



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

EXTRAKCE A APLIKACE KERATINU Z OVČÍ VLNY

EXTRACTION AND APPLICATION OF KERATIN FROM SHEEP WOOL

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kateřina Jahnová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1808/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Kateřina Jahnová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a technologie
Vedoucí práce: **prof. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Extrakce a aplikace keratinu z ovčí vlny

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše (posouzení vlny z hlediska odpadového hospodářství, složení a využití vlny, chemické struktura a možnosti extrakce keratinu, využití keratinu).
2. Izolace keratinu z vlny.
3. Charakterizace izolovaného materiálu (FTIR, DSC, TGA).
4. Příprava a charakterizace kompozitů na bázi keratinu s cílem zlepšit jejich viskoelastické vlastnosti.
5. Diskuse výsledků a závěr práce

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2023:

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

Kateřina Jahnová
studentka

prof. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá izolací keratinu z ovčí vlny a použitím tohoto proteinu v kompozitních filmech. Cílem bylo porovnat výtěžnost alkalické hydrolýzy ovčí vlny za užití různých koncentrací hydroxidu sodného. Bylo zjištěno, že nejvíce efektivní byla alkalická hydrolýza použitím 2% (hm.) hydroxidu sodného, která vykazovala 80% úspěšnost v izolaci keratinu. Pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou řadou, diferenční skenovací kalorimetrie a termogravimetrickou analýzou byla potvrzena přítomnost keratinu v izolovaném materiálu z ovčí vlny. Izolovaný keratin byl následně použit jako přídatná látka při přípravě filmů na bázi polyvinyl alkoholu. Mechanické vlastnosti těchto připravených filmů ukázaly, že keratin hrál roli jako aktivní přídatná látka do polyvinyl alkohol kompozitů.

KLÍČOVÁ SLOVA

Keratin, ovčí vlna, hydrolýza, kompozity, viskoelastické vlastnosti

ABSTRACT

This thesis deals with the isolation of sheep wool keratin for using this protein in composite films. The goal was to compare the yield of alkaline hydrolysis of sheep wool using different concentrations of sodium hydroxide. It was found that the most effective was alkaline hydrolysis using 2wt% sodium hydroxide showing 80 % effectiveness of keratin isolation. Fourier infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry a thermo gravimetric analyses confirmed that the isolated material from sheep wool was keratin. The isolated keratin was used as filler for the preparation of polyvinyl alcohol-based composite films. The mechanical properties of keratin/polyvinyl alcohol films showed that keratin played the role as an active filler for polyvinyl alcohol composites.

KEY WORDS

Keratin, sheep wool, hydrolysis, composites, viscoelasticity

JAHNOVÁ, Kateřina. *Extrakce a aplikace keratínu z ovčí vlny* [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-01-09]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/147482>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Adriána Kovalčík.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala paní prof. Ing. Adriáně Kovalčík, Ph.D. za možnosti vypracovat práci pod jejím vedením, za její cenné i odborné rady, ochotu, trpělivost a čas, který mi při psaní této práce věnovala. Dále bych chtěla poděkovat doktorandům a studentům, se kterými jsme v laboratoři spolupracovali, a hlavně také mé rodině a přátelům za jejich velkou podporu

Obsah

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Odpadové hospodářství v potravinovém průmyslu a při chovu zvířat.....	9
2.2	Vlna	10
2.2.1	Složení ovčí vlny	11
2.2.2	Aplikace ovčí vlny	11
2.2.3	Chemické parametry	12
2.2.4	Typy ovčí a vlny	12
2.3	Valorizace ovčí vlny.....	13
2.4	Keratin	13
2.4.1	Vlastnosti keratinu.....	14
2.4.2	α – keratin, β - keratin.....	14
2.4.3	Rozdíl v složení AMK v keratinu	16
2.4.4	Aplikace keratinu	17
2.4.5	Metody izolace keratinu	18
2.5	Hydrolyza	18
2.5.1	Alkalická hydrolyza	18
2.5.2	Kyselá hydrolyza.....	19
2.5.3	Enzymatická hydrolyza	19
2.6	Kompozity z keratinu	21
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	23
3.1	Použité chemikálie	23
3.2	Přístroje	23
3.3	Materiál	23
3.4	Izolace keratinu	23
3.5	Charakterizace keratinu.....	24
3.6	Příprava keratinových filmů.....	26
3.7	Charakterizace keratinových filmů	27
	KOLORIMETRIE	27
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	28
4.1	Odtučnění peří	28
4.2	Alkalická hydrolyza	28
4.3	Charakterizace keratinu pomocí FTIR.....	30
4.4	Termální vlastnosti keratinu.....	30
4.5	TGA keratinu.....	31
4.6	Vlastnosti filmů.....	32
4.6.1	Kolorimetrie filmů.....	34
4.6.2	Mechanické vlastnosti filmů	35

4.6.3	Bobtnavost filmů	37
5	ZÁVĚR.....	38
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	39

1 ÚVOD

V současné době se většina společností zabývá jedním velkým problémem, a to znečištěním životního prostředí produkty na bázi ropy (plasty). Jenom celosvětově se do životního prostředí dostane přes 13 milionů tun plastových kontaminantů. Plasty jsou užitečné díky jejich vlastnostem jako například stabilita vůči chemikáliím, hydrolyze, UV, teplu atd. Na druhou stranu přinesly tyto vlastnosti i problémy s jejich zpracováním a likvidací. Plasty jsou likvidovány recyklací, pálením anebo uložením na skládkách [1, 2].

Na znečištění životního prostředí mají také dopad hospodářské a potravinářské odpady. Ze zpracování hospodářských produktů vznikají odpady, jako například sláma, výlisky z hroznů, jablek apod. Proto se začalo uvažovat o těchto odpadech jako o alternativních zdrojích pro výrobu bioproduktů [3].

Ovčí vlna jakožto taková má obrovský význam v textilním průmyslu, kde se ale nevyužije celé vyprodukované množství. Vlna se třídí podle několika kvalitních parametrů: délka, průměr a typ vláknů. Nevyužitý zbytek může být skládkován, spalován nebo kompostován, což je velmi pomalý proces. Ovčí vlna je považována za průmyslový produkt a v EU je vyprodukováno 200 tisíc tun hrubé a méně kvalitní vlny. Vlna je tvořena z velké části strukturální bílkovinou keratin. Ten je velmi intenzivně studován v rámci materiálové chemie, aby mohl přispět k nahrazení plastů na ropné bázi. Na rozdíl od konvenčních plastů je keratin biodegradabilní a rozkládá se pomocí mikroorganismů na aminokyseliny a peptidy. Jelikož jsou aminokyseliny bohaté na dusíkaté látky, působí v prostředí jako biohnojivo [4, 5].

V zájmu o keratin lze pozorovat rozdílné studie, které pojednávají o využití keratinových hydrolyzátů. Ty jsou známy už padesát let, ale zatím nemají žádné komerční využití. Keratin jako sám o sobě má mnoho využití. Nejznámější je jeho využití v kosmetickém průmyslu, kde se používá jako doplněk stravy pro zlepšení vlasů a nehtů. Extrakce keratinu z ovčí vlny je velmi energeticky náročná a komplikovaná, a proto se v současné době různé studie snaží tento proces lépe modifikovat. Keratin vyextrahovaný z ovčí vlny je možné použít k vytvoření folií. Ty však mají velmi špatné mechanické vlastnosti. Také jsou rozpustné ve vodě, tím pádem nemohou být užity jako obalový materiál. Vlastnosti filmu mohou být modifikovány přidáním síťovacích činidel, která nesmí být toxická, aby se tím nezhodnotila hlavní přednost produktu (nezávažnost) [4].

V této práci je souhrnně popsána izolace keratinu z ovčí vlny pomocí několika typů alkalických hydrolyz, následnou charakterizaci a využití keratinu v kompozitních materiálech.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Odpadové hospodářství v potravinovém průmyslu a při chovu zvířat

Jednou z příčin znečištění životního prostředí jsou odpady ze zemědělství a potravinářského průmyslu. Ročně jsou produkována velká množství odpadního materiálu ze zemědělství a zpracování jeho produktů. Patří sem zbytky ze zpracování kukuřice, cukrové třtiny, pšeničná sláma, výlisky z hroznů a jablek a tak dále. Většina z nich jsou v dnešní době zkoumány jako potenciální suroviny pro výrobu produktů s přidanou hodnotou. I přesto odpady z potravinářského průmyslu zůstávají z velké části nevyužity. Tímto dochází ke ztrátám cenných surovin. Obsahují totiž vysoké množství látek, které mohou být následně využity. Odpady z potravinářských průmyslů jsou produkovány v pevné a kapalné formě. Pevný odpad nemůže být použit jako výchozí materiál pro výrobu zamýšlených produktů. Jedná se o slupky, semena a vlákna, které jsou odstraněny při výrobě šťáv. V současnosti se výzkum v oblasti zpracování potravinového odpadu zaměřuje na nalezení efektivního a stabilního způsobu pro získání biopaliv a bioproduktů. Tento způsob zpracování je výhodný pro životní prostředí z důvodu snižování emisí methanu na skládkách a zachování přírodních zdrojů, jako je uhlí a fosilní paliva [3, 6, 7].

VEDLEJŠÍ PRODUKTY POTRAVINÁŘSKÉHO PRŮMYSLU

Cukrovarnický průmysl

Nejvýznamnější vedlejší produkt cukrovarnického průmyslu je melasa, která je složená převážně ze sacharózy, následně v menším množství z organických látek, popela a vody. Melasa je nezbytnou surovinou pro tvorbu lihu a droždí jako fermentační substrát. Také se využívá pro produkci kyseliny máselné, mléčné, citrónové, šťavelové, glycerolu a biomasy na krmení. Jako další vedlejší produkt v cukrovarnictví jsou vyslazené řízky, které vznikají lisováním řepných řízků. Slouží jako krmivo a k výrobě dietní vlákniny [8].

Výroba škrobu a mouky

Vedlejší produkt výroby škrobu z brambor je vláknina. Ta se lisuje nebo suší, a poté se využívá jako krmivo pro hovězí dobytek. Lepek je vedlejším produktem výroby pšeničného škrobu, který nalézá využití ve výrobě polévkového koření a v obuvnictví. Odpady z výroby mouky vznikají především při čištění zrna a dělí se na krmné (obilek) a nekrmné (plevy, sláma, minerální příměsi). Nekrmné se zpravidla kompostují [9, 10].

Zpracování mléka

V mlékárenství je vedlejším produktem syrovátka, která obsahuje laktosu, bílkoviny, minerální a organické látky. V původním stavu se syrovátka využívá při výrobě nápojů a krmení. Jelikož má syrovátka vysoký obsah vody, tak má omezenou trvanlivost. Proto se zahušťuje nebo suší. Ze syrovátky lze extrahovat bílkoviny (albumin, globulin, rozkladné produkty kaseinu). Těžištěm průmyslového zpracování syrovátky je získání laktosy (mléčný cukr), která se využívá v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Dalším vedlejším produktem je podmásli, které se uplatňuje jako dietikum [10, 11].

Výroba tuků a olejů

Odpady u těchto výrob se většinou zkrmují, přidávají do stavebních hmot, nebo spalují. Významnou druhotnou surovinou je hydratační kal, ze kterého se získává lecithin (fosfatidylcholin). Lecitiny se zkrmují, nebo se používají pro technické účely. Další druhotnou surovinou je mýdlový kal, ze kterého se rafinací získávají mastné kyseliny. Mýdlový kal může sloužit jako výchozí surovina pro přípravu detergentů [10].

Výroba sladu a piva

Nejcennější vedlejší produkt při výrobě piva je sladové mláto a pivovarské kvasnice. Sladové mláto se získá po oddělení zcukřeného rmutu, což je velmi cenné krmivo. Pivovarské kvasnice mají vysoký obsah lysinu vitamínů B a minerálních látek. Využívají se ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Zbývající odpady (chmelové mláto, hořké kaly, pěnové příkrývky) se pro své hořké senzorycké vlastnosti hodí ke zkrmování a likvidují se kompostováním [10, 12].

Zpracování masa

Každý rok je vyprodukováno obrovské množství organického odpadu. Sem patří odpady z jatek, drůbežáren a textilního průmyslu. Tyto odpady obsahují mnoho vláknitých proteinů jako je kolagen, elastin a keratin. Za vedlejší produkty lze považovat droby (jazyky, játra, ledviny). Jsou omezeně údrzné, proto se co nejrychleji zmrazují a předávají do tržní sítě. Dalším vedlejším produktem je krev. Ta se po vykvrvení stabilizuje, konzervuje a dále zpracovává k lidské výživě. Peří z drůbežářských závodů se tradičně používá do polštářů, ale také se používá k výrobě dusíkatého krmiva (pěřová moučka). Alkalickou hydrolyzou pěňové bílkoviny se vyrábí stabilizátor vzduchomechanické pěny (afrodon), který se používá v hasících přístrojích [10, 13, 14].

Do nedávna se tyto materiály užívaly jako proteinové aditivum do krmných směsí. Poté co se ustanovilo, že tyto směsi přenáší mnoho nemocí (např. nemoc šílených krav), se zakázaly a přestaly používat. Nyní se tyto odpady vyhazují anebo pálí. Vlna je velmi důležitý obnovitelný vedlejší produkt v textilním průmyslu. Velké množství je vyhozeno během tkaní vlny a tím pádem je i vyhozeno velké množství keratinových vláken, které nejen že nás ochuzují o důležité zdroje, ale zároveň znečišťují životní prostředí [5, 15, 16].

Co se týká produkce vlny, Evropská unie má druhou největší populaci ovcí. Jen v roce 2015 bylo maximum 86,1 milionů ovcí. Tuna běžné vlny obsahuje 640 kg čistého vlákna a zbytek tvoří nečistoty. Ovčí vlna je považována za průmyslový produkt a v EU je vyprodukováno 200 tisíc tun hrubé a méně kvalitní vlny. Evropský textilní průmysl používá dovezenou vlnu z Austrálie a Nového Zélandu. Proto je potřeba najít nové využití pro hrubou méně kvalitní vlnu, která většinou končí jako odpad [13].

2.2 Vlna

Význam ovčí vlny jako hlavního zdroje vlákna a hospodářského obchodu v Evropě v průběhu období středověku je již dlouho zaveden. Archeologické textilie nalezeny a regenerovány z nálezů, i když neúplné a křehké, jsou cenné nálezy pro studium výroby textilií v minulosti (např. tkací a barvicí techniky, vzory a styly), jejich obchod (např. textilní původ) a vývoj chovu ovcí (např. jemnost vlny, druh a původ). V průběhu historie chovatelé ovcí nesoucích vlnu usilovali o větší jednotnost v charakteristikách vlny nesené jejich vybraným plemenem. Rysy vlny jsou pozoruhodně dědičné a zjevné rozdíly v morfologii srsti jsou jedním z hlavních vlastností, kterými se plemena ovcí vyznačují. Střední a směrodatná odchylka průměru vlákna, jeho zdvojení, zakřivení, odbarvení vlny a pevnost surové vlny jsou běžně hodnocené vlastnosti, které ovlivňují zpracování a konečné produkty [17].

2.2.1 Složení ovčí vlny

Ovčí vlna je přírodní vlákno produkováno stříháním srsti ovce. Hlavními komponenty ovčí vlny jsou keratin, tuky, ovčí pot a další nečistoty. Chemické složení je vyobrazeno v Tabulce 1 [18].

Tabulka 1: Složení ovčí vlny [18]

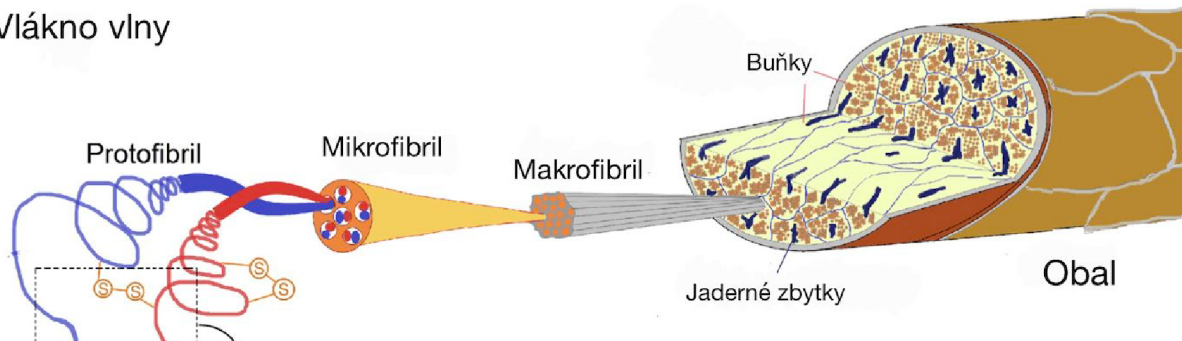
Keratin	33 %
Nečistoty	26 %
Mastnota	28 %
Tuk	12 %
Minerální voda	1 %

Keratinové vlákna ovčí vlny obecně obsahují čtyři části. Těmito částmi jsou epidermis, kortex, kmen a komplex buněčných membrán, ve kterém je hlavním komponentem alfa-keratin. Jak již bylo zmíněno jednou z částí vlákna ovčí vlny je epidermis. Ten se skládá celkem z tří vrstev:

- Vnější vrstva složená z α -aminokyselin s nízkou chemickou aktivitu
- Přechodná vrstva složená z nekystalického keratinu
- Vnější vrstva složená kystalického keratinu

Hlavní částí vlákna je kortex, který tvoří 70 až 90 % vlněného vlákna. Skládá se z ortokortikálních a paraortikálních buněk s různými fyzikálními vlastnostmi. Ortokortikální a parakortikální buňky se skládají z řády mikrofibril, které jsou tvořeny jedenácti protofibrily. Ty jsou tvořeny třemi keratinovými makromolekulami stočených kolem sebe ve formě spirály známou také jako alfa-helix. Mikrofibrily vytváří svazky makrofibrilů pomocí intramolekulárních vazeb: kovalentní disulfidové můstky, iontové interakce nebo vodíkové vazby. Obrázek 1 zobrazuje výše zmíněný popis ovčího vlákna [16, 19, 20].

Vlákno vlny



Obrázek 1: Schématický popis vlákna vlny [20]

2.2.2 Aplikace ovčí vlny

Již dříve měla ovčí vlna velké využití a obchodovalo se s ní po celé Evropě. Ve středověku se vlna nerozdělovala podle plemene, ale podle její délky. Krátká vlna se připravovala mykáním a používala se k výrobě tkanin (textilie s těžkou texturou, zesílené plněním). Dlouhá vlna se připravovala česáním a používala se pro lehčí česané tkaniny (materiály, které se obvykle neplnily) a tzv. *serge* (odolná látka mající hebký, čistý povrch). Nyní se cena vlny odvozuje od její kvality. Parametry kvality určují dva hlavní faktory: enviromentální a genetické. Enviromentálními faktory je rozuměno typ krmiva, stříhací sezóny, ustájení ovcí a kvalita pastvin. Genetické jsou dány genotypem zvířete, který je mezi plemeny různý. Parametry vlny se dělí na fyzické a chemické [22, 25].

2.2.2.1 Fyzické parametry

Délka spony

Kvalita vlny je globálně určována podle délky spony, která je měřena v milimetrech. Vlna s dlouhou délkou je komerčně preferovaná, jelikož mohou tvořit lepší příze v porovnání s kratšími. Tento parametr je ovlivněn jak enviromentálními, tak i genetickými faktory. Frekvence a doba mykání také ovlivňuje tento fyzický parametr. Růst spony není jednotný celý rok a v určitých obdobích může být mnohem vyšší. Kvůli tomuto jsou ovce stříhány dvakrát ročně. Na délku spony má také vliv pohlaví a stáří zvířete. Například u ovce druhu Menz je stanovována délka spony pro různé pohlaví. Ovce ženského pohlaví neboli bahnice mají průměrnou střední délku spony stanovenou na 5,07 cm. Zatímco ovce mužského pohlaví (berani) na 6,22 cm. Lze vidět že délka spony se u tohoto druhu u různých pohlaví může lišit o více než 1 cm. Mladé ovce mají délku spony většinou kratší. Na druhu použití vlny má vliv hlavně tento parametr [22, 23].

Typ vlákn

Důvod různých typů vláken je podíl sekundárního k primárnímu folikulu. Obecně jsou rozlišovány typy vlny na: vlnu, hetero a hrubou. Hetero a hrubá jsou typy vláken, které se řadí do vláken s kmenem. Ty mají centrální kanál s buněčnými zbytky a vzduchovými kapsami. Zatímco vlna neobsahuje kmen. Typ vlákn ovlivňuje genotyp a stáří ovce. Jsou značné rozdíly v kapacitě v růstu vlny a v její charakteristice u různých druhů ovcí. Například proporce vlnového typu je jiná u druhu Zhandi a Garole. U ovcí Zhandi se vyskytuje vlnový typ s proporcí 93 % a u ovcí Garole jenom z 19 % [22, 24].

Průměr vlákn

Tento parametr ovlivňuje cenu vlny a je měřen v mikronech (μm). Množství vlny, které se může měnit při zpracovávání vlny, je ovlivněno průměrem vlny. Jemnější vlákn tvoří obvykle lehčí a měkké tkaniny [22].

2.2.3 Chemické parametry

Výnos praní

Proces separace nečistot, mastnoty a cizích těles se nazývá praní. Tento parametr ovlivňuje mnoho faktorů jako: místo pastvy, kvalita vlny, čas stříhání a čas vzorkování. Celkové množství kontaminantů přítomných v mastné vlně je kolem 40% celkové hmotnosti vlny. Nejmenší výskyt volných lipidů je u horských karpatských ovcí a ovcí Preko [22, 25].

2.2.4 Typy ovcí a vlny

Swaledale ovce

Horská ovce původem z Velké Británie s hrubou odolnou vlnou. Ta je výhradně používána pro domácí nábytek a izolaci. Vlna má různou pigmentaci, převážně převládá bílá nebo šedá barva.

Velšské horské ovce

Vlna má podobné vlastnosti jako ta u Swaledale ovce a je používána pro vybavení bytu.

Drysdale ovce

Tento druh pochází z Nového Zélandu. Je známý pro svou hrubší vlnu.

Blackface ovce

Horský druh z Velké Británie. Užití vlny je opět v domácím nábytku a v tvídové textilií [22].

2.3 Valorizace ovčí vlny

Každý rok jsou vyprodukovány tuny odpadů bohatých na keratin. Nejvíce problematické je peří, které je produkováno v největší míře. Samozřejmě jsou další jiné živočišné zdroje jako je právě ovčí vlna, která je tvořena hlavně z keratinu. V této době se tyto odpady spalují, ale na druhou stranu se mohou použít jako zdroj proteinu pro zvířata nebo rostliny. I když je vlna bohatá na rostlinné makro- a mikroživiny, měla v rostlinné výrobě omezené uplatnění. Nedávná studie však ukázala, že nekompostovaná vlna může být využita jako zdroj výživy pro rostliny. Cílem tohoto patentu bylo vyrobit ze surové vlny organické hnojivo pro rostliny. Vlna je nejprve podrobena alkalické hydrolyze, při které dojde ke štěpení polypeptidických řetězců a vytvoření hydrolyzátu s volnými aminokyselinami. Následně se upraví pH na hodnotu 8 až 10 kyselinou fosforečnou. Tímto se připraví organické hnojivo obsahující dusík, draslík a fosfor [13].

Stravitelnost keratinových materiálů u zvířat je velmi nízká, a proto je důležité ji zlepšit. Toho lze dosáhnout hydrolyzou na rozpustné proteiny, peptidy nebo až na aminokyseliny. Na toto jsou používány metody alkalické, či kyselé hydrolyzy, ale v poslední době se i objevila metoda za použití enzymů izolovaných z mikroorganismů nebo dokonce použitím mikroorganismů samotných. Peptony jsou definovány jako proteinové deriváty, které se připravují z materiálů bohatých na látky obsahující sekundární proteinové deriváty jako: polypeptidy, dipeptidy a aminokyseliny. Díky tomuto složení jsou perfektním zdrojem dusíku, který je rozpustný ve vodě a nekoaguluje při zahřívání. Takže ho je možné použít do kultivačních médií. Jelikož je pepton drahý komponent v kultivačních médiích, některé studie se ho snaží získat právě z ovčí vlny, která je většinou vyhazována jako odpad. Ve studii M. Taskin a kol. byl prokázán pozitivní růst pro mikroorganismy *A. niger* a *E. coli* [5].

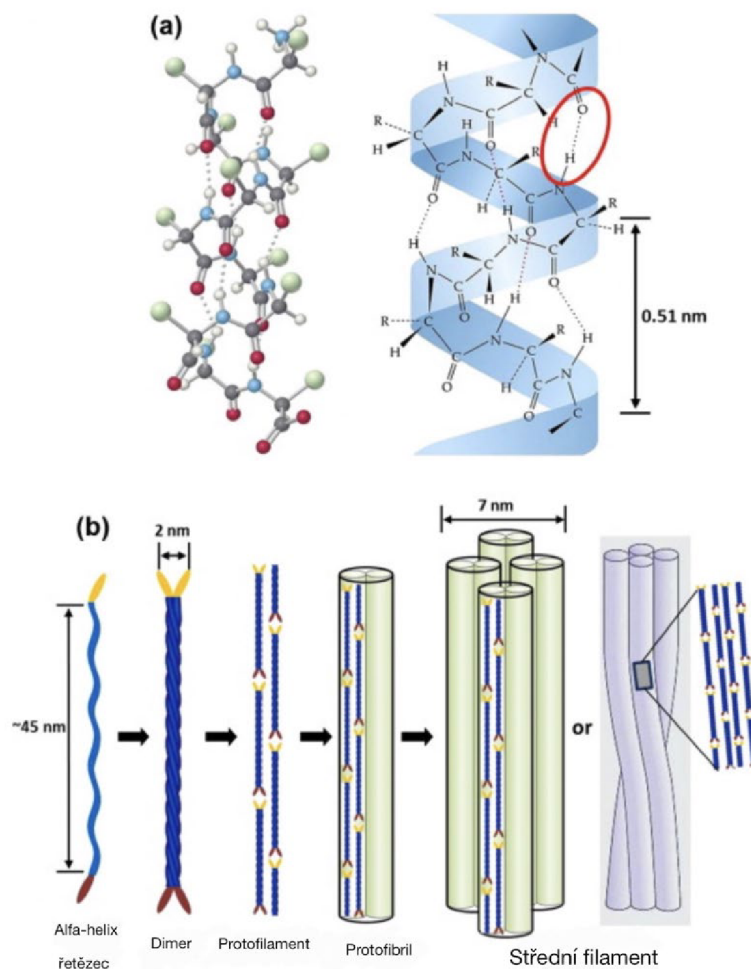
2.4 Keratin

Keratin je stabilní, nerozpustný a strukturní protein, který se nachází v epitelálních tkáních a v ochranných tkáních jako jsou vlasy (srst), vlna, nehty, peří a rohy. Podle sekundární struktury je keratin klasifikován na α -keratin a β -keratin. Beta-keratin je bohatý na beta skládaný list, který tvoří supramolekulární fibrilární svazky. Zatímco alfa-keratin je složen z alfa-helixu do filamentů. Keratin obsahuje velké množství disulfidických můstků (Obrázek 2), které udělují tuhost a chemickou odolnost. Keratinové materiály jsou tvořeny různým množstvím alfa a beta-keratinu. Například vlasy, ale i srst, jsou hlavně složeny z alfa-keratinu, zatímco peří z beta-keratinu [5, 15].

2.4.2 Alfa-keratin, beta-keratin

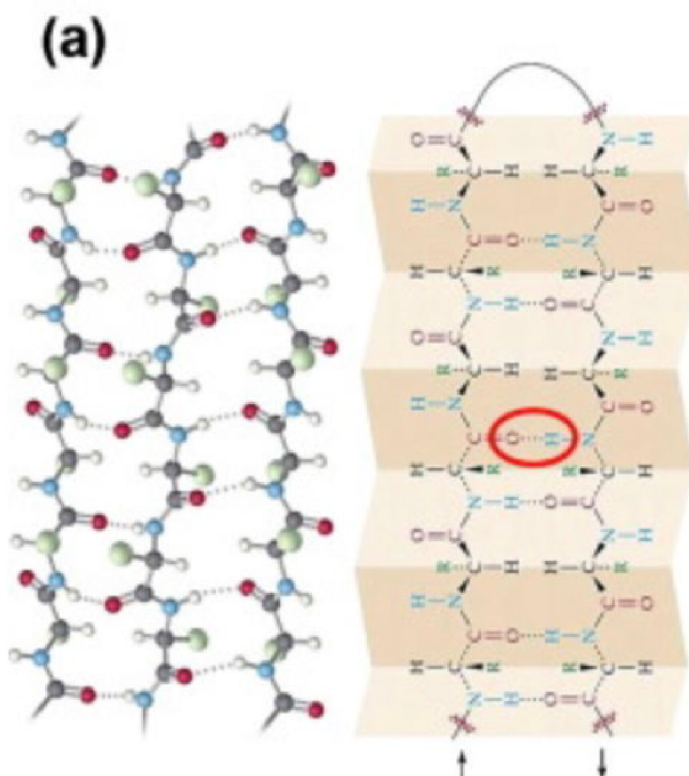
Alfa-keratin se nachází u všech obratlovců, zatímco beta-keratin výhradně u plazů a ptáků. Alfa-keratin, podtyp mezilehlých vláken nalezených v epitelu všech obratlovců, se rozšířil a funkčně diverzifikoval v amnioty prostřednictvím genové duplikace. Beta-keratin se vyskytuje primárně u plazů a ptáků, kde se také rozšířil a diverzifikoval, zejména v ptačích a chelonských liniích. Typ I (kyselé) a typ II (zásadité/neutrální) alfa-keratinu tvoří povinné heterodimery, které tvoří strukturální základ zrohovatělé epidermis a epidermálních přívěsků u savců, jako je právě ovčí vlna, vlasy, drápy, srst, rohy a kopyta. U ptáků a plazů tvoří epidermální alfa-keratiny zrohovatělou epidermis a epidermální přívěsky, jako jsou síťoviny a šupiny. Alfa-keratiny tvoří vlákna o průměru 7–10 nm a jsou to prostřední vlákna sloužící jako základ pro cytoskelet [28, 29, 30].

Rozdíl mezi molekulárními strukturami a formací filamentů jsou nejdůležitějšími znaky, které rozlišují alfa- a beta-keratin. Alfa-keratin je svinutý do alfa-helix konformace, kterou tvoří dva spirálovitě svinuté řetězce polypeptidů a jsou stabilizovány vodíkovými můstky. Alfa-helix proteiny vyskytující se v přírodě jsou pravotočivé. Na Obrázku 3 je zobrazen proces formace alfa-helixu. Dva izolované pravotočivé řetězce alfa-helixu se svíjí do levotočivé spirály pomocí disulfidických můstků. Pak dimer agreguje do protofilamentu, ze kterého následně vznikne protofibril. Čtyři protofibrily jsou kombinovány do helikální struktury [31].



Obrázek 3: Schéma formování alfa-keratinu [31]

Amorfní keratin obsahující síru je složen z proteinových řetězců složených z cysteinových, nebo glyceinových, tyrosinových a feny alaninových zbytků Beta-keratin se formuje do vláknitých struktur o průměru 4 nm, které nejsou klasifikované jako prostřední vlákna. Beta-keratin se formuje do skládaného listu, který je složen z bočních beta-vláken. Ty mohou být k sobě vázány intramolekulárními vodíkovými můstky paralelně, či antiparalelně (více stabilní). Skládaný list je stabilizován dvěma faktory: vodíkové můstky mezi beta-vlákný formují list a planarita peptidových vazeb zajišťuje, že se beta-list složí. Formace filamentu zahrnuje centrální polypeptidový řetězec složený k formaci čtyř bočních beta-vláken, které jsou spojeny vodíkovými můstky [28, 29, 30, 31].



Obrázek 4: Struktura beta-keratinu [31]

2.4.3 Rozdíl složení AMK keratinu

K analýze aminokyselin jsou používány nejčastěji metody kyselé hydrolýzy a automatická iontoměničová chromatografie. K porovnání byl vybrán keratin izolován z ovčí vlny (zástupce alfa-keratinu) a keratin z peří (zástupce beta-keratinu). Oba keratiny obsahují jako nejvyšší podíl cysteinu, který zajišťuje disulfidické můstky v systému a tímto rozlišuje keratin jako biopolymer s vyšším obsahem síry. Keratin izolován z vlny ukazuje vyšší obsah cystinu, prolinu a kyseliny glutamové než u keratinu z peří. Toto může být zapříčiněno chybějící sekundární helikální strukturou [30].

Tabulka 2: Složení aminokyselin alfa-keratinu (počet ks AMK na 100 ks AMK v řetězci) [30]

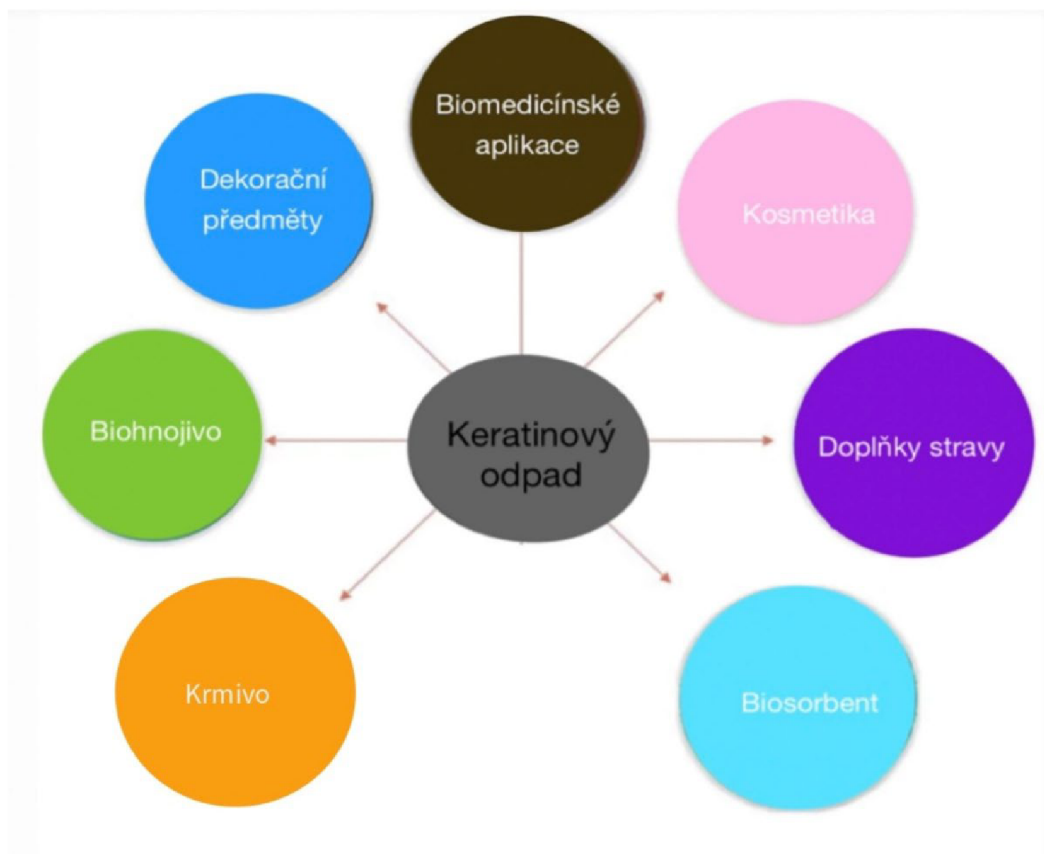
Alfa-keratin			
Aminokyselina	Zastoupení [%]	Aminokyselina	Zastoupení [%]
Alanin	5,5	Glycin	8,8
Arginin	6,6	Histidin	0,8
Kyselina aspartová	6,5	Izoleucin	3,4
Cystein	11,4	Leucin	7,8
Kyselina glutamová	11,3	Lysin	3,0
Methionin	0,5	Fenylalanin	2,5
Prolin	6,0	Serin	9,6
Threonin	6,1	Tyrosin	4,1
Valin	5,9		

Tabulka 3: Složení aminokyselin beta-keratinu (počet ks AMK na 100 ks AMK v řetězci) [30]

Beta-keratin			
Aminokyselina	Zastoupení [%]	Aminokyselina	Zastoupení [%]
Alanin	8,7	Glycin	13,7
Arginin	3,8	Histidin	0,2
Kyselina aspartová	5,6	Izoleucin	3,2
Cystein	7,8	Leucin	8,3
Kyselina glutamová	6,9	Lysin	0,6
Methionin	0,1	Fenylalanin	3,1
Prolin	9,8	Serin	14,1
Threonin	4,1	Tyrosin	1,4
Valin	7,8	Tryptofan	0,7

2.4.4 Aplikace keratinu

Keratin získaný z ovčí vlny lze použít k výrobě filmů, kompostovatelných obalů a nátěrů. Díky svým vlastnostem se mohou keratinové filmy používat v tkáňovém inženýrství a biomedicině [32].



Obrázek 5: Možnosti využití keratinového odpadu [31][32]

Kosmetický průmysl

Keratin je využíván jako hydrolyzát v různých kosmetických aplikacích. Keratinové hydrolyzáty jsou normální složkou šampónů, kondicionérů, krémů a výživných sér na vlasy. Také je lze najít v řasenkách, lacích na nehty a v očním make-upu. Keratinové peptidy zlepšují hydratační efekt a tím zvyšují lesk a jemnost vlasů. Funkce keratinového hydrolyzátu jsou: vytvoření ochranného filmu, vyhlazení vlasů či nehtů a zvýšení ohebnosti. Také bylo zjištěno, že výrazně snižuje povrchové napětí, tímto přídavek v kosmetice snižuje množství přidaného emulgátoru ke stabilizaci krému. Vysoká pufrovací schopnost keratinových hydrolyzátů je také využívána k udržení pH. Keratinový hydrolyzát má vlastnosti zvlhčovačla, které váže vodu ze spodní vrstvy epidermu [32, 33].

Biokompozity

Keratinové filmy jsou používány k produkci nových biodegradabilních a biokompatibilních materiálů pro tkáňové inženýrství. Podporují buněčnou adhezi a představují tak nový přístup k ošetřování ran [32].

Filmy připravené s koncentrací 10% keratinu a želatiny v 1 ml ethylenglykolu a glutaraldehydu vykazují mechanické a absorpční vlastnosti. Tímto jsou používány v obvazech k léčbě vnějších poranění. Keratin-chitosanové filmy připravené v 20% glycerolu mají využití jako materiál v kontaktních čočkách. Filmy z keratinu jsou obecně velmi křehké, proto se přídavkem glycerolu a sorbitolu zlepšují jejich plasticita [33].

Hydrogely na bázi keratinu ukázaly slibné výsledky jako biomateriály v různých biomedicínských aplikacích. Keratinový hydrogel o čistotě 9 % ukázal schopnost snížit postup popálení a podporuje regeneraci kůže. Směs 5% keratinového hydrogelu s 5% polyvinyl alkoholem vykazují dobré výsledky pro léčbu zranění in vivo. Polymery na bázi keratinu se používají v rozvoji scaffoldů pro dentální inženýrství. Hydrogely s koncentrací keratinu 20 % a 3% glycerolu zlepšují chování buněk v odontoblastu (buňky v dřeni zubů, který produkuje dentin) a ukazují slibné výsledky v regeneraci dentinu. Křížově spojené disulfidové hydrogely jsou kandidáty pro dodávání léčiv a jejich následné uvolnění [32, 33].

2.4.5 Metody izolace keratinu

Na extrakci keratinu z vedlejších přírodních produktů se používají metody jako jsou redukce, oxidace, mikrovlnná technika, lýza pomocí sulfitů, pomocí iontových roztoků, anebo enzymatické ošetření. Nevýhodou těchto metod je použití organických rozpouštědel a škodlivých chemikálií, které mohou poničit strukturu keratinu a jeho vlastnosti. Také jsou velmi drahé, toxické a neobnovitelné [34].

Tyto metody se řadí do dvou kategorií zpracování keratinového odpadu. Ten se zpracovává pomocí mokré nebo suché metody.

Mokrý metoda vyžaduje extrakci přímo ze zdroje. Keratin má rozdílné vlastnosti oproti ostatním fibriálním proteinům kvůli obsahu cysteinu. Cystein je aminokyselina, která způsobuje nerozpustnost keratinu. K rozpuštění je potřeba přerušit vodíkové a disulfidické můstky. Toho lze dosáhnout pomocí alkalické, kyselé, či enzymatické hydrolyzy. Suchou metodu lze použít, jelikož keratin působením tepla nevratně tuhne. Toto je opět způsobeno cysteinovými vazbami. Pokud má polymer více cysteinových vazeb, je obtížněji zpracovatelný. Proto je nezbytné použití redoxních činidel k narušení disulfidických vazeb [32].

2.5 Hydrolýza

Hydrolýza keratinových substrátů lze být provedena chemickou, enzymatickou, či mikrobiální metodou. Do chemických procesů se řadí alkalická nebo kyselé hydrolýza, ale lze použít i jiné reagenty (např.: redukční činidla). Nejčastěji jsou tyto typy prováděny při vysoké teplotě a tlaku.

Chemická hydrolýza je převážně rychlejší i jednodušší než enzymatická/mikrobiální a dosahuje vyšších hydrolytických výtěžků. Na druhou stranu může dojít ke zničení aminokyselin. Některé chemikálie (např.: thioly, siřičitany a peroxidy) představují zvýšenou toxicitu a kvůli reakčním podmínkám jako jsou vysoká teplota a tlak se jedná o velmi energetické metody.

Vlna je složena převážně z keratinu, přesněji z alfa-keratinu. Ten je poměrně pevný a nerozpustný v tradičních rozpouštědlech kvůli přítomnosti disulfidických můstků. Ty jsou k rozpuštění třeba rozbít [34, 35].

2.5.1 Alkalická hydrolýza

Hydrolýza za užití alkalických činidel je nejrozšířenější metodou pro získání keratinů. Tato metoda zahrnuje hydrolýzu disulfidických vazeb pomocí NaOH a KOH (méně často i s Ba(OH)₂), které je oxidují a vytvářejí hydrolyzát závisující na podmínkách při samotné hydrolýze. Alkalická hydrolýza se používá výhradně při stanovení tryptofanu, který je stabilní při jednoduchých podmínkách. Je také aplikovaná, pokud protein obsahuje velké množství

cukrů. Největší nevýhodou této metody je, že aminokyseliny jako serin, threonin, arginin a cystein jsou zničeny a ostatní aminokyseliny jsou racemizovány [35, 36].

2.5.2 Kyselá hydrolýza

Tímto typem hydrolýzy dochází ke štěpení peptidových vazeb v keratinovém řetězci. Vyžaduje podmínky jako jsou vysoká teplota a tlak, a tímto představuje velký enviromentální risk [33].

Kyselou hydrolýzou mohou být ztraceny některé aminokyseliny jako: serin, threonin, tyrosin a cystin. Asparagin, glutamin, methionin a tryptofan mohou být převedeny na jiné sloučeniny. Polypeptidy vzniklé z kyselé hydrolýzy mají více amorfní strukturu než u alkalických hydrolyzátů, jelikož je většina vodíkových můstků přerušena. Typické kyseliny používané při tomto procesu jsou kyselina chlorovodíková a sírová [37].

Keratinové materiály jsou velmi odolné vůči kyselinám, a proto se při hydrolýze využívají vysoce koncentrované roztoky. Kurbanoglu a kol. použili k hydrolýze suchých rohů 3M kyselinu sírovou. Směs byla zahřívána při 70 °C, po dobu 24 hodin [38].

2.5.3 Enzymatická hydrolýza

Keratinázy jsou proteolytické enzymy katalyzující hydrolýzu vysoce stabilních keratinů, které jsou převážnou složkou vlny, peří a dalších keratinových materiálů. Pepsin a papain, což jsou běžné proteázy, nedokážou keratin rozložit. Proces keratinolýzy má obecně dva kroky: sulfitolýzu a proteolýzu. Během prvního kroku sulfitolýzy se mění konformace disulfidických můstků keratinů a tím vznikne více vazeb, na které je umožněna keratinolýza. Redukci disulfidických můstků je umožněna pomocí sulfidových reductáz nebo sekrecí redukčních činidel [10].

Tabulka 5: Výtěžky hydrolyzy pomocí různých metod

Způsob zpracování	Materiál	Látka	Koncentrace	Podíl	Čas	Teplota	Srážení	Výtěžek	Odkaz
Nastříhaná na 2 mm	vlna	Vodný roztok L – cysteinu a močoviny	0,165M a 8M	5 g/100 ml	5 h	70°C	Dialýza, kyselina octová (pH 4 – 4,5), centrifugace	-	[37]
Namleté	peří	NaOH	1N	10 g/95 ml	2 h	70 °C	Ledová kyselina octová (pH 7)	5,38 g	[26]
Namleté	peří	NaOH a NaHSO ₃	1,75 % a 0,5 %	20 g/100 ml	90 min	80 °C	5 ml HCl, dialýza	49,9 %	[40]
Namleté	peří	NaOH a NaHSO ₃	2 % a 0,5 %	20 g/100 ml	105 min	90 °C	5 ml HCl, dialýza	60,22 %	[38]
-	peří	H ₂ SO ₄	1M	50 g/l	300 min	90 °C	Neutralizace NaOH na pH 7, centrifugace	676 mg/g	[39]

2.6 Kompozity z keratinu

Filmy

Filmy je možné tvořit z biopolymerů, již obsažených v roztoku. Při změně podmínek jako například působením tepla, nebo změnou pH dojde ke shlukování biopolymerů ve filmové fázi. Máme různé typy výroby jako je lití rozpouštědlem, tepelné lisování, tlakové lití nebo elektrostatické zvlákňování [32, 40].

Jednou z možností přípravy keratinových filmů, je příprava polyvinyl alkohol filmu s příměsí keratinu. Rozpuštěný protein je smíchán s 1 g PVA při pokojové teplotě za stálého míchání. Viskózní materiál je vylit na skleněnou desku a je ponechán schnout při pokojové teplotě. PVA představuje nosič nebo spíš podporu pro keratinový materiál k více strukturnímu filmu [42, 41]. Další možností přípravy keratinových filmů je s přidavkem chitosanu. Film se připravuje smícháním roztoků keratinu a chitosanu v 75% kyselině octové. Přídavek chitosanu zajišťuje silný a pružný film [46].

Filmy mohou být následně modifikovány plastifikátory, změkčovadly a síťovacími činidly. Plastifikátory o nízké molekulární hmotnosti jsou přidávány do proteinového filmu ke snížení přitažlivých sil mezi molekulami a tím modifikují 3D konformaci. Plastifikátory by měly mít specifické vlastnosti jako nízký bod tání a hydrofobicita. Funkční efekty plastifikátorů na kompozitní filmy na bázi proteinů zahrnují: snížení tvrdosti, zvýšení flexibility, nebo změna mechanických a elastických vlastností. Disulfidické vazby přítomné v nativním proteinu jsou příčinou nízké flexibility kompozitů. Rozštěpení této vazby je nutné k otevření proteinu na další úroveň. Zvýší se tím povrchová aktivita, hydrofobicita, zpěňovací kapacita a stabilita proteinu. Používanými redukčními činidly jsou dithiothreitol a β -merkapt ethanol. Změkčovadla (glycerol a sorbitol) difundují do disperze proteinu, díky své nízké molekulární hmotnosti. Glycerol se velmi jednoduše zabudovává do keratinového řetězce, kde dochází k asociaci s hydrofobními aminokyselinami. Film má pak vyšší schopnost vázat vodu. Síťovací vazby mezi jednotlivými polymery tvoří polymerní síť. Sílu, pevnost a odolnost vůči vodě zvyšuje stupeň zesíťování. Chemickými síťovacími činidly jsou glutaraldehyd, glycerinaldehyd, formaldehyd a kyselina mléčná. Pokud začleníme do keratinového filmu chitosan, dostaneme pružnější a silnější film se zlepšenou bobtnavostí. Tento film lze použít jako substrát pro buněčné kultury [32, 43, 44].

Gely

Hydrogel je trojrozměrná křížově spojená matrice složená z hydrofobních 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].

Patent z roku 2020 ukazuje jednostupňovou přípravu keratinového gelu. Nejdříve jsou odmaštěny vlasy máčením v organickém rozpouštědlu 2 až 4 hodiny a následně umyté v deionizované vodě a vysušené. Roztok hydrolyzátu (obsahující močovinu, thiomočovinu a pyrosiřičitan sodný). Podíly vlasy:roztok byly 0,01:1–0,01:3. Rozpouštění probíhalo při teplotách 70–100 °C a čase 1 až 2 hod. Chladnoucí teplota je 0–40 °C a čas 0,5 až 2 h. Cílem tohoto procesu je extrakce malých molekulových sloučenin (močovina, thiomočovina, atd.), které byly přidány při rozpouštění. Extrakce probíhá tak, že je gel umístěn ve vodě 4–8krát po dobu 3 hod. Dialýza nebo sušení není potřeba. Díky tomuto je možné tento postup nazývat

šetrný k životnímu prostředí. Připravený gel má dobrou bobtnající vlastnost, iontovou sílu a biodegradabilitu [45].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

Bromid draselný, Lach-Ner (ČR)

Ethanol, Lach-Ner (ČR)

Hexan, Lach-Ner (ČR)

Hydroxid sodný, Lach-Ner (ČR)

Kyselina chlorovodíková, Lach-Ner (ČR)

Kyselina sírová, Lach-Ner (ČR)

Polyvinyl alkohol o molární hmotnosti 30 000- 70 000, Sigma-Aldrich

3.2 Přístroje

Analytické váhy, OHAUS (USA)

Běžné laboratorní sklo a materiál

Centrifuga, HERMLE Labortechnik (SRN)

Extraktor typu Soxhlet SOXTERM, Gerhardt (SRN)

FTIR spektrometr Nicolet™ iS™ 5, Thermo Fischer Scientific (USA)

Membránová vývěva, KNF Group (SRN)

Miniaturní spektrometr USB650UV, Ocean Optics, Inc. (SRN)

Teplotně modulovaný kalorimetr DSC 8000, Perkin Elmer (USA)

Termogravimetrický analyzátor TGA Q5000IR, TA Instruments (USA)

Zkušební přístroj, Labortech (ČR)

3.3 Materiál

Ovčí vlna, plemeno Zwartbles

3.4 Izolace keratinu

ODTUČNĚNÍ VLNY

Odtučnění vlny bylo provedeno ve 2 l 50% roztoku ethanolu. Vlna byla ponechána v ethanolu po dobu jednoho dne. Následně byla vlna promyta vodou se saponátem alespoň třikrát a čtvrté promytí bylo provedeno destilovanou vodou. Tento proces odtučnění byl proveden ještě podruhé. Promytá vlna byla ihned zpracována následujícími procesy.

V druhém způsobu byla využita extrakce tuku pomocí extraktoru typu Soxhlet SOXTERMU. Suchá vlna o hmotnosti 5,5 g byla dána do prázdné celulózové patrony, která byla ucpána navrchu vatou. Následně byla vložena do drátkových držáků extrakční nádoby, do kterých bylo přidáno extrakční činidlo (hexan). Takto připravené čtyři extrakční nádoby s patronami byly vloženy do přístroje Gerhardt Soxtherm. Pomocí předem nastaveného programu pro extrakci v hexanu (viz. Tabulka 6), byla spuštěna extrakce, která trvala 3 hodiny a 4 minuty. Po skončení extrakce byly nádoby vyjmuty z přístroje a patrony byly ihned přemístěny do sušárny. Po odpaření hexanu byla vlny ihned zpracována.

Tabulka 6: 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 doby oplachování	1 h 0 min
Vypařování B	2x interval
Interval vypařování C	10 min
Délka programu	3 h 4 min

HYDROLÝZA VLNY

Proces hydrolyzy byl proveden podle dvou různých návodů, aby bylo zjištěno, kterým způsobem je možno dosáhnout co nejvyšší výtěžnosti keratinu.

Alkalická hydrolyza

Postup byl modifikován použitím různých koncentrací, časových intervalů působení hydroxidu sodného a charakteru materiálu (nastříhaná nebo nenastříhaná vlna). Podmínky hydrolyzy jsou uvedeny v Tabulce 7. Do 8 Erlenmeyerových baněk bylo přesunuto po 10 g odmaštěné vlny, následně do nich bylo přidáno 200 ml roztoku hydroxidu sodného o určité koncentraci. Proces hydrolyzy byl proveden za konstantního míchání při 70 °C po dobu odpovídající koncentraci hydroxidu a charakteru použitého materiálu. Po ukončení hydrolyzy, byla u nižších koncentrací provedena centrifugace hydrolyzátu při 4000 ot./min po dobu 3 min.

Tabulka 7: Parametry využití při hydrolyze za použití hydroxidu sodného

Nastříhaná vlna		Nenastříhaná vlna	
Koncentrace NaOH [hm. %]	Čas působení [h]	Koncentrace NaOH [%]	Čas působení [h]
0,5	25	0,5	26
1	3	1	6,5
2	3	2	3
3	3	3	3

Z alkalického hydrolyzátu byl keratin vysrážen pomocí 10% roztoku HCl. Nejprve byl hydrolyzát srážen na hodnotu pH 4,7. Roztok byl zdekantován a zbylý supernatant byl srážen na hodnotu 3,4. Po dialýze vzorku ze srážení na pH 4,7, byl přebytečný supernatant odejmut a opětovně srážen na hodnotu pH 3,4.

Dialýza následovala 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. Voda, v dialyzační nádobě, byla každý den měněna nejméně dvakrát. Následně byl dialyzovaný produkt přenesen do centrifugačních zkumavek a v nich zmražen.

LYOFILIZACE KERATINU

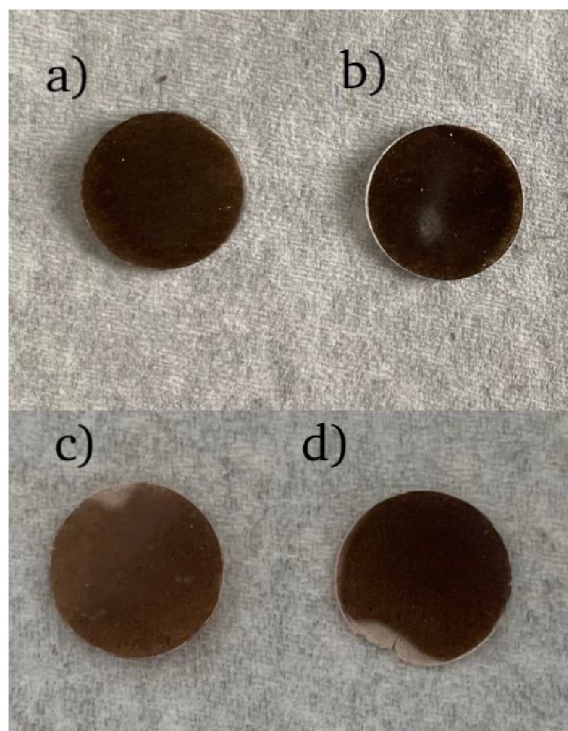
Vysrážený a zdialyzovaný keratin byl zamražen v centrifugačních zkumavkách o objemu 50 ml, do kterých bylo nalito 35 ml směsi bílkoviny a kapaliny. Poté byly umístěny do lyofilizačních nádob, kde působením vakua a nízké teploty byla dosažena sublimace kapaliny ze vzorku.

3.5 Charakterizace keratinu

FTIR

Vzorky získané z hydrolyz byly před analýzou nejprve vysušeny v sušárně a poté přeneseny do exsikátoru. Také byl vyžhán bromid draselný. Pro vytvoření tablety k analýze byly nejprve jednotlivé komponenty rozmělněny v třecích miskách. Pro jednu tabletu bylo vždy přibližně naváženo 280 μg bromidu draselného a 3 μg vzorku. Tyto dva komponenty byly rozmělněny v třecí misce a ze vzniklé homogenní směsi bylo naváženo 200 μg , která byla přenesena do lisovací formy. K vytvoření tablety byl použit hydraulický laboratorní lis. Vzniklá tableta byla použita pro infračervenou spektrometrii s Fourierovou transformací. Všechna spektra byla naměřena v rozsahu vlnočtů 400 až 4000 cm^{-1} . Počet skenů, který vyjadřuje počet spekter kumulovaných v rámci jednoho měření, byl stanoven na 64 a rozlišení 2 cm^{-1} . Všechna spektra byla korigována a normalizována k nejvyššímu píku [46].

Na Obrázku 6 jsou zobrazeny tablety vzorků z jednotlivých hydrolyz. Na fotografii a) je tableta z keratinu získaného z alkalické hydrolyzy nastříhané ovčí vlny za použití 1% (hm.) roztoku NaOH a následném srážení na pH 4,7. Na fotografii b) byla tableta vylisována z keratinu získaného alkalickou hydrolyzou nastříhané ovčí vlny za použití 3% (hm.) roztoku NaOH a následném srážení na pH 4,7. Na fotografii c) je vyfocena tableta z keratinu izolovaného pomocí alkalické hydrolyzy 2% (hm.) roztokem NaOH z nastříhané vlny a srážení na hodnotu pH 3,4 z prvního supernatantu. Na poslední fotografii d) je keratin také izolován z alkalické hydrolyzy nenastříhané ovčí vlny 1% (hm.) roztokem NaOH a z následného srážení na pH 3,4 z druhého supernatantu.



Obrázek 6: Tablety vzorků získané jednotlivými hydrolyzami

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 °C. Rychlost zahřívání byla nastavena na 10 °C·min⁻¹. Na termální analýzu keratinu pomocí DSC bylo použito 5 mg, které následně byly uloženy do hliníkových pánviček a testovány za následujících podmínek (viz. Tabulka 8) [47]

Tabulka 8: Parametry pro DSC analýzu vláken vlny [47]

Počáteční teplota	30 °C
Finální teplota	350 °C
Rychlost zahřívání	20 °C·min ⁻¹
Pročišťovací atmosféra	Dusík 80 ml ·min ⁻¹

TERMOGRAVIMETRICKÁ ANALÝZA

Byla provedena termogravimetrická analýza pomocí přístroje TGA Q5000IR v dusíkové atmosféře s průtokem vzduchu 30 ml·min⁻¹. Přibližně 5 mg vzorku bylo uzavřeno v hliníkovém tavícím kelímku a rychlost zahřívání byla nastavena na 10 °C·min⁻¹. Testování probíhalo v rozsahu teplot od 100 až do 650 °C [52].

3.6 Příprava keratinových filmů

Všechny filmy byly připravovány metodou lití rozpouštědlem. filmy byly připraveny ze dvou roztoků. První roztok byl vytvořen z 4% (hm.) roztoku polyvinyl alkoholu (PVA). Aby došlo k rozpuštění PVA, byla směs míchána magnetickým míchadlem a zahřívána na teplotu 85 °C. Druhý roztok byl připraven rozpuštěním určitého množství lyofilizovaného keratinu v 0,5 M roztoku hydroxidu sodného. Homogenní roztok keratinu byl vytvořen pomocí ultrazvuku. Následně bylo 15 ml 4% (hm.) roztoku PVA postupně přikapáváno do 3,75 ml roztoku keratinu. Následně byl roztok vylit do Petriho misek, které byly zakryty buničinou. Jejich obsah byl vysoušen za laboratorní teploty po dobu tří dnů. Zesíťování keratinových bylo prováděno podobně, ale objemy roztoků byly upraveny na dvojnásobné množství kvůli tloušťce filmu. Do finálního roztoku filmu byl také přidán síťovací činidlo složené z glutaraldehydu, fosfátového pufru (pH = 7,2) a glycerolu. Takto připravený roztok byl vylit do Petriho misek a přikryt buničinou. Obsah Petriho misek byl sušen 10 dní při pokojové teplotě. Slepý vzorek (PVAB) byl připraven přikapáváním 15 ml 4 hm.% roztoku PVA do 3,75 ml 2M roztoku NaOH, následně byl vylit do Petriho misky, přikryt buničinou a ponechán schnout při pokojové teplotě po dobu 3 dní.

Tabulka 9: Modifikace keratin-PVA filmů

Vzorek	Obsah keratinu [mg]	Obsah sušiny keratinu [%]	PVA [hm. %]	Rozpouštědlo [ml]	Objem rozpouštědla [ml]	Obsah síťovacího činidla [%]
PVAB	-	-	4	2M NaOH	3,75	-
PVAK1	68	10	4	0,5M NaOH	3,75	-
PVAK2	189	20	4	0,5M NaOH	3,75	-
PVAK3	324	30	4	0,5M NaOH	3,75	-
PVAK1Z	68	10	4	0,5M NaOH	3,75	1
PVAK2Z	189	20	4	0,5M NaOH	3,75	1
PVAK3Z	324	30	4	0,5M NaOH	3,75	1

3.7 Charakterizace keratinových filmů

KOLORIMETRIE

Kolorimetrie se řadí mezi optické metody, a to přímo mezi vizuální a subjektivní. Tato metoda slouží k objektivnímu popisu barev. K tomuto určení je nutné definovat tři základní elementy: zdroj světla, pozorovaný objekt a pozorovatel. Pozorovatel byl komisí CIE definován pomocí tří funkcí. Jsou jimi trichromatičtí členitelé \bar{x} , \bar{y} , \bar{z} . Model XYZ lze transformovat do souřadnic CIELAB díky nelineární transformaci na L^* , a^* , b^* . Parametr L^* je parametr měrné světlosti a určuje, jestli se jedná o barvu světlou a o barvu tmavou. Na a^* se nachází barvy od zelené po červenou, zatímco na ose b^* jsou barvy od modré po žlutou. Všem barvám je tedy možné přiřadit konkrétní souřadnice [49, 50].

Kolorimetrické parametry filmů byly zjišťovány pomocí Miniaturního spektrometru USB650UV. Spektrální intenzita vyzařování zdroje byla nastavena na D50 a pozorovatel byl požit dvoustupňový. Nejdříve byla změřena tloušťka filmu ve třech bodech. Následně byl umístěn film v místě změřené tloušťky do spektrometru. Spektrometrem byly změřeny souřadnice barvového prostoru L^* , a^* , b^* . Z těchto souřadnic lze určit souřadnice chroma C^* a odstín h^* .

MECHANICKÉ VLASTNOSTI FILMU

U vzorků zesíťovaných keratin-PVA filmů byly proměřeny hodnoty pro Youngův modul, pevnost v tahu σ_B a délkové prodloužení při přetržení ϵ_B . Nejdříve byly z filmů raženy lopatkové tvary za pomoci raznice a hydraulického lisu. Následně byla proměřena tloušťka d vyraženého filmu v pěti místech a vzorek byl upevněn do zkušebního stroje Labortech, ČR. Požitá rychlost deformace byla 10 mm/min.

BOBTNAVOST FILMU

Ze zasíťovaných filmů byly vystříženy kousky ve tvaru čtverce. Následně byly všechny vzorky zváženy v suchém stavu a umístěny na zvolený časový interval do destilované vody. Vzorky byly po vyjmutí zváženy. Tento celý proces trval 6 hodin, s tím že první 3 hodiny byly častější časové intervaly a následně se vážilo po hodině.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Odtučnění peří

Před samotným procesem hydrolyzy byla provedena předúprava ovčí vlny odtučněním. Tuk může ovlivnit výtěžnost procesu, jelikož vytváří ochrannou vrstvu na povrchu vlny. Také by mohla být zapříčiněna kontaminace produktu hydrolyzy. Proces odtučnění byl prováděn dvěma metodami: odtučněním pomocí 50 % ethanolu, nebo hexanu v přístroji SOXTHERM. V Tabulce 10 jsou uvedeny množství tuku, která byla získána jednotlivými extrakčními metodami.

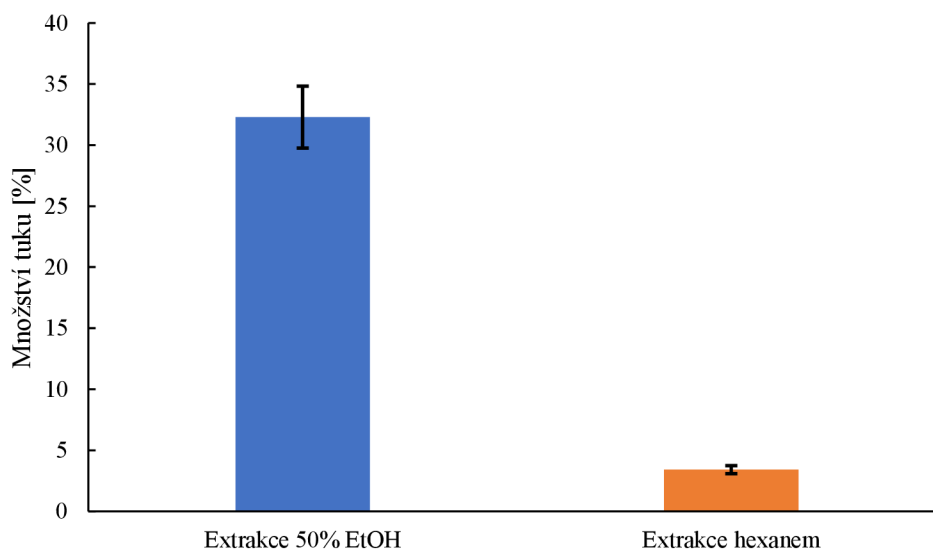
Tabulka 10: Množství tuku extrahovaného z ovčí vlny

Rozpouštědlo	Množství tuku [%]	Směrodatná odchylka [%]
50% EtOH	32,29	2,54
Hexan	3,42	0,33

Odtučnění ovčí vlny 50% ethanolem se významně lišilo svou účinností od druhé metody. Podle literatury je udáváno množství tuků u ovčí vlny v rozmezí 5–25 %. Hodnoty množství tuku se mohou lišit podle druhu a životních podmínek ovce [51].

Vyšší výtěžnost pomocí ethanolu může být způsobena rozpuštěním částečně polárních sloučenin [52, 53].

Grafické znázornění extrahovaného tuku zobrazuje Obrázek 7. Z obrázku je patrné, že na odtučnění ovčí vlny je postačující ethanol, jelikož zajišťuje pracovní nenáročnost a také je možné odtučnit větší množství vlny než u metody extrakcí hexanem.



Obrázek 7: Porovnání účinnosti extrakce tuků pomocí dvou různých metod

4.2 Alkalická hydrolyza

Izolace keratinu byla provedena pomocí hydroxidu sodného, za užití různých koncentrací a také různé dezintegrace materiálu (nastříhaná, nebo nenastříhaná vlna). Na základě výtěžků, byla stanovena účinnost jednotlivých izolací. Z hydrolyzátu byl následně srážen keratin na hodnoty pH: 4,7 a zbylý supernatant na 3,4 (1.). Po dialýze keratinu ze srážení na pH 4,7, byl zbylý

supernatant opět srážen na pH 3,4 (2.). V Tabulkách 11 a 12 jsou uvedena množství keratinu získaného různými metodami. Grafická znázornění účinnosti jednotlivých procesů jsou zobrazena na Obrázku 8.

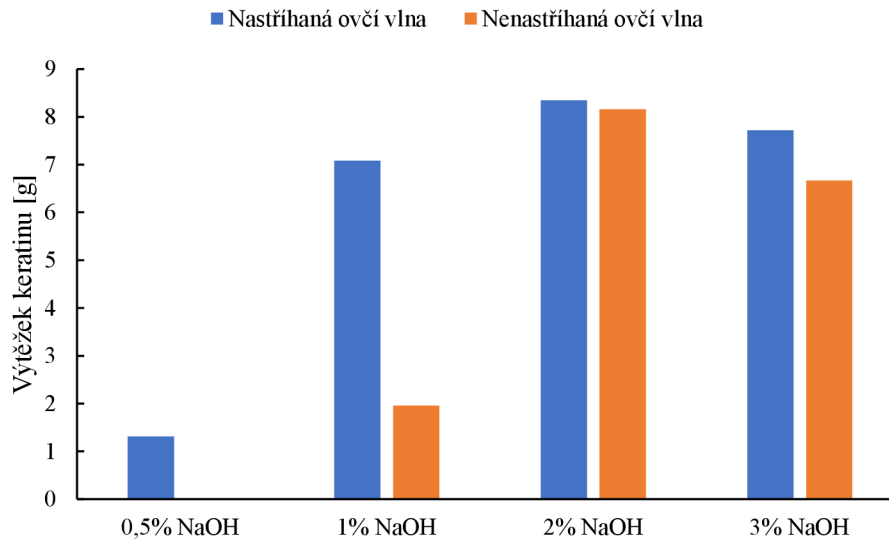
Tabulka 11: Výtěžnost alkalické hydrolyzy získaná z 10 g nastříhané ovčí vlny

Nastříhaná vlna					
Koncentrace NaOH [hm.%]	Hmotnost [g]			Celkový hmotnostní výtěžek [g]	Procentuální výtěžek [%]
	pH 4,7 [-]	pH 3,4 (1.) [-]	pH 3,4 (2.) [-]		
0,5	0,9152	0,2645	0,1280	1,3077	13,08
1	7,0554	0,0223	0,0018	7,0795	70,80
2	6,7101	1,4297	0,2034	8,3432	83,43
3	7,5107	0,2085	0,0001	7,7193	77,19

Tabulka 12: Výtěžnost alkalické hydrolyzy získaná z 10 g nenastříhané ovčí vlny

Nenastříhaná vlna					
Koncentrace NaOH [hm.%]	Hmotnost [g]			Celkový hmotnostní výtěžek [g]	Procentuální výtěžek [%]
	pH 4,7 [-]	pH 3,4 (1.) [-]	pH 3,4 (2.) [-]		
0,5	-	-	-	-	-
1	1,2833	0,1046	0,5687	19,566	19,57
2	7,8078	0,2844	0,0693	81,615	81,61
3	6,4402	0,0778	0,1495	66,675	66,68

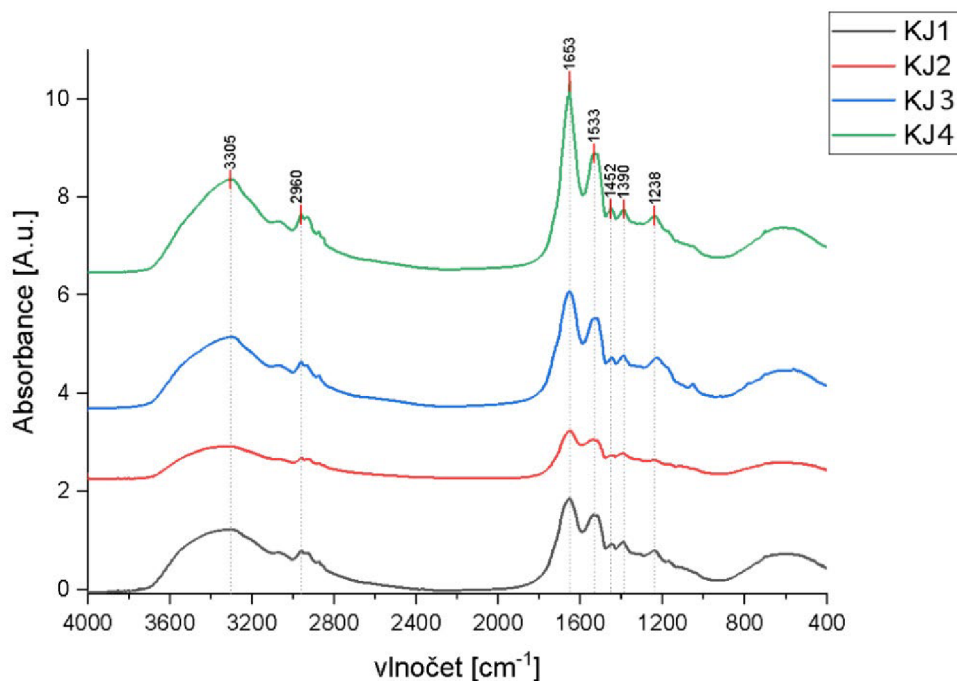
U izolace keratinu pomocí alkalické hydrolyzy byl zkoumán vliv koncentrace dané látky na výtěžnost keratinu. Nejnižší výtěžnost vykazovala metoda s využitím 0,5% (hm.) roztoku hydroxidu sodného. U izolace z nastříhané vlny činil výtěžek 13,08 % a u nenastříhané vlny nebylo možné žádného výtěžku dosáhnout, jelikož vlna nepodlehla úplné dezintegraci v hydrolyzátu. Při porovnání izolace keratinu pomocí 1% (hm.) roztoku hydroxidu sodného, lze vidět, že procentuální výtěžnost izolovaného keratinu z nenastříhané vlny byla o 50 % nižší než u izolace z nastříhané vlny. Tento velký rozdíl byl způsoben překročením teploty 70 °C při procesu hydrolyzy a tím se mohla část keratinu denaturovat. Nejúčinnější metodou bylo použití 2% (hm.) roztoku hydroxidu sodného, při které bylo vyizolováno 83,43 % a 81,61 % keratinu.



Obrázek 8: Výtěžnost jednotlivých hydrolyz z 10 g ovčí vlny

4.3 Charakterizace keratinu pomocí FTIR

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) byla použita pro naměření spekter extrahovaného keratinu v oblasti $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$. Na Obrázku 9 jsou zobrazeny charakteristické absorpční píky, které náleží peptidovým vazbám a potvrzují strukturu keratinu. V pásu od 1800 až do 1653 cm^{-1} byly detekovány struktury tzv. amidů I, které souvisejí s valenčními vibracemi vazeb u $\text{C}=\text{O}$ a stanovují sekundární strukturu proteinu. Následně byly detekovány amidy II v oblasti spektra 1553 cm^{-1} . tato oblast spektra náleží deformačním vibracím N-H a C-H. Pro amidy III jsou charakteristické pásy kolem 1440 až 1220 cm^{-1} , kde v této oblasti dochází k valenčním vibracím C-N a C=O. Detekována hodnota 1238 cm^{-1} byla přiřazena sekundárním aminům a v této oblasti jsou valenční vibrace se středně intenzivní odezvou. Pík detekován u hodnoty 500 je způsoben vibrací vazby C-S [54, 55].



Obrázek 9: FTIR spektra keratinu izolovaných z různých typů hydrolyz

- KJ1 – keratin izolován 1% (hm.) roztokem hydroxidu sodným, srážený na pH 4,7
 KJ2 – keratin izolován 3% (hm.) roztokem hydroxidu sodným, srážený na pH 4,7
 KJ3 – keratin izolován 2% (hm.) roztokem hydroxidu sodným, srážený na pH 3,4 (1.)
 KJ4 – keratin izolován 1% (hm.) roztokem hydroxidu sodným, srážený na pH 3,4 (2.)

4.4 Termické vlastnosti keratinu

DSC neboli Diferenční skenovací Kalorimetrie, je jedna z nejběžnějších termických analýz. Zaznamenává teplo, které je buď absorbované nebo uvolněné během různých přechodných stavů ve vzorku. Pomocí metody DSC byly získány teploty skelného přechodu (T_g), teplota tání (T_m) a entalpie tání (ΔH_m).

Výsledky diferenční skenovací kalorimetrie shrnuje Tabulka 13, kde vyplývá, že teplota skelného přechodu (T_g) analyzovaných vzorků byla detekována v rozmezí 95,5 až 114,2 °C. tyto výsledky jsou mírně nižší v dostupné literatuře, kde je teplota skelného přechodu udávána v rozmezí 78,2 až 100,3 °C. Teplota tání (T_m) byla zaznamenána pouze u vzorku KJ3 (keratin izolovaný pomocí 2% (hm.) roztoku hydroxidu sodného), a to na 148,2°C, což naznačuje že ostatní vzorky měly plně amorfni charakter a jejich teplota tání nebyla pomocí DSC detekovatelná [56].

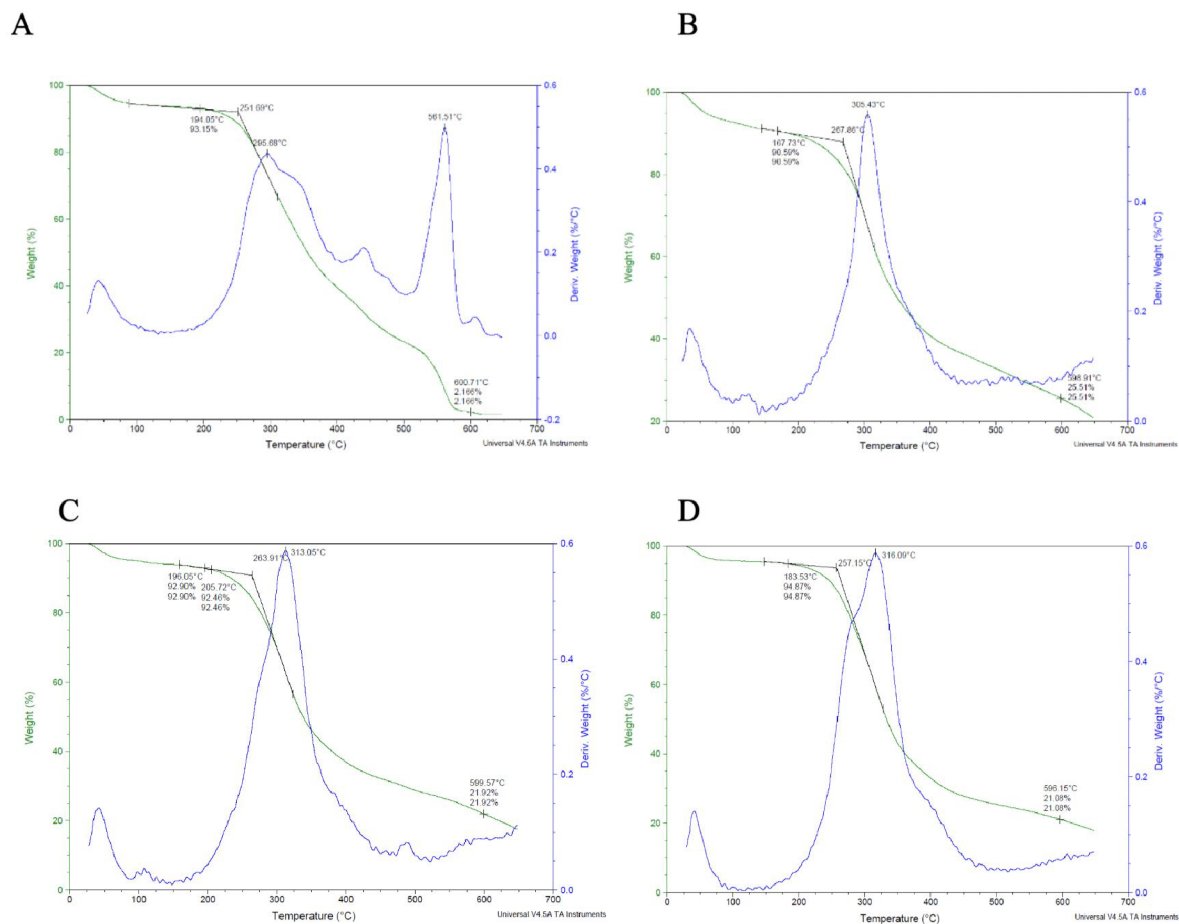
Tabulka 13: Výsledky DSC analýzy keratinu z jednotlivých typů hydrolyz

Vzorek	T_g [°C]	T_m [°C]	ΔH_m [J·g ⁻¹]
KJ1	103.8	-	-
KJ2	114.2	-	-
KJ3	95.5	148.2	13.9
KJ4	99.6	-	-

- KJ1 – keratin izolován 1% (hm.) roztokem hydroxidu sodným, srážený na pH 4,7
 KJ2 – keratin izolován 3% (hm.) roztokem hydroxidu sodným, srážený na pH 4,7
 KJ3 – keratin izolován 2% (hm.) roztokem hydroxidu sodným, srážený na pH 3,4 (1.)
 KJ4 – keratin izolován 1% (hm.) roztokem hydroxidu sodným, srážený na pH 3,4 (2.)

4.5 TGA keratinu

Pomocí termogravimetrické analýzy (TGA) byla analyzována termální stabilita izolovaných keratinů. Byly získány teploty počátku tepelné degradace (T_{onset}) a teplota maximální degradace (T_{max}). Ze záznamů měření zobrazených na Obrázku 10 jsou patrné teploty počátku termální degradace, které byly stanoveny v rozmezí 167,7–205,7 °C. Nejvíce termostabilním vzorkem byl KJ3, jehož počátek termální degradace byl určen na 205,7 °C. Prvotní ztráta hmotnosti ve vzorcích může být spojena se ztrátou vázané vody v molekule. Tento proces se nacházel v rozmezí 50–200 °C. Druhá degradace proběhla u teplot 250–350 °C. Kolem teploty 230 °C dochází k narušení helikální struktury, jelikož struktura alfa-keratinu prochází fázovou proměnou (přechod mezi pevnou a kapalnou fází). K uvolnění molekul obsahující síru dochází v intervalu 250–295 °C. Dochází totiž k narušení disulfidických vazeb zbytku cysteinu a je uvolňován H₂S. Nad teplotou 300 °C dochází k pyrolytickému rozložení. To je zapříčiněno rozrušením slabých vodíkových vazeb [57].

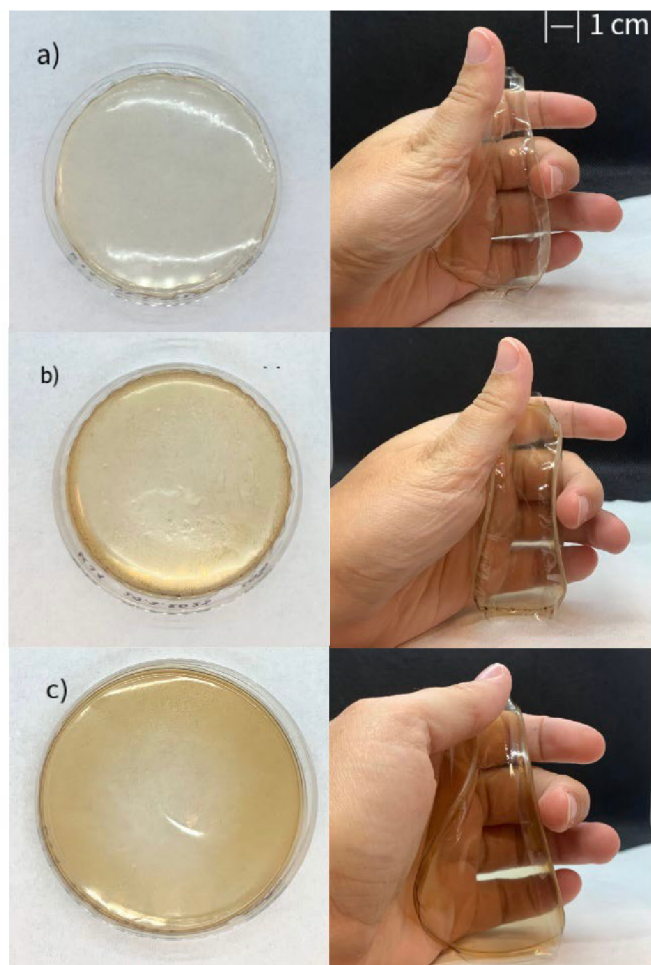


Obrázek 10 :Záznamy z termogravimetrické analýzy vzorků keratinu z jednotlivých hydrolyz: A) vzorek KJ1, B) vzorek KJ2, C) vzorek KJ3 a D) vzorek KJ4

- KJ1 – keratin izolován 1% (hm.) roztokem hydroxidu sodným, srážený na pH 4,7
- KJ2 – keratin izolován 3% (hm.) roztokem hydroxidu sodným, srážený na pH 4,7
- KJ3 – keratin izolován 2% (hm.) roztokem hydroxidu sodným, srážený na pH 3,4 (1.)
- KJ4 – keratin izolován 1% (hm.) roztokem hydroxidu sodným, srážený na pH 3,4 (2.)

4.6 Vlastnosti filmů

Připravované filmy byly modifikovány přidavkem polyvinyl alkoholu, případně síťovacím činidlem, aby se docílilo vhodných vlastností. Účelem této práce bylo modifikovat složení filmů, za účelem zvýšení viskoelastivity. Keratin-PVA filmy byly připraveny nejdříve tak, že keratin byl rozpuštěn v roztoku hydroxidu sodného o koncentraci (0,5M), poté bylo do roztoku keratinu a hydroxidu sodného přidán 4% (hm.) roztok PVA. Tyto filmy byly připravovány s různým obsahem keratinu (viz. Tabulka 9). Všechny filmy byly ohebné a vykazovaly pevnost, soudržnost tvaru.



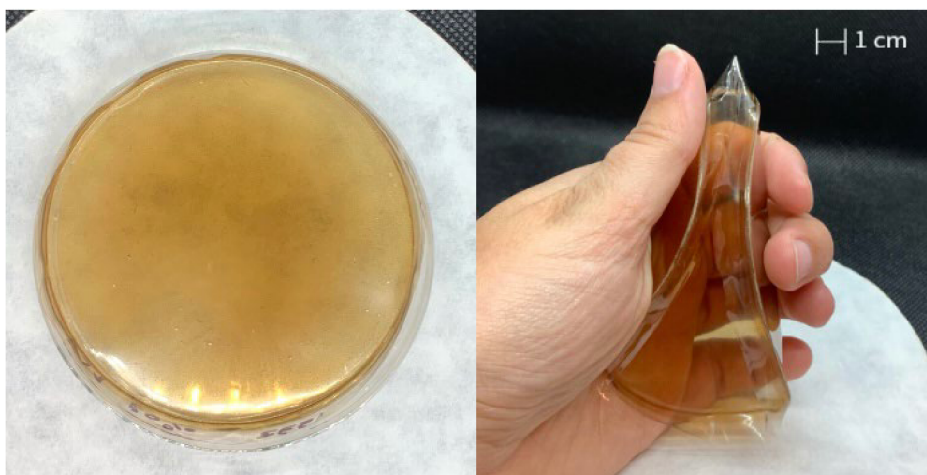
Obrázek 11: Vybrané vzorky keratin-PVA filmů: a) PVAK1, b) PVAK2, c) PVAK3, druhá část fotky obsahuje ukázkou ohebnosti filmů

PVAK1 – 4 hm.% PVA + 0,5M NaOH+ 10 % keratinu

PVAK2 – 4 hm.% PVA + 0,5M NaOH+ 20 % keratinu

PVAK3 – 4 hm.% PVA + 0,5M NaOH+ 30 % keratinu

Za účelem další modifikace filmů, bylo provedeno síťování kompozitních filmů. Filmy byly připraveny stejnou metodou s dvojnásobným množstvím roztoků. Po přidání 4% (hm.) roztoku PVA bylo ještě přidáno síťovací činidlo s látkami: glycerol, glutaraldehyd a fosfátový pufr. Po tomto kroku následovalo sušení v Petriho misce. Jejich pevnost se snížila a staly se více ohebné a elastické, bez žádných známek zvlnění. Nejlepším zesíťovaným filmem připraveným v této práci byl PVAK2Z.

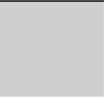
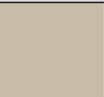
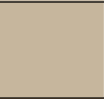
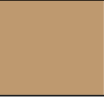


Obrázek 12: Zesíťovaný keratin-PVA film, vzorek PVAK2Z – 4 hm% PVA + 0,5M NaOH+ 20 % keratinu

4.6.1 Kolorimetrie filmů

Barva připravených filmů byla definována pomocí kolorimetrie, která používá několik parametrů k vyjádření číselné barevnosti. Pomocí parametru L^* byla stanovena světlost filmů. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 14. U filmu PVA, který sloužil jako blank byla stanovena měrná světlost 96,77. Měrná světlost u filmů s přídavkem keratinu (PVAK1, PVAK2, PVAK3) klesala podle obsahu keratinu. Nejtmavším filmem je tedy PVAK3 s obsahem přidaného keratinu 30 %, jelikož u něj byla naměřena nejnižší hodnota odstínu $h^* 72,67^\circ$. U tohoto vzorku byla také naměřena nejvyšší pestrost C^* a to s hodnotou 426,38. Pestrost vzorků klesala se snižujícím obsahem keratinu.

Tabulka 14: Naměřené a vypočítané hodnoty pro kolorimetrické stanovení

Vzorek	Tloušťka filmu [mm]	C^*	$h^* [^\circ]$	L^*	a^*	b^*	Barva
PVAB	0,155	0,40	52,88	96,77	0,28	0,28	
PVAK1	0,109	73,91	80,25	77,44	2,00	11,79	
PVAK2	0,068	124,59	79,03	76,02	3,01	15,49	
PVAK3	0,368	426,38	72,67	66,19	8,71	27,82	

L^* - měrná světlost, která 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

PVAK1 – 4% (hm.) PVA + 0,5M NaOH + 10 % keratinu

PVAK2 – 4% (hm.) PVA + 0,5M NaOH + 20 % keratinu

PVAK3 – 4% (hm.) PVA + 0,5M NaOH + 30 % keratinu

4.6.2 Mechanické vlastnosti filmů

Mezi mechanické vlastnosti patří Youngův modul, pevnost v tahu σ_B a délkové prodloužení při přetržení ε_B . Youngův modul nebo také modul pružnosti slouží k vyjádření pevnosti a možnosti její deformace. Jako další vlastnost je pevnost v tahu σ_B , což je schopnost materiálu odolávat napětí působenému na film, aniž by se porušil při jeho natahování. Poslední charakteristika filmu bylo prodloužení při přetržení ε_B a vyjadřuje celkovou tažnost polymeru.

Tabulka 15: Mechanické vlastnosti keratin-PVA filmů

Vzorek filmu	Youngův modul [MPa]		Pevnost v tahu σ_B [MPa]		Délkové prodloužení při přetržení ε_B [%]	
	Průměr	Směrodatná odchylka	Průměr	Směrodatná odchylka	Průměr	Směrodatná odchylka
PVAB	32,8	1,7	369,5	5,4	150,4	11,0
PVAK1	27,4	2,3	278,8	15,2	379,9	31,9
PVAK2	16,6	3,2	98,1	26,4	367,8	56,1
PVAK3	12,0	2,8	151,7	23,8	281,2	67,2
PVAK2Z	15,8	1,5	86,3	22,9	470,2	20,6
PVAK3Z	21,8	1,8	130,6	41,5	487,5	53,9

PVAK1 – 4% (hm.) PVA + 0,5M NaOH + 10 % keratinu

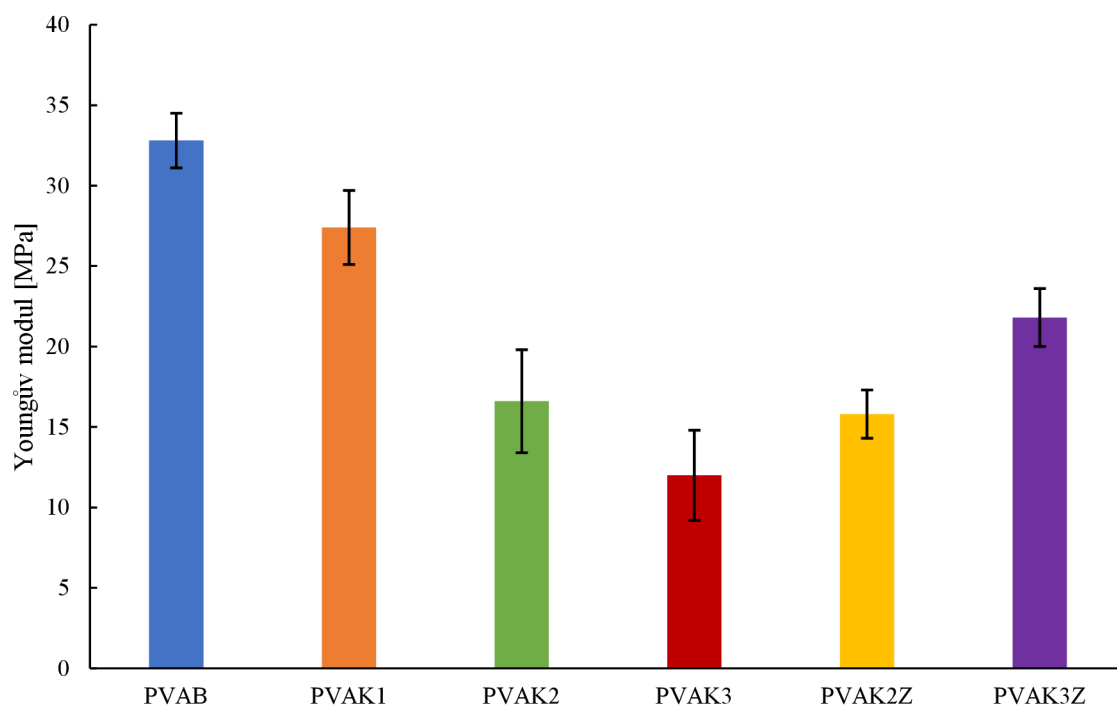
PVAK2 – 4% (hm.) PVA + 0,5M NaOH + 20 % keratinu

PVAK3 – 4% (hm.) PVA + 0,5M NaOH + 30 % keratinu

PVAK2Z – 4% (hm.) PVA + 0,5M NaOH + 20 % keratinu + síťovací činidlo

PVAK3Z – 4% (hm.) PVA + 0,5M NaOH + 30 % keratinu + síťovací činidlo

Na Obrázku 13 lze vidět, že hodnoty Youngova modulu klesaly v závislosti na procentuálním zastoupení keratinu v kompozitu. Nejvyšší hodnotu zaznamenal film PVAB (bez keratinu), jehož pružnost činila $32,8 \pm 1,7$ MPa. Následně byl zaznamenán velký pokles hodnot mezi vzorky PVAK1 a PVAK2, a to až o 10 MPa. Mezi vzorky PVAK2Z a PVAK3Z byl opačný trend, jelikož hodnota Youngova modulu vzrostla s procentuálním zastoupením keratinu o 6 MPa. Zesíťování u vzorku PVAK3Z mělo v tomto případě pozitivní efekt.



Obrázek 13 :Porovnání průměrných hodnot a směrodatných odchylek Youngova modulu pro keratin-PVA filmy

PVAK1 – 4% (hm.) PVA + 0,5M NaOH + 10 % keratinu

PVAK2 – 4% (hm.) PVA + 0,5M NaOH + 20 % keratinu

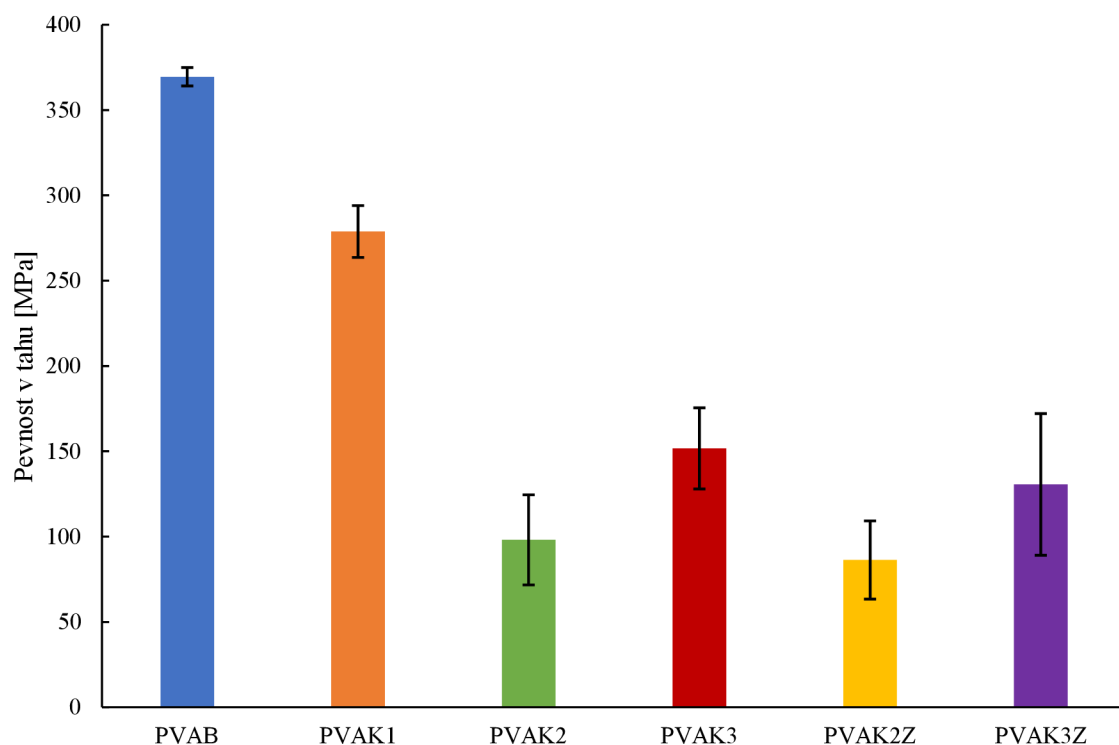
PVAK3 – 4% (hm.) PVA + 0,5M NaOH + 30 % keratinu

PVAK2Z – 4% (hm.) PVA + 0,5M NaOH + 20 % keratinu + síťovací činidlo

PVAK3Z – 4% (hm.) PVA + 0,5M NaOH + 30 % keratinu + síťovací činidlo

Porovnání naměřených hodnot pevností v tahu se nachází na Obrázku 14. Opět nejvyšší pevnost v tahu byla určena u filmu jen z PVA, která činila $369 \pm 4,4$ MPa. U filmu keratin-PVA hodnota tahu kolísala. Nejvyšší pevnost v tahu měl film PVAK1, a to s hodnotou $278 \pm 15,2$ MPa. U vzorku PVAK2, který měl markantně nižší hodnotu než PVAK1, mohl být takový pokles způsoben tím, že byly měřené vzorky raženy z vnitřní části filmu, kde mohl být film méně zesíťovaný než na krajích. Naměřené výsledky korelují s odbornými publikacemi, kde je uvedeno, že se zvýšeným podílem keratinu ve filmu dochází ke snížení pevnosti v tahu [41, 58].

U zesíťovaných vzorků se opakoval stejný trend jako u Youngova modulu.



Obrázek 14: Porovnání průměrných hodnot a směrodatných odchylek meze pevnosti v tahu pro keratin-PVA filmy

PVAK1 – 4% (hm.) PVA + 0,5M NaOH + 10 % keratinu

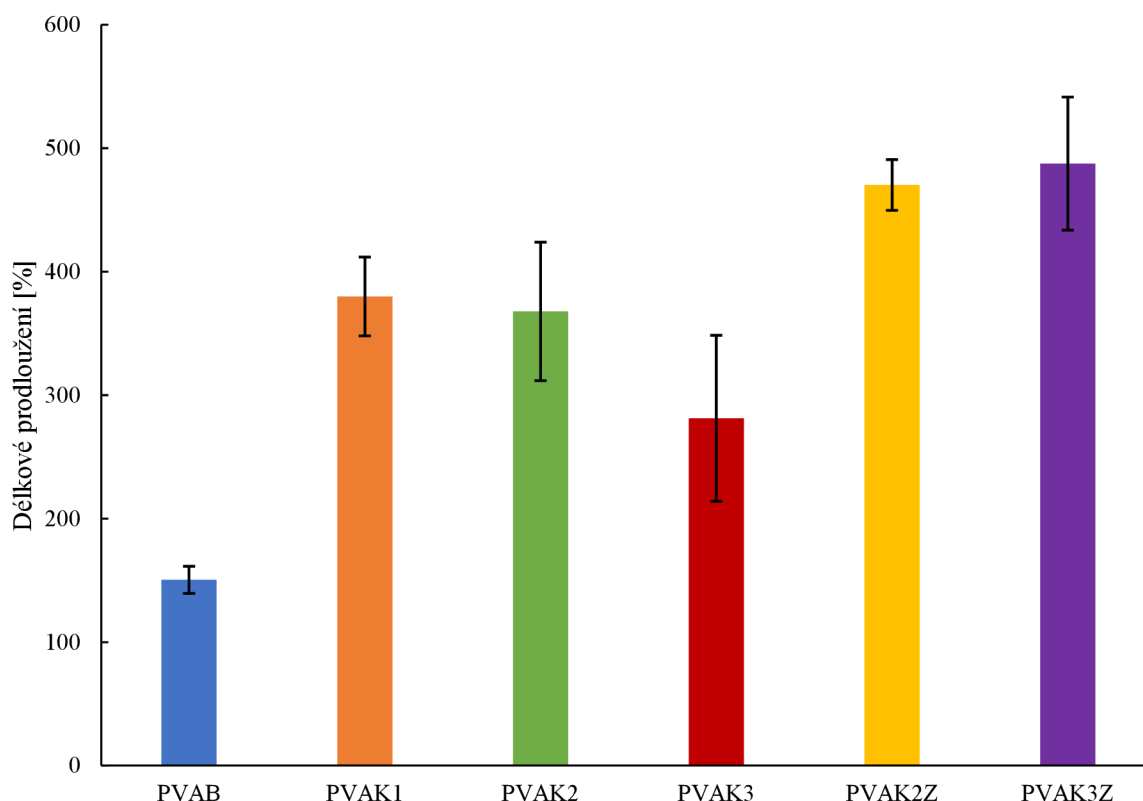
PVAK2 – 4% (hm.) PVA + 0,5M NaOH + 20 % keratinu

PVAK3 – 4% (hm.) PVA + 0,5M NaOH + 30 % keratinu

PVAK2Z – 4% (hm.) PVA + 0,5M NaOH + 20 % keratinu + síťovací činidlo

PVAK3Z – 4% (hm.) PVA + 0,5M NaOH + 30 % keratinu + síťovací činidlo

Třetí stanovovanou mechanickou vlastností bylo délkové prodloužení při přetržení (Obrázek 15). Z tohoto stanovení vyplývá, že keratin způsobil zlepšení délkového prodloužení. U zesíťovaných keratin-PVA filmů opět došlo ke zvýšení hodnoty stejně jako u hodnot pevnosti v tahu. Mezi vzorky PVAK2Z a PVAK3Z došlo ke zvýšení hodnot délkového prodloužení s přidavkem keratinu a to o 17 %. Tento rozdíl je zanedbatelný, jelikož se jejich směrodatné odchylky překrývají. V literatuře jsou udávány hodnoty délkového prodloužení pro nezesíťované filmy 208 % a pro zesíťované 300 %. Výsledky naměřené v této práci jsou o 100% vyšší než udávané v literatuře [58].



Obrázek 15: Porovnání průměrných hodnot a směrodatných odchylek délkového prodloužení keratin-PVA filmů

PVAK1 – 4% (hm.) PVA + 0,5M NaOH + 10 % keratinu

PVAK2 – 4% (hm.) PVA + 0,5M NaOH + 20 % keratinu

PVAK3 – 4% (hm.) PVA + 0,5M NaOH + 30 % keratinu

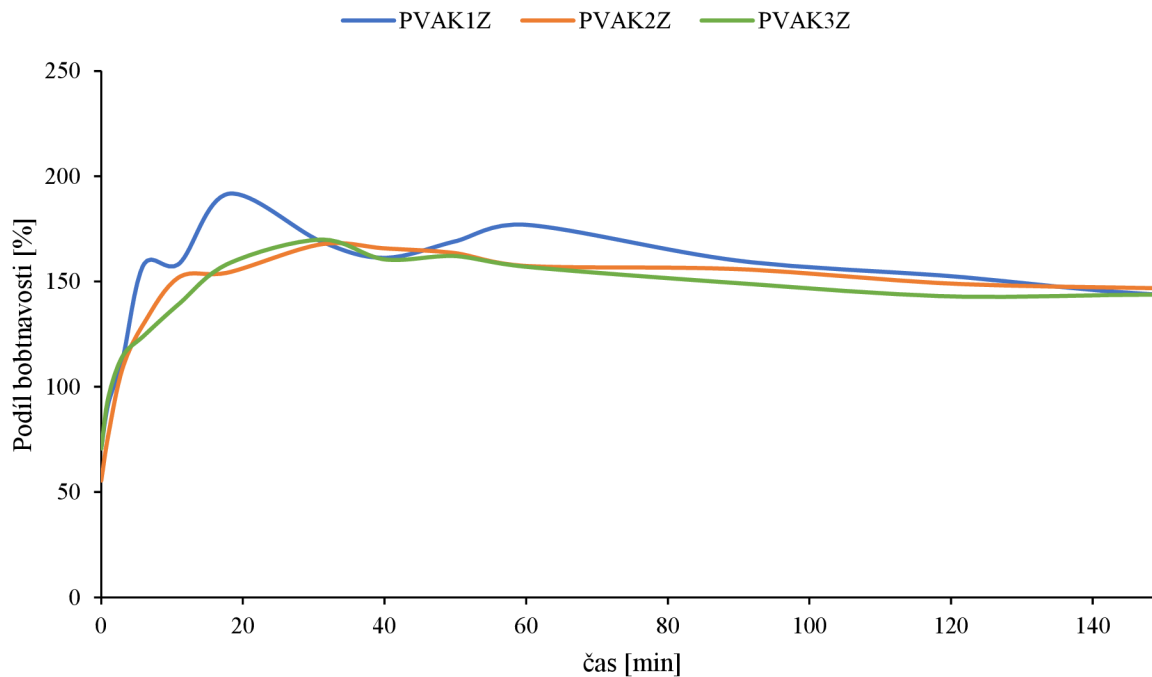
PVAK2Z – 4% (hm.) PVA + 0,5M NaOH + 20 % keratinu + síťovací činidlo

PVAK3Z – 4% (hm.) PVA + 0,5M NaOH + 30 % keratinu + síťovací činidlo

4.6.3 Bobtnavost filmů

Byla provedena analýza u keratin-PVA zesíťovaných filmů, jak jejich složení ovlivňuje absorpci vody (bobtnání). Z Obrázku 16 lze vidět že nejrychleji bobtnal film PVAK1Z, s tím že se jeho hmotnost zvýšila na 200 % už ve 20 minutě měření. Následně začalo docházet k markantnímu poklesu hmotnosti. To mohlo být zapříčiněno rozpouštěním filmu v roztoku vody. Nejvíce konstantní závislost podílu bobtnavosti na čase měl film PVAK3Z, což ukazuje, že se zvyšujícím procentuálním zastoupením keratinu v zesíťovaném filmu se zlepšuje bobtnavost filmu. V porovnání s literaturou, kde byly podíly bobtnavosti zkoumány pouze u nezesíťovaných filmů, byly maximální získané podíly mnohem vyšší, takže lze říct, že zesíťováním lze ovlivnit bobtnavost kompozitních filmů [41].

Čistý nezesíťovaný PVA film má podle literatury maximální podíl bobtnavosti kolem 950 %, ale jeho stabilita ve vodě byla velmi špatná, jelikož se po čase rozpustil. U měřených zesíťovaných filmů k rozpouštění nedocházelo. Díky přidavku keratinu a síťovacích činidel bylo dosaženo i mnohem lepší rozpustnosti [59].



Obrázek 16: Závislost podílu bobtnavosti na čase pro zesíťované keratin-PVA filmy

PVAK1Z – 4 hm.% PVA + 0,5M NaOH+ 10 % keratinu + síťovací činidlo

PVAK2Z – 4 hm.% PVA + 0,5M NaOH+ 20 % keratinu + síťovací činidlo

PVAK3Z – 4 hm.% PVA + 0,5M NaOH+ 30 % keratinu + síťovací činidlo

5 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývala izolací a aplikací keratinu z ovčí vlny, která je velkým polutantem textilního průmyslu. Tento odpad nemá v této době žádný komerční význam a je skládkován nebo i spalován. Oproti tomu je stále využíváno konvenčních plastů na bázi ropy, které zatěžují více životní prostředí než opady z jakéhokoliv jiného průmyslu. Vlna jakožto taková je velmi bohatá na bílkovinu keratin, který by se po přidavku do filmových kompozitů mohl valorizovat.

V experimentální části je nejdříve řešena samotná izolace keratinu z ovčí vlny. Byly provedeny hydrolýzy o čtyřech různých koncentracích a s dvěma typy materiálu. Při této hydrolýze se používal hydroxid sodný. Nejvyšší účinnost měla hydrolýza nastříhané ovčí vlny za použití 2% (hm.) roztoku hydroxidu sodného, kde byla výtěžnost 83,43 %. Získaný keratin byl podroben analýzám FTIR, TGA a DSC. U infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací, se naměřená spektra shodovala s publikovanými spektry izolovaného keratinu. Dále byla provedena Diferenční skenovací Kalorimetrie. Teplota tání byla zaznamenána pouze u vzorku keratinu izolovaným z nastříhané vlny pomocí 2% (hm.) roztoku hydroxidu sodného. Ostatní vzorky vykazovaly amorfní charakter. Metodou TGA byly stanoveny termální degradace izolovaného keratinu v rozmezí, které v porovnání s dostupnou literaturou jsou nižší.

Další část práce byla věnována přípravě keratinových filmů ve směsi s polyvinyl alkoholem. Následně byly připraveny i kompozitní filmy s příměsí síťovacích činidel (glutaraldehyd, glycerol, fosfátový pufr). Celkově se u filmů sledoval vliv obsahu keratinu a síťovacího činidla na mechanické vlastnosti. Bylo zjištěno, že u Youngův modulu se snižují hodnoty s vyšším přidavkem keratinu u nezesíťovaných filmů. U hodnot pevnosti v tahu hodnoty kolísaly. U filmu PVAK2 byl naměřen velký pokles oproti PVAK1. to mohlo být způsobeno různým zesíťováním po celém filmu. Film s takovými naměřenými hodnotami Youngova modulu a pevnosti v tahu vykazuje větší náchylnost na potrhání. Naopak u zesíťovaných filmů byl tento trend opačný. U délky prodloužení byly dosaženy hodnoty o 100% vyšší než v odborných publikacích. To znamená, že tohoto parametru má přidavek keratinu pozitivní dopad a kombinací síťovacího činidla a keratinu lze dosáhnout velmi elastických filmů. U zesíťovaných filmů také byla zjištěna bobtnavost. Díky této vlastnosti bylo zjištěno, jak moc který film nabobtná ve vodě. Nejrychleji nabobtnal film s 10% obsahem keratinu. Nejkonstantnější závislost bobtnavosti na čase měl film s 30% obsahem keratinu. Lze říct, že se zvyšujícím přidavkem keratinu se zlepšuje vlastnost bobtnavosti u zesíťovaných filmů. Po zlepšení této vlastnosti mohou být keratin-PVA filmy používány jako obalový materiál, nebo po zakomponování dalších přídatných látek (např.: hnojiva) může takový film pomalu tuto látku uvolňovat do svého prostředí.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BAGHERI, Amir Reza, Christian LAFORSCH, Andreas GREINER a Seema AGARWAL. Fate of So-Called Biodegradable Polymers in Seawater and Freshwater. *Global challenges* [online]. WEINHEIM: Wiley, 2017, 1(4), 1700048-n/a [cit. 2023-05-15]. ISSN 2056-6646. Dostupné z: doi:10.1002/gch2.201700048
- [2] Omezení dopadu některých plastových výrobků na životní prostředí. Evropský parlament [online]. Štrasburk: Evropský parlament, 2018 [cit. 2023-05-15]. Dostupné z: https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/TA-8-2018-0411_CS.html
- [3] MIRABELLA, Nadia, Valentina CASTELLANI a Serenella SALA. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of cleaner production* [online]. OXFORD: Elsevier, 2014, 65, 28-41 [cit. 2022-05-27]. ISSN 0959-6526. Dostupné z: doi:10.1016/j.jclepro.2013.10.051
- [4] 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
- [5] NUSTOROVA, Maya, Diana BRAIKOVA, Adriana GOUSTEROVA, Evgenia VASILEVA-TONKOVA a Peter NEDKOV. Chemical, microbiological and plant analysis of soil fertilized with alkaline hydrolysate of sheep's wool waste. *World journal of microbiology & biotechnology* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2006, 22(4), 383-390 [cit. 2022-11-29]. ISSN 0959-3993. Dostupné z: doi:10.1007/s11274-005-9045-9
- [6] VAN DYK, J.S., R. GAMA, D. MORRISON, S. SWART a B.I. PLETSCHKE. Food processing waste: Problems, current management and prospects for utilisation of the lignocellulose component through enzyme synergistic degradation. *Renewable & sustainable energy reviews* [online]. OXFORD: PERGAMON-ELSEVIER SCIENCE, 2013, 26, 521-531 [cit. 2022-05-27]. ISSN 1364-0321. Dostupné z: doi:10.1016/j.rser.2013.06.016
- [7] GIROTTO, Francesca, Luca ALIBARDI a Raffaello COSSU. Food waste generation and industrial uses: A review. *Waste management (Elmsford)* [online]. United States: Elsevier, 2015, 45, 32-41 [cit. 2022-05-27]. ISSN 0956-053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.wasman.2015.06.008
- [8] 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
- [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] MAREK, Miroslav a Michal VOLDŘICH. ODPADY Z POTRAVINÁŘSKÝCH VÝROB V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ [online]. 31. 1. 2006 [cit. 2022-02-07]. Dostupné z: http://www.phytosanitary.org/projekty/2005/vvf_07_2005.pdf
- [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] 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. *Hemijaska industrija*. 2013, 67(2), 277-291. ISSN 0367-598X. Dostupné z: doi:10.2298/HEMIND120410065P
- [13] PETEK, Blaž a Romana MARINŠEK LOGAR. Management of waste sheep wool as valuable organic substrate in European Union countries. *Journal of material cycles and waste management* [online]. Tokyo: Springer Japan, 2021, 23(1), 44-54 [cit. 2022-11-29]. ISSN 1438-4957. Dostupné z: doi:10.1007/s10163-020-01121-3

- [14] 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
- [15] A. Gousterova, M. Nustorova, I. Goshev, P. Christov, D. Braikova, K. Tishinov, T. Haertlé & P. Nedkov (2003) Alkaline Hydrolysate of Waste Sheep Wool Aimed as Fertilizer, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 17:2, 140-145, DOI: 10.1080/13102818.2003.10817072
- [16] LI, Rong a Dong WANG. Preparation of regenerated wool keratin films from wool keratin-ionic liquid solutions. *Journal of applied polymer science* [online]. Hoboken: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2013, 127(4), 2648-2653 [cit. 2022-11-29]. ISSN 0021-8995. Dostupné z: doi:10.1002/app.37527
- [17] SOLAZZO, Caroline, Julie WILSON, Jolon M. DYER, et al. Modeling Deamidation in Sheep α -Keratin Peptides and Application to Archeological Wool Textiles. *Analytical Chemistry*. 2014, 86(1), 567-575. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac4026362
- [18] PARLATO, Monica C. M., Francesca VALENTI, Giusi MIDOLO a Simona M. C. PORTO. Livestock Wastes Sustainable Use and Management: Assessment of Raw Sheep Wool Reuse and Valorization. *Energies (Basel)* [online]. Basel: MDPI, 2022, 15(9), 3008 [cit. 2022-11-29]. ISSN 1996-1073. Dostupné z: doi:10.3390/en15093008
- [19] SZATKOWSKI, Piotr, Alina TADLA, Zuzanna FLIS, Martyna SZATKOWSKA, Katarzyna SUCHOROWIEC a Edyta MOLIŁ. The potential application of sheep wool as a component of composites. *Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego* [online]. 2021, 17(4), 1-8 [cit. 2022-11-29]. ISSN 1733-7305. Dostupné z: doi:10.5604/01.3001.0015.5947
- [20] FERNÁNDEZ-D'ARLAS, Borja. Tough and Functional Cross-linked Bioplastics from Sheep Wool Keratin. *Scientific reports* [online]. LONDON: Springer Nature, 2019, 9(1), 14810-12 [cit. 2022-11-29]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-51393-5
- [21] POWICKE, F. M. a Eileen POWER. The Wool Trade in English Medieval History. *Economica* [online]. London School of Economics and Political Science, 1942, 9(33), 95-97 [cit. 2023-01-09]. ISSN 0013-0427. Dostupné z: doi:10.2307/2549877
- [22] GELAYE, G, B SANDIP a T MESTAWET. A review on some factors affecting wool quality parameters of sheep. *African journal of food, agriculture, nutrition, and development: AJFAND* [online]. Rural Outreach Program, 2021, 21(10), 18980-18999 [cit. 2022-11-29]. ISSN 1684-5374. Dostupné z: doi:10.18697/ajfand.105.19330
- [23] Gelaye G, Sandip B and T Mestawet Some physical and chemical properties of fleece from menz sheep. *Wayamba. J. Anim. Sci.* 2017; 9: 1498 – 1506
- [24] JAFARI, Shoja. Genetic selection for wool quality. *CAB Reviews Perspectives in Agriculture Veterinary Science Nutrition and Natural Resources* [online]. 2015, 7 [cit. 2023-01-09]. Dostupné z: doi:10.1079/PAVSNR201510017
- [25] STAPAI, P. V., N. P. STAKHIV, V. M. TKACHUK a O. O. SMOLIANINOVA. The relationship between structural lipids of sheep wool with its individual macrostructural components, chemical composition and physical indicators. *The Animal Biology* [online]. 2021, 23(1), 38-43 [cit. 2023-01-09]. ISSN 1681-0015. Dostupné z: doi:10.15407/animbiol23.01.038
- [26] CAHYANDARU, Nahar. Isolation and characterization of keratin from chicken feathers. In: *AIP Conference Proceedings* [online]. 2020 [cit. 2022-11-29]. ISBN 0735419884. ISSN 0094-243X. Dostupné z: doi:10.1063/5.0002792
- [27] BRAGULLA, Hermann H. a Dominique G. HOMBERGER. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of anatomy* [online]. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2009, 214(4), 516-559 [cit. 2022-11-29]. ISSN 0021-8782. Dostupné z: doi:10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x
- [28] SAHA, Sarthak, Muhammad ARSHAD, Muhammad ZUBAIR a Aman ULLAH. Keratin as a Biopolymer. *Keratin as a Protein Biopolymer*. Cham: Springer International Publishing, 2019, 2019-11-24, 163-185. Springer Series on Polymer and Composite Materials. ISBN 978-3-030-02900-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-02901-2_6

- [29] GREENWOLD, Matthew J, Weier BAO, Erich D JARVIS, Haofu HU, Cai LI, M Thomas P GILBERT, Guojie ZHANG a Roger H SAWYER. Dynamic evolution of the alpha (α) and beta (β) keratins has accompanied integument diversification and the adaptation of birds into novel lifestyles. *BMC Evolutionary Biology*. 2014, **14**(1). ISSN 1471-2148. Dostupné z: doi:10.1186/s12862-014-0249-1
- [30] SKIERESZ-SZEWCZYK, Kinga, Hanna JACKOWIAK, Tomasz BUCHWALD a Mirosław SZYBOWICZ. Localization of Alpha-Keratin and Beta-Keratin (Corneous Beta Protein) in the Epithelium on the Ventral Surface of the Lingual Apex and Its Lingual Nail in the Domestic Goose (*Anser Anser f. domestica*) by Using Immunohistochemistry and Raman Microspectros. *The Anatomical Record*. 2017, **300**(8), 1361-1368. ISSN 19328486. Dostupné z: doi:10.1002/ar.23591
- [31] 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* [online]. OXFORD: Elsevier, 2016, **76**, 229-318 [cit. 2022-11-29]. ISSN 0079-6425. Dostupné z: doi:10.1016/j.pmatsci.2015.06.001
- [32] SHI, Weida a Marie-josée DUMONT. Review: bio-based films from zein, keratin, pea, and rapeseed protein feedstocks. *Journal of materials science* [online]. Boston: Springer US, 2014, **49**(5), 1915-1930 [cit. 2022-11-29]. ISSN 0022-2461. Dostupné z: doi:10.1007/s10853-013-7933-1
- [33] 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* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2021, **11**(5), 220-220 [cit. 2022-11-29]. ISSN 2190-572X. Dostupné z: doi:10.1007/s13205-021-02734-7
- [34] 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
- [35] HOLKAR, Chandrakant R., Saransh S. JAIN, Ananda J. JADHAV a Dipak V. PINJARI. Valorization of keratin based waste. *Process safety and environmental protection* [online]. RUGBY: Elsevier B.V, 2018, **115**, 85-98 [cit. 2022-11-29]. ISSN 0957-5820. Dostupné z: doi:10.1016/j.psep.2017.08.045
- [36] FOUNTOULAKIS, Michael a Hans-werner LAHM. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A* [online]. AMSTERDAM: Elsevier B.V, 1998, **826**(2), 109-134 [cit. 2022-11-29]. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(98)00721-3
- [37] GOYAL, Sahil, Marius DOTTER, Elise DIESTELHORST, Jan Lukas STORCK, Andrea EHRMANN a Boris MAHLTIG. Extraction of keratin from wool and its use as biopolymer in film formation and in electrospinning for composite material processing. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics* [online]. 2022, **17** [cit. 2023-05-11]. ISSN 1558-9250. Dostupné z: doi:10.1177/15589250221090499
- [38] FAGBEMI, Olajumoke D., Bruce SITHOLE a Tamrat TESFAYE. Optimization of keratin protein extraction from waste chicken feathers using hybrid pre-treatment techniques. *Sustainable chemistry and pharmacy* [online]. Elsevier B.V, 2020, **17**, 100267 [cit. 2022-11-29]. ISSN 2352-5541. Dostupné z: doi:10.1016/j.scp.2020.100267
- [39] BEN HAMAD BOUHAMED, Sana a Nabil KECHAOU. Kinetic study of sulphuric acid hydrolysis of protein feathers. *Bioprocess and biosystems engineering* [online]. Berlin/Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2017, **40**(5), 715-721 [cit. 2022-11-29]. ISSN 1615-7591. Dostupné z: doi:10.1007/s00449-017-1737-7
- [40] HUBBER, Kerry C. a Milda E. EMBUSCADO, ed. *Edible Films and Coatings for Food Applications* [online]. 1. New York: Springer NY, 2009 [cit. 2023-05-11]. ISBN 03-879-2823-5. Dostupné z: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-0-387-92824-1#bibliographic-information>
- [41] EL-KHEIR, Abou A., Abou M. TALEB a H. EL-SAYED. Preparation and Characterization of Keratin- Polyvinyl Alcohol Composite Film. *Egyptian Journal of*

- Chemistry* [online]. 2012, (5), 491-507 [cit. 2023-05-15]. Dostupné z: doi:doi:10.21608/ejchem.2012.1170
- [42] TANABE, Toshizumi, Naoya OKITSU, Akira TACHIBANA a Kiyoshi YAMAUCHI. Preparation and characterization of keratin–chitosan composite film. *Biomaterials* [online]. 2002, **23**(3), 817-825 [cit. 2023-05-15]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(01)00187-9
- [43] MOKREJŠ, Pavel a Ferdinand LANGMAIER. *Aplikace přírodních polymerů*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008. ISBN 978-80-7318-674-6.
- [44] 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
- [45] YUJUAN, WEI. *Method for one-step preparation of high-performance keratin gel*. 2021. Zapsáno 2021.
- [46] CARDAMONE, Jeanette M. Investigating the microstructure of keratin extracted from wool: Peptide sequence (MALDI-TOF/TOF) and protein conformation (FTIR). *Journal of molecular structure* [online]. Elsevier B.V., 2010, **969**(1), 97-105 [cit. 2023-03-19]. ISSN 0022-2860. Dostupné z: doi:10.1016/j.molstruc.2010.01.048
- [47] AKSAKAL, Baki a Vilayet ALEKBEROV. The effect of temperature and water on the mechanical properties of wool fibres investigated with different experimental methods. *Fibers and polymers* [online]. Heidelberg: The Korean Fiber Society, 2009, **10**(5), 673-680 [cit. 2023-03-19]. ISSN 1229-9197. Dostupné z: doi:10.1007/s12221-010-0673-9
- [48] ALUIGI, A., M. ZOCCOLA, C. VINEIS, C. TONIN, F. FERRERO a M. CANETTI. Study on the structure and properties of wool keratin regenerated from formic acid. *International journal of biological macromolecules* [online]. Netherlands: Elsevier B.V., 2007, **41**(3), 266-273 [cit. 2023-03-19]. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2007.03.002
- [49] VIK, Michal. *Měření barevnosti a vzhledu v průmyslové praxi*. Liberec: VÚTS, 2015. ISBN 978-808-7184-646.
- [50] OHTA, Noboru a Alan R ROBERTSON. *Colorimetry: fundamentals and applications*. Chichester, West Sussex ; Hoboken: J. Wiley, 2005, xvi, 334 s. : il. ISBN 0-470-09472-9.
- [51] DUZELBAYEVA, Samal, Saparkali KONUSPAYEV, Dmitry MURZIN, Zauesh AKHATOVA a Batikha KASSENOVA. Development of the electrocoagulation and electrodialysis technologies for the quantitative recovery of lanolin. *Separation Science and Technology*[online]. 2022, **57**(18), 2984-2996 [cit. 2023-05-12]. ISSN 0149-6395. Dostupné z: doi:10.1080/01496395.2022.2097924
- [52] ABDOLI, M.A., F. MOHAMADI a E. FAYYAZI. Effective Parameters on Biodiesel Production from Feather fat oil as a Cost-Effective Feedstock. *International Journal of Environmental Research* [online]. 2014, **2014**(1), 139-148 [cit. 2023-05-12]. Dostupné z: doi:10.22059/IJER.2014.703
- [53] ZEISLER-DIEHL, Viktoria, Eshrak Ali 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* [online]. 2020, **257**(6), 1709-1724 [cit. 2023-05-12]. ISSN 0033-183X. Dostupné z: doi:10.1007/s00709-020-01544-7
- [54] MATTIELLO, Sara, Alessandro GUZZINI, Alessandra DEL GIUDICE, Carlo SANTULLI, Marco ANTONINI, Giulio LUPIDI a Roberto GUNNELLA. Physico-Chemical Characterization of Keratin from Wool and Chicken Feathers Extracted Using Refined Chemical Methods. *Polymers*. 2023, **15**(1). ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym15010181
- [55] DI FOGGIA, Michele, Paola TADDEI, Armida TORREGGIANI, Monica DETTIN a Anna TINTI. Self-assembling peptides for biomedical applications: Ir and raman spectroscopies for the study of secondary structure. *Proteomics research journal* [online]. 2012, **2**(3), 231-272 [cit. 2023-05-13]. ISSN 1935-2824. Dostupné z: <https://www.proquest.com/docview/1700638831?OpenUrlRefId=info:xri/sid:primo&accountid=17115>

- [56] ZHANG, Jing, Yi LI, Jiashen LI, et al. Isolation and characterization of biofunctional keratin particles extracted from wool wastes. *Powder technology* [online]. AMSTERDAM: Elsevier B.V, 2013, **246**, 356-362 [cit. 2022-11-29]. ISSN 0032-5910. Dostupné z: doi:10.1016/j.powtec.2013.05.037
- [57] PATANKAR, Kaustubh C., Saptarshi MAITI, Girendra Pal SINGH, Mohammad SHAHID, Sandeep MORE a Ravindra V. ADIVAREKAR. Chemically modified wool waste keratin for flame retardant cotton finishing. *Cleaner Engineering and Technology* [online]. Elsevier, 2021, **5**, 100319 [cit. 2023-05-13]. ISSN 2666-7908. Dostupné z: doi:10.1016/j.clet.2021.100319
- [58] GOU, Ming Xia a Xu Hong YANG. Preparation and Characterization of Wool Keratin/PVA Blended Films. *Advanced Materials Research*[online]. 2011, **175-176**, 132-136 [cit. 2023-05-14]. ISSN 1662-8985. Dostupné z: doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.175-176.132
- [59] JIA, Yuxiang, Taka-Aki ASOH, Yu-I HSU a Hiroshi UYAMA. Wet strength improvement of starch-based blend films by formation of acetal/hemiacetal bonding. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2020, **177** [cit. 2023-05-19]. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2020.109197