentuálnímu úbytku vlhkosti ze všech uvedených vzorků při teplotě 160 °C na 93 %. V opačném případě je úbytek vlhkosti nejmenší u nerozloženého podílu vlny. Ze všech typů materiálů došlo ke změně hmotnosti u KH Savinase 6.0T již při teplotách 180 °C, což odpovídá rozsahu endotermního píku tání uvedeného na DSC snímku. S tímto je spojena také degradace proteinu, jež u KH Savinase 6.0T začíná při 210 °C. U KH Esperase 6.0T je teplota rozkladu posunuta až ke 250 °C. V případě nerozloženého podílu vlny je zesítění značnější a tím dochází k větší odolnosti vůči zvoleným teplotám v porovnání s ostatními vzorky.

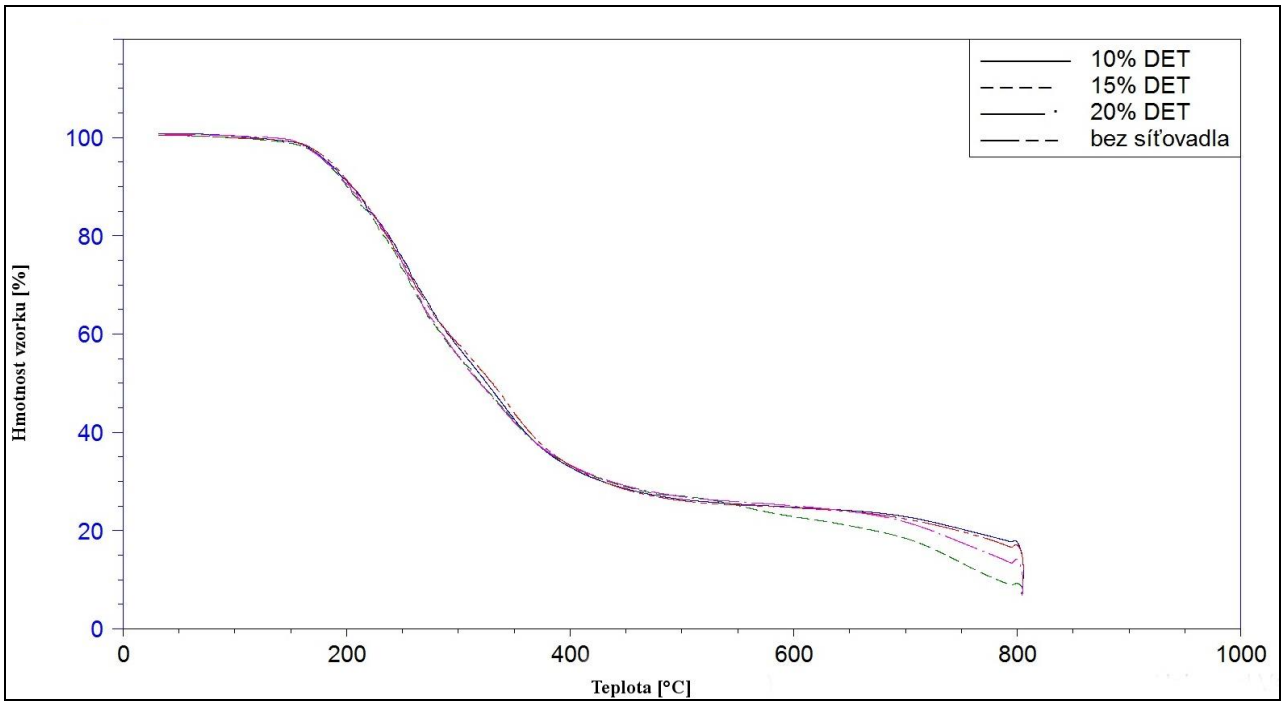
Největší množství popelovin po procesu žíhání – 12,26 %. Surová vlna měla naopak nejnižší stanovené hodnoty popelovin – 4,86 %, což odpovídá nepřítomnosti používaných chemikálií v postupech alkalicko-enzymové hydrolýzy a dalších úpravách při vzniku filmů.



Obr. 11 TG křivky filmů z KH Esperase 6.0T

Na obrázku č. 10 jsou opět viditelné čtyři křivky. V tomto případě se jedná o referenční vzorek (nesíťovaný film) a vzorky s přídavkem DET. Filmy mají konstantní hmotnost při teplotách do 100 °C. Se zvyšující se teplotou dochází k prudkému úbytku hmot-

nosti filmu způsobenou degradací proteinu. Ze všech uváděných křivek je úbytek hmotnosti od počátku 190 °C u síťovaných filmů větší oproti referenčnímu vzorku. Při teplotách 250 °C zde probíhá fáze odpařování změkčovadla. Nejvýznamnějšího maxima rychlosti degradace dosahuje film s 20 % DET – 262,92 °C. Při teplotě 800 °C byl úbytek z celkové hmotnosti přibližně 80 %, přičemž vzorek s 10 % DET byl mírně pod touto hranicí s hodnotou 79,78%. Po procesu žíhání byla přítomnost popelovin jednotlivých filmů následující: bez síťovadla – 7,656 %, 10 % DET – 2,090%, 15 % DET – 3,073 %, a 20 % DET - 6,698 %.



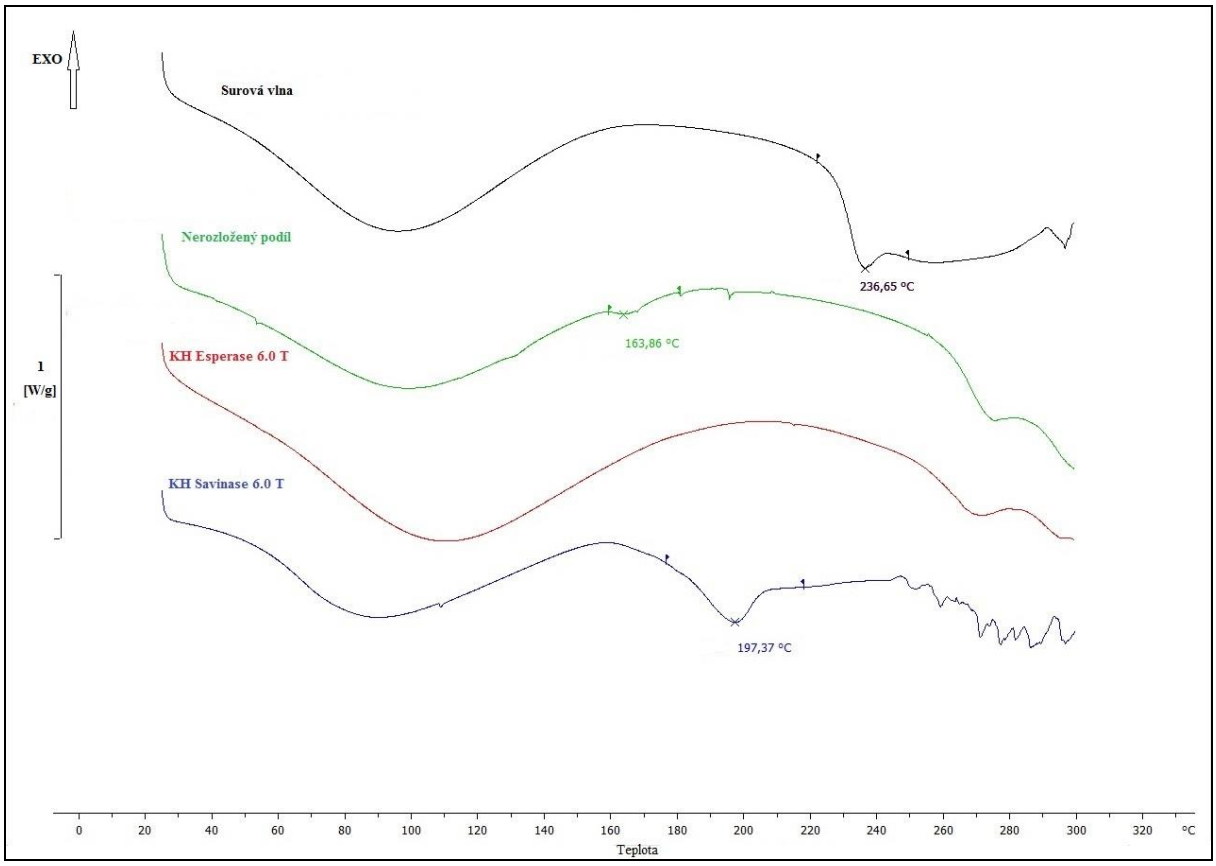
Obr. 12 TG křivky filmů z KH Savinase 6.0T

Na dalším snímku (obr. 11) je patrné porovnání filmů připravených z KH Savinase 6.0T bez a s přídavkem síťovadla. Zmíněné křivky mají poměrnou shodnost při teplotách do 100 °C, kdy při této teplotě dochází k pozvolnému odpařování vody. Při zvyšování teploty ohřevu je zřejmý úbytek hmotnosti, což signalizuje postupnou degradaci přítomného keratinu. Začátek degradace začíná při teplotě 190 °C. Po rozkladu keratinu dochází k pozvolnému úbytku hmotnosti v závislosti na zvyšujících se teplotách, kdy nastává odpaření plastifikátoru při teplotách nad 250 °C. Také síťovadlo degraduje spolu s odpařováním změkčovadla při teplotách kolem 280 °C. U těchto křivek nedochází k výrazné změně v průběhu úbytku hmotnosti. Celkový úbytek hmotnosti se pohybuje v hodnotách 75 -83 %, přičemž největší pokles je spatřován u síťovaného vzorku s 20% přídavkem

DET. Naopak nejmenší úbytek měl Savinase 6.0T s 10 % DET. Teplota žíhání skončila u všech vzorků při teplotě 800 °C, přičemž hmotnost popelovin byla největší u vzorku bez přídavku síťovadla (9,792 %). V případě vzorku s 10% přídavkem DET obsah popelovin činil – 8,654 %, 15 % DET – 7,292 % a nejméně u 20 %DET – 7,232 %.

8.4.2 Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC)

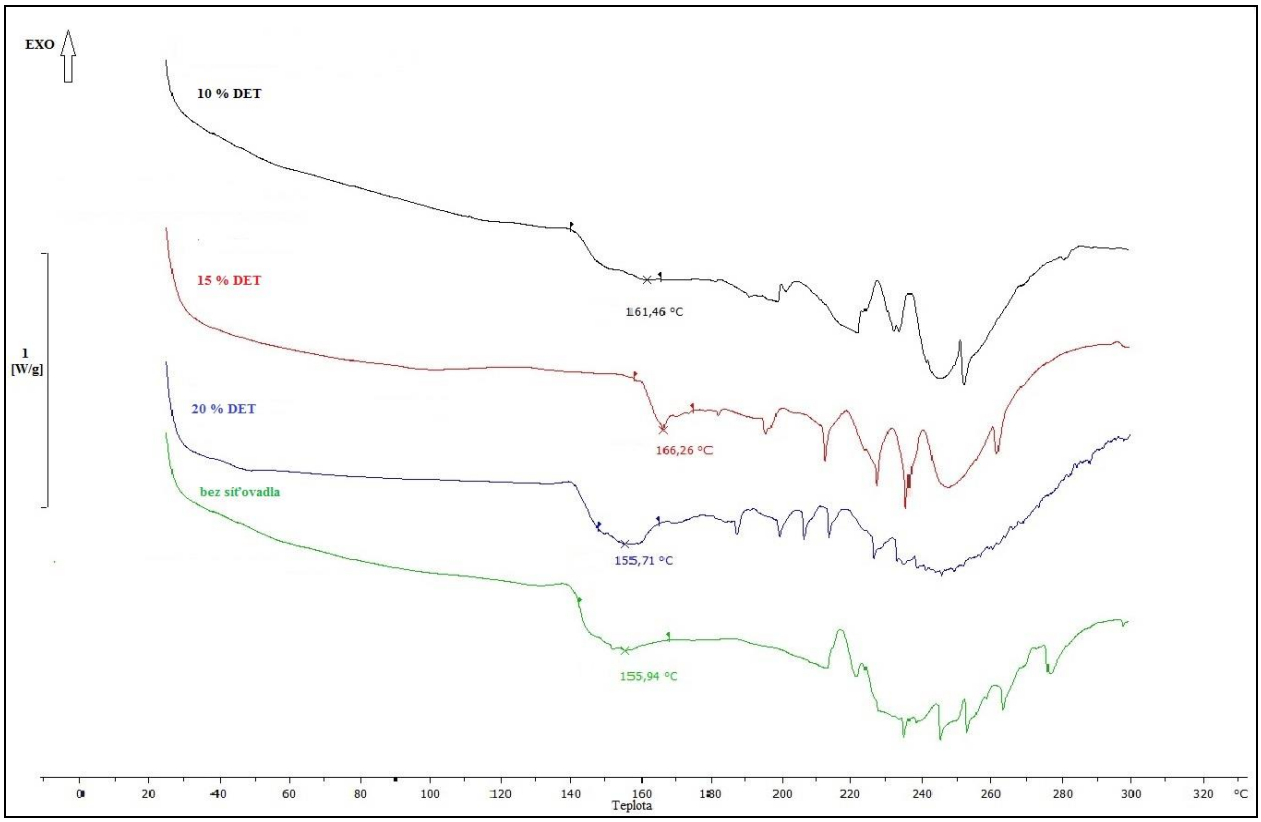
DSC měření probíhalo pomocí přístroje DSC 1. Naměřené DSC křivky jsou viditelné na obrázku 12 – 14. I v tomto případě jsou zde vyobrazeny křivky porovnávající filmy ze získaných keratinových hydrolyzátů s procentuálním přídavkem DET oproti nesíťovanému filmu a také keratinové hydrolyzáty oproti nerozloženému podílu vlny a vstupní surovině.



Obr. 13 DSC křivky filmů vstupní suroviny a výstupů alkalicko-enzymové hydrolýzy

Na uvedeném DSC snímku (obr. 12) je možné vidět píky nacházející se u surové vlny, nerozloženého podílu vlny a také KH Savinase 6.0T. Se zvyšující se teplotou dochází k úbytku vody, jež se přirozeně nachází v počátku každé suroviny. Po odpaření vody jsou

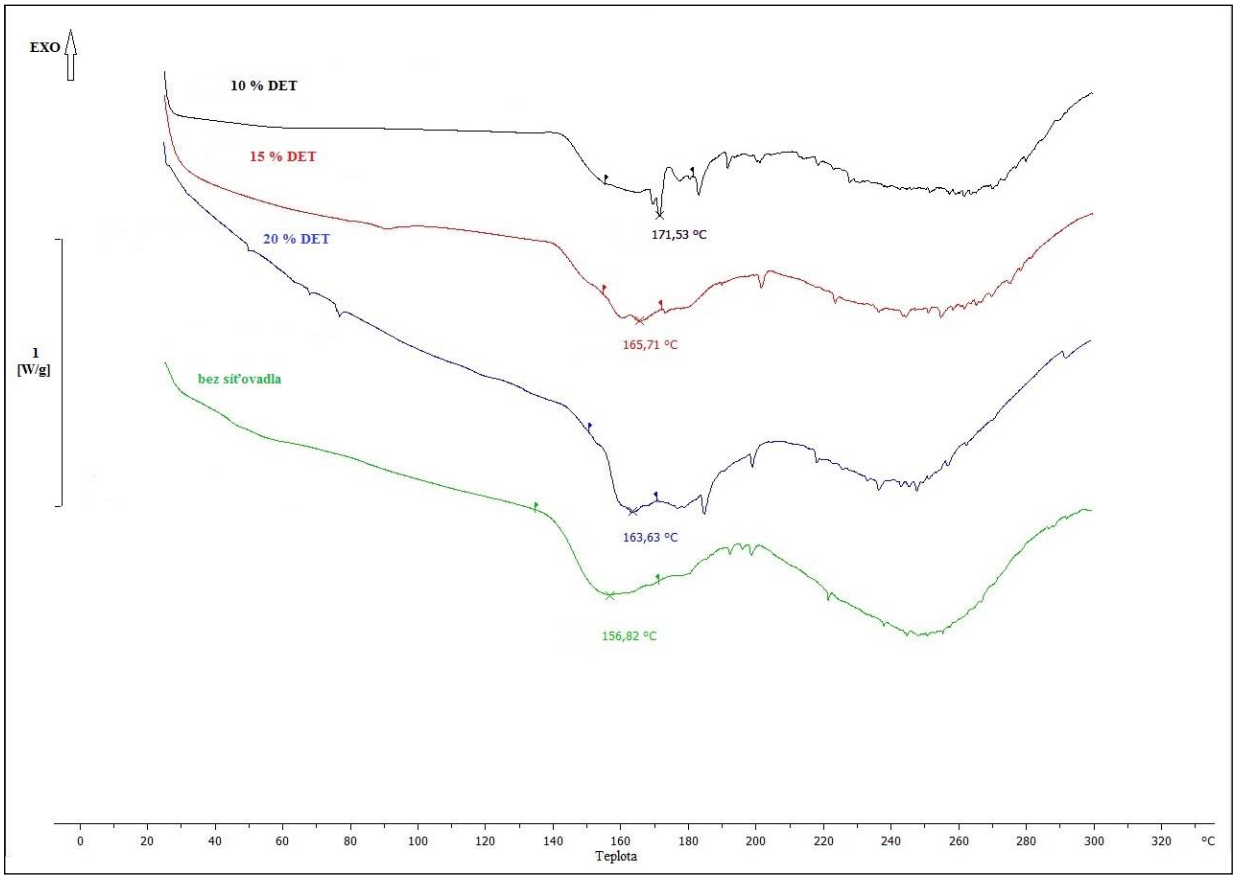
v oblasti 160 - 240 °C viditelné endotermní píky. V případě surové vlny leží pík na křivce poměrně dál oproti zbývajícím vzorkům. Jeho hodnota dosahuje v maxima 236,65 °C. V případě nerozloženého podílu dochází k tání filmu v oblasti 160 – 170 °C, přičemž maximum je opět vyznačeno v uvedeném grafu. Posledním vzorkem, u nějž se projevil endotermní pík je KH Savinase 6.0T. Jeho maximální hodnota v oblasti tání činí 197,37 °C. V případě KH Esperase 6.0T není patrný žádný pík poukazující na oblast tání vzorku. Je to dáno zřejmě jeho zcela amorfní strukturou.



Obr. 14 DSC křivky filmů z KH Esperase 6.0T

Z obrázku č. 13 zobrazující DSC křivky, lze vidět porovnání nesíťovaného keratinového filmu oproti filmům s přídavky síťovadla DET 10, 15 a 20 %. Ve všech případech dochází od počáteční teploty do přibližně 130 °C k odpařování přítomné vody z filmu. U filmu bez přídavku DET je patrný endotermní pík v rozmezí teplot 140 – 165 °C, jež poukazuje na tání vytvořeného filmu. Vrchol tohoto píku je zaznačen v grafu ukazující nejznačnější hodnotu tání (155,94 °C). Také lze u této křivky pozorovat degradační proces filmu při teplotě nad 200 °C se současným odpařováním glycerolu. Film obsahující 10% DET má obdobný průběh jako tomu bylo v případě nezesítěného filmu. Výjimkou je

však pík nacházející se v rozmezí 140 – 165 °C. Nejvyšší hodnota je pak 161,46 °C. Degradace probíhá opět při teplotách nad 200 °C. Přídavek 15 % DET má oproti předchozím dvěma filmům posunutou hranici tání. Nejvyšší hodnota píku je 166,26 °C. V případě 20% přídavku je hodnota vrcholu píku paradoxně nejnižší (155,71 °C). K degradačním změnám také dochází oproti ostatním filmům při nepatrně nižších teplotách. Také je důležité zmínit nástup procesu tání, při němž hodnota u nesíťovaného filmu se pohybuje okolo teploty 138 °C. Přídavek síťovadla tuto hodnotu tání posunul k nepatrně vyšším hodnotám a to u filmu s 10% přídavkem DET na 143 °C a u filmu s 20 % DET na 140 °C. Vůbec největší



posun je patrný u filmu s 15 % DET, kdy tato hranice začíná u hodnoty 158 °C.

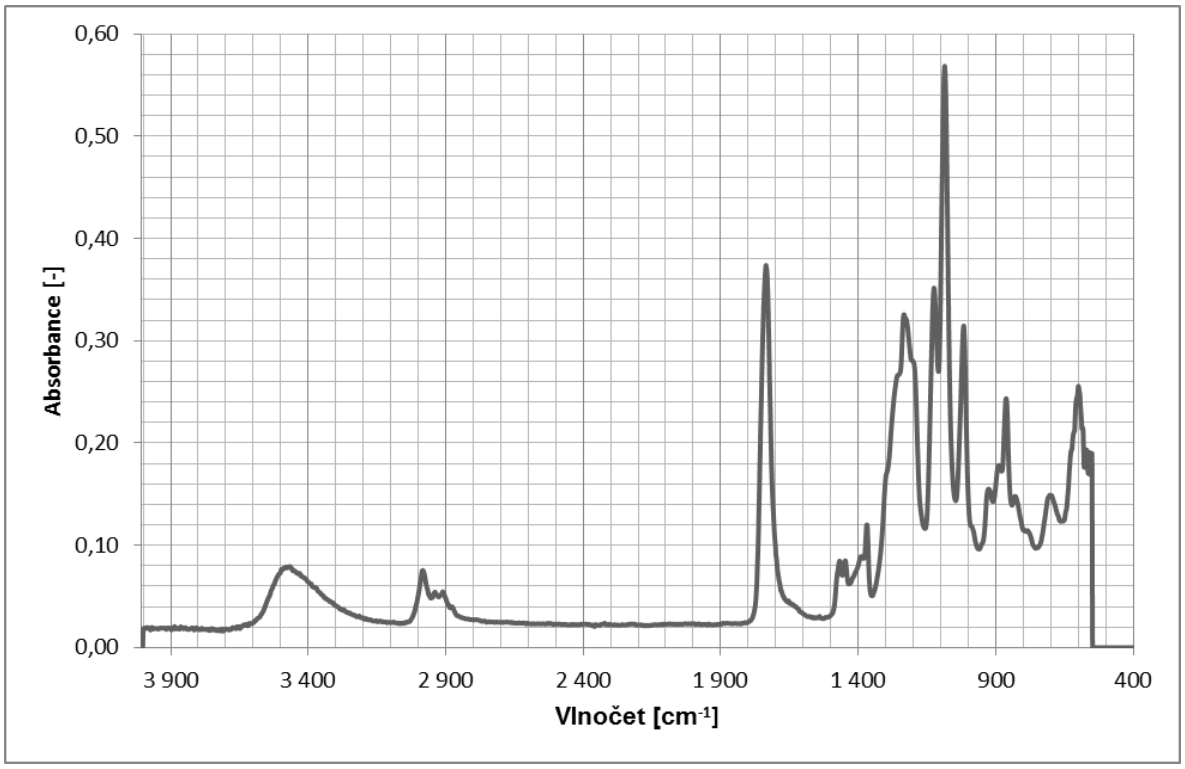
Obr. 15 DSC křivky filmůz KH Savinase 6.0T

V případě filmu (obr. 14) tvořeného z KH Savinase 6.0T bez přídavku DET je opět patrné odstranění vlhkosti do 130 °C. Endotermní pík se pohybuje v rozmezí teplot 140 - 180 °C s vrcholem 156,82 °C. Přídavky síťovadla poukazují na posun endotermních píků vztahující se k teplotě tání u zmiňovaných filmů. Tepelná odolnost filmů je tímto poznatkem mírně zvýšena oproti nezesíťovanému filmu. Hodnoty vrcholů píků se pohybují v rozmezích 160 – 172 °C. Tak jako v případě KH Esperase 6.0T, zde dochází k posunu

nástupu tání keratinu. U nesíťovaného filmu počátek probíhá při teplotě 138 °C. I zde dochází s procentuálním přídavkem DET k posunu hodnoty tání vzorku. Veškeré tyto zesítěné filmy mají hodnoty tání při teplotě 140 – 145 °C.

8.4.3 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR)

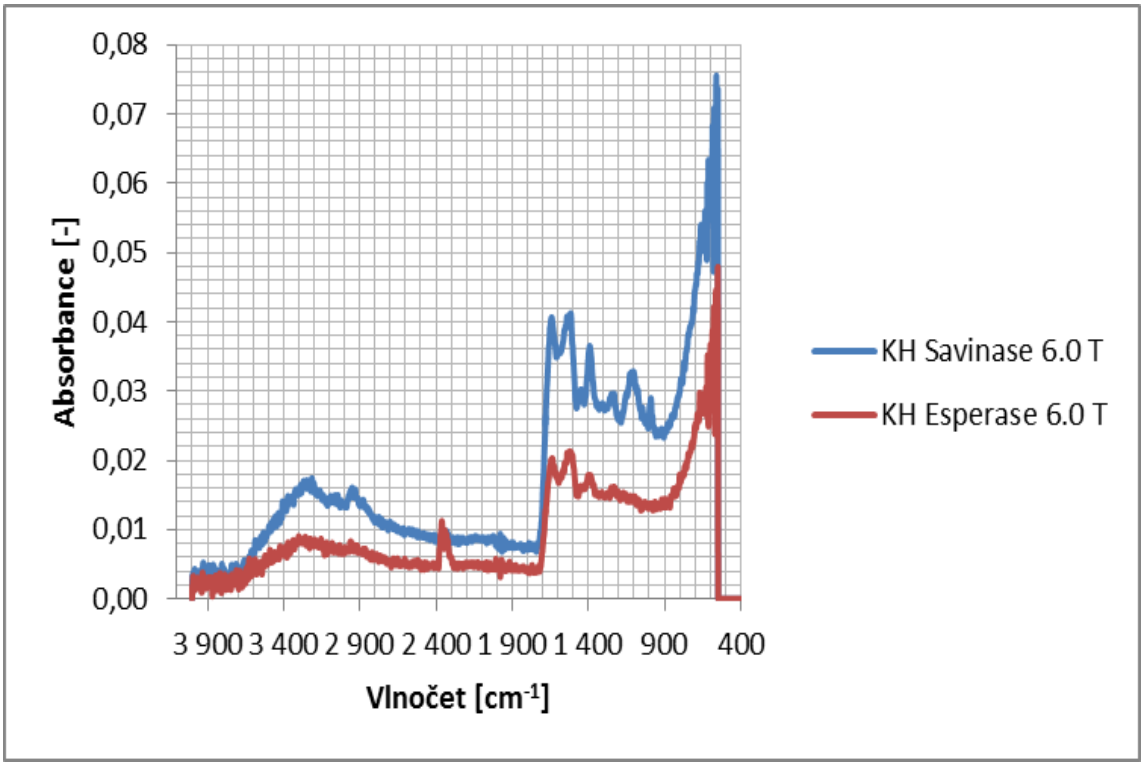
Měření probíhalo u veškerých vzorků keratinových filmů, keratinových hydrolyzátů a také vstupního síťovadla DET. Pro toto hodnocení byl zvolen přístroj spektrofotometr Avatar FT-IR 320 Nicolet. FTIR křivky jsou vyhodnoceny na obrázcích 15 – 18.



Obr. 16 FTIR křivka síťovadla DET

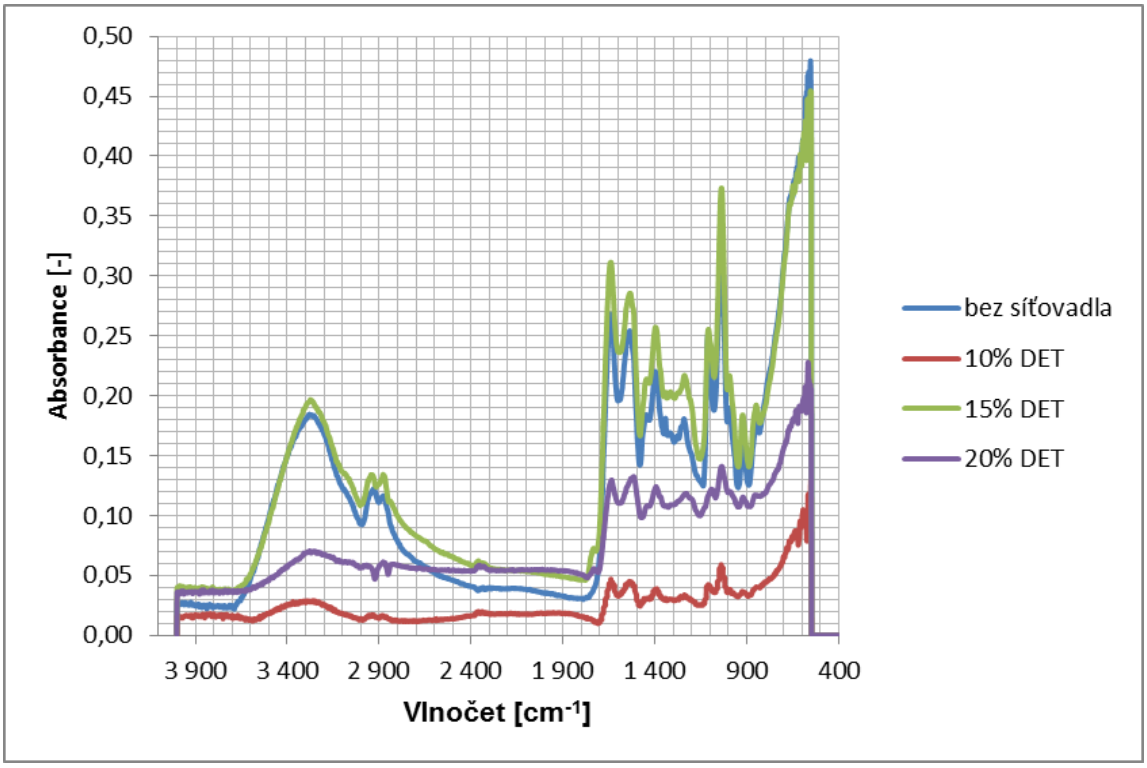
Na obrázku č. 15 je vyobrazen FTIR graf, který popisuje průběh absorbance vzorku DET v závislosti na zvoleném rozsahu vlnočtů. Jelikož se jedná o látku odvozenou od organické kyseliny, měli by se zde objevovat prvky – C, O a H, jež jsou společně spojovány jednoduchými i dvojnými vazbami. Pro tuto látku jsou primárně typické vazby C–H (alkany), které se pohybují v rozmezí hodnot vlnočtů 2980 – 2850 cm^{-1}. Jejich pík je vždy zdvojený, což je patrné i v tomto případě. Charakteristický ostrý pík, který se zde nachází v hodnotách 1800 – 1650 cm^{-1}, proto je spojen s esterovou vazbou C=O. Absorbance vzorku je patrná také v hodnotách 1500 – 1300 cm^{-1} což odpovídá vazbám $–CH_2–$ v deformační oblasti jak uvedeno i v odborné literatuře. Za těmito vlnočty jsou poté typické také C–O vazby spojované s karbonylem, které mají tabulkový rozsah v hodnotách 1320 – 1100 cm^{-1}. V tomto případě se jedná o rozsah velmi ostrých píků blízkých těmto hodnotám a to 1300 - 1000 cm^{-1}. Lze také hovořit o spojení –OH vazeb, které se tabulkově vyznačují

v rozmezí vlnočtů 3500 - 3100 cm^{-1}. U hodnot nižších než 1000 cm^{-1} se může opět jednat o vibrační deformace spojované s –OH skupinou.



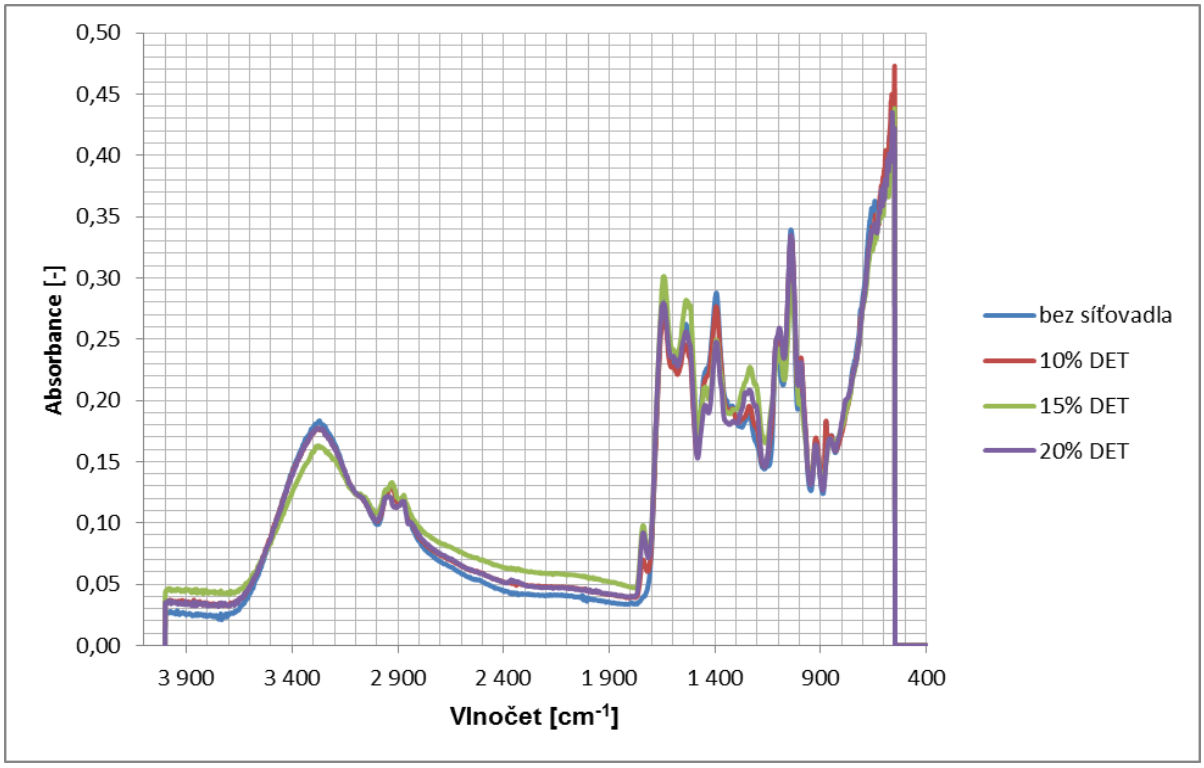
Obr. 17 FTIR křivky keratinových hydrolyzátů

U tohoto grafu (obr. 16) jsou vyobrazeny FTIR křivky pro získané KH. V případě Savinase 6.0T je patrná větší absorbance v porovnání s druhým hydrolyzátem. Také jsou zde viditelnější píky v oblasti hodnot vlnočtu 900 – 1200 cm^{-1} charakterizující –OH vazby. Také lze vidět značnější píky v oblasti 3300 – 2900 cm^{-1} typické pro proteiny. V případě Savinase 6.0T je patrný pík v oblasti vlnočtu 900 cm^{-1}, který je spojován s vazbou $-CH=CH_2$.



Obr. 18 FTIR křivky pro filmy tvořené z KH Esperase 6.0T

U následujícího grafu (obr. 17) jsou porovnávány keratinové filmy Esperase 6.0T bez přídavku síťovadla oproti filmům s jeho procentuálním přídavkem. Tak jako v předcházejícím grafu dochází k projevům charakteristických píků pro DET síťující film. Film bez přídavku síťovadla obsahuje glycerol, který pojímá ve své struktuře pouze –OH a C–H vazby. Takže kromě –OH píků nacházející se v oblasti 1300 – 1500 cm^{-1} je zde i charakteristický pík v rozmezí 2850 – 2950 cm^{-1}, který předurčuje právě vazbu CH_2. Přítomnost proteinu ve filmu je určen také menším náznakem píku, jež určuje -CONH- vazby nacházející se nad hodnotou vlnočtu 3000 cm^{-1}. Ze síťovaných filmů má největší absorbanci film s přídavkem 15 % DET. Jeho nejvyšší hodnota dosahuje k absobranci 0,45 a také veškeré píky jsou rapidně větší. U ze všech uvedených síťovaných filmů je přítomnost charakteristických píků DET shodná. Nachází se zde opět pík přibližně v oblasti 1500 - 1700 cm^{-1} odpovídající C=O vazbě. Je zde zaznamenána přítomnost také –OH vazeb, pro které platí ostřejší pík při 1000 cm^{-1}. Opět jsou ve všech křivkách přítomny vazby –CONH– a CH_2. Veškeré tyto píky mohou předurčovat vznik nově vytvořených peptidových vazeb. Absorbance síťovaných filmů jsou vyšší se zvyšujícím se přídavkem DET.



Obr. 19 FTIR křivky pro filmy tvořené z KH Savinase 6.0T

Na obrázku č. 18 je opět patrné porovnávání mezi referenčním a síťovaným vzorkem. V tomto případě absorbance nesíťovaného vzorku je v oblasti do 1700 cm^{-1} menší oproti síťovaným filmům. Tato křivka postrádá poměrně ostrý pík v oblasti 1800 – 1700 $cm^{-1,}$ který poukazuje na nepřítomnost esteru v jeho struktuře. Ve všech zmiňovaných filmech je přirozená přítomnost –CONH– i C–H vazeb. Také oblasti, ve kterých se nacházejí –OH vazby mají u reference nižší hodnoty oproti síťovaným filmům. U síťovaných filmů je znovu absorbance vyšší u 15% přídavku DET. Nejvyšší hodnoty v oblastech píků má v přítomnosti –OH a C=O vazeb.

Veškeré obrázky s FTIR grafy jsou pro detailnější prohlédnutí v příloze DP.

ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá možným zpracováním keratinových odpadů na keratinový hydrolyzát s jejich následnou schopností tvorby filmů. V teoretické části lze nalézt informace o vlně, keratinu a také možných štěpných reakcích za vzniku keratinových hydrolyzátů. V práci jsou rovněž uváděny informace o možném využití hydrolyzátů a také síťovací účinky dosud známých síťovadel spojovaných s tímto proteinem.

Praktická část popisuje průběh vzniku keratinového hydrolyzátu uskutečňovaného dvoustupňovou alkalicko-enzymovou hydrolýzou ovčí vlny, přičemž v prvním stupni byla předupravená vlna podrobena alkalickému působení $Ca(OH)_2$. Po úpravě hodnoty pH docházelo k druhému stupni hydrolýzy za přítomnosti proteolytického enzymu. Také je zde popsán průběh separace a dialýzy vzniklého keratinového hydrolyzátu. Praktická část zahrnuje tvorbu keratinových filmů s přídavkem glycerolu a síťovadla diethylesteru kyseliny vinné v obsahu 10, 15 a 20 % a glycerolu. Tyto filmy byly následně podrobeny analytickému i instrumentálnímu testování. Hodnocení filmů probíhalo vždy ve srovnání s nesíťovaným filmem. Výsledky testování účinnosti přítomného síťovadla na vytvořený film jsou vždy uváděny v příslušných tabulkách a grafech.

Při analytickém testování bylo zjištěno, že přítomnost obsahu dusíku u vytvořených filmů je nižší v porovnání se samotnými keratinovými hydrolyzáty. Je to dáno přidávaným množstvím plastifikátoru a také síťovadla. Hodnoty nesíťovaného filmu byly srovnatelné se síťovanými filmy. Také lze spatřovat v práci vhodnost použití dialyzačního procesu, neboť hodnoty spojované s KH Esperase 6.0T odpovídají značnému poklesu popelovin oproti KH Savinase 6.0T. Rovněž u rozpustnosti byly zjištěny nepatrné změny u síťovaných filmů v porovnání s nesíťovaným vzorkem, kdy s přídavkem síťovadla docházelo k menším úbytkům hmotnosti v závislosti na čase. Vůbec nejpomalejší rozpouštění probíhalo u KH Esperase 6.0T s procentuálním přídavkem 15 % DET.

Z výsledků TGA je patrné, že u přichystaných filmů nedochází k větším změnám v úbytcích hmotnosti v závislosti na zvoleném intervalu teplot. V případě DSC snímků je viditelný posun endotermních píků, poukazující na hodnotu tání filmu, u síťovaných filmů ve srovnání s nesíťovanými filmy. V případě KH Esperase 6.0T jsou tyto posuny patrnější. Především pak u 15% přídavku DET. FTIR snímky poté poukazují na přítomnost charakte-

ristických vazeb DET u síťovaných filmů, avšak nevykazují žádný viditelný nárůst vazeb -CO-NH-.

Z výsledků praktické části lze odvodit, že přídavek DET mírně zlepšuje fyzikálně-mechanické vlastnosti u filmů z keratinových hydrolyzátů, avšak filmy stále nedisponují takovými vlastnostmi, které byly původně očekávány. Proto lze konstatovat, že zvolený způsob síťování nevede ke srovnatelně dobrým vlastnostem, jako tomu je u filmů síťovaných glutaraldehydem. I přesto lze tento materiál zkoumat v příštích studiích jako potenciální netoxické síťovadlo využité především pro oblast medicíny a kosmetiky.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] MLÁDEK, Milan, Ferdinand LANGMAIER a Martina LEDVINKOVÁ. *Nauka o materiálech (pro kožedělnou výrobu)*. Vyd. 1. Zlín: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta technologická ve Zlíně, 2000, 128 s. ISBN 80-214-1688-2.

[2] BLAŽEJ, A. a E. POKLUDOVÁ. *Polyméry v kožiarskom, obuvníckom a galanternom priemysle*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1980, 361 s.

[3] MOKREJŠ, P. a F. LANGMAIER. *Aplikace přírodních polymerů*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008, 90 s. ISBN 978-80-7318-674-6

[4] PILLER, Bohumil a Otto LEVINSKÝ. *Malá encyklopedie textilních materiálů*. Vyd. 1. Praha: SNTL -Nakladatelství technické literatury, 1978, 221 s.

[5] *DOLSAN: Bioxine* [online]. [cit. 2015-05-03]. Dostupné z: http://www.bioxsine.ch/haarausfall/haarschichten

[6] BRAGULLA, H. H. a D. G. HOMBERGER. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of Anatomy* [online]. 2009, roč. 214, č. 4, s. 516-559 [cit. 2014-11-21]. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x

[7] VOET, D. a J. VOETOVÁ. *Biochemie*. 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995, 1325 s. ISBN 80-856-0544-9.

[8] TSUDA, Y. a Y. NOMURA. Properties of alkaline-hydrolyzed waterfowl feather keratin. *Animal Science Journal* [online]. 2014, roč. 85, č. 2, s. 180-185 [cit. 2014-11-21]. DOI: 10.1111/asj.12093. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1111/asj.12093

[9] EICHHORN, S.J., J.W.S. HEARLE, M. JAFFE a T. KIKUTANI. *Handbook of textile fibre structure* [online]. 1 vyd. Cambridge: Woodhead Pub, 2009 [cit. 2014-11-21]. ISBN 978-184-5697-303.

[10] MURRAY, R. K. *Harperova biochemie*. Vyd. v ČR 4., V H & H 3. Praha: H & H, 2002, ix, 872 s. ISBN 80-7319-013-3.

[11] ŠKÁRKA, B., FERENČÍK. M. *Biochémia*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1983, 635 s.

[12] ŠÍPAL, Z., ANZENBACHER, P., PEČ, P. a kol. *Biochemie*. 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1992, 479 s. ISBN 80-042-1736-2.

[13] ARAI, Kozo, Munenori SAKAMOTO, Sachio NAITO a Toshie TAKAHASHI. Crosslinking structure of keratin. II. Intermolecular and intramolecular crosslinks in potassium-cyanide-treated wool fibers. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 1989, roč. 38, č. 1, s. 29-44 [cit. 2015-05-03]. DOI: 10.1002/app.1989.070380104.

[14] OBŠIL, T. *Struktura proteinů a funkce enzymů* [online]. [cit. 2014-11-21]. Dostupné z: http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/Chemie/28obsil.pdf

[15] KODÍČEK, Milan. *Biochemické pojmy: výkladový slovník*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2004, 171 s. ISBN 80-708-0551-X.

[16] KLÁSEK, A. *Nauka o polymerech II: biopolymery*. Vyd. 1. Praha: SNTL, 1980, 115 s.

[17] KARLSON, P. *Základy biochemie*. 3 vyd. (přepracované). Praha: Academia, 1981, 504 s.

[18] *Struktura vlákna vlny* [online]. [cit. 2015-05-03]. Dostupné z: http://obchod.teplodomova.cz/Akademie-vlny/

[19] KREJČÍ, O. a P. MOKREJŠ. Sledování významnosti vybraných technologických podmínek při enzymové hydrolýze odpadní ovčí vlny. *Wasteforum* [online]. 2011, roč. 6, č. 1, s. 4 - 11 [cit. 2014-11-21]. Dostupné z: http://www.wasteforum.cz

[20] MOKREJŠ, P., O. KREJČÍ, R. ČERMÁK a P. SVOBODA. Optimalizace podmínek enzymové hydrolýzy kuřecího pěří. *Chemické listy* [online]. 2013, roč. 2013, č. 9 [cit. 2014-11-21]. Dostupné z: www.chemicke-listy.cz/

[21] VERMELHO, A.B., VASQUEZVILLA, MAZOTTO DE, PARAGUAI DE a S.E.P. DOS. *Keratin hydrolysates, process for their production and cosmetic composition containing the same* [patent]. Rio De Janeiro. EP2170096 A2. Uděleno 2010. Zapsáno 2008.

[22] VRBACKÝ, R.,VRBACKÁ, V. *Technologie výroby kožešin*. 3., přeprac. vyd. Praha: SNTL, 1990, 558 s. ISBN 80-03-00557-4.

[23] MLÁDEK, M. *Zpracování odpadů kožedělného průmyslu*. Vyd. 1. Praha: SNTL, 1971, 322 s.

[24] MOKREJŠ, P., O. KREJČÍ, P. SVOBODA a V. VASEK. Modeling technological conditions for breakdown of waste sheep wool. Zlín: Rasāyan journal of chemistry, 2011, roč. 4, č. 4. ISSN 0974-1496. Dostupné z: http://www.rasayanjournal.com

[25] GOUSTEROVA, A., D. BRAIKOVA, I. GOSHEV, P. CHRISTOV, K. TISHINOV, E. VASILEVA-TONKOVA, T. HAERTLE a P. NEDKOV. Degradation of keratin and collagen containing wastes by newly isolated thermoactinomycetes or by alkaline hydrolysis. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 2005, roč. 40, č. 5, s. 335-340 [cit. 2014-11-21]. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2005.01692.x. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.2005.01692.x

[26] SAVOLAINEN, Jouko E. T. *Procedure for hydrolyzing keratin* [patent]. Užitný zdroj, US 5262307 A. Uděleno 16. listopad 1993. Dostupné z: http://www.google.tl/patents/US5262307

[27] COWARD-KELLY, Guillermo, Frank K. AGBOGBO a Mark T. HOLTZAPPLE. Lime treatment of keratinous materials for the generation of highly digestible animal feed: 2. Animal hair. *Bioresource Technology* [online]. 2006, roč. 97, č. 11, s. 1344-1352 [cit. 2015-05-03]. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.05.017. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852405002828

[28] KURBANOGLU, Esabi Basaran a Namudar Izzet KURBANOGLU. The Use of Ram Horn Hydrolysate as a Supplement for Glycerol Production by Yeast. *Turkish Journal of Biology* [online]. 2004, č. 28 [cit. 2015-05-03]. Dostupné z: http://journals.tubitak.gov.tr/biology/issues/biy-04-28-2-4/biy-28-2-4-10-0403-2.pdf

[29] ZOCCOLA, M., A. ALUIGI, A. PATRUCCO, C. VINEIS, F. FORLINI, P. LOCATELLI, M. C. SACCHI a C. TONIN. Microwave-assisted chemical-free hydrolysis of wool keratin. *Textile Research Journal* [online]. 2012-10-26, roč. 82, č. 19, s. 2006-2018 [cit. 2015-05-03]. DOI: 10.1177/0040517512452948. Dostupné z: http://trj.sagepub.com/cgi/doi/10.1177

[30] KAKKAR, Prachi, Balaraman MADHAN a Ganesh SHANMUGAM. Extraction and characterization of keratin from bovine hoof: A potential material for biomedical applications. *SpringerPlus* [online]. 2014, roč. 3, č. 1, s. 596- [cit. 2015-05-03]. DOI: 10.1186/2193-1801-3-596. Dostupné z: http://www.springerplus.com/content/3/1/596

[31] VILLA, A.L.V., M.R.S. ARAGÃO, E.P. DOS SANTOS, A.M. MAZOTTO, R.B. ZINGALI, E.P. DE SOUZA a A.B VERMELHO. Feather keratin hydrolysates obtained from microbial keratinases: effect on hair fiber. *BMC Biotechnology* [online]. 2013, roč. 13, č. 1, s. 15 [cit. 2014-11-21]. DOI: 10.1186/1472-6750-13-15. Dostupné z: http://www.biomedcentral.com/1472-6750

[32] KOŁCZAK, T. a K. SURÓWKA. Enzymatyczna hydroliza niestandardowych oslonek kolagenowych i odpadów powstajacych przy produkcji oslonek. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* [online]. 2004, roč. 4, č. 41 [cit. 2014-11-23]. Dostupné z: http://www.pttz.org/zyw/wyd/czas/archiwum.html

[33] GRAZZIOTIN, A., F.A. PIMENTEL, E.V. DE JONG a A. BRANDELLI. Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. *Animal Feed Science and Technology* [online]. 2006, roč. 126, 1-2, s. 135-144 [cit. 2015-05-03]. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2005.06.002. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840105002609?np=y

[34] AL-MUSALLAM, A.A., D.H. AL-GHARABALLY a N. VADAKKANCHERIL. Biodegradation of keratin in mineral-based feather medium by thermophilic strains of a new Coprinopsis sp. *International Biodeterioration* [online]. 2013, roč. 79, s. 42-48 [cit. 2015-05-03]. DOI: 10.1016/j.ibiod.2012.11.011. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/S0964830512003204

[35] MOKREJŠ, P., O. KREJČÍ, S. SUKOP. Charakterizace keratinových hydrolyzátů připravených z kuřecího peří. *Chemické listy* [online]. 2014, roč. 2014 [cit. 2014-11-21]. Dostupné z: www.chemicke-listy.cz/

[36] FEŘTEKOVÁ, V. *Kosmetika v teorii a v praxi*. Praha: Maxdorf, 1994, 269 s., iv s. barev. il. ISBN 80-858-0020-9.

[37] GODDARD, E a James V GRUBER. *Principles of polymer science and technology in cosmetics and personal care*. New York: Marcel Dekker, 1999, xi, 671 p. Cosmetic science and technology series, 22. ISBN 08-247-1923-9.

[38] BARBA, C., S. MÉNDEZ, A. RODDICK-LANZILOTTA, R. KELLY, J. L. PARRA a L. CODERCH. Cosmetic effectiveness of topically applied hydrolysed keratin peptides and lipids derived from wool. *Skin Research and Technology* [online]. 2008, roč. 14, č. 2, s. 243-248 [cit. 2015-05-03]. DOI: 10.1111/j.1600-0846.2007.00280.x. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0846.2007.00280.x

[39] WEBER, C. J. *Biobased packaging materials for the food industry: status and perspectives : a european concerted action*. Frederiksberg: KVL Department of Dairy and Food Science, 2000. ISBN 87-905-0407-0.

[40] SHIH, J. C. H. Recent Development in Poultry Waste Dizgestion and Feather Utilization--A Review. *Poultry Science* [online]. 1993-09-01, roč. 72, č. 9, s. 1617-1620 [cit. 2014-11-23]. DOI: 10.3382/ps.0721617. Dostupné z: http://ps.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.3382/ps.0721617

[41] ADETUNJI, C.O., MAKANJUOLA, O.R.,AROWORA K.A., AFOLAYAN S.S., ADETUNJI J.B., Production and Application of Keratin-Based Organic Fertilizer from Microbially Hydrolyzed Feathers to cowpea (Vigna unguiculata). I*nternational Journal of Scientific & Engineering Research*. 2012, roč. 3, č. 12, ISSN 2229-5518.

[42] CHOI, J.M, NELSON, P.V., Developing a Slow-release Nitrogen Fertilizer from Organic Sources: II. Using Poultry Feathers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*.1996, roč. 121, č. 4, ISSN 2327-9788.

[43] NAKATA, R., A. TACHIBANA a T. TANABE. Preparation of keratin hydrogel/hydroxyapatite composite and its evaluation as a controlled drug release carrier. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2014, roč. 41, s. 59-64 [cit. 2014-11-23]. DOI: 10.1016/j.msec.2014.04.016. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493114002082 4.

[44] ROUSE, J.G. a M.E. VAN DYKE. A Review of Keratin-Based Biomaterials for Biomedical Applications. *Materials* [online]. 2010, roč. 3, č. 2, s. 999-1014 [cit. 2014-11-23]. DOI: 10.3390/ma3020999. Dostupné z: http://www.mdpi.com/1996-1944/3/2/999/

[45] BLANCHARD, CH.R. a kol., *Keratin-based hydrogel for biomedical applications and method of production* [patent]. Spojené státy Americké. US 20010009675 A1. Uděleno 2001. Zapsáno 1999. Dostupné z: http://patentimages.storage.googleapis.com/pdfs/US20010009675.pdf

[46] BLANCHARD, CH.R., S.F. TIMMONS a R.A. SMITH. *Keratin-based hydrogel for biomedical applications and method of production* [patent]. US6159496 A. Uděleno 2000. Zapsáno 1999.

[47] SHI, Weida a Marie-Josée DUMONT. Review: bio-based films from zein, keratin, pea, and rapeseed protein feedstocks. *Journal of Materials Science* [online]. 2014, vol. 49, issue 5, s. 1915-1930 [cit. 2015-05-03]. DOI: 10.1007/s10853-013-7933-1. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s10853-013-7933-1[

[48] BOURTOOM, T. Review article : edible protein films: properties enhancement. *International Food Research Journal* [online]. 2009, č. 16 [cit. 2015-05-

03]. Dostupné z: http://www.ifrj.upm.edu.my/16%20%281%29%202009/01%20IFRJ-2008-115%20Thawien%20Thailand%20FINAL.pdf

[49] CHARLES, Anker. *Method of preparing keratin-containing films and coatings.* [patent] Užitný zdroj, US 3642498. Uděleno 1972. Dostupné z: http://www.google.co.in/patents/US3642498

[50] YADA, Rickey Yoshio. *Proteins in food processing* [online]. Cambridge, Eng.: Woodhead Pub., 2004, xviii, 686 p. [cit. 2015-05-03]. ISBN 08-493-2536-6. Dostupné z: http://cst.ur.ac.rw/library/Food%20Science%20books/batch1/Proteins%20in%20food%20processing.pdf

[51] HECK, Tobias, Greta FACCIO, Michael RICHTER a Linda THÖNY-MEYER. Enzyme-catalyzed protein crosslinking. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2013, roč. 97, č. 2, s. 461-475 [cit. 2015-05-03]. DOI: 10.1007/s00253-012-4569-z. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3546294/

[52] MARK, E. A Van DYKE. *Methods for producing, films comprising, and methods for using heterogenous crosslinked protein networks.* [patent] Užitný vzor, US 6914126 B2. Uděleno 2005. Dostupné z: http://www.google.com/patents/US6914126

[53] SIMPSON, W a G CRAWSHAW. *Wool: science and technology*. Cambridge, England: Woodhead, c2002, xiv, 368 p. ISBN 08-493-2820-9.

[54] MIGNEAULT, DARTIGUENAVE, BERTRAND a WALDRON. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques* [online]. 2004, roč. 5, č. 37 [cit. 2015-05-03]. DOI: 10.2144/3705A0790. Dostupné z: http://www.biotechniques.com/multimedia/archive/00037/BTN_A_04375RV01_O_37190a.pdf

[55] DOU, Yao, Xue HUANG, Buning ZHANG, Ming HE, Guoqiang YIN a Yingde CUI. Preparation and characterization of a dialdehyde starch crosslin-

ked feather keratin film for food packaging application. *RSC Adv* [online]. 2015, roč. 5, č. 34, s. 27168-27174 [cit. 2015-05-03]. DOI: 10.1039/C4RA15469J. Dostupné z: http://xlink.rsc.org/?DOI=C4RA15469J

[56] SHI, Yan-Guo, Lei QIAN, Na ZHANG, Chun-Ran HAN, Ying LIU, Yi-Fang ZHANG a Yong-Qiang MA. Changes in Morphology and Activity of Transglutaminase Following Cross-Linking and Immobilization on a Polypropylene Microporous Membrane. *Molecules* [online]. 2011, roč. 16, č. 12, s. 10046-10058 [cit. 2015-05-03]. DOI: 10.3390/molecules161210046. Dostupné z: http://www.mdpi.com/1420-3049/16/12/10046/

[57] CARDAMONE, Jeanette M. Keratin transamidation. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2008, roč. 42, č. 5, s. 413-419 [cit. 2015-05-03]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2008.02.004. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813008000445

[58] ULLAH, Aman, Thavaratnam VASANTHAN, David BRESSLER, Anastasia L. ELIAS a Jianping WU. Bioplastics from Feather Quill. *Biomacromolecules* [online]. 2011-10-10, roč. 12, č. 10, s. 3826-3832 [cit. 2015-05-03]. DOI: 10.1021/bm201112n. Dostupné z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm201112n

[59] INOUE, Motoki, Makoto SASAKI a Tetsushi TAGUCHI. Biodegradable organic acid-crosslinked alkali-treated gelatins with anti-thrombogenic and endothelialization properties. *Science and Technology of Advanced Materials* [online]. 2012-12-01, roč. 13, č. 6, s. 064215- [cit. 2015-05-03]. DOI: 10.1088/1468-6996/13/6/064215. Dostupné z: http://stacks.iop.org/1468-6996/13/i=6/a=064215?key=crossref.5fb606249bae733b9eeb210156bc0bef

[60] PÁSZTOR, J. Využití kombinace infračervené spektroskopie (FT-IR) a termogravimetrie (TGA) pro analýzu polymerů. *Chemagazín* [online]. 2010, roč.20, č.1 [cit. 2015-05-03]. Dostupné z: http://www.chemagazin.cz/userdata/chemagazin_2010/file/chxx_1_cl4.pdf

[61] KLOUŽKOVÁ, A., P. ZEMENOVÁ, J. KLOUŽEK a W. PABST. Termická analýza. In: *Termická analýza* [online]. 2012 [cit. 2015-05-03]. Dostupné z: http://tresen.vscht.cz/sil/sites/default/files/Termick%C3%A1%20anal%C3%BDza.pdf

[62] SEILEROVÁ, Lenka, Hana BRUSOVÁ, Bohumil KRATOCHVÍL a Lukáš KREJČÍK. Využití metod termické analýzy ve výzkumu a vývoji léčiv. *Chemické listy* [online]. 2012, č. 106 [cit. 2015-05-03]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_10_890-895.pdf

[63] Infračervená spektroskopie. *VŠCHT* [online]. [cit. 2015-05-03]. Dostupné z: http://old.vscht.cz/lms/Zverze/Infrared.htm

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AMK Aminokyselina

KH Keratinový hydrolyzát

DAS Dialdehyd škrobu

DET Diethylester kyseliny vinné

např. Například

kDa KiloDalton, Dalton – jednotka molární hmotnosti (1 Da = 1 g/mol)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Řez a struktura vlasu vlny [5] 14
Obr. 2 Příčné vazby mezi řetězci polymerů 19
Obr. 3 Sekundární struktura fibrilárních proteinů [15] 20
Obr. 4 Makroskopické složení vlákna vlny [7,18] 22
Obr. 5 Postup alkalicko-enzymové hydrolýzy se vznikem keratinového hydrolyzátu 46
Obr. 6 Vstupní surovina (a) a produkty alkalicko-enzymové hydrolýzy – nerozložený podíl vlny (b) a keratinový hydrolyzát (c) 48
Obr. 8 Vytvořené filmy: a) KH Esperase 6.0T, b) KH Savinase 6.0T 52
Obr. 9 Vytvořené filmy z KH Esperase 6.0T v procentuálním přídavku: 52
Obr. 10 Vytvořené filmy z KH Savinase 6.0T v procentuálním přídavku: 53
Obr. 11 TG křivky vstupní suroviny a výstupů alkalicko-enzymové hydrolýzy 57
Obr. 12 TG křivky filmů z KH Esperase 6.0T 58
Obr. 13 TG křivky filmů z KH Savinase 6.0T 59
Obr. 14 DSC křivky filmů vstupní suroviny a výstupů alkalicko-enzymové 60
Obr. 15 DSC křivky filmů z KH Esperase 6.0T 61
Obr. 16 DSC křivky filmůz KH Savinase 6.0T 62
Obr. 17 FTIR křivka síťovadla DET 64
Obr. 18 FTIR křivky keratinových hydrolyzátů 65
Obr. 19 FTIR křivky pro filmy tvořené z KH Esperase 6.0T 66
Obr. 20 FTIR křivky pro filmy tvořené z KH Savinase 6.0T 67

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Skupinové rozložení AMK vlny [2] 17
Tab. 2 Zanalyzované hodnoty zjišťovaných elementů u vstupního materiálu 37
Tab. 3 Uvedené charakteristiky DET dle výrobce 39
Tab. 4 Vytvořené filmy v s procentuálním přídavkem DET a glycerolu 50
Tab. 5 Výsledné hodnoty obsahu dusíku surové vlny a výstupů uvedené hydrolýzy 53
Tab. 6 Výsledné hodnoty obsahu dusíku u vytvořených filmů 54
Tab. 7 Výsledné hodnoty obsahu síry surové vlny a výstupů uvedené hydrolýzy 54
Tab. 8 Zjištěné hodnoty obsahu popelovin u daných vzorků 55
Tab. 9 Naměřené hodnoty rozpustnosti pro filmy KH Esperase 6.0T 56
Tab. 10 Naměřené hodnoty rozpustnosti pro filmy KH Savinase 6.0T 56

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: FTIR snímek KH Esperase 6.0T

Příloha P II: FTIR snímek KH Savinase 6.0T

Příloha P III: FTIR snímek KH Esperase 6.0T – bez síťovadla

Příloha P IV: FTIR snímek KH Esperase 6.0T + 10 % DET

Příloha P V: FTIR snímek KH Esperase 6.0T + 15 % DET

Příloha P VI: FTIR snímek KH Esperase 6.0T + 20 % DET

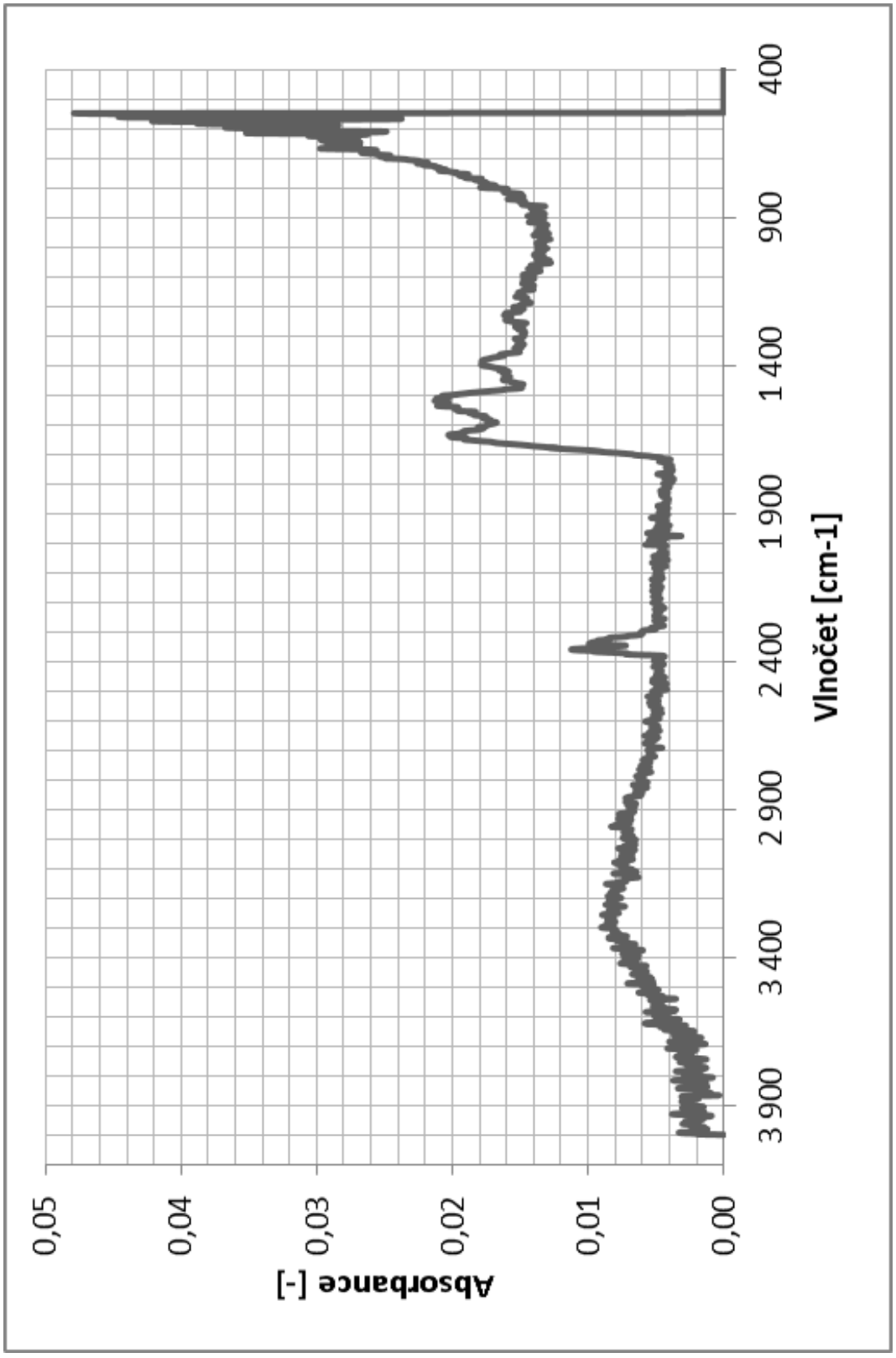
Příloha P VII: FTIR snímek KH Savinase 6.0T – bez síťovadla

Příloha P VIII: FTIR snímek KH Savinase 6.0T + 10 % DET

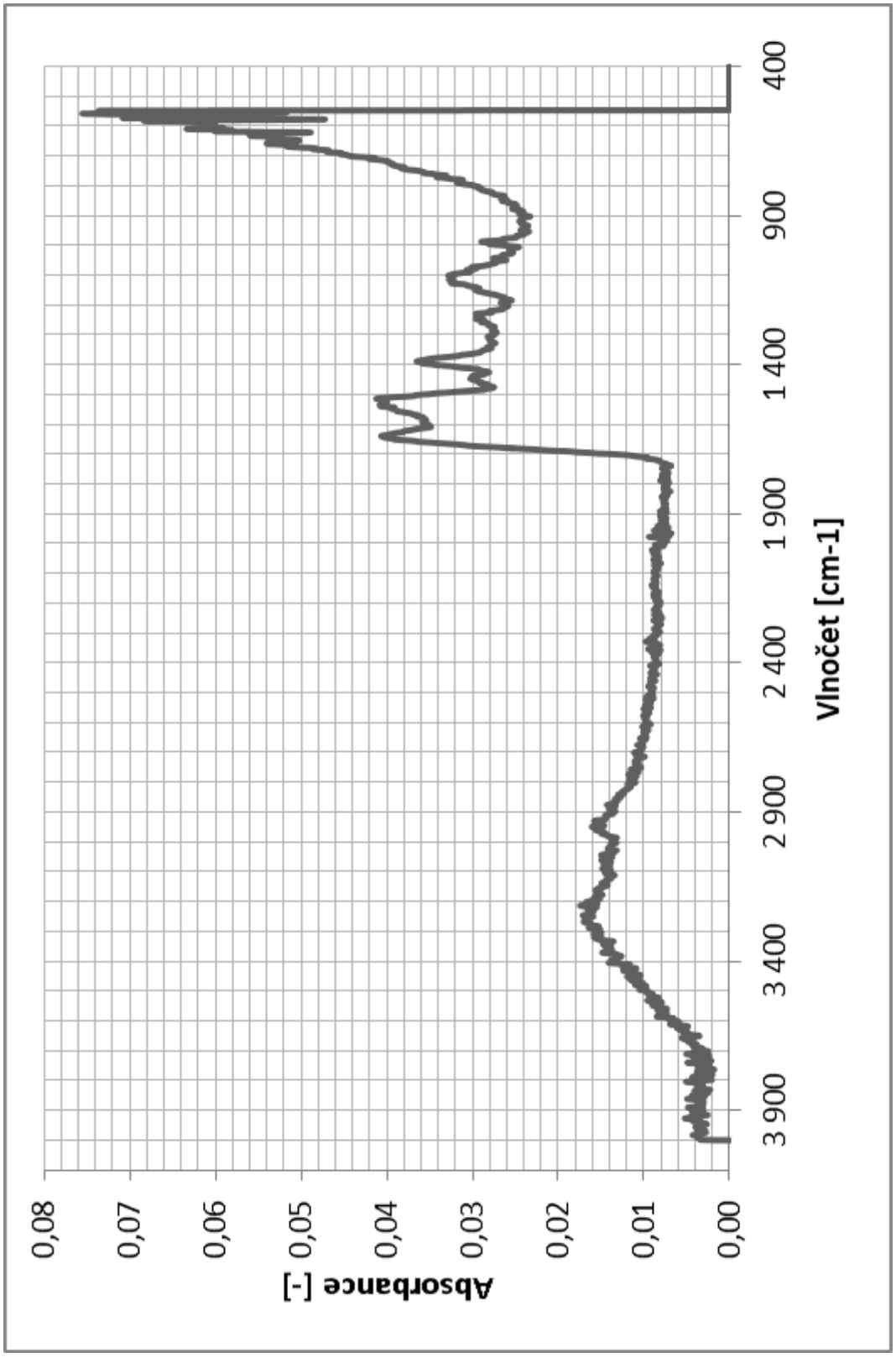
Příloha P IX: FTIR snímek KH Savinase 6.0T + 15 % DET

Příloha P X: FTIR snímek KH Savinase 6.0T + 20 % DET

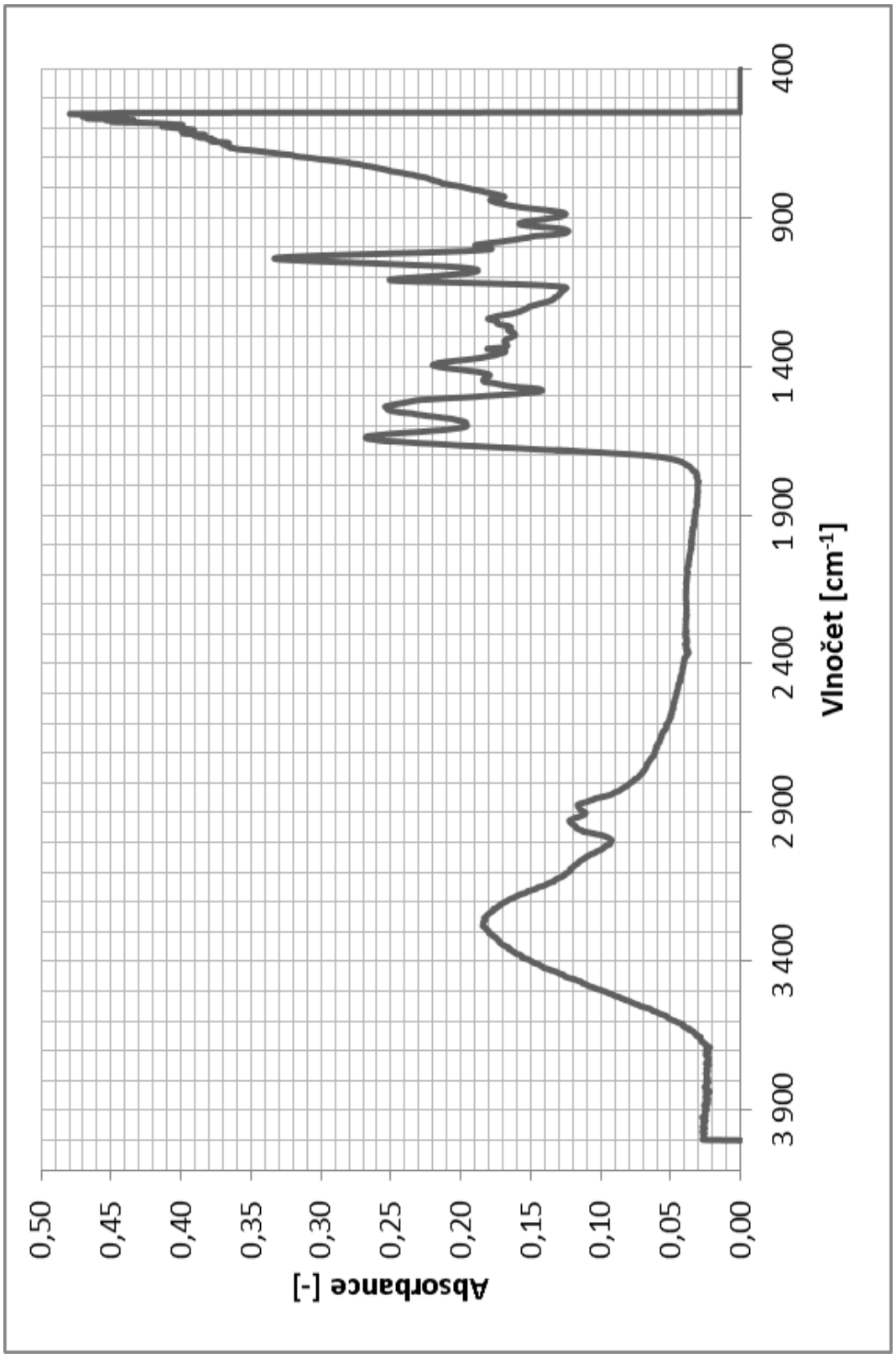
PŘÍLOHA P I: FTIR SNÍMEK KH ESPERASE 6.0T



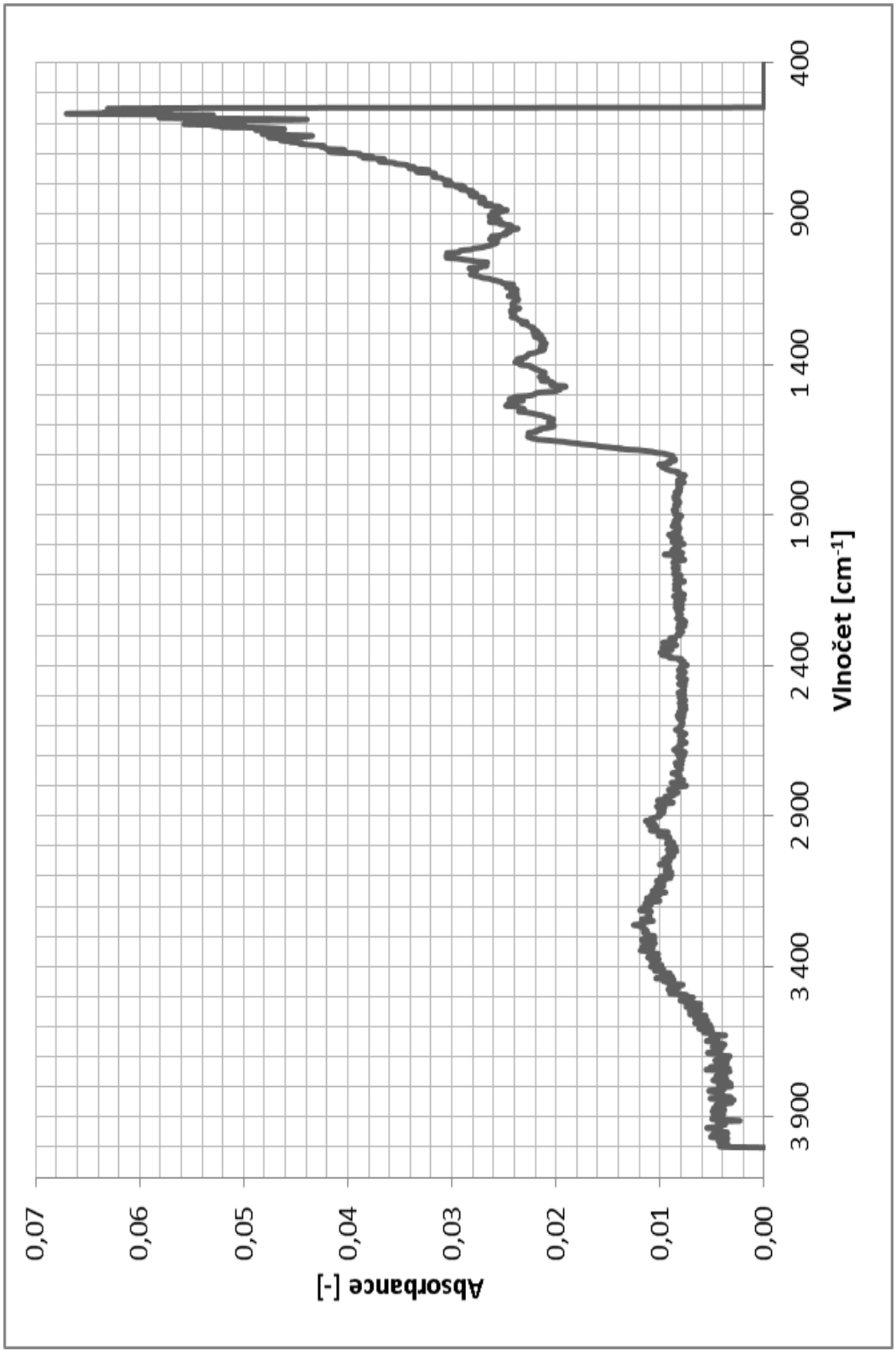
PŘÍLOHA P II: FTIR SNÍMEK KH SAVINASE 6.0T



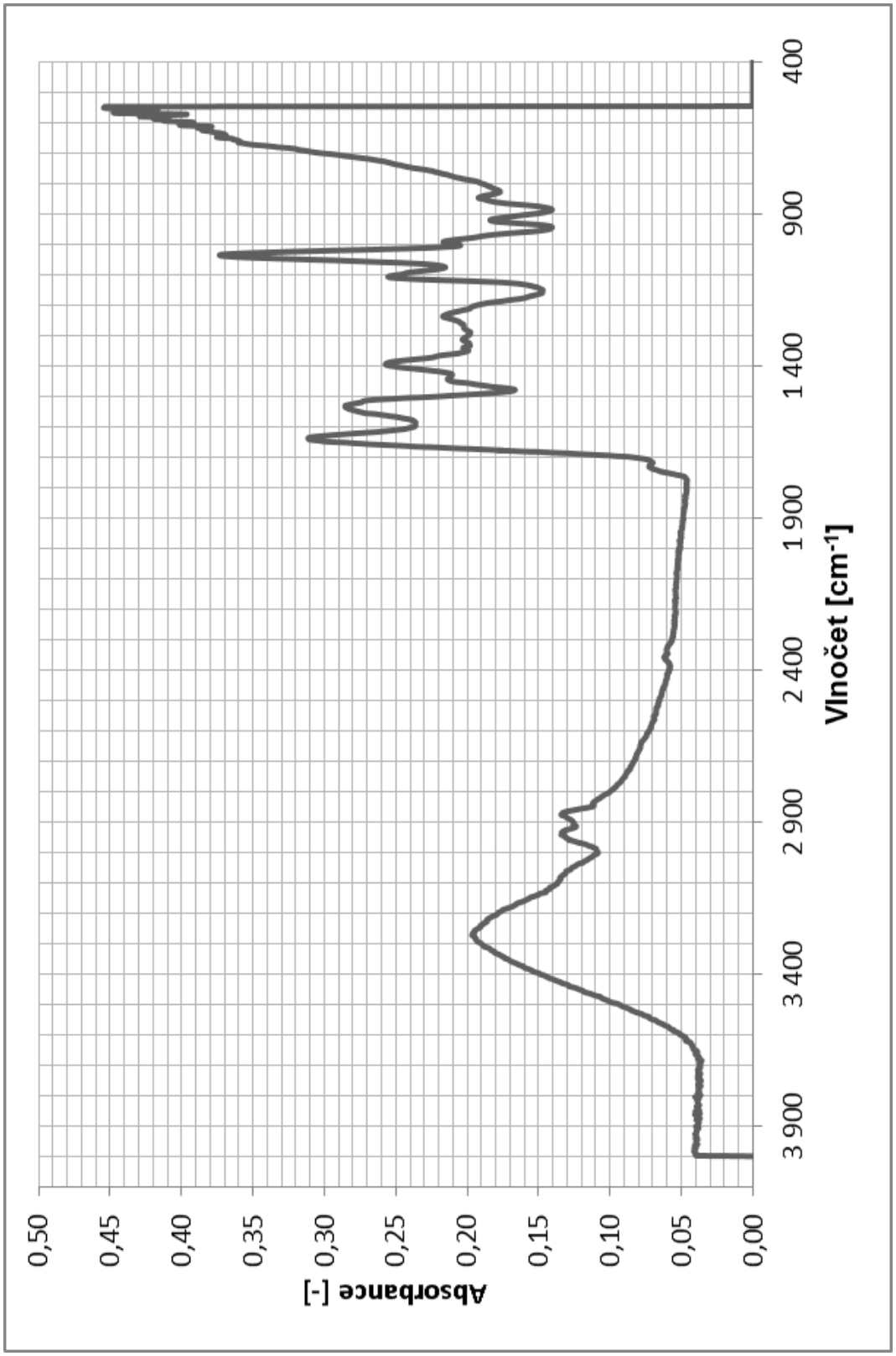
PŘÍLOHA P III: FTIR SNÍMEK KH ESPERASE 6.0T – BEZ SÍŤOVADLA



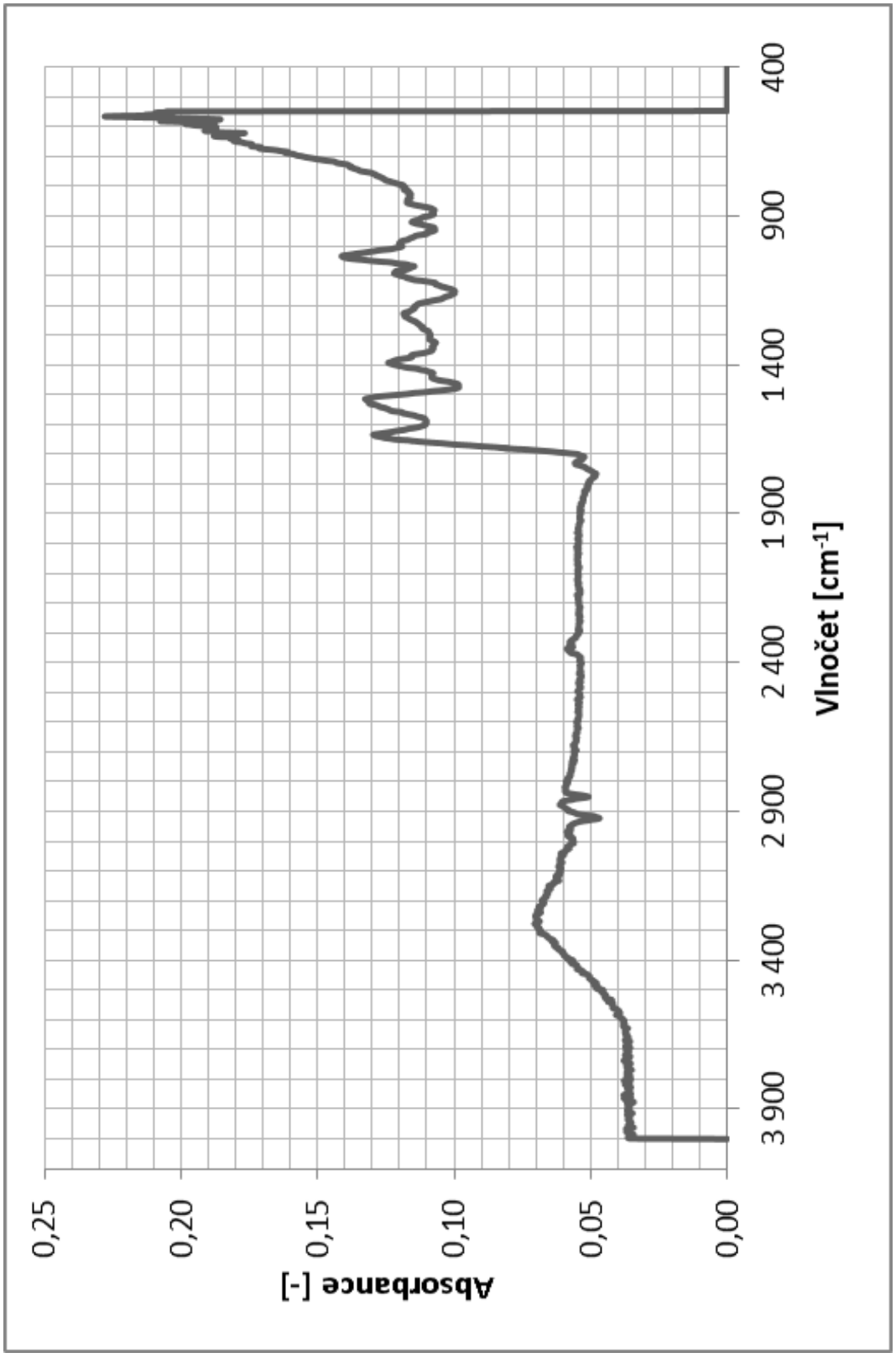
PŘÍLOHA P IV: FTIR SNÍMEK KH ESPERASE 6.0T + 10 % DET



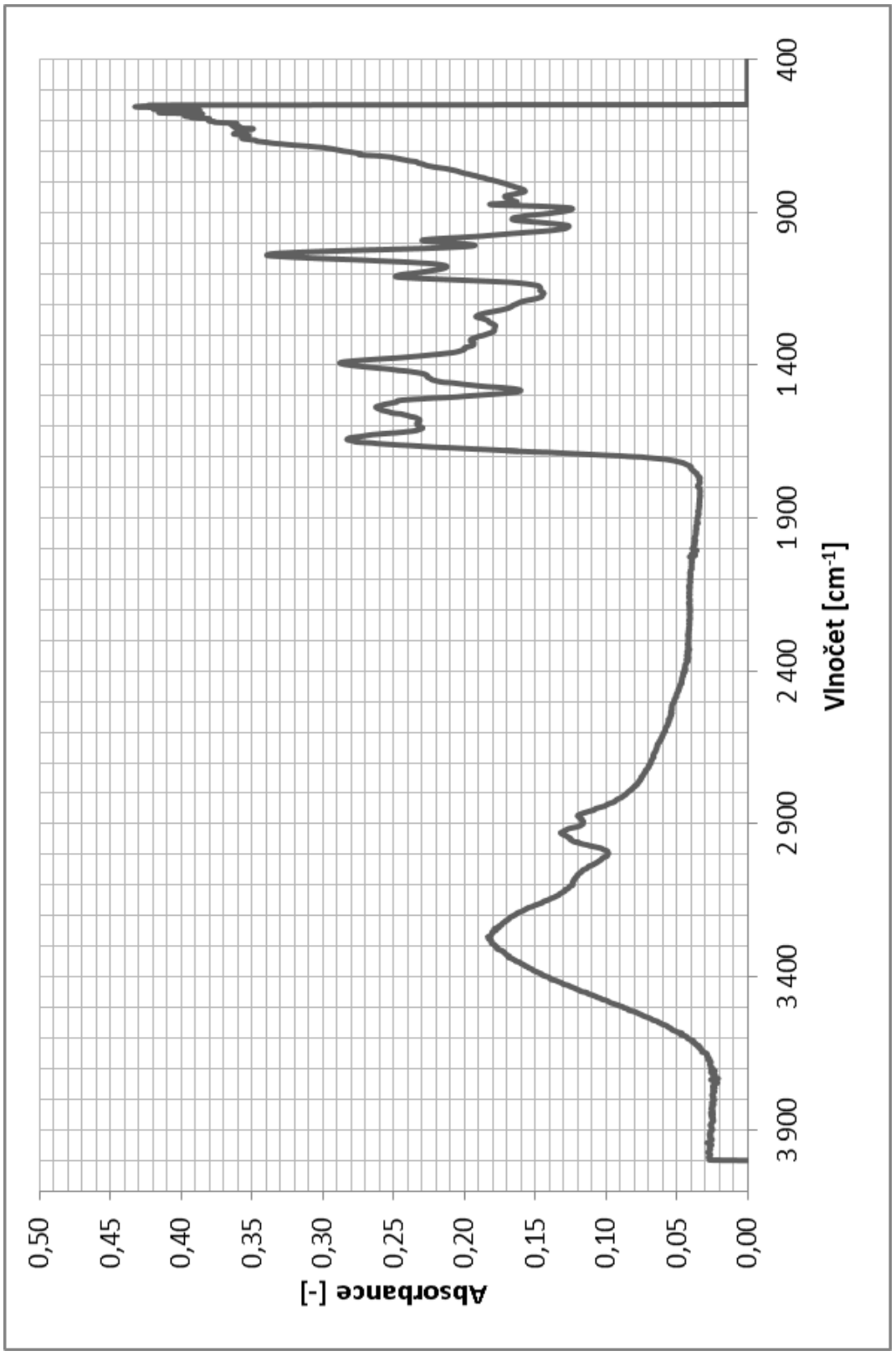
PŘÍLOHA P V: FTIR SNÍMEK KH ESPERASE 6.0T + 15 % DET



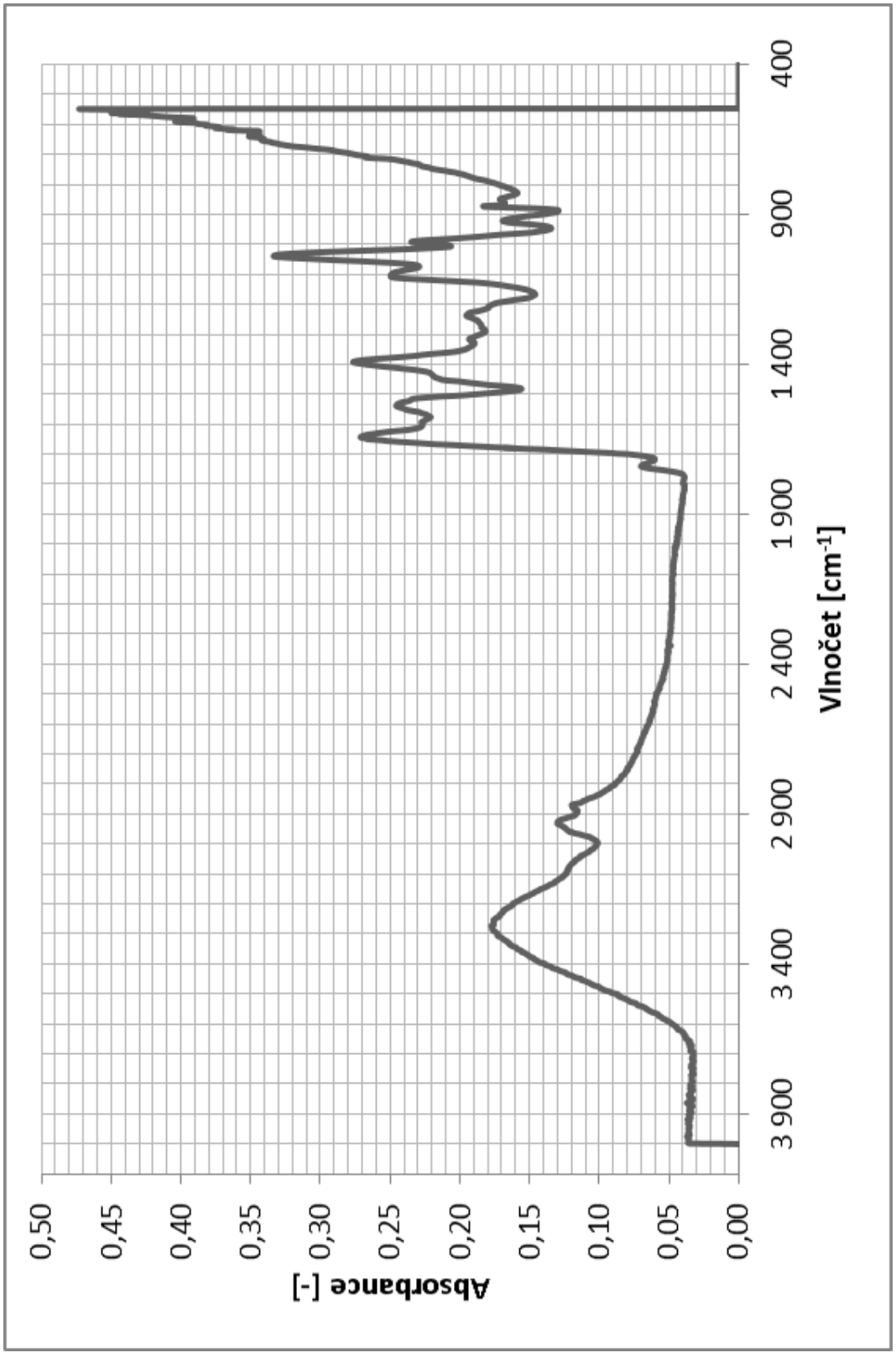
PŘÍLOHA P VI: FTIR SNÍMEK KH ESPERASE 6.0T + 20 % DET



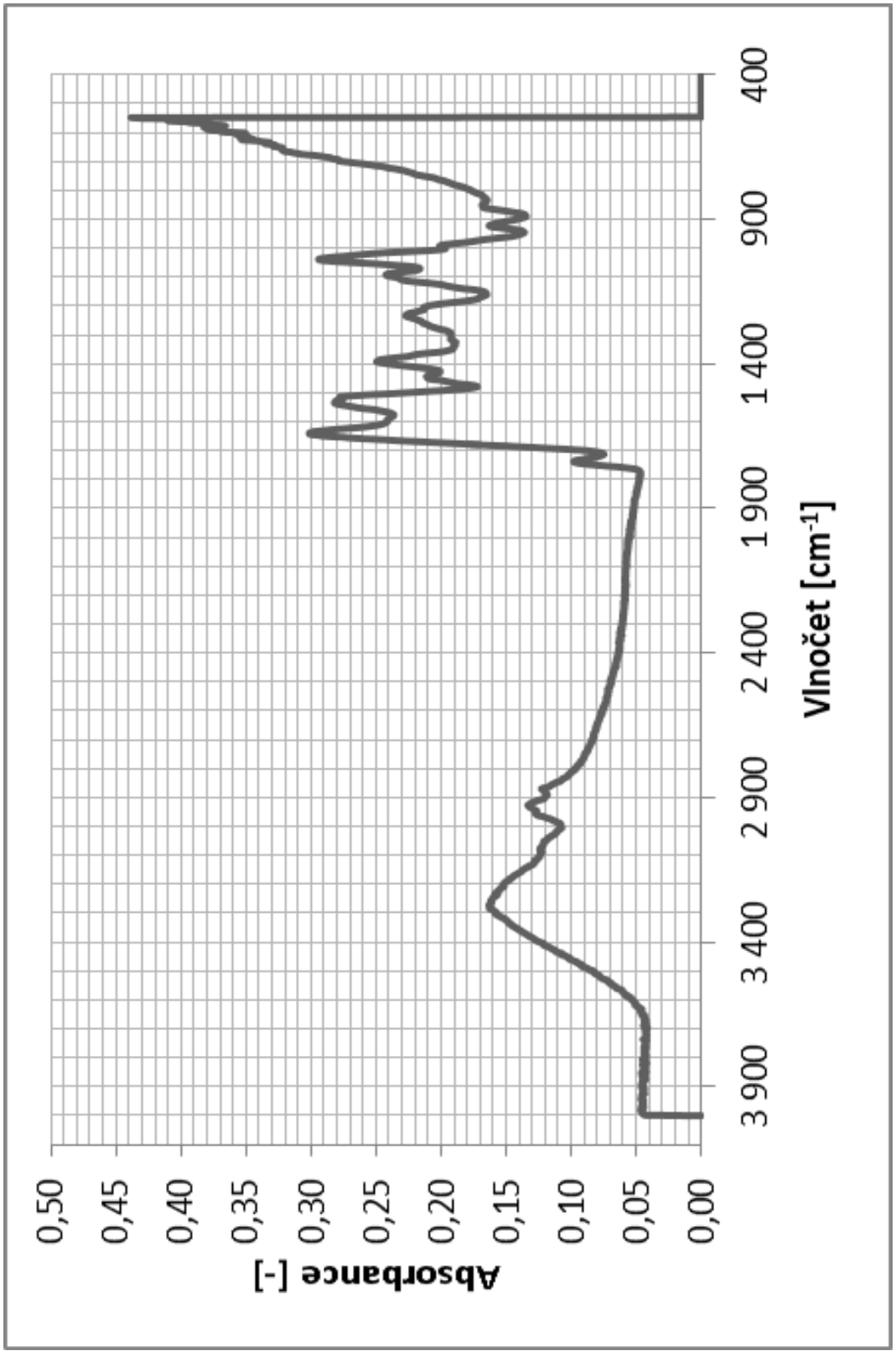
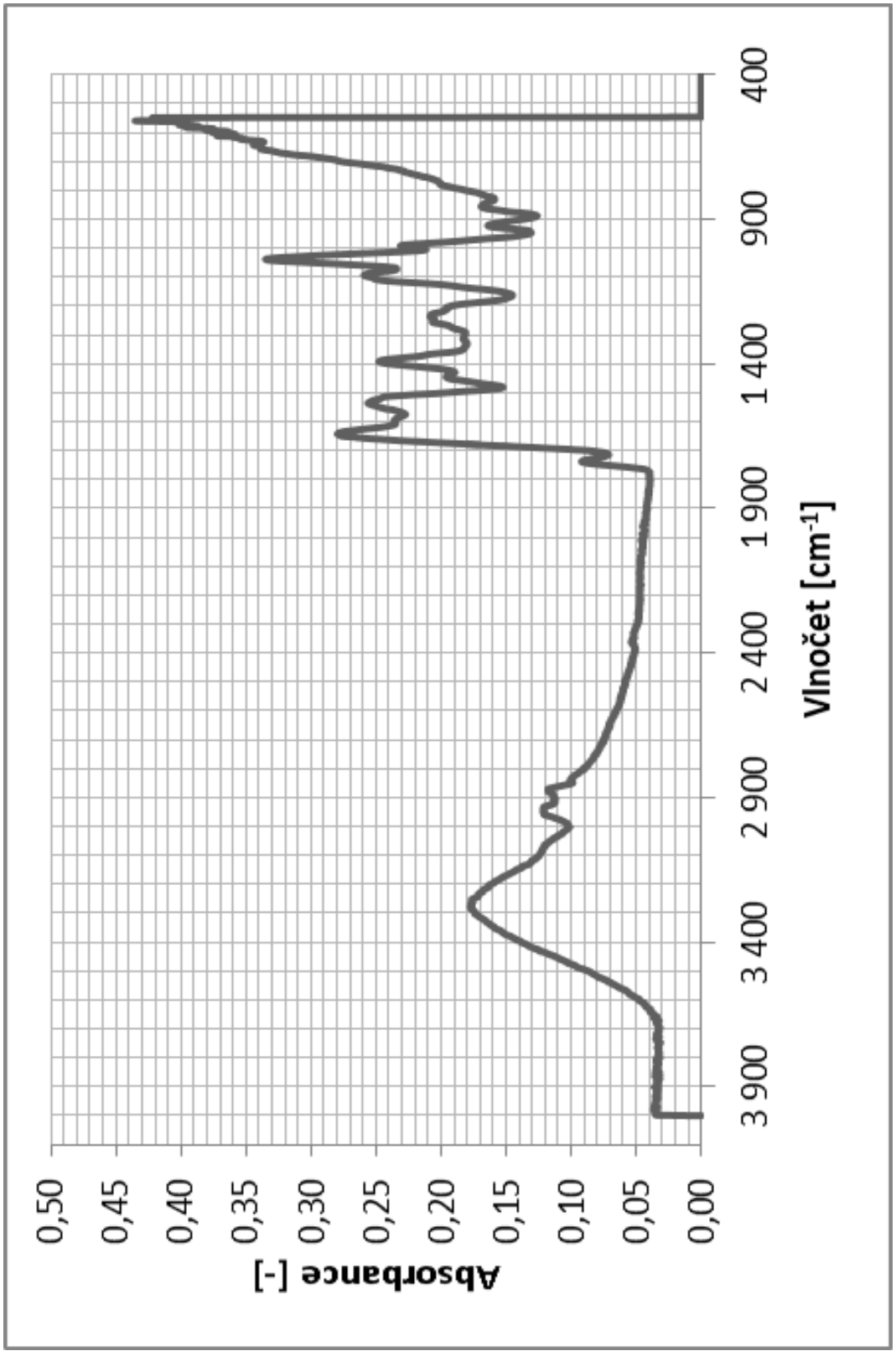
PŘÍLOHA P VII: FTIR SNÍMEK KH SAVINASE 6.0T – BEZ SÍŤOVADLA



PŘÍLOHA P VIII: FTIR SNÍMEK KH SAVINASE 6.0T + 10 % DET



PŘÍLOHA P IX: FTIR SNÍMEK KH SAVINASE 6.0T + 15 % DET



PŘÍLOHA P X: FTIR SNÍMEK KH SAVINASE 6.0T + 20 % DET