

MODYFIKACJA WŁAŚCIWOŚCI BIOMATERIAŁÓW CHITOZANOWYCH PRZEZ DODATKI HYDROLIZATÓW KERATYNY

J. SKOPIŃSKA-WIŚNIEWSKA*, A. SIONKOWSKA, J. KOZŁOWSKA, A. PŁANECKA

UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA, WYDZIAŁ CHEMII,
UL. GAGARINA 7, 87-100 TORUŃ

*MAILTO: JOANNA@CHEM.UNI.TORUN.PL

[*Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 123-125*]

Wstęp

W ostatnich latach biodegradowalne polimery naturalne, takie jak białka i polisacharydy, są coraz szerzej stosowane w medycynie oraz biotechnologii. Nasza uwaga skupiła się na keratynie i chitozanie jako biopolimerach wykazujących zarówno biodegradowalność jak i biokompatybilność. Właściwości te sprawiły, że znalazły one zastosowanie przy wytwarzaniu opatrunków, implantów, bioaktywnych powierzchni, czy trójwymiarowych struktur imitujących macierz międzykomórkową dla inżynierii tkankowej [1-3].

Chitozan jest polisacharydem uzyskiwanym przez deacetylację chityny – podstawowego budulca pancerzyków niektórych bezkręgowców. Dzięki obecności wolnych grup aminowych wykazuje on dobrą rozpuszczalność w roztworach kwasów i reaktywność chemiczną. Charakteryzuje się on także zmianą właściwości w zależności od rodzaju roztworu wodnego otaczającego materiał chitozanowy. Powierzchnia materiałów na bazie chitozanu przejawia dość dużą hydrofilowość, dzięki czemu sprzyja adhezji, różnicowaniu i proliferacji komórek. Pomimo tych atrakcyjnych cech, właściwości materiałów chitozanowych często jednak nie są zadowalające ze względu na ich niską wytrzymałość mechaniczną [3-6].

Keratyny to rodzina białek strukturalnych, stanowiących podstawowy budulec zewnętrznej okrywy ciała ptaków, gadów, czy ssaków, np. piór, paznokci, sierści, włosów, rogów, wełny. Charakterystyczną cechą tego białka jest duża zawartość cysteiny. Utlenione reszty tego aminokwasu mogą tworzyć wewnątrz- i międzycząsteczkowe wiązania disulfidowe, co w efekcie prowadzi do powstania trójwymiarowej, usieciowanej struktury sieci keratynowej. Zdolność ta decyduje o mechanicznych, termicznych i chemicznych właściwościach białka [1,2,7-10]. Niestety zjawisko to powoduje także nierozpuszczalność keratyny. W konsekwencji, ogromna większość uzyskiwanych obecnie materiałów keratynowych zawiera zmodyfikowane reszty cysteiny i zakłóca strukturę przestrzenną. To sprawia, że filmy uzyskane metodą odparowywania rozpuszczalnika są zbyt kruche by można było poddać je manipulacjom.

Celem pracy było zbadanie wpływu dodatku hydrolizatów keratyny na właściwości mechaniczne i stabilność termiczną biomateriałów chitozanowych.

Materiały i metodyka badań

Chitozan (o niskiej masie cząsteczkowej) zakupiono w Sigma-Aldrich.

Hedrolizaty keratyny otrzymano przez oczyszczenie i hydrolizę piór kurzych w roztworze wodnym zawierającym mocznik (8mol/dm^3), dodacylosiarczan sodu (SDS, $0,26\text{mol/dm}^3$), 2-merkaptioetanol ($1,66\text{mol/dm}^3$) w temp. 50°C przez

THE MODIFICATION OF BIOMATERIALS PROPERTIES BY ADDITION OF KERATIN HYDROLYZATES

J. SKOPIŃSKA-WIŚNIEWSKA*, A. SIONKOWSKA, J. KOZŁOWSKA, A. PŁANECKA

NICOLAUS COPERNICUS UNIVERSITY, FACULTY OF CHEMISTRY, 7
GAGARINA STR., 87-100 TORUN, POLAND

*MAILTO: JOANNA@CHEM.UNI.TORUN.PL

[*Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 123-125*]

Introduction

In recent years, naturally derived biodegradable polymers such as proteins and polysaccharides have been widely used to obtain materials for application in biomedical and biotechnological fields. Our attention have been focused on keratin and chitosan due to their biocompatibility and biodegradability. The both biopolymers can be designed for creation of wound dressings, implantable devices, bioactive surfaces for tissue engineering and three-dimensional scaffolds which take the role of extracellular matrix analogs [1-3].

Chitosan is the product of the deacetylation of chitin – the biopolymer, which is the primary component of arthropod exoskeletons. Due to presence of free amine groups chitosan reveals great solubility in acid solutions, chemical reactivity and water attractive properties. The surfaces of chitosan-based materials exhibit hydrophilicity, which favor cell adhesion, differentiation and proliferation but very often their mechanical properties are not satisfactory [3-6].

Keratins are a family of a structural proteins which are a main components of outer covering such as hair, wool, feathers, nails, horns and stratum corneum of mammals, reptiles and birds. The most characteristic feature of this fibrous protein is the high content of cysteine residues. It provides to creation of inter- and intramolecular disulfide bonds and, as a result, the three-dimensionally linked network of keratin. This process decides about mechanical, thermal and chemical properties of keratins [1,2,7-10]. Unfortunately it also causes the insolubility of keratin, so the most of keratin-based materials are obtained with chemically modified cysteine residues. Consequently, the films prepared by casting keratin solutions are to fragile to handle.

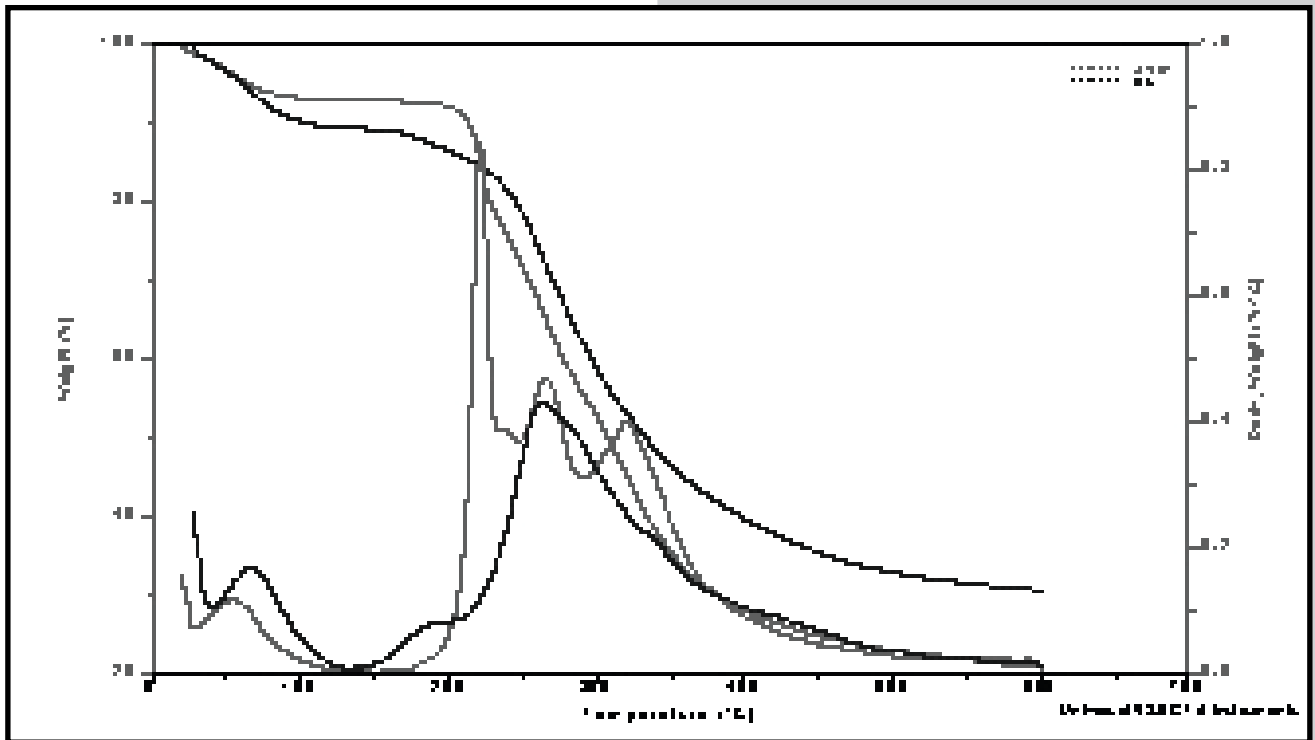
The aim of this work was to study the influence of addition of different amounts of keratin hydrolysates on the mechanical properties and thermal stability of chitosan biomaterials.

Materials and methods

Chitosan (low molecular weight) was obtained from Sigma-Aldrich.

Keratin was obtained from chicken feather. After purification, the material was hydrolyzed in aqueous solution containing urea (8mol/dm^3), sodium dodecyl sulphate (SDS, $0,26\text{mol/dm}^3$), 2-mercaptoethanol ($1,66\text{mol/dm}^3$) at the temperature 50°C for 16 hours. Then the insoluble parts were separated by filtration and the solution was dialyzed against deionised water for 3 days and lyophilized. The solution of keratin hydrolysates was obtained by dissolving of suitable amount of keratin powder in water.

Biopolymeric blends were prepared by mixing of chi-



RYS.1. Krzywa TG i DTG degradacji termicznej keratyny i mieszaniny chitozan/keratyna 30%.
FIG.1. TG and DTG curves of keratin and chitosan/keratin 70/30 blend films.

16 godz. Nierozpuszczalna pozostałość została odfiltrowana. Uzyskany roztwór poddano dializie względem wody dejonizowanej przez 3 dni, a następnie zliofilizowano. Roztwór hydrolizatów keratyny uzyskano przez rozpuszczenie odpowiedniej ilości proszku keratynowego w wodzie.

Mieszanki biopolimerowe otrzymano przez zmieszanie chitozanu i keratyny odpowiednich stosunkach wagowych (95/5, 85/15, 70/30) i oznaczono je odpowiednio jako 5%, 15%, 30%. Roztwory wylano na płyty szklane i w wyniku odparowania rozpuszczalnika uzyskano filmy.

Analizę termiczną przeprowadzono przy użyciu TA Instruments SDT 2960 z szybkością grzania 10°C/min w zakresie temp. 20-600°C, w atmosferze azotu.

Właściwości mechaniczne badano na maszynie wytrzymałościowej Zwick&Roell Z 0.5.

Wyniki i dyskusja

Krzywe TG i DTG degradacji termicznej keratyny i mieszaniny chitozan/keratyna 30% przedstawiono na RYS.1.

Zaobserwowano, że keratyna ulega przemianom ter-

	Chitosan	5%	15%	30%	Keratin		
t_1 [°C]	77	65	71	67	55,3		
m_1 [%]	14,6	13,1	11,4	10,5	7		
t_2 [°C]	284	288	291	264	221	227	322
m_2 [%]	49,8	56,6	52,7	58,9	20,1	17,4	34,8

TAB.1. Wartości temperatur i ubytków masy poszczególnych etapów degradacji termicznej chitozanu, keratyny i ich mieszanin.

TAB.1. Values of thermal parameters of chitosan and its blends with keratin determined by thermal analysis.

tosan and keratin hydrolysates solutions in appropriate weight ratios (95/5, 85/15, 70/30) signed as 5%, 15% and 30% respectively. Then the films were obtained by solvent evaporation from solutions poured onto glass plates.

Thermal analysis was performed using TA Instruments SDT 2960 at a rate of 10°C/min from 20 to 600°C in an atmosphere of nitrogen.

The mechanical properties have been investigated by Zwick&Roell Z 0.5.

Results and discussion

TG and DTG curves of thermal destruction of keratin and chitosan/keratin 30% blend are presented in FIG.1.

We observed that keratin destruction had been proceeded in four stages. The first one was an effect of evaporation of water connected with protein. In the next stages bounded water was released and small molecular products of thermal degradation of keratin were liberated. The chitosan and

	Chitosan	5%	15%	30%
σ_Y [MPa]	64,2	68,1	61,9	52,1
ε_Y [%]	3,5	2,5	2,6	4,6
σ_B [MPa]	55,4	58,7	51,9	46,5
ε_B [%]	15,1	6,2	8,4	6,4

TAB.2. Wartości naprężenia na granicy plastyczności (σ_Y) i przy zerwaniu (σ_B) oraz wydłużenia względnego na granicy plastyczności (ε_Y) i przy zerwaniu (ε_B) dla filmów chitozu i jego mieszanin z keratyną.

TAB.2. The values of ultimate tensile strength at a yield point (σ_Y) and at breaking point (σ_B) and ultimate percentage elongation at a yield point (ε_Y) and at breaking point (ε_B) of chitosan films, and its blends with keratin.

micznym w czterech etapach. Pierwszy z nich związany jest z parowaniem wody obecnej w strukturze białka. W kolejnych etapach uwalniana jest woda związana oraz małowcząsteczkowe produkty termicznego rozkładu keratyny. Natomiast na termogramach filmów chitozanowych oraz mieszanin widoczne są tylko dwa etapy degradacji. Najwyższą temperaturę dla procesu odparowania wody zaobserwowano w przypadku chitozanu, a dodatek keratyny obniża jej wartość, TAB.1. Film chitozanowy charakteryzuje się także największym ubytkiem masy w tym etapie przemian termicznych, a wzrost zawartości keratyny w materiale powoduje obniżenie ilości wody ulegającej odparowaniu. Sugeruje to, że dodatek keratyny obniża hydrofilowość materiału chitozanowego. Drugi pik na krzywej DTG chitozanu, charakteryzujący maksymalną szybkość procesu termicznego rozkładu próbki, zanotowano przy temp. 284°C. Niewielki dodatek keratyny (5, 15%) poprawia nieznacznie stabilność termiczną materiału, jednak 30% udziału białka w mieszaninie obniża tę wartość, TAB.1. Ubytek masy próbki wzrasta wraz z zawartością keratyny w próbce, by osiągnąć maksymalną wartość dla czystego białka (72,3% przy uwzględnieniu ostatnich trzech etapów degradacji)

Wartości parametrów mechanicznych takich jak naprężenie na granicy plastyczności (σ_Y) i przy zerwaniu (σ_B) oraz wydłużenie względne na granicy plastyczności (ϵ_Y) i przy zerwaniu (ϵ_B) zestawiono w TABELI 2. Stwierdzono, że 5% dodatek keratyny poprawia wytrzymałość filmów chitozanowych zarówno przy granicy plastyczności jak i zerwaniu, jednak niekorzystnie wpływa na wartość wydłużenia względnego. Prawdopodobnie efekt ten jest spowodowany powstawaniem międzycząsteczkowych wiązań wodorowych między składnikami materiału. Większy udział keratyny w filmie (15, 30%) powoduje pogorszenie właściwości mechanicznych. Wysoka zawartość keratyny, pomimo tworzenia wiązań poprzecznych, powoduje destabilizację struktury filmu, najprawdopodobniej ze względu na zbyt małą długość łańcuchów białkowych.

Wnioski

Na podstawie badań stwierdzono, że mały dodatek hydrolizatów keratyny (5%) do chitozanu poprawia wytrzymałość materiału, jednak zwiększenie dodatku białka niekorzystnie wpływa na właściwości mechaniczne. Także stabilność termiczna materiałów chitozanowych nieznacznie rośnie w obecności niewielkich ilości keratyny. Można także przypuszczać, że materiały zawierające keratynę będą wykazywały mniejszą zdolność do absorpcji wody niż filmy z czystego chitozanu.

chitosan/keratin films underwent the thermal changes only in two stages. The temperature of the water evaporation was the highest for chitosan film and addition of keratin decreased this value, TAB.1. Also the highest value of weight loss at the first stage for chitosan sample was observed. As the keratin content in samples had increased, the loss of water was smaller, TAB.1. It suggests that addition of keratin has decreased the hydrophilicity of chitosan films. The second peak on the DTG curve of chitosan sample appeared with a maximum at 284°C. Small additions of keratin (5, 15%) improved slightly the thermal stability of blends, while the samples with high content of the protein exhibited the lower temperature of the maximum speed of the thermal degradation, TAB.1. The weight loss increased with the higher amount of keratin in the sample and accomplished the maximum value for pure keratin (72,3% as a sum of three stages), TAB.1.

Mechanical properties as ultimate tensile strength at a yield point (σ_Y) and at breaking point (σ_B) and ultimate percentage elongation at a yield point (ϵ_Y) and at breaking point (ϵ_B) of chitosan films and its blends with keratin are presented in TABLE 2. The 5% of addition of keratin hydrolysates to chitosan material improved its strength, at the yield point as well as at breaking point while the ultimate percentage of elongation exhibited the lowest value. Probably the intermolecular hydrogen bonds between both biopolymers had been created. However, the films containing 15% and 30% of keratin hydrolysates were less strong. High amount of keratin, despite of formation of hydrogen bonds, have destabilized the structure of the materials, probably because of too low length of keratin chains.

Conclusion

Our study demonstrated that small addition (5%) of keratin hydrolysates to chitosan biomaterial improved its mechanical strength. However higher amount of keratin in film decreased its mechanical parameters. Also thermal stability increased with the small addition of keratin. We can also expect that absorption of water will be smaller for keratin/chitosan blends than for pure polysaccharide.

Piśmiennictwo

- [1] A. Aluigi, M. Zoccola, C. Vineis, C. Tonin, F. Ferrero, M. Canetti, Study on the structure and properties of wool keratin regenerated from formic acid, *Int. J. Biol. Macromol.* 2007, 41, 266-273
- [2] A. Kurimoto, T. Tanabe, A. Tachibana, K. Yamauchi, Keratin sponge: immobilization of lysozyme, *J. Biosc. Bioeng.* 2003, 96, 307-309
- [3] H.J. Chun, G.-W. Kim, C.-H. Kim, Fabrication of porous chitosan scaffold in order to improve biocompatibility, *J. Phys. Chem. Sol. Stat.* 2008, 69, 1573-1576
- [4] L. Zhao, J. Chang, Preparation and characterization of macroporous chitosan/wollastonite composite scaffolds for tissue engineering, *J. Mat. Sci.: Mat. Med.* 2004, 15, 625-629
- [5] O.C. Wilson JR., J.R. Hull, Surface modification of nanophase hydroxyapatite with chitosan, *Mat. Sci. Eng. C* 2008, 28, 434-437

References

- [6] S.V. Madhally, H.W.T. Mattew, Porous chitosan scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials* 1999, 20, 1133-1142
- [7] A. Vasconcelos, G. Freddi, A. Cavaco-Paulo, biodegradable materials based on silk fibroin and keratin, *Biomacromolecules* 2008, 9, 1299-1305
- [8] P. Sierpinski, J. Garrett, J. ma, P. Apel, D. Klorig, T. Smith, L.A. Koman, N. Atala, M. Van Dyke, The use of keratin biomaterials derived from human hair for the promotion of rapid regeneration of peripheral nerves, *Biomaterials* 2008, 29, 118-128
- [9] M. Zoccola, A. Aluigi, C. Vineis, C. tonin, F. Ferrero, M.G. Piacentino, Study on cast membranes and electrospun nanofibres made from keratin/fibroin blends, *Biomacromolecules* 2008, 9, 2819-2825
- [10] T. Tanabe, N. Okitsu, A. Tachibana, K. Yamauchi, Preparation and characterization of keratin-chitosan composite film, *Biomaterials* 2002, 23, 817-825