

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

OPTIMALIZACE PODMÍNEK ENZYMOVÉ HYDROLÝZY KUŘECÍHO PEŘÍ

PAVEL MOKREJŠ^{a,b}, ONDŘEJ KREJČÍ^a,
ROMAN ČERMÁK^{a,b} a PETR SVOBODA^{a,b}

^a Ústav inženýrství polymerů, Fakulta technologická, UTB ve Zlíně, nám. TGM 275, 762 72 Zlín, ^b Centrum polymerních systémů, UTB ve Zlíně, Nad Ovčírnou 3685, 760 01 Zlín

mokrejs@ft.utb.cz

Došlo 3.1.13, přijato 1.3.13.

Klíčová slova: enzymová hydrolýza, hydrolyzát, keratin, kuřecí peří, vedlejší produkty

Úvod

Keratiny mají velmi stabilní strukturu, zejména v důsledku zesíťování disulfidovými můstky (–S–S–), jsou velmi odolné proti degradaci a je obtížné je rozložit. K získání rozpustného keratinu je většinou nutné použít vysokých koncentrací roztoků chemikálií za spolupůsobení vysokých teplot, případně tlaku^{1–3}.

Při reakci keratinových řetězců se silnými kyselinami dochází ke štěpení peptidové vazby a ke tvorbě –COO[–] a –NH₄⁺ iontů. Během kyselých hydrolýz je částečně oxidován cystin na kyselinu cysteinovou a cystein, čímž dochází k částečnému rozštěpení –S–S– můstků⁴. Stejně jako u kyselých roztoků se při alkalické reakci hydrolyzuje peptidová vazba a dochází také k rozštěpení –S–S– můstků. V posledních letech se pro rozklad bílkovin stále více používají enzymy produkované nejčastěji bakteriemi nebo houbami^{5,6}. Výhodou jsou mírné reakční podmínky a malé množství dávkovaných proteas. Nevýhodou je občas složitá práce s bakteriemi, udržování stálého reakčního prostředí, vysoká cena enzymů a také poměrně dlouhý reakční čas (3–7 dnů) ve srovnání s kyselou nebo alkalickou hydrolýzou (řádově hodiny)⁷. Pro zvýšení výtěžnosti rozkladu keratinových materiálů při nižších reakčních podmínkách lze využít kombinace výše zmíněných postupů hydrolýzy. Jako nejlepší se jeví využití alkalické a enzymové hydrolýzy, neboť většina komerčně vyráběných proteolytických a keratinolytických enzymů má maximální účinnost v alkalické oblasti^{8–13}.

Keratinové hydrolyzáty mohou najít uplatnění v mnoha odvětvích, např. k úpravám nutričních hodnot

krmiv pro dobytek, v zemědělství jako růstové stimulatory, chelatační činidlo při odstraňování kovů z půdy, v lékařství a farmacii (filmy pro tkáňové inženýrství, nosiče léků)^{14–19}. Vlákna vyrobená z hydrolyzátu keratinu lze použít jako kompozity s jinými biopolymery nebo syntetickými polymery²⁰.

Cílem předloženého příspěvku je zpracování kuřecího peří alkalicko-enzymovou hydrolýzou na keratinový hydrolyzát a sledování vlivu technologických podmínek (množství enzymu, teplota a doba hydrolýzy) na účinnost rozkladu a na vlastnosti hydrolyzátu (obsah dusíku, popelovin, síry a –NH₂ skupin).

Experimentální část

Materiály a metody

Kuřecí peří bylo dodáno z drůbežárny v ČR. 100 g peří bylo nastříháno na kousky o délce do 5 mm a byly provedeny vstupní analýzy: sušina = 93,2 %; v sušině: dusík = 14,6 %, tuk = 1,15 %, popel = 1,01 %, síra = 2,80 %. Peří se odtučnilo tak, že se smíchalo s vodou v poměru 1:75, přidalo se 1,7 % enzymu Greasex 50 L, pH se upravilo na 9,0 ± 0,2 a směs se inkubovala 24 h při 40 ± 0,5 °C. Po filtraci se odtučněné peří promylo vodou a vysušilo se při 103 ± 2 °C do konstantní hmotnosti.

Chemikálie: enzymy Savinase Ultra 16 L (proteasa) a Greasex 50 L (lipasa) od firmy Novozymes (Dánsko). KOH, NaOH, H₂SO₄, H₃PO₄, 30% H₂O₂, BaCl₂ a *n*-hexan (p.a.) byly dodány firmou IPL Petr Lukeš. Přístroje a vybavení: odparka rotační Hei-Vap G1, pH metr přenosný SensoDirect 110SET, míchačka magnetická MR Hei Standard, míchadlo PTFE 350/8 mm, vodní lázeň Memmert WNE 45, analytické váhy Denver Summit SI234, topná deska Schott Ceran 93020, sušárna WTB Binder E/B 28, inkubátor WTC Binder B53, filtrační papír Filpap KA-1.

Vlhkost, popel, dusík, tuk a síra byly stanoveny dle standardních metod^{21–23}. Obsah primárních –NH₂ skupin se stanovil spektrofotometricky ninhydrinovým činidlem²⁴. Stupeň hydrolýzy se stanovil zjišťováním množství hydrolyzovaných peptidových vazeb reakcí primárních aminogrupin s *o*-ftalaldehydem²⁵.

Plánování a vyhodnocování experimentů hydrolýzy peří

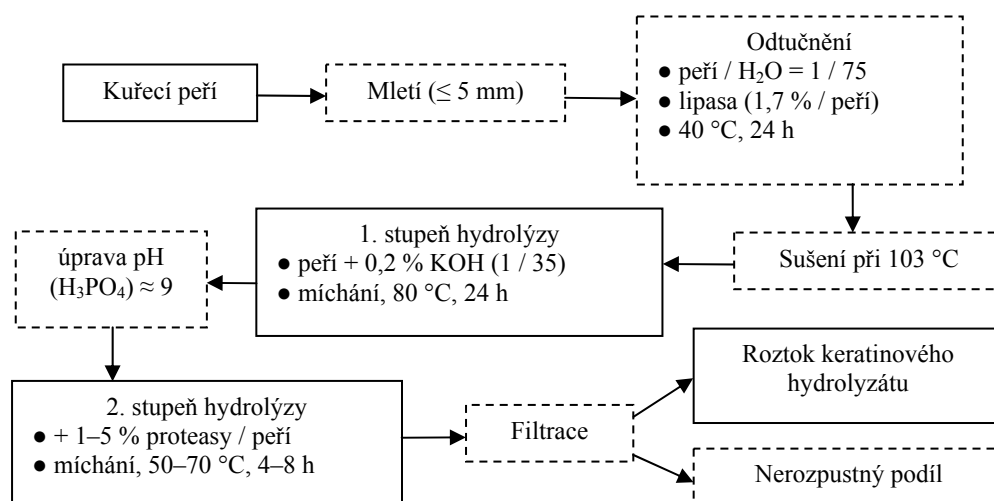
Ke studiu vlivu sledovaných faktorů při hydrolýze na účinnost hydrolýzy byly experimenty plánovány faktorovými pokusy 2³ se 2 opakováními ve středu. Sledovanými faktory byly: faktor A – doba 2. stupně hydrolýzy: 4–8 h; faktor B – dávka enzymu: 1–5 %; faktor C – teplota 2. stupně hydrolýzy: 50–70 °C. Vyhodnocení dat proběhlo ve statistickém programu STATGRAPHICS (Version 6.0,

Tabulka I

Výsledky rozkladu kuřecího peří 2-stupňovou alkalicko-enzymovou hydrolyzou v prostředí 0,2% KOH a složení keratinových hydrolyzátů

| Exp. č. | Sledované faktory ^a | | | Rozložené peří [%] | Stupeň hydrolyzy [%] | Složení hydrolyzátů (v sušině) | | | |
|---------|--------------------------------|--------------|---------------|--------------------|----------------------|--------------------------------|-----------|----------|--|
| | A τ [h] | B e [%] | C t [°C] | | | dusík [%] | popel [%] | síra [%] | -NH ₂ [mmol g ⁻¹] |
| 1 | 4 | 1 | 50 | 35,2 | 57,7 | 12,11 | 18,71 | 2,80 | 0,388 |
| 2 | 4 | 1 | 70 | 41,4 | 59,4 | 12,42 | 17,14 | 2,77 | 0,400 |
| 3 | 4 | 5 | 50 | 48,1 | 69,9 | 12,65 | 15,51 | 2,28 | 0,417 |
| 4 | 4 | 5 | 70 | 51,5 | 72,8 | 12,85 | 15,46 | 2,24 | 0,422 |
| 5 | 6 | 3 | 60 | 54,4 | 76,7 | 12,93 | 14,36 | 1,95 | 0,464 |
| 6 | 6 | 3 | 60 | 54,6 | 77,1 | 12,95 | 14,31 | 1,85 | 0,494 |
| 7 | 8 | 1 | 50 | 42,1 | 67,6 | 12,60 | 17,06 | 2,54 | 0,412 |
| 8 | 8 | 1 | 70 | 51,7 | 73,9 | 12,91 | 15,13 | 2,18 | 0,446 |
| 9 | 8 | 5 | 50 | 61,0 | 88,4 | 12,99 | 13,58 | 1,97 | 0,550 |
| 10 | 8 | 5 | 70 | 64,8 | 89,9 | 13,23 | 13,09 | 1,81 | 0,610 |

^a τ – doba 2. stupně hydrolyzy, e – přidavek enzymu (vztaženo na navážku suchého peří), t – teplota 2. stupně hydrolyzy



Obr. 1. Schéma zpracování kuřecího peří na keratinový hydrolyzát

Manugistic, USA). Přehled organizace faktorových pokusů, včetně výsledků, je sumarizován v tab. I.

Alkalicko-enzymová hydrolyza kuřecího peří

Schéma blokových operací při zpracování kuřecího peří na keratinový hydrolyzát je znázorněno na obr. 1. 1. stupeň hydrolyzy: Do Erlenmayerovy baňky se odvážílo 6 g peří, přidalo se 210 ml předehřátého (80 ± 1 °C) 0,2% roztoku KOH, obsahem se intenzivně třepalo 30 s a inkubovalo se 24 h při $80 \pm 0,2$ °C. V průběhu prvních 7 h

inkubace se v hodinových intervalech obsahem krátce protřepalo. pH směsi v průběhu hydrolyzy bylo následující: počátek inkubace 12,7, 2 h inkubace 12,2, 4 h inkubace 12,0, 6 h inkubace 11,5, 24 h inkubace 10,4. Po ukončení 1. stupně hydrolyzy se upravilo pH na $9,0 \pm 0,1$ přidavkem 1,5 ml 2% H₃PO₄. 2. stupeň hydrolyzy: Teplota směsi se upravila podle faktoru C. Přidal se enzym v množství podle faktoru B. Obsah baňky se míchal při 600 ot min⁻¹ na magnetickém míchadle po dobu podle faktoru A. Po 1, 2 a 3 hodinách se udržovala hodnota pH na $9,0 \pm 0,1$. Po ukončení hydrolyzy se nerozložený podíl peří separoval od

keratinového hydrolyzátu filtrací; poté se ještě promyl 40 ml destilované vody. Po vysušení nerozloženého podílu peří při 103 ± 2 °C do konstantní hmotnosti se gravimetricky zjistilo množství rozloženého peří. Keratinový hydrolyzáte se po filtraci ihned zahřál k varu a povařil se 10 min, čímž se inaktivoval enzym.

Výsledky a diskuse

Hydrolyza kuřecího peří

Souhrnné výsledky rozkladu kuřecího peří v prostředí 0,2% KOH a složení hydrolyzáte jsou uvedeny v tab. I. Množství rozloženého kuřecího peří (y) monitorované 3-faktorovým pokusem je popsáno následující nelineární rovnicí: $y = 10,58 + 0,44375A + 4,975B + 0,30625C + 0,28125AB + 0,02375AC - 0,05375BC$; korelační faktor: $R^2 = 0,944$. Statistická významnost sledovaných faktorů ve zvolených úrovních byla vyhodnocena standardní technikou Fisherova testu významnosti²⁶. Při $F_{krit}^{95\% (1;3)} = 10,13$ statisticky významně ovlivňují průběh hydrolyzy faktor A ($F = 17,00$) a faktor B ($F = 27,30$); faktor C a interakce AB, AC, BC jsou statisticky nevýznamné.

Grafická prezentace vlivu doby 2. stupně hydrolyzy a dávky enzymu na množství rozloženého peří je uvedena na obr. 2 – při teplotě 2. stupně hydrolyzy 50 °C (obr. 2a) a při 70 °C (obr. 2b). Ze sklonu vrstevnic, které jsou přibližně pod úhlem 45°, je zřejmý synergický vliv prodlužující se doby 2. stupně hydrolyzy a zvyšující se dávky enzymu na vzrůstající množství rozloženého peří. Při dolních limitech sledovaných faktorů se rozložilo poměrně malé množství peří, při horních limitech sledovaných faktorů se množství rozloženého peří zvýšilo cca 1,5–1,6 krát. Z výsledků stupně hydrolyzy (tab. I) vidíme, že při horních

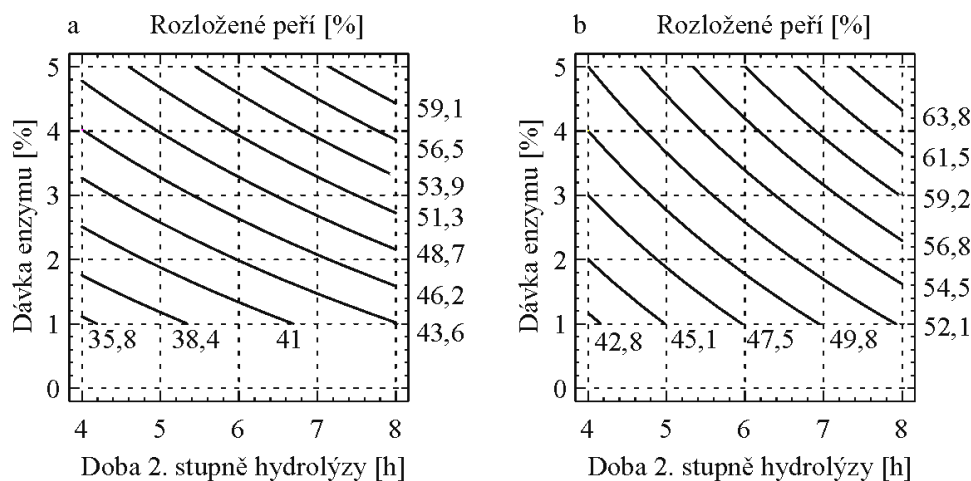
limitech sledovaných faktorů A, B, C se stupeň hydrolyzy blíží 90 %; molekulová hmotnost hydrolyzáte připraveného podle těchto podmínek bude nízká.

Keratinový hydrolyzáte

Roztoky připravených keratinových hydrolyzáte jsou po filtraci čiré, mírně nažloutlé barvy, po několika týdnech skladování při pokojové teplotě jsou stabilní. Pro charakterizaci keratinových hydrolyzáte v pevné fázi byl ze zahuštěného roztoku hydrolyzáte připraven prášek 24h sušením při 103 ± 2 °C. Obsah popela v hydrolyzátech je 13,1 až 18,7 % (viz tab. I). Přesto může být takový obsah popelovin pro některé aplikace hydrolyzáte nadlimitní. Snížit obsah popelovin v roztoku keratinového hydrolyzáte lze např. dialýzou či iontovou výměnou²⁷. Obsah dusíku v hydrolyzátech je 12,11–13,23 % a koresponduje s obsahem popela v hydrolyzátech – hydrolyzáte s nízkým obsahem popela obsahují nejvíce dusíku a naopak. Keratinové hydrolyzáte navíc obsahují vysoký obsah síry (1,81 až 2,80 %), a proto jsou vhodné k použití v zemědělství jako růstové stimulatory.

Závěr

Prezentovaná technologie hydrolyzy kuřecího peří dosahuje poměrně vysoké účinnosti (až 65 %) za mírných reakčních podmínek (teplota nepřesahující 80 °C, mírně alkalické prostředí, atmosférický tlak). Při optimálních podmínkách lze připravit keratinový hydrolyzáte s obsahem (vztaženo na sušinu) 13,2 % dusíku, 13,1 % popelovin, 1,8 % síry, $0,61 \text{ mmol g}^{-1}$ primárních $-\text{NH}_2$ se schopností tvořit filmy a povlaky. Keratinové hydrolyzáte je možné využít např. v zemědělství (růstové stimulatory), k výrobě



Obr. 2. Vliv doby 2. stupně hydrolyzy a dávky enzymu na množství rozloženého peří; a – teplota 2. stupně hydrolyzy 50 °C; b – teplota 2. stupně hydrolyzy 70 °C

biodegradabilních filmů či povlaků, nebo pro přípravu (mikro)kapsulí v chemickém průmyslu pro trvalejší uchování aktivity enkapsulovaných látek (např. barviva, stabilizátory, katalyzátory, vonné složky) a k zajištění jejich kontrolovaného uvolňování.

Tento článek byl vytvořen za podpory Operačního programu Výzkum a vývoj pro inovace, jenž je spolufinancován Evropským fondem regionálního rozvoje (ERDF) a státním rozpočtem ČR, v rámci projektu Centrum polymerních systémů (reg. číslo: CZ.1.05/2.1.00/03.0111).

LITERATURA

- Zocolla M., Aluigi A., Tonin, C.: *J. Mol. Struct.* 938, 35 (2009).
- Hill P., Brantley H., Van Dyke M.: *Biomaterials* 31, 585 (2010).
- Suzuki Y., Tsujimoto Y., Matsui H., Watanabe K.: *J. Biosci. Bioeng.* 102, 73 (2006).
- Simpson W., Crawshaw G.: *Wool: Science and Technology*. Woodhead, Cambridge 2002.
- Correa A. P. F., Daroit D. J., Brandelli A.: *Int. Biodeter. Biodegrad.* 64, 1 (2010).
- Khardenavis A. A., Kapley A., Purohit H. J.: *Waste Manage.* 29, 1409 (2009).
- Brandelli A.: *Food Bioprocess Technol.* 1, 105 (2008).
- Tatini R., Doddapaneni K. K., Potumarthi R. C., Vellanki R. V., Kandathil M. T., Kolli N., Mangamoori, L. N.: *Bioresour. Technol.* 99, 1596 (2008).
- Mambrouk M. E. M.: *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 2331 (2008).
- Grazziotin A., Pimentel F. A., Sangali S., de Jong E. V., Brandelli A.: *Bioresour. Technol.* 98, 3172 (2007).
- Dalev P. G.: *Bioresour. Technol.* 48, 265 (1994).
- Bore P. M., Arnaud J. C. (L'Oreal): US 4,948,876 (1990).
- Savolainen J. E. T. (Biodata Oy): US 5,262,307 (1993).
- Coward-Kelly G., Agbogbo F. K., Holtzapfel, M. T.: *Bioresour. Technol.* 97, 1344 (2006).
- Onifade A. A., Al-Sane N. A., Musallam A. A., Al-Zarban S.: *Bioresour. Technol.* 66, 1 (1998).
- Gousterova A., Braikova D., Goshev I., Christov P., Tishinov K., Vasileva-Tonkova E., Haertle T., Nedkov P.: *Lett. Appl. Microbiol.* 40, 335 (2005).
- Evangelou M. W. H., Ebel M., Koerner A., Schaeffer A.: *Chemosphere* 72, 525 (2008).
- Yang X., Zhang H., Yuan X., Cui S.: *J. Colloid Interface Sci.* 336, 756 (2009).
- Katoh K., Shibayama M., Tanabe T., Yamauchi K.: *Biomaterials* 25, 2265 (2004).
- Aluigi A., Vineis C., Ceria A., Tonin C.: *Composites, Part A* 39, 126 (2008).
- AOAC 935.46: *Gelatin - Ash, Moisture, Nitrogen*. Official Methods of Analysis of AOAC International, USA 1998.
- Davídek J., Hrdlička J., Karvánek M., Pokorný J., Seifert J., Velišek J.: *Laboratorní příručka analýzy potravin*. SNTL, Praha 1988.
- AOAC 955.48: *Microchemical Determination of Sulfur*. Official Methods of Analysis of AOAC International, USA 1998.
- Sung H. W., Hsu H. L., Shih C. C., Lin D. S.: *Biomaterials* 17, 1405 (1996).
- Nielsen P. M., Petersen D., Dammann C.: *J. Food Sci.* 66, 642 (2001).
- Strange K.: *Angewandte Statistik-Mehrdimensionale Probleme*. Springer Verlag, Heidelberg 1971.
- Arnesen J. A., Gildberg A.: *Bioresour. Technol.* 98, 53 (2007).

P. Mokrejš, O. Krejčí, R. Čermák, and P. Svoboda
(*Centre of Polymer Systems, Department of Polymeric Engineering, Faculty of Technology, Tomas Bata University, Zlín*): **Optimization of Enzymatic Hydrolysis Conditions of Chicken Feathers**

Poultry feathers, a by-product in poultry industry, and a significant keratin source, are not adequately utilised. The paper describes processing of chicken feathers by alkaline-enzymatic hydrolysis to obtain keratin hydrolysate. The effects of hydrolysis conditions on the extent of hydrolysis and on chemical properties of the hydrolysates were investigated. The experiments were statistically evaluated. Under mild conditions the keratin hydrolysate containing 13.2 % N, 13.1 % inorganic solids, 1.8 % S and 0.6 mmol g⁻¹ of NH₂ groups was obtained. Keratin hydrolysates can be utilised in fodders, in production of biodegradable films and coatings or as a material for microcapsules.