

Příprava keratinového hydrolyzátu alkalicko-enzymovým rozkladem ovčí vlny

Bc. Lucie Brázdová

Diplomová práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie BRÁZDOVÁ**
Studijní program: **N 2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Technologie a management**

Téma práce: **Příprava keratinového hydrolyzátu
alkalicko-enzymovým rozkladem ovčí vlny**

Zásady pro vypracování:

- 1. Keratin (složení, vlastnosti, výskyt, zpracování a využití)**
- 2. Příprava a využití hydrolyzátů keratinu**
- 3. V experimentální části vypracování a optimalizace postupu přípravy keratinového hydrolyzátu**
- 4. Sledování vlivu zvolených parametrů na účinnost rozkladu**
- 5. Zpracování a diskuze výsledků a zhodnocení přínosu práce**

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. Simpson, W. S., Crawshaw, G. H. Wool: Science and technology. Woodhead Publishing, 2002.

2. Mládek, M. a kol. Zpracování odpadů kožedělného průmyslu. 1. vyd. Praha SNTL, 1971.


3. Nnanna, I. A., Xia, J. Protein-based surfactants. Marcel Dekker, 2001.

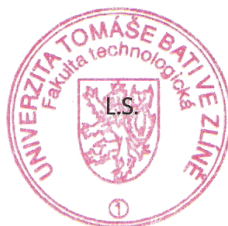
Vedoucí diplomové práce: **Ing. Ondřej Krejčí**
Ústav inženýrství polymerů

Datum zadání diplomové práce: **15. února 2010**

Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2010**

Ve Zlíně dne 15. února 2010


doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan





doc. Ing. Roman Čermák, 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 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 21. 5. 2010


.....

ABSTRAKT

Diplomová práce se v teoretické části zabývá keratinem, jeho strukturou a vlastnostmi, dále přípravou keratinových hydrolyzátů a jejich aplikacemi. Praktická část je zaměřena na zpracování odpadní ovčí vlny dvoustupňovou alkalicko–enzymovou hydrolyzou, při níž byl sledován vliv vybraných parametrů na účinnost hydrolyzy. Byla použita metodika dvouúrovňových statistických faktorových pokusů se třemi sledovanými parametry: koncentrace alkalického prostředí ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) při hydrolyze, teplota 1. stupně hydrolyzy a teplota 2. stupně hydrolyzy. V 1. stupni byla vlna hydrolyzována roztokem $\text{Ca}(\text{OH})_2$ po dobu 24 hodin a ve 2. stupni byla dále rozkládána enzymem dalších 24 hodin. Příkladek enzymu byl konstantní a byly použity dva různé enzymy Esperase 6.0 T a Everlase 6.0 T. Byly stanoveny optimální podmínky hydrolyzy. Získaný keratinový hydrolyzát by mohl najít uplatnění v obalové technice a zemědělství jako doplněk krmivo pro dobytek.

Klíčová slova: ovčí vlna, keratinový hydrolyzát, hydrolyza, keratin, pevný odpad

ABSTRACT

This master thesis in its theoretic part deals with keratin, its structure and properties, further treatment of waste wool to the keratin hydrolysates and its applications are described. The practical part is aimed at processing of waste sheep wool by two-stage alkali-enzymatic hydrolysis; influences of selected conditions on hydrolyses effectiveness were observed. Two-level statistical factorial-test method with three monitored conditions was used: concentration of alkali ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) during hydrolysis, temperature in the 1st stage of hydrolysis and temperature in the 2nd stage of hydrolysis. In the 1st stage the wool was hydrolysed using $\text{Ca}(\text{OH})_2$ for 24 hours. In the 2nd stage the wool was decomposed by enzyme for 24 hours. Amount of enzyme was constant, and two different enzymes were used (Esperase 6.0 T and Everlase 6.0 T). Optimal conditions of hydrolysis were designated. Gained keratin hydrolysate could be used in wrapping technology and agriculture like an animal feed supplement.

Keywords: sheep wool, keratin hydrolysate, hydrolysis, keratin, solid waste

Děkuji vedoucímu diplomové práce Ing. Ondřeji Krejčímu za odborné vedení, důležité rady a připomínky při tvorbě diplomové práce. Zároveň velmi děkuji laborantkám paní Věře Kymlové, Renatě Zelinové a Miroslavě Žalůdkové za obětavou pomoc při experimentech.

V neposlední řadě patří velký dík i celé mé rodině za trpělivost, pomoc a intenzivní podporu během celého studia.

Prohlašuji, že jsem na celé diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala.

V Olomouci, 14. 5. 2010

.....

podpis

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 KERATIN	11
1.1 CHEMICKÉ SLOŽENÍ KERATINŮ	11
1.2 MAKROMOLEKULÁRNÍ STRUKTURA KERATINŮ	13
1.3 CHEMICKÉ REAKCE KERATINU	15
1.3.1 Reakce s vodou.....	16
1.3.2 Působení kyselin.....	16
1.3.3 Působení zásad	16
1.3.4 Působení oxidačních činidel.....	17
1.3.5 Působení redukčních činidel.....	18
2 STAVBA, SLOŽENÍ A VLASTNOSTI OVČÍ VLNY	19
2.1 MORFOLOGICKÁ A HISTOLOGICKÁ STAVBA OVČÍ VLNY	19
2.1.1 Základní typy vláken	21
2.2 SLOŽENÍ OVČÍ VLNY	22
2.3 VLASTNOSTI OVČÍ VLNY	22
2.3.1 Jemnost vlny.....	22
2.3.2 Délka vlny	23
2.3.3 Zkadeření vlny (obloučkovitost)	23
2.3.4 Barva vlny	23
2.3.5 Lesk vlny	23
2.3.6 Vlhkost vlny	24
2.3.7 Mechanické vlastnosti vlny.....	24
3 ZPRACOVÁNÍ KERATINOVÝCH ODPADŮ	25
3.1 PŘÍPRAVA KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ	25
3.2 PŘÍPRAVA KERATINOVÝCH FILMŮ.....	29
4 APLIKACE KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ	31
II PRAKTICKÁ ČÁST	32
5 PLÁNOVÁNÍ EXPERIMENTŮ	33
6 MATERIÁLY A POSTUPY PRÁCE	36
6.1 VSTUPNÍ MATERIÁL	36
6.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	36
6.3 POUŽITÉ PŘÍSTROJE	38
6.4 POUŽITÉ POMŮCKY	38
6.5 POSTUP PRÁCE.....	39
6.5.1 Předúprava vlny.....	39
6.5.2 Alkalicko – enzymová hydrolýza ovčí vlny	40

6.6	ANALYTICKÉ METODY	42
6.6.1	Stanovení obsahu popelovin	42
6.6.2	Stanovení síry	43
6.6.3	Mikrochemické stanovení dusíku – Micro-Kjeldahlova metoda (upravený postup).....	44
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	46
7.1	ALKALICKO–ENZYMOVÁ HYDROLÝZA OVČÍ VLNY S ENZYMEM ESPERASE 6.0T	46
7.2	ALKALICKO–ENZYMOVÁ HYDROLÝZA OVČÍ VLNY S ENZYMEM EVERLASE 6.0T	50
7.3	VÝSLEDKY STANOVENÍ ANALYTICKÝCH METOD	54
7.3.1	Výsledky stanovení obsahu popelovin	54
7.3.2	Výsledky stanovení síry.....	55
7.3.3	Výsledky stanovení dusíku.....	56
7.4	POROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ	57
	ZÁVĚR	58
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	60
	SEZNAM OBRÁZKŮ	64
	SEZNAM TABULEK.....	65
	SEZNAM PŘÍLOH.....	66

ÚVOD

Kožedělný a masný průmysl produkuje značné množství nejrozmanitějších odpadů. Tyto odpady mohou přispívat ke znečištění životního prostředí. Počítá se, že asi 30 – 40% primární suroviny kožedělného průmyslu přechází na odpad. Odpady z kožedělných a masozpracujících výrobních (odpadní tuk, odpadová srst, keratinové odpady apod.) obsahují pestré směs látek chemického a biologického charakteru. Tyto odpady mohou být inertní, biologicky rozložitelné i nebezpečné. Převážnou část jich lze výhodně využít a zhodnotit. Keratinové odpady se vyznačují vysokým obsahem nerozpustné bílkoviny keratinu, která tvoří jejich hlavní součást. Mezi nejdůležitější keratinové odpady patří srst, vlna a štětiny, nevhodné pro jiné účely zpracování, dále rohy, kopyta, paznehty a peří. Například odpadní ovčí vlna obsahuje cca 90% keratinu. Keratinové odpady lze zpracovat na keratinové hydrolyzáty, které lze využít např. v zemědělství, kosmetickém průmyslu a jiných odvětvích.

Tato práce se zabývá zpracováním odpadní ovčí vlny na keratinový hydrolyzát dvoustupňovou alkalicko–enzymovou hydrolyzou, s návrhem optimálních podmínek rozkladu. Před zahájením hydrolyzy bylo třeba vlnu vyprat, vysušit a odtučnit. Jednotlivé experimenty byly naplánovány metodou faktorových pokusů 2^3 , tzn. pokusy se třemi sledovanými faktory při dvou úrovních (minimální a maximální) se dvěma středovými pokusy. Byly sledovány 3 veličiny, které ovlivňují rozklad vlny: koncentrace hydroxidu vápenatého, teplota 1. fáze hydrolyzy a teplota 2. fáze hydrolyzy. Experimenty byly provedeny se dvěma různými enzymy s jejich konstantním přídatkem.

Po rozkladu byla zbylá nerozložená tuhá fáze a kapalná fáze (keratinový hydrolyzát) oddělena a gravimetricky bylo zjištěno procento nerozložené vlny. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny v programu Statgraphics verze 6,0 a byly stanoveny optimální podmínky rozkladu ovčí vlny.

Získané keratinové hydrolyzáty a nerozložené tuhé fáze byly podrobeny analytickým metodám, při kterých byl stanoven obsah popela, sušiny, dusíku a síry.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KERATIN

Název keratin je odvozený z řeckého slova k \acute{e} ras a značí rohovinu nebo roh. Keratin patří do skupiny fibrilárních (vláknitých) proteinů, které mají silně protáhlé molekuly, jejichž sekundární struktura má dominantní charakter. Mnoho fibrilárních proteinů kůže, šlach a kostí slouží jako stavební materiály, které mají ochrannou, spojovací nebo podpůrnou úlohu v živých organismech. Proteiny svalů a bičků mají pohybové funkce. Fibrilární proteiny málokdy krystalizují, a tak nelze obvykle určit jejich strukturu rentgenovou analýzou. Tyto proteiny se spíše shlukují do vláken, v kterých jsou osy jejich molekul víceméně souběžné s osou vlákna, ale kde postrádají specifickou orientaci v jiných směrech. Rentgenový difrakční obrazec takového vlákna obsahuje málo informací, daleko méně, než by bylo možno získat z krystalického proteinu, a proto nejsou struktury fibrilárních proteinů podrobně známy. [1, 2]

Bílkoviny patřící do skupiny keratinů jsou ve většině běžných rozpouštědel nerozpustné a odolné vůči zředěným roztokům kyselin. Keratin je mechanicky odolný a chemicky nereaktivní protein, vyskytující se u všech vyšších obratlovců. Je hlavní složkou jejich vnější rohovité epidermální vrstvy a z ní vyrůstajících útvarů, jako jsou vlasy, rohovina, nehty a peří. Keratiny rozdělujeme na α -keratiny, které se vyskytují u savců, a β -keratiny, vyskytující se u ptáků a plazů. [1, 2]

1.1 Chemické složení keratinů

Keratin je polymer obsahující polypeptidové řetězce. V keratinu bylo doposud identifikováno okolo dvaceti různých látek, jejich podíl závisí na typu keratinu. Chemické složení a struktura keratinových útvarů kůže (srsti, pokožky, vlasy, apod.) ukazuje na velkou míru heterogenity. Keratin nemůžeme považovat za jedinou bílkovinu, ale za biologický útvar vytvořený z řady vzájemně se dost lišících bílkovin. Společným znakem těchto bílkovin je jejich nerozpustnost ve vodě, odolnost proti působení proteolytických enzymů a přítomnost příčných vazeb disulfidického typu. [3, 7]

Nejtypičtějším ukazatelem bílkovin skupiny keratinů je vysoký obsah tioaminokyselin, a to cystinu, cysteinu a metioninu. Nejvýznamnější aminokyselina keratinu je cystin a spolu s cysteinem má významnou úlohu jako redoxsystém při dýchání v buňkách. Po od-

umření buněk převládá proces oxidační nad redukčním, a tím nastává proces keratinizace – rohovatění. [4]

Především α -keratin je bohatý na cysteinové zbytky, které spojují příčnými vazbami sousední polypeptidové řetězce. Tím jsou vysvětleny jeho dvě nejdůležitější biologické vlastnosti, nerozpustnost a pevnost v ohybu. α -Keratiny jsou buď „tvrdé“ nebo „měkké“, podle toho, zda mají vysoký nebo nízký obsah síry. Tvrdé keratiny vlasů, rohoviny a nehtů jsou méně pružné než měkké keratiny kůže a mozolů, protože disulfidické vazby odolávají deformačním silám. Disulfidické vazby lze redukčně štěpit merkaptany. Celkový obsah síry v keratinu bývá v rozmezí od 2 do 5% na sušinu. [2, 4]

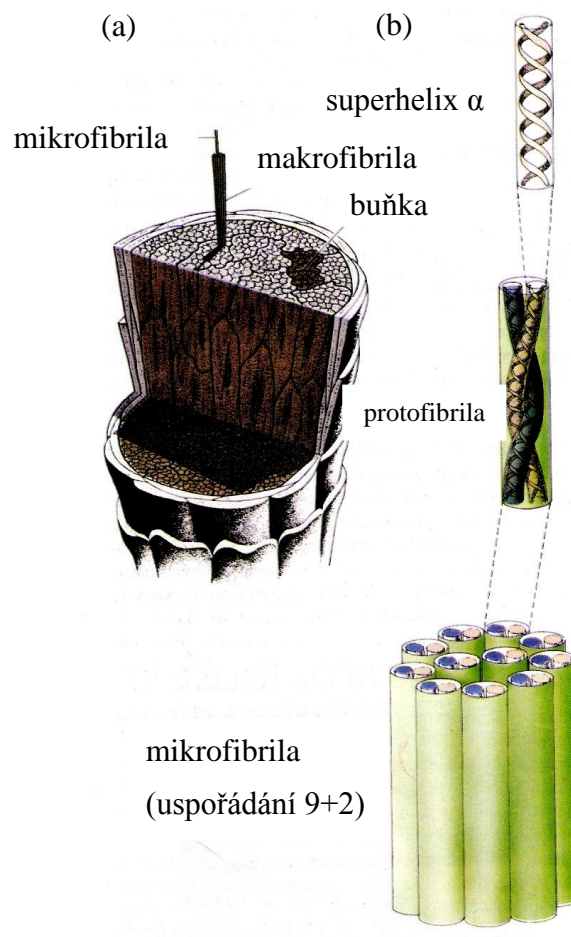
Další typické znaky aminokyselinového složení keratinů jsou poměrně vysoký obsah argininu (6 – 11%), nízký obsah histidinu (0,6 – 1,5%), střední množství lysinu a přítomnost tryptofanu. Dále je z tabulky 1 vidět, že keratiny obsahují poměrně velké množství hydroxyaminokyselin – serinu a treoninu a monoaminodikarbonových kyselin – asparagové a glutamové. [4]

Tabulka 1: Aminokyselinové složení různých keratinů

Složení	Epidermis člověka (%)	Lidský vlas (%)	Ovčí vlna (%)	Rohy velkého skotu (%)
Celkový N	14,2-15,5	15,5-16,9	16,2-16,9	14,8-16,9
Amidový N	1,16	1,17	1,10-1,37	1,14
Celková S	1,9	5,0-5,24	3,0-4,0	3,77-3,9
Glycin	6-13,8	4,1-4,2	5,2-6,5	9,6
Alanin	-	2,8	3,4-4,4	2,5
Valin	4,2-5,6	5,5-5,9	5,0-5,9	5,3-5,5
Leucin	8,3	6,4-8,3	7,6-8,1	7,6-8,3
Isoleucin	6,8	4,7-4,8	3,1-4,5	4,3-4,8
Fenylalanin	2,8	2,4-3,6	3,4-4,0	9,2-4,0
Prolin	3,2	4,3-9,6	5,3-8,1	8,2
Serin	16,5	7,4-10,6	7,2-9,5	6,8
Treonin	3,4	7,0-8,5	6,6-6,7	6,1
Tyrozín	3,4-5,7	2,2-3,0	4,0-6,4	3,7-5,6
Kys.asparagová	6,4-8,1	3,9-7,7	6,4-7,3	7,7-7,9
Kys.glutamová	9,1-15,4	13,6-14,2	13,1-16,0	13,8
Arginin	5,9-11,7	8,9-10,8	9,2-10,6	6,8-10,7
Lysin	3,1-6,9	1,9-3,1	2,8-3,3	2,4-3,6
Oxilysin	-	0	0,2	-
Histidin	0,6-1,8	0,6-1,2	0,7-1,1	0,6-1,0
Tryptofan	0,5-18	0,4-1,3	1,8-2,1	0,7-1,4
Cystin	2,3-3,8	16,6-18,0	11,0-13,7	10,5-15,7
Methionin	1,0-2,5	0,7-1,0	0,5-0,7	0,5-2,2
Cystein	-	0,4	0,4	0,8-1,6

1.2 Makromolekulární struktura keratinů

Struktura keratinových útvarů je charakterizována fibrilární částí a určitým podílem základní amorfni látky – matrixu. Matrix vyplňuje prostor mezi vřetenovitými buňkami a je intramolekulárně zesíťován cystinem. Jednou z hlavních skupin keratinů jsou α -keratiny, které jsou tvořeny pravotočivým polypeptidovým řetězcem s α -helikální strukturou. Jejich relativní molekulová hmotnost dosahuje až 50 000 kDa. Vřetenovité buňky keratinového vlákna se skládají z mikrofibril (s průměrem 6 – 8 nm), které se spojují do makrofibril (s průměrem 200 nm). Mikrofibrily se dále skládají z protofibril (s průměrem 2 nm), které tvoří peptidickými řetězci α -struktury. Devět protofibril je uspořádáno v kruhu po obvodě mikrofibrily, a dvě tvoří jádro tohoto útvaru. Tento strukturní motiv „9 + 2“ se často vyskytuje v bičících, které používají eukaryotní buňka při svém pohybu. [2, 5, 8]

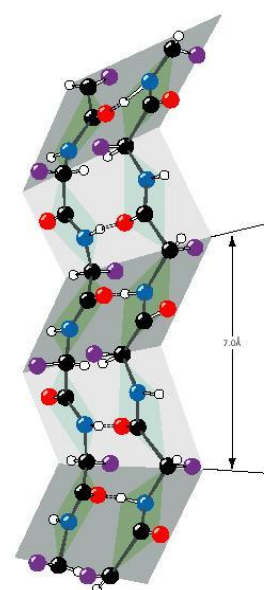
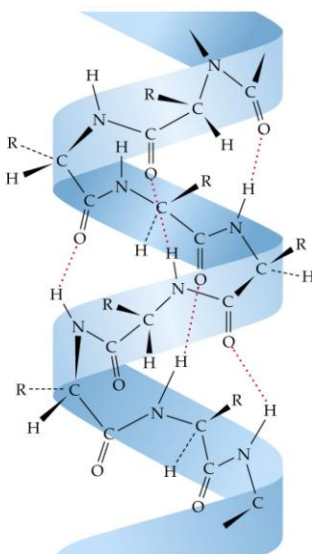
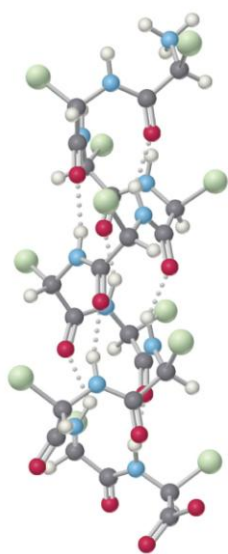


Obr. 1: (a) makroskopická struktura, (b) molekulová struktura vlasu

Rentgenové difrakční obrazce α -keratinu se podobají obrazcům α -helixu. α -Keratin má však výšku závitu 0,51 nm zatímco α -helix 0,54 nm. Tento fakt společně s množstvím

fyzikálních a chemických údajů naznačuje, že každá z protofibril α -keratinu se skládá ze dvou párů těsně spojených α -helixů, tedy vlastně ze dvou nadšroubovic, které jsou svinuty v levotočivou šroubovici. Normální výška závitů 0,54 nm každé α -šroubovice je tak změněna vzhledem k ose protofibrily, a má hodnotu 0,51 nm. Toto uspořádání se nazývá nadšroubovice (superhelix), protože osa každého α -helixu v této struktuře má šroubovicovitý tvar. [2]

Protážením keratinového vlákna (ve vlhkém stavu až o 100%) dochází k přestavbě α -struktury na zřasenou β -strukturu (struktura skládaného listu) s paralelním uspořádáním (s průměrem 4 nm). Tuto změnu α -struktury na zřasenou β -strukturu lze pozorovat pomocí rentgenové difrakce. Při zahřívání s vodou se keratinová vlákna vlny nevratně smršťují v důsledku reorganizace vodíkových nebo jiných nekovalentních vazeb. [5, 12]

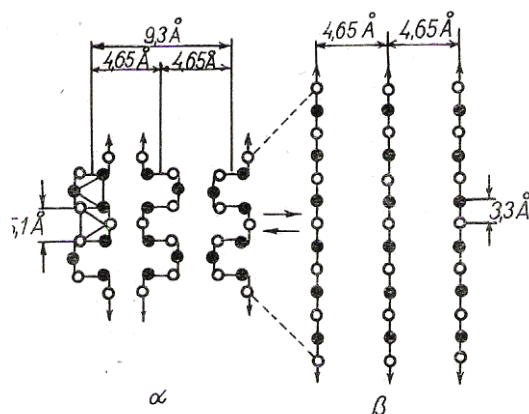


Obr. 2: Spirálová struktura α -keratinu

Obr. 3: Struktura β -keratinu

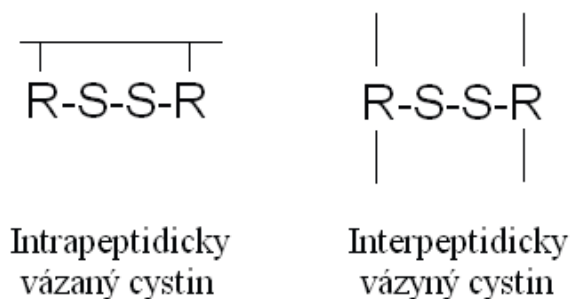
Pro pochopení strukturního modelu bílkovin, nestačí znát jen detailní konfiguraci polypeptidového řetězce, ale i molekulární strukturu dané bílkoviny a její agregační formy. Normální strukturní forma keratinů je α -struktura. α -Struktura keratinu se může modifikovat v přítomnosti vody a polárních sloučenin na β -strukturu. Přejít spirály alfa na konfiguraci beta můžeme charakterizovat tak, že keratin ve formě alfa je v nenataženém stavu a skupiny CO a NH peptidických vazeb tvoří intrapeptidické vodíkové vazby. Tyto vazby se roztážením poruší. [4]

Obecně, tuhost β -struktury je vyšší než u α -struktury. Mechanické vlastnosti a chování α -keratinu i β -keratinu závisí na obsahu vlhkosti, se zvyšujícím se obsahem vlhkosti klesá tuhost keratinů. [12]



Obr. 4: Přechod α -formy keratinu na β -formu keratinu

Na všechny strukturální formy keratinů má do značné míry vliv přítomnost cystinu a jeho možnost vázat se intrapeptidicky (uvnitř polypeptidického řetězce) nebo interpeptidicky (příčná disulfidická kovalentní vazba mezi dvěma sousedními řetězci).



Obr. 5: Způsoby vázání cystinu v peptidovém řetězci

1.3 Chemické reakce keratinu

Chemická struktura keratinu umožňuje vazbami a postranními skupinami aminokyseliny zbytků řadu reakčních možností. Na reaktivitu keratinu má kromě normálních funkčních skupin bílkovin významný vliv přítomnost disulfidické kovalentní vazby. Dále je reaktivita keratinu podmíněna přítomností cystinu. [1, 4, 6]

1.3.1 Reakce s vodou

Keratiny bobtnají ve vodě. Vlna se při bobtnání prodlouží asi o 1,2% a její tloušťka se zvětší asi o 11%. Bobtnání se vysvětluje částečným narušením elektrovalentních a vodíkových vazeb a vnikáním vody do uvolněné fibrilární struktury. Absorbce vody závisí na přítomnosti hydrofilních skupin v keratinu, ke kterým přísluší především skupiny $-NH_2$, $-COOH$, $-OH$ a peptidové skupiny. Absorpce vody hraje důležitou roli ve fyzikálních vlastnostech keratinu. [6, 7]

Zbobtnání keratinu je pro většinu reakcí důležitý předpoklad, chemikálie lépe difundují do nabobtnalého gelu keratinu. Při zvýšené teplotě, nad $80\text{ }^\circ\text{C}$, nastává určité odbourání, které v přítomnosti solí kovů Cu, Cd, Ag, Mg způsobuje pokles obsahu síry. Při teplotě varu nastává štěpení cystinu a částečná hydrolýza anodických skupin. Rovněž struktura alfa přechází na konfiguraci beta. Když se zahřívá keratin v uzavřené nádobě nad teplotu $130\text{ }^\circ\text{C}$, nastává kontrakce v průběhu 10 -ti minut asi o 36%. Epidermis hovězí kůže má T_s již při 50 až $70\text{ }^\circ\text{C}$. Tato teplota kontrakce má vztah ke stupni keratinizace. [4]

1.3.2 Působení kyselin

Proti účinkům kyselin je keratin poměrně odolný. Je to způsobeno odolností disulfidické vazby proti kyselé hydrolýze. Při reakci s kyselinami se potlačí disociace $-COOH$ skupin, které jsou v porovnání s bazickými skupinami vždy v nadbytku. A proto má keratin izoelektrický bod při pH 3,67 a s přidavkem dalšího množství kyselin získává kladný náboj. [1, 4]

Teprve při delším varu a vyšších koncentracích minerálních kyselin nastává hydrolýza bez porušení cystinu. Totální hydrolýza keratinu nastává při zahřívání s 30 – ti% H_2SO_4 nebo 6N HCl při $110\text{ }^\circ\text{C}$ 24 hodin. Při čištění a praní chlupů se proto používá kyselin, a nikoli zásad, které jsou proti cystinu agresivnější. [4]

1.3.3 Působení zásad

Působení zásad na keratin je výraznější a je funkcí pH, teploty a doby. V alkalickém prostředí se potlačí disociace $-NH_3^+$ skupin a keratin získává negativní náboj. Disulfidická vazba cystinu podléhá hydrolytickému štěpení. Vliv pH má vliv na měrnou pevnost

chlupů. Při alkalickém zpracování keratinu, např. v roztocích vápna nastává rozpouštění keratinu. [1, 4]

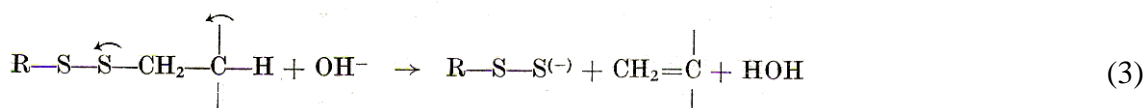
Z hlediska mechanismu štěpení disulfidické vazby keratinu účinkem zásad nastává podle Speakmanna tvorba sulfonové a triolové skupiny:



Podle Blažejce jde o heterolytické – iontové štěpení:



Podle Swana se uplatňuje v alkalickém prostředí nukleofilní působení OH^- iontů a to vede k ionizaci uhlíku α a následující eliminaci tiocysteinového aniontu $\text{R} - \text{S} - \text{S}^-$:



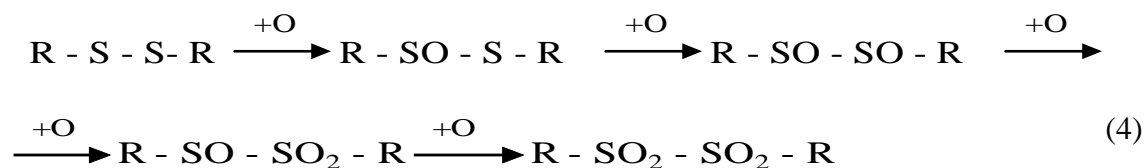
Disulfidická vazba může za určitých podmínek přecházet ve vazbu monosulfidickou za tvorby lantioninu, který je odolnější proti působení zásad. [4]

1.3.4 Působení oxidačních činidel

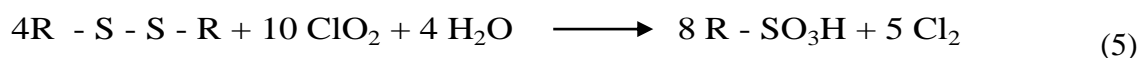
Při působení oxidačních látek na keratin v průběhu bělení chlupů, popřípadě oxidačního odchlupování mohou nastat dva případy:

- oxidace disulfidické vazby bez jejího štěpení,
- oxidační štěpení disulfidické vazby.

Na disulfidickou vazbu keratinu působí oxidačně bez štěpení roztoky peroxidu vodíku, roztoky KMnO_4 a fotooxidace při stárnutí keratinových bílkovin. Oxidace probíhá za tvorby sulfoxidu až sulfonu takto:



Při oxidačním štěpení keratinu účinkem perkyselin nebo chloristanu sodného nastává tvorba kerateinsulfokyselin za současného rozpouštění chlupů. [4]



Oxidovaná vlna má nižší pružnost i pevnost a snadněji se v zásadách rozpouští. Oxidační pochody se uplatňují při mrtvení a bělení kožešin peroxidem vodíku. [6]

1.3.5 Působení redukčních činidel

Při účinku redukčních činidel na keratin nastává redukční štěpení disulfidické vazby, např. účinkem sirovodíku, siřičitanů nebo tioglykolové kyseliny.



Reakce je vratná a mírnou oxidací se znovu vytvoří disulfidické vazby. Zpětná reakce se využívá k trvalému formování tvarů keratinových vláken. Redukční účinky na chlupy se projeví zvýšenou lámavostí při ohybu, teplota kontrakce se výrazně sníží, po redukci nastává snadný rozklad i rozpouštění keratinu účinkem enzymů. [4, 6]

Rozpouštění redukovaného keratinu v zásadách nelze označit jako hydrolýzu, nenastává štěpení peptidických vazeb. Při redukci keratinu, děje-li se při normální teplotě, lze oxidací získat chlupy původních vlastností. Při šetrné redukci nastává změkčení, plastifikace keratinu, který lze libovolně tvarovat a potom oxidací fixovat do elastického tvaru. [4]

2 STAVBA, SLOŽENÍ A VLASTNOSTI OVČÍ VLNY

Ovčí vlna je přirozený povrch těla ovce. I přes velmi nízkou tržní cenu za vlnu, vlna stále zůstává charakteristickým a zásadním ovčím produktem a z pohledu jejího upotřebení i klasickou textilní surovinou. Ačkoliv některé jiné druhy vláken mohou mít v některých parametrech srovnatelné či i vhodnější vlastnosti než je tomu u ovčí vlny, obecně je možno konstatovat, že celkově nedosahuje žádné jiné vlákno takových parametrů, jako je tomu v případě ovčího vlákna. Pro ovčí vlákno je především charakteristické: vlna je velmi dobrý absorbent, hřeje, je trvanlivá, relativně lehká a přitom pevná, je velmi elastická a pružná, tepelně odolná, poměrně dobře se barví. [9]

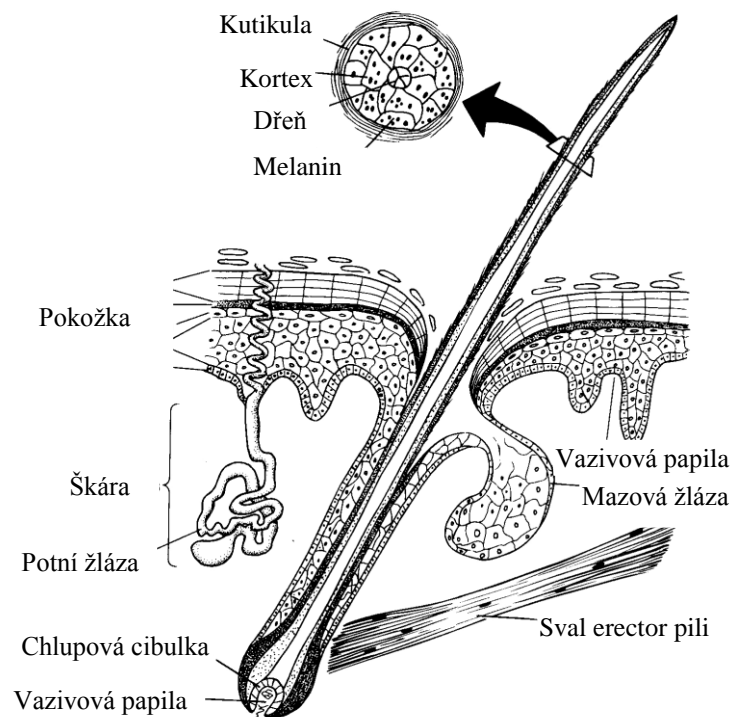
Nejvýznamnější světoví producenti ovčí vlny jsou stále Austrálie a Nový Zéland. V posledním období se zařadila mezi nejvýznamnější světové producenty vlny i Čína a Indie. Mezi významné světové dovozce a zpracovatele vlny patří Čína, Itálie, Velká Británie a Francie. Vlna je také velmi cenným odpadem koželužské výroby a je žádoucí její získávání. [4, 9]

2.1 Morfologická a histologická stavba ovčí vlny

Vlákno vlny se skládá ze tří částí:

- stvol (část nad pokožkou)
- kořen (část pod pokožkou)
- chlupová cibulka

Stvol a kořen vlákna obsahují odumřelé buňky a chlupová cibulka obsahuje živé epidermální buňky. Kořen vlákna vyrůstá z chlupového váčku (folikulu) a je hluboko zarostlý do kůže. Chlupový váček se skládá z kolagenových a elastinových vláken. Chlupový kořen je zakončen chlupovou cibulkou, která sedí na vazivové papile, v níž jsou krevní a mízní cévy vyživující vlákno. Vnější chlupová pochva se skládá z pokožkových buněk a je vlastně pokožkou chlupového váčku. Rohovitá vrstva je pouze ve vrchní části váčku, ve spodní části zůstává jen vrstva slizová. Během růstu vlny se buňky vytvářejí v chlupové cibulce. Jak vlákno vlny roste, buňky se přemísťují folikulem směrem k povrchu. Chlup vyrůstá z pokožky vždy šikmo a jeho směr je udáván sklonem chlupové pochvy. [3, 4]



Obr. 6: Příčný řez chlupu

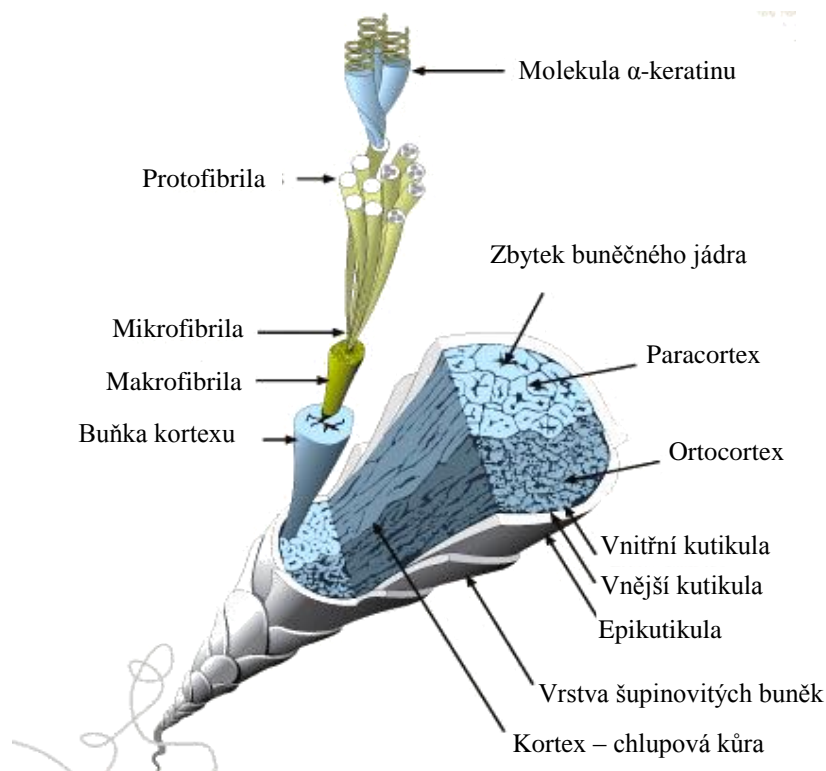
Mazové a potní žlázy ústí do vrchní části chlupového váčku. Mazové žlázy vylučují sekret, který obsahuje vlnotuk (lanolín), který chrání vlákno proti vnějším vlivům. [9]

Na příčném řezu vlnového vlákna je možno rozlišit tři základní vrstvy - pokožku, kůru a dřeň.

Pokožka (vrstva šupinatá, kutikula) – je povrchová vrstva plochých šupinovitých zrohovatělých buněk, které v jedné nebo několika vrstvách pokrývají vlákna. Jednotlivé šupinky se překrývají jako tašky na střeše a volné konce šupinek přitom směřují ke špičce vlákna. Pokožka je zpravidla 0,5 až 0,8 μm silná, přičemž představuje cca 6 – 16% síly vlákna. Povrch buněk pokrývá ještě jemný voskový film, označovaný jako epikutikula.

Chlupová kůra (vrstva kortikální, kortex) – představuje hlavní hmotu ovčího vlákna. Skládá se ze zrohovatělých buněk velmi protáhlého tvaru. Jednotlivé buňky jsou vřetenovité a jsou spojeny keratinovým tmelem, takže hustě vyplňují celý objem vlákna. Kůra je tvořena dvěma skupinami buněk; buňkami ortho a para cortexu, přičemž podíl buněk orthocortexu činí 60 – 90% a podíl buněk paracortexu 10 – 40%. Jednotlivé buňky kůry jsou navzájem spojeny tonofibrilami, to zabezpečuje především pevnost a pružnost ovčího vlákna.

Dřeň (vrstva medulární) – je nápadněji vyvinuta jen v nejtlustších vláknech; u jemnosrstých zvířat, jako jsou ovce merino, chybí nebo se vyskytují jen u vousů a řas. Ve špičce vlákna nebo jeho kořeni chybí vždy. Dřeň se skládá z jedné řady nebo více řad odumřelých buněk, jež se zrohovatěním seschly v nepravidelné hvězdicovité, zoubkované a jiné váčkovité útvary vyplněné vzduchem. Vzduch zaplňuje i prostory mezi buňkami, označované jako vakuoly. Buňky dřeně obsahují kapénky tuku a zrníčka pigmentů. [3, 9]



Obr. 7: Řez strukturou stvolu vlákna vlny

2.1.1 Základní typy vláken

Podle velikosti vlákna, podle jeho pružnosti fyziologické funkce rozeznáváme tři hlavní typy vláken – podsadové vlákna, pesíky a hmatové chlupy.

Podsadové vlákna – tvoří nejhustší vrstvu srsti, hustota však závisí na klimatických podmínkách. Podsadové vlákno je bez dřeně, lesk vlákna je nevýrazný a délka tohoto typu vlákna se pohybuje v rozmezí 5 – 15 cm.

Pesíky – jsou většinou nejdelší a nejtlustší vlákna. U pesíků je dřeňový kanálek souvislý. Pesíky dosahují síly 30 – 50% celého vlákna. Pro tento typ vlákna je charakteristický poměrně výrazný lesk.

Hmatové chlupy – jsou orgánem hmatu zvířete. Jsou velmi dlouhé, přímé a tlusté.

2.2 Složení ovčí vlny

Hlavní chemickou složkou vlnového vlákna je bílkovina keratin. Obsahy aminokyseliny variují v závislosti na výživě, plemeni zvířete a také na fázi růstu vlákna. Obecné chemické složení sušiny vlnového vlákna je zobrazeno v tabulce 2. [9]

Tabulka 2: Chemické složení sušiny vlnového vlákna

Chemická látka	Obsah (%)
uhlík	50%
vodík	22 – 25%
kyslík	16 – 17%
dusík	7%
síra	3 – 4%

Potní vlna obsahuje v průměru 15 – 72% vlastní vlny, 12 – 47% tuku a potu, 3 – 24% nečistot především rostlinného původu a 4 – 24% vlhkosti. Tuk z ovčí vlny je produkován mazovými žlázami v kůži ovce, zatímco pot je produkován potními žlázami. U tučných, jemných vln typu merino bývá podíl pravé, vlastní vlny v rozmezí 29 – 67%, u hrubých vln až 80%. Mezi nejdůležitější faktory, jež ovlivňují podíly jednotlivých komponentů potní vlny, patří především technologie chovu, plemeno, výživa, zdravotní stav, pohlaví, věk zvířete a genetické faktory. Nezanedbatelný vliv na složení potní vlny má i zacházení s vlnou po střížích, v tomto případě může být složení vlny zásadně ovlivněno způsobem jejího uskladnění či způsobem jejího zpracování. [6, 9, 10]

2.3 Vlastnosti ovčí vlny

2.3.1 Jemnost vlny

Jemnost vlny vyjadřuje sílu vlákna, uvádí se v μm , ideální je, aby síla vlákna byla po celé své délce stejná. Ale ve většině případů je jemnost vlákna po celé své délce poměr-

ně nestabilní, např. u polojemných vln může být rozdíl v síle vlákna od jednoho konce ke druhému až 10 μm . Jemnost vlákna se pohybuje v rozmezí 10 – 80 μm . Pro srovnání lidský vlas je silný cca 100 μm . Ideální vlákno by mělo mít kruhový tvar na příčném řezu, ale ve skutečnosti je příčný řez vlákna mírně eliptický. Obecně je síla vlákna ovlivněna hlavně plemenem ovce, zdravotním stavem, výživou, věkem, pohlavím a tělesnou partii zvířete. [9, 10, 11]

2.3.2 Délka vlny

Délku vlny u ovcí lze dělit na délku přirozenou a délku skutečnou. Přirozená délka vlny vyjadřuje délku vlákna v přirozeném nenataženém stavu. Přirozená délka vlny se pohybuje v rozmezí 5 – 50 cm. Skutečná délka je vzdálenost mezi oběma konci vlákna v narovnaném stavu. Rozdíl mezi přirozenou a skutečnou délkou je ovlivněn hlavně obloučkovitostí každého vlákna. [9, 10]

2.3.3 Zkadeření vlny (obloučkovitost)

Tuto vlastnost vlny ovlivňuje bilaterální skladba vláken. U normálního zkadeření jsou výška a základna obloučku prakticky shodné. U vysoké obloučkovitosti je výška vyšší, u nízké je naopak výrazně širší základna. Obecně je možno konstatovat, že čím je vlna jemnější, tím má vyšší obloučkovitost. [9]

2.3.4 Barva vlny

Barva je ovlivněna hlavně konkrétním plemenem, přičemž z pohledu evropské a domácí populace ovcí je dominantní barva vlny bílá až nažloutlá. Přirozené zbarvení vlny se dělí na vlnu bílou, pestrou a barevnou. Vlny pestré mají podíl barevných vláken do 2%, barevné vlny mají podíl barevných vláken vyšší jak 2%. V některých případech se můžeme setkat i s vlnou šedou, toto zbarvení je ovlivněno obsahem vzduchu ve vyschlých buňkách kůry nebo mezi nimi. [9]

2.3.5 Lesk vlny

Tato vlastnost vlny je především ovlivněna velikostí, tvarem a uspořádáním šupin na povrchu vlákna. Pro lesk vlny obecně platí závislost, že čím je vlna hrubší, tím je u ní zjišťován výraznější lesk. [9]

2.3.6 Vlhkost vlny

Vlhkost vlny udává procentuelní množství vody ve vlně. Při standardní atmosféře, což je 65% -ní relativní vlhkost vzduchu a teplota vzduchu 20 °C, by se hodnoty vlhkosti vlny měli pohybovat v rozmezí 14 – 18%. [9, 10]

2.3.7 Mechanické vlastnosti vlny

Mezi další významné vlastnosti vlny patří:

- Pevnost vlny: vyjadřuje odolnost vlny proti jejímu přetržení
- Pružnost vlny: vyjadřuje schopnost vlny obnovit původní rozměr a tvar po přerušení mechanického působení (tlaku, ohybu apod.)
- Tažnost vlny: vyjadřuje míru natažení vlákna, aniž by došlo k jeho přetržení.
- Bobtnavost vlny: vyjadřuje schopnost vlákna změnit svoji sílu či délku ve vlhkém prostředí.
- Hydroskopičnost vlny: vyjadřuje schopnost vlákna vázat vodu.
- Plstivost vlny: je schopnost vláken vlny, vzhledem ke své stavbě, se za určité teploty, vlhkosti, tlaku a za působení chemických činidel navzájem propojit tak, že se vytvoří souvislá vrstva plsti.
- Hřejivost vlny: je ovlivněna schopností vlny udržovat určitou teplotu díky své šupinaté struktuře. [9]

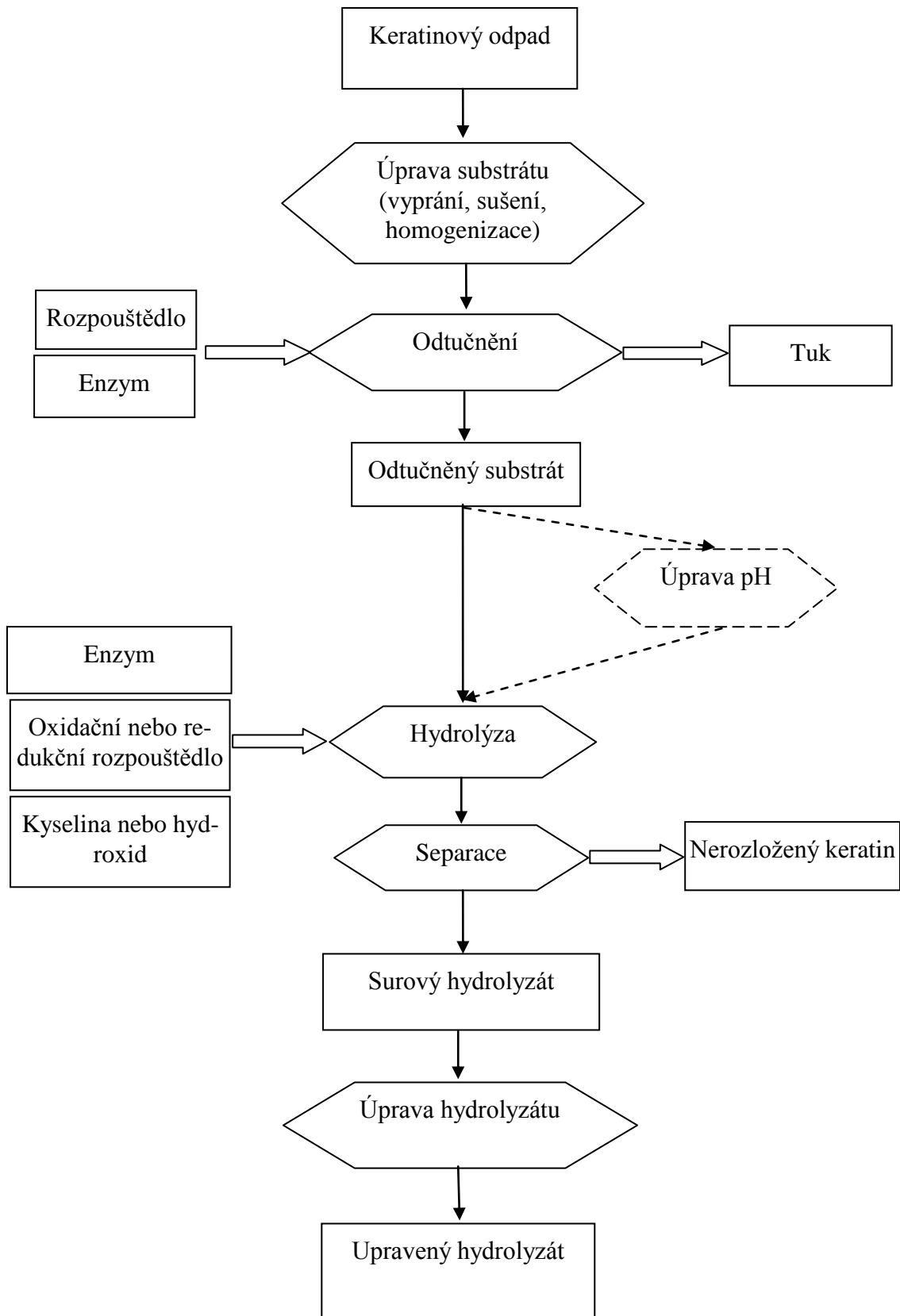
3 ZPRACOVÁNÍ KERATINOVÝCH ODPADŮ

Keratinové odpady tvoří značnou část odpadů koželužského a masného průmyslu. Skupinovým označením keratinové odpady rozumíme látky, vyznačující se vysokým obsahem nerozpustné bílkoviny keratinu, která tvoří jejich hlavní součást. Mezi nejdůležitější keratinové odpady patří srst a štětiny, nevhodné pro jiné účely zpracování, dále rohy, kopyta, paznehty a peří. Ačkoli, tyto materiály tvoří téměř nevyčerpatelný zdroj keratinu, zužitkovává se pouze malé množství těchto odpadů, např. jako péřová moučka nebo zpěňovací přísada do hasicích přístrojů. [4, 13]

Až 5% tělesné váhy drůbeže tvoří peří. Z jatek s kapacitou 50000 kusů drůbeže je denně vyprodukováno 2 – 3 tuny suchého peří. Dalším významným keratinovým odpadem je ovčí vlna. Ve světě se ročně vyprodukuje přibližně 1,2 mil. tun surové vlny určené převážně pro textilní průmysl. Velká část vlny se odstraní během čištění a úpravy vlny nebo je vyřazena pro své nevyhovující vlastnosti. Celkem je ve světě vyprodukováno více než 5 mil. tun keratinových odpadů za rok. [14,15]

3.1 Příprava keratinových hydrolyzátů

Jedním ze způsobů zpracování keratinových odpadů je výroba keratinových hydrolyzátů. Způsobů provedení hydrolýzy keratinových odpadů je mnoho, ale většina kroků je více či méně shodná s postupem uvedeným na obrázku 8. Keratinový odpad je nejdříve vyprán, vysušen a homogenizován. Poté je ze substrátu odstraněn tuk extrakcí rozpouštědly (methanol, dietyléter, chloroform, aj.) nebo rozložen pomocí lipolityckých enzymů. Odtučněný substrát je poté hydrolyzován. Hydrolýza keratinu se provádí pomocí enzymů, hydroxidů, kyselin nebo oxidačních a redukčních činidel. Před enzymovou hydrolýzou je potřeba upravit pH substrátu. Po hydrolýze je zbylý nerozložený podíl separován, nejčastěji filtrací nebo odstředěním. Získaný surový hydrolyzát je nutné následně upravit pro další použití. Keratinový hydrolyzát je možné zahuš'ovat a získané roztoky použít pro zpracování máčením, natíráním nebo odléváním. Jiným způsobem úpravy je vysušení hydrolyzátu na prášek. Surový hydrolyzát je možné také upravovat přidávkem aditiv (plastifikátorů, síťovačů, apod). [18]



Obr. 8: Schéma možností zpracování keratinových odpadů na keratinový hydrolyzát

Příprava redukovaných keratinů spočívá v rozštěpení disulfidických vazeb a vodíkových můstků proteinu činidlem za vhodně zvolených podmínek (teplota, pH prostředí). Jako redukční činidlo se používá zejména 2-merkptoethanol, kyselina thioglykolová a další ve vodě rozpustná činidla. Nevýhodou je, že sulfohydro skupiny (-SH) takto získaných keratinů se snadno oxidují na vzduchu a disulfidové vazby se znovu vytváří. Proto se v poslední době jako činidlo používá methyl jodid nebo kyselina jodoctová, tyto činidla zabraňují vzniku disulfidických vazeb. Jako prostředí se používá močovina ($\text{NH}_2 - \text{CO} - \text{NH}_2$), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ nebo NaHSO_3 . Celý proces probíhá obvykle za vyšších teplot do $80\text{ }^\circ\text{C}$, v alkalickém prostředí (pH 8 – 10). Výtěžek redukovaného keratinu se pohybuje okolo 30 – 70 %. Vodné roztoky keratinů se skládají z proteinů o molekulové hmotnosti cca 15 – 60 kDa a je možné je skladovat velmi dlouho, aniž by došlo k vysrážení proteinu. [16, 17]

Schrooyen a kol. použili k přípravě keratinových hydrolyzátů z kuřecího peří redukční činidlo 2-merkptoethanol a jako prostředí vodný roztok močoviny. Na 1g vypraného, nasekaného a odmaštěného peří bylo použito 25 ml tlumivého roztoku obsahující 6M močovinu, 3mM EDTA a 1,4M 2-merkptoethanol. Ke směsi bylo dále přidáno 1,4g dodecylsulfát sodného (SDS). Směs byla míchána v atmosféře dusíku při teplotě $40\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 60 minut. Ze získaného keratinového hydrolyzátu byly odstraněny nerozpustné části membránovou filtrací, při filtraci byly použity celulózové filtry s velikostí pórů 20 – 25 μm . Po filtraci byly filtry třikrát opláchnuty vodou, usušeny na vzduch a zváženy. Množství keratinu (výtěžek hydrolyzy) ve filtrátu bylo vyjádřeno jako procento z celkové hmotnosti použitého peří. Přídavek SDS před rozkladem zabraňuje agregaci keratinových, polypeptidových řetězců a následné oxidaci cysteinových residuí. Byl sledován vliv různých množství přídavků SDS na stupeň agregace polypeptidových řetězců, a na stupeň oxidace během rozkladu. [24]

Alkalickou hydrolyzu keratinových odpadů lze provádět pomocí silných roztoků hydroxidů (NaOH , $\text{Ca}(\text{OH})_2$, apod.). Coward-Kelly a kol. použili k přípravě keratinových hydrolyzátů $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Jako zdroj keratinových odpadů použili kravské chlupy a peří, které byly několikrát vyprány ve vodě, vysušeny na vzduchu při pokojové teplotě. Poté byl materiál vysušen při $105\text{ }^\circ\text{C}$, rozemlet v laboratorním mlýnku a nakonec proset přes síto s velikostí pórů 2 mm. Hydrolyza byla provedena v autoklávu s kontrolovanou teplotou a míchadlem. Vysoká rychlost míchání (1000 rpm) byla použita k udržení kontaktu mezi suspendovanou pevnou fází a kapalinou. Podmínky hydrolyzy peří byly různé: teplota (50 –

150 °C), čas (0 – 300 min), přídavek $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (0 – 0,4 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$ na gram vysušeného materiálu), množství suchého peří (18 – 80g). Po skončení hydrolýzy byly vzorky vyndány z autoklávu a dále byly separovány odstředěním. Při teplotě 105 °C 80% peří bylo rozpuštěno během 25 minut. Po třech hodinách hydrolýzy při teplotě 105 °C přešlo do roztoku 95% peří. Alkalická hydrolýza kravských chlupů probíhala při konstantní teplotě 100 °C. Podmínky, které se při hydrolýze měnily, byly čas, přídavek $\text{Ca}(\text{OH})_2$, množství suchých kravských chlupů. [19, 20]

Kawahara a kol. použili keratinové hydrolyzáty ke konečné úpravě vláken lýka, takto upravené vlákna vykazují zvýšení tahových vlastností. Jako zdroj keratinových odpadů byla použita odpadní ovčí vlna a prachové kachní peří. Prachové kachní peří bylo rozpuštěno v 1N NaOH při teplotě 70 °C po dobu tří hodin. Poté byl roztok peří neutralizován kyselinou octovou. Vlákna lýka byla ponořena do keratinového roztoku při teplotě 40 - 45 °C po dobu dvaceti minut, poté byla vlákna opláchnuta vodou. [21]

Další možnou metodou hydrolýzy keratinu je použití kyselin, např. HCl, nebo H_2SO_4 . Tyto kyseliny použili při svých experimentech Kurbanoglu a kol. Beraní rohy byly vyprány v demineralizované vodě a sušeny v sušárně při 100 °C do konstantní hmotnosti. Suché rohy byly nařezány na malé kousky a pomlety. 50g pomletých rohů bylo smícháno s 75ml 6N H_2SO_4 . Výsledná směs byly inkubovány při teplotě 70 °C po dobu 24 hodin. Po uplynutí doby bylo ke směsi přidáno 100 ml demineralizované vody a směs byla znovu inkubována při teplotě 130 °C po 4 hodiny. Získaný roztok byl zchlazen na pokojovou teplotu a pH roztoku bylo upraveno 5N $\text{Mg}(\text{OH})_2$ na pH 7. Poté byl roztok dvakrát zfiltrován. Tímto postupem bylo hydrolyzováno 42 g z původních 50 g materiálu. [25, 26]

Chemická příprava keratinových hydrolyzátů s použitím redukčních činidel, různé kombinace fyzikálních a chemických rozkladů za vysokých teplot s použitím kyselin a zásad jsou běžně používané. Tyto techniky jsou ale velmi nešetrné k životnímu prostředí. Z těchto důvodů se v posledních letech začínají využívat enzymatické rozklady a mikrobiologické přeměny. V přírodě se vyskytuje velké množství bakterií, které produkují enzymy schopné rozkládat keratin. Tyto bakterie je možné využít při zpracování keratinových odpadů nebo je možné využít běžné enzymy štěpící proteiny. Pomocí těchto enzymů je možné zpracovávat keratinové odpady za mírných podmínek. Nejvíce jsou používány bakterie rodu *Bacillus* a *Streptomyces*. Mikrobiologické přeměny jsou alternativní metody pro

úpravu keratinových odpadů, jsou k životnímu prostředí šetrné, a mají poměrně nízké energetické nároky. [18, 22, 23]

Dalev použil kombinovanou dvoustupňovou enzymově–alkalickou hydrolyzu pro rozklad odpadního peří. Pro tento experiment byl použit reaktor, což je nerezová nádoba s objemem 80 litrů, s kontrolovanou teplotou a s míchadlem. Nejprve bylo 40 kg peří mícháno v reaktoru se 30 litry 0,3M NaOH při teplotě 80 °C po dobu 30 minut. Po alkalickém stupni hydrolyzy vznikla z reakční směsi hustá homogenní hmota. Před enzymovou hydrolyzou bylo upraveno pH na 8,0 – 8,3 pomocí 10% HCl, a poté bylo přidáno 100 g alkalické proteinázy B72 z *Bacillus Subtilis*. Hydrolyza probíhala za stálého míchání po dobu 2 hodin při teplotě 55 °C. Po ukončení hydrolyzy bylo upraveno pH na 7,0 pomocí 10% HCl. Aktivita enzymu byla zničena zahřáním materiálu na 95 °C po dobu 30 minut. Získaný roztok (hydrolyzát) byl hustý a zakalený. Hydrolyzát byl poté sprejově sušen a byl získán šedivý prášek o hmotnosti 19,3 kg. [15]

Jiný postup enzymové hydrolyzy popsal Kida a kol. V experimentu zpracovávali rohy a kopyta krav a buvolů pomocí pěti různých enzymů. Na enzymovou hydrolyzu byly použity enzymy vzniklé z rodu *Bacillus*, *Aspergillus* a z prasečí slinivky (*Bacillus subtilis*, *Bacillus species*, *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus melleus*, enzym z prasečí slinivky). Rohy a kopyta byly rozemlety na částičky s průměrem menším než 250 μm. 40 mg rozemletého materiálu bylo smícháno se 7 ml fosfátového pufru (pH 8,3). Tato směs byla umístěna do reaktoru, kde byla míchána při teplotě 50 °C po dobu 30 minut. Poté byl ke směsi přidán 1ml roztoku enzymu obsahující 8mg komerčního enzymu a směs byla opět míchána při teplotě 50 °C po dobu 60 minut. Po ukončení hydrolyzy byl ze směsi odseparován nerozložený zbytek materiálu. [13]

3.2 Příprava keratinových filmů

Dalším ze způsobů zpracování keratinových odpadů je příprava keratinových filmů. Keratinové filmy se připravují oxidací redukovaných forem keratinu.

Vodné roztoky redukovaných keratinů o koncentraci 2,1% (w/w) se smíchají s glycerinem (50%, w/w proteinu). Tento roztok se vylije na hladkou plochu, např. na PP desku. Dále se roztok nechá vysušit v exsikátoru nad vysušeným silikagelem za pokojové teploty. Vysušené filmy se poté zahřejí na 15 minut při 80 °C a sloupnou se z desky.

K usnadnění separace filmu od podložky se podložka s vytvořeným filmem ponoří do vody. V případě potřeby se filmy ještě propláchnou vodou a nechají se vysušit při pokojové teplotě. [16]

Nevýhodou keratinových filmů připraveným metodou lití vodných roztoků redukováných keratinů bez přídavku aditiv je jejich křehkost. Další nevýhodou jsou limitované možnosti tvarování filmů do požadovaného tvaru. Tyto nevýhody lze překonat použitím lisování, jako alternativní metody pro přípravu keratinových filmů. [17]

4 APLIKACE KERATINOVÝCH HYDROLYZÁTŮ

Z velké části se keratinové hydrolyzáty využívají jako zdroj proteinu při výživě dobytka a jiných domestikovaných zvířat, jelikož obsahují velké množství proteinů. [19, 20]

Vodné roztoky redukovaného keratinu se používají pro přípravu obalových materiálů pro mikrokapsule. Enkapsulují se zejména barviva, ochucovadla, vůně, léčiva, oleje a tuky. Výhoda enkapsulace spočívá v tom, že enkapsulovaná substance si zachovává svoji aktivitu po delší dobu a je možné regulovat její uvolňování na specifickém místě. [16]

Keratinové hydrolyzáty mohou být také používány v potravinářství jako ochranné povlaky a obaly na maso, drůbež a ryby. [16]

Malé keratinové fragmenty získané hydrolýzou keratinu se používají jako přídavek do vlasové kosmetiky a krémů. Keratinové fragmenty se váží na strukturu vlasu a zpevňují ho, zároveň vytvářejí na pokožce i na vlasu ochrannou vrstvu. [16, 27]

Dalším využitím může být použití keratinových hydrolyzátů ke konečné úpravě vláken lýka, takto upravené vlákna vykazují zvýšení tahových vlastností. Hydrolyzát může být použit i při úpravě nasáklého dřeva, tato úprava potlačuje nadměrné vysychání dřeva v průběhu jeho schnutí. [21]

Vlákna vyrobená z keratinových hydrolyzátů se mohou uplatnit při výrobě kompozitních materiálů s jinými biopolymery nebo syntetickými polymery (např. PE). Kompozitní materiály složené z keratinu a celulózy se mohou použít v zemědělství jako kompostovatelné obaly. [28, 29]

Keratinové hydrolyzáty se také mohou využívat v zemědělství jako hnojiva a stimulanty růstu, pro svůj vysoký obsah aminokyselin. [30]

Také se keratinové hydrolyzáty mohou používat jako živná půda pro kultivaci mikroorganismů, nebo jako přísada do živných médií. [31]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 PLÁNOVANÍ EXPERIMENTŮ

Cílem experimentů bylo posoudit možnosti alkalicko-enzymového rozkladu ovčí vlny a navržení optimálních podmínek rozkladu. Experimenty zaměřené na rozklad ovčí vlny byly provedeny v laboratorních podmínkách. Byla použita metoda 2 - fázového rozkladu, kdy v 1. fázi byla vlna podrobena alkalické hydrolýze za definovaných podmínek (teplota, čas, doba míchání). Jako alkálie byl použit hydroxid vápenatý o různých koncentracích. Ve 2. fázi byla vlna podrobena enzymové hydrolýze za definovaných podmínek (pH, teplota, čas, doba míchání, přídavek enzymu). Jako enzymový preparát byly použity proteiny Esperase 6.0 T a Evarlase 6.0 T (výrobce Novozymes, Dánsko).

Před 2 - fázovým rozkladem byla ovčí vlna v přípravných operacích vyčištěna, odtučněna enzymem Lipex 100 T (výrobce Novozymes, Dánsko), vysušena a namleta.

Experimenty byly naplánovány metodou faktorových pokusů 2^3 , tzn. pokusy se třemi sledovanými faktory při dvou úrovních (minimální a maximální) se dvěma středovými pokusy. Faktorové pokusy 2^3 otestovaly vlivy jednotlivých proměnných na průběh reakce. Sledované proměnné: faktor A - koncentrace hydroxidu vápenatého (0,2 – 0,6%), faktor B - teplota 1. fáze hydrolýzy - alkalická hydrolýza (40 – 80 °C), faktor C - teplota 2. fáze hydrolýzy - enzymová hydrolýza (40 – 60 °C). Celková doba 1. i 2. fáze hydrolýzy byla konstantní 24 hodin. Z celkové doby hydrolýzy byla konstantní i doba míchání (6 hodin) a koncentrace enzymu (5%). Experimenty byly provedeny se dvěma různými enzymy.

Po rozkladu byla zbylá nerozložená tuhá fáze a kapalná fáze (keratinový hydrolyzát) oddělena a gravimetricky se zjistilo procento nerozložené vlny. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny v programu Statgraphics verze 6,0 a byly stanoveny optimální podmínky rozkladu ovčí vlny. Byla provedena diskuze výsledků, grafické a tabelární zpracování.

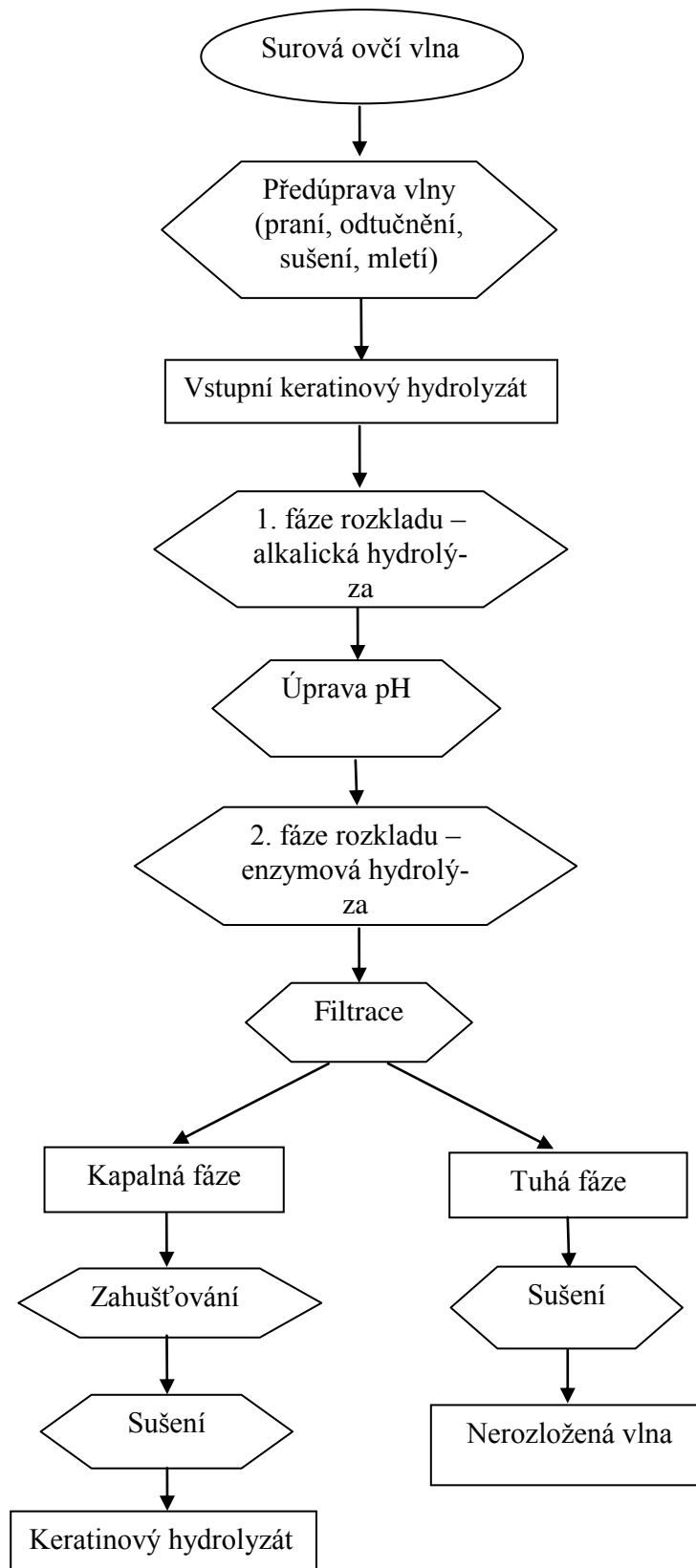
Tabulka 3: Přehled organizace faktorových pokusů dvoustupňové hydrolýzy

Podmínky alkalicko-enzymového rozkladu ovčí vlny			
Experiment č.	Faktor A: Koncentrace Ca(OH) ₂ (%)	Faktor B: Teplota 1. fáze hyd- rolýzy (alkalická hydrolýza) (°C)	Faktor C: Teplota 2. fáze hyd- rolýzy (enzymová hydrolýza) (°C)
1	0,2	40	40
2	0,2	40	60
3	0,2	80	40
4	0,2	80	60
5	0,6	40	40
6	0,6	40	60
7	0,6	80	40
8	0,6	80	60

Tabulka 4: Přehled organizace středových pokusů dvoustupňové hydrolýzy

Podmínky alkalicko-enzymového rozkladu ovčí vlny			
Experiment č.	Faktor A: Koncentrace Ca(OH) ₂ (%)	Faktor B: Teplota 1. fáze hyd- rolýzy (alkalická hydrolýza) (°C)	Faktor C: Teplota 2. fáze hyd- rolýzy (enzymová hydrolýza) (°C)
1	0,4	60	50
2	0,4	60	50

U středových pokusů značí experiment číslo 1 dvoustupňovou hydrolýzu s enzymem Esperase 6.0 T a experiment číslo 2 dvoustupňovou hydrolýzu s enzymem Everlase 6.0 T.



Obr. 9: Schéma rozkladu ovčí vlny 2 – stupňovou alkalicko–enzymovou hydrolyzou

6 MATERIÁLY A POSTUPY PRÁCE

6.1 Vstupní materiál

Vstupním materiálem byla odpadní ovčí vlna dodaná z jatek. Složení surové ovčí vlny je uvedeno v tabulce 5.

Tabulka 5: Složení surové vlny

Stanovení	Obsah (%)	Směrodatná odchylka
Sušina	91,56	0,13
Popel*	2,33	0,01
Tuk*	8,18	0,92
Dusík*	12,17	0,08
Síra*	2,51	0,28
* vztaženo na sušinu		

6.2 Použité chemikálie

Enzym Lipex 100 T (Novozymes – Dánsko)

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 Esperase 6.0 T (Novozymes – Dánsko)

Esperase je proteináza produkovaná submerzní fermentací mikroorganismu *Bacillus*. Esterase je serinový typ proteinázy charakterizovaný výbornou účinností při vyšší teplotě a pH. Esperase je velmi aktivní za vysoce alkalických podmínek. Esperase se používá

k odstranění skvrn bílkovinného charakteru, např. od trávy, krve a některých potravin. Esperase hydrolyzuje proteiny na peptidy, které se v roztoku snadno rozpouštějí nebo dispergují.

Enzym Everlase 6.0 T (Novozymes – Dánsko)

Everlase je proteináza vytvořená proteinovým inženýrstvím produkovaná submerzní fermentací geneticky modifikovaného mikroorganismu *Bacillus*. Everlase se používá k odstranění skvrn bílkovinného charakteru, např. od trávy, krve a některých potravin. Everlase hydrolyzuje proteiny na peptidy, které se v roztoku snadno rozpouštějí nebo dispergují.

Ca(OH)₂ (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, ČR)

5 N NaOH

1 N NaOH

5%- ní HCl

30%- ní H₂O₂, p. a. (Lachema, Brno, ČR)

96%- ní H₂SO₄, p. a. (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, ČR)

2%- ní H₃BO₃ (Lachema, Brno, ČR)

30%- ní NaOH (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, ČR)

0,02 N HCl

Tashirův indikátor (UTB, Zlín, ČR)

Tableta katalyzátoru

65%- ní HNO₃, p. a. (Lachema, Brno, ČR)

10% BaCl₂ · 2H₂O (Lachema, Brno, ČR)

Roztok AgNO₃ (UTB, Zlín, ČR)

Destilovaná voda

6.3 Použité přístroje

Sušárna MEMMERT ULP 400	(Německo)
Sušárna Binder WTB	(Německo)
Magnetická míchačka s ohřevem IKA – RTC Basic	(Německo)
Teplotní čidlo IKA ETS – D4 fuzzy	(Německo)
Laboratorní míchadlo LM 4 I	(Česká republika)
Muflová pec Labotherm L9/11/S27	(Nabertherm Německo)
Elektronické předvážky KERN 440 – 47	(Německo)
Elektronické analytické váhy KERN 770	(Německo)
Exsikátor (s vysušeným silikagelem)	
pH metr WTW pH 526 s elektrodou	(Německo)
Elektrický vaříč ETA 2107	(Česká Republika)
Vodní lázeň GFL 1002	(Německo)
Vodní lázeň GFF 1041	(Německo)
Mineralizátor Hach Digesdahl Digestion	(Dange USA)
Topné hnízdo 2000 ml LTHS 2000	(Brněnská Drutěva, Česká republika)
Přístroj Parnas-Wagner	(Česká republika)
Vakuová odparka Heidolph LABORA 4003 WB	(Německo)
Nožový mlýn Fritch, velikost síta 1mm	(Německo)
Lednička Samsung Calex	(Německo)
Elektrická trouba MORA 524	(Česká republika)

6.4 Použité pomůcky

25 ml, 100 ml, 500 ml odměrné válce

250 ml Erlenmayerovy baňky s gumovými zátkami

Nálevky

400 ml kádinky

Hodinové sklíčka

Filtrační papír KA 4 (Filpap, Česká Republika)

Petriho misky

Pipety + balónky

Navažovací lodička

50 ml odměrné baňky

Mineralizační baňky

Žíhací kelímky

Titrační baňky

PAD tkanina na filtraci (velikost pórů 150 μm)

Plastové síto (velikost pórů 1mm)

Třecí miska s tloučkem

Silikonové formy

6.5 Postup práce

6.5.1 Předúprava vlny

300 g surové vlny bylo nejdříve mechanicky zbaveno viditelných nečistot a důkladně propráno ve vodě. 300 g vlny bylo rozděleno na dvě stejně velké poloviny. 150 g vlny bylo vloženo do nádoby a přidalo se 7500 ml vody. 5N roztokem NaOH bylo upraveno pH směsi na hodnotu 8,0 (původní pH vlny bylo kyselé cca $\text{pH} = 5,8$). Dále byla vlna enzymově odtučněna podle následujícího postupu: Do nádoby se směsí vlny bylo přidáno 1,5 g enzymu Lipex 100 T a vše bylo promícháno. Nádoba se směsí byla umístěna do termostatu a při 40 ± 2 °C se odtučňovala po dobu 24 hodin. Během této doby bylo obsahem občas zamícháno.

Po odtučnění byla vlna důkladně proprána na sítu pod tekoucí vodou mírně teplou a nechala se vysušit při 103 ± 2 °C po 3 hodiny. Poté byla vlna opět proprána na sítu pod tekoucí mírně teplou vodou a nechala se sušit při 103 ± 2 °C po 24 hodin. Vysušená vlna byla pomleta na nožovém mlýně Fritch na malé kousky délce do 5mm. Upravená vlna byla uzavřena do exsikátoru, kde zůstala připravena k pokusům.



Obr. 10: Odtučněné, pomletá vlna

6.5.2 Alkalicko–enzymová hydrolýza ovčí vlny

Alkalicko-enzymová hydrolýza probíhala ve dvou stupních. V prvním stupni, alkalická hydrolýza, byly proměnlivými parametry koncentrace alkálie (0,2% – 0,6%) a teplota ($40 - 80\pm 2$ °C). Do 8 Erlenmayerových baněk bylo na analytických vahách naváženo (na čtyři desetinná místa) 10 g odtučněné, vysušené a pomleté vlny. Do prvních čtyř baněk bylo přidáno 0,3 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$ - koncentrace roztoku $\text{Ca}(\text{OH})_2$ byla 0,2%. Do zbylých čtyř baněk bylo přidáno 0,9 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$ - koncentrace roztoku $\text{Ca}(\text{OH})_2$ byla 0,6%. Do všech baněk bylo odměřeno 150 ml destilované vody a celý obsah baněk byl důkladně promíchán. Bylo třeba dbát na to, aby veškerá vlna byla smáčena a nebyly zbytky vlny na stěnách. Baňky byly umístěny do předem vyhřáté vodní lázně o teplotě 40 ± 2 °C a 80 ± 2 °C a míchány míchadly stanovenou dobu 6 hodin. Po uplynutí doby míchání byly baňky umístěny do inkubátorů předehřátých na teploty 40 ± 2 °C a 80 ± 2 °C. Z celkové doby hydrolýzy 24 hodin byla směs míchána 6 hodin a 18 hodin inkubována bez míchání. Po ukončení inkubace (1. stupni rozkladu) bylo upraveno pH směsi na $9,0 \pm 0,1$ přidáním 5% -ní HCl.

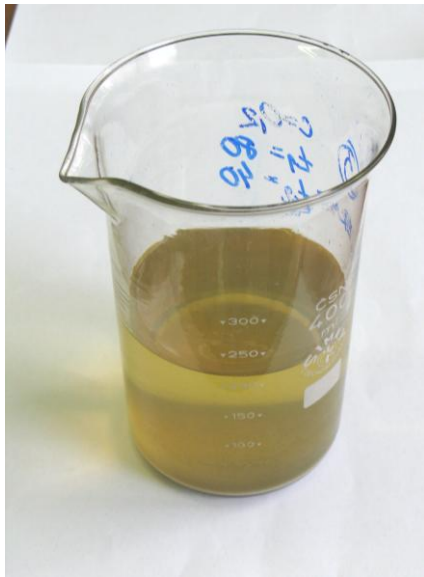
Ve druhém stupni, enzymová hydrolyza, bylo přidáno 0,5 g enzymu – koncentrace enzymu byla 5%, vztaženo na hmotnost suché vlny. Sledovaným parametrem byla teplota ($40 - 60 \pm 2$ °C). Baňky byly umístěny na předem vyhřáté vodní lázni o teplotě 40 ± 2 °C a 60 ± 2 °C a míchány míchadly stanovenou dobu 6 hodin. Po uplynutí doby míchání byly baňky umístěny do inkubátorů předehřátých na teploty 40 ± 2 °C a 60 ± 2 °C. Z celkové doby hydrolyzy 24 hodin byla směs míchána 6 hodin a 18 hodin inkubována bez míchání. Po ukončení inkubace bylo změřeno pH a vzorky byly přefiltrovány přes 20 vrstev PAD tkaničky. Tuhé fáze byly následně vysušeny při 103 ± 2 °C po dobu 24 hodin. Po vyjmutí ze sušárny a vychladnutí v exsikátoru zváženy. Kapalné fáze byly zahřány nad teplotu 80 ± 2 °C, aby došlo k deaktivaci enzymu. Dále byly kapalně fáze zahuštěny na jednu polovinu objemu na vakuové odparce. Zahuštěné kapalně fáze byly nality do silikonové formy a vysušeny v sušárně při teplotě 70 ± 2 °C. Vysušené hydrolyzáty byly rozdrceny na prášek ve třecí misce a vloženy do exsikátoru. Z vysušených a zvážených tuhých fází byla stanovena účinnost (η) hydrolyzy podle vztahu:

$$\eta = 100 - \left(\frac{m_1}{n} * 100 \right) (\%) \quad (7)$$

m_1 ... hmotnost nerozloženého podílu (g)

n ... navážka vzorku (g)

Alkalicko–enzymová hydrolyza byla provedena výše popsaným postupem shodně se dvěma různými enzymy Esperase 6.0 T a Everlase 6.0 T.



Obr.v11: Kapalná fáze po alkalicko-enzymovém rozkladu ovčí vlny



Obr. 12: Tuhá fáze po alkalicko-enzymovém rozkladu ovčí vlny



Obr. 13: Zahuštěná, vysušená a rozdrcená kapalná fáze (hydrolyzát)

6.6 Analytické metody

6.6.1 Stanovení obsahu popelovin

Stanovení bylo prováděno ze sušiny (při 103 ± 1 °C). Na analytických vahách s přesností 0,0001 g se zvaží přehřaný a vychladnutý kelímek z křemičitého, žáruvzdorného skla. Na analytických vahách se naváží do kelímku asi 1,0 g nerozložené fáze. Navážka

vzorku v kelímku byla opatrně spálena. První etapa spalování byla prováděna nad kahanem 30 minut až do svého zuhelnatění. Ve druhé etapě byl vzorek vyžihán v muflové peci při 550 ± 4 °C po dobu 60 minut. Poté byl žihací kelímek se vzorkem vychlazen v exsikátoru a bylo zváženo a přepočítáno množství popelovin ve vzorku. Množství popelovin (m_p) se přepočítalo podle vztahu:

$$m_p = \frac{m_7 - m_6}{n_H} * 100 (\%) \quad (8)$$

m_6 ... hmotnost žihacího kelímku bez vzorku (g)

m_7 ... hmotnost žihacího kelímku včetně vzorku po vyžihání (g)

n_H ... navážka hydrolyzátu vysušeného při 103°C (g)

6.6.2 Stanovení síry

Vzorek hydrolyzátu se zmineralizuje a sírany se v zmineralizovaném produktu stanoví gravimetricky. Ionty SO_4^{2-} reagují ve slabě okyseleném prostředí s ionty Ba^{2+} za vzniku velmi málo rozpustné sraženiny síranu barnatého:



Do Kjeldahlovy baňky bylo naváženo 1,5 g odtučněné vlny. Bylo přidáno 50 ml koncentrované kyseliny dusičné. Vzniklá směs byla mineralizována 2 hodiny do vymizení posledních zbytků uhlíku a vyčeření roztoku. Přičemž byly po každých 15 minutách vaření přidávány 3 ml 30% -ního peroxidu vodíku. Peroxid vodíku byl přidáván po kapkách přes nálevku s úzkou kapilárou. Po ochlazení byl roztok opatrně přelit do 200 ml odměrné baňky a dolit destilovanou vodou až po značku. Vzorek byl přefiltrován a již nebyl doplňován vodou. Směs byla přelita do 600 ml kádinky a zahřána k varu. Za stálého míchání bylo ke směsi přidáváno po částech 120 ml horkého roztoku 10% -ního chloridu barnatého, než se vytvořila sraženina. Směs byla asi 1 minutu míchána a poté byla vařena na vodní lázni po dobu 1 hodiny.

Směs se nechala 24 hodin odležet. Vzniklá sraženina byla filtrována přes filtrační papír KA 4. Sraženina byla promývána horkou destilovanou vodou, dokud nebyly odstraněny veškeré chloridy. Zkouška na chloridy ve vzorku byla prováděna roztokem dusičnanu stříbrného. Pokud byly chloridy přítomny ve vzorku, přidavek dusičnanu stříbrného způso-

boval mléčné zakalení. Filtr se sraženinou byl vysušen při teplotě 103 ± 2 °C a poté byl přenesen do předem vyžíhaného a zváženého kelímku z křemenného skla. Filtr společně se sraženinou byl opatrně zpopelněn po dobu cca 30 minut nad kahanem, a poté byl kelímek žíhán v muflové peci při teplotě 650 ± 4 °C po dobu 2 hodin. Po ochlazení v exsikátoru byl kelímek zvážen.

Množství síranů ve vzorku se vypočítá podle vzorce:

$$c_m(\text{SO}_4^{2-}) = \frac{m\text{BaSO}_4 \cdot f_p}{n} \cdot 100 \quad (10)$$

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

$m\text{BaSO}_4$...hmotnost BaSO_4 zjištěná vážením v g

f_p ...stechiometrický přepočítávací faktor, pro přepočet BaSO_4 na SO_4^{2-} , $f = 0,412$

n ...navážka vzorku na stanovení v g

Přepočet na množství síry:

$$c_m(\text{S}) = \frac{M(\text{S})}{M(\text{SO}_4^{2-})} \cdot c_m(\text{SO}_4^{2-}) \quad (11)$$

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

$c_m(\text{S})$...množství síry v %

$M(\text{SO}_4^{2-})$...molární hmotnost síranů 96,056 g/mol

$M(\text{S})$...molární hmotnost síry 32,06 g/mol

6.6.3 Mikrochemické stanovení dusíku – Micro-Kjeldahlova metoda (upravený postup)

Do mineralizační baňky bylo naváženo na analytických vahách 0,2 g vzorku s přesností na 0,0001 g. Dále bylo přidáno 5,6 ml koncentrované kyseliny sírové, 20 ml 0,02N HCl a tableta katalyzátoru. Mineralizační baňka byla vložena do mineralizátoru, kde při teplotě 480 ± 2 °C probíhala mineralizace do vyčerpání vzorku (1 – 1,5 hodiny). Po ukončení mineralizace se obsah z mineralizační baňky nechal zchladnout, poté byl zředěn malým množstvím vody. Po rozpuštění pevných částí byl přelit do 50 ml odměrné baňky a doplněn

po rysku destilovanou vodou. Do nálevky Parnas-Wagnerova přístroje bylo odpipetováno 25 ml mineralizátu a 20 ml roztoku NaOH, do předlohy Parnas-Wagnerova přístroje bylo nalito 15 ml 2% -ní H_3BO_3 . Od počátku varu destilace probíhala cca 20 minut a uvolněný amoniak se s vodní parou jímá do předlohy. Po dokončení destilace bylo do předlohy přidáno pár kapek Tashirova činidla a vzorek byl titrován 0,02N HCl do růžového zbarvení.

Procentuelní obsah dusíku ve vzorku se vypočítá podle vzorce:

$$\%N = \frac{V \cdot c \cdot 14,007,2}{n_H} \cdot 100 \quad (12)$$

V ...objem odměrného roztoku HCl spotřebovaný na titraci (ml)

c ...molární koncentrace HCl ($c = 0,02 \text{ mol.l}^{-1}$)

n_H ...navážka hydrolyzátu vysušeného při 103 °C (mg)

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Alkalicko–enzymová hydrolýza ovčí vlny s enzymem Esperase 6.0 T

V tabulce 6 jsou uvedeny podmínky rozkladu ovčí vlny dvoustupňovou alkalicko–enzymovou hydrolýzou s enzymem Esperase 6.0 T a v tabulce 7 jsou uvedeny výsledky rozkladu.

Tabulka 6: Podmínky rozkladu ovčí vlny dvoustupňovou alkalicko–enzymovou hydrolýzou s enzymem Esperase 6.0 T

Experiment č.	Faktor A: Koncentrace Ca(OH) ₂ (%)	Faktor B: Teplota 1. fáze hydrolýzy (°C)	Faktor C: Teplota 2. fáze hydrolýzy (°C)
1	0,2	40	40
2	0,2	40	60
3	0,2	80	40
4	0,2	80	60
5	0,6	40	40
6	0,6	40	60
7	0,6	80	40
8	0,6	80	60
Sředové pokusy	0,4	60	50

Tabulka 7: Výsledky rozkladu ovčí vlny dvoustupňovou alkalicko–enzymovou hydrolýzou s enzymem Esperase 6.0 T

Experiment č.	Vstup vlny (g)	Přídavek enzymu (g)	Tuhá fáze (g)	Účinnost rozkladu (%)	pH po ukončení hydrolýzy
1	10,0370	0,5008	8,9588	10,7423	8,64
2	10,0291	0,5047	8,1886	18,3516	7,53
3	10,0431	0,5027	8,8321	12,0580	8,07
4	10,0479	0,5012	7,5001	25,3565	7,18
5	10,0782	0,5021	8,3205	17,4406	8,46
6	10,0556	0,5041	7,3778	26,6299	7,70
7	10,0098	0,5004	5,4168	45,8850	8,55
8	10,0975	0,5042	3,7502	62,8601	7,79
Sřed. p. 1	9,9987	0,5049	7,7675	22,3149	8,09
Sřed. p. 2	10,0215	0,5053	7,8397	21,7712	8,10

V tabulce 8 jsou uvedeny hodnoty Fischerova testu, které vyjadřují statistickou významnost vlivu faktorů na účinnost rozkladu pro zvolené parametry a jejich interakce. Všechny sledované faktory jsou statisticky významné a mají vliv na množství výtěžku. Největší vliv na množství výtěžku má faktor A: Koncentrace $\text{Ca}(\text{OH})_2$, zatímco nejmenší vliv na množství výtěžku má faktor C: Teplota 2. fáze rozkladu.

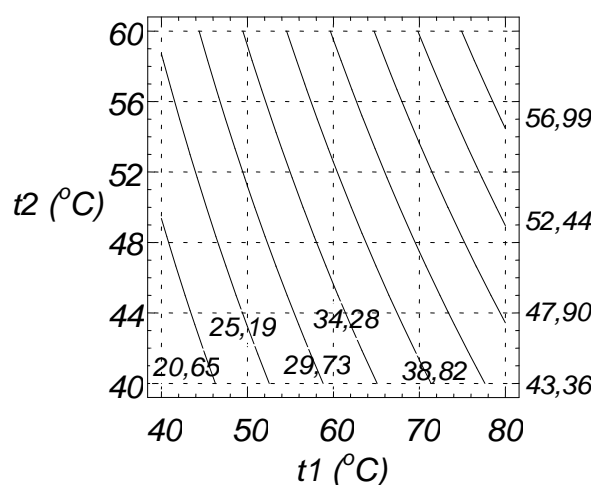
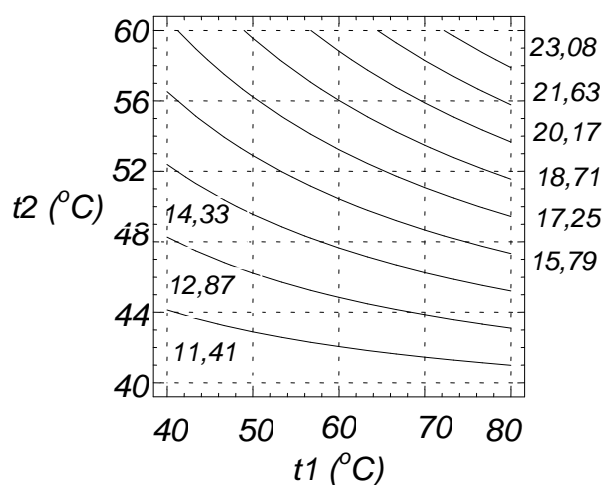
Tabulka 8: Analýza rozptylu a Fischerova testu statistické významnosti vlivu faktorů na množství výtěžku

Sledované faktory	Součet čtverců	F-test
A: Koncentrace $\text{Ca}(\text{OH})_2$	930,53	59,51
B: Teplota 1. fáze rozkladu	665,76	42,58
C: Teplota 2. fáze rozkladu	276,6	17,69
Interakce AB	397,34	25,41
Interakce AC	3,48	0,22
Interakce BC	22,78	1,46
Celková chyba	46,91	
Celková chyba (kor.)	2342,4	
$F_{\text{krit}}^{95\%} = 10,13$		

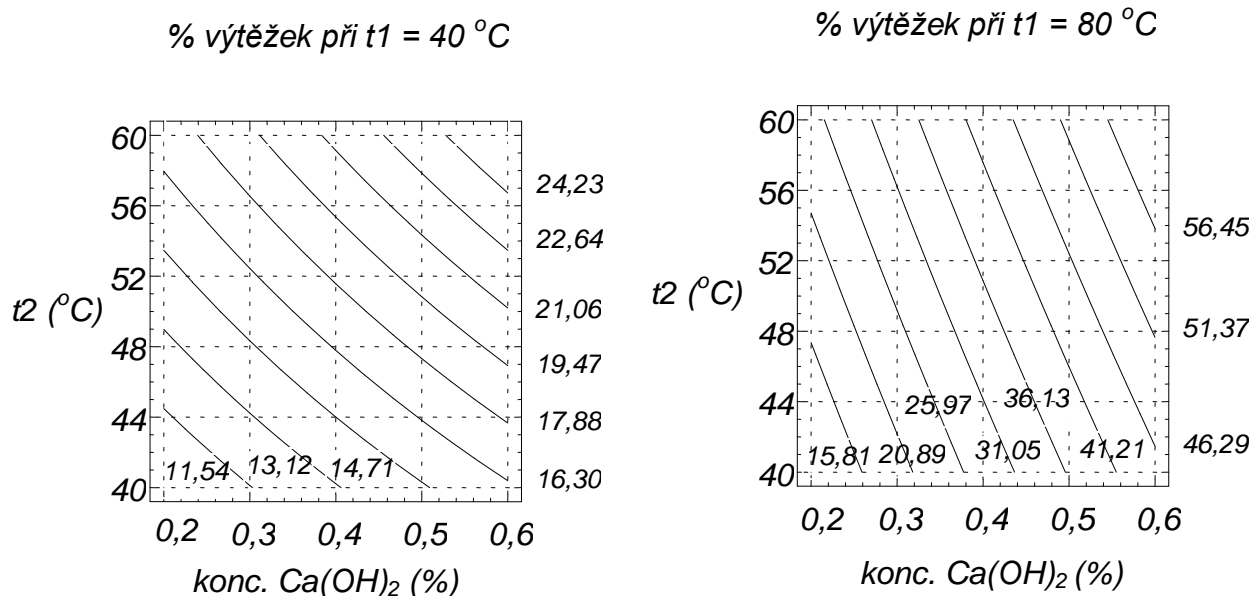
Množství výtěžku je popsáno následující rovnicí a jejím korelačním koeficientem (R^2):

$$Y = 22,21 - 68,29A - 0,67B - 0,05C + 1,76AB + 0,33AC + 0,01BC ; R^2 = 0,97998$$

Vliv parametrů alkalicko–enzymového rozkladu na množství výtěžku je popsán pomocí vrstevnicových diagramů (Obr. 14 – 16). Obrázek 14 znázorňuje vliv teploty 1. fáze rozkladu (t_1) a teploty 2. fáze rozkladu (t_2) na množství výtěžku při použití 0,2% $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a 0,6% $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Z diagramů je patrné, že při minimech sledovaných parametrů ($t_1 = 40\text{ }^\circ\text{C}$ a $t_2 = 40\text{ }^\circ\text{C}$) bylo v 0,2% $\text{Ca}(\text{OH})_2$ získáno jen 11,41% výtěžku, ale v 0,6% $\text{Ca}(\text{OH})_2$ bylo získáno 20,65% výtěžku. Při maximech sledovaných parametrů ($t_1 = 80\text{ }^\circ\text{C}$ a $t_2 = 60\text{ }^\circ\text{C}$) bylo v 0,2% $\text{Ca}(\text{OH})_2$ získáno jen 23,08% výtěžku, zatímco v 0,6% $\text{Ca}(\text{OH})_2$ bylo získáno již 56,99% výtěžku, což je téměř o 34% větší výtěžek. Ze sklonu křivek lze vypočítat, že vliv teploty 1. fáze rozkladu (t_1) je vyšší než vliv teploty 2. fáze rozkladu (t_2) při použití 0,6% $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Naopak při použití 0,2% $\text{Ca}(\text{OH})_2$ je vliv teploty 1. fáze rozkladu (t_1) nižší než vliv teploty 2. fáze rozkladu (t_2).

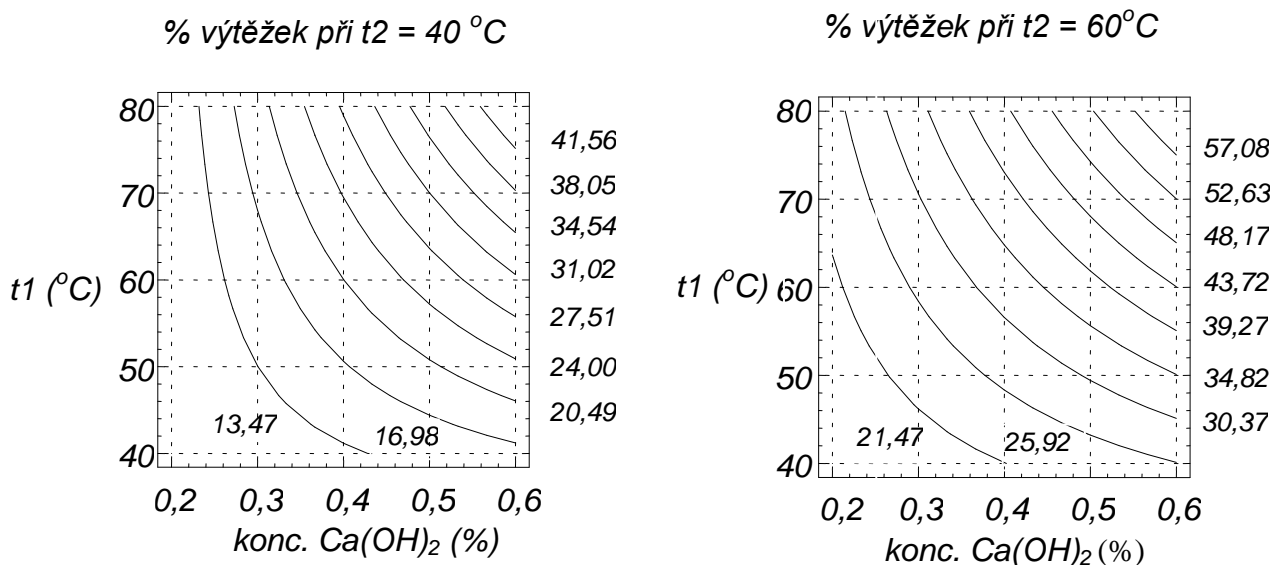
% výtěžek při koncentraci $\text{Ca(OH)}_2 = 0,2\%$ % výtěžek při koncentraci $\text{Ca(OH)}_2 = 0,6\%$ Obr. 14: Vliv teploty 1. fáze rozkladu (t_1) a teploty 2. fáze rozkladu (t_2) na množství výtěžku

Na obrázku 15 je znázorněn vliv koncentrace Ca(OH)_2 a teploty 2. fáze rozkladu (t_2) na množství výtěžku při různých teplotách 1. fáze rozkladu (t_1): 40 °C a 80 °C. Z diagramů je patrné, že při minimech sledovaných parametrů (koncentrace $\text{Ca(OH)}_2 = 0,2\%$ a $t_2 = 40$ °C) byl při teplotě 40 °C v 1. fázi rozkladu (t_1) výtěžek jen 11,54%, téměř stejný výtěžek 15,81% byl při teplotě 80 °C v 1. fázi rozkladu (t_1). Při maximech sledovaných parametrů (koncentrace $\text{Ca(OH)}_2 = 0,6\%$ a $t_2 = 60$ °C) byl při teplotě 40 °C v 1. fázi rozkladu (t_1) výtěžek jen 24,23%, při teplotě 80 °C v 1. fázi rozkladu (t_1) byl výtěžek zvýšen zhruba o 32% na 56,45%. Ze sklonu křivek diagramů můžeme vyvodit, že koncentrace Ca(OH)_2 má výraznější vliv na výtěžek, především při teplotě 80 °C v 1. fázi rozkladu (t_1).



Obr. 15: Vliv koncentrace Ca(OH)_2 a teploty 2. fáze rozkladu (t_2) na množství výtěžku

Vliv koncentrace Ca(OH)_2 a teploty 1. fáze rozkladu (t_1) na množství výtěžku při různých teplotách 2. fáze rozkladu (t_2): 40 °C a 60 °C je znázorněn na obrázku 16. Ze sklonu křivek lze vypočítat, že vliv koncentrace Ca(OH)_2 a teploty 1. fáze rozkladu (t_1) na množství výtěžku je skoro stejný. Při minimech sledovaných parametrů (koncentrace $\text{Ca(OH)}_2 = 0,2\%$ a $t_1 = 40\text{ °C}$) byl při teplotě 40 °C v 2. fázi rozkladu (t_2) výtěžek $13,47\%$, při teplotě 60 °C v 2. fázi rozkladu (t_2) byl výtěžek $21,47\%$. Při maximech sledovaných parametrů (koncentrace $\text{Ca(OH)}_2 = 0,6\%$ a $t_1 = 80\text{ °C}$) byl při teplotě 40 °C v 2. fázi rozkladu (t_2) výtěžek $41,56\%$, při teplotě 60 °C v 2. fázi rozkladu (t_2) byl výtěžek $57,08\%$.



Obr. 16: Vliv koncentrace Ca(OH)_2 a teploty 1. fáze rozkladu (t_1) na množství výtěžku

7.2 Alkalicko–enzymová hydrolýza ovčí vlny s enzymem Everlase 6.0 T

V tabulce 9 jsou uvedeny podmínky rozkladu ovčí vlny dvoustupňovou alkalicko–enzymovou hydrolýzou s enzymem Everlase 6.0 T a v tabulce 10 jsou uvedeny výsledky rozkladu.

Tabulka 9: Podmínky rozkladu ovčí vlny dvoustupňovou alkalicko–enzymovou hydrolýzou s enzymem Everlase 6.0 T

Experiment č.	Faktor A: Koncentrace Ca(OH) ₂ (%)	Faktor B: Teplota 1. fáze hydrolýzy (°C)	Faktor C: Teplota 2. fáze hydrolýzy (°C)
1	0,2	40	40
2	0,2	40	60
3	0,2	80	40
4	0,2	80	60
5	0,6	40	40
6	0,6	40	60
7	0,6	80	40
8	0,6	80	60
Středové pokusy	0,4	60	50

Tabulka 10: Výsledky rozkladu ovčí vlny dvoustupňovou alkalicko–enzymovou hydrolýzou s enzymem Everlase 6.0 T

Experiment č.	Vstup vlny (g)	Přídavek enzymu (g)	Tuhá fáze (g)	účinnost rozkladu (%)	pH po ukončení hydrolýzy
1	10,0733	0,5077	9,2603	8,0708	8,72
2	10,0576	0,5078	8,9297	11,2144	7,68
3	10,0503	0,5015	8,9366	11,0813	8,11
4	10,0624	0,5086	8,4458	16,0657	7,39
5	10,0001	0,5035	8,7227	12,7739	8,82
6	10,0617	0,5013	8,7788	12,7503	7,65
7	10,0112	0,5057	6,8198	31,8782	8,61
8	10,0322	0,5009	5,8191	41,9958	7,72
Střed. p. 1	9,9677	0,5031	8,6529	13,1906	8,67
Střed. p. 2	10,0139	0,5035	8,5028	15,0900	8,88

V tabulce 11 jsou uvedeny hodnoty Fischerova testu, které vyjadřují statistickou významnost vlivu faktorů na účinnost rozkladu pro zvolené parametry a jejich interakce. Pouze faktor A: Koncentrace $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a faktor B: Teplota 1. fáze rozkladu jsou statisticky významné a mají vliv na množství výtěžku. Největší vliv na množství výtěžku má faktor B: Teplota 1. fáze rozkladu, zatímco nejmenší vliv na množství výtěžku má faktor C: Teplota 2. fáze rozkladu, tento faktor není ani statisticky významný pro takto zvolené podmínky při rozkladu ovčí vlny.

Tabulka 11: Analýza rozptylu a Fischerova testu statistické významnosti vlivu faktorů na množství výtěžku

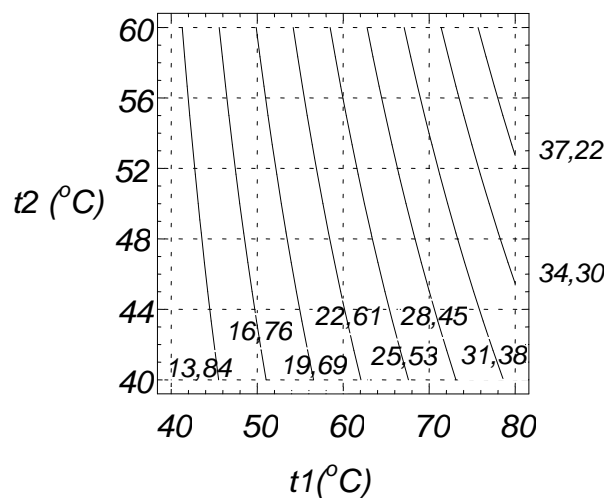
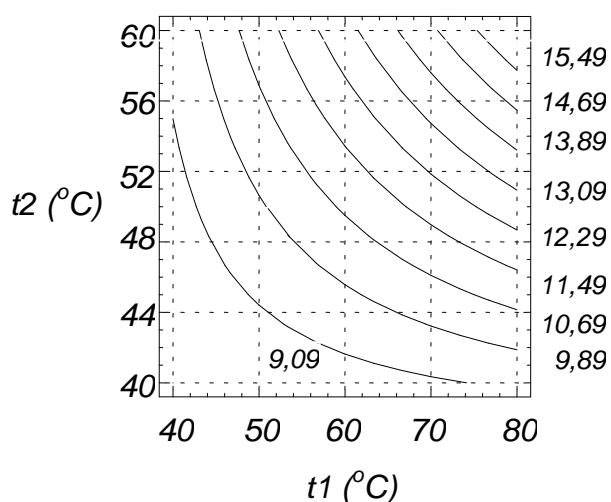
Sledované faktory	Součet čtverců	F-test
A: Koncentrace $\text{Ca}(\text{OH})_2$	350,73	28,33
B: Teplota 1.fáze rozkladu	395,23	31,92
C: Teplota 2.fáze rozkladu	41,54	3,36
Interakce AB	204,93	16,55
Interakce AC	0,49	0,04
Interakce BC	17,97	1,45
Celková chyba	37,14	
Celková chyba (kor.)	1048,03	
$F_{\text{krit}}^{95\%} = 10,13$		

Množství výtěžku je popsáno následující rovnicí a jejím korelačním koeficientem (R^2):

$$Y = 26,99 - 48,97A - 0,53B - 0,21C + 1,27AB + 0,12AC + 0,01BC ; R^2 = 0,96456$$

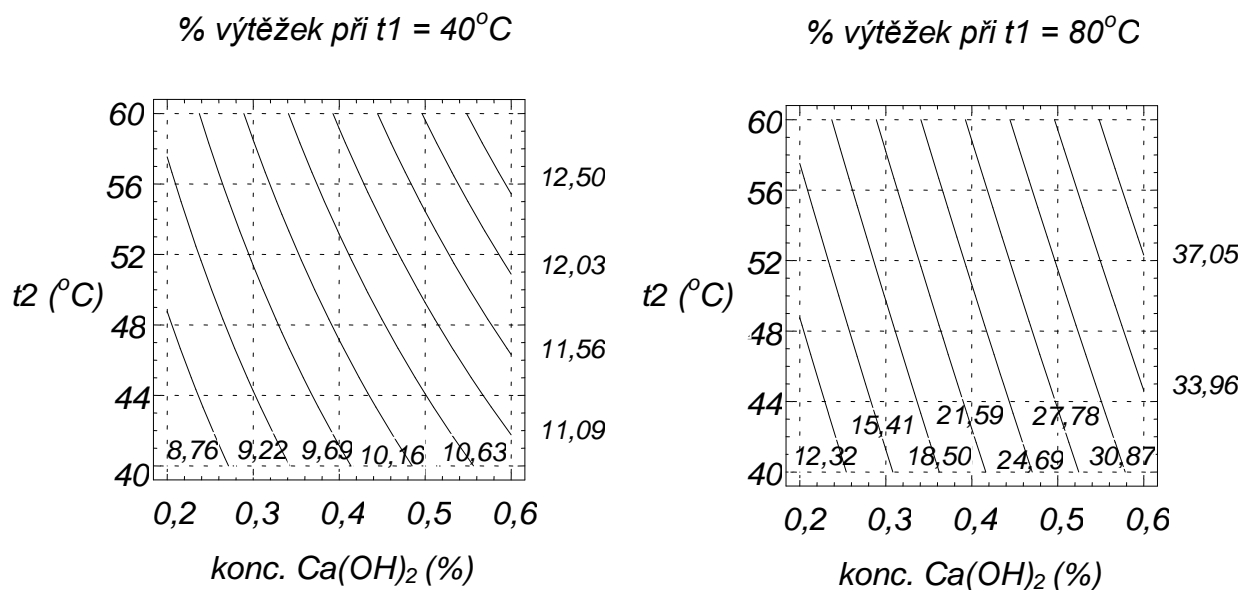
Na obrázcích 17 – 19 jsou znázorněny vrstevnicové diagramy rozkladu ovčí vlny dvoustupňovou alkalicko–enzymovou hydrolyzou při různých podmínkách. Obrázek 17 znázorňuje vliv teploty 1. fáze rozkladu (t_1) a teploty 2. fáze rozkladu (t_2) na množství výtěžku při použití 0,2% $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a 0,6% $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Z diagramů je patrné, že při minimech sledovaných parametrů ($t_1 = 40^\circ\text{C}$ a $t_2 = 40^\circ\text{C}$) bylo v 0,2% $\text{Ca}(\text{OH})_2$ získáno jen 9,09% výtěžku, ale v 0,6% $\text{Ca}(\text{OH})_2$ bylo získáno 13,84% výtěžku. Při maximech sledovaných parametrů ($t_1 = 80^\circ\text{C}$ a $t_2 = 60^\circ\text{C}$) bylo v 0,2% $\text{Ca}(\text{OH})_2$ získáno jen 15,49% výtěžku, zatímco v 0,6% $\text{Ca}(\text{OH})_2$ bylo získáno již 37,22% výtěžku, což je skoro o 22% větší výtěžek. Sklon křivek u obou diagramů je rozdílný. Ze sklonu křivek diagramu při použití 0,6% $\text{Ca}(\text{OH})_2$ lze vypočítat, že vliv teploty 1. fáze rozkladu (t_1) je vyšší než vliv teploty 2. fáze rozkladu (t_2). Při použití 0,2% $\text{Ca}(\text{OH})_2$ je vliv faktorů přibližně stejný.

% výtěžek při koncentraci $\text{Ca(OH)}_2 = 0,2\%$ % výtěžek při koncentraci $\text{Ca(OH)}_2 = 0,6\%$



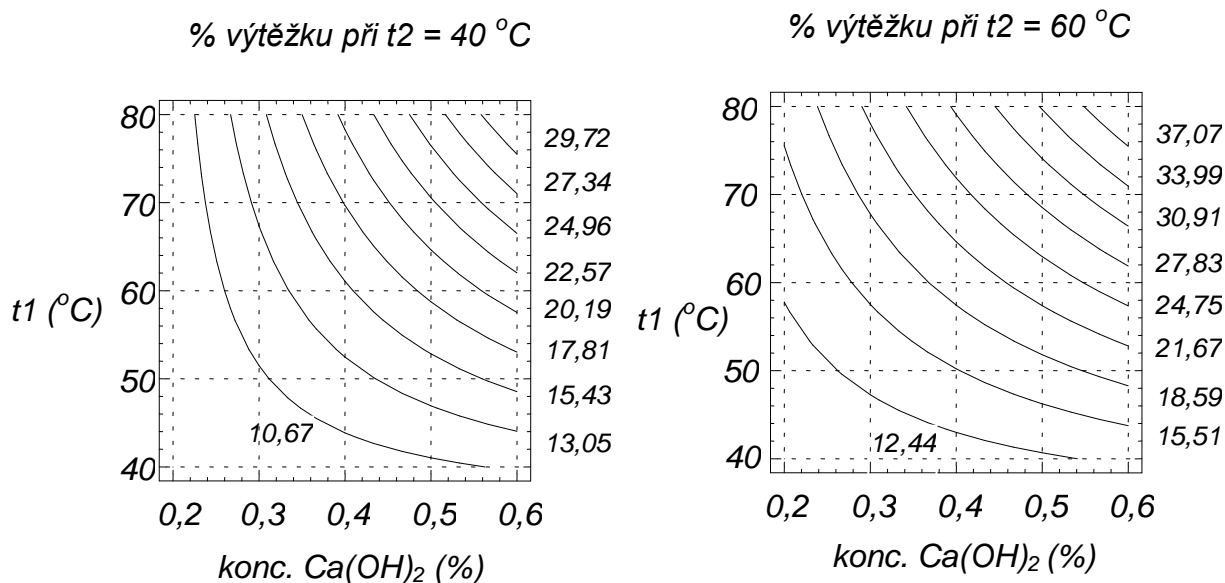
Obr. 17: Vliv teploty 1. fáze rozkladu (t_1) a teploty 2. fáze rozkladu (t_2) na množství výtěžku

Na obrázku 18 můžeme sledovat vliv koncentrace Ca(OH)_2 a teploty 2. fáze rozkladu (t_2) na množství výtěžku při různých teplotách 1. fáze rozkladu (t_1): 40 °C a 80 °C. Z diagramů je patrné, že při minimech sledovaných parametrů (koncentrace $\text{Ca(OH)}_2 = 0,2\%$ a $t_2 = 40$ °C) byl při teplotě 40 °C v 1. fázi rozkladu (t_1) výtěžek jen 8,76%, výtěžek 12,32% byl při teplotě 80 °C v 1. fázi rozkladu (t_1). Při maximech sledovaných parametrů (koncentrace $\text{Ca(OH)}_2 = 0,6\%$ a $t_2 = 60$ °C) byl při teplotě 40 °C v 1. fázi rozkladu (t_1) výtěžek jen 12,50%, při teplotě 80 °C v 1. fázi rozkladu (t_1) byl výtěžek téměř o 25% vyšší. Z křivek diagramů můžeme vyvodit, že koncentrace Ca(OH)_2 má mnohem výraznější vliv na výtěžek než teplota 2. fáze rozkladu.



Obr. 18: Vliv koncentrace Ca(OH)_2 a teploty 2. fáze rozkladu (t_2) na množství výtěžku

Vliv koncentrace Ca(OH)_2 a teploty 1. fáze rozkladu (t_1) na množství výtěžku při různých teplotách 2. fáze rozkladu (t_2) - 40°C a 60°C je znázorněn na obrázku 19. Ze sklonu křivek lze vypočítat, že vliv koncentrace Ca(OH)_2 a teploty 1. fáze rozkladu (t_1) na množství výtěžku je skoro stejný. Při minimech sledovaných parametrů (koncentrace $\text{Ca(OH)}_2 = 0,2\%$ a $t_1 = 40^\circ\text{C}$) byl při teplotě 40°C v 2. fázi rozkladu (t_2) výtěžek $10,67\%$, při teplotě 60°C v 2. fázi rozkladu (t_2) byl výtěžek velmi podobný, a to $12,44\%$. Při maximech sledovaných parametrů (koncentrace $\text{Ca(OH)}_2 = 0,6\%$ a $t_1 = 80^\circ\text{C}$) byl při teplotě 40°C v 2. fázi rozkladu (t_2) výtěžek $29,72\%$, při teplotě 60°C v 2. fázi rozkladu (t_2) byl výtěžek $37,07\%$.



Obr. 19: Vliv koncentrace Ca(OH)_2 a teploty 1. fáze rozkladu (t_1) na množství výtěžku

7.3 Výsledky stanovení analytických metod

7.3.1 Výsledky stanovení obsahu popelovin

Stanovení obsahu popelovin bylo provedeno u tuhých fází metodou žihání (postup metody je popsán výše) a u keratinových hydrolyzátů TGA analýzou. TGA analýzou byl také stanoven obsah sušiny v keratinových hydrolyzátech. U obou metod byly stanoveny obsahy popela pouze u nejvíce rozložených vzorků – experiment 8 (parametry hydrolyzy: $c = 0,6\%$; $t_1 = 80\text{ °C}$; $t_2 = 60\text{ °C}$) a nejméně rozložených vzorků – experiment 1 (parametry hydrolyzy: $c = 0,2\%$; $t_1 = 40\text{ °C}$; $t_2 = 40\text{ °C}$). Obsah popelovin byl také stanoven u středových pokusů. Výsledky stanovení obsahu popelovin jsou v tabulce 12.

Tabulka 12: Výsledky stanovení obsahu popelovin a sušiny

Experiment	Obsah popela (%)		Obsah sušiny (%)
	Tuhá fáze	Keratinový hydrolyzát	Keratinový hydrolyzát
8 *	4,14	24,13	96,61
8 **	4,19	35,85	95,34
1 *	2,12	34,65	97,14
1 **	2,43	33,86	95,62
středové pokusy *	2,46	32,37	96,13
středové pokusy **	2,46	26,06	95,74

* experiment s enzymem Esperase 6.0 T

** experiment s enzymem Everlase 6.0 T

U keratinových hydrolyzátů byla provedena termogravimetrická analýza (TGA) v rozsahu teplot 25 – 600 °C. Rychlost vyhřívání dT/dt byla nastavena na 20 °C/min, při dosažení 600 °C byla tato teplota udržována po dobu 120 minut. Po konci expozice byla z křivky TGA odečtena sušina při 103 °C a popel po ukončení expozice.

Obsah popela je mnohem menší v tuhých fázích než v samotném hydrolyzátu. U tuhých fází je obsah popela zhruba dvakrát vyšší u experimentů 8 (nejvíce rozložené vzorky) než ve zbývajících vzorcích. Naopak je tomu u keratinových hydrolyzátů kde větší obsah popela obsahují experimenty 1 (nejméně rozložené vzorky) než experimenty 8. Obecně je obsah popela v hydrolyzátech poměrně vysoký.

7.3.2 Výsledky stanovení síry

Stanovení síry bylo provedeno pouze u keratinových hydrolyzátů, a to u nejvíce rozložených vzorků, nejméně rozložených vzorků a středových pokusů. Výsledky stanovení síry jsou znázorněny v tabulce 13.

Tabulka 13: Výsledky stanovení síry

Experiment	Obsah síry (%)
8 *	2,98
8 **	4,08
1 *	6,07
1 **	6,54
středové pokusy *	5,47
středové pokusy **	9,62

* experiment s enzymem Esperase 6.0 T

** experiment s enzymem Everlase 6.0 T

Z výsledků stanovení síry vyplývá, že obsah síry ve vyšší u experimentů 1 než u experimentů 8. Celkově nejvyšší obsah síry je u hodnoty středového pokusu s enzymem Everlase 6.0 T.

7.3.3 Výsledky stanovení dusíku

Obsah dusíku byl stanoven u keratinových hydrolyzátů i u tuhých fází. Opět pouze u nejvíce rozložených vzorků, nejméně rozložených vzorků a středových pokusů. Výsledky stanovení dusíku jsou znázorněny v tabulce 14.

Tabulka 14: Výsledky stanovení dusíku

Experiment	Obsah dusíku (%)	
	Tuhé fáze	Keratinový hydrolyzát
8 *	12,86	11,10
8 **	11,53	9,87
1 *	14,09	6,85
1 **	14,14	5,27
středové pokusy *	13,87	8,44
středové pokusy **	14,24	6,80

* experiment s enzymem Esperase 6.0 T

** experiment s enzymem Everlase 6.0 T

Z výsledků je patrné, že obsah dusíku je vyšší u tuhých fází než u hydrolyzátů. U experimentů 1 je obsah dusíku tuhých fází podstatně vyšší než u hydrolyzátů. Podstatně menší rozdíl v obsahu dusíku je mezi touhou fází a hydrolyzátem u experimentů 8.

7.4 Porovnání výsledků

Vyšší účinnosti rozkladu alkalicko–enzymové hydrolýzy ovčí vlny bylo dosaženo s použitím enzymu Esperase 6.0 T. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo s použitím enzymu Esperase 6.0 T v experimentu 8 (parametry hydrolýzy: $c = 0,6\%$; $t_1 = 80\text{ }^\circ\text{C}$; $t_2 = 60\text{ }^\circ\text{C}$), kde účinnost rozkladu byla 62,86%. Při nejmírnějších podmínkách rozkladu – experiment 1 (parametry hydrolýzy: $c = 0,2\%$; $t_1 = 40\text{ }^\circ\text{C}$; $t_2 = 40\text{ }^\circ\text{C}$) bylo rozloženo pouze 10,74% původní navážky vlny. Z výsledků lze pozorovat, že s rostoucími teplotami 1. i 2. fáze rozkladu a s rostoucí koncentrací $\text{Ca}(\text{OH})_2$ účinnost rozkladu roste. Největší vliv na množství výtěžku má koncentrace $\text{Ca}(\text{OH})_2$, zatímco nejmenší vliv má teplota 2. fáze rozkladu.

Alkalicko–enzymová hydrolýza ovčí vlny s enzymem Everlase 6.0 T dosahuje nižší účinnosti rozkladu, než tomu bylo při použití enzymu Esperase 6.0 T. Nejvyšší účinnost rozkladu vykazovat také experiment 8 (parametry hydrolýzy: $c = 0,6\%$; $t_1 = 80\text{ }^\circ\text{C}$; $t_2 = 60\text{ }^\circ\text{C}$), při rozkladu za těchto podmínek bylo rozloženo 42% původní navážky vlny. Celkově nejnižšího výtěžku bylo dosaženo v experimentu 1 (parametry hydrolýzy: $c = 0,2\%$; $t_1 = 40\text{ }^\circ\text{C}$; $t_2 = 40\text{ }^\circ\text{C}$) s enzymem Everlase 6.0 T, výtěžek byl pouze 8,1%. Největší vliv na množství výtěžku má teplota 1. fáze rozkladu, zatímco nejmenší vliv na množství výtěžku má teplota 2. fáze rozkladu, tento faktor není ani statisticky významný a nemá vliv na množství výtěžku.

ZÁVĚR

Teoretická část diplomové práce se ve svém úvodu věnuje složení keratinu, jeho makromolekulární struktuře a různým chemickým reakcím keratinu. Dále je popsána ovčí vlna, její morfologická a histologická stavba, složení vlny a její vlastnosti. Teoretická část se rovněž zabývá zpracováním keratinových odpadů, zejména přípravou keratinových hydrolyzátů z odpadního keratinu kožedělného a masného průmyslu. V závěru jsou uvedeny možnosti aplikací keratinových hydrolyzátů.

Cílem experimentální části byla příprava keratinového hydrolyzátu dvoustupňovou alkalicko–enzymovou hydrolyzou odpadní ovčí vlny. Experimenty rozkladu vlny byly provedeny metodou dvouúrovňových faktorových pokusů se třemi sledovanými proměnnými při dvou úrovních (minimální a maximální) se dvěma středovými pokusy. Dvouúrovňové faktorové pokusy otestovaly vlivy jednotlivých proměnných na průběh reakce. Sledované proměnné byly koncentrace hydroxidu vápenatého (0,2 – 0,6%), teplota 1. fáze hydrolyzy - alkalická hydrolyza (40 – 80 °C) a teplota 2. fáze hydrolyzy - enzymová hydrolyza (40 – 60 °C). Celková doba 1. i 2. fáze hydrolyzy byla konstantní 24 hodin. Z celkové doby hydrolyzy byla konstantní i doba míchání (6 hodin) a koncentrace enzymu (5%). Experimenty byly provedeny se dvěma různými enzymy, při první alkalicko–enzymové hydrolyze byla použita proteináza Esperase 6.0 T. Při druhé hydrolyze byla použita proteináza Everlase 6.0 T.

Po rozkladu byla zbylá nerozložená tuhá fáze a kapalná fáze (keratinový hydrolyzát) oddělena a gravimetricky bylo zjištěno procento nerozložené vlny. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny v programu Statgraphics verze 6,0 a byly stanoveny optimální podmínky rozkladu ovčí vlny.

Vyšší účinnosti rozkladu alkalicko–enzymové hydrolyzy ovčí vlny bylo dosaženo s použitím enzymu Esperase 6.0 T. Nejlepšího výsledku, což je 62,86% výtěžek bylo dosaženo s použitím enzymu Esperase 6.0 T, kde koncentrace hydroxidu vápenatého byla 0,6%, teplota 1. fáze rozkladu 80 °C a teplota 2. fáze rozkladu byla 60 °C, tzn. při maximech sledovaných parametrů. Celkově nejnižšího výtěžku rozkladu bylo dosaženo při hydrolyze enzymem Everlase 6.0 T při nejmírnějších podmínkách, kde koncentrace hydroxidu vápenatého byla 0,2%, teplota 1. fáze rozkladu 40 °C a teplota 2. fáze rozkladu byla také 40 °C. Účinnost tohoto rozkladu byla pouze 8,1%.

Z Fischerova testu statistické významnosti vlivu jednotlivých proměnných vyplývá, že při alkalicko–enzymové hydrolyze ovčí vlny s použitím enzymu Esperase 6.0 T jsou všechny sledované faktory statisticky významné a mají vliv na množství výtěžku. Největší vliv na množství výtěžku má koncentrace $\text{Ca}(\text{OH})_2$, zatímco nejmenší vliv na množství výtěžku má teplota 2. fáze rozkladu. Jinak je tomu u alkalicko–enzymové hydrolyzy s použitím enzymu Everlase 6.0 T, největší vliv má teplota 1. fáze rozkladu, a nejmenší vliv na množství výtěžku má teplota 2. fáze rozkladu, tento faktor jako jediný nepřekročil hranici statistické významnosti.

Jako optimální podmínky pro rozklad odpadní ovčí vlny na keratinové hydrolyzáty pro námi zvolené enzymy byly vybrány experimenty při maximech sledovaných faktorů (0,6% $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 80 °C a 60 °C), kdy bylo rozloženo 63% vlny (s přídavkem Esperase 6.0 T) a 42% vlny (s přídavkem Everlase 6.0 T), U těchto relativně vysokých výtěžků, ale musíme přihlídnout k celkově vyššímu obsahu popela v keratinových hydrolyzátech (25 – 35%).

Získané keratinové hydrolyzáty by mohly najít uplatnění v zemědělství jako proteinové přídavky do krmiv pro dobytek, jako hnojiva nebo jako přísady do biodegradovatelných fólií.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BLAŽEJ, A. a kol. *Štruktúra a vlastnosti vláknitých bielkovín*, VEDA – vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, 1. vydání, Bratislava 1978, ISBN 71-156-78, 453 s.
- [2] VOET, D., VOETOVÁ, J. G. *Biochemie*, Victoria Publishing, 1. vydání, Praha 1995, ISBN 80-85605-44-9, 1325 s.
- [3] BLAŽEJ, A. a kol. *Technologie kůže a kožešin*, SNTL - nakladatelství technické literatury, 1. vydání, Praha 1984, ISBN 04-817-84, 456 s.
- [4] MLÁDEK, M. a kol. *Zpracování odpadů kožedělného průmyslu*, SNTL – nakladatelství technické literatury, 1. vydání, Praha 1971, ISBN 04-837-71, 322 s.
- [5] KLÁSEK, A. *Nauka o polymerech II. Biopolymery*, SNTL – nakladatelství technické literatury, 1. vydání, Praha 1980, ISBN 05-023-80, 115 s.
- [6] VRBACKÝ, R., VRBACKÁ, V. *Technologie výroby kožešin*, SNTL – nakladatelství technické literatury, 3. vydání, Praha 1990, ISBN 04-828-90, 560 s.
- [7] BENDIT, E. G., FEUGHELMAN, M. *Keratin*, BIKALES, N.M., CONRAD, J., RUKS, A., PERLMAN, J. *Encyclopedia of polymer science and technology*, volume 8, Interscience Publisher a division of John Wiley and Sons, New York 1968, ISBN 64-22188, 839 s.
- [8] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D. *Potravinářská biochemie I.*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 1. vydání, Zlín 2005, ISBN 80-7318-295-5, 170 s.
- [9] KUČTÍK, J., HOŠEK, M., AXMANN R., MILERSKI, M. *Chov ovcí*, Mendlova zemědělská a lesnická universita v Brně, 1. vydání, Brno 2007, ISBN 978-80-7375-094-7, 112 s.
- [10] SIMPSON, W. S., CRAWSHAW, G. H. *Wool: Science and technology*, Woodhead Publishing, 2002, ISBN 978-1-85573-574-3, 377 p.
- [11] Ovcí vlna [online]. [cit. 2010-04-20]. Dostupný z WWW:
http://www.pleteni.eu/ovci_vlna.htm
- [12] MEYERS, M. A., CHEN, P., LIN A. Y., SEKI Y. *Biological materials: Structure and mechanical properties*, Progress in Materials Science, Vol. 53, 2008, p. 1 – 206

- [13] KIDA, K., MORIMURA, S., NODA, J., NISHIDA, Y., IMAI, T., OTAGARI, M. *Enzymatic Hydrolysis of Horn and Hoof of Cow and Buffalo*, Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol. 80, No. 5, 1995, p. 478 - 484
- [14] KREJČÍ, O., MOKREJŠ, P. *Sledování vlivu technologických podmínek na účinnost rozkladu odpadní ovčí vlny*, Waste forum 2010, číslo 1, s. 35 – 42, Odpadové fórum 2010, 21. – 23. 4. Kouty nad Desnou, Jeseníky
- [15] DALEV, P. G. *Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate*, Bioresource Technology, Vol. 48, 1994, p. 265 – 267
- [16] MOKREJŠ, P., LANGMAIER F. *Aplikace přírodních polymerů*, UTB Zlín, 2008, ISBN 978-80-7318-674-6, 132 s.
- [17] KATOH, K., SHIBAYAMA, M., TANABE, T., YAMAUCHI, K. *Preparation and physicochemical properties of compression-molded karati films*, Biomaterials, Vol. 25, 2004, p. 2265 - 2272
- [18] KREJČÍ, O., MOKREJŠ, P. *Zpracování keratinových odpadů a možnosti aplikací redukováných forem keratinu – literární studie*, Odpadové fórum 2009, APROCHEM 2009, 22. – 24. 4. 2009 Milovy
- [19] COWARD-KELLY, G., AGBOGBO, F. K., HOLTZAPPLE, M. T. *Lime treatment of keratinous materials for the generation of highly digestible animal feed: 2. Animal hair*, Bioresource Technology, Vol. 97, 2006, p. 1244 - 1352
- [20] COWARD-KELLY, G., CHANG, V. S., AGBOGBO, F. K., HOLTZAPPLE, M. T. *Lime treatment of keratinous materials for the generation of highly digestible animal feed: 1. Chicken feathers*, Bioresource Technology, Vol. 97, 2006, p. 1337 - 1343
- [21] KAWAHARA, Y., ENDO, R., KIMURA, T. *Chemical finishing of bast fibers and wood using hydrolyzed keratin from waste wool and down*, Textile Research Journal, 2004 p. 93 – 96
- [22] BÁLINT, B., BAGI, Z., TÓTH, A., RÁKHELY, G., PEREI, K., KOVÁCS, K. L. *Utilization of keratin-containing biowaste to produce biohydrogen*, Appl Microbiol Biotechnol, Vol. 69, 2005 p. 404 – 410

- [23] HOOD, C. M., HEALY, M. G. *Bioconversion of waste keratins: wool and feathers*, Resources, Conservation and Recycling, Vol. 11, 1994, p. 179 - 188
- [24] SCHROOYEN, P. M. M., DIJKSTRA, P. J., OBERTHÜR, R.C., BANTJES, A., FEIJEN, J. *Stabilization of solutions of feather keratins by sodium dodecyl sulfate*, Journal of Colloid and Interface Science, Vol. 240, 2001, p. 30 - 39
- [25] KURBANOGLU, E. B. *Enhancement of glycerol production with ram horn hydrolysate by yeast*, Energy Conversion and Management, Vol. 44, 2003, p. 2125 - 2133
- [26] KURBANOGLU, E. B., KURBANOGLU, N. I. *A new process for the utilization as peptone of ram horn waste*, Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 94, No. 3, 2002, p. 202 - 206
- [27] FEŘTEKOVÁ, V., FEŘTEK, O., ŠRÁMEK, D., STRÁNSKÝ, P., ŠEDIVÝ, Z. *Kosmetika v teorii a v praxi*, Maxdorf, 3. vydání, Praha 2000, ISBN 80-85912-19-8, 336 s.
- [28] 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, Vol. 39, 2008, p. 126 – 132
- [29] BARONE, J. R. *Polyethylene/keratin fibre composites with varying polyethylene crystallinity*, Composites: Part A: applied science and manufacturing, Vol. 36, 2005, p. 1518 – 1524
- [30] MEDVEDÍKOVÁ, L. *Zpracování tuhých kožedělných odpadů*, Vědecké spisy Vysokého učení technického v Brně, Edice PhD Thesis, sv. 10, Brno 1998, ISBN 80-214-1314-X, 25 s.
- [31] KURBANOGLU, E. B., ALGUR, O. F. *Utilization of ram horn hydrolysate as a supplement for recovery of heat- and freeze-injured bacteria*, Food Control, Vol. 17, 2006, p. 238 - 242

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

apod. a podobně.

např. například

TGA Termogravimetrická analýzy

Střed. p. Středové pokusy

kDa kiloDalton, jednotka molekulové hmotnosti

mil. milionů

EDTA Dvojná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové

SDS Dodecylsulfát sodný

w/w Hmotnostní zlomek

AMK aminokyselina

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: (a) makroskopická struktura, (b) molekulová struktura vlasu.....	13
Obr. 2: Spirálová struktura α -keratinu.....	14
Obr. 3: Struktura β -keratinu.....	14
Obr. 4: Přejít α -formy keratinu na β -formu keratinu	15
Obr. 5: Způsoby vázání cystinu v peptidovém řetězci	15
Obr. 6: Příčný řez chlupu	20
Obr. 7: Řez strukturou stvolu vlákna vlny	21
Obr. 8: Schéma možností zpracování keratinových odpadů na keratinový hydrolyzát	26
Obr. 9: Schéma rozkladu ovčí vlny 2 – stupňovou alkalicko – enzymovou hydrolyzou ...	35
Obr. 10: Odtučněné, pomletá vlna	40
Obr. 11: Kapalná fáze po alkalicko - enzymovém rozkladu ovčí vlny	42
Obr. 12: Tuhá fáze po alkalicko - enzymovém rozkladu ovčí vlny	42
Obr. 13: Zahuštěné, vysušená a rozdrcená kapalná fáze (hydrolyzát)	42
Obr. 14: Vliv teploty 1. fáze rozkladu (t_1) a teploty 2. fáze rozkladu (t_2) na množství výtěžku	48
Obr. 15: Vliv koncentrace $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a teploty 2. fáze rozkladu (t_2) na množství výtěžku ..	49
Obr. 16: Vliv koncentrace $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a teploty 1. fáze rozkladu (t_1) na množství výtěžku ..	49
Obr. 17: Vliv teploty 1. fáze rozkladu (t_1) a teploty 2. fáze rozkladu (t_2) na množství výtěžku	53
Obr. 19: Vliv koncentrace $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a teploty 1. fáze rozkladu (t_1) na množství výtěžku..	54

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Aminokyselinové složení různých keratinů	12
Tabulka 2: Chemické složení sušiny vlnového vlákna	22
Tabulka 3: Přehled organizace faktorových pokusů dvoustupňové hydrolýzy	34
Tabulka 4: Přehled organizace středových pokusů dvoustupňové hydrolýzy	34
Tabulka 5: Složení surové vlny	36
Tabulka 6: Podmínky rozkladu ovčí vlny dvoustupňovou alkalicko – enzymovou hydrolýzou s enzymem Esperase 6.0 T	46
Tabulka 7: Výsledky rozkladu ovčí vlny dvoustupňovou alkalicko – enzymovou hydrolýzou s enzymem Esperase 6.0 T	46
Tabulka 8: Analýza rozptylu a Fischerova testu statistické významnosti vlivu faktorů na množství výtěžku	47
Tabulka 9: Podmínky rozkladu ovčí vlny dvoustupňovou alkalicko – enzymovou hydrolýzou s enzymem Everlase 6.0 T	50
Tabulka 10: Výsledky rozkladu ovčí vlny dvoustupňovou alkalicko – enzymovou hydrolýzou s enzymem Everlase 6.0 T	50
Tabulka 11: Analýza rozptylu a Fischerova testu statistické významnosti vlivu faktorů na množství výtěžku	51
Tabulka 12: Výsledky stanovení obsahu popelovin a sušiny	55
Tabulka 13: Výsledky stanovení síry	56
Tabulka 14: Výsledky stanovení dusíku	56

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA P I: Průběh hydrolyzy – míchání vzorků ve vytemperované vodní lázni	67
PŘÍLOHA P II: Surová ovčí vlna	67
PŘÍLOHA P III: Parnas – Wagnerův přístroj	68
PŘÍLOHA P IV: Vakuová odparka Heidolph LABORA 4003 WB	69

Příloha P I: Průběh hydrolyzy – míchání vzorků ve vytemperované vodní lázni**Příloha P II: Surová ovčí vlna**

PŘÍLOHA P III: Parnas – Wagnerův přístroj



PŘÍLOHA P IV: Vakuová odparka Heidolph LABORA 4003 WB

