

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
ĶĪMIJAS FAKULTĀTE

**Keratīna izdalīšana no dabas materiāliem un tā izmantošana  
augstas kapacitātes bio-sorbenta izstrādē**

MAGISTRA DARBS

Autore: **Vanda Voikiva**

Studenta apliecības Nr.: **vv19028**

Darba vadītāji: **Pētn., Lekt., *Dr.sc.ing.* Inga Jurgelāne**

**Asoc. Prof., *Dr. chem.* Elīna Pajuste**

RĪGA

2021

## ANOTĀCIJA

**Keratīna izdalīšana no dabas materiāliem un tā izmantošana augstas kapacitātes bio-sorbenta izstrādē.** Voikiva V., zinātniskie vadītāji pētniece, *Dr.sc.ing.* Inga Jurgelāne un asociētā profesore, *Dr. chem.* Elīna Pajuste. Maģistra darbs, 45 lappuses, 11 attēli, 6 tabulas, 49 literatūras avoti. Latviešu valodā.

Kursa darba ietvaros veikta literatūras analīze par keratīna īpašībām un pielietošanas iespējām dažādās jomās. Izpētītas literatūrā pieejamās ekstrakcijas metodes no dažādiem keratīnu saturošiem materiāliem un to ietekmējošie faktori. Tika veikta izvēlētas perspektīvas keratīna ekstrakcijas metodes - sārnu hidrolīzes metodes - optimizācija. Tika pārbaudīts ekstrahētā keratīna pielietojums bio-sorbenta izveidē

AITU VILNA, KERATĪNS, EKSTRAKCIJA, SORBCIJA

## ABSTRACT

**Use of keratin derived from sheep wool to form membranes.** Voikiva V., scientific supervisors researcher, *Dr.sc.ing.* Inga Jurgelane and Associate Professor, *Dr. chem.* Elina Pajuste. Master thesis, 46 pages, 11 pictures, 6 tables, 49 literature sources. Latvian Language.

Within the framework of the course work, the literature analysis on the properties of keratin and its application possibilities in various fields was performed. Extraction methods from various keratin-containing materials and their influencing factors available in the literature have been studied. Optimization of a selected perspective keratin extraction method - alkali hydrolysis method - was performed. The use of extracted keratin in the formation of a bio-sorbent was tested.

SHEEP WOOL, KERATIN, EXTRACTION, SORPTION

# SATURS

ANOTĀCIJA .....	2
ABSTRACT .....	3
APZĪMĒJUMU SARAKSTS .....	6
IEVADS.....	7
<b>1. LITERATŪRAS APSKATS.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1. Keratīna sastopamība vidē un ķīmiskais sastāvs.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2. Keratīna īpašības.....</b>	<b>10</b>
1.2.1. <i>Keratīna sorbcijas īpašības</i> .....	11
1.2.2. <i>Keratīna termiskās īpašības</i> .....	12
<b>1.3. Keratīna izmantošana .....</b>	<b>12</b>
<b>1.4. Membrānu izveide no keratīna un to pielietojums.....</b>	<b>13</b>
1.4.1. <i>Keratīna kompozīti</i> .....	13
1.4.2. <i>Keratīna bāzes hidroģēli</i> .....	14
1.4.3. <i>Šķērssiņu ietekme uz keratīna kārtiņu fizikāli ķīmiskajām īpašībām</i> .....	14
1.4.4. <i>Keratīna biomateriāli</i> .....	15
<b>1.5. Keratīna ekstrakcijas metodes .....</b>	<b>16</b>
1.5.1. <i>Oksidācijas metodes</i> .....	17
1.5.2. <i>Reducēšana / oksidēšana - tioglikolātā / ūdeņraža peroksīdā</i> .....	18
1.5.3. <i>Reducēšana - sulfīts</i> .....	18
1.5.4. <i>Sārnu hidrolīzes metode</i> .....	18
1.5.5. <i>Jonu šķidrums</i> .....	19
1.5.6. <i>Superkritiska ūdens un tvaika eksplozija</i> .....	20
1.5.7. <i>Mikroviļņu ekstrakcija</i> .....	21
<b>1.6. Temperatūras ietekme uz ekstrakcijas iznākumu .....</b>	<b>21</b>
<b>1.7. Denaturējošo līdzekļu ietekme .....</b>	<b>22</b>
<b>2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA.....</b>	<b>25</b>
<b>2.1. Reāģenti.....</b>	<b>25</b>
<b>2.2. Trauki un aparātūra .....</b>	<b>25</b>
<b>2.3. Paraugu sagatavošana.....</b>	<b>26</b>
<b>2.4. Keratīna ekstrakcija no aitu vilnas.....</b>	<b>26</b>
<b>2.5. Keratīna daudzuma noteikšana paraugos izmantojot Bredforda metodi.....</b>	<b>28</b>
2.5.1. <i>Liofilizētā keratīna tīrības noteikšana</i> .....	28
2.5.2. <i>Keratīna zudumu noteikšana katrā ekstrakcijas posmā</i> .....	28
<b>2.6. Keratīna struktūras analīze, izmantojot SEM.....</b>	<b>28</b>

2.7.	Keratīna/ algināta kompozīta izveide un raksturošana .....	29
2.7.1.	<i>Keratīna izskalošanās no keratīna – algināta lodītēm</i> .....	29
2.7.2.	<i>Svina sorbcijas noteikšana keratīna – algināta lodītēs</i> .....	29
3.	REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS .....	30
3.1.	Šķīdināšanas temperatūras un NaOH koncentrācijas ietekme uz keratīna ekstrakcijas iznākumu .....	30
3.2.	Keratīna zudumi atkarībā no izdalīšanas metodes posma .....	33
3.2.1.	<i>Liofilizētā keratīna struktūra</i> .....	34
3.3.	Keratīna – algināta kompozīta raksturošana .....	37
3.3.1.	<i>Keratīna – Algināta kompozīta SEM analīze</i> .....	37
3.3.2.	<i>Keratīna – algināta kompozīta stabilitāte</i> .....	39
3.3.3.	<i>Svina jonu sorbcija keratīna – algināta kompozītā</i> .....	39
	SECINĀJUMI .....	42
	IZMANTOTĀ LITERATŪRA .....	43

## APZĪMĒJUMU SARAKSTS

DMF	– N,N-Dimetilformamīds
EDC	– 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) karbodiimīda hidrohlorīds
PA6	– Poliamīds 6
PCC	– Perkarbonāts
PEO	– Polietilēna oksīds
PLLA	– Polilaktīds
PTFE	– Politetrafluoretilēns
SDS	– Nātrija dodecilsulfāts
SEM	– Skenējošā elektronu mikroskopija
MEC	– Merkaptoetanolis

## IEVADS

Pasaulē strauji aug pieprasījums pēc filtriem un to materiāliem ar augstu filtrācijas efektivitāti gan ūdens, gan gaisa attīrīšanai. Pēdējos gados farmaceitisko vielu atlikumi (antibiotikas, pretkrampju līdzekļu, pretvīrusu līdzekļi, hormoni) tiek uzskatīti par jauniem vides piesārņotājiem, ņemot vērā to pastāvīgo ieplūdi un noturību ūdens ekosistēmā. Dotajām vielām piemīt ļoti augstas endokrīno sistēmu bojājošas īpašības ūdens iemītniekiem – vēžveidīgajiem, zivīm un abiniekiem; izraisa populāciju feminizāciju, hermafrodītismu, neauglību u.c. nevēlamus efektus<sup>1</sup>. Augstāk minēto iemeslu dēļ, ekonomisku un efektīvu filtru un filtrācijas sistēmu ieviešana ir būtiska un nepieciešama gan cilvēkam, gan videi<sup>2</sup>.

Tirgū pašlaik pieejamie filtri galvenokārt sastāv no sintētiskiem materiāliem, kas netiek pārstrādāti vai atkārtoti izmantoti, tādējādi nonākot apkārtējā vidē un to piesārņojot. Sintētiskie filtri ir arī vieni no šobrīd aktualizētās mikroplastmasas piesārņojumu avotiem. Arī doto materiālu ražošana nav ilgtspējīga, jo tie ir izgatavoti no naftas produktiem. Bioloģiski noārdāmās filtru materiālu alternatīvas, piemēram, kokvilna, rada vides piesārņojumu tās audzēšanas un ražošanas procesā, jo šobrīd prasa lielu daudzumu saldūdens un pesticīdu<sup>3</sup>.

Pēdējos gados tirgū novērojamas jaunas tendences un prasības, kas paredz filtru ražotājiem rast risinājumus filtru pārstrādei vai reciklēšanai<sup>4</sup>, kas rada pieprasījumu pēc jauniem filtru materiāliem, kas būtu viegli pārstrādājami vai biodegradabli<sup>5</sup>. Par audzēšanas materiālu tiek uzskatīts keratīns. Tā plašais absorbējamo vielu klāsts un citas fizikāli ķīmiskās īpašības padara to par potenciāli labu alternatīvu pašreizējiem filtru materiāliem.

Pētījumos parādīts, ka keratīnam un tā materiālu un kompozītiem piemīt labas spējas absorbēt ūdeni un gaisu piesārņojošās vielas, kas parāda tā labās sorbcijas spējas un plašās izmantošanas iespējas jaunu filtrācijas materiālu jomā. Tomēr tā neefektīvās izdalīšanas metodes kavē tā iegūšanu industriālos apmēros. Lai risinātu šo problēmu ir nepieciešams uzlabot keratīna ekstrakcijas metodi, lai tā būtu efektīvāka, ar mazākiem vielas zudumu un ar videi draudzīgākiem reaģentiem<sup>6</sup>.

**Mērķis:** Optimizēt keratīna iegūšanas metodi un izveidot sorbentu uz keratīna bāzes, kas iegūts no aitu vilnas.

### **Darba uzdevumi:**

1. Veikt literatūras analīzi par keratīnu, tā iegūšanu un pielietojumiem;
2. Veikt keratīna ekstrakciju no aitu vilnas pie dažādām NaOH koncentrācijām un šķīdināšanas temperatūrām;
3. Noteikt ekstrahētā keratīna tīrību un raksturot tā morfoloģiju;

4. Izveidot keratīna /algināta kompozīta materiālu un veikt tā raksturošanu.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

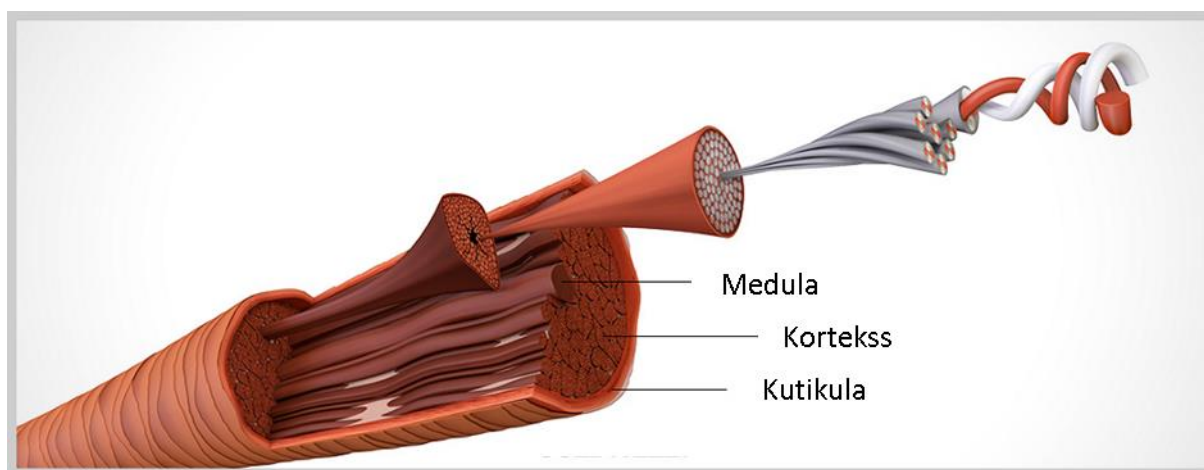
## 1.1. Keratīna sastopamība vidē un ķīmiskais sastāvs

Keratīns ir nosaukums strukturālo olbaltumvielu grupai, kas pazīstama kā skleroproteīni.  $\alpha$ -keratīns ir keratīna veids, kas sastopams mugurkaulniekos. Tas ir galvenais strukturālais materiāls, kas veido matus, nagus, spalvas, ragus, un mugurkaulnieku ādas ārējo slāni. Keratīns arī aizsargā epitēlija šūnas no bojājumiem vai stresa. Keratīns nešķīst ūdenī un organiskos šķīdinātājos<sup>7</sup>.

Zīdītājos pārsvarā keratīns ir sastopams  $\alpha$ -spirālveida struktūras veidā, turpretim putniem un rāpuļiem var būt gan  $\alpha$ -, gan  $\beta$ -tipi t.i.  $\alpha$ -spirālveida un  $\beta$ -lokšņu struktūru maisījumu<sup>8,9</sup>.

Keratīna šķiedru salikto struktūru veido trīs galvenie morfoloģiskie komponenti: kutikula, šūnu membrānu komplekss un kortekss. Šūnu membrānu komplekss darbojas kā starpšūnu cements, kas savieno kortikālās un kutikulas šūnas kopā<sup>10,11</sup>.

Vilnas šķiedru no ārpuses aizsargā kutikulas šūnas. Kutikulas šūnas ir vilnas šķiedras aizsargpārklājums, ko veido plākšņu formas šūnas (zvīņas), kas pārklājas gareniski un perifērijā, ar  $\sim 1 \mu\text{m}$  biežām malām, kas vērstas šķiedras gala virzienā. Kutikulas ārējais slānis sastāv no taukskābēm un proteīniem (galvenā sastāvdaļa ir 18- metileikozānskābe), kas kovalenti ir saistīta ar  $\alpha$ -slāni (epikutikulā). Vilnas šķiedrām ir komplicēta uzbūve, kura shematiski parādīta 1.1. attēlā<sup>11</sup>.



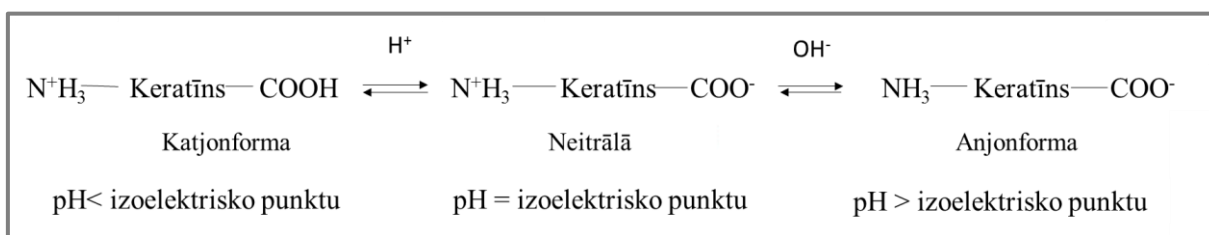
1.1. att. Vilnas šķiedras shematiska uzbūve<sup>12</sup>.

Vilnas šķiedras galvenokārt sastāv no strukturālo proteīnu dubultspirālēm - vairāk nekā 90 %, kas nodrošina vilnas šķiedru izturību un elastību. Šo struktūru nostiprina udeņraža saites

un disulfīda saites proteīnu ķēdē. Tās savieno katru spirāles spoli, palīdzot novērst tās stiepšanos<sup>12</sup>.

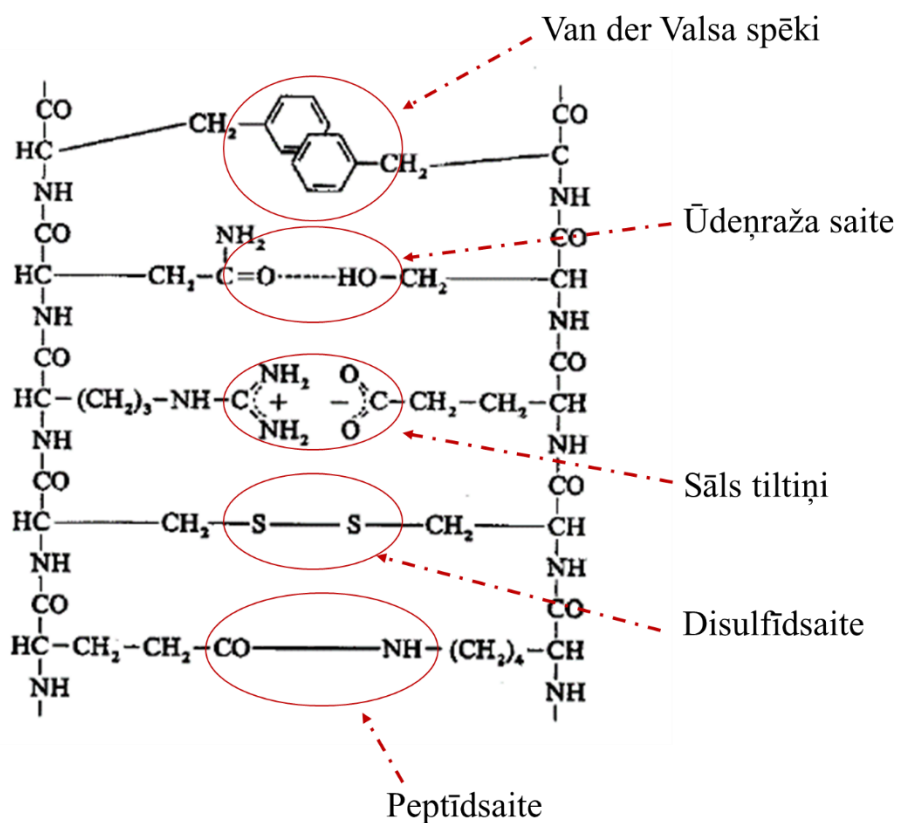
## 1.2. Keratīna īpašības

Tāpat kā visi proteīni, vilnas sastāvā esošais keratīns satur gan katjonu, gan anjonu grupas, tāpēc tas ir amfotērs. Sānu ķēdes, kas vilnā veido ievērojamu daļu no olbaltumvielu materiāla, mijiedarbojas ar katru no tām, tādējādi stabilizējot peptīdu, veidojot saites starp proteīnu virknēm. Vilnā esošais keratīns satur lielu daudzumu jonizējamu grupu un tā izoelektriskais punkts ir pie vērtības pH 4,5. Aitu vilnas šķiedru amfotēro īpašību shēmu var aplūkot 1.2. attēlā.



### 1.2. att. Keratīna amfotēro īpašību shēma

Vilnas keratīnā ir pieci saišu veidi, ar kādiem tiek sasaistītas peptīdu virknes keratīna struktūrā. Vilnas polimēru šķērssaites ir ūdeņraža saites, disulfīdsaites, kā arī jonu-jonu saites, ko sauc par sāls tiltiem, un peptīdsaites. Vilnas struktūrā darbojas arī Van der Valsa spēki. Disulfīdsaites, ūdeņraža saites un sāls tiltiņi nodrošina vilnas šķiedras stabilitāti, pateicoties to relatīvi vājajai šķīdībai. 1.3. attēlā redzamajā struktūrformulā ir shematiski attēloti visi pieci saišu veidi<sup>11</sup>.



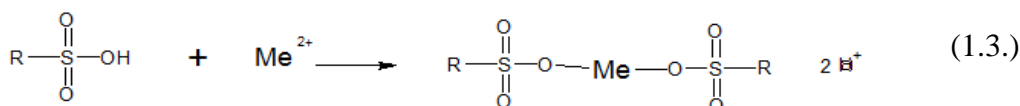
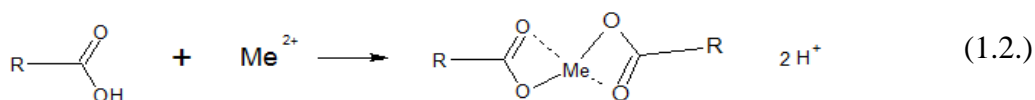
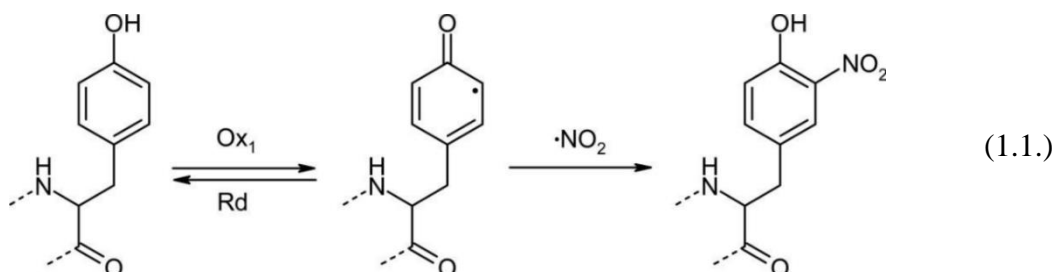
### 1.3. att. Vīlnā esošā keratīna struktūrformula

Keratīns ir bagāts ar aminoskābi cisteīnu, un tam piemīt spēja pašorganizēties šķiedru saišķos. Šajos šķiedru saišķos atsevišķi pavedieni tiek tālāk savstarpēji saistīti, izmantojot S-S (sēra-sēra) saites, iesaistot cisteīna sānu ķēdes. Tādā veidā keratīns veido īpaši izturīgas, nešķīstošas struktūras, kas ir vieni no spēcīgākajiem dabā sastopamajiem audiem. Vienīgie citi audi, kam ir līdzīga izturība kā keratīnam, ir hitīns (materiāls, kas atrodams kukaiņu eksoskeletā un vēžveidīgo ārējā apvalkā)<sup>10</sup>.

#### 1.2.1. Keratīna sorbcijas īpašības

Vairāki pētījumi ir pierādījuši<sup>13,5,14,15</sup>, ka keratīnu saturoši materiāli spēj absorbēt dažādus organiskos un neorganiskos savienojumus no apkārtējās vides. Mehānisms, pēc kura keratīnu saturoši materiāli spēj sorbēt dažādas ūdeni un gaisu piesārņojošās vielas, balstās uz fizikālās un ķīmiskās sorbcijas kombināciju. Fizikālajā sorbcijā vielas tiek ieslēgtas esošajās porveida iedobēs uz materiāla virsmas. Ķīmiskās sorbcijas jeb hemosorbcijas laikā notiek ķīmiska reakcija starp vielu un keratīnu saturošo materiālu, pamatā ar galvenajām funkcionālajām grupām, peptīdsaitēm un sānu ķēdēm, kas ir pietiekoši aktīvas, lai reaģētu ar neorganiskajiem un organiskajiem savienojumiem<sup>15</sup>.

Keratīnam ir labas sorbcijas spējas attiecībā siltumnīcas efekta gāzēm, viegli gaistošiem organiskajiem savienojumiem un smagajiem metāliem<sup>15,14,16</sup>. Svarīga loma NO<sub>2</sub> sorbcijā ir reakcijai ar aminoskābi tirozīnu, jo galvenokārt tieši pie šīs aminoskābes pievienojas NO<sub>2</sub> molekula., Tirozīns reakcijas mehānisms ar slāpekļa dioksīdu parādīts 1.1. vienādojumā<sup>17</sup>.



Mehānismi, pēc kuriem notiek metālu jonu sorbcija ir attēlots 1.2. un 1.3. vienādojumā<sup>18</sup>.

### 1.2.2. Keratīna termiskās īpašības

Termiskas apstrādes procesā keratīnam pirmais masas samazinājums novērojams ap 111 °C un tas ir saistīts ar ūdens iztvaikošanu<sup>19</sup>. Otrais masas samazinājums ir nedaudz virs 200 °C, tas norāda uz spirāles denaturāciju keratīnā. Augsta biomateriāla siltuma stabilitāte būtu priekšrocība pielietojumiem, kur svarīga ir laba termiskā izturība. Tādējādi keratīnam ir acīmredzama priekšrocība salīdzinot ar citiem bieži izmantotiem biopolimēriem, piemēram, kolagēnu, kuram denaturācija notiek jau pie 40 °C<sup>19</sup>.

### 1.3. Keratīna izmantošana

Tā kā cilvēka matos ir daudz keratīna, šis proteīns tiek pievienots daudziem matu kopšanas līdzekļiem. Tomēr, tāpat kā attiecībā uz maldinošajiem mārketinga apgalvojumiem, kas izteikti par elastīnu saturošiem ādas novecošanās līdzekļiem, nav pierādījumu, ka ārēji lietots keratīns varētu iekļūt matu struktūrā. Lai gan keratīnu galvenokārt pētīja izmantošanai kosmētikas (matu kopšanas) produktos, keratīna īpašību izpēte arī radīja uz keratīna bāzes veidotos biomateriālus, kurus varētu izmantot biomedicīnas vajadzībām. Keratīna neparastās

mehāniskās īpašības un izturība, kā arī spēja pašorganizēties ir šo biomedicīnas pētījumu virzītājspēks<sup>6</sup>.

Keratīna pētījumu vēsture parāda vēl vienu lielu izaicinājumu, izmantojot bioloģiski iegūtus polimērus kā biomateriālus: atkarībā no izmantotā keratīna avota un izmantotās ekstrakcijas procedūras, atsevišķi keratīna preparāti var ievērojami atšķirties. Atsevišķu preparātu mainīgums un nereproducējamība ir vispārīga iezīme vairumam bioloģiski iegūtu polimēru. Ir veikti pētījumi par olbaltumvielu kārtiņu sagatavošanu no keratīna, kas iegūts no vilnas un cilvēku matiem. Šīs tīru olbaltumvielu kārtiņas bija trauslas un vājas. Pētnieki laboratorijā nevarēja reproducēt izcilo keratīna stiprumu, kas veidojās *in vivo*. Tikai tad, kad glicerīnu pievienoja kā plastifikatoru, varēja iegūt salīdzinoši stipras un elastīgas keratīna plēves<sup>6</sup>.

#### **1.4. Membrānu izveide no keratīna un to pielietojums**

Daudz ir paveikts, lai izgatavotu un raksturotu jaunus keratīna bāzes izstrādājumus, piemēram, kārtiņas, sūkļus, sastatnes un šķiedras. Daudzos gadījumos ir pierādīts, ka šiem jaunajiem keratīna materiāliem ir lieliska bioloģiskā saderība. Turklāt pētnieki ir atklājuši keratīnu fizikālo un mehānisko īpašību modulēšanas metodes, lai izveidotu biomateriālus, kuriem ir piemērotas īpašības to interesējošajam pielietojumam<sup>20</sup>. Keratīna kārtiņu ražošanai ir vairākas metodes, piemēram, šķīdinātāju liešana, termiskā presēšana un kompresijas formēšana, elektriskā vērpsana un slāņu nogulsnešanās<sup>21</sup>.

##### **1.4.1. Keratīna kompozīti**

Keratīna kompozītiem, kas tiek gatavoti bez piedevu pievienošanas, ir trausla struktūra, kas ierobežo to pielietojumu. Tāpēc vairākos pētījumos ir mēģināts to risināt, pastiprinot keratīna matricu, iekļaujot dažādas piedevas, piemēram, dabiskus vai sintētiskus polimērus. Vairumā gadījumu tika sasniegtas uzlabotas mehāniskās īpašības, bet tika ziņots arī par modificētās keratīna matricas uzbriešanu un noārdīšanos<sup>22,20,21</sup>. Arvien lielāka interese ir pastiprināt keratīna matricu ar dabiski iegūtiem t.s. ‘zaļajiem’ savienojumiem. Kā piemēru var minēt keratīna maisījumus ar hitozānu brūču sadzīšanai un mākslīgiem ādas aizstājējiem<sup>23</sup>. No otras puses, keratīna un sintētisko polimēru mijiedarbība ir arī plaši un dziļi pētīta. Tika izpētītas arī sakarības starp polietilēna oksīda (PEO) un keratīna sajauktajām kārtiņām, lai izveidotu keratīna bāzes materiālu ar uzlabotām strukturālajām īpašībām: keratīna / PEO maisījumu uzlabotās strukturālās īpašības ļauj izstrādāt keratīna materiālus lietošanai kā sastatnes šūnu augšanai, brūču pārsēji un zāļu piegādes membrānas. Ir pētīta arī starpmolekulārā mijiedarbība starp keratīnu un poliamīdu 6 (PA6) ar mērķi radīt keratīna bāzes materiālus, kurus praktiski

var izmantot visdažādākajos pielietojumos, sākot no biomedicīnas ierīcēm līdz aktīvai ūdens filtrēšanai un tekstilšķiedrām<sup>23</sup>.

Biomateriālu jomā ļoti plaši ir pētīts keratīna – algināta kompozīts dažādās formās, piemēram, kā hidrogēls, nanogels un sūkļa veida. Tiek pētīta šo kompozītu pielietošana zāļvielu transportēšanā vēža ārstēšanai, audu inženierijā, un biosorbenta izveidē metilēnzilā absorbēšanai no ūdens vides. Literatūrā parādīts, ka šis biomateriāls ir arī efektīvs adsorbents krāsvielu noņemšanai no ūdens šķīduma. Absorbējot metilēnzilā krāsvielu ūdens šķīdumā, keratīna – algināta kompozīts uzrādīja augstāku absorbcijas kapacitāti, nekā tīrs algināts<sup>24,25</sup>.

#### **1.4.2. Keratīna bāzes hidrogēli**

Uz keratīna bāzes veidotiem materiāliem raksturīga augsta izturība un stabilitāte in vivo apstākļos. Viņi arī paātrina šūnu atjaunošanos un veido saderīgas sastatnes. Keratīna hidrogēlus var viegli rehidrēt, kas ir vēlams invazīvai injekcijai protezēšanā<sup>26</sup>. Tika salīdzinātas keratīna bāzes hidrogēlu īpašības ar hidrogēniem uz kolagēna bāzes, kas ir savstarpēji saistīti ar tādu pašu šķērssaistītāju kā 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimīds<sup>22</sup>. Tiek uzskatīts, ka uz keratīna bāzes veidotiem materiāliem ir lielāka mehāniskā izturība un elastība. Arī nešķērssaistīta keratīna mehāniskie parametri bija vairākas reizes augstāki nekā šķērssaistītā kolagēna parametri.

Parasti keratīna bāzes hidrogēliem ir piemērotas īpašības biomedicīnas vajadzībām. No keratīna iegūtie hidrogēli ir samērā stabili un ar labu mehānisko izturību pat bez šķērssaistīšanas modifikācijām.. Tomēr ir nepieciešami papildu pētījumi par keratīna bāzes hidrogēliem.

Biomateriālus galvenokārt veido no keratīna, kas izolēts no vilnas un cilvēku matiem<sup>22</sup>. Galvenais avots ir vilna, tomēr vairāk pētniekus interesē cilvēka atvasinātais keratīns, jo šajā gadījumā pastāv mazāks imūnās atbildes risks. Keratīnu var izmantot sastatņu sintēzē ilgstošai šūnu kultūrai. Hidrogēlos keratīns ļauj veidot porainus gēla formas materiālus un rada piemērotu vidi šūnu proliferācijai. Tos var ievadīt nervu kanālā kā filtru, lai vadītu nervu atjaunošanos<sup>22</sup>.

#### **1.4.3. Šķērssaišu ietekme uz keratīna kārtiņu fizikāli ķīmiskajām īpašībām**

Šķērssaistīšana ir zplatīta metode, lai uzlabotu olbaltumvielu un polisaharīdu kārtiņu fizikāli ķīmiskās īpašības, piemēram, ūdens izturību, stiepes izturību un termisko stabilitāti. Izmantojot etilēnglikola diglicidilēteri un glicerīna diglicidilēteri, lai ķīmiski savstarpēji saistītu reducētā keratīna šķīdumu, novēroja labāku savstarpēji saistītu kārtiņu pagarinājumu un ūdens izturību. Ķīmiskajiem šķērssaistīšanas līdzekļiem, piemēram, glutaraldehīdam,

glikoksālam un formaldehīdam, ir atšķirīgs toksiskuma līmenis, kas izriet no to atlikumiem vai atvasinājumiem.

Keratīna kārtiņu izveidošanā tiek izmantota dialdehīda ciete kā maz toksisks šķērssaistītājs. Rezultāti liecina, ka, pievienojot 2% dialdehīda cietes, kārtiņas bija amorfas un caurspīdīgas ar labāku stiepes pagarinājumu un ūdens tvaiku caurlaidību.

Transglutamināze ir vēl viens zemas toksicitātes šķērssaistītājs, ko plaši izmanto dažādu olbaltumvielu, piemēram, želatīna un keratīna šķērssaistīšanai. Šis enzīms ievieš kovalentu šķērssaistību starp olbaltumvielām un peptīdiem un tāpēc katalizē acilgrupu pārnese reakcijas un tādējādi uzlabo olbaltumvielu struktūras fizikāli ķīmisko stabilitāti<sup>15, 28</sup>.

#### **1.4.4. Keratīna biomateriāli**

Keratīna bāzes materiāli ir radījuši iespējas revolucionizēt biomateriālu pasauli to raksturīgās bioloģiskās saderības, bioloģiskās noārdīšanās, mehāniskās izturības un dabiskās izplatības dēļ. Keratīnu ekstrakcijas, attīrīšanas un raksturošanas attīstība biomateriālos izraisīja keratīna materiālu un to atvasinājumu komponenta eksponenciālo pieaugumu, pateicoties tam, ka ekstrahētajiem keratīna proteīniem ir raksturīga spēja pašiem savākties un polimerizēties porainās, šķiedrainās sastatnēs. Turklāt ir pierādīts, ka keratīna biomateriāliem, kas iegūti no vilnas un cilvēka matiem, piemīt šūnas saistošas īpašības, kas spēj atbalstīt šūnu piesaisti<sup>20</sup>.

Keratīna biomateriāliem ir daudz dažādu priekšrocību salīdzinājumā ar citām biomolekulām, ieskaitot unikālu ķīmiju, ko nodrošina tā augstais sēra saturs, ievērojamā bioloģiskā saderība, tieksme uz pašsakārtošanos un iekšējā šūnu atpazīšana. Kad šīs īpašības kļūst labāk izprotamas, kontrolējamas un izmantojamas, daudzi keratīna biomateriālu biomedicīnas pielietojumi iekļūs klīniskajos pētījumos un paplašinās keratīna materiālu tirgu<sup>29</sup>. Lai keratīnu varētu plaši izmantot kā biomateriālu, nākotnē ir jārisina daži jautājumi:

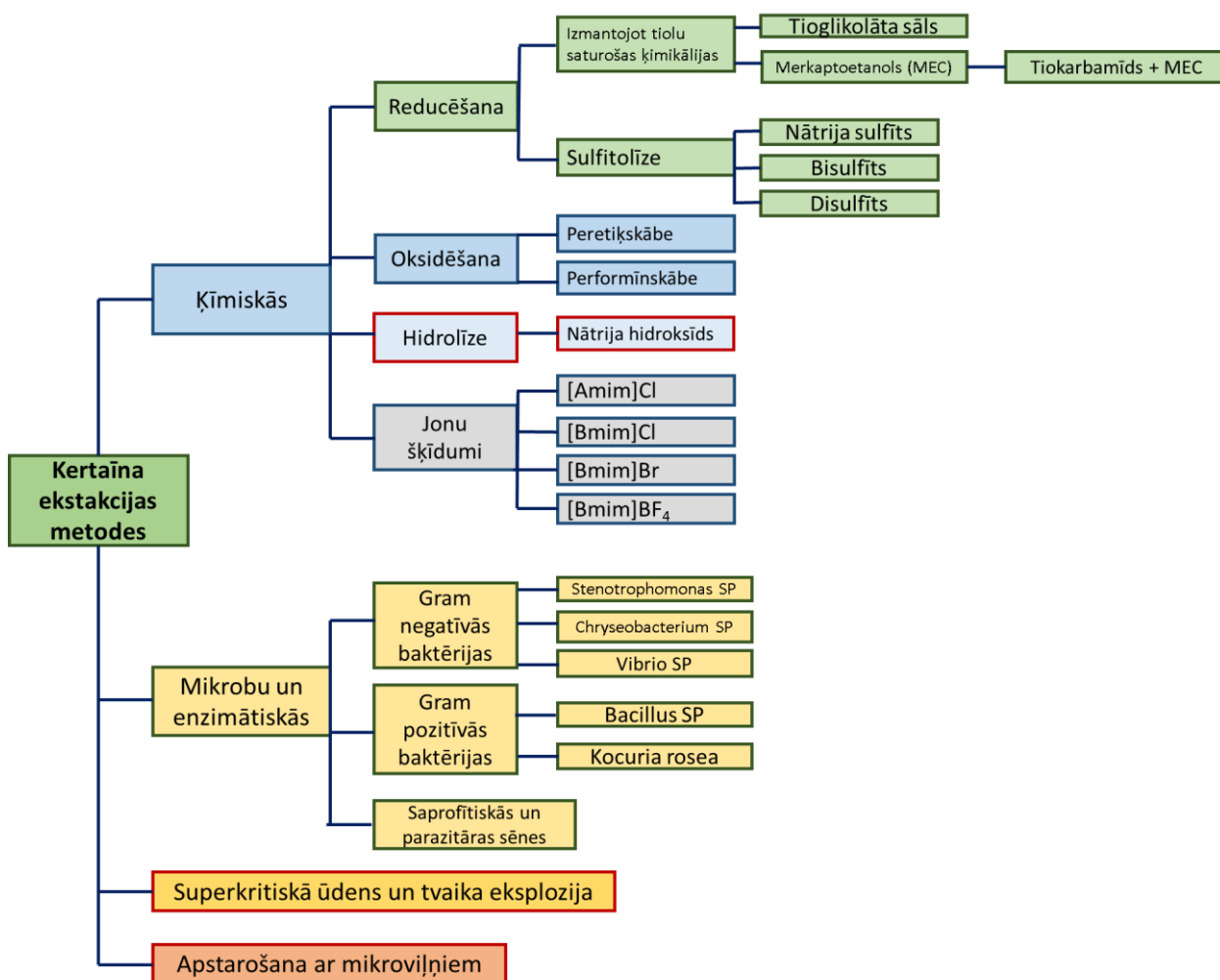
- (1) labāk jāsaprot keratīna mijiedarbība ar šūnām un tā loma šūnu atbalstīšanā. Līdz ar to ievērojami uzlabosies brūču dzīšana, nervu, kaulu un ādas atjaunošanās procesi, izmantojot keratīna biomateriālus;
- (2) jāuzlabo keratīna bāzes materiālu, piemēram, kārtiņu, kompozītu un sūkļu, mehāniskās un fizikālās īpašības un molekulārā līmenī jāizskaidro keratīna mijiedarbība ar citiem dabīgiem vai sintētiskiem polimēriem, lai optimizētu struktūru un biomateriāla funkcija;
- (3) ir vajadzīgi papildu pētījumi, lai atrastu vienkāršas, rentablas un tomēr efektīvas metodikas, piemēram, ķīmiskās vai fermentatīvās metodes, izmantojot jaunas zaļo šķīdinātāju klases vai dziļi izpētīt superkritisko šķīdumu tehnoloģiju, lai labāk iegūtu keratīnu no matiem, vilnas vai citiem avotiem.

Kad šīs keratīna īpašības tiks sasniegtas, paredzams, ka keratīna biomateriāli klīniskajos pētījumos pārvērtīsies par galveno biomateriālu<sup>29,6</sup>.

### **1.5. Keratīna ekstrakcijas metodes**

Vilnas šķiedras virsma ir bagāta ar lipīdiem, ar ārējo lipīdu slāni, kas sastāv no 18-metilikožānskābes kopā ar citām taukskābēm, kas lielā mērā ir saistītas ar tioesteru saitēm ar cisteinerīna pamatā esošajiem proteīniem. Tioesteru saites tiek viegli sašķeltas ar nukleofilu aizvietošanu [27,28]. Lai pilnībā izšķīdinātu vilnu, ir jāizjauc starpmolekulārās un molekulārās ūdeņraža saites, kā arī disulfīdu (-S-S-) saites starp olbaltumvielu ķēdēm<sup>30</sup>. Sakarā ar raksturīgo sarežģīto struktūru keratīna materiāliem parasti ir nepieciešams šķīdinātāju sistēmu maisījums, kur dažādiem sistēmas komponentiem ir dažādas funkcijas, lai izjauktu nekovalento un kovalento mijiedarbību starp polipeptīdu ķēdēm. Šīs keratīna ekstrakcijas sistēmas vienmēr ir saistītas ar sarežģītām metodēm šķīdinātāju reaģentu atdalīšanai<sup>30</sup>.

Vilnas šķīdināšana, kas prasa daļēju keratīna struktūras noārdīšanu, ir sarežģīta, taču to var panākt vairākos veidos, ieskaitot disulfīdu saišu reducēšanu, oksidēšanu un sulfitolīzi. Šajās reakcijās izmantotie reaģenti tomēr bieži ir toksiski un grūti pārstrādājami. Šie ierobežojumi ir iedvesmojuši pētniekus izstrādāt jaunas šķīdināšanas metodes<sup>29</sup>.



1.4.attēls. Esošo keratīna ekstrakcijas metožu apkopojums<sup>29</sup>.

### 1.5.1. Oksidācijas metodes

Par oksidēšanas metodēm literatūrā ir ziņots gadu desmitiem, keratīna ekstrakcija ar 2% peretiķskābi 30 stundas, kam seko viegla amonjaka (0,2 N) apstrāde un visbeidzot izgulsnēšana, izmantojot HCl<sup>31</sup>. Citi pētnieki aizstāja 2% peretiķskābi ar 2% performīnskābi, bet iznākums sastādīja tikai 6,6% keratīna<sup>32</sup>. Oksidācijas metode gadu gaitā nav tikusi modificēta, un to izmantoja keratīna ekstrakcijai no vilnas un matiem. Dotajai ekstrakcijas metodei ir zema efektivitāte, jo vilnas šķiedras nav viendabīgs materiāls, bet gan komplicēta struktūra. Ar šo metodi iegūtais keratīna šķīdums galvenokārt bija  $\alpha$ -keratīns, ko iegūst no šķiedru korteksa un kam pirms ekstrakcijas procesa ir kristāliska struktūra.

Nešķīstošie keratīna atlikumi veido biezu želejai līdzīgu materiālu un galvenokārt sastāv no  $\beta$ -keratīna, kas galvenokārt atrodas matu kutikulā. Apstrāde ar peretiķskābi daļēji oksidē keratīna disulfīta saites un pārvērš tās hidrofilās kuloniskās sulfongrupās cisteīna aminoskābes sānu ķēdēs, kas var veidot kompleksus ar ūdeni.

Apstrādājot vilnu 30 stundas ar 2% peretiķskābi, tika atklāts, ka disulfīta saites tiek oksidētas līdz sulfonātu grupām. Šie rezultāti vēlāk tika apstiprināti ar infrasarkanā staru spektroskopijas analīzi.

Citā pētījumā<sup>33</sup> tika izmantoti saudzīgi oksidēšanās apstākļi (2% peretiķskābes tikai 5 minūtes) un ziņots par cistīna monoksīda un dioksīda klātbūtni papildus sulfonātu grupām<sup>34</sup>. Sulfonāts tika noteikts kā galvenais oksidēšanās produkts, ja apstrāde veikta ar ūdeņraža peroksīdu, nātrija hipohlorītu, peretiķskābi vai kālija permanganātu ar dažādām pH vērtībām. Tāpēc galvenā reakcija visos šajos oksidēšanās procesos bija disulfīts līdz sulfonātam<sup>29, 35, 36</sup>.

Oksidācijas metodes priekšrocība ir tā, ka iegūtos keratīna paraugus pēc apstrādes ar perīnskābēm vai peretiķskābēm var sadalīt dažādās  $\alpha$ -,  $\beta$ - un  $\gamma$ -keratozes frakcijās, pamatojoties uz to šķīdību dažādās pH vērtībās.

Šī atdalīšanas metode ļāva izmantot labāk šķīstošos korteksa komponentus tādos produktos, kuriem nepieciešama augsta šķīdība, piemēram, biomedicīnas hidrogēli. Proteīni, kas iegūti oksidēšanās laikā (keratoze), tiek ķīmiski modificēti, un bisulfīta saites tiek pārveidotas par sulfonskābēm, tāpēc šiem proteīniem var būt atšķirīgas fizioloģiskās īpašības nekā keratīniem, kas iegūti, izmantojot citas apstrādes metodes<sup>37</sup>.

#### **1.5.2. Reducēšana / oksidēšana - tioglikolātā / ūdeņraža peroksīdā**

Pētījumā (atsauce) veikts salīdzinājums starp merkaptoetanolu (MEC) un tioglikolātu kā reducējošajiem līdzekļiem pie pH 5 vilnas šķīdināšanai. Tika novērots, ka abas ķīmiskās vielas ir ļoti līdzīgas to reducēšanas pakāpē, kad tiola koncentrācija bija zema, bet augstā tiola koncentrācijā, neitrāls tiols bija efektīvāks pie pH 7, un, palielinot tiola koncentrāciju, reducēšanas process tika pabeigts<sup>38</sup>. Autori ziņoja par maksimālo iznākumu 75 %. Parasti MEC tika uzskatīts par efektīvāku reducētāju nekā kālija tioglikolāts. Atšķirības starp šiem diviem tioliem bija acīmredzamas augstās koncentrācijās, kad kālija tioglikolāta jonizētās karboksilgrupas uzrādīja lielāku jonu stiprumu<sup>36</sup>.

#### **1.5.3. Reducēšana - sulfīts**

Disulfīdu saišu samazināšana, izmantojot MEC, ir bijusi standarta metode keratīna ekstrakcijai ar labu keratīna iznākumu, kuram ir saglabāta struktūra. Tomēr MEC ir toksiska (LD50 iekšķīgi lietojot - 98 - 162 mg/kg)<sup>39</sup> viela, un ir komerciāli un videi nevēlama augsto izmaksu un vides problēmu dēļ, kas saistītas ar tās nepatīkamo smaku un toksisko iedarbību uz vidi. Nātrija sulfīts var būt laba alternatīva sulfīdu saišu noārdīšanai un keratīna ekstrakcijai<sup>36</sup>.

#### **1.5.4. Sārma hidrolīzes metode**

Ir zināms, ka koncentrēti un karsti sārma šķīdumi var izšķīdināt vilnu. Apstrādājot vilnu ar sārma šķīdumu, sēra dubultsaite sāk sadalīties un notiek cistīna atlikumu noārdīšanās<sup>40</sup>.

Augstas koncentrācijas sārma šķīdums atdala ūdeņradi no sulfāta karboksilgrupas un atvieglo šķīšanu, taču rodas bojājumi peptīdu ķēdēs. Šo saišu noārdīšanās var izraisīt sērūdeņū smakas veidošanos apstrādes procesā, kura ir ļoti nevēlama. Proteīna mugurkaula disociācija, liela daudzuma sārnu reaģentu patēriņš un līdz ar to liels skābes daudzums, kas nepieciešams proteīnu šķīduma neitralizēšanai un nogulsnešanai, ir galvenie faktori, kas kavē sārnu metodes komercializāciju<sup>36</sup>.

Cistīns ir ļoti jutīgs pret sārnu klātbūtni un ļoti ātri sadalās. Caur šo cistīna sadalīšanos tiek ražoti tādi produkti kā skābeņskābe un pirovīnskābe. Sārnu ekstrakcijas metode var būt noderīga, lai spalvu keratīnu pārvērstu tādos produktos kā plēves un bioloģiski noārdāmas plastmasas, kam nepieciešami elastīgi un bioloģiski noārdāmi materiāli.

Sārnu apstrāde krasi ietekmē iegūtā keratīna proteīna aminoskābju saturu, un arī olbaltumvielu iegūšanas iznākumu, kas izmantojot šīs metodes bija ļoti zems. Tika novērts, ka procesa laikā tika zaudēta puse izejvielu, kas, iespējams, dialīzes procesā tika zaudētas kā brīvās aminoskābes<sup>41</sup>.

Citā pētījumā<sup>42</sup> spalvu paraugus apstrādāja ar vara oksīda un amonjaka šķīdumu (Schweitzer's reaģents, NaOH sajaukts ar vara sulfātu 2: 1 mol / mol). Neskatoties uz nātrija hidroksīda efektu, peptīdu ķēde netika sabojāta, un procesa laikā neveidojās lantionīns. Vēl svarīgāk ir tas, ka cistīna atlikumi netika bojāti, bet iegūtajā proteīnā tie tika pārveidoti par cisteīnskābes atlikumiem. Gala produkts bija proteīnu un vara komplekss, un varš netika izvadīts ar parasto dialīzi, jo vara un proteīnu starpā bija spēcīga saite. Tāpēc gala keratīna produkts var nebūt piemērots izmantošanai pārtikas produktos un farmaceitiskām vajadzībām vara klātbūtnes dēļ, kas kavē šīs metodes izmantošanu komerciāli.

Citā metodē matu paraugus vispirms apstrādāja ar 0,1 M NaOH un pēc tam 5 stundas apstrādāja ar NaSO<sub>3</sub>, urīnvielas un SDS šķīduma maisījumu 80 °C temperatūrā. Tika novērots 55% iznākums, un autori ziņoja, ka produkta  $\alpha$ -spirāles un  $\beta$ -loksnes struktūras ir saglabājušās un iegūtā keratīna molekulmasa ir 25–37 kDa. Praktiskā nozīmē sārmainā apstrādes agresīvā ietekme uz keratīna proteīnu ierobežo tā pielietojumu un komercializāciju. Dinātrija sulfāta šķīdums var palielināt šķīduma pH līdz 14, kas izjauc ūdeņraža saites un nodrošināt labāku pieeju tioliem, lai sasniegtu disulfīta saites, bet tajā pašā laikā augsts pH līmenis var sabojāt olbaltumvielu mugurkaulu.<sup>43</sup>

#### **1.5.5. Jonu šķīdumi**

Jonu šķīdumi (JŠ) ir sāļi, kas sastāv no organiskā katjona un vairākiem dažādiem organiskiem un neorganiskiem anjoniem, kuri kūst temperatūrā, kas zemāka par 100 °C. Jonu šķīdumiem ir dažas labas fizikāli ķīmiskās īpašības, tostarp zems tvaika spiediens, augsta jonu

vadītspēja, augsta termiskā stabilitāte un augsta šķīdība. Jonu šķīdumi ir plaši izmantoti kā polimēru šķīdinātāji tādu materiālu kā zīda, vilnas, celulozes un hitīna šķīdināšanai<sup>30</sup>.

Vilnā pieejamās kovalentās un nekovalentās mijiedarbības dēļ ir grūti to izšķīdināt vienā šķīdinātājā. Pētījumi parādīja<sup>44</sup>, ka hlorīdu saturošs JŠ bija labākais šķīdinātājs, salīdzinot ar citiem pārbaudītajiem anjoniem (BF<sub>4</sub>, PF<sub>6</sub> un Br). Tas var būt saistīts ar augsto Cl<sup>-</sup> koncentrāciju un tās nukleofīlo aktivitāti, kurai starp pārbaudītajām JŠ ir visspēcīgākā ietekme uz ūdeņraža saitēm. B – keratīna struktūra bija galvenā reģenerētā keratīna sastāva struktūra. Iegūtais keratīns arī uzrādīja lielāku termisko stabilitāti, salīdzinot ar dabisko vilnas šķiedru<sup>36</sup>.

Keratīna ekstrakcija, izmantojot JŠ, jāveic inertā atmosfērā jonu šķīdumu higroskopiskā rakstura dēļ, kam varētu būt nepieciešams dārgs specializēts aprīkojums. Ir novērots, ka augstas temperatūras šķīdināšanas process izraisa sekundārās struktūras traucējumus un tādējādi reģenerētā keratīna denaturāciju.

Dažādām vilnām ir ziņots<sup>45</sup> par dažādiem vilnas struktūras izvietojumiem. Piemēram, Merino vilnai ir divpusējs izkārtojums, Linkolna vilnai ir cilindrisks izkārtojums, un Mohēras galvenokārt sastāv no orto garozas. Šīs vilnas struktūras atšķirības var izraisīt dažādas gala keratīna produkta termiskās īpašības. Izmantojot JŠ, vilna nevar izšķīst temperatūrā, kas zemāka par 90 °C, šķīdināšanā 65 °C tika panākta tikai daļēja vilnas izšķīšana, savukārt, 130 °C temperatūrā tika panākta pilnīga izšķīšana<sup>45</sup>.

Izmantojot JŠ keratīna ekstrakcijā, lielākā daļa olbaltumvielu ir starp 10 un 40 kDa, kas parāda daļēju olbaltumvielu fragmentāciju ekstrakcijas rezultātā. Tāpēc olbaltumvielu hidrolīzes rezultātā rodas dažādu olbaltumvielu maisījums ar neviendabīgu molekulmasu<sup>30,36</sup>.

### **1.5.6. Superkritiska ūdens un tvaika eksplozija**

Ņemot vērā to, ka visvairāk pret karstumu jutīgās saites ir olbaltumvielu kovalentās saites, termiskais efekts var būt nepilnīgs, sadalot keratīna šķiedrā esošās disulfīta saites. Tvaika viršana ir termoķīmiska reakcija, tomēr otrā fāzē ir adiabatiskas izplešanās reakcija, kad notiek materiāla pēkšņa fizikālā izplešanās.

Tvaika sprādziens ir plaši izmantots kā zaļā tehnika miežu biokonversijai, koksnes, kviešu salmu delignifikācijai, lignocelulozes biomasas pulpēšanai un arī cukura iegūšanai no kukurūzas kātiem, kā arī citiem lauksaimniecības blakusproduktiem biodegvielu ražošanā. Tomēr to galvenokārt izmanto celulozes materiālu biokonversijai.

Līdzīgi kā ziņots par jonu šķīdumu ekstrakciju, iegūtais keratīns denaturējās zemas cisteīna un samazinātas alfa spirālveida struktūras dēļ. Maksimālais keratīna iznākums bija 70 %, kas tika konstatēta pie augstākā pārbaudītā spiediena 2 MPa, izmantojot fosfāta

buferšķīdumu pie pH 9 vai 0,2 % kālija hidroksīdu. Vienādos apstrādes apstākļos, izmantojot dejonizētu ūdeni, tika iegūts tikai 10% keratīna<sup>29</sup>.

Apstrādājot vilnu (cietvielu un šķīdumu attiecība 1: 3) 10 minūtes ar piesātinātu tvaiku 220 °C temperatūrā, procesa iznākums bija 62,4 % cietā produkta, 18,7 % ūdenī šķīstošās frakcijas un 1,1 % nogulšņu. Autori ziņoja, ka procesa laikā tika zaudēti 17,9 % no sākotnējās vilnas masas, kas var būt saistīts ar neproteīnu materiālu klātbūtni vilnā un arī procesa nepilnīgu atjaunošanos. Aminoskābju analīze parādīja, ka cisteīna saturs bija ļoti zems, ko izsauca spēcīgs karsēšanas process. Olbaltumvielu analīze, izmantojot SDS-PAGE gēlu, parādīja ka lielākajai daļai olbaltumvielu bija maza molekulmasa, diapazonā no 18 līdz 3 kDa. Neskatoties uz augstāku šķīdību, ātru apstrādes laiku un iespējamu zemas temperatūras izmantošanu salīdzinājumā ar citām parastajām tvaika eksplozijas metodēm, metodes trūkums ir ievērojams cisteīna daudzuma samazinājums galīgajā keratīna produktā<sup>29</sup>.

#### **1.5.7. Mikroviļņu ekstrakcija**

Mikroviļņu starojums ir izmantots vairākās keratīna ekstrakcijas metodēs. Izmantojot mikroviļņu starojumu ar mainīgu jaudu diapazonā no 150 līdz 570 W līdz 7 minūtēm un temperatūrā līdz 180 °C, iegūtais ekstrakcijas iznākums bija 60 %. Mikroviļņu starojuma izmantošana keratīna ekstrakcijas veicināšanai izraisa ievērojamu cisteīna zudumu - no 9,41 mol % vilnas līdz aptuveni 0,5 mol % ekstrahētajā keratīna paraugā pēc 90 minūtēm ilgas mikroviļņu apstrādes. Ir vērts pieminēt, ka precīza elektromagnētiskā starojuma loma un tā mijiedarbība ar vilnas matricu joprojām lielā mērā nav zināma<sup>29</sup>.

#### **1.6. Temperatūras ietekme uz ekstrakcijas iznākumu**

Pētījumi parādīja, ka šķīdināšanas temperatūra būtiski ietekmē keratīna fizikāli ķīmiskās īpašības<sup>6</sup>. Šķīdināšanas temperatūrai paaugstinoties no 120 līdz 180 °C, keratīna materiāla daudzums samazinājās no 57 % līdz 18 % attiecībā uz jēlvilnas masu. Tas ir saistīts ar ūdenī šķīstošo brīvo aminoskābju un zemas molekulmasas peptīdu veidošanos. Cisteīna saturs keratīnā krasi samazinājās no vidēji 10 mol% neapstrādātā vilnā līdz 1 mol% reģenerētā keratīna, izšķīdinot vilnu 180 °C temperatūrā, kam seko nogulsnešana ar ūdeni, līdzīgi citiem keratīna materiāliem, kas apstrādāti augstā temperatūrā. Tā kā cisteīns darbojas kā sēra avots, veidojot disulfīda šķērssaites keratīnā, bez šīs aminoskābes keratīna ķēdes ir kustīgas un efektīvi plastificējamas ar glicerīnu. SEM attēlos bija redzams, ka reģenerēto keratīnu lokšņu šķērsriezuma virsmas saturēja blīvu šķiedru tīklu, kas bija kompaktāks, ja tika izmantota augsta šķīdināšanas temperatūra (180 °C). Keratīna materiālam, kas reģenerēts augstā temperatūrā, ir zema mehāniskā izturība, un tas veido izstieptas saliedētas kārtiņas, ko pierāda stressa un slodzes raksturojums<sup>30</sup>.

## 1.7. Denaturējošo līdzekļu ietekme

Karbamīdu kā olbaltumvielu denaturantu parasti izmanto keratīna šķīdības palielināšanai ūdenī. Karbamīds lielā koncentrācijā (8 M) izraisa keratīna struktūras uzbriešanu, vājinot hidrofobo mijiedarbību polipeptīdu ķēdē un atvieglo reducētāja iedarbību uz polipeptīda ķēdi<sup>46</sup>.

Lielākajā daļā pētījumu, kuros tika izmantots sārma tiols, autori mēģināja samazināt tiola autooksidāciju, veicot ekstrakciju bez skābekļa atmosfērā, piemēram, slāpekļi. Slāpekļa iekļaušana procesā padara procedūru sarežģītu, un, vēl svarīgāk, dažādu partiju ekstrakti rada pretrunīgas kompozīcijas iespējamās automātiskās oksidēšanās dēļ, ko izraisa piemaisījumi paraugos. Nesabojātu olbaltumvielu un augsta iznākuma iegūšana ir bijis daudzu pētījumu galvenais mērķis, pētot keratīna ekstrakciju no vilnas. Tomēr daudzos ziņotajos pētījumos, kas tika veikti augstā pH vai augstā temperatūrā, olbaltumvielas tika stipri noārdītas un procesa laikā izveidojās lantionīns. Daudzos no šiem publicētajiem pētījumiem trūka informācijas par iegūtā keratīna fizikālajām un bioķīmiskajām īpašībām. Iespējams ekstrahētā un reducētā keratīna fizikāli ķīmiskās īpašības netika novērtētas darbietilpīgo sagatavošanās metožu un samazinātā keratīna proteīna nestabilitātes dēļ<sup>29</sup>.

Informācija par virsmaktīvās vielas saistīšanos ar keratīnu ir svarīga potenciālajam keratīna pielietojumam, tomēr šī mijiedarbība var būt diezgan sarežģīta atkarībā no keratīna avota veida, piem. matiem, vilnai, nagiem, nagiem to strukturālās, terciārās un sekundārās struktūras, kā arī disulfīdu saišu šķērssaišu pakāpes atšķirību dēļ<sup>36</sup>.

Keratīna ekstrahēšanai izmantojot metodi, kur kā galvenie šķīdinātāji ir karbamīds, tiourīnviela un 2-ME, tika iegūts augsts iznākums līdz 67%<sup>29</sup>. Neskatoties uz lielo iznākumu un spēju ekstrahēt keratīnu no dažāda veida keratīna materiāliem, iegūto olbaltumvielu šķīdumā var turēt tikai reducētā veidā, kas prasa, lai maisījumā paliktu visi reducētāji. Keratīns nogulsnejas, noņemot MEC, tāpēc dialīzes izmantošana urīnvielas, tiokarbamīda un MEC atdalīšanai var ietekmēt keratīna šķīdību. Turklāt šķīduma stabilitāte ir ļoti atkarīga no MEC / urīnvielas attiecības koncentrācijas, un nelielas izmaiņas šajā attiecībā var izraisīt olbaltumvielu nogulsnešanos. Produkti, kurus var pagatavot ar keratīnu, kas ekstrahēts ar šo metodi, ir ļoti ierobežoti, un tādu materiālu kā keratīna hidrogēls ražošana var būt problemātiska<sup>29, 47</sup>.

Kopsavilkums par visām aplūkotajām metodēm atrodams 1.1. tabulā.

## Keratīna ekstrakcijas metožu apkopojums

Metode	Keratīna ekstrakcijas iznākums, %	Metodes priekšrocības	Metode trūkumi
Reducēšana	75	Augsts iznākums.	Videi kaitīgi un toksiski reaģenti, augstas izmaksas, nepatīkama smaka.
Sārnu hidrolīze.	25	Videi nekaitīgi reaģenti, Nerodas toksiski blakusprodukti, Vienkāršs attīrīšanas process.	Liels reaģentu patēriņš, Iespējama smakas rašanās.
Sārnu hidrolīze (maisījums)	55	Augsts iznākums.	Gala produkts ir proteīna un vara komplekss, kas būtiski ierobežo produkta izmantošanas iespējas, liels reaģentu patēriņš.
Oksidēšana	5	Paraugu ir iespējams sadalīt $\alpha$ un $\beta$ kertatozēs pamatojoties uz dažādo šķīdību dažādās pH vidēs	Niecīgs iznākums Ilgs šķīdināšanas process, iegūtais materiāls ir ķīmiski modificēts un ar izmainītām īpašībām
Jonu šķidr.	51	Iegūtajam keratīnam ir augstāka termiskā stabilitāte, vienkārša attīrīšana, videi draudzīga metode.	Augsts enerģijas patēriņš, nepieciešama dārga un specializēta tehnika
Superkritiska tvaika metode	70	Videi draudzīga metode	Nepieciešama dārga un specializēta tehnika, zems cisteīna saturs gala produktā.
Mikroviļņu metode	60	Ātra metode ar augstu iznākumu.	Nepieciešama dārga un specializēta tehnika, zems cisteīna saturs gala produktā.

Ņemot vērā visus augstāk minētos metožu trūkumus un priekšrocības, nolēmām darba ietvaros uzsākt sārnu hidrolīzes metodes optimizāciju, šādu iemslu dēļ:

- 1) Iespēja ievērojami palielināt keratīna iznākumu, mainot apstrādes parametrus;
- 2) Nav nepieciešamas augstas izmaksas, jo izmantotie reaģenti ir salīdzinoši lēti un nav nepieciešama dārga un specializēta tehnika;
- 3) Iegūtajam keratīnam netiek būtiski mainīta struktūra, kas neierobežo tā izmantošanas iespējas.

### **Vilnas šķiedru attīrīšana**

Literatūrā ir atrodamas vairākas metodes vilnas attīrīšanai – mazgāšana siltā ūdenī ar virsmaktīvo līdzekli vai izmantojot organiskos šķīdinātājus. Vilnas mazgāšana siltā ūdenī (40 – 70 °C) ar mazgāšanas līdzekli paredz vairākkārtēju skalošanu siltā ūdenī. Tā ir salīdzinoši ātra un lēta metode, kas aizņem dažas stundas laika. Pētījumos tiek iedāvātas arī vairākas metodes, izmantojot organiskos šķīdinātājus, tādus kā, acetonu, petroleju, etilspirtu, kā arī to maisījumus. Vilnas attīrīšanas metodes, kuru pamatā ir organisko šķīdinātāju izmantošana ir efektīvas, tomēr dažas ir visai laikietilpīgas, kā arī organiskie šķīdinātāji ir dabai un cilvēka veselībai kaitīgi. Kā piemērotākā metode vilnas attīrīšanai tika izvēlēta mazgāšana siltā ūdenī ar mazgāšanas līdzekli (ziepēm), kas ir lēta, efektīva, pietiekoši ātra un vienkārša metode. Šī mazgāšanas metode ir arī nekaitīga dabai un cilvēkam, kas nav mazsvarīgi, jo, ja ir jāveic vilnas mazgāšana rūpnieciskos daudzumos, tad metodei ir jāatbilst visiem iepriekš minētajiem faktoriem<sup>48</sup>.

## 2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

### 2.1. Reāģenti

- Dejonizēts ūdens, elektrovadītspēja 0,055  $\mu\text{S}/\text{cm}$
- Slāpekļis 99,99 % (AGA)
- Hēlijs, 99,999 %, (AGA)
- Argons 99,999 %, (AGA)
- Acetilēns 99,99 % (AGA)
- Pb standartšķīdums,  $\gamma=1$  mg/mL, ražotājs: (Sigma Aldrich)
- Universālas saimniecības ziepes ražotājs: (Ringuva)
- $\text{NaHCO}_3$  95 %, : (Enola)
- Nātrija algināts, ražotājs: (Sigma Aldrich)
- $\text{CaCl}_2$ : ražotājs: (Sigma Aldrich)
- $\text{Na}_2\text{S}$  99 % : (Enola)
- Izopropanols – 99,9 % ražotājs: (Sigma Aldrich)
- $\text{H}_2\text{SO}_4$  95-98 %, : (Enola)
- HCl 35-38 %, : (Enola)
- NaOH 98,8 %, : (Enola)

### 2.2. Trauki un aparatūra

- 1000 mL vārglāzes
- 2000 mL vārglāzes
- 250 mL vārglāzes
- 100 mL apaļkolbas
- 500 mL koniskā kolba
- Petri trauki
- Pincetes
- Stikla nūjiņas
- Analītiskie svāri *METTLER TOLEDO ME 204*, precizitāte  $\pm 0,0001$  g,  $m_{\text{max}}= 220$  g;
- Mikropipete FinnpiPETTE (100-1000  $\mu\text{L}$ ;  $\pm 1$   $\mu\text{L}$ );
- Mikropipete RaininPipet–Lite (20 – 200  $\mu\text{L}$ ;  $\pm \leq 0,25\mu\text{L}$ );
- Mikropipete FinnpiPETTE Digital (1-10  $\mu\text{L}$ ;  $\pm 0,01$   $\mu\text{L}$ );
- Žāvējāmais skapis Memmert (temperatūras solis: 0,5  $^{\circ}\text{C}$ ,  $t_{\text{max}} = 220$   $^{\circ}\text{C}$ );

- Elektriskā plītiņa ražotājs: *Wiki*
- Termometrs;  $\pm 0,5$  °C
- Magnētiskais maisītājs
- Orbitālais kratītājs, ražotājs: Biosan
- Ūdens attīrīšanas sistēma Adrona C100;
- 50 mL plastmasas stobriņi (Sarstedt)
- 15 mL plastmasas stobriņi (Sarstedt)
- Centrifūga 5702 (Eppendorf)
- Mikropipete 100 -1000  $\mu$ L
- Skenējošai elektronu mikroskops Hitachi S4800;
- Spektrofotometrs Jenway
- Līmlenta
- SEM parauga analīzes galdiņš
- Liofilizators Beta 2-8 LSCplus (Christ)

### 2.3. Paraugu sagatavošana

Pirms paraugu mazgāšanas visus vilnas paraugus rūpīgi izplucināja, cenšoties tos pēc iespējas labāk atbrīvot no cietajām daļiņām. Paraugus vairākkārt mazgāja 0,12 % ( $\text{NaHCO}_3$ ) un 0,3 % dabiskas izcelsmes ziepju (nesatur sintētiskām krāsvielas un smaržvielas) ūdens šķīdumā, 40-60 °C temperatūrā. Pēc sildīšanas ūdenī paraugus mērcēja izopropanolā līdz 30 min, lai pēc iespējas efektīvāk atbrīvotos no taukvielām, kas atrodas uz šķiedrām, un rūpīgi skaloja ar dejonizētu ūdeni. Paraugus atstāja žāvēties gaisā istabas temperatūrā 24 h.

### 2.4. Keratīna ekstrakcija no aitu vilnas

2,5 g vilnas šķiedru iegremdēja 2 – 4 % NaOH ūdens šķīdumā un maisīja ar magnētisko maisītāju 40 un 60 °C temperatūrā 1 līdz 5 stundas atkarībā no metodes. Pēc vilnas šķiedru pilnīgas izšķīdināšanas lēnām pievienoja HCl, lai neutralizētu vilnas keratīna šķīdumu. Piemaisījums un nogulsnes no šķīduma tika noņemti, 10 minūtes centrifugējot ar ātrumu 4 000 apgriezieniem minūtē. Keratīna šķīdumu 3 dienas dializēja pret dejonizētu ūdeni, lai noņemtu nātrija hlorīda pārpalikumu. Tad dializēto keratīna šķīdumu liofilizēja, lai iegūtu pulverveida keratīnu.

Precīzi keratīna ekstrakcijas metožu parametri aplūkojami 2.1. tabulā. Tabulā apkopoti dati par vilnas iesvara masu (m, g), izmantotā ūdens daudzumu (V,  $\text{H}_2\text{O}$ ), temperatūru (T, °C), NaOH masas koncentrāciju ( $w\%(\text{NaOH})$ ), nepieciešamo laiku (t), kas vajadzīgs, lai panāktu

pilnīgu vilnas izšķīšanu un nepieciešamais skābes daudzums (V, HCl), lai neitralizētu gala šķīdumu.

2.1.tabula

Keratīna ekstrakcijas metožu parametri

Nr.	m, g	V, H <sub>2</sub> O	T, °C	w%(NaOH)	t	V, HCl
1.1	2.58					
1.2	2.42			2	5 h	26 ml
1.3	2.51					
2.1	2.52					
2.2	2.49	500 ml	40	3	4 h	33 ml
2.3	2.50					
3.1	2.37					
3.2	2.38			4	3 h	43 ml
3.3	2.46					
4.1	2.59					
4.2	2.49			2	2.5 h	23 ml
4.3	2.44					
5.1	2.36					
5.2	2.54	500 ml	60	3	100 min	31 ml
5.3	2.57					
6.1	2.46					
6.2	2.41			4	60 min	43 ml
6.3	2.36					

Liofilizēšanu veica keratīna šķīdumus ielejot traukos vai paplātē tā, lai šķīduma "biezums" nepārsniegtu 1 cm. Sasaldē saldētavā, ieliek liofilizatorā un liofilizē 48 stundas.

Veicot keratīna ekstrakciju no aitu vilnas tika aprēķināts izdalītā keratīna masas daļa pret vilnas masu. Aprēķins tika veikts pēc 1. vienādojuma

$$W\% = \frac{m_k}{m_v} * 100\% \quad (1)$$

, kur  $m_k$  - masa keratīnam,

$m_v$  – masa vilnai.

#### Dialīzes membrānu sagatavošana

Glicerīna, kas iekļauts kā mitrinātājs, atdalīšanu panāca, membrānas mazgājot tekošā ūdenī 3-4 stundas. Sēra savienojumu atdalīšanu panāca, membrānas apstrādājot ar 0,3 % nātrija sulfīda šķīdumu 80 °C temperatūrā 1 minūti. Tad mazgāja ar karstu ūdeni (60 °C) 2 minūtes, to paskābinot ar 0,2 % sērskābes šķīdumu, pēc tam noskalo ar karstu ūdeni, lai noņemtu skābi.

## **2.5. Keratīna daudzuma noteikšana paraugos izmantojot Bredforda metodi**

Keratīna satura noteikšana tika izmantota, lai noteiktu liofilizēto paraugu tīrību un lai noteiktu keratīna izskalošanos keratīna – algināta kompozīta, kā arī lai noteiktu keratīna zudumu rašanos pēc katra ekstrakcijas posma.

***Bredforda reaģenta pagatavošana:*** 50 mg Coomassie Brilliant zilā G-250 izšķīdināja 50 ml metanola un pievienoja 100 ml 85 % fosforskābes ( $H_3PO_4$ ). Skābes šķīduma maisījumu lēnām pievienoja 850 ml  $H_2O$  un ļāva krāsai izšķīst pilnībā. Uzglabā tumšā pudelē 4 °C temperatūrā.

***Analīzes procedūra:*** Kalibrēšanas grafikam sagatavoja piecus šķīdumus ar proteīna daudzumu diapazonā no 0 līdz 20  $\mu g/ml$ . Paraugu analīzei precīzi nosvēra aptuveni 50 mg keratīna atšķaidīja 50 ml stobriņā, lai koncentrācija būtu 1 mg/ml. Tad 40  $\mu l$  parauga pārnesa uz 15 ml stobriņu un pievienoja 160  $\mu l$  dejonizēta ūdens. Katrā mēģenē pievienoja 3,0 ml Bredforda reaģenta un kārtīgi samaisīja un inkubēja istabas temperatūrā 5 minūtes. Mērīja absorbciju pie 595 nm. Keratīna masas koncentrāciju paraugos aprēķināja pēc kalibrēšanas grafika taisnes vienādojuma.

### **2.5.1. Liofilizētā keratīna tīrības noteikšana**

Liofilizētā keratīna tīrību noteica nosakot keratīna masas koncentrāciju paraugos ar Bredforda metodi. Lai noteiktu keratīna masas koncentrāciju paraugos tika sagatavoti keratīna šķīdumu ūdenī no katra parauga ar koncentrāciju 1 mg/ml. Katram paraugam tika veikti četri paralēlie mērījumi, lai samazinātu rezultātu izkliedi.

### **2.5.2. Keratīna zudumu noteikšana katrā ekstrakcijas posmā**

Keratīna zudumu noteikšana tika veikta pēc katra keratīna ekstrakcijas posma nosakot keratīna saturu šķīdumā. Tika aprēķināta keratīna masas daļa pret vilnas iesvara masu. Kā arī tika ņemts vērā tas, ka maksimālais ekstrahējamais keratīna daudzums var būt 90 % no vilnas masas, jo tas ir aptuvenais keratīna daudzums vilnas šķiedrās.

## **2.6. Keratīna struktūras analīze, izmantojot SEM**

Liofilizēto keratīna paraugu SEM attēlus uzņēma ar SEM Hitachi S4800, darba spriegums 1,0 strāva kV, 7 – 10 A un attālums līdz detektoram: 2 mm. Keratīna paraugus piestiprināja ar elektrovadošanu oglekļa līmlentu pie paraugu analīzes galdiņa un veica mērījumus.

## **2.7. Keratīna/ algināta kompozīta izveide un raksturošana**

Lai noteiktu keratīna ietekmi uz kompozīta sorbcijas kapacitāti tika izveidotas lodītes ar trim dažādām keratīna koncentrācijām. Lodītes izveidoja nātrija algināta pulverim pievienojot ūdeni, lai panāktu viendabīgu viskozu šķīdumu, to sildot maisīja aptuveni 30 min līdz pilnīgai algināta izšķīšanai. Tad šķīdumam pievienoja attiecīgu liofilizēta keratīna masu, lai tā masa šķīdumā sastādītu 2, 3 un 4 % no kopējās masas un maisīja līdz viss keratīns ir viendabīgi iemaisīts šķīdumā.

### **2.7.1. Keratīna izskalošanās no keratīna – algināta lodītēm**

Tā kā tika novērots, ka sorbcijas procesa laikā keratīns pāriet no kompozīta lodītēm ūdens šķīdumā, tika veikta materiāla stabilitātes analīze. To veica iemērcot noteiktu masu ar keratīna – algināta lodītēm ūdenī un maisot. Paraugus analīzei ņēma ik pēc 1 h, paņemot 100 µl ūdens šķīduma, kurā iegremdētas lodītes. Tā kā lodītēm, kas pagatavotas no dažādas koncentrācijas algināta šķīduma, mainās to fizikālās īpašības, šo eksperimentu veica ar no 1, 2 un 3 % nātrija algināta šķīdumiem pagatavotām lodītēm. Katras koncentrācijas lodītēm tika veikti trīs paralēlie mērījumi. Tas tika veikts, lai izvērtētu algināta koncentrācijas ietekmi uz keratīna izskalošanos no kompozīta.

### **2.7.2. Svina sorbcijas noteikšana keratīna – algināta lodītēs**

Svina sorbcijas spēju noteikšanu keratīna /algināta lodītēs veica pagatavojot svina šķīdumu no svina nitrāta ar koncentrāciju 0,2 g/L. Precīzi nosvērtus kompozīta paraugus ar aptuveno masu 1 g ievietoja 100 ml apaļkolbās. Katrā kolbā ielēja 100 mL svina šķīduma un maisīja 12 h, tad paņēma 1 ml alikvotu un pārnesa 50 ml stobriņā, kuru pēc tam uzpildīja ar dejonizētu ūdeni līdz atzīmei. Svina daudzumu šķīdumā noteica ar liesmas atomabsorbcimetru. 12 stundu sorbcijas laiks tika noteikts pirms tam veicot svina sorbcijas kinētikas pētījumus, kur svina sorbcija tika veikta 26 h, reizi stundā ņemot alikvotu svina koncentrācijas noteikšanai paraugos.

### 3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

#### 3.1. Šķīdināšanas temperatūras un NaOH koncentrācijas ietekme uz keratīna ekstrahcijas iznākumu

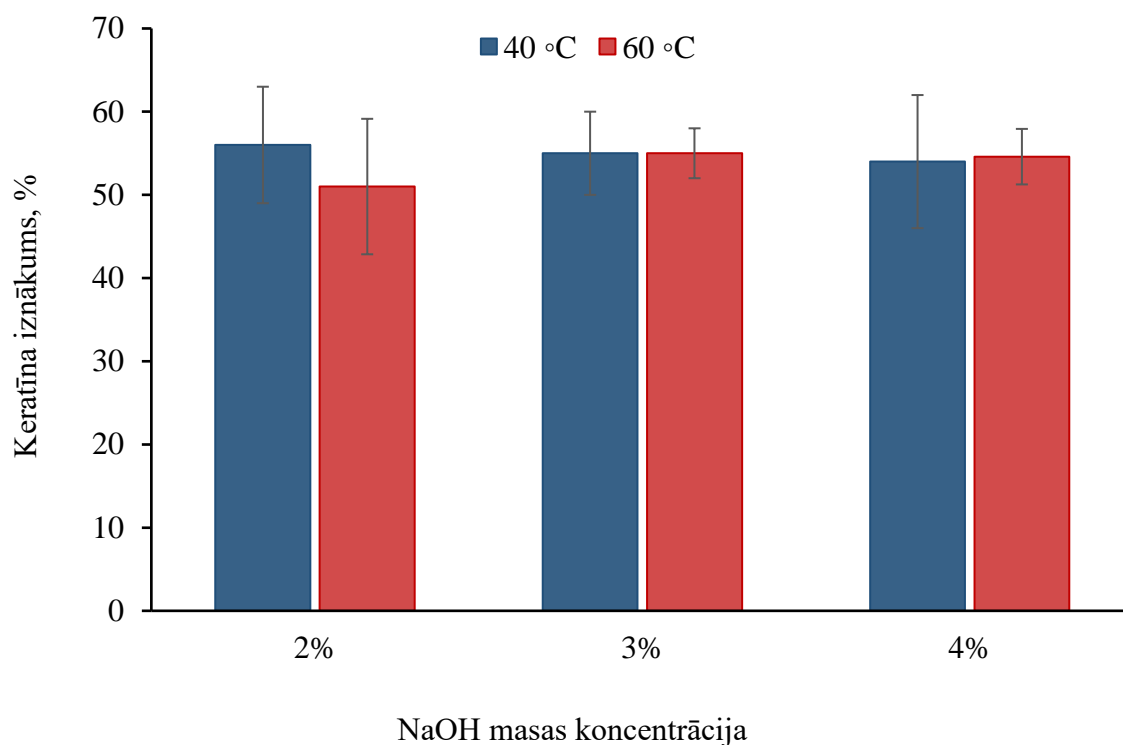
Veicot keratīna ekstrahcijas metodes optimizāciju no aitu vilnas, tika mainīti divi no galvenajiem parametriem – šķīdināšanas temperatūra un NaOH koncentrācija. Iegūtā keratīna iznākuma rezultāti atkarībā no metodes parametriem un tā tūrība ir apkopoti 3.1. tabulā.

3.1. tabula

Keratīna ekstrahcijas metodes optimizācijas rezultāti

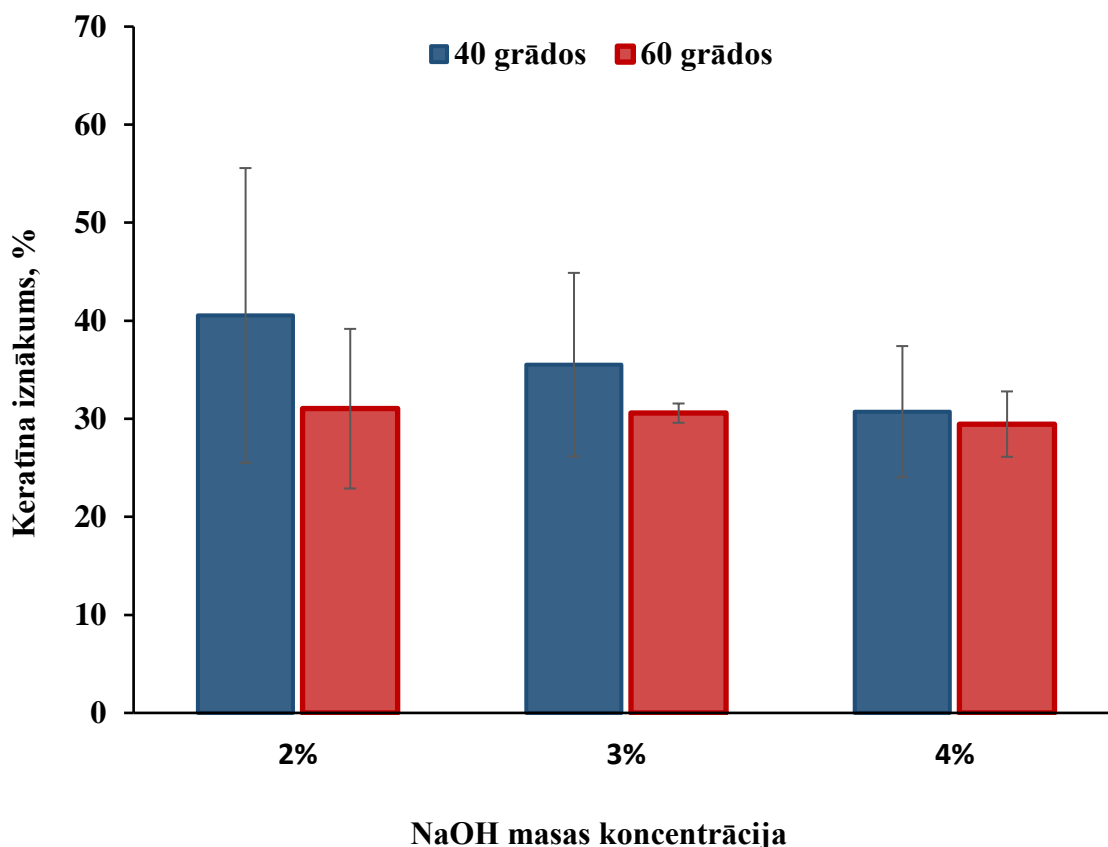
Metode	Liofilizētā keratīna masas daļa W vid %	Liofilizētā keratīna tūrība,%
40 °C, 2% NaOH	56 ± 7	72 ± 7
40 °C, 3% NaOH	55 ± 5	65 ± 4
40 °C, 4% NaOH	54 ± 8	57 ± 2
60 °C, 2% NaOH	51 ± 3	61 ± 10
60 °C, 3% NaOH	55 ± 8	50 ± 10
60 °C, 4% NaOH	55 ± 7	54 ± 9

Analizējot datus, kas iegūti no vielu svēršanas, visu metožu iznākumi ir vidēji 55%, kas kļūdu robežās sakrīt un nekādas tendences nebija novērojamas. Keratīna ekstrahcijas iznākums atkarībā no NaOH šķīduma koncentrācijas un temperatūras parādīts 3.1. attēlā.



**3.1.attēls. Keratīna ekstrakcijas iznākums noteikts no liofilizētā keratīna masas.**

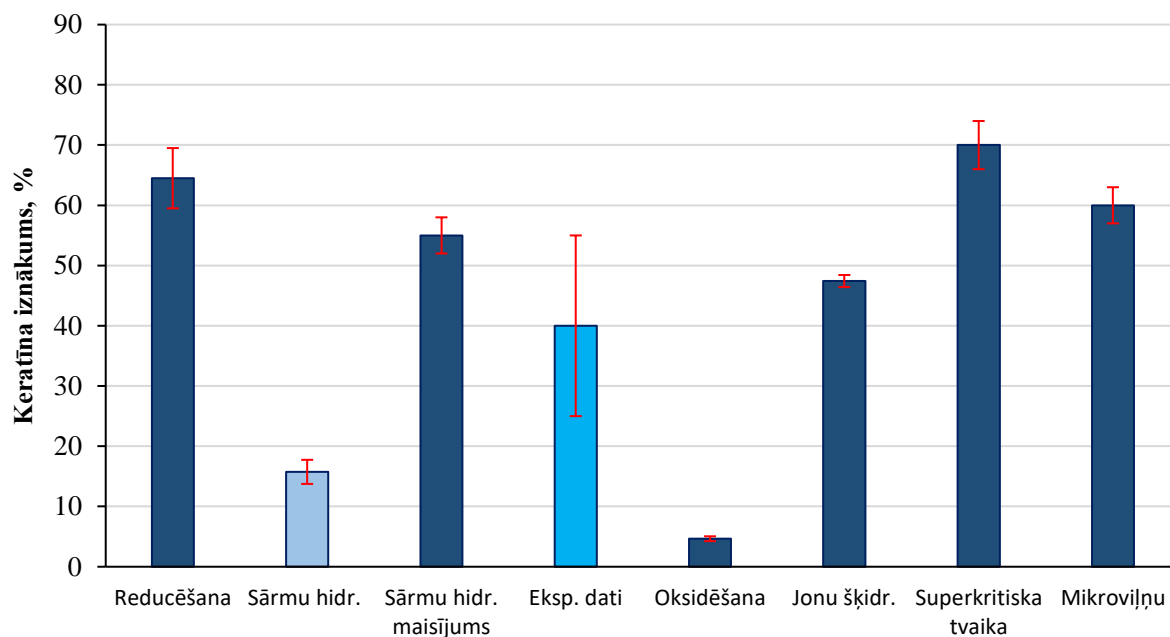
Analizējot liofilizēto keratīna paraugu tīrību, tika konstatēts, ka, palielinoties NaOH koncentrācijai šķīdumā, būtiski samazinās ekstrahētā keratīna tīrība. Palielinot NaOH koncentrāciju no 2% līdz 4%, liofilizētā keratīna tīrība samazinājās vidēji par 14%. Ņemot vērā paraugu tīrību, iegūtie rezultāti vēl joprojām kļūdas robežās sakrīt, tomēr ir skaidri redzamas tendences, kas liecina par temperatūras un reaģenta koncentrācijas negatīvu ietekmi uz keratīna iznākumu. Palielinoties temperatūrai par 20 °C keratīna iznākums samazinājās par 10 % no kopējās vilnas masas, kas sakrīt ar literatūras datiem<sup>30</sup>. Keratīna iznākuma dati, ņemot vērā paraugu tīrību, aplūkojami 3.2. attēlā.



**3.2. attēls. Keratīna iznākums atkarībā no ekstrakcijas metodes, ņemot vērā paraugu tīrību.**

Iegūtajiem rezultātiem ir novērojama liela izkliede, kas sasniedz 20 %. Ņemot vērā to, ka darbs tika veikts ar dabas materiāliem, šādas lielas svārstības rezultātos bija gaidāmas un ir pieņemamas, lai novērotu tendences un sakarības dažādu parametru ietekmē uz keratīna ekstrakcijas iznākumu. Lai samazinātu rezultātu izkliedi, ir nepieciešams vēl veikt papildu mērījumus, palielinot rezultātu statistiku. Tas ļautu arī precīzāk un ar lielāku pārliecību novērtēt temperatūras un reaģenta koncentrācijas ietekmi uz ekstrahētā keratīna iznākumu.

Salīdzinot eksperimentāli iegūtos keratīna ekstrakcijas iznākuma datus  $40 \pm 15\%$  ar optimizējamās metodes – sārnu hidrolīzes metodes sākotnējo iznākumu, kas sastādīja  $16 \pm 2\%$ <sup>36</sup>, ir novērojams būtisks keratīna iznākuma pieaugums, kas sastādīja 24 % no vilnas masas. Citiem autoriem<sup>43</sup>, kas arī ir optimizējuši šo metodi ir izdevies sasniegt pat 55 % iznākumu, kas liecina par metodes iznākuma uzlabošanas iespējām. Eksperimentāli iegūtā rezultāta (ar spilgi zilu) salīdzinājums ar citām literatūrā atrodamajām metodēm (ar tumši zilo) un optimizēto metodi (ar gaiši zilu) ir aplūkojams 3.4. attēlā.

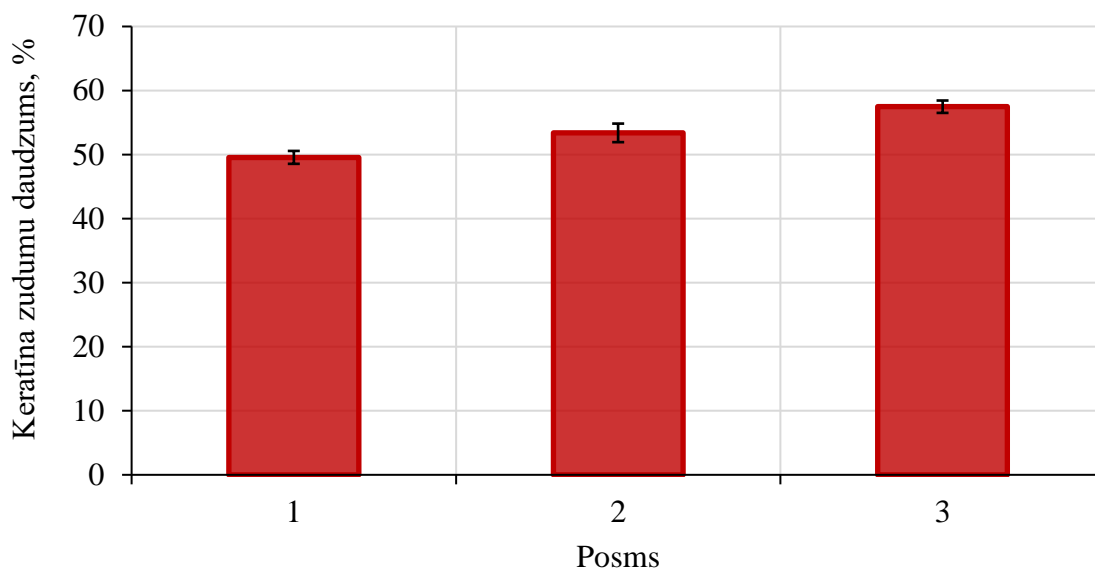


### 3.3.attēls. Keratīna ekstrakcijas metožu iznākuma salīdzinājums.

Iegūtais ekstrakcijas iznākums vēl aizvien ir salīdzinoši mazāks nekā citām literatūrā atrodamajām metodēm, tomēr jāuzsver, ka atšķirībā no pārējām metodēm, optimizētajā metodē netika izmantoti cilvēkam un videi kaitīgi reaģenti. Kā arī metode ir viegli integrējam ražošanā un neprasa specifisku un dārgu aprīkojumu.

### 3.2. Keratīna zudumi atkarībā no izdalīšanas metodes posma

Veicot kopējo keratīna zudumu analīzi pēc katra ekstrakcijas posma, ir redzams, ka katrā posmā zudumu daudzums palielinās aptuveni par 4% no kopējās šķīdinātās vilnas masas. Tas norāda uz to, ka, samazinot posmu skaitu, ir iespējams palielināt keratīna iznākumu. Tomēr vislielākā uzmanība jāpievērš būtu pašam pirmajam posmam – šķīdināšanai, kuras laikā rodas vislielākie zudumi, kas sastāda aptuveni 50 – 60% no kopējā teorētiskā, ja pieņem, ka keratīna daudzums vilnā sastāda 90%. Dati aplūkojami 3.3. attēlā.



**3.4. attēls. Keratīna zudumu daudzums atkarībā no izdalīšanas posma 1 posms – vilnas šķīdināšana, 2.posms – centrifugēšana, 3.posms - dialīze.**

Papildus visam iepriekš minētajam ir jāveic vēl papildus ekstrakcijas laika ietekmes izvērtējums uz keratīna ekstrakcijas iznākumu, jo vilnas šķīdināšana tika veikta līdz vizuālai vilnas šķiedru izšķīšanai. Jāveic vilnas šķīdināšana palielinot un samazinot šķīdināšanas laiku, tas varētu parādīt vai šis 50 – 60 % zudums (atkarībā no metodes parametriem) rodas neizšķīstot vilnas šķiedrām pilnībā vai keratīnam pārlietu hidrolizējoties.







Būtiskus uzlabojumus metodei varētu sniegt katalizatoru izmantošana vilnas šķīdināšanas procesa laikā, kas ļautu samazināt reaģentu daudzumu, temperatūru un šķīdināšanas laiku. Reaģentu daudzuma un temperatūras samazinājums savukārt sniegtu pozitīvu ietekmi uz keratīna ekstrakcijas iznākumu, ko varēja novērot pēc darbā iegūtajiem rezultātiem.

Papildus uzlabojumi nepieciešami arī attīrīšanas svārstījās no  $\approx 50$  līdz 70 %, kas sakrīt ar literatūras datiem sārnu hidrolīzes metodei. Tomēr šāda parauga tīrība ir nepietiekama un ir ievērojami mazāka, salīdzinājumā ar pārējām keratīna ekstrakcijas metodēm.

**3.2.1. Liofilizētā keratīna struktūra**

Visiem no aitu vilnas iegūtajiem keratīna paraugiem bija raksturīga pienbalta nokrāsa. Liofilizētais keratīns sastāvēja no pārsļveida struktūrām. Liofilizēta keratīna, kas iegūts no aitu vilnas, attēli redzami 3.2. tabulā. Kā redzams attēlos, keratīnam, kas iegūts šķīdinot vilnu augstākā temperatūra ( $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), ir raksturīgākas mazāka izmēra pārsļveida struktūras, ko vēlāk apstiprināja arī SEM attēli (3.3.tabula).

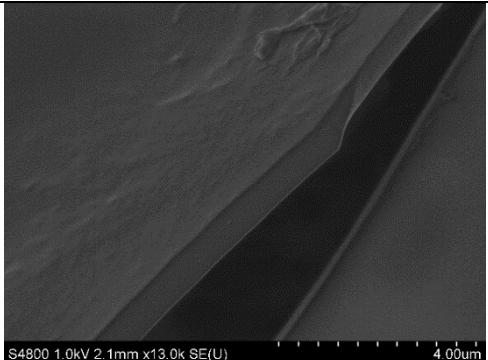
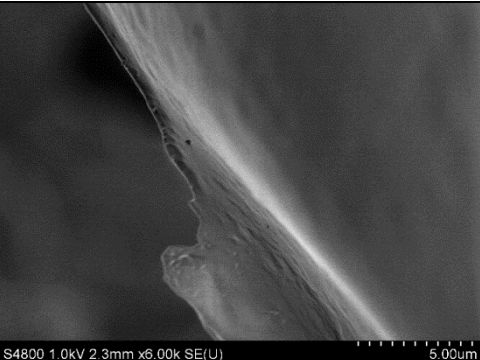
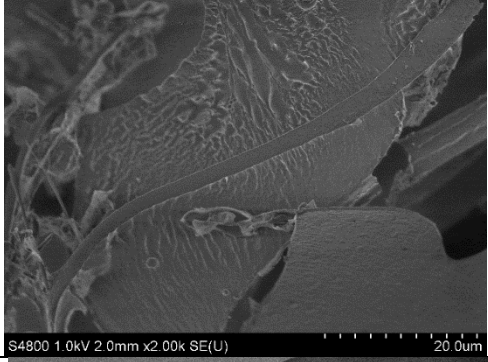
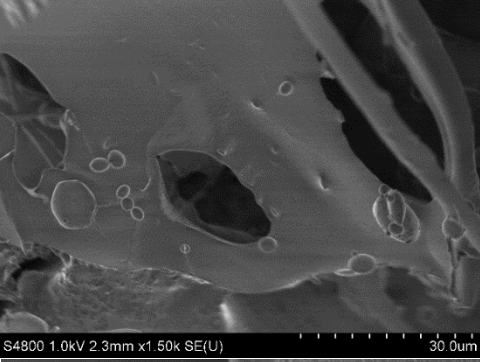
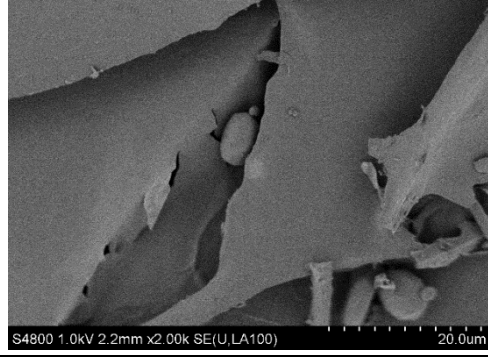
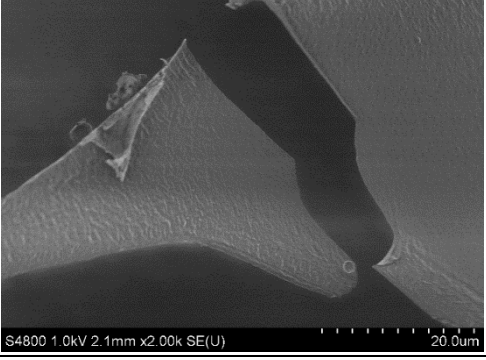
## No vilnas šķiedrām izdalīta liofilizēta keratīna attēli

Temperatūra NaOH konc.	40 °C	60 °C
2 %		
3 %		
4 %		

SEM analīze parādīja mikrostruktūru atšķirības starp liofilizētiem keratīna ekstrakta pulveriem, kas iegūti no vilnas, izmantojot dažādas metodes. Keratīna ekstrakti uzrāda plāksnēm līdzīgu struktūru, kas labi redzama visu metožu keratīna ekstraktos. Attēlos labi novērojams liels daudzums piemaisījumu, kas arī apstiprina liofilizēto keratīna paraugu zemo tīrību. Aplūkojot SEM attēlus ir redzams, ka temperatūras un reaģenta koncentrācijas palielinājums negatīvi ietekmē arī keratīna struktūru. Tā kļūst raupjāka un nevienmērīgāka, kā arī ievērojami palielinās plaisu un caurumu daudzums.

3.3.tabula

No vilnas šķiedrām izdalīta liofilizēta keratīna SEM attēli

Temperatūra NaOH konc.	40 °C	60 °C
2 %		
3 %		
4 %		

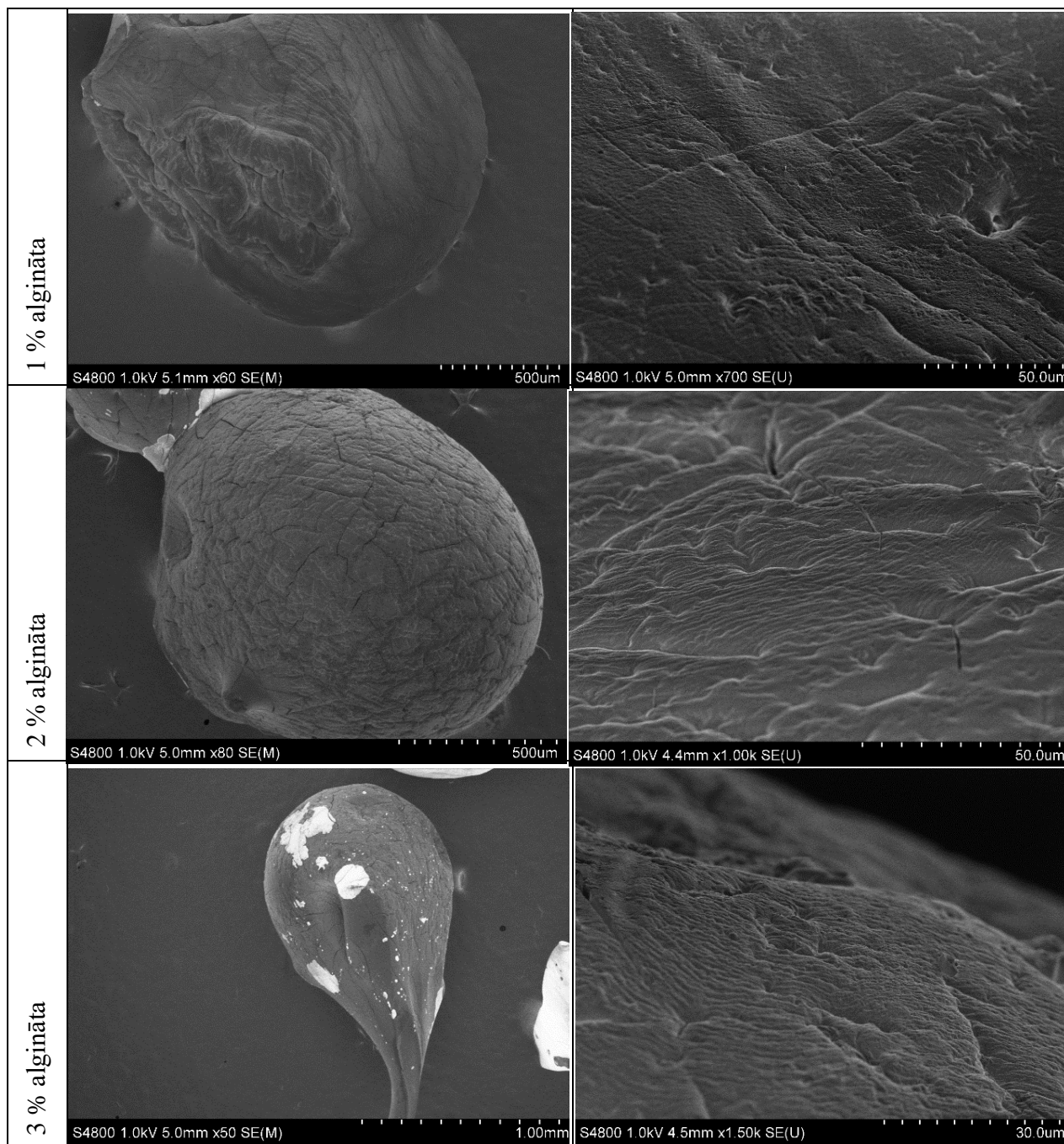
### **3.3. Keratīna – algināta kompozīta raksturošana**

Lai izveidotu viegli formējamu un ūdenī nešķīstošu keratīna – algināta kompozītu, tika izveidotas lodītes no dažādas koncentrācijas algināta šķīdumiem ar 20 %, 30 % un 40 % keratīna saturu sausās lodītēs.

#### **3.3.1. Keratīna – Algināta kompozīta SEM analīze**

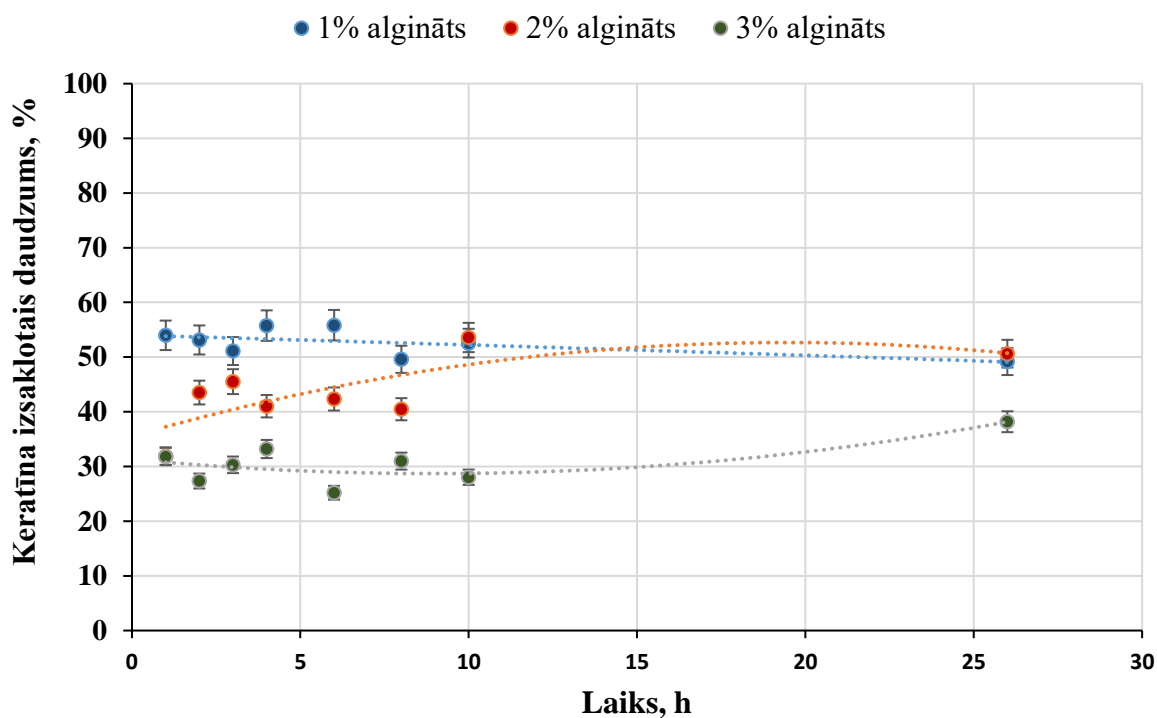
SEM analīze parādīja, ka keratīna – algināta lodītēm, kas gatavotas no dažādas koncentrācijas algināta šķīdumiem, ir raksturīgas atšķirības to formā. Kā redzams attēlos, lodītēm, kas gatavotas no 1% algināta šķīduma, raksturīga saplākšana un formas maiņa pēc žāvēšanas. Lodītes, kas gatavotas no augstākas koncentrācijas šķīduma, labāk saglabā savu formu pēc žāvēšanas. Lodītēm, kas gatavotas no 2% algināta šķīduma, ir izteiktāk raksturīga lodveida forma, bet lodītēm no 3% algināta šķīduma, ir raksturīga pilienveida forma. Lodītēm, kas veidotas no 2% un 3% nātrija algināta šķīduma, ir novērojams lielāks plaisu daudzums uz lodīšu virsmas un virsmas raupjums. Virsmas defekti un plaisas, izmantojot materiālu piesārņojošo vielu sorbcijai, var pozitīvi ietekmēt kompozīta sorbcijas kapacitāti, jo tas palielina virsmas laukumu. Izveidoto lodīšu SEM attēli redzami 3.4. tabulā.

## Keratīna/algināta lodīšu SEM attēli



Veicot keratīna/algināta lodīšu stabilitātes pārbaudi, tika novērots, ka 30-60 % keratīna, atkarībā no algināta koncentrācijas, jau stundas laikā izskalojas ūdenī. Tālāko 26 stundu laikā būtisks keratīna zudumu pieaugums nav novērojams, tomēr ir nepieciešami vēl papildus mērījumi mainot šķīduma temperatūru un pH, jo šie parametri arī var ietekmēt kompozīta struktūru un stabilitāti.

### 3.3.2. Keratīna – algināta kompozīta stabilitāte

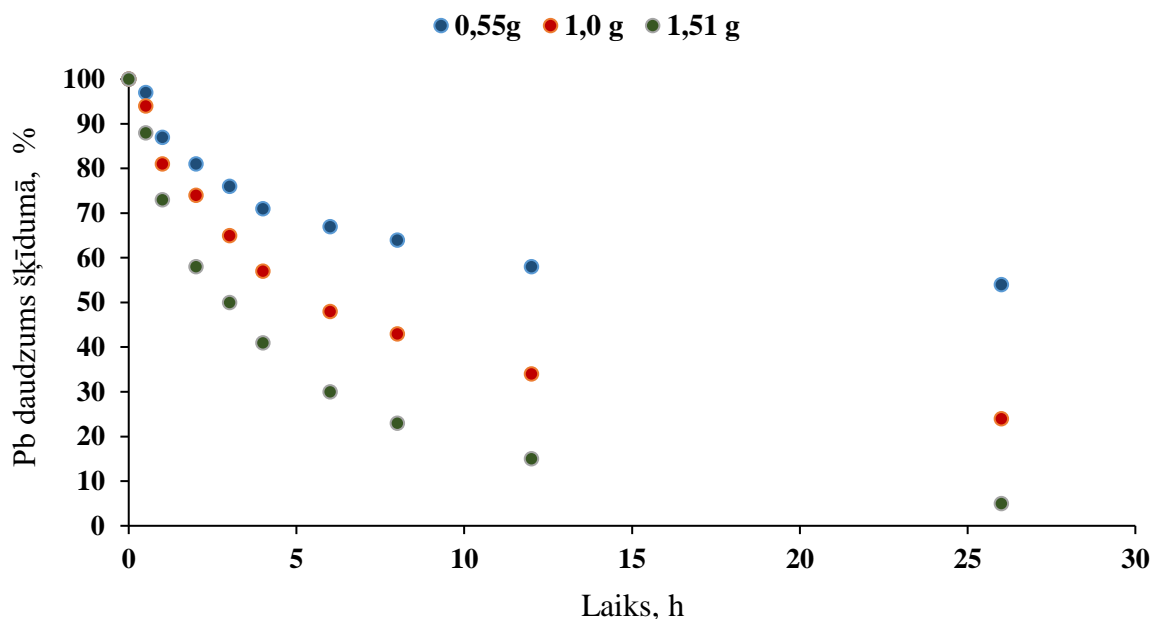


### 3.5. attēls. Keratīna izskalotais daudzums no keratīna/algināta lodītēm atkarībā no laika.

Sakarā ar to, ka lodītes, kas veidotas no 3% nātrija algināta šķīduma, uzrādīja labāko stabilitāti, kur radās tikai 30 – 40 % keratīna zudumu, tālākie sorbcijas eksperimenti tika veikti no lodītēm, kas veidotas tieši no šīs koncentrācijas šķīduma, ņemot vērā šos zudumus.

### 3.3.3. Svina jonu sorbcija keratīna – algināta kompozītā

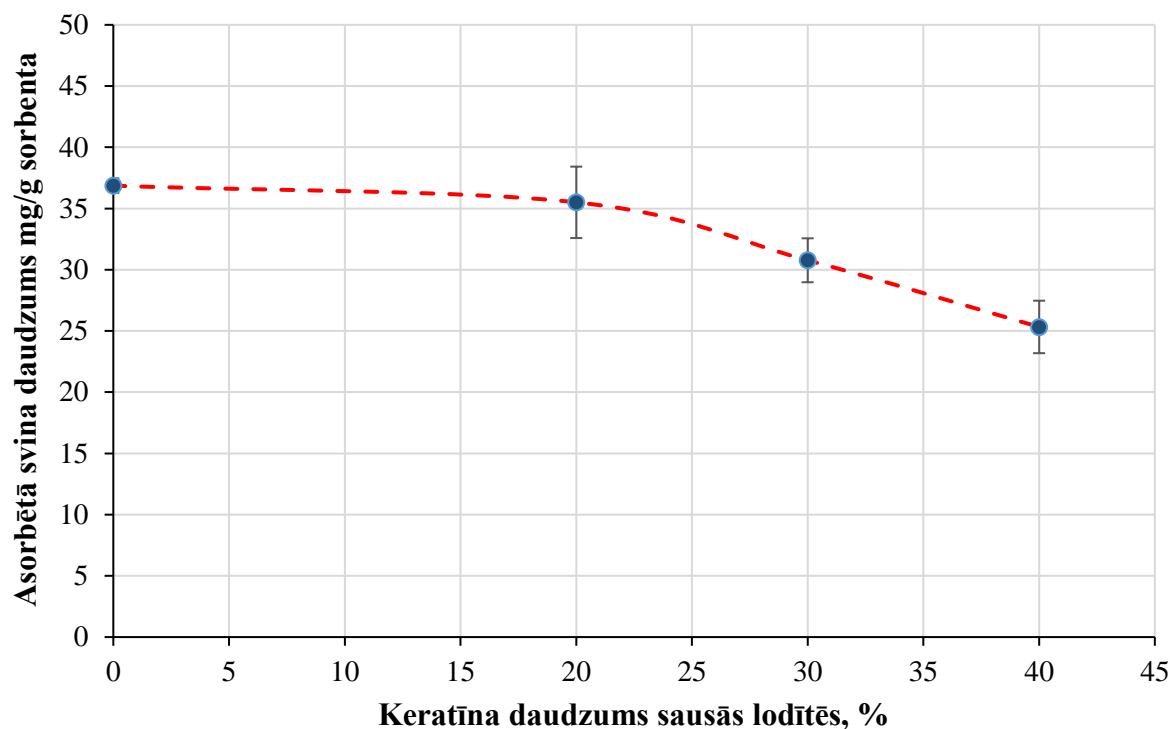
Analizējot keratīna/ algināta kompozīta svina jonu sorbcijas datus, tika konstatēts, ka vislielākais svina jonu daudzums tiek adsorbēts pirmajās 12 h. Šķīdumā esošo svina jonu daudzums procentos atkarībā no sorbcijas laika parādīts 3.6. attēlā.



**3.6. attēls. Šķīdumā esošo svina jonu daudzums procentos atkarībā no sorbcijas laika un sorbcijai izmantoto keratīna-algināta lodīšu iesvara masas**

Nemot vērā to, ka lielākais svina jonu daudzums tiek sorbēts pirmajās 12 h un tālākajā laikā tā samazinājums ir minimāls, tālākos sorbcijas eksperimentus veica tieši 12 h. Tā kā tālākajos eksperimentos netika noteikta maksimālā kompozīta sorbcijas kapacitāte, bet gan keratīna koncentrācijas ietekme un sorbcijas spējām, šis sorbcijas laiks bija optimāls. Precīzākiem materiāla sorbcijas kapacitātes mērījumiem vispirms ir būtiski risināt materiāla stabilitātes problēmas, novēršot keratīna izskalošanos no kompozīta lodītēm. To varētu izdarīt, izmantojot 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimīda hidrohlorīdu (EDC) kā šķērssaistīšanās aģentu, kas veidotu amīda saites starp karboksilgrupām un amīnu grupām, kas atrodamas keratīnā<sup>49</sup>.

Veicot svina jonu sorbcijas eksperimentus ar algināta un keratīna – algināta kompozīta lodītēm tika novērots, ka, palielinoties keratīna daudzumam, svina jonu sorbcijas kapacitāte samazinās. Tas ir pretēji tam, kas tika novērots citu autoru publikācijā<sup>24</sup>, kur tika sorbēts metilēnzilā krāsvielas no ūdens šķīduma. Tīra algināta un keratīna – algināta kompozīta ar 20 % keratīna sastāvu uzrādīja ļoti līdzīgu sorbcijas kapacitāti, kas kļūdas robežās sakrita. Būtiskāks sorbcijas kapacitātes samazinājums ir novērojams lodītēm ar 30 un 40 % keratīna saturu. Keratīna – algināta lodīšu svina sorbcijas spēju atkarība no keratīna masas koncentrācijas lodītēs ir aplūkojama 3.7. attēlā.



**3.7. attēls. Keratīna – algināta lodīšu svina sorbcijas spēju atkarība no keratīna masas koncentrācijas lodītēs.**

Lai labāk izvērtētu kompozīta potenciālo izmantošanu sorbenta izstrādē, ir jāveic arī citu smago metālu, farmpreparātu un citu piesārņotāju sorbcijas testi. Papildus nepieciešami eksperimenti, mainot paša materiāla struktūru un formu, kā arī jāizskata tā iespējamā izmantošana gaisa attīrīšanā. Papildus tam ir jāveic eksperimenti ar mazāka keratīna satura lodītēm un lodītēm, kas veidotas 2% nātrija algināta šķīdumā. Tas palīdzētu novērtēt vai šo samazinājumu sorbcijas kapacitātē tiešām rada keratīna satura pieaugums, vai tas ka izveidotās lodītes ir pārāk blīvas un tiek traucēta svina jonu difūzija lodīšu iekšpusē.

## SECINĀJUMI

1. Veicot keratīna ekstrakcijas metodes optimizāciju no aitu vilnas, tika sasniegts iznākuma palielinājums no  $16 \pm 2 \%$  līdz  $40 \pm 15 \%$
2. Ar optimizēto metodi iegūtajam keratīnam piemīt zema tīrība, kas svārstījās no  $\approx 50$  līdz  $70 \%$ , un tas liecina par to ka būtiski jāuzlabo keratīna attīršanas process .
3. Izveidotajam keratīna – algināta kompozītam ir zema stabilitāte, kuras rezultātā 30 līdz 40 % keratīna satura izskalojās no kompozīta.
4. Keratīna masas palielināšana keratīna – algināta kompozītā negatīvi ietekmē svina absorbcijas spēju, līdz ar to keratīna kompozīts nav pielietojams ūdens attīrīšanai no svina šādā formātā.

## IZMANTOTĀ LITERATŪRA

- (1) Abdel-Shafy, H. I.; Mansour, M. S. M. Treatment of pharmaceutical industrial wastewater via anaerobic /aerobic system for unrestricted reuse. *J. Sci. Ind. Res. (India)*. **2017**, *76*, 119–127.
- (2) Li, X.; Li, G. A Review: Pharmaceutical Wastewater Treatment Technology and Research in China. *Proc. 2015 Asia-Pacific Energy Equip. Eng. Res. Conf.* **2015**, *9*, 345–348. DOI: 10.2991/ap3er-15.2015.81.
- (3) Maumbe, B. M.; Swinton, S. M. Hidden health costs of pesticide use in Zimbabwe's smallholder cotton growers. *Soc. Sci. Med.* **2003**, *57*, 1559–1571. DOI: 10.1016/S0277-9536(03)00016-9.
- (4) Filters Market Size, Share \_ Industry Report, 2021-2028.pdf.
- (5) Aluigi, A.; Vineis, C.; Tonin, C.; Tonetti, C.; Varesano, A.; Mazzuchetti, G. Wool keratin-based nanofibres for active filtration of air and water. *J. Biobased Mater. Bioenergy* **2009**, *3*, 311–319. DOI: 10.1166/jbmb.2009.1039.
- (6) Rouse, J. G.; Van Dyke, M. E. A review of keratin-based biomaterials for biomedical applications. *Materials*. 2010, pp 999–1014. DOI: 10.3390/ma3020999.
- (7) Fraser, R. D. B.; MacRae, T. P.; Parry, D. A. D.; Suzuki, E. The structure of feather keratin. *Polymer*. 1971, pp 35–56. DOI: 10.1016/0032-3861(71)90011-5.
- (8) kakkar2014.pdf.
- (9) Wang, B.; Yang, W.; McKittrick, J.; Meyers, M. A. Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. *Prog. Mater. Sci.* **2016**, *76*, 229–318. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2015.06.001.
- (10) Lindely, H. The chemical composition and structure of wool. *Chem. Nat. Protein Fibres* **1977**, 147–191.
- (11) Bradbury, J. H. The Morphology and Chemical Structure of Wool. *Pure Appl. Chem.* **2007**, *46*, 247–253. DOI: 10.1351/pac197646020247.
- (12) It, W.; Acid, A. The Chemical & Physical Structure of Merino Wool. **2015**, 1–5.
- (13) Wolkoff, P.; Nielsen, P. A. A new approach for indoor climate labeling of building materials - Emission testing, modeling, and comfort evaluation. *Atmos. Environ.* **1996**, *30*, 2679–2689. DOI: 10.1016/1352-2310(95)00323-1.
- (14) Mansour, E.; Curling, S.; Stéphan, A.; Ormondroyd, G. Absorption of volatile organic compounds by different wool types. *Green Mater.* **2016**, *4*, 1–7. DOI: 10.1680/jgrma.15.00031.
- (15) Ghosh, A.; Collie, S. R. Keratinous materials as novel absorbent systems for toxic pollutants. *Def. Sci. J.* **2014**, *64*, 209–221. DOI: 10.14429/dsj.64.7319.
- (16) Taddei, P.; Monti, P.; Freddi, G.; Arai, T.; Tsukada, M. Binding of Co(II) and Cu(II) cations to chemically modified wool fibres: An IR investigation. *Journal of Molecular Structure*. 2003, pp 105–113. DOI: 10.1016/S0022-2860(03)00147-9.

- (17) Radi, R. Protein tyrosine nitration: Biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 550–559. DOI: 10.1021/ar300234c.
- (18) Hanzlíková, Z.; Braniša, J.; Jomová, K.; Fülöp, M.; Hybler, P.; Porubská, M. Electron beam irradiated sheep wool – Prospective sorbent for heavy metals in wastewater. *Sep. Purif. Technol.* **2018**, *193*, 345–350. DOI: 10.1016/j.seppur.2017.10.045.
- (19) Xia, Z.; Yao, C.; Zhou, J.; Ye, W.; Xu, W. Comparative study of cotton, ramie and wool fiber bundles' thermal and dynamic mechanical thermal properties. *Text. Res. J.* **2015**, *86*, 856–867. DOI: 10.1177/0040517515596937.
- (20) Luzi, F.; Puglia, D.; Torre, L. Natural fiber biodegradable composites and nanocomposites: A biomedical application. *Biomass, Biopolymer-Based Materials, and Bioenergy: Construction, Biomedical, and other Industrial Applications*. 2019, pp 179–201. DOI: 10.1016/B978-0-08-102426-3.00010-2.
- (21) Zhang, Z.; Ortiz, O.; Goyal, R.; Kohn, J. chapter 13 : Biodegradable Polymers. *Handbook of Polymer Applications in Medicine and Medical Devices*. 2014, pp 303–336.
- (22) Kaczmarek, B.; Nadolna, K.; Owczarek, A. Chapter 6 - The physical and chemical properties of hydrogels based on natural polymers; Chen, Y. B. T.-H. B. on N. P., Ed.; Elsevier, 2020; pp 151–172. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816421-1.00006-9>.
- (23) Yen, K. C.; Chen, C. Y.; Huang, J. Y.; Kuo, W. T.; Lin, F. H. Fabrication of keratin/fibroin membranes by electrospinning for vascular tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*. 2015, pp 237–244. DOI: 10.1039/c5tb01921d.
- (24) Fadillah, G.; Putri, N.; Febrianastuti, S.; Munawaroh, H.; Purnawan, C.; Wahyuningsih, S.  *$\alpha$ -keratin/Alginate Biosorbent for Removal of Methylene Blue on Aqueous Solution in a Batch System*; 2018; Vol. 333. DOI: 10.1088/1757-899X/333/1/012052.
- (25) Cell\_laden\_alginate-keratin\_based\_composite\_microc.pdf.
- (26) Zhu, J. Stress Risk Assessment Form. *Expert Rev. Med. Devices*. 2011, pp 607–626.
- (27) kaczmarek2020.pdf.
- (28) Reichl, S. Films based on human hair keratin as substrates for cell culture and tissue engineering. *Biomaterials*. 2009, pp 6854–6866. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.08.051.
- (29) Shavandi, A.; Silva, T. H.; Bekhit, A. E. A. Biomaterials Science application. 2017, pp 1699–1735.
- (30) Ghosh, A.; Clerens, S.; Deb-Choudhury, S.; Dyer, J. M. Thermal effects of ionic liquid dissolution on the structures and properties of regenerated wool keratin. *Polym. Degrad. Stab.* **2014**, *108*, 108–115. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2014.06.007.
- (31) Shavandi, A.; Carne, A.; Bekhit, A. A.; Bekhit, A. E. A. CONVERSION OF WASTE WOOL TO PROTEIN USING A SIMPLE OXIDATION METHOD IR spectra. 2015, pp 1–6.
- (32) Edwards, A.; Jarvis, D.; Hopkins, T.; Pixley, S.; Bhattarai, N. Poly( $\epsilon$ -caprolactone)/keratin-

- based composite nanofibers for biomedical applications. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **2015**, *103*, 21–30. DOI: 10.1002/jbm.b.33172.
- (33) Buchanan, J. H. A cystine-rich protein fraction from oxidized  $\alpha$ -keratin. *Biochem. J.* **1977**, *167*, 489–491. DOI: 10.1042/bj1670489.
- (34) Earland, C.; Knight, C. S. Studies on the structure of keratin: I. The analysis of fractions isolated from wool oxidized with peracetic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **1955**, *17*, 457–461. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(55\)90406-6](https://doi.org/10.1016/0006-3002(55)90406-6).
- (35) Raven, D. J.; Earland, C.; Little, M. Occurrence of dityrosine in Tussah silk fibroin and keratin. *BBA - Protein Structure*. 1971, pp 96–99. DOI: 10.1016/0005-2795(71)90065-1.
- (36) Brown, E. M.; Pandya, K.; Taylor, M. M.; Liu, C.-K. Comparison of Methods for Extraction of Keratin from Waste Wool. *Agricultural Sciences*. 2016, pp 670–679. DOI: 10.4236/as.2016.710063.
- (37) chemical-and-physical-behavior-of-human-hair-2002.pdf.
- (38) Yamauchi, K.; Yamauchi, A.; Kusunoki, T.; Kohda, A.; Konishi, Y. Preparation of stable aqueous solution of keratins, and physiochemical and biodegradational properties of films. *J. Biomed. Mater. Res.* **1996**, *31*, 439–444. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4636(199608)31:4<439::AID-JBM1>3.0.CO;2-M.
- (39) SIGMA-ALDRICH. beta-Mercaptoethanol Safety Data Sheet. **2013**, 1–8.
- (40) Blackburn, S.; Lee, G. R. The reaction of wool keratin with alkali. *Biochim. Biophys. Acta* **1956**, *19*, 505–512. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(56\)90474-7](https://doi.org/10.1016/0006-3002(56)90474-7).
- (41) Thor, C. J. B.; Gortner, R. A. SULFUR IN PROTEINS: V. THE EFFECT OF ALKALIES UPON CYSTINE, WITH SPECIAL REFERENCE TO THE ACTION OF SODIUM HYDROXIDE. *J. Biol. Chem.* **1933**, *99*, 383–403. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)76032-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)76032-8).
- (42) Tsuda, Y.; Nomura, Y. Properties of alkaline-hydrolyzed waterfowl feather keratin. *Anim. Sci. J.* **2014**, *85*, 180–185. DOI: 10.1111/asj.12093.
- (43) Fagbemi, O. D.; Sithole, B.; Tesfaye, T. Optimization of keratin protein extraction from waste chicken feathers using hybrid pre-treatment techniques. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2020. DOI: 10.1016/j.scp.2020.100267.
- (44) Xie, H.; Li, S.; Zhang, S. Ionic liquids as novel solvents for the dissolution and blending of wool keratin fibers. *Green Chem.* **2005**, *7*, 606–608. DOI: 10.1039/B502547H.
- (45) Idris, A.; Ranganathan, V.; Rana, U.; Patti, A.; MacFarlane, D. Dissolution and regeneration of wool keratin in ionic liquids. *Green Chem.* **2014**, *16*, 2857–2864. DOI: 10.1039/C4GC00213J.
- (46) Feroz, S.; Muhammad, N.; Ratnayake, J.; Dias, G. Keratin - Based materials for biomedical applications. *Bioact. Mater.* **2020**, *5*, 496–509. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.04.007>.
- (47) Nakamura, A. N.; Rimoto, M. A.; Akeuchi, K. T.; Ujii, T. F. The protein content in a

- keratinized structure. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2002, pp 569–572.
- (48) Carran, R. S.; Ghosh, A.; Dyer, J. M. Modification of surface properties of wool fabric with linde type a nano-zeolite. *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, *132*, 1–7. DOI: 10.1002/app.42392.
- (49) Hartrianti, P.; Nguyen, L. T. H.; Johanes, J.; Chou, S. M.; Zhu, P.; Tan, N. S.; Tang, M. B. Y.; Ng, K. W. Fabrication and characterization of a novel crosslinked human keratin-alginate sponge. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2017**, *11*, 2590–2602. DOI: 10.1002/term.2159.