

# Hodnocení vlastností filmů připravovaných ze směsi keratinového hydrolyzátu a chitosanu

Bc. Markéta Palová

---

Diplomová práce  
2018



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2017/2018

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Markéta Palová**  
Osobní číslo: **T16787**  
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Inženýrství polymerů**  
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Hodnocení vlastností filmů připravených ze směsi keratinového hydrolyzátu s chitosanem**

Zásady pro vypracování:

**Teoretická část práce bude pojednávat o přípravě směsí keratinových hydrolyzátů s chitosanem, jejich vlastnostech a možnostech využití zejména pro přípravu filmů a fólií. V praktické části práce budou nejprve připraveny zkušební filmy ze směsi keratinového hydrolyzátu s chitosanem a aditivy. Dále pak ze získaných směsí budou připraveny filmy, na kterých budou následně prováděny fyzikálně-mechanické a chemické zkoušky.**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

**KORNILLOWICZ-KOWALSKA, Teresa a Justyna BOHACZ. Biodegradation of keratin 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, England: 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 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **16. května 2018**

Ve Zlíně dne 1. března 2018



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 14. května 2018



.....

<sup>11</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 nevdělečně 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>21</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 vzdělávacího zařízení (školní dílo).

<sup>31</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). Odpirá-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 přihlídí k vyšší výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce se zabývá přípravou filmů z keratinového hydrolyzátu, chitosanu a dalších aditiv s následným zhodnocením jejich vlastností. V teoretické části jsou uvedeny základní informace, které se týkají keratinu a chitosanu a jejich vlastností, tj. složení, struktury, zdrojů, z nichž se získávají a jejich využití. V závěru teoretické části jsou uvedeny příklady filmů keratin/chitosan v praxi. V praktické části je popsána příprava keratinového hydrolyzátu za použití dvoustupňové hydrolýzy. Následně byly litím připraveny filmy složené z keratinového hydrolyzátu, chitosanu, změkčovadla glycerolu a síťovadla glutaraldehydu. Vstupní materiály a připravené filmy byly testovány pomocí fyzikálně-chemických zkoušek (rozpustnost, tepelná stabilita, obsah dusíku a popelovin) s následným statistickým vyhodnocením.

Klíčová slova: keratin, hydrolyzát, chitosan, filmy

## **ABSTRAKT**

This master thesis deals with a preparation of films from keratin hydrolyzate, chitosan and other additives with subsequent evaluation of their properties. In the theoretical part basic information about keratin and chitosan and their attributes such as the composition, the structure, the sources from which they are obtained and their use are present. At the end of the theoretical part, there are examples of keratin/chitosan films in practice. The practical part describes preparation of the keratin hydrolyzate by two-stage hydrolysis. Then films consisting of keratin hydrolyzate, chitosan, plasticizer glycerol and crosslinking agent glutaraldehyde were prepared. Input materials and prepared films were tested by using physical-chemical tests (solubility, thermal stability, amount of nitrogen and ash) with statistical evaluation.

Keywords: keratin, hydrolyzate, chitosan, films

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Ondřeji Krejčímu, PhD. za odborné vedení a cenné rady k mé práci a za pomoc, trpělivost a věnovaný čas při experimentech. Dále děkuji také paní laborantce, Miroslavě Žaludkové, za pomoc v laboratoři.

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

## OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	10
<b>I. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	11
<b>1 KERATIN</b> .....	12
1.1 Složení .....	12
1.2 Rozdělení .....	13
1.3 Zdroje keratinu .....	14
1.3.1 Vlna .....	14
1.3.2 Peří.....	15
1.4 Využití keratinu .....	16
1.4.1 Keratinový hydrolyzát .....	16
1.4.2 Keratinové filmy.....	16
<b>2 CHITOSAN</b> .....	18
2.1 Vlastnosti .....	18
2.1.1 Chemické vlastnosti.....	19
2.1.2 Biologické vlastnosti .....	19
2.1.3 Modifikace chitosanů .....	19
2.2 Zdroje.....	20
2.3 Zpracování a výroba chitosanu .....	21
2.4 Použití .....	21
2.4.1 Filmy a povlaky .....	22
2.4.2 Příklady filmů nebo povlaků .....	22
2.4.3 Porézní nanovláknové membrány .....	23
2.4.4 Nosiče léků na bázi chitosanu .....	23
2.4.5 Chitosan a jeho deriváty v tkáňovém inženýrství.....	23
<b>3 FILMY KERATIN/CHITOSAN</b> .....	25
3.1 Příprava a charakterizace filmů .....	25
3.2 Nanokompozitový hydrogel keratin-chitosan / n-ZnO pro antimikrobiální léčbu hojení ran .....	27
3.3 Vliv UV záření na vlastnosti keratin/chitosanových filmů .....	29
<b>4 CÍL PRÁCE</b> .....	31
<b>II. PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	32
<b>5 PŘÍPRAVA KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU</b> .....	33
5.1 Použité materiály, chemikálie a zařízení .....	33
5.2 Postup práce přípravy keratinového hydrolyzátu .....	34
5.2.1 Úprava a odtučnění vlny.....	34
5.2.2 Rozklad vlny.....	35
5.2.3 Separace.....	37
5.2.4 Dialýza.....	37
5.2.5 Vznik prášku keratinového hydrolyzátu.....	38
5.3 Příprava filmů .....	39
5.4 Analytické zkoušky .....	40
5.4.1 Stanovení sušiny prášku keratinového hydrolyzátu .....	40



5.4.2	Stanovení obsahu popelovin.....	41
5.4.3	Mikrochemické stanovení dusíku – Mikro-Kjeldahlova metoda .....	41
5.4.4	Zkouška rozpustnosti.....	43
5.4.5	Termogravimetrická analýza TGA.....	44
5.4.6	Statistické vyhodnocení pokusů .....	44
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>45</b>
6.1	Příprava hydrolyzátu.....	45
<b>7</b>	<b>FILMY .....</b>	<b>46</b>
7.1	Výsledky analytických zkoušek .....	47
<b>8</b>	<b>STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ .....</b>	<b>55</b>
8.1	Vyhodnocení jednotlivých faktorů pro obsah dusíku.....	55
8.2	Vyhodnocení jednotlivých faktorů pro obsah popelovin .....	58
8.3	Vyhodnocení jednotlivých faktorů na rozpustnost po 1 hod.....	61
8.4	Vyhodnocení jednotlivých faktorů pro tepelnou degradaci .....	64
<b>9</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>67</b>
<b>10</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>69</b>
<b>11</b>	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>72</b>
<b>12</b>	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>74</b>
<b>13</b>	<b>SEZNAM GRAFU .....</b>	<b>75</b>

## ÚVOD

Keratin je vláknitá bílkovina, která se nachází v epidermální vrstvě savců a mezi jeho hlavní zdroje patří vlna, peří a vlasy. Je odolný vůči fyzikálním a chemickým faktorům a je nerozpustný. Díky příčným spojením polypeptidových řetězců disulfidovými vazbami je obtížně zpracovatelný a nemůže tak být dostatečně využit. Vzniká tak velké množství nežádoucího odpadu, který se často likviduje a to i přesto, že keratin je biokompatibilní a biodegradabilní. Pomocí různých hydrolyzů lze získat keratinový hydrolyzát, se kterým se již dá dále pracovat. Pomocí hydrolyzy se oddělí peptidové a disulfidové vazby a keratin již lze rozpustit. Keratinový hydrolyzát tak nachází své uplatnění ve spoustě odvětví, především ve farmaceutickém, kosmetickém nebo potravinářském průmyslu.

Chitosan je jedinečný biopolymer, který kromě biokompatibility a biologické rozložitelnosti vykazuje vynikající vlastnosti. Díky tomu nabízí chitosan jedinečnou příležitost pro rozvoj biomedicínských aplikací, zejména v tkáňovém inženýrství.

Spojení keratinu a chitosanu má díky jejich specifickým vlastnostem a relativně nízkými náklady velký potenciál při vývoji nové generace biomateriálů.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 KERATIN

Keratin řadíme mezi vláknité strukturální bílkoviny, známé jako skleroproteiny, které nalezneme v přírodě. Je přítomen u savců, plazů, ptáků a ryb, téměř ve všech částech těla, včetně kopyt, rohů, kožešiny, vlny, kůže, peří a zobáků. Keratin je brán za jedinou látku, ale je to směs bílkovin a enzymů. Jeho funkce je mechanická a ochranná. [1, 2, 3]

Tento široce používaný nerozpustný protein se nachází ve středních vláknech. Tvoří hlavní část cytoplazmatických epitelíí a epidermálních přídatných struktur, jako jsou vlasy, vlna, rohy a nehty. Nalezneme jej pouze v epiteliálních buňkách a je charakterizován těmito jedinečnými vlastnostmi:

- odolný vůči fyzikálním a chemickým faktorům prostředí;
- nerozpustný ve vodě, ve slabých kyselinách a zásadách, organických rozpouštědlech;
- necitlivý na napadení běžnými proteolytickými enzymy, jako je trypsin nebo pepsin;
- nejdůležitější vlastností je vysoký obsah cystinu, který odlišuje keratiny od jiných strukturních proteinů. [1, 2, 4]

### 1.1 Složení

Keratiny, stejně jako všechny bílkoviny, jsou složeny z přirozeně se vyskytujících aminokyselin v různém počtu a sekvenci. Tyto aminokyseliny jsou spojeny peptidovými vazbami (-CO-NH-). Aminokyselinová sekvence keratinu ovlivňuje vlastnosti a funkce keratinového vlákna. Navíc pozice specifické aminokyseliny v řetězci může ovlivnit celou trojrozměrnou architekturu keratinové molekuly. [5, 6]

Keratin se vyznačuje vysokým obsahem aminokyselin jako glycin, alanin, serin a valin. Také obsahuje ve své struktuře menší množství methioninu, lysinu a tryptofanu. Nejvýznamnějšími složkami (7 – 12 %) jsou cystin a cystein. Jsou to aminokyseliny obsahující síru. Chemická aktivita keratinu je do značné míry závislá na cystinu, který prochází hydrolyzou, oxidací a redukcí (tab. 1). [7]

Aminokyseliny jsou klasifikovány jako iontové nebo neiontové, polární nebo nepolární. Cystein a cystin (obsahující sulfidové a disulfidové vazby) jsou odpovědné za vytváření kovalentních vazeb. Vodíkové vazby jsou vytvořené neiontovými polárními aminokyselinami, jako je threonin, histidin nebo glutamin. Iontové polární aminokyseliny, kyselina glutamová, arginin a lysin jsou odpovědné za iontové vlivy. Jako příklad nepolárních aminokyselin můžeme uvést methionin, prolin nebo fenylalanin. [7]

Tabulka 1 – Aminokyselinové složení keratinu z vlny a ptačího peří na 100 g bílkovin

Složení	Ovčí vlna [g]	Ptačí peří [g]
Cystein	12,72	7,80
Histidin	0,70	0,20
Serin	9,40	14,10
Threonin	6,76	4,10
Tyrosin	5,80	1,40
Arginin	10,40	3,80
Kyselina aspargová	7,27	5,60
Kyselina glutamová	15,27	6,90
Lysin	3,30	0,60
Alanin	4,40	8,70
Fenylalanin	3,80	3,10
Glycin	6,50	13,70
Isoleucin	-	3,20
Leucin	11,30	8,30
Methionin	0,70	0,10
Prolin	6,75	9,80
Valin	4,72	7,80

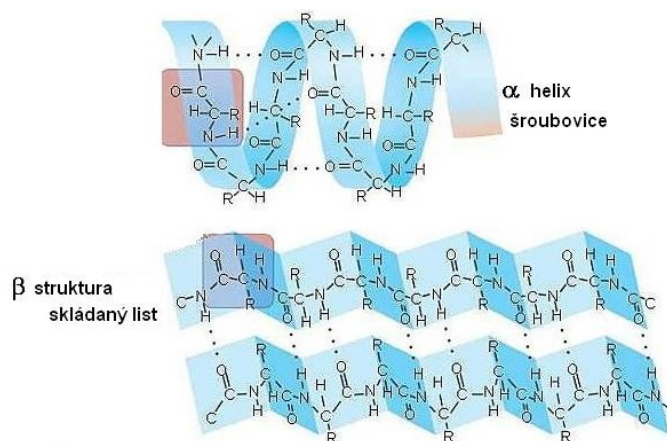
## 1.2 Rozdělení

Existuje několik zdrojů a typů keratinu. Bylo zjištěno, že keratiny z lidského a hovězího zdroje jsou si podobné a to s ohledem na náboj, velikost a imunoreaktivitu. V závislosti na podílu aminokyselin s obsahem síry jsou keratiny klasifikovány jako „měkké“ a „tvrdé“.

- Měkké keratiny mají menší obsah cystinu a menší odolnost vůči chemickým faktorům. Nacházejí se ve středních vláknech a jsou uspořádány ve volně nabitých svazcích a jsou odpovědné za mechanickou odolnost epitelálních buněk.
- Tvrdé keratiny mají vysoký obsah cystinu a vysokou chemickou odolnost. Nacházejí se v uspořádaných polích matric v chlupcích, nehtech, drápech a zobácích a přispívají k pevné struktuře epidermálních vrstev. [1, 2, 4, 8]

Keratiny lze rovněž klasifikovat jako  $\alpha$ -keratiny nebo  $\beta$ -keratiny (obr. 1).

- $\alpha$ -keratiny jsou vláknité a obsahují šroubovicovou strukturu s mikrovlákný zapuštěnými v amorfní keratinové matrici a zarovnanými vlákny podél osy. Poskytují vláknu houževnatost.
- $\beta$ -keratiny se syntetizují ve formě pevných struktur (drápy, zobáky) a z toho plyne, že mají vynikající chemickou odolnost a mechanickou pevnost. [2, 4]

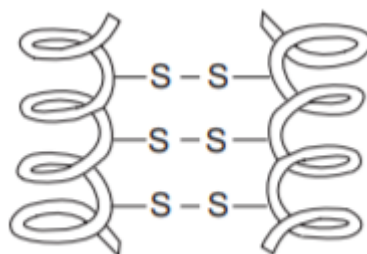
Obrázek 1 – Struktura  $\alpha$ -helixů a  $\beta$ -listů keratinu

### 1.3 Zdroje keratinu

Obvyklé komerční zdroje keratinu jsou živočišné odpady z drůbežního průmyslu, zpracování masa a kůže. Využívá se ve velkém množství v textilním a krmivářském průmyslu, dále pak v kosmetickém, obalovém nebo farmaceutickém průmyslu a v neposlední řadě také v zemědělství na výrobu hnojiv. [9]

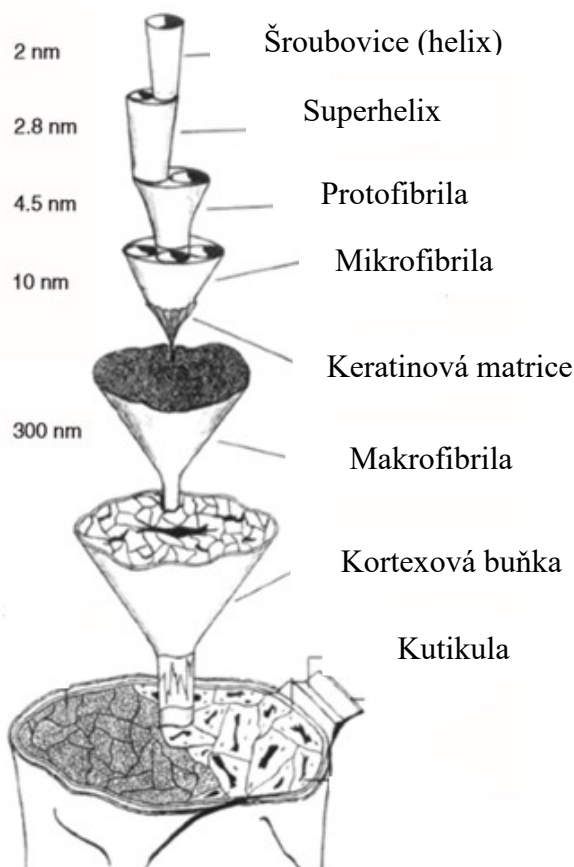
#### 1.3.1 Vlna

Vlna je přírodní bílkovinné vlákno a tvoří jej až 95 % keratinu. Surový materiál je z chlupaté části kůže ovcí, koz, králíků a velbloudů a slouží jako tepelné izolace. Poté se z ní vyrábí textilní tkanina. Skládá se z prvků uhlíku, vodíku, kyslíku, dusíku a síry. S výjimkou velkého obsahu síry je elementární složení typické pro bílkoviny. Keratinový protein obsahuje cystin (disulfidové vazby), (obr. 2), a solné můstky mezi řetězci, které zajišťují stabilitu a pevnost vláken z vlny. [10]



Obrázek 2 – Disulfidové vazby mezi polymerními řetězci

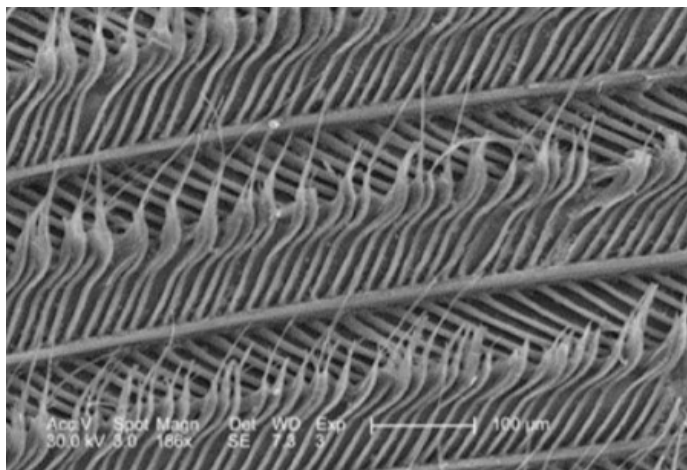
Vlna sestává hlavně z  $\alpha$ -keratinů, které jsou relativně robustní a nerozpustné v tradičních rozpouštědlech kvůli přítomnosti disulfidových vazeb.



Obrázek 3 – Struktura vlákna vlny Merino s průměrem 20  $\mu\text{m}$

### 1.3.2 Peří

Peří obsahuje až 90 % keratinu s průměrnou molekulovou hmotností 10 kDa. Tvoří vnější krytí ptáků, odlišné pro každý druh, někdy dokonce poddruh a pohlaví, odlišující stávající ptáky od jiných žijících skupin a umožňující jim létat. Peří pokrývá téměř celé tělo ptáků a kromě letu pomáhá při tepelné izolaci a hydroizolaci jejich těl. Odhaduje se, že celosvětově se vyprodukuje více než 8,5 miliardy tun. Peří je tvořené v drobných folikulech v kůži a je tvořeno především  $\beta$ -keratinovými bílkovinami (obr. 4). Odpady z peří se používají při výrobě krmiva s nízkou výživou. Mohou být také použity k výrobě kompozitů na bázi polyethylenu a jako výztuže s krátkými vlákny pro kompozitní materiály s matricí jako je např. polymethylmethakrylát. Ve formě prášku je používáno v kosmetice, nátěrech, kultivaci buněk. [11, 12, 13]



Obrázek 4 – Peří

## 1.4 Využití keratinu

### 1.4.1 Keratinový hydrolyzát

Keratiny mají velmi stabilní strukturu a vykazují vysokou chemickou a především mechanickou odolnost a to je hlavní překážkou v nativním zpracování keratinu. Díky tomu jsou velmi odolné proti degradaci a je obtížné je rozložit, což vede k jejich nedostatečnému využití. Abychom získali keratinový hydrolyzát, je důležité narušit disulfidické můstky. Toho docílíme hydrotermální úpravou, která se provádí za vysokého tlaku a vysokých teplot za použití kyselin nebo zásad. [14]

Pro přípravu hydrolyzátu můžeme využít alkalické, kyselé, enzymové hydrolyzy nebo jejich kombinaci. [14, 15]

Po extrakci se keratinový hydrolyzát dále využívá pro výrobu prášků, gelů, povlaků, fólií, vláken nebo pěn. [16]

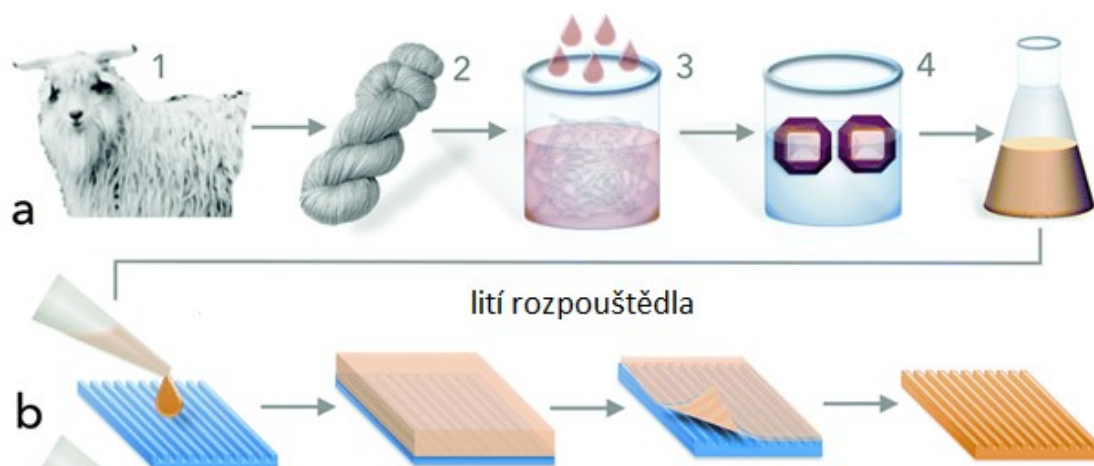
### 1.4.2 Keratinové filmy

Jednou z metod přípravy keratinových filmů je metoda lití z rozpouštědla. Díky této technologii získáme jednotnou distribuci tloušťky a vysokou čistotu filmu.

Jako první je důležitá příprava keratinového hydrolyzátu neboli redukované formy keratinu. Zdroj keratinu, vlna či peří, se promyje, vyčistí a rozemele na malá vlákna. Poté probíhá hydrolyza, dialýza a následně se získá prášek keratinového hydrolyzátu.

Z prášku keratinového hydrolyzátu a vody získáme kapalný keratinový hydrolyzát, který se dále smísí s dalšími aditivami, např. se změkčovadlem (glycerolem), který filmu dodá pružnost a zlepší vlastnosti filmu. Poté se filmotvorná disperze vylije na hladkou desku a nechá se vysušit při pokojové teplotě. Pro sloupnutí vysušeného filmu se deska na krátkou dobu zahřeje. Získáme transparentní, poměrně silný, flexibilní a biologicky rozložitelný film (obr. 5). [16]



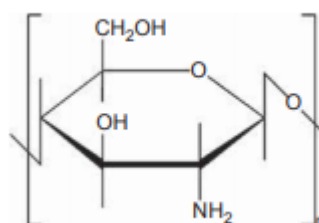


Obrázek 5 – Schéma výroby filmu litím rozpouštědla

## 2 CHITOSAN

Chitosan (2-amino-2-deoxy-[1→4]-β-D-glukopyranan) je přírodní polymer, polysacharid (obr. 6). Je nejdůležitější derivát chitinu získaný jeho částečnou nebo úplnou deacetylací. Chitin, výchozí materiál pro chitosan, je po celulóze druhým nejrozšířenějším přirozeně se vyskytujícím polysacharidem. Chitin je důležitou součástí buněčné stěny hub, skeletů korýšů a hmyzu. Chitosan je N-deacetylovaný derivát chitinu, lineární a polokrystalický polysacharid složený z glukosaminových a N-acetylglukosaminových jednotek spojených β-(1 → 4) glykosidickými vazbami. [17, 18, 19]

Chitosan je bílý až světle červený pevný prášek, zabarvení se liší v závislosti na podmínkách zpracování a množství zbytkových pigmentů. [17, 20]



Obrázek 6 – Vzorec chitosanu

Pokud je frakce glukosaminových jednotek větší než 50 %, je polymer obecně nazýván chitosanem a počet glukosaminových jednotek se nazývá stupeň deacetylace (DDA). Chitin je na druhé straně pojem, kdy jsou jednotky N-acetylglukosaminu větší než 50% a počet acetamidoskupin se nazývá stupeň acetylace (DA). Pokud DDA chitinu dosáhne přibližně 50% nebo více (v závislosti na původu polymeru a podmínkách zpracování) je rozpustný ve vodném kyselém prostředí. Chitosan je nerozpustný ve vodném roztoku nad pH 7, ve své krystalické formě. Avšak ve zředěných kyselinách (pH < 6) protonizované volné aminoskupiny na glukosaminu usnadňují rozpustnost polymerní molekuly. V kyselém prostředí se polysacharid převede na polyelektrolyt, to znamená, že polymer obsahuje pozitivně nebo negativně nabitě ionizovatelné skupiny. [17, 18, 20, 21]

### 2.1 Vlastnosti

Chemická povaha chitosanu poskytuje spoustu možností pro kovalentní a iontové modifikace, které umožňují rozsáhlé přizpůsobení biologických a mechanických vlastností zdravotnických prostředků na bázi chitosanu. Na rozdíl od rostlinných vláken obsahuje chitosan pozitivní iontové náboje, které dávají schopnost chemicky se vázat s negativně nabitými tuky, lipidy, proteiny, cholesterolem, makromolekulami a kovovými ionty. Kombinací chitosanu a jednoduchých aldehydů vzniká při hydrogenaci N-alkylchitosan. Přítomnost objemných substituentů oslabuje vodíkové vazby mezi řetězci chitosanu, proto N-alkylchitosan bobtná ve vodě navzdory hydrofobnosti alkylových řetězců. N-alkyl

chitosan si zachovává schopnost tvorby filmu chitosanu. Přítomnost určitých funkčních skupin jako -OH a -NH<sub>2</sub> v molekulách chitosanu poskytuje základ pro interakce s jinými polymery a biologickými molekulami. [17, 22]

Chitosan je druhým nejrozšířenějším přírodním biopolymerem po celulóze z hlediska dostupnosti v rozsahu více než 10 gigatun ( $1 \times 10^{13}$ ) ročně. Chitosan je netoxický, biologicky odbouratelný polymer s vysokou molekulovou hmotností a velmi podobný celulóze, rostlinné vláknině. V závislosti na zdroji a postupu přípravy může mít jeho molekulová hmotnost rozsah od 300 do 1000 kDa s DDA od 30 % do 95 %, i když pouze polymery s více než 50 % DDA jsou označovány jako chitosan. Funkční vlastnosti chitosanu, jako je tvorba filmu, antimikrobiální aktivita a použití jako zahušťovací činidlo souvisí s jeho molekulovou hmotností a DDA. Tyto dva parametry jsou velmi důležité, protože ovlivňují potenciální aplikace chitosanů v různých oblastech. Například chitosan s nízkou molekulovou hmotností má nízkou viskozitu, která omezuje jeho aplikace a oligomery chitosanu pak netvoří fólie. Kromě toho je antimikrobiální účinek chitosanu silnější, pokud je molekulová hmotnost vyšší než 100 kDa a pokud má vysokou DDA. [17, 18, 20]

### 2.1.1 Chemické vlastnosti

Chemické vlastnosti chitosanu jsou dány reaktivními aminoskupinami, lineární polyaminovou strukturou, dostupnými reaktivními hydroxylovými skupinami a schopností chelatovat mnoho iontů přechodných kovů. [19]

### 2.1.2 Biologické vlastnosti

Mezi biologické vlastnosti chitosanu patří především biokompatibilita, a to díky svému přírodnímu složení, čímž je tedy bezpečný a netoxický. Má regenerační účinek na pojivové tkáně a funguje jako tlumící činidlo centrální nervové soustavy. Působí jako hemostatikum, fungistatikum a je protinádorový a imunoadjuvantní. [17, 23]

### 2.1.3 Modifikace chitosanů

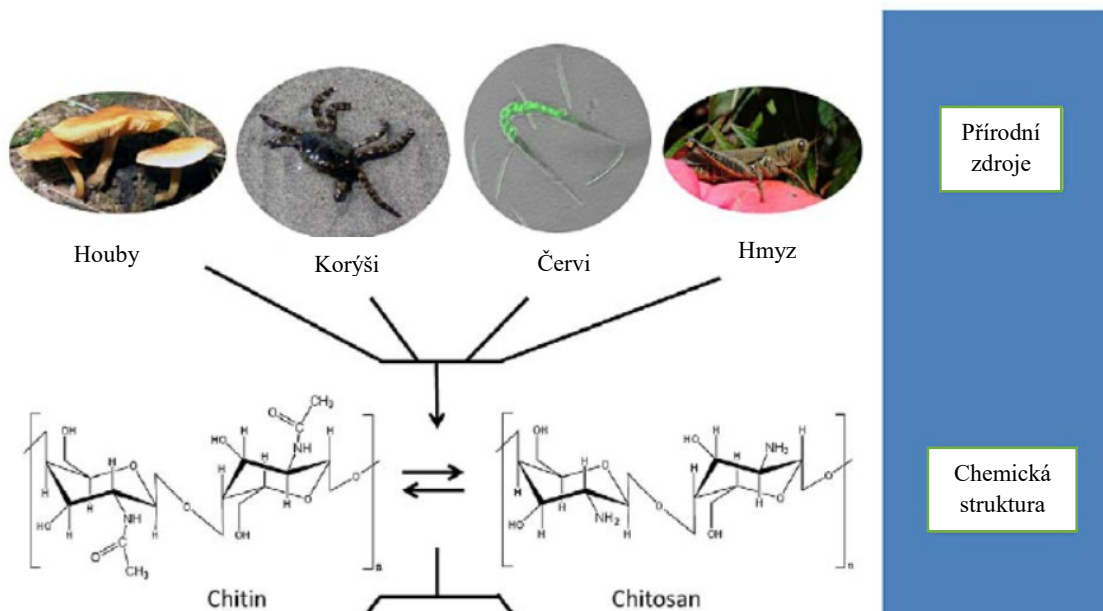
Z farmaceutického hlediska byla modifikacím polymerů věnována velká pozornost. Chitosan je jediný kationtový polysacharid v přírodě pocházející z biomasy. Jeho jedinečné fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti poskytují více využití nad jinými polymerními biomateriály ve farmaceutických a biomedicínských aplikacích. Nicméně, chitosan vykazuje určitá omezení ve své reaktivitě a zpracovatelnosti. Specifická rozpustnost ve vodě je hlavním omezujícím faktorem při jeho aplikaci. Byly proto zkoumány povrchové modifikace chitosanu pro usnadnění rozpustnosti a dalších vlastností pro průlom ve využití. Modifikace povrchu je technikou ke zlepšení fyzikálně-chemických vlastností polymerů. Chitosanového biopolymeru lze dosáhnout chemickou modifikací, fyzikálními interakcemi (anorganickými kompozity a polyelektrolytickými komplexy) a dalšími metodami. Ačkoliv samotný chitosan nabízí pro léčebné účely některé vynikající

chemické vlastnosti, lze dosáhnout určitých speciálně požadovaných vlastností, jako je zaměřování na specifické tkáně, řízené podávání léků a zvýšená antimikrobiální účinnost chemickou modifikací chitosanového řetězce. [17, 24]

Chitosan nabízí několik výhod v biomedicínských aplikacích, a to především biokompatibilitu a biologickou odbouratelnost, ale také je netoxický, nekarcinogenní a neimunogenní. Vzhledem k jedinečné polykationické povaze, řízené biodegradabilitě, biokompatibilitě, netoxicitě a biologicky resorbovatelné povaze má chitosan široké uplatnění v lékařských oborech pro aplikace, jako je genová terapie (dodávání léků nebo genů), obvazy na rány, tkáňové inženýrství, krevní antikoagulanty, hypocholesterolemické látky, antitrombogenní činidla, biomateriály regenerace kostí a antimikrobiální látky. Kromě toho se chitosan používá v jiných průmyslových oborech, jako jsou kosmetické přípravky, papír a buničina, čištění odpadních vod a potravinářské a krmné přídatné látky. Chitosan je vhodným kandidátem pro systémy balení potravin díky vynikající schopnosti vytvářet film a bariérovým vlastnostem plynů v suchých podmínkách. [17, 25]

## 2.2 Zdroje

Chitosan je získán alkalickou hydrolyzou chitinu ze skeletů korýšů a hmyzu a z buněčných stěn hub (obr. 7). [17]



Obrázek 7 – Zdroje chitosanu

## 2.3 Zpracování a výroba chitosanu

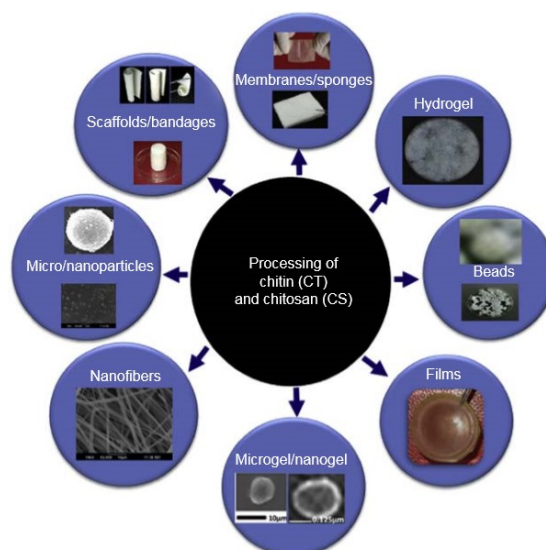
Zpracování chitinu/chitosanu zahrnuje drcení a sušení svrchních schránek z měkkýšů (např. krevety, krabi, humři nebo jiné vhodné druhy korýšů). Toto zpracování schránek má za následek velké množství odpadních materiálů, které potenciálně kontaminuje naše životní prostředí, a proto je tento odpad dále zpracováván na chitin nebo jeho cennější derivát, chitosan. [17, 26]

Produkce chitosanu zahrnuje kyselou úpravu (odvápnění), alkalickou úpravu (deproteinizaci), odbarvovací proces a typickou deacetylaci se silnými alkáliemi při vysoké teplotě a tlaku nebo enzymatickými procesy. Ve výrobním procesu existuje několik faktorů, které způsobují variabilitu ve fyzikálně-chemických vlastnostech chitosanu, jako je alkalická koncentrace, doba inkubace, poměr složek reakční směsi, atmosféra, teplota, zdroj chitinu (včetně polymorfismu), velikost částic, N-deacetylace podmínek a použití jednotlivých nebo víceúrovňových N-deacetylačních procesů. Ačkoliv se metody produkce chitinu a chitosanu mohou lišit, všechny z nich vždy zahrnují deproteinizaci a demineralizaci schránky z korýšů. Existuje řada faktorů, které ovlivňují množství chitinu přítomného v plášti, např. typ schránky (krevety, krab, humr). [17, 23]

Komerční chitosan má obvykle DDA v rozmezí 70-95 %. Charakterizace relativního podílu N-deacetylovaných skupin nebo obsahu  $\text{NH}_2$  je velmi důležitá při hodnocení účinnosti deacetylačního procesu chitinu, jako i vhodnosti pro jakoukoli jinou chemickou modifikaci a lékařské použití. Vzorky chitosanu mohou vykazovat různé charakteristiky, pokud jde o stupeň deacetylace a rozložení molekulové hmotnosti, což následně definuje jeho aplikaci a ovlivňuje konečné vlastnosti. [17]

## 2.4 Použití

Všestranné vlastnosti chitosanu umožňují jejich snadné zpracování na filmy, nanočástice, perličky, mikročástice, nanovlákná a membrány (obr. 8). [17, 23]



Obrázek 8 – Využití chitosanu

### 2.4.1 filmy a povlaky

Chitosan je pro svou specifickou rozpustnost, všestrannou chemickou funkčnost a dobrou schopnost vytvářet film dobrým aditivem pro tvorbu filmů a povlaků. Filmy a povlaky mají dobré mechanické vlastnosti, jsou pružné, obtížně se trhají, mají středně propustné vlastnosti pro vodní páru a vykazují dobrou nepropustnost kyslíku a jako antimikrobiální činidlo kontrolují enzymatické hnědnutí v ovoci. Mají tak dvojí úlohu, a to jako bariéra a antimikrobiální vrstva. [24, 27]

Chitosanové filmy nebo povlaky lze snadno připravit z roztoku technikami, jako je stříkání, máčení, odlévání roztoku nebo válcování. [22]

### 2.4.2 Příklady filmů nebo povlaků

Nanostruktury chitosanu se dobře dispergují v biopolymerech a mají potenciál být použity jako antimikrobiální činidla v biologicky odbouratelných obalech potravin nebo můžou být antimikrobiální účinky chitosanových nanostruktur kombinovány s jinými antimikrobiálními látkami. Antimikrobiální filmy na bázi chitosanu, které se skládají z chitosanu a polyvinylalkoholu, byly připraveny metodou odlévání roztoku a bylo zjištěno efektivní prodloužení skladovatelnosti rajčat. [25]

Chitosan je také využíván jako „zelený“ ochranný povlak. Chitosanový povlak působí jako zásobník kationtového inhibitoru koroze  $Ce^{3+}$  kvůli komplexaci  $Ce^{3+}$  s chitosanovými aminoskupinami, což zabráňuje jeho nekontrolovatelnému a rychlému vyluhování. Tyto povlaky poskytují aktivní ochranu proti korozi hliníkové slitině. Vlastní obnovitelnost „zelených“ ochranných povlaků na bázi chitosanu je jedním z jejich důležitých vlastností. Tyto kompozice vykazují při vystavení působení ultrafialového záření samoregulační vlastnosti. Když je poškozená oblast vystavena 120 W fluorescenční UV lampě při vlnové délce 302 nm pro záření 15-30 min, poškozená oblast zmizí. Děje se tak po vystavení působení UV záření, kdy se chitosanové tyčinky rozbijí a navzájem se přilepí přes poškozenou oblast. Samoobnovení poškozeného materiálu je vyvoláno ohřátím materiálu na teplotu mezi 40 a 200 ° C po dobu 5 sekund až 30 minut. [27]

Povlaky a filmy na bázi chitosanu a jeho N, O-karboxymethyl derivátů se používají ke snížení ztrát vody, vzduchu a bakterií u broskví, japonských hrušek, plodů kiwi, jahod, paprik, okurků, banánů a manga. N, O-karboxymethyl-chitinové filmy byly schváleny v několika zemích, aby uchovaly ovoce po dlouhou dobu. Aplikace nanosení chitosanového filmu na ovoce liči například zpomalila změny obsahu anthocyaninů, flavonoidů a celkových fenolických látek. Zpomalila zvýšení aktivity polyfenol oxidasy a částečně inhibovala zvýšení peroxidázové aktivity. [24]

Spojení chitosanových fólií s česnekovým olejem vede ke zvýšení antimikrobiální účinnosti proti určitým bakteriím. Použití česneku do fólií závisí na druhu potravin, u nichž není ovlivňována chuť použité potraviny. [29]

Chitosan je polykationické povahy s aktivní aminoskupinou a hydroxylovými funkčními skupinami a používá se hlavně jako antimikrobiální a antibakteriální činidlo ve stomatologii. Přílnavost ústních bakterií na povrchu zubu vede k tvorbě plaků.

Předpokládá se, že adheze mezi bakteriemi a povrchem zubů je způsobena elektrostatickými a hydrofobními interakcemi. Pozitivně nabitě aminové skupiny derivátů chitosanu mohou aktivně hrát proti těmto interakcím a zabránit tvorbě plaku. [1]

### 2.4.3 Porézní nanovláknové membrány

Výroba prvních chitosanových vláken byla uvedena v roce 1926 a byla vyrobena mokrým zvlákněním z roztoku kyseliny octové. V posledních letech je mokré zvláknění neboli elektrospinning (ESP) všestrannou technikou pro výrobu vláken s průměrem několik nanometrů až mikrometrů v závislosti na podmínkách zpracování. ESP využívá vysokého napětí k vytvoření elektricky nabitě trysky polymerního roztoku nebo taveniny, která může vést k tvorbě rohože z vláken. Tyto vlákna mají vysokou pórovitost, vysokou specifickou plochu povrchu a jsou schopné napodobit přirozenou extracelulární matrici, což z nich dělá velký příslib aplikací biomateriálů. Chitosanové (nano) vlákna jsou ideální aplikací pro přípravu obvazů na rány a tkáňové inženýrství. Nicméně, chitosan je polyelektrolyt v kyselém prostředí a jeho elektrospinning je obtížný. Během ESP dochází k odpudivým silám mezi nabitými polymery v důsledku použití důležitého elektrického pole. Tento jev omezuje tvorbu nekonečných vláken a často vede k tvorbě částic. Chitosan (nano) vlákna byly úspěšně vyrobeny z kyseliny trifluorooctové a dichlormethanu. Ovšem nejjednodušší způsob výroby chitosanových (nano) vláken je elektrospínování chitosanu ve směsi s jiným polymerem (PEO, UHMWPEO). [29]

### 2.4.4 Nosiče léků na bázi chitosanu

Hlavní vlastnosti chitosanu jsou stupeň acetylace a molekulová hmotnost, a ty ovlivňují jeho použití jako matricové molekuly pro dopravu léčiva, a také jeho rozpustnost ve vodě a hydrofobní vlastnosti. Chitosan je ve vodných rozpouštědlech za neutrálních a zásaditých podmínek málo rozpustný. Jeho rozpustnost se však v kyselých podmínkách zvětšuje především protonací aminoskupin. Chitosan také vykazuje řadu vlastností, které zvyšují jeho užitečnost jako nosiče léku. Je to dostupnost funkčních skupin, které usnadňují chemické modifikace a také biologická rozložitelnost. Nejběžnější způsoby použité pro chitosan jsou metody založené na emulzi, koacervaci, iontové želatinaci a dalších. [21]

### 2.4.5 Chitosan a jeho deriváty v tkáňovém inženýrství

Tkáňové inženýrství zahrnuje návrh polymerních struktur pro modulaci buněčného růstu a diferenciaci. Struktura používaná pro tkáňové inženýrství vyžaduje pro jejich fungování určité biologické a mechanické vlastnosti, podobné přírodní extracelulární matrici (ECM). Funkce označené jako důležité při výrobě struktur pro tkáňové inženýrství:

- 1) přítomnost vzájemně propojených pórů vhodných rozměrů pro podporu integrace a vaskularizaci tkání;

- 2) řízená biologická odbouratelnost a biologická resorbovatelnost, tak aby odpovídala náhradě tkáně;
- 3) přítomnost příznivých povrchových chemikálií pro modifikace a podporu buněčné vazby, diferenciaci a proliferaci;
- 4) optimální mechanické vlastnosti, které jsou podobné zamýšlenému místě implantace;
- 5) nízkou až zanedbatelnou toxicitu;
- 6) snadné výrobní postupy pro dosažení požadovaných tvarů a velikostí.

Struktury založené na chitosanu jsou vzhledem k jejich strukturní podobnosti s glykosaminoglykany v ECM a jejich schopnost formovat je do struktur s podobnými morfologickými a mechanickými vlastnostmi vynikající alternativou pro aplikace tkáňového inženýrství. [30]



### 3 FILMY KERATIN/CHITOSAN

Keratin a chitosan nenajdeme společně jako směsi v přírodě, ale specifické vlastnosti každého z nich mohou být použity k výrobě syntetických směsí, které poskytují jedinečné, strukturální a mechanické vlastnosti. [31]

#### 3.1 Příprava a charakterizace filmů

Keratin-chitosanový kompozitní film byl připraven litím smíchaného roztoku obou biopolymerů v 75% kyselině octové. Přestože keratinový film bez přísady je velmi křehký, po přidání 10 až 30 hmot. % chitosanu byla vytvořena silná a ohebná fólie (konečná pevnost: 27-34 MPa, konečné prodloužení: 4-9%). Přidáním glycerolu (20 hmot. %) byla dodána keratinovému filmu flexibilita (konečná pevnost: 1 MPa, konečné prodloužení: 28%). Další přidávání chitosanu ke keratinovému filmu obsahujícímu glycerol zvýšilo konečnou pevnost na 9 až 14 MPa, ale zároveň mělo jen malý vliv na konečné prodloužení. To označuje, že mechanické vlastnosti keratinového filmu jsou nastavitelné vhodným přidáním chitosanu a glycerolu. [31]

##### Příprava kompozitního filmu keratin-chitosan a jeho mechanické vlastnosti

Keratinový hydrolyzát byl připraven ponořením vlny do vodného roztoku močoviny, SDS a 2 - merkaptoethanolu. Směs byla při zahřívání a míchání a poté se zfiltrovala. Filtrát byl dialyzován za použití celulókových membrán. Vzniklý keratinový hydrolyzát se míchal s chitosanem, který je rozpustný ve vodě za kyselého pH. Vzhledem k tomu, že keratin vlny je kyselý protein, jehož izoelektrický bod zaostření (pI) je mezi 4,9 a 6,1, je pak vysrážen ve slabě kyselém prostředí. Proto byly keratin a chitosan rozpuštěny v 75% kyselině octové a poté smíchány do homogenního roztoku. Směs se odlijí na polypropylenovou fólii a vysuší se za vzniku transparentního filmu. Tloušťka získaných filmů byla v průměru 0,01-0,02 mm. Výsledný film byl obarven s Coomassie brilantní modrou (CBB), která se obecně používá k barvení proteinů. Zbarvení se objevilo homogenně na filmu, což naznačovalo, že keratin a chitosan byly dokonale smíchány. Obarvení je slabší s rostoucím obsahem chitosanu. [31]

Vzorky filmů ve tvaru obdélníku byly měřeny rychlostí 20 mm/s při 25 °C a při 65 % relativní vlhkosti. Z pěti nezávislých měření byla vypočítána konečná síla, maximální prodloužení a Youngův modul. Když byl obsah chitosanu menší než 5 hmotn. %, kompozitní film byl příliš křehký, pro měření jeho mechanických vlastností podobně jako u čistého keratinového filmu. Film připravený z keratinu smíchaného s 10 hmotn. % chitosanu byl poměrně pružný a pevný. Další zvýšení obsahu chitosanu dalo jen malou změnu v konečné síle a prodloužení, nicméně došlo k mírnému zvýšení Youngova modulu, což naznačuje, že přidání chitosanu způsobilo, že film byl tužší. V případě, že byl film doplněn o 20 hmotn. % glycerolu vzrostla jeho pružnost a zároveň poklesla pevnost. [31]

Pro bobtnání byl vzorek filmu připraven ve tvaru čtverečku a ponořen do octového pufru (pH 4,0), destilované vody (pH 6,3) nebo pufru Tris-HCl (pH 8,9) při pokojové teplotě, do doby, dokud film nedosáhl konstantní hmotnosti. Po nabobtnání byla každá fólie sušena a podrobena měření mechanických vlastností. [31]

Kontakt keratinového filmu obsahujícího glycerol s vodou znovu způsobil křehkost fólie kvůli rozpuštění glycerolu ve vodě. Samostatný chitosanový film byl rozpuštěn při pH 4,0 a 6,3 a nebylo tak možné stanovit jeho mechanické vlastnosti, zatímco nabobtnání při pH 8,9 neovlivnilo konečnou pevnost a konečné prodloužení filmu. Bobtnání filmu obsahující chitosan při pH 8,9 převede acetátovou sůl aminoskupin chitosanu na volnou formu. Nicméně eliminace náboje na chitosanovém řetězci nemá žádný vliv na konečnou pevnost a konečné prodloužení filmu. Na druhé straně keratin-chitosanový kompozitní film si udržoval svou pevnost a pružnost posuzovanou maximální pevností a konečným prodloužením po nabobtnání v daném rozsahu pH. Takže keratin-chitosanový kompozitní film měl ve srovnání se samostatnými keratinovými a chitosanovými filmy podstatně lepší odolnost proti působení vody. [31]

### Závěr

Kompozitní film připravený ze směsi keratinu a chitosanu vykazoval vynikající vlastnosti v porovnání s keratinovými a chitosanovými filmy. Při experimentu byl použit chitosan jako přísada keratinového filmu k posílení mechanických vlastností. Chitosan dává keratinovému filmu pevnost a pružnost. Ve srovnání s chitosanovým filmem byl keratin-chitosanový kompozitní film měkký. Keratin-chitosanový kompozitní film vykazoval zlepšené voděodolné vlastnosti. Chitosanový film se rozpustil v kyselém pH a intenzivně se nabobtnal dokonce i při neutrálním pH, což mělo za následek křehkou fólii po vysušení, zatímco keratin-chitosanový kompozitní film vykazoval u těchto podmínek potlačené nabobtnání a mechanické vlastnosti byly stejné jako před nabobtnáním. Při alkalickém pH chitosan nevykazoval žádné nabobtnání a naopak keratin-chitosanový film nabobtnal více, než keratinový film. Mechanické vlastnosti obou kompozitních vrstev chitosanu a keratin-chitosanu zůstalo po nabobtnání v alkalickém stavu stejné. Bylo také prokázáno, že kompozitní film z keratinu a chitosanu vykazuje antibakteriální aktivitu podobným způsobem jako chitosanový film a je dobrým substrátem pro vytváření buněčných struktur. [31]

### 3.2 Nanokompozitový hydrogel keratin-chitosan / n-ZnO pro antimikrobiální léčbu a hojení ran

Současné aplikovatelné obvazy na rány mají mnoho nevýhod (tuhost, neporéznost, nízkou mechanickou účinnost, nezajištěná baktericidní aktivita). Proto byly vyrobeny pórovité obvazy keratin-chitosan / n-ZnO (KCBZNs) prostřednictvím zařazení nano-ZnO do hydrogelu keratin-chitosan. Funkční skupiny a povrch obvazových materiálů byly charakterizovány různými metodami, např. Fourierovou transformační infračervenou spektroskopií (FT-IR) nebo skenovací elektronovou mikroskopií s rentgenovou spektroskopií. Navíc mechanická, baktericidní bio-kompatibilita nanokompozitu byla hodnocena tak, aby vykazovala svou účinnost pro biologické aplikace. [32]

Zanesení rány infekcí z okolního prostředí je i přes použité obvazy velkým problémem. Řešení těchto problémů je využití nanokompozitních materiálů na bázi hydrogelu, které mají všechny základní vlastnosti, například zachování mokrého povrchu zranění, umožňují přenos vzduchu, udržují obstrukci bakterií, mají kompatibilitu s krví, jsou netoxické a ekologicky bezpečné. [32]

#### Výroba nanokompozitních obvazů Keratin-Chitosan / n-ZnO

Keratinový prášek byl extrahován z lidských vlasů pomocí  $\text{Na}_2\text{S}$  v destilované vodě. Připravený dialyzovaný roztok byl potom lyofilizován, aby se získal keratinový prášek. Ten byl smíchán s vodou za vzniku roztoku keratinového hydrolyzátu a k němu byl přidán roztok chitosanu. Směsný roztok polymeru se uvolnil plynem, přenesl do Petriho misky, zmrazil se při teplotě  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  a lyofilizoval se za vzniku keratin-chitosan hydrogelu. Nanočástice oxidu zinečnatého byly vyrobeny pomocí techniky sol-gel. Byl připraven roztok vody se  $\text{Zn}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_2$  a vody s  $\text{NaOH}$ . Tyto roztoky solí byly promíchány. Následně byl vysrážený n-ZnO promyt methanolem, aby se odstranil vedlejší produkt a dehydratoval se při  $100\text{ }^\circ\text{C}$ . [32]

Vytvořený n-ZnO byl následně dispergován ve vodě. Roztok n-ZnO se nalije do keratin-chitosan hydrogelu a za neustálého míchání se udržuje po dobu 2 hodin. Jednotný keratin-chitosan / n-ZnO nanokompozit byl přenesen do Petriho misky, zmrazil se při  $-30\text{ }^\circ\text{C}$  a lyofilizoval se za vzniku nanokompozitních bandáží keratin-chitosan/n-ZnO (KCBZNs). [32]

#### Pórovitost, mechanické vlastnosti, biodegradace a bobtnání

Pórovitost je základním rysem, který zvětšuje vnější objem buněk, který je důležitým kritériem pro implantáty tkáňového inženýrství. Bylo zjištěno, že pórovitost keratin-chitosanového hydrogelu a obvazu KCBZN byla zvýšena po přidání n-ZnO. Všechny vyrobené bandáže měly pórovitost 71-83 %. Byla hodnocena mechanická účinnost vyrobeného keratin-chitosanového hydrogelu a obvazů KCBZN. Keratin-chitosanový hydrogelový vzorek vykazoval tahové napětí 0,15 MPa, které bylo dostatečné pro tkaninu pokrývající rány. Navíc začlenění n-ZnO poměrně zlepšilo mechanické napětí až na 0,31 MPa, což bylo způsobeno rozhraním mezi hydrogelovou maticí a n-ZnO. Proto získané důsledky potvrdily, že obvazy KCBZN měly dostatečnou pevnost k tomu, aby odolaly síle, která na ně působí. [32]

Statistika úbytku hmotnosti odhalila omezený degradační charakter obvazu KCBZN. Všechny vyrobené obvazy prokázaly úbytek hmotnosti 10 až 14 % (1 den), 35 až 42 % (3 dny) a 59 až 64 % (7 dnů) při biodegradaci. Přibližně 36 % prvotní hmotnosti obvazů zůstalo i po 7. dni in vitro biodegradace. Bobtnání keratin-chitosanového hydrogelu a obvazů KCBZNs bylo zkoumáno po inkubaci 1, 3 a 7 dnů ve fosfátovém pufru (PBS). Kreatin-chitosanový hydrogel a obvazy KCBZN vykazovaly srovnatelné hodnoty bobtnání i po přidání n-ZnO. Z tohoto důvodu se ukázalo, že začlenění n-ZnO do keratin-chitosanové matrice nemá vliv na bobtnání hydrogelových bandáží. [32]

### Závěr

Keratin–chitosan/n-ZnO nanokompozitové (KCBZNs) hydrogely byly účinně formovány lyofilizační technikou. Bandáž KCBZN vykazovala vysokou pórovitost, která by vedla ke zvětšení buněk fibroblastů. Díky účinnému spojení s n-ZnO byla potvrzena dobrá antibakteriální aktivita, pevnost v tahu a biodegradabilita. Celkově tyto výsledky mohou vést k využití hydrogelů KCBZNs jako prvotřídní aplikace pro hojení ran. [32]

### 3.3 Vliv UV záření na vlastnosti keratin/chitosanových filmů

V článku byly studovány mechanické, tepelné a povrchové vlastnosti chitosanu a keratinového hydrolyzátu s chitosanem a byl srovnáván vliv UV záření na tyto vlastnosti. [33]

Chitosan byl rozpuštěn v kyseliny octové a roztok byl odlit na skleněné desky. Po odpaření rozpouštědla byly vzorky filmu sušeny na vzduchu při pokojové teplotě. Keratin byl získán z kuřecího peří. Peří bylo rozřezáno na malé části, promyto destilovanou vodou a přečištěno postupnou extrakcí v ethanolu, směsi ethanol/etheru (50/50) a etheru a poté byl materiál sušen. Keratinový hydrolyzát byl připraven ponořením peří do vodného roztoku močoviny, dodecylsulfátu sodného a 2-merkapt ethanolu. Směs byla míchána, filtrována a následně dialyzována v celulózové membráně. Získaný roztok byl lyofilizován. Roztok hydrolyzátů keratinu byl získán rozpuštěním množství keratinového prášku ve vodě. Polymerní směsi byly připraveny smícháním vhodných objemů hydrolyzátů keratinu a chitosanu v kyselině octové. Konečné složení směsí bylo 5%, 15% a 30% (w/w.) keratinu ve směsi chitosan/keratin. Polymerní fólie byly získány odlitím roztoků na skleněné desky. Po odpaření rozpouštědla se vzorky daly vysušit. [33]

Vysušené fólie byly ozařovány pomocí rtuťové lampy při pokojové teplotě při vlnové délce 254 nm. Intenzita ozáření byla  $26 \text{ W} / \text{m}^2$  a ve vzdálenosti 5 cm od světelného zdroje. Bylo zjištěno, že u neozářených chitosanových fólií není ve spektru žádný absorpční pás. Pro neozářené keratinové filmy byla pozorována absorpční pásma při 278 nm, což je účinek absorpce aromatických aminokyselin v keratinových řetězcích. Malý pás při 278 nm jsme pozorovali také u chitosanových filmů obsahujících keratin. [33]

Byly měřeny kontaktní úhly tří kapalin: diiodometanu, formamidu a glycerolu na chitosanových filmech při konstantní teplotě ( $22 \text{ }^\circ\text{C}$ ) za použití goniometru vybaveného systémem analýzy tvaru kapky. Kontaktní úhel je měřítko nekovalentních sil mezi kapalinou a první monovrstvou materiálu. V případě silného mezifázového rozdílu se kapalina rozptýlí na pevnou látku a osuší ji. Na základě kontaktu může být vypočítána hladina volné plochy. Povrchová energie chitosanových filmů se zvýšila po vystavení účinkům UV záření. Po 8 hodinách UV záření se hladina volné plochy pro chitosan téměř zdvojnásobila. Vzrůst polaroty na povrchu chitosanových filmů je pravděpodobně způsoben fotografickou destrukcí glykosidických vazeb a tvorbou karboxylových skupin. Obecně se disperzní složka příliš nemění, ale polární složka povrchu se zvyšuje s dobou ozáření v chitosanových filmech. Menší než v chitosanu byly pozorovány změny hodnot polární části povrchové energie u chitosan/keratinových filmů. To naznačuje, že směsi jsou méně citlivé na fototransformaci. [33]

Byl také sledován lineární nárůst síly, prodloužení vzorku do doby než praskne. To bylo vyjádřeno jako % prodloužení vzorku z původní délky vs. prodloužení studovaných vzorků s ohledem na UV záření, lineární oblast tahové křivky napětí a prodloužení poskytuje hodnotu Youngovu modulu  $E$ , která dává inherentní tuhost materiálu. U výsledků závislosti mechanických vlastností a času UV záření pro chitosan a keratinové filmy bylo zjištěno, že ozařované chitosanové fólie, stejně jako filmy s chitosanem/keratinem mají menší hodnotu maximální pevnosti v tahu než je hodnota před UV zářením. Konečné procento prodloužení je vyšší u neozářených chitosanových filmů a chitosanových filmů

obsahující 5 % a 15 % keratinu. Pro chitosanové filmy obsahující 30 % keratinu po ozáření byl zaznamenán nárůst hodnoty prodloužení. Maximální pevnost v tahu a Youngův modul všech studovaných filmů se snížily vlivem UV záření. Změny v mechanických vlastnostech ukazují, že k fotodegradaci chitosanu dochází v přítomnosti keratinu. Bylo pozorováno zvýšení prodloužení vzorku po ozařování pro chitosan obsahující 30% keratinu, což může být způsobeno fotodegradací polymeru s tvorbou malých molekul, které působí jako změkčovadlo. [33]

Filmy založené na směsi chitosan/keratinu vykazují obecně menší pevnost v tahu, menší prodloužení při přetržení a menší Youngův modul než filmy s chitosanem. Povrchové a mechanické vlastnosti chitosan/keratinových filmů, jako je smáčivost, mez pevnosti v tahu, prodloužení při přetržení a Youngův modul jsou citlivé na působení UV záření. Zhoršení mechanických vlastností chitosan/keratin filmů po UV záření jsou výsledkem převážně fotochemických změn jako je zesílení a rozdělení řetězců. Kontaktní úhel měření a hodnoty povrchové volné energie ukázaly, že vlhkost chitosanových filmů byla změněna UV zářením. Zvýšení polarit vzorků signalizuje účinnou fotooxidaci na povrchu při UV záření. UV záření na chitosan/keratinové směsi může poskytnout materiálu vyšší tepelnou stabilitou než u chitosanu. [33]

## 4 CÍL PRÁCE

Prvním cílem práce bylo získat keratinový hydrolyzát dvoustupňovou alkalicko-enzymovou hydrolýzou.

Druhým cílem práce bylo z připraveného keratinového hydrolyzátu, chitosanu a dalších aditiv zhotovit filmy.

Posledním cílem bylo vyhodnocení vlastností jednotlivých filmů na základě odlišného složení. Plánování a vyhodnocení experimentů probíhalo na základě metody faktorových pokusů.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**



## 5 PŘÍPRAVA KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU

### 5.1 Použité materiály, chemikálie a zařízení

Jako vstupní materiál pro přípravu keratinového hydrolyzátu byla použita ovčí vlna typu Merino z obce Nevšová od soukromého chovatele.

Mezi chemikálie, které byly použity, patří enzym Lipex 100T, enzym Savinase Ultra 16L, 5M NaOH,  $\text{Ca(OH)}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , Tashirův indikátor, HCl,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , tableta katalyzátoru, glycerol, glutaraldehyd, chitosan firmy Sigma – Aldrich.

#### Chitosan

Byl použit vysokomolekulární Chitosan 419419 od firmy Sigma-Aldrich ve formě prášku. Stupeň deacetylace 75 %. [34]

#### Enzym Lipex 100T

Je kapalný enzymový přípravek obsahující lipázu vhodnou pro použití v detergentních přípravcích. Vyrábí se ponořenou fermentací geneticky modifikovaného mikroorganismu, kdy enzymový protein není sám o sobě modifikován, ale po fermentaci se enzym oddělí od produkčního organismu a čistí. Rozkládá jedlé tuky a oleje na mastné kyseliny a glycerol. Je účinný v neutrálních až alkalických podmínkách (optimálně při pH 10) a dosahuje širokého teplotního rozmezí 30-60 °C. Používá se v čistících prostředcích pro odstranění tuků a skvrn na bázi oleje [35].

#### Enzym Savinase Ultra 16L

Je kapalný nebo práškový enzymový přípravek obsahující proteázu vhodnou pro použití v prostředcích s vysokým pH a s nízkou teplotou při zpracování. Může hydrolyzovat většinu peptidových vazeb v molekule proteinu. Vytvoří se peptidy a aminokyseliny, které jsou rozpuštěny nebo dispergovány v promývací vodě. Je aktivní v celé oblasti zájmu pH pro většinu použití detergentů, konkrétně pH 8-12 (optimálně při pH 10). Pracuje mezi 20 – 60 °C, optimální teplota je 55 °C. Používá se v pracích prostředcích k odstranění skvrn na bázi proteinů [36, 37].

Mezi použité přístroje a pomůcky patří zavařovací hrnec DOMO, nožový mlýn Fritsch, odstředivka Universal 32 Hettich, sušárna Memmert, analytické váhy KERN, magnetická míchačka RCT Basic IKA, Parnas-Wagnerova destilační aparatura, muflová pec Labotherm 9/11Nabertherm, pH metr WTW 526 Sigma – Aldrich, TGA TA Instruments Q50, laboratorní sklo SIMAX, PA tkanina, celulózová membrána.

## 5.2 Postup práce přípravy keratinového hydrolyzátu

### 5.2.1 Úprava a odtučnění vlny

V prvním kroku bylo potřeba upravit surovou vlnu. Z vlny byly odstraněny nečistoty, poté byla vlna nastříhána na menší části, byla vyprána ve vlažné vodě a podruhé byla opět proprána ve vlažné vodě s trochou mycího prostředku pro odstranění dalších nečistot, a to po dobu nezbytně nutnou pro odstranění mycího prostředku. Následně bylo potřeba zkontrolovat pH, popřípadě jej upravit na pH 8 5M NaOH kvůli odtučnění vlny. Odtučnění bylo provedeno enzymaticky přidáním enzymu Lipex 100T. Enzymu bylo přidáno 1 %, vztaženo na hmotnost suché vlny. Odtučňování probíhalo ve vodě, v poměru vlna:voda 1:50, v sušárně při teplotě  $40\pm 2$  °C po dobu 24 hodin.

Po uplynutí 24 hod se odtučněná vlna opět propláchlá vodou a v horkovzdušné sušárně vysušila při teplotě 80 °C (obr. 9).

Vysušená vlna byla pomletá v nožovém mlýně s velikostí ok síta 1 mm (obr. 10).



Obrázek 9 – Promytá, odtučněná, vysušená vlna



Obrázek 10 – Pomletá vlna

### 5.2.2 Rozklad vlny

Příprava keratinového hydrolyzátu probíhala dvou-krokově alkalicko-enzymovým způsobem ve vyhřívané nádobě, obr. 11.

V prvním kroku probíhala alkalická hydrolýza. K celkové navážce 800 g pomleté vlny bylo přidáno 16 litrů vody a tolik  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , aby vznikl 0,6% roztok. Hydrolýza poté probíhala za neustálého míchání při teplotě 80 °C po dobu 48 hodin. Po uplynutí této doby přímo navazovala enzymová hydrolýza.

V druhém kroku byl přidán enzym Savinase Ultra 16L. Před jeho přidáním je důležité snížit teplotu na 60 °C a zkontrolovat, popřípadě upravit pH na hodnotu 9. Enzymu se přidalo 5 % vztažené na navážku vlny. Hydrolýza probíhala za neustálého míchání při teplotě 60 °C po dobu 24 hodin. Po uplynutí doby hydrolýzy bylo zásadní inaktivovat enzym. Děje se tak na konci hydrolýzy při zahřátí kapalně fáze na 95 °C po dobu 10 minut. Poté byla směs zchlazena na 50 °C (obr. 12).



Obrázek 11 – Zařízení pro přípravu keratinového hydrolyzátu



Obrázek 12 – Konec alkalicko-enzymové hydrolyzy

### 5.2.3 Separace

Po dvoukrokové hydrolýze bylo nutné oddělit nerozložený zbytek vlny od kapalná fáze. Separace sestávala ze dvou kroků, první došlo k filtraci, podruhé k odstředění. Kapalná fáze byla filtrována přes 16 vrstev PA tkaniny, kde velikost ok v PA tkanině byla 150  $\mu\text{m}$ , a odstředění probíhalo 10 minut při rychlosti 4000 otáček za minutu.

Po dokončení odstředění byla tuhá fáze vysušena (obr. 13) a kapalná fáze byla připravena k dialýze.



Obrázek 13 – Pevný nerozložený podíl po hydrolýze

### 5.2.4 Dialýza

Dialýza byla provedena přes celulózu membránu, jejíž propustnost byla 12kDa. Keratinový hydrolyzát byl nalit do membrány (viz obr. 14), která byla vložena do destilované vody. Poměr keratinového hydrolyzátu a destilované vody je 1:10.

Dialýza probíhala 7 dnů při pokojové teplotě, přičemž po 24, 48 a 96 hodinách docházelo k výměně destilované vody.



Obrázek 14 – Celulózová membrána naplněná kapalným keratinovým hydrolyzátem

### 5.2.5 Vznik prášku keratinového hydrolyzátu

Kapalný hydrolyzát byl po 7 dnech dialýzy vylit na plech a následně vložen do sušárny na 60 °C. Po odpaření vody byl získán vysušený zbytek, který byl ve třecí misce rozetřen na prášek, viz obr. 15.





Obrázek 15 – Vznik prášku keratinového hydrolyzátu

### 5.3 Příprava filmů

Z prášku keratinového hydrolyzátu a vody byl připraven vodný roztok keratinového hydrolyzátu o koncentraci 15 %, to odpovídalo 4,6 g hydrolyzátu na 25,4 g vody. Příprava vodného roztoku probíhala při míchání a teplotě 55 °C do úplného rozpuštění prášku. Poté se přidal glycerol, který má funkci změkčovadla a směs se dostatečně promíchala. Následně bylo nutné zkontrolovat pH hodnotu, popřípadě ji opravit na hodnotu pH 5,5. Tato hodnota pH je důležitá pro přidání další složky filmu, chitosanu, který se při této hodnotě rozpouští. Po přidání chitosanu se směs opět promíchá. Jako poslední je do směsi přidán glutaraldehyd, který má funkci síťovadla. Poměr uvedených složek je uveden v tab. 2

Vzniklá směs byla vylita do připravených silikonových formiček a vložena do exsikátoru, ze kterého byl odsán vzduch za účelem odstranění vzduchových bublin, na přibližně 30 min. Poté se formička s filmem vložila do sušárny na teplotu 40 - 45 °C.

Statistickou metodou faktorových pokusů  $2^3$  na dvou úrovních minimální a maximální hodnoty s jedním středovým pokusem bylo navrženo složení filmů. Byly sledovány tyto faktory přídavek A – chitosanu, B – glycerolu a C – glutaraldehydu. Množství jednotlivých složek bylo procentuálně vztaženo na navážku hydrolyzátu.

Tabulka 2 – Složení jednotlivých filmů

Film č.	Keratinový hydrolyzát [g]	Voda [ml]	Chitosan* [%] Faktor A	Glycerol* [%] Faktor B	Glutaraldehyd* [%] Faktor B
1	4,6	25,4	10	40	5
2			10	40	0,5
3			10	60	5
4			10	60	0,5
5			20	40	5
6			20	40	0,5
7			20	60	5
8			20	60	0,5
9			15	50	2,75

\*Vztaženo na sušinu navážky hydrolyzátu

## 5.4 Analytické zkoušky

### 5.4.1 Stanovení sušiny prášku keratinového hydrolyzátu

Stanovení se provádělo dvakrát. Do koželužských misek se na analytických vahách navážil přibližně 2 g vzorku a vložily se do sušárny, ve které byla teplota 103 °C. Sušení probíhalo dobu 2 hodin. Po uplynutí doby se misky vytáhly, nechaly se vytemperovat v exsikátoru a následně se zvažily.

Obsah sušiny se vypočítá dle vzorce:

$$S = \frac{m_1}{m_0} \cdot 100$$

$m_1$  = hmotnost vzorku po sušení [g]

$m_0$  = hmotnost vzorku před sušením [g]

$S$  = obsah sušiny [%]



### 5.4.2 Stanovení obsahu popelovin

Stanovení obsahu popelovin se provádělo dvakrát u každého vzorku.

V první fázi se musely přežíhat kelímky z křemenného skla a následně se v exsikátoru nechaly vychladnout. Po vychladnutí se zvažily prázdné misky na analytických vahách a poté se misky opět navázil spolu se vzorkem o navážce cca 1 g. Miska se vzorkem byla zahřívána nad kahanem, působením ohně došlo ke spálení až do zuhelnatění. Následně byla miska se vzorkem na dobu 90 minut vložena do muflové pece o teplotě 650 °C. Po daném čase se misky umístily do exsikátoru, ve kterém se pozvolna temperovaly, a po vychladnutí byla zvážena hmotnost popelovin.

Stanovení obsahu popelovin se vypočítá dle vzorce:

$$P = \frac{n_p}{n} \cdot 100$$

$n_p$  = hmotnost vzorku popele [g]

$n$  = hmotnost vzorku před stanovením [g]

$P$  = obsah popelovin ve vzorku [%]

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

Stanovení se provádělo u každého vzorku dvakrát.

Na analytických vahách bylo do mineralizační baňky naváženo cca 0,2 g vzorku, 5,6 ml 96% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 20 ml 0,02M HCl. Ke směsi byla přidána tableta katalyzátoru. Směs byla mineralizována při teplotě 480 °C asi 1 až 1,5 hodiny do celkového vyčerení (obr. 16).



Obrázek 16 – Mineralizace

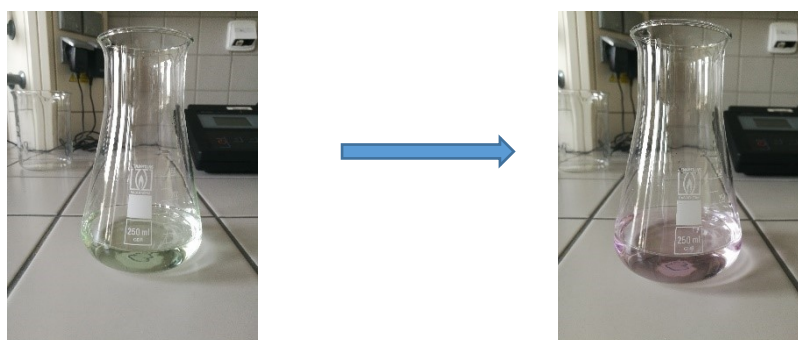
Po ukončení mineralizace došlo k vychladnutí mineralizátu a mineralizát byl naředěn malým množstvím vody kvůli rozpuštění pevných částic. Následně byl mineralizát přelit do 50 ml odměrné baňky, která se doplnila vodou po rysku.

Do nálevky Parnas-Wagnerovy destilační aparatury se odebralo pipetou 25 ml vzorku a přidalo 20 ml roztoku směsi  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 + \text{NaOH}$ . Destilace probíhala 20 minut od varu. Během destilace se  $\text{NH}_3$  jímalo do 15 ml 2%  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (obr. 17).



Obrázek 17 – Aparatura Parnas-Wagnerovy destilace

K roztoku  $\text{NH}_3$  a  $\text{H}_3\text{BO}_3$  se přidalo několik kapek Tashirova indikátoru a nazelenalý roztok se titroval 0,02M HCl do růžového zbarvení, obr. 18.



Obrázek 18 – Změna zbarvení roztoku

Množství dusíku ve vzorku bylo určeno dle vzorce:

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

$V$  = spotřeba HCl při titraci [ml]

$c$  = molární koncentrace HCl [mol.l<sup>-1</sup>]

$n$  = navážka vzorku [g]

$N$  = množství dusíku ve vzorku [%]

#### 5.4.4 Zkouška rozpustnosti

Z každého hotového filmu se vzaly čtyři vzorky o rozměrech cca 1×1 cm a zvážíly se na analytických vahách. Zvážíla se také skleněná váženka, do které se potom vložil vzorek, a opět se váženka spolu se vzorkem zvážíla. Následně se váženka se vzorkem naplnila 30 ml vody (obr. 19) a postupně po 30, 60, 120 a 240 minutách byla z váženek odlévána voda. Váženka byla vložena do sušárny na 80 °C a po vysušení byla vložena do exsikátoru kvůli vytemperování. Poté se váženka se vzorkem zvážíla na analytických vahách.



Obrázek 19 – Váženka se vzorkem pro stanovení rozpustnosti

Rozpustnost vzorku filmu byla určena dle vzorce:

$$R = \frac{m_1}{m_0} \cdot 100$$

$m_1$  = hmotnost vzorku po rozpustnosti [g]

$m_0$  = hmotnost vzorku před rozpustnosti [g]

$R$  = rozpustnost [%]

#### 5.4.5 Termogravimetrická analýza TGA

Na připravených filmech byla provedena termická zkouška TGA (Termogravimetrická analýza) (obr. 20).

Zkouška byla provedena u všech filmů, kdy měření bylo v rozmezí teplot od 30 °C do 800 °C, rychlost ohřevu byla 20 °C/min a navážka vzorků se pohybovala okolo 25 mg. Celé měření se uskutečnilo v inertní dusíkaté atmosféře s průtokem dusíku 100 ml/min.



Obrázek 20 – Přístroj pro měření TGA

#### 5.4.6 Statistické vyhodnocení pokusů

Vzniklé filmy se skládají ze základní složky keratinového hydrolyzátu, chitosanu, změkčovadla glycerolu a síťovadla glutaraldehydu. Uvedené složky byly pro vznik filmu zadány v různém poměru. Každá z těchto složek má jiné vlastnosti, které ovlivňují technologické podmínky a zpracování. Statistické vyhodnocení nám pomáhá zjistit vliv sledovaných faktorů na vlastnosti bez provádění dalších zkoušek.

Sledovali jsme tyto vlastnosti filmů: rozpustnost po 1 hod, obsah popelovin, obsah dusíku a teplotu degradace. Experimenty byly naplánovány a vyhodnoceny metodou faktorových pokusů  $2^3$ . Sledovaly se tři vybrané faktory (množství přidaného A – chitosanu, B – glycerolu, C – glutaraldehydu) na dvou úrovních minimální a maximální hodnoty s jedním středovým pokusem. Výsledky byly vyhodnoceny v programu Minitab 18.

Z dostupných dat byly vyhodnoceny Paretovy diagramy, regresní rovnice a vrstevnicové diagramy [38].

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 6.1 Příprava hydrolyzátu

Na obr. 21 vidíme postupný úbytek materiálu v jednotlivých stupních přípravy keratinového hydrolyzátu.

<b>Množství vlny před hydrolyzou</b>	<b>800 g</b>
<b>Množství rozložené vlny po hydrolyze</b>	<b>611,7 g</b>
<b>Množství nerozloženého pevného podílu, který zůstal na PA tkanině</b>	<b>188,3 g</b>
<b>Úbytek po dialýze</b>	<b>446,2 g</b>
<b>Množství získaného keratinového prášku</b>	<b>165,5 g</b>

Obrázek 21 – Hmotností úbytek vlny při přípravě hydrolyzátu

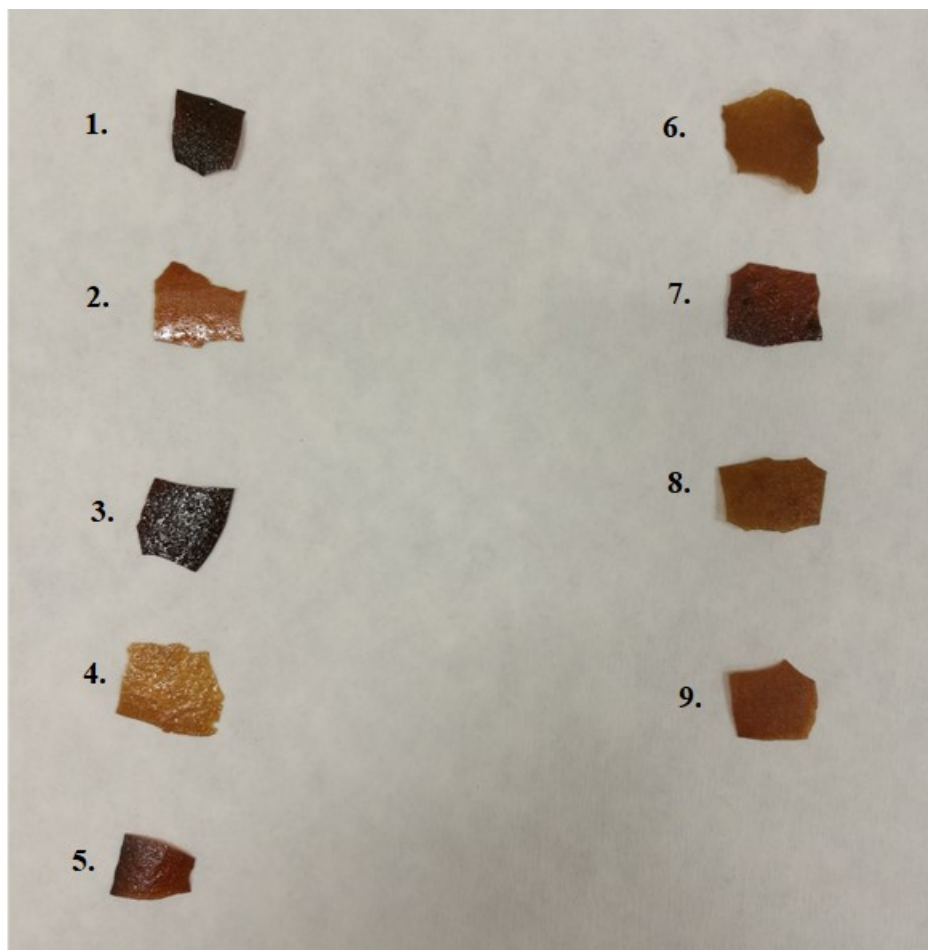
Výtěžnost vlny po hydrolyze byla 76,5 %.

Celková výtěžnost hydrolyzátu z vlny po hydrolyze a dialýze byla 20,7 %. Dle obrázku č. lze vidět, že největší ztráta byla při dialýze. Skrz membránu totiž dochází k vyplavování kratších řetězců keratinu z keratinového hydrolyzátu a nízkomolekulárních látek menších než 12 kDa do vody. Vznik většího množství kratších řetězců může ovlivnit použitý způsob hydrolyzy nebo také technologické podmínky (vysoká teplota, vysoká hodnota pH roztoku, doba).

Další příčinou, která se mohla podílet na ztrátě kapalného hydrolyzátu je možný únik do vody přes konce membrány, které nebyly dostatečně utěsněny. Během dialýzy dochází k pnutí v membráně v důsledku mírného zvyšování tlaku.

## 7 FILMY

Část filmů složených z keratinového hydrolyzátu, chitosanu, glycerolu a glutaraldehydu jsou znázorněny na obr. 22.



Obrázek 22 – Ukázka připravených filmů

Filmy byly po vysušení výrazně křehké. Filmy č. 1, 3, 5, 7, 9 byly vyjmuty z formiček snadno, ovšem ihned popraskaly. Filmy č. 2, 4, 6, 8, byly na první pohled pružnější, ale při vyšší deformaci docházelo také k prasknutí. Křehkost filmu je dána rozdílným množstvím glutaraldehydu, glycerolu a chitosanu. Např. v první skupině uvedených filmu je přídavek síťovadla 5 % a u druhého je ho jen 0,5 %. Při větším přídavku síťovadla je sice film pevnější, ale za to křehčí. Nevýhodou připravených filmů byl také vysoký obsah bublin, které vznikly při míchání roztoku.

Filmy se lišily barevným odstínem, ty které byly připraveny s nižším obsahem glutaraldehydu byly světlejší.

## 7.1 Výsledky analytických zkoušek

### Keratinový hydrolyzát

U keratinového hydrolyzátu bylo prováděno stanovení sušiny, stanovení obsahu dusíku a stanovení obsahu popelovin.

Dále se také stanovení obsahu dusíku provádělo u neodtučněné vlny, nedialyzovaného prášku a chitosanu (tab. 4).

Stanovení obsahu popelovin se provádělo u nedialyzovaného vzorku (tab. 6).

Tabulka 3 – Stanovení sušiny prášku keratinového hydrolyzátu

<b>Materiál</b>	<b>Obsah sušiny [%]</b>	<b>Obsah vlhkosti [%]</b>
<b>Keratinový hydrolyzát</b>	97,8	2,2

Toto stanovení se provádí pro výpočet množství navážky keratinového hydrolyzátu pro přípravu 15% roztoku, kdy je potřebné u navážky keratinového hydrolyzátu počítat s jeho vlhkostí 2,2 % (tab. 3).

Tabulka 4 – Stanovení obsahu dusíku

<b>Materiál</b>	<b>Obsah dusíku [%]</b>
<b>Keratinový hydrolyzát</b>	15,3
<b>Chitosan</b>	6,9
<b>Nedialyzovaný keratinový hydrolyzát</b>	12,1
<b>Neodtučněna vlna</b>	12,9

Z provedeného měření vyplývá, že nejmenší obsah dusíku vykazuje chitosan. Je to polysacharid a ty mají minimální hodnotu obsahu dusíku. Druhý vzorek s nejmenším obsahem dusíku byl nedialyzovaný keratinový hydrolyzát. Dalším vzorkem je neodtučněná vlna, která má o něco větší obsah dusíku než předešlý vzorek. V neodtučněné vlně jsou přítomny nečistoty a tuk, které zvyšují hmotnost vzorku a zároveň snižují obsah dusíku. Největší obsah dusíku z uvedených čtyř vzorků má čistý keratinový hydrolyzát, a to z důvodu, že se jedná o vyextrahovanou bílkovinu.

Tabulka 5 – Vyhodnocení stanovení obsahu dusíku filmů

<b>Film</b>	<b>Obsah N [%]</b>
<b>1</b>	8,5
<b>2</b>	8,5
<b>3</b>	7,6
<b>4</b>	8,4
<b>5</b>	8,0
<b>6</b>	9,4
<b>7</b>	8,2
<b>8</b>	8,6
<b>9</b>	9,3

Dle tabulky 5 lze odvodit obsah dusíku u filmů od 7,6 do 9,4 %. Obsah dusíku ve filmech je menší, než obsah v samotném keratinovém hydrolyzátu. Není pozorována žádná souvislost mezi přísadami aditiv a výsledkem analýzy s obsahem dusíku.

Tabulka 6 – Stanovení obsahu popelovin

<b>Materiál</b>	<b>Obsah popelovin [%]</b>
<b>Keratinový hydrolyzát</b>	5,2
<b>Nedialyzovaný keratinový hydrolyzát</b>	12,8

Dialyzovaný keratinový hydrolyzát obsahuje méně popelovin než ten nedialyzovaný. Důvodem je čištění v průběhu dialýzy.



Tabulka 7 – Vyhodnocení stanovení obsahu popelovin ve filmech

Film	Obsah popelovin[%]
1	3,6
2	3,6
3	3,7
4	3,5
5	3,8
6	3,8
7	3,6
8	3,7
9	3,5

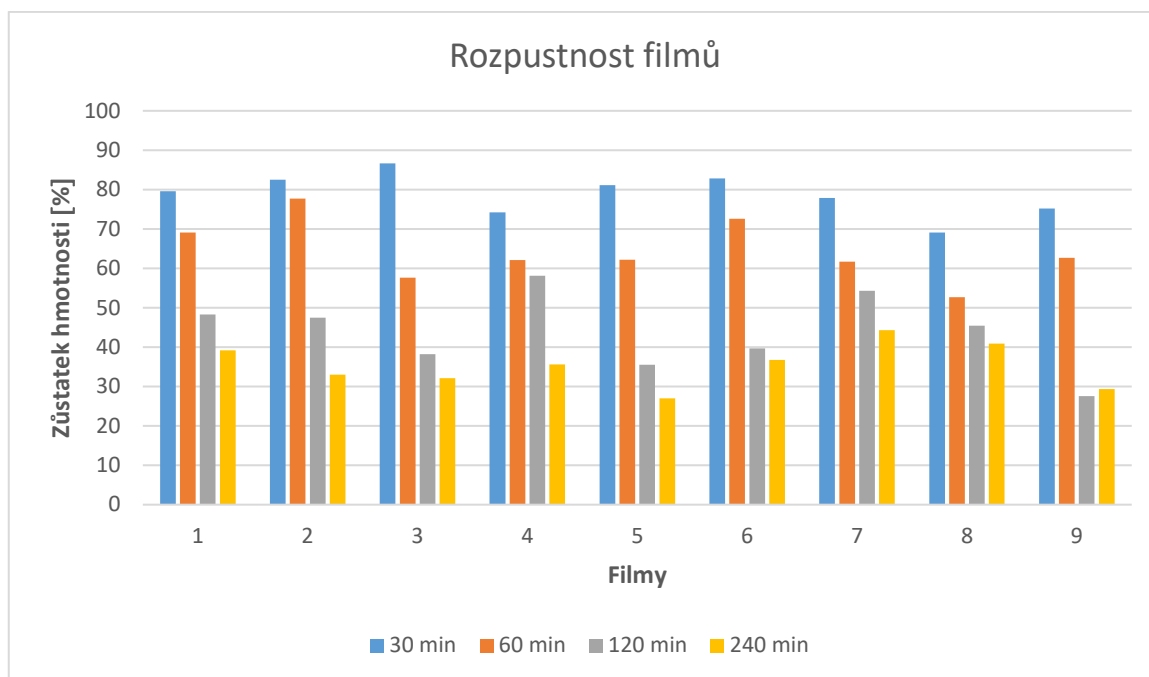
Tabulka 7 nám znázorňuje obsah popelovin ve filmech. Ten se pohybuje v rozmezí 3,5 – 3,8 % obsahu popelovin. Je to přibližně o 2 % popelovin méně než obsahuje samotný keratinový hydrolyzát.

#### Zkouška rozpustnosti

U všech filmů byly provedeny zkoušky rozpustnosti po 30, 60, 120 a 240 minutách, vyhodnocení je uvedené v tab. 8.

Tabulka 8 – Vyhodnocení zkoušky rozpustnosti vzorku filmů

Film	Množství nerozpuštěného materiálu [%] po			
	30 min	60 min	120 min	240 min
1	79,6	69,1	48,2	39,2
2	82,5	77,7	47,5	33,0
3	86,6	57,6	38,2	32,1
4	74,3	62,1	58,1	35,6
5	81,1	62,1	35,5	27,0
6	82,8	72,6	39,7	36,7
7	77,8	61,7	54,3	44,3
8	69,1	52,7	45,4	40,8
9	75,2	62,6	27,6	29,4



Graf 1 – Rozpustnost vzorků filmů po 30, 60, 120 a 240 min

a) Vliv glutaraldehydu na rozpustnost filmů

Každá dvojice filmů (1-2, 3-4, 5-6, 7-8) obsahovala 5 a 0,5 % glutaraldehydu. Při menším obsahu glutaraldehydu by se měl film rychleji rozpouštět. U první dvojice filmů se tak děje jen v případě rozpustnosti po 1 hod. U ostatních časů je rozpustnost téměř stejná. U druhé dvojice filmů je patrné minimální snížení rozpustnosti filmů při časech delších než 1 hodina. Rozdíl v rozpustnosti mezi filmem obsahujícím 0,5 % glutaraldehydu a filmem s 5 % glutaraldehydu je patrný při všech časech jen u filmů 5 a 6, kde jsou ovšem rozdíly také minimální. U poslední dvojice filmů je tento trend přesně opačný opět však jen s malou změnou mezi filmy. Z výsledků experimentů nelze usuzovat na výrazný vliv přídavku síťovadla pro zlepšení odolnosti proti vodě.

b) Vliv glycerolu

Obsah glycerolu ve filmech byl 40 a 60 %. V případě vyššího obsahu změkčovadla, by mělo docházet k větší rozpustnosti. Např. u filmu 5 a 7 je stejné množství glutaraldehydu a chitosanu a rozdílné glycerolu. Filmu s větším obsahem glycerolu se rozpustilo více než toho s menším obsahem, ale pouze po 30 minutách a 1 hodině. Vliv vyššího přídavku glycerolu je tedy viditelný pouze u filmů 1 a 3 v časech delších než 1 hodina. Nejednoznačnost výsledků může být způsobena rozdílnou plochou a tloušťkou filmů, ze kterých se poté rozdílně rychle uvolňuje změkčovadlo do vody.

c) Vliv chitosanu

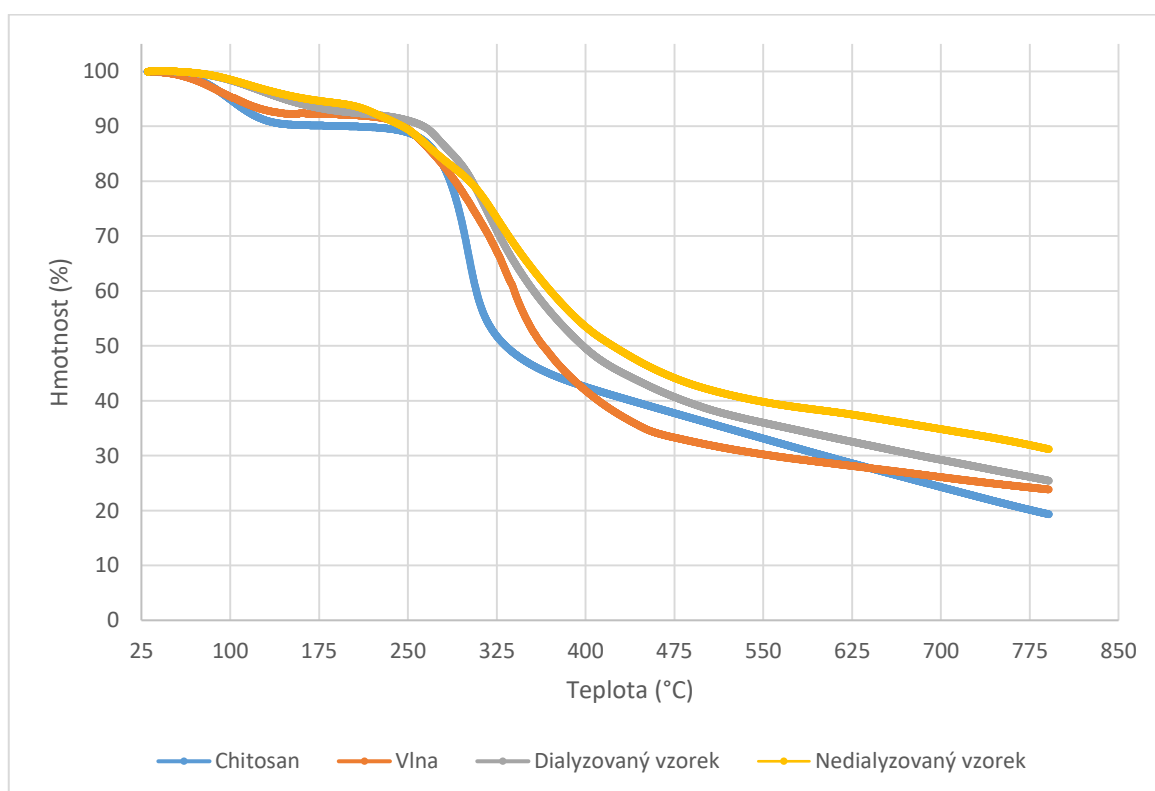
Přídavek chitosanu by měl pozitivně ovlivňovat rozpustnost filmů. Filmy, s větším obsahem chitosanu by tedy měly být odolnější než ty, které obsahují chitosanu méně. Tento výsledek je patrný u filmů 3 a 7 kde máme stejné množství glycerolu a glutaraldehydu a množství chitosanu je 10 a 20 %. Film č. 3 se v delších časech rozpouští

snáze než film č. 7. U zbylých filmů nedošlo ke splnění tohoto předpokladu a filmy s vyšším obsahem chitosanu se rozpouštěly stejně nebo více než filmy s obsahem nižším. Je tedy možné, že obsah chitosanu 20 % je již nadkritická hodnota, při níž nedochází ke zlepšení, ale ke zhoršení vlastností filmů. Pro důkladnější studium tohoto vlivu by bylo třeba provést další analýzy s širší škálou přísad chitosanu.

V případě, že výsledky neodpovídají daným předpokladům, mohou pak být ovlivněny chybou měření, nestejnou tloušťkou a rozměrem vzorků anebo přítomností bublin, vzniklých při přípravě roztoku filmu.

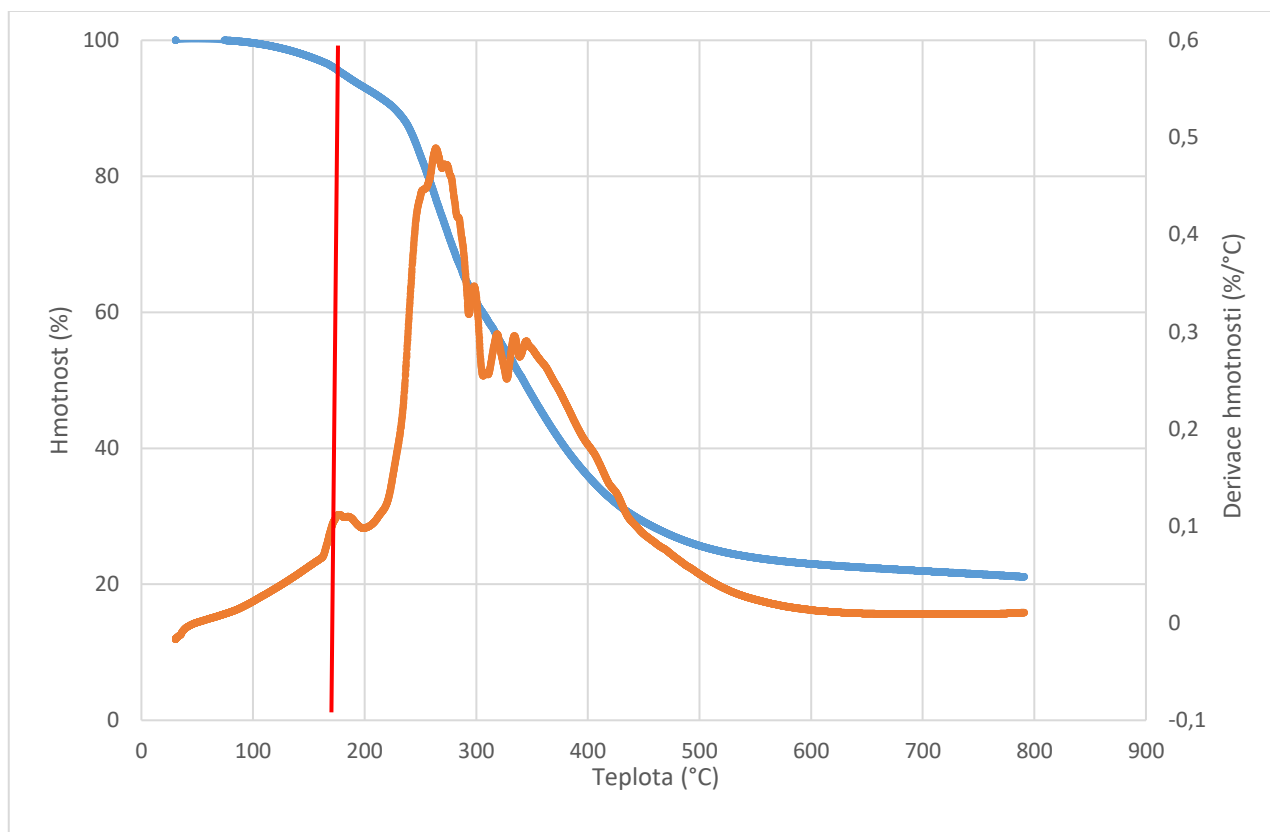
### Termogravimetrická analýza TGA

Při termogravimetrické analýze TGA, byly testovány původní vstupní materiály filmu a následně filmy z nich připravené (graf 2, 4, 5). Pomocí této analýzy dokážeme zjistit teplotu, při níž dochází k degradaci materiálu. Při teplotě uvedené v tab. 9 dochází k prvnímu rychlému úbytku hmotnosti vzorku, což značí degradaci vzorku.



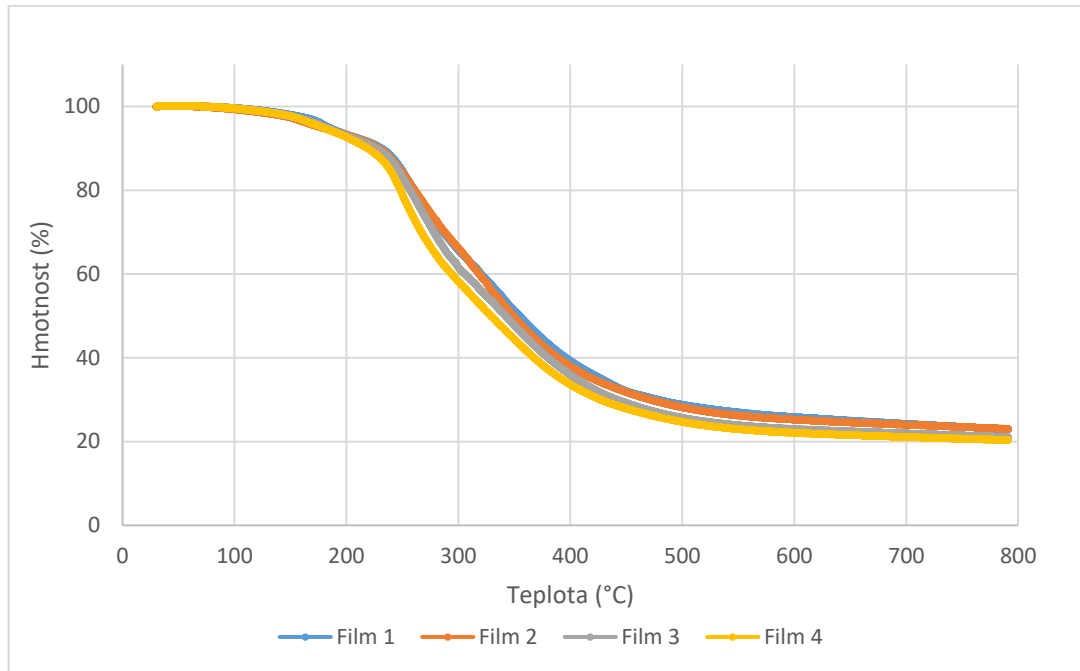
Graf 2 – Závislost hmotnosti na teplotě pro dané vzorky

Z grafického znázornění 2 vyčteme, že všechny čtyři vzorky ztrácejí svoji hmotnost přibližně okolo 100 °C, kdy dochází k odpařování vlhkosti a poté k samotné tepelné degradaci vzorků dochází přibližně při 250 °C. Nejrychleji a nejvíce ztrácí na své hmotnosti chitosan, poté je to vlna a téměř totožnou rychlost a ztrátu hmotnosti dosáhly dialyzovaný a nedialyzovaný vzorek.

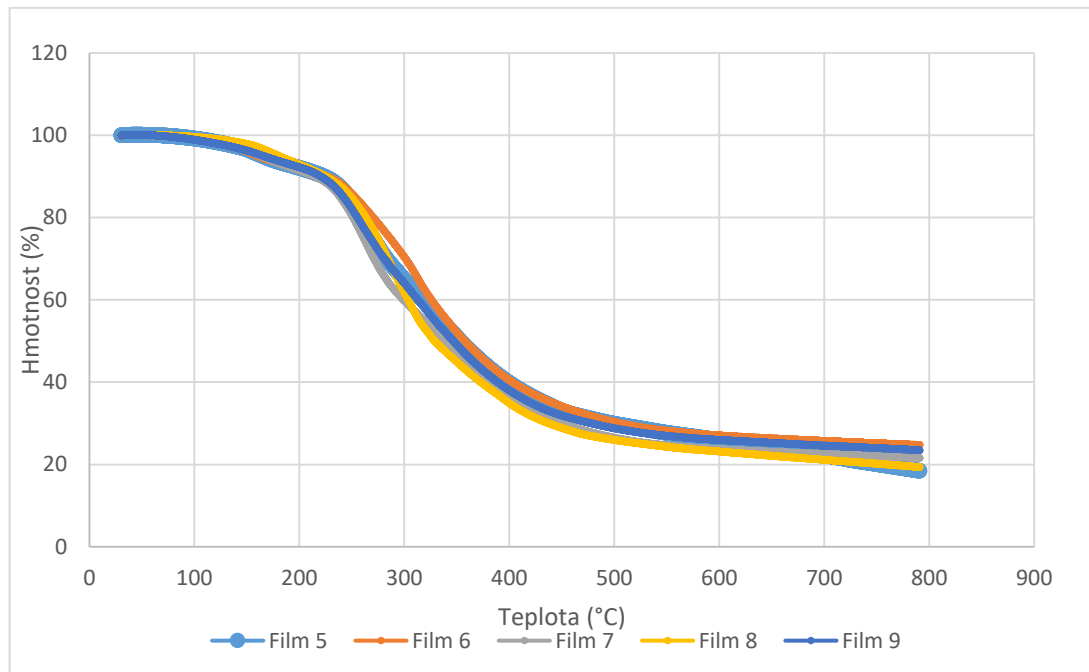


Graf 3 – Závislost hmotnosti a derivace hmotnosti na teplotě pro film č. 3

Z grafu 3 vyčteme, že vzorek filmu č. 3 začne ztrácet na hmotnosti přibližně okolo teploty 100 °C, kdy se začíná odpařovat povrchová vlhkost, ale může taky docházet k odpařování glutaraldehydu s tabulkovým bodem varu 101 °C. První pík je v rozsahu 133 až 200 °C. Právě tento pík jsme si stanovili jako kritickou hodnotu teploty, při které dochází k tepelné degradaci, ale také může docházet k degradaci kratších řetězců keratinu nebo k odpařování glycerolu, který má bod varu 182 °C. Při druhém píku derivace od teploty 225 - 290 °C dochází k nejprudšímu poklesu hmotnosti, až na 21 %. Důsledkem je zřejmě rozklad chitosanu a zbylých keratinových řetězců.



Graf 4 – Závislost hmotnosti na teplotě pro filmy č. 1 – 4



Graf 5 – Závislost hmotnosti na teplotě pro filmy č. 5 – 9

Grafy 4 a 5 znázorňují, že všech 9 filmů mají v závislosti na zvyšující se teplotě téměř totožný průběh ztráty úbytku hmotnosti. V první fázi dochází k odpařování vlhkosti a poté k samotné tepelné degradaci vzorků.

Tabulka 9 – Teploty degradace

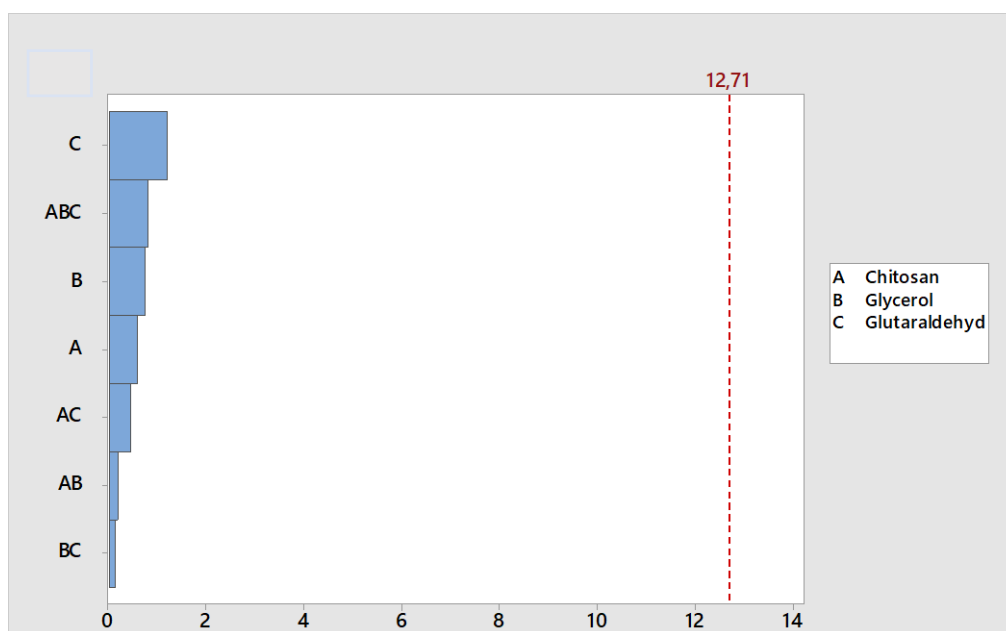
Film	Teplota degradace [°C]
1	180
2	163
3	187
4	158
5	155
6	156
7	166
8	175
9	165

Tabulka 9 nám znázorňuje teploty degradace. Ty se pohybují od 155 do 187 °C. U filmů 1, 2, 3, 4, u kterého je obsah chitosanu 10 % lze konstatovat, že teplota degradace závisí na přídávku glutaraldehydu, který je u filmů 1 a 3 5%. Jsou zde vyšší teploty degradace než u filmů 2 a 4, kde je příravek glutaraldehydu 0,5 %. U ostatních filmů, které obsahují chitosan 20 %, je trend opačný. Teploty degradace u filmů s nižším přídávkem glutaraldehydu vykazují vyšší teploty.

## 8 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ

### 8.1 Vyhodnocení jednotlivých faktorů pro obsah dusíku

Pomocí Paretova diagramu byl posuzován vliv jednotlivých faktorů a jejich kombinací na obsah dusíku. Z níže uvedeného obrázku je patrná velmi nízká statistická významnost námi vybraných faktorů.



Obrázek 23 – Paretův diagram pro obsah dusíku

Obsah dusíku (obr. 23) ve filmech byl nejvíce ovlivněn glutaraldehydem, následně na kombinaci všech tří složek (chitosan, glycerol a glutaraldehyd). Dále jednotlivými složkami glycerolu a chitosanu a kombinací chitosan-glutaraldehyd. Naopak nejméně filmy ovlivňuje kombinace chitosan-glycerol a glycerol-glutaraldehyd.

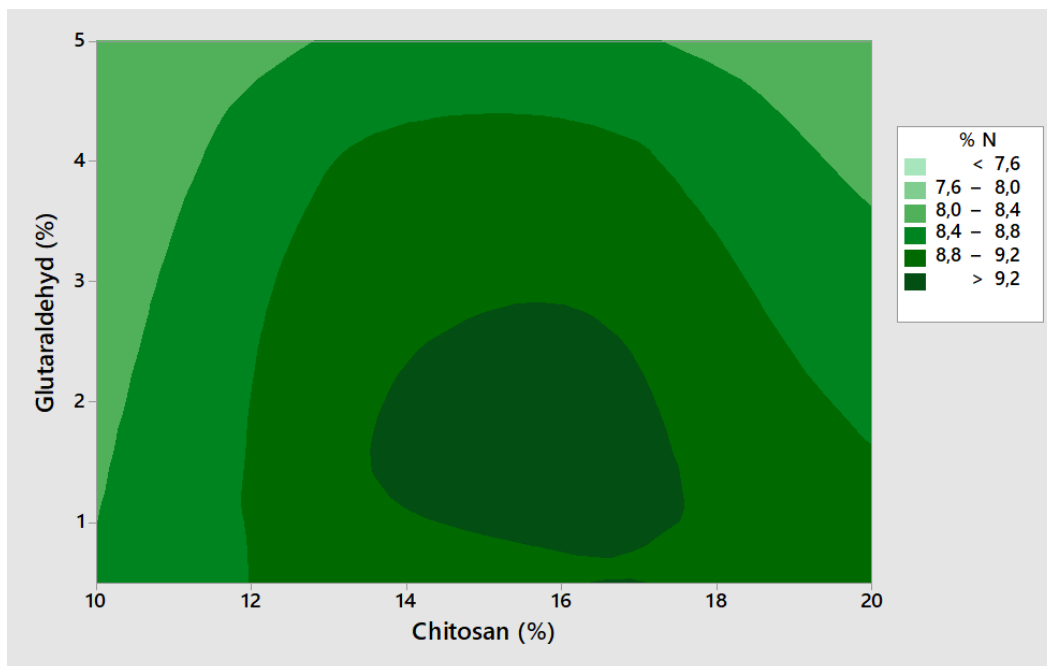
#### Regresní rovnice obsahu dusíku

Regresní rovnice popisuje průběh experimentu a dokáže predikovat výsledky v případě námi vymezených hodnot. Přesnost této rovnice je poměrně nízká, což může být způsobeno velmi malým vlivem jednotlivých faktorů na výsledek analýzy.

$$\% N = 6,00 + 0,274 A + 0,039 B + 1,39 C - 0,00422 A*B - 0,108 A*C - 0,0273 B*C + 0,00193 A*B*C$$

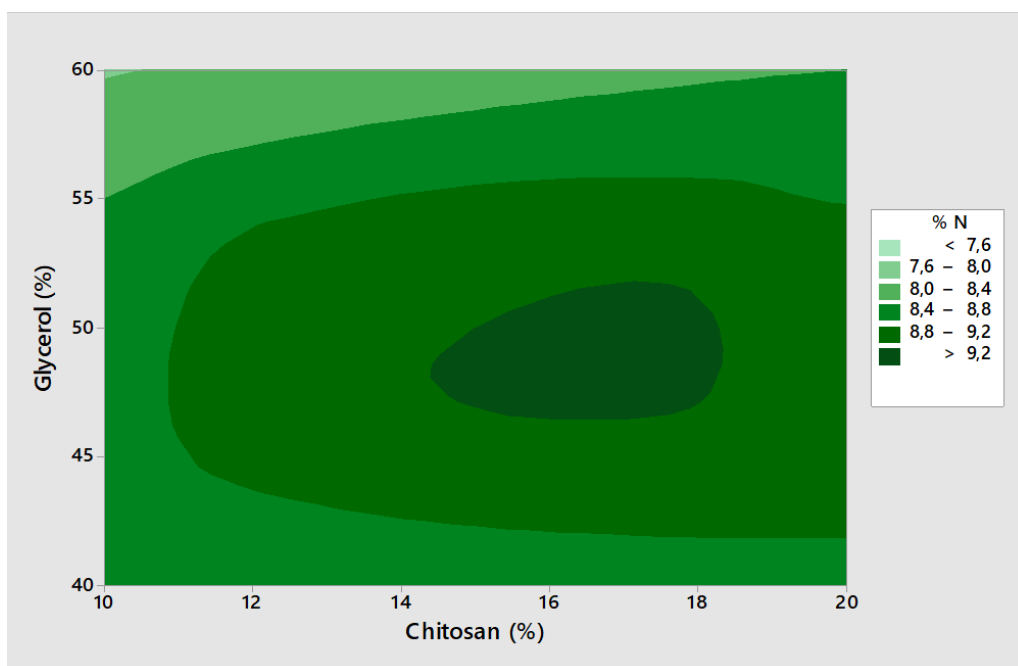
$$R^2 = 76,57 \%$$

Vyhodnocení obsahu dusíku podle vrstevnicových diagramů je znázorněno na obrázcích č. 24 až 26.



Obrázek 24 – Vrstevnicový diagram – Vliv obsahu Glutaraldehydu a Chitosanu na obsah dusíku

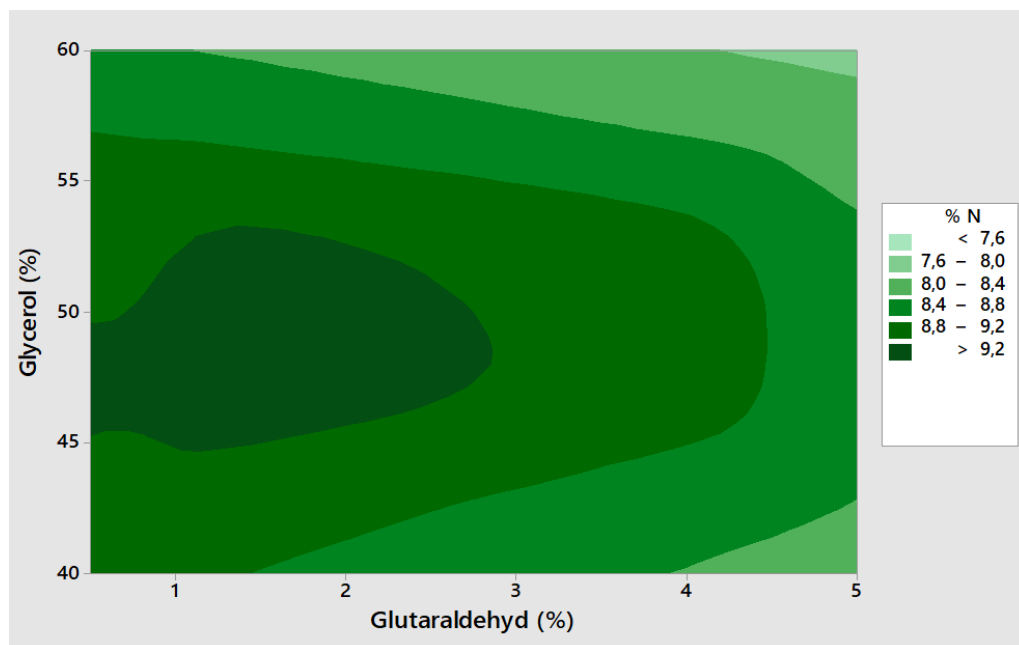
Na obrázku 24 můžeme vidět, že obsah dusíku se bude pohybovat od 7,6 – 8,0 % ve dvou oblastech, v první oblasti při množství glutaraldehydu 1 až 5 % a množství chitosanu 10 až 12 % nebo v druhé oblasti při množství glutaraldehydu 4 až 5 % a množství chitosanu 18 až 20 %. Naopak bude-li obsah glutaraldehydu 0,5 – 2,7 % a chitosanu cca 13,8 – 17,8 % vzroste obsah dusíku na více jak 8,8 %.



Obrázek 25 – Vrstevnicový diagram - Vliv obsahu Glycerolu a Chitosanu na obsah dusíku



Z obrázku 25 je patrné, že pokud bude množství glycerolu v rozmezí 55 – 60 % a chitosanu 10 – 20 %, bude obsah dusík mezi 7,6 - 8,0 %. Maximální obsah dusíku, mezi 8,8 a 9,2 %, budou vykazovat hodnoty glycerol od 47 – 52 % a chitosanu přibližně od 14 do 18 %.



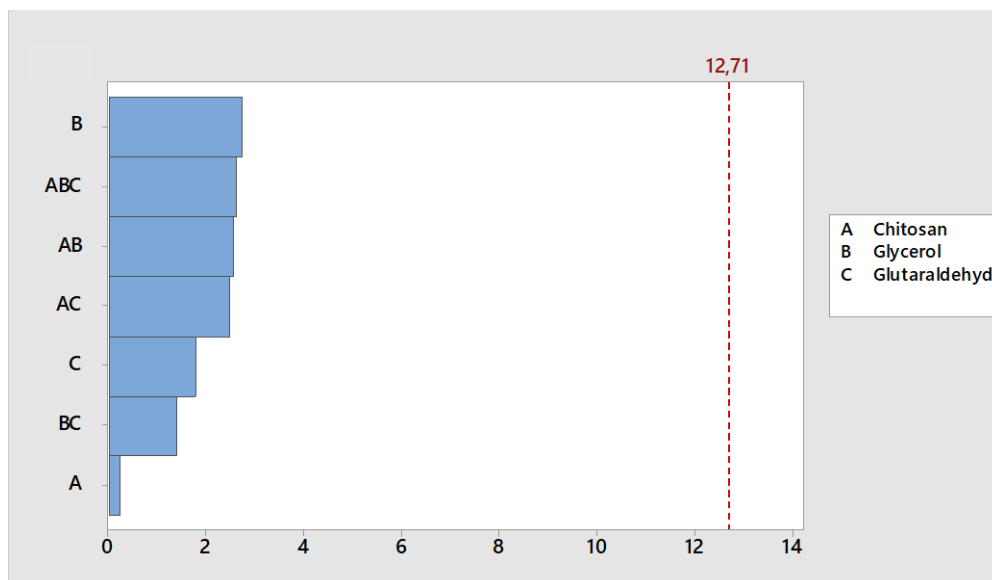
Obrázek 26 – Vrstevnicový diagram - Vliv obsahu Glycerolu a Glutaraldehyd na obsah dusíku

Obrázek 26 znázorňuje, že minimální obsah dusíku, méně jak 7,6 %, je dán přidavkem 60 % glycerolu při přidavku glutaraldehydu přibližně 4 – 5 %. A naopak pro maximální hodnoty obsahu dusíku vyplývá množství glycerolu 45 – 50 % při 0,5 % glutaraldehydu. Při zvyšování přidavku glutaraldehydu (od 1 – 2 %) se množství glycerolu zvýší na 53 %.

Shrnutím výsledků analýzy vrstevnicovými diagramy pro obsah dusíku ve filmech je zjištění, že na vyšší obsah dusíku má nejvíce vliv obsah chitosanu okolo 15 %. Minimální obsah dusíku byl zjištěn při přidavcích glycerolu kolem 60 % a glutaraldehydu 4 – 5 %.

## 8.2 Vyhodnocení jednotlivých faktorů pro obsah popelovin

Vliv jednotlivých faktorů a jejich kombinací na obsah popelovin byl posuzován podle Paretova diagramu. Z obr. 27 je patrné, že žádný z faktorů nedosahuje hodnoty kritické významnosti.



Obrázek 27 – Paretův diagram pro stanovení obsahu popelovin

Na obsah popelovin má nejmenší vliv chitosan. Ostatní složky, jak jednotlivé nebo v kombinaci, ovlivňují obsah popelovin podobně.

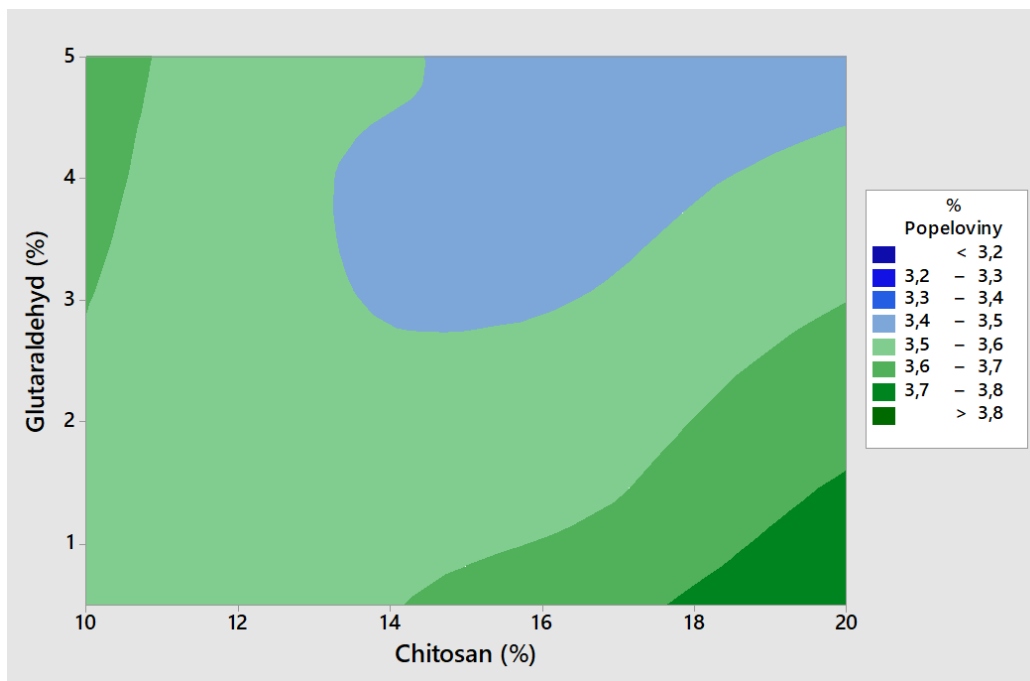
### Regresní rovnice obsahu popelovin

Pro obsah popelovin lze pomocí regresní rovnice předvídat výsledky i v případě dosazení mezi námi vymezené hodnoty.

$$\begin{aligned} \% \text{ Popelovin} = & 3,872 + 0,0001 A - 0,0112 B - 0,450 C + 0,00049 A*B + 0,0359 A*C \\ & + 0,01089 B*C - 0,000883 A*B*C \end{aligned}$$

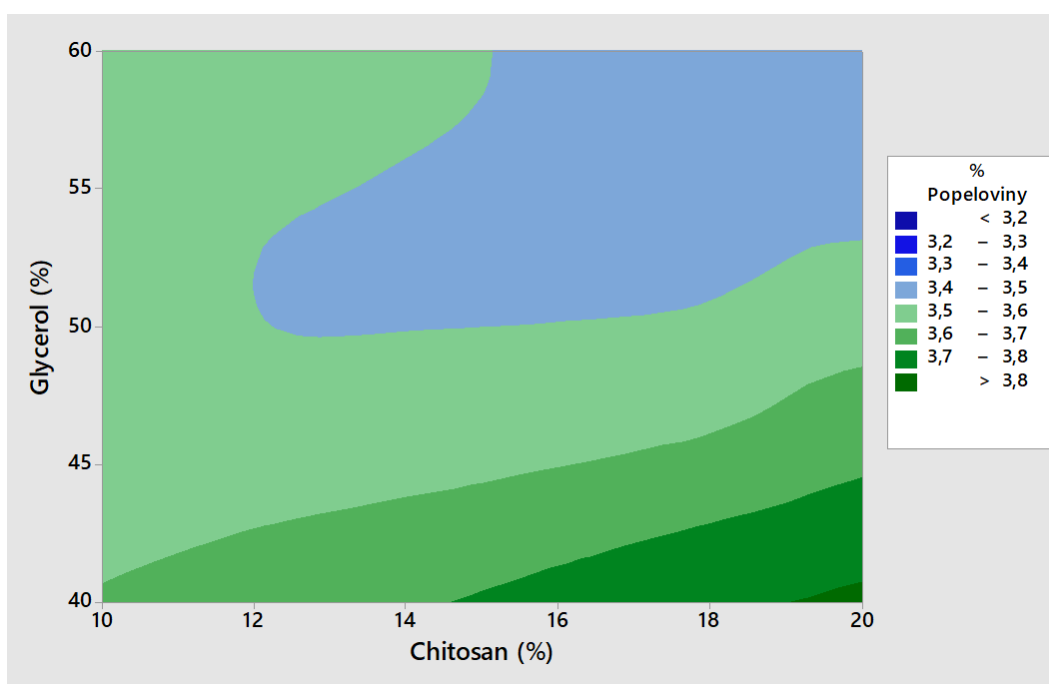
$$R^2 = 97 \%$$

Vyhodnocení statistické analýzy vlivu jednotlivých faktorů na obsah popelovin vrstevnicovými diagramy lze vyčíst z obrázků č. 28 až 30.



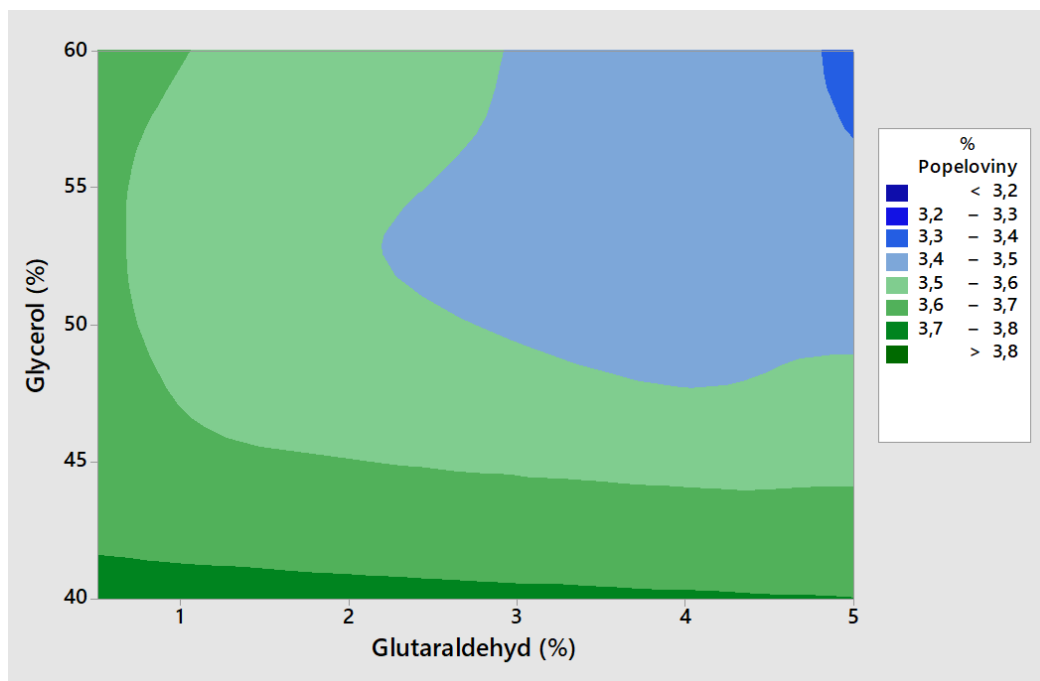
Obrázek 28 – Vrstevnicový diagram - Vliv obsahu Glutaraldehydu a Chitosanu na obsah popelovin

Na obrázku 28 vidíme minimální obsah popelovin při množství 3 – 5 % glutaraldehydu a chitosanu v rozmezí 13 – 20 %. Pokud zmenšíme množství glutaraldehydu na 0,5 – 1,5 % a přidavek chitosanu na přibližně 18 – 20 %, bude obsah popelovin od 3,7 do 3,8 %.



Obrázek 29 – Vrstevnicový diagram – Vliv obsahu Glycerolu a Chitosanu na obsah popelovin

Obrázek 29 nám ukazuje, že přidavek glycerolu od 50 – 60 % a chitosanu od 12 – 20 % snižuje obsah popelovin na 3,4 – 3,5 %. Ke zvyšování obsahu popelovin dochází u přidavku glycerolu v rozmezí od 40 – 45 % a chitosanu od 15 do 20 %. Maximálních hodnot je poté dosaženo při přidavku glycerolu 40 % a chitosanu 20 %.



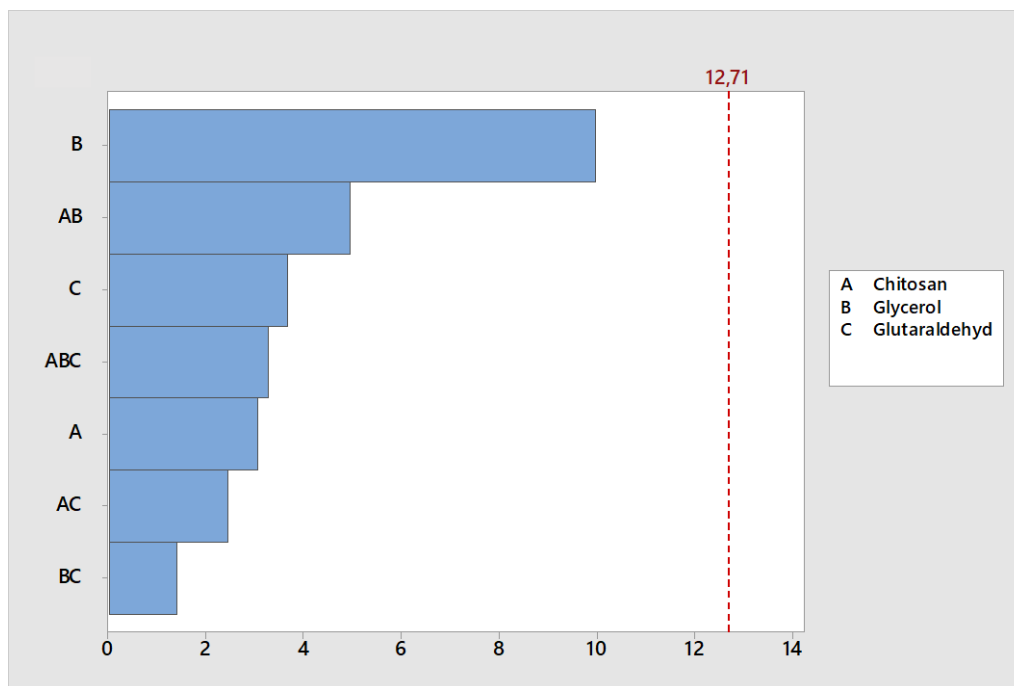
Obrázek 30 – Vrstevnicový diagram – Vliv obsahu Glycerolu a Glutaraldehydu na obsah popelovin

Pomocí analýzy uvedené na obrázku 30 můžeme konstatovat, že pro nejmenší obsah popelovin, od 3,3 do 3,4 %, je přidavek glycerolu 57 – 60 % a glutaraldehydu přibližně 5 %. Naopak vyšší obsah popelovin je dán obsahem glutaraldehydu od 0,5 až 5 % a obsahem glycerolu od 40 – 45 %.

Z vrstevnicových diagramů tedy vyplývá, že menší obsah popelovin bude u přidavku chitosanu okolo 10 %, glycerolu 60 % a glutaraldehydu od 3 do 5 %.

### 8.3 Vyhodnocení jednotlivých faktorů na rozpustnost po 1 hod

Prostřednictvím Paretova diagramu byl posuzován vliv jednotlivých faktorů a jejich kombinací na rozpustnost po 1 hod. Ke statistické významnosti se nejvíce blíží vliv množství glycerolu (obr. 31).



Obrázek 31 – Paretův diagram pro rozpustnost po 1 hod

Na rozpustnost filmů má největší vliv glycerol, o polovinu méně glutaraldehyd a nejméně ovlivňuje rozpustnost přísad chitosanu. Dobrý vliv na rozpustnost má kombinace glycerolu s chitosanem a také kombinace všech tří složek. Naopak kombinace glutaraldehydu s glycerolem nebo chitosanem tolik rozpustnost neovlivňuje.

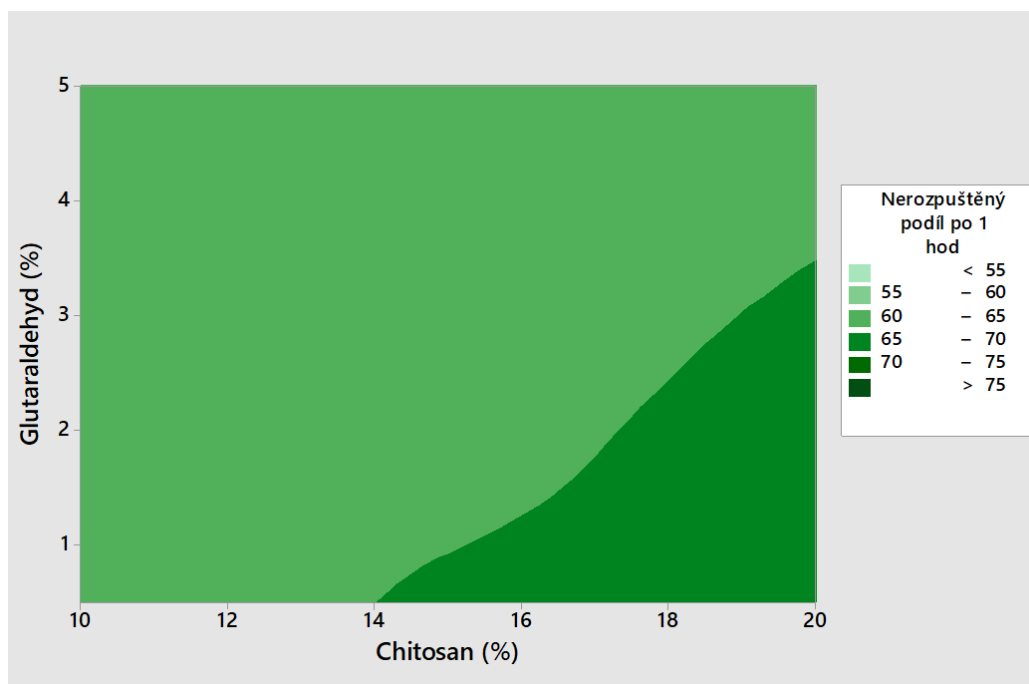
#### Regresní rovnice rozpustnosti po 1 hod

I když jsou zadány hodnoty mimo hranice minima a maxima, je možné je dopočítat touto níže uvedenou regresivní rovnicí.

$$\text{Rozpustnost po 1 hod} = 82,2 + 1,300 A - 0,521 B - 13,77 C - 0,0116 A*B + 0,730 A*C + 0,2950 B*C - 0,01719 A*B*C$$

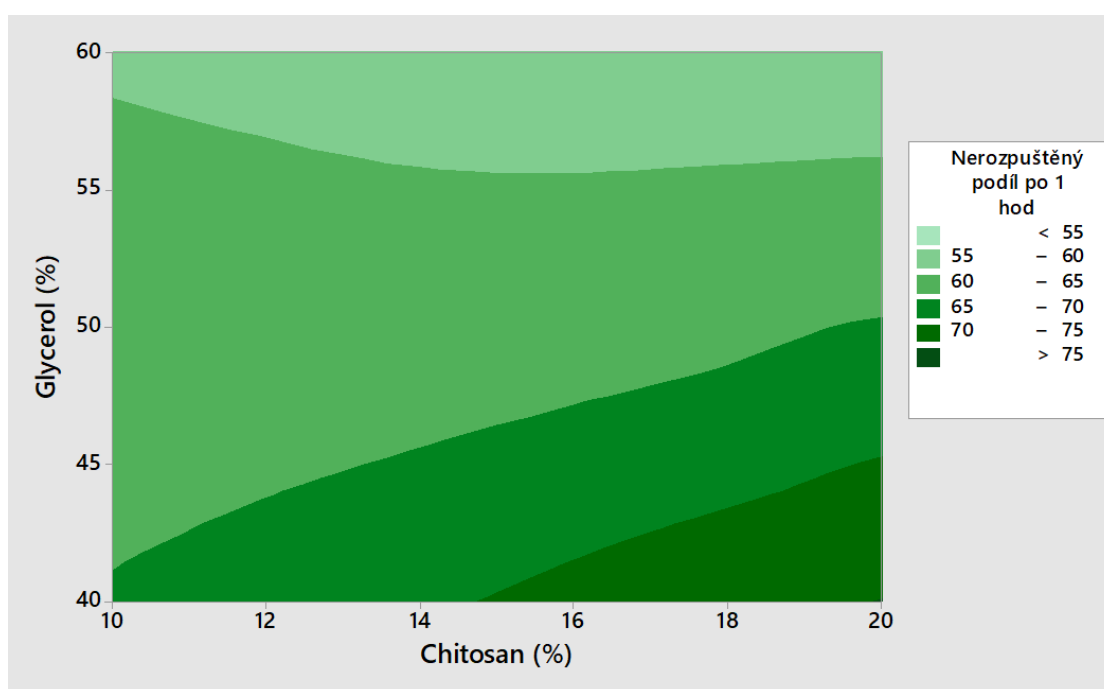
$$R^2 = 99,40 \%$$

Vyhodnocení rozpustnosti po 1 hod je znázorněno na obrázcích č. 32 až 34.



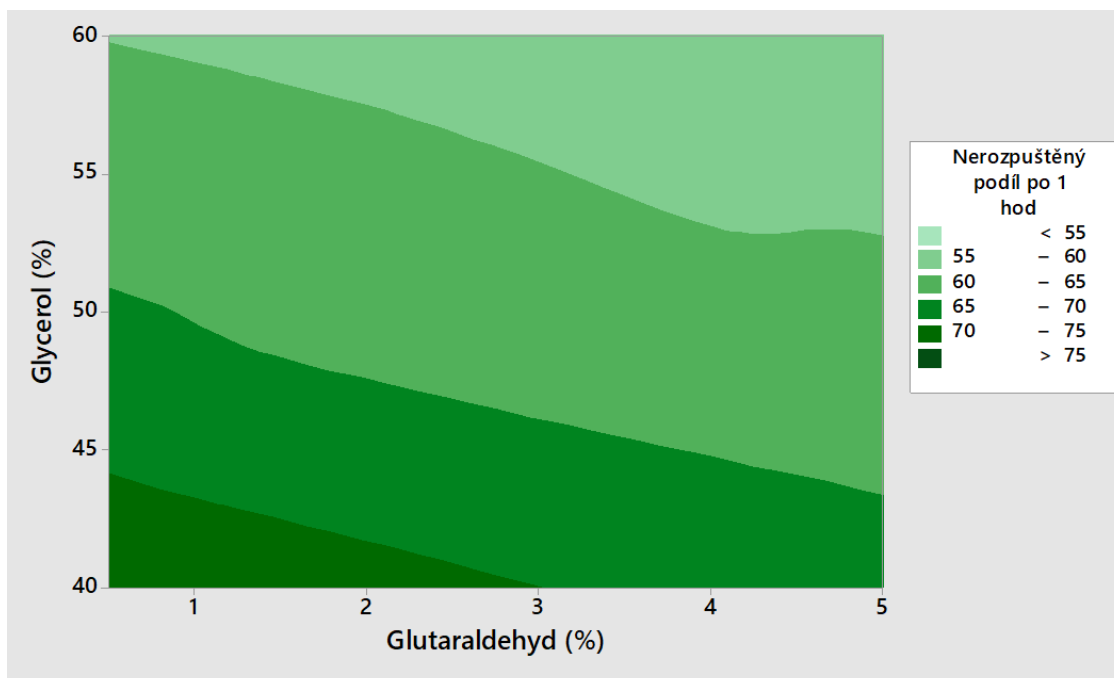
Obrázek 32 – Vrstevnicový diagram – Vliv obsahu Glutaraldehydu a Chitosanu na rozpustnost po 1 hod

Z tohoto obrázku 32 je patrné, že nižších hodnot rozpustnosti a tedy vyšších hodnot zbylé hmotnosti bylo dosaženo při kombinaci obsahu glutaraldehydu mezi 0,5 až 3 % a množstvím chitosanu vyšším než 14 %.



Obrázek 33 – Vrstevnicový diagram – Vliv obsahu Glycerolu a Chitosanu na rozpustnost po 1 hod

Dle obrázku 33 lze konstatovat, že u přídavku glycerolu nad 59 % a chitosanu v celém rozmezí od 10 do 20 % se rozpustí 40 – 45 % filmu (zůstatek 55 – 60 %). Sníží-li se přídavek glycerolu na maximálně 45 % a množství chitosanu bude více než 15 %, sníží se rozpustnost filmů na 25 – 30 %.



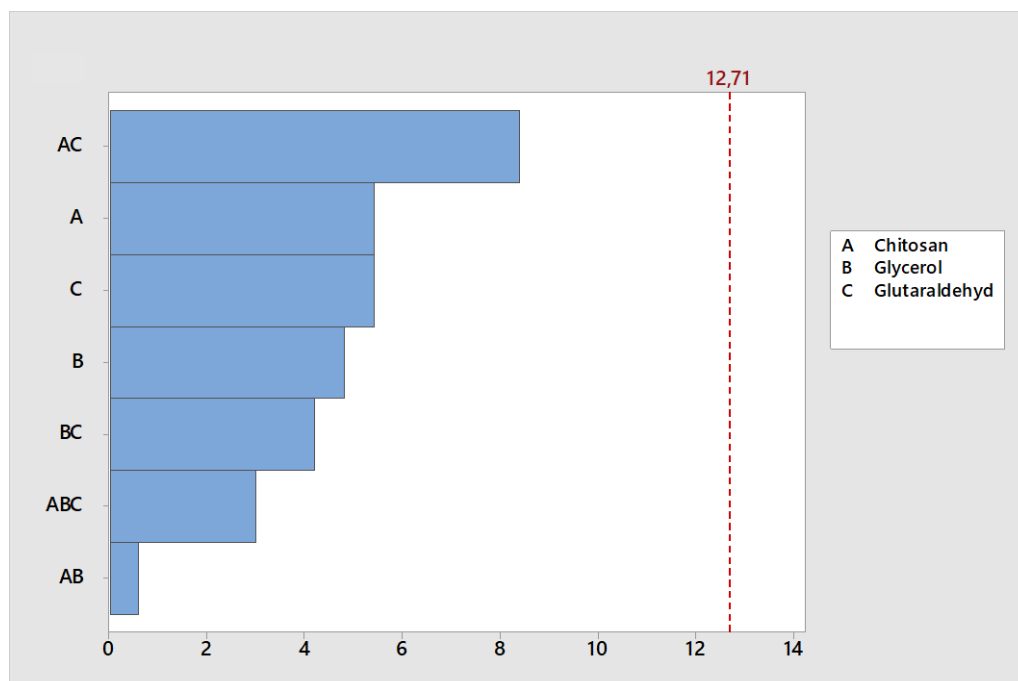
Obrázek 34 – Vrstevnicový diagram – Vliv obsahu Glycerolu a Glutaraldehyd na rozpustnost po 1 hod

Z obrázku 34 lze vypočítat, jak se se snižujícím se obsahem glycerolu snižuje rozpustnost filmu. Bude-li množství glycerolu od 52,5 do 60 % a glutaraldehydu od 0,5 do 5 % dochází k rozpouštění filmů od 40 do 45 %. Snížená rozpustnost filmu, od 25 – 30 %, bude v případě obsahu glycerolu v rozmezí 40 – 45 % a glutaraldehydu od 0,5 do 3 %.

Pomocí vrstevnicových diagramů byla vyhodnocena rozpustnost filmů po 1 hodině, z výsledků lze vytvořit závěr, že pro nižší rozpustnost je vhodný přídavek glutaraldehydu od 0,5 do 3 %, obsah chitosanu 14 – 20 % a u glycerolu je to obsah kolem 40 – 45 %.

## 8.4 Vyhodnocení jednotlivých faktorů pro tepelnou degradaci

V Paretově diagramu (obr. 35) můžeme vidět porovnání vlivu jednotlivých faktorů a jejich kombinací na tepelnou degradaci. Ani jeden z faktorů není statisticky významný.



Obrázek 35 – Paretoův diagram tepelné degradace

Na tepelnou degradaci vzorků má největší vliv kombinace chitosanu s glutaraldehydem, ale také jednotlivé složky. Nejmenší vliv má kombinace chitosanu s glycerolem.

Regresní rovnice tepelné degradace

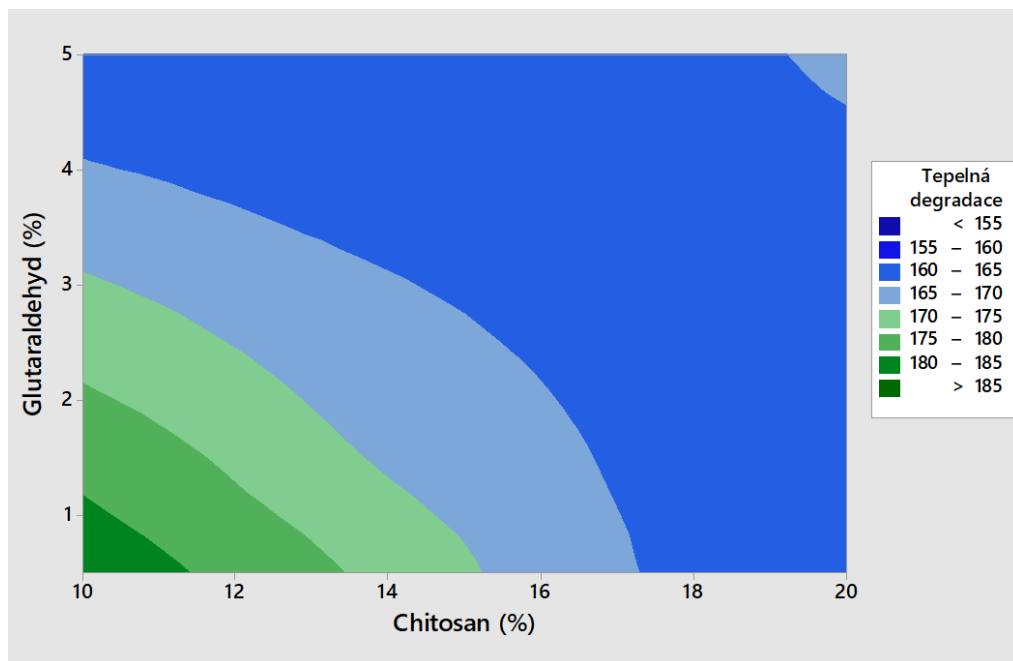
Pomocí regresní rovnice je možné dopočítat hodnoty, pokud by byly zvoleny jiné hodnoty faktorů, i mimo dané hranice minima a maxima.

$$\text{TGA} = 159,9 + 0,94 A + 1,039 B - 2,44 C - 0,0711 A*B - 0,489 A*C - 0,178 B*C + 0,02222 A*B*C$$

$$R^2 = 99,44 \%$$

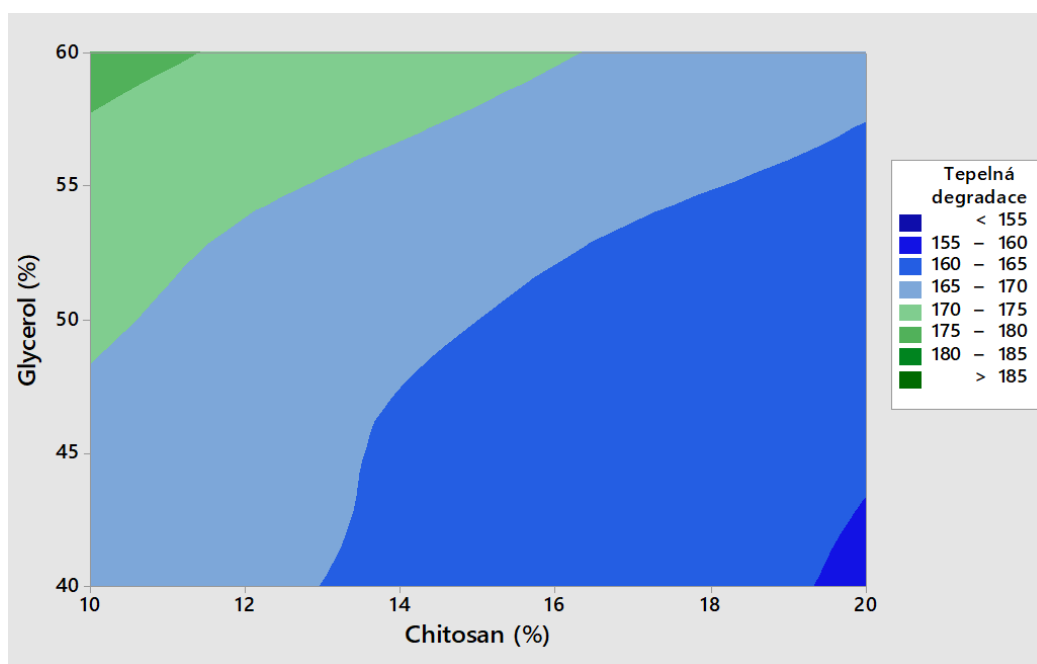


Zhodnocení teploty degradace statistickou analýzou vrstevnicových diagramů je znázorněno na obrázcích č. 36 až 38.



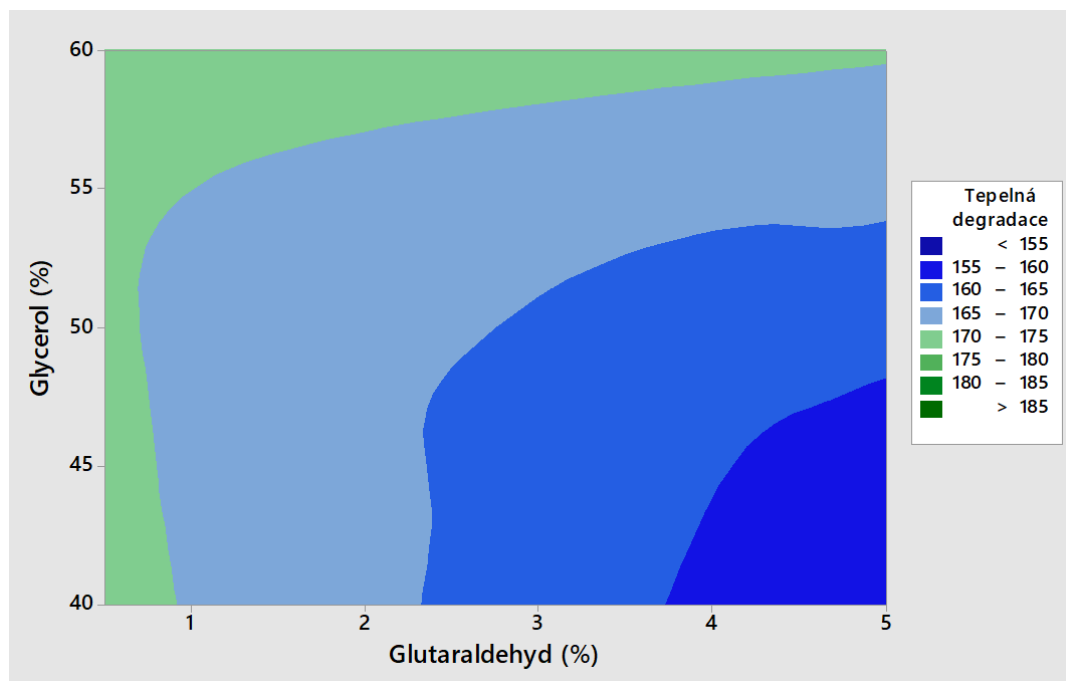
Obrázek 36 – Vrstevnicový diagram – Vliv obsahu Glutaraldehydu a Chitosanu na tepelnou degradaci

Z obrázku 36 vyčteme, že při obsahu glutaraldehydu přibližně 4 – 5 % a chitosanu 10 – 20 %, dochází k tepelné degradaci při 160 – 165 °C. K tepelné degradaci, ke které dochází při 180 – 185 °C, dojde při obsahu glutaraldehydu v obsahu kolem 1 % a chitosanu 10 – 11,5 %. Obecně lze říci, že při zvyšování obsahu jak glutaraldehydu tak i chitosanu dochází ke snižování teploty degradace.



Obrázek 37 – Vrstevnicový diagram – Vliv obsahu Glycerolu a Chitosanu na tepelnou degradaci

Z obrázku 37 je patrné, že bude-li množství glycerolu okolo 60 % a chitosanu 10 – 11,5 %, teplota degradace bude v rozmezí 175 – 180 °C. Naopak teplota degradace mezi 155 – 160 °C bude dosažena množstvím glycerolu od 40 do 43 % při množství chitosanu 19 – 20 %.



Obrázek 38 – Vrstevnicový diagram – Vliv obsahu Glycerolu a Glutaraldehydu na tepelnou degradaci

Dle obrázku 38 lze konstatovat, že pokud se sníží přídavek glycerolu na 40 - 47 % a glutaraldehydu bude od přibližně 3,8 - 5 % bude teplota degradace v rozmezí 155 – 160 °C. Naopak k tepelné degradaci při 170 – 175 °C dochází při přídavku glycerolu v celém rozsahu 40-60 % a zároveň glutaraldehydu do 1 % a souběžně s tím při přídavku glycerolu od 58 do 60 % a glutaraldehydu v celém rozsahu 0,5 – 5 %.

Z vrstevnicových diagramů lze tedy vyvodit závěr, že nejvyšších teplot dosáhnou filmy s množstvím glutaraldehydu v rozmezí 0,5 – 1 %, množstvím chitosanu 10 – 11,5 % a obsahem glycerolu 50 – 60 %.

## 9 ZÁVĚR

Diplomová práce je rozdělena na teoretickou a praktickou část. V teoretické části jsou popsány informace o keratinu a chitosanu a možnostech jejich společného využití, zejména pro tvorbu kompozitních filmů.

V praktické části je uvedena příprava keratinového hydrolyzátu z ovčí vlny. Příprava zahrnovala úpravu vlny, rozklad vlny alkalicko-enzymovou hydrolyzou a následnou separaci nerozloženého podílu od kapalné fáze. Poté probíhala dialýza, při které docházelo k vyplavování nežádoucích nízkomolekulárních látek. Pomocí dialýzy jsme získali čistý kapalný keratinový hydrolyzát, ze kterého jsme po vysušení získali prášek pro přípravu filmů. Kromě keratinového hydrolyzátu byly také součástí filmů chitosan, glycerol a glutaraldehyd.

Bylo připraveno 9 filmů, které měly stejný obsah keratinového hydrolyzátu a obsah zbylých aditiv byl naplánován statistickou metodou faktorových pokusů  $2^3$  na dvou úrovních (minimální a maximální) s jedním středovým pokusem pomocí programu Minitab18. Vzniklé filmy byly testovány fyzikálními a analytickými zkouškami a výsledky z nich byly poté statisticky vyhodnoceny. Byl sledován vliv jednotlivých faktorů (A – chitosan, B – glycerol, C – glutaraldehyd) na dané vlastnosti filmů (obsah dusíku, obsah popelovin, rozpustnost a teplota degradace). Statistická významnost faktorů byla vyhodnocena pomocí Paretova diagramu, regresní rovnice a vrstevnicových diagramů.

Obsah dusíku byl testován pro vstupní materiály a všech 9 filmů. Ze vstupních materiálů měl nejmenší obsah dusíku chitosan 6,9 % a největší obsah čistý keratinový hydrolyzát 15,3 %. U filmů se obsah dusíku pohyboval od 8,0 do 9,4 %. Z těchto výsledků není patrná žádná souvislost mezi přídávky aditiv a výsledky analýz. Z Paretova diagramu bylo zjištěno, že ani jeden z faktorů není statisticky významný. Z podrobnějších vrstevnicových diagramů bylo zjištěno, že větší obsah dusíku mají filmy s obsahem chitosanu okolo 15 %, a nižší obsah dusíku byl zaznamenán u filmů s obsahem glycerolu 60 % a glutaraldehydu 4 – 5 %.

Obsah popelovin byl prováděn u nedialyzovaného a dialyzovaného hydrolyzátu a u všech 9 filmů. V dialyzovaném hydrolyzátu byl obsah popelovin přibližně dvakrát menší. Důvodem bylo čištění hydrolyzátu od nízkomolekulárních složek v průběhu dialýzy. U filmů se obsah popelovin pohyboval okolo 3,7 %, což je o 2 % popelovin méně než obsahuje samotný keratinový hydrolyzát. Z Paretova diagramu bylo zjištěno, že ani jeden z faktorů nedosahuje statisticky významné hodnoty. Z vrstevnicových diagramů poté můžeme konstatovat, že pro menší obsah popelovin je vhodný přírůstek chitosanu okolo 10 %, glycerolu 60 % a glutaraldehydu od 3 do 5 %.

Zkouška rozpustnosti filmů byla provedena u všech 9 filmů v intervalech 30 minut, 60 minut, 120 minut a 240 minut. Pro vyhodnocení statistickou analýzou byla vybraná rozpustnost po 60 minutách. Rozpustnost jednotlivých filmů většinou neodpovídala očekávaným výsledkům, což mohlo být způsobeno velikostí a kvalitou vzorků filmů. Z Paretova diagramu bylo zjištěno, že ke statistické významnosti se nejvíce blíží vliv obsahu glycerolu. Pomocí vrstevnicových diagramů pro vyhodnocení rozpustnosti filmů po době 1 hodiny lze shrnout, že pro snížení rozpustnosti je vhodný přírůstek glutaraldehydu od 0,5 do 3 %, chitosanu 14 – 20 % a obsah glycerolu 40 – 45 %.

Teplota degradace byla testována pro vlnu, chitosan, dialyzovaný a nedialyzovaný vzorek a u všech 9 filmů. U vstupních materiálů docházelo k první ztrátě hmotnosti při cca 100 °C, kdy docházelo k odpařování vlhkosti a k tepelné degradaci docházelo poté při teplotě kolem 250 °C. Chitosan ztrácel svou hmotnost nejvíce a nejrychleji. U všech 9 filmů byl průběh ztráty hmotnosti stejný a teploty degradace se pohybovaly v rozmezí od 155 do 187 °C. Lze konstatovat, že u filmů s obsahem chitosanu 10 % a větším obsahem glutaraldehydu (5 %) a byla teplota degradace vyšší než u filmů s obsahem glutaraldehydu 0,5 %. Pomocí Paretova diagramu bylo zjištěno, že ani jeden z faktorů není statisticky významný, nejbliž se významnosti blížil vliv kombinace chitosanu a glutaraldehydu. Z vrstevnicových diagramů bylo zjištěno, že pro vyšší teploty degradace je vhodný přírůstek chitosanu v rozmezí 13 – 20 %, glycerolu 40 - 50 % a glutaraldehydu od 4 do 5 %.

Závěrem lze konstatovat, že z keratinového hydrolyzátu s chitosanem lze připravit filmy za použití dalších aditiv. Připravené filmy jsou křehké i při vysokém obsahu chitosanu a glycerolu, jejich rozpustnost se pohybuje mezi 55 a 75 % po 1 hodině a filmy jsou stabilní až do teplot mezi 155 a 187 °C. Nejlepší tepelnou stabilitu vykazoval film č. 3, nejlepší odolnost proti rozpouštění měl film č. 2. Pro bližší a detailnější studium vlastností připravených filmů by bylo třeba provést více opakování experimentů nebo další zkoušky.

## 10 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Kornilowicz-Kowalska, Teresa & Bohacz, Justyna. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. *Waste management (New York)* 31. 1689-701. 2001. DOI:10.1016/j.wasman.2011.03.024.
- [2] Reddy, Narendra. *Keratin-Based Biomaterials and Bioproducts*. Smithers Rapra Technology (2017). ISBN: 978-1-910242-87-2.
- [3] Wang, B., Yang, W., McKittrick, J., & Meyers, MA. Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. *Progress in Materials Science*, 76, 229-318. 2016. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2015.06.001
- [4] Kumbar, Sangamesh G. Laurencin, Cato T. Deng, Meng. *Natural and Synthetic Biomedical Polymers - 21.2.2.1 Chitosan*. (pp. 355). Elsevier. 2014. ISBN: 978-0-12-396983-5.
- [5] Mather, Robert R. Wardman, Roger H. *Chemistry of Textile Fibres - 3.2.8.3 Acid*. (pp. 66-75). Royal Society of Chemistry. 2011. ISBN: 978-1-84755-867-1.
- [6] Bragulla HH, Homberger DG. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of Anatomy*. 2009;214(4):516-559. DOI:10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x.
- [7] Paweł STAROŃ, Marcin BANACH, Zygmunt KOWALSKI. Keratin – origins, properties, application. Institute of Inorganic Chemistry and Technology, Cracow University of Technology, Cracow. *CHEMIK* 2011, 65, 10, 1019-10.
- [8] Schmidt, B. (2006), *Proteins: Structure and Function*. By David Whitford.. *ChemBioChem*, 7: 702-703. DOI:10.1002/cbic.200600064
- [9] Pandey, Ashok Höfer, Rainer Larroche, Christian Taherzadeh, et al. *Industrial Biorefineries and White Biotechnology - 18.3.6.4 Botulinum Toxin*. (pp. 636). 2015. ISBN: 978-0-444-63453-5
- [10] Annis, Patricia A. *Understanding and Improving the Durability of Textiles - 8.2.2.1 Wool*. (pp. 148). Woodhead Publishing. 2012. ISBN: 978-0-85709-087-4
- [11] He, et. all. Biodegradation of feather waste keratin by a keratin-degrading strain of *Bacillus subtilis* 8. *Journal of microbiology and biotechnology*. 28. 2018. DOI: 10.4014/jmb.1708.08077
- [12] Ju Wang, et. all. Feather keratin hydrogel for wound repair: Preparation, healing effect and biocompatibility evaluation, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Volume 149, 2017, Pages 341-350. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.10.038>.
- [13] Annis, Patricia A. *Understanding and Improving the Durability of Textiles - 8.2.2.1 Wool*. (pp. 148). Woodhead Publishing. 2012. ISBN978-0-85709-087-4

- [14] Mokrejš, P., Krejčí O., Čermák R., Svoboda P. Optimalizace podmínek enzymové hydrolýzy kuřecího peří. *Chemické listy*. 2013, (107), 709-712.
- [15] Chandrakant R. Holkar, et.all. Valorization of keratin based waste. *Process Safety and Environmental Protection*. Volume 115. 2018. Pages 85-98. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.08.045>.
- [16] Gennadios, A. Protein-based films and coating, CRC Press, 2002, ISBN 15-871-6107-9, 650 s.
- [17] Jennings, J. Amber Bumgardner, Joel D. Chitosan Based Biomaterials, Volume 1 - Fundamentals. Elsevier. 2017. ISBN: 978-0-08-100230-8
- [18] Grumezescu, Alexandru Mihai. Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering - Applications of Nanobiomaterials - 13.1.2.1 Structure-Proprieties Relationship. Elsevier. 2016. ISBN: 978-0-323-42865-1
- [19] Misra, Ambikanandan Shahiwala, Aliasgar. Applications of Polymers in Drug Delivery - 11.6.5 Gelatin. (pp. 392-393). Smithers Rapra. 2014. ISBN: 978-1-84735-851-6
- [20] Ebnesajjad, Sina. Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics - Properties, Processing and Applications - 10.2.3 Proteins. (pp. 201-202). Elsevier. 2013. ISBN: 978-1-4557-2834-3
- [21] Jennings, J. Amber Bumgardner, Joel D.. (2017). Chitosan Based Biomaterials, Volume 2 - Tissue Engineering and Therapeutics - 9.5.1 Viral Capsids and Envelopes. (pp. 246-256). Elsevier. ISBN: 978-0-08-100228-5
- [22] Montemor, M.F.. Smart Composite Coatings and Membranes - Transport, Structural, Environmental and Energy Applications - 9.2.1 Chitosan. (pp. 236-238). Elsevier. 2016. ISBN:978-1-78242-283-9
- [23] Narayan, Roger. Nanobiomaterials - Nanostructured Materials for Biomedical Applications - 2.2.2 Chitosan. (pp. 20-21). Elsevier. 2018. ISBN: 978-0-08-100716-7
- [24] Han, Jung H. . Innovations in Food Packaging - 20.2.2 Chitosan. (pp. 342-344). Elsevier. 2005. ISBN: 978-0-12-311632-1
- [25] Grumezescu, Alexandru Mihai. Food Packaging - Nanotechnology in the Agri-Food Industry, Volume 7 - 16.4.3 Nisin. (pp. 542-543). Elsevier. 2017. ISBN: 978-0-12-804302-8
- [26] Barros-Velázquez, Jorge. Antimicrobial Food Packaging - 47.3 Oregano Essential Oil. (pp. 582-583). Elsevier. 2016. ISBN: 978-0-12-800723-5
- [27] Wypych, George. Self-Healing Materials - Principles & Technology - References.(pp. 155). ChemTec Publishing. 2017. ISBN: 978-1-927885-23-9

- [28] Lagarón, José-María. Multifunctional and Nanoreinforced Polymers for Food Packaging - 14.7.5 Commercial Antimicrobial Systems. (pp. 399-400). Woodhead Publishing. Retrieved, 2011. ISBN: 978-1-84569-738-9
- [29] Sónia P. Miguel, Daniela R. Figueira, Déborah Simões, Maximiano P. Ribeiro, Paula Coutinho, Paula Ferreira, Ilídio J. Correia. Electrospun polymeric nanofibres as wound dressings: A review, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Volume 169. 2018. Pages 60-71. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.05.011>.
- [30] Riva R., et.al. Chitosan and Chitosan Derivatives in Drug Delivery and Tissue Engineering. In: Jayakumar R., Prabakaran M., Muzzarelli R. (eds) *Chitosan for Biomaterials II. Advances in Polymer Science*, vol 244. Springer, Berlin, Heidelberg. 2011. [https://doi.org/10.1007/12\\_2011\\_137](https://doi.org/10.1007/12_2011_137)
- [31] Toshizumi Tanabe, et al. Preparation and characterization of keratin–chitosan composite film. *Biomaterials*, Volume 23, Issue 3, 2002, Pages 817-825. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00187-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00187-9).
- [32] Mingcui Zhai, Yichen Xu, Biao Zhou, Weibin Jing. Keratin-chitosan/n-ZnO nanocomposite hydrogel for antimicrobial treatment of burn wound healing: Characterization and biomedical application. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Elsevier 180 (2018), s. 253-258. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.02.018>.
- [33] A. Sionkowska, J. Skopinska-Wisniewska, A. Planecka, J. Kozłowska. The influence of UV irradiation on the properties of chitosan films containing keratin. *Polym. Degrad. Stab.*, 95 (12) (2010), pp. 2486-2491.
- [35] Enzym Lipex 100T [online] [cit. 2018-05-05]. Dostupné z: <http://www.ncbe.reading.ac.uk/MATERIALS/Enzymes/lipex.html> <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.08.002>
- [34] Chitosan [online] [cit. 2018-05-05]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/419419?lang=en&region=CZ> <http://www.ncbe.reading.ac.uk/MATERIALS/Enzymes/lipex.html>
- [36] Enzym Savinase [online] [cit. 2018-05-05]. Dostupné z: <http://www.ncbe.reading.ac.uk/MATERIALS/Enzymes/savinase.html>
- [37] Enzym Savinase [online] [cit. 2018-05-05]. Dostupné z: <https://biakhim.com.ua/index.php?option=com>
- [38] KREJČÍ, O. Zpracování keratinových odpadů a možnosti aplikací redukováných forem keratinu. Zlín, 2014. Disertační práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.

## 11 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Struktura $\alpha$ -helixů a $\beta$ -listů keratinu .....	14
Obrázek 2 – Disulfidové vazby mezi polymerními řetězci .....	14
Obrázek 3 – Struktura vlákna vlny Merino s průměrem 20 $\mu\text{m}$ .....	15
Obrázek 4 – Peří .....	16
Obrázek 5 – Schéma výroby filmu litím rozpouštědla .....	17
Obrázek 6 – Vzorec chitosanu .....	18
Obrázek 7 – Zdroje chitosanu .....	20
Obrázek 8 – Využití chitosanu.....	21
Obrázek 9 – Promytá, odtučněná, vysušená vlna .....	34
Obrázek 10 – Pomletá vlna .....	35
Obrázek 11 – Zařízení pro přípravu keratinového hydrolyzátu.....	36
Obrázek 12 – Konec alkalicko-enzymové hydrolýzy .....	36
Obrázek 13 – Pevný nerozložený podíl po hydrolýze .....	37
Obrázek 14 – Celulózová membrána naplněná kapalným keratinovým hydrolyzátem .....	37
Obrázek 15 – Vznik prášku keratinového hydrolyzátu .....	39
Obrázek 16 – Mineralizace .....	41
Obrázek 17 – Aparatura Parnas-Wagnerovy destilace .....	42
Obrázek 18 – Změna zbarvení roztoku .....	42
Obrázek 19 – Váženka se vzorkem pro stanovení rozpustnosti .....	43
Obrázek 20 – Přístroj pro měření TGA .....	44
Obrázek 21 – Hmotnostní úbytek vlny při přípravě hydrolyzátu .....	45
Obrázek 22 – Ukázka připravených filmů .....	46
Obrázek 23 – Paretův diagram pro obsah dusíku .....	55
Obrázek 24 – Vrstevnicový diagram – Vliv obsahu Glutaraldehydu a Chitosanu na obsah dusíku .....	56
Obrázek 25 – Vrstevnicový diagram - Vliv obsahu Glycerolu a Chitosanu na obsah dusíku .....	56
Obrázek 26 – Vrstevnicový diagram - Vliv obsahu Glycerolu a Glutaraldehyd na obsah dusíku .....	57
Obrázek 27 – Paretův diagram pro stanovení obsahu popelovin.....	58
Obrázek 28 – Vrstevnicový diagram - Vliv obsahu Glutaraldehydu a Chitosanu na obsah popelovin .....	59
Obrázek 29 – Vrstevnicový diagram – Vliv obsahu Glycerolu a Chitosanu na obsah popelovin .....	59
Obrázek 30 – Vrstevnicový diagram – Vliv obsahu Glycerolu a Glutaraldehydu na obsah popelovin .....	60
Obrázek 31 – Paretův diagram pro rozpustnost po 1 hod.....	61
Obrázek 32 – Vrstevnicový diagram – Vliv obsahu Glutaraldehydu a Chitosanu na rozpustnost po 1 hod.....	62
Obrázek 33 – Vrstevnicový diagram – Vliv obsahu Glycerolu a Chitosanu na rozpustnost po 1 hod.....	62
Obrázek 34 – Vrstevnicový diagram – Vliv obsahu Glycerolu a Glutaraldehyd na rozpustnost po 1 hod.....	63
Obrázek 35 – Paretův diagram tepelné degradace .....	64



---

Obrázek 36 – Vrstevnicový diagram – Vliv obsahu Glutaraldehydu a Chitosanu na tepelnou degradaci .....	65
Obrázek 37 – Vrstevnicový diagram – Vliv obsahu Glycerolu a Chitosanu na tepelnou degradaci.....	65
Obrázek 38 – Vrstevnicový diagram – Vliv obsahu Glycerolu a Glutaraldehydu na tepelnou degradaci .....	66

## 12 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Aminokyselinové složení keratinu z vlny a ptačího peří na 100 g bílkovin....	13
Tabulka 2 – Složení jednotlivých filmů.....	40
Tabulka 3 – Stanovení sušiny prášku keratinového hydrolyzátu .....	47
Tabulka 4 – Stanovení obsahu dusíku .....	47
Tabulka 5 – Vyhodnocení stanovení obsahu dusíku filmů.....	48
Tabulka 6 – Stanovení obsahu popelovin .....	48
Tabulka 7 – Vyhodnocení stanovení obsahu popelovin ve filmech .....	49
Tabulka 8 – Vyhodnocení zkoušky rozpustnosti vzorku filmů .....	49
Tabulka 9 – Teploty degradace.....	54

### 13 SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 – Rozpustnost vzorků filmů po 30, 60, 120 a 240 min.....	50
Graf 2 – Závislost hmotnosti na teplotě pro dané vzorky.....	51
Graf 3 – Závislost hmotnosti a derivace hmotnosti na teplotě pro film č. 3.....	52
Graf 4 – Závislost hmotnosti na teplotě pro filmy č. 1 - 4.....	53
Graf 5 – Závislost hmotnosti na teplotě pro filmy č. 5 - 9.....	53