



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**VYUŽITÍ ROZPTYLOVÝCH TECHNIK PŘI STUDIU
DENATURACE PROTEINŮ**

UTILIZATION OF LIGHT SCATTERING TECHNIQUES IN STUDY ON PROTEIN DENATURATION

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kludia Kőbőlová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1145/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Kludia Kőbőlová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Využití rozptylových technik při studiu denaturace proteinů

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracovat literární rešerši na téma možností experimentálního studia denaturace proteinů se zvláštním zaměřením na využití rozptylových technik.
2. Na základě literární rešerše na vhodném proteinu otestovat využitelnost rozptylových technik v dispozici CMV při studiu jeho teplotní nebo chemické denaturace.

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Kludia Kőbőlová
student(ka)

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Táto bakalárska práca je zameraná na overenie využitia rozptylových techník na štúdium denaturácie proteínov. Teoretická časť je venovaná proteínom a ich vlastnostiam, popisu procesu denaturácie a zoznámenie sa s technikami rozptylu svetla. V experimentálnej časti práce boli skúmané denaturačné účinky štyroch vybraných denaturačných činidiel – močoviny, guanidínium hydrochloridu, dodecylsírany sodného, síranu meďnatého – na dvoch modelových enzýmoch: lipáza a lyzozým. Denaturačné účinky týchto denaturantov boli študované metódou dynamického rozptylu svetla (DLS). Na opis zmeny vo veľkosti častíc počas denaturácie bol používaný Z-priemer, objemový stred a intenzitná distribúcia, ktoré boli stanovené touto metódou.

Všetky testované chemické látky vyvolávali zmenu vo veľkosti enzýmoch. Táto zmena je predpokladaná ako známka denaturácie proteínov. So zvyšujúcou koncentráciou denaturantov sa zvýšil aj účinok denaturácie. Čím viac boli rozvinuté polypeptidové reťazce, tým viac rástla ich intenzita rozptylu. DLS je vďaka svojej citlivosti na odlišné veľkosti častíc vhodnou metódou na stanovenie degradačných zmien v proteíne.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Proteín, lipáza, denaturácia, močovina, guanidínium hydrochlorid, SDS, síran meďnatý, dynamický rozptyl svetla (DLS)

ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on verifying the use of light scattering techniques in the study of protein denaturation. The theoretical part of the thesis describes proteins, their general properties, the process of denaturation and it provides an insight into light scattering. In the experimental part of the study I investigated the denaturation effects of four selected potential denaturing agents – urea, guanidine hydrochloride, sodium dodecyl sulfate, copper (II) sulfate– on two model enzymes: lipase and lysosyme. The denaturation effects of these denaturants were studied with the help of the dynamic light scattering method (DLS). In order to describe the change in particle size during denaturation, I used Z-Average, Volume mean and intensity distribution which were determined by this method.

KEY WORDS

Protein, lipase, denaturation, urea, guanidine hydrochloride, SDS, copper (II) sulfate, dynamic light scattering (DLS)

KÖBÖLOVÁ, K. *Využití rozptylových technik při studiu denaturace proteinů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 50 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D..

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Týmto by som chcela poďakovať vedúcemu mojej bakalárskej práce Ing. Petrovi Sedláčkovi, Ph.D. za jeho odborné vedenie, užitočné rady, trpezlivosť a za pomoc pri riešení experimentálnej časti. Moja vďaka patrí rodine a priateľom za podporu počas celého štúdia.

OBSAH

1. TEORETICKÁ ČASŤ	9
1.1. Proteíny	9
1.1.1. Štruktúra	9
1.1.2. Funkcia	10
1.1.3. Využitie	12
1.1.4. Lipáza	12
1.1.5. Denaturácia.....	13
1.2. Rozptyl svetla.....	14
1.2.1. Statický rozptyl svetla	15
1.2.2. Dynamický rozptyl svetla.....	17
2. SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	22
2.1. Denaturácia proteínov	22
2.1.1. Močovina a guanidínium chlorid.....	22
2.1.2. Dodecylsírán sodný	24
2.2. Rozptylové techniky pri štruktúrnej charakterizácii prírodných materiálov.....	25
3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	28
3.1. Použité chemikálie	28
3.2. Príprava vzoriek	28
3.2.1. Zásobný roztok fosfátového pufru.....	28
3.2.2. Príprava zásobných roztokov denaturačných činidiel	28
3.2.3. Príprava vzoriek lipázy	29
3.2.4. Príprava vzoriek lyzozýmu.....	29
3.3. Štúdium denaturácie metódou DLS	29
4. VÝSLEDKY A DISKUZIA	30
4.1. Denaturačné účinky močoviny.....	30
4.2. Denaturačné účinky guanidínium hydrochloridu.....	31
4.3. Denaturačné účinky dodecylsíraniu sodného	33
4.4. Denaturačné účinky síranu meďnatého.....	34
4.5. Vplyv iónovej sily na denaturáciu.....	36
4.6. Denaturácia kontrolného proteínu.....	38
5. ZÁVER	40
6. ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV.....	41

7.	ZOZNAM SKRATIEK.....	46
8.	ZOZNAM SYMBOLOV	47
9.	ZOZNAM PRÍLOH.....	48

ÚVOD

Počiatky poznania bielkovín siahajú až do minulého storočia, kedy prebiehali prvé výskumy v rámci organickej chémie. Proteíny riadia životne dôležité funkcie, bez ktorých by život nemohol existovať. Pomocou ich prítomnosti je možná obnova buniek, premena výživy na energiu a sú stavebnými materiálmi organizmov a biokatalyzátory. Kvôli svojej nevyhnutnosti boli a ešte stále sú stredobodom pozornosti vo vednom výskume.

Proteíny sú veľmi citlivé na širokú škálu fyzikálnych, chemických a biologických faktorov ako napr. teplota, pH prostredie alebo chemické látky. Pri pôsobení týchto nepriaznivých faktorov dochádza k narušeniu priestorovej štruktúry proteínov a následnej strate biologickej funkcie. Ich stabilita je relevantnou otázkou v rôznych odvetviach priemyslu ako napr. farmaceutická oblasť alebo papierníctvo, potravinársky a kožiarský priemysel.

Na štúdium proteínov sa dnes používa mnoho metód a techník. Jednou z možností sú techniky založené na analýze rozptylu svetla. Biopolyméry vytvárajú koloidné roztoky a sú schopné rozptyľovať dopadajúce svetlo. Pomocou tejto metódy sa dá určiť molekulová hmotnosť polymérov, veľkosť častíc a ich elektrostatická stabilita. Tieto parametre sú užitočné na charakterizáciu agregačných a degradačných procesov. Na sledovanie denaturácie proteínov bola využívaná veľkosť častíc pomocou metódy dynamického rozptylu svetla.

Cieľom tejto práce je vypracovať literárnu rešerš o možnostiach experimentálneho štúdia denaturácie bielkovín a o využití rozptylových techník. Ďalším cieľom je otestovať rozptylové techniky so zvláštnym zameraním na dynamický rozptyl svetla a na charakterizáciu vybraných proteínov pri chemickej denaturácií.

1. TEORETICKÁ ČASŤ

1.1. Proteíny

Proteíny sú biologické makromolekulárne látky, ktoré sú esenciálnou súčasťou každého živého organizmu. Bielkoviny sú veľmi rozmanité a vďaka tomu sa líši aj ich funkcia v organizme. Skladajú sa z jedného alebo viac polypeptidových reťazcov o molekulovej hmotnosti tisíc až milión daltonov. [1, 2]

Ako polypeptidy označujeme polyméry zložené z aminokyselinových jednotiek, ktoré sú navzájom spojené peptidovou väzbou. Aminokyseliny, ktoré tvoria proteíny a sú nezávislé na ich výskyte a funkcií, sa nazývajú štandardné a je ich celkom 20. [1, 3] Bielkoviny môžeme klasifikovať z chemického hľadiska na jednoduché a zložené. Jednoduché proteíny obsahujú len polypeptidové reťazce a sú biologicky aktívne bez prítomnosti inej zložky. Zložené bielkoviny zahŕňajú okrem polypeptidových reťazcov aj nebielkovinovú časť, ktorá je nevyhnutná pre funkciu a štruktúru bielkovín. Najbežnejšie prostetické skupiny sú sacharidy, fosfátové skupiny, nukleové kyseliny, lipidy alebo kovové ióny. [2]

1.1.1. Štruktúra

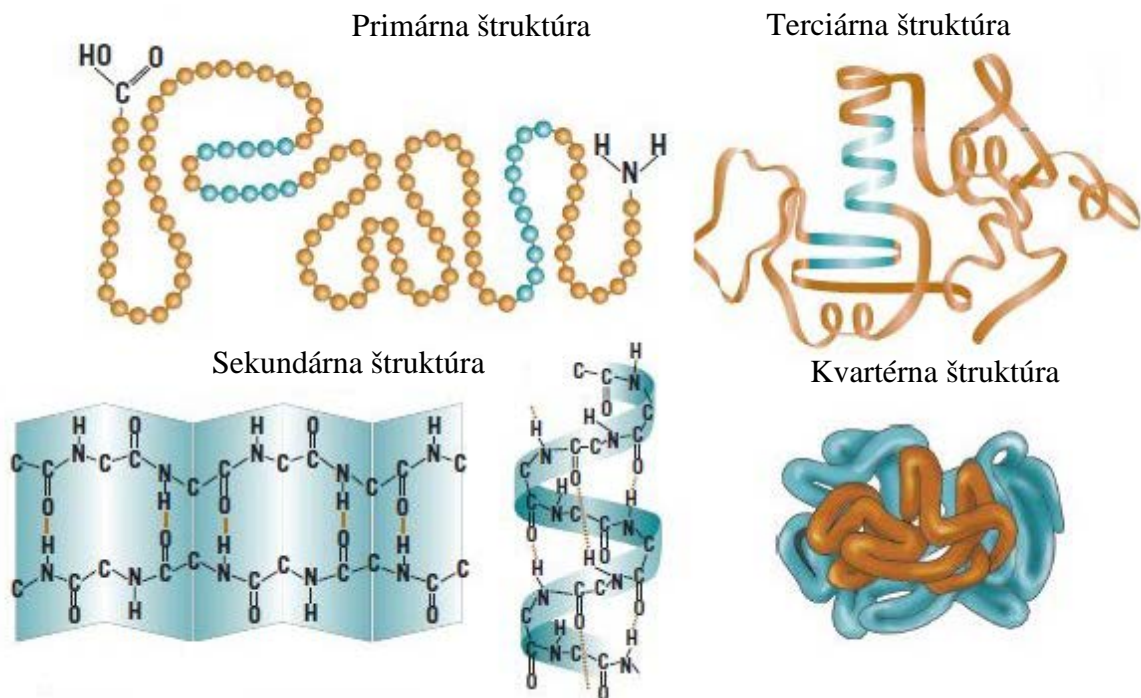
Molekuly tohto biopolyméru sú veľké a preto pri opise jeho štruktúry hovoríme o štyroch rôznych úrovniach. [3] Ako už bolo vyššie spomínané základná stavebná štruktúra proteínov je tvorená aminokyselinami. Primárna štruktúra je definovaná poradím a sekvenciou aminokyselín v polypeptidovom reťazci. [4] Pre polypeptidový reťazec je charakteristický začiatok NH_2 skupinou a označuje sa ako N-koniec. Koniec reťazca sa označuje ako C-koniec a je ukončený karboxylovou skupinou. Špecifickosť každého proteínu je určená primárnou štruktúrou, ktorá obsahuje informáciu pre tvorbu vyšších štruktúr a vyjadrenie jeho funkcie. [1]

Sekundárna štruktúra je charakterizovaná zbaľovaním proteínu vplyvom nekovalentných interakcií napríklad vodíkovými väzbami, iónovou alebo hydrofóbnou interakciou atď. [1] Rozoznávame dva typy sekundárnej konformácie: α -skrutkovica (α -helix) a β -štruktúra (skladaný list). Štruktúra α -helixu je daná vodíkovou väzbou medzi vodíkom amidu a kyslíkom karbonylu. Vodíková väzba je tvorená medzi každým tretím aminokyselinovým zvyškom. Stabilita α -helixu je podmienená počtom vodíkových mostíkov. [5] β -štruktúra obsahuje 5 až 10 aminokyselín z jednej alebo z rôznych oblastí polypeptidového reťazca, ktoré sú poskladané vedľa seba a spojené medzi-peptidovými vodíkovými väzbami. Vedľajšie reťazce sú orientované buď paralelne alebo antiparalelne v závislosti od toho či NHCO väzby majú rovnaký alebo opačný smer. Názov skladaný list vyjadruje striedavý výskyt postranných reťazcov nad a pod myšlienou rovinou [2, 4] Sekundárne štruktúry sa môžu navzájom spájať a vytvoria tak supersekundárnu štruktúru ako napr. kľúč, β - α - β atď. [4]

Terciárna štruktúra popisuje priestorové trojrozmerné usporiadanie polypeptidových reťazcov. Celková konformácia je výsledkom interakcií medzi jednotlivými úsekmi sekundárnej štruktúry. Jedným typom špecifických väzieb sú disulfidické mostíky, ktoré sú medzi zvyškami cysteínu vo vnútri polypeptidového reťazca. Druhý dôvod vzniku terciárnej štruktúry je odlišná chemická povaha postranných skupín aminokyselín schopných vytvárať nekovalentné väzby. Podľa terciárnej štruktúry delíme proteíny na fibrilárne a globulárne. [1]

Molekuly fibrilárnych bielkovín sú tvorené z niekoľkých polypeptidových reťazcov spletených do α -helixu alebo β -štruktúry. Pre takéto proteíny je typický vláknitý tvar, štruktúrna uniformita, pravidelnosť v poradí aminokyselinových zvyškov a nerozpustnosť. Väčšinou do tejto skupiny patria bielkoviny, ktorých funkcia je napr. stavebná, krycia atď. Pre globulárne proteíny je charakteristická chemická a štruktúrna pestrosť, guľovitý tvar a rozpustnosť. Ich molekula je podobná micelám, pretože ich štruktúra má nepolárne jadro a polárny obal. Zvinutie molekuly do tohto tvaru sa nazýva globula. Vo vnútri sa nachádzajú polypeptidové a nepolárne postranné reťazce. Vonkajšiu časť tvoria nabité polárne postranné skupiny. [5]

Mnoho proteínov pozostáva z niekoľkých podjednotiek, ktoré sú spojené nekovalentnými väzbami a tvoria tak kvartérnu štruktúru. Oligomerné bielkoviny sú zložené z dvoch alebo viacerých polypeptidových reťazcov. [4] Podjednotky sú spojené podobnými interakciami, ktoré sa uplatňujú aj pri terciárnej štruktúre. [6] Vytvorenie kvartérnej štruktúry umožňuje vznik nových vlastností ako napríklad funkciu hemoglobínu alebo allosterických enzýmov. [5]



Obr. 1: Hierarchický popis štruktúry bielkoviny [7]

1.1.2. Funkcia

Unikátna štruktúra bielkovín umožňuje špecifické biologické funkcie. Proteíny sa podieľajú na všetkých procesoch, ktoré sa odohrávajú v živom organizme a sú esenciálne pre život. Podľa funkcií, ktoré vykonávajú v živých systémoch sa delia do siedmych skupín. [4]

Jednu z najvýznamnejších skupín tvoria enzýmy. Pôsobia ako biokatalyzátory biochemických reakcií. Ich funkcia je založená na urýchlení reakcií pomocou zníženia aktivačnej energie bez vplyvu na zloženie chemickej zmesi. Podobne ako iné katalyzátory v priebehu reakcie nezmenia svoju štruktúru a tak pôsobia opakovane. Enzýmy sú charakterizované vysokou účinnosťou, regulovateľnosťou, schopnosťou pracovať za miernych podmienok a špecifitou. [8] Často katalyzujú reakciu len jednej zlúčeniny, ktorá sa

označuje ako substrát pre daný enzým. [3] Okrem substrátovej špecificity sa delia podľa typu katalyzovanej reakcie, ktoré sú uvedené v tabuľke 1. [8]

Tabuľka 1: Rozdelenie enzýmov podľa ich funkcie pri katalyzovaných reakciách a ich percentuálne zastúpenie v živom systéme [8]

Trieda:	Funkcia enzýmov:	Percentuálne zastúpenie (%):
Oxidoreduktázy	Intermolekulové oxidačne redukčné premeny	25,6
Transferázy	Prenos skupín v aktivovanej forme z donoru na akceptor	27,6
Hydrolázy	Štiepenie hydrolytickej väzby, ktoré vznikli kondenzáciou	22,9
Lyázy	Nehydrolytické štiepenie a vznik väzby C-C, C-O atď.	13,1
Izomerázy	Vnútro molekulové presuny atómov a skupín	5,3
Ligázy	Vznik energetický náročných väzieb za súčasného štiepenia makroergickej väzby	5,5

Základným stavebným materiálom živočíšnej ríše je skupina stavebných proteínov. Obvykle obsahujú veľký podiel pravidelných sekundárnych štruktúr. Väčšinou do tejto skupiny patria fibrilárne nerozpustné bielkoviny, ktoré vykazujú vláknitý charakter a poskytujú mechanickú oporu bunkám a tkanivám. Najzastúpenejšou skupinou skleroproteínov je kolagén. Kolagén je hlavnou zložkou kože, kostí, chrúpkavky a zubov. Tvorí tak stavebnú hmotu spojivového tkaniva.

Dôležitú funkciu v organizme zohrávajú skladovacie a transportné proteíny. Zásobné bielkoviny sú zdrojom aminokyselín a ďalších malých molekúl a iónov. Zastupiteľmi tejto skupiny sú: ferritin, ktorý ukladá železo v pečeni, kasein je zdrojom aminokyselín pre novorodené živočíchov alebo ovalbumin, legumin atď. Vedľa prenášačov v transporte majú podstatnú rolu proteíny, ktoré sú schopné prenášať látky z endogenného aj exogénneho pôvodu. Vhodný príklad pre transportný systém je hemoglobín. Hemoglobín cicavcov je uložený v červených krvinkách. Primárna funkcia tejto bielkoviny je transport kyslíku z pľúc do tkanív.

Všetky organizmy majú vyvinutý kontraktálny systém, ktorý umožňuje rôzne formy pohybu. Tieto mechanochemické funkcie vykonáva špeciálna skupina proteínov. Pohybové bielkoviny sú základom pre vnútornú organizáciu cystoskeletálnych filamentov ako mikrotubuly, intermediarne filamenty. Najdokonalejšia pohybová štruktúra je svalové vlákno. Obsahuje myozín, aktín, troponín a tropomyozín. Kontrakcia svalstva zahŕňa interakciu týchto štyroch bielkovín za prítomnosti iónov Ca^{2+} . [5]

Stavovce sú schopné chrániť sa pred účinkami cudzích biologických štruktúr. Tieto špecifické obranné mechanizmy nazývame ako imunitná reakcia. Protilátky alebo imunoglobulíny sú proteíny produkované imunitným systémom ako odozva na cudzorodú látku. Molekuly zložených bielkovín sa nekovalentne viažu na cudzie alebo vlastné pozmenené biomakromolekuly a bunky, ktoré sa nazývajú ako antigény a vyvolávajú imunitnú odpoveď. [9]

Medzi funkcie bielkovín patrí ich uplatnenie v regulačných mechanizmoch. Fungujú ako receptory alebo ako signály, ktoré prenášajú informácie. Najdôležitejšie signálne bielkoviny sú hormóny, neuromodulátory alebo regulátory gébovej exprese. Bielkovinové receptory sú schopné okrem signálu prichádzajúceho z okolia bunky prijímať informácie prostredníctvom iných zlúčenín. [5]

1.1.3. Využitie

Proteíny sa používajú vďaka svojej rozmanitosti, štruktúre a funkcií v každom odvetí priemyslu. V posledných desaťročiach sa stali hlavnou zložkou potravinárskeho, farmaceutického a kozmetického odvetvia. [10]

Proteíny majú okrem funkčnej a štruktúrnej úlohy v potravinách veľkú výživnú hodnotu. V potravinárskom priemysle je široko aplikovaná želatína kvôli svojim reologickým vlastnostiam. Želatína je denaturovaný kolagén so schopnosťou absorbovať množstvo vody, ktoré odpovedá desaťnásoboku jeho hmotnosti. Hlavným využitím sú cukrárske, mäsové a mliečne výrobky. V mliečnom priemysle veľký význam majú beta-galaktozidázy a laktázy, ktoré štiepia laktózu na glukózu a fruktózu. Vďaka tomuto postupu sú mliečne výrobky dostupné pre ľudí s intoleranciou laktózy. Enzým pektináza sa používa na rozloženie bunečnej steny ovocia a na zlepšenie výťažnosti šťavy pre ovocné džúsy a vína. [11-13]

Sericín je známy proteín s využitím pri výrobe hodvábu. Je vhodným materiálom pre rôzne odvetvia výroby kvôli svojim jedinečným vlastnostiam ako je absorpcia vody, lesknutie a termotolerancia. Najväčší význam má v textilnom priemysle a v súčasnosti je populárny aj ako biomateriál na báze hodvábu vo farmácii a kozmetike. Pretože má hydrofilné vlastnosti a hojí rany rýchlejšie viac vyhovuje pre porézne scaffoldy, hydrogély, hydratačné krémy, krémy proti vráskam a prenos liečiv. [10]

Kolagén patrí medzi najviac zastúpené bielkoviny. Hrá dôležitú rolu pri tvorbe tkanív a orgánov. Je biodegradabilný, netoxický, biokompatibilný s prírodnými biopolymérmi a je to povrchovo aktívna látka. Kolagén je značne využívaný materiál v biomedicínskych aplikáciách. Medzi hlavné uplatnenie patria systémy pre prenos liečiv ako hubky na popáleniny a rany, kolagénové filmy pre infekčné tkanivá alebo v tkanivovom inžinierstve ako implantáty kože, kosti a cievy. [14, 15]

1.1.4. Lipáza

Lipáza alebo triacylglycerolacylhydroláza je skupina enzýmov, ktorá katalyzuje reverzibilnú postupnú hydrolýzu triacylglycerolov v medzifázovom rozhraní vody a oleja. Lipázy majú regio- a stereošpecifitu, vďaka čomu tento biomateriál patrí medzi najžiadanejšie enzýmy v priemysle.

Lipáza sa nachádza v prírode, v kvasinkách, baktériách, hubách, zvieratách a rastlinách. [16] Všeobecne má molekulovú hmotnosť v rozmedzí 20 až 60 kDa a napriek jej nízkej sekvenčnej identite vykazuje podobnú trojrozmernú štruktúru. [2] Medzi lipázami rôzneho pôvodu existujú veľké rozdiely v špecifickosti vzhľadom k polohe hydrolyzovanej esterickéj väzby aj v rýchlosti štiepenia. Najčastejšie sú štiepené krajné polohy a obecné je charakteristické, že rýchlosť enzymatickej reakcie klesá od prvého kroku až k poslednému. [8]

Vykazujú selektívnosť pri odlišnej dĺžke reťazcov. Väčšinou uprednostňujú hydrolyzu esterov mastných kyselín s dĺžkou reťazca C8-C18. Pre lipázy je typická ich stabilita v organických rozpúšťadlách a ich optimálna enzymatická aktivita je pri pH 6-8,5 a teplote 30-35°C. [16]

Lipázy sú často označované ako serínové hydrolázy, pretože vo svojom aktívnom mieste majú triádu aminokyselín, čím sa podobajú na proteázy. Triáda je zložená zo serínu, histidínu a z kyseliny asparágovej alebo glutámovej. Aktívne miesto je obklopené hydrofóbnou oblasťou a ďalej je chránené peptidovým reťazcom z hydrofilných aminokyselinových zvyškov. Táto štruktúrna časť vysvetľuje pasivitu pri substrátoch rozpustných vo vode. Kontakt s rozhraním oleja vyvoláva konformačnú zmenu, ktorá sprístupní aktívne miesto substrátu.

V priemysle má lipáza veľký význam hlavne v odvetviach potravinárstva, farmácie, bioenergetiky a pri výrobe pochutín a čistiacich prostriedkov. Pre priemyselné využitie je lipáza izolovaná prevažne z baktérií a húb. Lipáza ako čistiaci prostriedok je používaná už viac ako 100 rokov. Mastné škvrny sú považované za najťažšie odstrániteľný druh škvŕn zo znečistených šiat. Pracie prášky, ktoré obsahujú tento enzým sú schopný účinne odstrániť škvrny, pretože štiepia triacylglyceroly na menšie medziprodukty, ktoré sú ľahšie odstrániteľné. [2]

Bionafta, vyrobená z obnoviteľných zdrojov, je alternatívou fosilnej nafty. Enzymatická výroba biodieselu za použitia lipázy ako katalyzátora je priateľská k životnému prostrediu. Radu biologických tukov a olejov je možné previesť enzymatickou reakciou (transesterifikáciou) na bionaftu. Obsah energie, fyzikálne a chemické vlastnosti sú podobné motorovej naftu. Jej hlavná výhoda spočíva v tom, že má nízku emisiu skleníkových plynov. [2, 16]

Triacylglyceroly majú vplyv na výživu a chuť potravín. Lipázy sú používané k ovplyvneniu chuti a vône rôznych potravinárskych výrobkov napr. pri výrobe syrov. Tiež sú využívané k rýchlejšiemu zreniu a vytvoreniu chuti čokoládovej hmoty, a k zlepšeniu šľahateľnosti bielka. V pekárskom priemysle sa lipáza pridáva do cesta aby zvýšila jeho stabilitu, objem a predĺžila jeho trvanlivosť. [2, 8]

Lipázy majú potenciál aj v organickej syntéze. Stereošpecifita enzýmu je veľkou výhodou pri výrobe farmaceutických produktov a medziproduktov. Mnoho liekov má chirálne centrum, avšak len jeden z izomérov má požadovaný biologický účinok. Druhý izomér je buď biologický neaktívny alebo má negatívny účinok a je potreba ho odstrániť. Enzýmy sú schopné vďaka svojej stereošpecifite selektívne syntetizovať požadovaný izomér ako napr. lipáza slúži pri výrobe kaptoprilu. [2, 16]

1.1.5. Denaturácia

Proteíny sa nachádzajú v natívnej forme pri svojich optimálnych podmienkach, čiže v konformácii v ktorej sú stabilné a aktívne. Tento stav je charakterizovaný termodynamickou stabilitou. Konformácia bielkovín je veľmi citlivá na zmeny prostredia. Pôsobením fyzikálnych a chemických faktorov dochádza k zmene vlastností a tento dej sa nazýva denaturácia. Denaturácia je súbor procesov, pri ktorých dochádza k strate vyšších štruktúr bez zmeny primárnej štruktúry. Táto zmena v štruktúre spôsobuje stratu aktivity. Prechod z natívneho

do zdenaturovaného stavu je sprevádzaný zmenou Gibbsovej voľnej energie. [17] Konformačná zmena môže byť vratná alebo nevratná. V prípade vratných procesov rozlišujeme termodynamicky vratnú denaturáciu, kedy je denaturovaná a natívna forma v rovnováhe a po vrátení pôvodných podmienok sa renaturuje. Druhá možnosť reverzibilnej denaturácie je obnovenie pomocou vytvorených špeciálnych podmienok. [5]

Prechod z natívneho stavu do denaturovaného závisí na denaturačných podmienkach. Denaturáciu môžu vyvolávať fyzikálne faktory ako teplo, vysoký tlak, povrchové sily, ultrazvuk, chemické činidlá a extrémne pH.

Stabilita proteínov je určená jej Gibbsovou energiou, ktorá je funkciou teploty. Pre zmenu Gibbsovej energie v procese tepelnej denaturácie platí vzťah:

$$\Delta G = \Delta H_{D-N} - T\Delta S_{D-N} \quad (1.)$$

ΔG , ΔH a ΔS predstavujú rozdiel Gibbsovej energie, entalpie a entropie medzi denaturovaným a natívnym stavom proteínu. Keď hodnota voľnej energie je pozitívna, uprednostňuje sa natívny stav pred denaturovaným. Naopak, pri zápornej hodnote sa daný proteín denaturuje. Teplota, pri ktorej je koncentrácia denaturovaného a natívneho proteínu rovnaká sa nazýva teplota topenia, to je stredná hodnota rozvíjania.

Pôsobením chemických činidiel napr. močovinou alebo guanidínium chloridu dochádza k porušeniu celkovej proteínovej štruktúry. Denaturačné činidlá môžu buď interagovať s postrannými skupinami aminokyselinových zvyškov, alebo môžu porušiť interakcie medzi vodou a proteínom. Voľná Gibbsova energia v priebehu tvorenia nových interakcií medzi proteínovou kostrou a chemickým činidlom je lineárna ku koncentrácií denaturačného činidla:

$$\Delta G = \Delta G_{D-N}^0 - m_{D-N} [D] \quad (2.)$$

ΔG_{D-N}^0 je zmena Gibbsovej energie bez denurantu, a $[D]$ je koncentrácia denurantu. Parameter m_{D-N} obsahuje poznatky o zväčšení povrchu proteínu pri kontakte s denaturačným činidlom. Každý bielkovinový zvyšok prispieva k hodnote parametru v závislosti na ich interakcii s činidlom. Malá hodnota m_{D-N} znamená, že povrchová plocha proteínu sa počas denaturácie výrazne nezmenila, a bielkovina teda nie je plne rozvinutá. [17-19]

1.2. Rozptyl svetla

Dopadáním svetelného lúča na častice sa svetlo buď absorbuje, rozptýli alebo je absorbované a zároveň rozptýlené v závislosti na vlnovej dĺžke svetla a optických vlastností materiálu. U rozptylu žiarenia je pohlcované svetlo znovu vyžiarené náhodne bez zmeny vlnovej dĺžky. Tento jav je pozorovateľný pri heterogénnych materiáloch, buď v dôsledku kolísania hustoty v čistej látke alebo optickej heterogenite prostredia. Rozptyl svetla sa často využíva a existujú dva hlavné typy rozptylu svetla a to je statický a dynamický. [20-22]

1.2.1. Statický rozptyl svetla

Obece pri rozptyle svetla sa predpokladá, že vlnová dĺžka svetla je podstatne väčšia ako častice v sledovanom systéme. Keď majú častice väčší rozmer prednostne dôjde k odrazu svetla a stávajú sa viditeľnými (Tyndallov efekt). Klasická teória statického rozptylu svetla (SLS) vyjadruje predstavu, že každá časť častice sa chová ako oscilujúci dipól a vyžaruje pohltenu svetelnú energiu vo všetkých smeroch bez zmeny vlnovej dĺžky a bez ohľadu na jej tvar. Tento typ rozptylu sa nazýva aj ako Rayleighov rozptyl. Intenzita rozptýleného svetla I závisí na intenzite dopadajúceho žiarenia I_0 , polarizovateľnosti rozptyľujúcej častice α , vlnovej dĺžke svetla λ , veľkosti častíc r a na uhle rozptylu θ :

$$I = \frac{I_0 \cdot 8\pi^4 \cdot \alpha^2}{r^2 \cdot \lambda^4} \cdot (1 + \cos\theta) \quad (3.)$$

Častice, ktoré sú dostatočne veľké nato aby neboli považované za jednoduchý dipól, to znamená, že ich rozmer je podobný vlnovej dĺžke, sú charakterizované Rayleigh-Debyeovou teóriou. Táto teória vyjadruje, že rozptylová krivka nie je zrkadlovo symetrická a klasickú teóriu stačí vynásobiť vhodným korekčným faktorom.

Pre ľubovoľné veľkosti častíc sa aplikuje Mieova teória, ktorá sa snaží o univerzálny popis. Keď sú rozptylové centrá veľké, na ich popis sa používa teória lomu, odrazu a difrakcii žiarenia. S rastúcim rozmerom častíc sa rozptýlená intenzita viac prejavuje smerom dopredu do oblasti malých uhlov. Závislosť rozptýlenia intenzity na pozorovanom uhle je významne nelineárna. [20, 23,25]

1.2.1.1. Princíp metódy

Statický rozptyl svetla sa využíva na meranie molekulovej hmotnosti, gyračného polomeru a druhého viriálneho koeficientu, ktorý popisuje silu interakcie medzi časticami a dispergovadlom. Princípom metódy je meranie priemeru intenzity rozptýleného svetla v určitom časovom intervale. Meraná intenzita rozptýleného svetla je potom priradená k určitej koncentrácii. [25]

Osvetlením molekuly sa v nej vytvorí oscilujúci dipól. Tento dipól bude spätne vyžarovať svetlo. Intenzita vyžarovaného svetla závisí na veľkosti dipólu, ktorý je indukovaný v molekule. Čím viac je molekula polarizovateľná, tým väčší je indukovaný dipól a vďaka tomu aj intenzita rozptýleného svetla. Pre charakterizáciu rozptylu svetla u týchto molekúl má dôležitý význam ich polarizovanosť, ktorá závisí na zmene indexu lomu s koncentráciou. Všetky častice, ktoré sa nachádzajú v roztoku rozptyľujú svetlo ako oscilujúci dipól a z toho vyplýva, že intenzita rozptýleného svetla je priamo úmerná koncentrácii.

V prípade keď sa monoméry zhlukujú a vytvárajú diméry pri rozptyle svetla správajú sa ako samostatné jednotky. Fáza týchto svetiel je nekoherentná. Pokiaľ tieto monoméry tvoria dimér a spolu sa pohybujú, tak difúzne svetlo jedného monoméru bude mať fázový vzťah k druhému. Inými slovami sú koherentné. Rozptýlené svetlo z diméru je dvakrát silnejšie ako z jednočlena, z čoho vyplýva, že násobením hmoty sa rovnomerne násobí aj rozptyl pri zachovaní koncentrácie. Vďaka priamej úmere medzi intenzitou a hmotou je statický rozptyl svetla

vhodnou metódou pre stanovenie molekulovej hmotnosti a na sledovanie tvorby agregátov. [25]

Pri praktickom meraní je detegovaná intenzita rozptylu svetla popísaná odvodenou Rayleighovou rovnicou:

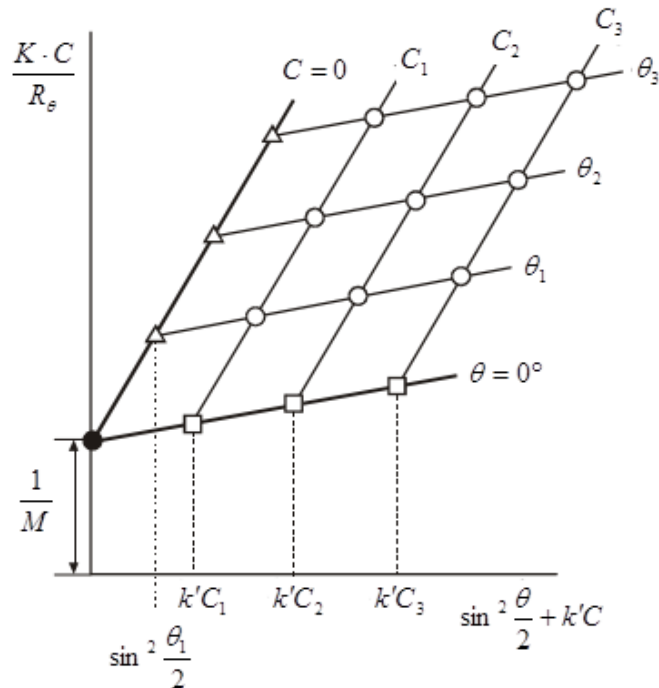
$$\frac{K \cdot C}{R_{\theta}} = \left(\frac{1}{M} + 2A_2 \cdot C \right) \cdot P_{\theta} \quad (4.)$$

Kde K je optická konštanta, C koncentrácia, R_{θ} Rayleighov pomer (pomer rozptýleného a dopadajúceho svetla na vzorku), M molekulová hmotnosť, A_2 druhý viriálny koeficient a P_{θ} uhlová závislosť. Keď sú častice menšie ako vlnová dĺžka, uhlová závislosť sa rovná jednej. V prípade rozptylu Mie, väčšie častice rozptyľujú viac fotónov a uhlová závislosť je vždy menšia ako jedna. Uhlová závislosť vyplýva z konštruktívnych a deštruktívnych interferencií difúzneho svetla z rôznych polôh jednej častice.

Sledovanie statického rozptylu svetla pomocou prístroja Zetasizer Nano ZS a S je založený na meraní intenzity rozptylu svetla pri rôznych koncentráciách vzoriek pod jedným uhlom. Pripravené vzorky musia byť úplne rozpustené, zbavené od prachu a prefiltrované, pretože prístroj je veľmi citlivý na nečistoty. Pri meraniach sa najprv musí premerať štandard pre stanovenie referenčnej intenzity rozptylu. Obvyklým štandardom je toluén. Rayleighové pomery toluénu sú dostatočne vysoké pre presné meranie a známe v širokom rozmedzí vlnových dĺžok a teplôt. Výhodou tejto látky je aj jej relatívne ľahké obstarávanie. Potom nasleduje premeranie a porovnávanie intenzity koncentračnej rady k štandardu. [25, 27]

1.2.1.2. Vyhodnotenie a využitie metódy

Po meraní môžu byť sledované látky vyhodnotené dvoma spôsobmi na základe ich veľkosti. Častice u ktorých platí Rayleighova teória sú vyhodnotené z grafu zo závislosti $K \cdot C/R_{\theta}$ na C . Pretože je meranie uskutočňované pri jednom uhle graf má tvar priamky. Molárna hmotnosť sa stanoví z priesečníka, a smernica priamky nám udáva druhý viriálny koeficient. Výpočet molekulovej hmotnosti je založený na extrapolácii hodnôt k nulovej koncentrácii. Pre väčšie častice, u ktorých neplatia optimálne podmienky sa používa Zimmov diagram. Pri konštrukcii tohto grafu sú vynesené výsledky merania pri rôznych koncentráciách, rozptylových uhlov a $K \cdot C/R_{\theta}$. Graf je znázornený na obr. 2.



Obr. 2: Zimmov diagram [28]

Zimmova metóda umožňuje stanovenie molárnej hmotnosti z oblasti $1/M$, zo smernice čiary pre $\theta = 0^\circ$ druhý viriálny koeficient a zo smernice čiary pre $C = 0$ gyačný polomer. Je to veľmi vhodná metóda pre častice, u ktorých sa nedá postupovať jednoducho a jej náročnosť tvorí prínos pri charakteristike rozmeru častíc. [25, 28, 29]

Druhý viriálny koeficient popisuje vzájomné pôsobenie medzi látkou a rozpúšťadlom. Využíva sa k vyhodnoteniu termodynamickkej kvality rozpúšťadla. Pre vzorky, kde A_2 (viz. rovnica 4.) nadobúda kladné hodnoty, častice uprednostňujú interakciu s rozpúšťadlom. Pre zápornú hodnotu A_2 je situácia opačná, prevládajú interakcie medzi časticami a dochádza k ich zhlukovaniu. Nulová hodnota druhého viriálneho koeficientu znamená, že vo vzorke sila interakcie medzi časticou-časticou a časticou-rozpúšťadlom je rovnocenná. V týchto prípadoch sa rozpúšťadlo označuje ako theta. [25]

Ďalším parametrom pri stanovení rozptylu svetla je gyačný polomer alebo polomer zotrvačnosti. Je definovaný ako priemerná hodnota kvadrátov vzdialenosti segmentov od ťažiska polymérneho reťazca. Slúži pre charakterizáciu veľkosti častíc ľubovoľného tvaru. [30, 31]

1.2.2. Dynamický rozptyl svetla

Metódy merania veľkosti častíc môžeme rozdeliť na ensemblové a čítacie. Pre ensemblové metódy je väčšinou charakteristické nízke rozlíšenie a citlivosť, ale široký dynamický rozsah veľkosti a vysoká štatistická presnosť. Do tejto skupiny patrí sedimentácia, laserová difrakcia a dynamický rozptyl svetla, s ktorým sa budeme zaoberať nižšie. Čítacie majú vysoké rozlíšenie a citlivosť, avšak úzky dynamický rozsah veľkosti. Sú viac vhodné pre určenie malého počtu častíc mimo danej medzi. Príkladom na tento spôsob merania je mikroskopická obrazová analýza. [24]

Metóda DLS sa najprv nazývala ako kvazi-elastický rozptyl svetla, avšak dneska je známa už aj pod názvom fotónová koleračná spektroskopia. Metóda má široké využitie pri analýze dynamických vlastností a veľkosti rôznych fyzikálnych, chemických a biologických systémov. Je to ideálny spôsob na meranie veľkosti častíc v submikrónovej oblasti (nm). [24, 32]

1.2.2.1. Princíp metódy

Pri obecnom rozptyle svetla je svetlo rozptýlené od častíc v rôznej fáze, nedôjde k jeho interferencii. Pri použití koherentného svetla laseru a po jeho interakcii s časticami k interferencii dôjde. [23] Intenzita rozptýleného svetla z častíc do daného uhlu je výsledkom interferencie detektora a svetla rozptýleného od rôznych častíc v roztoku. Táto fáza závisí na polohe častíc vzhľadom na smer prichádzajúcich a rozptýlených svetelných lúčov. Z toho vyplýva, že celková intenzita rozptýleného svetla pri danom uhle závisí na polohe častíc, čiže na štruktúre. [33] Prakticky častice nikdy nie sú nehybné, ale pohybujú sa Brownovým pohybom. Brownov pohyb je pohyb atómov a molekúl všetkých skupenstiev pri určitej teplote. Príčinou tohto pohybu sú náhodné zrážky vznášajúcich čiastočiek s molekulami prostredia. [34] Dôležitým rysom Brownovho pohybu pre dynamický rozptyl svetla je fakt, že sa malé častice pohybujú rýchlejšie a veľké pomalšie. Ožiarené a pohybujúce sa častice vyvolávajú náhodnosť medzi fázami rozptýleného svetla, čo spôsobuje koherentnú a deštruktívnu interferenciu. Konštruktívny a deštruktívny fázový prírastok rozptýleného svetla spôsobuje fluktuáciu intenzity.

Dynamický rozptyl svetla pre meranie fluktuácie sa využíva digitálny korelátor. Z fluktuácie intenzity rozptýleného svetla je získaná autokorelačná funkcia znázorňujúca podobnosti signálu za určitý časový interval:

$$g_{2,teoretický}(\tau) = (A \cdot e^{-B\tau})^2 + 1 \quad (5.)$$

Kde A, B sú konštanty, a τ je čas korelácie alebo oneskorenie. Čas korelácie je charakterizovaný ako časové oddelenie medzi intenzitami merania. Obvykle leží v časovom rozsahu 100 ns až niekoľkých sekúnd. V prípade vzoriek obsahujúcich častice s odlišnou veľkosťou funkcia autokorelácie je rozšírená ďalšími konštantami. Počet parametrov je určený podľa najlepšej zhody medzi teoretickou a meranou autokorelačnou funkciou.

Difúzny koeficient častíc závisí na konštante B, vlnovej dĺžke svetelného zdroja λ , rozptýlenom uhlu θ a na indexe lomu rozpúšťadla n :

$$D = \frac{B}{\left(\frac{4 \cdot \pi \cdot n}{\lambda} \cdot \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)\right)^2} \quad (6.)$$

Pre výpočet difúzneho koeficientu je najprv potrebné nájsť hodnotu parametru B z nameranej autokorelačnej funkcie $g_2(\tau)$. Parameter A zvyčajne neudáva žiadnu informáciu o časticách v roztoku. Hľadanie dvoch parametrov prebieha pomocou počítačového programu.

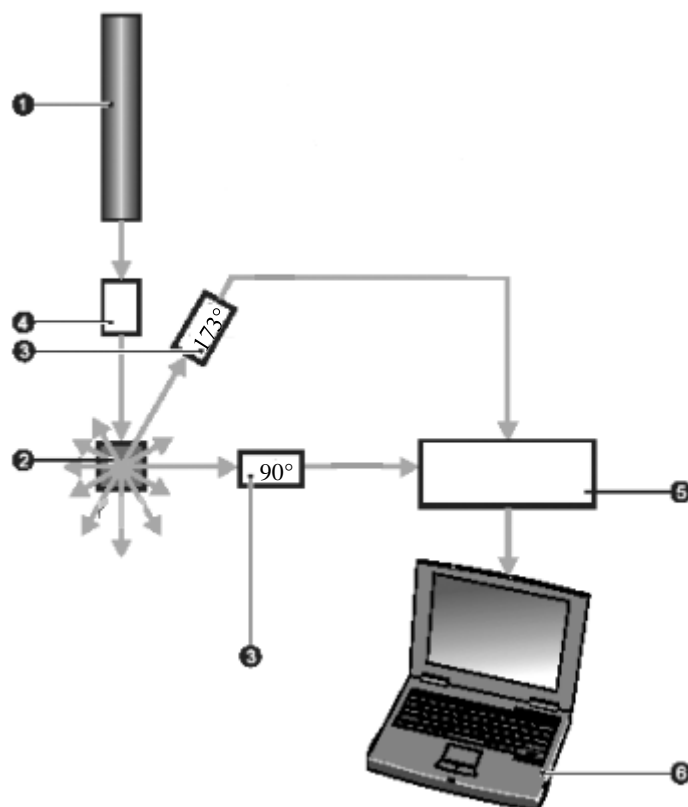
Pre určenie veľkosti častíc je difúzna konštanta interpretovaná do hydrodynamického polomeru r_h . Hydrodynamický polomer sa vypočíta pomocou Stokes-Einsteinovou rovnicou:

$$r_h = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (7.)$$

Kde k je Boltzmannova konštanta, T absolútna teplota, η viskozita rozpúšťadla, D difúzny koeficient. Hydrodynamický polomer sledovanej látky je definovaný ako polomer guľovitej častice, ktorá má rovnaký difúzny koeficient za rovnakých podmienok ako nameraná látka. Hydrodynamický polomer určí len veľkosť častíc, nepodáva informácie o ich tvare, či je guľa, elipsoid alebo náhodná cievka. Veľkosť častíc určená pomocou hydrodynamického polomeru je často väčšia ako veľkosť stanovená štatistickým rozptylom svetla alebo elektrónovým mikroskopom. Je to z dôvodu, že r_h môže zahrňovať solvantačný obal. [25, 27, 32, 35]

1.2.2.2. Inštrumentácia DLS a vyhodnotenie dát

Typická inštrumentácia DLS je charakterizovaná šiestimi hlavnými komponentami. Prvým prvkom je laser ako zdroj svetla, ktorý osvetľuje vzorku vo vnútri cely. Prechádzajúce a rozptýlené svetlo časticami vo vzorke je zachytené detektorom. Detektor sa používa na meranie intenzity rozptýleného svetla a teoreticky môže byť umiestnený v ľubovoľnej polohe. U prístroja Zetasizer Nano sa väčšinou používa poloha detektoru v uhle 90° alebo 173° . Detekcia pri 173° je známa ako spätný rozptyl. Tento výber uhlu má množstvo výhod. U spätného rozptylu dopadajúceho svetla nemusí prechádzať po celej vzorke. Vďaka tejto kratšej optickej dráhe sa môže merať vyššia koncentrácia. Efekt mnohonásobného rozptylu je minimálny pri tomto uhle a kontaminujúce látky ako napr. prach a ďalšie veľké častice rozptyľujú svetlo dopredu. Pri mnohých modeloch sa využíva klasický rozptyl s optikou 90° . Zaisťuje kontinuitu s ostatnými systémami, ktoré detegujú pri 90° . Detektor musí byť schopný zmerať intenzitu rozptýleného svetla v celom rozsahu. Niekedy je detegované príliš veľké množstvo svetla a detektor je preťažovaný. Na zníženie intenzity svetla z laseru sa používa zoslabovač. Zetasizer počas merania automaticky nastaví polohu a priepustnosť zoslabovača. Pri vzorkách s nízkou koncentráciou a u malých častíc, ktoré rozptyľujú menej svetla prechádza cez zoslabovač viac svetla. V opačnom prípade intenzita svetla je vždy znížená. Signál z detektoru prechádza na korelátor. Korelátor porovnáva intenzitu rozptylu svetla po sebe idúcich časových intervalov, aby odvodil rýchlosť pohybu častíc. Informácia z korelátora je nasledovne vyhodnotená a prevedená na informáciu o veľkosti pomocou počítačového programu. Schéma inštrumentácie metódy DLS je znázornená na obr. 3. [25]



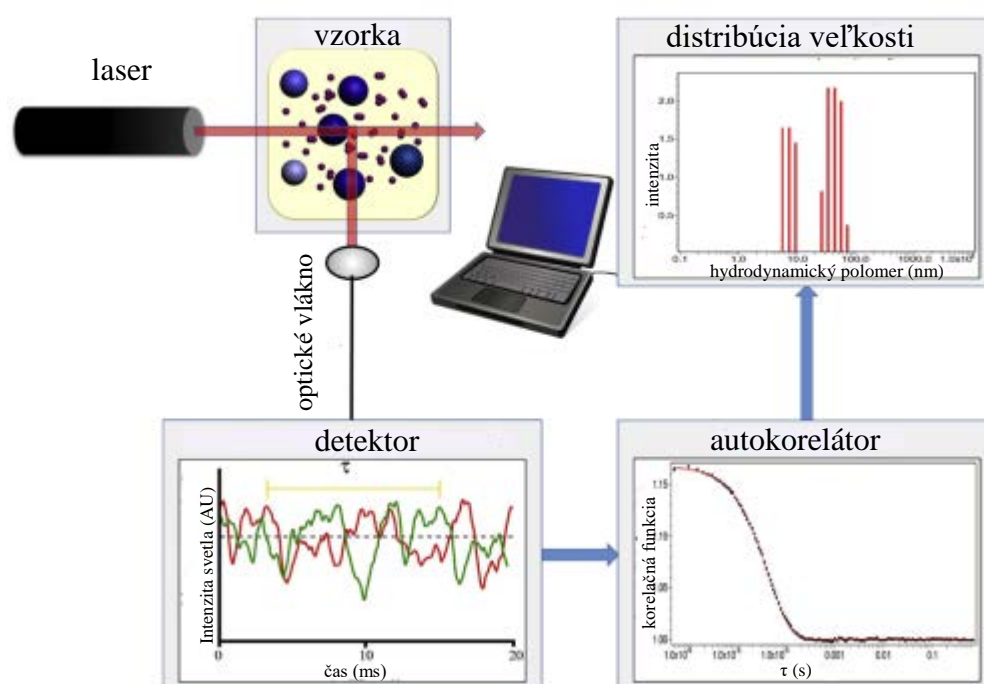
Obr. 3: Inštrumentácia prístroja Zetasizer Nano – 1 laser, 2 ceba, 3 detektor, 4 zoslabovač, 5 korelátor, 6 počítač [25]

Ako už bolo vyššie spomínané, fluktuácia intenzity rozptýleného svetla je detegovaná prístrojom a následne je prevedená korelácia medzi intenzitou a časom do autokorelačnej funkcie. Veľké častice sa pohybujú pomalšie takže ich fluktuácia je tiež pomalšia. Taktiež, malé častice kolísajú rýchlejšie, vďaka čomu aj ich fluktuácia je rýchlejšia. Software Zetasizer po zmeraní korelačnej funkcie pomocou algoritmu rozkladá rýchlosť a po triedení veľkostí vytvorí distribúciu veľkosti častíc. Typický graf distribúcie veľkosti častíc podľa intenzity má na ose x distribúciu tried veľkostí a na ose y je relatívna intenzita rozptýleného svetla. Použitím Mieovej teórie môže byť distribúcia intenzity prevedená na distribúciu objemu a počtu. Keď je distribúcia intenzity len jeden pík, tak po konverzii na objem bude forma píku nepatrne zmenená. Obecne pre veľkosť častíc platí, že: $d(\text{intenzita}) > d(\text{objem}) > d(\text{počet})$. Schéma merania a analýzy je na obr. 4. [25, 36, 37]

Pri meraní a príprave vzoriek dôležitú úlohu pri určení veľkosti častíc hrá koncentrácia a veľkosť. Metódou DLS sa obecné dá určiť veľkosť v rozmedzí 1 až 1000 nm. Častice s hydrodynamickým polomerom menším ako 1 nm slabo rozptyľujú svetlo a ich rozptyl je často maskovaný väčšími časticami v roztoku. Aj v prípade, keď sú malé častice samotné v roztoku ich rozptyl je príliš slabý a z odvodennej autokorelačnej funkcie bude ťažko určený hydrodynamický polomer. Na druhej strane častice väčšie ako 1000 nm majú tendenciu usadzovať sa v roztoku a neprodukujú rozptýlené svetlo. Ďalej je autokorelačná funkcia skreslená, pretože sa častice nepohybujú len Brownovým pohybom ale už tam prevláda sedimentácia. [27]

1.2.2.3. Využitie

Táto technika je bežne používaná v biologických a chemických laboratóriách na zisťovanie agregátov v makromolekulárnych roztokoch, na stanovenie veľkosti proteínov, nukleových kyselín a komplexov alebo na monitorovanie viazania ligandu. DLS je neinvazívna a nedeštruktívna metóda. Využíva sa pre charakterizáciu štruktúry a dynamických vlastností koloidných roztokov a biologických makromolekúl a polymérov. Biologické makromolekuly sú vhodným materiálom pre stanovenie pomocou tejto techniky. Sú dostatočne veľké nato, aby sa rozptyľovali pri nízkych koncentráciách. Sledované makromolekuly pomocou DLS sú proteíny, sacharidy, nukleové kyseliny a lipidy.



Obr. 4: Schéma analýzy [37]

Zo všetkých makromolekul sa najviac študujú pomocou DLS práve proteíny. Určenie veľkosti a tvaru polypeptidového reťazca alebo bielkoviny s viacerými podjednotkami sú najbežnejšie aplikácie tejto metódy pri ich štúdiu. Často je predmetom sledovanie viazania ligandu a odlišné podmienky prostredia, ktoré vyvolávajú zmeny v štruktúre proteínu, čo sa potom odráža aj na difúznej konštante. Ďalej je vyšetovaná štruktúra enzýmov a ich konformačná zmena pri naviazaní substrátu alebo ich agregácia. Agregáty sú vďaka svojej veľkosti ľahko identifikovateľné v stopovom množstve. Prítomnosť malého množstva agregátu v prítomnosti monomérov spôsobuje významnú zmenu v hydrodynamickom polomere a v polydisperzite. Avšak prítomnosť oligomérov a agregátov nevyvoláva zmenu v distribúcii objemu. Metódou DLS sa dá vyhodnotiť tepelná stabilita. Proteíny pri zvýšenej teplote denaturujú a to vedie k silnej agregácii a k zvýšeniu intenzity rozptylu svetla a veľkosti. Teplota, pri ktorej obidve hodnoty sa výrazne zvyšujú nazývame teplotou topenia. [37-40]

2. SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

V nasledujúcich odstavoch sú zhrnuté súčasné možnosti experimentálneho štúdia na denaturáciu proteínov a na rozptylové techniky.

2.1. Denaturácia proteínov

Proteíny vykazujú len okrajovú stabilitu, ktorá je silne ovplyvnená termodynamickými podmienkami a zložením roztoku. Táto stabilita môže byť narušená stresovými faktormi ako chemické činidlá, pH alebo teplota. Schopnosť pôsobenia močoviny, guanidínia, dodecylsíraru sodného alebo teploty už je dlho známa, avšak mechanizmus na molekulárnej úrovni je ešte stále diskutabilný a nie je upresnený.

2.1.1. Močovina a guanidínium chlorid

Močovina je malá hydrofilná látka, ktorá je prítomná vo všetkých taxonómiách a je široko rozšírený denaturant. Podľa literatúry existujú dva navrhované mechanizmy pôsobenia močoviny. Nepriamy mechanizmus predpokladá zmenu solvatačných vlastností proteínu v roztokoch močoviny. Močovina ľahko nahrádza vodíkové väzby medzi vodou a proteínom, avšak táto teória je spochybnená mnohými štúdiami. Priamy mechanizmus opisuje schopnosť interakcie močoviny s povrchom proteínu. Tento model vyvoláva ďalšie otázky o povahe interakcie močoviny s polárnymi a nepolárnymi bočnými reťazcami a peptidovou kostrou. Nové proteínové simulácie poskytujú jasný obraz, že vo vodných roztokoch močoviny sa zvyšuje kontakt medzi močovinou a hydrofóbnymi postrannými reťazcami a tiež medzi vodíkovými väzbami polárnej chrbtice. [41]

Canchi a spolok skúmali relatívny príspevok vedľajších reťazcov a kostry proteínu v priebehu denaturácie s močovinou. Na určenie týchto interakcií využívali preferenčný koeficient interakcie (*preferential interaction coefficient*), ktorý bol vypočítaný metódou REMD. Reverzibilná rovnováha medzi natívnym a denaturovaným stavom bola sledovaná na mini proteíne, Trp-cage v prítomnosti rôznej koncentrácie roztoku močoviny (0 M, 1,9 M, 3,8 M, 5,8 M). Trp-cage sa skladá z dvadsiatich aminokyselinových zvyškov. Vďaka svojej veľkosti a rýchlej kinetike zbaľovania je vhodným materiálom na sledovanie rovnováhy. Proteín bol simulovaný v dvoch silových poliach Amber94 a Amber99sb. Autori zistili, že močovina priaznivo interaguje s proteínovou kostrou a k denaturácii hlavne prispieva bočný reťazec. Táto štúdia podporuje model priameho mechanizmu. [42]

Stump a kolektív sa zaoberali objasnením a kvantifikáciou interakcie močoviny so všetkými prirodzenými 20 aminokyselinami pomocou simulácie molekulovej dynamiky. Cieľom bolo vysvetliť, či močovina prednostne reaguje s polárnymi alebo nepolárnymi zvyškami prípadne peptidovou kostrou. Aby oddelili vplyv sekvencie a sekundárnej alebo terciárnej štruktúry na okamžitú interakciu, použili simuláciu tripeptidu s obsahom terminálnych glycinov (GXG). Z experimentu vyplýva, že močovina interaguje hlavne s aromatickými a nepolárnymi zvyškami a proteínovou kostrou. Koeficient kontaktu bol najvyšší u cysteínu, tryptofánu a fenylalanínu. Polárne a hlavne kladne nabité aminokyseliny reagovali oveľa menej. Záporne nabité ako kyselina asprágová a glutámová uprednostnili interakciu s vodou pred močovinou. Ďalej prišli na to, že molekuly proteínu sú umiestnené na povrchu proteínu najmä pri menej

polárnych zvyškov a pri kostre. Z výsledkov vychádza, že vodíková väzba medzi močovinou a proteínom je výrazne slabšia ako u vodíkovej väzby kostra-voda alebo voda-voda. Vodíková väzba tvorená močovinou nemôže byť hnacou silou pre denaturáciu bielkovín, ale prispieva k celkovej energetike. [43]

Bennion a Daggett tiež študovali destabilizačné efekty močoviny na chymotripsínu (CI2) simuláciou s využitím molekulovej dynamiky. V experimente bola používaná simulácia CI2 v prítomnosti 8 M močoviny a čistej vody pri 60°C. Výsledky boli porovnané s chovaním enzýmu pri vysokej teplote (125°C) vo vode z predošlého výskumu. Na základe výsledkov nastala denaturácia katalyzovaná močovinou kombináciou priamych a nepriamych mechanizmov. Po prvé bola narušená štruktúra vody, čo spôsobilo, že oslabené interakcie a hydrofóbne molekuly boli ľahšie solvatované močovinou. Chovanie činidla pri solvácií hydrofóbnych priestraných reťazcov potvrdzuje model nepriameho mechanizmu. Porušenie štruktúry vody porušilo súdržnosť a voda sa po uvoľnení chovala ako primárny denaturant, čo zabezpečuje prechod medzi priamym a nepriamym mechanizmom. Močovina vytvorila vodíkové väzby s peptidovým reťazcom po porušení sekundárnej štruktúry. [44]

Guanidínium chlorid (GdmCl) je druhým dobre známym chaotropickým činidlom. Guanidínium obsahuje delokalizovaný pozitívny náboj a interaguje s hlavným reťazcom a polárnymi vedľajšími reťazcami. Táto iónová povaha je zodpovedná za maskovanie elektrostatických interakcií a za denaturáciu. Jha a kol. sa zaoberali dvojstupňovým mechanizmom denaturácie, ktorá bola spôsobená guanidínium chloridom. Sledovaným proteínom bola ribonukleáza HI (RNase H) od baktérie *Escherichia coli* pomocou metódy FRET. Autori potvrdili teóriu dvojstupňového priameho mechanizmu. V prvom kroku denaturant nahradí molekuly vody v solvatačnom obale. Tento jav umožňuje priamu interakciu činidla s proteínom za vzniku medziproduktu. Tento stav je označovaný ako „dry globule“. Prvý stupeň premeny RNase H je ovplyvnený koncentráciou guanidínia. Testy z CD naznačujú, že „dry molten globular“ (DMG) nemá solvatované jadro a jeho sekundárna štruktúra je veľmi podobná natívnemu stavu. Prerušenie štruktúry a solvacie hydrofóbneho jadra nastáva počas druhého pomalšieho kroku. Z merania vyplýva, že metóda FRET je nepoužiteľná na rozlišovanie stavu natívneho a DMG stavu. [45]

V práci [46] sa autori zaoberajú opisom mechanizmu denaturácie medzi malými rozpustnými látkami vo vodnom roztoku močoviny a guanidínium chloridu pomocou simulácie s využitím molekulovej dynamiky. Dôraz je kladený na hydrofóbne a iónové interakcie. Na simuláciu bol ako modelová molekula použitý metán a helix z myšieho proteínu PrP^C. Analýza ukazuje, že obidve denaturačné činidla v priebehu denaturácie vytvárajú vodíkové väzby s nabitými bočnými reťazcami a karbonylovou skupinou kostry. Rozvíjanie modelového helixu preukazuje na priamu interakciu denaturantu s polypeptidovým reťazcom, a to buď prostredníctvom vodíkovej väzby alebo iónovými interakciami. Všeobecne platí, že koncentrácia GdmCl potrebná k dosiahnutiu stredného bodu rozvinutého prechodu je menšia ako koncentrácia močoviny.

Autori článku [47] diskutujú o vplyve sekundárnej štruktúry bielkovín na denaturáciu. Denaturácia vybraných proteínov (BSA, HSA, lyzozým, trypsín a ribonukleáza A) bola sledovaná pomocou autofluorescencie. GdmCl prednostne narušuje štruktúrnu jednotku

α -helixu, a kvôli tomu je efektívnejší denaturant pre proteíny bohaté na α -skrutkovicu. Močovina je efektívnejšia pri rozvíjaní proteínu s veľkým obsahom beta-skladaného listu. Okrem toho boli sledované konformačné zmeny v indolovom kruhu tryptofánu a rigidite, ktoré silne ovplyvňujú emisnú vlnovú dĺžku proteínov. Konformačné zmeny a rigidita závisia na type a množstve sekundárnej štruktúry. Vzhľadom na to, že močovina a GdmCl majú selektívnu preferenciu pri rozrušení skrutkovice a skladaného listu umožňujú príležitosť identifikovať typ sekundárnej štruktúry pomocou sledovania autofluorescencie pri rôznych koncentráciách činidiel.

2.1.2. Dodecylsírán sodný

Zo skupiny iónových detergentov rutinne používaným denaturačným činidlom je známy dodecylsírán sodný (SDS). V laboratóriách sa používa na určenie molekulovej hmotnosti bielkovín alebo ako micelová membrána. Mechanizmus SDS indukovanej denaturácie v posledných rokoch výrazne pokročil, avšak niektoré základné problémy sú stále nevyriešené. Bhuyan sa zaoberal s dopĺňaním týchto nedostatkov. Na sledovanie mechanizmu denaturácie s SDS používal cytochróm c pri 22°C v neutrálnom pH a v extrémne alkalických podmienkach. Vzorky cytochrómu c boli zmerané metódou CD, fluoresenčnou a UV-Vis spektroskopiou v 0-100 mM koncentračnom rozmedzí SDS. Prechod z natívneho stavu do denaturovaného podľa práce je dvojstupňová. Prvý stupeň je strata takmer úplnej terciárnej a čiastočne sekundárnej štruktúry. Druhý stupeň je denaturovaný stav so zachovaním sekundárnych štruktúrnych jednotiek. Tieto dve prechody vychádzajú z dvoch odlišných dôsledkov interakcie SDS s proteínom. Za podmienky kritickej micelárnej koncentrácie (CMC) 1,5 mM strata terciárnej štruktúry je vyvolaná väzbou monoméru SDS. Rozklad vyššej štruktúrnej jednotky je vyvolaný hydrofóbnou interakciou. Pri vyšších koncentráciách ako CMC dôjde k úplnému rozloženiu reťazca. Dodecylové reťazce monomérov navzájom agregujú a na denaturovanom proteíne vytvárajú micelárne zhluky. Tento proces je podstatou náhrdelníkového modelu. [48]

Fano a spol. skúmali rezistenciu lipázy od *Thermomyces lanuginosus* na denaturáciu pôsobením SDS. Meranie bolo prevadené metódami: fluoresenčná spektroskopia, CD a VP-ITC. Z experimentu vyplýva, že pri neutrálnom pH a nízkej iónovej sile SDS vyvoláva konformačnú zmenu v lipáze. Táto štúdia tiež potvrdzuje vplyv SDS na stratu terciárnej štruktúry a zachovanie veľkého množstva sekundárnej štruktúry. Zmena iónovej sily silne pôsobí na SDS aj na lipázu. Zmena iónovej sily bola spôsobená pridaním chloridu sodného. Po zvýšení koncentrácie soli nebol SDS schopný úplne denaturovať lipázu. V prípadoch, keď monoméry zohrávajú rozhodujúcu úlohu v denaturačnom procese sa používa zvýšenie iónovej sily na stabilizáciu proteínu. [49]

Chaitanya a kol. analyzovali stabilitu lipázy z pankreasu prasiat (PPL) proti tepelnej a chemickej denaturácie využitím rôznych spektroskopických techník. PPL je relatívne veľký proteín s obsahom dvoch domén. Ukázalo sa, že denaturácia proti močoviny a guanidíniom chloridu je dvojstupňová ako u bežných menších globulárnych bielkovinách. Fluoresenčné spektrá naznačujú, že PPL je rozložená pri vyšších koncentráciách GdmCl, avšak spektrálne zmeny sú pozorované aj pod 0,5 M GdmCl. Pri nižších koncentráciách nedochádza ku globálnemu rozvinutiu, ale môže nastať premiestnenie rozpúšťadiel a miestnych konformačných zmien okolo tryptofánových zvyškov. Táto konformačná zmena ovplyvňuje

enzýmovú aktivitu. Enzým je kompletne neaktívny nad koncentráciou 0,5 M GdmCl. Spôsobením močoviny sa denaturácia začína pri koncentrácii 1 M a nad 6 M je lipáza úplne rozložená a stratila sekundárnu a terciárnu štruktúru. V porovnaní s GdmCl má močovina menší efekt na aktivitu a inhibuje enzým nad koncentráciou 3 M. Tento rozdiel je spôsobený odlišnou interakciou s proteínom. Zatiaľ čo močovina indukuje denaturáciu prostredníctvom interakcií vodíkových väzieb, guanidínium interaguje s bočnými reťazcami a rozbíja soľné mostíky. Denaturácia indukovaná s SDS prebieha v dvoch krokoch: účinky SDS pod a nad koncentráciou CMC. Pridanie SDS pod koncentráciou 0,2 mM nevykazuje merateľné konformačné zmeny PPL, ale interaguje s povrchom a zníži aktivitu enzýmu. Zvýšenie koncentrácie SDS do rozmedzia 0,2-2 mM vedie k strate sekundárnej a terciárnej štruktúry, ktorá je spôsobená iónovými a hydrofóbnymi interakciami medzi denaturantom a enzýmom. Nad hodnotou CMC (5 mM) SDS vytvárajú micely okolo hydrofóbných zvyškov proteínu. Lipáza bola denaturovaná aj pôsobením tepla. PPL je citlivý voči teplote. Zvýšenie teploty na 45°C viedlo k nevratnej štruktúrnej zmeny, avšak nevykazuje úplnú štruktúrnu stratu ani pri najvyššej teplote (80 °C). Termická analýza bola sledovaná aj za prítomnosti SDS nad koncentráciou CMC. Enzým s prítomnosťou micel bol stabilný voči teplote do 80 °C. [50]

2.2. Rozptylové techniky pri štruktúrnej charakterizácii prírodných materiálov

Z rozptylových techník je najvyužívanejší statický, dynamický a elektroforetický rozptyl svetla. Statický rozptyl svetla sa stal jednou z najpoužívanejších metód na stanovenie molekulárnej hmotnosti a v niektorých prípadoch aj veľkosti molekúl v roztoku. Podobne vývoj teórie o fluktuácii intenzity rozptylu svetla a dostupnosť prístrojov na meranie tejto fluktuácie vyvolalo rozšírenie metódy dynamického rozptylu svetla.

Carvalho a spol. skúmali termostabilitu hemoglobínu za prítomnosti povrchovo aktívnej látky, CTAC pri rôznej hodnote pH. Tepelná stabilita bola sledovaná pomocou DLS a SAXS. Teplota topenia HbGp v neprítomnosti a v prítomnosti CTAC bola analyzovaná na základe hydrodynamického polomeru, kritickej denaturačnej teploty a počtu častíc. Pri neutrálnom pH za neprítomnosti povrchovo aktívnej látky zostával hemoglobín do 51 °C stabilný. Pri vyššej teplote došlo k denaturácii a agregácii. Po pridaní CTAC sa denaturačná teplota znížila na 45 °C. Z grafu intenzity vyplýva, že hemoglobín podlieha čiastočnej disociácii pred denaturáciou a agregáciou. Za prítomnosti CTAC prebieha disociácia a denaturácia rovnako len pri nižších teplotách. V kyslom prostredí (pH 5) je hemoglobín stabilnejší, čo spôsobuje nárast denaturačnej teploty v oboch prípadoch. V kyslom prostredí pri vyššej koncentrácii proteínu (3 mg/ml) nebolo možné stanoviť veľkosť častíc, lebo pH bolo blízko k izoelektrickému bodu, ktorý inhibuje oligomérnu disociáciu a dochádza k agregácii. Zo štúdia vyplýva, že čiastočná oligomérna disociácia proteínu je dôležitým krokom pri tepelnej denaturácii nezávisle na hodnote pH a koncentrácii. [51]

Dev a spol. študovali chaotropickými látkami indukovanú denaturáciu arašidového aglutinínu (PNA) pomocou zmeny hydrodynamického polomeru. PNA sa počas denaturácie najprv mení na medziprodukt, na takzvaný „molten globule“. Ako chaotropické činidlo bola používaná močovina vo fosfátovom pufru. Pôsobením močoviny na PNA dochádza k deoligomerizácii tertraméru na monomerný stav, „molten globule“ a následne k úplnej

denaturácie. Zvýšením koncentrácie močoviny rastie hydrodynamický polomer, ktorý naznačuje stratu konformačnej štruktúry. Pri koncentrácii denaturantu viac ako 4,3 M bola zmena polomeru skoro konštantná a pomaly klesala. Po dosiahnutí tejto koncentrácie prevládala denaturovaná forma nad prechodným stavom. Natívny PNA sa vždy nachádza v malom množstve vo forme agregátu, avšak počas celej denaturácie sa jeho hodnota nezvyšuje. Pri 7 M močoviny bola sledovaná redenaturácia proteínu, ktorá však neprebíhala úspešne kvôli agregácii. [52]

Huang a kol. popisujú imunostanovenie metódou dynamického rozptylu svetla na báze zlatých nanočastíc (GNP) pre ultrasenzitívnu detekciu baktérií. *Listeria monocytogenes* je grampozitívna baktéria, ktorá je známa ako kontaminant potravín a patogén pre ľudí a zvieratá. Zlaté nanočastice sa rutinne používajú ako sondy pre zosilnenie signálu pre výrobu biosenzorov na báze DLS. Schopnosť GNP rozptyľovať svetlo je väčšia ako u mnohých biologických vzoriek. Sledované baktérie sú dostatočne veľké a obsahujú dostatočné množstvo antigénnych epitopov. Kvôli týmto vlastnostiam sú vhodné na väzbu so sondou GNP pokrytou monoklonálnou protilátkou (mAbs). Výsledky naznačujú, že selektívna interakcia antigén-protilátka spôsobujú lineárne zvýšenie hydrodynamického polomeru. To potvrdzuje vhodnosť mAbs-GNPs ako zosilňovača rozptylu na citlivé detekcie. Na skúmania vplyvu veľkosti GNP používali tri roztoky. Väčšie GNP vykazovali silnejší rozptyl ako menšie. Avšak nadmerná veľkosť sondy brzdí účinnosť väzby medzi mAbs a baktériami kvôli sterickým prekážkam. Ich teória bola prakticky vyskúšaná na detekciu týchto patogénnych baktérií na šaláte. Z testoch je zrejmé, že navrhovaná metóda je vhodná na rýchle a citlivé zistenie bežných patogénnych baktérií a vďaka väzbe antigén-protilátka je veľmi selektívna. [53]

Autori článku [54] sa zaoberali charakterizáciou zosieťovaného cyklodextrínového polyméru (CD). Pomocou metódy statického rozptylu svetla boli stanovené nabité, nenabité a fluorescenčne značené vzorky tohto polyméru. Presnosť techniky bola zaistená komplementárnym štúdiom agregácie pomocou dynamického rozptylu svetla. CD monoméry sú náchylné na sebaagregáciu. Autori predpokladali, že aj u sledovaných polyméroch by mohlo dôjsť k agregácii, ktorá by silno ovplyvnila výsledky molekulovej hmotnosti. Prítomnosť agregátov bola zistená metódou DLS. Na základe štúdia týchto agregátov bolo potrebné prefiltrovať testované vzorky. Z výsledkov sa ukázalo, že agregácia, interakcia segment-segmentu a spektrálne vlastnosti v prípade fluorescenčnej vzorky silne ovplyvňujú získané údaje metódou SLS. Okrem toho je k získaniu presných údajov o sledovanej látke potrebná membránová filtrácia a výber vhodného rozpúšťadla. Práca naznačuje, že metóda SLS, ktorá je všeobecne uznaná ako absolútna, vyžaduje kontrolu pre získanie platných výsledkov.

Wisunthorn a kol. skúmali dynamické štruktúrovanie mezoštruktúry prírodného kaučuku. Na sledovanie distribúcie molekulárnej hmotnosti metódou SEC-MALS boli vybrané dve genotypové modely kaučukovníku. Zmeny v molekulárnej hmotnosti prirodzeného kaučuku boli sledované pri pomalom (skladovanie pri izbovej teplote po dobu 18. mesiacov) a rýchlom (skladovanie 24 hodín v P_2O_5 pri 60°C) štruktúrovaní. Rýchle štruktúrovanie vzoriek pri obidvoch genotypov spôsobilo podstatné zmeny v mezoštruktúre. Dramaticky sa zvýšila číselná molárna hmotnosť, M_n a celkové množstvo gélu. Zvýšenie M_n je spôsobené iným

správaním u oboch genotypov. V prípade genotypu PRIM600 je zvýšenie vyvolané znížením počtu krátkych polyizoprénových reťazcov. U genotypu PB235 je nárast vyvolaný zvýšením množstva a veľkosti mikroagregátov. Z kvalitatívneho hľadiska vzorky PB235 obsahovali 52% gélu po 7 dňoch solubilizácie v THF, avšak gél nebol viditeľný. U genotypu PRIM600 bol vzniknutý gél viditeľný. To znamená, že v prvom prípade rýchle štruktúrovanie indukovalo tvorbu mikroagregátov a v druhom prípade tvorbu makroagregátov, čiže makrogélu. Pomalé štruktúrovanie tiež viedlo k zvýšeniu M_n a množstvu gélu, ale tento nárast je menší v porovnaní s rýchlym štruktúrovaním. Autori s tým potvrdili, že sa prírodný kaučuk za izbových podmienok vyvíja pomalšie. [55]

3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1. Použité chemikálie

Lipáza z *Rhizopus oryzae*, Sigma-Aldrich (NSR)
Lysozým z kuracieho vajca, Sigma-Aldrich (NSR)
Dodecylsírán sodný, Sigma-Aldrich (NSR)
Guanidínium hydrochlorid, Sigma-Aldrich (NSR)
Močovina čistoty p.a., PENTA s.r.o. (ČR)
Síran meďnatý pentahydrát, PENTA s.r.o. (ČR)
Hydrogénfosforečnan sodný dihydrát, PENTA s.r.o. (ČR)
Dihydrogénfosforečnan sodný dihydrát, PENTA s.r.o. (ČR)

3.2. Príprava vzoriek

3.2.1. Zásobný roztok fosfátového pufru

Pre prípravu 50 mM fosfátového pufru o pH 7,4 na predvážkach bolo navážené 1,761 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 6,89 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Navážené látky boli nasledovne kvantitatívne prevedené do sklenenej odmernej banky a obsah navážky bol doplnený do 1 l destilovanou vodou. Zmes bola rozpustená a bola skontrolovaná pH pripraveného roztoku.

3.2.2. Príprava zásobných roztokov denaturačných činidiel

Roztoky denaturačných činidiel a ich prípravu popisuje tabuľka 2. Tieto roztoky slúžili ako zásobné roztoky pre prípravu koncentračnej rady týchto činidiel na sledovanie denaturácie u lipázy a v prípade močoviny aj u lysozýmu.

Tabuľka 2: Príprava zásobných roztokoch:

Roztok:	Koncentrácia:	Príprava:
Močovina	8 M	Navážka 12,012 g močoviny bola kvantitatívne prevedená do odmernej banky, ktorá bola nasledovne doplnená do 25 ml fosfátovým pufrom o pH 7,4.
Guanidínium hydrochlorid	8 M	Navážka 19,106 g guanidínia bola kvantitatívne prevedená do 25 ml odmernej banky a doplnená fosfátovým pufrom o pH 7,4.
Dodecylsírán sodný	100 mM	Navážený 0,4326 g SDS bol kvantitatívne prevedený do odmernej banky a doplnený do 15 ml fosfátovým pufrom o pH 7,4.
Síran meďnatý	1 M	Roztok 1 M medi bol pripravený podobným spôsobom ako predchádzajúce roztoky. Meď je citlivá na pH a vyzrážala vo fosfátovom pufre. Pri príprave ako rozpúšťadlo bola použitá destilovaná voda, aby sa zabránilo precipitácii nerozpustných foriem Cu z roztoku.

3.2.3. Príprava vzoriek lipázy

Vzorky lipázy boli pripravené rozpúšťaním práškového enzýmu v odpovedajúcom množstve potenciálneho denaturačného činidla. Lipáza bola na analytickej váhe navážaná v množstve 9 mg do vialiek a potom rozpustená v 3 ml zmesi fosfátového pufru a denaturačného činidla v rôznych koncentráciách. Ako rozpúšťadlo bol vybraný fosfátový pufr z dôvodu splnenia pH optima pre sledovaný proteín. V prípade medi namiesto pufru bola použitá destilovaná voda. Použité denaturačné činidlá a ich koncentrácie sú zahrnuté v tabuľke 3. Okrem denaturantov bol sledovaný aj vplyv iónovej sily. Tieto vzorky lipázy boli rozpustené v 3 ml zriedených roztokoch fosfátového pufru s destilovanou vodou v pomere 1:1, 1:10, 1:100 a 1:1000. Vzorky boli po príprave stanovené metódou DLS.

Tabuľka 3: Použité koncentračné rady denaturantov:

Činidlo:	Koncentrácie (M):
Močovina:	0; 0,5; 1; 2; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 6; 7; 8
Guanidínium hydrochlorid:	0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8
SDS	0; $0,01 \cdot 10^{-3}$; $0,1 \cdot 10^{-3}$; $1 \cdot 10^{-3}$; 0,01; 0,1
Meď:	0; 0,05; 0,075; 0,1; 0,15; 0,2; 0,5; 1

3.2.4. Príprava vzoriek lyzozýmu

Na prípravu vzorky lyzozýmu bolo použité 9 mg tohto enzýmu, ktorý bol navážaný na analytickej váhe do vialky. Navážka bola rozpustená v 3 ml zmesi fosfátového pufru a močoviny. Bola pripravená koncentračná rada o koncentrácie 0, 2, 4, 6, a 8 M, ktorá bola nasledovane meraná metódou DLS.

3.3. Štúdium denaturácie metódou DLS

Meranie dynamického rozptylu svetla prebiehalo na prístroji Zetasizer Nano ZS. Tento prístroj má schopnosť merať tri charakteristické veličiny: molekulovú hmotnosť, difúzny koeficient a Zeta potenciál. Pre charakterizáciu denaturácie našich vzoriek bol použitý typ merania na zistenie veľkosti častíc.

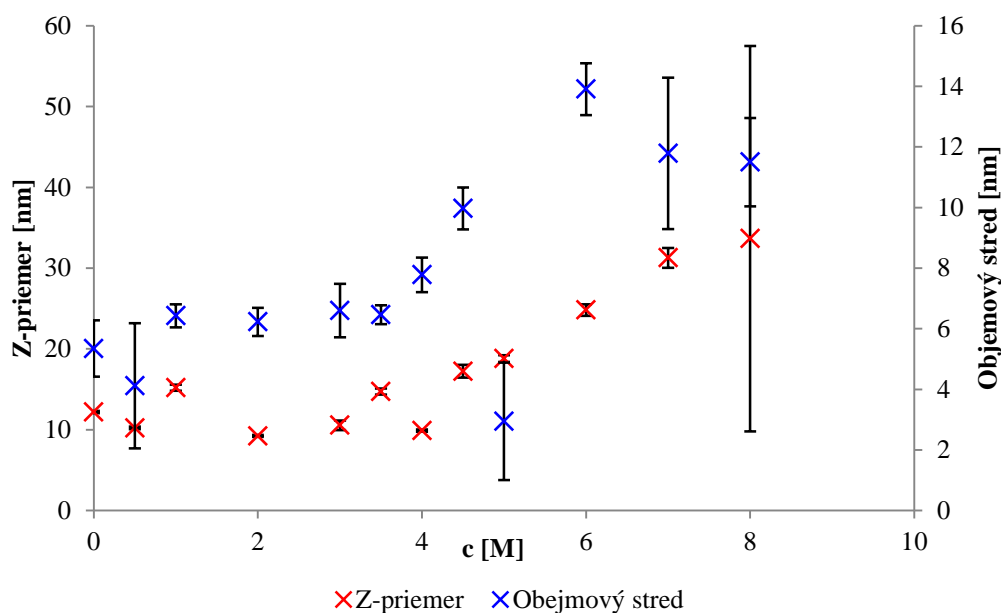
Po príprave a pred meraním boli všetky vzorky opatrne odplynené pomocou ručne vytvoreného vákua vo sklenenom striekačke. Nasledovne boli vzorky filtrované cez striekačkový filter (VWR Nylon 0,45 μm) do sklenených kyviet. Pre stanovenie priebehu denaturácie lipázy a lyzozýmu bol použitý helium-neonový laser s optikou 173°, čiže spätný rozptyl. Pred samostatným meraním vzorky boli prístrojom temperované 120 sekúnd na 25 °C. Za týchto podmienok boli premerané všetky koncentračné rady denaturačných činidiel a vplyv iónovej sily. Zetasizer softwer po zhromažďovaní dát analyzátorom vyhodnotil distribúciu intenzity a objemu. Z týchto distribúcií boli ďalej odvodené charakteristické rozmery – objemový stred, intenzitný stred, početný stred a Z-priemer. Tieto hodnoty sú ďalej vyhodnotené a diskutované.

4. VÝSLEDKY A DISKUZIA

Dynamický rozptyl svetla bol používaný na sledovanie stability lipázy a lyzozýmu pri denaturácii spôsobenou chemickými činidlami a nízkou iónovou silou. V priebehu denaturácie dochádza k rozvinutiu terciárnej a čiastočne sekundárnej štruktúry proteínov, čiže k zväčšeniu celkovej veľkosti danej molekuly. V prechádzajúcich štúdiách bolo zistené viz. kapitola 2, že denaturácia, rozvinutie polypeptidových reťazcov spôsobuje posun v rozložení veľkosti častíc k vyšším hodnotám. Pomocou metódy DLS môžeme sledovať niekoľko parametrov. Pri našom meraní jeden zo sledovaných parametrov je Z-priemer. Je primárnym a najstabilnejším parametrom, ale je veľmi citlivý aj na malé zmeny. Za predpokladu, že sledované častice sú sférické, teda enzýmy sú globulárne, na opis chovania lipázy a lyzozýmu v rôznych koncentráciách denaturantov bol zvolený objemový stred (*volume mean*). Naše vzorky neboli monomodálne, to znamená, že graf intenzitnej distribúcie neobsahoval iba jeden pík, a preto bola distribúcia rozdelená na dva intervaly. Jeden interval bol 4-50 nm a druhý 50-1000 nm. Týmto obmedzením vyhodnoteného rozsahu veľkostí sme odstránili rušivé faktory, ktoré budú podrobnejšie opísané pri určitých meraniach. [56]

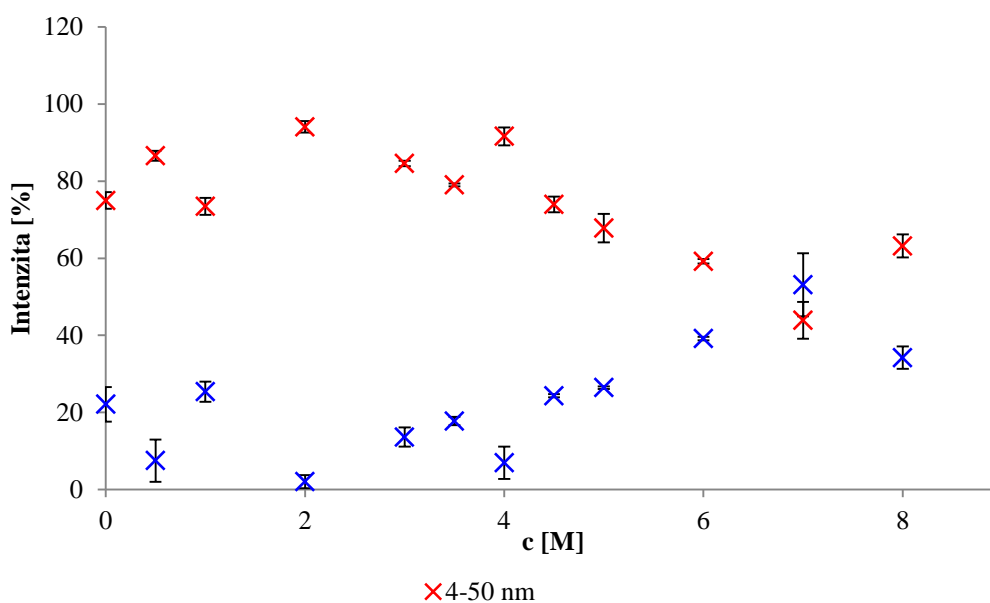
4.1. Denaturačné účinky močoviny

Prvé činidlo, ktoré bolo vybrané ako denaturant pre svoje silné účinky a preskúmanosti je močovina. Výsledky premeranej koncentračnej rady sú znázornené na obr. 5. Z kriviek pre obidva parametre je zrejмый posun veľkosti častíc so zvyšujúcou koncentráciou močoviny. Koncentračná rada bola rozšírená koncentraciami 3,5 M a 4,5 M pre lepšie rozoznávanie hranice, pri ktorej sa viac uprednostňuje denaturovaný stav. Z grafu je viditeľné mierne zvýšenie veľkosti častíc do koncentrácie 3,5 M. Rapídny nárast je sledovaný od koncentrácie 4 M močoviny. Rozdiel medzi Z-priemerom lipázy pri prítomnosti 8 M močoviny a bez prítomnosti činidla je približne 20 nm. Táto odlišnosť nám naznačuje stratu vyšších štruktúr a môžeme predpokladať denaturáciu enzýmu.



Obr. 5: Závislosť Z-priemeru a objemového stred na koncentrácii močoviny

Vzorky lipázy sa nechovali monomodálne, so zvyšujúcou koncentráciou sa zvyšovala prítomnosť druhého píku v intenzitnej distribúcii. Kvôli tomuto nerovnomernému rozloženiu veľkosti častíc sa musia brať do úvahy odchýlky Z-priemeru od reálnej veľkosti. Závislosť objemového stredy na koncentrácii nám udáva veľkosť častíc podľa priestorového objemu rôznych častíc vo vzorke. Z tejto krivky je viditeľná prítomnosť veľmi malých nežiadajúcich častíc vo vzorke s koncentráciou 5 M, ktoré sú Z-priemerom nerozoznateľné. Malá hodnota objemového stredy je spôsobená prítomnosťou častíc o veľkosti <1 nm, ktoré sú na dolnej hranici detekcie prístroja. Ich prítomnosť je pravdepodobne artefakt. Intenzitná distribúcia veľkosti častíc pre 5 M je zobrazené v prílohe 1. V grafe červený vrchol pod 1 nm spôsobuje odchýlenie tejto vzorky.



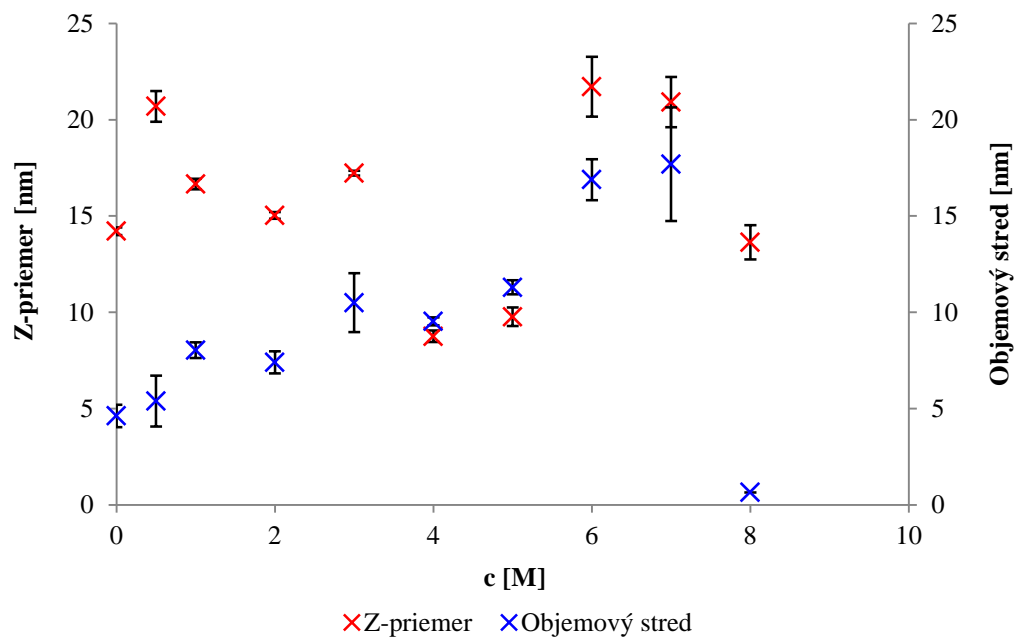
Obr. 6: Závislosť intenzity na koncentrácii močoviny

Intenzitná distribúcia bola rozdelená na dve rozmedzie veľkosti častíc kvôli zastúpeniu dvoch píkov. Ako dolný limit bola vybraná veľkosť 4 nm. Do tejto veľkosti je intenzita rozptýleného svetla nulová, ktorá naznačuje absenciu proteínov. Bod 1000 nm bol vybraný z dôvodu horného detekčného limitu prístroja. Vybrané rozmedzie je platné pre všetky ďalšie merania. Krivky z obr. 6 sú navzájom zrkadlovými obrazmi a je vidieť, že so zvyšujúcou sa koncentráciou klesá prítomnosť častíc z rozmedzia 4-50 nm a narastá intenzita väčších denaturovaných proteínov. Priebeh sledovanej denaturácie v grafe je podobný k obr. 5, kde je do koncentrácie 4 M intenzita takmer lineárna.

4.2. Denaturačné účinky guanidínium hydrochloridu

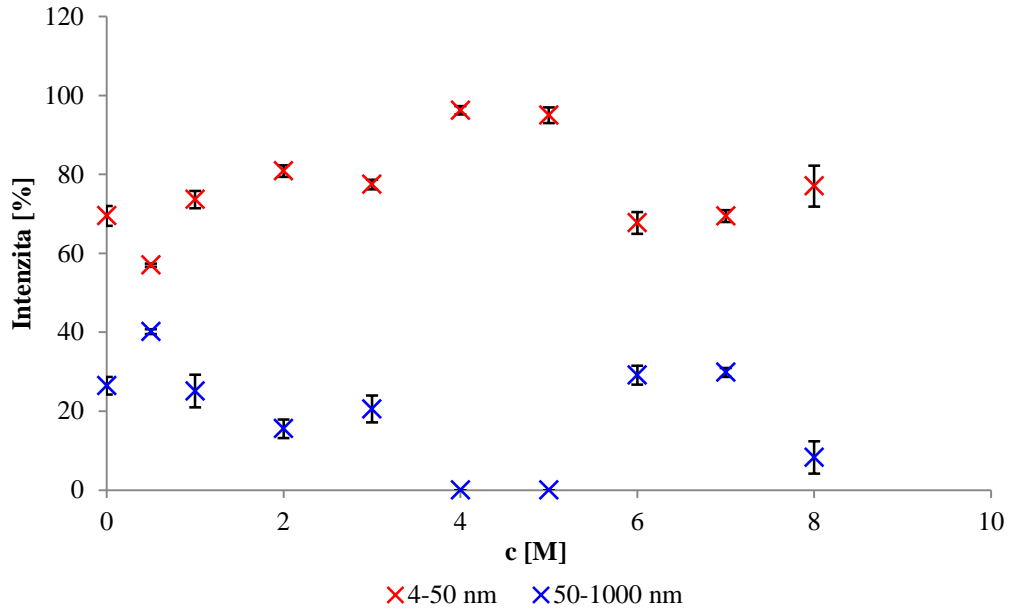
Druhým bežným denaturačným činidlom je guanidínium hydrochlorid. Guanidínium vplyvom svojej odlišnej štruktúry ako denurant interaguje s iným typom priestraných reťazcov aminokyselín v lipáze ako močovina. Vplyv guanidínia na lipázu zo Z-priemeru je ťažko definovateľný (viz. obr. 7) Oproti tomu, objemový stred naznačuje predpokladané denaturačné účinky sledovanej látky. Nárast veľkosti bielkoviny je pozorovateľný od koncentrácie 0,5 M a od 3 M guanidínia prevláda denaturačný stav nad natívnym stavom, ktorý sa prejavuje

výraznejším rozdielom medzi veľkosťami. Na denaturáciu stačila menšia koncentrácia v porovnaní k močovine, a to znamená, že guanidínium má silnejšie účinky. Pri koncentráciách 4 M, 5 M a hlavne u 8 M je sledovaný jasný odklon od ďalších údajov. Je to vyvolané prítomnosťou píkov pod 1 nm a nad 1000 nm. Pre vzorku 8 M je znázornená intenzitná distribúcia v prílohe 2. Tento bod je zaťažený chybou, jednak sú tam veľmi malé častice, ktoré sú brané ako artefakty. Ďalej sa očakáva, že pri tejto koncentrácii došlo k agregácii proteínov, ktoré už boli príliš veľké na Brownov pohyb, preto došlo k usadzovaniu. K tomu aby hodnoty Z-priemeru a objemového stredu neboli ovplyvnené nežiadajúcimi javmi, by mali byť softwarom odfiltrované. Program Zetasizer ich nevie odstrániť a kvôli tomu bola distribúcia intenzity ohraničená dolnou a hornou limitou.



Obr. 7: Závislosť Z-priemeru a objemového stredu na koncentraciu guanidínium hydrochloridu

Táto distribúcia bola rozdelená do dvoch rozmedzí, z ktorých je vidieť, že koncentrácia nemala výrazný vplyv na intenzitu. Ďalej z obr. 8 je zrejmé, že veľkosť častíc sa počas celého merania pohybovala okolo veľkosti 4-50 nm.



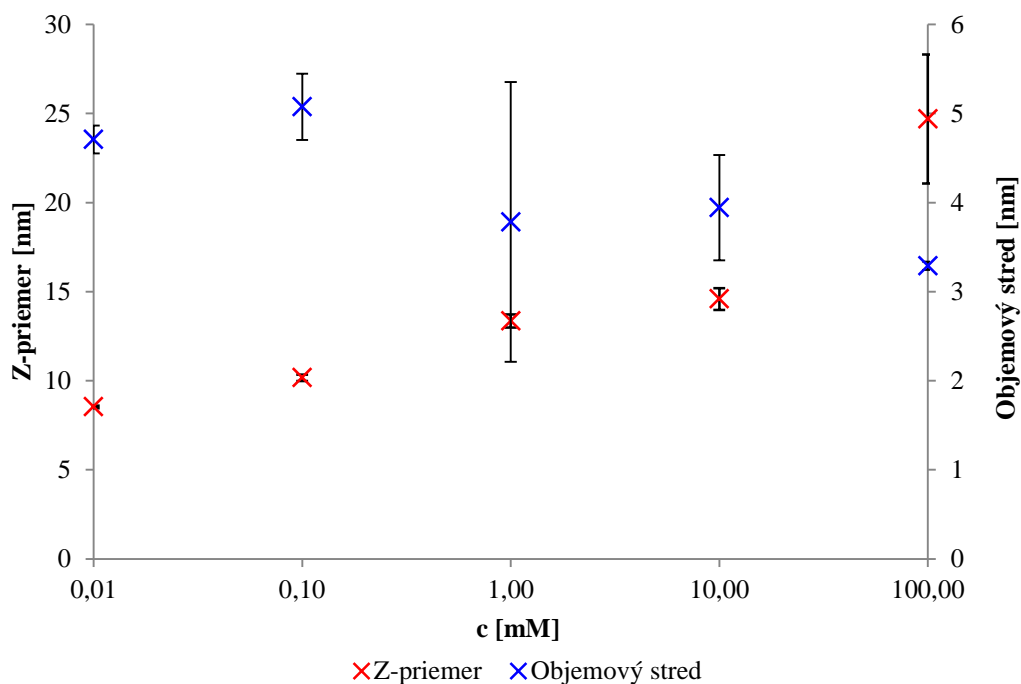
Obr. 8: Závislosť intenzity na koncentraciu guanidínium hydrochloridu

4.3. Denaturačné účinky dodecylsírany sodného

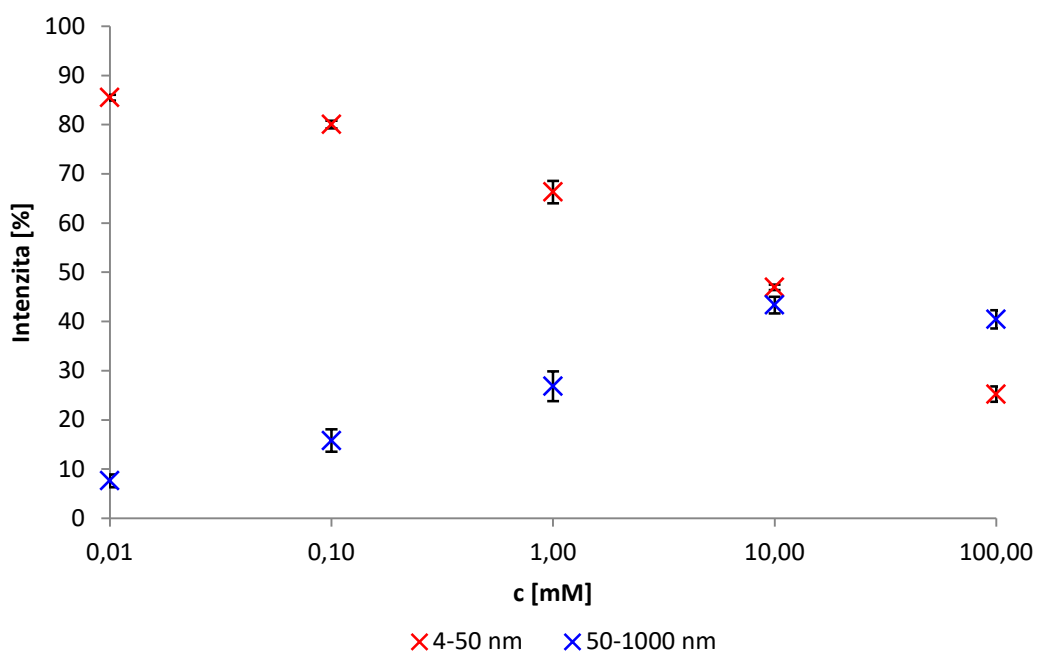
Tretí denaturant SDS je veľmi používaným denaturačným činidlom v metóde elektroforézy SDS-PAGE. Pri grafickom znázornení merania boli vynechané hodnoty vzorky pri 0 M koncentrácii, čiže vzorky, ktoré boli rozpustené v čistom fosfátovom pufré o pH 7,4. Pretože boli používané malé koncentrácie činidla, bola osa x preložená logaritmickou mierkou. Z-priemer sa zvyšoval podľa očakávania so zvyšujúcou koncentraciou. Rozvinutie polypeptidového reťazca lipázy je viditeľné na obr. 9, kde sa veľkosť počas denaturácie zvýšila približne o 15 nm. Podstatný rozdiel je medzi koncentraciou 10 a 100 mM, kde pravdepodobne mohlo dôjsť k denaturácii.

Objemový stred nie je vhodným parametrom na charakterizáciu veľkosti lipázy v SDS. Distribúcia intenzity je rozdelená na dve časti. Pri každom meraní sú prítomné dva píky, ktoré majú viac menej rovnakú intenzitu (príloha 3). Prepočet intenzity na objem je zaťažovaný malými zmenami v proporcionálnom rozložení týchto dvoch pík. Prepočet intenzity na objemový stred je nevhodný v prípade keď máme veľkú škálu veľkosti častíc v roztoku.

Závislosť obr. 10 potvrdzuje priebeh krivky Z-priemeru. Rozloženie veľkosti častíc v roztoku sa s vyšším obsahom SDS posúva k hodnotám 50 až 1000 nm.



Obr. 9: Závislosť Z-priemeru a objemového stredu na koncentráciu SDS

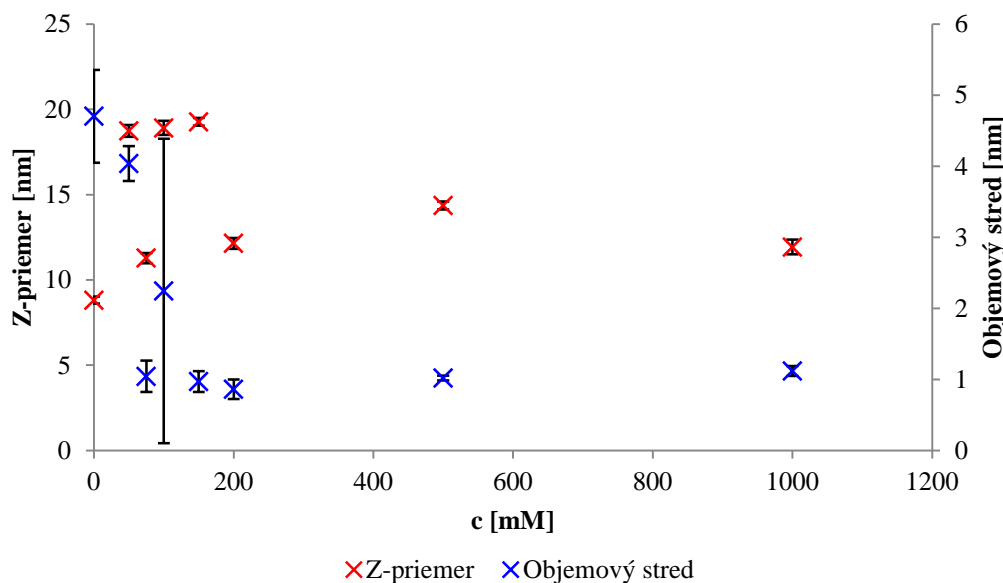


Obr. 10: Závislosť intenzity na koncentráciu SDS

4.4. Denaturačné účinky síranu meďnatého

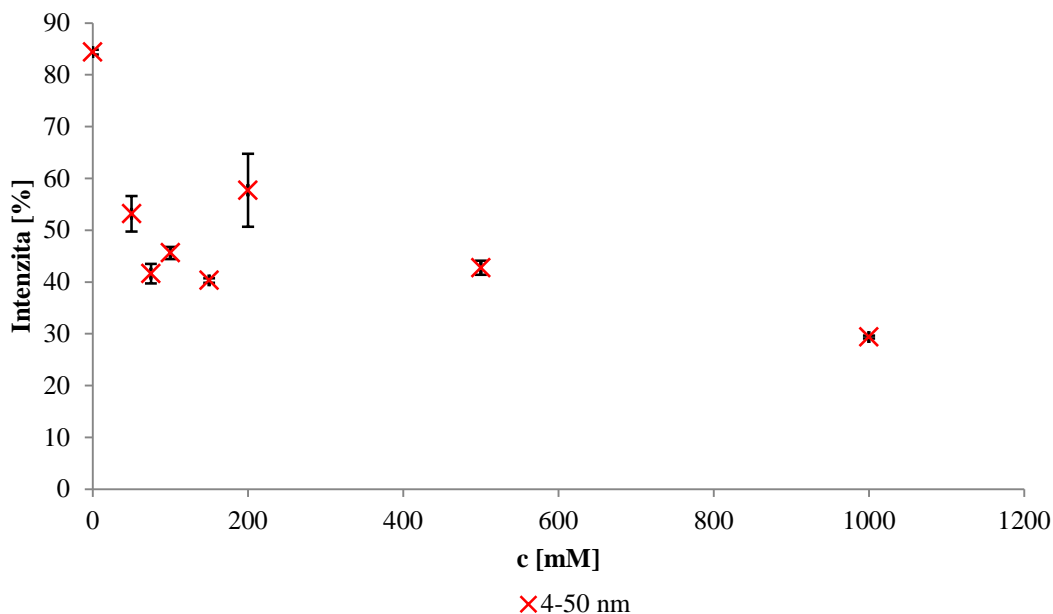
Denaturačné účinky meďnatých katiónov sú menej preskúmané ako ostatné denaturanty. Meď je citlivá na pH a pri príprave koncentračnej rady v zmesi s fosfátovým pufrom o pH 7,4 sa vyzrážala. Tieto vzorky boli na meranie nepoužiteľné. Ako náhradné rozpúšťadlo bola použitá destilovaná voda a tým boli zmenené vlastnosti prostredia.

Z grafu je viditeľné zväčšenie veľkosti lipázy pri nižších koncentráciách medi, ale po ďalšom zvýšení obsahu síranu mednatého v roztokoch sa ich rozmer zmenšil. Tento pokles je možné pozorovať pri oboch parametroch. V prílohe 4 je zobrazená a porovnaná intenzitná distribúcia pre roztoky 50 a 150 mM. So zvyšujúcou sa koncentráciou v grafe rastie prítomnosť malého píku pod 2 nm. Tento vrchol nemôže odpovedať ani natívnemu proteínu ani denaturovanému. Môžeme predpokladať, že sa jedná o malý precipitát nerozpustných solí medi. Kvôli tomu sú priemerné parametre a v tomto prípade aj intenzitná závislosť zaťažené touto chybou.

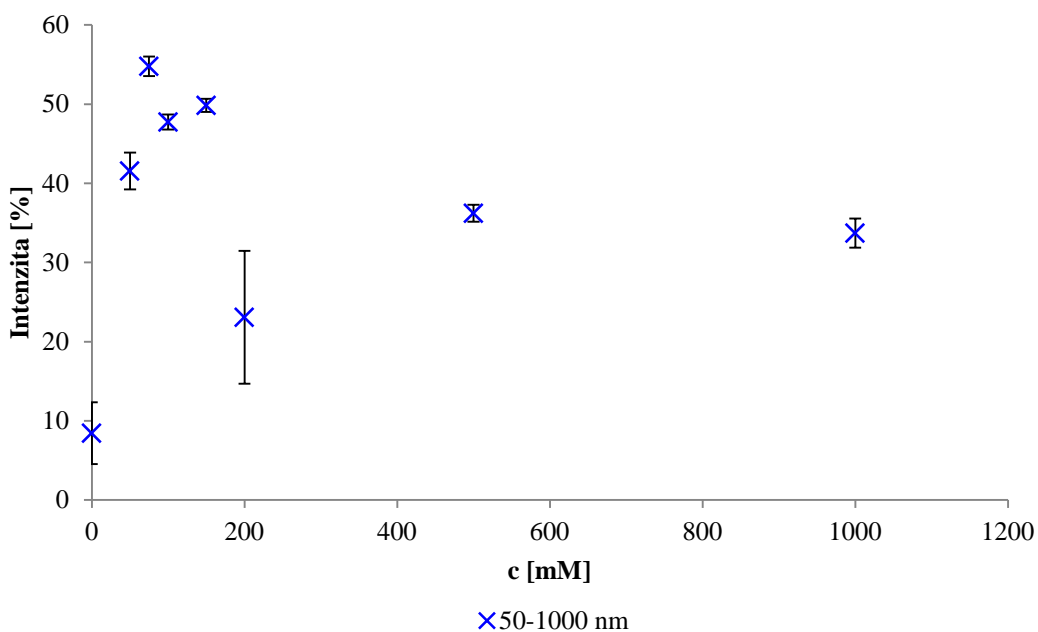


Obr. 11: Závislosť Z-priemeru a objemového stredy na koncentráciu síranu mednatého

Zo závislosti intenzity na koncentráciu v rozmedzí 4-50 nm častíc lipázy je zreteľný menej viditeľný pokles. V rozmedzí veľkosti proteínu 50-1000 nm dochádza k miernemu zvýšeniu intenzity v porovnaní so vzorkou bez denaturačného činidla. Z týchto posunov je viditeľné, že med' vyvoláva konformačné zmeny v štruktúre enzýmu, ktoré viac menej denaturovali sledovanú lipázu. Tiež musíme brať do úvahy, že vzorky lipázy boli rozpustené v zmesi destilovanej vody a medi. Destilovaná voda má odlišné pH a iónovú silu ako fosfátový pufr, a kvôli tomu mohlo mať rozpúšťadlo vplyv na správanie lipázy.



Obr. 12: Závislosť intenzity na koncentráciu síranu meďnatého v rozmedzí veľkosti častíc 4-50 nm

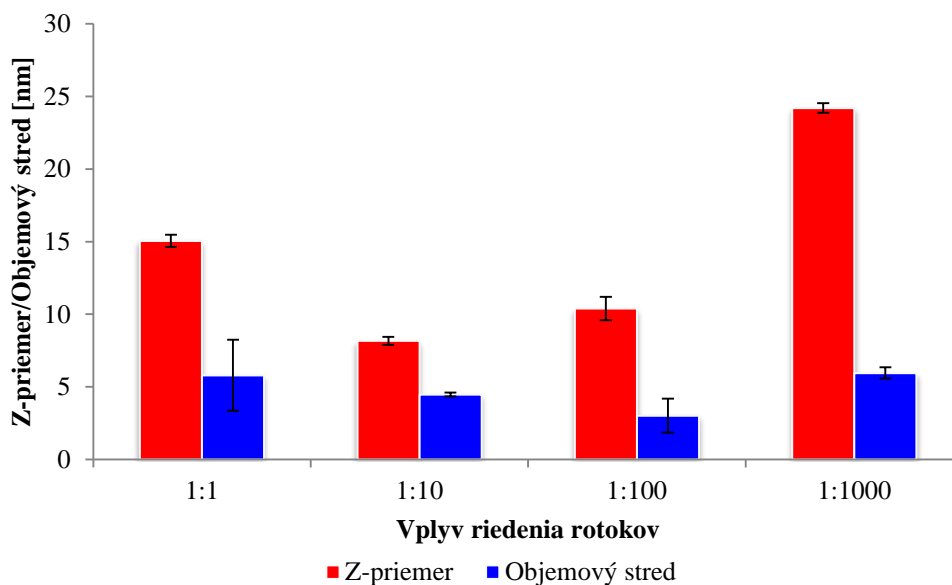


Obr. 13: Závislosť intenzity na koncentráciu meďi v rozmedzí veľkosti častíc 50-1000 nm

4.5. Vplyv iónovej sily na denaturáciu

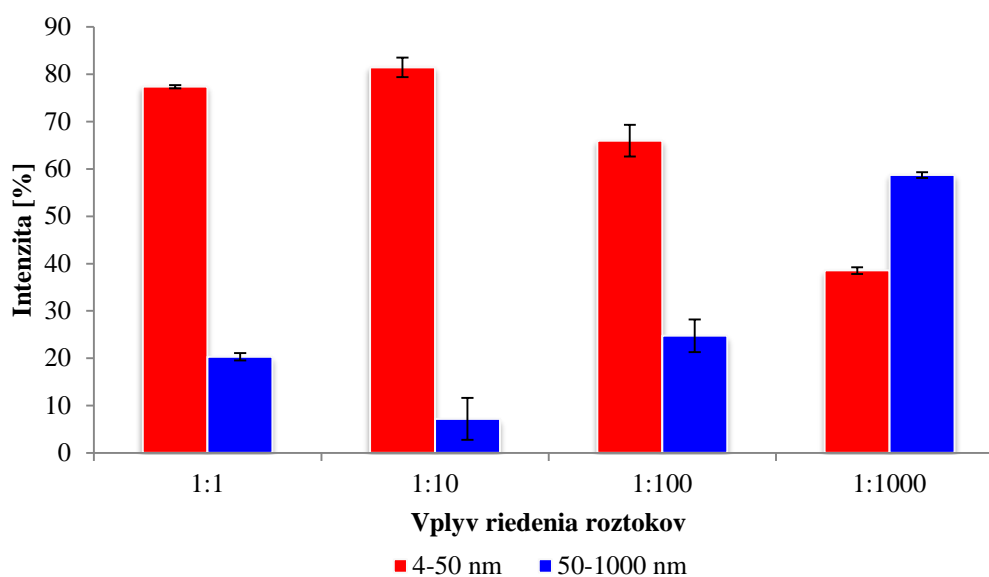
V kapitole 4.4 bolo naznačené, že lipáza sa správa inak v rozpúšťadle destilovanej vode a inak vo fosfátovom pufre o pH 7,4. V rámci experimentálnej časti bol sledovaný vplyv nízkej iónovej sily na natívnu štruktúru enzýmu. Iónova sila roztokov ovplyvňuje aktivný koeficient jednotlivých iónov a tým všetky veličiny, ktoré sú závislé na aktivite ako napr. pH roztoku, zmena Gibbsovej energie atď.

Zo stĺpcového grafu je zreteľný vplyv znižujúcej sa iónovej sily na veľkosť častíc. Posun častíc k vyšším hodnotám je najvýraznejší pri tisíckrát zriedenom zásobnom roztoku. Tento nárast je porovnaný k roztoku bez zriedenia v prílohe 5. V závislosti objemového streda na riedení roztokov je menej nárast viditeľný. Môže to byť spôsobené menším rozvinutím polypeptidového reťazca ako pri predošlých denaturačných činidlách.



Obr. 14: Závislosť Z-priemeru a objemového streda na riedenie roztokov

Priebeh pôsobenia iónovej sily je dobre pozorovateľný z obr. 15. So znižujúcou iónovou silou klesá prítomnosť častíc v rozmedzí 4-50 nm a prevláda veľkosť 50-1000 nm. U roztokov, ktoré sa najviac podobali iónovou silou destilovanej vode, je sledované najväčšie zvýšenie veľkosti. Tento jav môže byť vysvetlením pre správanie lipázy v prípade 4.4. Roztoky po rozpustení v destilovanej vode čiastočne deformovali štruktúru lipázy, čo sa odráža v odchýlkach.

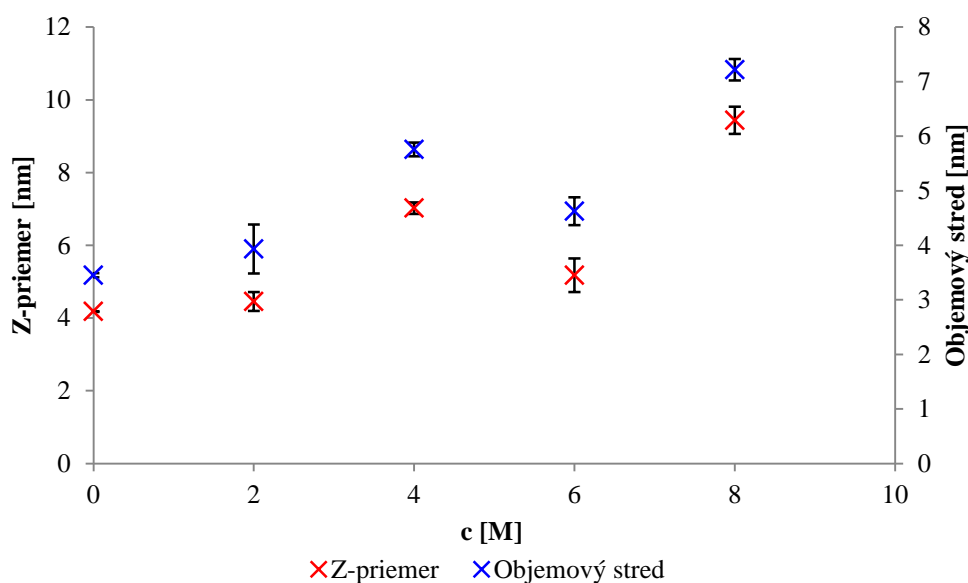


Obr. 15: Závislosť intenzity na riedenie roztokov

4.6. Denaturácia kontrolného proteínu

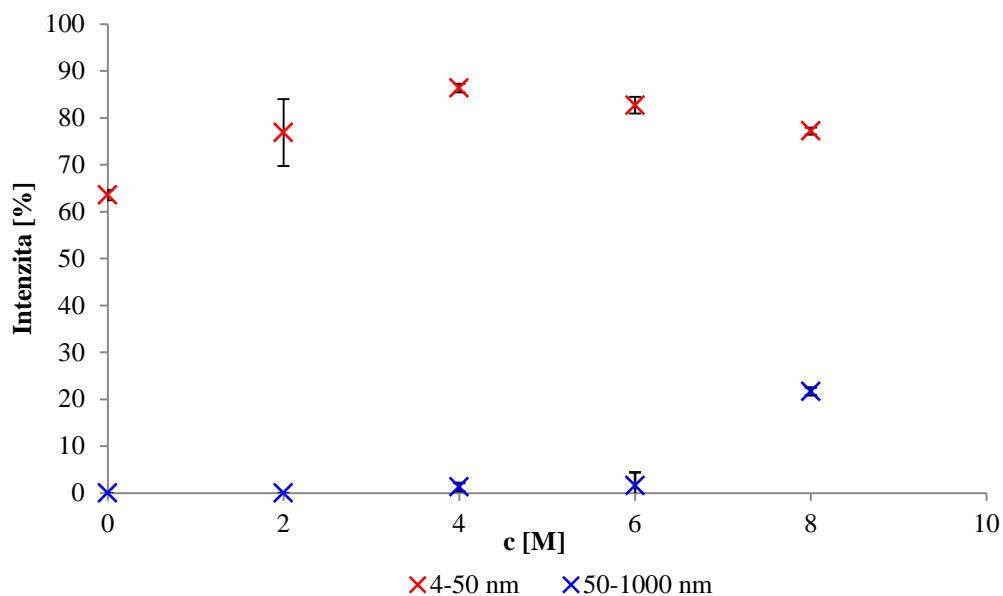
Ako kontrolný proteín bol požívaný lyzozým. Na denaturáciu tohto proteínu bol vybraný denaturant močovina, u ktorého vychádzalo najvýraznejšie rozvinutie lipázy a bol najmenej ovplyvnený vedľajšími účinkami prostredia.

Priebeh kriviek pre Z-priemer a objemový stred je rovnaký. Táto rovnosť je spôsobená tým, že lyzozým sa správa monomodálne a nie sú prítomné rušivé faktory. Ďalším dôvodom je, že molekula tohto enzýmu má guľovitý tvar a tým spĺňa všetky požiadavky potrebné na prevod intenzity na objemový stred. Okrem toho zo závislosti je evidentné, že veľkosť vzoriek so zvyšujúcim obsahom močoviny narastá. Medzi denaturovaným a natívnym stavom je približne 5 nm rozdiel.



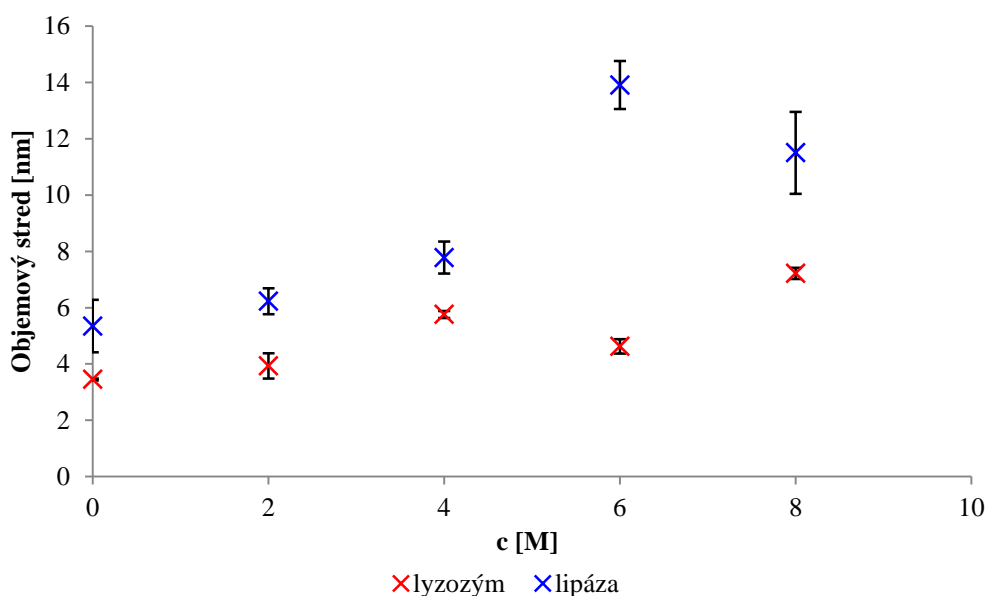
Obr. 16: Závislosť Z-priemeru a objemového stredu na koncentrácii močoviny

Ako už bolo spomínané, kvôli monomodálnemu správaniu lyzozýmu nie je potrebné rozloženie distribúcie intenzity do dvoch rozmedzí, pretože hodnoty intenzity pri prvých štyroch koncentráciách v rozmedzí 50-1000 nm sú skoro nulové. Minimálna intenzita je sledovaná pri koncentrácii 8 M močoviny, kde je v distribúcii prítomný druhý pík. Tento pík naznačuje rozpletené polypeptidové reťazce enzýmu. Porovnanie distribúcie intenzity pre lyzozým bez a s prítomnosťou 8 M močoviny je v prílohe 6. Rozdelenie intenzity do dvoch rozmedzí nie je univerzálnou metódou. Je vhodné len pre častice, ktoré nesplňujú monomodálnu distribúciu. Tento rozdiel je veľmi dobre viditeľný pri sledovaní dvoch testovaných enzýmov, čiže pri lipáze a lyzozýme.



Obr. 17: Závislosť intenzity na koncentrácii močoviny

Na obr. 18 je porovnané pôsobenie močoviny na lipázu a na lyzozým. Parameter objemový stred bol vybraný z dôvodu lepšej viditeľnosti veľkostných zmien. Pri oboch enzýmoch vyvolávalo pridanie močoviny zväčšenie ich veľkosti. Do koncentrácie 4 M má nárast lineárny charakter a od tohto bodu dochádza k výraznejším zmenám. Efekt močoviny ako denaturačného činidla je nezávislý od typu a štruktúry proteínu. Tieto merania potvrdili všestrannosť denaturačných účinkov močoviny.



Obr. 18: Závislosť objemového stredy na koncentrácii močoviny

5. ZÁVER

Táto bakalárska práca bola zameraná na štúdium rôznych spôsobov chemickej denaturácie. Cieľom bolo taktiež otestovať využiteľnosť rozptylových techník na sledovanie zmien vyvolaných denaturáciou. Teoretická časť bola všeobecne venovaná proteínom, ich štruktúre, využitiu a ich denaturácii. V tejto časti bol obecné popísaný rozptyl svetla, a predovšetkým bola charakterizovaná metóda dynamického rozptylu svetla.

V experimentálnej časti boli popísané prípravy jednotlivých zásobných roztokov a vzoriek enzýmov s príslušnými činidlami. Použité činidlá majú odlišné fyzikálne a chemické vlastnosti. Kvôli tejto odlišnosti, boli u každého činidla navrhované odlišné testované koncentrácie. Ako rozpúšťadlo bol používaný fosfátový pufr, ktorý zabezpečuje optimálne podmienky pre zachovanie natívnej štruktúry lipázy a lyzozýmu. V dôsledku citlivosti a vyzrážania medi v pufr, bola pri tomto činidle použitá destilovaná voda. Na zistenie zmeny vo veľkosti vyvolanej stresovými faktormi bol používaný Zetasizer Nano ZS.

V praktickej časti bola overená metóda dynamického rozptylu svetla na sledovanie denaturácie. Na jej opis boli vybrané tri parametre: Z-priemer, objemový stred a intenzitná distribúcia. Vplyv chemických činidiel na lipázu bol zaznamenaný u každého denaturantu. Lipáza sa počas merania nesprávala monomodálne. Kvôli tomuto nerovnomernému rozloženiu častíc bola distribúcia intenzity rozdelená na dve rozmedzia ohraničené dolnou a hornou limitou. Týmto spôsobom boli odstránené nežiadajúce intenzitné signály precipitátov, vzdušných častíc a ďalších experimentálnych artefaktov. Denaturácia s použitím močoviny a guanidínia mala podobné účinky, pričom z výsledkov vyplýva, že guanidínium chlorid vyvoláva konformačné zmeny v štruktúre už pri nižších koncentráciách. Dosah látky SDS na rozvinutie polypeptidového reťazca bol pozorovateľný zo Z-priemeru. Distribúcia intenzity opisovala rozsiahle množstvo veľkosti častíc a pri prepočte na objemový stred bol zaťažený chybami, kvôli čomu bol objemový stred nevhodným parametrom. Pôsobenie medi na lipázu bolo ťažko charakterizovateľné. Precipitáty nerozpustnej medi a rozpúšťadla ovplyvnili celé meranie. Zmeny v štruktúre vyvolané iónovou silou boli potvrdené pomocou zriedenia fosfátového pufru.

Na kontrolu merania bol ako proteín vybraný lyzozým a ako denaturačné činidlo bola vybraná močovina. Lyzozým je z hľadiska merania ideálnejším výberom na meranie veľkosti častíc metódou DLS, kvôli svojej globulárnej štruktúre a monomodálnemu správaniu. Močovina je univerzálnym denaturantom. Jej účinky sú nezávislé na type a štruktúre vybraného proteínu.

Na sledovanie veľkostných zmien proteínov je metóda dynamického rozptylu svetla vhodná čo sa podarilo overiť pomocou navrhnutých experimentov. Táto metóda je veľmi citlivá na prítomnosť veľmi malých častíc a vďaka tomu je schopná detegovať aj malé zmeny v štruktúre ako aj rozvinutie polypeptidového reťazca. Táto metóda je neinvazívna a nedeštruktívna, čo je jej veľkou výhodou. Podľa tohto výskumu je DLS vhodnou metódou na štúdium denaturácie bielkovín. Avšak pre overenie k skutočnému potvrdeniu denaturácie by bolo potreba previesť analýzu štruktúrnymi metódami.

6. ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulární biologie*. 2. rozš. vyd. Brno: Stanislav Rosypal, 1997. ISBN 80-238-8186-8.
- [2] WALSH, Gary. *Proteins: biochemistry and biotechnology*. 2e. V Brně: VITIUM, 2007. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 9780470669853.
- [3] MCMURRY, John. *Organická chemie*. V Brně: VUTIUM, 2007. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-214-3291-8.
- [4] MURRAY, Robert K. *Harperova Biochemie*. 23. vyd., (4. české vyd.), v H & H 3. Jinočany: H & H, 2002. Lange medical book. ISBN 80-7319-013-3.
- [5] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.
- [6] KLOUDA, Pavel. *Základy biochemie*. 2., přeprac. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2005. ISBN 80-86369-11-0.
- [7] Protein Structure. *Particle Sciences: Drug Development, Manufacturing & Delivery Services* [online]. Bethlehem (Pennsylvania): Particle Sciences, 2009 [cit. 2017-02-28]. Dostupné z:
<http://www.particlesciences.com/news/technical-briefs/2009/protein-structure.html>
- [8] VODRÁŽKA, Zdeněk, Pavel RAUCH a Jan KÁŠ. *Enzymologie*. Vyd. 3. přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. ISBN 80-7080-330-4.
- [9] ALBERTS, Bruce. *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York: Garland Science, c2008. ISBN 978-0-8153-4105-5.
- [10] LUO, Y. a T. WANG. Pharmaceutical and Cosmetic Applications of Protein By-Products. *Protein Byproducts* [online]. Elsevier, 2016, s. 147 [cit. 2017-03-17]. DOI: 10.1016/B978-0-12-802391-4.00009-4. ISBN 9780128023914. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128023914000094>
- [11] LUNDBLAD, Roger L. *Application of solution protein chemistry to biotechnology*. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, c2009. Protein science series. ISBN 978-1-4200-7341-6.
- [12] YADA, Rickey Yoshio. *Proteins in food processing*. Cambridge, Eng.: Woodhead Pub., 2004. ISBN 0-8493-2536-6.
- [13] *Medical and Health Sciences: v.2*. Oxford: EOLSS Publishers Co, 2010. ISBN 9781848268319.
- [14] LEE, Chi H., Anuj SINGLA a Yugyung LEE. Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2001, **221**(1-2), 1-22 [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.1016/S0378-5173(01)00691-3. ISSN 03785173. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517301006913>
- [15] RAMSHAW, JOHN A. M., PAUL R. VAUGHAN a JEROME A. WERKMEISTER. APPLICATIONS OF COLLAGEN IN MEDICAL DEVICES. *Biomedical Engineering: Applications, Basis and Communications* [online]. 2001, **13**(01), 14-26 [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.4015/S1016237201000042. ISSN 1016-2372. Dostupné z:
<http://www.worldscientific.com/doi/abs/10.4015/S1016237201000042>
- [16] YU, Xiao-Wei, Yan XU a Rong XIAO. Lipases from the genus *Rhizopus*: Characteristics, expression, protein engineering and application. *Progress in Lipid*

- Research* [online]. 2016, **64**, 57-68 [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.1016/j.plipres.2016.08.001. ISSN 01637827. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163782716300030>
- [17] MORRA, Giulia. *Role of electrostatics explored with molecular dynamics simulations for protein stability and folding*. FU Department of Biology, Chemistry and Pharmacy, 2006. Doctoral thesis. Freie Universität Berlin. Vedoucí práce Prof. Dr. Ernst-Walter Knapp.
- [18] FREIRE, Ernesto, Arne SCHÖN, Burleigh M. HUTCHINS a Richard K. BROWN. Chemical denaturation as a tool in the formulation optimization of biologics. *Drug Discovery Today* [online]. 2013, **18**(19-20), 1007-1013 [cit. 2017-03-20]. DOI: 10.1016/j.drudis.2013.06.005. ISSN 13596446. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644613001682>
- [19] FIELDER, Sebastian. Protein Stability by Chemical Denaturation. *AppliedPhotophysics: More time for science* [online]. 2017 [cit. 2017-03-21]. Dostupné z: <https://www.photophysics.com/resources/protein-stability-chemical-denaturation>
- [20] XU, Rensheng. *Particle characterization: light scattering methods*. Dordrecht ;; Kluwer Academic, c2000. Powder technology series, v.13. ISBN 0-7923-6300-0.
- [21] KVÍTEK, Libor a Aleš PANÁČEK. *ZÁKLADY KOLOIDNÍ CHEMIE* [online]. Olomouc: UNIVERZITA PALACKÉHO, 2007 [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: <http://fch.upol.cz/wp-content/uploads/2015/07/Kolonoidni-chemie-text.pdf>
- [22] WYATT, Philip J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Analytica Chimica Acta* [online]. 1993, **272**(1), 1-40 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1016/0003-2670(93)80373-S. ISSN 00032670. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000326709380373S>
- [23] KVÍTEK, Libor. *Metody studia koloidních soustav*. In: Acta Universitatis Palackianae Olomucensis [online]. Olomouc, Czech Republic: Faculty of Physical Culture, Palacky University [cit. 2013-02-10]. Dostupné z: <http://chemikalie.upol.cz/skripta/>
- [24] PABST, W. a E. GREGOROVÁ. *Charakterizace částic a částicových soustav* [online]. Praha: VŠCHT, 2007 [cit. 2017-04-02]. Dostupné z: http://old.vscht.cz/sil/keramika/Characterization_of_particles/CPPS%20_Czech%20version_.pdf
- [25] *Zetasizer Nano Příručka pro uživatele*. 3. vydání. Malvern instruments Ltd., Spojené království, 2007, 191 s
- [26] Intensity of Scattered Light and Molar Mass. *Wyatt Technology Europe* [online]. 2014 [cit. 2017-04-07]. Dostupné z: http://www.wyatt.eu/index.php?id=molar_mass&L=0%20onfocus%3D%22blurLink%28this%2Findex.php
- [27] ØGENDA, Lars. *Light Scattering a brief introduction* [online]. University of Copenhagen, 2016 [cit 2017-04-07]. Dostupné z: http://www.nbi.dk/~ogendal/personal/ho/LS_brief_intro.pdf
- [28] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 9788070806746.

- [29] The Zimm Plot: Molecular Weight and Radius of Gyration. *LS Instruments* [online]. Fribourg [cit. 2017-04-07]. Dostupné z: http://www.lsinstruments.ch/technology/static_light_scattering_sls/zimm_plot/
- [30] *Vlastnosti izolovaných polymerních molekul* [online]. Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2007 [cit. 2017-04-09]. Dostupné z: https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/3019/mod_resource/content/0/1%20Vlastnosti%20izolovan%C3%BDch%20polymern%C3%AADch%20molekul.pdf
- [31] Radius of Gyration. *LS Instruments* [online]. Fribourg [cit. 2017-04-09]. Dostupné z: http://www.lsinstruments.ch/technology/static_light_scattering_sls/radius_of_gyrat
- [32] Dynamic Light Scattering. *Wyatt Technology Europe* [online]. 2014 [cit. 2017-04-10]. Dostupné z: http://www.wyatt.eu/index.php?id=dynamic_light_scattering
- [33] PECORA, R. *Journal of Nanoparticle Research* [online]. **2**(2), 123-131 [cit. 2017-04-13]. DOI: 10.1023/A:1010067107182. ISSN 13880764. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1010067107182>
- [34] ILKOVIČ, Dionýz. *Fyzika I* [online]. 5. Bratislava: Alfa, 1973 [cit. 2017-04-13]. Dostupné z: http://www.kf.elf.stuba.sk/~bokes/DI_web/IlkovicI.php
- [35] COSGROVE, T. *Colloid science: principles, methods and applications*. Ames, Iowa: Blackwell Pub., 2005. ISBN 9781405126731.
- [36] Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes. *MALVERN INSTRUMENTS* [online]. United Kingdom, ©2017 [cit. 2017-04-18]. Dostupné z: <http://www.malvern.com/en/support/resource-center/technical-notes/TN101104DynamicLightScatteringIntroduction.aspx>
- [37] MINTON, Allen P. Recent applications of light scattering measurement in the biological and biopharmaceutical sciences. *Analytical Biochemistry* [online]. 2016, **501**, 4-22 [cit. 2017-04-18]. DOI: 10.1016/j.ab.2016.02.007. ISSN 00032697. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269716000683>
- [38] BROWN, Wyn. *Dynamic light scattering: the method and some applications*. New York: Oxford University Press, 1993. ISBN 9780198539421.
- [39] ARZENŠEK, Dejan. *Dynamic light scattering and application to proteins in solutions: Seminar* [online]. Ljubljana: University of Ljubljana - Faculty of Mathematics and Physics, 2010 [cit. 2017-04-18]. Dostupné z: http://www-f1.ijs.si/~rudi/sola/Dynamic_light_scattering_and_application_to_proteins_in_solutions.pdf
- [40] LORBER, Bernard, Frédéric FISCHER, Marc BAILLY, Hervé ROY a Daniel KERN. Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students. *Biochemistry and Molecular Biology Education* [online]. 2012, **40**(6), 372-382 [cit. 2017-04-18]. DOI: 10.1002/bmb.20644. ISSN 14708175. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bmb.20644>
- [41] ROSSKY, P. J. Protein denaturation by urea: Slash and bond. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2008, **105**(44), 16825-16826 [cit. 2017-04-19]. DOI: 10.1073/pnas.0809224105. ISSN 00278424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0809224105>

- [42] CANCHI, Deepak R. a Angel E. GARCÍA. Backbone and Side-Chain Contributions in Protein Denaturation by Urea. *Biophysical Journal* [online]. 2011, **100**(6), 1526-1533 [cit. 2017-04-20]. DOI: 10.1016/j.bpj.2011.01.028. ISSN 00063495. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349511001111>
- [43] STUMPE, Martin C. a Helmut GRUBMÜLLER. Interaction of Urea with Amino Acids: Implications for Urea-Induced Protein Denaturation. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2007, **129**(51), 16126-16131 [cit. 2017-04-20]. DOI: 10.1021/ja076216j. ISSN 00027863. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja076216j>
- [44] BENNION, B. J. a V. DAGGETT. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2003, **100**(9), 5142-5147 [cit. 2017-04-20]. DOI: 10.1073/pnas.0930122100. ISSN 00278424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0930122100>
- [45] JHA, Santosh Kumar a Susan MARQUSEE. Kinetic evidence for a two-stage mechanism of protein denaturation by guanidinium chloride. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2014, **111**(13), 4856-4861 [cit. 2017-04-20]. DOI: 10.1073/pnas.1315453111. ISSN 00278424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1315453111>
- [46] O'BRIEN, Edward P., Ruxandra I. DIMA, Bernard BROOKS a D. THIRUMALAI. Interactions between Hydrophobic and Ionic Solutes in Aqueous Guanidinium Chloride and Urea Solutions: Lessons for Protein Denaturation Mechanism. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2007, **129**(23), 7346-7353 [cit. 2017-04-20]. DOI: 10.1021/ja069232. ISSN 0002-7863. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja069232+>
- [47] SIDDARAMAIAH, Manjunath, Kapaettu SATYAMOORTHY, Bola Sadashiva Satish RAO, Suparna ROY, Subhash CHANDRA a Krishna Kishore MAHATO. Identification of protein secondary structures by laser induced autofluorescence: A study of urea and GnHCl induced protein denaturation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [online]. 2017, **174**, 44-53 [cit. 2017-04-20]. DOI: 10.1016/j.saa.2016.11.017. ISSN 13861425. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386142516306710>
- [48] BHUYAN, Abani K. On the mechanism of SDS-induced protein denaturation. *Biopolymers* [online]. 2010, **93**(2), 186-199 [cit. 2017-04-20]. DOI: 10.1002/bip.21318. ISSN 00063525. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bip.21318>
- [49] FANO, Mathias, Marco VAN DE WEERT, Eva Horn MOELLER, Nanna Aaby KRUSE a Sven FROKJAER. Ionic strength-dependent denaturation of *Thermomyces lanuginosus* lipase induced by SDS. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 2011, **506**(1), 92-98 [cit. 2017-04-20]. DOI: 10.1016/j.abb.2010.11.012. ISSN 00039861. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986110004728>
- [50] CHAITANYA, P. Krishna a N. Prakash PRABHU. Stability and Activity of Porcine Lipase Against Temperature and Chemical Denaturants. *Applied Biochemistry and Biotechnology* [online]. 2014, **174**(8), 2711-2724 [cit. 2017-04-20]. DOI:

- 10.1007/s12010-014-1220-8. ISSN 02732289. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12010-014-1220-8>
- [51] CARVALHO, José Wilson P., Francisco Adriano O. CARVALHO, Tatiana BATISTA, Patrícia S. SANTIAGO a Marcel TABAK. Cetyltrimethylammonium chloride (CTAC) effect on the thermal stability of oxy-HbGp: Dynamic light scattering (DLS) and small angle X-ray scattering (SAXS) studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2014, **118**, 14-24 [cit. 2017-04-21]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.03.021. ISSN 09277765. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776514001416>
- [52] DEV, Sagarika a Avadhesh SUROLIA. Dynamic light scattering study of peanut agglutinin: Size, shape and urea denaturation. *Journal of Biosciences* [online]. 2006, **31**(5), 551-556 [cit. 2017-04-21]. DOI: 10.1007/BF02708406. ISSN 02505991. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02708406>
- [53] HUANG, Xiaolin, Zhaodi XU, Yan MAO, Yanwei JI, Hengyi XU, Yonghua XIONG a Yanbin LI. Gold nanoparticle-based dynamic light scattering immunoassay for ultrasensitive detection of *Listeria monocytogenes* in lettuces. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2015, **66**, 184-190 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/j.bios.2014.11.016. ISSN 09565663. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566314009051>
- [54] PUSKÁS, István, Alexandra SZEMJONOV, Éva FENYVESI, Milo MALANGA a Lajos SZENTE. Aspects of determining the molecular weight of cyclodextrin polymers and oligomers by static light scattering. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2013, **94**(1), 124-128 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.01.025. ISSN 01448617. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861713000416>
- [55] WISUNTHORN, Suwaluk, Siriluck LIENGPRAYOON, Laurent VAYSSE, Jerome Sainte BEUVE a Frederic BONFILS. SEC-MALS study of dynamic structuring of natural rubber: Comparative study of two *Hevea brasiliensis* genotypes. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2012, **124**(2), 1570-1577 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1002/app.35099. ISSN 00218995. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.35099>
- [56] Dynamic light scattering - common terms defined. *Malvern Instruments* [online]. ©2011 [cit. 2017-05-07]. Dostupné z: <http://www.malvern.com/en/support/resource-center/Whitpapers/WP111214DLSTermsDefined.aspx>

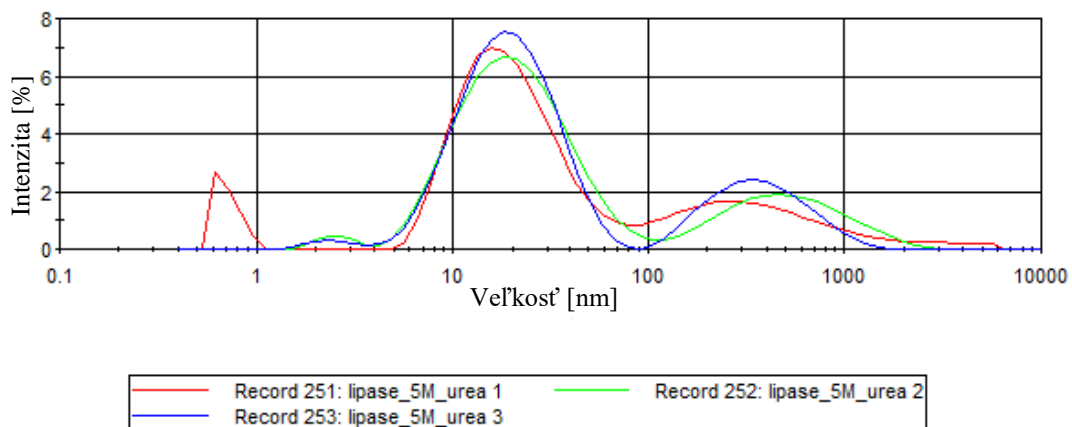
7. ZOZNAM SKRATIEK

SLS	Statický rozptyl svetla (<i>Static light scattering</i>)
DLS	Dynamický rozptyl svetla (<i>Dynamic light scattering</i>)
REMD	<i>Replica-Exchange</i> molekulová dynamika (<i>Replica-Exchange molecular dynamics</i>)
FRET	Fluoresenčne rezonančný prenos energie (<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>)
CD	Cirkulárny dichroismus (<i>Circular dichroism</i>)
VP-ITC	Izotermálna titračná kalorimetria (<i>Isothermal titration calorimetry</i>)
SAXS	Nízko uhlové röntgenové žiarenie (<i>Small-angle X-ray scattering</i>)
SEC-MALS	Vylučovací chromatografie s viac uhlovým SLS detektorom (<i>Size exclusion chromatography with multi-angle static light scattering</i>)
THF	Tetrahydrofurán

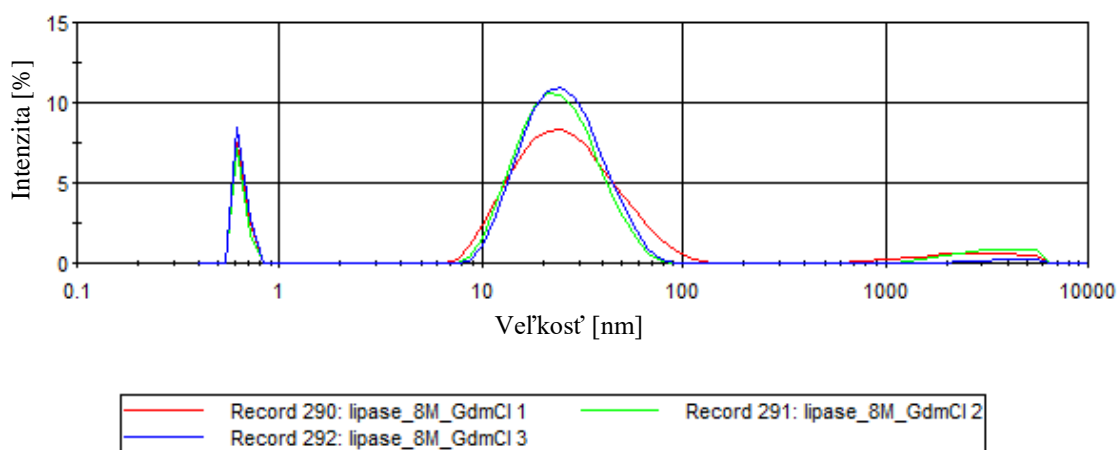
8. ZOZNAM SYMBOLOV

ΔG	Gibbsova energia
ΔH	Entalpia
ΔS	Entropia
T	Teplota
I	Intenzita rozptýleného svetla
I_0	Intenzita dopadajúceho svetla
α	Polarizovateľnosť
λ	Vlnová dĺžka
θ	Uhol rozptylu
K	Optická konštanta
C	Koncentrácia
R_θ	Rayleighov pomer
M	Molekulová hmotnosť
A_2	Druhý virialny koeficient
P_θ	Uhlová závislosť
n	Index lomu
D	Difúzny koeficient
r_n	Hydrodynamický polomer
k	Boltzmanova konštanta
η	Viskozita

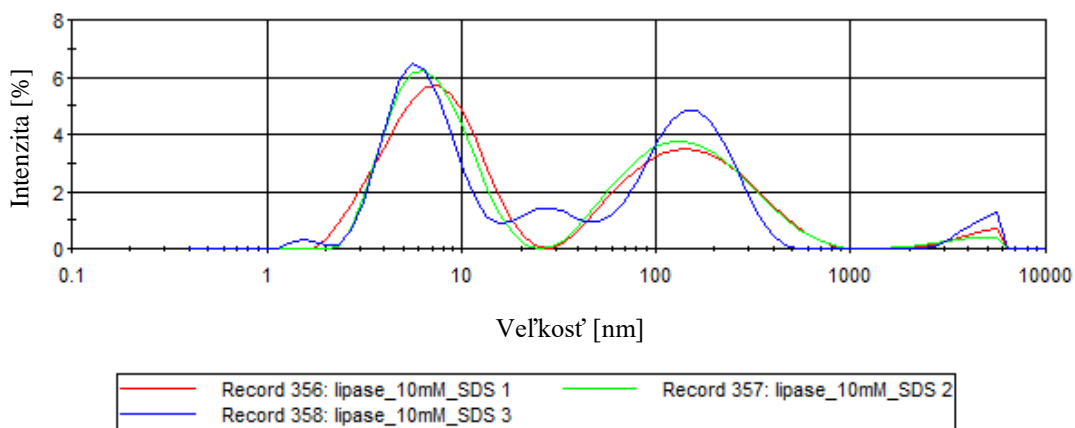
9. ZOZNAM PRÍLOH



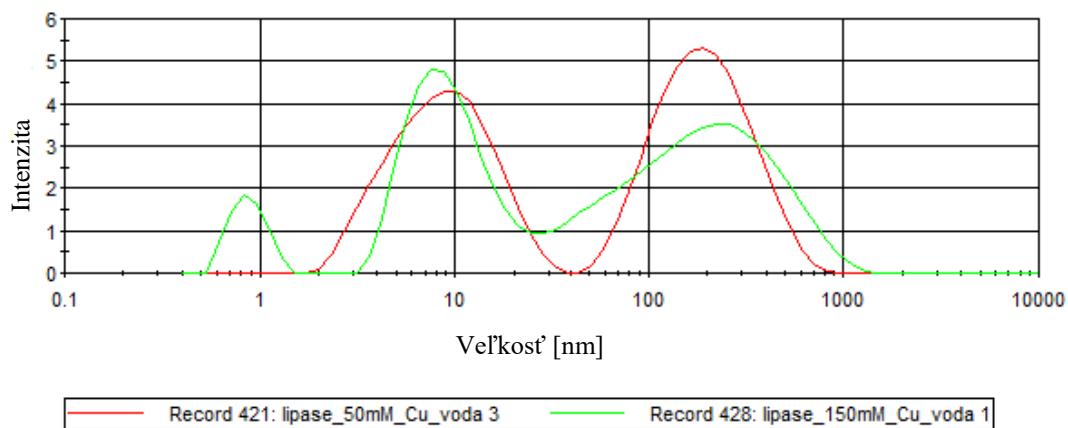
Príloha 1: Intenzitná distribúcia veľkosti častíc lipázy v roztoku 5 M urei



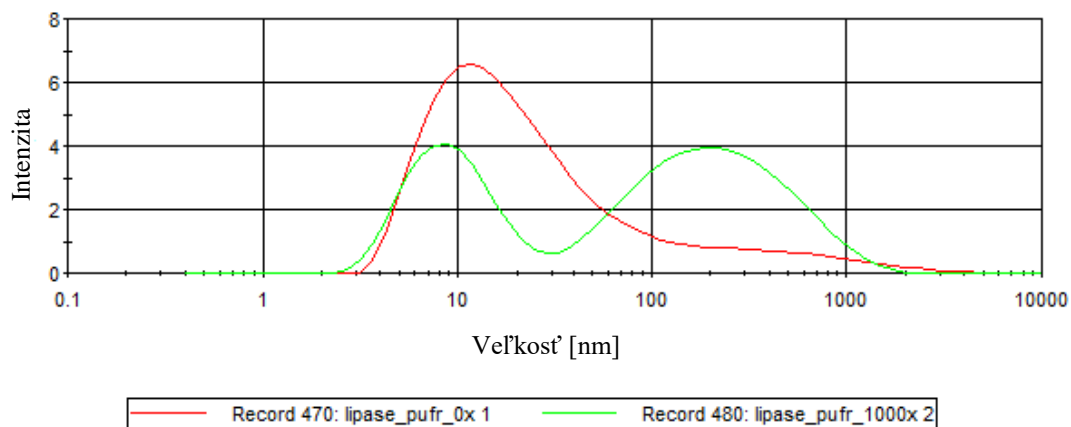
Príloha 2: Intenzitná distribúcia veľkosti častíc lipázy v roztoku 8 M guanidínium hydrochloridu



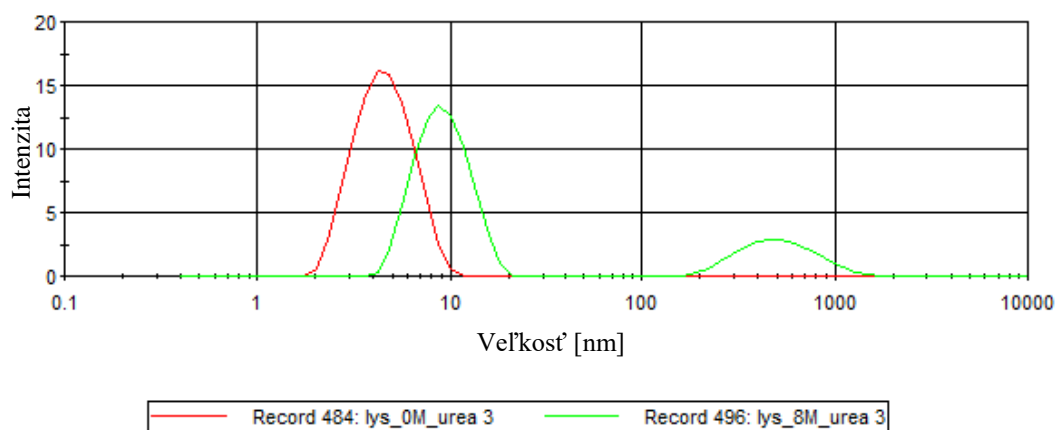
Príloha 3: Intenzitná distribúcia veľkosti častíc lipázy v roztoku 10 mM SDS



Príloha 4: Porovnanie intenzitnej distribúcie veľkosti častíc lipázy v roztokoch 50 a 150 mM síranu meďnatého



Príloha 5: Porovnanie intenzitnej distribúcie veľkosti častíc lipázy v tisíckrát a v nezriedenom roztoku



Príloha 6: Porovnanie intenzitnej distribúcie veľkosti častíc lyzozýmu bez a v prítomnosti 8 M močoviny