

# **Sít'ování keratinových hydrolyzátů a hodnocení jejich vlastností**

Radoslav Jež

---

Bakalářská práce  
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav inženýrství polymerů  
akademický rok: 2013/2014

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Radoslav Jež**  
Osobní číslo: **T11197**  
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Chemie a technologie materiálů**  
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Síťování Keratinových hydrolyzátů a hodnocení jejich vlastností**

Zásady pro vypracování:

**Teoretická část práce bude obsahovat rešerši o přípravě a vlastnostech keratinových hydrolyzátů. Cílem experimentální práce bude připravit směsi keratinových hydrolyzátů s přísadami různých síťovacích činidel a vytvořit z nich filmy. U připravených filmů budou poté studovány jejich vlastnosti a vliv použitých síťovadel.**

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. ledna 2014**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**28. května 2014**

Ve Zlíně dne 7. února 2014

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.

*děkan*



  
Ing. Lubomír Beníček, Ph.D.

*ředitel ústavu*

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu 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 28. května 2014

  
.....

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

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

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

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

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

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

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

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). 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 přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Tato práce se zaměřuje na možnosti síťování keratinových hydrolyzátů z vlasů a na přípravu filmových povlaků s aplikací v zemědělství, medicíně nebo textilním průmyslu. Stejně jako mnoho přirozeně odvozených biomolekul, keratin má vlastní biologickou aktivitu a biokompatibilitu. Kromě toho jsou keratinové hydrolyzáty schopny tvořit samostatně sestavené struktury. Tyto vlastnosti vedly k vývoji keratinových biomateriálů s aplikacemi v hojení ran, podávání léků a tkáňové inženýrství. V praktické části se tato práce zaměřuje na tvorbu síťujících směsí (keratinový hydrolyzát, voda, glycerol, dialdehyd škrobu, jantarová kyselina, dietyléster kyseliny vinné a litých filmů.

Klíčová slova: keratinový hydrolyzát, síťování, film.

## **ABSTRACT**

This work focuses on the possibilities of networking hair keratin hydrolysates and preparing film coatings with applications in agriculture, medicine and textile industry. Like many naturally derived biomolecules, keratin has its own biological activity and biocompatibility. In addition, keratin hydrolyzates are capable of forming self-laid structures. These properties have led to the development of keratin biomaterials with applications in wound healing, drug delivery, tissue engineering. In the practical part of this work focuses on the creation of cross-linking mixture (keratin hydrolyzate, water, glycerol, starch dialdehyde, succinic acid, (+)-diethyl tartrate) and cast films.

Keywords: keratin hydrolysates, cross-linking, film

Děkuji svému vedoucímu Ing. Ondřeji Krejčímu za odborné vedení bakalářské práce, pomoc při experimentech, důležité rady, připomínky a čas, který mi byl věnovaný při její tvorbě. Děkuji také paní laborantce Miroslavě Žaludkové za pomoc při experimentech.

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

# Obsah

<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
<b>1 KERATIN</b> .....	<b>11</b>
1.1 STRUKTURA A VLASTNOSTI .....	11
<b>2 BIOMATERIÁLY</b> .....	<b>14</b>
2.1 KERATINOVÉ FILMY .....	14
2.2 KERATINOVÁ VLÁKNA .....	17
<b>PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>20</b>
<b>4 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE</b> .....	<b>21</b>
<b>5 POUŽITÉ PŘÍSTROJE</b> .....	<b>21</b>
<b>6 PŘÍPRAVA HYDROLYZÁTU KERATINU</b> .....	<b>22</b>
6.1 HYDROLÝZA KERATINU.....	22
6.2 ČIŠTĚNÍ ZÍSKANÉHO HYDROLYZÁTU DIALÝZOU .....	24
<b>7 PŘÍPRAVA KERATINOVÝCH FILMŮ</b> .....	<b>25</b>
7.1 PŘÍPRAVA KERATINOVÉHO FILMU BEZ SÍŤOVADLA.....	25
7.2 PŘÍPRAVA KERATINOVÉHO FILMU S PŘÍDAVKEM SÍŤOVALA .....	26
<b>8 ANALÝZA ZÍSKANÝCH FILMŮ</b> .....	<b>27</b>
8.1 MIKROCHEMICKÉ STANOVENÍ DUSÍKU AOAC 960.52.....	27
8.2 TERMOGRAVIMETRICKÁ ANALÝZA (TGA) .....	28
<b>9 NAMĚŘENÉ VÝSLEDKY</b> .....	<b>29</b>
9.1 MIKROCHEMICKÉ STANOVENÍ DUSÍKU AOAC 960.52.....	29
9.2 VÝSLEDKY TGA .....	30
<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>33</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>34</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	<b>37</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>38</b>
<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	<b>39</b>



## ÚVOD

Jedním z hlavních cílů výzkumu biomateriálů je vytvoření matice nebo skeletu, které napodobují strukturu a funkci přirozené tkáně. Za tímto účelem bylo zkoumáno použití přírodních makromolekul v důsledku jejich vlastní schopnosti provádět velmi specifické biochemické, mechanické a strukturální úlohy. Zejména biomateriály na bázi proteinů se ukázaly jako potenciální kandidáti pro mnoho biomedicínských a biotechnologických aplikací díky jejich schopnostem fungovat v syntetickém extracelulárním matrixu, který umožňuje interakce buňka-buňka a buňka- matrice . Tyto substráty obsahují definované trojrozměrné mikrostruktury, které podporují proliferaci buněk naváděných k tvorbě tkáně, což patří mezi důležité vlastnosti skeletu biomateriálů. Tento typ biomateriálů je atraktivní pro další biomedicínské aplikace, pro které je nezbytná biokompatibilita, jako jsou zdravotnické prostředky, bioaktivní povrchy a hygienické výrobky.

Některé proteiny byly zkoumány ve vývoji přirozeně získaných biomateriálů, včetně kolagenu, albuminu, želatiny, fibrinu a keratinu. Z tohomateriály na bázi keratinu jsou revoluční z pohledu jejich vlastní biokompatibility, biologické rozložitelnosti, mechanické odolnosti a výskytu v přírodě. Tato práce se zaměřuje na výzkum a vývoj keratinových biomateriálů pro zemědělské aplikace. Přehled biologie keratinu je také diskutován s důrazem na to, jak jsou proteiny vyvinuty uvnitř vlasového vlákna.

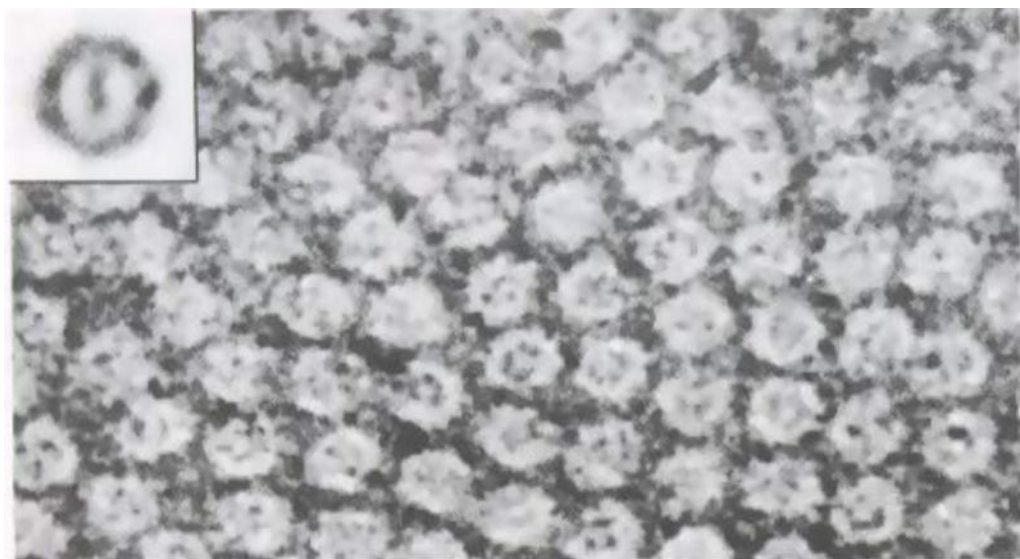
## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 KERATIN

Termín "keratin" původně odkazoval na široké kategorie nerozpustných proteinů, které se spojují jako intermediální filamenta a tvoří podstatnou část cytoplazmatické epitelu a epidermis (tj., vlasy, vlna, rohy, kopyta a nehty). Následný výzkum těchto strukturálních proteinů vedl ke klasifikaci savčího keratinu do dvou odlišných skupin na základě jejich struktury, funkce a regulace.

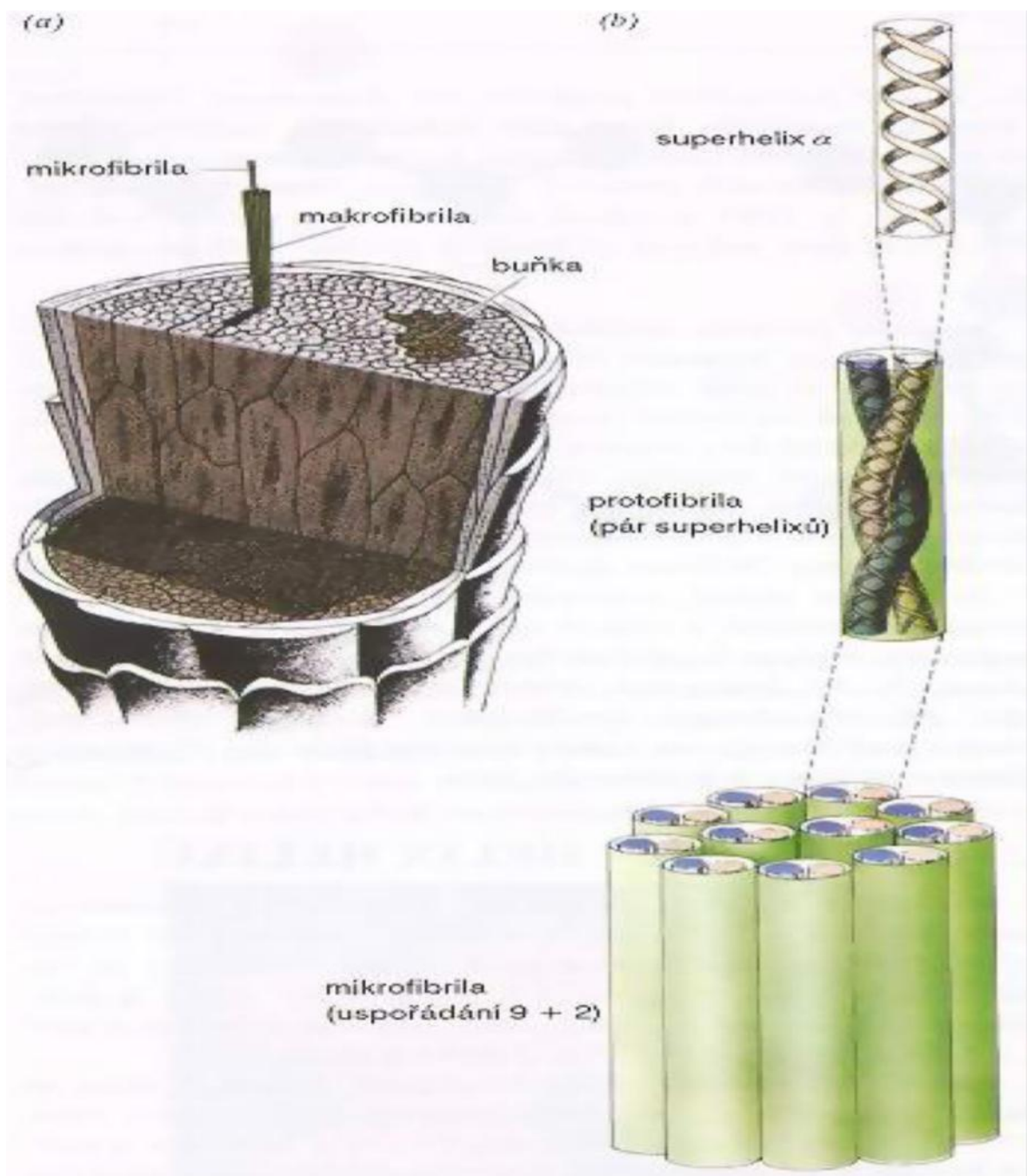
### 1.1 Struktura a vlastnosti

Keratin je mechanicky odolný a chemicky nereaktivní protein vyskytující se u všech vyšších obratlovců. Je hlavní složkou jejich horní epidermální vrstvy a zní vyrůstajících útvarů, jako jsou vlasy, rohovina, nehty a peří. Keratin rozdělujeme na  $\alpha$ -keratin, který se vyskytuje u savců a  $\beta$ -keratin vyskytující se u ptáků a plazů. Elektron-mikroskopické studie ukazují, že vlasy, které se skládají především z  $\alpha$ -keratinu, obsahují mnoho struktur. Typický vlas má průměr asi 20  $\mu\text{m}$  a je složen z mrtvých buněk, které obsahují svinuté makrofibrily (s průměrem 200 nm), které jsou orientovány souběžně s osou vlasu. Makrofibrily jsou složeny z mikrofibril (s průměrem 8 nm), které jsou navzájem spojeny amorfní proteinovou hmotou s vysokým obsahem síry. Mikrofibrily se dále skládají z profibril (ty mají v průměru 2 nm), přičemž devět profibril je uspořádáno v kruhu po obvodě jedné profibrily a dvě tvoří jádro tohoto útvaru (obr. 1 a 2a).[1]



Obr. 1. Elektron optický snímek vlákna [1]

Obrázek 1 v levém horním rohu ukazuje průmět několika na sebe naskládaných obrázků mikrofibril v téže orientaci. Rentgenové difrakční obrazce  $\alpha$ -keratinu se podobají obrazcům  $\alpha$ -helixů.  $\Lambda$ -keratin 0,51 nm, zatímco  $\alpha$ -helix 0,54 nm. Tento fakt spolu s množstvím fyzikálních a chemických parametrů naznačuje, že každá z protofibril  $\alpha$ -keratinu se skládá ze dvou párů těsně spojených  $\alpha$ -helixů, tedy vlastně ze dvou nadšroubovic, které jsou svinuty v levotočivou šroubovici (obr. 2b).



Obr. 2 a) Makroskopická struktura b) Molekulová struktura vlasu [1]

Normální výška závitů je 0,54 nm, každá  $\alpha$ -šroubovice je tak změněná proti ose protofibrily a má tak hodnotu 0,51 nm. Toto uspořádání se nazývá nadšroubovice (superhelix), protože osa každého  $\alpha$ -helixu v této struktuře má šroubovicový charakter.  $\alpha$ -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.  $\alpha$ -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 disulfidové vazby odolávají deformačním silám. Disulfidové vazby lze redukčně štěpit merkaptany.[1]

## 2 Biomateriály

Pevný základ pro výzkum keratinu vedl k rozvoji mnoha keratinových bázi biomateriálů pro použití v biomedicínských aplikacích. Tato podklad je založen na několika klíčových vlastnostech keratinu, které přispívají k celkovému fyzickému, chemickému a biologickému chování těchto biomateriálů. Za prvé, extrahované keratinové proteiny mají vnitřní schopnost autoorganizace a polymerace do porézních, vláknitých skeletů. Spontánní autoorganizace keratinových bázi byla studována jak v mikroměřítku, tak v makro-měřítku [2-5]. Tento jev autoorganizace je patrný ve vysoce konzervativní nástavbě vlasového vlákna a při správném zpracování tohoto vlákna je zodpovědný za reprodukovatelné architektury, rozměrnost a pórovitost těchto materiálů na bázi keratinu. Kromě toho u keratinových biomateriálů odvozených z vlny a vlasů bylo prokázáno, že mají buněčné vazebné motivy jako jsou vazebný zbytek leucin -aspartová kyselina – valin nebo vazebný zbytek kyselina glutamová - kyselina aspartová–serin. Tyto vazebné zbytky jsou schopny podporovat buněčnou přílohu [6-7]. Tyto vlastnosti společně vytvářejí příznivé trojrozměrné matrice, které umožňují mobilní infiltrace, uchycení a šíření. Stejně jako ostatní intermediálních filamenty, u keratinuse také věří, že se účastní na některých regulačních funkcích, které zprostředkovávají buněčné chování[8-9.]. To znamená, že zachování biologické aktivity v regenerovaných keratinových biomateriálech by mohlo být výhodné pro kontrolu specifických biologických funkcích v různých aplikacích tkáňového inženýrství.

Vylepšené fyzikální, chemické a biologické vlastnosti keratinu, stejně jako snaha využít vlnu a lidské vlasy jako obnovitelný přírodní zdroj, vyvolaly zvýšený zájem o keratinové biomateriály, což v průběhu posledních tří desetiletí vede k jejich intenzivnímu výzkumu. Ten řeší, jak vyrobit a charakterizovat nové produkty na bázi keratinu (např. filmy, houby, skelety nebo vlákna). V mnoha případech bylo prokázáno, že tyto nové keratinové materiály mají výbornou biokompatibilitu. Kromě toho byly objeveny nové metody pro úpravu fyzikálních a mechanických vlastností keratinu s cílem vytvořit biomateriály.

### 2.1 Keratinové filmy

Pro výzkum strukturálních a biologických vlastností autoorganizace keratinuse používaly proteinových filmy z keratinu extrahovaného z vlny a vlasů. Při jednom z prvních výzkumů vlastností keratinových výrobků z extrahované vlny byly popsány fyzikálně-

chemické a biodegradační vlastnosti rozpouštědel litých keratinových filmů. Tyto filmy byly příliš křehké pro praktické využití, přidání glycerolu jako změkčovadla mělo za následek transparentní, relativně silný, flexibilní a biologicky rozložitelný film.[10]

Další výzkum se zabýval popsáním kompatibility keratinového filmu k buňkám vypěstovaným na po-vrchu myších fibroblastů. Ve srovnání s růstem buněk na povrchu kolagenu a na skleněném povrchu, keratinový substrát se ukázal být jako lepidlo pro buňky, podporující další buněčné proliferace.[11]

Prokázalo se také, že vlasový keratin byl užitečný pro přípravu proteinových filmů a součástí jednoho z dalších zkoumání byl objev rychlé metody odlévání keratinových filmů. Tento výzkum také ukázal proveditelnost začlenění takových bioaktivních molekul jako je alkalická fosfatáza do keratinových filmů pro aplikace s řízeným uvolňováním. Filmy nicméně měly špatnou pevnost a pružnost.[12]

Společně tyto rané studie prokázaly proveditelnost přípravy keratinových filmů a potvrdily jejich potenciál pro využití těchto biomateriálů v lékařských aplikacích. Podobně jako mnoho přírodně odvozených biomateriálů, praktické využití produktů na bázi keratinu bylo omezeno jejich špatnými mechanickými vlastnostmi. Tak se výzkum keratinových filmů přesunul a zaměřil na optimalizaci fyzické síly a pružnosti filmů při zachování jejich vynikající biologické aktivity. Bylo provedeno několik pokusů k ovládnutí fyzikálních a biologických vlastností produktů na bázi keratinu, avšak jejich praktické využití zůstalo nakonec těmito mechanickými vlastnostmi stále omezeno. Výzkum keratinových filmů se přesunul a zaměřit na optimalizaci fyzické síly a pružnosti filmů při zachování jejich vynikající biologické aktivity.[13-23]

Výsledkem všech těchto výzkumů je v současnosti mj. několik přístupů ke kontrole fyzikálních a biologických vlastností keratinových biomateriálů. Jeden z nich byl využit i v Praktické části této práce.

V současnosti se výzkumy zaměřují na zlepšení mechanických vlastností keratinu. Mechanické vlastnosti glycerolem měkčeného keratinu byly vylepšeny přidavkem chitosanu. Jsou také zkoumány aplikace chitosanu, které vykazují vysokou biokompatibilitu, biologickou funkci pro hojení ran a antibakteriální aktivitu. Výsledkem přidavku chitosanu do keratinových filmů je zlepšení mechanické pevnosti. Kromě toho bylo prokázáno, že chitosan-keratinové filmy mají antibakteriální vlastnosti a jsou dobrými substráty pro buněčné kultury.[24]

Ke zvýšení biologické aktivity keratinových filmů došlo také začleněním buněčného adhezivního peptidu Arg-Gly-Asp-Ser na volné cysteinové zbytky redukováných keratinových extraktů. Keratinové filmy nesoucí Arg-Gly-Asp-Ser se ukázaly jako vynikající substráty pro růst savčích buněk.[25]

Silk fibroin (SF) je další přírodní polymer, který upoutal velkou pozornost jako biomateriál svou vnitřní biokompatibilitou a biologickou rozložitelností. Keratin-SF filmy byly studovány za účelem pochopení interakcí, ke kterým dochází mezi dvěma biomolekulami a vztahu těchto interakcí k celkovým mechanickým a biologickým vlastnostem biomateriálů. Při studiu sekundární struktury keratin-SF filmů a pozorování přechodu od náhodného klubka do  $\beta$ -listové struktury fibroinu v důsledku přítomnosti polárních aminokyselin přítomných v keratinu bylo smícháním keratinu a SF prokázáno, že mají lepší mechanické i biologické vlastnosti než filmy SF nebo filmy keratinu samostatně. Tato směs vykazuje zvýšenou biokompatibilitu [26], s největší pravděpodobností v důsledku zvýšené povrchové polarity směsi generované konformační přeměnou proteinu [27]. Dalším zkoumáním mechanických a degradačních vlastností směsných filmů keratinu-SF se dospělo k závěru, že interakce mezi SF a keratinem nejsou pouze aditivní. Spíše lze říci, že tyto dva proteiny jsou schopny unikátních mezimolekulárních interakcí, které se přímo dotýkají objemových vlastností filmu. Povaha a síla těchto interakcí a znalost sazeb rozkladu umožňují konstrukci matrice pro uvolňování účinných látek, které jsou vhodné pro budoucí biomedicínské aplikace.[28]

Kromě přírodních biopolymerů byla rovněž zkoumána interakce mezi keratinem a syntetickými polymery [29,30]. Byl prozkoumán vztah mezi směsí polyethylenoxidu



(PEO) a keratinového filmu, za účelem vývoje materiálů na bázi keratinu se zlepšenými konstrukčními vlastnostmi. Morfologickými, strukturálními a termálními analýzami keratin / PEO filmů bylo zjištěno, že na příslušných úrovních keratin inhibuje krystalizaci PEO. Samoorganizace keratinu je v PEO narušena navozením více tepelně-stabilní,  $\beta$ -sekundární struktury bílkoviny. Zlepšené strukturální vlastnosti keratinových / PEO směsí umožňují vývoj keratinových materiálů pro různá použití (např. skelet pro růst buněk, obvazy a membrány propouštění léků).[31]

Mezimolekulární interakce mezi keratinem a polyamidem 6 (PA6) byly rovněž studovány s cílem vytvořit materiál na bázi keratinu, který bude mít praktické využití pro širokou škálu aplikací nejen v biomedicínských zařízeních[32].

Kromě vytváření smíšené keratinových systémů z přírodních nebo syntetických polymerů byly také zkoumány alternativní výrobní technologie pro tvorbu keratinových filmů s více vhodnými mechanickými vlastnostmi. Byly hledány alternativní metody pro přípravu keratinových filmů, které měly překonat omezenou univerzálnost spojenou s přípravou filmu metodou lití. Jako účinná metoda se ukázalo lisování ze sulfo-keratinového prášku. Tuto techniku lze úspěšně použít pro výrobu čistých keratinových filmů odlišný tvarů.[33]

V poslední době se používají dva různé přístupy k substrátovým povlakům a byl prokázán výskyt růstu dvanácti různých buněčných linií pěstovaných na keratinových filmech. Výsledky ukázaly, že růstové substráty připravené odléváním keratinové nanosuspenze podporují buněčnou přilnavost a lepší růst buněk. Tento nový přístup je považován za nízkonákladovou, standardizovanou alternativu k běžně používaným povlakům, jako je například kolagen a fibronectin.[35]

## 2.2 Keratinová vlákna

V posledních letech se výzkum elektrospinningu na biokompatibilních polymerních materiálech značně zvýšil vzhledem k množství možných biomedicínských aplikací nanovláknenných materiálů. Elektrospinnové zvláknění je technika, která využívá vysoké napětí k vytvoření elektricky nabitého proudu polymeru. Ten je natažen směrem k uzemněné sběrné desce nebo trnu. Výsledná vlákna mají průměry v řádech mikro až nano

měřítka a jsou náhodně uspořádány pro vytvoření netkaného vláknitého materiálu. Zvýšená fyzická konfigurace (tj. malá velikost pórů, vysoká pórovitost, trojrozměrné funkce a vysoký povrchový poměr plochy k objemu) z nanostrukturálně netkané textilie podporuje buněčnou adhezi a růst, který vede k vývoji elektrostatických membrán pro takové použití jako výroba obvazů na hojení ran nebo skeletů pro tkáňové inženýrství. [38]

V poslední době se proces elektrospinningu rozšířil v důsledku rostoucí poptávky po keratinových materiálech touto metodou vyrobených. Proto se dnes vedle čistého keratinu používá jako vstupní materiál i regenerovaný keratin. Vzhledem k vnitřně špatným mechanickým vlastnostem čistého keratinu se mnoho vědců uchyluje k přidání syntetických nebo přírodních polymerů, aby se zvýšila zpracovatelnost keratinu pro tvorbu vláken. Velký význam mělo stanovení charakteristiky mezimolekulárních interakcí mezi keratinem a "aditivními" makromolekulami, jejichž úkolem je korelace vlastností roztoku směsi navlastnosti elektrospinnových vláken. [37]

Vlhké předení nebo-li wet-spinning je další vláknotvorná technika tradičně používaná pro výrobu syntetických vláken pro textilní průmysl. V poslední době se používá také pro přípravu vláknitých biomateriálů. Tato metoda spočívá v protlačování dopovaného roztoku přes zvláknovací trysku do koagulační lázně. Následným tažením k táhnoucí se podpoře, která seřadí polymerní řetězce, jsou vytvořena vlákna. Fyzická omezení keratinových materiálů, která brání produkci čistých keratinových vláken, byla překonána pomocí směsí syntetických a přírodních polymerů, které zlepšují vlastnosti výsledných směsných materiálů. [37]

### 3 Cíle práce

Cílem této práce bylo vytvořit síťovaný keratinový film z předem připraveného keratinového hydrolyzátu a následně stanovit jeho fyzikálně chemické vlastnosti.

Prvním cílem této práce byl tedy výběr síťovadla schopného reagovat s připraveným keratinovým hydrolyzátem.

Druhým cílem byla příprava síťovaných hydrolyzátů s přídavkem změkčovadla dle dané receptury.

Třetím cílem bylo provedení fyzikálně-chemických analytických zkoušek na vytvořených filmech.

Čtvrtým cílem bylo vyvození závěrů, které vyplynuly z fyzikálně-chemických analýz.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

Látky použité na přípravu filmů:

hydrolyzát keratinu (KH), glycerol, dialdehyd škrobu (DAS), dietyléster kyseliny vinné (DET)

Látky použité pro analytické stanovení dusíku AOAC:

kyselina sírová 96%, roztok  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  + NaOH (50 ml 25%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  + 200ml 50% NaOH), kyselina boritá 2%, Tashirův indikátor, kyselina chlorovodíková 0,02N, tableta katalyzátoru.

## 5 Použité přístroje

Přístroje použité pro přípravu litých filmů:

obdélníkové PP formičky, magnetická míchačka s ohřevem, analytické váhy, sušárna.

Přístroje použité pro mikrochemické stanovení dusíku AOAC 960.52:

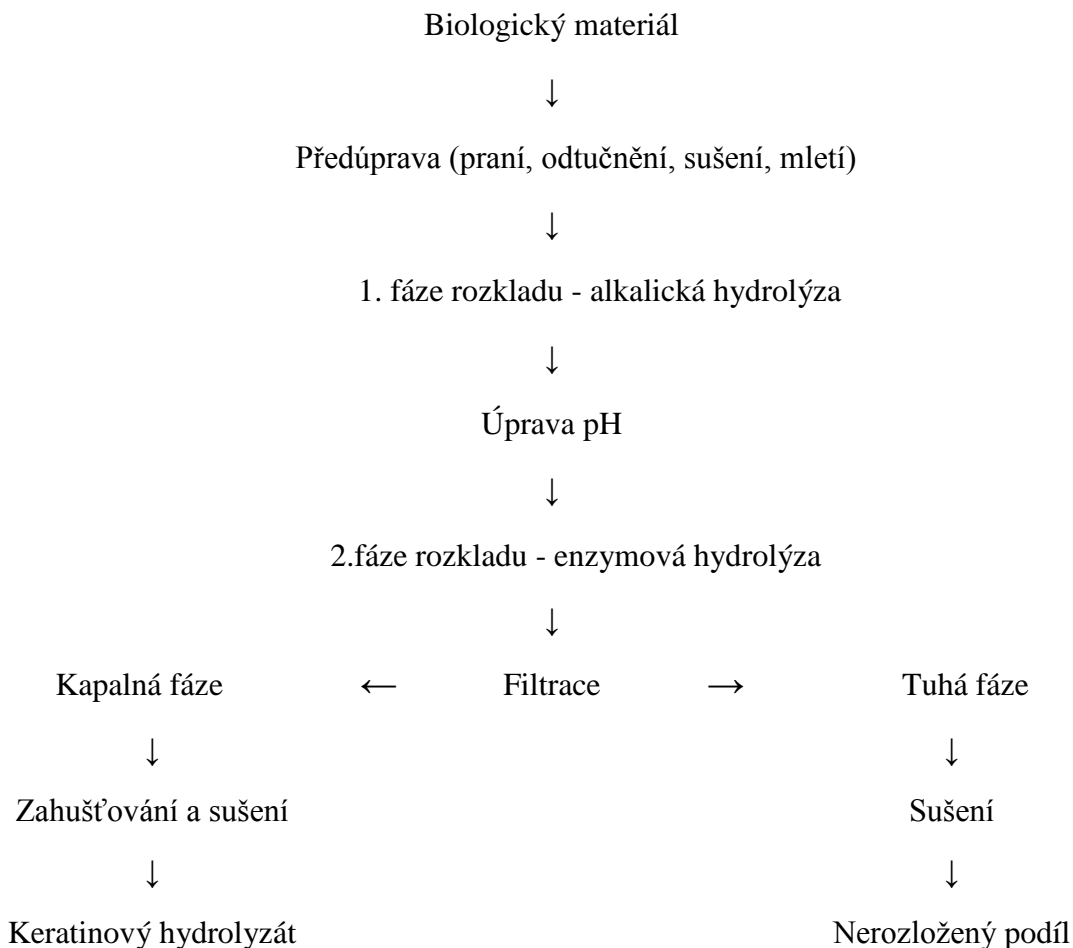
mineralizační aparatura, Parnas-Wagnerova destilační aparatura.

Přístroje použité pro termogravimetrickou analýzu:

TA Instruments TGA Q50.

## 6 PŘÍPRAVA HYDROLYZÁTU KERATINU

### 6.1 Hydrolýza keratinu



Obr. 3: Schéma přípravy keratinových hydrolyzátů alkalicko-enzymovým rozkladem

Jako vstupní surový biologický materiál byla použita vlna. Ta byla enzymově odtučněná přidáním enzymu Lipex 100 T v množství 10% na váhu surového materiálu. Nádoba se směsí byla udržována na teplotě cca 40 °C po dobu 24 hodin. Během této doby bylo obsahem občas zamícháno. Po odtučnění byl surový materiál proprán vodou a vysušen. Vysušená vlna byla pomleta nožovým mlýnem na malé kousky. Tím byl dokončen první krok – Předúprava.

Následovala první fáze rozkladu, ve které 1000 g předupraveného materiálu (vlny) bylo smícháno s 15000 ml 0,6 % KOH (to představuje 0,107 M roztok hydroxidu nebo také jinak 0,09 g hydroxidu na 1 g biologického materiálu). Tato směs byla vyhřáta na 90 °C a

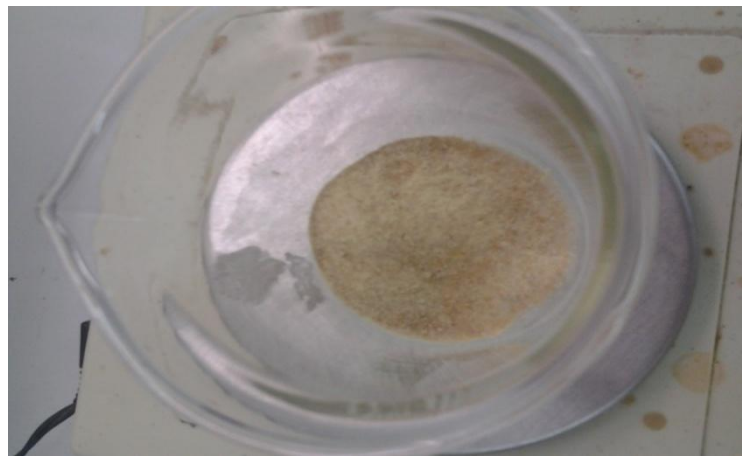
na této teplotě udržována 48 hodin, přičemž v průběhu prvních 6 hodin byla občas promíchána.

Ve druhé fázi bylo před přidáním enzymu do směsi upraveno její pH přidáním hydroxidu, enzymu Savinase 6.0 T bylo poté přidáno 5 % (vztaženo na hmotnost biologického materiálu). Tato směs byla vyhřáta na 60 °C a na této teplotě udržována 24 hodin, přičemž v průběhu prvních 6 hodin byla občas promíchána.

Před filtrací byla směs vyhřáta na 95 °C a na této teplotě udržována po dobu 10 min, aby došlo k inaktivaci enzymu. Následně byla směs filtrována přes bavlněné tkaniny o různé propustnosti. Zachycený (nerozložený) podíl byl vysušen v komorové sušárně při teplotě 80 °C za vakua a následně zvážen pro výpočet účinnosti alkalicko-enzymové hydrolyzy. Získaný roztok KH byl zahuštěn a vysušen na nerezovém plechu v komorové sušárně při teplotě 80 °C za vakua. Získaný suchý KH byl rozdrcen v třecí misce na jemný prášek.

## 6.2 Čištění získaného hydrolyzátu dialýzou

Získaných 50 g KH z vlny postupem popsáním v kapitole 6.1 bylo rozpuštěno v 500 ml destilované vody. Tento roztok byl následně dialyzován přes celulóзовou membránu o propustnosti 12 kDa proti destilované vodě. Dialýza probíhala při pokojové teplotě po dobu 72 hodin, přičemž voda byla měněna vždy po 24 hodinách. Roztok keratinového hydrolyzátu po dialýze byl následně zahuštěn a vysušen na nerezovém plechu v komorové sušárně při teplotě 80 °C za vakua. Získaný suchý keratinový hydrolyzát byl rozdrcen v třecí misce na jemný prášek (viz obr.4).



Obr. 4 Získaný suchý keratinový hydrolyzát



## 7 PŘÍPRAVA KERATINOVÝCH FILMŮ

### 7.1 Příprava keratinového filmu bez síťovadla

Film byl připraven z keratinového hydrolyzátu a změkčovadla rozpuštěním v destilované vodě. Obsah změkčující látky (glycerolu) byl 30% na celkovou navážku.

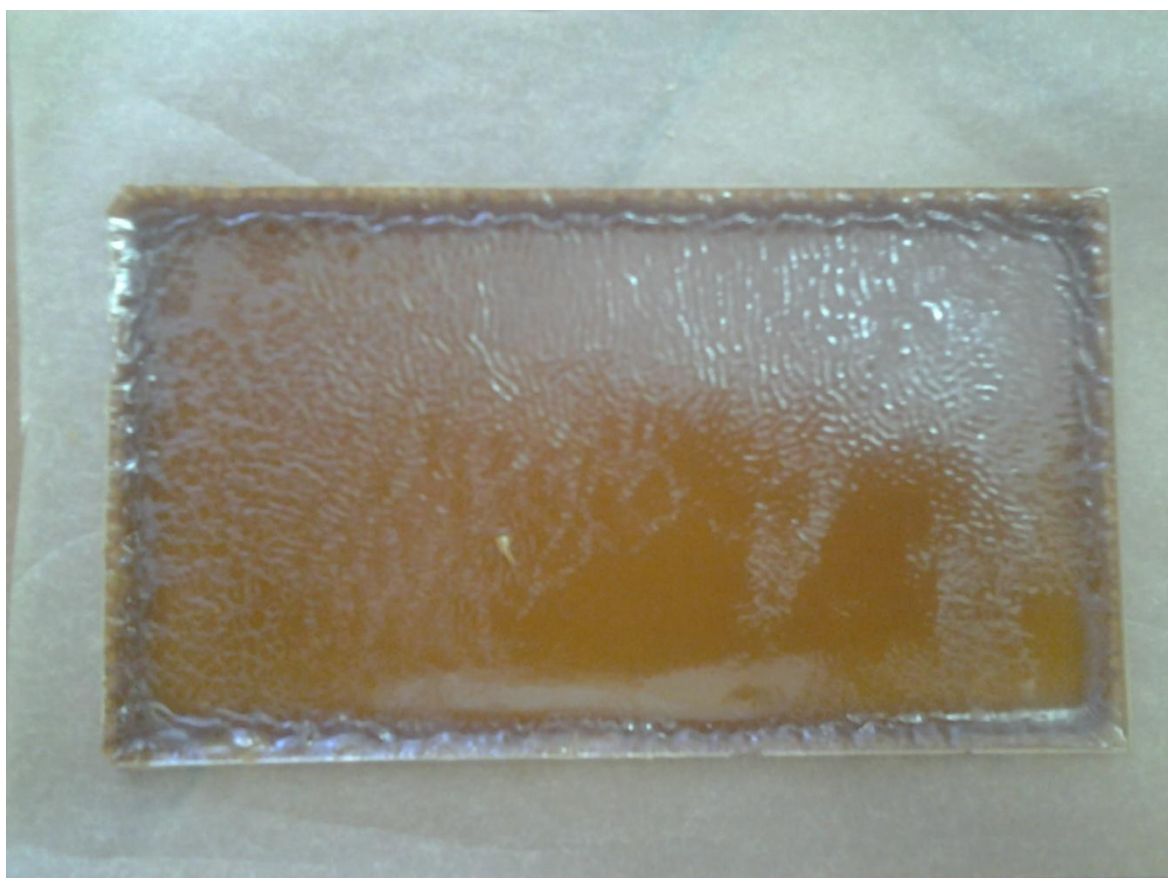
V kádince bylo připraveno 34 ml 15% roztoku KH, směs byla umístěna na magnetické míchadlo a míchána do úplného rozpuštění (viz obr. 5). Dále byl navážen glycerol (s přesností na 0,01 g) a postupně přidáván na magnetické míchadlo k roztoku hydrolyzátu. Směs byla míchána cca 20 minut, aby došlo ke spojení. Pro docílení rovnoměrné tloušťky filmu byly zkontrolovány a vyváženy vodní váhou plechy, na kterých bude film vytvářen. Rovnost plechu byla důležitá, aby nedošlo k vylití ze PP forem. Rozmíchaná směs byla nalita do dvou PP forem, které byly vloženy do sušárny. Tam probíhalo sušení při teplotě cca  $60 \pm 2$  °C po dobu 48 hodin. Vysušené filmy byly vloženy do exsikátoru a uchovány pro analytické zkoušky.



*Obr. 5 Příprava roztoku keratinového hydrolyzátu*

## 7.2 Příprava keratinového filmu s přídavkem síťovadla

Bylo připraveno celkem 6 roztoků KH stejným postupem jako v 7.1. Do těchto roztoků byly poté přidány síťovadla. Jako síťovadlo byla u tří filmů použita látky DAS, a to v množství 5 %, 10 %, 15 % na navážku hydrolyzátu. U dalších tří filmů bylo použito síťovaných DET ve stejných koncentracích jako DAS. Při přidávání DAS bylo upraveno pH na hodnotu 11,5 z důvodu špatné rozpustnosti DAS v neutrálním pH. Dále se postupovalo litím do formiček, jejich sušením a uskladněním stejně jako v 7.1.



*Obr. 6 Vysušený film*

## 8 Analýza získaných filmů

### 8.1 Mikrochemické stanovení dusíku AOAC 960.52

Do mineralizační baňky bylo naváženo na analytických vahách cca 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 vybavena zpětným chladičem a vložena na topnou desku, kde při teplotě  $480 \pm 2$  °C probíhala mineralizace do vyčerení vzorku (1 – 1,5 hodiny). Po ukončení mineralizace se obsah z mineralizační baňky nechal ochladnout, 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 směs 20 ml roztoku NaOH a  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ . Páry byly jímány do předlohy s 15 ml 2% roztoku  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . 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.



Obr. 7 Uspořádání vzorků při mineralizaci

Procentuální obsah dusíku ve vzorku se vypočítá podle vzorce:

(1)

## 8.2 Termogravimetrická analýza (TGA)

Nejjednodušší metodou termické analýzy je TGA nebo jednoduše termogravimetrie. V tomto případě se jedná o metodu, v níž je vzorek (v mém případě 0,012-0,014 g) vystaven tepelnému namáhání, a na citlivých mikrováhách je sledována změna jeho hmotnosti. Měření probíhalo v inertní dusíkové atmosféře o průtoku 40 ml/min a rychlostí ohřevu 20 °C/min v teplotním rozsahu 26 – 500 °C. Termogravimetrie tedy snadno a rychle stanovuje tepelnou nebo tepelně-oxidační stabilitu vzorku (čili to, jakou teplotu materiál „snese“), pomocí analýzy kroků degradace materiálu je pak možno usuzovat na jeho složení, obsah vlhkosti, obsah organické hmoty a anorganické hmoty. Složitější experimenty pak umožňují také odhad časové stability některých materiálů při zvolené teplotě. Měřit lze od laboratorní teploty do vysokých teplot, 1000 až 1600°C podle typu přístroje. Námi prováděné stanovení probíhá do 500 °C. Je-li potřeba zjistit, jaké látky se ze vzorku v průběhu tepelného namáhání uvolňují, lze s výhodou použít termogravimetrii kombinovanou s infračervenou spektrometrií[36].

## 9 Naměřené výsledky

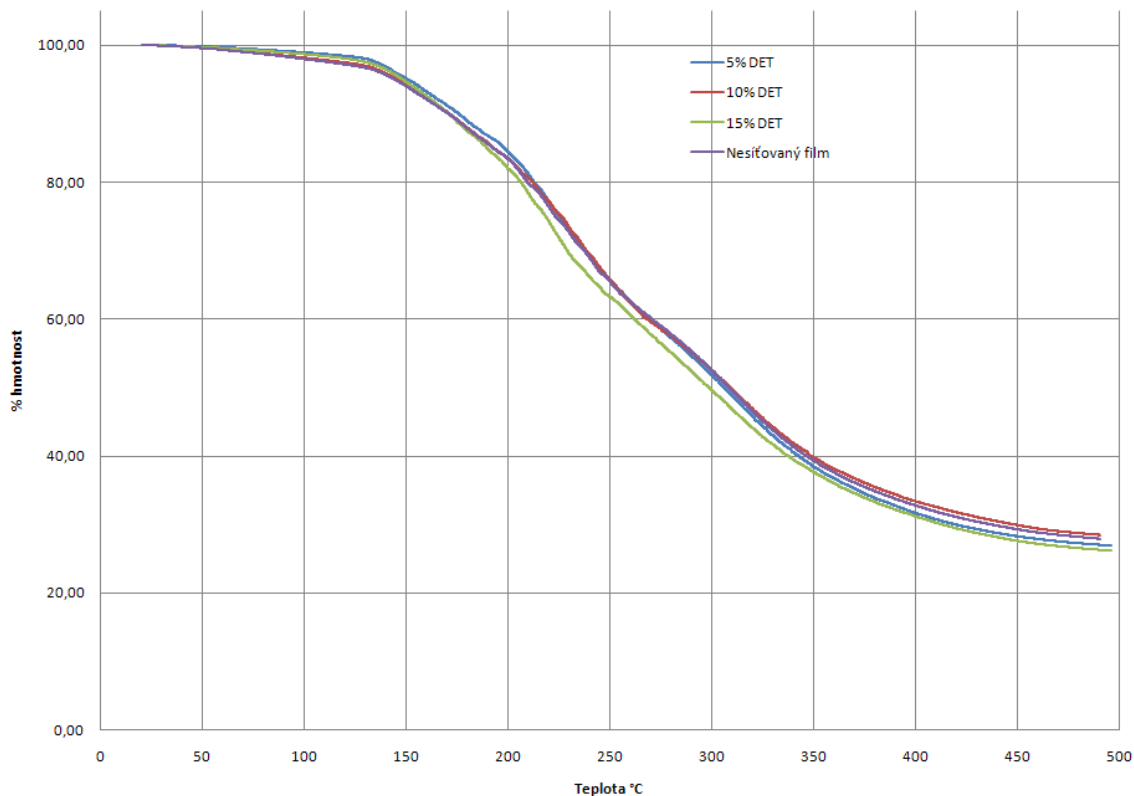
### 9.1 Mikrochemické stanovení dusíku AOAC 960.52

Tabulka 1: Analytické stanovené filmů

Stanovení	Obsah dusíku ve vzorku [%]	Směrodatná odchylka při stanovení dusíku	Vlhkost[%]	Popeloviny [%]
nesítovaný KH	9,34	0,175	2,21	27,77
práškový hydrolyzát	11,29	0,4	6,66	34,85
KH + 5% DAS	8,28	0,325	4,42	28,04
KH + 10% DAS	7,81	0,425	2,64	30,95
KH +15% DAS	8,87	0,07	3,66	29,55
KH + 5% DET	8,53	0,125	1,18	26,89
KH + 10% DET	8,53	0,01	5,47	28,32
KH + 15% DET	7,91	0,275	1,47	26,15

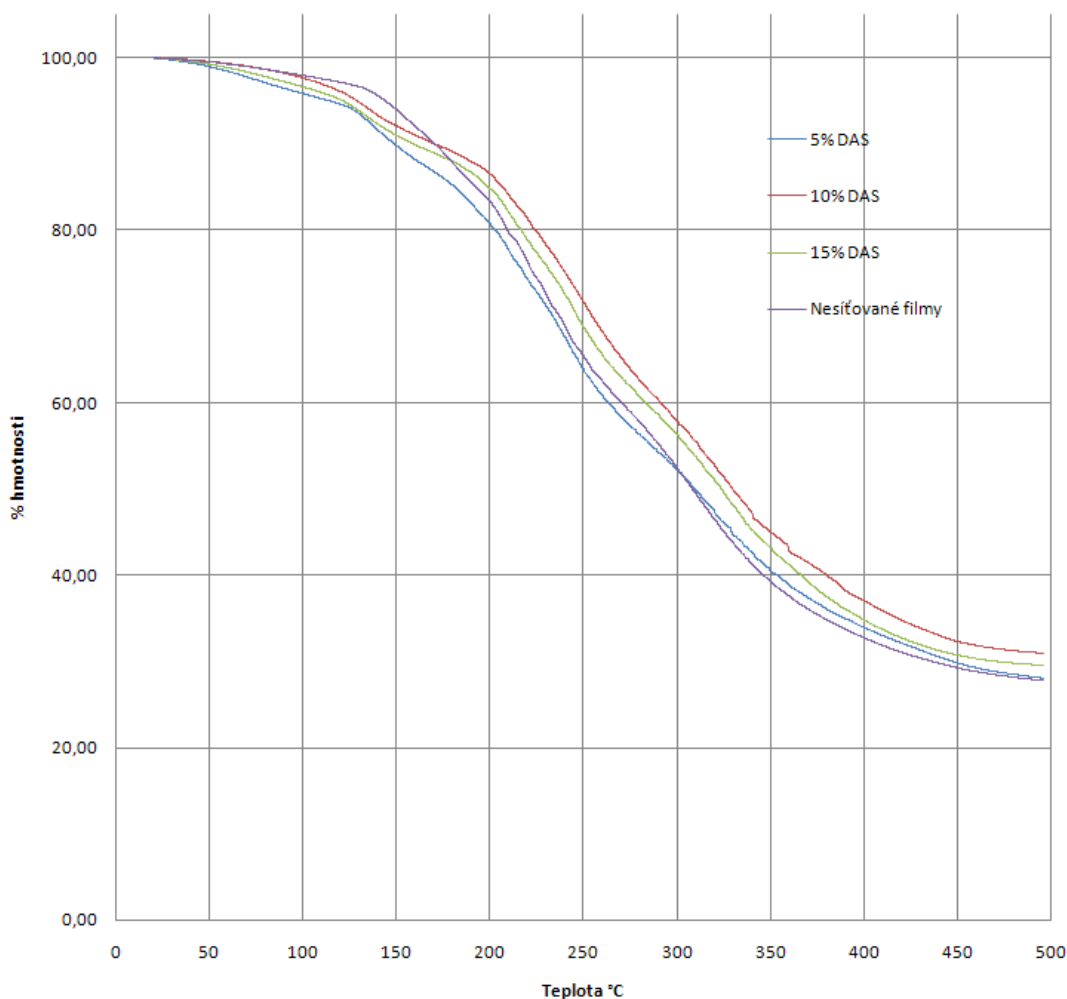
V tabulce 1 jsou uvedeny výsledky analytických stanovení pro filmy nesítované a filmy sítované s 5 %, 10 % a 15 % DAS a filmy sítované 5 %, 10 % a 15 %DET. Jsou patrné rozdíly mezi vlhkostí a obsahem popelovin sítovaných filmů DAS a DET. Obsah dusíku se měnil jen nepatrně. Vlhkost i popeloviny byly odečteny z hodno TGA.

## 9.2 Výsledky TGA



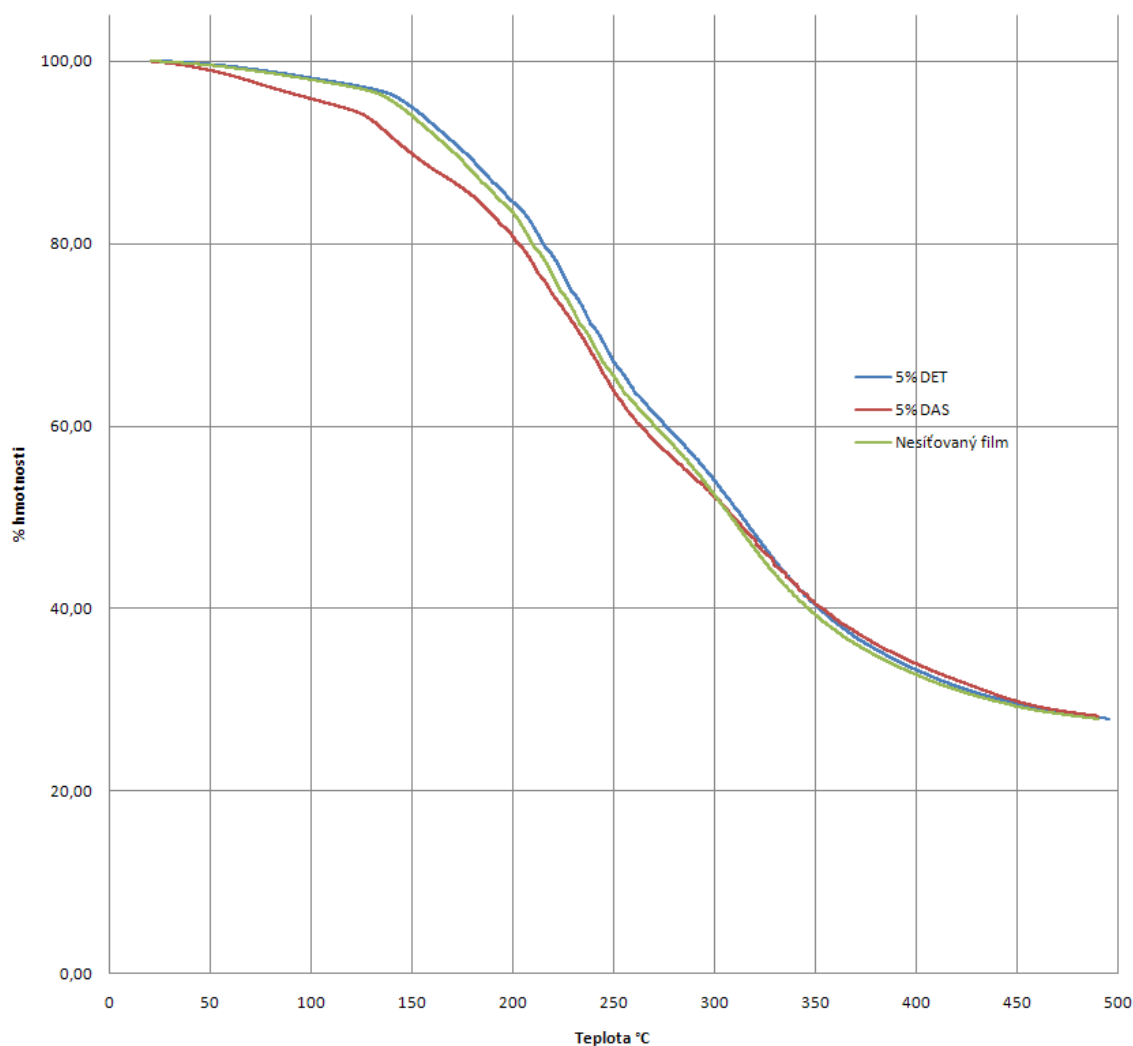
*Obr. 8 Porovnání TGA filmů síťovaných DET proti nesíťovanému*

Obr. 8 popisuje TGA vzorku 4 filmů síťovaných DET o různé koncentraci. Z obrázku jsou vidět jen nepatrné rozdíly mezi všemi vzorky. Ani jeden ze zkoumaných materiálů nevykazuje významné změny. V oblasti počátku do 105 °C, kdy se materiál zbavoval vlhkosti je pozorovatelný rozdíl do 1,5 %. V Oblasti do 200°C kdy materiály tály, dosáhl film s obsahem 15 % DET rychleji než film nesíťovaný. V oblasti nad teplotou 200 - 500 °C kdy materiály degradovaly, obsahoval nejvíc popelovin vzorek s obsahem 10 % DET, ale lišil se od nesíťovaného filmu jen o 0,5 %.



Obr. 9 Porovnání TGA filmů síťovaných DAS proti nesíťovanému

Obr. 9 popisuje TGA vzorku 4 filmů síťovaných DAS o koncentraci 5; 10; 15 %. Z obrázku jsou vidět výraznější rozdíly mezi všemi vzorky. V počáteční oblasti do 105 °C, kdy se materiál zbavoval vlhkosti je pozorovatelný rozdíl vyšší vlhkosti síťovaných materiálů. V oblasti do 200 °C kdy materiály tály, dosáhly filmy s obsahem 10 a 15 % síťovadla s menší ztrátou hmotnosti než film nesíťovaný. V oblasti nad teplotou 200 - 500 °C kdy materiály degradovaly, obsahoval nejvíc popelovin vzorky s 10 % a 15% síťovadla, přičemž od nesíťovaného filmu se lišily o cca 3 %.



*Obr. 10 Porovnání TGA filmů síťovaných DAS a DET proti nesíťovanému*

Obr. 10 porovnává TGA vzorku 3 filmů síťovaných 5 % DAS, 5 % DET a nesíťovaným. Z obrázku nejsou vidět výraznější rozdíly mezi všemi vzorky. V počáteční oblasti do 105 °C, kdy se materiál zbavoval vlhkosti je pozorovatelný rozdíl vyšší vlhkosti filmu s obsahem 5 % DAS. V Oblasti do 200 °C kdy materiály tály, se od sebe filmy lišili o cca 2%. V oblasti teplot 200 - 500 °C kdy materiály degradovaly, se procentuální obsah popelovin výrazněji nelišil.



## ZÁVĚR

Teoretická část Bakalářské práce se zabývá strukturou a vlastnostmi keratinu. Další kapitola se zabývá keratinovými materiály jak na bázi přírodními, tak na směsi keratinu se syntetickými polymery. Způsobem jejich přípravy vláken, filmů, skeletů a hub. A jejich aplikací v biomedicině a jiných odvětvích.

Experimentální část ve své úvodní části popisuje zpracování a rozklad ovčí vlny alkalicko-enzymovou hydrolyzou na keratinový hydrolyzát. V další části bylo z těchto hydrolyzátů následně připraveno 7 roztoků KH pro přípravu filmů. Do prvních tří roztoku KH bylo přidáno síťovadlo DET o koncentracích 5 %, 10 %, 15 % a do dalších tří DAS o koncentraci 5 %, 10 %, 15 %, jedna směs byla připravena bez síťovadla pro porovnání. Roztoky byly poté vylity na PP destičky, vysušeny a vloženy do exsikátoru. Následně byly u filmů provedeny analýzy na obsah dusíku za pomoci AOAC 960.52. Dále obsah vlhkosti a popelovin, který byl odečten z TGA.

Předpokladem pro tyto pokusy by měl být ukazatel počátku degradace, obsah popelovin a vlhkosti ve vytvořených filmech. Zesítněné filmy by se měli projevit nižší změnou úbytku hmotnosti jak při sušení do 105 °C tak při degradaci od 200 °C a na konci vyšším % obsahem popelovin. Nicméně připravené filmy jevíly obecně podobné vlastnosti jako film připravený bez síťovadla. Asi nejlépe z připravených síťovaných filmů vyšel film s obsahem 10% a 15 % DAS. Filmy připravené s 5; 10; 15 % DET se nijak výrazně nelišili od filmu bez síťovadla a to ani při vizuálních vlastnostech jako je křehkost nebo pevnost.

Celkově lze říci, že filmy s obsahem 10% a 15 % DAS mají lepší vlastnosti než zbylé mnou připravené filmy. Z důvodu pomalejší tepelné degradace a vyšších popelovin o 2 %.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] D. VOET, J. G. VOETOVÁ: Biochemie Victoria Publishing a.s., Praha 1995; překlad Arnošt Kotyk a kol.; 167-168.
- [2] Van de Locht, M. Reconstitution of microfibrils from wool and filaments from epidermis proteins. *Melliand Textilberichte* **1987**, *10*, 780–786.
- [3] Steinert, P.M.; Gullino, M.I. Bovine epidermal keratin filament assembly *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, *70*, 221–227.
- [4] Thomas, H.; Conrads, A.; Phan, P.H.; van de Locht, M.; Zahn, H. *In vitro* reconstitution of wool intermediate filaments. *Int. J. Biol. Macromol.* **1986**, *8*, 258–264.
- [5] Ikkai, F.; Naito, S. Dynamic light scattering and circular dichroism studies on heat-induced gelation of hard-keratin protein aqueous solutions. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 482–487.
- [6] Tachibana, A.; Furuta, Y.; Takeshima, H.; Tanabe, T.; Yamauchi, K. Fabrication of wool keratin sponge scaffolds for long-term cell cultivation. *J. Biotechnol.* **2002**, *93*, 165–170.
- [7] Verma, V.; Verma, P.; Ray, P.; Ray, A.R. Preparation of scaffolds from human hair proteins for tissue-engineering applications. *Biomed. Mater.* **2008**, *3*, 25007.
- [10] Yamauchi, K.; Yamauchi, A.; Kusunoki, T.; Kohda, A.; Konishi, Y. Preparation of stable aqueous solution of keratins, and physicochemical and biodegradational properties of films. *J. Biomed. Mater. Res.* **1996**, *31*, 439–444
- [11] Yamauchi, K.; Maniwa, M.; Mori, T. Cultivation of fibroblast cells on keratin-coated substrata. *J. Biomat. Sci.-Polym. E.* **1998**, *9*, 259–270.
- [12] Fujii, T.; Ogiwara, D.; Arimoto, M. Convenient procedures for human hair protein films and properties of alkaline phosphatase incorporated in the film. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, *27*, 89–93.
- [13] Tanabe, T.; Okitsu, N.; Tachibana, A.; Yamauchi, K. Preparation and characterization of keratin-chitosan composite film. *Biomaterials* **2002**, *23*, 817–825.
- [14] Yamauchi, K.; Hojo, H.; Yamamoto, Y.; Tanabe, T. Enhanced cell adhesion on RGDS-carrying keratin film. *Mat. Sci. Eng. C-Bio. S.* **2003**, *23*, 467–472.
- [15] Lee, K.Y.; Ha, W.S. DSC studies on bound water in silk fibroin/S-carboxymethyl keratine blend films. *Polymer* **1999**, *40*, 4131–4134.
- [16] Lee, K.Y.; Kong, S.J.; Park, W.H.; Ha, W.S.; Kwon, I.C. Effect of surface properties on the antithrombogenicity of silk fibroin/S-carboxymethyl keratine blend films. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1998**, *9*, 905–914.
- [17] Lee, K.Y. Characterization of Silk/Fibroin/S-carboxymethyl Keratine Surfaces: Evaluation of Biocompatibility by Contact Angle Measurements. *Fibers Polym.* **2001**, *2*, 71–74.
- [18] Vasconcelos, A.; Freddi, G.; Cavaco-Paulo, A. Biodegradable materials based on silk fibroin and keratin. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 1299–1305

- [19] Tonin, C.; Aluigi, A.; Vineis, C.; Varesano, A.; Montarsolo, A.; Ferrero, F. Thermal and structural characterization of poly(ethylene-oxide)/keratin blend films. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2007**, *89*, 601–608
- [20] Zoccola, M.; Montarsolo, A.; Aluigi, A.; Varesano, A.; Vineis, C.; Tonin, C. Electrospinning of polyamide 6/modified-keratin blends. *E-Polym.* **2007**, no. 105.
- [21] Fujii, T.; Ide, Y. Preparation of translucent and flexible human hair protein films and their properties. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, *27*, 1433–1436.
- [22] Katoh, K.; Shibayama, M.; Tanabe, T.; Yamauchi, K. Preparation and physicochemical properties of compression-molded keratin films. *Biomaterials* **2004**, *25*, 2265–2272.
- [23] Reichl, S. Films based on human hair keratin as substrates for cell culture and tissue engineering. *Biomaterials* **2009**, *30*, 6854–6866.
- [24] Tanabe, T.; Okitsu, N.; Tachibana, A.; Yamauchi, K. Preparation and characterization of keratin-chitosan composite film. *Biomaterials* **2002**, *23*, 817–825.
- [25] Yamauchi, K.; Hojo, H.; Yamamoto, Y.; Tanabe, T. Enhanced cell adhesion on RGDS-carrying keratin film. *Mat. Sci. Eng. C-Bio. S.* **2003**, *23*, 467–472.
- [26] Lee, K.Y.; Ha, W.S. DSC studies on bound water in silk fibroin/S-carboxymethyl kerateine blend films. *Polymer* **1999**, *40*, 4131–4134.
- [27] Lee, K.Y.; Ha, W.S. DSC studies on bound water in silk fibroin/S-carboxymethyl kerateine blend films. *Polymer* **1999**, *40*, 4131–4134.
- [28] Lee, K.Y.; Kong, S.J.; Park, W.H.; Ha, W.S.; Kwon, I.C. Effect of surface properties on the antithrombogenicity of silk fibroin/S-carboxymethyl kerateine blend films. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1998**, *9*, 905–914.
- [29] Lee, K.Y. Characterization of Silk/Fibroin/S-carboxymethyl Kerateine Surfaces: Evaluation of Biocompatibility by Contact Angle Measurements. *Fibers Polym.* **2001**, *2*, 71–74.
- [30] Vasconcelos, A.; Freddi, G.; Cavaco-Paulo, A. Biodegradable materials based on silk fibroin and keratin. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 1299–1305.
- [31] Tonin, C.; Aluigi, A.; Vineis, C.; Varesano, A.; Montarsolo, A.; Ferrero, F. Thermal and structural characterization of poly(ethylene-oxide)/keratin blend films. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2007**, *89*, 601–608.
- [32] Zoccola, M.; Montarsolo, A.; Aluigi, A.; Varesano, A.; Vineis, C.; Tonin, C. Electrospinning of polyamide 6/modified-keratin blends. *E-Polym.* **2007**, no. 105.
- [33] Katoh, K.; Shibayama, M.; Tanabe, T.; Yamauchi, K. Preparation and physicochemical properties of compression-molded keratin films. *Biomaterials* **2004**, *25*, 2265–2272.
- [34] Fujii, T.; Ide, Y. Preparation of translucent and flexible human hair protein films and their properties. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, *27*, 1433–1436.
- [35] Reichl, S. Films based on human hair keratin as substrates for cell culture and tissue engineering. *Biomaterials* **2009**, *30*, 6854–6866.
- [36] <http://www.chempoint.cz/kucerik-1>

- [37] Zoccola, M.; Aluigi, A.; Vineis, C.; Tonin, C.; Ferrero, F.; Piacentino, M.G. Study on část membranes and electrospun nanofibers made from keratin/fibroin blends. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 2819–2825.
- [38] Aluigi, A.; Vineis, C.; Varesano, A.; Mazzuchetti, G.; Ferrero, F.; Tonin, C. Structure and properties of keratin/PEO blend nanofibres. *Eur. Polym. J.* **2008**, *44*, 2465–2475.
- [39] Kurimoto, A.; Tanabe, T.; Tachibana, A.; Yamauchi, K. Keratin sponge: Immobilization of lysozyme. *J. Biosci. Bioeng.* **2003**, *96*, 307–309.

## SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

PEO Polyethylenoxidu

SF Silk fibroin

PA6 Polyamid 6

Obr. Obrázek

DAS Dialdehyd škrobu

DET Dietyléster kyseliny vinné

cca přibližně

KH Hydrolyzát keratinu

PP Polypropylen

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

<i>Obr. 1 Elektron optický snímek vlákna.[1]</i>	11
<i>Obr. 2 a)Makroskopická struktura b) Molekulová struktura vlasu[1]</i>	12
<i>Obr. 3 Schéma přípravy keratinových hydrolyzátu alkalicko-enzymovým rozkladem</i>	21
<i>Obr. 4 Získaný suchý keratinový hydrolyzát</i>	22
<i>Obr. 5 Příprava roztoku keratinového hydrolyzátu</i>	23
<i>Obr. 6Vysušený film</i>	24
<i>Obr. 7 Uspořádání vzorků při mineralizaci</i>	25
<i>Obr. 8 Porovnání TGA filmů síťovaných DET proti nesíťovanému</i>	28
<i>Obr. 9 Porovnání TGA filmů síťovaných DAS proti nesíťovanému</i>	29
<i>Obr. 10 Porovnání TGA filmů síťovaných DAS proti nesíťovanému</i>	30

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: Analytické stanovené filmů

27

