

# **Příprava proteinových hydrolyzátů a jejich využití ve speciálních ochranných emulzích**

Bc. Adéla Mahdalová

---

Diplomová práce  
2019



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2018/2019

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Adéla Mahdalová**  
Osobní číslo: **T170027**  
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Inženýrství polymerů**  
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Příprava proteinových hydrolyzátů a jejich využití ve speciálních ochranných emulzích**

Zásady pro vypracování:

**Teoretická část práce bude věnována souhrnu informací o proteinových hydrolyzátech, jejich výrobě, vlastnostech a možném použití zejména v kosmetickém průmyslu pro přípravu ochranných emulzí.**

**Cílem praktické části bude nejprve příprava a analýza proteinových hydrolyzátů. Dále pak příprava kosmetických emulzí s různými přísadkami vyrobených hydrolyzátů.**

**V poslední části práce bude poté vyhodnocen vliv přísadky hydrolyzátu na vlastnosti a kvalitu chlupů a pokožky testovaných subjektů.**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

**GUAGUERE, E. PRELAUD, P. CRAIG, M. A practical guide to Canine Dermatology, 2008, s. 17-33. ISBN 2-915758-11-5.**

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

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

Odborné publikace z databází Scopus, Science Direct, Web of Science a Knovel.

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Ondřej Krejčí, PhD.**

Ústav inženýrství polymerů

Datum zadání diplomové práce:

**2. ledna 2019**

Termín odevzdání diplomové práce:

**14. května 2019**

Ve Zlíně dne 18. února 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*

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

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 14. května 2019

.....

---

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

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

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

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

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

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

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce je zaměřena na aplikaci hydrolyzovaného keratinu v kosmetickém produktu pro zvířata. Teoretická část práce je zaměřená na keratiny, jejich hydrolytické štěpení a použití v kosmetických produktech pro zvířata. V praktické části byl připraven hydrolyzát keratinu alkalicko-enzymovým způsobem, který byl v koncentracích (0,5—1,5 %) vmíchán do kosmetického základu. Připravené balzámy byly následně aplikovány na 4 psy a poté byly sledovány mechanické vlastnosti chlupů. Ze získaných výsledků provedených zkoušek vyplývá, že balzámy s přídavkem keratinu zlepšují tahové vlastnosti a vyhlazují povrchovou strukturu chlupů. Přídavek keratinového hydrolyzátu rovněž zvyšuje viskozitu balzámů.

Klíčová slova: keratin, hydrolyza, kosmetika, balzám, chlup, hydrolyzát

## **ABSTRACT**

This thesis is focus on the application of hydrolysed keratin in cosmetic products for animals. The theoretical part is focused on general explanation of keratin and how it is extracted from sheep wool, it looks at the breakdown of hydrolytic cleavage with practical examples, an actual hair growth cycle of a dog and the use of cosmetic products for animals. In the practical part, we look at how the keratin hydrolysate was prepared by alkaline-enzyme method, which was added to concentrations of 0.5—1.5 % in cosmetic bases. These balsams were used on 4 dogs and then we observed the hair before and after application. The test results show that keratin added balsams improve the tensile quality and smoothing out surface structure of hair. This research thesis finds that addition of the keratin hydrolyse also increase viscosity of balsams.

Keywords: keratin, keratin hydrolysis, cosmetics, balsam, dog hair, hydrolyzate

Touto cestou bych chtěla vyjádřit poděkování vedoucímu panu inženýru Ondřeji Krejčímu, za maximální vstřícnost, odborné rady, cenné připomínky, pomoc a mimořádnou trpělivost při psaní mé diplomové práce.

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

# OBSAH

ÚVOD .....	10
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>11</b>
<b>1 KERATIN.....</b>	<b>12</b>
1.1 SCHÉMA CHEMICKÝCH VAZEB KERATINU .....	13
1.2 ZÍSKÁVÁNÍ KERATINU .....	14
1.2.1 Vlna.....	15
1.2.2 Vlastnosti vlny.....	16
1.2.3 Typy ovčí vlny.....	18
1.3 HISTORIE NETEXTILNÍHO ZPRACOVÁNÍ KERATINŮ.....	19
<b>2 PŘÍPRAVA KERATINU – HYDROLYTICKÉ ŠTĚPENÍ.....</b>	<b>20</b>
2.1 ALKALICKÁ HYDROLÝZA.....	20
2.2 KYSELÁ HYDROLÝZA .....	21
2.3 ENZYMOVÁ HYDROLÝZA .....	22
2.4 OXIDACE .....	23
2.5 REDUKCE.....	25
2.6 KOMBINOVANÁ HYDROLÝZA .....	26
2.6.1 Oxidačně-kyselá hydrolyza .....	27
2.6.2 Redukčně-enzymová hydrolyza .....	28
2.7 DIALÝZA KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU .....	30
<b>3 APLIKACE KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU V KOSMETICE .....</b>	<b>31</b>
3.1 PŘEHLED APLIKAČNÍCH FOREM KOSMETICKÝCH PŘÍRAD .....	32
3.2 KOSMETICKÉ PRODUKTY .....	34
3.2.1 Šampony a mycí roztoky .....	34
3.2.2 Kondicionéry, balzámy a masky .....	34
3.2.3 Doplnková kosmetika s keratinem .....	34
<b>4 SRST PSA A KOČKY.....</b>	<b>35</b>
4.1 FÁZE A CYKLUS RŮSTU CHLUPU U PSŮ A KOČEK.....	35
4.2 STRUKTURA PSÍHO CHLUPU.....	36
4.3 POSTUP PŘI KOUPÁNÍ.....	37
4.4 FREKVENCE KOUPÁNÍ.....	37
4.5 NEZBYTNOST APLIKACÍ BALZÁMŮ .....	38
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>39</b>
<b>5 CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>40</b>
<b>6 PŘÍPRAVA KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU.....</b>	<b>41</b>



6.1	POUŽITÉ ENZYMY .....	41
6.2	MATERIÁLY A POMŮCKY .....	42
6.3	BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	42
6.4	POSTUP PŘÍPRAVY .....	42
6.4.1	Úprava vlny .....	42
6.4.2	Odtučnění enzymem Lipex 100T .....	42
6.4.3	Rozklad vlny .....	42
6.4.4	Dialýza .....	43
<b>7</b>	<b>ANALYTICKÉ METODY .....</b>	<b>44</b>
7.1	ANALYTICKÉ METODY PROVEDENÉ NA SUROVÉ VLNĚ, DIALYZÁTU A HYDROLYZÁTU KERATINU .....	44
7.1.1	Účinnost hydrolýzy.....	44
7.1.2	Stanovení vlhkosti .....	45
7.1.3	Mikrochemické stanovení obsahu dusíku .....	45
7.1.4	Stanovení obsahu síry srážením roztokem chloridu barnatého .....	46
7.1.5	Stanovení obsahu popelovin .....	47
7.1.6	Stanovení distribuce molekulových hmotností (Mw) hydrolyzátů .....	48
7.2	PŘÍPRAVA KERATINOVÝCH BALZÁMŮ.....	49
7.3	TAHOVÁ ZKOUŠKA .....	50
7.4	VISKOZITA .....	51
7.5	MIKROSKOPIE .....	51
<b>8</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>53</b>
8.1	ÚČINNOST HYDROLÝZY .....	53
8.2	ANALYTICKÉ ZKOUŠKY .....	53
8.2.1	Obsah vlhkosti.....	53
8.2.2	Výsledek stanovení dusíku.....	54
8.2.3	Výsledek stanovení síry .....	55
8.2.4	Výsledek stanovení popela.....	55
8.2.5	Výsledek distribuce molekulových hmotností (Mw) hydrolyzátů .....	56
8.3	VÝSLEDEK TAHOVÉ ZKOUŠKY.....	58
8.4	VÝSLEDEK VISKOZITY .....	60
8.5	VÝSLEDEK POVRCHOVÉ MIKROSKOPIE .....	61
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>66</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>68</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>73</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>74</b>
	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>75</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH .....</b>	<b>CHYBA! ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.</b>

## ÚVOD

Toto téma je mi velmi blízké, protože pracuji jako stříhačka psů ve svém saloně a s kondicí srsti psa se setkávám denně. Proto vím, abych docílila nejlepšího stříhačského výsledku, musí být srst dokonale čistá, rozčesaná a nijak neponičená. Nedílnou součástí jsou kosmetické přípravky, které plní spoustu funkcí pro zdravou kůži a chlupy. Z vlastní praxe a trochou studentské možnosti vytvořit přípravek s keratinem, jsem měla ve výběru témata k mé diplomové práci hned jasno. Diplomová práce postupně navazuje na mou bakalářskou práci, kde se v úvodní části zmiňuji o anatomii kůže psa a růstu chlupů, fyzikální a chemické vlastnosti. V druhé polovině práce jsem se zabývala kosmetickými složkami a přípravky pro použití v profesionální kosmetice pro zvířata.

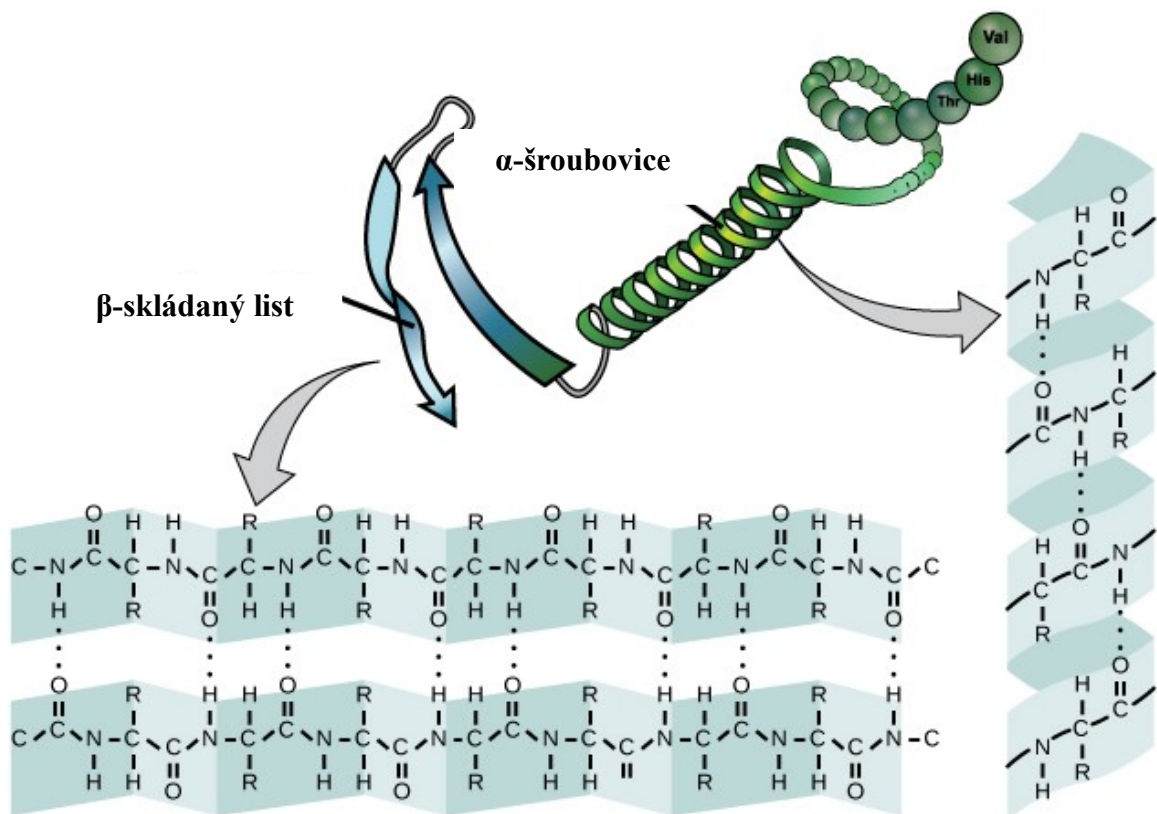
Při studování struktury chlupu jsem se dozvěděla, že chlup (srst) je v základu složen z keratinového vlákna, tuto bílkovinu můžeme po vhodném zpracování přidat jako důležitou ingredienci do kosmetiky s vysoce regeneračním účinkem. Kosmetické potřeby pro zvířata obsahují širokou škálu ingrediencí. Jednou z nejvíce zastoupených skupin, vedle tenzidů a látek lipidní povahy, jsou polymery, lze je použít především jako modifikátory viskozity, kondicionéry, stabilizátory fyzikálních vlastností apod. Dozvíme se něco o typech použití, práci základních složek v kosmetice i postupy pro správné mytí a další šetrné zkrášlování psa. Práci je možné použít jako naučný text pro stříhače, vystavovatele popř. chovatele psů.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 KERATIN

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

$\alpha$ -keratiny mohou být tvrdé nebo měkké, podle toho, zda mají vysoký nebo nízký obsah síry. Tvrdé keratin vlasů, rohoviny a nehtů jsou méně pružné a více odolávají deformaci než měkké keratiny kůže a mozolů. [3]



Obrázek 1  $\alpha$ -šroubovice a  $\beta$ -skládaný list struktura keratinové molekuly [4]

## 1.1 Schéma chemických vazeb keratinu

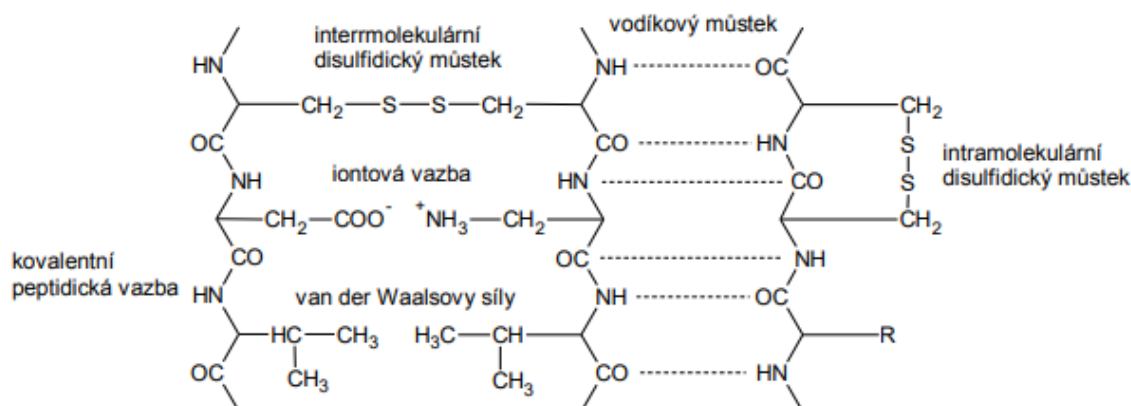
V keratinu se uplatňuje několik druhů chemických vazeb, které jsou znázorněny na obrázku pod textem. Podle těchto chemických vazeb lze usuzovat na možné chemické reakce keratinu. Tyto chemické reakce pak otevírají cesty pro případné zpracovatelské postupy.

Kovalentní polypeptidická vazba spojuje aminokyseliny do hlavního makromolekulárního řetězce keratinu. Kovalentní vazba disulfidického můstku cystinu může být intramolekulární nebo častěji intermolekulárně spojuje dva polypeptidické řetězce mezi sebou. [6]

Vodíkové můstky jsou jednak intramolekulární ve struktuře  $\alpha$  ( $\alpha$ -helix šroubovici) a také intermolekulární ve struktuře  $\beta$  ( $\beta$ -skládaného listu). Vznik dalších vodíkových můstků však umožňují i jiné zastoupené aminokyseliny s polární skupinou (alkoholické a fenolické skupiny). Vodíkové můstky mají silnou afinitu k polárním látkám a umožňují tak vázat například značné množství vody. [5-6]

Iontová vazba (elektrostatická vazba) vzniká mezi postranními amino skupinami a karboxylovými skupinami. Aminokyseliny s bazickými skupinami (diaminokarboxylové kyseliny) váží pak iontově nejen karboxylové skupiny sousedních řetězců, ale i cizích látek. Podobně aminokyseliny s kyselými skupinami (monoaminodikarboxylové kyseliny) váží pak iontově nejen zásadité skupiny sousedních řetězců, ale i cizích látek.

Van der Waalsovy síly jsou další slabé interakce, které kromě již zmíněných vodíkových můstků působí v keratinu. [6]



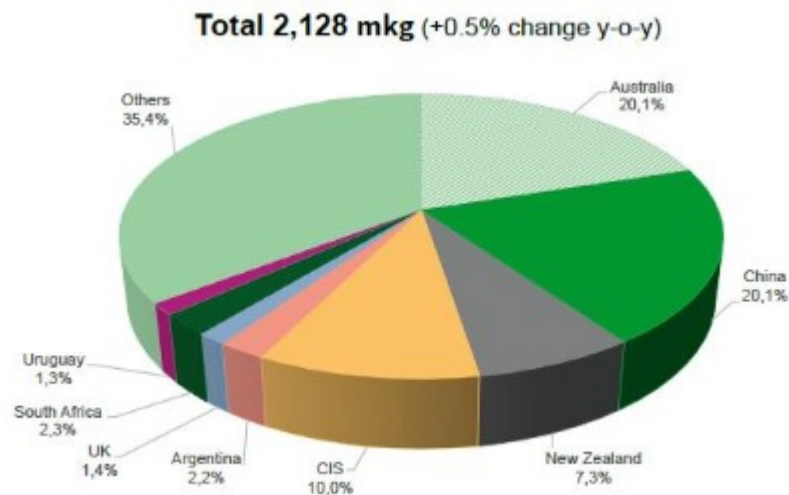
Obrázek 2 Schéma vazeb vyskytujících se v keratinu [6]

## 1.2 Získávání keratinu

Za keratinové odpady se považují látky s vysokým podílem nerozpustné bílkoviny keratinu, který tvoří jejich hlavní část. Mezi nejdůležitější keratinové odpady patří vlna, srst, štětiny, ale také složitě zpracovatelné odpady jako jsou rohy, kopyta a paznehty. [7]

V České republice, podle informací z Ministerstva zemědělství 2018, se produkce potní vlny zvýšila o bezmála 100 tun, tedy v roce 2010 byla produkce potní vlny 455 tun, za rok 2017 tomu bylo 550 tun. [9]

Podle dostupných údajů z roku 2015 je na celém světě více než 1,163 miliard ovcí, přibližně 1,160 milionu kg čisté surové vlny. Počet ovcí od roku 2014 mírně vzrostl o 79 milionů od roku 2010. Na obrázku č. 3 můžeme vidět světovou produkci nepřebrané vlny. [8]



Obrázek 3 Světová produkce vlny % [8]

Několik milionu tun surovin ročně je likvidováno na skládkách a jeho pálení je neefektivní a znečišťuje ovzduší, nejspíše kvůli vysokému obsahu síry. Keratin je přirozeně hydrofilní, biologicky rozložitelný, biokompatibilní a může být dále zpracován prostřednictvím chemických rozkladů. [10]

### 1.2.1 Vlna

Vlna se získává stříháním živých či mrtvých ovcí nebo chemicky ze stažených ovcí. Stříháním ovcí se získá vlna ve formě rouna, které tvoří souvislou vrstvu spojenou vlasovým tukem a potem. Chemicky patří tato vlákna mezi keratinová (30 – 60% hmotnosti vlákna), kde struktura keratinového řetězce jim udává některé specifické vlastnosti. Ovce se stříhá jednou ročně a podle druhu, pohlaví a stáří ovce je hmotnost rouna 3 – 6 kg. Po ostříhání se musí vlna vyprat od nečistot. [11]

Nejkvalitnější vlna pochází z Austrálie, odkud pochází téměř polovina vyprodukované vlny – Merino. Na ovcích můžeme mít několik typů vlny. Stříháním ovcí získáváme střížní vlnu. Kvalita rouna není po celém těle ovcí stejná. Nejkvalitnější vlna se nachází na lopatkách a bocích ovce, střední kvalitu má vlna z hřebenu a nejhorší jakost vlny je na hlavě, ocase a nohou. U ovčí vlny jsou deklarována čtyři základní plemena:

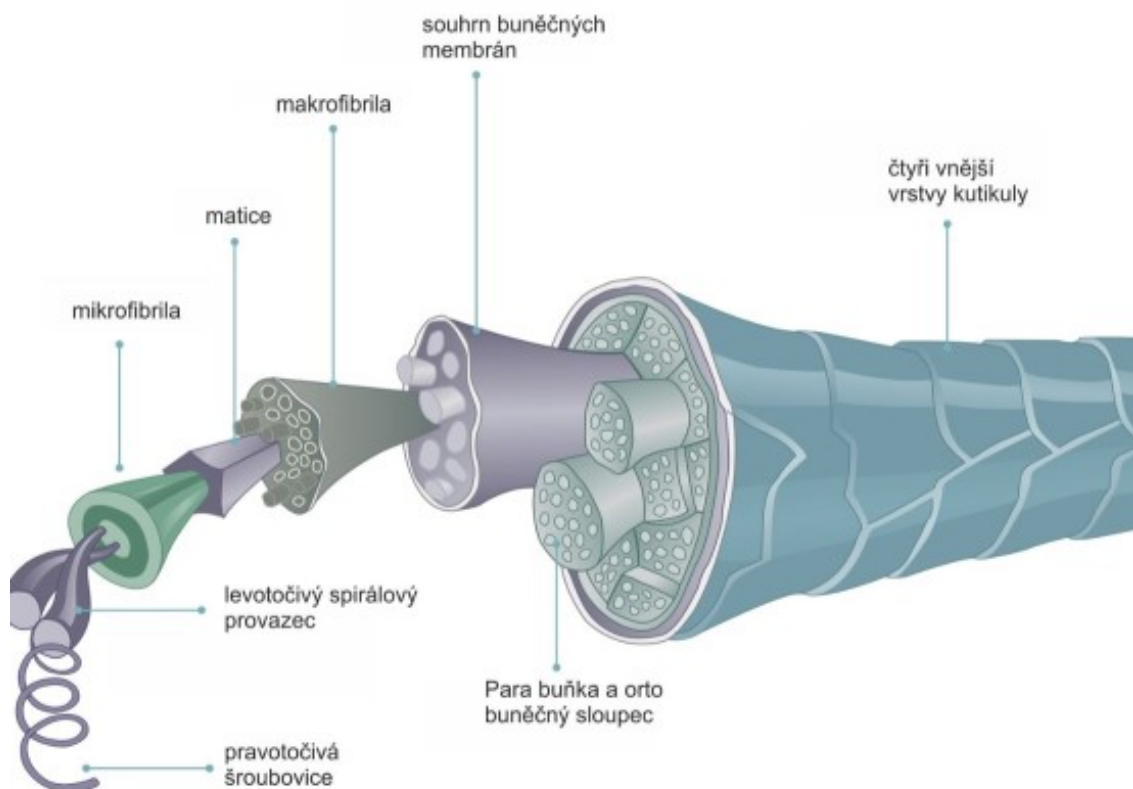
- merinové: kvalita Merino, Austrálie, Nový Zéland, Jižní Afrika, jemnost pod 24  $\mu\text{m}$
- kříženecké: kvalita Crossbred, křížením (ovce Merino + beran nižší kvality BritishBred) Nový Zéland, Austrálie jemnosti jsou v rozmezí 25 -- 50  $\mu\text{m}$
- anglické: cca 40 plemen, nejznámější jsou Cheviot, Dartmoor, Dorset, Jacob, Leicester, Romney, Southdown, Suffolk, WelshMountain. Jemnosti jsou v rozmezí 25 -- 70  $\mu\text{m}$
- nížinné: Čína, Tibet, Mongolsko, poskytující hrubé vlny [11]

Samozřejmě většina vlny se používá na pletení různých produktů, avšak některá vlna se na přímou spotřebu nehodí. Důvody mohou být různé, zvířata jsou podvyživená, nemocná, nestříhaná nebo silně znečištěná. Likvidace odpadů z keratinu, jako vedlejšího produktu u textilního průmyslu, ale i jako vlny z farem, rohoviny, kopyt atd. představuje vážný ekologický problém. [12]

### 1.2.2 Vlastnosti vlny

Z makromolekulárního hlediska je vlna složené vlákno, které obsahuje keratin, který je z největší části tvořen uhlíkem (50 %), kyslíkem a dusíkem (40 %) a sírou (3 – 5 %). Keratin ovčí vlny obsahuje  $\alpha$ -keratasy,  $\beta$ -keratasy a  $\gamma$ -keratasy.  $\alpha$ -keratosa má zastoupení 60% a rozděluje se na  $\alpha$ 1-frakci s vyšší molární hmotností a  $\alpha$ 2-frakci s nižší molární hmotností v poměru asi 3:1.  $\beta$ -frakce (10 %), která je nerozpustným zbytkem po oxidaci vlny kyselinou peroctovou. Zbylá část obsahuje  $\gamma$ -keratasy s velmi nízkou molární hmotností.

Kromě bílkovin vlna také obsahuje tuk (15–30%) množství tuku se provádí extrakčně pomocí Soxhletova přístroje. Tyto lipidy jsou obecně známé jako vlnotuky a dají se zcela odstranit drhnutím. Nejznámější z tuků je lanolín, ten se využívá také v kosmetice. Lanolín chrání vlnu před znečištěním bakteriemi a jinými mikroorganismy. Výrazně se podílí na regeneraci vlny, a proto je často označován jako samočisticí efekt vlny. Zároveň lanolín snižuje křehkost a lámavost vlasu. Vnitřní lipidy jsou tvořeny především z cholesterolu, mastných kyselin a polárních lipidů. Jedno procento z vlny se skládá z minerálních solí, zbytků nukleových kyselin a sacharidů. [11, 13]



Obrázek 4 Vlákně vlny [14]



Na obrázku je znázorněna vzájemná interakce mezi podjednotkami. Příkladem kvarterní struktury keratinu jsou dva pravotočivé  $\alpha$  helixy, které tvoří levotočivý superhelix. Superhelixy stočené navzájem tvoří protofibrilu. Z protofibril vzniká mikrofibrila a z nich útvar zvaný makrofibrila. Tento útvar je již pozorovatelný světelným mikroskopem. Celý komplex je stabilizován již dříve zmíněnými disulfidickými vazbami a také vodíkovými můstky do tvaru keratinového vlákna. [14, 53]

### **Pevnost vlny**

Pevnost vlny se udává, jako síla potřebná k přetržení. Vlákno o větší tloušťce má vyšší pevnost proto bude potřeba větší síly k přetržení. Objektivně se pevnost a tažnost zjišťuje na dynamometru (trhačka vlny). [14]

### **Hygroskopičnost vlny**

Je schopnost vlny absorbovat vlhkost z okolního prostředí. Vlna může svou hmotnost zvýšit až o 50 % původní hmotnost. Důležité je vlnu skladovat v suchých a větraných místnostech. [16, 17]

### **Odolnost vlny**

Vlna je odolná proti plísním a je nestravitelná pro hlodavce, ale náchylná vůči molům. Vlna je těžko hořlavá, obnovitelná a ekologická. [18]

### 1.2.3 Typy ovčí vlny

Tvar vláken můžeme rozdělit do dvou základních tříd a to na podsadu a pesíky, které udávají jakost rouna.

Podsada (viz. Obrázek 5) je vlna ovcí merinových a ovcí, které vznikly křížením s tímto plemenem. Tato vlna tvoří prameny 8-100 vláken, které jsou navzájem spleené potem a tukem. Pravá vlna je na dotyk měkká.



Obrázek 5 Vláknó podsadové [11]

Pesíky (viz. Obrázek 6) jsou jednotlivé, hrubé, dlouhé, rovné a lesklé chlupy, bývají nazývané jako konturovací vlna. Dlouhodobým šlechtěním ovcí merinových zakrněly, či úplně vymizely. [19]



Obrázek 6 Vláknó pesíkové [11]

### 1.3 Historie netextilního zpracování keratinů

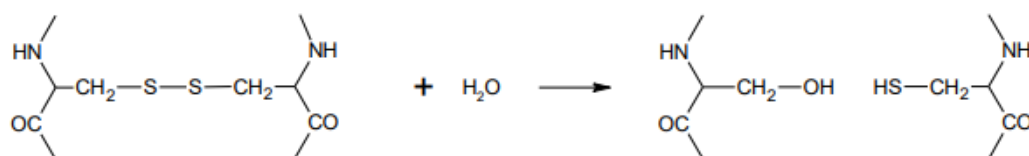
Během druhé světové války a bezprostředně po ní proběhlo několik výzkumů ohledně struktury a chemického složení přírodních vláken, jako jsou vlasy, vlna, chlupy. Hlavním důvodem byla velká komercializace syntetických vláken, jako je nylon a polyester. Australští vědci se tehdy snažili zachránit velký vlnový průmysl, protože syntetická vlákna vytlačily dokonce i vlněnou produkci. Důležitým krokem byl výzkum, kterým by bylo možné využít i použití přírodních vláken za účelem, kde se stále častěji využívají vlákna syntetická. Využili rentgenovou difrakci a elektronový mikroskop, kombinaci oxidačně-redukčních metod a vytvořili první kompletní popis vlákna vlasu. Tento popis vlasu byl prvním pevným základem pro výzkum keratinu a vedl k vývoji mnohých keratinových biomateriálů pro použití v biomedicínských aplikacích. Extrahované keratinové bílkoviny mají vnitřní schopnost samy síťovat do porézních vláknitých skeletů. Spontánní sestavení z keratinových roztoků bylo pozorované z mikroúrovně i makroúrovně. [20]

V mnoha případech bylo prokázáno, že tyto nové keratinové materiály mají výbornou biokompatibilitu. Kromě toho byly objeveny i nové metody pro úpravu fyzikálních a mechanických vlastností keratinu s cílem vytvořit biomateriály.

Pro zlepšení mechanických a fyzikálních vlastností se může vlna směšovat i se syntetickými vlákny, jako jsou polyesterová, akrylová, viskózová vlákna a s polyamidovými do pletacích přízí.[11]

## 2 PŘÍPRAVA KERATINU – HYDROLYTICKÉ ŠTĚPENÍ

Jedním ze způsobů zpracování keratinových odpadů je jejich štěpení na keratinové hydrolyzáty, které lze připravit několika různými způsoby. Během hydrolyzy keratinu dojde k rozštěpení peptidových a disulfidových vazeb dlouhých keratinových molekul, a tím je dosaženo následné lepší zpracovatelnosti materiálu. Mezi nejčastější metody, které se používají, patří oxidační, redukční, alkalická nebo kyselá hydrolyza a v poslední době také často využívaná metoda rozkladu keratinolytickými a proteolytickými enzymy. Všechny tyto způsoby hydrolyzy mají řadu výhod i nevýhod. Mnoho nevýhod lze částečně odstranit vhodnou kombinací různých metod hydrolyzy. [21]



Obrázek 7 Hydrolyza disulfidické vazby keratinu [22]



Obrázek 8 Hydrolyza polypeptidické vazby [23]

### 2.1 Alkalická hydrolyza

Obecně platí, že alkalická hydrolyza je proti kyselé účinnější. Při této hydrolyze se používají vyšší teploty a tlaky, výsledkem jsou hydrolyzáty o malé molární hmotnosti.

Alkalickou hydrolyzu popsal například Abouheif a kolektiv, kteří pro rozložení vlny použili 3% vroucí roztok NaOH. S NaOH pracovali také Tsuda a kolektiv, kteří použili hydroxid o koncentraci 10 g/l a zahřívali jej na teplotu 120 °C. [24, 25]

Pro hydrolyzu keratinu se běžně používají roztoky hydroxidů o vyšších koncentracích, kdy při vysoké teplotě můžeme dosáhnout téměř 100 % konverze nerozpustného keratinu na

rozpustné keratinové hydrolyzáty. U hydrolyzátů připravovaných alkalickým způsobem se předpokládá nízká molární hmotnost (6,5-30 kDa) a vysoký obsah popelovin. Teplota alkalické hydrolyzy se nejčastěji volí v intervalu 60-100 °C. Pro urychlení hydrolyzy lze využít i ohřevu mikrovlnným zářením, kdy lze dosáhnout více než 70 % hydrolyzy původního materiálu již po 1 hodině. [26,27]

Pro alkalickou hydrolyzu keratinu se používá uhličitan vápenatý a oxid hořečnatý za zvýšeného tlaku a při zvýšené teplotě 130 °C-140 °C po dobu 4 hodin. Například při hydrolyze chromitých postružin obsahuje izolovaný bílkovinný hydrolyzát v závislosti na podmínkách hydrolyzy řádově jednotky až desetiny procent oxidu chromitého, ale také značné množství sodných, draselných, vápenatých a hořečnatých solí. Často se proto alkalické hydrolyzy využívá v kombinaci s hydrolyzou enzymatickou, která je účinnější a získaný hydrolyzát je kvalitnější. [28, 29]

Příkladem alkalické hydrolyzy může být. Jako základní biologický materiál byla použita ovčí vlna. 10 g vlny bylo smícháno se 100 ml 0,15 M KOH a 0,05 M NaOH a zahřáto v autoklávu na teplotu 120 °C. Na této teplotě byla směs udržována 20 minut. Reakční směs byla odstředěna (4000 otáček/min po dobu 20 minut). Odstředěný roztok byl zahuštěn v rotační vakuové odparce a vysušen při teplotě 70 °C. Výtěžnost při tomto postupu alkalické hydrolyzy byla 82 %. [30]

## 2.2 Kyselá hydrolyza

Hydrolyzáty, které jsou připravené kyselou hydrolyzou, se nejčastěji používají jako vzorky pro další analytické stanovení. Postup kyselé hydrolyzy popsal Yamauchi a kolektiv. Při kyselé hydrolyze dochází ke štěpení peptidové vazby keratinových řetězců a ke vzniku  $\text{COO}^-$  a  $\text{NH}_4^+$  iontů.

Cystin je v průběhu hydrolyzy částečně oxidován na kyselinu cysteovou a cystein, díky čemuž dochází k částečnému rozkladu disulfidických vazeb. Keratiny jsou vysoce odolné bílkoviny proti působení kyselin, a proto se kyselá hydrolyza nejčastěji provádí v silných roztocích kyselin (6M HCl a 3M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) nejprve při teplotě 70 °C a poté za varu 120 °C. Tímto způsobem hydrolyzy lze rozložit více než 85 % materiálu.

Stejně jako u dříve popsané alkalické hydrolyzy je možné i zde využít ohřevu mikrovlnným zářením, kdy došlo k úplnému rozkladu původního materiálu a značnému zkrácení doby hydrolyzy. [31, 32]

Jako příkladem kyselé hydrolyzy může být uvedeno: základním biologickým materiálem byla použita rohovina. Vstupní materiál byl vyprán ve vodě, vysušen a pomlet. 50g pomletých rohů bylo smícháno se 75ml 6N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Reakční směs byla vyhřátá na teplotu 70 °C a na této teplotě udržována po dobu 24 hodin. Po uplynutí této doby bylo ke směsi přidáno 100 ml demineralizované vody a směs byla vyhřátá na teplotu 130 °C a na této teplotě udržována po dobu 4 hodin. Získaný roztok byl zchlazen a pH roztoku bylo upraveno 5N Mg(OH)<sub>2</sub> na hodnotu 7. Výsledný roztok byl zfiltrován. Z původních 50 g materiálu bylo tímto postupem hydrolyzováno 42 g. [33]

### 2.3 Enzymová hydrolyza

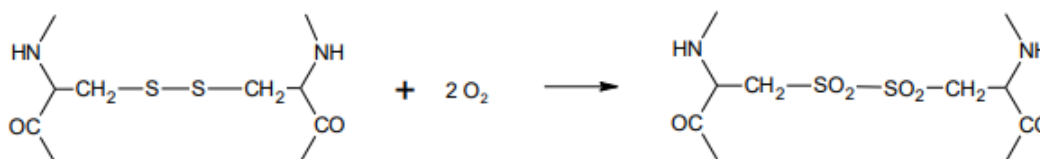
Perspektivním a v posledních letech intenzivně zkoumaným způsobem zpracování keratinu je jeho štěpení proteolytickými (štěpí -CO-NH- vazbu) a keratinolytickými (štěpí -S-S- vazbu) enzymy produkovanými bakteriemi nebo houbami. Průmyslově se nejčastěji používají alkalické proteinázy. Mezi výhody používání enzymů patří mírné podmínky hydrolyzy (teplota, pH, tlak), malé množství dávkovaných enzymů a široká distribuce molekulových hmotností připravených hydrolyzátů. Mezi nevýhody naopak může patřit složitější práce s bakteriemi a nutnost udržování stálého reakčního prostředí a poměrně dlouhý čas reakcí (3–7 dnů). Pro hydrolyzu keratinu enzymatickým štěpením se nejčastěji používají enzymy získané z bakterií rodu *Bacillus* a *Streptomyces*. [34]

Dostupné zdroje současné odborné literatury uvádějí příklady enzymové hydrolyzy, při níž v zásadě dochází k obdobným způsobům provádění s odlišností využitých enzymů v kombinaci s přídatnými složkami (reaktanty). Avšak model této hydrolyzy popisuje Mussallam a kol., z Kuvajtské univerzity. Zde bylo využito termofilního kmene *Coprinopsis* sp., jež rozkládal opět upravené kuřecí peří pomocí proteáz při zvolené inkubační době 14, 21, 28 a 35 dnů. Výsledkem bylo efektivní postupné uvolňování rozpustných AMK do média, což mělo za následek snížení hmotnosti sušiny substrátu. Zvolená teplota inkubace činila 20,4 °C a pH 9. [51]

## 2.4 Oxidace

Cystein a tryptofan jsou aminokyseliny nejvíce náchylné k oxidaci. Mají velký význam v síťování proteinů a přímo ovlivňují pevnost a pružnost vlněných vláken.

Při působení oxidačních činidel na keratin může nastat oxidace disulfidické vazby bez jejího štěpení. Na disulfidickou vazbu keratinu působí oxidačně bez štěpení například roztoky  $\text{KMnO}_4$ , roztoky  $\text{H}_2\text{O}_2$  a fotooxidace. Oxidace probíhá za tvorby sulfoxidu až sulfonu. [40]



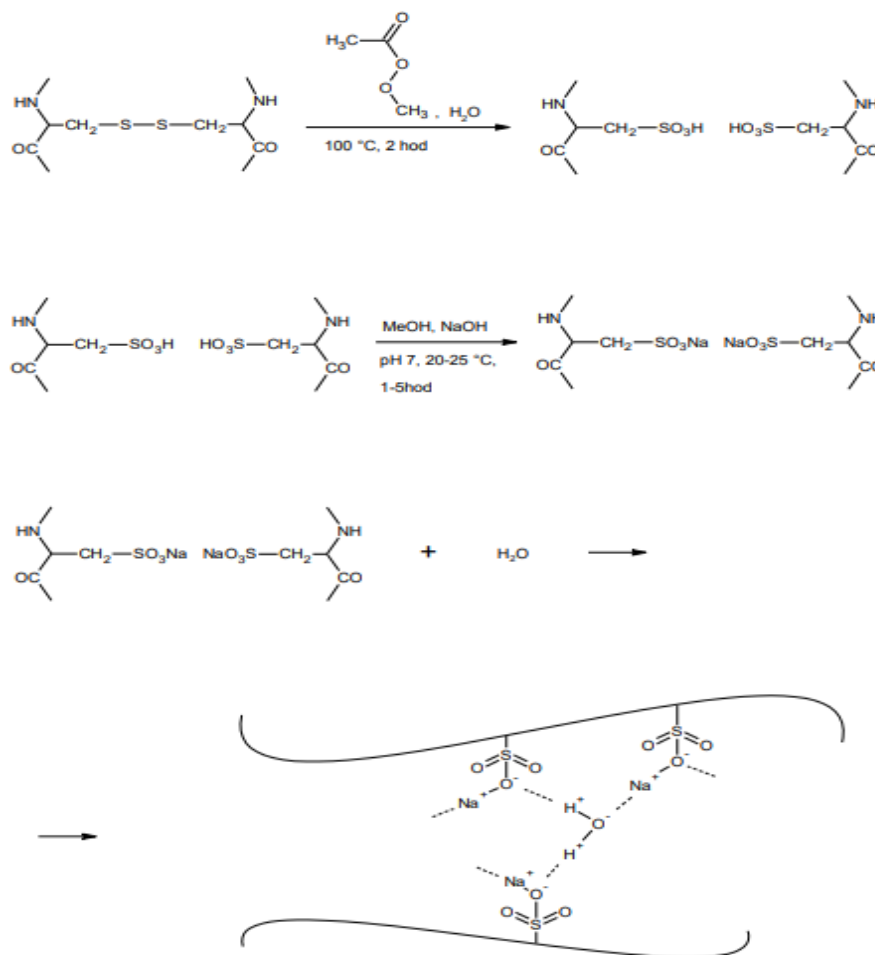
Obrázek 9 Oxidace disulfidické vazby keratinu bez jejího štěpení [40]

Příkladem v tomto popsaném postupu je keratin získaný z lidských vlasů. Postup však nevyklučuje použití i jiných zdrojů keratinu, jako například zvířecí srsti. Jako nejvhodnější materiál se však jeví lidské vlasy, u nichž není předpoklad imunologické reakce lidského organismu. 30 gramů vlasů bylo smícháno s 500 ml 2% kyseliny peroctové. Tato směs byla vyhřátá na  $100\text{ }^\circ\text{C}$  a na této teplotě udržována asi 2 hodiny. Tyto reakční parametry však mohou být nastaveny i jinak a mohou se pohybovat v rozmezích 1% až 32% kyseliny peroctové,  $0\text{ }^\circ\text{C}$  až  $100\text{ }^\circ\text{C}$  a 0,5 hodin až 24 hodin. [40]

Také oxidační činidlo může být odlišné od zde uvedeného postupu. Jako další oxidační činidla je možno použít například peroxid vodíku, benzoyl peroxid, perboritany, perkarbonáty nebo jejich směsi. Po oxidaci, je pevný keratin vizolován z reakční směsi (například filtrací nebo odstředěním) a promyt vodou, methanolem nebo ethanolem aby se odstranilo přebytečné okysličovadlo. Promytí je však potřeba omezit tak, aby nedocházelo k přílišnému vymývání rozpustných oxidovaných peptidů obsažených v keratinu. Izolovaný oxidovaný pevný keratin je rozpuštěn ve vhodném rozpouštědle. Jako nejvhodnější se jeví methanol, ethanol, ether, tetrahydrofuran, aceton, propylenglykol a 1,4- dioxan. Reakční směs je poté upravena na hodnotu pH 7 hydroxidem sodným nebo draselným a vyhřátá k varu. Na teplotě varu je pak reakční směs udržována asi 0,5 hodiny až 3 hodiny. Následuje vychlazení reakční směsi na teplotu cca  $20\text{ }^\circ\text{C}$  až  $25\text{ }^\circ\text{C}$  a udržování na této teplotě 1 hodinu až 5 hodin. Zreagovaná pevná část je vizolována z rozpouštědla (například filtrací ne-

bo odstředěním) a promyta nejlépe stejným rozpouštědlem jako je použité v předchozí reakci. Po filtraci a promytí je produkt vysušen ve vakuu a pomlet. Výsledným produktem je vysoce hydratovatelný keratin (nebo spíše materiál odvozený od keratinu) v podobě prášku, který má absorpční vlastnosti a v reakci s vodou tvoří hydrogel.[40]

Prášek, vlákna nebo jejich hydrogel mají využití jako savý materiál a jako léčebný prostředek pro léčbu pokožky. Vlákna byla testována na toxicitu různých parametrů a bylo zjištěno, že jsou netoxická, nedráždivá, nesenzibilní, a biokompatibilní pro lidský organismus. Získaný materiál může být využit k podpoře hojení poškozené kůže. Tento materiál může být aplikován na kožní postižení, jako jsou opruzeniny, popáleniny, spáleniny od slunce, řezné rány, odřeniny, vředy, proleženiny, diabetické vředy, podráždění kůže, chirurgické rány a kožní transplantace. [41]

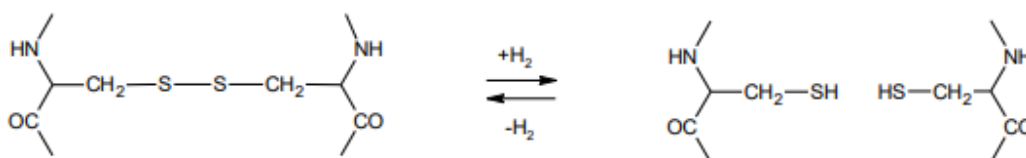


Obrázek 10 Příprava keratinového hydrogelu [41]



## 2.5 Redukce

Při působení redukčních činidel na keratin nastává redukční štěpení disulfidické vazby za vzniku cysteinu. Vzniklé merkaptoskupiny jsou velmi reaktivní a mohou být oxidovány zpět na disulfidické vazby. To je také podstatou studené ondulace vlasů. Vlasy se redukují roztokem kyseliny thioglykolové a po zformování do nového tvaru se zpět oxidují roztokem peroxidu vodíku. [22]



Obrázek 11 Redukce disulfidické vazby keratinu [22]

Mezi nejčastěji uváděná redukční činidla pak patří kyselina thioglykolová a její soli, 2-merkptoethanol, sulfid sodný, hydrogensulfid sodný, kyselina thiomléčná a thioglycerol. [42]

Příkladem redukční hydrolýzy může být: 3500 ml 1,0 M thioglykolové kyseliny bylo smícháno se 175 g lidských vlasů a přidáním 312,5 g hydroxidu draselného upraveno pH na hodnotu 10,2. (Před použitím byly vlasy vyprány vodným roztokem jemného čistícího prostředku, opláchnuty a vysušeny). Tato směs byla udržována na teplotě cca 25 °C pod dusíkem po dobu 18 hodin za neustálého míchání. Následně byla směs zfiltrována. Filtrací získané (částečně zreagované) vlasy byly dále zpracovány tak, že byly nejprve opláchnuty demineralizovanou vodou, přičemž vlasy zvětšily objem na téměř dvojnásobek původního objemu. Tyto opláchnuté vlasy byly smíchány s roztokem močoviny a míchány pod dusíkem při teplotě místnosti po dobu 24 hodin. Reakční směs byla zfiltrována. K přefiltrovanému extraktu byla přidána HCl a pH upraveno na hodnotu 7. Poté byl přidáním 100% ethanolu z reakční směsi vysrážen pevný keratinový materiál. Sraženina byla vyizolována filtrací, vysušena a rozdrčena. Reakční podmínky a pracovní postup se mohou od výše popsaného částečně lišit. Podstatou postupu je však dvoustupňová reakce. V prvním stupni dochází k redukci keratinu za působení redukčních činidel. Reakční teplota od cca 20 °C do 100 °C. Reakční doba od cca 4 hodin do 24 hodin. Reakce probíhá v inertní atmosféře, nejlépe dusíku. Kapalná frakce se oddělí od tuhé fáze pomocí filtrace nebo odstředěním nejlépe pod inertní atmosférou. Druhý reakční stupeň se provádí za použití vhodného činidla, nejuhodněji močoviny. Koncentrace činidla od cca 1 M do 10 M. Reakční teplota od

cca 20 °C do 100 °C. Reakční čas od cca 1 hodiny do 72 hodin. Přidáním rozpouštědla jako například ethanolu, methanolu, isopropylalkoholu, tetrahydrofuranu, acetonu nebo dioxanu dojde k vytvoření sraženiny obsahující vyloučené proteiny. Sraženina se oddělí od rozpouštědla filtrací nebo odstředěním. Vyloučené proteiny se následně suší, nejlépe ve vakuu při teplotě místnosti. Výsledným produktem je redukovaný keratin (keratin obsahující thiolové skupiny) o vysoké molekulové hmotnosti (HMWK) cca 50 až 85 kDa. Takto připravený materiál pak tvoří hydrogel, nachází-li se ve vodném prostředí. [42]

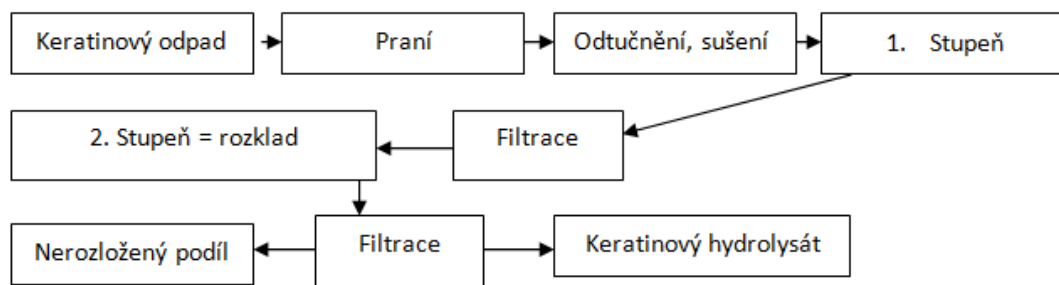
## 2.6 Kombinovaná hydrolýza

Všechny výše popsané způsoby hydrolýzy keratinových materiálů mají své výhody i nevýhody, které lze minimalizovat při použití kombinované metody rozkladu. Zejména se jedná o dosažení vyšších výtěžností keratinových hydrolyzátů při použití nižších reakčních podmínek

Průběh enzymových hydrolýz bývá následující: materiály se pomelou, odtuční a smíchají s reakčním prostředím, kam se po úpravě pH a teploty přidají bakterie nebo čisté enzymy. Po hydrolýze je nerozložený materiál separován a v kapalném hydrolyzátu dojde změnou teploty nebo pH k inaktivaci enzymu. V současné době je cena enzymů na takové úrovni, že celý proces může být levnější, než při použití kyselé či alkalické hydrolýzy. [35,36 – 38]

Redukovaný keratin je výhodné připravit 2 – stupňovým rozkladem (viz. Obrázek 12) za použití proteolytického enzymu.

- a) V 1. Stupni je keratinový materiál předzpracován za vhodných podmínek → použití redukčního činidla, teploty a doby
- b) Ve 2. Stupni přidavkem proteolytického enzymu nastává rozklad



Obrázek 12 Blokové zpracování keratinového odpadu na keratinový hydrolyzáát

Mezi prvním a druhým stupněm zpracování je možné alternativně zařadit filtraci, při níž se separuje roztok redukčního činidla a ve druhém stupni pracuje pouze ve slabě alkalickém vodném prostředí za použití enzymu. Tato metoda má výhodu v tom, že roztok redukčního činidla je možné použít opakovaně a že není nutné redukční činidlo z keratinového hydrolyzáátu odstraňovat př. dialýzou. Nevýhoda spočívá v nižší výtěžnosti keratinového hydrolyzáátu. [39]

Příkladem kombinací rozkladu můžou být metody oxidačně kyselý a redukčně enzymový. Obě metody sledovaly složení aminokyselin v hydrolyzátech, které můžeme vidět v tabulce 1.

### 2.6.1 Oxidačně-kyselá hydrolyzáa

Příklad této hydrolyzáy byla použita jako základním biologickým materiálem vlna. Ta byla smíchána s kyselinou peroctovou (200 % v/w na hmotnost vlny). Reakční směs byla vyhřátá na 40 °C a na této teplotě udržována 24 hodin. Poté bylo pH upraveno roztokem amoniaku na hodnotu 8 (odstranění kyseliny sulfenové). Následovala kyselá hydrolyzáa 6M HCl, teplota 110 °C, reakční čas 24 hodin. Pro stanovení methioninu a cysteinu byla provedena oxidační hydrolyzáa za použití kyseliny mravenčí a peroxidu vodíku 9:1. Cílem této práce bylo stanovit aminokyselinové složení a molekulovou hmotnost připraveného keratinového hydrolyzáátu viz tabulka.

Keratinový hydrolyzáát vykazoval velmi širokou distribuci molekulových hmotností. Střední molekulová hmotnost hydrolyzáátu MW = 18000. [43]

### 2.6.2 Redukčně-enzymová hydrolýza

Jako druhým příkladem byla využita redukčně – enzymová hydrolýza, jako základní biologický materiál byla použita vlna. Tato byla vyprána, zbavena nečistot a enzymově odtučněna enzymem Greasex 50L.

1. fáze (předzpracování): 2 g odtučněné vlny byly smíchány se 100 ml 0,1 M roztoku 2-merkptoethanolu. Směs byla vyhřátá na teplotu 50 °C a na této teplotě udržována 24 hodin s občasným promícháním.

2. fáze (enzymová hydrolýza): pH směsi bylo upraveno na 8,8 – 9,2 přidavkem NaOH. Do této směsi byly přidány 4 % (na sušinu vlny) enzymu Savinase Ultra 16L. Směs byla vyhřátá na 60 °C a na této teplotě byla udržována 14 hodin.

Cílem této práce bylo stanovit aminokyselinové složení a molekulovou hmotnost připraveného keratinového hydrolyzátu. Keratinový hydrolyzát vykazoval velmi širokou distribuci molekulových hmotností. Střední molekulová hmotnost hydrolyzátu  $MW = 3000$ .

Následující tabulka pak nabízí zajímavé srovnání dvou kombinovaných hydrolýz. [43]

Tabulka 1 Srovnání aminokyselin u kombinovaných hydrolyz

Aminokyseliny	Průměrná hodnota	Průměrná hodnota
	[ g/kg ] Po oxidačně kyselé hydrolyze	[ g/kg ] Po redukčně kyselé hydrolyze
Cystein	5,60	52,82
Methionin	16,46	5,93
Kyselina asparagová	106,75	51,73
Threonin	52,73	43,53
Serin	55,20	51,09
Kyselina glutamová	148,85	84,95
Prolin	36,43	45,71
Glycin	36,33	37,10
Alanin	45,01	26,15
Valin	56,43	38,47
Isoleucin	38,27	22,35
Leucin	92,17	53,87
Tyrosin	24,70	29,90
Fenylalanin	32,10	24,26
Histidin	12,60	11,52
Lysin	42,70	19,43
Arginin	108,28	69,50

## 2.7 Dialýza keratinového hydrolyzátu

Získané hydrolyzáty obsahují velké množství nežádoucích příměsí jako například draselné soli, jejichž podíl se zvyšuje se zvyšující se koncentrací použitého hydroxidu při hydrolyze. Dialyzovat je snaha o snížení obsahu nežádoucích nízkomolekulárních příměsí. Použitým analytickým postupem pro zjištění množství těchto příměsí se stanoví obsah popela. Keratinové hydrolyzáty se následně dialyzují přes celulóзовou membránu o propustnosti 12 kDa proti destilované vodě. Dialýza probíhá při pokojové teplotě po dobu 72 hodin, přičemž vodu je třeba měnit vždy po 24 hodinách. Roztok keratinového hydrolyzátu po dialýze je následně vysušen na nerezovém plechu v komorové sušárně při teplotě 80 °C za vakua. Získaný suchý keratinový hydrolyzát je rozdrcen v třecí misce na jemný prášek. Takto získaný hydrolyzát se následně podrobuje zkoušce na stanovení obsahu popela. [54]

### 3 APLIKACE KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU V KOSMETICE

V kosmetickém průmyslu se používá tzv. hydrolyzovaný keratin. Získaný hydrolyzát ve formě žluté tekutiny nebo prášku se používá v šampónech, maskách, kondicionérech. Tyto přípravky mají za úkol chránit chlup před poškozením způsobené chemikáliemi, teplem a mechanickým namáháním. [44]

Keratinové hydrolyzáty se dokáží vázat na strukturu vlákna a vyhlazuje jeho povrch s dočasným efektem zpevnění. Je to dáno možným rozpuštěním v alifatických alkoholech s následným vytvořením filmu nebo nátěru. Z tohoto důvodu je cílenou složkou v regeneračních maskách. Používané množství v těchto preparátech je avšak 0,2 – 2 %. [45,46]

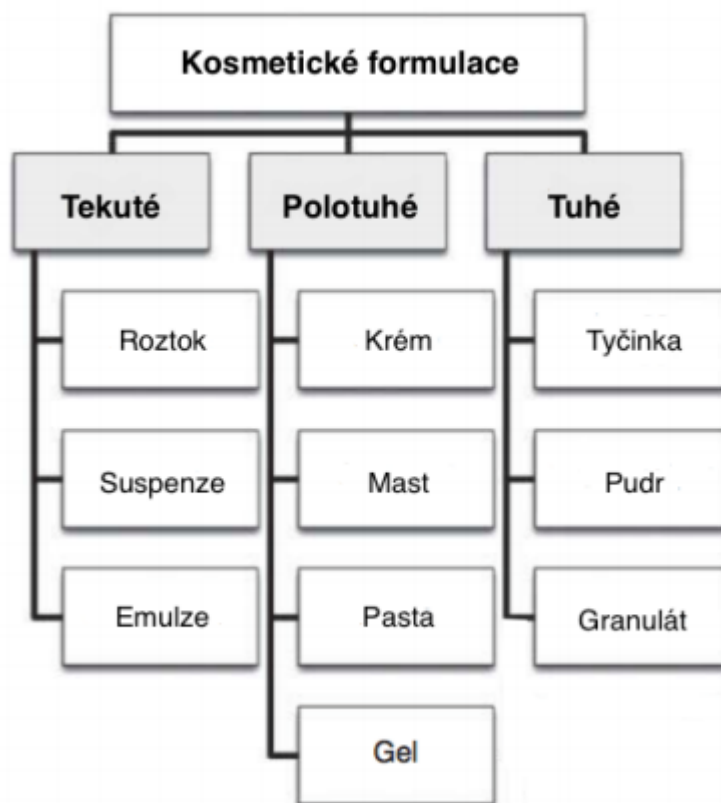
Tyto aktivní proteiny účinně posilují vlasové vlákno a zároveň snižují jeho poškození. Keratiny s molekulovou hmotností menší než 1 kDa jsou schopné proniknout kůrou vlasového vlákna a mohou podporovat povrchovou úpravu. Keratinové hydrolyzáty proniknou do struktury vlasu tím víc, čím delší je doba ošetření a u odbarvených vlasů dochází k většímu pronikání než u vlasů nepoškozených. [44]

Tabulka 2 Schéma aplikací keratinu v kosmetice [39]

Typ preparátu	Aplikace	Koncentrace preparátu [%]	Deklarovaný efekt
Hydrolyzát (molekulová hmotnost do 30 kDa)	Šampony	1 - 15	Vytvářejí ochranný film, uhlazují strukturu vlasu, zvyšují snášivost, zlepšují konsistenci přípravku
	Prostředky pro opláchnutí	3 - 15	
	Kondicionéry	1 – 15	
	Iniony	0,25 – 0,5	
	Spreje	0,5 – 1	
	Pěnové lázně	5	Podpora tvorby pěny

### 3.1 Přehled aplikačních forem kosmetických přísad

Kosmetická formulace je chápána jako konečná forma směsi chemických přísad (kosmetických přísad), kterou mohou spotřebitelé koupit a používat jako kosmetický přípravek.



Obrázek 13 Schéma rozdělení kosmetických formulací [47]

Roztoky a gely patří mezi běžné kosmetické přípravky, tyto složky je možné rozdělit na hydrofilní a lipofilní.

Emulze jsou systémy, ve kterých je tuková fáze dispergována ve vodné fázi nebo je vodná fáze dispergována v oleji. Jsou stabilizovány emulgátory, nejčastěji tenzidy.

Suspenze je systém tuhých částic dispergovaných v kontinuální fázi, kterou tvoří voda nebo vodné roztoky. Pevné částice mají při skladování tendenci sedimentovat. Sedimentaci lze zabránit přidáním povrchově aktivní látky nebo zahušťovačů, které zvýší viskozitu disperzního prostředí. Tato zahušťovač vytváří na pokožce souvislou vrstvu [39, 15].



Mast je polotuhá formulace, obsahující malé množství vody (méně než 20 %) nebo jsou bezvodé. Aplikují se na menší oblasti pokožky, která je vysušená. Masti jsou často neprůhledné a nažloutlé díky vysokému množství olejů. [15]

Pasta je vysoce viskózní formulace, která se obtížně aplikuje na pokožku díky vysokému obsahu tuhých látek. Její základ tvoří masti, které obsahují práškovité komponenty nerozpustné ve vodě a rozpouštědlech. [15].

Krém je emulze, která obvykle obsahuje více než 20 % vody a méně než 50 % uhlovodíků a vosků. Vzhledem k tomu, že krémy obsahují vyšší množství olejové fáze, jsou obecně mastnější. Tvoří emulze typu olej/voda nebo voda/olej. U emulzí typu olej/voda se používají zejména hydrofilní povrchově aktivní látky, zatímco u emulzí typu voda/olej se používají lipofilní povrchově aktivní látky. Krém má vysokou viskozitu, proto také málo teče. V kosmetice se aplikují například do kondicionérů. Jejich úkolem je zadržovat vlhkost v pokožce [47].

Pudr tvoří práškovitou kompozici, která obsahuje jeden nebo více typů práškových substancí. Jeho složení je závislé od požadovaného účinku na pokožku. Tekuté pudry tvoří mastek: křemičitan hořečnatý, oxid zinečnatý, oxid titaničitý, glycerol a voda. Kompaktní pudry tvoří barevné prášky s příměsí pojivého materiálu [15].

Granulát je robustní přípravek, který se skládá z jemně práškových materiálů, které mají výrazně menší velikost částic ve srovnání s pudry. Granuláty využívané v kosmetice (např. prášky na čištění zubů) se ve styku s vodou lehce rozpadají a díky tomu vytváří snadno roztíratelné pasty nebo suspenze. Používají se v takových případech, kdy dochází k uvolňování jejich účinné složky [15].

## 3.2 Kosmetické produkty

### 3.2.1 Šampony a mycí roztoky

Šampony jsou přípravky sloužící k odstraňování nečistot a mazu z povrchu chlupů a kůže. Mycí roztok nebo šampon s kombinací keratinu a výtažky z kopřivy, dodávají srsti výživu do hloubky, obnovuje kožní proteinovou vrstvu, zvýrazní krásu a lesk, dodá ochranu před vnějšími vlivy, působí preventivně proti dermatitidám, kopřivkám, nadměrné tvorbě mazu a proti vypadávání srsti. [48]

### 3.2.2 Kondicionéry, balzámy a masky

Upravovat a ošetřovat srst zvířete je třeba nejen z estetického hlediska, ale hlavně kvůli zdraví kůže a orgánů, které kryje. Pokud je srst klouzavá po ošetření speciálními kondicionéry, chytá na sebe méně nečistot, rostlin, bodláků, necuchá se a neláme se [48].

Kondicionéry s obsahem keratinu zastupují důležitou funkci pro aktivaci kožních buněk. Jsou vhodné pro řídkou srst, k zvýraznění kvality srsti, chrání chlupy před poškozením způsobeným chemikáliemi, teplem a mechanickou úpravou. [44]

Tyto přípravky je nutné aplikovat po mycím roztoku. Kondicionéry určené pro psy a kočky mají svěží vůni, obnovují přirozený kožní mikrofilm a zajišťují hydrataci kůže. Jeho složky napomáhají zajišťovat lesk a elasticitu srsti. Tyto přípravky jsou nezbytné pro obtížně česatelnou srst.[48]

### 3.2.3 Doplnková kosmetika s keratinem

Oleje – smícháním ve správném poměru: proteinový kondicionér s lanolínovým olejem vzniká revitalizační účinek proteinů – výborný odstraňovač plstí a má antistatické účinky [49]. Použití při balíčkování.

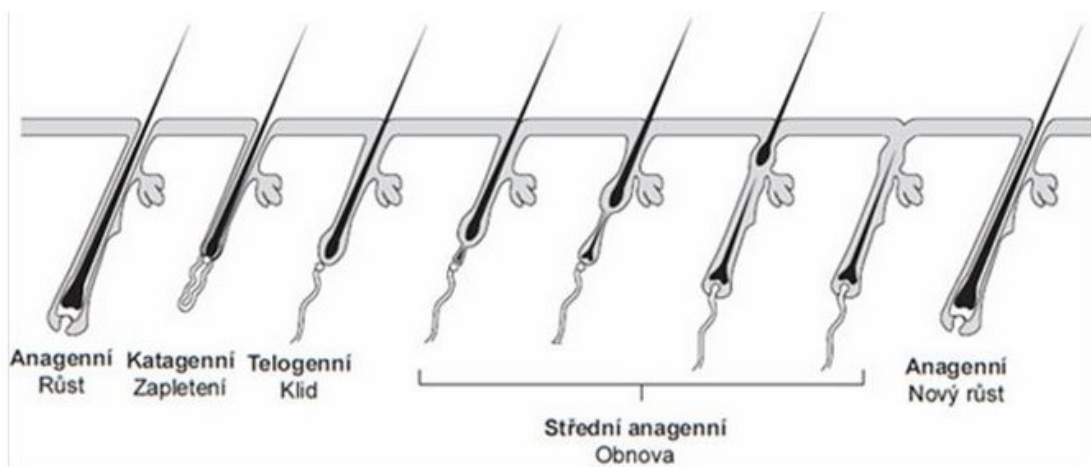
Spreje – objemové, padavá srst, rozčesávače, finální úprava – fixace, antistatické účinky. Na vlastnosti a aplikaci fixačních prostředků je kladeno mnoho požadavků. Mezi nejdůležitější patří vysoká odolnost střihu, snadná aplikace prostředku, snadné rozčesávání, rychlé zasychání, zvětšení objemu a lesku. Tvorba nehydrofobického a nelepivého filmu, který je dobře odstranitelný šamponem. [50]

Sérum - posilující sérum s keratinem a kopřivou vhodné pro řídkou srst, která potřebuje posílit a zhoustnout. Použití tohoto přípravku nevyžaduje opláchnutí.

## 4 SRST PSA A KOČKY

### 4.1 Fáze a cyklus růstu chlupu u psů a koček

Existují 3 stadia neboli cykly růstu chlupů. První je anagenní neboli růstová fáze, kdy chlupový folikul aktivně produkuje chlup. Pro chlup v anagenní neboli růstové fázi je typická dobře vyvinutá dermální papila, která je pokryta „čepičkou“ z chlupové matrice. Druhé stadium je katagenní neboli přechodné stadium mezi aktivním růstem a zastavením růstu. Pro chlup v této fázi je růst směrem k povrchu. Chlupový folikul v katagenní fázi je kratší a menší. Během telogenní neboli klidové fáze se růst chlupu zastaví. Chlup se drží v chlupovém folikulu jako mrtvý chlup. Telogenní chlup je velmi malý, dosahuje přibližně 1/3 délky anagenního chlupu. Chlupy pokračují v růstu, dokud nedosáhnou příslušné délky a pak vstoupí do klidové fáze, v níž zůstanou do té doby, dokud nezačnou růst nové chlupy, které vytlačí staré chlupy ven a ty pak vypadnou. Chlupy psů a koček se nahrazují mozaikovým způsobem. Vrchol vypadávání a náhrady chlupů probíhá na jaře a na podzim. K dalším dvěma nejběžnějším výměnám dochází sezónně ve vlnách. [47]

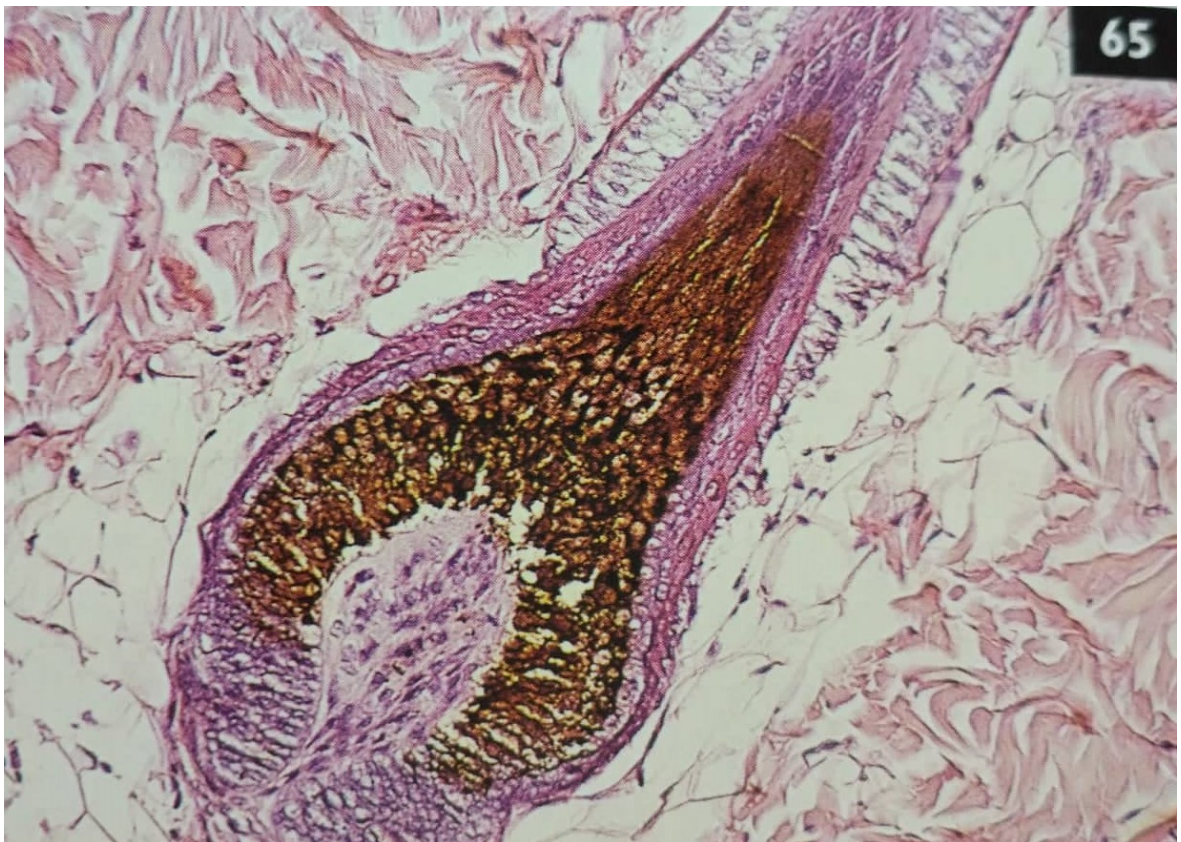


Obrázek 14 Fáze cyklu chlupu [53]

Růstový cyklus chlupů zvířat je regulován mnoha faktory, podílí se na něm: fotoperioda, teplota prostředí, zdravotní stav, genetické faktory, výživa, hormony a místní faktory, které přímo ovlivňují růst chlupových folikulů.

## 4.2 Struktura psího chlupu

Chlup je tvořen kořenem, ztlustělým v chlupovou cibulku, který obaluje vnitřní a zevní epitelová pochva a pochva vazivová. Podél dlouhé osy můžeme folikul rozdělit na několik částí. Dolní část, rozšířenou do cylindrického tvaru, označujeme jako vlasovou cibulku. Úsek nad ní mezi úponem vzpřimovače chlupu a vývodem mazové žlázy označujeme jako kmen (isthmus). Infundibulum je úsek, kterým folikul ústí na povrch kůže. Některé folikuly zasahují pouze do škáry, větší až do podkoží, které jim nejspíše poskytuje lepší podmínky pro tvorbu, živiny, teplo a lepší ochranu před účinky vnějšího prostředí. [54]



Obrázek 15 Mikroskopický snímek chlupové cibulky na řezu [47]

### 4.3 Postup při koupání

Začínáme důkladným namočením srsti, to může trvat i několik minut. Po dokonalém namočení začne kůže vstřebávat vodu. Pokud toto neprovedete, nemusí se šampon dostat až na kůži. Aplikujeme vhodný šampon, který je často ve vysokých koncentracích a proto ho musíme naředit. Pak ho jemně vmasírujeme (po dobu 3 minut) do celého povrchu těla. Slovo šampon pochází z indického jazyka a znamená masáž. Masáž provádíme po směru růstu chlupů. Bez čekání důkladně opláchneme velkým množstvím vody (cca 37 °C), tak abychom si byli jisti, že na těle žádný šampon nezůstal. [48]

Po dokonalém spláchnutí šamponu se jemně vetře nebo vmasíruje do kůže a srsti celého těla potřebné množství. Nutné vmasírovat kondicionér do hloubky až na kůži a důkladně pročesat směrem ke špičce chlupu, aby se přípravek dostal všude. Působení 5 - 20 minut podle stavu srsti. Pokud je srst hodně poškozená použije se tento přípravek formou zábalu. Následně se vypláchne vlažnou vodou. Po opláchnutí je nezbytně nutné srst zvířete vyfénovat vzduchem o tělové teplotě.

### 4.4 Frekvence koupání

Doporučené intervaly mezi koupelemi zdravých psů jsou 1x měsíčně, což odpovídá přirozenému cyklu obnovy kůže a chlupů. Náročnější srst (boloňský psík, bišon) vyžaduje koupele s vyživováním srsti v intervalech 7-10 dní. Nemocná kůže se ošetřuje 1x za 2 týdny, kůže potřebuje čas vstřebat kosmetické prostředky pro regeneraci a pro růst chlupů. Pokud se pes koupe častěji, kůže nemá dostatek času se zregenerovat.

## 4.5 Nezbytnost aplikací balzámů

Zvířata na rozdíl od lidí produkují kožní maz, který chrání její povrch před vnějšími vlivy a mikroorganismy. Tato ochranná vrstvička může být různými vlivy prostředí, ale i organismu narušena, proto je nezbytné ji obnovit a to by měl činit balzám. Ten však nevytváří jen jeden benefit, ale hned několik. Mezi ty prospěšné vlivy balzámů a kondicionérů patří:

- doplnění hydrolipidového filmu do kůže a do srsti
- možnost prodloužení intervalů mezi koupelemi
- odstranění mazotoku, neboť čím více se zvíře odmašťuje samotnými šampony, tím více se kůže brání a produkuje více mazu
- nedochází k tvorbě šupin u krátkosrstých psů
- kůže a srst na sebe nechytá prach ani nečistoty
- lesklá srst
- zvláčněná, hydratovaná kůže
- zlepšená výživa srsti a kůže
- regulace pH
- pes po koupeli není cítit. [52]

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 CÍLE PRÁCE

Cílem praktické části práce bylo zjistit účinek balzámů s přídavkem hydrolyzovaného keratinu na vlastnosti srsti psa a sledovat jeho účinek před i po. Prvním dílčím cílem bylo vyrobit hydrolyzát keratinu KH a charakterizovat jeho složení. Byla provedena alkalicko-enzymová hydrolýza s následnou dialýzou. Druhým dílčím cílem bylo připravit balzámy s různými koncentracemi a zhodnotit jejich viskozitu. KH bylo nutné přidat do předem vybraného kosmetického základu a nechat jej působit na vodou namočeného a šamponem vykoupaného psa. Po aplikaci srovnat chlupy po ošetření balzámu. Cílem také bylo statistické zpracování výsledků, prezentace výsledků a návrh optimálního přídavku keratinového hydrolyzátu do kosmetické emulze. Srovnat pozorováním vlastnosti chlupu optickou mikroskopií a tahovou zkouškou.



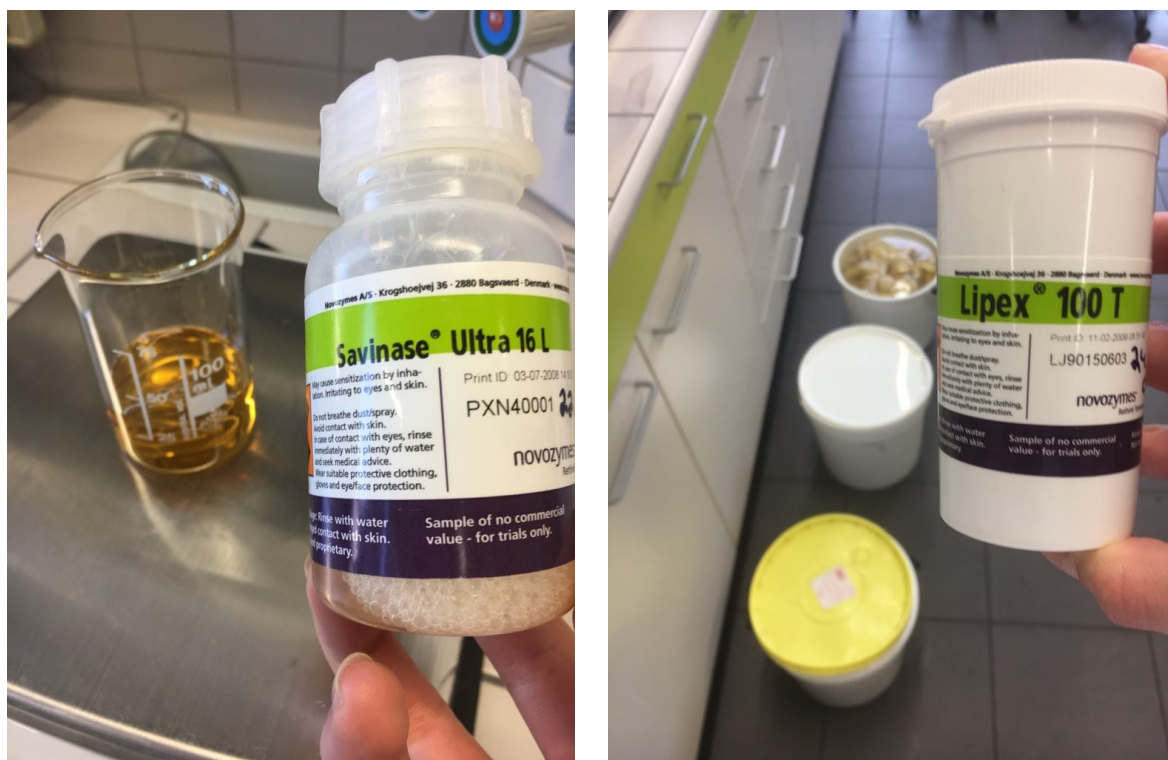
## 6 PŘÍPRAVA KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU

### 6.1 Použité enzymy

**Enzym Lipex 100T** - Lipex je lipáza do detergentů produkovaná submerzní fermentací geneticky modifikovaného kmene *Aspergillus*. Lipex štěpí jedlé tuky a oleje rozštěpením esterových vazeb v prvních a třetích pozicích tukové (glycerinové) molekuly. Produkty hydrolýzy jsou monoglyceridy a diglyceridy a volné mastné kyseliny, které jsou snadno dispergovány nebo rozpuštěny ve vodných roztocích. Lipex má širokou substrátovou specifiku a podporuje hydrolýzu široké škály různých tuků a olejů.

**Enzym Savinase Ultra 16L** - je proteináza s vysoce efektivním 2 % stabilizačním činidlem 4-FPBA (4-formyl-fenyl-kyselina boritá). 4-FPBA se chová jako reversibilní inhibitor proteinázy tím, že naváže proteinovou molekulu. Nejvyšší účinnost enzymu je dosažena při pH v rozsahu od 8,8-9,2 (výrobce NovoZymes, Dánsko).

Dále byly použity chemikálie, které jsou zaznamenány v následujících postupech.



Obrázek 16 Použité enzymy při hydrolýze

## 6.2 Materiály a pomůcky

Nádoby s víkem, nožový mlýn, vařič na hydrolyzu s míchadlem, PA tkanina, Celulózová membrána se sponou, Analogická úhlová odstředivka 4000 ot/min, Teploměr, pH metr Piccolo (s Amplified Electrode HI 1295), topná deska Ceran 93020 (výrobce Schott-Garäte GmbH), sušárna WTC Binder E 28 – TB 1, analytické váhy Kern 770 a předvážky Kern 440, vodní lázeň, míchadla, stojan, baňky, chladič, kádinky, Büchnerova nálevka, filtrační papír KA 1 a KA 4, Erlenmayerovy baňky, Topné hnízdo LTHS 2000, exsikátor, pipety.

## 6.3 Biologický materiál

Ovčí vlna MERINO

## 6.4 Postup přípravy

### 6.4.1 Úprava vlny

Nejdříve byla surová vlna přebrána od hrubých viditelných nečistot a rozstříhána na menší kousky. 800 g vlny se propralo ve vlažné vodě s přísadkou jaru. Nakonec se vlna důkladně proprala pod mírně teplou tekoucí vodou, tak aby byl úplně odstraněn jar.

### 6.4.2 Odtučnění enzymem Lipex 100T

Vlna byla přesunuta do nádob a doplnila se vodou v poměru vlna:voda = 1:50 (200 g / 10 l). Před přidáním enzymu (1 % enzymu na hmotnost suché vlny) se upraví hodnota pH na 8 pomocí NaOH. Následuje 24 h odtučňování při  $40 \pm 2$  °C. Během odtučňování dochází k občasnému míchání. Po odtučnění se vlna promyje a vysuší v horkovzdušné sušárně při  $103 \pm 2$  °C. Následuje mletí na nožovém mlýně s velikostí ok síta 1 mm.

### 6.4.3 Rozklad vlny

#### 1. Stupeň

700 g namleté vlny se doplní 14 l destilované vody, přidá se  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  tak aby vznikl 0,6% roztok, probíhá 48 h hydrolyza při 80 °C za stálého míchání.

## 2. Stupeň

Před přidáním enzymu (5 % enzymu na navážku vlny) se opět upraví hodnota pH na 9. Probíhá 24 h hydrolýza při 60 °C. Enzym se inaktivuje zahříváním kapalné fáze na 90 °C – 10 min.

### Separace

Hydrolyzát se separuje přes 8 vrstev PA tkaniny (oka 150 µm) a dále byl odstředěn při 4000 ot/min po dobu 10 min. Po odstředění se zbytek vysuší a zváží.

### 6.4.4 Dialýza

Hydrolyzát obsahoval nízkomolekulární látky (popeloviny), které musely být kvůli dalšímu využití odstraněny. Vhodnou metodou pro odstraňování nízkomolekulárních látek je dialýza přes celulózové membrány. Do membrány, která propouštěla látky s molekulovou hmotností menší než 12 kDa, byl nalit hydrolyzát a konce membrány byly uzavřeny svorkami. Hydrolyzát se dialyzoval oproti destilované vodě v poměru 1:10 ve prospěch destilované vody. Dialýza probíhala 1 týden, v průběhu týdne bylo médium vyměněno každých 24 hodin. Po skončení dialýzy byl hydrolyzát vylit na plech a vysušen při teplotě 60 °C.



Obrázek 17 Extrakce vlny před přidáním enzymu

## 7 ANALYTICKÉ METODY

### 7.1 Analytické metody provedené na surové vlně, dialyzátu a hydrolyzátu keratinu

#### 7.1.1 Účinnost hydrolýzy

Účinnost hydrolýzy [%] byla stanovena podle vztahu

$$\eta = \frac{m_{KH}}{m_{vlny}} \times 100$$

$m_{KH}$ ... hmotnost keratinového hydrolyzátu [g]

$m_{vlny}$ ... hmotnost vlny [g]



Obrázek 18 Čistá vlna - Keratinový hydrolyzát - Keratin hydrolyzát po dialýze

### 7.1.2 Stanovení vlhkosti

Vázkové stanovení sušiny, kdy sušina je hmota vzorku po odstranění vody sušením. Do připravených koželužských misek bylo naváženo cca 1 g vzorků (zváženo na analytických vahách s přesností  $\pm 0,0001$  g). Vzorky se umístily do sušárny, kde se sušily při teplotě  $103 \pm 2$  °C 5 hodin. Poté se misky se vzorky nechaly vychladit v exikátoru s vysušeným silikagelem na pokojovou teplotu a zvážil se rozdíl. Pro každý vzorek proběhlo měření dvakrát. Množství vody se určuje z hmotnostního úbytku po vysušení vzorku [%].

$$S = \frac{m_1}{m_0} \times 100$$

$m_0$  ... hmotnost vzorku před sušením [g]

$m_1$  ... hmotnost vzorku po sušení [g]

S ... obsah sušiny [%]

### 7.1.3 Mikrochemické stanovení obsahu dusíku

Do mineralizační baňky bylo naváženo 0,2 g vzorků s přesností  $\pm 0,0001$  g dále bylo přidáno 5,6 ml  $H_2SO_4$ , 20 ml 0,02N HCl a nakonec tableta katalyzátoru. Baňky spolu se směsí se mineralizovaly při teplotě  $510 \pm 2$  °C pod dobu 1,5 hodiny. Po zchladnutí se roztok zředil malým množstvím vody, aby došlo k rozpuštění pevných částic. Nakonec se roztok přelil do 50 ml odměrné baňky a doplnil po rysku. Dusík se stanovoval na Parnas – Wagnerově přístroji. Do Parnas-Wagnerovy destilační aparatury se odpipetovalo 25 ml vzorku a 20 ml roztoku  $Na_2S_2O_3$  s NaOH poté se pustil chladič. Jímalo se do předlohy destilační aparatury, ve které bylo 15 ml  $H_3BO_3$ . Amoniak jsem vydestiloval s vodní parou do předlohy, doba destilace byla 20 minut od počátku varu v destilační baňce. K destilátu bylo přidáno několik kapek Tashirova indikátoru a poté byl titrován 0,02N HCl do růžového zbarvení. Obsah dusíku se stanovoval u vzorků vlny, nerozloženého podílu vlny a hydrolyzátů. Pokus se provedl dvakrát a poté se z hodnot vypočítala průměrná hodnota.

Množství dusíku [%] se vypočítalo podle vzorce:

$$N = \frac{V \times c \times 14,007 \times 100 \times 2}{n \times 10^{-3}}$$

V ... spotřeba HCl při titraci [ml]

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

n ... navážka vzorku [g]

N ... obsah dusíku ve vzorku [%]

#### 7.1.4 Stanovení obsahu síry srážením roztokem chloridu barnatého

Vzorek hydrolyzátu se zmineralizuje a sírany se ve zmineralizovaném produktu stanoví gravimetricky. Ionty  $\text{SO}_4^{2-}$  reagují ve slabě okyseleném prostředí s ionty  $\text{Ba}^{2+}$  za vzniku velmi málo rozpustné sraženiny síranu barnatého.

Do Kjeldahlovy baňky byl navážen 1 g vzorku a k němu bylo přidáno 50 ml koncentrované  $\text{HNO}_3$ . Směs se nechala vařit nad kahanem 2 hodiny a každých 15 minut se k roztoku přidaly 3 ml 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Po mineralizaci a po zchladnutí se roztok přelil do 200 ml odměrné baňky, která se doplnila vodou po rysku. Roztok se poté zfiltraval do 600 ml kádinky přes středně hustý filtr a zahřál k varu. Za stálého míchání se postupně přidávalo 120 ml 10% horkého roztoku  $\text{BaCl}_2$ . Směs se nechala hodinu vařit a poté odležet 24 hodin v digestoři. Vzniklá sraženina se poté přefiltrovala přes hustý filtrační papír a sraženina na filtru byla promývána horkou destilovanou vodou, dokud nedošlo k odstranění veškerých chloridů (zkouška filtrátu se prováděla dusičnanem stříbrným). Filtrační papír se sraženinou se vysušil při  $103 \pm 2$  °C a poté zpopelnil v žihacím kelímku (vysušeném a zváženém) nad kahanem. Popel se dále nechal 2 hodiny žíhat v muflové peci při 800 °C. Po ochlazení v exsikátoru se kelímek zvažil.

Množství síranů a síry [%] se vypočítalo podle vzorce:

$$c(SO_4) = \frac{m \times 0,412 \times 100}{n}$$

$$c(S) = \frac{M(S)}{M(SO_4)} \times c(SO_4)$$

$c(SO_4^{2-})$  - množství síranů [%]

$m$  – hmotnost sraženiny  $BaSO_4$  [g]

$n$  – navážka vzorku na stanovení [g]

0,412 – přepočítávací faktor na přepočet  $BaSO_4$  na  $SO_4^{2-}$

$c(S)$  – množství síry [%]

$M(S)$  – molární hmotnost síry 32,06 [g/mol]

$M(SO_4^{2-})$  – molární hmotnost síranů 96,056 [g/mol]

### 7.1.5 Stanovení obsahu popelovin

Stanovení se provádělo vždy u každého vzorku dvakrát. Na začátku měření bylo nutné přežítat kelímky z křemenného skla, a následně je nechat vychladnout v exsikátoru. Poté se prázdné kelímky zvážily na analytických vahách a přidal se do nich vzorek. Kelímek spolu se vzorkem se opět zvážil na analytických vahách. Vzorek v kelímku se nechal spalovat nad kahanem do zuhelnatění. Poté se kelímek se vzorkem vložil na dobu 1,5 hodiny do muflové pece o teplotě 650 °C. Po uplynutí času se kelímky vložily do exsikátoru, ve kterém se temperovaly. Po vytemperování se opět převážily na analytických vahách. Množství popelovin [%] se vypočítalo podle vzorce:

$$mp = \frac{m_1 - m_2}{m_h} \times 100$$

$m_p$  – množství popelovin ve vzorku [%]

$m_1$  – hmotnost žíhacího kelímku se vzorkem po vyžihání [g]

$m_2$  – hmotnost žíhacího kelímku bez vzorku [g]

$m_h$  – hmotnost naváženého vzorku [g]

### 7.1.6 Stanovení distribuce molekulových hmotností ( $M_w$ ) hydrolyzátů

Distribuce molekulových hmotností ( $M_w$ ) keratinových hydrolyzátů byla provedena metodou SDS-PAGE na 10–20% tricine polyakrylamidovém gelu o rozměrech  $86 \times 81 \times 1$  mm při pH 8,3 v minicelle Novex Xcell II za použití programovatelného proudového zdroje Novex Model-3540 při konstantním napětí 125 V, proudové intenzitě na startu 80 mA a výkonu 5 W v čase vyvíjení alespoň 1,5 hod.

Je třeba si nejdříve připravit roztok vzorku. Do 10 ml odměrné baňky je třeba navážit přesně 0,120 g testovaného vzorku. Rozpustíme přidáním vody a nakonec doplnit po značku. Poté odstředit na malé odstředivce při cca 6000 ot/min, 5 minut. Při stanovování  $M_w$  se zředí ve vialkách roztok vzorku s pufrem v poměru 1:1 – připravit alespoň 100  $\mu$ l roztoku (50  $\mu$ l vzorku + 50  $\mu$ l pufru). Kde je nutné přidat redukční činidlo, ředíme v poměru 5:4:1 (na 100  $\mu$ l přijde 50  $\mu$ l vzorku + 40  $\mu$ l pufru + 10  $\mu$ l merkaptoetanolu).

Aplikované množství hydrolyzátů do jamek gelu bylo 20  $\mu$ l. Elektroforetická separace byla ukončena. Po proběhnutí gelové elektroforéze byl odstraněn zbytek pufru vodou a proběhlo ustálení gelu v roztoku kyseliny octové a metanolu, dále proběhlo barvení modří Brilliant Blue G. Poté se opět odlije barvivo a gel se několikrát opláchne a odbarví (přes noc) 25 % metanolem. Po uplynutí této doby byl gel vysušen.



## 7.2 Příprava keratinových balzámů

Z keratinového hydrolyzátu, který se přimíchal do kosmetického základu KZA byly připraveny balzámy (viz. Obrázek 20).

Složení kosmetického základu: Voda, Cetyl stearyl alkohol, Minerální olej, Hexadecyl- ti methyl amonium chlorid, Parfém, Kyselina citrónová, 2-fenoxyetanol, Ethyl hexyl glycerol, Metylester kyseliny mléčné, Mentol. [52]

Balzámy byly připraveny tak, že do 400 ml kádinky bylo naváženo 300 g kosmetického základu a dopočítáno množství keratinového hydrolyzátu. Celá směs byla poté homogениzována na míchadle RZR 2020 při teplotě 40°C po dobu 10 min při 800 ot/min. Získali jsme 3 balzámy a to KZA + 0,5 % KD, KZA + 1 % KD a KZA + 1,5 % KD. Připravené balzámy byly uchovány v uzavřené nádobě za pokojové teploty.



Obrázek 19 Z leva: KZA - 0,5% KD v KZA - 1% KD v KZA - 1,5% KD v KZA

### Postup aplikace

Nejprve byly odebrány vzorky chlupů před ošetřením na hrudníku, zádech a ocase. Pro analýzu vlivu přídavku KH měřením mikroskopicky byly chlupy z kůže odtrhnuty, pro měření tahové zkoušky odstříhány. Jednalo se o chlupy krycí nikoli podsadu.

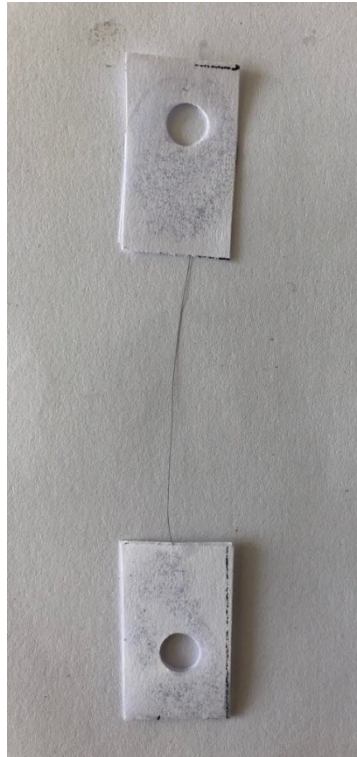
Vlažnou vodou se namočí důkladně srst psa až ke kůži, naaplikuje se šampon zředěný 1:3 vodou a jemně se vmasíruje do srsti celého povrchu těla. Šampon se nechal pět minut působit za jemné masáže krouživými pohyby. Poté se šampon spláchl hojným množstvím vody. Podle potřeby byl šampon aplikován znovu. Po dokonalém spláchnutí šamponu se vetře do kůže a srsti celého těla potřebné množství balzámu ± 250 ml a nechá se působit 15 – 20 minut. Balzám byl vypláchnut hojným množstvím vody. Následovalo úplné vysušení srsti fénem a pročesání. Vzorky chlupů byly po aplikaci odebrány ze stejných míst jako před ošetřením.



Obrázek 20 Před úpravou - Aplikace balzámu - Po úpravě

### 7.3 Tahová zkouška

Pro zhodnocení mechanických vlastností neošetřených a ošetřených chlupů se zvolila tahová zkouška. Ze tří míst na těle psa tedy hrudníku, zad a ocasu se ustříhly chlupy. Z každého místa se připravilo 15 vzorků (viz. Obrázek 19), chlupy byly z každé strany opatřeny papírovým páskem s očkem, který byl při měření upevněn do trhacího zařízení. Počáteční vzdálenost čelistí byla 40 mm a rychlost posuvu čelistí 200 mm/min. Z naměřených hodnot byl vyhodnocován průměr.



Obrázek 21 Přípravený vzorek chlupu k tahové zkoušce

#### 7.4 Viskozita

Měření bylo provedeno na reometru MALVERN KINEXUS, geometrií válec–válec pro všechny koncentrace přídatku KD i pro samotný KZA. Byla měřena závislost viskozity a smykového při  $\gamma = 0,1-10\text{s}^{-1}$ , za  $25^\circ$

#### 7.5 Mikroskopie

Zkouška byla provedena na mikroskopu Olympus BX41 U – CMAD3 při zvětšení 20x. Sledovány byly chlupy před, po ošetření a 24 hodin po ošetření u všech typů balzámů s přídatkem KD i bez něj. Chlup byl zatížen mezi dvěma skličky.

Tabulka 3 Základní informace o psech

Jméno psa	pohlaví	barva	věk	Hmotnost [kg]	Tloušťka chlupu hrudník [ $\mu\text{m}$ ]	Tloušťka chlupu záda [ $\mu\text{m}$ ]	Tloušťka chlupu ocas [ $\mu\text{m}$ ]
Mia Foxy Fox	fena	Černo - bílá	12 let	19	30	60	40
Armani Bánov Bells	pes	Černo- bílá	8,5 roku	24	60	70	50
Bianka Bánov Bellls	fena	Černo - bílá	6,5 roku	18	40	40	40
Celeste Bánov Bells	fena	Černo - bílá	3 roky	16	50	60	50

Pro zjištění mechanických zkoušek, tedy zkoušky tahové jsem aplikovala balzámy z koncentrací 0,5% KH na fenku Celeste a s nejvyšší koncentrací na fenku Bianku tedy 1,5 % KH. Pro srovnání byl aplikován pouze kosmetický základ na nejstaršího psa, fenku Miu.

U povrchových a strukturních vlastností chlupu, tedy zkoušky mikroskopické jsem použila všechny 4 vzorky balzámů na jednoho psa, Armaniho. Pomocí gumiček jsem oddělila chlupy ze všech tří odběrných míst – hrudi, zad a ocasu.

## 8 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 8.1 Účinnost hydrolýzy

Byla provedena alkalicko-enzymová hydrolýza ovčí vlny, která měla účinnost 67 %. Největší ztráta byla při dialýze. Při dialýze se z kapalného hydrolyzátu vyplavují ven z membrány kratší řetězce keratinu. Větší množství kratších řetězců mohlo vzniknout díky vysoké teplotě při hydrolýze, a rovněž také vlivem vysokého pH roztoku. Dalším z důvodů, který mohl přispět k větší ztrátě kapalného hydrolyzátu při dialýze, je jeho únik do vody. V průběhu dialýzy se mírně zvyšuje tlak a pnutí v membráně, což mohlo přispět k netěsnosti svorek uzavírajících membránu.

$m_{\text{vlny}}$  = hmotnost pomleté vlny 700 g

$m_{\text{KH}}$  – hmotnost nerozloženého podílu = 228,7 g.

$\eta$  = 67 %

### 8.2 Analytické zkoušky

V tabulkách 4–9 je možné vidět výsledky analytických zkoušek. Mezi tyto zkoušky patří množství sušiny, popela, dusíku, síry a distribuci molárních hmotností. Tyto analytické zkoušky byly provedeny u surové vlny, keratinového hydrolyzátu KH a keratinového dialyzátu KD.

#### 8.2.1 Obsah vlhkosti

Z následující tabulky je vidět obsah vlhkosti u čisté vlny, keratinového hydrolyzátu a následně dialyzovaného KH. Z výsledků vyplývá, že největší obsah vlhkosti měl KH. Tato zkouška byla nezbytná pro přepočítání vzorku na sušinu, kvůli přípravě míchání balzámů, kde bylo nutné výchozí složky přepočítat na sušinu.

Tabulka 4 Obsah vlhkosti [%]

<b>vzorek</b>	<b>p<sub>H2O</sub></b> <b>[%]</b>
Vlna	7,9
KH	8,5
KD	5,7

### 8.2.2 Výsledek stanovení dusíku

V tabulce č. 6 můžeme sledovat výsledky po stanovení dusíku v jednotlivých materiálech. Ve výsledcích, které jsou přepočteny na sušinu vlna obsahuje více dusíku než keratinový hydrolyzát. Může to být způsobeno tím, že keratinový hydrolyzát obsahoval více popela. Toto množství popela obsažené v hydrolyzátu procentuálně snižuje množství dusíku v navažce. Nejmenší obsah dusíku měl KH

Tabulka 5 Výsledky stanovení dusíku [%]

<b>Vzorek</b>	<b>Podíl dusíku* [%]</b>	<b>Směrodatná odchylka</b>
Vlna	20,2	3,24
KH	14	0,3
KD	17,3	1,21
* vztaženo na sušinu		

### 8.2.3 Výsledek stanovení síry

Obsah síry se moc neliší v žádném případě z měřených materiálů. Tento výsledek (viz. Tabulka 7) ukazuje na to, že při hydrolyze a následné dialýze nedochází k destrukci sirných aminokyselin.

Tabulka 6 Výsledky stanovení síry [%]

Vzorek	Podíl síranů [%]	Podíl síry* [%]	Směrodatná odchylka
Vlna	25,7	9,3	0,25
KH	27,3	9,6	0,14
KD	28,1	10,2	0,07
* vztaženo na sušinu			

### 8.2.4 Výsledek stanovení popela

Ze všech vzorků měl nejmenší množství popela keratinový dialyzát (viz. Tabulka 8) to může souviset se způsobem přípravy a následného čištění tohoto materiálu. Velmi malé množství popela obsahovala vlna, keratinový hydrolyzát obsahoval ze všech vzorků nejvyšší obsah popela, to souvisí se způsobem jeho přípravy. Příprava byla dvoustupňová, jednalo se o kombinovaný způsob alkalické a enzymové hydrolyzy. Následné zpracování vlny probíhalo v silně alkalickém prostředí  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  a dále docházelo k úpravě pH pomocí NaOH. Dodávání těchto látek se projevilo zvýšením obsahu popelovin, jak je vidět u KH, kde je obsah popelovin 18,6 %. Byla proto provedena dialýza, která zbavila hydrolyzát větší části popelovin, a výsledný obsah popelovin pak byl 0,22%. Kdyby dialýza probíhala déle, byl by obsah popelovin nižší. Pro naše potřeby byl obsah popelovin u hydrolyzátu naprosto dostačující.

Tabulka 7 Výsledky stanovení popela [%]

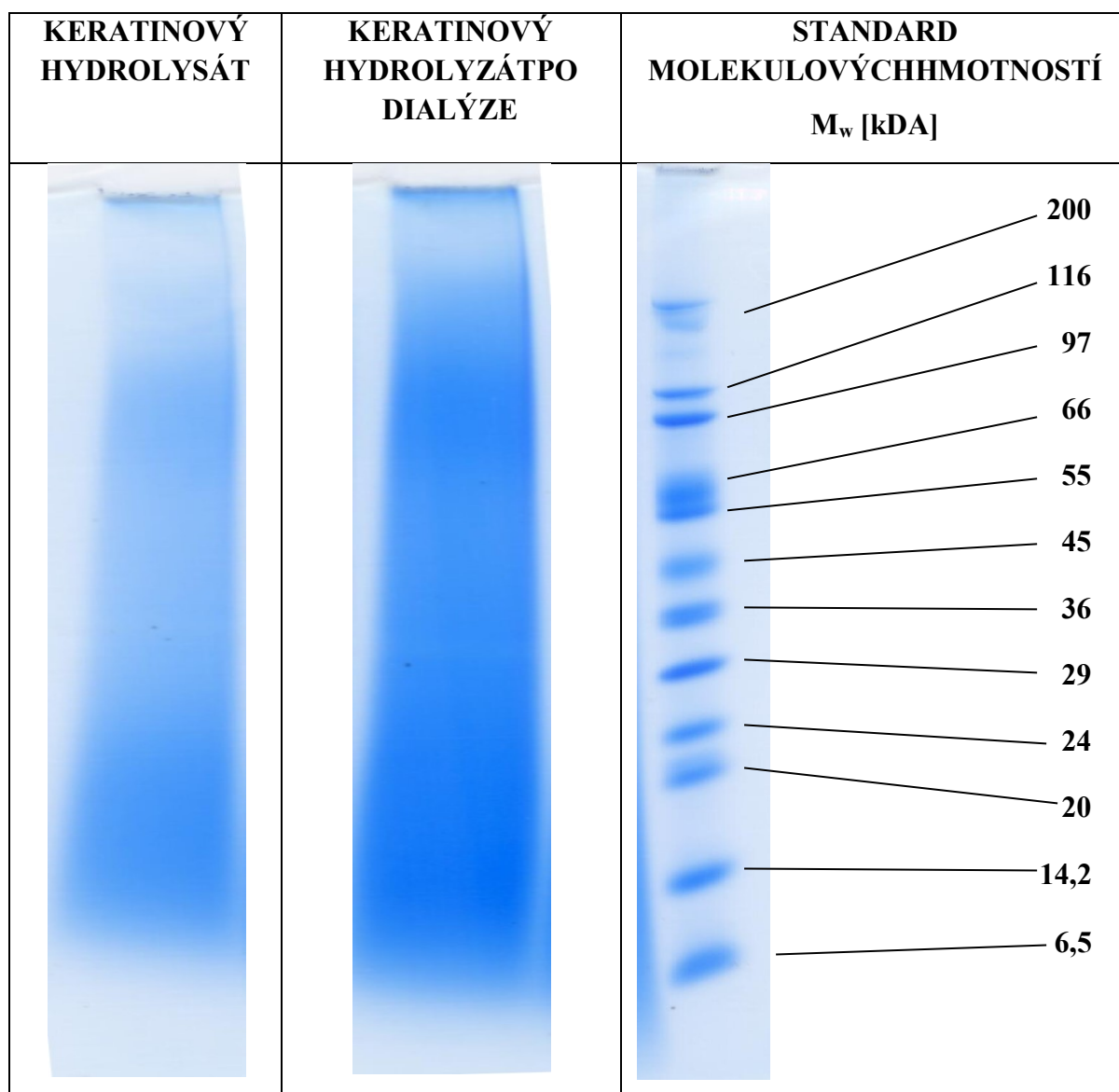
Vzorek	Podíl popela* %	Směrodatná odchylka
Vlna	0,92	0,28
KH	18,6	1
KD	0,22	0,07
* vztaženo na sušinu		

### 8.2.5 Výsledek distribuce molekulových hmotností ( $M_n$ ) hydrolyzátů

Metodou SDS – PAGE byla provedena distribuce molekulových hmotností a to u keratinového hydrolyzátu, kde jsme zjistily pomocí standartové tabulky nízký výskyt proteinového materiálu skoro o 20 %, který je dán velkým množstvím popelovin. Oproti hydrolyzátu po dialýze, kde se nachází široká distribuce molárních hmotností – od nízkých po velmi vysoké od 120 – 10 kDa. Výsledkem (viz. Tabulka 9) jsou dva výrazné pásy molárních hmotností, první pás ukazující na KH u nízkomolekulárních řetězců jeho středová hodnota je kolem 15kDa, druhý pás tedy hydrolyzát po dialýze má středové hodnoty  $\pm 100$ kDa. U KD jsou pásy výraznější, to poukazuje na nízký obsah popelovin, na navážku má větší koncentraci bílkovin. V KD není viditelný žádný výrazný pokles krátkých řetězců, může být způsobeno přidavkem redukčního činidla (merkaptetanolu).



Tabulka 8 Výsledek molekulových hmotností metodou SDS



### 8.3 Výsledek tahové zkoušky

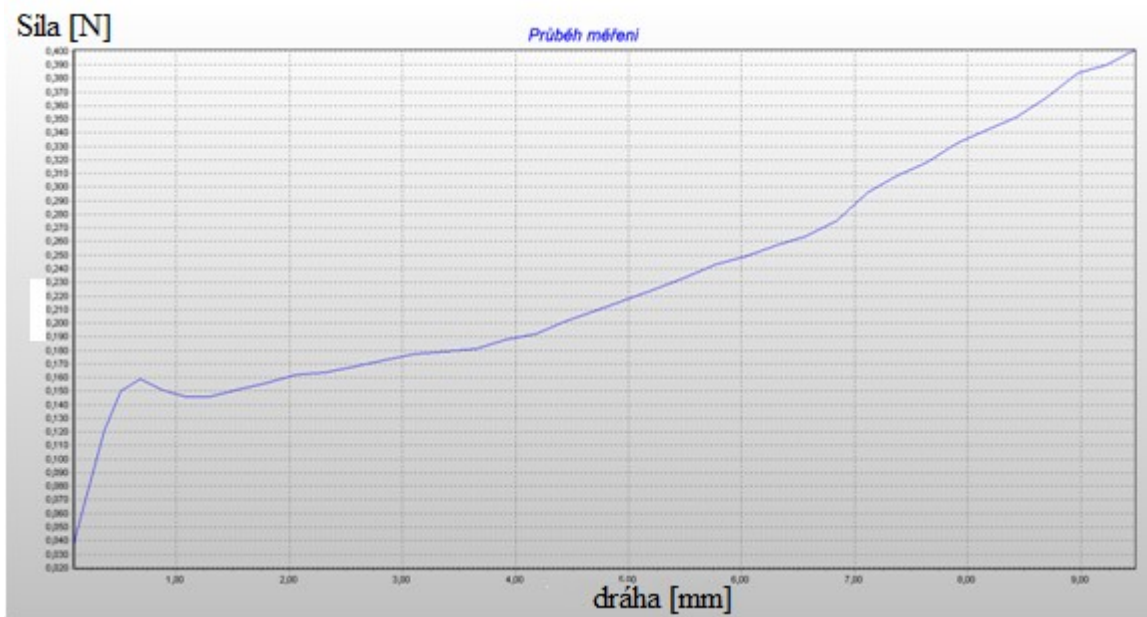
U chlupů byl testován pouze jeden typ mechanické zkoušky. Jednalo se o zkoušku tahovou. Z 15 připravených vzorků bylo do tabulky (č. 10) vybráno min. 7 nejlepších, některé byly špatně nalepeny, tím docházelo k uvolnění chlupů ze svorek, nebo se chlupy netypicky protahovaly. Přetržení chlupu bylo velmi rychlé, převážně dáno jeho tenkostí s průměrnou hodnotou 50  $\mu\text{m}$ .

Tabulka 9 Výsledky tahové zkoušky

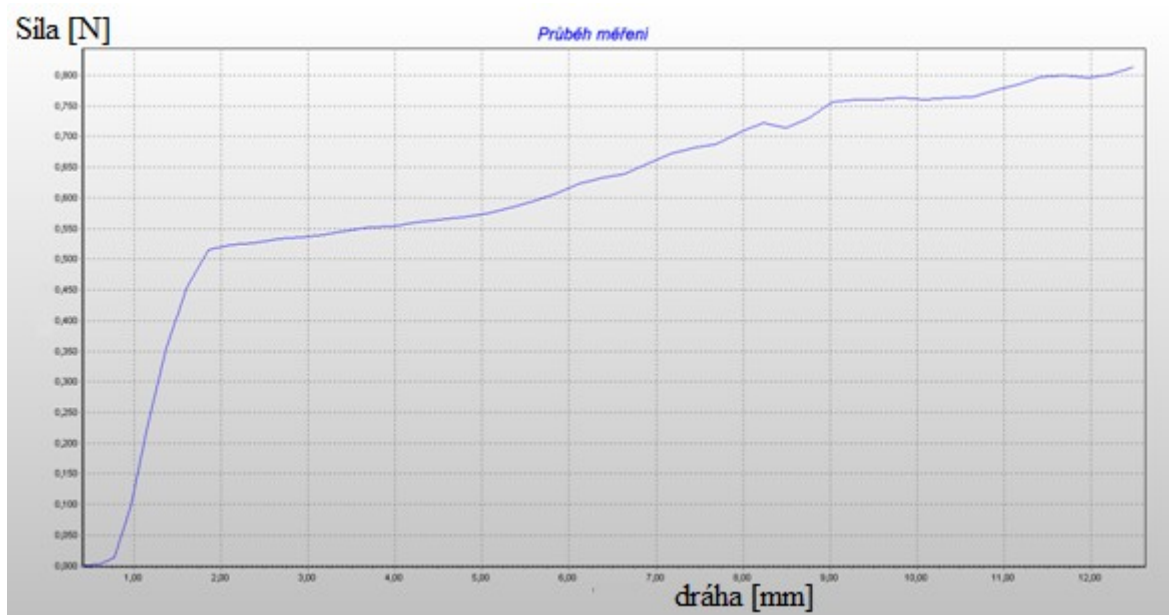
<b>Jméno psa</b>	<b>Celeste před</b>	<b>Celeste KZA + 0,5 % KD</b>	<b>Bianka před</b>	<b>Bianka KZA + 1,5 % KD</b>	<b>Mia před</b>	<b>Mia KZA</b>
<b>Dráha [mm]</b>	7	17	9	14	9	12
$\pm$	3	6	1	1	1	0,9
<b>Síla [N]</b>	0,5	0,4	0,4	0,6	0,6	0,4
$\pm$	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1

Po použití KZA došlo k zlepšení dlužení u všech vzorků. Síla potřebná k přetržení chlupu, je tak malá, že není výrazný rozdíl mezi jednotlivými hodnotami. Nejvýraznější rozdíl je u 0,5% KH v KZA, ale vůči vysoké směrodatné odchylce není měření relevantní. K dalšímu výraznému nárůstu prodloužení byl zaznamenán nejvyšší přírůstek KH (1,5 %) jedná se tak o 65% zlepšení prodloužení oproti chlupu neupravenému.

Na obrázku 22 lze vidět průběh tahové křivky před použitím KH a na obrázku 23 tahová křivka při potažení chlupu ošetřeným KZA s 1,5% KH.



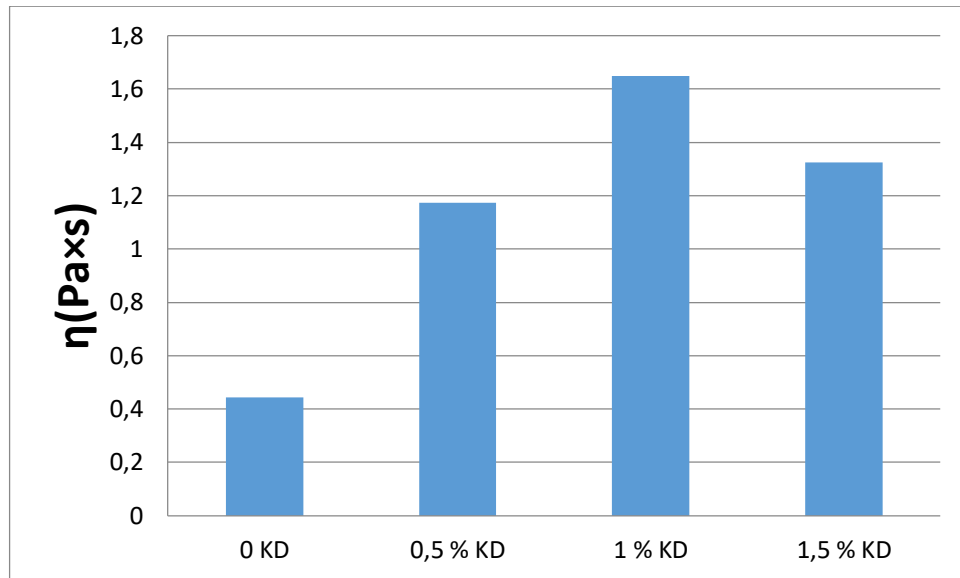
Obrázek 22 tahové zkoušky před použitím KH



Obrázek 23 Graf tahové zkoušky po použití 1,5 % KH

## 8.4 Výsledek viskozity

Na následujícím obrázku (viz. Obrázek 24), je uvedeno, že přidavkem KD je patrný nárůst viskozity než jen při použití kosmetického základu. Nejvýraznější nárůst  $\eta$  byl přidavkem 1 % KD. Výsledky měření viskozity jsou uvedeny v tabulce (č. 11).



Obrázek 24Vliv přidavku KH na viskozitu

Průběh smykové deformace se tedy chová podle předpokladu – se vzrůstající  $\gamma$  [s<sup>-1</sup>], klesá  $\eta$ . Přidavkem 1 % KD je vidět:  $\gamma$  0,1 [s<sup>-1</sup>] má  $\eta= 94,8$  [Pa×s] a při rychlosti smykové deformace  $\gamma$  10 [s<sup>-1</sup>] má viskozitu  $\eta= 1,65$  [Pa×s].

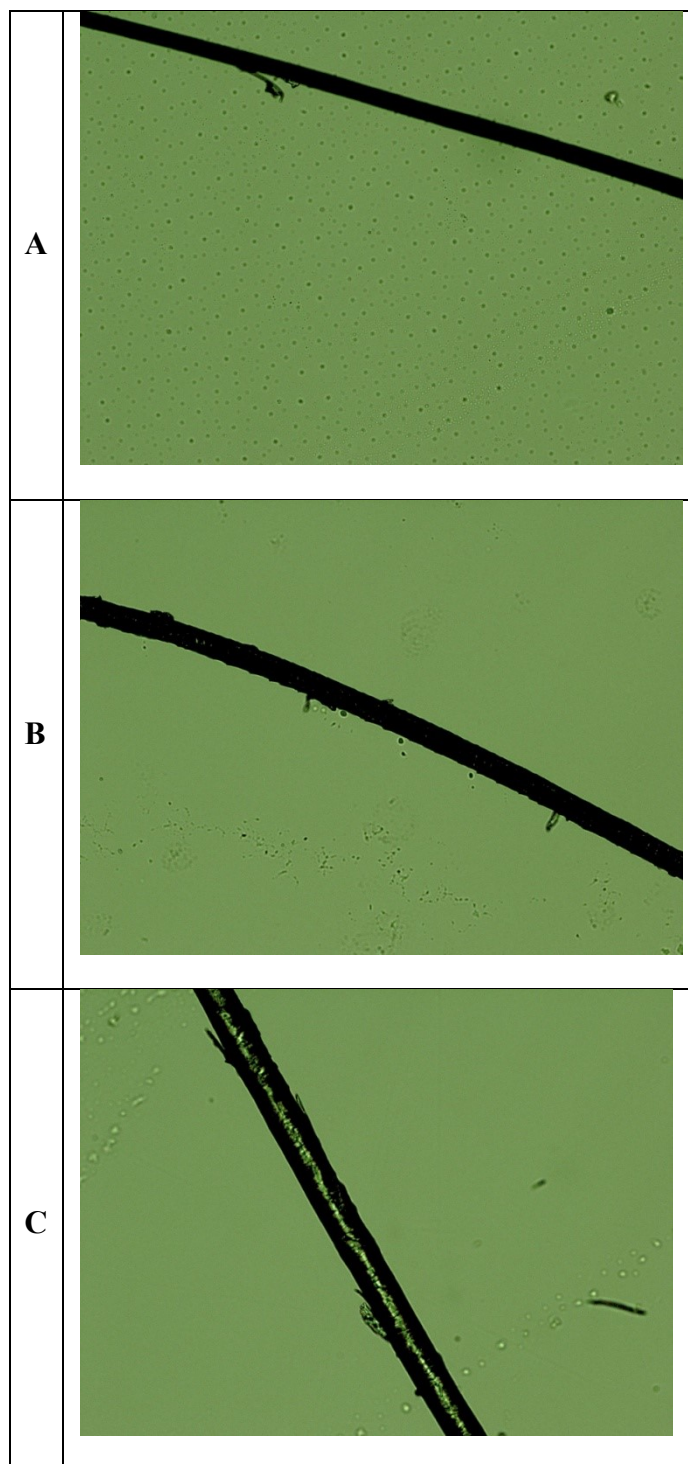
Tabulka 10 Výsledky naměřených hodnot smykové rychlosti a viskozity

	$\gamma$ [s <sup>-1</sup> ]	KZA		KZA 0,5 % KD		KZA 1 % KD		KZA 1,5 % KD	
		$\sigma$ [Pa]	$\eta$ [Pa×s]	$\sigma$ [Pa]	$\eta$ [Pa×s]	$\sigma$ [Pa]	$\eta$ [Pa×s]	$\sigma$ [Pa]	$\eta$ [Pa×s]
1	0,1	0,955	9,55	5,672	56,72	9,479	94,79	4,503	45,03
2	0,1585	1,128	7,116	6,211	39,19	9,578	60,44	4,88	30,79
3	0,2512	1,327	5,281	6,931	27,59	10,09	40,18	5,573	22,19
4	0,3981	1,551	3,895	7,631	19,17	10,76	27,02	6,589	16,55
5	0,631	1,803	2,858	8,211	13,01	11,51	18,24	7,9	12,52
6	1	2,096	2,096	8,685	8,684	12,27	12,27	9,059	9,058
7	1,585	2,43	1,533	9,125	5,757	13,03	8,219	9,797	6,181
8	2,512	2,818	1,122	9,581	3,814	13,84	5,508	10,48	4,171
9	3,981	3,262	0,8193	10,11	2,54	14,68	3,688	11,26	2,829
10	6,31	3,792	0,6009	10,82	1,715	15,54	2,463	12,14	1,923
11	10	4,423	0,4423	11,73	1,173	16,5	1,65	13,26	1,326

## 8.5 Výsledek povrchové mikroskopie

Na následujících obrázcích 25 – 28 jsou zobrazeny fotografie chlupů před a po aplikaci balzámů (A – před aplikací, B – po aplikaci balzámů, C – po 24 hodinové aplikaci balzámů). Z obrázků je patrné, že u neupravených chlupů lze pozorovat roztřepení chlupu a po aplikaci balzámů jsou hladší.

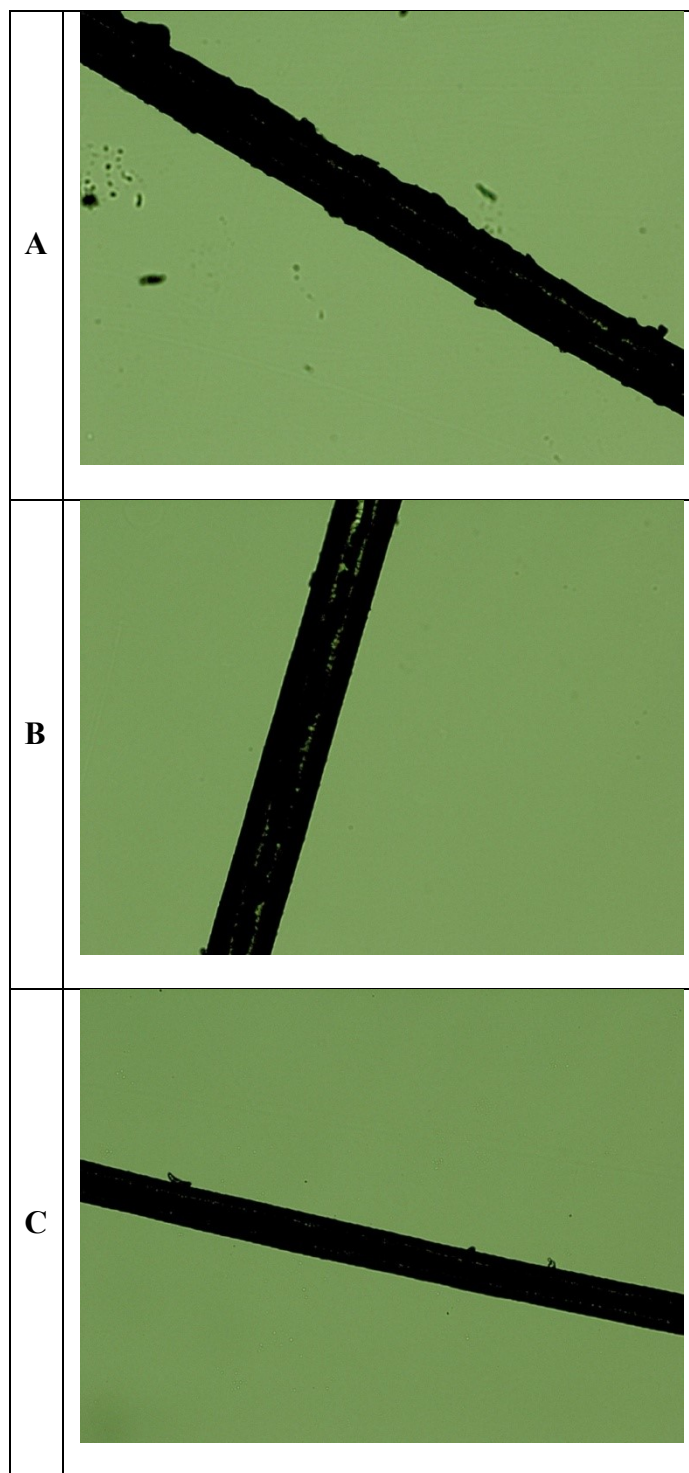
### 1. Aplikace KZA



Obrázek 25 Aplikace kosmetického základu

Pro srovnání bylo vyhodnoceno i samotné působení kosmetického základu bez přísad keratinového hydrolyzátu z odběrného místa na zádech s průměrnou tloušťkou chlupů 70  $\mu\text{m}$ . Tyto chlupy jsou ze subjektivního dojmu nejméně namáhané a poničené. Avšak i při mírných změnách na povrchu chlupu po aplikaci nebyl zjevný velký efekt.

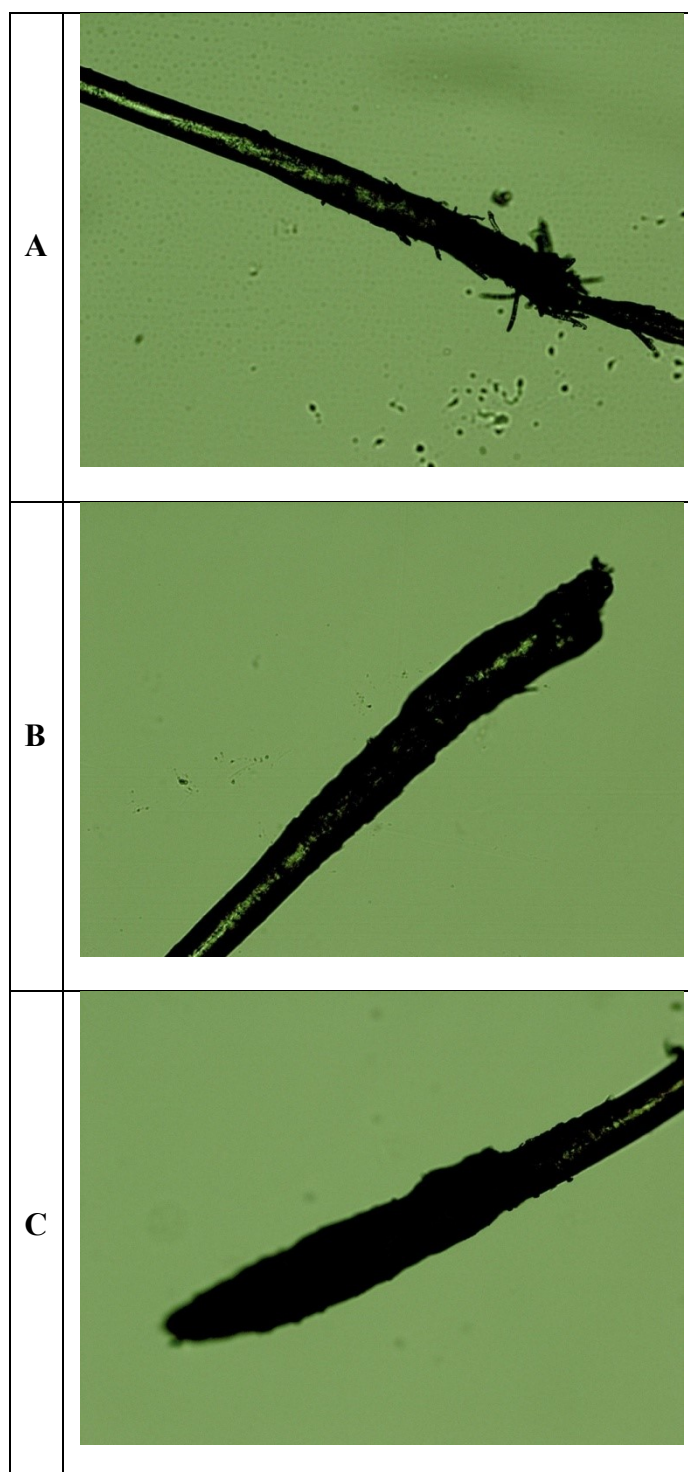
## 2. Aplikace KZA + 0,5 % KD



Obrázek 26 Aplikace KZA + 0,5 % KD

Balzámy s přísávkem 0,5 % KD v kosmetickém balzámu, byly aplikovány na chlupy hrudníku o tloušťce 60  $\mu\text{m}$ , lze usoudit mírné zlepšení, avšak po 24 hodinách se vyskytují mírné defekty na povrchu.

### 3. Aplikace KZA + 1 % KH

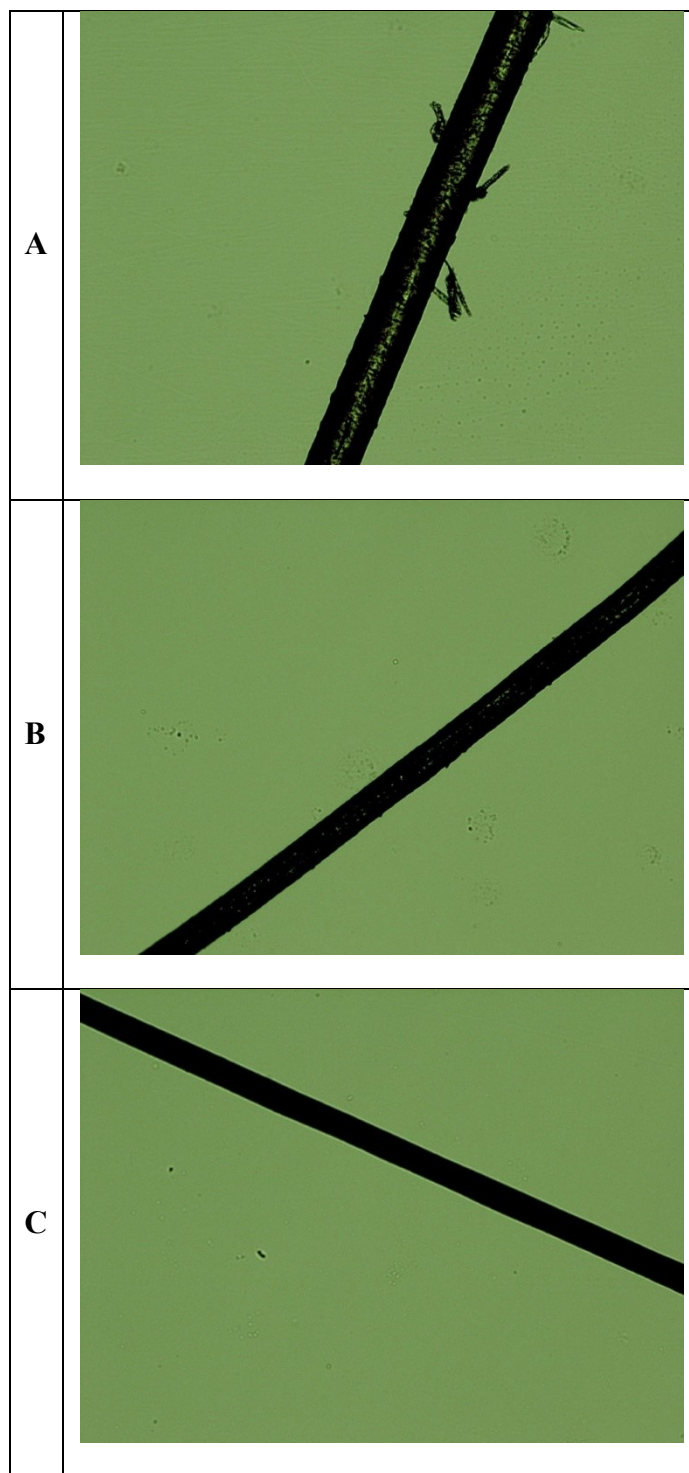


Obrázek 27 Aplikace KZA + 1 % KD

Při této zkoušce byly vybrány obrázky chlupového folikulu z umístění na zádech s tloušťkou 70  $\mu\text{m}$  před a po aplikaci 1% přídatku KD do kosmetického základu. Lze usoudit zlepšení především v místě odtržení kořene od kůže, k pozitivnímu vlivu došlo i po 24 hodinách po aplikaci.



#### 4. Aplikace KZA + 1,5 % KH



Obrázek 28 Aplikace KZA + 1,5 % KD

Použitím balzámu s nejvyšším přídávkem hydrolyzátu tedy 1,5 % do kosmetického základu, došlo k absolutnímu vyhlazení povrchu chlupu s účinností až 24 hodin. Vzorky chlupů byly odebrány z nejvíce namáhaného místa psa a to ocase s průměrnou tloušťkou 50  $\mu\text{m}$ .

## ZÁVĚR

Diplomová práce byla rozdělena na dvě části, na teoretickou a praktickou část. V teoretické části ve svém úvodu jsou popsány informace o keratinech, odpadech z ovčí vlny, z pohledu celosvětové i národní produkce vlny. Podstatná část teoretické části se zabývá hydrolytickým štěpením keratinů s demonstrativními příklady. V další části se zabývá formací kosmetických produktů pro zvířata s následnou aplikací keratinových hydrolyzátů. Na závěr teoretické části je popsán cyklus růstu chlupů s jeho morfologií a jsou zde zmíněny postupy a aplikace kosmetických přípravků při úpravě zvířete.

Cílem praktické části práce bylo sledovat účinek balzámů s přídavkem hydrolyzovaného keratinu na vlastnosti srsti psa s následným 24 hodinovým rozestupem. Prvním dílčím cílem bylo vyrobit hydrolyzát keratinu a charakterizovat jeho složení. Byla provedena alkalicko-enzymová hydrolýza s účinností 67 %, poté následovala dialýza, při ní došlo k největší ztrátě, po dialýze bylo získáno 131 g hydrolyzátu, který byl dále využíván pro přípravu balzámů. Dále byly provedeny analytické zkoušky obsahu sušiny, dusíku, síry a distribuce molekulových hmotností. Z výsledků těchto zkoušek lze usuzovat, že zvolený způsob alkalicko-enzymové hydrolýzy s následnou dialýzou byl zvolen optimálně.

Druhým dílčím cílem bylo připravit balzámy s různými koncentracemi hydrolyzátu a zhodnotit jejich reologické vlastnosti. Keratinový hydrolyzát byl přidán ve třech různých koncentracích 0,5 %, 1 % a 1,5 % do kosmetického základu určeného pro zvířata. Vyšší koncentrace nebylo možné připravit, jelikož při přídavku KH nad 1,7 % došlo k oddělení vodné a olejové frakce v balzámu. Při měření reologických vlastností bylo zjištěno, že přídavek hydrolyzátu zvyšuje viskozitu balzámů (nejvíce při koncentraci 1 %). Zvýšení viskozity mělo za následek lepší vlastnosti při nanášení balzámů, balzámy s KH se lépe aplikovaly na srst a při masírování do kůže psa se lépe vstřebávaly.

Třetím cílem bylo otestovat chlupy ošetřené balzámem s přídavkem KH i bez něj a vyhodnotit jejich mechanické vlastnosti tahovou zkouškou a povrchovou strukturu mikroskopicky. Balzámy byly aplikovány na 4 různě staré psy plemene Border collie s různou kondicí srsti (chlupy mechanicky poničené, chlupy v období vypadávání atd.). Pro mechanické testování byly hodnoceny chlupy před aplikací, ihned po aplikaci a 24 hodin po aplikaci. Tahovou zkouškou byly testovány koncentrace 0,5% a 1,5 % KH v porovnání s KZA. Bylo zjištěno, že chlup ošetřený 1,5% KH v KZA se protáhl o 65 % více než chlup neošetřený. U mikroskopické analýzy měl přídavek KH pozitivní účinek na uhlazení struktury

chlupu. Největší rozdíl byl zaznamenán u koncentrace 1,5 % přídatku KH, chlup byl téměř po celé délce uhlazený a to i 24 hodin po aplikaci.

Ze subjektivního hlediska můžu konstatovat, že po působení balzámu s KH a následném vyfénování byl pozorován rozdíl především v lepším rozčesávání a schnutí psa. Chlup byl rovnější a uhlazenější, což lze vidět i na obrázku uvedeném v kapitole o aplikaci balzámů. Pro důkladnější zhodnocení vlastností keratinového hydrolyzátu použitého v kosmetických přípravcích pro zvířata by bylo vhodné navázat např. dlouhodobým sledováním působení balzámů na srst zvířete.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] ŠKÁRKA, B a FERENČÍK, M. Biochémiá. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1983, 635 s.
- [2] ZOCCOLA, M, ALUGI, A a TONIN, C. Characterisation of keratin biomass from butchery and pool industry Wales. Journal of Molecular Structure. 2009, 938(1-3), 35-40. DOI: 10.1016/j.molstruc.2009.08.036.
- [3] BLAŽEJ, A. Technologie kůže a kožešin. 1.vyd. Praha: SNTL – Nakladatelství Technické literatury, 1984, 451 s.
- [4] KhanAcademy, Lessons&Practice [cit.15.04.2019]. [online]. Dostupné z: <https://www.khanacademy.org/science/biology/macromolecules/proteins-and-amino-acids/a/orders-of-protein-structure>
- [5] VOET, D, VOETOVÁ, J G. Biochemie. 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-85605-44-9.
- [6] WIENER, J, PRŮŠOVÁ, J, KRYŠTŮFEK, J Chemicko – textilní rozborý. Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2008.
- [7] SALHI, A, KACI, S, BOUDENE, A, CANDAU, Y. Development of biocomposites based of polymer matrix and keratin fibers: contribution to poultry feather biomass recycling. Part I., Conference and Training School Multiphase Polymer and Composite Systems: Fromnanoscale to Macro Composites, France, June 2011, p. 1-4.
- [8] WoolProduction | International Wool Textile Organisation. International Copyright© [cit.15.04.2019] [online]. Dostupné: [http://eagri.cz/public/web/file/590782/Ovce\\_kozy\\_2018\\_Web.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/590782/Ovce_kozy_2018_Web.pdf)
- [9] BERTINY, F, CANETTI, M, PATRUCCO, A, ZOCCOLA, M. Wool keratin – polypropylene composites : properties and thermaldegradation, Polymer Degradation and Stability. 2013, 98 (5), 980-987.
- [10] Vlákna z keratinu: vlna ovčí. e-LTex [online]. [cit.15.04.2019]. Dostupné z: <http://www.skolatextilu.cz/elearning/462/textilni-terminologie-zboziznalstvi/vlakna-prize-a-nite/Vlakna-zkeratinu:-vlna-ovci.html>
- [11] ZOCCOLA, M, ALUIGI, A, TONIN, C. Characterisation of keratin biomass from butchery and wool industry wastes, Journal of Molecular Structure. 2009, 938 (1-3), 35-40.

- [12] BAŘINKOVÁ, K. Příprava a charakterizace filmů z keratinových hydrolyzátů. Zlín, 2013. Diplomová práce. UTB, fakulta technologická. [online]. Dostupné z:  
[http://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/24636/ba%C5%99inkov%C3%A1\\_2013\\_dp.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/24636/ba%C5%99inkov%C3%A1_2013_dp.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- [13] POJETOVÁ, K. Řešení problematiky odborné přípravy oboru kadeřník/kadeřnice. Brno, 2012. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, pedagogická fakulta, katedra didaktických technologií. [online]. Dostupné z:  
[https://is.muni.cz/th/252093/pedf\\_b/](https://is.muni.cz/th/252093/pedf_b/)
- [14] LANGMAIER, F. Základy kosmetických výrob. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2001. Učební texty vysokých škol. ISBN 80-7318-016-2.
- [15] KUDRNA, K. Naučný slovník zemědělský. Praha: Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství ve Státním zemědělském nakladatelství, 1989.
- [16] HORÁK, F. Ovce a jejich chov. Praha: Brázda, 2004. ISBN 80-209-0328-3.
- [17] HÁNOVÁ, K. Syntetické polymery vyztužené krátkými keratinovými vlákny. Zlín, 2016. Diplomová práce. UTB, fakulta technologická. [online]. Dostupné z:  
[http://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/38635/h%C3%A1nov%C3%A1\\_2016\\_dp.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/38635/h%C3%A1nov%C3%A1_2016_dp.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- [18] FUČÍK, F. Encyklopedie textilních hmot, svazek II. díl 1, ovčí vlna, srsti, chlupy a přediva příbuzná, nákladem Textilního ústavu Československého Brno, 1948.
- [19] ROUSE, J G, VAN DYK, M E. Review of Keratin-Based Biomaterials For Biomedical Applications, Materials. 2010, 999-1014.
- [20] KREJČÍ, O a MOKREJŠ, P. Sledování vlivu technologických podmínek na účinnost rozkladu odpadní ovčí vlny. Wasteforum. 2010, 35-42. Dostupné z:  
[www.wasteforum.cz](http://www.wasteforum.cz)
- [21] HLADÍK, V. Textilní vlákna: vysokoškolská příručka. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1970.
- [22] STOKLASA, K. Makromolekulární chemie I. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005.
- [23] ABOUHEIF, M A, BASMAEIL, S, METWALLY, H a MASOUD, S. 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 [cit. 2015-03-15]. DOI: 10.1016/0377-8401(85)90024-0.
- [24] TSUDA, Y a NOMURA, Y. Properties of alkaline-hydrolyzed water fowl-feather keratin. *Animal Science Journal*, 2013, 85, 180-185
- [25] CARDAMONE, M. Keratin transamidation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2008, 42(5), 413-419. DOI: 10.1016/j.ibiomac.2008.02.004.
- [26] GOUSTEROVA, A, BRAIKOVA, D, GOSHEV, I, CHRISTOV, P, TISHINOV, P, VASILEVA-TONKOVA, E, HAERTLE, T a NEDKOV, P. Degradation of keratin and collagen containing wastes by new lysolated thermo actinomyces by alkaline hydrolysis. *Letters in Applied Microbiology*. 2005, 335-340. [online]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.2005.01692.x>
- [27] BROŽOVÁ, E. Třístupňová enzymatická hydrolýza manipulačních usňových odpadů, Diplomová práce, FT UTB ve Zlíně, 2003, 19-23
- [28] BLAŽEJ, A, DEYL, Z, ADAM, M, GALATÍK, A, MICHLÍK, I, SMEJKAL, P.: Štruktúra a vlastnosti vláknitých bielkovin, Bratislava: VEDA 1978, 69-72
- [29] NUSTOROVA, M. Chemical, microbiological and plant analysis of soil fertilized with alkaline hydrolysate of sheep's wool waste. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2005.
- [30] SIMPSON, W a CRAWSHAW, G. *Wool: science and technology*. Cambridge, England: Woodhead, 2002. ISBN 08-493-2820-9.
- [31] KURBANOGLU, E B, KURBANOGLU, N I. A new process for the utilization as peptone of ram horn waste. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2002, 94(3), 202-206. DOI: 10.1016/S1389-1723(02)80150-5.
- [32] KURBANOGLU, E. B, KURBANOGLU, N I. A new process for the utilization as peptone of ram horn waste. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2002, p. 202 - 206.
- [33] KUČERA, T., *Enzimologie, Inhibice a aktivace enzymů. Allosterická regulace. Kofaktory enzymů.*, Multimediální podpora- výuky klinických a zdravotních oborů., Portál 2, Lékařská fakulta, 2009., [online]. Dostupné z: [www.mefanet-motol.cuni.cz/clanky.phpaid=459](http://www.mefanet-motol.cuni.cz/clanky.phpaid=459).

- [34] MOKREJŠ, P., KREJČÍ, O., SUKOP, S. Charakterizace keratinových hydrolyzátů připravených z kuřecího peří. *Chemické listy* [online]. 2014, [cit. 2014-11-21]. Dostupné z: [www.chemicke-listy.cz/](http://www.chemicke-listy.cz/)
- [35] BRANDELLI, A. Bacterial Keratinases: Useful Enzymes for Bioprocessing Agroindustrial Wastes and Beyond. *Food and Bioprocess Technology*. 2008 1(2), 105- 116. DOI: 10.1007/s11947-007-0025-y.
- [36] CORREA, A, P, DAROIT, D, J, BRANDELLI, A. Characterization of a keratinase produced by *Bacillus* sp. P7 isolated from an Amazonian environment. *International Biodeterioration*. 2010,64(1), 1-6. DOI: 10.1016/j.ibiod.2009.06.015.
- [37] MABROUK, M E. Feather degradation by a new keratinolytic *Streptomyces* sp. MS-2. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2008, 24(10), 2331- 2338. DOI: 10.1007/s11274-008-9748-9.
- [38] MOKREJŠ, P a LANGMAIER, F. Aplikace přírodních polymerů. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008. ISBN 978-80-7318-674-6.
- [39] MLÁDEK, M a BLAŽEJ, A. Zpracování odpadů kožedělného průmyslu. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1971.
- [40] Keraplast Technologies, Ltd. Keratin-based powders and hydrogels for pharmaceutical applications. Arlene J. Siller-Jackson, Mark E. Van Dyke, Scott F. Timmons, Cheryl R. Blanchard, Robert A. Smith. United States Patent, number 6,544,548 B1. 2003.
- [41] Keraplast Technologies, Ltd. Hydrogel with controllable mechanical, chemical, and biological properties and method for making same. Mark E. Van Dyke. United States Patent, number 7,001,987 B2. 2006.
- [42] Proteiny 2008: [sborník příspěvků V. ročníku mezinárodní konference]. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008. ISBN 978-80-7318-706-4.
- [43] VILLA, A L V., ARAGÃO., SANTOS, M R S., MAZOTTO, A. M., ZINGALI, R. B., SOUZA, E. P. a VERMELHO, A. B., Feather keratin hydrolysates obtained from microbial keratinases: effect on hair fiber. *BMC Biotechnology* [online]. 2013, [cit. 2015-04-15]. DOI: 10.1186/1472-6750-13-15
- [44] FEŘTEKOVÁ, V. Kosmetika v teorii a v praxi. 4., aktualiz. vyd. Praha. 2005. ISBN 80-7345-046-1.

- [45] GODDARD, E a GRUBER, J. Princip lesof polymer science and technology in cosmetics and personal care. New York: Marcel Dekker, 1999, 671. Cosmetic science and technology series, 22. ISBN 08-247-1923-9.
- [46] Gleadhill, A. Getting under the skin Veterinary Record 2005, 61.
- [47] MITSUI, T. New cosmetic science. New York: Elsevier Science, 1997. ISBN 0444826548
- [48] MVDr. FÁBIKOVÁ, R., Veterinární dermatologie a kosmetologie. Péče o kůži a srst loveckých psů. [online] Dostupné z: [http://www.dingvet.cz/sites/default/files/9\\_0.pdf](http://www.dingvet.cz/sites/default/files/9_0.pdf)
- [49] LOCHHEAD, R Y. The Role of Polymers in Cosmetics: Recent trends. Washington DC: American Chemical Society, 2007
- [50] AL-MUSALLAM, A A., AL-GHARABALLY D H a VADAKKANCHERIL N. Biodegradation of keratin in mineral-based feather medium by thermophilic strains of a new Coprinopsis sp. International Biodeterioration [online]. 2013, 79, 42-48 [cit. 2015-05-03]. DOI: 10.1016/j.ibiod.2012.11.011. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/S0964830512003204>
- [51] VeterinarniKosmetika.cz - kosmetika pro psy, kočky koně [online]. Dostupné z: <https://www.veterinarnikosmetika.cz/clanky/uzitecne-informace/>
- [52] Cyklus růstu chloupků Depilujeme.cz. Aby se salonům dařilo. - Depilujeme.cz [online]. Copyright © Depilujeme.cz, všechna práva vyhrazena [cit. 15.04.2019]. Dostupné z: <https://www.depilujeme.cz/zajimavosti/cyklus-rustu-chloupku/>
- [53] MAHDALOVA, A. Využití bílkovin pro přípravu kosmetických produktů. Zlín, 2016. Bakalářská práce. UTB, fakulta technologická.
- [54] SOVA, J. Využití keratinových hydrolyzátů. Zlín, 2013. Diplomová práce. UTB, fakulta technologická. [online] Dostupné z: [https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/24814/sova\\_2013\\_dp.pdf?sequence=1](https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/24814/sova_2013_dp.pdf?sequence=1)



**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

$M_m$  Význam druhé zkratky. Molární hmotnost  $\text{kg} \times \text{mol}^{-1}$

KZA Kosmetický základ

KH Keratinový hydrolyzát.

KD Keratinový hydrolyzát po dialýze

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 $\alpha$ -šroubovice a $\beta$ -skládaný list struktura keratinové molekuly [4].....	12
Obrázek 2 Schéma vazeb vyskytujících se v keratinu [6].....	13
Obrázek 3 Světová produkce vlny % [8].....	14
Obrázek 4 Vlákno vlny [14] .....	16
Obrázek 5 Vlákno podsadové [11].....	18
Obrázek 6 Vlákno pesíkové [11] .....	18
Obrázek 7 Hydrolyza disulfidické vazby keratinu [22] .....	20
Obrázek 8 Hydrolyza polypeptidické vazby [23] .....	20
Obrázek 9 Oxidace disulfidické vazby keratinu bez jejího štěpení [40] .....	23
Obrázek 10 Příprava keratinového hydrogelu [41].....	24
Obrázek 11 Redukce disulfidické vazby keratinu [22] .....	25
Obrázek 12 Blokové zpracování keratinového odpadu na keratinový hydrolyzáát .....	27
Obrázek 13 Schéma rozdělení kosmetických formulací [47].....	32
Obrázek 14 Fáze cyklu chlupu[53] .....	35
Obrázek 15 Mikroskopický snímek chlupové cibulky na řezu [47] .....	36
Obrázek 16 Použité enzymy při hydrolyze.....	41
Obrázek 17 Extrakce vlny před přidáním enzymu.....	43
Obrázek 18 Čistá vlna - Keratinový hydrolyzáát - Keratin hydrolyzáát po dialýze .....	44
Obrázek 19 Zleva: KZA - 0,5% KD v KZA - 1% KD v KZA - 1,5% KD v KZA.....	49
Obrázek 20 Před úpravou - Aplikace balzámu - Po úpravě.....	50
Obrázek 21 Připravený vzorek chlupu k tahové zkoušce.....	51
Obrázek 22 tahové zkoušky před použitím KH .....	59
Obrázek 23 Graf tahové zkoušky po použití 1,5 % KH .....	59
Obrázek 24 Vliv přídavku KH na viskozitu .....	60
Obrázek 25 Aplikace kosmetického základu.....	62
Obrázek 26 Aplikace KZA + 0,5 % KD.....	63
Obrázek 27 Aplikace KZA + 1 % KD .....	64
Obrázek 28 Aplikace KZA + 1,5 % KD.....	65

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1Srovnání aminokyselin u kombinovaných hydrolyz .....	29
Tabulka 2Schéma aplikací keratinu v kosmetice [39].....	31
Tabulka 3Základní informace o psech .....	52
Tabulka 4Obsah vlhkosti [%] .....	54
Tabulka 6Výsledky stanovení dusíku [%].....	54
Tabulka 7Výsledky stanovení síry [%] .....	55
Tabulka 8Výsledky stanovení popela [%].....	56
Tabulka 9Výsledek molekulových hmotností metodou SDS.....	57
Tabulka 10Výsledky tahové zkoušky.....	58
Tabulka 11Výsledky naměřených hodnot smykové rychlosti a viskozity .....	61

