



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE OBALOVÝCH FILMŮ NA BÁZI BETA-KERATINU

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF PACKAGING FILMS BASED ON BETA-KERATIN

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Zuzana Měšťánková

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.

BRNO 2022

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1712/2021 Akademický rok: 2021/22  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Zuzana Měšťánková**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Příprava a charakterizace obalových filmů na bázi beta-keratinu

### Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Ověření metody izolace beta keratinu z odpadního materiálu
3. Charakterizace izolovaného materiálu
4. Příprava a charakterizace obalových filmů
5. Závěr práce

### Termín odevzdání diplomové práce: 18.5.2022:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu.  
Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Zuzana Měšťánková  
studentka

-----  
doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

-----  
prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce se zabývá izolací keratinu z odpadního peří a využitím izolovaného keratinu pro přípravu polymerních filmů. Hlavním cílem bylo prostřednictvím hydrolýzy izolovat keratin z drůbežního peří a porovnat výtěžnost různých typů hydrolýz. Nejefektivnější byla hydrolýza s 0,5% hydroxidem sodným s výtěžností 480 g keratinu na 1 kg slepičího peří. Izolovaný keratin byl charakterizován z hlediska struktury, morfologie a termálních vlastností. Porovnání s hmotnostním standardem ukázalo, že aplikované hydrolýzy rozštěpily keratin na makromolekuly menší než 15 kDa. Za pomoci skenovací elektronové mikroskopie bylo stanoveno, že lyofilizované keratinové částice dosahovaly velikosti v řádu desítek  $\mu\text{m}$  a měly nepravidelný tvar. Dále byly připraveny kompozitní filmy na bázi izolovaného  $\beta$ -keratinu a dalších polymerů. Pomocí termických metod bylo zjištěno, že přídavek keratinu výrazně snížil termální stabilitu kompozitních filmů. Analýzy ukázaly, že nejlepších mechanických vlastností bylo dosaženo u filmů na bázi polyvinyl alkoholu a keratinu. Ku příkladu přídavek 0,25 g keratinu na 1 g polyvinyl alkoholu významně zvýšil hodnotu prodloužení v tahu až o 68,9 %. Dále pak filmy na bázi chitosanu a keratinu měl antibakteriální vlastnosti. Výsledky této diplomové práce dokládají, že z drůbežního peří lze za pomoci alkalické hydrolýzy efektivně izolovat keratin, který může být využit pro přípravu kompozitních filmů s potenciálem pro praktickou aplikaci.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

$\beta$ -keratin, hydrolýza, bioplasty, slepičí peří

## **ABSTRACT**

This diploma thesis deals with keratin isolation from poultry feather waste and preparation of keratin-polymers composite films utilizing isolated keratin. The main goal was to isolate keratin from poultry feathers by hydrolysis and compare yield of diverse hydrolysis types. The most efficient was hydrolysis using 0.5% sodium hydroxide with yield 480 g of keratin per 1 kg of chicken feathers. Structure, morphology and thermal properties of isolated keratin was analyzed. Comparison with protein molecular weight standard it was revealed that hydrolysis cleaved keratin to macromolecules smaller than 15 kDa. Scan electron microscopy showed that size of lyophilized keratin particles was in the order tens of  $\mu\text{m}$  and had an irregular shape. Further, composite films based on isolated  $\beta$ -keratin and other polymers were prepared. Thermal analysis showed, the addition of keratin significantly reduced the thermal stability of composite films. Analyses revealed that Polyvinyl alcohol composite films reached the best mechanical properties. For example, an addition of 0.25 g of keratin per 1 g of polyvinyl alcohol increased the tensile elongation by up to 68.9%. Moreover, the film based on chitosan and keratin had antibacterial properties. The results demonstrate that it is able to efficiently isolate keratin from poultry feather waste by alkaline hydrolysis and isolated keratin can be utilized to prepare potentially applicable keratin-polymers composite films.

## **KEYWORDS**

$\beta$ -keratin, hydrolysis, bioplastic, chicken feathers

MĚŠŤÁNKOVÁ, Zuzana. *Příprava a charakterizace obalových filmů na bázi beta-keratimu*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138218>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Adriána Kovalčík.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## Poděkování:

*Velmi ráda bych poděkovala své vedoucí diplomové práce paní doc. Ing. Adriáně Kovalčík, Ph.D., za veškerou pomoc, cenné rady, za věnovaný čas a odborné vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat „mentolovi“ Ing. Pavlovi Vostrejšovi, Ing. Michaele Jakešové, Ing. Radimovi Střížovi, Ing. Nikole Černekové a paní laborantce Lence Somrové za pomoc při provádění experimentů a udržování příjemného prostředí na pracovišti. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině, která mě dokázala podpořit a motivovat v těch nejtěžších studijních a životních chvílích. Velké poděkování také patří slepicím, které obětovaly svůj život a své peří pro vědecké účely.*

## Obsah

1	ÚVOD .....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	10
2.1	Produkce a nakládání s odpady v potravinářském průmyslu a při chovu zvířat .....	10
2.2	Peří .....	13
2.2.1	Druhy peří .....	14
2.3	Složení peří .....	16
2.4	Keratin .....	16
2.5	Využití keratinu .....	19
2.5.1	Polymerní biokompozity s obsahem keratinu .....	20
2.5.2	Keratin jako aktivní složka v kosmetických přípravcích .....	21
2.5.3	Keratin jako biohnojivo .....	22
2.6	Zpracování a využití materiálů s obsahem keratinu .....	22
2.7	Popis přípravy filmů s obsahem keratinu .....	26
2.8	Vlastnosti filmů s obsahem keratinu .....	28
2.9	Obaly .....	30
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	33
3.1	Použité chemikálie .....	33
3.2	Přístroje .....	34
3.3	Materiál .....	34
3.4	Izolace keratinu .....	35
3.5	Příprava keratinových filmů .....	39
3.6	Charakterizace keratinu a keratinových filmů .....	42
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	49
4.1	Odtučnění peří .....	49
4.2	Plynová chromatografie .....	50
4.3	Porovnání jednotlivých hydrolyz .....	51
4.4	Analýza pomocí elektronové mikroskopie .....	53
4.5	PAGE-SDS .....	54
4.6	Antimikrobiální testy .....	54
4.7	Vlastnosti filmů .....	56
4.8	Kolorimetrie .....	61
4.9	Charakterizace keratinu pomocí FTIR .....	61

4.10	FTIR filmů .....	62
4.11	TGA .....	64
4.12	Termální vlastnosti peří a keratinu.....	66
4.13	TGA filmů.....	67
4.14	DSC filmů .....	68
4.15	Mechanické vlastnosti filmů .....	69
5	ZÁVĚR.....	72
6	LITERATURA.....	74
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	84

# 1 ÚVOD

V současné době je velká snaha o snížení výroby produktů na bázi ropy a nahradit je materiály vyrobených z obnovitelných a udržitelných zdrojů. Na celém světě se v roce 2017 vyrobilo 348 milionů tun polymerů. Z toho asi 40% bylo použito na vytvoření jednorázových produktů. Do životního prostředí se ročně dostane asi 13 milionů tun plastových kontaminantů, což představuje obrovskou zátěž pro životní prostředí. Plasty podléhají degradaci způsobené působením UV záření, mechanického obrušování a biologickou degradací. Mikroplastické částice se tak bioakumulují v přírodě, ze které se potravním řetězcem mohou dostávat až do lidské potravy. Proto se začalo uvažovat o odpadu ze zemědělského a potravinářského průmyslu, který by mohl být dále zpracován a sloužit jako alternativní zdrojem pro výrobu bioproduktů [1].

Většina vyprodukovaného peří, ale dnes nemá průmyslové využití. Tento odpadní materiál může být skládkován, kde může narušovat životní prostředí. Dále peří může být spalováno, což vede k problému se špatným hořením odpadního materiálu. V neposlední řadě může být peří kompostováno, v tom případě ale nastávají obtíže s velmi pomalým rozkladem. Malé množství peří je využíváno k výrobě krmiv pro zvířata. Celosvětově se za rok vyprodukuje 40 milionů tun peří, z čehož vyplývá fakt, že je tato surovina dobře dostupná a levná. Peří má jedinečné vlastnosti, jako je nízká hustota, dutá struktura medového plástu a hierarchická architektura. Peří je tvořeno z více jak 90 % bílkovinami ve formě keratinu. Keratin je intenzivně studován v rámci materiálové chemie, kde by mohl v určitých oblastech přispět k nahrazení ropných produktů. Od běžných plastů na bázi ropy má keratin výhodu v jeho biokompatibilitě a biodegradabilitě, kdy pomocí mikroorganismů je rozkládán na jednotlivé peptidy a aminokyseliny, které navíc působí v životním prostředí jako biohnojivo [2, 3].

Keratin má značné možnosti aplikace v různých průmyslových odvětvích. Proteinové hydrolyzáty jsou známé již padesát let. Od té doby byly keratinové materiály studovány a vylepšovány, ale žádní z nich nemá v současné době komerční využití. Pro produkci keratinových materiálů je velkým úskalím extrahování keratinu. Extrakce probíhá procesem hydrolýzy peří, která je komplikovaná svou energetickou náročností, použitím zdraví nebezpečných látek, malá výtěžnost nebo požadavky na specifické podmínky v průběhu reakce. Z keratinového hydrolyzátu je možné vytvořit filmy, které ovšem mají špatné mechanické vlastnosti a jsou rozpustné ve vodě, což je další komplikací pro produkci obalových materiálů. Vlastnosti filmu se mohou modifikovat přísady různých zesíťovacích činidel. Vzhledem k biologické povaze keratinových produktů je nezbytné, aby síťovací činidla nebyla toxická a nezneškodila tím hlavní přednosti keratinových produktů [3].

Díky zájmu o keratin v posledních letech, můžeme pozorovat rozdílné studie, které pojednávají o odlišných využitích keratinových hydrolyzáatů. Také se pracuje na vylepšení procesu hydrolýzy, při které by bylo vhodné zvýšení výtěžku a snížení její náročnosti na energii a drahé chemikálie. Keratinové materiály by tak mohly být využívány v nejrůznějších odvětvích a tím konkurovat komerčním materiálům.



Byla proveda řada výzkumů zaměřených na izolaci a využití keratinu z různých zdrojů, nicméně tato práce souhrně popisuje izolaci keratinu z pěti porovnáním několika typů hydrolyz, jejich následnou charakterizaci a využití získaného keratinu v kompozitních materiálech.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Produkce a nakládání s odpady v potravinářském průmyslu a při chovu zvířat

Potravinový odpad nebo potravinové ztráty vznikají v základních pěti fázích, do nich řadíme zemědělskou produkci, post-sklizňové zacházení s potravinou, které zahrnuje transport potravin z místa sklizně do místa zpracování potravin, přičemž může být potravin napadena hmyzem nebo znehodnocena špatným skladováním. Dále se potravinový odpad generuje při zpracování, distribuci a konzumaci potravin. Při zpracování různých potravinářských výrobků se vytváří řada produktů nepříznivých pro životní prostředí. Tyto produkty jsou obvykle převedeny do odpadních vod (praní, odpařování, filtrace apod.). Odpadní vody poté obsahují vysoké množství rozptýlených pevných a organických látek, které jsou ve vodě rozpuštěny. Z důvodu splachování části odpadu do odpadních vod jsou budovány čistírny odpadních vod samotnými potravinářskými závody. Největším problémem při čištění jsou těžké kovy, polychlorované bifenylly, antibiotika nebo odpadní vody se zvýšeným obsahem chloridu sodného, dusičnanů a dusitan. K odstranění hlavních polutantů se využívají fyzikální, chemické a biologické postupy. Biologické postupy můžeme dělit na aerobní, kdy se využívají mikroorganismy na přeměnu sacharidů, bílkovin a lipidů na mikrobiální biomasu a oxid uhličitý, a na anaerobní, ve kterých se využívají kvasinky a methanogenní bakterie na tvorbu ethanolu, bioplynu nebo organických kyselin. Jednotlivé technologické postupy jsou vybírány na základě míry znečištění odpadní vody, druhu surovin, ceně a náročnosti technologie [4].

Velkou část odpadu vytvořeného potravinářským průmyslem lze využít přímo jako krmivo nebo jako surovinu pro přípravu krmiv, krmných směsí nebo hnojiv. Při výrobě potravin se ročně v České republice vyprodukuje 362 tisíc tun odpadu. Za jeden rok se celosvětově vyprodukuje v rámci potravinářského průmyslu a zemědělství přes miliardu tun odpadu. Odhad Organizace pro výživu a zemědělství pro OSN (FAO – Food and Agriculture Organization) z roku 2012 udává dokonce  $1,3 \cdot 10^9$  t vyprodukovaného odpadu za rok. V zemích Evropské unie se pravděpodobně vytvoří až 90 milionů tun potravinových odpadů. Evropská komise odhaduje, že v oblasti potravinářského průmyslu bez zahrnutí zemědělství se přibližně vyprodukuje 42 % odpadu z domácností, 39 % odpadu z výroby potravin průmyslovými podniky, 14 % odpadu z restaurací a podniků hromadného stravování a posledních 5 % odpadu z důvodu chyb distribučního řetězce [5, 6, 7, 8].

#### VEDLEJŠÍ PRODUKTY POTRAVINÁŘSKÉHO PRŮMYSLU

##### *Vláknina a lepek*

Při výrobě škrobu z brambor a mouky vznikají vedlejší produkty ve formě vlákniny a lepku. Vláknina se využívá jako krmivo pro dobytek, před použitím se lisuje a suší. Lepek získáváme v technické nebo jedlé formě. Technický lepek se využívá v obuvnickém průmyslu a jedlý jako příměs do koření. Dle Girard a kol. navrhli využít fenolické látky na zlepšení vlastností lepku v oblasti nových biomateriálů, které by mohly být využívány jako jedlé, biologicky rozložitelné nebo aktivní obaly. Při výrobě mouky získáváme při čištění zrna krmné (obilky) a nekrmné

odpady (plevy, minerální příměsi, slámu). Nekrmných odpadů se zbavujeme pomocí kompostování [4, 9].

#### *Melasa a řízky*

V cukrovarnickém průmyslu vzniká melasa, která je nezbytnou surovinou pro tvorbu lihu a droždí, kde se využívá jako substrát ve fermentačním procesu. Tento substrát využívá při produkci kyselin, mezi ně zahrnujeme mléčnou, máselnou, citronovou, itakovou, šťavelovou, glycerolu, acetonu a biomasy na krmiva. Pomocí melasy se zlepšuje kvalita sena a siláže pro masný a dojný skot. Dalším vedlejším produktem při výrobě cukru jsou řepné řízky, ze kterých lisováním získáme sušinu. Sušina slouží jako krmivo, a k výrobě vlákniny [4, 10].

#### *Syrovátka a podmásli*

Při zpracování mléka je získávána jako vedlejší produkt syrovátka, která se obvykle upravuje do formy zahuštěného koncentráту anebo dochází k jejímu vysušení. Tyto úpravy se provádí z důvodu nízké trvanlivosti syrovátky, která v původním stavu má vysoký obsah vody. V tomto stavu se využívá na výrobu nápojů a krmiv. Syrovátka je bohatým zdrojem bílkovin, převážně na esenciální aminokyseliny, díky čemuž je jejich biologická hodnota vyšší než u jiných bílkovin živočišného a rostlinného původu. Ty se mohou použít na výrobu krmiv, doplňků stravy nebo pekárenských aditiv. Syrovátka obsahuje laktózu, která je zpracována v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Dále při výrobě mléka je získáváno podmásli, které je bohatým zdrojem laktózy, fosfolipidů a kyseliny mléčné. Podmásli obsahuje značné množství fosfolipidů a kaseinu, z tohoto důvodu se široce využívá v potravinářském průmyslu a to jako emulgátor [4, 11].

#### *Hydratační a mýdlový kal*

Při výrobě tuků a olejů vzniká hydratační kal, který je zdrojem fosfatidilcholinu a lecitinu. Ze sójového oleje je možné získat potravinářský lecitin, zatím co lecitin z ostatních olejů slouží k technickým účelům nebo jako krmivo. Mýdlový kal je využíván jako surovina pro přípravu detergentů a bionafty a dále jako zdroj rafinačních mastných kyselin. Rostlinné steroly, které jsou získávány jako vedlejší produkt z rafinace olejů, jsou využívány ve farmacii [4].

#### *Ovoce a zelenina*

V potravinářském průmyslu při výrobě nápojů z ovoce a zeleniny vzniká značné množství odpadu ve formě pokrutin, což je směs dužniny, slupek a stonků. Pokrutiny obsahují významné množství bioaktivních látek, díky nim mohou být využity jako aditivum (přírodní antioxidanty a dietní vláknina) v pekařských a mléčných výrobcích. Při jejich zpracování dostáváme výlisky, které slouží jako složka krmiv nebo z některých můžeme získávat pektin. Pektin získaný z jablek a citrusů je používán jako zahušťovadlo, želírující činidlo nebo jako stabilizátor potravin. K zvýšení antioxidační kapacity a tím zvýšení trvanlivosti potraviny lze použít polyfenolické látky a karotenoidy extrahované z odpadů získaných při zpracování ovoce a zeleniny. Výlisky se používají v čerstvé nebo stabilizované vysušené formě. V kosmetickém průmyslu se využívají oleje vylisované z jader, které se dále mohou využít na zkrmení [4, 12].

### *Sladové mláto a pivovarské kvasnice*

Při výrobě rmutu se získává sladové mláto, které obsahuje značné množství bílkovin a vlákniny, po úpravě lisováním a sušením slouží jako krmivo pro zvířata. Je snaha mláto využívat také jako složku lidské výživy, surovinu v biotechnologiích, adsorbent, k výrobě energie a papíru. V biotechnologických procesech lze pivovarnické mláto využít jako substrát pro kultivaci mikroorganismů a surovinu pro výrobu kyseliny mléčné, bioetanolu, bioplynu, fenolových kyselin, xylytolu a pullulanu. Dále při výrobě piva získáváme pivovarské kvasnice, které poskytují minerální látky, lysin a vitamín B, lze je také uplatnit ve farmaceutickém průmyslu. Ostatní vedlejší produkty nebo odpady při výrobě piva nejsou vhodná k dalšímu zpracování z důvodu vysokého obsahu hořkých látek [4, 13].

### *Víno, lih a droždí*

Při výrobě vína jako vedlejší produkt vznikají třapiny, které obsahují značný podíl celulózy. Třapiny se po sušení a mletí mohou zkrmovat anebo v kombinaci s výlisky silážovat. Z výlisků hroznů se dá vyrobit krmivo nebo jejich extrakcí horkou okyselenou vodou získáme extrakt, který je po zkvašení použit pro výrobu vinných destilátů. Z výlisků z červených hroznů lze získat antokyanová barviva, která se využívají jako přírodní aditivní barviva v potravinářství. Izolovaná semena se využívají na výrobu oleje. Z kvasničných kalů se odděluje zbytek vína a vzniklý mateční koláč je používán pro izolaci kyseliny vinné. Ve vinných sudech se usazuje vinný kámen, z kterého je získáván vinan sodno-draselný. Vedlejším produktem výroby lihu jsou výpalky, přičemž melasové výpalky se mohou používat pro výrobu krmného droždí. Sušené obilné a bramborové výpalky jsou využívány k výrobě krmiv. Ovočné výpalky, které zůstávají po destilaci pálenek, se na výrobu krmiv mohou použít až po úpravě pH a mohou se využít i jako hnojivo, ale až po vyhnití a neutralizaci vápnem. Využití odpadů z výroby droždí je spojeno s čištěním odpadních vod. Zcentrifugovaná vykvašená zápara obsahuje metabolické produkty, anorganické živiny a zbytky melasy. Při zpracování těchto odpadních vod se pomocí aerobního způsobu čištění získává v konečném důsledku bioplyn a kal, který je nutno stabilizovat před jeho použitím jako hnojivo [4].

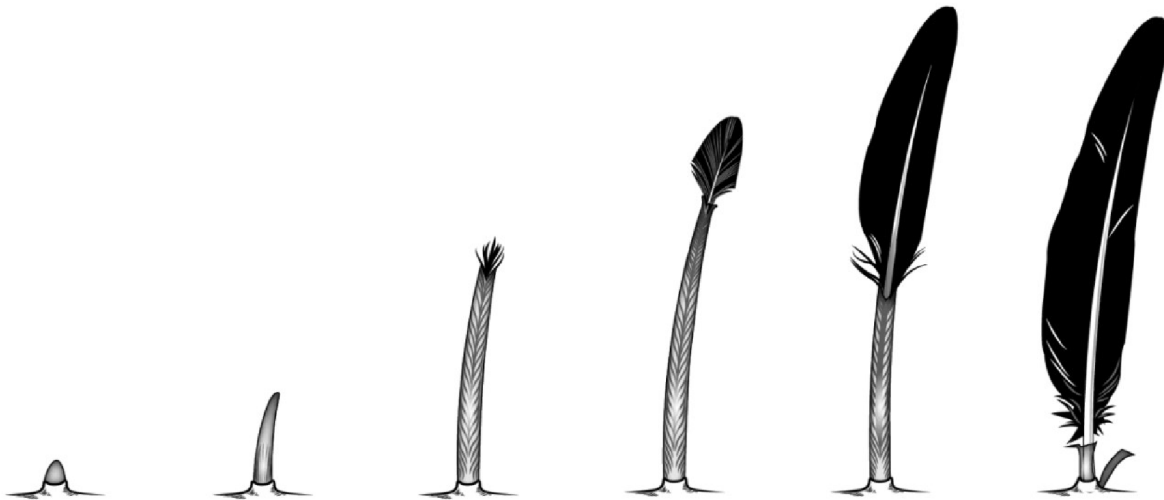
### *Zpracování masa*

Masný průmysl dodává značné množství vedlejších produktů. Mezi ně zahrnujeme tuky a droby, které se přidávají s masem do masných potravin pro zlepšení jejich vlastností. Dále se využívá krev, která musí projít úpravou, aby nedocházelo k jejímu srážení, poté může být použita jako složka krmiv, k lidské výživě a pro technické účely. Z krve lze získat plazmu, která je zdrojem aditivních bílkovin. Ze zvířat se dále využívají střeva, která slouží jako obalový materiál, kůže, která se po úpravě přimíchávají do masných výrobků, jsou zdrojem kolagenu a želatiny, nebo se zpracovávají v koželužnickém průmyslu. Kolagen lze využít jako emulgátor v masných výrobcích, dále z ve vodě nerozpustného kolagenu je možné získat řízenou hydrolýzou želatinu. Štětiny se využívají při výrobě štětců a kartáčů. Ze žláz s vnitřní sekrecí jatečných zvířat je možné získávat hormony, které mají uplatnění ve farmaceutickém průmyslu. Tyto hormony se rychle zmrazí a pak se použijí na výrobu léků. Obsahy trávicího traktu se zpracovávají k produkci hnojiv. Exkrementy drůbeže jsou vysoko-energetickým odpadem, který se využívá pro výrobu briket, dále obsahují škrobové látky, bílkoviny, močovinu

a minerální látky, proto z nich lze vyrábět krmivo. Z kostí se získává želatina a krmné moučky. Hlavním odpadním produktem z drůbeže je peří, které lze využít na přípravu pérové moučky nebo jako výplň do oblečení a polštářů. Po jeho hydrolýze lze získat keratin, který má rozmanité využití [4, 12].

## 2.2 Peří

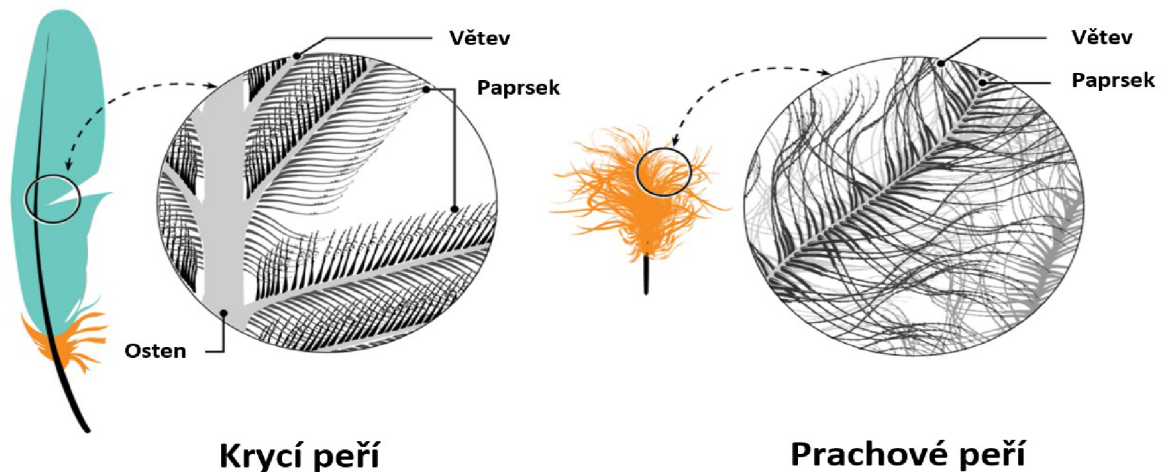
Ptačí pero se z fyziologického hlediska vyvinulo z plazích šupin a jedná se čistě o epidermální strukturu. Pera jsou v kůži ukotvena ve váčku a nevyrůstají na všech místech ptačího těla. Místa zakrytá peřím se nazývají nažiny a místa, kde pera vyrůstají se nazývají pernice. Pera jsou vyživována pomocí škárových cév, které prochází přes škárovou papilu do dutiny pera. Pokud dojde k výměně pera, dochází k obnově papily, která je schopna vytlačit stávající pero a poté se podílí na vytvoření nového. Pero je zachováno ve stočeném tvaru po dobu růstu, který je udržován pomocí ochranné pochvy. Špička pochvy je poté roztržena a dochází k uvolnění zralé části pera. Proces růstu je ukončen odpadnutím ochranného pouzdra (Obrázek 1) [14].



Obrázek 1: Proces růstu peří [15]

Výměna celé sady peří probíhá u ptáků minimálně jednou za rok, kdy jsou pera značně opotřebena. Pták si udržuje kvalitu peří přepíráním nebo neustálou péčí, kdy háčky peří zobákem vrací na své místo. Peří má několik forem, které jsou složeny z totožných základních částí. Tyto segmenty poté tvoří větvenou strukturu daného peří. Každé pero, s výjimkou prachového peří, má svou osu, která se nazývá stvol. Stvol je složen ze dvou částí. Jedna vyrůstající z kůže, má dutou strukturu a nazývá se brk. Druhá část má plnou strukturu kolem níž vyrůstá po stranách ostn. Z ostnu v obou stranách vyrůstají větve, na nichž jsou připojeny paprsky s háčky. Horní řada paprsků je otočena ke špičce pera, na jejich povrchu jsou drobné háčky a mikrostruktury, které se dokáží zachytit za spodní řadu paprsků, která se vyznačuje jednodušší strukturou. Všechny tyto části tvoří prapor. U ptáků rozlišujeme dva hlavní typy peří, kdy jedno zajišťuje izolaci a to druhé tvoří obrys těla. Prachové peří netvoří prapor, ale jen kratičké výrůstky. Tento druh peří má načechraný vzhled z důvodu volně uspořádané mikrostruktury s pružnými ostny a je schopen zachycovat teplo vycházející z těla ptáka. Načechránání je prováděno pomocí připojených nervových zakončení a svalů. Tento typ peří

se vyskytuje i v oblasti nažin. Peří krycí nebo také obrysové kryje hlavu, krk, nohy a tělo. Tento typ peří má tuhou strukturu a je obvykle ploché. Od prachového peří se liší mikrostrukturou, pomocí níž mohou ptáci létat a udržovat se v suchu. Struktura je tvořena háčky, které se nachází na paprscích, precizně do sebe zapadajících a vytvářejících tak vodě a větru odolnou bariéru (Obrázek 2). Peří poskytuje souvislou a mimořádně lehkou nosnou plochu ptačích křídel. Vzhled a uspořádání per se mění v závislosti na pohlaví, sociálním postavením a věku ptáka nebo na ročním období [14, 16].



Obrázek 2: Vnitřní struktura krycího a prachového peří [15]

### 2.2.1 Druhy peří

Letky jsou dlouhá pera modifikovaná k letu, vyznačují se nesouměrným praporem, jehož horní část má užší tvar a pevnější strukturu, spodní část má obrácené vlastnosti. Mají speciálně upravený povrch proti větru a jejich zúžený tvar v horní části zabraňuje zkroucení ve vzduchu. Letky se vzájemně překrývají a jejich stabilitu zajišťují vazy propojující brka jednotlivých per. Křídlo je tvořeno kostmi připomínající prsty a zápěstí savců, tyto kosti slouží k podepření primárních letek, které jsou nejdelší ze všech per tohoto typu. Rýdovací nebo také ocasní pera mají také nesymetrický tvar a prodloužení. Nahrazují funkci ocasu, kdy jsou ukotveny u srostlých ocasních obratlů a jsou vějířovitě seskládána. Tento typ per je důležitý při letu, kdy pomáhají při korigování směru letu, dále také slouží k brzdění při přistání. Ocasní pera ptáci používají při pohybu po kmeni, k opírání a u některých druhů jsou modifikována, aby zastávala ozdobnou funkci. Obvykle se vyskytuje u ptáků šest párů ocasních per, které vykazují nesymetrii směrem k vnějším párům (Obrázek 3) [14, 18].

Další druh představují prachová pera, která se liší od obrysových per svou strukturou, kdy netvoří prapor a na povrchu paprsku se objevují jen drobné výrůstky místo háčků. Díky tomu má prachové peří nadýchanou strukturu, která poskytuje teplou izolaci. Mláďata mají odlišně sestavené prachové peří, větve vychází přímo z báze a nikoliv z ostnu pera. Vlasová pera jsou krátká jednoduchá peříčka, která mohou mít na špičce malý prapor. Jejich funkce je snímání polohy obrysového peří, a proto se vyskytují u báze daného pera, ale mohou se také vyskytovat volně po těle ptáka. Dalším typem jsou specializovaná štětinová pera, která se vyznačují nejjednodušší strukturou. Jsou složena z tuhého vřetene, který obvykle postrádá větve vycházející z ostnu. Štětinové peří má hmatovou funkci a je podobné hmatovým chlupům

savců. Vyskytují se v oblasti očí a obličeje převážně kolem zobáku a nosních otvorů. Jiné specializované peří se vyskytuje u ústí kloaky nebo žlázy v blízkosti kostrče ptáka (Obrázek 3) [14, 18].



Obrázek 3: Druhy peří [15]

Jednotlivé druhy peří mají v životě ptáků důležité funkce, kam zařazujeme let, možnost splynout s okolní přírodou a tím se chránit před nebezpečím, zbarvení peří a jeho nastavení hraje signalizační roly při námluvách, kdy se samci snaží předvést před samicemi. Ptáci díky peří dokáží obývat jakýkoliv kout planety, což je způsobeno kombinací termoregulace a schopnosti létání. Dále peří poskytuje ptáku izolační vrstvu a ochraňuje ho před vlhkostí a vodou. Aby nedošlo k promočení peří, je impregnováno pomocí mazových žláz, které se vyskytují nad ocasem. Pták svým zobákem roztírá tuk po těle. Peří v oblasti hlavy si otírají o mastné peří na zádech. U mláďat se mazové žlázy ještě nevyskytují, a proto své peří impregnují otěrem o dospělého jedince. Pták své peří dokáže využít k izolaci, kdy načechráním vytvoří vrstvu vzduchu mezi peřím a tělem, což snižuje ztrátu tělesného tepla. Při horkých dnech pták své peří přitiskne k tělu a prudkým dýcháním zvýší odpar vody, což zapříčiní rychlejší tělesné ochlazení [15].

Obrovská rozmanitost ptačího zbarvení je dána třemi parametry. Mezi první parametr řadíme pigmenty, nejčastější jsou melaniny, které dávají peří hnědou, černou nebo tmavožlutou barvu. Dále peří zbarvují tuková barviva, jedná se o lipochromy nebo karotenoidy, které způsobují žluté až červené zbarvení per. Vzácnými pigmenty jsou zelené nebo růžové porfyriny. Druhým parametrem jsou fyzikálně optické jevy, souvisejí s lomem světla. Optické jevy probíhají na mikrostruktuře větví a paprsků pera. Pomocí fyzikálně optických jevů dostaneme strukturní barvy, mezi které řadíme bílou nebo různé tóny modré, které často vykazují kovové odlesky. Specifických barevných efektů a odstínování per, které závisí na tom, z jakého úhlu se na ptáka díváme, se dosahuje spojením pigmentů a strukturních barev. Ptačí zbarvení se může měnit v závislosti na ročním období, přepeřování nebo ulamování okrajových per. U každého druhu má svůj vlastní charakteristický barevný vzor, díky němuž jsme schopni jednotlivé

ptactvo určit. U zbarvení ptactva se často vyskytuje pohlavní dimorfismus, kdy zejména v době rozmnožování zbarvení samce od samice liší [16].

### 2.3 Složení peří

Peří obsahuje 90 % keratinového proteinu ( $\alpha$ -keratin 41 až 67 %,  $\beta$ -keratin 33 až 38 %, amorfni keratin 21 %), dále pak vitamínů a růstových faktorů. Konkrétně  $\beta$ -keratin v peří je z 53,6 % v konformaci  $\beta$ -listu, a z 32,2 % ve formě  $\alpha$ -šroubovice, linkerové oblasti tvoří 14,2 % [17].

### 2.4 Keratin

Keratin je protein, tvořen fibrilární a globulární složkou, která se vyznačuje vysokým obsahem cysteinových zbytků. Bílkovina se vyskytuje u všech vyšších obratlovců. Je základem pro výstavbu intermediárních filament cytoskeletu epitelových tkání (vlasů, nehtů, chlupů, rohů, vlny, šupin a peří). V závislosti na biologickém původu keratinu se jeho molekulová hmotnost pohybuje kolem 10 až 68 kDa. Keratin se skládá ze vzájemně se lišících podjednotek, které mají značně protáhlé molekuly, jsou nerozpustné ve vodě a jsou odolné vůči solím i proteolytickým enzymům. Ve vodě keratinová vlákna bobtnají z důvodu narušení iontových a vodíkových vazeb, voda poté vniká do rozvolněné fibrilární struktury. Charakter keratinu určuje sekvence aminokyselin, které tvoří aminokyselinové řetězce. Tyto řetězce se liší polaritou, nábojem, velikostí, počtem a uspořádáním aminokyselin. Díky přítomnosti aminokyselin cysteinu, cystinu a methioninu, které obsahují síru, a které jsou v sušině keratinu zastoupeny ze 2 až 5 %. Dochází k tvorbě intra- nebo intermolekulárních disulfidických vazeb. Tyto nekovalentní vazby vznikají pomocí enzymu sulfhydryl oxidázy. Enzym propojuje sulfydylové funkční skupiny dvou aminokyselin. Disulfidické vazby v keratinu mají za úkol udržovat strukturální integritu [19, 20, 21, 22, 23].

Z hlediska biosyntézy a množství sirných příčných vazeb, lze rozdělit keratiny na měkké a tvrdé. Tyto skupiny se liší svou strukturou, funkcí i regulací. Kompaktní a tvrdá struktura je složena z tvrdých keratinů, které tvoří uspořádaná vlákna, ty jsou zakomponována do matrice proteinu se značným obsahem cysteinu. Funkce měkkých keratinů je zprostředkovávat prodloužení a uvolňování napětí. Tento typ vytváří volně zabalená vlákna. U savců nacházíme 54 druhů keratinů, strukturální podjednotky pokožkových a vlasových keratinů se rozdělují na dva typy, které se od sebe liší složením a molekulovou hmotností. Typ I jsou kyselé a typ II jsou neutrální-bazické keratinové podjednotky [23].

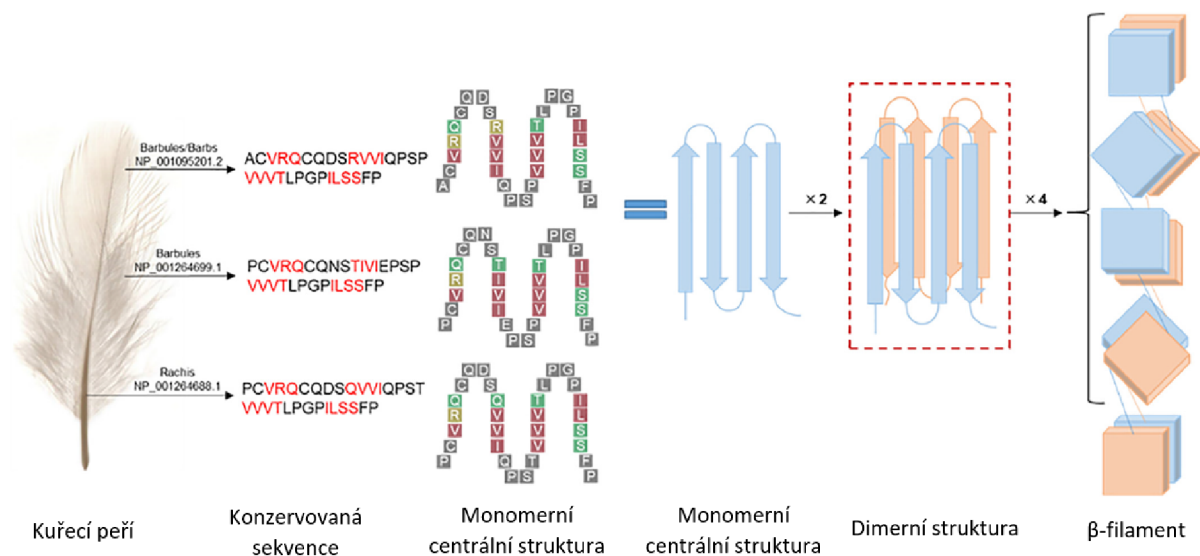
Rozlišujeme  $\alpha$ -keratin a  $\beta$ -keratin, které se liší intermediálními vlákny. Struktura  $\alpha$ -keratinu je složena z  $\alpha$ -šroubovic, jejichž spojením vzniká mikrofibrila. U  $\beta$ -keratinu vytváří intermediální vlákna spirálovou strukturu, které se vytváří v terciální struktuře. Vlákna mají menší průměr a jejich základem je  $\beta$ -skládaný list. Oba druhy keratinů jsou lineárně elastické, ale tuhost  $\beta$ -listu je větší než  $\alpha$ -šroubovice. Mechanické chování těchto proteinů je závislé na vlhkosti, s kterou dochází ke snížení tuhosti z důvodu hydratace [24].

#### *$\alpha$ -keratin*

$\alpha$ -keratin se vyskytuje u savců v jejich kůži, vlně, kopytech. Struktura monomeru  $\alpha$ -keratinu je tvořena třemi doménami, jsou to tzv. hlavní (N-koncová), tyčová, koncová (C-koncová) doména (Obrázek 4). Pomocí  $\alpha$ -helikální centrální spirálové tyčové doméne dochází



k samovolnému sestavování vláken. Nehelikální kulovitá variabilní hlavní nebo koncová doména na konci proteinu má zásadní úlohu při sestavování a regulaci intermediárních vláken. Tyčová doména se skládá ze čtyř pravotočivých  $\alpha$ -helikálních subdomén, které jsou od sebe odděleny nespíralovými linkerovými oblastmi ( $\beta$ -obraty). Subdomény jsou složeny ze sedmi se opakujících aminokyselin. První čtyři pozice obsahují specifické hydrofobní nepolární aminokyseliny, další tři pozice obsazují nabitě aminokyselinové zbytky, které stabilizují  $\alpha$ -šroubovici. Dva monomery vytvoří heterodimer (levotočivou cívku), spojením dvou heterodimerů pomocí disulfidových a vodíkových vazeb vzniká tetramer. Následně dva tetramery formují protofibril, který dosahují v průměru 3 nm. Pro vznik intermediálních filament  $\alpha$ -keratinu je potřeba spojení čtyř protofibrilů. Mikrofibrily obsahují intermediální vlákna, které se zesítují pomocí disulfidových vazeb, tento proces probíhá v matrici proteinů seskupené s keratinem. Mikrofibrily dosahují v průměru 8 nm. Strukturální stability jednotlivých keratinových helixů se dosahuje pomocí disulfidových, vodíkových a iontových vazeb. Zesítnění disulfidovými vazbami zapříčiní vznik vysoce rezistentní makromolekulární sestavy. U keratinů se vyskytují posttranslační modifikace, mezi které se zařazuje fosforylace a glykosylace. V hlavní doméně mění fosforylace celkový náboj brání tak interakcím s tyčovými doménám sousedních keratinů. Glykosylace způsobuje u keratinu změnu vazebných nebo signálních funkcí [24, 25, 26].

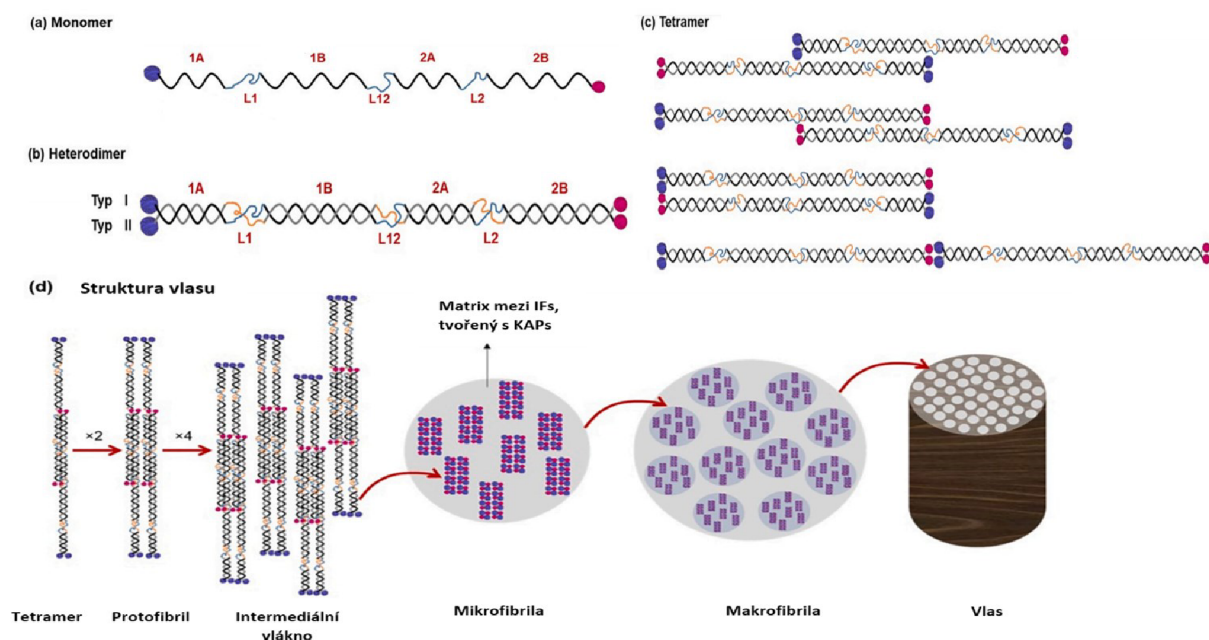


Obrázek 4:  $\alpha$ -keratin sekundární struktura [26]

### $\beta$ -keratin

$\beta$ -keratin se vyskytuje u ptáků v zobácích, peří a u plazů v drápech a šupinách. Molekulová hmotnost  $\beta$ -keratinu se pohybuje v rozmezí od 10 do 22 kDa. Tento protein je sestaven z  $\beta$ -listů, každý z nich je tvořen čtyřmi  $\beta$ -prameny, které obsahují 31 aminokyselinových zbytků (Tabulka 1). Tyto zbytky odpovídají přiřazené struktuře  $\beta$ -listu (Obrázek 5).  $\beta$ -prameny mohou být paralelní nebo antiparalelní, jsou drženy pohromadě díky hydrofobním interakcím. Na přehybu archy z vnitřní strany jsou nepolární zbytky (převážně valin a izoleucin), po stranách a na obloucích jsou cysteinové zbytky a nabitě zbytky (arginin), které slouží k tomu,

aby se nedotkly exponovaného okraje dvou odlišných  $\beta$ -listů. Prolin rozbíjí  $\beta$ -list, což zapříčiní vytvoření obrátů v konzervované centrální doméně. Monomerní strukturu  $\beta$ -keratinu tvoří  $\beta$ -list, který obsahuje ve své struktuře čtyři vlákna. Spojením dvou monomerních jednotek reverzním stahováním vzniká dimer, jehož soudržnost zajišťují hydrofobní interakce. Mezi aminokyselinami monomerů dimerní struktury se tvoří solné, vodíkové a disulfidové můstky.  $\beta$ -keratinové vlákno má charakter šroubovice, která je tvořena spojením čtyř dimerů. Tento útvar je vytvořen pomocí vodíkových a disulfidových vazeb. Vlákno má levotočivě spirálovou strukturu, jeho rozteč dosahuje 9,5 nm a na jednu otáčku se využívají čtyři opakující se jednotky. Intermediální vlákno  $\beta$ -keratinu dosahuje průměru 4 nm [24, 26, 27].



Obrázek 5: Struktura peří a sekundární struktura  $\beta$ -keratinu [26]

Tabulka 1: Obsah aminokyselin v peří (počet ks AMK na 100 ks AMK v řetězci) [27, 28]

Alanin	3,1-8,7	Methionin	0,1-0,4
Arginin	1,7-4,9	Phenylalanin	3,1-4,3
Kyselina aspartátová	5,6-6,7	Prolin	9,8-18,8
Kyselina glutamová	6,9-9,7	Serin	7,2-14,1
Glycin	7,2-16,2	Threonin	0,8-4,1
Histidin	0,2-0,5	Tyrosin	1,4-4,2
Isoleucin	3,2-4,3	Valin	2,07,8
Leucin	6,2-8,3	Tryptofan	0,7
Lysin	0,6-1,8	Cystein	5,1-7,8

### Biosyntéza keratinu

Při kritické mitóze buňky se vytváří dvě dceřiné buňky, kdy jedna nebo obě se uzpůsobí k produkci keratinu. V buňce dochází k syntéze mediátorové ribonukleové kyseliny, pomocí níž se dále syntetizují keratinové proteiny. Produkce mRNA se zpomaluje dozráváním keratinocyty, což následuje proces degradace jádra. Buňka po keratinové stabilizaci odumírá.

Nově syntetizované proteiny jsou vytvářeny pomocí polyribozomu. Proteiny se agregují s již vytvořenými vlákny, ale při tomto procesu jsou stále připojeny k polyribozomu. Po dobu dokončování a uvolnění proteinu se polyribozom nachází v těsné blízkosti fibril. Dále se na polyribozomu vytváří další řetězce, které umožňují agregaci s fibrilou a proces nadále pokračuje. Během syntézy nových vláken dochází k stabilizaci keratinu tvorbou disulfidových vazeb [28].

Keratin vzniká procesem rohovatění (keratinizace), kdy dochází k specifické buněčné diferenciaci. U aktivního epitelu probíhají změny vlastností vnitřní struktury a fyziologické změny. V konečném stádiu dochází ke vzniku nerozpustné, odolné vrstvy, kdy epidermální buňky umírají a hromadí se v povrchových vrstvách pokožky pro její ochranu. Při keratinizaci se přeměňuje složení cytoplazmatických epidermálních bílkovin a dochází ke ztrátě vody. Do přeměny se zahrnuje změna polypeptidových řetězců, dezintegrace a látková přestavba epidermálních buněk. Rohovatění probíhá neustále a vzniká keratin, který má různé vlastnosti a kvalitu. Kompaktní rohová vrstva z epidermálních buněk, která byla vytlačena ze základní vrstvy pokožky k povrchu, vzniká 26 až 28 dní [24, 30].

### *Funkce keratinu*

Keratin ovlivňuje polaritu, tvar buněk a mitotickou aktivitu buněk krycí tkáně, jeho funkcí je také transport, rozdělení a diferenciaci buněk. Jeho vlákna svazováním a vytvářením silných pramenů poskytují oporu epiteliálním buňkám a tkáním, které musí zvládnout mechanické namáhání a udržet strukturální celistvost. Keratiny jsou koncentrovány na buněčných periferiích, jejich polymerace je řízena signálními molekulami. Keratinová vlákna se mohou rychle sestavovat a rozkládat, také se mohou sestavovat v různých kombinacích bez toho, aby vlákno ztratilo svou funkčnost. Jejich funkce je regulována posttranslačními modifikacemi. Keratiny se přizpůsobují podmínkám tak, že se spojují s různými proteiny (desmoplakiny, desmozomy, proteiny teplotního šoku, tubulinového komplexu). Keratin inhibuje buněčnou proliferaci a indukuje buněčnou diferenciaci. Dále ovlivňuje správnou distribuci membránových proteinů v polarizovaných kožních buňkách. Tyčová doména se může vázat na signální receptor zabudovaný v buněčné membráně, čímž zabraňuje aktivaci druhého posla. V Cortiho orgánu mohou vlákna poskytovat mikromechanické funkce, kdy přenáší vibrace na sensorické vlasové buňky. Keratin může přispívat při transportu vezikul, které jsou vázány na membránu v cytoplazmě epitelových buněk. Jeho vlákna ovlivňují procesy buněčného metabolismu, mezi které patří syntéza bílkovin a buněčný růst [31].

## **2.5 Využití keratinu**

Strukturální variace keratinu umožňuje velké množství aplikací s rozmanitými funkcemi.  $\beta$ -keratin vykazuje moduly tahu a pevnosti v tahu okolo 3,6 GPa a 203 MPa, proto je vhodné použít keratin jako plnivo pro polymery při tvorbě kompozitů. Dále se keratin využívá jako krmivo pro zvířata, k výrobě hnojiv bohatých na dusík a biopaliv, je zdrojem dusíku v kultivačních médiích. Uplatnění keratinu je také v kosmetice a lékařském segmentu (membrány, scaffoldy, hydrogely), aplikuje se v biotechnologickém a odpadním sektoru. Keratin můžeme také použít jako biosorbent, který na sebe váže toxické těžké kovy z odpadních vod. Je možné z nich vytvořit akustickou izolaci, kompozity, textil, elektrická zařízení, různá

lepidla a filmy na bázi obalů. Keratinové filmy jsou tenké vrstvy, které vykazují velkou flexibilitu. U roztoku keratinu dochází k jeho samovolnému sestavení, tato schopnost je velmi užitečná při aplikaci léků. Při vytváření filmů se přidávají během procesu změkčovadla a síťovací činidla nebo se můžou použít přírodní nebo syntetické polymery tvořící matrice, je to z důvodu toho, že čistý keratinový film je křehký [17, 24, 32, 33].

### **2.5.1 Polymerní biokompozity s obsahem keratinu**

Biomateriály na bázi keratinu s aktivními složkami (růstové faktory, buněčné extrakty nebo léčiva) jsou schopny se samy sestavovat, jsou biokompatibilní, biologicky odbouratelné a mají schopnost podpořit buněčnou proliferaci. Velký zájem o tyto materiály je způsoben jejich jedinečnými fyzikálními, chemickými a biologickými aspekty. Smícháním biopolymeru s nanostrukturami se dosahují lepší mechanické, tepelné a bariérové vlastnosti biomateriálu. Keratin může být velmi dobrým biomateriálem, pokud se upraví jeho vlastnosti a to např. přidáním přírodních nebo syntetických polymerů. Keratin se v této oblasti používá při regeneraci kostí, nervů, zástavě krvácení a hojení ran [33, 34].

#### **HYDROGELY SE SLOŽKOU KERATINU**

Hydrogely se skládají ze zesíťovaných hydrofilních polymerů jednotlivých polymerních řetězců. Řetězce jsou propojeny iontovými a hydrofobními silami nebo vodíkovými vazbami. Tyto gely jsou schopny vázat velké množství vody, dělíme je na chemické a fyzikální. Fyzikální gely se často rozpouští změnou pH, teploty a iontové síly roztoku. Využívají se jako materiál pro výrobu kontaktních čoček, matrice pro zapouzdření buněk, dále jako média pro separaci proteinů a také se do něj aplikují léčiva a proteiny, které se poté řízeně uvolňují [33].

#### **NANOVLÁKNA SE SLOŽKOU KERATINU**

V biomedicínských aplikacích se začaly využívat biokompatibilní polymerní nanovlákná vytvořená elektrostatickým zvlákňováním. Při této technice se využívá vysoké napětí. Pomocí něho se generuje nabitý paprsek polymerů, který je přitahován k opačně nabitě sběrné desce. Vlákenný materiál má vylepšené fyzikální vlastnosti (menší velikost pórů, vyšší pórovitost, vyšší poměr povrchu k objemu), které mohou pomoci navázání buňky a prospět jejímu růstu. Nanovláknenné membrány se aplikuje jako obvazy pro hojení ran nebo scaffoldy v tkáňovém inženýrství. Keratin s mikrostrukturálními vlastnostmi se využívá jako součást kompozitních materiálů nebo netkaných textilií [33].

#### **POLYMERNÍ SCAFFOLDY SE SLOŽKOU KERATINU**

Pro materiály scaffoldů je žádoucí, aby napomáhaly adhezi, proliferaci a diferenciaci buněk. Keratin má odpovídající fyzikální vlastnosti, jako je schopnost poskytnutí vlhkého prostředí a absorbování přebytečné tekutiny z rány, také je schopen se sám polymerovat a vytvářet samostatně trojrozměrnou strukturu, což vedlo k jeho využití v podobě scaffoldů. 3D systémy se využívají v tkáňovém inženýrství, regenerativní medicíně, výzkumu buněčné biologie, modelování chorob. Biokompozity se vytvářejí obvykle lyofilizací roztoku keratinu, elektrostatickým zvlákňováním nebo za použití technik lisování/loužení částic. V tkáňovém inženýrství se keratinové matrice kombinují s různými substituenty (přírodní a syntetické

polymery), které zlepšují mechanické vlastnosti. Mezi tyto polymery zařazujeme chitosan, hedvábný fibroin, kyselinu polymléčnou nebo polyethylenglykol. Fyzikální vlastnosti keratinových scaffoldů lze upravit v průběhu výrobního procesu, kdy se změnou koncentrace proteinu modifikuje pórovitost, velikost pórů nebo příjem vody. Keratin je špatně rozpustný v běžných rozpouštědlech, což způsobuje, že je velmi obtížné z tohoto materiálu vytvořit jemná vlákna. Tyto vlákna se tvoří při správné viskozitě proteinového roztoku, kdy se makromolekuly v roztoku zarovnají s určitým stupněm zesíťování. Jiang a kolektiv zjistil, že scaffoldy z keratinu jsou například velmi vhodné pro obnovení chrupavky. Prvním aspektem je, že keratin obsahuje aminokyseliny arginin, glycin, kyselinu asparagovou a leucin, kyselina asparagová a valin, tyto aminokyseliny by mohly podporovat buněčnou adhezi. Dále je keratin schopen vysokého stupně zesíťování, což umožňuje lepší stabilitu ve vodním prostředí, a tak dlouhodobě podporuje růst chondrocytů. Xu a kolektiv vytvořili 3D strukturu z náhodně orientovaných jemných vláken z keratinu, který byl extrahován z peří a rozpuštěn ve vodném roztoku s dodecylsulfátem sodným. Vlákna byla generována elektrostatickým zvlákňováním. Po odstranění SDS scaffold, vykazoval stabilitu vůči vodě a podporoval vývoj a diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk odvozených z tuků [33, 35, 36, 37, 38].

## KERATIN VE FORMĚ BIOSORBENTU

Keratin má schopnost vyčistit přírodní a odpadní vody kontaminované těžkými kovy. Znečišťující látky jsou pomocí biosorpce vázány na funkční skupiny tohoto proteinu. Mezi tyto funkční skupiny řadíme karbonyl, karboxyl, hydroxyl a sulfhydryl. Organické a bakteriální druhy v odpadních vodách způsobují hydrofobní interakce probíhající v biosorbentech [3, 33, 39].

## KERATINOVÉ HOUBY

Houby lze využít jako biosorbent pro proteiny a léčiva jejich výhodou je, že si udržují strukturální integritu, což lze využít pro uvolňování léčiv. Látky se uvolňují okamžitě a podává se vyšší dávka nebo se nižší dávka uvolňuje po delší časový úsek. Houby vytvořeny redukční hydrolýzou mají hladší a homogenní strukturu oproti houbám, které byly vytvořené oxidační hydrolýzou. Houby Guzman a kol. spojili polyethylenglykol, keratin do houbovitého lešení, které absorbovalo testované proteiny s různými izoelektrickými body (albumin, hemoglobin a lysozym). Kinetika proteinů byla ovlivňována hodnotou pH. V kyselých podmínkách se proteiny uvolňovaly na základě molární hmotnosti a ve fyziologickém pH 7,4 na základě náboje [41].

### 2.5.2 Keratin jako aktivní složka v kosmetických přípravcích

Keratinové sloučeniny s dalšími přírodními polymery (chitosan, kolagen, hedvábný fibroin) se používají jako kosmetická směs. Pro hydrataci a pružnost pokožky se využívá hydrolyzovaný keratin, který poskytuje hladký a měkký pocit. Ve vlasové kosmetice je keratin základní složkou šamponů, kondicionérů, produktů proti vypadávání vlasů a dalších vlasových doplňků. Hydrolyzáty se využívají k posílení vlasů, snížení jejich lámavosti a k opravě poškozených vlasů. Keratin slouží také jako toner pro rovnoměrné udržení barvy vlasů [33, 34, 39].

### 2.5.3 Keratin jako biohnojivo

Odpad z peří je bohatý na peptidy, aminokyseliny, minerály. Hydrolyzáty z něj mají schopnost obnovovat kontaminovanou půdu a urychlit růst rostliny. Jako hnojivo je používána ovčí vlna, která ve vlhkém prostředí nabývá na objemu a díky tomu prokypřuje půdu, což prospívá kořenovému systému rostliny. Absorpční schopnosti vlny zabraňují erozi a vysychání půdy. Keratin je také používán jako zdroj dusíku v hnojivech. Peří i vlna, díky vysokému obsahu keratinu, jsou vhodné k použití při efektivním kompostování [33, 34, 42].

## 2.6 Zpracování a využití materiálů s obsahem keratinu

Keratin je možné získat z kůže koz, ovcí, skotu, buvolů a dále štetin, vlasů, rohů, kopyt a z peří drůbeže. Spalováním těchto materiálů se produkují toxické plyny a velké množství popela. Nesprávná likvidace peří může vést k velkému znečištění ovzduší a ohrožení zdraví. V České republice se ročně vyprodukuje asi 15 tisíc tun odpadního peří ročně. Peří je téměř čistým keratinem, a proto ho lze využít k výrobě krmiv pro zvířata. Dále se začaly vyvíjet systémy na zpracování tohoto odpadu, který může posloužit jako alternativní materiál pro použití v různých odvětvích průmyslu. Peří je vysoce odolné vůči různým proteolytickým mikroorganismům a enzymům, chemikáliím i mechanickému napětí a hydrofobní charakter [26, 43, 44].

### *Zpracování keratinového odpadu*

Zpracování keratinových odpadů lze provést mokřím nebo suchým způsobem. Do těchto dvou kategorií se řadí několik metod, mezi které patří tepelné zpracování v některých organických rozpouštědlech, redukce nebo oxidace disulfidických vazeb, tepelná, alkalická, kyselá nebo enzymatická hydrolýza, mikrovlnná technika, technika parní exploze a enzymatických ošetření (Obrázek 6: Možnosti využití keratinového odpadu [39, 40]).



Obrázek 6: Možnosti využití keratinového odpadu

### *Mokrý zpracování*

Mokrý zpracování obnáší extrakci keratinu z jeho zdroje. Keratin ve své struktuře obsahuje aminokyselinu cystein, který způsobuje jeho nerozpustnost v nepolárních a polárních rozpouštědlech. Cystein se vyznačuje rozsáhlým zesíťováním v struktuře keratinu

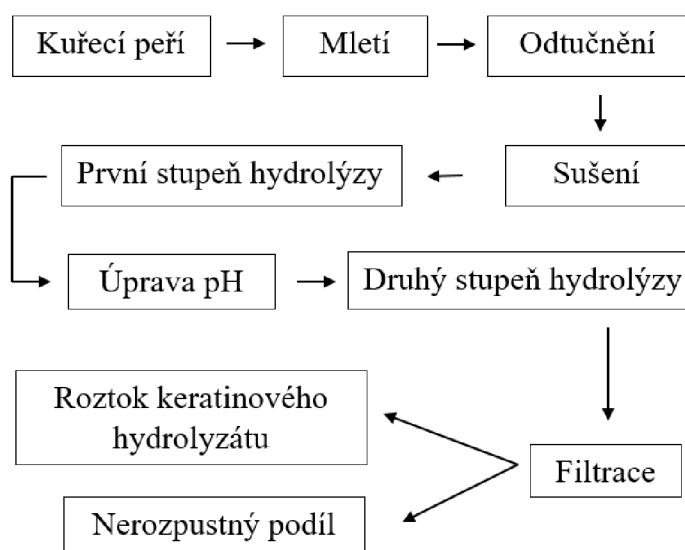
a hydrofobními vlastnostmi. Keratin je rozpuštěn, pokud se podaří rozbít disulfidové a vodíkové můstky, což je možno pomocí alkalické a kyselé hydrolyzy, kombinací enzymatické a chemické úpravy nebo použitím hydroxidu amonno-měďnatého [45].

### *Suché zpracování*

Keratin působením tepla nevratně ztuhne, což je způsobeno vysokým obsahem cysteinových vazeb. Pokud polymer má velké množství cysteinových vazeb tak se obtížněji zpracovává a je nezbytné použití redoxních činidel, aby se narušila disulfidická vazba mezi cysteinovými zbytky. Rozbitím vazeb se sníží viskozita a je možná jednodušší zpracovatelnost materiálu [45].

### *Hydrolyza keratinu*

Štěpením peptidových vazeb v polypeptidovém řetězci vznikají proteinové hydrolyzáty, které se skládají z komplexních směsí peptidů a aminokyselin. Průběh a typ procesu se odvíjí od vlastností bílkovinného substrátu, vhodných hydrolyzačních činidel a kvalitě konečného produktu. Hydrolyzu keratinových substrátů lze provádět několika metodami (chemické, enzymatické nebo mikrobiální). Chemická hydrolyza je často rychlá a jednoduchá, využívají se při ní silné kyseliny nebo redukční činidla a provádí se obvykle v prostředí s vysokým tlakem a teplotou (Obrázek 7). Průběh tohoto typu procesu je nespecifický a může docházet k poškození aminokyselin a produktů, které mají vysoký obsah popela. Nevýhodou je také vysoká spotřeba energie, obtížné zpracování procesních produktů a používání některých chemikálií, které jsou vysoce toxické. K podpoře chemické hydrolyzy a odstranění negativ hydrolyzátních kyselých nebo alkalických látek byly vyvinuty hydrotermální postupy, které využívají exploze vodní páry, ultrazvuk nebo mikrovlny. Hydrolyzáty se získávají pomocí proteolytického potenciálu mikroorganismů nebo mikrobiálních proteáz, které jsou v podobě surových nebo přečištěných enzymových přípravků. Tento typ procesu má mírné podmínky, specifickou účinnost, snadné řízení stupně hydrolyzy a konzervace aminokyselin. Enzymatické procesy se vyznačují vysokým výtěžkem hydrolyzy. Většina keratinových hydrolyzátnů se vyrábí thermochemickými metodami nebo mikrobiální biokonverzí [17, 34].



Obrázek 7: Schéma zpracování kuřecího peří na hydrolyzát keratinu

### *Alkalická hydrolyza*

Alkalická hydrolyza se používá ke stanovení tryptofanu, pokud vzorek bílkovin obsahuje velké množství sacharidů. Při tomto procesu dochází k znehodnocení serinu, threoninu, argininu a cysteinu a ostatní aminokyseliny jsou racemizovány. Roztoky hydroxidů o vyšší koncentraci v kombinaci s vysokou teplotou mohou poskytovat až stoprocentní přeměnu nerozpustného keratinu na keratinový hydrolyzát. Při alkalické hydrolyze Tsuda a Nomura využívali hydroxid sodný v koncentraci 10 g/l. Peří bylo rozpouštěno při 120 °C po dobu 10 min. Kawahara a kol. dokázali rozpustit 55 % keratinu za pomoci 1M roztoku hydroxidu sodného a teploty 70 °C, čímž získali hydrolyzát, který měl molekulovou hmotnost kolem 30 kDa. Stiborova a kol. prováděli hydrolyzu peří za použití 0,6% hydroxidu draselného při 70 °C po dobu 24 hodin. Při tomto pokusu se uvolnilo 326,4 mg/l volných aminokyselin [46, 47, 48, 49].

Dle nařízení Evropské komise musí zpracovatelská zařízení a některé jiné podniky provádět alkalickou hydrolyzu podle určitých norem. Při této hydrolyze se musí využívat roztok hydroxidu sodného, hydroxidu draselného nebo jejich kombinace. Dle hmotnosti, typu a složení vedlejších produktů živočišného původu se určuje množství hydroxidů pro jejich rozložení. Vedlejší produkty živočišného původu mohou mít vysoký obsah tuku. Tuk zapříčiňuje neutralizaci zásady, a proto je její množství upravováno k dosažení molární ekvivalence. Dále vedlejší produkty živočišného původu musí být uloženy do nádob z legované oceli, do které je poté přidána zásada v tuhém nebo kapalném stavu. Směs v uzavřené nádobě se musí v jádře zahřát nejméně na teplotu 150 °C při tlaku nejméně 4 bary po dobu nejméně jednu hodinu bez přerušení u materiálu pocházejícího z drůbeže. Při procesu se do nádoby materiál přidává po dávkách a obsah nádoby je neustále míchán, aby se urychlil proces rozkladu [50].

### *Kyselá hydrolyza*

Tímto typem hydrolyzy dochází ke štěpení peptidových vazeb v keratinovém řetězci. Při procesu je cystein částečně oxidován na kyselinu cysteovou a cystein, což zapříčiňuje rozklad disulfidových vazeb. Kyselá hydrolyza se obvykle používá k přípravě vzorků pro další analytické stanovení a pro stanovení tryptofanu, pokud není požadována vysoká přesnost. Keratinové materiály jsou velmi odolné vůči kyselinám, a proto se při hydrolyze využívají vysoce koncentrované roztoky. Kurbanoglu a kol. použili na kyselou hydrolyzu 3M kyselinu sírovou, která byla smíchána s keratinovým materiálem. Proces probíhal při 70 °C po dobu 24 hodin. Jou a kol. využili 20,5% roztok kyseliny chlorovodíkové spolu s mikrovlnným zářením, čímž rozložili veškerý keratinový materiál [51, 52, 57].

### *Enzymatický hydrolyza*

K extrakci keratinu je možné využít řadu mikroorganismů, které mají schopnost produkce keratinolytických a proteolytických enzymů zvaných keratinázy. Keratinázy jsou enzymy schopné úplné nebo částečné degradace keratinu a pracující v širokém rozmezí pH (7,5–9) a teplot (40–50 °C). Jedni z největších producentů těchto enzymů jsou mezofilní houby, aktinomycety, některé druhy *Bacillus*, vláknité bakterie *Streptomyces sp.* a *Actinomadura sp.* U enzymatické hydrolyzy dochází k malé spotřebě energie, k degradaci keratinu napomáhá proteolýza, sulfitolýza a deaminace. První dva procesy štěpí disulfidové vazby proteinu



na cystein a S-sulfocystein za pomoci uvolněných siřičitanů, které byly vyprodukovány mikroorganismy. Deaminace probíhá, pokud se mikrobiální enzymy váží na nerozpustný keratin a uvolňují molekuly obsahující volné aminoskupiny ( $-NH_2$ ) [39, 53, 54].

#### *Ostatní metody*

Extrakce keratinu pomocí redukčního štěpení byla popsána Schrooyen a kol., kteří využili mírného pH a roztok 2-merkptoethanolu, koncentrovaný roztok močoviny a EDTA na štěpení peptidových a disulfidových vazeb. Bylo docíleno vytvoření monomerního redukovaného keratinu z důvodu rozdělení fibrilárních svazků keratinu. Při této extrakci bylo rozloženo téměř 80 % keratinového materiálu. Redoxní rozpouštědla se označují jako kerateiny a ponechávají cysteiny neporušené. Ty poté mohou tvořit nové příčné mosty [54, 55].

Oxidačním způsobem lze připravit keratinový hydrolyzát za použití specifických oxidačních činidel, které se nazývají keratózy. Nejnáchylnější aminokyseliny na oxidaci jsou tryptofan a cystein, které jsou významné při zesíťování proteinu. Při tomto procesu, který se nazývá sulfitolýza, dochází k oxidaci disulfidových vazeb za pomoci iontů obsahujících síru. Pro extrakci keratinu z peří Poolea kol. využily sulfid sodný [37, 56, 57].

Rozpouštění materiálu obsahujícího keratin pomocí iontových kapalin, které obsahují anorganické nebo organické anionty nebo objemné kationty, je obvykle obtížná. Iontové kapaliny mají vysokou solvatační kapacitu, jsou využívány jako katalyzátory, rozpouštědla různých polymerů a iontově vodivá média. K získání keratinu se využívají iontové kapaliny, jako je  $BF_4^-$ , Br<sup>-</sup>, 1-butyl-3-methylimidazoliumchlorid, 1-allyl-3-methylimidazoliumchlorid [39, 58].

Při procesu s využitím mikrovlnného záření dochází k rovnoměrnému zahřívání keratinového materiálu během zlomku sekundy, díky tomu dochází k účinné degradaci a extrakci keratinu. Molekuly v mikrovlnném ohřevu mají tendenci adsorbovat energii homogenně se stoupající teplotou v reaktoru [34, 39].

Další metoda k získání keratinu je parní exploze, což je hydrotermální proces, při kterém se využívá vysokotlaká nasycená pára v krátkých intervalech 1–10 minut. Materiál obsahující keratin je umístěn v reaktoru při teplotě 180–230 °C. Na konci procesu dochází k rychlému snížení tlaku, což způsobuje výbušnou dekompresi a prasknutí tuhých vláken biomasy. Konečný produkt výrazně ovlivňuje řada faktorů souvisejících s teplotou, velikostí částic a vlhkostí [39].

V neposlední řadě může být použita teplená hydrolyza, což je dvoustupňový proces. V prvním stupni se denaturují intermediární vlákna keratinových proteinů a v dalším kroku jsou štěpeny disulfidové vazby, které spojují fibrily keratinu. Tento dvoukrokový proces poskytl výtěžek keratinu přibližně 70 % [39].

## 2.7 Popis přípravy filmů s obsahem keratinu

Keratinové filmy se připravují oxidací redukovaných forem keratinu [20].

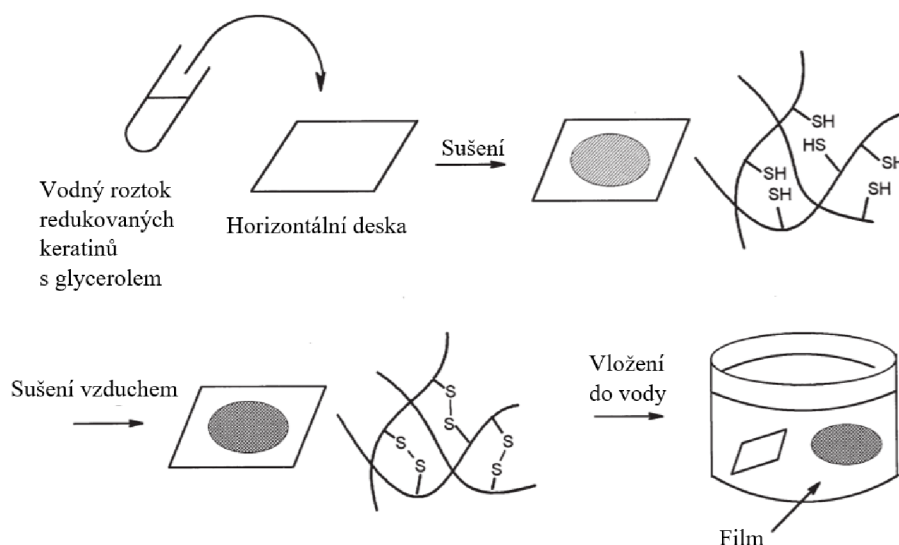
### *Výroba keratinových filmů*

Filmy můžeme tvořit z biopolymerů, které jsou obsaženy v roztoku. Změnou podmínek v roztoku (působením tepla, změna pH nebo přidáním soli) dochází k shlukování biopolymeru v oddělené filmové fázi. Kvalitu keratinových filmů ovlivňují parametry zpracování a úpravy. Při delší době zpracování dochází k snížení pevnosti v tahu a ke zvýšení prodloužení při přetržení. Máme různé typy výroby jako je lití rozpouštědlem, tepelné lisování, tlakové lití, elektrostatické zvlákňování [45, 59].

### *Lití rozpouštědlem*

Na odlévání filmů se využívají různé typy zařízení, mezi jednoduché řadíme odlévací desky a složitější patří pokročilé dávkové a kontinuální potahovače. Ve výzkumu se využívá ruční nanášení zředěného roztoku bílkovin, který obsahuje 5 až 10 % pevného podílu. Roztok ještě obsahuje změkčovadlo, poté je naléván do Petriho misek nebo forem, které jsou sušeny při požadované teplotě nebo v prostředí řízené relativní vlhkosti. U složitějších zařízení se produkují větší filmy, které mají danou tloušťku. Filmy lze sušit horkým vzduchem, infračerveným zářením, mikrovlnou energií nebo při teplotě okolních podmínek. Způsob sušení ovlivňuje fyzikální, mechanické a bariérové vlastnosti, morfologii a vzhled filmu [59].

Jednou z možností přípravy keratinových filmů je, smíchání vodného roztoku keratinu s glycerolem, poté je tento roztok vylit na Petriho misku a ponechán v exikátoru nad sušeným silikagelem za pokojové teploty. Vysušený film je zahřán na 15 min při 80 °C, poté je film odloupen z desky. V případě potřeby je možné film propláchnout vodou a usušen při pokojové teplotě. Filmy vyrobeny tímto způsobem se vyznačují hladkým povrchem a silně zesíťovanou strukturou. Ve vodě dochází k bobtnání a mohou se prodloužit až o 50 %. Ve vroucí vodě se naopak smršťují. Tají při teplotě kolem 250 °C (Obrázek 8) [20].



Obrázek 8: Příprava keratinových filmů metodou lití rozpouštědlem [60]

Tanabe a kol. využili metodu lití rozpouštědlem k vytvoření keratin-chitosanových filmů, kdy přídavek chitosanu zlepšil výrazně mechanické vlastnosti filmu, které se porovnávaly s vlastnostmi filmu složeného pouze z keratinu. V práci je uvedeno, že chitosan dodal filmu pružnost, sílu a podle Youngova modelu i měkkost. Dále byla prokázána antimikrobiální aktivita keratin-chitosanového filmu a byla zjištěna jeho vhodnost jako substrát pro savčí buňky [63].

V práci Abou El-Kheir a kol. byl použit polyvinyl alkohol k modifikaci vlastností keratinového filmu. Pružnost filmu byla podpořena síťovacími látkami jako je glycerol a glutaraldehyd. Skupina zjistila, že glutaraldehyd snižuje rozpustnost filmu ve vodě, pravděpodobně díky vzniku nových příčných vazeb mezi polypeptidovými řetězci na základě jejich amino a kboxilových skupin. Poukazují na to, že filmy neobsahující změkčovadlo vykazují nižší rozpustnost, a to z důvodu sulfidových můstku, které vznikají během sušení. Změkčovadlo zřejmě zabraňuje tvorbě těchto můstku a tím zvyšuje rozpustnost filmu. U keratin-polyvinyl alkoholových filmů se pevnost tahu snižuje z důvodu porušení disulfidických vazeb v makromolekulách keratinu, což je důsledek působení alkálií. Pevnost v tahu lze upravit využitím síťovacích činidel jako je glutaraldehyd nebo chlorid železitý, které dokáží zregenerovat vazby mezi makromolekulami keratinu [60].

Ramirez a kol. zjistili, že pomocí lití lze vytvořit z keratinu a kyseliny citronové film s antibakteriálními vlastnostmi. Kyselina citronová podporuje tvorbu makromolekulárního uspořádání keratinu, což vede ke zlepšení tažnosti a pružnosti filmu. Dále byl prokázán přirozený a úplný biocidní účinek, což taky prokázalo vliv na zlepšení trvanlivosti potravin. Filmy připravené z keratinu a kyseliny citronové mají potenciál k nahrazení klasických fólií ze syntetických polymerů a díky tomu by se mohly využít v potravinářském průmyslu jako aktivní obaly [60].

Ramakrishnan a kol zjistili, že při vytváření filmů metodou lití a využití glycerolu jako změkčovadla, dochází k snížení pevnosti v tahu se zvyšující se koncentrací glycerolu. Nejlepší výsledky pro pevnost v tahu vykazoval film s obsahem glycerolu 2 hm. %, vykazoval taky nejlepší tepelné vlastnosti. Díky modifikaci glycerolem byl povrch filmu homogennější oproti filmům bez změkčovadla. Vyrobený bioplast je biologicky odbouratelný, proto mohou v budoucnu nahrazovat materiály z fosilních zdrojů, které jsou škodlivé pro životní prostředí [65].

### *Tepelné lisování*

U této metody díky zvýšené teplotě a stříhu vzniká soudržná filmová matrice. Při lisování dochází k menší spotřebě energie a je také rychlejší než způsob lití rozpouštědlem. Směs na přípravu filmu je zahřívána a poté přelita na plát s šablonou. Vše je přeneseno do hydraulického lisu, po vylisování je oddělena šablona. Film je sušen při konstantní teplotě po dobu 8 hodin. Hotové filmy jsou průhledné a odolné vůči tahu [59].

### *Vytlačování*

Před vytlačováním se smíchá protein s vodou a změkčovadlem, tím vzniká produkt vhodný k vytlačování. Samotné vytlačování probíhá při určité teplotě, vznikají filmy v podobě tenkých

membrán. Filmy nedosahují takové elasticity, jako filmy vytvořené metodou lití rozpouštědlem [66].

### *Výroba keratinového kompozitu*

Keratinový kompozit se vytváří vrstvením jednotlivých filmu a celý proces probíhá na šabloně. Filmy se vrství na základě elektrostatické přitažlivosti mezi opačně nabitými skupinami různých polyelektrolytů, dále pomocí fyzikálních a chemických interakcí. Nevýhodou této metody je, že lze použít jen omezený počet vrstev [67].

### *Modifikace keratinových filmů*

Druh změkčovadla ovlivňuje vlastnosti filmu (mikrostrukturu, sorpční izotermu). Změkčovadla, jako je glycerol a sorbitol, snadno difundují do proteinové disperze, kvůli své nízké molekulové hmotnosti. Tyto látky způsobují rovnoměrnou strukturu filmu. Glycerol s také snadno zabudovává do keratinového řetězce, kde dochází k jeho asociaci a hydrofobními aminokyselinami (tyrosin a serin), film má poté vyšší míru schopnosti vázat vodu. Čím vyšší je obsah změkčovadla zabudovaného do keratinového řetězce tím vyšší je obsah vlhkosti v monovrstvě. U filmu se poté snižují bariérové schopnosti. Polyethylenglykol snižuje křehkost filmu. Chemickým zesíťováním pomocí ethylenglykolu-diglycidyletheru a glycerol-diglycidyletheru se zvyšuje voděodolnost filmu. Plastifikátory snižují křehkost keratinových filmů, protože zvyšují mobilitu v řetězci a zlepšují flexibilitu polymeru snížením inter- a intramolekulárních sil. Přidáním plastifikátoru při procesu může dojít k narušení stability filmu i jeho degradaci. Pokud začleníme do keratinového filmu chitosan, dostaneme pružnější a silnější film se zlepšenou bobtnavostí. Tento film lze použít jako substrát pro buněčné kultury. Přidáním želatiny docílíme hydrofilnosti filmu a vytvoříme film s lepší propustností kyslíku. Keratin smíchaný s fibroinem vytvoří film vykazující biokompatibilitu a schopnost snižovat tvorbu trombů. Tento typ filmu může být navržen s řízenými degradačními vlastnostmi a při uvolňování léku lze nastavit jeho stabilitu. Polyethylenglykol zabudovaný v keratinovém filmu zabraňuje sestavení keratinu a mění jeho tepelné vlastnosti, čímž zlepšuje tepelnou stabilitu filmu [45, 67].

## **2.8 Vlastnosti filmů s obsahem keratinu**

### *Viskoelasticita*

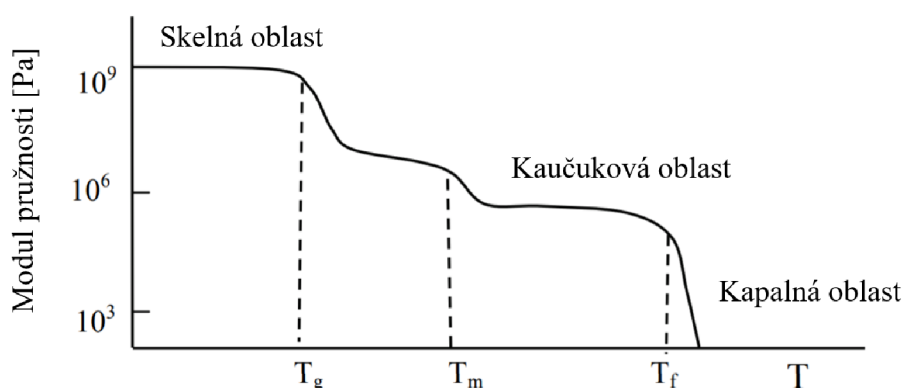
Viskoelastický materiál se vyznačuje jak elastickými (regenerace), tak viskózními vlastnostmi (tečení). Elastické materiály se deformují, aby uvolnily napětí, následně se navrátí do počátečního stavu. U viskózních materiálů dochází k uvolnění napětí, a tím se nevratně deformují. Viskoelastický materiál se deformuje vlivem napětí, deformace je funkcí napětí i času. Poměr napětí a deformace je funkcí času, během kterého působí napětí. Hodnotu poměru nazýváme časově závislý modul pružnosti. Časem se materiál nemusí vracet do původního stavu jako před deformací, ale po odstranění napětí se vrací do stavu podobného původnímu. V polymeru dojde k posunu polymerních řetězců, což nazýváme tečení. Přeskupení řetězců doprovází napětí, které způsobí zpětné napětí v pevném polymeru. Když se velikosti aplikovaného napětí vyrovná s naakumulovaným zpětným napětím nedochází k dalším změnám v materiálu. Po odstranění působícího napětí, dochází k návratu polymeru

do původního stavu za pomoci působení zpětného napětí. Práce, která je nutná na k deformaci tělesa, je částečně ukládána ve formě potenciální energie. Část energie ve formě tepla lze získat zpět. Elasticita obvykle vzniká atomárním nebo molekulárním roztahováním, viskozita zase atomovým nebo molekulárním tokem. Viskoelasticita může být lineární, kdy izochronické napětí a deformace jsou přímo úměrné v libovolně zvoleném čase, tedy jsou lineárně závislé. Tento typ viskoelasticity je využitelný pouze u malých deformací. Druhým typem je nelineární viskoelasticita, při níž izochronické napětí a deformace nejsou přímo úměrné v libovolně zvoleném čase. Tento typ nastane, pokud jsou deformace velké nebo pokud při deformaci materiál mění své vlastnosti. Pomocí nelineární viskoelasticity můžeme také popsat jevy, jako je normálové napětí, extenzní ztluštění a smykové ztenčování ve viskózních kapalinách [68, 69, 70].

Mezi viskoelastické materiály patří amorfni nebo semikrystalické polymery a biopolymery, živé tkáně i buňky. U materiálů se predikuje jejich chování za různých podmínek, a to za použití modelů. Mezi základní modely lineární viskoelasticity patří Maxwellův, Kelvinůvo – Voigtův, Burgersův a standartní lineární pevný model. Pomocí nich stanovujeme interakce napětí a namáhání, síly a posunu nebo také časové závislosti. Viskoelastické chování se charakterizuje pomocí lineárně řazených pružin a tlumičů, jejich uspořádání se liší v závislosti na typu modelu. Základní modely nelineární viskoelasticity se využívají k znázornění jevů v tekutinách. Pevná látka s viskoelastickými vlastnostmi podléhá tečení, kdy deformace je funkcí času a zatížení se udržuje konstantní, anebo relaxaci napětí, kdy je funkcí času snížené napětí a deformace se udržuje konstantní [28, 71].

Viskoelastické vlastnosti se vlivem teploty mění. Molekuly v polymeru v průběhu času přesouvají (tečou) do konformací, kterou jsou upřednostňovány před jinými. Vlivem tepelného pohybu dochází k přetváření a lámání sekundárních vazeb polymeru, což přispívá k deformaci daného polymeru. Modul tečení je obvykle vyjádřen jako poměr aplikovaného napětí k přeorganizování, které je závislé na čase. Při zvýšení teploty za konstantního napětí dochází k logaritmickému snížení času nutného k deformaci materiálu. Vliv teploty na viskoelastické chování polymeru lze znázornit pomocí schématu modulu pružnosti závislém na teplotě. Vykreslená křivka je rozdělena do čtyř oblastí. V první oblasti nedochází k pohybu molekul v polymeru z důvodu nízké teploty. V této oblasti je polymer ve skelném stavu, kdy jeho mechanické vlastnosti odpovídají křehkosti a tvrdosti. V druhé oblasti prochází polymer teplotou skelného přechodu. Díky vyšší teplotě dochází k lokálnímu pohybu molekul a polymer už není tak tuhý jako v první oblasti. Ve třetí oblasti dochází k překročení teploty skelného přechodu, polymer je ve stavu kaučukové elasticity a jeho vlastnosti prochází změnou. Části polymeru se mohou volně pohybovat a otáčet, což při působení síly způsobuje vratné deformace. U lineárních polymerů dochází k částečným deformacím, kdy se uvolní zapletené části, tuto vlastnost nazýváme viskoelasticita. Tento stav označujeme jako kaučukovitě elastický. U lineárních polymerů při dlouhém působení dochází k uvolňování zapletenin, a proto po uvolnění nedojde k návratu do původního stavu. Dochází k částečným trvalým deformacím a toto chování označujeme jako viskoelastické. Ve čtvrté oblasti dochází k dalšímu zvýšení teploty a polymer přechází do stavu plastického. Teplotní hranice je nazývána jako teplota tečení, kterou když překročíme, tak jsou všechny deformace nevratné. Viskózní polymer

po překročení této meze teče a má nízkou tuhost. Viskoelastické tečení nastává, jestliže viskoelastický materiál vystavujeme postupnému konstantnímu namáhání, při kterém probíhá časově závislý nárůst napětí (Obrázek 9) [72, 73, 74].



Obrázek 9: Teplotní závislost modulu pružnosti [75]

Keratinózní tkáň díky viskoelastickým vlastnostem dokáže tlumit kolísání zátěže, nárazy a pohlcovat energii. Viskoelastická biofilmů se měří prostřednictvím deformace při konstantním napětí v režimu tlaku, smyku nebo tahu, využívá se i měření napětí pro udržení konstantní deformace. Dále můžeme aplikovat jednoosou kompresi, při které je biofilm deformován nebo namáhán pomocí makroskopického pístu a deformace nebo relaxace napětí je poté zaznamenávána jako funkce času [28, 76].

## 2.9 Obaly

Obal je výrobek zhotovený z různých materiálů, který je určen k ochraně, manipulaci, dodávce nebo prezentaci výrobku nebo výrobků určených spotřebiteli nebo jinému konečnému uživateli. Obaly se rozdělují dle funkce na prodejní, skupinové a přepravní. Při uvádění obalu na trh musí být hmotnost a objem obalu co nejmenší, ale musí si uchovat vhodné vlastnosti pro spotřebitele. Důvodem je snížení množství odpadu z obalu, který je poté potřebný zpracovat nebo odstranit. Osoba, která uvádí obal na trh, musí dodržet určité koncentrace nebezpečných látek, které v obalu mohou vyskytovat. Tyto koncentrace látek se vztahují na emise, popel nebo výluh v případě spalování nebo skladování odpadu vzniklého z daného obalu. Dále by součet koncentrací olova, kadmia, rtuti a chromu v obalu neměl přesahovat více jak 100 mg/g. Obal po použití musí být schopen poskytovat opakované využití nebo být schopen procesu recyklace, energetického využití či biologického rozkladu. Na obal je nutné umístit označení z jakého materiálu byl zhotoven a toto značení musí být v souladu s právem Evropské unie [77].

### *Zdravotní požadavky na obaly potravin*

Nároky na obaly potravin jsou regulovány evropskou legislativou. Pro balení potravin je důležité využít kvalitních materiálů, které nebudou způsobovat nežádoucí kontaminaci potravin. K přestupu látek do potravin může docházet z důvodu migrace nebo koroze obalového materiálu. V České republice je zaveden systém kontroly kvality a bezpečnosti obalových materiálů, které přichází do kontaktu s potravinou. V Evropské unii se touto problematikou zabývá nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1935/2004. V tomto nařízení jsou stanoveny obecné zásady bezpečnosti a inertnosti obalů vůči balené potravíně.

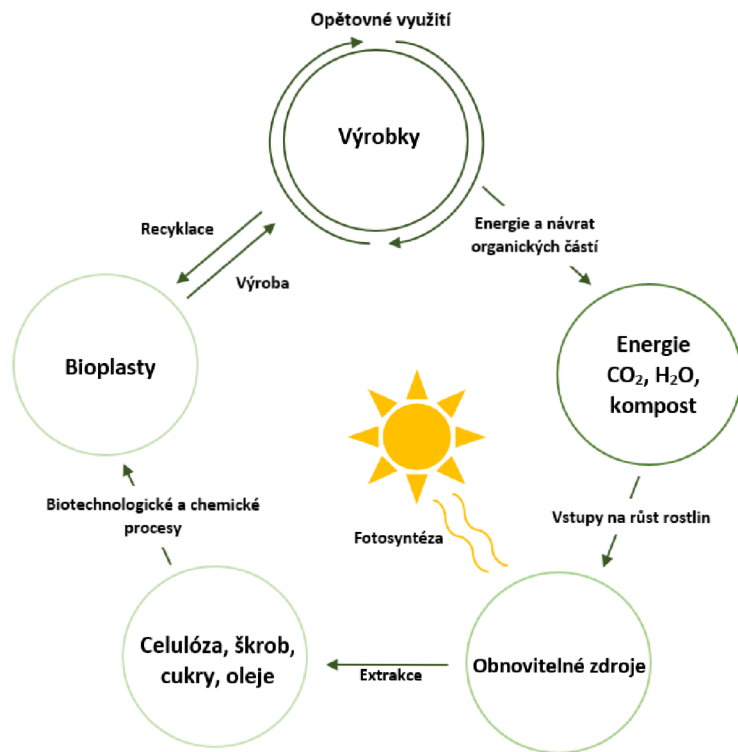
Přesněji obaly nesmí do potravin uvolňovat nadlimitní množství složek, které by mohly ohrozit zdraví člověka a dále nesmí způsobovat nepříjemnou změnu ve složení potravin a zhoršení jejich senzoryckých vlastností [77].

### *Bioplasty*

Bioplasty jsou materiály, které jsou vyrobeny z přírodních biopolymerů nacházející se v obnovitelných zdrojích biomasy. Bioplasty můžeme také definovat jako polymery, které lze rozložit na oxid uhličitý, vodu, anorganické sloučeniny nebo biomasu, zejména prostřednictvím enzymatických účinků mikroorganismů. Díky tomu můžeme bioplasty tvořené biopolymery řadit mezi materiály, které mají biodegradabilní vlastnosti a mají schopnost se dobře rozkládat v přírodě. V dnešní době byly popsány bioplasty z celé řady biopolymerů jako jsou škrob, kyselina polymléčná, agaróza, kasein, lignin nebo keratin. K produktům, které byly vytvořeny z biologického materiálu nacházejícího se v biomase, se přiřazuje termín bio-based. Tento termín se vztahuje na materiály nebo produkty vytvořené z obnovitelných zdrojů. Mezi tyto složky těchto materiálů řadíme sacharidy, proteiny, dřevní štěpku nebo přírodní kaučuk (Obrázek 10) [78, 79].

Plasty na biologické bázi dělíme na biologicky rozložitelné nebo nerozložitelné. Dále se dělí do tří kategorií na přírodní polymery, syntetizované polymery na biologické bázi vytvořených ze syntetizovaných monomerů a bioplasty z odpadu. V současné době bioplasty zaujímají jen 1% roční produkce plastů na světě. Hlavní aplikace těchto materiálů je v obalovém, textilním, automobilovém a stavebním průmyslu. Výroba bioplastů stoupla přibližně z 2 milionů tun v roce 2014 na přibližně 6,7 milionů tun v roce 2018. Většina tohoto materiálu byla vyrobena ze škrobu a polymerů na bázi kyseliny polymléčné (PLA). V dnešní době se získává surovina na výrobu bioplastů převážně z kukuřice a brambor, což vytváří konkurenci výrobě potravin, zabírá zemědělskou půdu pro pěstování jiných zemědělských plodin a spotřebovává se tak velké množství vody a živin [80].

Biopolymery lze extrahovat z biomasy nebo je lze vytvořit prostřednictvím mikroorganismů, kdy využijeme fermentační proces s vhodně zvoleným zdrojem uhlíku. Rostlinná biomasa lze rozložit chemicky nebo biokatalyticky na složky, které poslouží k vytvoření jiného polymeru. Plodiny využívající se k vytvoření polymerů rozdělujeme do dvou skupin. Na potravinářské, kam řadíme plodiny bohaté na sacharidy (kukuřice, cukrová třtina) a na nepotravinářské, kam řadíme lignocelulózový materiál, jež je chemicky rozložen na stavební bloky, ze kterých se vytváří řada bioplastů. Bioplasty lze také vytvářet z živočišné biomasy, která je bohatá na proteiny a tuky [79].



Obrázek 10: Životní cyklus biopolymerních obalových materiálů



### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Použité chemikálie

Akrylamid, Sigma-Aldrich (USA)  
Bromfenolová modř sodná sůl, SERVA (SRN)  
Citrofol, Jungbunzlauer (CHE)  
Coomasie Brilliant Blue G-250, SERVA (SRN)  
Denaturovaný ethanol  
D-Sorbitol, Alfa Aesar (SRN)  
Fosfátový pufr pH = 7,2, Sigma-Aldrich (USA)  
Glycerol, Lach-Ner (ČR)  
Glycin, Sigma-Aldrich (USA)  
Glutaraldehyd, Sigma-Aldrich (USA)  
Hexan, Lach-Ner (ČR)  
Hexan pro GC, Penta (ČR)  
Hydroxid sodný pecky p.a., PENTA s.r.o. (ČR)  
Chitosan o vysoké molekulární hmotnosti, Sigma-Aldrich (USA)  
Kyselina citronová, Lac-Ner (ČR)  
Kyselina heptadekanová pro GC, Sigma-Aldrich (SRN)  
Kyselina chlorovodíková, Lach-Ner (ČR)  
Kyselina octová, Lach-Ner (ČR)  
Kyselina sírová, Lac-Ner (ČR)  
2-Merkaptoethanol, Sigma-Aldrich (USA)  
Methanol pro HPLC, PENTA s.r.o. (ČR)  
Methanol, Sigma-Aldrich (USA)  
N,N'-metylenbisakrylamid, SERVA (SRN)  
Nutrient Broth (NB), Himedia (Indie)  
PageRuler proteinový žebříček 10-180 kDa, Thermo Fisher Scientific (USA)  
Peroxisíran amonný, Sigma-Aldrich (USA)  
Polyvinyl alkohol o molární hmotnosti 30 000-70 000, Sigma-Aldrich (USA)  
Proteáza *Bacillus licheniformis*, Sigma-Aldrich (USA)  
SDS-dodecylsulfát sodný, Sigma-Aldrich (USA)  
Síran amonný, Lach-Ner (ČR)  
Sulfid sodný, Lach-Ner (ČR)  
TEMED – N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin, SERVA (SRN)  
TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan, Sigma-Aldrich (USA)  
Trichloroctová kyselina, Lach-Ner (ČR)  
Yeast extract peptone dextrose (YPD), Himedia (Indie)

## 3.2 Přístroje

Analytické váhy, OHAUS (USA)  
Biologický termostat INB 300, Memmert (SRN)  
Centrifuga, Hettich (SRN)  
Centrifuga, HERMLE Labortechnik (SRN)  
Deuteriový, wolframový, halogenový světelný zdroj DT-MINI-2-GS, Ocean Optics, Inc. (SRN)  
Extraktor typu Soxhlet SOXTHERM, Gerhardt (SRN)  
FTIR spektrometr Frontier, Perkin Elmer (USA)  
FTIR spektrometr Nicolet™ iS™ 5, Thermo Fischer Scientific (USA)  
Inkubátor Unimax 1010 DT, Heidolph (SRN)  
Orbitální třepačka ES-20, Biosan (LV)  
Membránová vývěva, KNF Group (SRN)  
Miniaturní spektrometr USB650UV, Ocean Optics, Inc. (SRN)  
Mlýnek na kávu, Moulinex (FRA)  
Nova NanoSEM elektronový mikroskop, FEI Company (USA)  
SDS-PAGE polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného, Mini-PROTEAN® Tetra Systém, Bio RAD (ČR)  
Teplotně modulovaný kalorimetr DSC 8000, Perkin Elmer (USA)  
Termogravimetrický analyzátor TGA Q5000IR, TA Instruments (USA)  
Termoblok VWR, (ČR)  
Vortex/homogenizátor disruptor Genie, Scientific Industries, Inc. (USA)  
Zkušební přístroj, Labortech (ČR)  
Běžné laboratorní sklo a vybavení

### **Plynová chromatografie:**

Thermo Scientific TRACETM 1300 Gas Chromatograph, Thermo Fischer Scientific (USA),  
Detektor FID, (thermo Fischer Scientific, USA)  
Thermo Scientific AI 1310 Autosampler  
Kolona Zebron ZB-FAME, 30m x 0,25 mm x 0,20 µm, Phenomenex

**Mikroorganismy:** Tyto bakteriální kultury byly získány z České sbírky mikroorganismů Masarykovy university v Brně.

Bakterie: *Escherichia coli* CCM 7395, *Micrococcus luteus* CCM 1569, *Serratia marcescens* CCM8587

Kvasinka: *Candida glabrata* CCM 8270

## 3.3 Materiál

Husí peří trhané na sucho  
Slepičí peří trhané na sucho  
Slepičí peří trhané po spaření

Peří před provedením hydrolýzy bylo namleté na jemný prášek pomocí mlýnku na kávu.



Obrázek 12: Husí peří v celku a namleté pomocí mlýnku na kávu



Obrázek 11: Slepičí peří v celku a namleté pomocí mlýnku na kávu

### 3.4 Izolace keratinu

#### ODTUČNĚNÍ PEŘÍ

Odtučnění 50 g peří bylo provedeno ve 2 l 80% nebo 50% denaturovaného ethanolu. Peří namočené v ethanolu bylo ponecháno na třepačce po dobu jednoho dne. Poté byla provedena centrifugace při 4000 ot./min po dobu 20 min, kdy byl odstraněn ethanol z odtučněného peří. Proces promytí peří od ethanolu pomocí destilované vody byl vždy proveden třikrát. Promyté peří bylo ihned zpracováno následujícími procesy.

V druhém způsobu byla využita extrakce tuku pomocí extraktoru typu Soxhlet SOX THERMU. Suché peří o hmotnosti 1,5 g bylo dáno do prázdné celulózové patrony, která byla ucpána smotkem vaty a poté byla vložena do drátěných držáků extrakční nádoby, do kterých bylo přidáno 120 ml extrakčního činidla (hexan). Takto připravené čtyři extrakční nádoby byly vloženy do přístroje Gerhardt Soxtherm. Pomocí předem nastaveného programu, zvolených parametrů pro extrakci v hexanu (viz. tabulka 2), byla spuštěna extrakce. Celková doba extrakce byla nastavena na 3 hodiny a 4 minuty. Po skončení extrakce byly extrakční nádoby vyjmuty z přístroje, následně z nich byly patry vyjmuty a přemístěny do sušárny. Po odpaření hexanu bylo peří ihned zpracovááno.

Tabulka 2: Parametry extrakce na přístroji Gerhardt Soxtherm

Parametry extrakce v hexanu	
Teplotní limit	200 °C
Teplota extrakce	170 °C
Redukční interval	3 min 30 s
Redukční puls	3 s
Fáze extrakce	1 h 30 min
Vypařování A	5x interval
Interval doba oplachování	1 h 0 min
Vypařování B	2x interval
Interval vypařování C	10 min
Délka programu	3 h 4 min

### TRANSESTERIFIKACE LIPIDŮ Z PEŘÍ

Nejprve byla převedena směs lipidů a hexanu, která byla získána extrakcí pomocí přístroje Soxtherm, do předem zvážených varných baněk. Následně bylo provedeno odpaření hexanu pomocí vakuové odparky, varné baňky byly zváženy a tím bylo stanoveno množství lipidů v jednotlivých vzorcích. Do varných baněk bylo přidáno 9 ml hexanu a baňky byly vloženy do ultrazvuku k rozpuštění lipidů v kapalině. Předchozími kroky byla získána známá koncentrace lipidů ve vzorku. Do krimplovacích vialek bylo napipetováno 1,5 ml vzorku s hexanem. Hexan byl poté odpařen pomocí termobloku, který byl zahřátý na teplotu 85 °C. Ke vzorku již bez hexanu bylo přidáno 1,8 ml transesterifikační směsi. Ta byla složena z 15% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> v methanolu HPLC kvality a interní standard kyseliny heptadekanové v koncentraci 0,5 mg/ml. Takto připravené vzorky byly zakrimplovány a byly inkubovány v termobloku po dobu 2 hodin při teplotě 85°C. Poté byly vzorky volně ponechány, aby došlo k jejich vychladnutí na pokojovou teplotu. Do vialek o objemu 5 ml bylo napipetováno 0,5 ml 0,05 mol/l NaOH a kvantitativně byl do ní převeden obsah vialky se vzorkem. V dalším kroku byl přidán 1 ml hexan HPLC kvality, vialka byla uzavřena a nechána na vortexu třepat po dobu 5 min. Po oddělení fází bylo z organické hexanové fáze (horní fáze) odebráno 0,1 ml a převede do čisté 1,8 ml vialky a bylo přidáno 0,9 ml hexanu HPLC kvality. Takto připravený vzorek byl analyzován pomocí GC. Parametry GC sestavy jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Parametry GC/FID

Kapilární kolona	Zebron ZB-FAME, o rozměrech 30 m × 0,25 mm × 0,20 μm
Dávkování	Autosampler Thermo Scientific AI 1310
Objem nástřiku vzorku	1 μl
Poměr nástřiku děliče toku	10
Konstantní průtok nosného plynu H <sub>2</sub>	1 ml/min
Detektor	Plamenově ionizační
Teplota	250 °C
Průtok	Vzduch 350 ml/min, make-up N <sub>2</sub> 30 ml/min, H <sub>2</sub> 35 ml/min

## HYDROLÝZA PEŘÍ

Proces hydrolýzy byl proveden podle čtyř různých návodů, aby se zjistilo, kterým způsobem je možno dosáhnout co nejvyšší výtěžnosti keratinu. Dále se výběr hydrolýzy odvíjel od časové náročnosti a používání toxických látek.

### *Hydrolýza pomocí sulfidu sodného*

Do uzavíratelné simaxové láhve bylo přeneseno 10 g odmaštěného peří, ke kterému bylo přidáno 400 ml 0,5M roztoku sulfidu sodného. Nádoba byla ponechána v třepačce při 30 °C po dobu 24 hod. V roztoku se udržovalo pH 10–13. Následně byly z hydrolyzátu odstraněny nerozložené zbytky pomocí filtrace za sníženého tlaku nebo centrifugací při 10 000 ot./min po dobu 10 min [81].

### *Hydrolýza pomocí hydroxidu sodného*

Postup byl modifikován použitím různých koncentrací a časových period působení hydroxidu sodného, podmínky hydrolýzy jsou v tabulce 4. Do Erlenmeyerovy baňky bylo přesunuto 50 g odmaštěného peří, do které bylo přilito 500 ml roztok hydroxidu sodného určité koncentrace. Proces hydrolýzy byl proveden při 70 °C po dobu odpovídající koncentraci hydroxidu, obsah baňky byl promícháván pomocí magnetického míchadla. Následně byla provedena centrifugace vzniklého hydrolyzátu při 10 000 ot./min po dobu 5 min [82].

*Tabulka 4: Parametry využití při hydrolýze za použití hydroxidu sodného*

Koncentrace NaOH [%]	Čas působení [min]
0,5	240
1	120
2,5	75

### *Hydrolýza pomocí kyseliny sírové*

Proces hydrolýzy byl inspirován prací Bouhamed a kol., kteří použili různě modifikovaný proces kyselé hydrolýzy. Do Erlenmeyerovy baňky bylo přesunuto 50 g odtučněného peří, ke kterému byla přilita 1M kyselina sírová. Proces byl prováděn při teplotě 90 °C v olejové lázni po dobu 50 h. Celý objem baňky byl neustále promícháván pomocí magnetického míchadla. Po ukončení hydrolýzy byl objem baňky zcentrifugován při 10 000 ot./min po dobu 5 min [83].

### *Alkalicko-enzymatická hydrolýza*

Nejprve bylo 5 g odtučněného peří vloženo do Erlenmeyerovy baňky a bylo k němu přidáno 30 ml 0,3M hydroxidu sodného. Proces alkalické hydrolýzy probíhal při 80 °C po dobu 30 min. Následně bylo upraveno pH hustého roztoku na hodnotu 8,0–8,3 pomocí 10% kyseliny chlorovodíkové. Poté byla provedena enzymatická hydrolýza, při níž byl do roztoku přidán 1 ml proteázy z *Bacillus licheniformis*. Druhá část procesu byla prováděna po dobu 10 h při teplotě 55 °C. Pro skončení hydrolýzy bylo pH upraveno na hodnotu 7 pomocí 10% kyseliny chlorovodíkové a enzym byl deaktivován zahřátím materiálu na 95 °C po dobu 30 min.

Pro odstranění nerozložených částí byl hydrolyzát zcentrifugován při 10 000 ot./min po dobu 5 min [84].

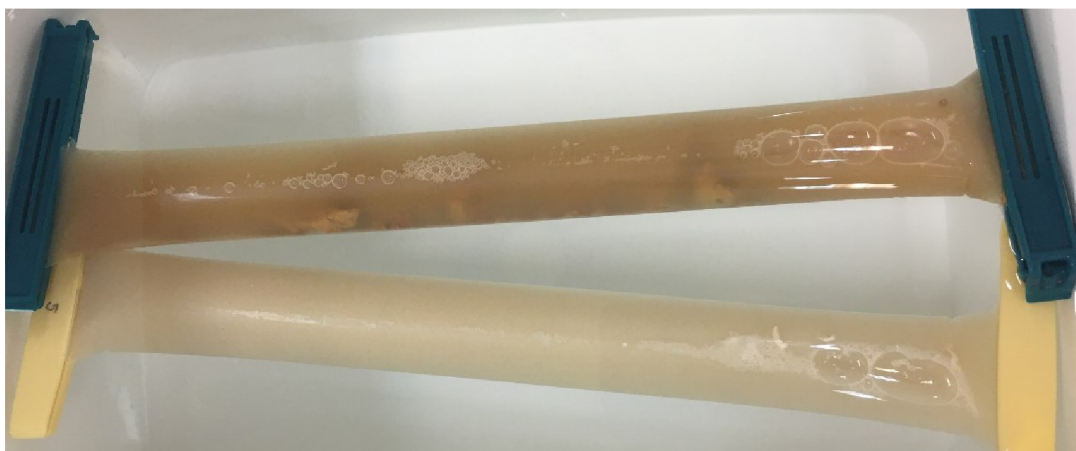
### SRÁŽENÍ KERATINU

Z hydrolyzátu byl keratin vysrážen za využití roztoku síranu amonného, který byl použit v práci Dhayanithi a kol. V 1 l destilované vody bylo rozpuštěno 700 g síranu amonného, roztok byl míchán, dokud nedošlo k rozpuštění všech částic. Roztok hydrolyzátu byl míchán a pomalu byl přikapáván síran amonný, až bylo dosaženo poměru 1:1. Po vysrážení byla provedena centrifugace při 10 000 ot./ min po dobu 5 min. Se získaným supernatantem byl proces opakován. Bílkovina získaná jak z hydrolyzátu tak i ze supernatantu byla přenesena do 100 ml destilované vody. Poté byla opět provedena centrifugace při 10 000 ot./min po dobu 5 min [81].

Alternativním postupem ke srážení keratinu byl postup dle Oluba a kol. Pro srážení keratinu byla využita 10% trichloroctová kyselina. Kyselinou bylo pH snižováno na hodnotu 2,4, díky okyselení byly v roztoku vytvořeny masivní vločky vysráženého keratinu. Bílkovina získaná z hydrolyzátu byla zcentrifugována při 10 000 ot./min po dobu 5 min [85].

### DIALÝZA

Dialýza, následována po procesu hydrolyzy a srážení, byla provedena tak, že přečištěná bílkovina byla přenesena do dialyzačního střeva 1 kDa, kde byla ponechána po dobu jednoho týdne (Obrázek 13). Voda v dialyzační nádobě byla každodenně měněna. Následně byl dialyzovaný produkt přenesen do centrifugačních zkumavek a zamražen.



Obrázek 13: Dialyzační střevo s vyzolovaným keratinem

### LYOFILIZACE KERATINU

Vysrážený a zdialyzovaný keratin byl zamražen v centrifugačních zkumavkách o objemu 50 ml, do kterých bylo nalito 35 ml směsi keratinu s kapalinou. Poté byly umístěny do lyofilizačních nádob, kde působením vakua a nízké teploty byla dosažena sublimace kapaliny ze vzorků. Lyofilizace probíhala po dobu 5 dní.

### 3.5 Příprava keratinových filmů

Všechny filmy byly připravovány metodou lití rozpouštědlem (Obrázek 14).

*Film z keratinu a kyseliny citronové*



Obrázek 14: Metoda lití rozpouštědlem

Příprava tohoto druhu filmu byla provedena ve třech poměrech obou látek s různým přidavkem glycerolu, jednotlivé množství látek jsou znázorněny v tabulce 5. Nejprve byla rozpuštěna kyselina citronová v 15 ml destilované vody. Poté byl k roztoku kyseliny přidán keratin, aby došlo k vytvoření homogenního roztoku byla kádinka s látkami vložena do ultrazvuku. V konečné fázi došlo k přidání glycerolu a promíchání roztoku na magnetické míchačce. Roztok byl poté vylit na Petriho misku a sušen při teplotě 40 °C po dobu 48 h [61].

Tabulka 5: Modifikace filmu z keratinu a kyseliny citronové

Vzorek	Obsah keratinu [mg]	Obsah kyseliny citronové [mg]	Obsah glycerolu [hm. %]	Objem destilované vody [ml]	Obsah sušiny keratinu [%]
KKC1	1,77	1,18	–	15	60
KKC2	1,77	1,18	10	15	16
KKC3	1,77	1,77	–	15	50
KKC4	1,77	1,77	10	15	31
KKC5	1,77	1,77	5	15	39
KKC6	1,77	1,77	2	15	53
KKC7	1,18	1,77	10	15	24
KKC8	1,18	1,77	2	15	36

### *Keratin-PVA film*

Tento typ filmu byl připraven ze dvou roztoků. První roztok byl vytvořen z 4 hm. % roztoku PVA. Aby došlo k rozpuštění PVA, byla směs míchána magnetickým míchadlem a zahřívána na teplotu 85 °C. Druhý roztok byl připraven tak, že v 0,5 M roztoku hydroxidu sodného byl rozpuštěn lyofilizovaný keratin. Homogenní roztok keratinu byl vytvořen pomocí ultrazvuku. Následně bylo 15 ml 4 hm. % roztoku PVA postupně přikapáváno do 3,75 ml roztoku keratinu. Veškeré modifikace jsou znázorněny v tabulce 6. Následně byl roztok vylit do Petriho misek, které byly zakryty buničinou. Jejich obsah byl vysušen za laboratorní teploty po dobu dvou dní. Po vysušení bylo provedeno zesíťování filmu v roztoku složeného z glutaraldehydu, fosfátového pufru pH = 7,2 a glycerolu. Zesíťování filmu bylo ukončeno po 10 min. Poté byl film promyt destilovanou vodou a následně byl usušen při pokojové teplotě [62].

*Tabulka 6: Modifikace keratin-PVA filmů*

Vzorek	Obsah keratinu [mg]	PVA [hm. %]	Rozpouštědlo	Objem rozpouštědla [ml]	Obsah sušiny keratinu [%]
PVAK1	375,0	4	2M NaOH	3,75	26
PVAK2	187,5	4	2M NaOH	3,75	15
PVAB1	–	4	2M NaOH	3,75	–
PVAK3	375,0	4	0,5M NaOH	3,75	31
PVAK4	187,5	4	0,5M NaOH	3,75	19
PVAK5	140,0	4	0,5M NaOH	3,75	15
PVAK6	93,75	4	0,5M NaOH	3,75	10
PVAB2	–	4	0,5M NaOH	3,75	–
PVAK7	187,5	4	0,3M NaOH	3,75	19
PVAK8	187,5	4	2,5M C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	3,75	7
PVAK9	93,75	4	2,5M C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	3,75	4

C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> – kyselina citronová

PVAB – blank z PVA

### *Keratin-chitosanový film*

Při výrobě keratin-chitosanového filmu byl nejdříve připraven 0,5% nebo 1% roztok chitosanu. Do varné baňky byl převeden chitosan a 75% kyselina octová. Objem varné baňky byl neustále míchán pomocí magnetického míchadla a byl ohříván přes olejovou lázeň na teplotu 80 °C a odpařovaná část byla chlazená pomocí chladiče. Rozpuštění chitosanu v octové kyselině probíhalo po dobu 24 hod. Následně byl roztok přefiltrován pomocí nálevky se skládaným filtrem. Roztok keratinu byl připraven tak, že bylo rozmícháno určité množství keratinu v 50 ml 75% octové kyselině. Přidávaná množství keratinu jsou v tabulce 7. Rozpuštění probíhalo za laboratorní teploty. Dále byly roztoky chitosanu a keratinu smíchány a ihned vylity do plastových Petriho misek, které byly následně přikryty vrstvou buničiny pro docílení pomalého odpařování kapaliny. Keratin-chitosanové filmy byly odlupovány z povrchu misek po 2 denním sušením při 30 °C v sušárně [63].



Tabulka 7: Modifikace keratin-chitosanového filmu

Vzorek	Obsah keratinu [mg]	Obsah chitosanu v roztoku [%]	Objem 75% kyseliny octové [ml]	Obsah sušiny keratinu [%]
CHK1	50	0,5	25	44
CHK2	125	0,5	25	67
CHK3	50	0,5	50	44
CHK4	125	0,5	50	67
CHB1	–	0,5	50	–
CHK5	50	1	50	29
CHK6	125	1	50	50
CHK7	50	1	30	29
CHK8	125	1	30	50
CHB2	–	1	50	–

CHK – keratin-chitosanový

CHB – chitosanový blank

#### *Keratin-sorbitolový film*

Roztok na filmy byl připravován tak, že do 25 ml 50% kyseliny octové byl přidán keratinu a následně bylo do této vodné disperze přidán sorbitol v následujících koncentracích 0,1 a 0,2 g/g keratinu. Přidávané množství jednotlivých látek jsou v tabulce 8. Disperze byly připraveny za stálého míchání na magnetické míchačce při teplotě místnosti po dobu 1 hod. Následně byly roztoky vylity na Petriho misky a sušeny v sušárně při 30 °C po dobu 24 hod [64].

Tabulka 8: Modifikace keratin-sorbitolového filmu

Vzorek	Obsah keratinu [mg]	Obsah sorbitolu [mg]	Objem 50% kyseliny octové [ml]	Obsah sušiny keratinu [%]
KS1	875	87,5	25	91
KS2	1750	175	25	91
KS3	875	175	25	83
KS4	1750	350	25	83
KS5	200	175	25	53
KS6	400	175	25	70
KS7	200	350	25	36
KS8	400	350	25	53

#### *Keratin-glycerolový film*

Film byl vytvořen z 30 ml roztoku 50% octové kyseliny, ve kterém byl rozpuštěn keratin. Keratin byl rozpouštěn pomocí ultrazvuku. Následně do roztoku byl vmíchán glycerol. Jednotlivá množství látek jsou uvedena v tabulce 9. Pro spojení všech komponent byla směs míchána při 60 °C po dobu 5 hod. Následně byl homogenní roztok vylit na skleněné Petriho misky, které byly vloženy do sušárny s nastavenou teplotou na 60 °C po dobu 48 hod [65].

Tabulka 9: Modifikace keratin-glycerolového filmu

Vzorek	Obsah keratinu [mg]	Obsah glycerolu [hm. %]	Rozpouštědlo	Objem rozpouštědla [ml]	Obsah sušiny keratinu [%]
KG1	30	10	2M NaOH	30	0,5
KG2	60	10	2M NaOH	30	1,0
KG3	30	5	2M NaOH	30	0,5
KG4	60	5	2M NaOH	30	1,0
KG5	30	5	50% CH <sub>3</sub> COOH	30	0,9
KG6	60	5	50% CH <sub>3</sub> COOH	30	1,8
KG7	60	10	50% CH <sub>3</sub> COOH	30	1,8
KG8	60	5	50% CH <sub>3</sub> COOH	30	3,7
KG9	120	5	50% CH <sub>3</sub> COOH	30	7,1
KG10	200	5	50% CH <sub>3</sub> COOH	30	11,2
KG11	120	2	50% CH <sub>3</sub> COOH	30	16,3
KG12	200	2	50% CH <sub>3</sub> COOH	30	24,5

CH<sub>3</sub>COOH – kyselina octová

#### *Keratin-citrofolový film*

Film byl vytvořen z 30 ml roztoku 50% octové kyseliny, ve kterém byl rozpuštěn keratin. Keratin byl rozpouštěn pomocí ultrazvuku. Následně do roztoku byl vmíchán citrofol. Jednotlivá množství látek jsou uvedena v tabulce 10. Pro spojení všech komponent byla směs míchána při 60 °C po dobu 5 hod. Následně byl homogenní roztok vylit na skleněné Petriho misky, které byly vloženy do sušárny s nastavenou teplotou na 60 °C po dobu 48 hod.

Tabulka 10: Modifikace keratin-citrofolového filmu

Vzorek	Obsah keratinu [mg]	Obsah citrofolu [hm. %]	Objem 50% kyseliny octové [ml]	Obsah sušiny keratinu [%]
KC1	120	5	30	7
KC2	200	5	30	11
KC3	120	2	30	16
KC4	200	2	30	25

### 3.6 Charakterizace keratinu a keratinových filmů

#### ELEKTRONOVÉ MIKROSKOPIE

K zobrazení struktury keratinu byla využita rastrovací elektronová mikroskopie. Lyofilizované vzorky byly před analýzou pozlaceny. Následně bylo provedeno měření při urychlovacím napětí 5 kV ve vzdálenosti 3,5–4,9 mm. Snímky povrchu vzorků byly pořízeny v různých stupních přiblížení.

# POLYAKRYLAMIDOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA V PŘÍTOMNOSTI DODECYLSÍRANU SODNÉHO

## **Příprava roztoků**

### *Roztoky pro přípravu gelů*

Roztok A: 60 g akrylamidu a 1,6 g N,N'-metylenbisakrylamid bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky na 100 ml a baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

Roztok B: 10 g SDS bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky na 100 ml a baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Roztok se uchovává v temnu při laboratorní teplotě.

Roztok C: V 50 ml destilované vody bylo rozpuštěno 9,1 g TRIS, po rozpuštění bylo upraveno pH na hodnotu 8,8 pomocí koncentrované HCl, poté byl roztok převeden do odměrné baňky na 100 ml a doplněn vodou po rysku. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

Roztok D: V 50 ml destilované vody bylo rozpuštěno 6 g TRIS, po rozpuštění bylo upraveno pH na hodnotu 6,8 pomocí koncentrované HCl, poté byl roztok převeden do odměrné baňky na 100 ml a doplněn vodou po rysku. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

Roztok E: V 1 l destilované vody bylo rozpuštěno 30,3 g TRIS, 1,44 g glycinu a 10 g SDS.

Roztok F: V 1 ml destilované vody bylo rozpuštěno 25 mg bromfenolové modři. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

Roztok G: V 1 ml destilované vody bylo rozpuštěno 0,1 g peroxodisíranu amonného. Roztok je nutné připravit pro každé stanovení čerstvý.

TEMED: komerčně dodávaný roztok

### *Pomocné roztoky*

Elektrodový pufr: Roztok byl složen ze 100 ml roztoku E a 900 ml destilované vody.

Roztok pro rozpuštění keratinu: Roztok byl složen z 0,25 ml roztoku D, 0,5 ml roztoku B a také 1 ml glycerolu. Poté byl roztok převeden do odměrné baňky na 100 ml a doplněn po rysku destilovanou vodou.

Vzorkový pufr: Bylo smícháno 3,5 ml roztoku D, 4 ml 25% roztoku SDS, 1 ml roztoku F, 9 ml glycerolu a 2,5 ml B-merkptoethanolu. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

### *Roztoky k vizualizaci bílkovin*

Stabilizační roztok: Bylo smícháno 150 ml methanolu a 600 ml vody. Roztok se uchovává při laboratorní teplotě a je používán opakovaně.

Barvicí roztok: Bylo smícháno 0,5 g Coomassie Blue G-250, 450 ml methanolu, 100 ml koncentrované kyseliny octové a 450 ml vody. Roztok se uchovává při laboratorní teplotě a je používán opakovaně.

Odbarvovací roztok: Bylo smícháno 250 ml methanolu, 100 ml koncentrované kyseliny octové a 650 ml vody. Roztok se uchovává při laboratorní teplotě.

#### *Příprava vzorků*

Vzorky byly připravovány tak, že v roztoku určeného k rozpouštění keratinu bylo rozpuštěno takové množství keratinu, aby vznikla koncentrace 1 g keratinu na 1 l daného roztoku. Rozpouštění bylo prováděno po dobu 24 hod. Následně bylo do mikrozkušavek Eppendorf napipetováno 50  $\mu$ l vzorku a 50  $\mu$ l vzorkovacího pufru. Mikrozkušavky byly promíchány pomocí vortexu a následně byly inkubovány v termobloku při 95 °C po dobu 2 min. Vzorky byly následně aplikovány do jamek připraveného gelu. Standard nebyl podroben žádné z předchozích úkonů a byl rovnou převeden do jamky připraveného gelu.

#### Separční gel

Množství roztoků jsou uvedena v tabulce 11.

*Tabulka 11: Objemy roztoků k přípravě separčního gelu*

Roztoky	Objem [ml]
A	10
B	0,3
C	15
Destilovaná voda	4,4
G	0,3
TEMED	0,01

Do kádinky byl TEMED a roztok G přidávány až po provedení odvzdušnění pomocí ultrazvuku, které se provádělo po dobu 2 až 3 min. Po přidání těchto dvou komponent byla směs na separční gel promíchána a ihned byla vylita do formy mezi skla tak, aby zůstaly 2 cm od horního okraje. Následně byl roztok opatrně převrstven 5 mm vrstvou destilované vody, aby nedocházelo k odpaření vody a došlo k vyrovnání hladiny. Během 20 až 30 min byl vytvořen separční gel pomocí polymerace na světle. Poté byla destilovaná voda odsáta filtračním papírem z povrchu vzniklého gelu.

#### Zaostřovací gel

Zaostřovací gel byl připraven podle složení uvedené v tabulce 12.

*Tabulka 12: Objemy roztoků k přípravě zaostřovacího gelu*

Roztoky	Objem [ml]
A	1
B	0,1
D	5
Destilovaná voda	3,8
G	0,15
TEMED	0,005

Do kádinky byl TEMED a roztok G přidávány až po provedení odvzdušnění pomocí ultrazvuku, které se provádělo po dobu 2 až 3 min. Po přidání těchto dvou komponent byla směs na zaostřovací gel promíchána a ihned byla vylita tak, aby forma byla mírně přeplněna. Následně byl do gelu vložen hřebínek, aby došlo k vytvoření drážek pro vzorky. Během 15 min byl vytvořen zaostřovací gel polymerací. Po vytvoření gelu byl hřebínek opatrně vytažen a drážky byly promyty elektrodočistěním. Hotový gel bylo možné uchovávat v lednici, nejdéle však do druhého dne.

### *Elektroforéza*

Sklo s připraveným gelem bylo vytaženo ze stojanu a sklo bylo očištěno od zbytků gelu a upevněno do stojanu pro elektroforézu větším sklem ven. Stojan byl umístěn do elektroforetické nádoby, vnitřní prostor stojanu byl zcela naplněn elektrodočistěním a vnější prostor byl naplněn po rysku na vaně. Poté byly pomocí automatické pipety s dlouhou špičkou do jamek nadávkovány připravené vzorky v množství 20 µl. Dále byl do jedné drážky pipetován standard. Takto připravená aparatura byla připojena ke zdroji. Elektroforéza byla nejprve nastavena na konstantních 50 V po dobu 10 min a poté bylo konstantní napětí zvýšeno na 100 V po dobu 110 min. V průběhu elektroforézy bylo nutné kontrolovat, jestli elektrodočistění neprotéká z vnitřní části stojanu do vnější a případně pufr doplňovat.

### *Zviditelnění bílkovin*

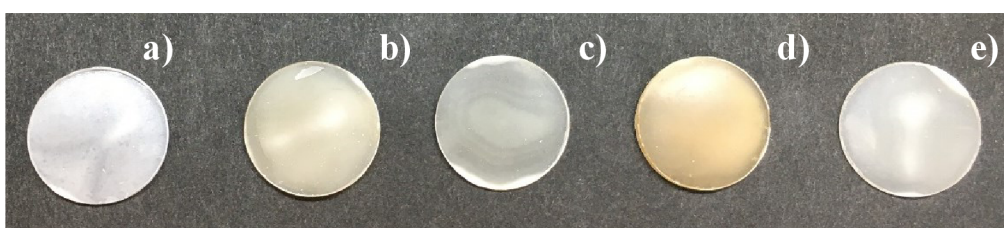
Elektroforéza byla ukončena a elektroforetická forma s gelem byla vyjmuta ze stojanu. Poté byl odlit přebytečný pufr a forma byla vložena do nádoby s destilovanou vodou tak, aby bylo menší sklo formy orientováno ke dnu nádoby. Spodní sklo bylo následovně odděleno od gelu pomocí umělohmotné špachtle. Gel byl pod vodou sejmuto i z horního skla. Destilovaná voda v nádobě byla nahrazena stabilizačním roztokem a gel byl stabilizován na třepačce po dobu 5 min. Poté byl stabilizační roztok slit a gel byl protřepáván 30 minut s barvicím roztokem. Nakonec byl barvicí roztok nahrazen roztokem odbarvovacím. Aby došlo k dostatečnému odbarvení gelu byla procedura prováděna po dobu 90 min na třepačce. Nakonec byl gel promyt destilovanou vodou a následně byla provedena analýza vzorků.

## ANTIMIKROBIÁLNÍ TESTY

Nejprve bylo připraveno medium na kultivaci, kdy pro kvasinku bylo použito médium YPD – Yeast extract peptone dextrose a pro ostatní mikroorganismy bylo připraveno NB – Nutrient Broth. Media byla připravena v Erlenmeyerových baňkách a sterilizována při 120 °C po dobu 45 min. Následně se média nechala vychladnout na teplotu 40 °C a byly do něho přemístěny dvě kličky kultury daného mikroorganismu. Takto připravené Erlenmeyerovy baňky byly inkubovány na třepačkách při 37 °C po dobu 24 hod. Na Petriho misky s příslušnou tuhou půdou (NB nebo YPD) pro daný mikroorganismus bylo přeneseno 100 µl kultury daného mikroorganismu. Kultura byla rozetřena po celém povrchu tuhé půdy pomocí sterilní hokejky. Následně po 5 min byly na povrch agaru vloženy stejné kousky keratin-chitosanového filmu a jeden film byl blank obsahující pouze chitosan. Petriho misky byly přeneseny na do inkubátoru s teplotou 37 °C a inkubace probíhala po dobu 24 hod.

## FTIR

Vzorky získané z jednotlivých hydrolyz byly před analýzou nejprve vysušeny v sušárně a poté přeneseny do exsikátoru. Také byl vyžihán bromid draselný. Pro vytvoření tablety k analýze byly nejprve jednotlivé komponenty rozmělněny v třecích miskách. Pro jednu tabletu bylo vždy přibližně naváženo 280  $\mu\text{g}$  bromidu draselného a 3  $\mu\text{g}$  vzorku. Tyto dvě komponenty byly rozmělněny v třecí misce a ze vzniklé homogenní směsi bylo naváženo 200  $\mu\text{g}$ , která byla přenesena do lisovací formy. K vytvoření tablety byl použit hydraulický laboratorní lis (Obrázek 15). Vzniklá tableta byla použita pro infračervenou spektrometrii s Fourierovou transformací. Všechna spektra byla naměřena v rozsahu vlnočtů 400 až 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Počet skenů, který vyjadřuje počet spekter kumulovaných v rámci jednoho měření, byl stanoven na 64 a rozlišení 2  $\text{cm}^{-1}$ . Všechna spektra byla korigována a normalizována k nejvyššímu píku.



Obrázek 15: *Tablety vzorků získané jednotlivými hydrolyzami: a) Tableta z čistého KBr, b) keratin z husího peří, c) supernatant získaný hydrolyzou z husího peří, d) keratin z slepičího peří, e) supernatant získaný hydrolyzou z slepičího peří,*

Proměrování filmů pomocí infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací byla provedena na spektrofotometru Frontier. Při analýze byl použit mód ATR – attenuated total reflectance, krystal diamant/ZnSe a detektor LiTaO<sub>3</sub>. Spektra byla opět naměřena v rozsahu vlnočtů 600 až 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Počet skenů, který vyjadřuje počet spekter kumulovaných v rámci jednoho stanovení, byl stanoven na 64 a rozlišení 2  $\text{cm}^{-1}$ . Všechna spektra byla korigována a normalizována k nejvyššímu píku.

## DIFERENČNÍ SKENOVACÍ KALORIMETRIE

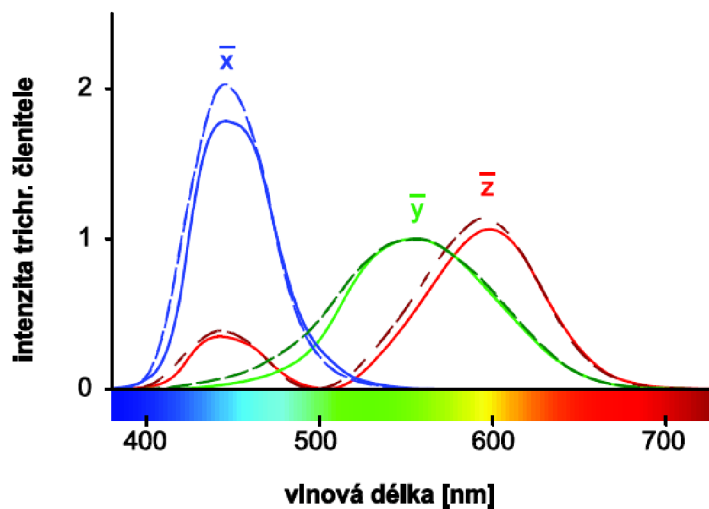
Analýza vzorků metodou diferenční snímací kalorimetrie byla provedena v dusíkové atmosféře. Kalibrace DSC byla provedena pomocí india s vysokou čistotou. Přibližně 10 mg vzorku bylo hermeticky uzavřeno do hliníkových pánviček. Testování probíhalo v rozsahu teplot od 20 až do 300  $^{\circ}\text{C}$ , pouze u vzorek peří do 250  $^{\circ}\text{C}$  kvůli jejich nízké teplotě degradace. Rychlost zahřívání byla nastavena na 10  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ .

## TERMOGRAVIMETRICKÁ ANALÝZA

Byla provedena termogravimetrická analýza pomocí přístroje TGA Q5000IR v dusíkové atmosféře s průtokem vzduchu 30  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Přibližně 5 mg vzorku bylo uzavřeno v hliníkovém tavícím kelímku a rychlost zahřívání byla nastavena na 10  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . Testování probíhalo v rozsahu teplot od 100 až do 650  $^{\circ}\text{C}$ .

## KOLORIMETRIE

Kolorimetrie je metoda sloužící k objektivnímu popisu barev. Pro určení barevnosti objektů je nutné definovat tři elementy, kterými jsou zdroj světla, pozorovaný objekt a pozorovatel. Objekt lze definovat pomocí parametru reflektance  $R(\lambda)$ , který se vypočítá pomocí poměru intenzit světla odraženého k světlu dopadajícího na objekt. Reflektance vyjadřuje, jak moc je objekt schopen světlo o dané vlnové délce odrážet. Zdroj světla je definován parametrem spektrální intenzity vyzařování  $M_e(\lambda)$ . Tento parametr říká, na které vlnové délce zdroj vyzařuje. Komise CIE definovala pozorovatele pomocí tří funkcí, které jsou nazývány trichromatičtí členitelé  $\bar{x}$ ,  $\bar{y}$ ,  $\bar{z}$  (Obrázek 16) [86].



Obrázek 16: Trichromatičtí členitelé  $2^\circ$  (plné čáry) a  $10^\circ$  (čárkovaně) pozorovatele [86]

Kolorimetrické parametry filmů byly zjišťovány pomocí Miniaturního spektrometru USB650UV. Spektrální intenzita vyzařování zdroje byla nastavena na D50, pozorovatel byl použit dvoustupňový. Nejprve byla změřena tloušťka filmu v pěti bodech. Následně byl film umístěn do stojanu a v místech změřené tloušťky byly stanoveny kolorimetrické parametry. Spektrometrem byly změřeny souřadnice barvého prostoru CIE  $L^*a^*b^*$ , chroma  $C^*$  a odstín  $h^*$ . Všem barvám, které může pozorovatel vnímat, lze přiřadit souřadnice v prostoru.

$L^*$  – měrná světlost, která nám určuje, zda se jedná o barvu světlou či tmavou

$a^*$  – osa, na které se nachází barvy od zelené po červenou

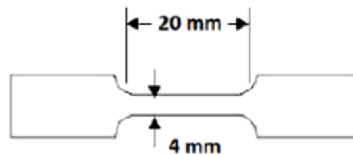
$b^*$  – osa, na které se nachází barvy od modré po žlutou

chroma  $C^*$  – vyjadřuje pestrost barvy

odstín  $h^*$  – je určen úhlem

## MECHANICKÉ VLATNOSTI FILMU

Vzorky PVA filmů byly vyraženy raznicí na požadovaný tvar lopatky za pomoci hydraulického laboratorního lisu. Rozměry lopatky jsou znázorněny na obrázku 17. Nejprve byla proměřena tloušťka lopatičky v 5 bodech. Následně byly proměřeny mechanické vlastnosti PVA filmů na zkušební přístroji (Labortech, ČR). Použitá rychlost deformace byla 5 mm· Z naměřených výsledků byly vypočteny hodnoty pro Youngův modul, pevnost v tahu  $\sigma_B$ , délkového prodloužení při přetržení  $\varepsilon_B$  a příslušné směrodatné odchylky.



Obrázek 17: Zkušební těleso ve tvaru lopatky



## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Odtučnění peří

Před procesem hydrolyzy byla vždy provedena předúprava peří odtučněním. Tuk může ovlivňovat výtěžnost procesu, a to tím, že vytváří ochrannou vrstvu na povrchu peří, navíc by mohl kontaminovat produkt v podobě hydrolyzátu. Proces se prováděl třemi metodami. V tabulce 15 jsou uvedeny množství tuku, která byla získána jednotlivými extrakčními metodami. Grafické znázornění extrahovaného tuku je zobrazeno na obrázku 18.

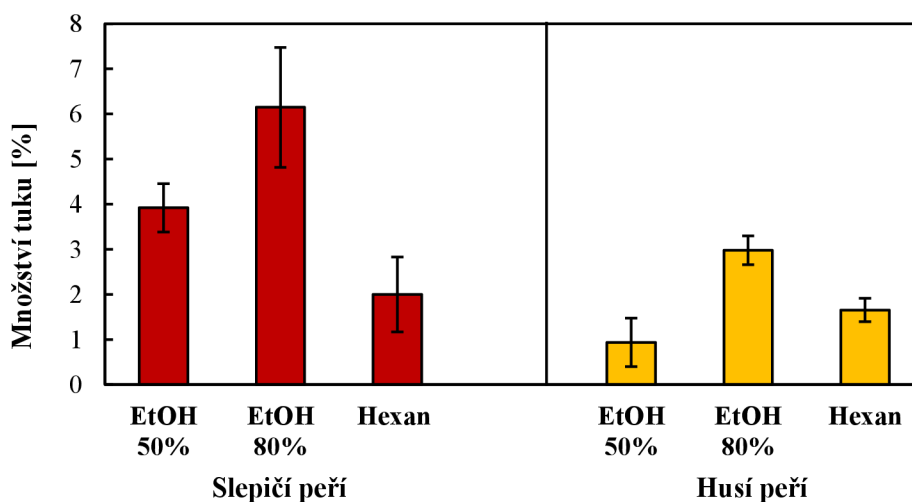
Tabulka 13: Množství tuku extrahovaného z pomletého peří

Rozpouštědlo	Slepičí peří		Husí peří	
	Množství tuku [%]	Směrodatná odchylka [%]	Množství tuku [%]	Směrodatná odchylka [%]
EtOH 50%	3,921	0,537	0,940	0,540
EtOH 80%	6,147	1,329	2,980	0,321
Hexan	2,004	0,828	1,657	0,258

Odtučnění peří 80% ethanolem se významně lišilo svou účinností od ostatních dvou metod bez ohledu na druh peří. Extrahované množství tuku bylo stanoveno u slepičího peří na  $6,15 \pm 1,33$  % a u husího na  $2,98 \pm 0,32$  %. Tyto hodnoty odpovídají množství tuků v drůbežím peří, rozsah uváděný v odborné literatuře odpovídá 2 až 12 % [87].

Rozdílná množství extrahovaných tuků u těchto dvou druhů peří by mohla být způsobena stářím drůbeže, ročním obdobím, které ovlivňuje složení mastných kyselin v produkovaném tuku. Extrahovaný tuk se může také lišit podle konkrétního jedince, jeho zdravotní kondice, složení stravy nebo od typu peří, poměr prachového ke krycímu peří [88, 89].

Z obrázku 18 je patrné, že ethanol je dostatečně účinná látka na extrakci tuku z peří. Výhodou využití ethanolu je procesní nenáročnost a také množství peří, které je možné najednou odtučnit, na rozdíl od extrakce v hexanu za použití přístroje SOX THERM. Ovšem je nutné poznamenat, že vyšší výtěžnost pomocí ethanolu může být způsobena rozpouštěním částečně polárních sloučenin [90, 89].



Obrázek 18: Porovnání účinnosti extrakce tuků z různých druhů peří

## 4.2 Plynová chromatografie

Extrahovaný tuk byl analyzován pomocí plynové chromatografie. Bylo zjištěno, že extrakt tuku obsahoval přibližně 26 % mastných kyselin v případě slepičího peří, respektive 18 % u husího peří (Tabulka 15). Složení mastných kyselin v tuku z peří je znázorněno v tabulce 14, z níž vyplývá, že složení tuků ze slepičího a husího peří jsou téměř identická. Tuk slepičího peří na rozdíl od husího obsahuje kyselinu laurovou, myristoolejovou, heptadecenovou a heneicosanovou, ale postrádá kyselinu kaprinovou. Největší zastoupení má kyselina palmitová a kyselina olejová (cis). Zastoupení jednotlivých mastných kyselin se s dostupnými studii částečně shoduje. Nejvyšší zastoupení bylo zjištěno u kyseliny palmitové, poté ji s klesajícím trendem následovaly kyselina olejová, stearová a linolová. Ve studii Abdoli a kol. bylo zjištěno významné množství kyseliny linolenové, kterou se v této práci nepodařilo detekovat [88, 90].

Tabulka 14: Složení mastných kyselin v tucích získaných odtučněním peří

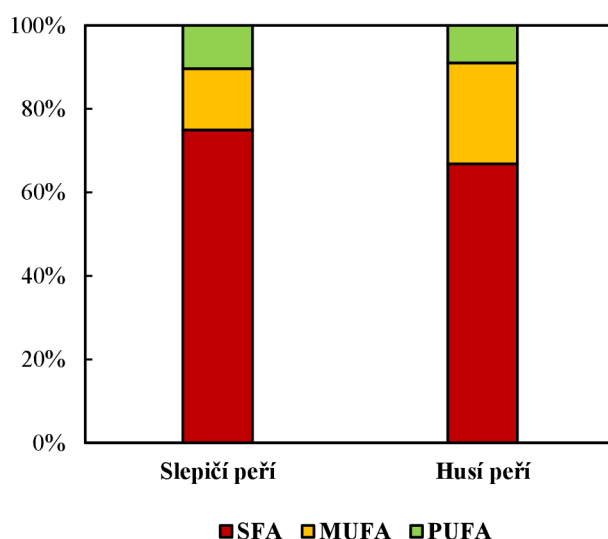
Mastná kyselina	Vzorec	Slepičí peří		Husí peří	
		Průměr	Směrodatná odchylka	Průměr	Směrodatná odchylka
<i>c</i> [mg/ml]					
Kyselina kaprinová	C10:0	–	–	0,265	0,0368
Kyselina laurová	C12:0	0,020	0,004	–	–
Kyselina myristová	C14:0	0,053	0,005	0,020	0,002
Kyselina myristoolejová	C14:1	0,011	–	–	–
Kyselina pentadekanová	C15:0	0,015	0,002	0,009	–
Kyselina palmitová	C16:0	0,676	0,033	0,340	0,117
Kyselina palmitoolejová	C16:1	0,040	0,001	0,014	0,006
Kyselina heptadecenová	C17:1	0,013	–	–	–
Kyselina stearová	C18:0	0,376	0,083	0,250	–
Kyselina olejová (cis)	C18:1c	0,384	–	0,211	0,011
Kyselina linolová (trans)	C18:2t	0,029	–	0,011	–
Kyselina linolová (cis)	C18:2c	0,111	0,067	0,123	0,127
Kyselina arachová	C20:0	0,089	0,024	0,090	0,004
Kyselina eikosenová	C20:1	0,030	0,004	0,013	0,001
Kyselina eikosadienová	C20:2	0,037	–	0,013	–
Kyselina heneicosanová	C21:0	0,018	0,001	–	–
Kyselina arachidonová	C20:4	0,020	0,006	0,015	0,001
Kyselina lignocerová	C24:0	0,047	0,016	0,044	0,004

Z naměřených dat, která jsou uvedena v tabulce 15 bylo vypočítáno procentuální zastoupení nasycených mastných kyselin (SFA), mononenasycených mastných kyselin (MUFA) a polynenasycených mastných kyselin (PUFA). Množství SFA výrazně dominovalo nad nenasycenými mastnými kyselinami.

Tabulka 15: Zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace

Druh peří	Lipidy (%)	Složení lipidů		
		SFA (%)	MUFA (%)	PUFA (%)
Slepičí peří	25,80	74,96	14,72	10,33
Husí peří	21,12	66,65	24,19	8,94

SFA – nasycené mastné kyseliny, MUFA – mononenasycené mastné kyseliny, PUFA – polynenasycené mastné kyseliny



Obrázek 19: Grafické znázornění zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace

### 4.3 Porovnání jednotlivých hydrolýz

Izolace keratinu ze slepičího peří byla provedena pomocí různých typů hydrolýz. Na základě získaných výtěžků byla stanovena účinnost jednotlivých metod. U husího peří byl proveden jeden typ hydrolýzy z důvodu nedostatku materiálu. K výtěžku byl přiřazen i vzniklý supernatant, který byl dále samostatně charakterizován (SPS, slepičí peří supernatant). V tabulce 18 jsou uvedena množství keratinu získaného jednotlivými typy hydrolýz. Grafické znázornění účinnosti jednotlivých procesů jsou zobrazeny na obrázku 20.

Tabulka 16: Výtěžnost jednotlivých hydrolýz získaných z 50 g peří

Druh hydrolýzy	Slepičí peří		Husí peří	
	Výtěžek keratinu [g]	Procentuální výtěžek [%]	Výtěžek keratinu [g]	Procentuální výtěžek [%]
NaOH 2,5%	15,08	30,16	4,94	9,89
NaOH 1,0%	21,79	43,57		
NaOH 0,5%	23,49	46,97		
Na <sub>2</sub> S	12,70	25,41		
Alkalicko-enzymatická	2,67	5,34		
Kyselá	1,03	2,06		

Z porovnání výtěžků jednotlivých hydrolyz bylo vyvozeno, že nejúčinnější izolace keratinu byla pomocí hydroxidu sodného, následovala metoda se sulfidem sodným. Izolace s využitím enzymu a kyseliny vykazovaly signifikantně nižší výtěžnost oproti předchozím dvěma zmíněným metodám. Ze získaných dat bylo dále zjištěno, že vliv na výtěžnost keratinu má typ extrakčního činidla při procesu odtučnění. Množství izolovaného keratinu bylo vyšší u použití 50% ethanolu, bez ohledu na druhu peří. Dalším ovlivňujícím faktorem při izolaci keratinu byl objem vsádky.

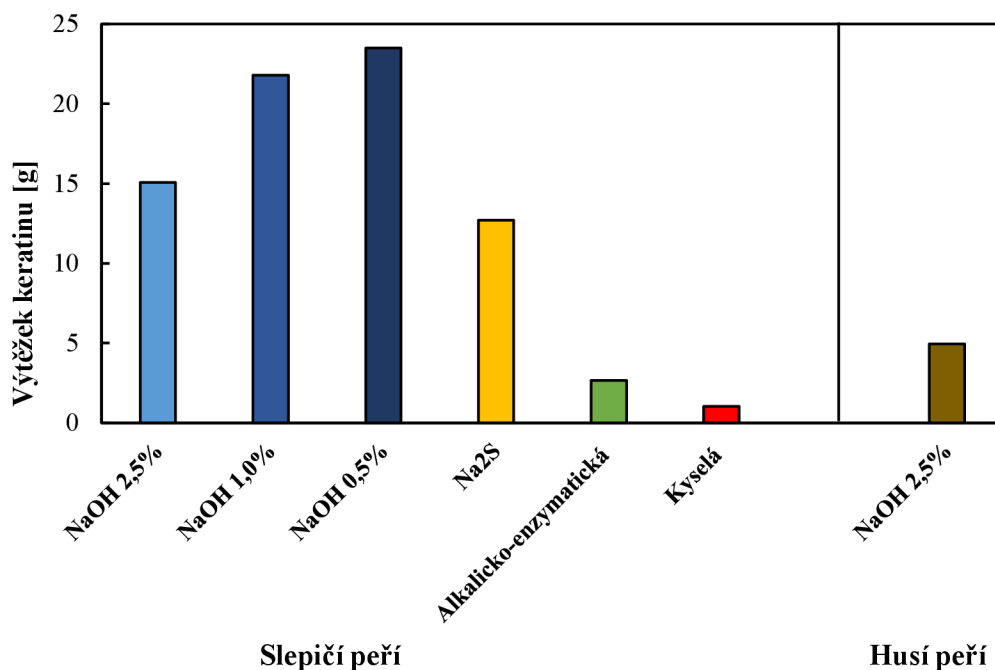
U izolace s hydroxidem sodným byl zkoumán vliv koncentrace dané látky a čas působení na výtěžnost keratinu. Nejnižší výtěžnost vykazovala metoda s využitím nejkonzentrovějšího (2,5 hm. %) hydroxidu sodného, při níž bylo vyizolováno 30 % keratinu. Výtěžnost tohoto procesu se signifikantně liší od publikace Sinkiewicz a kol., ve které bylo dosaženo pomocí 2,5% hydroxidu sodného výtěžku 94 % keratinu. Proces mohl být ovlivněn vysokou koncentrací hydroxidu, která byla značně agresivní a zapříčinila rozklad proteinů na jednotlivé aminokyseliny, což poté ovlivnilo proces srážení, při němž již nedošlo k sestavení proteinu. Ani při použití 1M hydroxidu sodného nebyla účinnost izolace stejná v porovnání s danou studií. V této diplomové práci bylo získáno 44 % keratinu, což je naopak o 14 % více než uvádí Sinkiewicz a kol. Vyšší výtěžnost mohla být způsobena delší dobou působení hydroxidu. Nejúčinnější metodou izolace s výtěžností až 47 % byla metoda využívající nejnižší koncentraci NaOH (0,5 hm. %), tato izolace probíhala po dobu 240 min. Snížení koncentrace hydroxidu zapříčinilo zvýšení výtěžnosti až o 17 %. Rozdíl mezi izolacemi při použití 1% a 0,5% hydroxidu sodného není již tak výrazný, což mohlo být způsobeno delší dobou působení 0,5% hydroxidu sodného na slepičí peří. Proces hydrolyzy s koncentrací NaOH 0,5% probíhal po delší dobu ve srovnání s ostatními metodami z důvodu patrných fragmentů nerozloženého peří. Nicméně delší doba působení alkálie mohla způsobit štěpení proteinu na fragmenty s velmi nízkou molekulovou hmotností [82].

Druhým typem hydrolyzy byl postup s využitím sulfidu sodného, jehož účinnost se pohybovala okolo 25 %. Výtěžnost této metody je signifikantně nižší ve srovnání s odbornou literaturou, která uvádí výtěžnost 62 respektive 70 %. Metoda nebyla v práci dále používána z důvodu časové náročnosti a nutnosti aplikace toxických látek [81, 91].

Dalším způsobem izolace proteinu byla alkalicko-enzymatická hydrolyza. Touto metodou bylo získáno 5 % keratinu. Srovnání výtěžnosti metody se studií Dalev ukázal, že izolace je výrazně nižší a to až o 43 %. Nízká účinnost mohla být zapříčiněna použitím odlišné proteázy nebo provedením izolace v menším objemu, který nebyl dostatečně promícháván. Ve srovnání s publikovanou studií, v níž proces probíhal v laboratorním bioreaktoru, v němž docházelo k dostatečnému promíchání objemu, tedy podmínky pro izolaci byly příznivější [84].

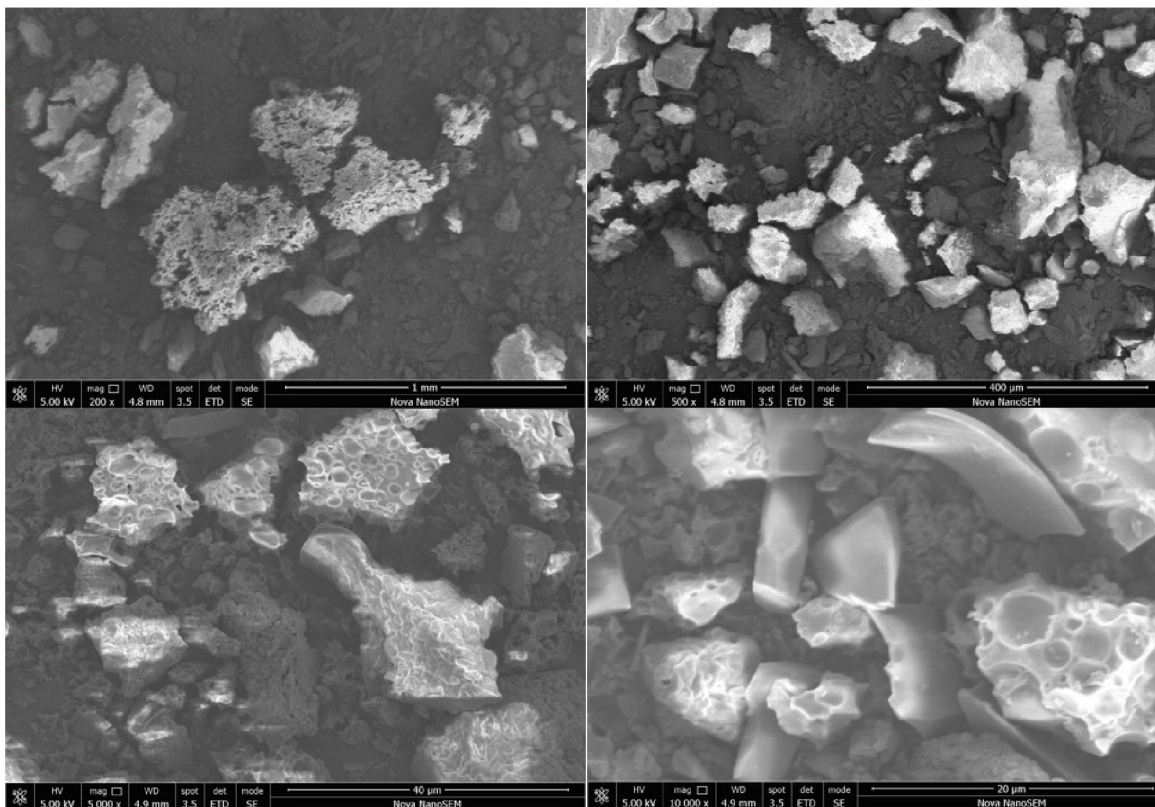
Proces kyselé hydrolyzy se signifikantně odlišoval svou výtěžností od ostatních metod. Izolace keratinu dosáhla pouze 2 %, což neodpovídá účinnosti v publikované studii, v níž dosáhli výtěžku až 68 %. Proces probíhal delší dobu, a to z důvodu patrných fragmentů nerozloženého peří. Nicméně ani za 50 hod nedošlo k úplnému rozkladu peří. Tento postup se neosvědčil pro svou nízkou efektivitu i časovou náročnost [83].

Izolace keratinu z husího peří měla výrazně nižší výtěžnost oproti izolaci ze slepičího peří. Vliv na účinnost procesu by mohla ovlivnit rozdílná struktura peří. Odborná literatura se konkrétně husímu peří nevěnuje z důvodu jeho využití v textilním průmyslu.



Obrázek 20: Výtěžnost jednotlivých hydrolyz z 50 g peří

#### 4.4 Analýza pomocí elektronové mikroskopie

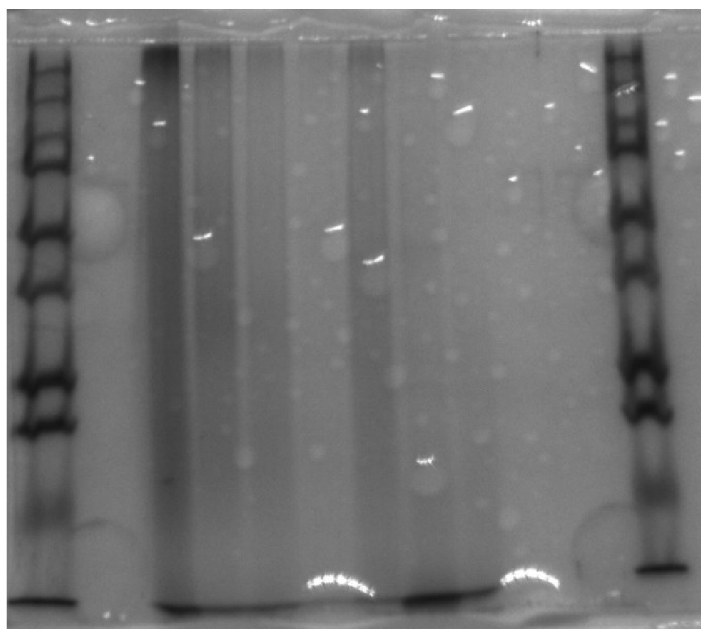


Obrázek 21: *Struktura keratinu při různém přiblížení SEM: Vzorek SP + 2,5% NaOH – keratin ze slepičího peří získaný hydrolyzou s využitím 2,5% roztoku NaOH*

Analýza byla provedena pro znázornění morfologie povrchu keratinu, ze snímků (Obrázek 21) je patrný nepravidelný tvar proteinových částic s drsným povrchem. Velikost částic nebyla jednotná, nicméně se pohybovala v řádu desítek nanometrů. Morfologie keratinu přibližně odpovídala snímkům publikovaným v recentní studii [92].

#### 4.5 PAGE-SDS

SDS PAGE byla provedena za účelem analýzy molekulových hmotností izolovaných keratinů a porovnání vlivu typu izolace na výslednou molekulovou hmotnost. Nicméně nebylo dosaženo úspěšného rozdělení proteinů na polyakrylamidovém gelu (Obrázek 22), pravděpodobně z důvodu značného rozštěpení keratinu během izolačních procesů na fragmenty s velmi nízkou molekulovou hmotností. Mimo to studie uvádí, že keratin má sám o sobě nízkou molekulovou hmotnost, okolo 10 kDa. Pro úspěšnou separaci by bylo v tomto případě vhodné použít účinnější analytickou metodu, například gradientový gel, který ovšem není možné připravit v běžné laboratoři [92, 93].



Obrázek 22: Snímek SDS-PAGE gelu s elektroforetickou separací proteinu

#### 4.6 Antimikrobiální testy

U chitosanového a keratin-chitosanového (CHK3, CHK4 – Tabulka 7) filmu byly ověřeny jejich antimikrobiální vlastnosti pomocí diskové difuzní metody. Chitosan by měl mít dle odborné literatury inhibiční účinky proti růstu gramnegativních bakterií, a to z důvodu navázání jeho kladně nabitě amino skupiny na negativně nabitou buněčnou stěnu bakterie. Antimikrobiální účinky chitosanu byly zkoumány na bakteriích *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* a kvasince *Candida glabrata*, což je znázorněno na obrázku 23 [94].

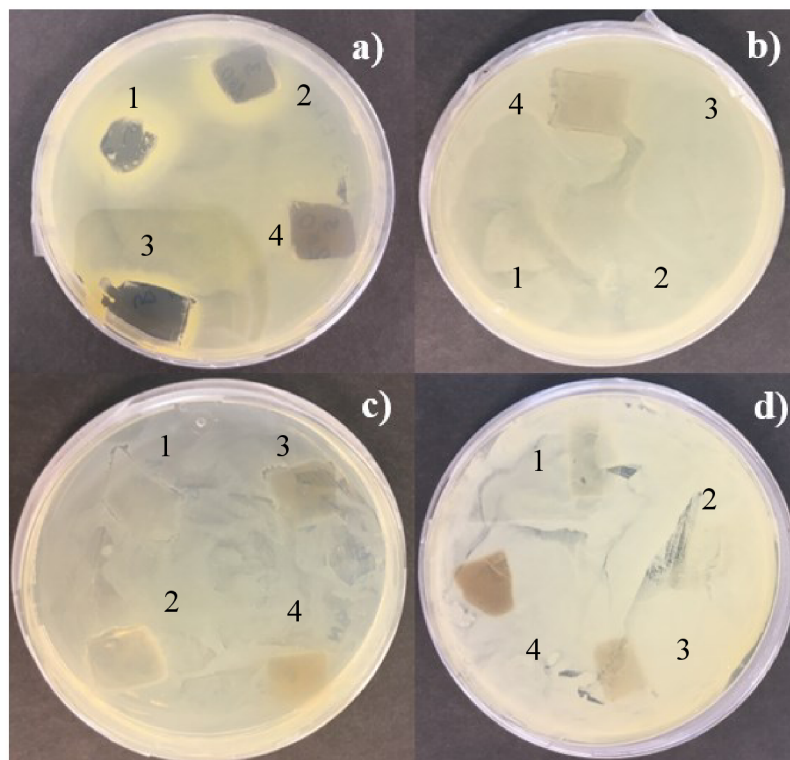
*Micrococcus luteus* je gram-pozitivní bakterie, která může mít v určitých podmínkách i negativní náboj na své buněčné stěně (gram-variabilní bakterie). Na fotografii a), lze pozorovat, že ve všech pozicích, kde došlo k položení filmu (bez ohledu na složení)

nevznikla okolo něj inhibiční zóna, ale na jeho povrchu nedocházelo růstu bakterie. Tyto výsledky se shodují s odbornou literaturou [95].

Na fotografii b) je Petriho miska, na kterou byla aplikována kvasinka *Candida glabrata*. Tato kvasinka je velmi odolná, a to z důvodu její schopnosti rychlé adaptace na stresové podmínky, což je viditelné na daném snímku, kde nedošlo k žádnému ovlivnění růstu kvasinky [96].

Na fotografii c) u *Serratia marcescens* nebyla patrná účinnost chitosanu na inhibici růstu mikroorganismu, což je v rozporu s tvrzením odborné publikace [94].

Na fotografii d), kde byla aplikována *Escherichia coli*, je možné pozorovat nepatrná inhibice v pozici keratin-chitosanového filmu, který obsahoval 125 mg keratinu. Ostatní filmy nebyly schopni růst mikroorganismu potlačit. Tento výsledek se liší od poznatků z odborné literatury [63]



Obrázek 23: **Disková difuzní metoda:** a) *Micrococcus luteus*, b) *Candida glabrata*, c) *Serratia marcescens*, d) *Escherichia coli*

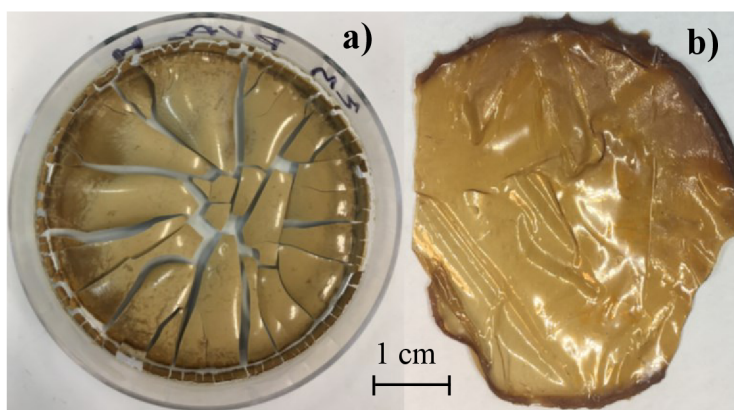
1) CHB1 – 0,5 hm. % chitosan + 50 ml 75% kyselina octová, 2) CHB2 – 1 hm. % chitosan + 50 ml 75% kyselina octová, 3) CHK3 – 0,5 hm. % chitosan + 50 ml 75% kyselina octová + 44 % keratin, 4) CHK4 – 0,5 hm. % chitosan + 50 ml 75% kyselina octová + 67 % keratin

#### 4.7 Vlastnosti filmů

Připravované filmy byly modifikovány přidavkem jiného polymeru, plastifikátoru, případně síťovacím činidlem, aby se docílilo vhodných vlastností. V této diplomové práci bylo modifikováno složení filmů, za účelem snížení křehkosti daného produktu.

##### *Keratin-PVA film*

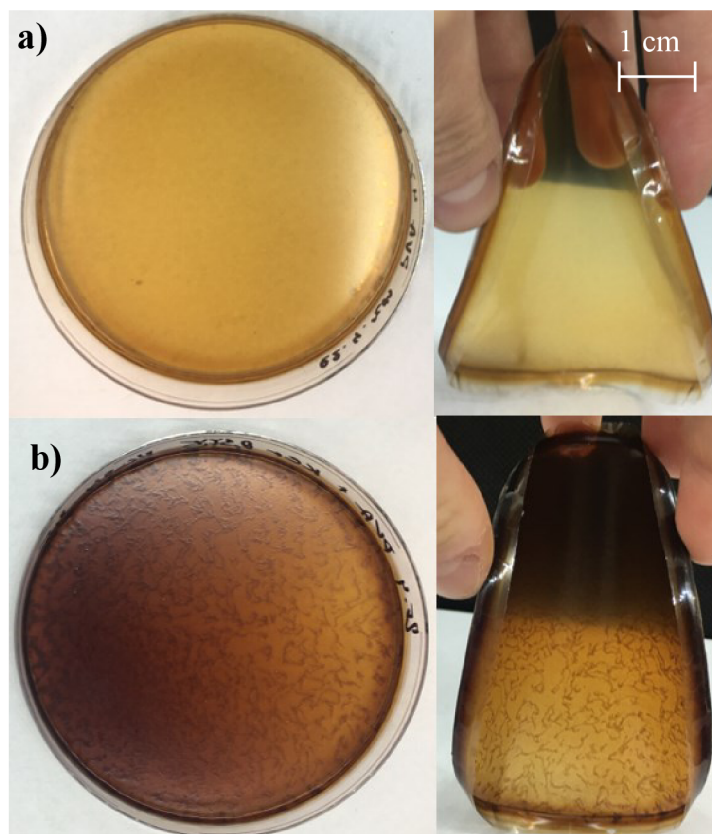
Keratin-PVA filmy byly připraveny nejdříve tak, že keratin byl rozpuštěn v roztoku hydroxidu sodného o vysoké koncentraci (2M), poté do roztoku byl přidán 4 hm. % roztok PVA, což způsobovalo nehomogenitu filmu a vysrážení soli na povrchu filmu, kompozitní film byl po vysušení křehký a lámavý. Dalším způsobem úpravy postupu byla náhrada roztoku rozpouštědla hydroxidu sodného 2,5M roztokem kyseliny citronové. Nicméně tato modifikace se neosvědčila z důvodu vysoké lepivosti povrchu vysušeného filmu, která byla pravděpodobně způsobena absorpcí vlhkosti. Další nevýhodou byla neschopnost udržet požadovaný tvaru z důvodu plasticity materiálu (Obrázek 24).



Obrázek 24: Vybrané vzorky vadných keratin-PVA filmů: a) PVAK1 – 4 hm. % PVA + 2M NaOH + 26 % keratin, b) PVAK9 – 4 hm. % PVA + kyselina citronová + 7 % keratin

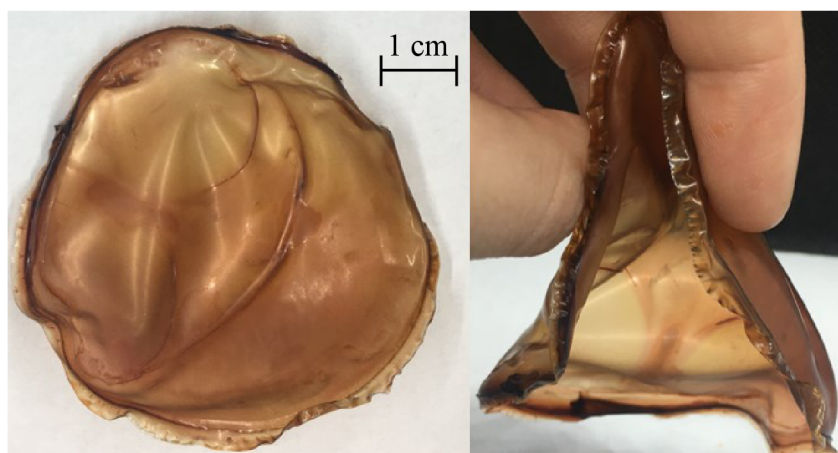
Následně bylo opět jako rozpouštědlo použit 0,5M hydroxid sodný, ale nyní o značně nižší koncentraci, což signifikantně ovlivnilo vlastnosti i chování produktů. Tyto filmy byly připravovány s různým obsahem keratinu (0,11 až po 0,33 g keratinu na 1g kompozitu). U produktů s obsahem 0,11 až 0,19 g keratinu na 1 g kompozitu byla viditelná homogenita jak povrchu tak i složení, což se nezdařilo u PVAK3 s 0,38 g keratinu, u něhož došlo k agregaci proteinu (Obrázek 25). Všechny filmy byly ohebné a vykazovaly pevnost, soudržnost tvaru, ale jejich nevýhodou byla nízká elasticita, která by se zvýšila přidáním změkčovadel. PVAK3, PVAK4, PVKA5, PVKA6 byly nejlepšími připravenými kompozitními filmy v této diplomové práci (Tabulka 6).





Obrázek 25 Vybrané vzorky keratin-PVA filmů: a) PVAK4 – 4 hm. % PVA + 0,5M NaOH + 19 % keratin, b) PVAK3 – 4 hm. % PVA + 0,5M NaOH + 31 % keratin, druhá část fotky obsahuje ukázkou ohebnosti filmu

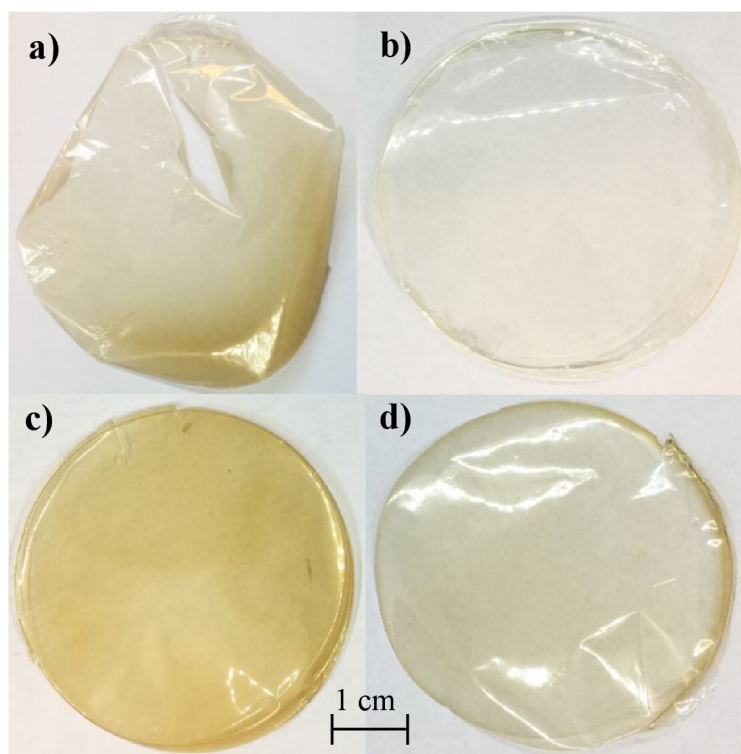
Za účelem další modifikace filmů, bylo provedeno síťování kompozitních filmů. Filmy byly po vysušení ponořeny po dobu 5 min do roztoku se síťovacími činidly (glycerol, glutaraldehyd, fosfátový pufr). Jejich pevnost se snížila a staly se více ohebné a tvarovatelné. Jejich povrch měl kožovitý charakter, který disponoval velmi zajímavými vlastnostmi, jimiž by bylo vhodné se dále ve výzkumu zabývat. Nedostatkem produktů bylo zvlnění v průběhu sušení, což by mohly zlepšit procesní úpravy nebo pomalé sušení ve vlhkém prostředí při mírných teplotách (Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.).



Obrázek 26: Vybraný vzorek keratin-PVA filmu po přidání síťovacích činidel: PVAK4 – 4 hm. % PVA + 0,5M NaOH + 19 % keratin

### *Keratin-chitosanový film*

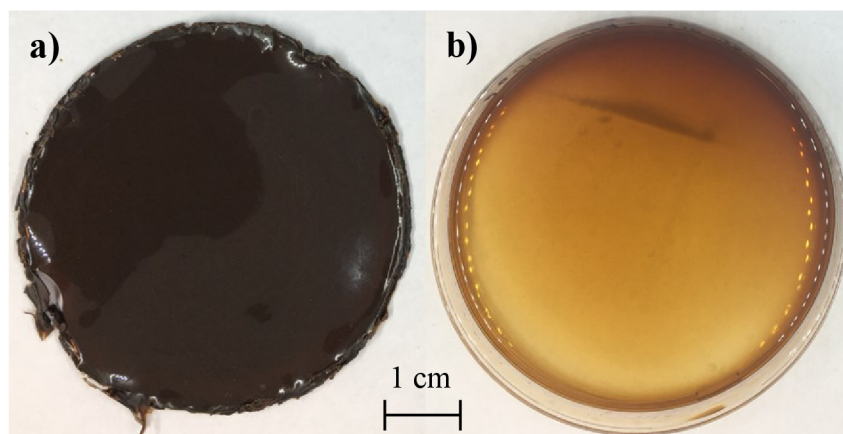
Keratin-chitosanové filmy byly připravovány ve dvou objemech 75% kyseliny octové (25 a 50 ml). Filmy s menším objemem kyseliny byly velmi tenké a lehce protržitelné. Po zvýšení množství kyseliny došlo k zvýšení pevnosti filmu. Při přípravě byly měněny koncentrace jak keratinu tak i chitosanu, bohužel všechny produkty byly značně křehké, což jde vysvětlit silnou krystalinitou. Zlepšení viskoelastických vlastností by mohlo být vyřešeno přidavkem změkčovadla. Homogenita filmu byla ovlivněna sušením, proud vzduchu musel být konstantní po celém povrchu filmu (Obrázek 27).



Obrázek 27: Vybrané vzorky keratin-chitosanových filmů: a) CHK1 – 0,5 hm. % chitosan + 25 ml 75% kyselina octová + 44 % keratin, b) CHB1 – 0,5 hm. % chitosan + 50 ml 75% kyselina octová, c) CHK4 – 0,5 hm. % chitosan + 50 ml 75% kyselina octová + 67 % keratin, d) CHK3 – 0,5 hm. % chitosan + 50 ml 75% kyselina octová + 44 % keratin

### *Film z keratinu a kyseliny citronové*

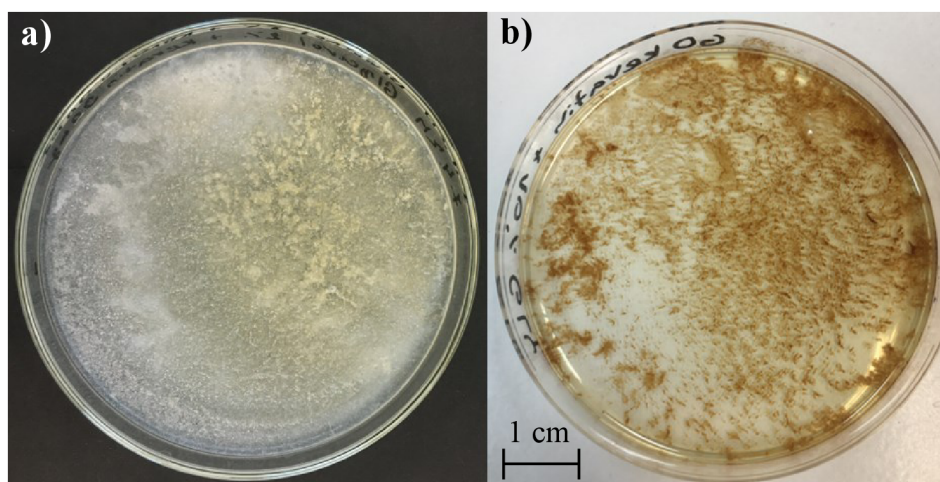
Filmy s kyselinou citronovou byly nejdříve připraveny v poměru 3:2 (keratin : kyselina citronová). Takto zhotovené produkty byly značně lámavé a jejich zlomy byly velmi ostré, což mohlo být způsobeno vysokou krystalinitou a koncentrací keratinu. Další filmy byly připravovány s přidavkem změkčovadla (glycerolu). Filmy s 10 hm. % glycerolu ani po čtyřech dnech sušení neztuhly, což mohlo způsobilo vysoké množství změkčovadla, díky kterým je polymerní matrice mobilnější. Následně i při snížení množství keratinu nebo plastifikátoru byl film velmi křehký. Dalšími vlastnostmi filmu byla homogenita hladký a lesklý povrch (Obrázek 28).



Obrázek 28: Vybrané vzorky filmů z keratinu a kyseliny citronové: a) KKC1 – 60 % keratin + 1,18 g kyselina citronová + 15ml destilované vody, b) KKC7 – 24 % keratinu + 1,77g kyseliny citronové + 15 ml destilované vody + 10 hm. % glycerolu

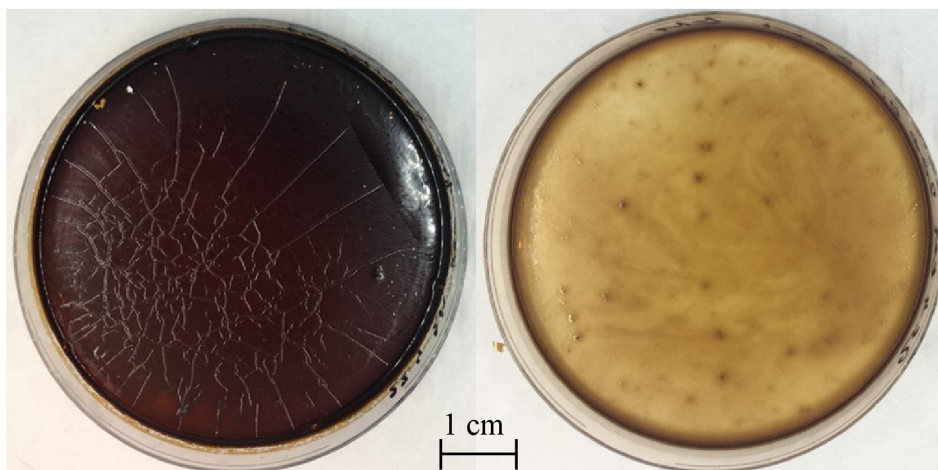
#### *Keratin-glycerolový, keratin-sorbitolový a keratin-citrofolový film*

Keratin-glycerolové filmy byly připravovány s hydroxidem sodným (2M). Tato koncentrace po vysušení filmu způsobovala vysrážení soli na povrchu filmu. Velké množství glycerolu způsobovala neúplné zatuhnutí produktu. Poté se filmy připravovaly s rozpouštědlem ve formě 50% kyseliny octové, která ve spojení s jakoukoli koncentrací glycerolu způsobovala to, že nedocházelo k vyschnutí kapaliny pro vytvoření filmu. V kyselině také docházelo k agregaci keratinu (Obrázek 29).



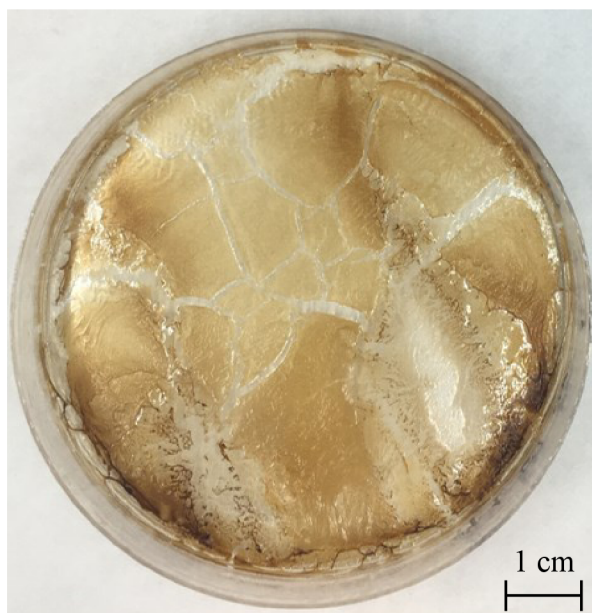
Obrázek 29: Vybrané vzorky keratin-glycerolových filmů: a) KG1 – 0,5 % keratin + 10 hm. % glycerol + 2M NaOH, b) KG7 – 1,8 % keratin + 10 hm. % glycerol + 50% kyselina octová

Keratin-sorbitolové filmy byly připraveny z důvodu neúspěchu přípravy kerati-glycerolových filmů. Produkty byly připravovány s různým obsahem keratinu i sorbitolu, při čem všechny vykazovaly stejnou míru křehkosti. Při sušení docházelo k popraskání celého kompozitu. Proto bylo v dalších pokusech rapidně sníženo množství keratinu, což způsobilo to, že nedocházelo k zesíťování a na Petriho misce se vytvořil vlhky lepkavý povlak (Obrázek 30).



Obrázek 30: Vybrané vzorky keratin-sorbitolových filmů: a) KS1 – 91 % keratin + 175 mg sorbitol + 50% kyselina octová, b) KS6 – 70 % keratin + 175 mg sorbitol + 50% kyselina octová

Vlastnosti keratin-citrofolových filmů nebyly vyhovující z důvodu nezesíťování, popraskání a agregaci keratinu, proto byly vyřazeny z procesu pro další modifikace (Obrázek 31).



Obrázek 31: Vybraný vzorek keratin-citrofolového filmu: KC1 – 7 % keratin + 5 hm. % citrofol + 50% kyselina octová

## 4.8 Kolorimetrie

Barva připravených filmů byla definována pomocí kolorimetrie, která využívá několika parametrů na číselné vyjádření barevnosti. Pomocí parametru  $L^*$  byla stanovena světlost nebo tmavost filmů (Tabulka 17). PVAB2 film byl průhledný, čemuž odpovídá nejvyšší naměřena světlost 96,77. Měrná světlost u PVA filmů s přidavkem keratinu se snižuje s stoupající koncentrací až do tmavých tónů barev. Nejtmaším kreatin-PVA filmem byl vzorek PVAK3, který obsahoval 31 % sušiny keratinu (Obrázek 25). U chitosanového filmu (CHB1) byla měrná světlost 93,95 (Obrázek 27). Stejně jako u PVAB2 byl film průhledný, ale jeho barva byla ovlivněna chitosanem rozpuštěným v kyselině octové (žlutý nádech). Filmy CHK5 a CHK6 s vyšším obsahem chitosanu (1 %) byly dle naměřených hodnot o pár řádu tmavší, oproti filmům CHK3 a CHK4 s nižším množstvím chitosanu (0,5 %). Nejtmaším filmem byl pak s kyselinou citronovou, jehož měrná světlost dosahovala hodnoty 17,08, čemuž odpovídá i nejnižší hodnota u odstínu  $h^*$  45,23 (Obrázek 28). Tento kompozit obsahoval nejvyšší množství keratinu, což odpovídá přidavku 36 % sušiny. Nejvyšší pestrost  $C^*$  měl film PVAK3, který disponoval 0,375 g keratinu, jeho barva byla přecházela z teple červených až do hnědých tónů barev.

Tabulka 17: Naměřené a vypočtené hodnoty pro kolorimetrické stanovení

Vzorek	Tloušťka filmu	$C^*$	$h^*$ [°]	$L^*$	$a^*$	$b^*$	Barva
PVAB2	86,2	0,40	52,88	96,77	0,28	0,28	
PVAK3	146,8	55,81	66,18	43,15	22,56	51,03	
PVAK4	127,6	43,01	73,85	66,91	12,12	41,25	
PVAK6	126,2	31,05	77,00	78,48	7,09	30,23	
CHB1	46,7	7,67	91,39	93,95	-0,18	7,66	
CHK3	30,2	13,64	82,46	89,18	1,79	13,52	
CHK4	41,1	27,84	80,17	80,19	4,76	27,43	
CHK5	54,6	21,14	82,04	85,09	2,91	20,93	
CHK6	71,1	39,25	77,66	76,51	8,43	38,33	
KKC8	338,5	39,21	45,23	17,08	25,21	29,01	

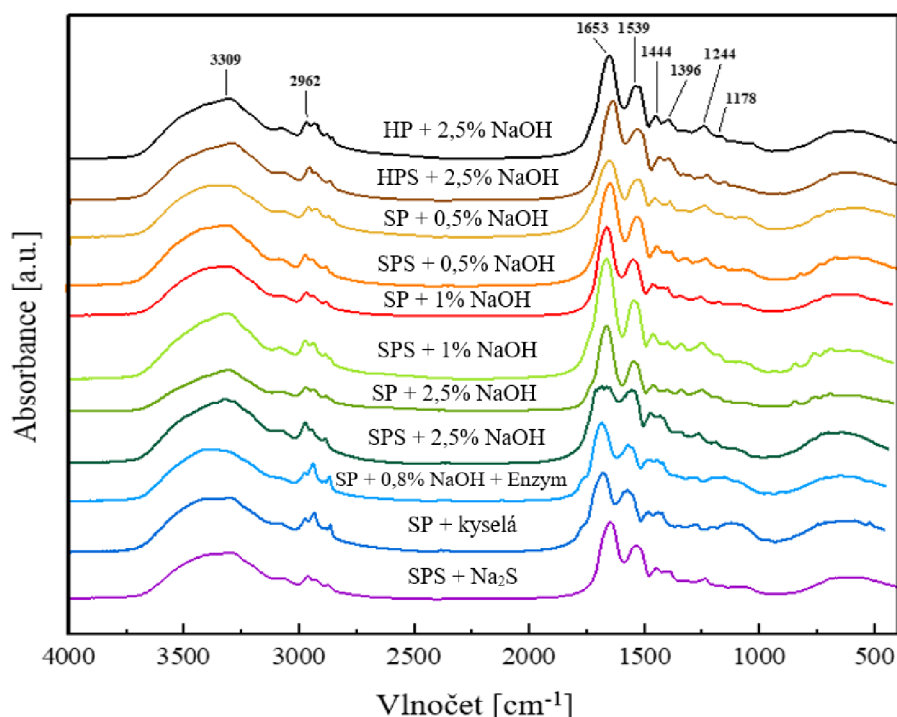
$L^*$  – měrná světlost, která nám určuje, zda se jedná o barvu světlou či tmavou,  $a^*$  – osa, na které se nachází barvy od zelené po červenou,  $b^*$  – osa, na které se nachází barvy od modré po žlutou, chroma  $C^*$  – vyjadřuje pestrost barvy, odstín  $h^*$  – je určen úhlem

PVAB2 – film z čistého PVA, PVAK6 – 4 hm. %PVA + 0,5M NaOH + 10 % keratinu, PVAK4 – 4 hm. %PVA + 0,5M NaOH + 19 % keratinu, PVA3 – 4 hm. %PVA + 0,5M NaOH + 31 % keratinu, CKB1 – film z čistého chitosanu + 50 ml 75% kyseliny octové, CHK3 – 0,5% chitosan + 50 ml 75% kyseliny octové + 44 % keratin, CHK4 – 0,5% chitosan + 50 ml 75% kyseliny octové + 67 % keratin, CHK5 – 1% chitosan + 50 ml 75% kyseliny octové + 29 % keratin, CHK6 – 1% chitosan + 50 ml 75% kyseliny octové + 50 % keratin, KKC8 – 1,77 g kyseliny citronové + 2 hm. % glycerol + 36 % keratinu

## 4.9 Charakterizace keratinu pomocí FTIR

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) byla použita pro naměření spekter extrahovaného keratinu v oblasti 400 až 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Ve spektru (Obrázek 32) jsou zobrazeny charakteristické absorpční píky, které náleží peptidovým vazbám.

Široký absorpční pás v rozmezí od 3000 až do 3600  $\text{cm}^{-1}$  náleží valenčním vibracím hydroxylových skupin. Tzv. amidy I souvisejí hlavně s valenčními vibracemi vazeb u  $\text{C}=\text{O}$ , jsou značně užitečné pro stanovení sekundární struktury proteinu. Amidy I byly detekovány v pásu od 1700 až do 1665  $\text{cm}^{-1}$ , v němž vykazovaly silnou intenzitu odezvy. Amidy II byly detekovány v oblasti kolem 1540  $\text{cm}^{-1}$  a vykazovaly silnou intenzitu signálu. Tato oblast náleží deformačním vibracím  $\text{N}-\text{H}$  a  $\text{C}-\text{H}$ . Pásky nacházející se kolem 1440 až 1220  $\text{cm}^{-1}$  jsou charakteristické pro amidy III. V této oblasti dochází k valenčním vibracím  $\text{C}-\text{N}$  a  $\text{C}=\text{O}$ . Detekovaná hodnota vlnočtu 1178  $\text{cm}^{-1}$  byla přiřazena sekundárním aminům, tato oblast náleží valenčním vibracím se středně intenzivní odezvou. Pás při 533  $\text{cm}^{-1}$  odpovídá síťující se sulfidové skupině ( $\text{S}-\text{S}$ ) [92, 97, 98, 99].



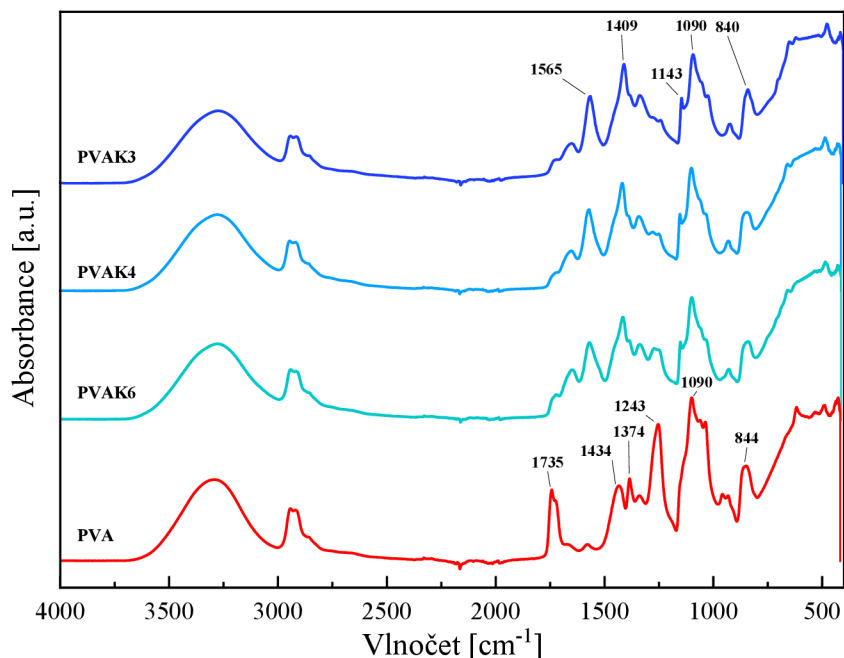
Obrázek 32: *FTIR spektra keratinů izolovaných různými typy hydrolyz: HP– husí peří, SP– slepičí peří, SPS– supernatant z hydrolyzy slepičího peří*

#### 4.10 FTIR filmů

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) byla použita pro naměření spekter PVA filmu a keratin-PVA filmů v oblasti 400 až 4000  $\text{cm}^{-1}$  (Obrázek 33). U filmů z čistého PVA byl detekován vlnčet 1735  $\text{cm}^{-1}$ , který odpovídá valenčním vibracím u karbonylové skupiny ( $\text{C}=\text{O}$ ). Píky v rozmezí vlnočtu 1374 až 1434  $\text{cm}^{-1}$  jsou charakteristické pro alkoholové skupiny, které vykazují silnou intenzitu signálu. V této oblasti dochází k deformačním vibracím dané skupiny. Vlnčet 1243  $\text{cm}^{-1}$  náleží valenčním vibracím  $\text{C}-\text{H}$ . Detekovaná hodnota vlnočtu 1090  $\text{cm}^{-1}$  byla přiřazena  $\text{C}-\text{O}$ , tato oblast odpovídá valenčním vibracím se středně intenzivní odezvou. Pás při 844  $\text{cm}^{-1}$  přísluší vazbě  $\text{C}-\text{C}$  [100, 101, 102].

U keratin-PVA filmů došlo k poklesu intenzity signálu u všech filmů bez ohledu na koncentraci keratinu v daném produktu. Pík s hodnotou vlnočtu 1565  $\text{cm}^{-1}$  odpovídá amidům II, které vykazují silnou intenzitu signálu. Tato oblast náleží deformačním vibracím

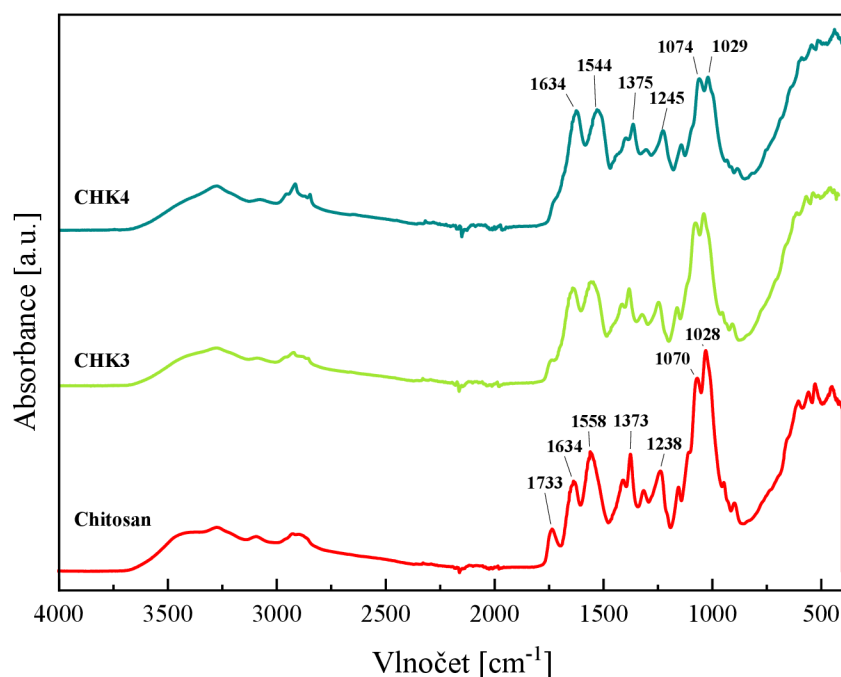
N–H a C–H. Pásky nacházející se kolem 1440 až 1220  $\text{cm}^{-1}$  jsou charakteristické pro amidy III. Vlnočet 1143  $\text{cm}^{-1}$  byl přiřazen k vazbě C–O, tato oblast náleží valenčním vibracím se středně intenzivní odezvou. Absorpční píky 1090 a 844  $\text{cm}^{-1}$  se shodují s filmem z čistého PVA [100, 102].



Obrázek 33: **FTIR spektra PVA filmu a keratin-PVA filmů:** PVA – 4 hm. % PVA + 0,5M NaOH, PVAK6 – 4 hm. % PVA + 0,5M NaOH + 10 g keratinu, PVAK4 – 4 hm. % PVA + 0,5M NaOH + 19 % keratinu, PVAK3 – 4 hm. % PVA + 0,5M NaOH + 31 % keratinu

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) byla použita pro naměření spekter chitosanového filmu a keratin-chitosanových filmů (Obrázek 34). U filmů z čistého chitosanu byla detekována karboxymethylová skupina, která byla přiřazena k vlnočtu 1733  $\text{cm}^{-1}$ . Přítomnost této skupiny je pravděpodobně zapříčiněna nízkou dekarboxylací chitinu při výrobě chitosanu. Přítomnost zbytků N-acetylové skupiny byla potvrzena vlnočtem 1634  $\text{cm}^{-1}$ , které odpovídají valenčním vibracím u karbonylové skupiny (C=O). Pík s hodnotou vlnočtu 1585  $\text{cm}^{-1}$  odpovídá amidům II, které vykazují silnou intenzitu signálu. Tuto oblast charakterizuje deformačním vibracím N–H a C–H. Pík vlnočtu 1373  $\text{cm}^{-1}$  byl charakteristický pro alkoholové skupiny, které vykazují silnou intenzitu signálu. V této oblasti dochází k deformačním vibracím dané skupiny. Vlnočet 1238  $\text{cm}^{-1}$  náleží valenčním vibracím C–H. Detekované hodnoty vlnočtu 1070 a 1028  $\text{cm}^{-1}$  byly přiřazeny skupině C–O, tato oblast odpovídá valenčním vibracím se silnou intenzivní odezvou [103].

Spektra keratin-chitosanových filmů se výrazně nelišila od spektra filmu z čistého chitosanu. Nejvýraznější odlišností byla absence píku 1733  $\text{cm}^{-1}$  ve spektrech kompozitních filmů. Dále se snížila intenzita signálů u směsných filmů.



Obrázek 34: **FTIR spektra chitosanového filmu a keratin- chitosanových filmů:**

Chitosan – 0,5 hm. % chitosan +50 ml 75% kyseliny octové, CHK3 – 0,5 hm. % chitosan +50 ml 75% kyseliny octové + 50 mg keratinu, CHK4 – 0,5 hm. % chitosan +50 ml 75% kyseliny octové + 125 mg keratinu

#### 4.11 TGA

Termální stabilita extrahovaných keratinů a peří byla analyzována (hodnocena) pomocí termogravimetrické analýzy. Z termogramů zobrazených na obrázku 35 byly získány teploty počátku tepelné degradace ( $T_{\text{onset}}$ ), teplota maximální degradace ( $T_{\text{max}}$ ) a byla odečtena zbytková hmotnost vzorku při teplotě 600 stupňů Celsia ( $m_{\text{rest}}$ ). Termální stabilita peří byla přibližně o 40 °C vyšší než u izolovaných keratinů. Slepičí peří mělo o 7 °C vyšší tepelnou stabilitu než peří husí a jeho  $T_{\text{onset}}$  byl stanoven na 239 °C. Naměřený počátek tepelné degradace je v souladu se studii, které analyzovaly tepelnou stabilitu drůbežího peří. V případě vzorků husího i slepičího peří neprobíhala termální degradace jednokrokově a nebylo tudíž možné přesně určit  $T_{\text{max}}$  ani  $m_{\text{rest}}$  [92, 104, 105].

Z izolovaných keratinů měl jednoznačně nejvyšší  $T_{\text{onset}}$  vzorek supernatantu po alkalické hydrolýze (215 °C). To mohlo být způsobeno výrazně rozdílným charakterem v porovnání s ostatními vzorky keratinů. Keratin získaný alkalickou hydrolýzou 2,5% NaOH měl spolu s keratinem z enzymatické hydrolýzy nejnižší  $T_{\text{onset}}$ , ale jeho  $T_{\text{max}}$  bylo až při 318 °C, tedy tepelná degradace probíhala pozvolněji než u ostatních keratinových vzorků. Studie zabývající se izolací keratinu z peří uvádí rozdílné údaje. Ve studii analyzující keratin izolovaný pomocí sulfidu sodného byla zaznamenána výrazně nižší tepelná stabilita,  $T_{\text{onset}}$  61 °C a  $T_{\text{max}}$  158 °C. Další studii porovnávající různé extrakční činidla (merkptoethanol, sulfid sodný a SDS) uvádí  $T_{\text{onset}}$  215 °C a  $T_{\text{max}}$  316 °C. Nicméně vzorky keratinů izolované pomocí dalších zmíněných extrakčních činidel měly výrazně nižší termální stabilitu, z čehož vyplývá, že použitý způsob izolace má na tepelnou stabilitu vliv, což je v souladu s našimi výsledky [92, 105].



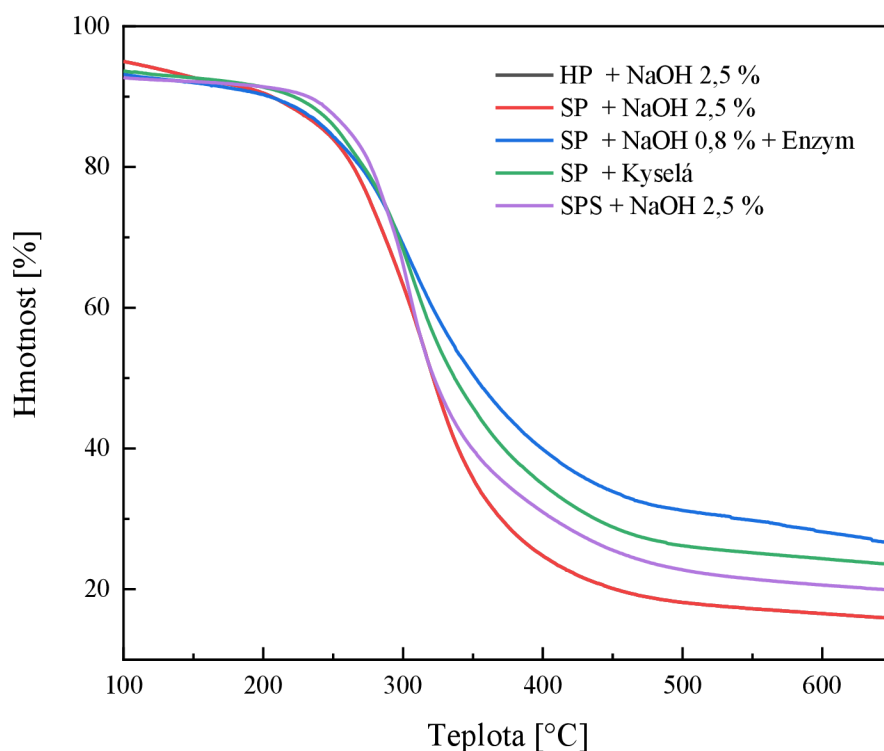
Tepelná degradace je spojena s denaturací struktury  $\beta$ -listu a destrukcí vazeb v peptidovém řetězci. Dochází k chemickým reakcím, které rozkládají keratin na lehčí produkty a těkavé sloučeniny jako jsou  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{HCN}$  a  $\text{H}_2\text{O}$  [106].

$M_{\text{rest}}$  byly zaznamenána v rozmezí 16 až 28 % což odpovídá údajům ze studie. V dalších studiích byly ovšem publikovány výrazně vyšší hodnoty (72 % Monthé, 62 % Sarma). Vysoká zbytková hmotnost je vysvětlována přítomností anorganických sloučenin použitých při izolaci ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) [92, 104, 105].

Tabulka 18: Výsledky TGA analýzy vzorků keratinu získaných z jednotlivých typů hydrolyz

Vzorek	$T_{\text{onset}}$ [°C]	$T_{\text{max}}$ [°C]	$m_{\text{rest}}$ při 600 °C [%]
HP	231,81	–	–
SP	239,01	–	–
HP + NaOH 2,5 %	190,05	307,83	16,67
SP + NaOH 2,5 %	182,28	318,07	16,53
SPS + NaOH 2,5 %	215,47	303,83	20,59
SP + NaOH 0,8% + Enzym	182,28	302,37	28,15
SP + Kyselá	190,75	304,98	24,34

HP – husí peří, SP – slepičí peří, SPS – supernatant z hydrolyzy slepičího peří,  $T_{\text{onset}}$  – začátek degradace,  $T_{\text{max}}$  – teplota, při které dochází k největšímu poklesu hmotnosti vzorku,  $m_{\text{rest}}$  – zbytková hmotnost vzorku po spálení při 600 °C



Obrázek 35: TGA analýza izolovaného keratinu: HP + NaOH 2,5% – husí peří hydrolyzované v 2,5% NaOH, SP + NaOH 2,5% – slepičí peří hydrolyzované v 2,5% NaOH, SPS+ NaOH 2,5% – supernatan tslepičího peří získaný při hydrolyze v 2,5% NaOH, SP + NaOH 0,8% + Enzym – slepičí peří hydrolyzované v 0,8% NaOH a proteázy, SP + kyselá – slepičí peří hydrolyzované v 1M kyselině sírové

#### 4.12 Termální vlastnosti peří a keratinu

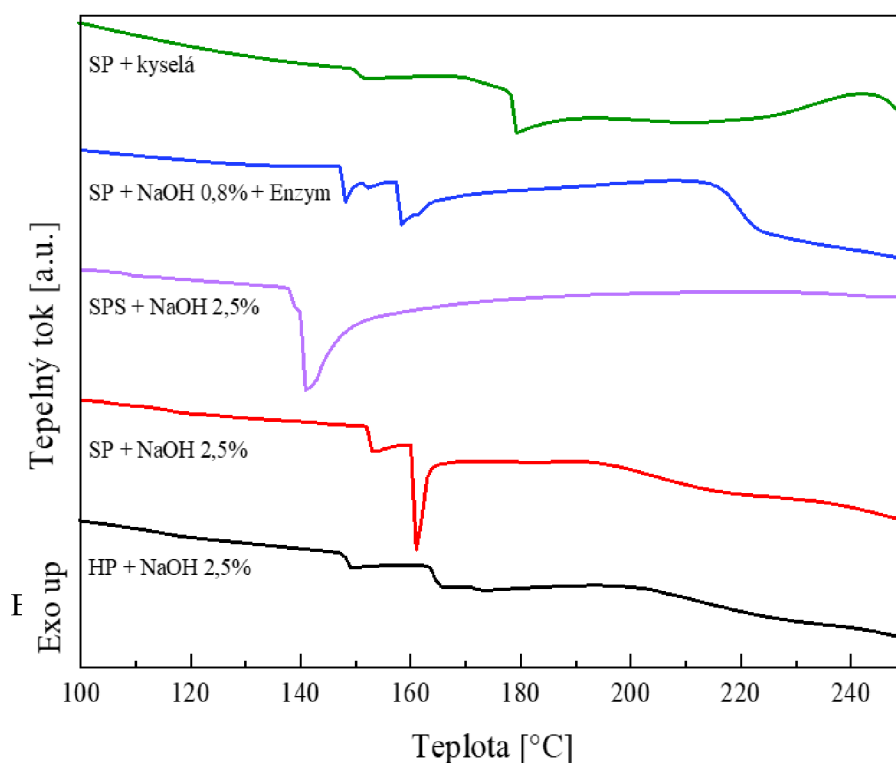
DSC je nejběžnější termální technika, která zaznamenává teplo absorbované nebo uvolněné během různých přechodových stavů ve vzorku během termální analýzy. DSC termogram keratinu je zobrazen na obrázku 36. Z termogramů neizotermické DSC byly získány teploty skelného přechodu ( $T_g$ ), teploty tání ( $T_m$ ) a entalpie tání ( $\Delta H_m$ ).

U obou druhů peří proběhlo tání ve třech krocích (Tabulka 19), přičemž  $\Delta H_m$  závěrečných termálních jevů bylo nejmarkantnější. Teplota skelného přechodu izolovaných keratinů byla detekována v rozmezí 146 až 153 °C. Stejně jako v případě TGA se výrazněji lišil pouze vzorek supernatantu, u kterého proběhl skelný přechod už při 109 °C,  $T_m$  byla 140 °C a tento vzorek měl nevyšší hodnotu entalpie tání. Druhou nejvyšší hodnotu  $\Delta H_m$  měl vzorek keratinu získaného pomocí 2,5% NaOH. V dostupné literatuře byly  $T_m$  nalezeny v rozsahu 170 až 215 °C, keratin izolovaný v této práci měl tedy  $T_m$  mírně nižší [92, 104].

Tabulka 19: Výsledky DSC analýzy vzorků peří a keratinu získaných z jednotlivých typů hydrolyz

Vzorek	$T_g$ [°C]	$T_m$ [°C]	$\Delta H_m$ [J·g <sup>-1</sup> ]
HP	–	171,58	0,607
	–	178,56	0,497
	–	226,73	11,400
SP	–	152,76	2,538
	–	170,31	4,234
	–	221,09	8,277
HP + NaOH 2,5 %	152,70	161,03	3,139
SP + NaOH 2,5 %	147,12	164,07	8,057
SPS + NaOH 2,5 %	108,76	140,15	67,680
SP + NaOH 0,8 % + Enzym	149,99	177,81	6,294
SP + Kyselá	146,75	156,69	5,769

HP – husí peří, SP – slepičí peří, SPS – supernatant z hydrolyzy slepičího peří,  $T_g$  – teplota skelného přechodu,  $T_m$  – teplota tání,  $\Delta H_m$  – entalpie tání



Obrázek 36: **DSC analýza izolovaného keratinu:** HP + NaOH 2,5% – husí peří hydrolyzované v 2,5% NaOH, SP + NaOH 2,5% – slepičí peří hydrolyzované v 2,5% NaOH, SPS+ NaOH 2,5% – supernatan tslepičího peří získaný při hydrolyze v 2,5% NaOH, SP + NaOH 0,8% + Enzym – slepičí peří hydrolyzované enzymaticky a alkalickou předúpravou

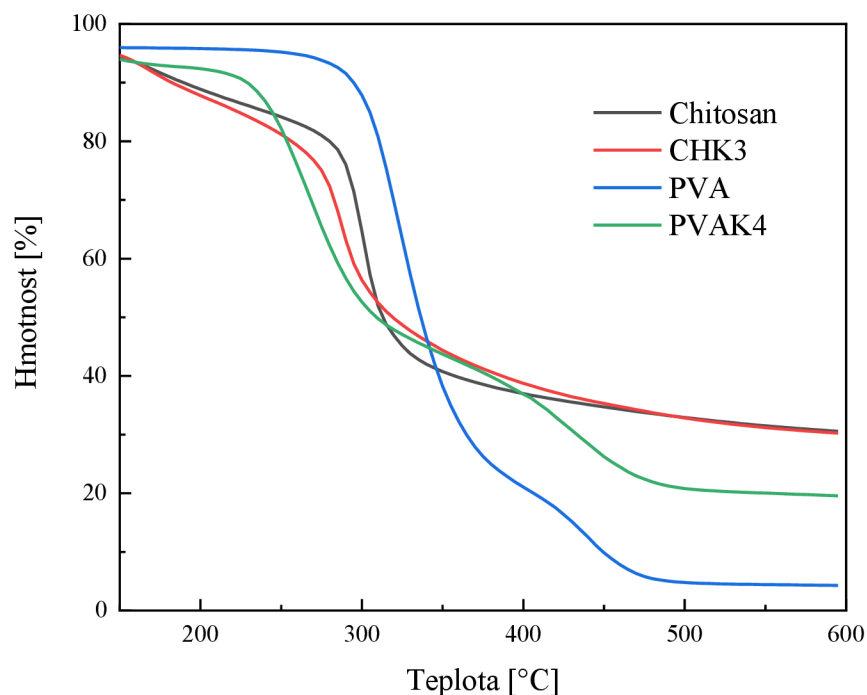
#### 4.13 TGA filmů

Byl analyzován vliv keratinu na termální vlastnosti kompozitních filmů připravených z PVA nebo chitosanu. Přidání keratinu k polymerům vedlo v obou případech ke snížení sledovaných teplot. V případě PVA došlo k výraznému snížení tepelné stability,  $T_{\text{onset}}$  poklesal o 64 °C a  $T_{\text{max}}$  o 56 °C. Podobný trend byl zaznamenán také ve studii El-Kheir a kol, ve které ovšem nebyl pokles tepelné stability tak markantní, nicméně v této práci byl použit keratin izolovaný z vlny. U chitosanových kompozitů měl keratin také negativní vliv i když ne tak velký jako u PVA filmů.  $T_{\text{onset}}$  i  $T_{\text{max}}$  bylo sníženo o 14 °C (Tabulka 20) [107].

Tabulka 20 Výsledky TGA analýzy filmů

Vzorek	$T_{\text{onset}}$ [°C]	$T_{\text{max}}$ [°C]
4% PVA + 0,5M NaOH	265,51	323,19
4% PVA + 19 % K + 0,5M NaOH	201,46	267,34
0,5% Chitosan + 50 ml KO	261,08	300,95
0,5% Chitosan + 44 % K + 50 ml KO	247,59	286,97

K – keratin, KO – kyselina octová



Obrázek 37: TGA analýza kompozitních filmů: Chitosan – 0,5 hm. % chitosan + 50 ml 75% kyseliny octové, CHK3 – 0,5 hm. % chitosan + 50 ml 75% kyseliny octové + 50 mg keratinu, PVA – 4 hm. % PVA + 0,5M NaOH, PVAK4 – 4 hm. % PVA + 0,5M NaOH + 19 % keratinu

#### 4.14 DSC filmů

Výsledky z analýzy DSC měly opačný trend než u TGA, sledované teploty se v důsledku přidání keratinu k polymerům zvýšily (Tabulka 21). Konkrétně u PVA filmů došlo ke zvýšení  $T_m$  o 8 °C, teplota skelného přechodu ovšem nebyla detekována. Tyto výsledky nejsou v souladu s jinými studiemi, kde keratin způsobil mírný pokles  $T_m$ . Kompozity připravené z chitosanu a keratinu měly totožnou  $T_g$ , keratin tedy neměl na skelný přechod vliv, ale teplota tání byla v důsledku přidání keratinu mírně zvýšena a to 4 °C. Tento nárůst je v souladu s výsledky publikovanými v práci Carvalho [107, 109, 110].

Tabulka 21: Výsledky DSC analýzy filmů

Vzorek	$T_g$ [°C]	$T_m$ [°C]	$\Delta H_m$ [J·g <sup>-1</sup> ]
4% PVA + 0,5M NaOH	42,92	186,54	12,24
4% PVA + 19 % K + 0,5M NaOH	–	194,88	5,558
0,5% Chitosan + 50 ml KO	152,23	166,23	2,044
0,5% Chitosan + 44 % K + 50 ml KO	152,36	170,31	4,234

K – keratin, KO – kyselina octová

#### 4.15 Mechanické vlastnosti filmů

Mechanické vlastnosti byly měřeny pouze u keratin-PVA filmů, protože ostatní filmy (keratin-chitosanový, film z keratinu a kyseliny citronové) byly křehké.

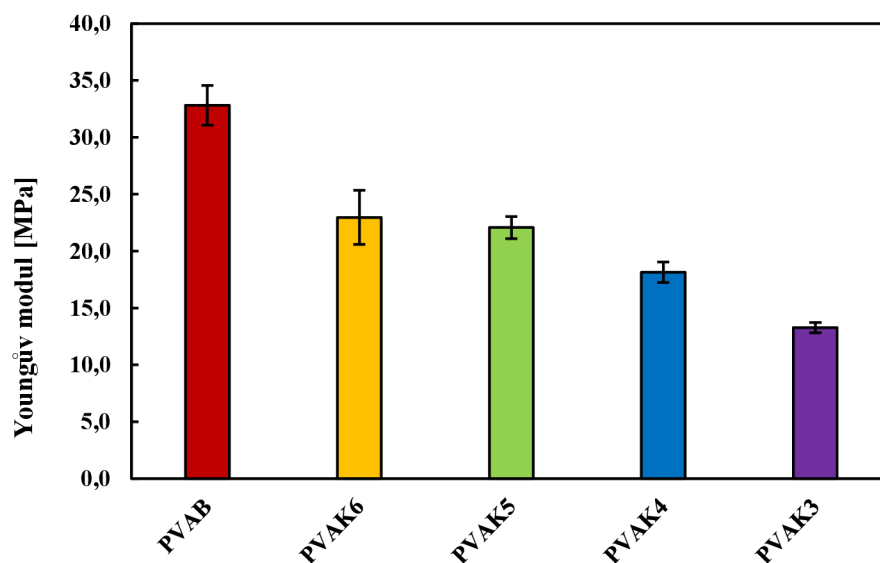
Tabulka 22: Mechnické vlastnosti keratin-PVA filmů

Vzorek filmu	Youngův modul [Mpa]		Pevnost v tahu $\sigma_B$ [Mpa]		Délkové prodloužení při přetržení $\epsilon_B$ [%]	
	Průměr	Směrodatná odchylka	Průměr	Směrodatná odchylka	Průměr	Směrodatná odchylka
PVAB	32,8	1,7	369,5	5,4	150,4	11,0
PVAK6	23,0	2,4	212,7	45,9	173,1	80,4
PVAK5	22,1	1,0	282,0	34,0	175,0	33,7
PVAK4	18,1	0,9	173,2	18,2	254,0	24,4
PVAK3	13,3	0,5	176,5	7,5	136,6	3,0

PVAB – film z čistého PVA, PVAK6 – 4 hm. %PVA + 0,5M NaOH + 10 % kerinu, PVAK5 – 4 hm. %PVA + 0,5M NaOH + 15 % kerinu, PVAK4 – 4 hm. %PVA + 0,5M NaOH + 19 % kerinu, PVA3 – 4 hm. %PVA + 0,5M NaOH + 31 % kerinu

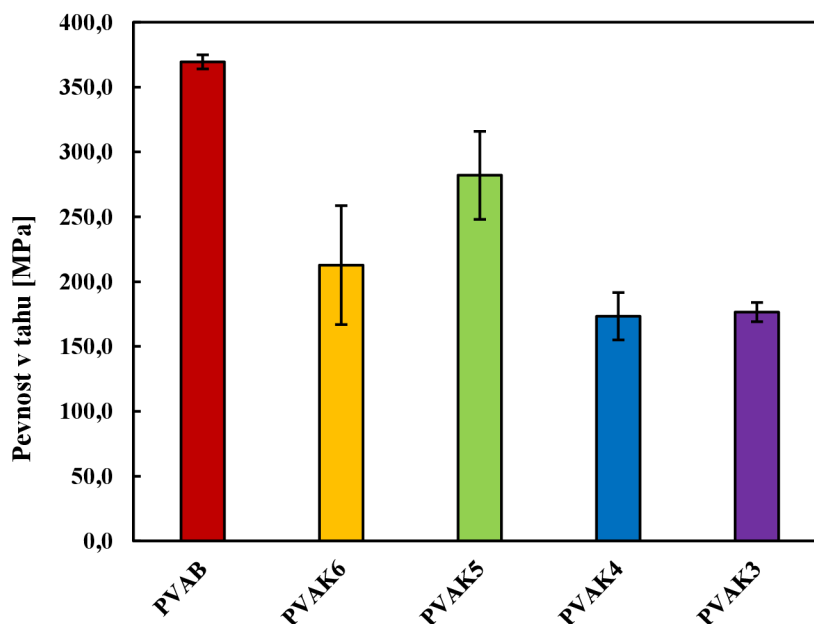
Mezi mechanické vlastnosti patří Youngův modul neboli modul pružnosti, který slouží k vyjádření houževnatosti polymeru. Díky houževnatosti zůstávají filmy při ohýbání a nárazech bez tvorby trhlin a nedochází k přetržení. Další vlastností je pevnost v tahu  $\sigma_B$ , schopnost materiálu odolávat působenému napětí bez poruchy při jeho natahování. Poslední měřená charakteristika filmu bylo délkové prodloužení při přetržení  $\epsilon_B$ , které vyjadřuje celkovou tažnost polymeru.

Naměřená hodnota Youngova modulu klesala v závislosti na koncentraci keratinu v kompozitu (Obrázek 39). Největší houževnatostí disponoval film z čistého PVA, u něhož hodnota modulu pružnosti činila  $32,8 \pm 1,7$  MPa. Mezi vzorkem PVAK6 a PVAK3 byl signifikantní pokles Youngova modulu, a to až 10 MPa, zlom nastává u vzorku PVAK4 s množstvím keratinu 0,188 g. Z naměřených dat vyplývá, že přídavek keratinu zvyšuje možnost tvorby trhlin a protržení daného materiálu. Srovnání Youngova modulu s odborná literatura nebylo možné, protože dostupné publikace se u keratin-PVA kompozitů zabývají pouze pevností v tahu (Tabulka 22).



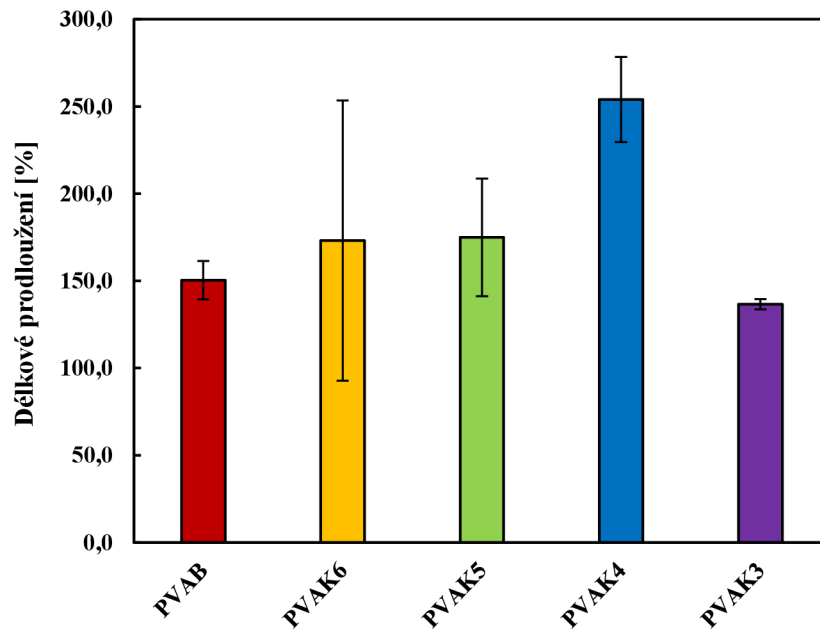
Obrázek 39: *Porovnání průměrných hodnot a směrodatných odchylek Youngova modulu pro polymerní filmy: PVAB – film z čistého PVA, PVAK6 – 4 hm. % PVA + 0,5M NaOH + 10 % keratinu, PVAK5 – 4 hm. % PVA + 0,5M NaOH + 15 % keratinu, PVAK4 – 4 hm. % PVA + 0,5M NaOH + 19 % keratinu, PVAK3 – 4 hm. % PVA + 0,5M NaOH + 31 % keratinu*

Porovnání naměřených hodnot pevností v tahu se nachází na obrázku 39. Nejvyšší pevnost v tahu byla zaznamenána u filmu z čistého PVA, která dosahovala hodnoty  $369,5 \pm 5,4$  MPa. U kompozitních filmů hodnota pevnosti v tahu kolísala v závislosti na dávce keratinu. Nejvyšší pevnost v tahu měl film PVAK5 s hodnotou  $282,0 \pm 34,0$  MPa. Ostatní vzorky měly podstatně nižší a téměř totožné hodnoty pevnosti v tahu. Naměřené výsledky se shodují s odbornými publikacemi, v nichž dochází k snížení pevnosti v tahu v závislosti na zvyšování množství keratinu (Tabulka 22) [62, 111].



Obrázek 38: *Porovnání průměrných hodnot a směrodatných odchylek meze pevnosti v tahu: PVAB – film z čistého PVA, PVAK6 – 4 hm. % PVA + 0,5M NaOH + 10 % keratinu, PVAK5 – 4 hm. % PVA + 0,5M NaOH + 15 % keratinu, PVAK4 – 4 hm. % PVA + 0,5M NaOH + 19 % keratinu, PVAK3 – 4 hm. % PVA + 0,5M NaOH + 31 % keratinu*

Třetí analyzovanou mechanickou vlastností bylo délkové prodloužení při přetržení  $\epsilon_B$  (Tabulka 22). Z této analýzy mechanických vlastností vyplývá, že keratin způsobil zlepšení délkového prodloužení a to v závislosti na dávce až do 0,188 g keratinu, po překročení této hranice už byl efekt keratinu negativní. V případě vzorku PVAK4 bylo dosaženo zlepšení délkového prodloužení o 254 % (Obrázek 40).



Obrázek 40: Porovnání průměrných hodnot a směrodatných odchylek délkového prodloužení při přetržení  $\epsilon_B$ : PVAB – film z čistého PVA, PVAK6 – 4 hm. % PVA + 0,5M NaOH + 10 % keratinu, PVAK5 – 4 hm. % PVA + 0,5M NaOH + 15 % keratinu, PVAK4 – 4 hm. % PVA + 0,5M NaOH + 19 % keratinu, PVAK3 – 4 hm. % PVA + 0,5M NaOH + 31 % keratinu

## 5 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala izolací keratinu z drůbežního peří. Cílem práce bylo zaměřeni se na hledání možností využití peří, které je produkováno jako odpad v potravinářském průmyslu. V dnešní době tento odpad nemá žádné následné využití a je spalován. V práci byly hodnoceny možnosti následného využití peří a to k vytvoření kompozitních filmů, které by mohly být uplatnitelné jako materiál potravinových obalů. V tomto segmentu se hojně využívají obaly na bázi ropy, které po ukončení jejich funkčnosti značně zatěžují životní prostředí a problematická je i jejich recyklace. Jejich nahrazení materiály z obnovitelných zdrojů je důležitý krok k vybudování udržitelné ekonomiky, která bude šetrná k životnímu prostředí.

Experimentální část se nejprve zabývala izolací keratinu z odpadního peří. Byly provedeny čtyři druhy hydrolyz, při nichž se využíval hydroxid sodný, sulfid sodný, kyselina sírová a enzymatická s alkalickou předúpravou. Nejvyšší účinnost na izolaci keratinu měla hydrolyza s využitím 0,5% hydroxidu sodného, u níž byla stanovena výtěžnost na necelých 50%. Získaný keratin byl charakterizován pomocí polyakrilamidové gelové elektroforézy, bylo zjištěno, že použité metody izolace vedly k získání keratinu s velmi malou molekulovou hmotností, nižší než 15 kDa. Dále byla k analýze využita infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací, naměřená FTIR spektra se shodovala s dříve publikovanými spektry izolovaného keratinu. U peří a izolovaného keratinu byly analyzovány termální vlastnosti pomocí DSC a TGA. Keratin izolovaný pomocí 2,5% NaOH měl nejvyšší hodnotu  $\Delta H_m$ . Analyzovaný keratin izolovaný v této práci měl mírně nižší  $T_m$  než se uvádí v literatuře. Metodou TGA bylo stanoveno, že termální stabilita peří byla přibližně o 40 °C vyšší než u izolovaných keratinů. Druhá část práce se věnovala přípravě kompozitních filmů z izolovaného keratinu ve směsi s polyvinyl alkoholem, chitosanem a kyselinou citronovou. Vlastnosti filmů byly modifikovány pomocí změn v poměrech látek nebo přidáním síťovací činidel. Modifikace se prováděly z důvodu vysoké krystalinity filmů. Charakterizace keratinu i kompozitních filmů s přidáním PVA a chitosanu byla provedena pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací, DSC a TGA. Porovnáním FTIR spekter čistých polymerů PVA a chitosanu s jejich keratinovými kompozity, bylo zjištěno, že přídavek keratinu způsobil změnu charakteru spektra. Pomocí metod termální analýzy byl analyzován dopad přídavku keratinu k polymerům, který vedl k snížení tepelné stability, ale zároveň k mírnému zvýšení teploty tání.

Tato diplomová práce poukázala na možnosti využití odpadního drůbežního peří pro výrobu obalového materiálu na bázi keratinu. Do budoucna by bylo možné taky prověřit možnosti využití v bioinženýrství za účelem přípravy skafoldů pro tkáňové inženýrství. Tyhle aplikační možnosti jsou hojně zastoupeny i v literatuře.

Zaměřeni se na keratin-chitosanové filmy bylo vybráno na základě odborné literatury, která uvádí aplikaci tohoto kompozitu například v oblasti regenerace nervů. Dále si keratin získal obrovskou pozornost jako scaffold pro tkáňové inženýrství, který disponuje pomalou degradací a antibakteriálními vlastnostmi, které jsou způsobeny přítomností chitosanu. Kompozitní film z keratinu a chitosanu podporuje uchycení a proliferaci fibroblastů, což poukazuje na to, že tento film může být vhodným substrátem pro savčí buněčné kultury. U keratin-chitosanových filmů byla ověřována účinnost na inhibici růstu gram-negativních bakterií, při níž byla zjištěna schopnost potlačit růst bakterie *Micrococcus luteus*.



Spojení keratinu a PVA se v odborné literatuře, nejčastěji věnuje v souvislosti s tvorbou scaffoldů pro tkáňové inženýrství. U keratin-PVA filmů byly prováděny modifikace různým obsahem keratinové sušiny. Pro vhodné vlastnosti bylo určeno hraniční množství keratinu o 19 %, u vyššího množství docházelo k agregaci keratinu a film vykazoval výrazné zhoršení mechanických vlastností. Bylo zjištěno, že Youngův modul a pevnost v tahu se s přidavkem keratinu snižuje oproti filmu z čistého PVA, ale za to délka prodloužení se u vzorku PVAK 4 oproti filmu z PVA zvýšila o necelých 100 %.

Pro aplikaci keratinových filmů v oblasti obalových materiálů by muselo dojít k provedení dalších modifikací, aby kompozitní filmy získaly lepší mechanické vlastnosti a byly odolnější vůči vlhkosti.

## 6 LITERATURA

- [1] Omezení dopadu některých plastových výrobků na životní prostředí. *Evropský parlament* [online]. Štrasburk: Evropský parlament, 2018 [cit. 2022-05-04]. Dostupné z: [https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/TA-8-2018-0411\\_CS.html](https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/TA-8-2018-0411_CS.html)
- [2] TEFAYE, Tamrat, Bruce SITHOLE a Deresh RAMJUGERNATH. Valorisation of chicken feathers: a review on recycling and recovery route—current status and future prospects. *Clean Technologies and Environmental Policy*. 2017, 19(10), 2363-2378. ISSN 1618-954X. Dostupné z: doi:10.1007/s10098-017-1443-9
- [3] REDDY, Narendra. Non-food industrial applications of poultry feathers. *Waste Management*. 2015, 45, 91-107. ISSN 0956053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.wasman.2015.05.023
- [4] MAREK, Miroslav a Michal VOLDŘICH. ODPADY Z POTRAVINÁŘSKÝCH VÝROB V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ [online]. 31. 1. 2006 [cit. 2022-02-07]. Dostupné z: [http://www.phyotosanitary.org/projekty/2005/vvf\\_07\\_2005.pdf](http://www.phyotosanitary.org/projekty/2005/vvf_07_2005.pdf)
- [5] KIZLINK, Juraj. Odpady: sběr, zpracování, využití, zneškodnění, legislativa. 3., upr. a rozš. vyd., V Akademickém nakl. CERM 1. vyd. Brno: Akademické nakladatelství CERM, 2014. ISBN 978-80-7204-884-7.
- [6] OBRUČA, Stanislav. Valorizace odpadů potravinářského průmyslu. Brno, 2015. Zkrácená verze habilitační práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [7] Towards the future we want: End of hunger and make the transition to sustainable agricultural and food systems. Food and agriculture organization of the United Nations, Rome, 2012.
- [8] MIRABELLA, N., V. CASTELLANI a S. SALA. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Jurnal of Cleaner Production*. 2014, roč. 65, s. 28-41.
- [9] GIRARD, Audrey L. a Joseph M. AWIKA. Effects of edible plant polyphenols on gluten protein functionality and potential applications of polyphenol–gluten interactions. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2020, 19(4), 2164-2199. ISSN 1541-4337. Dostupné z: doi:10.1111/1541-4337.12572
- [10] MORDENTI, Attilio Luigi, Elisa GIARETTA, Luca CAMPIDONICO, Paola PARAZZA a Andrea FORMIGONI. A Review Regarding the Use of Molasses in Animal Nutrition. *Animals*. 2021, 11(1). ISSN 2076-2615. Dostupné z: doi:10.3390/ani11010115
- [11] BARUKČIĆ, Irena, Katarina LISAK JAKOPOVIĆ a Rajka BOŽANIĆ. Valorisation of Whey and Buttermilk for Production of Functional Beverages – An Overview of Current Possibilities. *Food technology and biotechnology*. 2019, 57(4), 448-460. ISSN 13342606. Dostupné z: doi:10.17113/ftb.57.04.19.6460
- [12] SOCAS-RODRÍGUEZ, Bárbara, Gerardo ÁLVAREZ-RIVERA, Alberto VALDÉS, Elena IBÁÑEZ a Alejandro CIFUENTES. Food by-products and food

- wastes: are they safe enough for their valorization?. 2021, 114, 133-147. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2021.05.002
- [13] PEJIN, Jelena, Milos RADOSAVLJEVIC, Olgica GRUJIC, Ljiljana MOJOVIC, Suncica KOCIC-TANACKOV, Svetlana NIKOLIC a Aleksandra DJUKIC-VUKOVIC. Possible application of brewer's spent grain in biotechnology. *Hemijska industrija*. 2013, 67(2), 277-291. ISSN 0367-598X. Dostupné z: doi:10.2298/HEMIND120410065P
- [14] JELÍNEK, Jan a Vladimír ZICHÁČEK. *Biologie pro gymnázia: (teoretická a praktická část)*. 10. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2013. ISBN 978-80-7182-333-9.
- [15] THOMPSON, Mya. Everything You Need To Know About Feathers [online]. 2014 [cit. 2021-12-06]. Dostupné z: <https://academy.allaboutbirds.org/feathers-article/>
- [16] ZICHÁČEK, Vladimír a Vladimír ZICHÁČEK. *Zoologie: (teoretická a praktická část)*. 2., přeprac. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2012. ISBN 978-80-7182-291-2.
- [17] CALLEGARO, Kelly, Adriano BRANDELLI a Daniel Joner DAROIT. Beyond plucking: Feathers bioprocessing into valuable protein hydrolysates. *Waste Management*. 2019, 95, 399-415. ISSN 0956053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.wasman.2019.06.040
- [18] GAISLER, Jiří a Jan ZIMA. *Zoologie obratlovců: (teoretická a praktická část)*. 3., přepracované vydání. Praha: Academia, 2018. ISBN 978-80-200-2702-3.
- [19] KUCHARŤ, Miroslav. *Farmaceutický encyklopedický slovník*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2014. ISBN 978-80-7080-876-4.
- [20] MOKREJŠ, Pavel a Ferdinand LANGMAIER. *Aplikace přírodních polymerů*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008. ISBN 978-80-7318-674-6.
- [21] ZEHNÁLEK, Josef. *Biochemie 2*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003. ISBN 978-80-7157-716-4.
- [22] VRBACKÝ, Rudolf a Vlasta VRBACKÁ. *Technologie výroby kožešin*. 3., přeprac. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN 80-030-0557-4.
- [23] DONATO, Ricardo K. a Alice MIJA. Keratin Associations with Synthetic, Biosynthetic and Natural Polymers: An Extensive Review. *Polymers*. 2020, 12(1). ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12010032
- [24] MEYERS, Marc André, Po-Yu CHEN, Albert Yu-Min LIN a Yasuaki SEKI. Biological materials: Structure and mechanical properties. *Progress in Materials Science*. 2008, 53(1), 1-206. ISSN 00796425. Dostupné z: doi:10.1016/j.pmatsci.2007.05.002
- [25] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [26] QIU, Jingwen, Casper WILKENS, Kristian BARRETT a Anne S. MEYER. Microbial enzymes catalyzing keratin degradation: Classification, structure, function. *Biotechnology Advances*. 2020, 44, 3-6. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2020.107607

- [27] ODSTRČIL, Jaroslav. Biochemie. Vyd. 2., upr. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2005. ISBN 80-701-3425-9.
- [28] WANG, Bin, Wen YANG, Joanna MCKITTRICK a Marc André MEYERS. Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. *Progress in Materials Science*. 2016, 76, 229-318. ISSN 00796425. Dostupné z: doi:10.1016/j.pmatsci.2015.06.001
- [29] RAJABI, Mina, Azam ALI, Michelle MCCONNELL a Jaydee CABRAL. Keratin: Structures and functions in biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*. 2020, 110, 229-318. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2019.110612
- [30] Dermatovenerologie. Praha: Scientia Medica, 1994, 288 s. ISBN 80-855-2631-X.
- [31] BRAGULLA, Hermann H. a Dominique G. HOMBERGER. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of Anatomy*. 2009, 214(4), 516-559. ISSN 00218782. Dostupné z: doi:10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x
- [32] CHAITANYA REDDY, Chilakamarri, Irshad Ahamad KHILJI, Arun GUPTA, Prakash BHUYAR, Syed MAHMOOD, Khater Ahmed SAEED AL-JAPAIRAI a Gek Kee CHUA. Valorization of keratin waste biomass and its potential applications: Feathers bioprocessing into valuable protein hydrolysates. *Journal of Water Process Engineering*. 2021, 40, 399-415. ISSN 22147144. Dostupné z: doi:10.1016/j.jwpe.2020.101707
- [33] CHAITANYA REDDY, Chilakamarri, Irshad Ahamad KHILJI, Arun GUPTA, Prakash BHUYAR, Syed MAHMOOD, Khater Ahmed SAEED AL-JAPAIRAI a Gek Kee CHUA. Valorization of keratin waste biomass and its potential applications. *Journal of Water Process Engineering*. 2021, 40. ISSN 22147144. Dostupné z: doi:10.1016/j.jwpe.2020.101707
- [34] SOLCOVA, Olga, Jaroslav KNAPEK, Lenka WIMMEROVA, Kamila VAVROVA, Tomas KRALIK, Milena ROUSKOVA, Stanislav SABATA a Jiri HANIKA. Environmental aspects and economic evaluation of new green hydrolysis method for waste feather processing. *Clean Technologies and Environmental Policy*. ISSN 1618-954X. Dostupné z: doi:10.1007/s10098-021-02072-5
- [35] XU, Helan, Shaobo, Lan XU a YANG. Water-Stable Three-Dimensional Ultrafine Fibrous Scaffolds from Keratin for Cartilage Tissue Engineering. *Langmuir*. 2014, 30(28). ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la500768b
- [36] JIANG, Qiuran, Narendra REDDY, Simeng ZHANG, Nicholas ROSCIOLI a Yiqi YANG. Water-stable electrospun collagen fibers from a non-toxic solvent and crosslinking system. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2013, 101A(5), 1237-1247. ISSN 15493296. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.34422
- [37] COSTA, F., R. SILVA a A.R. BOCCACCINI. Fibrous protein-based biomaterials (silk, keratin, elastin, and resilin proteins) for tissue regeneration and repair. *Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue Regeneration and Repair*.

- Elsevier, 2018, 2018, , 175-204. ISBN 9780081008034. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100803-4.00007-3
- [38] ROUSE, Jillian G. a Mark E. VAN DYKE. A Review of Keratin-Based Biomaterials for Biomedical Applications. *Materials*. 2010, 3(2), 999-1014. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma3020999
- [39] CHILAKAMARRY, Chaitanya Reddy, Syed MAHMOOD, Siti Nadiah Binti Mohd SAFFE, Mohd Azmir Bin ARIFIN, Arun GUPTA, Mohamed Yacin SIKKANDAR, S Sabarunisha BEGUM a Boya NARASIAH. Extraction and application of keratin from natural resources: a review. *3 Biotech*. 2021, 11(5). ISSN 2190-572X. Dostupné z: doi:10.1007/s13205-021-02734-7
- [40] SINKIEWICZ, Izabela, Hanna STAROSZCZYK a Agata ŚLIWIŃSKA. Solubilization of keratins and functional properties of their isolates and hydrolysates. *Journal of Food Biochemistry*. 2018, 42(2). ISSN 01458884. Dostupné z: doi:10.1111/jfbc.12494
- [41] DE GUZMAN, Roche C. a Sina Y. RABBANY. PEG-Immobilized Keratin for Protein Drug Sequestration and pH-Mediated Delivery. *Journal of Drug Delivery*. 2016, 2016, 1-9. ISSN 2090-3014. Dostupné z: doi:10.1155/2016/7843951
- [42] KORNILŁOWICZ-KOWALSKA, Teresa a Justyna BOHACZ. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. *Waste Management*. 2011, 31(8), 1689-1701. ISSN 0956053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.wasman.2011.03.024
- [43] Koentjoro, M. P., & Nugroho Prasetyo, E. (2020). Advances in Use of Keratinase from Feather Wastes for Feedstock Modification . *Applied Food Biotechnology*, 8(1), 19-30. Dostupné z: doi: 10.22037/afb.v8i1.29996
- [44] SHARMA, Isha a Naveen KANGO. Production and characterization of keratinase by *Ochrobactrum intermedium* for feather keratin utilization. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2021, 166, 1046-1056 [cit. 2021-5-12]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.10.260
- [45] SHI, Weida, Marie-Josée DUMONT, Adnan A. BEKHIT a Alaa El-Din A. BEKHIT. Review: bio-based films from zein, keratin, pea, and rapeseed protein feedstocks. *Journal of Materials Science*. 2014, 49(5), 1915-1930. ISSN 0022-2461. Dostupné z: doi:10.1007/s10853-013-7933-1
- [46] FOUNTOULAKIS, Michael a Hans-Werner LAHM. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *Journal of Chromatography A*. 1998, 826(2), 109-134. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(98)00721-3
- [47] TSUDA, Yuichi, Yoshihiro NOMURA, Tereza VESELA, et al. Properties of alkaline-hydrolyzed waterfowl feather keratin. *Animal Science Journal*. 2014, 85(2), 180-185. ISSN 13443941. Dostupné z: doi:10.1111/asj.12093
- [48] KAWAHARA, Yutaka, Rie ENDO a Teruo KIMURA. Chemical Finishing of Bast Fibers and Woods Using Hydrolyzed Keratin from Waste Wool or Down. *Textile Research Journal*. 2004, 74(2), 93-96. ISSN 0040-5175. Dostupné z: doi:10.1177/004051750407400201
- [49] STIBOROVA, Hana, Barbora BRANSKA, Tereza VESELA, et al. Transformation of raw feather waste into digestible peptides and amino acids. *Textile*

- Research Journal. 2016, 91(6), 1629-1637. ISSN 02682575. Dostupné z: doi:10.1002/jctb.4912
- [50] NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 142/2011. 25. února 2011.
- [51] KURBANOGLU, Esabi Basaran a Omer Faruk ALGUR. Utilization of ram horn hydrolysate as a supplement for recovery of heat- and freeze-injured bacteria. *Food Control* [online]. 2006, 17(3), 238-242 [cit. 2021-10-3]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2004.11.001
- [52] JOU, C.J.G, Y.S CHEN, H.P WANG, K.S LIN a H.S TAI. Hydrolytic dissociation of hog-hair by microwave radiation. *Bioresource Technology* [online]. 1999, 70(1), 111-113 [cit. 2021-10-3]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/S0960-8524(99)00011-5
- [53] CHOJNACKA, Katarzyna, Helena GÓRECKA, Izabela MICHALAK a Henryk GÓRECKI. A Review: Valorization of Keratinous Materials. *Waste and Biomass Valorization*. 2011, 2(3), 317-321. ISSN 1877-2641. Dostupné z: doi:10.1007/s12649-011-9074-6
- [54] SHESTAKOVA, Anna, Svetlana TIMORSHINA a Alexander OSMOLOVSKIY. Biodegradation of Keratin-Rich Husbandry Waste as a Path to Sustainable Agriculture. *Sustainability*. 2021, 13(16). ISSN 2071-1050. Dostupné z: doi:10.3390/su13168691
- [55] SCHROOYEN, Peter M.M., Pieter J. DIJKSTRA, Radulf C. OBERTHÜR, Adriaan BANTJES a Jan FEIJEN. Stabilization of Solutions of Feather Keratins by Sodium Dodecyl Sulfate. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2001, 240(1), 30-39. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1006/jcis.2001.7673
- [56] POOLE, Andrew J. a Jeffrey S. CHURCH. The effects of physical and chemical treatments on Na2S produced feather keratin films. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015, 73, 99-108. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.11.003
- [57] SIMPSON, W a G CRAWSHAW. *Wool: science and technology*. Cambridge, England: Woodhead, 2002, 382 s. ISBN 08-493-2820-9.
- [58] DE OLIVEIRA MARTINEZ, Juan, Guiqin CAI, Matthias NACHTSCHATT, Laura NAVONE, Zhanying ZHANG, Karen ROBINS a Robert SPEIGHT. Challenges and Opportunities in Identifying and Characterising Keratinases for Value-Added Peptide Production. *Catalysts*. 2020, 10(2). ISSN 2073-4344. Dostupné z: doi:10.3390/catal10020184
- [59] *Edible Films and Coatings for Food Applications*. London: Springer, c2009. ISBN 03-879-2823-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-0-387-92824-1
- [60] *Protein-Based Films and Coatings*. CRC Press, 2002, 672 s. 1st. ISBN 978-1587161070.
- [61] RAMIREZ, Diego O. Sanchez, Riccardo A. CARLETTO, Cinzia TONETTI, Francesca Truffa GIACHET, Alessio VARESANO a Claudia VINEIS. Wool keratin film plasticized by citric acid for food packaging. *Food Packaging and Shelf Life*. 2017, 12, 100-106. ISSN 22142894. Dostupné z: doi:10.1016/j.fpsl.2017.04.004

- [62] Preparation and Characterization of Keratin-Polyvinyl Alcohol Composite Film. *Egyptian Journal of Chemistry*. 2012, 55(5), 491-507. ISSN 2357-0245. Dostupné z: doi:10.21608/ejchem.2012.1170
- [63] TANABE, Toshizumi, Naoya OKITSU, Akira TACHIBANA a Kiyoshi YAMAUCHI. Preparation and characterization of keratin–chitosan composite film. *Biomaterials*. 2002, 23(3), 817-825. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(01)00187-9
- [64] MARTELLI, Sílvia Maria, Geovana Rocha Plácido MOORE a João Borges LAURINDO. Mechanical Properties, Water Vapor Permeability and Water Affinity of Feather Keratin Films Plasticized with Sorbitol. *Journal of Polymers and the Environment*. 2006, 14(3), 215-222. ISSN 1566-2543. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-006-0017-4
- [65] RAMAKRISHNAN, Navina, Swati SHARMA, Arun GUPTA a Basma Yahya ALASHWAL. Keratin based bioplastic film from chicken feathers and its characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, 111, 352-358. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.01.037
- [66] LAI, Huey-Min a Graciela W. PADUA. Properties and Microstructure of Plasticized Zein Films. *Cereal Chemistry Journal*. 1997, 74(6), 771-775. ISSN 0009-0352. Dostupné z: doi:10.1094/CCHEM.1997.74.6.771
- [67] SHAVANDI, Amin, Tiago H. SILVA, Adnan A. BEKHIT a Alaa El-Din A. BEKHIT. Keratin: dissolution, extraction and biomedical application. *Biomaterials Science*. 2017, 5(9), 1699-1735. ISSN 2047-4830. Dostupné z: doi:10.1039/C7BM00411G
- [68] MEYERS, Marc A. a Krishan Kumar CHAWLA. *Mechanical behavior of materials*. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, c2009. ISBN 978-0-521-86675-0.
- [69] MCCRUM, N. G, C. P BUCKLEY a C. B BUCKNALL. *Principles of Polymer Engineering*. 2nd Edition. Oxford University Press, 1997. ISBN 978-0-198565-26-0.
- [70] MACOSKO, Christopher W., C. P BUCKLEY a C. B BUCKNALL. *Rheology: principles, measurements and applications*. 2nd Edition. New York: Wiley, 1994. ISBN 04-711-8575-2.
- [71] BISWAS, Abhijit, M. MANIVANNAN a Mandayam A. SRINIVASAN. Multiscale Layered Biomechanical Model of the Pacinian Corpuscle. *IEEE Transactions on Haptics*. 2015, 8(1), 31-42. ISSN 1939-1412. Dostupné z: doi:10.1109/TOH.2014.2369416
- [72] SHAW, Montgomery T. a William J. MACKNIGHT. *Introduction to polymer viscoelasticity*. 3rd ed. Hoboken: Wiley-Interscience, c2005. ISBN 978-0-471-74045-2.
- [73] BAEURLE, Stephan A., Atsushi HOTTA a Andrei A. GUSEV. On the glassy state of multiphase and pure polymer materials. *Polymer*. 2006, 47(17), 6243-6253. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2006.05.076

- [74] DUCHÁČEK, Vratislav. Polymery: výroba, vlastnosti, zpracování, použití. Vyd. 3., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2011. ISBN 978-80-7080-788-0.
- [75] PROKOPOVÁ, Irena. Makromolekulární chemie. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2007. ISBN 978-80-7080-662-3.
- [76] PETERSON, Brandon W., Yan HE, Yijin REN, et al. Viscoelasticity of biofilms and their recalcitrance to mechanical and chemical challenges. *FEMS Microbiology Reviews*. 2015, **39**(2), 234-245. ISSN 1574-6976. Dostupné z: doi:10.1093/femsre/fuu008
- [77] MINISTERSTVO ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ. Obaly. [online]. c2010-2014, portál Ministerstva životního prostředí (MŽP), [cit. 2021-12-06]. Dostupné z: <https://www.mzp.cz/cz/obaly>
- [78] YAMADA, Masanori, Sakura MORIMITSU, Eiji HOSONO a Tetsuya YAMADA. Preparation of bioplastic using soy protein. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020, 149, 1077-1083. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.02.025
- [79] IBRAHIM, Nor Izaida, Farah Syazwani SHAHAR, Mohamed Thariq Hameed SULTAN, Ain Umaira Md SHAH, Syafiqah Nur Azrie SAFRI a Muhamad Hasfanizam MAT YAZIK. Overview of Bioplastic Introduction and Its Applications in Product Packaging. *Coatings*. 2021, 11(11), 1077-1083. ISSN 2079-6412. Dostupné z: doi:10.3390/coatings11111423
- [80] ONEN CINAR, Senem, Zhi Kai CHONG, Mehmet Ali KUCUKER, Nils WIECZOREK, Ugur CENGIZ a Kerstin KUCHTA. Bioplastic Production from Microalgae: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020, 17(11), 1077-1083. ISSN 1660-4601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph17113842
- [81] N. B. DHAYANITHI, N. B. Dhayanithi a S. Meenakshisundaram S. MEENAKSHISUNDARAM. Separation of Natural Keratin Protein from The Chicken Feather Waste. *International Journal of Scientific Research*. 2012, 3(7), 34-36. ISSN 22778179. Dostupné z: doi:10.15373/22778179/July2014/12
- [82] SINKIEWICZ, Izabela, Agata ŚLIWIŃSKA, Hanna STAROSZCZYK a Ilona KOŁODZIEJSKA. Alternative Methods of Preparation of Soluble Keratin from Chicken Feathers. *Waste and Biomass Valorization*. 2017, 8(4), 1043-1048. ISSN 1877-2641. Dostupné z: doi:10.1007/s12649-016-9678-y
- [83] BEN HAMAD BOUHAMED, Sana, Nabil KECHAOU, Arun GUPTA a Basma Yahya ALASHWAL. Kinetic study of sulphuric acid hydrolysis of protein feathers. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2017, 40(5), 715-721. ISSN 1615-7591. Dostupné z: doi:10.1007/s00449-017-1737-7
- [84] DALEV, Pencho G. Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate. *Bioresource Technology*. 1994, **48**(3), 265-267. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/0960-8524(94)90156-2
- [85] OLUBA, Olarewaju M., Egosa OSAYAME a Ayoola O. SHOYOMBO. Production and characterization of keratin-starch bio-composite film from chicken



- feather waste and turmeric starch. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2021, 33. ISSN 18788181. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcab.2021.101996
- [86] PANÁK, Ondrej. Měření barevnosti. Katedra polygrafie a fotofyziky, Fakulta chemickotechnologická: Univerzita Pardubice. Dostupné také z: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.upce.cz/sites/default/binary\_www\_old/fcht/kpf/studenti-kpf/merenibarevnosti.pdf
- [87] DALE, Nick. True Metabolizable Energy of Feather Meal. *Journal of Applied Poultry Research*. 1992, 1(3), 331-334. ISSN 10566171. Dostupné z: doi:10.1093/japr/1.3.331
- [88] KONDAMUDI, Narasimharao, Jason STRULL, Mano MISRA a Susanta K. MOHAPATRA. A Green Process for Producing Biodiesel from Feather Meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, 57(14), 6163-6166. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf900140e
- [89] ZEISLER-DIEHL, Viktoria, Eshrak Ali AL-KHUTABI, Gregor KIRFEL, Lukas SCHREIBER, Gerhild VAN ECHTEN-DECKERT a Volker HERZOG. Detection of endogenous lipids in chicken feathers distinct from preen gland constituents. *Protoplasma*. 2020, 257(6), 1709-1724. ISSN 0033-183X. Dostupné z: doi:10.1007/s00709-020-01544-7
- [90] ABDOLI, M. A. Effective Parameters on Biodiesel Production from Feather fat oil as a Cost-Effective Feedstock. *Int. J. Environ. Res.* 8(1), 1-12. ISSN 1735-6865.
- [91] POOLE, Andrew J., Russell E. LYONS a Jeffrey S. CHURCH. Dissolving Feather Keratin Using Sodium Sulfide for Bio-Polymer Applications. *Journal of Polymers and the Environment*. 2011, 19(4), 995-1004. ISSN 1566-2543. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-011-0365-6
- [92] ALAHYARIBEIK, Samira a Aman ULLAH. Methods of keratin extraction from poultry feathers and their effects on antioxidant activity of extracted keratin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020, 148, 449-456. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.01.144
- [93] POOLE, Andrew J., Russell E. LYONS a Jeffrey S. CHURCH. Dissolving Feather Keratin Using Sodium Sulfide for Bio-Polymer Applications. *Journal of Polymers and the Environment*. 2011, 19(4), 995-1004. ISSN 1566-2543. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-011-0365-6
- [94] TSAI, GUO-JANE a WEN-HUEY SU. Antibacterial Activity of Shrimp Chitosan against *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*. 1999, 62(3), 239-243. ISSN 0362-028X. Dostupné z: doi:10.4315/0362-028X-62.3.239
- [95] KHAN, Alisha, Thu Thu AUNG a Debanik CHAUDHURI. The First Case of Native Mitral Valve Endocarditis due to *Micrococcus luteus* and Review of the Literature. *Case Reports in Cardiology*. 2019, 2019, 1-3. DOI: 10.1155/2019/5907319. ISSN 2090-6404. Dostupné také z: https://www.hindawi.com/journals/cric/2019/5907319/
- [96] MORITZ, Maike, Claudia WIACEK, Martin KOETHE a Peggy G. BRAUN. Atmospheric pressure plasma jet treatment of *Salmonella* Enteritidis inoculated

- eggshells. *International Journal of Food Microbiology*. 2017, 245(3), 22-28. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.004
- [97] NANDIYANTO, Asep Bayu Dani, Rosi OKTIANI a Risti RAGADHITA. How to Read and Interpret FTIR Spectroscopy of Organic Material. *Indonesian Journal of Science and Technology*. 2019, 4(1), 97-118. ISSN 2527-8045. Dostupné z: doi:10.17509/ijost.v4i1.15806
- [98] MOTHE, Michelle G., Larissa M. VIANA a Cheila G. MOTHE. Thermal property study of keratin from industrial residue by extraction, processing and application. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2018, 131(1), 417-426. ISSN 1388-6150. Dostupné z: doi:10.1007/s10973-017-6845-8
- [99] FRESNELLI, M., P. PETRINI a M. C. TANZI. Self-assembling peptides for biomedical applications: IR and Raman spectroscopies for the study of secondary structure. *Proteomics Research Journal*. 2012, 2(3), 1-16.
- [100] KHARAZMI, Alireza, Nastaran FARAJI, Roslina MAT HUSSIN, Elias SAION, W Mahmood Mat YUNUS a Kasra BEHZAD. Structural, optical, opto-thermal and thermal properties of ZnS–PVA nanofluids synthesized through a radiolytic approach. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 2015, 6(3), 529-536. ISSN 2190-4286. Dostupné z: doi:10.3762/bjnano.6.55
- [101] VALDEZ-ALEGRÍA, Cecilia, Rosa FUENTES-RIVAS, José GARCÍA-RIVAS, Rosa ZAVALA ARCE, María JIMÉNEZ NÚÑEZ a Beatriz GARCÍA-GAITÁN. Synthesis of Chitosan-Polyvinyl Alcohol Biopolymers to Eliminate Fluorides from Water. *Biomolecules*. 2020, 10(1), 529-536. ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom10010156
- [102] CHEN, Xunjun, Shufang WU, Minghao YI, Jianfang GE, Guoqiang YIN a Xinming LI. Preparation and Physicochemical Properties of Blend Films of Feather Keratin and Poly(vinyl alcohol) Compatibilized by Tris(hydroxymethyl)aminomethane. *Polymers*. 2018, 10(10). ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym10101054
- [103] FERNANDES QUEIROZ, Moacir, Karoline MELO, Diego SABRY, Guilherme SASSAKI a Hugo ROCHA. Does the Use of Chitosan Contribute to Oxalate Kidney Stone Formation?. *Marine Drugs*. 2015, 13(1), 141-158. ISSN 1660-3397. Dostupné z: doi:10.3390/md13010141
- [104] MOTHE, Michelle G., Larissa M. VIANA a Cheila G. MOTHE. Thermal property study of keratin from industrial residue by extraction, processing and application. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2018, 131(1), 417-426. ISSN 1388-6150. Dostupné z: doi:10.1007/s10973-017-6845-8
- [105] SHARMA, Swati. Extraction and characterization of keratin from chicken feather waste biomass: a study. *Proceedings of the national conference for postgraduate research (NCON-PGR 2016)*. University Malaysia Pahang, 2016, 693-699.
- [106] HERNANDEZ, A.L. Martinez, C. Velasco SANTOS, M. De ICAZA, V.M. CASTANO, H. EL-SAYED, Kee Woei NG, Rui L. REIS a Joaquim M. OLIVEIRA. Microstructural characterisation of keratin fibres from chicken feathers. *International*

- Journal of Environment and Pollution. 2005, 23(2), 537-542. ISSN 0957-4352.  
Dostupné z: doi:10.1504/IJEP.2005.006858
- [107] EL-KHEIR, A. Abou, C. POPESCU, S. MOWAFI, M. SALAMA, H. EL-SAYED, Kee Woei NG, Rui L. REIS a Joaquim M. OLIVEIRA. Physico-chemical properties of keratin-polyvinyl alcohol composite. *Fibers and Polymers*. 2015, 16(3), 537-542. ISSN 1229-9197. Dostupné z: doi:10.1007/s12221-015-0537-4
- [108] DOU, Yao, Buning ZHANG, Ming HE, Guoqiang YIN, Yingde CUI a Irina SAVINA. Keratin/Polyvinyl Alcohol Blend Films Cross-Linked by Dialdehyde Starch and Their Potential Application for Drug Release. *Polymers*. 2015, 7(3), 580-591. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym7030580
- [109] ESPARZA, Yussef, Aman ULLAH, Yaman BOLUK, Jianping WU, Yingde CUI a Irina SAVINA. Preparation and characterization of thermally crosslinked poly(vinyl alcohol)/feather keratin nanofiber scaffolds. *Polymers*. 2017, **133**(3), 1-9. ISSN 02641275. Dostupné z: doi:10.1016/j.matdes.2017.07.052
- [110] CARVALHO, Cristiana R., João B. COSTA, Lígia COSTA, Joana SILVA-CORREIA, Zi Kuang MOAY, Kee Woei NG, Rui L. REIS a Joaquim M. OLIVEIRA. Enhanced performance of chitosan/keratin membranes with potential application in peripheral nerve repair. *Biomaterials Science*. 2019, 7(12), 5451-5466. ISSN 2047-4830. Dostupné z: doi:10.1039/C9BM01098J
- [111] GOU, Ming Xia, Xu Hong YANG, M. De ICAZA, V.M. CASTANO, H. EL-SAYED, Kee Woei NG, Rui L. REIS a Joaquim M. OLIVEIRA. Preparation and Characterization of Wool Keratin/PVA Blended Films. *Advanced Materials Research*. 2011, 175-176(2), 132-136. ISSN 1662-8985. Dostupné z: doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.175-176.132

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

DSC	teplotně modulovaný kalorimetr
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
MUFA	mononenasyčené mastné kyseliny
NB	Nutrient Broth
OSN	Organizace spojených národů
PLA	kyselina polymléčná
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
PVA	polyvinyl alkohol
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsíranu sodného
SDS	dodecylsíran sodný
SFA	nasyčené mastné kyseliny
$T_c$	teplota krystalizace
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
$T_g$	teplota skelného přechodu
TGA	termogravimetrická analýza
$T_m$	teplota tání
$T_{max}$	teplota maximální degradace
$T_{onset}$	teplota počátku degradace
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
YPD	Yeast extract peptone dextrose