

# **Příprava filmů z keratinových hydrolyzátů a jejich sít'ování**

Matouš Huť'a

---

Diplomová práce  
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2013/2014

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Matouš Huřta**  
Osobní číslo: **T12376**  
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Inženýrství polymerů**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Příprava filmů z keratinových hydrolyzátů a jejich síťování**

Zásady pro vypracování:

**Teoretická část práce se bude věnovat popisu přípravy a zpracování keratinových hydrolyzátů a možnostem jejich využití pro tvorbu filmů a fólií. V praktické části bude sledován vliv přísad různých síťovadel na vlastnosti připravených filmů z keratinových hydrolyzátů.**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

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

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

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

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

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

Datum zadání diplomové práce: **10. ledna 2014**

Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2014**

Ve Zlíně dne 7. února 2014



doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
děkan



Ing. Lubomír Beníček, 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<sup>1)</sup>;
- 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<sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60<sup>3)</sup> 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<sup>3)</sup> 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 .....

.....

---

<sup>1)</sup> 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.

<sup>2)</sup> 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).

<sup>3)</sup> 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**

Tato práce se zabývá výrobou filmů z keratinového hydrolyzátu, připravených dvoustupňovou alkalicko-enzymovou hydrolyzou a jejich možné zlepšení vlastností pomocí použitých síťovadel (dialdehyd škrobu, diethylester kyseliny vinné a glutardialdehyd). Teoretická část práce shrnuje informace o keratinu, keratinových hydrolyzátech, jejich přípravě, filmech z keratinových hydrolyzátů a dalších aplikacích. V praktické části byly z keratinových hydrolyzátů namíchány směsi (keratinový hydrolyzát, voda, glycerol) z nichž byly připraveny filmy s přísádky síťovadel. Účinky použitých síťovadel byly sledovány pomocí metod DSC, TGA a FTIR.

**Klíčová slova:** keratinový hydrolyzát, filmy, síťování, vlastnosti

## **ABSTRACT**

This thesis deals with films preparation from keratin hydrolysate, which was prepared by two-step alkali-enzymatic hydrolysis and their properties improvement by cross-linking agents (starch dialdehyde, diethyl tartrate and glutaraldehyde). Theoretical part of work summarized information about keratin, keratin hydrolysates, their preparation, film formation and other applications. In experimental part of work, compounds (keratin hydrolysate, water, and glycerol) were mixed firstly and films with cross-linking agents were prepared from these mixtures. Effect of crosslinking-agents addition was studied by DSC, TGA and FTIR methods.

**Keywords:** keratin hydrolysate, films, cross-linking, properties

Děkuji svému vedoucímu Ing. Ondřeji Krejčímu za odborné vedení diplomové práce, pomoc při experimentech, překladu článků a důležité rady a připomínky při její tvorbě. Děkuji také paní laborantce Miroslavě Žaludkové za pomoc při experimentech.

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

## OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 BÍLKOVINY (PROTEINY)</b> .....	<b>12</b>
1.1 KERATIN .....	14
1.1.1 Chemické vazby v keratinu .....	17
1.1.2 Keratinové odpady .....	18
<b>2 HYDROLYTICKÉ ŠTĚPENÍ</b> .....	<b>20</b>
2.1 ALKALICKÁ HYDROLÝZA .....	21
2.2 KYSELÁ HYDROLÝZA .....	22
2.3 OXIDAČNÍ A REDUKČNÍ ZPŮSOB .....	22
2.4 ENZYMOVÁ HYDROLÝZA .....	23
2.5 KOMBINOVANÝ ZPŮSOB .....	24
2.6 VLASTNOSTI KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ .....	24
<b>3 KERATINOVÉ FILMY</b> .....	<b>26</b>
3.1 VLASTNOSTI KERATINOVÝCH FILMŮ .....	27
3.2 MODIFIKACE FILMŮ Z KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ .....	28
3.2.1 Změkčovadla .....	28
3.2.2 Chemické modifikace.....	28
3.2.3 Tepelné úpravy .....	29
3.2.4 Enzymatické úpravy .....	29
<b>4 APLIKACE KERATINU</b> .....	<b>30</b>
<b>5 APLIKACE KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ</b> .....	<b>31</b>
5.1 POUŽITÍ KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ V ZEMĚDĚLSTVÍ.....	31
5.2 POUŽITÍ KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ V OBALOVÉ TECHNICE.....	31
5.3 POUŽITÍ KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ V KOSMETICE A LÉKAŘSTVÍ.....	32
5.4 DALŠÍ APLIKACE.....	32
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>33</b>
<b>6 CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>34</b>
<b>7 MATERIÁLY A METODY</b> .....	<b>35</b>
7.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	35
7.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE .....	35
7.3 ANALYTICKÉ ZKOUŠKY A POUŽITÉ METODY .....	36
7.3.1 Mikrochemické stanovení dusíku – AOAC 960.52 .....	36
7.3.2 Stanovení sušiny – ČSN EN ISO 665 .....	36
7.3.3 Stanovení popela – ČSN ISO 2171 .....	36
7.3.4 Diferenciální skenovací kalorimetrie .....	36
7.3.5 Termogravimetrická analýza.....	38
7.3.6 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) .....	38
<b>8 PŘÍPRAVA KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU A POUŽITÝCH FILMŮ</b> .....	<b>40</b>



8.1	PŘÍPRAVA KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU .....	40
8.2	PŘÍPRAVA FILMŮ Z KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU .....	41
<b>9</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>44</b>
9.1	TESTOVÁNÍ FILMŮ .....	44
9.1.1	Analytická stanovení .....	44
9.1.2	Diferenciální snímací kalorimetrie .....	45
9.1.3	Termogravimetrická analýza .....	48
9.1.4	Infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) .....	52
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>54</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>55</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>58</b>
	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>59</b>

## ÚVOD

Ročně je ve světě vyprodukováno velké množství keratinových odpadů, které nejsou adekvátním způsobem zužitkovány a nejčastěji končí na skládkách nebo ve spalovnách. Tyto odpady přispívají k celosvětovému znečištění životního prostředí, a proto by se měla být věnována větší pozornost možnostem dalšího zpracování a využití těchto materiálů. Z odpadních keratinových látek lze připravit rozpustné redukované formy keratinu, s různými vlastnostmi, množstvím rozdílných metod. Takto připravené hydrolyzáty lze dále upravovat a připravit je tak pro využití v průmyslu nebo zemědělství.

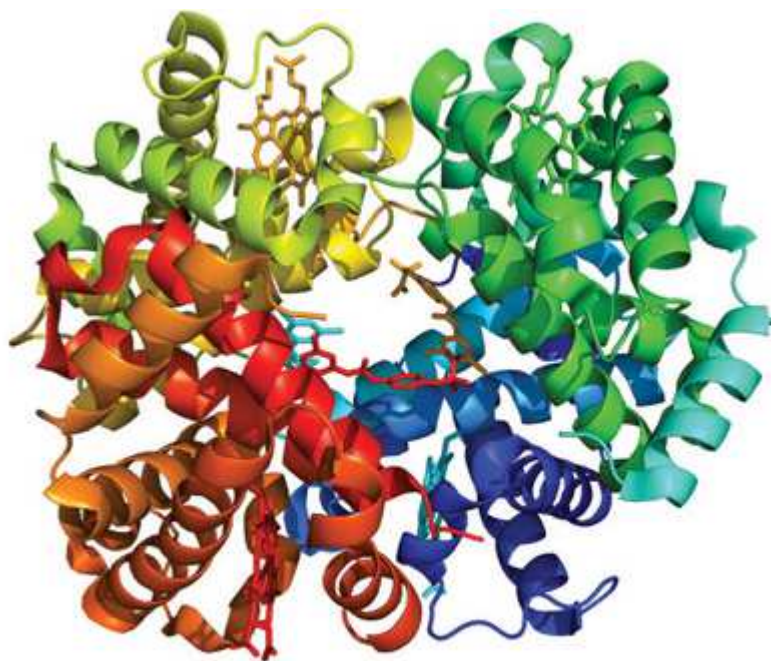
Jednou z možných aplikací keratinových hydrolyzátů je výroba filmů, jejichž aplikační vlastnosti ještě nejsou příliš dobré. Proto vzniká snaha upravení struktury připravených filmů a zlepšení jejich vlastností. Tomuto problému se věnuje i následující práce. Předem připravený keratinový hydrolyzát, získaný z vlny dvoustupňovou alkalicko-enzymovou hydrolyzou, bude nejprve podroben analytickým zkouškám pro zjištění jeho složení a kvality. Následně z něj budou připraveny filmy s přísadami síťovadel (dialdehyd škrobu, diethylester kyseliny vinné a glutardialdehyd), které budou podrobeny analytickým zkouškám a zkoumány metodami jako je DSC, TGA a FTIR jestli dokážou zlepšit konečné vlastnosti filmů.

Cílem diplomové práce je posouzení možností použití keratinového hydrolyzátu na výrobu filmů a možná úprava jejich vlastností pomocí síťovacích látek jako je dialdehyd škrobu, diethylester kyseliny vinné a glutardialdehyd.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 BÍLKOVINY (PROTEINY)

Bílkoviny se skládají z aminokyselin, které jsou v nich kondenzované do polypeptidových řetězců za pomoci peptidových (amidových) -CONH- vazeb. Dělí se na bílkoviny jednoduché a složené, jednoduché bílkoviny se skládají pouze z aminokyselin a bílkoviny složené obsahují kromě bílkovinné složky i složku nebílkovinnou což mohou být např. různé cukry, peptidy, enzymy a mnoho dalších. Bílkoviny lze rozdělovat podle řady dalších kritérií, jejichž stručný přehled je uveden v tabulce 1. Aminokyseliny jsou organické dusíkaté sloučeniny, které můžeme z hlediska chemické struktury definovat jako sloučeniny co mají na  $\alpha$ -uhlíku karboxylovou a aminovou skupinu. Dále se na  $\alpha$ -uhlíku váže vodíkový atom a čtvrtá valence obsahuje postranní řetězec -R, který nám určuje charakter a konečné vlastnosti aminokyseliny. Vlastnosti bílkovin závisí na chemickém složení (sekvenci aminokyselin), velikosti makromolekul a prostorovém uspořádání. [1,2]



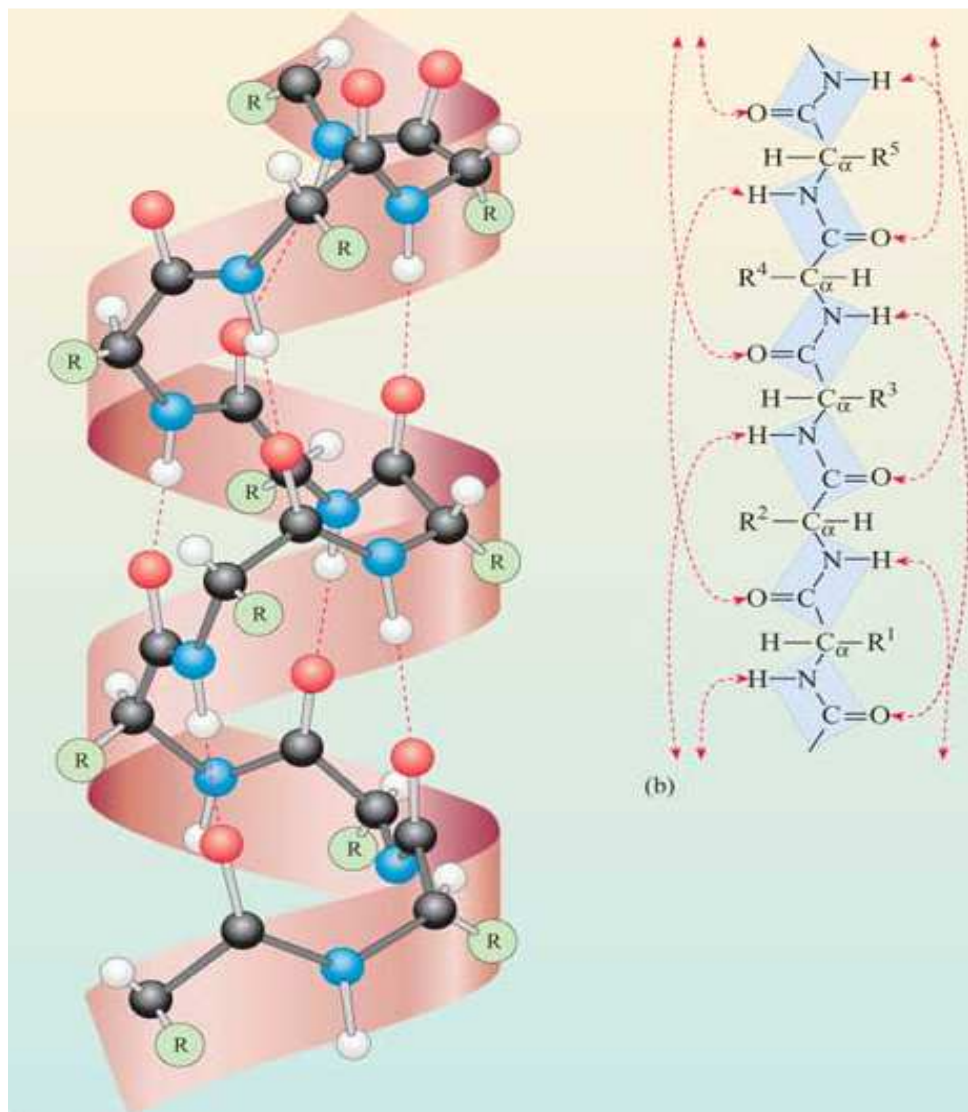
Obr. 1 – Znáznorněná stavba bílkoviny, na základě aminokyselin s peptidovými vazbami, které se spontánně skládají ve správném pořadí a do požadovaného tvaru

Tab. 1 – Rozdělení bílkovin [1]

<i>Kritérium</i>	<i>Druh</i>	<i>Vlastnosti</i>
Podle struktury	fibrilární globulární	vláknité, nerozpustné ve vodě, velká relativní molekulová hmotnost rozpustné ve vodě, méně asymetrické
Podle rozpustnosti	albuminy globuliny prolaminy skleroproteiny	rozpustné ve vodě rozpustné ve zředěných roztocích solí rozpustné v 70% alkoholu nerozpustné vláknité bílkoviny
Podle složení	jednoduché složené	obsahují jen bílkovinnou složku obsahují bílkovinnou i nebílkovinnou složku a) glykoproteiny - sacharidy b) fosfoprotein - kyselina fosforečná c) lipoprotein – lipidy d) nukleoprotein - kyselina nukleová e) mukoproteiny - aminocukry
Podle stavu	nativní denaturované	mají zachované fyzikální a chemické vlastnosti nastala změna v uvedených vlastnostech rozvinutím a rozpadem
Podle výživového hlediska	plnohodnotné neplnohodnotné	obsahují všechny esenciální aminokyseliny neobsahují všechny esenciální aminokyseliny
Podle biologické funkce	strukturní zásobní transportní katalytické signální imunitní ochranné	stavební složky buněk a těl organismů ukládání živin přenos potřebných látek, krev enzymy, hormony nervové, některé hormony obranná funkce srážení krve

## 1.1 Keratin

Keratin se řadí mezi nerozpustné fibrilární proteiny, jejichž struktura je značně sesíťována disulfidickými vazbami. Keratin je tvořen z řady vzájemně se lišících řetězců. Společným znakem těchto bílkovin je nerozpustnost ve vodě a mechanická i chemická odolnost (např. proti působení proteolytických enzymů). Tyto bílkoviny můžeme najít u všech obratlovců a to ve dvou formách, buď jako  $\alpha$ -šroubovice (helix), který se vyskytuje u savců a je vyobrazen na Obr. 2, anebo jako  $\beta$ -skládaný list, vyskytující se u plazů a ptáků. Keratin tvoří hlavní část hmotnosti vlasů, nehtů, srsti, rohoviny, peří, vlny a mnoha dalších látek. [1,6]



Obr. 2 –  $\alpha$ -helix struktura keratinové molekuly

Keratinová vlákna se skládají z řetězců, které jsou spojeny různými vazbami, dosahujícími síly kovalentní vazby i slabšího vzájemného ovlivňování.  $\alpha$ -keratin je bohatý na cysteinové zbytky, které se mohou spojovat příčnými vazbami se sousedními řetězci. To vysvětluje dvě nejdůležitější biologické vlastnosti keratinů – nerozpustnost a pevnost v ohybu. Mezi nekovalentní vazby patří vodíkové můstky, Coulombické interakce, Van der Waalsovy síly a hydrofobní vazby v přítomnosti vody. [1,4,6]

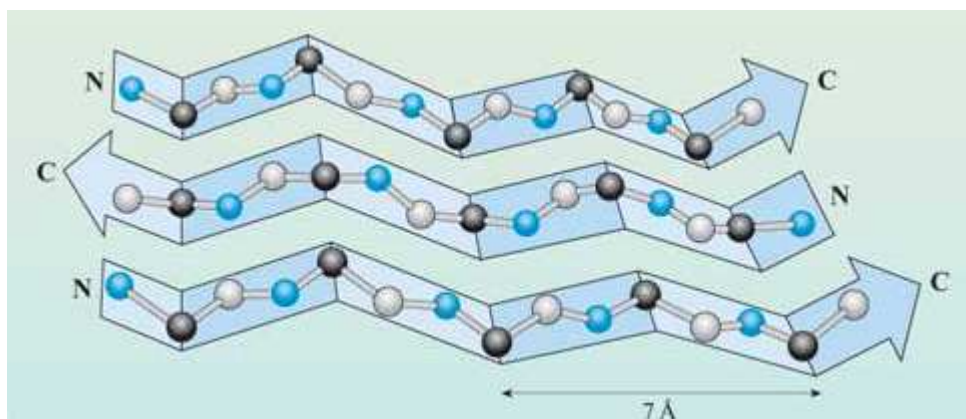
Tab. 2 – Aminokyselinové složení keratinu [4]

Aminokyseliny	Obsah [%]
Alanin	4,1
Arginin	19,1
Cystin	7,3
Glycin	6,3
Histidin	1,9
Iso-leucin	2,4
Kyselina Asparagová	4,3
Kyselina Glutamová	8,4
Leucin	5,8
Lysin	3,9
Methionin	0,3
Phenylalanin	2,1
Prolin	5,0
Serin	8,6
Threonin	5,1
Tryptophan	0,8
Tyrosin	2,6
Valin	4,1
Amidický dusík	6,7

$\alpha$ -keratiny mohou být tvrdé nebo měkké, podle toho, zda mají vysoký nebo nízký obsah síry. Tvrdé keratin vlasů, rohoviny a nehtů jsou méně pružné a více odolávají deformaci než měkké keratiny kůže a mozolů. U keratinu, stejně jako u jiných bílkovin, rozeznáváme čtyři základní struktury: primární, sekundární, terciární a kvartérní.

**Primární struktura** je popis přesné sekvence jednotlivých aminokyselinových zbytků spojených peptidickou vazbou v makromolekule. Vznikají lineární řetězce. Primární struktura je přímý obraz genetické informace. Pořadí a typy aminokyselin určují, jak bude protein prostorově uspořádán. Záměna jen jedné aminokyseliny může způsobit nefunkčnost proteinu.

**Sekundární struktura** vzniká vytvořením určité konformace makromolekuly, která se vytváří vznikem vodíkových vazeb. H-můstky spojují skupiny -CO- a -NH- uvnitř řetězce. Většinou vzniká struktura pravotočivé šroubovice ( $\alpha$ -helix), která je energeticky nejvýhodnější a její postranní řetězce směřují ven v důsledku sterických zábran. To způsobuje, že proti sobě ležící skupiny -NH- a -CO- jsou fixovány vodíkovými vazbami a boční řetězce aminokyselinových zbytků směřují ven kolmo k rovině šroubovice. Může vzniknout také struktura  $\beta$ -skládání list zobrazena na Obr. 2, u které postranní řetězce vyčnívají střídavě na opačné strany řetězce taktéž kvůli sterickým zábranám. [4]



Obr. 2 –  $\beta$ -sheet (skládání list) struktura keratinové molekuly

**Terciární struktura** nám popisuje uspořádání sekundárních struktur v prostoru, jejichž stavbu ovlivňují především interakce postranních řetězců aminokyselin. Dále mohou být ovlivněny např. vzájemným působením polárních i nepolárních substituentů na různých místech řetězce, které se vlivem stočení řetězce do šroubovice přibližují nebo oddalují.

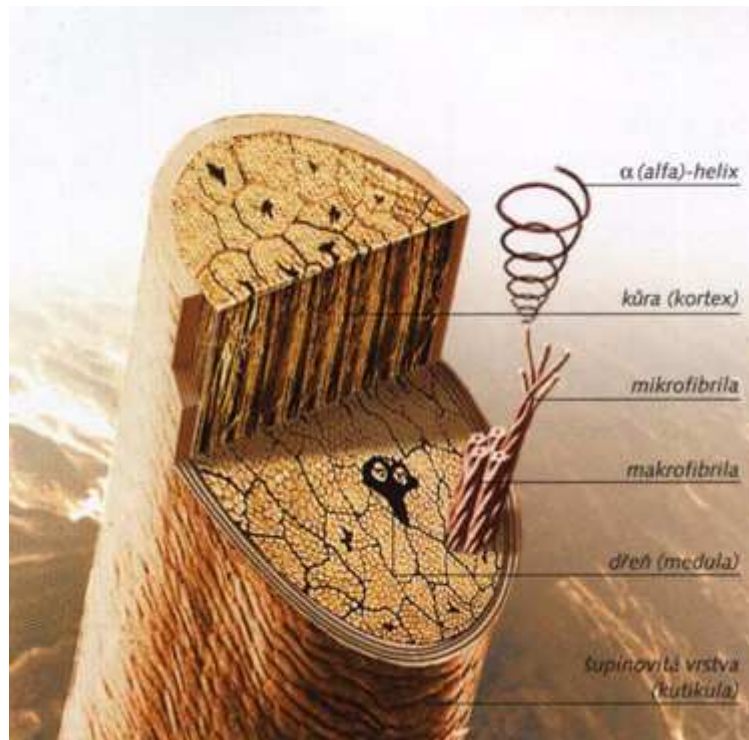
**Kvartérní struktura** je uspořádání různě orientovaných stejných nebo rozdílných struktur prostoru. Toto uspořádání je důležité pro zajištění funkce proteinu. Proteiny se zpravidla skládají tak, že hydrofobní zbytky aminokyselin jsou uzavřené uvnitř a hydrofilní části jsou na povrchu proteinu. Záleží však na prostředí, ve kterém se protein nachází. [1,2,7,10]

Na obrázku 3 je zobrazena struktura vlasu, jehož stavební buňky jsou postupně skládány z následujících částí:

1.  $\alpha$ -helix – molekula keratinu
2. superhelix – složený ze dvou navzájem stočených  $\alpha$ -helixů
3. protofibrila – složená ze dvou superhelixů



4. mikrofibrila – složená z 11 protofibril (9 tvoří kruh a uvnitř kruhu jsou 2)
5. makrofibrila – složená z několika set mikrofibril
6. vlasová buňka – složená z několika desítek makrofibril



Obr. 3 – Vlas

### 1.1.1 Chemické vazby v keratinu

V keratinu můžeme najít různé chemické vazby. Na základě těchto vazeb je pak možno předpokládat chování keratinu jak už při běžném používání a mechanickém namáhání tak i při jeho hydrolýze a následných zpracovatelských postupech.

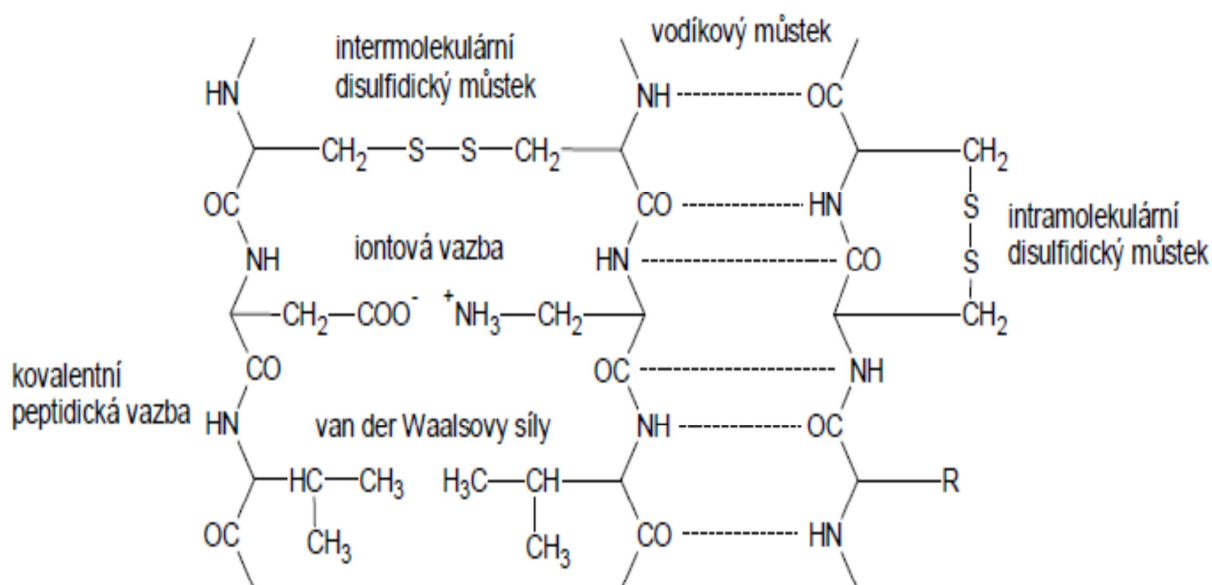
**Peptidická vazba** je vazba kovalentní, která spojuje postupně se řadící aminokyseliny do makromolekulárního řetězce keratinu.

**Disulfidická vazba** taktéž kovalentního druhu spojuje mezi sebou dva polypeptidické řetězce a drží je pevně mezi sebou. Může se nacházet jako intramolekulární ale častěji jako intermolekulární.

**Vodíkové můstky** můžeme najít jako intramolekulární ve struktuře  $\alpha$  ( $\alpha$ -šroubovice) šroubovici a nebo intermolekulární ve struktuře  $\beta$  ( $\beta$ -skládaného listu). Díky zastoupení i jiných aminokyselin s polární skupinou, je možný vznik dalších vodíkových můstků. Vodíkové můst-

ky díky své silné afinitě k polárním látkám napomáhají například ke schopnosti vázat velké množství vody.

Mezi postranními karboxylovými a aminovými skupinami vzniká elektrostatická **iontová vazba**. V tak vzniklé iontové vazbě potom aminokyseliny s bazickými skupinami iontově vážou nejenom karboxylové skupiny sousedních řetězců, ale i cizích látek. Stejně tak i aminokyseliny s kyselými skupinami vážou nejenom zásadité skupiny sousedních řetězců ale i cizích látek. Další slabé interakce působící v keratinu jsou **Van der Waalsovy síly**. Všechny tyto zmíněné vazby a vazebné interakce jsou názorně zobrazeny na Obr. 4. [4,5]



Obr. 4 – Vazby vyskytující se v keratinu [5]

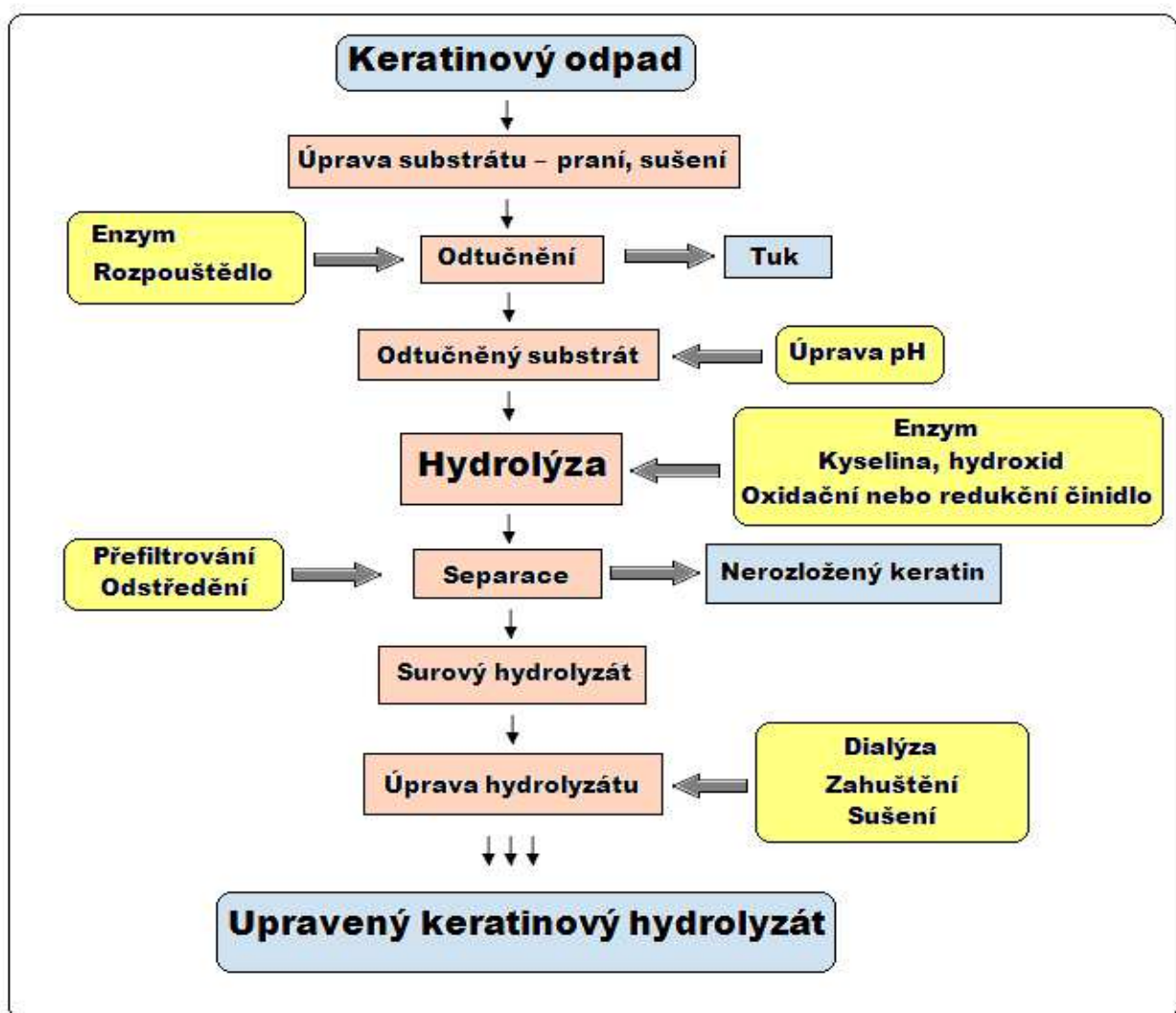
### 1.1.2 Keratinové odpady

Každým rokem je na světě vyprodukováno velké množství keratinových odpadů. Největšími producenty těchto odpadů jsou potravinářské a také textilní průmysly. Mezi odpady keratinového typu patří především vlna a srst pocházející z jatek a peří získávané z drůbežích farem. Peří tvoří asi 5-10 % hmotnosti drůbeže a proto z jatek, které denně zpracují 50000 kuřat, vzniknou 2-3 tuny keratinového odpadu každý den. Další částí keratinových odpadů je vlna, která není dostatečně kvalitní pro textilní průmysl a vlna od malých chovatelů. Mezi největšími producenty vlny patří Austrálie, Nový Zéland, Čína a Rusko. Ročně se

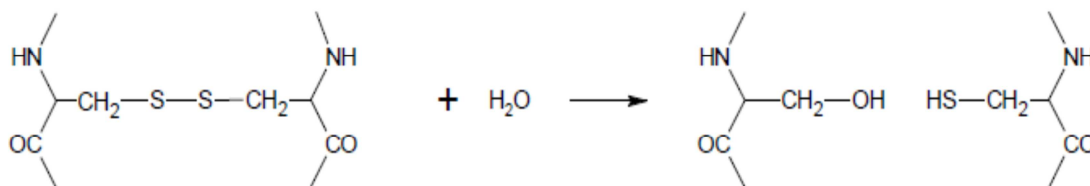
ve světě vyprodukuje kolem 1,5 mil tun vlny a více než 770 000 tun peří jako odpadu. Většina těchto odpadů končí na skládkách nebo ve spalovnách. [6,10,15]

## 2 HYDROLYTICKÉ ŠTĚPENÍ

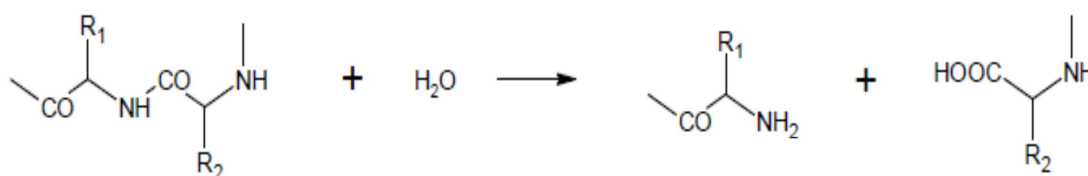
Jedním ze způsobů zpracování keratinových odpadů je jejich štěpení na keratinové hydrolyzáty, které lze připravit několika různými způsoby. Během hydrolyzy keratinu dojde k rozštěpení peptidových a disulfidových vazeb dlouhých keratinových molekul, a tím je dosaženo následné lepší zpracovatelnosti materiálu. Mezi nejčastější metody, které se používají, patří oxidační, redukční, alkalická nebo kyselá hydrolyza a v poslední době také často využívaná metoda rozkladu keratinolytickými a proteolytickými enzymy. Všechny tyto způsoby hydrolyzy mají řadu výhod i nevýhod. Mnoho nevýhod lze částečně odstranit vhodnou kombinací různých metod hydrolyzy. Stručné schéma výroby keratinového hydrolyzátu je zobrazeno na Obr. 5. [23]



Obr. 5 – Schéma hydrolyzy keratinového odpadu na keratinový hydrolyzát



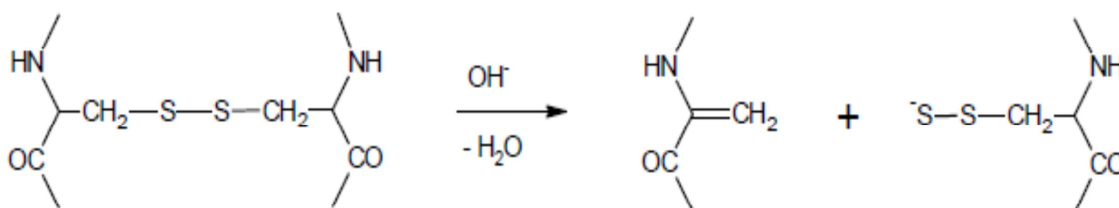
Obr. 6 – Oxidace disulfidické vazby keratinu s jejím štěpením [23]



Obr. 7 – Hydrolýza polypeptidické vazby keratinu [23]

## 2.1 Alkalická hydrolýza

Alkalická hydrolýza je jedním z nejstarších a nejběžněji používaných způsobů rozkladu keratinu. Běžně se používají roztoky hydroxidů o vyšších koncentracích, kdy při vysoké teplotě můžeme dosáhnout téměř 100 % konverze nerozpustného keratinu na rozpustné keratinové hydrolyzáty. Alkalickou hydrolýzu vlny a peří lze například provádět v roztocích NaOH, KOH, Ca(OH)<sub>2</sub>, aj. Bylo zjištěno, že se při těchto způsobech hydrolýzy mění aminokyselinové složení keratinových hydrolyzátů, a také klesá obsah dusíku. U hydrolyzátů připravovaných alkalickým způsobem se předpokládá nízká molární hmotnost (6,5 – 30 kDa) a vysoký obsah popelovin. Teplota alkalické hydrolýzy se nejčastěji volí v intervalu 60 – 100 °C. Pro urychlení hydrolýzy lze využít i ohřevu mikrovlnným zářením, kdy lze dosáhnout více než 70 % hydrolýzy původního materiálu již po 1 hodině. [11,24]



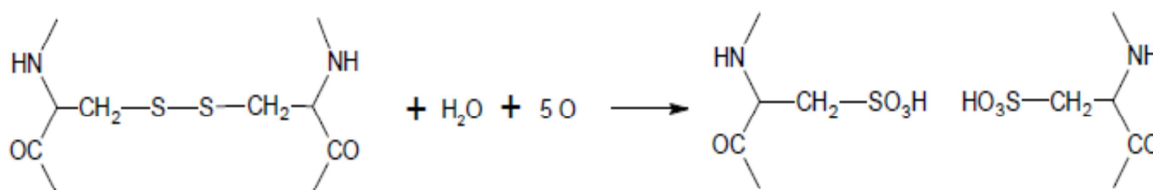
Obr. 8 – Působení nízkých koncentrací alkálií za mírných teplot na keratin [23]

## 2.2 Kyselá hydrolýza

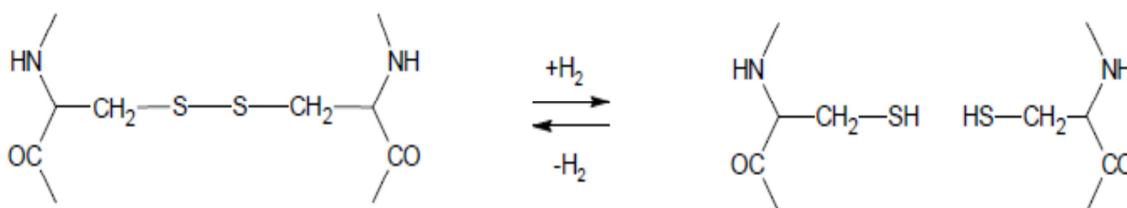
Keratinové hydrolyzáty, které jsou připravené kyselou hydrolýzou, se nejčastěji používají jako vzorky pro další analytické stanovení. Keratinové materiály jsou vysoce odolné proti působení kyselin, a proto se kyselá hydrolýza nejčastěji provádí v silných roztocích kyselin (6M HCl a 3M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) nejprve při teplotě 70 °C a poté za varu. Tímto způsobem hydrolýzy lze rozložit více než 85% materiálu. Stejně jako u dříve popsané alkalické hydrolýzy je možné i zde využít ohřevu mikrovlnným zářením, kdy došlo k úplnému rozkladu původního materiálu a značnému zkrácení doby hydrolýzy. [10,12]

## 2.3 Oxidační a redukční způsob

Oxidační i redukční způsob hydrolýzy keratinu se provádí velmi podobnými způsoby. Nejběžněji probíhá hydrolýza v prostředí močoviny, pufru a EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina) nebo SDS (dodecylsulfátu sodný) při 100 °C. Při redukčním postupu hydrolýzy se jako redukční činidlo využívá 2-merkaptoethanol, a lze tímto způsobem rozložit téměř 80 % keratinového materiálu. Oxidačním způsobem jsou štěpeny disulfidové vazby keratinu ionty obsahujícími síru, nejčastěji SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> a S<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>2-</sup>). Po ukončení hydrolýzy se hydrolyzáty čistí např. dialýzou a suší. [13,14]



Obr. 9 – Oxidace disulfidické vazby keratinu s jejím štěpením [23]



Obr. 10 – Redukce disulfidické vazby keratinu [23]

## 2.4 Enzymová hydrolýza

Perspektivním a v posledních letech intenzivně zkoumaným způsobem zpracování keratinu je jeho štěpení proteolytickými (štěpí -CO-NH- vazbu) a keratinolytickými (štěpí -S-S- vazbu) enzymy produkovanými bakteriemi nebo houbami. Průmyslově se nejčastěji používají alkalické proteinázy. Mezi výhody používání enzymů patří mírné podmínky hydrolýzy (teplota, pH, tlak), malé množství dávkovaných enzymů a široká distribuce molekulových hmotností připravených hydrolyzátů. Mezi nevýhody naopak může patřit složitější práce s bakteriemi a nutnost udržování stálého reakčního prostředí a poměrně dlouhý čas reakcí (3-7 dnů). Nevýhodou je také vysoká cena již izolovaných enzymů. Pro hydrolýzu keratinu enzymatickým štěpením se nejčastěji používají enzymy získané z bakterií rodu *Bacillus* a *Streptomyces*. Průběh enzymových hydrolýz bývá následující: keratinové materiály se pomelou, odtuční a smíchají s reakčním prostředím, kam se po úpravě pH a teploty přidají bakterie nebo čisté enzymy. Po hydrolýze je nerozložený materiál separován a v kapalném hydrolyzátu dojde změnou teploty nebo pH k inaktivaci enzymu.[16-18]

## 2.5 Kombinovaný způsob

Všechny výše popsané způsoby hydrolýzy keratinových materiálů mají své výhody i nevýhody, které lze minimalizovat při použití kombinované metody rozkladu. Zejména se jedná o dosažení vyšších výtěžností keratinových hydrolyzátů při použití nižších reakčních podmínek. Nejčastěji se používají dva kombinované způsoby rozkladu, a to oxidačně-enzymový a alkalicko-enzymový.

Prvním způsobem kombinované hydrolýzy je metoda kdy je keratinový materiál předupraven ve směsi oxidačních činidel a následně se štěpí enzymy. V prvním kroku se hydrolyzují disulfidové vazby  $\text{SO}_3^{2-}$  ionty a v druhém kroku se částečně hydrolyzovaný materiál zpracovává v roztoku proteinázy. [25]

Druhým používaným způsobem je alkalicko-enzymová hydrolýza, kde je v prvním kroku keratinový materiál částečně rozrušen v roztoku hydroxidu a poté dále hydrolyzován enzymem pracujícím v alkalické oblasti pH. Keratinové materiály se v alkáliích dobře rozpouštějí již při nízkých koncentracích. Alkálie naruší strukturu materiálu a to způsobuje, že enzymová hydrolýza poté probíhá rychleji. [19]

## 2.6 Vlastnosti keratinových hydrolyzátů

Roztoky připravených keratinových hydrolyzátů 2-stupňovou alkalicko-enzymovou hydrolýzou v prostředí 0,2% KOH, jsou po filtraci čiré, mírně nažloutlé barvy. Jsou stabilní i po několika týdnech skladování při pokojové teplotě. Pro charakterizaci keratinových hydrolyzátů v pevné fázi, musí být ze zahuštěného roztoku hydrolyzátu připraven prášek, který získáme sušením asi po 24 hodinách při teplotě  $103 \pm 2$  °C. Obsah popela v takto připravených hydrolyzátech je 8 až 13 %. Přesto takový obsah popelovin může být pro některé aplikace hydrolyzátů příliš velký. Snížení obsahu popelovin v roztoku keratinového hydrolyzátu lze například dialýzou či iontovou výměnou. Obsah dusíku v hydrolyzátech je 12,11–13,23 % a koresponduje s obsahem popela v hydrolyzátech – hydrolyzáty s nízkým obsahem popela obsahují nejvíce dusíku a naopak hydrolyzáty s vysokým obsahem popela obsahují dusíku méně. Keratinové hydrolyzáty navíc mají poměrně vysoký obsah síry 1,81 až 2,80 %, a proto jsou vhodné k použití v zemědělství jako růstové stimulanty.

Všechny tyto vlastnosti keratinových hydrolyzátů jsou přímo závislé na stupni hydrolýzy a na reakčních podmínkách již při zmiňované hydrolýze. Kvalita a výtěžek keratinového hydrolyzátu se řídí stupněm hydrolýzy, dobou hydrolýzy, její teplotou a množstvím přidaného



enzymu. Se zvyšující se teplotou, přidavkem enzymu a dobou hydrolýzy se zvyšuje stupeň hydrolýzy a tím i obsah rozloženého peří. Dále na stupni hydrolýzy závisí obsah dusíku a primárních  $-NH_2$ , které rostou se zvyšujícím se stupněm hydrolýzy, naopak obsah síry a popelovin se zvyšujícím se stupněm hydrolýzy klesá. [28]

### 3 KERATINOVÉ FILMY

Keratinové filmy vznikají z keratinových hydrolyzátů. Jsou připravovány v závislosti na požadované tvary a jejich vlastnosti různými způsoby. Mezi nejčastěji používané metody patří lití, termoplastifikace a zvláštním druhem filmů je příprava mikrokapsulí.

**Lití** je metoda, při které se filmy připravují z vodných roztoků keratinových hydrolyzátů o koncentraci kolem 2,1 hm. % s přídavkem 50 hm. % glycerinu. Roztok se vylije na hladkou plochu z PP desky, nebo lze použít různé silikové formy a nechá se vysušit v exsikátoru při pokojové teplotě. Po vysušení filmů se musí zahřát na 80 °C po dobu 15 minut a odloupnou se z desky, nebo z formy. Pokud je problematické film od podložky nebo formy oddělit je možné desku s vytvořeným filmem ponořit do destilované vody, aby došlo ke snadnější separaci filmu od podložky. Nakonec je dobré filmy propláchnout destilovanou vodou a nechat je vysušit při pokojové teplotě. [3,29]

**Termoplastifikace** je způsob na jehož základě a díky patentovaným technologiím je možné filmy připravovat termoplastifikací keratinu, respektive směsi keratinu a pšeničného glutenu obsahujícího další plastifikátory. Metoda je velmi atraktivní, protože podle výzkumných studií některé proteiny vykazují termoplastické vlastnosti a způsoby termoplastického zpracování jsou v dnešní době mnohem komerčnější a používanější. Při tomto způsobu je výhodou, že proces odpařování rozpouštědla úplně odpadá z celé výrobní fáze a tím se vyhneme časově náročnému sušení, jak to je u metody lití. Termoplastifikace spočívá v tom, že se protein s použitím změkčovadel zpracovává plastikářskými technikami nad jeho  $T_g$ . Ze vzniklé kaučukovité hmoty se formuje požadovaný výrobek, který následným ochlazením získá požadovaný a stabilní tvar. Při vlastní procesu se postupuje tak že, se nejprve extruder naplní práškovým proteinem, přidá se kolem 20 hm. % vody, změkčovadla např. glycerol a směs je míchána při teplotě cca 140 °C. Vznikne těstovitá hmota, která se poté vytlačuje přes tvarovací hlavu na požadovaný tvar a rozměry. Po vytlačení se vytlačený tvar kalibruje a ochlazením se rychle vytvrdí. Všechno závisí na vhodné volbě podmínek při zpracování směsi, jako je doba, tlak, teplota, ale také vhodné složení směsi. [3,29]

Pomocí **mikroenkapsulace** je možné vodné roztoky redukovaného keratinu používat pro přípravu mikrokapsulí, které se v praxi připravují nejčastěji ultrazvukovou vibrací. Mikroenkapsulace je vlastně proces kdy je nějaká aktivní látka obalena látkou obalovou a je tak chráněná před vnějšími vlivy. Aktivní látky, které se používají při mikroenkapsulaci jsou například vitamíny, olejové složky, mastné kyseliny, rostlinné silice a mnoho dalších. Tyto enkapsulované látky se pokrývají vhodnými látkami, což jsou hlavně sacharidy a proteiny. Takové pokrytí zlepšuje technologické vlastnosti suroviny a současně řeší problém její stability.

Při přípravě mikrokapsulí se nejprve připraví směs vodného roztoku redukovaného keratinu kolem, která obsahuje zhruba 1,8 hm. % keratinového hydrolyzátu s přídatkem asi 50 hm. % organického rozpouštědla a enkapsulovanou látku. Jako rozpouštědlo se může používat například toluen, xylen a isopropylfenol. Do připravené směsi se ponoří ultrazvuková sonda a probíhá mechanické míchání po dobu 3 min a teplotě kolem 22 °C. Vznikne nám suspenze, která se odstředí na odstředivce při 1000 ot/min po dobu 15min. Získáme dvě vrstvy, z nichž ve vrchní se budou nacházet mikrokapsule. Po oddělení se několikrát zředí vodou a znovu se odstředí, až dokud vodná fáze nebude téměř čistá. Velikost mikrokapsulí je 6–10 μm a tloušťka stěny 0,05–1 μm. Účinnost enkapsulace je více než 95%. Mikrokapsule získané z redukovaných forem keratinu ztrácejí tvar při zahřívání ve zředěných vodných roztocích 2-merkptoethanolu, kdy dochází ke štěpení –S–S– vazeb. [3,29]

### 3.1 Vlastnosti keratinových filmů

Keratinové filmy mají transparentní vzhled s nádechem hnědého zabarvení, mají hustě sesíťovanou strukturu a hladký lepkavý povrch. Jsou biologicky rozložitelné a po vložení do vody bobtnají a následně se rozpouštějí. Po vložení do vroucí vody se naopak smršťují. V organických rozpouštědlech jsou filmy z keratinových hydrolyzátů nerozpustné. Při zahřívání ve vodném roztoku 2-merkptoethanolu se filmy rozpadají na malé části nebo se rozpouštějí hlavně kvůli štěpení disulfidických vazeb. Například u filmů připraveny z kolagenu litím o tloušťce 0,4 mm a relativní vlhkosti 65 % bylo naměřeno. Pevnost v tahu 11 MPa, protažení při přetržení 32 %, Youngův modul 250 MPa a obsah vody 9 %. U stejného filmu o tloušťce 0,33 mm a relativní vlhkosti 85 % klesla pevnost v tahu na 5 MPa a Youngův modul na 88 MPa, stoupla hodnota protažení při přetržení na 42 % a obsahu vody na 12 %. [29]

Tab. 3 – Fyzikální vlastnosti keratinových filmů [29]

Vlastnosti filmů	Tloušťka / relativní vlhkost	
	0,4 mm / 65 %	0,33 mm / 85 %
Pevnost v tahu (MPa)	11	5
Protažení při přetržení (%)	32	42
Youngův modul (MPa)	250	88
Obsah vody (%)	9	12

### 3.2 Modifikace filmů z keratinových hydrolyzátů

Různými úpravami lze modifikovat vlastnosti získaných filmů či povlaků dle požadavků na finální aplikaci. Používají se fyzikální, chemické a nebo enzymatické úpravy, které nám zajistí dosažení požadovaných změn. Hodně časté úpravy se týkají zlepšení struktury a mechanických vlastností pomocí síťování. [30]

#### 3.2.1 Změkčovadla

Filmy z keratinových hydrolyzátů jsou obecně velmi křehké, a proto se využívá účinku změkčovadel, díky kterým filmy získají potřebnou pružnost. Používají se nízkomolekulární změkčovadla pronikající mezi polymerní řetězce, kde mezi nimi vzniká fyzikálně chemická soudržnost. Ta nám upravuje vzdálenosti a soudržnost řetězců samotného proteinu a film získá potřebnou flexibilitu. Změkčovadla také ovlivňují bariérové vlastnosti filmů, které jsou pro aplikační vlastnosti patřičně důležité. Přídavek změkčovadla nám bariérové vlastnosti zejména vůči vlhkosti a plynům snižuje. Nejčastěji používané změkčovadla jsou na bázi proteinů a patří mezi ně hlavně polyoly sorbitol a glycerol. Množství přidávaného plastifikátoru se pohybuje kolem 10 – 60 % na hmotnost hydrolyzáta. [3,30]

#### 3.2.2 Chemické modifikace

Použitím mono-funkčních a bi-funkčních aldehydů můžeme získat značně sesíťovanou strukturu v použitém proteinovém filmu. Aldehydy mají schopnost vytvořit kovalentní intramolekulární a intermolekulární vazby které ovlivní celkovou strukturu bílkoviny. Po

modifikaci vzorku aldehydy se zvyšuje pevnost v tahu, redukuje modul pružnosti a rozpustnost ve vodě. Takto připravené filmy jsou bohužel limitovány použitím v potravinářském odvětví díky toxické povaze aldehydů. Proto se stále hledají i jiné látky, schopné upravovat vlastnosti filmů podobně jako aldehydy, které budou stejně efektivní a bude je možno používat jako jejich možná náhrada. [30]

### **3.2.3 Tepelné úpravy**

Působením tepla na proteinové filmy lze značně upravit jejich vlastnosti. Takové filmy získají vyšší pevnost v tahu a nižší modul pružnosti, propustnost vodních par a rozpustnost ve vodě. Na proteinový film se nechá působit teplo zhruba o 55-140 °C po dobu od několika minut až po 24 hodin. Tepelná úprava podporuje tvorbu intermolekulárních a intramolekulárních příčných vazeb, které vznikají především díky lysinovým a cystinovým aminokyselinovým zbytkům. [30]

### **3.2.4 Enzymatické úpravy**

Ke zlepšení vlastností filmu z keratinových hydrolyzátů lze použít enzymů. Enzymy dokážou v proteinu podpořit proces síťování. Použitím například můžeme u proteinu zvýšit pevnost v tahu a neovlivníme propustnost pro vodní páry. Dále může být použit enzym transglutamináza, po kterém je film nerozpustný v dodecylsulfátu sodném a v 2-merkaptetanolu. Po použití enzymu se u vzorku zvýšila odolnost proti vlhkosti a pevnost v tahu. [3,30]

## 4 APLIKACE KERATINU

Keratin se hojně využívá v podobě zvířecích srstí. Ty se různě zpracovávají podle jejich druhu a používají se na širokou škálu různých předmětů a nástrojů. Ze zvířecích srstí se nejčastěji používají ke zpracování ovčí vlna, peří a několik dalších materiálů (vepřové štětiny, zaječí srst, koňské hřívy, hovězí rohy, aj.).

**Ovčí vlna** je známá jako jedna z nejcennějších koželužských srstí. Vlna na ovčích tvoří vrstvu která se nazývá rouno a jejím stříháním získáme tzv. střížní vlnu. Ovčí vlna je nejvýznamnější textilní vlákno živočišného původu. Slouží na výrobu plstěných výrobků nejvyšší jakosti a lepší druhy na výrobu česané příže.

**Peří** lze využít např. jako zdroj krmiva pro dobytek. Díky pokroku v enzymové technologii vzniká prostor pro využívání takto biologicky přeměněného peří a z keratinového odpadu znečišťujícího životní prostředí se stává krmivo bohaté na bílkoviny.

**Vepřové štětiny** se získávají pařením vepřových kůží a jejich následným odštětinováním na strojích nebo při loužení. Dále se musejí zbavit nečistot a usušit v sušárnách při teplotě kolem 75 °C. Z jednoho vepře se získá až 180 g štětín. Štětiny se pak používají v kartáčnické výrobě.

**Zaječí srst** je nejcennější srst pro výrobu vysoce kvalitních plstí. Její tloušťka a délka závisí na druhu zvířete a na prostředí ve kterém žije. Používá se zejména v čalounictví a kloboučnictví.

**Hovězí rohy** neboli rohovina se používá jako hnojivo poté co se rozemele a vyrobí se z ní moučka. Dále se používá podobně jako slonovina na k výrobě uměleckých a řezbářských výrobků. Odpad z rohoviny lze zpracovat hydrolýzou na krmný hydrolyzát. [3,4]

## 5 APLIKACE KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ

Surový nerozpustný (těžce zpracovatelný) keratinový materiál lze zpracovat množstvím metod a tím můžeme získat rozpustné keratinové hydrolyzáty s různou molární hmotností a vlastnostmi. Tyto hydrolyzáty pak můžeme použít pro výrobu vláken, pro kosmetické a lékařské aplikace, v potravinářském průmyslu, a nebo v zemědělství. [20]

### 5.1 Použití keratinových hydrolyzátů v zemědělství

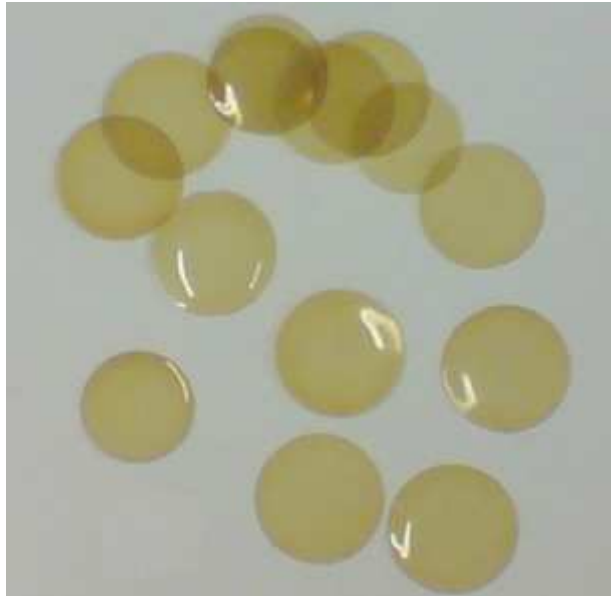
Keratinové hydrolyzáty lze používat jako dusíkatá hnojiva, protože mají vysoký obsah dusíku něco kolem 15 %. Jsou biologicky rozložitelné a lze je připravovat s různou rozpustností což nám zaručí postupné uvolňování dusíku do půdy. Mohou obsahovat také další potřebné látky, jako jsou například draselné a fosforečné ionty, jejichž obsah lze ovlivnit způsobem přípravy hydrolyzátu.

Jelikož téměř 95 % hmotnosti keratinových hydrolyzátů tvoří čisté bílkoviny s vysokým obsahem esenciálních aminokyselin, využívá se hydrolyzátů také jako přísadků do krmiv pro dobytek a drůbež. Jejich velkou výhodou je i snadné zpracování a z toho vyplývající nízká cena. Krmiva se v minulosti vyráběla v podobě keratinové moučky, která je v dnešní době v mnoha zemích (včetně EU) zakázána z obavy přenosu některých nemocí. [14,18]

### 5.2 Použití keratinových hydrolyzátů v obalové technice

Z keratinových hydrolyzátů je možné připravit povlaky a filmy např. pro potravinářský průmysl. Pro přípravu filmů se musí roztoky hydrolyzátů nejprve smíchat se změkčovadlem např. glycerolem, takto upravený roztok se poté vylíje na hladkou plochu a nechá se vysušit v exsikátoru za pokojové teploty. Vysušené filmy se poté zahřejí na 15 minut při 80°C a sloupnou se z desky. Filmy mají hladký povrch a hustě sesíťovanou strukturu, bobtnají ve vodě a mohou zvětšit svoji délku až o 50 %. Keratinové filmy jsou biologicky rozložitelné.

Vodné roztoky redukováného keratinu se používají také na přípravu mikrokapsulí. V praxi se mikrokapsule připravují nejčastěji ultrazvukovou vibrací. Enkapsulují se zejména barviva, ochucovadla, vůně, léčiva, oleje nebo tuky. Keratinové hydrolyzáty je možné použít jako povlaky a obaly na maso, drůbež a ryby. [3,12,13]



Obr. 11 – Keratinové filmy

### 5.3 Použití keratinových hydrolyzátů v kosmetice a lékařství

Lidská tkáň je tvořená z části keratinem, a proto je další významnou aplikací keratinových hydrolyzátů jejich použití v lékařství. Často se využívají pro přípravu tkanin a preparátů pomáhajících obnově tkáně při léčbě odřenin nebo popálenin. Keratinové hydrolyzáty se také přidávají v kosmetice do přípravků na ošetření vlasů a pokožky. [3,21]

### 5.4 Další aplikace

Z keratinových materiálů je možné vytvářet vlákna používaná v textilním průmyslu, lékařství a nebo na výrobu kompozitních materiálů. Vlákna se musí vhodně modifikovat, aby se snížila jejich krystalinita a jejich konečné vlastnosti závisí také na množství absorbované vlhkosti.

Keratinové materiály se také využívají na přípravu kompozitních materiálů jak se syntetickými polymery, tak s jinými přírodními materiály. Lze tak připravit biodegradabilní biokompozity například z keratinu a acetátu celulózy na přípravu tenkých průsvitných filmů. [12,25,26]



## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 6 CÍLE PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo připravit keratinový hydrolyzát zvolenou metodou dvou-  
stupňové alkalicko-enzymové hydrolýzy z odpadní ovčí vlny typu Merino, dále provést na  
připraveném keratinovém hydrolyzátu zvolené analytické zkoušky a měření TGA.

Z takto připraveného keratinového hydrolyzátu byla nachystána směs na výrobu filmů  
s přísádky tří síťovadel (dialdehyd škrobu, glutardialdehyd a diethylester kyseliny vinné) a  
změkčovadla. Přídavek síťovadel byl zvolen vždy 5 a 10 % na sušinu keratinového hydro-  
lyzátu a připravené filmy byly vždy porovnávány s referenčním vzorkem bez přísádky  
síťovadla.

Připravené filmy byly následně podrobeny analytickým zkouškám (stanovení dusíku, sta-  
novení obsahu sušiny a stanovení obsahu nespálitelných anorganických látek). Dále byly  
filmy studovány metodami diferenciální skenovací kalorimetrie, infračervené spektrosko-  
pie s Fourierovou transformací a termogravimetrickou analýzou.

U připravených filmů byl vyhodnocován vliv použitých síťovadel na fyzikálně-mechanické  
vlastnosti a jejich složení.

## 7 MATERIÁLY A METODY

### 7.1 Použité chemikálie

Kyselina sírová koncentrovaná (Lukeš)  
Thiosíran sodný pentahydrát 25% roztok (Lukeš)  
Hydroxid sodný 50% roztok, 0,1M roztok (Lukeš)  
Kyselina boritá 2% roztok (Lukeš)  
Glycerol (Lukeš)  
Dialdehyd škrobu (DAS) (Sigma-Aldrich)  
Kyselina chlorovodíková 0,02M roztok (Lukeš)  
Tashiho indikátor  
Katalyzátorové tablety (Fisher Scientifics)  
Glutardialdehyd (GDA) (Lukeš)  
Diethylester kyseliny vinné (DET) (Sigma-Aldrich)  
Lipex 100T (Novozymes)  
Savinase 6.0T Type W (Novozymes)  
Hydroxid draselný 0,6% roztok (Lukeš)

### 7.2 Použité přístroje

Mineralizátor Hach-Digesdahl Digestion (Digesdahl)  
Parnas-Wagnerova destilační aparatura  
Muflová pec Labotherm L9/11/S27 (Nabertherm)  
Třepačka LT2 (Fisher Scientifics)  
Topné hnízdo 2000ml LTHS 2000 (Drutěva)  
Elektronické analytické váhy 440-47 (KERN)  
Magnetická míchačka s ohřevem RTC Basic (IKA)  
Sušárna WTB (Binder)  
pH metr pH526 (WTW)  
DSC1 (Mettler-Toledo)  
TGA Q50 (TA Instruments)  
FTIR Satellite (Mattson)

### 7.3 Analytické zkoušky a použité metody

#### 7.3.1 Mikrochemické stanovení dusíku – AOAC 960.52

K navážce asi 0,2 g keratinového hydrolyzátu se přidá 5,6 ml kyseliny sírové a 20 ml 0,02N kyseliny chlorovodíkové. Přidá se tableta katalyzátoru a roztok se mineralizuje při teplotě 480 °C asi 1,5 hodiny. Po mineralizaci se roztok nechá zchladnout, přelije se do 50 ml odměrné baňky a zředí se vodou. Do Parnas-Wagnerovy destilační aparatury odpipetujeme 25 ml vzorku a přidáme 20 ml směsi thiosíranu sodného s hydroxidem sodným. Jímáme do 15 ml kyseliny borité. Destilujeme 20 minut od varu. Přidáme několik kapek indikátoru a roztok titrujeme 0,02N kyselinou chlorovodíkovou do růžového zbarvení

$$\%N = [\text{ml HCl} * \text{normalita} * 14,007 * 100 * 2] / \text{mg vzorku}$$

#### 7.3.2 Stanovení sušiny – ČSN EN ISO 665

Navážka 1g keratinového hydrolyzátu se vloží do koželužských misek i s víčkem a suší se v sušárně 3 hodiny při teplotě 103 °C. Po ochlazení v exsikátoru zvážíme. Po zvážení sušíme dalších cca 20 minut a po ochlazení znovu zvážíme; rozdíl mezi dvěma váženími nesmí být větší než 0,001 g; v opačném případě se v sušení pokračuje.

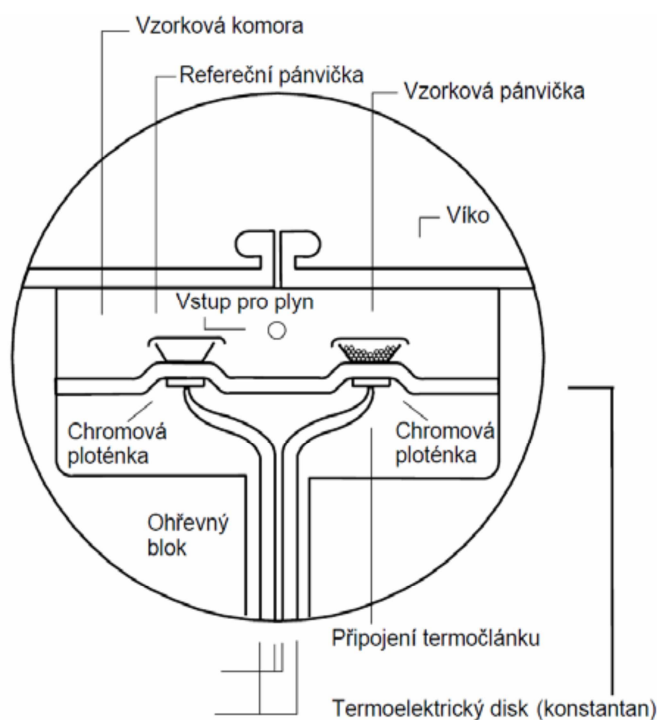
#### 7.3.3 Stanovení popela – ČSN ISO 2171

Navážka 1g keratinového hydrolyzátu se opatrně zpopelní nad kahanem v žíhacím kelímku, který musí být vysušený a předem zvážený. Popel se dále žíhá v muflově peci asi 1 hodinu při teplotě 650 °C. Po ochlazení v exsikátoru se kelímek zváží a vypočítá se obsah popelovin.

#### 7.3.4 Diferenciální skenovací kalorimetrie

Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) je termická analýza, při které se sledovaný vzorek podrobuje lineárnímu ohřevu anebo chlazení a přitom se plynule mění rychlost tepelného toku ve vzorku, která je úměrná okamžitému měrnému teplu. DSC se používá pro získání charakteristických teplot, jako jsou teplota tání a skelného přechodu, nebo specifické

kého tepla tání, krystalinity, kontrola vyžhání nebo vytvrzení. Podle předem nadefinovaného teplotního režimu se sleduje tepelný tok mezi měřeným a referenčním vzorkem (obvykle vzduch), které jsou umístěny do dvou symetrických, nezávisle temperovaných nádobek uvnitř měřicí komory. Zkušební i referenční vzorek jsou vyhřívány stejnou rychlostí takovým způsobem, aby mezi nimi nebyl žádný teplotní rozdíl. Množství tepla, které je potřebné k udržení izotermních podmínek mezi vzorky, je sledováno v závislosti na teplotě anebo čase. Pokud dojde ke zvýšení (endotermní procesy) anebo naopak ke snížení (exotermní procesy) tepelné kapacity sledovaného vzorku, tak se zvýší anebo naopak sníží množství dodávaného tepla do sledovaného vzorku a tato kompenzace zajistí nulový teplotní rozdíl mezi měřeným a referenčním vzorkem. K potlačení tepelného spádu se měří pouze velmi malé množství vzorku (10 – 300 mg), který je navíc umístěn v kovovém kelímku (obvykle z hliníku, zlata, stříbra, nerez, oceli). Malá tepelná kapacita celého systému tak dovoluje měřit i při relativně vysokých rychlostech změn teploty (až desítky stupňů za minutu). Nicméně je nutné brát ohled na to, že vyšší rychlost změny teploty zvyšuje velikost píku a současně ho posunuje jeho maximum k vyšším teplotám. Podobně působí velikost částic sledovaného materiálu. S ohledem na možnou degradaci vzorku se měření provádí za současného promývání měřicí komory inertním plynem (obvykle se používá dusík, argon a podobně).



Obr. 12 – Schéma měřicí komory DSC

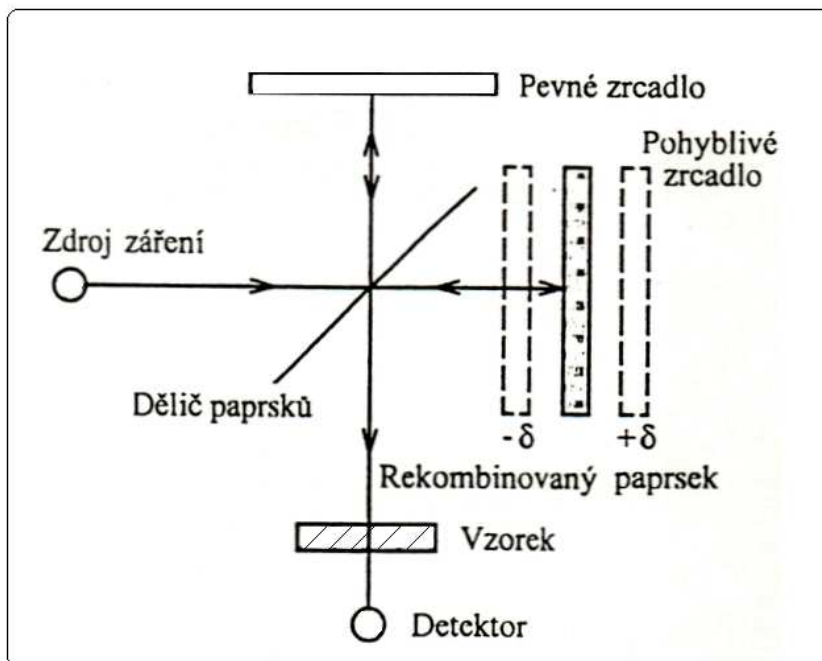
### 7.3.5 Termogravimetrická analýza

Termogravimetrická analýza (TGA) je termodynamickou metodu, jejíž základním principem je měření změn hmotnosti analyzovaného vzorku při jeho plynulém zahřívání anebo ochlazování. Změny hmotnosti jsou výsledkem odpařování, rozkladného procesu, nebo chemické reakce. Ke změně hmotnosti vzorku může dojít také v důsledku absorpce plynů (kyslík, vlhkost, a dalších). Hmotnost materiálů se může při jejich zahřívání měnit dvěma způsoby. Může docházet ke snižování hmotnosti v důsledku uvolňování plynné složky anebo k nárůstu, pokud materiál po reakci s plynou fází reaguje. Nejdůležitější součástí zařízení pro TGA měření jsou analytické váhy, schopné přesně měřit v širokém rozsahu teplot. Na vahách jsou umístěny nosiče vzorků, které zasahují do temperované komory. Stejně jako u předchozích metod, důležitou roli hraje také volba parametrů měření a množství a tvar sledovaného vzorku. Obvykle se zahřívá rychlostí několika stupňů za minutu (2 – 10 °C za minutu). Vyšší rychlosti se projeví zvýšením počáteční i koncové teploty přechodu. Zvýšení hmotnosti se také odráží ve zvýšení teploty nástupu reakce, a pokud probíhají dvě reakce v úzkém teplotním intervalu, nemusí dojít k jejich rozlišení. Důležitou roli hraje i velikost částic, kdy je průběh reakce rychlejší použitím jemnějších částic, které jsou reaktivnější a snižují počáteční a koncovou teplotu. Naopak větší částice zpožďují reakce a mohou tak dát prostor vzniku meziproducty, které by v případě rychlejší reakce vymizely. Dobrý tepelný kontakt mezi zkušebním vzorkem a jeho držákem zabezpečuje nosiče vzorků, což jsou kovové misky anebo kelímky (obvykle z korundu, platiny, stříbra anebo zlata) různé velikosti v závislosti na hmotnosti vzorku. Metody, jakými se zaznamenává změna hmotnosti zkoušených vzorků, jsou dvě a to výchylková, kdy se sleduje a zaznamenává každá výchylka vah z rovnováhy anebo kompenzační - kompenzuje se výchylka vahadla tak, aby vahadlo zůstalo v rovnovážné poloze.

### 7.3.6 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR)

Při infračervené spektrometrii s Fourierovou transformací (FTIR) se interferometricky získaný signál převede matematickou operací - Fourierovou transformací - na infračervené spektrum. Základem FTIR spektrometru je např. Michelsonův interferometr. Na obr. 9 je znázorněn princip tohoto interferometru. Záření ze zdroje přichází na polopropustný dělič paprsků, který jednu polovinu paprsků propustí k pohyblivému zrcadlu, druhá se odráží směrem k pevnému zrcadlu. Paprsky se od obou vzájemně kolmých zrcadel zpětně odráže-

jí a na děliči paprsků se podle polohy pohyblivého zrcadla buď sčítají, nebo odčítají; dochází k interferenci. Jak se mění optický dráhový rozdíl  $\delta$  obou paprsků, signál dopadající na detektor generuje **interferogram**.



Obr. 13 – Michelsonův interferometr (FTIR)

FTIR spektrometr má celou řadu výhod, jako je vysoká světelnost, velká rozlišovací schopnost, vlnočtová správnost získaného spektra, velká rychlost záznamu a možnost měřit v širokém vlnočtovém rozsahu. Pro zlepšení poměru signálu k šumu se ve FTIR spektrometrech spektra akumulují vícenásobným záznamem. Takto získané kvalitní záznamy (v digitální formě) se dále zpracovávají, vyhodnocují a interpretují s použitím výpočetní techniky.

## 8 PŘÍPRAVA KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU A POUŽITÝCH FILMŮ

### 8.1 Příprava keratinového hydrolyzátu

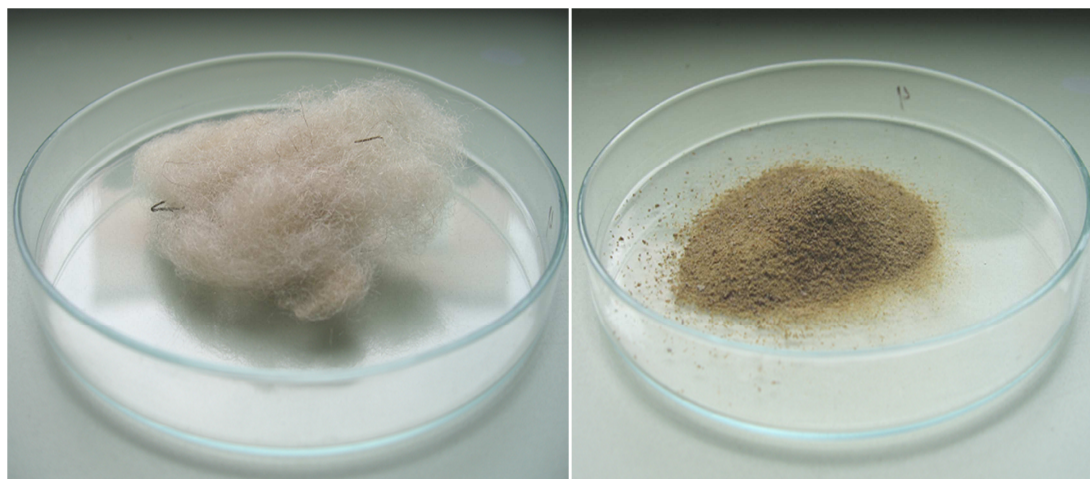
Keratinový hydrolyzát byl připraven dvoustupňovou alkalicko-enzymovou hydrolyzou z odpadní ovčí vlny typu Merino získané z jatek Přerov. Složení ovčí vlny bylo: Dusík 12,17 %, Popel 2,33 %, Síra 2,51 %, Tuk 8,18 %. Tato surová vlna byla před samotnou hydrolyzou vyprána nejprve jen ve vlažné vodě a poté i s přidáním mycího prostředku. Následně byla odtučněna enzymaticky (enzym Lipex 100T). V posledním kroku úpravy byla vysušená vlna rozemleta v nožovém mlýně.

V prvním stupni hydrolyzy byla upravená vlna podrobena alkalické hydrolyze, kde byla smíchána s vodným roztokem KOH. V tomto roztoku byla míchána 12 hodin při teplotě 90 °C a po uplynutí 12 hodin byla směs přemístěna do vyhřátého inkubátoru na 36 hodin. Po uplynutí této doby bylo upraveno pH roztokem NaOH.

Ve druhém stupni bylo ke směsi přidáno dané množství enzymu (Savinase 6.0T) a směs byla míchána na vodní lázni po dobu 12 hodin, při sledované teplotě. Poté byla směs inkubována dalších 12 hodin při stejné teplotě bez míchání.

Po uplynutí stanovené doby byla směs přefiltrována přes PA tkaniny a následně odstředěna. Tuhá fáze byla vysušena a po vychladnutí v exsikátoru bylo zjištěno množství nerozpuštěného keratinu. Kapalný keratinový hydrolyzát byl nejprve přiveden k varu (kvůli inaktivaci enzymu) a poté zahuštěn na vakuové odparce při 60 °C. Pro odstranění přebytečných anorganických látek byla provedena dialýza hydrolyzátu přes celulóзовou membránu (s propustností pro látky s molární hmotností menší než 12 kDa) proti destilované vodě. Nakonec byl hydrolyzát zahuštěn, vysušen v silikonové formě při 60 °C a rozetřen na prášek.





Obr. 14 – Ovčí vlna (vlevo) a keratinový hydrolyzát (vpravo)

Složení keratinového hydrolyzátu bylo zkoumáno výše popsanými metodami. Vždy byla provedena dvě měření, z nichž byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Výsledky analytických zkoušek jsou uvedeny v následující tabulce. Obsah nespalitelných anorganických látek byl odečten z TGA metody, kde byl testován keratinový hydrolyzát ještě před provedenou dialýzou.

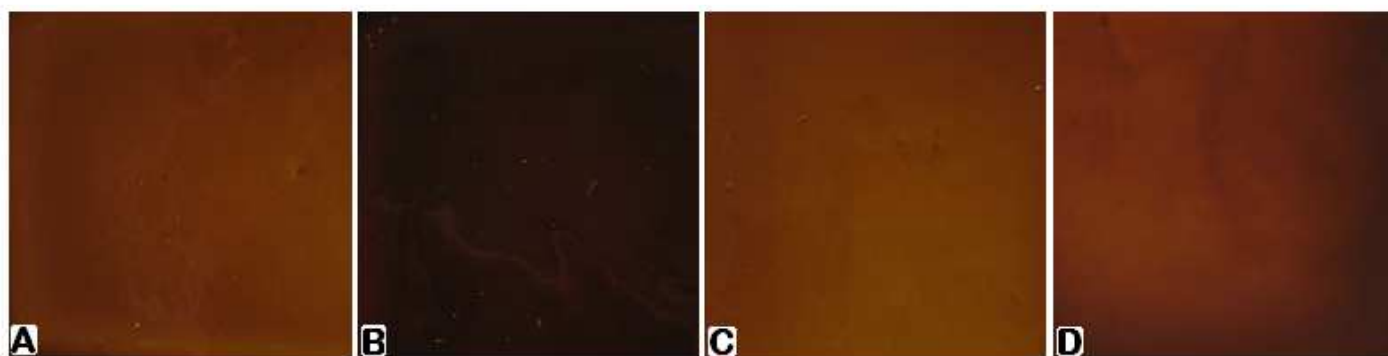
Tab. 4 – Hodnoty analytických zkoušek u keratinového hydrolyzátu

Stanovení	%	Směrodatná odchylka
Stanovení obsahu dusíku	13,62	0,19
Stanovení obsahu sušiny	96,53	0,02
Stanovení obsahu popela	3,55	0,29
Obsah nespalitelných látek	34,85	-

## 8.2 Příprava filmů z keratinového hydrolyzátu

Filmy z keratinového hydrolyzátu (KH) byly připraveny litím do silikonových forem a následným vysušením. Z keratinového hydrolyzátu byl rozpuštěním v destilované vodě připraven 15% roztok, ke kterému bylo přidáno 30 % glycerolu (na navážku hydrolyzátu) sloužícího jako změkčovadlo. Směs byla zahřívána při 30 °C na vodní lázni za stálého míchání, aby došlo k co nejlepší homogenizaci. Následně bylo do směsi přidáno síťovadlo v množství 5 a 10 % (na navážku hydrolyzátu). Jako síťovadla byly testovány **glutardial-**

**dehyd** (GDA), **diethylester kyseliny vinné** (DET) a **dialdehyd škrobu** (DAS). Před přidáním dialdehydu škrobu do směsi muselo být upraveno její pH na hodnotu 11,5 až 12 kvůli lepší rozpustnosti síťovadla. Připravena byla také srovnávací směs bez přidavku síťovadla. Všechny směsi byly dávkovány do silikonových forem o rozměrech 70 mm x 120 mm a hloubce  $h = 3$  mm. Filmy byly poté sušeny v horkovzdušné sušárně Memmert UFE 400 531 při teplotě 60 °C po dobu 48 hodin. Fotografie připravených filmů jsou uvedeny na následujícím obrázku (Obr. 15).



Obr. 15 – Fotografie připravených filmů

(A – bez síťovadla, B – s GDA, C – s DET, D – s DAS).

Tab. 5 – Označení a složení jednotlivých filmů z keratinového hydrolyzátu.

Označení filmu	Složení filmu
KH-film	Keratinový hydrolyzát + 30 % glycerol
GDA 5 %	Keratinový hydrolyzát + 30 % glycerol + 5 % GDA
GDA 10 %	Keratinový hydrolyzát + 30 % glycerol + 10 % GDA
DET 5 %	Keratinový hydrolyzát + 30 % glycerol + 5 % DET
DET 10 %	Keratinový hydrolyzát + 30 % glycerol + 10 % DET
DAS 5 %	Keratinový hydrolyzát + 30 % glycerol + 5 % DAS
DAS 10 %	Keratinový hydrolyzát + 30 % glycerol + 10 % DAS

Bylo připraveno 7 filmů, z nichž jeden film obsahoval pouze keratinový hydrolyzát a změkčovadlo a ve zbylých šesti filmech bylo přidáno vždy 5 nebo 10 % síťovadla. Získané filmy měly rozměry silikonové formy 70 x 120 mm a jejich tloušťka byla přibližně 0,3 až 0,5 mm na středu filmu. Směrem k okraji tloušťka filmu trochu rostla a na okraji vznikla

tvrdá hrana. Všechny filmy byly na povrchu mírně lepivé, ohebné a poddajné. Při uchování v exikátoru postupně ztrácely flexibilitu a v závislosti na době uskladnění se stával čím dál více křehké a lámavé. Připravené filmy měly hnědý poměrně lesklý vzhled, na první pohled byly průsvitné. Přídavek síťovadla diethylester kyseliny vinné vzhled vůbec nezměnil a film byl téměř totožný jako film bez síťovadla. Přídavek dialdehyd škrobu film ztmavil na tmavší odstín hnědé a snížil jeho průsvitnost a přídavek glutardialdehydu film úplně ztmavil a ten se stal neprůsvitným. Přídavky síťovadel také snížily lepivost povrchu připravených filmů.

## 9 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 9.1 Testování filmů

Připravené filmy byly studovány metodami FTIR, DSC a TGA. Infračervená spektroskopie byla měřena na přístroji Mattson Satellite v absorpčním módu v rozsahu vlnočtů 500–4000  $\text{cm}^{-1}$  se 64 skeny pro každý vzorek. Diferenciální skenovací kalorimetrie byla naměřena na přístroji Mettler-Toledo DSC1 v uzavřených hliníkových kelímcích v intervalu teplot 25–300 °C rychlostí ohřevu 10 °C/min v ochranné dusíkové atmosféře s průtokem plynu 40 ml/min. Termogravimetrická analýza (TGA) byla měřena na přístroji TA Instruments TGA Q50 na otevřených hliníkových pánvičkách v inertní atmosféře dusíku s průtokem 40 ml/min v rozsahu teplot 25 – 500 °C s rychlostí ohřevu 10 °C/min. Dále na každém z filmů bylo provedeno mikrochemické stanovení dusíku upravenou Micro-Kjeldahlovou metodou a byl zjištěn obsah sušiny.

#### 9.1.1 Analytická stanovení

Na všech připravených filmech bylo provedeno 2x mikrochemické stanovení dusíku u každé ho vzorku ze kterého byl pak vypočítán průměr a určená směrodatná odchylka. Dále byl zjištěn obsah sušiny a z výsledků TGA byl odečten obsah nespalitelných anorganických látek.

Tab. 6 – Hodnoty obsahu dusíku, sušiny a nespalitelných anorganických látek v připravených keratinových filmech

Keratinové filmy	Obsah dusíku	SMODCH	Obsah sušiny	Nes. látky
KH - film	7,76%	0,15	98,52%	28,50%
DAS 5 %	5,77%	0,43	98,73%	29,33%
DAS 10 %	6,25%	0,16	97,90%	32,52%
DET 5 %	7,18%	0,12	95,50%	28,08%
DET 10 %	6,98%	0,07	98,24%	28,22%
GDA 5 %	8,20%	0,29	98,18%	28,85%
GDA 10 %	7,70%	0,19	98,15%	27,65%

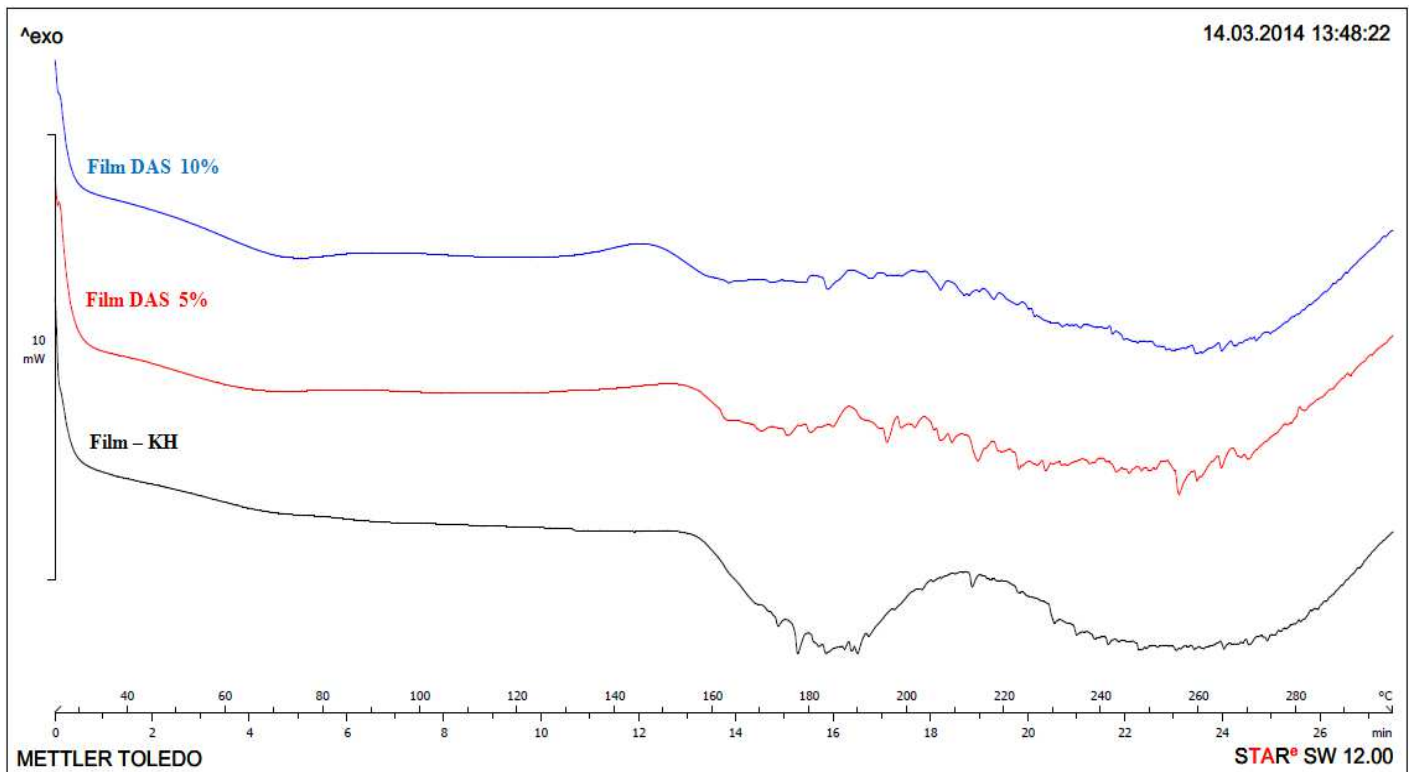
Připravené filmy z keratinových hydrolyzátů byly podrobeny mikrochemickému stanovení dusíku upravenou metodou podle Kjeldahla. Ovčí vlna, z které byl připraven keratinový hydrolyzát, měla 12,17 % dusíku. Keratinový hydrolyzát má poté obsah dusíku 13,62 %. U filmů připravených z tohoto hydrolyzátu se obsah dusíku pohybuje v rozmezí 6-8 %. Pokles dusíku u filmů je způsoben tím, že směs na přípravu filmů obsahovala kolem 55 – 60 % keratinového hydrolyzátu a dále přidané změkčovaadlo a síťovaadlo. Obsah sušiny všech filmů se pohyboval kolem 98 %. Z výsledků TGA byl odečten u každého vzorku obsah nespalitelných anorganických látek při teplotě 500 °C. U filmu z keratinového hydrolyzátu bez použitého síťovaadla byl obsah nespalitelných látek 28,5 %. Přidáním síťovaadla dialdehydu škrobu se obsah zvýšil zhruba o 1, respektive 4 % a u ostatních použitých síťovadel zůstal obsah nespalitelných anorganických látek obdobný jako u vzorku filmu bez síťovaadla.

### 9.1.2 Diferenciální snímací kalorimetrie

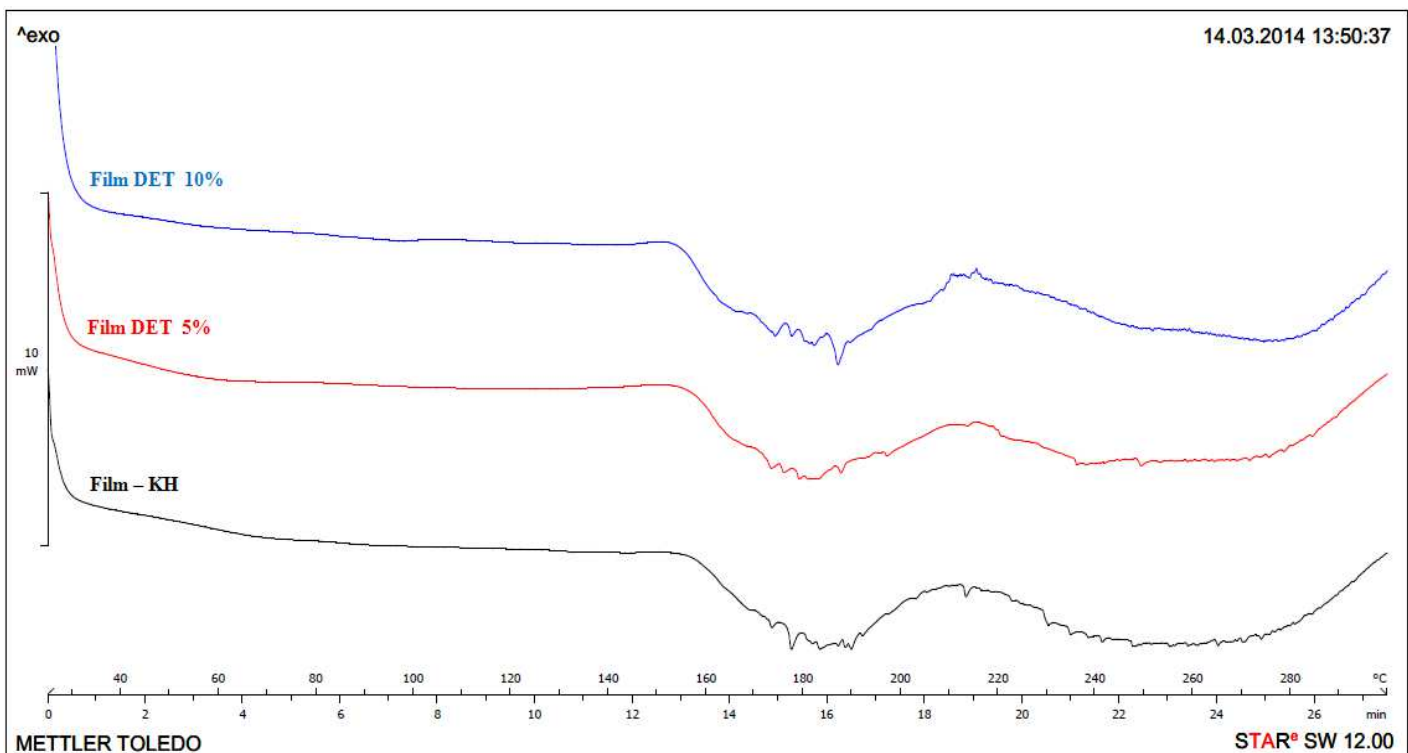
Na obrázku 16 – 18 můžeme vidět porovnání DSC křivek připravených filmů. Jako referenční slouží film z keratinového hydrolyzátu bez přídavku síťovaadla, který je uveden ve všech grafech, a zbylé dvě křivky jsou vždy vzorky filmů s přídavkem a 5 a 10 % síťovaadla. Na obrázku 16 jsou zobrazeny výsledky měření filmů síťovaných GDA. Všechny pozorované změny se u vzorků projeví endotermním chováním.

U vzorku bez přídavku síťovaadla dochází k poklesu křivky již od počátku měření, což je zřejmě způsobeno odpařováním vlhkosti obsažené ve filmu. Kolem teploty 150 °C můžeme zřejmě pozorovat počátek tání filmu, což je na křivce zobrazeno velkým endotermním píkem. Vrchol tohoto píku je kolem teploty 185 °C. U tohoto filmu můžeme dále pozorovat nástup tepelné degradace kolem teploty 210 °C opět provázené výrazným endotermním píkem. Kolem teploty 290 °C se začíná ze vzorku odpařovat glycerol.

Průběh křivek filmů s přídavkem 5 a 10 % DAS je obdobný jako u filmu bez přídavku síťovaadla. Film s přídavkem 5 % DAS začíná tát při stejné teplotě jako nesíťovaný film, tedy kolem 150 °C. U vzorku filmu s přídavkem 10 % DAS je teplota tání mírně nižší. Také degradace těchto filmů nastává při nižších teplotách 190 – 200 °C. Toto zjištění nepotvrdilo původní předpoklad, že přídavek síťovaadla zvýší tepelnou odolnost filmů, a síťovaadlo DAS se neukázalo jako vhodné pro zvýšení této teplotní stability filmů z KH.

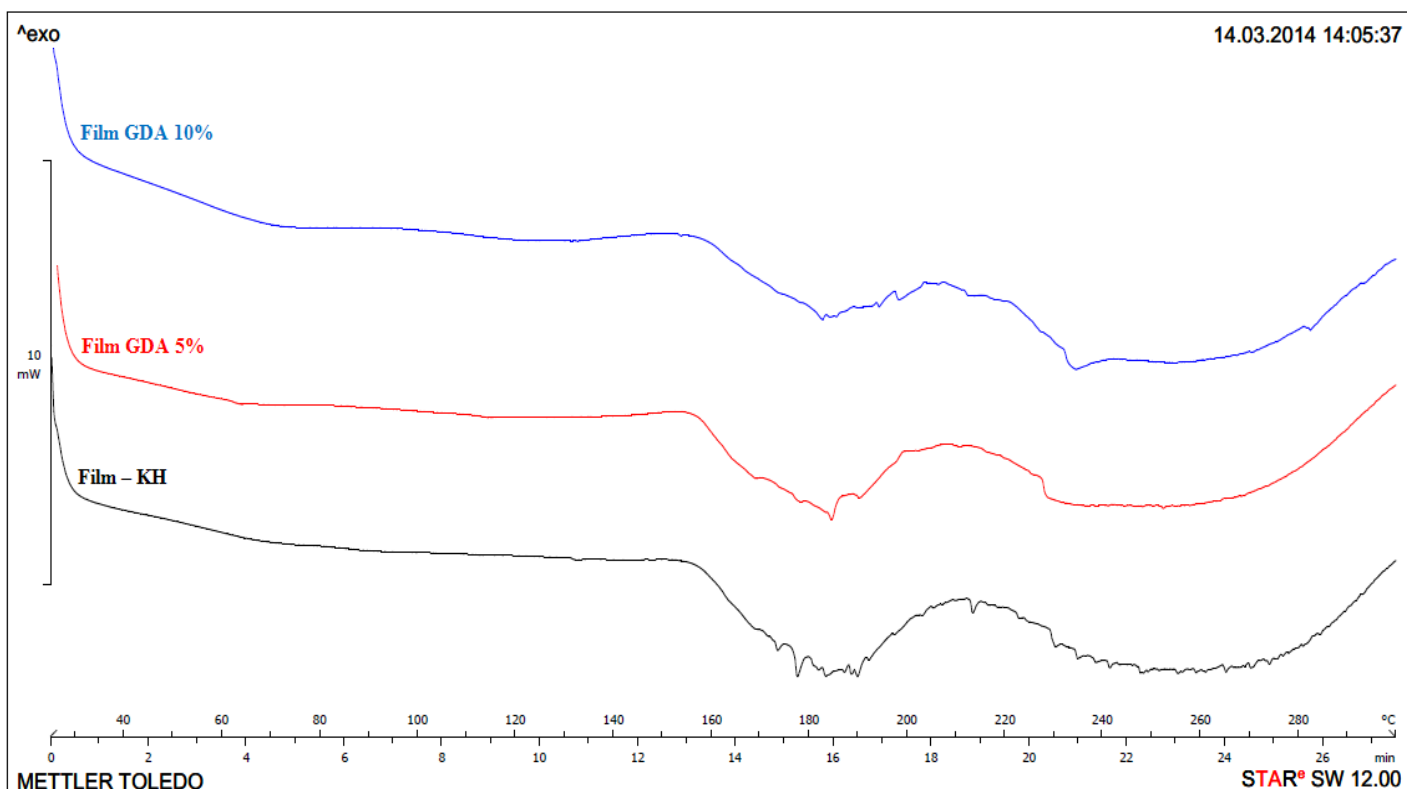


Obr. 16 – DSC porovnávající film bez přídavku síťovadla a s přídavkem 5 a 10 % DAS



Obr. 17 – DSC porovnávající film bez přídavku síťovadla a s přídavkem 5 a 10 % DET

Obrázek 17 grafu z DSC nám znázorňuje průběh křivek získaných z připravených filmů s přidavkem 5 a 10 % DET. Kolem teploty 150 °C můžeme vidět počátek tání, které je totožné jak u nesíťovaného filmu, tak i u obou vzorků s přidavkem DET. Degradace u těchto vzorků nastává kolem 215 °C a průběh křivky v této části je téměř totožný. Toto měření nám potvrdilo, že přidavek diethylesteru kyseliny vinné výrazně neovlivnil průběh křivky a ta měla téměř totožný průběh jako křivka keratinového hydrolyzátu bez přidavku síťovadla, nedošlo však také k předpokládanému zlepšení tepelné odolnosti.



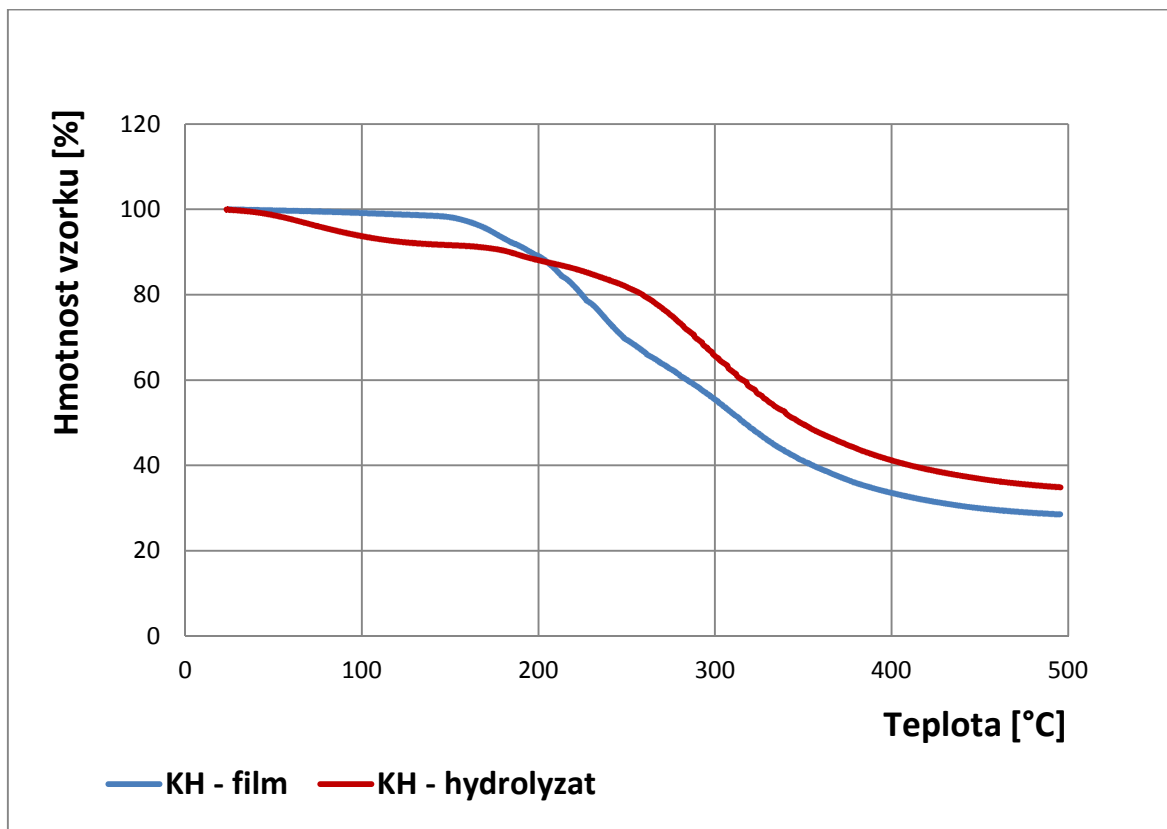
Obr. 18 – DSC porovnávající film bez přidavku síťovadla a s přidavkem 5 a 10 % GDA

Průběh křivek filmů s přidavkem 5 a 10 % GDA (Obr. 18) je téměř totožný jako u filmu bez přidavku síťovadla. Všechny tři filmy začínají tát při podobné teplotě a to kolem 150°C, kde je patrné mírné zvýšení této teploty u vzorku s 10 % GDA. Také degradace těchto filmů nastává při teplotách kolem 215 °C. Z průběhu těchto křivek vyplývá, že se nepotvrdil původní předpoklad, který nám říkal, že s přidavkem síťovadla zvýšíme u filmu jeho tepelnou odolnost.

Obrázky grafů získané z diferenciální snímací kalorimetrie nám znázornily, jak se připravené filmy chovají za zvýšených teplot a jaký je průběh jejich tání a následné degradace. Z křivek připravených filmů je zřejmé, že použitá síťovadla nepůsobí na strukturu filmů dle našeho očekávání a nezvyšují jejich tepelnou stabilitu. Ve filmech kde bylo použito síťovadlo dialdehyd škrobu, byl počátek tání při mírně nižších teplotách než u referenčního filmu bez přídavku síťovadla. U zbylých filmů se síťovadly diethylester kyseliny vinné a glutaraldehyd byly tyto teploty totožné jako referenční vzorek filmu bez síťovadla. Mírného zvýšení teploty tání bylo dosaženo u vzorku s 10 % GDA, ale i tak můžeme říct, že vliv těchto síťovadel není příliš velký.

### 9.1.3 Termogravimetrická analýza

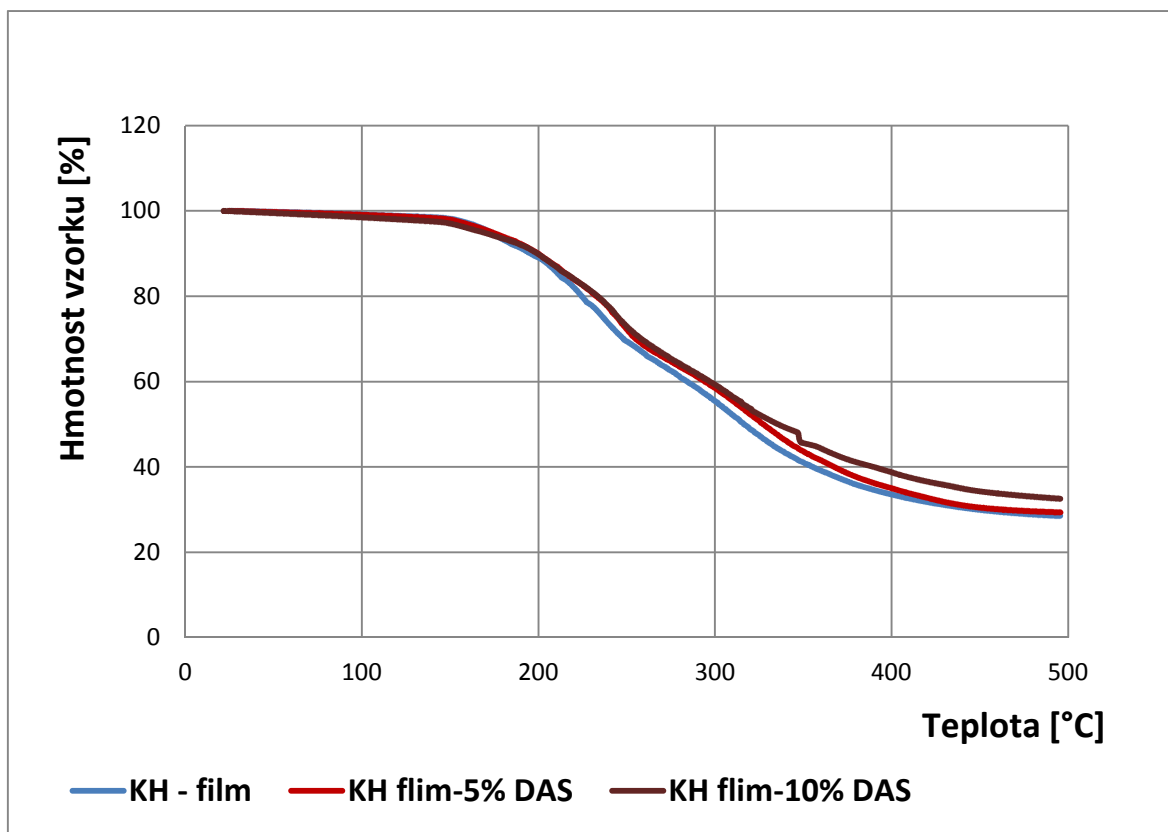
Termogravimetrická analýza byla provedena na všech vzorcích připravených filmů a také na vzorku keratinového hydrolyzátu (před dialýzou). Výsledky TGA jsou uvedeny na obrázcích 19 – 22



Obr. 19 – TGA vzorků keratinového hydrolyzátu a z něj připraveného filmu



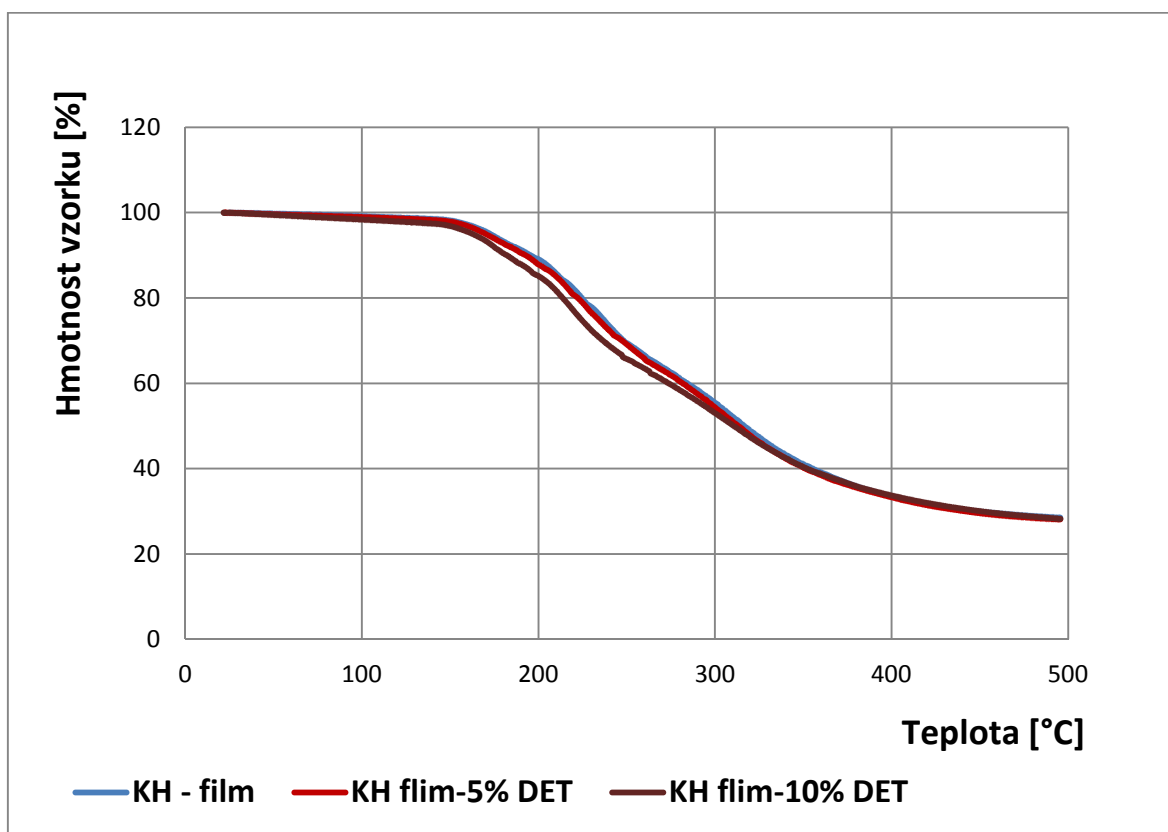
Na obrázku 19 jsou uvedeny TG křivky keratinového hydrolyzátu a z něj připraveného filmu bez přídavku síťovadla. Zobrazená závislost hmotnosti vzorků na teplotě nám ukazuje průběh úbytku hmotnosti se zvyšující se teplotou systému. Vzorek keratinového hydrolyzátu začal ztrácet hmotnost již kolem teploty 50 °C a při teplotě 103 °C byla hmotnost vzorku asi 93 %. Tento pokles hmotnosti je způsoben odpařováním zbytkové volné a vázané vody. Připravený film vykazoval v tomto rozmezí vyšší stabilitu a první ztráta se projevila až kolem teploty 150 °C. Od teploty 150 °C začínají obě křivky filmu i KH klesat strměji, což značí zřejmě počátek tání vzorků. Od teploty 250 °C byl průběh poklesu hmotnosti téměř totožný asi s 10% rozdílem hmotnosti. Při této teplotě již dochází k tepelné degradaci obou materiálů. Měření bylo ukončeno při teplotě 500 °C a hmotnost nespalitelného zbytku z keratinového hydrolyzátu byla 34,85 % původní hmotnosti a u filmu z KH byla 28,50 % původní hmotnosti.



Obr. 20 – TGA vzorků KH- filmu a filmů s přídavkem 5 a 10% DAS

V grafu uvedeném na obrázku 20 jsou zobrazeny tři TG křivky vzorků filmů bez síťovadla a s 5 a 10 % DAS. Průběh všech tří křivek je téměř totožný až po teplotu 220 °C, poté se

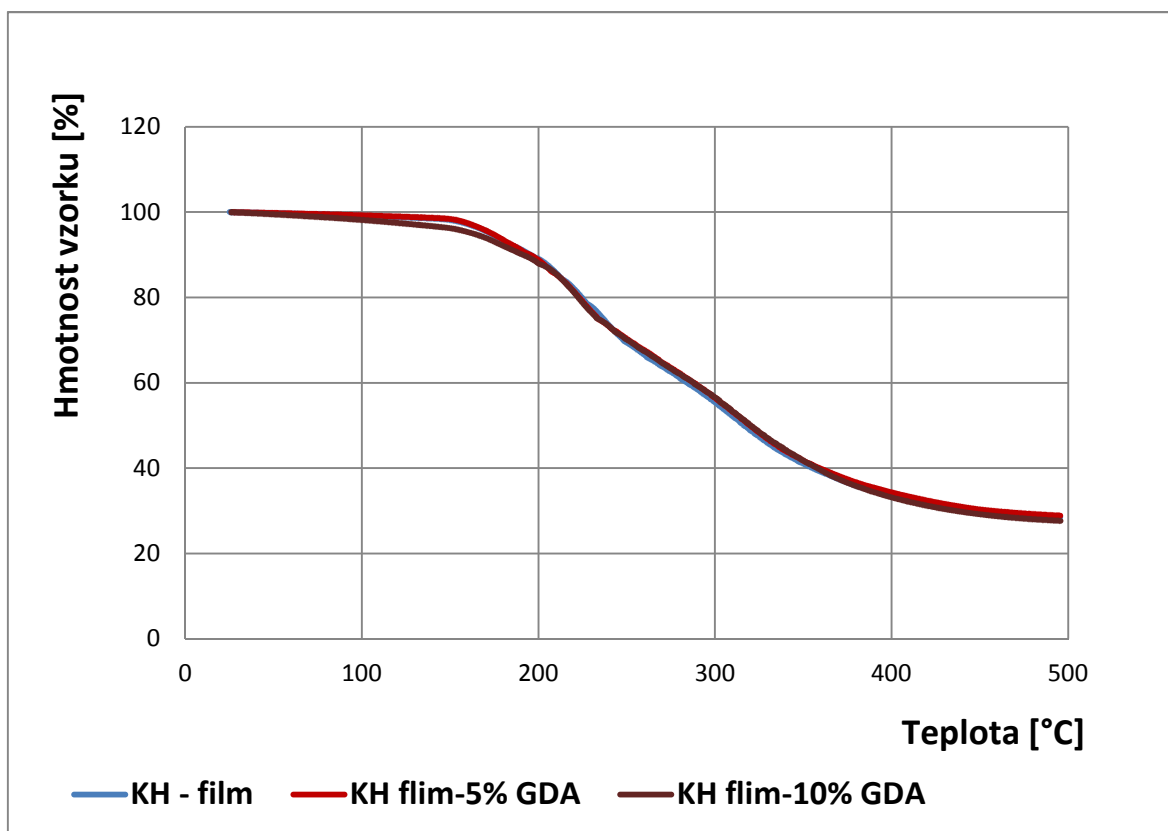
začal projevovat přidavek dialdehydu škrobu ve vzorcích filmů a pokles hmotnosti u těchto vzorků byl nižší než u filmu bez přísady síťovadla. Měření bylo ukončeno při teplotě 500 °C a zbylá hmotnost nespalitelných látek byla u KH – filmu 28,5 %, u filmu s přísadkou 5 % DAS byla 29,32 % a u filmu s přísadkou 10 % DAS byla 32,52 %. Z měření vyplývá, že přísadkou dialdehydu škrobu nijak zvlášť neovlivňuje teplotní odolnost filmů z keratinových hydrolyzátů.



Obr. 21 – TGA vzorků KH- filmu a filmů s přísadkou 5 a 10% DET

Na obrázku 21 je průběh měření TGA filmů s přísadkou 5 a 10 % diethylesteru kyseliny vinné a filmu bez síťovadla. Křivky se zvyšující se teplotou klesaly téměř totožně až do teploty 170 °C kde film s přísadkou 10 % DET začal ztrácet svoji hmotnost rychleji, což může být způsobeno odpařením zbytku nezreagovaného síťovadla. Tento rozdíl se začal postupně vyrovnávat a přibližovat zpět k průběhu ostatních dvou vzorků a do teploty 300 °C byl průběh opět totožný. Při konečné teplotě 500 °C se všechny tři filmy dostaly na téměř stejnou hodnotu a to KH-film 28,5 %, film s 5 % DET měl 28,08 % a film s 10 % měl poté 28,22 % své původní hmotnosti. Přídavek síťovadla diethylesteru kyseliny vinné

nezlepšil teplotní odolnost připravených keratinových filmů a průběh úbytku hmotnosti v závislosti na zvyšující se teplotě je téměř totožný jako u filmu z keratinového hydrolyzátu bez přídavku síťovadla.



Obr. 22 – TGA vzorků KH- filmu a filmů s přídavkem 5 a 10% GDA

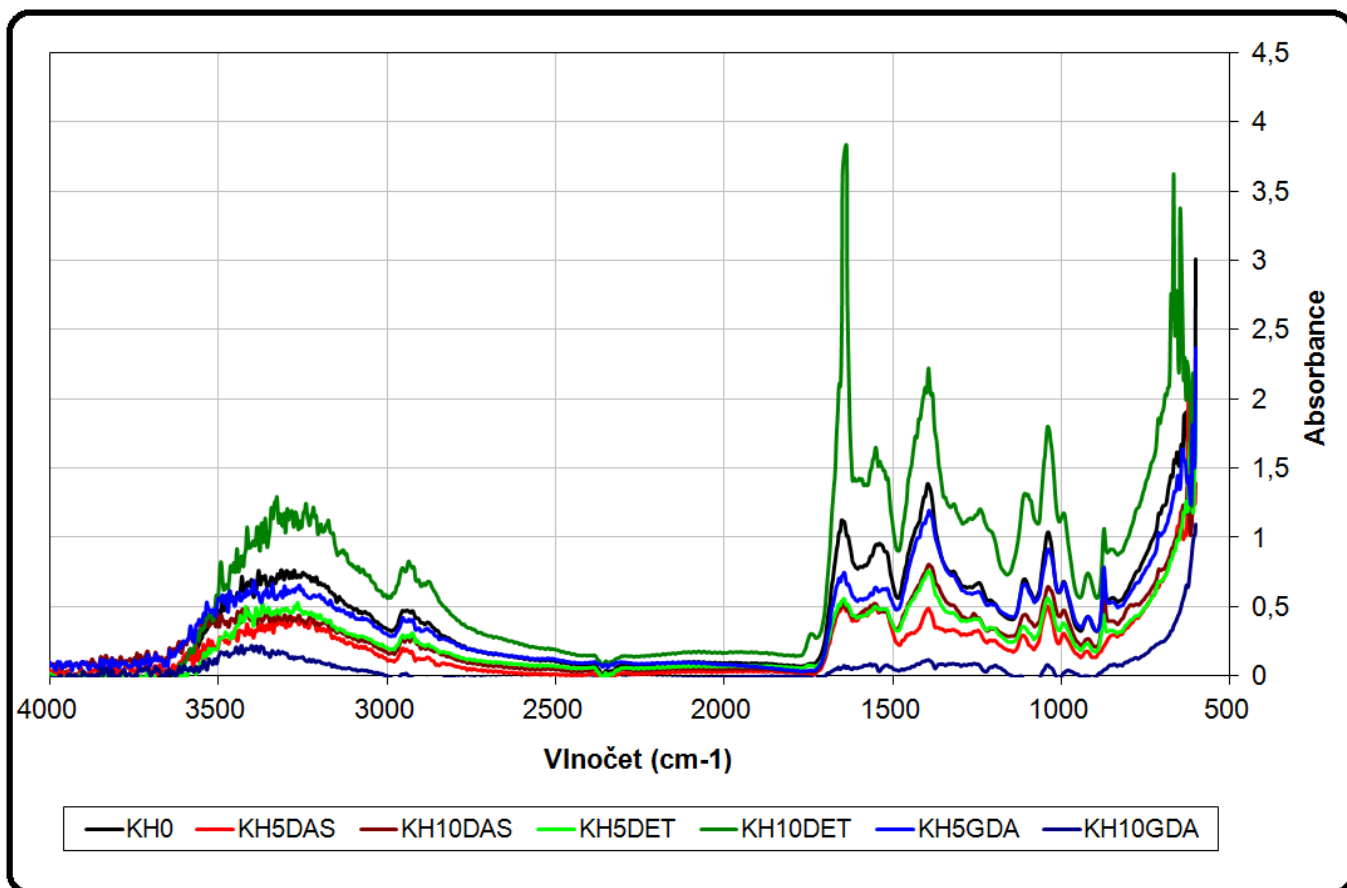
Na obrázku 22 je průběh z měření TGA filmů s přídavkem 5 a 10 % glutardialdehydu a filmu bez síťovadla. Křivky KH-filmu a filmu s přídavkem 10 % GDA mají po celou dobu měření téměř totožný průběh. Film z KH s přídavkem 5 % GDA měl nižší hmotnostní ztrátu v rozmezí teplot od 80 °C až do 180 °C. Při konečné teplotě 500 °C se všechny tři filmy dostaly na téměř stejnou hodnotu s rozdílem do 1 %. Přídavek 5 % síťovadla glutardialdehydu mírně zlepšil teplotní odolnost připraveného filmu. Při teplotách pod 180 °C oproti filmu bez přídavku síťovadla.

Z metody TGA u připravených filmů jsme získali závislosti úbytku hmotnosti na zvyšující se teplotě. Hodnotili jsme, zda použité síťovadla ovlivňují teplotní stabilitu keratinových filmů. U všech filmů v rozmezí teplot 50 až 100 °C nastává odpařování vlhkosti a kolem teploty 160 °C filmy začínají tát. Při teplotě kolem 205 °C nastává tepelná degradace fil-

mů, zvyšuje se rychlost poklesu hmotnosti a následuje spálení všech organických látek. Odpařování glycerolu, provázené dalším poklesem hmotnosti, se pohybuje kolem teploty 290 °C. Z použitých síťovadel se nejlépe jevil film s přídavkem 5 % GDA, který jako jediný mírně zvýšil teplotní odolnost vzorku při teplotách do 180 °C. Zbylé vzorky měly průběh poklesu hmotnosti téměř totožný se vzorkem filmu bez přídavku síťovadla.

#### 9.1.4 Infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR)

Na grafu infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací můžeme pozorovat průběh absorbance na všech připravených vzorcích filmů z keratinových hydrolyzátů. Z výsledků analýzy můžeme vypočítat několik změn ve vzorcích síťovaných filmů oproti kontrolnímu vzorku bez přídavku síťovadla. Největší změny jsou viditelné u vzorku filmu s přídavkem 10 % DET, kde je viditelný nárůst absorbance při všech charakteristických vlnočtech. Výrazný je zejména nárůst v pásmu 880–1170  $\text{cm}^{-1}$ , ve kterém mají své charakteristické píky -OH skupiny a -CO- skupiny, což je zřejmě způsobeno větším množstvím přidaného esteru kyseliny vinné. Další výrazný nárůst je v pásmu 1350–1490 a 1490–1720  $\text{cm}^{-1}$ , kde jsou charakteristické píky -CH<sub>2</sub>- a -CONH- skupin. Poslední rozdíl je vidět v pásmu 3000–3600  $\text{cm}^{-1}$ , kde jsou opět zastoupeny -CONH- vazby. Všechny tyto zvýšené hodnoty mohou znamenat vyšší množství nově vytvořených peptidových vazeb. Podobný průběh jako referenční KH-film bez přídavku síťovadel má také vzorek s 5 % GDA a další měřené vzorky již mají nižší absorbance než nesíťovaný vzorek. Charakteristické píky se však nacházejí ve stejných pásmech vlnočtů.



Obr. 23 – Graf z infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací s výsledky všech testovaných filmů

## ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývá možnostmi zpracování keratinového odpadu na keratinové hydrolyzáty a jejich použitím na výrobu filmů. V teoretické části jsou stručně charakterizovány bílkoviny (keratiny), jejich hydrolytické štěpení na keratinové hydrolyzáty a využití pro přípravu filmů a další aplikace těchto keratinových materiálů.

Experimentální část se zabývá popisem přípravy keratinového hydrolyzátu dvou-  
stupňovou alkalicko-enzymovou metodou z ovčí vlny, kdy v prvním stupni je vlna před-  
zpracována (zbohnána) v alkalickém roztoku a ve druhém stupni je po úpravě pH přidán  
proteolytický enzym. Po hydrolýze byl keratinový hydrolyzát zbaven většího množství  
popelovin dialýzou přes celulóзовou membránu. Připravený hydrolyzát byl charakterizo-  
ván analytickými zkouškami a následně z něj byly vytvořeny směsi pro přípravu filmů.  
Bylo připraveno sedm filmů, z nichž jeden film sloužil jako referenční (bez přídavku síťo-  
vadla) a do zbylých šesti filmů byly přidány vybrané síťovadla vždy v množství 5 nebo  
10 % na navážku hydrolyzátu. Do všech filmů byl přidán glycerol jako změkčovadlo pro  
zlepšení zpracovatelnosti a flexibility. Použité síťovadla byly dialdehyd škrobu, diethyles-  
ter kyseliny vinné a glutardialdehyd. Takto připravené filmy byly podrobeny analytickým  
zkouškám a zkoumány pomocí metod infračervené spektroskopie s Fourierovou transfor-  
mací, diferenciální skenovací kalorimetrie a termogravimetrické analýzy. Výsledky těchto  
analýz byly zpracovány do grafů, ze kterých byl vyhodnocován vliv použitých síťovadel na  
vlastnosti připravených keratinových filmů.

Bylo zjištěno, že u připravených filmů klesá obsah dusíku oproti původnímu hydrolyzátu,  
ale neliší se příliš od referenčního vzorku bez síťovadla. Hodnoty zjištěné sušiny a nespali-  
tečných látek jsou téměř stejné. Z TGA křivek bylo zjištěno, že připravené filmy ztrácí  
hmotnost pomaleji než hydrolyzát při teplotách pod 150 °C. Křivky jednotlivých filmů se  
však od sebe příliš neliší a pozitivního výsledku bylo dosaženo u filmu s 5 % GDA. Po-  
dobné výsledky byly zjištěny také měřením DSC, kde tání vzorků probíhalo od teploty  
kolem 150 °C a degradace od teploty asi 215 °C. Zde došlo k malému nárůstu teploty tání  
u vzorku s 10 % GDA. Z FTIR analýzy byl viditelný nárůst absorbance u vzorku s 10 %  
DET, nedošlo ovšem k posunu jednotlivých píků. Vybrané síťovadla nijak zvlášť neovliv-  
ňují studované vlastnosti filmů z keratinových hydrolyzátů a pro jejich úplnou charakteri-  
zaci by bylo nutné další podrobnější studium.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] ŠKÁRKA, B a FERENČÍK, M. *Biochémiá*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1983, 635 s.
- [2] KOLÁŘ, K, KODÍČEK, M a Jiří POSPÍŠIL. *Chemie: pro gymnázia*. 2., upr. a dopl. vyd. Praha: SPN - pedagogické nakladatelství, 2005, 128 s. ISBN 80-7235-283-0.
- [3] MOKREJŠ, P. et al. *Aplikace přírodních polymerů*. 1. Vyd. Zlín, 2008. 90 s. ISBN 978-80-7318-674-6.
- [4] BLAŽEJ, A. *Technologie kůže a kožešin*. 1.vyd. Praha: SNTL – Nakladatelství Technické literatury, 1984, 451s.
- [5] WIENER, J., PRŮŠOVÁ, J., KRYŠTŮFEK, J. *Chemicko – textilní rozbor*. Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2008.
- [6] ZOCCOLA, M, ALUGI, A, a TONIN, C., Characterisation of keratin biomass from butchery and pool industry Wales. *Journal of Molecular Structure*. 2009, 938(1-3), 35-40. DOI: 10.1016/j.molstruc.2009.08.036.
- [7] GÜHRS, K, WEISSHART, K, GROSSE, F. Lessons from nature-protein fibers. *Journal of biotechnology: Reviews in molecular biotechnology*. 2000, 74(2), 121-134
- [8] SMITH, G. New trends in photobiology (invited review) photodegradation of keratin and other structural proteins. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1995, 27(3), 187-198. DOI: 10.1016/1011-1344(94)07104-V.
- [9] HILL, P, BRANTLEY, H, VAN DYKE, M. Some properties of keratin biomaterials: Keratines. *Biomaterials*. 2010, 31(4), 585-593. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.076.
- [10] SIMPSON, W a CRAWSHAW, G. *Wool: science and technology*. Cambridge, England: Woodhead, c2002, 368 s. ISBN 08-493-2820-9.
- [11] CARDAMONE, M. Keratin transamidation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2008, 42(5), 413-419. DOI: 10.1016/j.ibiomac.2008.02.004.
- [12] KURBANOGLU, E, B, KUBRANOGLU, N, I. A new process for the utilization as peptone of ram horn waste. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2002, 94(3), 202-206. DOI: 10.1016/S1389-1723(02)80150-5.

- [13] GENNADIOS, Aristippos. *Protein-based films and coatings*. BocaRaton: CRC Press, 2002, 650 s. ISBN 15-871-6107-9.
- [14] SCHROOYEN, P. *Featherkeratins: modification nad film formation*. Enschede: University of Twente, 1999. ISBN 90-365-1302-2.
- [15] GRAZZIOTTON, A. Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. *Animal feed science and technology*, vol. 126, 2006, p. 135-144
- [16] BRANDELLI, A. Bacterial Keratinases: Useful Enzymes for Bioprocessing Agroindustrial Wastes and Beyond. *Food and Bioprocess Technology*. 2008 1(2), 105-116. DOI: 10.1007/s11947-007-0025-y.
- [17] CORREA, A, P, DAROIT, D, J, BRANDELLI, A. Characterization of a keratinase produced by *Bacillus* sp. P7 isolated from an Amazonian environment. *International Biodeterioration*. 2010, 64(1), 1-6. DOI: 10.1016/j.ibiod.2009.06.015.
- [18] MABROUK, M, E. Feather degradation by a new keratinolytic *Streptomyces* sp. MS-2. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2008, 24(10), 2331-2338. DOI: 10.1007/s11274-008-9748-9.
- [19] DALEV, P, G. Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate. *Bioresource Technology*. 1994, 48(3), 265-267.
- [20] WOOL, R, P. *Bio-based polymers and composites*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, c2005, 620 s. ISBN 01-276-3952-7.
- [21] KARTHIKEYAN, R., BALAJ, S., SEHGAL P, K. Industrial applications of keratins – A review. *Journal of scientific*. 2007, 66(9), 710-715.
- [22] REICHL, S. Films based on human hair keratin as substrates for cell culture and tissue engineering. *Biomaterials*. 2009, 30(36), 6854-6866. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.08.051
- [23] KREJČÍ, O, MOKREJŠ, P. Sledování vlivu technologických podmínek na účinnost rozkladu odpadní ovčí vlny. *Wasteforum*. 2010, 3(1), 35-42. Dostupné z: [www.wasteforum.cz](http://www.wasteforum.cz)



- [24] GOUSTEROVA, A, BRAIKOVA, D, GOSHEV, I, CHRISTOV, P, TISHINOV, P, VASILEVA-TONKOVA, E, HAERTLE, T, a NEDKOV, P. Degradation of keratin and collagen containing wastes by newly isolated thermoactinomycetes or by alkaline hydrolysis. *Letters in Applied Microbiology*. 2005, roč. 40, č. 5, s. 335-340. ISSN 02668254. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2005.01692.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.2005.01692.x>
- [25] BORE, P, M, ARNAUD, J, C. *Keratin polymer containing S-sulphocystein residues: process for its preparation and the compositions containing it* [patent]. 4,948,876, 218,220. Uděleno 14.8.1990. Zapsáno 13.7.1988.
- [26] GUPTA, R, RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, roč. 70, č. 1, s. 21-33. ISSN 01757598. DOI: 10.1007/s00253-005-0239-8. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s00253-005-0239-8>
- [27] ALUIGI, A, VINEIS, C, CERIA, A, TONIN, C. Composite biomaterials from fibre-wastes: Characterization of wool/cellulose acetate blends. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*. 2008, roč. 39, č. 1, s. 126-132. ISSN 1359835x. DOI: 10.1016/j.compositesa.2007.08.022. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359835X07001509>
- [28] MOKREJŠ, Pavel, Ondřej KREJČÍ, Roman ČERMÁK a Petr SVOBODA. Optimalizace podmínek enzymové hydrolyzy kuřecího peří. *Chemické Listy* [online]. 2013, vol. 107, iss. 9, s. 709-712. [cit. 2014-05-12]. ISSN 0009-2770
- [29] GENNADIOS, A. *Protein-based films and coating*, CRC Press, 2002, ISBN 15-871-6107-9, 650 s.
- [30] YADA, Rickey Yoshio. *Proteins in food processing*. DOI: ISBN 0-8493-2536-6., 728 s.

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1 – Znázorněná stavba bílkoviny, na základě aminokyselin s peptidovými vazbami, které se spontánně skládají ve správném pořadí a do požadovaného tvaru .....	12
Obr. 2 – $\beta$ -sheet (skládaný list) struktura keratinové molekuly .....	16
Obr. 3 – Vlas.....	17
Obr. 4 – Vazby vyskytující se v keratinu [5].....	18
Obr. 5 – Schéma hydrolýzy keratinového odpadu na keratinový hydrolyzát .....	20
Obr. 6 – Oxidace disulfidické vazby keratinu s jejím štěpením.....	21
Obr. 7 – Hydrolýza polypeptidické vazby keratinu.....	21
Obr. 8 – Působení nízkých koncentrací alkálií za mírných teplot na keratin .....	22
Obr. 9 – Oxidace disulfidické vazby keratinu s jejím štěpením.....	23
Obr. 10 – Redukce disulfidické vazby keratinu .....	23
Obr. 11 – Keratinové filmy .....	32
Obr. 12 – Schéma měřicí komory DSC.....	37
Obr. 13 – Michelsonův interferometr (FTIR).....	39
Obr. 14 – Ovčí vlna (vlevo) a keratinový hydrolyzát (vpravo).....	41
Obr. 15 – Fotografie připravených filmů.....	42
Obr. 16 – DSC porovnávací film bez přísady síťovadla a s přísadou 5 a 10 % DAS .....	46
Obr. 17 – DSC porovnávací film bez přísady síťovadla a s přísadou 5 a 10 % DET .....	46
Obr. 18 – DSC porovnávací film bez přísady síťovadla a s přísadou 5 a 10 % GDA .....	47
Obr. 19 – TGA vzorků keratinového hydrolyzáta a z něj připraveného filmu .....	48
Obr. 20 – TGA vzorků KH- filmu a filmů s přísadou 5 a 10% DAS.....	49
Obr. 21 – TGA vzorků KH- filmu a filmů s přísadou 5 a 10% DET.....	50
Obr. 22 – TGA vzorků KH- filmu a filmů s přísadou 5 a 10% GDA .....	51
Obr. 23 – Graf z infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací s výsledky všech testovaných filmů .....	53

**SEZNAM TABULEK**

Tab. 1 – Rozdělení bílkovin [1] .....	13
Tab. 2 – Aminokyselinové složení keratinu [4].....	15
Tab. 3 – Fyzikální vlastnosti keratinových filmů [29].....	28
Tab. 4 – Hodnoty analytických zkoušek u keratinového hydrolyzátu.....	41
Tab. 5 – Označení a složení jednotlivých filmů z keratinového hydrolyzátu.....	42
Tab. 7 – Hodnoty obsahu dusíku, sušiny a nespalitelných anorganických látek v připravených keratinových filmech.....	44