

Keratinové hydrolyzáty a jejich využití pro přípravu filmů

Bc. Eva Jelínková

Diplomová práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Eva Jelínková**
Osobní číslo: **T13376**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství polymerů**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Keratinové hydrolyzáty a jejich využití pro přípravu filmů**

Zásady pro vypracování:

Cílem teoretické části práce bude rešerše o možnostech přípravy keratinových hydrolyzátů a jejich využití pro tvorbu filmů, povlaků a fólií. Cílem experimentální části práce bude příprava keratinového hydrolyzátu z ovčí vlny, jeho charakterizace a následné využití pro odlévání filmů. U takto připravených filmů budou dále studovány jejich vlastnosti.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

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

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

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

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

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Ondřej Krejčí
Ústav inženýrství polymerů

Datum zadání diplomové práce:

16. ledna 2015

Termín odevzdání diplomové práce:

15. května 2015

Ve Zlíně dne 2. března 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




Ing. Lubomír Beníček, Ph.D.
ředitel ústavu

P R O H L Á Š E N Í

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, považuji 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 5. 5. 2015

Jelínková Eva
.....

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

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

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

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

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění

školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

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, § 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 užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.
- (3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Diplomová práce se věnuje výrobě keratinových hydrolyzátů z odpadních surovin a následné přípravě keratinových filmů, které mají velký potenciál v mnoha aplikacích. Teoretická část diplomové práce shrnuje základní informace o keratinu, dále popisuje přípravu keratinových hydrolyzátů a tvorbu keratinových filmů včetně jejich aplikačních možností. V praktické části byl nejprve připraven keratinový hydrolyzát alkalicko-enzymovou hydrolýzou za působení enzymu Esperase 6.0T, který byl dále využit pro vytvoření filmů. Při přípravě filmů bylo použito změkčovadlo glycerol a síťovací činidlo chitosan, jehož množství se pohybovalo v rozmezí 0 – 30 %. Stejně množství síťovacího činidla bylo použito i u dalších filmů, které byly vytvořeny z hydrolyzátu připraveného pomocí enzymu Savinase 6.0T. Vlna, nerozložený podíl vlny, oba hydrolyzáty a všechny filmy byly dále testovány analytickými a instrumentálními metodami.

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

ABSTRACT

This master thesis deals with a production of keratin hydrolysates from waste materials and next preparation of keratin films, which have a great potential in many applications. The theoretical part of master thesis summarizing basic information about keratin, then describes preparation of keratin hydrolysates and production of keratin films, including their application possibilities. In the practical part firstly keratin hydrolysate was prepared by alkali-enzymatic hydrolysis with enzyme Esperase 6.0T. Keratin hydrolysate was further used for preparation of films. The plasticizer glycerol and crosslinking agent chitosan were used for preparation of films. Amount of chitosan was between 0 to 30 %. The same amount of crosslinking agent was used also for preparation another films, which was created from hydrolysate prepared with enzyme Savinase 6.0T. Wool, undecomposed part of wool, hydrolysates and films were further tested by analytical and instrumental methods.

Keywords: wool, keratin, hydrolysis, films, chitosan

Ráda bych zde poděkovala svému vedoucímu Ing. Ondřeji Krejčímu, Ph.D. za odborné vedení, laskavou pomoc a cenné připomínky při tvorbě diplomové práce. Zároveň bych na tomto místě ráda poděkovala paní laborantce Miroslavě Žaludkové za obětavou pomoc a asistenci v laboratoři a paní Mgr. Michaelae Bařinové, Ph.D. za odbornou konzultaci.

Poslední poděkování patří mé rodině a přátelům za trpělivost a podporu během celého studia.

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 STRUKTURA KERATINU	12
1.2 AMINOKYSELINOVÉ SLOŽENÍ KERATINU.....	15
1.3 AMINOKYSELINOVÉ SLOŽENÍ KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ	17
2 OVČÍ VLNA	19
3 PRODUKCE KERATINOVÉHO ODPADU A JEHO VYUŽITÍ	20
4 HYDROLÝZA KERATINU	22
5 KERATINOVÉ FILMY Z OVČÍ VLNY	24
6 OPTIMALIZACE KERATINOVÝCH FILMŮ	25
6.1 PŘIDÁNÍ PŘÍRAD.....	25
6.2 SÍŤOVÁNÍ.....	26
7 APLIKACE KERATINU	29
7.1 VYUŽITÍ KERATINU V LÉKAŘSTVÍ.....	29
7.1.1 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ.....	29
7.1.2 DORUČOVÁNÍ LÉČIV	30
7.2 VYUŽITÍ KERATINU V ZEMĚDĚLSTVÍ	31
7.3 VYUŽITÍ KERATINU V KOSMETICE.....	32
II PRAKTICKÁ ČÁST	33
8 CÍLE A POSTUPY DIPLOMOVÉ PRÁCE	34
9 MATERIÁLY A POSTUPY	35
9.1 VSTUPNÍ MATERIÁL.....	35
9.2 SOUHRN POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ, MATERIÁLŮ A PŘÍSTROJŮ.....	35
9.3 ANALYTICKÉ STANOVENÍ A DALŠÍ METODY	37
9.3.1 Mikrochemické stanovení obsahu dusíku – Micro-Kjeldahlova metoda – AOAC 960.52	37
9.3.2 Stanovení obsahu síry srážením roztokem chloridu barnatého – AOAC 955.48.....	39
9.3.3 Stanovení obsahu popelovin	41
9.3.4 Stanovení obsahu tuku	42
9.3.5 Stanovení botnání a rozpustnosti	42
9.3.6 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací.....	43
9.3.7 Diferenciální skenovací kalorimetrie	43
9.3.8 Termogravimetrická analýza.....	44
10 POSTUP PRÁCE	45
10.1 PŘÍPRAVA KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU.....	45
10.2 PŘÍPRAVA FILMŮ	49
11 VÝSLEDKY A DISKUZE	52

11.1	ÚČINNOST HYDROLÝZY	52
11.2	STANOVENÍ OBSAHU DUSÍKU	52
11.3	STANOVENÍ OBSAHU SÍRY	53
11.4	STANOVENÍ OBSAHU POPELOVIN	53
11.5	STANOVENÍ OBSAHU TUKU	54
11.6	STANOVENÍ BOTNÁNÍ A ROZPUSTNOSTI	54
11.7	INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE S FOURIEROVOU TRANSFORMACÍ.....	58
11.8	DIFERENCIÁLNÍ SKENOVACÍ KALORIMETRIE.....	61
11.9	TERMOGRAVIMETRICKÁ ANALÝZA	64
12	ZÁVĚR.....	69
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	71
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	78
	SEZNAM OBRÁZKŮ	79
	SEZNAM TABULEK.....	80
	SEZNAM PŘÍLOH.....	81

ÚVOD

Vzhledem k vysokému množství každoročně vznikajícího keratinového odpadu je na místě otázka, jak tohoto odpadu vhodně využít. Výzkum zabývající se keratinem je díky aplikačním možnostem a vysokému množství surovinného zdroje perspektivní oblastí. Současné využití, které se zaměřuje především na kompostování, je nedostatečné. Dříve se keratinové odpady přidávaly do krmných směsí. Avšak kvůli ochraně lidského zdraví před infekcemi způsobenými patogenními mikroorganismy zvířecího původu, je tato aplikace v rámci EU zakázána.

Mezi hlavní nevýhody omezující široké využití patří energetická náročnost spojená s hydrolyzou keratinu. Keratiny jsou díky mechanické a chemické odolnosti obtížně zpracovatelné a k účinnému rozkladu se nejčastěji využívá energeticky náročná alkalická, kyselá či enzymová hydrolyza. Dalším limitujícím faktorem je použití látek, které mohou být zdraví nebezpečné. Jedná se například o síťovací činidlo formaldehyd či glutaraldehyd, které omezují použití v lékařství. Možným řešením je náhrada těchto látek přírodními, které nejsou zdraví nebezpečné. Příkladem může být přírodní polysacharid chitosan, který je použit v praktické části pro přípravu filmů.

Diplomová práce se v teoretické části zabývá popisem keratinu a možnostmi přípravy keratinových hydrolyzátů. Dále se věnuje využití hydrolyzátů v zemědělství, kosmetickém průmyslu či v lékařství. V praktické části diplomové práce je z ovčí vlny připravován keratinový hydrolyzát kombinovanou dvoustupňovou alkalicko-enzymovou hydrolyzou, jelikož kombinace těchto metod zvyšuje výtěžnost hydrolyzy. První stupeň hydrolyzy probíhá za působení $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a druhý stupeň za využití enzymu Esperase 6.0T. Z takto připraveného keratinového hydrolyzátu, změkčovadla glycerolu a síťovacího činidla chitosanu jsou dále připraveny filmy, které jsou odlity do silikonových formiček a usušeny. V praktické části jsou také připraveny filmy, které jsou tvořeny hydrolyzátem připraveným pomocí enzymu Savinase 6.0T, glycerolem a chitosanem. Druhý hydrolyzát byl pro praktickou část dodán již v hotové podobě.

U vzniklých filmů je zjišťována jejich rozpustnost a nárůst povrchu (botnání). Dále jsou testovány metodami infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací, diferenciální skenovací kalorimetrií a termogravimetrickou analýzou. U vlny, nerozloženého podílu a získaných hydrolyzátů je analyticky zjišťován obsah dusíku, síry, popelovin a tuku.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KERATIN

Keratiny (z řeckého slova kérias, znamenající roh) jsou vysoce specializované vláknité proteiny, označované jako skleroproteiny. Můžeme je naléznout v epidermálních tkáních obratlovců. Například v lidských vlasech a nehtech, v ovčí vlně, nosorožčím rohu, v rybích šupinách nebo také v peří, kopytech, drápech či zobácích. [1]

Obecně lze říci, že keratinová skupina proteinů je mechanicky pevná a strukturovaná tak, aby vyhovovala různým potřebám zvířat. Slouží například k ochraně před vnějšími vlivy jako je chlad a déšť (vlasy, vlna, peří), k umožnění mobility (peří a kopyta) nebo k maskování zvířat a identifikaci pohlaví (různé zbarvení a vzory). [1, 2, 3]

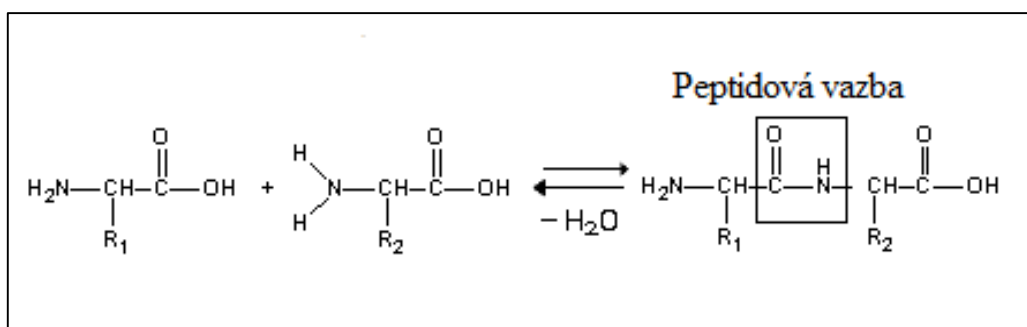
Keratin, podobně jako elastin, je vysoce nerozpustný protein odolávající vodě, slabým kyselinám a zásadám a organickým rozpouštědlům. Je odolný proti napadení běžnými proteolytickými enzymy, jako jsou trypsin nebo pepsin. Vysoká odolnost keratinu úzce souvisí s adaptací obratlovců na život na Zemi. [1, 4]

1.1 Struktura keratinu

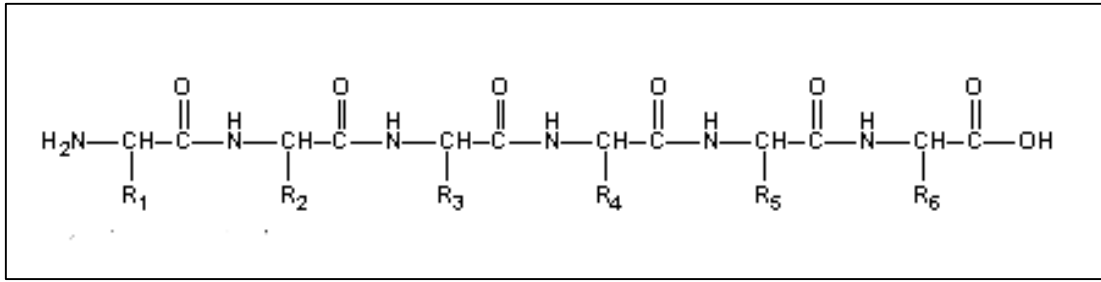
I přes značnou rozmanitost ve velikostech a tvarech mají keratinové materiály podobnou primární, sekundární a dokonce i terciární strukturu. [2]

PRIMÁRNÍ STRUKTURA

Primární strukturu keratinu, viz obrázek 2, tvoří hlavní polypeptidový řetězec, který vzniká spojením aminokyselin peptidovou vazbou, jak je znázorněno na obrázku 1. [2]



Obrázek 1: Spojení dvou aminokyselin peptidovou vazbou [5]

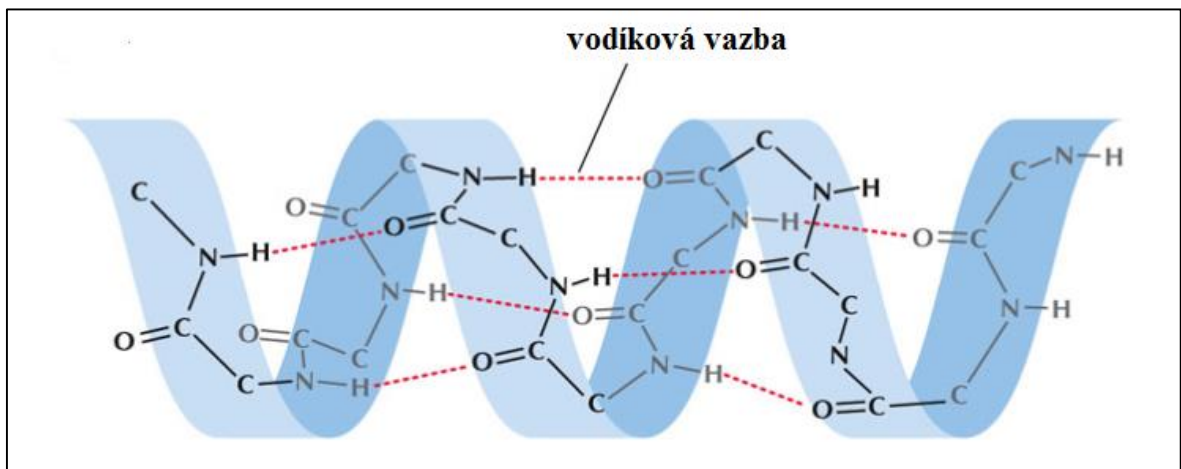


Obrázek 2: Obecný vzorec primární struktury keratinu [5]

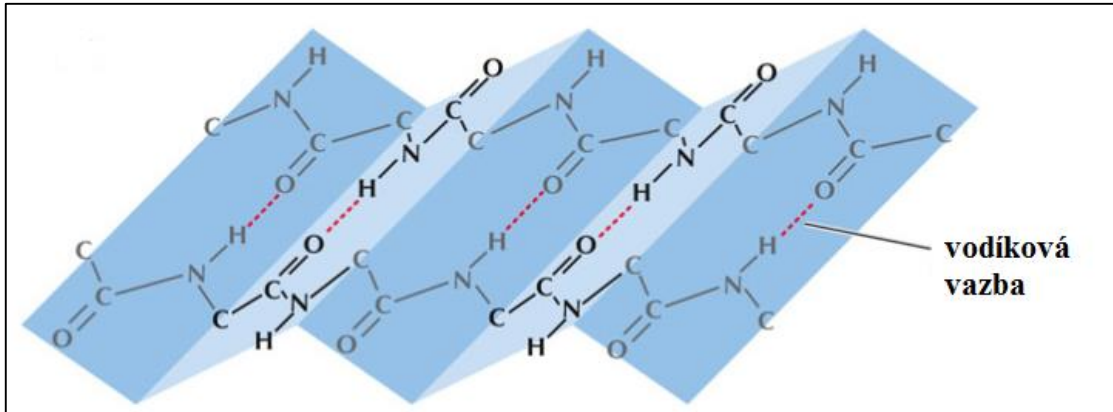
SEKUNDÁRNÍ STRUKTURA

Polypeptidové řetězce se mohou v keratinu vyskytovat ve dvou hlavních konformacích: α -šroubovice a β -skládaný list. Tomu odpovídá rozdělení keratinu na α -keratin (nacházející se typicky u savců) a β -keratin (vyskytující se u ptáků a plazů). [1, 3]

V α -šroubovici, znázorněné na obrázku 3, jsou polypeptidové řetězce stočeny do většinou pravotočivé šroubovice, která je stabilizována vodíkovými můstky mezi -NH a -CO skupinami. [6]

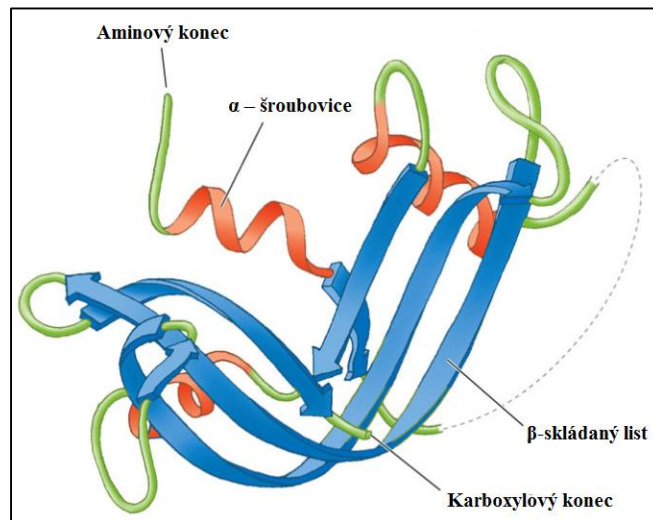
Obrázek 3: Konformace α – šroubovice [7]

V konformaci β -skládaný list, kterou můžeme vidět na obrázku 4, jsou polypeptidové řetězce uspořádány rovnoběžně. Tato struktura je opět stabilizována vodíkovými vazbami mezi -NH a -CO skupinami peptidových vazeb. Tentokrát však každá skupina náleží jinému polypeptidovému řetězci. [6]

Obrázek 4: Konformace β -skládaný list [7]

TERCIÁRNÍ STRUKTURA

Jako terciární struktura se označuje celkové uspořádání polypeptidového řetězce v prostoru. Stabilizace této struktury zajišťují především disulfidické můstky. Terciární struktura je zobrazena na následujícím obrázku. [6]

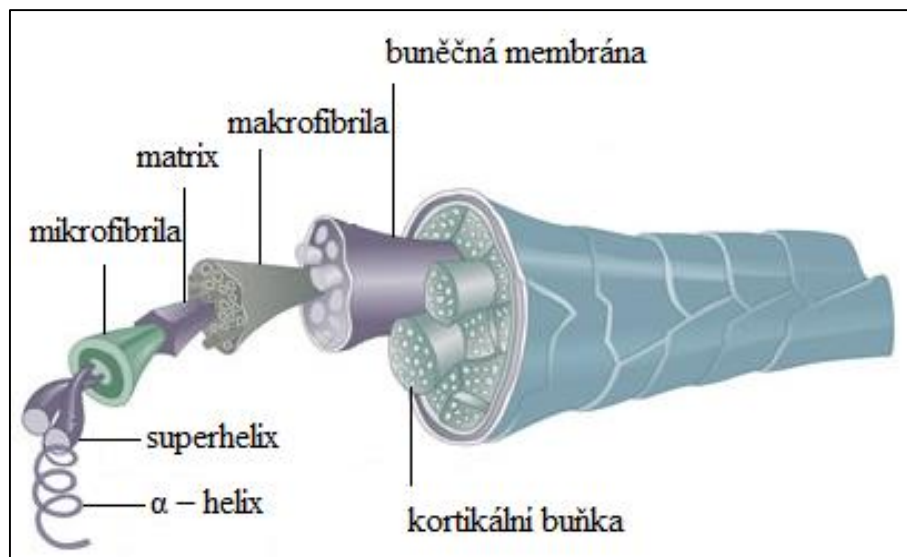


Obrázek 5: Terciární struktura keratinu [7]

KVARTÉRNÍ STRUKTURA

Kvartérní struktura je dána vzájemnou interakcí mezi podjednotkami, které tvoří protein. Řetězce jsou v kvartérní struktuře stabilizovány nekovalentními vazbami (vodíkovými a hydrofobními silami či iontovými a disulfidovými vazbami). [8]

Příkladem kvartérní struktury je vyšší uspořádání α – helixů do superhelixu, známého pod označením protofibrila. Složením superhelixů (protofibril) vzniká mikrofibrila, která dále tvoří makrofibrilu. Podrobnější popis vlněného vlákna následuje v další kapitole. Kvartérní struktura keratinu je znázorněna na obrázku 6. [1]



Obrázek 6: Kvartérní struktura keratinu [9]

1.2 Aminokyselinové složení keratinu

V tabulce 1 vidíme aminokyselinové složení keratinu z ovčí vlny včetně množství jednotlivých aminokyselin.

Vysoký obsah aminokyseliny cysteinu je jednou z nejdůležitějších vlastností, která odlišuje keratin od jiných strukturálních proteinů, jako je kolagen a elastin.

Cystein v keratinovém řetězci je schopen tvořit inter- a intramolekulární disulfidické vazby, které určují vlastnosti keratinu [4]. Množství cysteinu se liší v závislosti na zdroji keratinu. Keratin z vlny obsahuje 11 – 17 % cysteinu, zatímco z peří asi 7 % cysteinu [10].

Díky disulfidickým vazbám mezi cysteinem je keratin odolný vůči enzymové hydrolyze. Další charakteristikou keratinu je vysoký obsah glycinu, prolinu, serinu, kyselých aminokyselin, dále pak nízký obsah lysinu, histidinu, metioninu a úplná absence tryptofanu. [1]

Tabulka 1: Aminokyselinové složení keratinu z ovčí vlny [11]

AMINOKYSELINA	ZKRATKA	MNOŽSTVÍ [hm. %]
Kyselina glutamová a Glutamin	Glu	13,8
Cystein	Cys	10,8
Arginin	Arg	10,2
Serin	Ser	8,5
Leucin	Leu	7,2
Kyselina asparagová a Asparagin	Asp	7,0
Threonin	Thr	6,0
Tyrosin	Tyr	5,9
Prolin	Pro	5,7
Valin	Val	5,1
Glycin	Gly	4,6
Fenylalanin	Phe	3,6
Alanin	Ala	3,3
Isoleucin	Ile	3,2
Lysin	Lys	3,0
Histidin	His	1,3
Methionin	Met	0,6

Vzhledem k tomu, že biologické funkce jsou ovlivňovány různým aminokyselinovým složením, mohla by být na základě konkrétního aplikačního účelu vybrána konkrétní skupina aminokyselin. Z tabulky č. 1 vidíme, že kyselina glutamová a cystein jsou dvě nejhlavnější aminokyseliny v ovčím keratinu. Kyselina glutamová je klíčovou aminokyselinou v buněčném metabolismu lidského těla, která zvyšuje mozko-

vou funkci a duševní aktivitu. A cystein poskytuje odolnost těla před škodlivými účinky tím, že zvyšuje aktivitu bílých krvinek. [12]

1.3 Aminokyselinové složení keratinových hydrolyzátů

Díky hydrolyze vlny dochází k rozpuštění vlněných vláken a zároveň dochází také ke změnám aminokyselinového složení. Jako příklad je uvedena alkalická hydrolyza za použití NaOH. Při alkalické hydrolyze dochází k významným úbytkům serinu, cysteinu a treoninu. Naopak se zvyšuje obsah kyseliny glutamové či asparagové. Lysin je aminokyselinou, u které se výrazně nemění její množství. Podrobnější změny v aminokyselinovém složení jsou uvedeny v následující tabulce číslo 2. [13]

Tabulka 2: Změny aminokyselinového složení po alkalické hydrolyze [13]

AMINOKYSELINA	PŘED HYDROLÝZOU [mol%]	PO HYDROLÝZE [mol%]
Kyselina glutamová a Glutamin	12,23	19,3
Cystein	5,65	0,41
Arginin	7,30	5,28
Serin	11,00	3,99
Kyselina asparagová a Asparagin	6,43	11,2
Threonin	6,38	2,15
Prolin	7,08	5,16
Valin	6,38	7,67
Glycin	9,44	6,08
Lysin	3,01	3,22

Jako další příklad je v tabulce 3 uvedena enzymová hydrolyza, při které nedochází k tak výrazným změnám obsahu aminokyselin jako u hydrolyzy alkalické. V následující

tabulce jsou vypsány změny v aminokyselinovém složení, ke kterým dochází po enzymové hydrolýze. [14]

Tabulka 3: Změny aminokyselinového složení po enzymové hydrolýze [14]

AMINOKYSELINA	PŘED HYDROLÝZOU [hm. %]	PO HYDROLÝZE [hm. %]
Kyselina glutamová a Glutamin	11,45	12,00
Arginin	6,21	5,27
Serin	9,06	10,60
Leucin	4,75	3,73
Kyselina asparagová a Asparagin	5,55	6,98
Threonin	4,70	4,49
Tyrosin	2,68	2,10
Prolin	8,56	8,37
Valin	5,23	5,09
Glycin	5,87	7,38
Fenylalanin	4,50	3,80

Z uvedených tabulek je zřejmé, že aminokyselinové složení keratinové zdroje (vlny, peří,...) se díky hydrolýze mění. Zároveň je vidět, že složení aminokyselin u hydrolyzátů je ovlivněno reakčními podmínkami hydrolýzy. Liší se podle toho, zda šlo o hydrolýzu alkalickou, kyselou či například enzymovou.

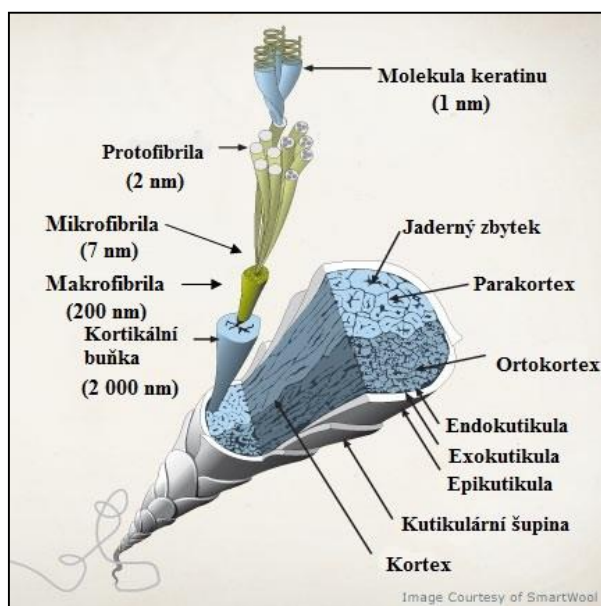
2 OVČÍ VLNA

Keratin z vlny je reaktivní, biokompatibilní a biologicky odbouratelný materiál. Vlna s až 95 hm. % keratinu je bohatým a čistým zdrojem bílkovinných vláken, které mohou být dále využity v široké škále biomateriálových aplikacích. [15]

Kromě Van der Waalsových interakcí působí v makromolekule vlněného vlákna také disulfidické vazby, vodíkové můstky a iontové vazby. Molekulová hmotnost keratinu izolovaného z vlny je 52 – 69 kDa. [16]

Vlněné vlákno, jehož struktura je zobrazena na obrázku 7, tvoří hlavní centrální část zvaná kortex (kůra) a vnější vrstva známá pod označením kutikula (pokožka), která chrání kůru. Kutikulární šupina se skládá ze tří vrstev: [16]

1. epikutikulární,
2. exokutikulární
3. endokutikulární.



Obrázek 7: Složky vlněného vlákna a jejich průměry [16, 17]

Kortex tvoří 70 – 90 % vlněného vlákna a skládá se z ortokortikálních a parakortikálních buněk s různými fyzikálními vlastnostmi. Ortokortikální a parakortikální buňky se skládají z řady mikrofibril, které jsou tvořeny 11 protofibrilami. [16]

Protofibrily jsou tvořeny třemi keratinovými makromolekulami stočenými kolem sebe. Spirálová forma keratinu je označována jako α -helix. [16]

3 PRODUKCE KERATINOVÉHO ODPADU A JEHO VYUŽITÍ

Bylo odhadnuto, že na celém světě ročně vznikne více než 5 miliónů tun keratinového odpadu. Vzniká převážně v chovatelském a jatečním průmyslu a skládá se z vlny, peří, chlupů, zobáků, rohů a kopyt. Se zvyšující se poptávkou po udržitelných materiálech v posledních letech se začaly považovat tyto vedlejší produkty za obnovitelný zdroj, který si zaslouží lepšího využití. [11]

Díky vysokému obsahu bílkovin je keratinový odpad používán například do krmných směsí. K tomuto způsobu využití se používá keratinový odpad z peří. Zpracování se provádí tepelně, chemicky či enzymově. Vzniká péřová moučka, která se přidává do krmiva pro zvířata. Tato směs obsahuje vysoké množství dusíku, tuku a minerálních solí. Naopak se vyznačuje značným nedostatkem lysinu, metioninu a histidinu. Péřová moučka má také nižší koeficient stravitelnosti aminokyselin, které jsou nezbytné pro drůbež (lysin, metionin, cystein a treonin) ve srovnání s jinými průmyslovými krmivy. Fyzikální a chemické zpracování keratinového odpadu navíc vyžaduje značné množství energie. [1]

Zpracováním vedlejších produktů živočišného původu vzniká masokostní moučka, která se získává z poražených a zpracovaných zvířat. Masokostní moučka se dříve běžně používala v krmivech pro zvířata. Nyní je však tato aplikace značně omezena, jelikož od 1. ledna 2000 je zakázáno použití masokostní moučky pro členské státy Evropské unie. Cílem je chránit lidské zdraví v rámci EU před infekcemi, které jsou způsobeny patogenními mikroorganismy zvířecího původu. [1]

Naopak, roste zájem o praktické využití keratinových hydrolyzátů v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. V posledních letech se provádějí výzkumy, ve kterých jsou použity keratinové biomateriály ve formě gelů, filmů, povlaků nebo vláken. Tyto biomateriály by mohly být využity jako zdravotnické doplňky pro hojení ran, regeneraci kostí a regeneraci periferního nervového systému. [1]

Keratinové odpady lze využít také v zemědělství pro přípravu hnojiv. Tyto látky příznivě ovlivňují některé vlastnosti půdy. Nicméně jejich vliv na mikrobiologickou aktivitu a na transformaci dusíku není jednoznačně pozitivní. Hnojivo způsobuje snížení respirační aktivity lehkých půd, narušuje nitrifikační procesy a způsobuje také ztráty dusíku v tomto prostředí. [1]

Zatím nejpopulárnější racionální metodou nakládání s keratinovým odpadem je kompostování. Při kompostování dochází k biologické přeměně organického odpadu na hygienicky nezávadný, na humus bohatý, relativně biostabilní produkt. Kompostování je bezpečná a nákladově efektivní technologie, která poskytuje produkt (kompost) použitelný jako hnojivo. Kompost zlepšuje vlastnosti půdy a poskytuje nutriční potřeby rostlinám. [1]

4 HYDROLÝZA KERATINU

Keratiny mají vysoký obsah síry a jsou proto mechanicky a chemicky velmi odolné. Na druhou stranu jsou kvůli vysokému obsahu síry obtížně zpracovatelné a kvůli tomu nedostatečně prakticky využité. Snadnější příprava keratinových hydrolyzátů by mohla zvýšit jejich využití v průmyslu. Mezi nejvýznamnější metody přípravy keratinových hydrolyzátů z původních zdrojů patří především redukční štěpení, alkalická, kyselá a enzymová hydrolyza. Aby byla účinnost rozkladu zvýšena, je možno jednotlivé metody kombinovat. Například kombinovaná alkalicko-enzymová hydrolyza je metoda s vysokou účinností rozkladu, jelikož mnoho komerčně dostupných keratinolytických a proteolytických enzymů má maximální účinnost v alkalickém prostředí. [18, 19, 20]

REDUKČNÍ ŠTĚPENÍ

Vzhledem k rozsáhlému disulfidovému zesílení a velkému množství hydrofobních aminokyselin jsou keratiny nerozpustné v nepolárních rozpouštědlech a rovněž v polárních rozpouštědlech. Keratiny mohou být extrahovány pouze v případě, že jsou porušeny disulfidové a vodíkové vazby. [21]

Redukční postup extrakce keratinu popsal Schrooyen a kolektiv. Metoda probíhala za mírných podmínek, kdy nedocházelo k významné hydrolyze peptidových vazeb. Při extrakci, která probíhala při mírném pH (8), byl použit 2-merkaptóetanol a koncentrovaný roztok močoviny. Tyto látky štěpí vodíkové vazby a S-S vazby mezi proteiny a způsobují, že svazky fibril u keratinu se oddělí a současně vznikne monomerní redukovaný keratin. Po získání stabilního roztoku byl 2-merkaptóetanol s močovinou z roztoku odstraněn dialýzou oproti destilované vodě, čímž došlo k agregaci polypeptidových řetězců a opětovné oxidaci cysteinových zbytků. Získal se bílý neprůhledný gel. Pro zvýšení rozpustnosti extrahovaného keratinu lze přidat k roztoku povrchově aktivní látky. Například dodecylsulfát sodný, který urychluje extrakci, zvyšuje výnos extrakce a rovněž stabilizuje roztok keratinu po odstranění močoviny dialýzou. [21, 22]

KYSELÁ HYDROLÝZA

Při kyselé hydrolyze dochází ke štěpení peptidové vazby keratinových řetězců a ke vzniku COO^- a NH_4^+ iontů. Cystin je v průběhu hydrolyzy částečně oxidován na kyselinu cysteovou a cystein, díky čemuž dochází k částečnému rozkladu disulfidických vazeb. Při kyselé hydrolyze se použije například 6 M HCl, která se přidá k surovému materiálu (vlně) a zahřívá se při teplotě 120 °C po dobu 6 hodin. Tento postup popsal Yamauchi a kolektiv. Dále může být použita 3 M H_2SO_4 , která se spolu se surovým materiálem zahřívá na teplotu 70 °C po 24 hodin. Pro získání hydrolyzátu z beraních rohů použil tento postup Kurbanoglu se svým vědeckým týmem. [20, 22, 23]

ALKALICKÁ HYDROLÝZA

Alkalickou hydrolyzu popsal například Abouheif a kolektiv, kteří pro rozložení vlny použili 3% vroucí roztok NaOH. S NaOH pracovali také Tsuda a kolektiv, kteří použili hydroxid o koncentraci 10 g/l a zahřívali jej na teplotu 120 °C. [24, 25]

ENZYMOVÁ HYDROLÝZA

V poslední době se pro rozklad bílkovin stále častěji používají enzymy, které jsou produkovány bakteriemi či houbami. Enzymová hydrolyza přináší řadu výhod, jako například menší změny výsledného produktu, bezpečnější laboratorní podmínky, vznik menšího množství znečišťujícího odpadu a menší dávky použitých proteáz. Naopak mezi nevýhody patří cena enzymů, nízká účinnost hydrolyzy, udržování stálého reakčního prostředí a dlouhá reakční doba potřebná pro hydrolyzu (často 3 – 7 dnů). [12, 20]

OXIDACE

Cystein a tryptofan jsou aminokyseliny nejvíce náchylné k oxidaci. Mají velký význam v síťování proteinů a přímo ovlivňují pevnost a pružnost vlněných vláken. Úplné oxidace cysteinu na kyselinu cysteinovou ve vlně je dosaženo pomocí peroxyoctové nebo ještě lépe pomocí permravněcí kyseliny. [26]

Sulfitolýzu pro extrakci keratinu z ovčí vlny použili například Fortunati s kolektivem a Aluigi s kolektivem, kteří ji provedli pomocí dithionanu sodného ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_6$) [27, 28]. Dále byl použit například sulfid sodný (Na_2S) pro extrakci keratinu z peří či disiřičitan sodný ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) při izolaci keratinu z vlny. [29, 30]

5 KERATINOVÉ FILMY Z OVČÍ VLNY

Příprava filmů z keratinových hydrolyzátů budí díky svým aplikačním možnostem velký zájem. Možnostem přípravy keratinových filmů z ovčí vlny se věnuje řada vědeckých skupin.

Mezi první, kteří se začali zabývat přípravou keratinových filmů z ovčí vlny, patří Yamauchi s kolektivem. Zkoumali strukturní, biologické a fyzikálně-chemické vlastnosti výrobků připravených z ovčího keratinu. Pro extrakci keratinu použili výše popsanou metodu redukčního štěpení za použití močoviny, redukčního činidla (2-merkaptóetanol) a povrchově aktivní látky (dodecylsulfát sodný). Vzniklou směs přefiltrovali a filtrát následně dialyzovali. Vznikl tak bezbarvý čirý roztok redukovaného keratinu. Jelikož čisté keratinové filmy byly pro praktické využití příliš křehké, přidali k roztoku keratinu glycerol, což vedlo ke zvýšení pevnosti. Vodný roztok redukovaného keratinu s glycerolem rozlili na vodorovnou kruhovou plochu polypropylenové fólie a nechali vysušit v exsikátoru. Takto připravené filmy vykazovaly značnou permeabilitu různých organických i anorganických látek. S rostoucí molekulovou hmotností prostupující látky permeabilita filmů klesala. U těchto filmů byla zkoumána také jejich buněčná kompatibilita a bylo zjištěno, že v porovnání s kolagenem byl keratinový filmový substrát lepším adhezivem pro buňky a více podporoval hojné množení buněk. [22, 31]

Při přípravě keratinových filmů použili Wang a Li roztok keratinu izolovaného z vlny pomocí iontové kapaliny (1-allyl-3-metylimidazolium chlorid nebo 1-butyl-3-metylimidazolium chlorid). Tento roztok rovnoměrně rozlili na skleněnou podložku a ponořili jej postupně do vody, metanolu a etanolu. Do srážecích roztoků byly filmy ponořovány na 12 hodin při pokojové teplotě podle psaného pořadí. Vzniklé filmy byly čištěny deionizovanou vodou a sušeny při pokojové teplotě. [32]

Metodu kompresního tvarování pro přípravu filmů zkoumali Katoh s kolektivem, kteří se lišili od Yamauchiho a Wanga připravující filmy metodu lití. Při přípravě filmů vycházel Katoh ze sulfo-keratinového roztoku, který získal extrakcí keratinu z vlny pomocí disiřičitanu sodného, močoviny a dodecylsulfátu sodného. Vysušením sulfo-keratinového roztoku připravil sulfo-keratinový prášek. Filmy připravil kompresním tvarováním prášku, jelikož chtěl překonat hlavní nevýhodu metody lití, kterou je vznik pouze omezených tvarů filmů. Při tvarování měnil teplotu a zjistil, že filmy s nejvyšší maximální mezí pevnosti a s nejvyšším Youngovým modulem vznikají při teplotě 120 °C. [30]

6 OPTIMALIZACE KERATINOVÝCH FILMŮ

6.1 PŘIDÁNÍ PŘÍRAD

Jelikož filmy složené pouze z keratinu nemají vždy námi požadované vlastnosti, můžeme použít další materiály, které nám pomohou tyto vlastnosti získat.

Například mechanickou pevnost keratinových filmů lze zvýšit přidáním glycerolu. Kromě glycerolu můžeme použít také chitosan, který má vysokou snášenlivost s biologickým prostředím, schopnost hojení ran a antibakteriální aktivitu. Keratin-chitosanovými filmy se zabýval například Tanabe, který přidával 10-30 hm. % chitosanu a získal tak pevné a pružné filmy s mezi pevnosti 27 - 34 MPa. [31]

Přidat vlákna hedvábí ke keratinovým filmům zkoušeli Lee a Vasconcelos, jelikož tyto vlákna mají dobrou snášenlivost s biologickým prostředím a jsou biologicky rozložitelná. Zjistili, že keratinové filmy s hedvábnými vlákny jsou více snášenlivé s biologickým prostředím než samotný keratin či hedvábí. Mezimolekulární interakce mezi vlákny hedvábí a keratinem přímo ovlivňují vlastnosti výsledných filmů. Povaha a pevnost těchto interakcí a znalost degradační rychlosti umožní vytvoření matrice, která může v budoucnu nalézt své uplatnění v biomedicínských aplikacích jako nosič účinných látek. [31]

Kromě přírodních polymerů mohou být ke keratinovým filmům přidávány také syntetické polymery. Například Tonin a kolektiv přidali ke keratinu polyetylenoxid (PEO). Ukázalo se, že PEO/keratinové filmy mají vyšší tepelnou stabilitu a lepší strukturální vlastnosti. Dále byly zkoumány kompozity tvořené keratinem a polypropylenem. Keratinový prášek působil jako stabilizátor a chránil polypropylenovou matici před termomechanickou degradací během zpracování. [31, 33]

Optimalizace filmů může probíhat nejen přidáním nových přírodních a syntetických materiálů, ale také novými metodami přípravy. Snahou je překonat univerzálnost, která je spojená s metodou lití keratinového roztoku. Alternativním způsobem může být příprava kompresním tvarováním keratinového prášku. Mechanické vlastnosti filmů připravených kompresním tvarováním jsou ovlivňovány teplotou tvarování a množstvím vody ve filmu. Tímto způsobem přípravy filmů se zabývá Katoh a kolektiv, jak již bylo napsáno výše. [30, 31]

6.2 SÍŤOVÁNÍ

Díky rozštěpení disulfidických vazeb, ke kterému dochází v průběhu extrakce, mají keratinové materiály nízkou mechanickou odolnost a stabilitu. Pro opětovné zlepšení mechanických vlastností je vhodné keratinové filmy síťovat. Můžeme použít chemickou metodu, kdy činidla reagují s funkčními skupinami keratinu, nebo působit fyzikálními vlivy, jako například světlem či zářením. Síťováním vznikají kovalentní či nekovalentní vazby mezi řetězci keratinu, čímž dochází k stabilizaci struktury. Zvolením podmínek síťování můžeme ovlivňovat výsledné vlastnosti filmů (například rozložitelnost, bariérové a mechanické vlastnosti). Síťované filmy jsou nerozpustné ve většině běžně používaných rozpouštědel. [34, 35]

CHEMICKY

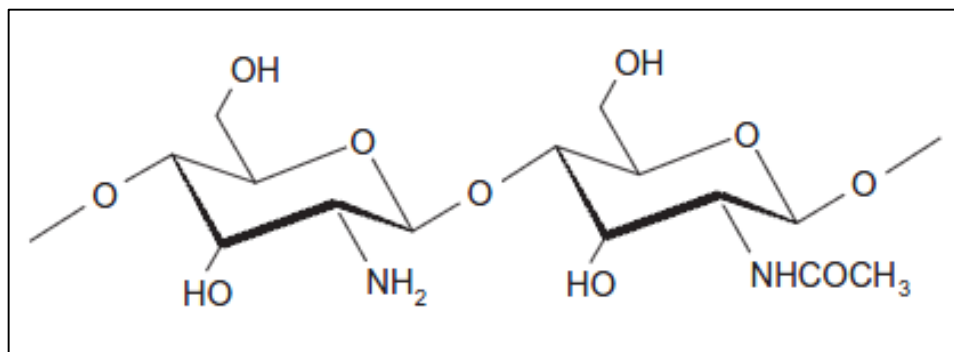
Molekuly s dlouhými řetězci a reaktivními koncovými skupinami jsou při síťování úspěšnější než tuhé aromatické činidla, které vyžadují přesnější polohování reaktivních skupin. Mezi chemická síťovadla patří například formaldehyd či glutaraldehyd. [36]

Formaldehyd je velmi silné síťovací činidlo, které je účinné již při nízkých koncentracích. Reakce formaldehydu s vlnou byla předmětem mnoha studií především proto, že formaldehyd je schopen úspěšně vytvářet síť v keratinu, zároveň je levný a díky malé velikosti molekul rychle proniká do vlněných vláken. Postranní řetězce aminokyselin argininu, lysinu, tyrosinu, tryptofanu, histidinu, cysteinu a amidových derivátů kyseliny asparagové a glutamové snadno tvoří vazby s formaldehydem. Podstatnou nevýhodou je jeho prokázaná karcinogenita, která tak omezuje jeho použití. [36, 37]

Glutaraldehyd hraje podstatnou roli při činění ovčí kůže a také chrání vlnu před plstěním při následném praní. Glutaraldehyd reaguje převážně s lysinovými zbytky. Nevýhodou síťování glutaraldehydem je fakt, že vlna získá zlatavé zbarvení, které však může být do určité míry sníženo použitím hydrogensířičitanu. [36]

V praktické části diplomové práce bude jako síťovací činidlo použit přírodní polymer (polysacharid) chitosan, který se připravuje deacetylací chitinu. Chitin je primární strukturální polymer nacházející se ve skeletu korýšů. Obecně se chitosan vyskytuje jako kopolymer N-acetylglukosaminových a N-glukosaminových jednotek, které jsou nahodile nebo blokově distribuovány po celém polymerním řetězci. Počet aminových skupin v chitosanu (označovaný jako stupeň deacetylce) má významný vliv na jeho fyzikální, chemické a biologické vlastnosti, jelikož prostřednictvím aminových skupin dochází k modifikaci

makromolekulárního řetězce chitosanu. Přítomnost volných aminových skupin zvyšuje jeho rozpustnost a reaktivitu. Chitosan je rozpustný v roztocích zředěných kyselin, například v kyselině octové či chlorovodíkové. Na následujícím obrázku 8 je znázorněna struktura chitosanu. [38]



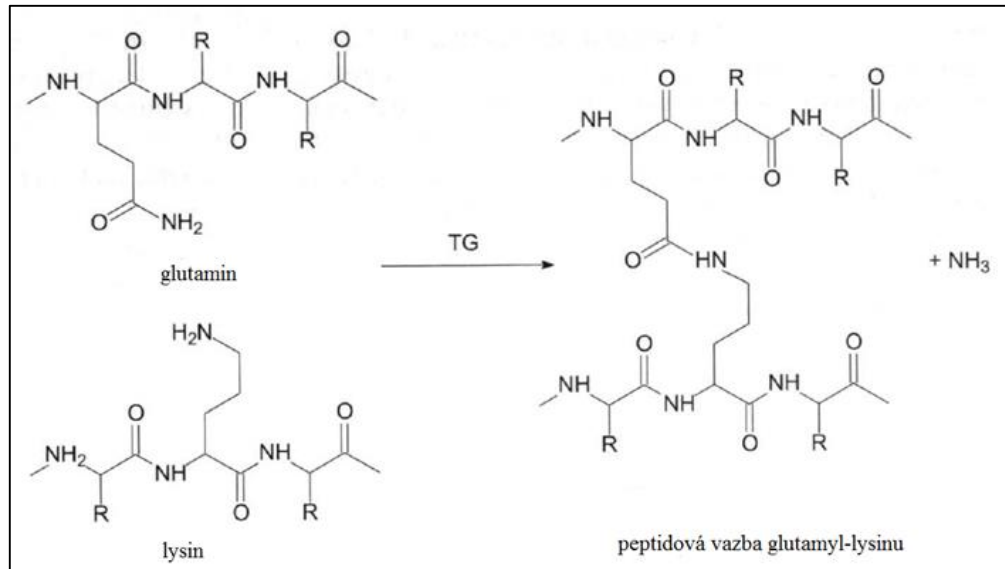
Obrázek 8: Struktura chitosanu [38]

FYZIKÁLNĚ

Mezi fyzikální metody patří například síťování indukované světlem či UV zářením, při kterém dochází k absorpci fotonů a následné tvorbě volných radikálů. Radikály vznikající během ozáření vzájemně interagují a spojují se, čímž vzniká síťovaná struktura [39, 40]. Při fyzikálním síťování lze použít činidla, která jsou aktivována světlem či zářením a která katalyzují síťovací reakce. Například pro síťování keratinu byl použit komplex ruthenia [34] a pro síťování celulózy byl použit metylen-bis-akrylamid. [41]

ENZYMOVĚ

Síťovaná struktura může být vytvořena také pomocí enzymů. Využívá se například enzym transglutamináza, který katalyzuje přenos acylové skupiny mezi donorem a akceptorem. Konkrétně u keratinu izolovaného z vlny se jedná o přenos acylové skupiny mezi glutaminem (donor acylové skupiny) a lysinem (akceptor), což můžeme vidět na obrázku 9. [42]



Obrázek 9: Schéma vzniku síťované struktury pomocí transglutaminázy [43]

Těmito reakcemi vznikají v keratinu intermolekulární a intramolekulární ϵ -amino-(γ -glutamyl)-lysinové sítě, které zlepšují pevnost. Aktivním centrem enzymu je thiolová skupina a aktivita enzymu je ovlivněna oxidačními a redukčními činidly. Optimální teplota pro aktivitu transglutaminázy je 50 – 55 °C a pH 5 – 7,5. [42]

7 APLIKACE KERATINU

7.1 VYUŽITÍ KERATINU V LÉKAŘSTVÍ

Keratin je v posledních letech stále častěji zkoumán pro své využití v biomedicínských aplikacích. Hlavní výhodou použití keratinu v biomedicínských aplikacích je jeho snášenlivost s biologickým prostředím, vnitřní biologická aktivita a biologická rozložitelnost. Výzkumy se převážně zabývají použitím v tkáňovém inženýrství či pro doručování léčiv.

7.1.1 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Několik posledních desetiletí existuje přirozená potřeba vývoje nových a lepších materiálů se zaměřením na měkké tkáňové inženýrství. Zájem je především o materiály, které vykazují snášenlivost v biologickém prostředí (tzv. biokompatibilitu), vnitřní biologickou aktivitu a jsou biologicky rozložitelné. Tyto podmínky keratin splňuje. Navíc obsahuje sekvence aminokyselin (Arg-Gly-Asp a Leu-Asp-Val) umožňující buněčnou adhezi, která přímo ovlivňuje růst buněk. Díky těmto vlastnostem může být keratin použit pro vývoj různých tkáňových konstrukcí. Filmy, připravené z čistého keratinu bez použití aditiv, byly příliš křehké na použití v tkáňovém inženýrství. Proto byly připraveny kompozity obsahující keratin, chitosan a želatinu. Tato keratinová kompozitní síť vykazovala dobrou mechanickou pevnost. Její struktura se navíc vyznačovala dobrou pórovitostí, která je velmi důležitá pro růst buněk a jejich množení v průběhu hojení ran. Fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti tohoto kompozitu jasně ukázaly jeho potenciál v tkáňovém inženýrství, zejména při hojení ran. [44, 45]

KERATINOVÉ FILMY PRO REKONSTRUKCI OČNÍHO POVRCHU

Závažné poranění povrchu rohovky a spojivky může mít za následek až ztrátu zraku. V průběhu posledních 20 let je pro rekonstrukci očního povrchu často používána lidská amniotická membrána, což je nejvnitřnější vrstva plodového vaku, který obklopuje plod v děloze. Membrána obsahuje látky, které podporují epiteliální hojení ran. Nevýhodou je však její snížená transparentnost, která vyvolává potřebu najít vhodnou alternativu. Z tohoto důvodu se provádějí výzkumy, při kterých se připravují transparentní a stabilní filmy z keratinu extrahovaného z lidských vlasů. Výsledky dané studie ukázaly, že keratinový film je mnohem transparentnější a tužší než plodová membrána. Dále tato studie

dokázala, že na keratinových filmech docházelo k připojení a hojnému množení epiteliálních buněk rohovky. Díky těmto zjištěním lze říct, že keratinové filmy mohou v budoucnu představovat náhradu amniotických membrán v očním lékařství. [46]

7.1.2 DORUČOVÁNÍ LÉČIV

KOSTNÍ VÝPLNĚ S POUŽITÍM KERATINU Z OVČÍ VLNY

Infekce po zavedení umělé kloubní náhrady je závažným problémem vyžadující reimplantaci náhrady. Současný výzkum se proto zaměřuje na rozvoj nových kostních výplní, které by svou přítomností podporovaly růst buněk kostní tkáně a které by zároveň fungovaly jako nosiče léčiva (antibiotik) se schopností prodlouženého uvolňování. [47]

V rámci výzkumu byly připraveny kompozity tvořené hydrogelem z keratinu nebo z karboxymetylovaného keratinu spolu s hydroxyapatitem. Tyto hydrogely sloužily jako nosiče léčiv s prodlouženým uvolňováním. Karboxymetylové skupiny na keratinu usnadňují uložení hydroxyapatitu na hydrogel. Z připraveného kompozitu byla uvolňována kyselina salicylová, která byla vybrána jako modelové léčivo. Množství uvolněné kyseliny salicylové se měřilo z absorbance při 296 nm. U hydrogelu bez hydroxyapatitu docházelo k rychlému uvolnění kyseliny salicylové v průběhu 1. hodiny (až 40 %). U kompozitu tvořeného hydroxyapatitem bylo počáteční rychlé uvolňování potlačeno na méně než 30 %. [47]

Přestože jsou nezbytné další úpravy, očekává se, že tyto kompozity budou mít využití jako výplně kostí se schopností prodlouženého uvolňování antibiotik a se schopností podporovat růst buněk kostní tkáně. [47]

KERATINOVÉ FILMY Z PEŘÍ PRO UVOLŇOVÁNÍ LÉČIV

Vědecká skupina z Číny využila keratin izolovaný z odpadového peří pro přípravu keratinových filmů se zaměřením na cílenou dopravu léčiv. Keratinové filmy obsahující účinnou látku byly připraveny litím. Uvolňování dané látky z filmů bylo kontrolováno pomocí UV-VIS spektrometrie. Filmy obsahovaly účinnou látku (Rhodamin B), která byla uvolňována při různých hodnotách pH. Při pH 7,5 bylo uvolnění poměrně rychlé. V průběhu 12 hodin se uvolnilo 94 % dané látky. V kyselém prostředí se rychlost uvolňování výrazně snížila. Při pH 3,6 se během 12 hodin uvolnilo pouze 40 % účinné látky.

Z uvolňovacích charakteristik Rhodaminu B při změně pH můžeme říct, že připravené filmy byly pH senzitivní a uvolňování léčiva by tak mohlo být jednoduše řízeno úpravou pH. Citlivost na změnu pH a biokompatibilita dělá z keratinového filmu z peří atraktivní materiál pro použití v oblasti biomedicíny. [48]

7.2 VYUŽITÍ KERATINU V ZEMĚDĚLSTVÍ

Keratinové filmy mohou mít v budoucnu využití v aplikacích, které vyžadují materiály šetrné k životnímu prostředí a materiály, které jsou biologicky rozložitelné. Jedná se například o balení potravin či mulčovací zemědělské fólie. Barone s kolektivem připravili keratinové filmy z odpadového peří. Extrahovaný keratin smíchali s glycerolem, který nahrazoval vodu obsaženou v přirozeném keratinu. Filmy byly připraveny během několika minut lisováním při teplotě 160 °C bez použití oxidačních či redukčních činidel. Tyto filmy byly pevné a mechanické vlastnosti byly podobné vlastnostem komerčně dostupných materiálů. [49]

Mulčovací fólie mají za úkol snížit růst plevelu, snížit ztrátu vlhkosti a chránit rostliny před nečistotami. Tyto filmy tak mohou snížit spotřebu chemikálií používaných proti plevelu, snížit spotřebu vody a pomoci dosáhnout vyšších výnosů. Kvůli ochraně životního prostředí se zvyšuje snaha o nahrazení syntetických polymerů přírodními materiály, které jsou biologicky rozložitelné. Keratinový hydrolyzát připravený enzymovou hydrolyzou byl použit při výrobě mulčovací fólie. Přítomnost hydrolyzátu zvyšuje absorpci vody, což má za následek snadnější a rychlejší rozklad ve srovnání s fólií neobsahující hydrolyzát. [50]

7.3 VYUŽITÍ KERATINU V KOSMETICE

Keratinové hydrolyzáty připravené především chemickou či enzymovou hydrolyzou nacházejí své uplatnění také v kosmetickém průmyslu, například v přípravcích pro ochranu vlasů jako jsou šampóny nebo kondicionéry. Mají za úkol chránit vlasy před poškozením způsobeným chemikáliemi, teplem a každodenní úpravou vlasů. Tyto aktivní proteiny účinně posilují vlasové vlákno a zároveň snižují jeho poškození. Keratiny s molekulovou hmotností menší než 1 kDa jsou schopné proniknout kůrou vlasového vlákna a mohou podporovat povrchovou úpravu. Keratinové hydrolyzáty proniknou do struktury vlasu tím víc, čím delší je doba ošetření a u odbarvených vlasů dochází k většímu pronikání než u vlasů nepoškozených. [51]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

8 CÍLE A POSTUPY DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem praktické části diplomové práce je připravit keratinový hydrolyzát z ovčí vlny, dvoustupňovou alkalicko-enzymovou hydrolyzou. Vzniklý hydrolyzát bude dále použit pro přípravu filmů. Použity budou dva typy hydrolyzátů, které se liší způsobem přípravy. Hlavní rozdíl mezi hydrolyzáty je v použitém enzymu při enzymové hydrolyze.

Dalším cílem je připravit z keratinových hydrolyzátů filmy, které se budou lišit různým množstvím síťovadla. Pro přípravu filmů bude použito 10 %, 20 % a 30 % síťovadla na navážku hydrolyzátu. Tyto filmy se budou vzájemně porovnávat spolu s filmem, který je bez síťovadla.

Vzorky vlny, nerozloženého podílu vlny, hydrolyzátu a vzorky připravených filmů budou analyticky testovány, aby byl zjištěn obsah dusíku, síry, popelovin a tuku. Dále budou podrobovány metodám diferenciální skenovací kalorimetrie, termogravimetrické analýze, infračervené spektroskopii, zkouškám rozpustnosti a botnacím zkouškám.

9 MATERIÁLY A POSTUPY

9.1 VSTUPNÍ MATERIÁL

Vstupním materiálem pro praktickou část diplomové práce byla ovčí vlna typu Merino pocházející z rodinné farmy v Nevšové.

9.2 SOUHRN POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ, MATERIÁLŮ A PŘÍSTROJŮ

Pro odtučnění vlny a její následný rozklad byly použity tyto enzymy:

Enzym Lipex 100T

Enzym Lipex 100T patří do skupiny lipáz a jeho primární aktivitou je hydrolýza esterových vazeb v triacylglycerolech. Reakčními produkty hydrolýzy jsou mastné kyseliny, monoacylglycerol a diacylglycerol. Dostupný je jako granulát či kapalina. [52]

Enzym Esperase 6.0T

Řadí se do skupiny endopeptidáz, což jsou enzymy, které hydrolyzují peptidové vazby uvnitř řetězců molekul proteinů. Má širokou specifitost a dobrou účinnost v alkalickém prostředí. [53]

Enzym Savinase 6.0T

Enzym Savinase 6.0T se řadí do skupiny proteáz a jeho primární aktivitou je hydrolýza peptidových vazeb v proteinu. Reakční produkty, které vznikají hydrolýzou, jsou peptidy a aminokyseliny. Vyrábí se jako granulát či kapalina. [52]

V následující tabulce 4 jsou shrnuty chemikálie a enzymy, které byly použity v průběhu praktické části diplomové práce.

Tabulka 4: Souhrn použitých látek včetně jejich výrobců

CHEMIKÁLIE A ENZYMY	VZORCE	VÝROBCE
Kyselina sírová	H_2SO_4	Ing. Petr Lukeš (Česká republika)
Thiosíran sodný	$Na_2S_2O_3$	Ing. Petr Lukeš (Česká republika)
Hydroxid sodný	NaOH	Ing. Petr Lukeš (Česká republika)
Kyselina boritá	H_3BO_3	Ing. Petr Lukeš (Česká republika)
Kyselina chlorovodíková	HCl	Ing. Petr Lukeš (Česká republika)
Tashirův indikátor	–	UTB, Zlín (Česká republika)
Katalyzátorové tablety	–	Fisher Scientifics (USA)
Kyselina dusičná	HNO_3	Ing. Petr Lukeš (Česká republika)
Dusičnan stříbrný	$AgNO_3$	Ing. Petr Lukeš (Česká republika)
Peroxid vodíku	H_2O_2	Ing. Petr Lukeš (Česká republika)
Chlorid barnatý	$BaCl_2$	Lachema (Česká republika)
Hydroxid vápenatý	$Ca(OH)_2$	Ing. Petr Lukeš (Česká republika)
Petrolether	–	Ing. Petr Lukeš (Česká republika)
Ethanol	C_2H_5OH	Ing. Petr Lukeš (Česká republika)
Glycerol	$C_3H_8O_3$	Ing. Petr Lukeš (Česká republika)
Enzym Lipex 100T	–	Novozymes (Dánsko)
Enzym Esperase 6.0T	–	Novozymes (Dánsko)
Chitosan	–	Sigma – Aldrich (USA)

V tabulce 5 jsou shrnuty přístroje (včetně výrobců), které byly použity v praktické části diplomové práce.

Tabulka 5: Souhrn použitých přístrojů včetně jejich výrobců

PŘÍSTROJ	VÝROBCE
Nožový mlýn Pulverisette 19	Fritsch (Německo)
Pračka	Romo (Česká republika)
Odstředivka Universal 32	Hettich (Německo)
Celulózová membrána D9402	Sigma-Aldrich (USA)
Sušárna	Memmert (Německo)
Elektronické analytické váhy	KONEKO marketing (Česká republika)
Magnetická míchačka RCT Basic	IKA (Německo)
Parnas-Wagnerova destilační aparatura	UTB, Zlín (Česká republika)
Muflova pec Labotherm L9/11	Nabertherm (Německo)
Topné hnízdo LTHS 2000	Brněnská Drutěva (Česká republika)
Topná deska Ceran 500/44A	Harry Gestigkeit GMBH (Německo)
pH metr WTW 526	Sigma – Aldrich (USA)
DSC	Mettler Toledo (Švýcarsko)
FTIR Avatar 320	Thermo Scientific (USA)
TGA Q50	TA Instruments (USA)

9.3 ANALYTICKÉ STANOVENÍ A DALŠÍ METODY

9.3.1 Mikrochemické stanovení obsahu dusíku – Micro-Kjeldahlova metoda – AOAC 960.52

K vzorku o navážce asi 0,2 g bylo přidáno 5,6 ml H_2SO_4 , 20 ml 0,02M HCl a nakonec tableta katalyzátoru. Roztok se nechal 1 – 1,5 hodiny mineralizovat na topné desce při teplotě 480 °C a poté se nechal zchladnout. Po zchladnutí se roztok zředil malým množstvím vody, aby došlo k rozpuštění pevných částic. Nakonec se roztok přelil do 50 ml od-

měrné baňky a doplnil po rysku. Na obrázku 10 je zobrazena mineralizace vzorků na topné desce.



Obrázek 10: Mineralizace vzorků na topné desce

Do Parnas-Wagnerovy destilační aparatury se odpipetovalo 25 ml vzorku a 20 ml roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ s NaOH . Jímalo se do předlohy destilační aparatury, ve které bylo 15 ml H_3BO_3 . Destilace probíhala 20 minut od počátku varu. K destilátu bylo přidáno několik kapek indikátoru a poté byl titrován 0,02M HCl do růžového zbarvení. Obsah dusíku se stanovoval u vzorků vlny, nerozloženého podílu vlny a u obou hydrolyzátů.

Množství dusíku v % se vypočítalo podle vzorce 1:

$$\% \text{ N} = \frac{V \cdot c \cdot 14,007 \cdot 100 \cdot 2}{m} \quad (1)$$

V – spotřeba HCl při titraci v ml,

c – koncentrace HCl v mol/l,

m – hmotnost vzorku v mg.

9.3.2 Stanovení obsahu síry srážením roztokem chloridu barnatého – AOAC 955.48

Do Kjeldahlovy baňky byl navážen 1 g vzorku a k němu bylo přidáno 50 ml koncentrované HNO_3 . Směs se nechala vařit nad kahanem 2 hodiny a každých 15 minut se k roztoku přidaly 3 ml 30% H_2O_2 . Po mineralizaci a po zchladnutí se roztok přelil do 200 ml odměrné baňky, která se doplnila vodou po rysku. Roztok se poté zfiltraval do 600 ml kádinky přes středně hustý filtr a zahřál k varu. Za stálého míchání se postupně přidávalo 120 ml 10% horkého roztoku BaCl_2 . Směs se nechala hodinu vařit a poté odležet 24 hodin v digestoři. Vzniklá sraženina se poté přefiltrovala přes hustý filtrační papír a sraženina na filtru byla promývána horkou destilovanou vodou, dokud nedošlo k odstranění veškerých chloridů (zkouška filtrátu se prováděla dusičnanem stříbrným). Filtrační papír se sraženinou se vysušil při 103 ± 2 °C a poté zpopelnil v žíhacím kelímku (vysušeném a zváženém) nad kahanem. Popel se dále nechal 2 hodiny žíhat v muflové peci při 800 °C. Po ochlazení v exsikátoru se kelímek zvážil. Obsah síry se stanovoval u vzorků vlny, nerozloženého podílu vlny a u obou hydrolyzátů.

Na následujícím obrázku je znázorněna mineralizace vzorku v Kjeldahlově baňce v koncentrované HNO_3 .



Obrázek 11: Mineralizace vzorku nad kahanem

Množství síranů a síry v % se vypočítalo podle vzorců 2 a 3:

$$c(\text{SO}_4^{2-}) = \frac{m \cdot 0,412 \cdot 100}{n} \quad (2)$$

$$c(\text{S}) = \frac{M(\text{S})}{M(\text{SO}_4^{2-})} \cdot c(\text{SO}_4^{2-}) \quad (3)$$

$c(\text{SO}_4^{2-})$ - množství síranů v %,

m – hmotnost sraženiny BaSO_4 v g,

n – navážka vzorku na stanovení v g,

0,412 – přepočítávací faktor na přepočet BaSO_4 na SO_4^{2-} ,

$c(\text{S})$ – množství síry v %,

$M(\text{S})$ – molární hmotnost síry = 32,06 g/mol,

$M(\text{SO}_4^{2-})$ – molární hmotnost síranů = 96,056 g/mol.

9.3.3 Stanovení obsahu popelovin

Navážka asi 0,5 g vzorku se opatrně zpopelnila nad kahanem v předem zváženém a vysušeném žíhacím kelímku z křemičitého, žáruvzdorného skla. Po zpopelnění nad kahanem se vzorek dále žíhal v Muflové peci při teplotě 600 °C 1,5 hodiny. Po vyžihání a po zchladnutí v exsikátoru se vzorek zvažil. Obsah popelovin se stanovoval u vzorků vlny, nerozloženého podílu vlny a u obou hydrolyzátů.

Obsah popelovin se vypočítal podle vzorce 4:

$$m_p = \frac{m_1 - m_2}{m_H} \cdot 100 \quad (4)$$

m_p – množství popelovin ve vzorku v %,

m_1 – hmotnost žíhacího kelímku se vzorkem po vyžihání v g,

m_2 – hmotnost žíhacího kelímku bez vzorku v g,

m_H – hmotnost naváženého vzorku v g.

9.3.4 Stanovení obsahu tuku

Navážka asi 2 g vlny byla vložena do extrakční patry Soxhletova přístroje a poté byla uzavřena vatou. Do zvážené extrakční baňky se skleněnými kuličkami bylo nalito 150 ml směsi rozpouštědel petroletheru a etanolu v poměru 1:1. Extrakční baňka se směsí rozpouštědel byla poté vložena do topného hnízda a na ni byl nasazen extraktor, ve kterém byla usazena extrakční patrona s vlnou. Nakonec byl na extraktor nasazen zpětný chladič a byl otevřen přepouštěcí kohout. Po spuštění chladiče bylo zapnuto topné hnízdo a tuk byl extrahován po dobu 8 hodin od počátku varu rozpouštědla v extrakční baňce. Po 8 hodinách byl přepouštěcí kohout uzavřen a většina rozpouštědla se nechala oddestilovat do zásobního prostoru. Poté byl odpojen chladič od extraktoru, extraktor od extrakční baňky a následně byla zastavena chladicí voda. Extrakční baňka s vyextrahovaným tukem byla umístěna do digestoře, aby se odpařil zbytek rozpouštědla. Nakonec byla baňka sušena do konstantní hmotnosti.

Obsah extrahovaného tuku ve vlně (E) se vypočte podle vzorce 5:

$$E = \frac{(m_2 - m_1)}{n} \cdot 100 \quad (5)$$

E – obsah vyextrahovaného tuku ve vlně v %,

m_1 – hmotnost extrakční baňky v g,

m_2 – hmotnost extrakční baňky s extraktem v g,

n – navážka vzorku polymeru v g.

9.3.5 Stanovení botnání a rozpustnosti

Z připravených filmů byly vystřižnuty vzorky, o velikosti cca 15x15 mm. U vzorků byly změřeny rozměry a poté byly vloženy do předem zvážených váženek. Po vložení změřených vzorků byly váženky znovu zváženy. Do váženek bylo nalito 30 ml destilované vody a poté byly váženky vloženy do sušárny, ve které byla udržovaná konstantní teplota 30 °C. Po stanovené době byla destilovaná voda vylita, váženka se vzorkem usušena a po zchladnutí v exsikátoru zvážena. Z úbytku váhy byla vypočítána procentuální rozpustnost. Z rozměrů vzorků před a po rozpouštění bylo zjištěno, zda vzorek botnal a k jakému nárůstu povrchu došlo.

9.3.6 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) je analytická metoda, která měří pohlcení (absorpci) infračerveného záření o různé vlnové délce zkoumaným vzorkem. Infračervené záření je elektromagnetické záření, které má vlnovou délku 0,78 - 1000 μm , čemuž odpovídá rozsah vlnočtu 12800 - 10 cm^{-1} . Výstupem metody je grafické zobrazení závislosti energie, vyjádřené například v jednotkách absorpance nebo procentech transmitance, na vlnové délce záření dopadajícího na vzorek. Infračervené spektrometry s Fourierovou transformací jsou přístroje, které pracují na principu interference záření. FTIR spektrometry měří interferogram (interferenční obrazce) modulovaného svazku záření po průchodu vzorkem. FTIR přístroje vyžadují matematickou transformaci, aby se získal klustický záznam spektra. Výhodou při FTIR měření je, že na detektor dopadá vždy celý svazek záření, což umožňuje měření vzorků, které silně absorbují záření. [54]

Infračervená spektra byla měřena pomocí FTIR spektrometru u jednotlivých filmů, u keratinových hydrolyzátů a u chitosanu. Měření probíhalo v rozsahu vlnočtů 400 - 4000 cm^{-1} a u každého vzorku se změřilo 32 skenů, které se zprůměrovaly. Vyšší počet skenů zajišťuje vyšší kvalitu spektra.

9.3.7 Diferenciální skenovací kalorimetrie

Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) patří mezi nejrozšířenější termické analýzy. Při měření dochází k ohřevu či ochlazení vzorku předem nastavenou rychlostí. Zároveň je ohříván či chlazen i vzorek referenční. Pro referenci se nejčastěji volí prázdná pánvička. Přístroj měří rozdíl teplot nebo energií, které musí být dodány, aby vzorek a referenční měly stejnou teplotu. Výhodou je potřeba malého množství vzorku. Pro měření stačí hmotnosti vzorků v rozmezí 3 – 10 mg. Podle měřené látky se volí druh pánvičky, který může mít různý tvar či různý způsob uzavírání. Měří se obvykle v inertní dusíkové atmosféře, aby nedocházelo k reakcím vzorku se vzduchem. Podle materiálu a druhu experimentu volíme rychlost ohřevu či chlazení. Nejčastěji se používá rychlost ohřevu/chlazení 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Pomocí DSC můžeme vyhodnocovat například teplotu tání, teplotu skelného přechodu, teplotu krystalizace či teplotu degradace. [55, 56]

Pro zjištění tepelného chování vzorků bylo provedeno měření na DSC přístroji v rozsahu teplot 25 - 300 $^{\circ}\text{C}$ s rychlostí ohřevu 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Měření probíhalo v inertní dusí-

kové atmosféře s průtokem 20 ml/min. Tepelné chování bylo pomocí DSC měřeno u vlny, nerozloženého podílu vlny, keratinových hydrolyzátů a připravených filmů.

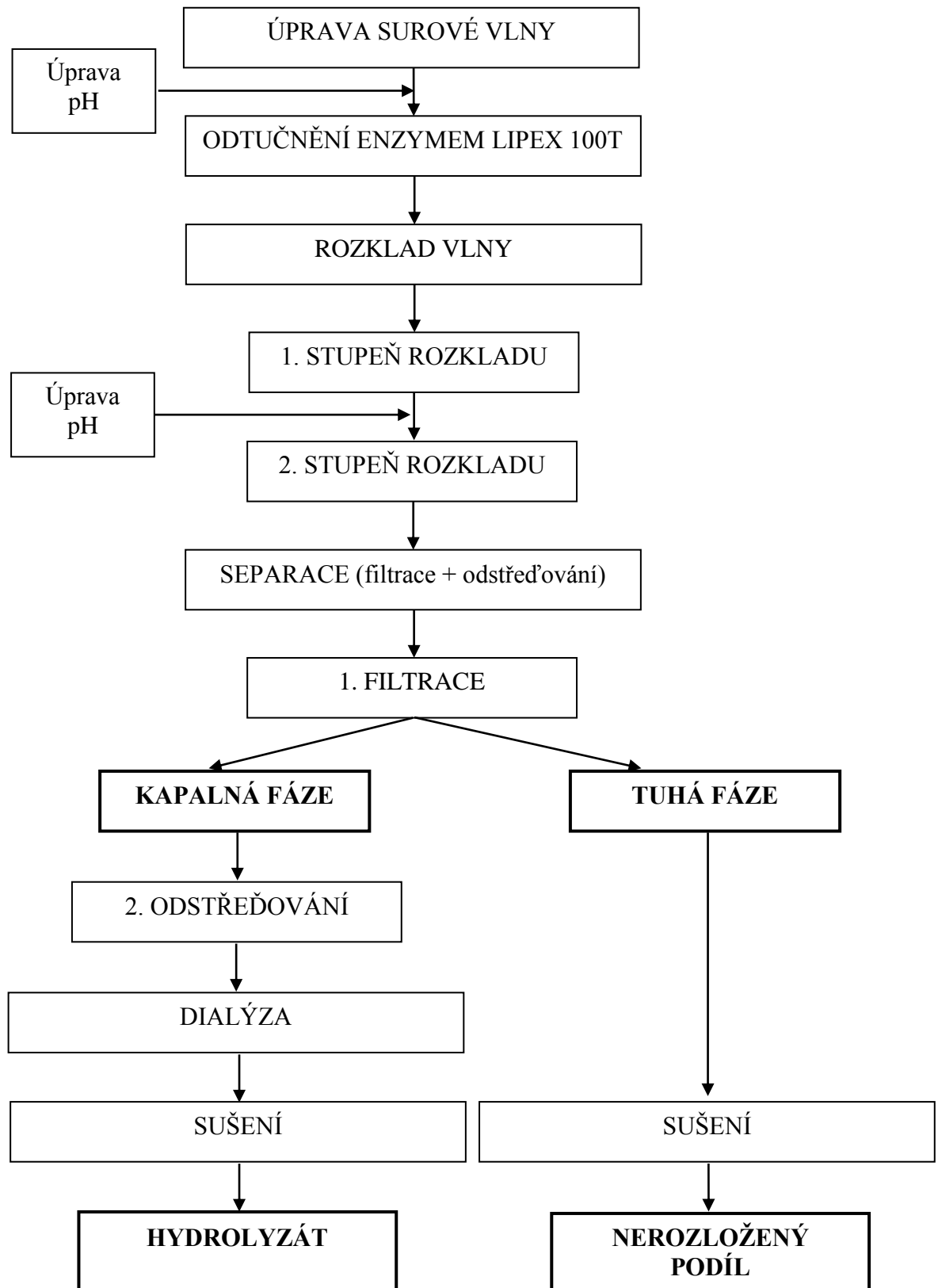
9.3.8 Termogravimetrická analýza

Termogravimetrická analýza (TGA) neboli termogravimetrie je metoda, při které je analyzovaný vzorek vystaven tepelnému namáhání (ohřevu či chlazení) a zároveň je sledována změna jeho hmotnosti. Analyzuje se vzorek o hmotnosti miligramů až gramů. Měření může probíhat v inertním prostředí (dusík, helium) či v prostředí oxidačním, kdy je nejjednodušší použít vzduch. Z měření tak zjistíme, jak je daný vzorek tepelně či oxidačně stabilní. [57]

Termogravimetrická analýza vzorků byla prováděna pomocí přístroje TGA Q50 v rozsahu teplot 25 – 800 °C. Pouze v případě prvního vzorku (vlny) byla dosažená maximální teplota měření 600 °C. Rychlost ohřevu byla 20 °C/min. Měření probíhalo v inertní atmosféře helia s průtokem 100 ml/min. Po dosažení maximální teploty 800 °C byl průtok helia zastaven a měření následně probíhalo za přítomnosti vzduchu, čímž došlo ke spálení vzorku. Spalování vzorků probíhalo 2 minuty a poté bylo měření ukončeno. Díky spálení vzorku bylo možné zjistit obsah popelovin (nespálených anorganických látek). Tepelné chování pomocí termogravimetrie bylo měřeno u vzorků vlny, nerozloženého podílu vlny, keratinových hydrolyzátů a připravených filmů.

10 POSTUP PRÁCE

10.1 PŘÍPRAVA KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU



ÚPRAVA SUROVÉ VLNY

Tato fáze zahrnuje mechanické odstranění viditelných nečistot, které se ve vlně nacházely. Poté následovalo vyprání vlny ve vlažné vodě, vyprání ve vodě s mycím prostředkem a nakonec propírání čistou vodou tak dlouho, dokud nedošlo k úplnému odstranění mycího prostředku. Vlna, která byla použita v praktické části, je znázorněna na obrázku 12 A.

ODTUČNĚNÍ ENZYMEM LIPEX 100T

Odtučnění vlny probíhalo ve vodě v poměru 1:50 ve prospěch vody, při teplotě 40 ± 2 °C po dobu 24 hodin. Enzym Lipex 100T byl přidán v 1% množství vztaženém na hmotnost suché vlny. Před samotným přidáním enzymu byla upravena hodnota pH na 8 pomocí roztoku NaOH. Původní pH vlny bylo slabě kyselé (přibližně 6,5). V průběhu odtučnění byla směs několikrát promíchána.

Po odtučnění byla vlna důkladně proprána vodou, aby byl odstraněn enzym, a následně byla vysušena v horkovzdušné sušárně při teplotě 103 ± 2 °C. Vysušená vlna byla pomleta v nožovém mlýně, jehož síto mělo 1 mm veliké oka.

ROZKLAD VLNY

Pomletá vlna byla vložena do bavlněného povlaku, který byl následně umístěn do pračky. K rozkladu vlny docházelo ve dvou stupních. Nejprve pomocí alkalické a následně pomocí enzymové hydrolýzy. Oba stupně hydrolýzy vlny probíhaly ve vodě v poměru 1:20 ve prospěch vody. Následně byl přidán $\text{Ca}(\text{OH})_2$ v takovém množství, aby vznikl 0,6% roztok. Hydrolýza probíhala v pračce po dobu 48 hodin při teplotě 80 °C. Prvních 6 hodin hydrolýzy byla směs promíchávána a poté byla až do konce ponechána v klidu. Po skončení prvního stupně byla teplota snížena na 60 °C. V druhém stupni rozkladu bylo upraveno pH na hodnotu 9 pomocí roztoku NaOH. Ihned po úpravě pH byl přidán enzym Esperase 6.0T v koncentraci 5 % na navážku suché vlny. Hydrolýza opět probíhala v pračce, tentokrát však po dobu 24 hodin. Směs byla znovu prvních 6 hodin promíchávána a poté byla do konce ponechána v klidu. Po skončení druhého stupně rozkladu byla kapalná fáze zahřátá v sušárně na teplotu 90 °C po dobu 10 minut, čímž došlo k inaktivaci enzymu Esperase 6.0T.

SEPARACE

Po dvoustupňové hydrolyze musel být vzniklý hydrolyzát oddělen od nerozloženého podílu. Byla proto provedena filtrace přes 16 vrstev polyamidové tkaniny. Nerozložený podíl zachycený na tkanině byl vysušen v sušárně při teplotě 103 ± 2 °C. Po vysušení a zchladnutí byl zvážen. Konečná podoba nerozloženého podílu je na obrázku 12 B.

ODSTŘEĐOVÁNÍ

Hydrolyzát separovaný od nerozložené vlny byl dále zbavován jemných nečistot pomocí odstřeďování. Malé množství hydrolyzátu bylo nalito do zkumavek v odstřeďivce a odstřeďování probíhalo při frekvenci 4 000 ot/min po dobu 10 minut. Po odstřeďování byl hydrolyzát vylit do sběrné nádoby.

DIALÝZA

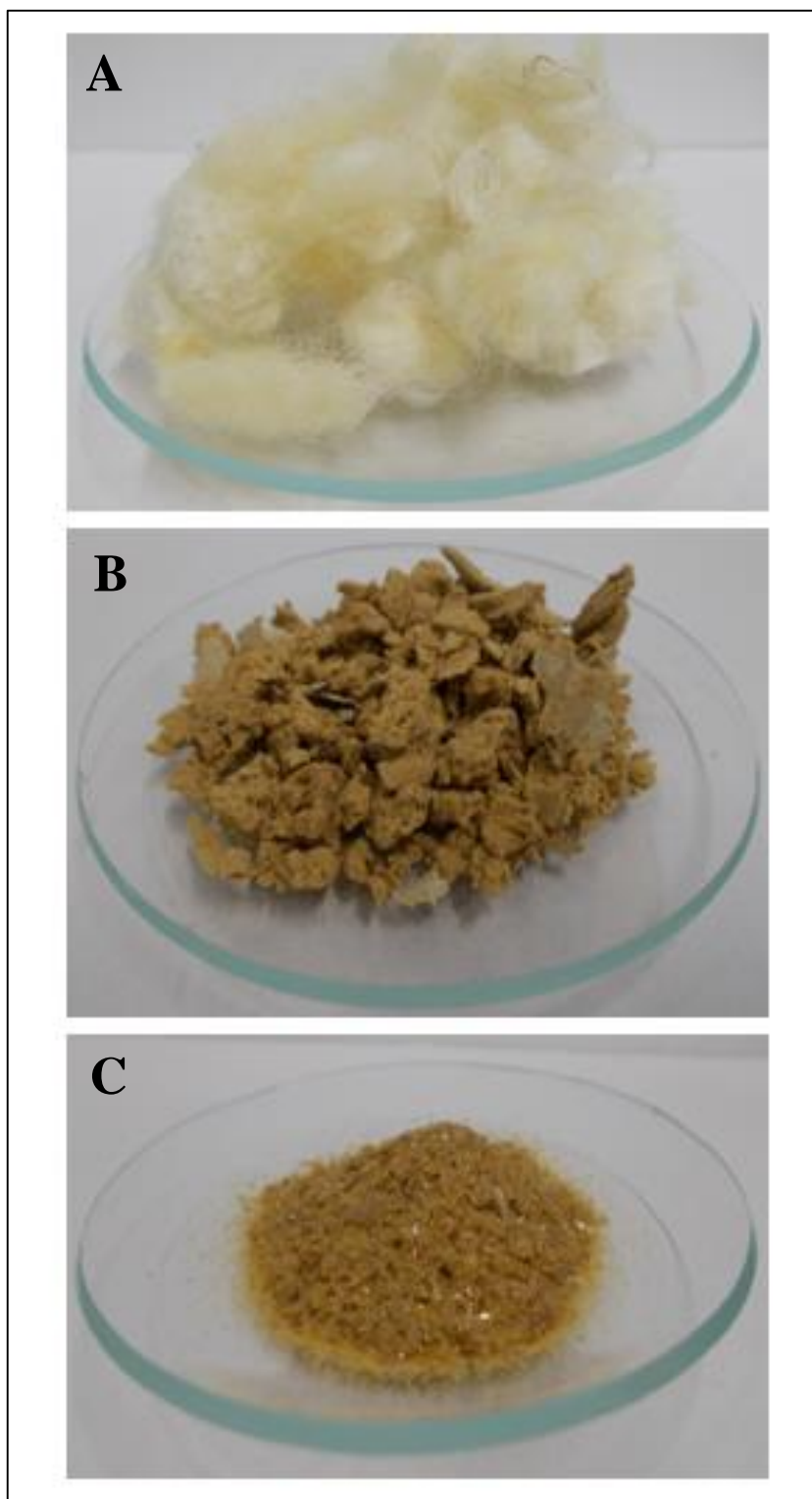
Hydrolyzát obsahoval nízkomolekulární látky (popeloviny), které musely být kvůli dalšímu využití odstraněny. Vhodnou metodou pro odstraňování nízkomolekulárních látek je dialýza přes celulózové membrány. Do membrány, která propouštěla látky s molekulovou hmotností menší než 12 kDa, byl nalit hydrolyzát a konce membrány byly uzavřeny svorkami. Hydrolyzát se dialyzoval oproti destilované vodě v poměru 1:10 ve prospěch destilované vody. Dialýza probíhala 1 týden a v průběhu týdne bylo médium dvakrát vyměněno. Po skončení dialýzy byl hydrolyzát vylit na plech a vysušen při teplotě 60 °C. Jeho konečnou podobu můžeme vidět na obrázku 12 C.

Účinnost hydrolyzy byla stanovena podle vztahu 6:

$$\eta = 100 - \left(\frac{m_1}{n} \cdot 100 \right) \quad (6)$$

m_1 – hmotnost nerozloženého podílu v g,

n – navážka vzorku v g.



Obrázek 12: Vlna (A), nerozložený podíl (B),
hydrolyzát (C)

Pro přípravu filmů byl dále použit druhý keratinový hydrolyzát, který byl dodán již v hotové podobě. Hlavní rozdíl oproti prvnímu hydrolyzátu byl v použitém enzymu v průběhu druhého stupně hydrolyzy. Postup přípravy druhého hydrolyzátu byl následující:

V prvním stupni hydrolyzy bylo 1 000 g surového materiálu smícháno s 15 000 ml 0,6 % KOH, čímž vznikl 0,107 M roztok hydroxidu. Alkalická hydrolyza probíhala 48 hodin při teplotě 90 °C, přičemž prvních 6 hodin byla směs promíchávána.

Na začátku enzymové hydrolyzy bylo pH směsi upraveno na hodnotu 9 pomocí HCl. Po úpravě pH bylo přidáno 5 % (vztaženo na navážku biologického materiálu) enzymu Savinase 6.0T. Druhá fáze hydrolyzy probíhala 24 hodin při teplotě 60 °C a opět byla směs prvních 6 hodin promíchávána. Po skončení druhé fáze byl enzym inaktivován zahřáním na teplotu 90 °C na 10 minut. Pro filtraci hydrolyzátu od nerozloženého podílu byla použita bavlněná tkanina o různé propustnosti. Nerozložená fáze byla zachycena na tkanině a následně vysušena v komorové sušárně při teplotě 80 °C ve vakuu. Získaný roztok hydrolyzátu byl zahuštěn a vysušen na nerezovém plechu v komorové sušárně při teplotě 80 °C ve vakuu. Vysušený keratinový hydrolyzát byl nakonec rozdrcen v třecí misce na jemný prášek.

10.2 PŘÍPRAVA FILMŮ

Pro vytvoření filmů byly využity dva keratinové hydrolyzáty: keratinový hydrolyzát připravený pomocí enzymu Esperase 6.0T (KHEE) a keratinový hydrolyzát připravený pomocí enzymu Savinase 6.0T (KHES). Dalším rozdílem mezi jednotlivými filmy bylo množství přidaného síťovadla. Filmy byly připraveny metodou lití do silikonových forem o rozměrech 12,5 cm x 7 cm x 0,3 cm. Keratinový hydrolyzát byl navážen v takovém množství, aby vznikl 15% roztok. K hydrolyzátu bylo přidáno změkčovadlo v množství 40 či 60 % na navážku hydrolyzátu. Dále bylo k hydrolyzátu a změkčovadlu přidáno síťovací činidlo (chitosan) a to vše bylo promícháno v destilované vodě za stálého míchání a slabého ohřevu. Aby došlo k rozpuštění chitosanu, bylo nejprve upraveno pH na hodnotu přibližně 5,5, jelikož bylo zjištěno, že chitosan se rozpouští v slabě kyselém prostředí.

Byly připraveny filmy s následujícím složením:

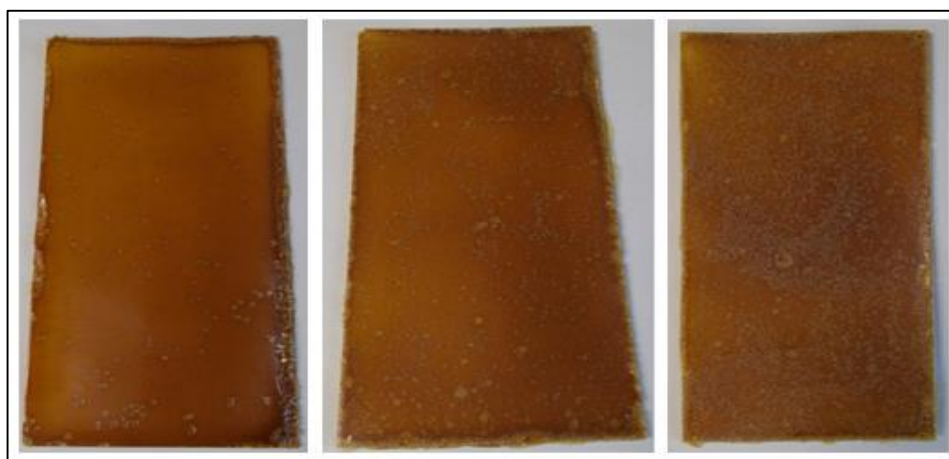
Tabulka 6: Složení připravených filmů

FILM	HYDROLYZÁT (%)	CHITOSAN (%)	GLYCEROL (%)	ENZYM
1.	15	—	40	Esperase 6.0T
2.	15	10	40	Esperase 6.0T
3.	15	20	60	Esperase 6.0T
4.	15	30	60	Esperase 6.0T
5.	15	—	40	Savinase 6.0T
6.	15	10	60	Savinase 6.0T
7.	15	20	60	Savinase 6.0T
8.	15	30	60	Savinase 6.0T

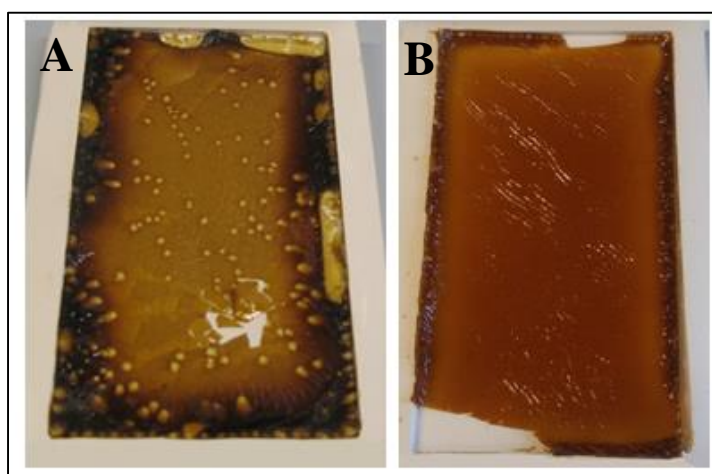
Nejprve byly připraveny filmy číslo 1 a 2, které obsahovaly pouze 40 % glycerolu. Tyto filmy byly příliš křehké, a proto do dalších filmů 3, 4, 6, 7 a 8 bylo přidáno již 60 % glycerolu, čímž se jejich pevnost zvýšila. Nevýhodou vzniklých filmů byl vysoký obsah bublin, který se do roztoku dostal při míchání. Aby mohly být filmy bez síťovadla porovnatelné, bylo do filmu bez síťovadla tvořeného KHES přidáno 40 % glycerolu. Připravené filmy jsou znázorněny na obrázcích 13 – 15.



Obrázek 13: Filmy s 10, 20 a 30 % chitosanu tvořené KHEE



Obrázek 14: Filmy s 10, 20 a 30 % chitosanu tvořené KHES



Obrázek 15: Nesít'ované filmy tvořené KHEE (A) a KHES (B)

11 VÝSLEDKY A DISKUZE

11.1 ÚČINNOST HYDROLÝZY

Účinnost hydrolýzy byla stanovena podle vztahu 6:

$$\eta = 100 - \left(\frac{m_1}{n} \cdot 100 \right)$$

$$\eta = 100 - \left(\frac{230}{800} \cdot 100 \right)$$

$$\eta = \underline{71,25 \%}$$

m_1 – hmotnost nerozloženého podílu = 230 g

n – navážka vzorku = 800 g.

Byla provedena alkalicko-enzymová hydrolýza ovčí vlny, která měla účinnost 71,25%.

11.2 STANOVENÍ OBSAHU DUSÍKU

U vzorků vlny, nerozloženého podílu vlny a u obou hydrolyzátů byl stanovován obsah dusíku, aby byl zjištěn obsah bílkovin. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 7: Výsledné hodnoty obsahu dusíku

VZOREK	OBSAH DUSÍKU [%]	SMĚRODATNÁ ODCHYLKA
VLNA	14,32	0,17
NEROZLOŽENÝ PODÍL VLNY	10,72	1,55
KHEE	14,18	1,29
KHES	11,56	0,18

U vlny byl obsah dusíku stanoven na $14,32 \% \pm 0,17$. Obsah dusíku $14,18 \% \pm 1,29$ u KHEE a $11,56 \pm 0,18$ u KHES nám značí, že nedošlo k výrazné destrukci aminokyselin v průběhu hydrolyzy.

11.3 STANOVENÍ OBSAHU SÍRY

U vzorků vlny, nerozloženého podílu vlny a u hydrolyzátů byl stanoven obsah síry. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce. Obsah síry byl u vzorků, kromě KHES, poměrně nízký. Pravděpodobně je to dáno typem vlny, který byl použit.

Tabulka 8: Výsledné hodnoty obsahu síry

VZOREK	OBSAH SÍRY [%]
VLNA	0,16
NEROZLOŽENÝ PODÍL VLNY	0,65
KHEE	0,04
KHES	2,77

11.4 STANOVENÍ OBSAHU POPELOVIN

U vzorků vlny, nerozloženého podílu vlny a u hydrolyzátů byl stanoven obsah pope-lovin. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce 9.

Tabulka 9: Výsledné hodnoty obsahu popelovin

VZOREK	OBSAH POPELOVIN [%]	SMĚRODATNÁ ODCHYLKA
VLNA	0,76	0,07
NEROZLOŽENÝ PODÍL VLNY	10,48	0,89
KHEE	4,57	0,17
KHES	17,52	0,13

Nejmenší obsah popelovin, $0,76 \% \pm 0,07$, je u surové vlny. Následné zpracování vlny probíhalo v silně alkalickém prostředí $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a dále docházelo k úpravě pH pomocí NaOH. Dodávání těchto látek se projevilo zvýšením obsahu popelovin, jak je vidět u nerozloženého podílu, kde je obsah popelovin $10,48 \% \pm 0,89$. Byla proto provedena dialýza, která zbavila hydrolyzát větší části popelovin, a výsledný obsah popelovin u KHEE pak byl $4,57 \pm 0,17$. Kdyby dialýza probíhala déle, byl by obsah popelovin nižší. Pro naše potřeby byl obsah popelovin u hydrolyzátu naprosto dostačující. U KHES je obsah popelovin poměrně vysoký a to $17,52 \% \pm 0,13$.

11.5 STANOVENÍ OBSAHU TUKU

Obsah tuku byl stanovován u vlny a byl stanoven na 3,47 %. Tento tuk byl odbourán před samotným rozkladem vlny pomocí enzymu Lipex 100T.

11.6 STANOVENÍ BOTNÁNÍ A ROZPUSTNOSTI

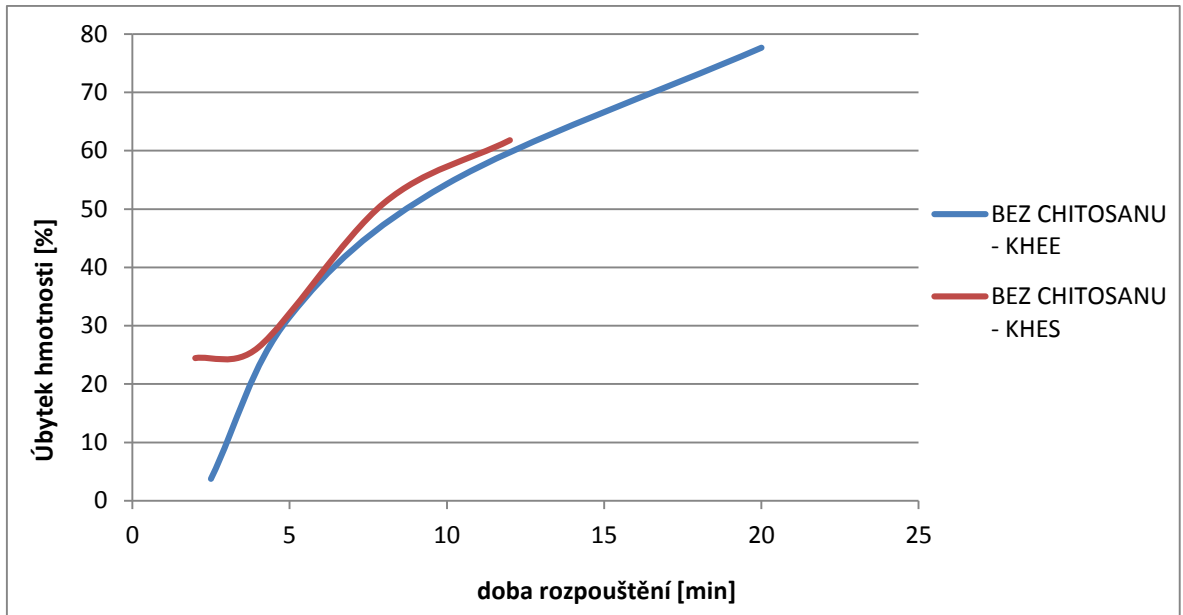
Zkouška botnání byla provedena u všech filmů. Filmy bez přídatku chitosanu a filmy s 10% přídatkem chitosanu nebotnaly, pouze se rozpouštěly, a nejsou proto v tabulce uvedeny.

Tabulka 10: Výsledné hodnoty zkoušky botnání u jednotlivých filmů

ZKOUŠKA BOTNÁNÍ					
FILM:	20 % CHIT - KHEE	30 % CHIT - KHEE	FILM:	20 % CHIT - KHES	30 % CHIT - KHES
DOBA BOTNÁNÍ [hod]	NÁRŮST POVRCHU [%]	NÁRŮST POVRCHU [%]	DOBA BOTNÁNÍ [hod]	NÁRŮST POVRCHU [%]	NÁRŮST POVRCHU [%]
1	38,73	42,46	1	45,38	29,57
2	42,69	21,86	2	44,42	39,80
3	31,31	15,79	3	44,95	46,47
4	13,14	14,26	4	26,11	36,59
6	11,07	6,95	24	17,11	30,45

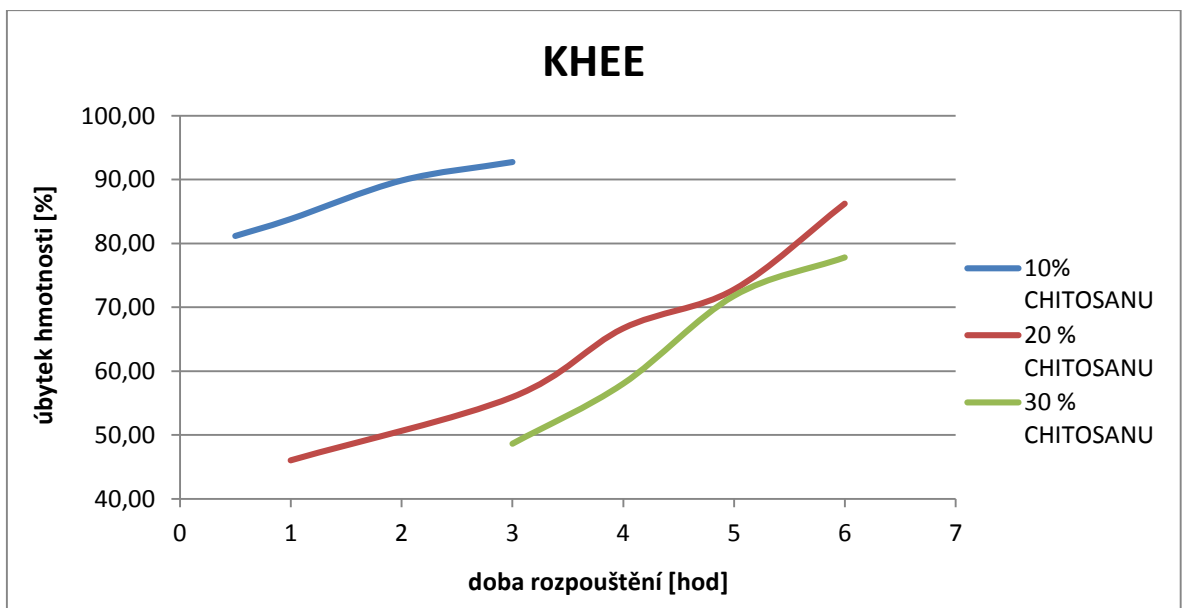
Z tabulky vidíme, že u filmů docházelo v prvních hodinách k botnání, které dosáhlo vrcholu a následně začalo klesat. Nejprve došlo k nárůstu povrchu filmů, což značí, že filmy botnaly. Poté botnání filmů přestalo a dále se již filmy rozpouštěly. K největšímu botnání docházelo u filmů s 20 a 30% přídavkem chitosanu s KHES, u nichž byl nárůst povrchu až 46%. U filmů s 20 a 30% přídavkem chitosanu s KHEE došlo také k výraznému botnání, které však pokračovalo značným rozpouštěním filmů.

Rozpustnost filmů, která je vyjádřena jako hmotnostní úbytek v závislosti na čase, je znázorněna na následujících obrázcích 16, 17 a 18.



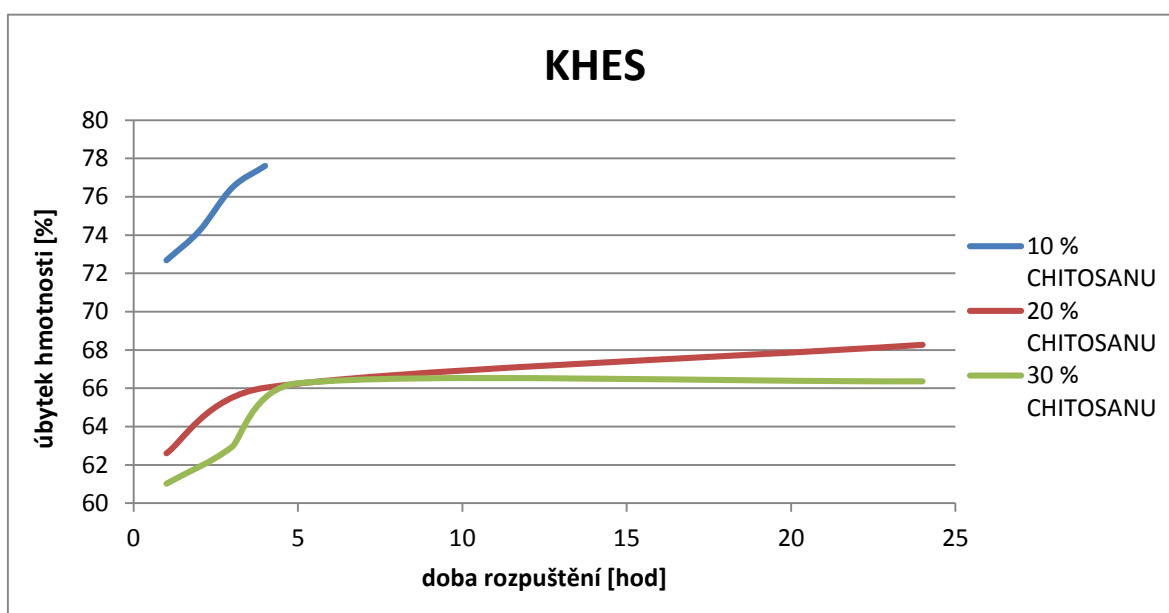
Obrázek 16: Rozpustnost nesít'ovaných filmů složených z KHEE a KHES

Na obrázku 16 je znázorněna rozpustnost nesít'ovaných filmů připravených z KHEE a KHES. Vidíme, že docházelo k rychlému rozpouštění filmů v řádu min. Během 10 minut byl hmotnostní úbytek větší jak 50 %. Rozpustnost filmu tvořeného KHES byla mírně větší než rozpustnost filmu tvořeného KHEE.



Obrázek 17: Rozpustnost filmů tvořených KHEE s 10, 20 a 30% přidavkem chitosanu

Na obrázku 17 je znázorněn úbytek hmotnosti filmů tvořených KHEE s 10, 20 a 30% přídavkem chitosanu v závislosti na čase. Vidíme, že k největšímu úbytku došlo u filmu s 10% přídavkem chitosanu. Naopak nejméně se rozpouštěl film tvořený 30 % chitosanu. Lze tedy říci, že s rostoucím množstvím síťovacího činidla rozpustnost filmu klesá. Například při 3 hodinách rozpouštění byl u filmu s 10% přídavkem chitosanu zjištěn úbytek hmotnosti 93 %, u filmu s 20 % chitosanu byl úbytek 57 % a u filmu s 30 % chitosanu byl jen 49 %. Kvůli rozdílné rozpustnosti filmů nebyly časy rozpouštění vždy stejné.

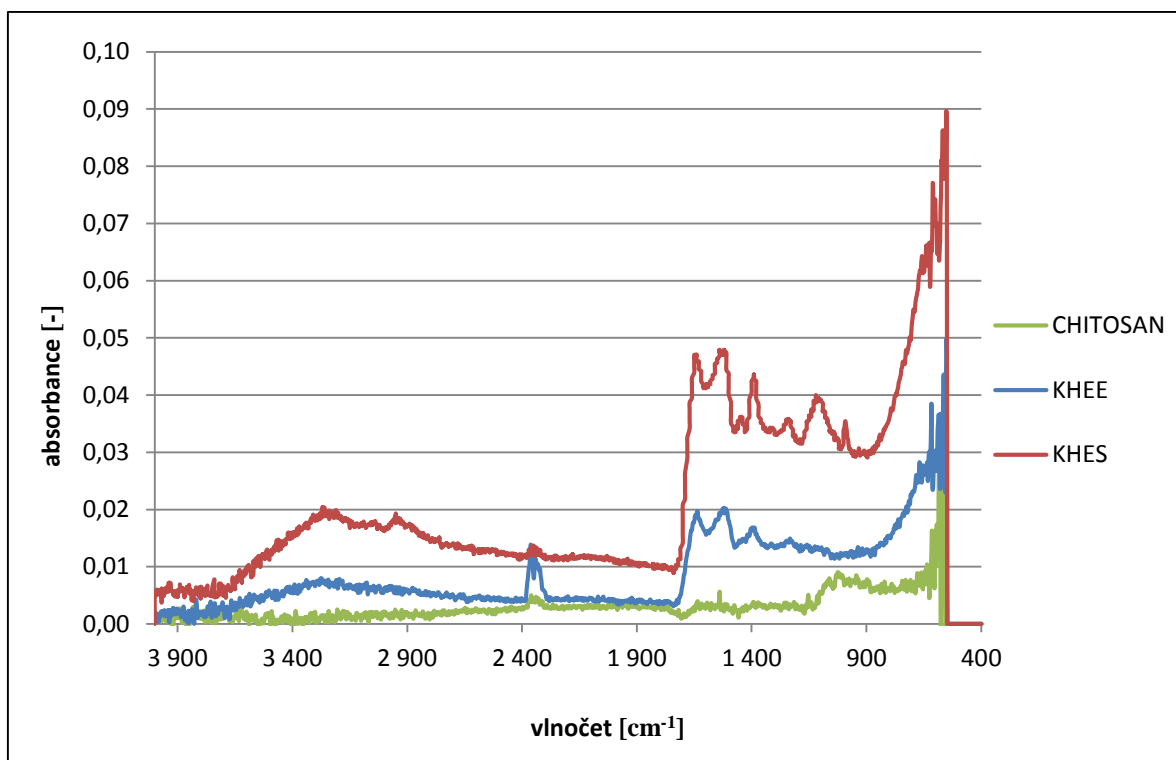


Obrázek 18: Rozpustnost filmů tvořených KHES
s 10, 20 a 30% přídavkem chitosanu

Na obrázku 18 vidíme, že opět byla rozpustnost filmů tím nižší, čím vyšší byl obsah síťovacího činidla. Tyto filmy byly oproti filmům připraveným z KHEE méně rozpustné, jelikož byl u nich úbytek hmotnosti do 78 %. U filmů tvořených KHEE byl úbytek hmotnosti až 93%. Ani po 24 hodinách nebylo u filmů s 20 a 30 % chitosanu rozpouštěno více než 69 % vzorku. Jejich rozpouštění bylo ve srovnání s předchozími filmy pozvolné.

11.7 INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE S FOURIEROVOU TRANSFORMACÍ

Na následujícím obrázku je výsledek FTIR analýzy KHEE, KHES a výsledné spektrum síťovacího činidla chitosanu.

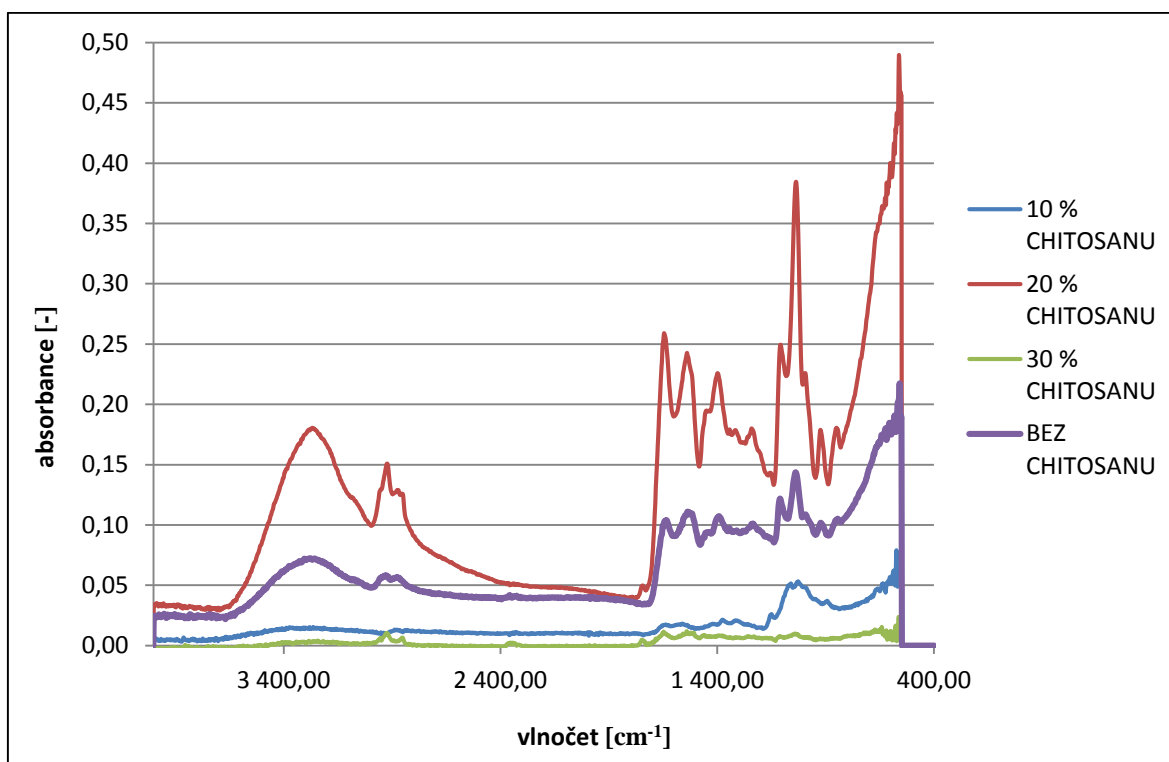


Obrázek 19: Výsledné křivky FTIR analýzy KHEE, KHES a výsledné spektrum síťovacího činidla chitosanu

Výsledná spektra obou hydrolyzátů se téměř shodují v polohách absorpčních pásem. Liší se však hodnotami absorbance. Výrazným absorpčním pásmem nacházejícím se u obou hydrolyzátů je pás rozprostírající se v oblasti 3000 - 3600 cm⁻¹, který znázorňuje -CONH-. U obou hydrolyzátů se dále nachází absorpční pásy v rozsahu vlnočtů 1350 - 1470 a 1480 - 1660 cm⁻¹, které jsou charakteristické pro skupiny -CH₂- a -CONH-. Výraznější rozdíl mezi hydrolyzáty je v nárůstu absorpčního pásma u KHES, který se nachází v rozsahu vlnočtů 1020 - 1180 cm⁻¹, kde mají své charakteristické píky -CO- a -OH skupiny. U KHEE se absorpční pás v tomto rozsahu vlnočtů nenachází. Pík charakterizující -CO- a -OH skupiny v rozsahu 1020 - 1180 cm⁻¹ je vidět i u absorpčního spektra chitosanu, na kterém nejsou další píky výrazné. Další výrazný rozdíl mezi KHEE a KHES je v

absorpčním pásu v rozsahu vlnočtů 950 – 1010, který je charakteristický pro $-\text{CH}=\text{CH}_2$ skupinu a nachází se pouze u KHES.

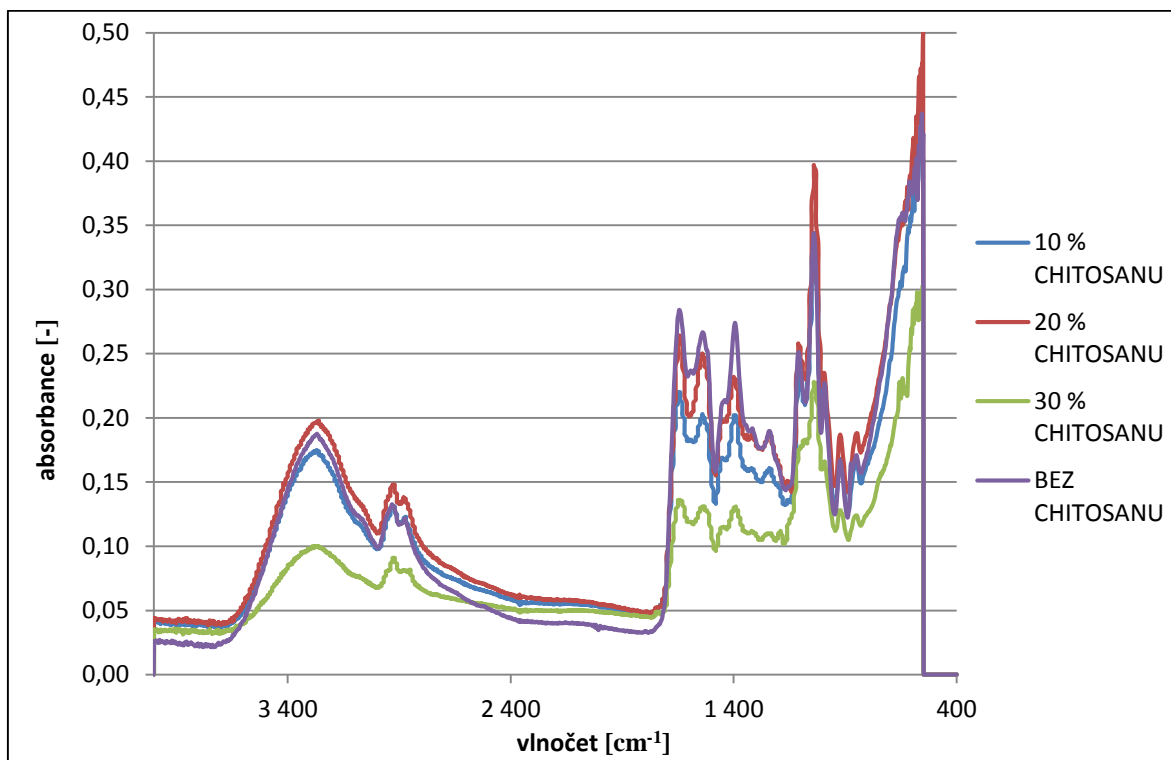
Na obrázku 20 jsou znázorněny získané spektra z FTIR analýzy filmů, které se skládají z KHEE. Tyto filmy se liší množstvím přidaného síťovadla, které bylo 0 - 30 %.



Obrázek 20: Výsledné křivky FTIR analýzy filmů tvořených KHEE

Nejvyšší hodnoty absorbance v jednotlivých pásmech vlnočtů má film s 20% přídavkem chitosanu. U tohoto filmu je znatelný široký absorpční pás rozprostírající se v oblasti 3 000 - 3 600 cm^{-1} , který znázorňuje $-\text{CONH}-$, což značí, že došlo k vytvoření velkého počtu vazeb mezi řetězci keratinového hydrolyzátu. Tento pík se nachází i u ostatních filmů, což je vidět na samostatných spektrech každého filmu, které jsou přiloženy v příloze. Další výrazný pík je při vlnočtech 2920 - 2960 cm^{-1} , který je charakteristický pro vazbu $-\text{CH}_2-$. I zde můžeme vidět v oblasti vlnočtů 1490 - 1700 cm^{-1} a 1350 - 1480 cm^{-1} charakteristické píky $-\text{CH}_2-$ a $-\text{CONH}-$ skupin. Výrazné pásmo vlnočtů v oblasti 950 - 1130 cm^{-1} přísluší skupinám $-\text{OH}$ a $-\text{CO}-$.

Výsledná spektra FTIR analýzy filmů, které se skládají z KHES, jsou znázorněny na následujícím obrázku 21. Tyto filmy se opět liší množstvím přidaného chitosanu, které bylo v rozmezí 0 - 30 %.

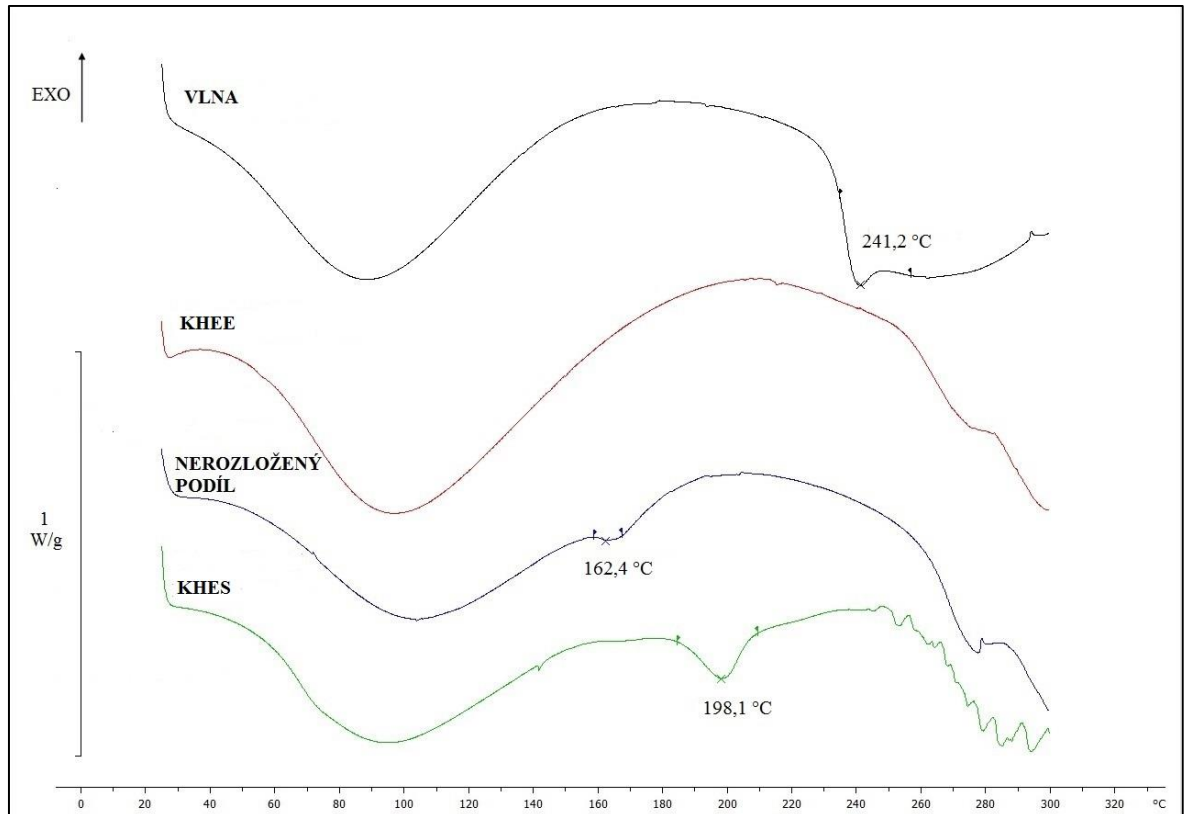


Obrázek 21: Výsledné křivky FTIR analýzy filmů tvořených KHES

Výsledná spektra u všech filmů mají stejné polohy absorpčních pásů s rozdílnými hodnotami absorbance. Opět je patrný široký absorpční pás v oblasti 3 000 - 3 600 cm⁻¹, který znázorňuje -CONH- vazbu. Další výrazné absorpční pásy jsou v oblasti 1490 - 1670 cm⁻¹ a v oblasti 1350 - 1490 cm⁻¹, kde jsou charakteristické píky -CH₂- a -CONH- skupin. Výrazný nárůst v pásmu vlnočtů 890 - 1160 cm⁻¹ je charakteristický pro skupiny -OH a -CO-.

11.8 DIFERENCIÁLNÍ SKENOVACÍ KALORIMETRIE

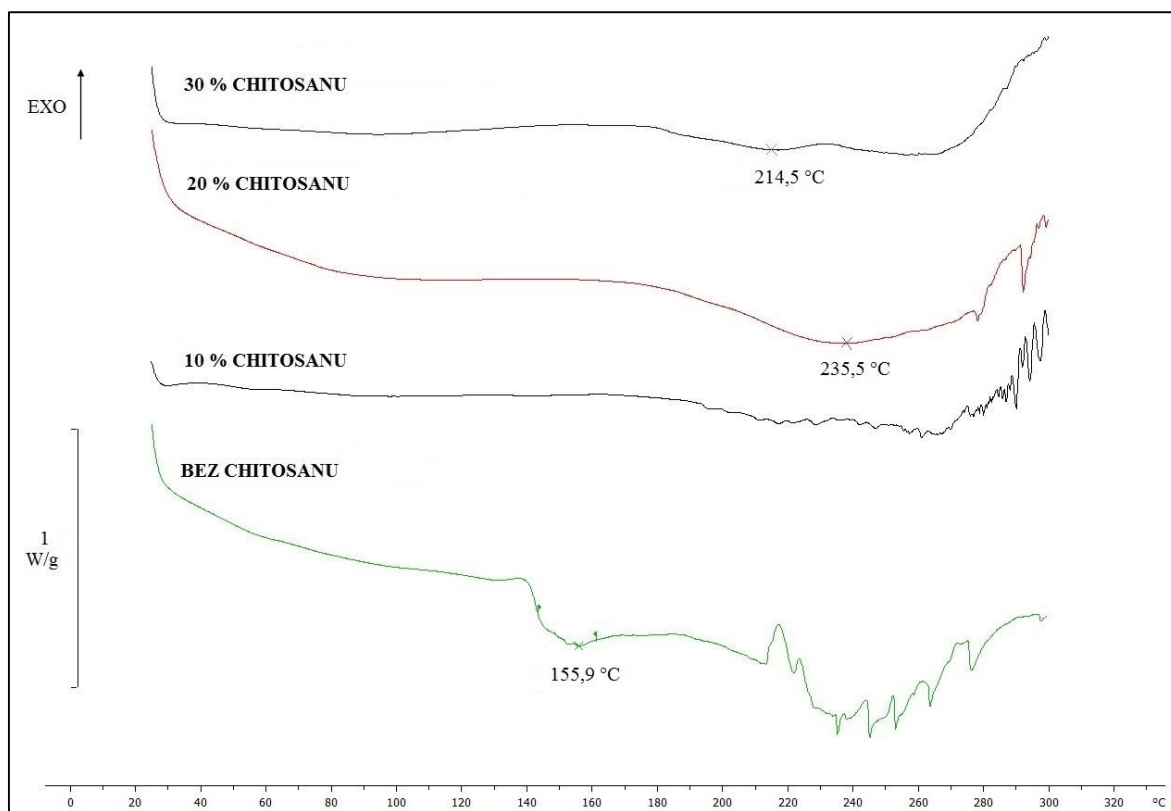
Na obrázku 22 jsou zaznamenány křivky z DSC analýzy vlny, nerozloženého podílu a obou hydrolyzátů.



Obrázek 22: Výsledné křivky DSC analýzy vlny, nerozloženého podílu a obou hydrolyzátů

První endotermní pokles, kterého si můžeme u vlny, nerozloženého podílu a obou hydrolyzátů všimnout, je způsoben odpařováním vody nacházející se ve vzorcích. Dále u KHES dochází k tání a to při teplotě 198 °C. Následně od teploty 250 °C začíná hydrolyzát degradovat. Nerozložený podíl začíná tát již při teplotě 162 °C a degradace začíná zřejmě kolem teploty 270 °C. U KHEE nejsou změny tolik výrazné. U vyšších teplot není viditelný žádný endotermní pík spojený s táním vzorku, což naznačuje amorfni strukturu tohoto hydrolyzátu. K degradaci dochází při teplotě nad 270 °C. Vlna díky vysoce síťovane struktuře začíná tát až při teplotě 241 °C a její degradace začíná při teplotě nad 290 °C.

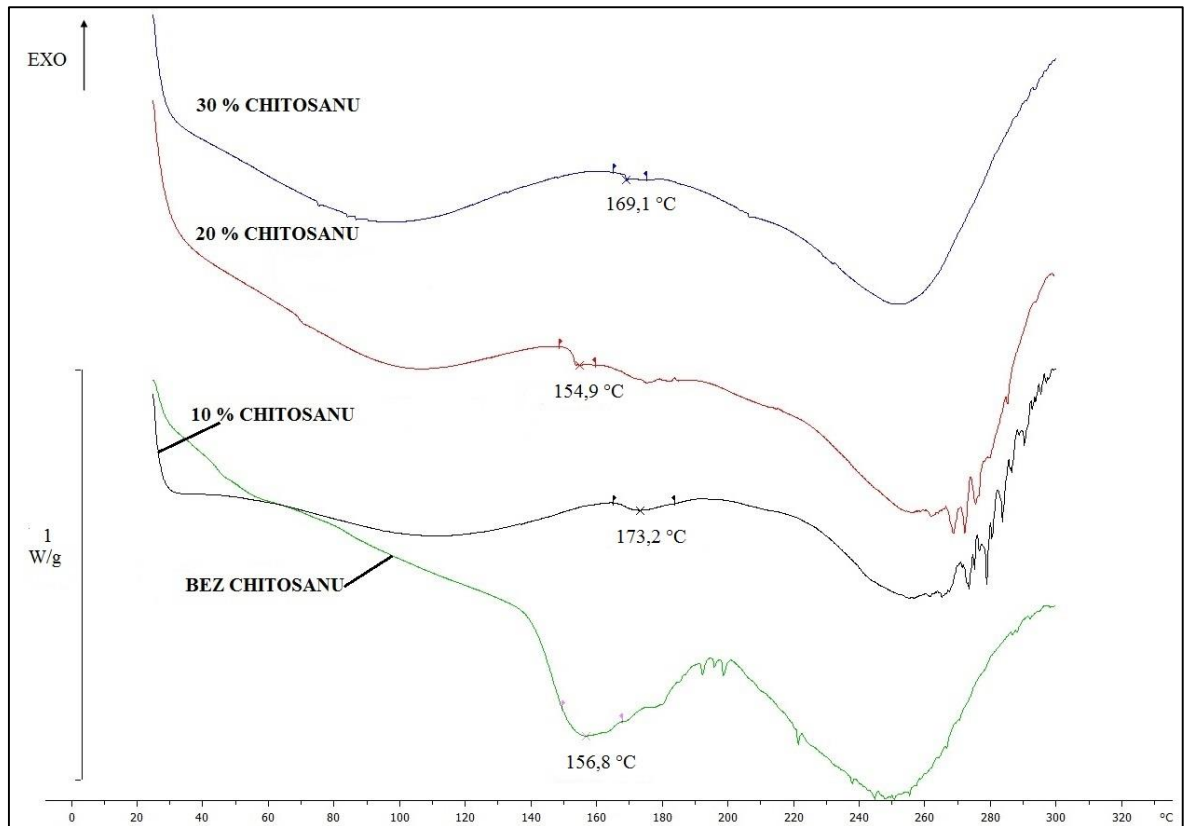
Na obrázku 23 jsou zobrazeny výsledné křivky DSC analýzy filmů lišících se množstvím přidaného chitosanu. Tyto filmy jsou složeny z KHEE.



Obrázek 23: Výsledné křivky DSC analýzy filmů tvořených KHEE

První endotermní pokles, kterého si můžeme všimnout u filmů na obrázku 23, je opět způsoben odpařováním vody. Film, který neobsahuje chitosan, má první výrazný endotermní pík s počátkem teploty 140 °C a vrcholem u teploty 156 °C. Tento pík představuje tání filmu. U ostatních filmů není pík značící tání tak výrazný, což lze přisoudit tomu, že u nesíťovaného filmu je krystalická fáze více zachována. Přibližně při teplotě 219 °C vidíme další pík, který zřejmě znamená počátek degradace filmu. Kolem teploty 280 °C se začíná rozkládat chitosan. Rozklad chitosanu se kryje s píkem značícím odpařování glycerolu, které by mělo začínat kolem teploty 290 °C. Vidíme, že další filmy s přídavkem chitosanu jsou tepelně odolnější než film bez přídavku chitosanu, jelikož u nich dochází k posunutí píku, značícího tání filmu, do vyšších teplot. U filmu s 20% přídavkem chitosanu má pík vrchol při teplotě přibližně 236 °C a u filmu s 30% přídavkem chitosanu má pík vrchol kolem 215 °C. U filmu s 10% přídavkem nelze tento pík určit. Píky značící degradaci filmu, degradaci chitosanu a odpařování glycerolu se u dalších filmů mohou prolínat.

Na obrázku 24 jsou výsledné křivky z DSC analýzy filmů lišících se množstvím přidaného chitosanu. Tyto filmy jsou složeny z KHES.

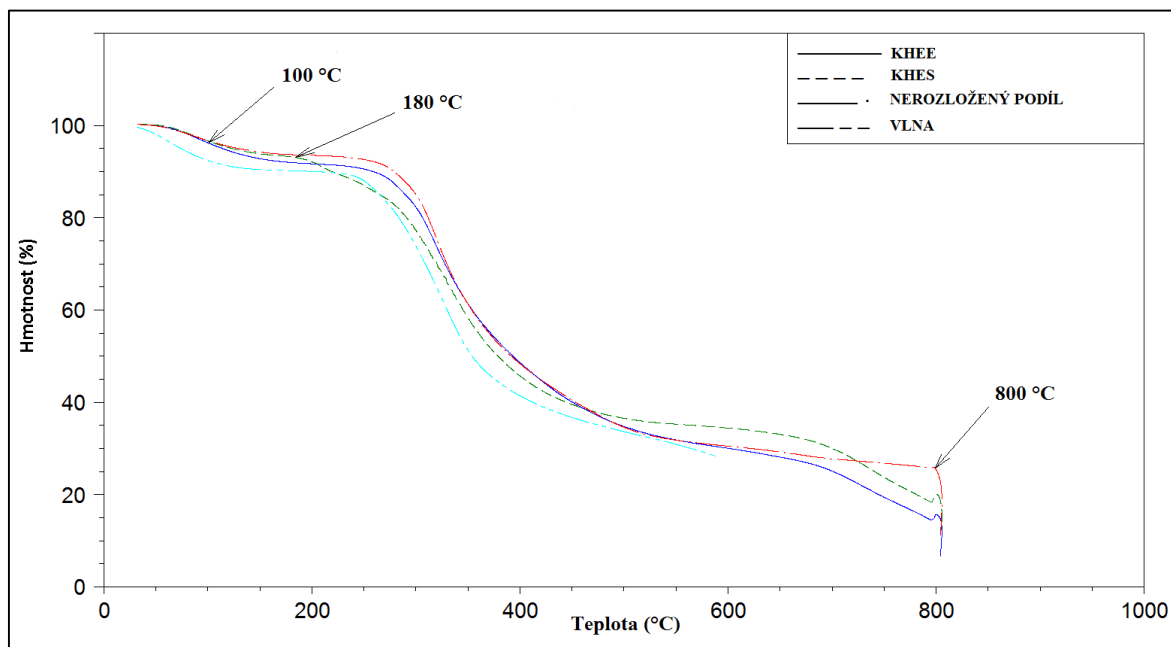


Obrázek 24: Výsledné křivky DSC analýzy filmů tvořených KHES

Stejně jako u předchozích filmů je i u těchto vidět prvotní endotermní pokles způsobený odpařováním vody. Další pík značící tání filmu je vidět při teplotě 157 °C u filmu bez chitosanu, při 173 °C u filmu s 10% přídavkem, při 155 °C u filmu s 20% přídavkem a při 169 °C u filmu s 30% přídavkem chitosanu. Další fází je degradace filmu, která u filmu bez chitosanu začíná již při teplotě 190 °C. U filmů s 10 a 20 % chitosanu je degradace filmu posunuta až přibližně k teplotě 270 °C a u filmu s 30% přídavkem chitosanu je teplota degradace posunuta o tolik, že není na křivce vidět. I v případě těchto filmů dochází kolem teploty 280 °C k degradaci chitosanu a kolem teploty 290 °C k odpařování glycerolu. Tyto píky se opět překrývají.

11.9 TERMOGRAVIMETRICKÁ ANALÝZA

Na následujícím obrázku jsou výsledky z TG analýzy vlny, nerozloženého podílu a obou hydrolyzátů.



Obrázek 25: Výsledné křivky TG analýzy vlny, nerozloženého podílu a obou hydrolyzátů

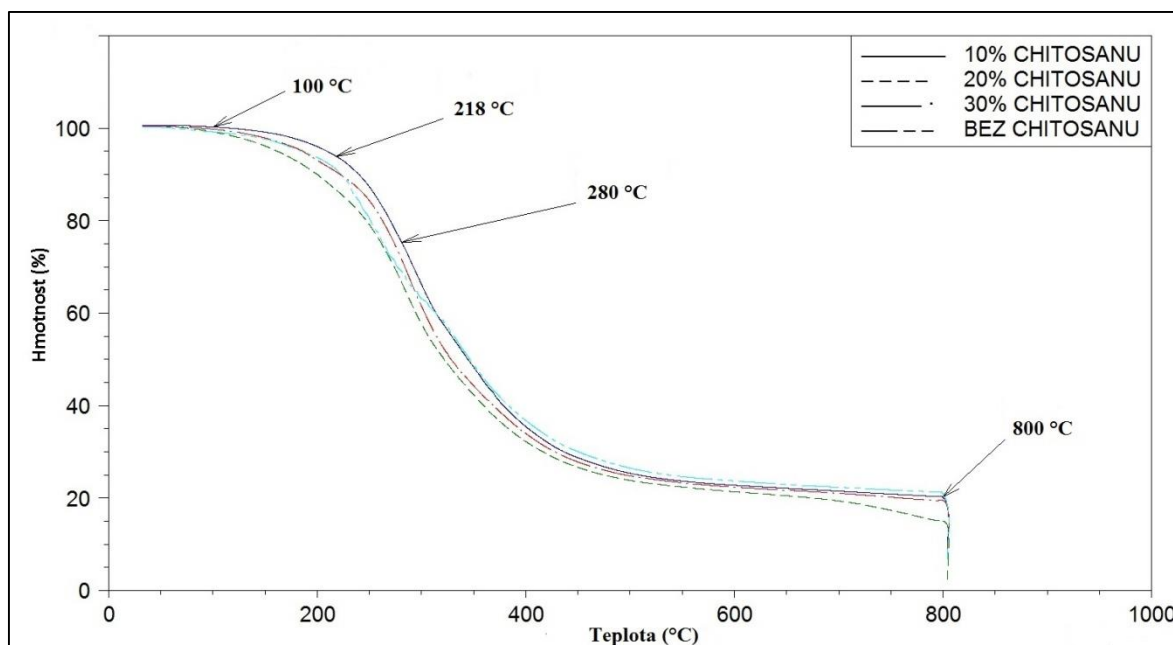
Výsledné křivky TG analýzy na obrázku 25 znázorňují úbytek hmotnosti v závislosti na teplotě. Můžeme si všimnout počátečního mírného poklesu hmotnosti, který je způsoben odpařováním vody nacházející se ve vzorcích. Vidíme, že k největšímu poklesu způsobenému odpařováním vody dochází u vlny. Naopak nejmenší obsah vody je u nerozloženého podílu. První výrazná změna nastává u KHES při teplotě 173 °C. Tato změna je pravděpodobně způsobena táním vzorku, které u KHEE začíná později. Dále začíná degradovat keratin a to již při teplotě 260 °C u KHES. U druhého hydrolyzátu tato degradace začíná při teplotě 280 °C. Vzorek vlny začíná degradovat již při teplotě 220 °C a tato degradace probíhá až do konce průběhu analýzy. Nejvíce teplotně stabilní byl nerozložený podíl, který začal výrazněji degradovat až při teplotě 291 °C. Při teplotě 800 °C bylo helium vyměněno za vzduch, čímž došlo ke spálení vzorku. Díky tomu byl zjištěn obsah popelovin (nespálených látek) u jednotlivých vzorků (kromě vlny) a tento obsah je uveden v následující tabulce. Vzorek vlny se nechal zahřívát pouze na teplotu 600 °C a to bez při-

stupu vzduchu. Nedošlo u něj proto ke spálení. Obsah popelovin po spálení byl nejnižší u KHEE a to 6,52 %. Naopak nejvyšší byl u druhého hydrolyzátu a to 11,68 %.

Tabulka 11: Obsah popelovin u vzorků

VZOREK	OBSAH POPELOVIN PO SPÁLENÍ [%]
KHEE	6,52
KHES	11,68
NEROZLOŽENÝ PODÍL	11,29
VLNA	—

Na následujícím obrázku 26 jsou výsledné křivky z TG analýzy filmů tvořených KHEE.



Obrázek 26: Výsledné křivky TG analýzy filmů tvořených KHEE

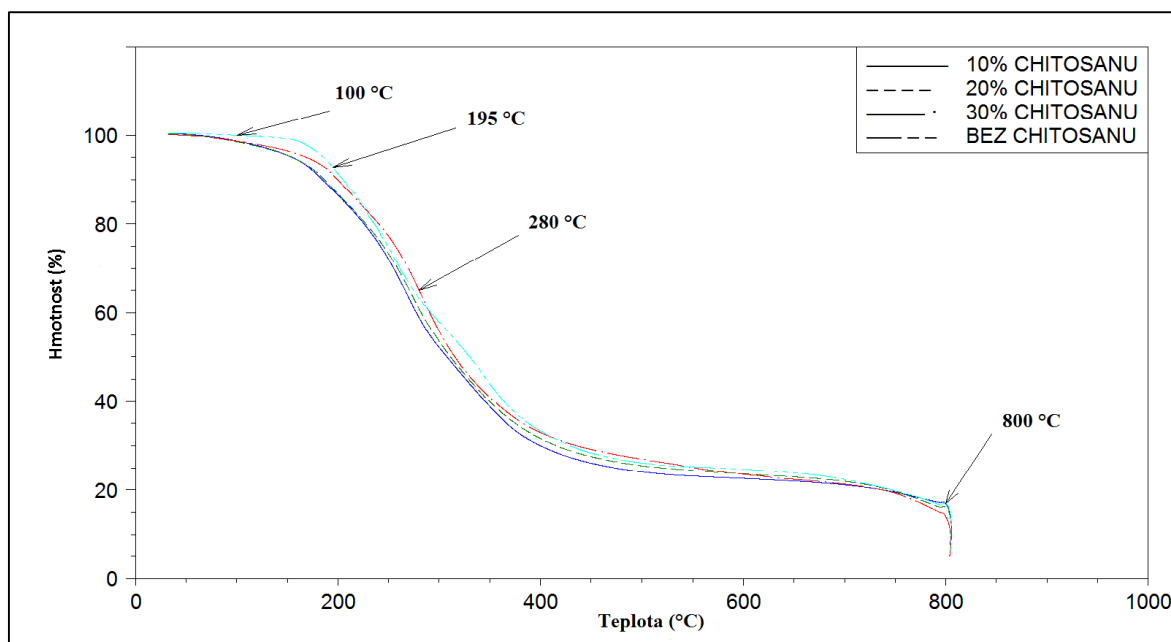
Z vyhodnocených křivek vidíme, že všechny filmy mají podobný průběh závislosti hmotnosti na teplotě. Zpočátku dochází k mírnému poklesu hmotnosti, který je způsoben

odpařováním vody obsažené ve vzorcích. Další úbytek hmotnosti je způsoben degradací keratinu, který začíná kolem teploty 218 °C jako je tomu u filmu s 10 % chitosanu. Degradace keratinu probíhá přibližně až do teploty 270 °C, kdy úbytek postupně pokračuje díky odpařování glycerolu, které začíná přibližně při teplotě 280 °C. Při této teplotě začíná degradovat i chitosan a degradace pokračuje až do teploty 345 °C v případě filmu s 30% přídavkem chitosanu. Čím větší je obsah chitosanu, tím déle rozklad probíhá (do vyšších teplot). V rozsahu teplot 100 - 800 °C nastává velký hmotnostní úbytek spojený s degradací filmů včetně jeho složek. Tento úbytek byl následující: 78,08 % u filmu bez chitosanu, 80,14 % u filmu s 10 % chitosanu, 84 % u filmu s 20 % chitosanu a u filmu s 30 % chitosanu je úbytek 80,34 %. Při teplotě 800 °C došlo opět ke spálení vzorků, aby mohl být zjištěn obsah popelovin. Nejméně popelovin je u filmu s 30% přídavkem chitosanu, což můžeme vidět v tabulce 12.

Tabulka 12: Obsah popelovin u filmů

VZOREK	OBSAH POPELOVIN PO SPÁLENÍ [%]
BEZ CHITOSANU	6,68
10 % CHITOSAN	10,39
20 % CHITOSAN	9,35
30 % CHITOSAN	3,92

Na obrázku 27 jsou výsledky z TG analýzy filmů tvořených KHES.



Obrázek 27: Výsledné křivky TG analýzy filmů tvořených KHES

Z výsledných hodnot vidíme, že i v tomto případě mají filmy velmi podobný průběh závislosti hmotnosti na teplotě. První hmotnostní úbytek je opět způsoben odpařováním obsažené vody. K dalšímu hmotnostnímu úbytku opět dochází díky degradaci keratinu, který začíná například již při teplotě 195 °C u filmu bez přídavku chitosanu. Hmotnostní úbytky způsobené degradací chitosanu a odpařováním glycerolu se opět vzájemně kryjí. Čím větší je obsah chitosanu, tím déle jeho rozklad probíhá. Hmotnostní úbytek spojený s degradací filmů a jeho složek v rozsahu teplot 100 - 800 °C je následující: 83,75 % u filmu bez chitosanu, 81,46 % u filmu s 10 % chitosanu, 82,39 % u filmu s 20 % chitosanu a 83,77 % u filmu s 30 % chitosanu.

Tabulka 13: Obsah popelovin u filmů

VZOREK	OBSAH POPELOVIN PO SPÁLENÍ [%]
BEZ CHITOSANU	9,03
10 % CHITOSAN	7,70
20 % CHITOSAN	5,24
30 % CHITOSAN	5,10

V tabulce 13 je výsledný obsah popelovin filmů, který byl zjištěn po spálení vzorku. Nejnižší je opět u filmu s 30 % chitosanu a to 5,10 %. Nejvyšší obsah popelovin byl u filmu bez chitosanu a to 9,03 %.

12 ZÁVĚR

Teoretická část diplomové práce se zprvu věnuje základním informacím o keratinu, jako jsou struktura, aminokyselinové složení či změny aminokyselinového složení, ke kterým dochází při hydrolýze. Dále je krátce popsána ovčí vlna a struktura vlněného vlákna. Podstatnou částí je kapitola věnována způsobům přípravy keratinového hydrolyzátu, které jsou nejčastěji používány. Díky hydrolýze jsou získány keratinové hydrolyzáty používané pro přípravu filmů. Další kapitoly jsou věnovány filmům z keratinových hydrolyzátů a možnostem jejich optimalizace. V závěru se teoretická část věnuje aplikacím keratinových filmů a to především aplikacím v lékařství, dále pak v zemědělství a kosmetice.

V praktické části byl nejprve připraven keratinový hydrolyzát, který byl dále použit pro přípravu filmů. Tento hydrolyzát byl připraven dvoustupňovou alkalicko-enzymovou hydrolýzou. Při alkalické hydrolýze byl použit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a při enzymové části rozkladu byl použit enzym Esperase 6.0T. Dále byl pro přípravu filmů použit hydrolyzát, pro jehož přípravu byl použit enzym Savinase 6.0T. Z obou hydrolyzátů byly připraveny roztoky o 15% koncentraci, ke kterým bylo přidáno změkčovadlo glycerol v množství 40 či 60 % na navážku hydrolyzátu a síťovací činidlo chitosan, jehož množství se pohybovalo v rozmezí 0 - 30 % na navážku hydrolyzátu. Vzniklé roztoky byly odlity do silikonových rámečků a následně usušeny.

U všech filmů byla provedena zkouška rozpustnosti a zkouška botnání. Bylo zjištěno, že filmy bez síťovadla se rozpouští velmi rychle, jelikož již během 10 minut došlo u těchto filmů k více jak 50% úbytku hmotnosti. U filmů tvořených KHES se s rostoucím přídatkem síťovadla jejich rozpustnost mírně snižovala a po 24 hodinách se úbytek hmotnosti v porovnání s první hodinou příliš výrazně nezvětšil. Rozpustnost filmů tvořených KHEE byla opět s rostoucím obsahem síťovadla nižší. Nejméně rozpustný film byl tvořen KHES s 30% přídatkem chitosanu, u kterého nebyla rozpustnost po 24 hodinách větší než 67 %.

U filmů tvořených KHEE a KHES s 20 a 30% přídatkem chitosanu docházelo k botnání, které dosáhlo určitého vrcholu a poté začalo klesat. Filmy bez přídatku chitosanu a filmy s 10% přídatkem chitosanu nebotnaly. Nejvíce botnal film, který byl tvořen KHES a obsahoval 30 % chitosanu. Po 3 hodinách jeho povrch narostl o téměř 47 %.

Z výsledků dalších instrumentálních metod lze konstatovat, že keratinové filmy s přídavkem chitosanu mají lepší tepelné vlastnosti než filmy bez přídavku chitosanu. Neoptimálnějších vlastností bylo dosaženo u filmu z KHEE s přídavkem 20 % chitosanu. Z výsledků DSC a TGA analýz lze pozorovat, že tento film začíná tát u teploty kolem 180 °C a degradovat při teplotách nad 218 °C.

Závěrem lze konstatovat, že nesíťované filmy měly horší vlastnosti než filmy síťované chitosanem. Docházelo u nich k rychlému rozpuštění v řádu minut a jejich tepelná stabilita byla nižší než tepelná stabilita síťovaných filmů. Dále lze říci, že filmy s vyšším obsahem chitosanu byly více odolné rozpouštění a více botnaly. Z tohoto pohledu lze říci, že chitosan pozitivně ovlivnil výsledné vlastnosti filmů. Nevýhodou filmů je však vysoký obsah bublin, který vznikl zamícháním vzduchu při přípravě filmů. I přes tento nedostatek se jeví chitosan jako vhodným materiálem pro síťování keratinových hydrolyzátů. Zvláště velký potenciál by mohl chitosan mít v lékařství, kde nelze síťovat běžně používanými síťovacími formaldehydem či glutaraldehydem kvůli jejich toxicitě.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KORNILŁOWICZ-KOWALSKA, Teresa a Justyna BOHACZ. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. *Waste Management* [online]. 2011, vol. 31, issue 8, s. 1689-1701 [cit. 2015-03-05]. DOI: 10.1016/j.wasman.2011.03.024.
- [2] BUSCHOW, K. *Encyklopedia of Materials: Science of Technology*. Volume 5, J-Mag: Keratin. Amsterdam: Elsevier, 2001, s. 5. ISBN 0-08-043152-6.
- [3] WHITFORD, David. *Proteins: structure and function*. Hoboken, NJ: J. Wiley & Sons, c2005, xiv, 528 s. ISBN 0-471-49893-9.
- [4] 2013. DUMITRIU, Severian a Valentin I POPA. *Polymeric biomaterials*. Boca Raton: CRC Press, Taylor, s. 330. ISBN 9781420094682.
- [5] Protein structure: The structure and property of amino acid. 2013. *The College of Saint Benedict and Saint John's University* [online]. [cit. 2015-03-12]. Dostupné z: <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/protstructure/olprotein-aminoacid.html>
- [6] *Přehled středoškolské chemie*. 2. vyd. Praha: SPN, 1999, 365 s. ISBN 80-723-5108-7
- [7] Basic cell chemistry-1. 2009. *Oregon State University* [online]. [cit. 2015-03-04]. Dostupné z: <http://oregonstate.edu/instruction/bi314/summer09/chemone.html>
- [8] Proteins: Tertiary and Quaternary Structures. *Austin Community College* [online]. [cit. 2015-03-04]. Dostupné z: <http://www.austincc.edu/emeyerth/tertiary.html>
- [9] About the fibre. 2012. *The woolmark company* [online]. [cit. 2015-03-04]. Dostupné z: <http://www.woolmark.com/learn-about-wool/about-the-fibre>
- [10] BARONE, Justin R., Walter F. SCHMIDT a Christina F. E. LIEBNER. Thermally processed keratin films. *Journal of applied polymer science* [online]. 2005, vol. 97, issue 4, s. 1644-1651 [cit. 2015-03-04]. DOI: 10.1002/app.21901

- [11] ZOCCOLA, Marina, Annalisa ALUIGI a Claudio TONIN. Characterisation of keratin biomass from butchery and wool industry wastes. *Journal of molecular structure* [online]. 2009, vol. 938, 1-3, s. 35-40 [cit. 2015-03-04]. DOI: 10.1016/j.molstruc.2009.08.036.
- [12] ZHANG, Jing, Yi LI, Jiashen LI, Zheng ZHAO, Xuan LIU, Zhi LI, Yanxia HAN, Junyan HU a Aizheng CHEN. Isolation and characterization of biofunctional keratin particles extracted from wool wastes. *Powder Technology* [online]. 2013, vol. 246, s. 356-362 [cit. 2015-05-04]. DOI: 10.1016/j.powtec.2013.05.037.
- [13] CARDAMONE, Jeanette M. Keratin transamidation. *International journal of biological macromolecules* [online]. 2008, vol. 42, issue 5, s. 413-419 [cit. 2015-03-04]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2008.02.004.
- [14] EREMEEV, N. L., I. V. NIKOLAEV, I. D. KERUCHEN'KO, E. V. STEPANOVA, A. D. SATRUTDINOV, S. V. ZINOV'EV, D. Yu. ISMAILOVA, V. P. KHOTCHENKOV, N. V. TSURIKOVA, A. P. SINITSYN, V. G. VOLIK a O. V. KOROLEVA. Enzymatic hydrolysis of keratin-containing stock for obtaining protein hydrolysates. *Applied biochemistry and microbiology* [online]. 2009, vol. 45, issue 6, s. 648-655 [cit. 2015-03-04]. DOI: 10.1134/s0003683809060131.
- [15] CARDAMONE, Jeanette M., Alberto NUÑEZ, Rafael A. GARCIA a Mila ALDEMA-RAMOS. Characterizing wool keratin. *Research Letters in Materials Science* [online]. 2009, vol. 2009, s. 1-5 [cit. 2015-03-04]. DOI: 10.1155/2009/147175.
- [16] EBRAHIMGOL F., TAVANAI H., ALIHOSSEINI F. and KHAYAMIAN T. (2014), Electrospayed recovered wool keratin nanoparticles, *Polymers for Advanced Technologies*, 25, pages 1001–1007, doi: 10.1002/pat.3342
- [17] Macro and Micro structure of Wool Fiber. *Yarn Manufacturing* [online]. 2011 [cit. 2015-03-04]. Dostupné z: <http://textilebd-yarn.blogspot.cz/2012/02/macro-and-micro-structure-of-wool-fiber.html>
- [18] KREJČÍ, Ondřej a Pavel MOKREJŠ. Sledování významnosti vybraných technologických podmínek při enzymové hydrolyze odpadní ovčí vlny. *Waste forum* [online]. číslo 1. Kouty nad Desnou: Waste forum, 2011 [cit. 2015-03-05]. Dostupné z: http://www.wasteforum.cz/cisla/WF_1_2011.pdf

- [19] KREJČÍ, Ondřej a Pavel MOKREJŠ. Snižování obsahu popelovin v hydrolyzátech keratinu dialýzou. *Waste forum* [online]. číslo 4. Kouty nad Desnou: Waste forum, 2012 [cit. 2015-03-05]. Dostupné z: http://www.wasteforum.cz/cisla/WF_4_2012.pdf#page=58
- [20] MOKREJŠ, Pavel, Ondřej KREJČÍ, Roman ČERMÁK a Petr SVOBODA. Optimalizace podmínek enzymové hydrolyzy kuřecího peří. In: *Chemické listy* [online]. 107. vyd., 2013 [cit. 2015-03-05]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2013_09_709-712.pdf
- [21] SCHROOYEN, Peter M.M., Pieter J. DIJKSTRA, Radulf C. OBERTHÜR, Adriaan BANTJES a Jan FEIJEN. Stabilization of solutions of feather keratins by sodium dodecyl sulfate. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2001, vol. 240, issue 1, s. 30-39 [cit. 2015-03-08]. DOI: 10.1006/jcis.2001.7673.
- [22] GENNADIOS, Edited by Aristippos. *Protein-based films and coatings*. Boca Raton: CRC Press, 2002. s 253 – 271. ISBN 9781420031980.
- [23] KURBANOGLU, Esabi Basaran a Omer Faruk ALGUR. Utilization of ram horn hydrolysate as a supplement for recovery of heat- and freeze-injured bacteria. *Food Control* [online]. 2006, vol. 17, issue 3, s. 238-242 [cit. 2015-03-08]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2004.11.001.
- [24] ABOUHEIF, M.A., S. BASMAEIL, H. METWALLY a S. MASOUD. Chemical preparation of NaOH—Keratin hydrolysate for improving the nutritive value of wheat straw. *Animal Feed Science and Technology* [online]. 1985, vol. 13, 3-4, s. 215-225 [cit. 2015-03-15]. DOI: 10.1016/0377-8401(85)90024-0.
- [25] TSUDA, Yuichi a Yoshihiro NOMURA. Properties of alkaline-hydrolyzed waterfowl feather keratin. *Animal Science Journal* [online]. 2013, vol. 85, issue 2, s. 180-185 [cit. 2015-03-15]. DOI: 10.1111/asj.12093
- [26] SIMPSON, W a G CRAWSHAW. *Wool: science and technology*. Cambridge, England: Woodhead, c2002, 143 – 146. ISBN 0849328209.
- [27] FORTUNATI, E., A. ALUIGI, I. ARMENTANO, F. MORENA, C. EMILIANI, S. MARTINO, C. SANTULLI, L. TORRE, J.M. KENNY a D. PUGLIA. Keratins extracted from Merino wool and Brown Alpaca fibres: Thermal, mechanical and biological proper-

ties of PLLA based biocomposites. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2015, vol. 47, s. 394-406 [cit. 2015-03-15]. DOI: 10.1016/j.msec.2014.11.007

[28] ALUIGI, A., C. TONETTI, C. VINEIS, C. TONIN a G. MAZZUCHETTI. Adsorption of copper(II) ions by keratin/PA6 blend nanofibres. *European Polymer Journal* [online]. 2011, vol. 47, issue 9, s. 1756-1764 [cit. 2015-03-15]. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2011.06.009.

[29] POOLE, Andrew J. a Jeffrey S. CHURCH. The effects of physical and chemical treatments on Na2S produced feather keratin films. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2015, vol. 73, s. 99-108 [cit. 2015-03-15]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.11.003

[30] KATOH, Kazunori, Mikio SHIBAYAMA, Toshizumi TANABE a Kiyoshi YAMAUCHI. Preparation and physicochemical properties of compression-molded keratin films. *Biomaterials* [online]. 2004, vol. 25, issue 12, s. 2265-2272 [cit. 2015-03-15]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.09.021.

[31] ROUSE, Jillian G. a Mark E. VAN DYKE. 2010. A Review of Keratin-Based Biomaterials for Biomedical Applications. *Materials* [online]. 3(2): 999-1014 [cit. 2015-03-15]. DOI: 10.3390/ma3020999. ISSN 1996-1944. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1996-1944/3/2/999/>

[32] LI, Rong a Dong WANG. Preparation of regenerated wool keratin films from wool keratin-ionic liquid solutions. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2013-02-15, vol. 127, issue 4, s. 2648-2653 [cit. 2015-03-15]. DOI: 10.1002/app.37527. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.37527>

[33] BERTINI, Fabio, Maurizio CANETTI, Alessia PATRUCCO a Marina ZOCCOLA. Wool keratin-polypropylene composites: Properties and thermal degradation. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2013, vol. 98, issue 5, s. 980-987 [cit. 2015-03-15]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2013.02.011.

[34] SANDO, Lillian, Misook KIM, Michelle L. COLGRAVE, John A. M. RAMSHAW, Jerome A. WERKMEISTER a Christopher M. ELVIN. Photochemical crosslinking of soluble wool keratins produces a mechanically stable biomaterial that supports cell adhesion

and proliferation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2010, 95A, issue 3, s. 901-911 [cit. 2015-03-15]. DOI: 10.1002/jbm.a.32913.

[35] MOKREJŠ, Pavel, Svatopluk SUKOP a Ondřej KREJČÍ. Charakterizace keratinových hydrolyzátů připravených z kuřecího peří. In: *Chemické listy* [online]. 2014 [cit. 2015-03-15]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014_s1_s26-s31.pdf

[36] SIMPSON, W a G CRAWSHAW. *Wool: science and technology*. Cambridge, England: Woodhead, c2002, 151 - 155. ISBN 0849328209.

[37] ABDOLLAHI, M. a A. HOSSEINI. Formaldehyde. *Encyclopedia of Toxicology*. Elsevier, 2014, s. 653. DOI: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00388-2. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123864543003882>

[38] JIANG, Tao, Meng DENG, Roshan JAMES, Lakshmi S. NAIR a Cato T. LAURENCIN. Micro- and nanofabrication of chitosan structures for regenerative engineering. *Acta Biomaterialia*. 2014, vol. 10, issue 4, s. 1632-1645. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.07.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706113003425>

[39] SMITH, Gerald J. New trends in photobiology (invited review) photodegradation of keratin and other structural proteins. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [online]. 1995, vol. 27, issue 3, s. 187-198 [cit. 2015-04-02]. DOI: 10.1016/1011-1344(94)07104-v.

[40] SIONKOWSKA, A., J. SKOPINSKA-WISNIEWSKA, A. PLANECKA a J. KOZLOWSKA. The influence of UV irradiation on the properties of chitosan films containing keratin. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2010, vol. 95, issue 12, s. 2486-2491 [cit. 2015-04-02]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2010.08.002.

[41] FEKETE, Tamás, Judit BORSA, Erzsébet TAKÁCS a László WOJNÁROVITS. Synthesis of cellulose-based superabsorbent hydrogels by high-energy irradiation in the presence of crosslinking agent. *Radiation Physics and Chemistry* [online]. 2015 [cit. 2015-04-02]. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2015.02.023.

- [42] CARDAMONE, J. M. a J. G. PHILLIPS. Enzyme-mediated Crosslinking of Wool. Part II: Keratin and Transglutaminase. *Textile Research Journal* [online]. 2007, vol. 77, issue 5, s. 277-283 [cit. 2015-04-02]. DOI: 10.1177/0040517507078788.
- [43] CARDAMONE, J. M. Enzyme-mediated Crosslinking of Wool. Part I: Transglutaminase. *Textile Research Journal* [online]. 2007, vol. 77, issue 4, s. 214-221 [cit. 2015-04-02]. DOI: 10.1177/0040517507076327.
- [44] KAKKAR, Prachi, Sudhanshu VERMA, I. MANJUBALA a B. MADHAN. Development of keratin–chitosan–gelatin composite scaffold for soft tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2014, vol. 45, s. 343-347 [cit. 2015-04-02]. DOI: 10.1016/j.msec.2014.09.021.
- [45] VERRIER, S., S. PALLU, R. BAREILLE, A. JONCZYK, J. MEYER, M. DARD a J. AMÉDÉE. Function of linear and cyclic RGD-containing peptides in osteoprogenitor cells adhesion process. *Biomaterials* [online]. 2002, vol. 23, issue 2, s. 585-596 [cit. 2015-04-02]. DOI: 10.1016/s0142-9612(01)00145-4.
- [46] REICHL, Stephan, Maria BORRELLI a Gerd GEERLING. Keratin films for ocular surface reconstruction. *Biomaterials* [online]. 2011, vol. 32, issue 13, s. 3375-3386 [cit. 2015-04-02]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.052.
- [47] NAKATA, Ryo, Akira TACHIBANA a Toshizumi TANABE. Preparation of keratin hydrogel/hydroxyapatite composite and its evaluation as a controlled drug release carrier. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2014, vol. 41, s. 59-64 [cit. 2015-04-02]. DOI: 10.1016/j.msec.2014.04.016.
- [48] LI, Fang-Ying, Rong-Min WANG, Yu-Feng HE, Xiao-Xiao LI, Peng-Fei SONG, Xiao-Chun YING a Chong-Wu MAO. Keratin films from chicken feathers for controlled drug release. *Journal of Controlled Release* [online]. 2011, vol. 152, e92-e93 [cit. 2015-04-15]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.08.144.
- [49] BARONE, Justin R., Walter F. SCHMIDT a Christina F. E. LIEBNER. Thermally processed keratin films. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2005, vol. 97, issue 4, s. 1644-1651 [cit. 2015-04-15]. DOI: 10.1002/app.21901.

[50] NTUMBA, Tshela, A. PRZEPIÓRKOWSKA a M. PROCHOŃ. The effect of enzymatic keratin hydrolyzate on the susceptibility of cellulosic-elastomeric material to biodecomposition. In: World Academy of Science, *Engineering and Technology* [online]. 2014 [cit. 2015-04-15]. Dostupné z: <http://waset.org/publications/9998611/the-effect-of-enzymatic-keratin-hydrolyzate-on-the-susceptibility-of-cellulosic-elastomeric-material-to-biodecomposition->

[51] VILLA, Ana Lúcia Vazquez, Márcia Regina Senrra ARAGÃO, Elisabete Pereira dos SANTOS, Ana Maria MAZOTTO, Russolina B ZINGALI, Edilma Paraguai de SOUZA a Alane Beatriz VERMELHO. Feather keratin hydrolysates obtained from microbial keratinases: effect on hair fiber. *BMC Biotechnology* [online]. 2013, vol. 13, issue 1 [cit. 2015-04-15]. DOI: 10.1186/1472-6750-13-15.

[52] A guide to novozymes household care. *Novozymes* [online]. 2010 [cit. 2015-04-15]. Dostupné z: <http://www.novozymes.com/en/solutions/household-care/dishwashing/soil-removal/documents/final-mini-guide-household-care.pdf>

[53] Enzymes for biocatalysis: For smarter chemical synthesis. *Novozymes* [online]. 2014 [cit. 2015-04-15]. Dostupné z: http://www.novozymes.com/en/solutions/biopharma/Brochures/Documents/2014-12715-01_Biocatalysis-Product-Sheet-Protease-3.pdf

[54] Infračervená spektroskopie. *Vysoká škola chemicko - technologická v Praze* [online]. [cit. 2015-04-26]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/lms/Zverze/Infrared.htm>

[55] Využití metod termické analýzy ve výzkumu a vývoji léčiv. 2012. *Chemické listy* [online]. [cit. 2015-05-04]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_10_890-895.pdf

[56] Termická analýza: Diferenční kompenzační kalorimetrie (DSC). 2011. *Chempoint: Vědci pro průmysl a praxi* [online]. [cit. 2015-05-04]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/kucerik-2>

[57] Termická analýza: Termogravimetrie (TGA). 2011. *Chempoint: Vědci pro průmysl a praxi* [online]. [cit. 2015-05-04]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/kucerik-1>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

hm. % Hmotnostní procento

ot/min Otáčky za minutu

FTIR Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

DSC Diferenciální skenovací kalorimetrie

TGA Termogravimetrická analýza

KHEE Keratinový hydrolyzát připravený pomocí enzymu Esperase 6.0T

KHES Keratinový hydrolyzát připravený pomocí enzymu Savinase 6.0T

kDa Kilodalton – jednotka molekulové hmotnosti (1 Da = 1 g/mol)

CHIT Chitosan

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Spojení dvou aminokyselin peptidovou vazbou [5].....	12
Obrázek 2: Obecný vzorec primární struktury keratinu [5].....	13
Obrázek 3: Konformace α – šroubovice [7]	13
Obrázek 4: Konformace β -skládaný list [7].....	14
Obrázek 5: Terciární struktura keratinu [7]	14
Obrázek 6: Kvartérní struktura keratinu [9]	15
Obrázek 7: Složky vlněného vlákna a jejich průměry [16, 17]	19
Obrázek 8: Struktura chitosanu [38].....	27
Obrázek 9: Schéma vzniku síťované struktury pomocí	28
Obrázek 10: Mineralizace vzorků na topné desce	38
Obrázek 11: Mineralizace vzorku nad kahanem.....	40
Obrázek 12: Vlna (A), nerozložený podíl (B),	48
Obrázek 13: Filmy s 10, 20 a 30 % chitosanu tvořené KHEE.....	51
Obrázek 14: Filmy s 10, 20 a 30 % chitosanu tvořené KHES.....	51
Obrázek 15: Nesíťované filmy tvořené KHEE (A) a KHES (B).....	51
Obrázek 16: Rozpustnost nesíťovaných filmů složených z KHEE a KHES	56
Obrázek 17: Rozpustnost filmů tvořených KHEE.....	56
Obrázek 18: Rozpustnost filmů tvořených KHES	57
Obrázek 19: Výsledné křivky FTIR analýzy KHEE, KHES a výsledné spektrum síťovacího činidla chitosanu.....	58
Obrázek 20: Výsledné křivky FTIR analýzy filmů tvořených KHEE.....	59
Obrázek 21: Výsledné křivky FTIR analýzy filmů tvořených KHES	60
Obrázek 22: Výsledné křivky DSC analýzy vlny, nerozloženého podílu a obou hydrolyzátů.....	61
Obrázek 23: Výsledné křivky DSC analýzy filmů tvořených KHEE.....	62
Obrázek 24: Výsledné křivky DSC analýzy filmů tvořených KHES.....	63
Obrázek 25: Výsledné křivky TG analýzy vlny, nerozloženého podílu a obou hydrolyzátů.....	64
Obrázek 26: Výsledné křivky TG analýzy filmů tvořených KHEE	65
Obrázek 27: Výsledné křivky TG analýzy filmů tvořených KHES	67

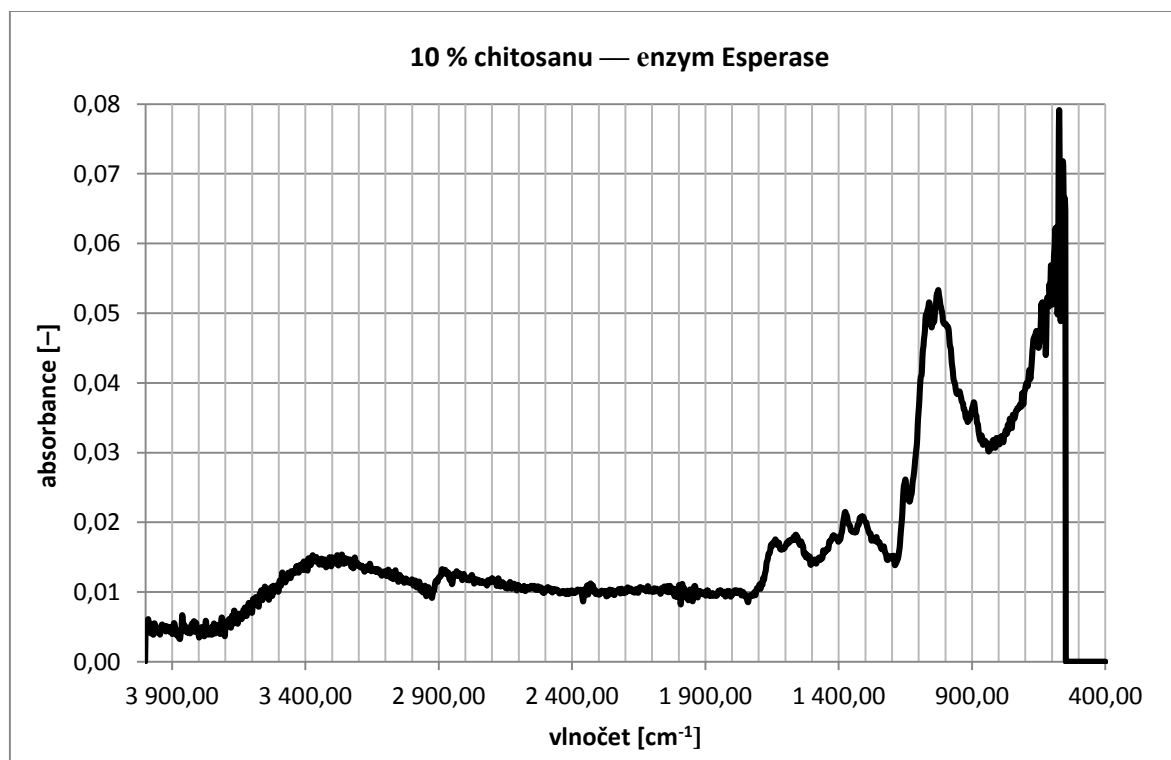
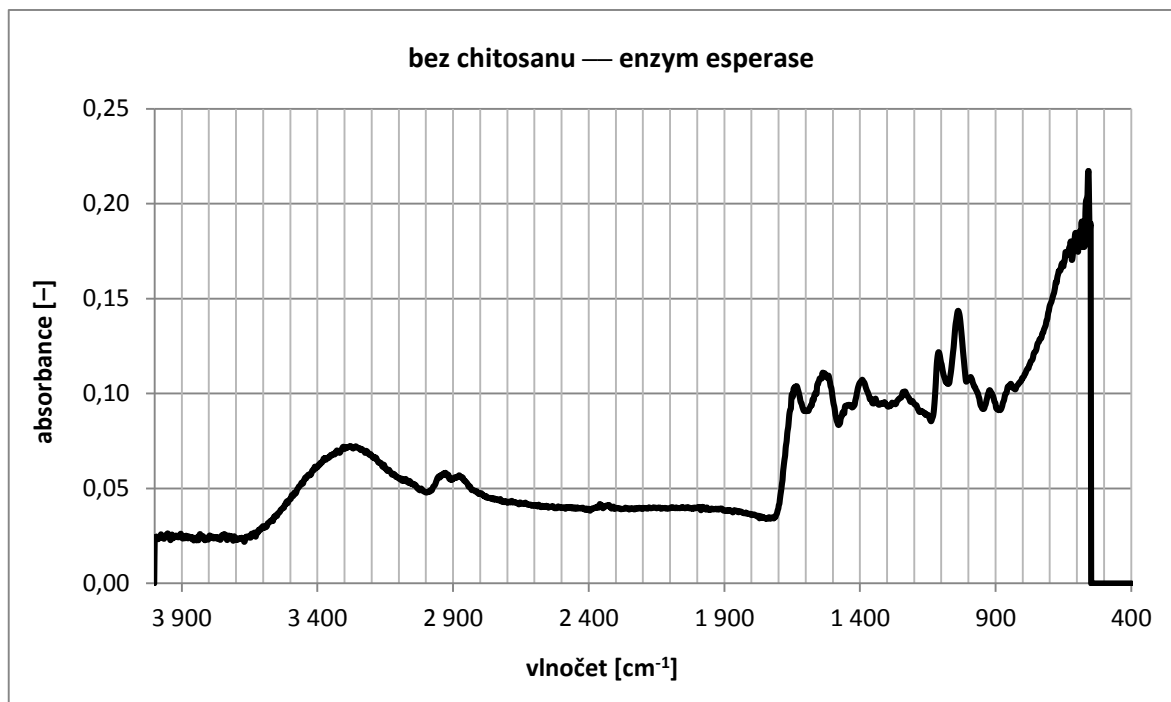
SEZNAM TABULEK

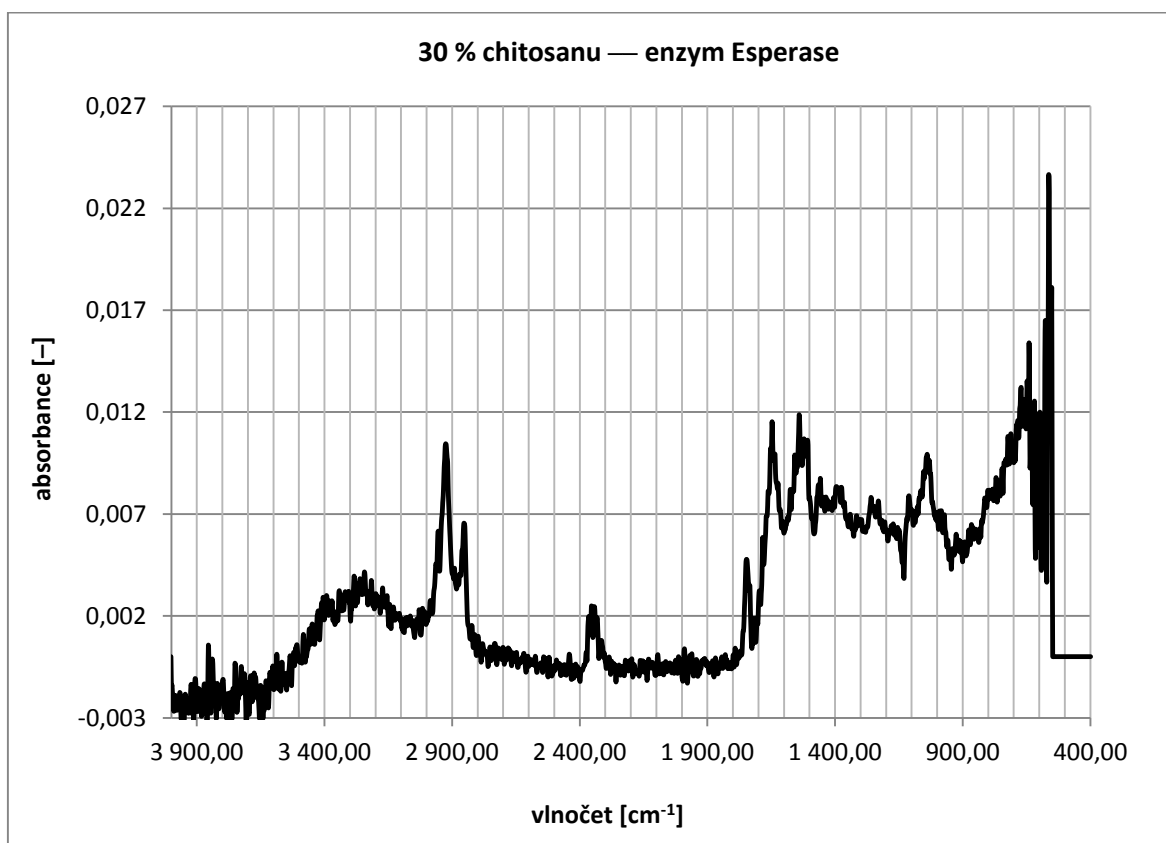
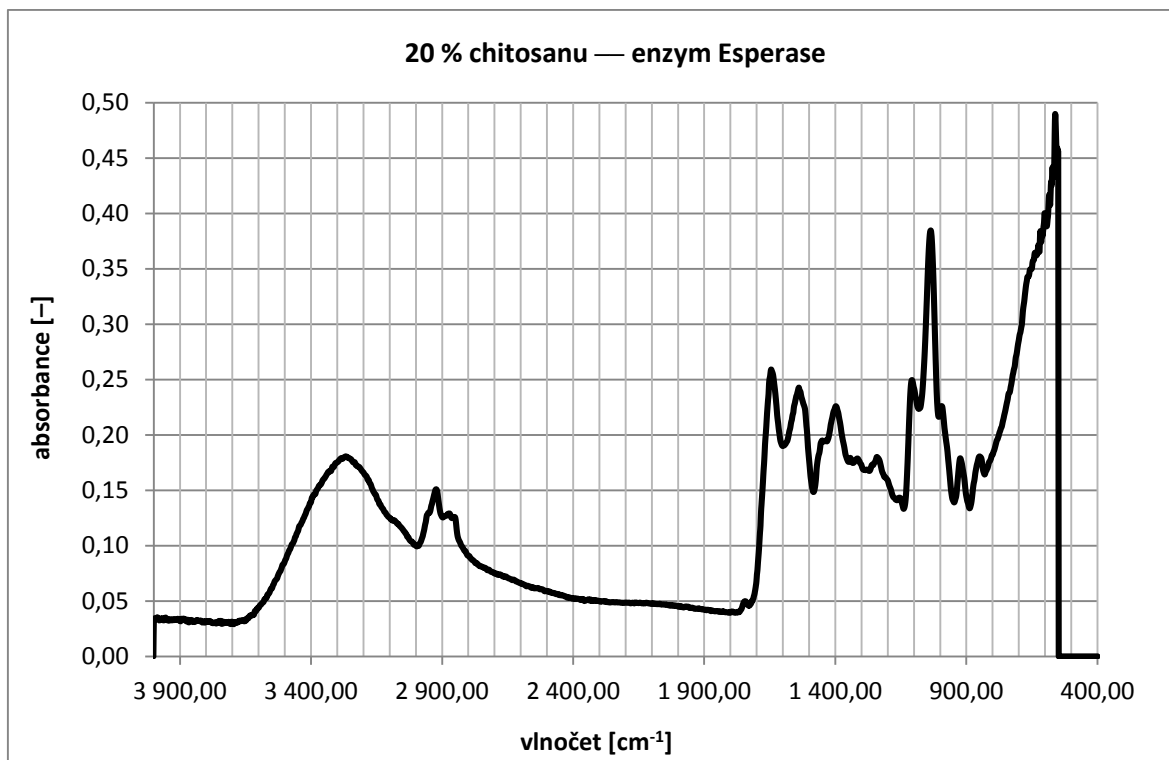
Tabulka 1: Aminokyselinové složení keratinu z ovčí vlny [11].....	16
Tabulka 2: Změny aminokyselinového složení po alkalické hydrolýze [13]	17
Tabulka 3: Změny aminokyselinového složení po enzymové hydrolýze [14]	18
Tabulka 4: Souhrn použitých látek včetně jejich výrobců.....	36
Tabulka 5: Souhrn použitých přístrojů včetně jejich výrobců	37
Tabulka 6: Složení připravených filmů	50
Tabulka 7: Výsledné hodnoty obsahu dusíku	52
Tabulka 8: Výsledné hodnoty obsahu síry.....	53
Tabulka 9: Výsledné hodnoty obsahu popelovin.....	54
Tabulka 10: Výsledné hodnoty zkoušky botnání u jednotlivých filmů	55
Tabulka 11: Obsah popelovin u vzorků.....	65
Tabulka 12: Obsah popelovin u filmů	66
Tabulka 13: Obsah popelovin u filmů	68

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA 1: FTIR spektra filmů s 0 – 30% přídavkem chitosanu, které jsou tvořeny hydrolyzátem připraveným pomocí enzymu Esperase 6.0T	82
PŘÍLOHA 2: FTIR spektra filmů s 0 – 30% přídavkem chitosanu, které jsou tvořeny hydrolyzátem připraveným pomocí enzymu Savinase 6.0T	84

PŘÍLOHA 1: FTIR spektra filmů s 0 – 30% přidavkem chitosanu, které jsou tvořeny hydrolyzátem připraveným pomocí enzymu Esperase 6.0T





PŘÍLOHA 2: FTIR spektra filmů s 0 – 30% přidavkem chitosanu, které jsou tvořeny hydrolyzátem připraveným pomocí enzymu Savinase 6.0T

