



**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 TERMICKÉ ANALÝZY PŘI STUDIU DENATURACE  
PROTEINŮ**

UTILIZATION OF THERMAL ANALYSIS IN STUDY ON PROTEIN DENATURATION

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Miriam Bošeřová**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**

**BRNO 2017**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1130/2016  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Miriam Bošeřová**  
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 termické analýzy při studiu denaturace proteinů

### Zadání bakalářské práce zadání:

1. Vypracovat literární rešerši na téma možností experimentálního studia denaturace proteinů se zvláštním zaměřením na využití různých technik termické analýzy.
2. Na základě literární rešerše na vhodném proteinu otestovat využitelnost technik termické analýzy 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.

-----  
Miriam Bošeřová  
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 sa zaoberá využitím techník termickej analýzy pri štúdiu tepelnej denaturácie proteínov. Ako modelový proteín bol zvolený lyzozým. V experimentálnej časti boli použité dve metódy termickej analýzy a to diferenčná kompenzačná kalorimetria (DSC) a teplotne modulovaná diferenčná kompenzačná kalorimetria (TMDSC). Jedným z cieľov práce bolo určiť využiteľnosť DSC a TMDSC pri štúdiu denaturácie lyzozýmu a zároveň bližšie charakterizovať výsledky, ktoré môžeme z jednotlivých metód získať. Ďalším cieľom bola optimalizácia TMDSC, kde boli porovnané módy *heat-iso*, *heat-only* a *heat-cool* pri 60 sekundovej a 100 sekundovej perióde. Vybranými metódami bola sledovaná denaturácia lyzozýmu, ktorá je tvorená predvážne reverzibilnou zložkou tepelného toku a denaturačná teplota je v závislosti na nastavených parametroch v rozmedzí 71,16 °C až 75,21 °C.

## ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the use of techniques of thermal analysis in the study of thermal denaturation of proteins. As a model protein was chosen lysozyme. In the experimental part were used two methods of thermal analysis – differential scanning calorimetry (DSC) and temperature modulated differential scanning calorimetry (TMDSC). One of the objectives of the study was to determine the utility of DSC and TMDSC in the study of lysozyme denaturation and to further characterize the results we can obtain from the individual methods. Another goal was the optimization of TMDSC. During optimization of TMDSC *heat-iso*, *heat-only* and *heat-cool* modes were compared in 60 seconds and 100 second periods. By selected methods was observed denaturation of lysozyme. Denaturation of lysozyme is predominantly created by reversible component of the heat flow and the denaturation temperature is in the range of 71,16 °C to 75,21 °C depending on the set parameters.

## KLÚČOVÉ SLOVÁ

lyzozým, tepelná denaturácia, termická analýza

## KEYWORDS

lysozyme, thermal denaturation, thermal analysis

BOŠELOVÁ, M. *Využití termické analýzy při studiu denaturace proteinů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 49 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 použitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....  
podpis študenta

### *Podakovanie:*

*Rada by som poďakovala vedúcemu mojej bakalárskej práce Ing. Petrovi Sedláčkovi Ph.D. za jeho odborné vedenie, čas a za jeho cenné rady pri vypracovaní bakalárskej práce. Ďalej by som veľmi rada poďakovala pani Leone Kubíkovej za jej ochotu a čas, ktorý strávila pri realizácii experimentálnej časti.*

# OBSAH

1	ÚVOD.....	6
2	TEORETICKÁ ČASŤ.....	7
2.1	Proteíny – základ živej hmoty.....	7
2.1.1	Štruktúra .....	7
2.1.2	Funkcia proteínov.....	8
2.1.3	Denaturácia.....	8
2.1.4	Lyzozým.....	9
2.2	Termická analýza .....	10
2.2.1	Úvod .....	10
2.2.2	Základná inštrumentácia .....	11
2.2.3	Výsledok termickej analýzy .....	12
2.2.4	Diferenčná kompenzačná kalorimetria .....	12
2.2.5	Teplotne modulovaná diferenčná kompenzačná kalorimetria .....	15
2.2.6	Kvázi-izotermálna teplotne modulovaná diferenčná kompenzačná kalorimetria.....	17
3	SÚČASTNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY .....	18
3.1	Denaturácia proteínov .....	18
3.2	Využitie teplotne modulovanej diferenčnej kompenzačnej kalorimetrie v praxi .....	19
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	21
4.1	Príprava vzorky .....	21
4.2	Kalorimetrické merania.....	21
4.2.1	Vplyv rýchlosti ohrevu .....	21
4.2.2	Vplyv amplitúdy a periódy .....	21
4.2.3	Kvazi-izotermálna teplotne modulovaná diferenčná kompenzačná kalorimetria 21	
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA .....	22
5.1	Diferenčná kompenzačná kalorimetria .....	22
5.1.1	Vplyv rýchlosti ohrevu na priebeh denaturácie .....	24
5.2	Teplotne modulovaná diferenčná kompenzačná kalorimetria .....	27
5.2.1	Vplyv amplitúdy a periódy na priebeh denaturácie .....	31
5.3	Kvazi-izotermálna analýza.....	42
6	ZÁVER.....	44
7	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY .....	45
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV .....	48

# 1 ÚVOD

Proteíny sú makromolekulové látky, ktoré sa nachádzajú v živých systémoch. Predstavujú štruktúru, ktorá podmieňuje základné prejavy života organizmov. Pri evolúcii živých systémov boli proteíny pralátkou, na ktorej sa formoval celý ďalší vývoj organizmov. Proteíny plnia v organizme mnoho funkcií, ktoré môžu vykonávať len pri natívnej konformácii. Správna konformácia proteínu zabezpečuje optimálnu špecifickú interakciu s inou molekulou napr. enzým - substrát. Štruktúra proteínov preto musí byť flexibilná, aby proteíny mohli plniť svoju funkciu. Stabilita proteínov súvisí s udržaním si svojej natívnej konformácie, ktorá môže byť porušená pri tepelnej alebo chemickej denaturácii. Preto je dnes tepelná denaturácia proteínov intenzívne študovaná.

K štúdiu denaturácie proteínov sa okrem spektroskopických metód čím ďalej tým viac používajú metódy termickej analýzy, ktorými môžeme analyzovať zmeny vo fyzikálnej štruktúre a ich mechanické správanie pri tepelnom zaťažení. Analýza týchto zmien umožňuje optimalizáciu podmienok, pri ktorých sú proteíny stabilné. Cieľom práce bolo overiť využiteľnosť diferenčnej kompenzačnej kalorimetrie (DSC) a teplotne modulovanej diferenčnej kompenzačnej kalorimetrie (TMDSC) k štúdiu denaturácie lyozýmu.

## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 Proteíny – základ živej hmoty

Proteíny – tiež nazývané aj bielkoviny – sa vyskytujú vo všetkých formách života. Tvoria viac ako 50 % bunkovej sušiny organizmov a vykonávajú v nich rôzne biochemické a fyziologické funkcie okrem prenosu informácie [1]. Z chemického hľadiska sú to biopolyméry zložené z jedného alebo viacerých polypeptidových reťazcov, ktoré obsahujú sto až niekoľko tisíc aminokyselinových zvyškov [2].

#### 2.1.1 Štruktúra

Základom chemickej štruktúry bielkovín je lineárny polymér, ktorý je tvorený kombináciou dvadsiatich proteínogénnych aminokyselín spojených peptidovými väzbami. Štruktúra bielkovín má priestorové usporiadanie, ktoré je za daných podmienok energeticky menej náročne a označuje sa ako jej konformácia. V každej konformácii má molekula určitý tvar a trojrozmerné usporiadanie. Samotná konformácia má v biológii veľký význam, pretože je základom rôznorodých štruktúr a bunkových organel [3]. U bielkovín sa stretávame s primárnou, sekundárnou, terciárnou a kvartérnou štruktúrou. Charakteristické poradie aminokyselinových zvyškov sa nazýva primárna štruktúra.

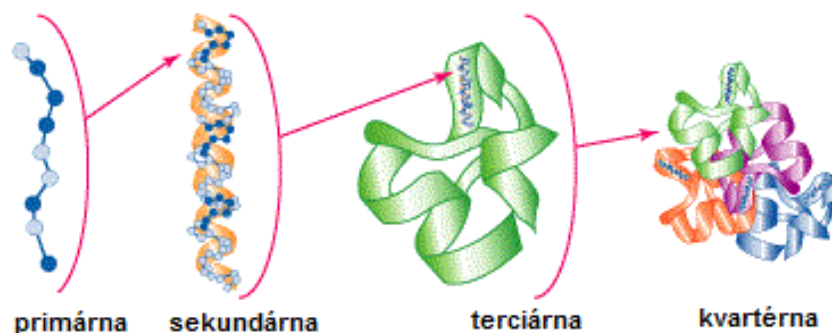
Primárna štruktúra každej bielkoviny je jedinečná a je jej hlavným rozpoznávacím znakom. Udáva poradie aminokyselín v polypeptidovom reťazci. Poradie aminokyselín v polypeptidovom reťazci môže byť ľubovoľné; dodnes je známe, že neexistujú žiadne obmedzenia vzájomných kombinácií aminokyselín. Aminokyseliny sú spojené peptidovou väzbou medzi aminoskupinou  $-NH_2$  jednej aminokyseliny a karboxylovú skupinu  $-COOH$  druhej aminokyseliny. Primárna štruktúra vzniká pri biosyntéze proteínov na ribozóm procesom nazývaným translácia. Primárna štruktúra podmieňuje ďalšie štruktúry aj samotnú funkciu bielkovín [1].

Natívna štruktúra je daná kovalentnou (chemickou) štruktúrou. Avšak, aby molekula proteínu mohla vykonávať svoju biologickú funkciu, musí mať určité priestorové usporiadanie, ktoré sa označuje ako natívna konformácia. Toto usporiadanie odpovedá minimálnej Gibbsovej energii a je dané nekovalentnými interakciami, ktoré stabilizujú trojrozmernú štruktúru molekuly proteínu. Kovalentná štruktúra zahŕňa aj kovalentné väzby, ktoré vznikajú až po syntéze polypeptidového reťazca na ribozóm [1].

Sekundárna štruktúra popisuje priestorové vzťahy susedných alebo blízkych aminokyselinových zvyškov [1]. Podľa zmeny uhlov na alfa uhlíku rozlišujeme dva základne typy sekundárnej štruktúry:  $\alpha$ -skrutkovica (závitnica) a  $\beta$ -štruktúra. V bielkovinách sa najčastejšie vyskytuje pravotočivá  $\alpha$ -závitnica označovaná ako  $\alpha$ -hélix, ktorá je charakterizovaná výškou jedného závitú, ktorá je 0,54 nm. Štruktúra je stabilizovaná vodíkovými väzbami medzi karboxylovým kyslíkom aminokyselinového zvyšku a vodíkom amidovej skupiny štvrtej nasledujúcej aminokyseliny [4]. Pre niektoré sekvencie aminokyselinových zvyškov je výhodnejšia štruktúra s mierne ohnutým reťazcom ako so zvinutým. Táto konformácia sa nazýva  $\beta$ -štruktúra ( $\beta$ -hrebeň) a vzniká vysunutím peptidových jednotiek z roviny úplne rozvinutého polypeptidového reťazca striedavo na obe strany. Takto sformované reťazce sa stabilizujú pomocou medzi-peptidových vodíkových väzieb, ktoré sú orientované na smer reťazca za vzniku pásov. Podľa toho či  $NHCO$  väzby reťazca majú vo vzniknutých pásoch rovnaký alebo opačný smer rozoznávame buď paralelnú alebo antiparalelnú  $\beta$ -štruktúru [2].

Terciárna štruktúra udáva celkovú konformáciu a tvar polypeptidového reťazca. Vzniká interakciou medzi postrannými aminoskupinami, ktoré sú schopné tvoriť nekovalentné väzby [3]. Pri fixácii sa uplatňujú hydrofobné a elektrostatické interakcie taktiež aj disulfidické väzby [2]. Proteíny sa podľa terciárnej štruktúry delia na globulárne a fibrilárne proteíny. V štruktúre globulárnych proteínov sa striedajú  $\alpha$ -závitnica a segmenty  $\beta$ -štruktúry s ostatnými segmentami proteínu a vytvárajú kľbko guľovitého tvaru. Štruktúru fibrilárnych proteínov tvoria segmenty typu  $\alpha$ -závitnice alebo  $\beta$ -štruktúry [3]. Terciárna štruktúra je závislá na primárnej štruktúre [4].

Kvartérna štruktúra vzniká po agregácii polypeptidov, ktoré tvoria oligomerné molekuly. Oligoméry sa môžu skladať z niekoľko rovnakých podjednotiek (homooligoméry) alebo z odlišných podjednotiek (heterooligoméry) [5]. Podjednotky môžu byť spojené nekovalentnými alebo pevnými kovalentnými väzbami. Kvartérna štruktúra umožňuje vznik nových potrebných vlastností, ktoré nižšie štruktúry nemôžu zaistiť [2].



Obrázok 1: Štyri úrovne štruktúry proteínov [6]

### 2.1.2 Funkcia proteínov

Proteíny majú veľký význam v enzýmovej funkcii, ktorú vykonávajú vo všetkých živých sústavách. Proteíny slúžia ako enzýmy, ktoré katalyzujú chemické reakcie a určujú smer a špecifitu reakcii. Okrem enzýmovej funkcie vykonávajú proteíny ďalšie biologické funkcie:

- tvoria štruktúru cytoplazmy, ribozómov a iných organel
- zaisťujú transport látok
- riadia rast a rozdelenie buniek ako regulačné proteíny
- pôsobia pri pohybových mechanizmoch bunkovej štruktúry ako kontraktilné proteíny
- sú súčasťou podporných pletív ako fibrilárne elastické proteíny
- prenášajú signál v rámci komunikácie (vnútrobunkovej, medzibunkovej alebo organizmálnej)
- slúžia ako protilátky v imunitnej obrane
- pôsobia ako receptory v membráne bunky [3].

### 2.1.3 Denaturácia

Bielkoviny sú vysoko usporiadané systémy a to vďaka svojej relatívne stabilnej konformácii. Forma, v ktorej vznikajú a fungujú v organizmoch, nazývame natívnou formou. Natívna konformácia pôsobením fyzikálnych a chemických vplyvov prechádza do menej usporiadanej formy náhodného kľbka. Denaturácia je teda proces, pri ktorom prechádza proteín z usporiadaného stavu do neusporiadaného. Pri denaturácii dochádza k porušeniu nekovalentnej sekundárnej a terciárnej štruktúry. Bielkoviny tak strácajú svoju biologickú funkciu a menia svoje fyzikálne vlastnosti pričom primárna štruktúra ostáva zachovaná [4].



Denaturácia môže byť fyzikálna alebo chemická. Pri fyzikálnej denaturácii sú denaturačnými činidlami zvýšená teplota a rozptýlenie bielkovín na veľkom povrchu (napr. penením bielkovinového roztoku). Chemickým denaturačným vplyvom sú organické rozpúšťadlá a tenzidy, ktoré narúšajú nepolárne väzby, pôsobenie silných kyselín a zásad (rušia iontové väzby) a zlúčeniny typu močoviny a guanidinu, ktoré majú mimoriadnu schopnosť tvorby vodíkových väzieb a tým obmedzujú ich tvorbu v bielkovine. Pôsobením denaturačných činidiel dochádza k rozvinutiu peptidového reťazca, čo ma za následok odkryvanie nepolárnych aminokyselinových zvyškov, znižuje sa solvácia molekúl a tým samotná rozpustnosť bielkovín. Opatrným pridávaním denaturačného činidla vo veľmi zriedenom roztoku môže nastať reverzibilné rozvinutie reťazca: pomalým odstránením činidla prejde proteín do svojej natívnej formy. Vo väčšine prípadov je roztok koncentrovanejší a nastáva v ňom sekundárny proces – intermolekulárna reakcia „odhalených“ funkčných skupín, ktorá vedie k vzniku stabilného, vysokomolekulového agregátu a k ďalšiemu zníženiu rozpustnosti. Denaturácia sa stáva ireverzibilnou a denaturované proteíny sú vylúčené z roztoku [4].

#### 2.1.4 Lyzozým

Lyzozým je jednoreťazový polypeptid, ktorý sa skladá zo 129 aminokyselinových zvyškov spojených štyrmi disulfidickými mostíkmi [7]. Lyzozým je enzým, ktorý špecificky štiepi polysacharidový reťazec a zbavuje tak baktérie ochranného obalu a ničí ich [4]. Hydrolyzuje  $\beta$  (1→4) väzby medzi kyselinou N-acetylmurámovou a N-acetyl-D-glukózaminovým zvyškom v peptidoglykáne a medzi N-acetyl-D-glukózaminovým zvyškom v chitodextríne. Gram-pozitívne baktérie sú veľmi citlivé na túto hydrolýzu, pretože ich bunková stena má vysoký obsah peptidoglykánu. Gram-negatívne baktérie sú menej náchylné v dôsledku prítomnosti vonkajšej membrány a nižšiemu obsahu peptidoglykánu [8]. Predstavuje tak prírodný dezinfekčný prostriedok, ktorý sa používa aj pre priemyselné použitie (napr. potravinárstvo, kozmetika) [4]. Jeho antibakteriálne vlastnosti boli prvý krát pozorované v roku 1909 Laschtschenkom [9], avšak až v roku 1922 bol enzýmu pridelený názov lyzozým Alexandrom Flemingom, ktorý pozoroval jeho antibakteriálne účinky na bakteriálnej kultúre nosového hlienu pacienta .

Molekula lyzozýmu má guľovitý tvar s nepolárnym vnútrom, v ktorom sa nachádza aktívne centrum v tvare štrbiny, ktorá sa tiahne celou molekulou. V aktívnom centre sa nachádza šesť zvyškov aminocukrov. Jednotky aminocukrov (ABCDEF) sú viazané cez vodíkové väzby. Pri väzbe zvyšku D dochádza k skrúteniu stoličkovej konformácii hexozového kruhu na polostoličkovú v dôsledku sféricity. Samotná hydrolýza prebieha na väzbe medzi jednotkami D a E. V prítomnosti tejto väzby je glutamát 35 a asparát 52. Sekundárnu štruktúru tvorí päť oddelených krátkych  $\alpha$ -helikálnych častí a jeden úsek s antiparalelnou  $\beta$ -štruktúrou [10].

Lyzozým sa nachádza v rôznych tkanivách a telesných tekutinách vrátane vtáčieho vajca, rastlín, baktérií a živočíšnych sekrétoch ako sú sliny, slzy, mlieko, respiračné sekréty. Jedným zo zdrojov lyzozýmu sú aj polymorfonukleárne leukocyty [11].

## 2.2 Termická analýza

### 2.2.1 Úvod

Počiatok termickej analýzy ako vednej disciplíny sa datuje až v roku 1887, kedy Le Chatelier publikoval výsledky termického správania ílovitých hornín tzv. *heating curve* metódou, ktorá odpovedá diferencnej termickej analýze bez referenčnej vzorky. Základ termickej analýzy bol na konci 19. storočia kedy už bola k dispozícii meriaca a prístrojová technika (teplomery, teplotné stupnice, termočlánky, pyrometre atď.) použiteľná k definovaniu teplotného programu a zaznamenaniu teploty a hodnoty študovanej vlastnosti [12].

Pojem termická analýza zahŕňa skupinu metód, ktoré zaznamenávajú chemické a fyzikálne zmeny zloženia a vlastnosti látky v závislosti na teplote. Tepelné zaťaženie vzorky prebieha podľa nastaveného programu, a môže byť dynamické (ochladzovanie alebo zahrievanie) alebo statické (pri konštantnej teplote v závislosti na čase). Podľa vlastnosti, ktorej zmena sa mení s teplotou sa nazýva i príslušná analýza [13]. Jednotlivé metódy sa nachádzajú v tabuľke 1.

**Tabuľka 1:** Metódy termickej analýzy [13]

Metóda	Sledovaná vlastnosť	Označenie
Termogravimetrická analýza	hmotnosť	TG
Diferenčná termická analýza	rozdiel teplôt	DTA
Diferenčná kompenzačná kalorimetria	entalpia a tepelný tok	DSC
Termomechanická analýza	rozmer a mechanické vlastnosti	TMA
Termooptometria	optické vlastnosti	TOA
Termoakustická analýza	akustické vlastnosti	-

Väčšina metód zaznamenáva príslušné vlastnosti látky ako dynamickú funkciu teploty. Základným dôležitým javom pre túto metódu je zmena entalpie ( $\Delta H$ ). Fyzikálne a chemické zmeny vieme charakterizovať zmenou Gibbsovej voľnej energie ( $\Delta G$ ), ktorá je daná vzťahom:

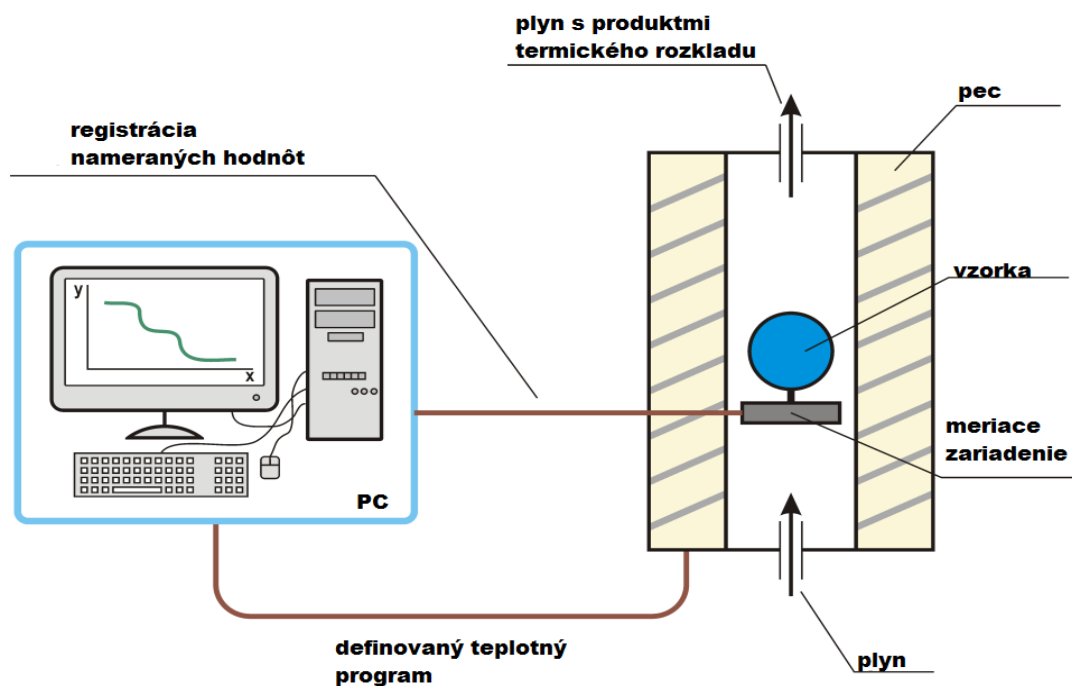
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S, \quad (1)$$

kde  $\Delta H$  je zmena entalpie,  $T$  je absolútna teplota a  $\Delta S$  je zmena entropie počas procesu. Každý systém sa snaží dosiahnuť stav s nižšou hodnotou Gibbsovej voľnej energie [13]. Ako príklad môžeme uviesť modifikačnú premenu látky z jednej kryštalickej formy do druhej, ktorá má za danej teploty nižšiu hodnotu Gibbsovej voľnej energie a je stabilnejšia. K vytvoreniu kryštalickej štruktúry alebo iného stavu s nižšou hodnotou voľnej energie môže dôjsť pri ohreve i cez jednotlivé medzistupne [14]. Vďaka širokému rozsahu merania sa termická analýza používa pri základnej charakterizácii materiálov, vo výskume, vývoji a kontrole kvality v priemysle a vo vedeckom odvetví [15].

## 2.2.2 Základná inštrumentácia

Termické analyzátory majú pre jednotlivé metódy spoločné všeobecné vlastnosti a skladajú sa z nasledujúcich častí:

- zdroj tepla – pec z tepelne odolného materiálu, napr. kremeň, korund, MoSi alebo grafit, ktorá je podľa zadaného programu elektricky ohrievaná
- meriace zariadenie (termočlánok, termováha), ktoré zaznamenávajú zmenu vlastností sledovanej látky vo forme elektrického signálu, súčasťou zariadenia je držiak a nosič – kelímok pre umiestnenie vzorky, systém je nastavený podľa príslušnej analýzy
- vstup nosného plynu a výstup plynných produktov tepelného rozkladu s nosným plynom (v prípade dynamickej pecnej atmosféry plyn prechádza pecou definovanou rýchlosťou, podľa typu nosného plynu sa rozlišuje pecná atmosféra tj. atmosféra vo vnútri pece v okolí vzorky na oxidačnú – vzduch, redukčnú – vodík, inertnú – dusík alebo argón; bez použitia nosného plynu je atmosféra nemenná tj. na začiatku merania je tvorená vzduchom, následne behom analýzy sa zvyšuje obsah plynných produktov, hovoríme o atmosfére statickej)
- počítač – zaznamenáva a spracováva namerané hodnoty [14]



Obrázok 2: Všeobecná schéma termického analyzátora [12]

Všeobecne experiment prebieha nasledovne: vzorka v kelímku je umiestnená v peci, ktorá je vyplnená nastavenou atmosférou na meriacom zariadení, pričom teplota pece je naprogramovaná experimentátorom pomocou teplotného programu a príslušné meriacia zariadenie taktiež komunikuje s počítačom, ktorým sú zaznamenané namerané hodnoty a pripravené k interpretácii pomocou softvéru.

### 2.2.3 Výsledok termickej analýzy

Výsledok TA je zaznamenaný pomocou termoanalytickej krivky, kde študovaná vlastnosť je graficky znázornená ako funkcia teploty. K podrobnému popisu termoanalytických kriviek slúžia pojmy:

- baseline (základná línia) – odpovedá nulovému rozdielu danej veličiny medzi meranou a referenčnou vzorkou
- plato – pozorujeme na termogravimetrickej krivke, je to oblasť termickej stability meranej vzorky, kedy sa jeho hmotnosť nemení
- pík – znázorňuje rozdiel danej vlastnosti (napr. teplota u DTA alebo tepelný tok u DSC) medzi meranou a referenčnou vzorkou, kedy v dôsledky exotermických a endotermických dejov prebiehajúcich v meranej vzorke odlišný priebeh v porovnaní so základnou líniou
- zlom – hmotnostný úbytok alebo hmotnostný nárast – oblasť zmeny hmotnosti [14].

### 2.2.4 Diferenčná kompenzačná kalorimetria

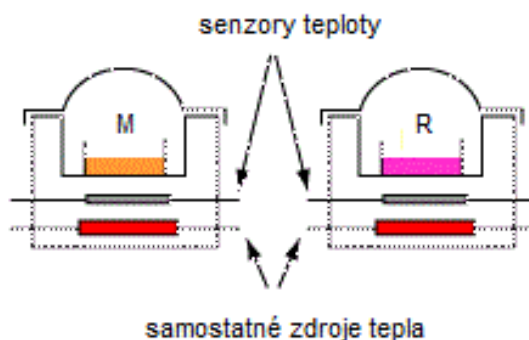
Diferenčná kompenzačná kalorimetria (DSC) je jednou z najpoužívanejších metód termickej analýzy, ktorá má široké využitie v mnohých odvetviach [15]. V roku 1964 vznikol prvý komerčný DSC prístroj [16] a zaviedla sa nomenklatúru diferenčná kompenzačná kalorimetria, ktorá sa niekedy prekladá aj ako diferenčná skenovacia kalorimetria. Princípom prístroja bolo udržiavanie nulového teplotného rozdielu medzi vzorkou meranou a referenčnou, a to kompenzáciou elektrickej energie buď do meranej alebo referenčnej vzorky, v závislosti na tom, či bola meraná vzorka zahrievaná alebo chladená lineárnou rýchlosťou [13]. Pomocou DSC sú študované tepelné vlastnosti látok a materiálu. DSC sa používa pri výrobe skla, keramiky, farmaceutík, plastov, polymérov, potravín atď. Najčastejšie deje, ktoré sa pomocou DSC sledujú sú: topenie, kryštalizácia, teplota skelného prechodu, oxidačná stabilita atď [14].

Princíp metódy je, že vzorka sa lineárne ohrieva a meria sa rýchlosť tepelného toku vo vzorke, ktorý je úmerný okamžitému meranému teplu. Vo vnútri meraného plášťa, ktorý má izbovú teplotu, sú ponorené dve symetrické nádoby. Ako primárna teplotná kontrola slúži odporový teplomer a ohrevný člen zabudovaný v nosiči vzorky. Sekundárny teplotný kontrolný systém meria teplotnú diferenciu medzi obidvomi nosičmi a tento rozdiel upravuje na nulový rozdiel kontrolou tepelného prúdu, ktorý je meraný. Teplota vzorky je udržiavaná izotermálne so vzorkou referenčnou dodávaním tepla do vzorky referenčnej. Množstvo tepla je zapisované v závislosti na teplote alebo na čase. Použitím malého množstva vzorky, ktorá je umiestnená na kovových fóliach sa znižuje tepelný spád na minimum. Celý systém má malú tepelnú kapacitu, čo umožňuje použiť veľké rýchlosti ohrevu a zaisťuje veľkú rozlišovaciu schopnosť. Množstvo uvoľneného tepla je úmerné množstvu elektrickej energie, ktorá bola spotrebovaná na zahriatie referenčnej vzorky. Hovoríme teda o kalorimetrickej metóde [17].

### DSC s kompenzáciou príkonu

Podstatou DSC s kompenzáciou príkonu je udržanie nulového teplotného rozdielu medzi meranou a referenčnou vzorkou. Ak dôjde k teplotnému rozdielu medzi vzorkami napr. kvôli fázovej zmene, energia je dodávaná do vzorky až do doby, kedy teplotný rozdiel nie je menší ako prahová hodnota ( $<0,01\text{ K}$ ) [18]. Energia je do vzorky meranej alebo referenčnej dodávaná lineárnou rýchlosťou. Množstvo tepla potrebné na udržanie nulového teplotného rozdielu je zaznamenané ako funkcia teploty. Zvýšenie entalpie má za následok endotermický prechod, ktorý je na DSC krivke naznačený píkom smerom nahor (energia je dodávaná do vzorky), naopak zníženie entalpie, exotermický prechod, je naznačený píkom smerom nadol [13].

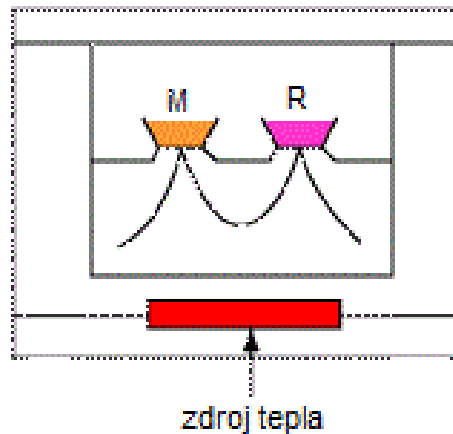
Základom sú dve oddelené kalorimetrické cely, ktoré sú dokonale izolované, aby sa zabránilo tepelnému toku medzi vzorkami a dve samostatné tepelné zdroje. Jeden zdroj je kontrolný, ktorý meria priemernú teplotu vzorky a automaticky vyrovnáva tepelný výkon tak, že sa priemerná teplota vzorky zvyšuje lineárne. Druhý zdroj je riadiaci a zaznamenáva rozdiel teplôt medzi meranou a referenčnou vzorkou, určuje, ktorá zo vzorky má vyššiu teplotu a automaticky kompenzuje tieto teplotné rozdiely [14]. Rýchlosť zahrievania je rovnaká, ak v meranej vzorke nedochádza k žiadnej zmene. Pokiaľ v meranej vzorke dôjde k endotermickému deju, zvýši sa prísun energie do meranej vzorky, a tým sa zvýši teplota meranej vzorky na hodnotu teploty referenčnej vzorky. Naopak, ak je dej exotermický, teplota meranej vzorky je vyššia ako referenčnej, preto sa dodáva menej energie meranej vzorke aby došlo k vyrovnaniu ich teplôt. V oboch prípadoch sa teplota udržuje vďaka kompenzácii príkonu. Meranou veličinou je elektrický príkon, ktorý je potrebný k udržaniu konštantnej teploty medzi obidvomi vzorkami. Toto usporiadanie umožňuje veľmi citlivé i veľmi rýchle zmeny teploty a je vhodné pre izotermálne deje [12].



**Obrázok 3:** Schéma DSC analyzátoru s kompenzáciou príkonu [19]

### DSC s tepelným tokom

Pri DSC s tepelným tokom sú referenčná i meraná vzorka v jednej kalorimetrickej cele umiestnené na samostatných teplotných čidlách a sú spojené tepelným mostom. Meranie rozdielu príkonu je nahradené meraním rozdielu teplôt meranej a referenčnej vzorky. V meranej vzorke dochádza k zmene teploty pôsobením endotermického alebo exotermického prechodu, ktorý má za následok rozdiel teploty medzi vzorkami. Teplota referenčnej aj meranej vzorky sa meria nepretržite. Ak meraná vzorka aj referenčná vzorka reagujú na teplotný program rovnakým spôsobom, tepelný tok oboch vzoriek ostáva konštantný. Zároveň je konštantný i teplotný rozdiel medzi dvomi bodami merania [12].



**Obrázok 4:** Schéma DSC analyzátoru s tepelným tokom [19]

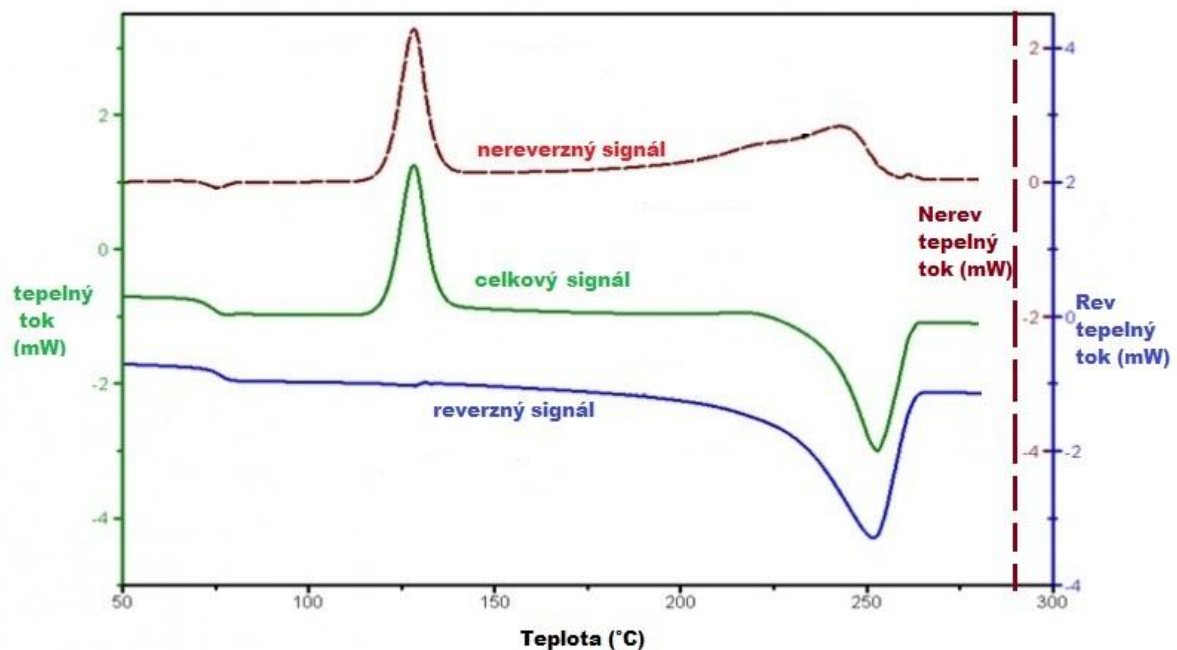
Toto usporiadanie umožňuje, aby elektromotorická sila bola priamo úmerná množstvu strateného tepla meranou a referenčnou vzorkou. Meraním sa získa rozdiel teplôt medzi vzorkami ako funkcia času. Výhodou tejto metódy je ľahká manipulácia a priame meranie, a to aj v prípade odplynených vzoriek. Výsledná krivka má stabilnú základnú líniu a umožňuje tak meranie skleného prechodu [13].

## 2.2.5 Teplotne modulovaná diferenčná kompenzačná kalorimetria

V roku 1993 Reading s kolektívom zaviedli teplotne modulovanú diferenčne kompenzačnú kalorimetriu (TMDSC), ktorej názov vtedy bol modulovaná DSC [20]. Podarilo sa im popísať tepelný tok vo vzorke, ku ktorému dochádza v dôsledku sínusovej modulácie teploty,

$$dq/dt = C_s\beta + f(t, T) \quad (2)$$

Výraz  $C_s\beta$  predstavuje časť tepelnej kapacity z celkového tepelného toku. Predpokladá sa, že tento signál je súčasťou periodicky meniacej sa rýchlosti ohrevu a je označovaný ako vratný signál. Výraz  $f(t, T)$  sa označuje ako nevratný signál, ktorý je kinetickým členom celkového tepelného toku. Medzi kinetické procesy, ktoré môžeme pomocou nereverzného signálu určiť je napr. kryštalizácia, rozklad, vyparovanie, atď [21]. Tepelný tok je zložený z dvoch častí, pričom jedna časť je spôsobená ohrevom vzorky a druhá časť je spôsobená prebiehajúcimi fázovými prechodmi. DSC je schopné merať len celkovú sumu tepelného toku, zatiaľ čo TMDSC je schopné tieto dve zložky oddeliť na reverznú a nereverzную časť (obrázok 5). Celkový tepelný tok sa vypočíta ako priemer nameraných hodnôt modulovaného tepelného toku použitím Fourierovej transformácie. Reverzný signál celkového tepelného toku sa vypočíta z reverznej tepelnej kapacity. Použitím Fourierovej transformácie vypočítame veľkosť amplitúdy a rýchlosť ohrevu. Rozdielom celkového tepelného toku a reverznej složky získame nereverzную signál celkového tepelného toku [22].



Obrázok 5: Krivka TMDSC [18]

Princíp merania TMDSC sa líši od klasickej DSC v tom, že TMDSC používa dve súbežné rýchlosti ohrevu – lineárny (priemerný) ohrev, ktorý poskytuje informácie ako klasická DSC a sínusovú alebo modulovanú rýchlosť ohrevu, ktorá umožňuje simultánne meranie tepelnej kapacity vzorky. Pri všetkých TMDSC je signál odvodený z troch meraných parametrov a to čas, modulovaná teplota (ako stimulátor) a modulovaný tepelný tok (ako odozva) [17].

## Výhody TMDSC

- vzrast citlivosti pri detekcii skleneného prechodu
- zvýšenie rozlišovacích schopností – proces prebieha vlastne pri dvoch rýchlostiach naraz
- schopnosť oddeliť procesy so zmenou kapacity a kinetické procesy
- reverzná zložka je vhodná pre meranie entalpickej relaxácie, odparovania, kryštalizácie, rozkladu a niektorých typov topenia
- schopnosť merať zmenu tepelnej kapacity i v priebehu reakcie (fázového prechodu)
- lepšia interpretácia kryštalizačného procesu a kryštalickej štruktúry u semikryštalických polymérov
- identifikácia rekryštalizácie i v priebehu topenia
- meranie veľmi nízkych tepelných vodivosti [17].

Pri použití TMDSC musíme zohľadniť výber optimálnych hodnôt a to periódy, amplitúdy a základnej rýchlosti ohrevu. Perióda je udávaná v sekundách a je to čas, ktorý odpovedá jednému cyklu modulácie. Perióda musí byť dostatočne dlhá, aby za zvolený čas bolo možné kvantitatívne meranie tepelného toku medzi referenčnou a meranou vzorkou. Použitá základná rýchlosť ohrevu musí byť čo najrýchlejšia aby bola schopná zvýšiť produktivitu, ale zároveň musí byť dostatočne pomalá aby sme získali minimálny počet modulovaných cyklov v teplotnom rozsahu prechodu. Pri prechode musia byť minimálne štyri modulované cykly. Zmenu sínusovej teploty udáva amplitúda, ktorou oscilujeme okolo základnej rýchlosti ohrevu. Väčšie hodnoty amplitúdy dávajú väčšie zmeny v rýchlosti ohrevu a to spôsobuje nárast citlivosti pri zaznamenaní prechodov zahrňajúcich zmenu tepelnej kapacity. Vo väčšine experimentov sa amplitúda volí tak aby počas modulácie bola vzorka buď chladená bola alebo len zahrievaná [22]. Podľa toho či vzorku zahrievame alebo chladíme rozlišujeme tak tri módy merania:

- *heat-only* – vzorka je len zahrievaná. V móde *heat-only* je amplitúda malá a rýchlosť zahrievania je vždy pozitívna, tj. vzorka sa počas merania len zahrieva a nikdy sa nechladí. Výhodou tohoto módu je, že všetky procesy, ktoré sa vyskytujú iba počas chladenia vzorky sú potlačené a zostávajúce procesy sa dajú ľahšie vyhodnotiť. Nevýhodou je zlý pomer signálu k šumu.
- *heat-cool* – vzorka je zahrievaná a chladí sa. Amplitúda je veľká, ale je v súlade so základnou rýchlosťou ohrevu, rýchlosť zahrievania sa mení periodicky a vzorka je pravidelne zahrievaná a chladená. Výhodou tohto módu je pomerne veľká rýchlosť ohrevu a dobrý pomer signálu k šumu, čo je obzvlášť užitočné ak máme malú hmotnosť vzorky. Nevýhodou je, že vzorka sa zahrieva a ochladzuje počas merania, čo môže spôsobiť problém v niektorých prípadoch napr. pri polyméroch, kde sa môžu vyskútnuť odlišné procesy v časti zahrievania a chladenia.
- *heat-iso* – vzorka sa zahreje a chvíľu sa drží pri konštantnej teplote. Rýchlosť ohrevu sa periodicky mení medzi základnou rýchlosťou ohrevu, amplitúdou a nulou. Tento mód má maximálny pomer signálu k šumu ale bez chladenia vzorky [23].



Voľba amplitúdy pre jednotlivé módy závisí od rýchlosti ohrevu a periódy. V tabuľke 2 môžeme vidieť jednotlivé amplitúdy pri perióde od 40 do 100 sekund a rýchlosti ohrevu od 0,1 do 5 °C/min.

**Tabuľka 2:** Amplitúdy pre jednotlivé rýchlosti ohrevu a periódy (*heat-iso* mód)

rýchlosť ohrevu [°C/min]	perióda [s]							
	40	50	60	70	80	90	100	
0,1	0,011	0,013	0,016	0,019	0,021	0,024	0,027	
0,2	0,021	0,027	0,032	0,037	0,042	0,048	0,053	
0,5	0,053	0,066	0,08	0,093	0,106	0,119	0,133	
1,0	0,106	0,133	0,159	0,186	0,212	0,239	0,265	
2,0	0,212	0,265	0,318	0,371	0,424	0,477	0,531	
5,0	0,531	0,663	0,796	0,928	1,061	1,194	1,326	

V prvom kroku sa zvolí perióda a základná rýchlosť ohrevu, ktoré budú používané pri všetkých experimentoch. Ak chceme použiť pri meraní *heat-iso* mód, použitú amplitúdu použijeme priamo z tabuľky. Napr. pri rýchlosti ohrevu 2 °C/min a perióde 60 sekund je amplitúda pre *heat-iso* mód 0,318 °C. Ak je zvolený *heat-cool* mód, pri každej väčšej amplitúde bude dochádzať k chladeniu počas modulácie. Naopak je to pri *heat-only*, kde amplitúda je menšia ako pri *heat-iso* móde [22].

## 2.2.6 Kvázi-izotermálna teplotne modulovaná diferenčná kompenzačná kalorimetria.

Kvázi-izotermálna teplotne modulovaná diferenčná kompenzačná kalorimetria (QiTMDSC) je jednou z variant klasickej TMDSC. Pri QiTMDSC je základná rýchlosť ohrevu rovná nule a teplota sa mení okolo konštantnej teploty. Termín kvázi znamená, že systém nie je naozaj izotermický, pretože teplota osciluje okolo nastavenej teploty [24]. Tepelná kapacita sa merania ako funkcia času pri akejkoľvek konkrétnej teplote. V dôsledku merania zmeny tepelnej kapacity môžeme pozorovať fyzikálne zmeny merané ako funkcia času [25]. Kvázi-izotermálna technika je obzvlášť silná, pretože umožňuje sledovanie kinetických javov v reálnom čase alebo sa môže použiť na identifikáciu základných termodynamických parametrov vzorky. Výhodou tejto metódy je možnosť určiť tepelnú kapacitu a to aj v izotermickom prípade, ktorý inak nie je možné určiť [24].

### 3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

#### 3.1 Denaturácia proteínov

Prechod proteínu z natívnej do denaturovanej formy je dôležitý v klinickom, farmaceutickom a potravinárskom výskume a vývoji. K štúdiu sa najčastejšie používajú metódy termickej analýzy a to najmä diferenčná kompenzačná kalorimetria.

G. Marshall a kolektív študovali tepelnú stabilitu a denaturáciu hemocyanínu pomocou DSC. Experiment vychádzal z predokladu, že denaturácia hemocyanínu je nevratná. Nevratnosť denaturácie bola potvrdená reddenaturáciou, kde krivka nevykazovala žiadnu endotermiu. Pomocou vysoko rozlišovacej DSC autori zistili, že denaturácia prebieha v dvoch krokoch a je pod kinetickou kontrolou [26].

Kolektív J.-L. Si sledovali vplyv chloridu sodného na denaturáciu aktomyozínu. Koncentrácia soli mala významný vplyv na stabilitu aj na denaturáciu aktomyozínu. Pri zvýšení koncentrácie chloridu sodného sa znížila aktivita Ca-ATPázy, zvýšila sa povrchová hydrofobicita aktomyozínu so súčasným zvyšovaním koncentrácie chloridu sodného. Pomocou DSC sledovali denaturáciu a z výsledkov plynie, že zvyšovanie koncentrácie chloridu sodného viedlo k posunu prechodovej teploty a k zníženiu plochy píku [27].

X. Cao a kolektív sa vo svojej práci zaoberali vplyvom močoviny na denaturáciu hovädzieho sérového albumínu (BSA). Denaturácia bola zaznamenávaná pomocou DSC. Meranie prebiehalo v dvoch cykloch pri jednej vzorke. Prvý cyklus v prítomnosti aj bez prídavku močoviny vykazoval prítomnosť jedného endotermického prechodu medzi 65 až 87 °C a 57 až 82 °C. Denaturácia BSA bola vždy ireverzibilná, pretože v druhom cykle nebol na krivke pozorovaný žiadny tepelný. Výsledok bol potvrdený po extrahovaní vzorky z kalorimetrickej cely, kedy vzorka už po prvom cykle bola vo forme želatíny, čo znamenalo, že došlo k nereverznej denaturácii. Zároveň zistili, že močovina urýchlila proces denaturácie BSA a znížila tak tepelnú a kinetickú stabilitu BSA [28].

Okrem metód termickej analýzy sa na štúdium denaturácie používajú aj spektroskopické metódy ako sú napr. infračervená spektroskopia, nukleárna magnetická rezonancia alebo cirkulárny dichroizmus. Pomocou týchto metód môžeme zároveň charakterizovať štruktúrne zmeny vrátane fázových prechodov proteínov.

A. Giugliarelli a kolektív skúmali tepelnú denaturáciu lyzozýmu v roztoku voda/DMSO (dimetylsulfoxid) pomocou infračervenej spektroskopie. Postupným zvyšovaním koncentrácie DMSO sa znižovala teplota topenia. Výsledky z infračervenej spektroskopie sa zhodujú s kalorimetrickými hodnotami zo štúdie Kamiyama a zároveň potvrdzujú, že denaturácia lyzozýmu pôsobením DMSO je vratná [29].

V štúdiu D. Mallamace a kolektívu použili infračervenú spektroskopiu k objasneniu mikroskopického mechanizmu, ktorý zasahuje do nevratnosti bielkoviny. Sledovali tepelný vývoj hlavných amidových vibračných módov hydratovaného lyzozýmu smerom k jeho tepelnej denaturácii. Zaznamenávali vibračné módy Amid I a II ako funkciu teploty. Tieto módy obsahujú informácie o štruktúrnej konformácii proteínu. Z výsledkov zistili, že v natívnom stave proteínu k absorpcii žiarenia prispieva v móde Amid II N-H vibračný ohyb a v oblasti módu Amid I je absorpcia žiarenia z  $\alpha$ -helixu. Keď dochádza k rozvíjaniu proteínu hlavný prínos v režime Amid II naopak pochádza z C-N vibrácií. Molekuly vody strácajú schopnosť stabilne sa viazať s rôznymi proteínovými zvyškami, pretože životnosť vodíkových väzieb klesá so zvyšovaním teploty. V oblasti módu Amid I došlo k poklesu prínosu z  $\alpha$ -helixu a k nárastu  $\beta$ -listov. Začína sa proces agregácie, pri ktorom sa  $\alpha$ -helix transformuje na  $\beta$ -listy, ktoré majú tendenciu samoagregácie [30].

V štúdiu M. Wolz a U. Kulozika pomocou NMR sledovali kinetiku denaturácie srvátkových bielkovín, ktorých koncentrácia bola až do 40 hmot. %. Z výsledkov plynie, že rýchlosť denaturácie sa zvyšuje so zvyšujúcou sa teplotou. Môžeme to vysvetliť silným vplyvom teploty na proces rozvíjania. Rýchlosť tepelnej denaturácie sa zvýšila s vyššou koncentráciou proteínu pravdepodobne v dôsledku zvýšenej pravdepodobnosti kolízie medzi molekulami srvátkových proteínov. Zvýšená koncentrácia má vplyv na stupeň denaturácie, ktorý sa zvýšil so zvýšením koncentrácie srvátkového proteínu [31].

S. R. Tello-Solís a B. Romero-García študovali tepelnú denaturáciu pepsínu pomocou spektroskopie cirkulárneho dichroizmu. Z výsledkov je patrné, že denaturácia je silne závislá na rýchlosti zahrievania ako sa očakáva pri kineticky kontrolovanom procese rozvinutia. Denaturácia sa javí ako nevratná a experimentálne bola preukázaná existencia rozvinutého stavu v rovnováhe s natívnym stavom. Na vysvetlenie rovnováhy medzi rozvinutým a natívnym stavom uvažovali o modeli Lumry-Eyringa, ktorý zohľadňuje prítomnosť rozvinutého stavu medzi natívnym a denaturovaným stavom [32].

### **3.2 Využitie teplotne modulovanej diferencnej kompenzačnej kalorimetrie v praxi**

Teplotne modulovaná DSC má široké využitie čo potvrdzuje aj množstvo publikácií. Pomocou TMDSC môžeme skúmať tepelné vlastnosti materiálov. Používa sa k zaznamenávaniu teploty skleneného prechodu, ktorý je spojený so zmenou vnútornej štruktúry materiálu, čo sa prejaví na mechanických vlastnostiach a na tepelnej kapacite, ktorá sa používa pri meraní.

M. Kotera a kolektív použili TMDSC pri sledovaní imidačného procesu v aromatickom polyimide a jeho vplyv na teplotu skleneného prechodu. Spracovania polyimidu zahŕňa súbežnú imidizáciu, vyparovanie zvyškov rozpúšťadla a kryštalizáciu. Meraním bolo zistené, že na teplotu skleneného prechodu má vplyv samotná premena polyakrylovej kyseliny na polyimid i zvyškové rozpúšťadlo, ktoré sa neodparilo pri cyklizácii. Poukázali, že TMDSC je užitočná metóda pre analýzu imidačných procesov [33].

S. Bulut a Ch. Schick vo svojej štúdiu sledovali želatináciu škrobu v nadbytku glycerolu pomocou TMDSC. Cieľom experimentu bolo detekovať amorfné frakcie, ktoré zostávajú skelné v nadbytku glycerolu a môžeme ich nazvať ako „tuhé amorfné“ frakcie škrobu. Podľa experimentu určili, že sklený prechod prebieha vo viacerých krokoch. V prvom stupni sa plastifikuje amorfná časť škrobu a v druhom stupni sa plastifikujú tuhé amorfné frakcie škrobu [34].

X. Hu a kolektív skúmali miesiteľnosť zmesi hodváb-tropoelastín a makrofázové interakcie pomocou TMDSC. Z výsledkov je vidieť, že k miešaniu zmesi dochádza čo potvrdzuje výskyt jednej teploty skleneného prechodu pre miesiteľnú zmes proteínov, ktorá je umiestnená medzi teplotami skleneného prechodu oboch proteínov. Miesiteľnosť je možná vďaka hodvábu, ktorý tvorí vodíkové väzby a tým sa stáva miesiteľný s tropoelastínom v rôznych pomeroch zmesi bez makrofázovej separácie [35].

Okrem teploty skleneného prechodu môžeme pomocou TMDSC zaznamenať endotermické a exotermické deje. Príkladom endotermického deja je tavenie, kde z krivky TMDSC môžeme určiť teplotu tavenia. Kryštalizácia je naopak typickým príkladom exotermického deja, kde teplota kryštalizácie sa určuje v lokálnom minime píku.

Chih-Lung Wei a kolektív použili TMDSC k objasneniu prítomnosti dvojitého píku pri tavení polyéteréterketónu (PEET). Vzorky PEET boli izotermálne kryštalizované v teplotnom rozmedzí 280 a 320 °C po dobu 10 minút a potom zahriaté na teplotu 380 °C. Z výsledkov plynie, že exotermické správanie v nereverznej krivke podporuje mechanizmus

rekryštalizácie v priebehu tavenia. Vzhľadom k tomu, že sa teplota izotermickej kryštalizácie postupne zvyšovala, je príspevok rekryštalizácie v priebehu tavenia postupne nižší až úplne zmizne. Pri 320 °C nebol pozorovaný žiadny exotermický tok pri teplote píku čo podporuje mechanizmus dvoch odlišných štruktúr. Zároveň platí, že pôvodný pík je zodpovedný za topenie primárnych kryštálov [36].

W. Chen a kolektív pomocou TMDSC študovali kinetiku kryštalizácie polyester-imidu. Pri svojej práci vychádzali z návrhu pána Toda a kolektívu [37]. Podľa získaných experimentov zhodnotili, že TMDSC je vhodná metóda k sledovaniu kryštalizácie polymérov [38].

M. C. Righetti a E. Tombari použili TMDSC k štúdiu kinetiky rastu kryštalických a tuhých amorfných frakcií kyseliny poly-L-mliečnej. Experiment bol zaznamenaný počas neizotermickej a kvazi-izotermickej kryštalizácie. Výsledky boli zaznamenané paralelne, boli porovnané a prediskutované aby sa overila možná existencia všeobecného pravidla pre vývoj tuhej amorfnej frakcie počas kryštalizácie kyseliny poly-L-mliečnej. Porovnaním výsledkov neizotermickej a kvazi-izotermickej kryštalizácie dospeli k záveru, že relatívne množstvá troch frakcií kyseliny poly-L-mliečnej (kryštalická, pohyblivá amorfná a tuhá amorfná) závisia od teploty, pri ktorej dochádza ku kryštalizácii. Zistili, že tuhá amorfná frakcia rastie paralelne s kryštalickou frakciou počas kvazi-izotermickej kryštalizácie pri 90 °C, zatiaľ čo pri 130 °C sa začína objavovať približne v súlade so sekundárnou kryštalizáciou. Pri 135 °C sa tuhá amorfná frakcia prakticky nevyvíja. V prípade neizotermickej kryštalizácii sa tuhá amorfná frakcia vyvíja súčasne so sekundárnou kryštalizáciou. Výsledky dokazujú, že vývoj tuhej amorfnej frakcie počas kryštalizácie závisí od mobility reťazcov, pretože mobilita je úzko spojená s teplotou: čím je mobilita nižšia, tým je vyššia pravdepodobnosť, že tuhá amorfná frakcia sa rozvíja počas prvého stupňa kryštalizácie [39].

## 4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

V experimentálnej časti bol použitý lyzozým v práškovej forme od firmy Sigma Aldrich, Co.

### 4.1 Príprava vzorky

Vzorky boli pripravené pre každé meranie a pre každú metódu rovnakým postupom. Pri príprave vzorky som vychádzala z článku [40]. Lyzozým (20 mg/ml) bol rozpustený v 3 ml fosfátového pufru o pH 7,4. Vzorky boli odplynené v sklenenej injekčnej striekačke pod ručne vytvoreným vákuom.

### 4.2 Kalorimetrické merania

Na kalorimetrické meranie bol použitý prístroj DSC Q2000, TA Instruments, DE. Prístroj bol kalibrovaný podľa predpísaného postupu pred každým meraním rovnakým postupom. Ako referenčný materiál pri kalibrácii bola použitá prázdna hliníková panvička. Na kalibráciu teploty a entalpie bola použitá destilovaná voda a ako štandard bolo použité indium. Tepelná kapacita bola kalibrovaná pomocou safirového disku. Namerané data boli spracované softverom Universal Analysis 2000.

#### 4.2.1 Vplyv rýchlosti ohrevu

Po kalibrácii prístroja bola na analytických váhach navážená vzorka do hliníkovej panvičky, ktorá potom bola hermeticky uzavrená. Hmotnosť vzorky sa pohybovala v rozmedzí od 9,80 do 10,21 mg. Následne bola do meriacej cely vložená vzorka, ktorá bola lineárne ohrievaná v teplotnom rozmedzí od 25 °C do 100 °C s rôznou rýchlosťou ohrevu. Použité rýchlosti ohrevu boli 1, 2, 5 a 10 °C/min. Meranie bolo pri každej rýchlosti ohrevu zopakované trikrát vždy s novou vzorkou.

#### 4.2.2 Vplyv amplitúdy a periódy

Vzorka bola odvážená na analytických váhach s hmotnosťou od 5 do 10 mg. Meranie vzorky prebiehalo pri lineárnom ohreve, cez ktorý bola preložená sínusová teplotná modulácia. Vzorka bola zahrievaná v teplotnom rozmedzí od 10 do 100 °C. Meranie prebiehalo pri dvoch periódach (60 s a 100 s) a troch módoch, ktorým odpovedajú príslušné amplitúdy (tabuľka 3). Meranie bolo pri každej amplitúde a perióde zopakované trikrát vždy s novou vzorkou.

Tabuľka 3: Postup merania

rýchlosť ohrevu	2 °C/min		
	perióda	mód	
amplitúda		60 s	100 s
	<i>heat-only</i>	± 0,159 °C	± 0,265 °C
	<i>heat-iso</i>	± 0,318 °C	± 0,53 °C
	<i>heat-cool</i>	± 0,636 °C	± 1,06 °C

#### 4.2.3 Kvazi-izotermálna teplotne modulovaná diferenčná kompenzačná kalorimetria

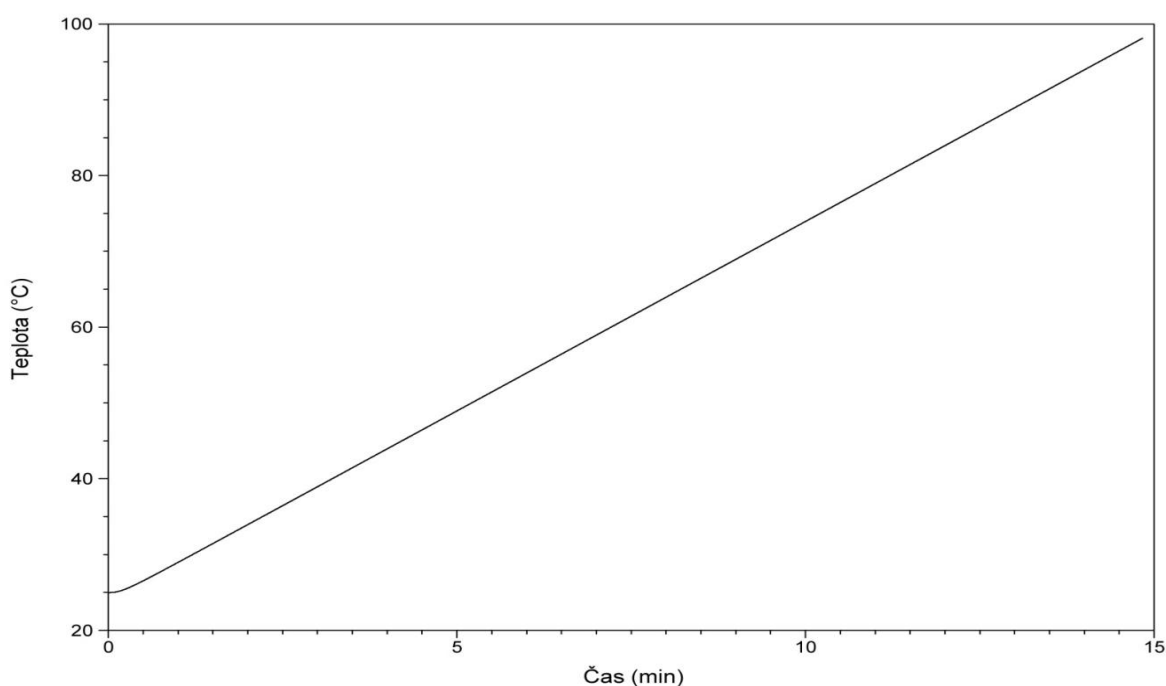
Vzorka bola opäť odvážená na analytických váhach a vložená do meriacej cely. Vzorka bola ohrievaná v teplotnom rozmedzí od 40 do 90 °C s teplotným prírastkom 1 °C a moduláciou ±1 °C/60s. Teplota bola udržiavaná izotermicky po dobu 10 minút.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Rastúci záujem o metódy termickej analýzy pri sledovaní fyzikálnych vlastností materiálov vyvoláva otázku, aké fyzikálne-chemické zmeny môžeme pomocou týchto metód sledovať a zo získaných nameraných dát vyhodnotiť. Mojim cieľom preto bolo otestovať dostupné metódy, ktoré sa nachádzajú na Fakulte chemickej VUT Brno, z nameraných výsledkov vyhodnotením získať parametre, ktoré pri danej metóde vieme získať a optimalizovať jednotlivé metódy k štúdiu denaturácie proteínov.

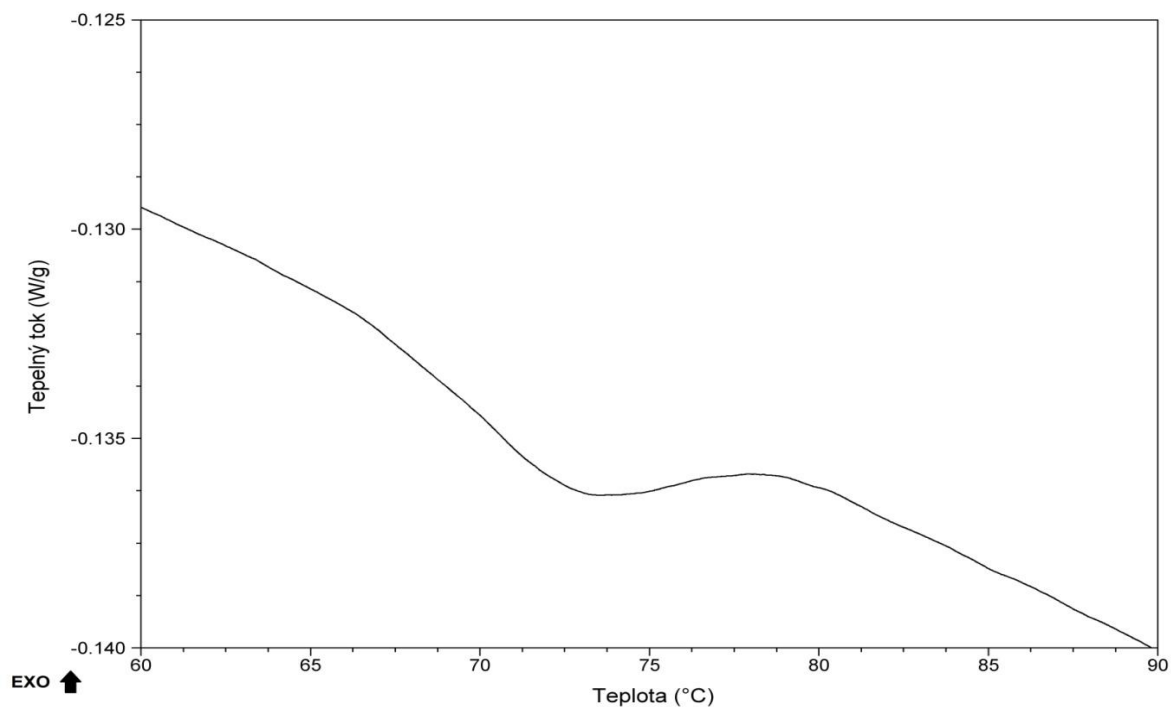
### 5.1 Diferenčná kompenzačná kalorimetria

Diferenčná kompenzačná kalorimetria bola použitá pri sledovaní vplyvu rýchlosti ohrevu na denaturáciu lyzozýmu a ku charakterizácii samotnej denaturácie. Pri DSC je zahrievanie lineárne čo môžeme vidieť na obrázku 6, na ktorom je znázornená závislosť nastaveného teplotného programu na čase. Z grafu vidíme, že teplotný program zahrievania bol nastavený od 25 do 100 °C a rýchlosť ohrevu bola 5 °C/min.



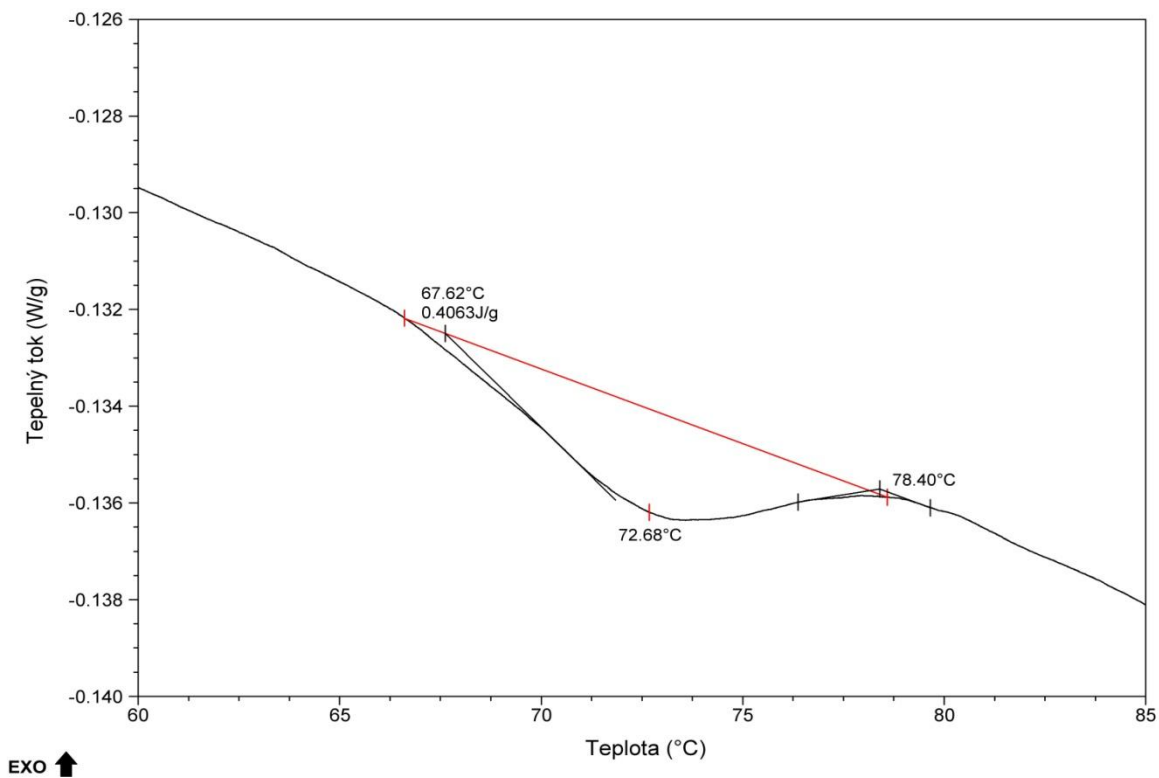
**Obrázok 6:** Závislosť teploty na čase pri rýchlosti ohrevu 5 °C/min

Pri zahrievaní sa vzorka denaturuje, čím dochádza k rozdielu teplôt medzi referenčnou a meranou vzorkou, preto musí dôjsť k teplotnému vyrovnaniu medzi vzorkami. Denaturáciu tak charakterizuje zmena tepelného toku, ktorá je úmerna teplu, ktoré bolo potrebné k vyrovnaniu teplôt. Výsledkom merania je závislosť tepelného toku na teplote (obrázok 7). Zo základnej závislosti sme schopný určiť aký dej pri danej zmene prebehol (exotermický/endotermický), charakteristickú teplotu toho deja (skleného prechodu, topenia, kryštalizácie, polymerizácie, degradácie, polymorfnej premeny atď) a množstvo dodaného/spotrebovaného tepla. Z výsledku merania, ktorý je zobrazený na obrázku 7 vidíme, že denaturácia lyzozýmu má endotermický charakter čo je naznačené píkom smerom nadol, keďže program vyhodnocuje meranie exotermického deju smerom nahor. Zároveň vidíme, že k denaturácii došlo približne pri teplote 72 °C.



**Obrázok 7:** Výsledok merania-závislosť tepelného toku na teplote pri rýchlosti ohrevu 2 °C/min

Zo závislosti tepelného toku na teplote vieme pomocou integrácie píku určiť hodnoty teploty onsetu (počiatočná teplota prechodu), píku, endsetu (konečná teplota prechodu) a množstvo tepla, ktoré bolo dodané na 1 gram vzorky. Ako môžeme vidieť na obrázku 8, integráciou sme určili teplotu onsetu na 67,62 °C, teplotu píku na 72,68 °C, teplotu endsetu na 78,40 °C a množstvo dodaného tepla bolo 0,4063 J/g vzorky čo odpovedá 20,315 J/g lyzozýmu.



**Obrázok 8:** Príklad vyhodnotenia píku pomocou integrácie s lineárnou základnou čiarou

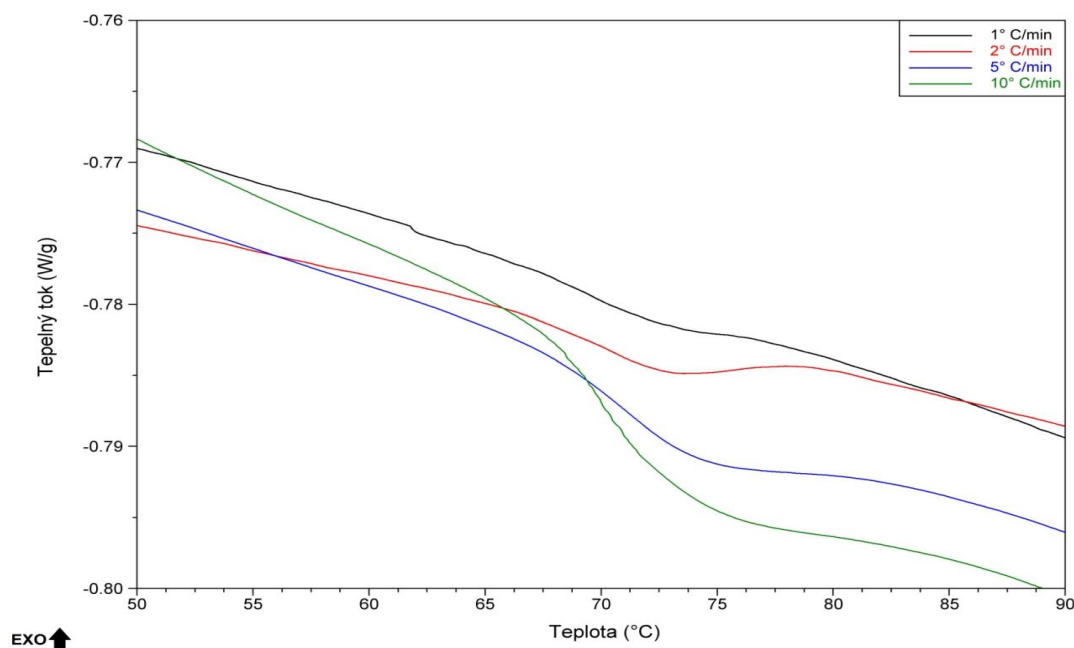
### 5.1.1 Vplyv rýchlosti ohrevu na priebeh denaturácie

K optimalizácii vybraných metód bolo potrebné porovnať vplyv vybraných rýchlostí ohrevu na priebeh denaturácie. Meranie pri rýchlostiach ohrevu 1 °C/min, 2 °C/min, 5 °C/min a 10 °C/min bolo zopakované pre každú rýchlosť trikrát. Výsledky z meraní boli v programe TA Instruments lineárne zintegrované a získané hodnoty boli v programe MS Excel štatisticky vyhodnotené. Vyhodnotené hodnoty priemerných teplôt onsetu, píku, endsetu a smerodajné odchylky sa nachádzajú v tabuľke 4.

**Tabuľka 4:** Vypočítaný priemer onsetu, píku, endsetu a smerodajnej odchylky pri vybraných rýchlostiach ohrevu

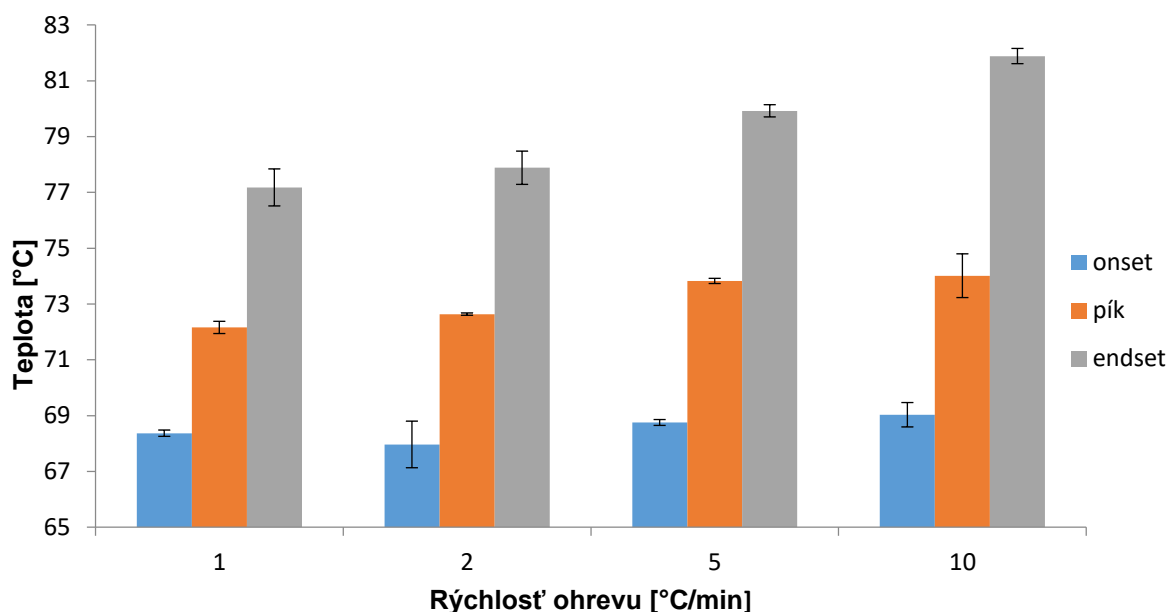
rýchlosť ohrevu [°C/min]	onset [°C]	$\sigma$ [°C]	pík [°C]	$\sigma$ [°C]	endset [°C]	$\sigma$ [°C]
1	68,37	0,11	72,16	0,22	77,18	0,66
2	67,97	0,84	72,64	0,04	77,88	0,60
5	68,75	0,11	73,83	0,09	79,92	0,22
10	69,03	0,44	74,01	0,78	81,89	0,27

Predpokladá sa, že s rastúcou rýchlosťou ohrevu sa teplota denaturácie posúva k vyšším teplotám a denaturačný pík zasahuje do väčšieho teplotného rozmedzia. Nasledujúce dva grafy popisujú závislosť tepelného toku vyjadreného na ose y na čase, ktorý je na ose x. Z porovnaných rýchlostí ohrevu môžeme vidieť, že predpoklad bol potvrdený a teploty onsetu, píku i endsetu sa postupne zvyšujú. Avšak pri rýchlosti ohrevu 2 °C/min je hodnota onsetu nižšia ako pri rýchlosti ohrevu 1 °C/min čo môže byť spôsobené tým, že voľba onsetu je čisto subjektívna a samotný začiatok prechodu nemusel byť presne určený. Pri rýchlostiach 5 °C/min (modrá krivka) a 10 °C/min (zelená krivka) dochádza k výraznejšiemu zahrievaniu a denaturačný pík zasahuje do širšieho teplotného rozmedzia. Čím rýchlejšie sa vzorka zahrieva, tým neskôr reaguje teplota na zmenu, preto sa teplota píku posúva ďalej od teploty, pri ktorej došlo k denaturácii.



**Obrázok 9:** Porovnanie vplyvu rýchlosti ohrevu na teplotu denaturácie





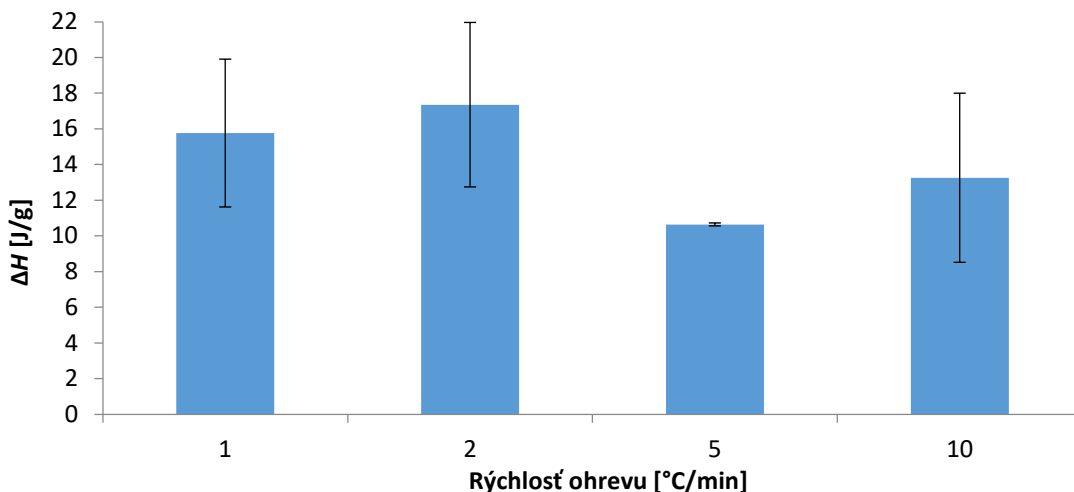
**Obrázok 10:** Porovnanie priemerných teplôt onsetu, píku a endsetu pri vybraných rýchlostiach ohrevu

Na obrázku 10 sú vynesené priemerné hodnoty v stĺpcovom grafe spolu so smerodajnými odchylkami. Pri onsete môžeme vidieť, že najväčšia odchylka je pri rýchlosti 2 °C/min a najmenšia pri 10 °C/min. Pri teplote píku je najväčšia pri 10 °C/min a najmenšia pri 2 °C/min. Rýchlosť ohrevu 1 °C/min má najväčšiu odchylku pri endsete a rýchlosť 5 °C/min má naopak najmenšiu odchylku. Vidíme, že jednotlivé odchylky sú najmenšie pri rýchlosti ohrevu 5 °C/min. Ako najvhodnejšia rýchlosť ohrevu bola zvolená rýchlosť ohrevu 2 °C/min, pretože odchylka píku bola najmenšia a z literárnej rešerše vieme, že denaturácia lyzozýmu je približne okolo teploty 72 °C, preto by pri vyšších rýchlostiach ohrevu mohlo dôjsť k nepresným výsledkom.

Okrem hodnôt teploty onsetu, píku a endsetu som integráciu získala množstvo tepla, ktoré bolo potrebné k denaturácii. Potrebné teplo bolo prepočítané na 1 gram lyzozýmu. Všetky hodnoty boli opäť v MS Excel spriemerované a boli určené smerodajné odchylky. V tabuľke 5 sú zobrazené priemerné hodnoty dodaného tepla prepočítaného na 1 gram lyzozýmu a ich smerodajné odchylky. Z výsledkou môžeme vidieť, že najviac tepla bolo dodaného pri rýchlosti 2 °C/min. Zároveň vidíme, že samotná odchylka je veľmi veľká čo sa odvíja od veľkosti odchýliek pri priemerných teplotách onsetu a endsetu. Najmenej tepla bolo dodané pri rýchlosti ohrevu 5 °C/min čo súvisí s tým, voľba onsetu a endsetu bola presnejšia.

**Tabuľka 5:** Priemerné hodnoty tepla a smerodajné odchylky pri vybraných rýchlostiach ohrevu

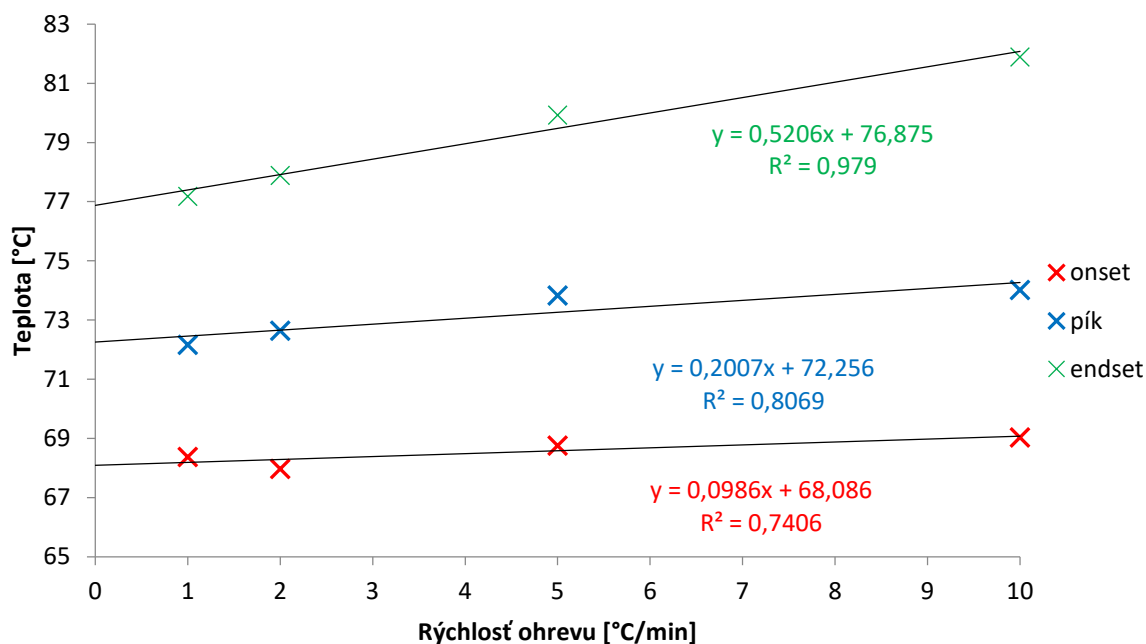
rýchlosť ohrevu [°C/min]	$\Delta H$ [J/g]	$\sigma$ [J/g]
1	15,76	4,14
2	17,35	4,61
5	10,64	0,08
10	13,26	4,74



**Obrázok 11:** Dodané teplo pri jednotlivých rýchlostiach ohrevu spolu so smerodajnými odchýlkami

Ako môžeme vidieť diferenciu kompenzačnú kalorimetriu môžeme použiť pri kvalitatívnom i kvalitatívnom vyhodnotení fyzikálnych a chemických dejoch, ktoré sú spojené s tepelnými zmenami. Výhodou tejto metódy je široký teplotný rozsah a citlivosť. Ďalšou výhodou je použitie malého množstva materiálu, ktorý môže byť v akejkoľvek forme a časová nenáročnosť merania. Jednou z nevýhod je samotné vyhodnotenie kedy kvôli subjektívnej voľbe počiatku a konca dochádza k odchýlkám. Samozrejme odchýlky vznikajú i pri samotnom meraní, kedy vzorka nemusí byť dostatočne odplynená a zvyšné plyny vytvárajú šum na krivke, a tým je samotný proces horšie viditeľný.

Po experimentálnej časti bol pozorovaný ešte vplyv ohrievania na teplotu onsetu, píku a endsetu. Priemerné hodnoty onsetu, píku a endsetu boli preložené priamkou a získané hodnoty tak odpovedajú teplotám pri nulovom zahrievaní.

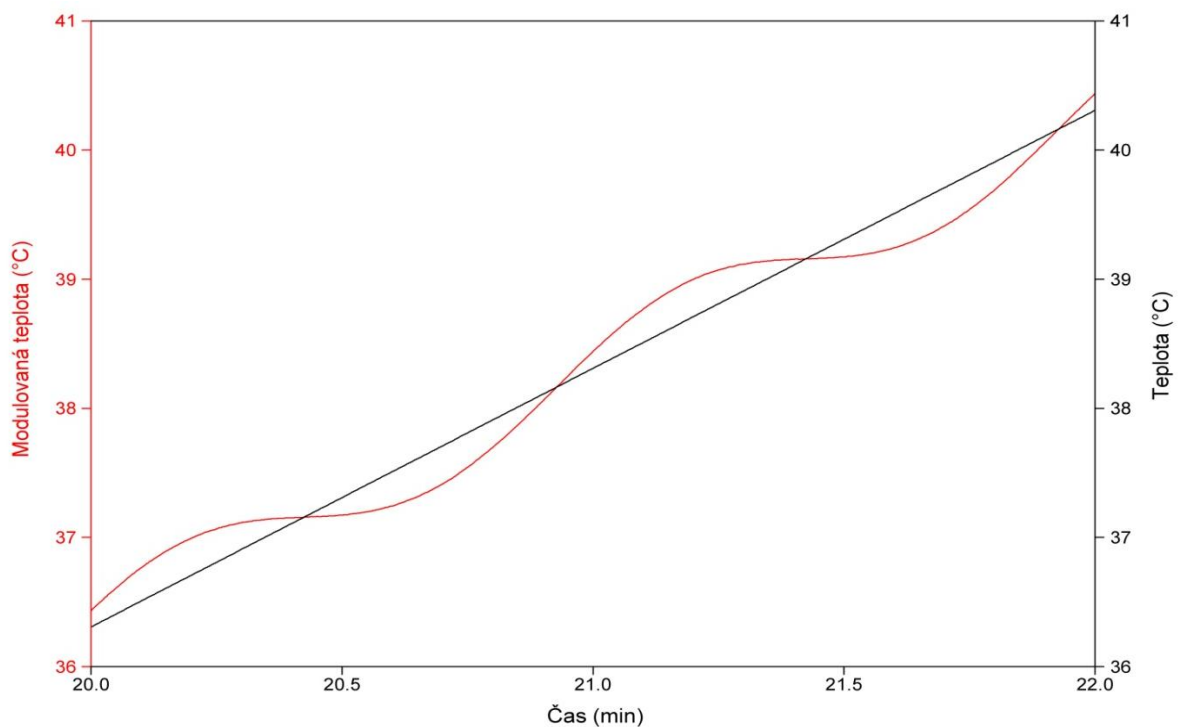


**Obrázok 12:** Extrapolácia priemerných hodnôt onsetu, píku a endsetu

Z výsledkou zobrazených na obrázku 12 vidíme, že teplota onsetu pri nulovom zahrievaní má hodnotu 68,1 °C, teplota píku je 72,3 °C a teplota endsetu je 76,9 °C. Zároveň zo smernice priamky vidíme, že teplota píku je najcitlivejšia na zahrievanie, to znamená, že dochádza tu k najväčšej chybe a najmenej citlivá na zahrievanie je teplota onsetu.

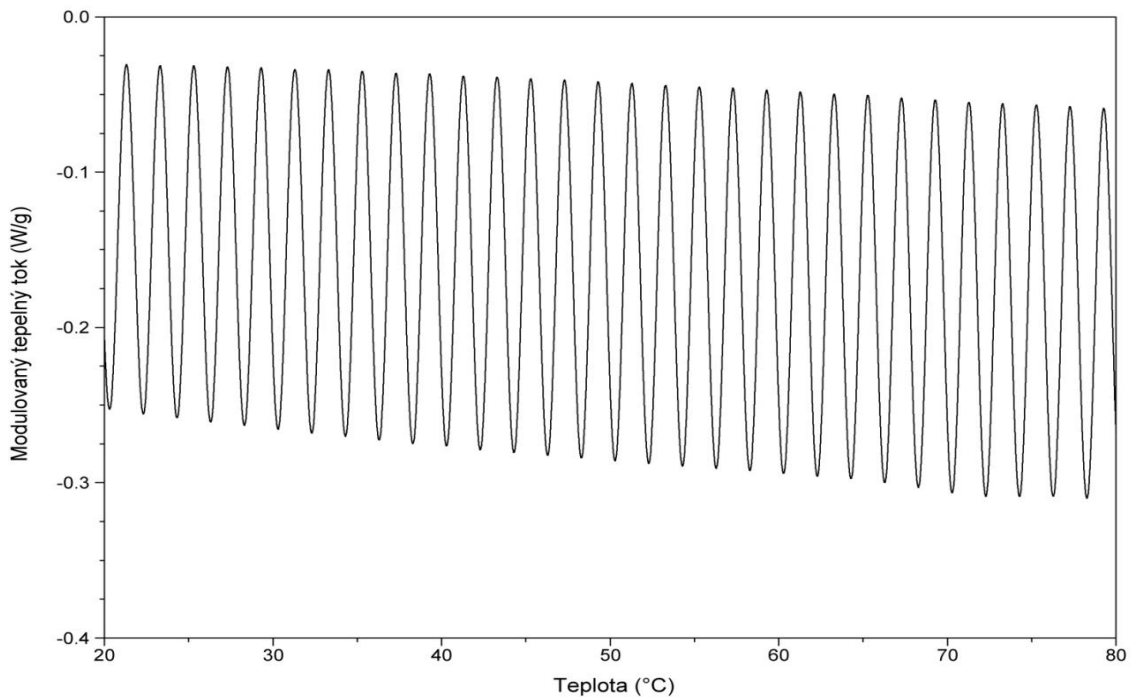
## 5.2 Teplotne modulovaná diferenčná kompenzačná kalorimetria

TMDSC ponúka rovnaké výhody ako klasická DSC, ale vďaka rozloženiu celkového tepelného toku na reverzibilný a nereverzibilný signál, nám môže poskytnúť ďalšie informácie pre lepšie pochopenie niektorých vlastností materiálu. Pomocou TMDSC môžeme v jednom experimente merať tepelný tok aj tepelnú kapacitu a to vďaka modulovanej rýchlosti ohrevu. Meranie je zobrazené na obrázku 13, kde základná lineárna rýchlosť ohrevu je 2 °C/min (čierna lineárna krivka), zatiaľ čo teplota rýchlosti okamžitého ohrevu (červená krivka) osciluje okolo základnej rýchlosti ohrevu s amplitúdou  $\pm 0,318$  °C. Lineárna zmena teploty umožňuje meranie tepelného toku a modulovaná zmena umožňuje výpočet tepelnej kapacity.



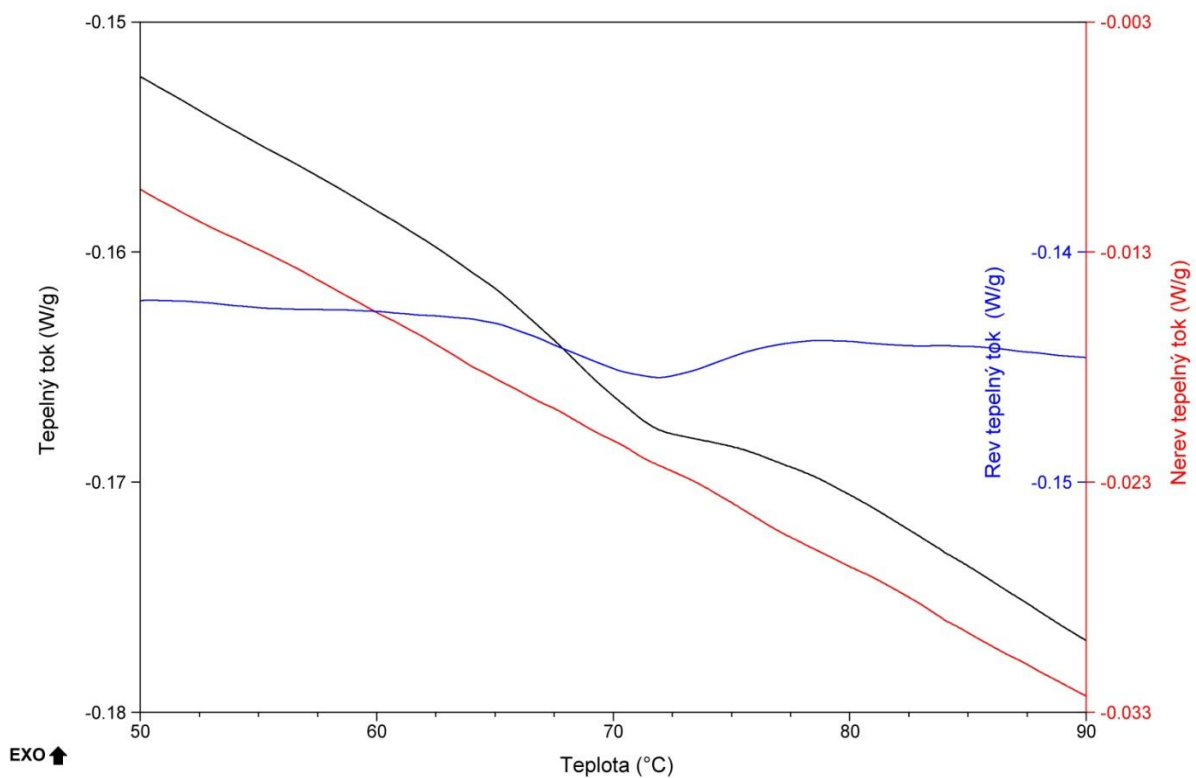
**Obrázok 13:** Sínusová modulácia teploty

Základným výsledkom merania je modulovaný tepelný tok v závislosti na základnej teplote (obrázok 14), ktorú definuje rastúci program, okolo ktorého oscilujeme.



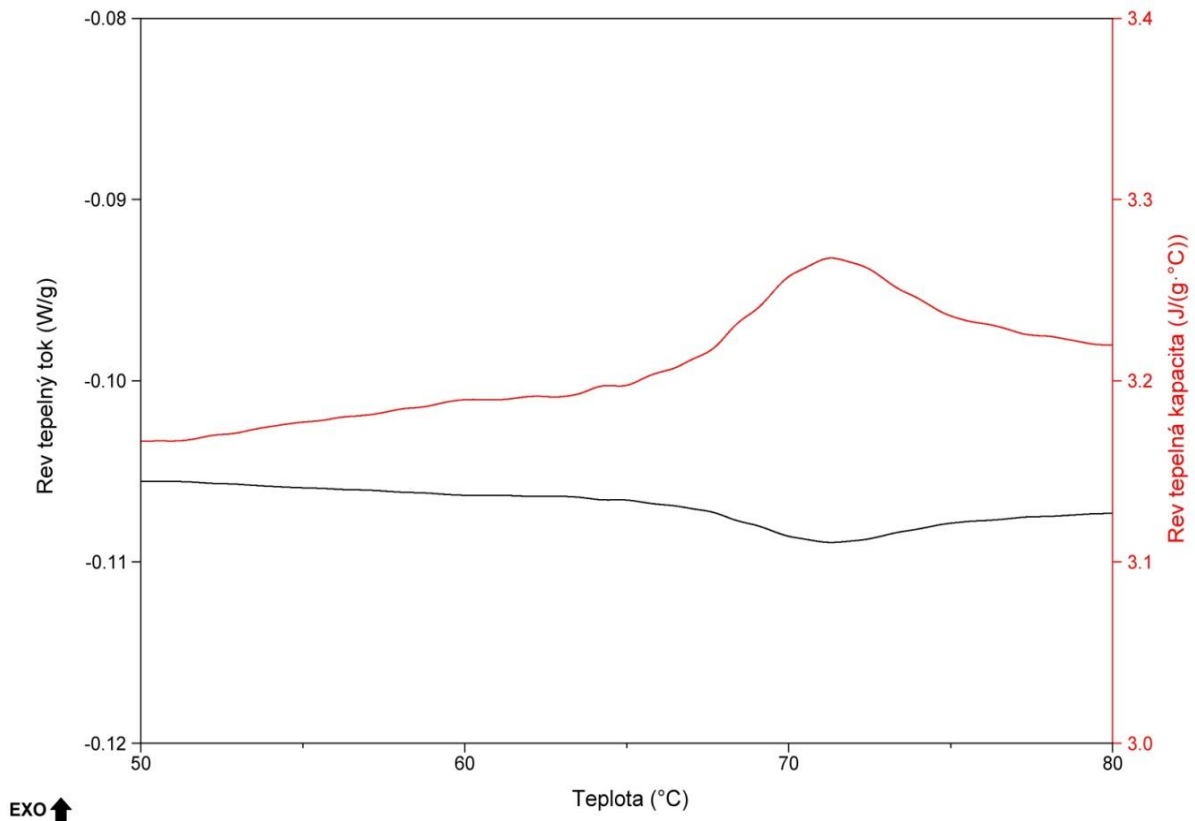
**Obrázok 14:** Závislosť modulovaného tepelného toku na teplote

Z celkového tepelného toku je softvér schopný výpočtom rozdeliť modulovaný tepelný tok na celkový tepelný tok a jeho reverzibilnú a nereverzibilnú zložku. Rozdelenie tepelného toku môžeme vidieť na obrázku 15, kde celkový tok je naznačený čiernou krivkou a je tvorený súčtom reverzného tepelného toku, ktorý je naznačený modrou krivkou a nereverzibilným tepelným tokom, ktorý je červenou farbou.



**Obrázok 15:** Rozloženie celkového tepelného toku na reverzibilnú a nereverzibilnú zložku

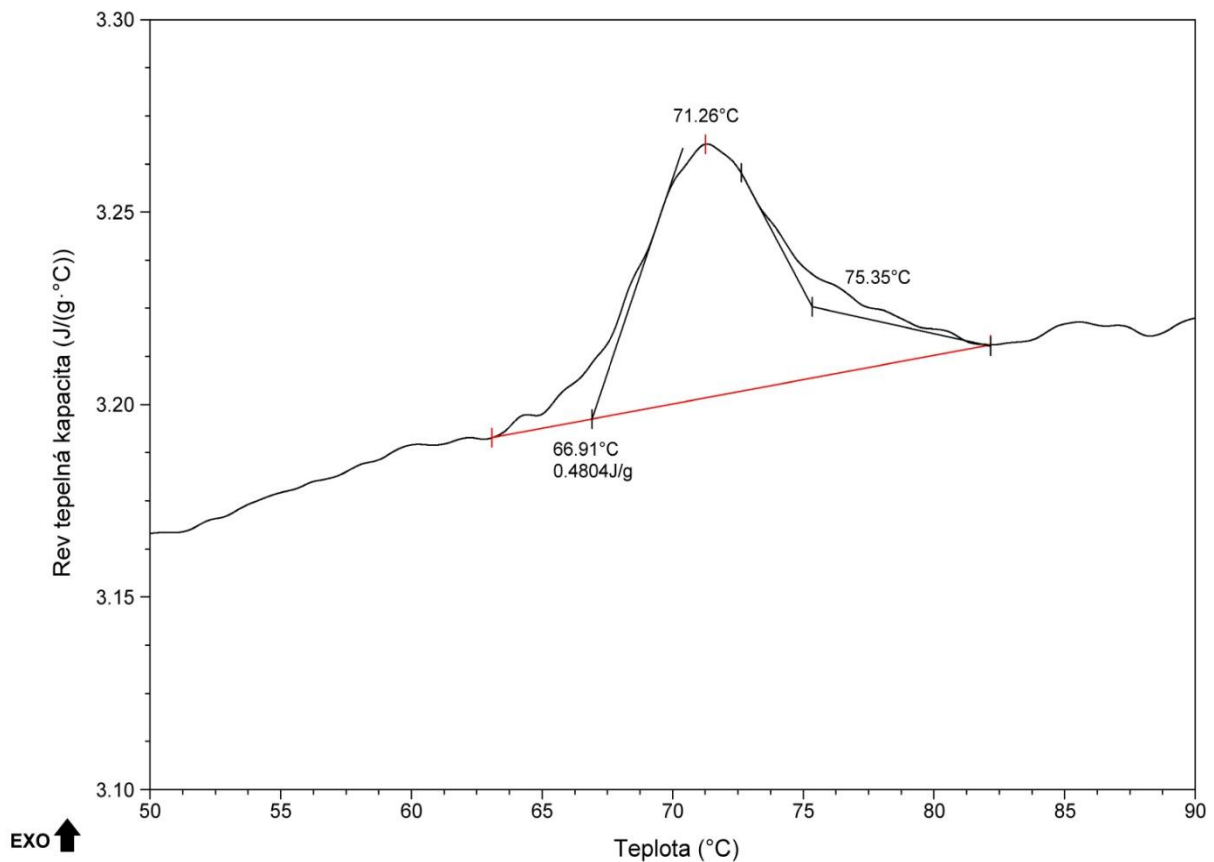
Pomocou rozloženia tepelného toku na jednotlivé zložky môžeme vidieť, že denaturácia lyzozýmu je tvorená prevažne reverzibilnou zložkou, ktorá je v grafe vyznačená modrou farbou. Reverzný dej môžeme ďalej charakterizovať reverznou tepelnou kapacitou, ktorú sme schopný vyjadriť z nameraných dát. Na obrázku 16 môžeme vidieť porovnanie reverzného tepelného toku, ktorý je naznačený čiernou farbou a reverznú tepelnú kapacitu, ktorá je červenou farbou. Z porovnanie vyplýva, že pík reverzného tepelného toku odpovedá píku reverznej tepelnej kapacity.



**Obrázok 16:** Porovnanie reverznej tepelnej kapacity a reverzného tepelného toku

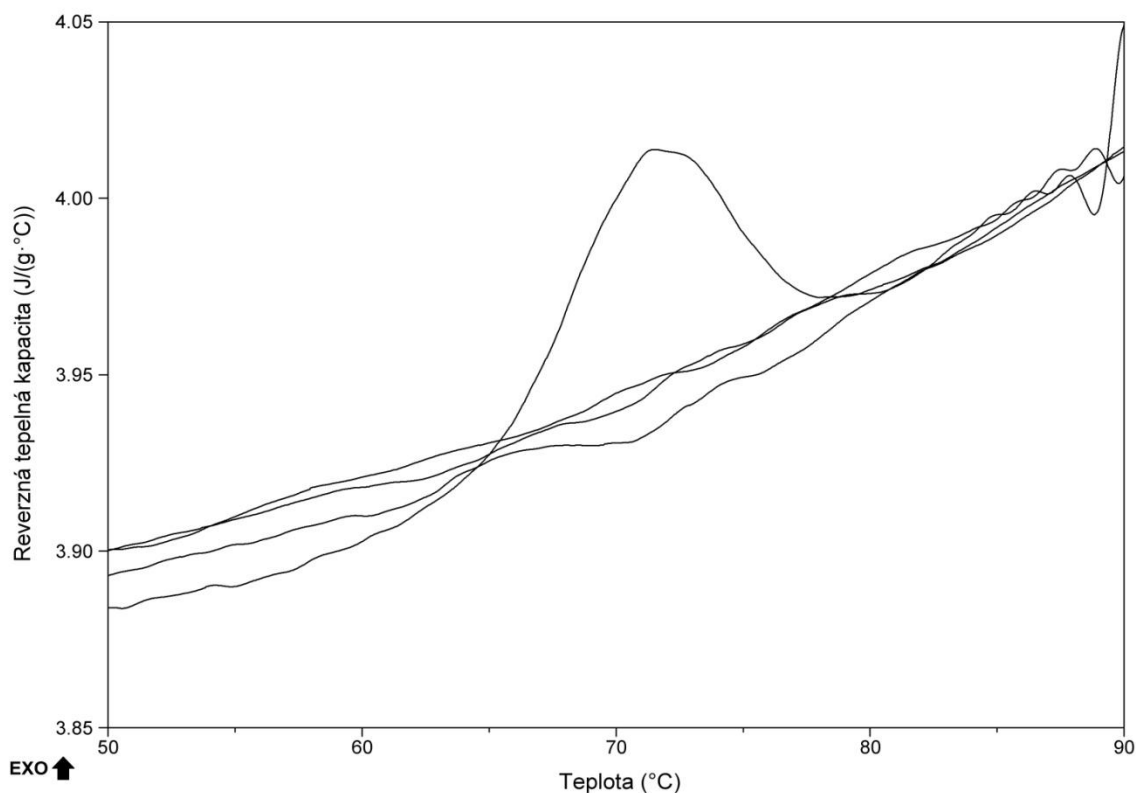
Pri porovnaní reverznej tepelnej kapacity a reverzného tepelného toku vidíme, že reverzná tepelná kapacita je lepšie viditeľná a denaturačný pík je ostrejší. Pri vyhodnocovaní teplôt onsetu, píku a endsetu bola použitá závislosť reverznej tepelnej kapacity na teplote.

Integráciou denaturačného píku (obrázok 17) boli získané teploty onsetu, ktorá je 66,91 °C, píku 71,26 °C a endsetu 75,35 °C. Integrácia plochy nám dáva množstvo dodaného tepla, ktoré v tomto prípade činí 0,4804 J/g vzorky čo odpovedá 24,02 J/g lyzozýmu.



**Obrázok 17:** Integrácia reverznej tepelnej kapacity

Pre potvrdenie vratnosti denurácie bolo jedno merania nastavené na štyri cykly. V prvom cykle sa vzorka zahrievala, v druhom sa chladila, v treťom opäť zahrievala a v poslednom opäť chladila. Pri meraní bola použitá rýchlosť ohrevu 2 °C/min, perióda bola 100 sekundová a amplitúda bola  $\pm 0,53$  °C. Ako môžeme vidieť na obrázku 18 meraním bolo zistené, že po skončení zahrievania a následným chladením je denaturácia nevratná. Ak by bola denaturácia vratná prejavilo by sa to prítomnosťou píku pri chladení. Keďže bolo meraním zistené, že denaturácia je nevratná, preto pri ostatných experimentoch meranie prebiehalo len v jednom zahrievacom cykle.



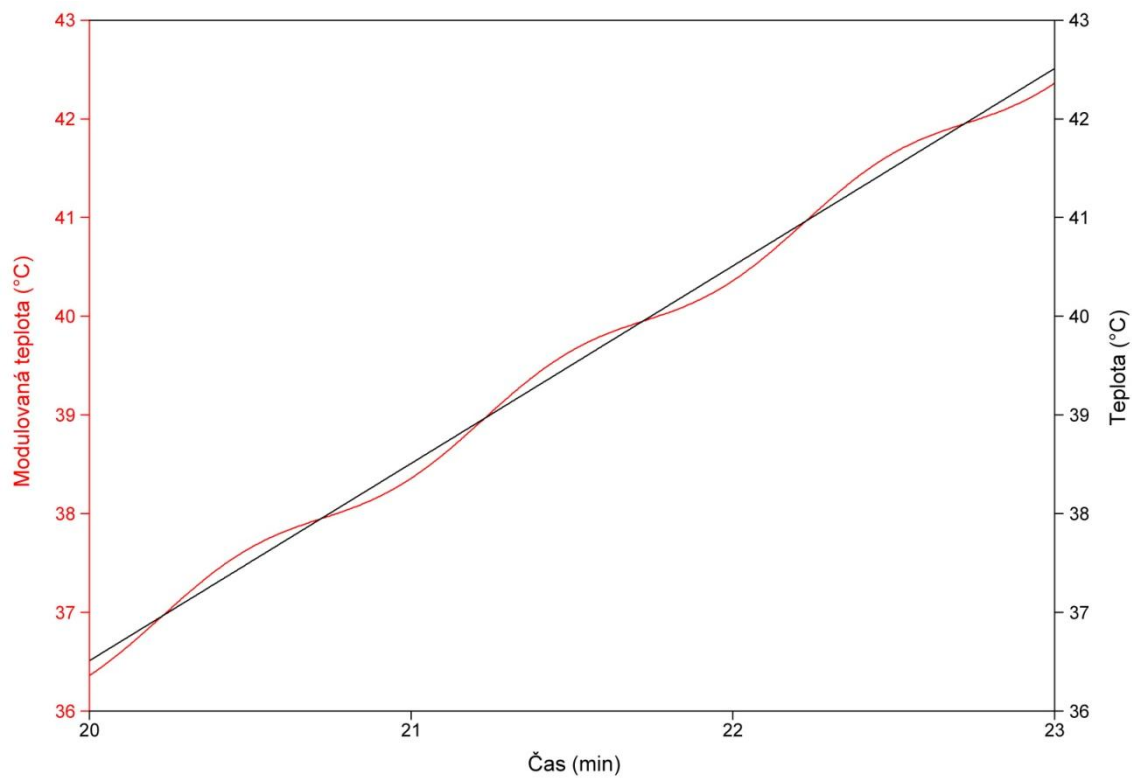
Obrázok 18: Vplyv procesu chladenia na priebeh denaturácie

### 5.2.1 Vplyv amplitúdy a periódy na priebeh denaturácie

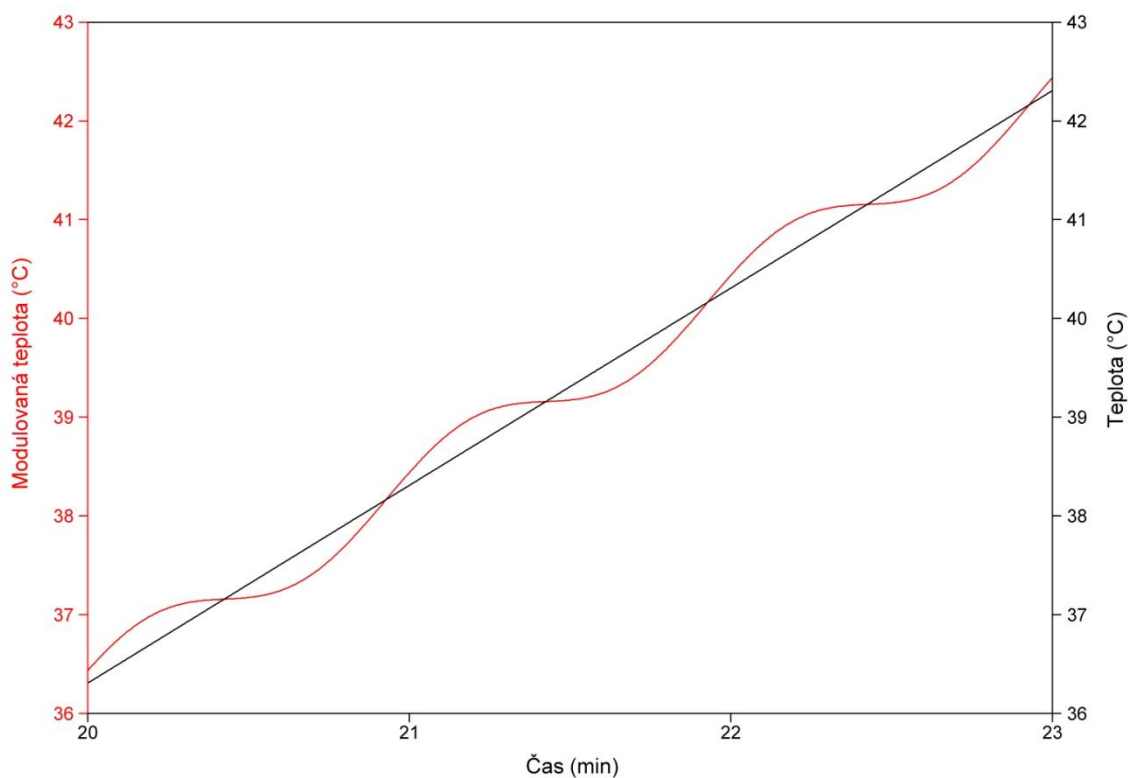
Jedným z mojich cieľov bolo optimalizovať metódy a určiť, pri ktorých parametroch je denaturácia najlepšie viditeľná. Na základe výsledkov kapitoly 5.1.1 bola zvolená základná rýchlosť ohrevu 2 °C/min. Pri tejto rýchlosti bol denaturačný pík najostrejší a najlepšie viditeľný. Táto rýchlosť sa ďalej používala pri TMDSC ako základná lineárna rýchlosť ohrevu, okolo ktorej sa modulovalo tromi amplitúdami, ktoré sú charakteristické pre jednotlivé módy a to *heat-iso*, *heat-only* a *heat-cool*. Hodnota amplitúdy bola pre každý mód určená vypočítom. V tabuľke 6 sa nachádzajú amplitúdy troch módov pri 60 a 100 s perióde. Na nasledujúcich šiestich grafoch je znázornená modulovaná teplota (červená farba), ktorá osciluje cez lineárny ohrev (čierná farba) v závislosti na čase pre 60 a 100 sekundovú periódu.

Tabuľka 6: Vypočítané amplitúdy pri 60 sekundovej a 100 sekundovej perióde pre všetky tri módy

mód	perióda [s]	
	60	100
	amplitúda [°C]	
<i>heat-only</i>	± 0,159	± 0,265
<i>heat-iso</i>	± 0,318	± 0,53
<i>heat-cool</i>	± 0,636	± 1,06

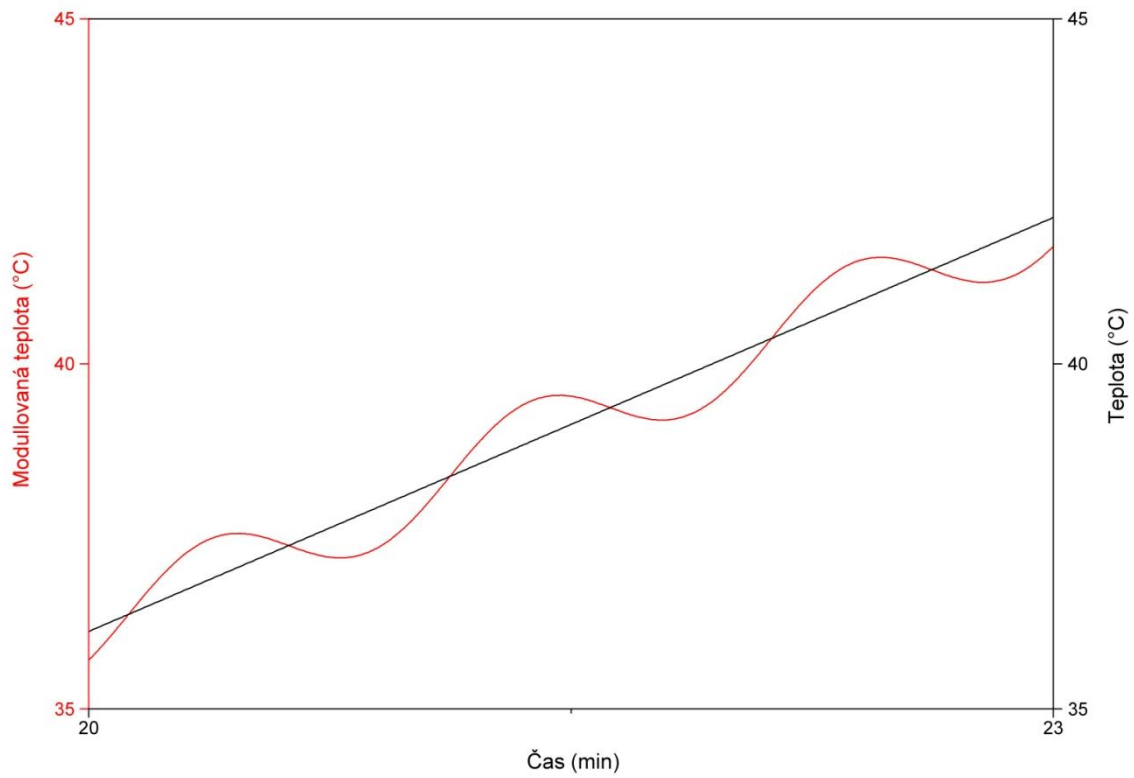


**Obrázok 19:** Heat-only mód analýzy teplotne modulovanej DSC pri 60 s perióde

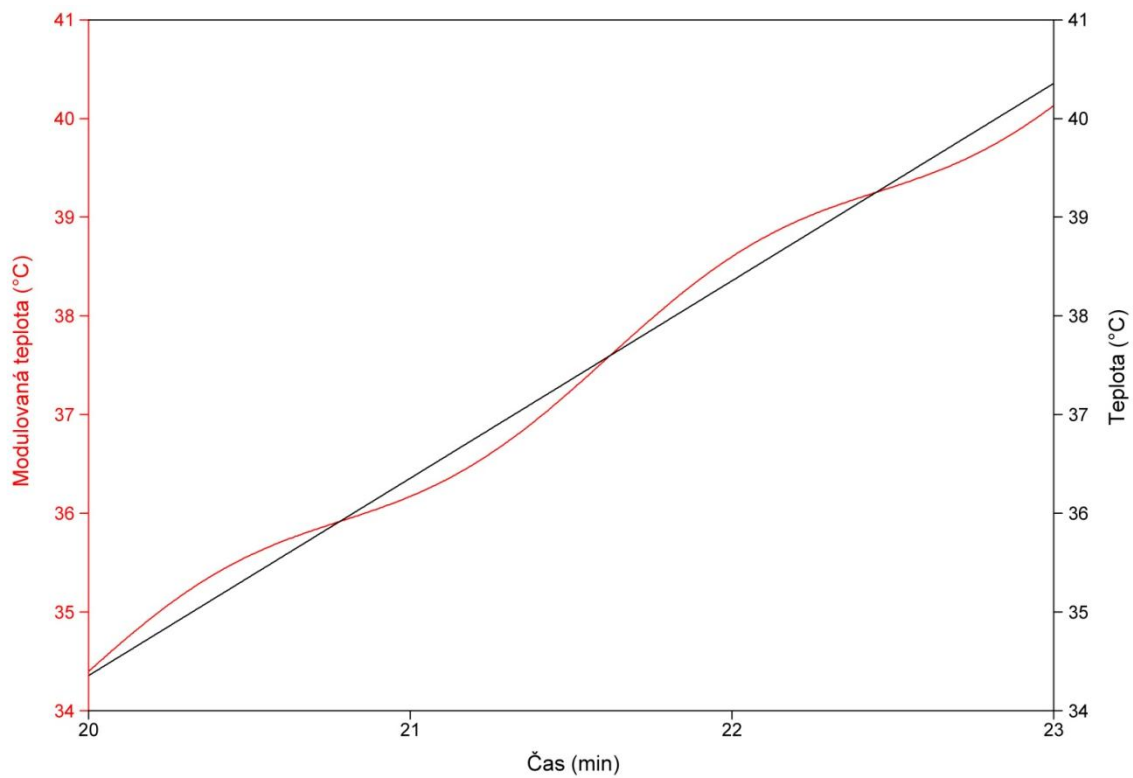


**Obrázok 20:** Heat- iso mód analýzy teplotne modulovanej DSC pri 60 s perióde

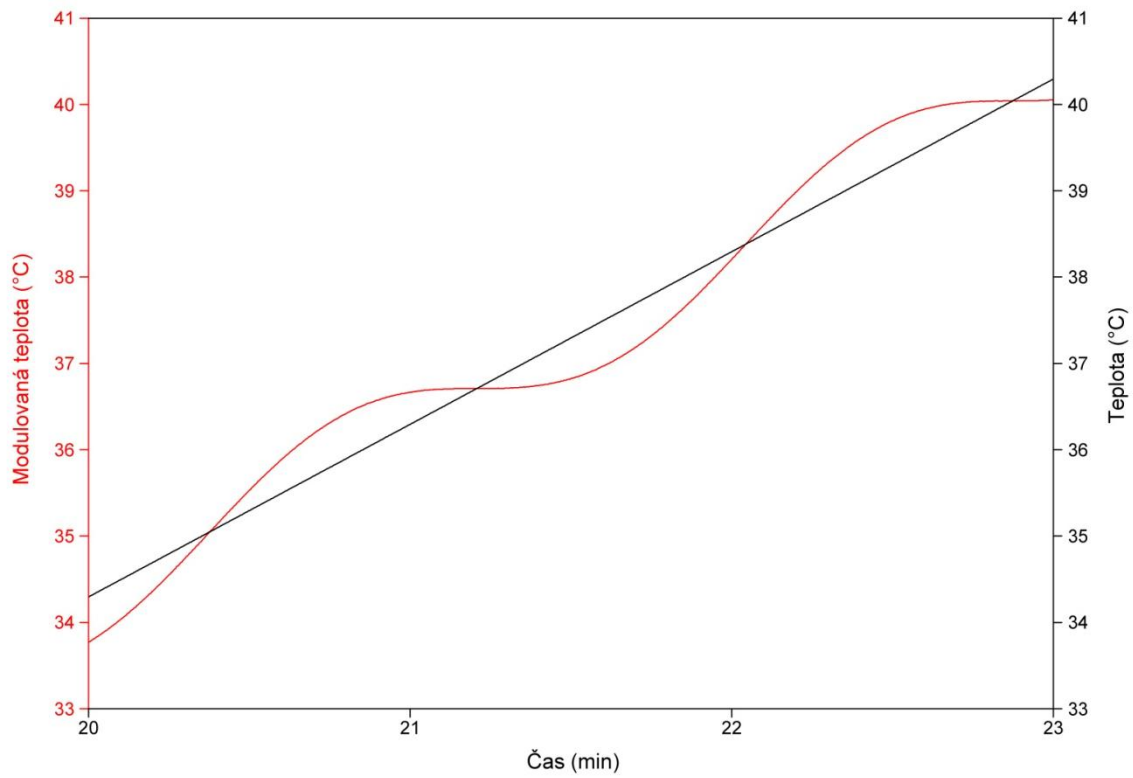




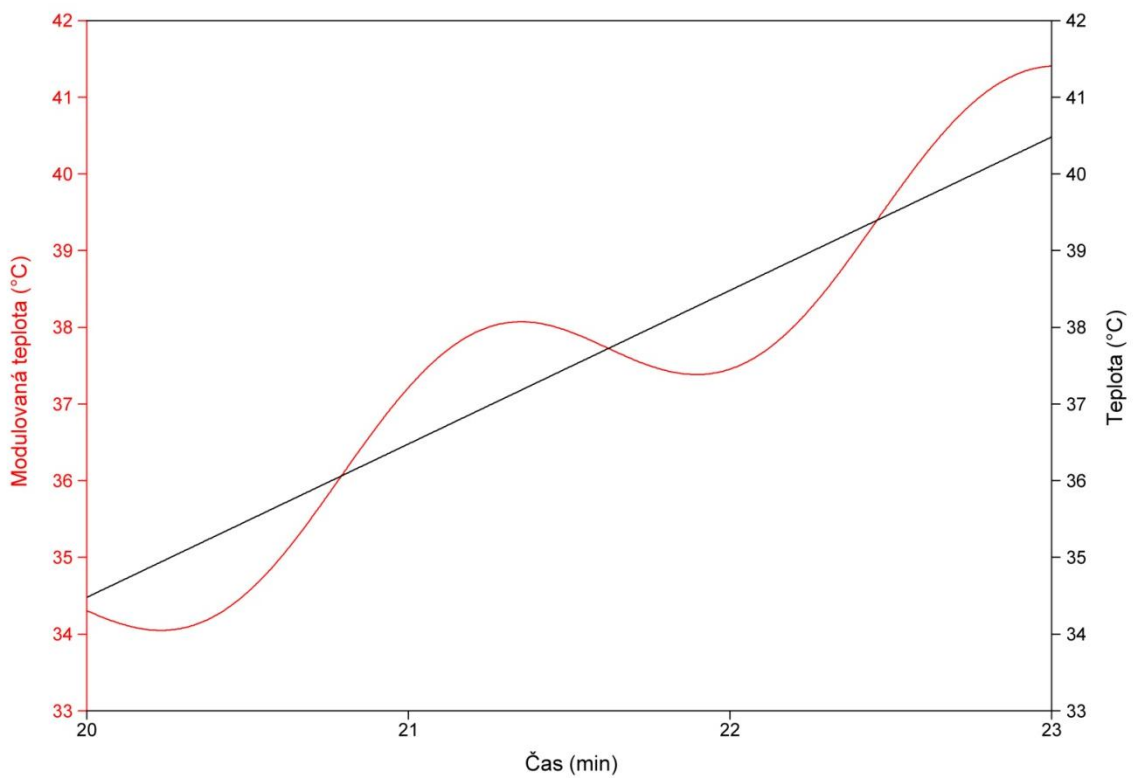
**Obrázok 21:** Heat-cool mód analýzy teplotne modulovanej DSC pri 60 s perióde



**Obrázok 22:** Heat-only mód analýzy teplotne modulovanej DSC pri 100 s perióde



**Obrázok 23:** Heat- iso mód analýzy teplotne modulovanej DSC pri 100 s perióde



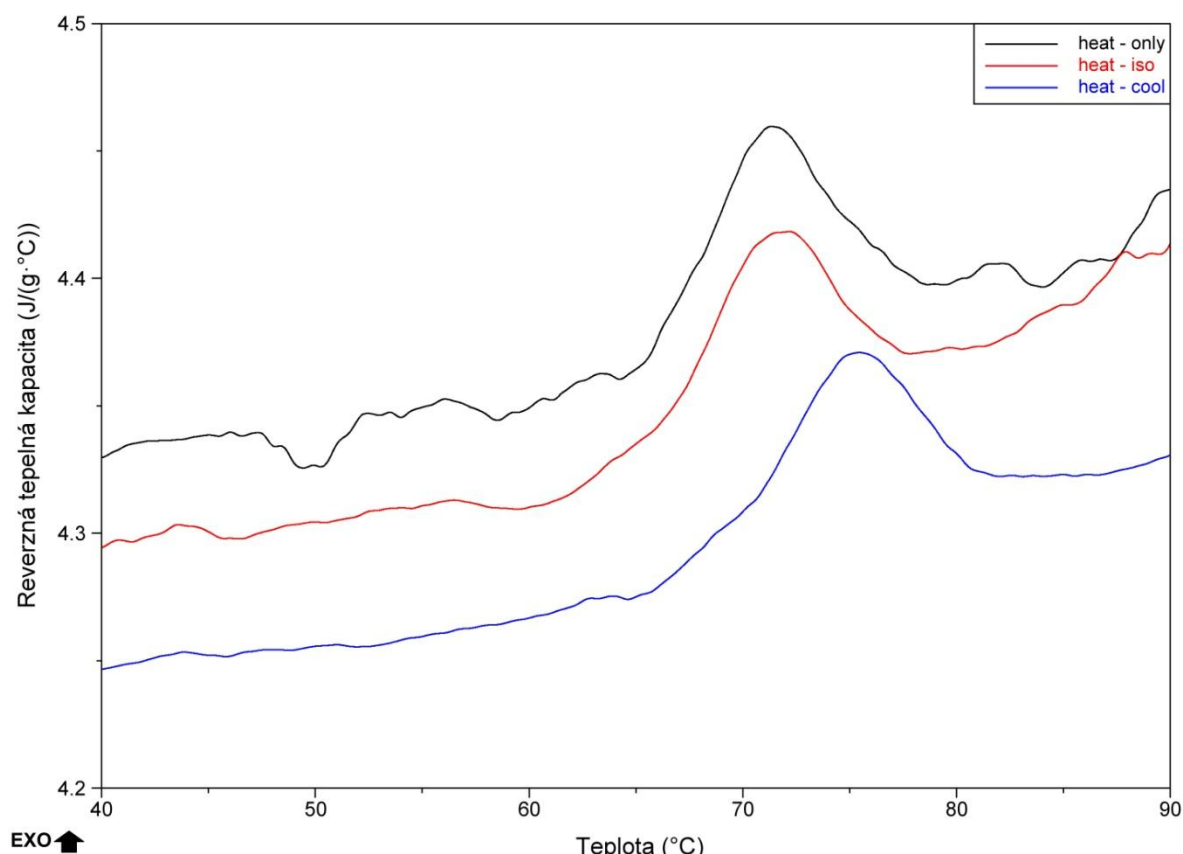
**Obrázok 24:** Heat-cool mód analýzy teplotne modulovanej DSC pri 100 s perióde

Pri vyhodnocovaní jednotlivých amplitúd bol postup rovnaký ako pri vyhodnovení rýchlosti ohrevu. V programe TA Instruments boli zintegrované denaturačné píky zo závislosti reverznej tepelnej kapacity na teplote. Získané hodnoty onsetu, píku, endsetu a množstvo dodaného tepla boli v MS Excel štatisticky vyhodnotené a v nasledujúcej tabuľke môžeme vidieť priemerné hodnoty a smerodajné odchyľky.

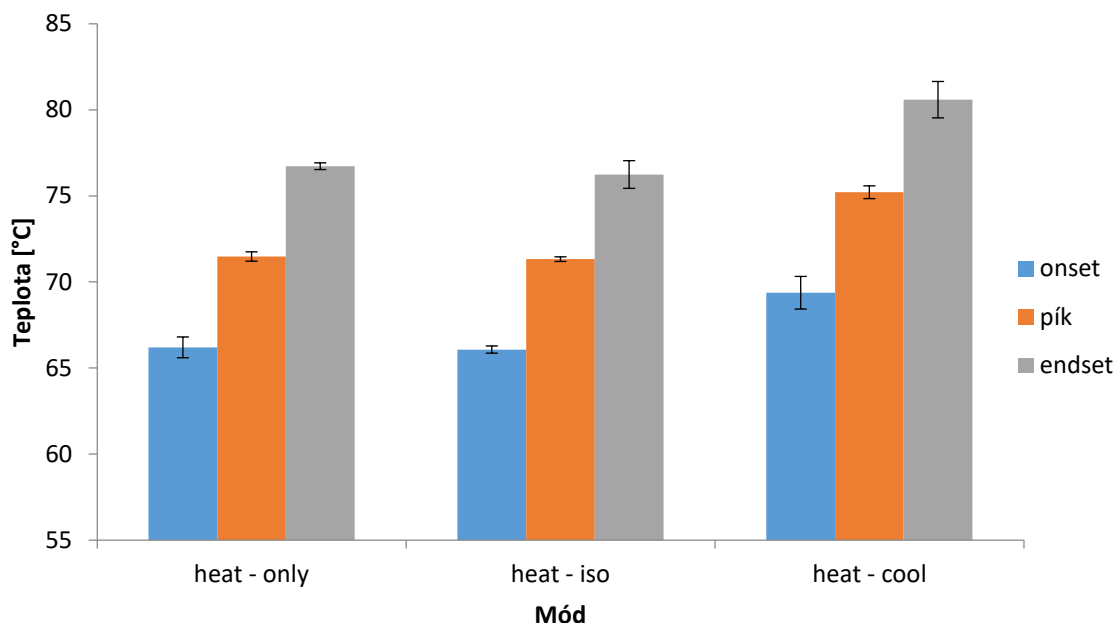
**Tabuľka 7:** Priemerné teploty onsetu, píku, endsetu a smerodajné odchyľky amplitúd pri 60 sekundovej perióde

mód	onset [°C]	$\sigma$ [°C]	pík [°C]	$\sigma$ [°C]	endset [°C]	$\sigma$ [°C]
<i>heat-only</i>	66,20	0,60	71,48	0,27	76,72	0,19
<i>heat-iso</i>	66,07	0,21	71,32	0,13	76,24	0,81
<i>heat-cool</i>	69,37	0,95	75,21	0,37	80,59	1,06

Na obrázku 25 sa nachádza porovnanie jednotlivých módov pri 60 sekundovej perióde v závislosti reverznej tepelnej kapacity na teplote. Čiernou farbou je *heat-only* mód, červenou farbou je *heat-iso* a modrou farbou je naznačený *heat-cool* mód. Zo závislosti vidíme, že hodnota denaturačného píku posunutá k vyšším teplotám ako zvyšných dvoch módov. Môžeme vidieť, že pri módoch kde dochádza len k zahriavaniu bez chladenia sú hodnoty onsetu, píku a endsetu približne rovnaké. V móde kde sa vzorka zahrieva i chladí je denaturácia posunutá k vyšším hodnotám.



**Obrázok 25:** Porovnanie amplitúd pri 60 sekundovej perióde



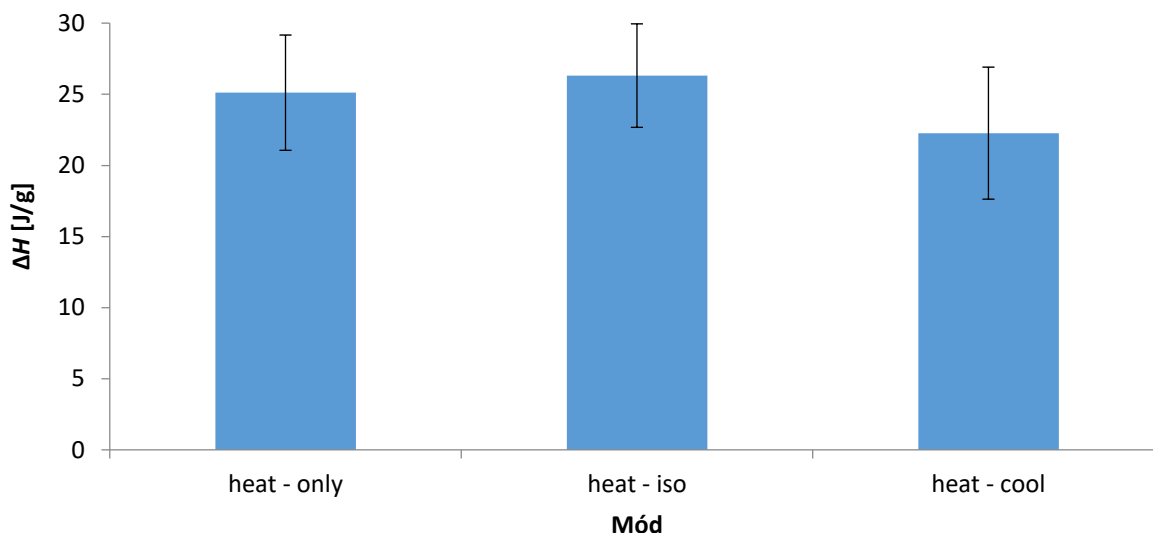
**Obrázok 26:** Vynesenie priemerných hodnôt so smerodajnými odchytkami amplitúd pri 60 sekundovej perióde

Zo závislosti, ktorá je na obrázku 26 vidíme, že jednotlivé teploty onsetu, píku a endsetu sú vyššie pri *heat-cool* móde. Z výsledkov vidíme, že pri *heat-cool* móde došlo k posunu teploty denaturácie čo nemusí byť spôsobené typom módu ale tým, že použité vzorky neboli pripravované s ostatnými v rovnakej šarži čo mohlo ovplyvniť ich tepelnú stabilitu. Meranie mohlo zároveň ovplyvniť pufr, ktorý mohol byť starý a tiež laboratórna teplota, ktorá nemusela byť rovnaká ako pri príprave ostatných vzoriek. Pri porovnaní zahrievacích módov vidíme, že ich hodnoty sú približne rovnaké. Ak berie do úvahy veľkosť smerodajnej odchytky pri priemernej hodnote teploty píku, tak *heat-iso* mód je presnejší k štúdiu denaturácie lyzozýmu pri 60 sekundovej perióde.

V nasledujúcej tabuľke sa nachádzajú priemerné hodnoty dodaného tepla, ktoré boli prepočítané na 1 gram lyzozýmu.

**Tabuľka 8:** Priemerné hodnoty dodaného tepla a smerodajné odchytky módov pri 60 sekundovej perióde

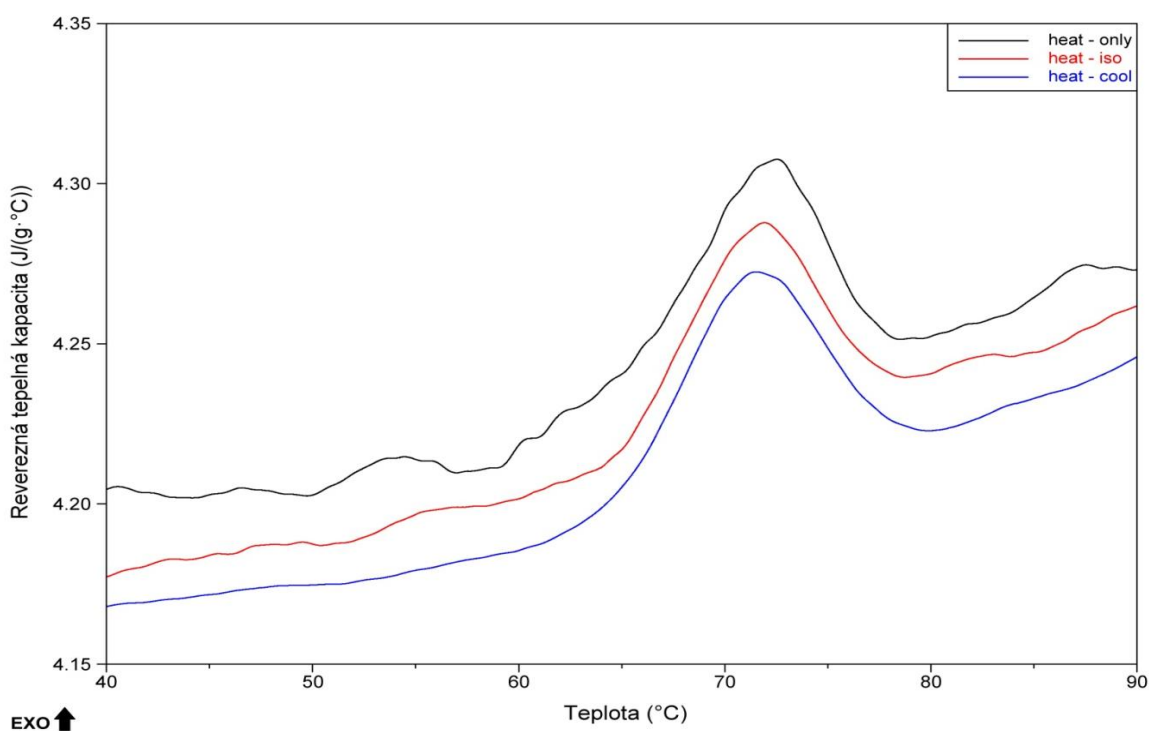
mód	$\Delta H$ [J/g]	$\sigma$ [J/g]
<i>heat-only</i>	25,12	4,05
<i>heat-iso</i>	26,31	3,64
<i>heat-cool</i>	22,27	4,64



**Obrázok 27:** Závislosť dodaného tepla pri jednotlivých mód 60 sekundovej periódy

Z výsledkou môžeme vidieť, že množstvo dodaného tepla sa výrazne nelíši. Najviac tepla bolo dodané pri *heat-iso* móde. Najmenej tepla bolo dodané pri *heat-cool* móde, pri ktorom je najväčšia smerodajná odchyľka.

Na obrázku 28 môžeme vidieť závislosť reverznej tepelnej kapacity všetkých troch módov na teplote pri 100 sekundovej perióde. Čiernou farbou je amplitúda pre *heat-only* mód, červenou farbou je *heat-iso* a modrou farbou je *heat-cool* mód. Zo závislosti môžeme vidieť, že s rastúcou amplitúdou sa počiatok denaturačného píku posúva k nižším hodnotám teploty. Taktiež môžeme vidieť, že teplota píku je pri všetkých módoch približne pri 72 °C.

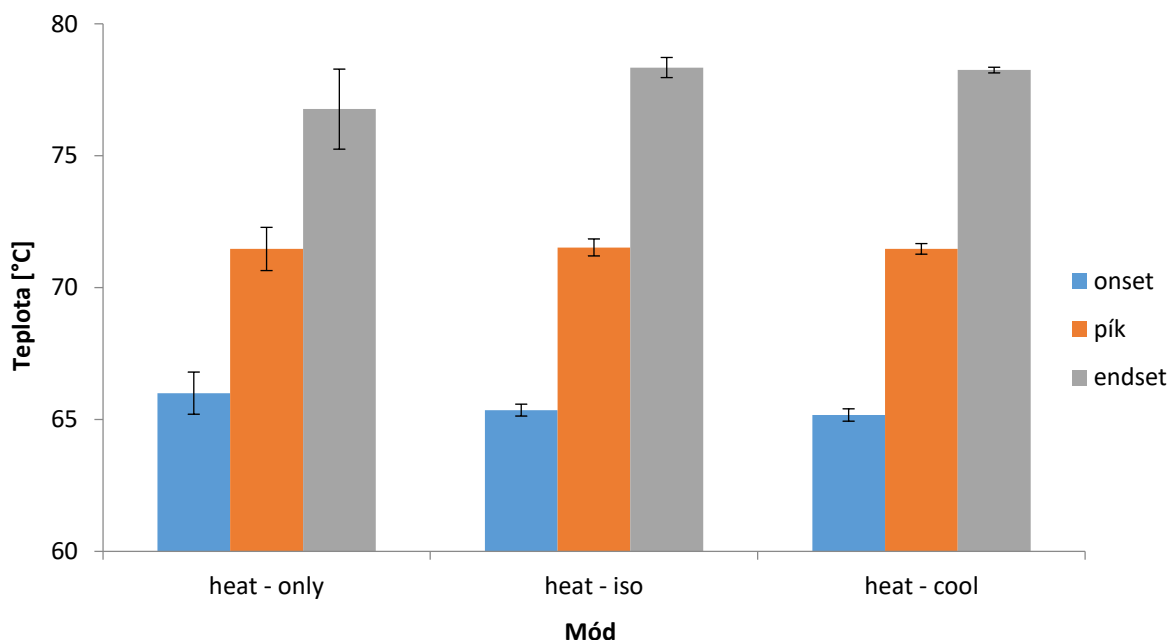


**Obrázok 28:** Porovnanie reverzných tepelných kapacít všetkých troch módov pri 100 sekundovej perióde

Integráciou píku reverznej tepelnej kapacity všetkých meraní boli získané hodnoty onsetu, píku a endsetu, z ktorých bol vypočítaný priemer a smerodajné odchytky pre všetky amplitúdy. Získané hodnoty sa nachádzajú v tabuľke 9. Z výsledkou môžeme vidieť, že s rastúcou periódou sa hodnota onsetu mierne znižuje čo je spôsobené tým, že celý denaturačný pík je s rastúcou amplitúdou posunutý k nižším teplotám. Hodnota píku je opäť ako pri 60 sekundovej perióde približne rovnaká. Priemerné hodnoty endsetu sa mierne líšia od hodnoty pri najmenšej amplitúde. Tento rozdiel môže byť spôsobený tým, že priebeh krivky nie je hladký ako pri ostatných dvoch amplitúdach a nepresná voľba počiatku a konca prechodu tu spôsobila najväčšiu chybu.

**Tabuľka 9:** Priemerné hodnoty onsetu, píku, endsetu a smerodajné odchytky jednotlivých amplitúd pri 100 sekundovej perióde

mód	onset [°C]	$\sigma$ [°C]	pík [°C]	$\sigma$ [°C]	endset [°C]	$\sigma$ [°C]
<i>heat-only</i>	66,00	0,80	71,47	0,82	76,77	1,52
<i>heat-iso</i>	65,36	0,23	71,52	0,32	78,35	0,38
<i>heat-cool</i>	65,17	0,23	71,47	0,20	78,25	0,11



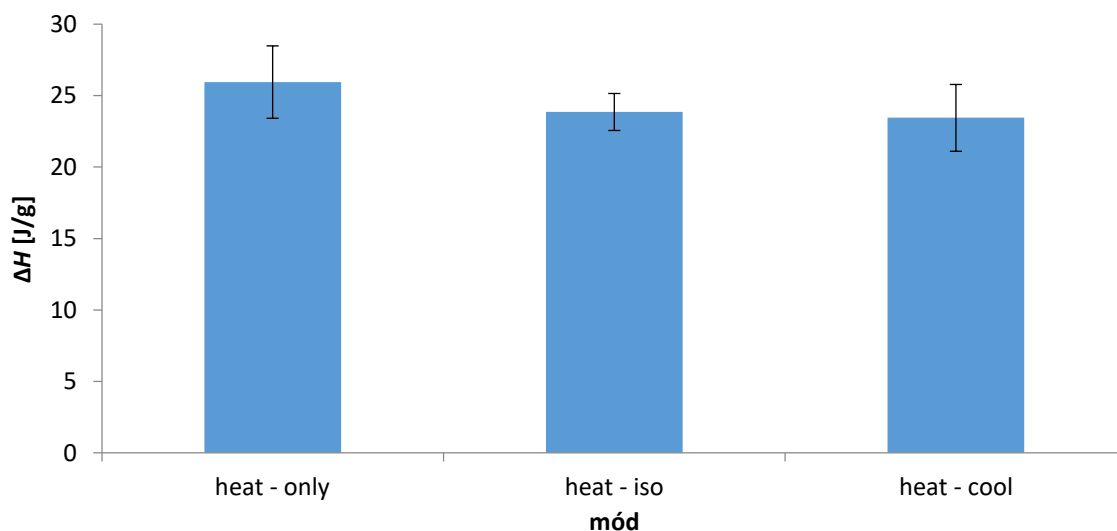
**Obrázok 29:** Závislosť priemerných hodnôt onsetu, píku a endsetu a ich smerodajné odchytky pri 100 sekundovej amplitúde

Z obrázku 29 môžeme skonštatovať, že vplyv jednotlivých módov na priebeh denaturácie je minimálny. Hodnoty počiatku, píku i konca prechodu sú približne rovnaké. Pri *heat-cool* móde sú jednotlivé odchytky najmenšie, preto považujem ten mód, ktorý má najväčšiu amplitúdu za najvhodnejšiu k štúdiu denaturácie lyzozýmu.

Po integrácii plochy píku sme získali množstvo tepla, ktoré bolo dodané do meranej vzorky počas denaturácie aby došlo k vyrovnaniu teplôt. Všetky hodnoty boli štatisticky vyhodnotené a v tabuľke 10 môžeme vidieť priemerné hodnoty pri jednotlivých módoch aj so smerodajnými odchytkami. Z výsledkou je vidieť, že priemerné hodnoty dodaného tepla sú približne rovnaké. Pri móde *heat-only* je hodnota o necelé 2 J/g vyššia a smerodajná odchytky je najvyššia čo súvisí s voľbou počiatku a konca denaturačného píku, ktorých odchytky tiež boli najväčšie.

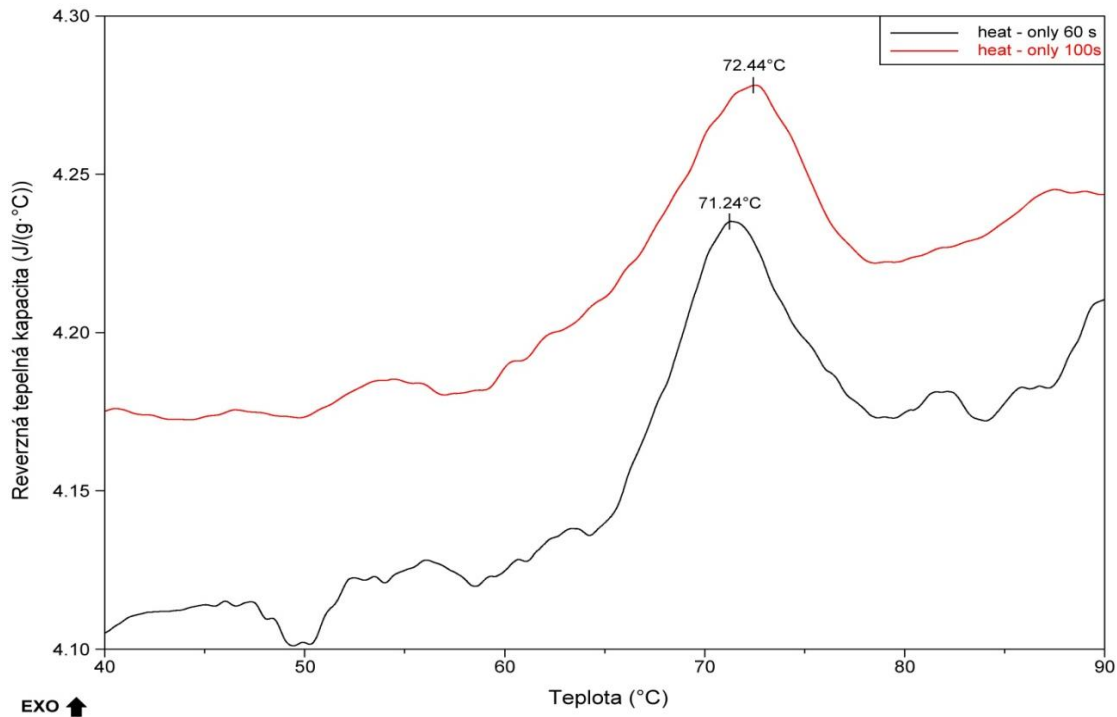
**Tabuľka 10:** Priemerné hodnoty dodaného tepla na 1 gram lyzozýmu a smerodajné odchyľky módov pri 100 sekundovej perióde

mód	$\Delta H$ [J/g]	$\sigma$ [J/g]
<i>heat-only</i>	25,96	2,53
<i>heat-iso</i>	23,86	1,29
<i>heat-cool</i>	23,45	2,34



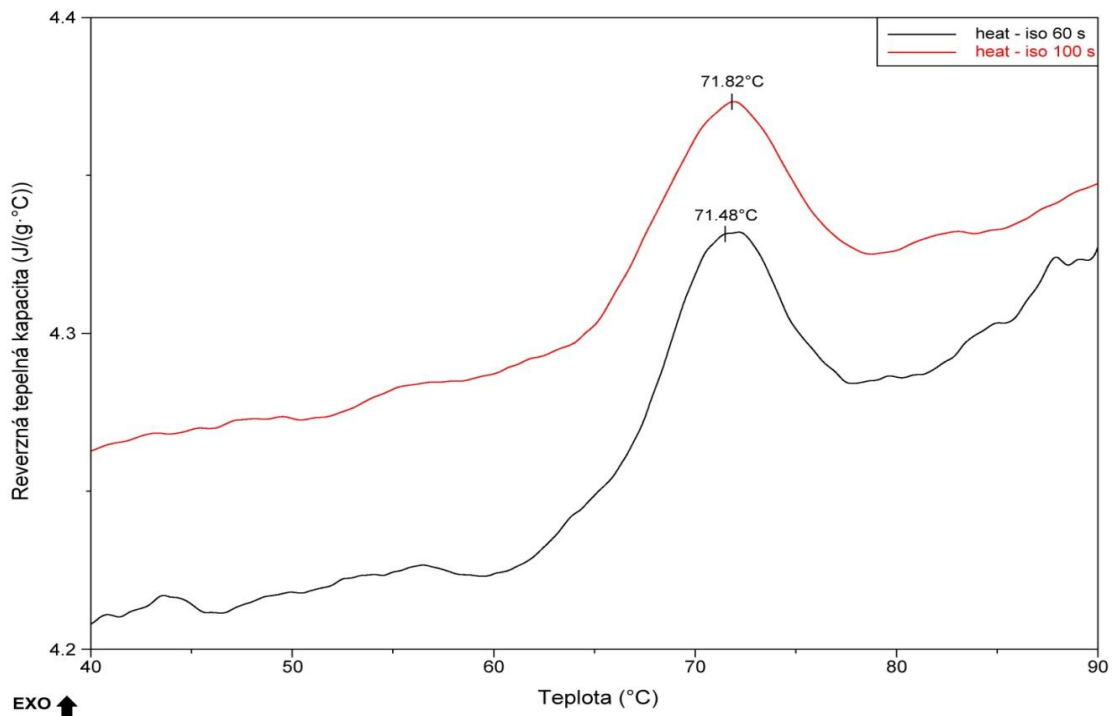
**Obrázok 30:** Závislosť dodaného tepla jednotlivých módov pri 100 sekundovej perióde

Pri porovnaní módov pri rovnakej perióde bolo zistené, že hodnoty počiatku, píku a koncu pri 100 sekundovej perióde sa výrazne nelíšia, čiže amplitúda nemá výrazný vplyv na priebeh denaturácie. Pri 60 sekundovej perióde bol pozorovaný vplyv amplitúdy na priebeh denaturácie, kde teplota denaturácie bola posunutá k vyšším teplotám pri *heat-cool* móde. Ostáva nám ešte porovnať jednotlivé módy pri 60 a 100 sekundovej perióde. Na obrázku 31 môžeme vidieť závislosť reverznej tepelnej kapacity na teplote pre *heat-only* mód, na ktorej čierna krivka predstavuje amplitúdu pri 60 s perióde a červenou krivkou je amplitúda pri 100 s perióde. Môžeme vidieť, že pri vyššej amplitúde a perióde má hodnota denaturačného píku o niečo vyššiu hodnotu avšak pri tomto móde nemajú jednotlivé parametre vplyv na priebeh denaturácie.



**Obrázok 31:** Závislosť reverznej tepelnej kapacity na teplote pre *heat-only* mód pri 60 s a 100 s perióde

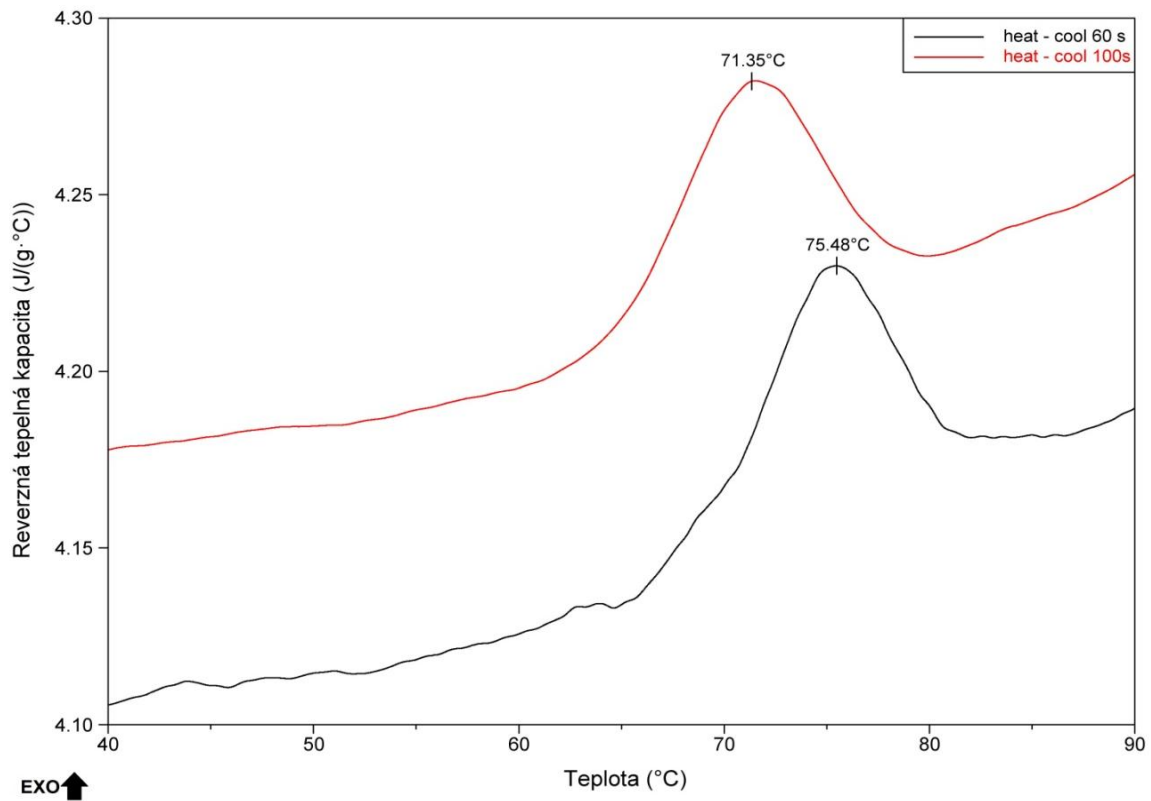
Na obrázku 32 je porovnanie *heat-iso* módu, kde čiernou farbou je amplitúda pre 60 s periódu a červenou farbou je vyznačená amplitúda 100 s periódy. Opäť môžeme vidieť, že pri 60 s perióde je teplota denaturácie o 0,34 °C nižšia avšak opäť nemá voľba periódy pri tomto móde žiadny vplyv pri štúdiu denaturácie.



**Obrázok 32:** Závislosť reverznej tepelnej kapacity na teplote pre *heat-iso* mód pri 60 s a 100 s perióde



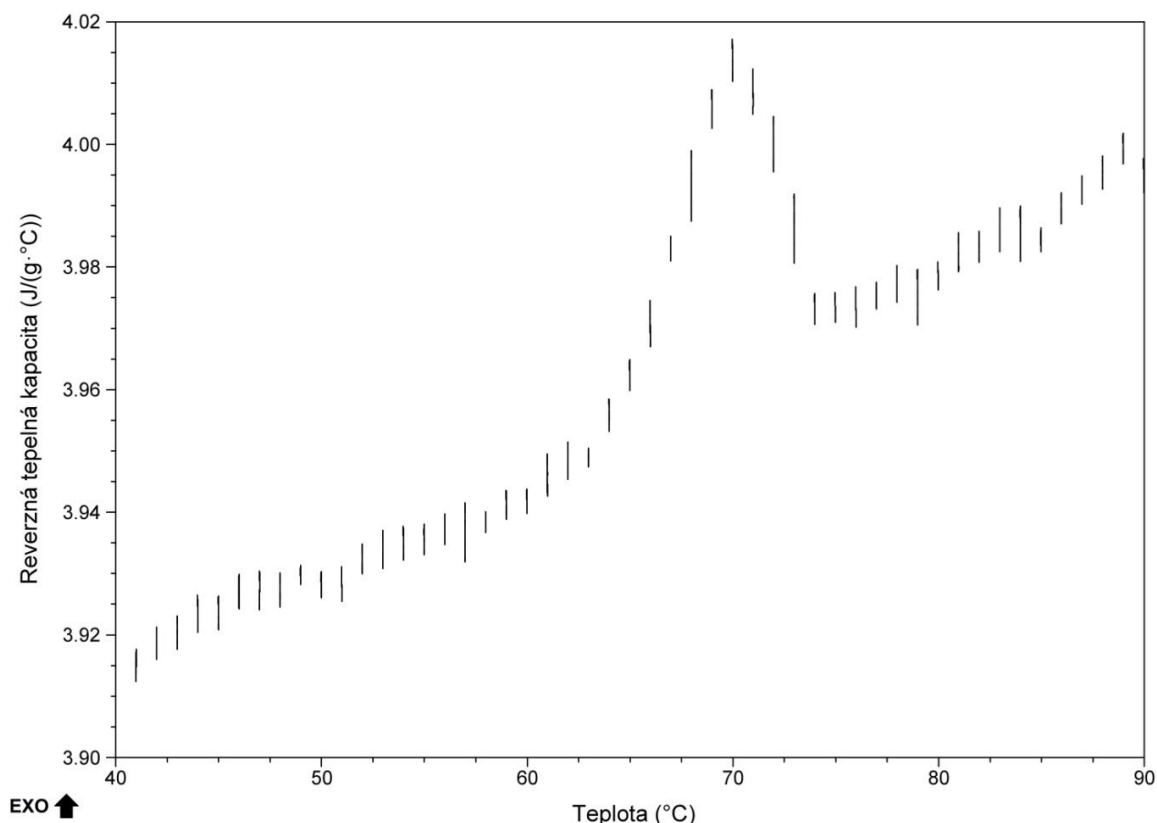
Porovnanie *heat-cool* módu je zobrazené na nasledujúcom grafe. Čiernou farbou je amplitúda pri 60 s perióde a červenou farbou je amplitúda pri 100 s perióde. Z porovnanie vidíme, že hodnoty sa od seba líšia. Pri 60 sekundovej perióde sú hodnoty posunuté k vyšším hodnotám. Ako už bolo vyššie spomenuté tento posun môže byť spôsobený tým, že vzorky pre 60 s periódu neboli pripravované v rovnaký deň ako ostatné vzorky.



**Obrázok 33:** Závislosť reverznej tepelnej kapacity na teplote pre *heat-cool* mód pri 60 s a 100 s perióde

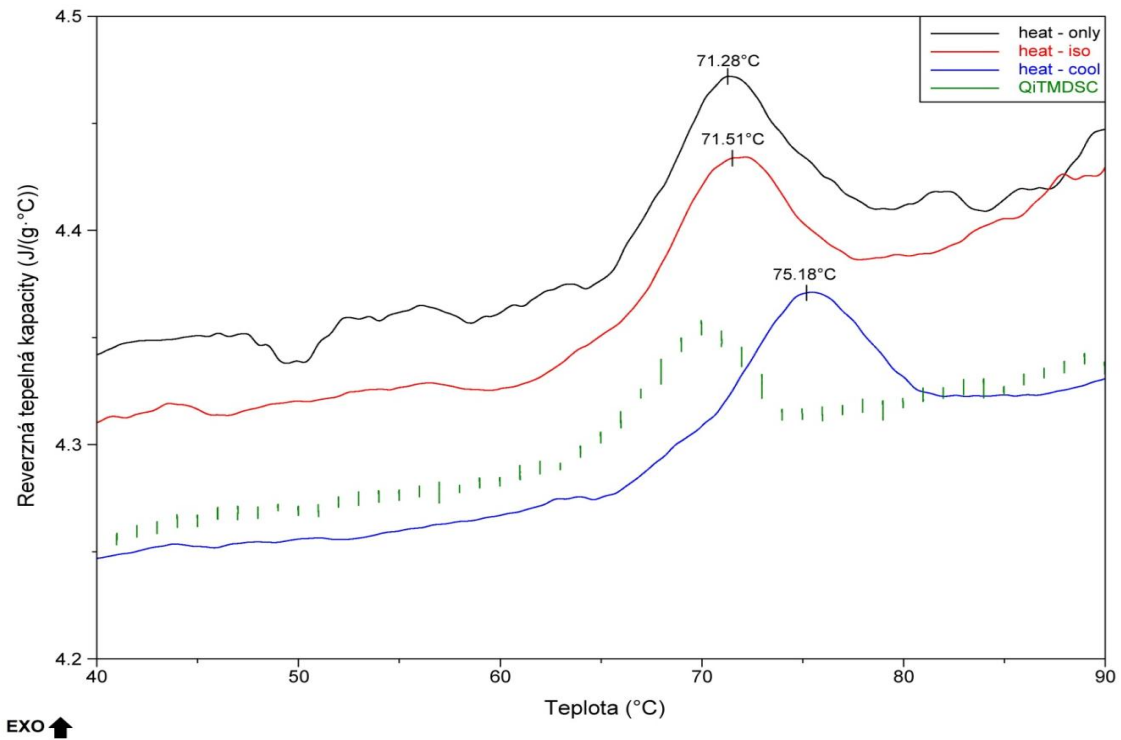
### 5.3 Kvazi-izotermálna analýza

Kvazi-izotermálna TMDSC je z vybraných metód najlepšia a najcitlivejšia k štúdiu denaturácie lyzozýmu. Podľa parametrov uvedených v experimentálnej časti 4.2.3 boli meraniami získané výsledky, ktoré boli najlepšie viditeľné na závislosti reverznej tepelnej kapacity na teplote. Ako môžeme vidieť na obrázku 34 výsledná krivka nie je lineárna, ale je tvorená zvislými úsečkami. Kvôli prerušovanej krivke nebolo možné QiMTDSC vyhodnotiť ako predchádzajúce dve metódy. Môžeme ale vidieť, že denaturácia začína približne pri teplote 65 °C, teplota denaturačného píku je 70 °C a koniec denaturácie je približne pri teplote 73 °C.



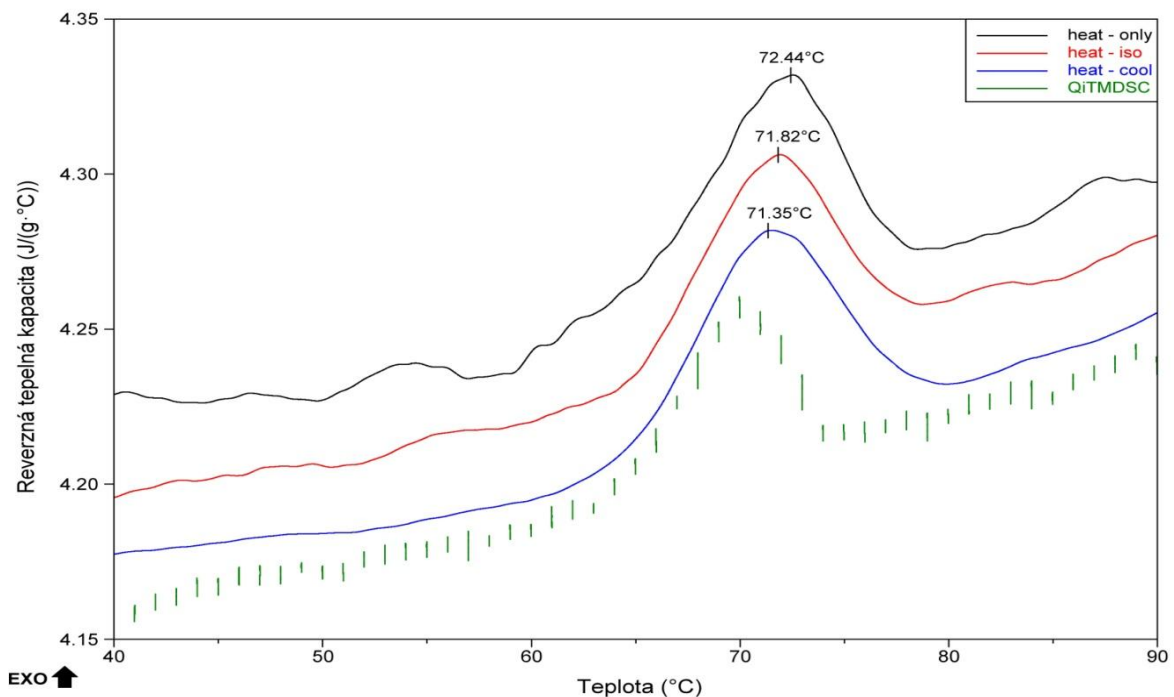
**Obrázok 34:** Závislosť reverznej tepelnej kapacity na teplote QiMTDSC

Na nasledujúcich dvoch obrázkoch môžeme vidieť porovnanie QiMTDSC a MTDSC. V závislosti reverznej kapacity na čase boli vynesené všetky tri módy pri danej perióde a kvazi-izotermálna krivka. Na obrázku 35 sa nachádza porovnanie pre 60 sekundovú periódu kde *heat-only* mód je čiernou farbou, *heat-iso* je červenou farbou, *heat-cool* je červenou farbou a krivka pre kvazi-izotermálnu MTDSC je zelenou farbou. Z porovnaní môžeme potvrdiť, že z vybraných módov pri 60 sekundovej perióde sú vhodné k štúdiu denaturácie lyzozýmu len *heat-only* a *heat-iso* mód. V oboch módoch sú hodnoty píku najbližšie k teplote píku pri QiMTDSC.



**Obrázok 35:** Porovnanie amplitúd pri 60 sekundovej perióde s QiTMDSC

Na obrázku 36 je zobrazená závislosť reverznej tepelnej kapacity módov 100 sekundovej periódy s QiTMDSC. Zo závislosti môžeme vidieť, že teplota denaturácie pri QiTMDSC je približne pri teplote 70 °C. K tejto teplote je najbližšie teplota pri *heat-cool* móde, ktorý bol pri porovnaní amplitúd vybraný ako najvhodnejší pre štúdium denatrácie lyzozýmu pri 100 sekundovej perióde. Zároveň vidíme, že všetky pri módy sú pri použití 100 s perióde dostatočne citlivé k štúdiu denaturácie lyzozýmu.



**Obrázok 36:** Porovnanie módov pri 100 sekundovej perióde s QiTMDSC

## 6 ZÁVER

Cieľom práce bolo overiť použiteľnosť diferenčnej kompenzačnej kalorimetrie (DSC) a teplotne modulovanej diferenčnej kompenzačnej kalorimetrie (TMDSC) pri štúdiu denaturácie lyzozýmu. Pri oboch metódach bola denaturácia viditeľná, takže obidve metódy sú vhodné k zaznamenávaniu denaturácie lyzozýmu.

Nakoľko sa v súčasnosti metódy termickej analýzy dostali viac do popredia, bolo jedným z cieľov experimentálnej časti bližšie popísať vybrané metódy a interpretovať výsledky, ktoré môžeme pomocou merania získať. Ako prvá bola použitá DSC, ktorej výsledkom merania je celkový tepelný tok, ktorý odpovedá množstvu tepla potrebného k vyrovnaniu teplôt. Z výsledku sme zistili, že k denaturácii lyzozýmu dochádza približne pri teplote 72 °C a má endotermický charakter, ktorý sme zistili po integrácii píku kde sme dostali hodnotu dodaného tepla.

Druhou metódou bola TMDSC, ktorá sa od klasickej DSC líši možnosťou rozdeliť celkový tepelný tok na jeho reverzibilnú a nereverzibilnú zložku. Základným výsledkom, z ktorého sa vychádza je modulovaný tepelný tok, ktorý dokáže softvér rozdeliť na celkový tepelný tok a jeho dve zložky. Po rozdelení tepelného toku na jednotlivé zložky bolo ďalej zistené, že denaturácia je tvorená reverzibilnou (termodynamickou) zložkou. Ďalším parametrom, ktorý vieme z tepelného toku odvodiť je tepelná kapacita. Tepelná kapacita môže byť opäť rozdelená na reverznú a nereverznú, pričom reverzná časť tepelnej kapacity odpovedá reverzibilnej zložke tepelného toku. V závislosti reverznej tepelnej kapacity na teplote bolo pri striedaní procesu zahrievania a chladenia zistené, že denaturácia lyzozýmu je nevratná, pretože pri chladení nebol pozorovaný žiaden tepelný prechod.

Z výsledku je vidieť, že obidve metódy sú vhodné k štúdiu denaturácie proteínov, preto sme sa v ďalšom experimente zamerali na optimalizáciu metód. Pri optimalizácii sme vychádzali z troch vplyvov, ktoré môžu ovplyvniť priebeh denaturácie a to rýchlosť ohrevu, amplitúda a perióda. Vplyv rýchlosti ohrevu na priebeh denaturácie bol pozorovaný pomocou DSC, kde zo štyroch rýchlostí ohrevu tj. 1 °C/min, 2 °C/min, 5 °C/min a 10 °C/min bolo sériou experimentov zistené, že s rastúcou rýchlosťou ohrevu sa teplota denaturácie posúva k vyšším teplotám. Ako najlepšia rýchlosť ohrevu bola zvolená rýchlosť 2 °C/min. Vplyv periódy a amplitúdy bol sledovaný pomocou TMDSC kde boli porovnávané módy *heat-iso*, *heat-only* a *heat-cool* pri 60 sekundovej a 100 sekundovej perióde. Meraním bolo zistené, že amplitúda ani perióda nemajú výrazný vplyv na priebeh denaturácie pri 100 sekundovej perióde. Pri 60 sekundovej perióde bolo zistené, že amplitúda pri *heat-cool* móde došlo k posunu denaturácie k vyšším hodnotám. Avšak samotný posun nemusí byť spôsobený konkrétnym módom, ale meranými vzorkami, ktoré neboli pripravené spolu s ostatnými vzorkami.

Porovnaním jednotlivých módov pri danej perióde boli stanovené módy, ktoré vnášajú najmenšie chyby pri štúdiu denaturácie lyzozýmu. Pri 60 s perióde bol ako najlepší mód zvolený *heat-iso* a pri 100 s perióde bol vybraný *heat-cool* mód. V poslednom kroku boli módy porovnané s kvazi-izotermálnou TMDSC, ktorá je považovaná za najpresnejšiu metódu. QiTMDSC bola vyhodnotená len zo závislosti reverznej tepelnej kapacity na teplote kde bolo vidieť, že denaturácia prebieha v teplotnom rozmedzí od 65 do 73 °C a teplota denaturácie lyzozýmu je okolo 70 °C.

## 7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] KODÍČEK, Milan, Olga VALENTOVÁ a Radovan HYNEK. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. Vydání první. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2015. ISBN 978-80-7080-927-3.
- [2] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.
- [3] ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulární biologie*. 4., (inovované) vyd. Brno: Stanislav Rosypal, 2005. ISBN 80-902-5625-2.
- [4] ŠÍPAL, Zdeněk. *Biochemie: Celostát.vysokoškol.učeb.pro stud.pedag.a přírodověd.fak.stud.oboru 76-12-8 učitelství všeobecněvzdělávacích předmětů*. 1.vyd. Praha: SPN, 1992. Učebnice pro vysoké školy (Státní pedagogické nakladatelství). ISBN 80-042-1736-2.
- [5] *Strukturní biochemie*. b.r. Učebnice pro vysoké školy (Státní pedagogické nakladatelství).
- [6] Overview of Crosslinking and Protein Modification. *Thermo Fisher Scientific* [online]. Walham, b.r. [cit. 2017-03-04]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-crosslinking-protein-modification.html>
- [7] JOLLÈS, P. *Lysozymes: A Chapter of Molecular Biology*. b.r. DOI: 10.1002/anie.196902271. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.196902271>
- [8] RUPLEY, J A, L BUTLER, M GERRING, F J HARTDEGEN a R PECORARO. Studies on the enzymic activity of lysozyme, 3. The binding of saccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1967, **57**(4), 1088–1095.
- [9] LASCHTSCHENKO, P. *Über die keimtötende und entwicklungshemmende Wirkung von Hühnereiweiß*. b.r. DOI: 10.1007/BF02216170.
- [10] VODRÁŽKA, Zdeněk, Pavel RAUCH a Jan KÁŠ. *Enzymologie*. Vyd. 3. přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. ISBN 80-708-0330-4.
- [11] IBRAHIM, Hisham R, Tetsuji MATSUZAKI a Takayoshi AOKI. *Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function*. b.r. DOI: 10.1016/S0014-5793(01)02872-1. Dostupné také z: [http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793\(01\)02872-1](http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793(01)02872-1)
- [12] ŠTRAHA, Pavel a Zdeněk TRÁVNÍČEK. *Termická analýza*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2011.
- [13] RAMACHANDRAN, V. S. *Handbook of thermal analysis of construction materials*. Norwich, N.Y.: Noyes Publications/William Andrew Pub., 2003. ISBN 08-155-1487-5.

- [14] KLOUŽKOVÁ, A., P. ZEMENOVÁ, J. KLOUŽEK a W. PABST. *Termická analýza: Zřízení laboratoře pro praktickou výuku termické analýzy se zaměřením na anorganické nekovové materiály*. Praha: VŠCHT, 2012.
- [15] EDITED BY PAUL GABBOTT., . *Principles and applications of thermal analysis*. 1. ed. Oxford: Blackwell Pub, 2008. ISBN 978-047-0697-702.
- [16] WATSON, E. S., M. J. O'NEILL, Joshua. JUSTIN a Nathaniel. BRENNER. *A Differential Scanning Calorimeter for Quantitative Differential Thermal Analysis*. b.r. DOI: 10.1021/ac60213a019.
- [17] VANÍČEK, Jiří. *Metody termické analýzy*. Liberec: Katedra textilních materiálů, TF, TÚ, 2006.
- [18] HATAKEYAMA, T. a F. X. QUINN. *Thermal analysis: fundamentals and applications to polymer science*. 2nd ed. New York: Wiley, 1999. ISBN 04-719-8362-4.
- [19] LOBO, Hubert. a Jose V. BONILLA. *Handbook of plastics analysis*. New York: Marcel Dekker, 2003. Plastics engineering (Marcel Dekker, Inc.), 68. ISBN 08-247-5573-1.
- [20] SIMON, Sindee L. *Temperature-modulated differential scanning calorimetry: theory and application*. b.r. DOI: 10.1016/S0040-6031(01)00493-2.
- [21] HAINES, P. J. *Principles of thermal analysis and calorimetry*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2002. ISBN 08-540-4610-0.
- [22] THOMAS, Leonard C. *Modulated DSC Technology*. 109 Lukens Drive, New Castle, DE 19720, USA, 2006. Dostupné také z: [www.tainstruments.com](http://www.tainstruments.com)
- [23] Thermal Analysis of Composites *Using DSC*. KESSLER, Michael. *Advanced Topics in Characterization of Composites*. Victoria, BC, Canada: Trafford Publishing, 2004, s. 11-35. ISBN 978-1-41203-639-9.
- [24] QI, Sheng a Duncan Q. M. CRAIG. *The Development of Modulated, Quasi-Isothermal and Ultraslow Thermal Methods as a Means of Characterizing the  $\alpha$  to  $\gamma$  Indomethacin Polymorphic Transformation*. b.r. DOI: 10.1021/mp2003412.
- [25] OTUN, Sarah O., Elizabeth MEEHAN, Sheng QI a Duncan Q. M. CRAIG. *The Use of Quasi-Isothermal Modulated Temperature Differential Scanning Calorimetry for the Characterization of Slow Crystallization Processes in Lipid-Based Solid Self-Emulsifying Systems*. b.r. DOI: 10.1007/s11095-014-1535-8.
- [26] MARSHALL, Gavin, Peter VALTCHEV, Fariba DEHGHANI a Vincent G. GOMES. *Thermal denaturation and protein stability analysis of Haliotis rubra hemocyanin*. b.r. DOI: 10.1007/s10973-015-4827-2.
- [27] SI, J.-L., J.-Q. ZHENG, H. LI a Y.-L. ZHANG. *Effect of salt content on the denaturation of pike eel (Muraenesox cinereus Forsskål, 1775) actomyosin*. b.r. DOI: 10.1111/jai.12681. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jai.12681>

- [28] CAO, Xiaomin, Yun *TIAN*, *Zhiyong WANG*, *Yuwen LIU* a *Cunxin WANG*. BSA denaturation in the absence and the presence of urea studied by the iso-conversional method and the master plots method. *b.r.* DOI: 10.1007/s10973-010-0773-1.
- [29] GIUGLIARELLI, Alessandra, Marco *PAOLANTONI*, *Assunta MORRESI* a *Paola SASSI*. Denaturation and Preservation of Globular Proteins: The Role of DMSO. *b.r.* DOI: 10.1021/jp308655p.
- [30] MALLAMACE, Domenico, Carmelo *CORSARO*, *Cirino VASI*, *Sebastiano VASI*, *Giacomo DUGO* a *Francesco MALLAMACE*. The protein irreversible denaturation studied by means of the bending vibrational mode. *b.r.* DOI: 10.1016/j.physa.2014.06.007.
- [31] WOLZ, Magdalena a Ulrich *KULOZIK*. *Thermal denaturation kinetics of whey proteins at high protein concentrations.* *b.r.* DOI: 10.1016/j.idairyj.2015.05.008.
- [32] TELLO-SOLÍS, Salvador R a *Bernardo ROMERO-GARCÍA*. *Thermal denaturation of porcine pepsin: a study by circular dichroism.* *b.r.* DOI: 10.1016/S0141-8130(00)00154-9.
- [33] KOTERA, M., T. *NISHINO* a *K. NAKAMAE*. *Imidization processes of aromatic polyimide by temperature modulated DSC.* *b.r.* DOI: 10.1016/S0032-3861(99)00546-7.
- [34] BULUT, Sami a Christoph *SCHICK*. *Devitrification of the amorphous fractions of starch during gelatinisation.* *Carbohydrate Polymers.* 2012, 90(1), 140-146. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.05.006. ISSN 01448617.
- [35] HU, Xiao, Xiuli *WANG*, *Jelena RNJAK*, *Anthony S. WEISS* a *David L. KAPLAN*. *Biomaterials derived from silk–tropoelastin protein systems.* *b.r.* DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.044.
- [36] WEI, Chih-Lung, Ming *CHEN* a *Feng-Er YU*. *Temperature modulated DSC and DSC studies on the origin of double melting peaks in poly(ether ether ketone).* *b.r.* DOI: 10.1016/j.polymer.2003.10.009.
- [37] TODA, Akihiko, Tatsuro *ODA*, *Masamichi HIKOSAKA* a *Yasuo SARUYAMA*. *A new analyzing method of temperature modulated DSC of exo- or endo-thermic process: Application to polyethylene crystallization.* 1997, , 47-63. DOI: 10.1016/S0040-6031(97)00051-8.
- [38] CHEN, W. *Study of crystallization kinetics by temperature-modulated DSC.* *b.r.* DOI: 10.1016/S0032-3861(99)00621-7.
- [39] RIGHETTI, Maria Cristina a *Elpidio TOMBARI*. *Crystalline, mobile amorphous and rigid amorphous fractions in poly(L-lactic acid) by TMDSC.* *b.r.* DOI: 10.1016/j.tca.2010.12.024.
- [40] OBRUCA, Stanislav, Petr *SEDLACEK*, *Filip MRAVEC*, *Ota SAMEK* a *Ivana MAROVA*. *Evaluation of 3-hydroxybutyrate as an enzyme-protective agent against heating and oxidative damage and its potential role in stress response of poly(3-hydroxybutyrate) accumulating cells.* *b.r.* DOI: 10.1007/s00253-015-7162-4.

## 8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

$\alpha$	alfa
atď	a tak ďalej
$\beta$	beta
$\beta$	lineárna konštanta rýchlosti ohrevu
BSA	hovädzí sérový albumín
Ca-ATPáza	adenosin trifosfatáza transportujúca vápenaté ionty
$C_s$	špecifická tepelná kapacita
C-N	nitrilová skupina
COOH	karboxylová skupina
DMSO	dimetylsulfoxid
DSC	diferenčná kompenzačná kalorimetria
DTA	diferenčná termická analýza
$f(T, t)$	tepelný tok z kinetických procesov
$\Delta G$	zmena Gibbsovej energie
g	gram
hmot. %	hmotnostné percento
$\Delta H$	zmena entalpie
J	Joule
K	Kelvin
mg	miligram
min	minúta
ml	mililiter
MS Excel	Microsoft Excel
napr.	napríklad
NH	imidová skupina
NH <sub>2</sub>	aminoskupina



nm	nanometer
PEET	polyéteréterketón
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrácie vodíkových katiónov v roztoku
QiTMDSC	kvazi – izotermnána teplotne modulovaná diferenčná kompenzačná kalorimetria
$\sigma$	smerodajná odchylka
s	sekunda
$\Delta S$	zmena entropie
$T$	absolútna teplota
TA	termická analýza
TG	termogravimetria
tj.	to je
TMA	termomechanická analýza
TMDSC	teplotne modulované diferenčná kompenzačná kalorimetria
TOA	termooptická analýza
°C	stupeň Celsia