

Studium hydrolyzátů proteinů kvasničné biomasy pomocí gelové permeační chromatografie

Bc. Markéta Šebelová

Diplomová práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav biochemie a analýzy potravin
akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Markéta ŠEBELOVÁ**
Osobní číslo: **T080373**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Studium hydrolyzátů proteinů kvasničné biomasy pomocí gelové permeační chromatografie**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika materiálu.
2. Hydrolýza.
3. Chromatografie.
4. Gelová permeační chromatografie.

II. Praktická část

1. Příprava roztoků hydrolyzátů proteinů.
2. Studium připravených vzorků pomocí GPC.
3. Interpretace získaných chromatogramů pomocí univerzální kalibrace.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] Churáček J. Chromatografie VŠCHT, 1988.

[2] Mori, S., Barth, H. G. Size exclusion chromatography, Springer, 1999, ISBN 3-540-65635-9.

[3] Determann, H. Gelová chromatografie, Academia, 1972.

[4] Velišek, J. Chemie potravin 1, 2002, OSSIS Tábor, ISBN 8086659003.

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Zdeněk Smékal

Ústav biochemie a analýzy potravin

Datum zadání diplomové práce:

4. ledna 2010

Termín odevzdání diplomové práce:

19. května 2010

Ve Zlíně dne 8. dubna 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: ŠEBELOVÁ Markéta, Bc.

Obor: THEVP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 17.5. 2010

Š. Šebelová

³¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělčně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

³²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k vyšší výdělků dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

V diplomové práci jsem se zabývala vlivem času při hydrolýze kvasničné biomasy vznikající při výrobě piva na velikost hydrolyzovaných molekul. Hydrolýza byla prováděna kyselou cestou. Teoretická část popisuje základní chromatografické metody, principy gelové permeační chromatografie (GPC, SEC) a základní principy hydrolýzy. Praktická část se zabývá analýzou vzorků v pevné formě i ve formě roztoku metodou GPC. Vyhodnocování proběhlo metodou univerzální kalibrace, kterou umožňovala přítomnost dvou detektorů - refraktometrického a viskozitního.

Klíčová slova: hydrolýza, kvasničná biomasa, gelová permeační chromatografie (GPC, SEC)

ABSTRACT

In the master thesis, I looked at the influence of hydrolysis time on yeast biomass produced in the brewing on the size of hydrolysed molecules. Hydrolysis was carried out by acid. The theoretical part describes the basic chromatographic methods, principles of gel permeation chromatography (GPC, SEC) and the basic principles of hydrolysis. The practical part deals with the analysis of samples in solid form and in solution using GPC. Evaluation was carried out using a universal calibration method, which allow the presence of two detectors – refractometric and viscometric.

Keywords: hydrolysis, yeast biomass, gel permeation chromatography (GPC, SEC)

Děkuji vedoucímu diplomové práce RNDr. Zdeňku Smékalovi, PhD. za odborné vedení, rady, připomínky a trpělivost při tvorbě diplomové práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 CHROMATOGRAFICKÉ METODY	12
1.1 OBECNÉ PRINCIPY CHROMATOGRAFIE	12
1.1.1 Rozdělení chromatografických metod.....	12
1.1.1.1 Dělení chromatografických metod podle povahy mobilní fáze	13
1.1.2 Chování rozpuštěných látek	14
1.1.2.1 Rozdělovací konstanta	14
1.1.2.2 Retardační faktor.....	14
1.1.2.3 Retenční objem	15
1.1.2.4 Kapacita kolony	15
2 GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRAFIE	16
2.1 SEPARAČNÍ MECHANIZMUS GPC.....	17
2.1.1 Geometrický model	19
2.1.2 Termodynamický model.....	20
2.1.3 Hydrodynamický model	20
2.2 ČÍSELNÝ A HMOTNOSTNÍ STŘED MOLÁRNÍ HMOTNOSTI.....	20
2.2.1 Distribuce molárních hmotností, index polydisperzity	21
2.3 STACIONÁRNÍ FÁZE	22
2.4 MOBILNÍ FÁZE	23
2.5 KOLONY A GELY	23
2.6 DETEKTORY	24
2.6.1 Refraktometrické detektory	24
2.6.2 Viskozitní detektory	25
2.7 KALIBRACE	26
2.7.1 Přímá kalibrace úzkými frakcemi.....	26
2.7.2 Univerzální kalibrace	27
2.7.3 Mark – Houwinkova rovnice.....	29
3 HYDROLÝZA	30
3.1 PRINCIP HYDROLÝZY	30
3.2 HYDROLÝZA BÍLKOVIN.....	31
II PRAKTICKÁ ČÁST	33
4 CÍL PRÁCE	34
5 MATERIÁLY A METODY	35
5.1 MATERIÁLY.....	35
5.1.1 Přístrojová technika.....	35
5.1.2 Chemikálie	36
5.1.3 Výběr mobilní fáze.....	36
5.1.4 Příprava mobilní fáze	37

5.1.5	Původ zkoumaného materiálu	37
5.1.6	Použité vzorky	38
5.2	METODY	39
5.2.1	Příprava vzorků	39
5.2.2	Nastavení přístroje	40
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	41
6.1	NAMĚŘENÉ HODNOTY PRO VZORKY A1 – A6	41
6.2	NAMĚŘENÉ HODNOTY PRO VZORKY B1 – B6	43
6.3	NAMĚŘENÉ HODNOTY PRO VZORKY C1 – C6	45
6.4	NAMĚŘENÉ HODNOTY PRO VZORKY D1 – D6	46
6.5	NAMĚŘENÉ HODNOTY PRO VZORKY E1 – E6	48
6.6	NAMĚŘENÉ HODNOTY PRO VZORKY HK/1 –HK/4	50
	ZÁVĚR	54
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	56
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	59
	SEZNAM OBRÁZKŮ	62
	SEZNAM TABULEK	64

ÚVOD

Pivovarské kvasinky jsou jednobuněčné mikroorganismy, z nichž nejpoužívanější jsou *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *uvarum carlsbergensis* a *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *cerevisiae*. Kvasničná biomasa vzniká při výrobě piva, po odfiltrování z tzv. mladiny. Tyto kvasinky mohou mít také funkci jako doplněk lidské výživy pro svůj vysoký obsah vitaminů skupiny B a jiné nutričně významné látky, např. bílkoviny či sacharidy, lecithin, aminokyseliny aj.

Hydrolýzou kvasničné biomasy získáme bílkovinný hydrolyzát, jehož využití v potravinářském průmyslu není prozatím zcela vyhraněné. Různými typy hydrolýzy můžeme získat značně variabilní produkty s různými vlastnostmi a molární hmotností. Mohou je tvořit různé druhy polymerů, ale samostatné monomery – aminokyseliny.

Tato diplomová práce se zaměřuje na stanovení molárních hmotností a jejich změn v závislosti na čase hydrolýzy a stanovení indexů polydisperzity. K těmto analýzám je využita metoda gelové permeační chromatografie (GPC, SEC).

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHROMATOGRAFICKÉ METODY

1.1 OBECNÉ PRINCIPY CHROMATOGRAFIE

Pojem chromatografie zahrnuje skupinu navzájem těsně spjatých separačních metod. Počátky pokusů můžeme datovat do začátku 20. století. Chromatografie má význam především jako analytická metoda. Slouží k dělení směsí a k izolaci a částečnému popisu oddělovaných látek, z nichž některé se mohou objevit nečekaně nebo jejichž přítomnost ve směsi nemusí být předem známá.

V chromatografii se oddělované složky rozdělují mezi dvě fáze. Jedna z fází je nepohyblivá (stacionární), má velký povrch nebo objem a druhá je fluidní (mobilní) a prochází nepohyblivou vrstvou nebo podél ní. K přechodu hmoty mezi mobilní a stacionární fází dochází proto, že molekuly ze směsi se adsorbují na povrchu částic nebo v pórech. Obecně se tento jev nazývá sorpce.

Dělení složek vzorku je založeno na tom, že rychlost pohybu jednotlivých rozpuštěných molekul kolonou nebo tenkou vrstvou sorbentu je přímo závislá na rozdělování těchto molekul mezi pohyblivou a nepohyblivou fází. Rozdělovací konstanta každé složky určuje její obsah v pohyblivé fázi v kterékoliv době a tedy i celkový čas, po který tato složka setrvává v nepohyblivé fázi. Ten pak určuje zadržení nebo zpomalení pohybu rozpuštěné látky. Jsou-li rozdíly v selektivním zpomalení významné, bude se každá složka pohybovat kolonou rychlostí závislou na jejich zvláštních sorpčních vlastnostech. Jestliže se složky dělí, vycházejí z kolony v různém časovém intervalu. Skončí-li proces dříve, než některá ze složek opustí náplň kolony nebo tenkou vrstvu, budou se složky rozdělovat v objemu stacionární fáze, místo aby se projevovaly v časovém odstupu u výstupu z kolony. Celý proces separace je důsledkem neselektivní hnací síly – průtokem mobilní fáze. Široký výběr materiálů pro nepohyblivou i pohyblivou fází v chromatografii umožňuje dělení látek, které se jen velmi málo od sebe liší ve fyzikálních i chemických vlastnostech [1].

1.1.1 Rozdělení chromatografických metod

Mobilní fází může být plyn nebo kapalina, stacionární kapalina nebo tuhá látka. Nejvyužívanější jsou kombinace kapalina – tuhá látka, plyn – tuhá látka. Rozlišují se chromatografie rozdělovací, iontově výměnné a vylučovací.

Rozdělovací chromatografie

Při rozdělovací chromatografii dochází k rozdělování látek mezi dvě fáze. Uplatní-li se při sorpční schopnosti tuhé fáze hlavně fyzikální povrchové síly, označuje se jako adsorpční chromatografie. Pro těkavé látky je vhodná plynová chromatografie. Metody kapalinové chromatografie využívají kapalnou mobilní fázi k unášení roztoku.

Iontově výměnná chromatografie

Při této chromatografii se tvoří vratné heteropolární chemické vazby mezi iontovými složkami v pohyblivé a nepohyblivé fázi. Použití molekulárních sít jako stacionární fáze je užitečné pro třídění molekul.

Vylučovací chromatografie

Metody vylučovací chromatografie zahrnují metody gelové permeační chromatografie [1].

1.1.1.1 Dělení chromatografických metod podle povahy mobilní fáze

Podle povahy mobilní fáze můžeme chromatografie rozdělit na plynovou, kdy mobilní fázi představuje plyn, a kapalinovou, kde mobilní fázi představuje kapalina [28].

1.1.1.1.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie bývá často označována zkratkou GC (gas chromatography) [27]. Od jiných druhů chromatografie se liší v tom, že mobilní fází je plyn a látky se dělí v plynném stavu. Při takovém dělení se postupuje tak, že vzorek obsahující dělené látky se vstříkne do vyhřívaného bloku, kde se okamžitě vypaří a je unášen proudem nosného plynu ve formě páry do kolony. Dělené látky se adsorbují na začátku kolony do stacionární fáze a pak desorbují čerstvým nosným plynem. Každá látka postupuje kolonou svou vlastní rychlostí. Látky se postupně eluují v pořadí podle zvětšujících se rozdělovacích konstant a stupují do detektoru připojeného k výstupu z kolony [1].

1.1.1.1.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je označována zkratkou LC (liquid chromatography). Kapalinová chromatografie je metoda založená na separaci směsi v roztoku selektivní adsorpcí. Všechny systémy obsahují pohyblivý solvent, pumpu, separační kolonu a detektor. Existují tři separační modely kapalinové chromatografie:

- kapalina – kapalina: proces separace je závislý na rozpustnosti jednotlivých komponentách vzorku ve dvou navzájem nemísitelných fázích;
- kapalina – pevná látka: separaci zde zajišťují různé polaridy částic vzorku a jejich relativní adsorpce na aktivním povrchu;
- separace na základě molárních hmotností, která je závislá na velikosti molekul.

Solventy, často označované jako nosiče, obsahují např. izooktan, ethylmethylketon, aceton, chloroform, tetrahydrofuran, hexan nebo toluen. Nejznámější aplikací kapalinové chromatografie je HPLC (High-performance liquid chromatography – vysokoúčinná kapalinová chromatografie) [27].

1.1.2 Chování rozpuštěných látek

Chování rozpuštěných látek při chromatografii je nejčastěji popisováno buď jejich retardačním faktorem nebo retenčním objemem, který odpovídá retenčnímu času. Obě veličiny umožňují určit zlomek času, po který zůstává rozpuštěná molekula v mobilní fázi. Každá látka má pro každou kombinaci sorbentu a rozpouštědla jiný retardační faktor a jiný retenční objem, proto při změně kombinace sorbent – rozpouštědlo může změnit stupeň zdržení.

1.1.2.1 Rozdělovací konstanta

Rozdělovací konstanta udává koncentraci rozpuštěné látky v obou fázích:

$$K_D = [A]_s / [A]_m \quad (1)$$

kde $[A]_s$ je koncentrace rozpuštěné látky A ve stacionární fázi a $[A]_m$ je koncentrace rozpuštěné látky A v mobilní fázi. Je-li rozdělovací izoterma lineární, rozdělovací konstanta bude konstantní a nezávislá na koncentraci rozpuštěné látky. To platí obecně i při velmi malých koncentracích a u všech chromatografických metod.

1.1.2.2 Retardační faktor

Retardační faktor udává poměr rychlosti posunu rozpuštěné látky k rychlosti posunu ideální standardní látky, která se nerozpouští nebo není sorbována nepohyblivou fází.

$$R = t_m / (t_m + t_s) \quad (2)$$

kde t_m a t_s jsou časy, po které zůstává molekula v mobilní a stacionární fázi. Retardační faktor také charakterizuje určitou rovnováhu a je funkcí rozdělovací konstanty.

V soustavách, u nichž průřez a rozdělovací konstanta nemusí být konstantní po celé délce vyvínění, se poměr vzdáleností dosažených rozpuštěnou látkou a mobilní fází nazývá hodnota R_F a je vyjádřena jako poměr vzdálenosti dosažené rozpuštěnou látkou a vzdálenosti dosažené mobilní fází.

1.1.2.3 Retenční objem

U kolonových metod je významný objem udávající množství mobilní fáze, vycházející z kolony do okamžiku, kdy maximum zóny rozpuštěné látky opouští kolonu. Když se objeví maximum píku u výstupu z kolony, polovina rozpuštěné látky je eluována v retenčním objemu V_R (někdy označováno jako V_{max}) a polovina zůstává v koloně jednak v mobilní fázi, V_m , jednak v objemu stacionární fáze V_s , tak

$$V_{RC_m} = V_m c_m + V_s c_s. \quad (3)$$

Po úpravě a zavedení rozdělovací konstant získáme rovnici

$$V_R = V_m + K_D V_s. \quad (4)$$

Vztah retenčního objemu k retenčnímu času je vyjádřen

$$V_R = t_R F_m, \quad (5)$$

kde F_m označuje objemovou rychlost toku. Retenční objem je také ve vztahu s retardačním faktorem:

$$V_R = L F_m / R u \quad (6)$$

kde L je délka kolony a u je lineární průtoková rychlost.

1.1.2.4 Kapacita kolony

Kapacitu kolony můžeme vyjádřit jako poměr množství látky rozpuštěné v obou fázích:

$$k = c_s V_s / c_m V_m \quad (7)$$

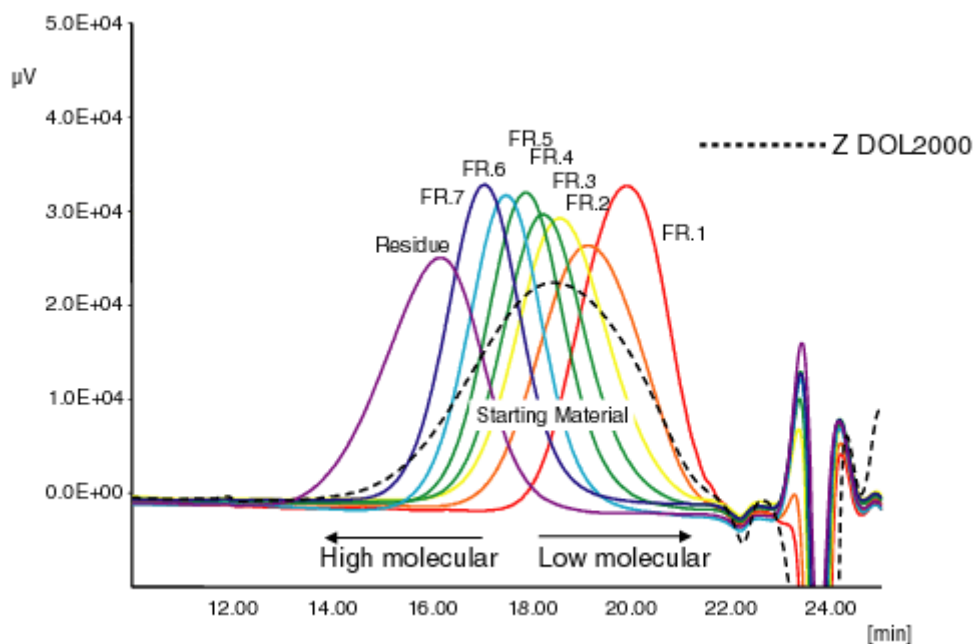
[1].

2 GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRAFIE

Gelová permeační chromatografie je metoda, jejíž separační princip je založen na hydrodynamickém objemu molekul. Vzorky jsou aplikovány do gelové kolony, která je naplněna např. polyakrylamidem, dextransy nebo polysacharidy a částice jsou separovány na schopnosti proniknout do pórů gelu, zatímco jsou vymývány mobilní fází [10].

Gelová chromatografie je metoda pro analytické a preparativní separace makromolekul. Historicky byla GPC filtrační chromatografií používaná při separaci proteinů ve vodných nativních podmínkách [12].

Dnes se používá GPC tam, kde je třeba dělit a analyzovat sloučeniny s rozdílnými molekulovými vahami. Oblast látek, které lze dělit pomocí GPC, sahá od živých virů přes bílkoviny, sacharidy a nukleové kyseliny, včetně jejich stavebních jednotek, přes hormony, antibiotika a lipidy až po syntetické vysokopolymerní látky [11].



Obr. 1. Chromatogram z GPC [34].



Obr. 2 Gelový permeační chromatograf, výrobce Polymer Laboratories [43].

2.1 SEPARAČNÍ MECHANIZMUS GPC

Separace pomocí GPC probíhá v závislosti na velikosti molekuly a je relativně nezávislý na chemických či elektronických podmínkách látek a mobilní fázi. Tato nezávislost zahrnuje podstatu náplně kolony, obvykle složenou z porézních částic o známé velikosti pórů [2].

V chromatografické koloně vzorek migruje skrz kolonu různou rychlostí a jednotlivé frakce vzorku jsou vylučovány z kolony v různých elučních časech. Jak se vzorek pohybuje skrz kolonu pomocí mobilní fáze, je postupně zadržován na povrchu kolony, tj. stacionární fázi. Zatímco se solut pohybuje pouze, pokud je v mobilní fázi, distribuce solutu mezi mobilní a stacionární fází probíhá průměrnou rychlostí migrace solutu [6].

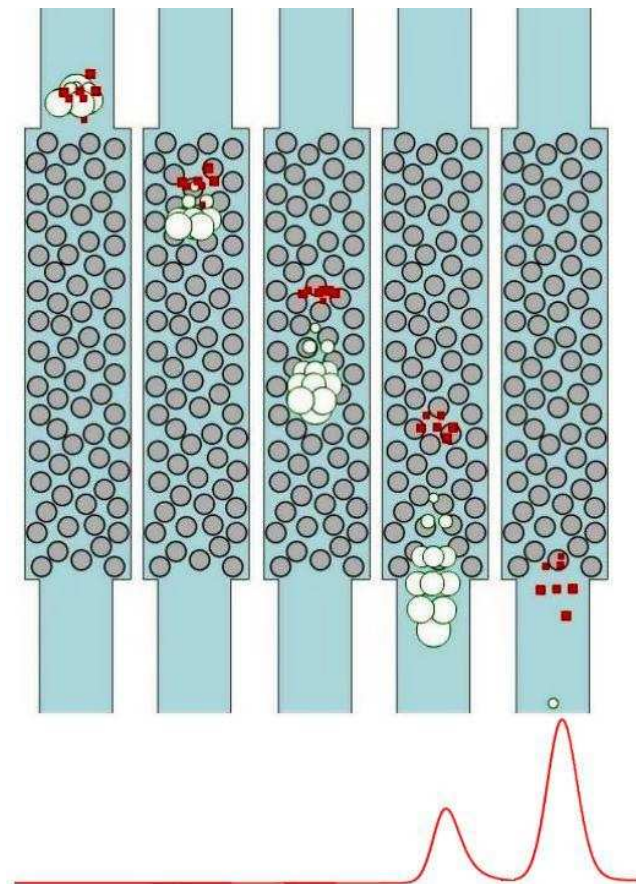
Velikost molekul (přesněji molekulární hydrodynamický objem) určuje separační proces GPC. To znamená, že směs solutů o různých velikostech prochází kolonou naplněnou porézními částicemi, proto molekuly, které jsou příliš velké, aby prošly póry, zůstávají zachyceny. Menší molekuly, které mohou proniknout do pórů, jsou eluovány v pozdějším retenčním čase nebo objemu. Vzorek je separován nebo frakcionován podle velikosti molekul. Tento děj je popsán jako distribuce molekulárních hmotností směsi [3].

Kalibrační křivka je získaná analyzováním několika standardních vzorků na konkrétní GPC koloně. Ve většině případů se jako standardy používají vzorky polysacharidů. Logaritmy molární hmotnosti jsou vyneseny na osu y, na ose x najdeme retenční objem. Průměrné molární hmotnosti reálného vzorku pak odčítáme z této kalibrační křivky [2].

Vzorky s vysokou molární hmotností, jejichž molekuly jsou příliš velké na to, aby pronikly do pórů gelu, jsou eluovány ven z kolony objemem mobilní fáze, který je umístěný mezi částicemi gelu. Pokud se molekulární hmotnost zmenší na hodnotu, kdy částice budou moci proniknout do pórů, prodlouží se jejich eluční čas.

Chování vzorků separovaných pomocí GPC může být popsáno obecnou rovnicí $V_R = V_0 + K_{SEC} V_i$, (8)

kde V_R je retenční objem, K_{SEC} je distribuční koeficient (termodynamický parametr definovaný jako poměr průměrné koncentrace solutu ku objemu pórů).



Obr. 3. Separační mechanismus GPC[40].

2.1.1 Geometrický model

Nejjednodušší modely jsou založeny na geometrických principech. Modely mají podstatu buď v konickém, nebo cylindrickém tvaru pórů, i když ve skutečnosti jsou mnohem složitější [1].

Řada teoretických prací z historických počátků GPC vysvětlovala mechanismus separace prostou sterickou exkluzí. Tomu odpovídaly též nejjednodušší geometrické modely, kterými byl popisován rozdělovací proces. Porath (1963) považoval porézní strukturu gelu za soubor děr kuželovitého tvaru, do kterých mohou kulovité molekuly pronikat. Rozdělovací koeficient takového systému byl určen rovnicí

$$K_{SEC} = k (1 - 2R_i/A)^3, \quad (9)$$

kde A je maximální průměr kužele, R_i je efektivní poloměr dělené makromolekuly a k je konstanta úměrnosti [5].

V konickém modelu se póry zužují s narůstající vzdáleností. Kulovité molekuly pronikají do pórů do určité vzdálenosti závislé na poměru velikosti molekuly a póru, do kterého proniká. Kulovité molekuly s průměrem větším, než pór, nemohou proniknout a jsou úplně vyloučeny z póru. Velké molekuly se pohybují přímo kolonou a objevují se první na chromatogramu. Nejmenší molekuly mohou dosáhnout dále do póru, a proto zabírají téměř celý vnitřní objem póru. Jsou proto déle zadržovány v koloně a eluovány jako poslední. Molekuly se střední velikostí mohou pronikat do póru do vzdálenosti odpovídající její velikosti. Proto se tyto tři typy molekul mohou vymývat z kolony v pořadí odpovídající jejich velikostem.

Geometrický model je obecně lépe využit ve vysocúčinné GPC. Ve srovnání s materiály v kolonách pro HPLC nejsou tak tuhé a bobtnavé. Velikost a objem pórů se příliš nemění s povahou mobilní fáze.

Konický a cylindrický model představují měkké gely, jako například dextran. Gely na bázi dextranu obsahují trojrozměrnou síť. Stupeň síťovitosti a složení mobilní fáze ovlivňují póry gelu: méně síťované mají větší bobtnavost, větší póry, a proto menší molekuly pronikají do sítě a jsou eluovány později.

2.1.2 Termodynamický model

Mnohem více akceptovaná teorie, a pravděpodobně i použitelnější, je založen na termodynamických úvahách, tzn. že je založen na termodynamické rovnováze mezi polymerem v intersticiálním objemu a objemem pórů. Tato rovnováha je popsána rovnicí:

$$K = \exp\left(-\frac{\Delta H^\circ}{RT}\right) \exp\left(\frac{\Delta S^\circ}{R}\right), \quad (10)$$

kde R je plynová konstanta, T absolutní teplota, ΔH° označuje změnu enthalpie a ΔS° změnu entropie. Za ideálních podmínek je ΔH° rovno nule (neexistují žádné enthalpické interakce mezi solutem a náplní kolony [1]).

Protože je separace řízena rozměry molekul v solutu, soluty podobného hydrodynamického objemu ale odlišnou molární hmotností budou eluovány ve stejném retenčním objemu. Podobně soluty s podobnou molární hmotností, ale rozdílnou konformací budou eluovány v rozdílných retenčních objemech [3].

2.1.3 Hydrodynamický model

Podle tohoto modelu je možné aproximovat porézní strukturu gelových částic systémem cirkulárních kapilár různých průměrů. Makromolekulární klubko je aproximováno kulovitou částicí, která se pohybuje vlivem toku v kapiláře. Protože za laminárního newtonského toku se vytváří v kapiláře parabolický rychlostní profil a izolovaná kulovitá makromolekula podléhá brownovské migraci, avšak nemůže se přiblížit ke stěně na vzdálenost menší než je její poloměr, je unášena kapilárou rychlostí větší, než je průměrná rychlost tekutiny. Čím větší je částice v kapiláře daného poloměru, tím větší bude rychlost jejího relativního pohybu. Retenční objem pro válcovitou kapiláru je pak dán vztahem

$$V_R = \pi l \frac{r^2}{2} \left[1 - \frac{\left(1 - \frac{R}{r}\right)^2}{2} - \gamma \left(\frac{R}{r}\right)^2 \right] \quad (11)$$

kde γ je funkcí tvaru distribuce hustoty makromolekuly, l je délka kapiláry, R je efektivní poloměr dělené makromolekuly a r je poloměr pórů [5].

2.2 Číselný a hmotnostní střed molární hmotnosti

Z mnoha separačních procesů je GPC jedna z nejjednodušších metod. V současné době je spíše nazývána jako sterická exkluzní chromatografie [2]. Pro polymerní materiály hraje

důležitou roli molekulární hmotnost, která určuje jejich vlastnosti. Ve srovnání s malými molekulami, které mají velmi malou a dobře definovatelnou molekulární hmotnost většina syntetických materiálů je složena ze stovek nebo tisíců monomerů různých molekulárních hmotností rozhodujících o charakteristické distribuci. Mnoho přírodních polymerů, jako jsou ropné produkty, ligniny, přírodní oleje a tuky, humusové kyseliny, přírodní guma, celulózy a polysacharidy, mají charakteristickou distribuci molárních hmotností, závislou na jejich zdroji a metodách izolace. Šířka distribuce, také nazývaná jako polydisperzita, je určena poměrem hmotnostního a číselného středu molárních hmotností (M_w/M_n). Hodnoty M_n a M_w mohou být měřeny nezávisle na fyzikálních metodách. Jedním z největších limitujících faktorů v určování hodnot průměrných molárních hmotností je především forma distribuce, která zůstává neznámá. Přesto dva polymery mohou mít stejnou průměrnou hodnotu molární hmotnosti, ale úplně rozdílnou hodnotu molární distribuce [3].

2.2.1 Distribuce molárních hmotností, index polydisperzity

Distribuce molárních hmotností a distribuce velikosti částic mohou být užitečné při výpočtu průměrných molárních hmotností, velikostí částic a indexů polydisperzity. Pokud odpověď detektoru odpovídá proporcionálně, platí pro M_w a d_w následující vztahy:

$$\overline{M}_w = \frac{\sum_0^{\infty} w_i M_i}{\sum_0^{\infty} w_i} = \frac{\sum_0^{\infty} h_i M_i}{\sum_0^{\infty} h_i}, \quad \overline{d}_w = \frac{\sum_0^{\infty} w_i d_i}{\sum_0^{\infty} w_i} = \frac{\sum_0^{\infty} h_i d_i}{\sum_0^{\infty} h_i} \quad (12)$$

Pro číselný střed molární hmotnosti či průměr částic platí:

$$\overline{M}_n = \frac{\sum_0^{\infty} n_i M_i}{\sum_0^{\infty} n_i} = \frac{\sum_0^{\infty} h_i}{\sum_0^{\infty} \frac{h_i}{M_i}}, \quad \overline{d}_n = \frac{\sum_0^{\infty} n_i d_i}{\sum_0^{\infty} n_i} = \frac{\sum_0^{\infty} \frac{h_i}{d_i}}{\sum_0^{\infty} \frac{h_i}{d_i^2}} \quad (13)$$

Polydisperzita může být obvykle charakterizována jako index polydisperzity:

$$I = \frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n} \text{ a } I = \frac{\overline{d}_w}{\overline{d}_n} \quad (14)$$

[4].

Čím více se hodnota disperzity blíží k 1, tím je užší rozptyl molární hmotnosti [2].

Experimentálně se mohou určit i další dva průměry. Označují se jako M_z a M_{z+1} [35]. Z – průměr molárních hmotností vyjadřuje větší vliv velkých částic. Lze ho získat vyhodnocením údajů sedimentační rovnováhy a je definován vztahem:

$$\overline{M_z} = \frac{\sum w_i \cdot M_i^2}{\sum w_i \cdot M_i} \quad (15)$$

Pro hodnotu $\overline{M_\eta}$ získanou z viskozimetrických měření platí:

$$[\eta] = \sum w_i [\eta_i] = \sum w_i \cdot K \cdot M_i^\alpha = K \cdot \overline{M_i^\alpha} \quad (16)$$

Z rovnice (16) vyplývá, že

$$\overline{M_\eta} = \left(\frac{\sum w_i \cdot M_i^\alpha}{\sum w_i} \right)^{\frac{1}{\alpha}} \quad (17)$$

[33]. Mezi jednotlivými průměry platí nerovnost

$$M_n \leq M_w \leq M_z \leq M_{z+1}. \quad (18)$$

Znaménko rovnosti platí pouze pro přísně monodisperzní vzorek [35].

2.3 Stacionární fáze

Stacionární fáze může být pevné nebo kapalné povahy nebo gel. Stacionární fáze mohou být obsaženy jako náplň v koloně nebo jako film [12]. Obal tvoří kovová nebo skleněná trubička [20].

S cílem získat informace o velikosti molekul solutu z měření pomocí GPC musí být kolona nejprve charakterizována z hlediska objemu přístupných pro analyty. Objem kolony GPC je dělitelný do tří částí: objem externích obalových materiálů (V_0), objem obsažený v pórech, který je přístupný pro malé molekuly (V_i), a objem, který zaujímá samotná náplň kolony (V_G). Hodnoty V_0 a V_i jsou určeny experimentálně měřením elučních objemů. Eluční objem (V_e) je určen z rozpuštěné látky, která je částečně zahrnuta do pórů gelu. Eluční objem je vyjádřen následující rovnicí:

$$V_e = V_0 + \sigma V_i \quad (19)$$

kde σ je rozdělovací koeficient rozpuštěné látky [12].

2.4 Mobilní fáze

Mobilní fáze je část chromatografického systému, často je to tekutina, která prochází skrz nebo podél stacionární fáze, v určitém směru. Může to být kapalina (kapalinová chromatografie) nebo plyn (plynová chromatografie) [13].

V nejběžnější formě chromatografie, známé jako eluční chromatografie, je mobilní fáze neustále doplňována ze zásobníku a proudí jako roztok. Stacionární fáze musí být neustále zaplněna mobilní fází. Složky mobilní fáze, které jsou více přitahovány k stacionární fázi, zůstávají v koloně déle, zatímco ty komponenty, které jsou méně přitahovány, jsou rychleji vymývány z kolony [20].

2.5 Kolony a gely

Účelná konstrukce chromatografických kolon je velice důležitá zejména vzhledem k reprodukovatelnosti výsledků dělení. Ve většině případů bude kolona sestávat ze skleněné trubice naplněné gelem. Eluční činidlo musí volně odtékat, mrtvý objem kolony musí být co nejmenší [11]. Vhodné jsou kolony o průměru 1,4 až 2,5 cm. Délka kolony je variabilní.

Růst bakterií a plísní může vážně zasahovat do chromatografických vlastností gelů. Mobilní fáze pro kolony by měla proto obsahovat malé množství baktericidní látky, jako je azid sodný (0,02%), 1-methyl-1-trichlormethylethanol (0,1%) nebo chloroform. Pro řidší, méně zesítené gely se však chloroform nedoporučuje, protože může způsobovat mírné smrštění částic gelu.

Volba vhodného gelu závisí na velikosti molekuly a na chemických vlastnostech látek, které se mají dělit. U každého typu gelu dochází k frakcionaci především v určité oblasti relativních molekulových hmotností, určené rozsahem velikosti pórů [1]. Velikost pórů se pohybuje přibližně v rozmezí 5 až 10^5 nm [14]. Je možné rozdělit látky, jejichž relativní molekulové hmotnosti se pohybují od několika stovek do 150 milionů [1].



Obr. 4. Chromatografické kolony [30].

2.6 Detektory

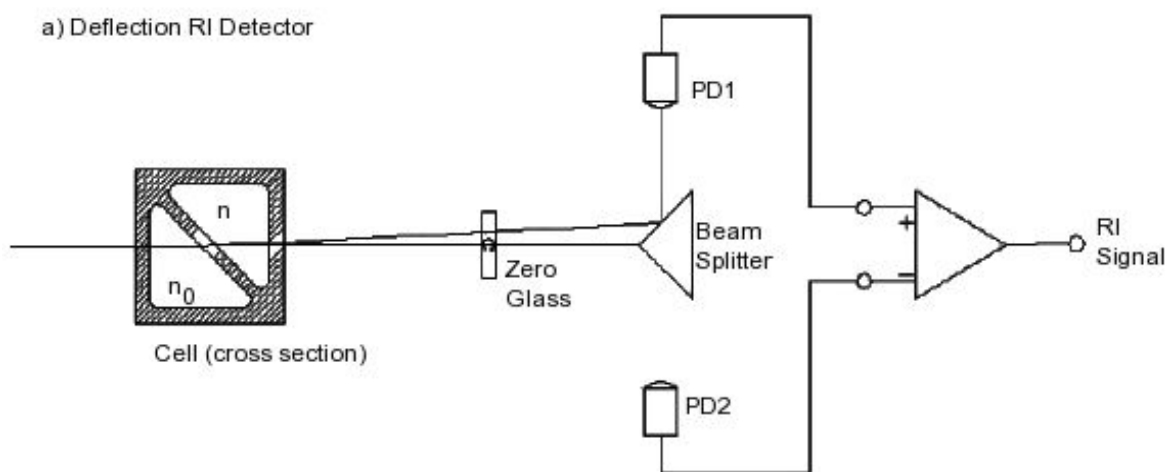
Detektory patří k základním komponentám gelových permeačních chromatografů. Detektor a čtecí zařízení slouží k detekci přítomnosti rozpuštěných látek v mobilní fázi, a zaznamenávají ji do výsledných chromatogramů. Zároveň jsou schopny i shromažďovat, ukládat a analyzovat chromatografická data [15].

Eluci proteinů lze detekovat většinou pomocí in-line detekčních systémů, nejčastěji UV detektorem [12].

2.6.1 Refraktometrické detektory

V současné době je vyhodnocování indexu lomu nejbližší k univerzální detekci pro kapalinovou chromatografii. Detekce je závislá na rozdílu v indexu lomu čistého rozpouštědla, které protéká po straně detektoru a vzorku vytékajícího z analytické kolony. Měření má nedestruktivní charakter na vzorek, vysokou úroveň citlivosti, a jednoduchý provoz [16].

Nejčastější RI detektory jsou založeny na vychýlení paprsku světla při průchodu duální mobilní jednotkou. Jedné straně prostoru obsahuje referenční rozpouštědlo, které je statické během procesu měření. Na druhé straně obsahuje roztoku vzorku, tj. sloupec eluentu. Má-li detektor přesný, pak index lomu roztoku musí být úměrný s koncentrací vzorku [21].



Obr. 5. Schéma refraktometrického detektoru [21].

2.6.2 Viskozitní detektory

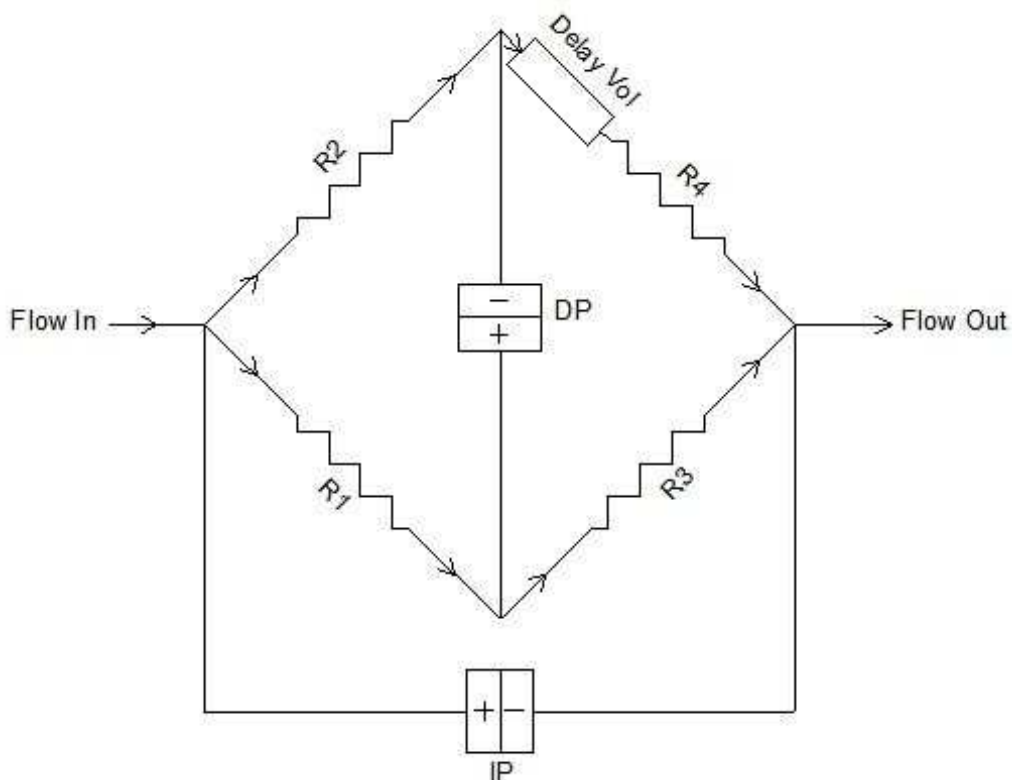
Detektor sleduje koncentrace eluovaného vzorku. Distribuce molární hmotnosti se vypočítá na základě měření elučního objemu. To je funkce schopnosti polymeru v roztoku pronikat do pórů gelu [17].

Nejčastější uspořádání viskozimetru je 4-kapilární. Čtyři kapiláry R1 až R4 s vnitřním průměrem přibližně 0,25 mm jsou uspořádány do vyvážené konfigurace. Zpožděný objem je přiváděn do obvodu před kapilární R4, s cílem poskytnout referenční průtok rozpouštědla přes R4 během eluce vzorku polymeru. Požadavky na zpožděný objem jsou:

- musí mít vnitřní objem větší než čisté eluční objem GPC kolony,
- tok odpor musí být zanedbatelné ve srovnání s kapilární resistence.

Kapiláry jsou vybrány tak, aby odpor průtoku byl téměř stejný. V tomto případě bude výstup signálu téměř nulový.

Viskozitní detektory poskytují důležitou data. Refraktometrické detektory poskytují informace o přesné molekulové hmotnosti. Viskozitní detektor poskytuje všechny důležité strukturální údaje, umožňující vyhodnocení vzorků proteinů. Nejpresnějších výsledů se dosáhne kombinací několika různých detektorů [22].



Obr. 6. Schéma viskozitního detektoru [22].

2.7 Kalibrace

Pro správné vyhodnocení získaných dat je třeba kolonu kalibrovat. Kalibrace se provádí dvěma způsoby:

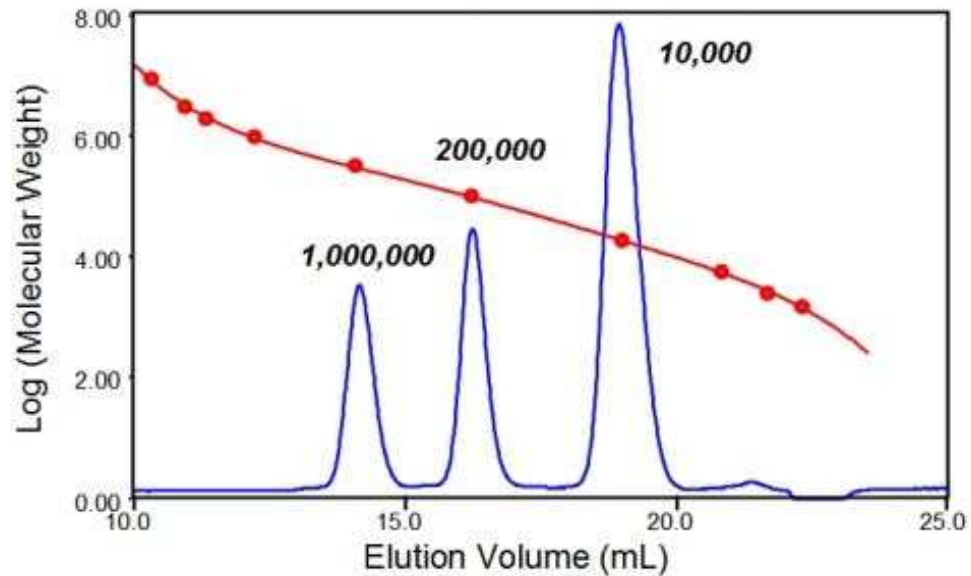
- univerzální kalibrace;
- přímá kalibrace úzkými frakcemi.

2.7.1 Přímá kalibrace úzkými frakcemi

Přímá kalibrace úzkými frakcemi je široce používána pro gelové permeační chromatografy, která jsou vybaveny pouze jediným detektorem; obvykle refraktometrickými nebo UV/VIS detektorem.

Principem gelové chromatografie je oddělování molekul na základě jejich hydrodynamických objemů. Při přímé kalibraci jsou relativní molární hmotnosti (M_w) a distribuce molární hmotnosti (MWD) stanoveny z naměřených hodnot retenčního objemu (V_R) pomocí kalibrační křivky (závislost $\log M_w$ na V_R). Proces přímé kalibrace probíhá tak, že do kolony je nastříknuta řada úzkých polymerů nebo proteinů o známé molární hmotnosti, změří

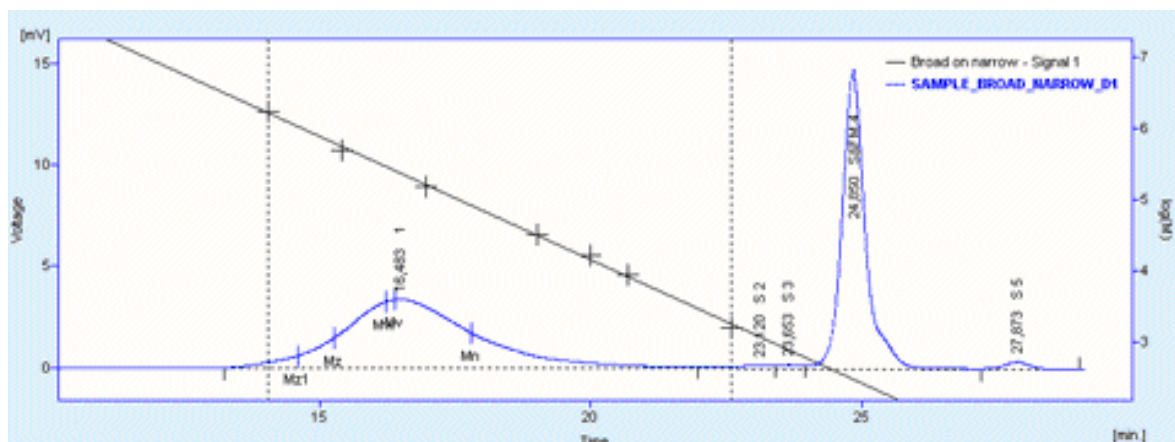
se retenční objem z výsledného píku a sestrojí se kalibrační křivka. Pomocí těchto dat mohou být nyní analyzovány vzorky [23].



Obr. 7. Kalibrační závislost molární hmotnosti na retenčním objemu pomocí přímé kalibrace úzkými frakcemi [23].

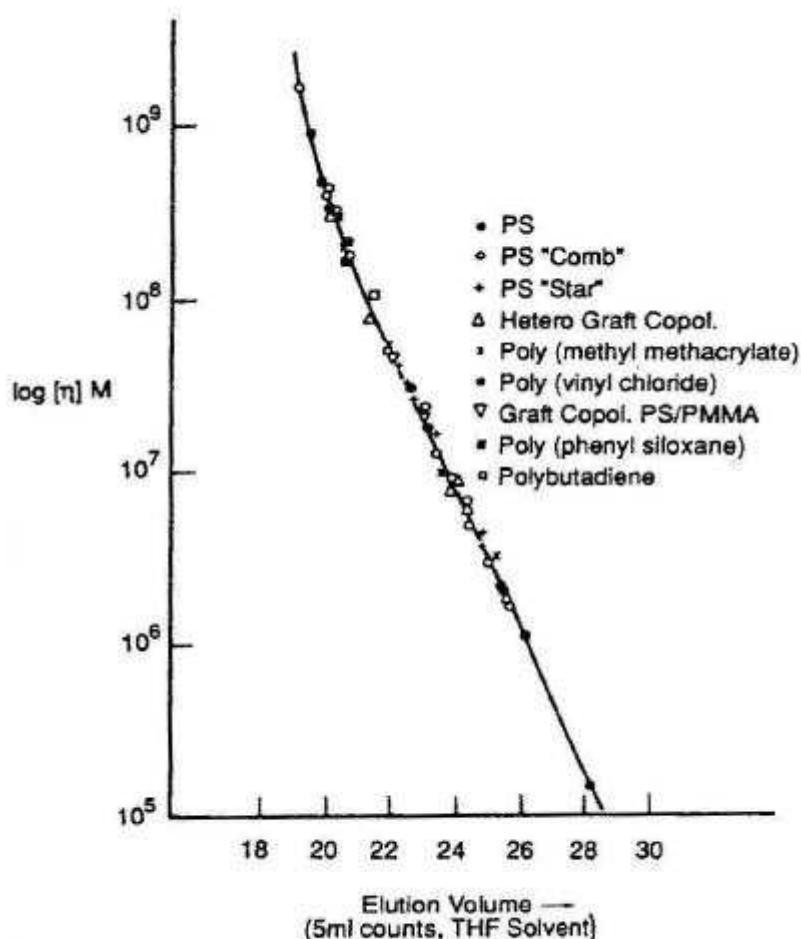
2.7.2 Univerzální kalibrace

Při přímé kalibraci úzkými frakcemi nastávají problémy, pokud budeme analyzovat vzorek, který se chemicky liší od standardu používaného ke kalibraci kolony. V dřívějších dobách tento případ nastával často, ale tyto problémy byly odstraněny po zavedení čtyřkapilárního viskozimetrického diferenciální detektoru a technikou nazývanou univerzální kalibrace [24].



Obr. 8. Vyhodnocení chromatogramu pomocí univerzální kalibrace [29].

Benoit a kolektiv v roce 1967 zavedli koncept univerzální kalibrace a zjistili, že retenční objemy V_R homopolymerů i kopolymerů s různou strukturou (lineární i rozvětvené), které byly rozpuštěny v tetrahydrofuranu (THF), sledují jedinou křivku, jsou-li vyneseny proti logaritmu součinu $[\eta] M$, kde $[\eta]$ je limitní viskozitní číslo a M je molární hmotnost polymeru. Bylo dokázáno, že součin $[\eta] M$ je úměrný hydrodynamickému objemu polymerního klubka. Vytvoření univerzální kalibrace umožňuje tedy analýzu téměř všech polymerů a stanovení jejich molární hmotnosti pomocí GPC. V původním konceptu použil Benoit pro měření viskozit polymerních standardů s nízkou polydisperzitou a polymerních vzorků skleněného kapilárního viskozimetru. Z viskozimetrických dat je pro kalibrační standardy možno sestavit Markův-Houwinkův graf, t.j. závislost $\log [\eta]$ na $\log M$, jehož směrnice je rovna parametru a a úsek je roven logaritmu K [18].



Obr. 9. Benoitova křivka univerzální kalibrace [35].

2.7.3 Mark – Houwinkova rovnice

$$[\eta] = K \cdot M^a \quad (20)$$

Rovnice popisuje závislost limitního viskozitního čísla (dříve označováno jako vnitřní viskozita) polymeru na jeho relativní molekulové hmotnosti, kde $[\eta]$ je limitní viskozitní číslo, K a a jsou konstanty, které závisí na povaze polymeru a rozpouštědla, stejně jako na teplotě [25].

Hodnoty K a a je nutno určit experimentálně na základě molárních hmotností stanovených jinými metodami (např. rozptylem světla) pro frakce s co nejužším rozdělením molárních hmotností [26]. Tyto hodnoty jsou dostupné ve standardizovaném a tabelovaném formátu v *Polymer Handbook* [19]. Použití tabelovaných K a a hodnot v GPC softwaru umožňuje výpočet „absolutních hodnot molárních hmotností“ studovaného polymeru [18].

Pomocí moderních SEC přístrojů., které využívají on-line spojení koncentračního a viskozitního detektoru lze přímo určit molární hmotnost každé frakce, která je eluována. Použitím signálu z koncentračního detektoru a signálu z viskozitního detektoru lze získat hodnotu limitního viskozitního čísla každé frakce vycházející z kolony a je tedy možné s výhodou použít křivku univerzální kalibrace.

Koncept univerzální kalibrace je vhodný pro polymery, které v roztoku tvoří statistické klubko. Pro polymery, které v roztoku tvoří tyčinky nebo tuhé koule, není univerzální kalibrace vhodná [35].

3 HYDROLÝZA

3.1 Princip hydrolýzy

Hydrolýzou obvykle označujeme rozklad solí, esterů, halogenidů, amidů, nitrilů působením H_2O za uvolňování H^+ nebo OH^- iontů. Na základě toho roztoky solí slabých kyselin a silných zásad spolu reagují zásaditě. Podstatou je přechod protonu molekuly vody na anion slabé kyseliny, k níž má větší afinitu [7].

Hydrolýza je jedním z neobvyklejších způsobů štěpení polymerů, a to konkrétně v důsledku činností hydrogenových (H^+) a hydroxylových (OH^-) iontů, které se nachází ve vodě. Koncentrace těchto iontů jsou zvýšeny v závislosti na kyselých či alkalických podmínkách [9].

Roztoky solí silných kyselin a slabých zásad reagují kyselé (v roztoku zůstane nadbytek iontu H^+). V případě solí slabé kyseliny a slabé zásady vznikne ve vodném roztoku nedisociovaná slabá kyselina i zásada. Roztok bude kyselý nebo zásaditý podle toho, který z obou slabých elektrolytů je silnější (má větší disociační konstantu). Soli silných kyselin se silnými zásadami a soli stejně slabých kyselin a zásad reagují neutrálně.

Například sůl slabé kyseliny HA a slabé zásady BOH, která má obecný vzorec BA poskytuje ve vodném roztoku ionty B^+ a A^- , které zdánlivě reagují s vodou vratně:



Čím je kyselina nebo zásada, z níž sůl vznikla, slabší, tím více se rovnováha posune směrem doprava, tj., tím více nedisociovaných molekul slabé kyseliny (zásady) se vytvoří. Stupeň hydrolýzy potom definujeme jako poměr počtu hydrolyzovaných molekul solí ke všem molekulám přítomným v roztoku.

Rovnováhu hydrolýzy charakterizuje konstanta hydrolýzy K_h , která se rovná součinu rovnovážné konstanty reakce hydrolýzy a koncentrace vody ($K_h \cdot [H_2O]$).

Při hydrolýze soli slabé kyseliny a silné zásady platí:

$$K_h = \frac{K_v}{K_A} \quad (23)$$

kde K_v je iontový součin vody,

K_A disociační konstanta slabé kyseliny.

Při hydrolyze soli slabé zásady a silné kyseliny platí:

$$K_h = \frac{K_B}{K_A} \quad (24)$$

kde K_B je disociační konstanta slabé zásady.

Pro hydrolyzu soli slabé kyseliny a slabé zásady platí:

$$K_h = \frac{K_v}{K_A + K_B} \quad (25)$$

Při hydrolyze bílkovin dochází ke štěpení peptidických vazeb bílkovin a peptidů na nižší rozpustné strukturální jednotky [8].

3.2 Hydrolyza bílkovin

Bílkoviny neboli proteiny jsou definovány jako jakákoliv skupina komplexních organických sloučenin, které se skládají z kombinace aminokyselin spojených pomocí peptidových vazeb. Aminokyseliny obsahují uhlík, vodík, kyslík, dusík a obvykle i síru. Jsou široce rozšířeny u rostlin a živočichů. Slovo protein je odvozeno z řeckého výrazu ‚první‘ nebo ‚primární‘, protože mají zásadní roli při zachování života. Potraviny se liší v obsahu bílkovin, ale i v jejich vlastnostech. Ty ovlivňuje právě sekvence aminokyselin, ze kterých jsou bílkoviny složeny.

Bílkoviny se zpravidla skládají z dvaceti aminokyselin, spojených peptidovou vazbou ($R-CO-NH-R'$). Devatenáct z těchto dvaceti aminokyselin má obecnou strukturu $H_2N-C_\alpha H(R)-CO_2H$, lišící se pouze v postranním řetězci R [36].

Proteiny mají mnoho rolí, jako například enzymy, stavební prvky a hormony a jsou nezbytné živiny. Při hydrolyze se bílkoviny štěpí na menší frakce peptidů a jejich složky aminokyseliny. Tato reakce může být katalyzována alkáliemi, kyselinami nebo enzymy (tzv. proteinázy) [10].

Hydrolyza proteinů je složitý proces, který zahrnuje komplexní řadu chemických reakcí [7]. Proteolýza může mít na strukturu proteinů různé efekty, ať už pozitivní či negativní (žádoucí či nežádoucí). Pozitivní význam proteolýzy můžeme najít ve zvýšení rozpustnosti, snížení povrchového napětí, zvýšení emulgování nebo zvýšené pěnivosti. Naopak negativní efekt má proteolýza u zvýšení hořkosti.

Během hydrolyzy bílkovin se mění velikost a charakter rozpustných peptidů, snižuje se délka peptidového řetězce [37].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo stanovit metodou gelové permeační chromatografie hmotnostní střed (M_w), číselný střed (M_n), index polydisperzity a distribuce molárních hmotností u vybraných vzorků proteinových hydrolyzátů kvasničné biomasy, jejímž zdrojem byly pivovarské kvasinky. Vzorky se lišily v době působení kyseliny mléčné na materiál.

5 MATERIÁLY A METODY

5.1 Materiály

5.1.1 Přístrojová technika

Analýzy vzorků byly prováděny na chromatografu PL – GPC 50, výrobce Polymer Laboratories, Church Stretton, Velká Británie (nyní Varian, Inc.; viz obr. 2). Chromatograf byl vybaven refraktometrickým detektorem (DRI) a viskozitním detektorem (VIS), rozděleným na diferenciální a integrální část. Byly taktéž použity dvě sériově zapojené kolony:

- kolona TSK GMPWXL , výrobce Tosoh Bioscience, Stuttgart, Německo,
- kolona Ultrahydrogel 250, výrobce Waters, Milford MA

PL – GPC 50 pojme až čtyři kolony dlouhé 300 mm. Přístup k nim je snadný, přes přední panel. Přístroj také obsahoval nástřikovou smyčku o objemu 100 μ l.



Obr. 10 Nástřikový ventil se smyčkou [41].

Výhoda chromatografu PL – GPC 50 spočívá v maximální flexibilitě – širokém výběru detektorů i kolon. Díky vyhřívání jsou podmínky stabilní, proto se zamezuje znehodnocení analýzy výkyvy teplot.

Příslušenství chromatografu:

- zásobní nádoba pro mobilní fázi, zásobní nádoba pro odpad
- degasér
- datová jednotka, výrobce Polymer Laboratories, Church Stretton, Velká Británie
- počítač se softwarem Cyrus
- syringe Gastight #1001, 1000 μ l, výrobce Hamilton – Bonaduz, Švýcarsko

Degasér (odplyňovač mobilní fáze) hraje při analýze důležitou roli. Může totiž odstranit většinu problémů vznikajících při chromatografické analýze. Odvzdušnění mobilní fáze

přináší výhody jako reprodukovatelné retenční časy, reprodukovatelnost objemu nástříku, stabilní průtok mobilní fáze, nízký šum základní linie (base line) [31].

5.1.2 Chemikálie

- dusičnan sodný (NaNO_3 p. a.), výrobce Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod
- azid sodný (NaN_3 p. a.), výrobce Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod
- acetonitril (CH_3CN), výrobce Fisher Scientific, UK Limited, Leicestershire
- destilovaná voda

5.1.3 Výběr mobilní fáze

Stanovení molární hmotnosti a distribuce molárních hmotností pomocí GPC u polymerů rozpustných ve vodných rozpouštědlech je často spojeno s obtížemi, protože se zde setkáváme s tzv. „non – size exclusion“ efektem, který ruší separaci makromolekul podle velikosti. GPC je technika založená na separaci molekul podle velikosti částice, která eluují se stejným retenčním objemem, musí mít stejnou velikost makromolekuly, aby bylo možno stanovit molární hmotnost sledovaného polymeru za pomoci kalibrační křivky sestavené z polymerních standardů, které se liší od analyzovaného vzorku. K „non – size exclusion“ efektům řadíme intermolekulární elektrostatické interakce mezi analyzovanou látkou a náplní kolony a adsorpci. Volbou vhodného rozpouštědla lze tyto vlivy potlačit [32].

Syntetické polymery (např. sulfonovaný polystyren), polyakrylamidy a některé přírodní polymery obsahují ve své struktuře aniontovou skupinu. Také stacionární fáze pro vodnou GPC mají na svém povrchu zbytkové aniontové skupiny, proto je eluce těchto aniontových polymerů ovlivněna iontovými exkluzními efekty. Tyto efekty jsou způsobeny elektrostatickými odpuzivými silami mezi aniontovými náplněmi a aniontovými polyelektrolyty a brání vstupu solutů do pórů náplně. Za účelem potlačení iontové exkluze je nutný přídavek neutrálních solí do vodné mobilní fáze nebo využití tlumivých roztoků jako mobilní fáze pro kontrolu pH. Avšak zvýšení iontové síly může způsobit zvětšení adsorpce. K potlačení adsorpce je možné zvolit přídavek malého množství organického rozpouštědla (ethanol, acetonitril) [3],[35].

5.1.4 Příprava mobilní fáze

Pro analýzu byla použita mobilní fáze o složení $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaNO}_3$, $0,2\% \text{ NaN}_3$ a $15\% \text{ acetonitril (ACN)}$ ve vodném roztoku. Mobilní fáze byla připravována kvůli její údržnosti po 500 ml .

Chemikálie byly navažovány na analytických vahách Denver Instrument SI 234A. Navážky chemikálií potřebné pro přípravu 500 ml mobilní fáze:



$$m = c \cdot V \cdot M$$

$$m = 0,1 \cdot 0,5 \cdot 84,995 [\text{g}]$$

$$m = 4,24075\text{g}$$

(26)



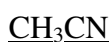
$500 \text{ ml} \sim 500 \text{ g}$

$500 \text{ g} \dots\dots\dots 100\%$

$x \text{ g} \dots\dots\dots 0,2\%$

$$x = 1 \text{ g}$$

(27)



$500 \text{ ml} \dots\dots\dots 85\%$

$x \text{ ml} \dots\dots\dots 15\%$

$$x = 88,2 \text{ ml}$$

(28)

Po smíchání a důkladném rozpuštění chemikálií byla pro zachování čistoty mobilní fáze přefiltrována přes filtrační kelímek s fritou.

5.1.5 Původ zkoumaného materiálu

Pro hydrolyzu a následnou analýzu byly použity pivovarské kvasnice. Kvasinky jsou jednobuněčné mikroorganismy, které zařazujeme do říše *Funghi*, třídy *Ascomycetes* a čeledi *Saccharomycetaceae*. Nejpoužívanější jsou *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *uvarum carlsbergensis* a *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *cerevisiae*. Metabolismus kvasinek je

z pivovarského hlediska hlavně přeměnou zkvasitelných cukrů na alkohol a oxid uhličitý za účasti enzymů a koenzymů [38].

Pivovarské kvasnice mají kromě své hlavní funkce v pivovarském výrobním procesu ještě význam jako zdroj různých biologicky cenných látek. Proto se užívají jak k léčebným účelům, tak i jako doplněk lidské výživy. Kromě bohatého obsahu dobře stravitelných bílkovin a sacharidů se ve srovnání s kvasnicemi jiného původu vyznačují vyšší koncentrací komplexu vitamínu B a rovněž ergosterolu. Dalšími biologicky významnými složkami pivovarských kvasnic jsou aminokyseliny, lecithin, cholin, glutathion, různé stopové prvky aj. Vzhledem k vysoké koncentraci stravitelných bílkovin (40 až 50%) jsou pivovarské kvasnice velmi cenným zdrojem doplňkové výživy.

Používání kvasnic k léčebným účelům bylo známé už ve starověku. Aplikují se především jako zdroj vitamínů skupiny B při nervových chorobách, při zánětlivých kožních onemocněních nebo při poruchách zažívacího traktu [39].

5.1.6 Použité vzorky

Pro analýzu byly použity vzorky uvedené v následující tabulce (Tab. 1). Je zde uvedeno i použité hydrolyzační činidlo a doba, po kterou byla hydrolyza prováděna. Pokud byly vzorky ve formě roztoku, byly bez zápachu, bezbarvé či mírně nažloutlé. Vzorky v pevné formě měly vzhled tenkého křehkého filmu, nažloutlé až oranžové a byly bez zápachu.

Tab. 1. Seznam použitých vzorků.

Označení vzorku	Hydrolyzační činidlo	Doba hydrolyzy [h]
A1	kyselina mléčná 1:5	2
A2	kyselina mléčná 1:5	4
A3	kyselina mléčná 1:5	6
A4	kyselina mléčná 1:5	8,5
A5	kyselina mléčná 1:5	24
A6	kyselina mléčná 1:5	48
B1	kyselina mléčná 1:10	2
B2	kyselina mléčná 1:10	4
B3	kyselina mléčná 1:10	6
B4	kyselina mléčná 1:10	8,5
B5	kyselina mléčná 1:10	24

Tab. 1. pokračování

B6	kyselina mléčná 1:10	48
C1	kyselina mléčná 2,5%	2
C2	kyselina mléčná 2,5%	4
C3	kyselina mléčná 2,5%	6
C4	kyselina mléčná 2,5%	8,5
C5	kyselina mléčná 2,5%	24
C6	kyselina mléčná 2,5%	48
D1	kyselina mléčná 5%	2
D2	kyselina mléčná 5%	4
D3	kyselina mléčná 5%	6
D4	kyselina mléčná 5%	8,5
D5	kyselina mléčná 5%	24
D6	kyselina mléčná 5%	48
E1	kyselina mléčná 10%	2
E2	kyselina mléčná 10%	4
E3	kyselina mléčná 10%	6
E4	kyselina mléčná 10%	8,5
E5	kyselina mléčná 10%	24
E6	kyselina mléčná 10%	48
HK/1	kyselina mléčná	10
HK/2	kyselina mléčná	8
HK/3	kyselina mléčná	1
HK/4	kyselina mléčná	5

5.2 Metody

5.2.1 Příprava vzorků

Základní podmínkou pro analýzu vzorku je jeho rozpustnost v mobilní fázi. Koncentrace roztoku odpovídala hodnotám 2 až 3 mg.ml⁻¹, proto navážka vzorku k rozpuštění v mobilní fázi váženého na analytických vahách měla hmotnost 10 až 15 mg. Vzorek byl kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 5 ml. Pokud vzorek obsahoval větší částice, které se hůře rozpouštěly, byly rozbity pomocí ultrazvuku (v ultrazvukové čističce PS 03000A).

Aby byla zajištěna naprostá čistota vzorku (opatření proti zanášení kolony), byl ještě přefiltrován přes filtr Chromatofil PET – 45/15 MS o velikosti pórů 45 μm (výrobce Marchrey – Nagel GmbH & Co. KG) do eppendorfkové zkumavky o objemu 2 ml. Takto připravený vzorek byl analyzován. Pro měření byly k dispozici i vzorky již ve formě roztoku. Tyto proto stačilo pouze přefiltrovat přes filtr Chromatofil a byly ihned k dispozici pro analýzu molární hmotnosti a distribuce molárních hmotností metodou gelové permeační chromatografie (GPC) na přístroji PL – GPC 50. Všechna měření byla z důvodu reprodukovatelnosti provedena dvakrát.

5.2.2 Nastavení přístroje

Některá nastavení přístroje jsou variabilní a přímo souvisí s analýzou. Nejdůležitějšími prvky byly průtok mobilní fáze kolonou a doba analýzy vzorku.

Průtok mobilní fáze byl nastaven 0,8 ml.min⁻¹ a celková doba analýzy 30 minut. Tlak pumpy, která vháněla mobilní fázi do kolony, se pohyboval mezi 3 až 4 MPa. Automatické vypnutí pro případ vysokého tlaku byla nastavena na 10 MPa. Teplota vyhřívané cely byla nastavena na 30 °C. Univerzální kalibrace pro vyhodnocování byla vytvořena za využití polysacharidových standardů – pullulanů s úzkou distribucí molárních hmotností. Rozmezí molárních hmotností bylo od 667 do 788.000 g.mol⁻¹ (výrobce Polymer Laboratories, Church Stretton, Velká Británie). Naměřená data byla zpracována pomocí programu Cirrus GPC Multi Detector Software (výrobce Polymer Laboratories, Church Stretton, Velká Británie).

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

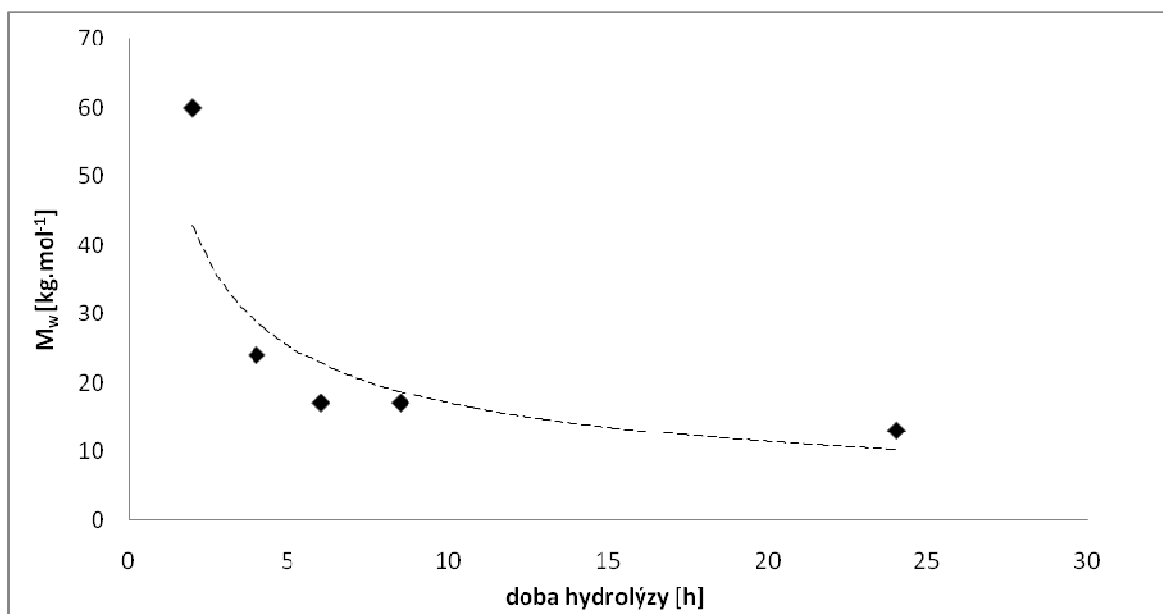
6.1 Naměřené hodnoty pro vzorky A1 – A6

Tyto analyzované vzorky byly dodány v roztoku. Pro vzorky s označením A1 – A6 jsou uvedeny naměřené hodnoty v následující tabulce (Tab. 2.). Pro vzorek A6 byly proteinové polymery pod hranicí detekovatelnosti.

Tab. 2. Seznam naměřených hodnot pro vzorky A1 – A6.

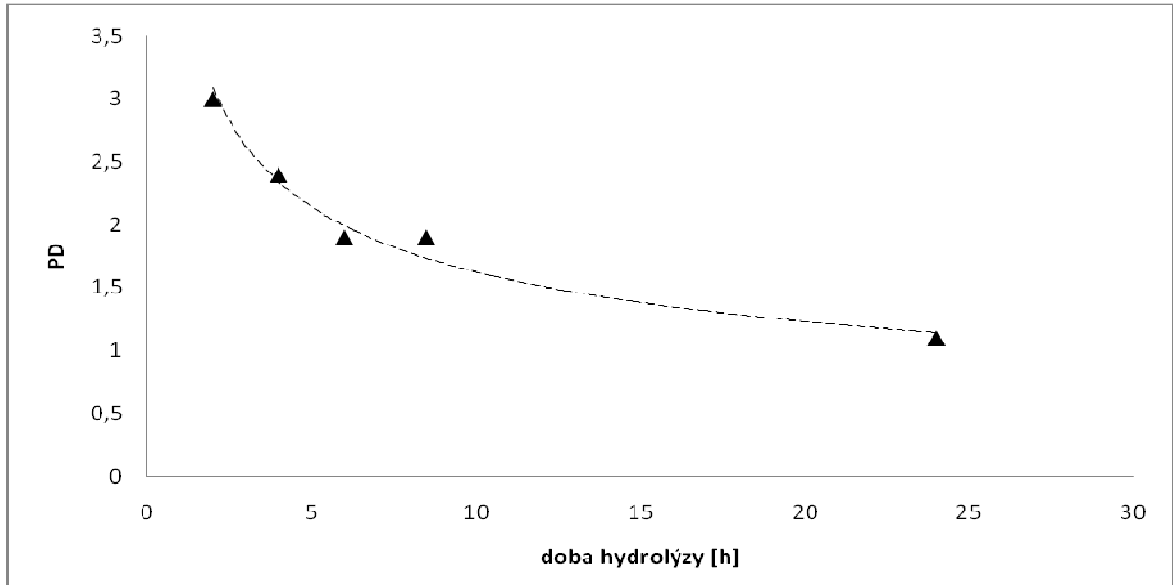
Označení vzorku	M_n [kg.mol ⁻¹]	M_w [kg.mol ⁻¹]	PD M_w/M_n
A1	20	60	3,0
A2	10	24	2,4
A3	9	17	1,9
A4	9	17	1,9
A5	12	13	1,1
A6	nedetekováno	nedetekováno	-

Připojený graf (Obr. 11.) vyjadřuje závislost hmotnostního středu molární hmotnosti na době hydrolýzy. Z grafu je patrné, že s rostoucí dobou hydrolýzy klesá molární hmotnost.



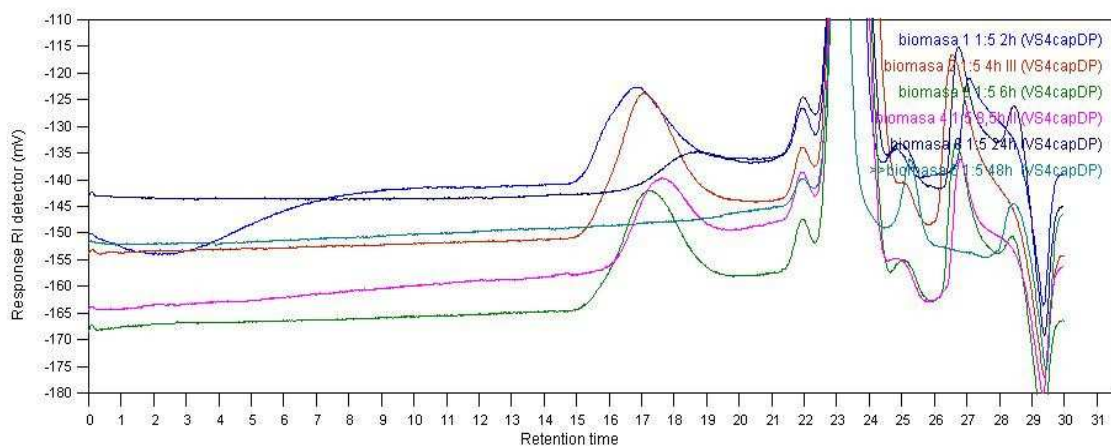
Obr. 11. Závislost M_w na době hydrolýzy pro vzorky A1 – A6.

Obr. 12 vyjadřuje závislost indexu polydisperzity (M_w/M_n) na době hydrolýzy. Výsledky analýzy ukazují, že se zvyšující se dobou hydrolýzy se snižoval i index polydisperzity. Nejnižší rozptyl hodnot PD byl zaznamenán u vzorku A5, s dobou hydrolýzy 24 hodin.



Obr. 12. Závislost indexu polydisperzity (PD) na době hydrolýzy pro vzorky A1 – A6.

Obr. 13. zachycuje signál viskozitního detektoru pro vzorky A1 – A6. Píky, které odpovídají hledaným polymerům, se nachází v oblasti retenčního času 14 až 20 minut. S rostoucím časem hydrolýzy dochází k posunům píků k vyššímu retenčnímu času, tedy k menší molární hmotnosti.



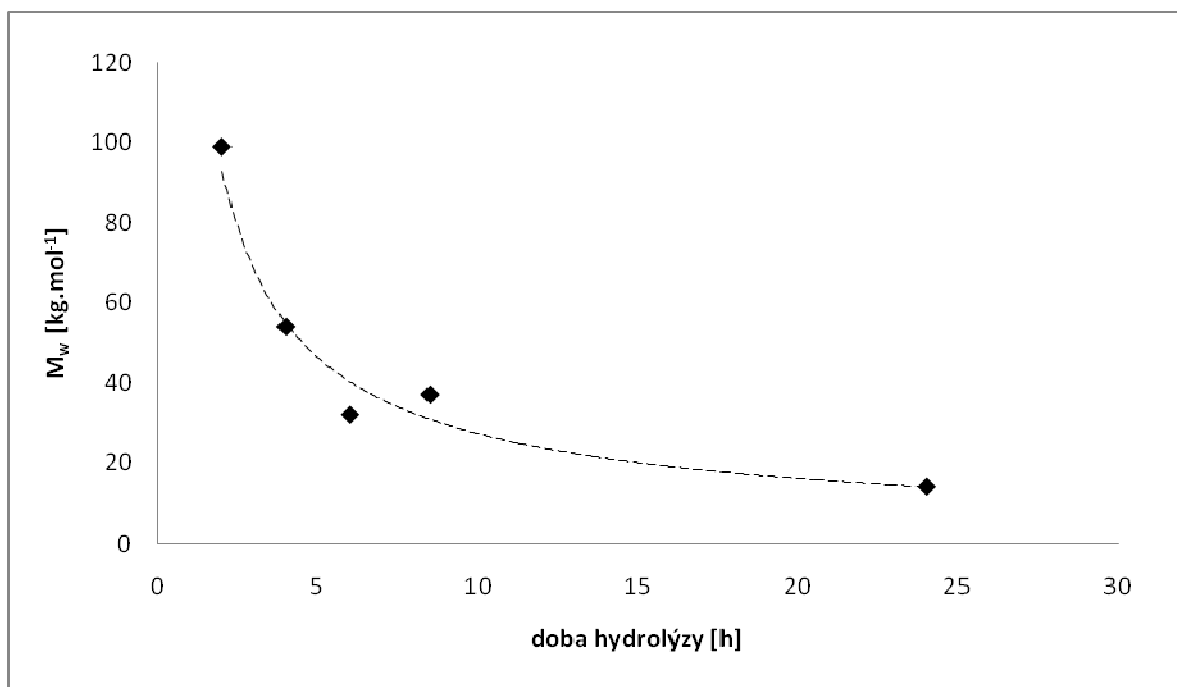
Obr. 13. Signál viskozitního detektoru pro vzorky A1 – A6.

6.2 Naměřené hodnoty pro vzorky B1 – B6

Vzorky s označením B1 – B6 nebyly dodány v pevném stavu, ale v roztoku. Výsledky pro tuto sérii vzorků jsou uvedeny v Tab. 3. Ve vzorku B6 bylo množství polymerů pod hranicí detekce. Následující graf (Obr. 14.) vyjadřuje závislost velikosti hmotnostního středu na době hydrolýzy.

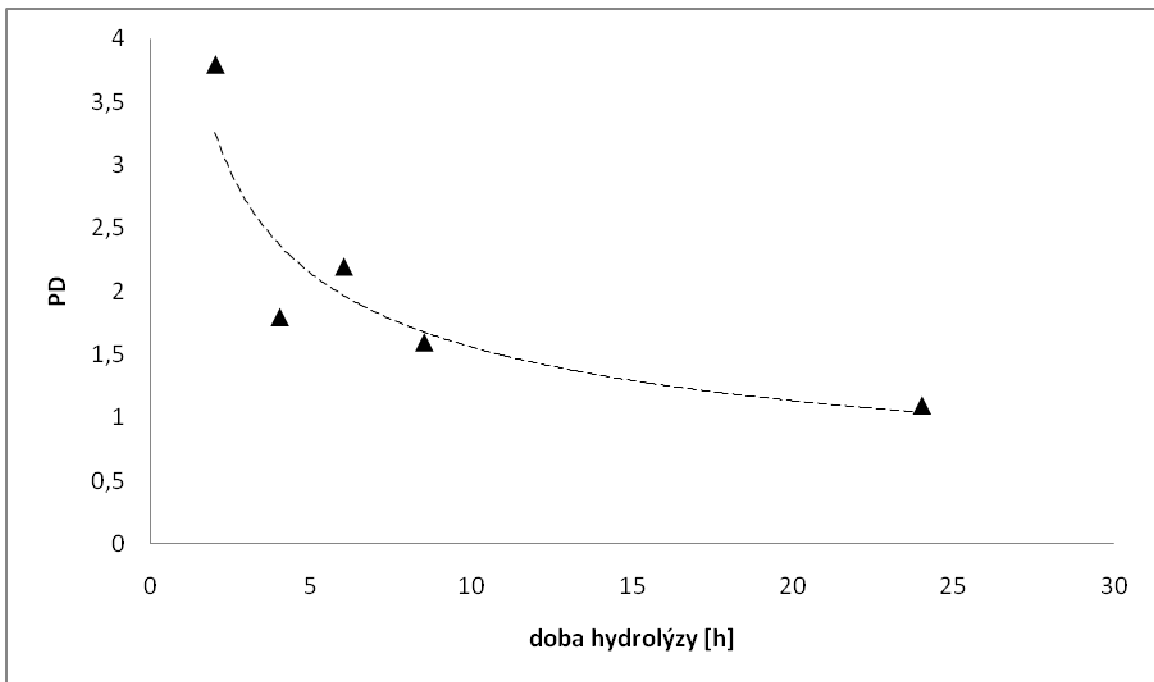
Tab. 3. Seznam naměřených hodnot pro vzorky B1 – B6.

Označení vzorku	M_n [kg.mol ⁻¹]	M_w [kg.mol ⁻¹]	PD M_w/M_n
B1	26	99	3,8
B2	29	54	1,8
B3	14	32	2,2
B4	24	37	1,6
B5	12	14	1,1
B6	nedetekováno	nedetekováno	-



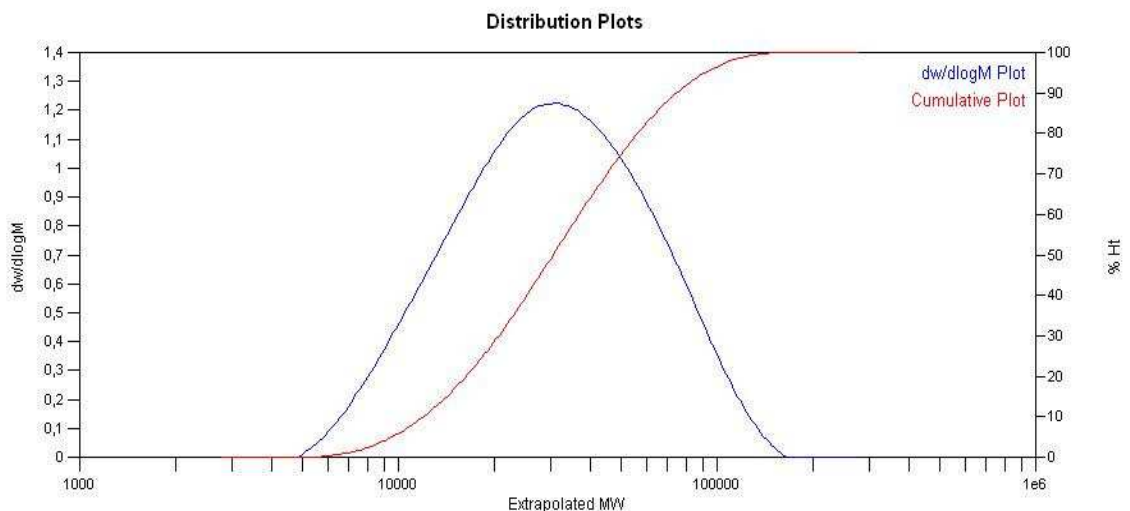
Obr. 14. Závislost hmotnostního středu molární hmotnosti na době hydrolýzy pro vzorky B1 – B5.

Následující graf (Obr. 15) zobrazuje závislost indexu polydisperzity na době hydrolýzy pro vzorky série B. S rostoucí dobou hydrolýzy klesá index polydisperzity.



Obr. 15. Závislost indexu polydisperzity (PD) na době hydrolýzy pro vzorky B1 – B5.

Obr. 16. popisuje průběh diferenciální a integrální distribuční křivky pro vzorek B4. Použití distribuční křivky je výhodné při stanovování změn struktury sledovaných vzorků. Obr. 16 je patrné, že distribuční křivka vykazuje nízkou variabilitu.



Obr. 16. Diferenciální a integrální distribuční křivka pro vzorek B4 (doba hydrolýzy 8,5 h).

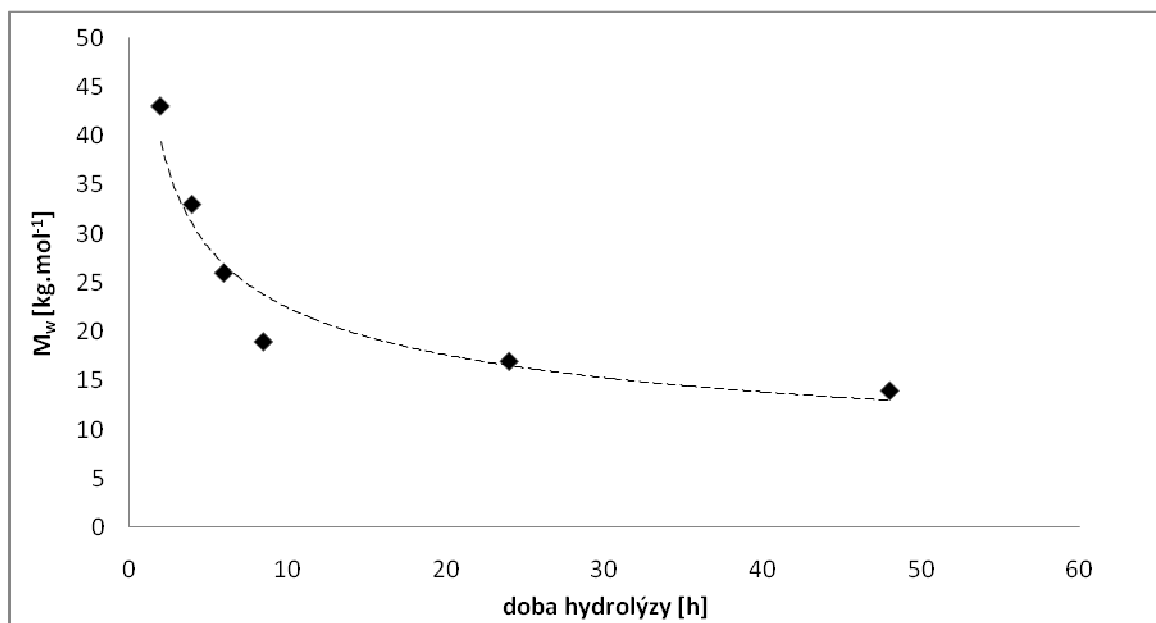
6.3 Naměřené hodnoty pro vzorky C1 – C6

Tyto vzorky byly ve formě pevné. Koncentrace roztoku odpovídala hodnotám 2 až 3 mg.ml⁻¹. Naměřené hodnoty pro tyto vzorky jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 4.). Všechny vzorky série C měli detekovanou oblast. Signály viskozitního a refraktometrického detektoru odpovídající proteinům jsou v oblasti retenčního času 15-20 minut.

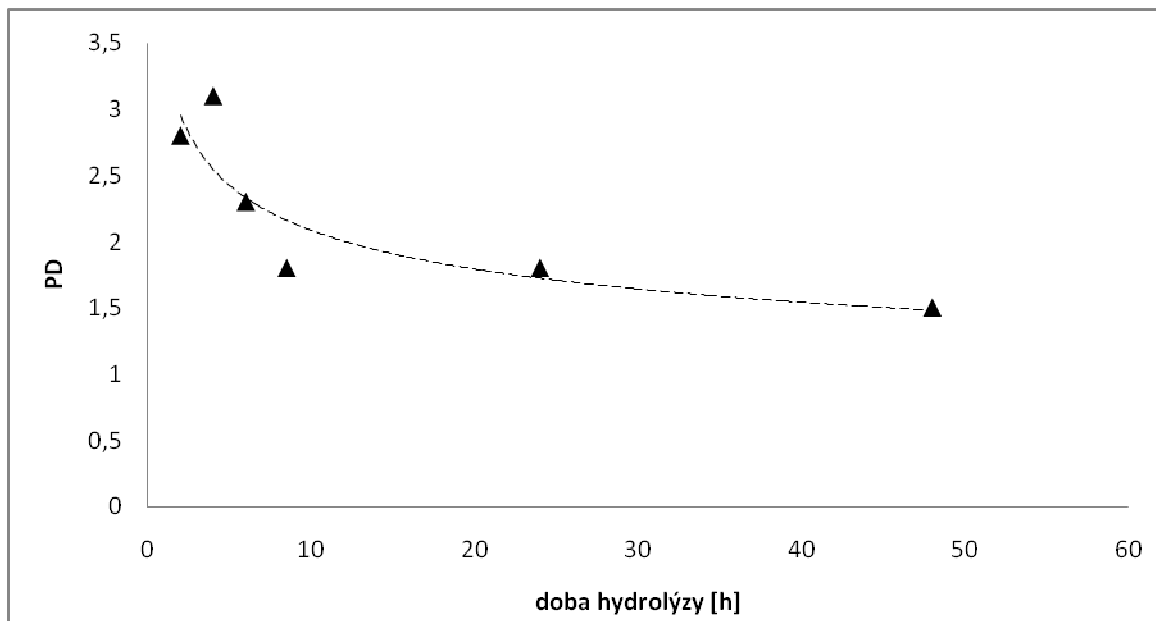
Tab. 4. Seznam naměřených hodnot pro vzorky C1 – C6.

Označení vzorku	M_n [kg.mol ⁻¹]	M_w [kg.mol ⁻¹]	PD M_w/M_n
C1	16	43	2,8
C2	11	33	3,1
C3	11	26	2,3
C4	10	19	1,8
C5	10	17	1,7
C6	9	14	1,5

Obr. 17 zobrazuje závislost hmotnostního středu molární hmotnosti na době hydrolýzy. Obr. 18 popisuje závislost indexu polydisperzity na době hydrolýzy pro vzorky C1 – C6. Z naměřených dat je patrné, že s rostoucí dobou hydrolýzy klesá také index polydisperzity.



Obr. 17. Závislost M_w na době hydrolýzy pro vzorky C1 – C6.



Obr. 18. Závislost indexu polydisperzity na době hydrolýzy pro vzorky C1 – C6.

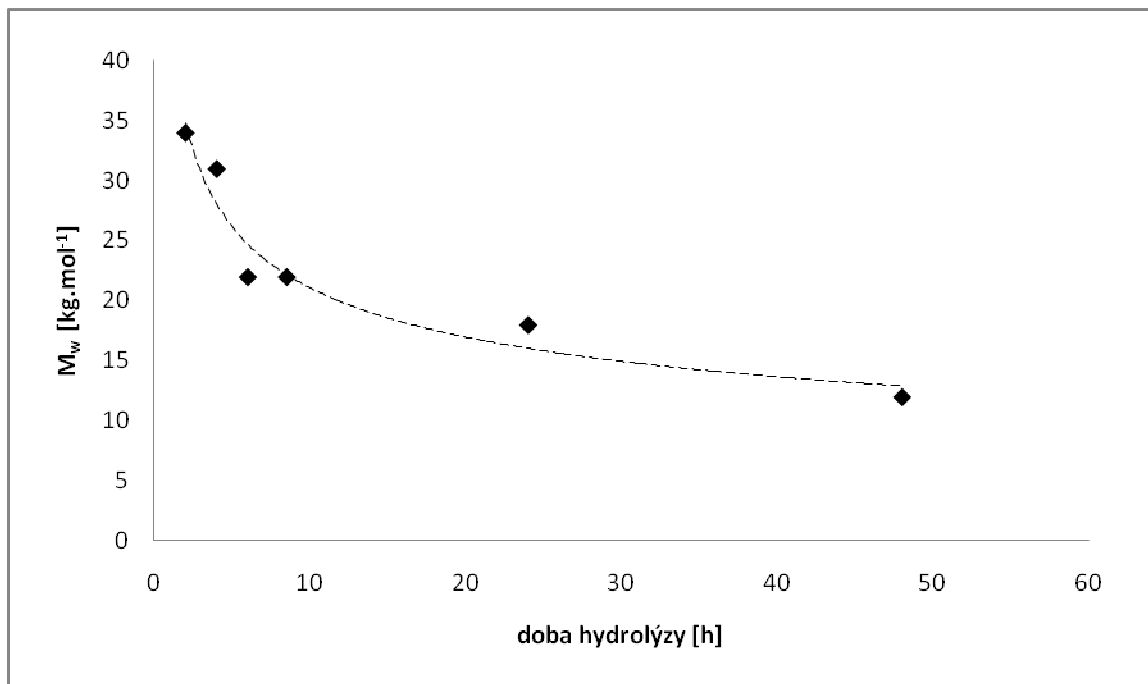
6.4 Naměřené hodnoty pro vzorky D1 – D6

Tyto vzorky byly v pevné formě, proto musely být převedeny do roztoku, jehož koncentrace odpovídala hodnotám 2 až 3 mg.ml⁻¹. Naměřené hodnoty pro tyto vzorky jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 5.).

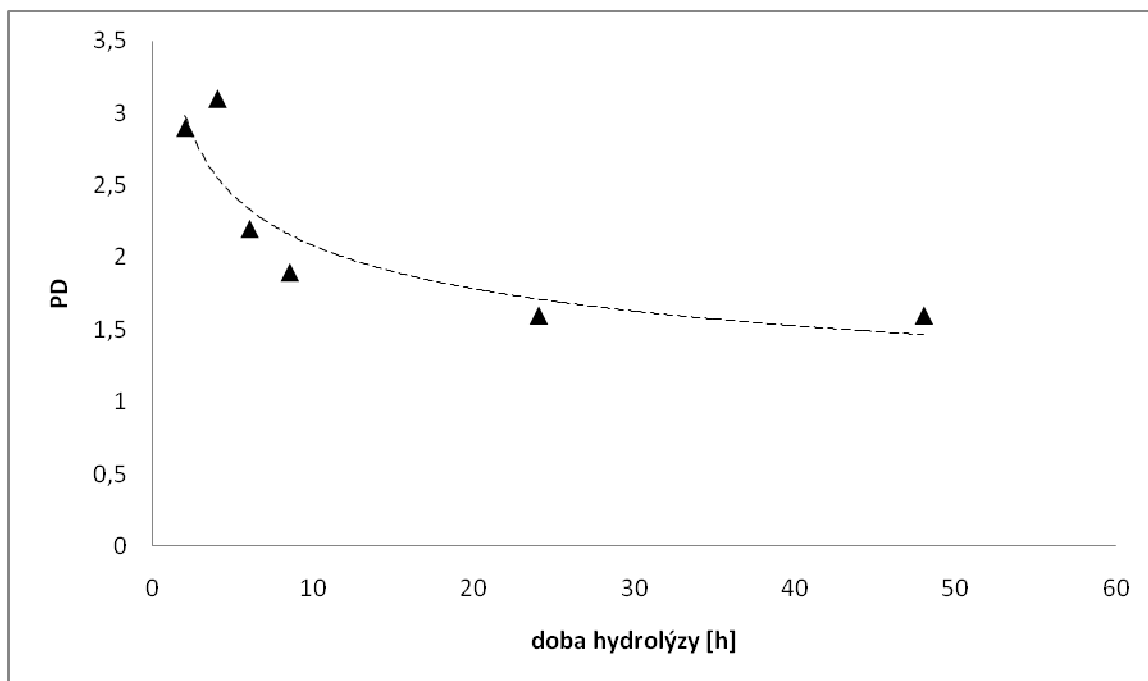
Tab. 5. Seznam naměřených hodnot pro vzorky D1 – D6.

Označení vzorku	M_n [kg.mol ⁻¹]	M_w [kg.mol ⁻¹]	PD M_w/M_n
D1	12	34	2,9
D2	10	31	3,1
D3	10	22	2,2
D4	11	22	1,9
D5	12	18	1,6
D6	8	12	1,6

Následující grafy (Obr. 19. a Obr. 20.) zachycují závislost hmotnostního středu molární hmotnosti a indexu polydisperzity na době hydrolýzy. Čím delší byla doba hydrolýzy, tím se snižovala molární hmotnost i index polydiperzity.



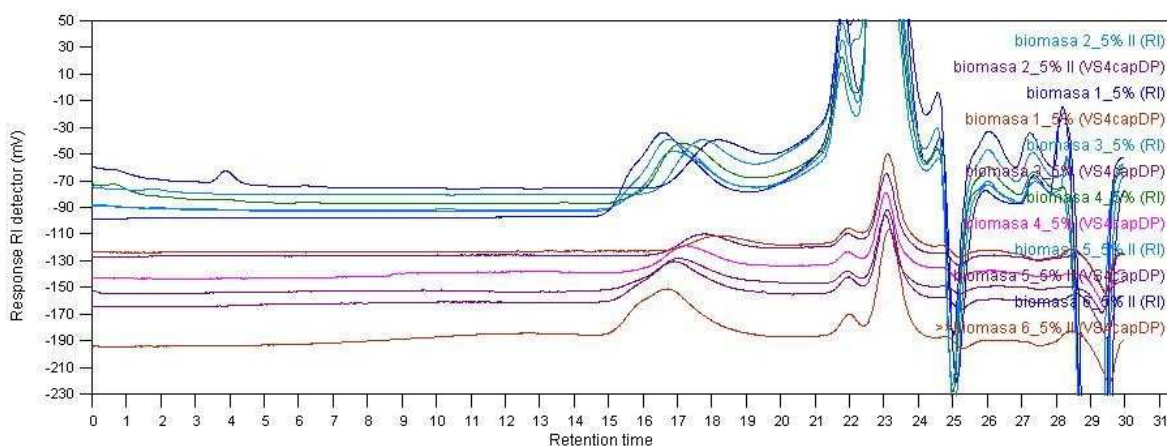
Obr. 19. Závislost hmotnostního středu molární hmotnosti na době hydrolýzy pro vzorky D1 – D6.



Obr. 20. Závislost indexu polydisperzity (PD) na době hydrolýzy pro vzorky D1 – D6.

Obr. 21. zachycuje signály viskozitního (DP) a refraktometrického (RI) detektoru. Píky odpovídající proteinům jsou v oblasti retenčního času 15-20 minut, s rostoucím časem hyd-

rolýzy dochází k posunům píků k vyššímu retenčnímu času, tedy k menší molární hmotnosti.



Obr. 21. Signály viskozitního a refraktometrického detektoru pro vzorky D1 – D6.

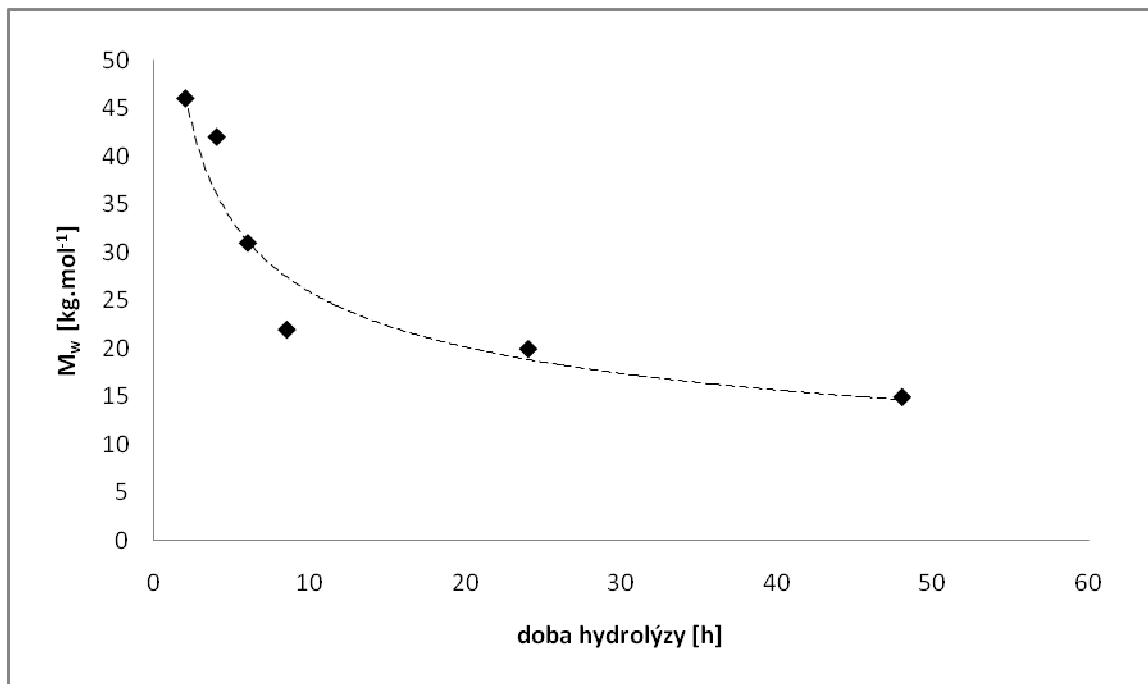
6.5 Naměřené hodnoty pro vzorky E1 – E6

Vzorky série E byly dodány v pevné formě. Filtrát hydrolyzátu měl nažloutlou barvu, snadno lámavou a křehkou strukturu. Výsledky analýzy jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 6.).

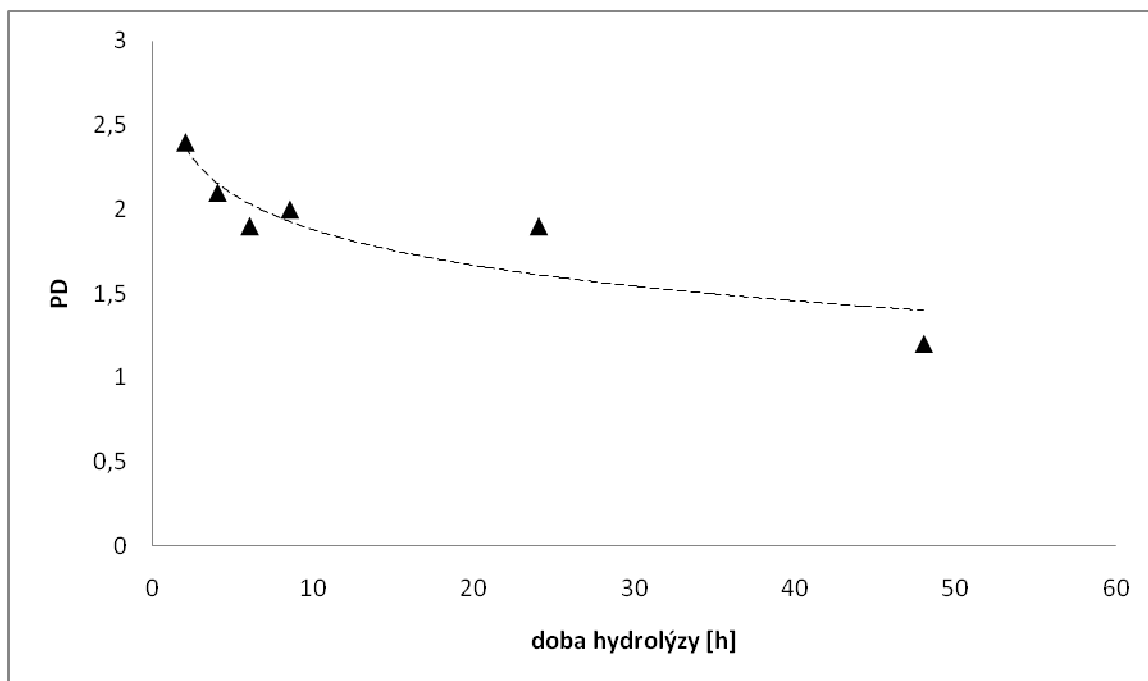
Tab. 6. Seznam naměřených hodnot pro vzorky E1 – E6.

Označení vzorku	M_n [kg.mol ⁻¹]	M_w [kg.mol ⁻¹]	PD M_w / M_n
E1	19	46	2,4
E2	20	42	2,1
E3	17	31	1,9
E4	11	22	2,0
E5	11	20	1,9
E6	12	15	1,2

Následující grafy (Obr. 22. a Obr. 23.) znázorňují závislost hmotnostního středu molární hmotnosti a indexu polydisperzity na době hydrolyzy. Čím delší byla doba hydrolyzy, tím se snižovala molární hmotnost i index polydisperzity.

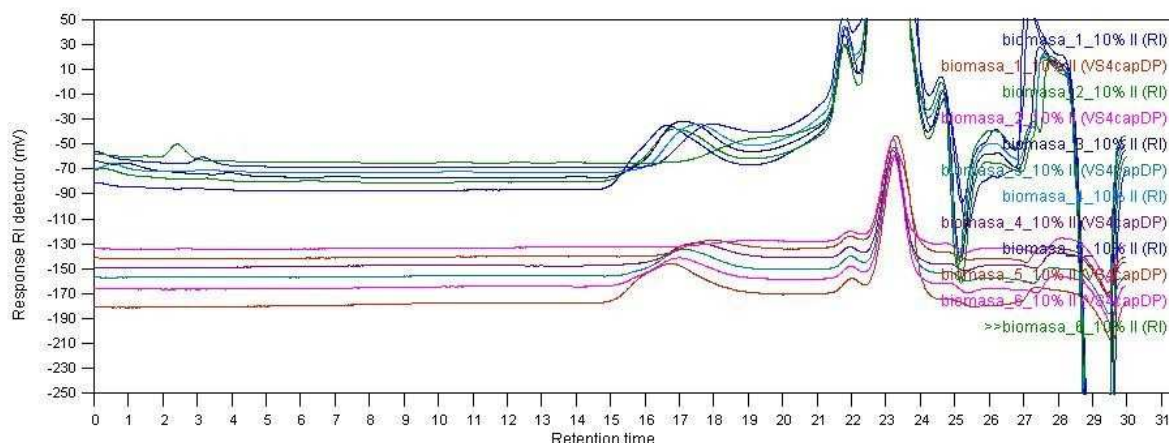


Obr. 22. Závislost hmotnostního středu molární hmotnosti na době hydrolýzy pro vzorky E1 – E6.



Obr. 23. Závislost indexu polydisperzity (PD) na době hydrolýzy pro vzorky E1 – E6.

Obr. 24 zachycuje signály viskozitního (DP) a refraktometrického (RI) detektoru. Píky odpovídající proteinům jsou v oblasti retenčního času 15-20 minut.



Obr. 24. Signály viskozitního a refraktometrického detektoru.

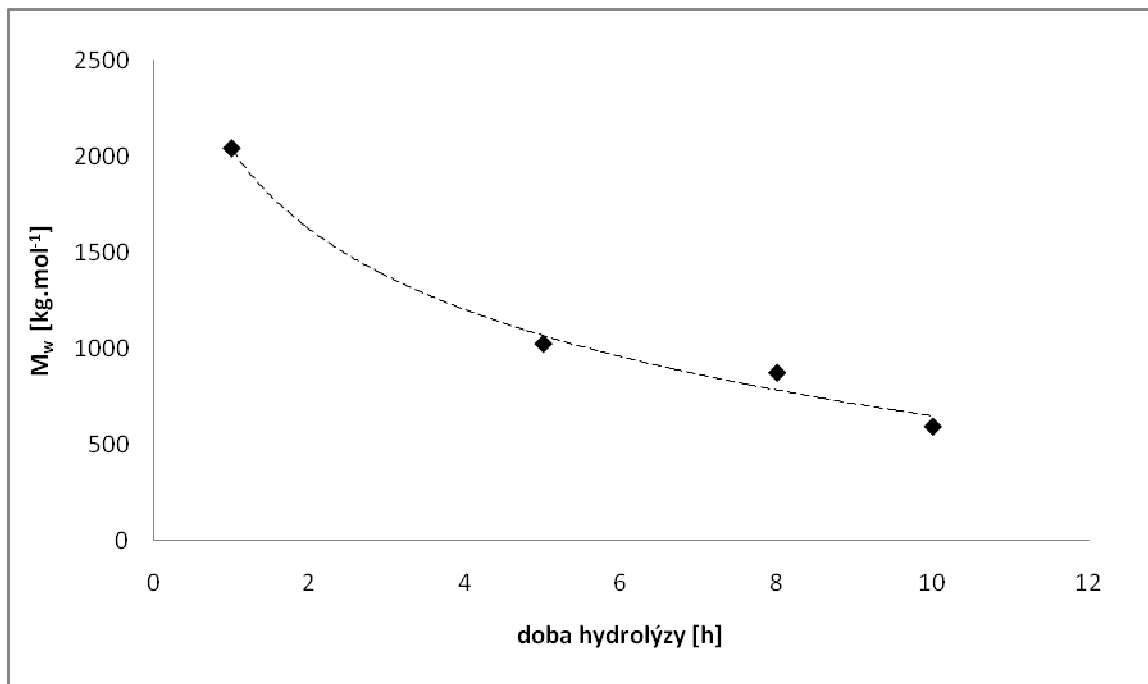
6.6 Naměřené hodnoty pro vzorky HK/1 –HK/4

Vzorky s označením HK byly z pevné formy převáděny do roztoku několik minut před analýzou. Koncentrace vzorku v roztoku odpovídala hodnotám 2 až 3 mg.ml⁻¹. Naměřené hodnoty pro tyto vzorky jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 7.). Signály viskozitního a refraktometrického detektoru pro hledané proteiny jsou v oblasti retenčního času 15-20 minut.

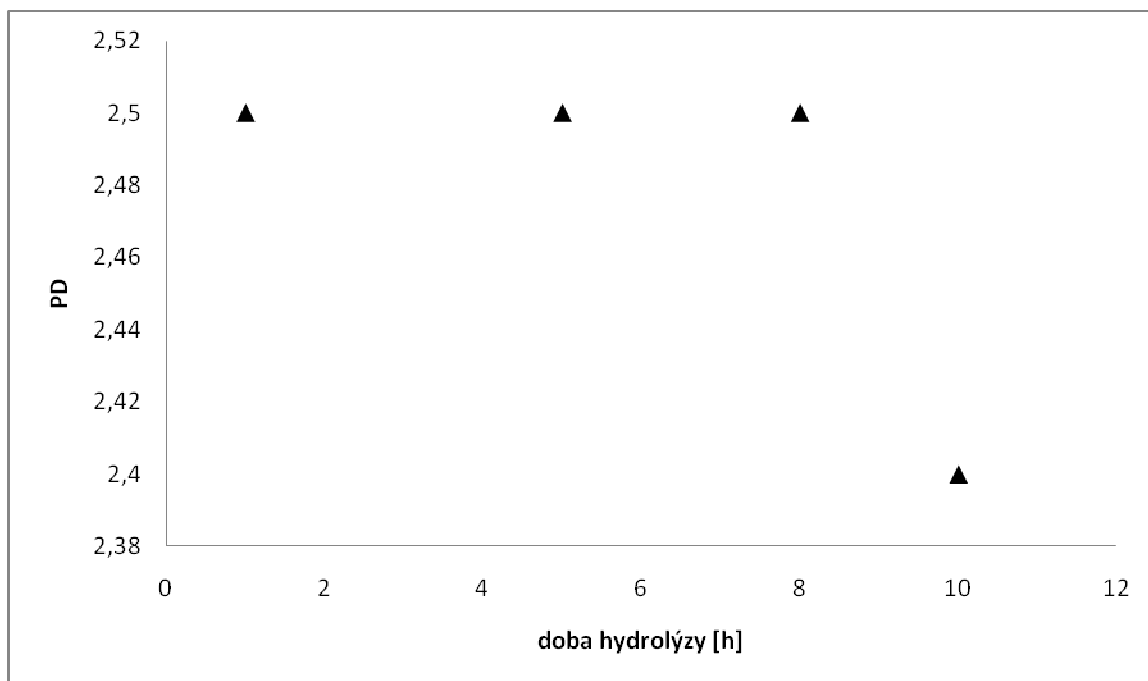
Tab. 7. Seznam naměřených hodnot pro vzorky HK/1 –HK/4.

Označení vzorku	M_n [kg.mol ⁻¹]	M_w [kg.mol ⁻¹]	PD M_w/M_n
HK/1	240	595	2,5
HK/2	355	875	2,5
HK/3	840	2040	2,4
HK/4	415	1025	2,5

Následující grafy (Obr. 25. a Obr. 26.) znázornují závislost hmotnostního středu molární hmotnosti a indexu polydisperzity na době hydrolyzy. S delší dobou hydrolyzy se snižoval index polydisperzity.



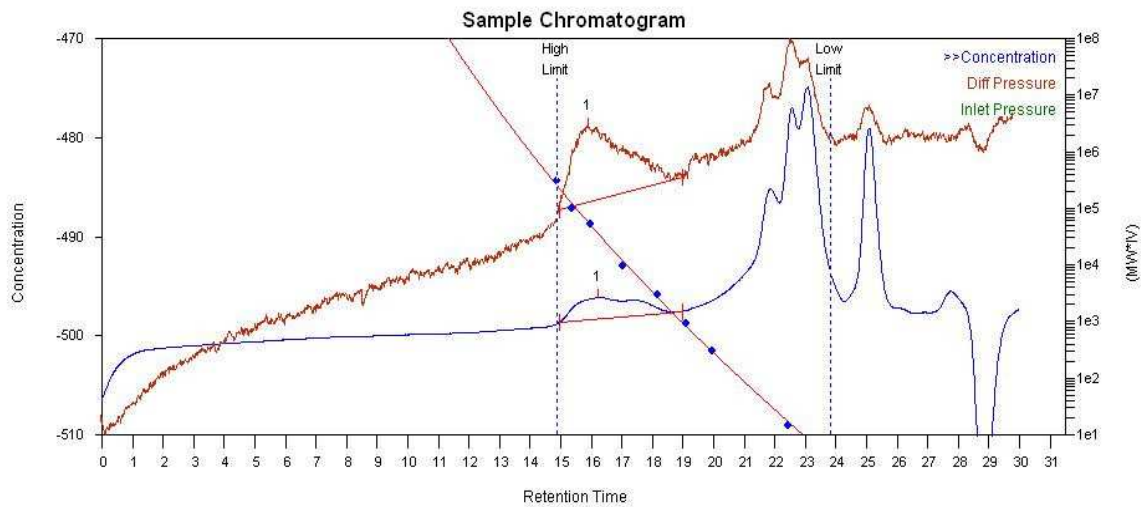
Obr. 25. Závislost hmotnostního středu molární hmotnosti na době hydrolýzy pro vzorky HK/1 –HK/4.



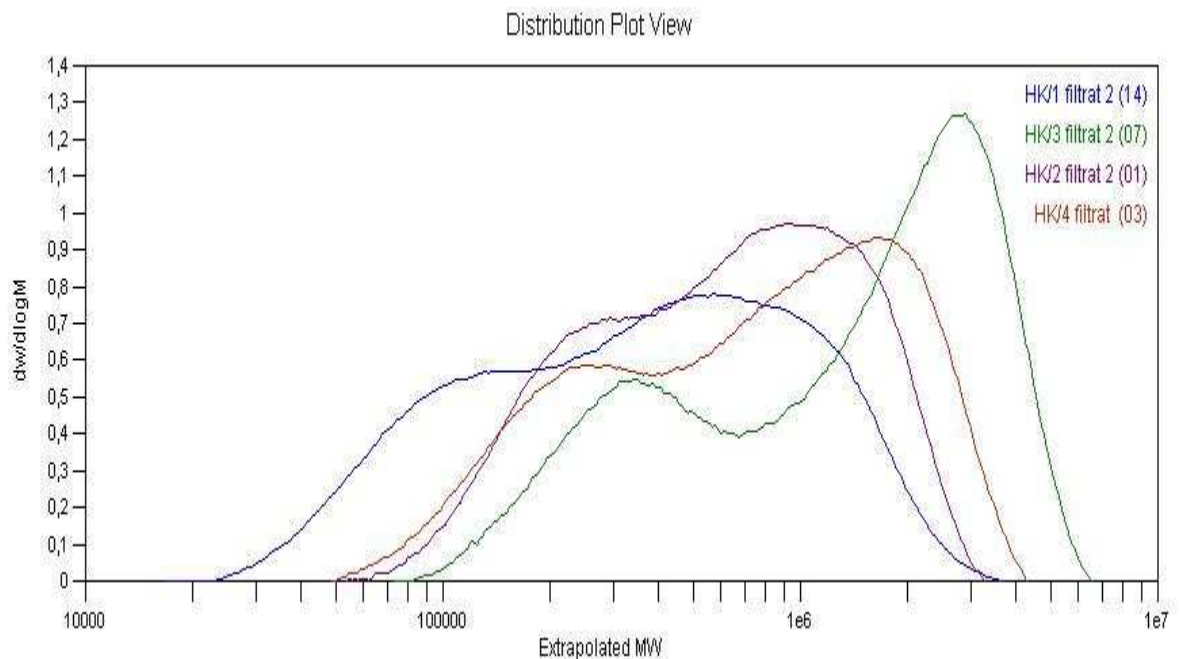
Obr. 26. Závislost indexu polydisperzity (PD) na době hydrolýzy pro vzorky HK/1 – HK/4.

Obr. 27. zobrazuje výsledný chromatogram vzorku HK/1 softwarem Cirrus. Retenční čas pro tento chromatogram se pohyboval v rozmezí 15 až 19 minut. Je zde i patrná křivka

univerzální kalibrace. Na Obr. 28 jsou znázorněny distribuční křivky pro vzorky HK/1 – HK/4. Na rozdíl od vzorku B4 (Obr. 16.) jsou křivky pro všechny čtyři vzorky bimodální.



Obr. 27. Signál viskozitního a koncentračního detektoru s označenými píky pro vzorek HK/1.



Obr. 28. Distribuční křivky pro vzorky HK/1 – HK/4.

V roce 2008 byla na Fakultě technologické UTB ve Zlíně provedena studie, která se zabývala charakterizací molekul o nízkých molárních hmotnostech kolagenových hydrolyzátů, které byly připraveny kombinací enzymatické a kyselého hydrolyzy s následnou analýzou

pomocí metody gelové permeační chromatografie. Práce prokázala, že molární hmotnost a její distribuce pro hydrolyzáty kolagenu jsou ovlivněny výběrem hydrolyzačního činidla a časem hydrolýzy [42].

ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývala zkoumáním proteinových hydrolyzátů kvasničné biomasy metodou gelové permeační chromatografie. Touto metodou byly stanoveny hmotnostní a číselné středy a index polydisperzity molárních hmotností zkoumaného materiálu, získaných kyselou hydrolyzou kyselinou mléčnou o různých koncentracích.

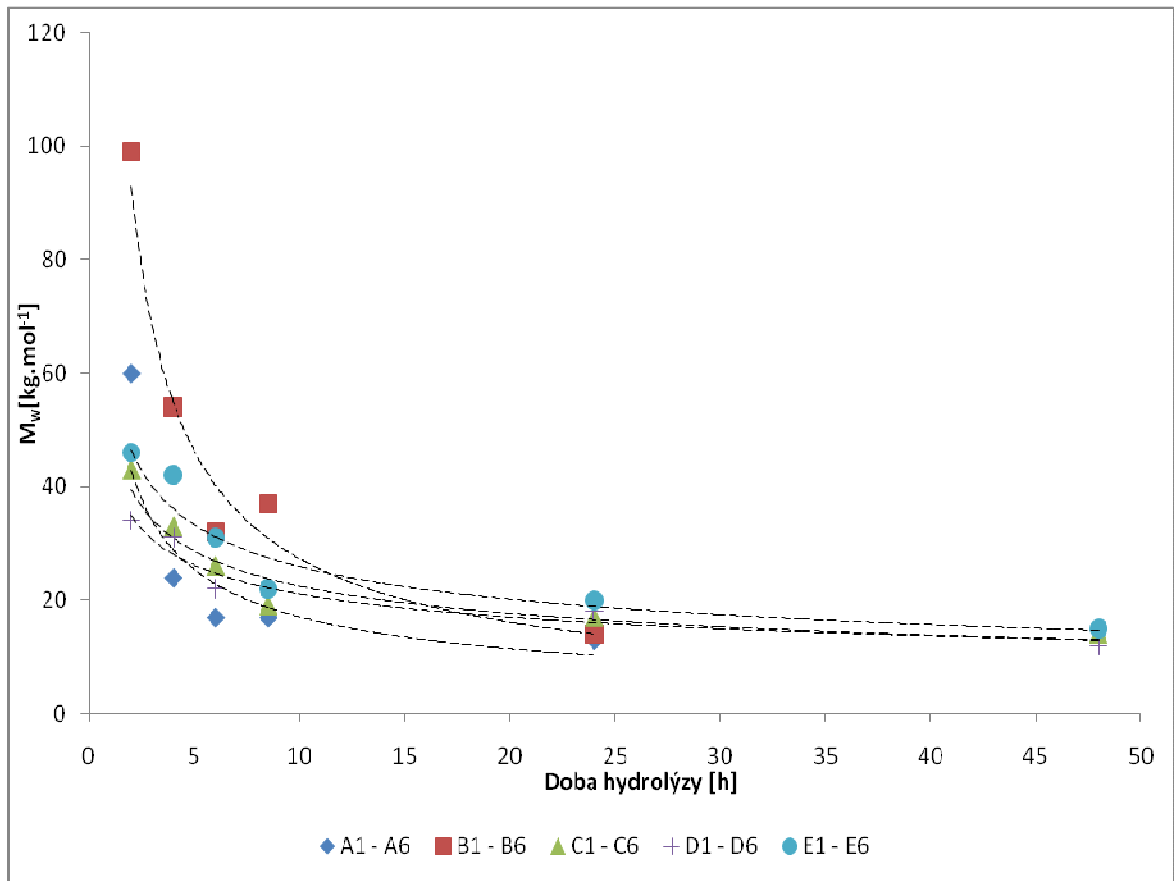
Teoretická část popisuje obecné chromatografické metody, blíže se zabývá metodou GPC a principy hydrolyzy.

Část praktická je zaměřena na experiment, který měl za cíl zjistit, jak doba hydrolyzy ovlivňuje hmotnostní středy molárních hmotností M_w , číselné středy molárních hmotností M_n , index polydisperzity PD a jejich distribuci.

Pro experiment bylo použito 34 vzorků. Ve vodě rozpustné filtráty hydrolyzátů kvasničné biomasy měly světle žlutou až sytě okrovou barvu, snadno lámavou a křehkou strukturu, byly bez zápachu.

Analýza vzorků proběhla pomocí GPC a k vyhodnocení naměřených dat byla použita metoda univerzální kalibrace. Univerzální kalibrační křivka byla vytvořena polysacharidovými pullulanovými standardy.

Souhrnný graf (Obr. 29.) a graf (Obr. 25.), kde jsou znázorněny vzorky HK/1 až HK/4 prokazují, že s rostoucí dobou hydrolyzy klesá i molární hmotnost. Z ostatních graficky znázorněných výsledků (Obr. 12, 15, 18, 20, 23, 26) je také patrné, že s delší dobou hydrolyzy klesá také index polydisperzity.



Obr. 29. Souhrnný graf závislosti molární hmotnosti na době hydrolýzy pro vzorky série A, B, C, D a E.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] DEAN, J. A. *Chemické dělicí metody*. 1. vydání. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1974. 402 s.
- [2] CROMPTON, T. R. *Polymer Reference Book*. Smithers Rapra Technology, 2006. 704 s. ISBN 978-1-85957-526-0.
- [3] MORI, S., BARTH, H. G. *Size exclusion chromatography*. Berlin: Springer, 1999. 234 s. ISBN 3-540-65635-9.
- [4] JANČA, J. *Microthermal field-flow fractionation: analysis of synthetic, natural, and biological macromolecules, and particles*. 1. vydání. New York: HNB Publishing, 2008. 247 s. ISBN 978-0-9728061-5-2.
- [5] JANČA, J. Separční mechanismy ve sterické exkluzní kapalinové chromatografii. In *Chemické listy*, svazek 78, 1984. s. 449-467.
- [6] STRIEGEL, A., YAU W. W., KIRKLAND, J. J., BLY, D. D. *Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography: Practice of Gel Permeation and Gel Filtration Chromatography*. 2. vydání. WileyBlackwell, 2009. 494 s. ISBN 978-0471201724.
- [7] WEIMER, B. C. *Improving the Flavour of Cheese*. Woodhead Publishing, 2007. 620 s. ISBN 978-0-8493-9158-3.
- [8] BROŽOVÁ, E. *Třístupňová enzymatická hydrolyza manipulačních usňových odpadů*. Diplomová práce. FT UTB Zlín, 2003.
- [9] MILNE, I., RITCHIE, R. O., KARIHALOO, B. *Comprehensive Structural Integrity*. Elsevier, 2003. 5052 s. ISBN 978-0-08-049073-1.
- [10] *Dictionary of Food Science and Technology*. International Food Information Service (IFIS Publishing), 2005. 413 s. ISBN 978-1-4051-2505-5.
- [11] DETERMANN, H. *Gelová chromatografie*. Praha: Academia, 1972. 218 s.
- [12] CREIGHTON T. C. *Encyclopedia of Molecular Biology*. Wiley, 1995. 1192 s. ISBN 978-0865426214.
- [13] MCNAUGHT, A. D., WILKINSON A. *Compendium of Chemical Technology*. 2. vydání. Blackwell Science, 1997. 464 s. ISBN 0865426848.
- [14] CAZES, J. *Encyclopedia of chromatography*. New York: Marcel Dekker, 2001. 928 s. ISBN 0-8247-0511-4.
- [15] PATNAIK, P. *Dean's Analytical Chemistry Handbook*. 2. vydání. McGraw-Hill, 2004. 1143 s. ISBN 978-1-60119-260-8.

- [16] KOLESKE, J. V. *Paint and Coating Testing Manual: Fourteenth Edition of the Gardner-Sward Handbook*. ASTM International, 1995. 925 s. ISBN 978-0-8031-2060-0.
- [17] MATHIOWITZ, E. *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*. 2. vydání. John Wiley & Sons, 1999. 1120 s. ISBN 978-1-59124-744-9.
- [18] STOJASPAL, R. *Aplikace gelové permeační chromatografie pro charakterizaci biopolymerů*. Bakalářská práce. FT UTB Zlín, 2007.
- [19] BRANDRUP, J., IMMERGUT, E. H., GRULKE, E. A., AKIHIRO, A., BLOCH, D. R. *Polymer Handbook*. John Wiley & Sons, 1995. 2336 s. ISBN 978-1-59124-883-5.
- [20] Dostupný z WWW: <<http://www.britannica.com/Ebchecked/topic/22506/analysis/80786/Chromatography#ref=ref621110>> [cit. 20. 03. 2010].
- [21] Dostupný z WWW: <http://www.malvern.com/LabEng/technology/gel_permeation_chromatography_theory/refractive_index_detector_gpc_theory.htm> [cit. 23. 03. 2010].
- [22] Dostupný z WWW: <http://www.malvern.com/LabEng/technology/gel_permeation_chromatography_theory/viscometer_detector_theory.htm> [cit. 23. 03. 2010].
- [23] Dostupný z WWW: <http://www.malvern.com/LabEng/technology/gel_permeation_chromatography_theory/conventional_calibration_gpc_theory.htm> [cit. 23. 03. 2010].
- [24] Dostupný z WWW: <http://www.malvern.com/LabEng/technology/gel_permeation_chromatography_theory/universal_calibration_gpc_theory.htm> [cit. 23. 03. 2010].
- [25] Dostupný z WWW: <<http://www.iupac.org/goldbook/M03706.pdf>> [cit. 24. 03. 2010].
- [26] Dostupný z WWW: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/markova-houwinkova_rovnice.html> [cit. 24. 03. 2010].
- [27] LEWIS, R. J., Sr. *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*. 15. vydání. John Wiley & Sons, 2007. 1383 s. ISBN 978-0-471-76865-4.
- [28] Dostupné z WWW: <http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/ana/A03.pdf> [cit. 26. 03. 2010].
- [29] Dostupné z WWW: <http://www.dataapex.co.uk/images/extensions/w-chromatogram-gpc-broad-na.gif> [cit. 28. 03. 2010].

- [30] Dostupné z WWW: <http://www.polygen.com.pl/viscotek/img/gpc_columns.jpg> [cit. 28. 03. 2010].
- [31] Dostupné z WWW: <<http://www.hplc.cz/Tip/degassing.htm>> [cit. 17. 04. 2010]
- [32] PECHÁČKOVÁ, M. *Charakterizace hydrolyzátů kolagenu pomocí gelové permeační chromatografie s refraktometrickou a viskozitní detekcí*. Diplomová práce. FT UTB Zlín, 2008.
- [33] ŠIMEK, L., HRNČIŘÍK, J. *Fyzikální chemie II*. 3. vydání. UTB – Academia centrum Zlín, 2005. 96 s. ISBN 80-7318-325-0.
- [34] Dostupné z WWW: <http://www.jasoint.co.jp/asia/products/chromatography/sfe_sfc/image/pfpe_gprah_02.gif> [cit. 20. 04. 2010].
- [35] STOJASPAL, R. *Stanovení molární hmotnosti a distribuce molárních hmotností želatiny pomocí gelové permeační chromatografie*. Diplomová práce. FT UTB Zlín, 2009.
- [36] YADA, R. Y. *Proteins in Food Processing*. Woodhead Publishihg, 2004. 728 s. ISBN 978-1-59124-928-3.
- [37] FLICKINGER, M. C., DREW, S. W., *Encyclopedia of Bioprocess Technology – Fermentation, Biocatalysis, and Separation, Volumes 1-5*. John Wiley & Sons, 1999. 2896 s. ISBN 978-0-471-13822-8.
- [38] KOSAŘ, K., PROCHÁZKA, S. *Technologie výroby sladu a piva*. VÚPS Praha, 2000. ISBN 80-902658-6-3.
- [39] BENDO VÁ, O., KAHLER, M. *Pivovarské kvasinky*. SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1981. 272 s.
- [40] Dostupné z WWW: < http://www.malvern.com/LabEng/technology/gel_permeation_chromatography_theory/separations_theory.htm> [cit. 20. 04. 2010]
- [41] Dostupné z WWW: < <http://www.basinc.com/products/ec/injectors.html> > [cit. 20. 04. 2010].
- [42] KAŠPÁRKOVÁ, V., KOLOMAZNÍK, K., BURKETOVÁ, L., ŠAŠEK V, ŠIMEK, L. Characterization of Low – molecular Weight Collagen Hydrolysates prepared by Combination of Enzymatic and Acid Hydrolysis. In *The Journal of The American Leather Chemists Association*, Volume 104 (2), 2009. s. 46-51.
- [43] Dostupné z WWW: <http://www.fikrahtechonology.com.my/v1/?view=products&partner=PL> [cit. 20. 04. 2010].

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

$[A]_m$	koncentrace rozpuštěné látky A v mobilní fázi
$[A]_s$	koncentrace rozpuštěné látky A ve stacionární fázi
$[\eta]$	limitní viskozitní číslo
a	konstanta pro Mark – Houwinkovu rovnici
A	maximální průměr kužele
ACN	acetonitril
c_m	množství látky rozpuštěné v mobilní fázi
c_s	množství látky rozpuštěné ve stacionární fázi
d_i	průměr molekuly
GC	plynová chromatografie
GPC	gelová permeační chromatografie
H^+	vodíkový kationt
H_2O	voda
h_i	výška píku
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
I	index polydisperzity
k	konstanta úměrnosti
K_D	rozdělovací konstanta
K	konstanta pro Mark – Houwinkovu rovnici
K_A	disociační konstanta slabé kyseliny
K_B	disociační konstanta slabé zásady
K_h	konstanta hydrolyzy
K_{SEC}	distribuční koeficient
K_v	iontový součin vody,
l	délka kapiláry
L	délka kolony
LC	kapalinová chromatografie
M	molární hmotnost polymeru
M_i	molární hmotnost molekuly
M_n	číselný střed molární hmotnosti
M_w	hmotnostní střed molární hmotnosti

MWD	distribuce molárních hmotností
M_z	z – průměr molárních hmotností
M_η	viskozitní střed molární hmotnosti
NaN_3	azid sodný
NaNO_3	dusičnan sodný
n_i	počet molekul
OH^-	hydroxydový aniont
PD	index polydisperzity
R	efektivní poloměr dělené makromolekuly (pro výpočet retenčního objemu)
R	plynová konstanta (pro výpočet termodynamické rovnováhy)
r	poloměr pórů
R	retardační faktor
R_F	poměr vzdáleností dosažených rozpuštěnou látkou a mobilní fází
R_i	efektivní poměr dělené molekuly
RI	refraktometrický
SEC	sterická exkluzní chromatografie
T	absolutní teplota
THF	tetrahydrofuran
t_m	čas, po který zůstává látka v mobilní fázi
t_R	retenční čas
t_s	čas, po který zůstává látka ve stacionární fázi
u	lineární průtoková rychlost
UV	ultrafialový
V_0	objem externích obalových materiálů
V_e	eluční objem
V_G	objem náplně kolony
V_i	objem pórů
V_m	objem mobilní fáze
V_{\max}	retenční objem
V_R	retenční objem
V_s	objem stacionární fáze
w_i	hmotnostní koncentrace

w_i	hmotnostní zlomek (pro rovnici 16)
γ'	funkce tvaru distribuce makromolekuly
ΔH°	změna enthalpie
ΔS°	změna entropie
σ	rozdělovací koeficient rozpuštěné látky

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Chromatogram z GPC [34].</i>	16
<i>Obr. 2 Gelový permeační chromatograf, výrobce Polymer Laboratories [43].</i>	17
<i>Obr. 3. Separační mechanismus GPC[40].</i>	18
<i>Obr. 4. Chromatografické kolony [30].</i>	23
<i>Obr. 5. Schéma refraktometrického detektoru [21].</i>	24
<i>Obr. 6. Schéma viskozitního detektoru [22].</i>	26
<i>Obr. 7. Kalibrační závislost molární hmotnosti na retenčním objemu pomocí přímé kalibrace úzkými frakcemi [23].</i>	27
<i>Obr. 8. Vyhodnocení chromatogramu pomocí univerzální kalibrace [29].</i>	27
<i>Obr. 9. Benoitova křivka univerzální kalibrace [35].</i>	28
<i>Obr. 10 Nástříkový ventil se smyčkou [41].</i>	35
<i>Obr. 11. Závislost M_w na době hydrolýzy pro vzorky A1 – A6.</i>	41
<i>Obr. 12. Závislost indexu polydisperzity (PD) na době hydrolýzy pro vzorky A1 – A6.</i>	42
<i>Obr. 13. Signál viskozitního detektoru pro vzorky A1 – A6.</i>	42
<i>Obr. 14. Závislost hmotnostního středu molární hmotnosti na době hydrolýzy pro vzorky B1 – B5.</i>	43
<i>Obr. 15. Závislost indexu polydisperzity (PD) na době hydrolýzy pro vzorky B1 – B5.</i>	44
<i>Obr. 16. Diferenciální a integrální distribuční křivka pro vzorek B4 (doba hydrolýzy 8,5 h).</i>	44
<i>Obr. 17. Závislost M_w na době hydrolýzy pro vzorky C1 – C6.</i>	45
<i>Obr. 18. Závislost indexu polydisperzity na době hydrolýzy pro vzorky C1 – C6.</i>	46
<i>Obr. 19. Závislost hmotnostního středu molární hmotnosti na době hydrolýzy pro vzorky D1 – D6.</i>	47
<i>Obr. 20. Závislost indexu polydisperzity (PD) na době hydrolýzy pro vzorky D1 – D6.</i>	47
<i>Obr. 21. Signály viskozitního a refraktometrického detektoru pro vzorky D1 – D6.</i>	48
<i>Obr. 22. Závislost hmotnostního středu molární hmotnosti na době hydrolýzy pro vzorky E1 – E6.</i>	49
<i>Obr. 23. Závislost indexu polydisperzity (PD) na době hydrolýzy pro vzorky E1 – E6.</i>	49
<i>Obr. 24. Signály viskozitního a refraktometrického detektoru.</i>	50
<i>Obr. 25. Závislost hmotnostního středu molární hmotnosti na době hydrolýzy pro vzorky HK/1 – HK/4.</i>	51

<i>Obr. 26. Závislost indexu polydisperzity (PD) na době hydrolýzy pro vzorky HK/1 – HK/4.</i>	<i>51</i>
<i>Obr. 27. Signál viskozitního a koncentračního detektoru s označenými píky pro vzorek HK/1.</i>	<i>52</i>
<i>Obr. 28. Distribuční křivky pro vzorky HK/1 – HK/4.</i>	<i>52</i>
<i>Obr. 29. Souhrnný graf závislosti molární hmotnosti na době hydrolýzy pro vzorky série A, B, C, D a E.</i>	<i>55</i>

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Seznam použitých vzorků.</i>	38
<i>Tab. 2. Seznam naměřených hodnot pro vzorky A1 – A6.</i>	41
<i>Tab. 3. Seznam naměřených hodnot pro vzorky B1 – B6.</i>	43
<i>Tab. 4. Seznam naměřených hodnot pro vzorky C1 – C6.</i>	45
<i>Tab. 5. Seznam naměřených hodnot pro vzorky D1 – D6.</i>	46
<i>Tab. 6. Seznam naměřených hodnot pro vzorky E1 – E6.</i>	48
<i>Tab. 7. Seznam naměřených hodnot pro vzorky HK/1 –HK/4.</i>	50