

# **Charakterizace hydrolyzátů kolagenu pomocí gelové permeační chromatografie s refraktometrickou a vizkozitní detekcí**

Bc. Michaela Pecháčková

---

Diplomová práce  
2008



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav potravinářského inženýrství

akademický rok: 2007/2008

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Michaela PECHÁČKOVÁ**  
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**  
  
Téma práce: **Charakterizace hydrolyzátů kolagenu pomocí gelové permeační chromatografie s refraktometrickou a viskozitní detekcí**

Zásady pro vypracování:

**Teoretická část bude zaměřena na**

- 1. Kolagen (obecné, fyzikální a chemické vlastnosti).**
- 2. Hydrolyzáty kolagenu (příprava pomocí kyselé, alkalické a enzymatické hydrolýzy).**
- 3. GPC (popis metody, princip separace, přístroj).**

**Experimentální část obsahuje**

- 1. Informace o použitých vzorcích a jejich přípravě.**
- 2. Podmínky měření, zpracování dat, kalibrační standardy a kalibraci GPC.**
- 3. Souhrn výsledků, jejich diskusi a závěr.**

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

1. BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M.: Gélová chromatografie, Bratislava: VEDA, 1983
2. VELÍŠEK, J.: Chemie potravin 1, Osis Tábor, 1999
3. BLAŽEJ, A., DEYL, Z., ADAM, M., GALATÍK, A., MICHLÍK, I., SMEJKAL, P.: Štruktúra a vlastnosti vláknitých bielkovin, Bratislava: VEDA, 1978
4. BLAŽEJ, A., GALATÍK, A., GALATÍK, J., MLÁDEK, M.: Technologie kůže a kožešin, Praha: SNTL, 1984

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Věra Kašpárková, CSc.**  
Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání diplomové práce: **20. listopadu 2007**

Termín odevzdání diplomové práce: **31. května 2008**

Ve Zlíně dne 2. května 2008

  
doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.  
děkan



  
prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.  
vedoucí katedry

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce se zabývá studiem vlivu enzymatické hydrolýzy na změny molární hmotnosti a distribuce molárních hmotností kolagenových hydrolyzátů. Ke sledování těchto změn byla použita gelová permeační chromatografie s refraktometrickou a viskozitní detekcí. Hydrolyzáty byly připraveny z odpadních kolagenových střívek za použití proteolytického enzymu alkalázy. Byly určeny i optimální podmínky hydrolýzy pokud jde o teplotu, koncentraci enzymu a dobu hydrolýzy. Rovněž byl diskutován vliv těchto proměnných na změny molární hmotnost a distribuce molárních hmotností hydrolyzátů.

Klíčová slova: kolagen, hydrolyzáty kolagenu, gelová permeační chromatografie

## **ABSTRACT**

In the graduation thesis, the influence of enzymatic hydrolysis on the change of molar mass and molar mass distribution of collagen hydrolyzates was investigated. Size exclusion chromatography coupled with refractometric and viscosity detector was employed. Hydrolyzates were prepared from collagen casings offal using proteolytic enzyme alcalase. The optimal hydrolysis conditions in terms of temperature, enzyme concentration and time of hydrolysis were determined. Influence of the above mentioned variables on the molar mass and molar mass distribution of hydrolyzates was thoroughly discussed.

Keywords: collagen, hydrolyzed collagen, size exclusion chromatography

Děkuji vedoucí diplomové práce Ing. Věře Kašpárkové, CSc. za odborné vedení, rady, připomínky a trpělivost při tvorbě diplomové práce.

Prohlašuji, že jsem na celé diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala.

Ve Zlíně 16.5.2008

.....

podpis

# OBSAH

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ÚVOD</b> .....                                   | <b>8</b>  |
| <b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....                      | <b>9</b>  |
| <b>1 KOLAGEN</b> .....                              | <b>10</b> |
| 1.1 CHEMICKÉ SLOŽENÍ .....                          | 10        |
| 1.2 AMINOKYSELINOVÉ SLOŽENÍ KOLAGENU.....           | 13        |
| 1.2.1 Glycin .....                                  | 14        |
| 1.2.2 Hydroxyprolin .....                           | 14        |
| 1.2.3 Tyrosin .....                                 | 14        |
| 1.2.4 Hydroxylysin .....                            | 14        |
| 1.2.5 Cystein.....                                  | 15        |
| 1.2.6 Leucin a isoleucin.....                       | 15        |
| 1.3 STRUKTURY KOLAGENU .....                        | 15        |
| 1.3.1 Primární struktura kolagenu .....             | 15        |
| 1.3.2 Sekundární struktura kolagenu.....            | 15        |
| 1.3.3 Terciální struktura kolagenu.....             | 16        |
| 1.3.4 Kvartérní struktura kolagenu.....             | 17        |
| 1.4 VLASTNOSTI KOLAGENU.....                        | 18        |
| 1.4.1 Fyzikálně chemické vlastnosti.....            | 18        |
| 1.4.2 Přeměna kolagenu na želatinu.....             | 19        |
| <b>2 HYDROLÝZA</b> .....                            | <b>21</b> |
| 2.1 PRINCIP HYDROLÝZY, ZÁKLADNÍ POJMY .....         | 21        |
| 2.2 HYDROLYZÁTY KOLAGENU .....                      | 22        |
| 2.2.1 Kolagenová střívka.....                       | 24        |
| 2.3 ALKALICKÁ HYDROLÝZA.....                        | 25        |
| 2.4 KYSELÁ HYDROLÝZA .....                          | 25        |
| 2.5 ENZYMATICKÁ HYDROLÝZA .....                     | 25        |
| <b>3 GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRFIE (GPC)</b> ..... | <b>28</b> |
| 3.1 DEFINICE CHROMATOGRFIE.....                     | 28        |
| 3.1.1 Mobilní fáze .....                            | 28        |
| 3.1.2 Stacionární fáze .....                        | 28        |
| 3.1.3 Obecná teorie chromatografie .....            | 28        |
| 3.2 STŘEDNÍ MOLÁRNÍ HMOTNOST .....                  | 29        |
| 3.3 PRINCIP GELOVÉ PERMEAČNÍ CHROMATOGRFIE.....     | 30        |
| 3.4 DETEKTORY .....                                 | 31        |
| 3.4.1 Detekce.....                                  | 31        |
| 3.4.2 Refraktometry.....                            | 32        |
| 3.4.3 Viskozitní detektor .....                     | 33        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 3.4.4     | Kalibrace .....  | 34        |
| <b>II</b> | <b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>  | <b>37</b> |
| <b>4</b>  | <b>POUŽITÉ MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE .....</b>  | <b>38</b> |
| 4.1       | VÝCHOZÍ SUROVINA – STRÍVKA .....   | 38        |
| 4.2       | PŘÍPRAVA HYDROLYZÁTU .....   | 38        |
| 4.3       | CHEMIKÁLIE .....   | 39        |
| <b>5</b>  | <b>POUŽITÉ METODY .....</b>  | <b>41</b> |
| 5.1       | GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRFIE .....   | 41        |
| 5.1.1     | Přístroj .....   | 41        |
| 5.1.2     | Volba mobilní fáze pro GPC .....   | 41        |
| 5.1.3     | Příprava vzorků pro GPC .....  | 42        |
| 5.1.4     | Vzhled a rozpustnost vzorků .....  | 42        |
| <b>6</b>  | <b>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>  | <b>43</b> |
| 6.1       | VZORKY HYDROLYZÁTŮ KOLAGENU PŘIPRAVENÉ PŘI TEPLITĚ 70°C .....  | 43        |
| 6.2       | VZORKY HYDROLYZÁTŮ KOLAGENU PŘIPRAVENÉ PŘI TEPLITĚ 65°C .....  | 50        |
| 6.3       | VZORKY HYDROLYZÁTŮ KOLAGENU PŘIPRAVENÉ PŘI TEPLITĚ 60°C .....  | 55        |
| 6.4       | SOUHRNNÉ ZHODNOCENÍ DISTRIBUCE MOLÁRNÍCH HMOTNOSTÍ<br>HYDROLYZÁTŮ PŘIPRAVENÝCH PŘI SLEDOVANÝCH TEPLITÁCH ..... | 60        |
|           | <b>ZÁVĚR .....</b>   | <b>72</b> |
|           | <b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>   | <b>74</b> |
|           | <b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>  | <b>77</b> |
|           | <b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>  | <b>79</b> |
|           | <b>SEZNAM TABULEK .....</b>  | <b>82</b> |

## ÚVOD

Kolagen je jednou z nejrozšířenějších bílkovin živočišné říše. Vyskytuje se téměř ve všech potravinách živočišného původu a tvoří až 30% bílkovin v těle savců. Hraje významnou roli jako složka důležitá pro stavbu těla živočichů i člověka. Kolagen je ve velké míře zastoupen hlavně v chrupavkách, vazivech, tkáních, kostech a také kůži. Důležitou roli hraje také v různých odvětvích průmyslu a to jak průmyslu farmaceutickém, ale také v průmyslu potravinářském, kde nachází mnohostranné použití například jako obalový materiál ve formě střívek v masném průmyslu. Hydrolýzou chrupavek, různých odřezků kůže, ale i hydrolýzou želatiny nebo klihu lze získat hydrolyzáty kolagenu. Hydrolyzáty kolagenu jsou v současnosti cennou surovinou, která se běžně používá v potravinářském, kosmetickém nebo farmaceutickém průmyslu. Další oblastí využití může být plastikářský průmysl, ale také průmysl barev, nátěrových hmot nebo zemědělství. Různými druhy hydrolýzy a také jejími stupni lze získat produkty, které se výrazně liší svými vlastnostmi a to jak fyzikálně chemickými, tak i uživatelskými. Jednou z těchto vlastností, která v zásadní míře ovlivňuje oblast a způsob použití hydrolyzátů je molární hmotnost. Různými druhy hydrolýzy lze připravit produkty se širokou škálou molárních hmotností, prakticky od aminokyselin až po polypeptidy s molární hmotností několik desítek tisíc  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

Předložená diplomová práce je zaměřená na stanovení změn molárních hmotností a distribuce molárních hmotností u hydrolyzátů kolagenu, připravených enzymatickou hydrolýzou odpadu kolagenových střívek. Molární hmotnost hydrolyzátů je sledována v průběhu hydrolýzy v závislosti na teplotě, množství použitého enzymu a době hydrolýzy. Ke stanovení je použita gelová permeační chromatografie (GPC), pomocí které lze stanovit hodnoty hmotnostního ( $M_w$ ) i číselného ( $M_n$ ) průměru molárních hmotností a získat cenné informace o průběhu distribučních křivek.



## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 KOLAGEN

Kolageny představují nejrozšířenější skupinu živočišných bílkovin. [1] Tvoří 25-30% bílkovin v těle savců. [2] V současnosti bylo popsáno nejméně 27 rozdílných typů kolagenu. Jako strukturální bílkovina je hlavní organickou složkou podpůrného systému živočišného organismu, kostí, chrupavek, šlach, vaziva a kůže. Kromě toho je významnou složkou cévních stěn, bazálních membrán, rohovek a některých orgánů těla. Kolagen má významnou funkci i v procesu stárnutí organismu, když orgány jejichž hlavní organickou složkou je kolagen, nemohou plnit normální fyziologickou funkci. [1]

Kolagen je také cennou surovinou pro řadu technických oborů. Důležité jsou farmaceutické výrobky, jako jsou hemostatické plsti a pěny, chirurgické nitě, kolagenové membrány nebo filtry. Kolagen je i významnou složkou potravinových doplňků, v nichž má profylaktickou a terapeutickou úlohu u chorob klíčových částí pohybového aparátu, tj. kloubů a šlach. Uplatňuje se také v potravinářském průmyslu, kde se využívá ve formě obalů (střívek) při výrobě uzenin a také v kosmetickém průmyslu v přípravcích pro potlačení projevů stárnutí kůže. [3]

### 1.1 Chemické složení

Kolagen je ve vodě nerozpustný, extracelulární skleroprotein. Charakteristickou vlastností kolagenu je jeho pevnost, podmíněná trojřetězcovou šroubovicovou strukturou molekul, zpevněnou příčnými vazbami. [4]

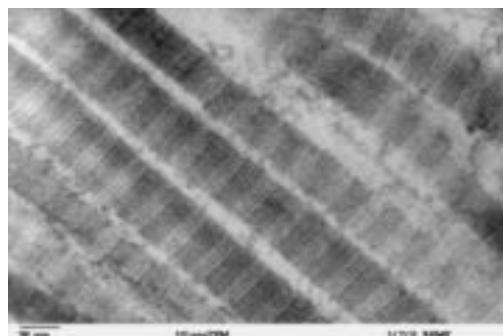


Obr.1 Model krystalové struktury  
trojitě šroubovice kolagenu

Jako všechny ostatní bílkoviny je i kolagen vytvořen asi z 20 druhů základních aminokyselin. Jeho specifická struktura proto závisí v první řadě na sekvenci aminokyselinových

zbytků, tzv. primární struktury polypeptidických řetězců. Z ní se odvozují strukturní vlastnosti vyšších řádů a biologické i fyzikální vlastnosti bílkoviny. Kolagenové molekuly jsou syntetizované buněčnými útvary jako jednoduché polypeptidické řetězce, ale svou funkci plní jako součást polymolekulární struktury, kolagenové fibrily. Jednotlivé molekuly se přeměňují na fibrily komplikovaným mnohostupňovým procesem na jehož začátku je prekursor základního řetězce, který má v N-koncové oblasti zvláštní peptidický výhonek, tzv. pro-kolagenový peptid. Tento peptid, jenž je ještě na buněčné úrovni, je vystaven řadě postupných modifikací, jako je hydroxylace některých prolinových a lysinových zbytků specifickými enzymy a navázání uhlohydrátových molekul na některé hydroxylysinové zbytky. Předpokládá se, že úlohou prokolagenového peptidu je délkové protažení a prostorové uspořádání tří polypeptidických řetězců do kompletní do kompletní trojné prokolagenové molekuly. Tato molekula je potom vylučována do mimobuněčných prostorů, kde je prokolagenový peptid enzymaticky odštěpen a molekula získá schopnost agregovat na fibrily. [5] Kolageny obsahují také cukry, které tvoří asi 0,4-12% hmotnosti molekul kolagenu. [6]

Důležitý význam má makromolekulární organizace kolagenové složky. Kolagen přítomný ve šlachách, kůžích a kostech vytváří fibrily poměrně tlusté, které se dále spojují do objemných vláknitých svazků. Naproti tomu kolagen chrupavky vytváří jemné síť z tenkých fibril. Tyto různé makromolekulární struktury jsou tvořeny odlišnými, geneticky určenými typy kolagenu. [1]



Obr.2 Kolagenová vlákna typu I  
v transmisním elektronovém mikrosko-

Nejrozšířenější je kolagen typu I, který je přítomný v kůži, kostech, šlachách apod.[5] Jeho aminokyselinové složení i detailní sekvence aminokyselin u jeho dvou odlišných polypeptidických řetězců je již známa. [1]

Typ II je přítomný v chrupavkách a jeho hlavní charakteristikou je relativně vysoký obsah hydroxylysinu (23 zbytků na 1000 zbytků aminokyselin) v porovnání s typem I, kde je přítomno 5 zbytků na 1000 zbytků aminokyselin. Typ II a podobně i typ III a IV jsou složeny ze tří identických polypeptidických řetězců. S vyšším stupněm hydroxylace lysinu souvisí také vysoký obsah sacharidových zbytků. Typ III se vyskytuje společně s typem I v kůži, kostech a hlavně svalech. Z hlediska chemického složení je pro něj typický vyšší obsah hydroxyprolinu (124 zbytků na 1000 zbytků aminokyselin) a dále přítomnost cysteinu, který stabilizuje kolagenovou strukturu kovalentní disulfidickou vazbou. Typ IV je přítomný v bazálních membránách a podobně jako typ III má vyšší obsah hydroxyprolinu (135 zbytků na 1000 zbytků aminokyselin), obsahuje také cystein a má vysoký obsah hydroxylysinu (156 zbytků na 1000 zbytků aminokyselin). Na druhé straně obsahuje tento typ kolagenu velmi málo argininu. Kolageny typu II až IV jsou velmi málo rozpustné, téměř až nerozpustné, a proto je nutné použít při jejich extrakci z tkáně enzymatické štěpení. [5]

Další typ kolagenu (typ V) se vyskytuje v bazálních membránách. Prokolagenové polypeptidické řetězce mají na N-konci a C-konci ještě peptidy, které jsou na N-konci částečně tvořeny trojitou spirálou. Vcelku však převažuje uspořádání odpovídající globulárním bílkovinám. Polypeptidické řetězce prokolagenu jsou asi o 50% delší než kolagenové alfa-řetězce. C konec potom obsahuje cystin a struktura je tedy stabilizovaná disulfidickou vazbou. [5]

Tab. 1 Přehled jednotlivých typů kolagenu [7]

| Typ | Charakteristika   | Výskyt                                |
|-----|---|---------------------------------------|
| I   | Obsahuje málo hydroxylysinu   | Kosti, šlachy, kůže, zubovina, vazivo |
| II  | Relativně bohatý na hydroxylysin                                    | Chrupavky, sklivce oka                |
| III | Bohatý na hydroxylysin obsahující mezi-řetězcové disulfidické vazby | Kůže, cévy, děloha, retikulum         |
| IV  | Bohatý na hydroxylysin, obsahuje rozsáhlé lobulární regiony         | Bazální membrány                      |
| V   | Stejný typ jako IV  | Spojovací tkáň                        |

| Ty   | Charakteristika              | Výskyt                     |
|------|------------------------------|----------------------------|
| VI   | Mikrofibrily                 | Spojovací tkáň             |
| VII  | Dlouhé řetězce               | Zpevňující fibrily         |
| VIII | Šroubovice zařazené za sebou | Některé endotermické buňky |
| IX   | Vedlejší protein chrupavek   | Chrupavky                  |

## 1.2 Aminokyselinové složení kolagenu

Ze studia primární struktury polypeptidických řetězců kolagenu je zřejmé, že se v této bílkovině střídají dva typy oblastí: polární a apolární. [5]

Apolární oblasti jsou relativně uniformní, pravidelně se v nich střídají sekvence Gly-Pro-R. Na místo R je možné dosadit různé aminokyseliny, jako Hyp, Ala, Arg, Asp, Phe, Thr, Ser. Velký význam pro sekundární a terciální strukturu kolagenu má tripeptid Gly-Pro-Hyp. Tripeptid Gly-Pro-R tvoří asi 33% celé kolagenové molekuly, tripeptid Gly-Pro-Hyp přitom zahrnuje asi 10% celé sekvence aminokyselin. [5]

O polárních oblastech můžeme tvrdit, že některé z nich obsahují většinou kyselé a jiné většinou bazické aminokyseliny. [5]

Aminokyselinová sekvence kolagenu byla nejlépe objasněna u kolagenu typu I, který byl izolován z telecí kůže. Struktura obou typů řetězců vyskytujících se v kolagenu typu I je velmi podobná. Na obou řetězcích je možno rozeznat tři strukturně i funkčně odlišné oblasti. Střední, nejdelší úsek řetězce, tvořeny více než 1000 aminokyselinovými zbytky, obsahuje tripeptidické jednotky obecného složení Gly-X-Y, kde X a Y představují libovolnou aminokyselinu. V koncových oblastech, které jsou jen 90 až 25 zbytků dlouhé, jsou pohromadě některé polární aminokyseliny a chybí tu pravidelnost výskytu glycinu. Aminokyselinové zbytky v řetězcích bílkovin jsou očíslovány od N-koncové aminokyseliny. Aby se umožnilo porovnání homologických oblastí při řetězcích různého původu bez ohledu na rozdílné počty aminokyselin v koncových oblastech. Koncové oblasti obsahují lysin, který slouží k vytváření příčných vazeb. [5]

### 1.2.1 Glycin

Kolagen obsahuje značné množství glycinu (330 molů na 1000 molů aminokyselin), který je v molekule rozložený zcela pravidelně, to znamená, že tvoří každou třetí aminokyselinu v sekvenci jednotlivých řetězců. Toto rozložení umožňuje těsné spojení polypeptidických řetězců do trojnásobné šroubovice. [1] Velké množství této aminokyseliny způsobuje vysoký obsah dusíku v kolagenu. [9]

### 1.2.2 Hydroxyprolin

Hydroxyprolin je pro kolagen charakteristickou aminokyselinou, protože je obsažen ve větším množství jen v této bílkovině. Velký obsah hydroxyprolinu a prolinu podmiňuje jeho stérickou rigiditu (nemožnost volné otáčivosti kolem vazby  $C_{\alpha}$  - N a stížené otáčení kolem vazby  $C_{\alpha}$  - CO) a odlišné prostorové uspořádání polypeptidických řetězců kolagenu ve srovnání s bílkovinami obsahujícími menší množství cyklických kyselin. Zatímco v peptidických řetězcích bez hydroxyprolinu a prolinu je otáčivost na vazbě omezeně možná na každém C atomu, tzn. v každém třetím článku peptidického řetězce, při zabudování hydroxyprolinu a prolinu do peptidického řetězce je taková otáčivost prakticky znemožněna v rozsahu šesti článků a při včlenění hydroxyprolinu a prolinu po sobě je dokonce v rozsahu devíti C atomů. Takové uspořádání proto umožňuje řetězci kolagenu vytvářet protáhlé šroubovice, které se stabilizují meziřetězcovými vodíkovými můstky, když se spojí do trojnásobné, tzv. super šroubovice. Obsah hydroxyprolinu a prolinu je rozdílný podle původu kolagenu. [1]

### 1.2.3 Tyrosin

Přítomnost tyrosinu v molekule kolagenu byla předmětem dlouhých sporů. Podrobné aminokyselinové studie ukázaly, že všechny tyrosin je nahromaděn v terminálních peptidech, tzv. telopeptidech, které nemají strukturu šroubovice a lze je lehce odštěpit proteolytickými enzymy. [1]

### 1.2.4 Hydroxylysin

Další typickou aminokyselinou je hydroxylysin, která se vyskytuje i v několika dalších bílkovinách, např. vlně. V těchto bílkovinách je však obsah hydroxylysinu ve srovnání s kolagenem malý. Jeho význam spočívá v tom, že se na něj vážou sacharidické složky. [1]

### 1.2.5 Cystein

Cystein je přítomen ve větším množství pouze v kolagenu nejnižších živočichů, ve kterém stabilizuje strukturu pomocí disulfidických můstků. U vyšších živočichů se vyskytuje pouze v registračním peptidu. [1]

### 1.2.6 Leucin a isoleucin

Pro kolagen je charakteristický malý výskyt leucinu a isoleucinu. [1] Jen dvě bílkoviny mají menší obsah těchto aminokyselin než kolagen, jsou to ribonukleáza a fibroin hedvábí. [10]

## 1.3 Struktury kolagenu

### 1.3.1 Primární struktura kolagenu

Primární strukturu kolagenu určuje chemické složení a pořadí aminokyselinových zbytků v polypeptidickém řetězci. Jak již bylo uvedeno, nejvíce zastoupenou aminokyselinou je glycin, dalšími významně zastoupenými aminokyselinami jsou hydroxyprolin a prolin, které dodávají polypeptidickým řetězcům strukturní tuhost. Zastoupení 10% kyselých a 8% bazických aminokyselinových zbytků má význam při vytváření acidobazických rovnováh, ovlivňuje chemické chování a reaktivitu kolagenu I. Ze studia primární struktury kolagenu vyplývá, že polypeptidický řetězec je tvořen středním, nejdelším úsekem a dvěma kratšími koncovými oblastmi, tzv. telopeptidy. Telopeptidy jsou tzv. neuspořádané oblasti, které nemají pro kolagen typické aminokyselinové složení, obsahují aminokyseliny jako je lysin a hydroxylysin. Tyto oblasti mohou být také různými proteolytickými enzymy odbourány, tím dojde k odstranění stabilizujících příčných vazeb a kolagen se stane rozpustným. [9]

### 1.3.2 Sekundární struktura kolagenu

Na úrovni sekundární struktury nás zajímá, jakou konformaci má hlavní polypeptidický řetězec kolagenu v prostoru. Tak jako u ostatních bílkovin je sekvence aminokyselinových zbytků v L-konformaci spojena planárními peptidickými vazbami. V dlouhém polypeptidickém řetězci je proto jediným zdrojem konformačních změn rotace kolem vazeb  $C_{\alpha} - N$  a  $C_{\alpha} - CO$ , které vycházejí z alfa uhlíkového atomu. Velikost těchto dvou rotačních úhlů vede ke vzniku pravidelné levotočivé šroubovice protáhlého typu. Rentgenografická spektra

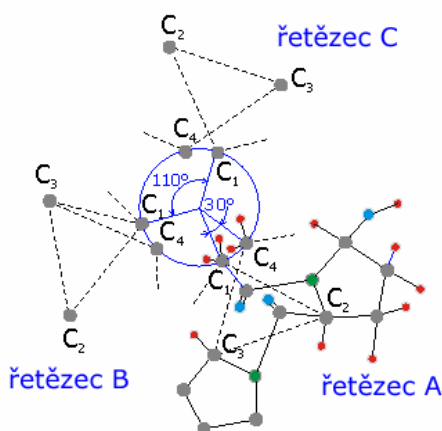
kolagenu ukazují, že závity mají stoupání 0,95 nm a jednotlivé peptidické jednotky jsou vzdáleny 0,286 nm. Celková délka řetězce je asi 290 nm. Takto protažená šroubovice je u bílkovin výjimečná a vyskytuje se jen u kolagenu nebo některých polypeptidů s podobnou aminokyselinovou sekvencí. Detailní rentgenové měření a stereochemické úvahy vedly k poznatku, že kolagenová šroubovice není symetrická kolem přímkové osy, ale kolem jiné šroubovice, která je naopak pravotočivá. [10]

Koncové oblasti kolagenových řetězců, v nichž chybí typická sekvence Gly-X-Y, postrádají toto pravidelné uspořádání. V C-koncovém peptidu je výrazná tendence ke tvorbě protažené konformace  $\beta$ -pleated sheet čili „skládaného listu“. [10]

### 1.3.3 Terciální struktura kolagenu

Terciální strukturu kolagenu tvoří tři řetězce, které jsou navzájem okolo sebe ovinuty a mají společnou osu. Vzniklý tyčinkovitý útvar je dlouhý asi 290 nm a v průměru má 1,4 nm. Nazývá se tropokolagen a je základní stavební jednotkou, schopnou agregace na fibrilární útvary.[10]

V tropokolagenové molekule jsou všechny tři řetězce udržovány při sobě vodíkovými vazbami mezi sousedními řetězci. Tyto vazby mohou vznikat jen tehdy, přiblíží-li se všechny tři řetězce k sobě. U kolagenu je to umožněno tím, že v každé třetí poloze se vyskytuje glycin, tj. aminokyselina bez vedlejšího řetězce. Zjednodušená projekce tropokolagenové struktury podél hlavní osy trojitě šroubovice je znázorněna na Obr. 3.



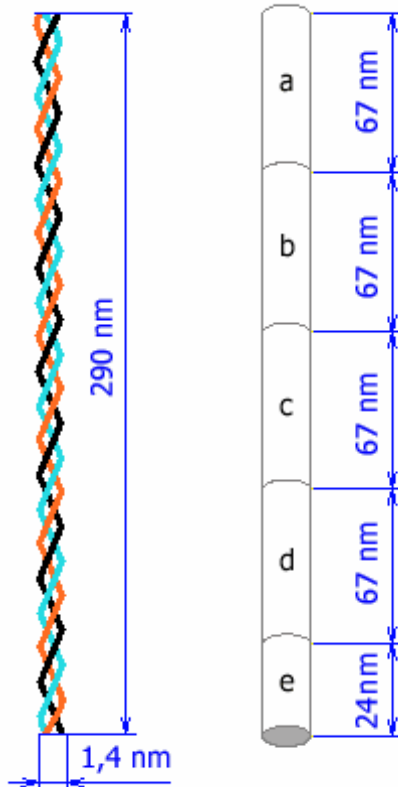
Obr. 3 Zjednodušená projekce uspořádání atomů u terciální struktury kolagenu [10]



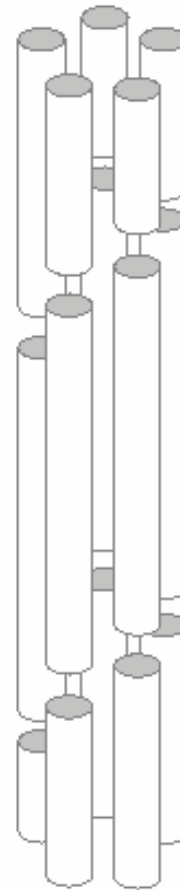
### 1.3.4 Kvartérní struktura kolagenu

Důležitou vlastností tropokolagenových molekul je schopnost vytvářet v extracelulárním prostoru vysoce uspořádané vláknité struktury. Tato schopnost, která se projevuje i za podmínek in vitro, je důsledek primární struktury kolagenu. Experimentální údaje potvrdily, že při uspořádání se uplatňuje jak polární, tak i hydrofobní interakce mezi molekulami.

[10]



Obr.4 Schematické znázornění trojitě tropokolagenové molekuly. Vpravo jsou naznačeny intervaly D (67 nm), o něž jsou jednotlivé molekuly vzájemně posunuty a necelistvý interval 0,35 D, který je v koncové oblasti a umožňuje vznik osové mezery



Obr.5 Model mikrofibrily vytvořené důsledkem interakce polárních a hydrofobních vedlejších řetězců. Pět tropokolagenových molekul je zde vzájemně posunuto o interval D a vytváří válcovitý útvar o průměru 4 nm

Orientace a osové uspořádání tropokolagenových tyčinkových molekul ve fibrilách byly odvozeny z elektronmikroskopických pozorování, ukazujících příčné pásování s periodou 67 nm. [10]

V mikrofibrile jsou útvary uspořádány koaxiálně způsobem hlava-pata (nebo N-konec – C-konec) s mezerami asi 35 nm. Mikrofibrily jsou dále uspořádány do fibril a větších vláknitých útvarů. V průběhu biologického vývoje jsou zesilované kovalentními vazbami. V procesu stárnutí vykazují kolagenové fibrily vzrůstající nerozpustnost a v konečném stavu mohou být rozpustné jen v silně hydrolytických prostředích. Tento jev je vyvolán postupným vznikem intermolekulárních a intramolekulárních příčných vazeb, které spojují tropokolagenové molekuly do kontinuální polymerní sítě. [1]

## 1.4 Vlastnosti kolagenu

### 1.4.1 Fyzikálně chemické vlastnosti

Chemické vlastnosti kolagenu typu I jsou dány jeho primární strukturou, tedy sekvencí aminokyselinových zbytků v polypeptidickém řetězci a především zastoupením jednotlivých funkčních skupin. Naproti tomu fyzikální vlastnosti jsou dány více méně uspořádáním ve vyšších strukturních celcích. [9]

Z chemického hlediska je kolagen polyamfolytem, tedy polyelektrolytem, mající kyselé a bazické skupiny. [9]

Charakteristickou konstantou kolagenu je izoelektrický bod a reaktivita kolagenu je závislá na jeho stavu vůči izoelektrickému bodu. Nativní kolagen má hodnotu izoelektrického bodu rovnu 7. V zásaditém prostředí nabývá kolagen záporný náboj, vzniká tzv. polyanion a v kyselém prostředí získává kolagen kladný náboj, vzniká tzv. polykation. Vzhledem ke svým vlastnostem je kolagen schopen vázat z roztoku kyseliny nebo zásady ve stechiometrických poměrech. [9]

Síla polyaniontu, respektive polykationtu, je dána charakterem bočních skupin a množstvím přidané kyseliny nebo zásady. Jeho síla postupně roste až do určité koncentrace, kdy veškeré kyselé nebo zásadité skupiny nesou záporný nebo kladný náboj. [9]

Pro kolagen byly popsány závislosti dokazující, že v oblasti izoelektrického bodu dochází ke snížení hydrofilnosti, tedy v této oblasti pH je kolagen minimálně rozpustný, přičemž tento pokles hydrofilnosti je způsoben poklesem počtu volných nábojů v polypeptidických řetězcích. Protože polypeptidické řetězce nesou v izoelektrickém bodě minimální náboj, vykazuje kolagen v tomto pH minimální bobtnání. Nastává tzv. osmotické zbotnění při němž voda proniká do tuhé fáze jako následek gradientu osmotického tlaku, který vzniká rozdílnou koncentrací pohyblivých iontů v tuhé a kapalné fázi. V okamžiku vyrovnání koncentrace iontů v obou fázích se dostaví rovnováha a bobtnání končí. Jak již bylo uvedeno, bobtnání se zvyšuje přidáním kyseliny v důsledku změny poměru nábojů, přičemž platí skutečnost, že s rostoucí koncentrací kyseliny zbotnění roste. Mezi kyseliny silně ovlivňující zbotnění patří např. minerální kyseliny jako kyselina sírová. U zásad je vliv koncentrace na bobtnání slabší, přičemž platí, že bobtnání v kyselé oblasti pH je větší ve srovnání s bobtnáním v alkalické oblasti pH a to z důvodu většího počtu bazických skupin v molekule kolagenu. Stupeň zbotnění může také ovlivnit přidání elektrolytu např. chloridu sodného. Osmotické zbotnění je považováno za úplně reverzibilní. [9]

Kromě uvedeného typu bobtnání existuje tzv. lyotropní (hydrotropní) zbotnění kolagenu, ke kterému dochází při extrémních hodnotách pH nebo přidáním lyotropních látek, jejichž působením dojde k rozrušení vodíkových vazeb kolagenu. To vyvolá další zbotnění kolagenu, které vede k úplnému zhroucení šroubovicové konformace a nastává denaturace struktury. Za lyotropní látky považujeme ty, které jsou schopné ovlivňovat svým polárním charakterem a malými rozměry interakce původní stabilizující vazby na karbonylovém kyslíku, tj. schopné převést nerozpustnou sloučeninu na rozpustnou (resp. vodorozpustnou) formu. Jako lyotropní látky působí neutrální soli, slabé organické kyseliny a jejich soli, alifatické dusíkaté sloučeniny aj. [9]

#### 1.4.2 Přeměna kolagenu na želatinu

Při zahřívání vlhkého kolagenu dochází při určité teplotě k výrazné strukturální změně, provázené zvýšením bobtnání a změnou fyzikálně chemických vlastností. Takto modifikovaný kolagen není odolný proti běžným proteázám a má mnohem nižší stupeň uspořádání. Označuje se názvem želatina. V širším smyslu se tak označují rozpustné i nerozpustné produkty, i když v technické se název želatina používá jen pro rozpustné produkty, které mají vyšší viskozitu a světlejší zbarvení než kliš. [10]

Přeměna kolagenu na želatinu nastává obvykle při teplotě kolem 60°C, závisí však na pH, iontové síle, složení roztoku a stupni kovalentního zesíťování kolagenu. Jde o transformaci prvního řádu, pravou fázovou přeměnu krystalické modifikace biopolymeru na amorfni modifikaci. Vlivem této transformace se mění konformace polypeptidických řetězců a zároveň se uvolňuje vazebná energie a vzrůstá entropie. Přeměna je většinou nevratná, po ochlazení se již nevytváří spontánně krystalická kolagenová konformace, i když struktura má do určité míry i vratný charakter. Makroskopicky se tepelná přeměna projevuje nejvýrazněji zkrácením osově délky kolagenových vláken na třetinu až čtvrtinu původní délky. Teplota při níž lze pozorovat první délkové smrštění, se označuje jako teplota smrštění. Tato teplota je o 5 až 15 °C nižší než teplota fázové přeměny. [10]

Vlivem transformace se původně uspořádaná kolagenová struktura mění na neuspořádaný stav, tzv. statistické klubko. Je to způsobeno tím, že kolagenový stav je stabilizovaný většinou jen slabými nekovalentními vazbami (vodíkovou, polární, hydrofobními kontakty apod.), které jsou citlivé na teplo a při zahřívání snižují svou vazebnou energii. Protože však zároveň zahříváním roste vnitřní energie systému, zesiluje se termodynamická tendence k vyšší entropii, tedy tendence k poklesu pravidelnosti v uspořádání makromolekul. Zvyšování teploty proto nakonec vede ke stavu, kdy jsou obě veličiny v rovnováze. Další vzrůst teploty vyvolává náhlé zborcení uspořádané struktury. [10]

Modifikace kolagenové struktury, která umožňuje vznik tepelně stálých, např. kovalentních příčných vazeb, způsobí výrazný posun transformační teploty k vyšším hodnotám. Tato skutečnost je vlastně základem činění kolagenu při výrobě usní. Denaturujeme-li kolagen v přítomnosti látek snižujících energii stabilizujících vazeb, např. močoviny, snižuje se teplota transformace. Je-li pokles tak velký, že transformace kolagen – želatina nastává už při normální teplotě, hovoříme o tzv. chemicky indukované přeměně na želatinu. [10]

## 2 HYDROLÝZA

### 2.1 Princip hydrolyzy, základní pojmy

Hydrolyzou obvykle označujeme rozklad solí, esterů, halogenidů, amidů, nitrilů působením  $H_2O$  za uvolňování  $H^+$  nebo  $OH^-$  iontů. Na základě toho reagují roztoky solí slabých kyselin a silných zásad zásaditě. Podstatou je přechod protonu molekuly vody na anion slabé kyseliny k níž má větší afinitu. Roztoky solí silných kyselin a slabých zásad reagují kysele (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. [12]

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 hydrolyzy potom definujeme jako poměr počtu hydrolyzovaných molekul solí ke všem molekulám přítomným v roztoku.

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

Při hydrolyze soli slabé kyseliny a silné zásady platí:

$$K_h = \frac{K_v}{K_A} \quad (3)$$

kde  $K_v$  je iontový součin vody,

$K_A$  disociační konstanta slabé kyseliny.

Při hydrolyze soli slabé zásady a silné kyseliny platí:

$$K_h = \frac{K_v}{K_B} \quad (4)$$

kde  $K_B$  je disociační konstanta slabé zásady.

Pro hydrolyzu soli slabé kyseliny a slabé zásady platí:

$$K_h = \frac{K_v}{K_A + K_B} \quad (5)$$

Při hydrolyze bílkovin dochází ke štěpení peptidických vazeb bílkovin a peptidů na nižší rozpustné strukturní jednotky. [12]

## 2.2 Hydrolyzáty kolagenu

Jedním z produktů hydrolyzy kolagenu jsou tzv. hydrolyzáty. Lze je vyrábět z kůží, odřezků kůže, jatečních odpadů, šlach, kostí, dále hydrolyzou želatiny, klihu, chromočiněných úsní nebo hotových úsní. V podstatě lze využít jakýkoliv odpad z kožedělného průmyslu obsahující kolagen. Hydrolytický rozklad se může provádět v kyselém nebo zásaditém prostředí, případně za použití enzymů. Vzhledem k nízkým požadavkům na energii je v poslední době upřednostňován způsob enzymatický, pomocí kterého lze v závislosti na zvolených podmínkách hydrolyzy získat produkty s různými vlastnostmi a různými molárními hmotnostmi. [12]

Hydrolyzáty mohou mít definovanou distribuci molárních hmotností. Molární hmotnosti nízkomolekulárních polypeptidů se pohybují od 1500 do 5000 g.mol<sup>-1</sup>. Kolagen lze hydrolyzovat na štěpy o různé délce případně až na aminokyseliny. Mohou se čistit, filtrovat, zahušťovat, sterilovat a práškovat. Působením peroxidu vodíku se získávají hydrolyzáty světlé barvy a bez zápachu. Dlouho trvající doba hydrolyzy a vysoká teplota vedou ke ztmavnutí konečného proteinového produktu. [12]

Použití hydrolyzátů je velmi široké. Mohou být použity obecně v potravinářství jako látky uchovávací vůni nebo chuť. Jsou hojně využívány také v kosmetice, kde se přidávají do krémů, pleťových masek a dalších výrobků, které mají za cíl dodávat kůži pevnost, tvar a vláčnost. Mohou se také využívat při výrobě šampónů či pracích prášků. [14]

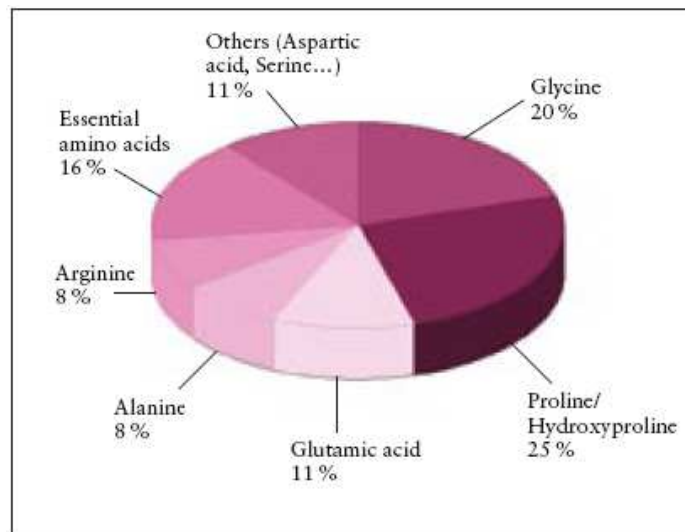
Další aplikační oblastí je použití hydrolyzátů jako náhrady kaseinu při výrobě pigmentových apretur v koželužství. Podřadnější proteinické hydrolyzáty jsou vhodnější jako přísady do krmiv a hnojiv. Smícháním s vhodným jílovým substrátem lze vyrábět tzv. hnojivové tyčinky. Přídavek kolagenu při výrobě některých polymerů má podporovat biologickou odbouratelnost plastů. [12]

Hydrolyzáty kolagenu se většinou dodávají ve formě prášku. Tato forma je bezprašná, dobře rozpustná a pro uživatele snadno použitelná. Snadná rozpustnost práškového hydrolyzátu vede ke snižování čekacích časů v různých průmyslových procesech.[14]



Obr.6 Rozptýlené a rozpustné hydrolyzáty kolagenu [15]

Hydrolyzáty kolagenu obsahují typické aminokyseliny, jejichž složení je velmi podobné přírodnímu kolagenu. Nejvíce jsou zastoupeny glycin, prolin a hydroxyprolin, které představují asi 45% celkového složení. Esenciální aminokyseliny tvoří asi 16% celkového složení a dále jsou zde obsaženy např. tryptofan, kyseliny glutamová, alanin nebo arginin. Z hlediska výživy je však kolagen neplnohodnotnou bílkovinou, zejména z důvodu nízkého obsahu aminokyseliny lysinu. [14]



Obr.7 Typické aminokyselinové složení hydrolyzátu kolagenu [14]

### 2.2.1 Kolagenová střívka

Počátek výroby kolagenových střívek se datuje do 30. let minulého století, kdy v Německém Weinheimu zjistili, že kolagen lze rozložit a dále zpracovat na hmotu schopnou vytlačování, ze které mohou být vyrobena střívka vhodná pro výrobu párků. Pro výrobce uzenin je použití kolagenového střívka výhodnější protože na rozdíl od „přírodních“ střívek ze zvířat mají jednotnou tloušťku, jednotný průměr, jsou pevná a zároveň elastická.

K výrobě střívek se používá kůží skotu, které jsou po odstranění papilární vrstvy a podkožních tkání několik týdnů vápněny a v dalších krocích promývány a neutralizovány. Poté následuje další důkladné promývání až do stadia, kdy je dosaženo předem stanoveného stupně zbotnění. V tomto stavu se kolagenní materiál rozkládá a je důkladně homogenizován do kašovitě, viskózní hmoty kterou lze zpracovat vytlačováním. Vytlačená střívka jsou v dalším kroku chemicky upravena tak, aby došlo k zesíťování kolagenních vláken což propůjčuje výrobku strukturální pevnost. Dále se střívka vypírají, suší a upravují do formy žádané spotřebitelem. [11]



### 2.3 Alkalická hydrolýza

Alkalický rozklad lze provádět například použitím uhličitanu vápenatého a oxidu hořečnatého za zvýšeného tlaku a při zvýšené teplotě 130°C - 140°C po dobu 4 hodin. Například při hydrolýze chromitých postružin obsahuje izolovaný bílkovinný hydrolyzát v závislosti na podmínkách hydrolýzy řádově jednotky až desetiny procent oxidu chromitého, ale také značné množství sodných, draselných, vápenatých a hořečnatých solí. [12], [15]

Tyto hydrolyzáty mají poměrně nízkou molární hmotnost, vysoký obsah chrómu a jsou znečištěny rozpustnými solemi. Často se proto alkalické hydrolýzy využívá v kombinaci s hydrolýzou enzymatickou, která je účinnější a získaný hydrolyzát je kvalitnější. [15]

I při těchto nevýhodách má alkalická hydrolýza uplatnění ve speciálních případech, např. alkalickou hydrolýzou se nerozkládá tryptofan, což se může využít při jeho kvantitativním stanovení. [16]

### 2.4 Kyselá hydrolýza

Při používání kyselin na hydrolýzu bílkovin jsou určeny pouze některé faktory, které ovlivňují rozsah a specifičnost kyselé hydrolýzy. Během působení kyselin na bílkoviny za mírných podmínek, probíhá parciální kyselá hydrolýza a při působení za drastičtějších podmínek se bílkovinná struktura štěpí na aminokyseliny. [15]

Kyselá hydrolýza se obvykle provádí pomocí kyseliny sírové. Touto vzniká chromitý polymerní hydrolyzát užitečný jako udržující činidlo. Hydrolyzujeme-li bílkoviny je možné použít kyselinu chlorovodíkovou, která štěpí jak proteiny tak i nukleové kyseliny.

Ve srovnání s alkalickou hydrolýzou probíhá kyselá hydrolýza kratší dobu, optimum je dosaženo za 50-60 minut při teplotě 100°C. Molární hmotnost vzniklých hydrolyzátu je nízká.

Kyselá hydrolýza se ve značné míře využívá v potravinářství k výrobě koření do polévek, omáček a pokrmů. [12]

### 2.5 Enzymatická hydrolýza

Enzymové štěpení v alkalickém prostředí je v podstatě alkalickou hydrolýzou, katalyzovanou působením enzymů.

Hlavními výhodami hydrolyzy katalyzované proteolytickými enzymy jsou mírné reakční podmínky dané maximální teplotou 80°C, alkalitou směsi v rozmezí 8-9 a atmosférickým tlakem. Získaný bílkovinný hydrolyzát obsahuje nízký podíl anorganických solí.

V praxi se setkáváme s jedno-, dvou-, a třístupňovým postupem enzymatické hydrolyzy. Při dvoustupňovém postupu lze v prvním stupni získat hydrolyzát schopný tvorby gelu s molární hmotností 75 000 až 200 000 g.mol<sup>-1</sup>. Po přidavku enzymu se ve stupni druhém získá nízkomolekulární hydrolyzát o molární hmotnosti 10 000 až 20 000 g.mol<sup>-1</sup>. [16]

Enzymy, které se používají jsou téměř výhradně proteinázy. Katalyzují štěpení peptidových vazeb bílkovin a patří do skupiny hydroláz. Peptidová vazba je vazba mezi N-atomem a C-atomem v karbonylové skupině. Je štěpena v reakci s vodou za tvorby volné koncové NH<sub>2</sub>-skupiny a COOH- skupiny. Jelikož se proteiny mohou skládat až z 20 různých aminokyselin, existuje 380 různých peptidových vazeb, které mohou sloužit jako možné cíle pro enzym. Enzymy jsou však schopny štěpit pouze určitý, specifický typ vazby. Poměrně často používanými enzymy v této oblasti jsou alkaláza a neutráza. Z 29 vazeb v oxidovaném B-řetězci insulínu je alkaláza schopna štěpit pět a neutráza šest peptidových vazeb, které se však od sebe liší. [12] Důležitou podmínkou pro enzymatické reakce těchto vazeb je, aby byly fyzicky dosažitelné pro enzym, který má obvykle značnou molární hmotnost. Jestliže jsou tyto vazby v trojrozměrné struktuře proteinu zanořeny, například jako v přírodním kolagenu, reakce neprobíhá. Pokud je ale protein denaturován, díky chemickému nebo tepelnému zpracování, struktura může být rozštěpena a protein je náchylnější k enzymatické degradaci. [15]

Deaktivace alkalických proteináz se provádí např. nevratně okyselením, kdy upravíme kyselost na pH 2-3 nebo zahřátím nad teplotu denaturace enzymu. [17]

Enzymy štěpící peptidové vazby se rozdělují do dvou hlavních skupin:

*exo*peptidázy – hydrolyzují koncové peptidové vazby (resp. odštěpují koncové aminokyseliny)

*endo*peptidázy – hydrolyzují peptidické vazby uvnitř řetězce.

Podle povahy aktivního centra se proteinázy rozdělují do čtyř skupin

1. První skupina vyžaduje ke své aktivitě kovové ionty ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , aj.). Patří sem hlavně exopeptidázy.
2. Druhou skupinu tvoří thiolové enzymy (papain a některé katepepsiny), které jsou inhibovány thiolovými reagensy.
3. Třetí skupina obsahuje ve svém centru aktivní serin a nazývají se serinové proteinázy. Je to nejdůležitější skupina zahrnující pankreatické enzymy – trypsin, chymotrypsin, elastázu aj.
4. Čtvrtá skupina obsahuje ve svém aktivním centru karboxylovou skupinu. Jejím představitelem je pepsin a rennin. [17]

Většina proteáz se širší specifitou dobře štěpí želatinu i jiné denaturační produkty kolagenu, ale na nedenaurovaný kolagen nebo rozpustný tropokolagen má pouze omezený účinek, tedy odštěpí z něj asi 1% hmoty ve formě peptidů. [18]

Existují však i specifické enzymy, které katalyzují rozsáhlou hydrolýzu nedenaurovaného kolagenu, označované jako kolagenázy. Kolagenáza byla poprvé objevena v bakteriích druhu *Clostridium histolyticum*. Tento druh bakterií je jako zdroj kolagenázy nejdostupnější a také nejlépe prostudovaný. Působením kolagenázy na kolagen se odštěpují převážně peptidy, které mají na konci aminokyselinu glycin. [17]

## 3 GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRAFIE (GPC)

### 3.1 Definice chromatografie

Chromatografie je obecně definována jako separační, fyzikálně chemická a současně analytická metoda určená pro separaci a analýzu směsi látek, jejímž základním principem je rozdělování složek směsi mezi mobilní a stacionární fázi.

Separací složek směsi je možné zjistit, že se zkoumaná směs skládá například ze tří různých látek a nebo naopak, že je tvořena pouze jedinou látkou a jedná se o látku v čistém stavu.

Výsledkem kvalitativní analýzy je zjištění, jaké látky jsou v dané směsi obsažené a výsledkem kvantitativní analýzy je zjištění koncentrace jednotlivých složek ve směsi. Je zřejmé, že pro provedení kvantitativní a kvalitativní analýzy je nutné jednotlivé složky směsi od sebe nejdříve oddělit. [19]

#### 3.1.1 Mobilní fáze

Mobilní fáze je ta fáze, která se v chromatografickém systému pohybuje. Mobilní fází může být kapalina nebo plyn. Je-li mobilní fází kapalina, pak takovou chromatografii nazýváme kapalinová chromatografie, je-li mobilní fází plyn, pak se taková chromatografie nazývá plynová chromatografie. [19]

#### 3.1.2 Stacionární fáze

Stacionární fáze je v chromatografickém systému ta fáze, která je nepohyblivá. Stacionární fází může být pevná látka nebo film kapaliny zakotvený na pevné látce. [19]

#### 3.1.3 Obecná teorie chromatografie

V průběhu chromatografické analýzy složky separované látky migrují chromatografickou kolonou jen tehdy, pokud se nachází v mobilní fázi a relativní rychlost jejich pohybu vzhledem k rychlosti mobilní fáze je tím menší, čím větší afinitu ke stacionární fázi vykazují. Vlastním mechanismem separace je tedy neustálé porušování určitého ustáleného rozdělení jednotlivých složek vzorku mezi oběma fázemi v důsledku konvektivního pohybu jedné z nich a úsilí systému obnovit porušenou rovnováhu difúzí. [19]

### 3.2 Střední molární hmotnost

Molární hmotnost vysokomolekulárních sloučenin je důležitou veličinou, která do velké míry ovlivňuje jejich vlastnosti. Jestliže se střední molární hmotnost stanovuje metodami, které měří veličiny úměrné hmotnosti nebo objemu částice (například rychlost sedimentace nebo rozptyl světla) je výsledkem stanovení **hmotnostní průměr molárních hmotností**  $M_w$ , který je definovaný rovnicí (6)

$$\bar{M}_w = \frac{\sum (w_i \cdot M_i)}{\sum w_i} = \sum (W_i \cdot M_i) = \frac{\sum c_i \cdot M_i^2}{\sum c_i \cdot M_i}, \text{ kde} \quad (6)$$

$m_i$  je hmotnost frakce  $i$ ,  $M_i$  je molární hmotnost frakce  $i$ ,  $W_i = m_i/\sum m_i$  je hmotnostní zlomek frakce  $i$ ,  $w_i = m_i/V$  je hmotnostní koncentrace frakce  $i$  a  $c_i = n_i/V = w_i/M_i$ .

Pomocí metod, které měří veličiny úměrné počtu makromolekul v polymeru, tzv. koligativní vlastnosti, se stanovuje **početní (číselný) průměr molárních hmotností**  $M_n$ . Mezi tyto metody patří osmometrie, ebullioskopie nebo kryoskopie. Číselný průměr molárních hmotností je daný vztahem (7)

$$\bar{M}_n = \frac{\sum (N_i \cdot M_i)}{\sum N_i} = \frac{\sum c_i \cdot M_i}{\sum c_i} = \sum (x_i \cdot M_i), \text{ kde} \quad (7)$$

$N_i$  je počet částic  $i$ -tého druhu,  $x_i = N_i/\sum N_i$  je molární zlomek frakce  $i$ .

Číselný průměr molární hmotnosti není vždy vhodný k posouzení závislosti mezi vlastnostmi polymeru na jeho molární hmotnosti, protože mnohé vlastnosti polymerů nezávisí ani tak na počtu částic s určitou molární hmotností, ale spíše na jejich hmotnostním podílu. Potom je vhodnější použít hmotnostní průměr molárních hmotností  $M_w$ .

Početní průměr molární hmotnosti je vždy menší než hmotnostní průměr molární hmotnosti ( $M_n < M_w$ ). U hodnoty  $M_n$  se více uplatňují nízké frakce, které obsahují relativně velký počet částic, kdežto u hodnoty  $M_w$  se naopak nejvíce uplatňují těžší podíly.

Kvantitativní zastoupení makromolekul jednotlivých molárních hmotností, které se v daném polymeru vyskytují udává distribuční křivka. Pro jednoduchý odhad šířky distribuce polymeru poslouží rovněž index polydispersity, který je definován vztahem [20]

$$P = \frac{M_w}{M_n} \quad . \quad (8)$$

### 3.3 Princip gelové permeační chromatografie

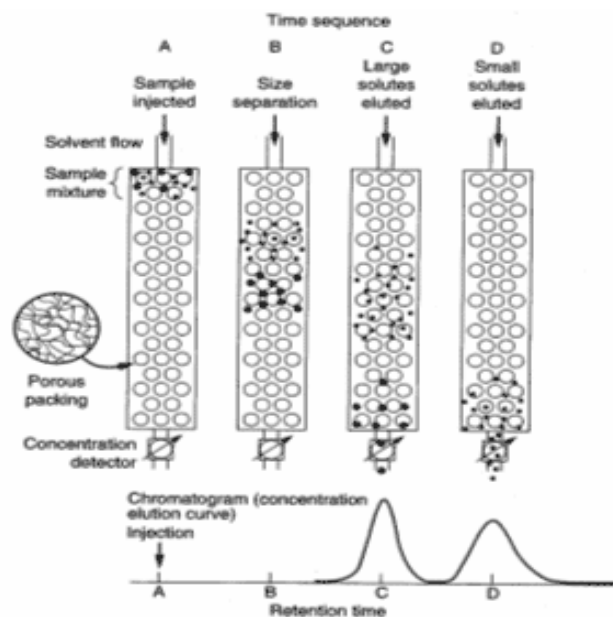
Gelová permeační chromatografie (v anglické literatuře lze najít název Size exclusion chromatography) je speciálním druhem kolonové kapalinové chromatografie. Lze ji využít k mnoha typům analýz, především však nabízí uplatnění při stanovení molárních hmotností, distribuce molárních hmotností a k analýze směsí oligomerních sloučenin u syntetických polymerů i biopolymerů. Bez zavedení GPC do praxe by byl nemyslitelný dnešní vývoj makromolekulární chemie a některých disciplín biochemie. [19]

Na rozdíl od adsorpční či rozdělovací chromatografie je separace u GPC závislá pouze na velikosti molekul analyzovaných látek a téměř vůbec nezávisí na jejich chemické povaze. Chemické vlastnosti separovaných látek určuje pouze systém, v němž bude separace prováděna (volbou hydrofilního či hydrofobního gelu a s tím související volbou elučního činidla).

Pomocí gelové chromatografie je možno separovat jakékoliv molekuly, které se liší svými rozměry, pokud se dobře rozpouštějí v některém rozpouštědle. Velikost molekul nehraje roli, jelikož moderní gelová chromatografie umožňuje separaci celé řady látek od nízkomolekulárních až po vysokomolekulární, jejichž molekulární hmotnost je v rozmezí  $10^2 - 10^7$  g.mol<sup>-1</sup>. [19]

Chromatografická kolona pro gelovou permeační chromatografií je naplněna malými částicemi gelu, který obsahuje póry různých rozměrů. Prostory mezi zrny gelové náplně i póry

jsou vyplněny rozpouštědlem (mobilní fází). Zředěný roztok vzorku se nanese na vstup do kolony a postupně se mobilní fází vymývá. Koncentrace vzorku v eluátu na výstupu z kolony se sleduje vhodným detektorem. Při dělení například tří druhů molekul podle jejich velikosti mohou nejmenší molekuly difundovat až do vnitřního prostoru gelu, a jsou tudíž nejdéle zadržovány v koloně. Zatímco středně velké molekuly se dostanou pouze do větších pórů gelu a nemohou difundovat až do jeho nitra. Molekuly, které mají rozměry větší než jsou rozměry pórů, jsou z gelové náplně vyloučeny (exkludovány), mohou se nacházet pouze v prostoru mezi zrnky a procházejí kolonou bez zadržování. Jelikož mobilní fáze volně proudí pouze v prostoru mezi zrnky, je pořadí eluce při gelové chromatografii takové, že největší molekuly opouštějí kolonu nejdříve a teprve potom odchází z kolony molekuly s menší molární hmotností. [19]



Obr.8 Princip gelové permeační chromatografie [21]

## 3.4 Detektory

### 3.4.1 Detekce

Obecně je chromatografická detekce definována jako proces, při kterém se indikuje poloha a určuje koncentrace, případně některé specifické vlastnosti složek směsi podrobených

chromatografické separaci. Při detekci lze stanovit buď vlastnosti eluátu vycházejícího z kolony nebo vlastnosti separované látky (solutu) rozpuštěné v eluátu.

Na detekci se nejčastěji používají kontinuálně pracující detektory a zjištěné výsledky se zaznamenávají. [22]

Na detektory jsou při analýze kladeny poměrně vysoké požadavky. Především jsou to:

- vysoká citlivost
- stabilita a reprodukovatelnost detekovaného signálu
- široký lineární dynamický rozsah
- rychlá odezva
- minimální objem detekční cely

Detektory můžeme rozdělit na specifické, měřící určitou typickou vlastnost solutu (fotometry, coulometry a pod.), nespecifické, často nazývané univerzální (plamenoionizační detektory, refraktometry a pod.) a smíšené. [22]

Jelikož je tato práce zaměřena na gelovou permeační chromatografii s refraktometrickou a viskozitní detekcí, budou podrobněji diskutovány pouze tyto dva typy detektorů.

### 3.4.2 Refraktometry

Refraktometry jsou typickým představitelem detektorů, které měří vlastnosti eluátu. Jejich principem je měření změn indexu lomu eluátu v závislosti na koncentraci solutu. Aby se zvýšila citlivost měření a omezili se rušivé vlivy, jsou refraktometry konstruovány v diferenčním vyhotovení, kde se porovnává index lomu eluátu s indexem lomu eluátu [22].

Z metod měření indexu lomu se v komerčně dostupných detektorech využívají čtyři principy:

- *Deflexní refraktometry* využívají lom světelných paprsků při průchodu přes rozhraní látek s rozdílnou optickou hustotou, popsany Snellovým zákonem.
- *Reflexní refraktometry* jsou založené na Fresnelově zákoně odrazu světla.
- *Refraktometry založené na Christiansenově jevu*. Prochází-li světlo květou naplněnou malými částicemi se stejným indexem lomu jako má kapalina v květi, jeho intenzita poklesne jen málo. Pokud se však index lomu eluátu změní, lomy a roz-



ptyl světla na rozhraních kapalina-částice vzrostou a intenzita světla poklesne. Změny intenzity světla jsou úměrné změně indexu lomu eluátu.

- *Interferometry*, refraktometry ve kterých koherentní paprsky světla procházejí srovnávací a měřicí kyvetou. Přítomnost solutu v měřicí kyvetě způsobuje změnu efektivní optické dráhy paprsku. Tato dráha se měří interferometrem.

Refraktometry jsou nejpoužívanější detektory v gelové permeační chromatografii. Detekují všechny látky, jejichž index lomu se dostatečně liší od indexu lomu mobilní fáze.

Problémy při použití refraktometru způsobuje většinou pouze závislost indexu lomu na teplotě a tlaku [22].

### 3.4.3 Viskozitní detektor

Viskozitní detektor řadíme do skupiny detektorů měřících molární hmotnost vzorků. Tato skupina detektorů tvoří moderní typy tzv. molar mass sensitive detectors, tj. detektory, které zaznamenávají molární hmotnost nebo viskozitu měřeného polymerního vzorků.

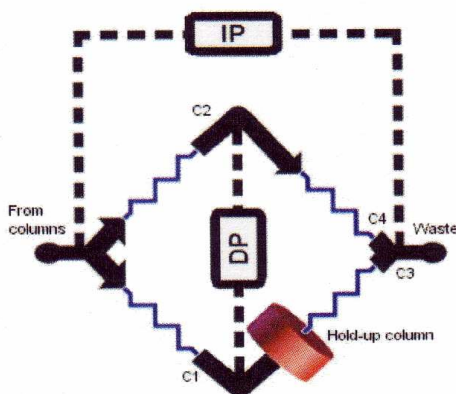
Pro on-line měření viskozity v GPC systému se nejčastěji používá viskozitního detektoru tvořeného čtyřmi kapilárami, které jsou sestaveny do můstku (viz. Obr. 9). Proudí-li tímto systémem pouze čisté rozpouštědlo s viskozitou  $\eta_0$ , je diferenciální tlak (differential pressure) v můstku nulový a  $\Delta P = 0$ , protože každá ze čtyř kapilár obsahuje pouze čisté rozpouštědlo. Začne-li můstkem proudit polymerní roztok, který je eluován z GPC kolony, vstupuje tento roztok do kapilár C1, C2 a C4, zatímco v kapiláře C3 zůstává, vzhledem k přítomnosti zásobníku (hold-up column) stále čisté rozpouštědlo. Zvýšení viskozity v kapilárách C1, C2 a C4 ve srovnání s viskozitou čistého rozpouštědla v kapiláře C3 způsobí tlakovou nerovnováhu v můstku, která je měřena tlakovým snímačem. Vstupní tlak (inlet pressure P) a diferenciální tlak jsou přímo úměrné specifické viskozitě polymerního roztoku. Specifická viskozita polymerního roztoku je potom určena rovnicí (8) [19]

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \frac{4\Delta P}{P_{in} - 2\Delta P} \quad (9)$$

Vzhledem k tomu, že měřené koncentrace polymerních roztoků jsou při GPC analýzách velmi nízké, je možno přímo stanovit limitní viskozitní číslo, bez nutnosti extrapolace k nulové koncentraci, jak je tomu běžné u klasických viskozitních měření:

$$\frac{\eta_{sp}}{c} \quad (10)$$

Spojení refraktometrického a viskozitního detektoru poskytuje přesné stanovení molární hmotnosti pro všechny typy polymerů, na které lze aplikovat univerzální kalibraci. Pomocí viskozitního detektoru lze získat i cenné informace o stupni větvení, které nejsou při měření se samotným refraktometrickým detektorem dostupné [19].



Obr. 9 Schéma viskozitního detektoru [19]

#### 3.4.4 Kalibrace

Aby bylo možno z GPC chromatogramů získat hodnoty molární hmotnosti, je třeba stanovit závislost mezi retenčním objemem (časem) a molární hmotností vzorků, tedy provést kalibraci.

##### Přímá kalibrace monodisperzními standardy

Jedním ze způsobů konstrukce kalibrační křivky pro GPC je použití série standardů s úzkou distribucí a známou molární hmotností. Standardy polymerů určené ke kalibraci GPC kolon mají pokrývat co nejširší oblast molárních hmotností a jejich distribuce má být co nejužší ( $M_w / M_n \leq 1,1$ ), aby bylo možné s dostatečnou přesností položit  $M_n \approx M_w \approx M_{GPC}$ , kde  $M_{GPC}$  je molární hmotnost odpovídající elučnímu objemu maxima

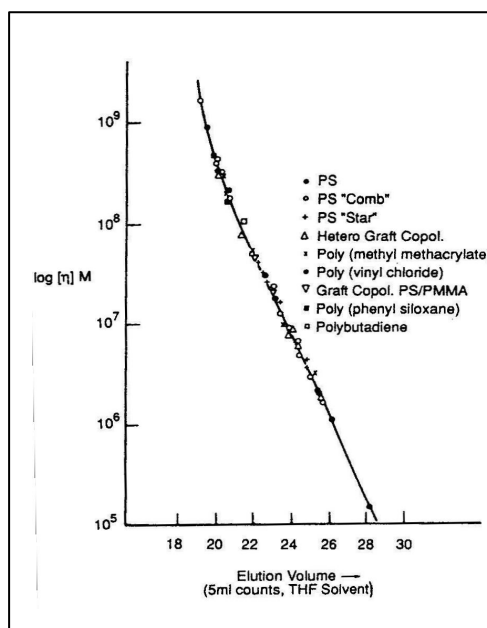
chromatogramu. Vlastní kalibrace se zakládá na změření chromatogramu řady úzkých frakcí uvažovaného polymeru se známými hodnotami molárních hmotností. Měříme za stejných podmínek, které se budou používat při analýzách neznámých vzorků. Doporučuje se pracovat s nejnižší možnou koncentrací kalibračních standardů, aby se omezil vliv koncentrační závislosti retenčních objemů. Retenční objemy  $V_R$  jednotlivých frakcí se potom vynesou proti logaritmu  $M$  a získaným bodovým polem se proloží hladká kalibrační křivka [19].

### Univerzální kalibrace

Dalším možným způsobem kalibrace je tzv. univerzální kalibrace, kterou zavedl v roce 1967 Benoit se spolupracovníky. Ti zjistili, že retenční objemy  $V_R$  homopolymerů i kopolymerů s různou strukturou (lineární i rozvětvené), které byly rozpuštěny v tetrahydrofuranu, sledují jedinou křivku, jsou-li vyneseny proti součinu  $\log [\eta]$  a  $M$ , kde  $[\eta]$  je limitní viskozitní číslo a  $M$  je molární hmotnost polymeru (obr. 10). 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 [24].

Pomocí moderních GPC systémů, které umožňují on-line spojení viskozitního a koncentračního detektoru (např. diferenciálního refraktometru) je možno přímo stanovit molární hmotnost pro každou frakci, která je eluována z kolony. Diferenciální refraktometr, jako koncentrační detektor poskytuje pro každou frakci koncentraci  $c$  a viskozimetrický detektor poskytuje součin  $[\eta] \cdot c$ . Vydělením signálu z viskozimetrického detektoru signálem z detektoru koncentračního, lze získat hodnotu limitního viskozitního čísla  $[\eta]_i$  každé polymerní frakce vycházející z kolony. Jelikož je známa hodnota limitního viskozitního čísla i retenční čas této každé frakce, lze použít křivku univerzální kalibrace a získat pro každou tuto frakci molární hmotnost  $M$ .

Platnost konceptu univerzální kalibrace byla prakticky ověřena na řadě typů polymerů, především pro polymery, které v roztoku zaujímají tvar statistického klubka. Existují však výjimky, kdy např. polymery tvořící ve roztoku tyčinky nebo tuhé koule křivce univerzální kalibrace nevyhovují. [19]



Obr .10 Křivka univerzální kalibrace  
(Benoit 1967)

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 POUŽITÉ MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE

### 4.1 Výchozí surovina – střívka

Pro experimentální práci byly použity odpady kolagenových střívek z produkce firmy Custisin, s.r.o. Jedná se o materiál vyrobený z čistého kolagenu, který je v kyselém prostředí sířován glutaraldehydem. Odpadní střívka nebyla vhodná k dalšímu použití vzhledem k nevyhovujícím mechanickým vlastnostem (nedostatečná pevnost, nehomogenita v tloušťce střívka, nestejný průměr). Obsah sušiny ve vzorcích činil 90 %, obsah dusíku 17 % a obsah popela 0.2 % (vztaženo na sušinu).

### 4.2 Příprava hydrolyzátu

Zbytky odpadních střívek (25g) byly nastříhány na kousky a poté vloženy spolu s 250 ml vody do laboratorního reaktoru, kde byly míchány a zahřívány na požadovanou teplotu. Po dosažení dané teploty bylo přidáno stanovené množství alkalázy. Hodnota pH byla upravena přidáním 35 ml (v jednom případě 30 ml) 1% roztoku n-butylaminu. Vzorky byly odebírány v určených časových intervalech (viz. tabulka 2) a pro odstranění případných nečistot nebo nehydrolyzovaného podílu po odběru filtrovány. U každého vzorku byl stanoven obsah dusíku Biuretovou metodou. Poté byly vzniklé hydrolyzáty vloženy do sušárny a vysušeny při teplotě 105°C do konstantní hmotnosti. Přehled analyzovaných vzorků a přehled jejich přípravy je stručně uveden v tabulce 2.

Tab. 2 Přehled přípravy jednotlivých vzorků

| Číslo pokusu | V n-butylamin 1% [ml] | V Alkaláza 1% [ml] | t [°C] | Časový interval odběru vzorků [min.] | Počet vzorků | Čas potřebný k rozkladu střívek [min.] |
|--------------|-----------------------|--------------------|--------|--------------------------------------|--------------|--|
| 61           | 30                    | 2,5                | 70     | 5                                    | 10           | 50 - 60                                |
| 62           | 35                    | 2                  | 70     | 9                                    | 8            | nerozložena                            |
| 63           | 35                    | 1,5                | 70     | 30                                   | 7            | nerozložena                            |
| 64           | 35                    | 2                  | 70     | 20                                   | 7            | nerozložena                            |
| 65           | 35                    | 2                  | 70     | 35                                   | 7            | nerozložena                            |
| 66           | 35                    | 2                  | 70     | 45                                   | 7            | nerozložena                            |
| 67           | 35                    | 2                  | 70     | 55                                   | 9            | částečně rozlož.                       |
| 68           | 35                    | 2                  | 65     | 60                                   | 5            | 25-30                                  |
| 69           | 35                    | 2                  | 65     | 15                                   | 9            | 40-45                                  |
| 70           | 35                    | 2                  | 65     | 10                                   | 9            | 20-30                                  |
| 71           | 35                    | 1,5                | 65     | 20                                   | 9            | 70-80                                  |
| 72           | 35                    | 1,5                | 65     | 10                                   | 9            | 30-40                                  |
| 73           | 35                    | 1,5                | 60     | 10                                   | 9            | 40                                     |
| 74           | 35                    | 1                  | 60     | 10                                   | 9            | 70                                     |
| 75           | 35                    | 0,5                | 60     | 10                                   | 7            | částečně rozlož.                       |
| 76           | 35                    | 0,5                | 60     | 20                                   | 9            | 80-100                                 |
| 77           | 35                    | 0,25               | 60     | 20                                   | 9            | částečně rozlož.                       |
| 78           | 35                    | 0,25               | 60     | 30                                   | 9            | 180-200                                |

V souvislosti s přípravou vzorků i diskusí výsledků je třeba uvést, že hydrolyzáty sledované v této práci jsou součástí širší studie prováděné na Ústavu automatizace a řídicí techniky FAI, jejíž cílem je mimo jiné i sledování kinetiky enzymatické hydrolýzy odpadních kolagenových střívek. Na výše jmenovaném pracovišti probíhala i příprava vzorků, které byly dodány ke GPC analýze.

### 4.3 Chemikálie

#### Hydrolýza vzorků

N-butylaminu (Acros Organics), 1% roztok

Alkaláza, 1% roztok

Tab. 3 Charakteristika alkalázy [13]

|   |  |
|---|--|
| Jméno   | Alkaláza   |
| Synonyma  | Subtilisin Carlsberg, Subtilopeptidase A, Bacterial Alkaline Protease  |
| Molární hmotnost  | 27 000 g.mol <sup>-1</sup>   |
| Specifická  | Subtilisin A se řadí do skupiny Serinových S8 Endoproteáz s širokou specificitou. Hydrolyzuje nativní a denaturované proteiny a je aktivní v alkalické oblasti |
| Izoelektrický bod   | pI = 9.4   |
| Vazby které enzym atakuje v oxidovaném B-řetězci insulínu <sup>a)</sup> | 4-5, 9-10, 11-12, 15-16, 26-27   |

<sup>a)</sup> oxidovaný B-řetězec insulínu: NH<sub>2</sub>-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-CySO<sub>3</sub>H-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-CySO<sub>3</sub>H-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala

### GPC

Mobilní fáze, která obsahuje:

Dusičnan sodný (Lachema), 0,1M vodný roztok

Azid sodný (Lachema), 0,02% vodný roztok

Acetonitril (LAB-SCAN analytical sciences)



## 5 POUŽITÉ METODY

### 5.1 Gelová permeační chromatografie

#### 5.1.1 Přístroj

Molární hmotnost a distribuce molárních hmotností byly stanoveny metodou gelové permeační chromatografie na přístroji GPC PL50 s viskozitní a refraktometrickou detekcí (*Polymer Laboratories Ltd*). K analýzám byla použita série kolon sestávající z jedné kolony TSKGMPWXL (Tosoh Bioscience) a jedné kolony Ultrahydrogel 250 (Waters). Vodná mobilní fáze obsahovala 0,1 M NaNO<sub>3</sub>, 0,02 % NaN<sub>3</sub> a 15% (V/V) acetonitrilu. Stanovení byla provedena při laboratorní teplotě za použití nástřikového objemu 100 μl při průtokové rychlosti mobilní fáze 0,8 ml.min<sup>-1</sup>. Universální kalibrace byla vytvořena za použití standardů polysacharidů – pullulanů s úzkou distribucí molárních hmotností v rozmezí molárních hmotností 180 až 788000 g.mol<sup>-1</sup> (*Polymer Laboratories Ltd*). Data byla zpracována pomocí programu Cirrus GPC Multi Detector Software (*Polymer Laboratories Ltd*). Použitá metoda nebyla validována. [24]

#### 5.1.2 Volba mobilní fáze pro GPC

Stanovení molární hmotnosti a distribuce molárních hmotností pomocí GPC u polymerů rozpustných ve vodných rozpouštědlech je často spojeno s těžkostmi, protože se zde setkáváme s tzv. „non-size exclusion“ efektem, který ruší separaci makromolekul podle jejich velikosti. GPC je technika založená na separaci molekul podle velikosti částice které 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. Navíc se explicitně předpokládá, že částice, které eluují z kolony dříve mají větší molární hmotnost jako částice s delším retenčním časem. U GPC ve vodné fázi se však poměrně často setkáváme s nežádoucími „non-size exclusion“ efekty, které výše uvedené zásady separace ruší. K těmto nežádoucím jevům řadíme intermolekulární elektrostatické interakce mezi analyzovanou látkou a náplní kolony (např. výměna iontů), intramolekulární elektrostatické interakce mezi analyzovanou látkou a náplní kolony (např. tvorba vodíkových můstků) a adsorpci. Volbou vhodného rozpouštědla lze tyto nežádoucí vlivy potlačit. Na doporučení

výrobce kolon byla proto pro analýzu hydrolyzátů kolagenu použita mobilní fáze sestávající z 0.1 M NaNO<sub>3</sub> a přídavku organického rozpouštědla acetonitrilu [25]. Azid sodný se běžně do mobilní fáze přidává jako látka bránící růstu mikroorganismů.

### 5.1.3 Příprava vzorků pro GPC

Vzorky pro analýzu byly připraveny navážením sušiny a jejím rozpuštěním v mobilní fázi, použité jako eluent pro GPC. Použitá koncentrace byla v rozmezí od 1,8 do 3,5 mg.ml<sup>-1</sup>. Doba rozpouštění činila přibližně 10 hodin a rozpouštění probíhalo při laboratorní teplotě. Před měřením byly vzorky vizuálně kontrolovány, obsahují-li nerozpuštěné částice a filtrovány přes filtr Chromafil PP/PET a velikosti pórů 0,45 μm.

### 5.1.4 Vzhled a rozpustnost vzorků

Vzhledem k tomu, že rozpustnost vzorků má přímou souvislost s velikostí koncentrace roztoku použitého pro GPC analýzu byla skutečnost, zda je hydrolyzát dobře či špatně rozpuštěn pozorně sledována. Rovněž vzhled hydrolyzátu byl pomocným měřítkem při hodnocení vzorků. Během přípravy hydrolyzátu bylo zjištěno, že vzhled a rozpustnost vzorků se lišily. Vzhled sušiny byl pro přehlednost rozdělen do čtyř skupin a tyto skupiny byly pojmenovány med, guma, křehký a tvrdý. Uvedené označení vystihuje charakter vzorku. Vzorek označený jako med byl lepkavý a velmi měkký, vzorek guma byl pružný, vzorek křehký bylo možno lehce rozlomit na malé části a tvrdý vzorek bylo možné rozlomit na malé části jen obtížně.

Rozpouštění vzorků probíhalo po dobu alespoň 10 hodin a bylo zjištěno že, rozpustnost vzorků nebyla závislá na jejich vzhledu. Údaje o vzhledu vzorku jsou uvedeny v tabulkách číslo 4-21. V roztocích některých vzorků byly po uplynutí doby rozpouštění pozorovány okem viditelné částice. Tyto vzorky byly proto ještě dále rozpouštěny při zvýšené teplotě 55°C v ultrazvukové lázni. Po rozpouštění při zvýšené teplotě již v roztocích viditelné částice pozorovány nebyly.

## 6 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 6.1 Vzorky hydrolyzátů kolagenu připravené při teplotě 70°C

Numerické hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností  $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností  $M_n$  a indexu polydisperzity  $P = M_w/M_n$  vzorků hydrolyzátů kolagenu připravených při teplotě 70°C jsou uvedeny v tabulkách 4-10. Grafické znázornění závislosti molární hmotnosti na době hydrolýzy u jednotlivých vzorků je souhrnně zobrazeno na Obr. 11. Obr. 12 zobrazuje grafické porovnání závislostí  $M_w$  na době hydrolýzy u vzorků č. 61, č. 62 a č. 63, kde je k hydrolýze použito různého množství alkalázy.

Tab. 4 Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností  $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností  $M_n$  a indexu polydisperzity  $P$  vzorku hydrolyzátu č. 61. Teplota hydrolýzy 70°C, množství 1% roztoku alkalázy 2,5 ml.

| Číslo vzorku | Vzhled vzorku | $M_n$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | $M_w$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | $P$<br>$M_w/M_n$ | Doba hydrolýzy<br>[min.] |
|--------------|---------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------|--------------------------|
| 61_1         | Guma-Křehký   | 1200                            | 5700                            | 5                | 5                        |
| 61_2         | Guma          | 2200                            | 5900                            | 2,7              | 10                       |
| 61_3         | Guma          | 2100                            | 6000                            | 2,9              | 15                       |
| 61_4         | Tuhý          | 1700                            | 8200                            | 4,9              | 20                       |
| 61_5         | Tuhý          | 2200                            | 5000                            | 2,2              | 25                       |
| 61_6         | Tuhý          | 2100                            | 6500                            | 3,1              | 30                       |
| 61_7         | Tuhý          | 2500                            | 7100                            | 2,9              | 35                       |
| 61_8         | Tuhý          | 2500                            | 8100                            | 3,2              | 40                       |
| 61_9         | Tuhý          | 1700                            | 7100                            | 4,2              | 45                       |
| 61_10        | Tuhý          | 1800                            | 6700                            | 3,8              | 50                       |

Tab. 5 Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností  $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností  $M_n$  a indexu polydisperzity P vzorku hydrolyzátu č. 62. Teplota hydrolyzy 70°C, množství 1% roztoku alkalázy 2,0 ml.

| Číslo vzorku | Vzhled vzorku | $M_n$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | $M_w$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | PD<br>$M_w/M_n$ | Doba hydrolyzy<br>[min.] |
|--------------|---------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------|--------------------------|
| 62_1         | Med           | 2200                            | 8400                            | 3,8             | 9                        |
| 62_2         | Med           | 1900                            | 8200                            | 4,2             | 18                       |
| 62_3         | Med           | 4800                            | 16900                           | 3,6             | 29                       |
| 62_4         | Med           | 2500                            | 15900                           | 6,5             | 36                       |
| 62_5         | Med           | 2400                            | 14400                           | 5,9             | 45                       |
| 62_7         | Med           | 2300                            | 9200                            | 3,9             | 63                       |
| 62_8         | Guma          | 2200                            | 15900                           | 7,3             | 72                       |

Tab. 6 Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností  $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností  $M_n$  a indexu polydisperzity P vzorku hydrolyzátu č. 63. Teplota hydrolyzy 70°C, množství 1% roztoku alkalázy 1,5 ml.

| Číslo vzorku | Vzhled vzorku | $M_n$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | $M_w$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | PD<br>$M_w/M_n$ | Doba hydrolyzy<br>[min.] |
|--------------|---------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------|--------------------------|
| 63_1         | Med           | 7500                            | 11200                           | 1,5             | 30                       |
| 63_2         | Med           | 7400                            | 20800                           | 2,8             | 60                       |
| 63_5         | Guma          | 10800                           | 26500                           | 2,5             | 150                      |
| 63_6         | Guma          | 3200                            | 26600                           | 8,1             | 180                      |
| 63_7         | Křehký        | 9700                            | 54300                           | 5,6             | 210                      |

Tab. 7 Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností  $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností  $M_n$  a indexu polydisperzity P vzorku hydrolyzátu č. 64. Teplota hydrolyzy 70°C, množství 1% roztoku alkalázy 2,0 ml.

| Číslo vzorku | Vzhled vzorku | $M_n$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | $M_w$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | PD<br>$M_w/M_n$ | Doba hydrolyzy<br>[min.] |
|--------------|---------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------|--------------------------|
| 64_1         | Med           | 1700                            | 6600                            | 3,9             | 20                       |
| 64_3         | Guma          | 2100                            | 13300                           | 6,5             | 60                       |
| 64_5         | Křehký        | 3200                            | 22300                           | 6,9             | 100                      |
| 64_7         | Křehký        | 2300                            | 14400                           | 6,4             | 140                      |

Tab. 8 Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností  $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností  $M_n$  a indexu polydisperzity  $P$  vzorku hydrolyzátu č. 65. Teplota hydrolyzy 70°C, množství 1% roztoku alkalázy 2,0 ml.

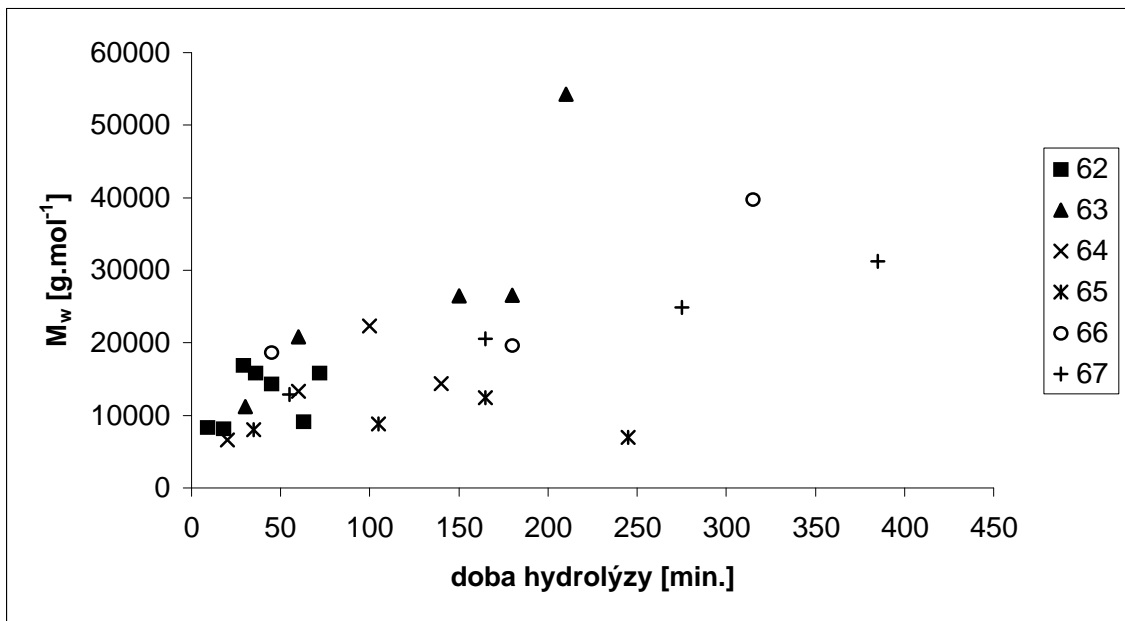
| Číslo vzorku | Vzhled vzorku | $M_n$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | $M_w$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | PD<br>$M_w/M_n$ | Doba hydrolyzy<br>[min.] |
|--------------|---------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------|--------------------------|
| 65_1         | Med           | 1700                            | 8000                            | 4,7             | 35                       |
| 65_3         | Med           | 2200                            | 8800                            | 3,9             | 105                      |
| 65_5         | Med           | 2700                            | 12400                           | 4,6             | 165                      |
| 65_7         | Guma          | 1900                            | 7000                            | 3,8             | 245                      |

Tab. 9 Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností  $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností  $M_n$  a indexu polydisperzity  $P$  vzorku hydrolyzátu č. 66. Teplota hydrolyzy 70°C, množství 1% roztoku alkalázy 2,0 ml.

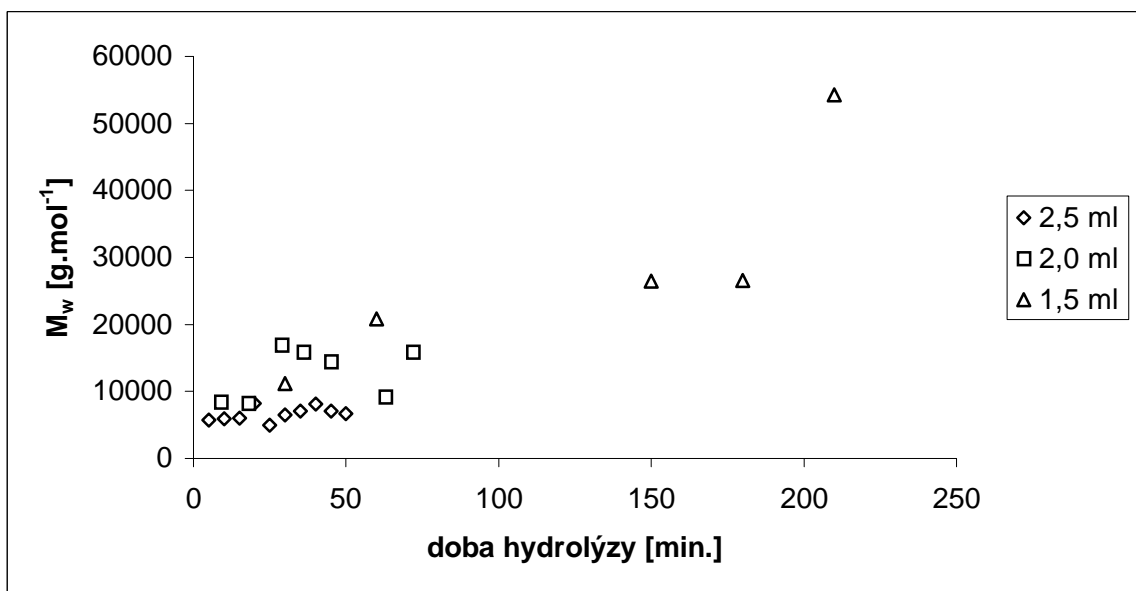
| Číslo vzorku | Vzhled vzorku | $M_n$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | $M_w$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | PD<br>$M_w/M_n$ | Doba hydrolyzy<br>[min.] |
|--------------|---------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------|--------------------------|
| 66_1         | Med           | 6000                            | 18700                           | 3,1             | 45                       |
| 66_4         | Guma          | 2500                            | 19700                           | 7,9             | 180                      |
| 66_7         | Křehký        | 3400                            | 39800                           | 11,8            | 315                      |

Tab. 10 Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností  $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností  $M_n$  a indexu polydisperzity  $P$  vzorku hydrolyzátu č. 67. Teplota hydrolyzy 70°C, množství 1% roztoku alkalázy 2,0 ml.

| Číslo vzorku | Vzhled vzorku | $M_n$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | $M_w$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | PD<br>$M_w/M_n$ | Doba hydrolyzy<br>[min.] |
|--------------|---------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------|--------------------------|
| 67_1         | Guma          | 2800                            | 12900                           | 4,6             | 55                       |
| 67_3         | Křehký        | 3600                            | 20600                           | 5,7             | 165                      |
| 67_5         | Křehký        | 5800                            | 24900                           | 4,3             | 275                      |
| 67_7         | Křehký        | 4500                            | 31200                           | 6,9             | 385                      |

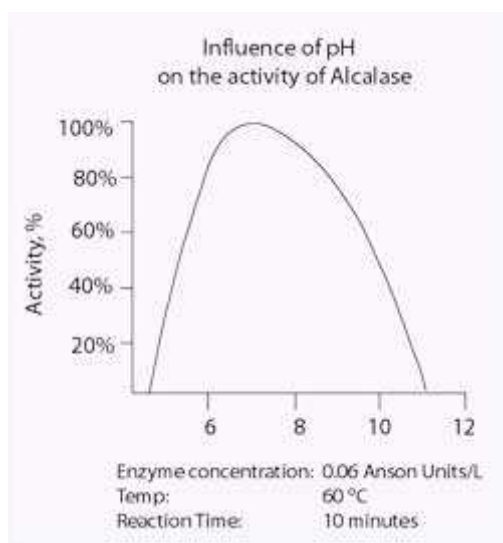


Obr. 11 Grafické vyjádření závislosti  $M_w$  na době hydrolýzy u vzorků připravených při teplotě 70°C



Obr. 12 Grafické vyjádření závislosti molární hmotnosti vzorků na době hydrolýzy při teplotě 70°C, kdy byly vzorky připraveny za přídavku alkalázy v množství 2,5 ml (vzorek č. 61), 2,0 ml (vzorek č. 62) a 1,5 ml (vzorek č. 63)

Hydrolyza byla provedena v alkalickém prostředí zajištěném přidavkem 30 až 35 ml 1 % -ního roztoku N-butylaminu. Alkalické prostředí je nezbytnou podmínkou pro správné působení alkalázy a z Obr. 13, kde je uvedena závislost aktivity alkalázy na pH je zřejmé, že maximální aktivita enzymu je mezi hodnotami pH 8 až 9. Po přidavku uvedeného množství N-butylaminu bylo pH roztoků cca 8,5 a pro působení alkalázy byly tedy vytvořeny optimální podmínky.



Obr.13 Závislost aktivity alkalázy na pH

V případě vzorků č. 61, č. 62 a č. 63 byla střívka hydrolyzována přidavkem 2,5 ml., 2,0 a 1,5 ml 1%-ního roztoku alkalázy. Závislost hmotnostního průměru molární hmotnost  $M_w$  na době hydrolyzy je pro tyto tři případy uvedena na Obr. 12. Numerické i grafické znázornění výsledků dokládá, že množství alkalázy použité k hydrolyze zásadně ovlivňuje hodnotu  $M_w$  a tedy i míru rozkladu výchozího materiálu. Vzorek č. 61 hydrolyzovaný 2,5 ml alkalázy vykazuje nejnižší hodnotu  $M_w$ , která leží v rozmezí od 5700 do 8200  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Zároveň je tento vzorek jediný z této série, u kterého došlo ke konci pokusu, cca po 50 až 60 minutách hydrolyzy k úplnému rozkladu střívek. Zajímavý je i průběh závislosti  $M_w$  na době hydrolyzy. Hodnota  $M_w$  se vzrůstající dobou hydrolyzy nemá ani vzestupnou, ani sestupnou tendenci, ale mění se náhodně ve výše uvedeném intervalu. To je možno vysvětlit tím, že alkaláza „odštěpuje“ za daných podmínek přibližně stejné části kolagenové molekuly.

ly, jejichž molární hmotnost se příliš neliší. Obdobně se chová i časová závislost  $M_w$  u vzorku č. 62. Molární hmotnosti vzorků č. 62 (2,0 ml alkalázy) a č. 63 (1,5 ml alkalázy) byly ve srovnání se vzorkem č. 61 vyšší. Pro vzorek č. 62 byla  $M_w$  v rozmezí 8200 až 16900  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  a pro č. 63 v rozmezí 11200 až 54300  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . U vzorku č. 63 navíc molární hmotnost během hydrolýzy rostla. Současně v obou posledně jmenovaných případech nedošlo k rozložení střívek, i když v případě vzorku č. 63 činila celková doba hydrolýzy 210 minut.

Další série vzorků, hydrolyzáty č. 64, č. 65, č. 66 a č. 67 byla připravena za použití stejného přídatku 2 ml 1% roztoku alkalázy a 35 ml N-butylaminu. Vzorky se lišily od vzorku č. 62, který byl rovněž hydrolyzován 2 ml alkalázy, pouze intervalem vzorkování, tedy celkovou dobou hydrolýzy. Pro hydrolyzát č. 64 byly vzorky odebírány po 20 minutách, pro č. 65 po 35 minutách, pro č. 66 po 45 minutách a pro hydrolyzát č. 67 po 55 minutách. Tyto vzorky byly primárně použity pro sledování kinetiky hydrolýzy [26], avšak z výsledků měření molárních hmotností lze rovněž učinit zajímavé závěry. Při srovnání numerických hodnot  $M_w$  (tabulky 4 – 10) a průběhu závislosti  $M_w$  na době hydrolýzy na Obr. 11 je vidět, že molární hmotnost hydrolyzátů u kterých vzorkování probíhalo po 20 a 35 minutách (č. 64, č. 65) je v průměru nižší ve srovnání s hydrolyzáty, kde vzorkování probíhalo po 45 a 55 minutách (č. 66, č. 67). Molární hmotnost prvních dvou hydrolyzátů byla v intervalu 6000 až 22000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , molární hmotnost druhých dvou vzorků ležela v intervalu 12 900 až 39 800  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Zároveň je možno konstatovat, že u posledně jmenovaných vzorků se molární hmotnost zvyšuje s prodlužující se dobou hydrolýzy. Příčinu této situace by bylo možno hledat buď ve vlivu nehomogenity výchozího materiálu a nebo, což je více pravděpodobné, ve skutečnosti, že aktivita alkalázy při dané teplotě klesá s prodlužující se dobou hydrolýzy.

Vliv teploty na aktivitu alkalázy byl sledován při konstantním  $\text{pH} = 8,5$  a různých teplotách a bylo publikováno, že při teplotě 70 °C nastává již po 10 minutách významný pokles aktivity enzymu, kdy zůstatková aktivita činila 25 % aktivity počáteční [27]. Klesající aktivita enzymu by tedy mohla způsobit růst molární hmotnosti hydrolyzovaného materiálu, protože by docházelo k odštěpování stále delších makromolekulárních řetězců. Z literatury je známo, že charakteristickou vlastností kolagenu je pevnost a trojřetězcová helikální struktura, kdy se tři kolagenové polypeptidové makromolekuly ( $\alpha$  řetězce) z nichž každý obsahuje asi 1000 aminokyselinových (AMK) zbytků společně stáčíjí do pravotočivé šroubovi-



ce. Úplná otáčka trojitě spirály obsahuje 30 AMK zbytků. Jednotlivé polypeptidové řetězce tvoří opakující se jednotky tripeptidů (Gly-X-Z) kde X, Z jsou aminokyseliny. Oblasti tvořené AMK s nízkou molární hmotností je možno považovat za krystalické, vysoce orientované úseky. Naopak oblasti s výšemolekulárními AMK nemají přísně uspořádanou stavbu jsou méně orientované a lze je považovat za amorfní. Pro jejich konformační volnost a přítomnost polárních skupin je lze považovat za reaktivní místa kolagenové molekuly. Při enzymatické hydrolýze je alkaláza schopna štěpit pět typů peptidických vazeb (viz tabulka 3). Dále je při reakci potřebné, aby příslušná vazba byla enzymu, který má sám poměrně vysokou molární hmotnost ( $27000\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) stericly dostupná. A pokud se tato vazba nachází uvnitř trojrozměrné kolagenové struktury, nemusí k reakci vůbec dojít. Preferovanými místy pro působení enzymu (ataku enzymu) jsou konce řetězce, kde je struktura helixu nedokonalá. V případě, kdy dojde k narušení trojrozměrné struktury molekuly ať už teplem nebo chemickou cestou, stávají se peptidické vazby více přístupnými a enzymatická hydrolýza je snazší. [28] S ohledem na výše uvedenou teoretickou úvahu je vhodné připomenout, že vzorky pro měření byly odebírány z „heterogenního systému“, kdy část střívek již byla rozložena a přešla do roztoku, avšak část byla v reaktoru stále ještě v pevném, nerozloženém stavu a současně s touto skutečností postupně docházelo k poklesu aktivity alkalázy v roztoku, respektive již po relativně krátké době hydrolýzy nebyla při  $70^\circ\text{C}$  alkaláza aktivní vůbec.

Další zdůvodnění růstu molární hmotnosti během hydrolýzy by bylo možno hledat ve zhoršené rozpustnosti vzorků. Tuto skutečnost však lze vyloučit, protože všechny vzorky byly před měřením dobře rozpuštěny a v jejich roztocích nebyly pozorovány nerozpuštěné částice nebo zbytky vzorku.

Z praktického hlediska je nutno konstatovat, že k rozkladu střívek nedošlo ani u jednoho ze sledovaných vzorků této série, pouze u vzorku č. 67 s nejdelší celkovou dobou hydrolýzy 385 minut byl pozorován jejich částečný rozklad. U této dlouhé reakční doby je rovněž možno uvažovat, že k hydrolýze přispívá nejen enzym, který působí v krátké době po začátku reakce, ale i běžné hydrolytické štěpení, ke kterému dochází v alkalickém prostředí a které převažuje v dlouhých časech hydrolýzy.

## 6.2 Vzorčky hydrolyzátů kolagenu připravené při teplotě 65°C

Další série vzorků byla připravena hydrolyzou střívek při teplotě 65°C. Výsledky jsou shrnuty v Tabulkách 11-15. Obr. 14 vyjadřuje závislost  $M_w$  na době hydrolyzy u jednotlivých vzorků této série. Na Obr. 16 je znázorněna závislost  $M_w$  na době hydrolyzy v vzorků č. 67 hydrolyzovaného při teplotě 70°C a č. 68 při teplotě hydrolyzy 65°C.

Tab. 11 Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností  $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností  $M_n$  a indexu polydisperzity  $P$  vzorku hydrolyzátu č. 68. Teplota hydrolyzy 65°C, množství 1% roztoku alkalázy 2,0 ml.

| Číslo vzorku | Vzhled vzorku | $M_n$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | $M_w$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | PD<br>$M_w/M_n$ | Doba hydrolyzy<br>[min.] |
|--------------|---------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------|--------------------------|
| 68_1         | Tuhý          | 2500                            | 7900                            | 3,1             | 60                       |
| 68_3         | Křehký        | 2600                            | 7400                            | 2,9             | 180                      |
| 68_4         | Tuhý          | 3000                            | 6800                            | 2,3             | 240                      |
| 68_5         | Tuhý          | 2300                            | 5900                            | 2,6             | 300                      |

Tab. 12 Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností  $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností  $M_n$  a indexu polydisperzity  $P$  vzorku hydrolyzátu č. 69. Teplota hydrolyzy 65°C, množství 1% roztoku alkalázy 2,0 ml.

| Číslo vzorku | Vzhled vzorku | $M_n$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | $M_w$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | PD<br>$M_w/M_n$ | Doba hydrolyzy<br>[min.] |
|--------------|---------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------|--------------------------|
| 69_1         | Guma          | 1900                            | 6100                            | 3,2             | 5                        |
| 69_2         | Tuhý          | 1900                            | 5500                            | 2,8             | 10                       |
| 69_3         | Tuhý          | 2700                            | 5900                            | 2,2             | 15                       |
| 69_4         | Tuhý          | 1800                            | 5300                            | 2,9             | 20                       |
| 69_6         | Tuhý          | 1400                            | 4100                            | 2,9             | 30                       |
| 69_8         | Tuhý          | 2300                            | 6300                            | 2,7             | 40                       |
| 69_9         | Tuhý          | 2300                            | 5500                            | 2,4             | 45                       |

Tab. 13 Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností  $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností  $M_n$  a indexu polydisperzity  $P$  vzorku hydrolyzátu č. 70. Teplota hydrolyzy  $65^\circ\text{C}$ , množství 1% roztoku alkalázy 2,0 ml.

| Číslo vzorku | Vzhled vzorku | $M_n$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | $M_w$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | PD<br>$M_w/M_n$ | Doba hydrolyzy<br>[min.] |
|--------------|---------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------|--------------------------|
| 70_1         | Guma          | 1800                            | 5300                            | 2,9             | 10                       |
| 70_2         | Tuhý          | 2000                            | 5200                            | 2,6             | 20                       |
| 70_3         | Tuhý          | 2200                            | 6300                            | 2,9             | 30                       |
| 70_4         | Tuhý          | 1400                            | 4700                            | 3,3             | 40                       |
| 70_5         | Tuhý          | 3000                            | 5600                            | 1,9             | 50                       |
| 70_6         | Tuhý          | 2500                            | 6400                            | 2,5             | 60                       |
| 70_7         | Tuhý          | 2200                            | 5700                            | 2,6             | 70                       |
| 70_8         | Tuhý          | 1900                            | 5000                            | 2,6             | 80                       |
| 70_9         | Tuhý          | 1400                            | 4400                            | 3,1             | 90                       |

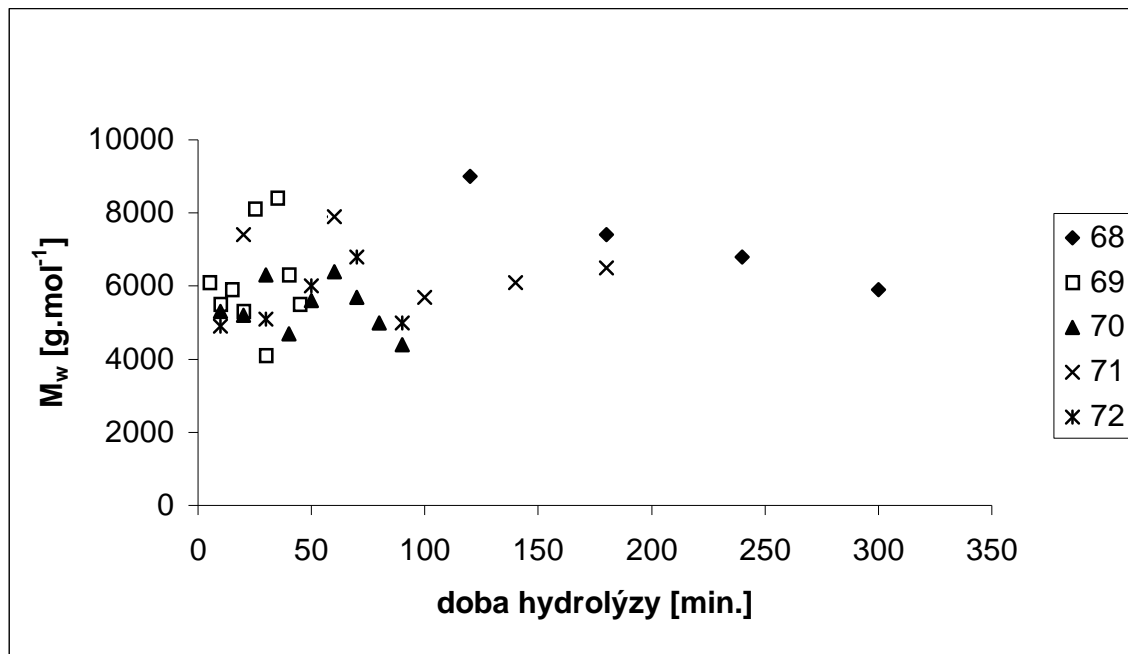
Tab. 14 Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností  $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností  $M_n$  a indexu polydisperzity  $P$  vzorku hydrolyzátu č. 71. Teplota hydrolyzy  $65^\circ\text{C}$ , množství 1% roztoku alkalázy 1,5 ml.

| Číslo vzorku | Vzhled vzorku | $M_n$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | $M_w$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | PD<br>$M_w/M_n$ | Doba hydrolyzy<br>[min.] |
|--------------|---------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------|--------------------------|
| 71_1         | Med           | 2100                            | 7400                            | 3,5             | 20                       |
| 71_3         | Guma          | 1800                            | 7900                            | 4,5             | 60                       |
| 71_5         | Tuhý          | 1900                            | 5700                            | 3               | 100                      |
| 71_7         | Tuhý          | 1800                            | 6100                            | 3,4             | 140                      |
| 71_9         | Tuhý          | 2700                            | 6500                            | 2,4             | 180                      |

Tab. 15 Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností  $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností  $M_n$  a indexu polydisperzity  $P$  vzorku hydrolyzátu č. 72. Teplota hydrolyzy  $65^\circ\text{C}$ , množství 1% roztoku alkalázy 1,5 ml.

| Číslo vzorku | Vzhled vzorku | $M_n$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | $M_w$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | PD<br>$M_w/M_n$ | Doba hydrolyzy<br>[min.] |
|--------------|---------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------|--------------------------|
| 72_1         | Med           | 1400                            | 4900                            | 3,5             | 10                       |
| 72_3         | Guma          | 1500                            | 5100                            | 3,4             | 30                       |

|      |      |      |      |     |    |
|------|------|------|------|-----|----|
| 72_5 | Tuhý | 1800 | 6000 | 3,3 | 50 |
| 72_7 | Tuhý | 2000 | 6800 | 3,3 | 70 |
| 72_9 | Tuhý | 1600 | 5000 | 3   | 90 |



Obr. 14 Grafické vyjádření závislosti  $M_w$  na době hydrolyzy u vzorků připravených při teplotě 65°C

Vzorky č. 68, č. 69 a č. 70 připravené přidavkem 2 ml alkalázy se navzájem odlišovaly intervaly vzorkování a tedy celkovou dobou hydrolyzy. Molární hmotnost hydrolyzátů se ve všech třech případech pohybovala v rozmezí od cca 4000 do 6000 g.mol<sup>-1</sup>. U hydrolyzátu č. 68 s nejdelší dobou hydrolyzy byla molární hmotnost po 60 a 180 minutách hydrolyzy mírně vyšší, cca 8000 g.mol<sup>-1</sup>. U všech těchto vzorků bylo možno pozorovat společný trend, a to mírný pokles molární hmotnosti s prodlužující se dobou hydrolyzy. Vzorky č. 71 a č. 72 připravené přidavkem 1,5 ml alkalázy se od předchozích třech vzorků podstatně nelišily a jejich molární hmotnosti ležely v intervalu od 4900 do 7900 g.mol<sup>-1</sup>.

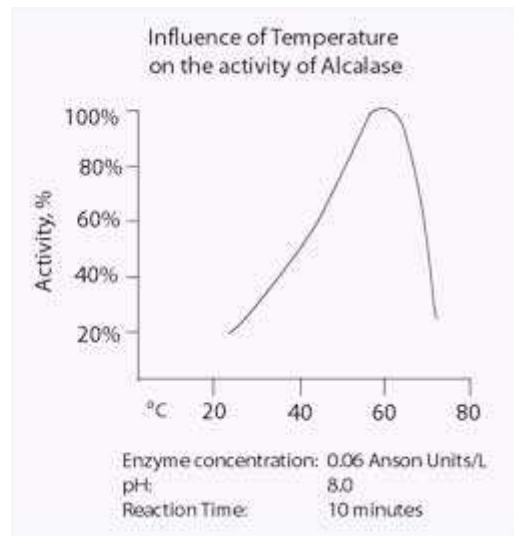
Srovnáme-li hodnoty  $M_w$  hydrolyzátů připravených při 65°C s hydrolyzáty připravenými při 70°C je na první pohled zřejmé, že při nižší teplotě hydrolyzy jsou molární hmotnosti obecně nižší, bez ohledu na množství alkalázy použité k hydrolyze. Zároveň však při 65°C není podstatný rozdíl mezi hydrolyzáty připravenými s 1,5 nebo 2 ml alkalázy. Vzhledem k tomu, že enzymatická hydrolyza s alkalázou způsobuje štěpení jen zcela konkrétních va-

zeb, je možno konstatovat, že tyto podmínky jsou pro rozklad střívek příznivé. Zároveň se však zřejmě dostáváme k hraniční situaci, kdy ani prodloužení doby hydrolyzy ani přidavek většího množství alkalázy k dalšímu snižování molární hmotnosti nevede.

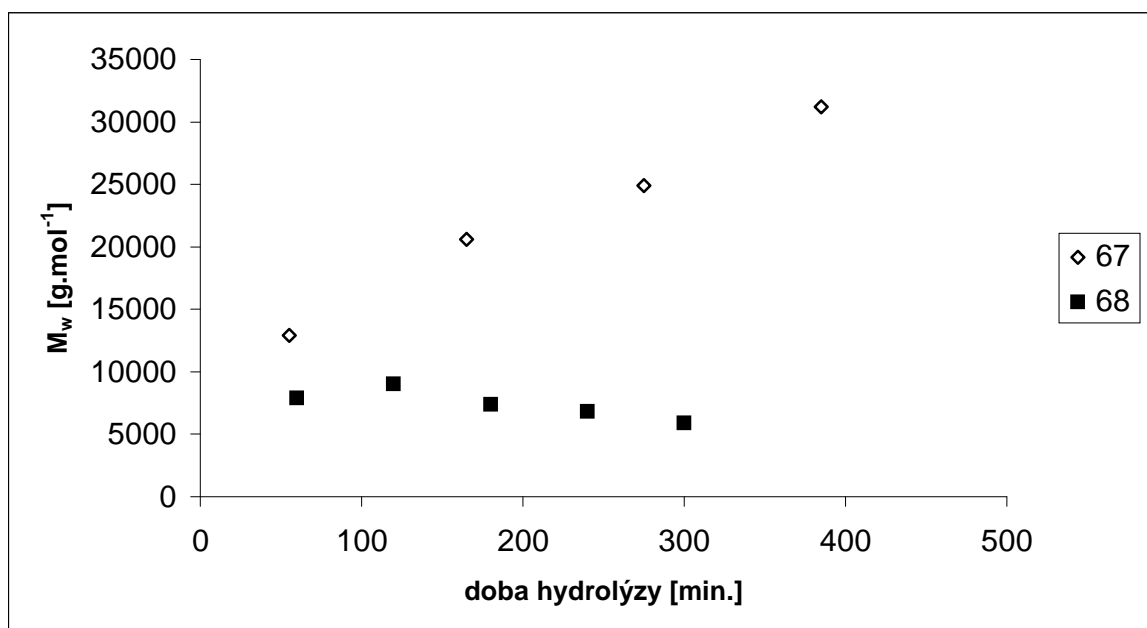
Na Obr. 16 je uvedena závislost  $M_w$  na době hydrolyzy u vzorků č. 67 a č. 68. Srovnání těchto vzorků je použito pro ilustraci vlivu teploty, při které hydrolyza probíhá na změnu molární hmotnosti připravených hydrolyzátů. Tyto dva vzorky byly připraveny hydrolyzou s 2 ml alkalázy po přibližně stejnou dobu a jediným rozdílným faktorem byla teplota hydrolyzy, která pro vzorek č. 67 činila 70°C a pro vzorek č. 68 činila 65°C. Obrázek názorně ukazuje, že při teplotě 70°C jsou hodnoty  $M_w$  vyšší a i průběh závislosti  $M_w$  na době hydrolyzy je zcela odlišný.

Při teplotě 65°C rovněž došlo ve všech případech k úplnému rozkladu střívek. Přídavkem alkalázy v objemu 2 ml (vzorky č. 68, č. 69 a č. 70) se střívka rozložila v průměru za 25 až 45 minut. Při přidavku alkalázy v objemu 1,5 ml byla doba delší, a to 30 až 80 minut (vzorky č. 71 a č. 72). Výsledky naznačují, že použitím většího objemu přidané alkalázy při teplotě 65°C se zvyšuje rychlost hydrolyzy kolagenových střívek, i když molární hmotnost vzorků se podstatně nemění.

Na základě výše uvedených pozorování je možno konstatovat, že rychlost hydrolyzy střívek při dané teplotě přímo souvisí s aktivitou alkalázy, která se s teplotou mění. Graficky je závislost účinnosti na teplotě uvedena na Obr. 15 [28]. Je zřejmé, že optimální teplota pro aktivitu alkalázy leží mezi 55 a 65°C. Při teplotě 55 až 60°C zůstává po 10 minutovém zahřívání zůstatková aktivita na 95 % aktivity původní a při 65°C je zůstatková aktivita 80 až 85 %. Při teplotách vyšších či nižších, než je uvedený interval aktivita alkalázy klesá [27]. Při působení alkalázy po dobu 1 hodiny při teplotě 60°C je hodnota její zůstatkové aktivity 80%, při zvýšení teploty na 65°C je po 10 minutách hodnota zůstatkové aktivity alkalázy již pouze 75% a po 20 minutách je to 50%. Zůstatková aktivita alkalázy po dobu působení jedné hodiny je pouhých 20%. Ještě k dalšímu snižování aktivity tohoto enzymu dochází při teplotě 70°C. Po 5 minutách je hodnota zůstatkové aktivity 5%, po 10 minutách 25% a po 35 minutách již alkaláza nevykazuje aktivitu žádnou. Z daných informací lze usoudit, že při dlouhodobém působení alkalázy, kdy z testovaných teplot měla nejvíce vyhovovat teplota 60°C, neboť se stoupající teplotou aktivita alkalázy během času výrazně klesá.



Obr. 15 Grafické vyjádření závislost aktivity enzymu alkalázy na teplotě [27]



Obr. 16 Grafické vyjádření závislost  $M_w$  na době hydrolýzy u vzorků č. 67 hydrolyzovaného při teplotě 70°C a vzorku č. 68 při teplotě hydrolýzy 65°C

### 6.3 Vzorky hydrolyzátů kolagenu připravené při teplotě 60°C

Vzhledem k průběhu závislosti aktivity alkalázy na teplotě uvedené na Obr. 15 probíhala příprava vzorků hydrolyzátů při 60°C při neoptimálnějších podmínkách. Proto byla tato série vzorků připravených při 60°C zaměřena na sledování možnosti ještě dále snížit množství použité alkalázy potřebné k rozkladu střívek a vzorky byly připraveny působením 1,5 ml (č. 73), 1,0 ml (č. 74), 0,5 ml (č. 75 a č. 76) a 0,25 ml (č. 77 a č. 78) 1%-ního roztoku enzymu. Obdobně jako pro předchozí série jsou i pro tyto hydrolyzáty hodnoty molárních hmotností shrnuty v tabulkách 16-21 a závislost  $M_w$  na době hydrolýzy je uvedena na Obr. 18.

Tab. 16 Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností  $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností  $M_n$  a indexu polydisperzity P vzorku hydrolyzátu č. 73. Teplota hydrolýzy 60°C, množství 1% roztoku alkalázy 1,5 ml.

| Číslo vzorku | Vzhled vzorku | $M_n$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | $M_w$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | PD<br>$M_w/M_n$ | Doba hydrolýzy<br>[min.] |
|--------------|---------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------|--------------------------|
| 73_1         | Med           | 2000                            | 7100                            | 3,6             | 10                       |
| 73_3         | Tuhý          | 1700                            | 4900                            | 3               | 30                       |
| 73_5         | Tuhý          | 1700                            | 6000                            | 3,5             | 50                       |
| 73_7         | Tuhý          | 1800                            | 5700                            | 3,1             | 70                       |
| 73_9         | Tuhý          | 1700                            | 5000                            | 2,9             | 90                       |

Tab. 17 Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností  $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností  $M_n$  a indexu polydisperzity P vzorku hydrolyzátu č. 74. Teplota hydrolýzy 60°C, množství 1% roztoku alkalázy 1,0 ml.

| Číslo vzorku | Vzhled vzorku | $M_n$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | $M_w$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | PD<br>$M_w/M_n$ | Doba hydrolýzy<br>[min.] |
|--------------|---------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------|--------------------------|
| 74_1         | Med           | 1700                            | 4900                            | 2,8             | 10                       |
| 74_3         | Guma          | 1800                            | 5600                            | 3,1             | 30                       |
| 74_5         | Tuhý          | 2100                            | 5700                            | 2,7             | 50                       |

|      |        |      |      |     |    |
|------|--------|------|------|-----|----|
| 74_7 | Křehký | 1700 | 5700 | 3,6 | 70 |
| 74_9 | Křehký | 1600 | 5600 | 3,4 | 90 |

Tab. 18 Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností  $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností  $M_n$  a indexu polydisperzity  $P$  vzorku hydrolyzátu č. 75. Teplota hydrolyzy  $60^\circ\text{C}$ , množství 1% roztoku alkalázy 0,5 ml.

| Číslo vzorku | Vzhled Vzorku | $M_n$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | $M_w$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | PD<br>$M_w/M_n$ | Doba hydrolyzy<br>[min.] |
|--------------|---------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------|--------------------------|
| 75_1         | Med           | 1500                            | 4400                            | 2,9             | 10                       |
| 75_2         | Med           | 3300                            | 8700                            | 2,6             | 20                       |
| 75_3         | Med           | 3200                            | 8800                            | 2,7             | 30                       |
| 75_4         | Guma          | 2300                            | 12500                           | 5,4             | 40                       |
| 75_5         | Tuhý          | 2500                            | 8200                            | 3,3             | 50                       |
| 75_6         | Tuhý          | 4100                            | 8100                            | 2,0             | 60                       |
| 75_7         | Křehký        | 2500                            | 9300                            | 3,7             | 70                       |

Tab. 19 Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností  $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností  $M_n$  a indexu polydisperzity  $P$  vzorku hydrolyzátu č. 76. Teplota hydrolyzy  $60^\circ\text{C}$ , množství 1% roztoku alkalázy 0,5 ml.

| Číslo vzorku | Vzhled Vzorku | $M_n$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | $M_w$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | PD<br>$M_w/M_n$ | Doba hydrolyzy<br>[min.] |
|--------------|---------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------|--------------------------|
| 76_1         | Med           | 2800                            | 10400                           | 3,7             | 20                       |
| 76_3         | Křehký        | 3800                            | 9100                            | 2,4             | 60                       |
| 76_5         | Křehký        | 2500                            | 7900                            | 3,2             | 100                      |
| 76_7         | Křehký        | 2500                            | 8500                            | 3,4             | 140                      |
| 76_9         | Křehký        | 2400                            | 8500                            | 3,5             | 180                      |

Tab. 20 Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností  $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností  $M_n$  a indexu polydisperzity  $P$  vzorku hydrolyzátu č. 77. Teplota hydrolyzy  $60^\circ\text{C}$ , množství 1% roztoku alkalázy 0,25 ml.

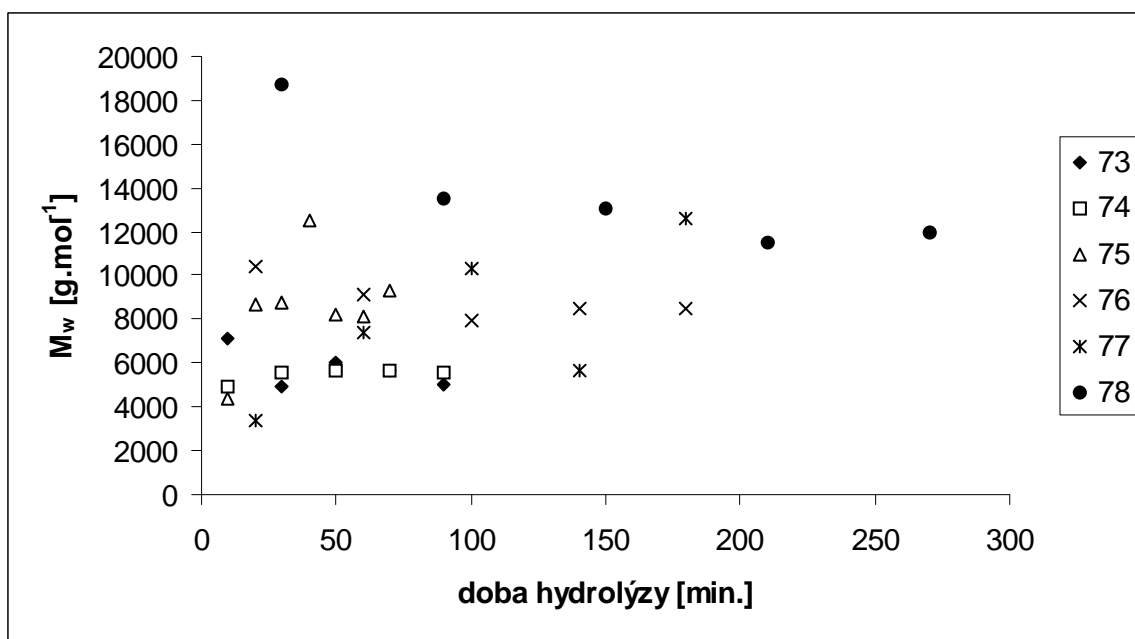
| Číslo vzorku | Vzhled Vzorku | $M_n$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | $M_w$<br>[g.mol <sup>-1</sup> ] | PD<br>$M_w/M_n$ | Doba hydrolyzy<br>[min.] |
|--------------|---------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------|--------------------------|
| 77_1         | Med           | 1300                            | 3400                            | 2,6             | 20                       |
| 77_3         | Guma          | 1900                            | 7400                            | 3,9             | 60                       |
| 77_5         | Křehký        | 2900                            | 10300                           | 3,5             | 100                      |
| 77_7         | Křehký        | 1300                            | 5700                            | 4,4             | 140                      |



|      |        |      |       |     |     |
|------|--------|------|-------|-----|-----|
| 77_9 | Křehký | 2900 | 12600 | 4,3 | 180 |
|------|--------|------|-------|-----|-----|

Tab. 21 Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností  $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností  $M_n$  a indexu polydisperzity  $P$  vzorku hydrolyzátu č. 78. Teplota hydrolyzy  $60^\circ\text{C}$ , množství 1% roztoku alkalázy 0,25 ml.

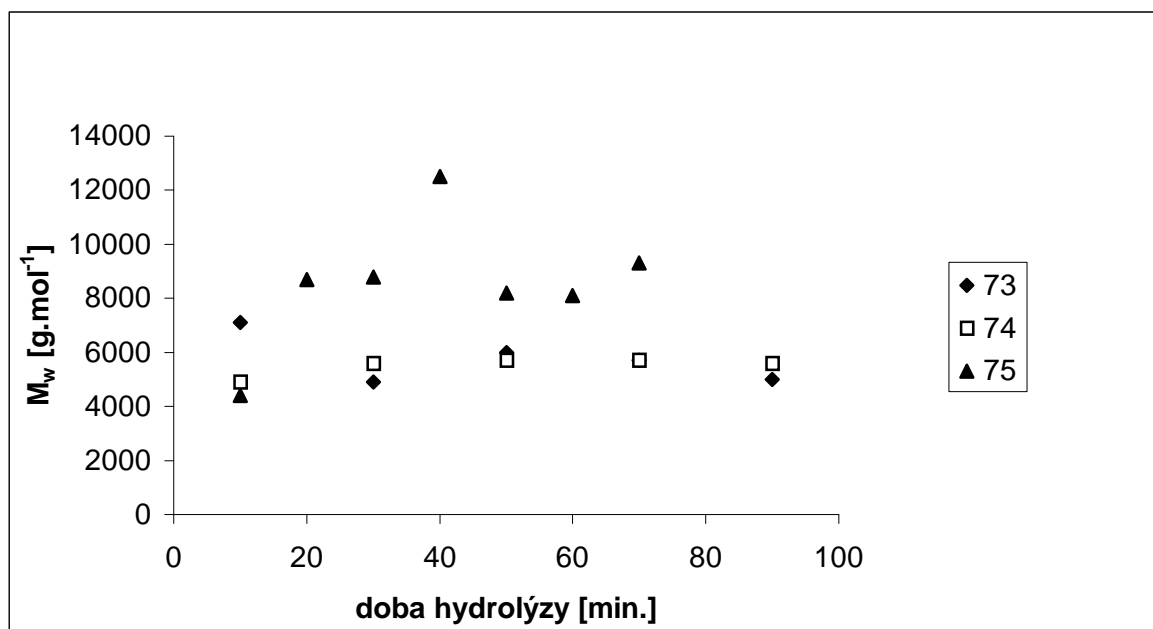
| Číslo vzorku | Vzhled Vzorku | $M_n$ [g.mol <sup>-1</sup> ] | $M_w$ [g.mol <sup>-1</sup> ] | PD $M_w/M_n$ | Doba hydrolyzy [min.] |
|--------------|---------------|------------------------------|------------------------------|--------------|-----------------------|
| 78_1         | Med           | 5500                         | 18700                        | 3,4          | 30                    |
| 78_3         | Guma          | 3900                         | 13500                        | 3,5          | 90                    |
| 78_5         | Křehký        | 3400                         | 13100                        | 3,9          | 150                   |
| 78_7         | Křehký        | 3700                         | 11500                        | 3,1          | 210                   |
| 78_9         | Křehký        | 3700                         | 12000                        | 3,2          | 270                   |



Obr. 17 Grafické vyjádření závislosti  $M_w$  jednotlivých vzorků připravených při teplotě  $60^\circ\text{C}$  na době hydrolyzy

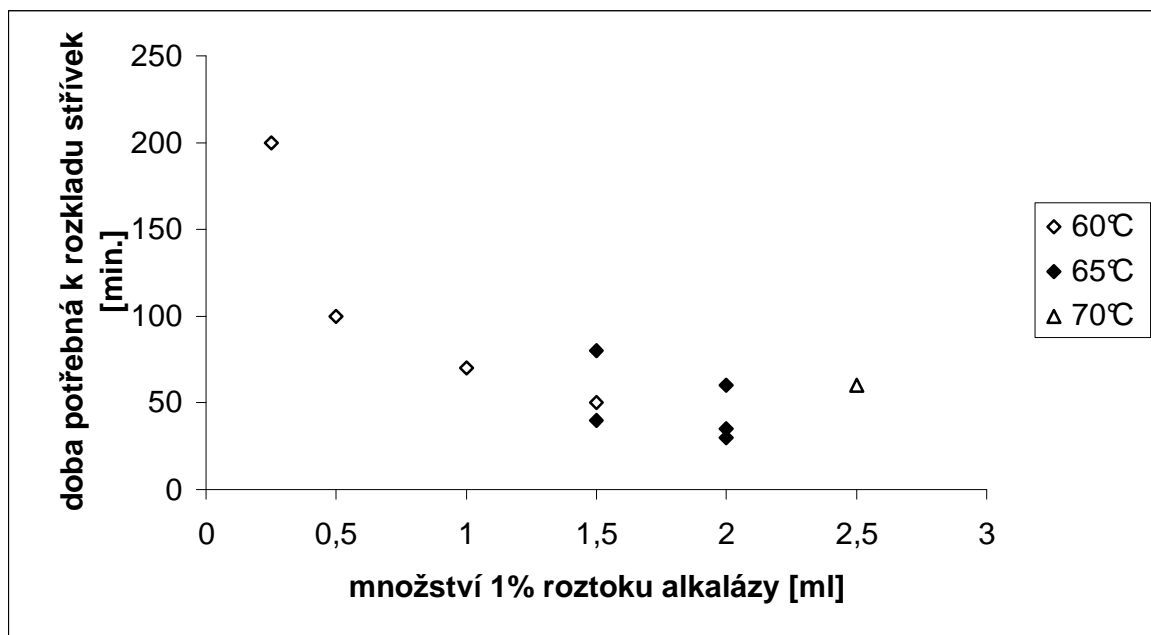
Výsledky analýzy vzorků této série ukazují že velikost molární hmotnosti hydrolyzátu má přímou souvislost s množstvím alkalázy použité k hydrolyze a že snižující se množství alkalázy způsobuje růst  $M_w$ . Při porovnání vzorků č. 73, č. 74 a č. 75 (viz.Obr. 18), které jsou všechny odebrány v časových intervalech 10 minut bylo zjištěno, že u vzorků č. 73 a

č. 74 , kde byla přidána alkaláza v množství 1,5 a 1,0 ml je  $M_w$  nejnižší a leží v rozmezí ca 5000 až 7100  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Mezi hydrolyzáty připravenými s 1,5 a 1,0 ml alkalázy však rozdíl v molárních hmotnostech není. Nárůst hodnoty  $M_w$  je možno pozorovat až u vzorku č. 75. Zde byla alkaláza přidána v množství 0,5 ml. Hodnoty  $M_w$  hydrolyzátu č. 75 jsou obecně vyšší než u posledně jmenovaného vzorku leží v intervalu od 4400 až 9300  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Další nárůst molární hmotnosti lze pozorovat u hydrolyzátu č. 77 a č. 78, které byly připraveny přidavkem 0,25 ml 1% -ního roztoku alkalázy a lišily se intervaly vzorkování. Hodnoty  $M_w$  ležely v intervalu 3400 až 12 600  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  u vzorku č. 77 a 11500 až 18700  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  u vzorku č. 78. Množství alkalázy ovlivňuje i rychlost rozkladu střívek. Při přidavku alkalázy 1,5 ml za stálé teploty 60°C je doba rozkladu vzorků asi 40 minut, při přidavku alkalázy o objemu 1,5 ml se prodlužuje na 100 minut a pro hydrolyzáty připravené s 0,25 ml enzymu činí doba rozkladu až 200 minut, případně k úplnému rozkladu střívek nedojede. Výsledky této části studie naznačují, že pro optimální enzymatický rozklad střívek je potřebné při této teplotě použít alespoň 1,5 ml 1% roztoku alkalázy, aby bylo dosaženo potřebně nízké molární hmotnosti a doba hydrolyzy nebyla dlouhá.



Obr. 18 Grafické vyjádření závislosti  $M_w$  na době hydrolyzy u vzorků č. 73 (1,5 ml alkalázy), č. 74 (1,0 ml alkalázy) a č. 75 (0,5 ml alkalázy) při teplotě hydrolyzy 60°C

Souhrnně je vliv množství alkalázy na dobu potřebnou k úplnému rozkladu střívek vyjádřen na Obr. 18, který uvádí výsledky pro všechny tři sledované teploty. V případech, kdy je doba potřebná k úplnému rozkladu střívek uvedena v tabulce č. 2 jako interval, například 20 až 30 minut, je v grafu zanesena její střední hodnota, tedy doba 25 minut. Grafická závislost ukazuje, že ve sledovaném teplotním intervalu, je množství alkalázy významným faktorem při hydrolyze a s rostoucím množstvím alkalázy doba rozkladu klesá. Zároveň je však možno konstatovat, že při teplotě 60° a 65°C není podstatný rozdíl v době rozkladu střívek použije-li se množství alkalázy přidané jako 1% roztok v objemu 1,0 nebo 1,5 ml.

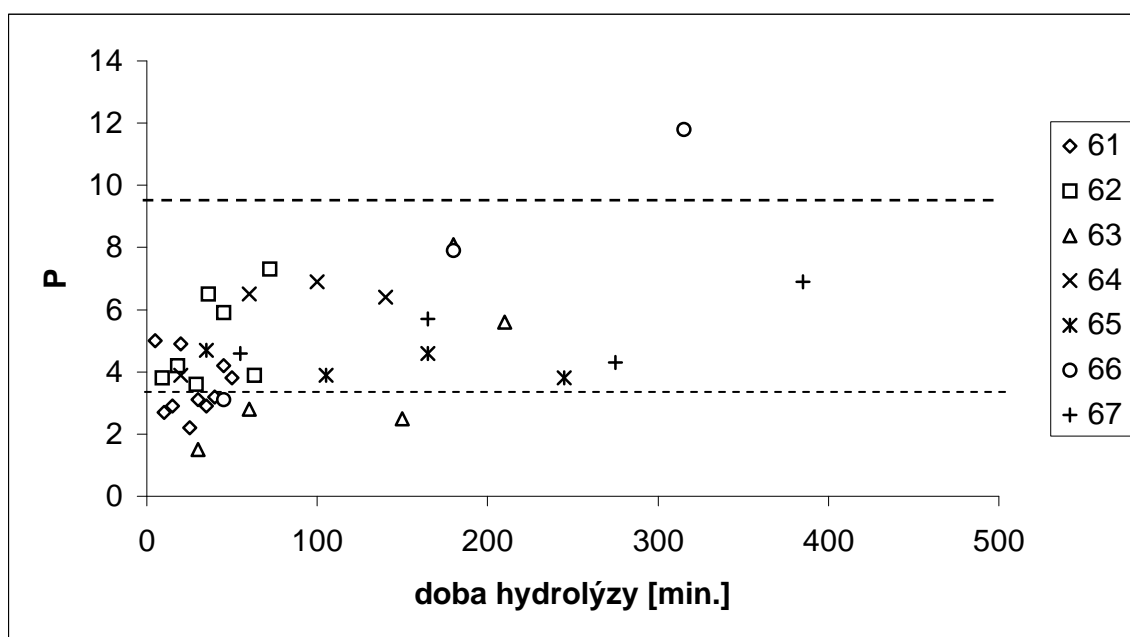


Obr. 19 Grafické vyjádření závislosti doby potřebné k rozkladu střívek na množství 1% roztoku alkalázy při teplotách 70°C, 65°C a 60°C

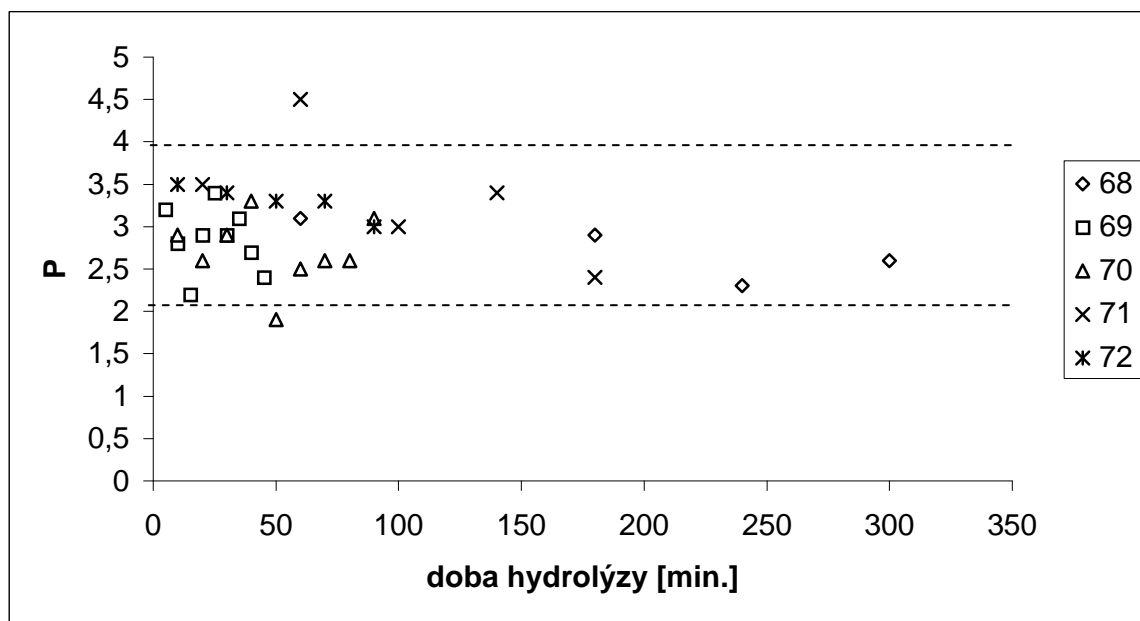
## 6.4 Souhrnné zhodnocení distribuce molárních hmotností hydrolyzátů připravených při sledovaných teplotách

Pro jednoduchý odhad šířky distribuce u polymerů je možno s výhodou použít index polydisperzity  $P$ , který je definovaný jako poměr hmotnostního  $M_w$  a číselného  $M_n$  průměru molárních hmotností. Závislost hodnoty  $P$  na době hydrolyzy je pro jednotlivé sledované hydrolyzáty graficky znázorněna na Obr. 20-22.

U hydrolyzátů připravených při  $70^\circ\text{C}$  vykazovala hodnota  $P$  největší variabilitu. Hodnoty indexu polydisperzity se u těchto vzorků pohybovaly v širokém rozmezí od 2 až po hodnotu 12. U vzorku č. 61, který byl hydrolyzován přidavkem 2,5 ml alkalázy a u kterého jako jediného v této sérii došlo po 50 až 60 minutách k úplnému rozkladu střívek, byla hodnota polydisperzity nejnižší a pohybovala se v rozmezí od 2,2 do 5. Pro hydrolyzáty připravené s nižším množstvím alkalázy, u kterých během hydrolyzy k rozkladu střívek nedošlo, byly hodnoty polydisperzity relativně vysoké, což svědčí o tom, že distribuce připraveného hydrolyzátu je široká. U této série vzorků nebylo možno jednoznačně zhodnotit závislost indexu polydisperzity na době hydrolyzy ani závislost mezi indexem polydisperzity a množstvím přidané alkalázy.



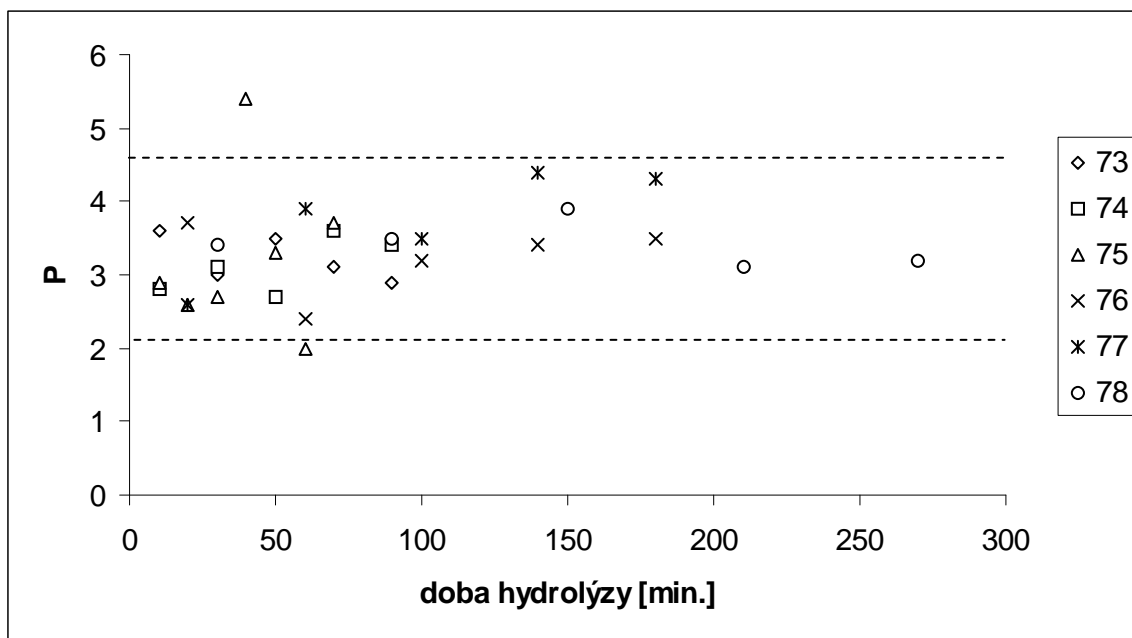
Další série vzorků byla připravena hydrolyzou při teplotě 65°C. Na rozdíl od série připravené při teplotě 70°C leží v tomto případě hodnoty P v relativně úzkém intervalu a pro většinu hydrolyzátů se pohybují od 1.9 po 3.5. Ve srovnání se sérií připravenou při teplotě 70°C je rozmezí těchto hodnot nejen užší, ale jednotlivé hodnoty indexu polydisperzity jsou i výrazně nižší. Závislost hodnoty P na době hydrolyzy je znázorněna na Obr. 21. Z obrázku je zřejmé, že index polydisperzity se výrazně nemění v závislosti na přidaném množství alkalázy. Tato skutečnost je v souladu s poznatky diskutovanými v části práce týkající se molárních hmotností. Pro teplotu hydrolyzy 65°C byly rovněž pozorovány nejnížší hodnoty molárních hmotností hydrolyzátů. Dochází tedy k nejefektivnějšímu rozkladu střívek za vzniku hydrolyzátu s nízkými molárními hmotnostmi a úzkou distribucí. U vzorků této série je rovněž možno pozorovat, že s prodlužující se dobou hydrolyzy index polydisperzity mírně klesá.



Obr. 21 Grafické znázornění závislosti hodnot indexu polydisperzity na době hydrolyzy při teplotě 65°C

U vzorků hydrolyzátů připravených při teplotě 60°C se hodnoty P pohybovaly většinou v rozmezí od 2 do 4. Index polydisperzity těchto vzorků byl o něco vyšší než u hydrolyzá-

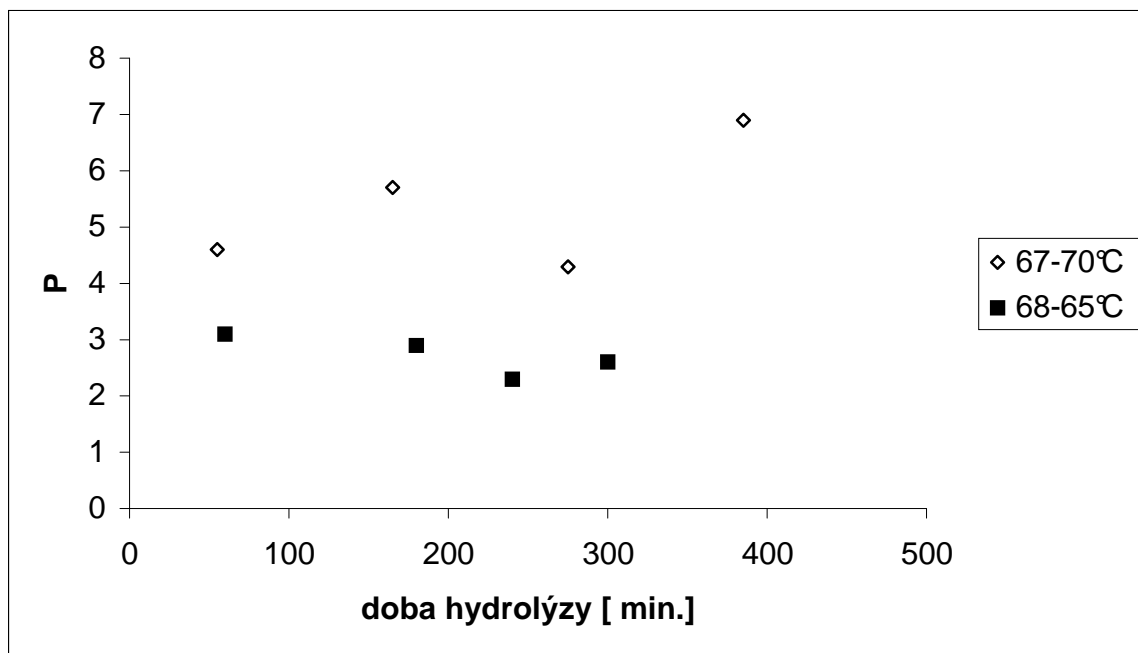
tů připravených při 65°C a interval ve kterém se hodnoty P nacházely byl rovněž o něco širší. U této série nebyla rovněž pozorována žádná společná závislost indexu polydisperzity na přidaném množství enzymu. Závislost indexu polydisperzity na době hydrolýzy nemá rovněž jednoznačný průběh, u některých vzorků index polydisperzity s prodlužující se dobou hydrolýzy mírně roste (vzorky č. 75, č. 76, č. 77 a č. 78) , u některých naopak mírně klesá (vzorky č. 73 a č. 78). Závislosti hodnot indexu polydisperzity na době hydrolýzy je znázorněna na Obr. 23. Skutečnost, že některé vzorky byly během hydrolýzy rozloženy zcela a některé pouze částečně hodnotu indexu polydisperzity neovlivnila



Obr. 22 Grafické znázornění závislosti hodnot indexu polydisperzity na době hydrolýzy při teplotě 60°C

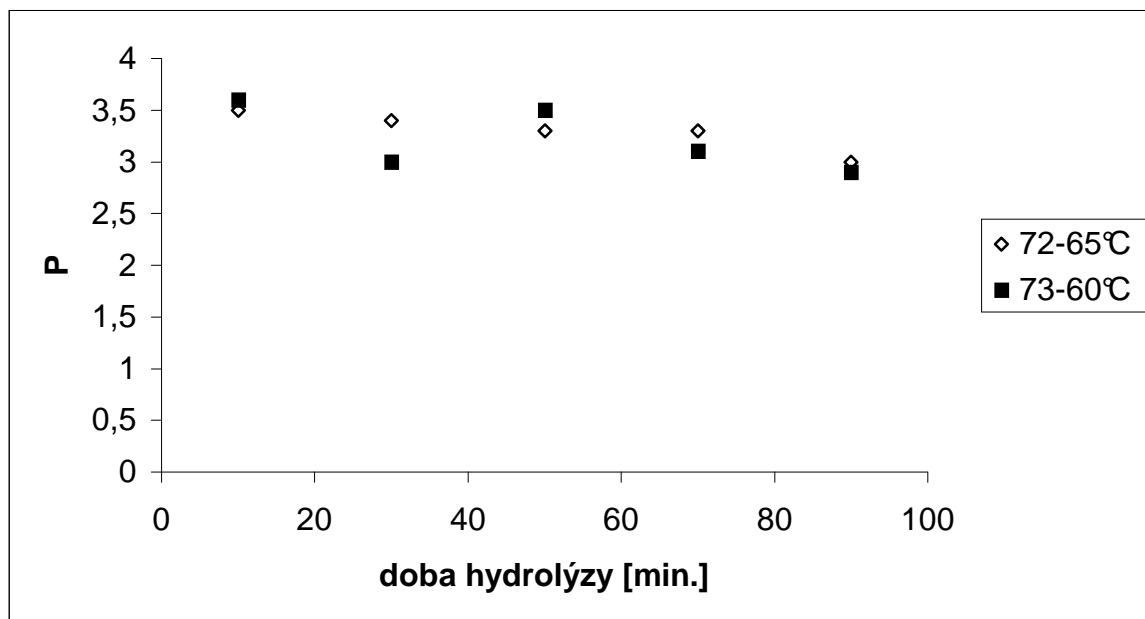
Z dané diskuze je tedy zřejmé, že na hodnotu indexu polydisperzity stejně jako na hodnotu molární hmotnosti má výrazný vliv teplota, při které byly jednotlivé vzorky hydrolyzovány. Jako příklad je uvedeno srovnání vzorků č. 67 a č. 68, u kterých bylo použito stejné množství N-butylaminu, stejné množství alkalázy a oba byly hydrolyzovány téměř stejnou dobu (vzorek č. 67 po dobu 385 minut a vzorek č. 68 po dobu 300 minut). Jediným rozdílem zde byla teplota hydrolýzy. Vzorek č. 67 byl hydrolyzován při teplotě 70°C a vzorek č. 68 při teplotě 65°C. Porovnáním bylo zjištěno, že u vzorku č. 67 byla hodnota indexu polydisper-

zity téměř dvojnásobná, než tomu bylo u vzorku č. 68. Toto zjištění lze sledovat na Obr. 23.



Obr. 23 Grafické vyjádření závislosti hodnot indexu polydisperzity na době hydrolýzy při teplotě 70°C (vzorek č. 68) a 65°C (vzorek č. 69), v obou případech použity 2 ml alkalázy.

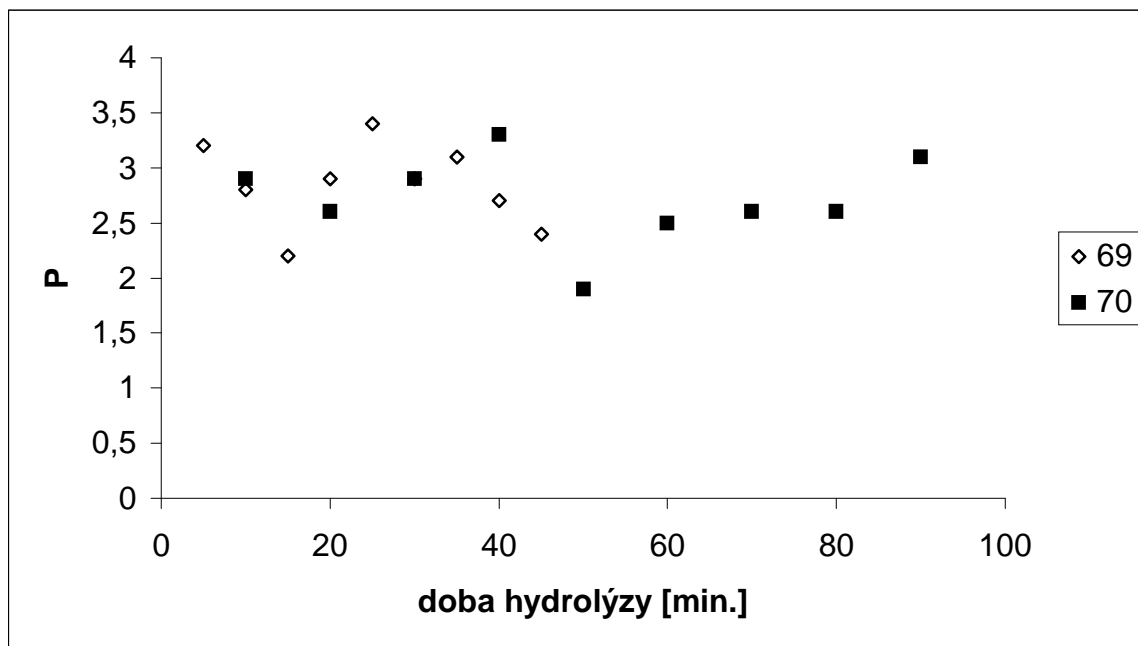
Na rozdíl od předchozího případu, mezi hodnotami P u hydrolyzátů připravených při teplotách 60°C a 65°C výrazný rozdíl nebyl. To lze dokumentovat na vzorcích č. 72 a č. 73. Tyto vzorky byly připraveny při různých teplotách hydrolýzy, vzorek č. 72 při teplotě 65°C a vzorek č. 73 při teplotě 60°C. Při hydrolýze těchto vzorků bylo použito stejné množství N-butylaminu, stejné množství alkalázy (1,5 ml) a doba hydrolýzy byla shodná (90 minut). Hodnoty indexu polydisperzity jsou u vzorku č. 72 v rozmezí od 3 až 3,5 a u vzorku č. 73 jsou hodnoty indexu polydisperzity v rozmezí 2,9 až 3,6. To je znázorněno na Obr. 24.



Obr. 24 Grafické vyjádření závislosti hodnot indexu polydisperzity na době hydrolyzy při teplotě 65°C (vzorek č. 72) a 60°C (vzorek č. 73), v obou případech použito 1,5 ml alkalázy

Významným faktorem, který ovlivňuje hodnotu indexu polydisperzity je tedy teplota, při které u daného vzorku došlo k hydrolyze. V předchozím textu je uváděno, že ve sledovaných časových intervalech nebyla při teplotách 60°C a 65°C pozorována významná závislost mezi hodnotou indexu polydisperzity a dobou hydrolyzy. To je vyjádřeno porovnáním vzorků č. 69 a č. 70, které byly hydrolyzovány při teplotě 65°C. Během hydrolyzy bylo přidáno stejné množství alkalázy (2 ml) a stejné množství N-butylaminu (35 ml) a vzorky se lišily dobou, po kterou hydrolyza probíhala. Ta byla u vzorku č. 69 čtyřicet pět minut a u vzorku č. 70 devadesát minut. Z Obr. 26, který vyjadřuje grafickou závislost hodnoty indexu polydisperzity na době hydrolyzy při teplotě hydrolyzy lze vyčíst, že hodnoty indexu polydisperzity jsou téměř totožné, i když doba hydrolyzy u vzorku č. 70 byla dvojnásobně delší než u vzorku č. 69.



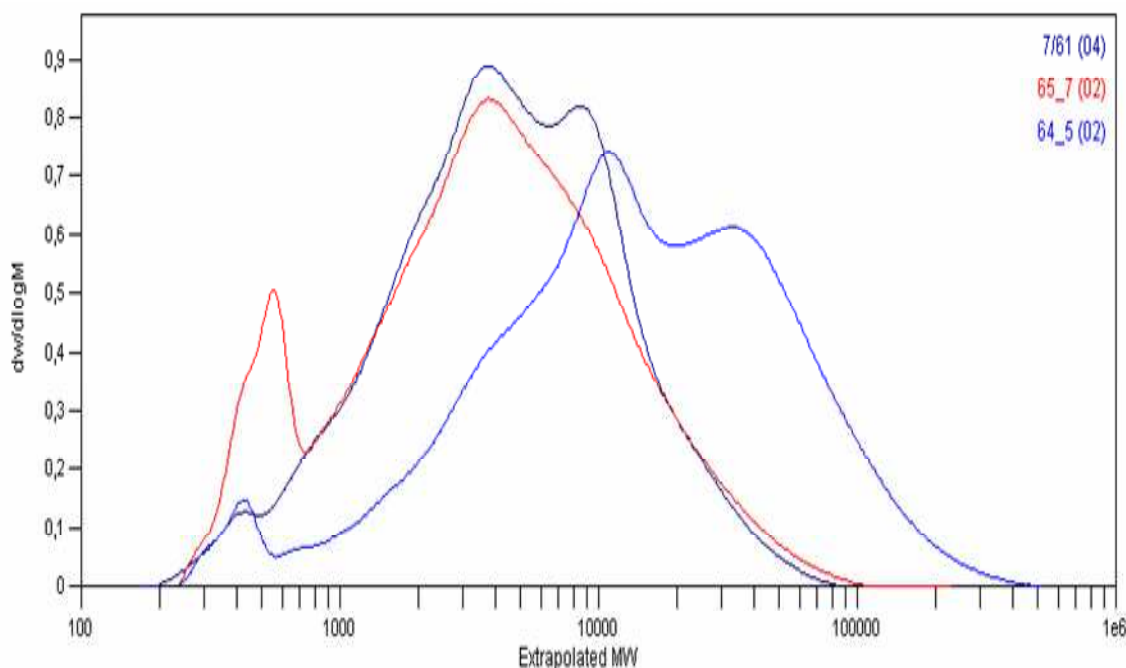


Obr. 25 Grafické vyjádření závislosti hodnot indexu polydisperzity na době hydrolýzy při teplotě 65°C u vzorků č. 69 a č. 70 (v obou případech použity 2 ml alkalázy)

Při hodnocení šířky distribuce hydrolyzátů je výhodné použít i distribuční křivky, z jejichž průběhu lze o změně struktury sledovaných vzorků vlivem působení alkalázy získat více informací, než z indexu polydisperzity. Obecně je možno říci, že tvar distribučních křivek zaznamenaných pro hydrolyzáty kolagenu vykazuje určité společné rysy, kde hlavní pík distribuce je doprovázen částečně separovaným, vedlejším píkem v oblasti nízkých molárních hmotností. Dále lze z hodnocení distribučních křivek udělat obecný závěr, že pro všechny vzorky bez ohledu na teplotu hydrolýzy a množství přidané alkalázy se distribuční křivky v závislosti na době hydrolýzy mění. V následující části jsou podrobněji diskutovány změny distribučních křivek zaznamenaných pro hydrolyzáty připravené při sledovaných teplotách.

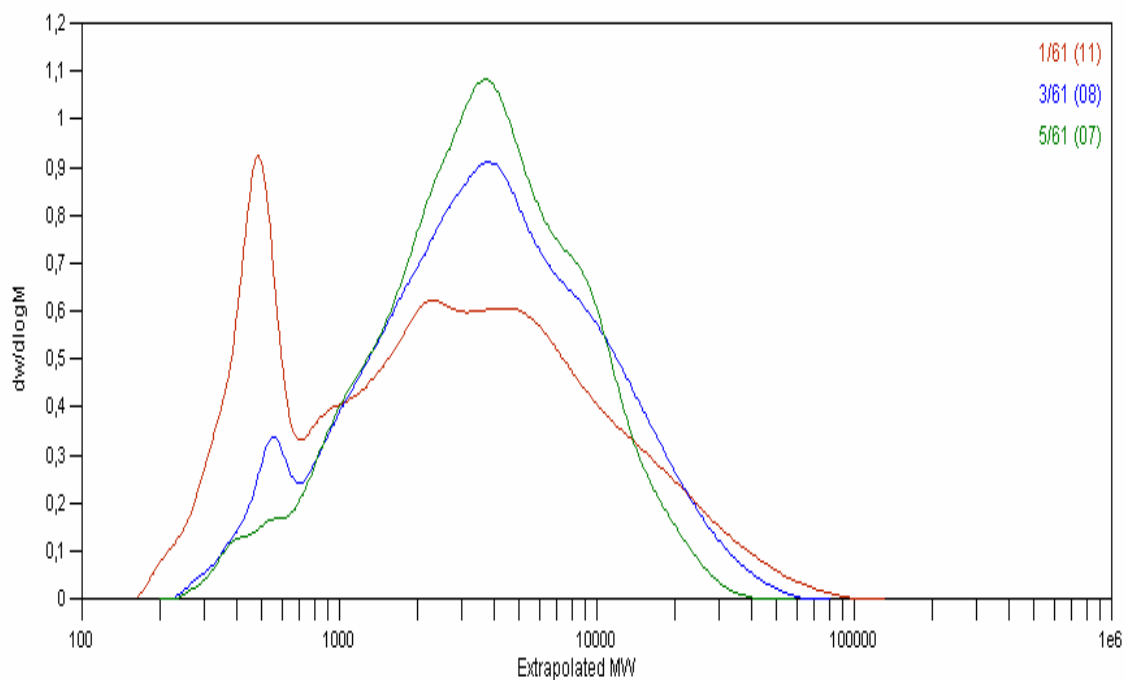
Distribuční křivky vzorků připravených při 70°C vykazují značnou variabilitu. Tvar hlavního píku se mění v závislosti na množství přidané alkalázy a době hydrolýzy, avšak tyto změny nejsou systematické. Pro některé ze vzorků je možno zaznamenat hladký monomodální tvar hlavního píku, pro některé zase hlavní pík částečně separovaný, což naznačuje, že v daném vzorku se vyskytují dvě významné populace makromolekul s rozdílnou molární

hmotností Tato skutečnost je ilustrována na Obr. 26, který uvádí příklady tvarů distribučních křivek vzorků připravených při této teplotě.



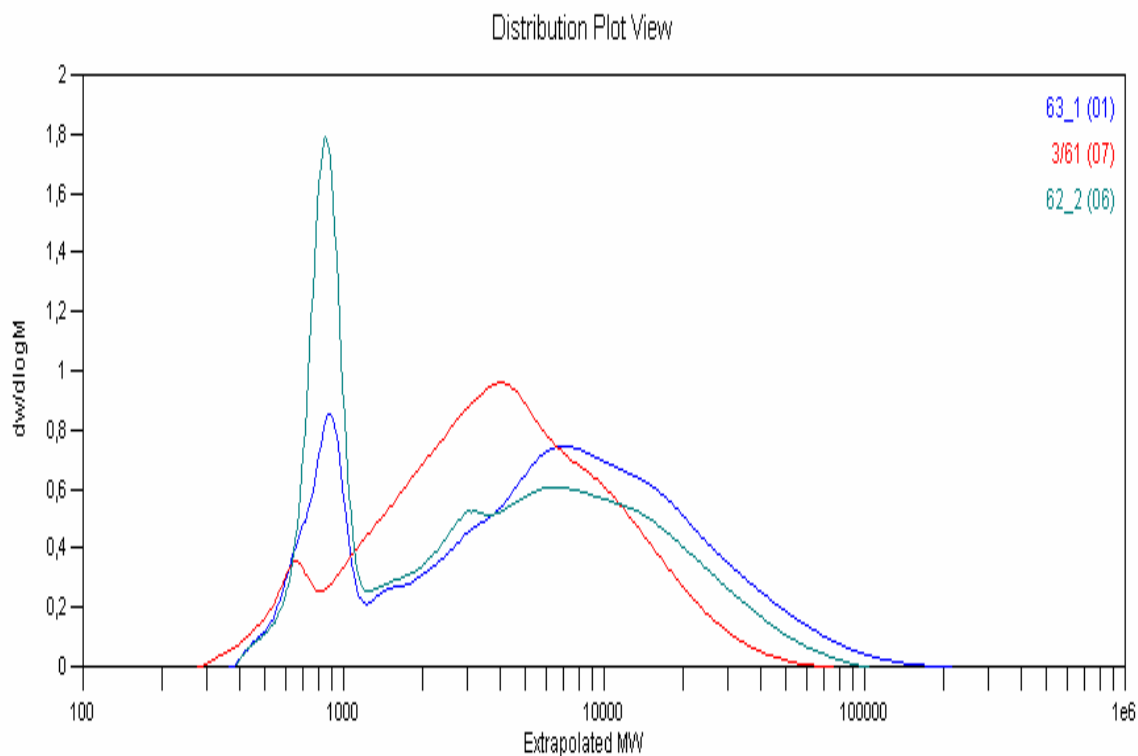
Obr. 26 Grafické srovnání různých tvarů distribučních křivek u vzorků č. 61 (množství alkalázy 2,5 ml), č. 64 a č. 65 (množství alkalázy 2,0 ml) hydrolyzovaných při teplotě 70°C

Kromě hlavního píku lze u této série vzorků zaznamenat přítomnost vedlejšího píku s maximem v oblasti molárních hmotností menších než ca  $1000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , pro který je charakteristické, že mění svoji velikost v závislosti na době hydrolyzy. U vzorku č. 61 (použito 2,5 ml alkalázy), kde došlo k úplnému rozkladu střívek se jeho velikost s prodlužující se dobou hydrolyzy zmenšuje a po 25 minutách od počátku hydrolyzy úplně vymizí (viz Obr. 27). Avšak například u vzorků č. 63, č. 64 a č. 65 se velikost nízkomolekulárního píku mění v průběhu hydrolyzy zcela náhodně.



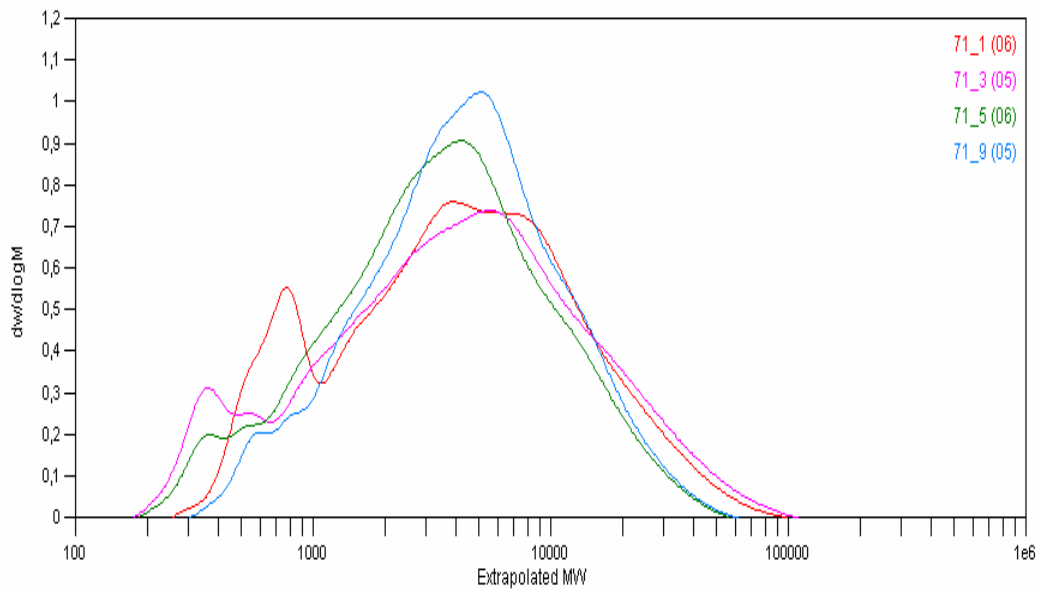
Obr. 27 Grafické znázornění změny distribučních křivek v průběhu hydrolyzy u vzorků č. 61\_1 (doba hydrolyzy 5 minut), č. 61\_3 (doba hydrolyzy 15 minut) a č. 61\_5 (doba hydrolyzy 25 minut) připravených při teplotě 70°C a přidavkem alkalázy 2,5 ml

Vliv množství alkalázy na změnu molárních hmotností při hydrolytickém rozkladu střívek lze dobře dokumentovat na srovnání distribučních křivek vzorků č. 61, č. 62 a č. 63 připravených hydrolyzou s 2,5, 2,0 a 1,5 ml alkalázy při teplotě 70°C (viz Obr. 28). Prezentované distribuční křivky patří hydrolyzátům č. 61 a č. 62 odebraným po cca 15 minutách od počátku hydrolyzy. Vzorek č. 63 odebraný v tomto časovém intervalu nebyl k dispozici a proto je pro srovnání použita distribuční křivka hydrolyzátu jehož doba hydrolyzy činila 30 minut. Na obrázku je zřetelně vidět, že s rostoucím množstvím alkalázy dochází ke snižování molární hmotnosti. O tom svědčí postupný posun distribučních křivek do oblasti s nižšími molárními hmotnostmi, tedy nárůst podílu řetězců s nižší molární hmotností na úkor řetězců s molární hmotností vyšší. Vzorek č. 63 hydrolyzovaný s nejmenším množstvím alkalázy, i přes nejdelší dobu hydrolyzy, vykazoval přítomnost největšího podílu makromolekul s vyššími molárními hmotnostmi.

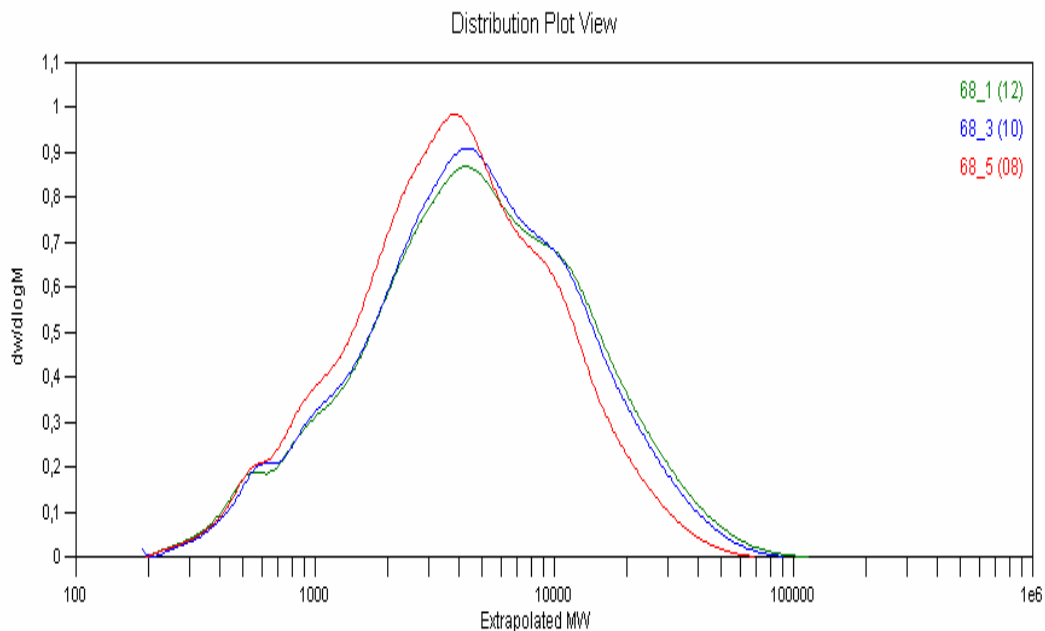


Obr. 28 Grafické znázornění distribučních křivek u vzorků č. 61 (množství alkalázy 2,5 ml), č. 62 (množství alkalázy 2 ml) a č. 63 (množství alkalázy 1,5 ml) připravených při teplotě 70°C

Pro všechny hydrolyzáty připravené při 65°C je charakteristická monomodální distribuce. Distribuční křivky všech vzorků z této série si jsou vzájemně velmi podobné a během prodlužující se doby hydrolyzy se jejich tvar výrazně nemění. Rovněž u této série je zřejmá přítomnost nízkomolekulárního píku, který je však ve srovnání se vzorky připravenými při 70°C podstatně menší. Bez ohledu na absolutní velikost nízkomolekulárního píku lze pozorovat, že pík je největší vždy u prvního vzorkování a během hydrolyzy se postupně zmenšuje. U vzorků č. 69 a č. 70 hydrolyzovaných s 2,0 ml alkalázy, kde vzorkování probíhalo po 10 a 20 minutách došlo k vymizení nízkomolekulárního píku shodně po 30 minutách. U vzorků č. 71 a č. 72, kde bylo množství alkalázy sníženo na 1,5 ml, byla tato doba delší. Jako příklad je uvedeno srovnání distribučních křivek vzorku č. 71 (viz Obr. 29). Výjimkou je vzorek č. 68, kde není nízkomolekulární pík přítomen vůbec (viz Obr. 30). To lze vysvětlit skutečností, že první odběr vzorku proběhl v tomto případě až po 60 minutách od začátku hydrolyzy a podmínky hydrolyzy, jak teplota tak množství použité alkalázy, byly příznivé.

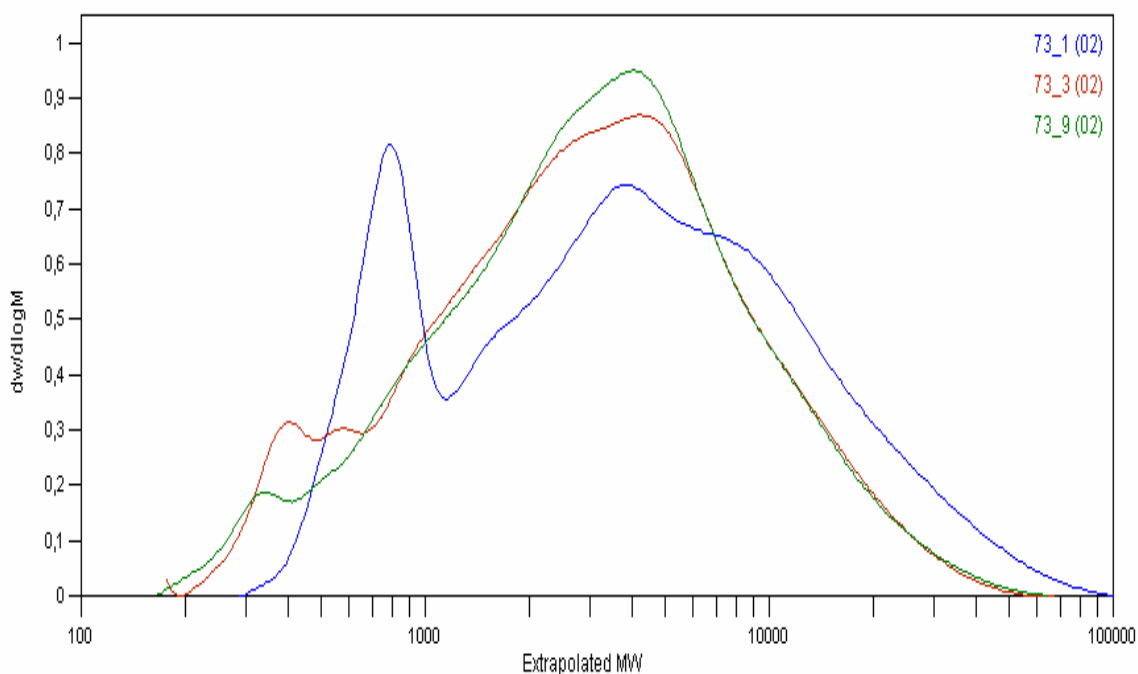


Obr. 29 Grafické znázornění distribučních křivek u vzorků č. 71\_1 (odebraný po 20 minutách), č. 71\_3 (odebraný po 60 minutách), č. 71\_5 (odebraný po 100 minutách) a č. 71\_9 (odebraný po 180 minutách) hydrolyzovaných při teplotě 65°C a přidavkem 1,5 ml alkalázy.



Obr. 30 Grafické znázornění distribučních křivek u vzorků č. 68\_1, č. 68\_3 a č. 68\_5 odebraných po 60, 180 a 300 minutách připravených při teplotě 65°C, přidavkem alkalázy 2 ml

U série vzorků připravených při teplotě 60°C lze opět pozorovat výše uvedený trend, a to že nízkomolekulární pík je největší při prvním odběru a s prodlužující se dobou hydrolyzy se postupně zmenšuje. Porovnáme-li velikost nízkomolekulárního píku u hydrolyzátů připravených při 60 °C se vzorky hydrolyzovanými při 65°, je zřejmé, že velikost nízkomolekulárního píku vzrostla. Obecně je možno konstatovat, že nízkomolekulární pík je nejmenší v případě hydrolyzátů připravených s vyšším množstvím alkalázy, které měly z této série nejnižší molární hmotnost a kde střívka byla nejlépe rozložena. Tvar hlavního píku je obdobný jako u vzorků hydrolyzátů připravených při 60°C.



Obr. 31 Grafické znázornění distribučních křivek u vzorků č. 73\_1, č. 73\_3 a č. 73\_9 odebraných po 10, 30 a 90 minutách, hydrolyzovaných při teplotě 60°C, přidavkem alkalázy 1,5 ml

Je zřejmé, že velikost nízkomolekulárního píku souvisí s kombinací efektu délky hydrolyzy, množství alkalázy a teploty. Jeho přítomnost by mohla mít souvislost se skutečností, že ke vzorkování dochází z heterogenního systému, ve kterém jsou přítomna nerozložená střívka a kde by mohlo docházet k počátečnímu rozkladu nestabilních koncových částí kolagenových molekul, které jsou nejvíce náchylné k degradaci. V současné době nebyly

vzhledem k omezeným časovým možnostem podniknuty žádné kroky k identifikaci tohoto piku.

## ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývá sledováním změn molárních hmotností a distribuce molárních hmotností u vzorků hydrolyzátů připravených enzymatickou hydrolyzou kolagenových střívek.

Teoretická část práce je zaměřena na popis kolagenu, jeho struktury, vlastností a stručně se věnuje charakteristikám kolagenových hydrolyzátů. Dále se zabývá jednotlivými typy hydrolyzy, kdy je pozornost věnována hydrolyze enzymatické. Poslední kapitola teoretické části je věnována metodě GPC.

Experimentální část diplomové práce je zaměřena na diskusi a hodnocení hmotnostních průměrů molárních hmotností  $M_w$ , indexu polydisperzity  $P$  a průběhu distribučních křivek získaných pro jednotlivé vzorky hydrolyzátů metodou GPC. Je zde rovněž stručně charakterizována výchozí surovina, kolagenová střívka. Enzymatický rozklad střívek byl proveden za různých podmínek, kdy se při samotné hydrolyze měnily následující proměnné: množství enzymu alkalázy, teplota a doba hydrolyzy. Hodnota pH byla u všech pokusů konstantní a pohybovala se v optimální alkalické oblasti. Hydrolyzované vzorky byly následně charakterizovány pomocí GPC. Z výsledků, které jsou diskutovány v experimentální části je možno učinit následující obecné závěry:

- u vzorků, které byly připraveny při teplotě 70°C, nedošlo k úplnému rozložení střívek. Pouze vzorek, který byl hydrolyzován za použití 2,5 ml 1% roztoku alkalázy se rozložil částečně a doba rozkladu činila 50 až 60 minut
- u vzorků, které byly připravovány při teplotách 65°C a 60°C, došlo k úplnému rozkladu střívek a doba potřebná k jejich rozložení byla závislá na množství přidané alkalázy a teplotě. Nejrychleji byla rozložena střívka hydrolyzovaná při 65°C za použití 2,0 ml 1% roztoku alkalázy, kdy doba rozkladu činila cca 30 minut
- u vzorků hydrolyzovaných při teplotě 70°C se hodnoty molárních hmotností stanovených jako  $M_w$  pohybovaly v širokém intervalu od 5700 g.mol<sup>-1</sup> do 54000 g.mol<sup>-1</sup>. Obecně byly hodnoty  $M_w$  těchto hydrolyzátů vyšší ve srovnání s molárními hmotnostmi vzorků připravených při ostatních sledovaných teplotách
- hodnoty  $M_w$  stanovené pro vzorky hydrolyzované při teplotách 65°C a 60°C jsou ve srovnání s hodnotami  $M_w$  vzorků připravených při 70°C nižší. Molární hmot-



nosti hydrolyzátů připravených při 65°C ležely v intervalu 4100 g.mol<sup>-1</sup> až 7900 g.mol<sup>-1</sup> a při 60°C v intervalu od 4900 g.mol<sup>-1</sup> do 18700 g.mol<sup>-1</sup>

- hodnoty indexu polydisperzity P leží u vzorků připravených při teplotě 70°C v širokém rozmezí (od 2 do 12) Vysoké hodnoty P byly zaznamenány pro vzorky, u kterých nedošlo k rozkladu střívek a svědčí o skutečnosti, že distribuce molárních hmotností těchto vzorků byla široká
- u vzorků připravených při teplotě 65°C a 60°C se hodnoty indexu polydisperzity pohybují v nižší oblasti a jejich rozmezí je podstatně menší. U vzorků připravených při teplotě 65°C se hodnoty pohybovaly hodnoty P v rozmezí od 1,9 do 3,5 a u vzorků připravených při teplotě 60°C se hodnoty pohybovaly v rozmezí od 2 do 4
- naměřené výsledky ukazují, že molární hmotnost a rychlost rozkladu jednotlivých vzorků hydrolyzátu lze výrazně ovlivnit teplotou, při které hydrolyza probíhá a množstvím přidaného enzymu alkalázy

Z výše uvedených dílčích závěrů je možno konstatovat, že v rozsahu sledovaných podmínek, probíhala hydrolyza odpadních kolagenových střívek nejlépe při teplotě 65°C za použití 1,5 až 2,0 ml 1% roztoku alkalázy. Za této situace byla hmotnost získaných hydrolyzátů nejnižší, vzorky měly úzkou distribuci molárních hmotností a doba rozkladu hydrolyzátů byla nejkratší.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] Dostupné na internetu:  
<<http://www.hypro.cz/nyRubrIn.aspx?intRubrKis=1251&intlang=0>>
- [2] VODRÁŽKA, Z.: Biochemie, Praha: Academia, 1996, s.81
- [3] Dostupné na internetu:  
<<file:///G:/Diplomka%20-%20materi%E1/kolagen.htm>>
- [4] Dostupné na internetu:  
<<file:///G:/Diplomka%20-%20materi%E1/kolagen201.htm>>
- [5] BLAŽEJ, A., GALATÍK, A., GALATÍK, J., MLÁDEK, M.: Technologie kůže a kožešin, Praha: SNTL, 1984, s.82-85
- [6] VELÍŠEK, J.: Chemie potravin 1, Osis Tábor, 1999
- [7] VÁCLAVKOVÁ, L.: Vlastnosti filmů z kolagenních hydrolyzátů, Diplomová práce, FT UTB ve Zlíně, 2006, s.
- [8] MLÁDEK, M., BLAŽEJ, A., JANSKÝ, K., LANGMAIER, F., LUDVÍK, J., MAZÁNEK, M., NĚMEC, B., PIVOŇKA, V., SUCHOMEL, A.: Zpracování odpadů kožedělného průmyslu, Praha: SNTL, 1971, s.34-35
- [9] KOHÁČOVÁ, M.: Sorpce směsi anioaktivních PAL na kolagen, Diplomová práce, FT UTB ve Zlíně, 2003, s.7, 10-11
- [10] BLAŽEJ, A., GALATÍK, A., GALATÍK, J., MLÁDEK, M.: Technologie kůže a kožešin, Praha: SNTL, 1984, s.90-97
- [11] HEIDEMANN, E.: Fundamentals of Leather Manufacture, KG Druckerei und Darmstadt, 1993, s.219
- [12] BROŽOVÁ, E.: Třístupňová enzymatická hydrolyza manipulačních úšňových odpadů, Diplomová práce, FT UTB ve Zlíně, 2003, s.19-23

- [13] PETERSEN, B., R.: Enzymes in manufacturing of leather and utilization of tannery waste products, NOVO INDUSTRI A/S, 1978, s.3-7
- [14] TAFFIN, A.: Hydrolyzed collagen, Wellness Foods Europe, 2006, s.15-16
- [15] BLAŽEJ, A., DEYL, Z., ADAM, M., GALATÍK, A., MICHLÍK, I., SMEJKAL, P.: Štruktúra a vlastnosti vláknitých bielkovin, Bratislava: VEDA 1978, s.69-72
- [16] PEPRNÍK, M.: 2-stupňová enzymatická hydrolyza manipulačních úšňových odpadů kožedělného průmyslu, FT UTB ve Zlíně, 2003
- [17] LACHNITOVÁ, S.: Výroba vysokomolekulárních proteinových hydrolyzátů, FT UTB ve Zlíně, 2001, s.32
- [18] BLAŽEJ, A., DEYL, Z., ADAM, M., GALATÍK, A., MICHLÍK, I., SMEJKAL, P.: Štruktúra a vlastnosti vláknitých bielkovin, Bratislava: VEDA 1978, s.123
- [19] STOJASPAL, R.: Aplikace gelové permeační chromatografie pro charakterizaci biopolymerů, Bakalářská práce, FT UTB ve Zlíně, 2007, s.9-11, 26-32
- [20] KAŠPÁRKOVÁ, V.: Střední molární hmotnost, ÚPI FT UTB ve Zlíně, 2008
- [21] Dostupné na internetu:  
<http://www.chemistry.adelaide.edu.au/external/soc-rel/content/size-exc.htm>
- [22] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M.: Gélková chromatografie, Bratislava: VEDA, 1983, s.100-104
- [23] SADAŇ, M., BARTH, H., G.: Size Exclusion Chromatography, Springer Verlag, 1999
- [24] KAŠPÁRKOVÁ, V.: Stanovení molární hmotnosti a distribuce molárních hmotností hydrolyzátů kolagenu STOSPOL, ÚPI FT UTB ve Zlíně, 2007
- [25] TOSOH Bioscience: Laboratory Products Catalog, 2006
- [26] FRIEBROVÁ, V.: Stanovení reakční kinetiky hydrolyzy vytvrzených

proteinových kolagenových materiálů, Diplomová práce, FT UTB ve Zlíně, 2008

[27] Dostupné na internetu:

[http://www.sigmaaldrich.com/AreaofInterest/Biochemicals/EnzymeExplorer/  
AnalyticalsEnzymes/Subtilisin.html](http://www.sigmaaldrich.com/AreaofInterest/Biochemicals/EnzymeExplorer/AnalyticalsEnzymes/Subtilisin.html)

[28] PETERKOVÁ, P., LAPČÍK, L.: Kolagen – vlastnosti, modifikace a aplikace,  
Chemické listy, 2000, s.372

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

|            |  |
|------------|--|
| Ala        | Alanin   |
| Arg        | Arginin  |
| Asp        | Asparagin  |
| c          | Koncentrace  |
| Gly        | Glycin   |
| Hyp        | Hydroxyprolin  |
| $K_A$      | Disociační konstanta slabé kyseliny                                |
| $K_B$      | Disociační konstanta slabé zásady                                  |
| $K_n$      | Konstanta hydrolýzy  |
| $K_v$      | Iontový součin vody  |
| $M_{GPC}$  | Molární hmotnost odpovídající elučnímu objemu maxima chromatogramu |
| $m_i$      | Hmotnost frakce i  |
| $M_i$      | Molární hmotnost frakce  |
| $M_n$      | Početní (číselný) průměr molárních hmotností                       |
| $M_w$      | Hmotnostní průměr molárních hmotností                              |
| $N_i$      | Počet částic i-tého druhu  |
| P          | Index polydisperzity   |
| $\Delta P$ | Diferenciální tlak   |
| Phe        | Fenylalanin  |
| Pro        | Prolin   |
| Ser        | Serin  |
| t          | Čas  |
| Thr        | Treonin  |
| V          | Objem  |

---

|          |                                   |
|----------|-----------------------------------|
| $V_R$    | Retenční objem                    |
| $w_i$    | Hmotnostní koncentrace frakce $i$ |
| $W_i$    | Hmotnostní zlomek frakce $i$      |
| $X_i$    | Molární zlomek frakce             |
| $\eta_0$ | Viskozita rozpouštědla            |

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

|  |    |
|--|----|
| Obr. 1 Model krystalové struktury trojitě šroubovice kolagenu.....   | 10 |
| Obr. 2 Kolagenová vlákna typu I v transmisním elektronovém mikroskopu.....   | 11 |
| Obr. 3 Zjednodušená projekce uspořádání atomů u terciální struktury kolagenu.....  | 16 |
| Obr. 4 Schematické znázornění trojitě tropokolagenové molekuly.....  | 17 |
| Obr. 5 Model mikrofibrily vytvořené důsledkem interakce polárních a hydrofobních řetězců.....  | 17 |
| Obr. 6 Rozptýlené a rozpustné různé hydrolyzáty kolagenu.....  | 23 |
| Obr. 7 Typické aminokyselinové složení hydrolyzátu kolagenu.....   | 24 |
| Obr. 8 Princip gelové permeační chromatografie.....  | 31 |
| Obr. 9 Schéma viskozitního detektoru.....  | 34 |
| Obr. 10 Křivka univerzální kalibrace.....  | 36 |
| Obr. 11 Grafické vyjádření závislosti $M_w$ na době hydrolýzy u vzorků připravených při teplotě 70°C .....   | 46 |
| Obr. 12 Grafické vyjádření závislosti molární hmotnosti na době hydrolýzy při teplotě 70°C, kdy vzorky byly připraveny za přídavku alkalázy v množství 2,5 ml (vzorek č. 61), 2,0 ml (vzorek č. 62) a 1,5 ml (vzorek č. 63)..... | 46 |
| Obr. 13 Závislost aktivity alkalázy na pH.....   | 47 |
| Obr. 14 Grafické vyjádření závislosti $M_w$ na době hydrolýzy u vzorků připravených při teplotě 65°C.....  | 52 |
| Obr. 15 Grafické vyjádření závislosti aktivity enzymu alkalázy na teplotě.....   | 54 |
| Obr. 16 Grafické vyjádření závislosti $M_w$ na době hydrolýzy u vzorků č. 67 hydrolyzovaného při teplotě 70°C a vzorku č. 68 při teplotě hydrolýzy 65°C.....   | 54 |

- Obr. 17 Grafické vyjádření závislosti  $M_w$  jednotlivých vzorků připravených při teplotě 60°C na době hydrolýzy.....57
- Obr. 18 Grafické vyjádření závislosti  $M_w$  na době hydrolýzy u vzorků č. 73 (1,5 ml alkalázy), č. 74 (1,0 ml alkalázy) a č. 75 (0,5 ml alkalázy) při teplotě hydrolýzy 60°C.....58
- Obr. 19 Grafické vyjádření závislosti doby potřebné k rozkladu střívek na množství 1% roztoku alkalázy při teplotách 70°C, 65°C a 60°C.....59
- Obr. 20 Grafické znázornění závislosti hodnot indexu polydisperzity na době hydrolýzy při teplotě 70°C.....60
- Obr. 21 Grafické vyjádření závislosti hodnot indexu polydiperzity na době hydrolýzy při teplotě 65°C.....61
- Obr. 22 Grafické vyjádření závislosti hodnot indexu polydiperzity na době hydrolýzy při teplotě 60°C.....62
- Obr. 23 Grafické vyjádření závislosti hodnot indexu polydisperzity na době hydrolýzy při teplotě 70°C (vzorek č. 68) a 65°C (vzorek č. 69), v obou případech použity 2 ml alkalázy.....63
- Obr. 24 Grafické vyjádření závislosti hodnot indexu polydisperzity na době hydrolýzy při teplotě 65°C (vzorek č. 72) a 60°C (vzorek č. 73), v obou případech použito 1,5 ml alkalázy.....64
- Obr. 25 Grafické vyjádření závislosti hodnot indexu polydisperzity na době hydrolýzy při teplotě 65°C u vzorků č. 69 a č. 70 (v obou případech použity 2 ml alkalázy).....65
- Obr. 26 Grafické srovnání různých tvarů distribučních křivek u vzorků č. 61 (množství alkalázy 2,5 ml), č. 64 a č. 65 (množství alkalázy 2,0 ml) hydrolyzovaných při teplotě 70°C.....66
- Obr. 27 Grafické znázornění změny distribučních křivek v průběhu hydrolýzy



- u vzorků č. 61\_1 (doba hydrolýzy 5 minut), č. 61\_3 (doba hydrolýzy 15 minut) a č. 61\_5 (doba hydrolýzy 25 minut) připravených při teplotě 70°C a přidavkem alkalázy 2,5 ml.....67
- Obr. 28 Grafické znázornění distribučních křivek u vzorků č. 61 (množství alkalázy 2,5 ml), č. 62 (množství alkalázy 2 ml) a č. 63 (množství alkalázy 1,5 ml) připravených při teplotě 70°C.....68
- Obr. 29 Grafické znázornění distribučních křivek u vzorků č. 71\_1 (odebraný po 20 minutách), č. 71\_3 (odebraný po 60 minutách), č. 71\_5 (odebraný po 100 minutách) a č. 71\_9 (odebraný po 180 minutách) hydrolyzovaných při teplotě 65°C a přidavkem 1,5 ml alkalázy.....69
- Obr. 30 Grafické znázornění distribučních křivek u vzorků č. 68\_1, č. 68\_3 a č. 68\_5 odebraných po 60, 180 a 300 minutách připravených při teplotě 65°C, přidavkem alkalázy 2 ml.....69
- Obr. 31 Grafické znázornění distribučních křivek u vzorků č. 73\_1, č. 73\_3 a č. 73\_9 odebraných po 10, 30 a 90 minutách, hydrolyzovaných při teplotě 60°C, přidavkem alkalázy 1,5 ml.....70

**SEZNAM TABULEK**

|         |  |    |
|---------|--|----|
| Tab. 1  | Přehled jednotlivých typů kolagenu.....  | 12 |
| Tab. 2  | Přehled přípravy jednotlivých vzorků.....  | 39 |
| Tab. 3  | Charakteristiky alkalázy.....  | 40 |
| Tab. 4  | Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností $M_n$ a indexu polydisperzity P vzorku hydrolyzátu č. 61. teplota hydrolýzy 70°C, množství 1% roztoku alkalázy 2,5 ml.....  | 43 |
| Tab. 5  | Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností $M_n$ a indexu polydisperzity P vzorku hydrolyzátu č. 62. teplota hydrolýzy 70°C, množství 1% roztoku alkalázy 2,0 ml.....  | 44 |
| Tab. 6  | Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností $M_n$ a indexu polydisperzity P vzorku hydrolyzátu č. 63. teplota hydrolýzy 70°C, množství 1% roztoku alkalázy 1,5 ml.....  | 44 |
| Tab. 7  | Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností $M_n$ a indexu polydisperzity P vzorku hydrolyzátu č. 64. teplota hydrolýzy 70°C, množství 1% roztoku alkalázy 2,0 ml.....  | 44 |
| Tab. 8  | Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností $M_n$ a indexu polydisperzity P vzorku hydrolyzátu č. 65. teplota hydrolýzy 70°C, množství 1% roztoku alkalázy 2,0 ml.....  | 45 |
| Tab. 9  | Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností $M_n$ a indexu polydisperzity P vzorku hydrolyzátu č. 66. teplota hydrolýzy 70°C, množství 1% roztoku alkalázy 2,0 ml. .... | 45 |
| Tab. 10 | Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností $M_n$ a indexu polydisperzity P vzorku hydrolyzátu č. 67. teplota hydrolýzy 70°C, množství 1% roztoku alkalázy 2,0 ml. .... | 45 |

- Tab. 11 Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností  $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností  $M_n$  a indexu polydisperzity  $P$  vzorku hydrolyzátu č. 68.  
teplota hydrolyzy 65°C, množství 1% roztoku alkalázy 2,0 ml.....50
- Tab. 12 Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností  $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností  $M_n$  a indexu polydisperzity  $P$  vzorku hydrolyzátu č. 69.  
teplota hydrolyzy 65°C, množství 1% roztoku alkalázy 2,0 ml.....50
- Tab. 13 Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností  $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností  $M_n$  a indexu polydisperzity  $P$  vzorku hydrolyzátu č. 70.  
teplota hydrolyzy 65°C, množství 1% roztoku alkalázy 2,0 ml. ....51
- Tab. 14 Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností  $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností  $M_n$  a indexu polydisperzity  $P$  vzorku hydrolyzátu č. 71.  
teplota hydrolyzy 65°C, množství 1% roztoku alkalázy 1,5 ml. ....51
- Tab. 15 Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností  $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností  $M_n$  a indexu polydisperzity  $P$  vzorku hydrolyzátu č. 72.  
teplota hydrolyzy 65°C, množství 1% roztoku alkalázy 1,5 ml.....51
- Tab. 16 Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností  $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností  $M_n$  a indexu polydisperzity  $P$  vzorku hydrolyzátu č. 73.  
teplota hydrolyzy 60°C, množství 1% roztoku alkalázy 1,5 ml.....55
- Tab. 17 Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností  $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností  $M_n$  a indexu polydisperzity  $P$  vzorku hydrolyzátu č. 74.  
teplota hydrolyzy 60°C, množství 1% roztoku alkalázy 1,0 ml.....55
- Tab. 18 Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností  $M_w$ , číselného průměru molárních hmotností  $M_n$  a indexu polydisperzity  $P$  vzorku hydrolyzátu č. 75.  
teplota hydrolyzy 60°C, množství 1% roztoku alkalázy 0,5 ml.....56
- Tab. 19 Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností  $M_w$ , číselného průměru

molárních hmotností  $M_n$  a indexu polydisperzity  $P$  vzorku hydrolyzátu č. 76.

teplota hydrolýzy 60°C, množství 1% roztoku alkalázy 0,5 ml.....56

Tab. 20 Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností  $M_w$ , číselného průměru

molárních hmotností  $M_n$  a indexu polydisperzity  $P$  vzorku hydrolyzátu č. 77.

teplota hydrolýzy 60°C, množství 1% roztoku alkalázy 0,25 ml.....56

Tab. 21 Hodnoty hmotnostního průměru molárních hmotností  $M_w$ , číselného průměru

molárních hmotností  $M_n$  a indexu polydisperzity  $P$  vzorku hydrolyzátu č. 78.

teplota hydrolýzy 60°C, množství 1% roztoku alkalázy 0,25 ml.....57



