

Charakterizace fibrilárních proteinů

Bc. Alena Navrátilová

Diplomová práce
2020

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Bc. Alena Navrátilová
Osobní číslo:	T18250
Studijní program:	N2808 Chemie a technologie materiálů
Studijní obor:	Materiálové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Téma práce:	Charakterizace fibrilárních proteinů

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na dané téma.
2. Připravte polymerní roztoky na bázi hedvábných proteinů za rozdílných fyzikálních podmínek.
3. Připravené roztoky charakterizujte pomocí dynamického rozptylu světla.
4. Z připravených roztoků imobilizujte dispergovaný protein na povrchu slidy a proveďte jeho charakterizaci pomocí mikroskopie atomárních sil.
5. Experimentální výsledky přehledně diskutujte a uveďte hlavní závěry práce.

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

Seznam doporučené literatury:

1. Hunter, R.J., Introduction to Modern Colloid Science. Oxford University Press, 1994.
2. Kubínek, R., Mikroskopie skenující sondou, Univerzita Palackého v Olomouci 2003, ISBN 80-244-0602-0.
3. Humeník, M., Smith, A., Arndt, S., Scheibel, T., Ion and Seed Dependent Fibril Assembly of a Spidroin Core Domain, Journal of Structural Biology 191(2) (2015) 130-138.
4. Humeník, M., Drechsler, M., Scheibel, T., Controlled Hierarchical Assembly of Spider Silk-DNA Chimeras into Ribbons and Raft-Like Morphologies, Nano Letters 14(7) (2014) 3999-4004.
5. Temenoff, J.S., Biomaterials: The Intersection of Biology and Materials Science, Rice University, 2009, ISBN-13:9780130097101.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Antonín Minařík, Ph.D.**
Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání diplomové práce: **3. února 2020**
Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Mgr. Aleš Mráček, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 17. února 2020

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně

.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

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

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

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

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

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

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

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

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

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

ABSTRAKT

Byly studovány agregační schopnosti *Bombyx mori* fibroinu (BMF) v roztocích a na fázových rozhraních pomocí mikroskopie atomárních sil a dynamického rozptylu světla. Studovanými proměnnými byl vliv disperzního prostředí, koncentrace, teploty, teplotního spádu, filtrace a doby skladování roztoku před jeho depozicí na povrch slídy. Z experimentálních výsledků vyplynuly rozdílné agregační schopnosti tohoto biopolymeru v závislosti na teplotních podmínkách přípravy polymerního roztoku a jeho koncentraci v daném disperzním prostředí. Pomocí vhodně nastaveného teplotního spádu, jenž vyvolává organizované toky kapaliny lze zcela zásadně měnit velikost agregovaných struktur na bázi BMF.

Klíčová slova: hedvábný protein, rozpouštědla, agregace, fibrily, mikroskopie atomárních sil, dynamický rozptyl světla

ABSTRACT

Aggregation capabilities of *Bombyx mori* fibroin (BMF) in solution and on phase interfaces by atomic force microscopy and by dynamic light scattering were studied. The studied variables were the influence of the dispersion medium, concentration, temperature, temperature drop, filtration and storage time of the solution before its deposition on the mica surface. The experimental results showed different aggregation capabilities of this biopolymer depending on temperature conditions for preparation of polymer solution and its concentration in the given dispersion medium. By means of a suitably set temperature gradient, which causes an organized flow of liquid the size of the aggregated structures based on BMF can be fundamentally changed.

Keywords: silk protein, solvents, aggregation, fibrils, atomic force microscopy, dynamic light scattering

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Ing. Antonínu Minaříkovi, PhD. za trpělivost, cenné rady a péči, kterou mi věnoval.

Také bych chtěla poděkovat Ing. Karolíně Kocourkové a Ing. Markétě Kadlečkové za rady a čas, které mi věnovaly.

Dále děkuji své rodině a příteli za trpělivost a podporu při studiu.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 HEDVÁBÍ	12
1.1 PROCES TVORBY HEDVÁBÍ.....	13
1.2 HEDVÁBNÉ PROTEINY	13
1.2.1 Hedvábný fibroin	14
1.2.2 Sericin	15
1.3 REGENEROVANÉ HEDVÁBÍ.....	15
1.3.1 Degumming.....	15
1.3.2 Rozpuštění regenerovaného BMF.....	16
1.4 APLIKACE REGENEROVANÉHO BMF	16
1.4.1 filmy	17
1.4.2 Vlákná	17
1.4.3 3D struktury	17
1.4.4 3D tisk	18
1.4.5 Nanočástice	18
1.5 VLASTNOSTI REGENEROVANÉHO BMF	18
2 FIBROIN V ROZTOKU	19
2.1 VLIV ROZPOUŠTĚDLA NA KONFORMACI BMF	19
2.1.1 Fibroin v roztocích anorganických solí.....	19
2.1.2 Fibroin v roztocích organických rozpouštědel	19
2.1.3 Fibroin v roztocích organických solí.....	20
2.2 MOLEKULOVÁ DISTRIBUCE BMF V ROZTOKU	20
3 CHARAKTERIZACE FIBRILÁRNÍCH PROTEINŮ	22
3.1 STRUKTURA FIBRILÁRNÍCH PROTEINŮ	22
3.1.1 Sekundární struktura proteinů	22
3.1.2 Samoorganizace fibrilárních proteinů	24
3.1.3 Faktory ovlivňující strukturu proteinů	24
3.2 VYBRANÉ METODY CHARAKTERIZACE STRUKTURY FIBRILÁRNÍCH PROTEINŮ	24
3.2.1 Rentgenová krystalografie (X-Ray crystallography)	24
3.2.2 NMR spektroskopie	25
3.2.3 Kryo-elektronová mikroskopie	25
3.2.4 Mikroskopie atomárních sil.....	25
3.2.5 Dynamický rozptyl světla	28
II PRAKTICKÁ ČÁST	29
4 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ BMF	30
4.1 POUŽITÝ MATERIÁL.....	30
4.2 ČISTĚNÍ POUŽITÝCH NÁDOB	30

4.3	ČISTOTA ROZPOUŠTĚDLA	30
4.4	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ BMF	31
5	METODY CHARAKTERIZACE	34
5.1	MIKROSKOP ATOMÁRNÍCH SIL (AFM).....	34
5.2	DYNAMICKÝ ROZPTYL SVĚTLA (DLS).....	35
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	36
6.1.1	Vliv prostředí na samorganizaci BMF	39
6.2	VLIV TEPLoty	41
6.3	VLIV TEPLotNÍHO SPÁDU	43
6.3.1	Vliv rozpouštědla na samoorganizaci BMF při teplotním spádu.....	47
6.4	VLIV SKLADOVÁNÍ NA SAMOORGANIZACI BMF Z FILTROVANÝCH ROZTOKŮ.....	48
6.5	VLIV ŘEDĚNÍ NA DISTRIBUCI ČÁSTIC CHARAKTERIZOVANOU POMOCÍ DLS	49
	ZÁVĚR	53
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	54
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	59
	SEZNAM OBRÁZKŮ	60

ÚVOD

Fibrilární proteiny v živočišných systémech plní konstrukční a podpůrnou funkci. Jedná se o proteiny jako je kolagen, keratin, fibrin, bílkoviny svalů a také hedvábný fibroin, kterému je věnována tato práce.

Ačkoli vlákna tohoto typu produkují tisíce druhů hmyzu, pouze několik z nich bylo detailněji prozkoumáno, například pavouci *Nephilia Clavipes* nebo larvy bource morušového (*Bombyx mori*). Hedvábí je složeno ze dvou proteinových komplexů – fibroinu a sericinu.

Hedvábný fibroin se vyznačuje vynikajícími mechanickými vlastnostmi, biokompatibilitou a možnostmi kontrolované degradace v biologickém prostředí. Díky těmto vlastnostem si získal pozornost a je studován jeho potenciál pro využití v tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně.

Cílem práce bylo prostudovat a charakterizovat agregační schopnosti *Bombyx mori* fibroinu (BMF) v hexafluoroisopropanolu (HFIP) a na fázových rozhraních kapalina/pevná látka v závislosti na procesních podmínkách přípravy jeho roztoku.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 HEDVÁBÍ

Hedvábná vlákna jsou tvořena dvěma typy proteinů, fibroinem a sericinem, které jsou ve formě vláken produkovány řadou druhů hmyzu jako jsou pavouci, larvy motýlů, roztoči, mouchy a mnoho dalších. Vlákna tohoto typu jsou produkována mnoha tisíci druhů hmyzu, ale jen několik z nich bylo podrobněji studováno, například pavouci *Nephilia Clavipes* nebo larvy bource morušového (*Bombyx mori*). [1, 2]

Obecně je hedvábí děleno do dvou skupin:

- a) hedvábí produkované divoce žijícími druhy jako jsou motýly rodu *Antheraea*, tzv. plané hedvábí
- b) hedvábí tvořené larvami bource morušového, tzv. komerční hedvábí.

Plané hedvábí se od komerčně produkovaného liší kompozicí proteinů, vlastnostmi a barvou. Tento typ hedvábí není příliš rozšířen, protože na rozdíl od komerčního hedvábí nemá vysokou výtěžnost, jako je tomu u hedvábí z *Bombyx mori*, kterému je věnována tato práce. [3]

Samotné hedvábné vlákno se pak skládá ze dvou paralelních fibroinových vláken obklopených sericinovým obalem, který drží vlákna pohromadě. Tento komplex je pokryt vrstvou proteinů a lipidů, která zastává ochrannou funkci. 70–80% vlákna tvoří fibroin, 12–28 % sericin a 0,8-1% lipidy. [2, 3]

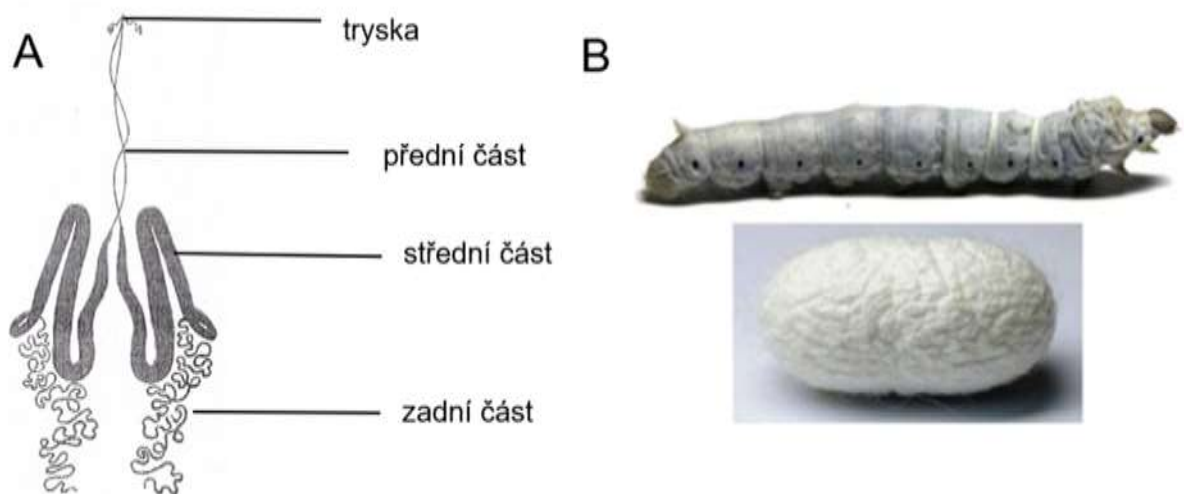


Obr. 1 Struktura hedvábného vlákna [1]

1.1 Proces tvorby hedvábí

Samotný proces tvorby hedvábného vlákna je založen na principu suchého zvlákňování z vodného roztoku, kdy za specifických podmínek dochází k separaci vlákna. Larvy *B. mori* mají pár snovacích žláz, které jsou v těle symetricky umístěny. Každá ze žláz je připojena k úzkému kanálku zakončeného tryskou ve spodní části pysku housenky. Obě žlázy jsou rozděleny do tří sekcí; zadní, střední a přední. V zadní části dochází k syntéze fibroinového gelu. V střední sekci je syntetizován sericin a tato část zároveň slouží k ukládání fibroinu před vstupem do poslední části. V přední sekci žlázy se fibroin následkem fázové separace seskupuje do konfigurace podobné micelám s anizotropními vlastnostmi tekutých krystalů. Na výstupu ze žláz přechází tato fáze na semi-krystalickou, ve vodě nerozpustnou formu s vysokým obsahem β -skládaných listů.

Tvorbu vlákna ovlivňuje obsah vody a koncentrace sodných, draselných a vápenatých iontů, která ovlivňuje pH gradient ve žlázách. [4–6] Gradient pH je klíčový pro tvorbu vlákna, hodnoty pH se pohybují od 6,9 (zadní sekce žlázy) přes 5 (střední část) k 4,8 (přední část). [4] Mechanické vlastnosti vlákna jsou výrazně ovlivněny samotnou tryskou a tlakem vyvíjeným svaly kolem ní.[5, 6]



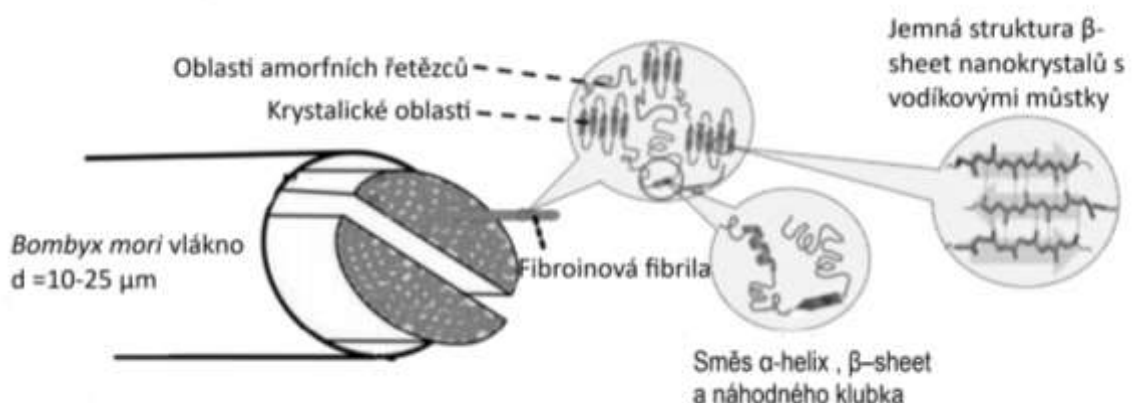
Obr. 2 A) Schéma snovacích žláz B) housenka a kokon *Bombyx mori* [7, 8]

1.2 Hedvábné proteiny

Jak již bylo zmíněno, hedvábné vlákno se skládá ze dvou proteinových komplexů – sericinu a fibroinu, jež budou v následujících podkapitolách více přiblíženy.

1.2.1 Hedvábný fibroin

Fibroin, jehož struktura je znázorněna na Obr.3, patří mezi fibrilární proteiny. Je to heterodimer složený z lehkých (L) a těžkých (H) polypeptidových řetězců. Tyto řetězce jsou navzájem provázány přes C-konec těžkého řetězce disulfidovou vazbou. H-L komplex je dále vázán nekovalentními vazbami glykoproteinem P-25 a prostřednictvím hydrofobních interakcí tak tvoří micelární elementární jednotku. Těžký řetězec je složen z 12 hydrofobních domén proložených 11 hydrofilními doménami. Na rozdíl od hydrofilních domén, hydrofobní domény obsahují opakující se sekvenci aminokyselin. [7, 9] V primární sekvenci H-řetězce jsou nejvíce zastoupeny glycin (43–46 %), alanin (25–30 %) a serin (12 %), v menším množství také tyrosin (5 %) a valin (2 %) a dále také kyselina asparagová, fenylalanin a další. [7] V hydrofobních doménách se nejvíce vyskytují glycin, alanin, serin, threonin a valin. Tyto domény, spojené vodíkovými vazbami, Van der Walsovými silami a hydrofobními interakcemi, tvoří antiparalelní β -sheet krystality, tvořící krystalické oblasti. Naproti tomu hydrofilní domény, které jsou tvořeny primárně aminokyselinami jako je kyselina glutamová, kyselina asparagová, arginin a lysin, ve fibroinu utváří amorfní oblasti, které obsahují směs náhodných klubek, β -skládaných listů a α -šroubovic. [7, 9, 10] Hydrofobní charakter krystalických oblastí poskytuje vláknům dobré mechanické vlastnosti a nerozpustnost ve vodě, většině organických rozpouštědel a zředěných kyselinách a zásadách. Amorfní oblasti naopak poskytují elasticitu a umožňují stáčení řetězce během krystalizace při procesu zvláknování. L-řetězec je tvořen hydrofilními doménami s nízkou nebo žádnou krystalinitou. [2, 11]



Obr. 3 Struktura fibroinového vlákna [12]

1.2.1.1 Krystalická struktura hedvábného fibroinu

Hedvábný fibroin (BMF) se vyskytuje ve třech krystalických stavech – silk I, silk II a v malé části silk III. [2, 13] Silk I je metastabilní, ve vodě rozpustná forma, která se nachází ve snovacích žlázách. Tento stav se vyznačuje částečně uspořádanou strukturou obsahující náhodná klubka a α -šroubovice. Silk II je pevná, ve vodě nerozpustná forma, jež vzniká po vytlačení ze snovacích žláz. Obsahuje krystalické domény tvořené antiparalelními β -sheety a amorfní oblasti. [10, 14] Předpokládá se, že přechod silk I na silk II je iniciován zejména smykovým tokem a poklesem pH, který je způsoben zvýšenou koncentrací solí v přední části snovacích žláz. Pokles pH zapříčiňuje strukturní změny v oblastech s vysokou koncentrací kyselých reziduí a dochází tak k nukleaci β -sheetů. [14] Silk III byla objevena na rozhraní vzduch/voda ve vodných roztocích fibroinu. Většinou se vyskytuje ve formě trojitě šroubovicové struktury. [9, 15]

1.2.2 Sericin

Sericin je globulární hydrofilní protein obsahující převážně aminokyseliny serin (40 %), glycin (16 %), kyselinu glutamovou, kyselinu asparagovou, threonin a tyrosin. V několika vrstvách obaluje fibroinová vlákna (viz Obr.1) a napomáhá lepší soudržnosti kokonu. Velmi snadno se rozpouští v horké vodě. Při výrobě regenerovaného hedvábí je jeho odstranění důležitým krokem. [16, 17]

1.3 Regenerované hedvábí

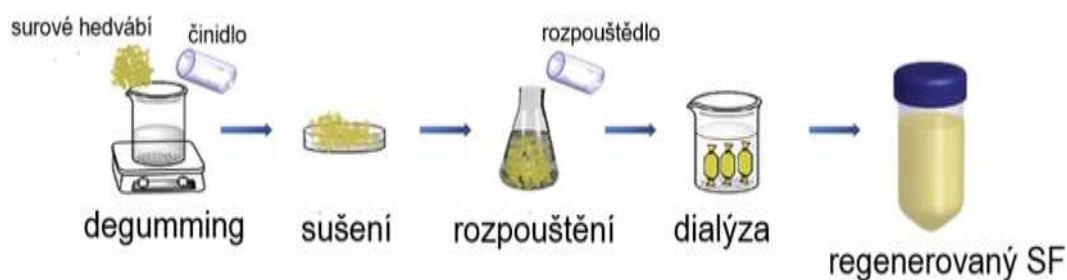
1.3.1 Degumming

Regenerovaný hedvábný fibroin je získáván z kokonů, které larva bource morušového utváří v posledním stádiu proměny v dospělého jedince. Prvním krokem je odstranění sericinu, tzv. degumming. Díky tomuto kroku se vlákno stává matné, tvrdé, hladké a získává tak vzhled typický pro hedvábné tkaniny. Další výhodou odstranění sericinu z hedvábného vlákna je zvýšení biokompatibility a snížení alergických reakcí, které po dlouhou dobu znemožňovaly využití BMF v regenerativní medicíně a farmacii. [18, 19] Jak bylo zmíněno výše, sericin je dobře rozpustný v horké vodě, proto je vaření kokonů ve vodě po dobu 5 až 60 minut nebo 30 minut v autoklávu při 120 °C běžně používanou metodou. [20] Dalšími používanými činidly jsou roztoky kyselin a zásad, například Na_2CO_3 , NaHCO_3 nebo vodné roztoky urey obsahující Tris-SO_4 . Běžně se také využívají roztoky mýdel nebo syntetických detergentů. Nicméně vyšší teplota a pH silnějších zásad může způsobit degradaci fibroinu, a ztrátu

mechanických vlastností. Pro minimalizaci těchto účinků je vhodnější uvedený proces zkrátit a provádět opakovaně.[18, 20, 21] Z důvodů možných negativních dopadů alkalických činidel na kvalitu regenerovaného fibroinu a vysoké spotřeby vody byly v posledních letech studovány alternativní metody degummingu. Četné studie se zabývaly použitím enzymů, konkrétně proteáz a lipáz. Nejlepších výsledků bylo dosaženo působením alkalických proteáz z hlediska odstranění sericinu a zachování mechanických a vzhledových vlastností vlákna. Proteázy v kombinaci s lipázami taktéž účinně odstranily sericin, a navíc zvýšily smáčivost vlákna.[22–24] Další studovanou metodou bylo působení páry na předem namočená surová hedvábná vlákna. Tento způsob se jeví jako výhodný s ohledem na nižší spotřebu vody a zachování vlastností regenerovaného hedvábí. [25]

1.3.2 Rozpouštění regenerovaného BMF

Po degummingu je fibroin promýván, vysušen a dále rozpouštěn. K rozpouštění fibroinových vláken po odstranění sericinu se běžně využívají vodné roztoky 9,3M LiBr nebo 9M LiSCN. Velmi dobrou výtěžnost poskytují systémy CaCl₂/etanol/voda a LiBr v alkoholovém vodném roztoku. Následnou dialýzou jsou z roztoku odstraněny nežádoucí ionty. Rozpouštění a dialýza jsou velmi časově náročné procesy a jejich volba ovlivňuje výslednou konformaci fibroinu, rozpustnost, gelaci a stupeň hydrolyzy. Výsledný roztok může být dále zpracován na požadovanou formu (např. film) nebo lyofilizován a opět rozpouštěn ve vhodném rozpouštědle. [20, 26]



Obr. 4 Proces regenerace hedvábného fibroinu [7, 19]

1.4 Aplikace regenerovaného BMF

Regenerovaný BMF může být dále zpracován na filmy, vlákna, pěny, scaffoldy či nanočástice. Ať už samotný nebo jako kompozit s polysacharidy, proteiny nebo syntetickými polymery se jeví jako nadějný biomateriál pro použití zejména v regenerativní medicíně a tkáňovém inženýrství. [27, 28]

1.4.1 Filmy

Filmy lze připravit širokou škálou technik v závislosti na metodě regenerace. Mezi nejjednodušší techniky patří sušení čili odpaření vody/rozpouštědla při laboratorní nebo zvýšené teplotě. Tvorbu β -sheet krystalů lze podpořit přidáním srážecího činidla, nejčastěji se používá metanol, etanol nebo aceton. Při použití metanolu je výsledný film průhledný s vysokým podílem β -sheetů. [26] Filmy připravené odpařením rozpouštědla nedosahují příliš dobrých mechanických vlastností. Proto je výhodnější filmy připravit pomocí spin-coatingu nebo vrstvení. Lze takto získat ultratenké filmy, jejichž mez napětí v tahu může dosáhnout až 100 MPa. Praktické využití filmů stále limituje jejich křehkost. Prozatím je známa jen jedna metoda, kterou lze křehkost potlačit. Vystavením vodním parám nebo vodní lázni lze zvyšovat obsah β -sheetů, což vede ke zvýšení pevnosti a flexibility BMF. [7]

1.4.2 Vlákna

Vlákna regenerovaného BMF lze vyrobit pomocí mokrého zvlákňování nebo elektrospiningu (elektrostatické zvlákňování). Pro tyto metody jsou nejčastěji používány roztoky připravené rozpouštěním v organickém rozpouštědle jako je například kyselina mravenčí, hexafluoroisopropanol (HFIP) nebo trifluoroaceton (TFA) nebo vodné roztoky. Při elektrospiningu se mezi elektrodou, na níž je roztok polymeru a druhou elektrodou – kolektorem generuje elektrické pole, v jehož směru dochází k tažení vláken z roztoku. Během cesty k druhé elektrodě dochází k odpaření rozpouštědla a formování vláken. Výsledný průměr vláken, který se pohybuje od desítek po tisíce nanometrů, závisí zejména na použitém rozpouštědle. Vlákna z organických rozpouštědel dosahují menších průměrů než z vodných roztoků. Výhodou elektrospiningu je výroba jemných vláken ve formě netkané textilie. Při mokrému zvlákňování je využíváno koagulační lázně (metanolu nebo etanolu) a vlákna dosahují průměrů desítek až stovek mikrometrů. Takto zpracovaná vlákna regenerovaného BMF se používají jako chirurgické nitě. [26, 28, 29]

1.4.3 3D struktury

Hedvábný fibroin může být zpracován do podoby 3D porézních struktur a to konkrétně pěny, mřížky a trubičky, které mají potenciál využití v tkáňovém inženýrství. Nejčastějšími metodami používanými pro výrobu těchto struktur je vysolování, lyofilizace a napěňování. Takto lze zpracovat BMF rozpuštěný ve vodných roztocích solí nebo HFIP. [29] Pro výsledné vlastnosti je zásadní počáteční koncentrace fibroinu, vyšší koncentrace poskytují vyšší pevnost a tuhost struktury. Obsah β -sheetů pak ovlivňuje mechanickou soudržnost

a voděodolnost. Zvolená metoda má dopad na velikost a distribuci pórů a tím mechanické vlastnosti pěn a scaffoldů. Například pěny připravené z vodných roztoků se vyznačují homogennější distribucí pórů než pěny zpracované z roztoků HFIP. [7]

1.4.4 3D tisk

V posledních letech si hedvábný fibroin díky svým vlastnostem získal pozornost jako potenciální materiál pro 3D tisk scaffoldů, protože jiné konvenční metody vytváření takovýchto struktur jsou časově náročné a vyžadují použití chemických činidel, která mohou negativně ovlivnit vlastnosti výsledného produktu. Kombinací BMF s jinými biomateriály (chitosan, HA, želatina, PEG a další) mohou být kompenzovány jejich slabiny z pohledu 3D tiskových úloh. Tímto způsobem lze optimalizovat reologické vlastnosti, biokompatibilitu a zabránit tak nežádoucí imunitní reakci při aplikaci do organismu. [30]

1.4.5 Nanočástice

Díky svým vlastnostem mají BMF nanočástice využití v kosmetice (přípravcích na péči o pleť) a medicíně pro dopravu léčiv nebo enzymů. Byla studována celá řada metod získávání fibroinových nanočástic. Jednou z nich je například srážení BMF vodného roztoku přebytkem polárního rozpouštědla jako je aceton, metanol nebo ethanol, kdy se fibroin z konformace náhodného klubka reorganizuje na konformaci β -sheet. Dále je to například fázová separace pomocí dihydrogenfosforečnanu draselného nebo PVA. V závislosti na zvolené metodě lze získat částice s velikostí 80 nm až 150 μ m. [26, 31]

1.5 Vlastnosti regenerovaného BMF

Jak již bylo zmíněno, přírodní hedvábí má vynikající vlastnosti jako je pevnost, tvrdost a kontrolovatelná biodegradabilita. Youngův modul surových vláken se pohybuje mezi 5 až 12 GPa, mez pevnosti v tahu může dosáhnout až 500 MPa a mezní protažení až 19 %. Široká variabilita mechanických vlastností závisí na mnoha faktorech. Kromě struktury je ovlivňuje kvalita chovu larev a jejich genetická modifikace. V posledních letech se použití fibroinu soustředí zejména na medicínální aplikace. Po dlouhou dobu byla problémem častá nepříznivá reakce imunitního systému. Bylo zjištěno, že hlavní příčinou výskytu alergických reakcí a problémů s biokompatibilitou je sericin. Proto je jeho důkladné odstranění (degumming) před dalším zpracováním BMF klíčové. Pokud je odstraněn, biokompatibilita fibroinu je srovnatelná s běžně používanými biomateriály. Na vlastnosti regenerovaného BMF kromě způsobu degummingu má vliv také způsob regenerace. [9, 32, 33]

2 FIBROIN V ROZTOKU

2.1 Vliv rozpouštědla na konformaci BMF

Hedvábí je nerozpustné ve vodě a v běžných rozpouštědlech pouze botná. Je to způsobeno přítomností intra- a intermolekulárních vodíkových vazeb, vysokou krystalinitou. Naproti tomu je velmi dobře rozpustné v koncentrovaných roztocích organických, anorganických solí (např. LiCNS, LiBr, CaCl₂) a organických rozpouštědlech (kyselina mravenčí, HFIP). Volbou rozpouštědla lze ovlivnit zejména výslednou konformaci BMF a jeho sklon ke konformačním přechodům. [34]

2.1.1 Fibroin v roztocích anorganických solí

Anorganické ionty interagují s vodíkovými vazbami a tím způsobí rozpad nadmolekulární struktury fibroinu, jež zůstává převážně v konformaci náhodného klubka (případně s malým podílem Silk II). [35] Za nižších teplot (-20 °C) může dojít k přechodu na silk I, nicméně tato skutečnost je ovlivněna zejména koncentrací anorganických iontů, silk I je převážně přítomna v roztocích s vyšší koncentrací fibroinu. [34] Výhoda těchto rozpouštědel spočívá v nízké tendenci fibroinu ke konformačním přechodům. Další výhodou z hlediska zpracování je nízká toxicita rozpouštědel. Nicméně přítomnost iontů znemožňuje přímé použití roztoku, který posléze musí být podroben dialýze. Tyto roztoky také mohou způsobovat degradaci řetězců. Kromě toho jsou vodné roztoky anorganických solí a regenerovaného fibroinu velmi nestabilní, mají sklony ke gelovatění a agregaci. Díky těmto nevýhodám je BMF z vodných roztoků těchto solí obtížně zpracovatelný do podoby vláken. [32, 36]

2.1.2 Fibroin v roztocích organických rozpouštědel

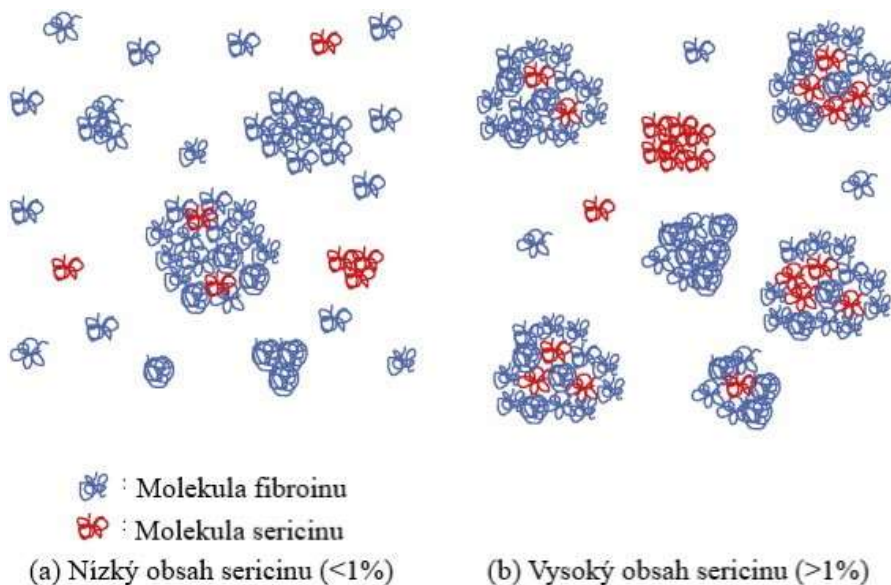
BMF v HFIP zaujímá konformaci α -šroubovice. Po odpaření rozpouštědla a následném srážení v methanolu fibroin přechází do podoby vodě nerozpustné β -sheetů. Hlavní nevýhodami HFIP a ostatních organických rozpouštědel (např. kys. mravenčí) jsou vysoká cena, toxicita a korozivita, jež komplikují jejich širší využití. Tato negativa kompenzuje dobrá stabilita BMF z hlediska nízké agregaci a tendenci ke gelovatění, díky čemuž jsou tyto roztoky vhodné pro výrobu regenerovaných fibroinových vláken. [32, 36]

2.1.3 Fibroin v roztocích organických solí

Organické soli mají rozdílné vlastnosti než čistá organická rozpouštědla, například nižší tlak par a vysokou termální stabilitu. Halogenové a karboxylátové ionty narušují vodíkové vazby v biomakromolekulách a tím zvyšují jejich rozpustnost. Fibroin je rozpustný pouze ve vysoce hydrofilních aniontových kapalinách, které mohou narušit vodíkové vazby. Těmito kapalinami jsou halogeny 1-alkyl-3-metylimidazolia, přičemž alkylový substituent musí mít méně než osm uhlíků, aby byla zachována vysoká polarita, která je pro přerušování vodíkových vazeb zásadní. Rozpustnost ovlivňují nejen ionty, ale také podmínky při rozpouštění – zejména teplota a čas. Většinou je požadována vyšší teplota mezi 80 °C až 100 °C v závislosti na typu soli, a delší čas (až 24 hodin). Je velmi dobře známo, že tyto podmínky mohou způsobit degradaci řetězců a negativně tak ovlivnit mechanické vlastnosti regenerovaného BMF. Tyto důsledky lze potlačit použitím vysokovýkonného ultrazvuku, který proces rozpouštění urychlí. [26]

2.2 Molekulová distribuce BMF v roztoku

Obecně molekulová hmotnost (M_w) je jedním z klíčových faktorů ovlivňující strukturu a vlastnosti polymerních materiálů. Má vliv na biodegradabilitu a mechanické vlastnosti regenerovaného BMF a jeho chování při zpracování do podoby filmů a vláken. Nicméně specifický efekt M_w na vlastnosti a strukturu u hedvábného fibroinu nebyl kvůli obtížně měřitelné distribuci M_w (M_wD) detailně prostudován. [37] Molekulová hmotnost surového hedvábí je závislá jednak na fibroinu, který se skládá ze dvou proteinových řetězců; těžkého ($M_w = 390$ kDa) a lehkého ($M_w = 26$ kDa), a obsahu sericinu, jehož M_w se pohybuje mezi 20 kDa až 310 kDa. [9] Molekulová hmotnost, respektive M_w , regenerovaného BMF v roztoku závisí na metodě degummingu a následně také na zvolené metodě rozpouštění. Při nižším obsahu sericinu od 0 % cca do 1 % (podle dat z FPLC) byla indikována M_w 450 kDa, nad 8 % sericinu byly zaznamenány nižší od M_w 59 kDa do 330 kDa. Naproti tomu z DLS dat vyplývá, že při nižším obsahu sericinu převažují menší částice o velikosti 10-50 nm s malým podílem větších částic cca 1000 nm. Zatímco při vyšším obsahu sericinu převažují částice s velikostí 1000 nm. To naznačuje, že vyšší obsah sericinu indukuje agregaci fibroinových molekul. Na Obr.5 je vyobrazen schématický diagram tohoto jevu. [38]



Obr. 5 Schéma BMF s různým obsahem sericinu [38]

Ačkoli se konkrétní data liší v závislosti na použité metodě odstranění sericinu, lze z nich vyvodit, že vodné roztoky BMF (například v LiBr) poskytují vyšší molekulovou hmotnost, než roztoky BMF v organických rozpouštědlech jako je například HFIP nebo kys. mravenčí. Vysoká hodnota M_w byla zaznamenána také v roztocích BMF v 1-allyl-3-metylimidazolium. [37, 39] Data z DLS poukazují na již známý fakt, že ve vodných roztocích fibroinové molekuly velmi snadno agregují v závislosti na podmínkách (typu rozpouštědla a času rozpuštění). Naproti tomu v organických rozpouštědlech je jejich tendence k agregaci výrazně nižší. [37]

3 CHARAKTERIZACE FIBRILÁRNÍCH PROTEINŮ

Proteiny jsou makromolekuly složené z polypeptidů. Každý polypeptid je tvořen sledem aminokyselinových zbytků, které jsou spojeny polypeptidovou vazbou. Sled aminokyselin je dán genovým kódováním a determinuje konformaci řetězce a tím jeho stabilitu. Obecně se proteiny dělí na dvě skupiny; jednoduché a složené (konjugované). Konjugované proteiny obsahují jednu nebo více nepeptidových složek, nejčastěji to bývají sacharidy (glykoproteiny) nebo například fosfátová skupina (fosfoproteiny). Jednoduché bílkoviny jsou tvořeny pouze polypeptidovým řetězcem. [40] Dělí se na dvě základní skupiny:

1. **fibrilární:** jejich molekuly mají silně protáhlý až vláknitý tvar. (např. kolagen)
2. **globulární:** vyznačují se oblým až kulovým tvarem. (např. globulin)

Fibrilární proteiny se nachází pouze v živočišných systémech. Plní zde konstrukční a podpůrnou funkci. Jedná se o bílkoviny jako je kolagen, keratin, fibrin a bílkoviny svalů a také hedvábný fibroin. Díky schopnosti samoorganizace, vynikajícím mechanickým vlastnostem, biokompatibilitou a možnosti kontrolované degradace mají potenciál pro využití ve tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně. [41, 42]

3.1 Struktura fibrilárních proteinů

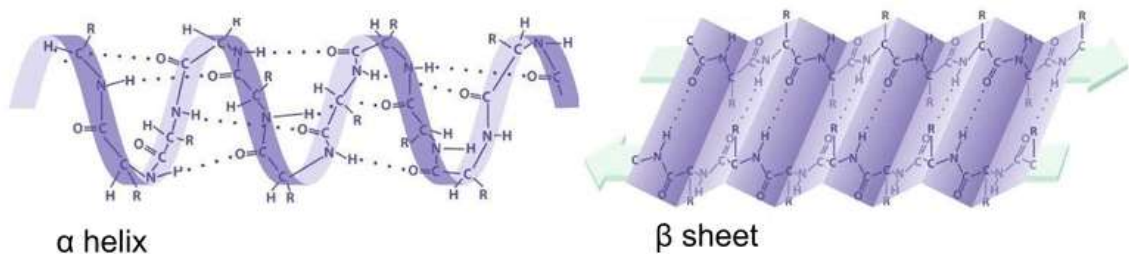
Struktura bílkovin se obecně dělí na čtyři základní[43]:

- a) **Primární struktura:** obsahuje údaj o sekvenci monomerních jednotek v řetězci. Určuje chemické a biologické vlastnosti a specifikuje vyšší uspořádání proteinové struktury.
- b) **Sekundární struktura:** charakterizuje prostorové upořádání jednotlivých částí řetězce, které jsou stabilizovány tzv. slabými (nekovalentními) interakcemi.
- c) **Terciární struktura:** charakterizuje vzájemné uspořádání jednotlivých částí řetězce o dané sekundární struktuře, určuje celkovou konformaci řetězce.
- d) **Kvarterní struktura:** Popisuje prostorové uspořádání podjednotek proteinů složených z více než jednoho polypeptidového řetězce.

3.1.1 Sekundární struktura proteinů

Každý protein zaujímá konformaci na základě toho, jakými aminokyselinami je tvořen jeho polypeptidový řetězec. Mezi jednotlivými částmi řetězce vznikají tzv. slabé

(nekovalentními) interakce, a to zejména vodíkové můstky, elektrostatické síly a hydrofobní interakce. Tyto interakce strukturu stabilizují a vzniká tak sekundární struktura, která se nejčastěji vyskytuje ve dvou základních formách; α -helix a β -sheet. [43]



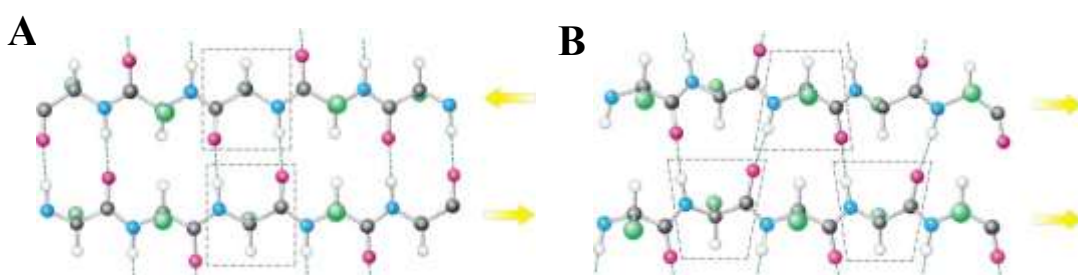
Obr. 6 Sekundární struktura proteinů [44]

3.1.1.1 α -helix

α -helix je pravotočivá šroubovice, jejíž vnitřní část je tvořena stočeným polypeptidovým řetězcem. Vnější část pak tvoří vyčnívající boční řetězce. Je stabilizována vodíkovými můstky mezi C=O skupinou a N-H skupinou každého čtvrtého aminokyselinového zbytku uvnitř hlavního řetězce s opakujícím se torzním úhlem -60° a -40° . Dva a více α -helixů utváří stabilní strukturu, která se nazývá super helix. Je typická pro vláknité proteiny jako jsou například keratin a myosin.[43, 45]

3.1.1.2 β -sheet

β -sheet neboli β skládaný list vzniká sklápěním pěti až deseti polypeptidových jednotek, jejichž řetězec je zcela natažen, pod úhlem -120° až 140° . Tato formace je stabilizována pomocí vodíkových vazeb se sousedním řetězcem orientovaných kolmo na směr řetězců za vzniku zřasených struktur. Přilehlé řetězce v pásech jsou buď paralelní nebo antiparalelní, podle toho, zdali CONH vazby mají stejný nebo opačný směr (viz.Obr.7). Paralelní β -sheety jsou méně stabilní než antiparalelní, i proto jsou paralelní s méně než pěti řetězci vzácné. [43]



Obr. 7 A) Antiparalelní β -sheet B) Paralelní β -sheet [45]

3.1.2 Samoorganizace fibrilárních proteinů

Samoorganizace proteinů je vratný a opakovatelný proces. Je to schopnost spontánní asociace jednotlivých částí systému do definovaných struktur v závislosti na primární sekvenci aminokyselin a podmínkách, mezi které patří teplota a pH. Asociace jednotlivých částí molekul probíhá prostřednictvím nekovalentních interakcí jako jsou vodíkové vazby, van der Waalovy síly, hydrofobní a iontové interakce. V případě hedvábí probíhá samoorganizace při vytlačování vlákna ze snovacích žláz, tento proces byl popsán výše v kapitole 1.1. Samoorganizací regenerovaného BMF dochází k reorganizaci na vlákna s amyloidní strukturou. Studie ukazují, že struktura vláken je primárně složena z β -sheetů a tzv. cross- β konformace. [46–49]

3.1.3 Faktory ovlivňující strukturu proteinů

Nativní stav proteinu ovlivňuje zejména jeho primární sekvence aminokyselin, která ovlivňuje sekundární strukturu. Nativní konformace je nestabilní a lze ji ovlivnit již malými změnami vnějšího prostředí. Zahřejeme-li roztok proteinu, již v malém teplotním rozmezí dochází k rozvinutí některých částí molekuly, které destabilizuje celou strukturu. Změnami pH se mění náboj postranních řetězců aminokyselin a tím dochází k ovlivnění intramolekulárních interakcí. Vliv rozpouštědla a stupeň rozvinutí řetězce je závislý na charakteru řetězce. Fibrilární proteiny obecně odolávají běžným rozpouštědlům, například s vodou a alkoholy příliš neinteragují, pouze dochází k tvorbě vodíkových můstků (botnání) s hydrofilními částmi řetězce. Naproti tomu některé soli (např. NaCl) strukturu stabilizují a jiné ji mohou destabilizovat jako například LiBr. [50]

3.2 Vybrané metody charakterizace struktury fibrilárních proteinů

3.2.1 Rentgenová krystalografie (X-Ray crystallography)

Metoda umožňující analyzovat trojrozměrné uspořádání atomů v molekule na základě difrakčního obrazce Rentgenova záření (RTG) procházejícího materiálem (krystalem). Podle krystalické povahy materiálu se RTG dělí na monokrystalovou (pro monokrystalický materiál) a práškovou (pro analýzu polykrystalů). Experimentální zařízení pro monokrystalovou RTG strukturní analýzu se nazývá čtyřkruhový difraktometr. Krystalografie biologických makromolekul není fundamentálně odlišná od krystalografie nízkomolekulárních sloučenin, ale je složitější kvůli velikosti molekulárního systému. [51]

3.2.2 NMR spektroskopie

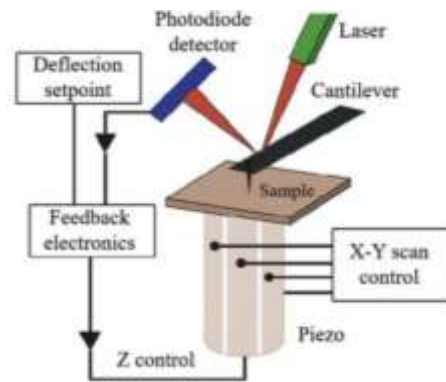
Nukleární magnetická resonance (NMR) využívá interakce atomových jader (s nenulovým jaderným spinem, např. ^{13}C) s magnetickým polem. Oproti RTG krystalografii má výhodu, že není potřeba krystalický vzorek, ale stačí pouze malý objem koncentrovaného roztoku proteinu. NMR poskytuje informaci o struktuře a dynamice proteinů. V kombinaci se znalostí aminokyselinové sekvence je v zásadě možné vypočítat trojrozměrnou strukturu proteinu. Po dlouho dobu nebylo možné analyzovat proteiny s Mw větší než 20 000 Da, protože se zvětšováním velikostí molekuly docházelo ke ztrátě rozlišení. Vývojem techniky v této oblasti se hranice posunula ke 100 000 Da. [52]

3.2.3 Kryo-elektronová mikroskopie

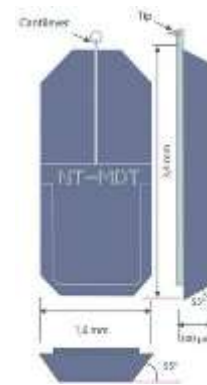
Kryo-elektronový mikroskop umožňuje zobrazení makromolekul a buněk v tzv. vitrifikovaném stavu. Vzorky jsou rychle zmrazeny (vitrifikovány) v tekutém heliu na teplotu přibližně $-200\text{ }^{\circ}\text{C}$, čímž se zachová jejich původní struktura. Aby bylo dosaženo co nejmenšího poškození, používají se ke snímání nízké dávky elektronů. [53]

3.2.4 Mikroskopie atomárních sil

Mikroskopie atomárních sil (AFM) je jednou z metod spadající pod mikroskopii skenující sondou. Schéma principu funkce AFM je vyobrazeno na Obr.8. Je to nedestruktivní technika, umožňující charakterizovat vzorek v různých prostředích (vzduch, kapalina) a přitom nevyžaduje složitou přípravu vzorku. Rekonstruuje trojrozměrnou morfologii vzorku na základě interakce mezi hrotem sondy a vzorkem., jež závislá na vzdálenosti hrotu sondy a povrchem vzorku. Běžně používanými nosnými substráty pro zobrazování proteinů pomocí AFM jsou slída, vysoce uspořádaný pyrolytický grafit (HOPG), zlato a sklo. Nejdůležitější částí AFM je již zmiňovaná sonda skládající se z držáku, ramínka a hrotu. Pohyblivé ramínko může mít trojúhelníkovou nebo obdélníkovou geometrii s délkou 10–200 μm . Sondy běžně používané v AFM jsou vyrobeny z křemíku nebo nitridu křemíku, mohou být pyramidálního nebo kónického tvaru, obvykle s poloměrem mezi 1 a 50 nm. Na Obr.9 je ukázka sondy používané při AFM. [54, 55]



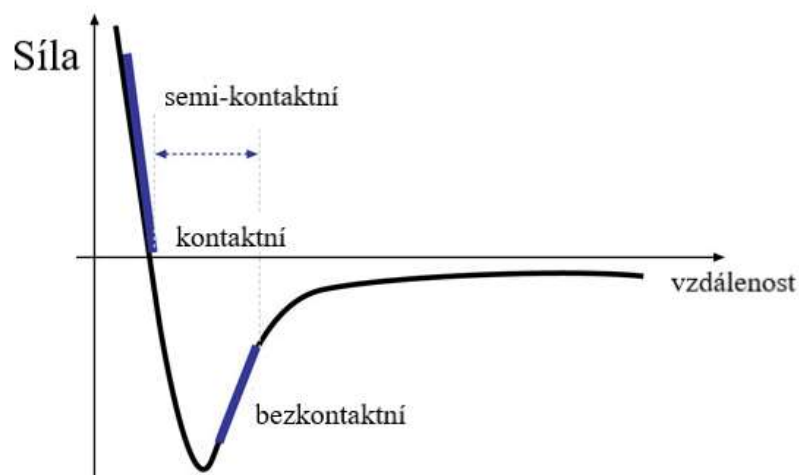
Obr. 8 schéma AFM [55]



Obr. 9 AFM sonda [56]

Na Obr. 10 je vyobrazen průběh sil působících mezi povrchem vzorku a sondou. Z této závislosti vyplývají charakteristické měřicí režimy AFM, ve kterých lze provádět měření. Měření lze provádět ve třech režimech [57]:

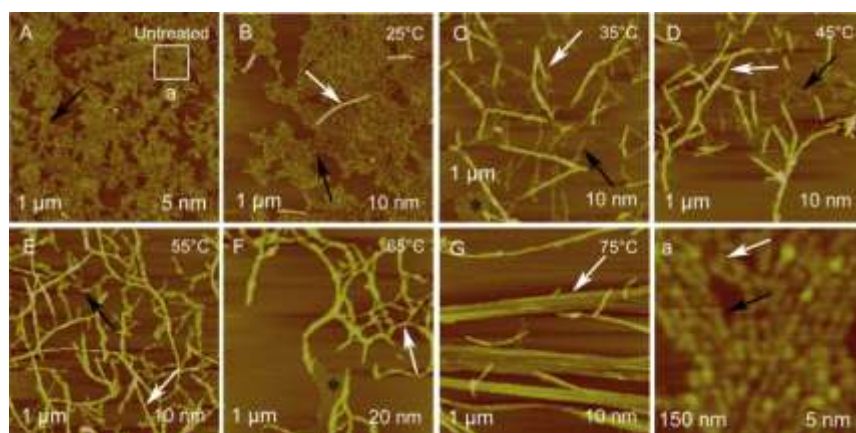
- Dotykový režim*: při tomto režimu je hrot sondy v přímém kontaktu se vzorkem. Tento režim je u tvrdých vzorků schopen zobrazení na úrovni atomárního rozlišení.
- Bezkontaktní režim*: hrot je udržován nad povrchem vzorku, zobrazování probíhá pomocí přitažlivých sil, které ohýbají nosník směrem k povrchu vzorku. Jelikož hrot není v kontaktu se vzorkem, nedochází k poškození vzorku a lze s jeho pomocí měřit měkké vzorky.
- Pokleповý režim*: je to kombinace dvou předchozích režimů. Sonda klepe do povrchu s určitou frekvencí a amplitudou určující časově přerušované silové působení hrotu na vzorek.



Obr. 10 Závislost síly na vzdálenosti hrotu [58]

3.2.4.1 Studium fibrilárních proteinů pomocí AFM

Obecně pro studium biologických vzorků je vhodný pokleповý režim, protože poskytuje dostatečně vysoké rozlišení bez narušení povrchu a zároveň vzorek nenaruší. Lze tak charakterizovat vzorky deponované na substrátu v prostředí vzduchu nebo kapalině. [57] V případě fibrilárních proteinů umožňuje charakterizovat agregáty či samostatná vlákna na molekulárním rozlišení. Je to efektivní metoda pro charakterizaci samostatných molekul a samoorganizaci hedvábného fibroinu. V dostupné literatuře byly studovány zejména BMF ve vodných roztocích anorganických iontů. Byly použity nízké koncentrace v řádech $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, protože při vyšších koncentracích by vysycháním mohlo na povrchu slídy dojít k tvorbě filmu. V závislosti na koncentraci a přípravě lze charakterizovat různé samoorganizace struktur jako jsou fibrily, kulové struktury, řetízkové agregáty a další. [59–62]



Obr. 11 AFM snímky samoorganizovaných struktur BMF o koncentraci $15 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ různých teplotách (černé šipky ukazují protofilamenta a bílé protofibrily)

3.2.5 Dynamický rozptyl světla

Dynamický rozptyl světla (DLS) je metoda vhodná pro měření velikosti částic v submikronové oblasti. Základem je měření fluktuace intenzity rozptýleného světla z laserového zdroje. Tyto fluktuace souvisí s interferenčním zeslabováním a zesilováním světla rozptýleného na nestacionárních částicích disperzní fáze, podléhajících Brownovu pohybu. DLS je běžně používáno k detekci agregace polymerních molekul v roztoku, ke stanovení velikosti proteinů, nukleových kyselin a komplexů. [63]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ BMF

4.1 Použitý materiál

Regenerovaný *Bombyx mori* fibroin v lyofilizované formě byl připraven na Univerzitě Bayreuth. Surové hedvábné kokony byly zbaveny sericinu varem v 0,02 M Na₂CO₃. Poté byly rozpuštěny v roztoku LiBr při zvýšené teplotě (60 °C) po dobu 4 h. Po rozpuštění byly nežádoucí ionty odstraněny dialýzou. Po centrifugaci a filtraci byl vytěžený fibroin lyofilizován.

Jako rozpouštědlo byl v experimentu použit hexafluoroisopropanol p.a. (HFIP); 99 % (abcr GmbH).

4.2 Čistění použitých nádob

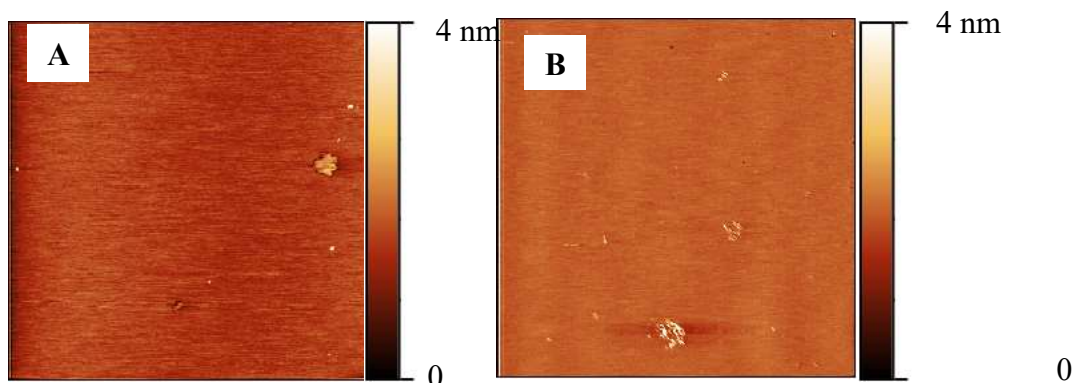
Z důvodů minimalizace biologické a chemické kontaminace bylo veškeré používané sklo umyto pomocí sérií lázní. První lázeň tvořila kyselina sírová, následoval oplach v destilované vodě, další lázeň tvořila kyselina chlorovodíková, poté následoval opět oplach v destilované vodě. Poslední lázeň byl roztok peroxidu vodíku. V každé lázni bylo sklo ponecháno minimálně 20 minut. Sklo bylo následně opláchnuto destilovanou vodou, acetonem, destilovanou vodou a etanolem. Poté následovalo sušení v sušárně při 120°C.

Před provedením každého experimentu byly používané nádoby promyty čistým rozpouštědlem. Nádoby, ve kterých bylo prováděno rozpouštění proteinu, byly promyty třepáním čistého rozpouštědla na třepačce po dobu 1 hodiny. Eppendorfovy nádoby, v nichž bylo prováděno ředění před deponováním na slídu pro charakterizaci pomocí AFM, byly vymyty třepáním po dobu 1 minuty na vortexu.

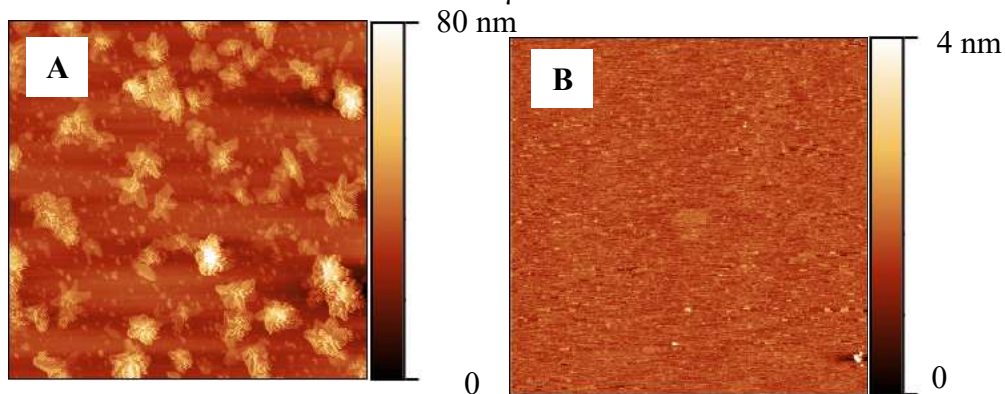
4.3 Čistota rozpouštědla

Dále byla zkontrolována čistota používaného rozpouštědla ze zásobní láhve. Jak lze vidět na Obr.12, rozpouštědlo neobsahuje významné nečistoty. Na povrchu slídy je patrné minimální množství částic, které by mohly rušit organizaci BMF nebo zkreslovat výsledky. Pro filtraci byly používány speciální filtry Anotop® od firmy Whatman® odolné vůči HFIP. S ohledem na HFIP, které patří mezi silná polární rozpouštědla, byla dále posouzena vhodnost použití plastové či skleněné stříkačky. Na povrch čisté slídy bylo deponováno rozpouštědlo z plastové a posléze ze skleněné stříkačky. Podle výsledků patrných na Obr. 13 byla zvolena

k práci skleněná stříkačka, která na rozdíl od plastové neuvolnila žádné nežádoucí částice, které by mohly komplikovat samoorganizaci proteinu.



Obr. 12 snímek AFM: A) čistá slída B) čisté rozpouštědlo deponované na slídu (plocha $10 \times 10 \mu\text{m}$)



Obr. 13 snímek AFM: A) plastová stříkačka B) skleněná stříkačka (plocha $10 \times 10 \mu\text{m}$)

4.4 Příprava roztoků BMF

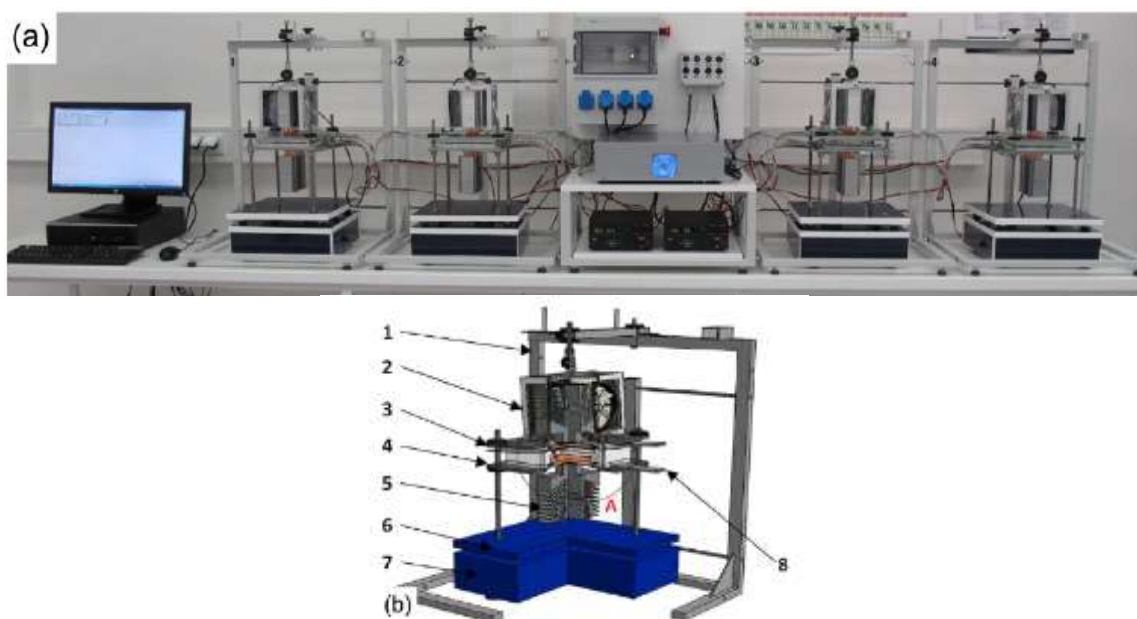
Pro přípravu ředěných roztoků byl připraven 2% zásobní roztok rozpuštěním lyofilizovaného fibroinu v HFIP na třepačce po dobu 21 hodin při $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Ředění zásobního roztoku probíhalo následovně:

- ředěním HFIP v poměru 1:1000, 1:10000 a 1:1000000. Tyto roztoky byly dále filtrovány přes stříkačkový filtr Anotop® od firmy Whatman® s velikostí pórů $0,2 \mu\text{m}$,
- ředěním HFIP v poměru 1:1 000 000 a zahříváním v sušárně po dobu 2 hodin při teplotě $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $35 \text{ }^\circ\text{C}$, $40 \text{ }^\circ\text{C}$ a $50 \text{ }^\circ\text{C}$,
- ředěním HFIP v poměru 1:1 000 000 a zahříváním na TFFC zařízení při teplotním spádu,

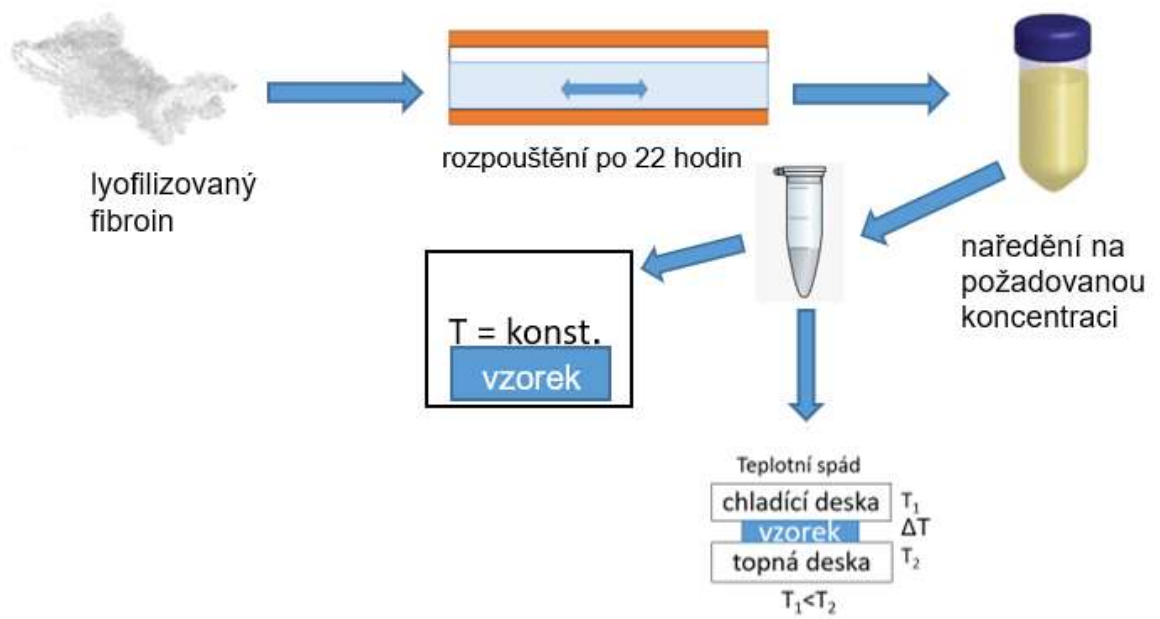
- d) ředěním demi-vodou v poměru 1:1 000 000 a zahříváním na TFFC zařízení při teplotním spádu.

4.4.1 TFFC zařízení pro definované rozpouštění polymerních roztoků

Pro přípravu roztoků HA v teplotních spádech bylo použito zařízení zkonstruované na UFMI, UTB ve Zlíně. Toto zařízení slouží pro definované rozpouštění polymerních systémů v teplotních spádech. Použitý přístroj se skládá z kontrolní a napájecí jednotky a čtyř pracovních podjednotek, viz. Obr. 14. Klíčovou funkcí zařízení je zajištění rovnoměrného přenosu z nebo do rozpouštěného polymerního roztoku. [64] Upravovaný vzorek se vkládá mezi topnou a chladicí desku v Petriho misce s víčkem zajištěným parafilmem, aby bylo minimalizováno odpařování rozpouštědla. BMF byl v TFFC zařízení modifikován po dobu 1-2 hodiny.



Obr. 14 Zařízení pro definované rozpouštění a) Sestava zařízení s hlavními funkčními částmi
b) pracovní jednotka, 3 - horní chladicí deska, 4 - spodní topná deska. Podrobnější popis
zařízení je uveden v práci A. Minaříka a kol. [64]



Obr. 15 Schéma přípravy vzorků BMF v HFIP

5 METODY CHARAKTERIZACE

5.1 Mikroskop atomárních sil (AFM)

Touto metodou byly studovány agregační a schopnosti BMF deponovaného na povrch slídy z HFIP roztoků. Pro měření byl použit mikroskop atomárních sil AFM – INTEGRA Prima (viz Obr.16) od společnosti NT-MDT. Měření probíhala rychlostí 0,5 Hz s rozlišením $512 \times 512 \mu\text{m}$. Pro měření byly použity křemíkové sondy NSG01 od společnosti NT-MDT. Měřená plocha byla $10 \times 10 \mu\text{m}$, $5 \times 5 \mu\text{m}$ a $2 \times 2 \mu\text{m}$. 10 μl připraveného roztoku BMF bylo deponováno na povrch čerstvě odštípnuté slídy a po odpaření rozpouštědla byl povrch dosušen proudem vzduchu.



Obr. 16 Mikroskop atomárních sil INTEGRA Prima

5.2 Dynamický rozptyl světla (DLS)

Touto metodou byla charakterizována velikost částic v roztoku. Měření bylo prováděno na přístroji Zetasizer Nano od firmy Malvern Instruments. Měření bylo prováděno při 25 °C a rozptylovém úhlu 173°. Pro měření byla použita skleněná kyveta, do níž bylo umístěno 1,5 ml vzorku. Kyveta byla přikryta víčkem, aby bylo zamezeno vypařování rozpouštědla.



Obr. 17 Přístroj Zetasizer Nano [65]

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce je věnována charakterizaci fibrilárních proteinů, a to konkrétně hedvábnému fibroinu druhu *Bombyx mori*. Jak již bylo zmíněno, fibroin v závislosti na typu použitého rozpouštědla zaujímá různé konformace. Ve vodných roztocích má tendenci k agregaci a gelaci. Pro minimalizaci tohoto jevu bylo jako rozpouštědlo vybráno HFIP, v němž je agregace fibroinu nižší. [32, 36] Cílem práce bylo prostudovat a charakterizovat agregační a samoorganizační schopnosti *Bombyx mori* fibroinu v HFIP v závislosti na procesních podmínkách přípravy jeho roztoků. Studovanými proměnnými byly vliv koncentrace (ředění), teploty a teplotního spádu.

První část experimentální části je věnována studiu vlivu koncentrace fibroinu v roztoku, vlivu teploty při ředění a teplotního spádu pomocí AFM. V literatuře je prostudován vliv koncentrace a teploty pouze u vodných roztoků fibroinu [59, 61, 62].

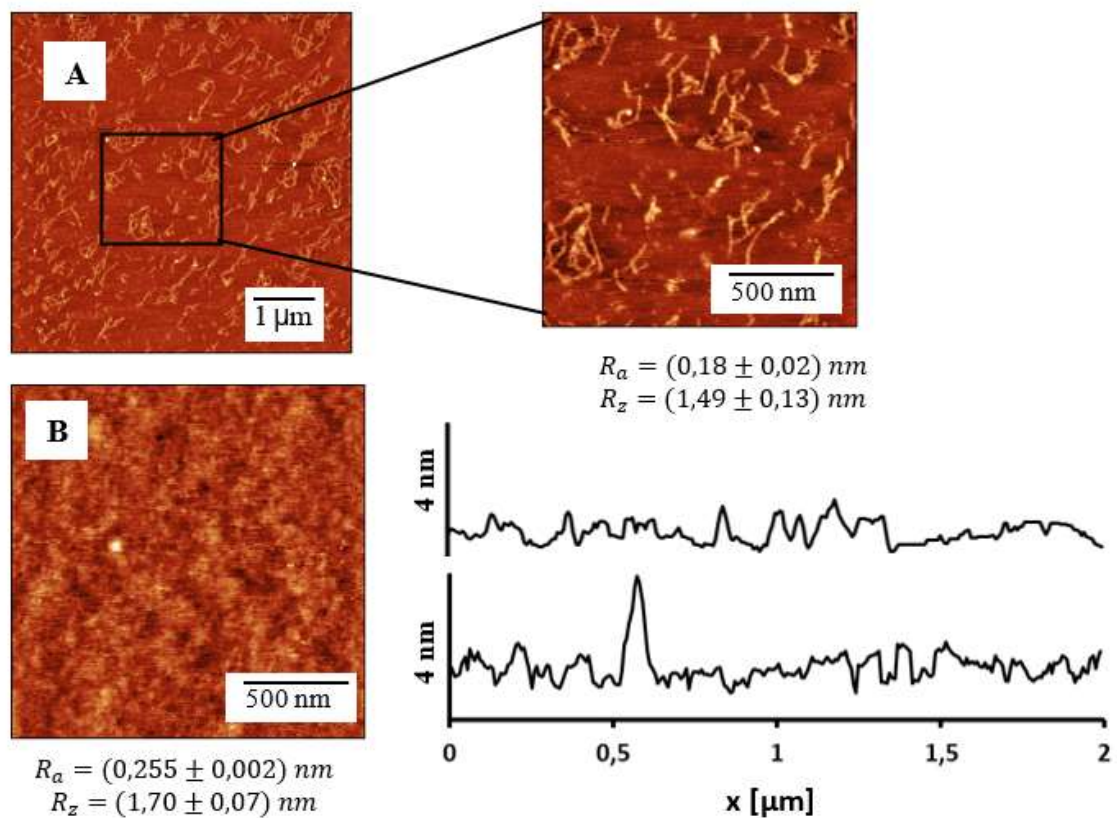
Druhá část je věnována studiu vlivu koncentrace fibroinu na velikost částic charakterizovanou pomocí DLS. Jak již bylo zmíněno výše, problematika Mw a velikosti částic fibroinu není dostatečně prostudována. V minulosti byl výzkum zaměřen pouze na vodné roztoky a roztoky kyseliny mravenčí. [39]

6.1 Vliv koncentrace

Z literatury je známo, že při nízkých koncentracích fibroinu v roztoku dochází k jeho organizaci do podoby vláknitých agregátů. Nutno podotknout, že byly studovány vodné roztoky, v nichž se, jak je zmíněno výše, fibroin chová mírně odlišně než v roztocích organických rozpouštědlech. Proto bylo zvoleno postupné ředění výchozího roztoku po definovaných krocích. Výchozí roztok fibroinu, jehož koncentrace odpovídala $20 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (2 hm%), byl naředěn HFIP v poměru 1:1 000, 1:10 000, 1:100 000 a 1:1 000 000. Ve výchozím roztoku nejsou znatelné žádné útvary ani samostatná vlákna, jak ukazuje snímek AFM na Obr.18. V závislosti na ředění docházelo k postupné organizaci na fibrily, které byly nejlépe viditelné při ředění 1:1 000 000, jak můžeme vidět na Obr.18. U ředění 1:1 000 nebyl viditelný žádný útvar (Obr. 19 A). Se snižující se koncentrací BMF v roztoku je patrná přítomnost vláknitých agregátů, zejména při ředění 1:10 000 (Obr. 19 B) a 1:100 000 (Obr. 19 C).

Z porovnání profilových řezů (viz Obr.18) 2 hm% koncentrace a ředění 1:1 000 000 vyplývá, že došlo k mírnému snížení výšky útvarů, což je znatelné i ze srovnání hodnot R_a a R_z . Hodnota R_a původní koncentrace byla $(0,255 \pm 0,002) \text{ nm}$ a ředění 1:1 000 000 $(0,18 \pm 0,02) \text{ nm}$.

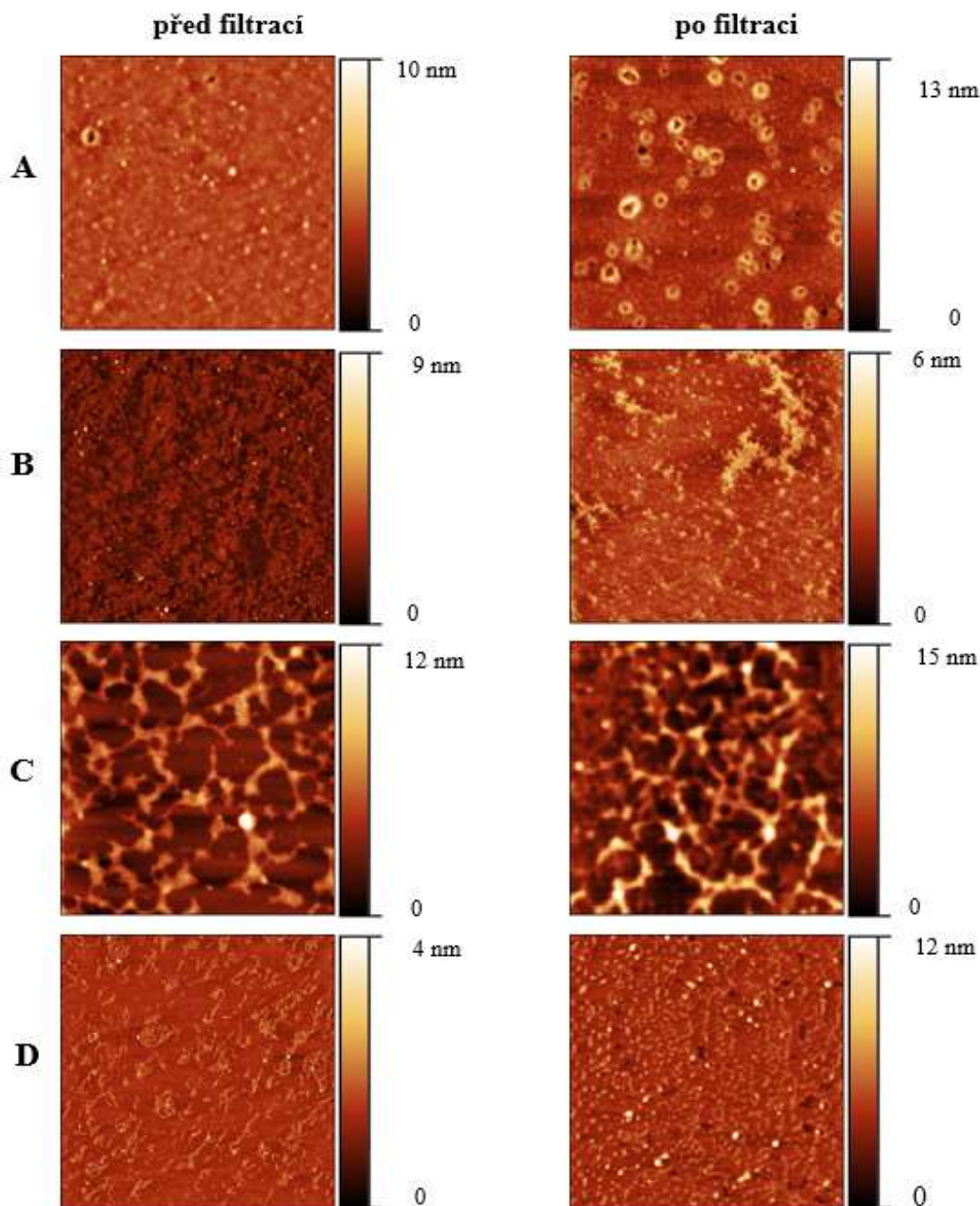
Pozn.: Parametry R_z a R_a byly získány z minimálně 10 profilových řezů přes plochu zobrazenou pomocí AFM. Pro zpracování dat z AFM byl použit program Gwyddion. Parametr R_z je rozdíl nejvyšší hodnoty výškového profilu a nejnižší hodnoty výškového profilu, R_a je střední aritmetická odchylka výškového profilu



Obr. 18 Srovnání AFM obrázku a profilových řezů BMF na povrchu slídy z A) ředěného roztoku 1:1 000 000 B) zásobního roztoku 2 hm%.

Roztoky byly dále podrobeny filtraci přes stříkačkový filtr Anotop® od firmy Whatman® s velikostí pórů 0,2 μm . Při porovnání roztoků před a po filtraci na Obr.19 můžeme vidět, že dochází k rozpadu původní struktury a reorganizaci na novou, a to i u ředění 1:1 000 Obr. 19 A, u něhož původně nebyly viditelné žádné organizované útvary. Nejzajímavější změna nastala u ředění 1:100 000, Obr. 19 C, kdy po filtraci vznikl útvar podobný síti. Naproti tomu u největšího ředění došlo k rozpadu vláken, které se již zpět neorganizovaly. Naopak u ředění 1:10 000 Obr. 19 B je reorganizovaná struktura nejvíce podobná fibrilám.

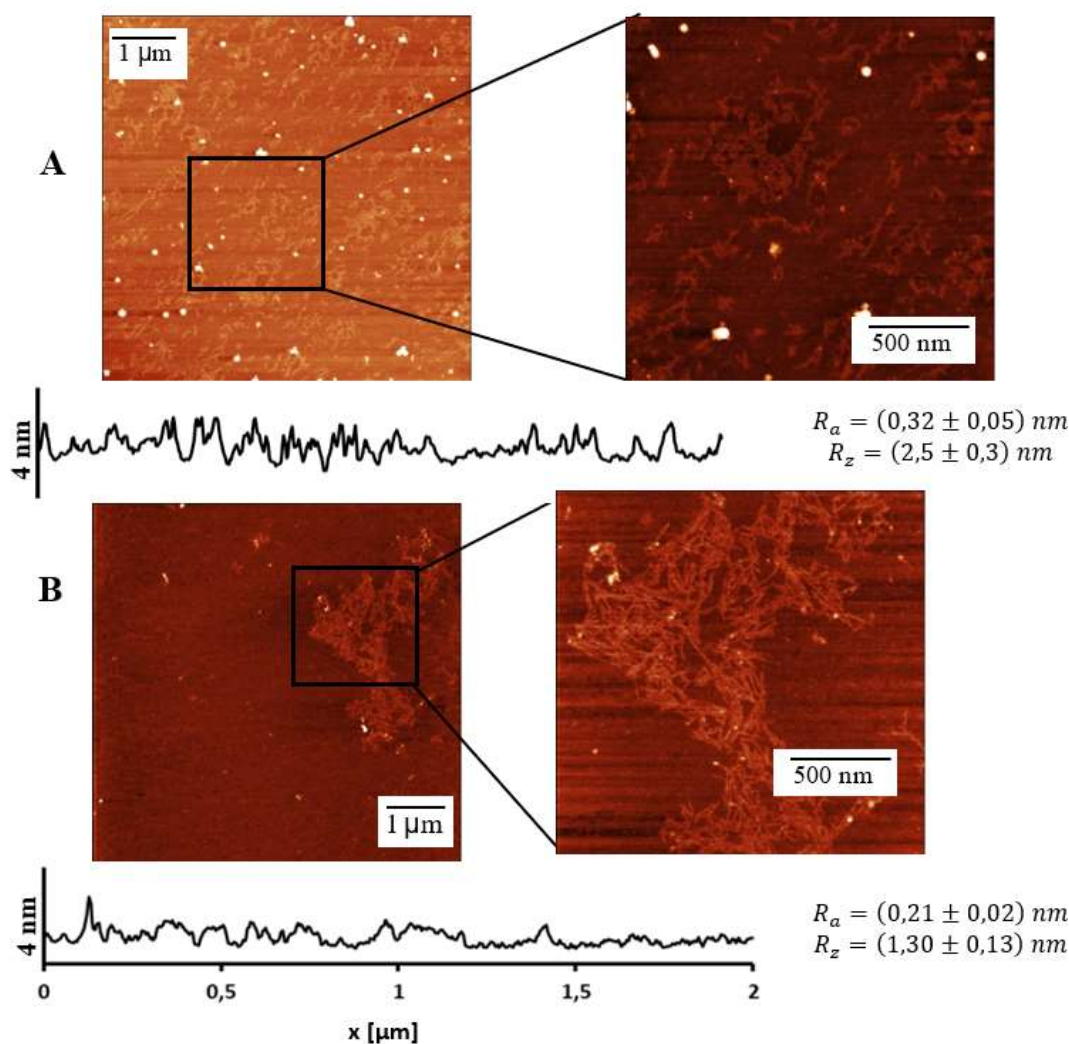
Z měření vyplývá, že se snižující se koncentrací dochází k postupné organizaci BMF do podoby fibril, které můžeme pozorovat při velmi nízkých koncentracích fibroinu, viz. Obr. 19 D (vlevo). Smykové namáhání BMF roztoku v HFIP zapříčiněné filtrací má za následek přechod BMF do jiných typů struktur.



Obr. 19 BMF na povrchu slídy deponovaných z flitrované a nefiltrované roztoku ředěného v poměru: A) 1:1000 B) 1:10 000 C) 1:100 000 D) 1:1 000 000 (snímaná plocha $5 \times 5 \mu\text{m}$)

6.1.1 Vliv prostředí na samorganizaci BMF

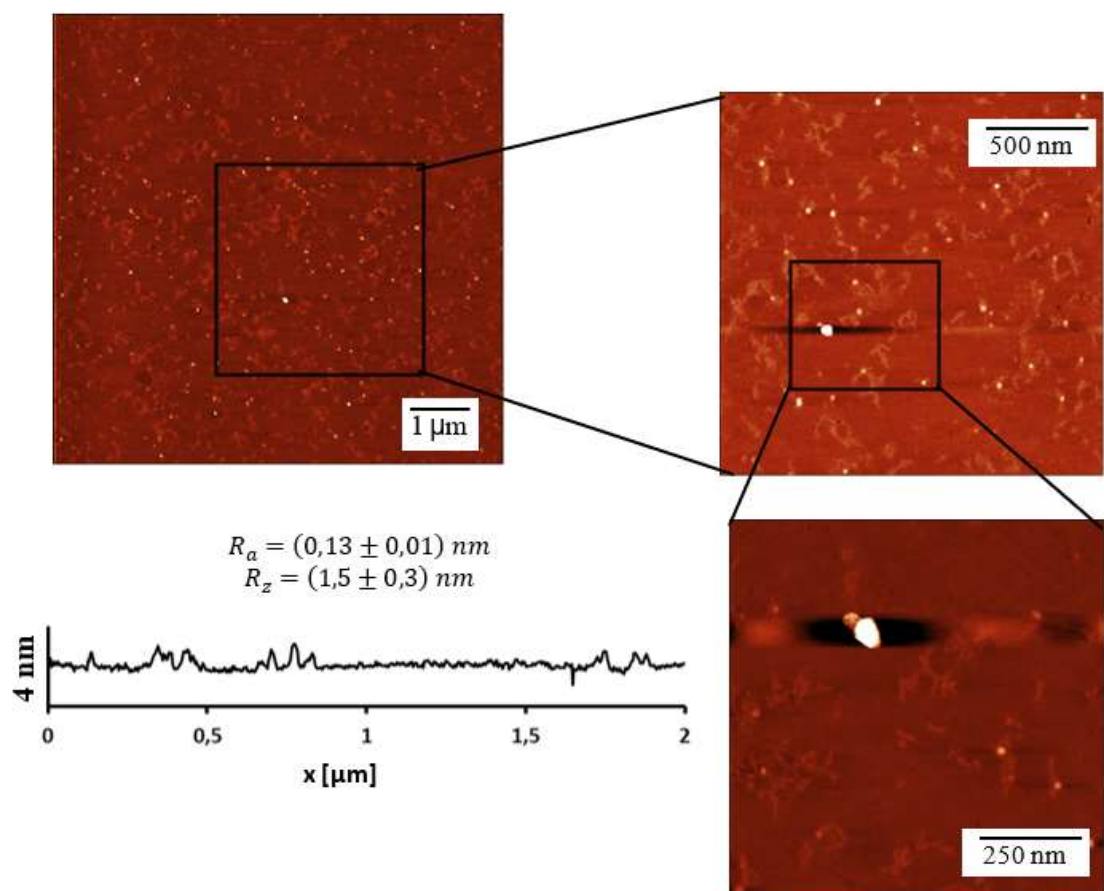
V teoretické část bylo rozebráno, jakou fibroin v závislosti na rozpouštědle zaujímá konformaci. Pro srovnání byl výchozí 2 hm.% roztok BMF v HFIP naředěn v poměru 1:1 000 000 deionizovanou (demi) vodou a stejným postupem jako v předchozím experimentu deponován na slídu.



Obr. 20 Srovnání AFM obrázků a profilových řezů BMF deponovaného na povrch slídy z ředěného roztoku 1:1 000 000 z A) HFIP B) vody

Fibrily ve vodném roztoku mají jemnější strukturu než fibrily v roztoku HFIP a ze snímků AFM je znát, že se vyskytují spíše ve větších agregátech, jak můžeme vidět na Obr. 20. Naproti tomu, fibrily v HFIP se vyskytují buď samostatně nebo v menších agregátech. Tato skutečnost, odpovídá teorii, podle níž fibroin ve vodných roztocích agreguje více než v organických rozpouštědlech.

V rámci experimentů byly při ředění HFIP 1:1 000 000 pozorovány fibrily různých velikostí. Vyskytovaly se samostatně nebo v agregátech, jak můžeme vidět na Obr. 18 a 20. Také byly pozorovány velmi malé a jemné fibrily, které můžeme vidět na Obr.21. V tomto případě byl roztok BMF deponován bezprostředně po naředění, zatímco ve výše uvedených případech byl roztok ponechán dvě hodiny při laboratorní teplotě.

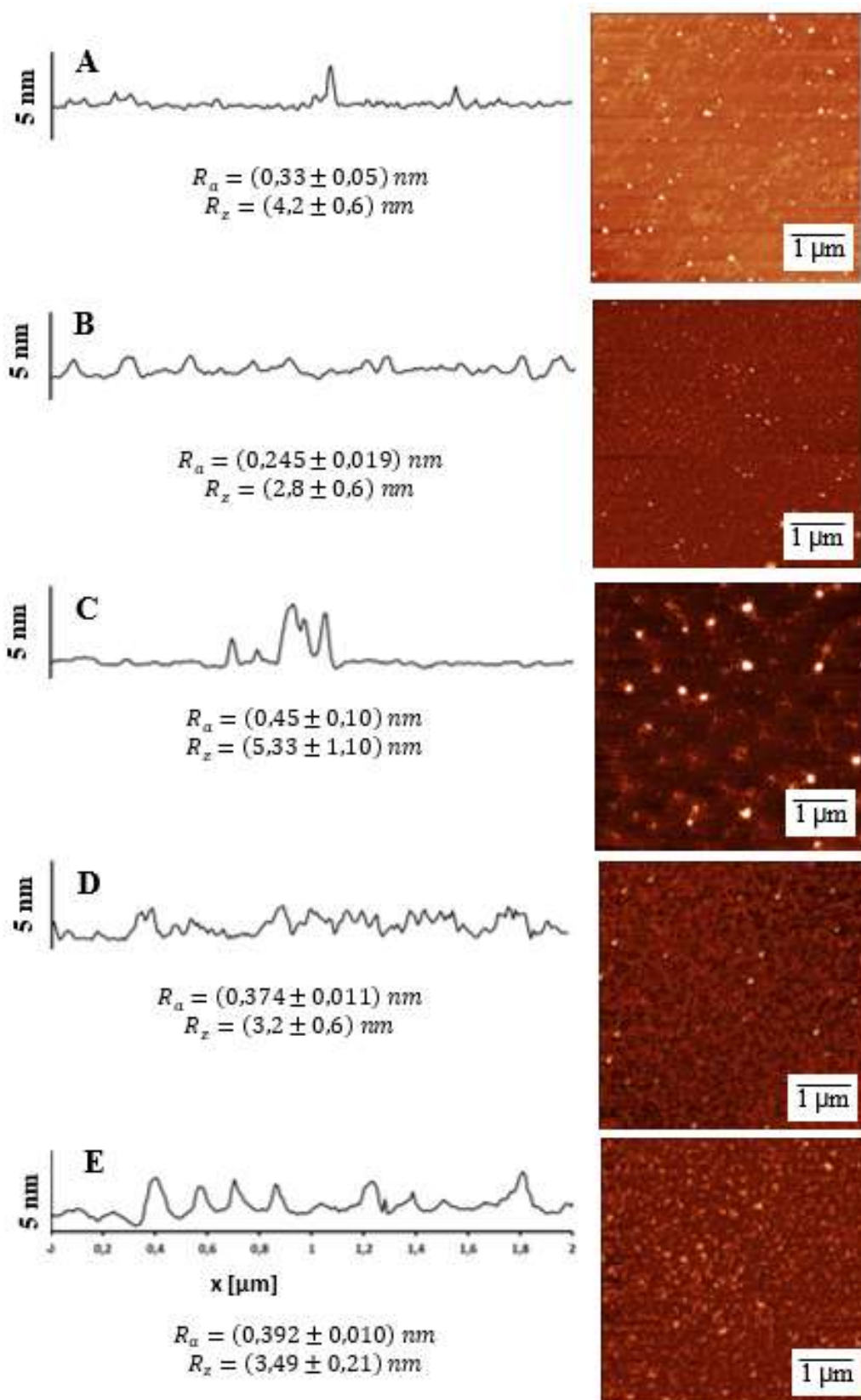


Obr. 21 AFM obrázků a profilových řezů BMF deponovaného na povrch slídy z ředěného roztoku 1:1 000 000 bezprostředně po naředění

6.2 Vliv teploty

Teplota je jedním z hlavních faktorů ovlivňujících strukturu a samoorganizaci fibrilárních proteinů. Pro tento experiment byly použity roztoky BMF s ředěním 1:1 000 000, které byly při teplotách 30 °C, 35 °C, 40 °C a 50 °C uloženy v nádobě Eppendorf Tubes® 3810X na 2 hodiny do laboratorní sušárny.

Jak můžeme vidět na Obr. 22 A, při 25 °C (laboratorní teplota) se zformovaly podobné fibrily, které můžeme vidět výše v oddílu 6.1. Při vyšších teplotách došlo k agregaci do objemnějších útvarů. Při srovnání profilových řezů můžeme vidět, že při 30 °C došlo k poklesu velikosti struktur oproti roztoku, který nebyl vystaven zvýšené teplotě. Naproti tomu při 35 °C velikost vzrostla a vytvořily se větší agregáty. Při 40 °C a 50 °C nastal podobný nárůst. Z toho lze vyvodit, že se zvýšenou teplotou se BMF organizuje do podoby agregovaných struktur, jejichž velikost s teplotou narůstá.

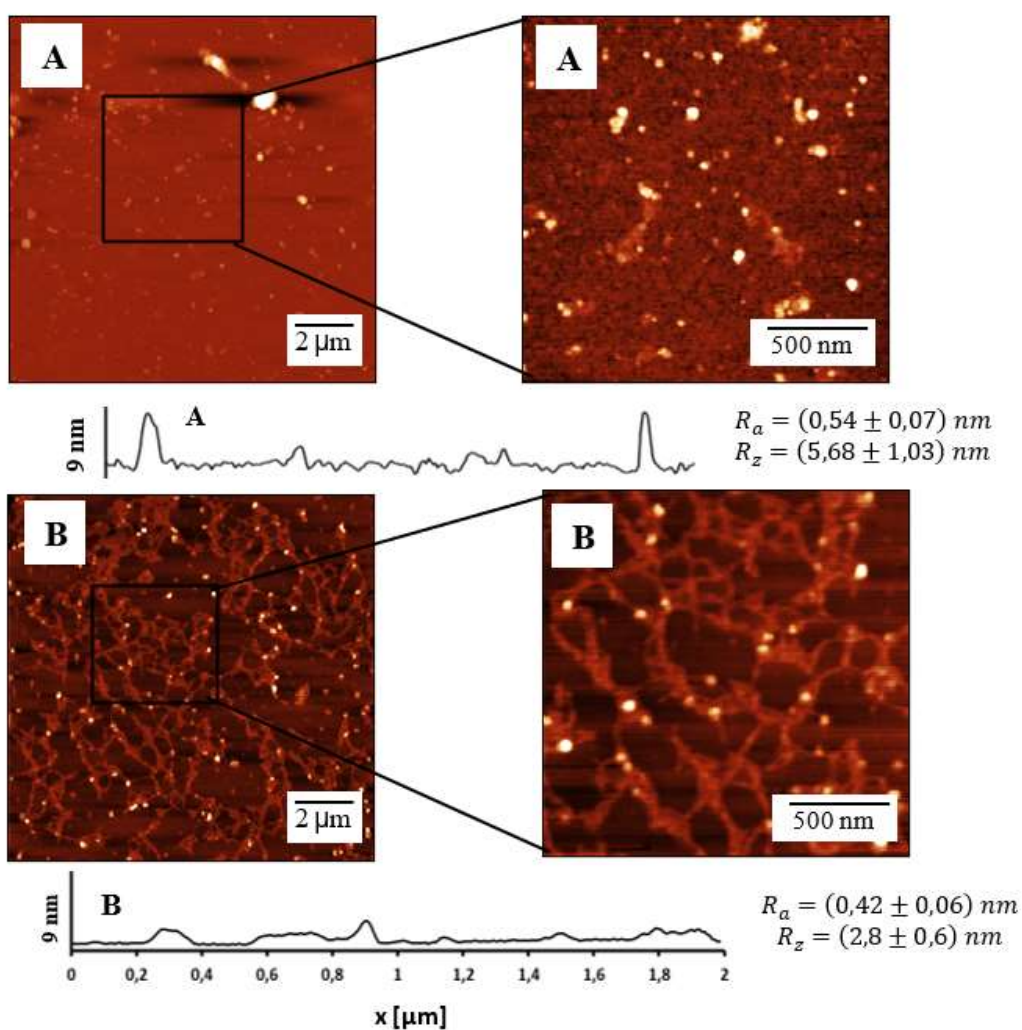


Obr. 22 Snímky AFM a profilové řezy pro BMF na A) výchozího roztoku (1:1 000 000) temperovaného na 25°C B) 30°C C) 35 °C D) 40 °C E) 50 °C (snímaná plocha 5 × 5 μm)

6.3 Vliv teplotního spádu

Roztoky s ředěním 1:1 000 000 byly dále vystaveny účinkům teplotnímu spádu mezi dvěma deskami TFFC zařízení, jehož princip je popsán v práci A. Minaříka a kol.[64] Účelem tohoto zařízení je vyvolat ve vrstvě kapaliny teplotní spád, který zapříčiní vznik organizovaného proudění kapaliny v podobě Bénard-Marangoniho buněk. Uvnitř těchto buněk může docházet, za určitých limitních podmínek, ke změně konformace polymerního systému v důsledku smykového namáhání jednotlivých makromolekulárních klubek.

Pozn.: Teplotním spádem se rozumí rozdíl teplot mezi spodní topnou a horní chladicí plochou v použitém TFFC zařízení. Uvedené teploty byly měřeny na těchto plochách. Teploty v roztoku nebyly stanovovány, aby nedošlo ke kontaminaci charakterizovaného systému.

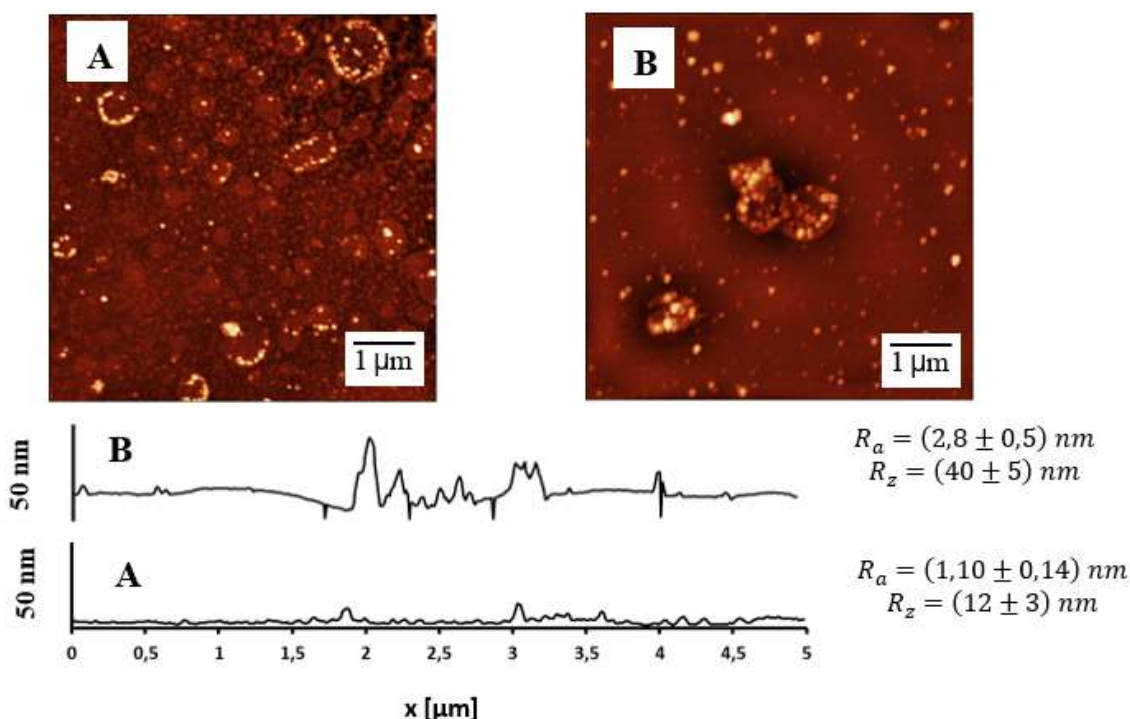


Obr.

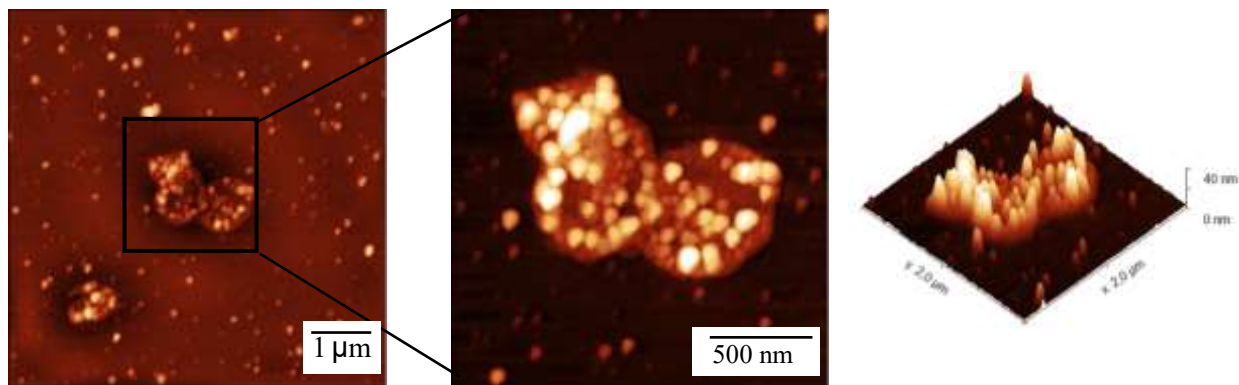
23 Srovnání snímku z AFM a profilových řezů (plocha $2 \times 2 \mu\text{m}$) A) nefiltrovaného a B) filtrovaného roztoku BMF vystaveného teplotnímu spádu $50 \text{ }^\circ\text{C} / 10 \text{ }^\circ\text{C}$

Na Obr. 23 jsou srovnány AFM snímky a profilové řezy vzorku, jejichž roztok byl vystaven teplotám 50 °C na spodní desce a 10 °C na horní desce po dobu 1 hodiny a následně filtrován přes výše uvedený stříkačkový filtr. Teplotní spád způsobil rozpad původních fibril a vzrůst velikosti agregovaných struktur podobně jako v případě experimentů věnovaných vlivu střední teploty roztoku, viz. předešlý oddíl 6.2. Následnou filtrací došlo k rozrušení agregovaných struktur a jejich reorganizaci do podoby síťových struktur, viz. porovnání Obr. 23 A a B.

Při teplotě horní desky 40 °C a spodní desky 10 °C taktéž došlo k vytvoření nové struktury. Po 1 hodině působení teplotního spádu došlo ke vzniku agregovaných struktur kulovitého tvaru (Obr. 24 A), bez významného zvýšení jejich výšky. Naproti tomu po vystavení roztoku teplotnímu spádu po dobu 2 hodin (Obr. 24 B) došlo k nárůstu velikosti kulových struktur a zároveň k jejich úbytku. Na Obr.24 jsou srovnány profilové řezy roztoku vystaveného teplotnímu spádu po dobu 1 a 2 hodin. Na Obr. 25 jsou detailní AFM snímky agregátu vzniklého po 2 hodinách.

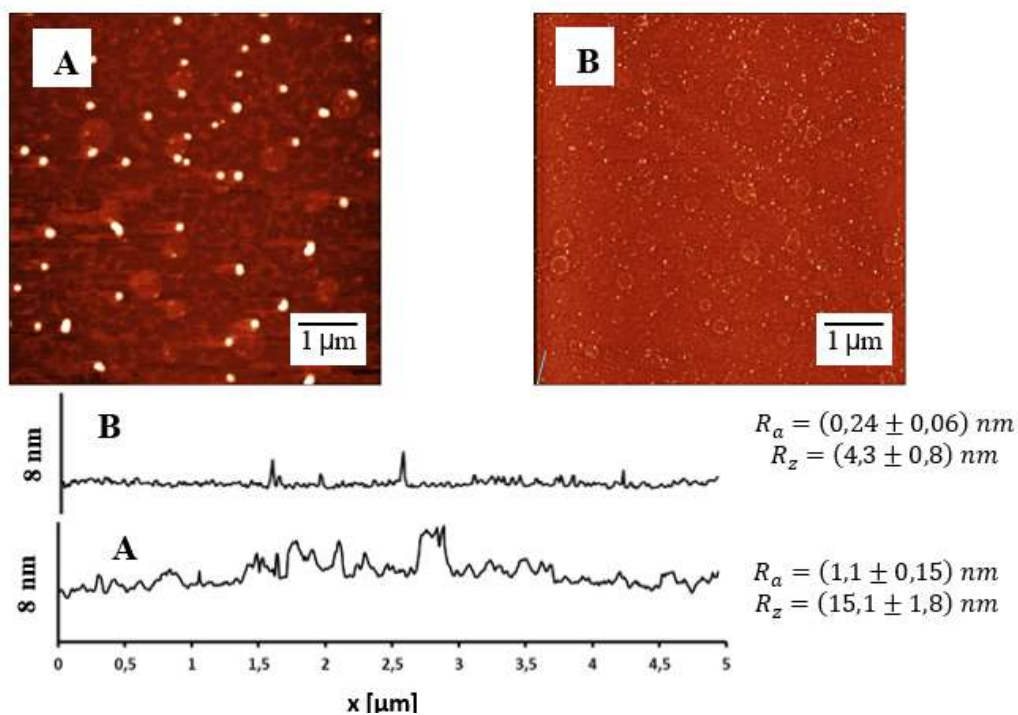


Obr. 24 Srovnání AFM snímků a profilových řezů BMF deponovaného na povrch slídy z roztoku vystaveného teplotního spádu 40 °C / 10 °C po dobu A) 1 hodiny B) 2 hodin

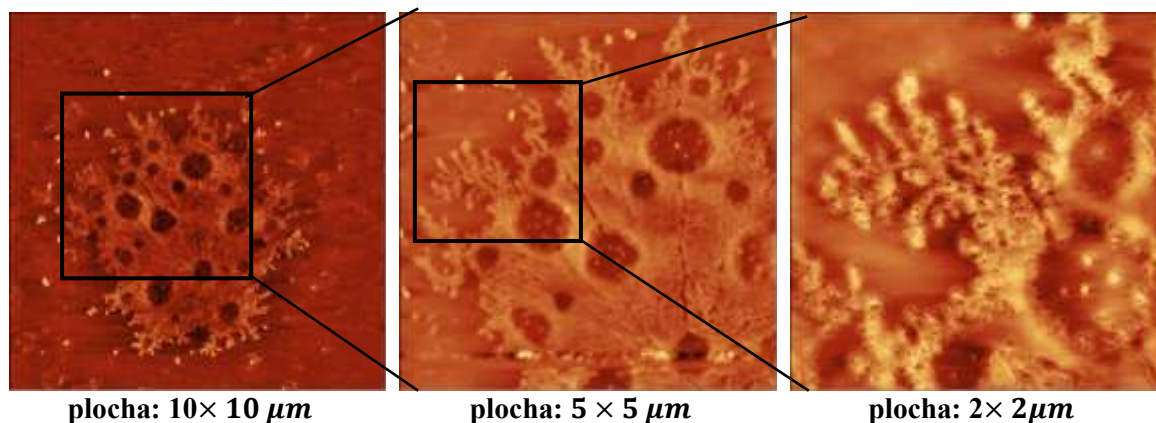
plocha: $5 \times 5 \mu\text{m}$ plocha: $2 \times 2 \mu\text{m}$

Obr. 25 Detail agregovaných struktury BMF vzniklých při teplotním spádu $40\text{ }^\circ\text{C}/10\text{ }^\circ\text{C}$ po 2 hodinách

Při nižší střední teplotě v roztoku a menším teplotním spádu, kdy byla teplota horní desky $30\text{ }^\circ\text{C}$ a teplota spodní desky $10\text{ }^\circ\text{C}$ udržována po dobu 1 hodiny, můžeme vidět, že v roztoku se nacházely zbytky fibril, které svou velikostí odpovídaly původnímu stavu uvedenému na Obr. 26 A. Zároveň docházelo ke vzniku velkých agregovaných struktur, jejichž detailní AFM snímky můžeme vidět na Obr. 27. Po 2 hodinách působení teplotního spádu došlo ke zformování struktur, které se podobají strukturám vzniklých při teplotním spádu $40\text{ }^\circ\text{C}/10\text{ }^\circ\text{C}$ po jedné hodině. Jejich velikost je dvakrát tak nižší, než je tomu po 1 hodině, jak lze vidět z porovnání uvedeného na Obr. 26 A a B,

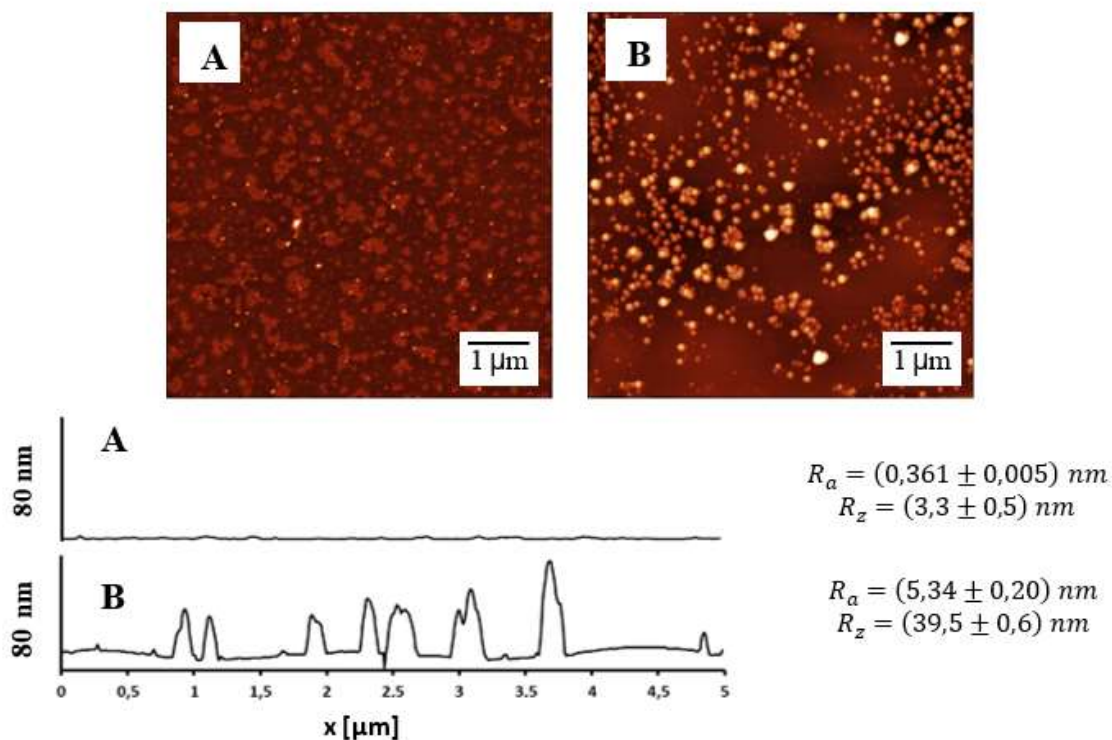


Obr. 26 Srovnání AFM snímků a profilových řezů BMF deponovaného na povrch slídy z roztoku vystaveného teplotního spádu $30\text{ }^\circ\text{C}/10\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu A) 1 hodiny B) 2 hodin

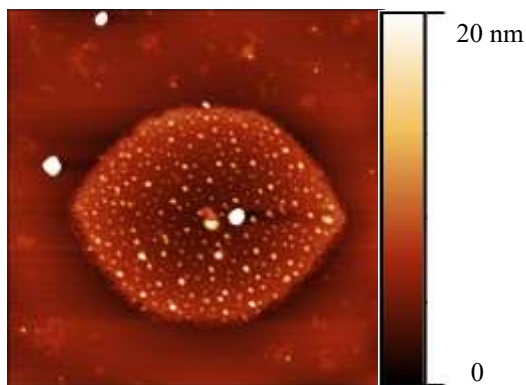


Obr. 27 Detail agregátů BMF vzniklých v důsledku působení teplotního spádu 30 °C/10 °C po dobu 1 hodiny

Při teplotě spodní desky 50 °C a teplotě horní desky 40 °C, dochází po jedné hodině k rozpadu vláken a ke zformování velkých kulovitých agregátů. Příklad takové struktury můžeme vidět na Obr. 29. Výška těchto agregátů se příliš neliší od původního roztoku připravovaného bez působení teplotního spádu při teplotách 40 až 50 °C viz. Obr. 22 D a E. Naproti tomu po dvou hodinách dochází až k až desetinásobnému nárůstu jejich výšky, jak plyne z porovnání uvedeného na Obr. 28 A a B.



Obr. 28 Srovnání AFM snímků a profilových řezů BMF deponovaného na povrch slídy z roztoku vystaveného teplotního spádu 50 °C/40 °C po dobu A) 1 hodiny B) 2 hodin



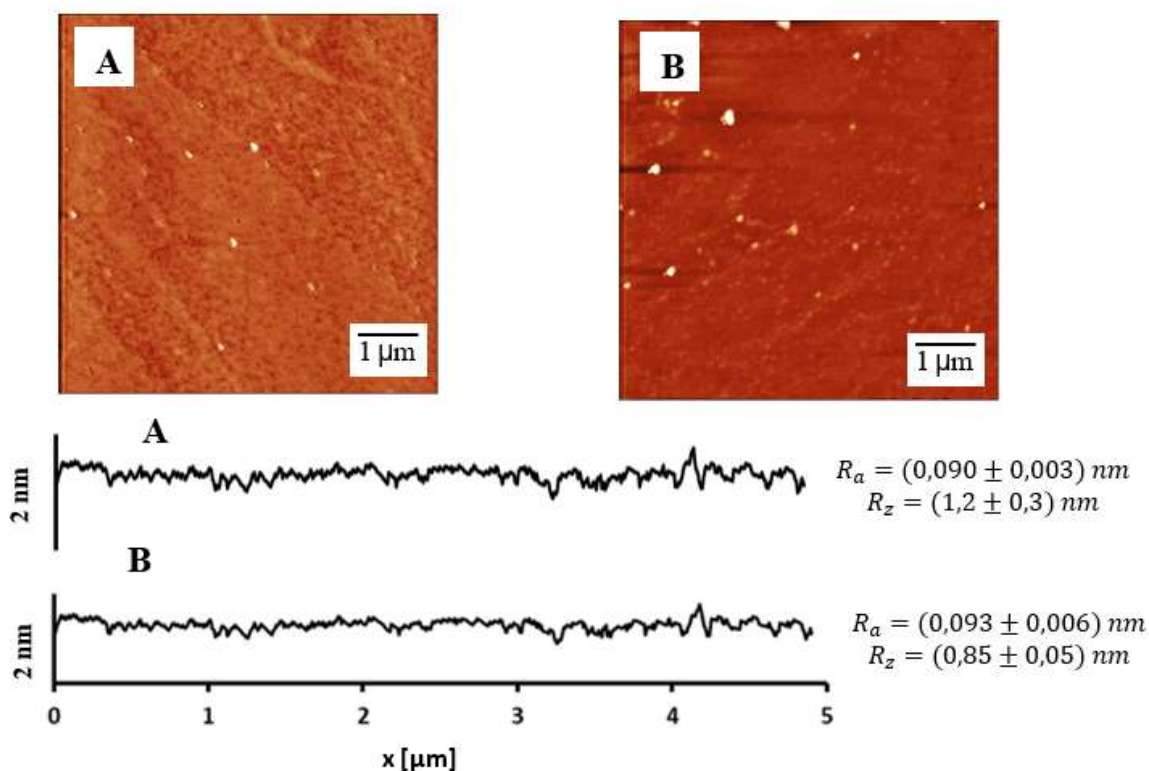
Obr. 29 Příklad výše agregované struktury vzniklé při teplotním spádu 50 °C/40 °C po 1 hodině. AFM obrázek výškových změn o rozměru 5 × 5 μm

Teplotní spád oproti konstantní teplotě zapříčiňuje v agregaci fibroinu. Tato skutečnost je v souladu s literárními poznatky [59, 66] o působení teploty a smykového namáhání na proteinové systémy. Agregáční schopnost BMF narůstá nejen se změnou teplotního spádu, ale rovněž s nárůstem teploty spodní (topné) plochy TFFC zařízení.

6.3.1 Vliv rozpouštědla na samoorganizaci BMF při teplotním spádu

Stejně jako v oddílu 6.1.1. byl výchozí 2 hm.% roztok BMF v HFIP naředěn v poměru 1:1 000 000 deionizovanou vodou a vystaven dvěma teplotním spádům. První teplotní spád byl při teplotě spodní desky 50 °C a horní desky 10 °C a druhý při teplotě spodní desky 40 °C a horní desky 10 °C.

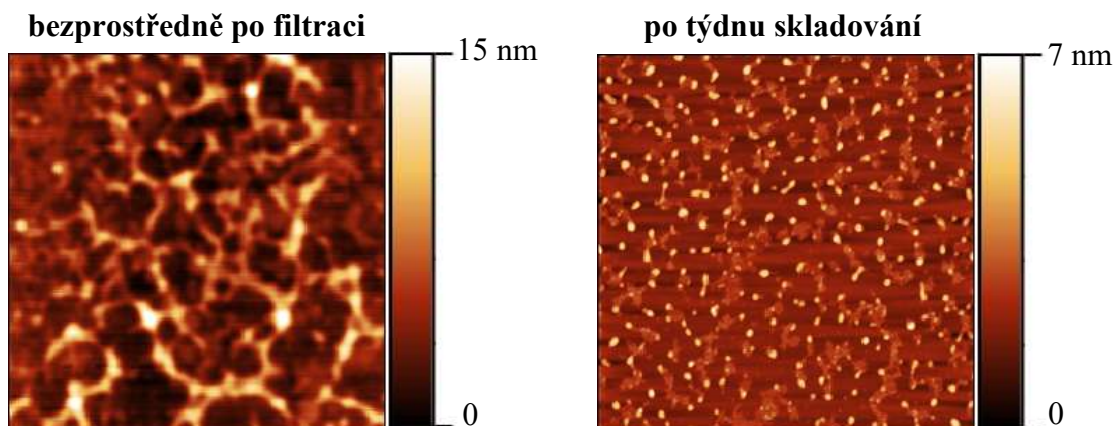
Na rozdíl od výše popsaných experimentů s HFIP, se fibroin ve vodě vlivem teplotního spádu nezformoval do žádné výraznější struktury. Struktury vzniklé ve vodě při obou teplotních spádech si jsou velmi podobné, jak je patrné z porovnání profilových řezů na Obr. 30.



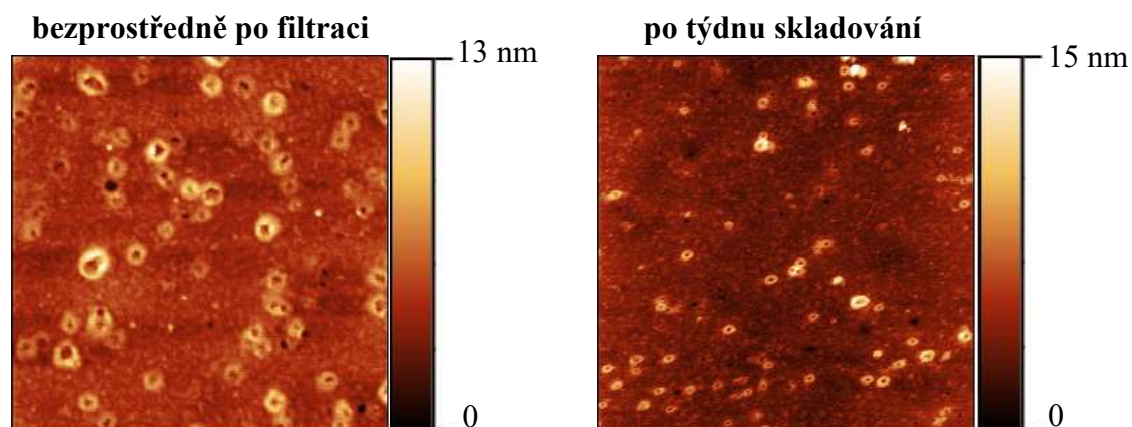
Obr. 30 Srovnání AFM snímků a profilových řezů BMF na povrchu slídy z vodného roztoku vystaveného teplotního spádu A) 50 °C /10 °C B) 40 °C/10 °C (plocha 5 × 5 μm)

6.4 Vliv skladování na samoorganizaci BMF z filtrovaných roztoků

Filtrované roztoky s ředěním 1:100 000 byly skladovány po dobu 7 dnů při teplotě 5°C. Po této době byl skladovaný roztok opětovně deponován na povrch slídy. Jak můžeme vidět z porovnání uvedeného na Obr. 31, došlo k rozpadu síťové struktury vyvolané působením smykové síly na BMF řetězce procházející přes filtrační membránu. Z toho lze usoudit, že filtrací vyvolané struktury jsou časově nestabilní a po čase se systém vrací do původního konformačního uspořádání. V případě použití koncentrovanějších roztoků takovéto chování není tak zřetelné. viz. srovnání Obr. 31 a 32.



Obr. 31 Srovnání BMF na povrchu slídy z filtrovaných roztoků (1:100 000) bezprostředně po filtraci a po týdnu skladování při 5 °C. AFM obrázek 5 × 5 μm

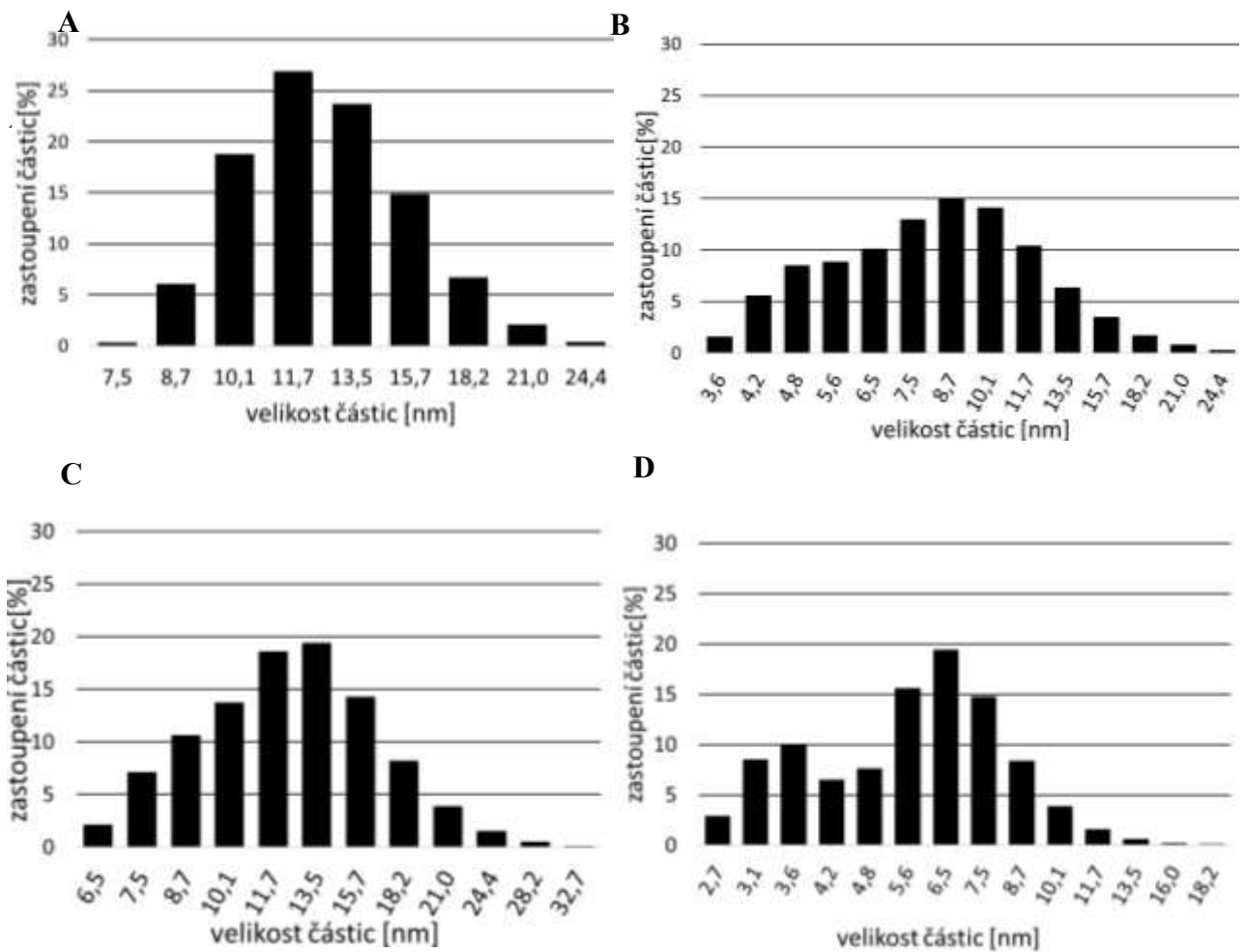


Obr. 32 BMF na povrchu slídy z filtrovaných roztoků (1:1000) bezprostředně po filtraci a po týdnu skladování při 5 °C. AFM obrázek 5 × 5 μm

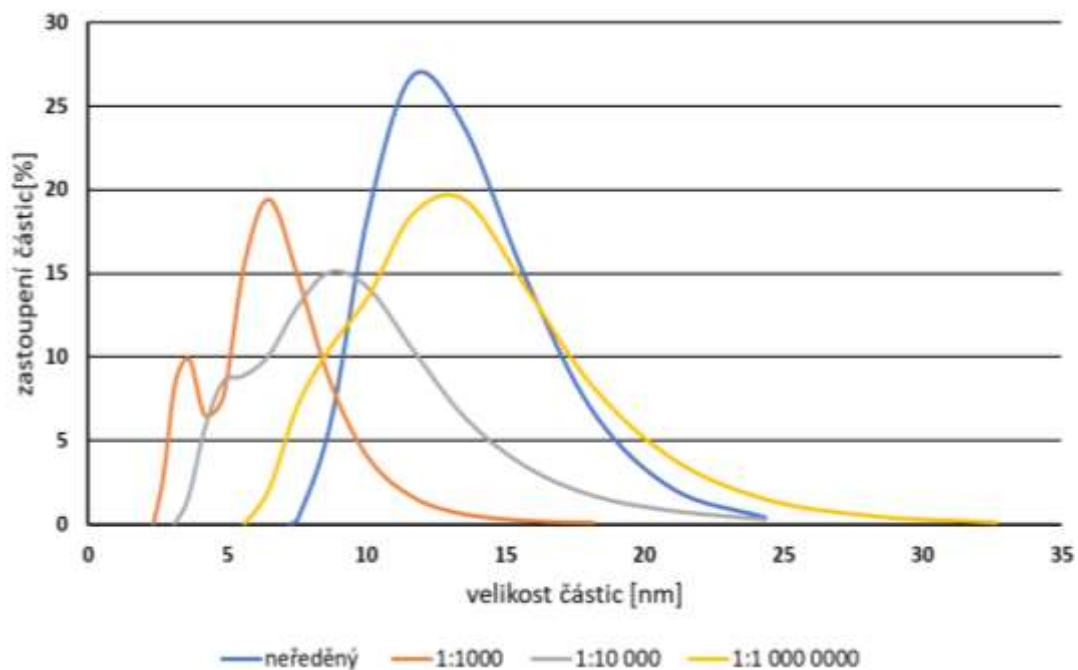
6.5 Vliv ředění na distribuci částic charakterizovanou pomocí DLS

Vliv koncentrace BMF v HFIP na změnu velikosti agregátů v roztoku byla studována pomocí měření dynamického rozptylu světla (DLS) a to konkrétně u neředěného výchozího roztoku BMF o koncentraci 2 hm. % a roztoků s ředěním 1:1 000, 1:10 000, 1:1 000 000. Jak můžeme vidět na Obr. 33 A u původní koncentrace se velikost částic pohybuje v rozmezí 7,531 – 24,360 nm, přičemž nejvyšší zastoupení mají částice s velikostí 11,7 nm. Naředěním došlo k posunu nejvíce zastoupených částic k nižším hodnotám a rozšíření jejich distribuce, jak je patrné z Obr. 33 B-D. Ředěním v poměru 1:1000 došlo ke snížení velikosti částic na rozsah 2,696 – 18,17 nm, který je nejnižší z měřených roztoků. Ředěním na nižší koncentraci došlo ke zpětnému posunu k vyšším velikostem částic, z čehož se dá usuzovat, že došlo k agregaci částic, jak můžeme vidět u ředění 1:10 000 a 1:1 000 000. Rozsah velikostí částic u ředění 1:10 000 se pohyboval od 3,6 po 24,4 nm, při čemž částice s nejvyšším procentuálním zastoupením mají 8,7 nm. Ředění s poměrem 1:1 000 000 posunulo velikost

částic k podobným hodnotám jako u původní koncentrace, a to konkrétně do rozmezí 6,5 – 32,7 nm. Nejvyšší procentuální zastoupení měly částice s velikostí 13,6 nm.

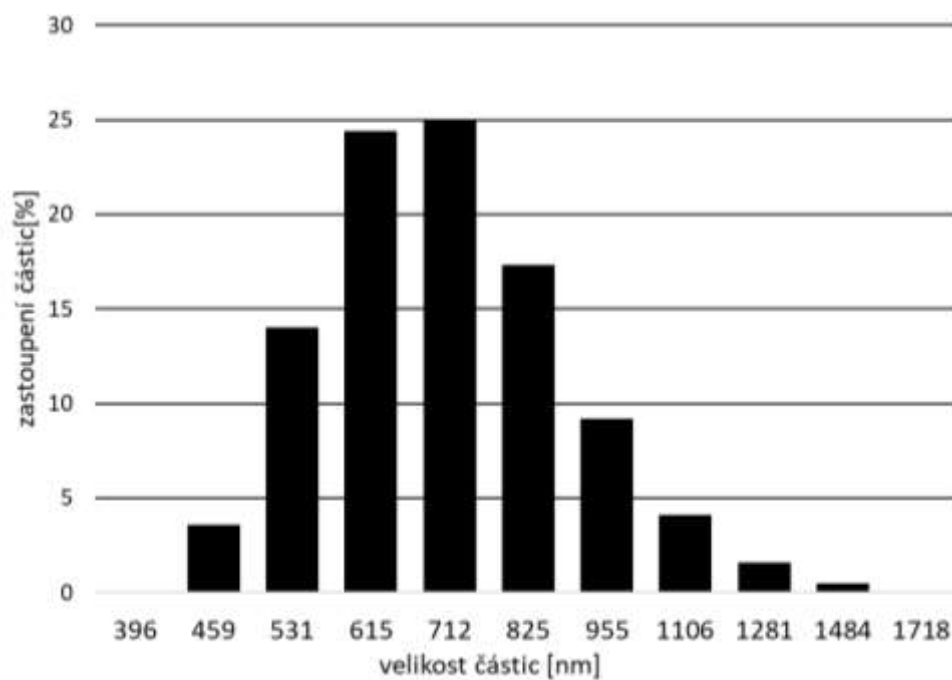


Obr. 33 Procentuální zastoupení velikosti částic v závislosti na jejich střední velikosti pro BMF roztok připravované při 25 °C bez a s následným ředěním. A) výchozí roztok s 2 hm% BMF, ředění výchozího BMF v poměru: B) 1:1 000, C) 1:100 000, D) 1:1 000 000. Měření provedena pomocí DLS



Obr. 34 Souhrné porovnání dat z DLS uvedených na Obr. 33

Z porovnání distribucí částic pro jednotlivé koncentrace BMF v roztoku, viz. Obr. 34 vyplývá, že ředěním se distribuce velikosti částic rozšiřuje. Je zajímavé, že se velikost částic s ředěním 1:1000 snížila, ale s dalším ředěním na 1:10 000 a 1:1 000 000 mírně vzrostla, přičemž velikost částic u 1:1 000 000 je srovnatelná s původním neředěným roztokem. Pro přesnější pochopení těchto posunů v rozložení a střední velikosti klubek a agregátů BMF bude nezbytné provést větší množství experimentů. Oproti tomuto srovnání je vliv teplotního spádu na BMF v roztoku HFIP zcela zásadní. Po aplikaci teplotního spádu 50 °C/40 °C řádově vzrostla střední velikost agregovaných BMF struktur v roztoku, viz. Obr. 35. Stejně tak se rozšířila distribuce jejich velikostí na rozmezí 396–1718 nm. Toto pozorování koreluje s daty získanými pomocí AFM, což dokazuje, že pozorované útvary na povrchu slídy pomocí AFM reflektují stav proteinu v roztoku před jeho depozicí na pevný povrch.



Obr. 35 Procentuální zastoupení velikosti částic v závislosti na jejich střední velikosti pro BMF roztok připravované při teplotním spádu 50 °C/40 °C po dobu 2 hod. Výchozí roztok ředěn v poměru 1:1 000 000. Měření provedena pomocí DLS

ZÁVĚR

Byl studován vliv koncentrace hedvábného proteinu (BMF) v organickém rozpouštědle (HFIP) a teploty na jeho agregační schopnosti. Pro srovnání vlivu rozdílných typů rozpouštědel na chování BMF byly provedeny srovnávací experimenty s vodou. Agregované BMF struktury byly studovány na povrchu slídy pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM). Velikost BMF částic v roztoku HFIP byla studována pomocí dynamického rozptylu světla (DLS).

Pro pozorování izolovaných fibrilárních útvarů na bázi BMF je nezbytné dostatečně snížit koncentraci tohoto systému v roztoku. Se změnou koncentrace BMF v roztoku se mění jeho agregační schopnosti. Mimo to jsou tyto změny podmiňovány tepelnou historií přípravy vzorku. S rostoucí teplotou se mění tvar a velikost agregovaných struktur. Tyto struktury lze rozrušit působením smykových sil vyvolaných filtrací roztoku. Po delší době skladování se takto rozrušený systém vrací do původního stavu. Z experimentů dále vyplynulo, že působením koordinovaného smykového namáhání při vyšší teplotě má za následek vznik řádově větších BMF agregátů oproti přípravě roztoků bez působení teplotního spádu.

Z kontrolních experimentů věnovaných studiu chování BMF ve vodných prostředích se potvrdily poznatky z odborné literatury spojené s odlišným chováním BMF v různých typech rozpouštědel. Pro tento typ disperzního prostředí nebyly pozorovány agregované struktury jako v případě HFIP.

Data získaná z DLS korelují s výsledky z AFM. Z toho plyne, že pozorované struktury pomocí AFM na povrchu slídy reflektují stav daného systému v roztoku před jeho depozicí na pevný podklad a vysušením.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BABU, K. M. Silk production and the future of natural silk manufacture. In: *Handbook of Natural Fibres*. 2012. ISBN 9780128187821.
- [2] VALLUZZI, R., S. WINKLER, D. WILSON and D. L. KAPLAN. Silk: molecular organization and control of assembly. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* [online]. 2002, **357**(1418), 165–167. ISSN 0962-8436. Dostupné: doi:10.1098/rstb.2001.1032
- [3] KOZŁOWSKI, Ryszard M. Types, Properties and Factors Affecting Breeding and Cultivation. In: *Handbook of Natural Fibres*, [online]. B.m.: Woodhead Publishing, 2012. ISBN 978-1-84569-697-9. Dostupné: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpHNFVTPF1/handbook-natural-fibres/handbook-natural-fibres>
- [4] ANDERSSON, Marlene, Jan JOHANSSON and Anna RISING. Silk Spinning in Silkworms and Spiders. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2016, **17**(8), 1290. ISSN 1422-0067. Dostupné: doi:10.3390/ijms17081290
- [5] ASAKURA, Tetsuo, Kosuke UMEMURA, Yasumoto NAKAZAWA, Haruko HIROSE, James HIGHAM and David KNIGHT. Some Observations on the Structure and Function of the Spinning Apparatus in the Silkworm *Bombyx mori*. *Biomacromolecules* [online]. 2007, **8**(1), 175–181. ISSN 1525-7797. Dostupné: doi:10.1021/bm060874z
- [6] GUO, Nanguo, Kunpeng LU, Lan CHENG, Zhi LI, Chunman WU, Zulan LIU, Shubo LIANG, Sihao CHEN, Wenhao CHEN, Chenlong JIANG and Fangyin DAI. Structure analysis of the spinneret from *Bombyx mori* and its influence on silk qualities. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2019, **126**, 1282–1287. ISSN 01418130. Dostupné: doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.12.219
- [7] KOH, Leng-Duei, Yuan CHENG, Choon-Peng TENG, Yin-Win KHIN, Xian-Jun LOH, Si-Yin TEE, Michelle LOW, Enyi YE, Hai-Dong YU, Yong-Wei ZHANG and Ming-Yong HAN. Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials. *Progress in Polymer Science* [online]. 2015, **46**, 86–110. ISSN 00796700. Dostupné: doi:10.1016/j.progpolymsci.2015.02.001
- [8] TRIVEDY, Kanika, M MONDAL, K TRIVEDY and S NIRMAL KUMAR. *Standardization of Fibroin extraction View project Quantification of Vitamin C and its uses View project The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, Bombyx mori Linn.,-a review* [online]. 2007. Dostupné: <http://research.guilan.ac.ir/cjesorwww.cjes.net>
- [9] VEPARI, Charu and David L. KAPLAN. Silk as a biomaterial. *Progress in Polymer Science* [online]. 2007, **32**(8–9), 991–1007. ISSN 00796700. Dostupné: doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.013
- [10] NGUYEN, Thang Phan, Quang Vinh NGUYEN, Van-Huy NGUYEN, Thu-Ha LE, Vu Quynh Nga HUYNH, Dai-Viet N. VO, Quang Thang TRINH, Soo Young KIM and Quyet van LE. Silk Fibroin-Based Biomaterials for Biomedical Applications: A Review. *Polymers* [online]. 2019, **11**(12), 1933. ISSN 2073-4360. Dostupné: doi:10.3390/polym11121933
- [11] HUANG, Wenwen, Shengjie LING, Chunmei LI, Fiorenzo G. OMENETTO and David L. KAPLAN. Silkworm silk-based materials and devices generated using biotechnology. *Chemical Society Reviews* [online]. 2018, **47**(17), 6486–6504. ISSN 0306-0012. Dostupné: doi:10.1039/C8CS00187A
- [12] QI, Yu, Hui WANG, Kai WEI, Ya YANG, Ru-Yue ZHENG, Ick KIM and Ke-Qin ZHANG. A Review of Structure Construction of Silk Fibroin Biomaterials from

- Single Structures to Multi-Level Structures. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2017, **18**(3), 237. ISSN 1422-0067. Dostupné: doi:10.3390/ijms18030237
- [13] WARWICKER, J. O. The crystal structure of silk fibroin. *Acta Crystallographica* [online]. 1954, **7**(8), 565–573. ISSN 0365110X. Dostupné: doi:10.1107/S0365110X54001867
- [14] ASAKURA, Tetsuo, Keiko OKUSHITA and Mike P. WILLIAMSON. Analysis of the Structure of Bombyx mori Silk Fibroin by NMR. *Macromolecules* [online]. 2015, **48**(8), 2345–2357. ISSN 0024-9297. Dostupné: doi:10.1021/acs.macromol.5b00160
- [15] VALLUZZI, Regina, Samuel P. GIDO, Wayne MULLER and David L. KAPLAN. Orientation of silk III at the air-water interface. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 1999, **24**(2–3), 237–242. ISSN 01418130. Dostupné: doi:10.1016/S0141-8130(99)00002-1
- [16] JOSHI, M., R. PURWAR, S. WAZED ALI and S. RAJENDRAN. Antimicrobial Textiles for Health and Hygiene Applications Based on Eco-Friendly Natural Products. In: *Medical and Healthcare Textiles* [online]. 2010, p. 84–92. Dostupné: doi:10.1533/9780857090348.84
- [17] CAO, Ting-Ting and Yu-Qing ZHANG. Processing and characterization of silk sericin from Bombyx mori and its application in biomaterials and biomedicines. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2016, **61**, 940–952. ISSN 09284931. Dostupné: doi:10.1016/j.msec.2015.12.082
- [18] LI, Guohong, Hong LIU, TianDuo LI and Jiyang WANG. Surface modification and functionalization of silk fibroin fibers/fabric toward high performance applications. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2012, **32**(4), 627–636. ISSN 09284931. Dostupné: doi:10.1016/j.msec.2011.12.013
- [19] GHOLIPOURMALEKABADI, Mazaher, Sunaina SAPRU, Ali SAMADIKUCHAKSARAEI, Rui L. REIS, David L. KAPLAN and Subhas C. KUNDU. Silk fibroin for skin injury repair: Where do things stand? *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2019. ISSN 0169409X. Dostupné: doi:10.1016/j.addr.2019.09.003
- [20] YAMADA, Hiromi, Hiroshi NAKAO, Yoko TAKASU and Kozo TSUBOUCHI. Preparation of undegraded native molecular fibroin solution from silkworm cocoons. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2001, **14**(1–2), 41–46. ISSN 09284931. Dostupné: doi:10.1016/S0928-4931(01)00207-7
- [21] RAJKHOWA, Rangam, Lijing WANG, Jagat R. KANWAR and Xungai WANG. Molecular weight and secondary structure change in eri silk during alkali degumming and powdering. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2011, **119**(3), 1339–1347. ISSN 00218995. Dostupné: doi:10.1002/app.31981
- [22] GULRAJANI, M L, & SHAILJA, Vaidya GUPTA, Abhilasha GUPTA and Mona SURI. *Degumming of silk with different protease enzymes*. 1996.
- [23] CHOPRA, S., R. CHATTOPADHYAY and M. L. GULRAJANI. Low Stress Mechanical Properties of Silk Fabric Degummed by Different Methods. *Journal of the Textile Institute* [online]. 1996, **87**(3), 542–553. ISSN 0040-5000. Dostupné: doi:10.1080/00405009608631356
- [24] FREDDI, Giuliano, Raffaella MOSSOTTI and Riccardo INNOCENTI. Degumming of silk fabric with several proteases. *Journal of Biotechnology* [online]. 2003, **106**(1), 101–112. ISSN 01681656. Dostupné: doi:10.1016/j.jbiotec.2003.09.006
- [25] WANG, Rui, Yaofeng ZHU, Zhuo SHI, Wenbin JIANG, Xiangdong LIU and Qing-Qing NI. Degumming of raw silk via steam treatment. *Journal of Cleaner Production*

- [online]. 2018, **203**, 492–497. ISSN 09596526.
Dostupné: doi:10.1016/j.jclepro.2018.08.286
- [26] WANG, Hai-Yan, Zheng-Guo WEI and Yu-Qing ZHANG. Dissolution and regeneration of silk from silkworm *Bombyx mori* in ionic liquids and its application to medical biomaterials. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, **143**, 594–601. ISSN 01418130.
Dostupné: doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.12.066
- [27] LI, Z, S JI, Y WANG, X SHEN and H LIANG. Silk fibroin-based scaffolds for tissue engineering. *Frontiers of Materials Science* [online]. 2013, **7**(3), 237–247. ISSN 2095-025X. Dostupné: doi:10.1007/s11706-013-0214-8
- [28] SRIVASTAVA, Chandra Mohan, Roli PURWAR and Roli PURWAR*. Recent developments in regenerated silk fibres. *International Journal of Research in Advent Technology* [online]. 2014, **2**(1). ISSN 2321-9637.
Dostupné: <https://www.researchgate.net/publication/261576337>
- [29] NGUYEN, Thang Phan, Quang Vinh NGUYEN, Van Huy NGUYEN, Thu Ha LE, Vu Quynh Nga HUYNH, Dai Viet N. VO, Quang Thang TRINH, Soo Young KIM and Quyet VAN LE. *Silk fibroin-based biomaterials for biomedical applications: A review* [online]. B.m.: MDPI AG. 1. December 2019. ISSN 20734360.
Dostupné: doi:10.3390/polym11121933
- [30] WANG, Q. *3D printing of silk fibroin for biomedical applications* [online]. B.m.: MDPI AG. 6. February 2019. ISSN 19961944. Dostupné: doi:10.3390/ma12030504
- [31] MOTTAGHITALAB, F, M FAROKHI, M.A. SHOKRGOZAR, F ATYABI and H HOSSEINKHANI. Silk fibroin nanoparticle as a novel drug delivery system. *Journal of Controlled Release* [online]. 2015, **206**, 161–176. ISSN 01683659.
Dostupné: doi:10.1016/j.jconrel.2015.03.020
- [32] ZHAO, Chenhua, Juming YAO, Hiromi MASUDA, Raghuvansh KISHORE and Tetsuo ASAKURA. Structural characterization and artificial fiber formation of *Bombyx mori* silk fibroin in hexafluoro-iso-propanol solvent system. *Biopolymers* [online]. 2003, **69**(2), 253–259. ISSN 0006-3525. Dostupné: doi:10.1002/bip.10350
- [33] ALTMAN, G H, F DIAZ and Ca JAKUBA. Silk-based biomaterials. *Biomaterials* [online]. 2003, **24**(3), 401–416. ISSN 01429612. Dostupné: doi:10.1016/S0142-9612(02)00353-8
- [34] CAO, Kuan, Yong LIU and Seeram RAMAKRISHNA. Recent Developments in Regenerated Silk Fiber. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* [online]. 2017, **17**(12), 8667–8682. ISSN 1533-4880. Dostupné: doi:10.1166/jnn.2017.15010
- [35] MING, Jinfa, Fukui PAN and Baoqi ZUO. Influence factors analysis on the formation of silk I structure. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2015, **75**, 398–401. ISSN 01418130.
Dostupné: doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.02.002
- [36] SASHINA, E. S., A. M. BOCHEK, N. P. NOVOSELOV and D. A. KIRICHENKO. Structure and solubility of natural silk fibroin. *Russian Journal of Applied Chemistry* [online]. 2006, **79**(6), 869–876. ISSN 1070-4272.
Dostupné: doi:10.1134/S1070427206060012
- [37] CHO, H.J., Ch.S. KI, H. OH, K. LEE and I. UM. Molecular weight distribution and solution properties of silk fibroins with different dissolution conditions. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2012, **51**(3), 336–341. ISSN 01418130. Dostupné: doi:10.1016/j.ijbiomac.2012.06.007
- [38] KO, JS, K YOON, Ch S KI, H.J. KIM and D BAE. Effect of degumming condition on the solution properties and electrospinnability of regenerated silk solution.

- International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2013, **55**, 161–168. ISSN 01418130. Dostupné: doi:10.1016/j.ijbiomac.2012.12.041
- [39] WANG, Q, Q CHEN, Y YANG and Z SHAO. Effect of Various Dissolution Systems on the Molecular Weight of Regenerated Silk Fibroin. *Biomacromolecules* [online]. 2013, **14**(1), 285–289. ISSN 1525-7797. Dostupné: doi:10.1021/bm301741q
- [40] VODRÁŽKA Z. *Biochemie*. 2nd ed. Praha: Academia, 1996. ISBN 8020006001.
- [41] WANG, X, H.J, KIM and Ch. WONG. Fibrous proteins and tissue engineering. *Materials Today* [online]. 2006, **9**(12), 44–53. ISSN 13697021. Dostupné: doi:10.1016/S1369-7021(06)71742-4
- [42] WINKLER, S. and D.L. KAPLAN. Biosynthesized Materials: Properties and Processing. In: *Encyclopedia of Materials: Science and Technology* [online]. 2001, p. 609–615. Dostupné: doi:10.1016/B0-08-043152-6/00117-0
- [43] M.M. COX, G. N. Philips. *Handbook of proteins: structure, function and methods*. Chichester: Wiley, 2007. ISBN 9780470060988.
- [44] SCHROER, M. A. *Small angle X-ray scattering studies on proteins under extreme conditions*. 2011.
- [45] BERG JM, Tymoczko JL, Stryer L. Secondary Structure: Polypeptide Chains Can Fold Into Regular Structures Such as the Alpha Helix, the Beta Sheet, and Turns and Loops. In: *Biochemistry*. New York: W H Freeman, 2002.
- [46] KAPLAN, D. L. Fibrous proteins—silk as a model system. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 1998, **59**(1–3), 25–32. ISSN 01413910. Dostupné: doi:10.1016/S0141-3910(97)00000-1
- [47] HUMENIK, M., G. LANG and T. SCHEIBEL. Silk nanofibril self-assembly versus electrospinning. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* [online]. 2018, **10**(4), e1509. ISSN 19395116. Dostupné: doi:10.1002/wnan.1509
- [48] RAMBARAN, R.N and L. C. SERPELL. Amyloid fibrils. *Prion* [online]. 2008, **2**(3), 112–117. ISSN 1933-6896. Dostupné: doi:10.4161/pri.2.3.7488
- [49] KYLE, S., A. AGGELI, E. INGHAM and M. MCPHERSON. Production of self-assembling biomaterials for tissue engineering. *Trends in Biotechnology* [online]. 2009, **27**(7), 423–433. ISSN 01677799. Dostupné: doi:10.1016/j.tibtech.2009.04.002
- [50] VOET J. G. A D. VOET. *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 8085605449.
- [51] KRATOCHVÍL, B., M. HUŠÁK, J. BRYNDA and J. SEDLÁČEK. *CO NABÍZÍ SOUČASNÁ RTG STRUKTURNÍ ANALÝZA?* 2008.
- [52] ALBERTS B, Johnson A, Lewis J. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York: Garland Science, 2002. ISBN 0-8153-3218-1.
- [53] H. LODISH. *Molecular Cell Biology*. 4th ed. New York: W.H.Freeman, 2000.
- [54] STYLIANOU, A, S KONTOMARIS, C GRANT and E ALEXANDRATOU. Atomic Force Microscopy on Biological Materials Related to Pathological Conditions. *Scanning* [online]. 2019, **2019**, 1–25. ISSN 0161-0457. Dostupné: doi:10.1155/2019/8452851
- [55] RUGGERI, F.S., T ŠNEIDERIS, M VENDRUSCOLO and T. P.J. KNOWLES. Atomic force microscopy for single molecule characterisation of protein aggregation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 2019, **664**, 134–148. ISSN 00039861. Dostupné: doi:10.1016/j.abb.2019.02.001
- [56] *AFM Probes & Accessories Catalogue NT-MDT Spectrum Instruments Company* [online]. no date. Dostupné: www.ntmdt-si.com

- [57] L. MACHALA, M. Vůjtek, R. Kubínek, M. Mašláň. *Mikroskopie skenující sondou* [online]. Olomouc: Univerzita Palackého, 2003. Dostupné: doi:<http://atmilab.upol.cz/mss/index.html>
- [58] MAGHSOUDY-LOUYEH, S., M. KROPF and B. R. TITTMANN. Review of Progress in Atomic Force Microscopy. *The Open Neuroimaging Journal* [online]. 2018, **12**(1), 86–104. ISSN 1874-4400. Dostupné: doi:[10.2174/1874440001812010086](https://doi.org/10.2174/1874440001812010086)
- [59] ZHONG, J, X LIU and D WEI. Effect of incubation temperature on the self-assembly of regenerated silk fibroin: A study using AFM. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2015, **76**, 195–202. ISSN 01418130. Dostupné: doi:[10.1016/j.ijbiomac.2015.02.045](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.045)
- [60] GONG, Z, L HUANG, Y YANG and X CHEN. Two distinct β -sheet fibrils from silk protein. *Chemical Communications* [online]. 2009, (48), 7506. ISSN 1359-7345. Dostupné: doi:[10.1039/b914218e](https://doi.org/10.1039/b914218e)
- [61] ZHONG, J, M MA and J ZHOU. Tip-Induced Micropatterning of Silk Fibroin Protein Using In Situ Solution Atomic Force Microscopy. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. 2013, **5**(3), 737–746. ISSN 1944-8244. Dostupné: doi:[10.1021/am302271g](https://doi.org/10.1021/am302271g)
- [62] YAMADA, K, Y TSUBOI and A ITAYA. AFM observation of silk fibroin on mica substrates: morphologies reflecting the secondary structures. *Thin Solid Films* [online]. 2003, **440**(1–2), 208–216. ISSN 00406090. Dostupné: doi:[10.1016/S0040-6090\(03\)00460-7](https://doi.org/10.1016/S0040-6090(03)00460-7)
- [63] LORBER, Bernard, Frédéric FISCHER, Marc BAILLY, Hervé ROY and Daniel KERN. Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students. *Biochemistry and Molecular Biology Education* [online]. 2012, **40**(6), 372–382. ISSN 14708175. Dostupné: doi:[10.1002/bmb.20644](https://doi.org/10.1002/bmb.20644)
- [64] MINAŘÍK, A, P SMOLKA, M MINAŘÍK and A MRÁČEK. A special instrument for the defined modification of polymer properties in solutions and polymer layers. *Measurement* [online]. 2017, **97**, 218–225. ISSN 02632241. Dostupné: doi:[10.1016/j.measurement.2016.11.006](https://doi.org/10.1016/j.measurement.2016.11.006)
- [65] *ZETASIZER NANO Series PERFORMANCE, SIMPLICITY, VERSATILITY* [online]. no date. Dostupné: www.malvern.com
- [66] JIN, Yuan, Yichun HANG, Qingfa PENG, Yaopeng ZHANG, Huili SHAO and Xuechao HU. Influence of shear on the structures and properties of regenerated silk fibroin aqueous solutions. *RSC Advances* [online]. 2015, **5**(77), 62936–62940. ISSN 2046-2069. Dostupné: doi:[10.1039/C5RA12885D](https://doi.org/10.1039/C5RA12885D)

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BMF	<i>Bombyx mori</i> fibroin
Na ₂ CO ₃	uhličitan sodný
NaHCO ₃	hydrogen uhličitan sodný
HFIP	hexafluoroisopropanol
LiBr	bromid litný
LiSCN	kyanid litný
CaCl ₂	chlorid vápenatý
TFA	trifluoroaceton
HA	kyselina hyaluronová
PEG	polyetylenglykol
PVA	polyvinylalkohol
M _w	molekulová hmotnost
M _w D	distribuce molekulové hmotnosti
NaCl	chlorid sodný
DLS	dynamický rozptyl světla
RTG	Rentgenovo záření
NMR	nukleární magnetická resonance
AFM	mikroskopie atomárních sil

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1</i> Struktura hedvábného vlákna [1]	12
<i>Obr. 2</i> A) Schéma snovacích žláz B) housenka a kokon <i>Bombyx mori</i> [7, 8]	13
<i>Obr. 3</i> Struktura fibroinového vlákna [12]	14
<i>Obr. 4</i> Proces regenerace hedvábného fibroinu [7, 19]	16
<i>Obr. 5</i> Schéma BMF s různým obsahem sericinu [38]	21
<i>Obr. 6</i> Sekundární struktura proteinů [44]	23
<i>Obr. 7</i> A) Antiparalelní β -sheet B) Paralelní β -sheet [45]	23
<i>Obr. 8</i> schéma AFM [55]	26
<i>Obr. 9</i> AFM sonda [56]	26
<i>Obr. 10</i> Závislost síly na vzdálenosti hrotu [58]	27
<i>Obr. 11</i> AFM snímky samoorganizovaných struktur BMF o koncentraci 15 mg.ml^{-1} různých teplotách (černé šipky ukazují protofilamenta a bílé protofibrily)	27
<i>Obr. 12</i> snímek AFM: A) čistá slída B) čisté rozpouštědlo deponované na slídu (plocha $10 \times 10 \mu\text{m}$	31
<i>Obr. 13</i> snímek AFM: A) plastová stříkačka B) skleněná stříkačka (plocha $10 \times 10 \mu\text{m}$)	31
<i>Obr. 14</i> Zařízení pro definované rozpouštění a) Sestava zařízení s hlavními funkčními částmi b) pracovní jednotka, 3 - horní chladicí deska, 4 - spodní topná deska. Podrobnější popis zařízení je uveden v práci A. Minaříka a kol. [64]	32
<i>Obr. 15</i> Schéma přípravy vzorků BMF v HFIP	33
<i>Obr. 16</i> Mikroskop atomárních sil INTEGRA Prima	34
<i>Obr. 17</i> Přístroj Zetasizer Nano [65]	35
<i>Obr. 18</i> Srovnání AFM obrázku a profilových řezů BMF na povrchu slídy z A) ředěného roztoku 1:1 000 000 B) zásobního roztoku 2 hm%	38
<i>Obr. 19</i> BMF na povrchu slídy deponovaných z flitorvané a nefiltrované roztoku ředěného v poměru: A) 1:1000 B) 1:10 000 C) 1:100 000 D) 1:1 000 000 (snímaná plocha $5 \times 5 \mu\text{m}$)	39
<i>Obr. 20</i> Srovnání AFM obrázků a profilových řezů BMF deponovaného na povrch slídy z ředěného roztoku 1:1 000 000 z A) HFIP B) vody	40
<i>Obr. 21</i> AFM obrázků a profilových řezů BMF deponovaného na povrch slídy z ředěného roztoku 1:1 000 000 bezprostředně po naředění	41
<i>Obr. 22</i> Snímky AFM a profilové řezy pro BMF na A) výchozího roztoku (1:1 000 000) temperovaného na 25°C B) 30°C C) 35°C D) 40°C E) 50°C (snímaná plocha $5 \times 5 \mu\text{m}$)	42
<i>Obr. 23</i> Srovnání snímku z AFM a profilových řezů (plocha $2 \times 2 \mu\text{m}$) A) nefiltrovaného a B) filtrovaného roztoku BMF vystaveného teplotnímu spádu $50^\circ\text{C}/10^\circ\text{C}$	43
<i>Obr. 24</i> Srovnání AFM snímků a profilových řezů BMF deponovaného na povrch slídy z roztoku vystaveného teplotního spádu $40^\circ\text{C}/10^\circ\text{C}$ po dobu A) 1 hodiny B) 2 hodin	44

<i>Obr. 25 Detail agregovaných struktury BMF vzniklých při teplotním spádu 40 °C/10 °C po 2 hodinách.....</i>	<i>45</i>
<i>Obr. 26 Srovnání AFM snímků a profilových řezů BMF deponovaného na povrch slídy z roztoku vystaveného teplotního spádu 30 °C/10 °C po dobu A) 1 hodiny B) 2 hodin.....</i>	<i>45</i>
<i>Obr. 27 Detail agregátů BMF vzniklých v důsledku působení teplotního spádu 30 °C/10 °C po dobu 1 hodiny.....</i>	<i>46</i>
<i>Obr. 28 Srovnání AFM snímků a profilových řezů BMF deponovaného na povrch slídy z roztoku vystaveného teplotního spádu 50 °C/40 °C po dobu A) 1 hodiny B) 2 hodin.....</i>	<i>46</i>
<i>Obr. 29 Příklad výše agregované struktury vzniklé při teplotním spádu 50 °C/40 °C po 1 hodině. AFM obrázek výškových změn o rozměru 5 × 5 μm.....</i>	<i>47</i>
<i>Obr. 30 Srovnání AFM snímků a profilových řezů BMF na povrchu slídy z vodného roztoku vystaveného teplotního spádu A) 50 °C/10 °C B) 40 °C/10 °C (plocha 5 × 5 μm).....</i>	<i>48</i>
<i>Obr. 31 Srovnání BMF na povrchu slídy z filtrovaných roztoků (1:100 000) bezprostředně po filtraci a po týdnu skladování při 5 °C. AFM obrázek 5 × 5 μm.....</i>	<i>49</i>
<i>Obr. 32 BMF na povrchu slídy z filtrovaných roztoků (1:1000) bezprostředně po filtraci a po týdnu skladování při 5 °C. AFM obrázek 5 × 5 μm.....</i>	<i>49</i>
<i>Obr. 33 Procentuální zastoupení velikosti částic v závislosti na jejich střední velikosti pro BMF roztok připravované při 25 °C bez a s následným ředěním. A) výchozí roztok s 2 hm% BMF, ředění výchozího BMF v poměru: B) 1:1 000, C) 1:100 000, D) 1:1 000 000. Měření provedena pomocí DLS.....</i>	<i>50</i>
<i>Obr. 34 Souhrné porovnání dat z DLS uvedených na Obr. 33.....</i>	<i>51</i>
<i>Obr. 35 Procentuální zastoupení velikosti částic v závislosti na jejich střední velikosti pro BMF roztok připravované při teplotním spádu 50 °C/40 °C po dobu 2 hod. Výchozí roztok ředěn v poměru 1:1 000 000. Měření provedena pomocí DLS.....</i>	<i>52</i>

