

# **Příprava a charakterizace směsí keratinových hydrolyzátů s chitosanem**

Bc. Iveta Balogová

---

Diplomová práce  
2017



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav inženýrství polymerů  
akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Iveta Balogová**  
Osobní číslo: **T15386**  
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Inženýrství polymerů**  
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Příprava a charakterizace směsí keratinových hydrolyzátů s chitosanem**

Zásady pro vypracování:

**Teoretická část práce bude pojednávat o možnostech využití keratinových hydrolyzátů v průmyslu, zemědělství a farmacii. Dále pak o tvorbě směsí keratinových hydrolyzátů s dalšími látkami.**

**Praktická část práce se bude věnovat zejména přípravě keratinových hydrolyzátů a charakterizaci směsí těchto materiálů s chitosanem pro budoucí přípravu filmů a gelů.**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

**KORNILLOWICZ-KOWALSKA, Teresa a Justyna BOHACZ. Biodegradation of ke-ratin waste: Theory and practical aspects. Waste Management [online]. 2011, vol. 31, issue 8, s. 1689-1701 [cit. 2015-03-05]. DOI: 10.1016/j.wasman.2011.03.024.**

**WHITFORD, David. Proteins: structure and function. Hoboken, NJ: J. Wiley & Sons, c2005, xiv, 528 s. ISBN 0-471-49893-9.**

**GENNADIOS, Edited by Aristippos. Protein-based films and coatings. Boca Raton: CRC Press, 2002. s 253 271. ISBN 9781420031980.**

**SIMPSON, W a G CRAWSHAW. Wool: science and technology. Cambridge, En-gland: Woodhead, c2002, 143 146. ISBN 0849328209.**

Odborné databáze Knovel, Web of Science, Scopus, ScienceDirect

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Ondřej Krejčí, PhD.**

Ústav inženýrství polymerů

Datum zadání diplomové práce:

**2. ledna 2017**

Termín odevzdání diplomové práce:

**10. května 2017**

Ve Zlíně dne 1. března 2017



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.

*děkan*



doc. Ing. Tomáš Sedláček, Ph.D.

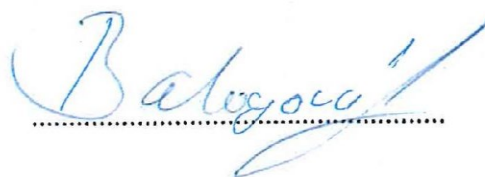
*ředitel ústavu*

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 2.5.2017



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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

## **ABSTRAKT**

Teoretická část diplomové práce popisuje základní informace o keratinu a chitosanu, a dále se tato část věnuje popisu přípravy a charakterizace keratinového hydrolyzátu. V další části se práce zabývá možnostmi přípravy filmů z keratinového hydrolyzátu, modifikaci vlastností těchto filmů, zejména přidavkem chitosanu. Praktická část práce popisuje přípravu keratinového hydrolyzátu z ovčí vlny za použití kombinace alkalické a enzymové hydrolýzy. Dále se práce věnuje přípravě filmů z keratinového hydrolyzátu s přidavkem chitosanu, změkčovadla glycerolu a síťovadla glutaraldehydu. Vstupní materiály a připravené filmy byly testovány analytickými a fyzikálně-mechanickými metodami.

Klíčová slova: vlna, keratin, chitosan, hydrolyzát, filmy

## **ABSTRACT**

Theoretical part of this master thesis provides general information about keratin and chitosan, preparation and characterization of keratin hydrolysate. In the next chapter it also deals with the possibilities of film preparation from the keratin hydrolysate, modification of the film properties, especially with the addition of chitosan. The practical part describes the preparation of keratin hydrolysate from sheep wool using a combination of alkaline and enzymatic hydrolysis. Then the work deals with films preparation from keratin hydrolysate with addition of chitosan, plasticizer glycerol and cross-linking agent glutaraldehyde. Input materials and films were tested by analytical and physico-mechanical methods.

Keywords: wool, keratin, chitosan, hydrolysate, films

Chtěla bych ráda poděkovat svému vedoucímu diplomové práce Ing. Ondřeji Krejčímu, Ph.D. za jeho odborné vedení, ochotu a pomoc při tvorbě této práce.

Rovněž bych také ráda poděkovala rodině a přátelům za jejich podporu.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 KERATIN</b> .....	<b>12</b>
1.1 VLASTNOSTI A VÝSKYT KERATINU.....	12
1.2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ KERATINU .....	12
1.3 MAKROMOLEKULÁRNÍ STRUKTURA KERATINU .....	15
1.3.1 Primární struktura.....	15
1.3.2 Sekundární struktura .....	16
1.3.3 Terciární struktura .....	17
1.3.4 Kvartérní.....	17
<b>2 HYDROLÝZA KERATINU</b> .....	<b>19</b>
2.1 ALKALICKÁ HYDROLÝZA.....	19
2.2 KYSELÁ HYDROLÝZA .....	20
2.3 ENZYMOVÁ HYDROLÝZA .....	20
2.4 OXIDAČNÍ HYDROLÝZA .....	20
2.5 REDUKČNÍ HYDROLÝZA.....	21
2.6 KOMBINOVANÝ ZPŮSOB HYDROLÝZY .....	21
<b>3 VYUŽITÍ KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU</b> .....	<b>22</b>
3.1 APLIKACE V LÉKAŘSTVÍ .....	22
3.2 APLIKACE V OBLASTI KOSMETIKY.....	23
3.3 APLIKACE V ZEMĚDĚLSTVÍ .....	23
3.4 ČINĚNÍ KŮŽE.....	24
<b>4 KERATINOVÉ FILMY</b> .....	<b>25</b>
4.1 VLASTNOSTI KERATINOVÝCH FILMŮ .....	25
4.2 PŘÍPRAVA FILMŮ .....	25
4.2.1 Lití roztoku.....	26
4.2.2 Termoplastický proces .....	26
4.3 MODIFIKACE PROTEINŮ .....	27
4.3.1 Modifikace keratinových filmů .....	27
4.3.2 Keratinové kompozity .....	27
4.4 APLIKACE FILMŮ .....	28
<b>5 CHITOSAN</b> .....	<b>29</b>
5.1 APLIKACE CHITOSANŮ .....	30
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>31</b>
<b>6 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>32</b>



<b>7</b>	<b>MATERIÁLY A METODY .....</b>	<b>33</b>
7.1	CHEMIKÁLIE .....	33
7.2	VSTUPNÍ MATERIÁLY .....	33
7.3	PŘÍSTROJE A POMŮCKY .....	34
7.4	METODY .....	34
7.4.1	Příprava keratinového hydrolyzátu .....	34
	Úprava a odtučnění vlny .....	34
	Rozklad vlny .....	34
	Separace .....	35
	Dialýza .....	35
	Vznik prášku .....	35
7.4.2	Příprava filmů .....	36
7.4.3	Analytické zkoušky .....	37
	Stanovení sušiny .....	37
	Stanovení popelovin .....	38
	Mikrochemické stanovení dusíku – Mikro-Kjeldahlova metoda .....	38
	Zkouška rozpustnosti .....	39
7.4.4	Tahová zkouška .....	40
7.4.5	Diferenciální snímací kalorimetrie DSC .....	40
7.4.6	Statistické vyhodnocení pokusů .....	41
<b>8</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>42</b>
8.1	VÝTĚŽNOST HYDROLÝZY .....	42
8.2	FILMY .....	43
8.3	ANALYTICKÉ ZKOUŠKY .....	45
8.3.1	Keratinový hydrolyzát .....	45
8.3.2	Analytické zkoušky filmů .....	47
	Stanovení sušiny .....	47
	Zkouška rozpustnosti .....	47
8.4	TAHOVÁ ZKOUŠKA .....	51
8.5	DIFERENCIÁLNÍ SNÍMACÍ KALORIMETRIE DSC .....	54
8.6	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ .....	57
8.6.1	Statistická významnost jednotlivých faktorů .....	57
8.6.2	Vrstevnicové diagramy .....	60
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>68</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>70</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>74</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>75</b>
	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>77</b>

## ÚVOD

Keratin se nachází ve vnější rohovité epidermální vrstvě všech vyšších obratlovců. Vyskytuje se také v útvarech, které z této vrstvy vyrůstají, jako jsou vlasy, nehty, rohovina nebo peří. Keratin je vysoce stabilní. Vyznačuje se mechanickou a chemickou odolností. Je nerozpustný, obtížně degradovatelný a nestravitelný. Je to způsobeno příčným spojením polypeptidových řetězců disulfidovými vazbami. Díky těmto vazbám je keratin obtížně zpracovatelný. Z toho důvodu není dostatečně využit. Vzniká tím velké množství keratinových odpadů, což je velmi neefektivní, protože se tím plýtvá energií. Navíc keratin je považován za biomateriál, který je biokompatibilní a biodegradabilní. Plýtváním tímto biomateriálem se přichází o možnost jej využít v oblasti biomedicíny.

Oddělením peptidových a disulfidových vazeb vzniká keratinový hydrolyzát, který již lze rozpustit i strávit. Produkce keratinového hydrolyzátu z těchto keratinových odpadů je jednou z možností, jak tento odpad efektivně využít. Keratinový hydrolyzát nachází své uplatnění např. ve farmaceutickém průmyslu (výroba mikrokapsulí). Dále v potravinářském průmyslu, kde se z něho vyrábí ochranné folie nebo jedlé povlaky, díky kterým vydrží potraviny déle čerstvé.

Keratinové filmy jsou vhodné pro přípravu biodegradabilních a jedlých filmů nebo povlaků. Mohou sloužit jako obalové materiály pro (mikro) kapsule.

Chitosan je pro biomateriálové aplikace velmi zajímavou a zkoumanou molekulou. Je vysoce biokompatibilní, poskytuje biologickou funkci pro hojení ran a vyznačuje se antibakteriální aktivitou. Přídavkem chitosanu do keratinového filmu se posílí mechanické vlastnosti tohoto filmu, a kromě toho se posilují antibakteriální vlastnosti těchto filmů. Keratinové filmy s přídavkem chitosanu jsou dobrými substráty pro růst buněčné kultury, a díky tomu jsou tyto filmy předmětem vědeckého zkoumání pro oblast tkáňového inženýrství.

## I. TEORETICKÁ ČÁST

## 1 KERATIN

### 1.1 Vlastnosti a výskyt keratinu

Keratin patří mezi fibrilární (vláknité) proteiny. Je to chemicky nereaktivní a mechanicky odolný protein, který se vyskytuje u všech vyšších obratlovců. Nachází se ve vnější rohovité epidermální vrstvě, a také v útvech, které z této vrstvy vyrůstají, jako jsou nehty, vlasy, rohovina nebo peří. Existují dva typy,  $\alpha$ -keratin a  $\beta$ -keratin,  $\alpha$ -keratin se vyskytuje u savců a  $\beta$ -keratin u ptáků a plazů [1].

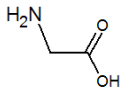
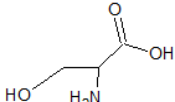
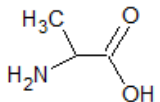
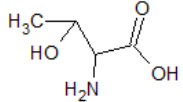
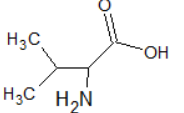
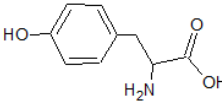
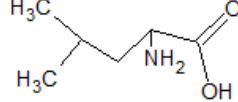
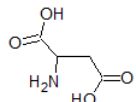
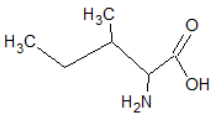
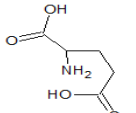
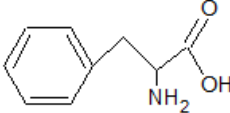
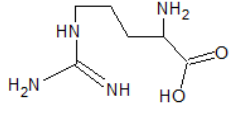
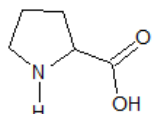
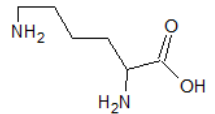
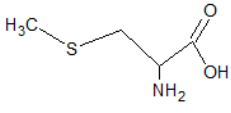
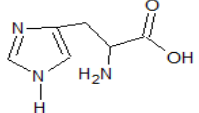
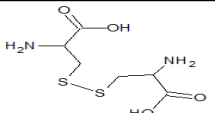
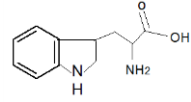
Keratiny se vyznačují vysoce stabilní strukturou, odolností vůči degradaci, jsou obtížně rozložitelné. Je to dáno především obsahem disulfidových vazeb (S-S). Použitím vysokých koncentrací roztoků chemikálií za působení vysokých teplot a tlaků je možné získat rozpustný keratin [1].

Keratin se nachází jen v epiteliálních buňkách a je charakteristický svými jedinečnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Je odolný vůči štěpení enzymem pepsinem nebo trypsinem, je nerozpustný ve vodě, zředěných kyselinách a zásadách, organických rozpouštědlech a ve vodných roztocích solí. Rozpouští se v roztocích, které obsahují denaturační činidla, jako je močovina [2].

### 1.2 Chemické složení keratinu

Keratin je složen z aminokyselin, které jsou mezi sebou spojeny peptidovou vazbou. V tabulce č. 1 je vidět přehled aminokyselin, které tvoří keratin. Množství jednotlivých aminokyselin v keratinu je ovlivněno živočišným druhem, ze kterého je keratin získán, a týká se to i u plemen stejného druhu. Liší se také v tom, z jaké části biologického útvaru je vzorek odebrán. Životní prostředí a potrava má rovněž na množství aminokyselin vliv [3, 4]. V aminokyselinách cystin, cystein a methionin je vázána síra, proto se keratinové proteiny vyznačují vysokým obsahem síry. V keratinu se cystinu nachází mnohem více než u jiných proteinů [4]. Obsah cystinu má významný vliv na fyzikální a chemické vlastnosti keratinu [5].

Tabulka 1: Přehled aminokyselin, které tvoří keratin [6]

Název aminokyseliny	Vzorec	Název aminokyseliny	Vzorec
Glycin		Serin	
Alanin		Threonin	
Valin		Tyrosin	
Leucin		Kyselina asparagová	
Izoleucin		Kyselina glutamová	
Fenylalanin		Arginin	
Prolin		Lysin	
Methionin		Histidin	
Cystin		Tryptofan	

Obsah síry je stejně tak kolísavý, jako obsah aminokyselin. Celkový obsah síry v keratinu je od 2 do 5 %. V tabulce č. 2 je možné vidět kolísavost ve složení cystinu a síry v závislosti na zdroji, ze kterého byly získány [5, 6].

Tabulka 2: Rozdílné složení [%] cystinu a síry u různých zdrojů [5]

Zdroj	Složení [%]
<b>Cystin</b>	
Ovčí vlna	11,5 - 13,1
Lidské vlasy	11,5 - 15,3
Koňské žíně	8
Koňské štětiny	kolem 7
<b>Síra</b>	
Jemné vlny	3,82
Hrubé vlny	3,24 - 3,33

Množství jednotlivých aminokyselin v závislosti na zdroji, ve kterém se nacházejí je vidět v tabulce č. 3.

Tabulka 3: Průměrný obsah aminokyselin [%] v keratinu [5]

Skupina Aminokyselin	Aminokyseliny	Lidský vlas	Ovčí vlna
<b>Kationaktivní</b>	Arginin	8,9 - 9,8	9,2 - 10,6
	Lysin	1,9 - 3,1	2,8 - 3,3
	Histidin	0,6 - 1,2	0,7 - 1,1
<b>Anionaktivní</b>	Kyselina asparagová	3,9 - 7,7	6,4 - 7,3
	Kyselina glutamová	13,6 - 14,2	13,1 - 16,0
<b>Hydroxyaminokyseliny</b>	Serin	7,4 - 10,6	7,2 - 9,5
	Threonin	7,0 - 8,5	6,6 - 6,7
	Tyrosin	2,2 - 3,0	4,0 - 6,4
<b>Thioaminokyseliny</b>	Cystin	16,6 - 18,0	11,0 - 13,7
	Methionin	0,7 - 1,0	0,5 - 0,7
<b>Hydrofobní</b>	Alanin	3,8	3,4 - 4,4
	Valin	5,5 - 5,9	5,0 - 5,9
	Leucin	6,4 - 8,3	7,6 - 8,1
	Izoleucin	4,7 - 4,8	3,1 - 4,5
	Prolin	4,3 - 9,6	5,3 - 8,1
	Fenylalanin	2,4 - 3,6	3,4 - 4,0
	Tryptofan	0,4 - 1,3	1,8 - 2,1

### 1.3 Makromolekulární struktura keratinu

Struktura proteinu ovlivňuje jeho vlastnosti, a tím i jeho funkci. Rozdílnost jednotlivých proteinů je především dána typem aminokyselin, které obsahují, jejich množstvím, a také jejich uspořádáním ve struktuře proteinu. [7, 8].

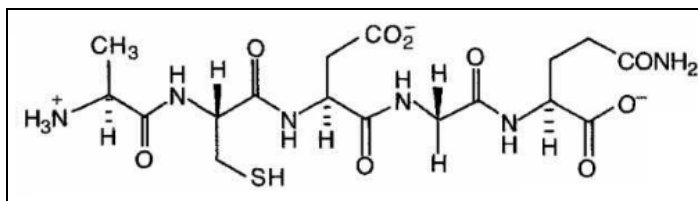
Základní stavební jednotkou všech proteinů jsou aminokyseliny. Aminokyseliny jsou definovány jako sloučeniny, u kterých se na uhlíku nachází karboxylová a aminová skupina. Na třetí vazbě uhlíku se nachází atom vodíku. U čtvrté vazby se u glycinu nachází další vodík. U všech ostatních aminokyselin se na čtvrté vazbě nachází boční řetězec R, který umožňuje podrobnější charakteristiku jednotlivých aminokyselin. Podle charakteru a počtu bočních skupin se aminokyseliny rozdělují na kyselé, zásadité a neutrální. Dále také na alifatické, heterocyklické a aromatické. Rozdělují se také podle toho, zda jsou polární či nepolární [9].

Jednotlivé aminokyseliny se ve fyziologickém systému slučují polykondenzací na vyšší útvary, biopolymery, za vzniku peptidové vazby  $-\text{CONH}$ . Mezi tyto útvary patří oligopeptidy, polypeptidy a bílkoviny. Oligopeptidy obsahují do 10 aminokyselin, polypeptidy obsahují nad 10 aminokyselin po relativní molární hmotnost 10 000. Pokud je relativní molární hmotnost nad 10 000, jedná se o bílkoviny [9].

#### 1.3.1 Primární struktura

Primární strukturu je možné popsat jako polypeptidový řetězec, který vznikl spojením aminokyselin kovalentní peptidovou vazbou  $-\text{CONH}$ . Kromě tohoto typu vazby se zde vyskytují ještě další, které jsou způsobeny vzájemnou reakcí funkčních skupin nacházejících se na bočním řetězci aminokyselin. Mezi tyto vazby patří vazba disulfidová, amidová a esterová. Vazba disulfidová vzniká mezi dvěma molekulami cysteinu. U amidové a esterové vazby dochází pomocí kyseliny fosforečné ke spojení molekul např. argininu, serinu a lysinů. Z primární struktury proteinu vznikají další vyšší typy struktur. Pro vznik vazeb, které tvoří peptidový řetězec, je nutný blízký kontakt atomů, mezi kterými mají tyto vazby vznikat [10, 11].





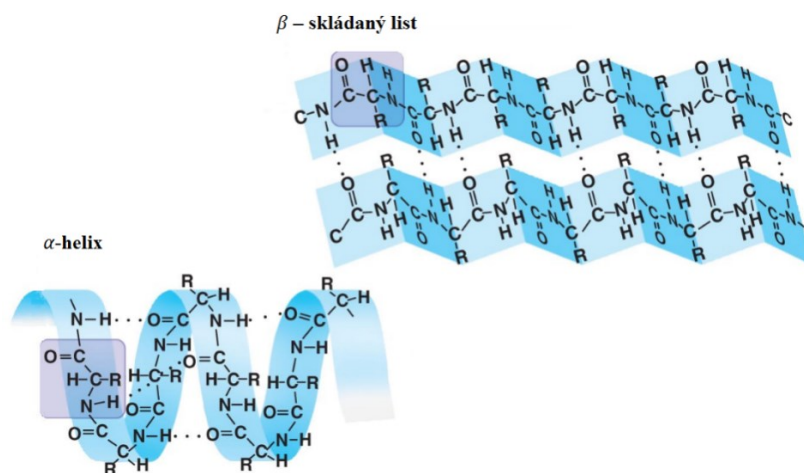
Obrázek 1: Primární struktura keratinu [12]

### 1.3.2 Sekundární struktura

Peptidová vazba se může nacházet buď v cis- nebo trans- konformaci. Termodynamicky je ale mnohem výhodnější trans-konformace. V rámci peptidové vazby se mohou vyskytovat rotace okolo třech chemických vazeb. Rotace vazby C-N prakticky neexistuje, a v důsledku toho je peptidová vazba planární (rovinná). Všechny atomy v rámci polypeptidového řetězce jsou v jedné rovině, přičemž atomy H a R leží nad a pod rovinou. V polypeptidovém řetězci mohou volně rotovat jen atomy nacházející se na uhlíku aminokyseliny, a tím také významně ovlivnit konformaci polypeptidů a bílkovin [9].

Obecně nejvýznamnějším prvkem sekundární struktury proteinů je šroubovice (helix), která vznikne stočením polypeptidového řetězce. Šroubovice je chirální a nejčastěji pravotočivá. Má příznivou konformaci pro vznik vodíkových vazeb mezi  $-NH$  a  $-CO$  skupinami hlavního polypeptidového řetězce a umožňuje jeho rigidní uspořádání [7]. Na 5 otáček šroubovice vychází 18 peptidových vazeb, přičemž každá peptidová vazba je zabudovaná do vodíkové vazby v rámci řetězce [9]. Na každou otočku šroubovice připadá 3,6 aminokyselinových zbytků, a délka 5 otáček je 2,7 nm [5].

U proteinů existují dva typy sekundární struktury,  $\alpha$ -helix a  $\beta$ -skládaný list [13, 7]. Pro  $\alpha$ -šroubovici je charakteristické stočení polypeptidového řetězce do pravotočivé šroubovice, ve které následně vzniknou vodíkové vazby mezi  $-NH$  a  $-CO$  skupinami v rámci jednoho řetězce. Konformace  $\beta$ -skládaný list je charakteristická rovnoběžným uspořádáním polypeptidových řetězců. V této struktuře také vznikají vodíkové vazby mezi  $-NH$  a  $-CO$  skupinami peptidové vazby, tentokrát ale každá skupina patří jinému řetězci [14, 7].



Obrázek 2: Sekundární struktura  $\alpha$ -helix (dole) a  $\beta$ -skládaný list (nahore) [15]

### 1.3.3 Terciární struktura

Jedná se o celkové prostorové uspořádání polypeptidových řetězců [7]. Terciární struktura je složena z pravidelně opakujících se jednotek sekundárních struktur polypeptidů v energeticky povolených konformacích [8].

Polypeptidové řetězce jsou vzájemně spojeny kovalentní cystinovou (disulfidovou) vazbou, elektrovalentní vazbou, a dále ještě Van der Waalsovými silami. Elektrovalentní vazby vznikají vzájemným působením kyselých ( $-\text{COOH}$ ) a alkalických ( $-\text{NH}_2$ ) skupin [16]. Významnou roli hrají i vodíkové vazby [7]. Dále mohou mezi polypeptidovými řetězci působit také hydrofobní interakce [11].

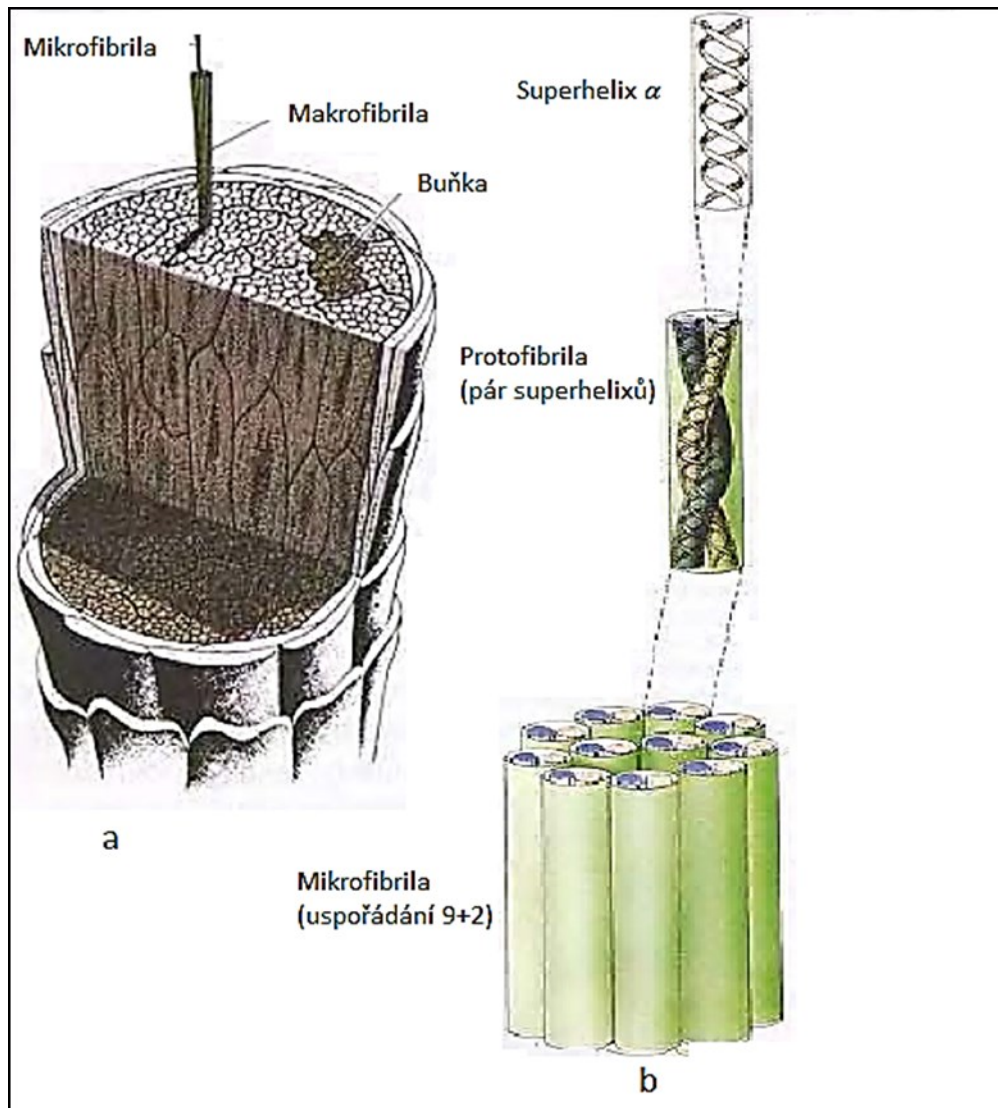
Až na základě terciární struktury vzniká definitivní prostorové upořádání molekuly, které udává proteinu jeho charakteristické biologické vlastnosti [11, 14].

### 1.3.4 Kvartérní

Kvartérní struktura je dána vzájemným působením polypeptidových řetězců, které vede k vytvoření vyššího molekulárního celku, proteinu, viz obr. č. 4. Stabilita struktury je zajištěna pomocí intermolekulárních nekovalentních vazeb, jako jsou hydrofobní síly, vodíkové, iontové a disulfidové vazby [7].

Příkladem vyšších struktur keratinu, který obsahuje  $\alpha$ -keratin, je např. vlas. Vlas je složen z makrofibril, které se skládají z mikrofibril. Prostor mezi mikrofibrilami je vyplněn proteinovou hmotou s vysokým obsahem síry. Mikrofibrila se skládá z protofibril, přičemž

každá protofibrila vzniká spojením párů superhelixů. Superhelix vzniká spojením dvou  $\alpha$ -helixů [7, 17].



Obrázek 3: a) Makroskopická struktura, b) molekulová struktura vlasu [7].

## 2 HYDROLÝZA KERATINU

Keratin se vyznačuje vysokou stabilitou, mechanickou a chemickou odolností. Je to dáno příčným spojením polypeptidových řetězců prostřednictvím disulfidových vazeb. Nicméně právě tohle spojení způsobuje obtížnou zpracovatelnost keratinu. Díky tomu není keratin dostatečně využit [1, 18].

Kromě toho, že je keratin nerozpustný, je také obtížně degradovatelný, a nedá se štěpit běžnými proteolytickými enzymy, jako je trypsin, pepsin nebo papain. To způsobuje jeho nestravitelnost. Pokud dojde k oddělení peptidových a disulfidových vazeb, vzniká keratinový hydrolyzát, který je již rozpustný a stravitelný. K tomu, aby došlo k rozložení disulfidových vazeb, je nutné pracovat při vysoké teplotě, tlaku a při vyšší koncentraci chemických látek.

Existuje více metod pro přípravu keratinových hydrolyzátů. Mezi tyto metody patří alkalická, kyselá a enzymová hydrolyza. Pro zvýšení účinnosti se v praxi používá i kombinovaná hydrolyza [1, 18]. Hydrolyza keratinu může být provedena také oxidačním a redukčním způsobem s použitím např. 2-mercaptoetanolu, močoviny nebo peroxidu vodíku [19, 20].

### 2.1 Alkalická hydrolyza

Jedná se o nejstarší typ hydrolyzy a o jednu z neúčinnějších metod hydrolyz. V případě alkalické reakce se hydrolyzuje peptidová vazba, a dochází ke štěpení disulfidových můstků [1]. Účinek je ovlivněn teplotou, pH i dobou působení. Nejčastějšími použitými alkáliemi jsou KOH, NaOH a  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  [19, 21].

Gousterova a kolektiv [21] popsali alkalickou hydrolyzu provedenou v mikrovlnné troubě. Tvrzení bylo takové, že podmínky v mikrovlnné troubě jsou podobné těm, které jsou v autoklávu. Definované množství vlny bylo smícháno s KOH a NaOH. Směs byla zahřáta v mikrovlnné troubě. Vzniklá sraženina se vysušila při vysoké teplotě a rozemlela na prášek.

Coward-Kelly a kolektiv [21] prováděli alkalickou hydrolyzu za použití  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Zdrojem keratinu bylo drůbeží peří a kravská srst. Všechny suroviny byly přidány do autoklávu s míchadlem. Hydrolyza probíhala při teplotě 150 °C po dobu 300 minut. Po 3 hodinách hydrolyzy při teplotě 150 °C se uvolnilo 90 % keratinu do roztoku [21].

## 2.2 Kyselá hydrolýza

Působením silných kyselin na řetězce keratinu nastane štěpení peptidové vazby, při kterém začínou vznikat  $-\text{COO}^-$  a  $-\text{NH}_4^+$  ionty. Dochází také k částečné oxidaci cystinu na kyselinu cysteinovou a cystein, čímž se částečně rozštěpí disulfidové můstky [1].

Kyselá hydrolýza keratinu může být provedena např. s použitím kyseliny octové (acetic acid) nebo kyseliny peroxooctové (peroxoacetic acid). Použitím 6M HCL při 80 °C je možné rozštěpit až 86% keratinu, nicméně jedná se poměrně o drastickou metodu rozbití struktury, která sebou nese značné, které negativně přispívají ke kvalitě keratinového hydrolyzátu [19].

## 2.3 Enzymová hydrolýza

Teprve nedávno se ke štěpení keratinu začala využívat enzymová hydrolýza [19]. V případě enzymové hydrolýzy se pro rozklad bílkoviny požívají enzymy produkované bakteriemi nebo houbami. Mezi výhody této metody patří mírné reakční podmínky, malé množství použitých proteáz (skupinu enzymů, které štěpí bílkoviny). Nicméně se i při této metodě objevuje několik nevýhod, např. udržení vhodných podmínek pro práci s bakteriemi, udržení stálého reakčního prostředí, vysoké cenové náklady této metody vzhledem k vysoké ceně enzymů a dlouhý reakční čas (3–7 dnů) ve srovnání s chemickým typem hydrolyz (několik hodin) [1]. Reakční podmínky obvykle závisí na druhu použitých enzymů nebo bakterií. Při této metodě je možné použít např. enzymy z rodu *Bacillus* *Sreptomyces* genera. Kida a kolektiv [19] při této metodě použili enzymy z rodu *Bacillus subtilis*, *Bacillus species*, *Bacillus licheniformis*, *Aspergillusmelleus*, a dále také enzymy z vepřové slinivky [19].

## 2.4 Oxidační hydrolýza

Oxidačním činidlem může být siřičitan sodný. Při použití siřičitanu sodného nastává děj sulfitolýza. Při tomto ději se oxiduje keratin za vzniku cysteinu a cysteinu-sulfonátu [20].

## 2.5 Redukční hydrolýza

Redukční hydrolýza může být provedena za použití chemikálií, jako jsou 2-mercaptoetanol, močovina nebo peroxid vodíku [19].

Katoh a kolektiv [19] použili pro redukční hydrolýzu dodecylsulfát sodný. Vzniklý hydrolyzát se získal ve formě prášku. Yang a kolektiv [19] použili pro tuto hydrolýzu dithiothreitol a guanidin hydrochloridu [19].

## 2.6 Kombinovaný způsob hydrolýzy

Pro vyšší účinnost rozkladu keratinových materiálů, a tím zvýšení výtěžnosti, při zachování nízkých reakčních podmínek, je možné použít kombinovaný způsob hydrolýzy. Nejlepší možnou kombinací je kombinace alkalické a enzymové hydrolýzy. Důvodem je vysoká účinnost většiny komerčně vyráběných keratinolytických a proteolytických enzymů [1].

Daley a kolektiv [19] při tomto způsobu hydrolýzy použili NaOH a enzym *Bacillus subtilis*. Účinnost hydrolýzy byla zhruba kolem 50 %. Vysušený keratinový hydrolyzát měl vysoký obsah proteinu a byl vhodný jako krmivo pro dobytek [19].

Mokrejš a kolektiv [1] také prováděli kombinovaný způsob hydrolýzy, při které byl použit KOH a enzym proteáza [1].

### 3 VYUŽITÍ KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU

Z celosvětové produkce ovčí vlny, produktů drůbežích farem (peří), jatek a koželužen (chlupy, kožešiny, štětiny, rohy, kopyta, atd.) zůstává velké množství keratinových odpadů. [19]. Ročně se po celém světě vyhodí okolo 5 miliónů tun těchto odpadních produktů obsahujících keratin. Je velmi neefektivní vyhazovat odpad na skládku nebo jej spalovat. Plýtvá se tím energií, a navíc to zvyšuje produkci CO<sub>2</sub>. Produkce keratinového hydrolyzátu z těchto odpadů je jednou z možností, jak tento odpad efektivně využít.

Své uplatnění nacházejí např. ve farmaceutickém průmyslu jako nosiče léčiv (např. mikrokapsule), v lékařství, potravinářském průmyslu při výrobě ochranných fólií nebo jedlých povlaků, díky kterým vydrží potraviny déle čerstvé. Dále se uplatňují při výrobě mikrokapsulí pro řízené uvolňování aktivní složky [2, 22].

#### 3.1 Aplikace v lékařství

Keratin je považován za biomateriál. Je biokompatibilní, biodegradabilní a je přítomen v buňkách. Materiál z keratinu poskytuje prostředí, které je podobné extracelulární matrix. Díky této vlastnosti urychluje syntézu a růst nových tkání. Několik přírodních polymerů, jako je např. kolagen, chitosan nebo keratin mají schopnost podporovat rozmnožování buněk, a díky tomu se hledá jejich široké uplatnění v oblasti biomedicíny [23].

Součástí řetězce keratinu jsou úseky, které podporují buněčnou adhezi (Arg-Gly-Asp). Dále se v tomto řetězci nacházejí takové úseky (Leu-Asp-Val), které jsou součástí proteinů (např. fibronectin) v extracelulární matrix. Keratin také poskytuje specifický způsob pro vytváření vazeb mezi buňkami podobně jako je tomu u extracelulární matrix. Díky tomu keratin vytváří podobnou strukturu a s ní související vlastnosti jako extracelulární matrix. To je důvod, proč se využívá při vývoji v oblasti tkáňového inženýrství [23].

Keratinové filmy se poslední dobou využívají při transplantaci poškozené oční rohovky. Dříve se k tomu používala amniotická membrána. Amniotická membrána je sice biokompatibilní, pružný a elastický materiál, nicméně její nevýhodou je, že se musí hledat vhodný dárcce, protože jinak hrozí vyšší riziko vzniku infekce. Další její nevýhodou je nedostatečná transparence. Proto je nutné amniotickou membránu nahradit takovým materiálem, který bude biokompatibilní, bude podporovat hojení ran, eliminovat vznik infekce a poskytovat vysokou transparenční. Musí být také dostatečně flexibilní, aby se s ním dalo bezpečně chi-



rurgicky manipulovat. Bylo zjištěno, že keratinové filmy tyto vlastnosti splňují, a navíc je možné je připravit bez použití aditiv [24, 25].

Infekce po implantaci umělé kloubní náhrady je problémem, který vyžaduje reimplantaci náhrady. Díky tomu se poslední dobou výzkumná činnost zabývá vývojem kostních výplní, které budou podporovat růst buněk kostní tkáně, a rovněž budou fungovat jako nosiče chemických látek s postupným uvolňováním. Mezi takové chemické látky mohou patřit léčiva, jako např. antibiotika.

Keratinové hydrolysáty se používají např. při léčbě odřenin nebo popálenin. Mají zde fungovat jako látky podporující růst nové kožní tkáně [26].

### 3.2 Aplikace v oblasti kosmetiky

Přísady, které obsahují keratinové hydrolysáty, mohou být velmi užitečné v oblasti kosmetiky. Dovedou např. vytvořit prostředí, které zabraňuje zbytečným ztrátám vody v kůži a ve vlasech. Díky tomu přispívá jejich zdraví. To je důvod častého výskytu keratinových hydrolysátů v řadě kosmetických výrobků, jako např. v pleťových krémech, šampónech, kondicionérech, lacích na vlasy, apod. Na základě jiných výzkumů bylo zjištěno, že přidavkem keratinového hydrolysátu do vlasových kondicionérů se dodá vlasům lesk, jemnost a poddajnost. Přípravky obsahující keratinové hydrolysáty se používají také na ošetření vlasů po trvalé ondulaci [27, 28, 29, 30].

### 3.3 Aplikace v zemědělství

Keratinový hydrolysát získaný z peří se používá jako přísada krmiv pro hospodářská zvířata. Cílem je obohatit krmivo o aminokyseliny, a tím celkově zvýšit jeho nutriční hodnotu [31]. Přídavek keratinového hydrolysátu z peří, který byl hydrolyzován pomocí enzymu vzniklého z bakterií rodu *Bacillus licheniformis*, způsobil nejen zvýšení nutriční hodnoty krmiva, ale fungoval také i jako růstový stimulátor [32, 21]. Nicméně přídavek těchto přísad je v některých zemích zakázán. Důvodem je obava z šíření některých nemocí, jako je např. ptačí chřipka [21].

Bylo zjištěno, že enzymovou hydrolyzou zbytků kopyt a rohů ze skotu, je možné získat produkt, který bude mít vysoký obsah dusíku. Díky tomu lze využít jako dusíkaté hnojivo. V rámci výzkumu bylo u tohoto produktu nalezeno 18 druhů volných aminokyselin. U ně-

kterých z nich, jako třeba u prolinu, bylo zjištěno, že mají pozitivní efekt na rostliny, který se projevuje např. zvýšenou rozvětveností nebo vyšším obsahem sušiny těchto rostlin [33].

### 3.4 Činění kůže

Při procesu činění kůže se nejčastěji jako činící látky používají soli chromu. Bohužel ale absorpce chromu do kůže při procesu činění nepřekročí 60 %. To vede k problému, kdy se jednak plýtvá vstupním materiálem, a také vlivem vylévání odpadu s obsahem chromu dochází ke znečištění prostředí. Finanční náklady na odstranění chromu z odpadu jsou nákladné [34].

Tyto problémy se mohou zlepšit přidávkem keratinového hydrolyzátu (2 – 3 %) připraveného z drůbežího peří. Reakce peptidů keratinového hydrolyzátu s chromem při činění probíhá ve dvou krocích. V prvním kroku spolu zreagují kolagen (obsažený v kůži) s volným chromem, a v druhém kroku kolagen zreaguje s komplexem keratin – chrom. To vede ke zvýšení absorpce chromu až na 90 %. Při fixaci keratinu s chromem se ještě do roztoku přidávají karboxylové skupiny, které se vyznačují vysokou afinitou vůči chromu [34].

## 4 KERATINOVÉ FILMY

V současné době se neustále zvyšuje produkce proteinových filmů. Důvodem může být snaha nahradit materiály získané z neobnovitelných zdrojů. Dalším důvodem může být využití odpadů např. z jatečné výroby či z drůbežáren. Důležitou vlastností proteinových filmů je biodegradabilita a biokompatibilita [10].

### 4.1 Vlastnosti keratinových filmů

Čisté keratinové filmy jsou z hlediska praktického využití křehké, proto je nutné do nich přidat změkčovadlo, např. glycerol. Přídavek glycerolu vytvoří pružný, transparentní a biologicky rozložitelný film [35, 22]. Keratinové filmy jsou méně propustné pro plyny a vlhkost, nicméně se zvyšující se molární hmotností permeujících látek jejich propustnost klesá [22]. Přídavkem lipidů se sníží propustnost vůči vlhkosti [39]. Pokud se do filmů přidá síťovadlo, vytvoří se zesíťovaná struktura, která způsobí botnání filmů. K tavení filmů dochází kolem teploty 250°C. Při DSC analýze se tento děj projeví endotermním píkem, který je způsoben rozkladem  $\beta$ -struktury [22]. Další vlastností keratinových filmů je buněčná biokompatibilita. V rámci výzkumu byl porovnán růst buněk na skleněném, kolagenovém a keratinovém substrátu. Keratinový substrát poskytl daleko lepší adhezi k buňkám a více napomáhal buněčné proliferaci [35].

### 4.2 Příprava filmů

Filmy mohou být připraveny dvěma základními způsoby. Prvním způsobem je tzv. mokrá proces. Ten je proveden tak, že jsou disperze nebo roztok polymeru zpracovány litím a vypařením rozpouštědla vzniká film. Druhý způsob se označuje jako tzv. suchý způsob, protože se provádí v prostředí o nízké vlhkosti. V případě druhého způsobu se využívá termoplastických vlastností biopolymerů [36].

Pro přípravu filmů a povlaků se využívá zejména proces lití, máčení a sprejování. Při těchto metodách je nutné po rozpuštění keratinového hydrolyzátu (ve vodě) k roztoku přidat změkčovadlo (např. glycerol, sorbitol), aby výsledný film či povlak nebyl křehký. Pro docílení lepších mechanických vlastností se filmy a povlaky síťují chemickým způsobem za použití síťovacích činidel (např. formaldehyd nebo glutaraldehyd) reagujících s funkčními skupinami proteinu nebo fyzikálními metodami (např. teplem či zářením). V průběhu síťo-

vání se tvoří kovalentní a nekovalentní vazby mezi řetězcí proteinu, a tím se stabilizuje struktura nově vzniklého útvaru. Volbou podmínek při síťování lze ovlivňovat biologickou rozložitelnost takových struktur, dále jejich bariérové, mechanické a další vlastnosti [37]. V průběhu přípravy filmů z roztoku mohou být přidány lipidy pro zvýšení odolnosti vůči vlhkosti. Poté musí být vše zahřáto nad teplotu tání lipidu a homogenizováno, aby se získala emulze [36].

Katoh a kolektiv [35] prezentovali nekonvenční metodu pro výrobu keratinového filmu. Jednalo se o slisování keratinového prášku. Tím se vyrobily čisté keratinové filmy odlišných tvarů. Kontrola mechanických vlastností filmů byla zajištěna kontrolou teploty při lisování, kontrolou obsahu vody ve filmu a biokompatibilita byla kontrolována růstem buněk na keratinovém substrátu [35].

#### 4.2.1 Lití roztoku

Lití, nebo také rozpouštědlový proces, je proveden vysoušením filmotvorného roztoku či disperze. Tomu předchází přivedení do disperze nebo rozpuštění polymeru. Pro biodegradabilní polymery je proces lití tím nejvhodnějším, a také nejvíce používaným způsobem pro přípravu filmů. Tento proces je také aplikován přímo na potravinové produkty jako tzv. povlak, který má vytvořit ochrannou filmovou vrstvu. Jako rozpouštědla mohou být použity voda nebo etanol [36].

Tvorba filmu nebo povlaku je proces, při kterém je protein rozpuštěn v rozpouštědle, dále zahřátím nebo úpravou pH je rozpouštědlo vypařeno. V posledním kroku jsou přidány další přísady. V některých případech je nutné, aby byl proces prováděn ve vakuu z důvodu eliminace vzniku bublin. Teplota okolí, množství relativní vlhkosti ve vzduchu a čas pro vypařování rozpouštědla jsou velmi důležitými faktory při tvorbě filmů. Ve většině případů je lití prováděno při pokojové teplotě za přítomnosti, nebo naopak absenci vzduchu [36].

#### 4.2.2 Termoplastický proces

Při této metodě je protein zpracováván spolu se změkčovadlem plastikářskými technikami nad  $T_g$ . Ze vzniklé kaučukové hmoty se tvaruje výrobek. Tvar je pak zafixován ochlazením. V praxi to funguje tak, že se práškový protein naplní do extrudéru, přidá se k němu změkčovadlo, např. glycerol (asi kolem 20 %), a směs se míchá při teplotě kolem 100 °C. Poté se přes formu vytlačuje a pro stabilizaci tvaru ochladí. Důležité je nastavit správné

parametry, tzn. dobu míchání, teplotu a tlak [22]. Pro dosažení optimálních procesních parametrů jako je nastavení teploty při extruzi nebo nastavení výkonu linky, popř. přídavek nějakých chemikálií, je nutné znát, jak se mění fyzikální a chemická struktura proteinu při daných nastavených parametrech, která má za následek charakteristické vlastnosti tohoto proteinu. Viskozita proteinů a jejich zpracování nezávisí jen na jejich struktuře, ale také na molární hmotnosti. Kratší řetězce je jednodušší extrudovat, ale je u nich složitější zachovat tvar finálního produktu, který souvisí s intermolekulárními vazbami, které jsou důležité pro stabilizaci 3D sítě [36].

### **4.3 Modifikace proteinů**

#### **4.3.1 Modifikace keratinových filmů**

Do jedlých filmů v potravinářství se mohou přidávat látky antimikrobiální, antifungicidní a antioxidantní. Dále se přidávají také barviva, protože barva filmu může mít velmi důležitý vliv např. na kladnou reakci spotřebitele [36].

Yamauchi a kolektiv [36] zlepšili mechanické vlastnosti filmů přídavkem glycerolu a chitosanu. Chitosan je velmi zajímavou a zkoumanou biomolekulou pro biomateriálové aplikace. Zajišťuje vysokou biokompatibilitu, biologickou funkci pro hojení ran a antibakteriální aktivitu. Přídavek chitosanu do keratinového filmu posílí mechanické vlastnosti, a kromě toho keratinové filmy s přídavkem chitosanu mají antibakteriální vlastnosti a jsou dobrými substráty pro růst buněčné kultury. Biologická aktivita keratinových filmů vzrostla také začleněním peptidů podporujících buněčnou adhezi (arg-gly-asp-ser). Takto složené keratinové filmy poskytují substrát, který je vynikající pro buněčný růst u savců. Takto vzniklý materiál je možné aplikovat v oblasti tkáňového inženýrství [36].

#### **4.3.2 Keratinové kompozity**

Přídavek pevných částic nebo vláken, a tím vytvoření kompozitu z biomateriálu, může rovněž zlepšit mechanické vlastnosti filmů [39,1]. Nicméně vlastnosti kompozitu nezávisí jen na vlastnostech přísad, ale také na jejich množství, tvaru a velikosti částic, a rovněž na distribuci velikostí těchto částic [36].

Vytvoření systému, kde budou vytvořeny vazby mezi keratinem a syntetickými polymery, je možné docílit lepších mechanických vlastností, a zároveň zachovat biologickou aktivitu

materiálu [35]. Bylo objeveno, že vazby mezi polyetylenoxidem a keratinem mohou vytvořit film, který bude biokompatibilní, a zároveň bude mít vylepšené strukturní vlastnosti. Zkoumání tohoto filmu pomocí metod termické analýzy prozradilo, že tato kombinace materiálů způsobuje vyšší teplotní odolnost. Dále bylo zjištěno, že kombinací těchto dvou materiálů se vytvoří substrát pro rychlejší buněčný růst. Dalším příkladem kombinace biomateriálu a syntetického polymeru může být keratin a PA6. Tento materiál je pak použit např. pro výrobu filtrů, které jsou určeny k čištění vzduchu a vody [36]. Keratinové materiály totiž dokáží absorbovat toxické látky jako např. těžké kovy [38].

Dále bylo zjištěno, že kombinací dvou biomateriálů, keratinu a fibroinu, je možné vyrobit materiály, které ve vysoké míře zabraňují trombóze a zvyšují biokompatibilitu ve srovnání s tím, když se ve filmu nacházejí samostatně. Díky tomu se mohou uplatnit v oblasti biomedicíny [36].

#### 4.4 Aplikace filmů

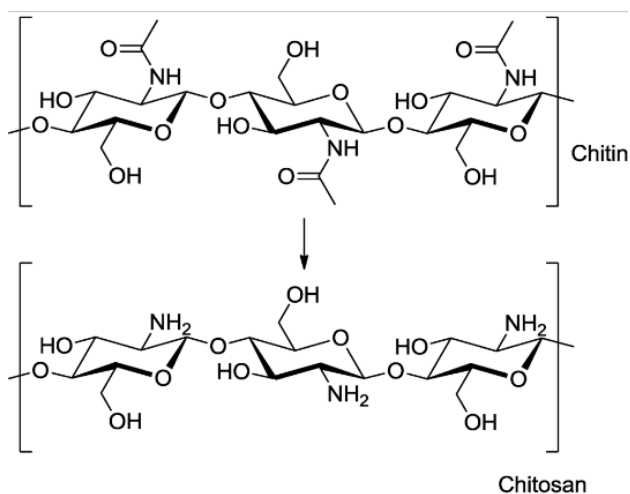
Keratinové filmy jsou díky svým vlastnostem vhodné pro přípravu biodegradabilních a jedlých filmů, povlaků a vláken. Jedlé filmy mohou být využity jako bariéra vůči plynům, jako je vzdušná vlhkost, kyslík, oxid uhličitý nebo aromatické látky. Pokud budou u filmů zachovány vhodné mechanické vlastnosti, je možné tyto filmy použít jako obal na potraviny, u kterých je potřeba zachovat jejich soudržnost. Své uplatnění nacházejí také v zemědělství jako mulčovací fólie nebo obalové materiály pro (mikro) kapsule [36, 37].

V rámci vědeckého výzkumu bylo zjištěno, že růstové substráty formované litím keratinové suspenze podporují buněčnou přilnavost a vylepšují růst buněk ve srovnání s čistým polystyrenovým substrátem [35].

## 5 CHITOSAN

Chitosan je deacetylovaný derivát chitinu. Jedná se o lineární polysacharid, který je ve vodě nerozpustný. Je netoxický a bez zápachu. Jeho velkou výhodou je biodegradabilita a biokompatibilita s tkáněmi. Proto se používá ve farmacii a medicíně [22].

Chitin je polysacharid, který produkují korýši nebo hmyz za účelem vytvrzení kompozitní struktury jejich křídel, krunýřů a těl. Je součástí buněčných stěn hub [22].



Obrázek 4: Struktura chitinu a chitosanu [39]

Chitosany jsou krystalické. Čím nižší je stupeň acetylace, tím je menší i krystalinita. S klesajícím stupněm acetylace klesá také hydrofobnost, a díky tomu se pak molekula chitosanu lépe rozpouští ve vodném prostředí. V kyselém prostředí nastává protonisace aminoskupin, což má za následek změnu polymeru na polykation. Depolymerizace se dá provést enzymem chitinásou. Chitin i chitosan jsou tzv. amfifilní polymery. Jejich molekuly mají hydrofobní i hydrofilní skupiny. Vlastnosti těchto molekul jsou dány typem a podílem těchto skupin, které u molekul určují botnání, rozpustnost, viskozitu ve vodném prostředí a organických rozpouštědlech. Fyzikální a chemické vlastnosti chitosanů závisí na mnoha faktorech. Mezi ně patří např. koncentrace deacetylačního činidla a doba jeho působení, typ a množství použitého chitinu, teplota a prostředí (dusíkatá atmosféra, vzduch), při kterém reakce probíhá [22].



Vlastnosti chitosanu mohou být modifikovány přídavkem jiného polymeru, jako je kolagen, PVAL, PVP a PEO. Tyto vlastnosti mohou být také modifikovány UV zářením, mechanickým namáháním nebo ohřevem. V průběhu ozařování polymeru UV světlem dochází k excitaci molekul, a poté nastávají procesy jako krácení řetězců, jejich příčné spojení nebo oxidace řetězců. Chitosan a keratin spolu v přírodě nevytvářejí směsi. Nicméně je možné vytvořit vazby mezi keratinem a chitosanem synteticky, a tím vytvořit směs, která bude mít jedinečné strukturní a mechanické vlastnosti. Dále tato směs materiálů dává možnost použití relativně levných biomateriálů, které minimálně znečišťují životní prostředí, mají jedinečné vlastnosti a nabízí široké využití, např. při vyvíjení nových biomateriálů [40].

## 5.1 Aplikace chitosanů

V praxi se chitosany používají nejčastěji ve formě roztoků, ze kterých se dají vyrobit vlákna a filmy. Své uplatnění nacházejí také v oblasti medicíny a farmakologie. Dají se z nich vyrábět obvazy a polštářky na rány, nebo hydrogely sloužící jako nosiče léčiv [22]. Jedna z důležitých vlastností chitosanu je možnost z něj vytvořit pórovitou strukturu a tenké filmy, které budou použity pro buněčnou transplantaci a obnovu tkání. V oblasti medicíny nebo ve farmaceutickém průmyslu se chitosan dále používá pro výrobu membrán, umělé kůže, kontaktních čoček, dále v oblasti řízeného uvolňování léčiv, a také pro chirurgické stehy [40]. Významné využití se nachází také v potravinářství, kde nejčastěji slouží jako povlaky na čerstvě sklizené potraviny nebo antimikrobiální obaly na balení masa a drůbeže. Dokáží se také uplatnit jako nosiče potravinářských aditiv. V oblasti zemědělství lze z chitosanu vyrobit filmy na semena, která jsou takto chráněna proti škůdcům. To vede ke zvyšování výnosů. Chitosanové filmy dokážou vázat ionty těžkých kovů. Díky tomu se používají na čiření odpadních vod nebo jako detoxikace nebezpečných odpadů [22].

## II. PRAKTICKÁ ČÁST

## 6 CÍL PRÁCE

Prvním cílem práce bylo vyrobit keratinový hydrolyzátní z odtučněné a promyté ovčí vlny, a následně u něj provést analytické zkoušky. Pro výrobu hydrolyzátní byla zvolena kombinace alkalické a enzymové hydrolyzy.

Druhým cílem bylo připravit z keratinového hydrolyzátní a chitosanu filmy spolu s přísávkem změkčovadla a síťovadla v různém poměru.

Třetím cílem bylo otestovat vlastnosti jednotlivých filmů v závislosti na jejich složení a vlastnosti filmů posoudit také na základě statistického vyhodnocení. Filmy byly testovány analytickými, mechanickými a termickými zkouškami.

## 7 MATERIÁLY A METODY

### 7.1 Chemikálie

Enzym Lipex 100T, enzym Savinase Ultra 16L, NaOH, Ca(OH)<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, Tashirův indikátor, HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, glycerol, glutaraldehyd.

#### Enzym Lipex 100T

Jedná se o lipázu do detergentů, která je produkována submerzní fermentací modifikovaného kmene *Aspergillus* [41].

V granulované formě se jedná bílý a nízkoprašivý granulát, který se snadno mísí se standardními složkami práškových a tabletových detergentů. Aktivita tohoto enzymu je 100 KLU (Kilo Lipázových Jednotkách) na gram výrobku [41].

Lipex štěpí esterové vazby jedlých tuků a olejů. Proto se používá k odstraňování skvrn obsahujících tuk a olej [41].

#### Enzym Savinase Ultra 16L

Jedná se o jasnou, světle žlutou tekutinu. Má slabou vůni po benzaldehydu [42].

Savinase 16 L obsahuje 4-FPBA (4-formyl-fenyl-kyselina boritá). 4-FPBA v enzymu působí zároveň jako stabilizátor i reverzibilní inhibitor enzymu (V průběhu praní se enzym uvolní z inhibitoru, a roste tím aktivita tohoto enzymu) [42].

### 7.2 Vstupní materiály

Materiálem pro výrobu keratinového hydrolyzátu byla ovčí vlna z plemene Merino od soukromého chovatele z obce Nevšová. Dalším materiálem, se kterým se pracovalo, byl chitosan od firmy Sigma – Aldrich.

### 7.3 Přístroje a pomůcky

Nožový mlýn Fritsch, odstředivka Universal 32 Hettich, sušárna Memmert, analytické váhy KERN, magnetická míchačka RCT Basic IKA, Parnas-Wagnerova destilační aparatura, muflova pec Labotherm 9/11Nabertherm, pH metr WTW 526 Sigma – Aldrich, trhací stroj QUASAR 25 GALDABINI, DSC přístroj METTLER TOLEDO, laboratorní sklo SIMAX.

### 7.4 Metody

#### 7.4.1 Příprava keratinového hydrolysátu

##### *Úprava a odtučnění vlny*

Prvním krokem byla úprava vlny. Vlnu bylo potřeba zbavit nečistot, nastříhat, proprat ve vlažné vodě spolu s mycím prostředkem, a proprat vodou do odstranění mycího prostředku.

Dále bylo potřeba vlnu odtučnit použitím enzymu Lipex 100T. Při odtučňování byla vlna dána do vody, přičemž poměr vlna : voda byl 1:50. Dále bylo nutné před přidáním enzymu upravit hodnotu pH na 8. Teprve pak se přidalo 1 % enzymu (vztaženo na hmotnost suché vlny). Teplota při odtučňování byla  $40 \pm 2$  °C. Proces odtučnění probíhal po dobu 24 hodin. V průběhu odtučňování bylo nutné směs několikrát promíchat.

Po odtučnění se vlna opět promyla vodou a vysušila v horkovzdušné sušárně při teplotě 80 °C. Nakonec se vlna pomlela v nožovém mlýně s velikostí ok síta 1 mm.

##### *Rozklad vlny*

Příprava keratinového hydrolysátu probíhala dvoustupňově alkalicko-enzymovým způsobem.

V prvním stupni probíhala alkalická hydrolýza. K navážce 416 g pomleté vlny bylo přidáno 12,32 litrů vody. Dále bylo potřeba přidat tolik  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , tak aby vznikl 0,6% roztok. V případě této diplomové práce to bylo 73,92 g. Hydrolýza probíhala při teplotě 80 °C po dobu 48 hodin, při rychlosti míchání 300 otáček za minutu.

Druhý stupeň byl proveden enzymovým způsobem. Ve druhém stupni byl přidán enzym Savinase Ultra 16L. Nicméně před samotným přidáním enzymu bylo nutné snížit teplotu na 60 °C, a poté upravit pH na hodnotu 9. Bylo přidáno 30,80 g enzymu tak, aby to odpo-

vidalo 5 % na navážku vlny. Hydrolyza probíhala při teplotě 60 °C po dobu 24 hodin, při rychlosti 300 otáček za minutu. Na konci druhého stupně hydrolyzy se kapalná fáze zahřála na 95 °C po dobu 10 minut, aby se inaktivoval enzym.

### *Separace*

Po hydrolyze bylo potřeba oddělit nerozložený zbytek vlny od kapalně fáze. Separace se skládala ze dvou částí. První byla filtrace, druhou odstředění.

Kapalná fáze se nejprve filtrovala přes 16 vrstev PA tkaniny. Velikost ok v PA tkanině byla 150  $\mu\text{m}$ . Odstředění probíhalo 10 minut při rychlosti 4000 otáček za minutu. Po odstředění se tuhá fáze vysušila, a kapalná dialyzovala.

### *Dialýza*

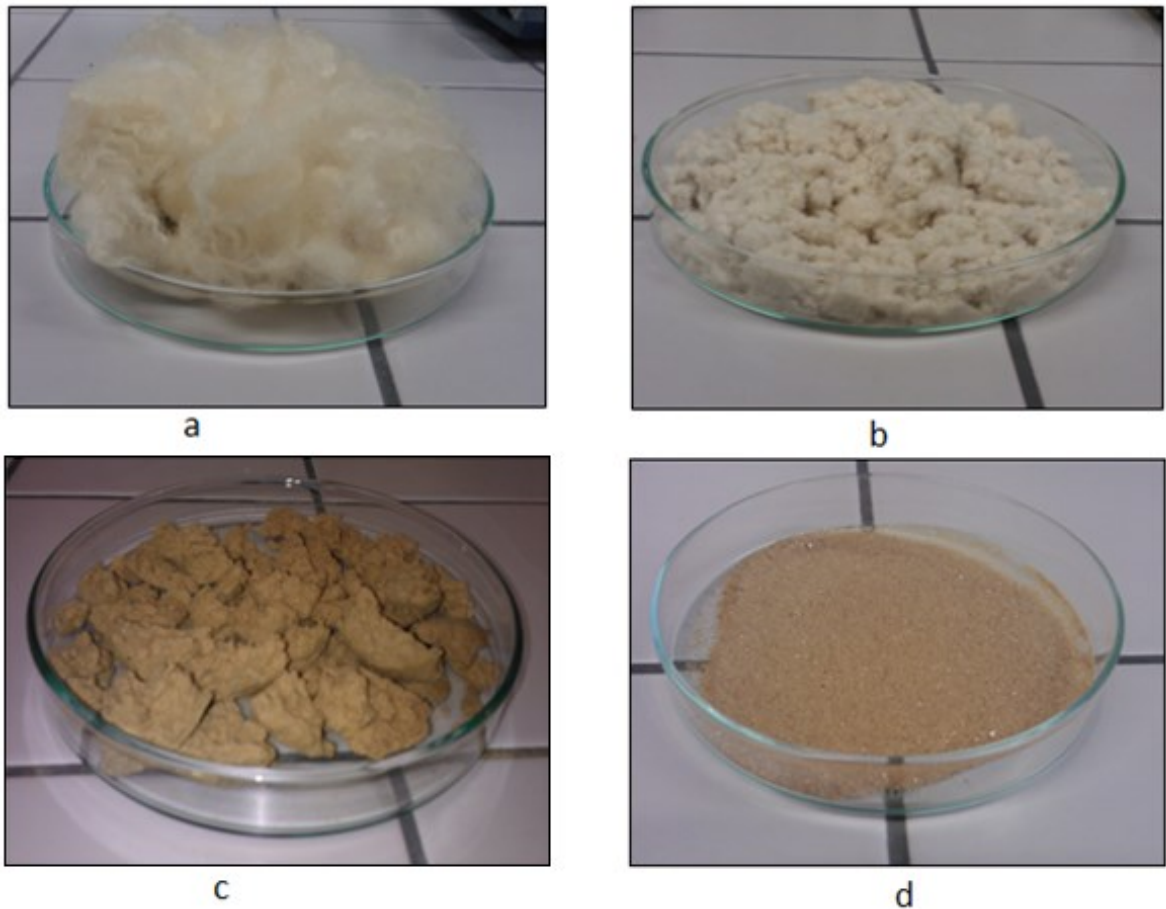
Při dialýze se 500 ml kapalně hydrolyzátu nalilo do celulózy membrány, jejíž propustnost byla 12 kDa. Tato membrána se poté vložila do 5 litrů destilované vody. Dialýza probíhala 7 dnů při pokojové teplotě. Výměna vody byla po 24, 48 a 96 hodinách.



Obrázek 5: Celulózy membrána s kapalně hydrolyzátem

### *Vznik prášku*

Kapalně hydrolyzáte se po dialýze vylil na plech a vložil do sušárny na 60 °C. Po odpaření vody zůstal na plechu prášek hydrolyzátu, který se roztřel v třecí misce.



Obrázek 6: Neodtučněná vlna (a), odtučněná a pomletá vlna (b), zbytek nerozložené vlny po hydrolyze (c) a keratinový hydrolyzát (d).

#### 7.4.2 Příprava filmů

Z keratinového hydrolyzátu byly připraveny filmy. Složení těchto filmů bylo naplánováno statistickou metodou faktorových pokusů  $2^3$  se dvěma středovými pokusy. Sledovanými faktory byly množství chitosanu, glycerolu a glutaraldehydu. Množství jednotlivých složek byly procentuálně vztaženy na navážku hydrolyzátu.



Tabulka 4: Složení filmů

Číslo filmu	Množství chitosanu [%]	Množství glycerolu [%]	Množství glutaraldehydu [%]
1	5	50	0,5
2	5	50	2
3	5	70	0,5
4	5	70	2
5	10	50	0,5
6	10	50	2
7	10	70	0,5
8	10	70	2
9	7,5	60	1,25
10	7,5	60	1,25

Na začátku se připravil 20% vodný roztok keratinového hydrolyzátu. To odpovídalo množství 7 g hydrolyzátu na 35 g vody. Po rozpuštění hydrolyzátu ve vodě se přidalo změkčovaadlo, kterým byl glycerol. Směs se dostatečně promíchala. Před přidavkem chitosanu se upravila hodnota pH. Chitosan se rozpouštěl při pH kolem 5,5. Po úpravě pH se přidal chitosan a směs se opět promíchala. Nakonec se do směsi přimíchalo síťovadlo glutaraldehyd a směs se vylila do silikonové formičky. Poté se formička s filmem vložila do exsikátoru, ze kterého se odsál vzduch, aby se odstranily vzduchové bubliny. Nakonec se formička s filmem vložila do sušárny na teplotu 60 °C po dobu 12 hodin.

### 7.4.3 Analytické zkoušky

#### *Stanovení sušiny*

Stanovení se vždy provádělo dvakrát. Do koželužských misek se na analytických vahách navážil přibližně 1 g vzorku. Poté se misky vložily do sušárny, ve které byla teplota 103 °C. Sušilo se po dobu 2 hodin. Po sušení se misky vytáhly, vložily do exsikátoru a nechaly vytemperovat. Po vytemperování se znovu zvažily. Tento postup se opakoval do konstantní hmotnosti vzorků.

Obsah sušiny ve vzorku se určil dle vztahu:

$$S = \frac{m_1}{m_0} \cdot 100 \quad (1)$$

$m_0$  ... hmotnost vzorku před sušením [g]

$m_1$  ... hmotnost vzorku po sušení [g]

$S$  ... obsah sušiny [%]

### **Stanovení popelovin**

Stanovení se provádělo vždy u každého vzorku dvakrát. Na začátku měření bylo nutné přezíhat kelímky z křemenného skla, a následně je nechat vychladnout v exsikátoru. Poté se prázdné porcelánové kelímky zvažily na analytických vahách. Následně se do kelímku vložil vzorek. Kelímek spolu se vzorkem se opět zvažil na analytických vahách. Vzorek v kelímku se nechal spalovat nad kahanem do zuhelnatění. Poté se kelímek se vzorkem vložil na dobu 1,5 hodiny do muflové pece o teplotě 650 °C. Po uplynutí času se kelímky vložily do exsikátoru, ve kterém se temperovaly. Po vytemperování se opět převážily na analytických vahách.

Stanovení obsahu popelovin bylo dle vztahu:

$$P = \frac{m_p}{n} \cdot 100 \quad (2)$$

$m_p$  ... hmotnost popela vzorku [g]

$n$  ... hmotnost vzorku před zuhelnatěním [g]

$P$  ... obsah popelovin ve vzorku [%]

### **Mikrochemické stanovení dusíku – Mikro-Kjeldahlova metoda**

Do mineralizační baňky se navážilo 0,2 g vzorku na analytických vahách. Poté se k němu přidalo 5,6 ml 96% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 20 ml 0,02M HCl. Přidala se také tableta katalyzátoru. Následně se směs nechala mineralizovat při teplotě 480 °C asi 1 až 1,5 hodiny do úplného vyčerení. Po mineralizaci se mineralizát nechal vychladnout, a poté se zředil malým množ-

stvím vody. Po rozpuštění pevných částic se přelil do 50 ml odměrné baňky, která se vodou doplnila po rysku.

Do nálevky Parnas-Wagnerovy destilační aparatury se odpipetovalo 25 ml vzorku, a přidalo 20 ml roztoku směsi  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  NaOH. Destilovalo se 20 minut od varu. V průběhu destilace se  $\text{NH}_3$  jímalo do 15 ml 2%  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . K roztoku  $\text{NH}_3$  a 2%  $\text{H}_3\text{BO}_3$  se přidalo několik kapek Tashirova indikátoru, a roztok se titroval 0,02M HCl do růžového zbarvení. Stanovení se provádělo u každého vzorku dvakrát.

Množství dusíku ve vzorku bylo určeno dle vztahu:

$$N = \frac{V \cdot c \cdot 14,007 \cdot 100 \cdot 2}{n \cdot 10^{-3}} \quad (3)$$

*V ... spotřeba HCl při titraci [ml]*

*c ... molární koncentrace HCl [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ]*

*n ... navážka vzorku [g]*

*N ... obsah dusíku ve vzorku [%]*

### ***Zkouška rozpustnosti***

Z připravených filmů se vystřihly 4 vzorky o rozměrech cca 2×2 cm. Na analytických vahách se zvažila prázdná skleněná váženka. Poté se do ní vložil vzorek, a vzorek s váženkou se opět zvažil. Poté se do váženky se vzorkem nalilo 30 ml vody a vložilo se to do vodní lázně vytemperované na teplotu 37 °C. Každá z váženek se vytáhla z lázně v jiný čas. První váženka se vytáhla po 1 minutě, druhá po 10 minutách, třetí po 30 minutách a čtvrtá po 60 minutách. Po vytažení váženky z lázně se vylila nadbytečná voda, a váženka se vložila do sušárny na teplotu 80 °C. Po odpaření vody se váženka vložila do exsikátoru, aby se vytemperovala. Po vytemperování se na analytických vahách zvažila váženka se vzorkem. Stanovení se provádělo u každého vzorku dvakrát.

Rozpustnost vzorku byla určena dle vztahu:

$$R = \frac{m_1}{m_0} \cdot 100 \quad (4)$$

$m_0$  ... hmotnost vzorku před rozpuštěním [g]

$m_1$  ... hmotnost vzorku po rozpuštění [g]

$R$  ... rozpustnost [%]

#### 7.4.4 Tahová zkouška

Pro zhodnocení mechanických vlastností filmů se zvolila tahová zkouška. Z každého filmu se vyřezaly 3 pásy o šířce cca 15 mm a délce cca 70 mm. Vzorky se upevnily do čelistí trhacího zařízení. Počáteční vzdálenost čelistí byla 40 mm a rychlost posuvu čelistí 20 mm/min.

Tahová zkouška se prováděla u každého vzorku minimálně třikrát. Výsledky z tahové křivky se zprůměrovaly. Z průměrných hodnot se vytvořila tahová křivka.

#### 7.4.5 Diferenciální snímací kalorimetrie DSC

Jedinou termickou zkouškou, která se prováděla, byla zkouška DSC (Diferenciální snímací kalorimetrie).

Tato zkouška se prováděla u všech filmů. Měření probíhalo v rozmezí teplot od 25 °C do 300 °C. Rychlost ohřevu byla 10 °C/min. Navážka vzorků se pohybovala v rozmezí od 5 mg do 10 mg. Měření probíhalo v inertní dusíkaté atmosféře s průtokem dusíku 20 ml/min.

Vzorek se navážil do hliníkové pánvičky, na kterou se poté zalisovalo víčko. Víčko se propíchlo jehlou, tak aby odcházely vzniklé plyny ven. Do DSC přístroje se nalevo vložila pánvička se vzorkem, a napravo prázdná pánvička, která sloužila jako reference. Poté se spustilo měření. Přístroj v průběhu experimentu měřil rozdíl tepla, které musí být dodáno, aby vzorek a reference měly stejnou teplotu.

#### 7.4.6 Statistické vyhodnocení pokusů

Vlastnosti filmů ovlivňuje technologické zpracování a složení těchto filmů. Filmy byly složeny z keratinového hydrolyzátu, chitosanu, glycerolu a glutaraldehydu. Množství hydrolyzátu bylo u všech filmů stejné, nicméně množství chitosanu, glycerolu a glutaraldehydu bylo v různém poměru. Poměr jednotlivých složek značně ovlivňuje vlastnosti filmů. Ke statistickému vyhodnocení se často používají faktorové pokusy, které zjišťují, který se zvolených faktorů nejvíce ovlivňuje sledovanou vlastnost. Mezi sledované vlastnosti filmů patřily: Rozpustnost, maximální napětí a teplota degradace. Výhodou tohoto vyhodnocení je, že se ke zjištění výsledků nemusí provádět velké množství experimentů [43].

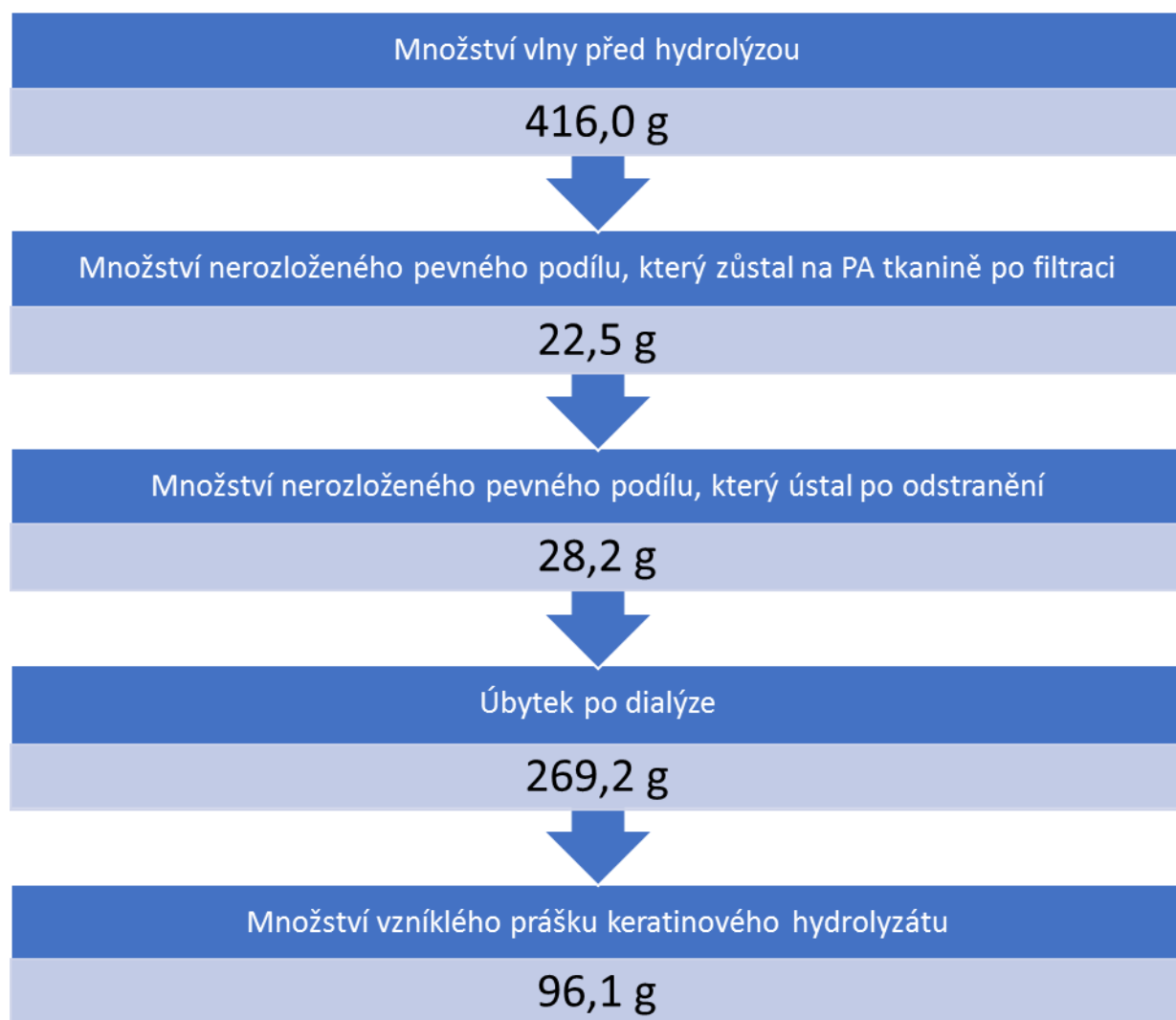
Faktorové pokusy byly nastaveny jako  $2^3$ , protože se sledovaly 3 faktory (vliv chitosanu, glycerolu a glutaraldehydu) na dvou úrovních (minimální a maximální hodnota) se dvěma středovými opakováními (dva vzorky se stejným a středovým množstvím jednotlivých komponent). Výsledky se vyhodnotily v programu Minitab 17.

Pomocí statistických ukazatelů byl vyhodnocen vliv jednotlivých faktorů na vybrané vlastnosti filmů. Mezi tyto statistické ukazatele patřily: Fisherovy hodnoty, p-hodnoty a Paretovy diagramy. Pomocí Fisherova testu lze zjistit, že když F-hodnota vybraného faktoru má hodnotu vyšší, než je kritická hodnota (10,13), jsou tyto faktory statisticky významné. Postup při vyhodnocení p-hodnot je obdobný. Pokud je p-hodnota nižší, než kritická hodnota (0,05), vybrané faktory mají významný vliv na vybrané vlastnosti. Paretův diagram slouží ke grafickému znázornění statistické významnosti faktorů. Byly také vytvořeny vrstevnicové diagramy, které popisují chování jednotlivých faktorů na vybrané vlastnosti připravených filmů [43].

## 8 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 8.1 Výtěžnost hydrolýzy

Na obrázku č. 7 je znázorněn postupný úbytek materiálu v jednotlivých krocích přípravy keratinového hydrolyzátu.



Obrázek 7: Výtěžnost hydrolýzy

Výpočet výtěžnosti hydrolýzy:

100 % ... 416 g

x % ... 96,1 g

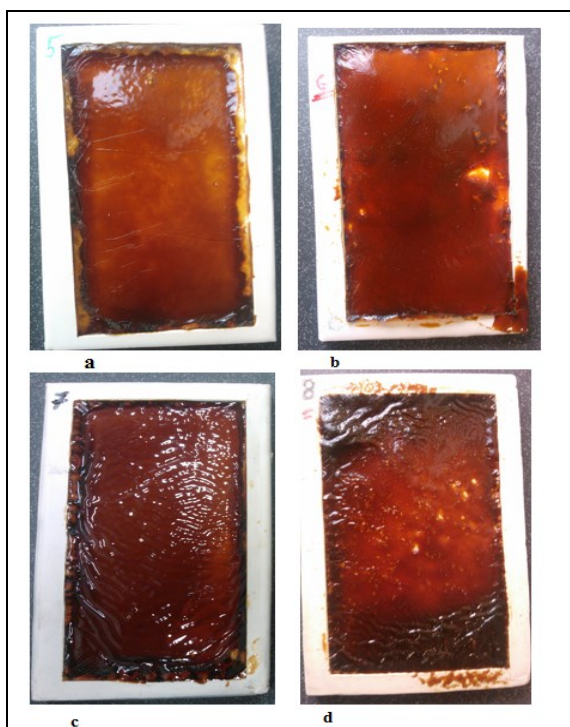
x = 23,1 %

Výtěžnost hydrolýzy byla 23,1 %. Na obrázku č. 7 je možné vidět, že největší ztráta byla při dialýze. Při dialýze se z kapalného hydrolyzátu vyplavují ven z membrány kratší řetězce keratinu. Větší množství kratších řetězců mohlo vzniknout díky vysoké teplotě při hydrolýze, a rovněž také vlivem vysokého pH roztoku.

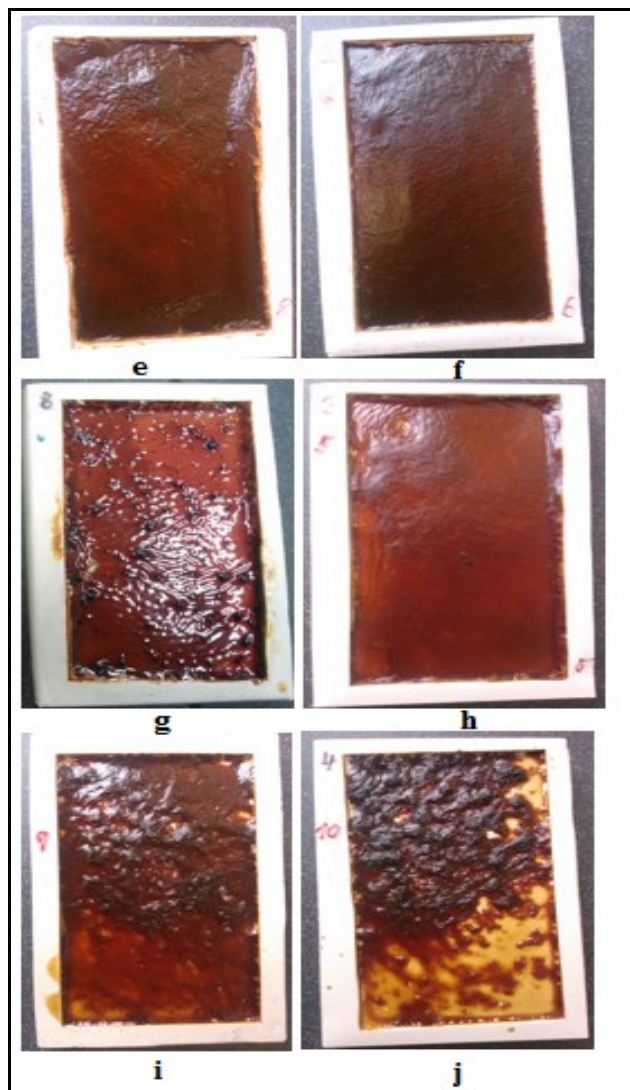
Dalším z důvodů, který mohl přispět k větší ztrátě kapalného hydrolyzátu při dialýze, je jeho únik do vody. V průběhu dialýzy se mírně zvyšuje tlak a pnutí v membráně, což mohlo přispět k netěsnosti svorek uzavírajících membránu.

## 8.2 filmy

Z keratinového hydrolyzátu byly připraveny filmy. Vzhled filmů je vidět na obrázku 8 a 9.



Obrázek 8: Film č. 1 (a), film č. 2 (b), film č. 3 (c) a film č. 4 (d).



Obrázek 9: Film č. 5 (e), film č. 6 (f), film č. 7 (g), film č. 8 (h), film č. 9 (i) a film č. 10 (j).

Filmy č. 1 a 2 byly velmi křehké. Důvodem může být malé množství chitosanu (jen 5 % na navážku hydrolyzátu) a změkčovadla (50 % na navážku hydrolyzátu). Tyto filmy bylo obtížně z formy vyjmout, protože se lámaly.

Film č. 3 obsahoval vyšší procento změkčovadla (70 % na navážku hydrolyzátu). Díky tomu byl film ohebnější a poddajnější, a dalo se s ním lépe pracovat.

Film č. 4 byl opět velmi křehký. Obsahoval sice 70 % změkčovadla na navážku hydrolyzátu, nicméně ve srovnání s filmem č. 3 obsahoval 2 % síťovadla. Film č. 3 obsahoval 0,5 % síťovadla. Větší množství síťovadla vytvořilo pevnější film, nicméně tato pevnost byla na úkor křehkosti filmu.



Film č. 5 byl pevnější, než byly předchozí filmy. Důvodem zřejmě bylo vyšší procento chitosanu (množství bylo 10 % na navážku hydrolyzátu). Tento film neměl tendenci se lámat.

Film č. 6 už obsahoval 2 % síťovadla ve srovnání s filmem č. 5 (0,5 % na navážku hydrolyzátu). Tento film byl sice pevný díky vyššímu obsahu chitosanu (10 % na navážku hydrolyzátu), ale více se lámal než film č. 5. Důvodem je zřejmě vyšší procento síťovadla.

Filmy č. 7 a 8 byly velmi ohebné díky většímu množství změkčovadla (70 % na navážku hydrolyzátu). Tyto filmy byly také dostatečně pevné kvůli vyššímu procentu obsahu chitosanu (10 % na navážku hydrolyzátu). Lišily se ve vzhledu. Film č. 8 byl na pohled mnohem hladší než film č. 7.

Filmy č. 9 a 10 měly stejné složení, které bylo na středu mezi skupinou filmů 1 až 4 a 5 až 8. Díky stejnému složení byly filmy velmi podobné.

### 8.3 Analytické zkoušky

#### 8.3.1 Keratinový hydrolyzát

V tabulce č. 5 a 6 je možné vidět výsledky analytických zkoušek u hydrolyzátu. Mezi tyto zkoušky patří množství sušiny, popela a dusíku. Množství dusíku bylo stanoveno Mikro-Kjeldahlovou metodou. Tyto analytické zkoušky s výjimkou obsahu sušiny byly také provedeny u chitosanu, neodtučněné a odtučněné vlny. Výsledky byly porovnány s výsledky hydrolyzátu.

Tabulka 5: Obsah sušiny keratinového hydrolyzátu

Materiál	Množství vlhkosti [%]	Množství sušiny [%]
<b>Keratinový hydrolyzát</b>	7,51	92,49

Důvodem stanovení obsahu sušiny, bylo zjistit přesné množství při navažování. Ke každé navážce bylo nutné přičíst cca 8 % z navážky keratinového hydrolyzátu, protože množství vlhkosti v hydrolyzátu je 8 %.

Tabulka 6: Výsledky analytických zkoušek

<b>Materiál</b>	<b>Množství popela [%]</b>	<b>Množství dusíku [%]</b>
<b>Keratinový hydrolyzát</b>	4,47	13,7
<b>Chitosan</b>	0,41	7,37
<b>Neodtučněná vlna</b>	1,53	12,39
<b>Odtučněná vlna</b>	0,95	14,9

Ze čtyř vzorků měl nejmenší množství popela chitosan. To může souviset se způsobem přípravy a následného čištění tohoto materiálu. Nicméně vzhledem k tomu, že se jedná o materiál dodaný výrobcem, nejsou známy přesnější informace o jeho přípravě. Velmi malé množství popela obsahovala odtučněná vlna. Je to dáno především tím, že před odtučněním byla vlna pečlivě promyta a zbavena nečistot. Neodtučněná vlna promyta nebyla, a díky tomu obsahuje více popela než vlna odtučněná. Keratinový hydrolyzát obsahoval ze všech vzorků nejvyšší obsah popela. Souvisí to zřejmě se způsobem jeho přípravy. Příprava byla dvoustupňová. Jednalo se o kombinovaný způsob alkalické a enzymové hydrolyzy. Při alkalické hydrolyze byl použit  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Přídavek této chemikálie může mít za následek vyšší procento obsahu popela.

Nejmenší obsah dusíku měl chitosan. Důvodem je, že chitosan je polysacharid. Dále z výsledků vyplývá, že nízký obsah dusíku má také neodtučněná vlna. Je to dáno tím, že do celkové hmotnosti vzorku neodtučněné vlny přispívají také nečistoty a tuk. Tím pádem se snižuje procento množství dusíku. V odtučněné vlně již tuk ani nečistoty nezvyšují hmotnost vzorku, a díky tomu je procentuálně množství dusíku v odtučněné vlně vyšší. Velké množství dusíku se nachází v keratinovém hydrolyzátu, protože se jedná o vyextrahovanou bílkovinu. Ve výsledcích odtučněná vlna obsahuje více dusíku než keratinový hydrolyzát. Může to být způsobeno tím, že keratinový hydrolyzát obsahoval více popela. Toto množství popela obsažené v hydrolyzátu procentuálně snižuje množství dusíku v navázce.

### 8.3.2 Analytické zkoušky filmů

#### *Stanovení sušiny*

U všech filmů byl zjišťován obsah sušiny. Výsledky jsou zaznamenány v tabulce č. 7.

Tabulka 7: Obsah sušiny ve filmech

Číslo filmu	Množství vlhkosti [%]	Množství sušiny [%]
1	5,45	94,55
2	6,27	93,73
3	5,86	94,14
4	6,65	93,35
5	7,49	92,51
6	7,18	92,82
7	6,94	93,06
8	6,46	93,54
9	7,43	92,57
10	6,95	93,05

U výsledných filmů bylo nutné testovat obsah sušiny, protože obsah vlhkosti ve filmech by mohl značně ovlivnit výsledné vlastnosti těchto filmů. Projevilo by se to zejména u tahové zkoušky, při kterých by se mohlo stát, že filmy, které by obsahovaly vyšší procento vlhkosti, by vykazovaly větší prodloužení. Navíc filmy byly připravovány jednotlivě. U každé přípravy se mohly mírně lišit okolní podmínky.

Obsah vlhkosti se navzájem mezi filmy příliš nelišil, navíc nebyl ani příliš odlišný od keratinového hydrolyzátu (cca 8 % vlhkosti).

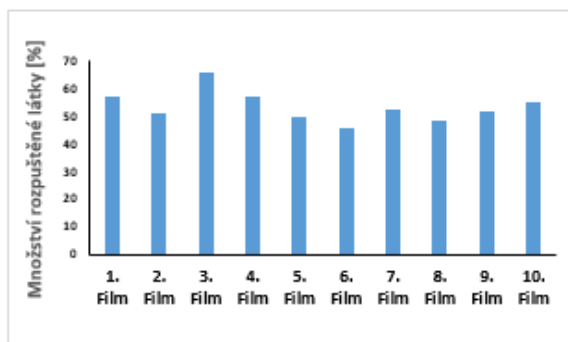
#### *Zkouška rozpustnosti*

U všech filmů byla zjišťována jejich rozpustnost. Doba, po kterou byly filmy testovány na rozpustnost, byla 60 minut, 10 minut, 30 minut a 1 minuta.

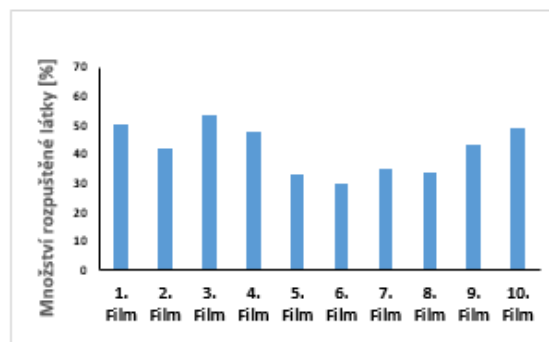
Tabulka 8: Zkouška rozpustnosti filmů

Doba rozpouštění	60 minut	30 minut	10 minut	1 minuta
Číslo filmu	Množství rozpuštěného materiálu [%]			
1	56,67	50,46	33,95	7,22
2	51,14	42,35	30,49	6,56
3	65,33	53,41	34,09	14,84
4	57,03	47,96	32,67	12,40
5	49,51	32,9	15,23	5,45
6	45,87	29,64	13,12	4,70
7	52,33	35,03	17,15	7,29
8	48,18	33,97	15,49	6,03
9	51,30	43,61	29,48	6,59
10	54,80	49,21	21,05	7,13

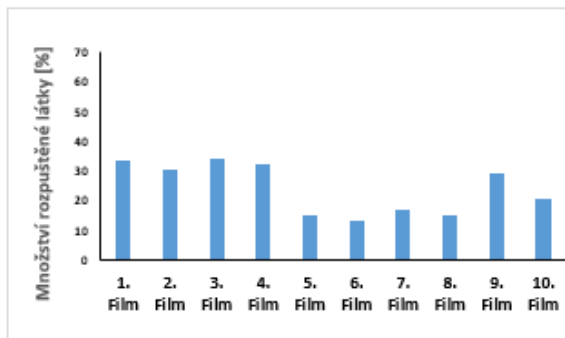
Rozpustnost jednotlivých filmů je znázorněna i graficky na obrázcích č. 10 až 13. V průběhu zkoušky rozpustnosti nedošlo u žádného filmu k úplnému rozpuštění ani po 5 dnech. Viditelná změna filmů při rozpouštění se projevila nejvíce v průběhu první hodiny. V tabulce č. 9 jsou zapsány výsledky po 5 dnech rozpouštění.



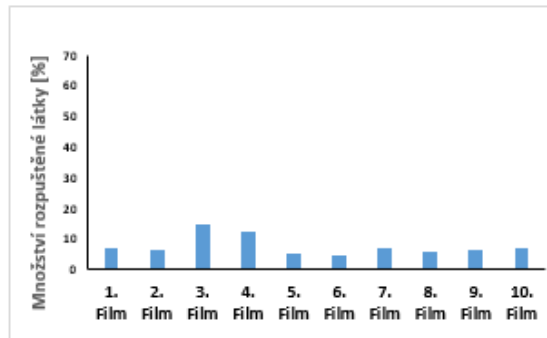
Obrázek 10: Rozpustnost po 60 minutách



Obrázek 11: Rozpustnost po 30 minutách



Obrázek 12: Rozpustnost po 10 minutách



Obrázek 13: Rozpustnost po 1 minutě

Množství chitosanu ve filmech velmi ovlivňuje rozpustnost těchto filmů. Filmy, které obsahují větší procento obsahu chitosanu, se rozpouštějí mnohem hůře než ty, které obsahují chitosanu méně. Např. filmy č. 1 a 5 obsahovaly stejné množství změkčovadla i síťovadla, ale rozdílné množství chitosanu. Film č. 5 obsahoval více chitosanu (10 % chitosanu na navážku hydrolyzátu) ve srovnání s filmem č. 1 (5 % chitosanu na navážku hydrolyzátu), a díky tomu se rozpouštěl hůře. Filmu č. 5 se za dobu 60 minut rozpustilo jen 49,51 %, zatímco filmu č. 1 56,67 %. Tento rozdíl je vidět také mezi filmy č. 2 a 6, 3 a 7 nebo 4 a 8.

Dále měl velký vliv na rozpustnost filmů obsah změkčovadla. Filmy, které obsahovaly vyšší procento obsahu změkčovadla, se rozpouštěly mnohem více než ty s menším obsahem. Tento jev je možné vidět mezi filmy č. 1 a 3, 2 a 4, 5 a 7 nebo 6 a 8. Např. filmy č. 1 a 3 obsahují stejné množství chitosanu i síťovadla, ale film č. 3 obsahuje vyšší procento obsahu změkčovadla (70 % na navážku hydrolyzátu) než film č. 1 (50 % na navážku hydrolyzátu), a díky tomu se filmu č. 3 rozpustilo 65,33 % a filmu č. 1 jen 56,67 %.

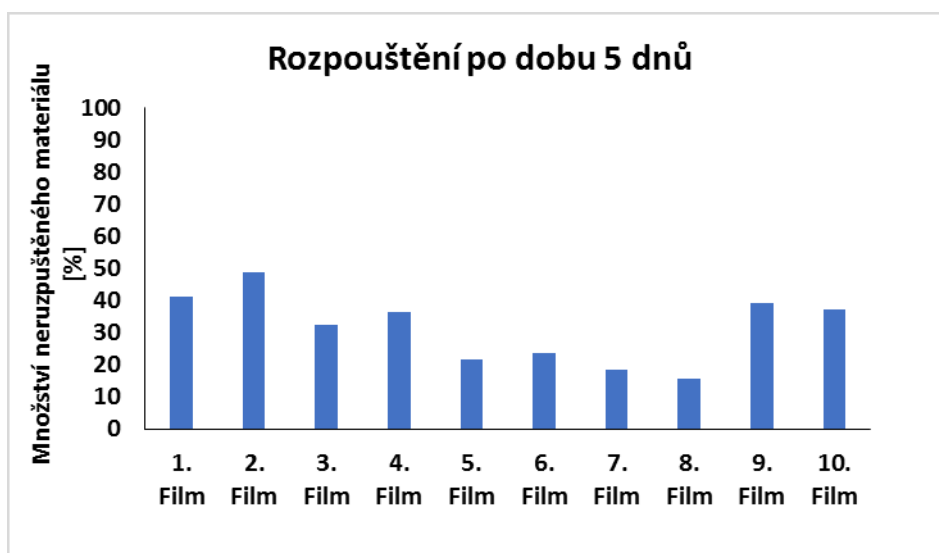
Množství síťovadla ve filmu rovněž značně ovlivnilo rozpustnost tohoto filmu. S rostoucím obsahem síťovadla se snižovala rozpustnost. Tento jev je vidět mezi filmy č. 1 a 2, 3 a 4, 5 a 6 nebo 7 a 8. Např. film č. 2 obsahoval 2 % síťovadla, a rozpustilo se ho 51,14 %, zatímco film č. 1 obsahoval pouze 0,5 % síťovadla, a jeho rozpustnost byla 56,67 %.

Mírná odlišnost v rozpustnosti byla také u filmů č. 9 a 10, které měly stejné složení.

Tabulka 9: Rozpouštění po dobu 5 dnů

Rozpouštění po dobu 5 dnů		
Číslo filmu	Množství rozpuštěného materiálu [%]	Množství nerozpuštěného materiálu [%]
1	58,96	41,04
2	51,41	48,59
3	67,52	32,48
4	63,71	36,29
5	78,28	21,72
6	76,42	23,58
7	81,69	18,31
8	84,53	15,47
9	60,82	39,18
10	62,67	37,33

Na obrázku č. 14 je graficky znázorněno množství nerozpuštěného materiálu po dobu rozpouštění 5 dnů.



Obrázek 14: Množství nerozpuštěného materiálu

U filmů s větším množstvím chitosanu (filmy č. 5 až 8) zůstalo méně nerozpuštěného zbytku. Příčinou toho může být nedostatečné příčné spojení mezi řetězci keratinu síťovadlem.

Sít'ovadlo příčně spojilo mezi sebou jen některé řetězce, u těch ostatních mohlo dojít ke vzniku chemické vazby pouze v rámci jednoho řetězce (jedné šroubovice). Špatné spojení mezi řetězci mohlo nastat vlivem nedostatečného rozmíchání sít'ovadla díky vysoké viskozitě směsi. Vysoká viskozita byla způsobena větším množstvím chitosanu. Chitosan způsoboval spíše vznik zapletenin mezi řetězci keratinu a chitosanu. Při teplotě 37 °C po dobu asi 1 hodiny docházelo zřejmě k rozplétání těchto zapletenin. Po částečném rozpletení řetězců se projevil vliv sít'ovadla.

U filmů č. 1 až 4 zůstal větší podíl nerozpuštěného zbytku než u filmů č. 5 až 8. Filmy č. 1 až 4 obsahovaly méně chitosanu. Směs při míchání měla menší viskozitu, a díky tomu se zřejmě lépe rozmíchalo i sít'ovadlo. Tento jev mohl přispět k většímu počtu příčně spojených řetězců keratinu, a tím k většímu množství nerozpuštěného materiálu.

Při rozpouštění se projevil i vliv změkčovadla. Filmy s větším množstvím změkčovadla se rozpouštěly více. Příkladem toho je rozdíl mezi filmy 1 a 3. Oba dva obsahovaly stejné množství chitosanu i sít'ovadla, ale film č. 3 obsahoval více změkčovadla, což vedlo k jeho větší rozpustnosti. Změkčovadlo zřejmě oddálilo řetězce keratinu mezi sebou, což zmenšilo pravděpodobnost pro vznik příčné vazby, a film se rozpouštěl více. Vliv změkčovadla se dále projevil mezi filmy č. 2 a 4, 5 a 7 nebo 6 a 8.

Filmy č. 9 a 10 se vlivem stejného složení rozpouštěly podobně. Jejich rozpustnost se pohybovala na středu mezi filmy č. 1 až 4 a 5 až 8.

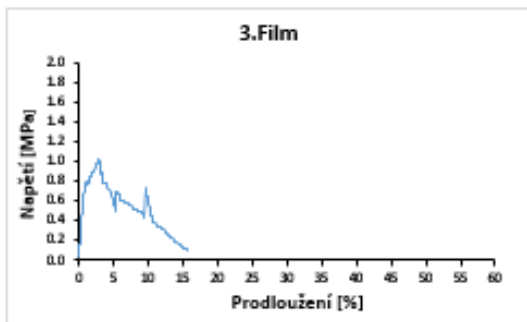
#### **8.4 Tahová zkouška**

U filmů byla testována pouze jeden typ mechanické zkoušky. Jednalo se o zkoušku tahovou. V tabulce č. 10 jsou zapsány hodnoty maximální síly, maximálního napětí a prodloužení při maximální síle, resp. maximálním napětí. Tahovou zkouškou bylo změřeno pouze 7 filmů. Filmy č. 1, 2 a 4 nebyly změřeny, protože byly velmi křehké a rozpadly se.

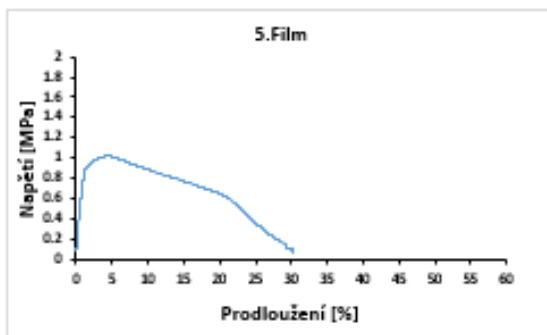
Tabulka 10: Výsledky z tahové zkoušky

Č. filmu	Maximální síla [N]	Maximální napětí [MPa]	Prodloužení při maximální síle/ maximálním napětí [%]
3	15,75	1,02	2,90
5	10,79	1,00	2,50
6	20,54	1,85	3,06
7	17,66	1,15	4,51
8	20,28	1,20	5,01
9	13,12	0,83	5,33
10	11,42	0,55	5,51

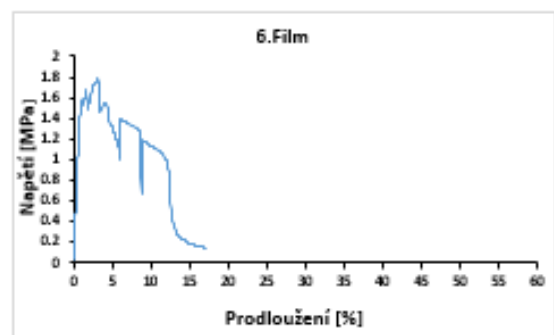
Na obrázcích č. 15 až 21 jsou graficky zobrazeny výsledné tahové křivky.



Obrázek 15: Tahová křivka pro 3. film

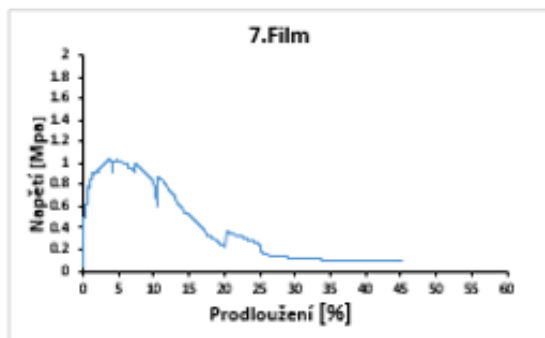


Obrázek 16: Tahová křivka pro 5. film

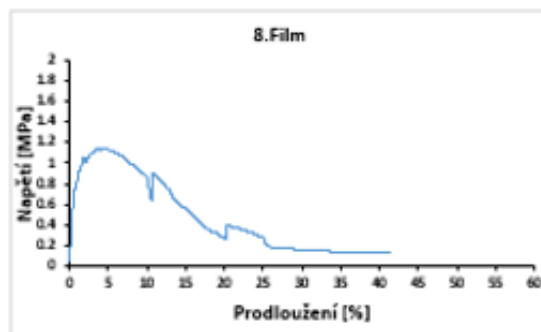


Obrázek 17: Tahová křivka pro 6. film

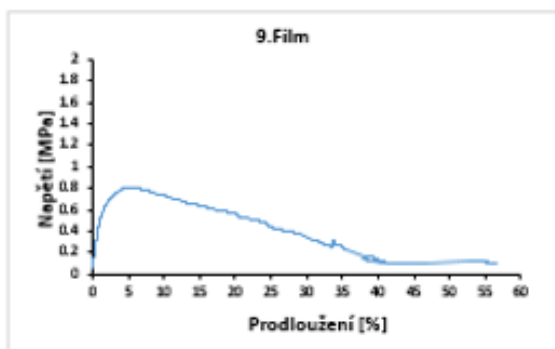




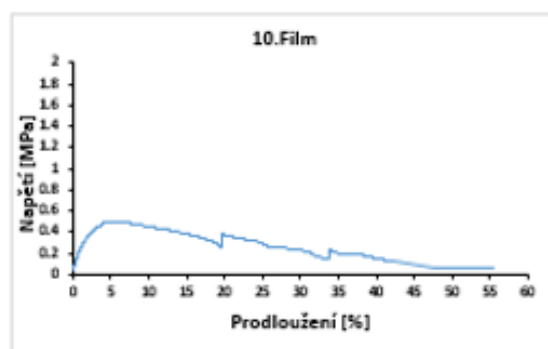
Obrázek 18: Tahová křivka pro 7. film



Obrázek 19: Tahová křivka pro 8. film



Obrázek 20: Tahová křivka pro 9. film



Obrázek 21: Tahová křivka pro 10. film

Z tahových křivek je patrné, že s rostoucím množstvím síťovadla roste maximální síla, maximální napětí, a klesá prodloužení při maximální síle, resp. maximálním napětí. Vliv síťovadla je vidět mezi filmy 5 (0,5 % síťovadla) a 6 (2 % síťovadla), nebo 7 (0,5 % síťovadla) a 8 (2 % síťovadla). Z důvodu většího množství síťovadla měl film č. 6 vyšší hodnotu maximální síly (20,54 N), a rovněž také vyšší hodnotu maximálního napětí (1,85 MPa), než film č. 5 (maximální síla 10,79 N a maximální napětí 1,00 MPa). Rovněž platilo, že se tahová křivka filmu č. 6 protáhla méně, než u filmu č. 5. Obdobná situace nastala také mezi filmy č. 7 a 8.

S rostoucím množstvím chitosanu rovněž rostla maximální síla a s ní související maximální napětí. Vliv chitosanu je vidět mezi filmy č. 3 (5 % chitosanu) a 7 (10 % chitosanu). Hodnota maximální síly u filmu č. 3 je 15,75 N a maximálního napětí 1,02 MPa, zatímco u filmu č. 7 jsou tyto hodnoty 17,66 N a 1,15 MPa.

Množství změkčovadla rovněž velmi ovlivnilo tahové vlastnosti filmů. S rostoucím množstvím změkčovadla roste protažení vzorků. Lze to vidět např. mezi filmy č. 5 (50 % změk-

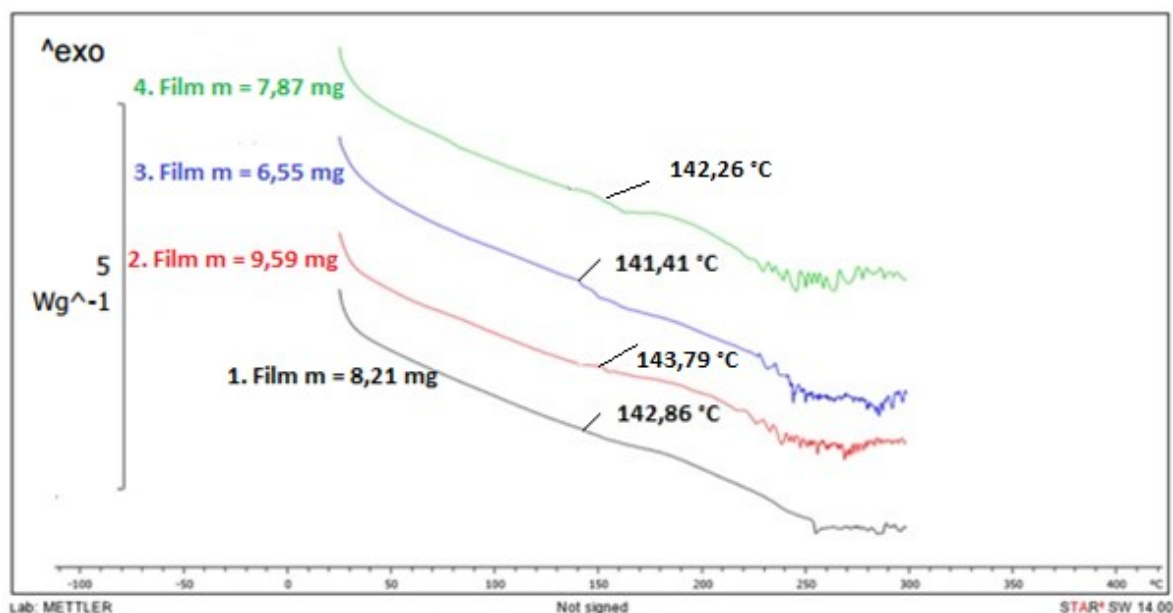
čovadla) a 7 (70 % změkčovadla), nebo 6 (50 % změkčovadla) a 8 (70 % změkčovadla). Prodloužení při maximální síle, resp. maximálním napětí bylo u filmu č. 5 jen 2,50 %, zatímco u filmu č. 7 až 4,51 %. Podobný rozdíl byl také mezi filmy č. 6 a 8.

Filmy č. 9 a 10 měly stejné složení. Mělo se jednat o kontrolní filmy, které svým složením byly na přesně na středu mezi skupinami filmů č. 1 až 4 a 5 až 8. Tahové křivky těchto filmů vypadají velmi podobně. Tyto filmy se ze všech filmů nejvíce prodloužily, a maximální napětí při prodloužení bylo u nich nejmenší. Důvodem může být složení těchto filmů, souvisejícím s optimálním poměrem jednotlivých složek.

### 8.5 Diferenciální snímací kalorimetrie DSC

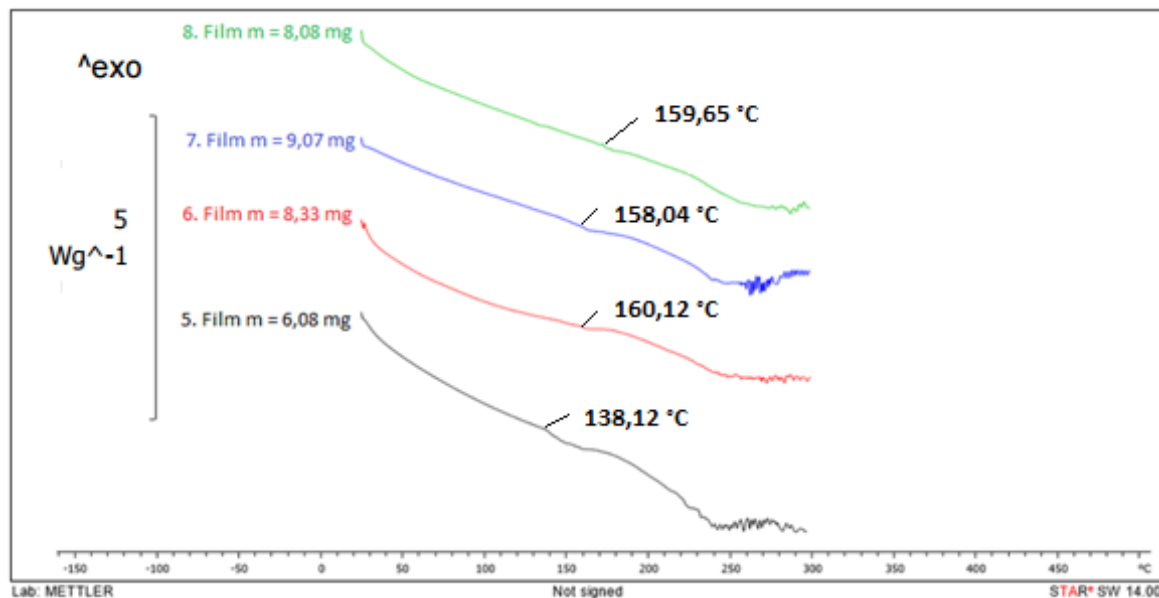
Jedinou termickou zkouškou, kterou byly otestovány filmy, byla diferenciální snímací kalorimetrie DSC. Touto metodou bylo otestováno všech 10 filmů. Na obrázcích č. 22 až 24 je znázorněn průběh DSC křivek jednotlivých filmů.

Na obrázku č. 22 jsou vidět DSC křivky filmů 1 až 4, na obrázku č. 22 filmy 5 až 8, a na obrázku č. 23 filmy 9 a 10.



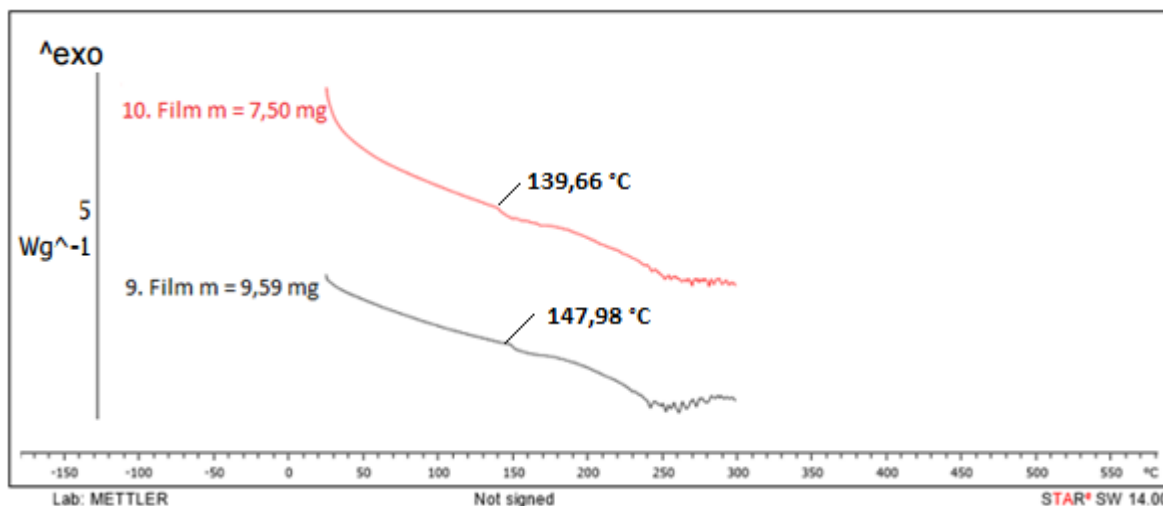
Obrázek 22: DSC křivky filmů č. 1 až 4

DSC křivky filmů č. 1 až 4 mají přibližně podobný průběh. U každé křivky se nachází viditelný pokles těsně za teplotou 140 °C, který zřejmě souvisí s  $T_g$  přechodem. U filmu č. 1 a 4 je vidět mírný pík kolem teploty 290 °C, který zřejmě značí odpařování glycerolu. Filmy začínají degradovat kolem teploty 215 °C až 250 °C.



Obrázek 23: DSC křivky filmů 5 až 8

DSC křivky filmů č. 5 až 8 mají také přibližně podobný průběh. Na těchto křivkách se rovněž nachází pokles. Teploty, odpovídající těmto poklesům, se u jednotlivých filmů mírně liší. Tyto teploty jsou v rozmezí od 138,12 °C do 160 °C. U filmu č. 7 se nachází mírný endotermní pík kolem teploty 290 °C, který zřejmě odpovídá odpařování glycerolu. Začátek teploty degradace se u těchto filmů pohyboval přibližně od 230 °C do 270 °C.



Obrázek 24: DSC křivky filmů 9 a 10

DSC křivky filmů č. 9 a 10 měly velmi podobný průběh. V oblasti teplot 130 °C až 150 °C nastalo T<sub>g</sub>. Přibližně od teploty 230 °C vzorky začaly degradovat.

U filmů, které obsahovaly více síťovadla, se T<sub>g</sub> posunula mírně k vyšším hodnotám. Vliv síťovadla je vidět mezi filmy č. 1 a 2, 3 a 4, 5 a 6, nebo 7 a 8. Např. u filmu č. 1 s obsahem síťovadla 0,5 % byla hodnota T<sub>g</sub> 142,86 °C, zatímco u filmu č. 2 s obsahem síťovadla 2 % se hodnota T<sub>g</sub> zvedla na teplotu 143,79 °C. Obdobně je tomu i u ostatních dvojic filmů.

Obecně lze říct, že u vzorků s větším množstvím chitosanu (filmy č. 5 až 8) byla teplota degradace mírně posunuta směrem k vyšším hodnotám, přibližně od 230 °C začaly vzorky degradovat. Vzorky s menším množstvím chitosanu (filmy č. 1 až 4) začaly degradovat přibližně kolem teploty 215 °C. V tabulce č. 11 jsou zaznamenány teploty degradace jednotlivých filmů.

Tabulka 11: Teploty degradace

Č. filmu	Teplota degradace (°C)
1	250,15
2	212,21
3	222,45
4	225,02
5	230,34
6	239,19
7	260,45
8	270,61
9	249,11
10	235,29

## 8.6 Statistické vyhodnocení

Vliv jednotlivých faktorů (množství chitosanu, glycerolu a glutaraldehydu) na vybrané vlastnosti filmů (rozpuštnost, maximální napětí v tahu a teplota degradace) byl hodnocen pomocí F-hodnot, p-hodnot a Paretových diagramů.

Pro bližší popis vlastností filmů v závislosti na jejich složení byly také vytvořeny vrstevnicové diagramy.

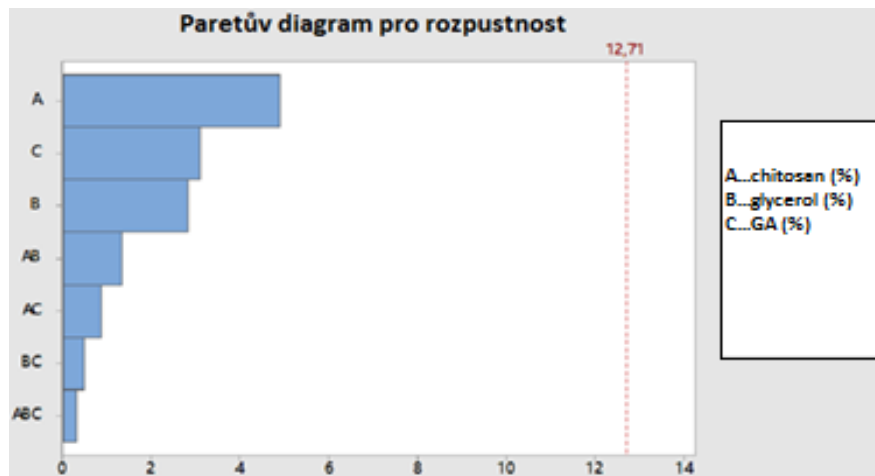
### 8.6.1 Statistická významnost jednotlivých faktorů

Sledování statistické významnosti jednotlivých faktorů pomocí F-hodnot a p-hodnot je vidět v tabulce č. 12.

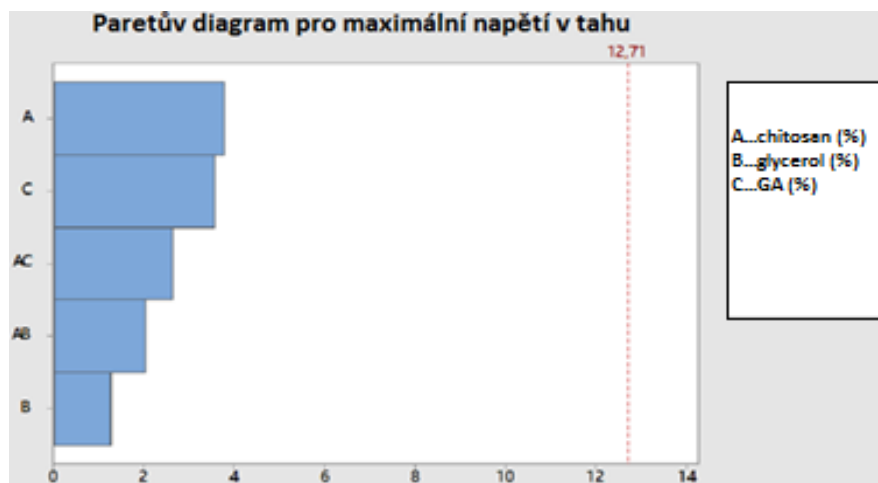
Tabulka 12: F-hodnoty a p-hodnoty

Faktor	Rozpustnost [%]		Maximální napětí v tahu [MPa]		Teplota degradace [°C]	
	F-hodnota	p-hodnota	F-hodnota	p-hodnota	F-hodnota	p-hodnota
<b>chitosan [%]</b>	23,98	0,128	14,16	0,165	13,52	0,182
<b>glycerol [%]</b>	7,90	0,218	9,59	0,326	10,24	0,201
<b>GA [%]</b>	9,54	0,199	12,66	0,174	16,41	0,151

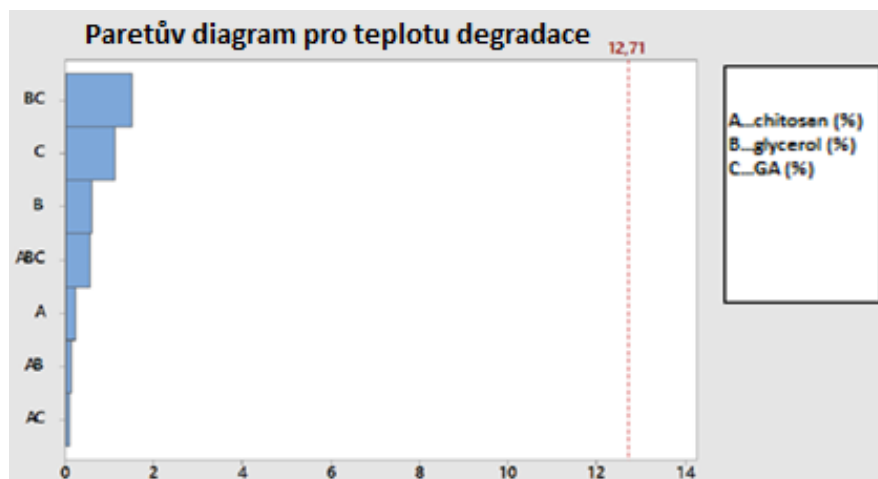
Významnost jednotlivých faktorů byla také posuzována na základě Paretoových digramů, které se nacházejí na obrázcích č. 25 až 27.



Obrázek 25: Pareto diagram pro rozpustnost



Obrázek 26: Paretův diagram pro maximální napětí v tahu



Obrázek 27: Paretův diagram pro teplotu degradace

Na rozpustnost má největší vliv chitosan, dále glutaraldehyd, a na posledním místě glycerol. Dle Paretova diagramu nebyl žádný faktor ovlivňující rozpustnost statisticky významným. Ve stejném trendu jako je Paretův diagram se nacházejí F-hodnota a p-hodnota. F-hodnota dokonce vyhodnotila vliv chitosanu statisticky významným.

Maximální napětí v tahu je podle Paretova diagramu velmi ovlivněno chitosanem a glutaraldehydem. Vliv chitosanu mírně převládá nad vlivem glutaraldehydu. Kombinace chitosanu a glutaraldehydu má také významný vliv na napětí v tahu. Maximální napětí v tahu je nejméně ovlivněno glycerolem. Více než samotný glycerol, ovlivňuje napětí v tahu kombinace chitosanu a glycerolu. Pořadí vlivu chitosanu, glutaraldehydu a glycerolu na

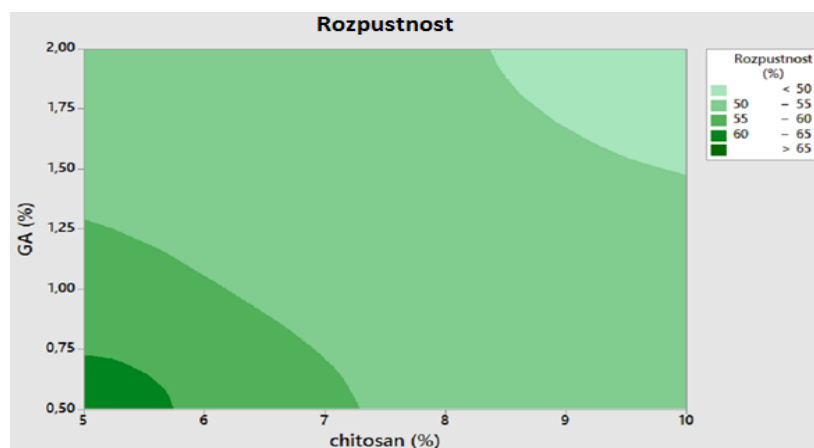
maximální napětí v tahu je opět ve stejném trendu, jako je F-hodnota nebo p-hodnota. F-hodnota vyhodnotila vliv chitosanu a glutaraldehydu statisticky významným.

Paretův diagram ukazuje, že teplotní degradace vzorků je velmi ovlivněna kombinací jednotlivých složek (chitosan, glycerol a glutaraldehyd). Tato kombinace svým vlivem převládá nad vlivem jednotlivých složek. Největší vliv má kombinace glycerolu a glutaraldehydu. Z hlediska vlivu jednotlivých složek převládá vliv glutaraldehydu a glycerolu. Chitosan jakožto samotná složka ovlivňuje dle Paretova diagramu teplotu degradace ze všech složek nejméně. V případě teploty degradace informace získané z Paretova diagramu nejsou ve stejném trendu, jako jsou F-hodnoty a p-hodnoty. F-hodnota vyhodnotila chitosan druhým významným faktorem v pořadí, a dokonce všechny tři faktory vyhodnotila jako statisticky významnými.

### 8.6.2 Vrstevnicové diagramy

Pomocí vrstevnicových diagramů byl podrobněji posuzován vliv jednotlivých faktorů na vybrané vlastnosti filmů, jako byla rozpustnost, maximální napětí v tahu a teplota degradace.

Hodnocení rozpustnosti bylo znázorněno na obrázcích č. 28 až 30.

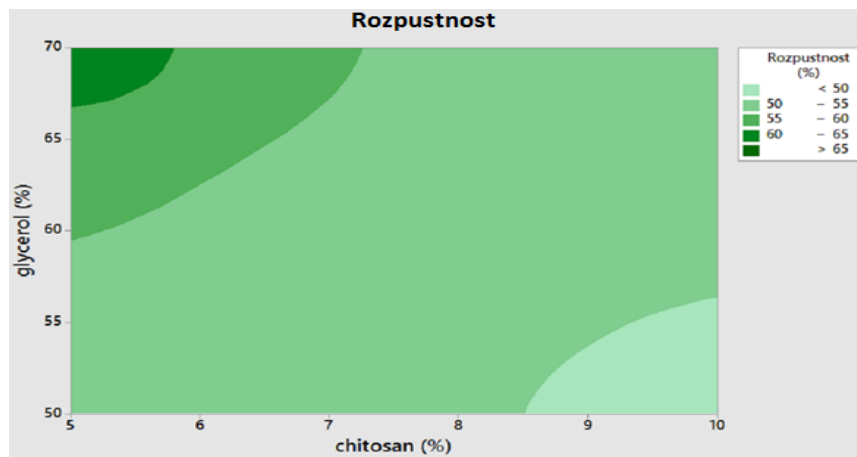


Obrázek 28: Rozpustnost (%): GA (%) vs chitosan (%)

Z obrázku č. 28 je patrné, že rozpustnost filmu klesne pod 50 %, je-li množství glutaraldehydu v rozmezí od 1,75 % do 2 % a množství chitosanu přibližně od 8 % do 10 %. Naopak

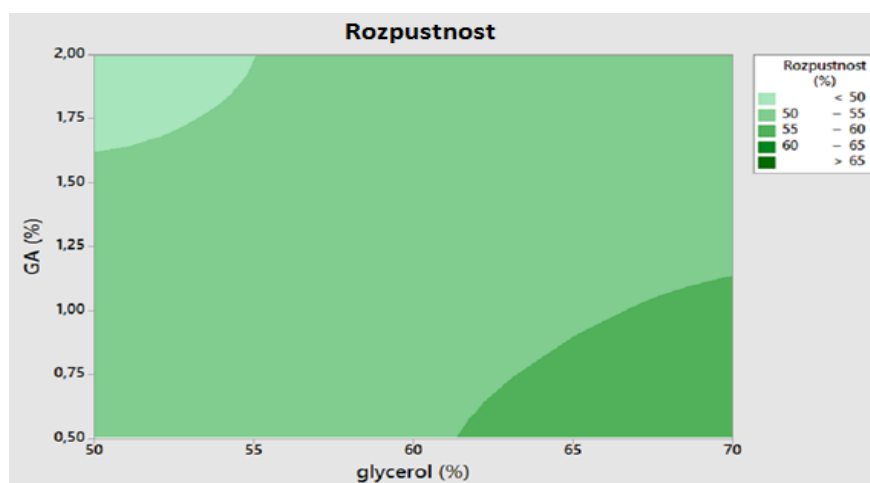


přídavkem glutaraldehydu v rozmezí přibližně od 0,50 % do 0,75 % a chitosanu pod 5,5 % se rozpustí více, jak 65 % filmu.



Obrázek 29: Rozpustnost (%): glycerol (%) vs chitosan (%)

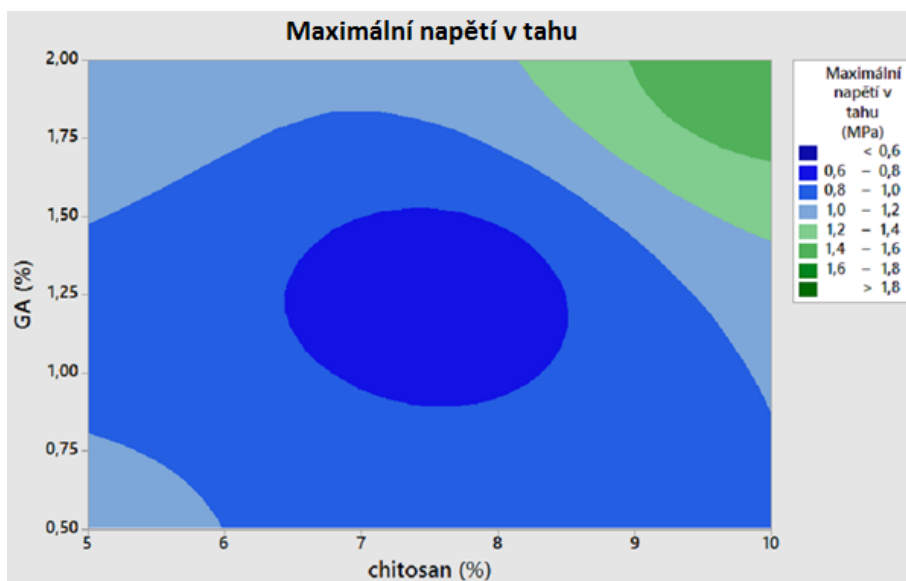
Na základě obrázku č. 27 je patrné, že bude-li se množství glycerolu pohybovat přibližně od 50 % do 55 %, a množství chitosanu bude v rozmezí od 8,5 % do 10 %, rozpustí se maximálně 50 % filmu. Z obrázku je dále patrné, že nejhorší rozpustnost budou mít filmy, bude-li se množství glycerolu pohybovat přibližně nad 66 % a množství chitosanu klesne pod 6 %. Zvedne-li se množství glutaraldehydu nad 66 %, a množství chitosanu klesne pod 6 %, rozpustnost filmu vzroste až na 65 % a více.



Obrázek 30: Rozpustnost (%): GA (%) vs glycerol (%)

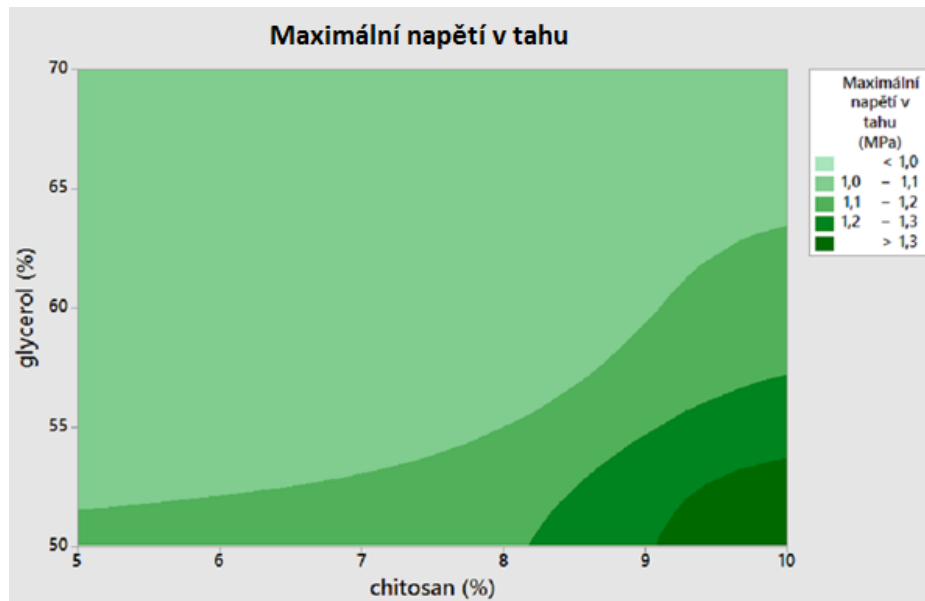
Dle obrázku č. 30 je možné konstatovat, že přidavkem glutaraldehydu přibližně nad 1,60 % a chitosanu pod 55 % se nerozpustí více, jak 50 % filmu. Přidavkem glutaraldehydu přibližně do 1,25 % a glycerolu nad 61 % rozpustnost filmu stoupne na 55 až 60 %.

Hodnocení maximálního napětí v tahu bylo znázorněno na obrázcích č. 31 až 33.



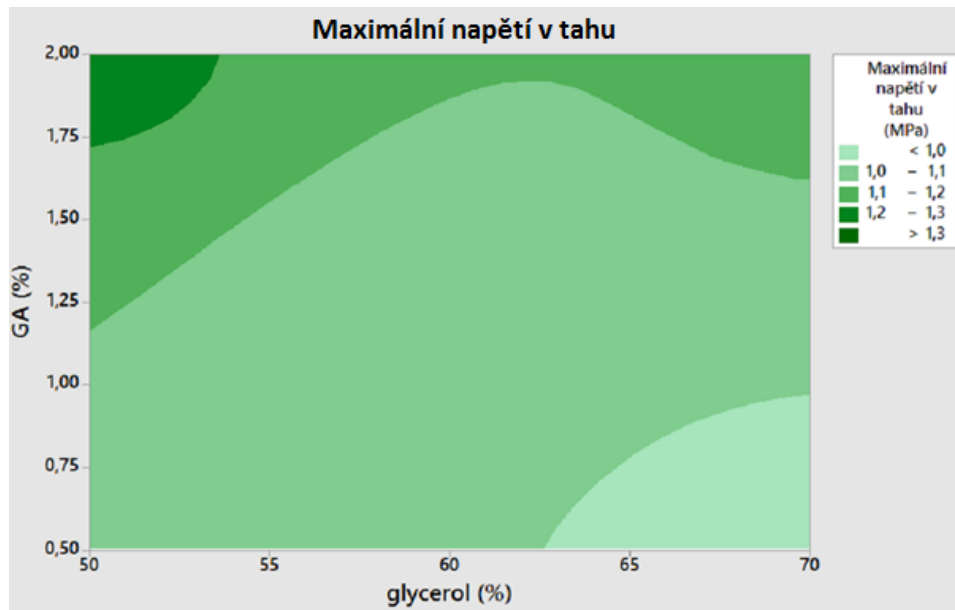
Obrázek 31: Maximální napětí v tahu (MPa): GA (%) vs chitosan (%)

Na obrázku č. 31 je vidět, že bude-li se množství glutaraldehydu pohybovat v rozmezí hodnot přibližně od 1 % do 1,50 % a množství chitosanu přibližně od 6,5 % do 8,5 %, maximální napětí v tahu klesne pod 0,6 MPa. Přidavkem glutaraldehydu nad 1,75 % a množství chitosanu nad 9 % bude hodnota maximálního napětí v tahu vyšší, jak 1,8 MPa.



Obrázek 32: Maximální napětí v tahu (MPa): glycerol (%) vs chitosan (%)

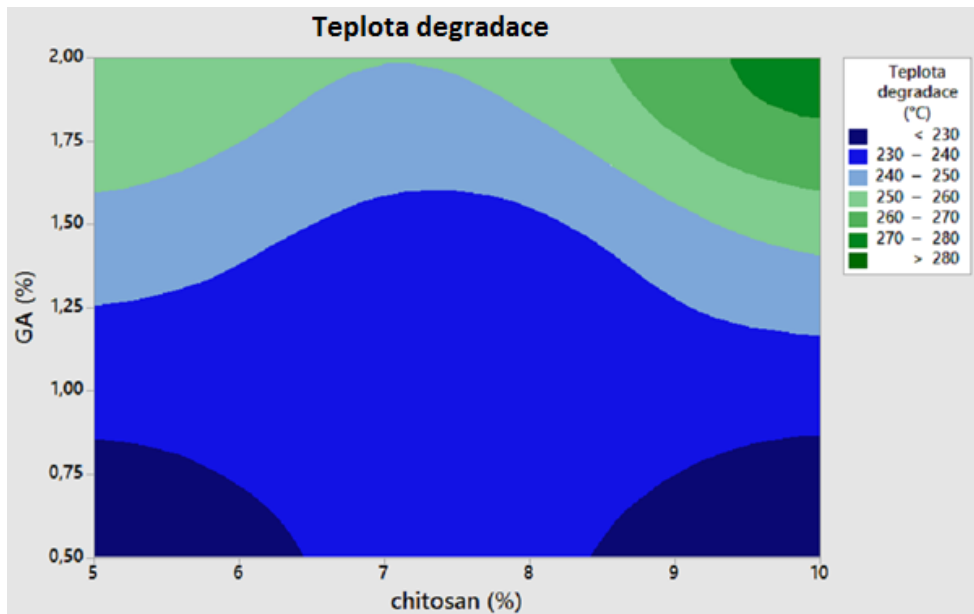
Dle obrázku č. 32 je možné konstatovat, že vliv glycerolu zaujímá široké pásmo v diagramu, což může znamenat, že vliv glycerolu na maximální napětí v tahu je významný. Z vrstevnicového digramu je vidět, že přidavkem glycerolu přibližně nad 51 % se hodnota maximálního napětí v tahu pohybuje v rozmezí od 1,0 MPa do 1,1 MPa. Aby se mírně snížil účinek glycerolu, je nutné přidat víc, jak 8 % chitosanu. Pokud bude množství chitosanu vyšší, jak 9 %, a množství glycerolu přibližně do 52 %, vzroste hodnota maximálního napětí v tahu na hodnotu, která se bude pohybovat v intervalu od 1,2 MPa do 1,3 MPa. V rozporu s vrstevnicovým diagramem je Paretův diagram, F-hodnota i p-hodnota. Na základě hodnocení statistické významnosti bylo totiž zjištěno, že vliv glycerolu je až na posledním místě.



Obrázek 33: Maximální napětí v tahu (MPa): GA (%) vs glycerol (%)

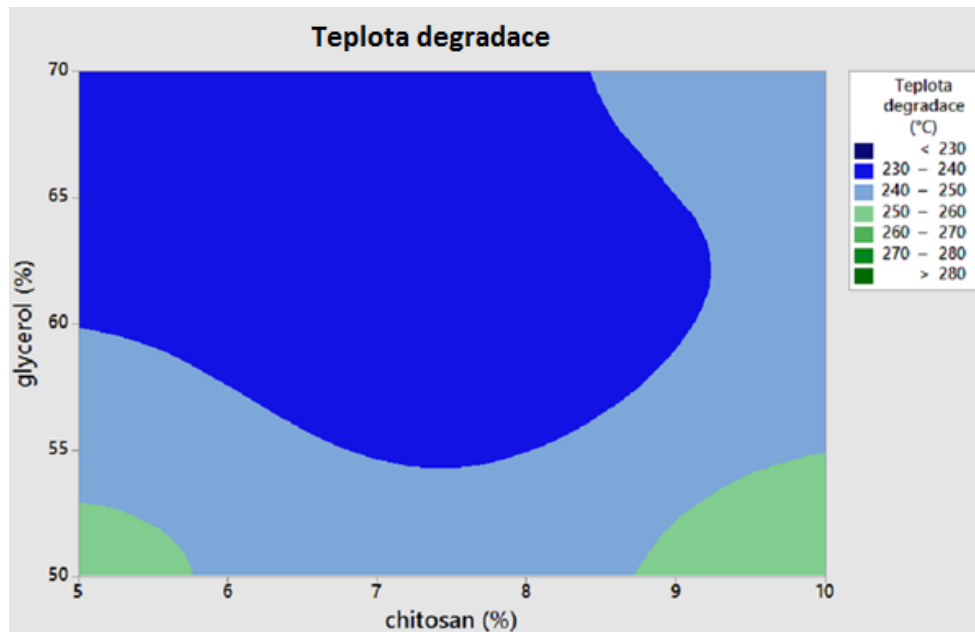
Obrázek č. 33 znázorňuje, že v případě maximálního napětí v tahu vliv glycerolu převyšuje vliv glutaraldehydu. Pokud je množství glutaraldehydu vyšší, jak 1,75 % a množství glycerolu do 50 %, hodnota maximálního napětí je vyšší, jak 1,3 MPa. Snížením množství glutaraldehydu přibližně pod 1,25 %, a zvýšením množství glycerolu nad 63 %, klesne hodnota maximálního napětí na rozmezí hodnot od 1,0 MPa do 1,1 MPa. Dalším snížením množství glutaraldehydu pod 1 % při zachování stejného množství glycerolu (asi 63 %) klesne hodnota maximálního napětí v tahu pod 1 MPa.

Hodnocení teploty degradace bylo znázorněno na obrázcích č. 34 až 36.



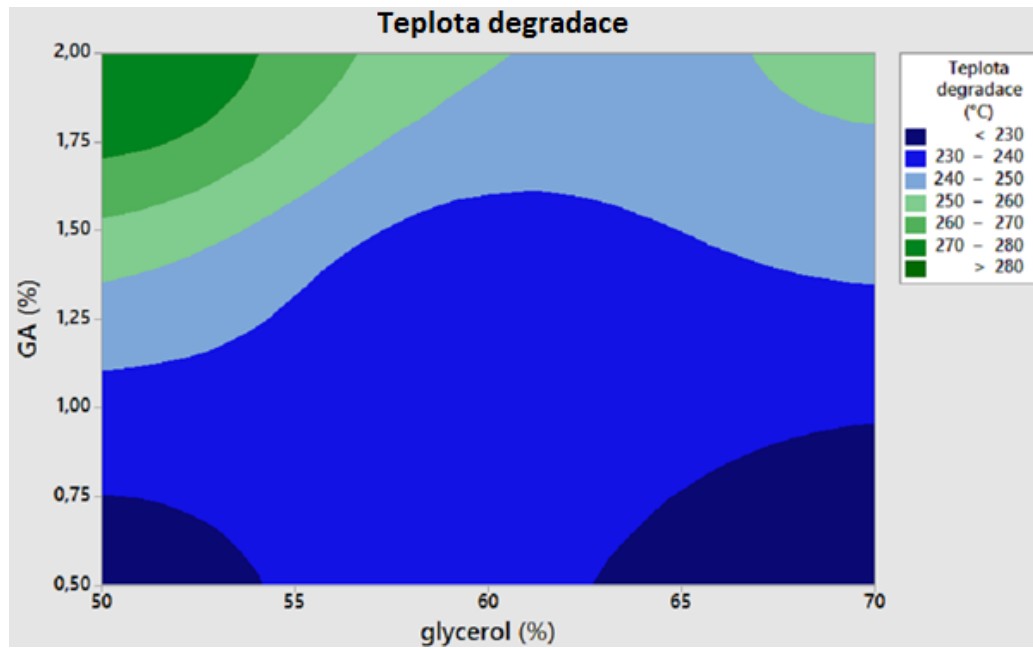
Obrázek 34: Teplota degradace (°C): GA (%) vs chitosan (%)

Na obrázku č. 34 je patrné, že bude-li množství glutaraldehydu vyšší, jak 1,75 %, a množství chitosanu se bude pohybovat nad 9 %, bude teplota degradace nad 280 °C. Naopak teploty degradace, která bude nižší, jak 230 °C, se dosáhne snížením množství glutaraldehydu přibližně pod 0,85 %, a přidavkem chitosanu v rozmezí množství od 5 % do přibližně 6,5 % a od přibližně 8,5 % do 10 %.



Obrázek 35: Teplota degradace (°C): glycerol (%) vs chitosan (%)

Dle obrázku č. 35 se množstvím glycerolu přibližně pod 55 %, a množstvím chitosanu v rozmezí od 5 % do přibližně 6 % a od přibližně 8,5 % do 10 %, hodnota teploty degradace bude pohybovat v rozmezí hodnot od 250 °C do 260 °C. Zvýšením množství glycerolu nad 55 % a přidávkem množství chitosanu od 6 % do přibližně 9 % teplota degradace klesne na rozmezí hodnot od 230 °C do 240 °C.



Obrázek 36: Teplota degradace (°C): GA (%) vs glycerol (%)

Obrázek č. 36 znázorňuje, že množství glutaraldehydu pod 1 % a množství glycerolu v rozmezí od 50 % do přibližně 55 % a od přibližně 63 % do 70 %, snižuje degradaci filmu pod teplotu 230 °C. Zvýšením množství glutaraldehydu nad 1,75 % a přidávkem množství glycerolu do 54 % se hodnota teploty degradace zvýší nad 280 °C.

## ZÁVĚR

Diplomová práce byla rozdělena na dvě části, na teoretickou a praktickou část. V teoretické části byly popsány informace o keratinu, o jeho vlastnostech a výskytu. Podstatná část práce byla věnována způsobům přípravy keratinového hydrolyzátu. Další část byla věnována přípravě filmů z keratinového hydrolyzátu a modifikaci vlastností těchto filmů s použitím chitosanu.

Prvním cílem praktické části bylo připravit keratinový hydrolyzát z ovčí vlny. Keratinový hydrolyzát byl připraven kombinací alkalické a enzymové hydrolyzy, kterou bylo rozloženo přibližně 87 % vlny. Druhým cílem bylo vyrobit filmy z keratinového hydrolyzátu. Kromě keratinového hydrolyzátu byl součástí těchto filmů také chitosan, změkčovadlo glycerol a síťovadlo glutaraldehyd. Bylo připraveno 10 filmů, u nichž bylo vždy stejné množství keratinového hydrolyzátu a množství zbylých složek bylo naplánováno statistickou metodou faktorových pokusů  $2^3$  pomocí programu Minitab 17. Třetím cílem bylo otestovat filmy, a statisticky vyhodnotit vliv jednotlivých faktorů (množství chitosanu, glycerolu a glutaraldehydu) na vybrané vlastnosti filmů (rozpustnost, tahové vlastnosti a teplota degradace). Statistická významnost faktorů byla vyhodnocena pomocí Paretových diagramů, dále F-hodnot a p-hodnot. K rozšíření informací souvisejících s vlivem jednotlivých faktorů na vybrané vlastnosti filmů byly vytvořeny vrstevnicové diagramy zpracované programem Minitab 17.

Rozpustnost filmů byla testována po 1 minutě, dále po 10, 30 a 60 minutách. V průběhu testování rozpustnosti bylo zjištěno, že filmy s větším množstvím chitosanu a glutaraldehydu se rozpouští méně, naopak filmy s větším množstvím glycerolu více. Žádný z filmů se nerozpustil úplně ani po 5 dnech rozpouštění. Zvýšením množstvím chitosanu z 5 % na 10 % se snížila rozpustnost filmu až o 10 %, zvýšením množství glutaraldehydu z 0,5 % na 2 % se rozpustnost filmů snížila v průměru o 2 %. Naopak přidávkem glycerolu z 50 % na 70 % se rozpustnost zvýšila v průměru o 10 %. Z Paretova diagramu bylo zjištěno, že největší vliv na rozpustnost má chitosan, dále glutaraldehyd, a až na třetím místě glycerol. Ve stejném trendu jako Paretův diagram se nacházely také F-hodnota a p-hodnota. Z F-hodnoty se také ukázalo, že vliv chitosanu je statisticky významný.

Při testování tahových vlastností filmů se dospělo k závěru, že s rostoucím množstvím změkčovadla roste prodloužení filmů. S rostoucím množstvím chitosanu a glutaraldehydu



roste napětí v tahu. Zvýšením množství chitosanu z 5 % na 10 % se zvýšilo maximální napětí přibližně o 0,15 MPa. Navýšením množství glutaraldehydu z 0,5 % na 2 % se zvýšilo maximální napětí v tahu až o 0,85 MPa. Naopak přidávkem glycerolu z 50 % na 70 % se prodloužení při maximálním napětí zvýšilo z 2,50 % na 4,51 %. Z Paretova diagramu bylo zjištěno, že největší vliv na maximální napětí v tahu má chitosan, dále glutaraldehyd, a na posledním místě glycerol. F-hodnota a p-hodnota byly ve stejném trendu. Z F-hodnoty se rovněž ukázalo, že vliv chitosanu je opět statisticky významným.

Z DSC křivek bylo možné posoudit, že u filmů s větším množstvím glutaraldehydu se mírně posunula teplota skelného přechodu směrem k vyšším hodnotám. Zvětšením množství glutaraldehydu z 0,5 % na 2 % se teplota skelného přechodu posunula směrem k vyšším hodnotám přibližně o 25 °C. S rostoucím množstvím chitosanu se posunula směrem k vyšším hodnotám také teplota degradace. Zvětšením množství chitosanu z 5 % na 10 % se hodnota teploty degradace zvýšila přibližně až o 40 °C. Z Paretova diagramu bylo zjištěno, že na teplotu degradace má velký vliv glutaraldehyd. Obdobné informace nám poskytla i F-hodnota a p-hodnota.

Závěrem lze konstatovat, že chitosan má významný vliv na vlastnosti keratinových filmů. Zvyšuje mechanické vlastnosti filmů týkající se pevnosti a soudržnosti. Nicméně filmy jsou naopak méně poddajné a ohebné. S rostoucím množstvím chitosanu se snižuje prodloužení v tahu, a také rozpustnost filmů. V případě teploty degradace je vliv chitosanu převýšen vlivem glutaraldehydu. Významný vliv na růst teploty degradace směrem k vyšším hodnotám má pouze kombinace chitosanu a glutaraldehydu, která dokonce svým vlivem převyšuje vliv samotného glutaraldehydu.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] Mokrejš, P., Krejčí O., Čermák R., Svoboda P. Optimalizace podmínek enzymové hydrolyzy kuřecího peří. *Chemické listy*. 2013, (107), 709-712.
- [2] BRAGULLA, H. H., HOMBERGER, D. G. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of anatomy*. 214. 2009, **4**, 516-559. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x.
- [3] FELIX, V. *Chemicko-technické textilní rozborů*. Praha: Průmyslové vydavatelství, 1951.
- [4] ZOCCOLA, M., ALUIGI, A., TONIN, C. Characterisation of keratin biomass from butchery and wool industry wastes. *Journal of Molecular Structure*. 2009, **938**(1-3), 35-40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2009.08.036>.
- [5] VRBACKÝ, R., VRBACKÁ, V. *Technologie výroby kožešin*. 3., přeprac. vyd. Praha: SNTL, 1990, 558 s. ISBN 80-03-00557-4.
- [6] HLADÍK, V., KOZEL, T., MIKLAS, Z. *Textilní materiály*. 2 vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1984, 225 s.
- [7] VOET, D., VOET, J. G. *Biochemie*. Praha: Victoria Publish., 1995, 550 s. ISBN 80-85605-44-9.
- [8] MURRAY, R. K. *Harperova biochemie*. 23 vyd. Jihlava: Nakladatelství H+H, 2002, 892 s. ISBN 80-7319-013-3.
- [9] BLAŽEJ, A. a Š. ŠUTÁ. *Vlastnosti textilních vláken*. Bratislava: Alfa, 1982, 430 s.
- [10] ŠKÁRKA, B., FERENČÍK, M., NOVÁK, M., TURECKÝ, L. *Biochémi*a. 4. přeprac. vyd. Bratislava: Slovak Academic Press, 2000, 924 s. ISBN 8088908574.
- [11] ŠÍPAL, Z., ANZENBACHER, P., PEČ, P., POSPÍŠIL, J., RŮŽIČKA, I. *Biochemie*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1992, 465 s. ISBN 80-04-21736-2.
- [12] DOBSON, C. M., GERRARD, J. A., PRATT, A. J. *Foundations of Chemical Biology*. Oxford Chemistry Primers, 2002, 104 s. ISBN 9780199248995.
- [13] OBŠIL, T. *Struktura proteinů a funkce enzymů* [online]. In: . Katedra fyzikální a makromolekulární chemie: Přírodovědecká fakulta UK v Praze, s. 1-10 [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: <http://docplayer.cz/407796-Struktura-proteinu-a-funkce-enzymu.html>

- [14] KLÁSEK, A. *Nauka o polymerech II*. Praha: SNTL, 1980, 115 s. ISBN 05-023-80.
- [15] FREEMAN, S., QUILLIN, K., ALLISON, L. *Biological Science*. 5 vyd. Pearson, 2013, 672 s. ISBN 9780321841810.
- [16] VRBACKÁ, V. *Příručka koželuha IV*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1967, 447 s.
- [17] KORNIŁŁOWICZ-KOWALSKA, T., BOHACZ, J. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. *Waste Management*. 2011, **31**(3), 1689–1701. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.03.024>.
- [18] MOKREJŠ, P., KREJČÍ, O. Snižování obsahu popelovin v hydrolyzátech keratinu dialýzou. / " 0 1 2 § & ' (. Praha: CEMC, 2012, **2012**(4), 216-220. ISSN 1804-0195.
- [19] MOKREJŠ, M., KREJČÍ O., SVOBODA, P., VAŠEK, V. Modeling technological conditions for breakdown of waste sheep wool. *Rasayan journal of chemistry*. 2011, **4**(4), 728-735. ISSN 0974-1496.
- [20] ZOCCOLA, M., ALUIGI, A., PATRUCCO, A. Microwave-assisted chemical-free hydrolysis of wool keratin. *Textile Research Journal*. 2012, **82**(19), 2006–2018.
- [21] GOUSTEROVA, A., BRAIKOVA, D., GOSHEV, I., CHRISTOV, P. Degradation of keratin and collagen containing wastes by newly isolated thermoactinomycetes or by alkaline hydrolysis. *Applied Microbiology*. 2005, **40**(5), 335–340. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2005.01692.x.
- [22] MOKREJŠ, P. a F. LANGMAIER. *Aplikace přírodních polymerů*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008, 90 s. ISBN 978-80-7318-674-6.
- [23] VERRIER, S., PALLU, S., BAREILLE, R., JONCZYK, A. Function of linear and cyclic RGD-containing peptides in osteoprogenitor cells adhesion process. *Biomaterials*. 2002, **23**(2), 585–596. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00145-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00145-4).
- [24] REICHL, S., BORRELLI, M., GEERLING, G. Keratin films for ocular surface reconstruction. *Biomaterials*. 2011, **32**(13), 3375–3386. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.052>.

- [25] KAKKAR, P., VERMA, S., MANJUBALA, I., MADHAN, B. Development of keratin–chitosan–gelatin composite scaffold for soft tissue engineering. *Materials Science and Engineering*. 2014, **45**, 343–347. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.09.021>.
- [26] REICHL, S. Films based on human hair keratin as substrates for cell culture and tissue engineering. *Biomaterials*. 2009, **30**(36), 6854–6866. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.08.051>.
- [27] SECCHI, G. Role of protein in cosmetics. *Clinics in Dermatology*. 2008, **26**(4), 321–325. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2008.04.004>.
- [28] DESMOND, E., GRUBER, J. V. *Principles of polymer science and technology in cosmetics and personal care: Cosmetic Science and technology*. 22. New York: Marcel Dekker, 1999, 571 s. ISBN 0-8247-1923-9.
- [29] SECCHI, J. V., TEGLIA, A. *Proteins in cosmetics*. New York: Marcel Dekker, 2000. ISBN 978-0-203-90794-8.
- [30] FUJII, T. Hair keratin film as a substitute device for human hair Application in hair care science. *Journal of Biological Macromolecules*. 2013, **12**, 3-15. DOI: <http://doi.org/10.14533/jbm.12.3>. ISSN 2187-3240.
- [31] COWARD-KELLY, G., CHANG, V. S., AGBOGBO, F. K. Lime treatment of keratinous materials for the generation of highly digestible animal feed: 1. Chicken feathers. *Bioresource Technology*. 2006, **97**(11), 1337–1343. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.05.021>.
- [32] GRAZZIOTIN, A., PIMENTEL, F. A., SANGALI, S. Production of feather protein hydrolysate by keratinolytic bacterium *Vibrio* sp. kr2. *Bioresource Technology*. 2007, **98**(16), 3172–3175. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.034>.
- [33] VESELÁ, M., FRIEDRICH, J. Amino acid and soluble protein cocktail from waste keratin hydrolysed by a fungal keratinase of *Paecilomyces marquandii*. *Biotechnology and Bioprocess*. 2009, **14**(1), 84–90. DOI: 10.1007/s12257-008-0083-7.
- [34] KARTHIKEYAN, S., BALAJI, B., SEGHAL, P. K. Industrial applications of keratins – A review. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 2007, **66**(9), 710-715. ISSN 0022-4456.

- [35] ROUSE, J. G., VAN DYKE, M. K. A Review of Keratin-Based Biomaterials for Biomedical Applications. *Materials*. 2010, **3**(2), 999-1014. DOI: 10.3390/ma3020999.
- [36] LAGARÓN, J. G. *Multifunctional and nanoreinforced polymers for food packaging*. Philadelphia: Woodhead Publishing Limited, 2011, 691 s. ISBN 978-1-84569-738-9.
- [37] MOKREJŠ, P., SUKOP, S., KREJČÍ, O. Charakterizace keratinových hydrolyzátů připravených z kuřecího peří. *Chemické listy*. 2014, **108**(SPEC. 1), 26-31. ISSN 0009-2770.
- [38] ALUIGI, A., VINEIS, C., CLAUDIO, T., CINZIA, T. Wool Keratin-Based Nanofibres for Active Filtration of Air and Water. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*. American Scientific Publishers, 2009, **3**(3), 311-319. DOI: <https://doi.org/10.1166/jbmb.2009.1039>.
- [39] HECKEL, T., KONIECZNA, D.D., WILHELM, R. An Ionic Liquid Solution of Chitosan as Organocatalyst. *Catalysts*. Switzerland: MDPI, 2013, **3**(4), 914-921. DOI: 10.3390/catal3040914.
- [40] SIONKOWSKA, A., SKOPINSKA-WISNIEWSKA, J., PLANECKA, A., KOZLOWSKA, J. Polymer Degradation and Stability Volume 95, Issue 12, December 2010, Pages 2486–2491 Cover image The influence of UV irradiation on the properties of chitosan films containing keratin. *Polymer Degradation and Stability*. 2010, **95**(12), 2486–2491. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.08.002>.
- [41] EKOZYM. Product Sheet Lipex. *Novoenzymes*. 2016. Informační list.
- [42] EKOZYM. Product Sheet Savinase Ultra. *Novoenzymes*. 2016. Informační list.
- [43] KREJČÍ, O. *Zpracování keratinových odpadů a možnosti aplikací redukováných forem keratinu*. Zlín, 2014. Disertační práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

Arg	Arginin
Gly	Glycin
Asp	Kyselina asparagová
Leu	Leucin
Val	Valin
Ser	Serin
DSC	Diferenční snímací kalorimetrie
T <sub>g</sub>	Teplota skelného přechodu
3D	Trojrozměrný prostor
PA6	Polyamid 6
PVAL	Polyvinylalkohol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PEO	Polyetylenoxid
KLU	Kilo lipázových jednotek
4-FPBA	4-formyl-fenyl-kyselina boritá
kDa	Kilodalton

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Primární struktura keratinu [12].....	16
Obrázek 2: Sekundární struktura $\alpha$ -helix (dole) a $\beta$ -skládaný list (nahore) [15] .....	17
Obrázek 3: a) Makroskopická struktura, b) molekulová struktura vlasu [7]. .....	18
Obrázek 4: Struktura chitinu a chitosanu [39] .....	29
Obrázek 5: Celulózová membrána s kapalným hydrolyzátem.....	35
Obrázek 6: Neodtučněná vlna (a), odtučněná a pomletá vlna (b), zbytek nerozložené vlny po hydrolyze (c) a keratinový hydrolyzát (d).....	36
Obrázek 7: Výtěžnost hydrolyzy.....	42
Obrázek 8: Film č. 1 (a), film č. 2 (b), film č. 3 (c) a film č. 4 (d). .....	43
Obrázek 9: Film č. 5 (e), film č. 6 (f), film č. 7 (g), film č. 8 (h), film č. 9 (i) a film č. 10 (j). .....	44
Obrázek 10: Rozpustnost po 60 minutách minutách .....	48
Obrázek 11: Rozpustnost po 30 minutách .....	48
Obrázek 12: Rozpustnost po 10 minutách minutách .....	49
Obrázek 13: Rozpustnost po 1 minutě ....	49
Obrázek 14: Množství nerozpuštěného materiálu .....	50
Obrázek 15: Tahová křivka pro 3. film.....	52
Obrázek 16: Tahová křivka pro 5. film	52
Obrázek 17: Tahová křivka pro 6. film.....	52
Obrázek 18: Tahová křivka pro 7. film	53
Obrázek 19: Tahová křivka pro 8. film.....	53
Obrázek 20: Tahová křivka pro 9. film	53
Obrázek 21: Tahová křivka pro 10. film .....	53
Obrázek 22: DSC křivky filmů č. 1 až 4.....	54
Obrázek 23: DSC křivky filmů 5 až 8 .....	55
Obrázek 24: DSC křivky filmů 9 a 10 .....	56
Obrázek 25: Paretův diagram pro rozpustnost.....	58
Obrázek 26: Paretův diagram pro maximální napětí v tahu .....	59
Obrázek 27: Paretův diagram pro teplotu degradace .....	59
Obrázek 28: Rozpustnost (%): GA (%) vs chitosan (%) .....	60
Obrázek 29: Rozpustnost (%): glycerol (%) vs chitosan (%) .....	61
Obrázek 30: Rozpustnost (%): GA (%) vs glycerol (%).....	61
Obrázek 31: Maximální napětí v tahu (MPa): GA (%) vs chitosan (%).....	62
Obrázek 32: Maximální napětí v tahu (MPa): glycerol (%) vs chitosan (%).....	63

---

Obrázek 33: Maximální napětí v tahu (MPa): GA (%) vs glycerol (%).....	64
Obrázek 34: Teplota degradace (°C): GA (%) vs chitosan (%).....	65
Obrázek 35: Teplota degradace (°C): glycerol (%) vs chitosan (%).....	66
Obrázek 36: Teplota degradace (°C): GA (%) vs glycerol (%) .....	67



**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: Přehled aminokyselin, které tvoří keratin [6] .....	13
Tabulka 2: Rozdílné složení [%] cystinu a síry u různých zdrojů [5].....	14
Tabulka 3: Průměrný obsah aminokyselin [%] v keratinu [5] .....	14
Tabulka 4: Složení filmů.....	37
Tabulka 5: Obsah sušiny keratinového hydrolyzátu .....	45
Tabulka 6: Výsledky analytických zkoušek.....	46
Tabulka 7: Obsah sušiny ve filmech .....	47
Tabulka 8: Zkouška rozpustnosti filmů .....	48
Tabulka 9: Rozpouštění po dobu 5 dnů .....	50
Tabulka 10: Výsledky z tahové zkoušky .....	52
Tabulka 11: Teploty degradace .....	57
Tabulka 12: F-hodnoty a p-hodnoty.....	58