

# ПОЛУЧАВАНЕ И АНАЛИЗ НА КЕРАТИНОВИ ХИДРОЛИЗАТИ ОТ КОСЪМНАТА ПОКРИВКА НА КОЗИ КОЖИ

**Дарина ЖЕЛЕВА, Маргарита КОЛЕВА, Силвия СТОЕВА**

Химикотехнологичен и Металургичен Университет, бул. Кл. Охридски 8, 1756 София  
e-mail: darinajeleva@abv.bg

## EXTRACTION AND ANALYSES OF KERATIN HYDROLIZATES OBTAINED FROM GOAT SKIN

**Darina ZHELEVA, Margarita KOLEVA, Silvia STOEVA**

University of Chemical Technology and Metallurgy, Kl. Ohridski Blvd. 8, 1756 Sofia, Bulgaria  
e-mail: darinajeleva@abv.bg

### ABSTRACT

*The present research was conducted to extract keratin protein from goat hair. The goat hair is a waste that exists in abundance, but keratin products are difficult to degradation due to the nonreactivity and the resistance of keratin. We have applied a variety of methods for the extraction of keratin protein from this type of animal source. The main processes involved are dissolving the goat hair using different reducing agents. Reducing agents used are: 1) sodium hydroxide; 2) thioglicolic acid and 3) solution of sodium pyrosulfate and urea. A comparison of the three reducing agents was made and it was found that the sodium hydroxide shows the highest efficiency in dissolving the enzyme-treated goat hair. The extracted samples, i.e. keratin obtained, are evaluated by means of biuret test, respectively photometric, and by FTIR analysis. The biuret test helps us determine the concentration of the resulting protein from different methods. The results from FTIR analysis confirmed the presence of carboxyl acids and amino groups and proved the destruction of the disulfide bridges between the protein macromolecules.*

**Keywords:** goat hair, keratin hydrolizates, reducing agents, analyses

### Увод

Роговото вещество в животинските организми е изградено почти изцяло от белтъка кератин. Кератиновите отпадъци съществуват в изобилие, т.е. това са отпадъците от птицеферми, кланици, кожухарската и текстилната промишленост, изчислени на 5 млн. тона годишно в световен мащаб. Вълната, например съдържа до 95% чист кератин, който може да бъде екстрахиран и използван. Но за съжаление малка част от тези отпадъци биват оползотворени, а останалата част представляват опасност за околната среда.

Думата "кератин" се появява за първи път в литературата около 1850 година, за да се опише материала, от който са съставени твърдите тъкани [1,2]. През 1905 г. с патента на John Hoffmeier от САЩ е описан процеса на екстрахирането на кератини от животински рога чрез използването на вар. Екстрахираните кератини са използвани за приготвянето на кератинови гелове, които могат да бъдат подсилени чрез добавяне на формалдехид. През годините 1905-1935 са разработени много методи за извличане на кератини, използващи окислителни и редуционни технологии.

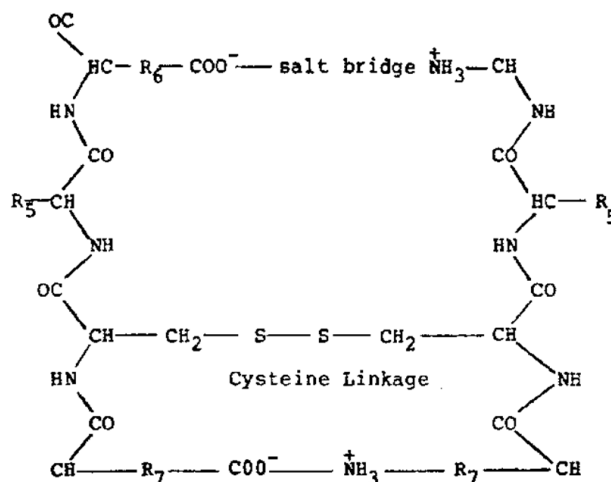
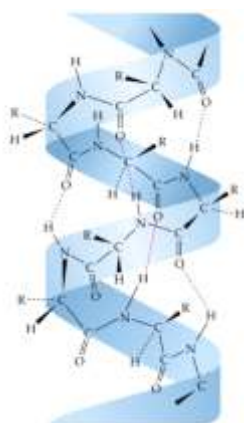
Биологичните свойства на екстрактите са довели до повишен интерес към разработването на кератини за медицински приложения. През 1920 г. се променя фокусът на изследванията за кератина от кератинови продукти към изследвания на структурата и функцията на кератиновите протеини. По време на Втората Световна война [1] е приет един от най-големите проекти за научни изследвания върху структурата и химията на космените влакна. В годините между 1940 и 1970 японски учени правят най-многобройните изследвания в областта на кератините. Това е ренесансовият период на кератиновите изследвания спрямо фундаменталните за материалите и биоматериалите. През 1970 г. са разработени методи за получаване на екстрахираните кератини под формата на: прахове, филми, гелове, покрития, влакна и пени. Всички тези методи се базират на окислителни и редуционни способности. През 1980-те колагена се превръща в често използвана биомолекула в много медицински приложения.

Редица трудности съществуват по пътя на получаването на кератинови хидролизати, дължащи се на нереактивоспособността и устойчивостта на кератина. Много и различни методи са прилагани за получаването му, но много от тези методи изискват силни реагенти или самите процеси протичат при драстични условия. Въпреки това през последния век се наблюдава напредък в екстрахирането, пречистването и охарактеризирането на кератинови протеини и приложението им като биоматериали.

Кератиновите биоматериали притежават много различни предимства в сравнение с

конвенционалните биомолекули, включително и уникални химични свойства, дължащи се на високото съдържание на сяра в структурата им, забележителна биосъвместимост, склонност за самостоятелно конфигуриране и вътрешно клетъчно разпознаване. Тъй като тези свойства стават все по-добре изследвани, контролирани и прилагани, много биомедицински приложения на кератиновите биоматериали са си проправили път в клиничните проучвания и ще търпят нови преработки и изследвания в създаването на нови методи за синтез на композитни биоматериали [3-8].

Хидролизата на пептидните връзки протича сравнително бавно в присъствие на киселини. Действието на основите е по-силно изразено. Под действието на основи най-уязвимото място се явява дисулфидната връзка, което води до образуване на сулфенови киселини и сулфхидрилни производни. В продължилите дълги години изследвания върху хидролизата на кератини, едни от изследванията залагат на продължителна киселинна хидролиза с концентрирана сярна киселина, други методи са провеждани с помощта на редуктори - тиогликолова киселина, натриев цианид, натриев сулфид, трети използват хидроксида - NaOH, KOH, Ca(OH)<sub>2</sub>. Има изследвания също и с използването на ензими за денатуриране на кератина. Всички тези методи са познати от много години, но изпълнението на голяма част е изключително трудно. По време на хидролизата освен, че се разрушават двата типа връзки (дисулфидни и пептидни), получената структура на кератиновите хидролизати е различна в сравнение със структурата на кератиновия протеин [9-21].



Фигура 1 Структура на веригите на  $\beta$ -кератина

## Материали и методи

При нашите изследвания за получаване на кератинови хидролизати, са използвани образци само от косъмната покривка на кози кожи, съответно в нативен вид и ензимно третирани. Ензимно третираната косъмна покривка е получена с използването на протеолитични ензими по време на етапа на обезкосмяване на кози кожи при определени условия.

### *I. Методика за определяне съдържанието на несвързани намаляващи вещества в кожени или космени образци*

Състои се в екстрахиране на свободните намаляващи вещества, намиращи се в пробата с органични разтворители [22]. Извличането на несвързаните намаляващи вещества от кожата се извършва чрез екстракция с органични разтворители в апарата на Сокслет.

### *II. Методика за определяне съдържанието на влага в пробите*

Пробата се суши в сушилня при температура 100-105 °С до получаване на постоянно тегло, което се определя в резултат на няколко последователни притегления [22].

### *III. Методики за хидролиза на образци от косъмната покривка на кози кожи*

#### *1. Хидролиза с натриев метаби сулфат (пиросулфат)*

Кератинът се екстрахира от вълна чрез сулфитолиза с натриев метаби сулфат [17]. Приблизително 5 g от почистените и кондиционирани влакна се нарязват на късчета с размери няколко mm и се обработват със 100 ml разтвор, съдържащ карбамид (8M), натриев пиросулфат ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) (0,5M). Третирането продължава до достигане на  $pH$  6,5 с  $\text{NaOH}$  (5N), посредством разбъркване за 2 h при 65 °С. Водният разтвор на кератина се филтрува с филтър с размер на порите 5  $\mu\text{m}$ . Филтратът се излива и изсушава до получаване на регенериран чист кератин.

#### *2. Хидролиза с тиогликолова киселина*

Образците се хидролизират във воден разтвор на 0,5 M тиогликолова киселина ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2\text{S}$ ) при нагряване 30 °С, в продължение на 6 h на хладник и на водна баня [21].

#### *3. Хидролиза с натриева основа*

Кератинови хидролизати са получени с помощта на натриева основа [14]. Почистените и промитите птичи пера се изпират с разтвор на

ПАВ, изсушават и нарязват. След това се разтварят в 5%-ен разтвор на  $\text{NaOH}$  в продължение на 4 h, при 40 °С. Полученият протеинов разтвор се подлага на диализа и се утаява с концентрирана  $\text{HCl}$  при  $pH$  4,2.

### *IV. Методики за анализ на белтъчни вещества*

Биуретовата реакция е индикатор на пептидната група  $-\text{CO}-\text{NH}-$ . В алкална среда йоните на медта образуват с тази група цветен комплекс.

Качествено и количествено определяне на белтък може да бъде осъществено по биуретовия метод [23].

#### *1. Количествено определяне на белтък с помощта на спектрофотометър*

Към всяка епруветка се долива по 4 ml биуретов реактив и се оставя 30 min при стайна температура. Разтворите се спектрофотометрират в кювети с широчина 10 mm при дължина на вълната  $\lambda=540$  nm (за контролна проба служи дестилирана вода, т.е. 1 ml дест.  $\text{H}_2\text{O}$  и 4 ml биуретов реактив).

Използваният апарат е тип *JENWAY 6300 Spectrophotometer*.

### *V. Методики за определяне на сярсъдържащи аминокиселини*

Типични са за белтъците, съдържащи цистин и цистеин [23].

#### *1. Нитропрусидна реакция*

Изследваният протеинов разтвор в количество 0,5 ml от се смесва с 0,5 ml 10%-ен разтвор на  $\text{NaOH}$  и се нагрява 3 минути. След охлаждане се добавят 2-3 капки натриев нитропрусида. Появява се червено-кафяво оцветяване.

#### *2. Реакция на Фол*

В епруветка се налива 1 ml разтвор на оловен ацетат и към него постепенно се добавя разтвор на  $\text{NaOH}$  до разтваряне на образуваната утайка на оловен хидрооксид. След това се долива 0,5-1,0 ml от изследвания протеинов разтвор и се нагрява до поява на черно оцветяване [23].

### *VI. Методика за използване на инфрачервена спектроскопия*

Инфрачервената спектроскопия е метод на молекулната абсорбционна спектроскопия, при който се измерва поглъщането на инфра-

червено лъчение с определена честота, обусловено от преход между две вибрационни състояния на молекулата [24].

Анализът е извършен с помощта на апарат тип *Bruker Tensor 27 Spectrometer* със скорост на сканиране 10 kHz. Спектърът е записан с помощта на МСТ детектор (64 scans и 1 cm<sup>-1</sup> резолюция).

## Експериментална част

### 1. Методи за хидролиза на кератинови продукти

#### 1. Образци от ензимно третирана козя косъмна покривка

Обезмасляването на образци от ензимно третирана козя косъмна покривка е извършено с 3 образци. Съдържанието на мазнини 3-те образца са съответно: 5.22 g; 4.88 g и 5.88 g, а съдържанието на влага е съответно: 4,44 g; 4,55 g и 4,55 g.

*1.1. Хидролиза на ензимно обработена козя косъмна покривка с натриев пиросулфат и карбамид:*

Първоначално вълната е почистена, измита с ПАВ за отстраняване на онечиствания и след това е проведена екстракция с тетрахлорметан с помощта на Сокслетов апарат за отстраняване на мазнините. Следва промиване с H<sub>2</sub>O и кондициониране при 20 °C, 24 h.

Приблизително 5 g от почистените влакна се нарязват на късчета с размери няколко mm и се подлагат на сулфитолиза. Това означава, че тези влакна се обработват със 100 ml разтвор, съдържащ карбамид (8M), натриев пиросулфат (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (0,5M). Хидролизата протича при 65 °C, при непрекъснато разбъркване за 2 h [17].

Не беше получен хидролизат при първото третиране, затова се наложи повторно провеждане на сулфитолизата. Третирането продължи до достигане на *pH* 6,5 с помощта на 5N NaOH. Полученият кератинов разтвор беше филтруван и изсушен до получаване на регенериран чист кератин. Не се образува ципа (филм), а кристалчета, т.е. кератинът беше получен в прахообразна форма.

#### 2. Образци от нативна козя косъмна покривка

Образци от нативна козя косъмна покривка бяха подложени на обезмасляване и количеството на мазнините за 3-те образци е: 3.76 g; 3.62 g и 4.24 g.

#### 2.1. Хидролиза на нативна козя косъмна покривка с натриев пиросулфат и карбамид:

Образците бяха подложени на хидролиза по същата методика, както и ензимна третираните такива. Методът на сулфитолиза бе проведен при същите условия [17].

След приключване на експерименталната процедура не беше наблюдавано разкъсване на макромолекулните вериги и преминаването им в разтвора. Същият образец беше подложен на повторно третиране с ново количество 100 ml разтвор на карбамид и натриев пиросулфат. Отново не бе наблюдавано преминаване на кератиновите вериги в разтвора.

Проведено беше и трето третиране при същите условия, но без никакъв резултат.

Полученото количество разтвор беше разделено на две части:

- 1) Единият разтвор беше филтруван,
- 2) другият подложен на хидролиза с помощта на тиогликолова киселина.

#### 2.2. Хидролиза на нативна козя косъмна покривка с тиогликолова киселина:

Образците се хидролизират във воден разтвор на 0,5 M тиогликолова киселина (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S). Реакцията на хидролиза е проведена при следните условия: нагряване 30 °C, в продължение на 6 h, на хладник и на водна баня [21]. Наблюдавана е недостатъчна хидролиза при нашите образци.

#### 2.3. Хидролиза на нативна козя косъмна покривка с натриева основа:

Съгласно методика [14] образците от нативна козя косъмна покривка в количество 5 g предварително се обработват в 0,1 N воден разтвор на HCl при стайна температура в продължение на 2 h. Следва хидролиза на образца с реагент 5%-ен разтвор на NaOH в продължение на 4 h, при 40 °C.

Косъмният образец в количество 5 g беше разтворен в 250 ml 5%-ен разтвор на NaOH. След 40 min беше наблюдавано вече накъсване на косъма. След още 70 min беше наблюдавано пълно хидролизиране или преминаване на кератина в разтвора. Реакцията продължи 4 h, при 40 °C.

Получи се черно оцветяване на разтвора, което говори, че вероятно кератиновият хидролизат е деструктирал до аминокиселини. Измереното *pH* е 13, показващ силно основен характер.

Нови образци от косъмна козя покривка (бяла на цвят) бяха подложени на обезмасляване. Тези образци в количество 3,49 g бяха разтворени в 5 %-ен разтвор на NaOH (100 ml). След 15 min разбъркане разтворът промени цвета си в наситено жълто. Реакцията продължи 4 h, при 40 °C, съгласно описаната методика.

Обобщено казано, при нашите изследвания са използвани следните източници на кератин: образци от косъмна покривка от различни кози кожи. Едни от образците са ензимно третирано предварително, а останалите са в нативно състояние.

Приложени са няколко методики за хидролиза на кератин. Една от методиките е посредством сулфитолиза с натриев метабисулфат (пиросулфат) и карбамид. Третирането продължи до достигане на  $pH$  6,5 с помощта на NaOH, посредством разбъркване, в продължение на 2 h при 65 °C. Водният разтвор на кератина се филтрува и изсушава до получаване на регенериран чист кератин. Друг използван метод е със следните реактиви: воден разтвор на тиогликолова киселина при нагряване 30 °C в продължение на 3 часа.

Трети използван метод в нашите изследвания е хидролиза с помощта на 5%-ен разтвор на NaOH в продължение на 4 часа, при 40 °C.

Подбраните експериментални условия се оказаха подходящи за една част от изследваните образци, но при останалите хидролиза не протече. Най-добри резултати бяха получени за ензимно третираните образци от косъмната покривка на козя кожа. Предварителното ензимно третиране с протеолитични ензими е допринесло вероятно за разкъсване на част от връзките: физични, водородни и може би част от дисулфидните връзки.

## II. Методи за качествен анализ на белтъчни вещества

### 1. Биуретов метод

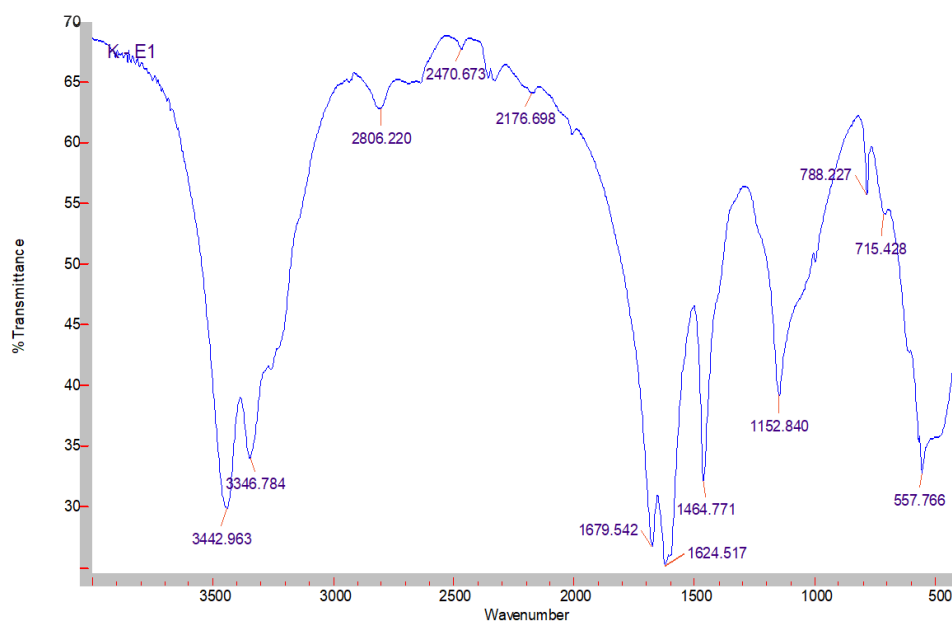
Най-силно и наситено оцветяване беше наблюдавано при образеца от ензимно третираната косъмна покривка от козя кожа (*хидролиза с натриев пиросулфат и карбамид*). Това беше потвърдено и от спектрофотометричното изследване. Наличие на по-слабо разкъсване на полипептидните вериги беше наблюдавано при нативната козя косъмна покривка по метода на хидролиза с NaOH, а най-слабо при метода на хидролиза с тиогликоловата киселина.

## III. Методи за определяне на сяросъдържащи аминокиселини

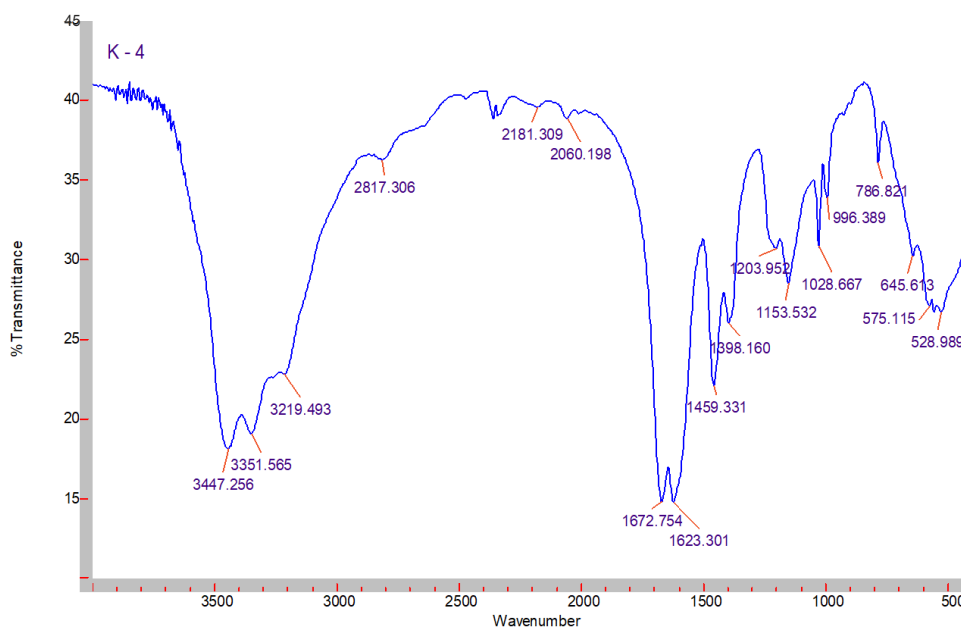
По отношение на кератиновия хидролизат, получен от ензимно третираната козя косъмна покривка, реакцията на Фол и нитропрусидавата реакция показаха, че има разкъсване на *дисулфидните връзки* и наличие на свободни -SH групи, докато резултатите при образците от нативната косъмна покривка показаха точно обратното, т.е. има все още наличие на *дисулфидни връзки*. Този метод още веднъж доказва, че предварителното ензимно третиране е изиграло съществена роля в разкъсването на дисулфидните мостове.

## IV. Метод за изследване с инфрачервена спектроскопия

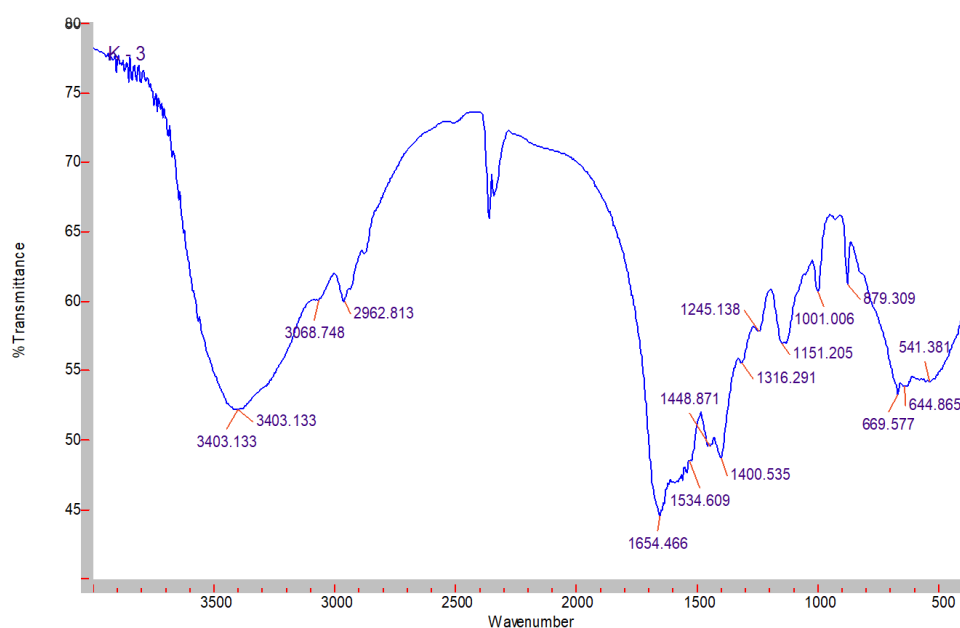
При получените от нас кератинови хидролизати (от косъмната покривка на кози кожи) се наблюдават максимуми, отговарящи за Амид I и Амид III. Амид I се свързва с вторичната структура на полипептидните вериги и се отнася до вибрационното състояние на C=O. При спектрите на част от нашите кератинови хидролизати се наблюдават абсорбционните ивици за Амид III (свързан с вибрационните състояния на C-N и N-H), а при другите хидролизати липсват. Например при хидролизатът от ензимно третираната козя кожа няма наличие на Амид III (*Фигура 1*).



**Фигура 1** ИЧ-спектър на кератинов хидролизат, получен от ензимно обработена косъмна покривка от КОЗИ КОЖИ  
(метод на хидролиза с натриев тиросулфат и карбамид)



**Фигура 2** ИЧ-спектър на кератинов хидролизат, получен от нативна косъмна покривка от КОЗИ КОЖИ  
(метод на хидролиза с тиоколова киселина)



**Фигура 3** ИЧ-спектър на кератинов хидролизат, получен от нативна косъмна покривка от кози кожи (метод на хидролиза с натриева основа)

Абсорбционна ивица при  $1000-1025\text{ cm}^{-1}$  показва наличие на цистеинови остатъци или сяросъдържащи аминокиселини, а при  $630-625\text{ cm}^{-1}$  показва присъствието на C-S връзки. При образците от косъмната покривка на кози кожи се наблюдава разкъсване на дисулфидните връзки при ензимно третирания образец (*Фигура 1*), за разлика от хидролизатът на нативния косъм с тиоглиголова киселина (*Фигура 2*), където интензивността на ивицата е значителна. Известно е, че под действие на основи първоначално настъпва хидролиза на дисулфидната връзка. Наблюденията от ИЧ-спектроскопските анализи напълно корелират с качествените и количествените методи, описани по-горе.

### Заклучение

В заключение може се обобщят получените резултати. За решаването на екологичният проблем, свързан с животинските кератиносъдържащи отпадъци, е намирането на оптимален метод за хидролиза на кератиновите суровини. Много от методите изискват голямо количество реагенти, продължително третиране, или пък за по-кратко време хидролизата протича с участието на силни реагенти, което не е екологично обосновано. При нашето изследване са използвани три метода на хидролиза: 1) с

NaOH, 2) тиоглиголова киселина и 3) в разтвор на натриев пиросулфат и карбамид. Използваните суровини са: нативен и ензимно третиран косъм от кози кожи. Разтварящата способност на трите реагента е сравнена и е показано, че NaOH има най-добро хидролизиращо действие върху дисулфидните връзки и съответно върху пептидните връзки. Предварителното ензимно третиране на образеца води до улесняване на хидролизните процеси. Присъствието на кератинов протеин бе потвърдено количествено и качествено посредством биуретова реакция и фотометрично. Инфрачервените спектри също потвърдиха amino- и карбоксилни групи в образците и до каква степен става изчерпване на дисулфидните и пептидните връзки в зависимост от интензивността на адсорбционните ивици при съответни дължини на вълните.

Необходимо е последващо оптимизиране на условията на хидролизния процес. Получаването на един подходящ кератинов хидролизат би довело до разработване на рецептурни състави за получаване на биокомпозитни материали.

### ЛИТЕРАТУРА

- [1] Rouse J., Van Dyke M., Material J. 2010, 3, 999-1014, A Review of Keratin-Based Materials for Biomedical Applications

- [2] Rather B.D., Hoffman A., Shoen F., Lemons J., *Biomaterials science - An Introduction to Materials in Medicine*, 1996, USA ISBN: 0-12-582460-2
- [3] Yamauchi K., Hojo H., Enhanced cell adhesion on RGDS-carrying keratin film, *Mater. Sci. Eng. C-Bio. S.*, 2003, 23, 467-472
- [4] Yamauchi K.; Yamauchi A.; Kusunoki, T., Preparation of stable aqueous solution of keratins and physiochemical and biodegradational properties of films, *J. Biomed., Mater. Res.*, 1996, 31, 439
- [5] Tachibana A., Kaneko S., Rapid fabrication of keratin-hydroxyapatite hybrid sponges toward osteoblast cultivation and differentiation, *Biomaterials J.*, 2005, 26, 297-302
- [6] Verma V., Ray P., Preparation of scaffolds from human hair proteins for tissue-engineering applications, *Biomed. Mater. J.*, 2008, 3
- [7] Sierpinski P., Garrett J., The use of keratin biomaterials derived from human hair for the promotion of rapid regeneration of peripheral nerves, *Biomaterials J.*, 2008, 29, 118-128
- [8] Apel P., Atala A., Peripheral nerve regeneration using a keratin-based scaffold: Long-term functional and histological outcomes in a mouse model, *J. Hand Surg. Am. J.*, 2008, 33, 1541
- [9] Mokrejs P., Krejci O., Svoboda P., Producing Keratin Hydrolysates from Sheep Wool, *Oriental J. of Chemistry*, Vol.27, 4, 2011, 1303-1309
- [10] Krejci O., Mokrejs P., Sukop S., Preparation and Characterization of Keratin Hydrolysates, *Math. Methods and Tech. in Eng. and Env. Sci.*, ISBN: 978-1-61804-046-6, p.308
- [11] Yin X., Li F., Study of effective extraction of chicken feather keratins and their films for controlling drug release, *Biomaterials Sci. J.*, 2013, 1, 528
- [12] Cardamone J., Nunez A., Garcia R., Ramos M., Characterizing Wool Keratin, *Research Letter in Mater. Sci.*, 2009, doi: 10.1155/2009/147175
- [13] Cardamone J., Investigation the microstructure of keratin extracted from wool: Peptide sequence (MALDI-TOF/TOF) and protein conformation (FTIR), *J. Mol. Structure*, 969 (2010), 97-105
- [14] Saravanan S., Sameera D., Moorthi A., Sevamurugan N., Chitosan scaffolds containing chicken keratin nanoparticles for bone tissue engineering, *Inter. J. Biol. Macromol.*, 62 (2013), 481-486
- [15] Hikima T., Nonomura Y., Powderization of Wool Keratin by Alkali Hydrolysis in Higher Alcohol/Water Binary Systems, *Chemistry Letters*, Vol. 37, 3, 2008, 338-339
- [16] Rivalcola V., Martinez A., Removal of Hexavalent Chromium from Water by Polyurethane/ Keratin Hybrid Membranes, *Water Air Soil Pollut. J.*, (2011), 218, 557
- [17] Aluigi A., Tonetti C., Adsorption of cooper (II) ions by keratin / PA6 blend nanofibres, *Eur. Polym. J.*, 47 (2011), 1756-1764
- [18] Zoccola M., Aluigi A., Tonin C., Characterization of keratin biomass from butchery and wool industry wastes, *J. Mol. Structure*, 938 (2009), 35-40
- [19] Xing Z., Yuan J., Chae W., Kang I., Keratin Nanofibres as a Biomaterial, 2010 Inter. Conf. on Nanotechnology and Biosensors IPCBEE, Vol. 2 (2011), p. 120-124
- [20] Yang X. et al, Effect of concentration of wool keratin on the rebuilding of disulfur bond, *Chinese Science Bulletin*, 2007, vol. 52, 20, 2876-2879
- [21] Gupta A., Kamarudin N., Kee C., Yunus R., Extraction of Keratin Protein from Chicken Feather, *J. Chem. Chem. Eng.*, 6 (2012), 732-737
- [22] Пешева М, Контрол на качеството на готовите кожи, София, 1980, с.40
- [23] Йотова Л., Добрев И., Практикум по биохимия част I, Diagnosis Press, 2000
- [24] Андреев Г., Молекулна спектроскопия, Университетско изд. П. Хилендарски, 2010, с.72