

Vliv technologických podmínek při hydrolýze keratinových materiálů

Bc. Lucie Majstryszynová

Diplomová práce
2020



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Majstryszínová**
Osobní číslo: **T16605**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství polymerů**
Forma studia: **Kombinovaná**
Téma práce: **Vliv technologických podmínek při hydrolýze keratinových materiálů**

Zásady pro vypracování

Teoretická část práce bude zaměřena na stručnou rešerši informací o keratinových hydrolyzátech a způsobech jejich přípravy různými druhy hydrolyzy. Cílem praktické části práce bude provedení série hydrolyz keratinových materiálů a sledování vlivu vybraných technologických podmínek (teplota, čas, pH, apod.) na účinnost hydrolyzy a získaný hydrolyzát.

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

Seznam doporučené literatury:

DULLAART, Renke. a Joao. MOUSQUES. Keratin: structure, properties, and applications. Hauppauge, N.Y: Nova Science Publishers, c2012. ISBN 9781621003366.

FRASER, R. D. B., T. P. MACRAE a G. E. ROGERS. Keratins: their composition, structure, and biosynthesis. Springfield, Ill.: Thomas, 1972. ISBN 0-398-02283-6.

WALLENBERGER, Frederick T. a Norman WESTON. Natural Fibers, Plastics and Composites. Boston, MA: Springer US, 2004. ISBN 978-144-1990-501.

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

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2020**
Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

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

Ve Zlíně dne 17. února 2020

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně

.....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Diplomová práce je věnována tématu hydrolýzy keratinu a vlivu jednotlivých technologických podmínek na množství a složení hydrolyzátů. Teoretická část popisuje strukturu, složení a vlastnosti keratinu. Dále pak studuje jednotlivé metody hydrolýz, jejich výhody a nevýhody a možné aplikace keratinových materiálů.

Experimentální část je zaměřená konkrétně na metodu kombinované alkalicko-enzymové hydrolýzy, kde byly ze základní suroviny (ovčí vlna) připraveny keratinové hydrolyzáty. Byl hodnocen jak vliv technologických podmínek, tak i analytické složení hydrolyzátů. Jako optimální se ukázaly být podmínky hydrolýzy - 0,5% NaOH, 4 h alkalická část a 24 h enzymová část hydrolýzy. Při těchto podmínkách byla zjištěna nejvyšší účinnost (71,5 %) a hydrolyzát měl zároveň neoptimálnější složení.

Klíčová slova: keratin, keratinové hydrolyzáty, enzymová hydrolýza, alkalická hydrolýza, ovčí vlna

ABSTRACT

The diploma thesis is devoted to the topic of keratin hydrolysis and the influence of individual technological conditions on the amount and composition of hydrolysates. The theoretical part describes the structure, composition and properties of keratin. Furthermore, it studies individual methods of hydrolysis, their advantages and disadvantages and possible applications of keratin materials.

The experimental part is focused specifically on the method of combined alkaline-enzymatic hydrolysis, where keratin hydrolysates were prepared from the basic raw material (sheep wool). Both the influence of technological conditions and the analytical composition of hydrolysates were evaluated. The conditions of hydrolysis – 0,5% NaOH, 4 h alkaline part and 24 h enzyme part of hydrolysis - proved to be optimal. Under these conditions, the highest efficiency (71,5%) was found and the hydrolyzate also had the most optimal composition.

Keywords: keratin, keratin hydrolysates, enzymatic hydrolysis, alkalic hydrolysis, sheep wool

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Ing. Ondřeji Krejčímu, Ph.D. za mimořádnou ochotu a pomoc, odborné vedení a cenné připomínky.

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

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 KERATIN	12
1.1 FUNKCE KERATINU	12
1.2 STRUKTURA KERATINU	12
1.3 CHEMICKÉ SLOŽENÍ KERATINU	16
2 OVČÍ VLNA	18
2.1 STRUKTURA VLÁKNA VLNY	19
3 HYDROLÝZA KERATINU	22
3.1 DRUHY HYDROLÝZY	23
3.1.1 Kyselá hydrolýza	23
3.1.2 Alkalická hydrolýza	23
3.1.3 Redukční a oxidační hydrolýza	23
3.1.4 Enzymová hydrolýza	24
3.1.5 Kombinovaný způsob hydrolýzy	25
4 APLIKACE KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ	26
4.1 VYUŽITÍ V MEDICÍNĚ	26
4.1.1 Keratinové filmy	27
4.1.2 Keratinové scaffoldy	27
4.1.3 Keratinová vlákna	27
4.2 VYUŽITÍ V KOSMETICE	28
4.3 VYUŽITÍ VE VÝŽIVĚ ZVÍŘAT	28
4.4 VYUŽITÍ PŘI ZPRACOVÁNÍ KŮŽE	28
4.5 VYUŽITÍ V ZEMĚDĚLSTVÍ.....	29
4.6 VYUŽITÍ V TEXTILNÍM PRŮMYSLU	29
4.7 VYUŽITÍ PŘI VÝROBĚ OBALOVÝCH MATERIÁLŮ	30
II PRAKTICKÁ ČÁST	31
5 CÍLE PRÁCE	32
6 MATERIÁL A METODY	33

6.1	POUŽITÉ PŘÍSTROJE	33
6.2	POUŽITÉ POMŮCKY	34
6.3	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	34
6.4	POUŽITÉ ENZYMY	35
6.5	POUŽITÝ MATERIÁL A PŘEDÚPRAVA VLNY	35
6.6	ALKALICKO-ENZYMOVÁ HYDROLÝZA	38
6.7	ÚČINNOST HYDROLÝZY	43
6.8	STANOVENÍ SUŠINY	43
6.9	STANOVENÍ POPELOVIN	43
6.10	MIKROCHEMICKÉ STANOVENÍ DUSÍKU – MICRO-KJELDAHLOVA METODA AOAC 960.52	44
6.11	ELEKTROFORÉZA	47
6.12	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ	49
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	50
7.1	HYDROLÝZA	50
7.2	VÝSLEDKY ANALYTICKÝCH ZKOUŠEK	59
7.3	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ	62
	ZÁVĚR	68
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	70
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	75
	SEZNAM OBRÁZKŮ	76
	SEZNAM TABULEK	78

ÚVOD

Keratin je přírodní protein, patří tedy mezi obnovitelné zdroje. Je také odpadním produktem a představuje tak levnou surovinu vhodnou k dalšímu využití. Z těchto hledisek je určitě výhodné se touto surovinou zabývat.

Mezi materiály, které obsahují keratin, se řadí například vlna, peří nebo kopyta. Jsou to tvrdé produkty s vysokým obsahem síry a bílkovin. Vysoký obsah cystinu (7-13 %) odlišuje keratiny od jiných strukturálních proteinů, jako je například kolagen a elastin. Rozpouštění a samotná extrakce keratinu je velmi obtížný proces ve srovnání s jinými přírodními polymery jako je chitosan, škrob a kolagen. Molekula keratinu je tvořena polypeptidovými řetězci příčně spojenými disulfidovými vazbami, které není snadné rozštěpit. Použití keratinu závisí na nákladově a časově efektivní metodě extrakce. Často jsou k hydrolýze používány látky, které jsou sice velmi účinné, avšak hydrolyzáty extrahované s pomocí těchto látek nejsou použitelné v lékařství a kosmetice, jelikož mohou být zdravotně závadné. Z důvodu komplikované a z mnoha hledisek náročné hydrolýzy je snaha o získávání keratinu z odpadních produktů co nejjednodušší a pokud možno nejvýhodnější cestou.

V současné době se s výhodou používá hydrolyzát keratinu jako přídavek do nejrůznějších produktů, kde zlepšuje jejich vlastnosti a obohacuje je o specifické funkce. Nejčastěji používanou formou jsou keratinové filmy a vlákna, ze kterých se dále vytváří netkané textilie na úrovni nano.

Cílem diplomové práce bylo stanovení neoptimálnějších podmínek hydrolýzy keratinu z ovčí vlny. V laboratořích byly provedeny série dvoustupňových alkalicko-enzymových hydrolýz při různých podmínkách. Experimenty byly navrženy metodou faktorových pokusů se středovými pokusy. Byla upravována doba experimentu a koncentrace hydroxidu sodného. K enzymové hydrolýze byl použit enzym Savinase Ultra 16L (Novozymes). Produkty jednotlivých hydrolýz byly hodnoceny analytickými metodami. K vyhodnocení a návrhu experimentů byl použit statistický program Minitab.

Teoretická část se zabývá vlastnostmi, strukturou a složením keratinu. Popisuje praktické využití v medicíně, kosmetice, zemědělství, kožedělném průmyslu, textilním průmyslu a v neposlední řadě ve výživě zvířat. Ze surovin získávaných z keratinu se zaměřuje na ovčí vlnu, jelikož byla použita jako základní surovina v experimentální části. Dále

se zaměřuje na jednotlivé typy hydrolyz. Popisuje jejich postup, výhody a nevýhody z ekonomického a časového hlediska a také náročnosti na použité látky.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KERATIN

Slovo keratin pochází z řeckého *keras*, kde znamená roh [1]. Keratin je strukturální, nerozpustný protein vznikající keratinizací epitelárních buněk, nazývaných keratinocyty, které procesem keratinizace tvoří neživé, nerozpustné útvary. Keratinocyty se vyskytují v tělech savců, ptáků, plazů i obojživelníků. Tvoří velkou část horní vrstvy epidermis a podílí se tak na struktuře srsti, rohů, nehtů, drápů, kopyt, peří, vlny a dalších pokožkových útvarů. Těmto útvarům keratin poskytuje dobrou odolnost, umožňují exkreci a chrání tělo živočicha před vnějším prostředím. Keratin je jedním z nejtvrdějších biologických materiálů s vysokou houževnatostí a Youngovým modulem vyšším než v případě kolagenu [2, 3].

1.1 Funkce keratinu

Keratinová vlákna ovlivňují strukturu a mitotickou aktivitu epitelárních buněk. Buňkám a tkáním poskytují tzv. scaffold, který zvyšuje odolnost proti mechanickému namáhání a udržuje jejich strukturální celistvost. Vlákna keratinu mohou být rychle rozložena a znovu sestavena, čímž je zajištěna pružnost cytoskeletu. Keratiny se mohou také podílet na buněčné signalizaci, přenosu a diferenciaci buněk [4].

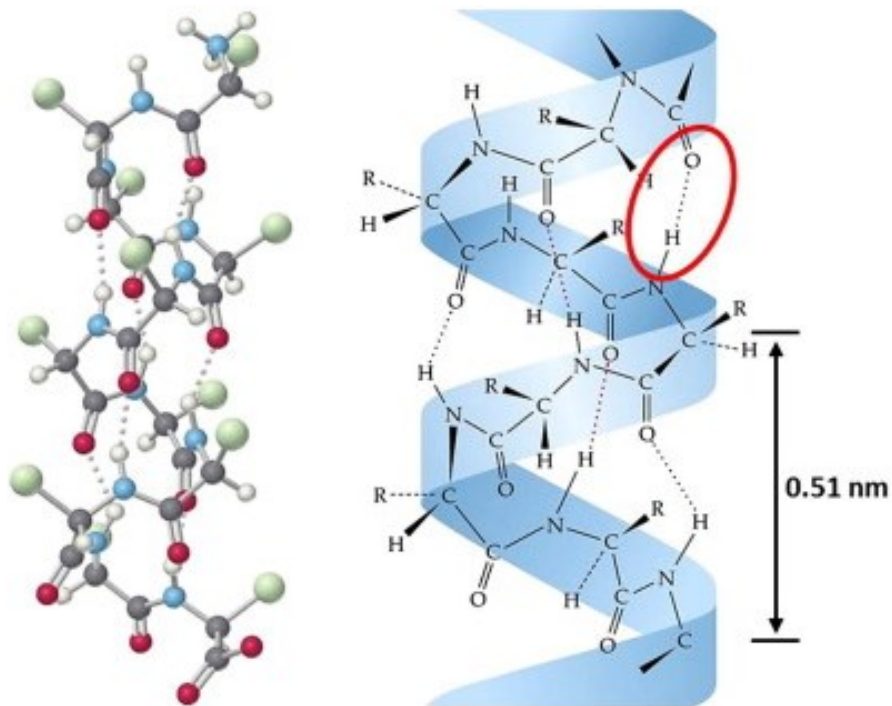
1.2 Struktura keratinu

Keratinová vlákna se skládají z polypeptidového řetězce, který vzniká spojením aminokyselin kovalentními peptidickými vazbami (-CO-NH-). Sekvence aminokyselin tvoří primární strukturu keratinu a ovlivňuje jeho vlastnosti a funkce. Různé uspořádání aminokyselin v řetězci tedy vytváří odlišné vlastnosti. Molekuly keratinu vytváří vláknitou strukturu, řadíme je tedy mezi skleroproteiny [5, 6].

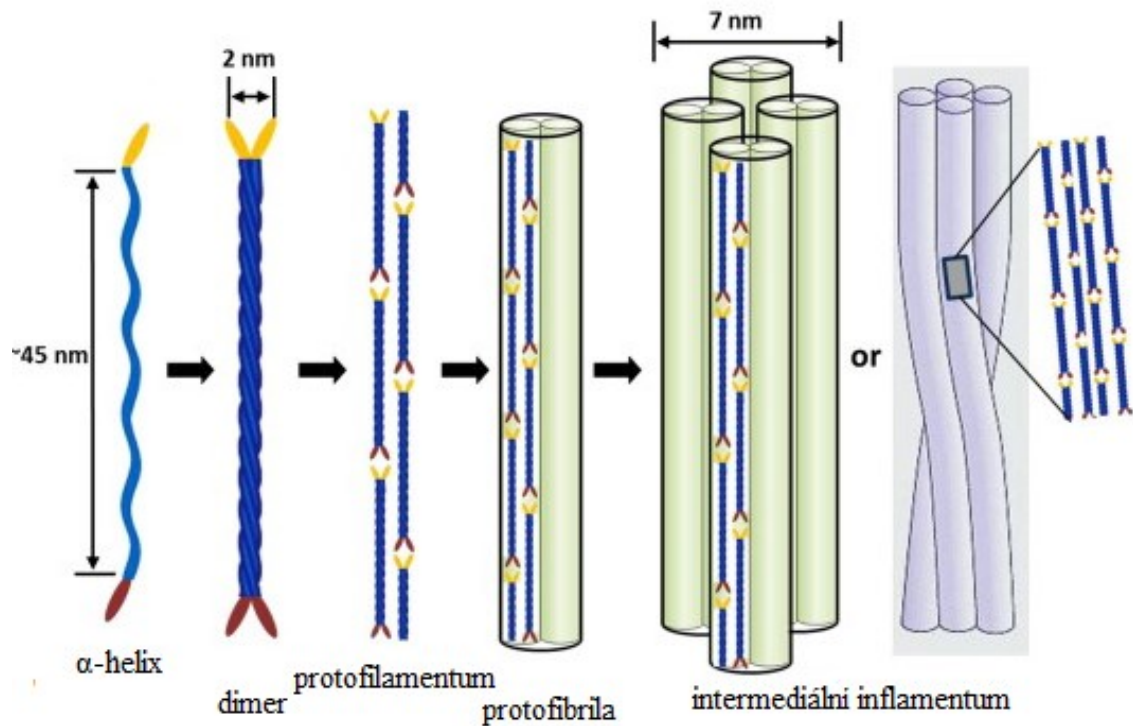
Keratin se dělí na tři typy, jimiž jsou α -, β -keratin a amorfní keratin. α -keratin je s molekulovou hmotností 40-65 kDa typický pro savce, β -keratin pro ptáky a plazy. Na rozdíl od α -keratinu, který je pružný a ohebný je β -keratin pevný. β -keratin je obtížněji extrahovatelný a není vhodný pro tvorbu filmů, gelů, povlaků a vláken pro medicínské aplikace. Amorfní keratin (γ -keratin) je globulární protein s vysokým obsahem cystinu a molekulovou hmotností přibližně 15 kDa. Vyskytuje se například ve vnější vrstvě vlasové kůžičky.

Strukturu α -keratinu tvoří dva helikálně svinuté řetězce polypeptidu. α -helixy nacházející se v proteinech jsou pravotočivé. Šroubovitá struktura je stabilizována vodíkovými

vazbami uvnitř řetězce, což umožňuje otáčení řetězce a vzniká tak šroubovitý tvar. Obrázek 1 znázorňuje proces formování α -struktury. Dva izolované řetězce α -helix tvoří stočenou cívku, neboli dimer (45 nm dlouhý). Disulfidovými vazbami se pak jednotlivé dimery spojují svými konci s jinými disulfidovými vazbami a uspořádávají se vedle sebe za vzniku protofilamenta (průměr 2 nm). Dvě protofilamenta se bočně spojují za vzniku protofibrily. Čtyři protofibrily se spojují do kruhového nebo spirálovitého intermediálního filamenta (průměr 7 nm). Intermediální filamenta se dále spojují s matricovými proteiny [5].

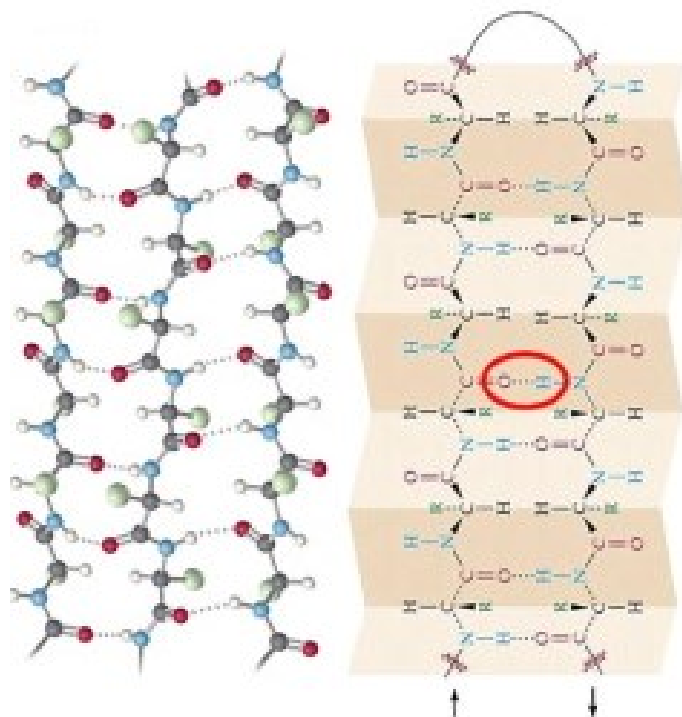


Obr. 1. Model α -helixu [5]



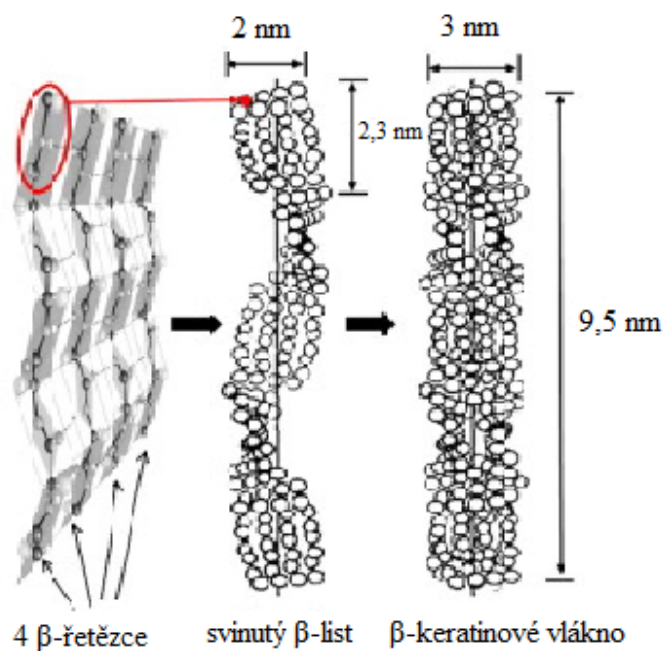
Obr. 2. Vznik intermediálního filamenta [5]

β -keratin má strukturu skládaného listu. Je bohatý na glycinové, alaninové, serinové a prolinové zbytky, ale neobsahuje cystein. Skládá se z bočně sbalených β -vláken, které mohou být paralelní nebo antiparalelní a řetězce jsou vzájemně spojeny intermolekulárními vodíkovými vazbami. Struktura skládaného listu je stabilizována vodíkovými vazbami mezi vlákny, které umožňují vytvoření listu a rovinné peptidové vazby umožňují skládání β -listu (Obr. 3).



Obr. 3. Model β -skládaného listu [5]

Jeden polypeptidový řetězec se skládá tak, že tvoří čtyři β -řetězce, které se stáčíjí a tvoří β -list. Dva listy tvoří β -keratinové vlákno [5]. Vznik β -keratinového vlákna znázorňuje Obr. 4.

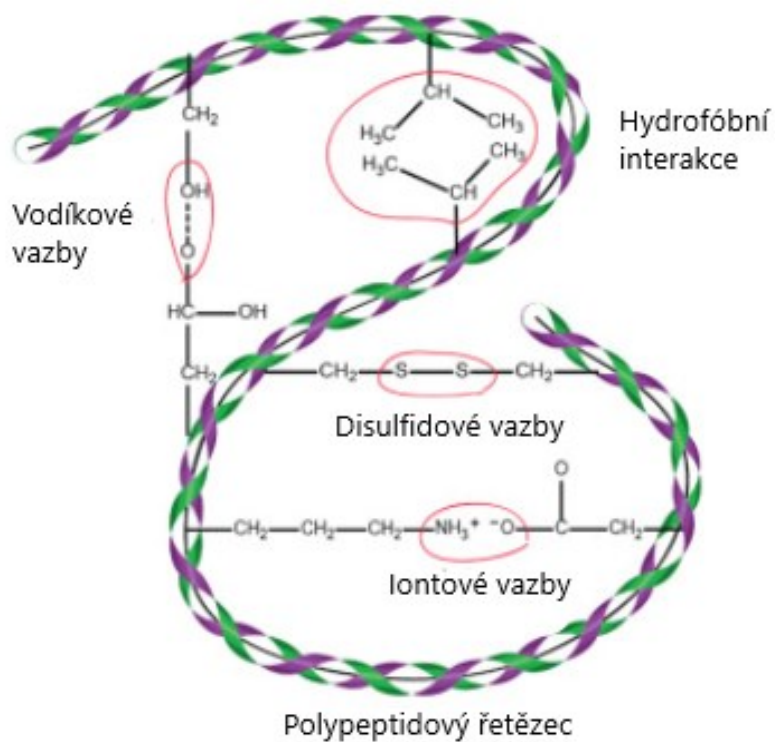


Obr. 4. Vznik β -keratinového vlákna [5]

1.3 Chemické složení keratinu

V keratinu mohou být obecně přítomny všechny aminokyseliny. Keratin vyskytující se v různých tkáních různých živočichů má jiné zastoupení aminokyselin a také se liší jejich množstvím. Nejvýznamnější aminokyselinou je cystein, který se v keratinu vyskytuje ve vysokém množství (7-20 % z celkového počtu aminokyselinových zbytků), dále má velký podíl glycinu, serinu, leucinu a kyseliny glutamové. Díky cysteinu jsou tato vlákna velmi odolná, nerozpustná ve vodě a organických rozpouštědlech a chemicky nereaktivní. Dále jsou pružná a mají schopnost obnovy po opakovaném mechanickém namáhání pouze s malou ztrátou fyzikálních vlastností. Molekuly cysteinu jsou spojeny disulfidickými můstky [5].

Podle obsahu cysteinu dělíme keratin na tvrdý typ a měkký typ. Tvrdý keratin se nachází například v nehtech, kde je potřebná vysoká odolnost a tvrdost struktury. Tyto vlastnosti jsou zajištěny v důsledku vyššího množství disulfidových vazeb. Tvrdý keratin odolává většině proteolytických enzymů jako je pepsin trypsin, ale může být tepelně hydrolyzován ve vodě pod tlakem. Naopak měkký keratin je přítomen v kůži, je zesíťován menším množstvím disulfidových vazeb a je tedy flexibilnější. Disulfidové vazby se vyskytují mezi atomy síry a k jejich rozštěpení je nutné použití silných alkálií a redukčních činidel. Iontové vazby se vyskytují mezi skupinami COOH a NH a tyto vazby lze rozštěpit za pomoci alkálií. Iontové vazby jsou poměrně slabé ve vodném prostředí a energie potřebná k rozštěpení vazby je asi 13 kJ/mol. Hodnota disociační energie se liší v závislosti na prostředí. Mezi další vazby přítomné v molekule keratinu patří vodíkové vazby a hydrofobní interakce [6, 7, 8, 9]. Chemické vazby v keratinu znázorňuje Obr. 5.



Obr. 5. Chemické vazby v keratinu [10]

2 OVČÍ VLNA

Vlna je velmi složitě přírodní, biodegradabilní proteinové vlákno. Jedná se tedy o obnovitelnou a recyklovatelnou surovinu. Z hlediska životního prostředí má vlna výhodu v tom, že její růst není ve srovnání s rostlinnými produkty podpořen pesticidy a hnojivy. Vlna se pro své skvělé vlastnosti nejčastěji využívá v textilním průmyslu. Mezi ně bezesporu patří dobrá pružnost, termoregulační schopnost, prodyšnost, antibakteriální schopnost a schopnost absorbovat vlhkost. Kvalita vlny závisí na mnoha faktorech, například způsobu získávání suroviny, původem, stářím a pohlavím zvířete. Na jednotlivých částech těla zvířete se vyskytuje vlna o různé kvalitě od jemné po hrubou. Vlnu lze dělit do skupin podle jemnosti na základě plemene ovce, ze které je získávána. Jemnost vlny se pohybuje v rozmezí 10 – 80 μm [9, 10]. Nejjemnější vlnou je vlna z plemene Merino, které vzniklo ve středověku ve Španělsku. Průměr vláken Merino vlny se pohybuje v rozmezí 17-25 μm . Hrubou vlnu produkují plemena Corriedale (28-33 μm), Romney (33-37 μm), Perendale (31-35 μm), Lincoln (39-41 μm), Leicester (37-40 μm), Suffolk (30-34 μm) a Blackface (40-44 μm) [11].

Vlákna vlny rostou ve svazcích (staplová vlákna), které obsahují tisíce vláken. Tato vlákna jsou velice pružná a elastická. Mohou být ohýbána a kroucena až 30 000 krát bez poškození. Každé vlákno má přirozenou elasticitu, která umožňuje protažení vlákna až o jednu třetinu a jeho navrácení na původní délku [9, 10].

Surová vlna obsahuje 25-70 % nečistot a rostlinné hmoty. Vlněný tuk je směs různých mastných kyselin a esterů. Suint, který vzniká z potu je složen převážně z draselných solí, kyselin s krátkým řetězcem. Dalšími složkami jsou sírany, fosfáty a dusíkaté látky. Tuky a nečistoty se odstraňují odmaštěním, rostlinná hmota mechanicky česáním [11].

Až 91 % vlny je složeno z α -keratinu. Vlákna vlny se skládají přibližně z 82 % keratinových proteinů s vysokým obsahem cysteinu. Okolo 17 % proteinů obsahuje malé množství cysteinu. Dále jsou v malém množství ve vlně přítomny také tuky a polysacharidy. Obsah aminokyselin se liší v závislosti na plemeni, stáří zvířete a jeho výživě [9, 10]. Tabulky číslo 1 a 2 udávají obecné prvkové a aminokyselinové složení ovčí vlny.

Tab. 1. Prvkové složení ovčí vlny [12]

Prvek	Obsah [%]
Uhlík	45,2
Kyslík	27,0
Vodík	6,6
Dusík	15,1
Síra	5,2

Tab. 2. Aminokyselinové složení ovčí vlny [5]

Aminokyselina	Obsah [%]
Alanin	5,5
Arginin	6,6
Kyselina asparagová	6,5
Cystein	11,4
Kyselina glutamová	11,3
Glycin	8,8
Histidin	0,8
Isoleucin	3,4
Leucin	7,8
Lysin	3,0
Methionin	0,5
Fenylalanin	2,5
Prolin	6,0
Serin	9,6
Threonin	6,1
Tyrosin	4,1
Valin	5,9

2.1 Struktura vlákna vlny

Svrchní vrstvu vlny tvoří pokožka, pod pokožkou se nachází jádro a uvnitř dřev. Obr. 6. znázorňuje strukturu vlněného vlákna. Obr. 7. znázorňuje vlákno vlny v mikroskopickém měřítku.

Pokožka (kutikula)

Pokožku tvoří ploché zrohovatělé buňky podobné šupinám. Jejich velikost se pohybuje okolo 30 μm . Jednotlivé buňky se překrývají a tvoří tak hladký povrch vlákna. Šupi-

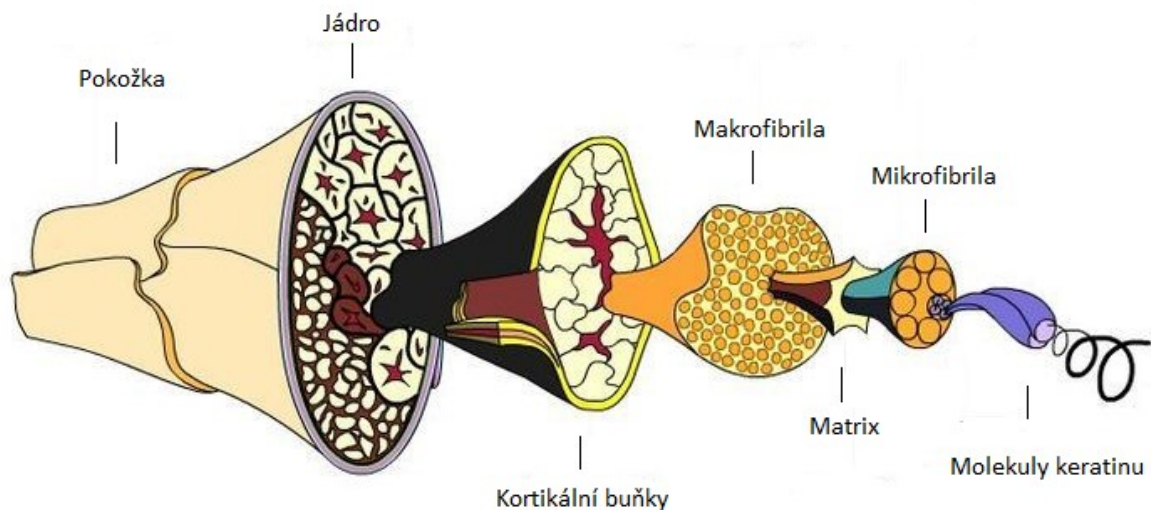
natá struktura způsobuje dobrou prodyšnost vláken. Pokožka poskytuje ochranu vlákna před vnějšími vlivy.

Jádro (cortex)

Jádro tvoří polygonální podlouhlé větvenovité buňky z podélných mikrofibril, makrofibril, buněčných membrán, para buněk a orto buněčného komplexu. Tvoří 70-90 % vlněného vlákna a poskytují vláknu pružnost a pevnost [13].

Dřeň (medula)

Dřeň je tvořena odumřelými zrohovatělými buňkami různých tvarů. Mezbuněčný prostor je vyplněn vzduchem, dřeň má tedy pórovitou strukturu. Plní tepelnou a izolační funkci [14].



Obr. 6. *Struktura vlákna vlny [15]*



Obr. 7. Mikroskopické zobrazení vlákna vlny [16]

3 HYDROLÝZA KERATINU

Každý rok jsou po celém světě generovány miliony tun keratinového odpadu. Z ekonomického a environmentálního hlediska je vhodné rozvíjet procesy, které umožní opětovné využití těchto zdrojů. Příkladem je vlna, která obsahuje až 95 % čistého keratinu. Keratin má vysokou stabilitu a odolnost vůči chemickým látkám v důsledku zesíťování proteinového řetězce disulfidovými vazbami a inter a intra molekulárním vodíkovým vazbám. Vzhledem k jeho nereaktivnímu charakteru a silné odolnosti lze keratin zpracovávat jen s velkou obtížností a vždy musí být alespoň částečně hydrolyzován [17].

Pro získání hydrolyzátů keratinu lze použít mnoho různých postupů a metod. Hydrolyza může být prováděna v různých provozních podmínkách, s různými chemickými činidly. Nejčastěji se provádí hydrolyza ve zředěné kyselině nebo zásadě, nebo enzymatická hydrolyza. Proces hydrolyzy vlny pomocí vody, kyselin, bází a enzymů zahrnuje rozpad peptidových vazeb a disulfidových vazeb proteinů, což vede k tvorbě oligopeptidů a nakonec aminokyselin. Tyto proteiny a aminokyseliny mohou být nakonec rafinovány a použity pro různé aplikace.

Kyselá a alkalická hydrolyza má určitá omezení. Jsou jimi například vysoké náklady na kyselinu a alkálie, obtížnost při manipulaci, nadměrné poškození keratinové struktury atd. Enzymová hydrolyza je ekologický proces, ale má také omezení, jako jsou náklady na enzym a čas hydrolyzy [18]. Doba hydrolyzy se pohybuje od 4 do 48 hodin v závislosti na použité metodě. Obecně se po ukončení hydrolyzy oddělí nerozpustné frakce od proteinových hydrolyzátů za použití odstředivky, filtru nebo mikrofiltračního systému. Filtrace se často vícekrát opakuje pro dosažení žádoucí barvy a jasnosti roztoku. K odbarvení a odstranění zákalu se běžně používá dřevěné uhlí. K odstranění solí se filtrát podrobuje výměnné chromatografii. Po filtraci je hydrolyzát tepelně zpracován za účelem sterilizace a nakonec je produkt vysušen.

Chemické způsoby vyžadují agresivnější reakční podmínky a přináší větší riziko pro životní prostředí. Enzymatická hydrolyza je z ekologického hlediska přívětivější avšak drahá a časově náročná. Reakce často probíhá za vysokých teplot, což mimo jiné způsobuje destrukci aminokyselin a produkt tak ztrácí na kvalitě.

Výtěžek hydrolytických procesů závisí na podmínkách, za kterých byly hydrolyzy provedeny. Výtěžnost ovlivňuje hodnota pH, teplota, doba reakce, typ a koncentrace pou-

žité báze nebo zásady. Rozpustnost a stabilita hydrolyzátů závisí na stupni degradace proteinu [19].

3.1 Druhy hydrolyzy

3.1.1 Kyselá hydrolyza

Při kyselé hydrolyze za použití silných kyselin jako je HCl nebo H₂SO₄ dojde k rozštěpení peptidových vazeb a vznikají –COO– a –NH₄⁺ ionty. Nastává částečná oxidace cystinu na kyselinu cysteinovou a cystein a částečně se rozloží -S-S- vazby [19]. Příkladem je působení 30% kyseliny H₂SO₄ nebo 20% kyseliny HCl o teplotě 110 °C po dobu 25 hodin, kdy nastane úplná hydrolyza keratinu [20]. Kyselá hydrolyza je velmi účinná a rychlá. Vzniklý keratinový hydrolyzát není příliš kvalitní, protože dochází k destrukci většiny aminokyselin působením vysoce koncentrovaných kyselin.

3.1.2 Alkalická hydrolyza

Jednou z nejjednodušších a nejstarších extrakcí keratinu je alkalická hydrolyza při vysoké teplotě. Keratin z vlny obsahující 90 % proteinu je možné hydrolyzovat použitím 0,15 M KOH a 0,05 M NaOH po dobu 20 minut při teplotě 120 °C. Stejně jako při kyselé hydrolyze vzniká nepříliš kvalitní hydrolyzát s nízkou nutriční hodnotou obsahující pouze malé množství esenciálních aminokyselin [17, 18]. Alkalická hydrolyza je ve srovnání s kyselou hydrolyzou pomalejší.

Příkladem provedení alkalické hydrolyzy je hydrolyza Gousterové podle Tzokova. Hydrolyza probíhala v mikrovlnné troubě, která simulovala podmínky autoklávu. Vlna byla smíchána s 0,15 mol.l⁻¹ KOH a 0,05 mol.l⁻¹ NaOH a umístěna do trouby. Po odstředění byl tuhý podíl vysušen a podroben analytickým zkouškám. Použití mikrovlnného záření je ekonomické a efektivní [9].

3.1.3 Redukční a oxidační hydrolyza

Keratin může být extrahován štěpením disulfidových vazeb cystinu redukčními činidly, jako jsou thioly, za vzniku cysteinu nebo sulfitolýzou za použití siřičitanu sodného za vzniku cysteinu a cystein-sulfonátu. Dalším způsobem je použití oxidačních činidel, jako je kyselina peroctová, za vzniku kyseliny sulfonové. Nicméně redukční nebo oxidační činidla (sulfidy, thioly nebo peroxidy) používaná pro štěpení S-S vazeb jsou škodlivé a

často toxické. Kromě toho způsobují degradaci proteinové struktury keratinu s redukcí molekulové hmotnosti a ztrátou mechanických vlastností [17].

Tým vědců (Izabela Sinkiewicz a kol.) prováděl studie s různými redukčními činidly. 2-merkapt ethanol, dithiothreitol, m-bisulfitem sodným, hydrogensířičitanem sodným a hydroxidem sodným, na keratinu z kuřecího peří. Po 2 hodinové redukci 2-merkapt ethanol a hydrogensířičitanem sodným byl výtěžek rozpustného keratinu přibližně stejný a činil 84%. Levnější a šetrnější hydrogensířičitan sodný navíc snížil dobu extrakce na 1 hodinu se stejným výtěžkem. Kromě toho přídavek 2,5% NaOH zlepšil účinnost extrakce zvýšením výtěžku až na 94% [21].

3.1.4 Enzymová hydrolýza

Enzymatická hydrolýza probíhá za mírných podmínek, není tedy energeticky náročná. Musí jí být nápomocna chemická redukční činidla degradující keratinové disulfidové vazby [13]. Aktivita enzymu a výtěžek rozpustného keratinu je poměrně malý. Výhodou je použití malého množství enzymů. Lze získat hydrolyzát s širokou distribucí molekulových hmotností. Za nevýhodu lze považovat časovou náročnost procesu. Doba reakce se pohybuje od 2 do 7 dnů. Tento aspekt má za následek omezené použití v průmyslové praxi. Při enzymové hydrolýze musí být udržováno stálé reakční prostředí z důvodu citlivosti enzymů na změnu reakčních podmínek, ovšem tyto podmínky jsou v porovnání s jinými metodami velmi mírné.

Většina enzymů působí v alkalickém prostředí. Enzymová hydrolýza vyžaduje buď čisté keratinázy izolované z mikroorganismů nebo samotné mikroorganismy. Keratinázy schopné degradace keratinů jsou extracelulární serinové proteázy nebo metaloproteázy. Mezi nejpoužívanější bakterie pro přípravu enzymů patří zástupci rodu *Bacillus* a *Streptomyces* [22]. Využívá se enzym jako je například alkaláza extrahovaná z bakterie rodu *Bacillus licheniformis*. Optimální reakční prostředí je při pH 6,5 – 8,5. Dalším enzymem je například Savináza vyráběná z bakterie rodu *Bacillus* (*Bacillus lentus*). Savináza pracuje při pH 8–12. Po skončení hydrolýzy musí být enzymy inaktivovány tepelně nebo změnou pH [23]. Keratin hydrolyzovaný pomocí enzymů se používá jako hnojivo, krmivo a jako prostředek v kožedělném a farmaceutickém průmyslu [24].

Příkladem enzymové hydrolýzy je provedení od Eremeeva a kol., jejichž cílem bylo získat hydrolyzát s vysokou biologickou hodnotou. Enzym byl extrahován z *Acremonium chrysogenum*. Hydrolyzát byl smíchán s vodou a 0,5% sulfidem sodným. Směs byla in-

tenzivně míchána při teplotě 55 °C. Doba reakce se pohybovala od 1 do 6 hodin. Došlo ke zvýšení výtěžku a produkt byl charakteristický vyváženým složením aminokyselin [25].

Dalším příkladem je studie Munawara a kolektivu, který použil *Bacillus licheniformis*. Jako vstupní surovina bylo použito peří. *Bacillus licheniformis* byl schopen růst a produkovat keratinázu v živném médiu, ve kterém péřová moučka sloužila jako další zdroj uhlíku a dusíku a působila jako induktor enzymů, což vedlo k téměř úplné degradaci peří po 7 dnech inkubace při pokojové teplotě [26].

3.1.5 Kombinovaný způsob hydrolýzy

S výhodou lze výše uvedené způsoby kombinovat. Lze tak docílit vyšší výtěžnosti a lepší kvality hydrolyzátu za mírnějších reakčních podmínek. Nejčastěji se používá kombinace alkalicko-enzymová a oxidačně-enzymová. V prvním kroku vždy dochází k částečnému narušení keratinového materiálu a v druhém kroku po přidání enzymu je materiál dále hydrolyzován [27].

Alkalicko - enzymovou hydrolýzou se zabýval Pavel Mokrejš a kolektiv. Jako vstupní surovina bylo použito drůbeží peří. V prvním stupni bylo peří smícháno s 0,3% KOH v poměru 1:50. Reakce probíhala při teplotě 70 °C po dobu 24 hodin. V druhém stupni byl přidán proteolytický enzym (1 – 5 %) a hydrolýza probíhala při teplotě 50 – 70 °C, po dobu 4 – 8 hodin. Bylo dosaženo vysoké účinnosti za relativně mírných reakčních podmínek [28].

4 APLIKACE KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ

V současnosti jsou průmyslové odpady ve formě keratinových hydrolyzátů surovinami s širokým spektrem využití. Jelikož keratin neobsahuje žádné škodlivé sloučeniny, může být po vhodném postupu hydrolýzy použit i na výrobu farmaceutických produktů a kosmetických přípravků, jako jsou krémy, šampony a vlasové kondicionéry. Rozpustný keratin má uplatnění při hojení ran, regeneraci tkání, difúzi a distribuci léčiv [29]. Dále se používá jako doplněk stravy pro zvířata, hnojivo v zemědělství, biodegradční činidla nebo jako plnivo v plastech [24]. Keratinový hydrolyzát lze převést do formy porézních pěn různých tvarů, filmů, vláken a gelů [30].

4.1 Využití v medicíně

První zmínky o použití keratinu v lékařství pochází od čínské bylinkářky Li Shi-Zhen z 16. století. V průběhu 38 let Shi-Zhen sepsala soubor 800 knih známých jako Ben Cao Gang Mu, které obsahují více než 11 000 terapeutických receptů. Jednou z látek, které ve svých produktech využívala, byl popílek z pyrolyzovaných lidských vlasů známý pod názvem Crinis Carbonisatus. Tato látka pomáhala srážet krev a urychlovala hojení ran [30].

Keratin díky své schopnosti usnadňovat buněčnou adhezi a proliferaci poskytuje biokompatibilní matici pro regeneraci tkáně. Navíc jeho aminokyselinové složení umožňuje řídit dobu degradace matrice. Rozpad matrice je ovlivňován začleněním různých hydrofobních nebo hydrofilních skupin [31].

V medicínských aplikacích se s výhodou používají keratinové bílkoviny díky jejich schopnosti samovolně polymerizovat do porézních vláknitých struktur. Při správném zpracování je navíc tato struktura, rozměry a porozita materiálů reprodukovatelná. Jelikož se jedná o přírodní materiál, vykazuje dobrou vazbu k buňkám. Díky aminokyselinovým zbytkům jsou se buňky schopny uchytit také na materiál. Keratin vytváří trojrozměrnou matici, která umožňuje buněčnou infiltraci, vazbu a proliferaci. Keratin se také účastní některých regulačních funkcí, které zprostředkovávají buněčné chování. V posledních třech desetiletích výzkum směřuje k vývoji různých forem materiálů, jako jsou pěny, filmy, houby a vlákna. Dále se zaměřuje na modifikaci fyzikálních a mechanických vlastností pro specifické použití.

Jelikož byla u keratinových materiálů prokázána cytokompatibilita a biodegradace jsou používány k regeneraci tkání. Výzkum ukázal, že hydrogely na bázi keratinu jsou neuroinduktivní a rovněž schopné usnadnit regeneraci poškození periferního nervu u myši. Další z výzkumů se zaměřoval na využití keratinu z lidských vlasů. Tento keratin zlepšil in vitro aktivitu Schwannových buněk vyvoláním buněčné proliferace a migrace a došlo ke zvýšení exprese specifických genů potřebných pro funkci nervových buněk. Keratinové hydrogely z lidských vlasů mají hemostatický účinek, podporují neuromuskulární regeneraci a usnadňují regeneraci nervů.

Keratin se také využívá k zástavě krvácení. Keratinové gely vytváří porézní strukturu, která vyplňuje místo poranění a umožňuje tak buněčnou infiltraci a tvorbu granulózní tkáně. Zajímavou aplikací je využití keratinu jako povlaku na obnovu očního povrchu [32].

4.1.1 Keratinové filmy

Keratinové filmy pro medicínské aplikace se vyrábí s přídavkem glycerolu, protože čisté filmy jsou příliš křehké pro praktické použití. Přidáním glycerolu vznikají transparentní, relativně silné, flexibilní a biologicky rozložitelné fólie. S výhodou lze do keratinových filmů začlenit bioaktivní molekuly. Zlepšit mechanické vlastností filmů lze například přídavkem chitosanu, který má dobrou biokompatibilitu a díky antibakteriálním vlastnostem urychluje hojení ran.

4.1.2 Keratinové scaffoldy

Schopnost extrahovaných keratinových proteinů samovolně polymerovat do trojrozměrné sítě vedla k vývoji scaffoldů pro tkáňové inženýrství. Matrice vznikající lyofilizací keratinových roztoků má pevnou, tepelně stabilní homogenně porézní mikrostrukturu. Léšení vykazuje dobrou buněčnou kompatibilitu, podporuje fixaci a proliferaci fibroblastů a přítomnost volných cysteinových zbytků poskytuje potenciální místa pro začlenění bioaktivních látek.

4.1.3 Keratinová vlákna

Keratinová vlákna se vyrábí pomocí metody elektrospinning, která využívá vysokého napětí k vytvoření elektricky nabitě trysky, kterou je veden polymer k uzemněné sběrné desce nebo se navíjí na cívku. Výsledná vlákna mají průměry v rozmezí nano až mikro a vytvářejí netkanou vláknitou strukturu. Tyto netkané textilie slouží jako obvazy pro hojení ran a také léšení pro tkáňové inženýrství [32].

4.2 Využití v kosmetice

Díky příbuznosti s lidským keratinem se keratinový hydrolyzát přidává do kosmetických výrobků a slouží zde, jako zvlhčovač. Má schopnost vytvářet tenkou vrstvu na vlasech a nehtech a plní tak převážně ochrannou funkci. Působení chemických látek a vysoké teploty na vlasy vede k poškození jejich struktury a ztrátě pevnosti v tahu. Vlasy se poté stávají citlivými na lámání, což se projevuje ztrátou lesku, vlasy jsou suché a křehké. Aplikace keratinu obnovuje mechanické vlastnosti a udržuje vlhkost ve vlasových vláknech. Keratin zpevňuje strukturu vlasu tím, že částečně proniká do místa poškození a může tak nahradit chybějící protein. Po aplikaci produktů s obsahem keratinu jsou vlasy lesklé a hedvábně jemné.

V lacích na nehty slouží také jako zpevňovací prostředek [33]. Je možné jej aplikovat na pokožku pat, kolen nebo loktů kde vyhlazuje povrch a pomáhá předcházet poškození [32, 33, 34].

4.3 Využití ve výživě zvířat

Hlavním cílem zemědělství je zvýšit účinnost krmiv a umožnit tak vyšší produkci mléka, masa a vajec. Tento postup vyžaduje látky, které optimálně podporují funkci tenkého střeva jako koncového místa pro trávení a absorpci výživových složek.

Peptidy vzniklé hydrolýzou rostlinných a živočišných bílkovin se přidávají do krmiva pro prasata, drůbež, ryby a jiná zvířata. Keratinové hydrolyzáty obsahují velké množství čistých bílkovin s vysokým obsahem esenciálních aminokyselin. Obohacování krmiv hydrolyzáty je ekonomicky výhodné z důvodu snadného zpracování a vysoké účinnosti [35].

Příkladem je výzkum výživy prasat. Většina studií zahrnujících přidání peptidů do krmiva byla prováděna s prasaty po odstavu s cílem zlepšit růst a zdraví zvířete. Proteinové hydrolyzáty působily pozitivně na nezralý trávicí a imunitní systém mladých zvířat po odstavu, která trpěla sníženým příjmem krmiva, střevní atrofií a průjmem. Zlepšil se tak jejich výživový stav, střevní funkce a schopnost odolávat infekčním onemocněním [36].

4.4 Využití při zpracování kůže

V kožedělném průmyslu se procesem zvaným činění přeměňuje hnilobný kožní kolagen na stabilní a odolnou kůži. V současnosti se k činění kůží používá síran chrómu kvůli jeho všestrannému charakteru vhodnému pro různé druhy kůží. Tento postup ovšem není

šetrný k životnímu prostředí, jelikož se v čínící lázni vyčerpá 60-65 % chrómu a zbylý podíl je jakožto nevyužitelný produkt vypuštěn do odpadních vod. Limitní množství vypuštěného chrómu do odpadních vod by ve většině zemí nemělo překročit 2 ppm.

Ekologicky šetrnějším postupem je použití keratinového hydrolyzátu připraveného z rohové moučky kyselou a enzymovou hydrolyzou. Přídavek hydrolyzátu podporuje eliminaci chrómu v solné lázni. Reakce ve vodě rozpustných keratinových peptidů je dvou-
stupňová. Zpočátku peptidy s nízkou molekulovou hmotností reagují s chromem. Ve druhé fázi reaguje kolagen v kůži jak s volným chromem, tak s již vzniklým chróm-keratinovým komplexem. Keratinový hydrolyzát vytváří přídavné karboxylové skupiny, které mají vysokou afinitu k chrómu. Keratinový komplex navázaný v kůži tak umožňuje vysoký příjem chrómu. Odpadní vody z procesu činění kůži tak obsahují menší množství chrómu [30].

4.5 Využití v zemědělství

Keratinový hydrolyzát je používán v ekologickém zemědělství jako pomalu uvolňované hnojivo, jehož rozpad lze ovlivnit různou rozpustností. Ekologické zemědělství využívá organické látky bohaté na dusík, které zlepšují růst rostlin a zvyšují mikrobiální aktivitu v půdě. Hnojivo z keratinového hydrolyzátu obsahuje okolo 15 % dusíku a díky jeho snadné dostupnosti je i levné [12].

4.6 Využití v textilním průmyslu

K barvení celulósových textilií se používá přídavek elektrolytů (solí) kvůli podpoře vstřebatelnosti barviv tkaninou. Množství elektrolytů se pohybuje okolo 20 % z hmotnosti materiálu. Barvivo je i přes použití solí vyčerpáno ze 70-80 %. Odpadní voda obsahující nevyužitá barviva a zbytkovou sůl se obtížně čistí a přispívá tak ke znečištění životního prostředí. Proto je snaha omezit množství solí. Jednou z nejvýhodnějších metod je modifikace textilního substrátu polymery, jakými jsou polyepichlorhydindimethylamin, polyamid epichlorhydrin, dendritické polymery, biopolymery z jejich zástupců se využívá například chitosan, dále deriváty a sloučeniny škrobu, amoniové sloučeniny chlorotriazinu, N-methylolakrylamid, monomery běžně používané při modifikaci bavlněných vláken a v neposlední řadě hydrolyzáty keratinu.

Při experimentech s použitím hydrolyzátu keratinu bylo prokázáno, že jeho přídavek zvýší účinnost barvení tkanin až o 91 % oproti použití solí. Tkanina má stejnou kvalitu jako v případě použití solí [37].

4.7 Využití při výrobě obalových materiálů

Keratinové filmy se využívají na výrobu obalových materiálů v zemědělství, kde slouží jako mulčovací fólie. Tyto fólie omezují růst plevelů a zadržují vlhkost. Tímto se snižuje spotřeba pesticidů a vody. Navíc jsou na rozdíl od syntetických materiálů zcela rozložitelné. Keratin ve fóliích váže vodu a tím přispívá ke snadnějšímu rozkladu.

Dále se keratinové filmy používají k výrobě potravinových obalů, kde slouží jako bariéra proti vlhkosti, oxidu uhličitému, aromatickým látkám a kyslíku [37, 38].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo porovnat vliv jednotlivých faktorů na vlastnosti vzniklých hydrolyzátů a stanovit neoptimálnější technologické podmínky ve vztahu k získaným vlastnostem.

Prvním dílčím cílem praktické části diplomové práce bylo provést série dvoustupňových alkalicko-enzymových hydrolyz keratinu z ovčí vlny. Parametry byly navrženy pomocí programu Minitab 17 statistickou metodou faktorových pokusů 2^3 . Proměnnými podmínkami byla koncentrace NaOH a doba alkalické a enzymové hydrolyzy.

Druhým dílčím cílem bylo poté na základě účinností provedených hydrolyz statisticky vyhodnotit neoptimálnější experimenty a ty zopakovat v dvojnásobném množství. V této sérii byly sledovány pouze dva proměnné parametry a těmi byla doba enzymové hydrolyzy a koncentrace NaOH.

Třetím dílčím cílem bylo vzniklé hydrolyzáty zhodnotit analytickými metodami. Byla stanovena účinnost jednotlivých experimentů, obsah sušiny, vlhkosti a popelovin. Dále byla u vzorků stanovena distribuce molárních hmotností. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny.

6 MATERIÁL A METODY

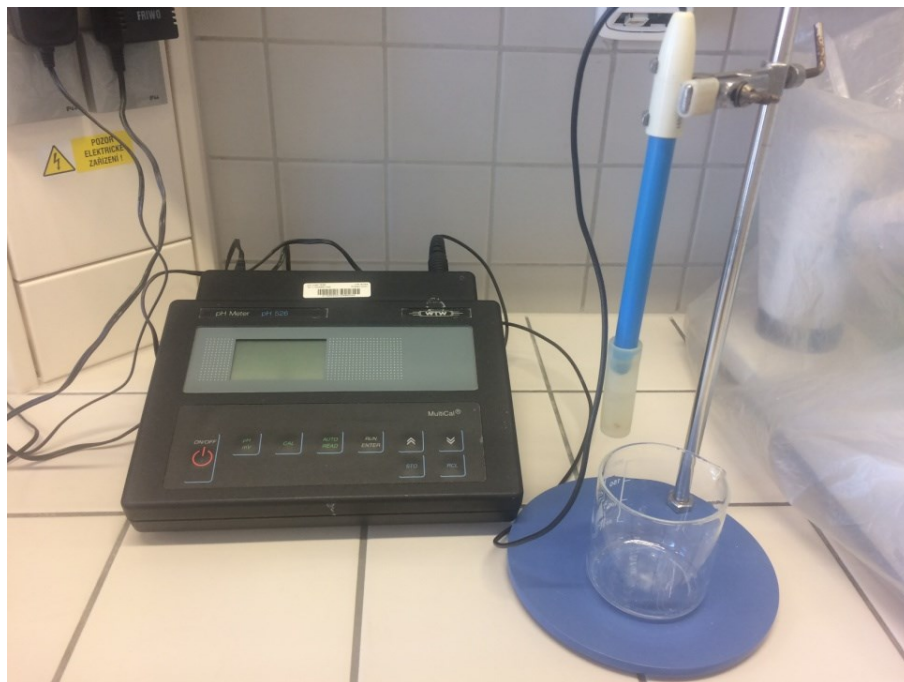
V následujících kapitolách jsou uvedeny použité přístroje a pomůcky, chemikálie a enzymy. Dále je uveden postup předúpravy vstupní suroviny a alkalicko-enzymové hydrolyzy. Posledním bodem jsou analytické a statistické metody vyhodnocení.

6.1 Použité přístroje

Horkovzdušná sušárna Memmert, analytické váhy VWR, odstředivka Hettich EBA20, nožový mlýn, vodní lázeň MLW (Obr. 8), míchadla LAB-EGG, pH metr WTW (Obr. 9), vařič ETA, analytické váhy KERN 770, vařič CERAN 500, muflová pec NABETHERM, zdroj napětí Novex Model – 3540, elektroforetická jednotka Minicela Novex Xcell II



Obr. 8. Vodní lázeň s míchadly LAB-EGG



Obr. 9. pH metr WTW

6.2 Použité pomůcky

Erlenmayerova baňka 500 ml, kádinky (různé objemy), nůžky, sítko, 10 l nádoby, skleněná tyčinka, lžička, injekční stříkačka, pipety (2 ml, 50 ml), balónek na pipety, teploměr, PA tkanina (150 μm oka), třecí misky, plech, alobal, Petriho misky, skleněné koželužské misky, exsikátor, chladič, mineralizační baňky), odměrné baňky o objemu 50 ml, Parnas-Wagnerova destilační aparatura, kelímky z křemenného skla, exsikátor, plynový kahan s trojnožkou, sušící sestava Novex, celofánové fólie, Invitrogen 10-20% triclin polyakrylamid gel EC6625, hamiltonka 10 μl , mikropipeta, nůž na gely (Novex), Petriho misky (velké), kádinky, víálky

6.3 Použité chemikálie

Hydroxid sodný čistý (Lach:Ner), 3% HCl, 20% HCl, 0,5 M NaOH, 0,05 M NaOH, 0,275 M NaOH, 30% NaOH, destilovaná voda, 96% kyselina sírová, 2% kyselina boritá, Tashirův indikátor, 0,02 M kyselina chlorovodíková, katalyzátor 1000 KJELTABS KWS, roztok $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + \text{NaOH}$, proteinový standard s širokou distribucí molekulárních hmotností 6,500-200,000 Da (Sigma Aldrich), pufrý Running Buffer 10X a Sample Buffer

2X - Invitrogen Tricine SDS (Thermo Fisher), 2-merkaptoethanol (Sigma Aldrich), metanol, etanol, barvivo Brilliant Blue G (Sigma Aldrich)

6.4 Použité enzymy

Lipex 100T

Enzym Lipex 100T se získává izolací z bakterií kmene *Aspergillus*. Lipex rozkládá jedlé tuky a oleje na mastné kyseliny a glycerol, používá se tedy v čisticích prostředcích na odstranění skvrn na bázi oleje. Je účinný v neutrálních až alkalických podmínkách (optimálně při pH 10) a dosahuje širokého teplotního rozsahu (30-60 °C) [39]. Použitý enzym Lipex 100T dodává firma Novozymus (Dánsko).

Savinase Ultra 16L

Enzym Savinase Ultra 16L vylučuje bakterie *Bacillus lentus*. Je k dostání v tekuté nebo práškové formě. Savinasa katalytický rozkládá peptidové vazby. Funkce Savinasy je neoptimálnější při pH 6,5-11 a používá se při teplotách 10-65 °C [40]. Použitý enzym Savinase Ultra 16L dodává firma Novozymus (Dánsko).

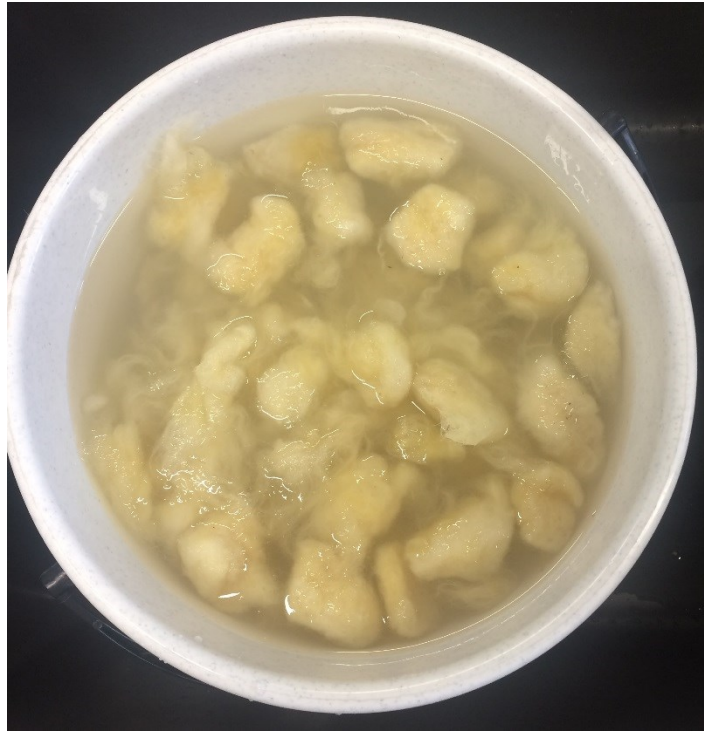
6.5 Použitý materiál a předúprava vlny

Použitým vstupním materiálem byla ovčí vlna typu Merino od soukromého chovatele z obce Nevšová. Teorií o vlně se zabývá kapitola 2.

Nejprve byly ze surové vlny odstraněny hrubé nečistoty. Vlna byla nastříhána na malé kousky z důvodu usnadnění míchání vlny s vodou. Dále byla vlna vyprána ve vlažné vodě, poté ve vodě s mycím prostředkem a následně byla propírána v čisté vodě až do odstranění veškerého mycího prostředku.

Dalším krokem bylo odtučnění vlny. Vlna zbavená nečistot byla namočená v destilované vodě v poměru vlna:voda = 1:50. Dále bylo upraveno pH směsi na hodnotu 9 a přidáno 1 % enzymu Lipolase 100T (vztaženo na hmotnost suché vlny). Odtučňování probíhalo při teplotě 40 °C ± 2 °C po dobu 24 hodin. V průběhu odtučňování byla směs několi-

krát promíchána (Obr. 10). Po odtučnění následovalo promytí vlny ve vodě a vysušení v horkovzdušné sušárně při $103\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ (Obr. 11).



Obr. 10. Průběh odtučňování vlny



Obr. 11. Vlna po vysušení v sušárně

Nakonec byla vysušená vlna pomleta (Obr. 12) na nožovém mlýně (Obr. 13) s velikostí ok síta 1 mm.



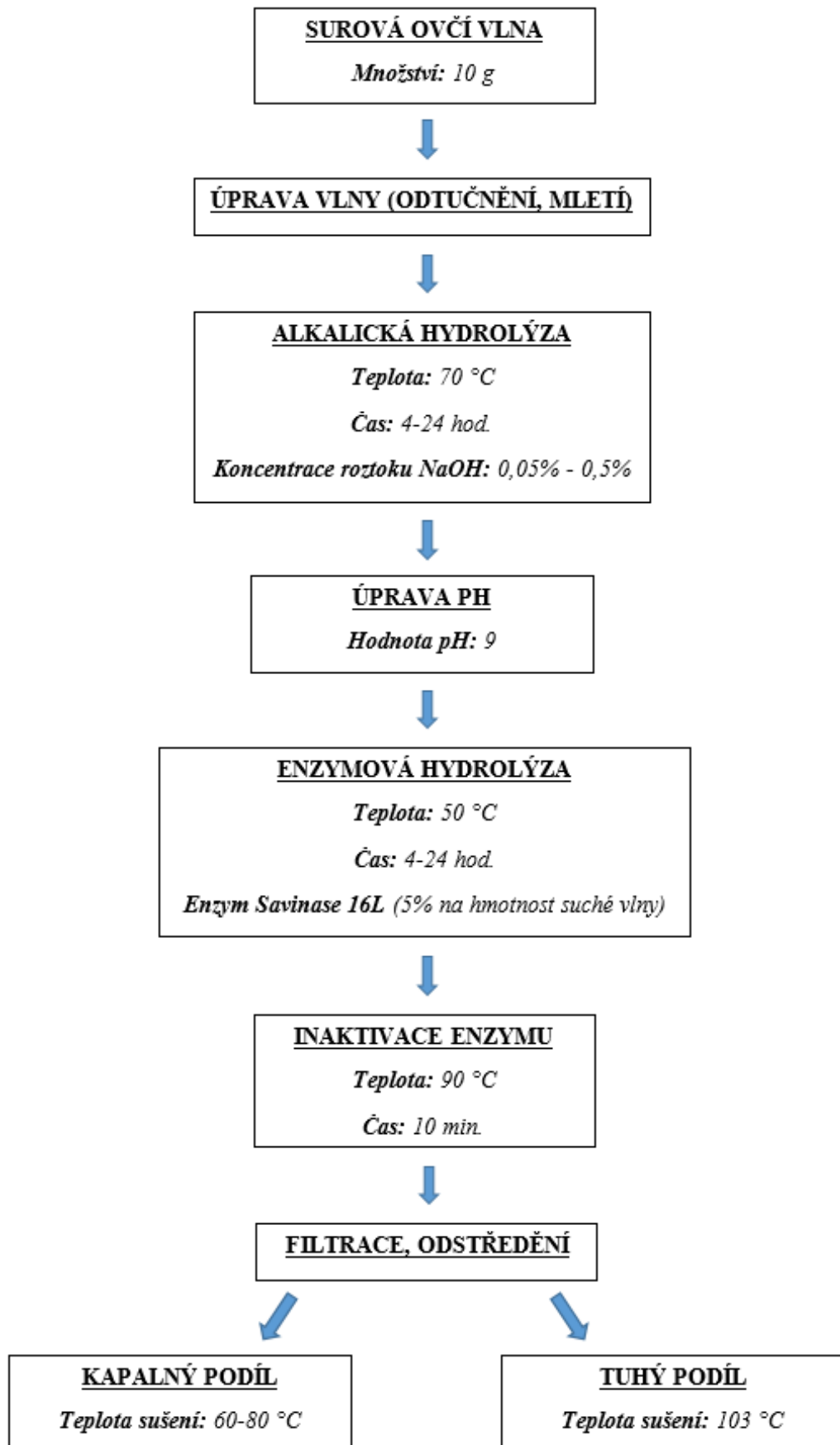
Obr. 12. Pomletá vlna



Obr. 13. Nožový mlýn

6.6 Alkalicko-enzymová hydrolýza

Níže je znázorněn postup alkalicko-enzymové hydrolýzy (Obr. 14).

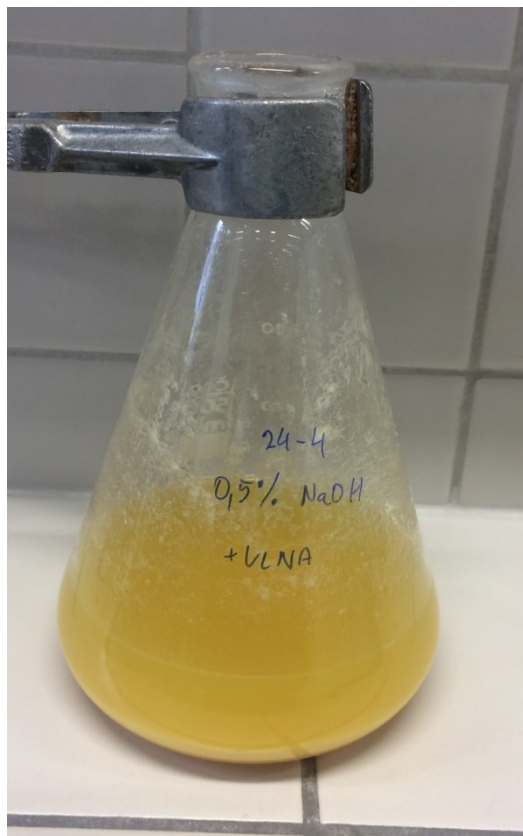


Obr. 14. Schéma průběhu hydrolyzy

Navážka 10 g vlny byla smíchána s připravenými roztoky NaOH o koncentraci 0,05%-0,5% v poměru vlna:roztok NaOH = 1:20. Alkalicko-enzymová hydrolýza probíhala ve dvou stupních. V prvním stupni proběhla alkalická hydrolýza, ve druhém stupni enzymová hydrolýza (Obr. 15).

První stupeň:

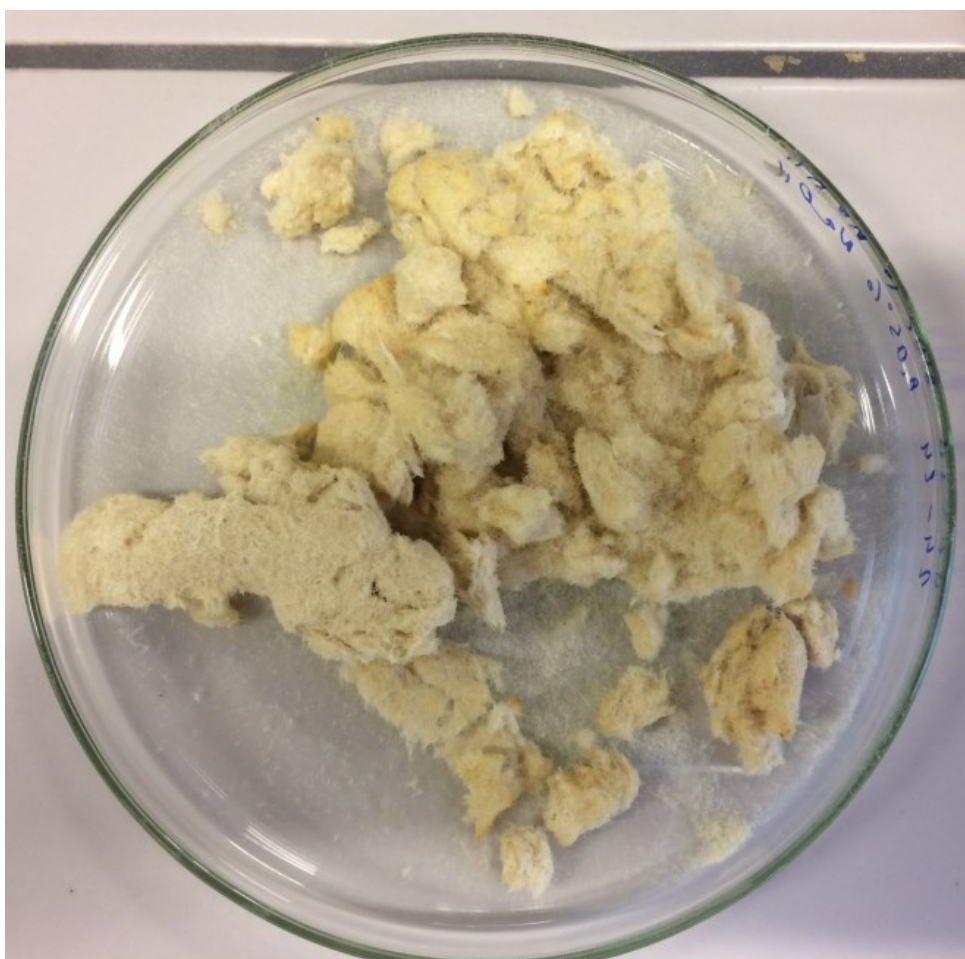
Alkalická hydrolýza probíhala při teplotě 70 °C, po dobu 4-24 hodin v připravených roztocích NaOH.



Obr. 15. Průběh hydrolýzy (vlna s 0,5% NaOH)

Druhý stupeň:

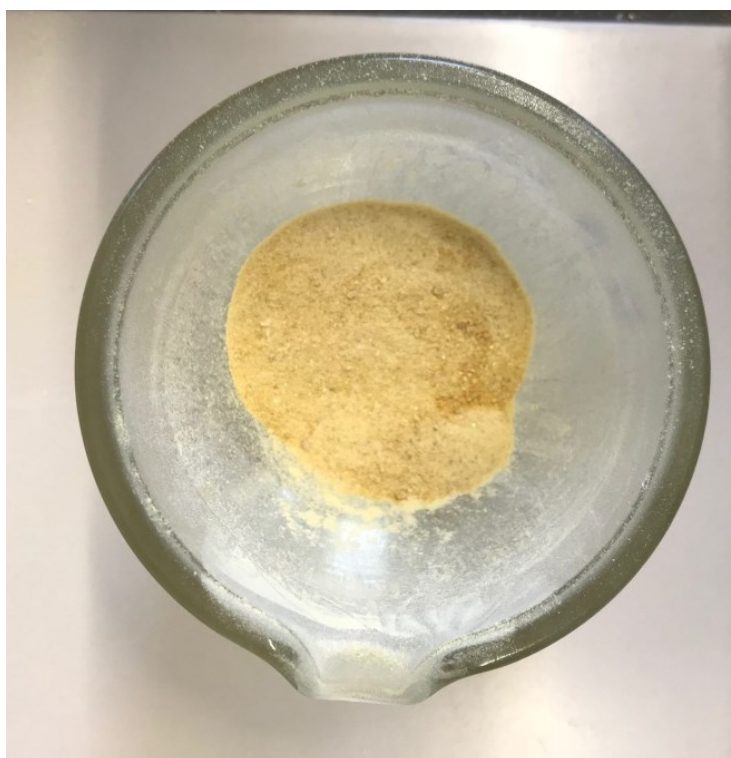
Enzymová hydrolýza probíhala při teplotě 50 °C po dobu 4-24 hodin s přidavkem enzymu Savinase Ultra 16L (5 % enzymu na hmotnost suché vlny). Všechny použité enzymy jsou komerčně vyráběny firmou Novozymes. Před provedením enzymové hydrolýzy bylo upraveno pH na hodnotu 9. Po ukončení hydrolýzy proběhla inaktivace enzymu zahřátím roztoku na 90 °C po dobu 10 minut. Roztok byl následně zfiltrován přes PA tkaninu (minimálně 8 vrstev tkaniny) a odstředěn při 4000 otáček/min po dobu 10 min. Tuhý podíl byl vysušen při 103 °C (Obr. 16). Kapalný podíl (Obr. 17, 18) byl vysušen při 60-80 °C v horkovzdušné sušárně. Tab. 3. shrnuje podmínky jednotlivých hydrolýz.



Obr. 16. Vysušený tuhý podíl (0,05% NaOH)



Obr. 17. Hydrolyzát keratinu (0,5% NaOH)



Obr. 18. Vysušený hydrolyzát (0,05% NaOH)

6.7 Účinnost hydrolýzy

Podle následujícího vzorce byla stanovena účinnost hydrolýzy.

Vzorec pro výpočet účinnosti hydrolýzy:

$$\eta = 100 - \left(\frac{m_T}{m_{vlna}} \cdot 100 \right)$$

η ... účinnost hydrolýzy [%]

m_T ...hmotnost tuhého podílu [g]

m_{vlna} ...hmotnost (navážka) vlny [g]

6.8 Stanovení sušiny

Nejprve byly zváženy prázdné, suché skleněné koželužské misky. Dále bylo do misek naváženo 0,5 g hydrolyzátu. Misky s hydrolyzátem byly přemístěny do sušárny, kde se vzorek sušil při teplotě 103 °C po dobu 3-4 hodiny. Po uplynutí 3-4 hodin se misky přemístily do exsikátoru. Po vychladnutí se misky zvážily a následně přesunuly do sušárny na dalších cca 30 minut, poté se opět přemístily do exsikátoru, zvážily a vyhodnotilo se, zda je rozdíl hmotností mezi posledníma dvěma váženími menší než 1 mg. V případě většího rozdílu se hydrolyzáat opakovaně sušil až do konstantní hmotnosti.

Vzorec pro výpočet obsahu sušiny ve vzorku:

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

S ... obsah sušiny ve vzorku [%]

m ...hmotnost vzorku po sušení [g]

m_0 ...hmotnost vzorku před sušením [g]

6.9 Stanovení popelovin

Kelímky z křemenného skla byly nejprve předžihány v muflové peci, následně ponechány vychladnout v exsikátoru a zváženy. Poté do nich byl odvážen vzorek hydrolyzátu a

kelímky se vzorkem byly přemístěny do muflové pece a žihány při teplotě 650 °C po dobu 1 hodiny. Po uplynutí této doby byly kelímky se vzorky vyjmuty z pece a ponechány vychladnout v exsikátoru a následně byly zváženy. Výsledná hodnota je průměrem dvou stanovení z každého vzorku.

Vzorec pro výpočet obsahu popelovin ve vzorku:

$$P = \frac{n}{n_0} \cdot 100$$

P... obsah popelovin ve vzorku [%]

n ...hmotnost vzorku po žihání [g]

n₀...hmotnost vzorku před žiháním [g]

6.10 Mikrochemické stanovení dusíku – Micro-Kjeldahlova metoda AOAC 960.52

Do mineralizačních baněk bylo naváženo cca 0,2 g vzorku, dále bylo přidáno 5,6 ml 96 % kyseliny sírové a 20 ml 0,02 M HCl. Nakonec byla přidána tableta katalyzátoru a baňky byly přemístěny na vařič, kde probíhala mineralizace při teplotě 480 °C po dobu 1-1,5 hodiny (Obr. 19). Mineralizace byla ukončena ve chvíli, kdy se roztok zbarvil do světle zelené barvy. Mineralizát byl následně ponechán vychladnout. Po vychladnutí byl mineralizát naředěn malým množstvím destilované vody, z důvodu rozpuštění pevných částic a následně přelit do 50 ml odměrných baněk. Baňky byly doplněny destilovanou vodou po rysku.



Obr. 19. Mineralizační aparatura

Následovala destilace v Parnas-Wagnerově destilační aparatuře (Obr. 20). Do nálevky aparatury bylo odpipetováno 25 ml vzorku, 20 ml roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + \text{NaOH}$. Destilace probíhala po dobu 20 minut od okamžiku varu. NH_3 byl během destilace jímán do 15 ml 2% kyseliny borité.



Obr. 20. Parnas-Wagnerova aparatura

Po ukončení destilace bylo ke vzniklému roztoku přidáno pár kapek Tashirova indikátoru a následovala titrace roztokem 0,02 M HCl do světle růžového zbarvení.

Vzorec pro výpočet obsahu dusíku ve vzorku:

$$N = \frac{V_{\text{HCl}} \cdot c \cdot 14,007 \cdot 100 \cdot 2}{m \cdot 10^{-3}}$$

N ... obsah dusíku ve vzorku [%]

V... spotřeba zásobního roztoku HCl při titraci [ml]

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

m ... navážka vzorku hydrolyzátu [g]

Dále byl stanoven obsah bílkovin pomocí univerzálního přepočítávacího faktoru (6,25), který vychází z faktu, že bílkoviny obsahují v průměru 16 % dusíku (100:16).

Vzorec pro výpočet obsahu bílkovin ve vzorku:

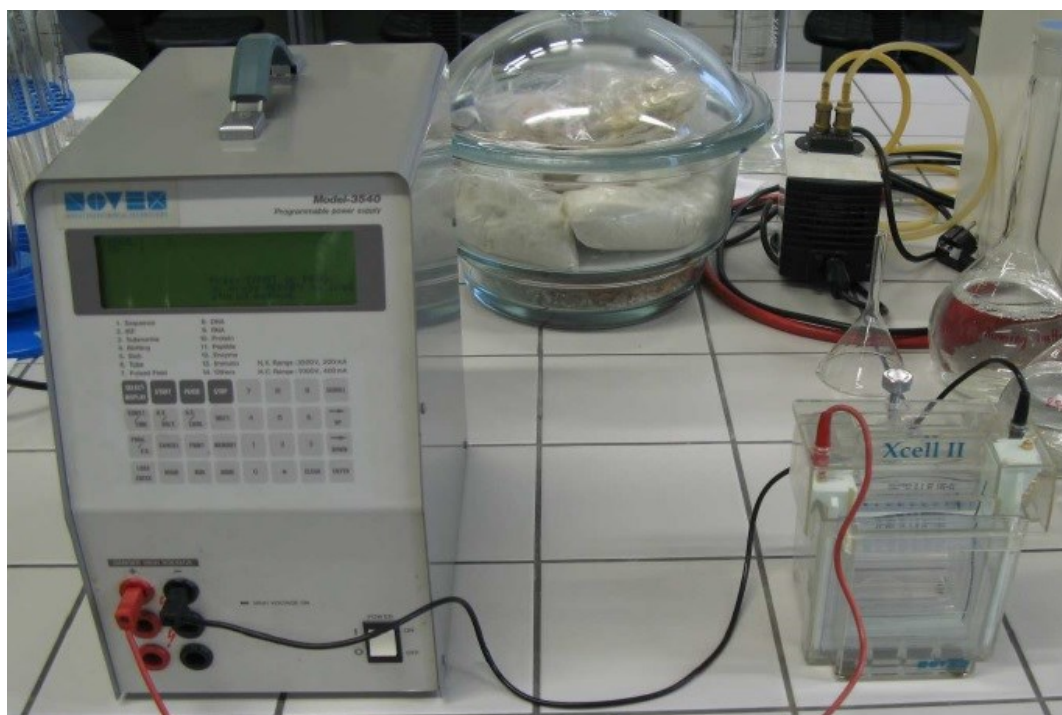
$$B = N \cdot 6,25$$

B ... obsah bílkovin ve vzorku [%]

N ... obsah dusíku ve vzorku [%]

6.11 Elektroforéza

Principem elektroforézy je migrace nabitě částice pod vlivem elektrického pole. Biologické molekuly, jako jsou aminokyseliny, peptidy, proteiny, nukleotidy a nukleové kyseliny mají ionizovatelné skupiny, a proto při daném pH existují v roztoku jako elektricky nabitě kationty nebo anionty. Působením elektrického pole dochází k migraci na katodu nebo anodu v závislosti na náboji. Zařízení pro elektroforézu se skládá z napájecího zdroje a elektroforetické jednotky [41].



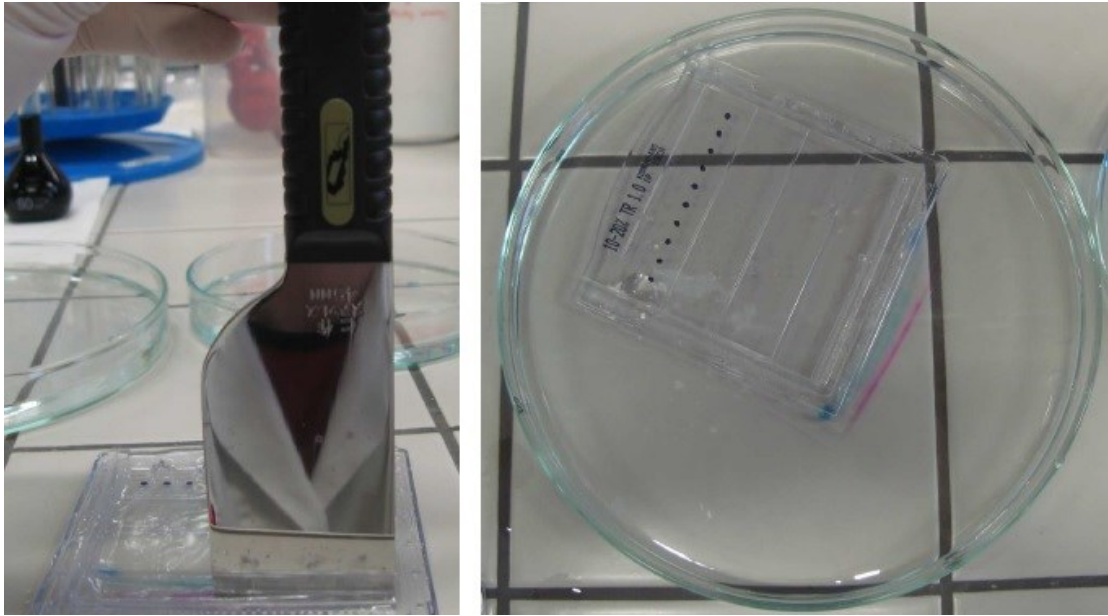
Obr. 21. Přístroj pro elektroforézu

Navážka práškového vzorku (0,12 g hydrolyzátu keratinu) byla rozpuštěna ve vodě v 10 ml odměrné baňce. Dále byl roztok odstředěn na odstředivce při 6000 ot/min. po dobu 5 minut. Roztok vzorku byl zředěn ve vialkách pufrem Sample SDS Buffer 2X v poměru 1:1.

Deska s gelem byla opláchnuta vodou pro odstranění uchovávajícího roztoku. Deska byla umístěna do cely Novex Xcell II tak, aby vznikly dvě komory pro pufr. Do komor byl nalit pufr tak, aby mezi deskami byly zaplaveny jamky a pod deskami tak, aby byla ponořena elektroda. Dále byly nadávkovány vzorky a standardy do jamek a byl připojen zdroj. Na zdroji byly nastaveny hodnoty metodou s konstantními limity a časem (limit napětí 125 V, limit proudu 80 mA, limit výkonu 5 W, čas min. 1 hodinu a 30 minut). Zařízení pro elektroforézu je vyobrazeno na Obr. 21. Po ukončení vyvíjení byly vyjmuty desky a opláchnuty vodou. Horní část desky byla sundána a nožem odříznut gel na spodní části a výstupky mezi jamkami. Gel byl převeden do vody v Petriho misce a důkladně opláchnut vodou za účelem odstranění pufru bránícího vybarvování (Obr. 22).

Gel byl v Petriho misce zalit 50 ml ustalovacího roztoku (40 ml metanolu + 7% kyselina octová) a byl umístěn na třepačku na 1 hodinu. Po ustálení byl slit roztok a gel byl opláchnut 25% metanolem. Barvení probíhalo na třepačce roztokem modři po dobu 1,5 hodiny. Poté bylo odlito barvivo a gel opláchnut 25% metanolem. Odbarvování gelu probíhalo přes noc v 25% metanolu na třepačce.

Gel byl opláchnut vodou a zalit sušícím roztokem (30% metanol + 5% glycerol) na 20 minut. Poté byl gel přesunut do rámečku mezi celofánové fólie. Sušení probíhalo ve svislé poloze v lednici po dobu 24 hodin. Po vysušení byl gel nechán 2 dny zatížený, aby nedošlo ke skroucení.



Obr. 22. Práce s gelem

6.12 Statistické vyhodnocení

Bylo využito faktorových pokusů 2^3 s jedním středovým pokusem. Proměnnou byla koncentrace NaOH a doba hydrolýzy jednotlivých fází. Účelem faktorových pokusů je stanovení významnosti vlivů působící na výsledky experimentu a způsob, jakým výsledky ovlivňují. Technologické podmínky opakované série hydrolýz byly navrženy pomocí faktorových pokusů 2^2 , tedy se dvěma proměnnými, jimiž byla koncentrace NaOH a doba enzymové hydrolýzy.

Ke statistickému vyhodnocení byl využit Paretův diagram, který statistickou významnost znázorňuje graficky. Vrstevnicové diagramy popisují závislost faktorů na vybrané vlastnosti. Výsledky byly vyhodnoceny v programu Minitab 17.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Hydrolýza

Byly provedeny dvě série hydrolýz za stejných podmínek (viz. Tab. 3).

Rozdíl v sériích byl v úpravě pH během enzymatické hydrolýzy:

- První série bez úpravy pH během druhé fáze (enzymatické hydrolýzy)
- Druhá série s úpravou pH během druhé fáze (enzymatické hydrolýzy)

Tab. 3. Podmínky jednotlivých hydrolýz keratinu

Experiment	Doba 1. fáze [hod]	Doba 2. fáze [hod]	Koncentrace NaOH [%]
1	4	4	0,05
2	4	4	0,5
3	4	24	0,05
4	4	24	0,5
5	14	14	0,275
6	14	14	0,275
7	24	4	0,05
8	24	4	0,5
9	24	24	0,05
10	24	24	0,5

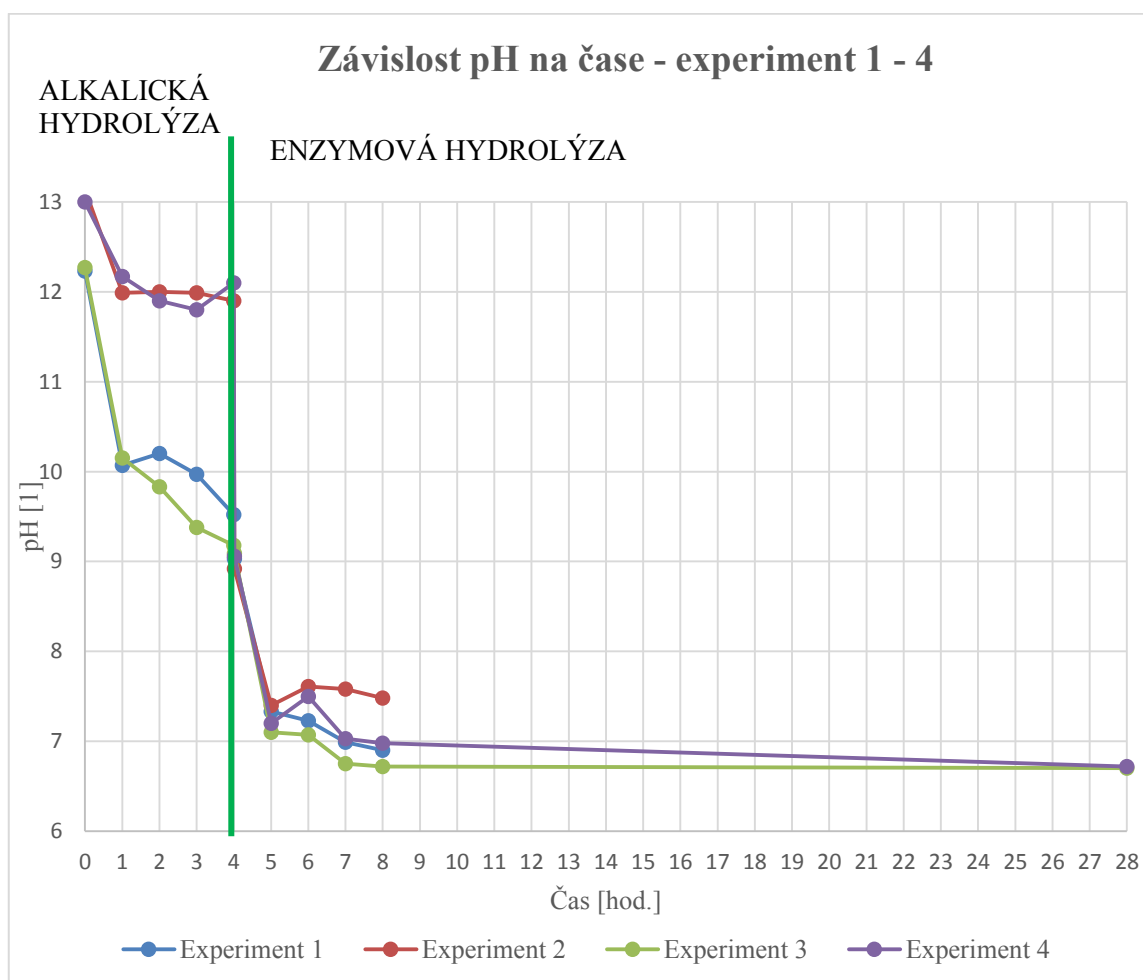
SÉRIE HYDROLÝZ BEZ ÚPRAVY pH V PRŮBĚHU ENZYMOVÉ HYDROLÝZY

V průběhu hydrolýzy byly sledovány hodnoty pH v pravidelných časech. Při 1. sérii byla hodnota pH upravena na hodnotu 9 pouze před začátkem enzymové hydrolýzy. Při pH 9 má enzym neoptimálnější aktivitu. V následujících grafech (Obr. 23 – 25) je znázorněna změna pH za čas pro jednotlivé hydrolýzy 1. série. Zelená čára rozděluje alkalickou a enzymovou hydrolýzu.

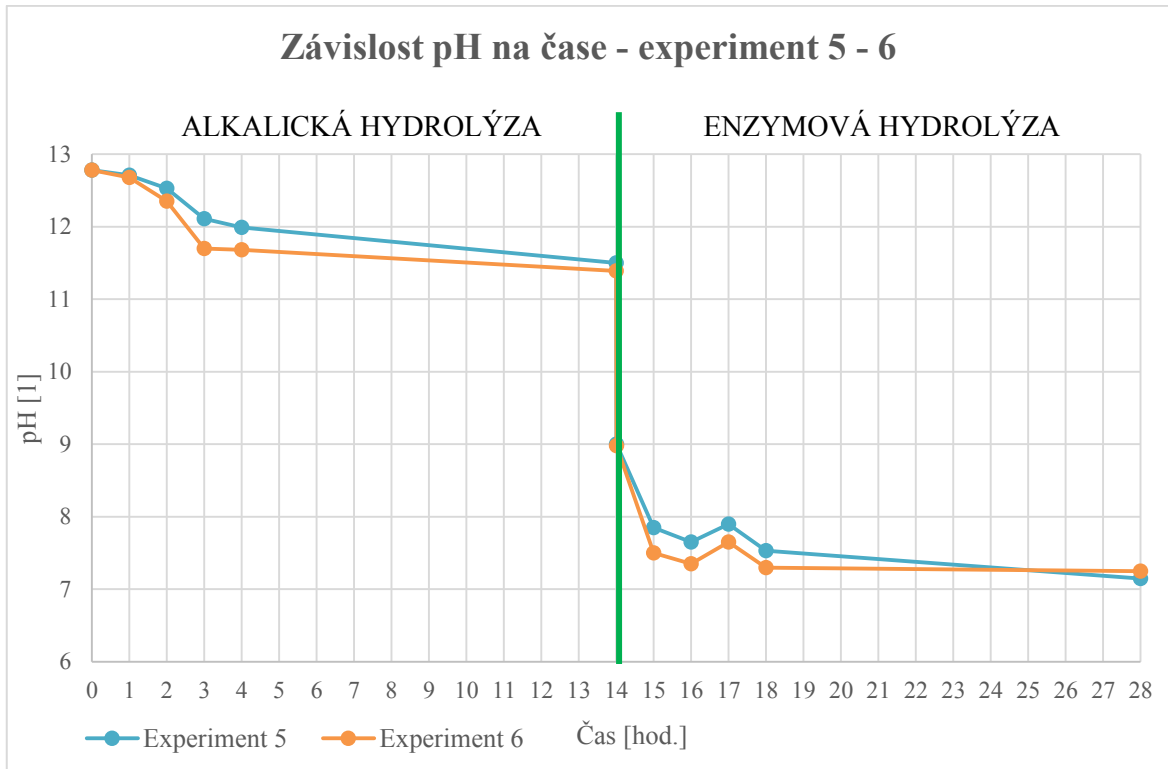
Zpočátku alkalické hydrolýzy byl pozorován strmější pokles pH během jednotlivých měření. Ze začátku enzymové hydrolýzy klesala hodnota pH srovnatelně strmě jako v případě alkalické hydrolýzy. Během posledních šestnácti hodin hydrolýz s delším časem 2. fáze byl již pokles pouze v rámci desetin hodnoty pH, což znázorňuje obrázek 23.

Obrázek 24 znázorňuje průběh změny pH pro dva středové pokusy provedené za stejných podmínek. Dle očekávání jsou téměř totožné. Na obrázku 25 jsou znázorněny hydrolýzy s delší dobou alkalické fáze. Zde je vidět pokles pH do cca 4. hodiny od počátku, dále pak po zbylou dobu klesá pH velmi mírně. Během enzymové hydrolýzy dochází k poklesu pH v podobné míře jako na začátku alkalické fáze.

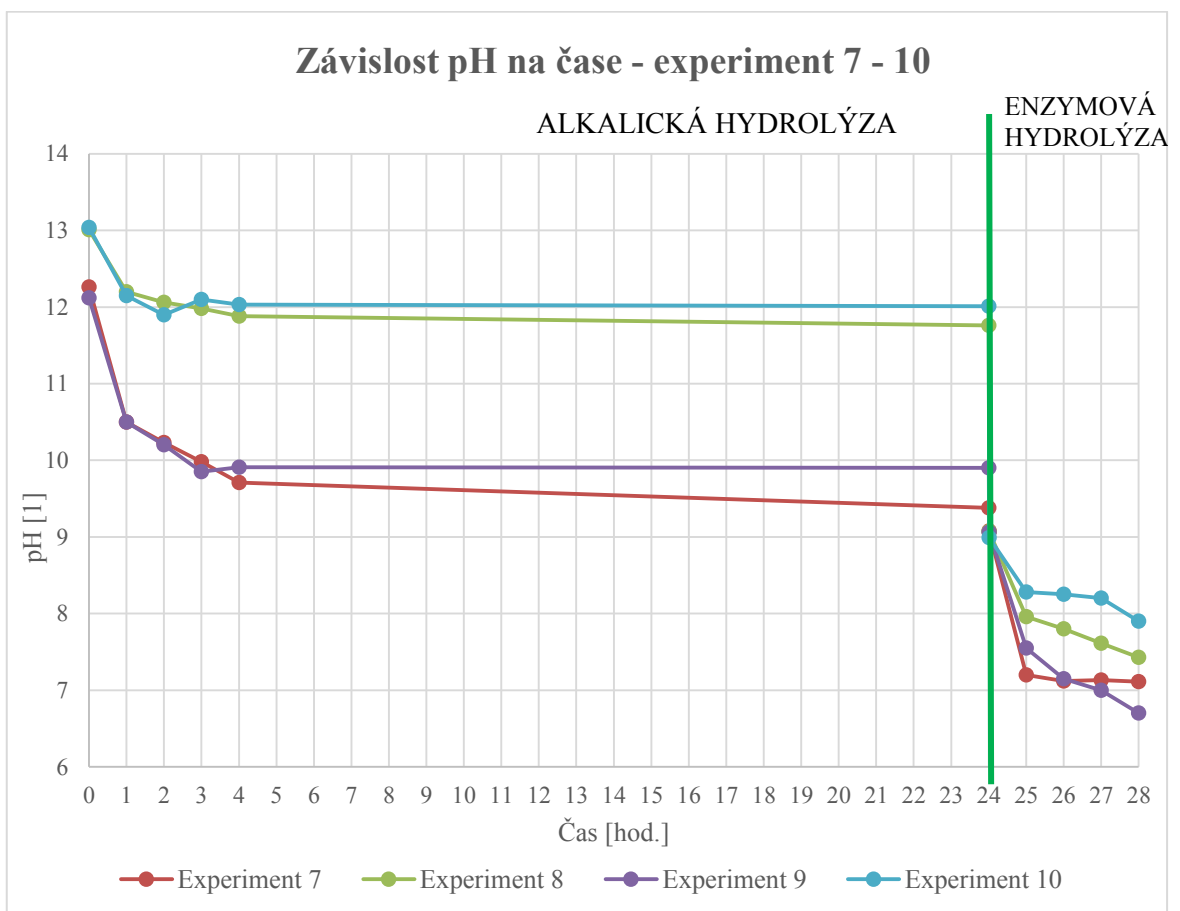
Obecně lze tedy říci, že zhruba do 4. hodiny od počátku, pH klesalo strměji. S delší dobou reakce byl již pokles mírný.



Obr. 23. Graf závislosti pH na čase pro experimenty 1 – 4



Obr. 24. Graf závislosti pH na čase pro experimenty 5 – 6

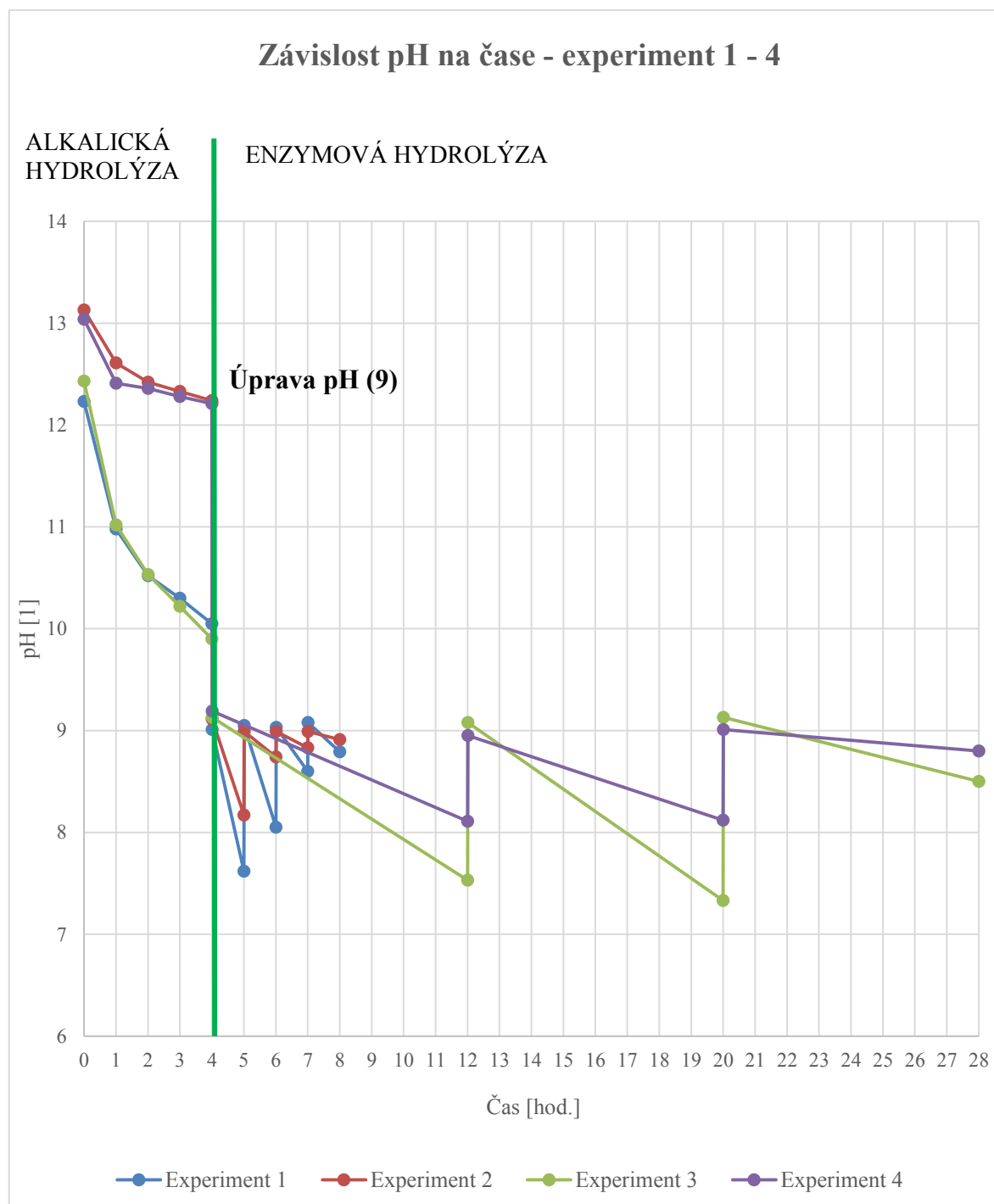


Obr. 25. Graf závislosti pH a čase pro experimenty 7 – 10

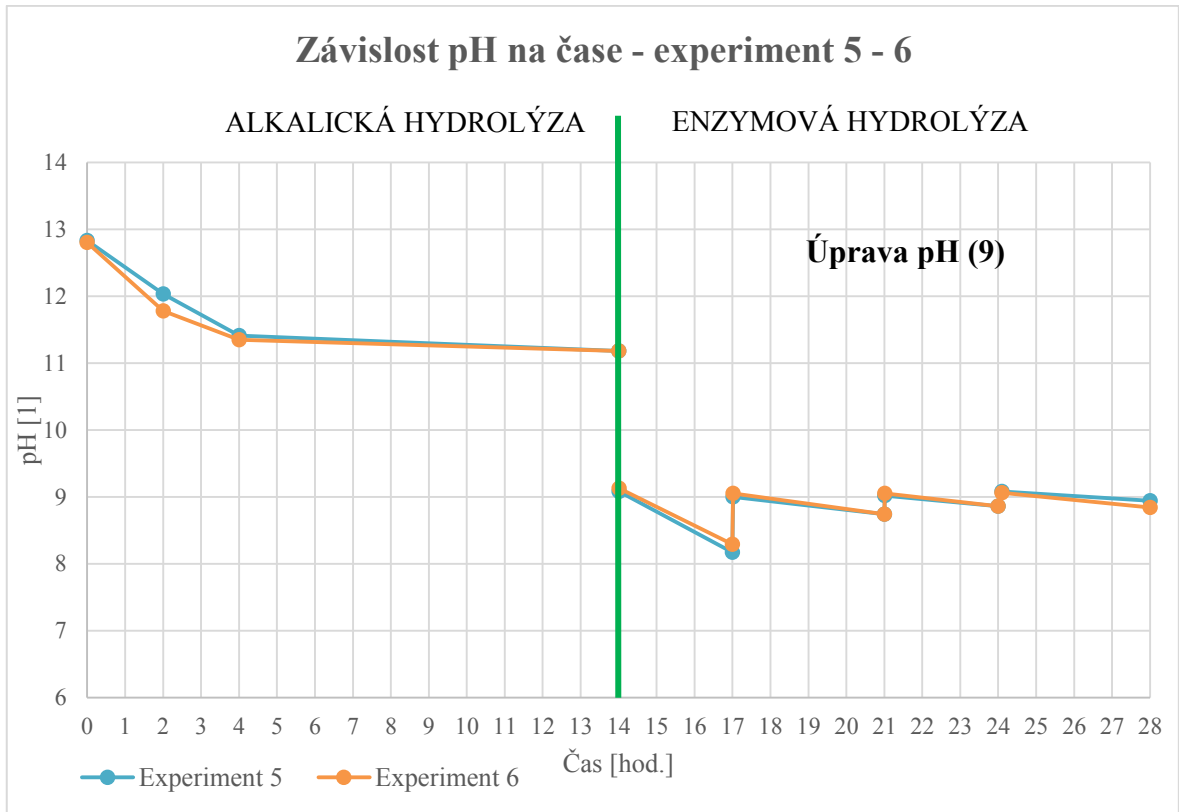
SÉRIE HYDROLÝZ S ÚPRAVOU pH V PRŮBĚHU ENZYMOVÉ HYDROLÝZY

V následující grafech (Obr. 26 – 28) je znázorněna změna pH za čas pro jednotlivé hydrolýzy 2. série. V této sérii bylo po určitých intervalech upravováno pH na hodnotu 9 během druhé fáze (enzymové hydrolýzy) z důvodu podpory funkce enzymu.

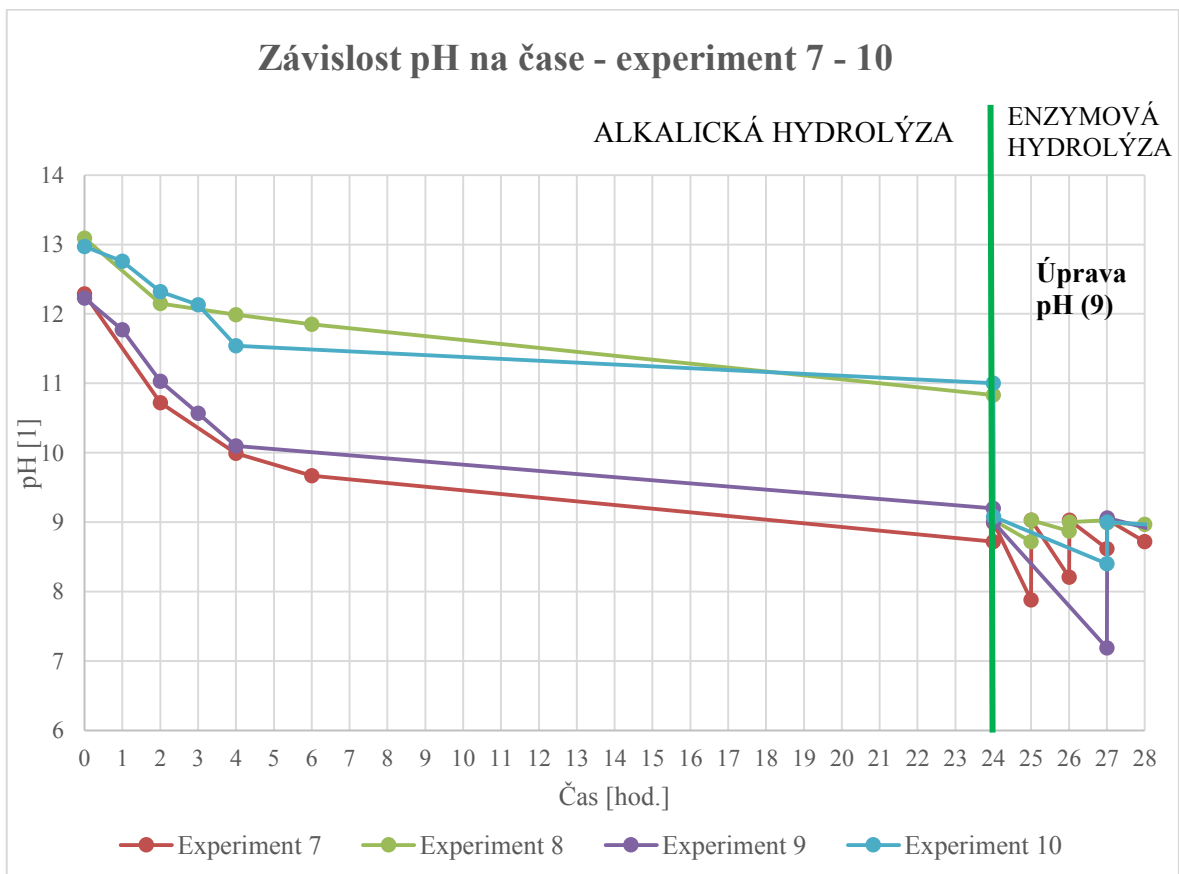
Zpočátku obou hydrolýz je opět pozorován strmější pokles hodnot pH. S časem se pokles ustaluje a křivka klesá mírně. Na obrázku 26 a 28 je zřetelný pokles pH v enzymové části hydrolýz. Nejprve docházelo k většímu poklesu po jednotlivých úpravách pH, s časem byl již pokles mírnější. Obrázek 27 znázorňuje průběh hodnot pH středových pokusů. Křivky jsou téměř totožné. Průběh alkalické fáze je srovnatelný s první sérií hydrolýz, dochází tedy zpočátku ke strmějšímu poklesu hodnot pH, s časem se pokles snižuje.



Obr. 26. Graf závislosti pH na čase hydrolyzy (experimenty 1 – 4)



Obr. 27. Graf závislosti pH na čase hydrolyzy (experimenty 5 – 6)



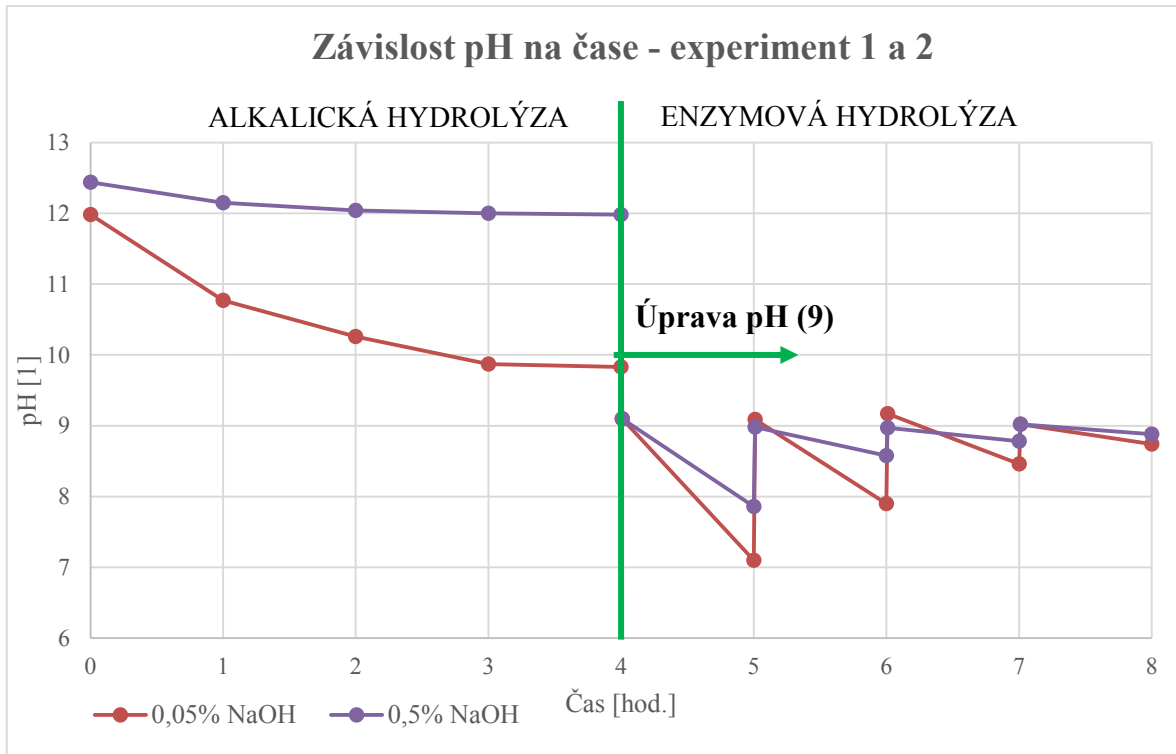
Obr. 28. Graf závislosti pH na čase hydrolyzy (experiment 7-10)

Tab. 4. Vyhodnocení neoptimálnějších podmínek hydrolýz

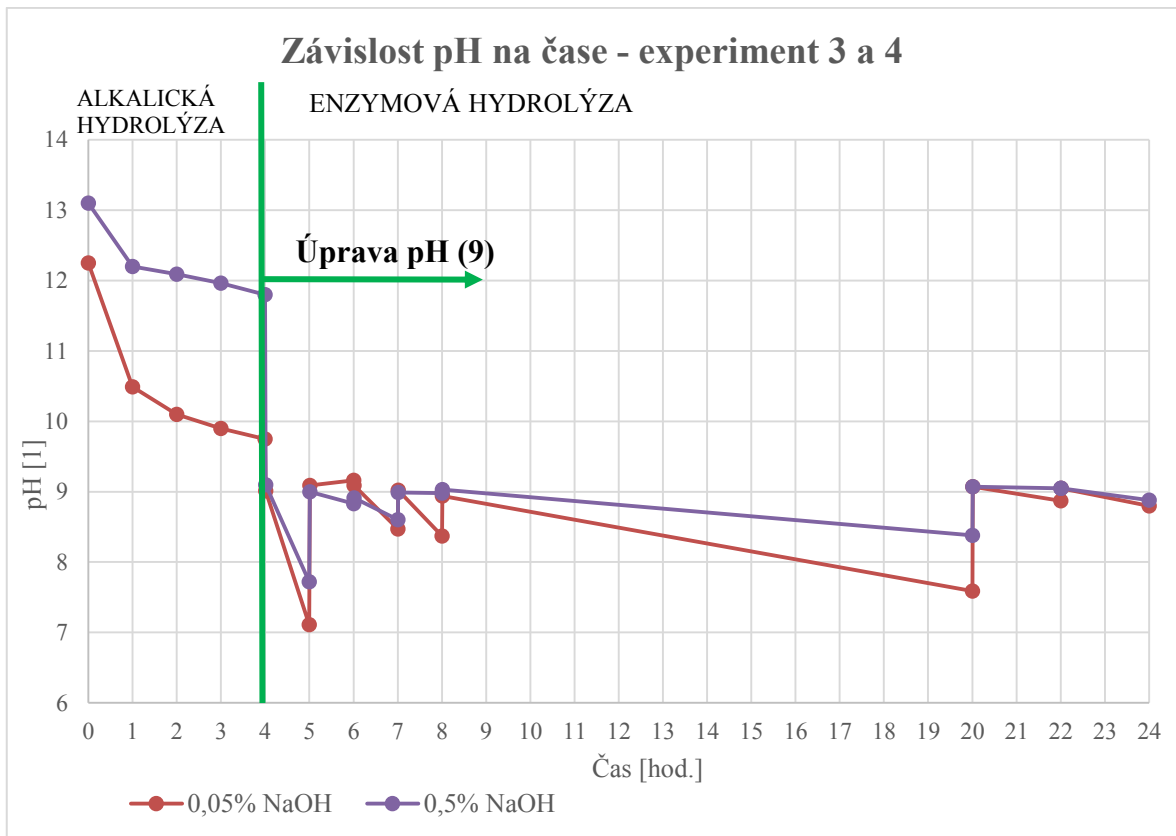
Experiment	Koncentrace NaOH [%]	Doba 1. fáze bez úpravy pH [hod.]	Doba 2. fáze s úpravou pH [hod.]	Účinnost hydrolýzy 1. fáze [%]	Účinnost hydrolýzy 2. fáze [%]
1	0,05	4	4	10,5	21,8
2	0,5	4	4	51,7	57,4
3	0,05	4	24	12,6	23,1
4	0,5	4	24	59,3	72,4
5	0,275	14	14	31,8	35,0
6	0,275	14	14	28,4	34,2
7	0,05	24	4	14,4	16,1
8	0,5	24	4	79,9	85,4
9	0,05	24	24	15,9	26,8
10	0,5	24	24	72,7	84,0

Na základě statistického vyhodnocení, v programu Minitab 17, vlivu faktorů na účinnost hydrolýzy jednotlivých experimentů bylo zjištěno, že největší vliv má koncentrace hydroxidu, dále pak doba enzymové hydrolýzy a nejmenší vliv má doba alkalické hydrolýzy. Na základě těchto zjištění a nemožnosti opakovat všechny hydrolýzy byly vybrány optimální podmínky hydrolýz, které jsou v tabulce 6 vyznačeny oranžově a byly znovu provedeny ve větším množství z důvodu získání většího množství produktů použitelných k analýzám. Pro nové statistické vyhodnocení byl proveden jeden středový pokus s dobou první fáze 4 hodiny.

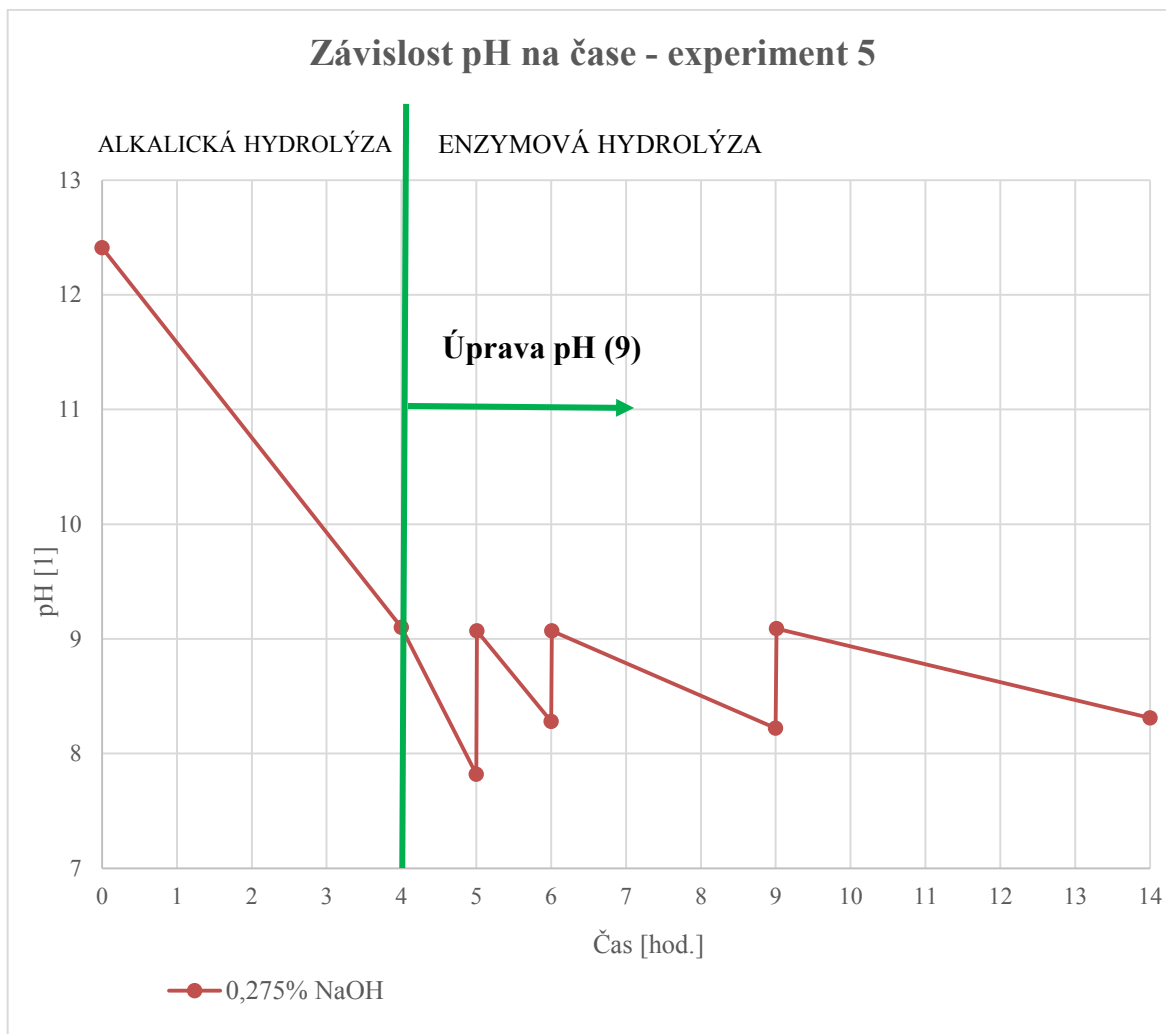
Následující grafy (Obr. 29 - 31) znázorňují změnu pH během hydrolýzy pro opakované experimenty 1 – 5. V této sérii bylo upravováno pH na hodnotu 9 v intervalech během enzymové hydrolýzy. Zelená čára rozděluje alkalickou a enzymovou fázi. Z grafů je evidentní, že po úpravě pH vždy následoval pokles hodnot. Na začátku je pozorován větší pokles, s delší dobou pH klesalo mírněji. Na obrázcích 29 a 30 lze jasně vidět, že s delší dobou působení pH klesalo mírněji a bylo pouze minimálně dorovnáváno na hodnotu 9. Obrázek 31 znázorňuje průběh středového pokusu, ze kterého je také zřejmé, že pH s časem klesá mírněji.



Obr. 29. Graf závislosti pH na čase hydrolyzy (experiment 1 a 2)



Obr. 30. Graf závislosti pH na čase hydrolyzy (experiment 3 a 4)



Obr. 31. Graf závislosti pH na čase hydrolyzy (experiment 5)

Tab. 5. Účinnosti opakovaných experimentů

Experiment	Účinnost hydrolyzy [%]
1	21,0
2	68,0
3	20,5
4	71,5
5	42,6

Tabulka 5 sumarizuje vypočítané účinnosti opakovaných sérií hydrolyz. Nejvyšší účinnost 71,5 % má experiment 4, který byl proveden s NaOH o nejvyšší koncentraci (0,5 %) v porovnání s ostatními experimenty a delší dobou enzymové hydrolyzy (24 hodin). O něco nižší účinnost 68 % měl experiment 2. Zde byla také použita vysoká koncentrace NaOH, ale kratší doba enzymové hydrolyzy (4 hodiny). Nejnižší účinnost 20,5 % vykazuje

experiment 3, kde byla použita nejnižší koncentrace NaOH (0,05 %) a enzymová hydrolyza probíhala 24 hodin. Velice podobně vyšla účinnost experimentu 1 (21 %), který se lišil pouze kratším časem enzymové hydrolyzy. Účinnost středového pokusu je dle očekávání přibližně uprostřed. Z výsledků lze usuzovat, že z hlediska účinnosti není čas hydrolyzy příliš významný.

7.2 Výsledky analytických zkoušek

STANOVENÍ OBSAHU SUŠINY A VLHKOSTI

Tab. 6. Obsah sušiny a vlhkosti pro první provedení

Experiment	Podíl sušiny 1. série [%]	Podíl vlhkosti 1. série [%]	Podíl sušiny 2. série [%]	Podíl vlhkosti 2. série [%]
1	91,7	8,3	93,2	6,9
2	95,3	4,7	95,2	4,8
3	93,1	6,9	92,6	7,4
4	95,0	5,1	94,4	5,6
5	93,6	6,4	93,2	6,8
6	93,7	6,3	93,5	6,5
7	92,2	7,8	92,5	7,5
8	94,4	5,6	93,6	6,4
9	92,3	7,7	92,9	7,1
10	94,9	5,1	93,9	6,1

Tab. 7. Obsah sušiny a vlhkosti pro opakované hydrolyzy

Experiment	Podíl sušiny [%]	Podíl vlhkosti [%]
1	95,7	4,3
2	95,9	4,1
3	96,7	3,4
4	97,7	2,4
5	97,9	2,1
6	95,9	4,1

Dva středové pokusy provedené během prvního stanovení (Tab. 6) jsou dobře srovnatelné. Podíl sušiny je 93 %. Jelikož byl během opakované série zopakován středový po-

kus s časem 1. fáze hydrolyzy 14 hodin a druhé fáze 14 hodin, je možné porovnat tento pokus s již provedeným. Zde se podíl sušiny liší o cca 3 %. Tento rozdíl vznikl pravděpodobně v důsledku rozdílného postupu sušení. Z důvodu delšího intervalu mezi sušeními vzorek navázal vzdušnou vlhkost.

Obsah sušiny v opakované sérii hydrolyz (Tab. 7) se pohyboval v intervalu od 95,7 % do 97,9 %. Největší podíl sušiny měly experimenty s delší dobou enzymové hydrolyzy (24 hodin).

STANOVENÍ OBSAHU POPELOVIN

Tab. 8. Stanovení obsahu popelovin

Experiment	Obsah popelovin [%]
1	16,3
2	19,9
3	16,5
4	18,3
5	16,5

Na jednotlivých hydrolyzáttech byl stanoven obsah popelovin (Tab. 8). Nejvíce popelovin bylo obsaženo ve vzorcích experimentu 2 a 4. Důvodem je vyšší koncentrace NaOH. Nižší podíl popela mají vzorky s nižší koncentrací NaOH.

STANOVENÍ OBSAHU DUSÍKU

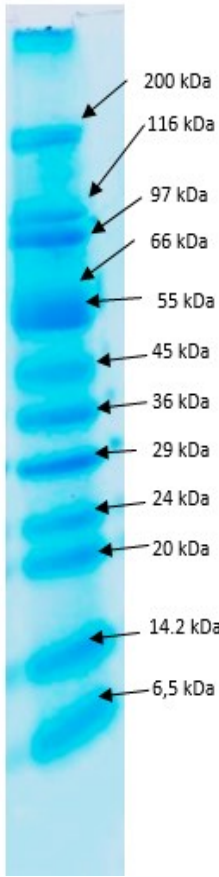






Tab. 9. Stanovení obsahu dusíku a bílkovin

Experiment	Obsah dusíku [%]	Obsah bílkovin [%]
1	14,7	91,9
2	11,4	71,3
3	13,2	82,5
4	11,6	72,5
5	11,5	71,9

Nejvíce dusíku obsahovaly vzorky experimentu 1 a 3 (Tab. 9). Zde byla použita nižší koncentrace NaOH (0,05 %). Tyto vzorky měly také největší podíl bílkovin. Naopak nejmenší obsah dusíku obsahovaly vzorky s vyšší koncentrací NaOH (0,5 %).

ELEKTROFORÉZA

Tab. 10. Přehled elektroforegramů

Experiment	Standard	1	2	3	4	5	6
Čas 1. fáze / 2. fáze [hod.]	/	4/4	4/4	4/24	4/24	14/14	4/14
Koncentrace NaOH [%]	/	0,05	0,5	0,05	0,5	0,275	0,275
							

Dalším z vyhodnocení bylo elektroforetické stanovení distribuce molárních hmotností. Byl použit standard s širokou distribucí molárních hmotností (6,5 – 200 kDa). Pro větší přehled jsou v tabulce 10 k jednotlivým elektroforegramům přiřazeny podmínky, za jakých

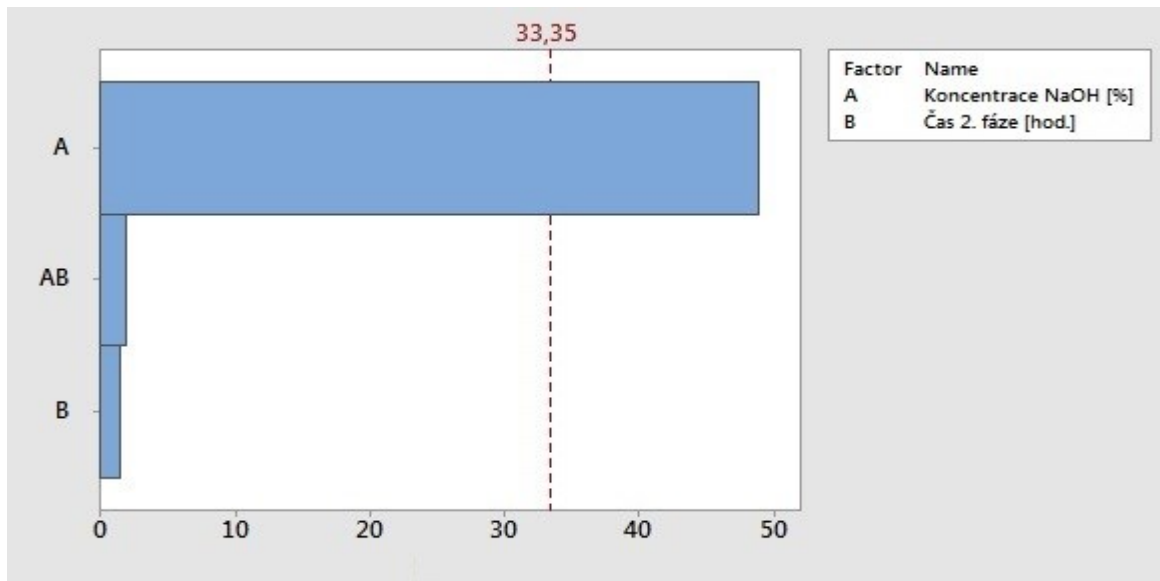
byly hydrolýzy provedeny. Zde se vzorek 4 jeví jako nejoptimálnější s největším zastoupením krátkých i dlouhých řetězců. Je zde poměrně hodně dlouhých řetězců od 60 do 200 kDa a stejně tak krátkých řetězců od 14 do 29 kDa. Důvodem jsou podmínky hydrolýzy. Byla zde použita vyšší koncentrace NaOH a vliv měla pravděpodobně i delší doba enzymové hydrolýzy (24 hodin). Stejně tak měla vyšší koncentrace NaOH vliv na vzorek 2, kde je také zřejmé zastoupení všech řetězců, ovšem ne v takové míře jako u vzorku 4. Zde se hrála roli kratší doba enzymové hydrolýzy (4 hodiny). Vzorky 2, 4, 5 a 6 obsahují vysoko molekulové frakce (55 – 200 kDa). Totožný profil mají vzorky 5 a 6 z důvodu stejné koncentrace NaOH (0,275%). Vzorek 1 má velmi malé zastoupení frakcí, v porovnání s ostatními vzorky. Vyskytuje se zde menší množství delších řetězců (55 – 200 kDa) s téměř úplnou absencí krátkých řetězců. Stejný profil má i vzorek 3. U vzorku 3 by se dalo očekávat v porovnání se vzorkem 1 větší množství frakcí, jelikož byl podroben delšímu času enzymové hydrolýzy.

Závěrem by se dalo říci, že technologické podmínky hydrolýzy mají vliv na distribuci molekulových hmotností hydrolyzátu. Úpravou podmínek lze tedy připravit hydrolyzáty s různým podílem vysoko-molekulárních, středně-molekulárních nebo nízko-molekulárních frakcí. Ideálními podmínkami byla v tomto experimentu delší doba enzymové hydrolýzy a vyšší koncentrace NaOH.

7.3 Statistické vyhodnocení

VYHODNOCENÍ VLIVU FAKTORŮ NA ÚČINNOST

Vliv jednotlivých faktorů na účinnost hydrolýzy byl vyhodnocen pomocí Paretova diagramu (Obr. 32.). Z něj lze vyčíst, že faktor A (koncentrace NaOH) přesahuje hodnotu kritické významnosti, je tedy statisticky vysoce významný. Čas 2. fáze hydrolýzy má zde minimální význam.



Obr. 32. Paretův diagram pro účinnost

Regresní rovnice:

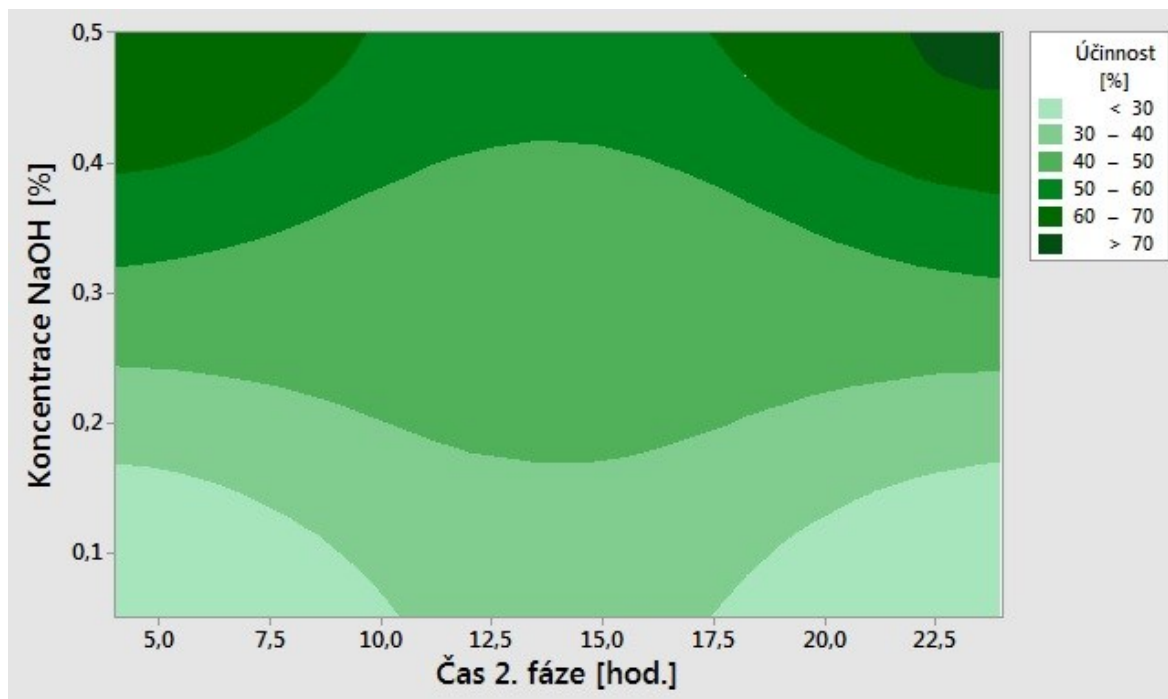
$$\% \text{ Účinnost} = 15,97 + 102,7 * A - 0,04722 * B + 0,4444 * A * B - 2,676 * CP$$

$$R^2 = 100 \%$$

A ... koncentrace NaOH [%]

B ... čas 2. fáze [hod.]

CP ... středový bod

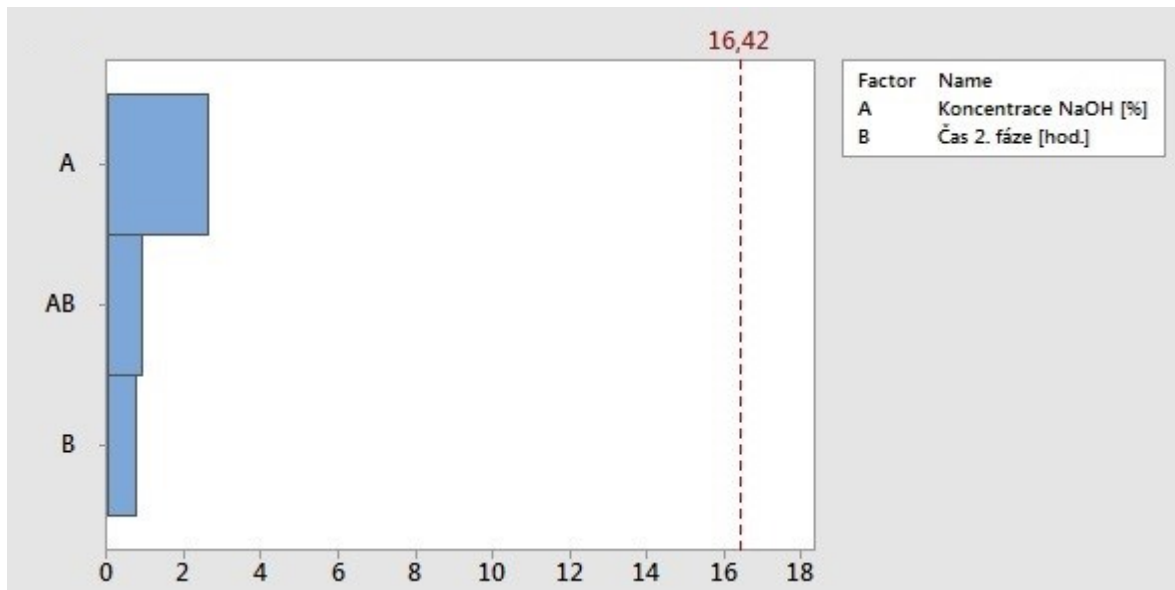


Obr. 33. Vrstevnicový diagram vlivu faktorů na účinnost

Obrázek 33 je vrstevnicový diagram vlivu faktorů na účinnost. Na tomto grafu je zřetelně vidět nárůst účinnosti s rostoucí koncentrací. Je zde patrné, že největší účinnost (nad 70 %) bude mít hydrolyzát, na jehož přípravu bude použit NaOH o koncentraci v rozmezí 0,45 – 0,5 % a hydrolyza bude probíhat po dobu od 22 do 24 hodin. V tomto případě sehrála roli i delší doba hydrolyzy. Ovšem není to faktor, který má zásadní vliv na účinnost, jelikož o něco nižší účinnost (60 – 70 %) vykazují vzorky, které byly podrobeny času od 4 do 10 hodin, stejně tak jako od 17,5 do 24 hodin. Při kratších časech byla koncentrace od 0,39 % do 0,5 %, při delších časech byla spodní hodnota koncentrace jen o něco málo nižší (cca 0,38 % - 0,5 %). Nejnižší účinnost pod 30 % je v případě doby hydrolyzy od 4 do 10 hodin a od 17,5 do 24 hodin při koncentraci NaOH od 0,05 % do 0,16 %, což opět potvrzuje zásadní vliv koncentrace na účinnost.

VYHODNOCENÍ VLIVU FAKTORŮ NA OBSAH POPELOVIN

Obrázek 34 znázorňuje Paretův diagram významnosti faktorů na obsah popelovin. Zde žádný z faktorů nedosahuje statistické významnosti. Z diagramu lze vyčíst, že největší vliv měla koncentrace NaOH. Doba hydrolyzy měla menší významnost.

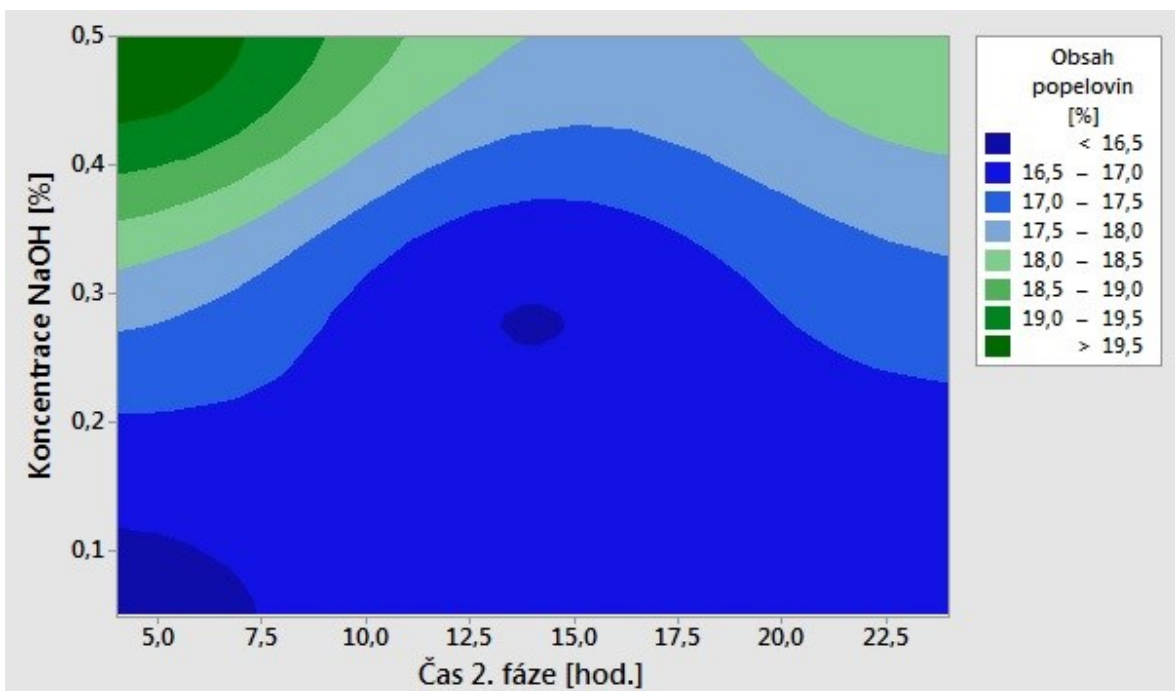


Obr. 34. Paretův diagram pro obsah popelovin

Regresní rovnice:

$$\% \text{ Popelovin} = 15,93 + 8,484 * A + 0,01569 * B - 0,1914 * A * B - 1,258 * CP$$

$$R^2 = 100 \%$$

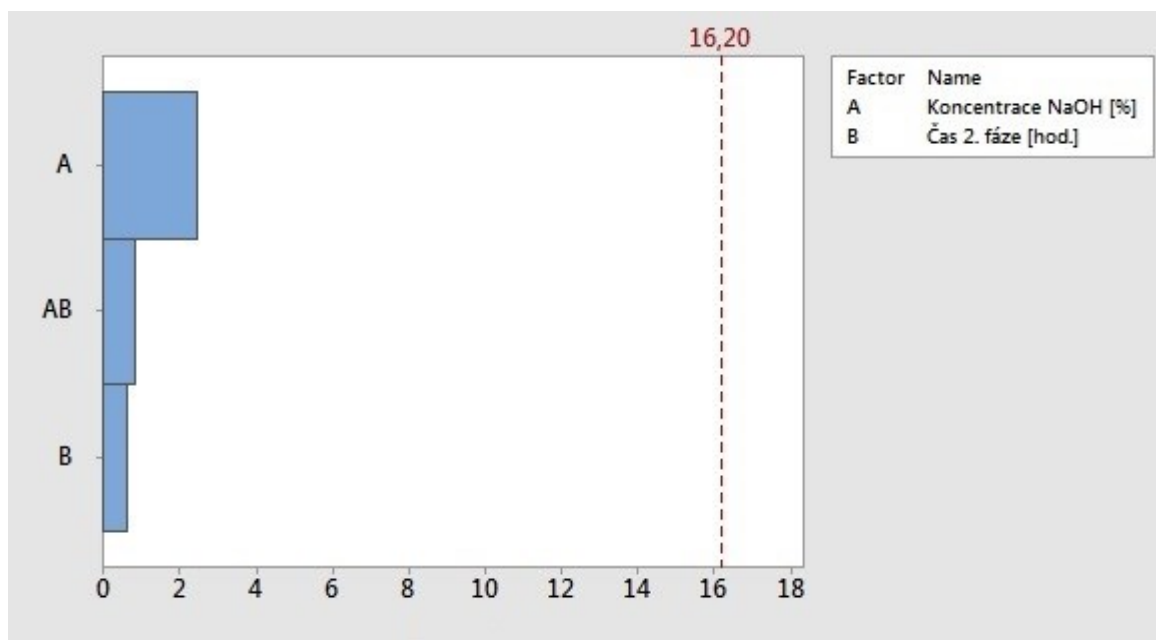


Obr. 35. Vrstevnicový diagram vlivu faktorů na obsah popelovin

Obrázek 35 znázorňuje vrstevnicový diagram vlivu faktorů na obsah popelovin. Jsou zde patrné dvě oblasti s nejnižším obsahem popelovin. První oblast je v nízké koncentraci NaOH v rozmezí od 0,05 % do 0,12 % s krátkým časem hydrolyzy od 4 do 7,5 hodin. Druhá oblast je středový pokus, kde se koncentrace NaOH pohybuje zhruba od 0,24 % do 0,26 % v čase od 13 do 14,5 hodin. Nejvyšší obsah popelovin (více než 19,5 %) je v oblasti vysoké koncentrace (0,44 – 0,5 %) a krátké doby hydrolyzy (4 – 7,5 hodin). Obsah popelovin 16,5 - 17 % se vyskytuje v celém intervalu času, tedy od 4 do 24 hodin při koncentraci od 0,05 % do 0,35 %. S rostoucím obsahem popelovin se již dále zkracuje doba reakce a 18 – 19,5 % popelovin je v rozmezí od 4 do 12,5 hodin. 18 – 18,5 % popelovin je při koncentraci od 0,31 % do 0,5 % v čase 4 – 14 hodin a 19 – 24 hodin. Obecně lze vyhodnotit, že se s rostoucí koncentrací NaOH zvyšuje obsah popelovin.

VYHODNOCENÍ VLIVU FAKTORŮ NA OBSAH DUSÍKU

Paretův diagram pro obsah dusíku (Obr. 36.) ukazuje, že větší význam v porovnání s časem hydrolyzy měla koncentrace NaOH.

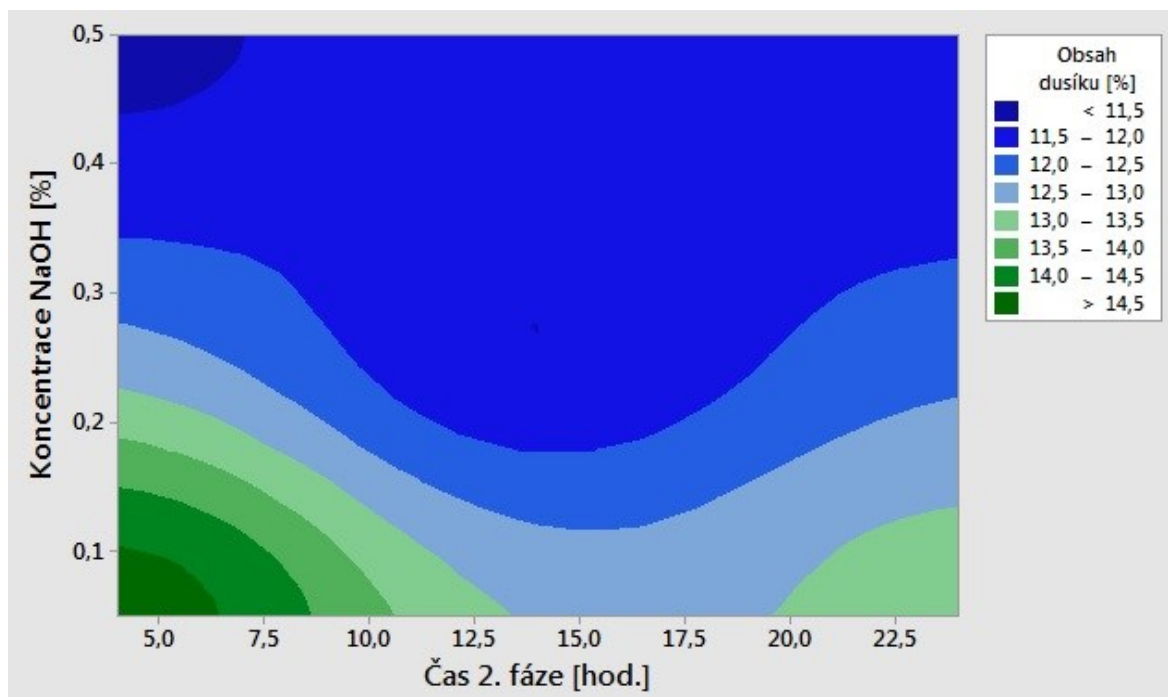


Obr. 36. Paretův diagram pro obsah dusíku

Regresní rovnice:

$$\% \text{ Dusíku} = 15,40 - 8,089 * A - 0,08444 * B + 0,1889 * A * B - 1,225 * CP$$

$$R^2 = 100 \%$$



Obr. 37. Vrstevnicový diagram vlivu faktorů na obsah dusíku

Obrázek 37 znázorňuje vrstevnicový diagram vlivu faktorů na obsah dusíku. Zde má tedy zásadní vliv na obsah dusíku koncentrace NaOH. Nejvyšší obsah dusíku bude za nízké koncentrace NaOH (0,05 – 0,1 %) a krátkou dobu (4 – 6 hodin). Nejnižší obsah dusíku za vysoké koncentrace NaOH (0,45 – 0,5 %) a krátkého času hydrolýzy (4 – 6 hodin). Obsah dusíku v rozmezí 11,5 – 12 % se vyskytuje v celém intervalu časů a v koncentraci od 0,2 % do 0,5 %. Lze tedy říci, že s rostoucí koncentrací NaOH se snižuje obsah dusíku.

ZÁVĚR

Diplomové práce je dělena na teoretickou a experimentální část. Teoretická část popisuje problematiku, kterou se poté praktická část zabývá. Hlavním tématem práce je keratin a způsoby jeho hydrolýzy. Dále jsou popsány praktické možnosti využití hydrolyzátů.

Prvním krokem praktické části bylo provedení dvou sérií alkalicko-enzymových hydrolýz lišících se úpravou pH v průběhu enzymové části hydrolýzy. Na základě statistického vyhodnocení bylo zjištěno, že doba alkalické hydrolýzy má nejmenší význam, a proto byla tato hodnota v další sérii zafixována na 4 h. Metodou faktorových pokusů 2^2 byla vytvořena a provedena nová série experimentů, u nichž byla vypočítána účinnost a provedeny analytické zkoušky. Nejvyšší účinnosti dosahovaly vzorky experimentů 2 a 4 (68 %, 71,5 %). Důvodem je zřejmě vyšší koncentrace NaOH (0,5 %). Statistickými metodami bylo potvrzeno, že největší vliv na účinnost hydrolýzy měla koncentrace NaOH a čas hydrolýzy měl prakticky zanedbatelný význam.

Z výsledků analytických zkoušek pak lze zjistit, že největší obsah sušiny měly vzorky podrobené delší době enzymové hydrolýzy. Nejvyšší obsah popela byl stanoven u experimentů 2 a 4 (19,9 %, 18,3 %), které probíhaly za vyšší koncentrace NaOH. Statisticky bylo potvrzeno, že obsah popela je taktéž ovlivněn převážně koncentrací NaOH. Z vrstevnicových diagramů je zřejmé, že obsah popela s rostoucí koncentrací NaOH stoupá. Obdobně hrála hlavní roli koncentrace NaOH v souvislosti s obsahem dusíku. Zde ovšem podíl dusíku rostl s klesající koncentrací. Největší podíl dusíku obsahovaly vzorky experimentů 1 a 3 (14,7 %, 13,2 %), kde byla použita nižší koncentrace NaOH (0,05 %). Naopak nejmenší podíl dusíku měly experimenty s vyšší koncentrací.

Na základě provedené elektroforézy byl jako nejoptimálnější, z hlediska distribuce molárních hmotností, vyhodnocen experiment 4 s koncentrací NaOH 0,5 % a dobou enzymové hydrolýzy 24 hodin. Tento vzorek obsahoval krátké i dlouhé řetězce v největším množství v porovnání s ostatními vzorky a měl největší podíl frakcí o molekulové hmotnosti od 60 do 200 kDa. Podobně vypadal vzorek experimentu 2, kde byla taktéž použita vyšší koncentrace NaOH, ale enzymová hydrolýza probíhala kratší dobu. Zde by se dalo říci, že na množství a rozložení jednotlivých frakcí mají vliv extrémnější podmínky.

Závěrem lze tedy konstatovat, že zásadní vliv na složení a množství získaného hydrolyzátu má zejména koncentrace NaOH, doby hydrolýzy měly vždy pouze minoritní roli.

Na základě získaných výsledků tedy zřejmě lze cílenou úpravou technologických podmínek připravit hydrolyzáty s konkrétními vlastnostmi, což by bylo vhodné podpořit dalšími studiiemi na dané téma.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Keratin. *Dictionary.com* [online]. [cit. 2020-04-30]. Dostupné z: www.dictionary.com
- [2] FEUGHELMAN, Max. *Mechanical Properties and Structure of Alpha-keratin Fibres: Wool, Human Hair and Related Fibres*. Sydney: UNSW Press, 1997. ISBN 9780868403595.
- [3] COULOMBE, P. A. a K. M. BERNOT. Keratins and the Skin. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Elsevier, 2004, p. 497-504. DOI: 10.1016/B0-12-443710-9/00345-8.
- [4] BRAGULLA, Hermann H. a Dominique G. HOMBERGER. Structure and function of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of Anatomy* [online]. 2009, **214**(4), 516-559 [cit. 2020-03-28]. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x. ISSN 00218782. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x>
- [5] WANG, B., W. YANG, J. MC KITTRICK a M. A. MEYERS. Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. *Progress in Materials Science*. 2016, Vol. **76**, p. 229-318. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2015.06.001.
- [6] STAROŃ, Paweł, Marcin BANACH, Zygmunt KOWALSKI a Anita STAROŃ. Hydrolysis of keratin materials derived from poultry industry. *Proc. ECOpole* [online]. 2014 [cit. 2020-03-28]. DOI: 10.2429/proc.2014.8(2)050. Dostupné z: http://tchie.uni.opole.pl/PECO14_2/EN/StaronBanach_PECO14_2.pdf
- [7] VOET, Donald, Judith G. VOET a Charlotte W. PRATT. *Principles of biochemistry: international student version*. 4th ed. Singapore: John Wiley, c2013. ISBN 9781118092446.
- [8] WILLIAMS, Peter A, ed. *Renewable Resources for Functional Polymers and Biomaterials* [online]. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2011 [cit. 2020-03-28]. Polymer Chemistry Series. DOI: 10.1039/9781849733519. ISBN 978-1-84973-245-1.
- [9] GOUSTEROVA, A., D. BRAIKOVA, I. GOSHEV, P. CHRISTOV, K. TISHINOV, E. VASILEVA-TONKOVA, T. HAERTLE a P. NEDKOV. Degradation of keratin and collagen containing wastes by new isolated thermoactinomycetes or by alkali-

- ne hydrolysis. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 2005, **40**(5), 335-340 [cit. 2020-03-28]. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2005.01692.x. ISSN 0266-8254. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.2005.01692.x>
- [10] SHAVANDI, Amin, Alan CARNE, Adnan A. BEKHIT a Alaa El-Din A. BEKHIT. An improved method for solubilisation of wool keratin using peracetic acid. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [online]. 2017, **5**(2), 1977-1984 [cit. 2020-03-28]. DOI: 10.1016/j.jece.2017.03.043. ISSN 22133437. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213343717301367>
- [11] LOUIS, David M. a John A. RIPPON. *The Coloration of Wool and Other Keratin Fibres*. John Wiley, 2013. ISBN 9781118625095.
- [12] ISLAM, Rafiqul. *Perspectives on sustainable technology*. New York: Nova Science Publishers, c2008. ISBN 9781604560695.
- [13] D'ARCY, J. B. *Sheep Management and Wool Technology*. 3. Australia: UNSW Press, 1990. ISBN 9780868400365.
- [14] EBRAHIMGOL, Farzaneh, Hossein TAVANAI, Farzaneh ALIHOSSEINI a Taghi KHAYAMIAN. Electrospayed recovered wool keratin nanoparticles. *Polymers for Advanced Technologies* [online]. 2014, **25**(9), 1001-1007 [cit. 2020-03-28]. DOI: 10.1002/pat.3342. ISSN 10427147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pat.3342>
- [15] Macro and Micro Structure of Wool Fiber. *Yarn Manufacturing* [online]. [cit. 2020-04-30]. Dostupné z: <http://textilebd-yarn.blogspot.com/2012/02/macro-and-micro-structure-of-wool-fiber.html>
- [16] *Terra Lana* [online]. [cit. 2019-03-30]. Dostupné z: <http://www.terralana.co.nz/breathability.html>
- [17] BĂLĂU MÎNDRU, Tudorel a Iulia BĂLĂU MÎNDRU. Effect of Reaction Conditions on the Hydrolysis of Wool Keratins. *Annals of the University of Oradea Fascicle of Textiles, Leatherwork* [online]. **1**(53), 143-148 [cit. 2020-03-28]. Dostupné z: <http://textile.webhost.uoradea.ro/Annals/Vol%20XVIII-No1-2017/Pielarie/Art.nr.%20232-pag.%20143-148.pdf>
- [18] BHAVSAR, Parag, Marina ZOCCOLA, Alessia PATRUCCO, Alessio MONTARSOLO, Giorgio ROVERO a Claudio TONIN. Comparative study on the effects of superheated water and high temperature alkaline hydrolysis on wool kera-

- tin. *Textile Research Journal* [online]. 2016, **87**(14), 1696-1705 [cit. 2020-03-28]. DOI: 10.1177/0040517516658512. ISSN 0040-5175. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0040517516658512>
- [19] MOKREJŠ, Pavel, Ondřej KREJČÍ, Roman ČERMÁK a Petr SVOBODA. Optimalizace podmínek enzymové hydrolýzy kuřecího peří. *Chemické Listy*. 2013, (107), 709-712.
- [20] MLÁDEK, M. a kol. Zpracování odpadů kožedělného průmyslu, 1. vydání, Praha, SNTL, 1971, 324 s.
- [21] SINKIEWICZ, Izabela, Agata ŚLIWIŃSKA, Hanna STAROSZCZYK a Ilona KOŁODZIEJSKA. Alternative Methods of Preparation of Soluble Keratin from Chicken Feathers. *Waste and Biomass Valorization* [online]. 2017, **8**(4), 1043-1048 [cit. 2020-04-29]. DOI: 10.1007/s12649-016-9678-y. ISSN 1877-2641. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12649-016-9678-y>
- [22] REDDY, Narendra. *Keratin-based Biomaterials and Bioproducts*. Smithers Rapra, 2017. ISBN 9781910242889.
- [23] CARDAMONE, Jeanette M., Alberto NUÑEZ, Rafael A. GARCIA a Mila ALDEMA-RAMOS. Characterizing Wool Keratin. *Research Letters in Materials Science* [online]. 2009, **2009**, 1-5 [cit. 2020-03-28]. DOI: 10.1155/2009/147175. ISSN 1687-6822. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/amse/2009/147175/>
- [24] Preparation and Characterization of Keratin Hydrolysates. KREJČÍ, Ondřej, Pavel MOKREJŠ a Svatopluk SUKOP. *Mathematical Methods and Techniques in Engineering and Environmental Science* [online]. Wseas, 2011, s. 308-311 [cit. 2020-04-30]. ISBN 9781618040466. Dostupné z: https://pdfs.semanticscholar.org/ce43/e857b1a4a376716f15dae4b1e41032252dd0.pdf?_ga=2.81076370.402637899.1585412842-1367894670.1585412842
- [25] EREMEEV, N. L., I. V. NIKOLAEV, I. D. KERUCHEN'KO, et al. Enzymatic hydrolysis of keratin-containing stock for obtaining protein hydrolysates. *Applied Biochemistry and Microbiology* [online]. 2009, **45**(6), 648-655 [cit. 2020-04-29]. DOI: 10.1134/S0003683809060131. ISSN 0003-6838. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1134/S0003683809060131>

- [26] MUNAWAR, Tappa Mohammad, K. ARUNA a A. V. N. SWAMY. Studies on production of keratinase from different keration substrates using *Bacillus licheniformis* strains. *International Journal of Pharmaceutical Research and Development* [online]. 2012, **4**(07) [cit. 2020-04-29].
- [27] DALEV, Pencho G. Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate. *Bioresource Technology* [online]. 1994, **48**(3), 265-267 [cit. 2020-03-28]. DOI: 10.1016/0960-8524(94)90156-2. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0960852494901562>
- [28] MOKREJS, Pavel, Petr SVOBODA, Josef HRNCIRIK, Dagmar JANACOVA a Vladimir VASEK. Processing poultry feathers into keratin hydrolysate through alkaline-enzymatic hydrolysis. *Waste Management & Research* [online]. 2011, **29**(3), 260-267 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1177/0734242X10370378. ISSN 0734-242X. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0734242X10370378>
- [29] SHARMA, Swati a Arun GUPTA. Sustainable Management of Keratin Waste Biomass: Applications and Future Perspectives. *Brazilian Archives of Biology and Technology* [online]. 2016, **59** [cit. 2020-03-28]. DOI: 10.1590/1678-4324-2016150684. ISSN 1516-8913. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132016000100701&lng=en&tlng=en
- [30] KARTHIKEYAN, Rajan a Balaji SRINIVASAN. Industrial applications of keratins – A review. *Journal of scientific and industrial research* [online]. 2017, **66**, 710-715 [cit. 2020-03-28]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/228583971_Industrial_applications_of_keratins-A_review
- [31] SHAVANDI, Amin, Tiago H. SILVA, Adnan A. BEKHIT a Alaa El-Din A. BEKHIT. Keratin: dissolution, extraction and biomedical application. *Biomaterials Science* [online]. 2017, **5**(9), 1699-1735 [cit. 2020-03-28]. DOI: 10.1039/C7BM00411G. ISSN 2047-4830. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C7BM00411G>
- [32] ROUSE, Jillian G. a Mark E. VAN DYKE. A Review of Keratin-Based Biomaterials for Biomedical Applications. *Materials* [online]. 2010, **3**(2), 999-1014 [cit. 2020-03-28]. DOI: 10.3390/ma3020999. ISSN 1996-1944. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1996-1944/3/2/999>

- [33] DRAELOS, Zoe Diana. *Cosmetics and Dermatologic Problems and Solutions*. 3. New York: CRC Press, 2011. ISBN 9781841847412.
- [34] VILLA, Ana Lúcia Vazquez, Márcia Regina Senrra ARAGÃO, Elisabete Pereira DOS SANTOS, Ana Maria MAZOTTO, Russolina B. ZINGALI, Edilma Paraguai DE SOUZA a Alane Beatriz VERMELHO. Feather keratin hydrolysates obtained from microbial keratinases: effect on hair fiber. *BMC Biotechnology* [online]. 2013, **13**(1) [cit. 2020-03-28]. DOI: 10.1186/1472-6750-13-15. ISSN 1472-6750. Dostupné z: <http://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6750-13-15>
- [35] PADNEY, Ashok, Rainer HÖFER, Mohammad TAHERZADEH, Madhavan NAMPOOTHIRI a Christian LARROCHE. *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*. Elsevier, 2015. ISBN 9780444634535.
- [36] HOU, Yongqing, Zhenlong WU, Zhaolai DAI, Genhu WANG a Guoyao WU. Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. *Journal of Animal Science and Biotechnology* [online]. 2017, **8**(1) [cit. 2020-03-28]. DOI: 10.1186/s40104-017-0153-9. ISSN 2049-1891. Dostupné z: <http://jasbsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40104-017-0153-9>
- [37] ARIVITHAMANI, Nallathambi, Soloman AGNES MARY, Muthusamy SENTHIL KUMAR a Venkateshwarapuram Rengaswami GIRI DEV. Keratin hydrolysate as an exhausting agent in textile reactive dyeing process. *Clean Technologies and Environmental Policy* [online]. 2014, **16**(6), 1207-1215 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1007/s10098-014-0718-7. ISSN 1618-954X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10098-014-0718-7>
- [38] LAGARÓN, José-María. *Multifunctional and Nanoreinforced Polymers for Food Packaging*. Woodhead Publishing, 2011. ISBN 9781845697389.
- [39] Lipex. *National Center for Biotechnology Education* [online]. [cit. 2020-04-30]. Dostupné z: <http://www.ncbe.reading.ac.uk/MATERIALS/Enzymes/lipex.html>
- [40] Savinase. *Novozymes* [online]. [cit. 2020-04-30]. Dostupné z: <https://www.novozymes.com>
- [41] WILSON, Keith a John WALKER. *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*. Ilustrované vydání. Cambridge University Press, 2010. ISBN 9780521516358.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

kDa kiloDalton

PA polyamid

ppm parts per milion

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Model α-helixu [5]</i>	13
<i>Obr. 2. Vznik intermediálního filamenta [5]</i>	14
<i>Obr. 3. Model β-skládaného listu [5]</i>	15
<i>Obr. 4. Vznik β-keratinového vlákna [5]</i>	15
<i>Obr. 5. Chemické vazby v keratinu [10]</i>	17
<i>Obr. 6. Struktura vlákna vlny [15]</i>	20
<i>Obr. 7. Mikroskopické zobrazení vlákna vlny [16]</i>	21
<i>Obr. 8. Vodní lázeň s míchadly LAB-EGG</i>	33
<i>Obr. 9. pH metr WTW</i>	34
<i>Obr. 10. Průběh odtučňování vlny</i>	36
<i>Obr. 11. Vlna po vysušení v sušárně</i>	37
<i>Obr. 12. Pomletá vlna</i>	37
<i>Obr. 13. Nožový mlýn</i>	38
<i>Obr. 14. Schéma průběhu hydrolyzy</i>	39
<i>Obr. 15. Průběh hydrolyzy (vlna s 0,5% NaOH)</i>	40
<i>Obr. 16. Vysušený tuhý podíl (0,05% NaOH)</i>	41
<i>Obr. 17. Hydrolyzát keratinu (0,5% NaOH)</i>	42
<i>Obr. 18. Vysušený hydrolyzát (0,05% NaOH)</i>	42
<i>Obr. 19. Mineralizační aparatura</i>	45
<i>Obr. 20. Parnas-Wagnerova aparatura</i>	46
<i>Obr. 21. Přístroj pro elektroforézu</i>	47
<i>Obr. 22. Práce s gelem</i>	49
<i>Obr. 23. Graf závislosti pH na čase pro experimenty 1 – 4</i>	51
<i>Obr. 24. Graf závislosti pH na čase pro experimenty 5 – 6</i>	52
<i>Obr. 25. Graf závislosti pH a čase pro experimenty 7 – 10</i>	52
<i>Obr. 26. Graf závislosti pH na čase hydrolyzy (experimenty 1 – 4)</i>	54
<i>Obr. 27. Graf závislosti pH na čase hydrolyzy (experimenty 5 – 6)</i>	55
<i>Obr. 28. Graf závislosti pH na čase hydrolyzy (experiment 7-10)</i>	55
<i>Obr. 29. Graf závislosti pH na čase hydrolyzy (experiment 1 a 2)</i>	57
<i>Obr. 30. Graf závislosti pH na čase hydrolyzy (experiment 3 a 4)</i>	57
<i>Obr. 31. Graf závislosti pH na čase hydrolyzy (experiment 5)</i>	58
<i>Obr. 32. Paretův diagram pro účinnost</i>	63

<i>Obr. 33. Vrstevnicový diagram vlivu faktorů na účinnost</i>	64
<i>Obr. 34. Paretův diagram pro obsah popelovin</i>	65
<i>Obr. 35. Vrstevnicový diagram vlivu faktorů na obsah popelovin</i>	65
<i>Obr. 36. Paretův diagram pro obsah dusíku</i>	66
<i>Obr. 37. Vrstevnicový diagram vlivu faktorů na obsah dusíku</i>	67

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Prvkové složení ovčí vlny [12]</i>	19
<i>Tab. 2. Aminokyselinové složení ovčí vlny [5]</i>	19
<i>Tab. 3. Podmínky jednotlivých hydrolyz keratinu</i>	50
<i>Tab. 4. Vyhodnocení neoptimálnějších podmínek hydrolyz</i>	56
<i>Tab. 5. Účinnosti opakovaných experimentů</i>	58
<i>Tab. 6. Obsah sušiny a vlhkosti pro první provedení</i>	59
<i>Tab. 7. Obsah sušiny a vlhkosti pro opakované hydrolyzy</i>	59
<i>Tab. 8. Stanovení obsahu popelovin</i>	60
<i>Tab. 9. Stanovení obsahu dusíku a bílkovin</i>	60
<i>Tab. 10. Přehled elektroforegramů</i>	61

