

Využití keratinových hydrolyzátů jako nosičů aktivních látek

Matouš Huřta

Bakalářská práce
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Matouš HUŤŤA**
Osobní číslo: **T09744**
Studijní program: **B 2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Chemie a technologie materiálů**

Téma práce: **Využití keratinových hydrolyzátů jako nosičů
aktivních látek**

Zásady pro vypracování:

Cílem bakalářské práce bude vyzkoušet připravený keratinový hydrolyzát jako nosič aktivních látek. Teoretická část práce bude zaměřena na popis keratinu a přípravy hydrolyzátů, vlastností těchto hydrolyzátů a možnosti jejich aplikací. V praktické části bude provedeno:

1. příprava kapslí z keratinových hydrolyzátů s aktivní látkou
2. testování rozpustnosti připravených kapslí
3. zjišťování množství aktivní látky v kapslích

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

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

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

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

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

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

Datum zadání bakalářské práce: **10. února 2012**

Termín odevzdání bakalářské práce: **1. června 2012**

Ve Zlíně dne 10. února 2012


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno:

Obor:

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně

.....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Tato práce se zaměřuje na zhodnocení možnosti využití keratinových hydrolyzátů, připravených dvou-stupňovou alkalicko-enzymovou hydrolyzou, jako nosičů aktivních látek. Teoretická část práce shrnuje informace o keratinu a keratinových hydrolyzátech, jejich přípravě a aplikacích. V praktické části byly z keratinových hydrolyzátů vytvořeny směsi (keratinový hydrolyzát, voda, glycerol, kyselina askorbová, dialdehyd škrobu) z nichž byly připraveny tablety s přídavkem a bez přídavku síťovadla. Tablety byly rozpouštěny za definovaných podmínek (destilovaná voda, 37 °C, třepání) po vybranou dobu (5–120 minut) a byl sledován obsah uvolněné kyseliny askorbové v závislosti na čase. Toto množství s časem roste téměř lineárně. Z tablet s přídavkem síťovadla se při delších dobách rozpouštění kyselina askorbová uvolňuje pomaleji.

Klíčová slova: keratinový hydrolyzát, kyselina askorbová, rozpouštění, tablety

ABSTRACT

This thesis deals with evaluation of keratin hydrolysate (prepared by two-steps alkali-enzymatic hydrolysis) possibility as a carrier for active substances. A theoretical part summarized information about keratin and keratin hydrolysates, their preparation and applications. In a practical part blends from keratin hydrolysates, water, glycerol, ascorbic acid and starch dialdehyde were prepared. From these blends, tablets with and without cross-linking agent were produced. Tablets were dissolved in water (37°C and shaking) for selected times (5–120 minutes) and time dependence of released amounts of ascorbic acid was observed. This amount increase almost linear and from tablets with cross-linking agent at longer time ascorbic acid was released slower.

Keywords: ascorbic acid, dissolution, keratin hydrolysate, tablets

Děkuji svému vedoucímu Ing. Ondřeji Krejčímu za odborné vedení bakalářské práce, pomoc při experimentech, překladu článků a důležité rady a připomínky při její tvorbě. Děkuji také paní laborantce za pomoc při experimentech. Tato práce by nemohla vzniknout bez laskavého přístupu mých blízkých, a proto i jim patří můj dík.

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

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 BIOPOLYMERY	11
1.1 BÍLKOVINY (PROTEINY)	11
1.1.1 Keratin.....	12
1.1.2 Keratinové odpady	16
2 HYDROLYTICKÉ ŠTĚPENÍ	17
2.1 ALKALICKÁ HYDROLÝZA	17
2.2 KYSELÁ HYDROLÝZA	17
2.3 OXIDAČNÍ A REDUKČNÍ ZPŮSOB	18
2.4 ENZYMOVÁ HYDROLÝZA.....	18
2.5 KOMBINOVANÝ ZPŮSOB	19
3 APLIKACE KERATINU	20
4 APLIKACE KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ	21
4.1 POUŽITÍ KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ V ZEMĚDĚLSTVÍ.....	21
4.2 POUŽITÍ KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ V OBALOVÉ TECHNICE.....	21
4.3 POUŽITÍ KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ V KOSMETICE A LÉKAŘSTVÍ.....	22
4.4 DALŠÍ APLIKACE.....	22
II PRAKTICKÁ ČÁST	23
5 MATERIÁLY A METODY	24
5.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	24
5.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE	24
5.3 PŘÍPRAVA KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU	24
5.4 ANALYTICKÉ ZKOUŠKY KERATINOVÉHO HYDROLYZÁTU	25
5.4.1 Mikrochemické stanovení dusíku – AOAC 960.52	25
5.4.2 Stanovení obsahu síry srážením roztokem chloridu barnatého – AOAC 955.48.....	26
5.4.3 Stanovení sušiny – ČSN EN ISO 665	27
5.4.4 Stanovení popela – ČSN ISO 2171	27
5.5 POSTUP PŘÍPRAVY TABLET	27
5.6 ROZPOUŠTĚNÍ.....	28
5.7 STANOVENÍ OBSAHU UVOLNĚNÉ KYSELINY ASKORBOVÉ.....	29
6 VÝSLEDKY A DISKUSE	30
ZÁVĚR	33
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	34
SEZNAM OBRÁZKŮ	37
SEZNAM TABULEK	38

ÚVOD

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

Jednou z možných aplikací keratinových hydrolyzátů je jejich použití jako nosičů aktivních látek (vitamínů, barviv, hnojiv, aj.). Tomuto problému se věnuje i následující práce. Předem připravený keratinový hydrolyzát, získaný z vlny dvoustupňovou alkalickoenzymovou hydrolyzou, bude nejprve podroben analytickým zkouškám pro zjištění jeho složení a kvality. Následně budou z hydrolyzátu připraveny směsi a bude sledováno uvolňování kyseliny askorbové z tablet v čase.

Cílem bakalářské práce je posouzení možností použití keratinového hydrolyzátu jako nosiče aktivních látek (kyselina askorbová). Teoretická část práce si klade za cíl shrnutí informací o vlastnostech, přípravě a nejběžnějších aplikacích keratinových hydrolyzátů. V praktické části je poté ověřována možnost použití těchto hydrolyzátů na přípravu tablet a jejich využití jako nosičů. Jako další cíl bylo zvoleno posuzování vlivu síťovadla na množství uvolňovaného vitamínu C z tablety.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOPOLYMERY

Biopolymery jsou přírodní polymery a jsou to vysokomolekulární organické látky, které jsou produkovány biochemickými reakcemi u zvířat, rostlin a mikroorganismů. Biopolymery mají rozhodující význam při výstavbě těl organismů a při zabezpečování takových důležitých funkcí jako je přenos a přepis genetické informace, katalytického urychlování chemických reakcí, transport důležitých látek, konzervace chemické energie apod. Jsou součástí živých systémů, v neživé přírodě se nevyskytují. Vznikají polykondenzací základních nízkomolekulárních jednotek, jako jsou monosacharidy, aminokyseliny a nukleotidy. [1]

1.1 Bílkoviny (Proteiny)

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

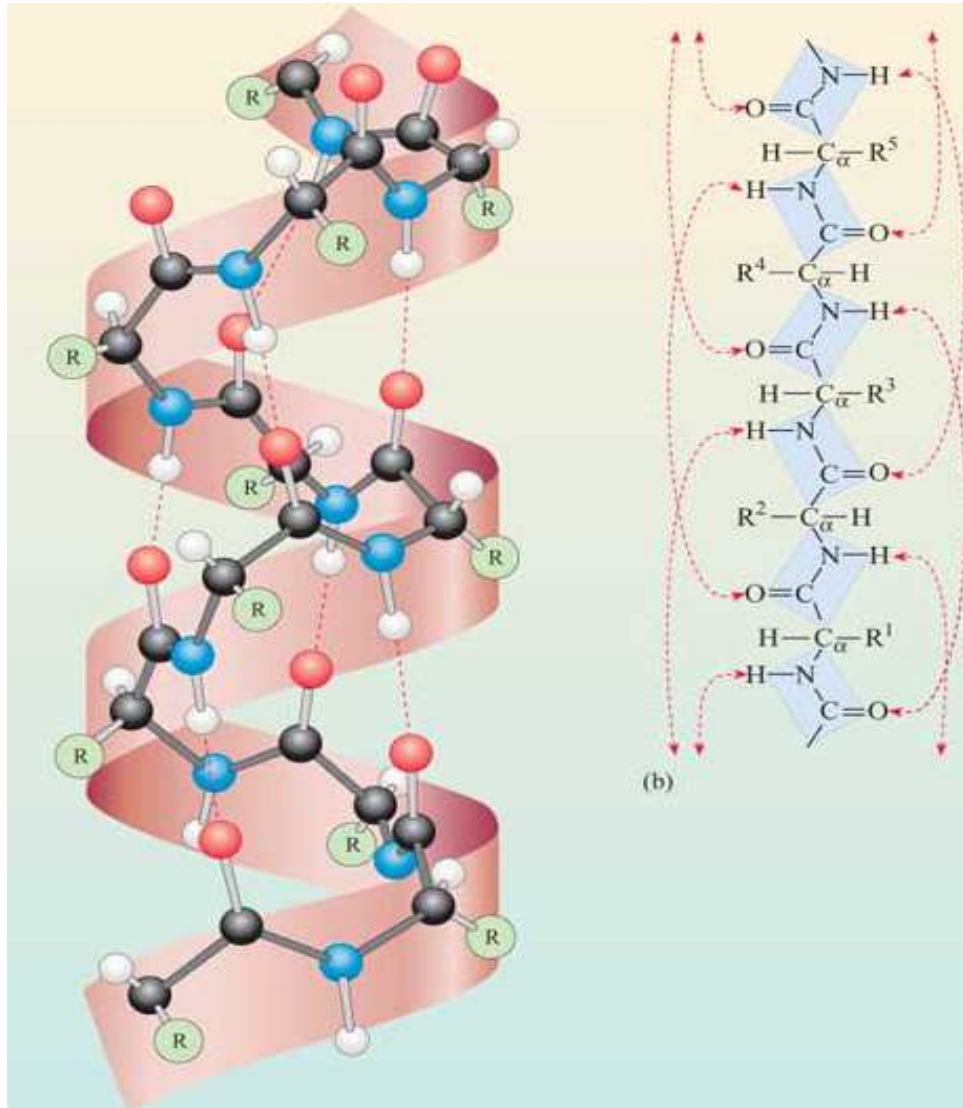
Tab. 1 – Rozdělení bílkovin

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

1.1.1 Keratin

Keratin patří mezi nerozpustné fibrilární proteiny, jejichž struktura je značně sesíťována 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, buď jako α -šroubovice (helix), který se vyskytuje u savců,

anebo jako β -skládaný list u plazů a ptáků. Keratin tvoří hlavní část hmotnosti vlasů, nehtů, srsti, rohoviny, peří, vlny a mnoha dalších látek. [1,5]



Obr. 1 – α -helix struktura keratinové molekuly

Keratinová vlákna se skládají z řetězců, které jsou spojeny různými vazbami, dosahujícími síly kovalentní vazby i slabšího vzájemného ovlivňování. α -keratin je bohatý na cysteinové zbytky, které se mohou spojovat příčnými vazbami se sousedními řetězci. To vysvětluje dvě nejdůležitější biologické vlastnosti keratinů – nerozpustnost a pevnost v ohybu. Mezi nekovalentní vazby patří vodíkové můstky, Coulombické interakce, Van der Waalsovy síly a hydrofobní vazby v přítomnosti vody. [1,4,5]

Tab. 2 – Aminokyselinové složení keratinu

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

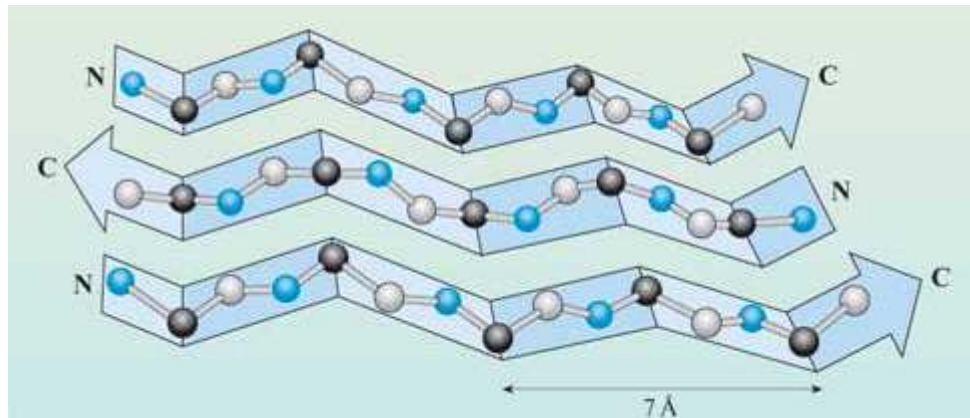
α -keratiny mohou být tvrdé nebo měkké, podle toho, zda mají vysoký nebo nízký obsah síry. Tvrdé keratin vlasů, rohoviny a nehtů jsou méně pružné a více odolávají deformaci než měkké keratiny kůže a mozolů. [4]

U keratinu, stejně jako u jiných bílkovin, rozeznáváme čtyři základní struktury: primární, sekundární, terciární a kvartérní.

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

Sekundární struktura vzniká vytvořením určité konformace makromolekuly, která se vytváří vznikem vodíkových vazeb. H-můstky spojují skupiny -CO- a -NH- uvnitř řetězce. Většinou vzniká struktura pravotočivé šroubovice (α -helix), která je energeticky nejvýhodnější a její postranní řetězce směřují ven v důsledku stericých zábran. To způsobuje, že proti sobě ležící skupiny -NH- a -CO- jsou fixovány vodíkovými vazbami a boční řetězce

aminokyselinových zbytků směřují ven kolmo k rovině šroubovice. Může vzniknout také struktura β -skládání list u které postranní řetězce vyčnívají střídavě na opačné strany řetězce taktéž kvůli sterickým zábranám.



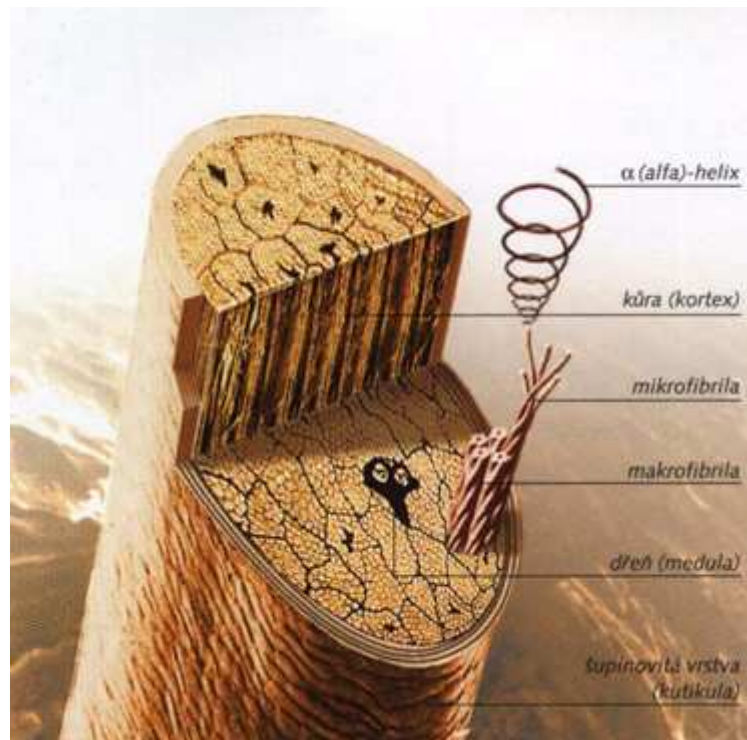
Obr. 2 – β -sheet (skládání list) struktura keratinové molekuly

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

Kvartérní struktura je uspořádání různě orientovaných stejných nebo rozdílných struktur v prostoru. Toto uspořádání je důležité pro zajištění funkce proteinu. Proteiny se zpravidla skládají tak, že hydrofobní zbytky aminokyselin jsou uzavřené uvnitř a hydrofilní části jsou na povrchu proteinu. Záleží však na prostředí, ve kterém se protein nachází. [1,2,6,9]

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

1. α -helix – molekula keratinu
2. superhelix – složený ze dvou navzájem stočených α -helixů
3. protofibrila – složená ze dvou superhelixů
4. mikrofibrila – složená z 11 protofibril (9 tvoří kruh a uvnitř kruhu jsou 2)
5. makrofibrila – složená z několika set mikrofibril
6. vlasová buňka – složená z několika desítek makrofibril



Obr. 3 – Vlas

1.1.2 Keratinové odpady

Každým rokem je na světě vyprodukováno velké množství keratinových odpadů. Největšími producenty těchto odpadů jsou potravinářské a také textilní průmysly. Mezi odpady keratinového typu patří především vlna a srst pocházející z jatek a peří získávané z drůbežích farem. Peří tvoří asi 5-10 % hmotnosti drůbeže a proto z jatek, které denně zpracují 50 000 kuřat, vzniknou 2-3 tuny keratinového odpadu každý den. Další částí keratinových odpadů je vlna, která není dostatečně kvalitní pro textilní průmysl a vlna od malých chovatelů. Mezi největší producenty vlny patří Austrálie, Nový Zéland, Čína a Rusko. Ročně se ve světě vyprodukuje kolem 1,5 mil tun vlny a více než 770 000 tun peří jako odpadu. Většina těchto odpadů končí na skládkách nebo ve spalovnách. [5,9,14]

2 HYDROLYTICKÉ ŠTĚPENÍ

Jedním ze způsobů zpracování keratinových odpadů je jejich štěpení na keratinové hydrolyzáty, které lze připravit několika různými způsoby. Během hydrolýzy 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 hydrolýza a v poslední době také často využívaná metoda rozkladu keratinolytickými a proteolytickými enzymy. Všechny tyto způsoby hydrolýzy mají řadu výhod i nevýhod. Mnoho nevýhod lze částečně odstranit vhodnou kombinací různých metod hydrolýzy. [22]

2.1 Alkalická hydrolýza

Alkalická hydrolýza je jedním z nejstarších a nejběžněji používaných způsobů rozkladu keratinu. Běžně se používají roztoky hydroxidů o vyšších koncentracích, kdy při vysoké teplotě můžeme dosáhnout téměř 100 % konverze nerozpustného keratinu na rozpustné keratinové hydrolyzáty. Alkalickou hydrolýzu vlny a peří lze například provádět v roztocích NaOH, KOH, Ca(OH)₂, aj. Bylo zjištěno, že se při těchto způsobech hydrolýzy mění aminokyselinové složení keratinových hydrolyzátů, a také klesá obsah dusíku. U hydrolyzátů připravovaných alkalickým způsobem se předpokládá nízká molární hmotnost (6,5 – 30 kDa) a vysoký obsah popelovin. Teplota alkalické hydrolýzy se nejčastěji volí v intervalu 60 – 100°C. Pro urychlení hydrolýzy lze využít i ohřevu mikrovlnným zařízením, kdy lze dosáhnout více než 70 % hydrolýzy původního materiálu již po 1 hodině. [10,23]

2.2 Kyselá hydrolýza

Keratinové hydrolyzáty, které jsou připravené kyselou hydrolýzou, se nejčastěji používají jako vzorky pro další analytické stanovení. Keratinové materiály jsou vysoce odolné proti působení kyselin, a proto se kyselá hydrolýza nejčastěji provádí v silných roztocích kyselin (6M HCl a 3M H₂SO₄) nejprve při teplotě 70°C a poté za varu. Tímto způsobem hydrolýzy lze rozložit více než 85% materiálu. Stejně jako u dříve popsané alkalické hydrolýzy je

možné i zde využít ohřevu mikrovlnným zářením, kdy došlo k úplnému rozkladu původního materiálu a značnému zkrácení doby hydrolýzy. [9,11]

2.3 Oxidační a redukční způsob

Oxidační i redukční způsob hydrolýzy keratinu se provádí velmi podobnými způsoby. Nejběžněji probíhá hydrolýza v prostředí močoviny, pufru a EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina) nebo SDS (dodecylsulfátu sodný) při 100°C. Při redukčním postupu hydrolýzy se jako redukční činidlo využívá 2-merkptoethanol, a lze tímto způsobem rozložit téměř 80 % keratinového materiálu. Oxidačním způsobem jsou štěpeny disulfidové vazby keratinu ionty obsahujícími síru, nejčastěji SO_3^{2-} a $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$. Po ukončení hydrolýzy se hydrolyzát čistí např. dialýzou a suší. [12,13]

2.4 Enzymová hydrolýza

Perspektivním a v posledních letech intenzivně zkoumaným způsobem zpracování keratinu je jeho štěpení proteolytickými (štěpí -CO-NH- vazbu) a keratinolytickými (štěpí -S-S- vazbu) enzymy produkovanými bakteriemi nebo houbami. Průmyslově se nejčastěji používají alkalické proteinázy. Mezi výhody používání enzymů patří mírné podmínky hydrolýzy (teplota, pH, tlak), malé množství dávkovaných enzymů a široká distribuce molekulových hmotností připravených hydrolyzátů. Mezi nevýhody naopak může patřit složitější práce s bakteriemi a nutnost udržování stálého reakčního prostředí a poměrně dlouhý čas reakcí (3-7 dnů). Nevýhodou je také vysoká cena již izolovaných enzymů. Pro hydrolýzu keratinu enzymatickým štěpením se nejčastěji používají enzymy získané z bakterií rodu *Bacillus* a *Streptomyces*. Průběh enzymových hydrolýz bývá následující: keratinové materiály se pomelou, odtuční a smíchají s reakčním prostředím, kam se po úpravě pH a teploty přidají bakterie nebo čisté enzymy. Po hydrolýze je nerozložený materiál separován a v kapalném hydrolyzátu dojde změnou teploty nebo pH k inaktivaci enzymu. [15-17]

2.5 Kombinovaný způsob

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

Prvním způsobem kombinované hydrolýzy je metoda, kdy je keratinový materiál předupraven ve směsi oxidačních činidel a následně se štěpí enzymy. V prvním kroku se hydrolyzují disulfidové vazby SO_3^{-2} ionty a v druhém kroku se částečně hydrolyzovaný materiál zpracovává v roztoku proteinázy. [24]

Druhým používaným způsobem je alkalicko-enzymová hydrolýza, kde je v prvním kroku keratinový materiál částečně rozrušen v roztoku hydroxidu a poté dále hydrolyzován enzymem pracujícím v alkalické oblasti pH. Keratinové materiály se v alkáliích dobře rozpouštějí již při nízkých koncentracích. Alkálie naruší strukturu materiálu a to způsobuje, že enzymová hydrolýza poté probíhá rychleji. [18]

3 APLIKACE KERATINU

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

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

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

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

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

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

4 APLIKACE KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ

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

4.1 Použití keratinových hydrolyzátů v zemědělství

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

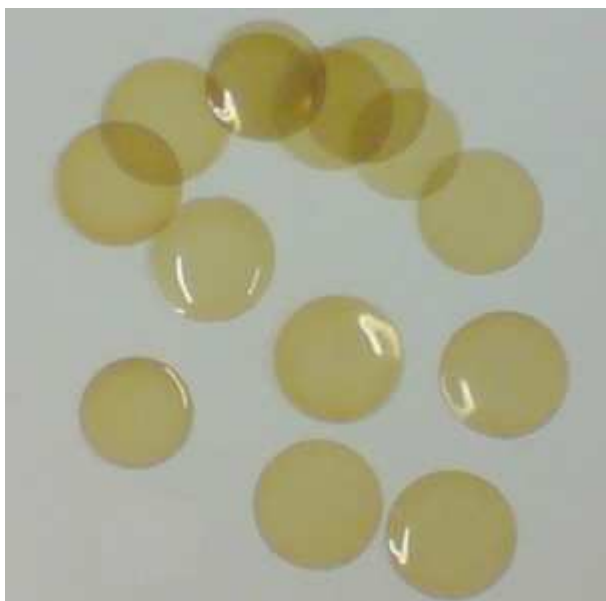
Jelikož téměř 95% hmotnosti keratinových hydrolyzátů tvoří čisté bílkoviny s vysokým obsahem esenciálních aminokyselin, využívá se hydrolyzátů také jako přísad do krmiv pro dobytek a drůbež. Jejich velkou výhodou je i snadné zpracování a z toho vyplývající nízká cena. Krmiva se v minulosti vyráběla v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

4.2 Použití keratinových hydrolyzátů v obalové technice

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

Vodné roztoky redukováného keratinu se používají také na přípravu mikrokapsulí. V praxi se mikrokapsule připravují nejčastěji ultrazvukovou vibrací. Enkapsulují se zejména barvi-

va, ochucovadla, vůně, léčiva, oleje nebo tuky. Keratinové hydrolyzáty je možné použít jako povlaky a obaly na maso, drůbež a ryby. [3,12,13]



Obr. 4 – Keratinové filmy

4.3 Použití keratinových hydrolyzátů v kosmetice a lékařství

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

4.4 Další aplikace

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

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

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 MATERIÁLY A METODY

5.1 Použité chemikálie

Škrob – 1% roztok ve vodě (Sigma-Aldrich)

Kyselina sírová – 10% roztok, koncentrovaná (Lukeš)

Jod – 0,0245M (Lukeš)

Kyselina dusičná – koncentrovaná (Lukeš)

Peroxid vodíku – 30 roztok (Lukeš)

Chlorid barnatý – 10% roztok (Lukeš)

Thiosíran sodný pentahydrát – 25% roztok (Lukeš)

Hydroxid sodný – 50% roztok (Lukeš)

Kyselina boritá – 2% roztok (Lukeš)

Glycerol (Lukeš)

Dialdehyd škrobu (Sigma-Aldrich)

Kyselina askorbová (Lukeš)

5.2 Použité přístroje

Mineralizátor Hach Digesdahl Digestion (Dange USA)

Parnas-Wagnerova destilační aparatura (Česká republika)

Muflová pec Labotherm L9/11/S27 (Nabertherm Německo)

Inkubátor Louvibond (Rakousko)

Třepačka LT2 (Česká republika)

Topné hnízdo 2000ml LTHS 2000 (Brněnská Drutěva, České republiky)

Elektronické analytické váhy KERN 440-47 (Německo)

Magnetická míchačka s ohřevem Ika – RTC Basic (Německo)

Sušárna Binder WTB (Německo)

5.3 Příprava keratinového hydrolyzátu

Keratinový hydrolyzát byl připraven dvoustupňovou alkalicko-enzymovou hydrolyzou ovčí vlny. Surová vlna byla před samotnou hydrolyzou vyprána nejprve jen ve vlažné vodě a poté i s přidáním mycího prostředku. Následně byla odtučněna enzymaticky (enzym Lipex 100T). V posledním kroku úpravy byla vysušená vlna rozemleta v nožovém mlýně.

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

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

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



Obr. 5 – Ovčí vlna (vlevo) a keratinový hydrolyzát (vpravo)

5.4 Analytické zkoušky keratinového hydrolyzátu

5.4.1 Mikrochemické stanovení dusíku – AOAC 960.52

K navážce asi 0,2 g keratinového hydrolyzátu se přidá 5,6 ml kyseliny sírové a 20 ml 0,02N kyseliny chlorovodíkové. Přidá se tableta katalyzátoru a roztok se mineralizuje při teplotě 480 °C asi 1,5 hodny. Po mineralizaci se roztok nechá zchladnout, přelije se do

50 ml odměrné baňky a zředí se vodou. Do Parnas-Wagnerovy destilační aparatury odpipe-tujeme 25 ml vzorku a přidáme 20 ml směsi thiosíranu sodného s hydroxidem sodným. Jímáme do 15 ml kyseliny borité. Destilujeme 20 minut od varu. Přidáme několik kapek indikátoru a roztok titrujeme 0,02N kyselinou chlorovodíkovou do růžového zbarvení

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

5.4.2 Stanovení obsahu síry srážením roztokem chloridu barnatého – AOAC 955.48

Do Kjeldahlovy baňky se naváží 1g keratinového hydrolyzátu, přidá se 50 ml koncentrované kyseliny dusičné a směs se vaří nad kahanem 2 hodiny a každých 15 minut přidáváme 3 ml 30% peroxidu. Po mineralizaci roztok ochladíme a přelijeme do 200 ml odměrné baňky. Roztok zfiltrujeme do 600 ml kádinky přes středně hustý filtr a zahřejeme k varu. Za stálého míchání přidáváme 120 ml horkého 10% roztoku chloridu barnatého. Směs mi-nutu intenzivně mícháme a poté vaříme další hodinu, po uplynutí doby ji necháme odležet v digestoři 24 hodin a vzniklou sraženinu poté přefiltrujeme přes hustý filtrační papír. Fil-trační papír se sraženinou se vysuší při 103 °C a poté opatrně zpopelní v žihacím kelímku a dále se žihá v muflově peci při 800 °C asi 2 hodiny. Po ochlazení v exsikátoru se kelímek zvaží.

$$c(\text{SO}_4^{2-}) = \frac{m * 0,412 * 100}{n} [\%]$$

$$c(S) = \frac{M(S)}{M(\text{SO}_4^{2-})} * c(\text{SO}_4^{2-}) [\%]$$

$c(\text{SO}_4^{2-})$ – množství síranů v %

m – hmotnost sraženiny BaSO_4 v g

n – navážka vzorku na stanovení v g

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

$c(S)$ – množství síry v %

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

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

5.4.3 Stanovení sušiny – ČSN EN ISO 665

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

5.4.4 Stanovení popela – ČSN ISO 2171

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

Složení keratinového hydrolyzátu bylo zkoumáno výše popsanými metodami. Mimo stanovení obsahu síry byly vždy provedeny dvě měření, z nichž byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Výsledky analytických zkoušek jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 3 – Hodnoty analytických zkoušek u keratinového hydrolyzátu

Stanovení	%	Směrodatná odchylka
Stanovení obsahu dusíku	13,62	0,19
Stanovení obsahu síry	0,88	-
Stanovení obsahu sušiny	96,53	0,02
Stanovení obsahu popela	3,55	0,29

5.5 Postup přípravy tablet

Na výrobu tablet byly připraveny 2 směsi. Při přípravě první směsi bylo rozpuštěno 10 g keratinového hydrolyzátu v 10 ml destilované vody a poté byly přidány 3 g změkčovadla

(glycerolu). Směs byla zahřívána na vodní lázni při 30 °C za stálého míchání, aby se co nejlépe zhomogenizovala. Po dostatečném rozmíchání byl přidán 1 g kyseliny askorbové (vitamín C) a směs byla dále zahřívána na vodní lázni. Bylo připraveno 24 g směsi, která byla dále rozdělena na poloviny. Do jedné dávky bylo přidáno 0,05 g dialdehydu škrobu, který sloužil jako síťovadlo a opět byla směs důkladně zhomogenizována.

Takto připravené dvě různé směsi byly pečlivě dávkovány do pryžových forem. Naplněné formy byly sušeny v sušárně s nuceným oběhem vzduchu 72 hodin při teplotě 60 °C. Po vysušení jsme získali asi 25 tablet z každé směsi. Aby bylo získáno potřebné množství tablet, byl postup přípravy opakován.

Získali jsme 2 druhy tablet z keratinového hydrolyzátu, které obsahovaly vitamín C jako aktivní látku. Jeden druh tablet obsahoval navíc ještě síťovadlo. Před vlastním rozpouštěním byla každá tableta zvážena a bylo vypočítáno množství vitamínu C v jednotlivých tabletách.



Obr. 6 – Tablety z keratinových hydrolyzátů

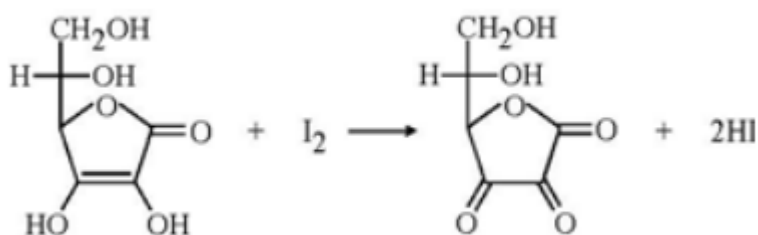
5.6 Rozpouštění

Tablety byly vkládány do 200 ml Erlenmayerových baněk se zátkou. Vzorky byly rozpouštěny v 50 ml destilované vody v inkubátoru při konstantní teplotě 37 °C. V inkubátoru byly baňky třepány po celou dobu rozpouštění. Byla zvolena nízká intenzita třepání, aby nedo-

cházel k rychlému rozpadu tablet. Volené časy rozpouštění byly 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 a 120 minut. Ihned po uplynutí zvoleného času byla baňka s tabletou vyjmuta z inkubátoru a bylo provedeno stanovení obsahu rozpuštěné kyseliny askorbové.

5.7 Stanovení obsahu uvolněné kyseliny askorbové

Stanovení obsahu vitamínu C v roztoku 50 ml destilované vody, ve kterém se rozpouštěla tableta po daný čas, se provádělo jodometrickou titrací. Kyselinu askorbovou neboli vitamín C ($C_6H_8O_6$) lze v kyselém prostředí stechiometricky oxidovat jodem na kyselinu dehydroaskorbovou ($C_6H_6O_6$), přičemž jedna molekula kyseliny askorbové reaguje právě s jednou molekulou jodu.



Obr. 7 – Reakční schéma jodometrické titrace

Z roztoku po rozpouštění byla nejprve vyjmuta tableta a roztok byl přelit do titrační baňky. Poté bylo přidáno 5 ml 10% kyseliny sírové a 5 ml škrobu. Titrační baňka byla umístěna na magnetické míchadlo a vzorek byl titrován roztokem jodu do tmavého zbarvení. Obsah vitamínu C v mg byl spočítán podle následující rovnice.

$$m = c \cdot V \cdot M$$

m – hmotnost vitamínu C v mg

c – koncentrace jodu

V – objem jodu v ml

M – molární hmotnost vitamínu C

6 VÝSLEDKY A DISKUSE

Směsi keratinových hydrolyzátů s aktivní látkou (kyselina askorbová) ve formě tablet byly podrobeny rozpouštění při konstantních podmínkách. Byla sledována hmotnost rozpuštěného vitamínu C, uvolněného ze dvou směsí, v závislosti na čase. Každý experiment byl proveden dvakrát a ze zjištěných výsledků byl vypočítán průměrný obsah uvolněného vitamínu C. Dále byla dopočítána směrodatná odchylka. Výsledky měření vyjádřené v procentech jsou uvedeny v následující tabulce.

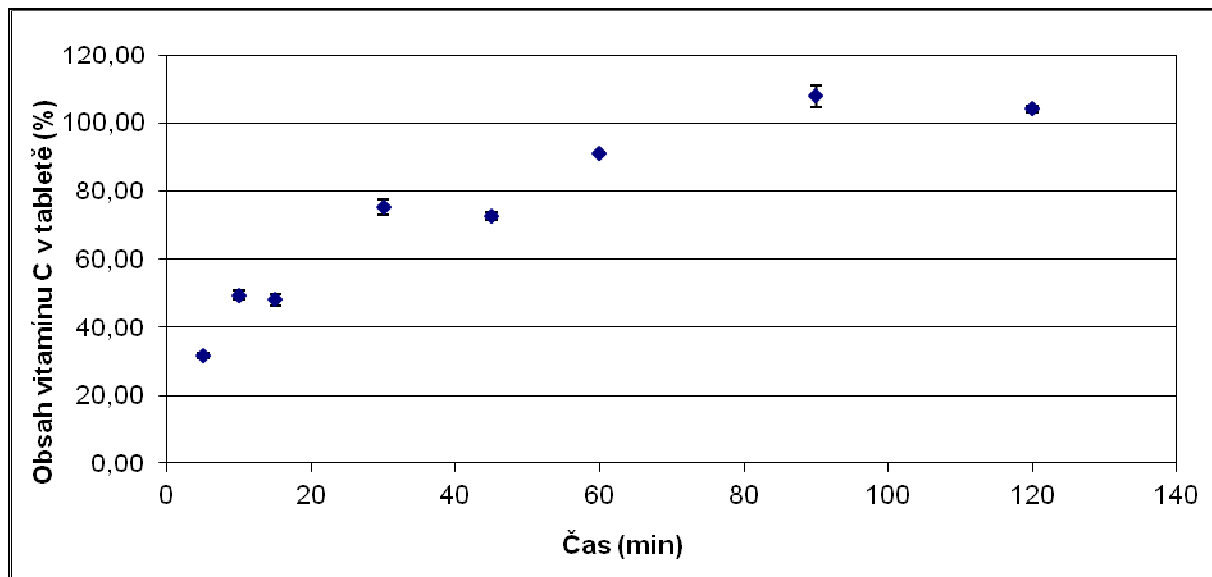
Tab. 4 – Výsledky rozpouštění vitamínu C v závislosti na čase pro dvě směsi keratinových hydrolyzátů.

Směs 1 (bez síťovadla)			Směs 2 (se síťovadlem)		
Čas [s]	Průměrné množství uvolněného vitamínu C [%]	Směrodatná odchylka	Čas [s]	Průměrné množství uvolněného vitamínu C [%]	Směrodatná odchylka
5	31,56	0,68	5	37,96	1,55
10	49,59	1,29	10	52,89	1,96
15	48,22	1,64	15	35,03	0,37
30	75,13	2,2	30	50,53	2,08
45	72,51	1,23	45	76,37	4,14
60	91,11	0,52	60	79,49	5,87
90	107,64	3,29	90	100,61	2,76
120	103,93	1,01	120	101,06	5,99

Z uvedených výsledků je patrné, že během prvních 5 minut rozpouštění se uvolnila značná část vitamínu C a to více než 30 %. Předpokladem bylo, že ze směsi se síťovadlem se bude vitamín C uvolňovat pomaleji než ze směsi bez síťovadla. Tento předpoklad se potvrdil až při delších časech rozpouštění, zatímco při krátkých časech (do 15 minut) bylo množství rozpuštěného vitamínu C podobné nebo vyšší. Po 90 minutách rozpouštění bylo u obou směsí zjištěno uvolnění veškerého vitamínu C. Výsledky s hodnotami vyššími, než 100 % mohou být vysvětleny chybou při titračním jodometrickém stanovení nebo nízkou citlivostí používané metody.

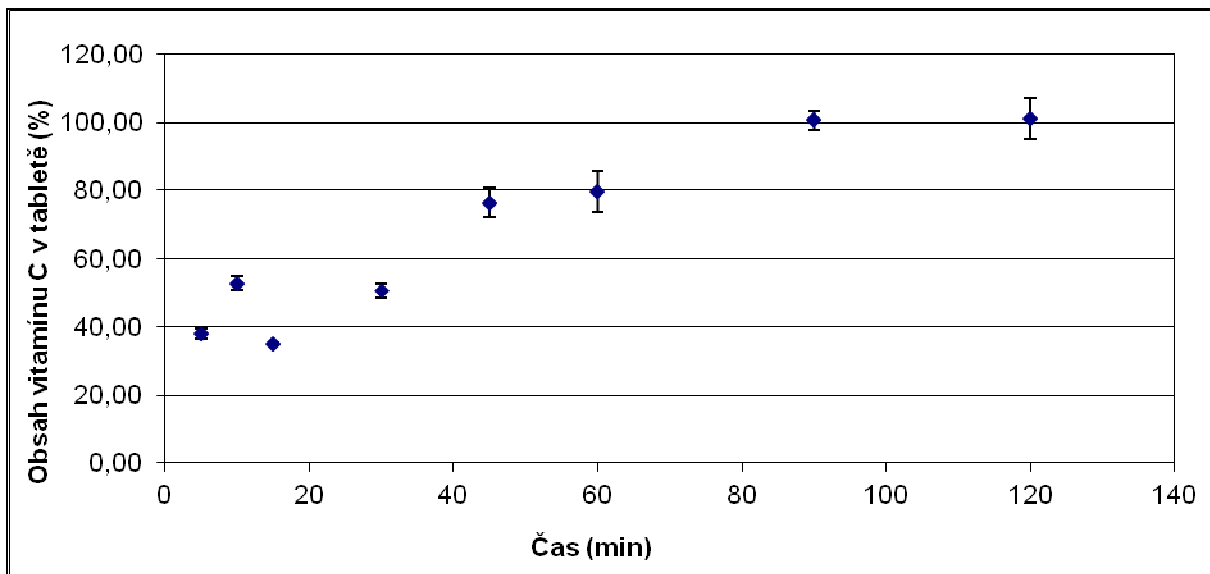
Na obrázku 8 je zobrazen průběh uvolňování kyseliny askorbové z tablet připravených ze směsi č. 1. V časech rozpouštění kratších než 1 hodina probíhalo uvolňování vitamínu C téměř lineárně a od času 60 minut, kdy bylo dosaženo přibližně 90 % rozpuštěného množ-

ství vitamínu C, klesá rychlost uvolňování. Nejrychleji se z připravených tablet uvolňovala kyselina askorbová v prvních 10 minutách, kdy jí bylo rozpuštěno téměř 50 %.



Obr. 8 – Závislost uvolněného vitamínu C ze směsi 1 (bez síťovadla)

Podobný trend jako u směsi 1 můžeme pozorovat také u směsi se síťovadlem (viz. Obrázek 9), kde bylo také v prvních 15 minutách rozpuštěno více než 50 % kyseliny askorbové. U této směsi došlo při 10 minutách rozpouštění k výrazné odchylce od ostatních hodnot, což mohlo být způsobeno vyšší počáteční hmotností rozpouštěných tablet a tím vyšším obsahem vitamínu C v těchto tabletách. Při vyšších časech rozpouštění již lze pozorovat vliv síťovadla na rychlost uvolňování vitamínu C, kdy po 60 minutách bylo z tablet připravených ze směsi se síťovadlem uvolněno o 10 % méně kyseliny askorbové než ze směsi bez síťovadla za stejnou dobu.



Obr. 9 – Závislost uvolněného vitamínu C ze směsi 2 (se síťovadlem)

Ze zjištěných výsledků lze vyvodit závěr, že připravený keratinový hydrolyzát lze použít jako nosič aktivních látek. Pro lepší řízení rychlosti uvolňování kyseliny askorbové z připravených tablet by bylo potřeba připravit kapsle s menší velikostí (menším povrchem), popřípadě otestovat přípravu mikrokapsulí. Druhým způsobem ovlivnění rychlosti uvolňování aktivních látek by mohlo být použití vyššího množství síťovadla, čímž by došlo k vytvoření hustší sítě mezi molekulami keratinu a tím k pomalejšímu rozpouštění a uvolňování. Další možností by mohlo být snížení obsahu změkčovadla ve směsi, ale tento způsob by vedl ke zvýšení křehkosti tablet a tím k horší manipulaci s nimi.

ZÁVĚR

Bakalářská práce se zabývá možnostmi zpracování keratinového odpadu na keratinové hydrolyzáty a jejich použití jako nosičů aktivních látek. V teoretické části jsou stručně charakterizovány biopolymery, bílkoviny a keratin. Dále pak hydrolytické štěpení keratinu na keratinové hydrolyzáty a aplikace těchto keratinových materiálů.

Experimentální část se zabývá popisem přípravy keratinových hydrolyzátů dvou-
stupňovou alkalicko-enzymovou metodou z ovčí vlny. Z těchto hydrolyzátů byly následně vyrobeny dvě směsi pro přípravu tablet, které se lišily pouze použitím síťovadla v jedné z nich. Ze směsí byly připraveny tablety, které obsahovaly aktivní látku (kyselina askorbová), ty byly podrobeny řízenému rozpouštění za definovaných podmínek ve zvolených časových intervalech. Množství uvolněného vitamínu C bylo zjišťováno jodometrickou titrací a výsledné hodnoty byly zpracovány. Množství rozpuštěného vitamínu C roste z počátku téměř lineárně během prvních 60 minut, kdy dojde k rozpouštění téměř 90 % obsaženého vitamínu C. Po 60 minutách rozpouštění rychlost klesá. Množství uvolněného vitamínu C z tablet ovlivňuje také přidání síťovadla ke keratinovému hydrolyzátu, které zvláště při delších časech zpomaluje rychlost rozpouštění tablet a tím i rozpouštění aktivní látky, v našem případě přibližně o 10 % po 60 minutách rozpouštění oproti tabletám bez síťovadla.

Závěrem lze prohlásit, že námi připravené vzorky tablet keratinových hydrolyzátů s aktivní látkou lze používat jako nosiče a přidáním síťovadla lze ovlivnit rychlost uvolňování přidávaných aktivních látek. Lepší řízení průběhu uvolňování vitamínu C by bylo možné ovlivnit velikostí tablet a obsahem přidaného síťovadla nebo změkčovadla.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ŠKÁRKA, B a FERENČÍK, M. *Biochémiá*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1983, 635 s.
- [2] KOLÁŘ, K, KODÍČEK, M a Jiří POSPÍŠIL. *Chemie: pro gymnázia*. 2., upr. a dopl. vyd. Praha: SPN - pedagogické nakladatelství, 2005, 128 s. ISBN 80-7235-283-0.
- [3] MOKREJŠ, P. et al. *Aplikace přírodních polymerů*. 1. Vyd. Zlín, 2008. 90 s. ISBN 978-80-7318-674-6.
- [4] BLAŽEJ, A. *Technologie kůže a kožešin*. 1.vyd. Praha: SNTL – Nakladatelství Technické literatury, 1984, 451s.
- [5] 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.
- [6] GÜHRS, K, WEISSHART, K, GROSSE, F. Lessons from nature-protein fibers. *Journal of biotechnology: Reviews in molecular biotechnology*. 2000, 74(2), 121-134
- [7] SMITH, G. New trends in photobiology (invited review) photodegradation of keratin and other structural proteins. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1995, 27(3), 187-198. DOI: 10.1016/1011-1344(94)07104-V.
- [8] HILL, P, BRANTLEY, H, VAN DYKE, M. Some properties of keratin biomaterials: Keratines. *Biomaterials*. 2010, 31(4), 585-593. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.076.
- [9] SIMPSON, W a CRAWSHAW, G. *Wool: science and technology*. Cambridge, England: Woodhead, c2002, 368 s. ISBN 08-493-2820-9.
- [10] CARDAMONE, M. Keratin transamidation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2008, 42(5), 413-419. DOI: 10.1016/j.ibiomac.2008.02.004.
- [11] KURBANOGLU, E, B, KUBRANOGLU, N, I. A new process for the utilization as peptone of ram horn waste. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2002, 94(3), 202-206. DOI: 10.1016/S1389-1723(02)80150-5.
- [12] GENNADIOS, Aristippos. *Protein-based films and coatings*. Boca Raton: CRC Press, 2002, 650 s. ISBN 15-871-6107-9.

- [13] SCHROOYEN, P. *Feather keratins: modification nad film formation*. Enschede: University of Twente, 1999. ISBN 90-365-1302-2.
- [14] GRAZZIOTI, A. Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. *Animal feed science and technology*, vol. 126, 2006, p. 135-144
- [15] BRANDELLI, A. Bacterial Keratinases: Useful Enzymes for Bioprocessing Agro-industrial Wastes and Beyond. *Food and Bioprocess Technology*. 2008 1(2), 105-116. DOI: 10.1007/s11947-007-0025-y.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] DALEV, P, G. Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate. *Bioresource Technology*. 1994, 48(3), 265-267.
- [19] WOOL, R, P. *Bio-based polymers and composites*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, c2005, 620 s. ISBN 01-276-3952-7.
- [20] KARTHIKEYAN, R., BALAJ, S., SEHGAL P,K. Industrial applications of keratins – A review. *Journal of scientific*. 2007,66(9), 710-715.
- [21] REICHL, S. Films based on human hair keratin as substrates for cell culture and tissue engineering. *Biomaterials*. 2009, 30(36), 6854-6866. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.08.051
- [22] KREJČÍ, O, MOKREJŠ, P. Sledování vlivu technologických podmínek na účinnost rozkladu odpadní ovčí vlny. *Wasteforum*. 2010, 3(1), 35-42. Dostupné z: www.wasteforum.cz
- [23] GOUSTEROVA, A, BRAIKOVA, D, GOSHEV, I, CHRISTOV, P, TISHINOV, P, VASILEVA-TONKOVA, E, HAERTLE, T, a NEDKOV,P. Degradation of keratin and collagen containing wastes by newly isolated thermoactinomycetes or by alkaline hydrolysis. *Letters in Applied Microbiology*. 2005, roč. 40, č. 5, s. 335-340.

ISSN 02668254. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2005.01692.x. Dostupné z:
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.2005.01692.x>

- [24] BORE, P,M, ARNAUD, J,C. *Keratin polymer containing S-sulphocystein residues: process for its preparation and the compositions containing it* [patent]. 4,948,876, 218,220. Uděleno 14.8.1990. Zapsáno 13.7.1988.
- [25] GUPTA, R, RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, roč. 70, č. 1, s. 21-33. ISSN 01757598. DOI: 10.1007/s00253-005-0239-8. Dostupné z:
<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s00253-005-0239-8>
- [26] ALUIGI, A, VINEIS, C, CERIA, A, TONIN, C. Composite biomaterials from fibre wastes: Characterization of wool?cellulose acetate blends. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*. 2008, roč. 39, č. 1, s. 126-132. ISSN 1359835x. DOI: 10.1016/j.compositesa.2007.08.022. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359835X07001509>

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 – α -helix struktura keratinové molekuly.....	13
Obr. 2 – β -sheet (skládaný list) struktura keratinové molekuly.....	15
Obr. 3 – Vlas.....	16
Obr. 4 – Keratinové filmy.....	22
Obr. 5 – Ovčí vlna (vlevo) a keratinový hydrolyzát (vpravo)	25
Obr. 6 – Tablety z keratinových hydrolyzátů	28
Obr. 7 – Reakční schéma jodometrické titrace	29
Obr. 8 – Závislost uvolněného vitamínu C ze směsi 1 (bez síťovadla)	31
Obr. 9 – Závislost uvolněného vitamínu C ze směsi 2 (se síťovadlem)	32

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 – Rozdělení bílkovin.....	12
Tab. 2 – Aminokyselinové složení keratinu	14
Tab. 3 – Hodnoty analytických zkoušek u keratinového hydrolyzátu.....	27
Tab. 4 – Výsledky rozpuštění vitamínu C v závislosti na čase pro dvě směsi keratinových hydrolyzátů.....	30