

Využití směsí keratinových hydrolyzátů s chitosanem na přípravu tablet s řízenou rozpustností

Bc. Monika Drgová

Diplomová práce
2019



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Monika Drgová**
Osobní číslo: **T17290**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství polymerů**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Využití směsí keratinových hydrolyzátů s chitosanem na přípravu tablet s řízenou rozpustností**

Zásady pro vypracování:

Teoretická část práce bude zaměřena na stručnou rešerši informací o směsích keratinových hydrolyzátů s chitosanem, způsobech jejich přípravy a možnostech jejich využití.

Cílem praktické části práce bude nejprve příprava několika směsí keratinových hydrolyzátů s chitosanem a hodnocení jejich rozpustnosti. Dále budou připraveny tablety ze směsí s různou rozpustností a budou hodnoceny jejich vlastnosti, zejména možnosti řízeného rozpouštění v různém prostředí a množství uvolněných látek vázaných v tabletě.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

KORNILLOWICZ-KOWALSKA, Teresa a Justyna BOHACZ. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. Waste Management [online]. 2011, vol. 31, issue 8, s. 1689-1701 ěcit. 2015-03-05. DOI: 10.1016/j.wasman.2011.03.024. WHITFORD, David. Proteins: structure and function. Hoboken, NJ: J. Wiley & Sons, c2005, xiv, 528 s. ISBN 0-471-49893 databáze Knovel, Web of Science, Scopus, ScienceDirect

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Ondřej Krejčí, Ph.D.
Ústav inženýrství polymerů

Datum zadání diplomové práce:

2. ledna 2019

Termín odevzdání diplomové práce:

17. května 2019

Ve Zlíně dne 25. února 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Tomáš Sedláček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno:

Obor:

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 užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně

.....

²⁾ 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 nevydávalečně 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.

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, § 35 odst. 3:

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

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

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

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

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jim 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 přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce pojednává o směsích keratinového hydrolyzátu s chitosanem a jejich použití pro přípravu tablet. Teoretická část je zaměřena na ovčí vlnu, jako zdroj keratinového materiálu, keratin, metody hydrolýzy, chitosan a směsi KH a chitosanu. Praktická část se zabývá přípravou keratinového hydrolyzátu z ovčí vlny alkalicko-enzymovou hydrolýzou s účinností 65,2 %. Následnou dialýzou bylo získáno asi 20,5 % KH. Z keratinového hydrolyzátu byly připraveny směsi (naplánovány a vyhodnoceny metodou faktorových pokusů) s chitosanem (10 – 15 %), glycerolem (30 – 40 %), kyselinou askorbovou (2 %) a glutaraldehydem (0,5 %). Ze směsí byly tablety připraveny odléváním a následně byl sledován vliv složení na rozpustnost a uvolňování vitamínu C.

Klíčová slova: keratin, hydrolýza, chitosan, tablety

ABSTRACT

This master thesis deals with mixtures of keratin hydrolysate with chitosan and their use for tablet preparation. The theoretical part is focused on sheep wool as a source of keratin material, keratin, methods of hydrolysis, chitosan and mixtures of KH with chitosan. The practical part deals with preparation of keratin hydrolysate from sheep wool by alkaline-enzymatic hydrolysis with an efficiency of 65.2 %. Approx. 20.5 % of KH was obtained by subsequent dialysis. Mixtures (planned and evaluated by factorial tests) from keratin hydrolysate with chitosan (10 – 15 %), glycerol (30 – 40 %), ascorbic acid (2 %) and glutaraldehyde (0.5 %) were prepared. Tablets were prepared from these mixtures by casting. Their solubility and ascorbic acid amount released in time were studied.

Keywords: keratin, hydrolysis, chitosan, tablets

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Ondřeji Krejčímu, Ph.D. za odborné vedení, ochotný přístup, pomoc při experimentech, trpělivost a čas, který mi věnoval při tvorbě této práce. Poděkování patří také paní laborantce Miroslavě Žaludkové za pomoc v laboratoři. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mému partnerovi a rodině za trpělivost během mého studia.

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

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 VLNA.....	12
2 KERATIN	13
2.1 STRUKTURA KERATINU	13
2.1.1 Primární struktura.....	13
2.1.2 Sekundární struktura	14
2.1.3 Terciární struktura	15
2.1.4 Kvartérní struktura	15
2.2 VLASTNOSTI KERATINU	15
3 KERATINOVÉ HYDROLYZÁTY	17
3.1 ALKALICKÁ HYDROLÝZA	17
3.2 KYSELÁ HYDROLÝZA	18
3.3 ENZYMOVÁ HYDROLÝZA.....	18
3.4 REDUKČNÍ A OXIDAČNÍ HYDROLÝZA	18
3.5 KOMBINOVANÝ ZPŮSOB HYDROLÝZY	19
4 APLIKACE KERATINU A KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ	20
4.1 KERATINOVÉ FILMY	20
4.2 KERATINOVÉ SCAFFOLDY A VLÁKNA	20
4.3 KERATINOVÉ MEMBRÁNY	21
4.4 VYUŽITÍ KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ V ZEMĚDĚLSTVÍ	21
4.5 DALŠÍ VYUŽITÍ KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ.....	21
5 CHITOSAN.....	23
5.1 VYUŽITÍ CHITOSANU	24
5.2 MEDICÍNA A FARMACIE	24
5.3 KOSMETICKÝ PRŮMYSL.....	26
5.4 POTRAVINÁŘSKÝ PRŮMYSL	26
5.5 ÚPRAVA VODY	26
6 SMĚSI KERATINU A CHITOSANU	27
6.1 KERATIN-CHITOSANOVÉ MEMBRÁNY	27
6.2 NANOKOMPOZITNÍ HYDROGEL	28
6.3 KERATIN-CHITOSANOVÝ SCAFFOLD	28
II PRAKTICKÁ ČÁST	30
7 CÍL PRÁCE	31
8 MATERIÁLY A POSTUP PRÁCE.....	32

8.1	MATERIÁLY	32
8.2	PŘÍSTROJE, POMŮCKY, CHEMIKÁLIE	32
8.3	PŘÍPRAVA KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU	32
8.3.1	Úprava vlny	32
8.3.2	Odtučnění enzymem Lipex 100T	33
8.3.3	Rozklad vlny a separace	33
8.3.4	Dialýza	35
8.3.5	Výtěžnost hydrolýzy a dialýzy	36
9	ANALYTICKÉ ZKOUŠKY	37
9.1	STANOVENÍ SUŠINY	37
9.2	STANOVENÍ OBSAHU POPELOVIN	37
9.3	MIKROCHEMICKÉ STANOVENÍ DUSÍKU	38
9.4	STANOVENÍ MOLÁRNÍ HMOTNOSTI ELEKTROFORÉZOU	40
9.5	VÝSLEDKY ANALYTICKÝCH ZKOUŠEK	41
10	PŘÍPRAVA SMĚSÍ A TABLET	44
10.1	STANOVENÍ ROZPUSTNOSTI	45
10.2	STANOVENÍ MNOŽSTVÍ UVOLNĚNÉHO VIT. C	46
10.3	VÝSLEDKY STANOVENÍ ROZPUSTNOSTI A UVOLNĚNÉHO MNOŽSTVÍ VIT. C	47
11	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ	51
11.1	VLIV FAKTORŮ NA ROZPUSTNOST TABLET	51
11.1.1	Rozpustnost v čase 5 min	51
11.1.2	Rozpustnost v čase 20 min	54
11.1.3	Rozpustnost v čase 40 min	56
11.1.4	Rozpustnost v čase 70 min	58
11.1.5	Rozpustnost v čase 90 min	60
11.2	VLIV FAKTORŮ NA UVOLŇOVÁNÍ VIT. C	62
11.2.1	Uvolňování vit. C v čase 5 min	62
11.2.2	Uvolňování vit. C v čase 20 min	64
11.2.3	Uvolňování vit. C v čase 40 min	66
11.2.4	Uvolňování vit. C v čase 70 min	68
11.2.5	Uvolňování vit. C v čase 90 min	70
	ZÁVĚR	73
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	83
	SEZNAM OBRÁZKŮ	84
	SEZNAM TABULEK	86

ÚVOD

Ovčí vlna je materiál, který se hojně využívá díky své kvalitě v textilním průmyslu, kdy při jeho zpracování vzniká velké množství odpadu, který je potřeba dále zpracovávat. Jedná se o materiál bohatý na keratin, jenž obsahuje velké množství disulfidových vazeb, které způsobují jeho nerozpustnost ve vodě a také odolnost proteolytickým enzymům. Kvůli tomu jsou keratiny těžce zpracovatelné a také málo využívané. Jejich zpracovatelnost lze zlepšit rozštěpením dlouhých molekul keratinu pomocí hydrolýzy. Hydrolýzou se získávají keratinové hydrolyzáty využívající se v kosmetice, medicíně, potravinářství nebo zemědělství.

Keratin je fibrilární protein, který je hlavní složkou nejen ovčí vlny, ale také vlasů, štětin, peří, kopyt apod. Je to mechanicky velmi odolný protein, jenž je ve vodě nerozpustný. Odolává jak proteolytickým enzymům, tak fyzikálnímu a chemickému působení prostředí. Keratin má dvě struktury, a to α -keratin a β -keratin. Keratinové hydrolyzáty lze získat, jak již bylo řečeno výše, hydrolýzou, a to alkalickou, enzymovou, kyselou, redukční a oxidační, nebo jejich kombinací.

Keratiny a keratinové hydrolyzáty nalézají v dnešní době mnoho možností aplikací. Lze je využít v lékařství, zemědělství, potravinářství, ale také v kosmetice. Je možné je využít při tvorbě filmů, které slouží v lékařství, ale také jako obalový materiál v potravinářském průmyslu. Další aplikací jsou např. scaffoldy a vlákna nalézající uplatnění především ve tkáňovém inženýrství. Tyto materiály se aplikují také při mikroenkapsulaci, např. léčiv, při výrobě kosmetických přípravků, ale také při prodlužování vlasů.

Chitosan je deacetylovaný chitin, jenž je biokompatibilní a biodegradabilní materiál s antimikrobiální aktivitou. Hojně se využívá ve farmacii a medicíně při dermálním a perorálním podávání léčiv, ve tkáňovém inženýrství, v potravinářském a kosmetickém průmyslu, nebo při úpravě vody.

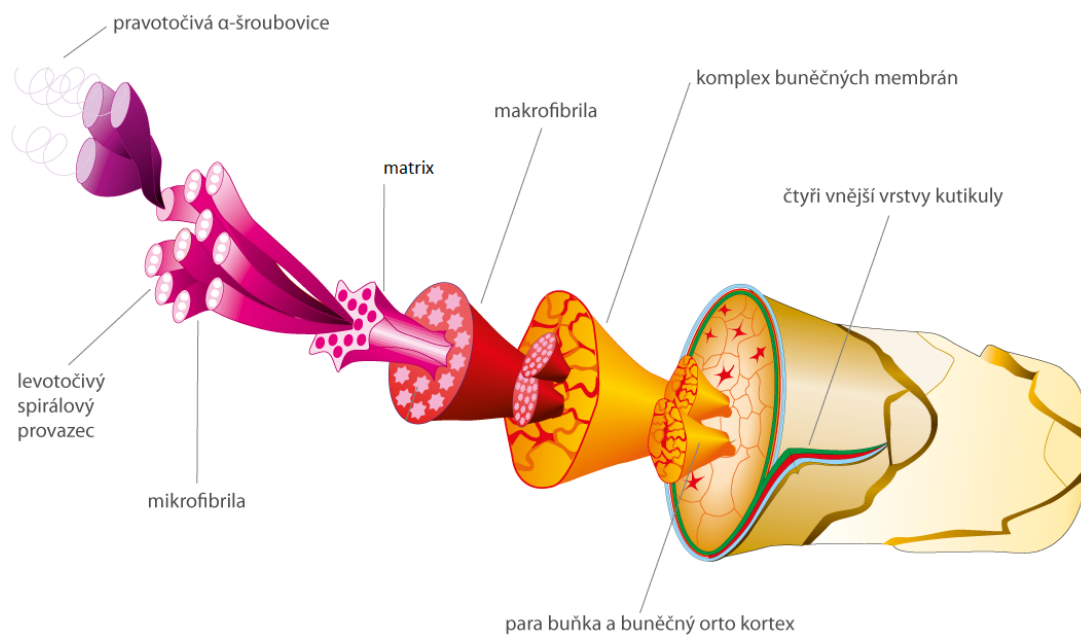
Keratinový hydrolyzát a chitosan se využívají k přípravě směsí, ze kterých se následně připravují např. nanokompozitní hydrogely, scaffoldy nebo membrány. Směsi lze využít v lékařských aplikacích, jako systémy pro transport léčiv, k hojení ran nebo ve tkáňovém inženýrství. Lze je aplikovat také v kosmetickém, potravinářském nebo zemědělském průmyslu.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VLNA

Vlna je typickým příkladem keratinového materiálu, jehož vlákna jsou hojně využívána v textilních aplikacích. Čisté vlákno vlny obsahuje asi 82 % keratinu s vysokým obsahem aminokyseliny (AMK) cystein. Dále obsahuje přibližně 17 % bílkovinného materiálu, nazývaný „nekeratinový“ materiál, který má výrazně nižší obsah cysteinu než keratinová složka vlny. Zbylé 1 % zahrnuje složku materiálu skládající se z lipidů a malého množství polysacharidů. [1 – 3]

Vlákna vlny, o průměru přibližně 20 μm , se skládají z kortexu a kutikuly. Kortex, nebo také kůra, tvoří vnitřní prostor a kutikula, zvaná pokožka, tvoří obal vnitřního prostoru. To, z čeho se vlněné vlákno skládá, je znázorněno na obrázku 1. Lze vidět, že mikrofibrily se skládají z α -helixů. Mikrofibrily jsou obklopeny matricí a jejich skládáním dojde k vytvoření makrofibril, které jsou obklopeny buněčnou membránou, kterou dále obklopuje kortex (kůra). [1, 4]



Obr. 1: Schéma struktury vlákna vlny [1]

Díky velkému obsahu keratinu má vlna vysokou molekulovou hmotnost. Dále má výbornou biokompatibilitu (snášlivost v biologickém prostředí) a za určitých podmínek biodegradabilitu (schopnost rozložit se). Vlákna vlny mají také výborné fyzikální vlastnosti díky přítomnosti chemických skupin na makromolekulách keratinu a jejich uspořádání. [1 – 3]

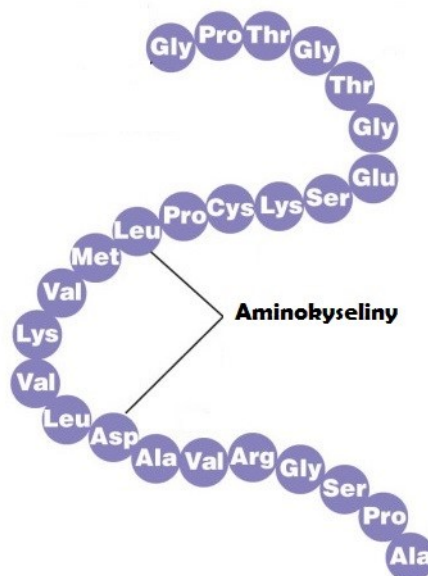
2 KERATIN

Keratin je protein (skleroprotein) patřící mezi vláknité, neboli fibrilární proteiny. Tato bílkovina je součástí vlasů, kůže, štětin, vlny, rohů, kopyt, peří apod. Jedná se o chemicky nereaktivní protein, který je mechanicky odolný, ve vodě nerozpustný. Keratiny mají mechanickou a obranou funkci. Známe 2 struktury keratinu, a to α -keratin nacházející se u savců a dále β -keratin vyskytující se u plazů a ptáků. Typickým zdrojem keratinu jsou kopyta, rohy, vlna, srst, chlupy, nehty, vlasy, peří, drápy, zobáky. Keratiny lze rozdělit na měkké a tvrdé. Měkké keratiny obsahují menší množství síry, než tvrdé keratiny. Díky svým vlastnostem, jako je biologická rozložitelnost a biokompatibilita, lze keratinový hydrolyzát využívat v mnoha oblastech. Používá se ve formě gelu, filmů, perliček, nanočástic a mikročástic, a to ve farmacii, medicíně, potravinářství a kosmetickém průmyslu. [1, 6 – 10]

2.1 Struktura keratinu

2.1.1 Primární struktura

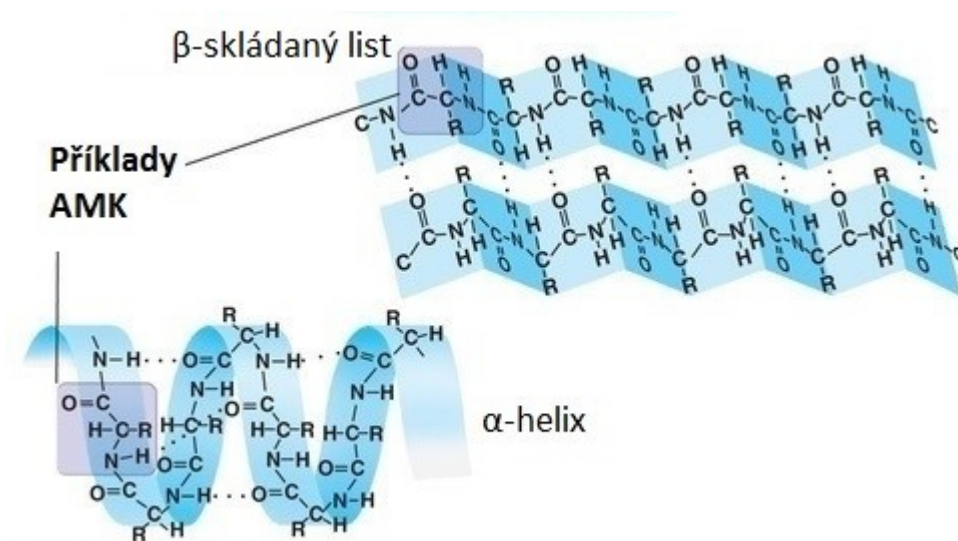
Primární struktura keratinů je dána řetězcem AMK, které jsou spojeny peptidovou vazbou. Řetězce se mohou lišit v počtu a sekvenci AMK a také v polaritě a náboji. AMK sekvence určuje vlastnosti a funkce keratinového vlákna. Keratiny se složením liší podle svého původu. Například keratiny nacházející se v kůži skotu, nebo lidské kůži jsou bohaté na AMK glycin, serin, leucin a kyselinu glutamovou. U savců je složení keratinů v měkkých a tvrdých tkáních srovnatelné. Aminokyselinová sekvence dále určuje jak sekundární a terciární, tak i kvartérní strukturu a povahu vazeb při případné interakci s jinými složkami cytoskeletu. Primární struktura je znázorněna na obrázku 2. [1, 11, 12]



Obr. 2: Primární struktura [2]

2.1.2 Sekundární struktura

Sekundární struktura je dána konformacemi α -helix a β -skládaný list. Tyto konformace jsou znázorněny na obrázku 3. Stabilizujícím prvkem u konformace α -helix nacházející se především u savců jsou vodíkové můstky, a to mezi $-\text{CO}$ a $-\text{NH}$ skupinami. Polypeptidové řetězce se v tomto případě stáčí převážně do pravotočivé šroubovice. U konformace β -skládaného listu jsou polypeptidové řetězce seřazeny rovnoběžně a stejně jako u konformace α -helix i zde jako stabilizační prvek působí vodíkové můstky mezi $-\text{CO}$ a $-\text{NH}$ skupinami. [1, 11, 12]

Obr. 3: Konformace α -helix, β -skládaný list a znázornění AMK jednotek [3]

2.1.3 Terciární struktura

Terciární struktura keratinu má podobu heterodimeru, který sestává ze dvou různých řetězců, a to z kyselého a zásaditého. Tato struktura udává uspořádání polypeptidových řetězců v prostoru. Řetězce jsou spojeny disulfidovými můstky, Van der Waalsovými silami a elektrokovalentní vazbou. Kromě těchto vazeb mohou mezi polypeptidovými řetězci působit také hydrofobní interakce. Terciární struktura určuje následné uspořádání celé molekuly v prostoru. [1, 11, 12]

2.1.4 Kvartérní struktura

Keratiny jsou schopny tvořit keratinová vlákna s komplexní kvartérní strukturou, včetně tvorby tetrameru (protofilament) a oktameru (protofibril, nebo také superhelix). Skládáním protofibril dojde k vytvoření mikrofirily. Následně z mikrofibril vznikají makrofibrily. [4]

Kvartérní strukturou se rozumí působení polypeptidových řetězců mezi sebou navzájem. Vzájemným působením dojde k vytvoření vyššího molekulárního celku. Stabilizačním prvkem u této struktury jsou hydrofobní síly, disulfidové, vodíkové a iontové vazby, tedy jak kovalentní, tak nekovalentní vazby. [1, 11, 15]

2.2 Vlastnosti keratinu

Keratin je nerozpustný protein ve vodě, v kyselinách a zásadách i v organických rozpouštědlech. Je biodegradabilní, biokompatibilní a odolný vůči proteolytickým enzymům, chemickému a fyzikálnímu působení prostředí. [5]

Keratiny se skládají z AMK. Mají vysoký obsah kyseliny glutamové, serinu a cysteinu. To je odlišuje od ostatních proteinů. Ve srovnání s kolagenem keratin obsahuje výrazně méně prolinu a glycinu. V AMK složení keratinu se nenachází hydroxyprolin. [10, 11]

Fyzikálně-chemické vlastnosti keratinů, molekulová hmotnost a isoelektrický bod, určují fyzikální vlastnosti v epiteliálních buňkách a tkáních. Ke stanovení fyzikálně-chemických vlastností je třeba rozštěpit disulfidové vazby pomocí rozpouštědel močoviny a redukčních činidel (např. merkaptoethanol). Narušením disulfidových vazeb dojde k rozpuštění keratinu a následně se separují podle molekulové hmotnosti a isoelektrického bodu pomocí jedno a dvourozměrné gelové elektroforézy. Rozdílnost v molekulové hmotnosti a isoelektrickém bodu jsou z důvodu různého počtu fosforylovaných a glykosylovaných aminokyselinových zbytků. [4]

Molekulová hmotnost keratinu, nacházejícího se u savců, se pohybuje v rozmezí od 40 do 70 kDa. Isoelektrický bod (pI) se liší u jednotlivých typů keratinů z důvodu jejich rozdílného AMK složení. pI se u keratinů pohybuje v intervalu přibližně od 4,7 po 8,5, kdy hodnota pI záleží na tom, ze které tkáně byl keratin získán. [4]

3 KERATINOVÉ HYDROLYZÁTY

Keratinové hydrolyzáty (KH) vznikají díky rozštěpení peptidových a disulfidových vazeb, které se nachází v keratinu, pomocí procesu zvaného hydrolyza. Keratin se podrobuje tomuto procesu z toho důvodu, že je sám nerozpustný, obtížně zpracovatelný a také těžce degradovatelný [6]. Dále lze jako nevýhodu keratinu uvést to, že je nestravitelný z důvodu nemožnosti jeho štěpení enzymy trypsinem nebo pepsinem. [1, 17]

Jak již bylo řečeno, KH se získávají hydrolyzou. Existuje několik typů hydrolyzy – alkalická, enzymová, kyselá, redukční nebo oxidační. V některých případech se využívá také kombinace jednotlivých typů hydrolyzy. Vhodnou kombinací je např. enzymová a alkalická hydrolyza. [6]

3.1 Alkalická hydrolyza

V případě alkalické hydrolyzy se jedná o nejstarší způsob provedení štěpení peptidových a disulfidových vazeb v keratinu. Při alkalické hydrolyze se využívají roztoky hydroxidů, jež mají vysoké koncentrace. Pokud tyto hydroxidy působí současně s vysokou teplotou, lze dosáhnout až 100 % přeměny nerozpustného keratinu na keratinový hydrolyzát. [7]

Při rozkladu zdroje keratinu (vlna, peří) lze použít až 12 % roztoku NaOH za teploty varu. Za těchto podmínek dochází ke změně AMK složení a snížení obsahu dusíku u hydrolyzátů. Hydrolyzáty získané touto metodou mají nízkou molekulovou hmotnost a vysoký obsah popelovin. [8]

U alkalické hydrolyzy můžeme také využít mikrovlnného ohřevu, kdy za současného použití roztoku hydroxidu draselného a hydroxidu sodného lze hydrolyzovat vlnu i s kůží, čímž dojde k získání jak hydrolyzátů keratinu, tak kolagenu [9]. Další možností je příprava KH pomocí roztoku NaOH za působení teploty 60 °C, kdy lze získat KH s nízkou molekulovou hmotností, a to v intervalu od 6,5 do 20 kDa [10]. Pro alkalickou hydrolyzu lze použít i jiných alkalických roztoků, než výše zmíněných. Při získávání KH touto metodou by byla účinnost vyšší při použití alkalických roztoků s vyšší koncentrací za působení vyšších teplot. [7]

3.2 Kyselá hydrolýza

Při provádění kyselé hydrolýzy se používají roztoky o vysoké koncentraci z důvodu velké odolnosti keratinových materiálů. Keratinový materiál se rozele na prášek a smíchá se s kyselinou sírovou. Tato směs se ohřeje na teplotu 70 °C po dobu 24 hod. Po uplynutí této doby se směs ohřeje na teplotu 130 °C a při této teplotě se směs udržuje po dobu 4 hodin. Poté se přidá deionizovaná voda, směs se ochladí na pokojovou teplotu a pH směsi se upraví na hodnotu 7. Po filtraci se získá kapalný KH. Takto získané hydrolyzáty se používají ke zvýšení produktivity při výrobě kyseliny citronové. [11]

3.3 Enzymová hydrolýza

Jedná se o velmi často používaný způsob hydrolýzy. Při této hydrolýze dochází k působení enzymu, a to nejčastěji proteinázy nebo keratinázy. Tyto enzymy produkují bakterie (např. rodu *Bacillus* a *Streptomyces*) a houby [7]. Výhodou této metody je malé dávkování enzymů a bezpečnější reakční podmínky. Nevýhodou je naopak dlouhý reakční čas, který činí 3 – 7 dní, složitá práce s bakteriemi, vysoká cena enzymů a udržování reakčních podmínek [12]. Při enzymové hydrolýze se rozemletý keratinový materiál smíchá s roztokem solí, následuje vytemperování na určitou teplotu a úprava pH. Poté se k reakční směsi přidají kultury bakterií. Pro ukončení hydrolýzy musí dojít k inaktivaci bakterií a enzymů pomocí změny teploty nebo pH [7]. U enzymové hydrolýzy jsou využívány například bakterie *Amycolatopsis keratiniphila* D2. Tento typ bakterií je vhodný pro enzymovou hydrolýzu při teplotě 40 °C, kdy enzym produkovaný těmito bakteriemi má nejvyšší účinnost [13]. Při použití kultury bakterií *Acremonium chrysogenum* je optimální teplota enzymové hydrolýzy 55 – 60 °C. [14]

3.4 Redukční a oxidační hydrolýza

Díky redukční hydrolýze můžeme rozložit až 80 % keratinového materiálu. Například umístěním keratinového materiálu do směsi 2-merkaptoethanolu, močoviny, ethylendiamintetraoctové kyseliny a pufru, kdy dochází ke štěpení disulfidových vazeb. [15]

Analogickým postupem redukční hydrolýzy je oxidační hydrolýza, při které oxidační činidla, jejichž ionty obsahující síru (např. $S_2O_5^{2-}$), rozkládají disulfidové vazby obsažené v keratinovém materiálu [16]. Tato metoda hydrolýzy může být provedena ve směsi 8M

roztoku močoviny, 0,5M roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ a 0,2M roztoku dodecylsulfátu sodného. Při použití této směsi k oxidační hydrolýze se pracuje za teploty 100 °C. [27, 28]

3.5 Kombinovaný způsob hydrolýzy

Kombinovaného způsobu hydrolýzy se využívá za účelem zvýšení výtěžnosti při rozkladu keratinového materiálu na keratinový hydrolyzát. Vhodnou kombinací je alkalická a enzymová hydrolýza. V prvním kroku se ke keratinovému materiálu přidá alkalická sloučenina a následně se po úpravě pH přidá vhodný enzym. Dále je možné kombinovat oxidační a enzymovou hydrolýzu. V tomto případě na keratinový materiál působí oxidační činidlo a následně se vazby v keratinu štěpí enzymy. [3, 29]

Možným provedením kombinovaného způsobu hydrolýzy je také použití enzymu Savinase 16.0LEX v roztoku sodného pufru obsahující hydrogensířičitan sodný a dodecylsulfát sodný. Při využití dodecylsulfátu sodného byla zjištěna vyšší aktivita enzymu. [17]

4 APLIKACE KERATINU A KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ

Keratinové hydrolyzáty se díky svým vlastnostem využívají v mnoha odvětvích průmyslu. Používají se v lékařství, zemědělství, potravinářství a v poslední době se využívá především v kosmetice. Při použití KH do konkrétní aplikace je třeba znát jejich vlastnosti - rozpustnost, tepelná stabilita, schopnost vytvořit film, nebo reologické vlastnosti. KH se kombinuje s dalšími materiály, jako je např. chitosan. Samotný KH i jeho směsi se využívají v mnoha aplikacích. [18]

4.1 Keratinové filmy

V polovině 90. let minulého století byly poprvé připraveny keratinové filmy. Tyto filmy, připravené pouze z keratinu, byly pro praktické použití nevýhodné z důvodu jejich křehkosti. Proto se začalo využívat glycerolu jako změkčovadla, což zajistilo, že fólie měly lepší vlastnosti, a to především průhlednost, pružnost a biodegradabilitu. Biologická rozložitelnost byla zajištěna lepším rozpuštěním z důvodu přídavku změkčovadla. [26, 32, 33]

V roce 2002 došlo ke zlepšení keratinových filmů díky přidání glycerolu a chitosanu. Přidáním chitosanu do směsi určené pro přípravu fólií bylo dosaženo zlepšení mechanických vlastností. Takto připravené filmy vykazovaly antibakteriální vlastnosti. [33, 34]

Keratinové filmy jsou využívány nejen pro lékařské potřeby, ale také jako obalový materiál pro potravinářský průmysl. Filmy slouží jako obalový materiál na drůbež, ryby a maso. [19]

4.2 Keratinové scaffoldy a vlákna

Keratiny jsou schopny samovolně vytvářet trojrozměrné struktury. Proto se začaly využívat k vývoji scaffoldů (tkáňové „lešení“) pro tkáňové inženýrství. Scaffoldy byly vytvořeny lyofilizací (sušení mrazem) vodných roztoků keratinu, čímž byla vytvořena tuhá a tepelně stabilní struktura. Tkáňové „lešení“ na bázi keratinu je vhodné pro použití v této oblasti z důvodu své biokompatibility a biodegradability. [20]

Dále se z keratinu mohou připravovat také vlákna, která jsou využívána pro biomedicínské aplikace. Tato vlákna mají velikost v rozměrech nano až mikrometrů a jsou náhodně uspořádány. Pro zvýšení mechanických vlastností těchto vláken se keratin kombinuje s polyethylenoxidem (PEO). Kombinuje se vodný roztok keratinu a prášek PEO v různých pomě-

rech, aby došlo k tvorbě materiálů, které mají různé chemické, fyzikální, reologické, mechanické a tepelné vlastnosti. Z vláken na bázi keratinu a PEO se získávají netkané textilie, jež slouží jako podpora adheze a růstu buněk, materiál podporující hojení ran nebo jako scaffold ve tkáňovém inženýrství. [33, 36 – 38]

4.3 Keratinové membrány

Kůže slouží jako ochrana těla proti mechanickému poškození nebo biochemickým činičům. Při jejím poškození není schopna regulovat teplotu, zajistit transport tekutin nebo zabránit bakteriální infekci. K regeneraci kůže, nebo také jiných tkání, se tedy používají keratinové membrány, které podporují růst tkáně. Membrány jsou biokompatibilní, strukturně pevné a propustné pro biomolekuly, jako jsou hormony nebo živiny. Keratinové membrány lze použít při léčbě popálenin, parodontálních onemocnění, kostí nebo zubů. [21]

4.4 Využití keratinových hydrolyzátů v zemědělství

Díky vysokému obsahu proteinu a esenciálních AMK, se KH s oblibou využívají jako krmivo nebo případné aditivum do krmných směsí. Jejich výhodou je snadné zpracování a nízká cena. KH pro tyto aplikace se získávají enzymovou hydrolýzou keratinu. Jako krmivo v minulosti sloužila keratinová moučka, což byl rozemletý keratin za vysoké teploty a tlaku. Nevýhodou takovéto přípravy byla ztráta AMK tryptofanu nebo methioninu. [40 – 42]

Díky vysokému obsahu dusíku slouží KH jako hnojiva nebo růstové stimulanty. Díky různé rozpustnosti těchto přípravků je zajištěno postupné uvolňování dusíku do půdy. Hydrolýzou lze za použití hydroxidu draselného a kyseliny fosforečné získat KH obsahující i další látky prospěšné půdě, a to draselné a fosforečné ionty. [22]

4.5 Další využití keratinových hydrolyzátů

Další možností využití KH je mikroenkapsulace. Pro přípravu mikrokapsulí se využívají vodné roztoky KH. Nejčastěji enkapsulovanými látkami jsou oleje, barviva, ochucovadla, vůně nebo léčiva. Mikroenkapsulace se často provádí ultrazvukovou vibrací. Tento proces přípravy mikrokapsulí se skládá z emulzifikace a chemického síťování proteinových molekul. Mikrokapsule se připravují z vodného roztoku, rozpouštědla (např. isopropylfenol) a

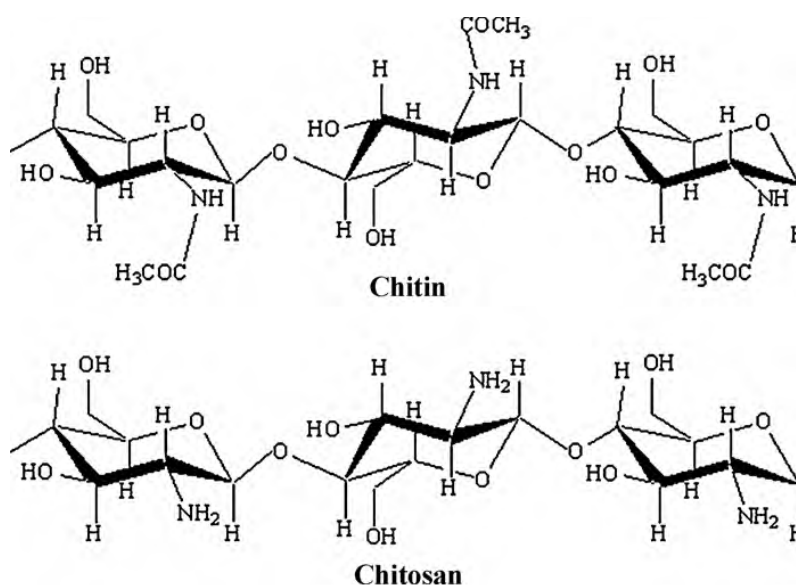
látky určené k enkapsulaci. U této směsi probíhá díky ultrazvukové sondě sonifikace, čímž vznikne suspenze, která je odstředěna. Po odstředění je separována horní vrstva, jež obsahuje mikrokapsule, a několikrát se promyje vodou. [19]

Keratinové hydrolyzáty se dále využívají v kosmetice jako prostředek k ošetření poškozených vlasů nebo pokožky. Používají se pro jejich schopnost vytvořit prostředí, které zajistí, že nedochází ke ztrátám vody ve vlasech a kůži. Z KH se vyrábí kosmetické přípravky. Např. šampóny, kondicionéry, laky na vlasy, nebo pleťové krémy. Díky keratinovému hydrolyzátu mohou být také prodlužovány a zahušťovány vlasy. KH zde tvoří spoj přírodních vlasů a vlasů napojovaných. [35, 43]

5 CHITOSAN

Chitosan se získává z chitinu, což je lineární polysacharid vyskytující se v tělech členovců (korýši, krevety, ...), v buněčné stěně hub a ve vnější kostře hmyzu [23]. Chitosan je tedy deacetylovaný derivát chitinu, neboli (1→4)-2-amino-2-deoxy-β-D-glukan (obr. 4). Chitosan je charakterizován jednou aminoskupinou v pozici C2 a dvěma hydroxylovými skupinami v pozicích C3 a C6. Jedná se o funkční a reakční jednotky. U chitosanu existují 4 krystalické polymorfy, mezi které patří tendonová forma, forma II a L2 (hydratované polymorfy) a nehydratovaná forma. Hydratovaná forma ve vodě snadno tvoří rozpustné soli s organickými a minerálními kyselinami. Nehydratovaná forma vzniká díky zahřívání hydratovaného chitosanu nad teplotu 200 °C. [24]

Díky volným aminoskupinám má chitosan velmi dobré vlastnosti, jako například biokompatibilita, biodegradabilita, antimikrobiální aktivita, nízká imunogenita a v neposlední řadě také netoxičnost [44, 45]. Jeho hydrofobní, aniontové a kationtové vlastnosti, mohou být řízeny modifikací jinými funkčními skupinami. Vzhledem k těmto vlastnostem je hojně využíván ve farmacii, medicíně, kosmetice, při čištění vody nebo při konzervaci potravin. Vzhledem k vyšší míře rozpustnosti v organických rozpouštědlech a vodě je pro biologické aplikace je chitosan vhodnější než chitin. V aplikacích se využívá se formě nanovláken, nanočástic, mikročástic, gelů, membrán, perliček a scaffoldů. [7, 46]



Obr. 4: Strukturální vzorec chitinu a chitosanu [25]

5.1 Využití chitosanu

Chitosan se díky svým vlastnostem, jako například biokompatibilita, biodegradabilita a vynikající mechanická pevnost, využívá ve farmacii a v oblasti medicíny jako náhrada kostních štěpů, hydrogely pro hojení ran, pro cílené dodávání léků nebo v tkáňovém inženýrství. Další uplatnění chitosanu je v kosmetice, potravinářství, nebo agrochemii. [47 – 49]

Molekulová hmotnost, stupeň acetylace a schopnost enkapsulace jsou vlastnosti, díky kterým je chitosan využíván jako matrice pro transport léčiv. Při transportu léčiv chitosan zajišťuje řízené uvolňování a cílení léčiva. Chitosan se využívá při podávání léčiv ve formě hydrogelů. Hydrogely se mohou aplikovat perorálně, rektálně, do očí, nebo do dýchacího ústrojí [26]. Rozpouští se v kyselých až neutrálních roztocích. Je mukoadhezivní, díky čemuž se využívá při přípravě léků obsahující antibiotika, analgetika nebo antiseptika. Degradaci chitosanu zajišťují enzymy lysozym a chitináza, nebo také kyselé prostředí. [47, 50]

5.2 Medicína a farmacie

Perorální podávání léčiv

Při perorálním podávání léčiva slouží hydrogely na bázi chitosanu jako matrice s řízeným uvolňováním. Zajistí transport léčivé látky do specifických míst, jako je ústní dutina, žaludek nebo tenké a tlusté střevo. V případě transportu léčiva do dutiny ústní lze léčit stomatitidu (zánět dutiny ústní), periodontální onemocnění (onemocnění dásní), plísňové a virové infekce a také rakovinu ústní dutiny. Hydrogely se dále používají pro cílení např. klarithromycinu, což je antibiotikum určeno k léčbě bakteriálních onemocnění dýchacího ústrojí nebo žaludečních potíží způsobených patogenní bakterií *Helicobacter pylori*. Dále mohou být podávány léčiva jako inzulin, nifedipinum, metronidazol, tetracyklin, amoxicillin nebo theophyllin. Studie in vivo dokazují, že léčivo má prodlouženou dobu uvolňování a působí antibakteriálně. [26]

Dermální podávání léčiv

Při dermálním podávání léčiv se využívají membrány nebo náplasti na bázi chitosanu. Tyto přípravky mají řízené uvolňování léčiva a také předem stanovenou rychlost uvolňování. Jsou připravovány kombinací chitosanu se škrobem a glutaraldehydem. Další možnou lát-

kou přidávanou do těchto membrán a náplastí je kurkumin, který slouží v léčbě diabetes II. typu, při snižování rizika vzniku Alzheimerovy choroby, nebo při redukci hmotnosti. [49, 51, 52]

Aplikace do očí

Při aplikaci kapek do očí je hlavním problémem retence v oku. Proto jsou oftalmické přípravky aplikovány pomocí hydrogelů, které zajistí, že léčivo je časově v delším kontaktu s rohovkou. Termosenzitivní hydrogely připravené z chitosanu a β -glycerol fosfátu vykazovaly zlepšení transkorneální propustnosti oproti vodným roztokům léčiva, minimalizaci vedlejších účinků a také méně častou aplikaci léčiva. Další teplotně citlivé hydrogely, složené z chitosanu a poly-N-isopropylakrylamidu, jsou připravovány pro dodávání léčiva timolol maleate. [26]

Další možné aplikace léčiv

Další možnou aplikací léčiva je aplikace do nosu. Při podání léčiv do nosu lze taktéž využít pro zlepšení uvolňování léčiva hydrogely na bázi chitosanu. Hydrogely umožňují lepší absorpci léčiv, protože usnadňují transport větších molekul přes povrch sliznice. Léčivou látkou může být u těchto hydrogelů aciklovir. [26]

Dále mohou být léčiva pomocí hydrogelů aplikována per rektum. Tato možnost nabízí alternativu intravenóznímu a injekčnímu podávání léčiv. Výhodou je lokální zacílení léků k orgánům. Uvolňování léčiv v tomto případě ovlivňuje viskozita hydrogelů. [26]

Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství (TI) zajišťuje transplantaci nebo regeneraci poškozených tkání nebo orgánů. V TI je pro své vlastnosti hojně využíván chitosan. V této oblasti se využívají chitosanové hydrogely podporující agregaci a proliferaci buněk. Chitosanový hydrogel obsahující rutin (rostlinný glykosid) lze použít jako injektovatelné obvazy pro hojení ran. Další možnou kombinací pro tvorbu hydrogelu zajišťujícího hojení ran je karboxymethyl chitosan s vodným roztokem želatiny. Hydrogely na bázi chitosanu a glycerolfosfátu lze použít pro regeneraci nervové soustavy. [49, 53, 54]

Další možné využití v medicíně a farmaci

Díky svým vlastnostem je chitosan využíván také jako materiál pro chirurgické stehy, zubní implantáty, náhradu kůže, nebo pro kontaktní čočky, dialyzační membránu, obvazy na rány, léčbu popálenin a poškozených kostí, náhrada kloubních chrupavek a šlach. [53, 55]

5.3 Kosmetický průmysl

Chitosan se využívá v kosmetice např. do přípravků na vlasy, jako jsou šampony, barvy na vlasy, spreje na vlasy a vlasová tonika. Díky schopnosti interagovat s vlasovým keratinem tvoří transparentní elastické fólie na vlasech, čímž jsou vlasy jemnější, pevnější a méně často dochází k jejich poškození. Díky absorpci chitosanu a chitosanových derivátů pod vlnovou délkou 400 nm se také využívají v péči o pokožku, konkrétně v opalovacích krémech, nebo dále jako hydratační krémy pro pokožku. [27]

5.4 Potravinářský průmysl

V potravinářství se chitosan a jeho deriváty využívají pro antimikrobiální a antioxidační vlastnosti. Protože je chitosan citlivý na vlhkost, kombinuje se s jinými biologicky odbouratelnými polymery. Ve formě fólií, kapslí nebo sáčků se aplikují na potraviny, jako je maso nebo ovoce a zelenina, ryby a mořské plody. Tyto obaly zabraňují mikrobiální kontaminaci potravin. Obaly jsou jedlé, prodlužují trvanlivost potravin a jsou bezpečné. Aplikují se také pro čištění a regulaci kyselosti v ovocných nápojích, zlepšení aroma potravin, zahuštění a zlepšení textury potravin, nebo ke stabilizaci barev. [57, 58]

5.5 Úprava vody

Chitosan se dále používá jako koagulant při úpravě povrchové vody. Jako koagulant je schopen odstraňovat huminové látky a snižovat zákal. Škodlivé látky jsou z vody odstraňovány díky protonizaci AMK v kyselém prostředí. Tím chitosan získá kladný náboj a váže na sebe záporně nabitě látky, kterými jsou nečistoty. Dochází k jejich destabilizaci, seskupování, čímž tvoří větší útvary, jež lze různými metodami separovat z vody, a to např. sedimentací nebo filtrací. Úpravu vody pomocí chitosanu koagulací ovlivňují fyzikální a chemické vlivy, jako pH, teplota nebo samotné složení upravované vody. [28]

6 SMĚSI KERATINU A CHITOSANU

V různých oblastech medicíny se aplikuje díky dobrým vlastnostem, jako je biodegradabilita a biokompatibilita, keratin. Jeho aplikace jsou však omezené kvůli jeho nezpůsobivosti odolávat mechanickému namáhání. Pro zlepšení těchto vlastností byly vyvinuty kompozity z keratinu a dalších přírodních polymerů, jako jsou proteiny a polysacharidy. Mezi proteiny používané pro tvorbu těchto kompozitů patří kolagen nebo želatina. Z polysacharidů jsou to celulóza, kyselina hyaluronová, nebo chitin, a to především v deacetylované podobě – chitosan. [29]

Směsi keratinu s chitosanem podporují adhezi a růst buněk, využívají se v lékařských aplikacích k hojení ran, jako systémy pro transport léčiv, povlaky nebo pro tkáňové inženýrství. Dále se mohou aplikovat v potravinářském, zemědělském nebo kosmetickém průmyslu. [29]

Z těchto směsí se připravují např. filmy, které mohou sloužit v lékařství při hojení ran. V 75 % kyselině octové jsou postupně rozpuštěny chitosan a keratin. Z připraveného roztoku jsou odlévány fólie. Aby fólie nebyly křehké, přidávají se ke směsím změkčovadla, jako například glycerol. Přídavkem chitosanu a glycerolu lze ovlivnit mechanické vlastnosti odlévaných fólií. V případě 5 hm. % přídavku chitosanu byly filmy velmi křehké, jejich flexibilita byla vylepšena větším přídavkem chitosanu – 10 hm. % a také přídavkem glycerolu. [30]

6.1 Keratin-chitosanové membrány

Výše zmíněné směsi z keratinu a chitosanu lze použít pro přípravu membrán určených pro podporu hojení ran. Takovýto kompozit by mohl vykonávat synergické funkce těchto polymerů, jako mechanická pevnost, biodegradabilita a biokompatibilita, lepší adheze a proliferace buněk. Směsi určené pro tuto aplikaci jsou zesíťovány pomocí UV záření. UV záření působí na směs po dobu 15 min, poté se vzorky suší na tmavém místě po dobu 16 až 24 hodin. Membrány jsou po vysušení transparentní a mají nažloutlou barvu. Jejich povrch je hladký, bez defektů. Tyto membrány mohou být využívány v lékařství jako materiál pro výrobu obvazů na rány a další aplikace. [31]

6.2 Nanokompozitní hydrogel

V dnešní době využívané krytí na rány má nevýhody v tom, že krytí se může lepit na ránu, je tuhé a nezajišťuje baktericidní aktivitu. Pro vylepšení krytí ran proto byly vyvinuty hydrogely na bázi keratinu a chitosanu s nanočásticemi oxidu zinečnatého. Jedná se o biokompatibilní kompozitní porézní obvaz zajišťující rychlejší hojení rány a baktericidní aktivitu. [32]

Keratin pro tuto aplikaci byl získáván z lidských vlasů. Dialyzovaný roztok keratinu byl vysušen lyofilizací, čímž byl získán keratinový hydrolyzát v podobě prášku. Dále byly připraveny nanočástice oxidu zinečnatého, a to technikou sol-gel. Byly připraveny roztoky $Zn(O_2CCH_3)$ ve vodě a NaOH ve vodě. Po důkladném promíchání byly tyto roztoky smíchány, čímž došlo k vysrážení nanočástic ZnO. Tyto nanočástice byly důkladně promyty methanolem za účelem odtranění veškerého vedlejšího produktu. [32]

Tento hydrogel byl připraven ze směsi keratinu a chitosanu, do níž byly přidány nanočástice oxidu zinečnatého. Jeho lyofilizací vznikl hydrogel určený pro krytí ran. Vzniklý hydrogel byl vysoce porézní, což zajistilo růst buněk. Díky přítomnosti nanočástic ZnO byl hydrogel antibakteriální, pevný v tahu a biodegradabilní. Výzkumy potvrdily schopnost tohoto hydrogelu podpořit hojení ran, ale také hojení popálenin. [32]

6.3 Keratin-chitosanový scaffold

Scaffold na bázi keratinu a chitosanu je porézní kompozitní materiál sloužící pro hojení ran a regeneraci kůže. Tento biomateriál je antibakteriální a cytocompatibilní. Keratin pro tuto aplikaci byl extrahován z vlny redukční hydrolýzou, a to pomocí směsi dodecylsulfát sodného (SDS), močoviny a 2-merkaptoethanolu za teploty 60 °C po dobu 12 hodin. Získaný roztok keratinu byl poté dialyzován. Dialyzovaný roztok keratinu byl odlitý do kádinek a do roztoků byl dispergován chitosan. Byly získány keratin-chitosanové směsi o koncentraci chitosanu 50, 100, 200, 400, 600 a 1000 µg/ml. Směsi byly odplyněny a nality do kultiivačních destiček, v nichž byly lyofilizovány při teplotě -80 °C po dobu 48 hodin. Poté byly vzorky promývány PBS (pufrovaný fyziologický roztok) a deionizovanou vodou a následně vysušeny. Stejným způsobem byly připraveny také čisté porézní keratinové a chitosanové scaffoldy pro srovnání jejich vlastností. [33]

Čistý chitosanový scaffold vykazoval výrazně větší prodloužení, pevnost a Youngův modul proti čistému keratinovému scaffoldu. Při koncentraci chitosanu 50 µg/ml v roztoku

keratinu byly mechanické vlastnosti podobné čistému keratinovému scaffoldu. S navyšováním koncentrace chitosanu docházelo ke zlepšení mechanických vlastností. Výsledky v této studii ukázaly, že přídavek chitosanu do keratinového scaffoldu zaručí zlepšení jejich mechanických vlastností díky jeho mechanické pevnosti. [33]

Dále byla u těchto typů scaffoldů testována jejich antibakteriální aktivita. Scaffold vytvořený pouze z chitosanu vykazoval největší antibakteriální aktivitu. Vzorek tohoto scaffoldu byl ponořen do bakteriální suspenze (*S. aureus* a *E. coli*) po dobu 2 hodin, kde došlo ke snížení počtu bakterií. Keratin-chitosanové scaffoldy také vykazovaly antibakteriální aktivitu, a to především od koncentrace chitosanu vyšší než 400 µg/ml. [33]

Přídavkem chitosanu ke keratinu došlo ke změně morfologie scaffoldu, snížila se hydrofilita, porozita, bobtnavost a také došlo ke zpomalení degradace daných scaffoldů. Se zvyšující se koncentrací chitosanu byly vylepšeny mechanické vlastnosti i jeho antibakteriální aktivita. Nejlepší adheze buněk a jejich proliferace byla u koncentrace chitosanu 400 µg/ml. Vyvinuté scaffoldy lze díky jejich vlastnostem využít při hojení ran a regeneraci kůže. [33]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

7 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo posoudit vliv složení směsí z keratinového hydrolyzátu s chitosanem a dalšími aditivami na rozpustnost a uvolňování aktivní složky z připravených tablet.

Prvním dílčím cílem této diplomové práce byla úprava ovčí vlny. Vlna byla odtučněna, namleta na nožovém mlýně. Z takto upravené ovčí vlny byl připraven alkalicko-enzymovou hydrolýzou keratinový hydrolyzát, který dále sloužil pro přípravu tablet.

Druhým dílčím cílem byla příprava směsí naplánovaná faktorovými pokusy s jedním středovým bodem. Sledovanými faktory byly přídavek chitosanu v rozmezí 10 – 15 % na navážku hydrolyzátu a přídavek změkčovadla v rozmezí od 30 do 40 % na navážku hydrolyzátu. Takto připravené směsi byly použity na odlévání tablet.

Třetím dílčím cílem této práce bylo stanovit vliv složení směsi na rozpustnost a uvolňování vitamínu C z tablet ve vodném prostředí.

8 MATERIÁLY A POSTUP PRÁCE

8.1 Materiály

Vstupním materiálem pro získání keratinového hydrolyzátu byla ovčí vlna typu Merino od soukromého chovatele. Dále byl na přípravu směsí spolu s keratinovým hydrolyzátem použit chitosan s vysokou molární hmotností od 310 do 375 kDa. Ze směsí byly následně připraveny tablety.

8.2 Přístroje, pomůcky, chemikálie

Z přístrojů a pomůcek byly využity nožový mlýn Fritsch, zavařovací hrnec Domo s míchacím zařízením, odstředivka Hettich Rotina 35, sušárna Memmert, analytické váhy Kern, pH metr, laboratorní sklo Simax, PA tkanina, celulósová membrána Sigma-Aldrich určená pro dialýzu, mineralizační aparatura, Parnas-Wagnerova destilační aparatura, muflová pec Nabertherm (Labotherm L9/11), sušárna VacuCell 55 Comfort, silikonová forma na tablety, programovatelný zdroj Novex Model-3540, minicela Novex Xcell II, sušící sestava Novex, celofánové fólie, Invitrogen 10-20% tricine polyakrylamidový gel EC6625.

Z chemikálií byly použity enzym Lipex 100T, Savinase Ultra 16 L, NaOH, Ca(OH)₂, H₃PO₄, glycerol bezvodý p.a., glutaraldehyd, kyselina askorbová (vit. C), roztok Na₂S₂O₃ a NaOH, jód, jodid draselný, HCl, H₂SO₄, roztok škrobu, H₃BO₃, Tashirův indikátor, tableta katalyzátoru, proteinový standard s širokou distribucí molárních hmotností (6,500-200,000 Da), pufrý Running Buffer 10X a Sample Buffer 2X, 2-merkptoethanol, ledová CH₃COOH, methanol, barvivo Brilliant Blue G.

8.3 Příprava keratinového hydrolyzátu

8.3.1 Úprava vlny

Keratinový hydrolyzát byl připravován z ovčí vlny. Vlna byla nejprve zbavena nečistot, nastříhána na menší kousky a následně vyprána ve vlažné vodě. Poté bylo třeba vlnu vyprat s mycím prostředkem. Aby vlna neobsahovala mycí prostředek, bylo dále nutné ji vyprat vlažnou vodou až do úplného odstranění mycího prostředku.

8.3.2 Odtučnění enzymem Lipex 100T

Vlna byla po kompletním vyprání mycího prostředku umístěna do destilované vody. Poměr pro vlnu a vodu byl 1:50. Před přidáním enzymu bylo pH upraveno na hodnotu 8, a to pomocí 20 % NaOH. Po úpravě pH bylo přidáno 1 % enzymu Lipex 100T. Množství enzymu bylo vztaženo na hmotnost suché vlny. Odtučňování vlny probíhalo 24 hodin, a to při teplotě 40 °C. Během odtučňování bylo potřeba směs vlny a vody několikrát promíchat. Po uplynutí doby 24 hodin byla vlna vyjmuta z vody a promyta čistou destilovanou vodou. Následně se promytá vlna vysušila v horkovzdušné sušárně při teplotě 103 °C.

8.3.3 Rozklad vlny a separace

Před započítím rozkladu vlny bylo potřeba ji pomlet na nožovém mlýně s velikostí ok síta 1 mm. Rozklad vlny, který byl proveden v zavařovacím hrnci Domo s míchacím zařízením (obr. 6), probíhal ve dvou stupních.



Obr. 5: Vlna po odtučnění a namletí

V prvním stupni bylo naváženo 800 g namleté vlny (obr. 5) a přidáno 16 l destilované vody. Ke směsi bylo přidáno 96 g hydroxidu vápenatého a následovala hydrolýza při teplotě 80 °C po dobu 48 hodin.



Obr. 6: Zavařovací hrnec Domo s míchacím zařízením využitý pro rozklad vlny

Po uplynutí doby 48 hodin bylo potřeba snížit teplotu hydrolýzy na 60 °C, upravit pH na hodnotu 9. Bylo upraveno 10 % kyselinou fosforečnou. Po upravení pH bylo přidáno 5 % enzymu Savinase Ultra 16 L na navážku vlny, tedy 40 g. Poté pokračovala hydrolýza 24 hodin při teplotě 60 °C. Po 24 hodinách byl inaktivován použitý enzym zahřátím teploty kapalně fáze na 90 °C po dobu 10 minut.

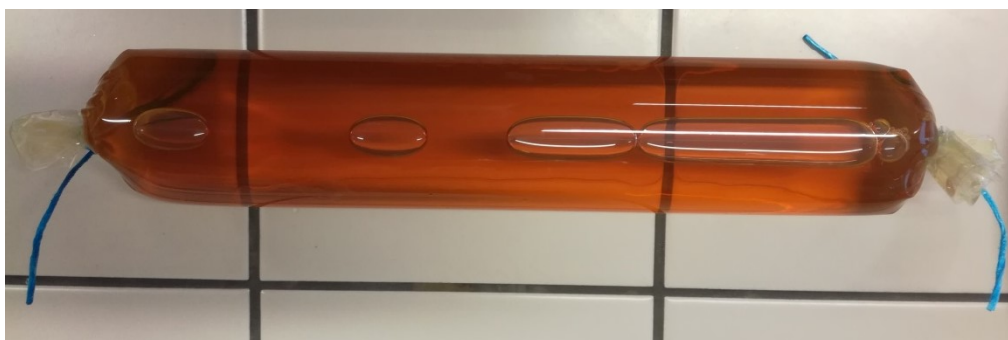
Poté následovala separace nerozloženého zbytku vlny (obr. 7). Bylo využito filtrace přes 16 vrstev PA tkaniny, jejíž velikost ok byla 150 μm. Nerozložený zbytek vlny byl vysušen při teplotě 103 °C a následně zvážen. Z hmotnosti nerozloženého zbytku vlny byla dopočítána účinnost hydrolýzy. Aby došlo k úplnému odstranění nerozloženého zbytku vlny, byla kapalná fáze odstředována při 4000 ot/min po dobu 6 minut. Po odstředění byl získaný keratinový hydrolyzát dialyzován.



Obr. 7: Nerozložený zbytek vlny po vysušení

8.3.4 Dialýza

Při dialýze bylo 500 ml keratinového hydrolyzátu nalito do celulózy membrány (obr. 8). Membrána s keratinovým hydrolyzátem byla poté umístěna do 5 l destilované vody. Dialýza probíhala při pokojové teplotě 7 dní, přičemž byla voda měněna po 24, 48 a 96 hodinách. Po dialýze byl kapalný keratinový hydrolyzát nalitý na plech a umístěn do horkovzdušné sušárny vyhřáté na teplotu 65 °C. Poté, co byl keratinový hydrolyzát vysušen na prášek, byl rozetřen ve třecí misce (obr. 9).



Obr. 8: Celulózy membrána s kapalným keratinovým hydrolyzátem



Obr. 9: Keratinový hydrolyzát po vysušení a rozetření ve třecí misce

8.3.5 Výtěžnost hydrolýzy a dialýzy

V tab. 1 jsou uvedeny výsledky alkalicko-enzymové hydrolýzy. Při hydrolýze bylo rozloženo 65,2 % odtučněné ovčí vlny, přičemž 34,8 % ovčí vlny nebylo rozloženo.

Tab. 1: Tabulka výsledků výtěžností a ztrát po hydrolýze a dialýze

	m [g]	m [%]
Navážka vlny na hydrolýzu	800,0	100,0
Množství rozložené vlny	521,5	65,2
Množství nerozloženého podílu	278,5	34,8
Keratinový hydrolyzát - po vysušení*	107,0	20,5
Úbytek po dialýze*	414,5	79,5

*vztaženo na množství rozložené vlny

Po alkalicko-enzymové hydrolýze byla provedena dialýza, jejíž výtěžnost byla 20,5 %, zatímco úbytek po dialýze byl 79,5 %. Velký úbytek keratinového hydrolyzátu byl způsoben tím, že celulózová membrána použitá pro dialýzu je schopná propustit kratší řetězce KH a také nízkomolekulární látky s menší molekulovou hmotností než 12 kDa a popeloviny.

9 ANALYTICKÉ ZKOUŠKY

9.1 Stanovení sušiny

U vysušeného keratinového hydrolyzátu byla provedena zkouška na stanovení obsahu sušiny. Stanovení bylo provedeno dvakrát. Pro stanovení obsahu sušiny byly použity koželužské misky. Do těchto misek bylo na analytických vahách naváženo 1 g KH. Misky s materiálem byly vloženy do horkovzdušné sušárny, kde byla teplota 103 °C. Vzorky byly sušeny po dobu 4 hodin. Poté byly koželužské misky vyjmuty ze sušárny, uloženy do exikátoru a po vychladnutí byly zváženy.

Dle vzorce (1) vypočítáme obsah sušiny:

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

S ... obsah sušiny [%]

m_0 ... hmotnost vzorku před vysušením [g]

m_1 ... hmotnost vzorku po vysušení [g]

9.2 Stanovení obsahu popelovin

Pro stanovení obsahu popelovin v odtučněné vlně a keratinovém hydrolyzátu byly použity žihací kelímky z křemenného skla a muflová pec. Stanovení bylo provedeno u KH i OV dvakrát. Kelímky byly vyžihány, následně ochlazeny v exikátoru a poté zváženy. Do vyžihovaných kelímků byl na analytických vahách navážen vzorek, a to přibližně 1 g. Kelímky byly poté se vzorkem umístěny nad kahan, kde došlo ke spálení vzorku. Po spálení vzorku byly kelímky umístěny do muflové pece na 90 minut, kde byla teplota 650 °C. Po stanoveném čase byly kelímky vyjmuty z muflové pece a ochlazeny v exikátoru. Po ochlazení byly i se spáleným vzorkem zváženy. Obsah popelovin se vypočítá dle vzorce (2).

$$P = \frac{m_1}{m_0} \cdot 100 \quad (2)$$

P ... obsah popelovin ve vzorku [%]

m_0 ... hmotnost vzorku před spálením [g]

m_1 ... hmotnost vzorku po spálení [g]

9.3 Mikrochemické stanovení dusíku

Stanovení dusíku u vzorků odtučněné vlny a keratinového hydrolyzátu bylo pomocí Micro-Kjeldahlovy metody. Tato metoda spočívá v mineralizaci vzorku a následné destilaci mineralizátu. Stanovení bylo provedeno u KH i OV dvakrát.

V prvním kroku bylo naváženo 0,2 g vzorku do mineralizační baňky, bylo přidáno 5,6 ml kyseliny sírové, 20 ml 0,02N HCl a tableta katalyzátoru. Mineralizační baňka byla umístěna na topnou desku (obr. 10) a mineralizace probíhala při teplotě 480 °C do úplného vyčerpání vzorku. Po ochlazení byl mineralizát zředěn malým množstvím destilované vody a po rozpuštění pevných částic přelity do 50 ml odměrné baňky a doplněn po rysku.



Obr. 10: Mineralizační aparatura

Ve druhém kroku proběhla destilace zředěného mineralizátu. Do Parnas-Wagnerovy destilační aparatury (obr. 11) bylo odpipetováno 25 ml vzorku a přidáno 20 ml roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ a NaOH. Předestilovaný vzorek byl jímán do 15 ml kyseliny borité. Destilace probíhala 20 minut od počátku varu. Po skončení destilace bylo ke vzorku přidáno pár kapek Tashirova indikátoru a následně se roztok titroval 0,02N HCl do růžového zbarvení (obr. 12).



Obr. 11: Parnas-Wagnerova destilační aparatura



Obr. 12: Vzorek před titrací a vzorek po titraci

Dle vzorce (3) se vypočítá obsah dusíku:

$$N = \frac{V \cdot c \cdot 14,007 \cdot 100 \cdot 2}{m} \quad (3)$$

N ... obsah dusíku ve vzorku [%]

V ... spotřeba HCl při titraci [ml]

c ... molární koncentrace HCl [mol.l⁻¹]

m ... hmotnost vzorku [mg]

9.4 Stanovení molární hmotnosti elektroforézou

Stanovení molární hmotnosti bylo provedeno SDS – PAGE elektroforézou (obr. 13).

Příprava vzorků

120 mg KH bylo rozpuštěno v 10 ml destilované vody. Část roztoku byla ve vialkách zředěna s pufr a merkptoethanolem v poměru 5:4:1. Vialky byly následně vloženy do kádinky a zalaty vroucí vodou. Ve vroucí vodě byly po dobu 2 min.

Vyvíjení gelů

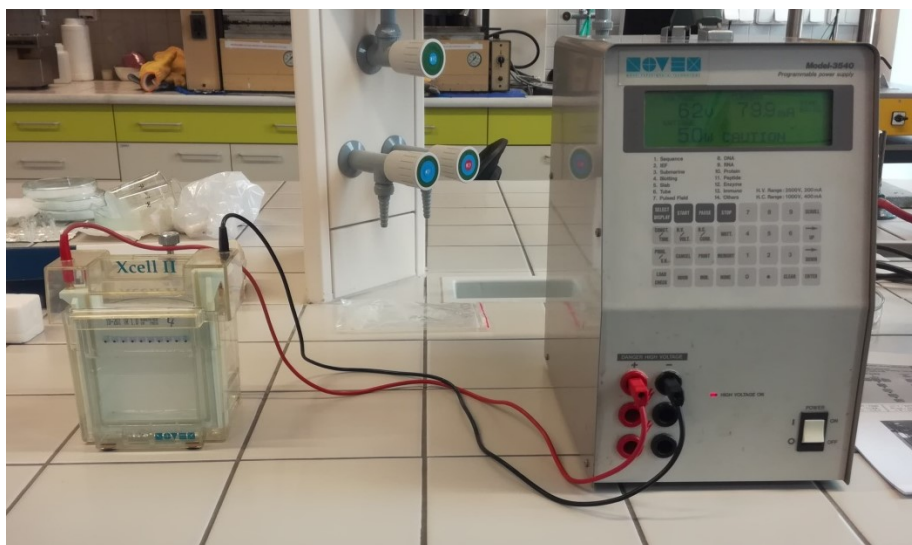
Deska s gelem obsahující jamky byla opláchnutá vodou pro odstranění uchovávacího roztoku a umístěna do cely Novex Xcell II tak, že vznikly dvě komory pro pufr. Do těchto komor byl nalit pufr tak, aby byly zaplaveny jamky. Poté byl do jamek nadávkován vzorek (20 μ l) a standard. Vyvíjení gelů probíhalo 90 min při limitním napětí 125 V, limitním proudem 80 mA a limitním výkonem 5 W.

Ustalování a barvení gelů

Gel byl v Petriho misce zalitý roztokem kyseliny octové v methanolu a byl třepán 1 hodinu na třepačce. Poté byl promytý methanolem a nabarven roztokem brilantní modři. Po nabarvení gelu byl opět promytý methanolem.

Sušení gelu

Odbarvený gel byl propláchnutý 25% methanolem a zalitý sušícím roztokem. Následně byl umístěn mezi celofánové fólie a vysušen.



Obr. 13: Minicela Novex Xcell II a programovatelný zdroj Novex Model-3540

9.5 Výsledky analytických zkoušek

V tabulkách níže jsou uvedeny výsledky analytických zkoušek, které byly provedeny u keratinového hydrolyzátu a ovčí vlny. Výsledné hodnoty těchto zkoušek mezi sebou korepondují.

Tab. 2: Obsah sušiny a vlhkosti ve vzorku keratinového hydrolyzátu

	Obsah sušiny [%]	Obsah vlhkosti [%]
Keratinový hydrolyzát	95,6 ± 0,2	4,4 ± 0,2

V tab. 2 jsou uvedeny výsledky zkoušky stanovení sušiny u připraveného keratinového hydrolyzátu. Stanovení obsahu sušiny bylo provedeno dvakrát, průměrná hodnota obsahu sušiny byla 95,6 %. Obsah sušiny byl stanovován pro přípravu směsí z KH – složky směsí byly přepočítávány na sušinu KH.

Tab. 3: Obsah popela ve vzorku keratinového hydrolyzátu a odtučněné ovčí vlně

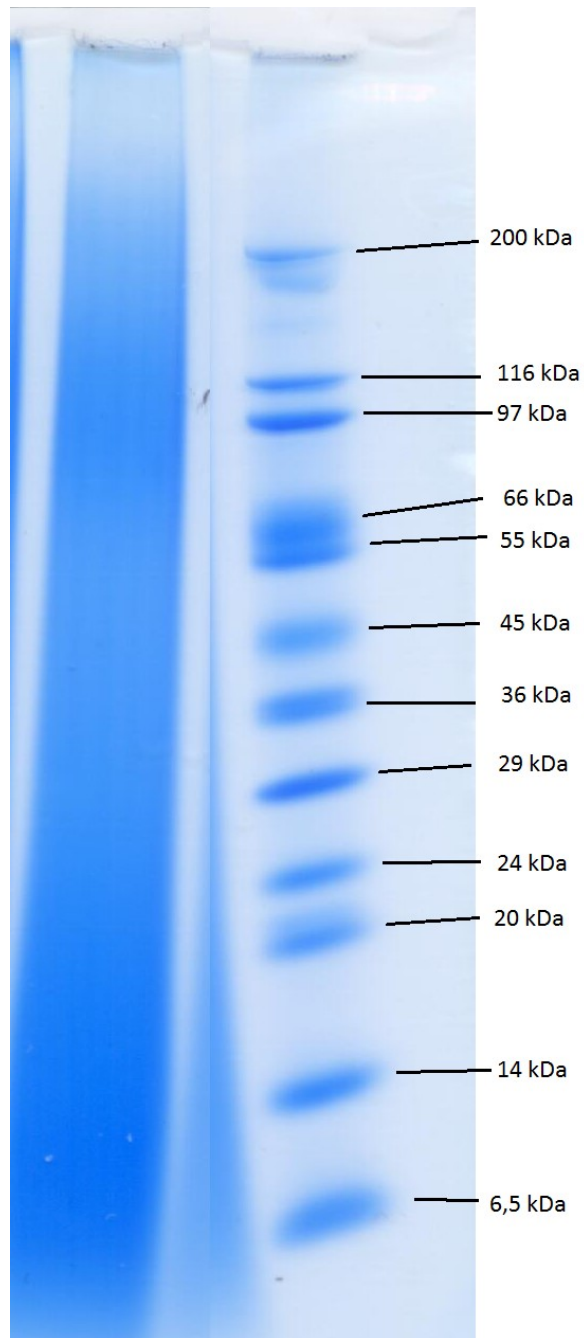
	Obsah popela [%]
Keratinový hydrolyzát	6,4 ± 0,4
Odtučněná vlna	1,5 ± 0,3

Výsledky zkoušky stanovení popela jsou uvedeny v tab. 3. Tato zkouška byla u vzorku KH i OV provedena dvakrát, přičemž průměrná hodnota obsahu popelovin u KH byla 6,4 %, u OV byl průměrný obsah popelovin 1,5 %. U nedialyzovaných hydrolyzátů bývá obsah popelovin vyšší (obvykle kolem 15 %), je tedy patrné, že dialýzou byla odstraněna podstatná část popelovin z KH [64, 65]. U našeho vzorku KH je vyšší z toho důvodu, že obsahuje i anorganické látky z hydrolyzy. Obsah popelovin by bylo možné snížit delším časem dialýzy nebo častější výměnou vody při tomto procesu.

Tab. 4: Obsah dusíku ve vzorku keratinového hydrolyzátu a odtučněné vlny

	Obsah dusíku [%]
Keratinový hydrolyzát	15,0 ± 0,2
Odtučněná vlna	16,3 ± 0,2

Obsah dusíku byl stanovován ve vzorcích keratinového hydrolyzátu a odtučněné vlny. Stanovení proběhlo u daných vzorků 2x a výsledky jsou uvedeny v tab. 4. Průměrný obsah dusíku u KH byl 15 %, u OV 16,3 %.



Obr. 14: Gel po ustálení a barvení, vzorek KH – vlevo, standard – vpravo

Na obrázku 14 lze vidět výsledek elektroforézy. Vlevo se nachází vzorek KH, vpravo standard. Podle intenzity vybarvení gelu lze říci, že daný vzorek KH alkalicko-enzymovou hydrolýzou obsahoval složky jak o nižší molární hmotnosti, tak o vyšší molární hmotnosti. U vzorku KH se nachází dva intenzivněji vybarvené pásy, a to v oblasti kolem 6,5 až 20 kDa a kolem 80 až 120 kDa. Z toho lze usoudit, že v daných oblastech bylo větší množství těchto frakcí KH.

10 PŘÍPRAVA SMĚSÍ A TABLET

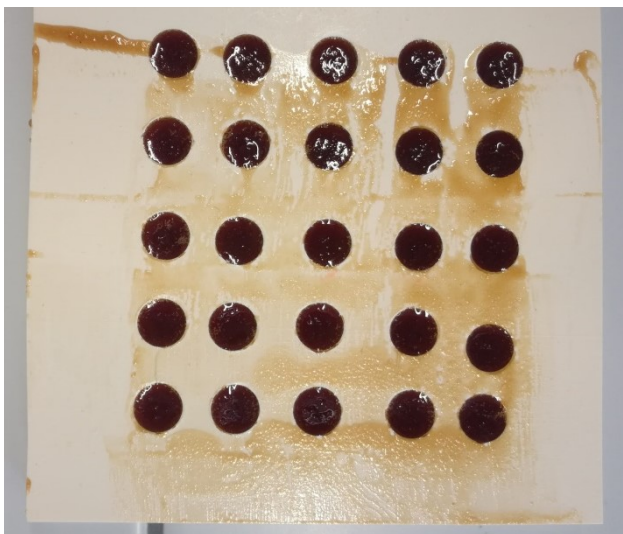
Směsi pro přípravu tablet byly navrženy podle faktorových testů 2^2 s jedním středovým pokusem. Byly připravovány z keratinového hydrolyzátu, chitosanu, vody, glycerolu, kyseliny askorbové a glutaraldehydu. Celkem bylo připraveno 5 směsí, u nichž byl odlišný přídavek chitosanu a glycerolu. Složení jednotlivých směsí je uvedeno v tabulce 5.

Tab. 5: Složení směsí pro přípravu tablet

Směs	Sušina KH [g]	Voda [g]	Chitosan* [%]	Glycerol* [%]	Kyselina askorbová* [%]	Glutaraldehyd* [%]
1	10,46	50	10	40	2	0,5
2			15	40		
3			10	30		
4			15	30		
5			12,5	35		

* vztaženo na sušinu KH

Směsi byly připravovány rozpuštěním chitosanu ve vodě. K tomu bylo potřeba upravit pH na hodnotu 5,5. Po rozpuštění chitosanu ve vodě byl po menších dávkách přimícháván keratinový hydrolyzáat. Pro lepší rozpouštění KH byl roztok chitosanu ve vodě zahříván na vodní lázni při teplotě 35 °C. Dál byl přidán glycerol. Po rozpuštění KH byla tato směs zahuštěna zahříváním roztoku na vodní lázni (85 °C) na objem 20 ml. Následně byla přidána kyselina askorbová a glutaraldehyd. Poté byla směs ihned nalita do silikonové formy a umístěna do vakuové sušárny na 30 minut. Po uplynutí této doby byly silikonové formy se směsí (obr. 15) umístěny do sušárny a byly sušeny při teplotě 40 °C do druhého dne pro odpaření vody. Takto připravené tablety lze vidět na obr. 16. Tablety byly půlkulatého tvaru, o průměru 9 mm.



Obr. 15: Silikonová forma pro přípravu tablet s KH-chitosanovou směsí



Obr. 16: Připravené tablety z KH-chitosanové směsí

10.1 Stanovení rozpustnosti

U připravených tablet byla provedena zkouška rozpustnosti. Tableta předem zvážená na analytických vahách byla umístěna do předem zvážené váženky (obr. 17). K tabletě bylo do váženky přidáno 50 ml destilované vody. V předem stanovených časech (5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 70 a 90 min) byla voda z váženek odebírána a váženka se vzorkem byla následně umístěna do sušárny. Po vysušení byla váženka vložena do exikátoru kvůli vytemperování a následně zvážena na analytických vahách. Množství rozpuštěné tablety bylo stanoveno dle vzorce (4). Pro každý čas byly rozpouštěny min. 2 tablety.



Obr. 17: Váženka s tabletou pro stanovení rozpustnosti a množství uvolněného vit. C

Rozpustnost tablety se vypočítá dle vzorce (4):

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

R ... rozpustnost [%]

m_0 ... hmotnost tablety před rozpuštěním [g]

m_1 ... hmotnost tablety po rozpuštění [g]

10.2 Stanovení množství uvolněného vit. C

Pro stanovení uvolněného množství vitamínu C byla tableta rozpouštěna v 50 ml destilované vody (obr. 17). V předem stanovených časech (5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 70 a 90 min) byla voda odebírána do titračních baněk, ve kterých byla po přidavku 5 ml 2M H_2SO_4 a 5 ml 1% roztoku škrobu titrována 0,05 M roztokem jódu. Zbylá tableta byla poté úplně rozpouštěna v 50 ml destilované vody. Po kompletním rozpuštění tablety byla voda odebrána a titrována roztokem jódu. Ze zaznamenaných spotřeb roztoku jódu bylo poté stanoveno celkové množství vit. C obsaženého v tabletě a množství uvolněného vit. C během daných časů. Pro každý čas byly rozpouštěny min. 2 tablety.

Hmotnost vit. C v tabletě se vypočítá dle vzorce (5):

$$m_{vit.C} = c_{I_2} \cdot (V_{1(I_2)} + V_{2(I_2)}) \cdot M_{vit.C} \quad (5)$$

$m_{vit.C}$... hmotnost vit. C v tabletě [g]

c_{I_2} ... koncentrace roztoku jódu [mol/l]

$V_{1(I_2)}, V_{2(I_2)}$... spotřeba roztoku jódu při titraci [ml]

$M_{vit.C}$... molární hmotnost kyseliny askorbové [g/mol]

Hmotnost uvolněného vit. C z tablety se vypočítá dle vzorce (6):

$$m_{vit.C} = c_{I_2} \cdot V_{I_2} \cdot M_{vit.C} \quad (6)$$

$m_{vit.C}$... hmotnost uvolněného vit. C z tablety [g]

c_{I_2} ... koncentrace roztoku jódu [mol/l]

V_{I_2} ... spotřeba roztoku jódu při titraci [ml]

$M_{vit.C}$... molární hmotnost kyseliny askorbové [g/mol]

Množství uvolněného vit. C se vypočítá dle vzorce (7):

$$VC = \frac{m_1}{m_0} \cdot 100 \quad (7)$$

VC ... množství uvolněného vitamínu C [%]

m_0 ... celková hmotnost vit. C v tabletě [mg]

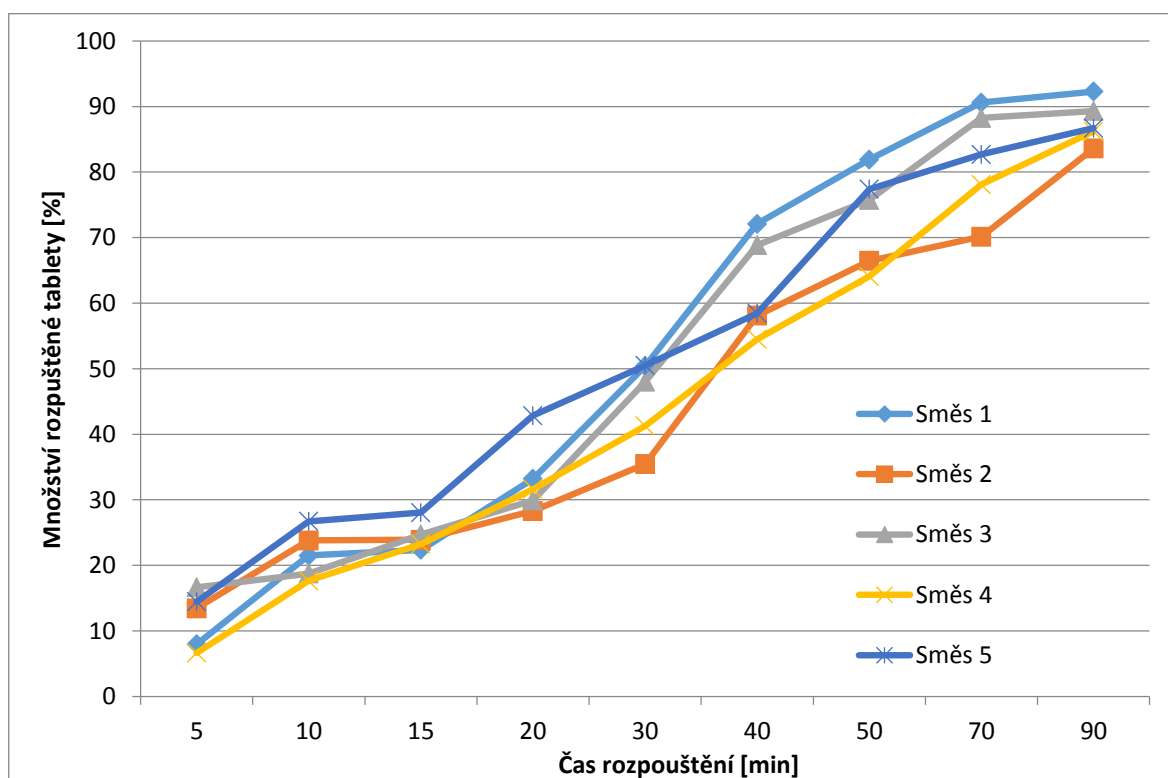
m_1 ... hmotnost uvolněného vit. C z tablety [mg]

10.3 Výsledky stanovení rozpustnosti a uvolněného množství vit. C

V tabulce 6 jsou znázorněny výsledky zkoušky rozpustnosti. V jednotlivých časech byly rozpouštěny 2 tablety, v tabulce níže jsou uvedeny průměrné hodnoty množství rozpuštěné tablety. Grafické znázornění výsledků této zkoušky je na obrázku 18.

Tab. 6: Vyhodnocení zkoušky rozpustnosti u jednotlivých směsí

Čas rozpouštění [min]	Množství rozpuštěné tablety [%]				
	Směs 1	Směs 2	Směs 3	Směs 4	Směs 5
5	8,0 ± 1,6	13,5 ± 3,8	16,7 ± 2,0	6,7 ± 4,5	14,5 ± 2,1
10	21,5 ± 3,4	23,8 ± 1,7	18,8 ± 0,3	17,7 ± 0,7	26,7 ± 4,0
15	22,4 ± 3,2	23,9 ± 0,2	24,7 ± 0,9	23,3 ± 1,3	28,1 ± 1,1
20	33,2 ± 3,3	28,3 ± 1,0	29,9 ± 1,5	31,7 ± 0,4	42,9 ± 0,1
30	50,4 ± 7,7	35,5 ± 1,5	48,0 ± 4,2	41,3 ± 1,4	50,5 ± 1,5
40	72,1 ± 3,6	58,1 ± 0,8	68,9 ± 7,2	54,5 ± 2,6	58,5 ± 1,8
50	81,9 ± 3,6	66,5 ± 3,8	75,8 ± 4,2	64,1 ± 1,0	77,4 ± 0,2
70	90,6 ± 1,0	70,2 ± 3,4	88,3 ± 0,4	78,1 ± 3,2	82,7 ± 2,3
90	92,3 ± 1,3	83,6 ± 3,4	89,3 ± 0,9	86,2 ± 2,7	86,7 ± 1,3



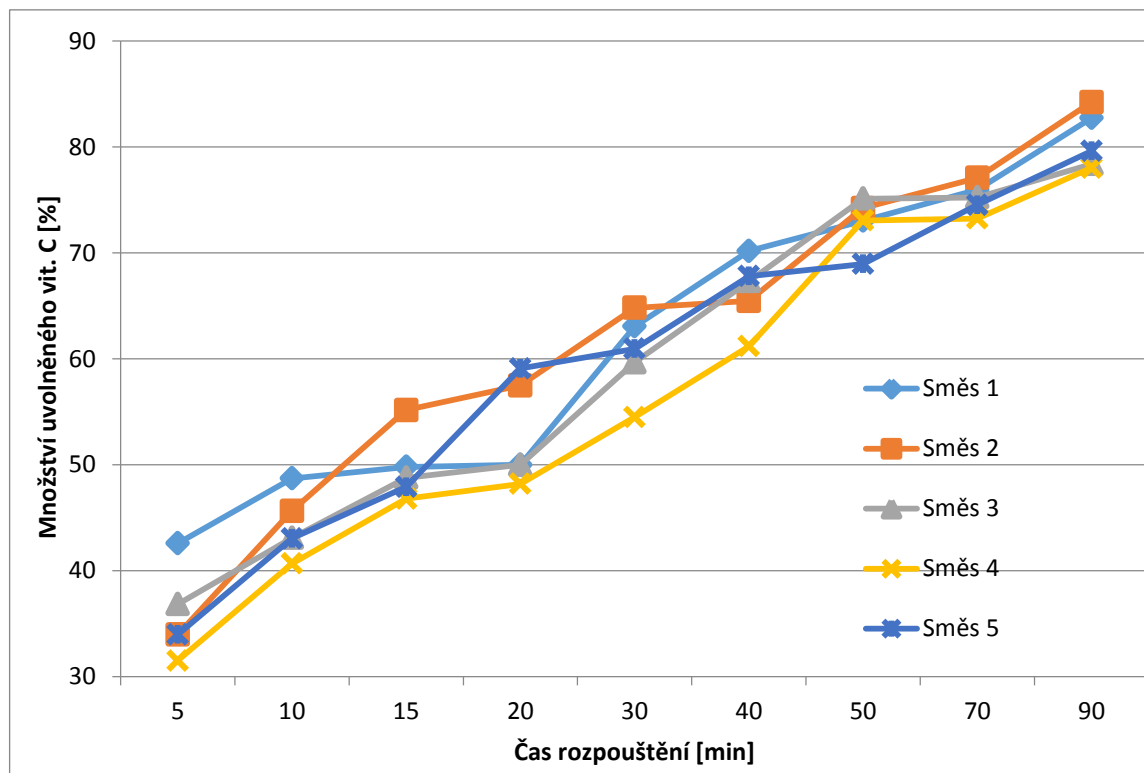
Obr. 18: Graf závislosti množství rozpuštěné tablety na čase rozpouštění

Z uvedených výsledků vyplývá, že množství rozpuštěné tablety se zvyšujícím se časem rozpouštění rostlo. Na rozpouštění tablety měl vliv obsažený chitosan a glycerol. Dle předpokladu by se tableta ze směsi 1, tedy s nejnižším obsahem chitosanu (10 %) a s nejvyšším obsahem glycerolu (40 %), měla rozpouštět nejlépe. Tento jev lze vidět pouze u časů rozpouštění vyšších než 30 min. Nejméně by se měla rozpouštět tableta ze směsi 4 obsahující 15 % chitosanu a 30 % glycerolu. Toto lze pozorovat pouze u krátkých časů rozpouštění (5 a 10 min) a poté u časů rozpouštění 40 a 50 min. Jak lze vidět ve výše zmíněném grafu, tableta nebyla v čase 90 min zcela rozpuštěna. Pro kompletní rozpuštění tablety je potřeba pokračovat v rozpouštění ještě asi 30 minut. Z aplikačního hlediska se směs 4 jeví jako nejlepší z toho důvodu, že její křivka je téměř lineární a má minimální odchylky.

V tabulce 7 jsou znázorněny výsledky zkoušky uvolňování vit. C. V jednotlivých časech byly rozpouštěny 2 tablety, v tabulce níže jsou uvedeny průměrné hodnoty množství uvolněného vit. C. Grafické znázornění výsledků této zkoušky je na obrázku 19.

Tab. 7: Vyhodnocení zkoušky uvolňování vit. C

Čas rozpouštění [min]	Množství uvolněného vit. C [%]				
	Směs 1	Směs 2	Směs 3	Směs 4	Směs 5
5	42,6 ± 0,4	34,0 ± 1,0	36,9 ± 0,3	31,5 ± 0,7	34,0 ± 1,0
10	48,7 ± 4,1	45,7 ± 1,8	43,1 ± 0,4	40,7 ± 1,0	43,1 ± 2,0
15	49,8 ± 3,1	55,2 ± 0,0	48,8 ± 6,2	46,8 ± 2,0	47,9 ± 0,2
20	50,0 ± 0,0	57,5 ± 1,2	50,0 ± 0,0	48,2 ± 0,1	59,1 ± 0,0
30	63,1 ± 0,9	64,8 ± 2,6	59,7 ± 1,5	54,5 ± 1,0	61,0 ± 1,4
40	70,2 ± 0,3	65,5 ± 1,7	67,3 ± 1,0	61,2 ± 0,5	67,8 ± 1,7
50	73,0 ± 1,5	74,2 ± 0,1	75,1 ± 2,6	73,1 ± 0,0	69,0 ± 4,9
70	76,0 ± 1,4	77,1 ± 3,0	75,2 ± 3,1	73,2 ± 1,2	74,5 ± 0,7
90	82,7 ± 1,8	84,2 ± 2,1	78,4 ± 3,4	78,0 ± 1,6	79,6 ± 2,7



Obr. 19: Graf závislosti množství uvolněného vit. C na čase rozpouštění

Jak je možné vidět v grafu na obrázku 19, množství uvolněného vitamínu C se zvyšovalo se zvyšujícím se časem rozpouštění. Dle předpokladu mělo k největšímu množství uvolněného vit. C docházet u směsi 1 obsahující 10 % chitosanu a 40 % glycerolu. K tomu dochází pouze v případě rozpouštění tablety po dobu 5, 10 a 40 min. V čase 5 min bylo uvolněno 42,6 % vit. C, v čase 10 min 48,7 % a v čase 40 min bylo uvolněno 70,2 % vit. C. Naopak předpokladu o nejmenším množství uvolněného vit. C odpovídají tablety ze směsi 4 s obsahem chitosanu 15 % a glycerolu 30 %. Pouze u času rozpouštění 50 min nedošlo k uvolnění nejmenšího množství vit. C. U tablet ze směsi 4 došlo k uvolnění 31,5 % vit. C v čase 5 min. V čase 20 min došlo k uvolnění 48,2 % vit. C. 78 % uvolněného vit. C bylo u času rozpouštění 90 min. Jak je patrné z grafu na obrázku 19, nebylo dosaženo stoprocentního uvolnění vit. C z tablety, neboť ani po 90 minutách nebyla tableta zcela rozpuštěna.

11 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ

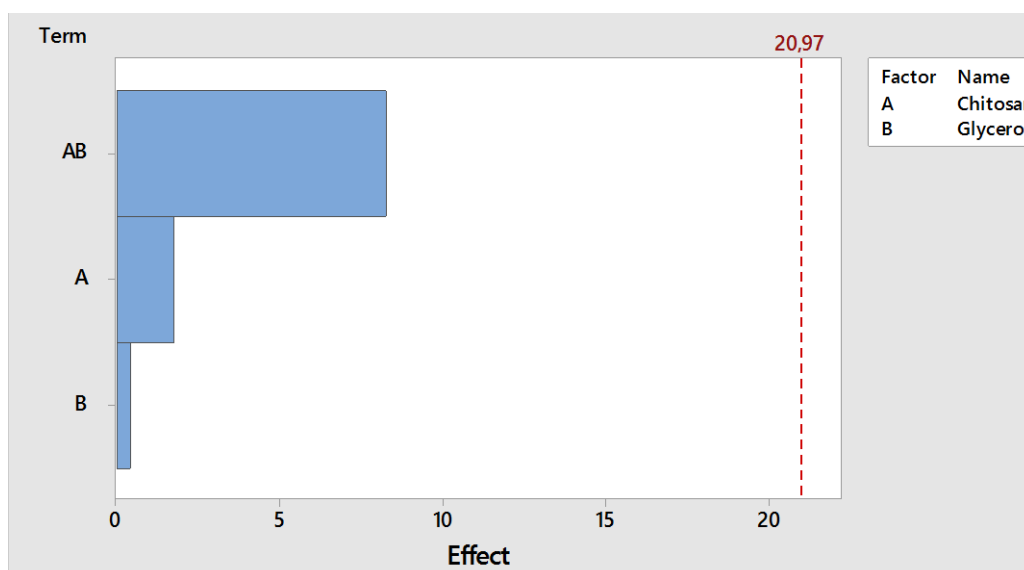
Směsi pro přípravu tablet byly naplánovány metodou faktorových pokusů 2^2 (2 limity a 2 faktory) s jedním středovým pokusem metodou DOE (Design of experiments). Statistické vyhodnocení bylo provedeno u rozpustnosti tablet a u množství uvolněného vit. C. Obojí bylo vyhodnocováno u časů rozpouštění 5, 20, 40, 70 a 90 min.

11.1 Vliv faktorů na rozpustnost tablet

U vlivu faktorů A – chitosanu a B – glycerolu na rozpustnost tablet byly vyhodnoceny Paretovy diagramy, regresní rovnice, vrstevnicové diagramy a grafy vlivů sledovaných faktorů.

11.1.1 Rozpustnost v čase 5 min

Obrázek 20 znázorňuje vliv faktorů A, B a jejich kombinací na rozpustnost tablet. V diagramu vidíme, že žádný z faktorů nedosáhl kritické hodnoty, tedy není statisticky významný. Jak je z Paretova diagramu patrné, nejmenší vliv na rozpustnost měl glycerol. V případě chitosanu byl vliv na rozpustnost vyšší. Největší vliv ale měla na rozpustnost tablet ve stanoveném čase kombinace těchto dvou faktorů, tedy chitosanu a glycerolu.



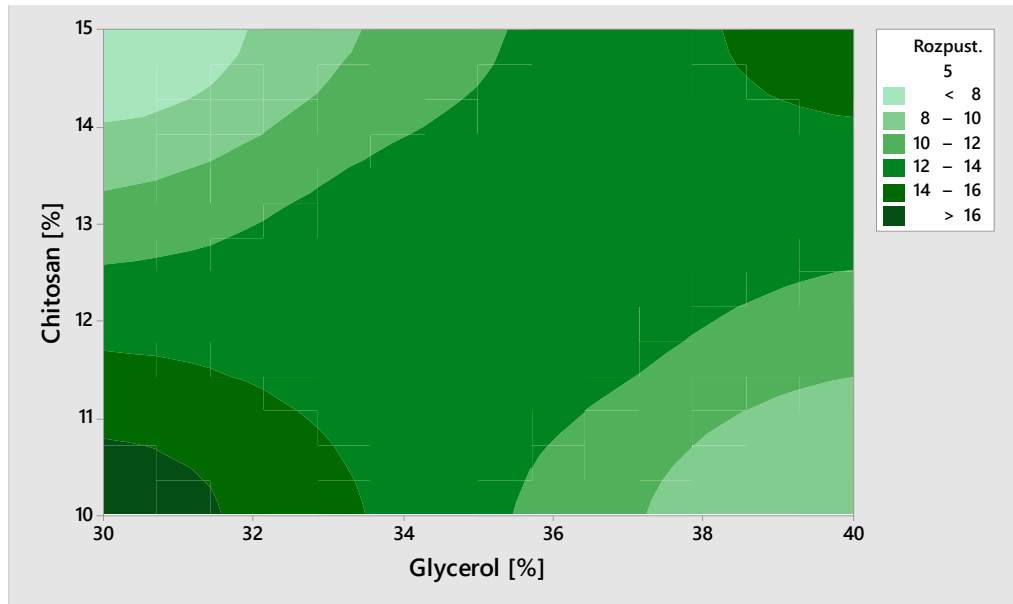
Obr. 20: Paretoův diagram pro rozpouštění po dobu 5 min

Regresní rovnice:

Regresní rovnice popisuje vliv faktorů A a B na rozpustnost tablet v čase 5 min.

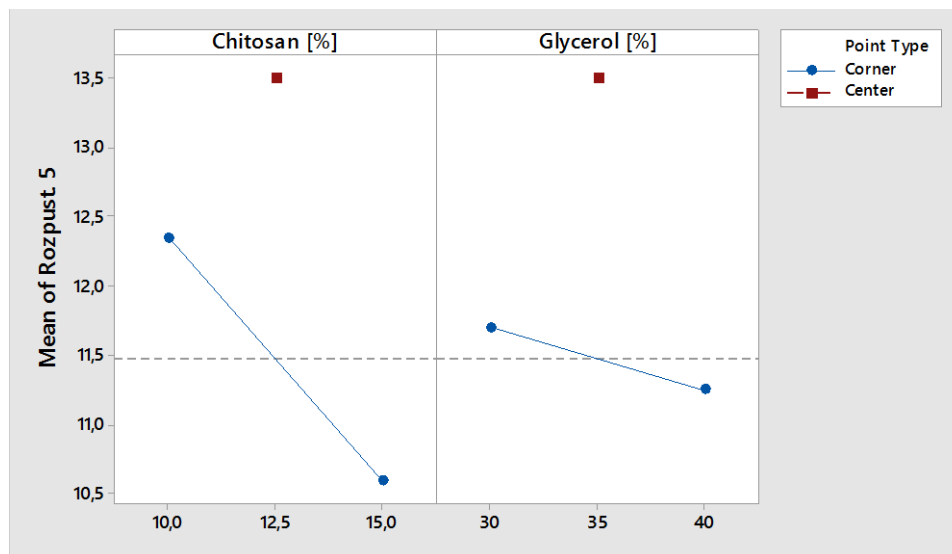
$$\text{Rozp. 5 minut} = 161,8 - 11,90A - 4,170B + 0,3300A * B + 2,025CtPt$$

$$R^2 = 100 \%$$



Obr. 21: Vrstevnicový diagram pro čas rozpouštění 5 min

Na obrázku 21 je znázorněn vliv množství chitosanu a glycerolu na množství rozpuštěné tablety v daném čase. Nejmenší rozpustnost bude v případě, že obsah chitosanu bude v rozmezí od 14 do 15 % a obsah glycerolu od 30 do 32 %. Největší rozpustnost bude ve dvou případech. V prvním případě při obsahu chitosanu od 10 do necelých 11 % a glycerolu od 30 do 31,5 %. Druhým případem je obsah chitosanu od 14 do 15 % a glycerolu od 38 do 40 %.

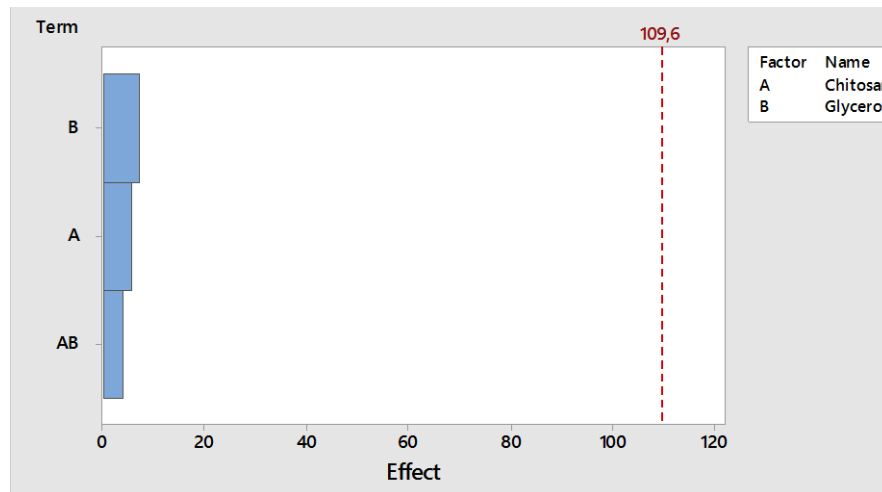


Obr. 22: Vliv sledovaných faktorů na rozpustnost v čase 5 min

Grafy na obrázku 22 znázorňují vliv jednotlivých faktorů na rozpustnost za 5 min. U faktoru A – chitosanu, dochází k poklesu množství rozpuštěné tablety se zvyšujícím se množstvím chitosanu. U faktoru B – glycerolu, dochází rovněž k poklesu množství rozpuštěné tablety, čímž nebyl potvrzen předpoklad, že se zvyšujícím se množstvím glycerolu se zvyšuje množství rozpuštěné tablety. U chitosanu je větší rozptyl než u glycerolu, chitosan tedy rozpouštění v tomto čase ovlivňuje více než glycerol, který má velmi malý rozptyl.

11.1.2 Rozpustnost v čase 20 min

Na obrázku 23 je znázorněn Paretův diagram pro rozpouštění tablety po dobu 20 min. Vliv faktorů na rozpustnost v tomto případě je velmi malý. Protože ani jeden z nich nedosáhl kritické hodnoty, nejsou statisticky významné. Nejmenší vliv na rozpouštění v tomto čase má kombinace chitosanu a glycerolu, naopak největší vliv na rozpustnost má glycerol.



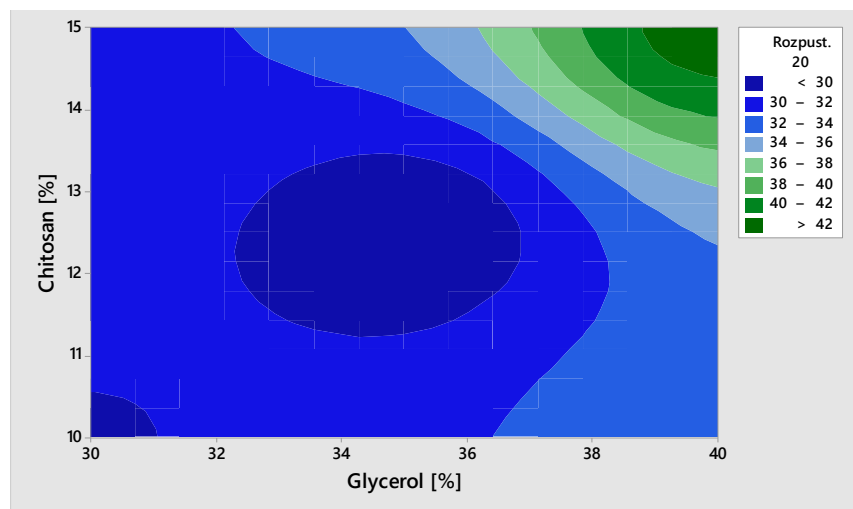
Obr. 23: Paretův diagram pro rozpouštění po dobu 20 min

Regresní rovnice:

Regresní rovnice popisuje vliv faktorů A a B na rozpustnost tablet v čase 20 min.

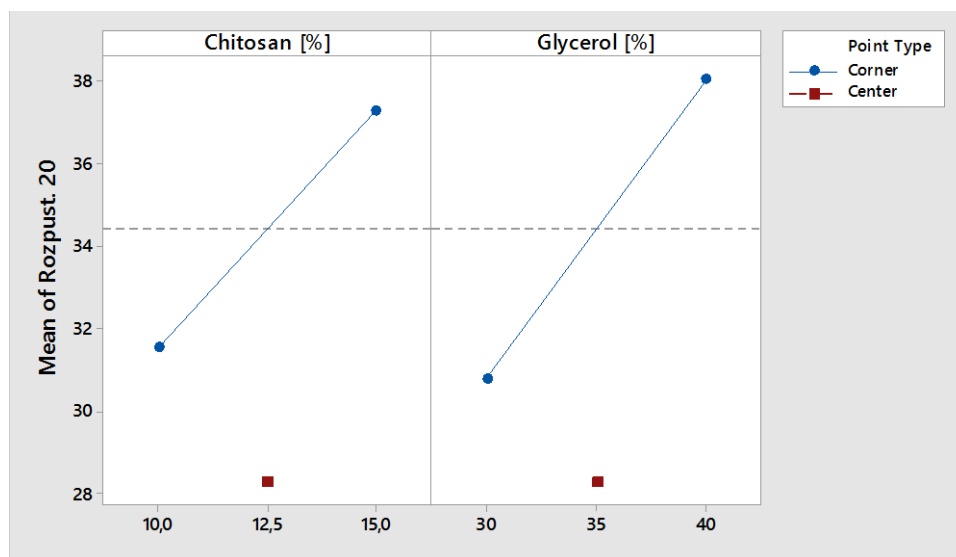
$$\text{Rozp. 20 minut} = 63,80 - 4,380A - 1,250B + 0,1580A * B - 6,125CtPt$$

$$R^2 = 100 \%$$



Obr. 24: Vrstevnicový diagram pro čas rozpouštění 20 min

Vrstevnicový diagram na obrázku 24 znázorňuje rozpouštění tablet v čase 20 min. Z diagramu lze soudit, že k nejmenšímu rozpuštěnému množství, tj. méně než 30 %, bude docházet v případě, že obsah chitosanu bude od 10 do 10,5 % a glycerolu od 30 do 31 % a dále při obsahu chitosanu přibližně od 11 do 13,5 % a obsahu glycerolu od 32,5 do 36,5 %. Nejvyšší rozpustnost v tomto čase bude u obsahu chitosanu od 14,5 do 15 % a obsahu glycerolu přibližně od 38,5 do 40 %.

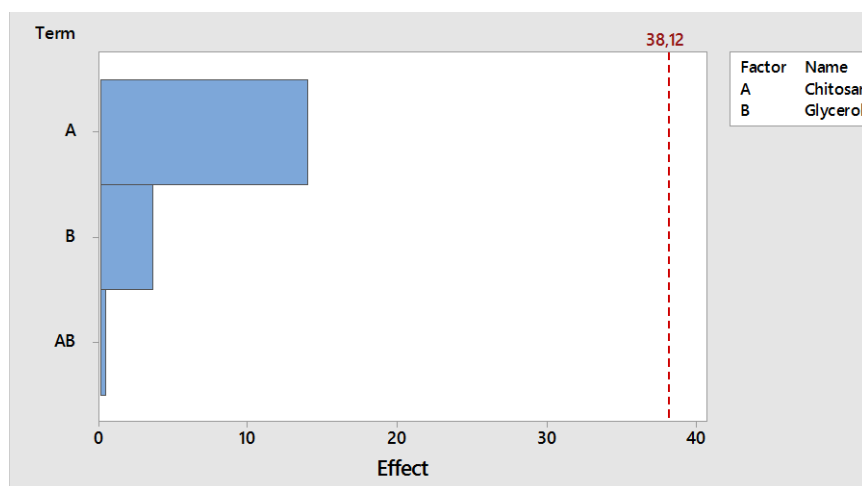


Obr. 25: Vliv sledovaných faktorů na rozpustnost v čase 20 min

Na obrázku 25 se nachází grafy znázorňující vliv jednotlivých faktorů na množství rozpuštěné tablety po 20 min. Jak je v prvního grafu patrné, rozpustnost tablet v tomto čase rozpouštění roste s rostoucí koncentrací chitosanu. Nedošlo tedy k potvrzení předpokladu, že s rostoucím množstvím chitosanu klesá rozpustnost. Předpoklad, že rozpustnost roste s rostoucím obsahem glycerolu, je potvrzen v druhém grafu, který znázorňuje vliv faktoru B na rozpustnost. Z grafu je patrné, že rozpustnost v tomto čase roste s rostoucí koncentrací glycerolu. U obou faktorů je větší rozptyl hodnot, oba tedy ovlivňují rozpustnost v čase 20 min.

11.1.3 Rozpustnost v čase 40 min

Paretův diagram na obrázku 26 znázorňuje statistický vliv faktorů na rozpustnost v čase 40 min. Ani jeden z faktorů nedosáhl kritické hodnoty znázorněné v diagramu, tudíž jsou statisticky nevýznamné. Největší vliv má v tomto případě chitosan, nejmenší kombinace chitosanu a glycerolu. I v tomto případě se jedná o malý statistický vliv faktorů na rozpustnost.



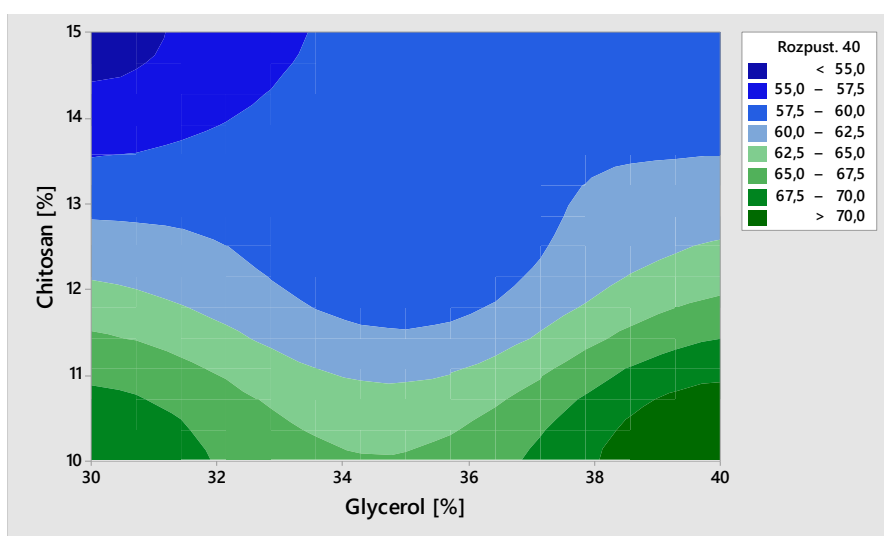
Obr. 26: Paretův diagram pro rozpouštění po dobu 40 min

Regresní rovnice:

Regresní rovnice popisuje vliv faktorů A a B na rozpustnost tablet v čase 40 min.

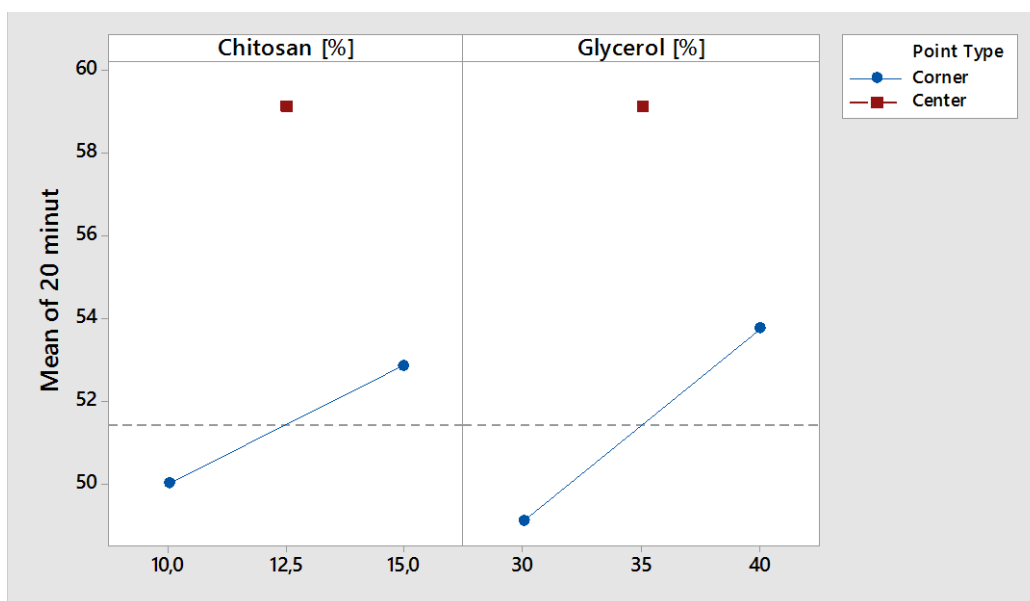
$$\text{Rozp. 40 min} = 92,90 - 3,360A + 0,1600B + 0,01600A * B - 5,400CtPt$$

$$R^2 = 100 \%$$



Obr. 27: Vrstevnicový diagram pro čas rozpouštění 40 min

Na obrázku 27 se nachází vrstevnicový diagram pro rozpustnost v čase 40 min. Jak je patrné, nejméně se rozpouští tablety s obsahem chitosanu od 14,5 do 15 % a obsahem glycerolu od 30 do 31,5 %. Naopak tablety s největší rozpustností jsou s obsahem chitosanu od 10 do necelých 11 % a obsahem glycerolu přibližně od 38 do 40 %.

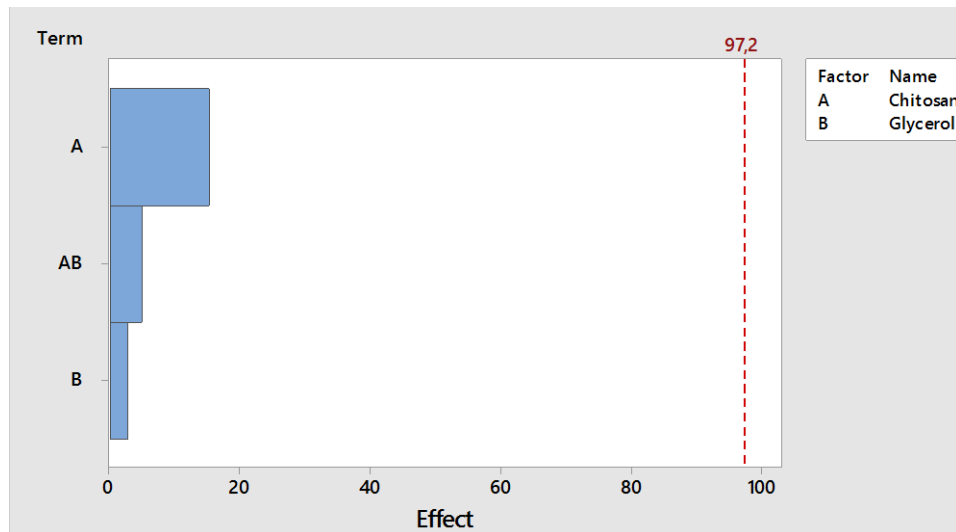


Obr. 28: Vliv sledovaných faktorů na rozpustnost v čase 40 min

Jak je z grafu na obrázku 28 patrné, rozpustnost roste se zvyšujícím se obsahem chitosanu, čímž nedošlo k potvrzení předpokladu, že rozpustnost klesá se zvyšujícím se obsahem chitosanu. Naopak se potvrdil předpoklad, že rozpustnost roste se zvyšujícím se obsahem glycerolu, jak lze vidět v grafu výše. Dle rozptylu hodnot u jednotlivých grafů můžeme říci, že více rozpustnost v čase 40 minut ovlivňuje glycerol.

11.1.4 Rozpustnost v čase 70 min

Paretův diagram na obrázku 29 znázorňuje, že největší vliv na rozpustnost v čase 70 min měl chitosan, naopak nejmenší vliv měl glycerol. Opět se jedná o případ, kdy faktory nedosáhly kritické hodnoty a mají tedy velmi malý statistický vliv na rozpustnost.



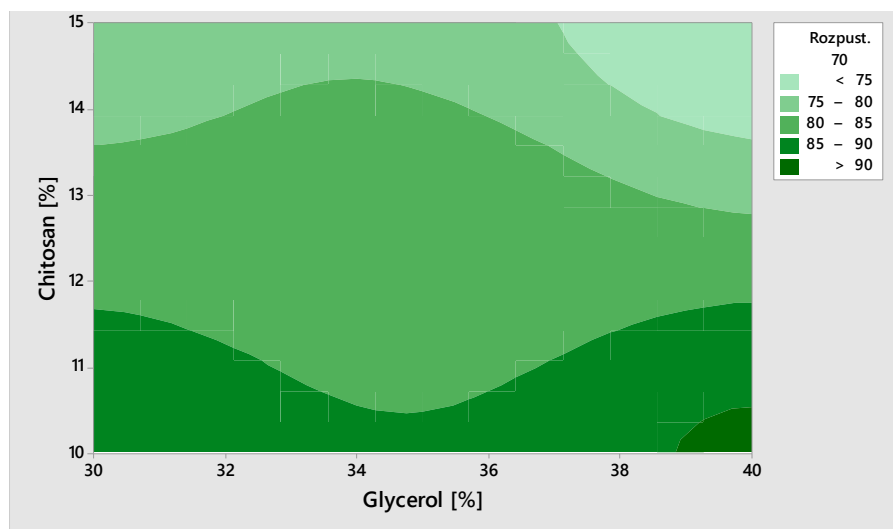
Obr. 29: Paretův diagram pro rozpouštění po dobu 70 min

Regresní rovnice:

Regresní rovnice popisuje vliv faktorů A a B na rozpustnost tablet v čase 70 min.

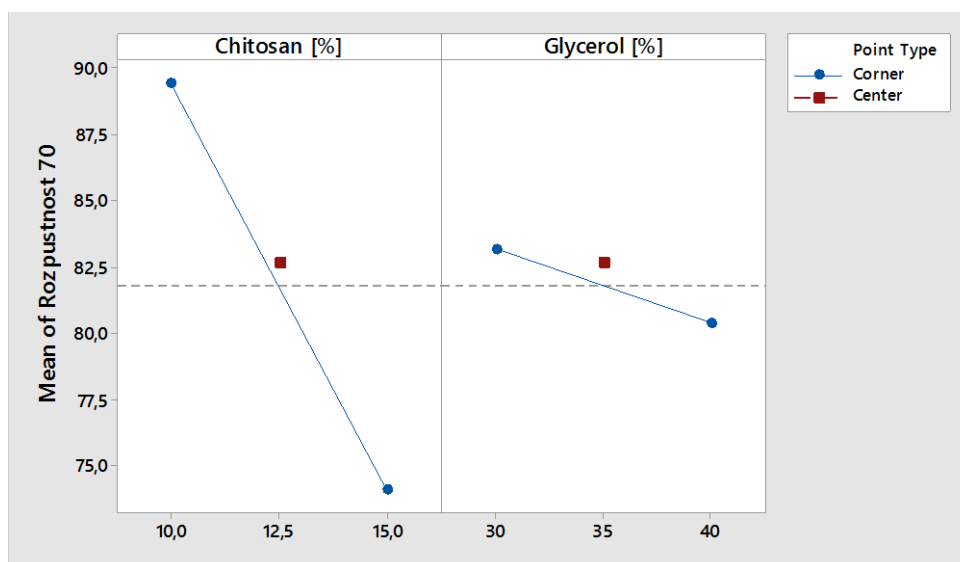
$$\text{Rozp. 70 min} = 40,60 + 4,080A + 2,270B - 0,2040A * B + 0,9000CtPt$$

$$R^2 = 100 \%$$



Obr. 30: Vrstevnicový diagram pro čas rozpouštění 70 min

Na obrázku 30 je znázorněn vrstevnicový diagram pro rozpouštění v čase 70 min. Nejmenší množství rozpuštěné tablety je v tomto případě pro obsah chitosanu přibližně od 13,5 do 15 % a obsah glycerolu od 37 do 40 %. Největší množství rozpuštěné tablety je u tablet obsahujících přibližně 10 % chitosanu a 39 až 40 % glycerolu.

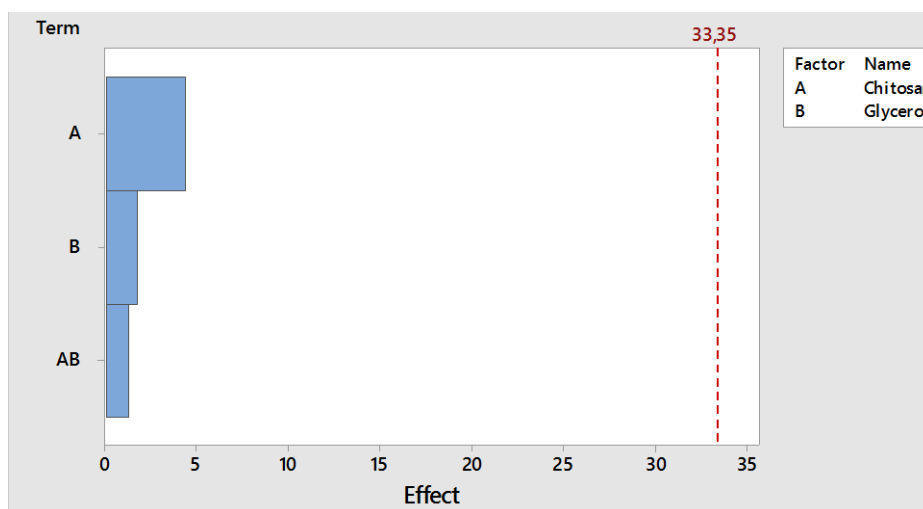


Obr. 31: Vliv sledovaných faktorů na rozpustnost v čase 70 min

Graf na obrázku 31 znázorňuje vliv faktorů na množství rozpuštěné tablety, přičemž v grafu pro faktor A lze vidět, že došlo k potvrzení předpokladu, že s rostoucím obsahem chitosanu klesá rozpustnost. Nebyl však potvrzen předpoklad, že rozpustnost roste se zvyšujícím se obsahem glycerolu. V tomto případě má větší vliv na rozpouštění chitosan.

11.1.5 Rozpustnost v čase 90 min

Jak je z Paretova diagramu na obrázku 32 patrné, faktory nedosáhly kritické hodnoty, tudíž nejsou statisticky významné. Největší vliv u rozpouštění tablet po dobu 90 min vykazuje chitosan. Nejmenší vliv na rozpouštění v tomto čase má kombinace námi zvolených faktorů.



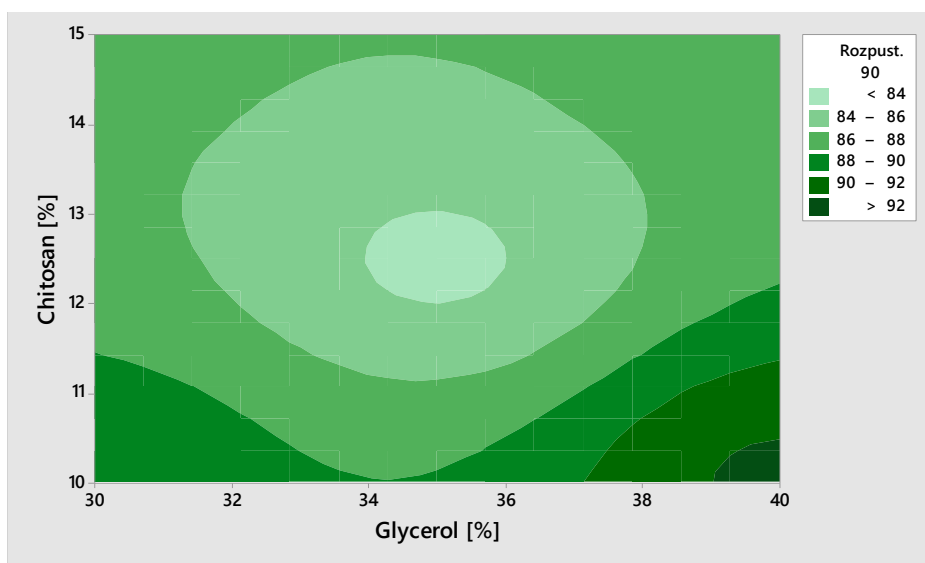
Obr. 32: Paretoův diagram pro rozpouštění po dobu 90 min

Regresní rovnice:

Regresní rovnice popisuje vliv faktorů A a B na rozpustnost tablet v čase 90 min.

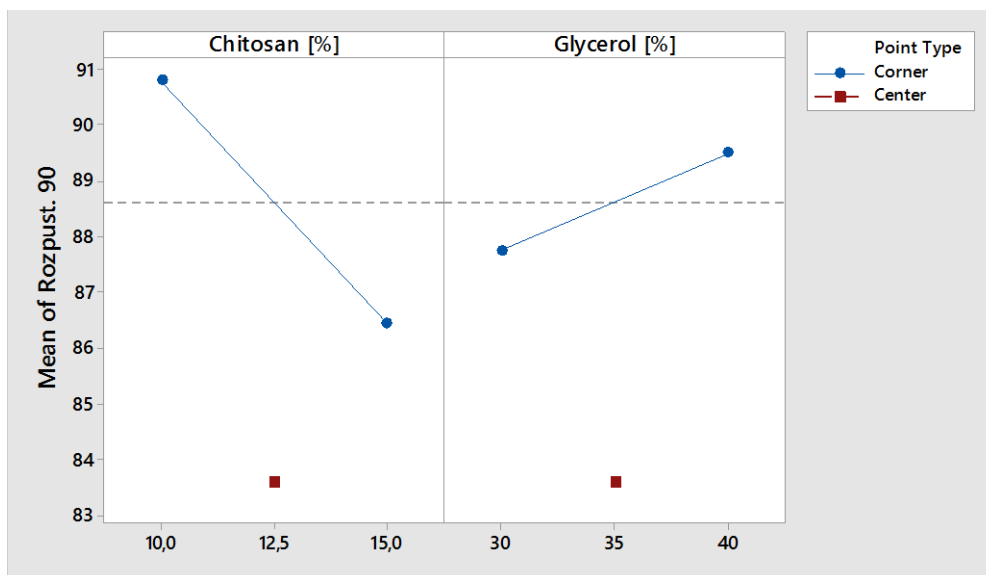
$$\text{Rozp. 90 min} = 71,50 + 0,8800A + 0,8000B - 0,05000A * B - 5,025CtPt$$

$$R^2 = 100 \%$$



Obr. 33: Vrstevnicový diagram pro čas rozpouštění 90 min

Jak lze vidět v diagramu na obrázku 33, nejméně se v tomto čase rozpouští tablety obsahující přibližně 34 až 36 % glycerolu a 12 až 13 % chitosanu. Největší rozpustnost vykazuje obsah chitosanu od 10 do 10,5 % a 39 až 40 % glycerolu.



Obr. 34: Vliv sledovaných faktorů na rozpustnost v čase 90 min

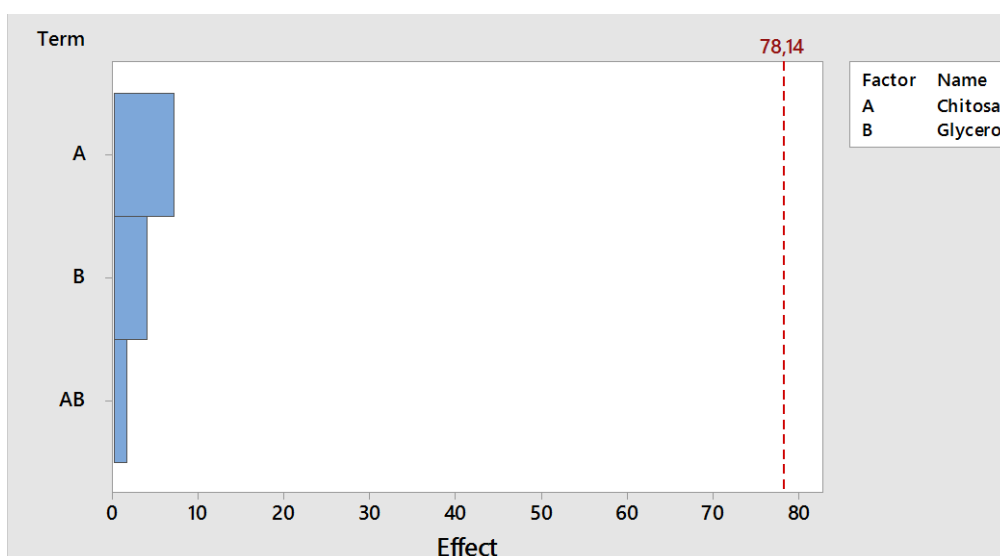
V případě rozpouštění tablet po dobu 90 minut došlo k potvrzení předpokladů, a sice že rozpustnost klesá se zvyšujícím se obsahem chitosanu a roste se zvyšujícím se obsahem glycerolu. Tento jev lze pozorovat v grafech na obrázku 34. Chitosan má v tomto případě větší vliv na rozpouštění než glycerol.

11.2 Vliv faktorů na uvolňování vit. C

U vlivu faktorů A – chitosanu a B – glycerolu na uvolňování vit. C z tablet byly vyhodnoceny Paretovy diagramy, regresní rovnice, vrstevnicové diagramy a grafy vlivů sledovaných faktorů.

11.2.1 Uvolňování vit. C v čase 5 min

Na obrázku 35 se nachází Paretův diagram znázorňující statistický vliv faktorů na množství uvolněného vit. C při čase rozpouštění 5 min. Žádný z faktorů nedosáhl kritické hodnoty, nejsou tedy statisticky významné. Lze říci, že největší vliv na množství uvolněného vit. C měl chitosan, naopak nejmenší vliv měla kombinace faktorů chitosanu a glycerolu.



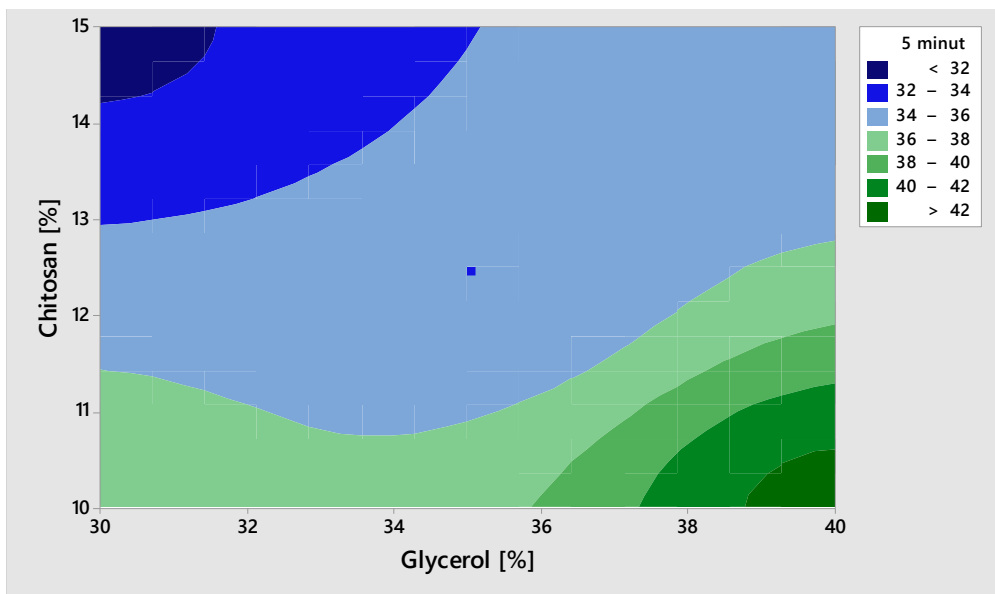
Obr. 35: Paretův diagram pro dobu uvolňování vit. C 5 min

Regresní rovnice:

Regresní rovnice popisuje vliv faktorů A a B na uvolňování vit. C v čase 5 min.

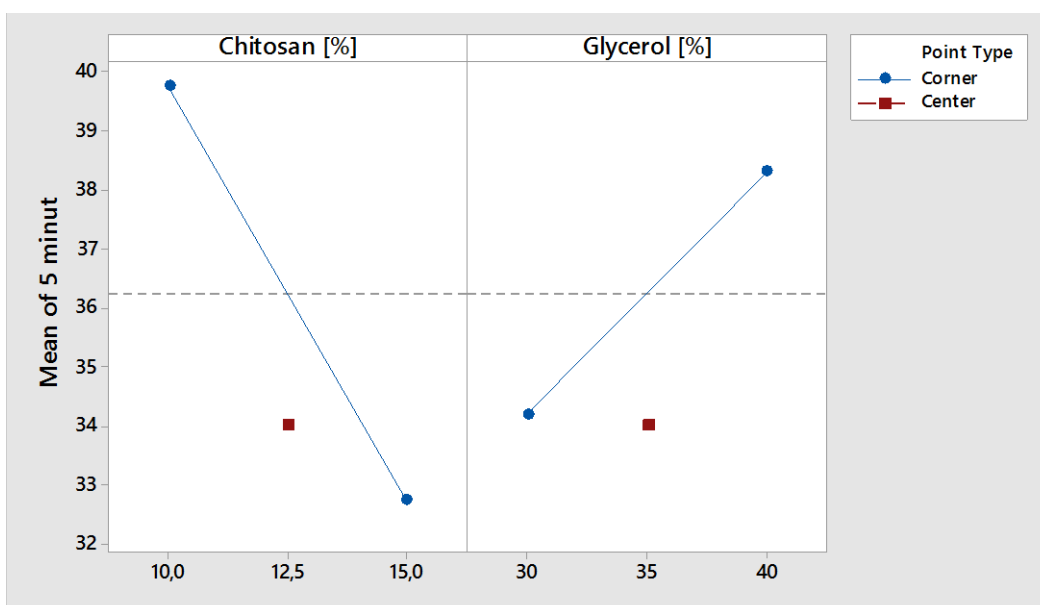
$$Uvolňování\ 5\ min = 11,40 + 0,8400A + 1,210B - 0,06400A * B - 2,250CtPt$$

$$R^2 = 100\ %$$



Obr. 36: Vrstevnicový diagram pro dobu uvolňování vit. C 5 min

Vrstevnicový diagram na obrázku 36 znázorňuje množství uvolněného vit. C v čase 5 min. Nejméně uvolněného vit. C vykazuje tableta obsahující přibližně 14 – 15 % chitosanu a 30 až 31,5 % glycerolu. Nejvíce uvolněného vit. C bude v případě, že tableta bude obsahovat 10 až 10,5 % chitosanu a přibližně 39 až 40 % glycerolu.

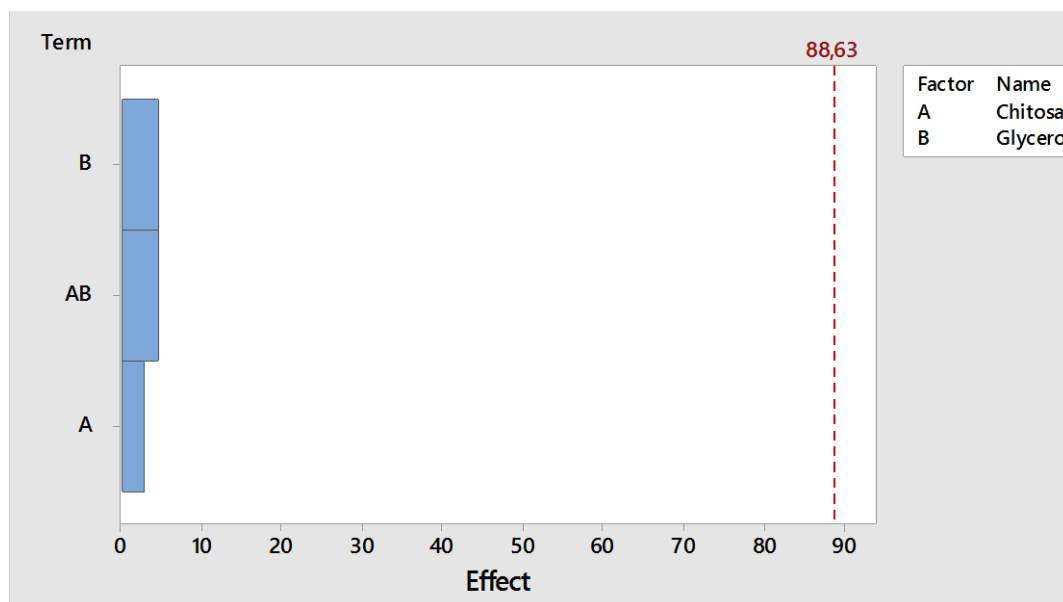


Obr. 37: Vliv sledovaných faktorů na množství uvolněného vit. C v čase 5 min

Z grafu na obrázku 37 je patrné, že došlo k potvrzení předpokladů, a to sice že množství uvolněného vit. C klesá se zvyšujícím se množstvím chitosanu a zároveň roste se zvyšujícím se obsahem glycerolu. Jak je z grafu patrné, výrazněji množství uvolněného vit. C ovlivňuje obsah chitosanu.

11.2.2 Uvolňování vit. C v čase 20 min

Paretův diagram na obrázku 38 ukazuje statistický vliv faktorů na množství uvolněného vit. C při rozpouštění v čase 20 min. Faktory jsou statisticky nevýznamné, jelikož nedosáhly kritické hodnoty znázorněné v diagramu. Stejný vliv v tomto případě mají faktory glycerol a kombinace faktorů. Nejmenší vliv na uvolňování vit. C má v tomto případě chitosan.



Obr. 38: Paretův diagram pro dobu uvolňování vit. C 20 min

Regresní rovnice:

Regresní rovnice popisuje vliv faktorů A a B na uvolňování vit. C v čase 20 min.

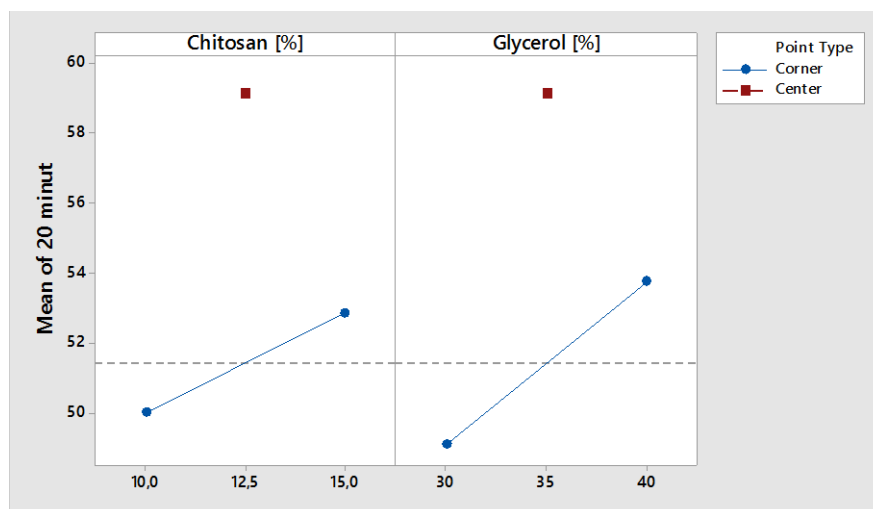
$$\text{Uvolňování 20 min} = 109,4 - 5,940A - 1,860B + 0,1860A * B + 7,675CtPt$$

$$R^2 = 100 \%$$



Obr. 39: Vrstevnicový diagram pro dobu uvolňování vit. C 20 min

Vrstevnicový diagram na obrázku 39 znázorňuje, že největší rozpustnost vykazuje tableta obsahující 12 až 13 % chitosanu a 34 až 36 % glycerolu. V tomto případě je splněn předpoklad, že vit. C se bude uvolňovat nejméně u tablet obsahujících 14 až 15 % chitosanu a 30 až 32 % glycerolu.

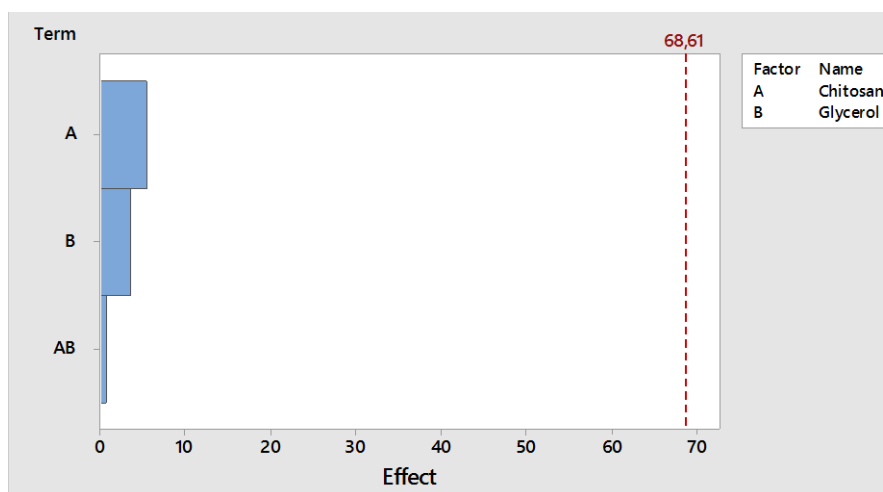


Obr. 40: Vliv sledovaných faktorů na množství uvolněného vit. C v čase 40 min

Na obrázku 40 v grafu zobrazující vliv chitosanu lze vidět, že množství uvolněného vit. C roste s rostoucím obsahem chitosanu, čímž nedošlo k potvrzení předpokladu, že množství uvolněného vitamínu C klesá s vyšším obsahem chitosanu. Naopak byl potvrzen předpoklad, že množství uvolněného vit. C roste s rostoucím obsahem glycerolu, jak lze vidět v grafu. Oba faktory mají v tomto případě malý vliv na uvolňování vit. C.

11.2.3 Uvolňování vit. C v čase 40 min

Na obrázku 41 je znázorněn Paretův diagram pro statistickou významnost faktorů na uvolňování vit. C v čase 40 min. Vzhledem k tomu, že faktory nedosáhly kritické hodnoty, nejsou statisticky významné. Největší vliv na uvolňování vit. C z tablety má chitosan, naopak minimální vliv na uvolňování vit. C má kombinace těchto faktorů



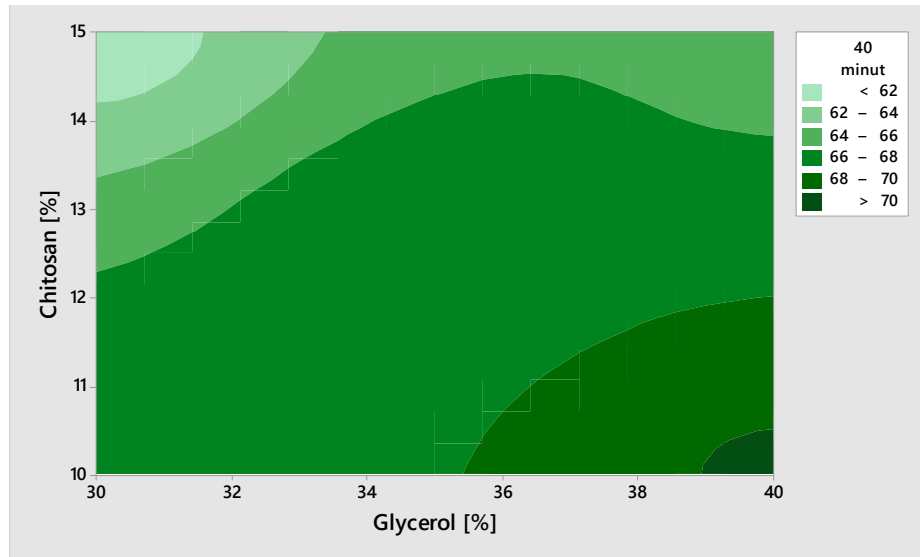
Obr. 41: Paretův diagram pro dobu uvolňování vit. C 40 min.

Regresní rovnice:

Regresní rovnice popisuje vliv faktorů A a B na uvolňování vit. C v čase 40 min.

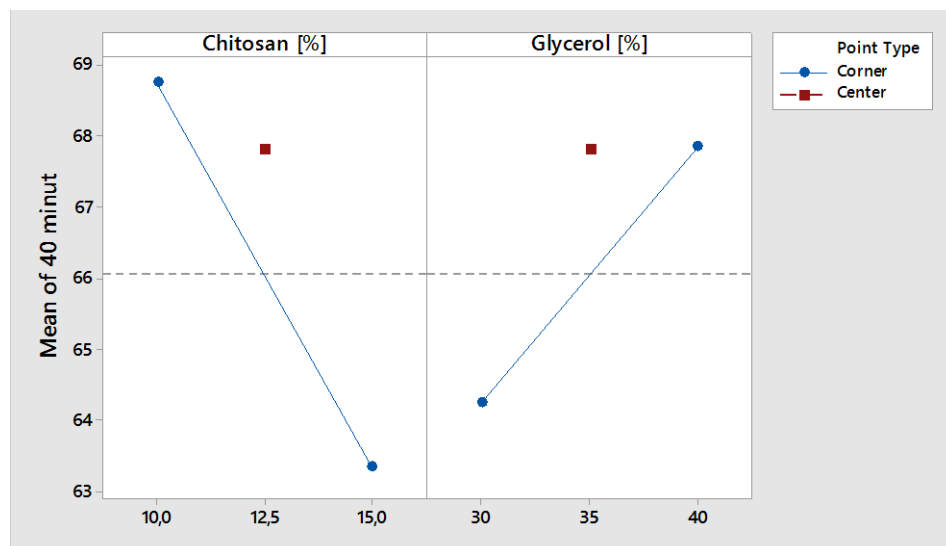
$$Uvolňování\ 40\ min = 79,20 - 2,060A + 0,01000B + 0,02800A * B + 1,750 CtPt$$

$$R^2 = 100 \%$$



Obr. 42: Vrstevnicový diagram pro dobu uvolňování vit. C 40 min

Diagram na obrázku 42 znázorňuje uvolňování vit. C v čase rozpouštění 40 min. Nejmenší množství uvolněného vit. C vykazuje tableta obsahující chitosan v intervalu přibližně od 14 do 15 % a glycerol od 30 do 31,5 %. Nejvíce vit. C se uvolní z tablety obsahující maximálně 10,5 % chitosanu a glycerolu 39 až 40 %.

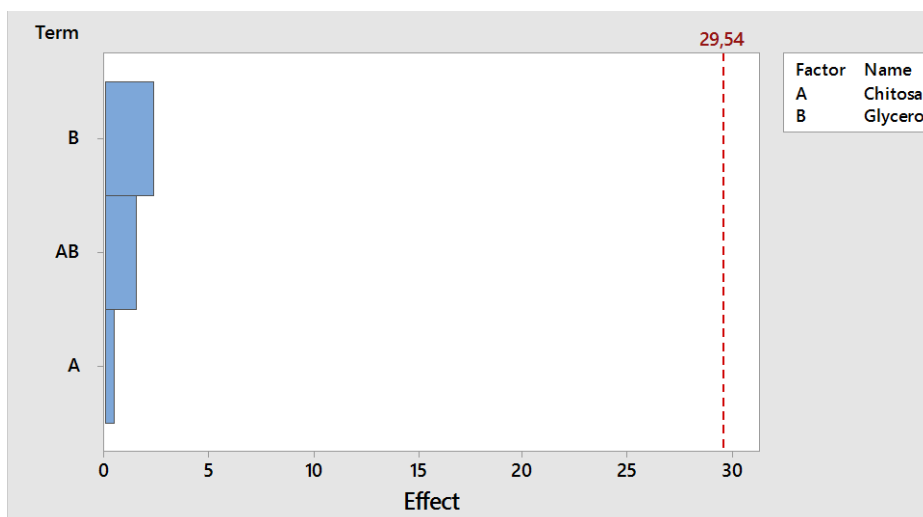


Obr. 43: Vliv sledovaných faktorů na množství uvolněného vit. C v čase 40 min

V grafu na obrázku 43 lze vidět, že došlo k potvrzení obou předpokladů, a sice že množství uvolněného vit. C klesá s rostoucím obsahem chitosanu a zároveň roste s rostoucím obsahem glycerolu. Jak je z grafu patrné, více v tomto případě ovlivňuje množství uvolněného vit. C chitosan.

11.2.4 Uvolňování vit. C v čase 70 min

Na obrázku 44 je znázorněn vliv faktorů na uvolňování vit. C pomocí Paretova diagramu. Faktory nedosáhly kritické hodnoty a jsou tedy statisticky nevýznamné. Největší vliv na množství uvolněného vit. C má v tomto případě glycerol, naopak nejmenší vliv vykazuje chitosan.



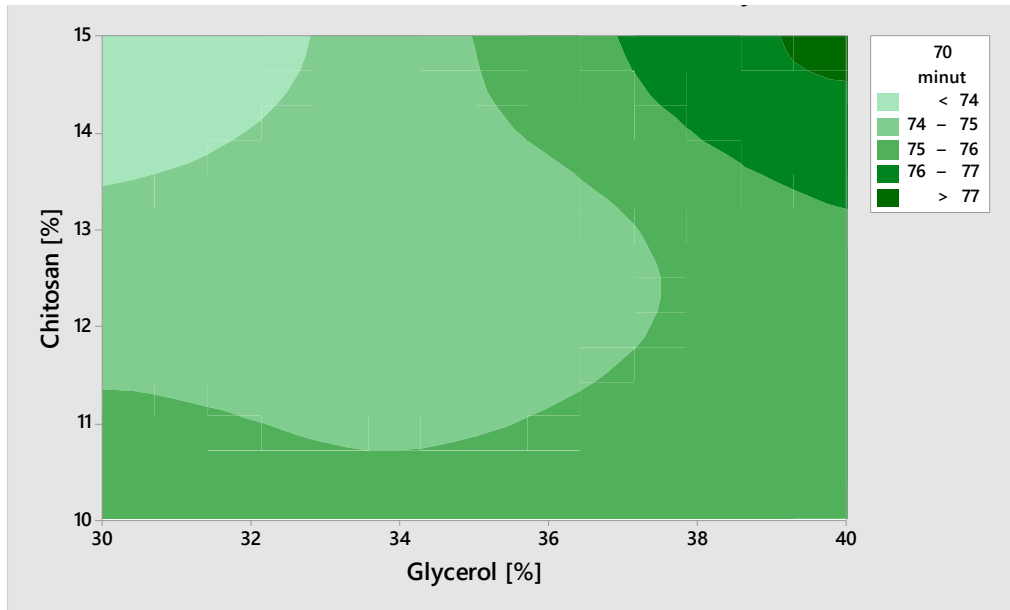
Obr. 44: Paretův diagram pro dobu uvolňování vit. C 70 min

Regresní rovnice:

Regresní rovnice popisuje vliv faktorů A a B na uvolňování vit. C v čase 70 min.

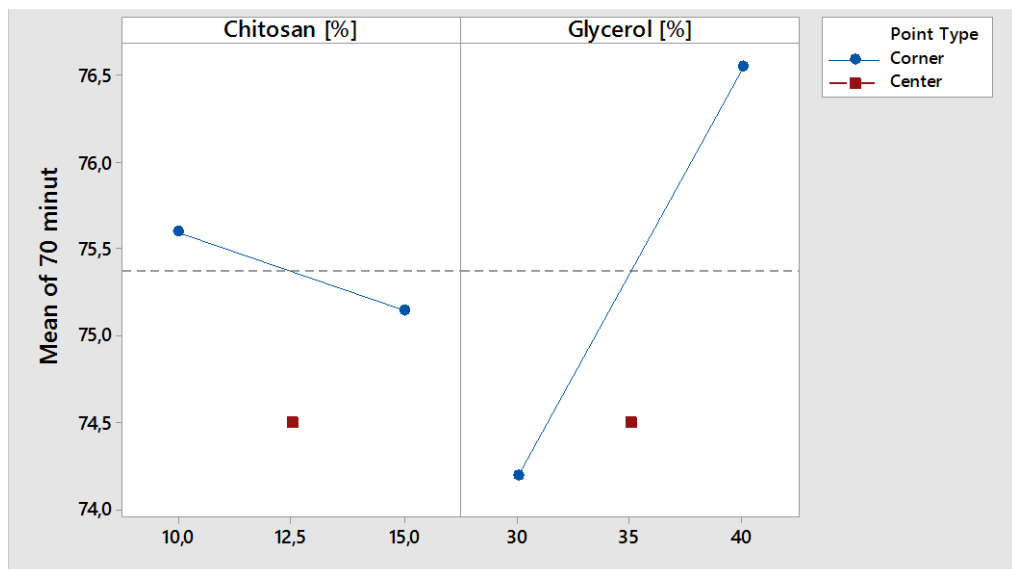
$$Uvolňování\ 70\ min = 95,40 - 2,260A - 0,5400B + 0,06200A * B - 0,8750CtPt$$

$$R^2 = 100 \%$$



Obr. 45: Vrstevnicový diagram pro dobu uvolňování vit. C 70 min

Ve vrstevnicovém diagramu na obrázku 45 lze vidět, že nejmenší množství vit. C se uvolňuje v případě, že tableta obsahuje 13,5 až 15 % chitosanu a 30 až 32,5 % glycerolu. Naopak nejvíce vit. C se uvolňuje u tablety obsahující 14,5 až 15 % chitosanu a přibližně 39 až 40 % glycerolu.

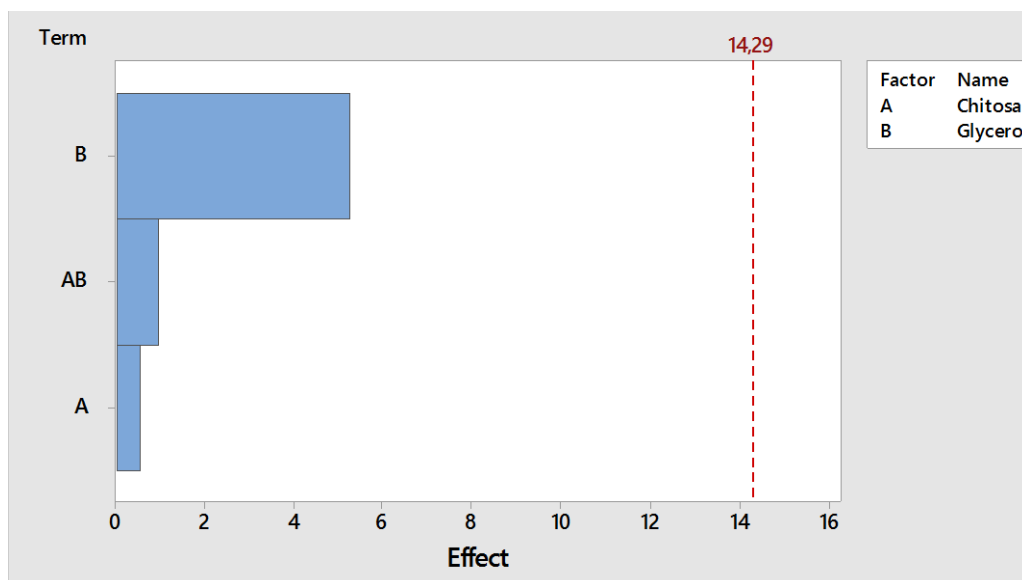


Obr. 46: Vliv sledovaných faktorů na množství uvolněného vit. C v čase 70 min

V grafu na obrázku 46 pozorujeme splnění předpokladu, že množství uvolněného vit. C klesá s rostoucím množstvím chitosanu. Dále je předpoklad splněn také u vlivu glycerolu, kde rozpustnost roste s rostoucím množstvím glycerolu. Větší vliv na množství uvolněného vit. C má v tomto případě glycerol, jehož hodnoty mají větší rozptyl.

11.2.5 Uvolňování vit. C v čase 90 min

Paretův diagram znázorněný na obrázku 47 vypovídá o statistickém vlivu faktorů na množství uvolněného vit. C při čase rozpouštění 90 min. Faktory nedosáhly kritické hodnoty, tudíž jsou statisticky nevýznamné. Nejvíce množství uvolněného vit. C ovlivňuje faktor B, tedy glycerol. Množství uvolněného vit. C nejméně ovlivňuje faktor A, tedy chitosan.



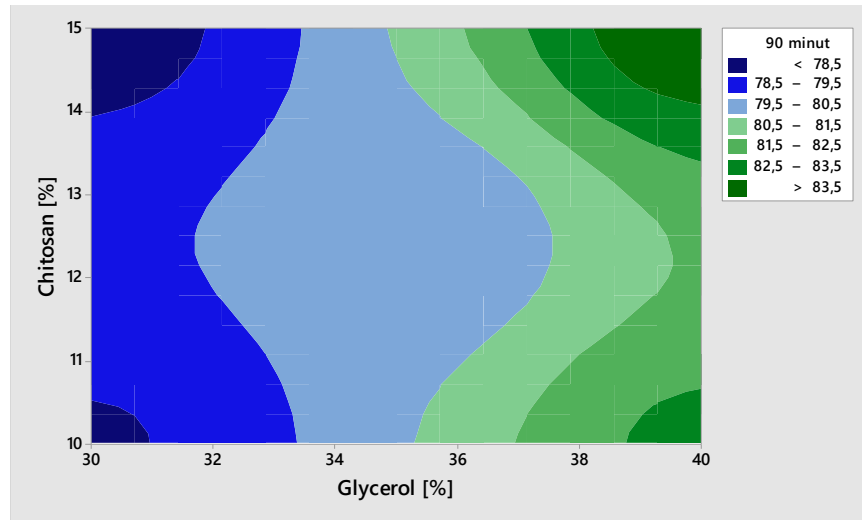
Obr. 47: Paretův diagram pro dobu uvolňování vit. C 90 min

Regresní rovnice:

Regresní rovnice popisuje vliv faktorů A a B na uvolňování vit. C v čase 90 min.

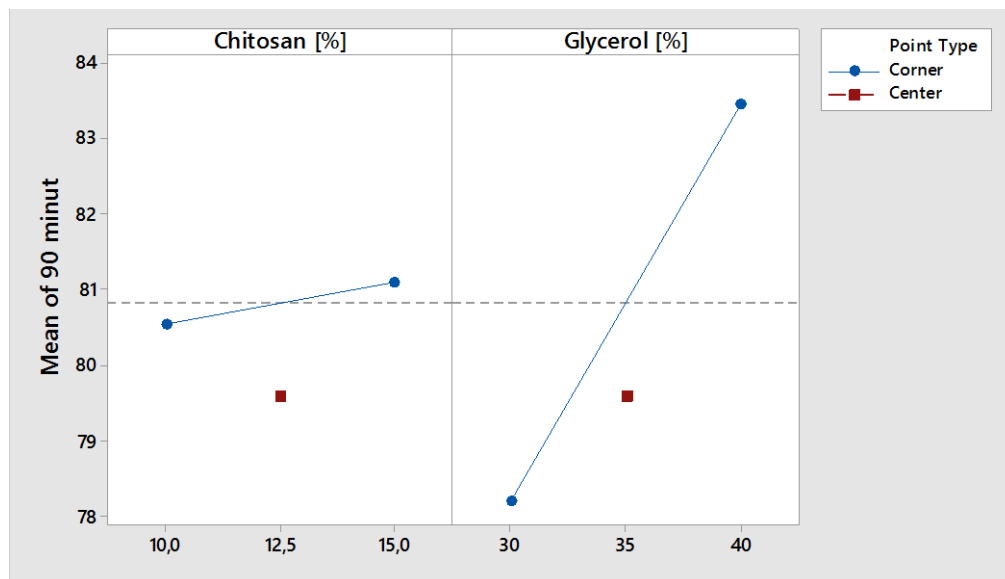
$$\text{Uvolňování 90 min} = 77,70 - 1,220A + 0,05000B + 0,03800A * B - 1,225CtPt$$

$$R^2 = 100 \%$$



Obr. 48: Vrstevnicový diagram pro dobu uvolňování vit. C 90 min

Vrstevnicový diagram na obr. 48 znázorňuje množství uvolněného vit. C v čase rozpouštění 90 min podle zvolené koncentrace daných faktorů. Nejméně uvolněného množství vit. C je ve dvou případech, a to při obsahu chitosanu od 10 do 10,5 % a glycerolu od 30 přibližně do 31 %. Dále u obsahu chitosanu od 14 do 15 % a glycerolu od 30 do necelých 32 %. Největší množství vit. C se uvolní při obsahu chitosanu od 10 do 10,5 % a glycerolu od 38 do 40 %. Dále od 14 do 15 % chitosanu a glycerolu od 38 do 40 %.



Obr. 49: Vliv sledovaných faktorů na množství uvolněného vit. C v čase 90 min

Na obrázku 49 je znázorněn vliv chitosanu a glycerolu na množství uvolněného vit. C v čase 90 min. U faktoru chitosanu není splněn předpoklad, tedy nedochází k poklesu množství uvolněného vit. C s rostoucím množstvím chitosanu. Naopak je splněn předpoklad u glycerolu, kdy s jeho rostoucím množstvím roste množství uvolněného vit. C. Větší vliv má v tomto případě glycerol, jak je patrné z rozptylu hodnot.

ZÁVĚR

Teoretická část se zabývá zdrojem keratinu – vlnou, keratinem a možnostmi jeho hydrolyzy, jejich využitím a poté chitosanem a možnostmi jeho využití. Dále také pojednává o směsích z KH a chitosanu a jejich použití.

V praktické části byl jako první připraven keratinový hydrolyzát, a to alkalicko-enzymovou hydrolyzou odtučněné vlny. Rozklad byl proveden ve dvou stupních. V prvním stupni rozklad probíhal za účasti $\text{Ca}(\text{OH})_2$, ve druhém stupni enzymem Savinase Ultra 16 L. Účinnost hydrolyzy byla 65,2 % a dialýzy 20,5 %. Z celkového množství vlny bylo získáno 13,4 % keratinového hydrolyzátu.

U KH byly provedeny analytické zkoušky, a to stanovení sušiny a molární hmotnosti. U KH a OV byl dále stanoven obsah popelovin a mikrochemické stanovení dusíku. Jednotlivé analytické zkoušky vychází podle předpokladu. Obsah sušiny u KH byl 95,6 %. Výsledky obsahu popelovin a dusíku u KH byly porovnávány s výsledky u OV. KH měl vyšší obsah popelovin než OV, a to 6,4 %. Obsah dusíku byl u KH nižší než u OV, a to 15 %. Po provedení elektroforézy KH bylo zjištěno, že daný vzorek ve srovnání se standardem se širokou distribucí molárních hmotností obsahoval složky jak o nižší molární hmotnosti (nejvíce v intervalu 6,5 až 20 kDa), tak složky o vyšší molární hmotnosti (nejvíce v intervalu 80 až 120 kDa).

Z připraveného KH byly připravovány směsi s chitosanem, glycerolem, glutaraldehydem a vit. C. U směsí byl hodnocen vliv přídavku chitosanu a glycerolu naplánovaný a vyhodnocený metodou faktorových pokusů. Rozsah přídavku chitosanu byl 10 – 15 %, glycerolu pak 30 – 40 %. U připravených tablet byla sledována jejich rozpustnost a uvolňování vit. C. Bylo předpokládáno, že nejlépe se bude ve stanovených časech rozpouštět tableta obsahující 10 % chitosanu a 40 % glycerolu (směs 1). Tento předpoklad byl splněn u časů rozpouštění vyšších než 30 min. Dále bylo předpokládáno, že nejméně se bude rozpouštět tableta obsahující 15 % chitosanu a 30 % glycerolu (směs 4). To je splněno u časů rozpouštění 5, 10, 40 a 50 min. Bylo očekáváno, že nejvíce se bude vitamin C uvolňovat z tablet obsahujících 10 % chitosanu a 40 % glycerolu (směs 1). Tento předpoklad byl potvrzen pouze u časů rozpouštění 5, 10 a 40 min. Dále bylo předpokládáno, že nejmenší množství vit. C bude uvolněno z tablety obsahující 15 % chitosanu a 30 % glycerolu (směs 4), což je splněno u většiny časů rozpouštění, kromě času rozpouštění 50 min. Z tohoto

důvodu můžeme směs 4 považovat za nejvhodnější pro další analýzy nebo případné aplikace.

Pro statistické vyhodnocení byly zvoleny Paretovy a vrstevnicové diagramy, regresní rovnice a grafy znázorňující vliv jednotlivých faktorů na rozpouštění a uvolňování vit. C. Dle Paretových diagramů měl největší vliv na rozpustnost ve většině případů faktor A – chitosan, nejmenší kombinace faktorů. U uvolňování vit. C měl největší vliv faktor B – glycerol, nejmenší pak faktor A - chitosan. Porovnávané faktory ani v jednom případě nedosáhly kritické hodnoty, byly tedy statisticky nevýznamné.

Cílem diplomové práce bylo posoudit vliv složení směsí na rozpustnost a uvolňování vit. C. Jelikož sledované faktory byly statisticky nevýznamné, do budoucna by bylo vhodné věnovat se analýze vlivu dalších technologických podmínek (např. množství GA, teplotě, době).

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Vlastnosti vlny a úprava EXP. In: *Texnetis* [online]. b.r. [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: <http://texnetis.com/skupina-pradelen-schoeller/vlastnosti-vlny-a-uprava-exp/>
- [2] Proteins structural levels. In: *Biochermanics* [online]. b.r. [cit. 2019-02-11]. Dostupné z: <https://biochermanics.wordpress.com/tag/proteins-structural-levels/>
- [3] Do alpha helices involve one polypeptide, while beta pleated sheets involve several?. In: *Quora* [online]. b.r. [cit. 2019-02-11]. Dostupné z: <https://www.quora.com/Do-alpha-helices-involve-one-polypeptide-while-beta-pleated-sheets-involve-several>
- [4] BRAGULLA, H. a D. HOMBERGER. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of anatomy* [online]. 2009, , 516–559 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x.
- [5] KLÁSEK, A. *Nauka o polymerech II.: Biopolymery*. Praha: SNTL, 1980.
- [6] MOKREJŠ, P., S. SUKOP a O. KREJČÍ. Charakterizace keratinových hydrolyzátů připravených z kuřecího peří. *Chemické listy* [online]. 2014, (108), 26-31 [cit. 2019-02-23].
- [7] KREJČÍ, O. *Zpracování keratinových odpadů a možnosti aplikací redukováných forem keratinu* [online]. Zlín, 2008 [cit. 2019-03-02]. Disertační práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [8] ABOUHEIF, M., S. BASMAEIL a H. METWALLY. Chemical preparation of NaOH-Keratin hydrolysate for improving the nutritive value of wheat straw. *Animal Feed Science and Technology* [online]. 1985, (13), 215-225 [cit. 2019-03-02]. DOI: 10.1016/0377-8401(85)90024-0.
- [9] GOUSTEROVA, A., D. BRAIKOVA a I. GOSHEV. Degradation of keratin and collagen containing wastes by newly isolated thermoactinomycetes or by alkaline hydrolysis. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 2005, (40), 335–340 [cit. 2019-03-02]. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2005.01692.x.

- [10] CARDAMONE, J. Keratin transamidation. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2008, (42), 413–419 [cit. 2019-03-02]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2008.02.004.
- [11] KURBANOGLU, E. Enhancement of citric acid production with ram horn hydrolysate by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* [online]. 2004, (92), 97–101 [cit. 2019-03-02]. DOI: 10.1016/j.biortech.2003.08.002.
- [12] MOKREJŠ, P., O. KREJČÍ, R. ČERMÁK a P. SVOBODA. Optimalizace podmínek enzymové hydrolyzy kuřecího peří. *Chemické listy* [online]. 2013, (107), 709-712 [cit. 2019-03-02].
- [13] RODMAN, A., F. FALCO a D. GEROGIORGIS. Enzymatic keratin hydrolysis: Dynamic modelling, parameter estimation and validation. In: *28th European Symposium on Computer-Aided Process Engineering (ESCAPE)* [online]. 2018, s. 1553-1558 [cit. 2019-03-02]. DOI: 10.1016/B978-0-444-64235-6.50271-0.
- [14] EREMEEV, N., I. NIKOLAEV a I. KERUCHEN'KO. Enzymatic Hydrolysis of Keratin-Containing Stock for Obtaining Protein Hydrolysates. *Applied Biochemistry and Microbiology* [online]. 2009, (45), 648-655 [cit. 2019-03-02]. DOI: 10.1134/S0003683809060131.
- [15] GENNADIOS, A. *Protein-based films and coatings*. Boca Raton: CRC Press, 2002. ISBN 15-871-6107-9.
- [16] SIMPSON, W. a G. CRAWSHAW. *Wool: science and technology* [online]. Cambridge: Woodhead, 2002 [cit. 2019-03-02]. ISBN 08-493-2820-9.
- [17] ESLAHI, N., F. DADASHIAN a N. NEJAD. Optimization of enzymatic hydrolysis of wool fibers for nanoparticles production using response surface methodology. *Advanced Powder Technology* [online]. 2013, (24), 416–426 [cit. 2019-03-03]. DOI: 10.1016/j.appt.2012.09.004.
- [18] KARTHIKEYAN, R., S. BALAJI a P. SEHGAL. Industrial applications of keratins - A review. *Journal of Scientific & Industrial Research* [online]. 2007, (66), 710-715 [cit. 2019-02-23].

- [19] MOKREJŠ, P. a F. LANGMAIER. *Aplikace přírodních polymerů*. Zlín, 2008. ISBN 978-80-7318-674-6.
- [20] ROUSE, J. a M. VAN DYKE. A Review of Keratin-Based Biomaterials for Biomedical Applications. *Materials* [online]. 2010, , 999-1014 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.3390/ma3020999.
- [21] NAVARRO, J., J. SWAYAMBUNATHAN a M. LERMAN. Development of keratin-based membranes for potential use in skin repair. *Acta Biomaterialia* [online]. 2019, (83), 177–188 [cit. 2019-03-09]. DOI: 10.1016/j.actbio.2018.10.025.
- [22] DALEV, P. Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate. *Bioresource Technology* [online]. 1994, (48), 265-267 [cit. 2019-03-03]. DOI: 10.1016/0960-8524(94)90156-2.
- [23] RAZAVI, M. Bio-based nanostructured materials. *Nanobiomaterials: Nanostructured materials for biomedical applications* [online]. 2018, , 17-39 [cit. 2018-11-05]. DOI: 10.1016/B978-0-08-100716-7.00002-7.
- [24] VAVŘÍKOVÁ, E. a J. VINŠOVÁ. Chitosan a jeho farmaceutické aplikace. *Chemické listy* [online]. 2009, , 5665 [cit. 2018-11-08].
- [25] JAYAKUMAR, R., D. MENON a K. MANZOOR. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2010, , 227–232 [cit. 2018-11-08]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.04.074.
- [26] TAPAN, K., T. AMRITA a A. AMIT. Modified chitosan hydrogels as drug delivery and tissue engineering systems: present status and applications. *Acta Pharmaceutica Sinica B* [online]. 2012, (5), 439–449 [cit. 2019-03-20]. DOI: 10.1016/j.apsb.2012.07.004.
- [27] ARANAZ, I., N. ACOSTA a C. CIVERA. Cosmetics and Cosmeceutical Applications of Chitin, Chitosan and Their Derivatives. *Polymers* [online]. 2018, (10) [cit. 2019-03-23]. DOI: 10.3390/polym10020213.
- [28] LESKOVJANOVÁ, J. a P. DOLEJŠ. Využití biopolymeru chitosanu při úpravě vody koagulací. *Chemické listy* [online]. 2012, (106), 826-830 [cit. 2019-03-26].

- [29] BALAJI, S., R. KUMAR a R. SRIPRIYA. Preparation and comparative characterization of keratin–chitosan and keratin–gelatin composite scaffolds for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering C* [online]. 2012, (32), 975–982 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.1016/j.msec.2012.02.023.
- [30] TANABE, T., N. OKITSU a A. TACHIBANA. Preparation and characterization of keratin-chitosan composite film. *Biomaterials* [online]. 2002, (23), 817-825 [cit. 2019-03-03]. DOI: 10.1016/S0142-9612(01)00187-9.
- [31] LIN, C., Y. CHEN a M. LU. Photo-Crosslinked Keratin/Chitosan Membranes as Potential Wound Dressing Materials. *Polymers* [online]. 2018, (10) [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.3390/polym10090987.
- [32] ZHAI, M., Y. XU a B. ZHOU. Keratin-chitosan/n-ZnO nanocomposite hydrogel for antimicrobial treatment of burn wound healing: Characterization and biomedical application. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [online]. 2018, (180), 253-258 [cit. 2019-03-29]. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2018.02.018.
- [33] TAN, H. B., F. Y. WANG a W. DING. Fabrication and Evaluation of Porous Keratin/chitosan (KCS) Scaffolds for Effectively Accelerating Wound Healing. *Biomedical and environmental sciences* [online]. 2015, (3), 178-189 [cit. 2019-04-22]. DOI: 10.3967/bes2015.024.
- [34] BALOGOVIČ, I. *Příprava a charakterizace směsí keratinových hydrolyzátů s chitosanem* [online]. Zlín, 2017 [cit. 2018-11-05]. Dostupné z: https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/40672/balogov%C3%A1_2017_dp.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [35] SINKIEWICZ, I., A. ŚLIWIŃSKA a H. STAROSZCZYK. Alternative Methods of Preparation of Soluble Keratin from Chicken Feathers. *Waste Biomass Valor* [online]. 2017, (4), 1043–1048 [cit. 2018-11-05]. DOI: 10.1007/s12649-016-9678-y.
- [36] KORNILLOWICZ-KOWALSKA, T. a J. BOHACZ. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. *Waste Management* [online]. 2011, (8), 1689-1701 [cit. 2018-11-05]. DOI: 10.1016/j.wasman.2011.03.024.

- [37] HAMDI, M., R. NASRI a S. HAJJI. Acetylation degree, a key parameter modulating chitosan rheological, thermal and film-forming properties. *Food Hydrocolloids* [online]. 2019, , 48-60 [cit. 2018-11-08]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2018.07.027.
- [38] WANG, B., W. YANG a J. MCKITTRICK. Keratin: Structure, Mechanical Properties, Occurrence in Biological Organisms, and Efforts at Bioinspiration. *Progress in materials science* [online]. 2016, , 229-318 [cit. 2018-11-09]. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2015.06.001.
- [39] PANDEY, A., R. HÖFER a C. LARROCHE. *Industrial Biorefineries and White Biotechnology* [online]. Elsevier, 2015 [cit. 2019-02-11]. ISBN 978-0-444-63453-5.
- [40] HILL, P., H. BRANTLEY a M. VAN DYKE. Some properties of keratin biomaterials: Kerateines. *Biomaterials* [online]. 2010, , 585–593 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.076.
- [41] LI, B., J. YAO a J. NIU. Effects of Graphene Oxide on the Structure and Properties of Regenerated Wool Keratin Films. *Polymers* [online]. 2018, **10**(12) [cit. 2019-02-15]. DOI: 10.3390/polym10121318.
- [42] IDRIS, A., R. VIJAYARAGHAVAN a U. RANA. Dissolution and regeneration of wool keratin in ionic liquids. *Green Chemistry* [online]. 2014, **16**(5), 2857-2864 [cit. 2019-02-15]. DOI: 10.1039/c4gc00213j.
- [43] AHSAN, S., M. THOMAS a K. REDDY. Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2018, (110), 97-109 [cit. 2019-02-25]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.140>.
- [44] CROISIER, F. a C. JÉRÔME. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal* [online]. 2013, (49), 780–792 [cit. 2019-02-25]. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009.
- [45] WHITFORD, D. *Proteins: structure and function* [online]. Hoboken, NJ: J. Wiley, 2005 [cit. 2019-03-02]. ISBN 0-471-49893-9.

- [46] YAMAUCHI, K., A. YAMAUCHI a T. KUSUNOKI. Preparation of stable aqueous solution of keratins, and physicochemical and biodegradational properties of films. *Journal of Biomedical Materials Research* [online]. 1996, (31), 439-444 [cit. 2019-03-03]. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4636(199608)31:4<439::AID-JBM1>3.0.CO;2-M.
- [47] KATOH, K., M. SHIBAYAMA a T. TANABE. Preparation and physicochemical properties of compression-molded keratin films. *Biomaterials* [online]. 2004, (25), 2265–2272 [cit. 2019-03-03]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.09.021.
- [48] VASCONCELOS, A., G. FREDDI a A. CAVACO-PAULO. Biodegradable Materials Based on Silk Fibroin and Keratin. *Biomacromolecules* [online]. 2008, (9), 1299–1305 [cit. 2019-03-03]. DOI: 10.1021/bm7012789.
- [49] ALUIGI, A., C. VINEIS a A. VARESANO. Structure and properties of keratin/PEO blend nanofibres. *European Polymer Journal* [online]. 2008, (44), 2465–2475 [cit. 2019-03-09]. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2008.06.004.
- [50] ALUIGI, A., A. VARESANO a A. MONTARSOLO. Electrospinning of Keratin/Poly(ethylene oxide)Blend Nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, [online]. 2007, (104), 863-870 [cit. 2019-03-09]. DOI: 10.1002/app.25623.
- [51] GAJDZIOK, J. a D. VETCHÝ. Mukoadhezivní polymery v lékových formách. *Chemické listy* [online]. 2012, (106), 632-638 [cit. 2019-03-10].
- [52] FREDDI, G., M. TSUKADA a H. SHIOZAKI. Chemical Modification of Wool Fibres with Acid Anhydrides. *Journal of Applied Polymer Science*, [online]. 1999, (71), 1573-1579 [cit. 2019-03-14]. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4628(19990307)71:10<1573::AID-APP5>3.3.CO;2-1.
- [53] ZHELJAZKOV, V., G. STRATTON a J. PINCOCK. Wool-waste as organic nutrient source for container-grown plants. *Waste Management* [online]. 2009, (29), 2160-2164 [cit. 2019-03-14]. DOI: 10.1016/j.wasman.2009.03.009.

- [54] DALEV, P., I. IVANOV a A. LIUBOMIROVA. Enzymic Modification of Feather Keratin Hydrolysates with Lysine Aimed at Increasing the Biological Value. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 1997, (73), 242-244 [cit. 2019-03-14].
- [55] Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. *Animal Feed Science and Technology* [online]. 2006, (126), 135-144 [cit. 2019-03-14]. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2005.06.002.
- [56] SECCHI, G. Role of protein in cosmetics. *Clinics in Dermatology* [online]. 2008, (26), 321-325 [cit. 2019-03-14]. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2008.04.004.
- [57] CHUENG SAMARN, S., S. RATTANAMONGKOLGUL a R. LUECHAPUDIPORN. Curcumin Extract for Prevention of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* [online]. 2012, (11), 2121–2127 [cit. 2019-03-20]. DOI: 10.2337/dc12-0116.
- [58] ISAACSON, R., C. GANZER a H. HRISTOV. The clinical practice of risk reduction for Alzheimer's disease: A precision medicine approach. *Alzheimer's & Dementia* [online]. 2018, (12), 1663-1673 [cit. 2019-03-20]. DOI: 10.1016/j.jalz.2018.08.004.
- [59] ISLAM, S., M. BHUIYAN a M. ISLAM. Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2017, (25), 854–866 [cit. 2019-03-22]. DOI: 10.1007/s10924-016-0865-5.
- [60] TRAN, N., Y. JOUNG a E. LIH. In Situ Forming and Rutin-Releasing Chitosan Hydrogels As Injectable Dressings for Dermal Wound Healing. *Biomacromolecules* [online]. 2011, (12), 2872–2880 [cit. 2019-03-22]. DOI: 10.1021/bm200326g.
- [61] RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* [online]. 2006, (31), 603–632 [cit. 2019-03-23]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001.
- [62] SHAHIDI, F., J. ARACHCHI a Y. JEON. Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 1999, (10), 37-51 [cit. 2019-03-24].

- [63] MANIGANDAN, V., R. KARTHIK a S. RAMACHANDRAN. Chitosan Applications in Food Industry. *Biopolymers for Food Design: Handbook of Food Bioengineering* [online]. 2018, , 469-491 [cit. 2019-03-24]. DOI: 10.1016/B978-0-12-811449-0.00015-3.
- [64] JELÍNKOVÁ, E. *Keratinové hydrolyzáty a jejich využití pro přípravu filmů* [online]. Zlín, 2015 [cit. 2019-05-06]. Dostupné z: http://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/33651/jel%C3%ADnkv%C3%A1_2015_dp.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [65] PALOVÁ, M. *Hodnocení vlastností filmů připravovaných ze směsi keratinového hydrolyzátu a chitosanu* [online]. 2018 [cit. 2019-05-06]. Dostupné z: http://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/42363/palov%C3%A1_2018_dp.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AMK	Aminokyselina.
pI	Isoelektrický bod.
KH	Keratinový hydrolyzát.
PEO	Polyethylenoxid.
TI	Tkáňové inženýrství.
SDS	Dodecylsulfát sodný.
PBS	Pufrovaný fyziologický roztok.
OV	Odtučněná vlna.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Schéma struktury vlákna vlny [5].....	12
Obr. 2: Primární struktura [13]	14
Obr. 3: Konformace α -helix, β -skládaný list a znázornění AMK jednotek [14]	14
Obr. 4: Strukturní vzorec chitinu a chitosanu [45]	23
Obr. 5: Vlna po odtučnění a namletí.....	33
Obr. 6: Zavařovací hrnc Domo s míchacím zařízením využitý pro rozklad vlny.....	34
Obr. 7: Nerozložený zbytek vlny po vysušení	35
Obr. 8: Celulózová membrána s kapalným keratinovým hydrolyzátem	35
Obr. 9: Keratinový hydrolyzáat po vysušení a rozetření ve třecí misce.....	36
Obr. 10: Mineralizační aparatura	38
Obr. 11: Parnas-Wagnerova destilační aparatura	39
Obr. 12: Vzorek před titrací a vzorek po titraci	39
Obr. 13: Minicela Novex Xcell II a programovatelný zdroj Novex Model-3540	40
Obr. 14: Gel po ustálení a barvení, vzorek KH – vlevo, standard – vpravo.....	43
Obr. 15: Silikonová forma pro přípravu tablet s KH-chitosanovou směsí	45
Obr. 16: Připravené tablety z KH-chitosanové směsi.....	45
Obr. 17: Váženka s tabletou pro stanovení rozpustnosti a množství uvolněného vit. C	46
Obr. 18: Graf závislosti množství rozpuštěné tablety na čase rozpouštění	48
Obr. 19: Graf závislosti množství uvolněného vit. C na čase rozpouštění	50
Obr. 20: Paretův diagram pro rozpouštění po dobu 5 min.....	51
Obr. 21: Vrstevnicový diagram pro čas rozpouštění 5 min	52
Obr. 22: Vliv sledovaných faktorů na rozpustnost v čase 5 min	53
Obr. 23: Paretův diagram pro rozpouštění po dobu 20 min.....	54
Obr. 24: Vrstevnicový diagram pro čas rozpouštění 20 min	54
Obr. 25: Vliv sledovaných faktorů na rozpustnost v čase 20 min	55
Obr. 26: Paretův diagram pro rozpouštění po dobu 40 min.....	56
Obr. 27: Vrstevnicový diagram pro čas rozpouštění 40 min	56
Obr. 28: Vliv sledovaných faktorů na rozpustnost v čase 40 min	57
Obr. 29: Paretův diagram pro rozpouštění po dobu 70 min.....	58
Obr. 30: Vrstevnicový diagram pro čas rozpouštění 70 min	58
Obr. 31: Vliv sledovaných faktorů na rozpustnost v čase 70 min	59
Obr. 32: Paretův diagram pro rozpouštění po dobu 90 min.....	60

Obr. 33: Vrstevníkový diagram pro čas rozpouštění 90 min	60
Obr. 34: Vliv sledovaných faktorů na rozpustnost v čase 90 min	61
Obr. 35: Paretův diagram pro dobu uvolňování vit. C 5 min	62
Obr. 36: Vrstevníkový diagram pro dobu uvolňování vit. C 5 min	63
Obr. 37: Vliv sledovaných faktorů na množství uvolněného vit. C v čase 5 min	63
Obr. 38: Paretův diagram pro dobu uvolňování vit. C 20 min	64
Obr. 39: Vrstevníkový diagram pro dobu uvolňování vit. C 20 min	65
Obr. 40: Vliv sledovaných faktorů na množství uvolněného vit. C v čase 40 min	65
Obr. 41: Paretův diagram pro dobu uvolňování vit. C 40 min.	66
Obr. 42: Vrstevníkový diagram pro dobu uvolňování vit. C 40 min	67
Obr. 43: Vliv sledovaných faktorů na množství uvolněného vit. C v čase 40 min	67
Obr. 44: Paretův diagram pro dobu uvolňování vit. C 70 min	68
Obr. 45: Vrstevníkový diagram pro dobu uvolňování vit. C 70 min	69
Obr. 46: Vliv sledovaných faktorů na množství uvolněného vit. C v čase 70 min	69
Obr. 47: Paretův diagram pro dobu uvolňování vit. C 90 min	70
Obr. 48: Vrstevníkový diagram pro dobu uvolňování vit. C 90 min	71
Obr. 49: Vliv sledovaných faktorů na množství uvolněného vit. C v čase 90 min	71

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Tabulka výsledků výtěžností a ztrát po hydrolýze a dialýze	36
Tab. 2: Obsah sušiny a vlhkosti ve vzorku keratinového hydrolyzátu	41
Tab. 3: Obsah popela ve vzorku keratinového hydrolyzátu a odtučněné ovčí vlně	41
Tab. 4: Obsah dusíku ve vzorku keratinového hydrolyzátu a odtučněné vlny	42
Tab. 5: Složení směsí pro přípravu tablet	44
Tab. 6: Vyhodnocení zkoušky rozpustnosti u jednotlivých směsí.....	48
Tab. 7: Vyhodnocení zkoušky uvolňování vit. C	49