

Využití keratinových hydrolyzátů

Bc. Jaromír Sova

Diplomová práce
2013

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství polymerů
akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jaromír Sova**
Osobní číslo: **T11021**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství polymerů**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Využití keratinových hydrolyzátů**

Zásady pro vypracování:

Teoretická část práce se bude věnovat dosavadním poznatkům o keratinu, keratinových hydrolyzátech a možnostech jejich využití. Cílem praktické práce bude připravit keratinový hydrolyzát a ověřit jeho praktický aplikační potenciál.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

WOOL, Richard P. Bio-based polymers and composites. Amsterdam: Elsevier Academic Press, c2005, 620 s. ISBN 01-276- 3952-7.

SIMPSON, W a G CRAWSHAW. Wool: science and technology. Cambridge, England: Woodhead, c2002, 368 s. ISBN 08-493- 2820-9.

GENNADIOS, Aristippos. Protein-based films and coatings. Boca Raton: CRC Press, 2002, 650 s. ISBN 15-871-6107-9.

DALEV, Pencho G. Utilisation of waste feathers from poutry slaughter for production of a protein concentrate. Bioresource Technology. 1994, 48(3), 265-267.

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

Datum zadání diplomové práce: **11. února 2013**

Termín odevzdání diplomové práce: **17. května 2013**

Ve Zlíně dne 11. února 2013


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Sova Jaromír


Obor: Inženýrství polymerů

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 2. 5. 2013



.....

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

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

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlédnutí 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.

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá poznatky o keratinu, keratinových hydrolyzátech a možnostech jejich využití. Dále představuje praktickou přípravu keratinového hydrolyzátu a ověřuje možnost přípravy materiálů z tohoto hydrolyzátu.

Klíčová slova: keratin, keratinový hydrolyzát.

ABSTRACT

This work deals with the knowledge of keratin, keratin hydrolysates and possibilities of their use. Furthermore, a practical preparation of keratin hydrolyzate and verifies the possibility of preparing materials from this hydrolyzate.

Keywords: keratin, keratin hydrolyzate.

Děkuji ing. Ondřeji Krejčímu za jeho pomoc.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 KERATIN	12
1.1 VÝSKYT A ZÁKLADNÍ VLASTNOSTI KERATINU.....	12
1.2 AMINOKYSELINOVÉ SLOŽENÍ KERATINU	12
1.3 STRUKTURA KERATINU	15
1.3.1 Primární struktura.....	15
1.3.2 Sekundární struktura	16
1.3.3 Terciální struktura	18
1.3.4 Kvarterní struktura	19
1.4 SCHÉMA CHEMICKÝCH VAZEB KERATINU	20
1.5 CHEMICKÉ REAKCE KERATINU A PŘÍKLADY ZPRACOVATELSKÝCH POSTUPŮ	21
1.5.1 Denaturace působením tepla	21
1.5.2 Hydrolýza	21
1.5.3 Reakce působením alkálií (jiné alkalické hydrolýzy, než výše uvedené).....	28
1.5.4 Oxidace	30
1.5.5 Redukce.....	34
1.5.6 Reakce vedoucí k síťování bílkovin.....	36
1.6 KERATIN JAKO VEDLEJŠÍ PRODUKT	42
II PRAKTICKÁ ČÁST	44
2 CÍLE A POSTUPY PRAKTICKÉ ČÁSTI	45
2.1 PŘÍPRAVA KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU.....	45
2.2 PŘÍPRAVA KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU BEZ OHŘEVU SMĚSI.....	47
2.3 ROZPUSTNOST KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU	48
2.4 DIALÝZA KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU	48
2.5 PŘÍPRAVA FOLIÍ Z KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU	49
2.6 PŘÍPRAVA FOLIÍ Z KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU S TEPELNOU EXPOZICÍ	55
2.7 MĚŘENÍ KERATINOVÝCH FOLIÍ POMOCÍ DIFERENČNÍ SKENOVACÍ KALORIMETRIE	55
2.8 MĚŘENÍ KERATINOVÝCH FOLIÍ POMOCÍ INFRAČERVENÉ SPEKTROSKOPIE S FOURIEROVOU TRANSFORMACÍ	56
3 VÝSLEDKY EXPERIMENTŮ	57

3.1	VÝSLEDKY PŘÍPRAVY KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ.....	57
3.2	VÝSLEDKY PŘÍPRAVY KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU BEZ OHŘEVU SMĚSI.....	59
3.3	VÝSLEDKY ROZPUSTNOSTI KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU	60
3.4	VÝSLEDKY DIALÝZY KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU.....	60
3.5	VÝSLEDKY PŘÍPRAVY FOLIÍ Z KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU	61
3.6	VÝSLEDKY PŘÍPRAVY FOLIÍ Z KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU S TEPELNOU EXPOZICÍ.....	64
3.7	VÝSLEDKY MĚŘENÍ KERATINOVÝCH FOLIÍ POMOCÍ DIFERENČNÍ SKENOVACÍ KALORIMETRIE	65
3.8	VÝSLEDKY MĚŘENÍ KERATINOVÝCH FOLIÍ POMOCÍ INFRAČERVENÉ SPEKTROSKOPIE S FOURIEROVOU TRANSFORMACÍ.....	67
ZÁVĚR		73
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....		76
SEZNAM OBRÁZKŮ		79
SEZNAM TABULEK.....		81
SEZNAM SCHÉMAT		82

ÚVOD

Lidský život zásadním způsobem ovlivňují energetické a surovinové zdroje a zatím všechny okolnosti nasvědčují tomu, že otázka jak získat energii a suroviny bude nabývat na důležitosti.

Jen těžko si lze představit nejbližší budoucnost bez fosilních zdrojů, které nyní pokrývají největší část energetické a surovinové spotřeby lidstva. Je však pravděpodobné, že naše blízká budoucnost směřuje jednak k radikálnímu šetření s fosilními zdroji a také k rozmanitějšímu složení energetických a surovinových zdrojů.

Keratin nejspíše nebude tím materiálem, který by měl potenciál konkurovat současným materiálům. I přes to, má smysl se jím zabývat. Keratin by mohl být malou částí tvořící budoucí mozaiku našich materiálových zdrojů. Jeho výhoda a potenciál, je především v tom, že je to materiál přírodní, tedy obnovitelný (recentní), v přírodě zcela rozložitelný. Jeho další výhoda a potenciál je v tom, že je to materiál odpadní (druhotný). Tedy materiál, který je produkován lidskou činností bez ohledu na to co se s ním dále děje. Je-li dále nějak využit, nebo jestli je jen obtížným odpadem. Není zapotřebí ho tedy získávat předchozí zemědělskou činností a vytvářet tím další tlak na zemědělsky obhospodařovanou půdu. Tlak ve smyslu toho, jak tuto cennou půdu využít a čemu dát přednost. Jestli na ní pěstovat zemědělské plodiny jako zdroj lidské výživy. Nebo na ní pěstovat zemědělské plodiny jako surovinové zdroje. Anebo na ní rozmístit fotovoltaické panely. Je také třeba říci, že je to odpadní materiál, kterého vzniká poměrně velké množství. A dále, že je to materiál mající zajímavé fyzikální a chemické vlastnosti. To vše pak představuje dle mého názoru dobrý důvod, proč se keratinem zabývat.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KERATIN

1.1 Výskyt a základní vlastnosti keratinu

Keratin je mechanicky odolný a chemicky nereaktivní protein, vyskytující se u všech vyšších obratlovců. Je hlavní složkou jejich vnější rohovité epidermální vrstvy (pokožky, epidermis) a také biologických útvarů z ní vyrůstajících, jako jsou vlasy, chlupy, rohovina, nehty a peří. Keratiny rozdělujeme na α -keratiny, které se vyskytují u savců, a β -keratiny, vyskytující se u ptáků a plazů. [1]

Keratin však nemůžeme považovat pouze za jedinou bílkovinu. Pod tímto názvem je možné si spíše představit biologické útvary (nejčastěji pokožku, vlasy, chlupy, nehty, rohovinu a peří) vytvořené z odlišných bílkovin. Tyto bílkoviny však mají mnohé společné znaky, které tak dovolují uvádět tyto proteiny zjednodušeně pod společným názvem keratin (keratiny). [2]

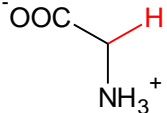
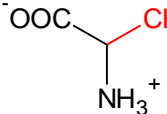
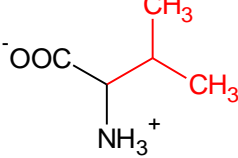
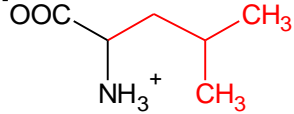
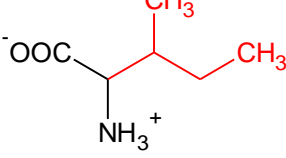
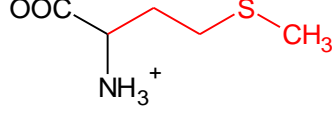
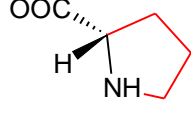
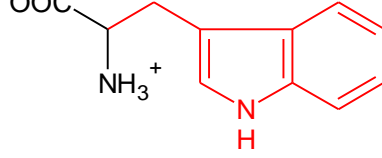
Keratin se vyznačuje vysokým obsahem cystinu, kyseliny glutamové a serinu. Redukovaný cystin (tedy cystein), není pak v keratinu prakticky vůbec zastoupen. [3]

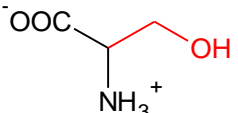
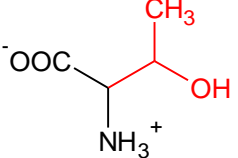
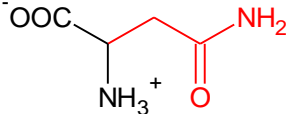
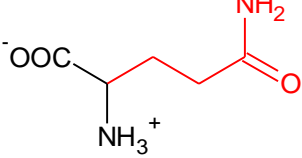
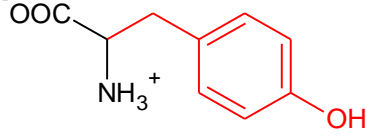
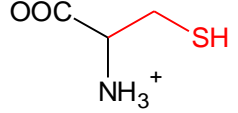
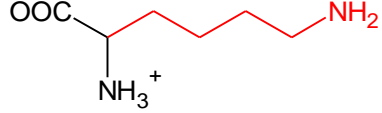
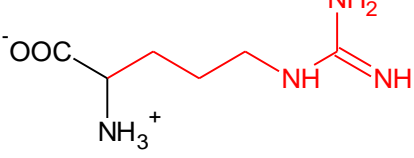
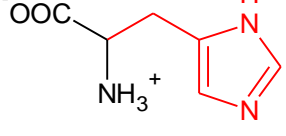
Keratin je bohatý na síru obsaženou v aminokyselinových zbytcích cysteinu. Tyto aminokyselinové části však nejsou volné, ale spojují navzájem příčnými disulfidickými vazbami sousední makromolekulární řetězce (za tvorby cystinu). Dochází tak k chemickému zesíťování makromolekulárních řetězců, přičemž hustota zesíťování je proměnlivá podle obsahu cystinu v daném keratinu. Tím jsou vysvětleny dvě nejdůležitější biologické vlastnosti keratinu, tedy jeho chemická a mechanická odolnost. Keratiny mohou být tvrdé nebo měkké, podle toho jak velký je v nich obsah cystinu. Tvrdé keratiny vlasů, nehtů a rohoviny jsou pak méně pružné než měkké keratiny kůže a mozolů. [1]

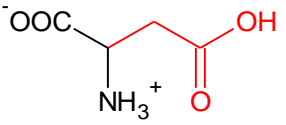
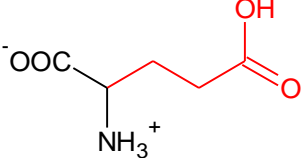
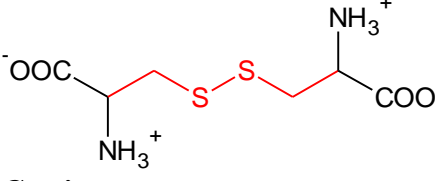
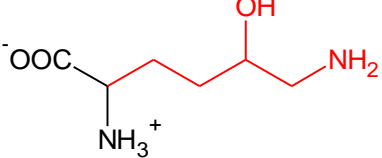
1.2 Aminokyselinové složení keratinu

Množství jednotlivých aminokyselin v keratinu se liší nejen podle biologického útvaru a živočišného druhu, ze kterého daný keratin pochází. Liší se i podle plemen stejného živočišného druhu, podle potravy a životního prostředí. Aminokyselinové složení také může být různé v jednotlivých částech stejného biologického útvaru. [4]

Tabulka 1: Aminokyselinové složení keratinů [g/100 g] [5]

	Lidská pokožka	Lidský vlas	Ovčí vlna	Kuřecí peří	
Aminokyseliny s nepolárním postranním řetězcem	 Glycin	6-13,8	4,1-4,2	5,2-6,5	7,2
	 Alanin	-	2,8	3,4-4,4	5,4
	 Valin	4,2-5,6	5,5-5,9	5,0-5,9	8,3-8,8
	 Leucin	8,3	6,4-8,3	7,6-8,1	7,4-8,0
	 Isoleucin	6,8	4,7-4,8	3,1-4,5	5,3-6,0
	 Methionin	1,0-2,5	0,7-1,0	0,5-0,7	0,4-0,5
	 Prolin	3,2	4,3-9,6	5,3-8,1	8,8-10,0
	 Tryptofan	0,5-1,8	0,4-1,3	1,8-2,1	0,7

Aminokyseliny s nenabíým postranním řetězcem	 <p>Serin</p>	16,5	7,4-10,6	7,2-9,5	10,2-14
	 <p>Threonin</p>	3,4	7,0-8,5	6,6-6,7	4,4-4,8
	 <p>Asparagin</p>	Hodnoty pro volnou kyselinu asparagovou a její amid asparagin jsou uvedeny společně.			
	 <p>Glutamin</p>	Hodnoty pro volnou kyselinu glutamovou a její amid glutamin jsou uvedeny společně.			
	 <p>Tyrosin</p>	3,4-5,7	2,2-3,0	4,0-6,4	2,0-2,2
	 <p>Cystein</p>	-	0,5-0,8	0,4	0,4
Aminokyseliny s nabíým postranním řetězcem, bazické	 <p>Lysin</p>	3,1-6,9	1,9-3,1	2,8-3,3	1,0-1,7
	 <p>Arginin</p>	5,9-11,7	8,9-10,8	9,2-10,6	6,5-7,5
	 <p>Histidin</p>	0,6-1,8	0,6-1,2	0,7-1,1	0,3-0,7

Aminokyseliny s nabitým postranním řetězcem, kyselé	 Asparagová kyselina	6,4-8,1	3,9-7,7	6,4-7,3	5,8-7,5
	 Glutamová kyselina	9,1-15,4	13,6-14,2	13,1-16,0	9,0-9,7
	 Cystin	2,3-3,8	16,6-18,0	11-13,7	6,8-8,2
	 Hydroxylysin	-	0	0,2	-
	Celkový dusík	14,2-15,5	15,5-16,9	16,2-16,9	15,0-16,2
Amidový dusík	1,16	1,17	1,10-1,37	1,09	
Celková síra	1,9	5,0-5,24	3,0-4,0	2,9	

1.3 Struktura keratinu

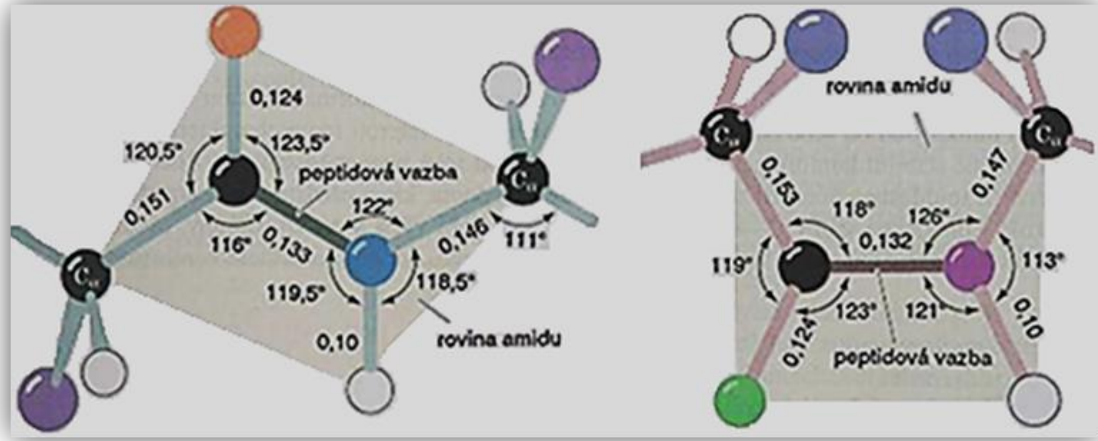
Funkce proteinů je neoddělitelně spojena s jejich strukturou. Strukturu proteinů a dalších polymerů tradičně popisujeme z hlediska čtyř úrovní organizace.

1.3.1 Primární struktura

Primární struktura proteinů je dána pořadím (sekvencí) jednotlivých aminokyselin v polypeptidickém řetězci (konfigurací). [3]

Proteiny jsou makromolekulární látky, tedy látky vznikají spojením velkého počtu opakujících se částí – merů. V případě proteinů jsou těmito opakujícími se částmi alfa-L-aminokyseliny spojené navzájem kovalentní peptidovou vazbou. Peptidová vazba má rigidní rovinnou strukturu. Forma trans vysoce převažuje nad formou cis, která je stericky

nevýhodná. Peptidová vazba C – N je o 14 pm kratší než jednoduchá vazba C – N. Vazba C = O je o 2 pm delší než u aldehydů a ketonů. [1]



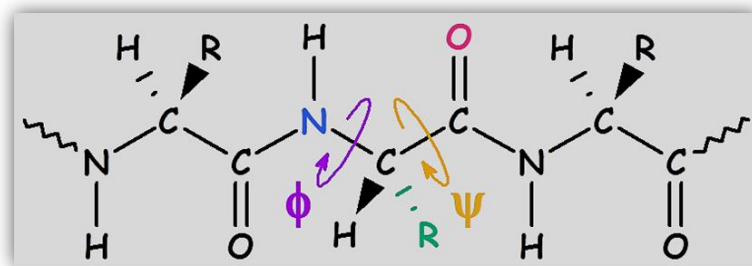
Obr. 1: Peptidová vazba (konfigurace trans a cis) [1]

1.3.2 Sekundární struktura

Sekundární struktura je prostorové uspořádání (konformace) v určitém místě hlavního polypeptidového řetězce bez ohledu na jeho postranní řetězce. [1]

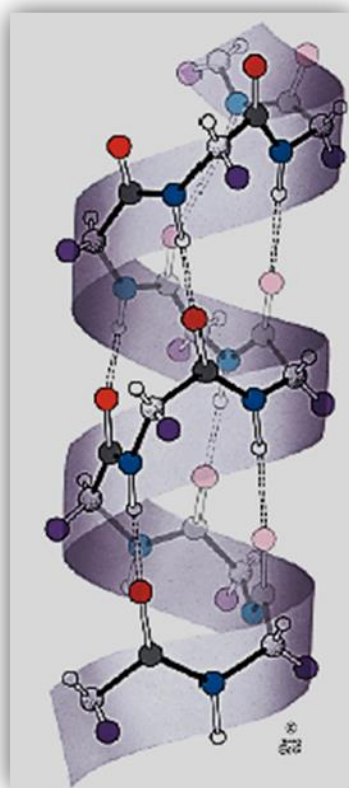
Určuje tedy vzájemné prostorové uspořádání dvou sousedních jednotek řetězce. Neurčuje však celkové prostorové uspořádání makromolekuly, ale jen lokální prostorové uspořádání hlavních atomů řetězce v základním segmentu bez přihlédnutí k postranním řetězcům. [3]

Vazba C – N v peptidické vazbě není volně otočná a má rovinnou strukturu. Po stranách však zůstávají dva vnitřní rotační (torzní) úhly které umožňují vznik určité konformace. ϕ (fi) je torzní úhel kolem vazby mezi dusíkem a α -uhlíkem. ψ (psi) je torzní úhel mezi α -uhlíkem a uhlíkem karbonylu. [1]



Obr. 2: Torzní úhly polypeptidu [6]

α -helix konformace polypeptidů je model, který navrhl Pauling v roce 1951 a je milníkem strukturní biochemie. Představuje strukturu polypeptidu sestaveného z L- α -aminokyselin mající konformaci pravotočivé šroubovice, kdy jeden závit tvoří 3,6 aminokyselinových zbytků a výška závitů je 0,54 nm. Torzní úhly $\varphi = -57^\circ$ a $\psi = -47^\circ$. Přičemž skupina C = O peptidové vazby n-tého zbytku směřuje ke skupině N – H peptidové vazby (n+4)-tého zbytku. Tak vznikne pevný vodíkový můstek. Jádru α -helixu je těsně stočeno, takže jeho atomy se dotýkají svými van der Waalsovými povrchy, čímž je jejich asociační energie maximální. Postranní řetězce směřují ven ze šroubovice. [1]

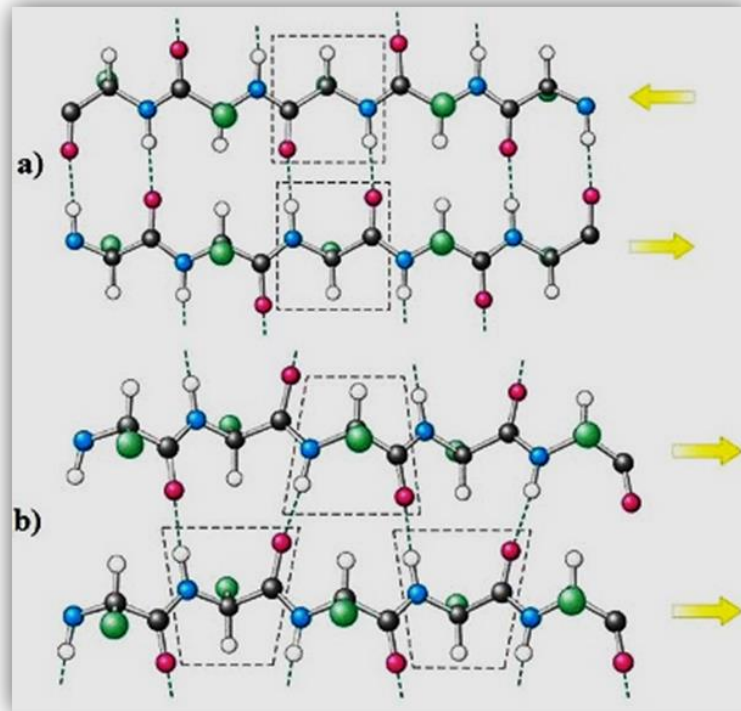


Obr. 3: α -helix struktura [1]

β -struktura nazývaná také skládaný list nebo β -hřeben je další strukturou polypeptidu, kterou v roce 1951 navrhli Pauling a Corey. V této struktuře se vodíkové můstky vyskytují spíše mezi sousedními polypeptidovými řetězci, než uvnitř téhož řetězce, jak je to v případě α -helixu. [1]

Skládaný list může mít dvě varianty. Řetězce mohou jít proti sobě – antiparalelní skládaný list, nebo souběžně - paralelní. V případě antiparalelního β -listu jsou NH a CO skupiny každé aminokyseliny spojeny vodíkovou vazbou s CO a NH skupinami sousedního řetězce.

V paralelní struktuře je NH skupina každé aminokyseliny vázána vodíkovou vazbou na CO skupinu aminokyseliny sousedního řetězce, zatímco CO skupina je vázána vodíkovou vazbou s NH skupinou aminokyseliny sousedního řetězce o dvě aminokyseliny dále. [6]



Obr. 4: β -struktura, skládaný list (a-antiparalelní, b-paralelní) [6]

Výše popsaná α -struktura se vyskytuje v keratinu savců. V peří ptáků se pak vyskytuje β -struktura. [1]

1.3.3 Terciální struktura

Terciální struktura bílkovin udává prostorové uspořádání všech atomů polypeptidického řetězce a tím tedy celkový tvar polypeptidického řetězce, který v prostoru zaujímá.

Podle terciální struktury se bílkoviny dělí na dva extrémní typy. Fibrilární (vláknité) proteiny mají silně protáhlé molekuly. Jsou charakterizovány tvarem prutů (tyčinek) a pláství. Je to pak také struktura charakteristická pro výše popsané uspořádané struktury α a β .

Globulární (klubkovité) proteiny jsou neuspořádané struktury, které jsou charakterizovány klubkem a odpovídají náhodnému svinutí. Většina bílkovin se však nedá zařadit do popsaných extrémních typů a je charakterizována určitým podílem uspořádané a neuspořádané struktury. [3]

1.3.4 Kvarterní struktura

Kvarterní struktura bílkovin vzniká sdružením jednotlivých polypeptidových řetězců ve vyšší, molekulární celek. Toto spojení je realizováno nejčastěji intermolekulárními nekovaletními vazbami. [3]

V biochemii (Voet, D., Voetová, J. G.) je α -keratin označen jako helix helixů. Jeho sekundární struktura je tvořena pravotočivou šroubovicí α -helix a terciální struktura je fibrilární (vláknitá). Příkladem vyšších struktur keratinu je vlas. Má průměr asi 20 μm a tvoří ho mrtvé buňky. Buňky obsahují svinuté makrofibrily o průměru 200 nm. Makrofibrily jsou složeny z mikrofibril o průměru 8 nm. Mikrofibrily se pak skládají z protofibril o průměru 2 nm, přičemž devět protofibril je usprádané v kruhu po obvodě mikrofibrily a dvě tvoří jádro tohoto útvaru. Každá z protofibril α -keratinu se skládá ze dvou párů těsně spojených α -helixů, tedy vlastně ze dvou nadšroubovic (superhelixů). [1]



Obr. 5: Struktura keratinu ve vlasu [1]

1.4 Schéma chemických vazeb keratinu

V keratinu se uplatňuje několik druhů chemických vazeb. Podle těchto chemických vazeb lze usuzovat na možné chemické reakce keratinu. Tyto chemické reakce pak otevírají cesty pro případné zpracovatelské postupy.

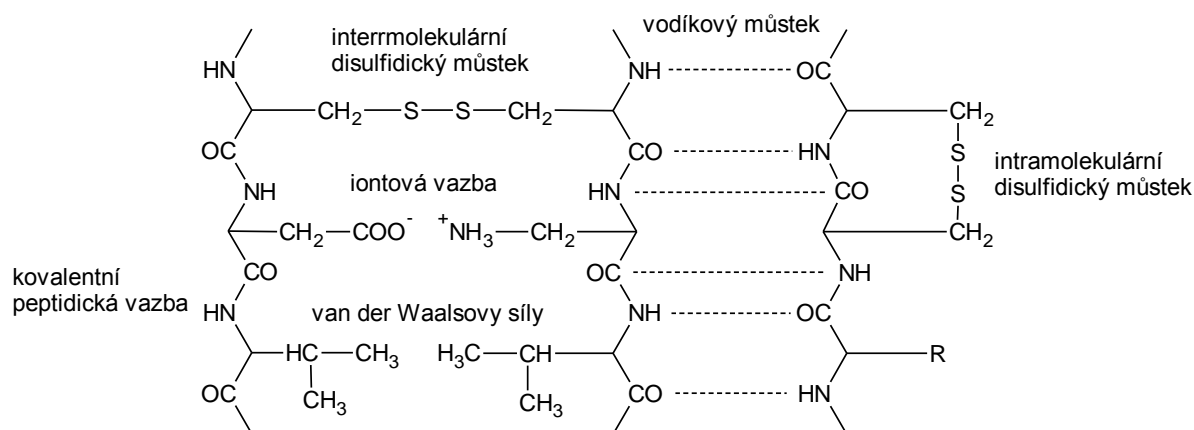
Kovalentní polypeptidická vazba spojuje aminokyseliny do hlavního makromolekulárního řetězce keratinu.

Kovalentní vazba disulfidického můstku cystinu může být intramolekulární nebo častěji intermolekulárně spojuje dva polypeptidické řetězce mezi sebou. [4]

Vodíkové můstky jsou jednak intramolekulární ve struktuře α (α -helix šroubovici) a také intermolekulární ve struktuře β (β -skládaného listu). Vznik dalších vodíkových můstků však umožňují i jiné zastoupené aminokyseliny s polární skupinou (alkoholické a fenolické skupiny). Vodíkové můstky mají silnou afinitu k polárním látkám a umožňují tak vázat například značné množství vody. [1-4]

Iontová vazba (elektrostatická vazba) vzniká mezi postranními amino skupinami a karboxylovými skupinami. Aminokyseliny s bazickými skupinami (diaminokarboxylové kyseliny) váží pak iontově nejen karboxylové skupiny sousedních řetězců, ale i cizích látek. Podobně aminokyseliny s kyselými skupinami (monoaminodikarboxylové kyseliny) váží pak iontově nejen zásadité skupiny sousedních řetězců, ale i cizích látek.

Van der Waalsovy síly jsou další slabé interakce, které kromě již zmíněných vodíkových můstků působí v keratinu. [4]



Obr. 6: Schéma vazeb vyskytujících se v keratinu [4]

1.5 Chemické reakce keratinu a příklady zpracovatelských postupů

Od výše popsaných chemických vazeb se odvíjí možné chemické reakce keratinu. Tyto reakce pak otevírají cestu pro možné zpracovatelské postupy keratinu a jeho využití v technické praxi.

1.5.1 Denaturace působením tepla

Zahřátím proteinu na T_m (analogie s teplotou tání pevných látek) dochází k porušení mezimolekulárních vazeb, které udržují protein v nativní (přirozené) konformaci. Většina proteinů má pak hodnotu T_m nižší než 100 °C. Dochází k destrukci nativní konformace a zhroucení makromolekuly proteinu do neuspořádaného klubka. [1]

Příklad 1:

Biologický materiál obsahující keratin je zpracován při teplotě 146 °C a tlaku 345 kPa po dobu 30 až 70 minut.

Tyto podmínky vedou ke změnám v nativní prostorové struktuře keratinu. Dochází ke štěpení mezimolekulárních vazeb včetně disulfidických vazeb cystinu. Takto denaturovaný keratin je již hydrolyzovatelný enzymy, včetně trávicích enzymů zvířat na jednotlivé aminokyseliny. [7]

1.5.2 Hydrolýza

Rozkladná reakce působením vody a katalyzovaná kyselým prostředím, zásaditým prostředím nebo působením enzymů. Hydrolýza je destruktivní reakce pro bílkoviny charakteristická, stejně jako pro další makromolekulární látky vzniklé polykondenzací. Stupeň hydrolytického štěpení je závislý na konkrétních reakčních podmínkách. Obecně pak je alkalická hydrolýza proti kyselé hydrolýze účinnější. [8]

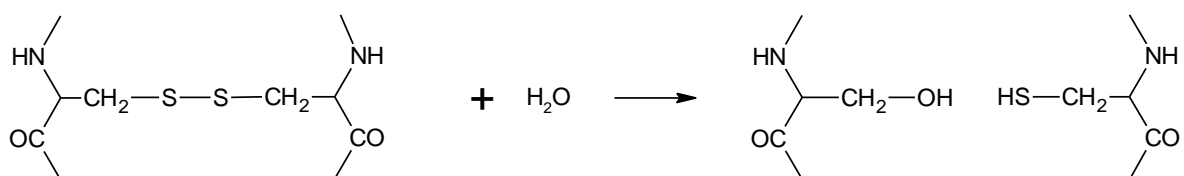


Schéma 1: Hydrolýza disulfidické vazby keratinu [9]

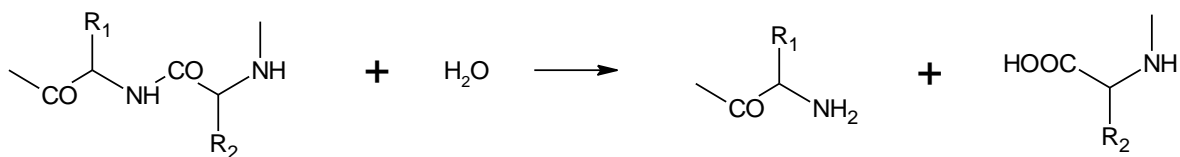


Schéma 2: Hydrolýza polypeptidické vazby [8]

Příklad 2:

Jako základní biologický materiál byla použita rohovina. Vstupní materiál byl vyprán ve vodě, vysušen a pomlet. 50g pomletých rohů bylo smícháno se 75ml 6N H₂SO₄. Reakční směs byla vyhřáta na teplotu 70 °C a na této teplotě udržována po dobu 24 hodin. Po uplynutí této doby bylo ke směsi přidáno 100 ml demineralizované vody a směs byla vyhřáta na teplotu 130 °C a na této teplotě udržována po dobu 4 hodin. Získaný roztok byl zchlazen a pH roztoku bylo upraveno 5N Mg(OH)₂ na hodnotu 7. Výsledný roztok byl zfiltrován.

Z původních 50 g materiálu bylo tímto postupem hydrolyzováno 42 g. [10-11]

Příklad 3:

Jako základní biologický materiál byla použita vlna. Ta byla smíchána s kyselinou peroctovou (200 % v/w na hmotnost vlny). Reakční směs byla vyhřáta na 40 °C a na této teplotě udržována 24 hodin. Poté bylo pH upraveno roztokem amoniaku na hodnotu 8 (odstranění kyseliny sulfenové). Následovala kyselá hydrolyza 6M HCl, teplota 110 °C, reakční čas 24 hodin. Pro stanovení methioninu a cysteinu byla provedena oxidační hydrolyza za použití kyseliny mravenčí a peroxidu vodíku 9:1.

Cílem této práce bylo stanovit aminokyselinové složení a molekulovou hmotnost přípravného keratinového hydrolyzátu. Následující tabulka pak nabízí zajímavé srovnání s tabulkou 3 a také s tabulkou 1. [12]

Tabulka 2: Aminokyselinové složení keratinového hydrolyzátu dle příkladu 3 [12]

	průměrná hodnota [g/kg]	směrodatná odchylka	variační koeficient
Cystein	5,60	2,76	4,63 %
Methionin	16,46	0,93	5,64 %
Kyselina asparagová	106,75	1,75	1,64 %
Threonin	52,73	0,97	1,83 %

Serin	55,20	1,03	1,87 %
Kyselina glutamová	148,85	7,44	5,00 %
Prolin	36,43	0,99	2,71 %
Glycin	36,33	0,76	2,10 %
Alanin	45,01	0,81	1,80 %
Valin	56,43	1,25	2,21 %
Isoleucin	38,27	0,72	1,89 %
Leucin	92,17	4,46	4,62 %
Tyrosin	24,70	1,63	6,58 %
Fenylalanin	32,10	0,79	2,46 %
Histidin	12,60	1,00	7,92 %
Lysin	42,70	0,99	2,31 %
Arginin	108,28	2,47	2,28 %

Keratinový hydrolyzát vykazoval velmi širokou distribuci molekulových hmotností. Střední molekulová hmotnost hydrolyzátu MW = 18000. [12]

Příklad 4:

Jako základní biologický materiál byla použita ovčí vlna. 10 g vlny bylo smícháno se 100 ml 0,15 M KOH a 0,05 M NaOH a zahřáto v autoklávu na teplotu 120 °C. Na této teplotě byla směs udržována 20 minut. Reakční směs byla odstředěna (4000 otáček/min po dobu 20 minut). Odstředěný roztok byl zahuštěn v rotační vakuové odparce a vysušen při teplotě 70 °C. Výtěžnost při tomto postupu alkalické hydrolýzy byla 82 %. [13]

Příklad 5:

Jako základní biologický materiál bylo použito peří. Vstupní materiál byl několikrát vyprán ve vodě, vysušen, rozemlet a proset přes síto o velikosti ok 2 mm. Jako reakční činidlo byl použit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ o maximální koncentraci 0,4 g na gram vysušeného materiálu. Hydrolýza byla provedena v autoklávu s mícháním (1000 rpm). Při teplotě 105 °C bylo během 25 minut rozpuštěno 80 % peří a během 3 hodin bylo rozpuštěno 95 % peří. [14]

Příklad 6:

Jako základní biologický materiál byla použita vlna. Tato byla mechanicky zbavena viditelných nečistot, proprána v 1 % - ním roztoku Na_2CO_3 , proprána v roztoku jaru a na závěr proprána v čisté vodě.

Vlna byla enzymově odtučněna: 30 g vlny bylo smícháno s 2000 ml vody a 1,5 g enzymu Greasex 50L. 1 % - ním roztokem NaOH bylo upraveno pH směsi na hodnotu 9,0. Směs byla vyhřáta na teplotu 40 °C a na této teplotě udržována 24 hodin s občasným promícháním. Odtučněná vlna byla proprána teplou vodou, vysušena při 103 °C a nastříhaná na malé kousky o délce do 5 mm.

1. fáze (předzpracování): 2 g odtučněné vlny byly smíchány se 100 ml 0,1 M roztoku 2-merkptoethanolu. Směs byla vyhřáta na teplotu 50 °C a na této teplotě udržována 24 hodin s občasným promícháním.

2. fáze (enzymová hydrolyza): pH směsi bylo upraveno na 8,8 – 9,2 přidavkem NaOH. Do této směsi byly přidány 4 % (na sušinu vlny) enzymu Savinase Ultra 16L. Směs byla vyhřáta na 60 °C a na této teplotě byla udržována 14 hodin.

Při těchto reakčních podmínkách bylo z navážky 2,0159 g sušiny vlny získáno 1,7292g keratinového hydrolyzátu a 0,2365 g nerozložené vlny, což je 11,73 %. [15]

Příklad 7:

Jako základní biologický materiál byla použita vlna. Tato byla vyprána, zbavena nečistot a enzymově odtučněna enzymem Greasex 50L.

1. fáze (předzpracování) byla provedena v 0,1 M roztoku 2-merkptoethanolu.

2. fáze (enzymová hydrolyza) byla provedena enzymem Savinase Ultra 16L.

Cílem této práce bylo stanovit aminokyselinové složení a molekulovou hmotnost připraveného keratinového hydrolyzátu. Následující tabulka pak nabízí zajímavé srovnání s tabulkou 2 a také s tabulkou 1. [12]

Tabulka 3: Aminokyselinové složení keratinového hydrolyzátu dle příkladu 7 [12]

	průměrná hodnota [g/kg]	směrodatná odchylka	variační koeficient
Cystein	52,82	2,90	5,49 %
Methionin	5,93	0,48	8,10 %
Kyselina asparagová	51,73	0,95	1,85 %
Threonin	43,53	1,37	3,14 %
Serin	51,09	1,41	2,75 %
Kyselina glutamová	84,95	1,17	1,38 %
Prolin	45,71	0,35	0,76 %
Glycin	37,10	0,68	1,85 %
Alanin	26,15	0,56	2,14 %
Valin	38,47	0,69	1,78 %
Isoleucin	22,35	0,32	1,44 %
Leucin	53,87	0,77	1,43 %
Tyrosin	29,90	0,40	1,35 %
Fenylalanin	24,26	0,30	1,22 %
Histidin	11,52	0,35	3,08 %
Lysin	19,43	0,45	2,31 %
Arginin	69,50	0,95	1,36 %

Keratinový hydrolyzáat vykazoval velmi širokou distribuci molekulových hmotností. Střední molekulová hmotnost hydrolyzátu MW = 3000. [12]

Příklad 8:

Jako základní biologický materiál bylo použito peří. Toto bylo rozstříháno na malé kousky, mechanicky zbaveno nečistot, vyprané v 1 % - ním roztoku Na₂CO₃, vyprané v roztoku jaru a vyprané v čisté vodě.

Peří bylo enzymově odtučněno: 30 g peří bylo smícháno s 2000ml vody a 1,5 g enzymu Greasex 50 L. 1 % - ním roztokem NaOH bylo upraveno pH směsi na hodnotu 9,0. Směs byla vyhřáta na teplotu 40 °C a na této teplotě udržována 24 hodin s občasným promícháním. Odtučněné peří bylo propráno teplou vodou, vysušeno při 103 °C a nastříháno na malé kousky o délce do 5 mm.

1. fáze (předzpracování): 2 g odtučněného peří byly smíchány se 100 ml 0,4 M roztoku 2-merkptoethanolu. Směs byla vyhřáta na teplotu 70 °C a na této teplotě udržována 48 hodin s občasným promícháním.

2. fáze (enzymová hydrolýza): pH směsi bylo upraveno na 8,8 – 9,2 přidavkem NaOH. Do této směsi bylo přidáno 6 % (na sušinu peří) enzymu Savinase Ultra 16 L. Směs byla vyhřáta na 50 °C a na této teplotě byla udržována 8 hodin.

Při těchto reakčních podmínkách byla účinnost rozkladu 99,91 %. Při zachování pak stejných reakčních podmínek 2. fáze a navážky pouze 2 % enzymu na sušinu peří byla účinnost rozkladu 97,24 %. [16]

Příklad 9:

Jako základní biologický materiál bylo použito peří. Toto bylo rozstříháno na malé kousky, mechanicky zbaveno nečistot, vyprané v 1 % - ním roztoku Na₂CO₃, vyprané v roztoku jaru a vyprané v čisté vodě.

Peří bylo enzymově odtučněno: 90 g peří bylo smícháno s 6,66 l vody a 1,5 g enzymu Greasex 50 L. 1 % - ním roztokem NaOH bylo upraveno pH směsi na hodnotu 9,0. Směs byla vyhřáta na teplotu 40 °C a na této teplotě udržována 24 hodin s občasným promícháním. Odtučněné peří bylo popráno teplou vodou, vysušeno při 103 °C a nastříháno na malé kousky o délce do 5 mm.

1. fáze (předzpracování): 2 g odtučněného peří byly smíchány se 100 ml 0,3 % roztoku KOH. Směs byla vyhřáta na teplotu 80 °C a na této udržována 24 hodin s občasným promícháním.

2. fáze (enzymová hydrolýza): pH směsi bylo upraveno na 8,8 – 9,2 přidavkem H₃PO₄. Do této směsi byl přidán enzym Savinase Ultra 16 L nebo enzym Polarzyme 12 L. Směs byla vyhřáta a udržována na teplotě. [17]

Tabulka 4: Dosažené výsledky při použití enzymu Savinase Ultra 16 L (% vztažena na sušinu peří) [17]

Doba 2. stupně rozkladu (h)	Teplota 2. stupně rozkladu (°C)	Dávka enzymu (%)	Rozložené peří (%)
8	50	1	78,54
8	50	5	88,15
8	70	1	87,15
8	70	5	90,83

Tabulka 5: Dosažené výsledky při použití enzymu Polarzyme 12 L (% vztažena na sušinu peří) [17]

Doba 2. stupně rozkladu (h)	Teplota 2. stupně rozkladu (°C)	Dávka enzymu (%)	Rozložené peří (%)
8	30	1	75,67
8	30	5	82,29
8	50	1	83,77
8	50	5	88,71

Příklad 10:

Jako základní biologický materiál byla použita vlna. Tato byla nejdříve mechanicky zbavena viditelných nečistot a proprána ve vodě. 150 g vlny bylo smícháno se 7500 ml vody a 5N roztokem NaOH bylo upraveno pH směsi na hodnotu 8,0 (původní pH vlny bylo kyselé cca pH = 5,8).

Vlna byla enzymově odtučněna: ke směsi vlny bylo přidáno 1,5 g enzymu Lipex 100 T, směs byla vyhřáta na teplotu 40 °C a na této teplotě byla udržována 24 hodin za občasného promíchání. Odtučněná vlna byla důkladně proprána vodou, vysušena při 103±2 °C po dobu 3 hodin, opět proprána vodou a vysušena při 103 °C po dobu 24 hodin. Vysušená vlna byla pomleta na kousky o délce do 5mm.

1. fáze (předzpracování): 10 g odtučněné vlny bylo smícháno se 150 ml 0,6 % $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (0,9 g hydroxidu vápenatého). Směs byla vyhřáta na 80 °C a na této teplotě udržována 24 hodin, přičemž prvních 6 hodin byla míchána.

2. fáze (enzymová hydrolýza): pH směsi bylo upraveno na $9,0 \pm 0,1$ přidáním 5 % - ní HCl. Do této směsi bylo přidáno 0,5 g (5%, vztaženo na hmotnost suché vlny) enzymu Evarlase 6.0 T. Směs byla vyhřáta na 60 °C a na této teplotě udržována 24 hodin, přičemž prvních 6 hodin byla míchána.

Při těchto reakčních podmínkách byla účinnost rozkladu 62,86%. [18]

Příklad 11:

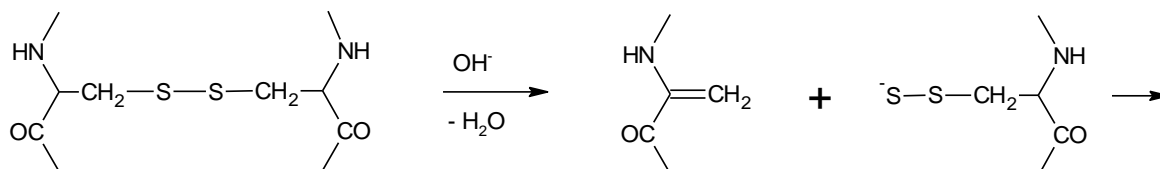
1. fáze (předzpracování): Jako základní biologický materiál bylo použito peří. 215 kg rozsekaného peří (suchá hmotnost asi 60 kg) bylo smícháno se 735 litry vody a 4,8 kg Na_2SO_3 , pH bylo 7,5. Za stálého míchání byla směs vyhřáta na 95 °C a na této teplotě udržována po dobu 40 minut. Po výše uvedené době, byla směs ochlazena na 60 °C a hodnota pH byla upravena KOH na 8,0.

2. fáze (enzymová hydrolýza): Ke směsi byl přidán enzym Maxatase. Směs byla nepřetržitě míchána a udržována na teplotě 60 °C po dobu 6 hodin.

Výsledný produkt obsahoval 80,5 % hydrolyzovaného materiálu. [7]

1.5.3 Reakce působením alkálií (jiné alkalické hydrolýzy, než výše uvedené)

Pokud jsou při alkalické hydrolýze koncentrace hydroxyly nízké (pod 0,5 M) a teploty mírné, převládá odlišný mechanismus reakce. Působením alkálií za mírných teplot může v keratinu vznikat značný počet stálých příčných vazeb. Nově vznikající síťující aminokyselinou je lantionin. [2]



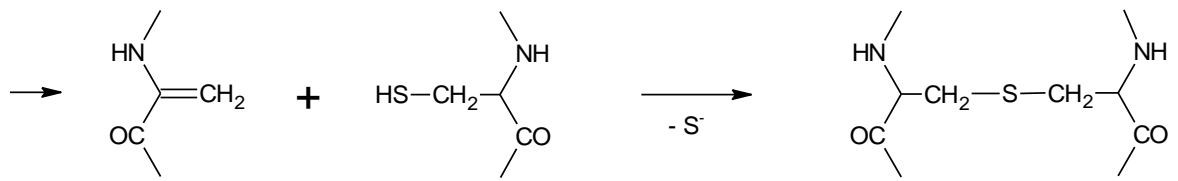


Schéma 3: Působení nízkých koncentrací alkálií za mírných teplot na keratin [2]

Působením alkálií dochází také k hydrolyze amidických skupin asparaginu a glutaminu, stoupá tak obsah kyselých skupin. Dochází také k reakcím vedoucím k poklesu bazických skupin patřících argininu. [2]

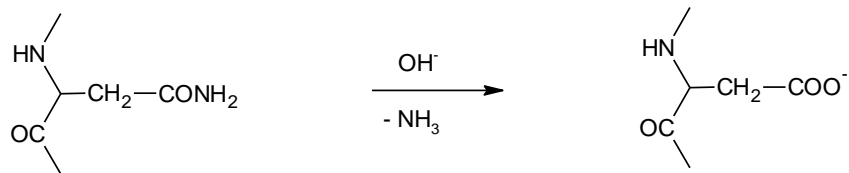


Schéma 4: Působení alkálií na asparagin [2]

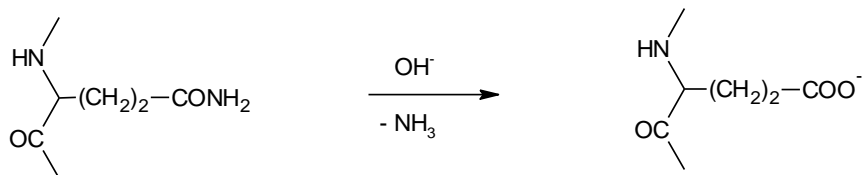


Schéma 5: Působení alkálií na glutamin [2]

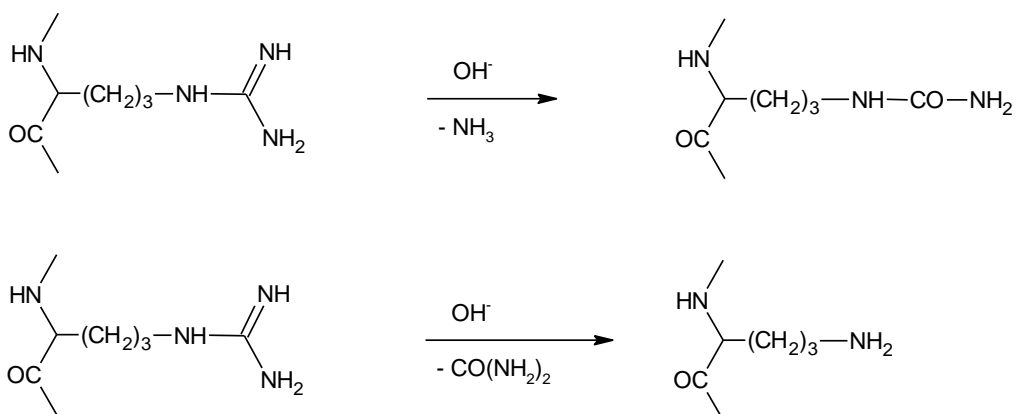


Schéma 6: Působení alkálií na arginin [2]

1.5.4 Oxidace

Při působení oxidačních činidel na keratin může nastat oxidace disulfidické vazby bez jejího štěpení. Na disulfidickou vazbu keratinu působí oxidačně bez štěpení například roztoky KMnO_4 , roztoky H_2O_2 a fotooxidace. Oxidace probíhá za tvorby sulfoxidu až sulfonu. [19]

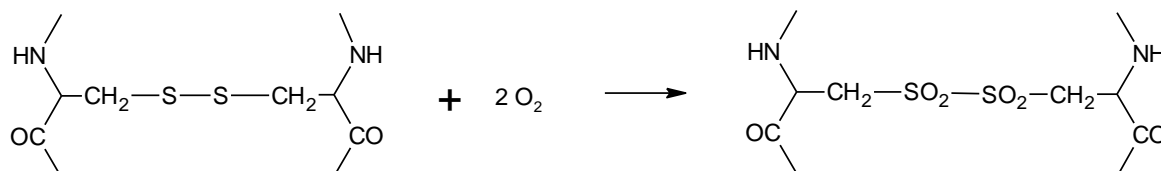


Schéma 7: Oxidace disulfidické vazby keratinu bez jejího štěpení [19]

Nebo může nastat oxidační štěpení disulfidické vazby. Mezi nejčastěji uváděná oxidační činidla pak patří kyselina peroctová, peroxid vodíku, benzoyl peroxid, perboritany, perkarbonáty a kyselina permravněčí. V konečném stadiu oxidační činidla, štěpí cystin a vzniká cysteinová kyselina. [1-10]

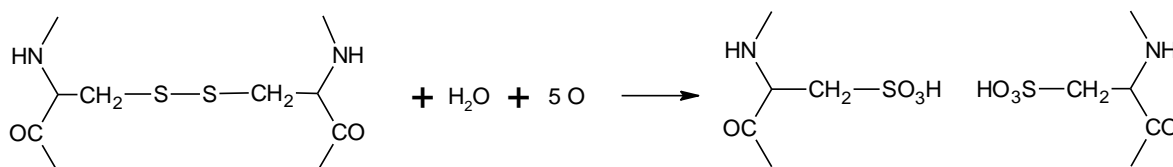


Schéma 8: Oxidace disulfidické vazby keratinu s jejím štěpením [9]

Příklad 12:

Preferovaným zdrojem v tomto popsaném postupu je keratin získaný z lidských vlasů. Postup však nevyklučuje použití i jiných zdrojů keratinu, jako například zvířecí srsti. Jako nejvhodnější materiál se však jeví lidské vlasy, u nichž není předpoklad imunologické reakce lidského organismu.

30 gramů vlasů bylo smícháno s 500 ml 2 % kyseliny peroctové (hmotnost / objem). Tato směs byla vyhřáta na 100 °C a na této teplotě udržována asi 2 hodiny. Tyto reakční parametry však mohou být nastaveny i jinak a mohou se pohybovat v rozmezích 1 % až 32 % kyseliny peroctové, 0 °C až 100 °C a 0,5 hodin až 24 hodin. Také oxidační činidlo může být odlišné od zde uvedeného postupu. Jako další oxidační činidla je možno použít například

peroxid vodíku, benzoyl peroxid, perboritany, perkarbonáty nebo jejich směsi. Po oxidaci, je pevný keratin vyizolován z reakční směsi (například filtrací nebo odstředěním) a promyt vodou, methanolem nebo ethanolem aby se odstranilo přebytečné okysličovadlo. Promytí je však potřeba omezit tak, aby nedocházelo k přílišnému vymývání rozpustných oxidovaných peptidů obsažených v keratinu.

Vyizolovaný oxidovaný pevný keratin je rozpuštěn ve vhodném rozpouštědle. Jako nejvhodnější se jeví methanol, ethanol, ether, tetrahydrofuran, aceton, propylenglykol a 1,4-dioxan. Reakční směs je poté upravena na hodnotu pH 7 hydroxidem sodným nebo draselným a vyhřáta k varu. Na teplotě varu je pak reakční směs udržována asi 0,5 hodiny až 3 hodiny. Následuje vychlazení reakční směsi na teplotu cca 20 °C až 25 °C a udržování na této teplotě 1 hodinu až 5 hodin. Zreagovaná pevná část je vyizolována z rozpouštědla (například filtrací nebo odstředěním) a promyta nejlépe stejným rozpouštědlem jako je použité v předchozí reakci. Po filtraci a promytí je produkt vysušen ve vakuu a pomlet.

Výsledným produktem je vysoce hydratovatelný keratin (nebo spíše materiál odvozený od keratinu) v podobě prášku, který má absorpční vlastnosti a v reakci s vodou tvoří hydrogel.

Prášek, vlákna nebo jejich hydrogel mají využití jako savý materiál a jako léčebný prostředek pro léčbu pokožky. Vlákna byla testována na toxicitu různých parametrů a bylo zjištěno, že jsou netoxická, nedráždivá, nesenzibilní, a biokompatibilní pro lidský organismus.

Získaný materiál může být využit k podpoře hojení poškozené kůže. Tento materiál může být aplikován na kožní postižení, jako jsou opruzeniny, popáleniny, spáleniny od slunce, řezné rány, odřeniny, vředy, proleženiny, diabetické vředy, podráždění kůže, chirurgické rány a kožní transplantace. Keratinový materiál přicházející do kontaktu s vodou tvoří hydrogel, ten poté tvoří ochrannou vrstvu a zároveň udržuje ránu ve vlhkém prostředí (preferované mokré hojení). Materiál je biokompatibilní a schopný se začleňovat do kožních struktur a tím podporovat hojení poškozené kůže. Vlákna mohou být zpracována do netkaných a tkaných textilií. Tyto lze následně použít přímo jako součást obvazového materiálu.

[20]

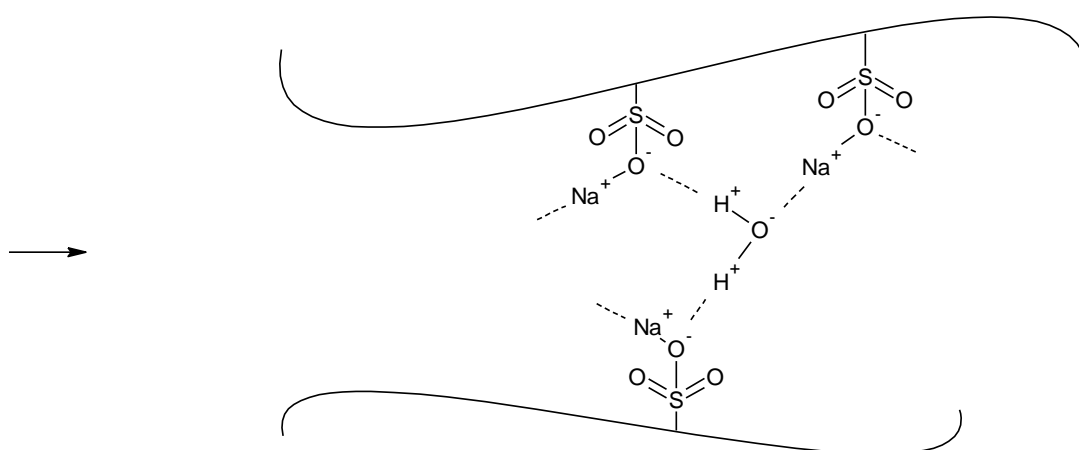
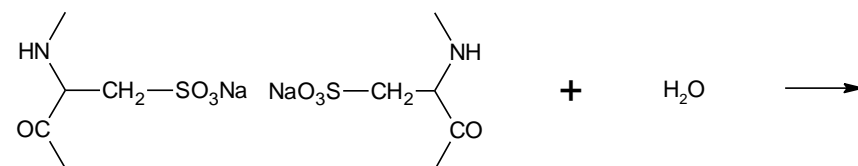
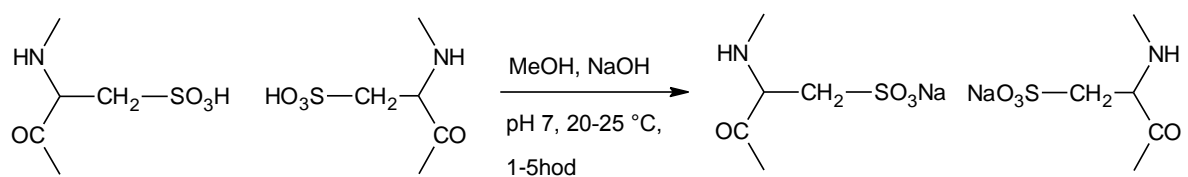
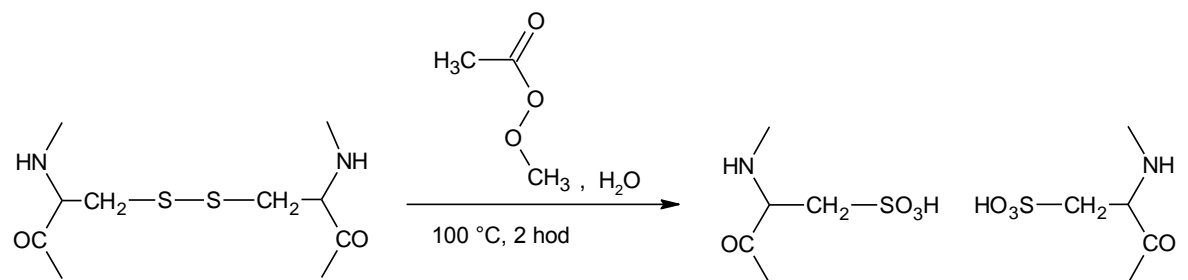


Schéma 9: Příprava hydratovatelného keratinu, který v reakci s vodou tvoří hydrogel (dle příkladu 12) [20]

30 g lidských vlasů bylo smícháno s 500 ml 2 % H_2O_2 (hmotnost / objem). Tato směs byla vyhřáta k varu a na teplotě varu udržována 2 hodiny až 6 hodin. Takto získaný (vyizolovaný) oxidovaný keratin byl přidán k určenému množství norefedrinu rozpuštěného v ethanolu. Reakční směs byla vyhřáta k varu a 2 hodiny udržována na refluxu. Následně ochlazena a míchána při pokojové teplotě po dobu 24 hodin. Po navázání norefedrinu na oxidovaný keratin byla pevná látka oddělena filtrací a vysušena.

Výsledným produktem je léčivá látka, která je začleněná do struktury polymerního keratinového materiálu a nabízí tak výhody oproti konvenčním formám dávkování léčiv. Dochází k postupnému uvolňování léčivé látky z polymerní matrice a udržování vyvážené koncentrace léčiva v organismu. Zde citovaný patentový dokument pak uvádí širokou škálu léčivých látek, které je možné pro daný postup použít.

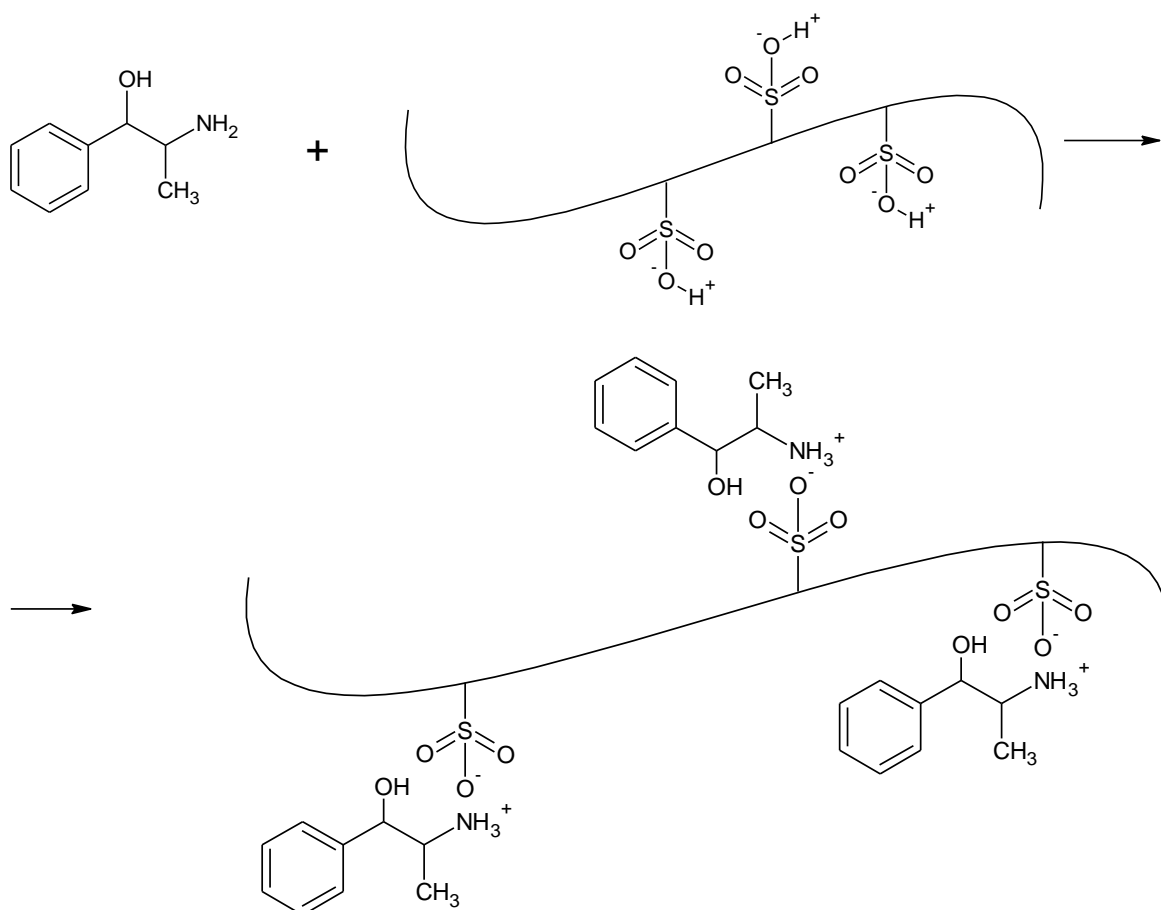


Schéma 10: Příprava aktivní farmaceutická substance začleněné do struktury keratinového materiálu (dle příkladu 12) [20]

1.5.5 Redukce

Při působení redukčních činidel na keratin nastává redukční štěpení disulfidické vazby za vzniku cysteinu. Vzniklé merkaptoskupiny jsou velmi reaktivní a mohou být oxidovány zpět na disulfidické vazby. (To je také podstatou studené ondulace vlasů. Vlasy se redukují roztokem kyseliny thioglykolové a po zformování do nového tvaru se zpět oxidují roztokem peroxidu vodíku). [9]

Mezi nejčastěji uváděná redukční činidla pak patří kyselina thioglykolová a její soli, 2-merkптоethanol, sulfid sodný, hydrogensulfid sodný, kyselina thiomléčná a thioglycerol. [21]

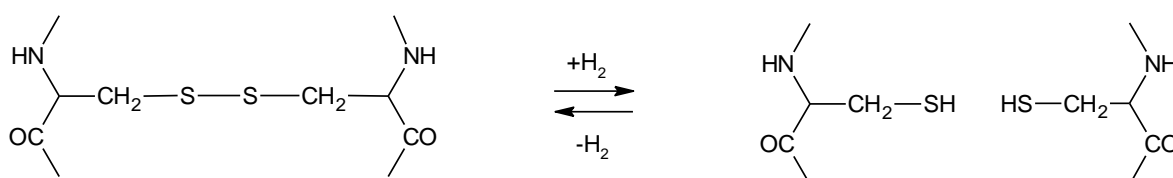


Schéma 11: Redukce disulfidické vazby keratinu [9]

Příklad 13:

Jako základní biologický materiál bylo použito peří. Toto bylo vyčištěno, vysušeno, pomleto a odtučněno. 1 gram upraveného peří byl smíchán s roztokem 6 M močoviny, 3 mM kyseliny ethylendiaminotetraoctové a 1,4 M 2-merkптоethanolu. Směs byla udržována na teplotě 40 °C, hodnotě pH 7,0-9,0 a rozrušována v dusíkové atmosféře po dobu 30 minut.

Při těchto reakčních podmínkách byl výtěžek až 75 % redukovaných keratinů. [22]

Příklad 14 (pokračuje dále v příkladu 16):

50 gramů vlny nebo lidských vlasů bylo smícháno s 1 litrem 5 M kyseliny thioglykolové. Ca(OH)₂ bylo pH upraveno na hodnotu 12,5. Směs byla vyhřáta na 50 °C a na této teplotě probíhala reakce 20 minut. Za tuto dobu byl keratin v podstatě rozpuštěn. [23]

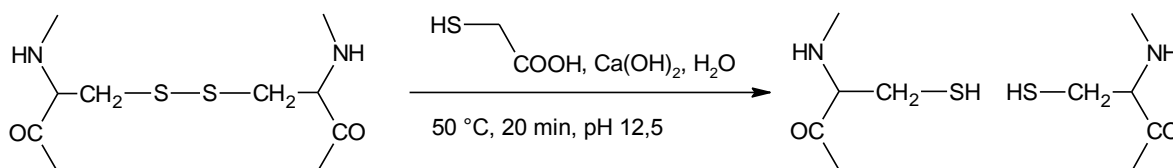


Schéma 12: Příprava redukovaného keratinu (dle příkladu 14) [23]

Příklad 15 (pokračuje dále v příkladu 17):

3500 ml 1,0 M thioglykolové kyseliny bylo smícháno se 175 g lidských vlasů a přidáním 312,5 g hydroxidu draselného upraveno pH na hodnotu 10,2. (Před použitím byly vlasy vyprány vodným roztokem jemného čistícího prostředku, opláchnuty a vysušeny). Tato směs byla udržována na teplotě cca 25 °C pod dusíkem po dobu 18 hodin za neustálého míchání.

Následně byla směs zfiltrována. Filtrací získané (částečně zreagované) vlasy byly dále zpracovány tak, že byly nejprve opláchnuty demineralizovanou vodou, přičemž vlasy zvětšily objem na téměř dvojnásobek původního objemu. Tyto opláchnuté vlasy byly smíchány s roztokem močoviny a míchány pod dusíkem při teplotě místnosti po dobu 24 hodin.

Reakční směs byla zfiltrována. K přefiltrovanému extraktu byla přidána HCl a pH upraveno na hodnotu 7. Poté byl přidáním 100 % ethanolu z reakční směsi vysrážen pevný keratinový materiál. Sraženina byla vyizolována filtrací, vysušena a rozdrcena.

Reakční podmínky a pracovní postup se mohou od výše popsaného částečně lišit. Podstatou postupu je však dvoustupňová reakce. V prvním stupni dochází k redukci keratinu za působení redukčních činidel. Jako vhodná redukční činidla jsou uváděna například kyselina thioglykolová a její soli, merkaptoethanol, sulfid sodný, hydrogensulfid sodný, kyselina thiomléčná a thioglycerol. Jako vhodné koncentrace redukčního činidla jsou uváděné koncentrace od cca 0,1 M až do 10 M. Hodnota pH od cca 9 až 10,5. Reakční teplota od cca 20 °C do 100 °C. Reakční doba od cca 4 hodin do 24 hodin. Reakce probíhá v inertní atmosféře, nejlépe dusíku. Kapalná frakce se oddělí od tuhé fáze pomocí filtrace nebo odstředěním nejlépe pod inertní atmosférou.

Druhý reakční stupeň se provádí za použití vhodného činidla, nejvýhodněji močoviny. Koncentrace činidla od cca 1 M do 10 M. Reakční teplota od cca 20 °C do 100 °C. Reakční čas od cca 1 hodiny do 72 hodin. Přidáním nevodného rozpouštědla jako například ethanolu, methanolu, isopropylalkoholu, tetrahydrofuranu, acetonu nebo dioxanu dojde k vytvoření sraženiny obsahující vyloučené proteiny. Sraženina se oddělí od rozpouštědla filtrací nebo odstředěním. Vyloučené proteiny se následně suší, nejlépe ve vakuu při teplotě místnosti.

Výsledným produktem je redukovaný keratin (keratin obsahující thiolové skupiny) o vysoké molekulové hmotnosti (HMWK) cca 50 až 85 kDa. Takto připravený materiál pak tvoří hydrogel, nachází-li se ve vodném prostředí. [21]

1.5.6 Reakce vedoucí k síťování bílkovin

Příkladem biochemického síťování probíhajícího v živých organismech je proces síťování kolagenu a elastinu. V procesu stárnutí vykazují fibrily vzrůstající nerozpustnost, tento jev je vyvolán postupným vznikem příčných vazeb. Nejdůležitější reaktivní skupiny, které se zúčastňují mezimolekulárních vazebných reakcí, jsou aminokyselinové zbytky lysinu a hydroxylysinu. Aminokyseliny těchto zbytků jsou oxidovány enzymem lisyloxidasou za katalytického působení měďnatých iontů. Vznikají tak velmi reaktivní aldehydy, allysin a hydroxyallysin. Tyto aldehydicke skupiny reagují s aminokyselinami sousedních řetězců a vytvářejí tak mezimolekulární (příčné) vazby. Vznikají takzvané Schiffovy báze. Reakcí s těmito popisovanými aldehydy se účastní především aminokyseliny lysin a hydroxylysin. [2]

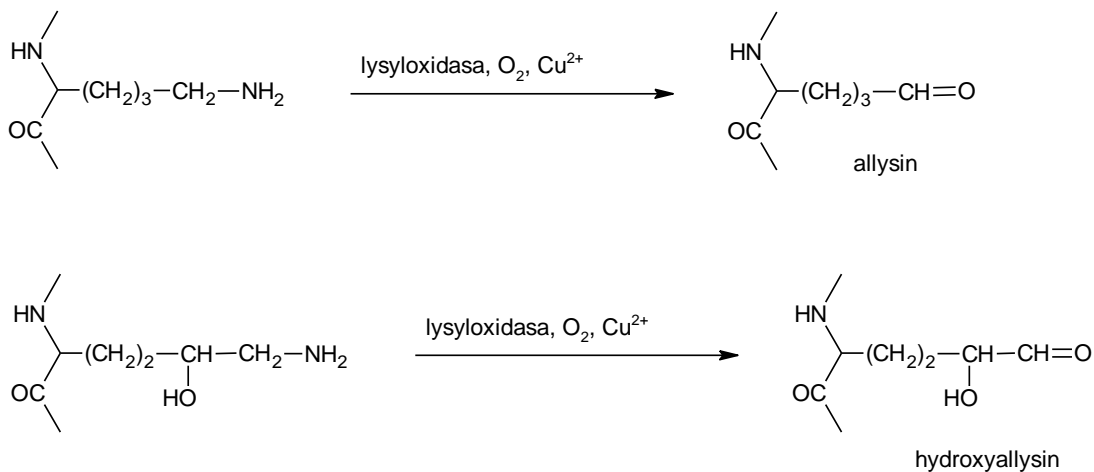


Schéma 13: Vznik allysinu a hydroxyallysinu [2]

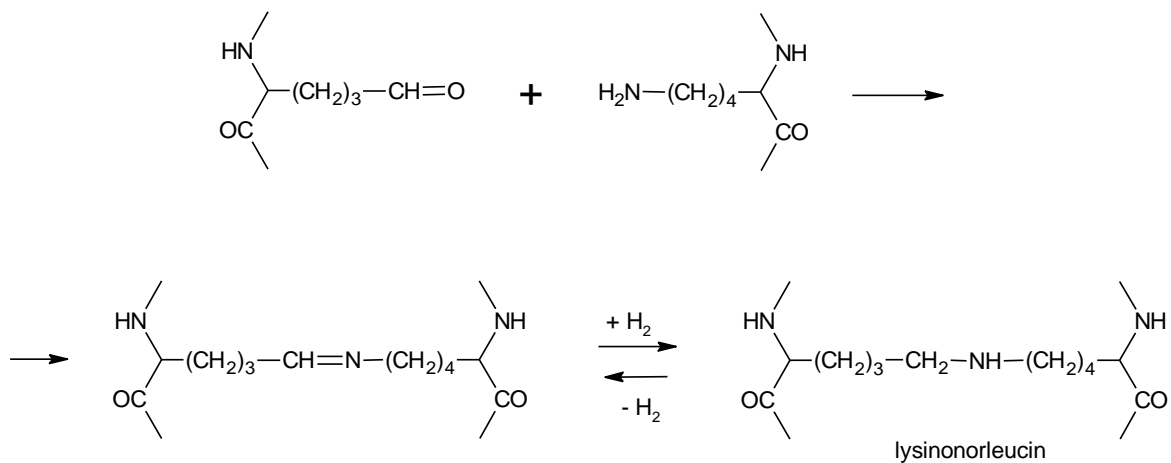


Schéma 14: Reakce allysinu s lysinem [2]

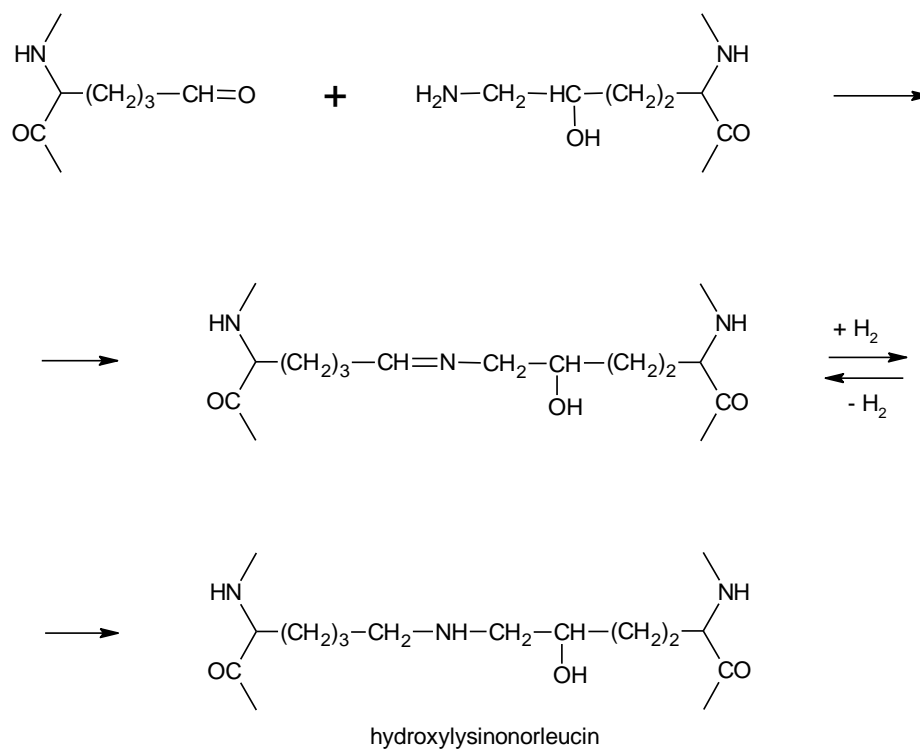


Schéma 15: Reakce allysinu s hydroxylysinem [2]

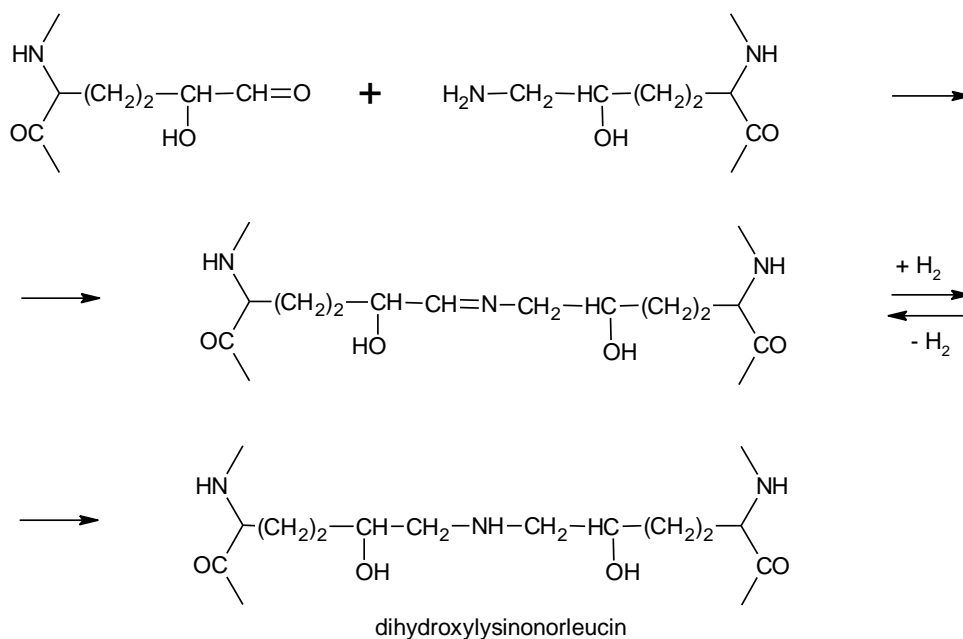


Schéma 16: Reakce hydroxyallysinu s hydroxylysinem [2]

Je však možná i vzájemná reakce dvou aldehydických skupin (aldolová kondenzace) za vzniku aldolového zbytku (nenasyceného a nasyceného).

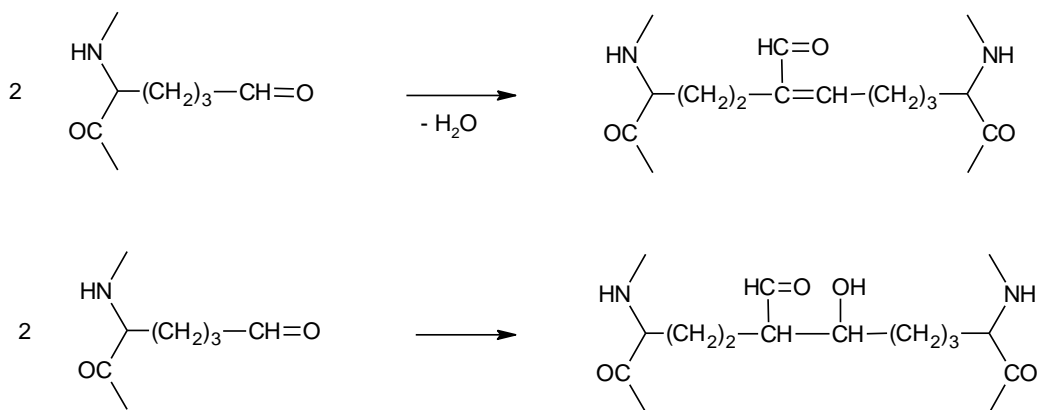
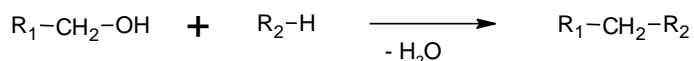


Schéma 17: Vzájemná reakce aldehydů (allysinu) [2]

Aldehydy jsou také látky často používané pro tvorbu příčných kovalentních vazeb v technické praxi. Reakcí aldehydu s aktivním vodíkem vzniká reaktivní hydroxylová skupina, která reaguje s další skupinou obsahující aktivní vodík za vzniku methylenového můstku. [2]



Například:

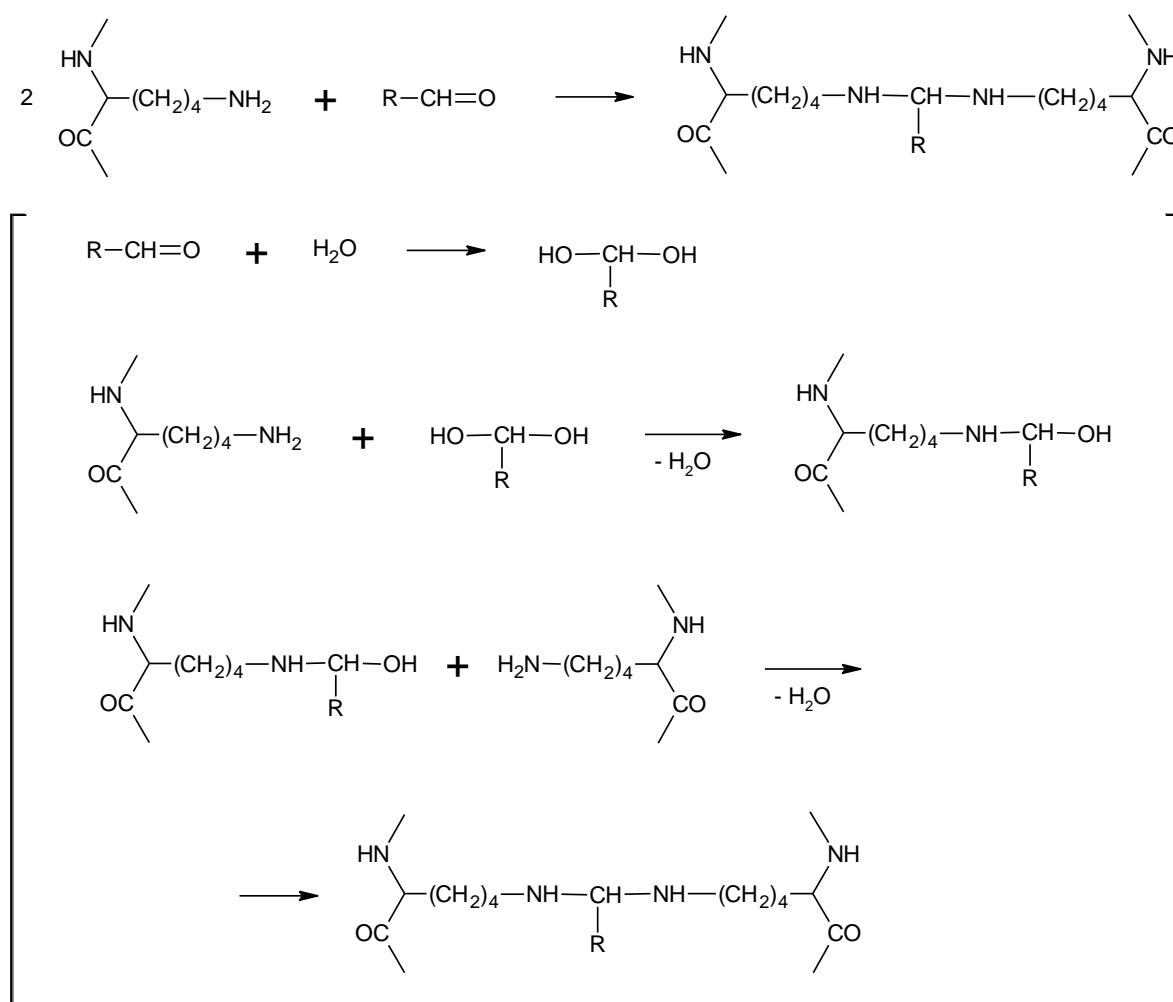


Schéma 18: Tvorba příčných vazeb pomocí aldehydu [2]

Další látky, které je možné použít pro tvorbu příčných kovalentních vazeb, jsou izokyanáty (izokyanatany).

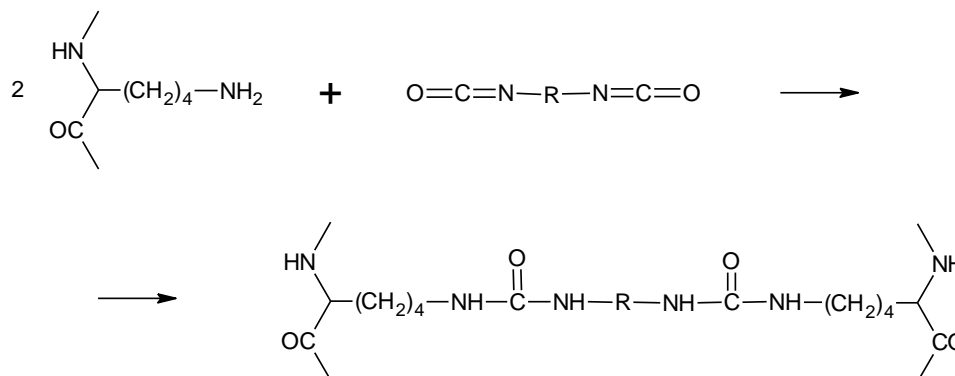


Schéma 19: Tvorba příčných vazeb pomocí izokyanátu [2]

Jiné látky, které je možné použít pro tvorbu příčných kovalentních vazeb, jsou epoxydové sloučeniny.

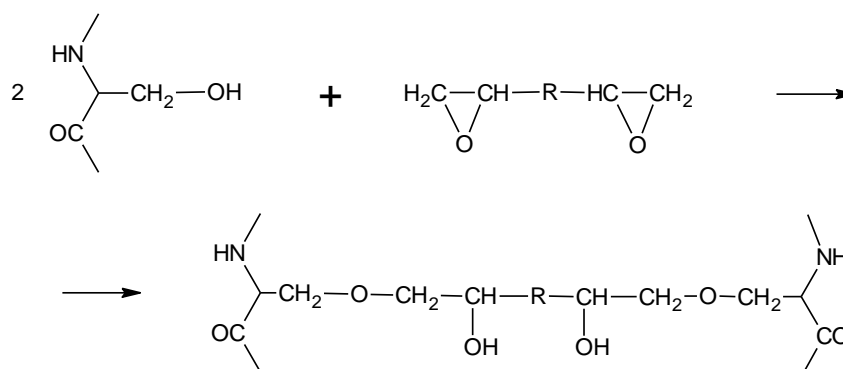


Schéma 20: Tvorba příčných vazeb pomocí epoxydové sloučeniny [2]

Vícefunkční chloridy jsou taktéž uváděny jako látky, které je možné použít pro síťování keratinu.

Příklad 16 (pokračování příkladu 14):

Ethylendichlorid reagoval s roztokem redukováného keratinu za tvorby bishioetherových příčných vazeb keratinu. Tento postup tak představuje způsob pro přípravu regenerovaného keratinu a produktů z něho. [23]

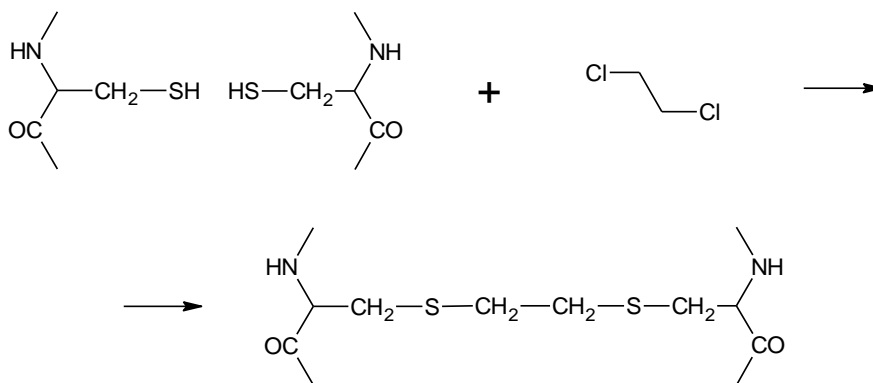


Schéma 21: Tvorba příčných vazeb pomocí ethylendichloridu (dle příkladu 16) [23]

Příklad 17 (pokračování příkladu 15):

Vlastnosti hydrogelu založené pouze na vodíkových můstcích nemusí být pro mnoho účelů dostatečně stabilní. K tomu, aby bylo možné vyrobit skutečně stabilní hydrogel, je potřeba zapracovat do hydrogelu kovalentní můstky. Funkční skupiny obsažené v aminokyselinách keratinu poskytují nástroj pro kovalentní síťování. Ve výhodném provedení je redukovaný keratin o vysoké molekulové hmotnosti (HMWK) poskytován jako suchý práškový prekurzor. Síťovací činidlo je v roztoku, který se následně přidá k práškovému redukovanému HMWK. Roztok síťovacího činidla obsahuje alespoň 5 hmot. %, nejlépe cca 10 hmot. %, síťovacího činidla (vztaženo na redukovaný HMWK).

Jako síťovací činidla pak postup uvádí vícefunkční karboxylové kyseliny (případně jejich anhydridy), vícefunkční izokyanáty a vícefunkční epoxidy.

Jako aminokyseliny účastníci se tvorby příčných vazeb (reagující se síťovacími činidly) pak postup uvádí především aminokyseliny obsahující reaktivní merkapto skupinu, hydroxylovou skupinu a amino skupinu. [21]

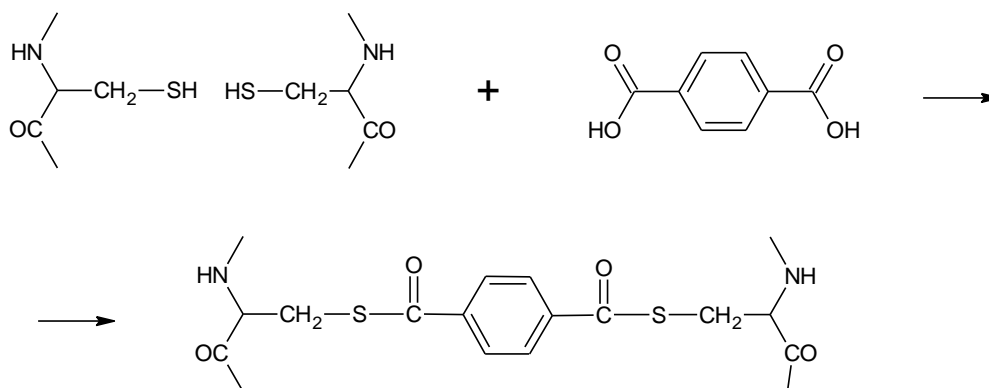


Schéma 22: Tvorba příčných vazeb pomocí kyseliny tereftalové (dle příkladu 17) [21]

Další reakční schémata uvedená v tomto postupu odpovídají schématům 19 a 20 popsaným výše, jen s tím detailem, že reagujícími aminokyselinovými skupinami jsou merkapto skupiny, hydroxylové skupiny a amino skupiny. [21]

1.6 Keratin jako vedlejší produkt

Nařízení (ES) č. 1774/2002 Evropského parlamentu a Rady ze dne 3. října 2002 o hygienických pravidlech pro vedlejší produkty živočišného původu, které nejsou určeny pro lidskou spotřebu.

Toto nařízení stanoví opatření, která mají být provedena pro zpracování vedlejších produktů živočišného původu.

Vedlejší produkty živočišného původu jsou definovány jako celá těla, části těl zvířat nebo produkty živočišného původu, které nejsou určeny pro lidskou spotřebu. Tyto materiály jsou pak odstraněny nebo zpracovány a opětovně použity v mnoha různých odvětvích (kosmetický průmysl, farmaceutický průmysl a jiné technické účely).

Toto nařízení stanoví pravidla pro:

- sběr, přepravu, skladování, manipulaci, zpracování, využití nebo neškodné odstranění vedlejších produktů živočišného původu
- uvádění na trh a v některých zvláštních případech vývoz a tranzit vedlejších produktů živočišného původu a výrobků z nich

Tato směrnice rozděluje vedlejší produkty živočišného původu do tří kategorií. Zjednodušeně lze říci, že do prvních dvou kategorií spadá materiál, který představuje zdravotní riziko (např. BSE) a riziko pro životní prostředí. Tento materiál musí být likvidován převážně přímým spalováním (při předepsaných podmínkách, jako je teplota, množství kyslíku a další podmínky) nebo jinými předepsanými způsoby.

Do třetí kategorie spadá materiál ze zdravých zvířat, který však není určen k přímé lidské spotřebě. Do této třetí kategorie pak patří také keratin, tedy materiál, který je předmětem této práce. Kategorie 3 zahrnuje například následující vedlejší produkty živočišného původu:

- části poražených zvířat, které jsou vhodné k lidské spotřebě, ale nejsou určeny k lidské spotřebě z obchodních důvodů
- části poražených zvířat, které jsou odmítnuty jako nevhodné k lidské spotřebě, ale nejsou ovlivněny žádnou nemocí
- kůže, kožky, kopyta, paznehty, rohy, prasečí štětiny a peří pocházející ze zvířat poražených na jatkách, která byla prohlášena za vhodná k lidské spotřebě a procházející vyšetřením před porázkou

S výjimkou kuchyňského odpadu musí být vedlejší produkty živočišného původu kategorie 3 shromažďovány a značeny. Manipulace a skladování materiálu kategorie 3 musí probíhat ve schválených zařízeních pro tuto kategorii. Zpracovatelská zařízení kategorie 3 musí být předmětem schválení ze strany příslušného orgánu. [24]

Jako další legislativní vymezení (zákony, nařízení a vyhlášky) pro likvidaci odpadů živočišného původu a jejich využití je možné jmenovat:

- Zákon 185/2001 Sb., o odpadech, ve znění zákona č. 106/2005 Sb.
- Vyhláška č. 381/2001 – Katalog odpadů
- Vyhláška č. 383/2001, o podrobnostech pro nakládání s odpady [25]

Vedlejší produkty živočišného původu zahrnují velké množství keratinu. Například peří představuje téměř 8,5 % z celkové hmotnosti kuřete a každý rok je tohoto odpadu vyprodukováno kolem 1 044 000 tun v USA a 750 000 tun v EU. [17]

Tabulka 6: Přehled vedlejších produktů živočišného původu (* peří) [17]

Zvířata	Pevný odpad (kg / zvíře)	Pevný odpad (% z tělesné váhy)
Skot	83,0	24,0
Ovce	2,4	12,0
Drůbež	0,2*	8,5*

II. PRAKTICKÁ ČÁST

2 CÍLE A POSTUPY PRAKTICKÉ ČÁSTI

Cílem experimentální části bylo připravit keratinový hydrolyzát alkalicko-enzymovým rozkladem biologického materiálu ve větším než laboratorním množství. Tím tak prakticky ověřit tento technologický postup na takzvané čtvrt provozní šarži a také tím získat dostatečné množství keratinového hydrolyzátu pro další experimenty.

Dalším cílem bylo pokusit se připravit z tohoto získaného hydrolyzátu materiál, který by měl vhodné fyzikální a chemické vlastnosti. Zvoleným postupem k dosažení tohoto cíle byla reakce keratinových řetězců s různými činidly. Tato činidla mohou jednak tvořit mezimolekulární (příčné) vazby makromolekul nebo pouze modifikují jejich vlastnosti jako takzvané změkčovadlo.

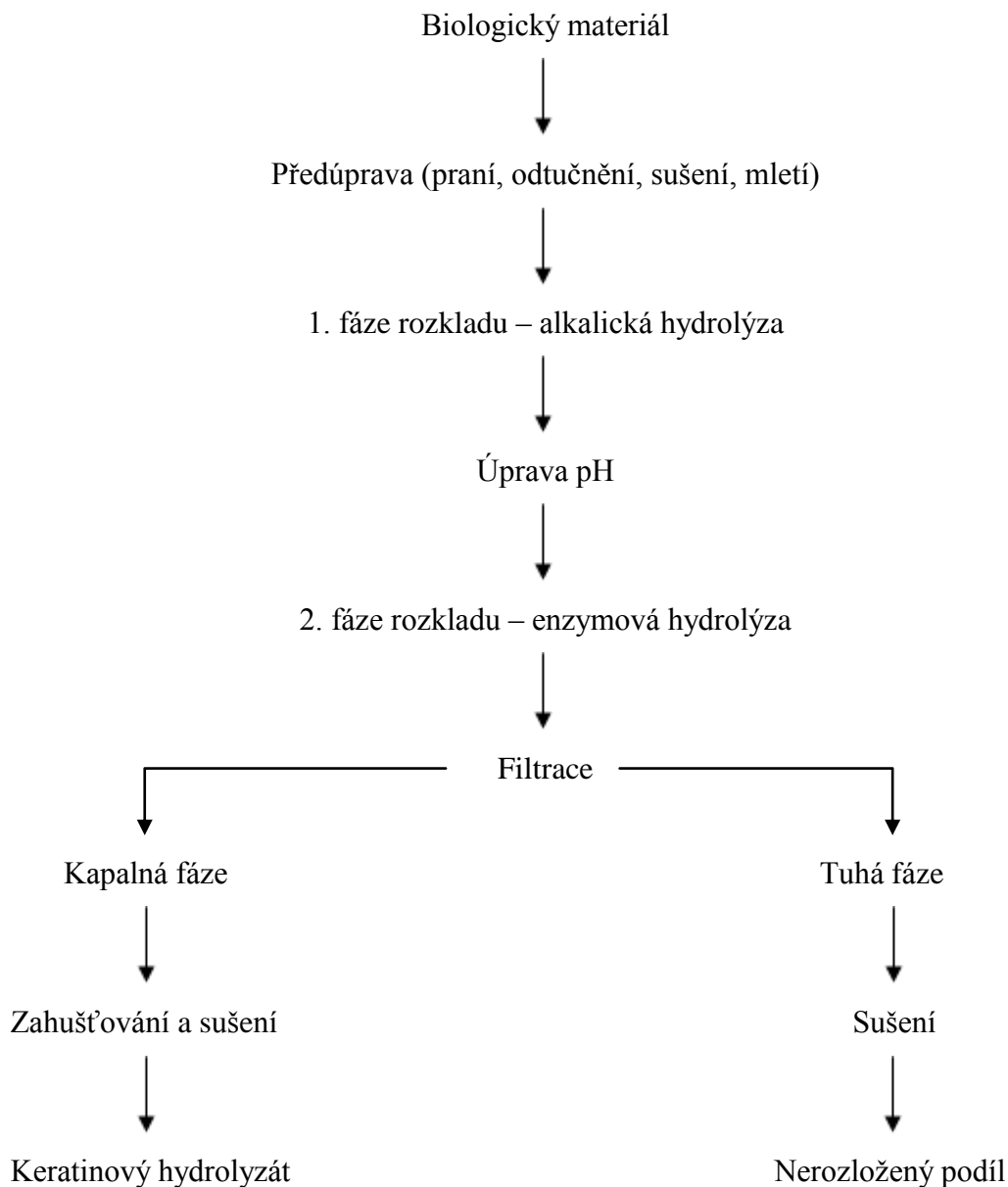
2.1 Příprava keratinového hydrolyzátu

Byla použita metoda 2 - fázového rozkladu. V 1. fázi byl biologický materiál podroben alkalické hydrolýze, ve 2. fázi byl pak biologický materiál podroben enzymové hydrolýze. Jako biologický materiál byla v jednom experimentu použita vlna. Ve druhém experimentu, který probíhal za totožných podmínek, bylo pro srovnání použito peří.

V experimentu byly použity dva enzymy:

Pro odtučnění biologického materiálu byl použit enzym **Lipex 100 T**. Lipex je lipáza produkovaná submerzní fermentací geneticky modifikovaného kmene *Aspergillus*. Lipex štěpí tuky a oleje rozštěpením esterových vazeb. Enzym Lipex 100 T je komerčně vyráběný firmou Novozymes. [18]

Pro enzymovou hydrolýzu byl použit enzym **Savinase 6.0 T**. Savinase 6.0 T je proteináza produkovaná submerzní fermentací mikroorganismu *Bacillus*. Je to serinový typ proteinázy charakterizovaný výbornou účinností při vyšší teplotě a vysokém (alkalickém) pH. Používá se k odstranění skvrn bílkovinného charakteru a to především v pracích prostředcích. Enzym Savinase 6.0 T je komerčně vyráběný enzym firmou Novozymes. [26]



Obr. 7: Schéma přípravy keratinového hydrolyzátu alkalicko-enzymovým rozkladem

Surový biologický materiál byl nejdříve zbaven viditelných nečistot a proprán ve vodě. Dále byl tento materiál enzymově odtučněn přidáním 10 % (na váhu surového materiálu) enzymu Lipex 100 T. Nádoba se směsí byla udržována na teplotě cca 40 °C po dobu 24 hodin. Během této doby bylo obsahem občas zamícháno. Po odtučnění byl surový materiál proprán vodou a vysušen. Vysušená vlna byla pomleta na nožovém mlýně na malé kousky. Pro experiment, kdy bylo jako výchozí materiál použito peří, bylo od mletí upuštěno, protože tento výchozí materiál byl velmi drobný.

1. fáze (předzpracování): 1000 g surového materiálu (vlny nebo peří) bylo smícháno s 15 000 ml 0,6 % KOH (to představuje 0,107 M roztok hydroxidu nebo také jinak 0,09 g hydroxidu na 1 g biologického materiálu). Tato směs byla vyhřáta na 90 °C a na této teplotě udržována 48 hodin, přičemž v průběhu prvních 6 hodin byla občas promíchána.

2. fáze (enzymová hydrolyza): pH směsi bylo upraveno na hodnotu $9,0 \pm 0,1$ přidáním HCl. Do této směsi bylo dále přidáno 5 % (vztaženo na hmotnost biologického materiálu) enzymu Savinase 6.0 T. Tato směs byla vyhřáta na 60 °C a na této teplotě udržována 24 hodin, přičemž v průběhu prvních 6 hodin byla občas promíchána.

V další fázi byla směs vyhřáta na 95 °C a na této teplotě udržována po dobu 10 min, aby došlo k inaktivaci enzymu. Následně byla směs filtrována na bavlněných tkaninách o různé propustnosti. Zachycený (nerozložený) podíl byl vysušen v komorové sušárně při teplotě 80 °C za vakua a následně zvážen pro výpočet účinnosti alkalicko-enzymové hydrolyzy. Získaný roztok keratinového hydrolyzátu byl zahuštěn a vysušen na nerezovém plechu v komorové sušárně při teplotě 80 °C za vakua. Získaný suchý keratinový hydrolyzát byl rozdrcen v třecí misce na jemný prášek.

2.2 Příprava keratinového hydrolyzátu bez ohřevu směsi

Výše popsany technologický postup přípravy keratinového hydrolyzátu je značně energeticky náročný. Je sice možné použít o něco mírnější teploty a kratší reakční časy (popsáno v části 1.5.2), ale energetická náročnost je vždy značná. Cílem tohoto experimentu tak bylo získat odpověď na otázku, je-li možné nahradit dodané teplo delším reakčním časem.

1. fáze (předzpracování): 100 g odtučněné, suché a pomleté vlny (postup předúpravy je popsán výše) bylo smícháno s 1500 ml 0,6 % KOH (to představuje 0,107 M roztok hydroxidu nebo také jinak 0,09 g hydroxidu na 1 g biologického materiálu). Tato směs byla ponechána při běžné pokojové teplotě cca 20 °C – 30 °C po dobu 10 dnů a občas promíchána.

2. fáze (enzymová hydrolyza): pH směsi bylo upraveno na hodnotu $9,0 \pm 0,1$ přidáním HCl. Do této směsi bylo dále přidáno 5% (vztaženo na hmotnost biologického materiálu) enzymu Savinase 6.0 T. Tato směs byla ponechána při pokojové teplotě cca 20 °C – 30 °C po dobu 10 dnů a občas promíchána.

Následně byla směs filtrována na bavlněných tkaninách o různé propustnosti. Zachycený (nerozložený) podíl byl vysušen v komorové sušárně při teplotě 80 °C za vakua a zvážen pro výpočet účinnosti alkalicko-enzymové hydrolyzy. Po zvážení byl nerozložený zbytek vrácen zpět do roztoku hydrolyzátu (ze kterého byl předtím zfiltrován). Získaná směs byla opět ponechána při pokojové teplotě po dobu 10 dnů a občas promíchána. Po uplynutí této doby bylo vše opět zfiltrováno a zvážen zachycený pevný podíl. Následovalo opět vrácení nerozloženého podílu do roztoku, další 10 denní hydrolyza za pokojové teploty, filtrace a zvážení nerozloženého podílu.

2.3 Rozpustnost keratinového hydrolyzátu

Pro reakce keratinového hydrolyzátu s chemickými činidly, která by byla schopna tvořit mezimolekulární kovalentní vazby je nutné nalezení vhodného společného rozpouštědla. Keratinový hydrolyzát (získaný z vlny postupem popsáním v kapitole 2.1) byl postupně smíchán s různými rozpouštědly. V experimentu pak byla použita tato rozpouštědla: voda, methanol, ethanol, isopropylalkohol, isoamylalkohol, aceton, toluen, xylen, octan ethylnatý, ethylether, 2-methoxyethanol, N,N-dimethylformamid, triethylamin, monochlorbenzen, dichlorethan, N-methylpyrrolidon a kyselina octová (99 %). Rozpustnost keratinového hydrolyzátu v těchto rozpouštědlech byla vyhodnocena vizuálním pozorováním.

2.4 Dialýza keratinového hydrolyzátu

Získaný hydrolyzát obsahuje velké množství nežádoucích příměsí jako například draselné soli, jejichž podíl se zvyšuje se zvyšující se koncentrací použitého hydroxidu při hydrolyze. Cílem následujícího postupu bylo pokusit se snížit obsah těchto nežádoucích nízkomolekulárních příměsí. Použitým analytickým postupem pro zjištění množství těchto příměsí pak bylo stanovení obsahu popela.

50 g keratinového hydrolyzátu získaného z vlny postupem popsáním v kapitole 2.1 bylo rozpuštěno v 500 ml destilované vody. Tento roztok byl následně dialyzován přes celulóзовou membránu o propustnosti 12 kDa proti destilované vodě. Dialýza probíhala při pokojové teplotě po dobu 72 hodin, přičemž voda byla měněna vždy po 24 hodinách. Roztok keratinového hydrolyzátu po dialýze byl následně zahuštěn a vysušen na nerezovém plechu v komorové sušárně při teplotě 80 °C za vakua. Získaný suchý keratinový hydrolyzát byl rozdrcen v třecí misce na jemný prášek.

Takto získaný hydrolyzát byl následně podroben zkoušce na stanovení obsahu popela. Pro porovnání byl stejný zkoušce podroben nedialyzovaný hydrolyzát (získaný z vlny postupem popsaným v kapitole 2.1).

Na stanovení popela byl použit vždy 1 g vysušeného keratinového hydrolyzátu (odváženého na analytických vahách s přesností na $\pm 0,0001$ g). Tento hydrolyzát byl spalován po dobu 30 minut. Poté byl žíhán v muflové peci při teplotě 700 ± 2 °C 4 hodiny. Stanovení bylo provedeno pro každý vzorek vždy dvakrát a výsledná hodnota byla získána z průměru těchto hodnot. Množství popelovin (m_p) bylo vypočítáno podle vztahu:

$$m_p [\%] = \frac{m_1 - m_2}{m_3} * 100$$

m_1 ... hmotnost žíhacího kelímku včetně vzorku po vyžíhání (g)

m_2 ... hmotnost žíhacího kelímku (g)

m_3 ... navážka hydrolyzátu (g)

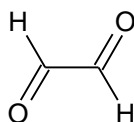
2.5 Příprava folií z keratinového hydrolyzátu

Cílem experimentu bylo pokusit se připravit ze získaného hydrolyzátu materiál ve formě folie, který by měl vhodné fyzikální a chemické vlastnosti. Pro experiment byl použit suchý práškový hydrolyzát získaný z postupu popsaného v kapitole 2.1.

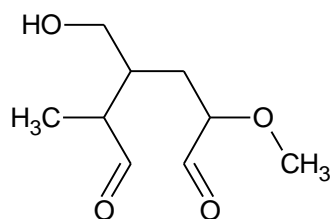
Zvoleným postupem k dosažení tohoto cíle byla reakce keratinových řetězců (obsažených v hydrolyzátu) s různými činidly. Použitá činidla mají potenciál tvořit mezimolekulární kovalentní (příčné) vazby nebo mohou působit jako změkčovadlo (glycerol).

V experimentu byla použita tato chemická činidla:

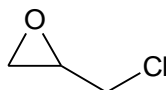
Glyoxal, chemický název ethandial. CAS 107-22-2. Bezbarvá až žlutá kapalina. Molární hmotnost 58,04 g/mol. Bod varu 103,6 °C. Hustota 1,27 g/cm³. Je mísitelný s vodou. Zdraví škodlivá látka (zejména při vdechování a při požití), dráždí oči a kůži. Nebezpečí vážného poškození očí, nebezpečí nevratných účinků. Látka je mutagen 3. kategorie. [27]



Dialdehyd škrobu, neboli polymeric dialdehyde. CAS 9047-50-1. Bílý prášek. Molární hmotnost 188,22 g/mol. Hustota 1,065g/cm³. Vzniká oxidací škrobu. [28]



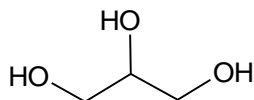
Epichlorhydrin, chemický název 1-chlor-2,3-epoxypropan. CAS 106-89-8. Bezbarvá kapalina. Molární hmotnost 92,52 g/mol. Bod varu 117,9 °C. Hustota 1,181 g/cm³. Je mísitelný s vodou. Reaktivní látka s toxickými a karcinogenními účinky. [27]



1,2-dichlorethan, také ethylendichlorid. CAS 107-06-2. Bezbarvá kapalina specifického aroma. Molární hmotnost 98,96 g/mol. Bod varu 84,1 °C. Hustota 1,253 g/cm³. Je špatně mísitelný s vodou (0,87 g/100 ml při 20 °C) a dobře mísitelný s většinou organických rozpouštědel. Látka s toxickými a karcinogenními účinky. [27]



Glycerol, také glycerin, chemický název propan-1,2,3-triol. CAS 56-81-5. Bezbarvá viskózní kapalina. Molární hmotnost 92,09 g/mol. Bod varu 290 °C. Hustota 1,26 g/cm³. Mísitelný s vodou. [27]



8 g keratinového hydrolyzátu (získaného z vlny postupem popsáním v kapitole 2.1) bylo vždy rozpuštěno ve 40 ml destilované vody. Do takto připravených roztoků bylo následně přidáno 10 %, 20 %, 25 %, 30 % a 40 % glycerolu (vztaženo na hmotnost suchého hydrolyzátu) jako změkčovadla.

8 g keratinového hydrolyzátu (získaného z vlny postupem popsáním v kapitole 2.1) bylo vždy rozpuštěno ve 40 ml destilované vody. Do těchto roztoků bylo přidáno vždy 10 % (vztaženo na hmotnost suchého hydrolyzátu) reakčního činidla. Takto byly připraveny roztoky obsahující 10 % glyoxalu, 10 % dialdehydu škrobu a 10 % epichlorhydrinu. Následně bylo upraveno pH těchto roztoků na hodnotu 9 – 10 přidáním NaOH. Roztoky hydrolyzátu s reakčními činidly byly vyhřáty na 60 °C – 70 °C a na této teplotě udržovány po dobu cca 30 min s občasným promícháním. Průběžně bylo také kontrolováno pH reakčních roztoků a udržováno na minimální hodnotě pH 9 případným přidáním NaOH. Poté byl do roztoků přidán glycerol jako změkčovadlo. Glycerol byl přidán tak, aby vždy jeden roztok s jedním použitým reakčním činidlem obsahoval 10 %, 20 %, 25 %, 30 % a 40 % glycerolu (vztaženo na hmotnost suchého hydrolyzátu).

Podobným postupem byl připraven roztok (8 g hydrolyzátu ve 40 ml destilované vody) s obsahem 10 % glyoxalu (na hmotnost hydrolyzátu) jako reakčního činidla. Přidáním NaOH bylo pH udržováno v rozmezí 9 – 10. Místo reakční teploty 60 °C – 70 °C udržované po dobu cca 30 min probíhala však reakce v tomto experimentu za mírného refluxu roztoku udržovaného po dobu cca 60 minut. Následovalo přidání 30 % glycerolu.

V dalším experimentu byl opět připraven roztok obsahující 8 g keratinového hydrolyzátu ve 40 ml destilované vody. K tomuto bylo přidáno 10 % glyoxalu (vztaženo na hmotnost suchého hydrolyzátu) smíchaného předem s 5 ml destilované vody a 1 g pyrosiřičitanu sodného. Roztok byl vyhřát na teplotu 60 °C – 70 °C a na této teplotě udržován po dobu cca 30 min. Poté bylo přidáno 30 % glycerolu.

V dalším postupu byly připraveny roztoky (8 g hydrolyzátu ve 40 ml destilované vody). K těmto roztokům bylo následně přidáno zvýšené množství reakčních činidel. Konkrétně 20 % glyoxalu, 20 % dialdehydu škrobu nebo 20 % epichlorhydrinu (vztaženo na hmotnost hydrolyzátu). Přidáním NaOH bylo pH udržováno v rozmezí 9 – 10. Reakční roztoky byly vyhřáty na 60 °C – 70 °C a na této teplotě udržovány po dobu cca 30 min. K těmto roztokům bylo přidáno vždy 30 % glycerolu jako změkčovadla.

Takto připravený materiál (ze všech popsanych reakčních postupů) byl poté vždy nalit do silikonových forem a sušen v sušárně při teplotě cca 50 °C po dobu přibližně 24 hodin.

Následně byly odlité folie dosušeny při pokojové teplotě po dobu cca 72 hodin.

Cílem všech výše postupů bylo pokusit se vytvořit intermolekulární kovalentní vazby. Tedy vazby mezi keratinovými makromolekulárními řetězci a použitými reakčními činidly podle následujících schémat:

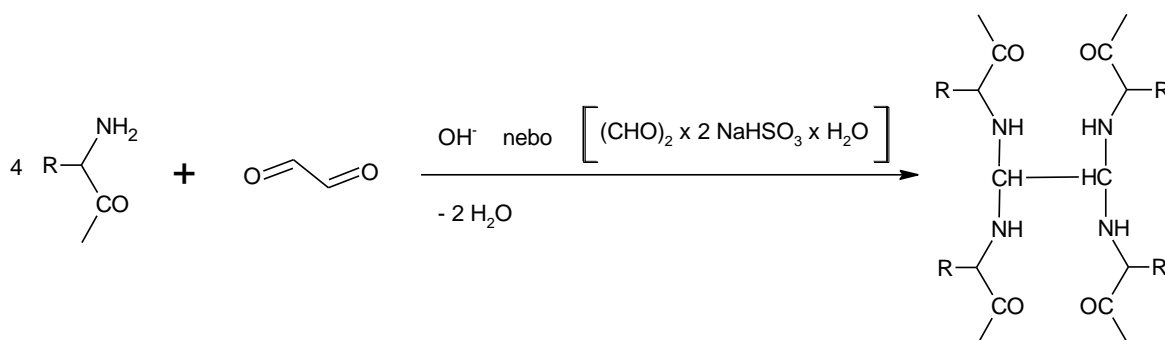


Schéma 23: Síťování keratinu glyoxalem

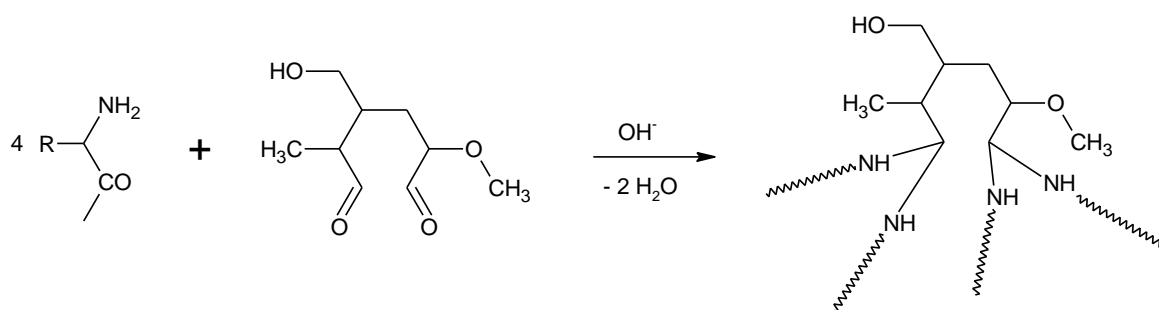


Schéma 24: Síťování keratinu dialdehydem škrobu

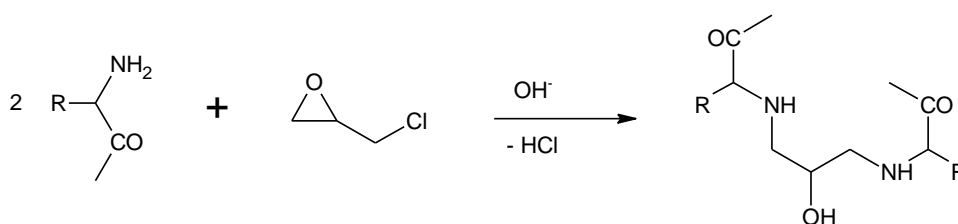
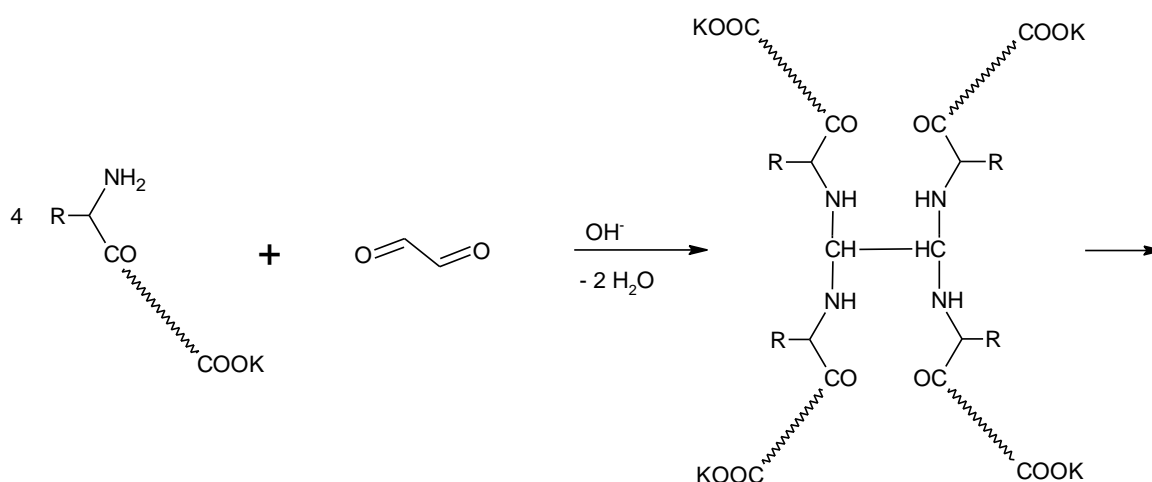


Schéma 25: Síťování keratinu epichlorhydrinem

V dalším postupu bylo 8 g keratinového hydrolyzátu (získaného z vlny postupem popsaným v kapitole 2.1) rozpuštěno ve 40 ml destilované vody. Do tohoto roztoku bylo přidáno 10 % (vztaženo na hmotnost suchého hydrolyzátu) glyoxalu. Následně bylo upraveno pH roztoku na hodnotu 9 – 10 přidáním NaOH. Roztok hydrolyzátu s reakčním činidlem byl vyhřát na 60 °C – 70 °C a na této teplotě udržován po dobu cca 60 min s občasným promícháním. Průběžně bylo také kontrolováno pH reakčního roztoku a udržováno v alkalické oblasti případným přidáním NaOH. Spotřeba NaOH byla však regulována tak, aby po uplynutí reakční doby bylo pH roztoku jen pouze mírně alkalické až neutrální. Do takto připravené reakční směsi bylo následně přidáno 30 % (vztaženo na hmotnost suchého hydrolyzátu) 1,2-dichlorethanu. Reakční směs byla vyhřátá na 60 °C – 70 °C a na této teplotě udržován po dobu cca 60 min s občasným promícháním. Poté bylo do tohoto roztoku přidáno 30 % (vztaženo na hmotnost suchého hydrolyzátu) glycerolu jako změkčovadla. Takto připravený materiál byl nalit do silikonové formy a sušen v sušárně při teplotě cca 50 °C po dobu přibližně 24 hodin. Následně byla odlitá folie dosušena při pokojové teplotě po dobu cca 72 hodin.

Cílem tohoto postupu bylo pokusit se vytvořit již výše popsané intermolekulární vazby reakcí aldehydu s aminoskupinami keratinových řetězců. Dále pak pokusit se vytvořit další příčné vazby reakcí dichlorethanu a karboxylových skupin (jejich draselných solí) keratinových řetězců podle následujícího schématu:



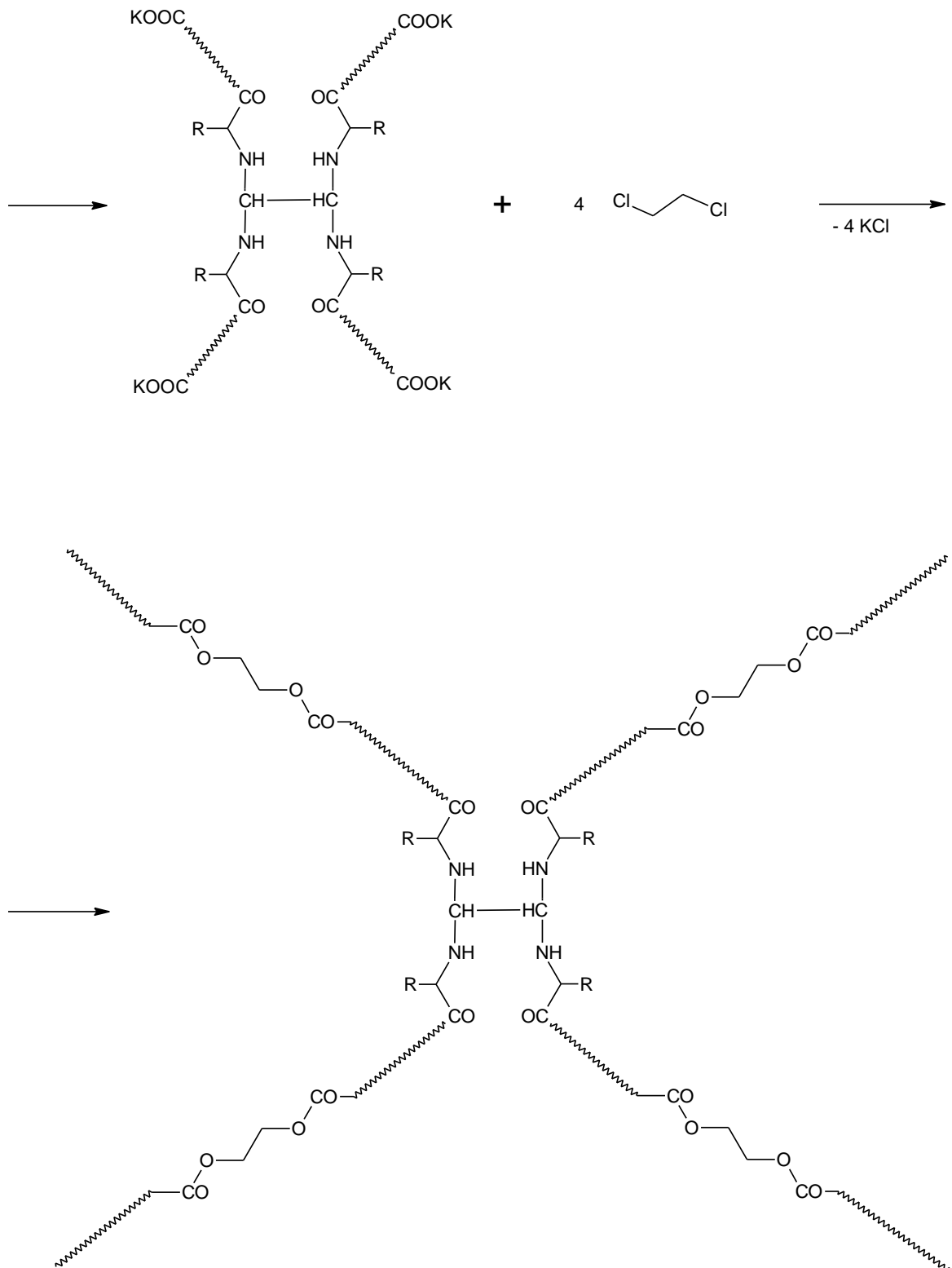


Schéma 26: Síťování keratinu glyoxalem a 1,2-dichlorethanem

Metodou hodnotící úspěšnost všech výše popsaných postupů byla jednak vizuální kontrola a dále zkouška rozpustnosti připravených keratinových filmů ve vodě. Výše popsané reakce by měly vytvořit pevné kovalentní vazby mezi řetězci a tím tedy dodat zhotoveným filmům jistou odolnost vůči vodě.

2.6 Příprava folií z keratinového hydrolyzátu s tepelnou expozicí

Shodným postupem, jako již výše popsáno, byly připraveny folie obsahující 10 % glyoxalu, 10 % dialdehydu škrobu, 10 % epichlorhydrinu a vždy 30 % glycerolu jako změkčovadla. Folie byly připraveny při pH 9 – 10 a reakční teplotě 60 °C – 70 °C udržované po dobu cca 30 min (postupy jsou detailně popsány v části 2.5).

Všechny takto připravené (vysušené) folie byly následně vyhřátý na teplotu 80 °C v komorové sušárně a na této teplotě udržovány po dobu 20 hodin. Cílem bylo zjistit, jestli toto následné tepelné působení na folie přispěje ke zlepšení jejich vlastností jako důsledku vyšší míry příčného síťování. Folie byly hodnoceny vizuálně a také podrobeny zkoušce rozpustnosti ve vodě.

2.7 Měření keratinových folií pomocí diferenční skenovací kalorimetrie

Byla připravena folie bez obsahu reakčního činidla obsahující 30 % glycerolu. Dále byly připraveny folie obsahující 10 % glyoxalu, 10 % dialdehydu škrobu, 10 % epichlorhydrinu a vždy 30 % glycerolu jako změkčovadla. Folie byly připraveny při pH 9 – 10 a reakční teplotě 60 °C – 70 °C udržované po dobu cca 30 min. Dále byla připravena folie obsahující 10 % glyoxalu, 30 % 1,2-dichlorethanu a 30 % glycerolu (postupy jsou detailně popsány v části 2.5).

Všechny tyto zhotovené (vysušené) folie byly následně analyzovány metodou diferenční skenovací kalorimetrie (DSC). Měření bylo provedeno v rozsahu 25 °C – 300 °C, rychlostí ohřevu 10 °C/min, v inertní dusíkové atmosféře. Cílem experimentu bylo pokusit se získat pomocí této analytické metody odpověď na otázku, zda nedochází k příčnému síťování až následně, tedy za vyšších teplot.

2.8 Měření keratinových folií pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací

Byla připravena folie bez obsahu reakčního činidla obsahující 30 % glycerolu. Dále byly připraveny folie obsahující 10 % glyoxalu, 10 % dialdehydu škrobu, 10 % epichlorhydrinu a vždy 30 % glycerolu jako změkčovač. Folie byly připraveny při pH 9 – 10 a reakční teplotě 60 °C – 70 °C udržované po dobu cca 30 min. Dále byla připravena folie obsahující 10 % glyoxalu, 30 % 1,2-dichlorethanu a 30 % glycerolu (postupy jsou detailně popsány v části 2.5).

Všechny tyto zhotovené (vysušené) folie byly následně analyzovány pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR). Cílem tohoto experimentu bylo pokusit se zjistit jak vysoký je výskyt zainteresovaných funkčních skupin ve chvíli, kdy již měly proběhnout výše popsané reakce.

3 VÝSLEDKY EXPERIMENTŮ

3.1 Výsledky přípravy keratinových hydrolyzátů

Z hydrolyzy 1000 g vlny zůstalo 204 g nerozloženého podílu. Účinnost alkalicko-enzymové hydrolyzy (dle postupu popsáno v části 2.1) dosáhla tedy 79,6 %.

Vysušeného hydrolyzátu bylo získáno 740 g. Teoretický výtěžek je $796 \text{ g} + 90 \text{ g} = 886 \text{ g}$. Rozdíl mezi teoretickým a skutečným množstvím získaného suchého hydrolyzátu byl způsoben jednak vodou obsaženou ve vlně a také ztrátami při zpracování.

Získaný materiál z hydrolyzy vlny má žluto-hnědou barvu, je bez zápachu nebo i dá se říci mírně příjemného aroma.

Jako nejvíce problematickou operací při zpracování tohoto většího množství vlny se jednoznačně ukázala filtrace hydrolyzátu. Nerozložený podíl tvoří velmi mazlavou hmotu, která zanáší filtrační materiál. Hydrolyzát musel být postupně filtrován přes dva druhy tkaniny. Nejprve byla použita tkanina s větší a následně tkanina s menší propustností. Filtrace musela být přerušována a filtrační tkaniny musely být v průběhu filtračního procesu čištěny. Jedním z výsledků experimentu je tedy i poznatek, že popsany technologický postup nutně vyžaduje dostatečně velkou filtrační plochu. Jako technologicky výhodnější postup se pro tuto izolaci zdá být odstředování (opět s dostatečně velkou filtrační plochou) než podtlaková nebo přetlaková filtrace.

Peří podleho stejné hydrolyze o poznání snadněji a rozložilo se skoro všechno. Z hydrolyzy 1000 g peří (dle postupu popsáno v části 2.1) zůstalo pouhých 30 g pevného nerozloženého podílu. Účinnost výše popsané alkalicko-enzymové hydrolyzy tak dosáhla 97 %.

Získaný materiál z peří je však materiálem dosti nepříjemného zápachu což může být i na překážku pro jeho využití. Veškerá manipulace při hydrolyze je z tohoto důvodu taktéž značně nepříjemná.



Obr. 8: Pomletá vlna



Obr. 9: Roztok keratinového hydrolyzátu získaný z vlny



Obr. 10: Suchý keratinový hydrolyzát získaný z vlny

3.2 Výsledky přípravy keratinového hydrolyzátu bez ohřevu směsi

Z hydrolyzy 100 g vlny alkalicko-enzymovým postupem bez ohřevu směsi (tedy jen při pokojové teplotě dle postupu popsaného v kapitole 2.2) zůstalo:

Po deseti dnech alkalické hydrolyzy a následujících deseti dnech enzymové hydrolyzy 68 g nerozloženého podílu. Účinnost tedy dosáhla 32 %. Po dalších deseti dnech enzymové hydrolyzy za pokojové teploty bylo množství nerozloženého podílu 53 g. To znamená účinnost 47 %. Po následujících 10 dnech činil pevný podíl 45 g. Tedy účinnost 55 %.

Tabulka 7: Výsledky přípravy keratinového hydrolyzátu bez ohřevu směsi

	Po 20 dnech	Po 30 dnech	Po 40 dnech
Nerozložený podíl [g]	68	53	45
Účinnost hydrolyzy [%]	32	47	55

Z výsledků je patrné, že časový faktor má značný vliv na popsanou alkalicko-enzymovou hydrolyzu. Dostatečně dlouhý reakční čas by tedy do jisté míry mohl nahradit množství potřebné energie.

3.3 Výsledky rozpustnosti keratinového hydrolyzátu

Rozpustnost keratinového hydrolyzátu byla hodnocena vizuálním pozorováním (postup popsán v části 2.3).

V rozpouštědlech methanol, ethanol, isopropylalkohol, isoamylalkohol, aceton, toluen, octan ethylnatý, xylen, ethylether, 2-methoxyethanol, N,N-dimethylformamid, triethylamin, monochlorbenzen, 1,2-dichlorethan a N-methylpyrrolidon je rozpustnost keratinového hydrolyzátu špatná a hydrolyzát je v těchto rozpouštědlech v podstatě nerozpustný.

Kyselina octová (o obsahu 99 %) je pak výrazně lepším rozpouštědlem hydrolyzátu, což by mohlo představovat možnost pro případné reakce s anhydridy kyselin. To tedy i znamená teoretickou možnost tvorby příčných kovalentních vazeb pomocí vícefunkčních anhydridů kyselin.

Dá se tedy říci, že jediné nalezené dobré rozpouštědlo je tak voda. Je to poznatek velmi negativní a omezující z pohledu možných reakcí hydrolyzátu s chemickými činidly. Pro následné chemické reakce je zapotřebí použití vhodného společného rozpouštědla pro keratinový hydrolyzát i pro použité chemické činidlo. Voda jako jediné vhodné rozpouštědlo hydrolyzátu je však v mnoha případech zároveň nevhodným rozpouštědlem pro případná činidla. Tato buď ve vodě nejsou rozpustná, nebo naopak s vodou přednostně reagují. Voda je tak nevhodné rozpouštědlo pro taková potenciální činidla jako například izokyanáty, epoxidy, estery a další.

3.4 Výsledky dialýzy keratinového hydrolyzátu

Výsledky analýzy na obsah popelovin z nedialyzovaného hydrolyzátu (postup popsán v části 2.4) vykazují značné hodnoty nežádoucích příměsí.

Nedialyzovaný keratinový hydrolyzát obsahoval 20,89 % popela.

Výsledky analýzy na obsah popelovin z dialyzovaného hydrolyzátu vykazují pak hodnoty daleko mírnější.

Dialyzovaný keratinový hydrolyzát obsahoval 5,4 % popela.

3.5 Výsledky přípravy folií z keratinového hydrolyzátu

Byly připraveny tyto folie z keratinového hydrolyzátu (postup je popsán v části 2.5):

Folie bez síťovadla o obsahu 10 %, 20 %, 25 %, 30 % a 40 % glycerolu.

Folie s 10 % glyoxalu o obsahu 10 %, 20 %, 25 %, 30 % a 40 % glycerolu.

Folie s 10 % dialdehydu škrobu o obsahu 10 %, 20 %, 25 %, 30 % a 40 % glycerolu.

Folie s 10 % epichlorhydrinu o obsahu 10 %, 20 %, 25 %, 30 % a 40 % glycerolu.

Folie s 10 % glyoxalu o obsahu 30 % glycerolu, připravená za refluxu reakčního roztoku.

Folie s 10 % glyoxalu o obsahu 30 % glycerolu, za použití pyrosiřičitanu sodného.

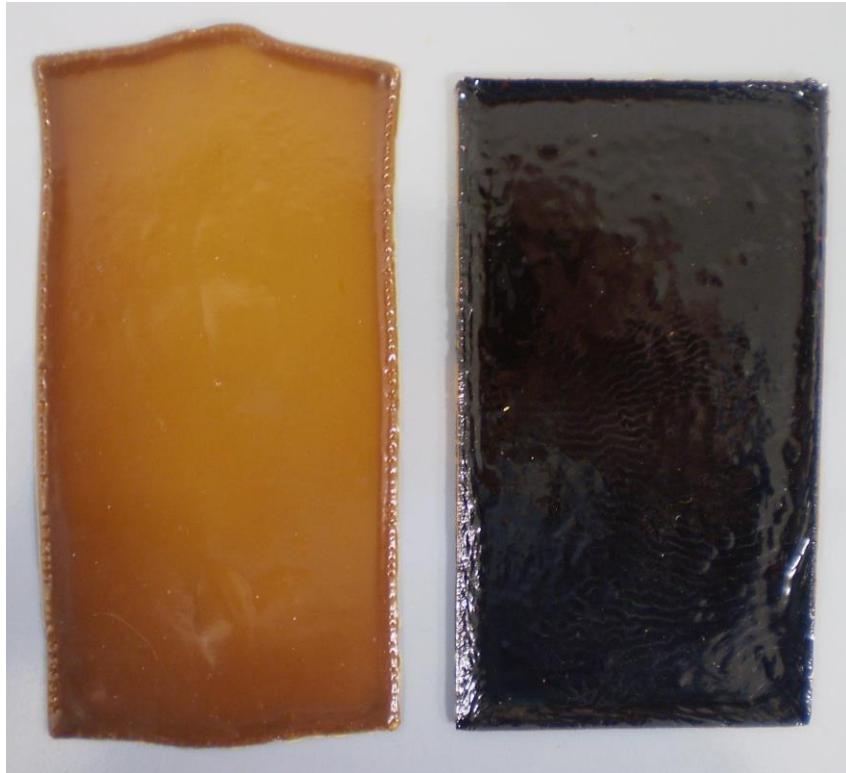
Folie s 20 % glyoxalu o obsahu 30 % glycerolu.

Folie s 20 % dialdehydu škrobu o obsahu 30 % glycerolu.

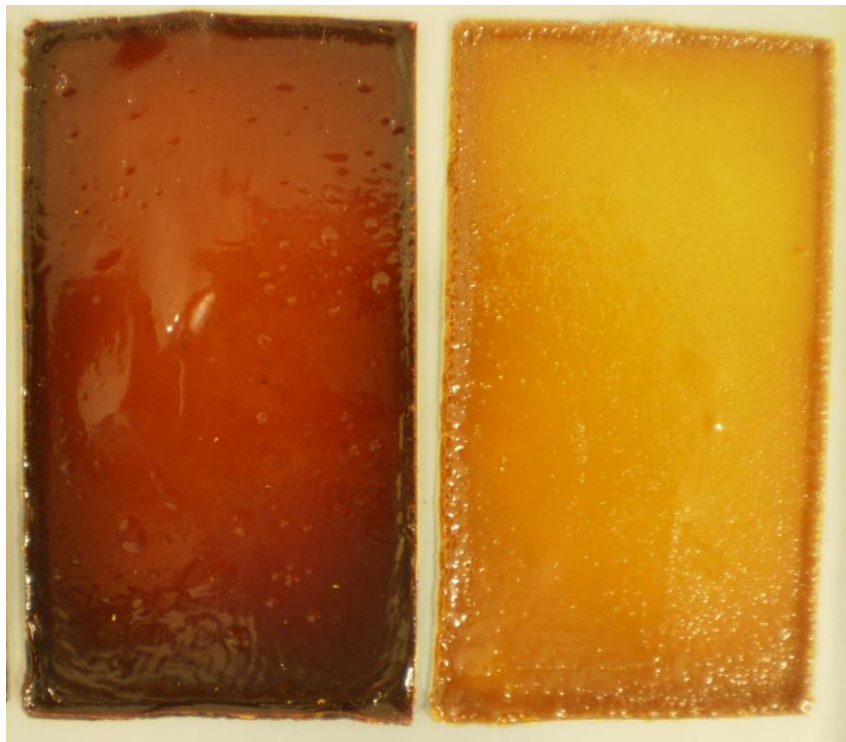
Folie s 20 % epichlorhydrinu o obsahu 30 % glycerolu.

Folie s 10 % glyoxalu a 30 % 1,2-dichlorethanu o obsahu 30 % glycerolu.

Všechny připravené folie měly rozměry cca 12 cm × 7 cm × 1 mm. Barva folií byla jednak hnědá (dalo by se říci medově hnědá) a umožňovala i částečný průchod světla. Světlejších odstínů hnědé byly folie neobsahující žádné síťující činidlo a folie obsahující dialdehyd škrobu. Tmavších odstínů hnědé (až velmi tmavé) pak byly folie obsahující glyoxal. Folie s obsahem epichlorhydrinu byly světle žluté barvy umožňující částečný průchod světla.



Obr. 11: Vlevo folie s 30 % glycerolu, vpravo folie s 10 % glyoxalu a 30 % glycerolu



Obr. 12: Vlevo folie s 10 % dialdehydu škrobu a 30 % glycerolu, vpravo folie s 10 % epichlorhydrinu a 30 % glycerolu

Všechny folie obsahující 10 % glycerolu jako změkčovadla byly velmi křehké, z formy se nedaly vyjmout a při manipulaci došlo k destrukci folie na velmi malé části.

Všechny folie obsahující 20 % glycerolu byly také dosti křehké, z formy šly vyjmout a při manipulaci se rozpadaly většinou na dvě části. Dá se však říci, že v průběhu jejich stárnutí se jejich ohebnost zvyšovala a stávaly se tak časem poměrně plastické.

Všechny folie obsahující 40 % glycerolu špatně vysychaly a tak i po dlouhé době vysychání připomínaly spíše vysoce viskózní kapalinu.

Nejlepšího výsledku dosáhly folie s obsahem 25 % a 30 % glycerolu jako změkčovadla. Všechny tyto folie byly velmi ohebné. Bylo možné s nimi opakovaně manipulovat a opakovaně je namáhat ohybem, aniž by docházelo k jejich poškození. Taktéž bylo možné tyto folie namáhat mírným tahem v rukou, aniž by docházelo k jejich přetržení. Povrch folií s obsahem 30 % změkčovadla byl však s přibývajícím časem částečně lepkavý. Tato jejich vlastnost se projevila spíše za vyšších teplot, kdy docházelo k částečnému přilepení folií k podložce. Folie s obsahem 25 % změkčovadla byly pak zpočátku křehčí, s časem se však stávaly velmi ohebné a jejich povrch pak vykazoval minimální lepkavost.



Obr. 13: Folie s 30 % glycerolu jako změkčovadla v ohybu

Zajímavou vlastností keratinových folií je jejich značná adheze k různým materiálům a schopnost tak tvořit jejich pevné povlaky. Pro odlévání folií byly použity pružné silikonové formy, ze kterých šly folie dobře vyjmout. Při odlévání folií do skla (petriho misky) a také do nerezové formy měly keratinové filmy k použitým formám značnou adhezi. Vyjmout nešly a bylo tak nutné je značnou silou z forem v podstatě vysekat ostrým nástrojem.

Všechny zhotovené folie byly podrobeny zkoušce rozpustnosti ve vodě. Vždy celá folie byla ponořena do kádinky s vodou o pokojové teplotě. Této zkoušce byly tedy podrobeny tyto připravené keratinové folie:

Folie bez sířovadla o obsahu 10 %, 20 %, 25 %, 30 % a 40 % glycerolu. Folie s 10 % glyoxalu o obsahu 10 %, 20 %, 25 %, 30 % a 40 % glycerolu. Folie s 10 % dialdehydu škrobu o obsahu 10 %, 20 %, 25 %, 30 % a 40 % glycerolu. Folie s 10 % epichlorhydrinu o obsahu 10 %, 20 %, 25 %, 30 % a 40 % glycerolu. Folie s 10 % glyoxalu o obsahu 30 % glycerolu připravená za refluxu reakčního roztoku. Folie s 10 % glyoxalu o obsahu 30 % glycerolu připravená za použití pyrosiřičitanu sodného. Folie s 20 % glyoxalu o obsahu 30 % glycerolu. Folie s 20 % dialdehydu škrobu o obsahu 30 % glycerolu. Folie s 20 % epichlorhydrinu o obsahu 30 % glycerolu. Folie s 10 % glyoxalu a 30 % 1,2-dichlorethanu o obsahu 30 % glycerolu.

Všechny tyto folie reagovaly s vodou ve velmi krátkém čase. Do 15 minut došlo u všech vzorků ke značnému poškození struktury folie. Do 30 minut byly pak všechny folie v podstatě rozpuštěny. Malá odolnost vůči vodě je patrná už při kontaktu folií s vlhkým předmětem. Již při otření všech folií vlhkou buničinou docházelo k uvolňování materiálu z folií a zbarvení buničiny.

3.6 Výsledky přípravy folií z keratinového hydrolyzátu s tepelnou expozicí

Byly připraveny tyto folie z keratinového hydrolyzátu (postup dle části 2.5 a 2.6):

Jedna folie s 10 % glyoxalu o obsahu 30 % glycerolu.

Jedna folie s 10 % dialdehydu škrobu o obsahu 30 % glycerolu.

Jedna folie s 10 % epichlorhydrinu o obsahu 30 % glycerolu.

Po vyschnutí byly folie vystaveny následnému působení tepla. Byly vyhřátý na 80 °C a na této teplotě udržovány po dobu 20 hodin. Zhotovené folie byly podrobeny zkoušce rozpustnosti ve vodě. Vždy celá folie byla ponořena do kádinky s vodou o pokojové teplotě.

Všechny folie s vodou ihned reagovaly a v krátkém čase došlo u všech vzorků k destrukci struktury. Do 30 minut byly pak folie z podstatné části rozpuštěny. Už při pouhém kontaktu těchto folií s vlhkou buničinou docházelo k uvolňování materiálu a zbarvení buničiny.

Další účinky tepelného působení na folie jsou pak uvedeny také v následující kapitole.

3.7 Výsledky měření keratinových folií pomocí diferenční skenovací kalorimetrie

Byly připraveny tyto folie z keratinového hydrolyzátu (postup dle části 2.5 a 2.7):

Jedna folie bez obsahu reakčního činidla o obsahu 30 % glycerolu.

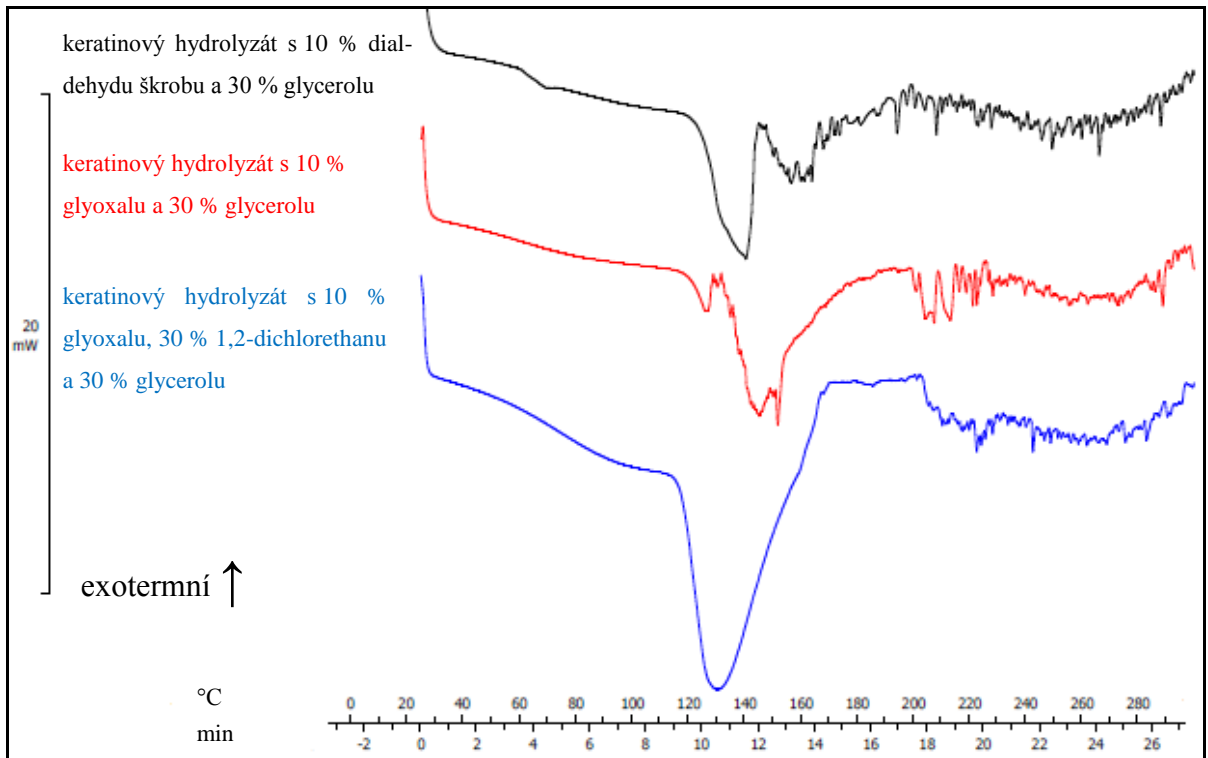
Jedna folie s 10 % glyoxalu o obsahu 30 % glycerolu.

Jedna folie s 10 % dialdehydu škrobu o obsahu 30 % glycerolu.

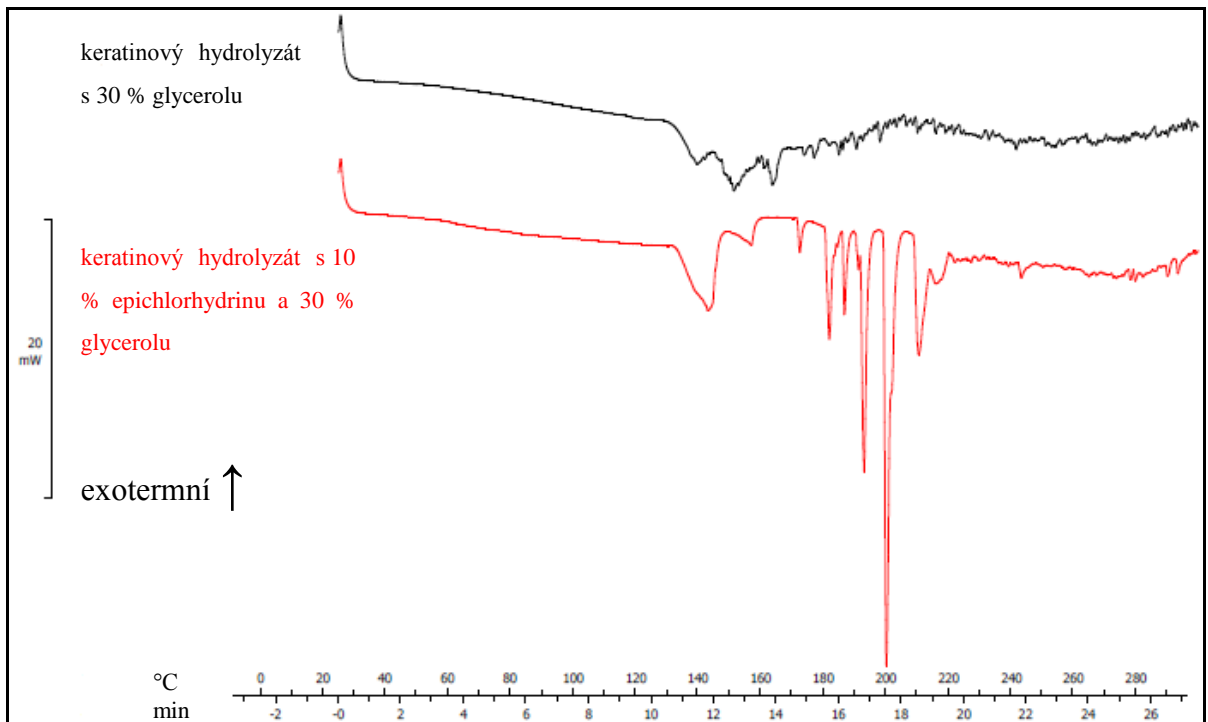
Jedna folie s 10 % epichlorhydrinu o obsahu 30 % glycerolu.

Jedna folie s 10 % glyoxalu, 30 % 1,2-dichlorethanu o obsahu 30 % glycerolu.

Všechny tyto folie byly následně analyzovány metodou diferenční skenovací kalorimetrie (DSC). Dá se říci, že všechny výsledné grafy z této analýzy mají od počátku endotermní charakter. Kolem 120 °C pak začínají mít výsledné grafy charakter prudce endotermní. Tyto výsledky lze však interpretovat různě. Byl proto proveden experiment, který měl dění ve výrazně endotermní oblasti (cca 120 °C – 140 °C) vysvětlit. Folie obsahující 10 % glyoxalu a 30 % glycerolu byla v sušárně udržována na teplotě cca 130 °C po dobu 30 min. Stejná folie byla ponořena do isoamylalkoholu (folie je v tomto rozpouštědle nerozpustná, teplota varu tohoto rozpouštědla je cca 130 °C). Isoamylalkohol s ponořenou folií byl vyhřát k varu a refluxován po dobu cca 30 minut. Vlivem tohoto tepelného působení došlo jednak k tání folií a nakonec z obou folií zbytek připomínající organické látky, které byly vystaveny účinkům karbonizace. Dá se tedy říci, že prudce endotermní charakter grafu (kolem 120 °C) představuje tání materiálu, odpařování nízkomolekulárních složek a také jistou formu degradace materiálu. Tento poznatek je pak také zajímavý v kontextu zjištění z předcházející kapitoly (3.6).



Obr. 14: Výsledky diferenční skenovací kalorimetrie keratinových folií č. 1



Obr. 15: Výsledky diferenční skenovací kalorimetrie keratinových folií č. 2

3.8 Výsledky měření keratinových folií pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací

Byly připraveny tyto folie z keratinového hydrolyzátu (postup dle části 2.5 a 2.8):

Jedna folie bez obsahu reakčního činidla o obsahu 30 % glycerolu.

Jedna folie s 10 % glyoxalu o obsahu 30 % glycerolu.

Jedna folie s 10 % dialdehydu škrobu o obsahu 30 % glycerolu.

Jedna folie s 10 % epichlorhydrinu o obsahu 30 % glycerolu.

Jedna folie s 10 % glyoxalu, 30 % 1,2-dichlorethanu o obsahu 30 % glycerolu.

Všechny tyto folie byly následně analyzovány metodou infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR).

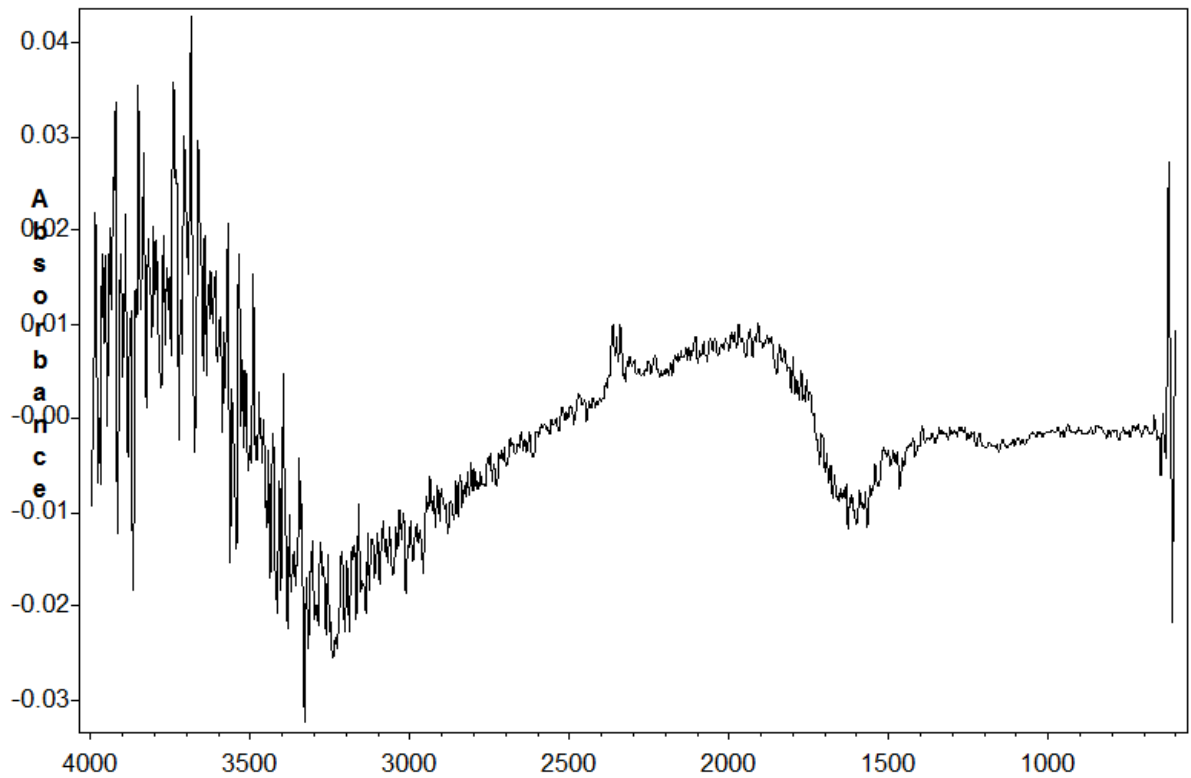
Absorbující charakter vazby N – H aminů by se měl projevovat přibližně v rozsahu vlnočtů $3000 - 3500 \text{ cm}^{-1}$. Tato oblast absorpance je také ve výsledných grafech výrazná. V tomto pásmu je možné hledat jednak původní N – H₂ skupiny, reakcí následně vznikající N – H skupiny a také zbylé peptidové vazby hydrolyzovaných řetězců.

Absorbující charakter vazby C = O aldehydů by se měl projevovat přibližně v rozsahu vlnočtů $1700 - 1750 \text{ cm}^{-1}$. Pro analyzované folie obsahující dialdehyd škrobu a glyoxal je absorpance v tomto pásmu zřetelná.

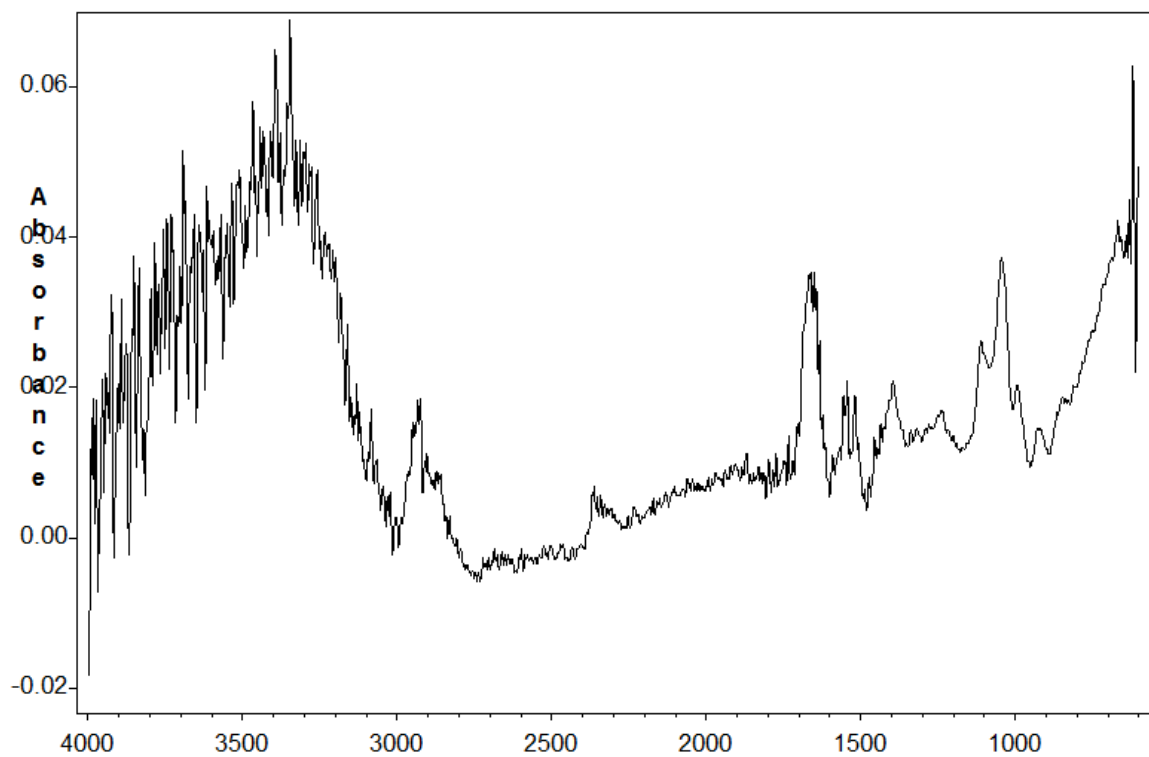
Absorbující charakter epichlorhydrinu by se měl projevovat přibližně v rozsahu vlnočtů $1200 - 1350 \text{ cm}^{-1}$. Naměřené hodnoty analyzovaného vzorku vykazují absorpaci v tomto pásmu avšak tato absorpance má výrazně nižší hodnoty proti standardu.

Naměřené hodnoty absorpací by mohly ukazovat na neochotu funkčních skupin použitých činidel reagovat s keratinovým hydrolyzátem nebo také na jejich velký molární přebytek.

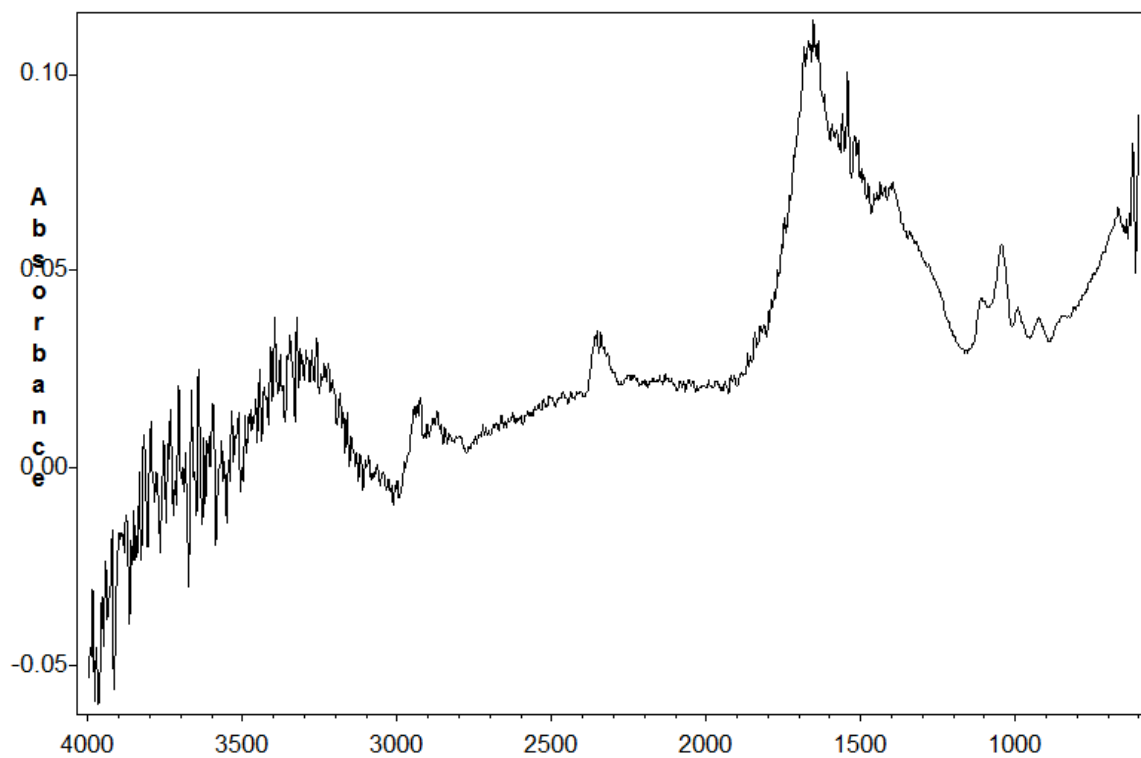
V následujících grafech pak č. 1 vždy znamená měření bez jakéhokoli pozadí a č. 2 měření kdy byla jako pozadí použita folie bez obsahu reakčního činidla o obsahu 30 % glycerolu.



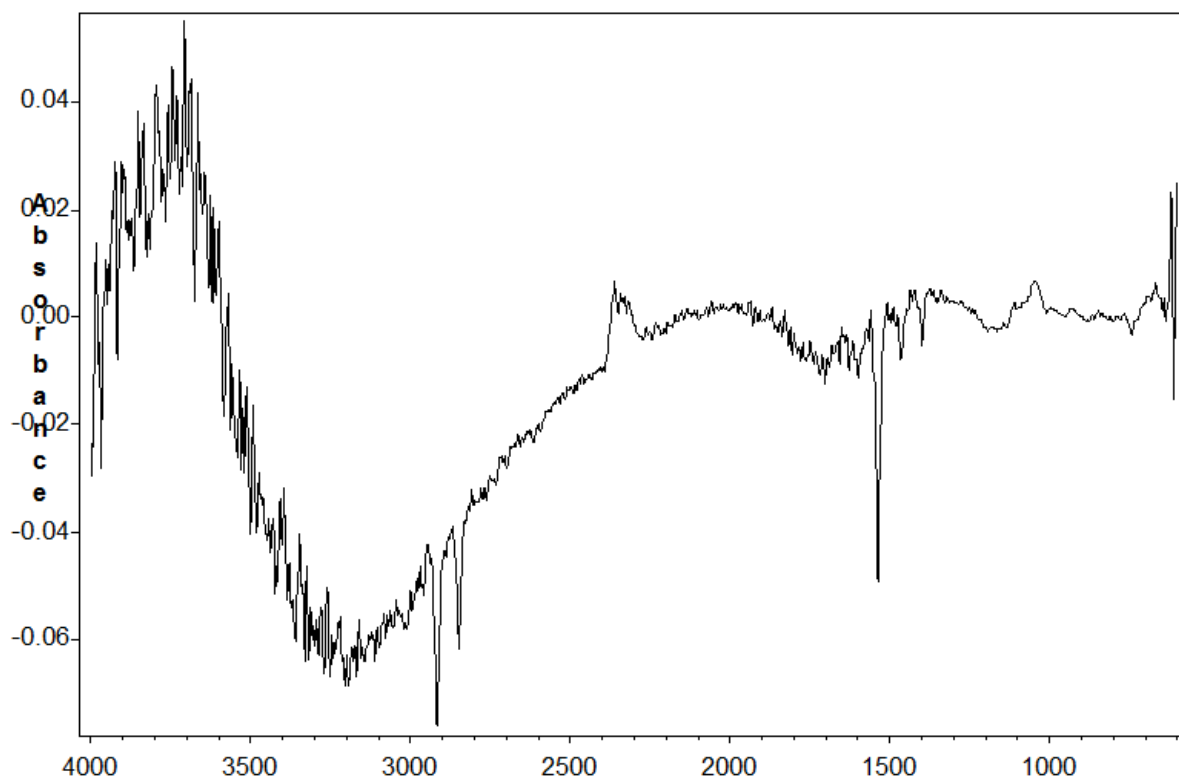
Obr. 16: Výsledky infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací pro folii bez obsahu reakčního činidla o obsahu 30 % glycerolu



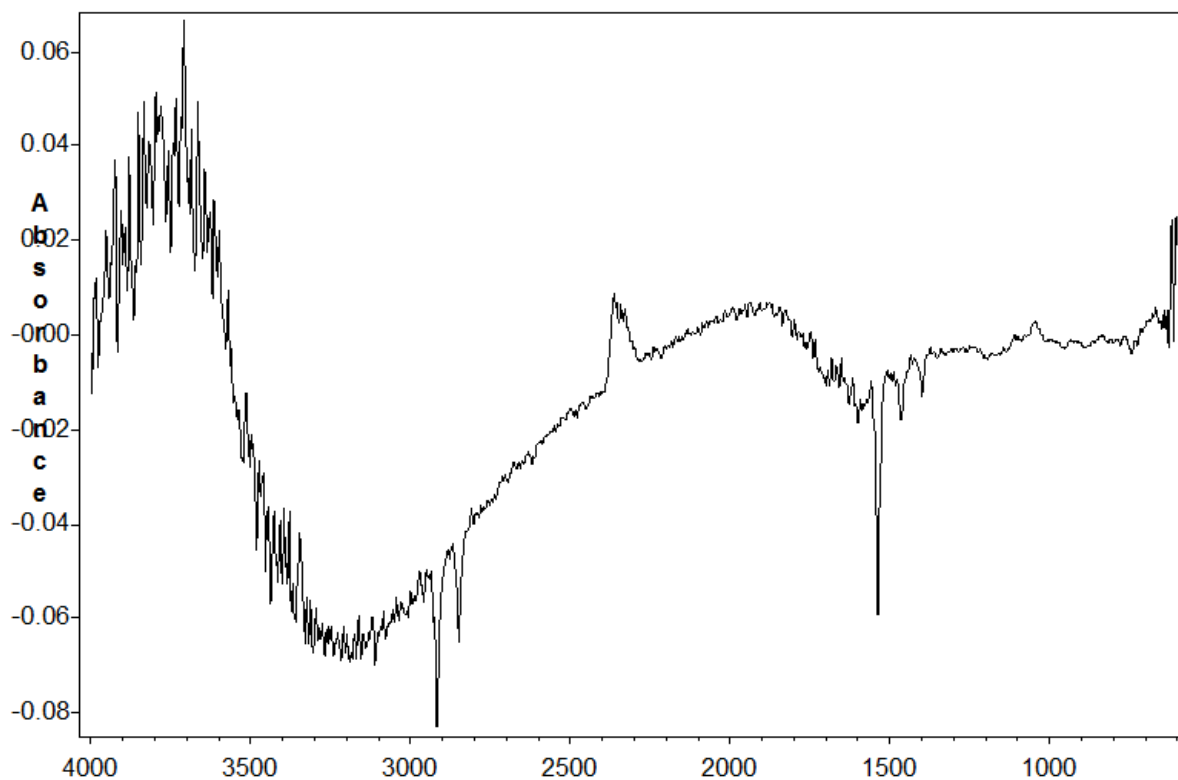
Obr. 17: Výsledky infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací pro folii s 10 % dialdehydu škrobu o obsahu 30 % glycerolu č. 1



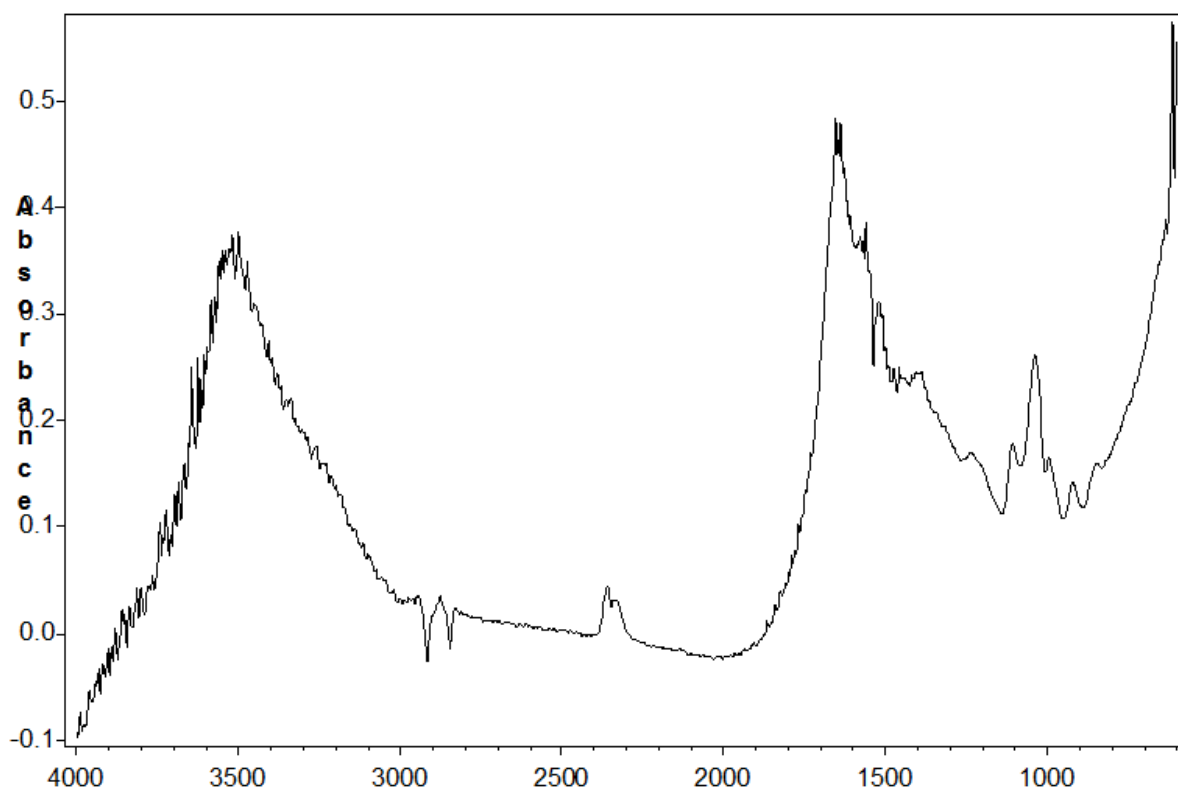
Obr. 18: Výsledky infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací pro folii s 10 % glyoxalu o obsahu 30 % glycerolu č. 1



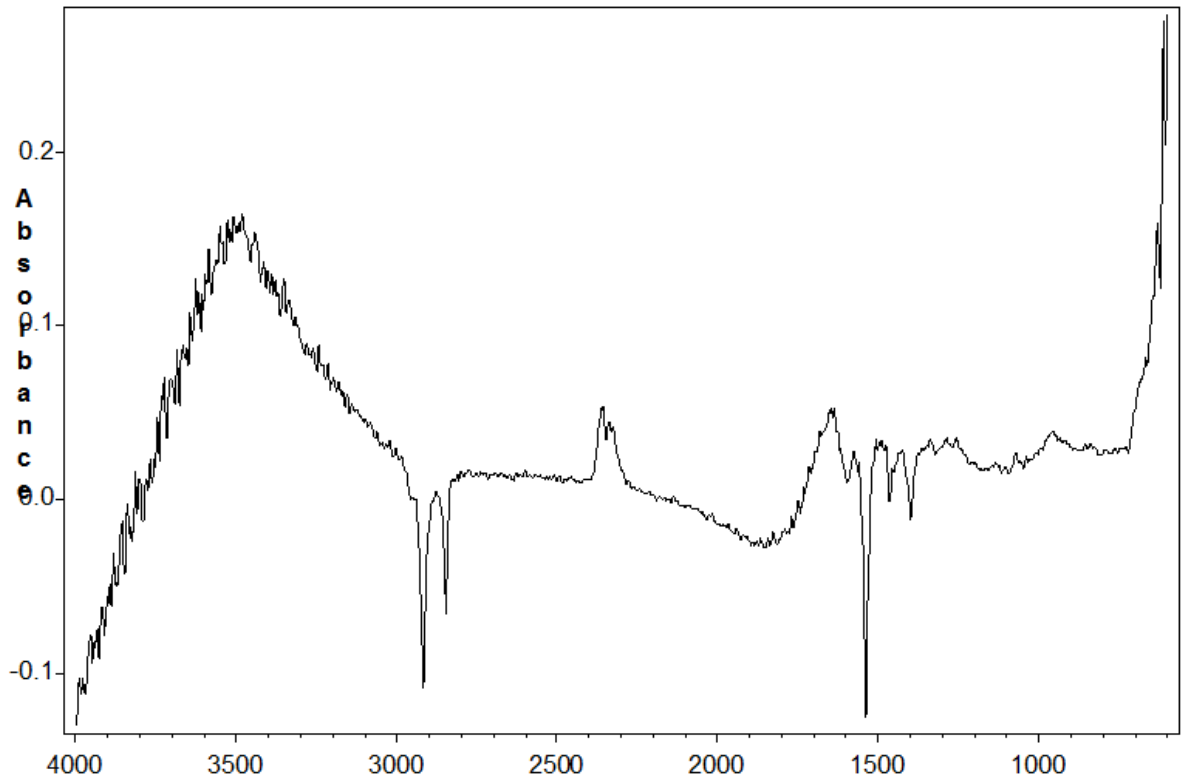
Obr. 19: Výsledky infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací pro folii s 10 % epichlorhydrinu o obsahu 30 % glycerolu č. 1



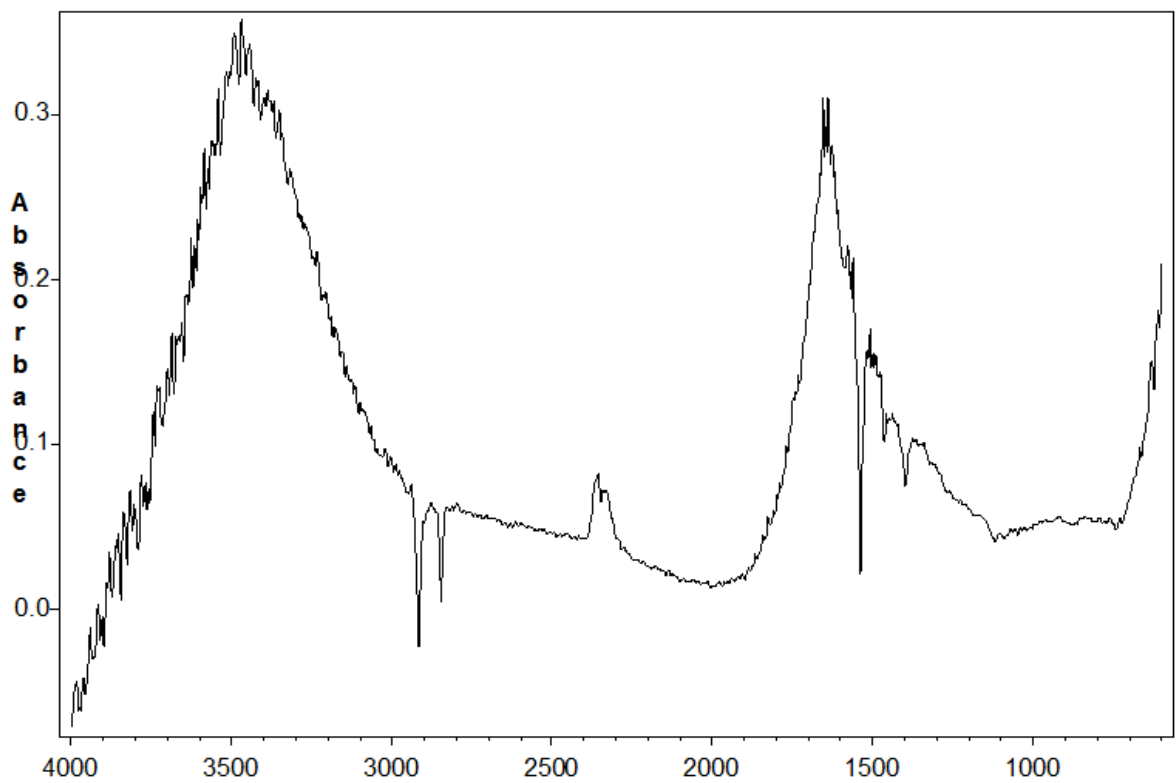
Obr. 20: Výsledky infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací pro folii s 10 % glyoxalu, 30 % 1,2-dichlorethanu o obsahu 30 % glycerolu č. 1



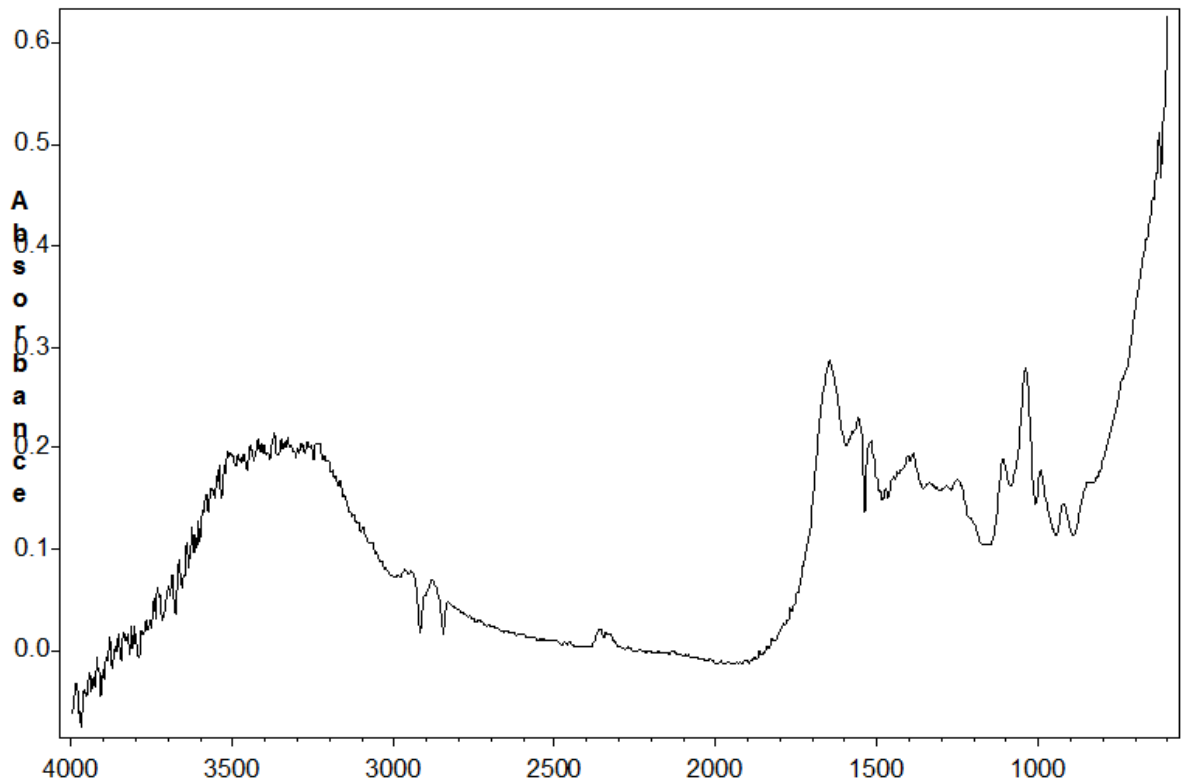
Obr. 21: Výsledky infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací pro folii s 10 % dialdehydu škrobu o obsahu 30 % glycerolu č. 2



Obr. 22: Výsledky infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací pro folii s 10 % glyoxalu o obsahu 30 % glycerolu č. 2



Obr. 23: Výsledky infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací pro folii s 10 % epichlorhydrinu o obsahu 30 % glycerolu č. 2



Obr. 24: Výsledky infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací pro folii s 10 % glyoxalu, 30 % 1,2-dichlorethanu o obsahu 30 % glycerolu č. 2

ZÁVĚR

Teoretická část této práce se postupně zabývá výskytem keratinu, jeho aminokyselinovým složením, molekulární a nadmolekulární strukturou a chemickými vazbami. Největší díl teoretické části se poté věnuje chemickým reakcím keratinu a praktickým příkladům jejich využití v technické praxi. Poslední část teorie je pak věnována keratinu jakožto vedlejšímu produktu živočišné výroby.

V experimentální části byl proveden rozklad většího množství biologického materiálu (1000 g) alkalicko – enzymovou hydrolyzou pro ověření tohoto postupu na větším než laboratorním množství. Pro srovnání byly provedeny dva tyto rozklady a to s odlišným vstupním materiálem. V prvním experimentu byla jako biologický materiál použita vlna, ve druhém bylo použito peří.

Účinnost alkalicko – enzymové hydrolyzy vlny dosáhla 79,6 % a po vysušení bylo získáno 740 g suchého hydrolyzátu. Získaný materiál měl žluto-hnědou barvu, byl bez zápachu nebo i dá se říci mírně příjemného aroma. Toto získané množství materiálu také vytvořilo dostatečnou zásobu pro následné experimenty. Peří podlelo stejné hydrolyze o poznání snadněji a rozložilo se skoro všechno. Účinnost alkalicko – enzymové hydrolyzy dosáhla 97 %. Získaný materiál z peří je však materiálem dosti nepříjemného zápachu což může být i na překážku pro jeho využití.

I přes použití alkalicko – enzymové hydrolyzy je celý rozkladný proces značně energeticky náročný. V dalším experimentu byl tedy proveden rozklad za použití stejných koncentrací činidel jako v předešlých experimentech. Reakční směs však nebyla vyhřívána, byla ponechána na pokojové teplotě a byl značně prodloužen reakční čas rozkladu.

Účinnost alkalicko – enzymové hydrolyzy vlny bez ohřevu směsi (tedy jen při pokojové teplotě) dosáhla po čtyřiceti dnech účinnosti 55 %. Je tedy patrné, že časový faktor má na celý postup značný vliv. Dostatečně dlouhý reakční čas by tedy do jisté míry mohl nahradit množství potřebné energie.

Pro reakce keratinového hydrolyzátu s různými chemickými činidly je zapotřebí použití vhodného společného rozpouštědla. Rozpustnost vyrobeného keratinového hydrolyzátu tak byla testována na řadě rozpouštědel.

Jediné nalezené dobré rozpouštědlo je voda. O něco horší je pak rozpustnost v kyselině octové (o obsahu 99 %). Jiné vhodné rozpouštědlo se nalézt nepodařilo. Je to poznatek velmi negativní a omezující. Voda jako dobré rozpouštědlo hydrolyzátu je zároveň v mnoha případech nevhodným rozpouštědlem pro případná chemická činidla. Tato buď ve vodě nejsou rozpustná, nebo naopak s vodou reagují.

Získaný hydrolyzát obsahuje velké množství nežádoucích příměsí, jako například draselné soli. Pomocí dialýzy hydrolyzátu byl učiněn pokus obsah těchto příměsí snížit. Použitým analytickým postupem pro zjištění množství těchto příměsí bylo stanovení obsahu popela.

Nedialyzovaný keratinový hydrolyzát obsahoval 20,89 % popela. Dialyzovaný keratinový hydrolyzát obsahoval 5,4 % popela, tedy hodnotu výrazně mírnější.

Cílem dalšího experimentu bylo pokusit se připravit ze získaného hydrolyzátu materiál ve formě folie, který by měl vhodné fyzikální a chemické vlastnosti. Zvoleným postupem k dosažení tohoto cíle byla reakce keratinových řetězců (obsažených v hydrolyzátu) s různými činidly. Použitá činidla mají potenciál tvořit mezimolekulární kovalentní (příčné) vazby nebo mohou působit jako změkčovadlo. Jako činidlo byl použit glyoxal, dialdehyd škrobu, epichlorhydrin a 1,2-dichlorethan. Jako změkčovadlo pak glycerol. V postupech byly použity různé koncentrace těchto látek a také postupy se nepatrně odlišovaly.

Nejlepšího výsledku dosáhly folie s obsahem 25 % a 30 % glycerolu jako změkčovadla. Všechny tyto folie byly velmi ohebné a bylo možné je opakovaně namáhat ohybem. Žádné zhotovené folie však nemají potřebnou odolnost proti vodě a ve vodném prostředí dochází k jejich rychlé destrukci a rozpouštění. Žádné použité chemické činidlo, použitá koncentrace a použitý postup, na tomto faktu nedokázaly nic změnit.

Byl učiněn pokus zvýšit odolnost folií proti vodě následným tepelným působením. Folie byly vyhřátý na 80 °C a na této teplotě udržovány po dobu 20 hodin. Snahou bylo zvýšit hustotu příčného kovalentního síťování. Ani tato následná tepelná expozice však odolnost folií proti vodnému prostředí nezvýšila.

Při analýze pomocí diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) měly grafy analyzovaných folií od počátku endotermní charakter. Kolem teploty 120 °C je pak charakter všech grafů prudce endotermní. Následným experimentem bylo zjištěno, že prudce endotermní charakter grafu (kolem 120 °C) představuje tání materiálu, odpařování nízkomolekulárních složek a jistou formu degradace materiálu.

Zhotovené folie byly analyzovány metodou infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR). Nalezený absorbuující charakter vazby N – H aminů se projevuje přibližně v rozsahu vlnočtů $3000 - 3500 \text{ cm}^{-1}$. Nalezený absorbuující charakter vazby C = O aldehydů (dialdehydu škrobu a glyoxalu) se projevuje přibližně v rozsahu vlnočtů $1700 - 1750 \text{ cm}^{-1}$. Nalezený absorbuující charakter epichlorhydrinu se projevuje přibližně v rozsahu vlnočtů $1200 - 1350 \text{ cm}^{-1}$. Naměřené hodnoty by mohly ukazovat na neochotu funkčních skupin použitých činidel reagovat s keratinovým hydrolyzátem nebo na jejich velký molární přebytek.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VOET, D., VOETOVÁ, J. G. *Biochemie*. Vyd. 1. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-85605-44-9.
- [2] BLAŽEJ, Anton. *Technologie kůže a kožešin*. Vyd. 1. Praha: SNTL, 1984.
- [3] KLÁSEK, Antonín. *Nauka o polymerech II: biopolymery*. Vyd. 1. Praha: SNTL, 1980.
- [4] WIENER, J., PRŮŠOVÁ, J., KRYŠTŮFEK, J. *Chemicko – textilní rozbor*. Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2008.
- [5] WARD, Wilfred H., LUNDGREN Harold P. The Formation, Composition, and Properties of Keratins. *Advances in Protein Chemistry*. 1954, vol. 9, p. 243-297.
- [6] Základy biochemie. Proteiny, peptidy a aminokyseliny. Inovace studia biochemie prostřednictvím e-learningu, CZ. 04. 1.03/3.2. 15.3/0407. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta. [online]. [cit. 2013-02-09].
Dostupné z WWW:
https://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:kaBJKLiYspsJ:bio.host.sk/Modul-01a.pdf+Z%C3%A1klady+biochemie+KBC+//BCH+Proteiny,+peptidy&hl=cs&gl=cz&pid=bl&srcid=ADGEESiprKomBZCaujcc9GD1TLFmzqnTIVvujR3UFV0LCsyhW5a6ZtXlqLUg8nB8A9tc_yZTCEmLPqfaWchRnKxpOCIQt1KJjWKv6h0AO4jFh-I1rsYKffPx3LH1nf90rsCy9g54HYd2&sig=AHIEtbTXej7RTBfQJ-20oBINQPe6bFzu6Q
- [7] Biodata Oy, Helsinki, Finland. *Procedure for hydrolyzing keratin*. JOUKO E. T. SAVOLAINEN. United States Patent, number 5,262,307. Nov., 16, 1993.
- [8] STOKLASA, Karel. *Makromolekulární chemie I*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005.
- [9] HLADÍK, V., et al. *Textilní vlákna*. Praha: SNTL, 1970.
- [10] KURBANOGU, E. B., KURBANOGU, N. I. A new process for the utilization as peptone of ram horn waste. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2002, vol. 94, no. 3, p. 202 - 206.

- [11] KURBANOGU, E. B. Enhancement of glycerol production with ram horn hydrolysate by yeast. *Energy Conversion and Management*. 2003, vol. 44, p. 2125 - 2133.
- [12] *Proteiny 2008: [sborník příspěvků V. ročníku mezinárodní konference]*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008. ISBN 978-80-7318-706-4.
- [13] NUSTOROVA, M. et al. Chemical, microbiological and plant analysis of soil fertilized with alkaline hydrolysate of sheep's wool waste. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2005.
- [14] COWARD-KELLY, G., CHANG, V. S., AGBOGBO, F. K., HOLTZAPPLE, M. T. Lime treatment of keratinous materials for the generation of highly digestible animal feed: 1. Chicken feathers. *Bioresource Technology*. 2006, vol. 97, p. 1337 - 1343.
- [15] FIALOVÁ, Anna. *Zpracování keratinových odpadů*. Diplomová práce (Ing.). Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 2006.
- [16] MATĚJČEK, Tomáš. *Enzymový rozklad keratinového odpadu masného průmyslu*. Bakalářská práce (Bc.). Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 2007.
- [17] MATĚJČEK, Tomáš. *Zpracování drůbežního perí na keratinový hydrolyzát*. Diplomová práce (Ing.). Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 2009.
- [18] BRÁZDOVÁ, Lucie. *Příprava keratinového hydrolyzátu alkalicko-enzymovým rozkladem ovčí vlny*. Diplomová práce (Ing.). Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 2010.
- [19] MLÁDEK, Milan. *Zpracování odpadů kožedělného průmyslu*. Vyd. 1. Praha: SNTL, 1971.
- [20] Keraplast Technologies, Ltd. *Keratin-based powders and hydrogel for pharmaceutical applications*. Arlene J. Siller-Jackson, Mark E. Van Dyke, Scott F. Timmons, Cheryl R. Blanchard, Robert A. Smith. United States Patent, number 6,544,548 B1. Apr., 8, 2003.

- [21] Keraplast Technologies, Ltd. *Hydrogel with controllable mechanical, chemical, and biological properties and method for making same*. Mark E. Van Dyke. United States Patent, number 7,001,987 B2. Feb., 21, 2006.
- [22] SCHROOYEN, M. M. P. et al. Partially Carboxymethylated Feather Keratins.1. Properties in Aqueous Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, vol. 48, 4326-4334 s.
- [23] *Regenerated keratin*. Ralph L. Evans. N.Y. United States Patent, number 2,434,688. Nov., 3, 1942.
- [24] Regulation (EC) No 1774/2002 of the European Parliament and of the Council of 3 October 2002 laying down health rules concerning animal by-products not intended for human consumption [online]. [cit. 2012-01-10].
Dostupné z:
http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/specific_themes/f81001_en.htm
- [25] Ministerstvo životního prostředí [online]. [cit. 2012-10-09]. Dostupné z WWW:
http://www.mzp.cz/cz/platne_pravni_predpisy
- [26] WOLFGANG, Aehle. *Enzymes in Industry*. Third Edition. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007. ISBN 978-3-527-31689-2.
- [27] Internetový portál EuroChem [online]. [cit. 2013-03-18]. Dostupné z WWW:
<http://www.eurochem.cz/index.php?LA=CS>
- [28] ŠUJAN Pavol. *Sledování vlivu tepelné historie filmů připravených z hydrolyzátu kolagenu na jejich rozpustnost*. Bakalářská práce (Bc.). Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 2007.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Peptidová vazba (konfigurace trans a cis)

Obr. 2: Torzní úhly polypeptidu

Obr. 3: α -helix struktura

Obr. 4: β -struktura, skládaný list (a-antiparalelní, b-paralelní)

Obr. 5: Struktura keratinu ve vlasu

Obr. 6: Schéma vazeb vyskytujících se v keratinu

Obr. 7: Schéma přípravy keratinového hydrolyzátu alkalicko-enzymovým rozkladem

Obr. 8: Pomletá vlna

Obr. 9: Roztok keratinového hydrolyzátu získaný z vlny

Obr. 10: Suchý keratinový hydrolyzát získaný z vlny

Obr. 11: Vlevo folie s 30 % glycerolu, vpravo folie s 10 % glyoxalu a 30 % glycerolu

Obr. 12: Vlevo folie s 10 % dialdehydu škrobu a 30 % glycerolu, vpravo folie s 10 % epichlorhydrinu a 30 % glycerolu

Obr. 13: Folie s 30 % glycerolu jako změkčovadla v ohybu

Obr. 14: Výsledky diferenční skenovací kalorimetrie keratinových folií č. 1

Obr. 15: Výsledky diferenční skenovací kalorimetrie keratinových folií č. 2

Obr. 16: Výsledky infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací pro folii bez obsahu reakčního činidla o obsahu 30 % glycerolu

Obr. 17: Výsledky infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací pro folii s 10 % dialdehydu škrobu o obsahu 30 % glycerolu č. 1

Obr. 18: Výsledky infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací pro folii s 10 % glyoxalu o obsahu 30 % glycerolu č. 1

Obr. 19: Výsledky infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací pro folii s 10 % epichlorhydrinu o obsahu 30 % glycerolu č. 1

Obr. 20: Výsledky infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací pro folii s 10 % glyoxalu, 30 % 1,2-dichlorethanu o obsahu 30 % glycerolu č. 1

Obr. 21: Výsledky infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací pro folii s 10 % dialdehydu škrobu o obsahu 30 % glycerolu č. 2

Obr. 22: Výsledky infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací pro folii s 10 % glyoxalu o obsahu 30 % glycerolu č. 2

Obr. 23: Výsledky infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací pro folii s 10 % epichlorhydrinu o obsahu 30 % glycerolu č. 2

Obr. 24: Výsledky infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací pro folii s 10 % glyoxalu, 30 % 1,2-dichlorethanu o obsahu 30 % glycerolu č. 2

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Aminokyselinové složení keratinů

Tabulka 2: Aminokyselinové složení keratinového hydrolyzátu dle příkladu 3

Tabulka 3: Aminokyselinové složení keratinového hydrolyzátu dle příkladu 7

Tabulka 4: Dosažené výsledky při použití enzymu Savinase Ultra 16 L

Tabulka 5: Dosažené výsledky při použití enzymu Polarzyme 12 L

Tabulka 6: Přehled vedlejších produktů živočišného původu

Tabulka 7: Výsledky přípravy keratinového hydrolyzátu bez ohřevu směsi

SEZNAM SCHÉMÁT

Schéma 1: Hydrolýza disulfidické vazby keratinu

Schéma 2: Hydrolýza polypeptidické vazby

Schéma 3: Působení nízkých koncentrací alkálií za mírných teplot na keratin

Schéma 4: Působení alkálií na asparagin

Schéma 5: Působení alkálií na glutamin

Schéma 6: Působení alkálií na arginin

Schéma 7: Oxidace disulfidické vazby keratinu bez jejího štěpení

Schéma 8: Oxidace disulfidické vazby keratinu s jejím štěpením

Schéma 9: Příprava hydratovatelného keratinu, který v reakci s vodou tvoří hydrogel (dle příkladu 12)

Schéma 10: Příprava aktivní farmaceutická substance začleněné do struktury keratinového materiálu (dle příkladu 12)

Schéma 11: Redukce disulfidické vazby keratinu

Schéma 12: Příprava redukováného keratinu (dle příkladu 14)

Schéma 13: Vznik allysinu a hydroxyallysinu

Schéma 14: Reakce allysinu s lysinem

Schéma 15: Reakce allysinu s hydroxylysinem

Schéma 16: Reakce hydroxyallysinu s hydroxylysinem

Schéma 17: Vzájemná reakce aldehydů (allysinu)

Schéma 18: Tvorba příčných vazeb pomocí aldehydu

Schéma 19: Tvorba příčných vazeb pomocí izokyanátu

Schéma 20: Tvorba příčných vazeb pomocí epoxydové sloučeniny

Schéma 21: Tvorba příčných vazeb pomocí ethylendichloridu (dle příkladu 16)

Schéma 22: Tvorba příčných vazeb pomocí kyseliny tereftalové (dle příkladu 17)

Schéma 23: Síťování keratinu glyoxalem

Schéma 24: Síťování keratinu dialdehydem škrobu

Schéma 25: Síťování keratinu epichlorhydrinem

Schéma 26: Síťování keratinu glyoxalem a 1,2-dichlorethanem