

Modifikace vlastností hydrolyzátu živočišné bílkoviny sít'ováním

Tereza Kulendová

Diplomová práce
2016



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Tereza Kulendová**
Osobní číslo: **T14329**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství polymerů**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Modifikace vlastností hydrolysátu živočišné bílkoviny síťováním**

Zásady pro vypracování:

1. Síťování živočišných a rostlinných bílkovin.
2. Prostudujte podmínky a mechanismy síťování bílkovin vybranými sloučeninami, odvoďte rámcové podmínky síťování pro praktickou část práce.
3. V praktické části se zaměřte na síťování hydrolysátu vybrané živočišné bílkoviny zadaným síťovadlem.
4. Studujte vliv technologických podmínek při síťování na vlastnosti filmů/gelů; stupeň zesíťování vyhodnoťte vhodnými metodami.
5. Zpracujte výsledky, proveďte diskuzi, navrhněte optimální podmínky síťování pro daný systém a zhodnoťte přínos práce pro praxi.



Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Gennadios, A.: **Protein-Based Films and Coatings**. CRC Press: Boca Raton, 2002.

H. W. Ockerman, C. L. Hansen: **Animal By-Product processing & Utilization**. CRC Press: Boca Raton, 2000.

Vědecké články a monografie z databází Web of Science, Science Direct a další, databáze elektronických knih (např. Knovel).

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Pavel Mokrejš, Ph.D.**
Ústav inženýrství polymerů

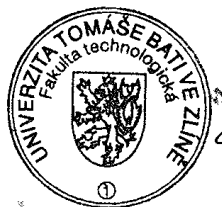
Datum zadání diplomové práce: **15. ledna 2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **20. května 2016**

Ve Zlíně dne 1. března 2016



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



Ing. Lubomír Beníček, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 09. 05. 2016

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Bílkoviny patří mezi biopolymery hojně využívané v širokém spektru aplikací. V oblastech různých druhů průmyslu, lékařství a medicínského výzkumu jsou na vlastnosti finálních výrobků kladeny vysoké požadavky. Jelikož bílkoviny, jako například kolagen, želatina a kolagenní hydrolyzát, vykazují určitý stupeň nestability vůči působení různých vlivů, je nutno jejich vlastnosti modifikovat. Ke stabilizaci a optimalizaci vlastností bílkovinných materiálů mohou být zvoleny různé způsoby síťování, díky kterému dojde k vytvoření intermolekulárních vazeb mezi řetězci bílkoviny.

Klíčová slova: bílkoviny, kolagen, želatina, kolagenní hydrolyzát, síťování.

ABSTRACT

Proteins are biopolymers widely used in a wide range of applications. In areas of different types of industry, medicine and medical research there are made high requirements on the properties of final products. Proteins such as collagen, gelatin and collagen hydrolysate have a certain degree of instability caused by the wide range of factors, therefore it is necessary to modify their properties. To stabilize and optimize the properties of protein materials can be made by various methods of crosslinking which creates intermolecular covalent bonds between the chains of proteins.

Keywords: proteins, collagen, gelatin, hydrolysate, crosslinking.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, všechny literární zdroje jsem správně citovala a odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Tímto bych ráda poděkovala doc. Ing. Pavlu Mokrejšovi, Ph.D. za jeho cenné rady, trpělivost a vstřícný přístup během psaní této práce.

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| ÚVOD | 10 |
| I TEORETICKÁ ČÁST | 11 |
| 1 SÍŤOVÁNÍ BÍLKOVIN | 12 |
| 1.1 CHEMICKÉ SÍŤOVÁNÍ BÍLKOVIN | 13 |
| 1.2 FYZIKÁLNÍ METODY SÍŤOVÁNÍ BÍLKOVIN | 14 |
| 1.2.1 UV záření a gama záření | 14 |
| 1.2.2 Mikrovlnné záření | 15 |
| 1.2.3 Fotochemické síťování | 15 |
| 1.3 SÍŤOVÁNÍ ENZYMY | 15 |
| 2 SÍŤOVÁNÍ KOLAGENU, ŽELATINY A HYDROLYZÁTU KOLAGENU A JINÝCH BÍLKOVIN | 17 |
| 2.1 SÍŤOVÁNÍ ALDEHYDY | 19 |
| 2.1.1 Síťování glutaraldehydem | 19 |
| 2.1.2 Síťování dialdehydem škrobu | 21 |
| 2.1.3 Síťování dialdehydem celulózy | 23 |
| 2.1.4 Síťování dialdehydem karboxymethylcelulózy | 25 |
| 2.1.5 Síťování alginátovým dialdehydem | 25 |
| 2.2 SÍŤOVÁNÍ EPOXIDY | 27 |
| 2.2.1 Síťování 1,4-butanediol diglycidyl etherem | 29 |
| 2.2.2 Síťování ethylen glycol diglycidyl etherem | 32 |
| 2.2.3 Síťování polyepoxy triglycidyl isokyanurátem | 35 |
| 2.3 SÍŤOVÁNÍ TRANSGLUTAMINÁZOU | 36 |
| II PRAKTICKÁ ČÁST | 38 |
| 3 CÍL PRAKTICKÉ ČÁSTI PRÁCE | 39 |
| 3.1 KOLAGEN-ELASTINOVÝ HYDROLYZÁT A CHEMIKÁLIE | 40 |
| 3.2 POMŮCKY A PŘÍSTROJE..... | 40 |
| 3.3 METODIKA PRÁCE | 40 |
| 3.4 VYHODNOCENÍ STUPNĚ ZESÍŤOVÁNÍ..... | 41 |
| 3.5 PŘÍPRAVA HYDROLYZÁTU A NĚKTERÝCH SÍŤOVADEL | 42 |
| 3.5.1 Příprava kolagen-elastinového hydrolyzátu | 42 |
| 3.5.2 Příprava alginátového dialdehydu | 44 |
| 3.5.3 Příprava dialdehydu celulózy | 46 |
| 3.5.4 Příprava dialdehydu karboxymethylcelulózy | 47 |
| 4 POSTUP PRÁCE | 48 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.1 | SÍŤOVÁNÍ GLYCEROL DIGLYCIDYL ETHEREM | 49 |
| 4.2 | SÍŤOVÁNÍ DIALDEHYDEM ŠKROBU | 51 |
| 4.3 | SÍŤOVÁNÍ DIALDEHYDEM CELULÓZY | 52 |
| 4.4 | SÍŤOVÁNÍ DIALDEHYDEM KARBOXYMETHYLCELULÓZY..... | 54 |
| 4.5 | SÍŤOVÁNÍ ALGINÁTOVÝM DIALDEHYDEM | 56 |
| 4.6 | SÍŤOVÁNÍ TRANSGLUTAMINÁZOU | 57 |
| 4.7 | PŘÍPRAVA NEZESÍŤOVANÉHO FILMU | 59 |
| 5 | VÝSLEDKY A DISKUZE | 60 |
| 5.1 | FILMY SÍŤOVANÉ GLYCEROL DIGLYCIDYL ETHEREM | 60 |
| 5.2 | FILMY SÍŤOVANÉ DIALDEHYDEM ŠKROBU..... | 62 |
| 5.3 | FILMY SÍŤOVANÉ DIALDEHYDEM CELULÓZY | 65 |
| 5.4 | FILMY SÍŤOVANÉ DIALDEHYDEM KARBOXYMETHYLCELULÓZY | 66 |
| 5.5 | FILMY SÍŤOVANÉ ALGINÁTOVÝM DIALDEHYDEM..... | 67 |
| 5.6 | FILMY SÍŤOVANÉ TRANSGLUTAMINÁZOU..... | 69 |
| 6 | ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ SÍŤOVÁNÍ..... | 72 |
| | ZÁVĚR | 75 |
| | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... | 77 |
| | SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK | 82 |
| | SEZNAM OBRÁZKŮ | 84 |
| | SEZNAM TABULEK..... | 87 |

ÚVOD

Bílkoviny patří mezi biodegradabilní, ekologické, netoxické, znovu obnovitelné a hojně se vyskytující biopolymery a nacházejí stále větší uplatnění v širokém spektru aplikací. Tradičně jsou využívány v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu, v odvětvích zabývajících se obalovými materiály a v neposlední řadě v lékařství a biomedicíně.

I přes své unikátní vlastnosti bílkoviny vykazují určitý stupeň nestability vůči působení různých vlivů. S cílem zvýšení funkčnosti, odolnosti vůči enzymatické degradaci, teplotní odolnosti, vylepšení mechanických a bariérových vlastností, snížení rozpustnosti ve vodném prostředí aj., je nutno tyto vlastnosti modifikovat. K modifikaci vlastností bílkovin se využívá síťování, během kterého dochází k vytvoření intramolekulárních kovalentních vazeb mezi molekulami bílkoviny. Mezi nejčastěji modifikované bílkoviny živočišného původu využívané v potravinářských výrobcích, obalových materiálech a oblasti biomedicínského výzkumu, patří kolagen, želatina, keratin a kolagenní hydrolyzáty, jsou ale také využívány bílkoviny rostlinného původu, jako například sójový protein, pšeničný gluten či kukuřičný zein.

V závislosti na aplikaci finálních produktů (filmy, folie, membrány, gely, matrice aj.) je zvolen i způsob, jakým je bílkovinný materiál síťován.

Existují různé způsoby síťování. Běžně, s ohledem na dostupnost a množství, jsou bílkoviny síťovány chemickými síťovadly. Je nutno brát v potaz působení jednotlivých chemických síťovadel na lidský organismus, zaměřit se na možné nežádoucí účinky, především toxicitu a s ní spojené alergické reakce, ale také sledování vlivu a dopadu na životní prostředí a živé organismy. Z toho důvodu je stále větší pozornost věnována šetrným síťovadlům na přírodní bázi či modifikaci stávajících chemických síťovadel. Alternativou k chemickým síťovadlům jsou enzymy. Síťování pomocí enzymů představuje šetrný způsob modifikace vlastností bílkovin, jelikož enzymy jsou netoxické a reagují za mírných podmínek. Bílkoviny mohou být síťovány také pomocí fyzikálních metod, například působením tepla, elektromagnetického či UV záření.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 SÍŤOVÁNÍ BÍLKOVIN

Bílkoviny, označované také jako proteiny, jsou přírodní makromolekuly s molekulovou hmotností od několika tisíc až do milionů kDa. Stavebními jednotkami všech proteinů jsou aminokyseliny, spojené do dlouhých řetězců. Bílkoviny se skládají z dvaceti aminokyselin.

Rozeznávají se dva zdroje bílkovin, živočišné, jako například kolagen, želatina, kasein, syrovátka, keratin, a rostlinné, mezi které patří sójový protein, kukuřičný zein, pšeničný gluten anebo například bílkovina hrachu. Proteiny nacházejí stále větší uplatnění v širokém spektru aplikací. Ve srovnání se syntetickými polymery patří bílkoviny mezi rozložitelné, ekologické, znovu obnovitelné, hojně se vyskytující přírodní polymery. Mezi oblasti využití patří výroba textilu a kůží, potravinářský průmysl, tkáňové inženýrství, biochemický a biomedicínský výzkum [1, 5].

Bílkoviny vykazují nestabilitu vůči působení různých vlivů, pro splnění náročných požadavků kladených na finální produkty, je nutno některé jejich vlastnosti jako například funkčnost, viskozitu, rozpustnost, botnací schopnosti, emulgaci, bariérové a mechanické vlastnosti modifikovat [1, 4].

Síťování je jedním z hlavních procesů sloužících k modifikaci vlastností proteinů. Během síťování dochází k vytvoření intramolekulární kovalentní vazby mezi molekulami proteinu. Vznikají tak nové makromolekulární agregáty s odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, než jaké měly původní sloučeniny. Nové kovalentní vazby mezi proteiny vznikají přidávkem chemického síťovačů, za přítomnosti enzymatických katalyzátorů, fyzikálními způsoby, jako například působením tepla, anebo jejich kombinací [1, 4].

Ve většině případů síťovacích technik dochází k reakci u čtyř funkčních skupin proteinů:

1. Aminoskupina ($-NH_2$) přítomná na konci polypeptidového řetězce a bočním řetězci lysinových zbytků.
2. Karboxylová skupina ($-COOH$) přítomná na karboxylovém konci polypeptidového řetězce a bočních řetězcích kyseliny asparagové.
3. Sulfoskupina ($-SH$) nacházející se na bočním řetězci cysteinu, přičemž cysteiny jsou spojeny mezi svými bočními řetězci disulfidickou vazbou ($-S-S-$).

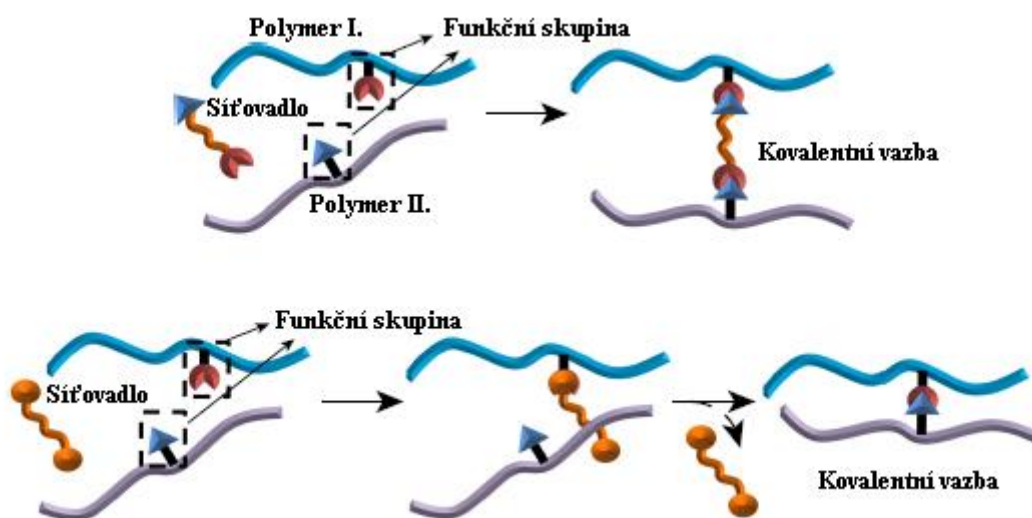
4. Karbonylová (-COH) aldehydová skupina, která vzniká oxidací karbohydrátových skupin u glykoproteinů [5].

Nejčastěji dochází ve struktuře proteinů ke vzniku disulfidové vazby mezi cysteinovými zbytky, monosulfidové vazby mezi cysteinem a dalšími zbytky a isopeptidovou vazbou mezi lysinem a dalšími zbytky [2].

1.1 Chemické síťování bílkovin

K hlavním předpokladům chemického síťování, patří volba vhodné chemikálie, síťovadla, která bude schopna reagovat s určitým druhem funkčních skupin přítomných v bílkovině, tedy látku, která bude obsahovat reaktivní koncové skupiny schopné reakce s koncovými amino a sulfoskupinami aminokyselinových zbytků [5].

Na Obrázku 1 je schematicky znázorněn mechanismus chemického síťování, kdy v prvním případě je síťovadlo začleněno do vazby a v případě druhé reakce do vazby začleněno není.



Obrázek 1: Obecné schéma reakčního mechanismu chemického způsobu síťování bílkovin.

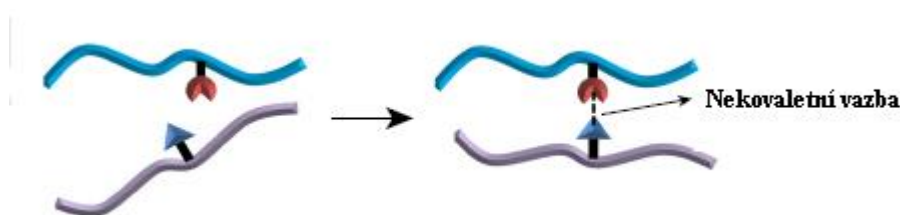
Chemický způsob patří stále mezi nejčastější postupy pro síťování bílkovin. A to především díky nepřehlednému množství různých chemických síťovadel, které se vzájemně liší

v reaktivitě, chemických vlastnostech a použití v různých aplikacích [3, 4]. Mezi nejvíce používaná síťovací činidla patří epoxidy, aldehydy, thioly, polyisokyanáty aj.

I přes nepřehledné množství výhod spojených s použitím různých druhů chemikálií, u velkého počtu z nich jako například u formaldehydu, byly prokázány velmi vážné zdraví škodlivé účinky na lidský organismus.

1.2 Fyzikální metody síťování bílkovin

Síťování bílkovin za pomoci fyzikálních metod může být provedeno působením různých druhů záření anebo působením teploty na daný vzorek. Mezi níže popsané fyzikální metody patří UV, gama a mikrovlnné záření, ale také fotochemická síťovací metoda.



Obrázek 2: Obecné schéma reakčního mechanismu fyzikálního způsobu síťování bílkovin.

1.2.1 UV záření a gama záření

Síťování bílkovin UV zářením, formě neionizujícího elektromagnetického záření, nevyžaduje použití chemikálií, zvyšuje tepelnou odolnost a mechanické vlastnosti, je to jednoduchá a šetrná metoda, která má schopnost ničit škodlivé mikroorganismy. UV záření vytváří vazby mezi jádry aromatických zbytků (především tyrosinu a phenylalaninu), aniž by vznikaly vazby mezi polypeptidovými řetězci. Kolagenní materiály byly podle studií [11, 14] vystaveny UV záření po dobu pouhých 30 minut a může vytvořit nízký stupeň zesílení bez ztráty biologické funkčnosti kolagenu. Mezi hlavní oblasti využití patří medicína a potravinářské aplikace [11, 14].

Gama záření předchází toxicitě, umožňuje v jednom kroku síťování i sterilizaci materiálu. Má potenciál pro síťování bílkovinných materiálů v nano měřítku, a to jako nosiče léčivých

látek a různých biomateriálů pro medicínské aplikace [30]. Ve studii autorů Chen et. al. [31] je zmíněno, že větší procento poškození přirozené struktury proteinu nastává v důsledku gama záření, než UV záření.

1.2.2 Mikrovlnné záření

Mikrovlnná energie je v průmyslové oblasti všeobecně považovaná za rychlý, dostupný, univerzální a energeticky výhodný tepelný proces zpracování materiálu. Autoři studie Vandelli et.al. [7] se zaměřili na síťování želatiny. Při teplotě přibližně 220°C a době působení 10 minut, došlo k vytvoření zesíťené struktury ve vzorku. Výsledky studie předpokládají využití mikrovlnného záření ve farmaceutickém průmyslu, konkrétně pro cílené dávkování léčiv. Výhodou metody je biologická rozložitelnost, absence toxických látek a tolerance tkáněmi příjemce [7].

1.2.3 Fotochemické síťování

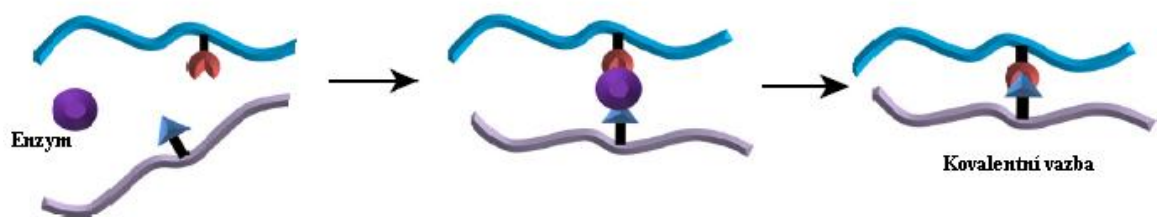
Metoda fotochemického síťování byla vyvinuta autory Chan et.al. [6]. Ve studii bylo prokázáno, že výrazným způsobem zlepšuje mechanické vlastnosti, chemickou stabilitu a botnací schopnosti biomateriálů na bázi kolagenu. Princip spočívá ve fotochemické reakci, kdy fotosenzibilátory (spojené s kolagenovým gelem) se aktivují tím, že absorbují fotony ze světelného zdroje. Aktivované fotosenzibilátory v excitovaném stavu a fotoprodukt (reaktivní formy kyslíku) reagují se sousedními molekulami (aminokyselinami) za tvorby příčných vazeb, které zvyšují pevnost, tvrdost, materiál se stává více hydrofobním. Metoda fotochemického síťování nevyžaduje použití extrémních tlaků ani teplot, toxických látek ani organických rozpouštědel. Materiály na bázi kolagenu za pomoci této metody mohou nalézt uplatnění v medicínských aplikacích, například pro cílené dávkování léčiv [6].

1.3 Síťování enzymy

Síťování bílkovin za pomoci enzymů představuje důležitou roli v oblasti medicíny, potravinářského, textilního a kožedělného průmyslu. Ve srovnání s chemikáliemi, enzymy jsou méně toxické, vyžadují mírnější podmínky, ale na druhé straně vyžadují vyšší finanční ná-

klady. Jednotlivé druhy enzymů se zásadně liší svými biochemickými vlastnostmi a reakčními mechanismy. Obecně se teplotní rozsah použitelnosti nachází od 0 do 50°C a při pH = 4 - 9 [3].

Ne Obrázku () je zobrazen obecný reakční mechanismus enzymatického síťování, kdy enzym působí jako katalyzátor reakce a dává vznik kovalentním vazbám mezi molekulami bílkovin [4].



Obrázek 3: Obecné schéma reakčního mechanismu síťování bílkovin za pomoci enzymů

2 SÍŤOVÁNÍ KOLAGENU, ŽELATINY A HYDROLYZÁTU KOLAGENU A JINÝCH BÍLKOVIN

Kolagen představuje základní stavební jednotku všech živých organismů, je součástí kostí, kůže, šlach, chrupavek a vaziva, nachází se také ve stěnách cév, bazálních membrán a rohovek. Patří mezi tzv. fibrilární bílkoviny, charakteristické svojí vláknitou strukturou. Molekuly kolagenu se skládají ze tří α -řetězců, vzájemně propletených do pravidelné šroubovice [1, 13]. Tak zvaný pravotočivý triple-helix vytváří trojrozměrnou strukturu, ideální geometrii pro vytvoření vodíkové vazby uvnitř řetězce. Intra a inter-helixové můstky zvyšují biodegradabilitu, prostorovou stabilitu a hydrotermální vlastnosti [10, 15].

Podle autorů [10] je známo dvacet sedm druhů kolagenu, přičemž:

- typ I je nejčastěji se vyskytujícím, nachází se v kůži, kostech, šlachách, cévách, zubovině,
- typ II je přítomný především ve chrupavkách, ale také například ve sklivci oka,
- typ III se nachází v kůži. Významným faktorem je stáří, které ovlivňuje procentuální zastoupení kolagenu. V mladé kůži může být obsazen z 50 %, postupem času klesá na 5 až 10 %,
- ostatní typy kolagenu se vyskytují v malém množství a jsou přítomny především v orgánech [10, 13].

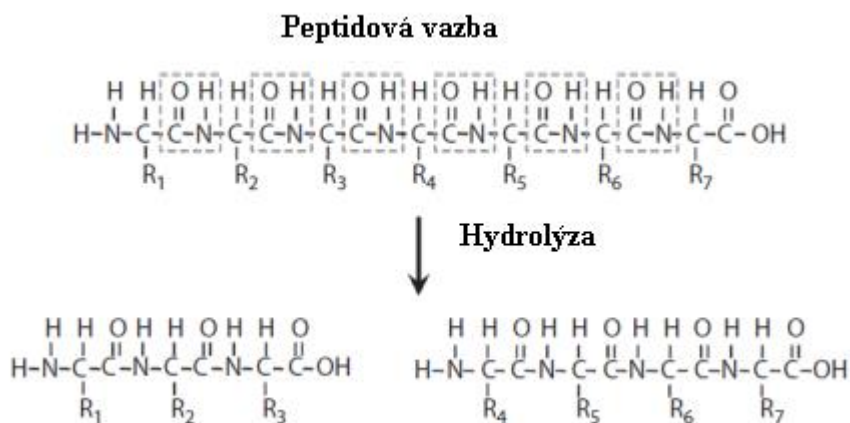
Kromě tradičního použití v potravinářském průmyslu, kolagen zaujímá významné postavení také ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu a medicíně. Jsou vyvíjeny nové materiály na bázi kolagenu, které mají využití jako funkční materiály v biomedicínských aplikacích. A to zejména díky faktům, že po fyziologické stránce je zvířecí kolagen blízký kolagenu lidskému (vyvolává v lidském organismu pouze slabé imunologické reakce), je biokompatibilní, hydrofilní, má vláknitou strukturu a vysokou pevnost v tahu [1, 15].

Želatina vzniká částečnou hydrolyzou nativního kolagenu. V průběhu zpracování je upraveno pH syrového živočišného materiálu zředěnou kyselinou nebo zásadou, čímž dochází k částečnému štěpení příčných vazeb a to má za následek extrakci želatiny. Získat a připravit želatinu je mnohem jednodušší a levnější než kolagen, a tudíž je i výhodnější vyrábět ji ve velkém množství.

Želatina se vyznačuje unikátními vlastnostmi, je hojně využívána v potravinářském průmyslu pro svoji nízkotučnost, želírovací schopnosti, stabilizační vlastnosti, schopnosti vázat vodu aj. a to hlavně ve výrobě cukrovinek, pečiva, masa a mléčných výrobků. Slouží ke snižování obsahu sacharidů v diabetické stravě a zvyšuje obsah bílkovin důležitých pro nízkotučnou stravu kulturistů. Ve farmaceutickém průmyslu se želatina využívá při léčení ran, k výrobě měkkých a tvrdých želatinových kapslí, tablet a expandérů plasmy. V medicíně jako součásti nitrožilních infuzí, maticí pro implantáty, systémů pro cílené dávkování léčiv prostřednictvím injekční aplikace a také jako stabilizátory ve vakcínách proti tetanu, spalničkám, záškrtu i vzteklině [1,10].

Nejčastějšími zdroji jsou hovězí a vepřový kolagen a želatina. Velký potenciál je ve zpracování rybího kolagenu a želatiny. A to jednak z toho důvodu, že rybí odpad po zpracování masa, tvoří zhruba 21% (kůže, ploutve, kosti), ale také z náboženských, vegetariánských postojů nebo kauze BSE [10].

Hydrolyzáty vznikají štěpením peptidové vazby mezi aminokyselinovými zbytky a to za pomoci molekuly vody, jak je patrné na Obrázku 4. [2].



Obrázek 4: Reakční mechanismus hydrolyzy.

Získání hydrolyzátu kolagenu není finančně nákladné, provádí se jak v kyselém prostředí (zředěná HCl, H₂SO₄), tak v alkalickém prostředí (NaOH, KOH), či za působení enzymů (pomocí proteázy, alkalázy, pepsinu aj.) [2].

Jelikož v oblasti průmyslové výroby vzniká množství kolagenního odpadu, který končí buďto na skládkách anebo odpadních vodách, které znečišťuje amoniakem, je tento nevyužitelný kolagenní odpad potenciální surovinou pro výrobu kolagenních hydrolyzátů [29].

Mezi hlavní výhody oproti kolagenu patří vyšší rozpustnost, proto je vhodný pro aplikace v tkáňovém inženýrství. Zvyšuje se také schopnost vázat vodu, emulgační a pěnicí vlastnosti [1]. Mezi další oblasti použití patří také aplikace v průmyslové oblasti, jako například krmivo pro hospodářská zvířata nebo jako růstové stimulanty [12].

Dalšími oblastmi využití jsou filmy a folie jako obalový materiál potravinářských, kosmetických a farmaceutických výrobků. Bez modifikace jsou však filmy či folie křehké, mají nízkou mechanickou pevnost a elongaci a jsou vysoce hydrofilní. Do jisté míry lze tyto vlastnosti vylepšit změkčovadly, ale ty hydrofilitu ještě zvyšují. Přídavkem různých síťovadel lze vytvořit materiál s požadovanými modifikovanými vlastnostmi [29].

2.1 Síťování aldehydy

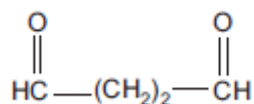
Formaldehyd patřil mezi nejpoužívanější síťovací činidla bílkovin. Avšak v důsledku později prokázaných toxických účinků na lidský organismus a neúčinného síťování s funkčními aminoskupinami sousedních polypeptidových řetězců kolagenu, se od něj ustoupilo [3, 35]. Pozornost byla zaměřena na glutaraldehyd či dialdehydové polysacharidy.

2.1.1 Síťování glutaraldehydem

Glutaraldehyd představuje další běžně používané síťovací činidlo proteinů, které reaguje s proteinovými aminoskupinami lysinu [33].

V souvislosti s glutaraldehydem byly provedeny mnohé studie týkající se modifikace biologických tkání, především pro aplikace jako náhrada srdečních chlopní, osrdečnickových

záplat, cévních štěpů a vazů. Výzkumy však přišly se závěrem, že vyvolává alergické reakce organismu a způsobuje cytotoxicitu [23]. Ta je způsobena uvolněním nezreagovaných molekul [29]. Podle jiné studie [8] se ukázalo, že koncentrace glutaraldehydu menší jak 8 % cytotoxicitu nezpůsobuje.



Obrázek 5: Chemický vzorec glutaraldehydu [15].

Ve studii [33] se autoři Rodrigues et. al. zabývali síťováním kolagenu z vepřových kůží glutaraldehydem o koncentraci 0 – 0,1 % a reakční době 15 a 45 minut.

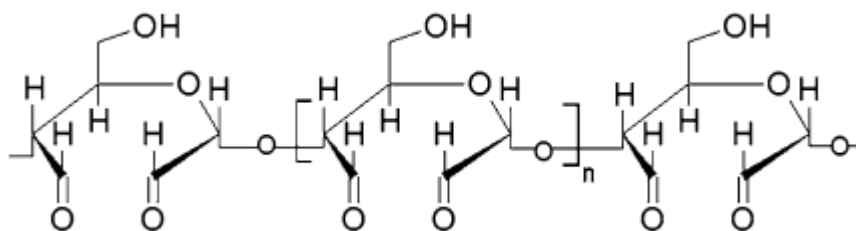
Struktura zesíťovaných kolagenních matrice byla porovnána s nezesíťovanými pomocí SEM analýzy. Výsledky ukázaly menší pórovitost a celistvou strukturu u matric zesíťovaných glutaraldehydem. Síťování glutaraldehydem tedy zvýšilo agregaci kolagenních vláken. Byla také testována biodegradace matric enzymem trypsin. Se zvyšující se reakční dobou bylo pozorováno menší procento degradace u vzorků o stejné koncentraci síťovadla. Stupeň zesíťování se zvyšoval se zvyšující se koncentrací glutaraldehydu a delší reakční dobou.

Matrice by mohly nalézt uplatnění v oblasti rekonstrukcí měkkých tkání, jako například k léčbě popálenin druhého stupně, a to především díky snadné biodegradabilitě, biokompatibilitě a dobrým mechanickým vlastnostem [33].

Kromě předem zmíněné toxicity glutaraldehydu a nekontrolovatelné reaktivitě, může vést síťování glutaraldehydem k vápenatění bioprotéz. Sergio et.al. [34] ve své studii představili novou metodu síťování kolagenních matric acetalu glutaraldehydu, kdy aldehydové skupiny reagují v kyselém prostředí s čistým ethyl alkoholem za tvorby acetalů nebo hemiacetalů, čímž se předchází vápenatění a cytotoxicitě aplikovaných matric v lidském organismu. Bylo zjištěno, že odolnost vůči enzymatické degradaci byla třikrát vyšší, než u matric zesíťovaných běžnými metodami [34].

2.1.2 Síťování dialdehydem škrobu

Dialdehyd škrobu je získán oxidací jodistanu, jedná se o biodegradabilní, biokompatibilní a netoxický materiál [27, 29].



Obrázek 6: Strukturální chemický vzorec dialdehydu škrobu [27].

Byly provedeny mnohé testy zkoumající stupeň toxicity u proteinů síťovaných dialdehydem škrobu a vědci přišli k poznatku, že její procento je mnohem menší, než v případě glutaraldehydu [27]. Ve vědecké práci autorů Langmaier et. al. je zmíněno, že již dříve bylo využito síťování bílkovin dialdehydem škrobu v oblasti medicíny jako adsorpční činidlo při léčbě chronického zánětu ledvin [29] nebo jako nosič pro cílené dávkování léků [28].

Autoři Liu et. al. se ve své práci [28] zabývali síťováním hovězího kolagenu dialdehydem škrobu s cílem vytvořit matrici, která by mohla nalézt uplatnění v medicíně jako náhrada srdečních chlopní a jako stenty podporující hojivost poškozených cév.

Postup přípravy spočíval v rozpuštění různých koncentrací DAS ve fosfátovém pufru za mírně zvýšené teploty. Poté bylo síťovadlo přidáno k roztoku kolagenu, s úpravou $\text{pH} = 7,4 \pm 0,2$ za použití 0,1 N NaOH. Požadovaný izotonický roztok byl upraven fosfátovým puftrem.

Reakční směs byla inkubována při teplotě 37 °C, po uplynutí 48 hodin byly vytvořené gely za současného třepání promývány destilovanou vodou po dobu 8 hodin.

Před DSC analýzou byly vzorky přes noc vysušeny v digestoři a před testování odolnosti vůči enzymatické degradaci byly lyofilizovány.

Se zvyšující se koncentrací DAS se zvyšovalo i procento zesítnění kolagenu. Odolnost vůči enzymatické degradaci byla testována pomocí proteázy.

Ukázalo se, že hmotnostní poměr kolagen:DAS 1:120 se jeví jako optimální vůči odolnosti enzymu. Nejvyšší tepelná odolnost byla zaznamenána u stejného poměru kolagenu vůči DAS. Se zvyšujícími se hodnotami DAS naopak tepelná odolnost klesala, což má pravděpodobně za následek změna krystalického triple-helixu na náhodně uspořádanou amorfni šroubovici.

Po dobu 21 dní byla sledována také odolnost vůči vápenatění, bylo zjištěno, že nejvyšší odolnost je při nízké koncentraci DAS, u kterých byla však zaznamenána nízká tepelná odolnost i odolnost vůči působení enzymů. Pro medicínské aplikace je tedy nutno podniknout další studie [28].

Využitím zesíťovaného hydrolyzátu kolagenu dialdehydem škrobu se ve své studii zabývali autoři Langmaier et. al. [12]. Cílem bylo vytvořit biodegradabilní obalový materiál zemědělských chemikálií či různých čisticích a dezinfekčních prostředků, který by jednak v sobě udržoval požadovanou látku, ale po uplynutí požadované doby by ji uvolnil.

Nejdříve bylo postupným zvyšováním teploty až na $60,0 \pm 0,5$ °C smícháno 30 g hydrolyzátu kolagenu se 100 ml destilované vody. Po úplném rozpuštění hydrolyzátu bylo upraveno pH pomocí 4N NaOH na hodnotu $11,0 \pm 0,2$. Za stálého míchání na magnetickém míchadle byly k roztoku postupně přidány 3 g DAS a 1,5 g glycerinu.

Směs byla vlita do silikonových destiček umístěných v sušárně bez cirkulace za účelem vysušení filmů při teplotě $40,0 \pm 0,5$ °C po dobu 75 hodin. Poté byly filmy vyjmuty z destiček a umístěny do exsikátoru po dobu 24 hodin.

Následně byly z filmů vytvořeny vzorky 20x20 mm, které byly vloženy do sušárny bez cirkulace vzduchu při teplotách 60, 70, 80, $90,0 \pm 0,5$ °C po dobu 24 hodin s následným uložením do exsikátoru na dalších 48 hodin.

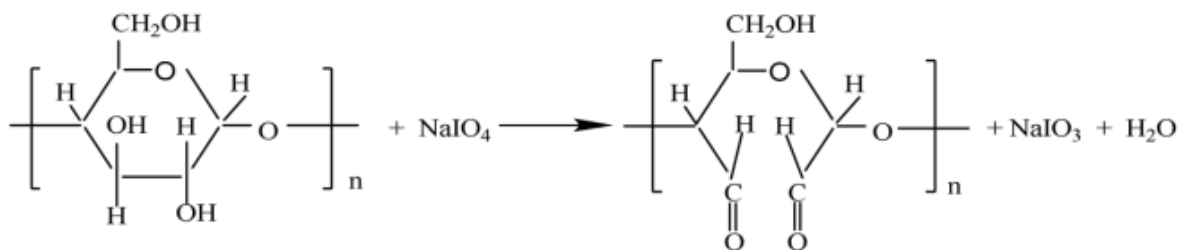
Byla sledována rozpustnost jednotlivých vzorků a bylo zjištěno, že po dodatečném působení teploty bylo ovlivněno jak botnání, tak i rozpustnost.

Nejnižší stupeň rozpustnosti 63 % byl po uplynutí 400 hodin zaznamenán u vzorků tepelně zesíťovaných při teplotě 90 °C, naopak nejvyšší rozpustnost filmu, z 99 %, u vzorků při teplotě 60° C.

Dodatečné působení teploty tedy může ovlivnit požadované vlastnosti filmů a ty mohou nalézt uplatnění jako obalové materiály [12].

2.1.3 Sít'ování dialdehydem celulózy

Dialdehyd celulózy, modifikovaný biopolymer celulózy, byl ve studii autorů Kanth et. al. [35] použit ke stabilizaci kolagenních matic. Jedná se o cenově dostupný, biodegradabilní a netoxický polysacharid. Sít'ovací reakce probíhá s amininokupinami lysinu, hydroxylisinu či bočními skupinami argininu [35]. Na Obrázku 7 je schematicky znázorněna reakce celulózy s jodistanem sodným, během které dochází k rozštěpení vazby mezi 2. a 3. uhlíkem za vzniku 2,3-dialdehydu celulózy [36].



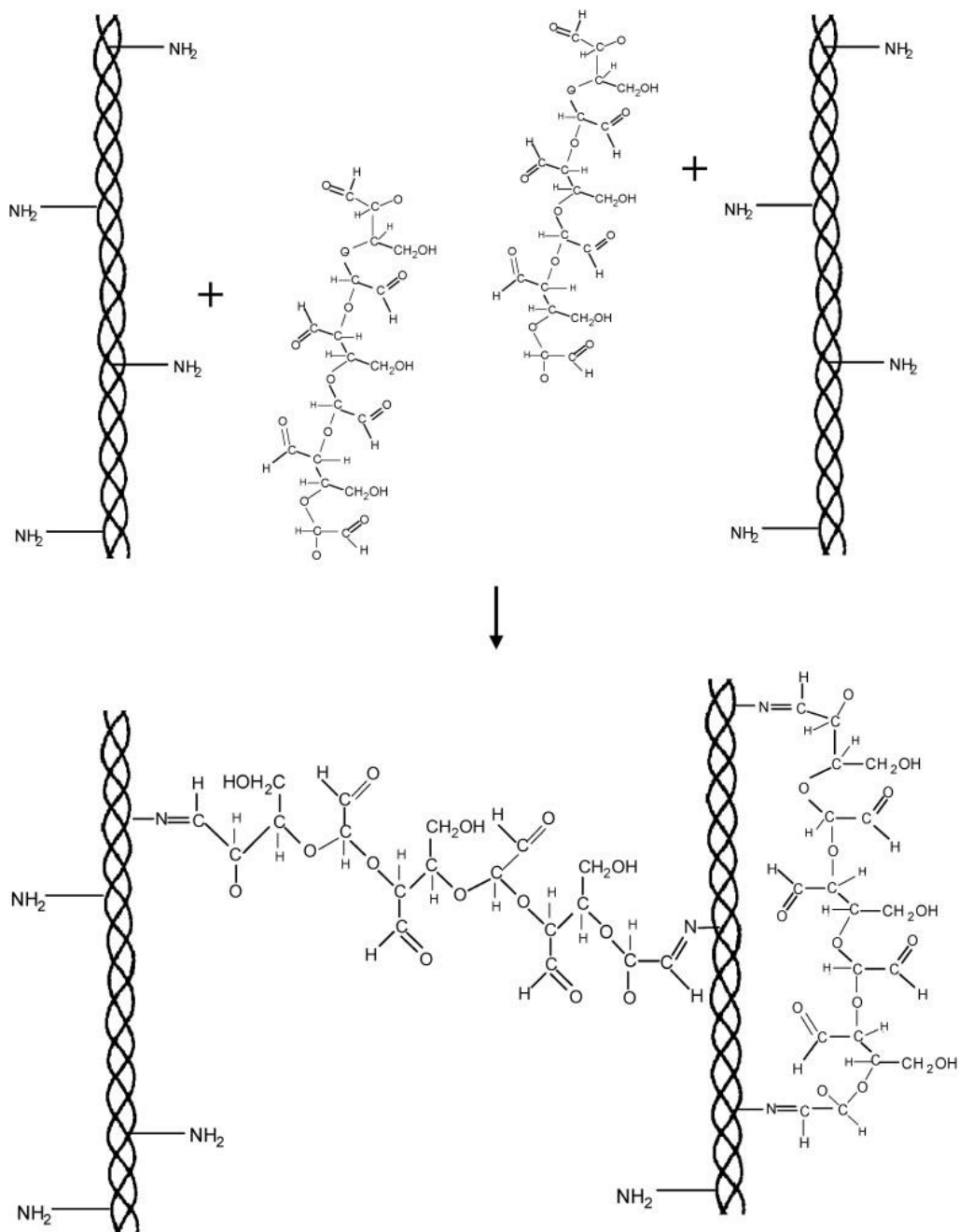
Obrázek 7: Reakční schéma oxidace celulózy jodistanem sodným za vzniku dialdehydu celulózy [36].

Kolagen byl získán ze šlach ocasů krys. Kolagenní vlákna byla důkladně omyta destilovanou vodou o teplotě 4 °C, s následným ošetřením 1 % roztokem dialdehydu celulózy, při teplotě 25 °C a pH 8, reakce probíhala po dobu 24 hodin. Na Obrázku () je schematicky znázorněna sít'ovací reakce kolagenu s dialdehydem celulózy.

Po uplynutí reakční doby 24 hodin byly vzorky pečlivě omyty a ponechány dalších 24 hodin k odležení. Byla testována odolnost enzymatické degradaci enzymem colagenasou zesíťovaných a nezesíťovaných kolagenních matic.

Po 96 hodinách inkubace vykazovala nezesíťovaná kolagenní vlákna degradaci z 99 %, kdežto vlákna zesíťovaná dialdehydem celulózy pouze 7 %. Bylo pozorováno, že odolnost enzymatické degradaci stoupá se zvyšující se koncentrací síťovadla a pH prostředí.

Se zvyšující se koncentrací síťovadla a zvyšujícím se pH se zvyšovalo procento zesíťení kolagenních matic, což bylo způsobeno větším množstvím aldehydových skupin zesíťovaných s aminoskupinami kolagenu [35].



Obrázek 8: Reakční schéma síťování kolagenu dialdehydem celulózy [35].

2.1.4 Síťování dialdehydem karboxymethylcelulózy

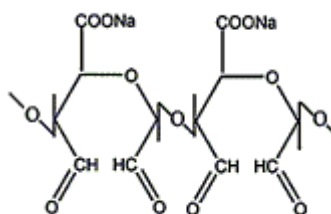
Autoři Mu et. al. se ve své vědecké studii [39] zabývali síťováním želatiny dialdehydem karboxymethyl celulózy s cílem vytvořit biodegradabilní obalový materiál, který by mohl nahradit syntetické obaly. Nejdříve připravili želatinový roztok rozpuštěním želatinového prášku získaného z hovězích kůží v destilované vodě. Jako změkčovadlo použili glycerol. Síťovadlo bylo rozpouštěno v destilované vodě za současného míchání, při pokojové teplotě. Poté bylo síťovadlo přidáno k želatinovému roztoku a celá směs byla míchána další hodinu při zvýšené teplotě 60 °C. Po rozmíchání byla směs rozlita do Petriho misek opatřených teflonovým povrchem a sušena po dobu 24 hodin, při teplotě 40 °C. Nakonec byly usušené filmy umístěny do exsikátoru.

Následné mechanické testy ukázaly, že nezávisle na množství glycerolu obsaženého v želatinovém filmu, se stoupajícím množstvím síťovadla pevnost v tahu stoupá, zatímco protažení při přetržení klesá. Avšak se zvyšujícím se množstvím změkčovadla v želatinovém filmu pevnost v tahu klesala, zatímco protažení při přetržení bylo vyšší. Také byla pozorována nižší tepelná odolnost u filmů s vyšším přídatkem glycerolu.

Zvyšující se obsah změkčovadla a zesílení významně snížilo botnací schopnosti filmů a to nezávisle na přidaném množství síťovadla. Síťováním vznikla celistvá struktura a zvýšila se i tuhost filmu. I teplotní odolnost byla vyšší v důsledku zesílení, avšak s rostoucím podílem glycerinu klesala. Což se může přikládat tomu, že vyšší obsah glycerinu brání protein – protein interakci a tím pádem je film více citlivý na teplo. Bylo také zjištěno, že vzniklé filmy jsou transparentní a odolné UV záření a mohly by nalézt uplatnění jako obalový materiál [39].

2.1.5 Síťování alginátovým dialdehydem

Alginátový dialdehyd, přirozeně se vyskytující polysacharid, vzniká oxidací alginátu jodistanu [42].



Obrázek 9: Chemický vzorec alginátového dialdehydu

Během síťování reagují funkční aldehydové skupiny s volnými aminoskupinami proteinu. Jedná se o biokompatibilní a biodegradabilní síťovací činidlo. Ve své práci [42] se autoři Xu et. al. zabývali síťováním vepřových aort alginátovým dialdehydem s cílem vytvořit matici pro aplikace v tkáňovém inženýrství.

Aorty byly zafixovány 15 % roztokem alginátového dialdehydu upraveného fyziologickým roztokem fosfátového pufru na pH 7,4. Pro porovnání použili k síťování 0,625 % roztokem glutaraldehydu o stejném pH. Nádoby s roztoky byly umístěny na třepačku po dobu 72 hodin, při teplotě 37 °C.

Po uplynutí reakční doby byly provedeny testy odolnosti vůči působení enzymů. Ukázalo se, že nezesíťované vzorky degradují podstatněji rychleji, než vzorky zesíťované, avšak tkáň zesíťovaná glutaraldehydem vykazovaly vyšší odolnost vůči degradaci než tkáň zesíťovaná alginátovým dialdehydem. To může být způsobeno odlišnou chemickou strukturou a molekulovou hmotností. S tím jsou spojeny i výsledky mechanických testů, které potvrdily, že pevnost v tahu byla vyšší u tkání síťovaných glutaraldehydem než alginátovým dialdehydem, u čerstvých tkání kvůli silné degradaci nebylo téměř možno testy uskutečnit. Analýza struktury pod mikroskopem ukázala neporušenost zesíťovaných tkání po působení collagenasy, kdežto nezesíťované tkáň se rozpadaly. Odolnost vůči degradaci je pravděpodobně způsobena změnou struktury kolagenu, tzn. místa, ve kterých dochází ke štěpení kolagenu, jsou během procesu síťování skryta nebo změněna reakcí volných aminoskupin [42].

V jiné studii autoři Xu et.al. porovnali stupeň zesíťování tkání z vepřových aort 0,625 % roztokem glutaraldehydu, 4 % roztokem polyepoxidu a 15 % roztokem alginátového dialdehydu. Následné testy potvrdili výsledky předchozí studie, kdy glutaraldehydem fixované tkáň měly vyšší odolnost enzymatické degradaci než tkáň fixované alginátovým dialde-

hydem. Nejnižší odolnost byla pozorována u tkání síťovaných epoxidem. Výsledky mechanické pevnosti byly srovnatelné jak pro glutaraldehydem tak alginátovým dialdehydem síťované tkáně, menší pevnost měly epoxidem fixované tkáně. Byla testována i cytotoxicita a ukázalo se, že alginátový dialdehyd má podstatně nižší hodnoty než ostatní dvě síťovadla a takto zesíťované tkáně by mohly nalézt uplatnění v aplikacích tkáňového inženýrství [43].

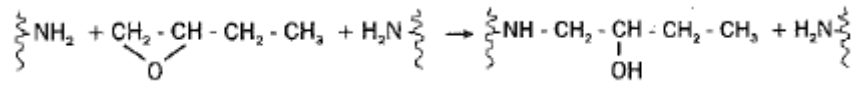
2.2 Síťování epoxidy

Síťování bílkovin epoxidy má zásadní význam v oblasti medicíny, především v tkáňovém inženýrství. Stávají se alternativou k aldehydům, které často nespĺňují striktní environmentální a legislativní nařizení, a vynikají těmito vlastnostmi:

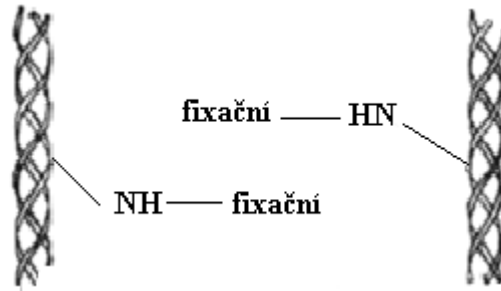
- relativně menší toxicitou,
- za vhodně zvolených reakčních podmínek vykazují reaktivitu v širokém spektru funkčních skupin,
- velkou škálu molekulárních struktur, které mohou být přizpůsobeny konečným aplikacím,
- schopnost polymerace síťováním s cílem vytvoření kovalentních vazeb,
- jsou komerčně volně dostupné v relativně velkém množství [15].

K síťovací reakci dochází mezi volnými epoxydickými skupinami a aminoskupinami, karboxylovými skupinami, ale také hydroxylovými skupinami. Je však známo, že nejčastěji epoxidy reagují s funkčními aminoskupinami lysinu. Síťovací reakce lze uskutečnit jak v kyselém, tak zásaditém prostředí. V kyselém prostředí se epoxid mění na vysoce reaktivní a protonovaný, kdežto v zásaditém prostředí se lysinová aminoskupina přemění na silně nukleofilní činidlo [22, 23].

Mezi příčnými řetězci proteinu dochází k obsazení aminoskupin bez vytvoření můstků, u monofunkčních epoxidů nastává pouze maskování aminoskupin, tak jak je schematicky znázorněno na Obrázku 10 a 11 [22, 23].

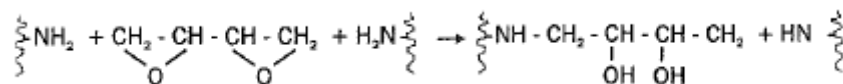


Obrázek 10: Reakční mechanismus síťování bílkoviny monofunkčním epoxidem [23].

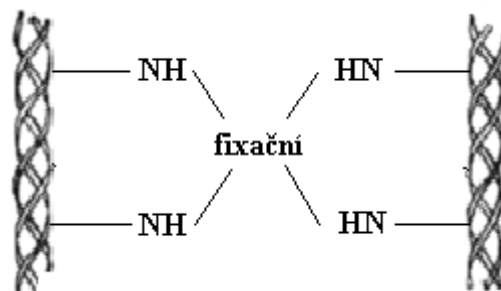


Obrázek 11: Schematické znázornění maskování aminoskupin

Zatímco u síťování s bifunkčním a vícefunkčním epoxidem nastává vytvoření příčných vazeb, tedy pravé síťování, jako je zobrazeno na Obrázku 12, 13 [22, 23].



Obrázek 12: Reakční mechanismus síťování bílkoviny bifunkčním a vícefunkčním epoxidem [23].

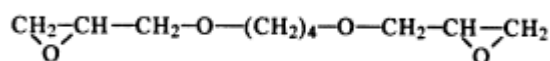


Obrázek 13: Schematické znázornění pravého síťování [22].

Sítování materiálů na bázi kolagenu glycidyl ethery nachází velké uplatnění v oblasti tkáňového inženýrství a vykazuje vynikající mechanické vlastnosti, odolnost vůči enzymatické degradaci a nízký předpoklad k vápenatění [20]. Ve studii [23] bylo zmíněno, že maximální koncentrace epoxidového roztoku pro fixaci tkání bez následné cytotoxicity, je 55 až 60 ppm, tedy hodnoty menší než u roztoků glutaraldehydu (10 – 25 ppm).

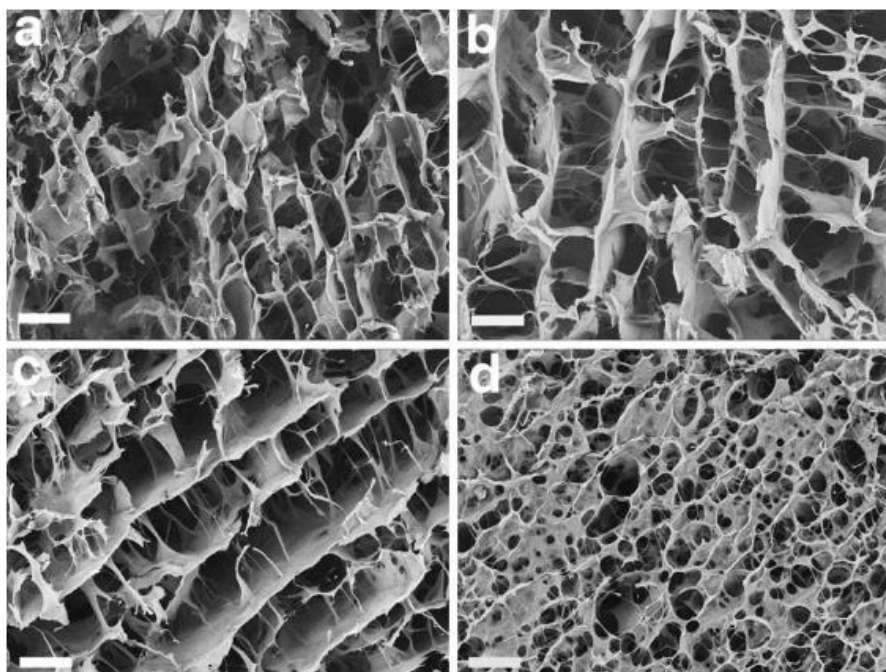
2.2.1 Sítování 1,4-butanediol diglycidyl etherem

Autoři Nicoletti et.al. se ve své studii [17] zabývali sítováním kolagenu s 1,4-butanediol diglycidyl etherem (BDDEGE) s cílem vytvoření snadno rozložitelné a vstřebatelné matrice pro léčbu závažných poškození chrupavky, které mají samy o sobě malou schopnost regenerace.



Obrázek 14: Chemický vzorec 1,4-butanediol diglycidyl etheru

Byl vyvinut třívrstvý kompozitní materiál s cílem regenerace chrupavky a kosti v jednom kroku. Matrice byla vyrobena z hydroxyapatitu obohaceného o magnezium a z kolagenu typu I, modifikovaného BDDEG. Každá z vrstev kompozitu byla podrobena analýze s cílem vysledovat vhodné podmínky sítování v závislosti na pH, teplotě a koncentraci BDDEG. Byl vytvořen vodný roztok o různých koncentracích BDDEG, do kterého byly ponořeny jednotlivé vrstvy i celá matrice po dobu 48 hodin v závislosti na reakční teplotě a pH, a poté byly přefiltrovány a uloženy na desku z mylaru. Položením všech tří vrstev na sebe byla sestavena osteochondrální matrice. Jednotlivé vrstvy anebo celé matrice byly lyofilizovány za daných podmínek a následně uloženy ve vakuu po dobu 60 hodin. Poté byly testovány chemicko-fyzikální vlastnosti a morfologie za pomoci TG-DTG, FTIR, SEM, XRD a UV spektroskopie. Výsledky ukázaly, že koncentrace BDDEG, teplota i hodnoty pH ovlivňují jak makroporozitu, tak i mikroporozitu každé z vrstev matrice. Nejvíce prostorově uspořádaná homogenní struktura byla pozorována při teplotě 37 °C a koncentraci 1 až 2 wt% jak je vyobrazeno na Obrázku 15 u snímku c. Při koncentraci 4 wt% velikost pórů dosahuje nejnižší limitní hranice 120 μm (snímek d), u nezesítované vrstvy je viditelná nehomogenní, vysoce vláknitá struktura.

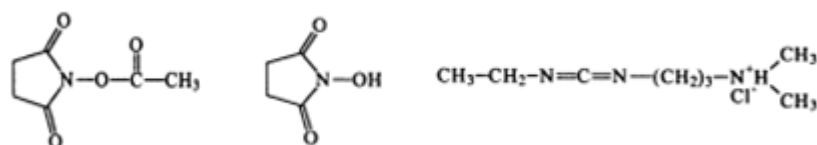


Obrázek 15: Srovnání vzorků chrupavkových vrstev pomocí SEM, za podmínek přípravy při teplotě 37 °C, v roztoku uhličitanového pufru, kde: a) nezesíťovaná vrstva, b) 0,05 wt% BDDGE, c) 2 wt% BDDGE, d) 4 wt% BDDGE [17].

Bylo zjištěno, že k nejučinnějším reakcím dochází u vrstev síťovaných v alkalickém prostředí. Studie ukázala optimální podmínky síťování při tělesné teplotě, alkalickém prostředí a 1wt% BDDEG. Za těchto podmínek může mít matrice potencionální uplatnění v artroskopii a v léčbě osteochondrálních defektů [17].

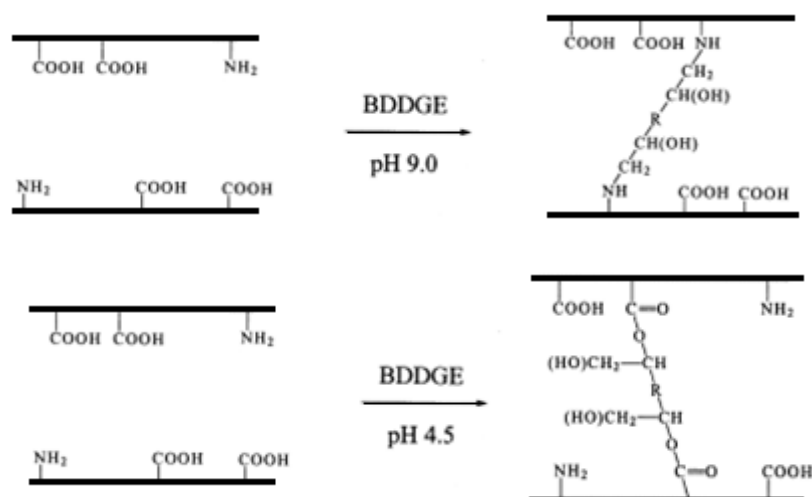
Ve studii autorů Zeeman et.al. [20] se také autoři zabývali podmínkami síťování kolagenu (z ovčích kůží) za použití různých koncentrací BDDEG, různých teplot a pH. Při koncentraci 4 wt% BDDEG byla zaznamenána vyšší reakční rychlost než u koncentrace 1 wt% BDDEG. Na stupeň zesíťení nemělo vliv zvyšování teploty, došlo pouze k urychlení reakce. Bylo pozorováno odlišné chování materiálu v alkalickém prostředí a kyselém prostředí. U pH 8-10 docházelo k síťovací reakci mezi aminoskupinami kolagenu a epoxidovými skupinami síťovadla, na druhé straně u pH 4-6 k reakci s karboxylovými skupinami kolagenu. Kolagenní materiál síťovaný v kyselém prostředí vykazoval mnohem nižší odolnost vůči enzymatické degradaci, větší pevnost v tahu a větší protažení při přetržení (měkká a pružná tkáň) než v alkalickém prostředí (neohebná a tvrdá tkáň), kdy byla zaznamenána nižší pevnost v tahu a menší protažení při přetržení [20, 24]. Cílem autorů [20] zachovat vynikající mechanické vlastnosti (při podmínkách pH 4,5) uvedené v předchozí studii a zvýšit odolnost vůči enzymatické degradaci a to za použití carboimidu, jakožto druhého

síťovacího kroku. Nejdříve probíhaly reakce nezesíťovaného kolagenu s 4wt% BDDGE jak v kyselém (pH=4,5), tak zásaditém prostředí (pH= 9) po dobu sedmi dnů při pokojové teplotě, jak je schematicky zobrazeno na obrázku (), kdy epoxidové skupiny reagují s aminoskupinami z lysinových zbytků (II) v zásaditém prostředí a v kyselém prostředí epoxidové skupiny síťovadla reagují s karboxylovými zbytky asparticu a glutamicu (III). Poté aplikovali na materiál zesíťovaný v kyselém prostředí druhý síťovací krok za použití 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carboimidu (EDC) za přítomnosti N-hydroxysuccinimidu (NHS) a kyseliny chlorovodíkové a během reakce dochází k dodatečnému vytvoření příčných vazeb.

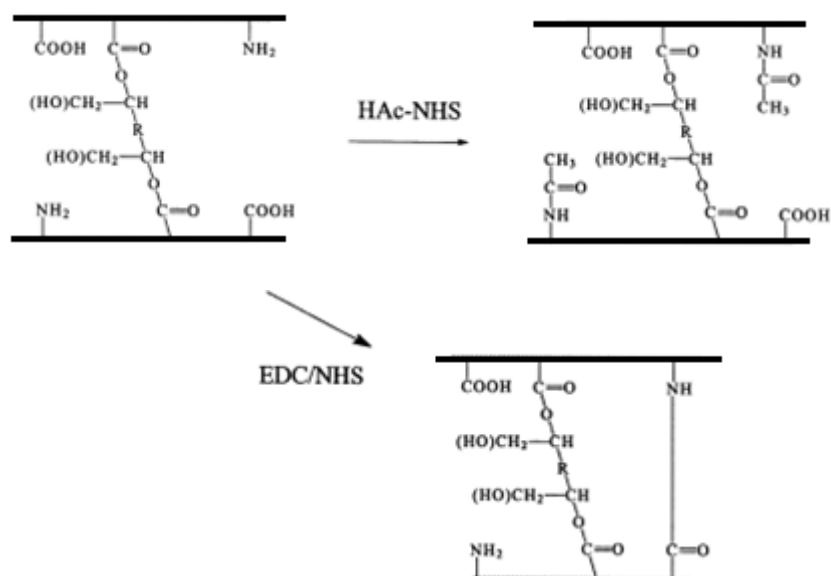


Obrázek 16: Chemické vzorce, zleva EDC, NHS, HAc-NHS

Současně byla provedena acylace (III) aminoskupin za pomoci esteru kyseliny octové N-hydroxysuccinimidu (HAc-NHS), přičemž žádné nově vznikající příčné vazby nejsou pozorovány (IV).



Obrázek 17: Schematické znázornění síťovací reakce kolagenu s BDDGE při odlišných hodnotách pH [20].

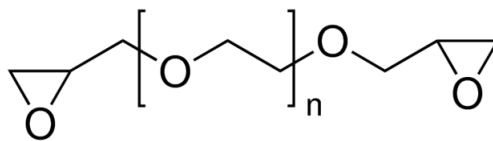


Obrázek 18: Schematické znázornění síťovací reakce kolagenu s HAc-NHS a EDC/NHS [20].

Cílem práce [20] bylo vytvořit biomateriál se zachováním excelentních mechanických vlastností jako u autorů práce Zeeman et.al. [24], ale se zvýšením odolnosti vůči enzymatické degradaci, která byla v předchozích studiích velmi nízká. To se podařilo dodatečnou síťovací reakcí za pomoci EDC/NHS. Byly provedeny testy v roztocích collagenasy a protenasy a vyhodnoceny jako závislost váhového úbytku na čase. Autoři provedli pro srovnání i zesíťování stejného kolagenního materiálu 0,5 wt% glutaraldehydem. Jak je patrné z grafů na obrázku () vynikající odolnost vůči degradaci protenasou má kolagen síťovaný BDDEG při pH=9,0 a současně kolagen zesíťovaný nejdříve BDDEG při pH=4,5 a dodatečně EDC/NHS. Nejmenší odolnost enzymatické degradaci byla pozorována u vzorků (), u kterých byla provedena acylace aminoskupin pomocí HAc-NHS [20].

2.2.2 Síťování ethylen glycol diglycidyl etherem

Ethylene glycol diglycidyl ether (EGDE) obsahuje dvě funkční epoxidové skupiny, viz. Obrázek 19.



Obrázek 19: Strukturální chemický vzorec EGDE

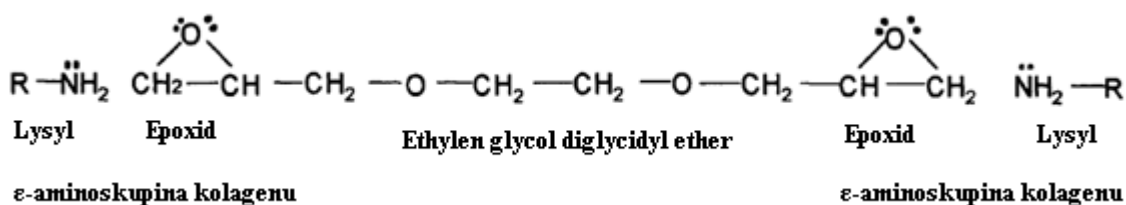
Ve vědecké práci autorů Enea et.al. [26] byl použit EGDE k síťování kolagenních vláken pro potenciaální léčení poraněných vazů a šlach v kombinaci s EDC, zmíněného v předchozí kapitole. Touto kombinací chtěli autoři vyvinout matici s vylepšenými mechanickými vlastnostmi, biokompatibilitou a vyšší odolností enzymatické degradaci oproti samotnému EGDE. Kolagenní vlákna (hovězí kůže) byla nejdříve ponořena do 40 ml fyziologického roztoku fosfátového pufru. V následujícím kroku bylo přidáno dalších 50 ml obsahujících NHS, EDC v poměru 1:2:0,5 (kolagen:NHS:EDC) a EGDE o koncentraci 5% v/v. Poté následovala inkubace po dobu pěti hodin při teplotě 37°C.

Mechanické testy ukázaly vysokou pevnost kolagenních vláken síťovaných EGDE, která je způsobena vysokým počtem nukleofilních skupin přítomných v řetězci EGDE, ale na druhou stranu byl zjištěn nízký stupeň biokompatibility [26].

V jiné studii [16] byl sledován vliv síťovadel EGDE a glycerol diglycidyl etheru (GDE) na vlastnosti keratinových filmů pro aplikace v medicíně. Filmotvorný roztok byl tvořen 10 ml vodného roztoku keratinu obsahujícího 100 mg bílkoviny a přísadkou 7,5–30 mg EGDE nebo GDE. Roztoky byly nality do polypropylenových forem a přes noc při teplotě 50°C byly usušeny. Ze vzniklých filmů o tloušťce 0,02 – 0,04 mm byly vytvořeny vzorky o rozměrech 10x10 a 50x5 mm, které byly ponořeny při pokojové teplotě ponořeny v destilované vodě, acetátovém nebo Tris-HCL pufru po dobu přibližně dvou hodin. Obdélníkové vzorky byly usušeny přes noc při teplotě 37 °C a posléze použity pro mechanické testy. Vzorky byly souběžně testovány a porovnávány s keratin-chitosanovým kompozitem a samotným keratinem. Mechanické vlastnosti nebylo možno testovat pro křehkost samotného keratinového vzorku, u ostatních byly naměřené mechanické vlastnosti podobné, jen v případě vzorku síťovaného 7,5 wt. % GDE byla konečná elongace vyšší pravděpodobně v důsledku přítomnosti tří hydroxylových skupin ve vzorku, oproti dvěma hydroxylovým skupinám ve vzorku síťovaného 7,5 wt. % EDGE. Se snižující koncentrací síťovadla byly vzorky křehčí. Mez pevnosti u vzorků s vyšší koncentrací síťovadla klesala, zatímco ko-

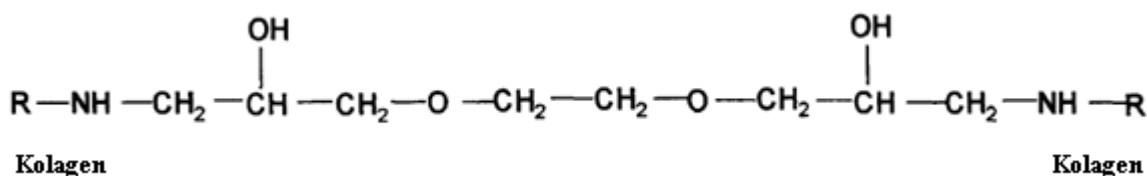
nečné prodloužení stoupalo, jelikož síťovadlo zřejmě plní funkci plastifikátoru. Byla sledována i rozpustnost. Keratin-chitosanové vzorky při pH=4 a pH=6,3, naopak vzorky síťované epoxidy se rozpustily při pH=8,9, ale při rozpouštění ve vodném prostředí si udržely výborné mechanické vlastnosti [16].

Cílem studie autorů Sung et.al. [21] bylo porovnat odolnost vůči enzymatické degradaci vnitřní hrudní tepny (vepřové) zesíťované za pomoci EDGE a glutaraldehydu a vliv na fyzikální vlastnosti v závislosti na teplotě, pH a koncentraci síťovadla. Na Obrázku 20 je zobrazena chemická struktura epoxidu před síťováním.



Obrázek 20: Reakční mechanismus síťování kolagenu pomocí EDGE.

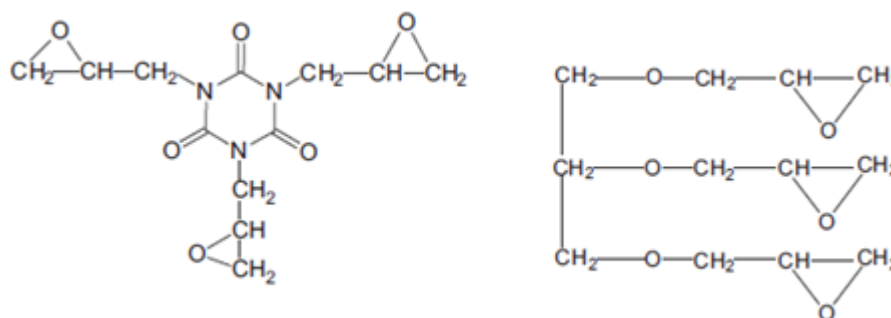
Byl použit 4% roztok EDGE upravený na pH=10,5 a 0,625 % roztok glutaraldehydu s pH=7,4. Po zafixování vzorku tepny bylo pozorováno zažloutlé zbarvení v případě glutaraldehydu, u EDGE nedošlo ke změně barvy, a to patrně díky vyššímu obsahu vlhkosti. Mechanické vlastnosti byly v případě obou síťovadel podobné. Odolnost vůči enzymatické degradaci byla testována colagenasou. Zesíťované vzorky vykazovaly vyšší odolnost, než nezesíťované, odolnost vůči enzymatické degradaci stoupala s rostoucím stupněm zesíťování. Rychlost fixace s tkání byla vyšší u glutaraldehydu. V případě síťování EDGE míra fixace stoupá s rostoucím pH, je tedy nutná přeměna lysinové ϵ -aminoskupiny v nukleofilní činidlo. Na Obrázku () je znázorněna struktura kolagenu po zesíťování EDGE [21].



Obrázek 21: Struktura zesíťovaného kolagenu pomocí EDGE.

2.2.3 Síťování polyepoxy triglycidyl isokyanurátem

Ve studii autorů Tu et.al. [15] byl kolagen z ovčí kůže síťován tri-funkčním epoxidem, polyepoxy triglycidyl isokyanurátem (TEPIC), glycerol diglycidyl etherem (GTE) a glutaraldehydem (GTA). TEPIC představuje vysoce reaktivní epoxid, a to zejména díky přítomnosti aromatické skupiny v jeho struktuře. Z řad epoxidů je jedním z nejúčinnějších činidel pro síťování kolagenu. GTE patří také mezi tri-funkční epoxidy, ale s alifatickou strukturou.



Obrázek 22: Chemické strukturní vzorce, zleva TEPIC a GTE

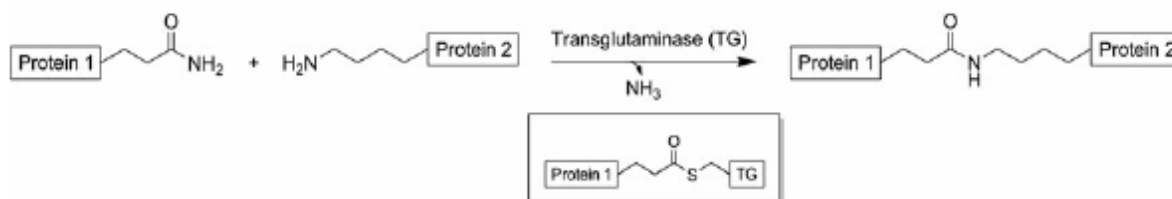
Síťovací reakce kolagenu (pásky 8x4 cm, pH=3,5) s výše uvedenými síťovadly probíhaly v roztoku 4% Na₂SO₄ 0,05 M fosfátového pufru při teplotě 15 °C po dobu dvou hodin, poté bylo upraveno pH roztokem 0,25 M Na₂CO₃/NaHCO₃. Anebo po dobu 24 hodin a teplotě 35 °C. Následovalo upravení pH na neutrální 0,1 M kyselinou octovou a vysušení za pokojové teploty. Byla sledována závislost síťovací reakce na pH, teplotě, čase a podílu síťovadla. Byly provedeny mechanické testy, které ukázaly, že TEPIC v porovnání s GTE a GTA lepší pevnost v tahu, ale horší protažení. Při porovnání zesíťovaných materiálů s nezesíťovaným kolagenem byla zjištěna menší pevnost v tahu, zapříčiněná efektem sekundárního zesíťování, ale vyšší protažení, což je pravděpodobně způsobeno určitým vlněním vláken a tím i zvýšením úhlu vazby během síťovací reakce. Byla testována také prostorová stabilita za pomoci SEM. Po vysušení byl nezesíťovaný kolagen tužší a vzorek tenčí (z důvodu ztráty vody) a průhlednější díky vysokému stupni vodíkových vazeb mezi polárními skupinami. U GTA a TEPIC byly zpozorovány téměř identické hodnoty zvýšení tloušťky o 170 % a to díky zvýšení poréznosti vláken matrice. Glutaraldehydová matrice byla v porovnání s maticí TEPIC měkčí, flexibilnější. Z hlediska termální degradace, která

byla testována v intervalu 30 až 430 °C pomocí termální gravitační analýzy. TEPIC měl při teplotě 300 °C úbytek na váze 18 %, GTE 20 %. Nejvyšší váhový úbytek u TEPIC byl při teplotách 344 °C 37 % a 370 °C 39 %, u GTE při teplotě 331 °C 23 % a 355 °C 46 % (viz. Obrázek () grafy B, C). Vysoká teplotní odolnost je vysvětlována kombinací prostorových vazeb se zavedením tuhé heterocyklické páteře do polypeptidové makromolekulární sítě. Běžná degradační teplota polypeptidového řetězce je pro srovnání 200 až 230 °C, nejvyšší stupeň degradace udává při teplotě 300 °C váhový úbytek 27 % a 42 % při teplotě 336 °C [15].

Optimální síťovací podmínky kolagenu s polyepoxy triglycidyl etherem byly stanoveny při pH=9,2 až 9,5 za přidání 10 – 12 % síťovadla, při teplotě 37 °C po dobu dvaceti hodin. Takový materiál má potencionální uplatnění v textilním a kožedělném průmyslu [15].

2.3 Síťování transglutaminázou

Nejvíce používaný enzymem pro síťování bílkovin patří transglutamináza. Mikrobiální transglutamináza katalyzuje tvorbu isopeptidové vazby mezi γ -karbonylovou skupinou glutaminových zbytků a ϵ -aminoskupinou lysinových zbytků [32]. Síťování bílkoviny skrze transamidovou reakci katalyzovanou transglutaminázou je schematicky znázorněno na Obrázku 23.



Obrázek 23: Reakční mechanismus síťování bílkoviny transglutaminázou [4].

Síťování bílkovin transglutaminázou nachází velké uplatnění v potravinářském průmyslu. Prodlužuje trvanlivost výrobků, vylepšuje jejich texturu, strukturu, vzhled a vůni [4].

Bertoni et al. [32] se zabývali síťováním želatiny pomocí mikrobiální a tkáňové transglutaminázy s cílem vytvořit bílkovinnou matici pro aplikace v tkáňovém inženýrství. Vytvořili reakční roztok složený z želatiny, tris-pufry a vody, ke kterému přidali různou navážku enzymu a následně směs inkubovali při teplotě 37 °C po dobu 15 minut až 1 hodiny.

S cílem snížit rozpustnost ve vodném prostředí, zesíťovanou želatinu zakomponovali do gellanové matrice. U matrice želatina/gellan v poměru 50/50 během botnacích testů byla zaznamenána dobrá stabilita. V porovnání s nezesíťovaným vzorkem byl stupeň nabotnění poloviční, což lze vysvětlit tím, že zesíťovaný vzorek vede k méně rozpínající se struktuře a tím i k menší absorpci vody. Zesíťovaná matrice vykazovala vyšší tuhost díky zamezení pohyblivosti řetězců vytvořením peptidové vazby mezi glutaminovými a lysinovými zbytky želatiny. U zesíťované matrice byla pozorována dobrá přilnavost buněk a její struktura měla vhodné předpoklady k buněčnému růstu [32].

V jiné studii se autoři Chen et al. [31] zabývali síťováním kolagenu z vepřových kůží mikrobiální transglutaminázou. Sledovali působení vlivu inkubační teploty, pH prostředí a koncentraci enzymu na vlastnosti kolagenní matrice.

Zkoušky pevnosti v tahu ukázaly vyšší pevnost u matric síťovaných při pH 3 a 4, než při pH 5 a 6, a to i přes skutečnost, že matrice síťované při nižším pH měly nižší stupeň zesíťování. Při nižším pH byla kolagenní vlákna rozpuštěna ve vodě, zatímco při vyšším pH byla patrná heterogenita roztoku a tím i nerovnoměrnost vzniku enzymatických příčných vazeb. Struktura matric byla analyzována pomocí SEM. U matric síťovaných při pH 3 byla pozorována stejnoměrná struktura s malými póry, kdežto u matric síťovaných při pH 5 byly póry rozšířené a struktura nepravidelná, proto při zkouškách pevnosti v tahu došlo ke snadnému přerušování.

Cílem autorů bylo vytvořit kolagenní matici pro aplikace v oblasti tkáňového inženýrství, proto byla studie zaměřena i na potenciální cytotoxicitu. Po zavedení matrice do lidského těla byl pozorován buněčný růst a běžná morfologie, možná cytotoxicita nebyla zaznamenána [31].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍL PRAKTICKÉ ČÁSTI PRÁCE

V teoretické části práce byly popsány různé způsoby modifikace vlastností živočišných bílkovin síťováním. Byly sledovány technologické podmínky síťování kolagenu, želatiny či keratinu a metody, kterými se zesíťované substráty jako například filmy, folie či matrice, testují. V současných studiích se síťování kolagenního hydrolyzátu často nevyskytuje, z toho důvodu byla experimentální část zaměřena na ověření možností síťování kolagen-elastinového hydrolyzátu (připraveného z hovězích šlach) vybranými síťovadly.

Tradičně jsou bílkoviny síťovány glutaraldehydem, cílem práce však bylo kolagen-elastinový hydrolyzát síťovat netoxickými síťovadly a to za použití oxidovaných sacharidů, které kromě nízkého stupně toxicity jsou biodegradabilní a citlivé vůči životnímu prostředí.

Jelikož vědeckých studií týkajících se síťovacích účinků oxidovaných polysacharidů ve spojitosti s bílkovinami není mnoho, a ověřené účinky síťování na kolagen-elastinový hydrolyzát nejsou známy, cílem praktické části práce tedy bylo:

- 1) připravit oxidované polysacharidy – alginátový dialdehyd, dialdehyd celulózy a karboxymethyl celulózu,
- 2) posoudit možnosti síťování kolagen-elastinového hydrolyzátu oxidovanými polysacharidy, epoxidy a transglutaminázou,
- 3) připravit filmy a vyhodnotit síťovací účinky pomocí testování rozpustnosti filmů,
- 4) porovnat síťovací účinky jednotlivých síťovadel,
- 5) navrhnout optimální podmínky síťování.

3.1 Kolagen-elastinový hydrolyzát a chemikálie

Hydrolyzát: kolagen-elastinový hydrolyzát (UTB),

Změkčovaadlo: glycerin (Sigma Aldrich),

Sítovadla: glycerol diglycidyl ether (Sigma Aldrich), dialdehyd škrobu (Monomer – Polymer & Dajac Labs, Inc.), dialdehyd karboxymethylcelulózy (UTB), dialdehyd celulózy (UTB), alginátový dialdehyd (UTB), transglutamináza (Ajinomoto Foods Europe S.A.S),

Ostatní chemikálie: 30 % hydroxid sodný, 1 M hydroxid sodný, 5 M hydroxid sodný, 3 % kyselina chlorovodíková, alginát sodný, dusičnan stříbrný, jodistan sodný, ethylen glykol.

3.2 Pomůcky a přístroje

V experimentální části bylo použito běžné laboratorní sklo a pomůcky: kádinky 10, 25, 50, 100, 150 ml, odměrný válec 25, 100, 250 ml, pipeta 1, 5, 10 ml, Erlenmayerova baňka 1000 ml, odměrná baňka 100ml, hodinová skla, navažovací lodička, Petriho misky, koželužské misky, exsikátor, Buchnerova nálevka, plech s teflonovým povrchem.

Silikonové destičky (125 x 69 mm), celulózová membrána s propustností pro látky s $M > 12$ kDa (Sigma Aldrich), filtrační papír nejnižší hustoty, lžička, pinzeta, stopky, aluminiová folie, tloušťkoměr.

Pro laboratorní účely bylo pracováno s běžnými laboratorními přístroji. Analytické váhy Kern 770 – 60, magnetická míchadla Lavat MM4, Shott Geräte GMBH, IKA® C - MAG HS 7 s teplotním čidlem IKA® ETS – D5, pH metr WTW 526, MultiCal®, odstředivka Hettich Universal 32, sušárna Binder E28-TBI, sušárna Memmert ULP 400, třepačka LT 2.

3.3 Metodika práce

Technologické podmínky síťování byly provedeny na základě naplánovaných faktorových pokusů, z nichž lze vytěžit maximální množství informací o vlivech a vazbách jednotlivých veličin na konečný výsledek anebo výsledky za minimalizace počtu měření. Z teoretických poznatků se nejdříve určí takové proměnné, tzv. faktory, o kterých se předpokládá, že by mohly mít největší vliv na výsledek. Účinkem faktorů je změna výsledků pokusů při změně jeho úrovní. Počet faktorů se odvíjí od složitosti daného experimentu [25, 37].

V praktické části práce byly použity 2 a 3 faktory na dvou úrovních včetně centrálního experimentu. Dvě úrovně jsou v běžné praxi nejčastěji používány, jelikož jsou jednoduché a zajišťují nízký počet experimentů. Uskutečněním všech možných kombinací pokusů je výsledkem kompletní faktorová analýza daného experimentu.

3.4 Vyhodnocení stupně zesíťování

Stupeň zesíťování filmů byl vyhodnocen na základě testování rozpustnosti jednotlivých filmů ve vodném prostředí při pokojové teplotě.

Nejdříve byly z připravených filmů vyříznuty vzorky o velikosti přibližně 10x10 mm a byly zváženy na analytických vahách. Pomocí tloušťkoměru byla změřena tloušťka vzorků, která byla v průměru 0,25 – 0,35 mm. Do kádinek bylo nalito přibližně 30 ml destilované vody, do nichž byly opatrně pinzetou vloženy vzorky. Od okamžiku kontaktu vzorku s vodou byl měřen čas na stopkách. Vzorky byly rozpouštěny v předem stanovených časových intervalech, testy rozpustnosti byly ukončeny v okamžiku úplného rozpuštění vzorku ve vodě. Měřené časové intervaly byly (v minutách):

1 2 5 10 15 20 30 60 120 240 480

Po uplynutí doby rozpouštění byly vzorky opatrně vyjmuty pomocí pinzety či lžičky do Petriho misky a ihned umístěny do předem vyhřáté sušárny bez cirkulace vzduchu při teplotě 103 ± 2 °C a to do zaznamenání konstantní hmotnosti. Poté byly Petriho misky se vzorky přikryty víčky a uloženy do exsikátoru do úplného vychladnutí na pokojovou teplotu. Nakonec byly zváženy na analytických vahách.

Nejprve se stanovil obsah sušiny a vlhkosti v jednotlivých filmech použitím matematických vzorců (1) a (2) [43]. Na analytických vahách byla zvážena koželužská miska (A) a následně i koželužská miska se vzorkem o minimální navážce 1 g (B), která byla poté umístěna do předem vyhřáté sušárny bez cirkulace vzduchu při teplotě $103,0 \pm 2$ °C do zaznamenání konstantní hmotnosti. Po vysušení byla miska přikryta víčkem a vložena do exsikátoru ke zchlazení na pokojovou teplotu. Nakonec byla zvážena koželužská miska se vzorkem na analytických vahách (C) a stanoven procentuální obsah vlhkosti a sušiny filmu.

$$vlhkost = \frac{B - C}{B - A} \cdot 100 \quad (\%) \quad (1)$$

$$sušina = 100 - vlhkost \quad (\%) \quad (2)$$

Na základě znalosti obsahu sušiny v jednotlivých filmech bylo vypočítáno procento rozpuštěného filmu z výsledků analýzy rozpustnosti. Podle matematických vzorců (3) a (4) bylo nejdříve stanoveno procento nerozpuštěného vzorku, kde a představuje hmotnost nerozpuštěného vzorku (v gramech) a n navážku vzorku (v gramech) a poté vypočítána rozpustnost jednotlivých filmů (v procentech) [43].

$$\%_{\text{NEROZP.VZORKU}} = \frac{a}{n} 100 \quad (\%) \quad (3)$$

$$\%_{\text{ROZP.VZORKU}} = 100 - \%_{\text{NEROZP.VZORKU}} \quad (\%) \quad (4)$$

3.5 Příprava hydrolyzátu a některých síťovadel

Kolagen-elastinový hydrolyzát a oxidované polysacharidy – dialdehyd celulózy, dikarbonyl celulóza a alginátový dialdehyd, byly připraveny v laboratoři na Ústavu inženýrství polymerů Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně.

3.5.1 Příprava kolagen-elastinového hydrolyzátu

Kolagen-elastinový hydrolyzát byl připraven z hovězích vazovic dodaných z jatek. Prvním krokem přípravy bylo odtučnění hovězích vazovic pětinasobnou extrakcí v acetonu po jedné hodině a následným hydrolytickým zpracováním v následujících třech procesních krocích: zbotnáním vazovic, enzymovým opracováním vazovic a extrakcí hydrolyzátu.

Nejdříve se promyté surové vazovice přerušily v sušárně s cirkulací vzduchu přibližně po dobu 30 hodin při teplotě 35 °C. Přerušené vazovice byly poté smíchány s acetonem v poměru 1:5 (w/v) v Erlenmayerově baňce a byly umístěny do třepačky po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Po uplynutí 1 hodiny byl aceton vyměněn za čerstvý a postup se

opakoval ještě čtyřikrát. Po poslední extrakci se odtučněné vazovice vysypaly na plech, který byl následně umístěn do digestoře po dobu 30 minut kvůli odpaření zbytkového acetonu.

Tímto došlo k odtučnění vazovic a následoval první procesní krok – zbotnění. Odtučněné vazovice byly smíchány v poměru 1 : 6 (w/v) s destilovanou vodou, přičemž bylo upraveno pH na $8,0 \pm 0,2$, přídatkem ledové CH_3COOH . Směs v Erlenmayerově baňce byla třepána na třepačce po dobu 8 hodin při laboratorní teplotě. První 3 hodiny za kontroly pH a jeho případné úpravy na hodnotu $8,0 \pm 0,2$. Nakonec byla kapalina odfiltrována, vazovice byly 3 x promyty destilovanou vodou v poměru 1 : 10 (w/v) a protřepány po dobu 30 sekund.

Po zbotnění byly v druhém procesním kroku vazovice opracovány enzymem. Nejdříve byly vazovice smíchány s destilovanou vodou v poměru 1 : 6 (w/v). Proteolytický enzym Polarzyme 6.0 T vykazuje nejvyšší účinnost při $\text{pH} = 8,0 \pm 0,2$, k úpravě pH byla použita stejně jako v předchozím procesním kroku ledová CH_3COOH . Po úpravě pH roztoku byly přidány 3 % enzymu (w/w, vztažených na sušinu výchozích šlach) a směs byla třepána na třepačce po dobu 16 hodin při laboratorní teplotě, kontrola pH odpovídající $8,0 \pm 0,2$ byla provedena první 3 hodiny a případně upravena.

V posledním procesním kroku byla směs přelita do kádinky, a za občasného promíchání udržována po dobu 15 minut při teplotě 75 ± 2 °C. Následně byla směs přivedena k varu, ve kterém byla udržována po dobu 5 minut s cílem inaktivace enzymu. Poté byla směs přefiltrována za použití běžného kovového kuchyňského síta vyloženého dvouvrstvou PA tkaniny. Roztok hydrolyzátu byl rozlit do plechů s vrstvou nepřilnavé potravinářské folie. Plechy byly vloženy do sušárny s cirkulací vzduchu po dobu 36 hodin při teplotě 40 ± 1 °C. Takto vysušené kolagen – elastinové filmy byly rozdrceny na prášek a následně přesypán do skleněné lahve s uzávěrem. Vzhled práškového hydrolyzátu je vyobrazen na Obrázku 25. Hydrolyzát obsahoval přibližně 30,0 % elastinu, 65,5 % kolagenu a 4,5 % popelovin (procentuální obsah vztažený na sušinu hydrolyzátu).



Obrázek 24: Kolagen-elastinový hydrolyzát

3.5.2 Příprava alginátového diadehydu

Příprava alginátového dialdehydu (ADA) byla provedena podle postupu přípravy uvedeného ve studii autorů Kanth et. al. [40].

Nejdříve byla navážka 10 g alginátu sodného smíchána s 200 ml destilované vody v Erlenmayerově baňce na magnetickém míchadle. Do kádinky bylo naváženo 11 g jodistanu sodného a bylo přidáno 80 ml destilované vody. Za mírně zvýšené teploty byl roztok míchán na magnetickém míchadle do úplného rozpuštění jodistanu. Roztok postupně změnil barvu ze zakalené na čirou. Poté byl přelit do odměrné baňky a doplněn na objem 100 ml destilovanou vodou. Erlenmayerova baňka byla obalena aluminiovou folií, aby reakce probíhala ve tmě, a ke směsi za současného míchání baňky krouživými pohyby v ruce, byl postupně přidán roztok jodistanu sodného. Následně byla Erlenmayerova baňka upevněna do třepačky při 4000 ot./min, teplotě 24 °C, po dobu 6 hodin.



Obrázek 25: Erlenmayerova baňka obalená aluminiovou folií, umístěná na třepačce.

Po uplynutí reakční doby byly drobné nerozpuštěné částičky přefiltrovány přes filtrační papír nejnižší hustoty na Buchnerově nálevce. Reakce byla zastavena přidáním 5 ml ethylen glykolu k roztoku. Roztok byl přelit do celulókové membrány, která byla na obou koncích uzavřena svorkami. Poté byla celulóková membrána vložena do velké plastové nádoby s destilovanou vodou tak, aby byla celá ponořena. Aparatura je vyobrazena na Obrázku 26.



Obrázek 26: Celulóková membrána umístěná v nádobě s destilovanou vodou

Reakční směs byla dialyzována přes celulóзовou membránu v destilované vodě při teplotě 25°C. Během dialýzy byla měněna destilovaná voda v nádobě, vždy po 24 hodinách za současné kontroly přítomnosti jodistanu ve vyčerpané vodě pomocí AgNO_3 . Dialýza byla ukončena po 4 dnech, kdy v destilované vodě již nebyla detekována přítomnost jodistanu.

Čistý dialyzát byl přelit na plech opatřený nepřilnavou vrstvou folie a uložen do sušárny bez cirkulace vzduchu při teplotě 35 °C po dobu přibližně 72 hodin. Po vytažení ze sušárny byl alginátový dialdehyd umístěn do skleněné Petriho misky a uzavřen víčkem [40].



Obrázek 27: Vysušený alginátový dialdehyd, vlevo po vysušení na plechu s nepřilnavou folií, vpravo na Petriho misce

3.5.3 Příprava dialdehydu celulózy

Dialdehyd celulózy byl připraven podle pracovního postupu uvedeného ve studii autorů Varma et. al. [38]. Prvním krokem přípravy dialdehydu celulózy byla hydrolýza 30 g mikrokrystalické celulózy v 250 ml 5N HCl při teplotě 80 °C. Reakce probíhala 7,5 hodin. Po ochlazení byla směs přefiltrována. Celulóza uchycená na fritovém kelímku byla spolu s přidavkem 60 g NaIO_4 vložena do Erlenmayerovy baňky. Reakce probíhá ve tmě, z toho důvodu byla Erlenmayerova baňka obalena aluminiiovou folií. Směs byla míchána na magnetickém míchadle, pH směsi bylo upraveno na hodnotu $4,0 \pm 0,2$ 1 M H_2SO_4 . Poté byla baňka upevněna na třepačku umístěnou v inkubátoru bez přístupu světla, při teplotě 35 °C, po dobu 48 hodin. Poté byla směs odstředěna na odstředivce při 4000 ot. / min po dobu 6 minut. Kapalný podíl byl vlit do dvojnásobného objemu t-butyl alkoholu a míchán na

magnetickém míchadle po dobu 10 minut, během které došlo k vysrážení dialdehydu celulózy. Následovalo opětovné odstředění směsi (4000 ot./min po dobu 6 minut) a promytí v přebytku t - butyl alkoholu (celkem třikrát). Nakonec bylo síťovadlo vysušeno v sušárně při teplotě 35 °C po dobu 24 hodin [38].

3.5.4 Příprava dialdehydu karboxymethylcelulózy

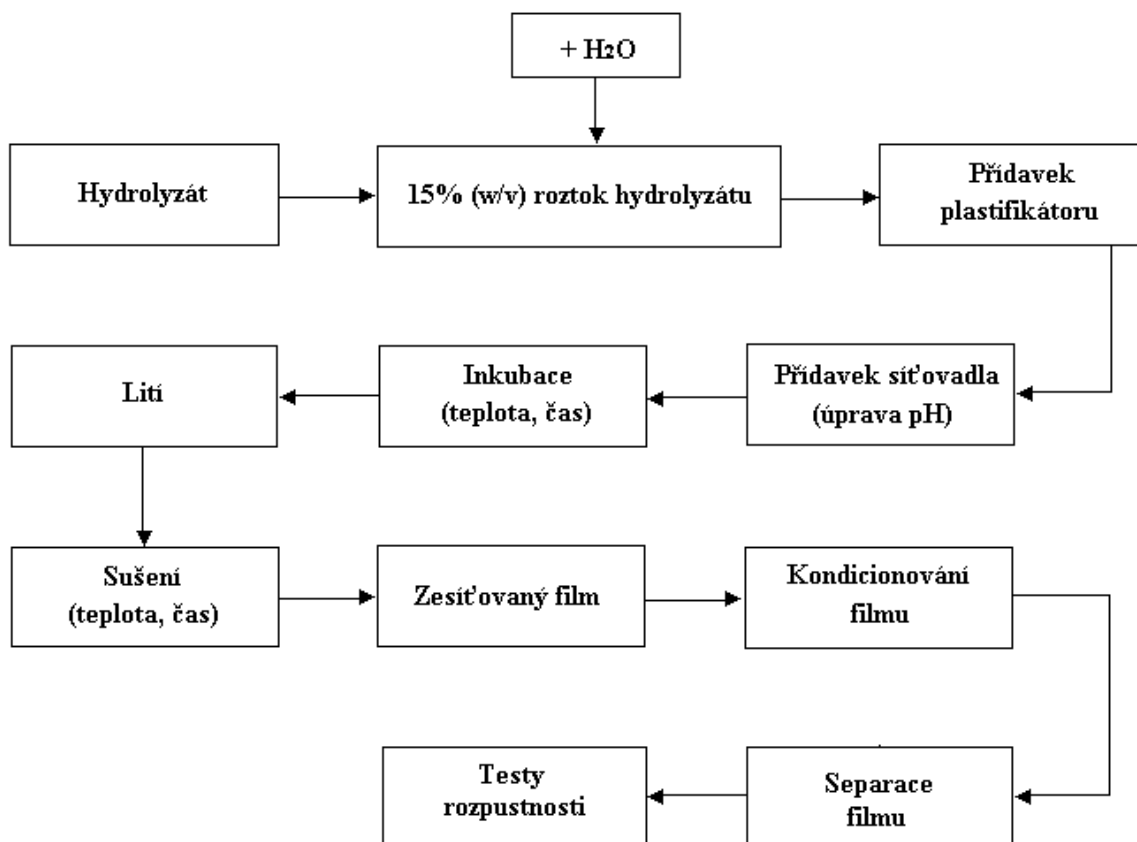
Dialdehyd karboxymethyl celulózy (DCMC) byl připraven podle práce autorů Mu et. al. [39]. Nejdříve byla Erlenmayerova baňka obalena aluminiovou folií, aby reakce probíhala ve tmě. V baňce bylo s použitím skleněné tyčinky rozmícháno 10 g karboxymethylcelulózy s 200 ml destilované vody. Směs vytvořila hustý gel. Postupně bylo ke směsi přidáno 100 ml 11% roztoku NaIO_4 za současného míchání Erlenmayerovy baňky v ruce, krouživými pohyby. Přídavkem 1M H_2SO_4 bylo upraveno pH směsi na $3,3 \pm 0,2$. Poté byla Erlenmayerova baňka připevněna na třepačku umístěnou v inkubátoru a směs byla třepána při teplotě 35 °C po dobu 4 hodin. Po uplynutí reakční doby byla směs přefiltrována přes filtrační papír nejnižší hustoty na Buchnerově nálevce.

Do 500 ml ethanolu, za současného míchání na magnetickém míchadle, byla postupně vlita reakční směs. Po vysrážení byl DCMC odstředěn na odstředivce při 4000 ot. / min., po dobu 6 min. Ze všech zkumavek byl DCMC spláchnut malým množstvím ethanolu do Erlenmayerovy baňky s následným třepáním po dobu 30 s a opětovným odstředěním. Tento postup byl dvakrát až třikrát opakován.

Posledním krokem přípravy DCMC bylo vysušení v sušárně při teplotě 35 °C po dobu 24 hodin [39].

4 POSTUP PRÁCE

Postup přípravy filmů je schematicky znázorněn na Obrázku 28. Byl připraven 15% (w/v) roztok kolagen-elastinového hydrolyzátu. Nejdříve byl hydrolyzát rozpuštěn v destilované vodě. Jeho vlastnosti byly upraveny přidavkem jednotlivých síťovadel (oxidované polysacharidy, epoxid) a plastifikátoru (glycerin), u určitých síťovadel bylo upraveno pH prostředí. Rozmíchaná reakční směs byla inkubována v inkubátoru při určité teplotě, po určitou dobu, v závislosti na zvoleném síťovadle. Po uplynutí reakční doby byla směs rozmíchána na magnetickém míchadle. U některých směsí, v závislosti na zvoleném síťovadle, bylo překontrolováno a případně upraveno pH na požadovanou hodnotu. Poté byly roztoky nality do silikonových destiček umístěných v sušárně s cirkulací vzduchu a sušeny při teplotě 60 °C po dobu 48 hodin. Po vysušení byly filmy včetně silikonových destiček uloženy do exsikátoru při pokojové teplotě, po dobu 48 hodin. Nakonec byly filmy odděleny od silikonových destiček a podrobeny analýze.



Obrázek 28: Schematický postup přípravy filmů z kolagen-elastinového hydrolyzátu.

Na základě odhadnutých technologických podmínek síťování byly nejprve připraveny kolagen-elastinové filmy s minimy a maximy sledovaných faktorů, které by mohly mít největší vliv na výsledné vlastnosti filmu. Za předpokladu možných komplikací během přípravy filmů (nerozpustnost síťovadla ve vodném prostředí, usazování síťovadla během doby inkubace) či negativních výsledků (křehkost filmu, vysoká rozpustnost ve vodném prostředí), bylo nutno upravit technologické podmínky síťování.

4.1 Síťování glycerol diglycidyl etherem

Během studia síťování kolagen-elastinového hydrolyzátu glycerol diglycidyl etherem (GDE) byly sledovány tři vybrané parametry: přidavek síťovadla, teplota reakce a doba reakce. Faktorové pokusy byly složeny ze tří faktorů na dvou úrovních, s jedním centrálním experimentem, o jednom opakování.

Faktor A: Přídavek síťovadla: 6 – 11 – 16 % (vztaženo na navážku hydrolyzátu)

Faktor B: Teplota reakce: 25 – 35 – 45 °C

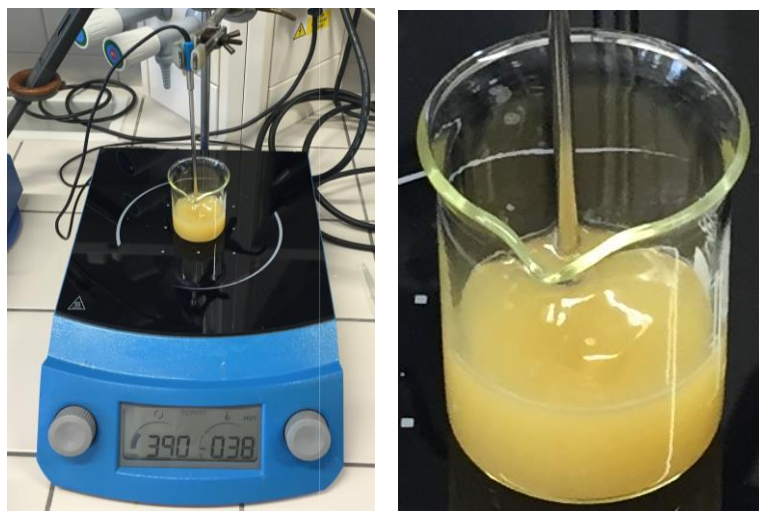
Faktor C: Doba reakce: 1 – 4 – 7 h

| Technologické podmínky síťování | | | | | | |
|---------------------------------|----------|----------|----------|---------------------|--------|---------------------|
| Exp. č. | Faktor A | Faktor B | Faktor C | pH ₁ (r) | V [ml] | pH ₂ (r) |
| | [%] | [°C] | [h] | | | |
| 1 | 6 | 25 | 1 | 11,02 | 11,02 | 10,37 |
| 2 | 16 | 45 | 7 | 11,14 | 11,14 | 11,78 |

Kde: $pH_1 (r)$ označuje pH filmotvorného roztoku před dobou reakce a $V [ml]$ objem 30 % NaOH potřebný k úpravě pH roztoku na $pH_1 (r)$, $pH_2 (r)$ označuje pH roztoku po době reakce.

Tabulka 1: Technologické podmínky síťování kolagen-elastinového hydrolyzátu glycerol diglycidyl etherem

Připravil se 15 % (w/v) roztok hydrolyzátu. Nedříve byly připraveny filmy s limitními hodnotami sledovaných faktorů. Do kádinky bylo naváženo 6 g hydrolyzátu a přidáno 30 ml destilované vody. Směs byla míchána za mírného zvýšení teploty (přibližně 40 °C) na magnetickém míchadle do úplného rozpuštění hydrolyzátu (viz. Obrázek 31). V druhé kádince byla na magnetickém míchadle rozmíchána navážka GDE, podle faktoru A, v 5 ml destilované vody. Následně byl roztok síťovadla vmíchán k roztoku hydrolyzátu. Další 5 ml destilované vody bylo použito k vypláchnutí kádinky, ve které byl připraven roztok síťovadla. Za použití 30 % roztoku NaOH o určitém objemu V (viz. Tabulka 1) bylo upraveno pH směsi na $\text{pH}_1(r) = 11 \pm 0,2$ (viz. Tabulka 1). Směs byla míchána na magnetickém míchadle po dobu 20 min při teplotě 45-50 °C. Následně byla kádinka přikryta víčkem a uložena do inkubátoru při teplotě dle faktoru B, po dobu dle faktoru C. Po uplynutí reakční doby byla směs míchána 5 min na magnetickém míchadle a nakonec byla zaznamenána hodnota pH, (viz. Tabulka 1, $\text{pH}_2(r)$). Filmotvorný roztok byl nalit do silikonové destičky o rozměrech 125x69 mm, uložené v sušárně s cirkulací vzduchu. Film byl sušen po dobu 48 hodin při teplotě 60 °C. Na závěr byla silikonová destička s filmem uložena do exsikátoru a v něm ponechána minimálně dalších 48 hodin před samotným testováním.



Obrázek 29: Roztok kolagen-elastinového hydrolyzátu během míchání na magnetickém míchadle.

4.2 Síťování dialdehydem škrobu

Během studia síťování kolagen-elastinového hydrolyzátu dialdehydem škrobu (DAS) byly sledovány tři vybrané parametry: přidavek síťovadla, přidavek změkčovadla a doba reakce. Faktorové pokusy byly složeny ze tří faktorů na dvou úrovních, s jedním centrálním experimentem, o jednom opakování.

Faktor A: Přidavek síťovadla: 4 – 8 – 12 % (vztaženo na navážku hydrolyzátu)

Faktor B: Přidavek změkčovadla: 5 – 10 – 15 % (vztaženo na navážku hydrolyzátu)

Faktor C: Doba reakce: 1 – 4 – 7 h

| Technologické podmínky síťování | | | | | | | |
|---------------------------------|----------|----------|----------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| Exp. č. | Faktor A | Faktor B | Faktor C | pH ₁ | V ₁ | pH ₂ | V ₂ |
| | [%] | m [g] | t [h] | (r) | [ml] | (r) | [ml] |
| 1 | 4 | 5 | 1 | 12,21 | 1,15 | 12,20 | 0,05 |
| 2 | 8 | 10 | 7 | 12,20 | 1,66 | 12,22 | 0,12 |
| 3 | 12 | 15 | 4 | 12,22 | 1,67 | 12,20 | 0,09 |

Kde: $pH_1 (r)$ označuje pH filmotvorného roztoku před dobou reakce a $V_1 [ml]$ objem 5 M NaOH potřebný k úpravě pH roztoku na $pH_1 (r)$; $pH_2 (r)$ označuje pH roztoku po době reakce a $V_2 [ml]$ objem 5 M NaOH potřebný k úpravě pH roztoku na $pH_2 (r)$.

Tabulka 2: Technologické podmínky síťování kolagen-elastinového hydrolyzátu dialdehydem škrobu.

Připravil se 15 % (w/v) roztok hydrolyzátu. Nejdříve byly připraveny experimenty s limitními hodnotami sledovaných faktorů plus centrální experiment. Do kádinky byla přidána navážka 6 g hydrolyzátu a 30 ml destilované vody. Směs byla míchána za mírného zvýšení teploty (přibližně 40 °C) na magnetickém míchadle do úplného rozpuštění hydrolyzátu. Navážka glycerinu, podle faktoru B, byla rozmíchána v kádince na magnetickém míchadle v 5 ml destilované vody. Poté byl roztok vlit do roztoku hydrolyzátu. Dále byla k roztoku hydrolyzátu za současného míchání na magnetickém míchadle přidána navážka práškového DAS. Zbývajících 5 ml destilované vody bylo použito na spláchnutí navažovací lodičky. Kompletní směs byla míchána po dobu 10 minut na magnetickém míchadle.

Bylo upraveno pH roztoku 5 M NaOH o celkovém objemu V_1 (viz. Tabulka 2) na $\text{pH}_1(r) = 12 \pm 0,2$ (viz. Tabulka 2). Směs byla míchána na magnetickém míchadle po dobu 20 minut při teplotě 55 °C. Poté byla hladina odpovídající 40 ml vyznačena na kádinku, kádinka byla opatřena víčkem a vložena do inkubátoru po dobu dle faktoru C, při teplotě 60 °C. Po uplynutí reakční doby byl objem kádinky překontrolován a případně upraven na celkový objem 40 ml destilovanou vodou. Roztok byl rozmíchán na magnetickém míchadle po dobu 5 minut, za úpravy pH na $\text{pH}_2(r) = 12 \pm 0,2$ určitým objemem V_2 a to 5 M NaOH (viz Tabulka 2). Roztok hydrolyzátu byl vlit na silikonovou destičku o rozměrech 125x69 mm uloženou v sušárně s cirkulací vzduchu a v ní byl film sušen po dobu 48 hodin při teplotě 60 °C. Následně byla silikonová destička s filmem uložena do exsikatoru a v něm ponechána minimálně dalších 48 hodin před samotným testováním.

4.3 Síťování dialdehydem celulózy

Během studia síťování kolagen-elastinového hydrolyzátu dialdehydem celulózy (DAC) byly sledovány dva vybrané parametry: přidavek síťovadla a přidavek změkčovadla, doba reakce byla konstantní. Faktorové pokusy byly složeny ze dvou faktorů na dvou úrovních, s jedním centrálním experimentem, o jednom opakování.

Faktor A: Přidavek síťovadla: 2 – 5 – 8 % (vztaženo na navážku hydrolyzátu)

Faktor B: Přidavek změkčovadla: 10 – 15 – 20 % (vztaženo na navážku hydrolyzátu)

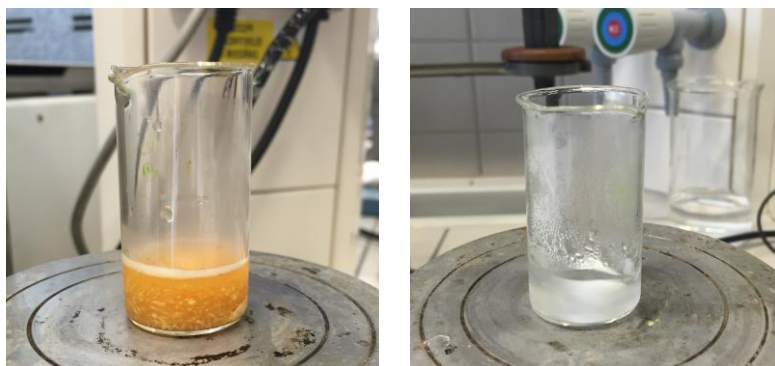
Doba reakce: konstantní – 8 h

| Technologické podmínky síťování | | | | |
|---------------------------------|----------|----------|---------------------|---------------------|
| Exp. č. | Faktor A | Faktor B | pH ₁ (r) | pH ₂ (r) |
| | [%] | [%] | | |
| 1 | 8 | 10 | 6,57 | 6,66 |
| 2 | 8 | 20 | 6,59 | 6,08 |
| 3 | 20 | 10 | 6,92 | 6,67 |
| 4 | 20 | 20 | 6,46 | 6,19 |
| 5 | 14 | 15 | 6,80 | 6,29 |

Kde: $pH_1 (r)$ označuje pH filmotvorného roztoku před dobou reakce a $pH_2 (r)$ označuje pH roztoku po době reakce.

Tabulka 3: Technologické podmínky síťování kolagen-elastinového hydrolyzátu dialdehydem celulózy.

Připravil se 15 % (w/v) roztok hydrolyzátu. Byly připraveny všechny experimenty na základě sledovaných technologických parametrů (viz. Tabulka 3). Do kádinky byla přidána navážka 6 g hydrolyzátu a 25 ml destilované vody. Směs byla míchána za mírného zvýšení teploty (přibližně 40 °C) na magnetickém míchadle do úplného rozpuštění hydrolyzátu. K roztoku hydrolyzátu byla přidána navážka glycerinu, podle faktoru B, předem rozmíchána na magnetickém míchadle v 5 ml destilované vody. Navážka dialdehydu celulózy, podle faktoru A, byla přidána k 5 ml destilované vody. Směs byla míchána na magnetickém míchadle s postupným zvyšováním teploty k varu, při kterém byla udržována do úplného rozpuštění DAC.



Obrázek 30: Detail přípravy roztoku dialdehydu celulózy na počátku rozpuštění síťovadla (vlevo) a po rozpuštění (vpravo).

Roztok síťovadla byl poté vlit do roztoku hydrolyzátu spolu s dalšími 5 ml destilované vody, použité k vypláchnutí kádinek, ve kterých bylo připraveno změkčovadlo a síťovadlo. Kompletní roztok byl poté míchán dalších 10 minut. Bylo změřeno pH směsi a poznačeno jako pH_1 (r) roztoku před dobou reakce (viz. Tabulka 3). Na kádinku byla vyznačena hladina odpovídající celkovému objemu roztoku 40 ml, byla opatřena víčkem a následně uložena do inkubátoru po dobu 4 hodin při teplotě 60 °C. Po uplynutí reakční doby byl překontrolován a případně doplněn objem odpovídající 40 ml destilovanou vodou a roztok byl míchán po dobu 5 minut na magnetickém míchadle. Nakonec bylo změřeno pH a zaznamenáno jako pH_2 (r) filmotvorného roztoku po uplynutí doby reakce. Nakonec byl roztok hydrolyzátu vlit na silikonovou destičku o rozměrech 125x69 mm uloženou v sušárně s cirkulací vzduchu, a v ní byl film sušen po dobu 48 hodin při teplotě 60 °C. Po vysušení byla silikonová destička včetně filmu uložena do exsikátoru a v něm ponechána minimálně dalších 48 hodin před samotným testováním.

4.4 Síťování dialdehydem karboxymethylcelulózy

Během studia síťování kolagen-elastinového hydrolyzátu dialdehydem karboxymethyl celulózy (DCMC) byly sledovány dva vybrané parametry: přídavek síťovadla a přídavek změkčovadla, doba reakce byla konstantní.

Faktor A: Přídavek síťovadla: 8 – 14 – 20 % (vztaženo na navážku hydrolyzátu)

Faktor B: Přídavek změkčovadla: 10 – 15 – 20 % (vztaženo na navážku hydrolyzátu)

Doba reakce: konstantní – 4 h

| Technologické podmínky síťování | | | | |
|---------------------------------|----------|----------|---------------------|---------------------|
| Exp. č. | Faktor A | Faktor B | pH ₁ (r) | pH ₂ (r) |
| | [%] | [%] | | |
| 1 | 8 | 10 | 6,88 | 6,35 |
| 2 | 8 | 20 | 6,70 | 6,44 |
| 3 | 20 | 10 | 6,67 | 6,08 |
| 4 | 20 | 20 | 6,55 | 5,58 |
| 5 | 14 | 15 | 6,60 | 6,13 |

Kde: $pH_1 (r)$ označuje pH filmotvorného roztoku před dobou reakce a $pH_2 (r)$ označuje pH roztoku po době reakce.

Tabulka 4: Technologické podmínky síťování kolagen-elastinového hydrolyzátu dialdehydem karboxymethylcelulózy

Připravil se 15 % (w/v) roztok hydrolyzátu. Byly připraveny všechny experimenty na základě sledovaných technologických parametrů (viz. Tabulka 4). Do kádinky byla přidána navážka 6 g hydrolyzátu a 25 ml destilované vody. Směs byla míchána za mírného zvýšení teploty (přibližně 40 °C) na magnetickém míchadle do úplného rozpuštění hydrolyzátu. K roztoku hydrolyzátu byla přidána navážka glycerinu, podle faktoru B, předem rozmíchána na magnetickém míchadle v 5 ml destilované vody. Do další kádinky bylo přidáno 5 ml destilované vody, ve kterém byla na magnetickém míchadle rozmíchána navážka dialdehydu karboxymethylcelulózy, podle faktoru A. Se vzrůstající teplotou až k varu byl roztok míchán do úplného rozpuštění DCMC, po dobu 30 minut, a následně přidán k roztoku hydrolyzátu. Kompletní směs byla dalších 5 minut míchána na magnetickém míchadle. Poté bylo změřeno pH roztoku a zaznamenáno jako $pH_1 (r)$ směsi před dobou reakce (viz. Tabulka 4). Na kádinku s filmotvorným roztokem byl vyznačen objem odpovídající 40 ml, a s nasazeným víčkem byla kádinka uložena do inkubátoru při teplotě 60 °C po dobu 4 hodin. Po 2 hodinách inkubace byl obsah kádinky 2 minuty míchán na magnetickém míchadle a poté uložen zpátky do inkubátoru po dobu dalších 2 hodin při teplotě 60 °C. Po uplynutí doby inkubace byl překontrolován objem kádinky a případně doplněn na celkový objem odpovídající 40 ml destilovanou vodou. Směs byla míchána 5 minut na magnetickém míchadle a nakonec bylo změřeno a zaznamenáno pH roztoku po uplynutí doby reakce jako $pH_2 (r)$ (viz. Tabulka 4). Nakonec byl roztok hydrolyzátu vlit na silikonovou destičku o

rozměrech 125x69 mm uloženou v sušárně s cirkulací vzduchu, a v ní byl film sušen po dobu 48 hodin při teplotě 60 °C. Po vysušení filmu byla silikonová destička včetně filmu uložena do exsikátoru a v něm ponechána minimálně dalších 48 hodin před samotným testováním.

4.5 Síťování alginátovým dialdehydem

Během studia síťování kolagen-elastinového hydrolyzátu alginátovým dialdehydem (ADA) byly sledovány dva vybrané parametry: přidavek síťovadla a přidavek změkčovadla, doba reakce byla konstantní. Faktorové pokusy byly složeny ze dvou faktorů na dvou úrovních, s jedním centrálním experimentem, o jednom opakování.

Faktor A: Přidavek síťovadla: 8 – 14 – 20 % (vztaženo na navážku hydrolyzátu)

Faktor B: Přidavek změkčovadla: 10 – 15 – 20 % (vztaženo na navážku hydrolyzátu)

Doba reakce: konstantní – 4 h

| Technologické podmínky síťování | | | | |
|---------------------------------|----------|----------|---------------------|---------------------|
| Exp. č. | Faktor A | Faktor B | pH ₁ (r) | pH ₂ (r) |
| | [%] | [%] | | |
| 1 | 8 | 10 | 6,64 | 5,99 |
| 2 | 8 | 20 | 6,60 | 5,97 |
| 3 | 20 | 10 | 5,90 | 5,31 |
| 4 | 20 | 20 | 6,76 | 5,31 |
| 5 | 14 | 15 | 6,40 | 5,38 |

Kde: $pH_1 (r)$ označuje pH filmotvorného roztoku před dobou reakce a $pH_2 (r)$ označuje pH roztoku po době reakce.

Tabulka 5: Technologické podmínky síťování kolagen-elastinového hydrolyzátu alginátovým dialdehydem

Připravil se 15 % (w/v) roztok hydrolyzátu. Byly připraveny všechny experimenty na základě sledovaných technologických parametrů (viz. Tabulka 5).

Do kádinky byla přidána navážka 6 g hydrolyzátu a 25 ml destilované vody. Směs byla míchána za mírného zvýšení teploty (přibližně 40 °C) na magnetickém míchadle do úplného rozpuštění hydrolyzátu. K roztoku hydrolyzátu byla přidána navážka glycerinu, podle faktoru B, předem rozmíchaná na magnetickém míchadle v 5 ml destilované vody. K navážce ADA, podle faktoru A, bylo přidáno 5 ml destilované vody a roztok byl míchán na magnetickém míchadle za postupného zvyšování teploty až k varu do úplného rozpuštění síťovadla. Poté byl roztok síťovadla přidán k roztoku hydrolyzátu spolu s dalšími 5 ml destilované vody použité pro vypláchnutí kádinek, ve kterých byly připraveny roztoky se síťovadlem a změkčovadlem. Směs byla následně míchána na magnetickém míchadle po dobu 5 minut, poté bylo změřeno a zaznamenáno pH jako pH_1 (r) roztoku před dobou reakce (viz Tabulka 5).

Na kádince byla vyznačena hladina odpovídající celkovému objemu 40 ml. Kádinka s roztokem byla opatřena víčkem a vložena do inkubátoru, ve kterém byla uložena po dobu 4 hodin při teplotě 60 °C. Po dvou hodinách inkubace byl roztok rozmíchán na magnetickém míchadle po dobu 2 minut a poté opět uložen na další dvě hodiny k inkubaci.

Po uplynutí reakční doby byl roztok rozmíchán po dobu 5 minut na magnetickém míchadle, poté byl překontrolován a případně upraven celkový objem roztoku na 40 ml destilovanou vodou. Nakonec byla změřena hodnota pH a označena jako pH_2 (r) filmotvorného roztoku po uplynutí reakční doby (viz. Tabulka 5). Poté byl roztok hydrolyzátu vlit na silikonovou destičku o rozměrech 125x69 mm uloženou v sušárně s cirkulací vzduchu, ve které byl film sušen po dobu 48 hodin při teplotě 60 °C. Po vysušení filmu byla silikonová destička i s filmem uložena do exsikátoru, a v něm ponechána minimálně dalších 48 hodin před samotným testováním.

4.6 Síťování transglutaminázou

Během studia síťování kolagen-elastinového hydrolyzátu transglutaminázou (TG) byly sledovány dva vybrané parametry: přidavek síťovadla a přidavek změkčovadla, doba reakce byla konstantní. Faktorové pokusy byly složeny ze dvou faktorů na dvou úrovních, s jedním centrálním experimentem, o jednom opakování.

Faktor A: Přídavek síťovadla: 2 – 5 – 8 % (vztaženo na navážku hydrolyzátu)

Faktor B: Přídavek změkčovadla: 10 – 15 – 20 % (vztaženo na navážku hydrolyzátu)

Doba reakce: konstantní – 8 h

| Technologické podmínky síťování | | | | | | |
|---------------------------------|----------|----------|------------------------|------------------------|------------------------|---------------------|
| Exp. č. | Faktor A | Faktor B | pH ₁ (r) | V ₁ [ml] | pH ₂ (r) | V ₂ [ml] |
| | [%] | [%] | | | | |
| 1 | 2 | 10 | 7,41 | 1,15 | 10,09 | 0,80 |
| 2 | 2 | 20 | 7,43 | 1,43 | 10,08 | 0,84 |
| 3 | 8 | 10 | 7,42 | 1,45 | 10,07 | 0,76 |
| 4 | 8 | 20 | 7,40 | 1,25 | 10,05 | 0,85 |
| 5 | 5 | 15 | 7,43 | 1,58 | 10,10 | 0,70 |

Kde: $pH_1(r)$ označuje pH filmotvorného roztoku před dobou reakce a $V_1 [ml]$ objem 1 M NaOH potřebný k úpravě pH roztoku na $pH_1(r)$; $pH_2(r)$ označuje pH roztoku po době reakce a $V_2 [ml]$ objem 5 M NaOH potřebný k úpravě pH roztoku na $pH_2(r)$.

Tabulka 6: Technologické podmínky síťování kolagen-elastinového hydrolyzátu transglutaminázou

Připravil se 15% (w/v) roztok hydrolyzátu. Byly připraveny všechny experimenty na základě sledovaných technologických parametrů (viz. Tabulka 6). Do kádinky byla přidána navážka 6 g hydrolyzátu a 25 ml destilované vody. Směs byla míchána za mírného zvýšení teploty (přibližně 40 °C) na magnetickém míchadle do úplného rozpuštění hydrolyzátu. V druhé kádince byla na magnetickém míchadle rozmíchána navážka glycerinu podle faktoru B s 5 ml destilované vody a poté byl roztok vlit do roztoku hydrolyzátu. Podle faktoru A byla následně k roztoku přidána navážka práškové transglutaminázy, spolu s dalšími 5 ml destilované vody použité pro spláchnutí navažovací lodičky a kádinky, ve které byl připraven roztok změkčovadla. Roztok byl míchán po dobu 20 minut při teplotě 40 °C, pH směsi bylo upraveno 1 M NaOH na hodnotu $7,40 \pm 0,2$, během míchání bylo kontrolováno a případně upraveno, nakonec bylo zaznamenáno pH jako $pH_1(r)$ roztoku před dobou reakce a celkový objem 1 M NaOH použitý k jeho úpravě jako V_1 (viz. Tabulka 6). Na kádinku byla poznačena ryska odpovídající hladině 40 ml a poté byla s nasazeným víčkem vložena

do inkubátoru. Inkubace filmotvorného roztoku probíhala po dobu 8 hodin při teplotě 55°C. Po uplynutí inkubační doby byl překontrolován objem kádinky a případně doplněn na objem odpovídající 40 ml destilovanou vodou. Na magnetickém míchadle byla směs míchána za mírně zvýšené teploty přibližně 55 °C po dobu 10 minut. Po rozmíchání bylo upraveno pH na hodnotu $10,00 \pm 0,20$ pomocí 5 M NaOH. Hodnota pH byla zaznamenána jako pH₂ (r) roztoku po uplynutí reakční doby a objem potřebný k jeho úpravě jako V₂ (viz. Tabulka 6). Nakonec byl roztok hydrolyzátu vlit na silikonovou destičku o rozměrech 125x69 mm uloženou v sušárně s cirkulací vzduchu a v ní byl film sušen po dobu 48 hodin při teplotě 60 °C. Následně byla silikonová destička i s filmem uložena do exsikátoru a v něm ponechána minimálně dalších 48 hodin.

4.7 Příprava nezesíťovaného filmu

Pro porovnání procentuální rozpustnosti zesíťovaných a nezesíťovaných filmů byly vytvořeny dva filmy bez přídavku síťovadla. Byl připraven 15 % (w/v) roztok hydrolyzátu. Do kádinky byla přidána navážka hydrolyzátu s 30 ml destilované vody. Směs byla míchána na magnetickém míchadle při mírně zvýšené teplotě (přibližně 40 °C) do úplného rozpuštění hydrolyzátu. Byl připraven 10 % a 20 % přídavek glycerinu (vztaženo na navážku hydrolyzátu), který byl smíchán s 5 ml destilované vody na magnetickém míchadle. Poté byl glycerinový roztok přidán k roztoku hydrolyzátu, spolu s dalšími 5 ml destilované vody použité pro výplach kádinky, a směs byla míchána dalších 10 minut na magnetickém míchadle při mírně zvýšené teplotě přibližně 40 °C. Bylo změřeno a zaznamenáno pH (r) roztoku (viz. Tabulka 7). Nakonec byly roztoky vlitý do silikonových destiček o velikosti 125x69 mm umístěných v sušárně s cirkulací vzduchu. Filmy byly sušeny při teplotě 60 °C po dobu 48 hodin. Po vysušení byly silikonové destičky s filmy vloženy do exsikátoru po dobu 48 hodin před dalším testováním.

| Exp. č. | Plastifikátor [%] | pH (r) |
|---------|-------------------|--------|
| 1 | 10 | 7,13 |
| 2 | 20 | 6,98 |

Kde: pH (r) označuje pH roztoku hydrolyzátu s plastifikátorem.

Tabulka 7: Příprava nezesíťovaného filmu z kolagen-elastinového hydrolyzátu.

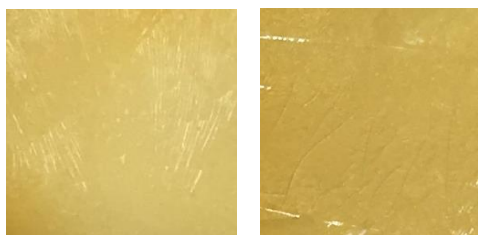
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Zesíťované filmy z kolagen-elastinového hydrolyzátu byly připraveny technologickým postupem lití. Po vysušení a uplynutí doby kondicionace v exsikátoru, byly filmy separovány od silikonových destiček a byly vytvořeny vzorky k testování rozpustnosti ve vodném prostředí. Jako referenční materiály byly použity nezesíťované filmy z kolagen-elastinového hydrolyzátu, které obsahovaly 10 % a 20 % přídavek plastifikátoru (vztaženo na navážku hydrolyzátu).

5.1 Filmy síťované glycerol diglycidyl etherem

Během přípravy roztoku síťovadla bylo problematické rozpustit navážku glycerol diglycidyl etheru (GDE) v destilované vodě. Na dně kádinky se vytvořily sraženiny a roztok byl mléčně zakalený. Bylo testováno, zda se síťovadlo rozpustí v kyselém, či zásaditém prostředí. Nejprve bylo do kádinky přidáno 10 ml destilované vody a navážka GDE (dvojnásobná navážka síťovadla podle Tabulky 1, Experimentu 2). Za současného míchání roztoku na magnetickém míchadle byla provedena úprava na pH $3,0 \pm 0,2$ za použití 2% roztoku HCl. Při pokojové teplotě se GDE nerozpouštěl, stejně jako v neutrálním prostředí vytvářel sraženiny a byl mléčně zakalený. Poté bylo přistoupeno k úpravě směsi 30% roztokem NaCl na pH $11,0 \pm 0,2$. Roztok byl míchán za zvýšené teploty. V zásaditém prostředí se GDE rozpouštěl lépe než v neutrálním a kyselém prostředí. Avšak byla patrná nehomogenita roztoku síťovadla.

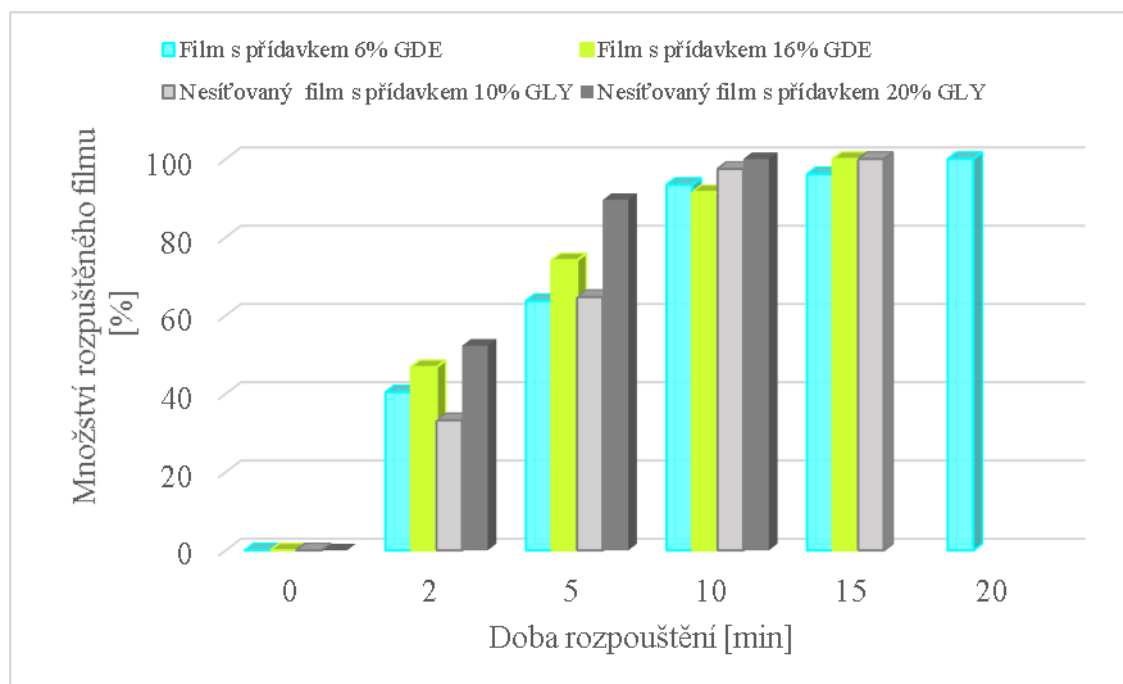
Připravené filmy byly velmi křehké, rozpadaly se na malé kousky. Nebylo možno vytvořit souvislý vzorek větší jak 10x10 mm. S vyšším obsahem síťovadla, zvyšující se teplotou a dobou reakce byla křehkost filmu vyšší a byl pozorován i tmavší barevný odstín filmu. Na Obrázku 31 jsou srovnány barevné odstíny filmů připravených s limitními hodnotami síťovadla.



Obrázek 31: Porovnání filmů síťovaných glycerol diglycidyl etherem, vlevo film s přísávkem 6 % GDE, vpravo film s přísávkem 16 % GDE.

Na Obrázku 32 je zobrazena rozpustnost filmů síťovaných GDE v různých časových intervalech. Nezesíťované filmy byly použity jako referenční vzorky. Je patrné, že se zvyšujícím se obsahem síťovadla byla rozpustnost ve vodném prostředí nižší. Avšak rozdíl v rozpustnosti mezi zesíťovanými a nezesíťovanými vzorky byl zanedbatelný. V 10 minutách byly filmy síťované GDE z přibližně 90 %. Rychlé rozpuštění filmů mohlo být způsobeno nedokonalým rozpuštěním síťovadla.

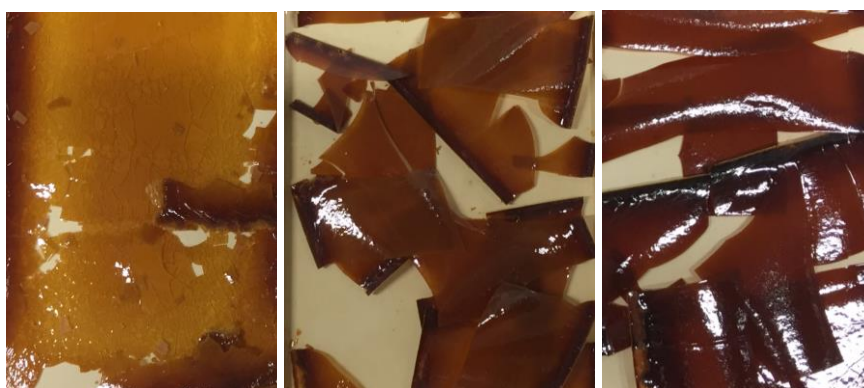
U filmů z kolagen-elastinového hydrolyzátu síťovaných GDE nebyly potvrzeny síťovací účinky.



Obrázek 32: Rozpustnost filmů síťovaných glycerol diglycidyl etherem v závislosti na době rozpouštění a srovnání s referenčními vzorky.

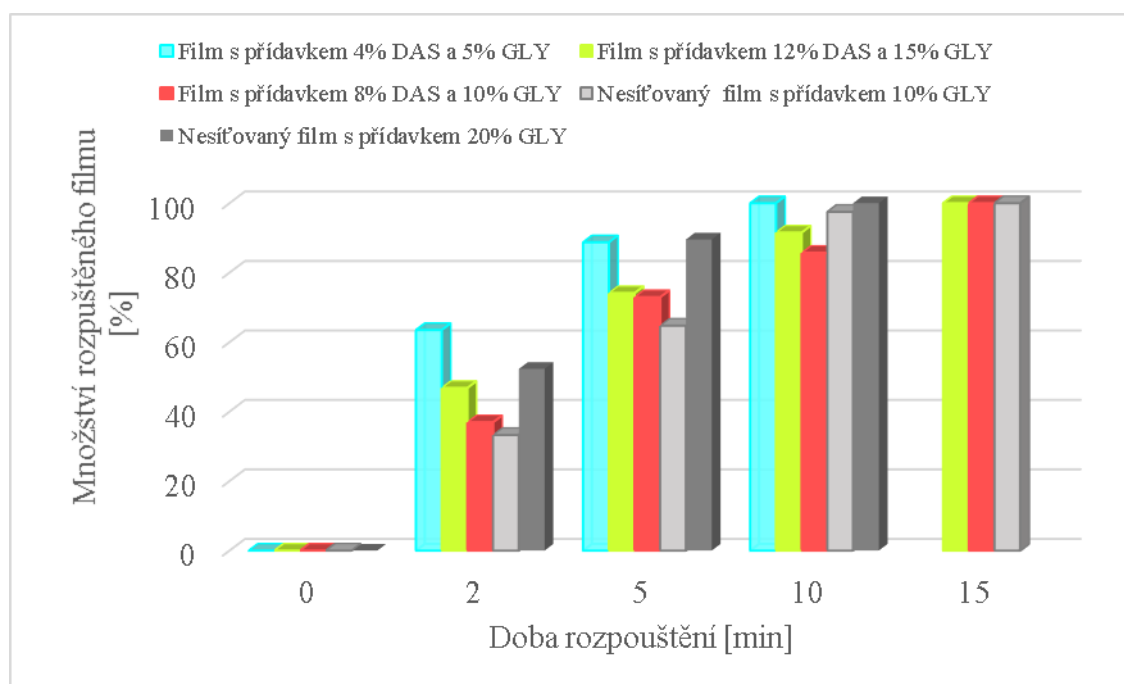
5.2 Filmy síťované dialdehydem škrobu

Filmy síťované dialdehydem škrobu (DAS) jsou zobrazeny na Obrázku 33. Film s nejnižším obsahem síťovadla, jak je patrné z obrázku zleva, byl velmi křehký a bylo komplikované z něj vytvořit vzorek větší jak 10x10 mm. Zatímco filmy s vyšším obsahem DAS (Obrázek 33 uprostřed a vpravo) byly pevnější a šly snadněji separovat od silikonové destičky. Se zvyšujícím se obsahem DAS a zvyšující se dobou reakce bylo možno pozorovat i tmavší barevný odstín hnědé barvy.



Obrázek 33: Filmy síťované dialdehydem škrobu

Na Obrázku 34 je zobrazena rozpustnost filmů síťovaných DAS v různých časových intervalech. Nezesíťované filmy byly použity jako referenční vzorky. Zesíťované vzorky se rychle rozpouštěly. Film s nejnižším podílem síťovadla byl už ve 2 minutách z 60 % rozpuštěn, zatímco referenční vzorky byly rozpuštěny z 30 a 50 %. Z obrázku je zřejmé, že mezi zesíťovanými a nezesíťovanými vzorky nejsou velké rozdíly v rozpustnosti. Síťovací účinek dialdehydu škrobu na kolagen-elastinový hydrolyzát nebyl potvrzen.



Obrázek 34: Rozpustnost filmů síťovaných dialdehydem škrobu o první sérii experimentů v závislosti na době rozpouštění a srovnání s referenčními vzorky.

Na základě výsledků rozpustnosti filmů byly upraveny technologické podmínky síťování a byla připravena druhá série experimentů.

Byly připraveny 15 % roztoky hydrolyzátu (w/v) na základě faktorových pokusů, s limitními hodnotami sledovaných parametrů. První směs s 10 % přísávkem síťovadla rozpuštěného v 5 ml 3 % roztoku HCl a 10 % přísávkem glycerinu, a druhá směs 20 % přísávkem síťovadla rozpuštěného v 10 ml 3 % roztoku HCl a 20 % přísávkem glycerinu (% přísávků vztaženy na navážku hydrolyzátu). Roztoky hydrolyzátu a glycerin byly přidány k roztoku hydrolyzátu a celkový objem směsi byl upraven tak, aby obsahoval 40 ml destilované vody. Po důkladném rozmíchání byly reakční roztoky inkubovány při teplotě 60 °C po dobu 4 hodin.

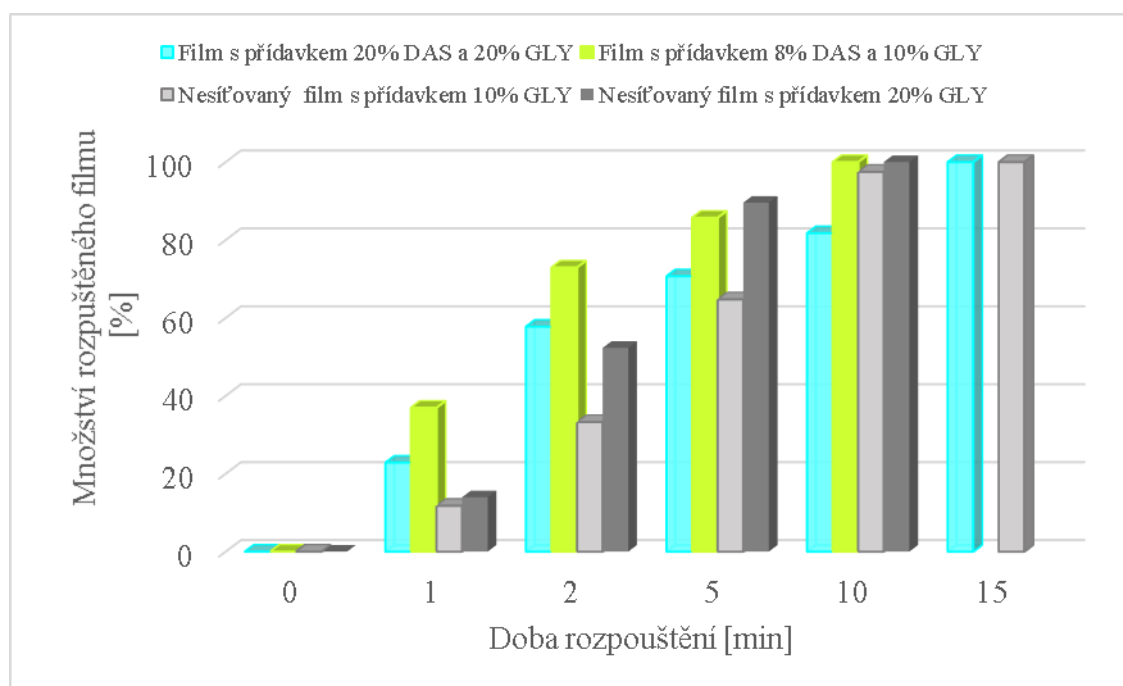
Následující kroky přípravy byly totožné jako v postupu síťování DAS (viz. Kapitola 4.2, Síťování dialdehydem škrobu).

Připravené filmy měly ještě tmavější hnědé zbarvení, než předešlé filmy zesíťované DAS. Film s vyšším obsahem síťovadla byl pevnější a tmavší než film s nižším obsahem síťovadla.

Na Obrázku 35 je zobrazena rozpustnost filmů síťovaných DAS (druhá série experimentů) v různých časových intervalech. Referenčními vzorky byly nezesíťované filmy. Se zvyšujícím se přidavkem síťovadla rozpustnost klesala, ale i přes to byl vzorek s vyšším obsahem DAS rozpuštěn již v 15 minutách, ve stejném čase, jako referenční vzorek s nižším obsahem plastifikátoru.

Ani v případě druhé série experimentů nebyly potvrzeny síťovací účinky DAS na kolagen-elastinový hydrolyzát a výsledky rozpustnosti byly srovnatelné s výsledky rozpustnosti první série experimentů. Zatímco ve studii autorů Langmaiera et. al. [12], kteří síťovali kolagenní hydrolyzát dialdehydem škrobu, byly prokázány síťovací účinky DAS. Konkrétně filmy síťované při teplotě 60 °C byly rozpuštěny až po 400 hodinách.

Neúčinnost síťování v případě uskutečněného experimentu v rámci diplomové práce mohla být způsobena odlišnými technologickými podmínkami síťování filmů.



Obrázek 35: Rozpustnost filmů síťovaných dialdehydem škrobu o druhé sérii experimentů v závislosti na době rozpouštění a srovnání s referenčními vzorky.

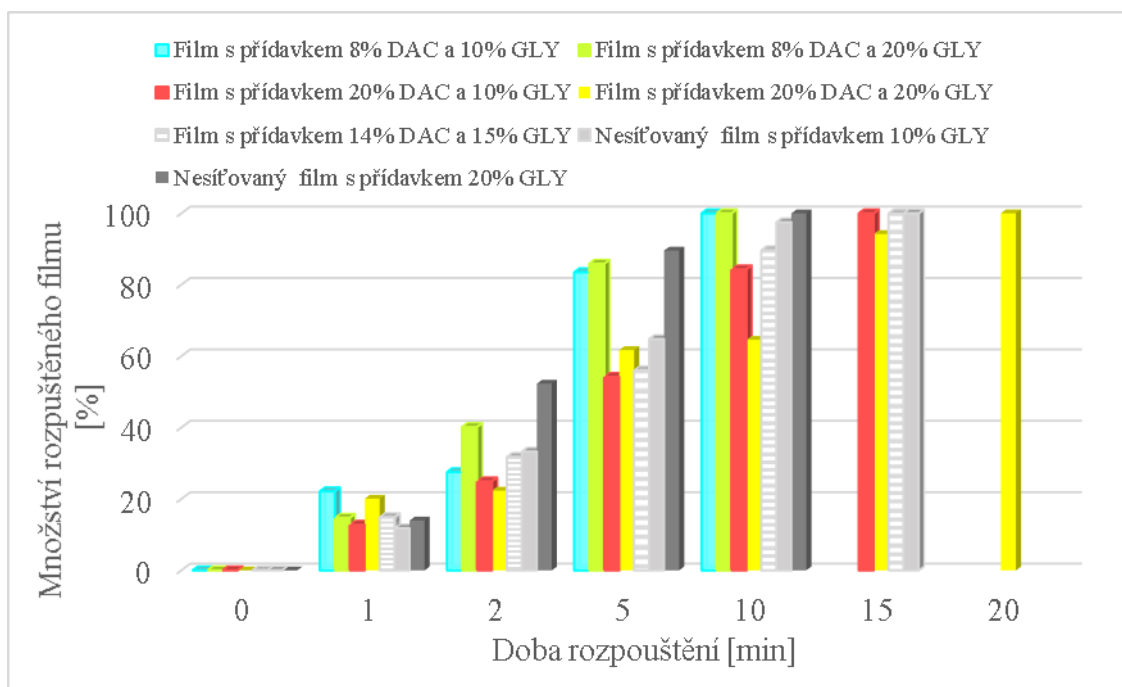
5.3 Filmy síťované dialdehydem celulózy

Filmy síťované dialdehydem celulózy (DAC) byly v barevných odstínech hnědé barvy, se zvyšujícím se obsahem síťovadla - od světle hnědé, po středně hnědou, na Obrázku 36 jsou srovnány barevné odstíny filmů připravených s limitními hodnotami síťovadla a plastifikátoru. Nejlépe šly od silikonových destiček separovat filmy s vyššími podíly síťovadla, ale ne takovým způsobem, aby mohl být separován celý film. Filmy se lámaly.



Obrázek 36: Porovnání filmů síťovaných dialdehydem celulózy, vlevo film s přísávkem 8 % DAC a 10 % GLY, vpravo film s přísávkem 20 % DAC a 20 % GLY.

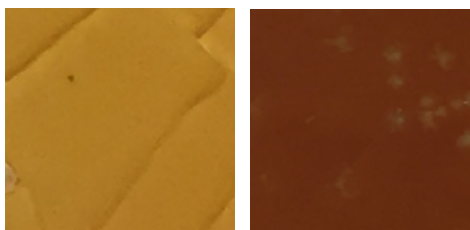
Na Obrázku 37 je zobrazena rozpustnost filmů síťovaných DAC v různých časových intervalech. Referenčními vzorky byly nezesíťované filmy. Se zvyšujícím se přísávkem síťovadla byla rozpustnost filmů pomalejší. Nejpomaleji se rozpustili filmy s přísávkem 20 % DAC a 20 % plastifikátoru ve 20 minutách, oproti tomu nejvyšší rozpustnost měly vzorky s 8 % podílem síťovadla, které se rozpustili o 10 minut dříve. A to ve stejném časovém intervalu jako nezesíťovaný referenční vzorek s 20 % přísávkem glycerinu. U filmů se stejnými přísávkem síťovadla a různými přísávkem plastifikátoru nebyly razantní rozdíly v rozpustnosti. Díky rychlému rozpuštění filmů nebyly v případě DAC potvrzeny síťovací účinky.



Obrázek 37: Rozpustnost filmů síťovaných dialdehydem celulózy v závislosti na době rozpouštění a srovnání s referenčními vzorky.

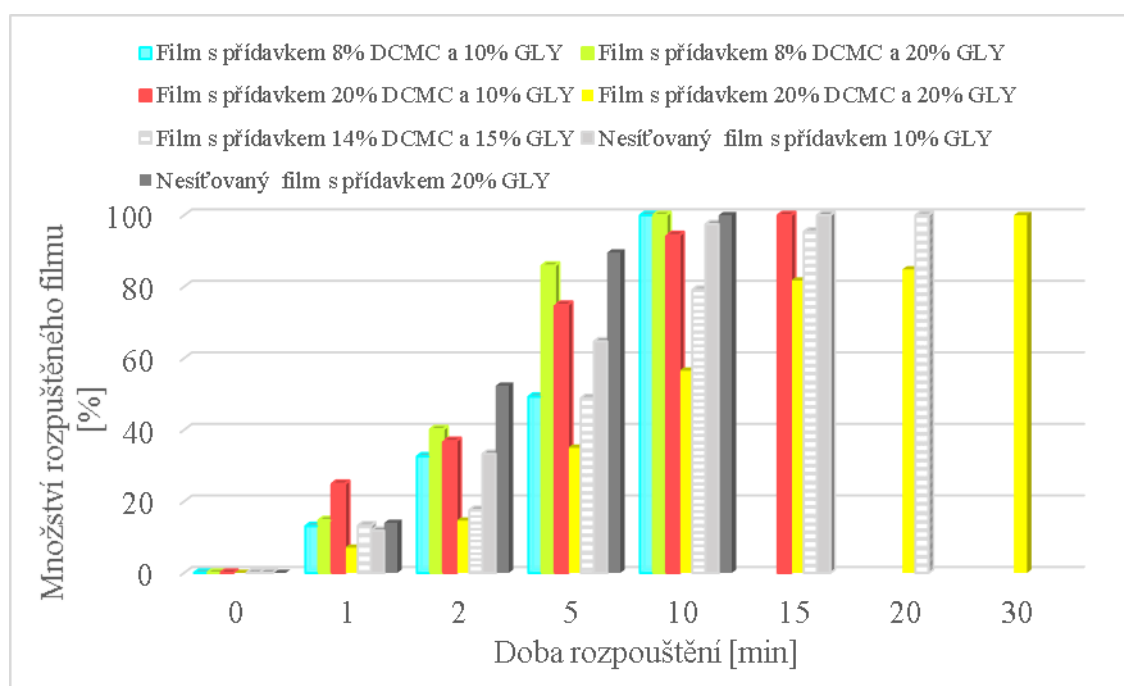
5.4 Filmy síťované dialdehydem karboxymethylcelulózy

U filmů síťovaných dialdehydem karboxymethylcelulózou (DCMC) byla se zvyšujícím se přísávkem síťovadla pozorována barevná změna od světle hnědé po středně hnědou barvu. Se zvyšujícím se procentem síťovadla a změkčovadla byly filmy pevnější, avšak ne do takové míry, aby šly v jednom kuse separovat od silikonové destičky. Byla pozorována lámavost filmu. Na Obrázku 38 jsou srovnány barevné odstíny filmů připravených s limitními hodnotami síťovadla a plastifikátoru.



Obrázek 38: Porovnání filmů síťovaných dialdehydem karboxymethylcelulózy, vlevo film s přísávkem 8 % DCMC a 10 % GLY, vpravo film s přísávkem 20 % DCMC a 20 % GLY.

Na Obrázku 39 je zobrazena rozpustnost filmů síťovaných DCMC v různých časových intervalech. Referenčními vzorky byly nezesíťované filmy. Zesíťované filmy s přídavkem 20 % DCMC a 20 % plastifikátoru byly rozpuštěny ve 30 minutách, tedy o 20 minut později než referenční vzorek se stejným obsahem síťovadla. Nejrychleji se rozpouštěly filmy s nejnižším obsahem DCMC a byly rozpuštěny ve stejnou dobu, jako referenční vzorek s 20 % plastifikátoru. Vzorky síťované 14 % DCMC a 15 % plastifikátoru byly rozpuštěny v 15 minutách, v rozmezí mezi rozpuštěním filmů s minimálním a maximálním přídavkem síťovadla. Je tedy patrné, že se zvyšujícím se přídavkem síťovadla rozpustnost filmu klesala a byl prokázán síťovací účinek DCMC.



Obrázek 39: Rozpustnost filmů síťovaných dialdehydem karboxymethylcelulózy v závislosti na době rozpouštění a srovnání s referenčními vzorky.

5.5 Filmy síťované alginátovým dialdehydem

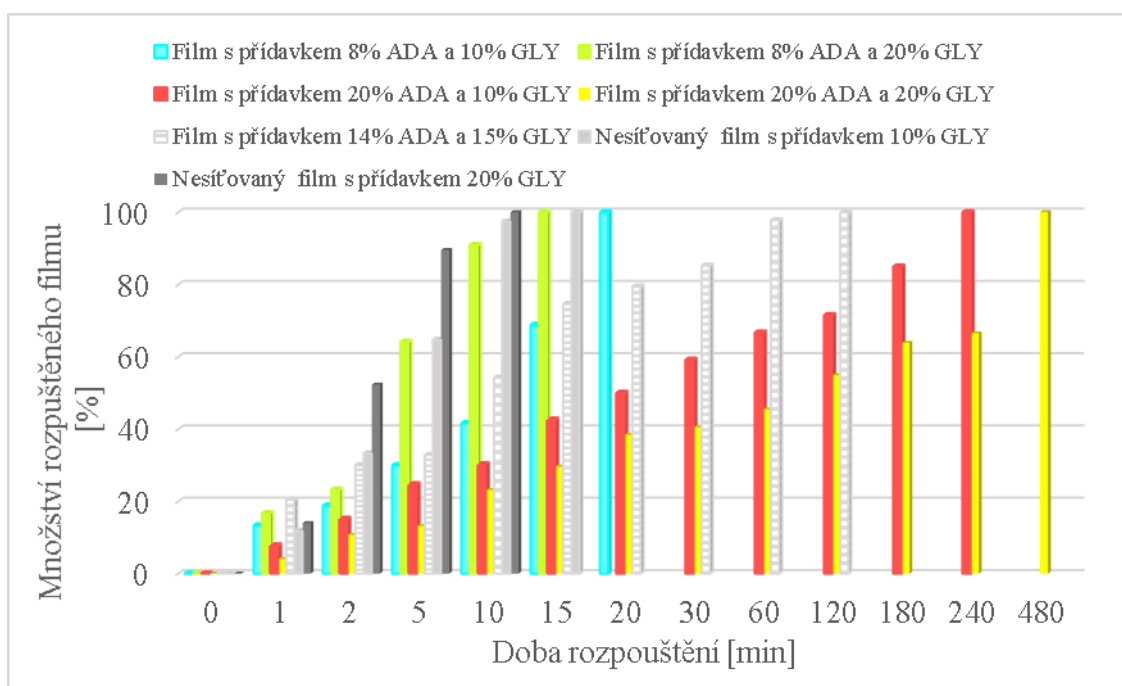
Během přípravy filmotvorného roztoku s obsahem alginátového dialdehydu (ADA) byla pozorována černohnědá tmavá barva. Vysušené filmy byly tmavě hnědé, až černé. Filmy s nejvyšším přídavkem změkčovadla šly snadněji separovat od silikonové destičky, než filmy s nejnižšími přídavky síťovadla, které se velmi lámaly. Obecně byla pozorována vy-

soká křehkost filmů a vzorky bylo nutno vytvořit s maximální opatrností. Na Obrázku 40 jsou srovnány barevné odstíny filmů připravených s limitními hodnotami síťovadla a plastifikátoru, jak je vidět na obrázku, rozdíl v barevnosti mezi filmy s nejnižším a nejvyšším podílem síťovadla byl razantní.



Obrázek 40: Porovnání filmů síťovaných alginátovým dialdehydem, vlevo film s přidavkem 8 % ADA a 10 % GLY, vpravo film s přidavkem 20 % ADA a 20 % GLY.

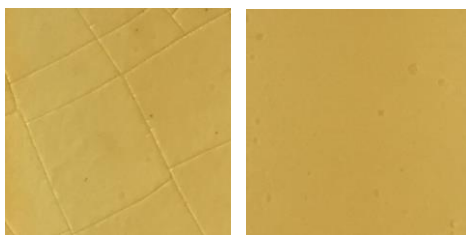
Na Obrázku 41 je zobrazena rozpustnost filmů síťovaných ADA v různých časových intervalech. Referenčními vzorky byly nezesíťované filmy. Z obrázku je zřejmé, že se zvyšujícím se přidavkem síťovadla, rozpustnost filmů klesala. Film s nejvyšším obsahem síťovadla a plastifikátoru se rozpustil ve 480 hodinách, doba potřebná k rozpuštění byla 48 násobně větší než u referenčního vzorku s přidavkem 20 % plastifikátoru. Film s přidavkem 20 % ADA a 10 % glycerinu byl rozpuštěn ve 240 minutách, tedy o 120 minut později, než film s přidavkem 14 % ADA a 15 % glycerinu. Zatímco filmy s nejnižšími přidavky ADA byly rozpuštěny v už 15 a 20 minutách, což může být způsobeno vyšším přidavkem plastifikátoru, než síťovadla. Byl pozorován síťovací účinek ADA na kolagen-elastinový hydrolyzát, který byl potvrzen i u autorů Xu et. al. [43], kteří ve své práci síťovali 15 % roztokem alginátového dialdehydu vepřové tkáně. Porovnali výsledné vlastnosti fixovaných tkání s tradičním síťovadlem glutaraldehydem a zjistili, že obě síťovadla mají srovnatelné síťovací účinky.



Obrázek 41: Rozpustnost filmů síťovaných alginátovým dialdehydem v závislosti na době rozpouštění a srovnání s referenčními vzorky.

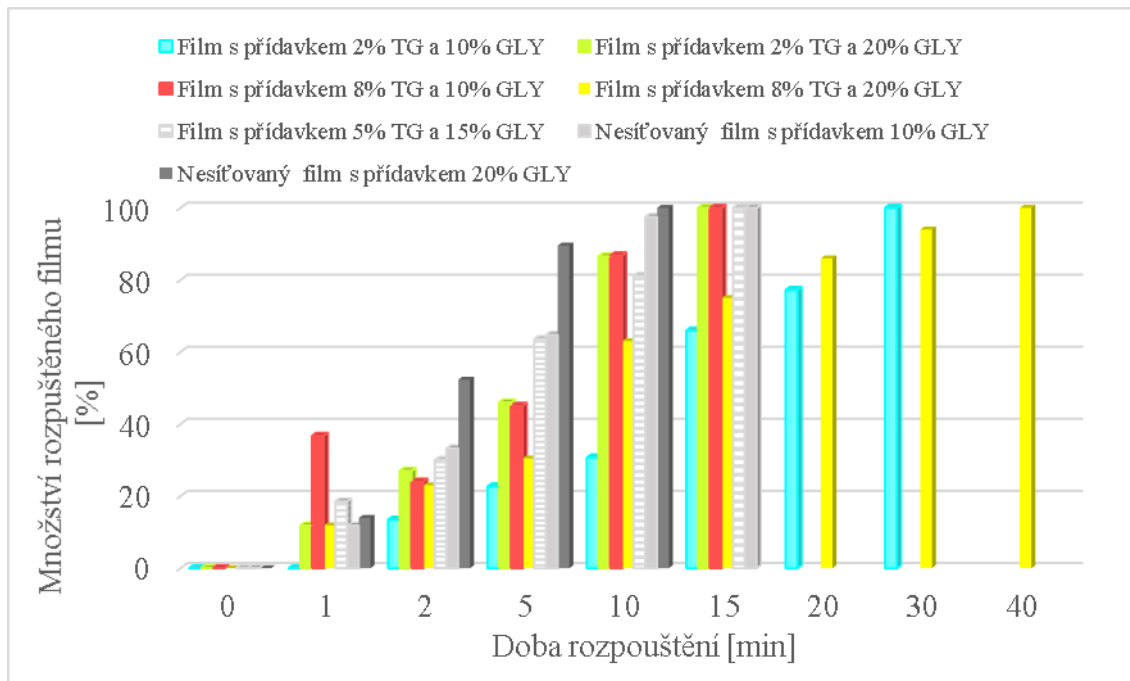
5.6 Filmy síťované transglutaminázou

Filmy síťované transglutaminázou měly světle žlutou barvu, která se se zvyšujícím se obsahem plastifikátoru a síťovadla, neměnila. Byla pozorována vysoká křehkost u filmu síťovaného nejvyšším podílem síťovadla a nejnižším podílem změkčovadla, film se lámal na malé části a nebylo snadné vytvořit vzorek větší jak 10x10 mm. Oproti tomu u filmu s nejnižšími hodnotami síťovadla a změkčovadla byla lámavost nižší. Ostatní filmy byly pevnější a šly snadněji separovat od silikonových destiček, film s nejvyšším obsahem síťovadla a změkčovadla šlo dokonce separovat v jednom kuse. Na Obrázku 42 jsou srovnány barevné odstíny filmů připravených s limitními hodnotami síťovadla a plastifikátoru, jak je vidět na obrázku, rozdíl v barevnosti mezi filmy s nejnižším a nejvyšším podílem síťovadla nebyl prakticky žádný. Na obrázku vlevo je zobrazena lámavost filmu po vysušení.



Obrázek 42: Porovnání filmů síťovaných transglutaminázou, vlevo film s přidavkem 2 % TG a 10 % GLY, vpravo film s přidavkem 8 % TG a 20 % GLY.

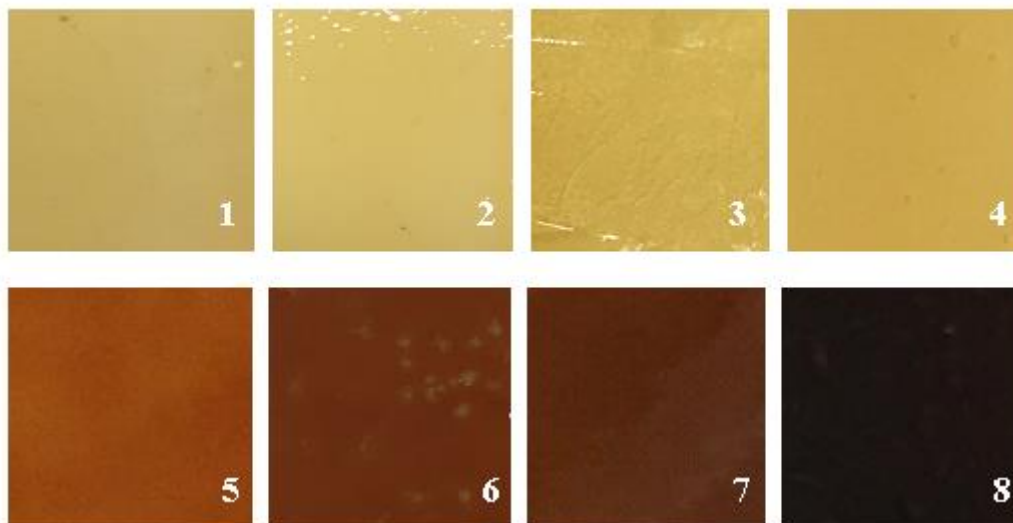
Na Obrázku 43 je zobrazena rozpustnost filmů síťovaných TG v různých časových intervalech. Referenčními vzorky byly nezesíťované filmy. Z obrázku je zřejmý vliv plastifikátoru. Nejpomaleji se rozpouštěl film s obsahem 8 % síťovadla a 20 % plastifikátoru, o 25 minut dříve byl rozpuštěn film s přidavkem 2% síťovadla a 20 % plastifikátoru. Zajímavé jsou výsledky rozpustnosti filmů se stejným podílem změkčovadla, ale přidavkem 2 % TG a 8 % TG. Film s vyšším přidavkem síťovadla byl rozpuštěn o 15 minut dříve, než film s nižším přidavkem síťovadla, což může mít spojitost s předem zmíněnou vysokou křehkostí a lámavostí filmu. V porovnání s referenčním nezesíťovaným vzorkem s přidavkem 20 % glycerinu a filmem zesíťovaným nejvyššími podíly síťovadla a změkčovadla je patrný rozdíl v rozpouštění. Bylo zjištěno, že síťováním byla prodloužena doba rozpustnosti o 30 minut. Síťovací účinky enzymu transglutaminázy na kolagen-elastinový hydrolyzát byly prokázány.



Obrázek 43: Rozpustnost filmů sířovaných transglutaminázou v závislosti na době rozpouštění a srovnání s referenčními vzorky.

6 ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ SÍŤOVÁNÍ

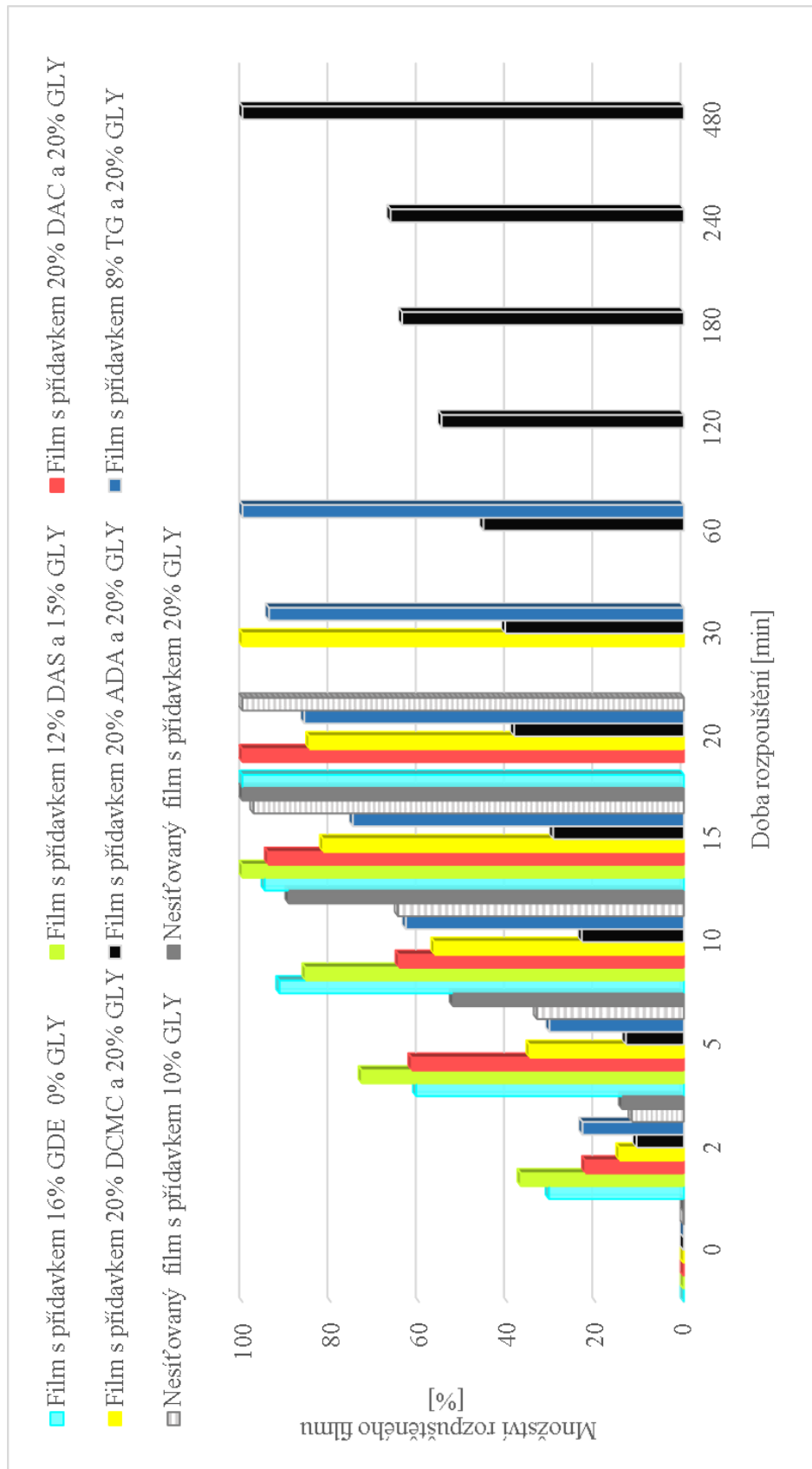
Barevnost zesíťovaných filmů byla porovnána s referenčními vzorky. Na Obrázku 44 jsou filmy seřazeny od světlých, po středně hnědé až černohnědé odstíny filmů. Kde: 1 představuje nezesíťovaný film s přídavkem 10 % plastifikátoru, 2 znázorňuje nezesíťovaný film s přídavkem 20 % plastifikátoru, 3 znázorňuje film s přídavkem 16 % GDE, 4 znázorňuje film s přídavkem 8 % TG a 20 % plastifikátoru, 5 znázorňuje film s přídavkem 20 % DAC a 20 % plastifikátoru, 6 je film s přídavkem 12 % DAS a 15 % změkčovadla, film 7 s přídavkem 20 % DCMC a 20 % DAC a poslední obrázek 8 představuje film s přídavkem 20 % ADA a 20 % plastifikátoru. Z obrázku je patrné, že nejsvětější barva byla v případě filmů síťovaných GDE a TG, která se nepatrně lišila od referenčních nezesíťovaných vzorků. Zatímco středně hnědé filmy byly pozorovány u filmů síťovaných DAC, DAS a DCMC. Až černohnědý odstín byl pozorován u filmu síťovaného ADA.



Obrázek 44: Srovnání barevnosti filmů s horními limitními hodnotami sledovaných parametrů ve srovnání s nezesíťovanými referenčními vzorky.

Zesíťované vzorky s maximálními přídávky síťovadel a plastifikátoru byly porovnány na Obrázku 45 zobrazujícího závislost množství rozpuštěného filmu na době rozpouštění. Nejvyšší síťovací účinek na kolagen-elastinový hydrolyzát byl pozorován v případě alginátového dialdehydu. Síťovací účinky měla i transglutamináza a dialdehyd karboxymethyl celulózy. Ve srovnání s alginátovým dialdehydem byl však síťovací účinek podstatně menší. Film s přídávkem transglutaminázy byl rozpuštěn ve 40 minutách, film s přídávkem dialdehydu karboxymethyl celulózy ve 30 minutách, což oproti 480 minutách v případě filmu síťovaného alginátovým dialdehydem je razantně méně. Nebyly potvrzeny síťovací účinky filmů síťovaných glycerol diglycidyl etherem a dialdehydem škrobu. Oba filmy byly rozpuštěny přibližně ve stejné době jako referenční nezesíťované filmy. Film s přídávkem dialdehydu celulózy měl mírně nižší rozpustnost než referenční vzorky, ale ve srovnání s transglutaminázou byl rozpuštěn o polovinu času rychleji.

Nejúčinnějším síťovadlem pro kolagen-elastinový hydrolyzát s ohledem na pomalé rozpouštění filmu ve vodném prostředí byl tedy alginátový dialdehyd, neprokázané síťovací účinky a nejrychlejší rozpustnost filmu ve vodném prostředí bylo zaznamenáno u dialdehydu škrobu.



Obrázek 45: Srovnání rozpustnosti filmů s maximálními přísadky síťovadel v závislosti na době rozpouštění a srovnáním s referenčními vzorky.

ZÁVĚR

Teoretická část diplomové práce se zabývala síťováním bílkovin chemickými, fyzikálními a enzymatickými metodami. Z dostupné vědecké literatury byly nastudovány mechanismy a podmínky, během kterých se nejčastěji bílkoviny jako kolagen, želatina a keratin, síťují. Dále bylo studováno, jakými metodami se zesíťované materiály, jako například filmy, folie, matrice, membrány, testují.

Na základě těchto poznatků byly stanoveny cíle pro praktickou část práce. Jako bílkovinný materiál byl zvolen kolagen-elastinový hydrolyzát alkalického typu, pocházející z hovězích šlach. Litím byly připraveny filmy z 15 % roztoku hydrolyzátu s přídavkem plastifikátoru a síťovadla. Byla testována tato síťovadla: glycerol diglycidyl ether, dialdehyd škrobu, dialdehyd celulózy, dialdehyd karoxyethylcelulózy, alginátový dialdehyd a transglutamináza. Byly sledovány technologické parametry, které by mohly nejvíce ovlivnit vlastnosti filmů (přídavek síťovadla, změkčovadla, doba a teplota reakce). Po vysušení a kondicionaci filmů byly provedeny testy rozpustnosti ve vodném prostředí při pokojové teplotě a byly vyhodnoceny síťovací účinky jednotlivých síťovadel.

Bylo zjištěno, že nejvyšší síťovací účinek ze všech použitých síťovadel měl alginátový dialdehyd. Film s přídavkem 20 % alginátového dialdehydu a 20 % plastifikátoru (vztaženo na navážku hydrolyzátu) se rozpouštěl 48x pomaleji, než referenční nezesíťovaný film s přídavkem 20 % plastifikátoru (vztaženo na navážku hydrolyzátu).

U všech zesíťovaných vzorků bylo pozorováno, že se stoupajícím podílem síťovadla v daném vzorku, rozpustnost filmu klesala. Nebyly potvrzeny síťovací účinky u dialdehydu škrobu a glycerol diglycidyl etheru. Nejvyšší rozpustnost ze všech použitých síťovadel byla u filmu s přídavkem 12 % dialdehydu škrobu a 15 % plastifikátoru (vztaženo na navážku hydrolyzátu), který se rozpustil již v 15 minutách. Film s přídavkem 16 % (vztaženo na navážku hydrolyzátu) GDE byl rozpuštěn ve 20 minutách, zatímco film síťovaný alginátovým dialdehydem v 8 hodinách.

Ukázalo se, že alginátový dialdehyd připravený oxidací alginátu sodného s jodistanem sodným, je účinným síťovadlem kolagen-elastinového hydrolyzátu a může být vhodnou alternativou k tradičním síťovadlům, mezi které patří například glutaraldehyd. Netoxické účinn-

ky předurčují alginátový dialdehyd k síťování bílkovinných matic pro aplikace v potravinářském a farmaceutickém průmyslu a medicíně.

Doporučuji se dále zabývat studiem síťování kolagen-elastinových hydrolyzátů, ale i jiných bílkovin, alginátovým dialdehydem.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Mokrejš, P., Langmaier, F.: *Aplikace přírodních polymerů*, Vyd. 1. Zlín, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008, ISBN 978-80-7318-674-6.
- [2] Hettaarachchy, N. S., Satō, K., Marschall, M. R., Kannan, A.: *Food proteins and peptides: Chemistry, Functionality, Interactions and Commercialization*, Boca Raton, CRC Press, 2012.
- [3] Li, Y., Yang, Y.: *Formaldehyde-Free Chemical and Enzymatic Crosslinking of Plant Proteins*, Research Journal of Textile and Apparel, 2011, 15, 41.
- [4] Heck, T., Faccio, G., Richter, M., Thöny-Meyer, L.: *Enzyme – Catalyzed Protein Crosslinking*, Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97, s. 461 – 475.
- [5] McMurry, J.: *Organická chemie*, Vyd. 6, Vysoké učení technické v Brně – Nakladatelství VUTIUM, 2004, ISBN 978-80-214-3291-8.
- [6] Chan, B. P., Chan, O. C. M., So, K. F.: *Effects of Photochemical Crosslinking on the Microstructure of Collagen and a Feasibility Study on Controlled Protein Release*, Acta Biomaterialia, 2008, 4, 6, s. 1627 – 1636.
- [7] Vandelli, M. A., Romagnoli, M., Monti, A., Gozzi, M., et al.: *Microwave-treated Gelatine Microspheres as Drug Delivery System*, Journal of Controlled Release, 2004, 96, 1, s. 67 – 84.
- [8] Reddy, N., Reddy, R., Jiang, Q.: *Crosslinking Biopolymers for Biomedical Applications*, Trends in Biotechnology, 2015, 33, 6, s. 362 – 369.
- [9] Reddy, N., Yang, Y.: *Potential of Plant Proteins for Medical Applications*, Trends in Biotechnology, 2011, 29, 10, s. 490 – 498.
- [10] Karim, A. A., Bhat, R.: *Fish Gelatin: Properties, Challenges, and Prospects as an Alternative to Mammalian Gelatins*, Food Hydrocolloids, 2009, 23, 3, s. 563 – 576.
- [11] Davidenko, N., Bax, D. V., Schuster, C. F., Farndale, R. W., et al.: *Optimisation of UV Irradiation as a Binding Site Conserving Method for Crosslinking Collagen-*

- based Scaffolds*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2016, 27, 1, 1 – 17.
- [12] Mokrejš, P., Janáčová, D., Langmaier, F., Mládek, M., et al.: *The Influence of Thermal Crosslinking on Solubility of Films Prepared from Collagen Hydrolysate*, Journal of American Leather Chemists Association, 2008, 103, s. 314 – 322.
- [13] Lapčík, L., Raab, M.: *Nauka o materiálech II*, Vyd. 2., Zlín, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2004, ISBN 80-7318-229-7.
- [14] Wang, W., Zhang, Y., Ye, R., Ni, Y.: *Physical crosslinking of Edible Collagen Casing*, International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 81, s. 920 – 925.
- [15] Tu, R., Schen S. H., Lin, D., Hata, C., et al.: *Collagen Stabilization and Modification Using Polyepoxide, Triglycidyl Isocyanurate*, Polymer Degradation and Stability, 2009, 94, s. 1684 – 1692.
- [16] Tanabe, T., Okitsu, N., Yamauchi, K.: *Fabrication and Characterization of Chemically Crosslinked Keratin Films*, Materials Science and Engineering C, 2004, 24, 3, s. 441 – 446.
- [17] Nicoletti, A., Fiorini, M., Paolillo, J., Dolcini, L., et al.: *Effects of Different Crosslinking Conditions on the Chemical-physical Properties of a Novel Bio-inspired Composite Scaffold Stabilized with 1,4-butanediol Diglycidyl Ether*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2013, 24, 1, s. 17 – 35.
- [18] Di, Y., Heath, R. J.: *Collagen Stabilization and Modification Using a Polyepoxide, Triglycidyl Isocyanurate*, Polymer Degradation and Stability, 2009, 94, 10, s. 1684 – 1692.
- [19] Langmaier, F., Mokrejš, P., Kolomazník, K., Mládek, M., Karnas, R.: *Crosslinking Epoxide Resins with Hydrolysates of Chrome-tanned Leather Waste*, Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2007, 88, 3, s. 857 – 862.
- [20] Zeeman, R., Dijkstra, P. J., van Wachem, P. B., van Luyn, M. J. A., et al.: *Successive Epoxy Carbodiimide Cross-linking of Dermal Sheep Collagen*, Biomaterials, 1999, 20, 10, 921 – 931.

- [21] Sung, H. W., Hsu, Ch. S., Lee, Y. S.: *Physical Properties of a Porcine Internal Thoracic Artery Fixed with an Epoxy Compound*, *Biomaterials*, 1996, 17, 24, s. 2357 – 2365.
- [22] Kupec, J., Pšejka, J., Hruzík, P.: *Síťování bílkovin epoxidy*, *Plasty a kaučuk*, 2004, 41, 1 – 2, s. 6 – 7.
- [23] Sung, H. W., Hsu, H. L., Shih, Ch. Ch., Lin, D. S.: *Cross-linking Characteristics of Biological Tissues Fixed with Monofunctional or Multifunctional Epoxy Compounds*, *Biomaterials*, 1996, 17, 14, s. 1405 – 1410.
- [24] Zeeman, R., Dijkstra, P. J., van Wachem P. B., van Luyn M. J. A., et al.: *Crosslinking and Modification of Dermal Sheep Collagen Using 1,4-Butanediol Diglycidyl Ether*, *Journal of Biomedical Materials Research*, 1999, 46, 3, s. 424 – 433.
- [25] Beneš, M., Likeš, J.: *Faktorové experimenty v průmyslovém výzkumu*, *Pokroky matematiky, fyziky a astronomie*, 1957, 2, 1, 18 – 30.
- [26] Enea, D., Henson, F., Kew, S., Wardale, J., et al.: *Extruded Collagen Fibres for Tissue Engineering Applications: Effect of Crosslinking Method on Mechanical and Biological Properties*, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2011, 22, 6, s. 1569 – 1578.
- [27] Skopinska-Wisnieewska, J., Wegrzynowska-Drzymalska, K., Bajek, A., et al.: *Is Dialdehyde Starch a Valuable Cross-linking Agent for Collagen/elatin Based Materials?*, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2016, 27, 4, s. 1 – 10.
- [28] Liu, Y., Acharya, G., Lee, Ch. H.: *Effects of Dialdehyde Starch on Calcification of Collagen Matrix*, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2011, 99A, 3, s. 485 – 492.
- [29] Langmaier, F., Mokrejš, P., Kolomazník, K., Mládek, M.: *Biodegradable Packing Materials from Hydrolysates of Collagen Waste Proteins*, *Waste Management*, 2008, 28, 3, s. 549 – 556.

- [30] Varca, G. H. C., Queiroz, R. G., Lugão, A. B.: *Irradiation as an Alternative Route for Protein Crosslinking: Cosolvent Free BSA Nanoparticles*, Radiation Physics and Chemistry, 2016, 124, s. 111 – 115.
- [31] Chen, R. N., Ho, H. O., Sheu, M. T.: *Characterization of Collagen Matrices Crosslinked Using Microbial Transglutaminase*, Biomaterials, 2005, 26, 20, s. 4229 – 4235.
- [32] Bertoni, F., Barbani, N., Giusti, P., Ciardelli, G.: *Transglutaminase Reactivity with Gelatine: Perspective Applications in Tissue Engineering*, Biotechnology Letters, 2006, 28, 10, s. 697 – 702.
- [33] Rodrigues, F. T., Martins, V. C. A., Plepis, A. M. G.: *Porcine Skin as a Source of Biodegradable Matrices: Alkaline Treatment and Glutaraldehyde Crosslinking*, Polímeros, 2010, 20, 2, 92 – 97.
- [34] Yoshioka, S. A., Goissis, G.: *Thermal and Spectrophotometric Studies of New Crosslinking Method for Collagen Matrix with Glutaraldehyde Acetals*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2008, 19, 3, 1215 – 1223.
- [35] Kanth, S. V., Ramaraj, A., Rao, J. R., Nair, B. U.: *Stabilization of Type I Collagen Using Dialdehyde Cellulose*, Process Biochemistry, 2009, 44, 8, s. 869 – 874.
- [36] Cui, D., Liu, Z., Yang, Y., Huang, R., et. al.: *Adsorption Performance of Creatinine on Dialdehyde Nanofibrillated Cellulose Derived from Potato Residues*, Biotechnology Progress, 2016, 32, 1, s. 208 – 214.
- [37] Štrausová, K., Dolejš, P.: *Vyžití faktorového plánu experimentů při poloprovozním měření a v předprojektové přípravě.*
- [38] Varma, A. J., Kulkarni, M. P.: *Oxidation of Cellulose under Controlled Conditions*, Polymer Degradation and Stability, 2002, 77, 1, s. 25 – 27.
- [39] Mu, Ch., Guo, J., Li, X., Lin, W., Li, D.: *Preparation and Properties of Dialdehyde Carboxymethyl Cellulose Crosslinked Gelatin Edible Films*, Food Hydrocolloids, 2012, 27, 1, s. 22 – 29.
- [40] Kanth, S. V., Nirenjana, M., Archana, T., N., et. al.: *Dialdehyde Alginic Acid – A Novel Biopolymeric Tanning Agent*, Journal of the American Leather Chemists Association, 2007, 102, 11, s. 353 – 361.

- [41] Bigi, A., Gojazzi, G., Panzavolta, S., Rubini, K., et. al.: *Mechanical and Thermal Properties of Gelatin Films at Different Degrees of Glutaraldehyde Crosslinking*, *Biomaterials*, 2001, 22, 8, s. 763 – 768.
- [42] Xu, Y., Huang, Ch., Li, L., Yu, X., et al.: *In Vitro Enzymatic Degradation of Biological Tissue Fixed by Alginate Dialdehyde*, *Carbohydrate Polymers*, 2013, 95, 1, s. 148 – 154.
- [42] Xu, Y., Li, L., Gu, Z., Zhang, X.: *Feasibility Study of a Novel Crosslinking Reagent (Alginate Dialdehyde) for Biological Tissue Fixation*, *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87, 2, s. 1589 – 1595.
- [43] <http://www.utb.cz/file/43786/>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|--------------------------------|---|
| ADA | alginátový dialdehyd |
| AgNO ₃ | dusičnan stříbrný |
| BDDGE | 1,4-butanediol diglycidyl ether |
| BSE | Bovine spongiform encephalopathy |
| °C | stupeň Celsia (jednotka teploty) |
| CH ₃ COOH | kyselina octová |
| Da | g.mol ⁻¹ (jednotka molekulové hmotnosti) |
| DAC | Dialdehyd škrobu |
| DAS | dialdehyd celulózy |
| DCMC | dialdehyd karboxymethylcelulózy |
| DSC | diferenční skenovací kalorimetrie |
| EDC | 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carboimid |
| EGDE | ethylen glycol diglycidyl ether |
| FTIR | infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací |
| g | gram (jednotka hmotnosti) |
| GDE | glycerol diglycidyl ether |
| GLY | glycerin |
| H ₂ SO ₄ | kyselina sírová |
| HCl | kyselina chlorovodíková |
| KOH | hydroxid draselný |
| min | minuta (jednotka času) |
| ml | mililitr (jednotka objemu) |
| mm | mm (jednotka délky) |

| | |
|-------------------|---|
| NaIO ₄ | jodistan sodný |
| NaOH | hydroxid sodný |
| SEM | skenovací elektronová mikroskopie |
| TEPIC | polyepoxy triglycidyl isokyanurát |
| UV | ultrafialové záření |
| w/v | weight/volume – hmotnost/objem (jednotka koncentrace) |
| XRD | rentgenová difrakční analýza |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|--|----|
| <i>Obrázek 1: Obecné schéma reakčního mechanismu chemického způsobu síťování bílkovin.</i> | 13 |
| <i>Obrázek 2: Obecné schéma reakčního mechanismu fyzikálního způsobu síťování bílkovin.</i> | 14 |
| <i>Obrázek 3: Obecné schéma reakčního mechanismu síťování bílkovin za pomoci enzymů.</i> | 16 |
| <i>Obrázek 4: Reakční mechanismus hydrolyzy.</i> | 18 |
| <i>Obrázek 5: Chemický vzorec glutaraldehydu [15].</i> | 20 |
| <i>Obrázek 6: Strukturní chemický vzorec dialdehydu škrobu [27].</i> | 21 |
| <i>Obrázek 7: Reakční schéma oxidace celulózy jodistanem sodným za vzniku dialdehydu celulózy [36].</i> | 23 |
| <i>Obrázek 8: Reakční schéma síťování kolagenu dialdehydem celulózy [35].</i> | 24 |
| <i>Obrázek 9: Chemický vzorec alginátového dialdehydu.</i> | 26 |
| <i>Obrázek 10: Reakční mechanismus síťování bílkoviny monofunkčním epoxidem [23].</i> | 28 |
| <i>Obrázek 11: Schematické znázornění maskování aminoskupin.</i> | 28 |
| <i>Obrázek 12: Reakční mechanismus síťování bílkoviny bifunkčním a vícefunkčním epoxidem [23].</i> | 28 |
| <i>Obrázek 13: Schematické znázornění pravého síťování [22].</i> | 28 |
| <i>Obrázek 14: Chemický vzorec 1,4-butanediol diglycidyl etheru.</i> | 29 |
| <i>Obrázek 15: Srovnání vzorků chrupavkovitých vrstev pomocí SEM, za podmínek přípravy při teplotě 37 °C, v roztoku uhličitanového pufru, kde: a) nezesíťovaná vrstva, b) 0,05 wt% BDDGE, c) 2 wt% BDDGE, d) 4 wt% BDDGE [17].</i> | 30 |
| <i>Obrázek 16: Chemické vzorce, zleva EDC, NHS, HAC-NHS.</i> | 31 |
| <i>Obrázek 17: Schematické znázornění síťovací reakce kolagenu s BDDGE při odlišných hodnotách pH [20].</i> | 31 |
| <i>Obrázek 18: Schematické znázornění síťovací reakce kolagenu s HAC-NHS a EDC/NHS [20].</i> | 32 |
| <i>Obrázek 19: Strukturní chemický vzorec EGDE.</i> | 33 |
| <i>Obrázek 20: Reakční mechanismus síťování kolagenu pomocí EDGE.</i> | 34 |
| <i>Obrázek 21: Struktura zesíťovaného kolagenu pomocí EDGE.</i> | 34 |

| | |
|---|----|
| Obrázek 22: Chemické strukturní vzorce, zleva TEPIC a GTE..... | 35 |
| Obrázek 23: Reakční mechanismus síťování bílkoviny transglutaminázou [4]. | 36 |
| Obrázek 24: Kolagen-elastinový hydrolyzát..... | 44 |
| Obrázek 25: Erlenmayerova baňka obalená aluminiovou folií, umístěná na třepačce..... | 45 |
| Obrázek 26: Celulózová membrána umístěná v nádobě s destilovanou vodou..... | 45 |
| Obrázek 27: Vysušený alginátový dialdehyd, vlevo po vysušení na plechu s nepřilnavou folií, vpravo na Petriho misce | 46 |
| Obrázek 28: Schematický postup přípravy filmů z kolagen-elastinového hydrolyzátu. | 48 |
| Obrázek 29: Roztok kolagen-elastinového hydrolyzátu během míchání na magnetickém míchadle. | 50 |
| Obrázek 30: Detail přípravy roztoku dialdehydu celulózy na počátku rozpuštění síťovadla (vlevo) a po rozpuštění (vpravo)..... | 53 |
| Obrázek 31: Porovnání filmů síťovaných glycerol diglycidyl etherem, vlevo film s přísávkem 6 % GDE, vpravo film s přísávkem 16 % GDE..... | 61 |
| Obrázek 32: Rozpustnost filmů síťovaných glycerol diglycidyl etherem v závislosti na době rozpouštění a srovnání s referenčními vzorky. | 61 |
| Obrázek 33: Filmy síťované dialdehydem škrobu | 62 |
| Obrázek 34: Rozpustnost filmů síťovaných dialdehydem škrobu o první sérii experimentů v závislosti na době rozpouštění a srovnání s referenčními vzorky..... | 63 |
| Obrázek 35: Rozpustnost filmů síťovaných dialdehydem škrobu o druhé sérii experimentů v závislosti na době rozpouštění a srovnání s referenčními vzorky..... | 64 |
| Obrázek 36: Porovnání filmů síťovaných dialdehydem celulózy, vlevo film s přísávkem 8 % DAC a 10 % GLY, vpravo film s přísávkem 20 % DAC a 20 % GLY. | 65 |
| Obrázek 37: Rozpustnost filmů síťovaných dialdehydem celulózy v závislosti na době rozpouštění a srovnání s referenčními vzorky. | 66 |
| Obrázek 38: Porovnání filmů síťovaných dialdehydem karboxymethylcelulózy, vlevo film s přísávkem 8 % DCMC a 10 % GLY, vpravo film s přísávkem 20 % DCMC a 20 % GLY..... | 66 |
| Obrázek 39: Rozpustnost filmů síťovaných dialdehydem karboxymethylcelulózy v závislosti na době rozpouštění a srovnání s referenčními vzorky..... | 67 |

- Obrázek 40: Porovnání filmů síťovaných alginátovým dialdehydem, vlevo film s přísávkem 8 % ADA a 10 % GLY, vpravo film s přísávkem 20 % ADA a 20 % GLY..... 68
- Obrázek 41: Rozpustnost filmů síťovaných alginátovým dialdehydem v závislosti na době rozpouštění a srovnání s referenčními vzorky. 69
- Obrázek 42: Porovnání filmů síťovaných transglutaminázou, vlevo film s přísávkem 2 % TG a 10 % GLY, vpravo film s přísávkem 8 % TG a 20 % GLY. 70
- Obrázek 43: Rozpustnost filmů síťovaných transglutaminázou v závislosti na době rozpouštění a srovnání s referenčními vzorky. 71
- Obrázek 44: Srovnání barevnosti filmů s horními limitními hodnotami sledovaných parametrů ve srovnání s nezesíťovanými referenčními vzorky..... 72
- Obrázek 45: Srovnání rozpustnosti filmů s maximálními přísávkami síťovadel v závislosti na době rozpouštění a srovnáním s referenčními vzorky..... 74

SEZNAM TABULEK

| | |
|---|-----------|
| <i>Tabulka 1: Technologické podmínky síťování kolagen-elastinového hydrolyzátu glycerol diglycidyl etherem</i> | <i>49</i> |
| <i>Tabulka 2: Technologické podmínky síťování kolagen-elastinového hydrolyzátu dialdehydem škrobu.....</i> | <i>51</i> |
| <i>Tabulka 3: Technologické podmínky síťování kolagen-elastinového hydrolyzátu dialdehydem celulózy.....</i> | <i>53</i> |
| <i>Tabulka 4: Technologické podmínky síťování kolagen-elastinového hydrolyzátu dialdehydem karboxymethylcelulózy.....</i> | <i>55</i> |
| <i>Tabulka 5: Technologické podmínky síťování kolagen-elastinového hydrolyzátu alginátovým dialdehydem.....</i> | <i>56</i> |
| <i>Tabulka 6: Technologické podmínky síťování kolagen-elastinového hydrolyzátu transglutaminázou.....</i> | <i>58</i> |
| <i>Tabulka 7: Příprava nezesíťovaného filmu z kolagen-elastinového hydrolyzátu.</i> | <i>59</i> |