



**Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně**  
**Fakulta technologická**

**Ing. Ondřej Krejčí**

**Zpracování keratinových odpadů a možnosti  
aplikací redukováných forem keratinu**

**Keratin Waste Treatment and Application Possibilities  
of Reduced Forms of Keratin**

Disertační práce

Studijní program: P2808 Chemie a technologie materiálů  
Studijní obor: 2808V006 Technologie makromolekulárních látek  
Školitel: Doc. Ing. Pavel Mokrejš, Ph.D.

2014

## ABSTRAKT

Práce je zaměřena na přípravu keratinových hydrolyzátů z odpadní ovčí vlny, jejich následnou charakterizaci a možnosti jejich praktického využití. Pro přípravu keratinových hydrolyzátů byla vypracována a optimalizována alkalicko-enzymová hydrolýza, při které je v prvním stupni vlna hydrolyzována v roztoku alkálie s nízkou koncentrací a ve druhém kroku je přidán proteolytický enzym. Experimenty hydrolýz byly naplánovány a vyhodnocovány statistickými faktorovými pokusy, byl sledován vliv vybraných faktorů při hydrolýze na její účinnost. Nejvyšší účinnosti hydrolýzy (téměř 75 % rozložené vlny) bylo dosaženo při zpracování vlny v 1. stupni 0,6% KOH při 90°C po dobu 48 hodin a s přídatkem 5 % enzymu Savinase 6.0T při 60°C po dobu 24 hodin ve 2. stupni. Největší vliv na množství rozložené vlny měla koncentrace alkálie.

Při charakterizaci připravených keratinových hydrolyzátů bylo zjištěno, že jejich molární hmotnosti se pohybují nejčastěji mezi 15–50 kDa, ale u některých hydrolyzátů byly zjištěny i frakce s molární hmotností >100 kDa. Složení keratinových hydrolyzátů se odlišuje od vlny zejména obsahem síry a popelovin, ale obsah dusíku se příliš nemění. Dialýzou lze u připravených hydrolyzátů dosáhnout snížení obsahu popelovin na přípustných 5 %. Dle optimalizovaných podmínek alkalicko-enzymové hydrolýzy bylo připraveno zásobní množství hydrolyzátu k dalším pokusům.

Aplikační potenciál připravených keratinových hydrolyzátů byl testován na třech vybraných způsobech použití. Nejprve byly z hydrolyzátu připravovány filmy s aditivy (změkčovač, síťovač), u kterých byly hodnoceny fyzikálně-mechanické vlastnosti a složení. Bylo zjištěno, že filmy s přídatkem 30 % glycerolu a síťované glutardialdehydem měly nejoptimálnější vlastnosti. Dále byly připraveny kompozity ze dvou typů PE s přídatkem 5 a 10 % hydrolyzátu. Mechanické a tepelné vlastnosti těchto směsí se s přídatkem keratinového hydrolyzátu příliš neměnily. Přídatkem hydrolyzátu snižuje u těchto kompozitů krystalinitu a tažnost. Poslední zkoušenou aplikací bylo použití hydrolyzátů jako nosičů aktivních látek. Z připravených kapslí se obsažená aktivní látka uvolňovala postupně v průběhu rozpouštění kapslí.

**Klíčové slova:** vlna, hydrolýza, keratinový hydrolyzát, složení, molární hmotnosti, dialýza, film, kompozit, nosič

## ABSTRACT

This thesis deals with preparation of keratin hydrolysates from waste sheep wool, characterization of these hydrolysates and their application possibilities. A method of alkali-enzymatic hydrolysis was developed and optimized for preparation of keratin hydrolysates, where in a first step wool was hydrolysed in a low-concentrated alkali solution and in a second step a proteolytic enzyme was added. Hydrolysis experiments were planned and evaluated by statistical factorial test and influence of chosen hydrolysis factors on effectivity of hydrolysis was observed. High efficiency of hydrolysis (almost 75 % of decomposed wool) was reached in experiment, where wool was treated in 0.6% KOH at 90°C for 48 hours in first step and 5 % enzyme Savinase 6.0T addition at 60°C for 24 hours in second step. Concentration of alkali solution has high influence to amount of decomposed wool.

Molar weight of prepared keratin hydrolysates was mostly between 15–50 kDa, but in some experiments fractions with molar weight more than 100 kDa were found. Composition of hydrolysates was a little different in comparison with wool, especially in sulphur and ash content, but amount of nitrogen was almost unchanged. A reduction of ash content to acceptable 5 % in prepared keratin hydrolysates was achieved by a dialysis. A stock amount of the keratin hydrolysate was produced according to optimized conditions of alkali-enzymatic hydrolysis.

The application potential of prepared keratin hydrolysates was tested for three chosen types of utilization. The first utilization was a film preparation from the keratin hydrolysate with additives (plasticizer, cross-linking agent) and testing their physical-mechanical properties and composition. Properties of films with 30 % addition of the glycerol and cross-linked by the glutaraldehyde had the most optimal properties. In the second utilization composite desks from two types of PE with 5 or 10 % of hydrolysate addition were prepared. Mechanical and thermal properties of composite desks weren't negatively affected by hydrolysate. Addition of the keratin hydrolysate into PE led to decrease of crystallinity and elongation. The last utilization was testing the keratin hydrolysate as a carrier of active substances. The obtained active substance from prepared capsules was liberated gradually during a process of capsules dissolution.

**Key words:** wool, hydrolysis, keratin hydrolysate, composition, molar weights, dialysis, film, composite, carrier

Rád bych na tomto místě poděkoval svému vedoucímu Doc. Ing. Pavlu Mokrejšovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a cenné připomínky k mé práci. Dále svým kolegům na Ústavu inženýrství polymerů za pomoc s provedením a vyhodnocením některých měření, a také Ing. Svatopluku Sukopovi, CSc. z Ústavu chemie za pomoc při stanovování molárních hmotností. Poslední a největší poděkování patří mé rodině za podporu a trpělivost.

Motto:

„Synu, od svého mládí se věnuj vzdělávání, až do šedin tak budeš nacházet moudrost.“

**Sírachovec 6:18**

# OBSAH

ABSTRAKT.....	2
ABSTRACT.....	3
OBSAH.....	5
SEZNAM TABULEK.....	7
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	8
SEZNAM ZKRATEK.....	10
1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	11
1.1 Keratin.....	11
1.2 Vlna.....	14
1.3 Keratinové odpady.....	16
1.4 Hydrolytické štěpení keratinu.....	17
1.4.1 Alkalická hydrolýza.....	17
1.4.2 Kyselá hydrolýza.....	18
1.4.3 Redukční způsob.....	18
1.4.4 Oxidační způsob.....	18
1.4.5 Enzymová hydrolýza.....	19
1.4.6 Kombinovaný způsob.....	20
1.5 Aplikace keratinových hydrolyzátů.....	21
1.5.1 Filmy a povlaky.....	21
1.5.2 Hnojiva a růstové stimulanty.....	21
1.5.3 Krmivo a aditivum krmných směsí.....	22
1.5.4 Kompozitní materiály.....	22
1.5.5 Lékařství a kosmetika.....	22
1.5.6 Vlákna.....	23
1.5.7 Další aplikace.....	23
2. CÍLE PRÁCE.....	24
3. PŘÍPRAVA KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ.....	25
3.1 Statistické plánování a vyhodnocování pokusů.....	25
3.2 Materiály a metody.....	26
3.2.1 Metody stanovení.....	26
3.2.2 Vstupní materiál.....	27
3.2.3 Použité chemikálie.....	27
3.3 Hydrolytické zpracování.....	28
3.3.1 Odtučnění.....	28
3.3.2 Hydrolýza.....	28
3.4 Výsledky experimentů – alkalická hydrolýza.....	29
3.5 Výsledky experimentů – alkalicko-enzymová hydrolýza.....	32
3.6 Zhodnocení.....	42
4. CHARAKTERIZACE KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ.....	43
4.1 Stanovení distribuce molárních hmotností.....	43
4.1.1 Postup práce.....	43

4.1.2	Výsledky stanovení molárních hmotností.....	44
4.1.3	Zhodnocení.....	47
4.2	Složení a tepelné vlastnosti hydrolyzátů .....	48
4.2.1	Složení keratinových hydrolyzátů.....	48
4.2.2	Termogravimetrická analýza.....	50
4.2.3	Zhodnocení.....	50
4.3	Dialýza keratinových hydrolyzátů.....	51
4.3.1	Vliv teploty.....	51
4.3.2	Vliv výměny média .....	52
4.3.3	Vliv doby .....	52
4.3.4	Zhodnocení.....	53
4.4	Příprava zásobního množství keratinového hydrolyzátu.....	53
5.	FILMY Z KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU .....	55
5.1	Postup přípravy filmů .....	55
5.2	Sledování vlivu obsahu změkčovadla.....	57
5.3	Vlastnosti filmů.....	58
5.3.1	Diferenciální skenovací kalorimetrie .....	58
5.3.2	Termogravimetrická analýza.....	59
5.3.3	Infračervená spektroskopie.....	62
5.3.4	Sledování rozpustnosti filmů.....	63
5.3.5	Složení filmů .....	63
5.3.6	Zhodnocení.....	64
6.	KERATINOVÝ HYDROLYZÁT VE SMĚSI SE SYNTETICKÝMI POLYMERY .....	65
6.1	Výchozí suroviny .....	65
6.2	Příprava kompozitů na bázi PE/KH.....	65
6.3	Vlastnosti kompozitů .....	66
6.3.1	Tahové zkoušky.....	66
6.3.2	Termogravimetrická analýza.....	67
6.3.3	Diferenciální skenovací kalorimetrie .....	69
6.3.4	Polarizační mikroskopie.....	71
6.4	Zhodnocení .....	74
7.	KERATINOVÝ HYDROLYZÁT JAKO NOSIČ LÁTEK.....	75
7.1	Příprava kapslí .....	75
7.2	Rozpouštění kapslí.....	75
7.3	Zhodnocení .....	77
8.	PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI.....	78
	ZÁVĚR.....	79
	LITERATURA .....	81
	SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA.....	90
	CURRICULUM VITAE.....	92
	PŘÍLOHA .....	93

## SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1 – Aminokyselinové složení keratinů .....</i>	<i>12</i>
<i>Tabulka 2 – Analytické složení surové vlny.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabulka 3 – Podmínky a výsledky rozkladu ovčí vlny v prvním stupni hydrolyzy .....</i>	<i>29</i>
<i>Tabulka 4 – Hodnoty statistických ukazatelů pro alkalickou hydrolyzu.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabulka 5 – Podmínky a výsledky rozkladu ovčí vlny dvoustupňovou alkalicko-enzymovou hydrolyzou v prostředí KOH a K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> s enzymem Savinase 6.0T.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabulka 6 – Hodnoty statistických ukazatelů pro alkalicko-enzymovou hydrolyzu v prostředí 0,3% KOH a K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> s enzymem Savinase 6.0T .....</i>	<i>34</i>
<i>Tabulka 7 – Podmínky a výsledky rozkladu ovčí vlny dvoustupňovou alkalicko-enzymovou hydrolyzou v prostředí KOH s enzymem Savinase 6.0T.....</i>	<i>36</i>
<i>Tabulka 8 – Podmínky a výsledky rozkladu ovčí vlny dvoustupňovou alkalicko-enzymovou hydrolyzou v prostředí Ca(OH)<sub>2</sub> s enzymem Esperase 6.0T .....</i>	<i>36</i>
<i>Tabulka 9 – Hodnoty statistických ukazatelů pro alkalicko-enzymovou hydrolyzu v prostředí KOH – Savinase 6.0T a Ca(OH)<sub>2</sub> – Esperase 6.0T .....</i>	<i>38</i>
<i>Tabulka 10 – Podmínky a výsledky rozkladu ovčí vlny dvoustupňovou alkalicko-enzymovou hydrolyzou v prostředí Ca(OH)<sub>2</sub> s enzymy Esperase 6.0T a Everlase 6.0T.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabulka 11 – Hodnoty statistických ukazatelů pro alkalicko-enzymovou hydrolyzu v prostředí Ca(OH)<sub>2</sub> s enzymy Esperase 6.0T a Everlase 6.0T.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabulka 12 – Výsledky analytických stanovení u vybraných hydrolyzátů .....</i>	<i>49</i>
<i>Tabulka 13 – Pokles obsahu popelovin při různých teplotách provádění dialýzy.....</i>	<i>52</i>
<i>Tabulka 14 – Seznam a složení připravených filmů z KH pro další analýzy .....</i>	<i>55</i>
<i>Tabulka 15 – Výsledky analýzy vybraných filmů .....</i>	<i>64</i>
<i>Tabulka 16 – Vlastnosti polyethylenů Liten BB 10 a Bralen RB 2-62 .....</i>	<i>65</i>
<i>Tabulka 17 – Výsledky tahových zkoušek.....</i>	<i>66</i>
<i>Tabulka 18 – Výsledky stanovení krystalinity .....</i>	<i>71</i>

# SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1 – Sekundární struktura keratinových molekul .....</i>	<i>13</i>
<i>Obrázek 2 – Struktura vlákna vlny .....</i>	<i>14</i>
<i>Obrázek 3 – Reakce cystinových zbytků při alkalické hydrolýze .....</i>	<i>16</i>
<i>Obrázek 4 – Vrstevnicové diagramy alkalické hydrolýzy ovčí vlny v prostředí 0,1% a 0,3% KOH .....</i>	<i>30</i>
<i>Obrázek 5 – Vrstevnicové diagramy alkalické hydrolýzy ovčí vlny v prostředí 0,1% a 0,3% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> .....</i>	<i>30</i>
<i>Obrázek 6 – Paretovy diagramy statistické významnosti faktorů alkalické hydrolýzy ..</i>	<i>32</i>
<i>Obrázek 7 – Vrstevnicové diagramy hydrolýzy ovčí vlny v prostředí 0,3% KOH s enzymem Savinase 6.0T .....</i>	<i>33</i>
<i>Obrázek 8 – Vrstevnicové diagramy hydrolýzy ovčí vlny v prostředí 0,3% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> s enzymem Savinase 6.0T .....</i>	<i>34</i>
<i>Obrázek 9 – Paretovy diagramy statistické významnosti faktorů alkalicko-enzymové hydrolýzy v prostředí 0,3% KOH a K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> s enzymem Savinase 6.0T .....</i>	<i>35</i>
<i>Obrázek 10 – Vrstevnicové diagramy hydrolýzy ovčí vlny v prostředí KOH s enzymem Savinase 6.0T .....</i>	<i>37</i>
<i>Obrázek 11 – Vrstevnicové diagramy hydrolýzy ovčí vlny v prostředí Ca(OH)<sub>2</sub> s enzymem Esperase 6.0T .....</i>	<i>38</i>
<i>Obrázek 12 – Paretovy diagramy statistické významnosti faktorů alkalicko-enzymové hydrolýzy v prostředí KOH – Savinase 6.0T a Ca(OH)<sub>2</sub> – Esperase 6.0T .....</i>	<i>39</i>
<i>Obrázek 13 – Vrstevnicové diagramy hydrolýzy ovčí vlny v prostředí Ca(OH)<sub>2</sub> s enzymem Esperase 6.0T .....</i>	<i>40</i>
<i>Obrázek 14 – Vrstevnicové diagramy hydrolýzy ovčí vlny v prostředí Ca(OH)<sub>2</sub> s enzymem Everlase 6.0T .....</i>	<i>41</i>
<i>Obrázek 15 – Paretovy diagramy statistické významnosti faktorů alkalicko-enzymové hydrolýzy v prostředí Ca(OH)<sub>2</sub> s enzymy Esperase 6.0T a Everlase 6.0T .....</i>	<i>42</i>
<i>Obrázek 16 – Elektroforeogramy vzorků připravených dle podmínek A .....</i>	<i>44</i>
<i>Obrázek 17 – Elektroforeogramy vzorků připravených dle podmínek C .....</i>	<i>45</i>
<i>Obrázek 18 – Elektroforeogramy vzorků připravených dle podmínek D .....</i>	<i>46</i>
<i>Obrázek 19 – Elektroforeogramy vzorků připravených dle podmínek E .....</i>	<i>46</i>
<i>Obrázek 20 – Elektroforeogramy vzorků připravených dle podmínek F .....</i>	<i>47</i>
<i>Obrázek 21 – TG křivky surové vlny a keratinového hydrolyzátu .....</i>	<i>50</i>
<i>Obrázek 22 – Závislost poklesu obsahu popelovin na době provádění dialýzy .....</i>	<i>53</i>
<i>Obrázek 23 – Fotografie vybraných filmů s 30 % glycerolu bez síťovadla, s DAS a GDA .....</i>	<i>56</i>
<i>Obrázek 24 – Fotografie vybraných filmů s 30 % glycerolu s DET, GOX a EPCH ....</i>	<i>56</i>
<i>Obrázek 25 – Fotografie filmu s 30 % glycerolu a 10 % DCE v ohybu .....</i>	<i>57</i>
<i>Obrázek 26 – DSC křivky filmů bez síťovadla a síťovaných 5 a 10 % GDA, DET a DAS .....</i>	<i>58</i>
<i>Obrázek 27 – DSC křivky filmů síťovaných 10 % EPCH, DCE a GOX .....</i>	<i>59</i>
<i>Obrázek 28 – TGA křivky nesíťovaného filmu a filmů s 5 a 10 % DAS .....</i>	<i>60</i>



<i>Obrázek 29 – TGA křivky nesíťovaného filmu a filmů s 5 a 10 % DET.....</i>	<i>61</i>
<i>Obrázek 30 – TGA křivky nesíťovaného filmu a filmů s 5 a 10 % GDA.....</i>	<i>61</i>
<i>Obrázek 31 – FTIR spektra vybraných filmů bez síťovadla, s DAS, s GDA a s DET... </i>	<i>62</i>
<i>Obrázek 32 – TG křivky vzorků KH, Litenu a jejich kompozitních směsí.....</i>	<i>67</i>
<i>Obrázek 33 – TG křivky vzorků KH, Bralenu a jejich kompozitních směsí .....</i>	<i>68</i>
<i>Obrázek 34 – DSC křivky Litenu a kompozitů s KH .....</i>	<i>69</i>
<i>Obrázek 35 – DSC křivky Bralenu a kompozitů s KH.....</i>	<i>70</i>
<i>Obrázek 36 – Struktura řezu Bralenu na polarizačním mikroskopu (zvětšení 100x) ...</i>	<i>71</i>
<i>Obrázek 37 – Struktura řezu Bralenu + 5 % KH na polarizačním mikroskopu (zvětšení 100x).....</i>	<i>72</i>
<i>Obrázek 38 – Struktura řezu Bralenu + 10 % KH na polarizačním mikroskopu (zvětšení 100x).....</i>	<i>72</i>
<i>Obrázek 39 – Struktura řezu Litenu na polarizačním mikroskopu (zvětšení 100x).....</i>	<i>73</i>
<i>Obrázek 40 – Struktura řezu Litenu + 5 % KH na polarizačním mikroskopu (zvětšení 100x).....</i>	<i>73</i>
<i>Obrázek 41 – Struktura řezu Litenu + 10 % KH na polarizačním mikroskopu (zvětšení 100x).....</i>	<i>74</i>
<i>Obrázek 42 – Kapsle z keratinového hydrolyzátu s kyselinou askorbovou .....</i>	<i>75</i>
<i>Obrázek 43 – Výsledky rozpouštění tablet z keratinového hydrolyzátu s aktivní látkou (kyselina askorbová) v čase.....</i>	<i>76</i>

## SEZNAM ZKRATEK

---

<b>Zkratka</b>	<b>Vysvětlení</b>
DAS	dialdehyd škrobu
DCE	ethylendichlorid, 1,2-dichlorethan
DET	diethylester kyseliny vinné
DSC	diferenciální skenovací kalorimetrie
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EPCH	epichlorhydrin, 1-chlor-2,3-epoxypropan
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GDA	glutardialdehyd, glutaraldehyd, pentan-1,5-dial
GOX	glyoxal, ethandial
HRMWM	high range molar weight marker, standard pro vysoké molární hmotnosti
kDa	kilo Dalton (1 Da = 1 g/mol)
KH	keratinový hydrolyzát
LDPE	nízkohustotní polyethylen
LRMWM	low range molar weight marker, standard pro nízké molární hmotnosti
PA	polyamid
PA6	polyamid 6
PE	polyethylen
PEO	polyethylenoxid
SDS	dodecylsulfát sodný
TGA	termogravimetrická analýza

---

# 1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Disertační práce popisuje možnosti zpracování odpadních keratinových materiálů (odpadní ovčí vlny) na rozpustné keratinové hydrolyzáty, jejich charakterizaci a možnosti dalšího využití těchto produktů pro průmyslové a zemědělské aplikace. Podle dostupných zdrojů je ve světě produkováno velké množství dále využitelných keratinových odpadů, které ale nejsou vždy využívány jako zdroj materiálu pro další zpracování a jsou ve většině případů neefektivně spalovány a skládkovány [2, 16]. Možnosti zpracování odpadních keratinů na dále využitelné hydrolyzáty byly studovány a popsány v průběhu posledních 50 let, kdy bylo vyzkoušeno velké množství způsobů zpracování keratinových materiálů. Několik těchto způsobů bylo vyzkoušeno také v poloprovozních nebo provozních podmínkách a následně patentováno, ale i přes to se žádný způsob více nerozšířil v praxi a nezajistil tak předpokládaný pokles produkce keratinových odpadů. Jedním z důvodů může být i to, že mnohé z těchto způsobů štěpení keratinových molekul, mají své nevýhody ať už v použití zdraví nebezpečných látek, energetické náročnosti, malé výtěžnosti nebo speciálních podmínkách reakcí. Dalším důvodem může být to, že ač jsou aplikační možnosti využití keratinových hydrolyzátů poměrně velké a různorodé, nebylo tomuto tématu zatím věnováno tolik pozornosti jako možnostem rozkladů keratinových odpadů. V posledních letech se však tento trend vyrovnává a začíná se více zkoumat možnost použití keratinových hydrolyzátů, připravených zejména enzymovým způsobem, proto je jen otázkou času, než se začne tento materiál více využívat v běžném životě. Pro další rozšíření aplikačního potenciálu keratinových hydrolyzátů by bylo potřeba vypracovat takovou metodu rozkladu keratinových molekul, při které by bylo použito mírných reakčních podmínek a běžných (levných) chemikálií, aby bylo dosaženo dobré výtěžnosti rozkladu, a zároveň, aby připravené keratinové materiály měly dobré vlastnosti a byly tak využitelné pro přípravu konkurenceschopných výrobků.

## 1.1 Keratin

Keratiny jsou skupinou látek, které jsou známy již dlouhou dobu a jejichž vlastnosti, složení a struktura byly již v minulosti důkladně popsány. Obecně nazýváme keratiny skupinu strukturálních proteinů vyskytujících se v kůži, chlupcích, nehtech, peří, vlně, kopytech, rozích a dalších částech těl většiny obratlovců [1-3]. Dále lze za keratiny označit nerozpustné proteiny s velkou odolností proti působení běžných proteolytických enzymů [4, 5], přičemž bylo této vysoké odolnosti a dobrých fyzikálně-mechanických vlastností využíváno lidmi již od dávných dob [6].

Jako všechny proteiny jsou také keratiny složeny z aminokyselin a mohou ve své molekule obsahovat až kolem 100000 aminokyselinových zbytků [7]. Keratiny slouží ve většině případů jako ochranný obal organismů [1]. Pro tyto

proteiny, patřící do skupiny keratinů, je typický vysoký obsah síry, která je většinou vázána v aminokyselinách cystein, cystin a methionin [1, 2, 4, 5]. Průměrné aminokyselinové složení keratinů je uvedeno v tabulce 1 a je odlišné jak u různých typů keratinu, tak i u různých zdrojů, z nichž keratinové materiály získáváme. Obsah dusíku se v keratinech pohybuje obvykle mezi 14–16 % a obsah síry bývá přibližně 2–5 % [2, 4, 5, 8-11].

*Tabulka 1 – Aminokyselinové složení keratinů*

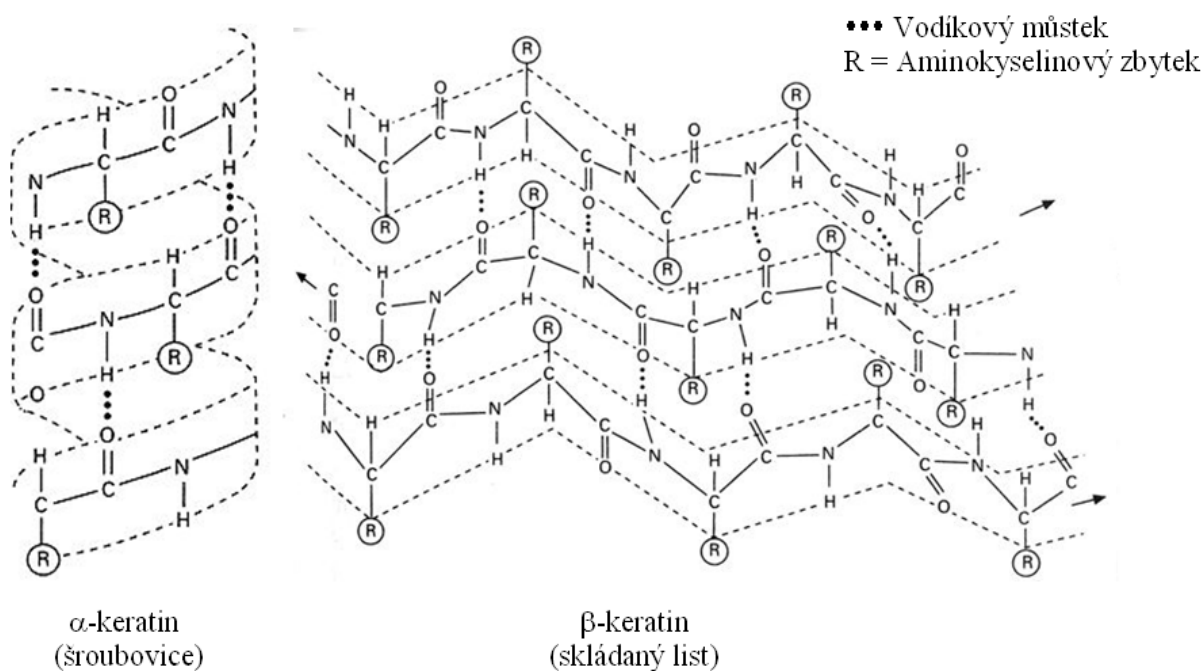
<b>Aminokyselina</b>	<b>Minimální zjištěný obsah (hm. %)</b>	<b>Maximální zjištěný obsah (hm. %)</b>
asparagin	2,4	7,0
kys. asparagová	4,4	7,6
glutamin	4,3	13,8
kys. glutamová	5,4	15,6
arginin	4,9	19,1
lysin	2,5	4,3
histidin	0,7	1,9
tryptophan	0,5	1,8
serin	7,9	11,7
threonin	4,7	6,9
tyrosin	1,2	5,9
cystein	0,1	10,8
thiocystein	0,1	0,1
kys. cysteinová	0,1	10,0
cystin	3,8	13,7
lanthionin	0,1	0,1
methionin	0,6	2,5
glycin	4,6	9,1
alanin	3,3	5,6
valin	4,2	6,2
prolin	5,1	9,6
leucin	5,9	8,1
isoleucin	2,4	4,5
phenylalanin	1,9	4,0

Jelikož jsou keratinová vlákna hustě zesíťovaná disulfidovými můstky, vodíkovými můstky a hydrofobními interakcemi mají velkou chemickou i mechanickou odolnost [2, 8, 12, 13]. Díky této velmi stabilní struktuře jsou keratiny odolné proti degradaci a jen velmi obtížně rozložitelné. Pro jejich úplný rozklad je nutné použít vysokých koncentrací roztoků chemikálií nebo vysoké teploty a tlaku. Keratiny jsou stejně jako další proteinové přírodní materiály poškozovány a částečně degradovány světlem (ultrafialovým i viditelným) a při této fotodegradaci dochází k řadě reakcí a změnám v aminokyselinovém složení

jednotlivých keratinových řetězců [14]. Podle vlnové délky světla, které dopadá na molekuly keratinu, dochází na vláknech nejčastěji ke žloutnutí nebo bělení. Při použití světla s krátkou vlnovou délkou (pod 375 nm) dochází v rámci degradační reakce ke žloutnutí a naopak při použití světla s větší vlnovou délkou (kolem 450 nm) vede degradační reakce k bělení [15]. Při těchto degradačních reakcích jsou nejčastěji fotodegradací změněny aminokyseliny tryptophan, cystin a tyrosin [14].

Jak již bylo uvedeno výše, mohou se keratiny jako všechny jiné proteiny lišit svou strukturou a aminokyselinovým složením také podle podmínek, kde byly vypěstovány [6]. Obecně můžeme keratiny rozdělit na tři typy  $\alpha$ -,  $\beta$ -, a  $\gamma$ -keratiny, které se od sebe odlišuje převážně primární a sekundární struktura molekul. Tyto tři typy keratinů se poté liší hlavně obsahem aminokyselin obsahujících síru, délkou řetězců a jejich vzájemným uspořádáním [1, 2]. Nejběžněji se keratiny vyskytují v sekundární struktuře jako  $\alpha$ -šroubovice a  $\beta$ -skládané listy (viz. Obrázek 1).

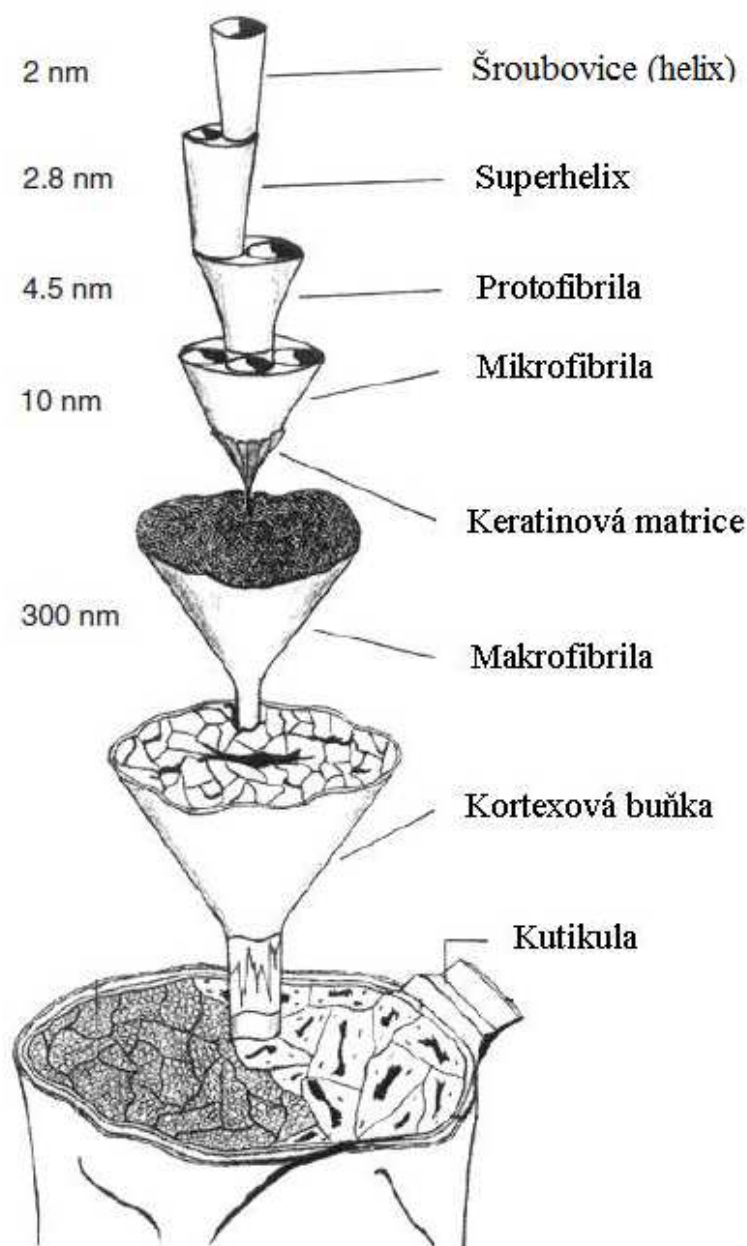
- $\alpha$ -keratiny jsou nejčastější složkou vlny, kůže, rohů a kopyt u savců, ale můžeme je nalézt i u ptáků a plazů. Jejich strukturu tvoří šroubovice zpevněné příčnými disulfidovými vazbami mezi zbytky siřných aminokyselin a vodíkovými můstky [1, 2].
- $\beta$ -keratiny jsou typické strukturou skládaného listu a můžeme je nalézt u ptáků a plazů v peří, pařátech, zobácích a šupinách [1, 2].
- $\gamma$ -keratiny nazýváme globulární nízkomolekulární proteiny (do 15 kDa) s vysokým obsahem síry, které nejčastěji slouží jako spojovací materiál v keratinových vláknech pro tvorbu makrofibril vlny, vlasů a srsti [8].



Obrázek 1 – Sekundární struktura keratinových molekul

## 1.2 Vlna

Vlna je přírodní nanokompozit složený z mikrovláken keratinu (mikrofibril) vzájemně spojených nízkomolekulární matricí. Keratinové mikrofibrily jsou pak složeny z dlouhých keratinových molekul s  $\alpha$ -strukturou s nízkým obsahem síry a naopak nízkomolekulární matrice je složena z krátkých globulárních molekul  $\gamma$ -keratinů s vysokým obsahem síry. Obvyklá délka vlněných vláken je mezi 5 až 50 cm a jejich průměr bývá mezi 20 až 40  $\mu\text{m}$ . Hustota vlny je přibližně  $1,3 \text{ g/cm}^3$ . Mezi atomy, které jsou nejvíce zastoupené ve vlně, patří uhlík (50–52 hm. %), vodík (6,5–7,5 hm. %), kyslík (22–25 hm. %), dusík (16–17 hm. %) a síra (3–4 hm. %) [17].



Obrázek 2 – Struktura vlákna vlny

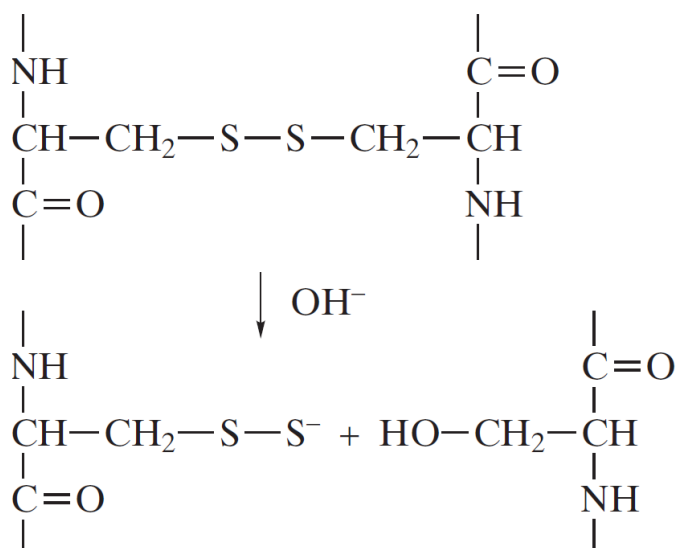
Kromě keratinových vláken, která jsou hlavní složkou vlny, obsahuje vlněné vlákno ještě tuk (lanolin), absorbovanou vodu, pot a asi 0,5 hm. % anorganických nespalitelných látek (popelovin). Obsah lanolinu se liší podle plemene a původu ovce a většinou se pohybuje mezi 2–15 hm. %. Absorbovaná voda je velmi důležitým faktorem ovlivňujícím většinu fyzikálních vlastností vlněných vláken. Při standardních podmínkách, kterými jsou 60% vzdušná vlhkost a 20°C, bývá množství absorbované vody mezi 14 až 18 hm. % [17].

Každé keratinové vlákno, ať už jde o vlnu, vlasy nebo srst, je z morfologického hlediska složeno ze dvou odlišných částí (viz. Obrázek 2). Vnější ochranu vláken tvoří kutikula, což je soustava téměř obdélníkových listů poskládaných přes sebe (jako střešní tašky). Rozměry těchto listů se pohybují mezi 20–30  $\mu\text{m}$  s tloušťkou kolem 0,6  $\mu\text{m}$ . Vnější kutikula tvoří asi 6–16 hm. % z celého vlákna. Keratinové molekuly v kutikule mají vysoký obsah síry (až 35 hm. %), a proto je jejich zesíťování velmi husté a tvoří tak velmi dobrou a odolnou ochranu proti vnějším vlivům [17].

Část vláken pod vnějším obalem (asi 90 hm. %) tvoří kortex, který je poskládan z fibril spojených keratinovou maticí. Délka kortexových buněk je asi 45–95  $\mu\text{m}$  a jejich tloušťka se pohybuje mezi 2–6  $\mu\text{m}$ . Každá kortexová buňka se skládá z 5 až 20 makrofibril a každá makrofibrila z 500 až 800 mikrofibril. Mikrofibrily jsou složeny z devíti protofibril, které jsou složeny ze dvou superhelixů. Superhelixem se nazývá dvojice vzájemně stočených  $\alpha$ -šroubovic keratinu (viz. Obrázek 1) [17].

Keratinové molekuly jsou stabilní a odolné proti působení chemikálií, nejsou však úplně nereaktivní a v různých roztocích chemikálií reagují aminokyselinové zbytky různými způsoby. Pro přípravu keratinových hydrolyzátů jsou důležité zvláště reakce, při nichž dochází ke štěpení keratinových molekul ať už v peptidové vazbě tak také v disulfidových můstcích. Při reakci keratinových řetězců se silnými kyselinami dochází ke štěpení peptidové vazby a k tvorbě  $-\text{COO}^-$  a  $-\text{NH}_4^+$  iontů. Interakce těchto vzniklých iontů hrají důležitou roli při stabilizaci struktury proteinu v okolí izoelektrického bodu (při pH kolem 6,5). Dlouhodobé vystavení keratinových molekul působení silných kyselin vede k hydrolýze peptidové vazby a amidických skupin, uvolňování amoniaku a tvorbě dodatečných karboxylových skupin. Během hydrolýzy silnými kyselinami je zcela zničena aminokyselina tryptophan a výrazně klesá také množství serinu, threoninu a tyrosinu. Částečně je poté oxidován cystin na kyselinu cysteinovou a cystein, čímž dochází také k částečnému rozštěpení disulfidových můstků [17].

Pro zpracování keratinu je lepší využít alkalických roztoků, které degradují keratin při nižších koncentracích a teplotách než kyselé roztoky. Podobně jako u roztoků kyselin se při alkalické reakci hydrolyzuje peptidová vazba. Alkalickou hydrolýzou dochází také k rozštěpení disulfidických můstků dle následující reakce (viz. Obrázek 3) [17]. Alkalickou hydrolýzou je zcela zničen cystin a úbytek lze pozorovat také u aminokyselin argininu, histidinu a serinu.



Obrázek 3 – Reakce cystinových zbytků při alkalické hydrolýze

Pevná zesíťovaná struktura keratinových molekul je velmi odolná proti působení běžných proteolytických enzymů. Proto je pro enzymové zpracování keratinu lepší předzpracovat keratin v roztoku alkálie, oxidačním nebo redukčním činidlem. Pro zvýšení účinnosti enzymové hydrolýzy je také možné použít více různých enzymů najednou [17].

Pro zpracování vlny oxidačním způsobem se využívá toho, že tyrosin, cystin a cystein jsou velmi náchylné k oxidaci, v průběhu které se mění aminokyselinové složení tak, že značná část těchto aminokyselin je oxidována na jinou sloučeninu. Nejčastějším oxidačním zpracováním keratinu je sulfitolýza, při které je značná část disulfidových můstků rozštěpena. Obdobně probíhá také redukční štěpení disulfidových můstků keratinu, ke kterému dochází nejčastěji reakcí s ionty thiolu. Redukce probíhá většinou mezi cystinovými zbytky a má za následek rozštěpení disulfidických vazeb mezi řetězci keratinu [17].

### 1.3 Keratinové odpady

Zemědělství i průmysl vytváří každý den mnoho tun keratinových odpadů. Mezi největší producenty těchto odpadů patří potravinářský (zejména masozpracující), textilní a kožedělný průmysl. Největší část ze všech keratinových odpadů tvoří peří z jatek a drůbežáren. Peří zaujímá asi 5–10 % hmotnosti drůbeže, tzn., že např. z jatek, které každý den zpracují 50000 kuřat, vzniknou 2–3 tuny odpadu denně. Každý rok je pak ve světě vyprodukováno více než 770000 tun peří jako odpadu z drůbežářských farem a jatek [16]. Druhou největší částí keratinových odpadů je vlna, která není zpracována v textilním průmyslu pro své nevyhovující vlastnosti a také vlna od drobných chovatelů, která je z ekonomických důvodů těžko obchodovatelná. Ročně je vyprodukováno ve světě kolem 1,5 mil. tun vlny. Největšími producenty vlny jsou Austrálie, Nový Zéland, Čína a Rusko [17]. Značná část této vlny je pro své nevyhovující mechanické nebo fyzikální vlastnosti vytřídění a stává se tak



odpadem. Tyto odpady pak končí nejčastěji na skládkách nebo ve spalovnách. Celkově je ve světě vyprodukováno přes 5 milionů tun keratinových odpadů ročně [2].

## 1.4 Hydrolytické štěpení keratinu

Principem přípravy rozpustných keratinových hydrolyzátů je vždy rozštěpení disulfidových a peptidových vazeb. Tím se dosáhne lepší zpracovatelnosti původně dlouhých keratinových molekul. Toto zpracování na keratinové hydrolyzáty pak lze provádět mnoha různými způsoby.

### 1.4.1 Alkalická hydrolýza

Jedním z nejstarších způsobů přípravy rozpustných frakcí keratinových materiálů je zpracování alkalickou metodou. Při použití roztoků hydroxidů s vyššími koncentracemi spolu s vysokou teplotou můžeme dosáhnout až 100% konverze nerozpustného keratinu na keratinové hydrolyzáty. Tento způsob přípravy popisuje např. Abouheif a kol., kteří alkalicky rozkládali vlnu a peří v roztocích NaOH o koncentracích až 12% za varu [18]. Bylo zjištěno, že při takovýchto podmínkách hydrolýzy se mění aminokyselinové složení hydrolyzátů a klesá obsah dusíku. U takto připravených hydrolyzátů lze předpokládat vysoký obsah popelovin a nízkou molekulovou hmotnost hydrolyzátů. Podobným způsobem připravovala keratinové hydrolyzáty Cardamone, která vlnu rozkládala v 0,5M roztoku NaOH při 60°C [19]. Také u těchto hydrolyzátů byla zjištěna nízká molekulová hmotnost 6,5–20 kDa. Alkalického rozkladu peří v 1M roztoku NaOH využili také Kawahara a kol., kteří po třech hodinách při 70°C rozpustili 55% keratinu a získali hydrolyzát s molekulovou hmotností kolem 30 kDa [20]. Jiného způsobu alkalické hydrolýzy použili Gousterova a kol., kteří hydrolyzovali odpad vlny i s kůží v roztoku 0,15M KOH a 0,05M NaOH za ohřevu mikrovlnami a dosáhli tímto způsobem více než 70 % hydrolýzy původního materiálu. V tomto materiálu pak byly společně obsaženy jak hydrolyzáty keratinu tak hydrolyzáty kolagenu [21]. Dalším vyzkoušeným způsobem alkalické hydrolýzy je rozklad keratinových materiálů v roztocích  $\text{Ca(OH)}_2$ , který popsal Coward-Kelly a kol. ve svých pracích. Tímto způsobem rozložili až 95 % původního materiálu, ovšem pouze za teplot kolem 150°C. Také u tohoto způsobu hydrolýzy lze očekávat vyšší obsah popelovin v hydrolyzátech a u těchto hydrolyzátů byl také zjištěn úbytek některých aminokyselin [22, 23]. Lze předpokládat, že pro alkalickou hydrolýzu by bylo možné použít i jiné alkalické roztoky než výše popsání. Účinnost této hydrolýzy by poté zřejmě narůstala s vyšší koncentrací alkálie nebo vyšší teplotou hydrolýzy.

### 1.4.2 Kyselá hydrolýza

Obvyklým využitím kyselé hydrolýzy keratinových materiálů je pro přípravu vzorků pro další analytické stanovení. Z důvodů poměrně vysoké odolnosti keratinových materiálů proti působení kyselin je nutné využívat vysoké koncentrace roztoků použitých při zpracování kyselou hydrolýzou [17]. Touto problematikou se poměrně podrobně zabývali Kurbanoglu a kol., kteří kyselou hydrolýzou keratinových materiálů připravovali vstupní materiál pro své další experimenty [24-30]. Kyselá hydrolýza probíhala v silných roztocích kyselin (6M HCl a 3M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) nejdříve při teplotě 70°C a po následném zředění destilovanou vodou pokračovala hydrolýza při 130°C. Po ukončení hydrolýzy bylo upraveno pH na 7 přidáním 10M roztoku NaOH. Tímto způsobem dokázali rozložit více než 85 % původního materiálu [24]. Odlišný způsob kyselé hydrolýzy byl popsán Jou a kol., kteří hydrolyzovali chlupy v 20,5% roztoku HCl při zahřívání mikrovlnným zářením [31]. Tímto způsobem rozložili všechny keratinový materiál a zjistili, že použití mikrovlnného ohřevu v kombinaci s kyselou hydrolýzou urychluje rozklad keratinu [31].

### 1.4.3 Redukční způsob

Metodiku rozkladu keratinu redukčními činidly podrobně popsali Schrooyen a kol., kteří vedle postupu přípravy keratinových hydrolyzátů uvádějí také např. jejich následné zpracování a vlastnosti [32-36]. Při redukčním způsobu hydrolýzy, který navrhli a vyzkoušeli, byly disulfidové vazby hydrolyzovány roztokem 2-merkptoethanolu v prostředí močoviny, ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA) a pufru. Tímto způsobem bylo rozloženo téměř 80 % původního keratinového materiálu [32]. Podobný způsob přípravy popsal Gennadios pro přípravu keratinových filmů [37] a také Reichl, který redukčním způsobem připravoval keratinové hydrolyzáty pro přípravu filmů využitelných v lékařství [38].

### 1.4.4 Oxidační způsob

Oxidační způsob přípravy keratinových hydrolyzátů je obdobný redukčnímu, jedinou změnou je použití specifického oxidačního činidla, což vede k reakci, při které jsou disulfidové vazby oxidovány ionty obsahujícími síru (např. SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, S<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>2-</sup>). Při použití těchto oxidačních činidel se tomuto způsobu říká sulfitolýza, která je používána pro úpravu vlněných vláken v textilním průmyslu [17]. Tohoto způsobu rozkladu keratinu použili také Vasconcelos a kol., kteří rozkládali vlnu ve směsi 8M roztoku močoviny, 0,2M roztoku dodecylsulfátu sodného (SDS) a 0,5M roztoku Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [39]. Stejný postup zvolili také Katoh a kol.; použili směs močoviny, SDS a Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> a hydrolyzovali v této směsi vlnu při 100°C [40]. Po hydrolýze, následném přečištění hydrolyzátu dialýzou a vysušení ve sprejové sušárně získali šedobílý prášek keratinového hydrolyzátu s částicemi menšími než 10 μm [40].

### 1.4.5 Enzymová hydrolýza

Jedním z nejpoužívanějších způsobů hydrolýzy keratinu se v posledních letech stává rozklad použitím enzymů (proteinázy nebo keratinázy), které jsou produkovány nejčastěji bakteriemi nebo houbami. Alkalické proteinázy jsou nejčastěji využívané enzymy pro průmyslové aplikace, celkem zaujímají mezi 40–60 % trhu s enzymy [13, 41]. Velkou výhodou enzymatických postupů jsou velmi mírné reakční podmínky hydrolýzy a také malé množství dávkovaných enzymů. Nevýhodou na druhou stranu je občas složitá práce s bakteriemi a udržování stálého reakčního prostředí. Další nevýhodou může být také vysoká cena enzymů připravených pro hydrolýzu keratinu. Posledním negativem, které je třeba zmínit je poměrně dlouhý čas reakcí (3–7 dnů) oproti např. kyselé nebo alkalické hydrolýze. Mezi nejčastěji využívané bakterie pro přípravu enzymů pro hydrolýzu keratinových materiálů jsou bakterie z rodů *Bacillus* a *Streptomyces* [42].

Základ provedení enzymové hydrolýzy je u všech autorů podobný, způsob rozkladu se většinou liší jen použitým druhem bakterií (a tedy jiným enzymem) a dalších reakčních prostředků. Hydrolýza začíná nejprve tím, že keratinové materiály byly pomlety a odtučněny a poté smíchány s roztoky solí (popřípadě kvasnic a agaru). Následně, po vytemperování a případné úpravě pH, byly přidány kultury bakterií. Tato směs byla poté při nízké teplotě inkubována. Nakonec byla směs zfiltrována, popřípadě byly bakterie a enzymy inaktivovány změnou pH nebo zahřáním. Enzymovou hydrolýzu keratinu pomocí enzymu produkovaného bakteriemi *Bacillus* použil např. Grazziotin a kol., kteří takto rozkládali peří [16]. Pomleté peří smíchali s roztoky solí a přidali kulturu bakterií. Celou směs inkubovali při 30°C a pH 6 po dobu 7 dnů. Obdobného způsobu využili také Fakhfakh-Zouari a kol., kteří zkoumali možnosti růstu bakterií *Bacillus pumilus* A1 na keratinovém substrátu [43]. Dalším používaným druhem bakterií jsou *Bacillus licheniformis* PWD-1, které pro enzymový rozklad používali Wang a kol. [44] a také Lin a kol. [45]. Toto je jen část autorů, kteří se věnují rozkladu keratinu bakteriálně-enzymovým způsobem, existuje ještě mnoho dalších podobných způsobů enzymové hydrolýzy keratinu bakteriemi rodu *Bacillus* [13, 46, 47].

Druhým nejčastěji používaným rodem bakterií je rod *Streptomyces*. S těmito bakteriemi rozkládali keratinové materiály např. Hood a Healy již před více než 15 lety [3], když využili keratinolytické bakterie *Streptomyces fradiae* pro rozklad vlny a peří. Dalšími, kdo používali pro rozklad keratinu enzymy produkované bakteriemi *Streptomyces* jsou Syed a kol. [48], Tatineni a kol. [49], Chao a kol. [50] a Mabrouk [51].

Kromě výše zmíněných rodů bakterií, které jsou nejčastěji používány, lze pro enzymový rozklad keratinu využít také dalších rodů bakterií, jako jsou např. *Vibrio sp.* kr2, které vyzkoušel a popsal Grazziotin a kol. [52, 53]. Postup hydrolýzy byl proveden obdobně jako u ostatních autorů. Bylo zjištěno, že při použití těchto bakterií byl veškerý keratinový materiál rozložen po 5 dnech

kultivace [53]. Jiný možný způsob použili Yamauchi a kol., kteří popsali možnosti enzymové degradace keratinu proteinázou K z bakterií *Tritiachium album* [54]. Další možnost použití bakterií pro hydrolýzu keratinu popsali Khardenavis a kol. [41], kteří zdokumentovali využití enzymu produkovaného bakterií *Serratia sp.* HPC 1383. Možnosti využití bakterie *Chryseobacterium sp.* kr6 pro rozklad keratinových materiálů popsali Brandelli a Riffel, kde také uvádějí, že největší aktivitu má produkovaný enzym při 30°C a pH mezi 6 a 8 [55]. Ereemeev a kol. použili pro rozklad keratinu enzymovou hydrolýzou *Acremonium chrysogenum* [56]. Tímto způsobem získali keratinový hydrolyzát a také zjistili, že nejvyšší aktivity enzym dosahoval při pH kolem 9 a teploty kolem 55°C. Další odlišný způsob použili Vasileva-Tonkova a kol., kteří rozkládali peří enzymem produkovaným bakteriemi *Thermoactinomyces* [57]. V této práci bylo zjištěno, že nejvíce keratinu se rozpustí při inkubaci po dobu 72 hodin při pH kolem 8, a to až 56%.

Jak již bylo dříve zmíněno, kromě použití bakterií je pro rozklad keratinu možné použít také enzymy produkované houbami a plísněmi což popsali např. Kaul a Sumbali, kteří použili pro rozklad keratinového materiálu enzym produkovaný houbami [58].

#### 1.4.6 Kombinovaný způsob

Jako jeden z prostředků pro zvýšení výtěžnosti rozkladu keratinových materiálů při nižších reakčních podmínkách může být využití kombinace výše zmíněných postupů hydrolýzy. Jako nejúčinnější se jeví využití alkalické a enzymové hydrolýzy, jelikož keratinové materiály v alkáliích botnají a rozpouštějí se snadněji než v jiných roztocích a již nízké koncentrace těchto alkalických roztoků naruší strukturu keratinových materiálů a tím zjednodušují a zrychlují následnou enzymovou hydrolýzu keratinových řetězců [17]. Druhou výhodou je, že existuje mnoho proteolytických a keratinolytických enzymů, které pracují v alkalické oblasti [41, 49, 51, 53]. Tohoto způsobu hydrolýzy využil pro svůj výzkum Dalev [59], který keratinové materiály hydrolyzoval v prvním stupni v 0,3M roztoku NaOH při 80°C a následně po úpravě pH přidal proteinázu B72 pracující v alkalické oblasti a rozkládal keratin enzymaticky při 55°C. Při těchto mírných podmínkách rozložil po 2,5 hodinách hydrolýzy téměř 50 % z původního materiálu. Možnou nevýhodou tohoto postupu může být obtížnější práce při použití bakterií produkujících proteinázu B72.

Jiným používaným způsobem kombinované hydrolýzy je předúprava keratinového materiálu ve směsi oxidačních činidel a následné štěpení enzymy. Tento způsob přípravy keratinových hydrolyzátů byl popsán Borem a Arnaudem, kteří nejdříve v prvním kroku hydrolyzovali disulfidové vazby  $\text{SO}_3^{2-}$  ionty a poté, po vyprání, v druhém kroku již částečně zhydrolyzované keratinové molekuly dále zpracovávali v roztoku proteinázy [60]. Podobný způsob popsal také Savolainen, který opět v prvním kroku použil oxidační

sulfitolýzu  $\text{SO}_3^{2-}$  ionty a poté po úpravě pH přidal proteinázu a pokračoval hydrolyzou enzymy [61].

## **1.5 Aplikace keratinových hydrolyzátů**

Keratin a keratinové hydrolyzáty mohou najít a nacházejí své uplatnění v širokém spektru různých odvětví průmyslu. Kromě méně častých využití jako aditiv při přípravě betonu a keramiky jsou keratinové hydrolyzáty využívány např. v zemědělství, kosmetice, lékařství a potravinářském průmyslu [62].

### **1.5.1 Filmy a povlaky**

Z různých keratinových hydrolyzátů lze poměrně jednoduchým způsobem připravit filmy a povlaky využitelné v zemědělství i průmyslu [37]. Pro přípravu filmů je k roztoku hydrolyzátů nutné přidat změkčovač (glycerol, sorbitol), protože keratinové filmy bez změkčovačů jsou příliš křehké. Pro dosažení lepších mechanických vlastností lze filmy a povlaky síťovat např. teplem nebo působením síťovacích činidel (formaldehyd, glutaraldehyd). Při tomto síťování dochází k obnově části příčných vazeb mezi řetězci keratinu a tím ke stabilizaci jejich struktury [17, 37]. Filmy a povlaky z rozpustných keratinových hydrolyzátů se připravují nejčastěji litím z vodných roztoků. Keratinový hydrolyzát je nejprve rozpuštěn ve vodě, do tohoto roztoku je poté přidáno změkčovač a popř. síťovač. Následně je směs homogenizována a vylita na podložku nebo do formy, kde je poté přebytečná voda odpařena. Připravené filmy jsou nerozpustné ve většině běžně používaných organických rozpouštědel. Na DSC křivkách těchto filmů je patrný endotermní pík při teplotách kolem 250–270°C související zřejmě se změnou krystalické fáze (tání) keratinu. Tloušťky takovýchto filmů se pohybují kolem 50  $\mu\text{m}$  a mají poměrně dobré mechanické vlastnosti, navíc jsou úplně biologicky rozložitelné [37]. Tyto biodegradabilní filmy se využívají v potravinářství, zemědělství a obalovém průmyslu [63].

### **1.5.2 Hnojiva a růstové stimulanty**

Jedno z nejvíce rozšířených použití keratinových hydrolyzátů je aplikace jako dusíkatých hnojiv a růstových stimulantů v zemědělství [53, 67]. Hydrolyzáty mají vysoký obsah dusíku (kolem 15 %) což z nich činí velmi dobrý a levný zdroj tohoto prvku. Další jejich výhodou je, že jsou biologicky rozložitelné a také přípravou hydrolyzátů s různou rozpustností lze usměrnit dávkování a uvolňování dusíku do půdy [23, 63]. Pokud je navíc hydrolyzát připraven např. alkalickou hydrolyzou v KOH a následně zneutralizován kyselinou fosforečnou, budou ve výsledném hnojivu obsaženy i další potřebné draselné a fosforečné ionty [68].

### 1.5.3 Krmivo a aditivum krmných směsí

Keratinové materiály obsahují i po hydrolýze velké množství proteinů a esenciálních aminokyselin, čehož může být využíváno pro přípravu krmiv a aditiv do krmných směsí pro dobytek a další hospodářské zvířata [41, 52, 69-71]. Tento typ krmiva je ovšem v některých částech světa zakázán (včetně EU) z obavy šíření některých nemocí (např. ptačí a prasečí chřipka, BSE) [21]. V některých státech Asie nebo Afriky se však tyto keratinové suplementy stále používají. Velkou výhodou krmiv z keratinových hydrolyzátů je jejich nízká cena a snadné zpracování. Často se v minulosti keratinové odpady zpracovávaly na tzv. keratinovou moučku, která se dále používala na příkrmování dobytka a drůbeže [70-73]. Tato moučka se vyráběla tak, že se keratinové odpady pomlely a společně zpracovávaly při vysokých teplotách a tlacích [21, 62, 63], kdy ovšem dochází ke značnému snížení obsahu některých aminokyselin (methionin, lysin, tryptophan) [43, 63]. Pro zpracování keratinových materiálů na krmivo pro dobytek nebo drůbež lze využít také enzymovou hydrolýzu keratinu, která není tak energeticky náročná než původní zpracování vysokou teplotou a tlakem, ale probíhá po delší dobu a vyžaduje stabilní prostředí pro hydrolýzu [72].

### 1.5.4 Kompozitní materiály

Keratinové materiály lze využít pro přípravu kompozitů jak mícháním se syntetickými [77, 78], tak s přírodními materiály [79, 80]. Touto problematikou se zabýval např. Barone, který popsal ve svém článku přípravu a vlastnosti PE kompozitů s keratinovými vlákny a zjišťoval jak keratinová vlákna ovlivňují krystalinitu polymerní matrice [77]. Aluigi a kol. připravovali kompozitní materiály z keratinových hydrolyzátů a PEO. Z těchto kompozitů poté vyráběli nanovlákna elektrospínáním [78]. Obdobným způsobem vyráběli Aluigi a kol. nanovlákna z keratinu a PA6 [93]. Z keratinových hydrolyzátů lze připravit také biodegradabilní kompozitní směsi např. z keratinu a acetátu celulózy, ze kterých lze připravit tenký průsvitný film s dobrými tahovými a tepelnými vlastnostmi a propustností pro vodní páru [79]. Další biokompozit popsal Wool, který se zabýval přípravou biologicky rozložitelných směsí ze sojového oleje a keratinu připraveného z peří [80]. Ve všech výše uvedených případech byl keratin použit jako aditivum nebo plnivo, ale lze jej také použít i jako polymerní matici, čehož se využívá např. pro přípravu kompozitů keratinu s oxidem chromitým využívaným v kožedělném průmyslu jako činidla [81].

### 1.5.5 Lékařství a kosmetika

Keratinové hydrolyzáty, kvůli své podobnosti s lidskou tkání mohou nacházet své uplatnění také v lékařství nebo kosmetickém průmyslu. Jedno z nejvíce popisovaných použití keratinových hydrolyzátů je při léčbě povrchových zranění jako odřenin, popálenin apod. jako látky pomáhající růstu nové kožní

tkáně. Toto využití popisuje např. Reichl, který používal keratinové hydrolyzáty pro přípravu filmů pro tkáňové inženýrství [38]. Podobné využití keratinových materiálů popsali také Yang a kol. [74]. Dalším z popsaných metod využití keratinových materiálů v lékařství testovali Li a kol., kteří připravili kompozitní materiál z kyseliny polymléčné a keratinu, a následně z tohoto materiálu připravili skelet pro kultivaci osteoblastů (kostní buňky) [75]. Podobně jako v lékařství mohou pomáhat keratinové hydrolyzáty také v kosmetických přípravcích pro ošetření poškozené pokožky nebo vlasů. Kvůli své příbuznosti s keratinem v kůži se proto používají jako složky přípravků pro péči o pokožku a vlasy [76].

### **1.5.6 Vlákna**

Další zdokumentovanou možností využití keratinových hydrolyzátů je kromě přípravy filmů a fólií také výroba vláken použitelných v textilním průmyslu, lékařství nebo pro technické aplikace jako je příprava kompozitů. Tyto vlákna je většinou nutné před finální aplikací vhodně modifikovat např. anhydridy kyselin nebo kyselinou mravenčí pro snížení krystalinity [64, 65]. Výsledné vlastnosti keratinových vláken jsou poté ovlivněny množstvím absorbované vlhkosti [66].

### **1.5.7 Další aplikace**

Kromě výše popsaných využití byly keratinové hydrolyzáty zkoušeny také pro další, méně používané aplikace. Jednou z méně běžných aplikací je možnost využití keratinových odpadů pro výrobu vodíku enzymovým rozkladem, který popsal Bálint a kol. [82]. Dalšími mohou být aplikace keratinových hydrolyzátů pro přípravu kultivačního substrátu pro produkci a regeneraci bakterií [83, 84] a také jako materiálu stabilizujícího nanočástice [85]. Mezi méně běžné aplikace můžeme zařadit také využití hydrolyzátů keratinu jako chelatačních činidel pro odstranění některých kovů z půdy. Tento experiment provedli Evangelou a kol. a zjistili, že za použití hydrolyzátů vlny lze odstranit až 65 % mědi a 5,5 % kadmia z půdy [86]. Keratinové hydrolyzáty připravené alkalickou hydrolyzou a následně použité pro úpravu lýkových vláken zvyšují tahové vlastnosti těchto vláken a to pevnost v tahu až o 40 MPa a prodloužení až o 4 % [20]. Hydrolyzáty připravené z peří mohou najít své uplatnění také v archeologii pro úpravu a stabilizaci vodou nasáklého dřeva [87, 88]. Dále mohou být roztoky keratinových hydrolyzátů využity jako enkapsulační látky pro dopravu a dávkování barviv, léčiv, hnojiv a dalších chemikálií [37].

## 2. CÍLE PRÁCE

Disertační práce si vytyčila tři hlavní cíle, týkající se zpracování odpadního keratinu na keratinové hydrolyzáty a jejich dalšího použití, kterým se budou věnovat následující kapitoly.

Prvním dílčím cílem bylo vyzkoušet a optimalizovat proces hydrolýzy odpadní ovčí vlny na keratinový hydrolyzát. Jako metoda zpracování byla vybrána dvoustupňová alkalicko-enzymová hydrolýza probíhající v roztocích alkálií s nízkou koncentrací a s přísávkou komerčně využívaných proteolytických enzymů. Optimalizace procesu byla provedena a vyhodnocována za použití statistických metod (faktorové pokusy, testování významnosti). Hlavním kritériem pro hodnocení jednotlivých pokusů bylo sledování účinnosti rozkladu původního materiálu a tedy množství získaného keratinového hydrolyzátu.

Druhým dílčím cílem této práce byla charakterizace připravených keratinových hydrolyzátů. U hydrolyzátů bylo zjišťováno jejich složení a distribuce molárních hmotností, kvůli následnému zhodnocení jejich vlastností v návaznosti na způsob provedení a výtěžnost hydrolýzy. Tyto zjištěné vlastnosti poté sloužily spolu s výsledkem účinnosti hydrolýzy k selekci jednoho způsobu přípravy keratinového hydrolyzátu, na kterém poté probíhal další výzkum aplikačního potenciálu.

Posledním vytyčeným cílem disertační práce bylo zhodnocení možností využití keratinového hydrolyzátu pro několik aplikací. Jako testované aplikace byly vybrány příprava filmů z keratinových hydrolyzátů, dále příprava kompozitních materiálů se syntetickými polymery a také možnost využití keratinových hydrolyzátů jako nosičů aktivních látek.



### 3. PŘÍPRAVA KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ

První část této disertační práce pojednává o přípravě keratinových hydrolyzátů z odpadní ovčí vlny. Nejprve se tato kapitola věnuje charakterizaci surové ovčí vlny, dále pak její předúpravě, hydrolýze a nakonec diskuzi výsledků jednotlivých pokusů. Výsledky uvedené v této kapitole byly publikovány ve dvou člancích v zahraničních časopisech (viz. Seznam publikací P1, P2), ve dvou člancích v českém recenzovaném časopise (viz. Seznam publikací P4, P5), dále na jedné mezinárodní konferenci (viz. Seznam publikací P15) a třech českých konferencích (viz. Seznam publikací P9, P10, P12).

#### 3.1 Statistické plánování a vyhodnocování pokusů

Množství rozloženého keratinu a také vlastnosti připravených keratinových hydrolyzátů ovlivňuje v průběhu hydrolýzy řada technologických podmínek a faktorů. Pro snadnější zjištění významných faktorů je možné použít statistické metody navrhování a vyhodnocování experimentů. Často používaným statistickým nástrojem jsou i faktorové pokusy, díky kterým lze snadno zjistit, které ze zvolených faktorů nám nejvíce ovlivňují sledovanou veličinu, aniž bychom museli provádět velké množství experimentů.

Experimenty hydrolýzy vlny byly proto naplánovány faktorovými pokusy  $2^3$  (3 sledované faktory na dvou úrovních – minimální a maximální) se dvěma opakováními ve středovém experimentu. Výsledky byly poté vyhodnoceny v programu Statgraphics 6.0 [92]. Pro plánování experimentů byly vždy vybrány tři faktory u nichž se sledoval vliv na množství rozložené vlny a jejich hodnota byla měněna, zbylé faktory byly konstantní. Vliv vybraných technologických podmínek na účinnost hydrolýzy byl vyhodnocován pomocí statistických ukazatelů: Fisherova testu, p-hodnoty a Paretova diagramu. Dále byly ve stejném programu vytvořeny vrstevnicové diagramy popisující množství rozložené vlny při různých hodnotách vybraných faktorů, a také rovnice křivek popisujících vliv experimentálních faktorů na množství rozložené vlny.

Fisherův test nám říká, že když F-hodnota zvoleného faktoru nebo interakce několika faktorů dosáhne vyšší hodnoty než je kritická hodnota  $F_{krit(1;3)}^{95\%} = 10,13$  (tabelární hodnota pro faktorové pokusy  $2^3$  s jedním opakováním pokusů [92]) mají tyto faktory statistickou významnost. Stejným způsobem se postupuje při vyhodnocení p-hodnot, které nám ukazují, že faktory s p-hodnotou nižší než  $\alpha = 0,05$  mají s 95% pravděpodobností vliv na množství rozložené vlny. Čím nižší je p-hodnota, tím větší je vliv faktoru. U paretových diagramů je pak statistická významnost faktorů a interakcí znázorněna graficky. Veškeré statistické výsledky byly zpracovány ve statistickém programu Statgraphics [92].

## 3.2 Materiály a metody

### 3.2.1 Metody stanovení

Mezi použité analytické stanovení patří stanovení obsahu dusíku, síry, popela, těkavých látek (sušiny) a tuků (pouze u surové vlny).

*Stanovení obsahu dusíku* bylo prováděno podle standardních metod AOAC 960.52 [89]. Principem metody je nejprve mineralizace vzorku v kyselině sírové a chlorovodíkové při teplotě nad 450°C a s přidavkem desetinásobného množství katalyzátoru. Dále následuje vydestilování navázaného amoniaku vodní parou do roztoku kyseliny borité a titrace kyselinou chlorovodíkovou na směsný indikátor. Ze zjištěného obsahu dusíku byl poté vynásobením faktorem 6,25 vypočítán celkový obsah bílkovin ve vzorku.

*Stanovení obsahu síry* bylo prováděno podle metodiky AOAC 955.48 [89]. Principem tohoto stanovení je mineralizace vzorku v koncentrované kyselině dusičné za varu a přidavku peroxidu vodíku. Vzniklé síranové ionty jsou poté vysráženy chloridem barnatým, odfiltrovány, vysušeny a zpopelněny. Po vyžhání při 700°C je gravimetricky zjištěn obsah síranů ve vzorku, který je následně přepočítán na obsah síry.

*Stanovení obsahu popela* se provádělo dle standardní metodiky ČSN ISO 2171 [96]. Principem je gravimetrické zjištění obsahu popela ve vzorku po jeho zpopelnění nad kahanem a následném vyžhání při 650°C.

*Stanovení obsahu těkavých látek* (stanovení *sušiny*) bylo prováděno dle metodiky uvedené v normě ČSN EN ISO 4684 [97]. Principem je vysušení vzorku při teplotě 103±2°C a gravimetrickém určení obsahu sušiny nebo těkavých látek.

*Stanovení obsahu tuků* bylo provedeno dle běžně užívané standardní metodiky zpracované v knize Davídek – Laboratorní příručka analýzy potravin [90]. Principem metody je extrakce tuků rozpouštědly za varu v Soxhletově extrakční aparatuře. Jako rozpouštědlo byla použita směs chloroformu a petroleteru (1:1).

*Termogravimetrická analýza* byla prováděna na přístroji TA TGA Q50 (TA Instruments, USA) v rozsahu teplot 25–500°C rychlostí ohřevu 10°C/min v inertní atmosféře dusíku s průtokem 40 ml/min.

*Diferenciální skenovací kalorimetrie* byla měřena na přístroji Mettler-Toledo DSC1 (Mettler-Toledo, USA) v teplotním režimu 25–300°C s rychlostí ohřevu 10°C/min. Vzorky byly zalisovány do hliníkových misek a zahřívány v pícce přístroje v inertní dusíkové atmosféře s průtokem dusíku 40 ml/min.

*Infračervená spektroskopie* byla měřena na přístroji Mattson Satellite (Mattson, USA) v absorpčním módu v rozsahu vlnočtů 500–4000 cm<sup>-1</sup> s 64 skeny.

### 3.2.2 Vstupní materiál

Vstupním materiálem pro práci byla surová odpadní ovčí vlna typu Merino získaná z jatek Přerov. Z odpadní vlny byly nejdříve odstraněny ručně nejhrubší nečistoty a poté byla vlna vyprána ve vodě pro odstranění drobnějších nečistot. Dále následovalo odstranění potu a části mastnoty vypráním vlny ve vodě s přidávkem saponátu. Následně byla vlna propírána vodou až do úplného vymizení saponátu. Poté byla vlna vysušena při  $80\pm 2^\circ\text{C}$  po dobu 24 hodin. Takto vyčištěná vlna byla dále zpracovávána ve dvou částech. První část vlny byla nejprve sušena při  $103\pm 2^\circ\text{C}$  8 hodin a byly na ní provedeny analytické zkoušky podle dále popsanych postupů. Druhá část vlny byla po vyčištění odtučněna pro další experimenty podle námi navrženého postupu.

Surová ovčí vlna používaná pro přípravu keratinových hydrolyzátů má analytické složení uvedené v tabulce 2. Sušina byla u surové vlny pouze 91,56 % což je způsobeno ochotou vlněných vláken přijímat vzdušnou vlhkost. Naopak obsah popela byl u vlny nízký a to 2,33 %. Dalším sledovaným parametrem byl obsah tuku v surové vlně, který byl stanoven na 8,18 %. Tento tuk musel být následně enzymaticky odstraněn pro bezproblémový průběh hydrolýzy, kde by tuk obsažený ve vlně mohl ovlivňovat její průběh. U surové vlny byl také zjištěn obsah dusíku 12,17 % což po vynásobení faktorem 6,25 značí celkový obsah bílkovin 76,06 %. Posledním stanovením bylo zjištění obsahu síry 2,51 %, která je obsažena v sirných aminokyselinách keratinu. Toto složení se nijak nevymyká obvyklému složení vlny popisované v odborné literatuře [17].

*Tabulka 2 – Analytické složení surové vlny*

<b>Stanovení</b>	<b>% obsah</b>	<b>Směrodatná odchylka (%)</b>
Sušina	91,56	0,13
Popel*	2,33	0,01
Tuk*	8,18	0,92
Dusík*	12,17	0,08
Síra*	2,51	0,28

\* vztaženo na sušinu

### 3.2.3 Použité chemikálie

Pro přípravu keratinových hydrolyzátů a jejich charakterizaci bylo využito velké množství speciálních přípravků i běžných chemikálií. V této kapitole budou popsány jen ty nejdůležitější materiály potřebné k výzkumu. Všechny běžné chemikálie byly dodány v analytické čistotě firmou IPL (Ing. Petr Lukeš, ČR). Původ speciálních chemikálií a přípravků je poté uveden v příslušné kapitole týkající se jejich použití v experimentech.

Enzymy pro odtučnění a hydrolýzu keratinu byly dodány firmou Novozymes (Dánsko). Lipex 100T je lipáza produkovaná submerzní fermentací geneticky

modifikovaného kmene *Aspergillus*. Savinase 6.0T, Type W je serinový typ proteinázy charakterizovaný výbornou účinností při vyšším pH, je produkována submerzní fermentací geneticky modifikovaného mikroorganismu *Bacillus*. Esperase 6.0T je serinový typ proteinázy charakterizovaný výbornou účinností při vyšší teplotě a pH, je produkována submerzní fermentací mikroorganismu *Bacillus*. Everlase je proteináza vytvořená proteinovým inženýrstvím produkována submerzní fermentací geneticky modifikovaného mikroorganismu *Bacillus*.

### 3.3 Hydrolytické zpracování

#### 3.3.1 Odtučnění

Vyčištěná vlna byla smíchána s vodou v poměru 1:50 (w/w) tak aby byla celá smáčena ve vodě. Následně bylo upraveno pH této směsi 5M roztokem NaOH na hodnotu  $\text{pH} = 8 \pm 0,1$ . Do připravené směsi byl poté dávkován lipolitycký enzym Lipex 100T v množství odpovídající 1 % navážky vlny. Vlna byla za občasného míchání odtučňována při  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  po dobu 24 hodin. Po odtučnění byla vlna třikrát proprána ve vodě a sušena při  $103 \pm 2^\circ\text{C}$  po dobu dalších 24 hodin.

Vysušená a odtučněná vlna byla pomleta na nožovém mlýně přes síto s velikostí ok 1 mm. Takto upravená vlna byla poté skladována v uzavíratelném sáčku v exsikátoru s vysušeným silikagelem.

#### 3.3.2 Hydrolýza

Rozklad odtučněné a pomleté vlny byl proveden metodou dvoustupňové alkalicko-enzymové hydrolýzy. Tato metoda byla vybrána kvůli nižším dávkám přidávaných chemikálií a tím lepším vlastnostem získaných hydrolyzátů.

V prvním stupni byla vlna vystavena působení slabých roztoků alkálií (KOH,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) za zvýšené teploty ( $60\text{--}90 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Koncentrace alkalických roztoků se pohybovala v rozmezí 0,1–0,6 hm. %. Doba trvání prvního stupně hydrolýzy byla volena mezi 6–48 hodinami, přičemž bylo vždy první čtvrtinu doby vzorkem intenzivně mícháno (1000 ot/min) a poté byl vzorek zbylou dobu inkubován při stejné teplotě bez míchání.

Po ukončení prvního stupně (alkalické hydrolýzy) byla ve směsi provedena úprava pH 5M roztokem NaOH na hodnotu  $\text{pH} = 9 \pm 0,1$  a směs byla ochlazená na teplotu  $40 \pm 5^\circ\text{C}$ . Ihned poté byl ke směsi přidán vybraný enzym v množství 1–5 hm. % (vztaženo na navážku suché vlny). Testovány byly enzymy Savinase 6.0T, Esperase 6.0T a Everlase 6.0T. Vzorky byly poté opět zahřívány při teplotě  $40\text{--}60 \pm 2^\circ\text{C}$  po zvolenou dobu 6–24 hodin. Stejně jako v prvním stupni hydrolýzy bylo se vzorky první čtvrtinu doby intenzivně mícháno a poté byly zbylou dobu inkubovány bez míchání.

Po ukončení hydrolýzy byl nejprve odfiltrován nerozložený podíl vlny přes 20 vrstev PA tkaniny (velikost ok 150  $\mu\text{m}$ ). Poté byl inaktivován enzym

zahřátím filtrátu (keratinový hydrolyzát) na teplotu  $85\pm 2^{\circ}\text{C}$  a zahříván při této teplotě 10 minut. Po ochlazení byly poslední zbytky nerozložené vlny odstředěny při 4000 ot/min po dobu 15 minut.

Kapalný keratinový hydrolyzát byl následně zahuštěn na vakuové odparce při  $60\pm 2^{\circ}\text{C}$  a poté dosušen v třecích miskách při stejné teplotě. Sušení hydrolyzátů probíhalo přibližně 48 hodin. Výjimkou byly experimenty hydrolyzy D, které byly sušeny při  $103\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Vysušený materiál byl poté rozdrcen v třecí misce na prášek a uchováván v uzavřené nádobě nebo sáčku v exsikátoru s přesušeným silikagelem při pokojové teplotě.

### 3.4 Výsledky experimentů – alkalická hydrolyza

V první části byly provedeny experimenty rozkladu vlny pouze v prvním stupni, tedy jen působením alkálií kvůli prvnímu seznámení s průběhem hydrolyzy a alespoň částečné počáteční optimalizaci jednotlivých faktorů hydrolyzy. Výsledky alkalické hydrolyzy jsou uvedeny níže v tabulce 3. Pro tento pokus byly sledovanými faktory koncentrace alkálie, teplota a doba hydrolyzy. Jako alkalické prostředí bylo vybráno KOH a  $\text{K}_2\text{CO}_3$ .

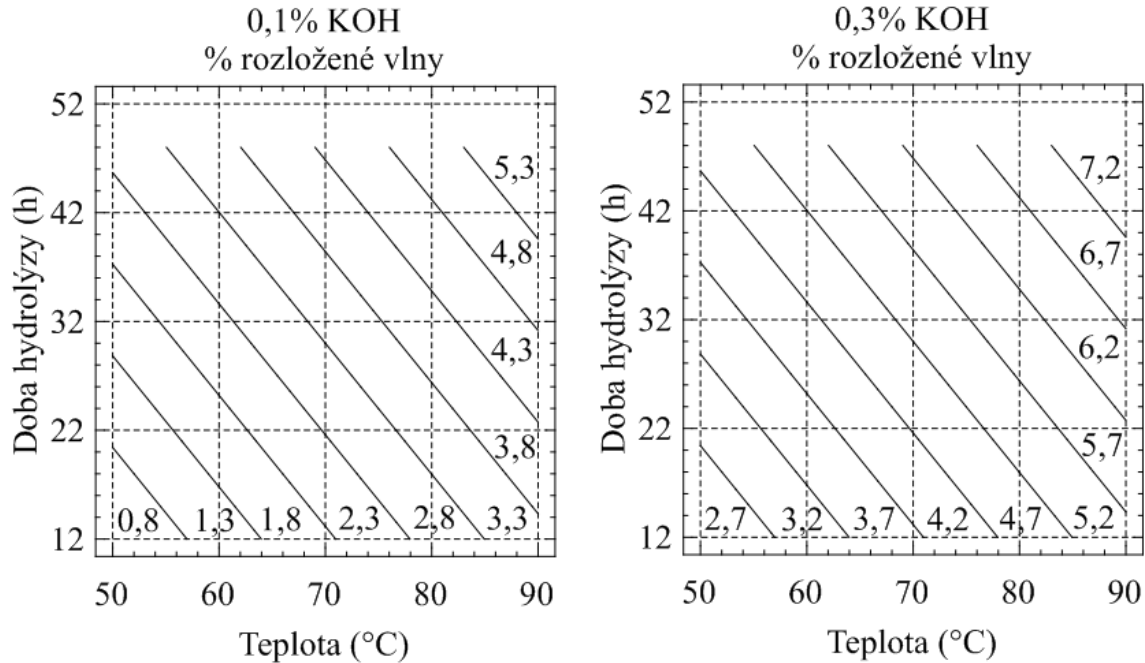
Tabulka 3 – Podmínky a výsledky rozkladu ovčí vlny v prvním stupni hydrolyzy

Faktor A: Koncentrace alkálie (%)	Faktor B: Teplota ( $^{\circ}\text{C}$ )	Faktor C: Doba hydrolyzy (h)	Množství rozložené vlny (%)	
			KOH	$\text{K}_2\text{CO}_3$
0,1	50	12	2,2	2,4
0,1	50	48	1,9	2,2
0,1	90	12	3,7	3,5
0,1	90	48	6,1	5,5
0,2	70	30	3,3	3,4
0,2	70	30	3,5	3,3
0,3	50	12	2,5	2,2
0,3	50	48	5,3	2,0
0,3	90	12	5,0	5,3
0,3	90	48	8,7	9,5

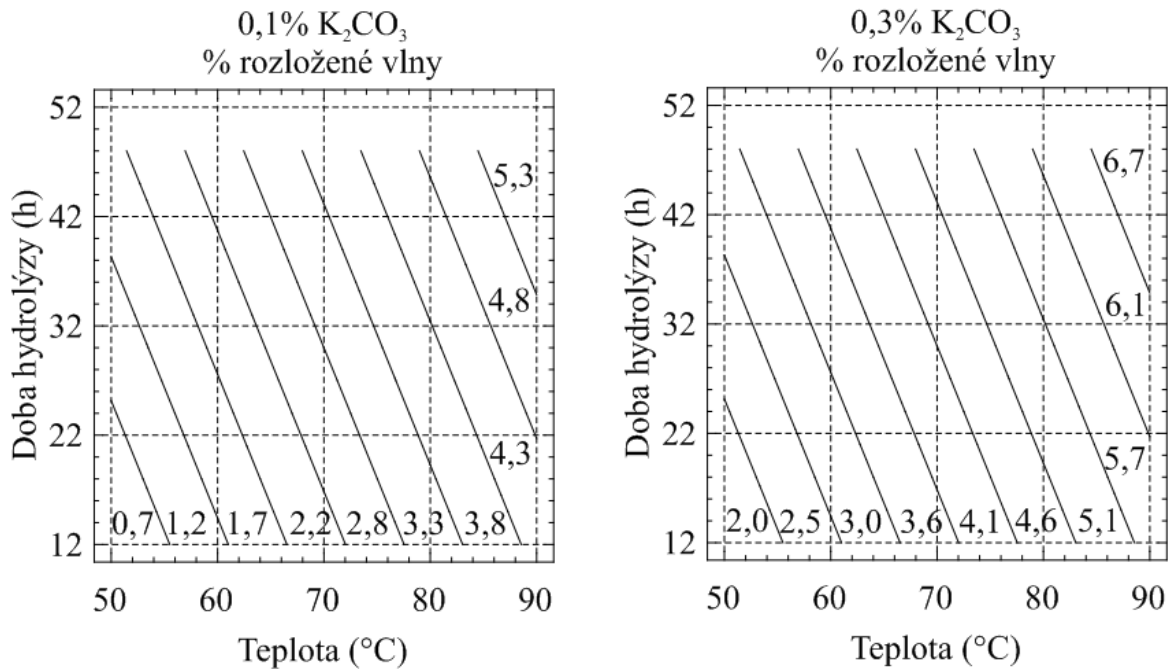
Z výsledků je patrné, že při takto nízkých koncentracích je účinek pouze alkalické hydrolyzy velmi nízký. U obou použitých alkálií nebylo dosaženo ani 10% rozkladu ovčí vlny. Pro statistické vyhodnocení sledovaných faktorů byly vytvořeny vrstevnicové grafy a rovnice rozkladu, dále pak paretovy diagramy a tabulka F a p-hodnot.

Na obrázcích 4 a 5 jsou znázorněny vrstevnicové diagramy pro množství rozložené vlny v závislosti na teplotě a době hydrolyzy při dvou koncentracích alkálie (0,1 a 0,3%). Z těchto grafů je patrné že množství rozložené vlny je v obou alkáliích o koncentraci 0,1% téměř stejné. Drobné rozdíly se projeví u

koncentrace 0,3% při delších dobách hydrolýzy a vysokých teplotách, kde je u KOH rozloženo asi o 0,5 % více keratinu, což je zanedbatelný rozdíl. Ze sklonu jednotlivých křivek můžeme zjistit, že pro prostředí KOH mají oba faktory (teplota i doba) téměř stejnou statistickou významnost, zatímco v prostředí  $K_2CO_3$  je významnějším faktorem teplota při hydrolýze.



Obrázek 4 – Vrstevnicové diagramy alkalické hydrolýzy ovčí vlny v prostředí 0,1% a 0,3% KOH



Obrázek 5 – Vrstevnicové diagramy alkalické hydrolýzy ovčí vlny v prostředí 0,1% a 0,3%  $K_2CO_3$

Dalším sledovanou statistickou veličinou jsou regresní koeficienty, z kterých lze vytvořit rovnici rozkladu, pomocí níž můžeme zjistit pravděpodobný výtěžek hydrolýzy např. při jiných hodnotách sledovaných parametrů. Přesnost vytvořené rovnice (udávaná korelačním koeficientem  $R^2$ ) by bylo možné zvýšit vícerym opakováním jednotlivých sad experimentů, případně přidáním dalších členů rovnice popisujících interakce mezi jednotlivými faktory. Pro jednodušší práci s rovnicemi však byly použity pouze členy samostatných faktorů i za cenu snížení přesnosti rovnice. Pro alkalickou hydrolýzu v prostředí KOH byla vytvořena následující regresní rovnice:

$$Y = k + a \cdot A + b \cdot B + c \cdot C$$

$$Y = -4,4640 + 9,4125A + 0,0717B + 0,0595C$$

$$R^2 = 0,8402$$

Pro alkalickou hydrolýzu v prostředí  $K_2CO_3$  byla poté vytvořena následující rovnice:

$$Y = -5,1327 + 6,6375A + 0,0937B + 0,0392C$$

$$R^2 = 0,7420$$

Pro zhodnocení statistické významnosti jednotlivých zvolených faktorů byly zjištěny hodnoty Fisherova testu (F-hodnota) a p-hodnoty (uvedené v tabulce 4) a nakonec byly vytvořeny Paretovy diagramy uvedené na obrázku 6.

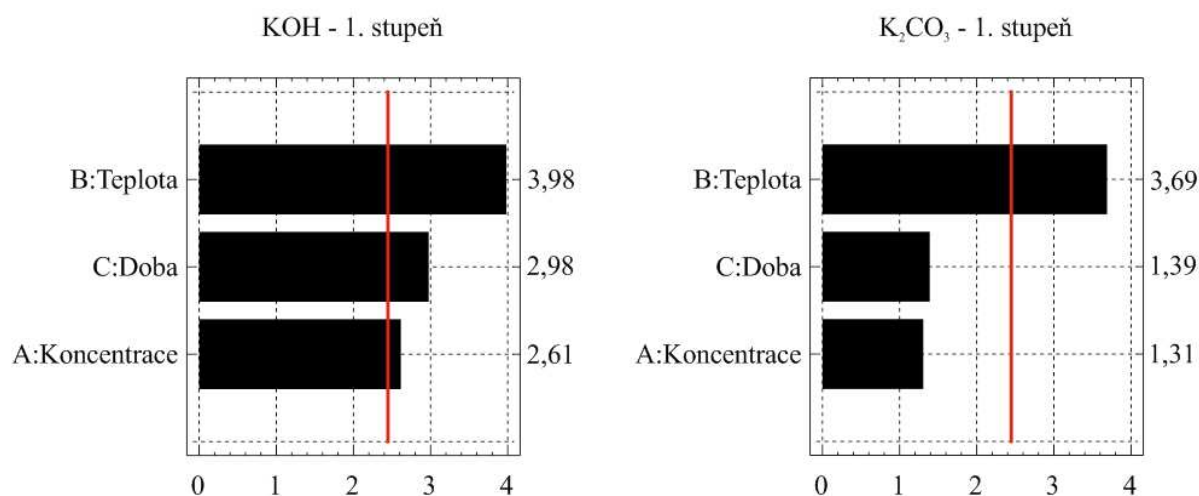
*Tabulka 4 – Hodnoty statistických ukazatelů pro alkalickou hydrolýzu*

Faktory	KOH		$K_2CO_3$	
	Statistický ukazatel F-hodnota	Statistický ukazatel p-hodnota	Statistický ukazatel F-hodnota	Statistický ukazatel p-hodnota
Faktor A: Koncentrace alkálie	6,83	0,0399	1,71	0,2391
Faktor B: Teplota	15,86	0,0073	13,61	0,0102
Faktor C: Doba hydrolýzy	8,85	0,0248	1,93	0,2137
Kritické hodnoty: $F > 10,13$ a $p < 0,05$				

Z uvedených ukazatelů statistické významnosti je patrné, že při alkalické hydrolýze KOH je nejvýznamnějším faktorem teplota při hydrolýze (faktor B), ale i zbylé dva faktory jsou dle p-hodnot a Paretova diagramu nad hranicí významnosti. V případě hydrolýzy v prostředí  $K_2CO_3$  je dle všech tří ukazatelů významným faktorem pouze teplota při hydrolýze (faktor B).

Z výše popsáných výsledků vyplývá, že pokud bychom chtěli použít pro hydrolýzu vlny pouze alkalickou hydrolýzu museli bychom pro dosažení lepší účinnosti mnohonásobně zvýšit koncentraci alkálie jak uvádí např. Abouheif a kol. [18]. Další možností je zvýšení teploty a doby hydrolýzy což zkoumal Coward-Kelly a kol. [22, 23]., případně by bylo možné provádět rozklad za

zvýšeného tlaku. Další možností je přidání druhého stupně (enzymové hydrolýzy), který probíhá také v alkalickém prostředí a výrazně zvyšuje účinnost hydrolýzy, tuto možnost popsal Dalev [59].



Obrázek 6 – Paretovy diagramy statistické významnosti faktorů alkalické hydrolýzy

### 3.5 Výsledky experimentů – alkalicko-enzymová hydrolýza

Kombinovaná dvoustupňová alkalicko-enzymová hydrolýza ovčí vlny byla vybrána pro své výhody, kterými jsou zejména nízké koncentrace používaných chemikálií a možnost ovlivnit vlastnosti keratinových hydrolyzátů více faktory. Celkem bylo provedeno 6 sérií rozkladů ve třech různých prostředích se třemi různými enzymy. Souhrnná tabulka ze všech pokusů je uvedena v příloze. Jednotlivé sady experimentů jsou popsány níže.

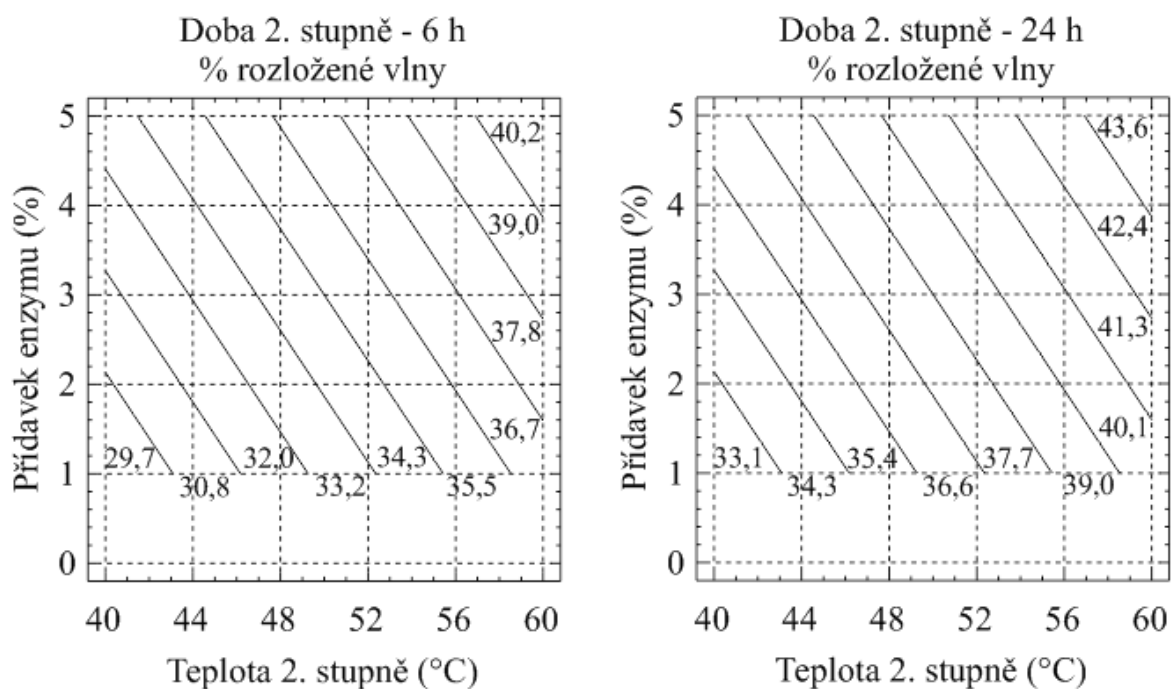
Jako první byly provedeny experimenty v prostředí KOH (A) a K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (B) s enzymem Savinase 6.0T. První stupeň hydrolýzy byl proveden podle dříve zjištěných nejvýhodnějších hodnot faktorů alkalické hydrolýzy (viz. Tabulka 5), tedy koncentrace alkálie 0,3%, teplota 90°C a doba 1. stupně hydrolýzy 48 hodin. Ve druhém stupni hydrolýzy byl poté zkoumán vliv množství přidaného enzymu (na navážku suché vlny), teplota a doba 2. stupně hydrolýzy. Výsledky těchto dvou experimentů jsou uvedeny v tabulce 5.

Přidáním 2. stupně (enzymové hydrolýzy) stouplо množství rozloženého keratinového materiálu z necelých 10 % po 1. stupni na více než 40 %. V prostředí 0,3% KOH se množství rozložené vlny pohybuje od 30,6 % do 45,5 % a v prostředí 0,3% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> jsou tyto hodnoty v rozmezí 31,7 % až 42,2 %. Z výsledků dále vyplývá, že při nejnižších hodnotách sledovaných faktorů bylo v prostředí K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> rozloženo asi o 1 % více vlny než v prostředí KOH, zatímco při nejvyšších hodnotách sledovaných faktorů je tomu naopak.



Tabulka 5 – Podmínky a výsledky rozkladu ovčí vlny dvoustupňovou alkalicko-enzymovou hydrolýzou v prostředí KOH a K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> s enzymem Savinase 6.0T

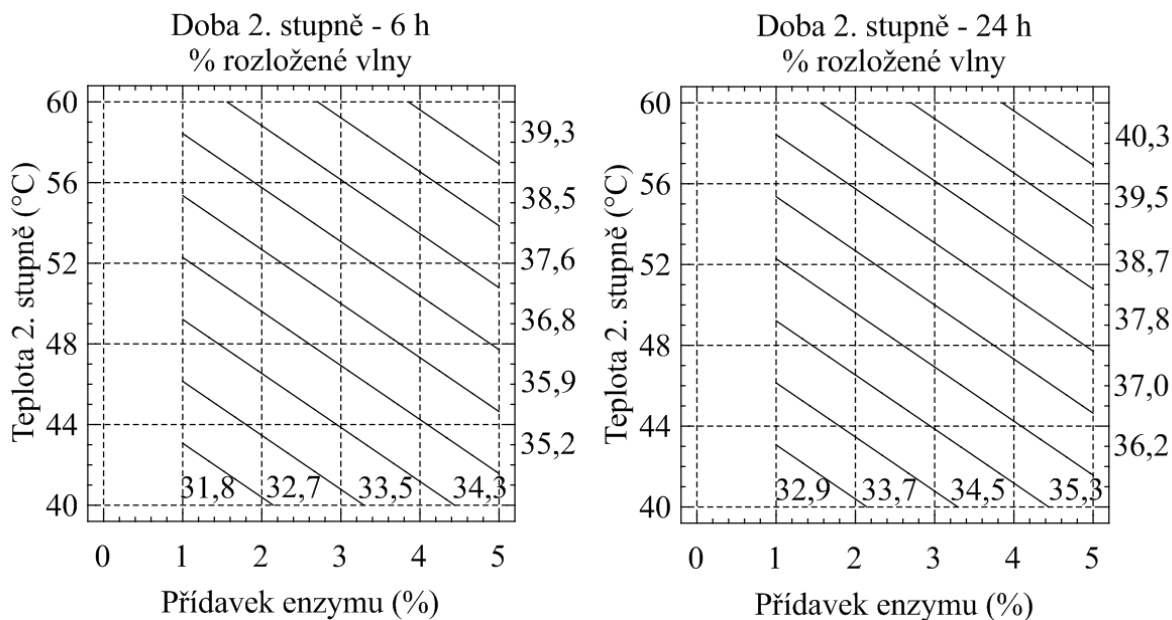
Faktor A: Přídavek enzymu (%)	Faktor B: Teplota 2. stupně (°C)	Faktor C: Doba 2. stupně (h)	Množství rozložené vlny			
			0,3% KOH		0,3% K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	
			Výtěžek (%)	Označení KH	Výtěžek (%)	Označení KH
1	40	6	30,6	A1	31,7	B1
1	40	24	30,8	A2	33,0	B2
1	60	6	34,9	A3	36,1	B3
1	60	24	40,0	A4	37,7	B4
3	50	15	41,6	A5	36,2	B5
3	50	15	41,4	A6	36,2	B6
5	40	6	32,9	A7	33,6	B7
5	40	24	35,1	A8	35,1	B8
5	60	6	39,2	A9	39,1	B9
5	60	24	45,5	A10	42,2	B10



Obrázek 7 – Vrstevníkové diagramy hydrolýzy ovčí vlny v prostředí 0,3% KOH s enzymem Savinase 6.0T

Na obrázcích 7 a 8 jsou vrstevníkové diagramy znázorňující % množství rozložené vlny v závislosti na přídavku enzymu a teplotě 2. stupně hydrolýzy při dvou různých dobách 2. stupně (6 a 24 hodin). Z diagramů je patrné, že při krátkých časech hydrolýzy se v prostředí KOH a K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> rozloží téměř stejné

množství vlny. Při 24 hodinách hydrolyzy se rozdíl mezi jednotlivými alkalickými prostředími zvětšuje, v prostředí KOH je rozloženo o 3 % více vlny než v  $K_2CO_3$ . Ze sklonu jednotlivých křivek je dále patrné, že nejvýznamnějším faktorem ovlivňujícím účinnost hydrolyzy je teplota.

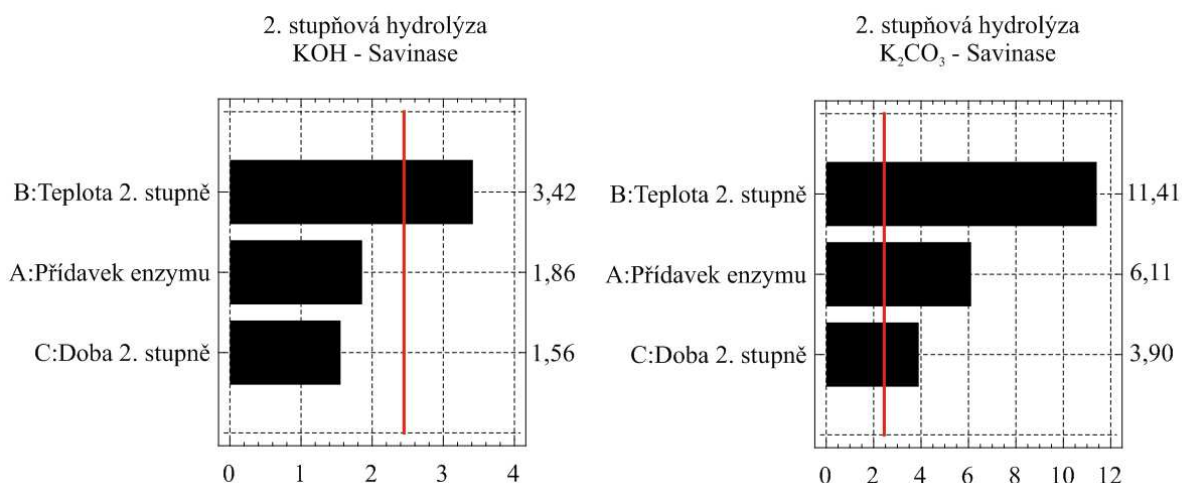


Obrázek 8 – Vrstevnicové diagramy hydrolyzy ovčí vlny v prostředí 0,3%  $K_2CO_3$  s enzymem Savinase 6.0T

Tabulka 6 – Hodnoty statistických ukazatelů pro alkalicko-enzymovou hydrolyzu v prostředí 0,3% KOH a  $K_2CO_3$  s enzymem Savinase 6.0T

Faktory	KOH - Savinase		$K_2CO_3$ - Savinase	
	Statistický ukazatel	Statistický ukazatel	Statistický ukazatel	Statistický ukazatel
	F-hodnota	p-hodnota	F-hodnota	p-hodnota
Faktor A:				
Přídavek enzymu	3,46	0,1124	37,37	0,0009
Faktor B:				
Teplota 2. stupně	11,67	0,0142	130,18	0
Faktor C:				
Doba 2. stupně	2,42	0,1706	15,23	0,008
Kritické hodnoty: $F > 10,13$ a $p < 0,05$				

Statistická významnost vybraných faktorů byla opět zjišťována z Fisherova testu, p-hodnot (tabulka 6) a Paretových diagramů (obrázek 9). Z uvedených hodnot je patrné, že pro prostředí KOH je statisticky významným faktorem pouze teplota ve 2. stupni hydrolyzy, zatímco pro prostředí  $K_2CO_3$  jsou významné všechny tři sledované faktory.



Obrázek 9 – Paretovy diagramy statistické významnosti faktorů alkalicko-enzymové hydrolyzy v prostředí 0,3% KOH a K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> s enzymem Savinase 6.0T

Také u experimentů s alkalicko-enzymovou hydrolyzou byly vytvořeny regresní rovnice rozkladů. Následující rovnice byla vytvořena pro prostředí KOH:

$$Y = 12,4281 + 1,0256A + 0,3770B + 0,1908C$$

$$R^2 = 0,7453$$

Další regresní rovnice je pro hydrolyzu v prostředí K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:

$$Y = 18,8934 + 0,7222A + 0,2696B + 0,1024C$$

$$R^2 = 0,9682$$

Jako třetí experiment (C) byl proveden rozklad opět v prostředí KOH s enzymem Savinase 6.0T při zvýšení koncentrace alkálie. Sledovanými faktory v této sérii pokusů byly koncentrace alkálie (0,2–0,6%), přídavek enzymu (1–5 %) a teplota ve 2. stupni hydrolyzy (40–60°C). Konstantní hodnoty byly pak zvoleny u faktorů teplota v 1. stupni hydrolyzy (90°C), doba 1. stupně hydrolyzy (48 hodin) a doba 2. stupně hydrolyzy (24 hodin).

Čtvrtou sadou experimentů (D) bylo provedení hydrolyzy v prostředí Ca(OH)<sub>2</sub> s enzymem Esperase 6.0T. První stupeň hydrolyzy byl proveden v 0,5% roztoku Ca(OH)<sub>2</sub> při teplotě 80°C po dobu 6–24 hodin. Ve druhém stupni bylo poté přidáno 1–5 % enzymu Esperase a pokračovala hydrolyza při 60°C opět po dobu 6–24 hodin.

V tabulce 7 jsou uvedeny výsledky množství rozložené vlny pro experiment v KOH s enzymem Savinase a v tabulce 8 jsou poté výsledky z experimentu v Ca(OH)<sub>2</sub> s enzymem Esperase.

Tabulka 7 – Podmínky a výsledky rozkladu ovčí vlny dvoustupňovou alkalicko-enzymovou hydrolýzou v prostředí KOH s enzymem Savinase 6.0T

<b>Faktor A:</b> <b>Konc. alkálie</b> (%)	<b>Faktor B:</b> <b>Přídavek enzymu</b> (%)	<b>Faktor C:</b> <b>Teplota 2. stupně</b> (h)	<b>Množství rozložené vlny</b> <b>KOH - Savinase</b>	
			<b>Výtěžek</b> (%)	<b>Označení KH</b>
0,2	1	40	<b>26,7</b>	C1
0,2	1	60	<b>30,7</b>	C2
0,2	5	40	<b>29,3</b>	C3
0,2	5	60	<b>36,7</b>	C4
0,4	3	50	<b>50,8</b>	C5
0,4	3	50	<b>53,4</b>	C6
0,6	1	40	<b>63,2</b>	C7
0,6	1	60	<b>71,8</b>	C8
0,6	5	40	<b>71,9</b>	C9
0,6	5	60	<b>73,9</b>	C10

Tabulka 8 – Podmínky a výsledky rozkladu ovčí vlny dvoustupňovou alkalicko-enzymovou hydrolýzou v prostředí Ca(OH)<sub>2</sub> s enzymem Esperase 6.0T

<b>Faktor A:</b> <b>Doba 1. stupně</b> (h)	<b>Faktor B:</b> <b>Doba 2. stupně</b> (h)	<b>Faktor C:</b> <b>Přídavek enzymu</b> (%)	<b>Množství rozložené vlny</b> <b>Ca(OH)<sub>2</sub> - Esperase</b>	
			<b>Výtěžek</b> (%)	<b>Označení KH</b>
6	6	1	<b>25,0</b>	D1
6	6	5	<b>34,5</b>	D2
6	24	1	<b>39,0</b>	D3
6	24	5	<b>41,0</b>	D4
15	15	3	<b>38,0</b>	D5
15	15	3	<b>38,5</b>	D6
24	6	1	<b>35,8</b>	D7
24	6	5	<b>38,1</b>	D8
24	24	1	<b>37,5</b>	D9
24	24	5	<b>54,5</b>	D10

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že při rozkladu v KOH s enzymem Savinase bylo při maximech sledovaných faktorů dosaženo nejvyššího % rozložené vlny a to téměř 75 %. Tento výsledek je oproti podobnému pokusu z první série experimentů (A10) téměř o 30 % vyšší. Zvýšení koncentrace alkálie tedy vedlo k výraznému nárůstu množství hydrolyzovaného materiálu.

Ve druhém případě v prostředí  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  s enzymem Esperase bylo při maximech sledovaných faktorů rozloženo více než 50 % výchozího materiálu.

Stejně jako u předchozích pokusů, byly i zde vytvořeny rovnice rozkladů. Pro experiment v KOH s enzymem Savinase byla vytvořena regresní rovnice:

$$Y = -5,8154 + 98,3625A + 1,2094B + 0,2734C$$

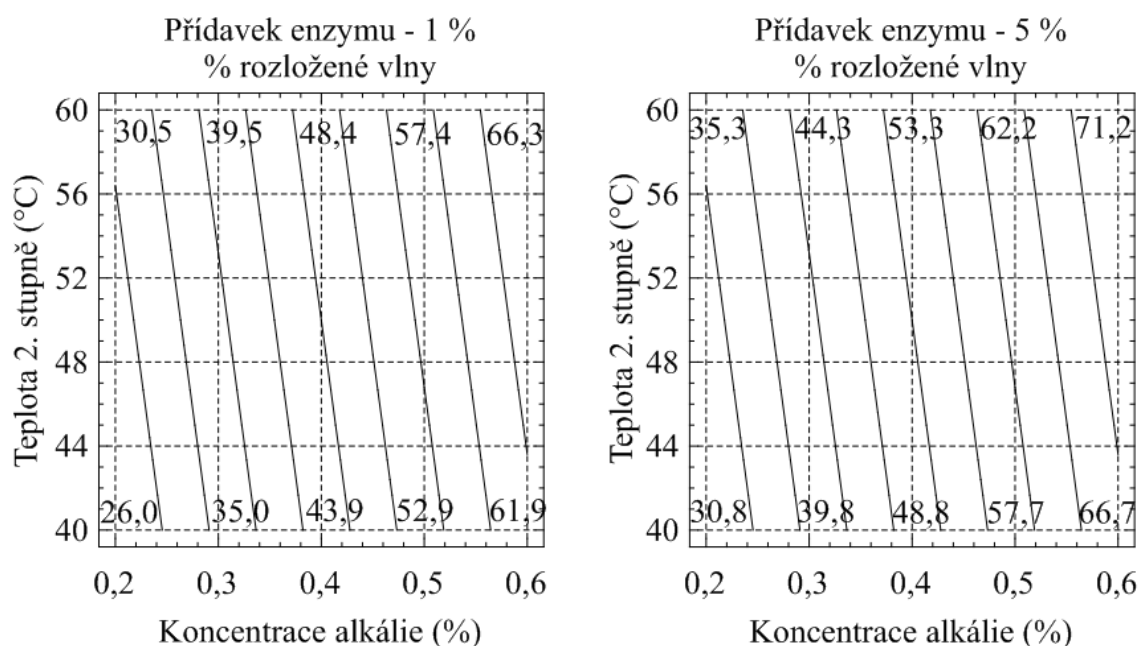
$$R^2 = 0,9933$$

Pro experiment v  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  s enzymem Esperase byla vytvořena rovnice:

$$Y = 20,0551 + 0,4064A + 0,5022B + 2,3013C$$

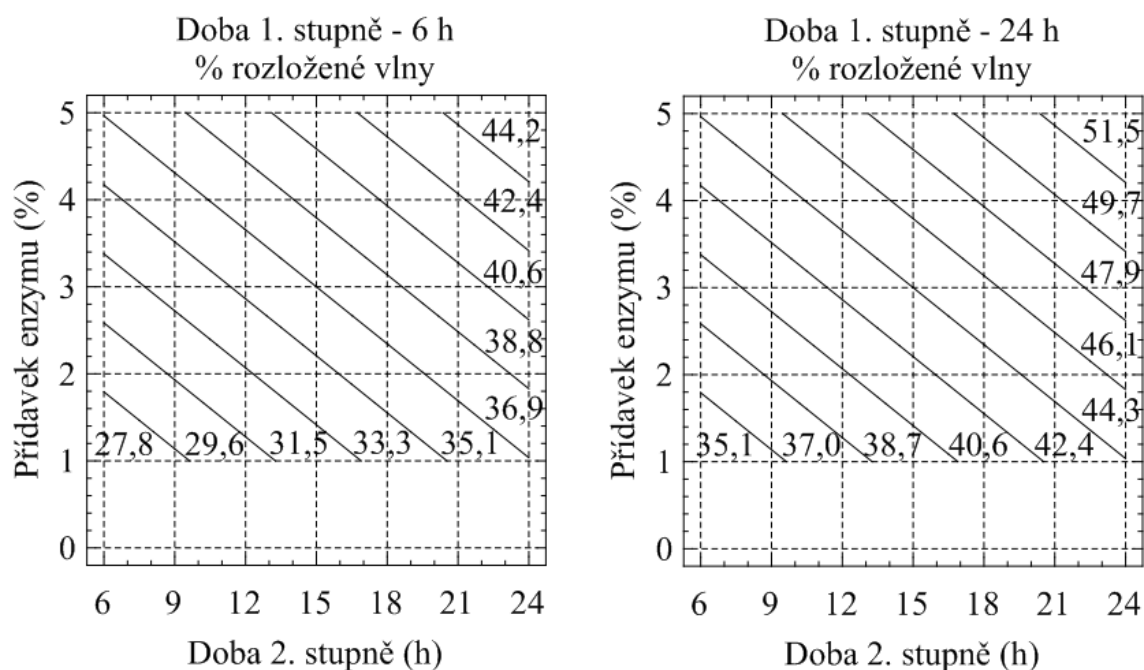
$$R^2 = 0,8606$$

Dále byly vytvořeny vrstevnicové diagramy popisující vliv vybraných faktorů na množství rozložené vlny. Pro experiment v prostředí KOH s přidavkem enzymu Savinase bylo sledováno množství rozložené vlny v závislosti na koncentraci alkálie a teplotě 2. stupně při minimu a maximu přidavku enzymu (viz. Obrázek 10). Ve druhém případě při experimentu v prostředí  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  s enzymem Esperase bylo sledováno množství rozloženého keratinu v závislosti na přidavku enzymu a době 2. stupně hydrolyzy při minimální a maximální době 1. stupně hydrolyzy (viz. Obrázek 11).



Obrázek 10 – Vrstevnicové diagramy hydrolyzy ovčí vlny v prostředí KOH s enzymem Savinase 6.0T

Na obrázku 10 je ze sklonu křivek jasně patrné, že největší vliv na množství rozložené vlny má faktor A – koncentrace alkálie. Dále lze z vrstevnicových diagramů zjistit, že když zvýšíme množství přidaného enzymu z 1 % na 5 % vzroste nám při maximech sledovaných faktorů množství rozložené vlny z 66,3 % na 71,2 %.



Obrázek 11 – Vrstevnicové diagramy hydrolýzy ovčí vlny v prostředí  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  s enzymem Esperase 6.0T

Vrstevnicové diagramy množství rozložené vlny zobrazené na obrázku 11 nám ukazují, že při tomto experimentu je vliv obou vybraných faktorů téměř stejný, protože sklon jednotlivých křivek je blízký  $45^\circ$ . Se vzrůstajícím přídatkem enzymu a rostoucí dobou 2. stupně hydrolýzy nám roste i množství rozložené vlny, a to v rozmezí 27,8 % až 44,2 % pro dobu 1. stupně hydrolýzy 6h. Při zvýšení doby 1. stupně hydrolýzy na 24 hodin nám při minimu sledovaných faktorů (1 % enzymu a 6 hodin) vzroste množství rozložené vlny asi o 7 % a při maximech těchto faktorů (5 % enzymu a 24 hodin) nám množství rozložené vlny také vzroste o stejný rozdíl 7 %.

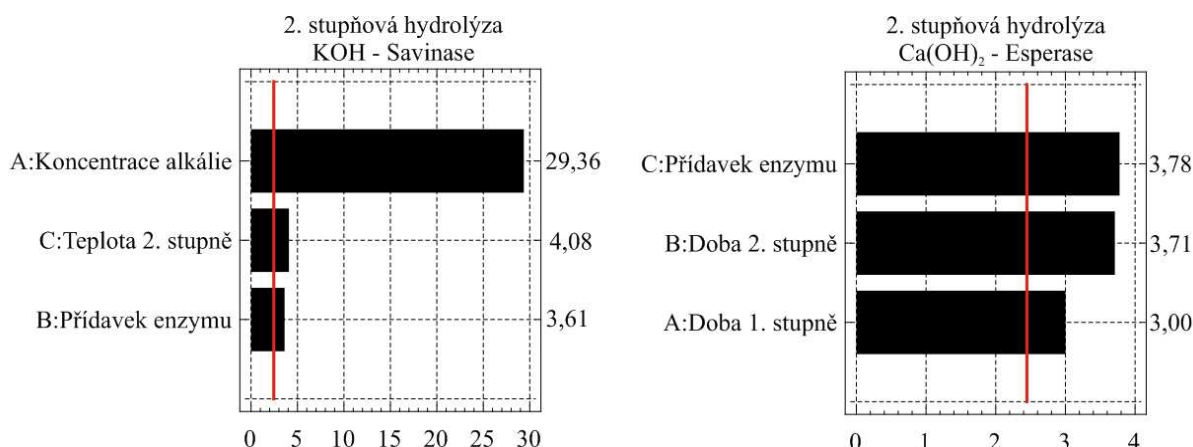
Dále následuje tabulka 9 se statistickými ukazateli významnosti jednotlivých faktorů, které jsou pro experiment v  $\text{KOH}$  s enzymem Savinase: A – koncentrace alkálie, B – přídatek enzymu a C – teplota 2. stupně. Pro druhý experiment v  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  s enzymem Esperase jsou to: A – doba 1. stupně hydrolýzy, B – doba 2. stupně hydrolýzy a C – přídatek enzymu.

Tabulka 9 – Hodnoty statistických ukazatelů pro alkalicko-enzymovou hydrolýzu v prostředí  $\text{KOH}$  – Savinase 6.0T a  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  – Esperase 6.0T

Faktory	KOH - Savinase		$\text{Ca}(\text{OH})_2$ - Esperase	
	Statistický ukazatel		Statistický ukazatel	
	F-hodnota	p-hodnota	F-hodnota	p-hodnota
Faktor A	862,17	0	9,01	0,024
Faktor B	13,03	0,0112	13,76	0,01
Faktor C	16,65	0,0065	14,27	0,0092

Kritické hodnoty:  $F > 10,13$  a  $p < 0,05$

Posledním sledovaným statistickým ukazatelem jsou Paretovy diagramy, které jsou uvedeny na obrázku 12.



Obrázek 12 – Paretovy diagramy statistické významnosti faktorů alkalicko-enzymové hydrolyzy v prostředí KOH – Savinase 6.0T a Ca(OH)<sub>2</sub> – Esperase 6.0T

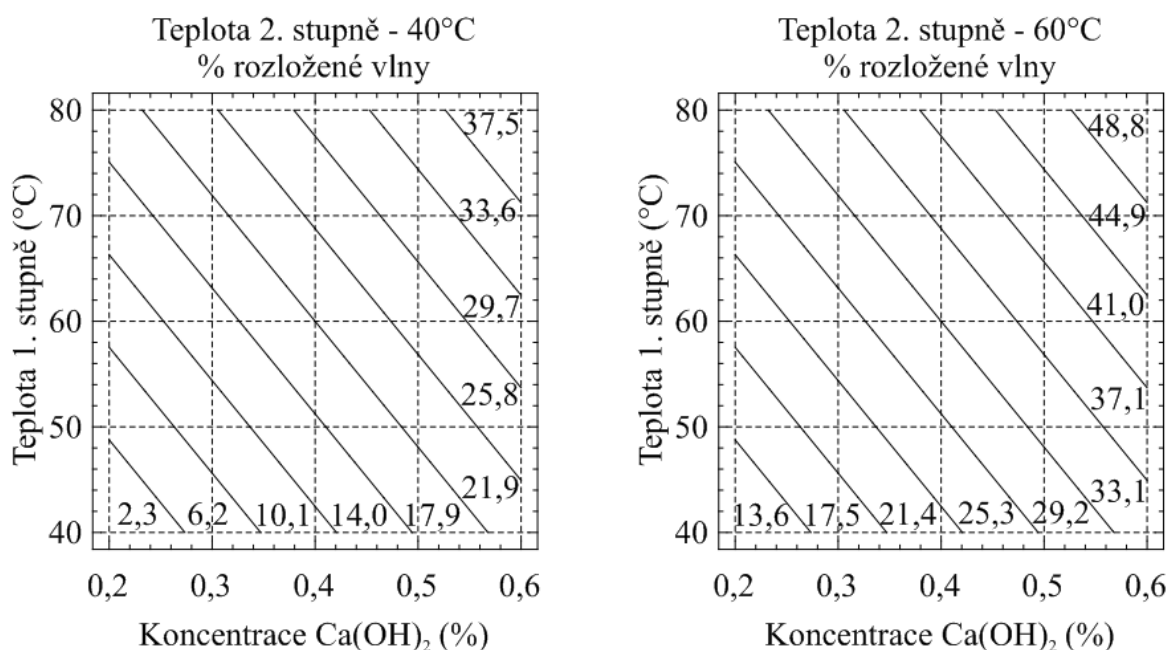
Ze statistických výsledků vyplývá, že pro experiment v KOH s enzymem Savinase jsou všechny faktory statisticky významné, avšak faktor A – koncentrace alkálie výrazně převyšuje zbylé faktory ve všech hodnotách sledovaných ukazatelů. Také u pokusu v Ca(OH)<sub>2</sub> s enzymem Esperase jsou dle Paretova diagramu a p-hodnot všechny faktory statisticky významné. Fisherův test v tomto případě určil faktor A jako nevýznamný.

Tabulka 10 – Podmínky a výsledky rozkladu ovčí vlny dvoustupňovou alkalicko-enzymovou hydrolyzou v prostředí Ca(OH)<sub>2</sub> s enzymy Esperase 6.0T a Everlase 6.0T

Faktor A: Konc. alkálie (%)	Faktor B: Teplota 1. stupně (°C)	Faktor C: Teplota 1. stupně (°C)	Množství rozložené vlny			
			Esperase		Everlase	
			Výtěžek (%)	Označení KH	Výtěžek (%)	Označení KH
1	40	6	<b>8,4</b>	E1	<b>4,7</b>	F1
1	40	24	<b>15,3</b>	E2	<b>8,3</b>	F2
1	60	6	<b>9,8</b>	E3	<b>7,3</b>	F3
1	60	24	<b>22,4</b>	E4	<b>14,6</b>	F4
3	50	15	<b>19,7</b>	E5	<b>10,9</b>	F5
3	50	15	<b>19,2</b>	E6	<b>12,4</b>	F6
5	40	6	<b>14,9</b>	E7	<b>9,9</b>	F7
5	40	24	<b>24,2</b>	E8	<b>10,9</b>	F8
5	60	6	<b>42,9</b>	E9	<b>28,7</b>	F9
5	60	24	<b>59,2</b>	E10	<b>39,6</b>	F10

V poslední sadě byly provedeny pokusy v prostředí  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  se dvěma enzymy Esperase 6.0T a Everlase 6.0T. U těchto dvou experimentů byl posuzován vliv jednotlivých zvolených enzymů a z faktorů byly sledovány koncentrace alkálie a teploty v 1. a 2. stupni hydrolýzy. Jako konstantní byly vybrány faktory doba hydrolýzy v 1. stupni (24 hodin), přídavek enzymu (5 % na navážku suché vlny) a doba hydrolýzy ve 2. stupni (24 hodin). Výsledky rozkladů jsou uvedeny v následující tabulce 10. Z uvedených výsledků lze usuzovat, že využití enzymu Everlase je mnohem méně výhodné než používání enzymu Esperase, kde ve všech případech byly zjištěny lepší výsledky. Nejvyššího množství rozložené vlny enzymem Esperase bylo dosaženo u pokusu E10 při maximech sledovaných faktorů a to 59,2 %.

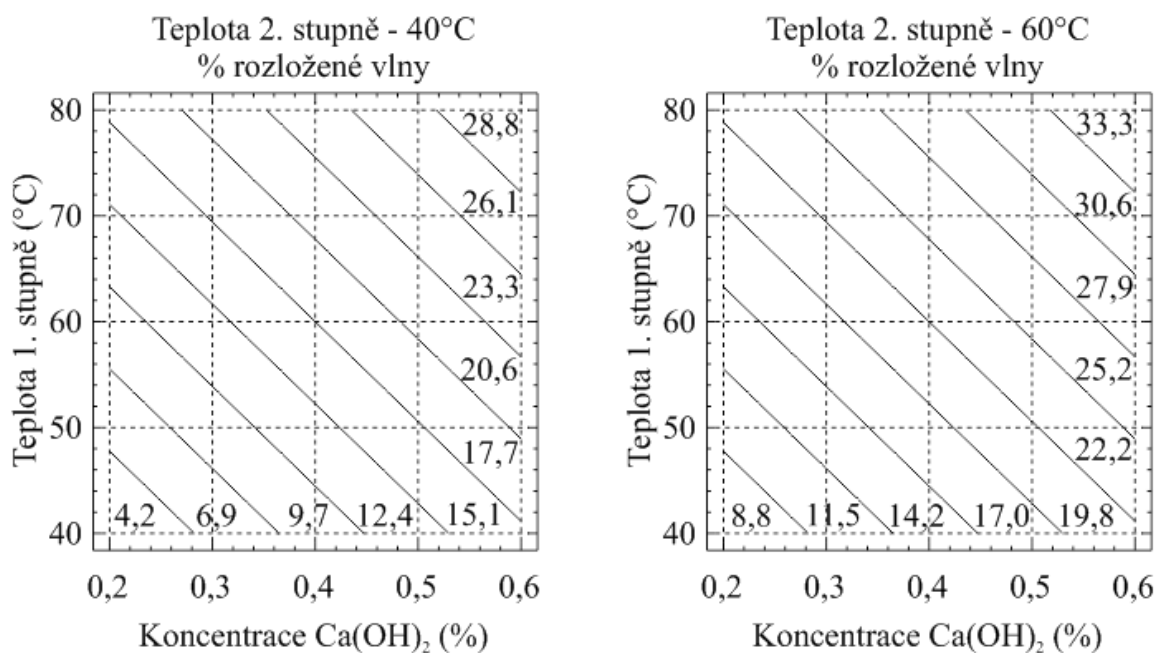
Vytvořené vrstevnicové diagramy na obrázcích 13 a 14 nám u těchto experimentů ukazují % množství rozložené vlny v závislosti na koncentraci alkálie a teplotě v 1. stupni hydrolýzy při dvou teplotách 2. stupně (40 a 60°C).



Obrázek 13 – Vrstevnicové diagramy hydrolýzy ovčí vlny v prostředí  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  s enzymem Esperase 6.0T

Z obrázků vrstevnicových diagramů můžeme opět vyčíst poměrně velký rozdíl v množství rozložené vlny mezi enzymy Esperase a Everlase při obou teplotách 2. stupně hydrolýzy. Zatímco při teplotě 2. stupně 40°C je při použití enzymu Esperase rozloženo až 37,5 % vlny, při stejných podmínkách je při použití enzymu Everlase rozloženo jen 28,8 % vlny. Stejný trend se projevil i při teplotě 2. stupně 60°C, kde je rozdíl v množství rozložené vlny více než 15 %.





Obrázek 14 – Vrstevnicové diagramy hydrolyzy ovčí vlny v prostředí Ca(OH)<sub>2</sub> s enzymem Everlase 6.0T

Regresní rovnice rozkladů ovčí vlny alkalicko-enzymovou hydrolyzou jsou uvedeny dále. Pro hydrolyzu s enzymem Esperase byla vytvořena rovnice:

$$Y = -52,6920 + 53,2062A + 0,4464B + 0,5641C$$

$$R^2 = 0,8033$$

Pro hydrolyzu s enzymem Everlase pak regresní rovnice:

$$Y = -28,3115 + 33,1062A + 0,3514B + 0,2279C$$

$$R^2 = 0,7514$$

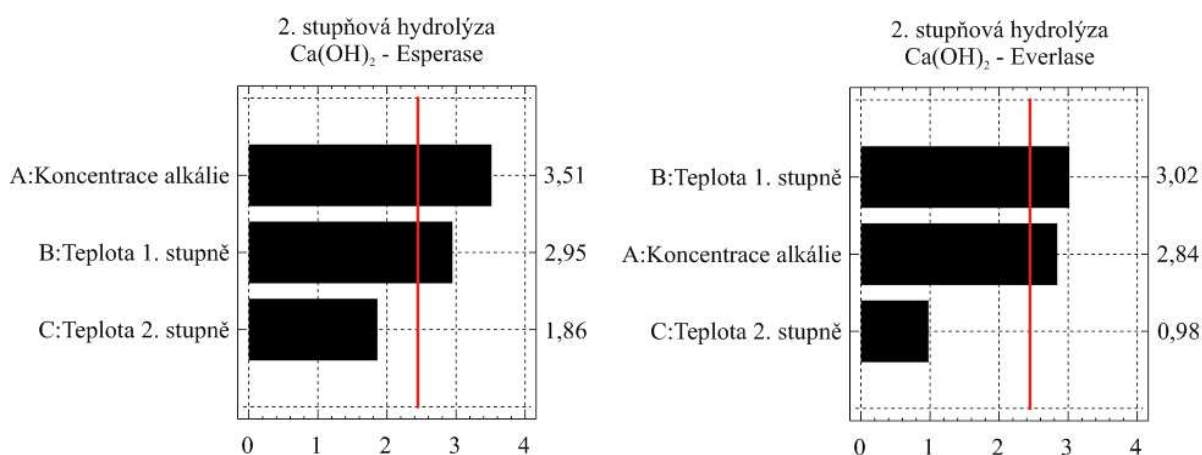
Tabulka 11 – Hodnoty statistických ukazatelů pro alkalicko-enzymovou hydrolyzu v prostředí Ca(OH)<sub>2</sub> s enzymy Esperase 6.0T a Everlase 6.0T

Faktory	Ca(OH) <sub>2</sub> - Esperase		Ca(OH) <sub>2</sub> - Everlase	
	Statistický ukazatel	Statistický ukazatel	Statistický ukazatel	Statistický ukazatel
	F-hodnota	p-hodnota	F-hodnota	p-hodnota
Faktor A: Koncentrace alkálie	12,34	0,0126	8,08	0,0295
Faktor B: Teplota 1. stupně	8,69	0,0257	9,10	0,0235
Faktor C: Teplota 2. stupně	3,47	0,1118	0,96	0,3758

Kritické hodnoty: F > 10,13 a p < 0,05

Statistické ukazatele zobrazené v tabulce 11 a na obrázku 15 nám ukazují, které z vybraných faktorů nám významně ovlivňují hydrolyzu (množství

rozložené vlny). Z tabulky je patrný nesoulad mezi výsledky Fisherova testu a p-hodnotou, kde p-hodnota určila statisticky významné faktory A a B u obou experimentů, což potvrzují i výsledky v Paretových diagramech, zatímco Fisherův test určí významným faktorem pouze koncentraci  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  v experimentu s enzymem Esperase.



Obrázek 15 – Paretoovy diagramy statistické významnosti faktorů alkalicko-enzymové hydrolyzy v prostředí  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  s enzymy Esperase 6.0T a Everlase 6.0T

### 3.6 Zhodnocení

V této kapitole byly uvedeny výsledky několika sérií alkalické a alkalicko-enzymové hydrolyzy, které byly provedeny a statisticky vyhodnoceny. Z výše uvedených výsledků je patrné, že provádění pouze alkalické hydrolyzy při nízkých koncentracích alkálie nevede k dostatečnému množství rozložené vlny. Přidáním 2. stupně enzymové hydrolyzy je poté účinnost hydrolyzy mnohonásobně zvýšena což potvrdil i Dalev a kol. [59]. Nejvyšší účinnosti hydrolyzy bylo dosaženo při experimentu C10 – hydrolyza v prostředí 0,6% KOH (90°C, 48 hodin) s přidavkem 5 % enzymu Savinase 6.0T (60°C, 24 hodin), kdy bylo rozloženo téměř 75 % původního keratinového materiálu. U této série pokusů (C) nám také vytvořená regresní rovnice nejpřesněji popisuje průběh hydrolyzy a faktor A – koncentrace alkálie dosáhl ve Fisherově testu i v Paretově diagramu nejvyšší hodnoty. V případě p-hodnot byl tento faktor roven nule stejně jako faktor B – teplota 2. stupně hydrolyzy v sérii B. Toto je také jedním z důvodů proč byl postup přípravy hydrolyzátu C10 vybrán pro další studium.

## **4. CHARAKTERIZACE KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ**

Druhá kapitola praktické části této práce pojednává o charakterizaci vybraných keratinových hydrolyzátů. Mezi studované vlastnosti KH patří zejména distribuce molárních hmotností hydrolyzátů a jejich složení. Tyto vlastnosti jsou poté porovnávány jak s původním složením vlny tak s odbornou literaturou. Výsledky z této kapitoly byly publikovány v článku uveřejněném v zahraničním časopise (viz. Seznam publikací P2), dále v článcích v českém recenzovaném časopise (viz. Seznam publikací P4, P5), výsledky byly prezentovány na mezinárodní konferenci (viz. Seznam publikací P15) a také na české konferenci (viz. Seznam publikací P11). Další článek zabývající se charakterizací KH je připraven k tisku v zahraničním periodiku (viz. Seznam publikací P3). V poslední části této kapitoly se poté budu věnovat čištění připravených hydrolyzátů dialýzou. Výsledky z této poslední části byly uveřejněny v článku v českém recenzovaném časopise (viz. Seznam publikací P6) a prezentovány na české konferenci (viz. Seznam publikací P13).

### **4.1 Stanovení distribuce molárních hmotností**

Připravené keratinové hydrolyzáty byly charakterizovány nejprve metodou elektroforetického stanovení distribuce molárních hmotností SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis). Pro toto stanovení byly vybrány pouze některé z připravených hydrolyzátů tak aby byly charakterizovány hydrolyzáty při minimálních, maximálních i středových hodnotách jednotlivých faktorů hydrolyzy. Poslední místa pro stanovení byla doplněna hydrolyzáty vyrobenými při podmínkách spadajících mezi tyto tři hodnoty. Studovány byly vzorky z experimentů rozkladu A (1, 4, 5, 7, 10); C (1, 4, 5, 7, 10); D (1, 3, 5, 8, 10); E (1–5, 7–10); F (1, 4, 5, 7, 10). Elektroforetické stanovení distribuce molárních hmotností bylo provedeno na vzorcích, které nebyly vyčištěny dialýzou, tudíž obsahují také nízkomolekulární frakce, které by byly jinak odstraněny v průběhu dialýzy.

#### **4.1.1 Postup práce**

Stanovení distribuce molárních hmotností bylo provedeno na 10–20% tricine polyakrylamidových gelech (Invitrogen, USA) o rozměrech 8,6 x 8,1 cm při pH 8,3. Elektroforéza byla poté prováděna v minicelle Novex Xcell II za použití programovatelného proudového zdroje Novex Model-3540 při konstantním napětí 125 V a proudové intenzitě na startu 80 mA a na konci 40 mA.

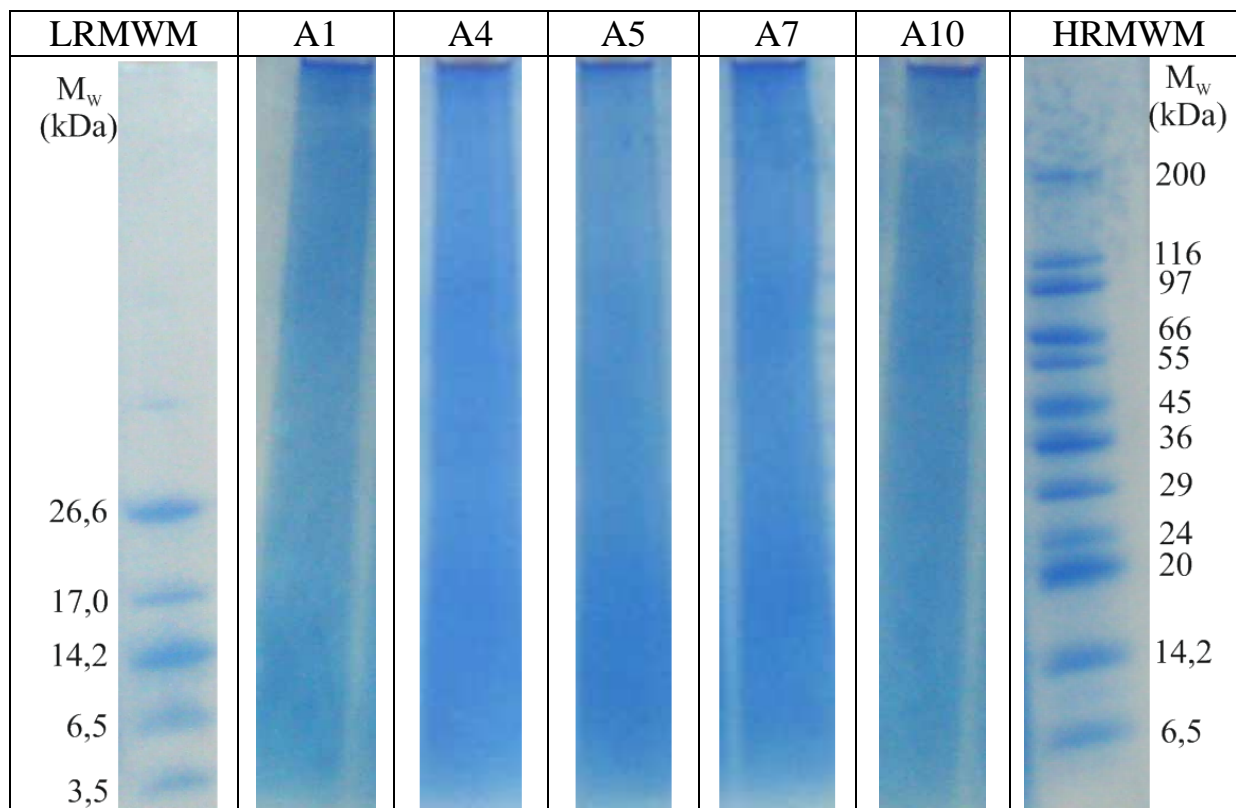
Vzorky keratinových hydrolyzátů byly před vlastním stanovením rozpuštěny v poměru 1:1 v pufru (Tricine SDS Buffer Kit: 30 % 3M Tris-HCl, 24 % glycerol, 8 % SDS, 0,015 % Coomassie Blue G, 0,005% Phenol Red, dále

přidáno 2,5 %  $\beta$ -merkaptoethanolu a destilovaná voda) (Invitrogen, USA) a zahřívány při  $85 \pm 0,5^\circ\text{C}$  po dobu 2 minut.

Aplikované množství keratinového roztoku do jamek gelu bylo 10  $\mu\text{l}$  (asi 60  $\mu\text{g}$ ). Následovala elektroforetická separace, která byla ukončena přibližně za 90 minut. Po proběhnutí gelové elektroforézy byla provedena fixace frakcí v gelu 7% roztokem ledové kyseliny octové v 40% methanolu po dobu 1 hodiny. Následovala detekce separovaných frakcí barvením gelu v modrém barvivu Brilliant Blue G dispergovaném ve vodném roztoku methanolu po dobu asi 1,5 hodiny. Po vybarvení gelu byl přebytek barviva odstraněn ponořením gelu na 24 hodin do 25% roztoku methanolu.

#### 4.1.2 Výsledky stanovení molárních hmotností

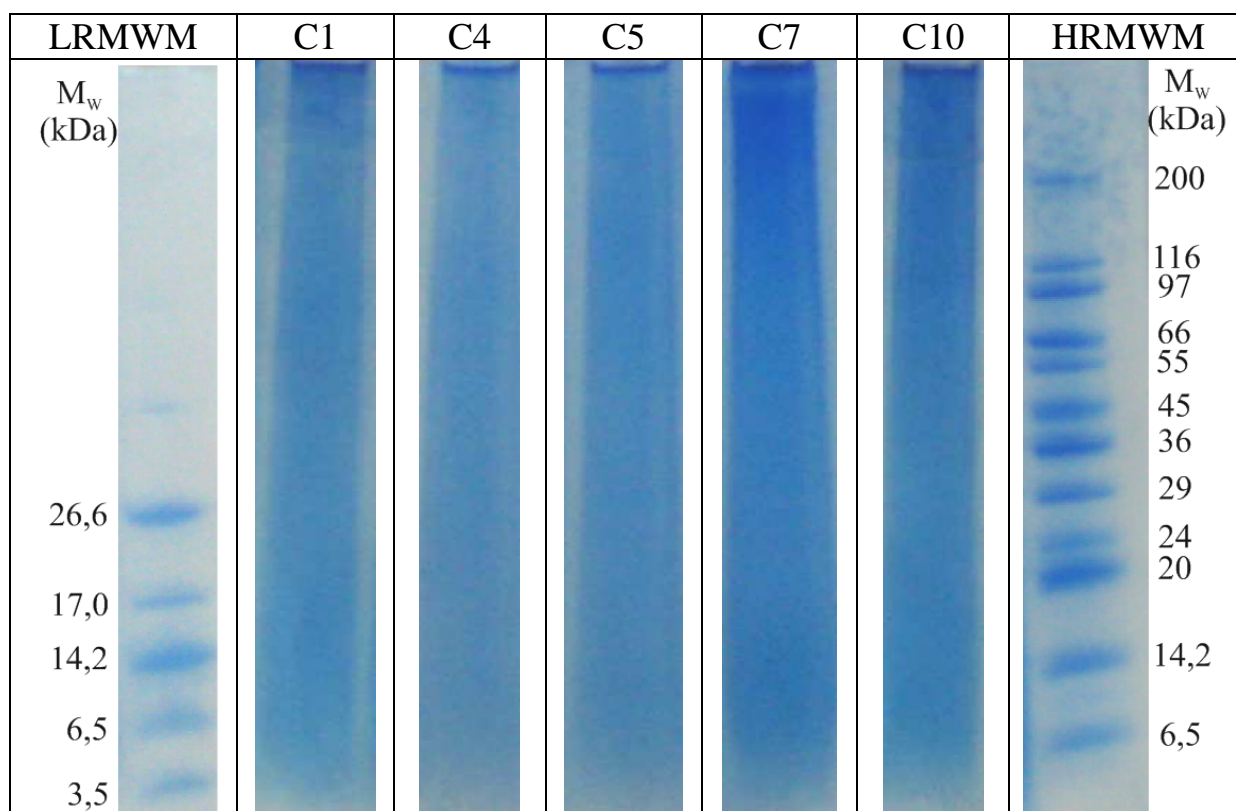
Na obrázcích 16–20 jsou uvedeny elektroforeogramy distribucí molárních hmotností ( $M_w$ ) seřazených dle jednotlivých způsobů hydrolyzy popsaných v kapitole 3.3. Vzorky jednotlivých hydrolyzátů byly srovnávány se dvěma standardy (Sigma-Aldrich, USA) pokrývajícími molární hmotnosti od 3500 do 200000 Da. Standard pro oblast nízkých molárních hmotností (LRMWM) obsahoval 6 proteinů s molárními hmotnostmi v rozmezí 3500 až 26600 Da. Standard pro oblast vysokých molárních hmotností (HRMWM) obsahoval 12 proteinů s molárními hmotnostmi v rozmezí 6500 až 200000 Da.



Obrázek 16 – Elektroforeogramy vzorků připravených dle podmínek A

Pro experimenty hydrolyzy A bylo pro stanovení molárních hmotností vybráno 5 vzorků (A1, A4, A5, A7 a A10) jejichž elektroforeogramy jsou uvedeny na obrázku 16. Z výsledků je patrné, že všechny vzorky mají poměrně širokou distribuci  $M_w$  od frakcí s velmi nízkou  $M_w$  (méně než 3 kDa) až po frakce s poměrně vysokou  $M_w$  (více než 200 kDa). Jako vzorek s nejvyšším podílem frakcí s vyšší  $M_w$  se jeví vzorek A1, u kterého převažují právě řetězce s molární hmotností vyšší než 66 kDa. Druhou nejvíce zastoupenou frakcí u tohoto vzorku je pak ta s  $M_w < 14$  kDa.

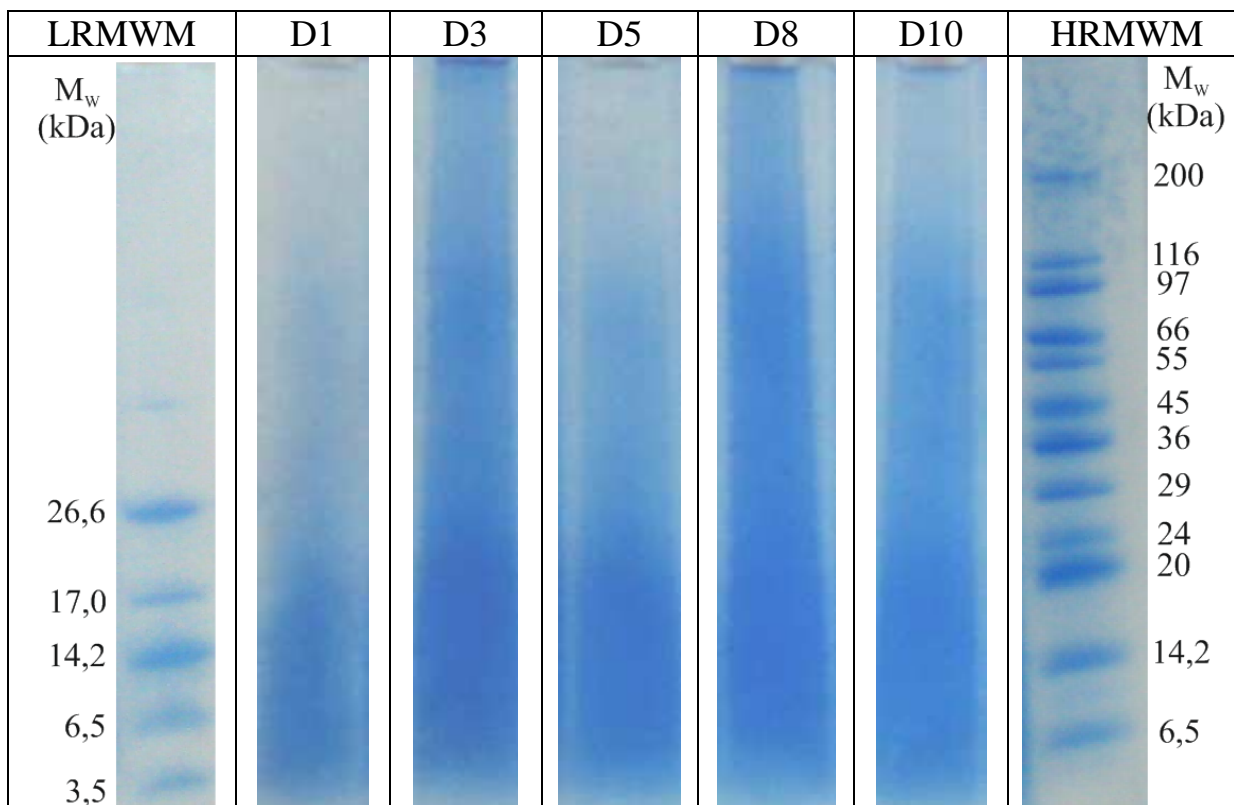
Dalším experimentem hydrolyzy, ze kterého byly vybrány vzorky pro stanovení distribuce molárních hmotností je hydrolyza C. Zde bylo pro stanovení  $M_w$  opět vybráno 5 vzorků (C1, C4, C5, C7 a C10) jejichž elektroforeogramy jsou uvedeny na následujícím obrázku 17. I zde je možné vidět, že všechny vzorky mají poměrně širokou distribuci molárních hmotností. Jako nejlepší se zde jeví vzorky C7 a C10, u kterých jsou nejvíce zastoupeny frakce s  $M_w$  větší než 100 kDa. V případě vzorku C7 jsou poté hojně zastoupeny frakce s  $M_w > 200$  kDa.



Obrázek 17 – Elektroforeogramy vzorků připravených dle podmínek C

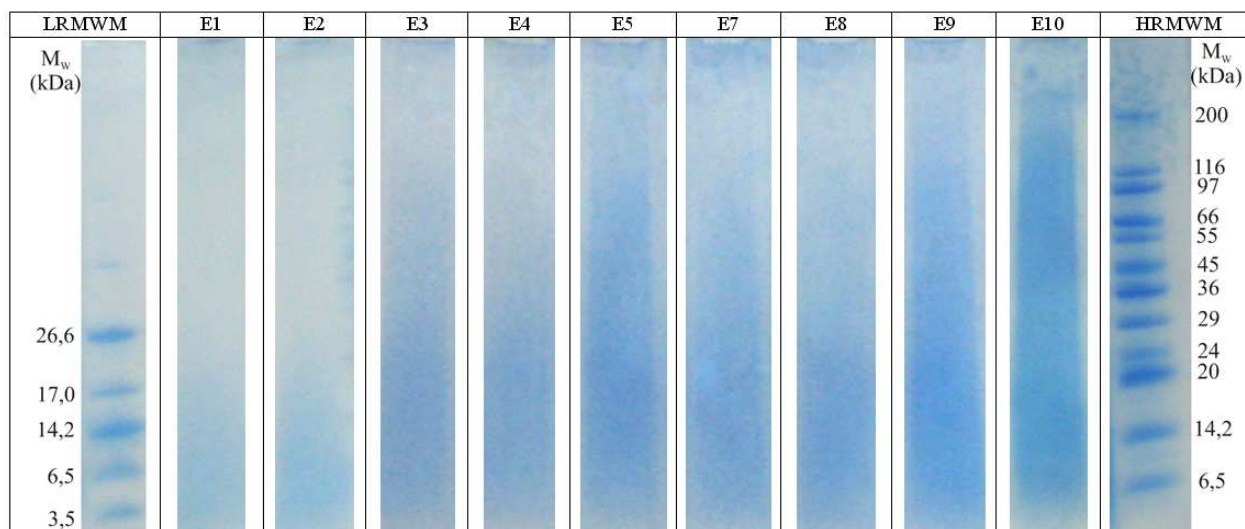
Jako třetí byly studovány vybrané vzorky ze experimentů hydrolyzy D, a to D1, D3, D5, D8 a D10. Z výsledků elektroforézy uvedených na obrázku 18 můžeme vidět, že u těchto vzorků převažují spíše frakce s nižší  $M_w$  (méně než 25 kDa). U vzorků D3, D5, D8 a D10 je přítomen také menší podíl frakcí se

střední molární hmotností kolem 50 kDa. Pouze u vzorků D3 a D8 byla zjištěna také přítomnost řetězců s  $M_w > 120$  kDa.



Obrázek 18 – Elektroforeogramy vzorků připravených dle podmínek D

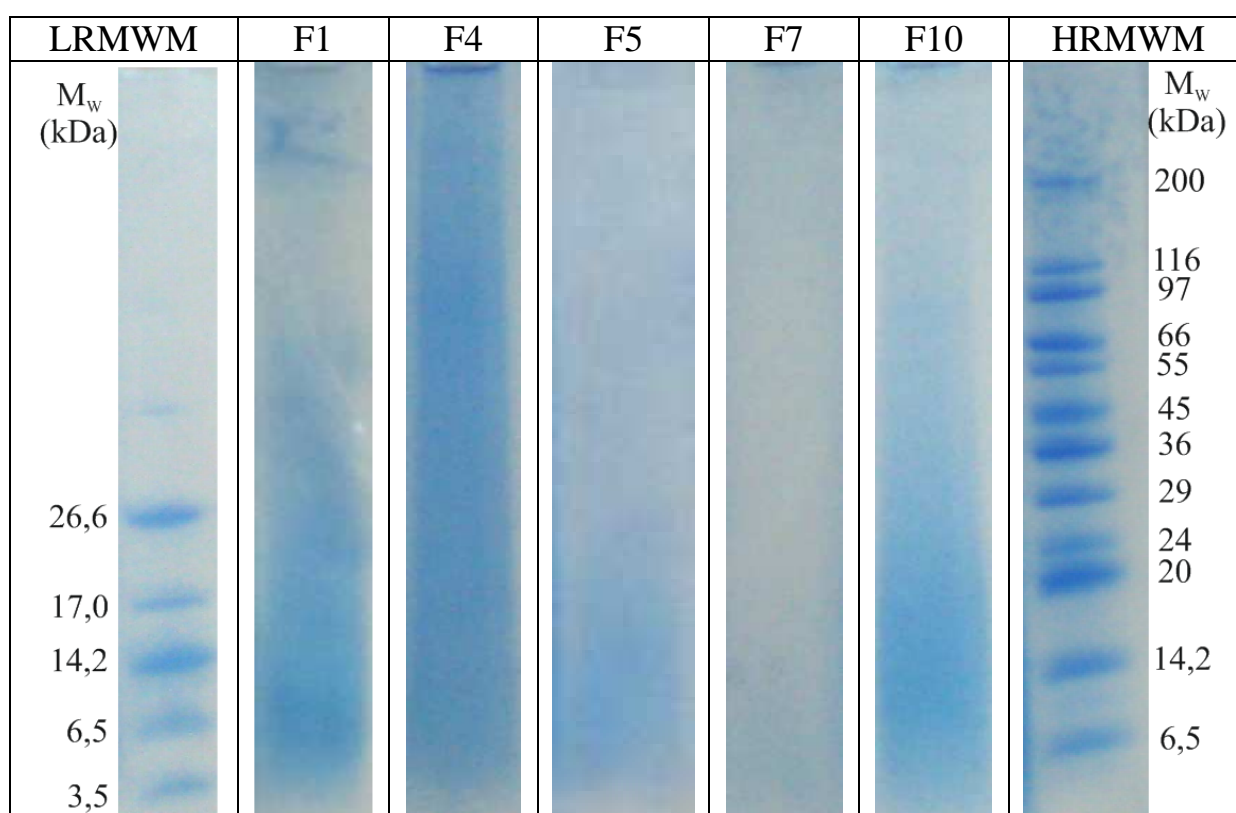
Nejvíce vzorků bylo studováno pro experimenty hydrolýzy E, kde byla elektroforéza provedena pro všechny vzorky kromě jednoho ze středových pokusů (E6), u kterého bylo předpokládáno, stejné složení a distribuce  $M_w$  jako u vzorku E5.



Obrázek 19 – Elektroforeogramy vzorků připravených dle podmínek E

Z výsledků uvedených na obrázku 19 vyplývá, že i u těchto vzorků převažují nízkomolekulární frakce ( $M_w$  3,5–25 kDa). Jako nejlepší byl zvolen vzorek E10 u něhož bylo zjištěno také větší množství delších řetězců s molární hmotností mezi 40 a 180 kDa. Malé množství těchto řetězců bylo zjištěno také ve vzorcích E5 a E9.

Poslední série vzorků pro stanovení distribuce molárních hmotností byla vybrána z experimentů rozkladu F. Elektroforeogramy těchto vzorků jsou uvedeny na obrázku 20. Bylo zjištěno, že tyto vzorky, podobně jako v předchozích případech, obsahují většinou kratší řetězce s  $M_w$  do 50 kDa. Výjimkou je zde vzorek F4, který obsahoval přibližně stejné množství výšemolekulárních frakcí s  $M_w > 60$  kDa. Největší část pak u vzorku F4 tvořily frakce s molární hmotností mezi 40 a 110 kDa.



Obrázek 20 – Elektroforeogramy vzorků připravených dle podmínek F

#### 4.1.3 Zhodnocení

Z výše uvedených výsledků lze konstatovat, že vzorky připravené v roztoku KOH (A, C) mají vyšší podíly výšemolekulárních frakcí než vzorky připravené v  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (D, E, F). Jako nejlepší byly celkově vyhodnoceny vzorky C7 a C10, u nichž byl pozorován poměrně vysoký podíl frakcí s  $M_w > 100$  kDa. Takto vysoké molární hmotnosti u hydrolyzátů připravených alkalicko-enzymovou hydrolyzou nebyly zjištěny v žádném z odborných článků zabývajících se stejným tématem. Alkalickou hydrolyzou připravili Cardamone a kol. [19]

hydrolyzáty s  $M_w$  6,5–20 kDa a Kawahara a kol. [20] stejným způsobem dosáhli  $M_w$  kolem 30 kDa. Jelikož většina autorů používala pro hydrolýzu keratinu vysokých koncentrací chemikálií a vysokých teplot lze očekávat, že jejich hydrolyzáty byly také nízkomolekulární. U přípravy KH bakteriální enzymovou hydrolýzou lze očekávat vyšší molární hmotnosti než při použití chemického postupu, avšak žádný z autorů neuvádí přesnou distribuci  $M_w$  svého hydrolyzátu. Dále nebyl také potvrzen původní předpoklad, že vzorky keratinových hydrolyzátů vyrobené při nižších zpracovatelských podmínkách (teploty, koncentrace, doby) budou mít větší podíl výšemolekulárních frakcí než hydrolyzáty vyrobené při vyšších podmínkách. Experiment C10 byl poté i z důvodu své poměrně široké distribuce molárních hmotností s poměrně vysokým obsahem výšemolekulárních frakcí vybrán pro další studium.

## **4.2 Složení a tepelné vlastnosti hydrolyzátů**

Analytická stanovení byla prováděna nejprve na vzorcích surové ovčí vlny, jejichž výsledky jsou uvedeny v kapitole 3.2.2. Ze všech provedených experimentů hydrolýzy bylo vybráno pouze několik připravených hydrolyzátů k podrobnějšímu zkoumání. Postupy všech zkoušek, podle kterých byly keratinové hydrolyzáty testovány, jsou uvedeny a popsány v kapitole 3.2.1.

### **4.2.1 Složení keratinových hydrolyzátů**

Z připravených keratinových hydrolyzátů byly vybrány pro analýzy vzorky vždy při minimálních a maximálních hodnotách sledovaných faktorů u experimentů C–F a pro experimenty E a F i jejich středové pokusy. Výsledky průměrných hodnot analytických stanovení jsou uvedeny v tabulce 12, směrodatné odchylky pak pro všechny měření byly nižší než 0,5 % proto nejsou v tabulce zaznamenány.

Největší obsah dusíku a tím i největší celkový obsah bílkovin byl zjištěn u experimentu C10, kde bylo naměřeno 12,53 % dusíku, což je téměř stejné množství jako u surové vlny. Z tohoto zjištění lze usuzovat, že v průběhu hydrolýzy nedošlo u tohoto experimentu k výrazné změně složení aminokyselin oproti surové vlně a při rozkladu byla velká část bílkovin keratinu z vlny převedena na hydrolyzát. Tuto úvahu potvrzuje i zjištěné množství síry ve vzorku hydrolyzátu (2,88 %), které je také velmi podobné jako u vzorku surové vlny (2,51 %). Naopak nejnižší obsah dusíku byl zjištěn u experimentu F1, kdy zřejmě i kvůli nízkému množství rozložené vlny bylo zjištěno pouze 5,27 % dusíku ve vzorku, což odpovídá asi 33 % celkových bílkovin. Celkově vyšší obsahy dusíku byly zjištěny u všech vzorků připravených při maximech sledovaných faktorů hydrolýzy (C10, D10, E10 a F10). Výjimkou je vzorek D1, který má zjištěný obsah dusíku 10,14 % což je jen o necelé 1 % méně než vzorek D10. Mezi těmito vzorky však byl také nejmenší rozdíl v množství



rozložené vlny. Lze tedy konstatovat, že čím je vyšší množství rozložené vlny, tím bude vyšší i zjištěné množství dusíku.

Tabulka 12 – Výsledky analytických stanovení u vybraných hydrolyzátů

Označení pokusu	Analytická stanovení				
	Dusík* (%)	Bílkoviny* (%)	Síra* (%)	Popel* (%)	Sušina (%)
C1	9,99	62,44	1,87	13,82	93,56
C10	12,53	78,31	2,88	14,93	94,32
D1	10,14	63,38	1,81	19,88	99,80
D10	11,00	68,75	3,24	15,28	99,80
E1	6,85	42,81	6,07	34,65	97,14
E5	8,44	52,75	5,47	32,37	96,13
E10	11,10	69,38	2,98	24,13	96,61
F1	5,27	32,94	6,54	33,86	95,62
F5	6,80	42,50	9,62	26,06	95,74
F10	9,87	61,69	4,08	35,85	95,34

\* vztaženo na sušinu vzorku

Dalším sledovaným ukazatelem je množství síry zjištěné v keratinových hydrolyzátech. Oproti surové vlně byl zjištěn nižší obsah síry u vzorků C1 a D1 a téměř stejný obsah síry u vzorku C10. Výrazné zvýšení obsahu síry pak bylo zjištěno u vzorku F5, kde byl stanoven obsah síry 9,62 % což je téměř 4x více než u surové vlny. Toto je zřejmě způsobeno tím, že při hydrolýze došlo k rozštěpení velkého množství vazeb keratinu a následnému přechodu siřných aminokyselin do roztoku keratinového hydrolyzátu.

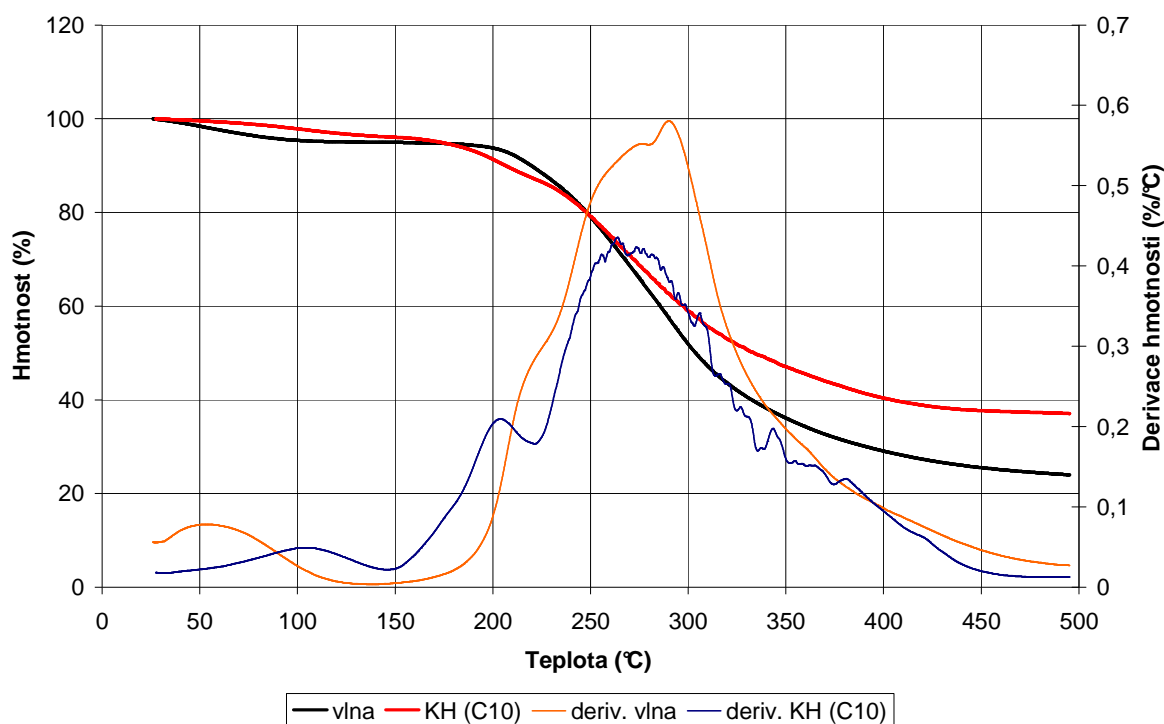
U všech zkoumaných hydrolyzátů došlo k výraznému nárůstu obsahu popela, který je způsoben použitím alkalického prostředí pro hydrolýzu. Zbytky alkálií poté zůstávají v roztocích keratinových hydrolyzátů a po vysušení tvoří nespálitelnou anorganickou část těchto hydrolyzátů. Nejnižší obsah popelovin byl zjištěn u hydrolyzátu C1 a C10, kde se pohybuje pod hranicí 15 %. Nejvyšší obsah popela byl poté zjištěn u vzorku F10, kde bylo stanoveno více než 35 % nespálitelných anorganických popelovin.

Posledním zjišťovaným stanovením byl obsah sušiny hydrolyzátů, na který byly všechny výsledky analytických stanovení přepočítávány. Mezi látky, které se v průběhu stanovení odpaří, patří zejména zbytková vlhkost keratinových hydrolyzátů. Sušina se u všech vzorků pohybovala nad 93 %. Nejvyšší sušina (téměř 100%) byla zjištěna u vzorků D1 a D10, které byly ovšem sušeny po hydrolýze při teplotě nad 100°C, zatímco zbylé vzorky byly vždy sušeny po hydrolýze při 60°C.

## 4.2.2 Termogravimetrická analýza

Termogravimetrická analýza byla prováděna dle postupu uvedeného v kapitole 3.2.1. Pro stanovení termogravimetrické analýzy byl vybrán vzorek hydrolyzátu vyrobený dle postupu C10, který byl srovnáván se vzorkem surové vlny. TG křivky obou sledovaných vzorků jsou uvedeny na obrázku 21.

U obou sledovaných vzorků je patrný pokles hmotnosti již od počátku měření až po asi 150°C, kdy dochází k odpařování volné a vázané vody ve vzorcích vlny i KH. Při 150°C má vzorek vlny hmotnost rovnou 95 % a vzorek KH hmotnost rovnou 96 % původní hmotnosti. Od teploty přibližně 150°C začíná zřejmě tání vzorků, které je provázeno dalším poklesem hmotnosti. Oba vzorky začínají prudce ztrácet na hmotnosti od teploty 225°C, kdy již dochází k degradaci keratinových řetězců. Kolem teploty 250°C začíná hmotnost vzorku vlny klesat výrazně rychleji než hmotnost vzorku KH. Při 500°C byl zjištěn obsah nespalitelných anorganických látek ve vlně asi 23 % a v KH asi 37 %.



Obrázek 21 – TG křivky surové vlny a keratinového hydrolyzátu

## 4.2.3 Zhodnocení

Z analýzy vybraných keratinových hydrolyzáatů lze usuzovat, že vzorky připravené při nižších podmínkách hydrolýzy mají nižší obsah dusíku a tím i bílkovin, tzn. že u těchto vzorků nebylo dosaženo výrazného množství rozložené vlny. Nejlepšího výsledku pak bylo dosaženo pro vzorek C10, který měl obsah dusíku 12,53 % a obsah bílkovin pak 78,31 %. Tento výsledek je srovnatelný s výsledkem, který popsal Dalev [59], jež ve své publikaci uvádí obsah proteinů asi 79,5 %. U většiny autorů pak nebývá obsah dusíku ani bílkovin uváděn a

věnují se spíše studiu aminokyselinového složení. Velký rozptyl byl zjištěn v obsahu síry, kdy u některých vzorků klesl oproti surové vlně a u jiných vzorků výrazně vzrostl, což je zřejmě způsobeno přechodem siřných aminokyselin z keratinových molekul do hydrolyzátů. Obsah popelovin oproti surové vlně vzrostl u všech vzorků, avšak u hydrolyzátů připravených v KOH byl obsah popelovin nižší o asi 20 % než u hydrolyzátů připravených v  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Pro další zpracování je pak nutné množství popelovin zredukovat což je popsáno v následující kapitole 4.3. TGA byla poté provedena pro hydrolyzát připravený podle postupu C10 a pro surovou vlnu, kde bylo zjištěno, že oba vzorky jsou tepelně odolné do  $150^\circ\text{C}$ , kdy začínají tát a jejich degradace poté začíná při asi  $225^\circ\text{C}$ , což odpovídá také zjištěným vlastnostem vlny popsaným v odborné literatuře [17].

### **4.3 Dialýza keratinových hydrolyzátů**

U všech připravených keratinových hydrolyzátů byl zjištěn nárůst obsahu popelovin, který je zřejmě způsoben použitím alkalických roztoků, které nelze filtrací ani odstředěním oddělit od připravených hydrolyzátů. Kvůli tomuto zvýšenému obsahu popelovin bylo nutné keratinové hydrolyzáty vyčistit. Jako metodu čištění (snížení obsahu popelovin) jsme zvolili dialýzu přes celulóзовou membránu (Sigma-Aldrich, USA) proti destilované vodě. Membrána byla ve tvaru válce o průměru 8 cm (plocha membrány byla přibližně  $270\text{ cm}^2/10\text{ cm}$  délky), na obou koncích byla uzavřena svorkami. Membrána měla propustnost pro látky s molární hmotností menší než 12 kDa, to znamená, že při dialýze byly odstraněny kromě zbytků alkalických roztoků také nízkomolekulární frakce keratinových hydrolyzátů. Pro zjištění optimálních podmínek provedení dialýzy bylo provedeno několik pokusů, které sledovaly vliv teploty, doby a výměny média při dialýze.

#### **4.3.1 Vliv teploty**

Jako první byl sledován vliv teploty na účinnost dialýzy (snižování obsahu popelovin). Nejprve byly připraveny roztoky hydrolyzátů rozpuštěním 3 g práškového hydrolyzátu ve 120 ml destilované vody při pokojové teplotě za stálého míchání na magnetickém míchadle. Po rozpuštění byl roztok hydrolyzátu vlit do připraveného rukávu z dialyzační membrány a uzavřen svorkami. Vzorek byl poté umístěn do PE nádoby o objemu 2 l a bylo k němu přilito 1200 ml destilované vody, tak aby byla membrána zcela ponořena pod hladinou. Dialýza těchto vzorků probíhala po dobu 72 hodin při teplotách 10, 25 a  $40^\circ\text{C}$  v prostředí destilované vody (poměr roztoku hydrolyzátu a vody byl 1:10). Celých 72 hodin dialýzy byly vzorky třepány na laboratorní třepačce. Po uplynutí doby dialýzy byl hydrolyzát vylit z membrány a zahuštěn na vakuové odparce při  $60^\circ\text{C}$ . Nakonec byl roztok hydrolyzátu vysušen při  $103^\circ\text{C}$  a u vysušeného hydrolyzátu bylo provedeno stanovení obsahu popelovin.

V tabulce 13 jsou znázorněny výsledky dialýzy keratinového hydrolyzátu při třech různých teplotách. Procentuelní pokles obsahu popelovin ve vyčištěném vzorku byl spočítán z rozdílu obsahu popelovin ve vzorku před dialýzou a po dialýze. Z tabulky 13 je také patrné, že největšího množství odstraněných popelovin z keratinových hydrolyzátů bylo dosaženo při teplotě 25°C, při této teplotě klesl obsah zjištěných popelovin o více než 76 %. Při snížené teplotě (10°C) byl poté pokles obsahu popelovin asi o 70 % a při zvýšené teplotě (40°C) byl zjištěn pokles obsahu popelovin téměř 66 %.

*Tabulka 13 – Pokles obsahu popelovin při různých teplotách provádění dialýzy*

<b>Teplota (°C)</b>	<b>Pokles obsahu popelovin (%)</b>	<b>Směrodatná odchylka (%)</b>
10	70,75	0,9
25	76,5	1,2
40	65,83	1,6

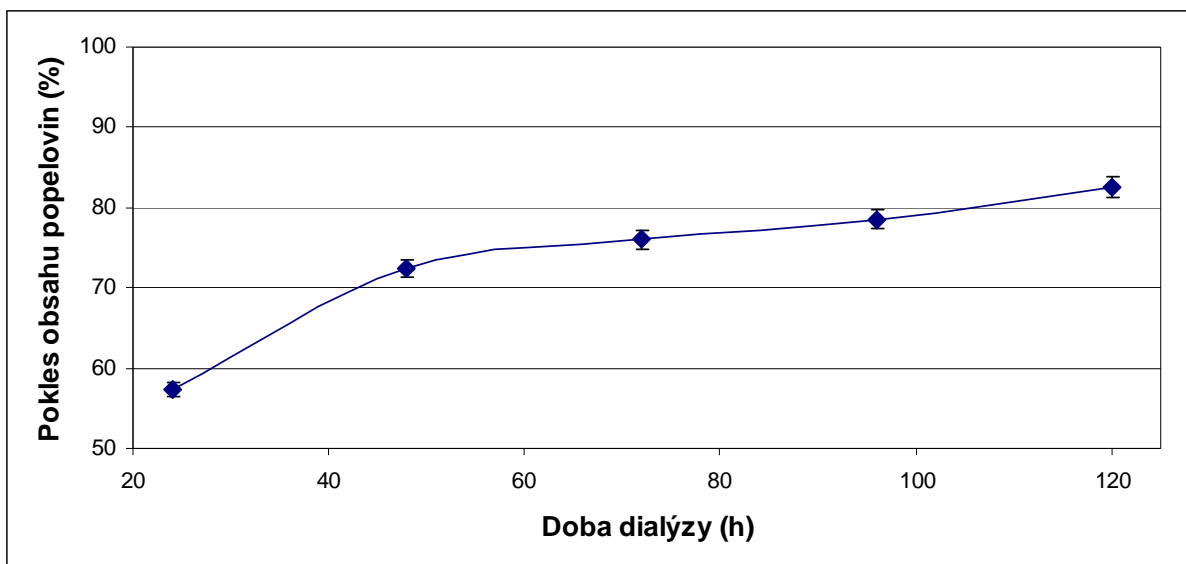
#### **4.3.2 Vliv výměny média**

V další sadě pokusů byl sledován vliv výměny média (destilované vody) za čistou. Vzorky pro dialýzu byly opět připraveny podle postupu uvedeného výše a stejně tak provedení dialýzy bylo podobné. Vzorky keratinového hydrolyzátu byly dialyzovány po dobu 72 hodin při 40°C za třepání, proti destilované vodě (poměr hydrolyzát : voda = 1:10). Jednomu ze vzorků byla vždy po 24 hodinách dialýzy vyměněna voda za čistou, zatímco druhý vzorek byl dialyzován po celou dobu v jednom médiu. Po ukončení dialýzy byly vzorky opět vylity a zahuštěny na vakuové odparce. Po následném vysušení pak bylo opět stanoveno množství popelovin. Při výměně destilované vody za čistou v průběhu dialýzy je pokles obsahu popelovin výrazně vyšší než u vzorku bez výměny média. U pokusu, kde probíhala dialýza 72 hodin stále ve stejném prostředí destilované vody, bylo dosaženo jen asi 43% úbytku popelovin, zatímco u vzorku, kde bylo prostředí destilované vody vždy po 24 hodinách nahrazeno čistým je pokles popelovin více než 65%, tedy o více než 20 % vyšší.

#### **4.3.3 Vliv doby**

Posledním faktorem, který byl sledován, je doba průběhu dialýzy. Pro tento experiment bylo dle výše popsaného postupu připraveno 5 vzorků roztoků keratinových hydrolyzátů. Vzorky byly opět dialyzovány proti destilované vodě (poměr hydrolyzát : voda = 1 : 10) při teplotě 25°C za neustálého třepání. Sledována byla doba v rozmezí 24–120 hodin a vždy po 24 hodinách byla u všech vzorků vyměněna destilovaná voda za čistou. Každých 24 hodin byl poté ukončen jeden experiment, který byl ihned zahuštěn a vysušen jako v předchozích případech. Následovalo opět stanovení množství zbylých

popelovin ve vzorku. Na následujícím obrázku 22 je znázorněna časová závislost poklesu obsahu popelovin. Výsledky ukazují, že nejrychleji probíhá dialýza v průběhu prvních 24 hodin, kdy je odstraněno téměř 60 % popelovin. Při delších časech rychlost odstraňování popelovin ze vzorků postupně klesá. Po 120 hodinách dialýzy bylo ze vzorků odstraněno 82 % popelovin. Jako optimální čas jsme zvolili 72 hodin trvání dialýzy, kdy je po této době ve vzorku již méně než čtvrtina z původního obsahu popelovin.



Obrázek 22 – Závislost poklesu obsahu popelovin na době provádění dialýzy

#### 4.3.4 Zhodnocení

Ze všech výše provedených pokusů byla následně vypracována optimální metodika čištění připravených keratinových hydrolyzátů, které bylo dále prováděno u všech vzorků určených pro testování jejich aplikačních možností. Dialýza byla prováděna za laboratorní teploty (přibližně 23°C) po dobu 72 hodin a za stálého třepání. Objem destilované vody byl vždy 10x vyšší než objem roztoku keratinového hydrolyzátu. Vždy po uplynutí 24 hodin dialýzy byla destilovaná voda vyměněna za čistou. Po dialýze byl vyčištěný hydrolyzát zahuštěn při 60°C na vakuové odparce a následně vysušen při 80°C. Suchý hydrolyzát byl rozdrcen na prášek v třecí misce a uchováván v uzavřené nádobě v exsikátoru s přesušeným silikagelem při pokojové teplotě. Výsledky provádění dialýzy nebylo možné porovnat s odbornou literaturou, jelikož autoři sice uvádějí dialýzu jako metodu, kterou použili pro čištění svých hydrolyzátů, ale již se nezabývají dalšími podrobnostmi [93, 94].

#### 4.4 Příprava zásobního množství keratinového hydrolyzátu

Z výše uvedených výsledků hydrolyz a charakterizací keratinových hydrolyzátů byl vybrán postup hydrolyzy C10 pro přípravu většího zásobního

množství keratinového hydrolyzátu. Tento KH byl dále využíván pro přípravu vzorků k hodnocení aplikačních možností hydrolyzátů.

Hydrolýza byla prováděna za stejných podmínek ve 40-ti násobném množství než v původním experimentu. Po vyprání, odtučnění a pomletí byla vlna hydrolyzována v 0,6% KOH při 90°C nejprve v pračce, kde byla míchána a poté v inkubátoru při stejné teplotě. Ve druhém stupni bylo opět upraveno pH a přidáno 5 % enzymu Savinase 6.0T a bylo pokračováno v hydrolýze opět nejprve za míchání v pračce a následné inkubaci při 60°C. Nakonec byla nerozložená vlna odseparována filtrací a následným odstředěním a KH byl zahuštěn a vysušen při 60°C. U takto připraveného KH došlo k mírnému snížení účinnosti hydrolýzy z původních téměř 74 % na 67 %. Tato odchylka od experimentálního výsledku může být způsobena např. sníženou přesností při navažování jednotlivých chemikálií nebo vyššími ztrátami při filtraci. U hydrolyzátu bylo poté zjištěno analytické složení. Celkový obsah dusíku podle Kjeldahla byl zjištěn = 11,8 % (celkový obsah bílkovin po vynásobení faktorem 6,25 = 73,8 %), popeloviny = 16,0 %, síra = 3,2 %, vlhkost = 7 %. Toto složení se nijak výrazně nemění oproti složení zjištěnému u původního hydrolyzátu z experimentu C10.

Pro některé aplikace byl tento KH přečištěn dialýzou přes celulóзовou membránu proti destilované vodě. Dialýza probíhala za stálého třepání při pokojové teplotě po dobu 72 hodin (vždy po 24 hodinách byla vyměněna destilovaná voda). Po dialýze byl hydrolyzát zahuštěn a vysušen při 60°C. Obsah popelovin byl tímto snížen na 5,4 %.

## 5. FILMY Z KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU

Cílem této kapitoly je popsat možnosti přípravy a vlastností filmů z keratinových hydrolyzátů s přidavkem aditiv (sít'ovadlo, změkčovadlo). U filmů byl sledován vliv přidavku sít'ovadla a změkčovadla na jejich mechanické vlastnosti a složení. Sít'ované filmy byly vždy porovnávány s filmem bez přidavku sít'ovadla, ale s totožným obsahem změkčovadla. Část výsledků uvedených v této kapitole byla prezentována na české konferenci (viz. Seznam publikací P14).

### 5.1 Postup přípravy filmů

Pro přípravu filmů byl použit keratinový hydrolyzát ze zásobního množství připravený dle pokusu rozkladu C10, který byl přečištěn dialýzou přes celulóзовou membránu proti destilované vodě.

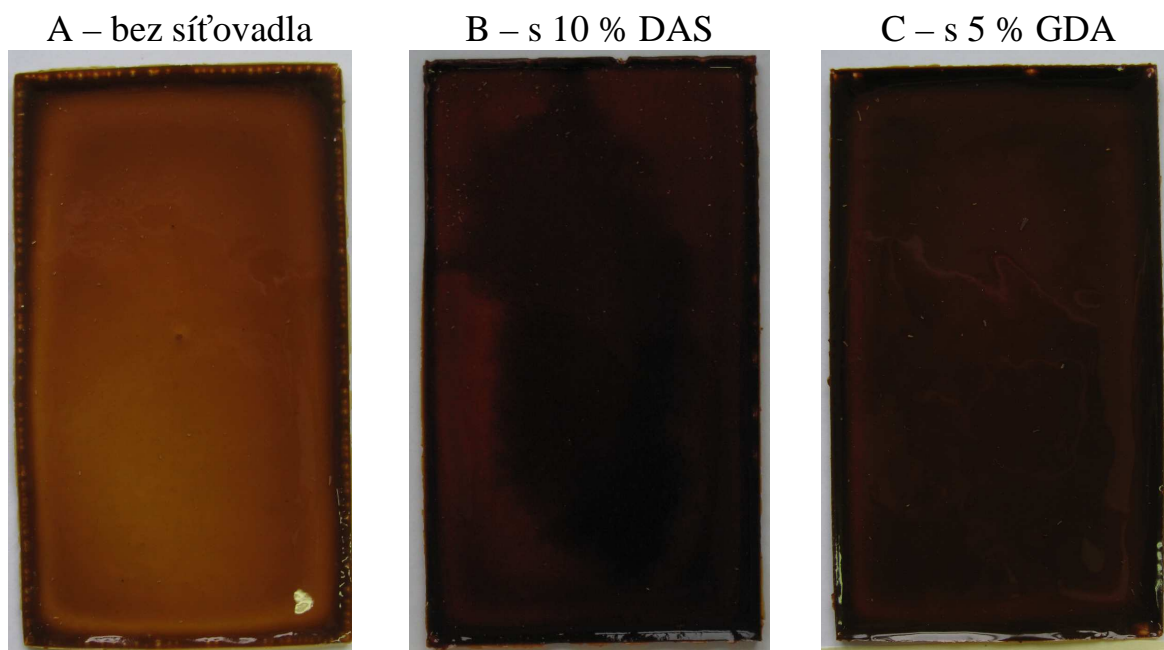
Tabulka 14 – Seznam a složení připravených filmů z KH pro další analýzy

Číslo filmu	Označení filmu	Obsah glycerolu (%)	Sít'ovadlo	Obsah sít'ovadla (%)
film 1	KH0	30	bez	0
film 2	KH5DAS	30	DAS	5
film 3	KH10DAS	30	DAS	10
film 4	KH5DET	30	DET	5
film 5	KH10DET	30	DET	10
film 6	KH5GDA	30	GDA	5
film 7	KH10GDA	30	GDA	10
film 8	KH040	40	bez	0
film 9	KH1DAS40	40	DAS	1
film 10	KH5DAS40	40	DAS	5
film 11	KH10DAS40	40	DAS	10
film 12	KH1GDA40	40	GDA	1
film 13	KH5GDA40	40	GDA	5
film 14	KH10GDA40	40	GDA	10
film 15	KH10GOX	30	GOX	10
film 16	KH10DCE	30	DCE	10
film 17	KH10EPCH	30	EPCH	10

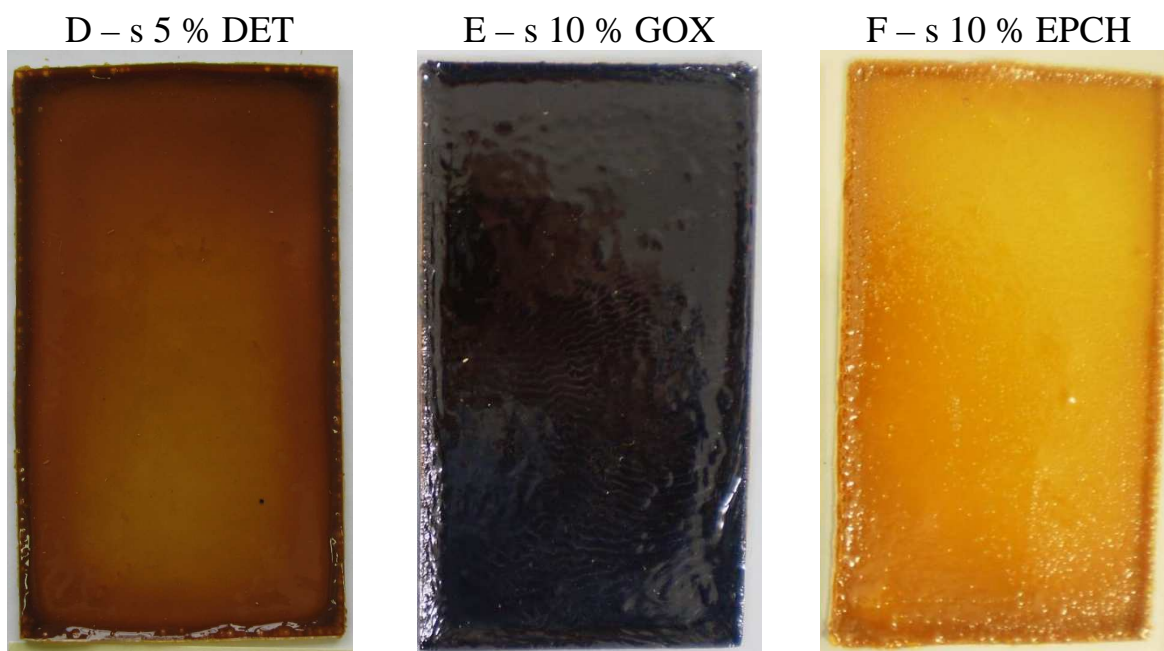
Z přečištěného hydrolyzátu byly nejprve připraven 15% roztok ve vodě. Po úplném rozpuštění hydrolyzátu byl přidán glycerol (10–40 % na navážku KH) jako změkčovadlo a důkladně zamíchán do roztoku na magnetickém míchadle. Nakonec bylo do roztoku přidáno sít'ovadlo a směs byla intenzivně míchána po dobu nejméně 5 minut aby došlo k důkladné homogenizaci. Jako sít'ovadla byly zkoušeny glutardialdehyd (GDA), dialdehyd škrobu (DAS), diethylester kyseliny vinné (DET), glyoxal (GOX), dichlorethan (DCE) a epichlorhydrin

(EPCH) v množství 1–10 % na navážku hydrolyzátu. Celková hmotnost směsi byla vždy 45 g. Při použití DAS bylo ještě nutné upravit pH roztoku na 11,5–12 pro lepší rozpustnost síťovadla.

Takto připravené směsi byly vylity do silikonových forem o rozměrech 70 x 120 x 3 mm, ve kterých byly sušeny 48 hodin při teplotě 60°C. Po vysušení byly filmy vyjmuty z forem, byl zhodnocen jejich vzhled a základní vlastnosti. Filmy byly skladovány v uzavřených PE sáčcích v exsikátoru s přesušeným silikagelem při pokojové teplotě.



Obrázek 23 – Fotografie vybraných filmů s 30 % glycerolu bez síťovadla, s DAS a GDA



Obrázek 24 – Fotografie vybraných filmů s 30 % glycerolu s DET, GOX a EPCH



Filmy připravené z KH měly dle použitého síťovadla světle hnědou až tmavě červeno-hnědou barvu. Tloušťka filmů se pohybovala mezi 0,3–0,5 mm a byla vždy mírně větší při okrajích filmu. Složení jednotlivých dále testovaných filmů a fotografie vybraných filmů jsou uvedeny v tabulce 14 a na obrázcích 23 a 24. Popis základních mechanických vlastností filmů se velmi liší podle množství použitého změkčovadla a je uveden v samostatné kapitole 5.2.

## 5.2 Sledování vlivu obsahu změkčovadla

Jelikož je připravený keratinový hydrolyzát křehký je nutné filmy z něj připravené vhodně upravit přidáním aditiv. Pro přípravu filmů byl kvůli snížení křehkosti jako změkčovadlo vybrán glycerol (propan-1,2,3-triol), který je běžně používaným změkčovadlem filmů [94] a povlaků v potravinářském průmyslu. Byly testovány přídavky 10, 20, 25, 30 a 40 % glycerolu na navážku hydrolyzátu. Po vysušení byly vizuálně posouzeny vlastnosti jednotlivých filmů a vyhodnocen byl také vliv množství změkčovadla na mechanické vlastnosti filmů.



Obrázek 25 – Fotografie filmu s 30 % glycerolu a 10 % DCE v ohybu

Filmy s přídavkem 10 % změkčovadla byly stále velmi křehké a již při vyjmutí ze silikonové formy praskaly a nebyly dále použitelné. Stejný problém se projevil i u filmů s přídavkem 20 % změkčovadla, které byly také stále příliš křehké. Tyto filmy šly již vyjmout z formy, ale vždy došlo k jejich narušení nebo prasknutí. Lepší vlastnosti měly filmy s přídavkem 25 a 30 % glycerolu, které šly již dobře vyjmout z forem a byly poměrně ohebné bez praskání (viz. Obrázek 25). Povrch těchto fólií však byl v závislosti na použitém síťovadle mírně lepkavý. Filmy s přídavkem 40 % změkčovadla byly nejvíce měkké a ohebné a jejich povrch byl také nejvíce lepkavý. Při vytahování z forem se také

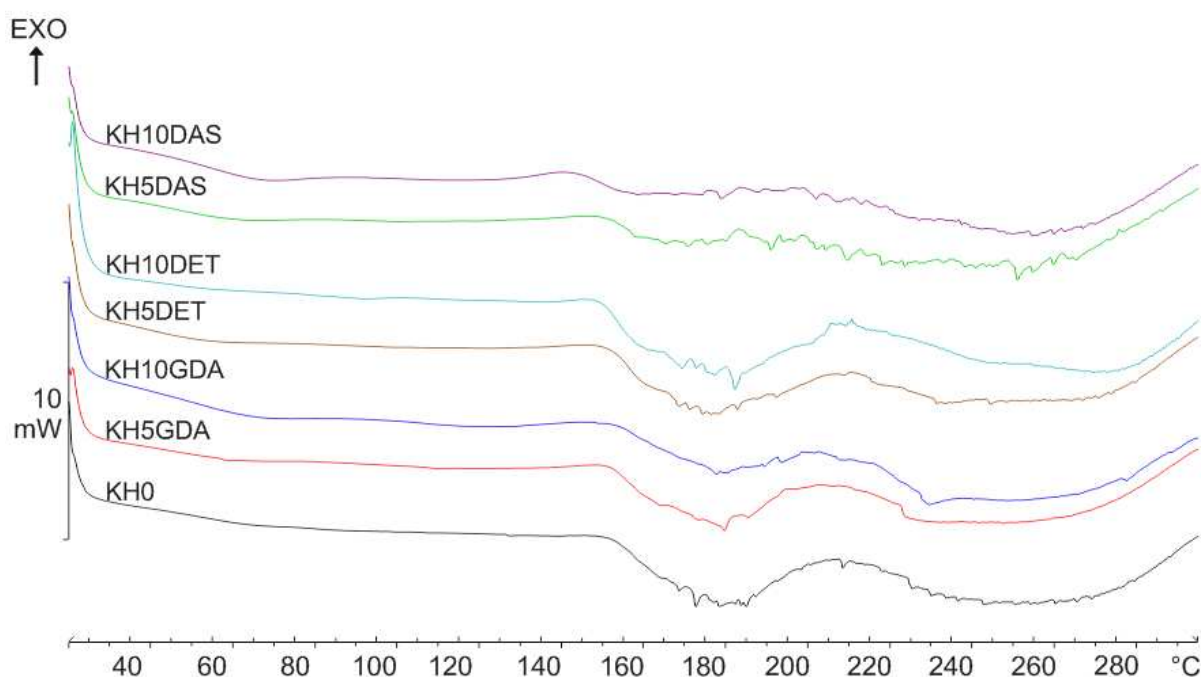
protahovaly, a tím docházelo k jejich deformaci. S časem se filmy stávaly křehčími a ztrácely svou ohebnost.

### 5.3 Vlastnosti filmů

U vybraných filmů bylo provedeno několik měření pro zjištění fyzikálně-mechanických vlastností a také bylo zkoumáno analytické složení filmů. Popis podmínek a průběhů jednotlivých metod je uveden v kapitole 3.2.1. Případné rozšiřující informace jsou pak uváděny u jednotlivých analýz.

#### 5.3.1 Diferenciální skenovací kalorimetrie

Touto metodou byly testovány vzorky filmů 1–7 (viz. Obrázek 26) a 15–17 (viz. Obrázek 27), které měly vždy přísávek 30 % glycerolu.

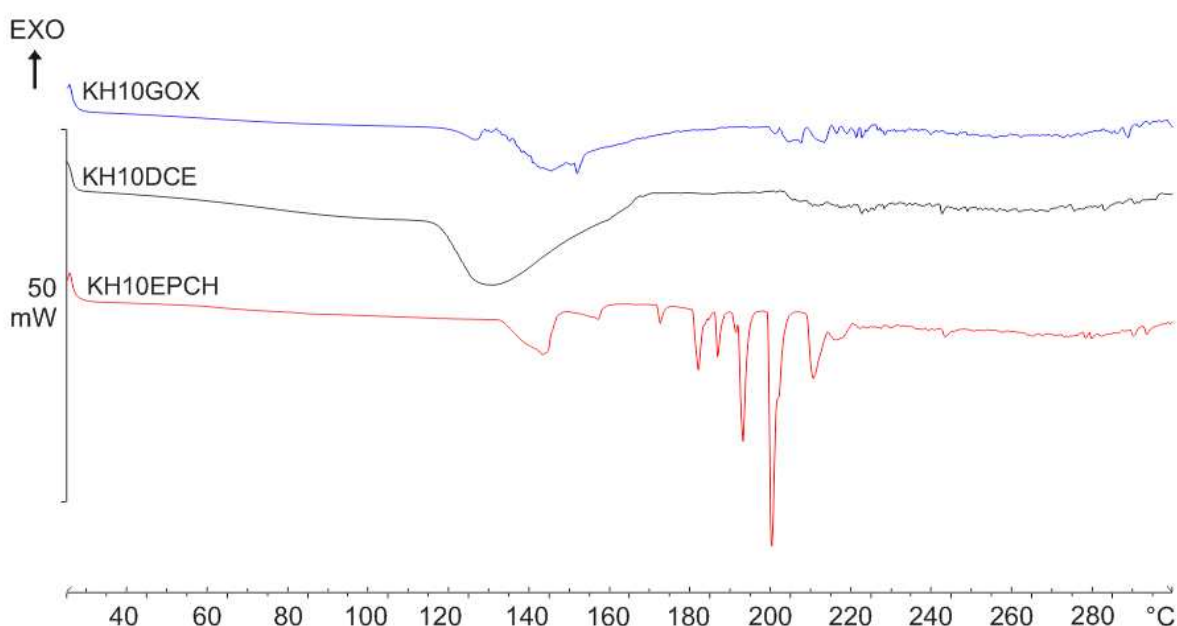


Obrázek 26 – DSC křivky filmů bez sířovadla a sířovaných 5 a 10 % GDA, DET a DAS

Všechny analyzované filmy mají DSC křivky s podobnými průběhy. U všech křivek jsou vidět endotermní děje, které souvisí s odpařováním zbytkové volné a vázané vlhkosti ve filmech, dále mohou souviset s táním vzorků a odpařováním zbytků některých sířovadel nebo mohou souviset s tepelnou degradací vzorků. Film KH0 bez přísavku sířovadla má první výrazný endotermní pík od teploty 150°C s minimem kolem 185°C, tento pík zřejmě souvisí s táním vzorku. Další pík na této křivce začíná při teplotě 213°C, kdy zřejmě začíná vzorek filmu degradovat. Kolem teploty 290°C by mělo také docházet k odpařování glycerolu. Tyto výsledky jsou mírně nižší než u filmů připravených jinými metodami, kdy byl endotermní pík zjištěn až při teplotách kolem 250°C [37]. Filmy 4–7 s přísavky sířovadel GDA a DET mají téměř totožný průběh jako

KH0. Všechny čtyři filmy mají počátek tání vzorků kolem teploty 150°C a degradace v rozmezí teplot 205–215°C. U filmů KH5GDA a KH10GDA může při teplotě kolem 187°C také docházet k odpařování zbytků glutardialdehydu. Diethylester kyseliny vinné se poté odpařuje ze vzorků filmů KH5DET a KH10DET při teplotách nad 280°C spolu s glycerolem. Vzorky filmů s přísadkou DAS mají mírně nižší nástup tání a to při teplotě 147°C pro KH5DAS a 143°C pro KH10DAS. Také nástup degradace u těchto vzorků je nižší oproti vzorku bez síťovadla KH0 a to při asi 203°C.

Na obrázku 27 jsou uvedeny DSC křivky vzorků filmů síťovaných glyoxalem, dichlorethanem a epichlorhydrinem. Tyto tři vzorky se liší oproti nesíťovanému filmu více než zbylé testované filmy. U vzorku síťovaného EPCH je viditelný endotermní pík s počátkem při teplotě asi 130°C a minimem při 143°C. Tento pík zřejmě opět souvisí s táním vzorku a případným odpařováním EPCH. Degradace poté nastává nad teplotou 170°C. Vzorek síťovaný DCE má počátek tání kolem teploty 115°C stejně jako vzorek síťovaný GOX. Degradovat začínají tyto vzorky kolem teploty 200°C.



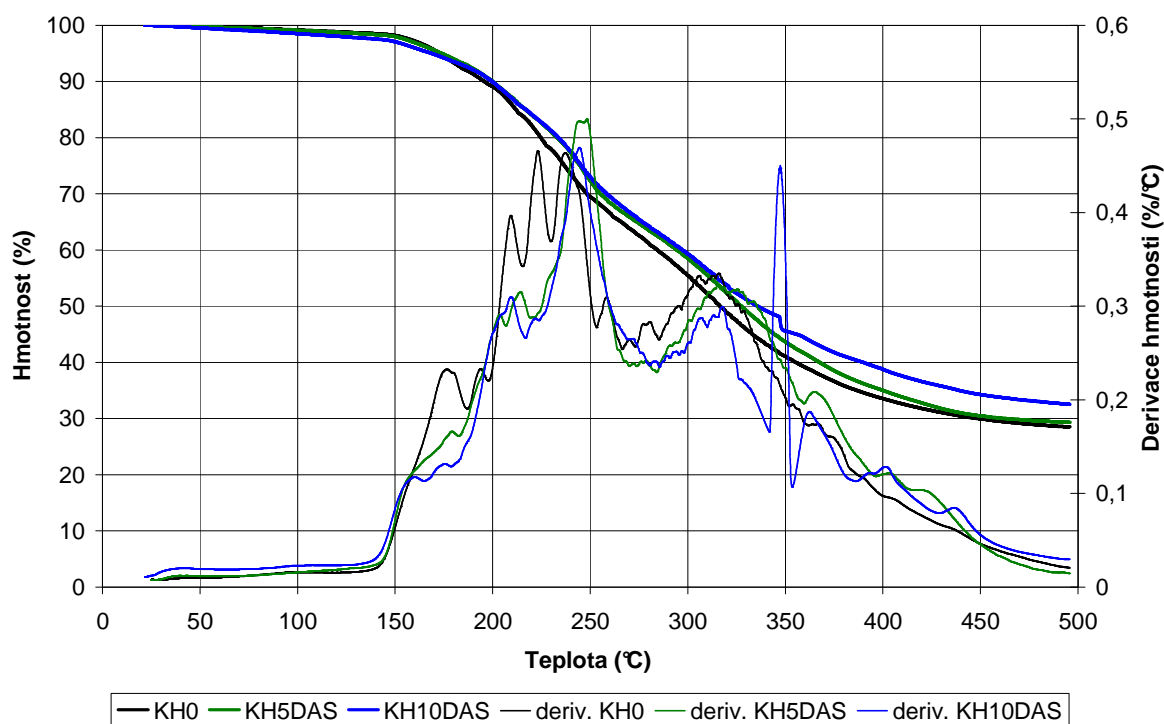
Obrázek 27 – DSC křivky filmů síťovaných 10 % EPCH, DCE a GOX

### 5.3.2 Termogravimetrická analýza

Metodou termogravimetrické analýzy byly testovány a hodnoceny filmy 1–7 se síťovadly GDA, DET a DAS a 30 % glycerolu. TGA křivky testovaných filmů jsou zobrazeny na obrázcích 28–30 a jsou porovnávány vždy s nesíťovaným vzorkem, který je uveden na všech obrázcích.

Z naměřených hodnot je patrné, že všechny vzorky mají velmi podobný průběh závislosti hmotnosti na teplotě. Hmotnost všech vzorků hned od počátku mírně klesá, což je způsobeno odpařováním obsažené vody ve filmech. Nesíťovaný vzorek KH0 začíná ztrácet na hmotnosti asi od teploty 135°C, kdy

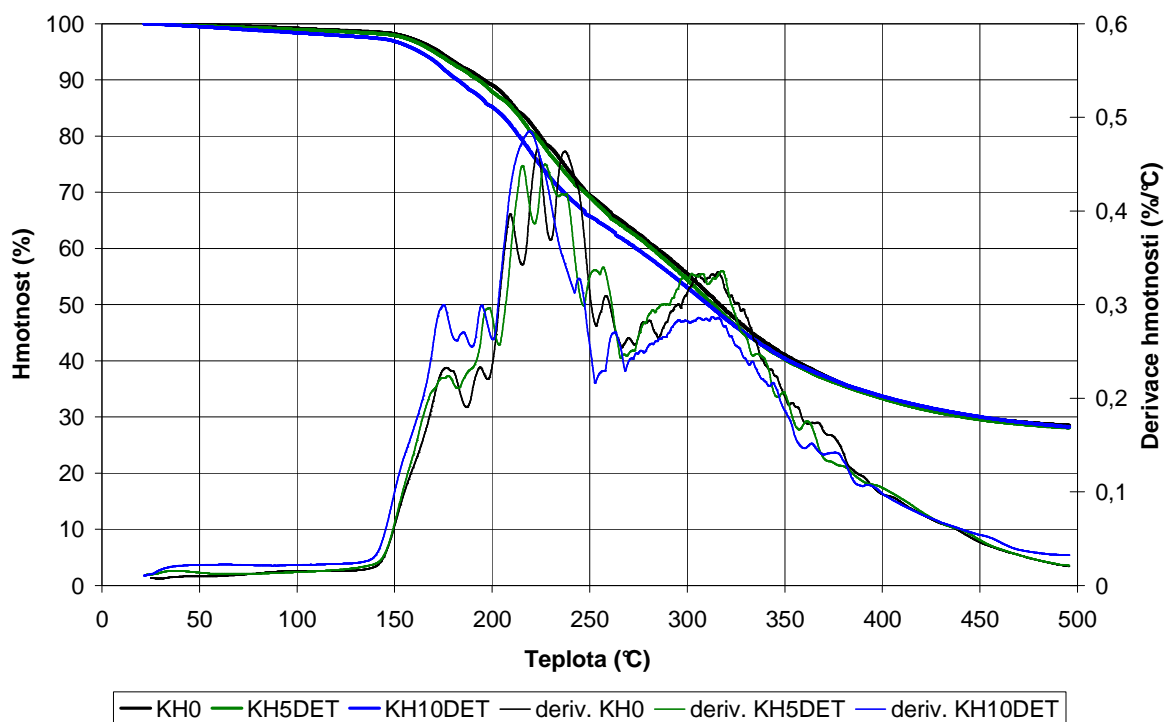
měl stále 98,5 % původní hmotnosti. Při této teplotě zřejmě začíná tání vzorků, které je na křivce derivace zobrazeno prvním píkem. Tento děj je provázen poklesem hmotnosti až na 89 %. Od teploty 199°C začíná vzorek degradovat a kolem teploty 286°C se z filmu začíná odpařovat glycerol. Nespálené anorganické látky (popeloviny) tvoří po ukončení měření 28,5 % z původní hmotnosti filmu.



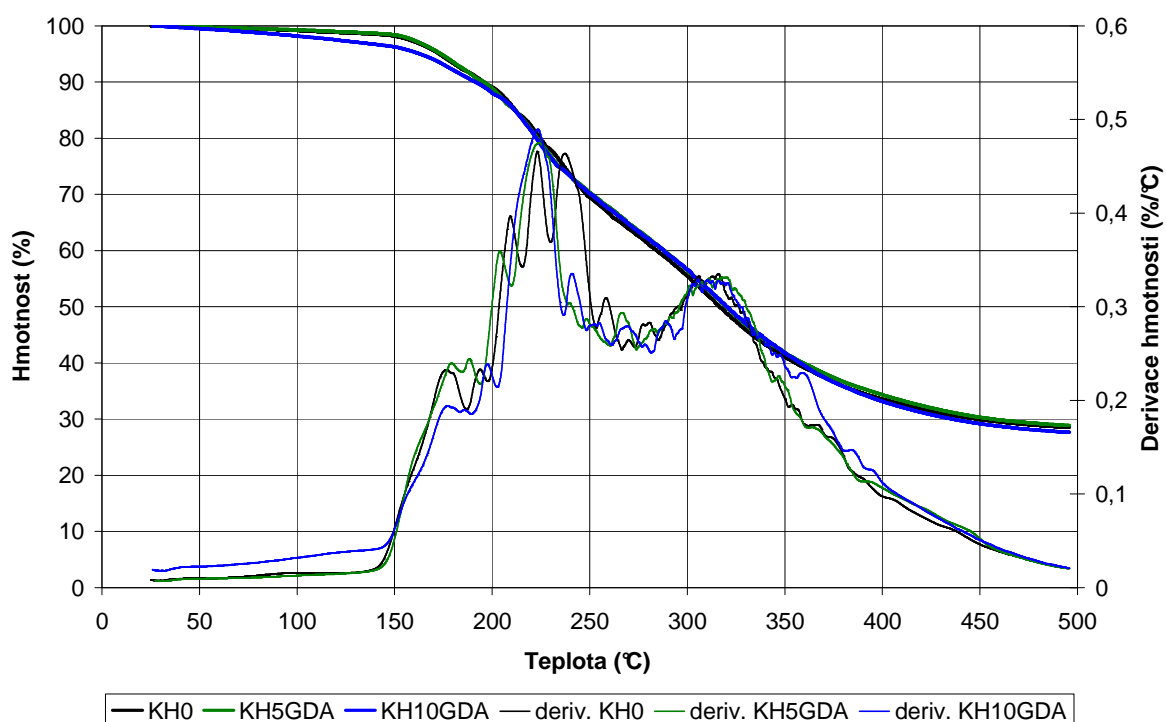
Obrázek 28 – TGA křivky nesíťovaného filmu a filmů s 5 a 10 % DAS

Filmy síťované DAS (KH5DAS a KH10DAS) mají velmi podobný průběh. Tání vzorků probíhá zřejmě v intervalu 135–204°C a je provázeno poklesem hmotnosti z 97,7 % na 88,5 %. Nad teplotou 205°C poté vzorky rychle ztrácí na hmotnosti, oproti nesíťovaným vzorkům je ovšem ztráta hmotnosti nižší. Zbylé popeloviny poté tvoří 29,3 % hmotnosti filmu KH5DAS a 32,5 % hmotnosti KH10DAS.

Téměř stejný průběh křivek jako má nesíťovaný vzorek můžeme vidět na obrázku 29 také pro vzorky síťované DET. Oba síťované vzorky začínají tát při teplotě kolem 135°C, jejich hmotnosti jsou při 201°C rovny 85 (KH5DET) respektive 87,5 % (KH10DET). Při teplotách nad 201°C začínají vzorky degradovat a při asi 270°C se začíná odpařovat nezreagovaný DET a poté glycerol. Obsah zbylých popelovin je poté 28 %.



Obrázek 29 – TGA křivky nesíťovaného filmu a filmů s 5 a 10 % DET



Obrázek 30 – TGA křivky nesíťovaného filmu a filmů s 5 a 10 % GDA

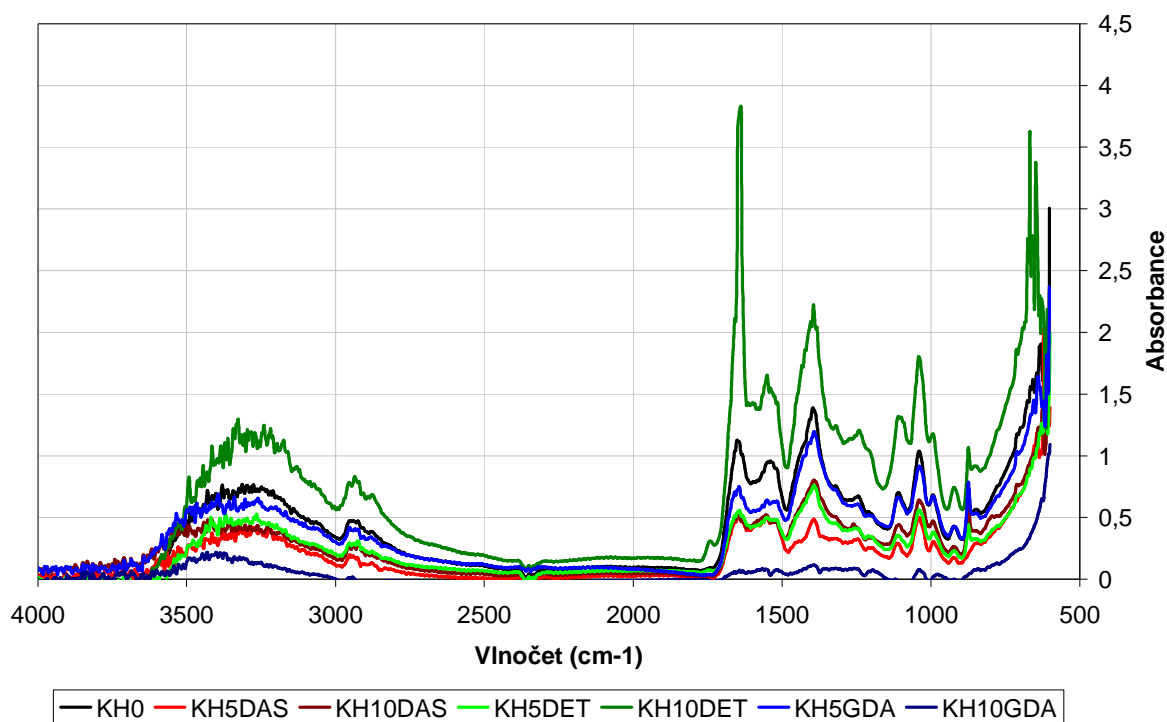
U vzorků síťovaných GDA je průběh křivek opět velmi podobný křivce KH0. Posun lze u těchto vzorků zaznamenat při počátku tání, kdy vzorky KH5GDA a KH10GDA začínají tát až při teplotě kolem 140°C, při které je jejich hmotnost kolem 98,7 % pro vzorek KH5GDA, respektive 96,7 % pro vzorek KH10GDA.

Degradace začíná u obou vzorků kolem teploty 205°C, kdy jejich hmotnost klesla na 87 % původní hmotnosti. Při této teplotě by měl být již také odpařen zbylý GDA. Obsah popelovin těchto filmů se opět pohybuje kolem 28 %.

U termogravimetrické analýzy byl zaznamenán pozitivní výsledek pro filmy síťované glutardialdehydem, u kterých došlo k posunutí teploty první výraznější ztráty hmotnosti ze 135°C na 140°C. Zbylé vzorky se v teplotách ani v úbytcích hmotnosti příliš nelišily od filmu bez přídavku síťovadla. Výsledky TGA filmů nebyly porovnávány s odbornou literaturou, jelikož se žádný z autorů nezaměřil na tuto metodu hodnocení.

### 5.3.3 Infračervená spektroskopie

Výsledky FTIR analýzy jsou uvedeny na následujícím obrázku 31. Testované filmy se shodují v polohách píků a liší se vždy jen v hodnotách absorbovaného záření.



Obrázek 31 – FTIR spektra vybraných filmů bez síťovadla, s DAS, s GDA a s DET

Oproti nesíťovanému filmu KH0 mají téměř všechny síťované filmy nižší hodnoty absorbancí v jednotlivých pásmech vlnočtů. Jediný vzorek, s vyššími hodnotami absorbovaného záření je film KH10DET, kde je patrný zejména nárůst v pásmu vlnočtů 880–1170  $\text{cm}^{-1}$ , ve kterém mají své charakteristické píky -OH skupiny a také -CO- skupiny, což je zřejmě způsobeno větším množstvím přidaného esteru kyseliny vinné (síťovadlo). Dalšího výrazného nárůstu si lze všimnout v pásmu 1350–1490 a rovněž 1490–1720  $\text{cm}^{-1}$ , kde jsou charakteristické píky -CH<sub>2</sub>- a -CONH- skupin. Poslední výraznější rozdíl mezi

tímto filmem a nesít'ovaným filmem je vidět v pásu 3000–3600  $\text{cm}^{-1}$ , kde jsou opět zastoupeny -CONH- vazby. Tyto odlišné hodnoty by pak mohly znamenat více nově vytvořených vazeb mezi řetězci keratinového hydrolyzátu.

#### 5.3.4 Sledování rozpustnosti filmů

Vzorky jednotlivých filmů byly podrobeny zkoušce rozpustnosti v několika rozpouštědlech. Této zkoušce byly podrobeny filmy 9–17, které byly postupně rozpouštěny ve vodě, ethanolu, acetonu a směsi koncentrovaných kyselin mravenčí a octové (2:1). Z jednotlivých filmů byly ustříženy vzorky o rozměrech asi 2 x 2 cm a ty byly poté ponořeny do jednotlivých rozpouštěcích médií. Rozpustnost byla sledována vizuálně a byl hodnocen vliv použitého rozpouštědla na vzorek filmu.

Filmy z keratinových hydrolyzáatů se ukázaly jako odolné proti rozpouštění v ethanolu, kde jsou zřejmě rozpustné jen velmi krátké řetězce KH, protože došlo k mírnému zabarvení ethanolu po ponoření filmů. Stejně tak se neprokázala rozpustnost těchto vzorků v acetonu. Vzorky ponořené do směsi kyseliny mravenčí a octové se rozpustily vždy do 30 minut. Tohoto poznatku by se dalo využít pro další zpracování síťovaných KH např. pro přípravu vláken. Nejlepším rozpouštěcím médiem je voda, ve které došlo k rozpouštění všech připravených vzorků. Nejdříve byly rozpouštěny vzorky bez síťovadla a vzorky síťované GOX, DCE a EPCH, které se rozpustily za méně než 15 minut. Vzorky z filmů KH1DAS40 a KH1GDA40 se rozpustily asi za 20 minut, následovány vzorky KH5DAS40 a KH10DAS40, jejichž rozpouštění trvalo kolem 30 minut. Největší odolnost proti rozpouštění ve vodě prokázaly vzorky s přídavkem 5 a 10 % GDA (KH5GDA40 a KH10GDA40), které se rozpustily až po více než 60 minutách.

#### 5.3.5 Složení filmů

U vybraných filmů 8–14 byly provedeny analýzy obsahu sušiny, dusíku a obsahu čistých bílkovin. Veškerá stanovení byla provedena podle metodik popsanych v kapitole 3.2.1. Výsledky jednotlivých stanovení jsou uvedeny v následující tabulce 15. Výsledky v tabulce jsou uváděny jako průměr ze dvou měření se směrodatnou odchylkou nižší než 0,5 %.

U všech zkoumaných filmů byla zjištěna sušina vzorků kolem 95 %, což je předpokládaný výsledek, jelikož filmy byly sušeny pouze při teplotě 60°C. Ve srovnání s původním KH (12,53 %) došlo u všech vzorků ke snížení obsahu dusíku, což je způsobeno obsahem změkčovadla a síťovadla ve vzorcích filmů. Stejně tak klesá i obsah čistých bílkovin, který koresponduje s tím, že ve vzorcích analyzovaných filmů je 40 % změkčovadla a až 10 % síťovadla. Předpokladem bylo, že vzorky s nejnižším obsahem síťovadla budou mít nejvyšší obsah bílkovin, což se potvrdilo pro filmy s GDA, ale u vzorků

síťovaných DAS je patrná odchylka od předpokládaného průběhu, která je zřejmě způsobena přidaným NaOH pro úpravu pH ve filmech při jejich přípravě.

*Tabulka 15 – Výsledky analýzy vybraných filmů*

Označení filmu	Analytická stanovení		
	Dusík* (%)	Bílkoviny* (%)	Sušina (%)
KH040	7,80	48,75	95,30
KH1DAS40	7,90	49,38	97,10
KH5DAS40	8,10	50,63	94,70
KH10DAS40	7,60	47,50	93,80
KH1GDA40	8,60	53,75	97,50
KH5GDA40	8,10	50,63	95,20
KH10GDA40	7,80	48,75	95,50

\* vztaženo na sušinu vzorku

### 5.3.6 Zhodnocení

Cílem této kapitoly bylo popsat možnosti přípravy filmů z keratinových hydrolyzátů. Pro tvorbu filmů, které budou mít dobré fyzikálně-mechanické vlastnosti je nejprve nutné otestovat možnosti síťování ve vodě rozpustných keratinových hydrolyzátů zpět na nerozpustné nebo málo rozpustné keratinové řetězce. Pro síťování KH bylo zkoušeno šest různých síťovadel v několika koncentracích. Dále je také nutné přidání změkčovadla pro snížení přílišné křehkosti keratinových filmů. Jako asi nejúčinnější síťovadlo se z naměřených dat jeví glutardialdehyd, který nejlépe obstál ve zkouškách rozpustnosti, TGA i DSC.



## 6. KERATINOVÝ HYDROLYZÁT VE SMĚSI SE SYNTETICKÝMI POLYMERY

Jednou z možností zlepšení aplikačního potenciálu keratinových hydrolyzátů by mohlo být vytvoření jejich směsí se syntetickými polymery. U takovýchto kompozitů by bylo nutné, aby přidáním hydrolyzátů nedošlo ke snížení mechanických vlastností kompozitů oproti čistě syntetickým materiálům, a zároveň by měly přírodní keratinové hydrolyzáty zajistit alespoň částečnou biodegradabilitu připravených kompozitů. V této kapitole byly vyzkoušeny postupy přípravy kompozitních směsí z keratinového hydrolyzátu a dvou běžně používaných polyethylenů. Výsledky práce uvedené v této kapitole doposud nebyly publikovány, jsou však již zpracovány do článku, který bude zaslán k publikaci v tomto roce (viz. Seznam publikací P16).

### 6.1 Výchozí suroviny

Pro přípravu vzorků byl využit KH ze zásobního množství získaný podle experimentálního rozkladu C10. Tento hydrolyzát nebyl dialyzován a jeho složení je uvedeno v kapitole 4.4. Po odseparování nerozložené vlny byl keratinový hydrolyzát pouze zahuštěn, vysušen a rozdrcen na prášek s velikostí částic  $< 0,6$  mm.

Jako první zkoušený syntetický polymer byl vybrán lineární PE Liten BB10 (Unipetrol, Litvínov, ČR), který se běžně používá na vytlačování a lisování desek, profilů a pro netlakové aplikace. Druhým polymerem je LDPE Bralen RB2-62 (Slovnaft, Bratislava, Slovensko), tento běžná druh PE je vhodný na vytlačování a lisování desek, profilů a malých nádob, je rovněž vhodný pro výrobu hraček a obalových materiálů pro potraviny. Základní charakteristiky obou komerčních plastů jsou uvedeny v následující tabulce 16.

Tabulka 16 – Vlastnosti polyethylenů Liten BB 10 a Bralen RB 2-62

Charakteristická vlastnost	Liten BB 10	Bralen RB 2-62
Napětí na mezi kluzu (MPa)	20	12
Prodloužení na mezi kluzu (%)	10	11
Index toku taveniny 190°C / 2,16 kg (g/10 min)	0,1	2
Teplota měknutí dle Vicata (°C)	118	95
Tvrдость Shore (°Shore D)	57	46
Hustota (kg/m <sup>3</sup> )	942	918

### 6.2 Příprava kompozitů na bázi PE/KH

Z obou polymerů byly připraveny kompozitní směsi s přísadkou 5 a 10 % keratinového hydrolyzátu v hnětiči Brabender Plasti-Corder (Brabender, Německo). Míchání bylo prováděno v komůrce hnětiče při teplotě 180°C a

23 ot/min. Celková doba míchání byla 8 minut. Po uplynutí této doby byly směsi vyjmuty z míchací komůrky a ze směsí byly vylisovány zkušební desky o rozměrech 12,5 x 12,5 x 2 mm. Lisování desek probíhalo taktéž při teplotě 180°C, časy jednotlivých fází lisování byly: předehřev směsi = 11 minut, zalisování = 6 minut (0,1 MPa), chlazení = 7 minut (20 MPa, 180°C → 40°C, dt/dτ = 20°C/min). Z vylisovaných desek byly následně vyseknutím připraveny tělíška pro testování v tahu, pro DSC a TGA analýzy a pro polarizační optickou mikroskopii.

## 6.3 Vlastnosti kompozitů

### 6.3.1 Tahové zkoušky

Tahové zkoušky byly provedeny podle normy ČSN EN ISO 527-2 [98] při rychlosti posuvu čelistí 100 mm/min. Z každé směsi bylo testováno 5 vzorků a stejný počet vzorků byl testován také pro vzorky připravené z čistých syntetických polymerů, výsledky jsou poté uvedeny jako aritmetický průměr a směrodatná odchylka. U tahových zkoušek byly vyhodnoceny parametry napětí na mezi kluzu, prodloužení na mezi kluzu a Youngův modul pružnosti v tahu. Výsledky tahových zkoušek jsou uvedeny v tabulce 17.

Tabulka 17 – Výsledky tahových zkoušek

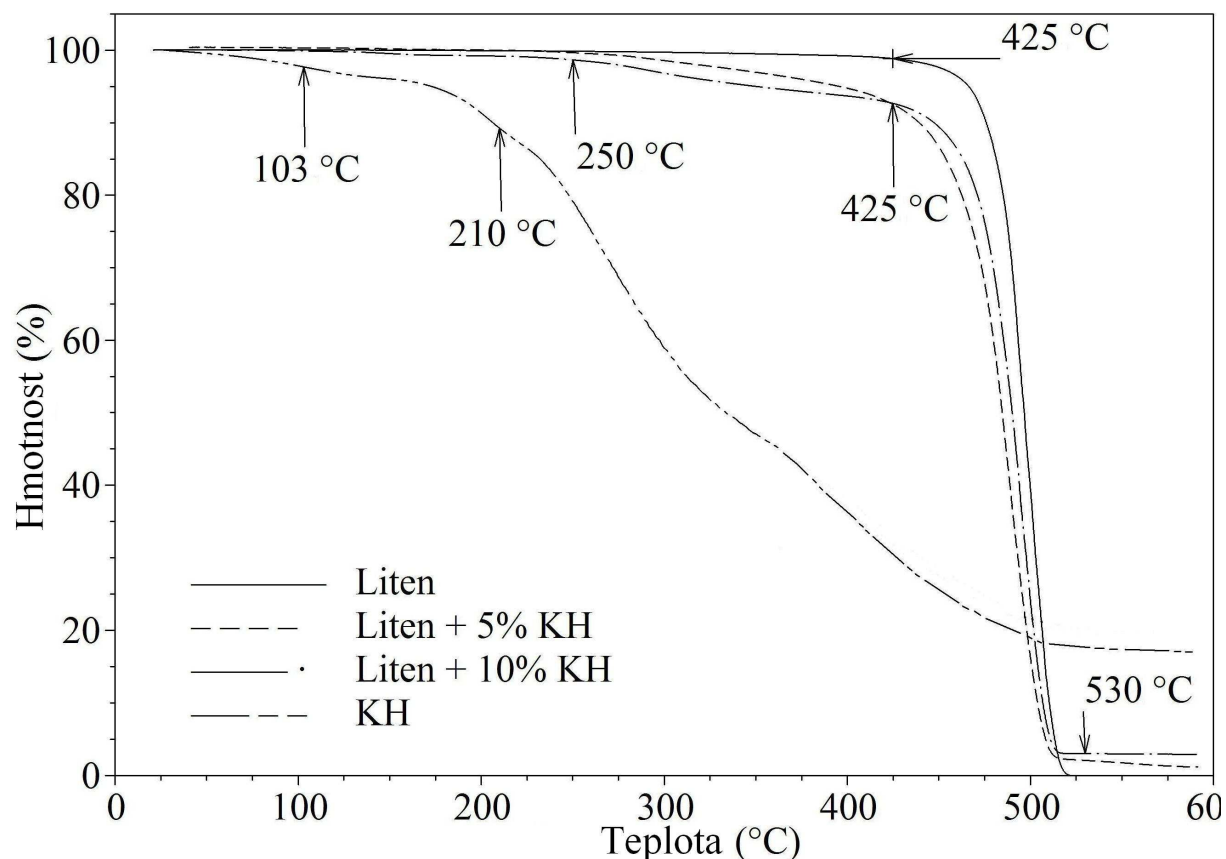
Vzorek	Prodloužení na mezi kluzu $\varepsilon \pm SO$ (%)	Napětí na mezi kluzu $\sigma \pm SO$ (MPa)	Youngův modul pružnosti $E \pm SO$ (MPa)
Liten	19,5 ± 0,4	20,6 ± 0,4	181,0 ± 3,0
Liten + 5 % KH	18,1 ± 0,7	20,8 ± 0,7	198,9 ± 4,5
Liten + 10 % KH	16,0 ± 0,7	21,1 ± 0,4	211,5 ± 7,9
Bralen	32,0 ± 0,7	9,8 ± 0,2	66,2 ± 1,5
Bralen + 5 % KH	27,3 ± 0,6	10,5 ± 0,1	81,7 ± 3,1
Bralen + 10 % KH	26,7 ± 0,6	11,2 ± 0,1	82,6 ± 1,0

Jak je patrné z výše uvedených výsledků, tak s přidavkem KH jsou u Litenu a Bralenu obdobné tendence změny sledovaných tahových vlastností. Prodloužení na mezi kluzu klesá s přidavkem KH u Litenu s 5 % KH o 7,2 % a u Litenu s 10 % KH o 18 %. Stejný trend můžeme vidět také u Bralenu, kde byl pokles 14,7 %, respektive 16,6 %. Z těchto výsledků je zřejmé, že při 5 % přidavku KH je u Litenu pokles  $\varepsilon$  přibližně o polovinu nižší, než u Bralenu, zatímco při 10 % přidavku KH je pokles  $\varepsilon$  u obou kompozitních směsí přibližně stejný. Obrácený trend lze pozorovat u napětí na mezi kluzu, kde při 5 %, respektive 10 % plnění KH došlo u Litenu k velmi mírnému zvýšení o 1,0 %, respektive o 2,4 %. U Bralenu bylo zvýšení napětí na mezi kluzu o 7,1 %, respektive o 14,3 %. Z těchto výsledků vyplývá, že u Bralenu je zvýšení  $\sigma$  cca 7x větší, než u Litenu

v případě 5 % přídavku KH a při 10 % přídavku je toto zvýšení cca 5,5x větší. Zvýšené hodnoty oproti čistým polymerům byly zjištěny také u Youngova modulu, kde při 5 %, respektive 10 % plnění KH došlo u Litenu ke zvýšení tahového modulu pružnosti o 9,9 %, respektive o 16,9 %. Naproti tomu u Bralenu došlo ke zvýšení E v obou případech přibližně o stejnou hodnotu 23,4 %, respektive 24,8 %.

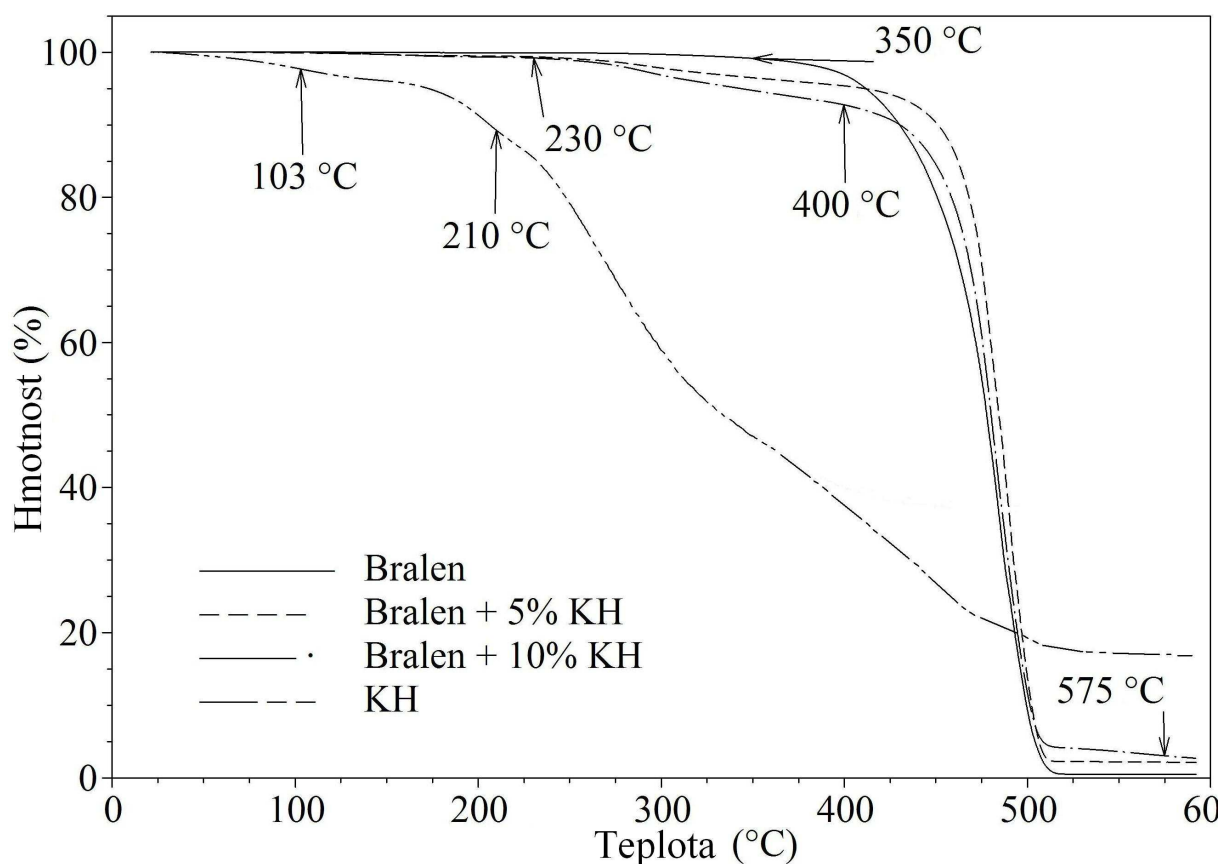
### 6.3.2 Termogravimetrická analýza

Tepelná stabilita vzorků byla zjišťována termogravimetrickou analýzou na otevřené platinové misce v rozsahu teplot 20–600°C. Zbylé parametry měření jsou totožné s předchozími, jejichž provedení je shrnuto v kapitole 3.2.1. Na obrázku 32 jsou znázorněny TG křivky čistého Litenu, Litenu plněného 5 a 10 % KH a pro srovnání i čistého KH. Na této křivce dochází u KH k prvnímu hmotnostnímu úbytku při teplotě 103°C a souvisí s odpařováním volné vlhkosti z KH ( $\approx 3,0$  %). Přibližně do 210°C není hmotnostní úbytek KH výrazný ( $\approx 9,6$  %), tento úbytek souvisí s uvolňováním strukturálně vázané vody ze vzorku. Nad touto teplotou (210°C) začíná rychlá termická degradace KH a nad 530°C je KH zcela degradován. Zbylých přibližně 16,5 % tvoří anorganické popeloviny.



Obrázek 32 – TG křivky vzorků KH, Litenu a jejich kompozitních směsí

Z obrázku 32 můžeme dále vypočítat, že u čistého Litenu nedochází až do přibližně 425°C k téměř žádné ztrátě hmotnosti, při teplotách nad 450°C nastává poté rychlý nástup degradace. Liten je úplně zdegradován při teplotě cca 530°C, kdy je zbytková hmotnost vzorku 0 %. Vzorky Litenu plněného 5 a 10 % KH mají průběh TG křivek velmi podobný jen nepatrně odlišný od čistého Litenu. Do teploty kolem 250°C je u obou takto plněných vzorků ztráta hmotnosti minimální (0,3 % u Litenu s 5 % KH a 1,3 % u Litenu s 10 % KH) a je zřejmě způsobena odpařováním vlhkosti obsažené v KH. Nad 250°C je již zřejmá pomalá postupná degradace keratinového hydrolyzátu obsaženého v matici kompozitního vzorku a při 425°C je u obou vzorků ztráta hmotnosti cca 7,4 %. Nad touto teplotou dochází opět k rychlé termické degradaci a nad 520°C jsou vzorky již zcela zdegradovány. Zbývá hmotnost je u obou směsí < 2,5 % a představuje minerální podíl z přidaného keratinového hydrolyzátu.



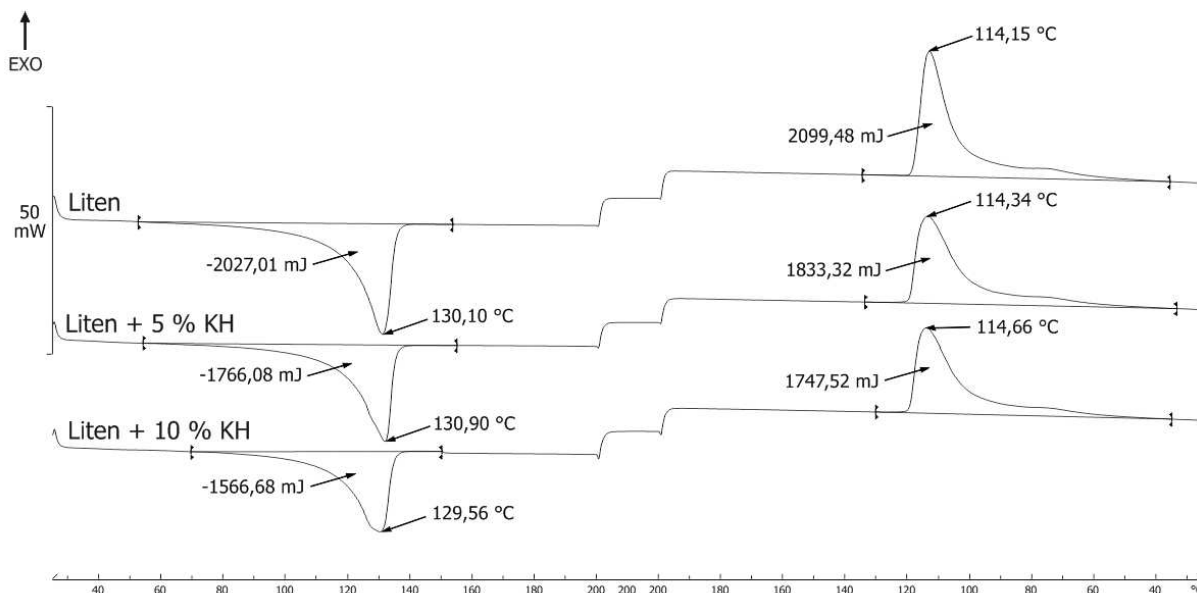
Obrázek 33 – TG křivky vzorků KH, Bralenu a jejich kompozitních směsí

Na obrázku 33 jsou zobrazeny TG křivky Bralenu a jeho kompozitů s přísávkou 5 a 10 % KH, a také pro srovnání TG křivka čistého hydrolyzátu. V případě Bralenu a jeho plnění KH je průběh TG křivek podobný jako u vzorků Litenu. Čistý Bralen je kvůli své struktuře méně teplotně stabilní než Liten. Totéž můžeme vidět i na křivkách Bralenu plněného KH. U čistého Bralenu vidíme, že je do přibližně 350°C stabilní (ztráta 0,8 % je způsobena zřejmě zbytkovou vázanou vlhkostí nebo nízkomolekulární frakcí). Při teplotách

nad 375°C nastává rychlý nástup degradace a při teplotě kolem 525°C je materiál kompletně zdegradován. Ze vzorku zůstává přibližně 0,5 % hmotnosti tvořené nespalitelnými anorganickými zbytky. Vzorky Bralenu plněné 5 a 10 % KH mají průběh TG křivek navzájem podobný a jen málo odlišný od čistého Bralenu. Vzorky jsou stabilní do asi 230°C (ztráta hmotnosti 0,7 % u Bralenu s 5 % KH a 0,8 % u Bralenu s 10 % KH způsobená odpařováním vlhkosti z KH). Nad 230°C je již zřejmá pomalá postupná degradace obsaženého keratinového hydrolyzátu a při 400°C je ztráta hmotnosti již 4,6 % u Bralenu s 5 % KH a u vzorku s 10 % KH je při stejné teplotě ztráta hmotnosti 7,2 %. Nad touto teplotou dochází k rychlému nástupu termické degradace. Zbytková hmotnost obou kompozitních materiálů při teplotě nad 520°C po degradaci je < 2,3 % a představuje zbytkový minerální podíl z přidaného keratinového hydrolyzátu.

### 6.3.3 Diferenciální skenovací kalorimetrie

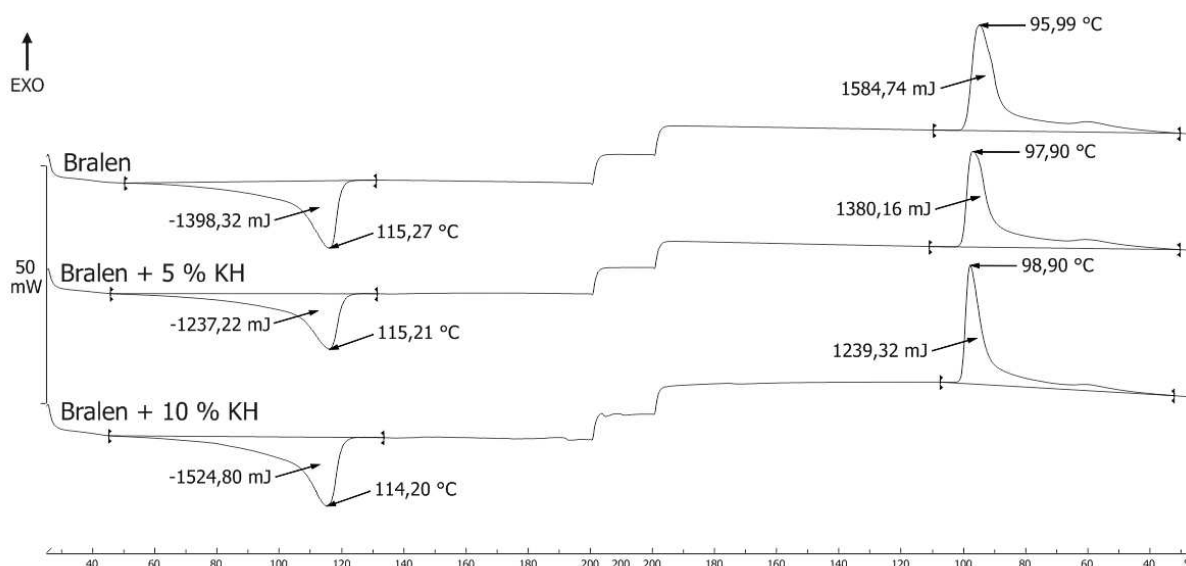
Pro zjištění tepelných vlastností a množství krystalické fáze bylo u vzorků Litenu a Bralenu s keratinovým hydrolyzátem provedeno měření DSC v rozsahu 25–200°C s rychlostí ohřevu  $dt/d\tau = 10^\circ\text{C}/\text{min}$ . Vzorky (o váze kolem 10 mg) byly měřeny v téměř uzavřených hliníkových miskách s malým otvorem pro přístup vzduchu. Nejprve byly vzorky zahřívány na 200°C a následně chlazeny zpět na 25°C. Po celou dobu měření byl vzorek v ochranné dusíkové atmosféře s průtokem plynu 40 ml/min.



Obrázek 34 – DSC křivky Litenu a kompozitů s KH

DSC křivky Litenu plněného KH jsou uvedeny na obrázku 34 a křivky Bralenu plněného KH jsou poté uvedeny na obrázku 35. Z naměřených hodnot je patrné, že přídavek KH nijak výrazně neovlivňuje teplotu tání ani teplotu krystalizace jednotlivých vzorků. Litenu a jeho kompozity s KH mají teplotu tání

kolem 130°C a teplotu krystalizace pak kolem 114°C. Stejně je tomu i u vzorků Bralenu a jeho kompozitů, kde se teplota tání pohybuje kolem 115°C a teplota krystalizace kolem 97°C.



Obrázek 35 – DSC křivky Bralenu a kompozitů s KH

U naměřených křivek Litenu, Bralenu a také jejich kompozitů s 5 a 10 % KH byly zjištěny plochy pod píky z nichž byla vypočítána krystalinita jednotlivých vzorků jak pro křivku tání tak pro křivku krystalizace. Obsah krystalické fáze byl vypočítán podle následující rovnice:

$$X_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m(100\%)} * 100$$

$X_c$  ... podíl krystalické fáze v polymeru (%)

$\Delta H_m$  ... změna entalpie při tání nebo krystalizaci vzorku (J/g)

$\Delta H_m(100\%)$  ... změna entalpie při tání nebo krystalizaci 100% krystalického polymeru (J/g) – dpočítaná tabulková hodnota (pro PE = 293 J/g) [95]

Výsledky stanovení krystalinity vzorků připravených z čistého Litenu a Bralenu a vzorků plněných 5 a 10 % keratinového hydrolyzátu jsou uvedeny v následující tabulce 18.

Z výsledků je patrné, že krystalinita je u téhož vzorku vždy mírně vyšší v případě výpočtu vycházejícího z plochy píku krystalizace, což je zřejmě způsobeno poloviční rychlostí chlazení při měření DSC (10°C/min) než při lisování desek (20°C/min). Krystalinita zjištěná u čistého vzorku Litenu je 54 % pro tání a 56 % při chlazení. Se stupněm plnění KH krystalinita vzorků klesá, pro Liten s 10 % KH je pak o 16,7 % (tání), respektive o 10,7 % (krystalizace) nižší. Stejný trend je viditelný i u vzorků Bralenu, kde pro čistý polymer byla zjištěna krystalinita 33 % při tání a 37 % při opětovné krystalizaci. Stejně tak s vyšším stupněm plnění KH krystalinita klesá a při přídatku 10 % KH je

krystalinita při tání vzorku o 21,2 % nižší než u čistého polymeru, respektive u krystalizace je hodnota krystalinity o 16,2 % nižší než u čistého Bralenu.

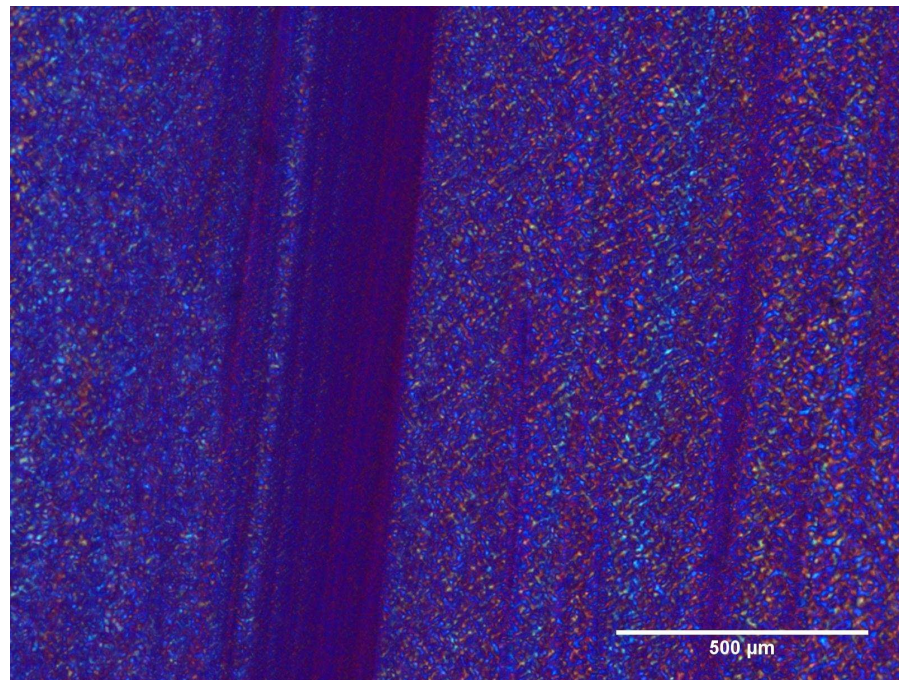
*Tabulka 18 – Výsledky stanovení krystalinity*

Vzorek	Krystalinita (%)	
	Ohřev vzorku	Chlazení vzorku
Liten	54	56
Liten + 5% KH	53	55
Liten + 10% KH	45	50
Bralen	33	37
Bralen + 5% KH	32	36
Bralen + 10% KH	26	31

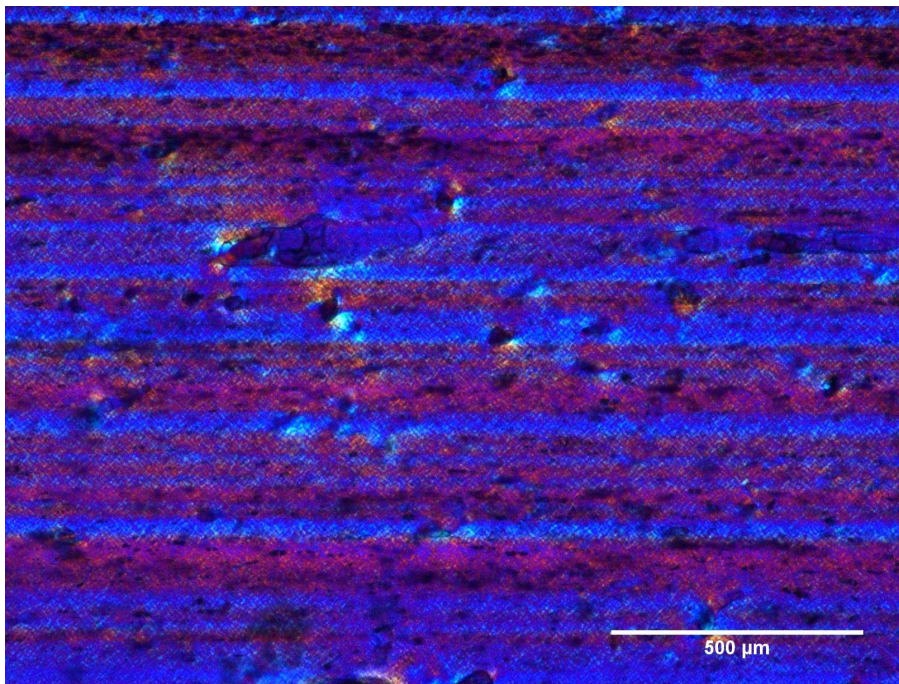
#### 6.3.4 Polarizační mikroskopie

Struktura kompozitních vzorků byla zkoumána polarizační mikroskopickou analýzou na optickém mikroskopu Olympus BX41 s polarizačním filtrem. Vzorky pro mikroskopickou analýzu (velikost 3 x 1 cm) byly vyříznuty z vylisovaných desek a z nich byly následně mikrotomovým nožem Leica RM2265 byly připraveny plátky o tloušťce 15  $\mu\text{m}$ .

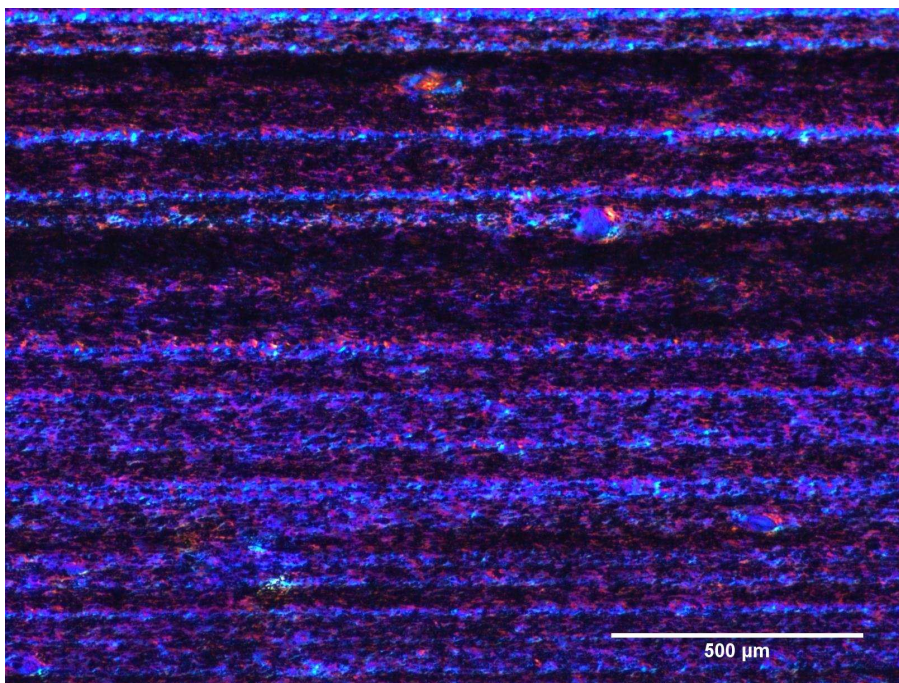
Na obrázcích 36, 37 a 38 jsou uvedeny fotografie řezů Bralenu a jeho kompozitů s KH při 100-násobném zvětšení.



*Obrázek 36 – Struktura řezu Bralenu na polarizačním mikroskopu (zvětšení 100x)*



*Obrázek 37 – Struktura řezu Bralenu + 5 % KH na polarizačním mikroskopu (zvětšení 100x)*



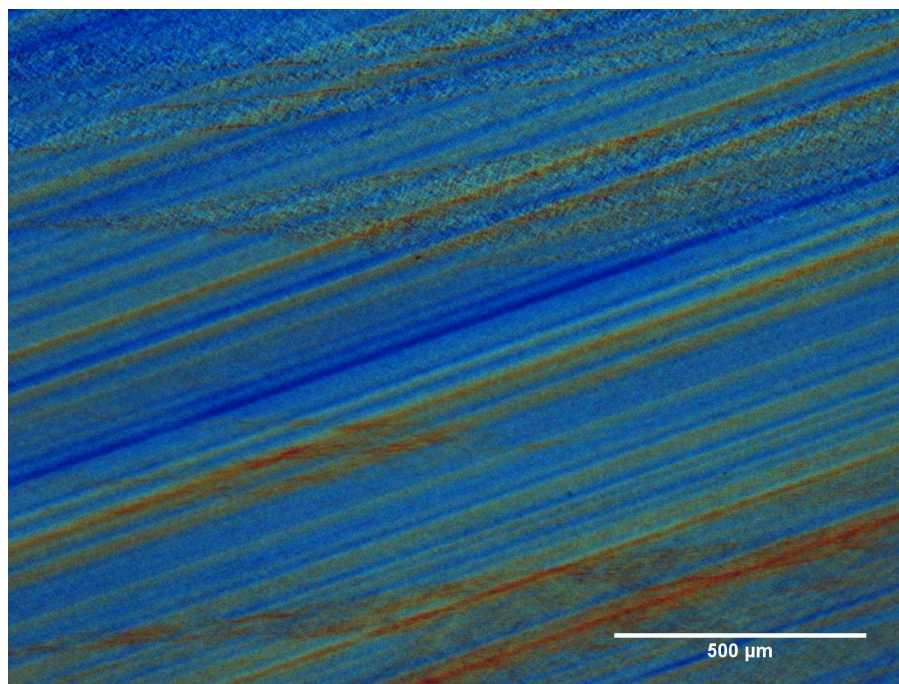
*Obrázek 38 – Struktura řezu Bralenu + 10 % KH na polarizačním mikroskopu (zvětšení 100x)*

Z výše uvedených obrázků je patrné, že struktura Bralenu se s přidavkem KH výrazně nemění. Pásky makromolekul polyethylenu jsou patrné na všech třech snímcích. Na obrázku 36 je navíc viditelná mikrokrytalická struktura Bralenu. Dále vidíme u vzorku Bralenu s 5 % KH (viz. Obrázek 37), že KH (tmavé skvrny) je nerovnoměrně distribuovaný v matrici PE, částice KH jsou oddělené, netvoří shluky a jejich velikost se pohybuje v řádu desítek  $\mu\text{m}$ . Odlišná situace

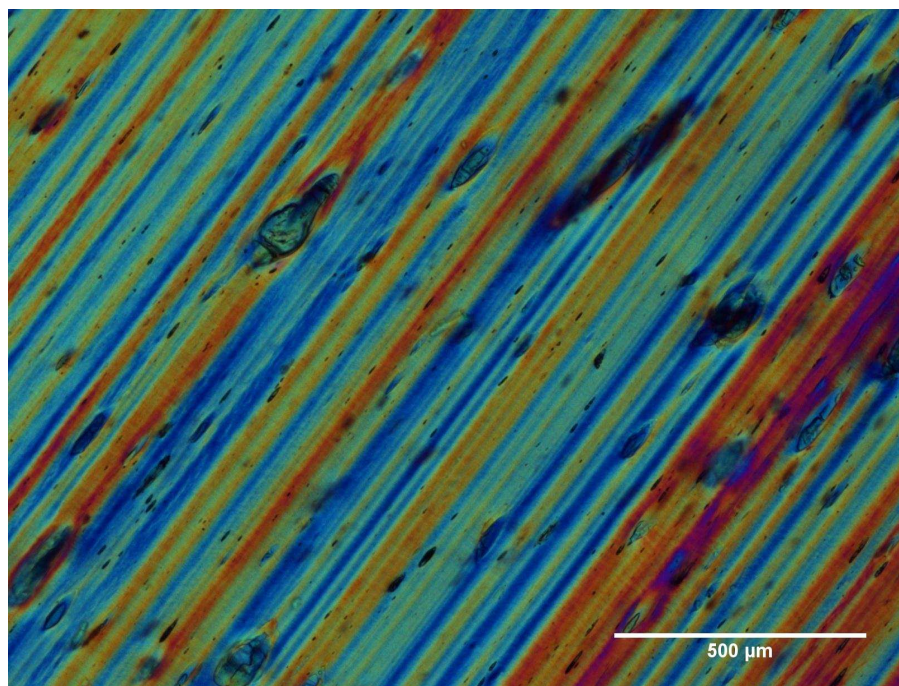


je viditelná u Bralenu plněného 10 % KH (viz. Obrázek 38), kde kvůli vyššímu množství přidaného KH dochází k lepší distribuci hydrolyzátu v matrici PE. Narozdíl od 5 % plnění dochází v tomto případě k vytváření shluků KH o nepravidelné velikosti (tmavé skvrny) a v některých místech si můžeme všimnout také (tmavých) pásů KH.

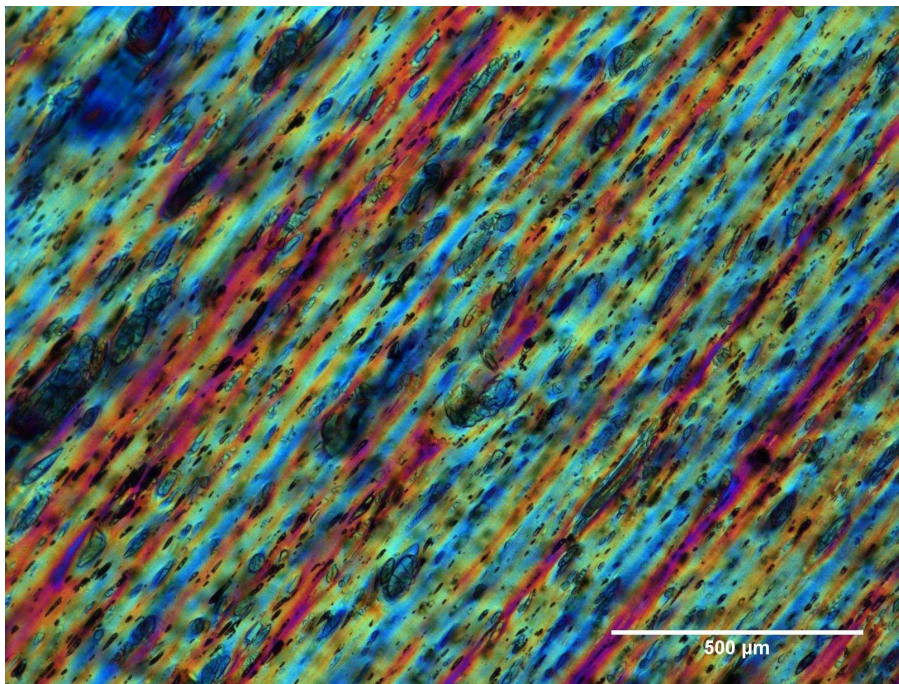
Na následujících obrázcích 39–41 jsou uvedeny fotografie z polarizačního mikroskopu pro vzorky Litenu a jeho kompozitů s KH opět při zvětšení 100x.



*Obrázek 39 – Struktura řezu Litenu na polarizačním mikroskopu (zvětšení 100x)*



*Obrázek 40 – Struktura řezu Litenu + 5 % KH na polarizačním mikroskopu (zvětšení 100x)*



Obrázek 41 – Struktura řezu Litenu + 10 % KH na polarizačním mikroskopu (zvětšení 100x)

Na obrázku 39 nejsou u čistého Litenu viditelné žádné sférolity krystalické struktury na rozdíl od vzorku čistého Bralenu. Vzorek Litenu plněný 5 % KH uvedený na obrázku 40 nám ukazuje, že KH (tmavé skvrny) je opět nerovnoměrně distribuován v matrici PE, částice KH jsou od sebe oddělené a netvoří tak shluky. Velikost těchto částic se pohybuje přibližně od 30 do 150  $\mu\text{m}$ . Obdobně je tomu u vzorku Litenu plněného 10 % KH (viz. Obrázek 41), kde je ovšem KH rovnoměrněji distribuován v polymerní matrici. Jsou zde patrné samostatné částice KH o stejných rozměrech jako při 5 % plnění, ale vidíme také menší shluky KH o nepravidelné velikosti (tmavé skvrny).

## 6.4 Zhodnocení

Cílem této kapitoly bylo zhodnocení aplikačního potenciálu keratinových hydrolyzátů jako přísad pro tvorbu kompozitních směsí se syntetickými polymery (polyethyleny Bralen a Liten). U připravených kompozitů byly zhodnoceny některé mechanické a fyzikální vlastnosti a bylo zjištěno, že 5 % a 10 % přísad KH k běžně používaným PE nijak výrazně nesnižuje vlastnosti kompozitů oproti čistým PE. Z mechanických vlastností kompozitních směsí klesá prodloužení na mezi kluzu, ale narůstá napětí na mezi kluzu i Youngův modul pružnosti. Dále klesá krystalinita vzorků s přísadkou KH, nicméně teploty tání ani krystalizace se nemění. Podobné výsledky můžeme vidět také v článku, který publikoval Barone [77], který ovšem přidával místo hydrolyzátů keratinové vlákna připravené z peří. Výrazněji se mění pouze odolnost proti působení tepla, kdy kompozity začínají ztrácet hmotnost dříve než čisté PE.

## 7. KERATINOVÝ HYDROLYZÁT JAKO NOSIČ LÁTEK

Cílem této části disertační práce bylo zjistit, za by bylo možné využití keratinových hydrolyzátů jako nosičů nízkomolekulárních látek např. ve formě kapslí. Předpokladem bylo vytvoření směsi keratinových hydrolyzátů s aditivou (změkčovadla, síťovadla) s přidavkem nízkomolekulární látky (kyselina askorbová) a vytvoření kapslí z této směsi. Následně bylo sledováno množství uvolněné kyseliny askorbové z kapslí při rozpouštění ve vodě v závislosti na čase.

### 7.1 Příprava kapslí

Pro přípravu kapslí byl opět použit zásobní hydrolyzát připravený dle podmínek C10 a přečištěný dialýzou. Nejprve byly vytvořeny dvě směsi (bez síťovadla a s přidavkem síťovadla) vždy z 5 g KH, 5 g destilované vody a 1,5 g glycerolu. Směsi byly míchány při 30°C na vodní lázni asi 10 minut než došlo k dostatečné homogenizaci. Poté bylo do obou směsí přidáno 0,5 g kyseliny askorbové a do jedné směsi navíc 0,05 g síťovadla dialdehydu škrobu. Obě směsi byly míchány dalších 5 minut a následně byly přelity do připravených pryžových forem pro výrobu kapslí. Formy s kapslemi byly sušeny při 60°C po dobu 72 hodin. Z každé směsi bylo tímto způsobem připraveno 25 kapslí jejichž fotografie je uvedena na obrázku 42.



Obrázek 42 – Kapsle z keratinového hydrolyzátu s kyselinou askorbovou

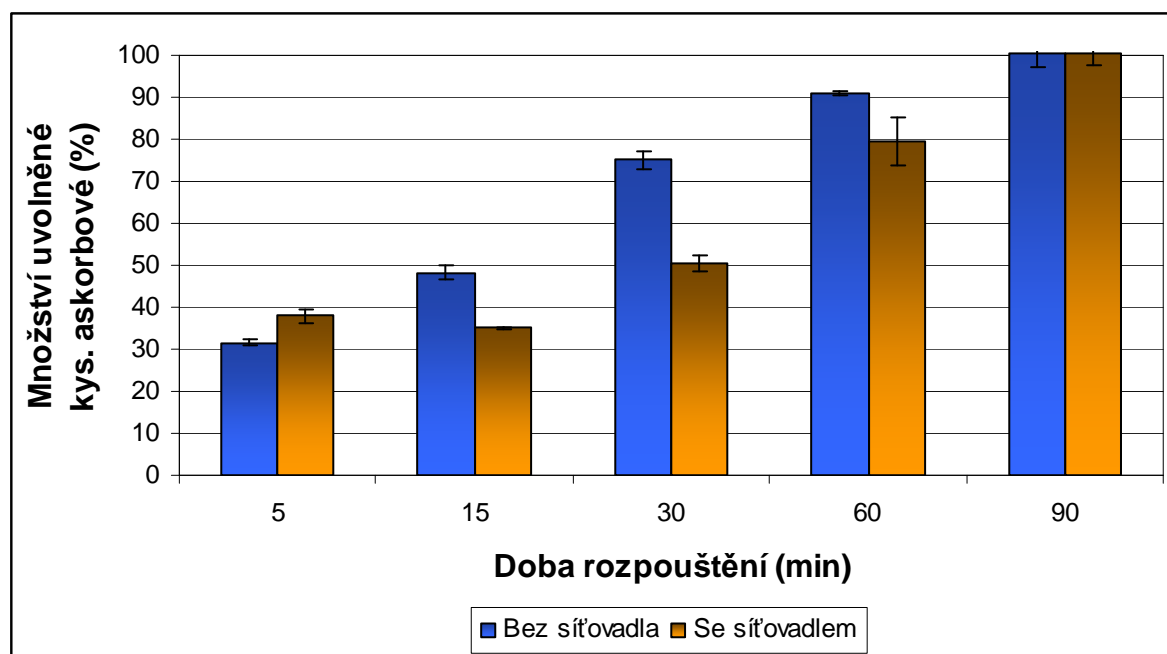
### 7.2 Rozpouštění kapslí

Kapsle z keratinového hydrolyzátu s přidavkem kyseliny askorbové byly rozpouštěny za neustálého třepání v inkubátoru při teplotě 37°C. Kyselina askorbová byla vybrána jako aktivní látka kvůli její snadné zpracovatelnosti a jednoduché metodě stanovení v roztoku.

Kapsle byly rozpouštěny v 50 ml destilované vody, předem vyhřáté na požadovanou teplotu, po různé doby (5, 15, 30, 60 a 90 minut). Po uplynutí doby rozpouštění byly zbytky nerozpuštěné tablety odfiltrovány přes filtrační papír a ihned bylo titrací stanoveno množství uvolněné kyseliny askorbové v roztoku. Stanovení bylo provedeno vždy třikrát pro každý čas rozpouštění.

Množství uvolněné kyseliny askorbové bylo stanovováno jodometrickou titrací. Kyselinu askorbovou lze v kyselém prostředí oxidovat jódem na kyselinu dehydroaskorbovou, přičemž vždy jedna molekula kyseliny askorbové reaguje pouze s jednou molekulou přidaného jódu.

Na obrázku 43 jsou uvedeny výsledky uvolňování kyseliny askorbové z kapslí v čase. Z výsledků je patrné, že během prvních 5 minut rozpouštění je z kapslí uvolněno více než 30 % aktivní látky. Při této době bylo také uvolněno více kyseliny askorbové z kapslí se síťovadlem než z kapslí bez přídavku síťovadla. Toto zjištění neodpovídá původnímu předpokladu a v dalších pokusech se již nepotvrdilo. S prodlužující se dobou rozpouštění se množství uvolněné kyseliny askorbové téměř lineárně zvyšuje až po její 100 % rozpuštění v roztoku po 90 minutách. Při této době byly také úplně rozpuštěny kapsle jak bez síťovadla tak s přídavkem dialdehydu škrobu. V časech 15, 30 a 60 minut lze také pozorovat, že větší množství uvolněné aktivní látky je z kapslí bez síťovadla.



Obrázek 43 – Výsledky rozpouštění tablet z keratinového hydrolyzátu s aktivní látkou (kyselina askorbová) v čase

### **7.3 Zhodnocení**

V této kapitole bylo cílem zjistit, zda by bylo možné využít keratinový hydrolyzát pro přípravu kapslí s postupným uvolňováním aktivní látky. Bylo zjištěno, že z keratinových hydrolyzátů lze připravit kapsle, z nichž se bude postupně uvolňovat aktivní látka. Problémem, který bude nutné dále zkoumat, je prodloužení doby rozpouštění těchto kapslí např. použitím jiných síťovadel.

## 8. PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI

Disertační práce se zabývala možnostmi zpracování odpadního keratinového materiálu (ovčí vlny) na rozpustný keratinový hydrolyzát a jeho aplikačním potenciálem především pro technické aplikace a zemědělství.

V první části práce byl vypracován a otestován dvoustupňový alkalicko-enzymový způsob hydrolýzy odpadní ovčí vlny, který na rozdíl od hydrolýz používaných jinými autory pracuje s nízkými koncentracemi chemických prostředků a využívá také komerčně dostupných proteolytických enzymů. Bylo prokázáno, že tímto způsobem lze rozložit téměř 75 % původního materiálu. Pomocí statistického vyhodnocení získaných dat lze navrhnout nastavení parametrů hydrolýzy tak aby bylo dosaženo optimálního výsledku rozkladu.

Charakterizace keratinových hydrolyzátů spočívala ve stanovení jejich složení, teplotní odolnosti a distribuci molárních hmotností. Pomocí těchto parametrů bylo popsáno, jak se mění složení a struktura připravených hydrolyzátů oproti původnímu materiálu a také jak tyto vlastnosti souvisí s parametry hydrolýzy. Takto souhrnná charakterizace hydrolyzátů není v dostupné literatuře popsána.

Závěrečnou částí disertační práce je posouzení aplikačního potenciálu keratinových hydrolyzátů. První testovanou aplikací je příprava filmů s přidanými aditivami (změkčovadlo, síťovadlo) a posouzení jejich vlastností. Tyto filmy by mohly najít své uplatnění jako biodegradabilní a rozpustné filmy, fólie a povlaky v zemědělství nebo obalovém průmyslu. Další testovanou aplikací je příprava kompozitních směsí keratinových hydrolyzátů se syntetickými polymery (PE), kde bylo zjišťováno jak přídavek KH ovlivňuje mechanické a tepelné vlastnosti připravených kompozitů. Kompozitní materiály by mohly být poté využity pro přípravu částečně biodegradabilních fólií. Jako poslední aplikace byla testována možnost využití keratinových hydrolyzátů jako nosičů aktivních látek. Bylo zjištěno, že z keratinových hydrolyzátů lze připravit kapsle s obsahem aktivní látky, která se v průběhu rozpouštění postupně uvolňuje. Tato aplikace by mohla najít své uplatnění např. v zemědělství jako nosič pro hnojiva, insekticidy apod.

## ZÁVĚR

Cílem práce bylo zhodnotit a otestovat nejprve možnost přípravy keratinového hydrolyzátu z odpadní ovčí vlny. Dále tyto připravené hydrolyzáty charakterizovat a zjistit tak jejich případné aplikační využití, jehož možné provedení bylo testováno v poslední části disertační práce.

Po prvotních pokusech rozkladů alkalickou hydrolyzou byla vypracována dvoustupňová alkalicko-enzymová hydrolyza za použití nízkých koncentrací roztoků alkálií (KOH,  $K_2CO_3$ ,  $Ca(OH)_2$ ) s přidavkem komerčně využívaných proteolytických enzymů (Savinase, Esperase, Everlase). Provedení hydrolyz bylo plánováno a vyhodnocováno ve statistickém softwaru Statgraphics 6.0 za použití faktorových pokusů  $2^3$ . Jednotlivé faktory provedení hydrolyzy byly hodnoceny statistickými metodami a byl posuzován jejich vliv na množství rozložené vlny. Bylo zjištěno, že i při použití mírných podmínek hydrolyzy lze rozložit téměř 75 % původního materiálu. Tohoto výsledku bylo dosaženo u experimentu C10, kde byla vlna hydrolyzována v prvním stupni v roztoku 0,6% KOH při 90°C po dobu 48 hodin a následně ve druhém stupni bylo přidáno 5 % enzymu Savinase 6.0T a hydrolyza pokračovala dalších 24 hodin při 60°C. Jako statisticky nejvýznamnější faktor ovlivňující účinnost hydrolyzy se ukázala koncentrace alkálie ze stejného pokusu.

Před testováním možností využití keratinových hydrolyzátů byly připravené KH nejprve charakterizovány zjištěním jejich distribuce molárních hmotností, analytickým složením a pro vybraný hydrolyzát C10 také teplotní odolností. U většiny keratinových hydrolyzátů byl elektroforeticky zjištěn rozsah molárních hmotností pohybující se spíše v nižších hodnotách 15–50 kDa, avšak byly zjištěny také výšemolární frakce kolem 100 kDa u experimentů C7 a C10. Při analýze složení keratinových hydrolyzátů bylo zjištěno, že obsah dusíku se oproti surové vlně příliš nemění, ale narůstá obsah síry a popelovin. Nespalitelné anorganické popeloviny byly poté z hydrolyzátů odstraněny dialýzou přes celulóзовou membránu proti destilované vodě. Pro nejlepší experiment C10 byla poté termogravimetricky zjištěna teplotní odolnost do 150°C, kdy začíná vzorek rychle ztrácet na hmotnosti zřejmě v důsledku tání a od teploty 225°C již degraduje.

Na základě zjištěných výsledků účinnosti hydrolyzy a složení hydrolyzátů byl vybrán experiment C10 pro otestování hydrolyzy ve 40-ti násobném množství. Byla prokázána dobrá přenositelnost laboratorních experimentů do podmínek přibližujících se poloprovozním zkouškám; byl zjištěn pokles množství rozložené vlny asi o 7 % oproti původnímu výsledku. Složení hydrolyzátu připravené při těchto podmínkách je však téměř totožné s původním složením hydrolyzátu připraveného v malém experimentálním množství. Tímto způsobem bylo poté připraveno zásobní množství hydrolyzátu, které bylo použito pro testování aplikačních možností keratinových hydrolyzátů.

V poslední části disertační práce byly nejprve připravovány filmy z KH s přídavkem změkčovadla a různých síťovadel. U připravených filmů byl poté zjišťován vliv jednotlivých složek na vlastnosti filmů. Ze zjištěných výsledků vyplývá, že po mechanické stránce je nejlepší využití filmů s přídavkem 25 nebo 30 % změkčovadla, které již nejsou křehké a lze je ohýbat a dále s nimi pracovat bez jejich dalšího poškození. Jako nejlepší síťovadlo byl vybrán glutardialdehyd, který zvýšil odolnost filmů proti rozpouštění a filmy s tímto síťovadlem dosahovaly dobrých výsledků při měření TGA a DSC. Dalším testovaným použitím byla příprava kompozitních materiálů ze dvou druhů PE s přídavky 5 a 10 % KH. U těchto kompozitů byl poté zjišťován vliv přídavku hydrolyzátu na fyzikálně mechanické vlastnosti, které byly porovnávány s čistými PE. Bylo zjištěno, že přídavky KH nijak výrazně nesnižují mechanické ani tepelné vlastnosti kompozitů, u všech testovaných vzorků klesá s přídavkem KH pouze tažnost materiálu a krystalinita. Posledním aplikací, která byla testována je použití KH jako nosičů aktivních látek. Bylo zjištěno, že z keratinových hydrolyzátů lze vyrobit kapsle, ze kterých se postupně při rozpouštění uvolňuje aktivní látka.

Závěrem lze konstatovat, že z odpadní ovčí vlny lze alkalicko-enzymovou hydrolýzou připravit keratinové hydrolyzáty, které mají složení podobné původnímu materiálu a molární hmotnosti většinou v rozmezí 15–50 kDa. Těchto hydrolyzátů pak lze využít pro přípravu filmů, kompozitních materiálů i kapslí s dobrými fyzikálně-mechanickými vlastnostmi. Další testy rozkladů a charakterizace byly rovněž provedeny na odpadním kuřecím peří z drůbežáren (viz. Seznam publikací P7, P8).



## LITERATURA

- [1] MEYERS, Marc André, Po-Yu CHEN, Albert Yu-Min LIN a Yasuaki SEKI. Biological materials: Structure and mechanical properties. *Progress in Materials Science*. 2008, **53**(1), 1-206. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2007.05.002.
- [2] ZOCCOLA, Marina, Annalisa ALUIGI a Claudio TONIN. Characterisation of keratin biomass from butchery and wool industry wastes. *Journal of Molecular Structure*. 2009, **938**(1-3), 35-40. DOI: 10.1016/j.molstruc.2009.08.036.
- [3] HOOD, Colette M. a Michael G. HEALY. Bioconversion of waste keratins: wool and feathers. *Resources, Conservation and Recycling*. 1994, **11**(1-4), 179-188. DOI: 10.1016/0921-3449(94)90088-4.
- [4] BLOCK, Richard J. a Diana BOLLING. The amino acid composition of keratins. *Journal of biological chemistry*. 1939(127), 685-693.
- [5] BLOCK, Richard J. The composition of keratins. *Journal of biological chemistry*. 1939(128), 181-186.
- [6] GÜHRS, Karl-Heinz, Klaus WEISSHART a Frank GROSSE. Lessons from nature-protein fibers. *Journal of biotechnology: Reviews in molecular biotechnology*. 2000, **74**(2), 121-134.
- [7] DERKSEN, Johannes T.P., F. Petrus CUPERUS a Peter KOLSTER. Renewable resources in coatings technology: a reiew. *Progress in Organic Coatings*. 1996, **27**(1), 45-53.
- [8] HILL, Paulina, Helen BRANTLEY a Mark VAN DYKE. Some properties of keratin biomaterials: Kerateines. *Biomaterials*. 2010, **31**(4), 585-593. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.076.
- [9] GRAHAM, Claire E., Helen K. WAITKOFF a Stanley W. HIER. The amino acid content of some scleroproteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1949(177), 529-532.
- [10] CORFIELD, M.C., A. ROBSON a B. SKINNER. The amino acid compositions of three fractions from oxidized wool. *Biochemical Journal*. 1958, **68**(2), 348-352.
- [11] *Biopolymers: Biopolymers Polyamides and Complex Proteinaceous Materials II*. A. Steinbüchel. Weinheim: Wiley-VCH, 2003, 519 s. ISBN 35-273-0223-9.
- [12] SUZUKI, Yasunori, Yoshiyuki TSUJIMOTO, Hiroshi MATSUI a Kunihiro WATANABE. Decomposition of extremely hard-to-degrade animal proteins by thermophilic bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2006, **102**(2), 73-81. DOI: 10.1263/jbb.102.73.
- [13] CORREA, Ana Paula F., Daniel J. DAROIT a Adriano BRANDELLI. 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.

- [14] SMITH, Gerald J. 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.
- [15] MILLINGTON, K.R. a J.S. CHURCH. The photodegradation of wool keratin II. Proposed mechanisms involving cystine. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1997, **39**(3), 204-212. DOI: 10.1016/S1011-1344(96)00020-6.
- [16] GRAZZIOTIN, A., F.A. PIMENTEL, E.V. DE JONG a A. BRANDELLI. Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. *Animal Feed Science and Technology*. 2006, **126**(1-2), 135-144. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2005.06.002.
- [17] SIMPSON, W a G CRAWSHAW. *Wool: science and technology*. Cambridge, England: Woodhead, c2002, 368 s. ISBN 08-493-2820-9.
- [18] ABOUHEIF, M.A., S. BASMAEIL, H. METWALLY a S. MASOUD. Chemical preparation of NaOH-Keratin hydrolysate for improving the nutritive value of wheat straw. *Animal Feed Science and Technology*. 1985, **13**(3-4), 215-225. DOI: 10.1016/0377-8401(85)90024-0.
- [19] CARDAMONE, Jeanette M. Keratin transamidation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2008, **42**(5), 413-419. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2008.02.004.
- [20] KAWAHARA, Y., R. ENDO a T. KIMURA. Chemical Finishing of Bast Fibers and Woods Using Hydrolyzed Keratin from Waste Wool or Down. *Textile Research Journal*. 2004, **74**(2), 93-96. DOI: 10.1177/004051750407400201.
- [21] 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 newly isolated thermoactinomycetes or by alkaline hydrolysis. *Letters in Applied Microbiology*. 2005, **40**(5), 335-340. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2005.01692.x.
- [22] COWARD-KELLY, Guillermo, Vincent S. CHANG, Frank K. AGBOGBO a Mark T. HOLTZAPPLE. Lime treatment of keratinous materials for the generation of highly digestible animal feed: 1. Chicken feathers. *Bioresource Technology*. 1994, **48**(3), 1337-1343. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.05.021.
- [23] COWARD-KELLY, Guillermo, Frank K. AGBOGBO a Mark T. HOLTZAPPLE. Lime treatment of keratinous materials for the generation of highly digestible animal feed: 2. Animal hair. *Bioresource Technology*. 2006, **97**(11), 1344-1352. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.05.017.
- [24] KURBANOGLU, Esabi Basaran a Namudar Izzet KURBANOGLU. 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.
- [25] KURBANOGLU, E.B, O.F ALGUR a A ZULKADIR. Submerged production of edible mushroom *Agaricus bisporus* mycelium in ram horn hydrolysate. *Industrial Crops and Products*. 2004, **19**(3), 225-230. DOI: 10.1016/j.indcrop.2003.10.004.
- [26] KURBANOGLU, Esabi Basaran. Enhancement of citric acid production with ram horn hydrolysate by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*. 2004, **92**(1), 97-101. DOI: 10.1016/j.biortech.2003.08.002.
- [27] KURBANOGLU, Esabi Basaran a Namudar Izzet KURBANOGLU. Utilization for lactic acid production with a new acid hydrolysis of ram horn waste. *FEMS Microbiology Letters*. 2003, **225**(1), 29-34. DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00472-5.
- [28] KURBANOGLU, Esabi Basaran a Namudar Izzet KURBANOGLU. Ram horn hydrolysate as enhancer of xanthan production in batch culture of *Xanthomonas campestris* EBK-4 isolate. *Process Biochemistry*. 2007, **42**(7), 1146-1149. DOI: 10.1016/j.procbio.2007.04.010.
- [29] KURBANOGLU, Esabi Basaran a Namudar Izzet KURBANOGLU. Utilization as peptone for glycerol production of ram horn waste with a new process. *Energy Conversion and Management*. 2004, **45**(2), 225-234. DOI: 10.1016/S0196-8904(03)00148-1.
- [30] KURBANOGLU, Esabi Basaran. Enhancement of glycerol production with ram horn hydrolysate by yeast. *Energy Conversion and Management*. 2003, **44**(13), 2125-2133. DOI: 10.1016/S0196-8904(02)00238-8.
- [31] JOU, C.J.G, Y.S CHEN, H.P WANG, K.S LIN a H.S TAI. Hydrolytic dissociation of hog-hair by microwave radiation. *Bioresource Technology*. 1999, **70**(1), 111-113. DOI: 10.1016/S0960-8524(99)00011-5.
- [32] SCHROOYEN, P. *Feather keratins: modification and film formation*. Enschede: University of Twente, 1999. ISBN 90-365-1302-2.
- [33] SCHROOYEN, Peter M. M., Pieter J. DIJKSTRA, Radulf C. OBERTHÜR, Adriaan BANTJES a Jan FEIJEN. Partially Carboxymethylated Feather Keratins. 2. Thermal and Mechanical Properties of Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001, **49**(1), 221-230. DOI: 10.1021/jf0004154.
- [34] SCHROOYEN, Peter M. M., Piet J. DIJKSTRA, Radulf C. OBERTHÜR, Adriaan BANTJES a Jan FEIJEN. Partially Carboxymethylated Feather Keratins. 1. Properties in Aqueous Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, **48**(9), 4326-4334. DOI: 10.1021/jf9913155.
- [35] SCHROOYEN, P. Stabilization of Solutions of Feather Keratins by Sodium Dodecyl Sulfate. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2001, **240**(1), 30-39. DOI: 10.1006/jcis.2001.7673.

- [36] SCHROOYEN, P.M.M. a R. BOBERTHUR. *Keratin-based products and methods for their productions* [patent]. USA. US2004/0210039A1, 10/483,566. Uděleno 21.10.2004. Zapsáno 12.7.2002.
- [37] GENNADIOS, Aristippos. *Protein-based films and coatings*. Boca Raton: CRC Press, 2002, 650 s. ISBN 15-871-6107-9.
- [38] REICHL, Stephan. 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.
- [39] VASCONCELOS, Andreia, Giuliano FREDDI a Artur CAVACO-PAULO. Biodegradable Materials Based on Silk Fibroin and Keratin. *Biomacromolecules*. 2008, **9**(4), 1299-1305. DOI: 10.1021/bm7012789.
- [40] KATOH, Kazunori, Mikio SHIBAYAMA, Toshizumi TANABE a Kiyoshi YAMAUCHI. Preparation and physicochemical properties of compression-molded keratin films. *Biomaterials*. 2004, **25**(12), 2265-2272. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.09.021.
- [41] KHARDENAVIS, Anshuman A., Atya KAPLEY a Hemant J. PUROHIT. Processing of poultry feathers by alkaline keratin hydrolyzing enzyme from *Serratia* sp. HPC 1383. *Waste Management*. 2009, **29**(4), 1409-1415. DOI: 10.1016/j.wasman.2008.10.009.
- [42] BRANDELLI, Adriano. 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.
- [43] FAKHFAKH-ZOUARI, Nahed, Anissa HADDAR, Noomen HMIDET, Fakher FRIKHA a Moncef NASRI. Application of statistical experimental design for optimization of keratinases production by *Bacillus pumilus* A1 grown on chicken feather and some biochemical properties. *Process Biochemistry*. 2008, **45**(5), 617-626. DOI: 10.1016/j.procbio.2009.12.007.
- [44] WANG, Jeng-Jie, Harold E. SWAISGOOD a Jason C.H. SHIH. Production and characterization of bio-immobilized keratinase in proteolysis and keratinolysis. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003, **32**(7), 812-819. DOI: 10.1016/S0141-0229(03)00060-7.
- [45] LIN, Xiang, Jason. C.H. SHIH a Harold E. SWAISGOOD. Hydrolysis of Feather Keratin by Immobilized Keratinase. *Applied and environmental microbiology*. 1996, **62**(11), 4273-4275.
- [46] LATEEF, A., J.K. OLOKE, E.B. GUEGUIM KANA, B.O. SOBOWALE, S.O. AJAO a B.Y. BELLO. Keratinolytic activities of a new feather-degrading isolate of *Bacillus cereus* LAU 08 isolated from Nigerian soil. *International Biodeterioration*. 2010, **64**(2), 162-165. DOI: 10.1016/j.ibiod.2009.12.007.
- [47] KIDA, K. Enzymatic hydrolysis of the horn and hoof of cow and buffalo. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1995, **80**(5), 478-484. DOI: 10.1016/0922-338X(96)80923-8.

- [48] SYED, Dastager G., Jae Chan LEE, Wen-Jun LI, Chang-Jin KIM a Dayanand AGASAR. Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*. *Bioresource Technology*. 2009, **100**(5), 1868-1871. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.09.047.
- [49] TATINENI, Radhika, Kiran Kumar DODDAPANENI, Ravi Chandra POTUMARTHI, Ravi Nagaraj VELLANKI, Manjusha Thomas KANDATHIL, Nilima KOLLI a Lakshmi Narasu MANGAMOORI. Purification and characterization of an alkaline keratinase from *Streptomyces* sp. *Bioresource Technology*. 2008, **99**(6), 1596-1602. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.04.019.
- [50] CHAO, Ya-peng, Fu-hong XIE, Jing YANG, Jing-hua LU a Shi-jun QIAN. Screening for a new *Streptomyces* strain capable of efficient keratin degradation. *Journal of environmental sciences (China)*. 2007, **19**(9), 1125-1128.
- [51] MABROUK, Mona E. M. 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.
- [52] GRAZZIOTIN, A., F.A. PIMENTEL, E.V. DE JONG a A. BRANDELLI. Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. *Animal Feed Science and Technology*. 2006, **126**(1-2), 135-144. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2005.06.002.
- [53] GRAZZIOTIN, Adriane, Fernanda A. PIMENTEL, Sidnei SANGALI, Erna V. DE JONG a Adriano BRANDELLI. Production of feather protein hydrolysate by keratinolytic bacterium *Vibrio* sp. kr2. *Bioresource Technology*. 2007, **98**(16), 3172-3175. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.10.034.
- [54] YAMAUCHI, Chikara, Wataru OKAZAKI, Tadashi YOSHIDA a Aya KARASAWA. Enzymatic degradation of keratin films and keratin fibers prepared from human hair. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2008, **31**(5), 994-997.
- [55] BRANDELLI, Adriano a Alessandro RIFFEL. Production of an extracellular keratinase from *Chryseobacterium* sp. growing on raw feathers. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2005, **8**(1), 35-42. DOI: 10.2225/vol8-issue1-fulltext-6.
- [56] EREMEEV, N. L., I. V. NIKOLAEV, I. D. KERUCHEN'KO, E. V. STEPANOVA, A. D. SATRUTDINOV, S. V. ZINOV'EV, D. Yu. ISMAILOVA, V. P. KHOTCHENKOV, N. V. TSURIKOVA, A. P. SINITSYN, V. G. VOLIK a O. V. KOROLEVA. Enzymatic hydrolysis of keratin-containing stock for obtaining protein hydrolysates. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2009, **45**(6), 648-655. DOI: 10.1134/S0003683809060131.
- [57] VASILEVA-TONKOVA, Evgenia, Adriana GOUSTEROVA a Georgi NESHEV. Ecologically safe method for improved feather wastes

- biodegradation. *International Biodeterioration*. 2009, **63**(8), 1008-1012. DOI: 10.1016/j.ibiod.2009.07.003.
- [58] KAUL, S. a G. SUMBALI. Keratinolysis by poultry farm soil fungi. *Mycopatologia*. 1997, **139**(3), 137-140.
- [59] DALEV, Pencho G. Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate. *Bioresource Technology*. 1994, **48**(3), 265-267.
- [60] BORE, P.M. a J.C. ARNAUD. *Keratin polymer containing S-sulphocystein residues: process for its preparation and the compositions containing it* [patent]. USA. 4,948,876, 218,220. Uděleno 14.8.1990. Zapsáno 13.7.1988.
- [61] SAVOLAINEN, Jouko E.T. *Procedure for hydrolyzing keratin* [patent]. USA. 5,262,307, 834,590. Uděleno 16.11.1993. Zapsáno 12.2.1992.
- [62] KARTHIKEYAN, R., S. BALAJI a P.K. SEHGAL. Industrial applications of keratins – A review. *Journal of scientific*. 2007, **66**(9), 710-715.
- [63] GUPTA, Rani a Priya RAMNANI. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, **70**(1), 21-33. DOI: 10.1007/s00253-005-0239-8.
- [64] BARONE, Justin R. a Walter F. SCHMIDT. Effect of formic acid exposure on keratin fiber derived from poultry feather biomass. *Bioresource Technology*. 2006, **97**(2), 233-242. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.02.039.
- [65] FREDDI, Giuliano, Masuhiro TSUKADA a Hideki SHIOZAKI. Chemical modification of wool fibers with acid anhydrides. *Journal of Applied Polymer Science*. 1999, **71**(10), 1573-1579.
- [66] MELIAN, Claudiu, Dan E. DEMCO, Monica ISTRATE, Andreea BALACEANU, Dumitrita MOLDOVAN, Radu FECHETE, Crisan POPESCU a Martin MÖLLER. Morphology and side-chain dynamics in hydrated hard  $\alpha$ -keratin fibres by 1H solid-state NMR. *Chemical Physics Letters*. 2009, **480**(4-6), 300-304. DOI: 10.1016/j.cplett.2009.09.013.
- [67] VESELÁ, Mária a Jožefa FRIEDRICH. Amino acid and soluble protein cocktail from waste keratin hydrolysed by a fungal keratinase of *Paecilomyces marquandii*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2009, **14**(1), 84-90. DOI: 10.1007/s12257-008-0083-7.
- [68] GOUSTEROVA, A., M. NUSTOROVA, I. GOSHEV, P. CHRISTOV, D. BRAIKOVA, K. TISHINOV, T. HAERTLÉ a P. NEDKOV. Alkaline hydrolysate of waste sheep wool aimed as fertilizer. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2003, **17**(2).
- [69] ONIFADE, A.A., N.A. AL-SANE, A.A. AL-MUSALLAM a S. AL-ZARBAN. A review: Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresource Technology*. 1998, **66**(1), 1-11. DOI:10.1016/S0960-8524(98)00033-9.
- [70] ZHELJAZKOV, Valtcho D., Glenn W. STRATTON, James PINCOCK, Stephanie BUTLER, Ekaterina A. JELIAZKOVA, Nedko K. NEDKOV a

- Patrick D. GERARD. Wool-waste as organic nutrient source for container-grown plants. *Waste Management*. 2009, **29**(7), 2160-2164. DOI: 10.1016/j.wasman.2009.03.009.
- [71] DALEV, Pencho, Ivailo IVANOV a Anna LIUBOMIROVA. Enzymic Modification of Feather Keratin Hydrolysates with Lysine Aimed at Increasing the Biological Value. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1997, **73**(2), 242-244.
- [72] BERTSCH, A. a N. COELLO. A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient. *Bioresource Technology*. 2005, **96**(15), 1703-1708. DOI: 10.1016/j.biortech.2004.12.026.
- [73] ODETALLAH, N.H., J.J. WANG, J.D. GARLICH a J.C.H. SHIH. Keratinase in starter diets improves growth of broiler chicks. *Poultry Science*. 2003, **82**(4), 664-670.
- [74] YANG, Xiao, Hui ZHANG, Xiaoliang YUAN a Shuxun CUI. Wool keratin: A novel building block for layer-by-layer self-assembly. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2009, **336**(2), 756-760. DOI: 10.1016/j.jcis.2009.04.050.
- [75] LI, Jiashen, Yi LI, Lin LI, Arthur F.T. MAK, Frank KO a Ling QIN. Fabrication and degradation of poly(l-lactic acid) scaffolds with wool keratin. *Composites Part B: Engineering*. 2009, **40**(7), 664-667. DOI: 10.1016/j.compositesb.2009.04.012.
- [76] SECCHI, Gianfranco. Role of protein in cosmetics. *Clinics in Dermatology*. 2008, **26**(4), 321-325. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2008.04.004.
- [77] BARONE, J.R. Polyethylene/keratin fiber composites with varying polyethylene crystallinity. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*. 2005, **36**(11), 1518-1524. DOI: 10.1016/j.compositesa.2005.03.006.
- [78] ALUIGI, Annalisa, Claudia VINEIS, Alessio VARESANO, Giorgio MAZZUCHETTI, Franco FERRERO a Claudio TONIN. Structure and properties of keratin/PEO blend nanofibres. *European Polymer Journal*. 2008, **44**(8), 2465-2475. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2008.06.004.
- [79] ALUIGI, A., C. VINEIS, A. CERIA a C. TONIN. Composite biomaterials from fibre wastes: Characterization of wool-cellulose acetate blends. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*. 2008, **39**(1), 126-132. DOI: 10.1016/j.compositesa.2007.08.022.
- [80] WOOL, Richard P. *Bio-based polymers and composites*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, c2005, 620 s. ISBN 01-276-3952-7.
- [81] KARTHIKEYAN, R., S. BALAJI, N. K. CHANDRABABU a P. K. SEHGAL. Horn meal hydrolysate-chromium complex as a high exhaust chrome tanning agent-pilot scale studies. *Clean Technologies and Environmental Policy*. 2008, **10**(3), 295-301. DOI: 10.1007/s10098-007-0119-2.

- [82] BÁLINT, Balázs, Zoltán BAGI, András TÓTH, Gábor RÁKHELY, Katalin PEREI a Kornél L. KOVÁCS. Utilization of keratin-containing biowaste to produce biohydrogen. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005, **69**(4), 404-410. DOI: 10.1007/s00253-005-1993-3.
- [83] KURBANOGLU, Esabi Basaran a Omer Faruk ALGUR. Utilization of ram horn hydrolysate as a supplement for recovery of heat- and freeze-injured bacteria. *Food Control*. 2006, **17**(3), 238-242. DOI: 10.1016/j.foodcont.2004.11.001.
- [84] POOPATHI, Subbiah a S. ABIDHA. Biodegradation of poultry waste for the production of mosquitocidal toxins. *International Biodeterioration*. 2008, **62**(4), 479-482. DOI: 10.1016/j.ibiod.2008.03.005.
- [85] LÜ, Xiaowen a Shuxun CUI. Wool keratin-stabilized silver nanoparticles. *Bioresource Technology*. 2010, **101**(12), 4703-4707. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.01.110.
- [86] EVANGELOU, Michael W.H., Mathias EBEL, Andrea KOERNER a Andreas SCHAEFFER. Hydrolysed wool: A novel chelating agent for metal chelant-assisted phytoextraction from soil. *Chemosphere*. 2008, **72**(4), 525-531. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.03.063.
- [87] ENDO, Rie, Kaeko KAMEI, Ikuho IIDA a Yutaka KAWAHARA. Dimensional stability of waterlogged wood treated with hydrolyzed feather keratin. *Journal of Archaeological Science*. 2008, **35**(5), 1240-1246. DOI: 10.1016/j.jas.2007.08.011.
- [88] ENDO, Rie, Kaeko KAMEI, Ikuho IIDA, Misao YOKOYAMA a Yutaka KAWAHARA. Physical and mechanical properties of waterlogged wood treated with hydrolyzed feather keratin. *Journal of Archaeological Science*. 2010, **37**(6), 1311-1316. DOI: 10.1016/j.jas.2009.12.034.
- [89] Association of Analytical Communities. *Official methods of analysis of AOAC International*. 16th edition, 4th revision, AOAC International 1998.
- [90] DAVIDEK, Jiří. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. 2. vydání. Praha: SNTL, 1981.
- [91] REISENAUER, Roman. *Metody matematické statistiky a jejich aplikace v technice*. 2. vyd. Praha: SNTL, 1970.
- [92] Munugistic Inc.: Statistical Graphic System Statgraphics 6.0, USA 1992.
- [93] ALUIGI, A., C. TONETTI, C. VINEIS, C. TONIN a G. MAZZUCHETTI. Adsorption of copper(II) ions by keratin/PA6 blend nanofibres. *European Polymer Journal*. 2011, **47**(9), s. 1756-1764. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2011.06.009.
- [94] LUSIANA, Stephan REICHL a Christel C. MÜLLER-GOYMANN. Keratin film made of human hair as a nail plate model for studying drug permeation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2011, **78**(3), s. 432-440. DOI: 10.1016/j.ejpb.2011.01.022.
- [95] WUNDERLICH, Bernhard. *Macromolecular physics: Volume 3, Crystal melting*. New York: Academic Press, 1980.



- [96] ČSN ISO 2171. *Obiloviny, luštěniny a výrobky z nich - Stanovení obsahu popela spalováním*. Praha: Český normalizační institut, 2008.
- [97] ČSN EN ISO 4684. *Usně - Chemické zkoušky - Stanovení těkavých látek*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2006.
- [98] ČSN EN ISO 527-2. *Plasty - Stanovení tahových vlastností: Část 2: Zkušební podmínky pro tvářené plasty*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2012.

## SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

### Články v odborných periodikách:

- **P1:** MOKREJS, Pavel, Ondřej KREJCI, Petr SVOBODA a Vladimír VASEK. Modeling technological conditions for breakdown of waste sheep wool. *Rasyan journal of chemistry*. 2011, **4**(4), 728-735.
- **P2:** MOKREJS, Pavel, Ondřej KREJCI a Petr SVOBODA. Producing Keratin Hydrolysates from sheep wool. *Oriental journal of chemistry*. 2011, **27**(4).
- **P3:** MOKREJŠ, Pavel, Ondřej KREJČÍ, Svatopluk SUKOP a Petr SVOBODA. Characterising Keratin Hydrolysates Prepared from Sheep Wool. *Asian Journal of Chemistry*. 2014, **26**(18). – v tisku
- **P4:** KREJČÍ, Ondřej a Pavel MOKREJŠ. 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)
- **P5:** KREJČÍ, Ondřej a Pavel MOKREJŠ. Sledování významnosti vybraných technologických podmínek při enzymové hydrolyze odpadní ovčí vlny. *Wasteforum*. 2011, **4**(1), 4-11. Dostupné z: [www.wasteforum.cz](http://www.wasteforum.cz)
- **P6:** KREJČÍ, Ondřej a Pavel MOKREJŠ. Snižování obsahu popelovin v hydrolyzátech keratinu dialýzou. *Wasteforum*. 2012, **5**(4). Dostupné z: [www.wasteforum.cz](http://www.wasteforum.cz)
- **P7:** MOKREJŠ, Pavel, Ondřej KREJČÍ, Roman ČERMÁK a Petr SVOBODA. Optimalizace podmínek enzymové hydrolyzy kuřecího peří. *Chemické Listy*. 2013, **107**(9), 709-712.
- **P8:** MOKREJŠ, Pavel, Svatopluk SUKOP a Ondřej KREJČÍ. Charakterizace keratinových hydrolyzátů připravených z kuřecího peří. *Chemické Listy*. 2014, 108. – v tisku

### Konferenční příspěvky:

- KREJČÍ, Ondřej a Pavel MOKREJŠ. Zpracování keratinových odpadů a možnosti aplikací redukováných forem keratinu: Literární studie. In: *Sborník Odpadové Fórum 2009*. Praha: PCHE-PetroChemEng., 2009.
- **P9:** KREJČÍ, Ondřej a Pavel MOKREJŠ. Technologie zpracování odpadní vlny enzymovou hydrolyzou. In: *Sborník Chisa 2009*. Praha: Česká společnost chemického inženýrství, 2009.
- **P10:** KREJČÍ, Ondřej a Pavel MOKREJŠ. Způsob přípravy keratinového hydrolyzátu z odpadní vlny. In: FEČKO, Peter a Vladimír ČABLIK. *Recyklace odpadu XIII: 27.11.2009, VSB-TU Ostrava*. Ostrava: VSB-TU Ostrava, 2009.
- **P11:** KREJČÍ, Ondřej a Pavel MOKREJŠ. Možnosti izolace bílkovin z odpadů keratinového typu. In: *Odpadové fórum 2010*. Praha: CEMC, 2010.

- **P12:** KREJČÍ, Ondřej a Pavel MOKREJŠ. Možnosti přípravy biopolymerů z keratinových odpadů. In: *Sborník konference Plastko*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2010.
- **P13:** KREJČÍ, Ondřej, Pavel MOKREJŠ a Svatopluk SUKOP. Příprava hydrolyzátů keratinu a jejich čištění dialýzou. In: *Proteiny 2011: Sborník z vědecké konference*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2011.
- **P14:** MATOUŠ, Huťša, Ondřej KREJČÍ a Pavel MOKREJŠ. Biopolymerní filmy připravené z keratinového hydrolyzátu vyrobeného z odpadů masného průmyslu. In: *Sborník konference Plastko*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2014.
- **P15:** KREJCI, Ondrej, Pavel MOKREJS a Svatopluk SUKOP. Preparation and Characterization of Keratin Hydrolysates. In: *Mathematical methods and techniques in engineering & environmental science*. Catania, Sicily, Italy: WSEAS Press, 2011.

#### **Články připravené k publikaci:**

- **P16:** MOKREJS, Pavel, Ondrej KREJCI a Petr SVOBODA. Desks prepared from polyethylene filled with keratin hydrolysate.

#### **Publikace nesouvisející s tématem práce:**

- MOKREJS, Pavel, Ondrej KREJCI, Josef HRNCIRIK a Dagmar JANACOVA. Decelerating weight loss of harvested strawberries by applying edible coatings based on starch-protein hydrolysate of amaranth flour. *Oriental Journal of Chemistry*. 2009, **25**(4), 833-839.
- JANICEK, Miroslav, Ondrej KREJCI a Roman CERMAK. Thermal stability of surface-esterified cellulose and its composite with polyolefinic matrix. *Cellulose*. 2013, **20**(6), 2745-2755.

# CURRICULUM VITAE

**Jméno:** Ondřej Krejčí  
**Adresa:** Strmá 200, Zlín – Štípa, 76314  
**Datum narození:** 10. srpna 1984  
**Telefon:** 776884632  
**E-mail:** okrejci@ft.utb.cz

## Vzdělání

2008 – dnes Doktorské studium, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně,  
Fakulta technologická, Ústav inženýrství polymerů  
obor: Technologie makromolekulárních látek  
2006 – 2008 Magisterské studium, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně,  
Fakulta technologická  
obor: Inženýrství polymerů  
2003 – 2006 Bakalářské studium, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně,  
Fakulta technologická  
obor: Chemie a technologie materiálů  
1999 – 2003 SPŠ Otrokovice  
obor: Výpočetní technika v chemii

## Zaměstnání

2011 – dnes Pedagogický pracovník, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně,  
Fakulta technologická, Ústav inženýrství polymerů

## Studijní a pracovní zkušenosti

2008 Kurz základů vědecké práce, AVČR, Praha  
2010 Kurz navrhování a vyhodnocování experimentů, VUT Brno  
2007 – 2008 Brigáda – Greiner Packaging Slušovice s.r.o., obsluha  
tvarovací linky  
2010 Práce na částečný úvazek – Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně,  
Fakulta technologická, Ústav inženýrství polymerů,  
Pedagogický pracovník pro vedení laboratorních cvičení  
2009 – dnes Vedoucí 5 diplomových a 4 bakalářských prací  
2014 – dnes Realizátor roadshow, Projekt OPVK CZ.1.07/2.3.00/45.0015:  
Centrum pro podporu přírodovědných a technických věd:  
Technická a přírodovědná laboratoř pro děti a mládež  
Zlínského kraje

# PŘÍLOHA

Označení pokusu	Alkálie	Enzym	1. stupeň (alkalická hydrolýza)			2. stupeň (enzymová hydrolýza)			% rozložené vlny		
			Koncentrace alkálie (%)	Teplota 1. stupně (°C)	Doba 1. stupně (h)	Přídatek enzymu (%)	Teplota 2. stupně (°C)	Doba 2. stupně (h)			
A1			0,3	90	48	1	40	6	30,6		
A2			0,3	90	48	1	40	24	30,8		
A3			0,3	90	48	1	60	6	34,9		
A4			0,3	90	48	1	60	24	40,0		
A5	KOH	Savinase 6.0T	0,3	90	48	3	50	15	41,6		
A6			0,3	90	48	3	50	15	41,4		
A7			0,3	90	48	5	40	6	32,9		
A8			0,3	90	48	5	40	24	35,1		
A9			0,3	90	48	5	60	6	39,2		
A10			0,3	90	48	5	60	24	45,5		
B1					0,3	90	48	1	40	6	31,7
B2					0,3	90	48	1	40	24	33,0
B3					0,3	90	48	1	60	6	36,1
B4					0,3	90	48	1	60	24	37,7
B5	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Savinase 6.0T	0,3	90	48	3	50	15	36,2		
B6			0,3	90	48	3	50	15	36,2		
B7			0,3	90	48	5	40	6	33,6		
B8			0,3	90	48	5	40	24	35,1		
B9			0,3	90	48	5	60	6	39,1		
B10			0,3	90	48	5	60	24	42,2		

Označení pokusu	Alkálie	Enzym	1. stupeň (alkalická hydrolýza)			2. stupeň (enzymová hydrolýza)			% rozložené vlny		
			Koncentrace alkálie (%)	Teplota 1. stupně (°C)	Doba 1. stupně (h)	Přídavek enzymu (%)	Teplota 2. stupně (°C)	Doba 2. stupně (h)			
C1			0,2	90	48	1	40	24	26,7		
C2			0,2	90	48	1	60	24	30,7		
C3			0,2	90	48	5	40	24	29,3		
C4			0,2	90	48	5	60	24	36,7		
C5	KOH	Savinase 6.0T	0,4	90	48	3	50	24	50,8		
C6			0,4	90	48	3	50	24	53,4		
C7			0,6	90	48	1	40	24	63,2		
C8			0,6	90	48	1	60	24	71,8		
C9			0,6	90	48	5	40	24	71,9		
C10			0,6	90	48	5	60	24	73,9		
D1			Ca(OH) <sub>2</sub>	Esperase 6.0T	0,5	80	6	1	60	6	25,0
D2					0,5	80	6	1	60	24	39,0
D3					0,5	80	6	5	60	6	34,5
D4					0,5	80	6	5	60	24	41,0
D5	0,5	80			15	3	60	15	38,0		
D6	0,5	80			15	3	60	15	38,5		
D7	0,5	80			24	1	60	6	35,8		
D8	0,5	80			24	1	60	24	37,5		
D9	0,5	80			24	5	60	6	38,1		
D10	0,5	80			24	5	60	24	54,5		

Označení pokusu	Alkálie	Enzym	1. stupeň (alkalická hydrolýza)			2. stupeň (enzymová hydrolýza)			% rozložené viny
			Koncentrace alkálie (%)	Teplota 1. stupně (°C)	Doba 1. stupně (h)	Přídavek enzymu (%)	Teplota 2. stupně (°C)	Doba 2. stupně (h)	
E1	Ca(OH) <sub>2</sub>	Eperase 6.0T	0,2	40	24	5	40	24	8,4
E2			0,2	40	24	5	60	24	15,3
E3			0,2	80	24	5	40	24	9,8
E4			0,2	80	24	5	60	24	22,4
E5			0,4	60	24	5	50	24	19,7
E6			0,4	60	24	5	50	24	19,2
E7			0,6	40	24	5	40	24	14,9
E8			0,6	40	24	5	60	24	24,2
E9			0,6	80	24	5	40	24	42,9
E10			0,6	80	24	5	60	24	59,2
F1	Ca(OH) <sub>2</sub>	Everlase 6.0T	0,2	40	24	5	40	24	4,7
F2			0,2	40	24	5	60	24	8,3
F3			0,2	80	24	5	40	24	7,3
F4			0,2	80	24	5	60	24	14,6
F5			0,4	60	24	5	50	24	10,9
F6			0,4	60	24	5	50	24	12,4
F7			0,6	40	24	5	40	24	9,9
F8			0,6	40	24	5	60	24	10,9
F9			0,6	80	24	5	40	24	28,7
F10			0,6	80	24	5	60	24	39,6