

Univerzita Karlova v Praze

Pedagogická fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Příprava polysacharidových pojiv používaných
v uměleckých dílech

Katedra Chemie a didaktiky chemie

Vypracovala: Lenka Švajcrová

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Ing. Štěpánka Hrdličková Kučková, Ph.D.

Studijní program: Biologie, geologie a environmentalistika - Chemie

2014

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma příprava polysacharidových pojiv používaných v uměleckých dílech vypracovala pod vedením vedoucího bakalářské práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále prohlašuji, že tato bakalářská práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze dne 16. 04. 2014

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování Mgr. Ing. Štěpánce Hrdličkové Kučkové, Ph.D., za její cenné rady, odborné vedení, trpělivost při vedení bakalářské práce a čas strávený v laboratoři při vypracovávání experimentální části bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Lucii Maršálové z Ústavu biochemie a mikrobiologie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze (VŠCHT Praha) za změření vzorků metodou LC-MS/MS.

ABSTRAKT

Hlavním cílem bakalářské práce byla příprava polysacharidových pojiv z vybraných druhů škrobů (bramborového, kukuřičného, pšeničného, rýžového, kuzu), arabské gumy a jejich barvení pomocí anorganických pigmentů. Dále byly vzniklé vzorky polysacharidových pojiv připraveny k dalšímu zkoumání pomocí metody kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) a infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací (FT-IR).

Tato práce se rovněž zabývala historií výroby škrobu, jeho původem, obsahovými látkami a pěstováním konkrétních rostlin, ze kterých je získáván. Dále bylo do práce zahrnuto pojednání o technologické výstavbě obrazů a jiných polychromovaných uměleckých děl. Technický charakter malby totiž určují hlavně pojidla barev, a proto z toho důvodu zde byla kromě polysacharidových pojiv popsána i olejová, proteinová a olejovo-pryskyřičná pojiva.

Klíčová slova: polysacharidová pojiva, škrob, arabská guma, umělecká díla

ABSTRACT

The main aim of this bachelor thesis was to prepare polysaccharide binders from the chosen kinds of starch (gained from potatoes, corn, wheat, rice and kuzu), Arabic gum and to pigment them. The created samples of the polysaccharide binders were then prepared for further investigation using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR).

This work is also focused on the history of the production of starch, its origin, contained substances and growing of the specific plants, from which the starch is obtained from. Furthermore, there is also described the technology process of paintings and other polychromatic arts creation. The technical character of paintings is actually determined by the binders, thus apart from the polysaccharide binders there are also described oil, protein and oil-resin binders.

Key words: polysaccharidic binders, starch, Arabic gum, artworks

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Umělecká díla	10
2.2 Polysacharidová pojiva	12
2.2.1 Škrob	12
2.2.1.1 Syntéza a odbourávání škrobu	15
2.2.1.2 Historie výroby škrobu	17
2.2.1.3 Produkce škrobu ve světě	17
2.2.2 Bramborový škrob a jeho výroba	18
2.2.3 Pšeničný škrob a jeho výroba	20
2.2.4 Kukuřičný škrob a jeho výroba	23
2.2.5 Rýžový škrob a jeho výroba	25
2.2.6 Kuzu	27
2.2.7 Arabská guma	28
2.3 Proteinová pojiva	29
2.4 Pyskyřičná pojiva	32
2.5 Aditiva	35
2.6 Pigmenty	35
2.6.1 Oxid železitý (Fe_2O_3)	37
2.6.2 Síran vápenatý (CaSO_4)	38
2.6.3 Uhličitan vápenatý (CaCO_3)	38
2.7 Analytické metody	39
2.7.1 Hmotnostní spektrometrie	39
2.7.2 Chromatografické metody	42
2.7.3 Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS)	43
2.7.4 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací	44
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	46
3.1 Materiál a chemikálie	46
3.2 Použité analytické přístroje a chemikálie	47
3.3 Příprava polysacharidových pojiv	47
3.3.1 Roztok arabské gumy	47

3.3.2 Výroba škrobových mazů	47
3.4 Příprava barevných vrstev polysacharidových pojiv	48
3.5 Identifikace metodou FT-IR	49
3.6 Identifikace proteinů metodou peptidového mapování	49
3.6.1 Štěpení trypsinem	49
3.6.2 Přečištění a zkoncentrování peptidových štěpů na reverzní fázi.....	49
3.6.3 Identifikace proteinů pomocí LC-MS/MS	50
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	51
4.1 Identifikace polysacharidových pojiv metodou infračervené spektroskopie (FT-IR)	51
4.2 Vyhodnocení pomocí LC-MS/MS	52
5. ZÁVĚR	61
6. LITERATURA	62
7. SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	66

1. ÚVOD

Cílem této bakalářské práce bylo přehledné zpracování výroby konkrétních polysacharidových pojiv používaných v malířství. Polysacharidová pojiva byla vytvořena z vybraných druhů škrobu (bramborového, kukuřičného, pšeničného, rýžového, kuzu) a arabské gumy, u kterých byly dále zkoumány vlastnosti a proteinové složení pomocí analytických metod kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS, Liquid Chromatography – Mass Spectrometry/Mass Spectrometry) a infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR, Fourier Transform Infrared Spectroscopy).

Práce se skládá ze dvou částí, a to teoretické a experimentální. V teoretické části je popsána výstavba obrazu a typu pojiv (polysacharidová, proteinová, olejová, olejovo-pryskyřičná), která byla a jsou i dnes využívána v uměleckých oborech. Dále se práce zabývá škrobem; jeho historií a současným využitím ve světě. U vybraných druhů škrobu je popsán jejich původ, složení a následná výroba, která je ovšem v mnoha bodech u různých rostlin shodná. V této části jsou také shrnuty analytické metody (LC-MS/MS a FT-IR), kterými byla vybraná pojiva analyzována.

V experimentální části je shrnuta příprava pěti polysacharidových pojiv ze škrobů, se kterými je možné se běžně setkat i v domácnosti (bramborový, kukuřičný, pšeničný a rýžový škrob). Experimentálně byl vybrán i kuzu škrob, který ale dosud není v našich podmínkách příliš známý. Dále byla provedena příprava pojiva z arabské gumy. Recepty pro přípravu polysacharidových pojiv byly čerpány z Formulas for painters [1]. Všechna tato polysacharidová pojiva byla napigmentována třemi druhy pigmentů (oxidem železitým, síranem vápenatým a uhličitanem vápenatým) a ponechána na podložních sklíčkách, kdy jedna sada byla vystavena dennímu světlu a druhá setrvala ve tmě. (Tyto připravené vzorky slouží k doplnění databáze referenčních vzorků na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze). Vybrané vzorky byly dále podrobeny zkoumání analytickými metodami FT-IR a LC-MS/MS a následně vyhodnoceny.

2. TEORETICKÁ ČÁST

V této části je popsán teoretický základ nutný pro porozumění a pochopení daného tématu. Tato kapitola je rozdělena na podkapitoly Umělecká díla (oddíl 2.1), Polysacharidová pojiva (oddíl 2.2), Proteinová pojiva (oddíl 2.3), Pryskyřičná pojiva (oddíl 2.4), Aditiva (oddíl 2.5) a Pigmenty (oddíl 2.6), ve kterých jsou popsány obecné vlastnosti daných látek s přihlédnutím na látky použité v této práci. V poslední podkapitole Analytické metody (oddíl 2.7) jsou popsány aplikované metody.

2.1 Umělecká díla

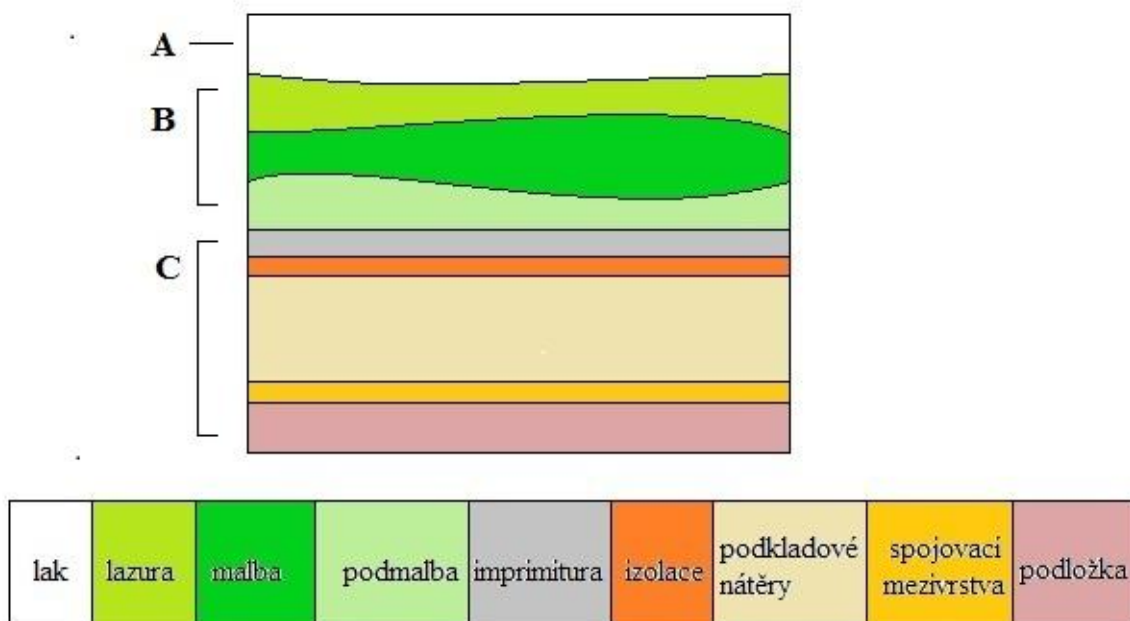
Každý umělec má svůj vlastní osobitý styl malby, svoji oblíbenou paletu barviv a pigmentů i používaných pojiv, a proto je každé umělecké dílo jak po stránce umělecké, tak i po stránce chemické unikátní. Přesto zejména závěsné obrazy vykazují řadu společných znaků, protože jejich autoři již po staletí dodržují stejné základní technologické postupy [2].

Z technologického hlediska není obraz posuzován pouze jako plošný útvar, ale jako trojrozměrné těleso. Na svém průřezu se obvykle skládá z několika homogenních barevných vrstev (směsí barviva či pigmentů s pojivem (obr. 1)), jež jsou seřazeny v odpovídajícím pořadí vzniku malby. Přímo na podložce obrazu je nanášena podkladová vrstva. Na tuto vrstvu je pak promítána tvůrčí práce malíře. Barvy, které se ve vrstvách nanášejí na poklad, se nazývají malbou. Malbu kryje lak (průhledný nátěr), odpovídající za ochranou funkci. Tyto vrstvy nejsou v obraze přítomny vždy jednotlivě, ale mohou se skládat z dalších vrstev, kde se jejich pojmenování a uspořádání mění podle typu malířské techniky. Například podklad, zvyšující odolnost a pevnost malby, se skládá z více vrstev. Nejspodnější vrstvou, jak již bylo zmíněno, je podložka, na které leží celá malba. Podložka může být zhotovena z různých materiálů, např. z dřevěných desek, kovu, papíru, plátna, lepenky, kartónu, pergamenu, skla, kamene nebo umělých hmot. Na podložce je nanášen jednovrstevný nebo vícevrstevný pokladový nátěr, kterým se vhodně upraví struktura povrchu podložky. Podkladové nátěry, bývají často rozdělovány podle druhu pojivých látek na olejové, křidlové, emulzní a disperzní, dále podle plnidel či pigmentů na sádrové, křidlové a bolusové, nebo podle světlosti a barvy na tmavé, bílé nebo barevné. Mezivrstva spojující podložku s podkladem podporuje soudržnost a odolnost obou složek.

Vyrábí se buď ze želatiny, klihu nebo z pryskyřičných laků. Povrch podkladového nátěru je pokryt takzvanou „izolací“, která zabraňuje vniknutí pojidla barev do podkladu. Bílé podklady jsou tónovány lazurní nebo poloprůhlednou barvou tzv. imprimiturou z důvodu velké intenzity svítivosti, která ne vždy vyhovuje umělcům. Imprimitura je nanášena na již uschlou izolaci nebo je k ní přimíchávána pomocí oleje a klihu [2, 3].

Nejpodstatnější částí obrazu je malba. Skládá se z většího počtu vrstev, kde nejspodnější vrstvu tvoří podmalba. Na ní leží samotná malba, kterou kryje krycí vrstva nanesené barvy na hotový obraz označovaná jako přemalba. Další ochrannou vrstvu tvoří lazura, která tvoří průhledné nánosy barev. Konečnou povrchovou ochrannou vrstvu tvoří lak. Laky dělíme podle povahy schnutí na olejové, těkavé, chemicky a fyzikálně schnoucí a teplem tvrditelné. Podle složení je můžeme rozdělit na olejo-pryskyřičné, bílkovinné, syntetické, ester celulósovité a éter celulósovité. Dalším faktorem pro jejich dělení mohou být rozpouštědla, kdy laky dělíme na lihové, terpentýnové, acetonové a vodové [3].

Technický charakter malby určují pojidla barev. Pojidla jsou koloidní látky, které se vyznačují vynikající lepivostí a jsou považována často za lepidla. Podle složení se pojidla dělí na polysacharidová pojiva (oddíl 2.2) rostlinného původu, mezi které řadíme arabskou gumu, škrob, tragant a další. Dále na proteinová (bílkovinná) pojiva (oddíl 2.3) živočišného původu, mezi které řadíme bílek, albumin, kožní, kostní a rybí klič. Je možné rozlišit i olejová a olejovo-pryskyřičná pojiva (oddíl 2.4). Malířské techniky rozlišujeme podle způsobu provedení: buď jde o tenké průhledné barevné nánosy malby, kdy se jedná o akvarel, nebo jde o malbu s krycími barvami nazývanou kvaš. Dále máme techniky olejomalbou, temperou, pastely a eukaustikou. V dnešní době se při malování používá většinou jednotná technika, ale dříve nebylo výjimkou použít hned několika různých technik na jednom obraze [4].



Obrázek 1. Průřez deskovým obrazem. A = lak, B = malba, C = podklad [4].

2.2 Polysacharidová pojiva

Polysacharidy jsou látky vysokomolekulární povahy, tvořené z monosacharidů, které jsou mezi sebou spojeny glykosidovými vazbami [5, 6]. Některé polysacharidy jsou ve vodě dobře rozpustné, zatímco jiné ve vodě jen bobtnají. Z pohledu funkce v tělech organismů je můžeme rozdělit na zásobní (rezervní) a stavební. Zásobní polysacharidy (škrob, glykogen, atd.) jsou zastoupeny v živých organismech, například v hlízách rostlin nebo u živočichů v játrech a svalech. Stavební polysacharidy zpevňují a vyztužují tkáň rostlin (celulosa) a u živočichů zpevňují vnější kostru (chitin) [5-7].

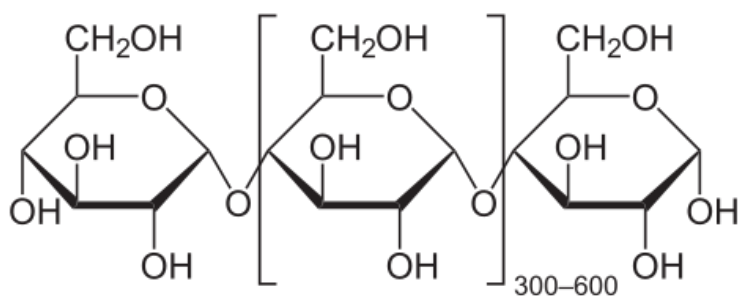
V uměleckých dílech se používají polysacharidová pojiva, hlavně škrob vyrobený z hlíz brambor (oddíl 2.2.2), semen pšenice (oddíl 2.2.3), kukuřice (oddíl 2.2.4), rýže (oddíl 2.2.5) nebo kuzu (oddíl 2.2.6).

2.2.1 Škrob

Se škrobem se v přírodě setkáváme v rostlinném materiálu v podobě zrněk uložených v kořenech, hlízách, semenech a listech. Ve škrobu jsou prvky uhlíku, vodíku a kyslíku

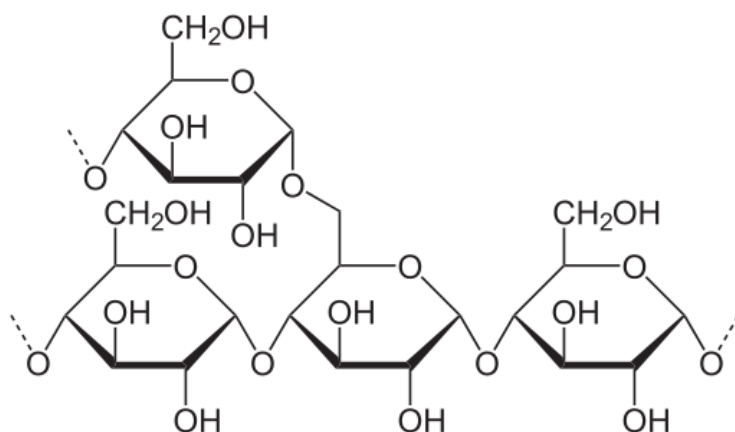
zastoupeny v poměru 6:10:5. Základními složkami škrobu je amylosa a amylopektin, což jsou makromolekuly složené z α -D-glukopyranosy.

Amylosa (obr. 2) je lineární α -D-(1 \rightarrow 4)-glukan (4-130), proto je považována za disacharid maltosy. V malém množství dochází k větvení řetězce asi na deseti místech molekuly [8]. Amylosa je rozpustná ve vodě, v přítomnosti roztoku jódu se barví do modra. Molekulová hmotnost amylosy se udává v rozmezí od 40 000 do 150 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [7].



Obrázek 2. Strukturní složení amylosy [9].

Amylopektin (obr. 3) se skládá z D-glukosových jednotek s α -(1 \rightarrow 4) vazbami, z nichž se přibližně po 10-100 jednotkách větví postranní řetězce α -(1 \rightarrow 6) [8]. Amylopektin je na rozdíl od amylosy nerozpustný ve vodě. Jeho molekulová hmotnost se obvykle udává kolem 500 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [7].



Obrázek 3. Strukturní složení amylopektinu [10].

Poměr amylosy a amylopektinu (tab. I) se v jednotlivých rostlinách liší, například bramborový škrob obsahuje jiný poměr amylosy a amylopektinu než škrob kukuřičný. Díky tomu je možné podle tohoto poměru určit i rostlinu, ze které byl škrob vyroben. U některých škrobů, jako např. pšeničný škrob, se můžeme setkat jen s amylopektinem, u jiných naopak jen s lineární amylosou [11].

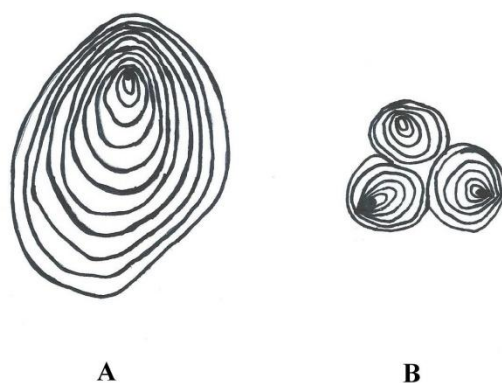
Tabulka I. Obsah škrobu a jeho složení (obsah amylosy) u vybraných druhů potravin [8].

Potravina	Škrob [%]	Amylosa [%]*
Brambory	17-24	20-23
Kukuřice	65-75	24-26
Pšenice	59-72	24-29
Rýže	70-80	8-37

* Obsah amylopektinu se dopočítává vždy do 100 %.

Škrobová zrna (obr. 4) neboli granule škrobu se liší podle typu rostliny, ze které pochází. Mají ale svůj společný stavební model, skládají se z radiálně uspořádaného amylopektinu ve tvaru disku. Můžeme rozeznávat čtyři typy polymorfní formy škrobu podle stupně krystalinity na A, B, C a V. Forma A je nejstabilnější a je obsažena v cereálních škrobech. Nejméně stabilní forma B je obsažena u škrobů kořenové zeleniny a brambor. Forma C je obsažena v luštěninách (nejspíše se jedná o spojení forem A a B). U želatinových škrobů, obsahujících lipidy s interakcí amylosy a mastných kyselin, se setkáváme s formou V [8].

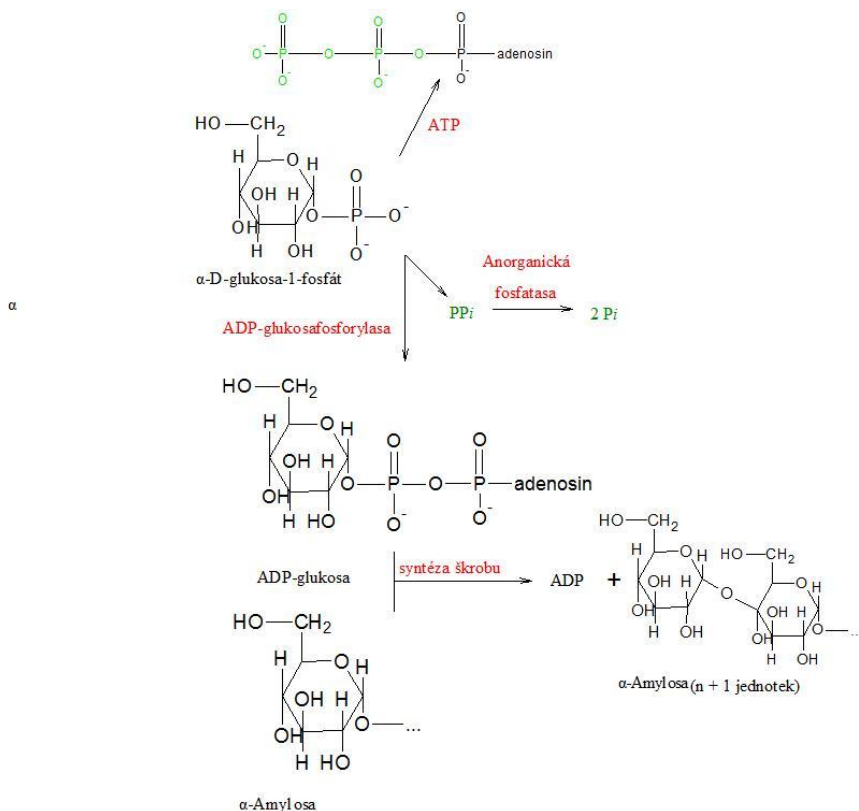
Škrobová zrna jsou ve studené vodě nerozpustná, stejně tak ale i například v chloroformu a alkoholu [4, 7], proto je důležité k disperzi dospět pomocí zahřátí škrobu. V přítomnosti horké vody se ze škrobu vytváří tzv. škrobový maz, který má vysokou viskozitu a propůjčuje škrobu gumovitou a kohezní texturu [8]. V analytické chemii se škrobový maz využívá jako indikátor při titrační metodě zvané jodometrie. V uměleckých oborech je ale využíván jako lepidlo pro dekorativní a restaurátorská díla, kde se do něj pro zvýšení lepících schopností přidává klišová voda [3, 4, 11]. V obchodech se škrob prodává v podobě bílého prášku bez určité charakteristické chuti nebo vůně.



Obrázek 4. Schematické znázornění škrobových zrn, A – škrobové zrnó jednoduché, B – složená škrobová zrna.

2.2.1.1 Syntéza a odbourávání škrobu

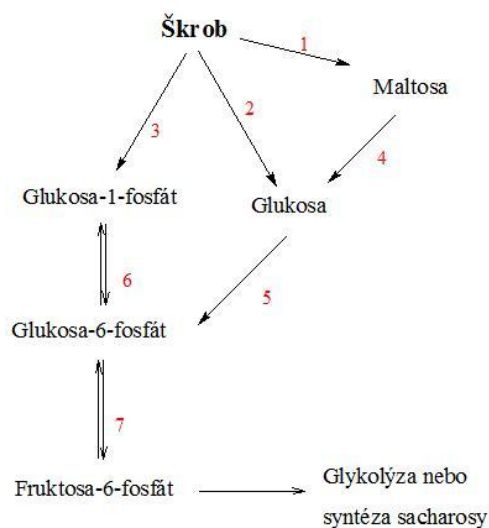
Škrob je syntetizován (obr. 5) v plastidech, chloroplastech a ve všech rostlinných tkáních, kde neprobíhá fotosyntéza, jako jsou semena, kořeny a hlízy. Ve fotosyntetických tkáních, tj. chloroplastech, je syntetizovaný škrob degradován na maltosu a glukosu během temnostní fáze fotosyntézy. Tyto cukry jsou pak exportovány do cytosolu a používány dále k syntéze sacharosy. Sacharosa může být snadno přepravována po nefotosyntetizujících tkáních, kdy podporuje růst rostlin, nebo slouží jako podpora syntézy škrobu v amyloplastech. Biosyntéza škrobu zahrnuje jak chloroplastické tak amyloplastické dráhy. Výchozím bodem pro chloroplastické dráhy je fruktosa-6-fosfát, produkt fotosyntetické fixace uhlíku. Výchozím bodem pro amyloplastické dráhy je glukosa-1-fosfát, produkt rozkladu sacharosy [12, 13]. Glukosa-1-fosfát je aktivována ADP-glukosapyrofosforylasou za vzniku ADP-glukosy. ADP-glukosa se dále používá pro syntézu škrobu s enzymy, které glukose přidávají jednotky na konec rostoucího polymerního řetězce k vytvoření molekuly škrobu [14].



Obrázek 5. Schéma syntézy škrobu [14].

Odbourávání škrobu

Odbourávání škrobu (obr. 6) probíhá pomocí enzymů α -amylosa a β -amylosa. Rostlina potřebuje pokrýt energetickou potřebu pomocí škrobu, který ale nemůže přijmout v původním stavu, nýbrž v podobě jednoduchých cukrů, které může organismus dále metabolizovat. α -amylosa je enzym katalyzující štěpení „uvnitř“, na libovolném místě amylosy a amylopektinu (oddíl 2.2.1). Amylopektin lze odštěpit jak z větvené struktury za vazbami α -(1-6), tak i z volných koncových řetězců. Optimální pH pro tuto enzymatickou reakci je 5,3 až 6,0. Druhý enzym, β -amylasa, působí též na amylosu a amylopektin, ale z vnějšku molekuly. Postupně odštěpuje maltosu z konce řetězců. Amylopektin podléhá hydrolýze β -amylosou, která ale není schopna úplné hydrolýzy vazeb. Pro dokonalou hydrolýzu je zapotřebí obou zmíněných enzymů. Optimální hodnota pH pro tuto enzymatickou reakci je 4,3 [15].



Obrázek 6. Schéma odbourávání škrobu. 1 – β -amylasa, 2 – α -amylasa, 3 – fosforylasa, 4 – glukosidasa, 5 – hexokinasa, 6 – fosfoglutamasa, 7 – glukosa-6-fosfát isomerasa [16].

2.2.1.2 Historie výroby škrobu

Počátek výroby škrobu se přisuzuje do Malé Asie. K výrobě byla od počátku používána nejčastěji pšenice, ale o konkrétním způsobu výroby se dochovalo velmi málo zpráv. Do 18. století se používala k výrobě škrobu stále hlavně pšenice, ale později i brambory. V 19. století se zvláště v Německu, Rusku a Francii začal vyrábět bramborový škrob. V Americe se rozvinula výroba škrobu z kukuřice, která byla s rozmachem pěstování kukuřice v evropských podmínkách později přenesená i na tento kontinent. V polovině 19. století se škrob začal vyrábět z rýže a tato produkce se později také dostala do Evropy [11].

2.2.1.3 Produkce škrobu ve světě

V průmyslové oblasti má škrob největší uplatnění při výrobě zásypů, pudrů a dalších technických produktů. Roční produkce škrobu ve světě je odhadována přibližně na 12 milionů tun. Nejvyšší produkce připadá na kukuřičný (85 %), dále pak na bramborový (10 %) a pšeničný škrob (5 %). Další druhy škrobu jako jsou například rýžový, ječný, batátový, kuzu nebo maniokový škrob se vyrábějí ve velmi malém množství [17].

V České republice se přibližně za rok vyrobí kolem 18 tisíc tun bramborového a 15 tisíc tun pšeničného škrobu. Největšími odběrateli škrobu jsou textilní, potravinářský a papírenský průmysl [17].

2.2.2 Bramborový škrob a jeho výroba

Důležitou surovinou pro výrobu bramborového škrobu jsou podzemní hlízy lilku bramboru (*Solanum tuberosum*). Mezi odrůdy pěstované pro výrobu škrobu řadíme rané (Tegal, Protiva), polorané (Rustica, Calla) a polopozdní brambory (Borka, Amylax, Javor, Panda, Saturna). Tyto odrůdy průmyslových brambor obsahují v hlíze přibližně 23–24 % sušiny a podíl škrobu je 8–29 % v bramboře (tab. II) [17].

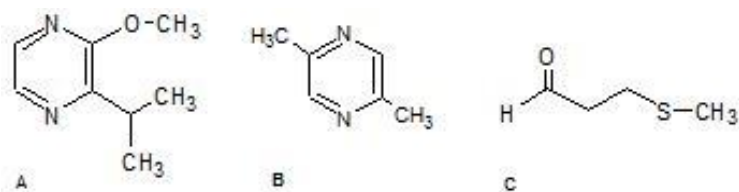
Tabulka II. Látkové složení bramborové hlízy [17].

Látka	Obsah látky [%]
voda	75,38
sušina	24,62
sacharidy (škrob + ostatní)	20,60
bílkoviny	1,95
lipidy	0,15
vláknina	0,95
popeloviny	0,98

Tato tabulka obsahuje průměrné zastoupení vody a sušiny v bramboře. Sušina zahrnuje sacharidy, bílkoviny, lipidy, vlákninu a popelovinu.

Lilek brambor (*Solanum tuberosum*), čeleď lilkovité (*Solanaceae*)

Aroma syrových brambor tvoří sloučeniny 2-isopropyl-3-methoxypyrazin a 2,5-dimethylpyrazin. Aroma vařených brambor tvoří jako hlavní složka methional (obr. 7). Krom těchto sloučenin se dále uplatňují i některé alkoholy a karbonylové sloučeniny [18].

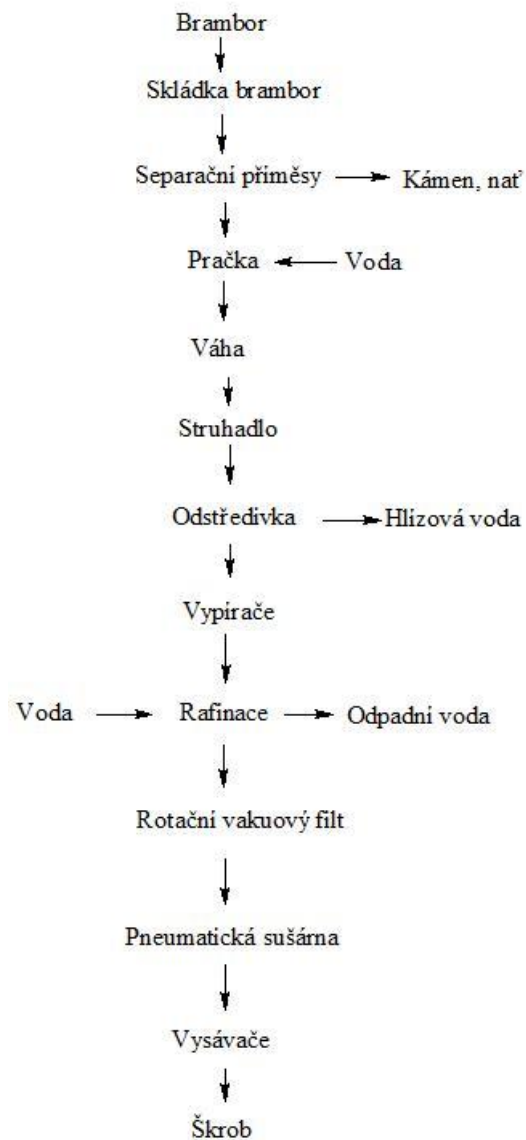


Obrázek 7. Vzorce A – 2-isopropyl-3-methoxypyrazinu B – 2,5-dimethylpyrazinu, C – methionalu.

Výroba bramborového škrobu

Prvním krokem při výrobě bramborového škrobu (obr. 8) je brambory roztřídit a oddělit od hrubých nečistot. V dalším kroku putují brambory do takzvané pračky, v které se o sebe operou a zbaví zbylých nečistot. Z pračky dále pokračují do struhačky, kde se rozstrouhají na jemnou kaši. Pomocí čerpadel se kaše procedí přes síto a zde se pomocí vody škrob z kaše vypere. Vzniklá kaše neboli třenička padá do rozmělnovacího mlýnku, kde se pomocí vody znovu procedí. Přebytečná voda odtéká kanálem pryč a třenička se suší nebo lisuje. Z vypíracích sít odtéká takzvané škrobové mléko, které se shromažďuje v nádobě. Odtud dál pokračuje na rafinační síta, kde se zbavuje zbytků prošlých nečistot, uchycující se na hedvábném sítu. Získané škrobové mléko se pumpuje do usazovacích žlabů, kde se nechá škrob usadit a přebytečná voda se odpouští ven mimo továrnu, nejběžněji do řeky. Usazený škrob je dopraven k přečištění do mísidla, kde se znovu smíchá s vodou a nechá usadit. Tento proces se provede ještě jednou a poté se ze svrchní vrstvy usazeného škrobu seškrábnou nečistoty. Po zbavení nečistot se znovu škrob smíchá s malým množstvím vody a putuje do nádržek s odstředivkami. Vzniklý škrob putuje pomocí výtahu do prvního poschodí a odtud padá do plechových krabic, poté se suší v sušících přístrojích a sušárnách.

V posledním kroku se získaný přečištěný škrob rozmíchá s vodou. Putuje do nádržek, kde se zředí s čerstvou vodou a proseje přes síto s hedvábnou látkou. Vzniklé škrobové mléko se nechá usadit v usazovacích žlabech. Z usazeného škrobu se přečištěním stane konečný surový škrob [11].



Obrázek 8. Schéma výroby bramborového škrobu [19].

2.2.3 Pšeničný škrob a jeho výroba

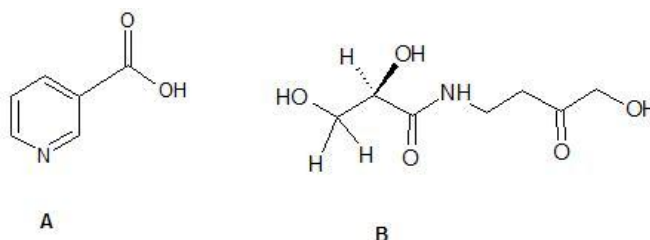
Surovinou pro výrobu pšeničného škrobu je pšeničná mouka. Pšenice obsahuje přibližně 85 % sušiny, 14 % vody a obsah škrobu v pšenici se pohybuje kolem 63 % (tab. III) [17].

Tabulka III. Látkové složení pšeničné mouky [17].

Látka	Obsah látky [%]
voda	14,0 %
škrob	68,4 %
nižší sacharidy	0,8 %
vláknina	1,2 %
bílkoviny	13,5 %
tuky	1,5 %
popelovina	0,6 %

Pšenice setá (*Triticum aestivum*), čeleď lipnicovité (*Poaceae*)

Pšenice setá obsahuje zásobní látky prolaminy a gluteniny. Dále gliadiny a gluteniny, které za přítomnosti kyslíku tvoří, tzv. lepek. Krom vitamínu B1, B2 a B6 má také kyselina pyridin-3- karboxylové (niacin) a kyselinu pantotenovou (obr. 9) [20].



Obrázek 9. Vzorce A – kyseliny pyridin-3-karboxylové, B – kyseliny pantotenové.

Výroba pšeničného škrobu

Výrobu pšeničného škrobu (obr. 10) lze provést dvěma níže popsanými způsoby.

- Výroba pšeničného škrobu za pomoci kvašení.

Nejdříve se pšenice namočí, aby mohla být lépe rozemleta. V létě se namáčí po dobu tří až čtyř dnů, v zimě 8 až 12 dnů. Důkaz, že je zrno dostatečně rozmočeno, lze provést rozmáčknutím mezi prsty. Voda, ve které byla zrna namočena, se

vypustí a sliz utvořený na povrchu zrn se spláchne čistou vodou. Rozmočené zrnو putuje mezi litinové válce, které jej nestejně rychlým otáčením mačkají.

Rozmačkaná hmota podléhá kvašení, jehož hlavní funkce je rozrušit škrob, aby se dále lépe štěpil. Rozmočená hmota putuje do nádoby, ve které se smíchá s kyselou vodou za vzniku kaše. Důkazem, že opravdu probíhá kvašení, jsou vystupující bubliny CO₂. Nejdříve probíhá kvašení lihové (polysacharidy jsou za pomoci kvasinek přeměňovány na alkohol) a dále přechází v kyselé kvašení. Kaše se musí v průběhu kvašení pravidelně míchat. Samo kvašení končí při dosažení teploty 15 °C až 20 °C, a to za 10 až 14 dní. Ukončení kvašení se pozná podle slizkosti kaše, dalším ukazatelem je, jestli lze procedit přes síto. Dále se kyselá voda odpustí a zbylá hmota se přepere v měděném děrovaném válci.

Škrobové mléko z válců putuje do nádob, kde se nechá usadit po dobu 4 až 5 dnů. Naspodu je usazený škrob. Nad škrobem se vydělují vrstvy s lepem (neboli gluten, což je směs bílkovin obsažených v obilných zrnech, je rozpustný ve vodě, proto se v této fázi vyděluje do roztoku) [21], spodní tmavší vrstva je směs škrobu a lepu a nejsvrchnější vrstvu tvoří pouze tzv. kyselý lep. Po odpuštění vody se obě svrchní vrstvy obsahující lep seškrábnou a zbylý škrob se znovu smíchá s vodou. Vzniklé mléko se proseje přes síto, aby se zbavilo přebytečných nečistot. Poté se znovu nechá škrob usadit a oddělí se svrchní vrstvy. Je-li žádoucí čistý bílý škrob, musí se důkladně odstranit lepek. Konečný škrob se po sušení rozpadá na tyčinky.

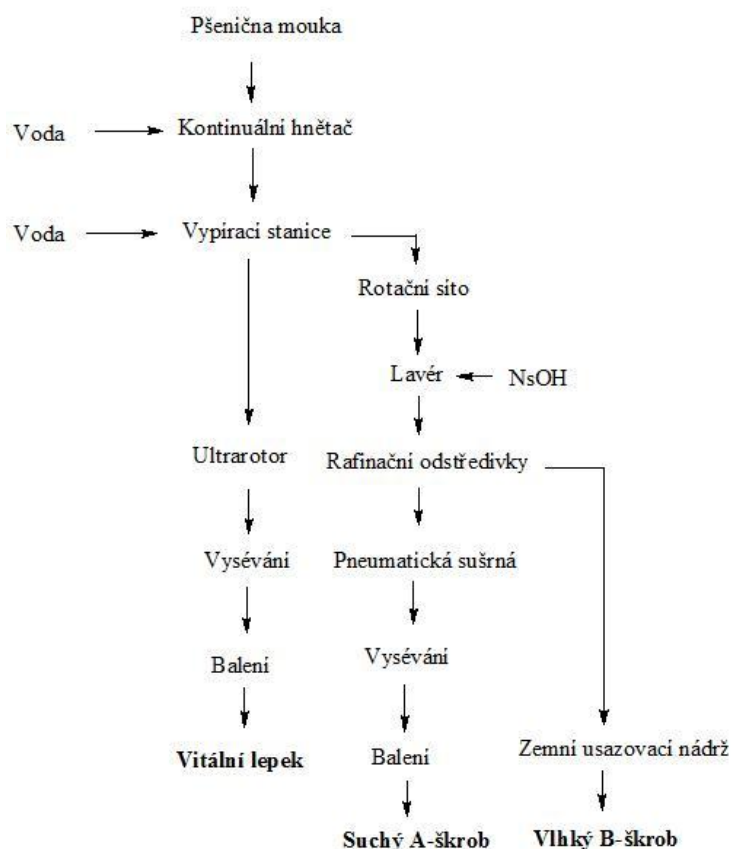
b) Výroba pšeničného škrobu bez pomoci kvašení.

Začátek přípravy se shoduje s předešlým postupem, jen se častěji vyměňuje voda, aby kaše byla jemnější. Zato vypírání škrobu je obtížnější, než tomu bylo při kvašení. Vzniklou kaši umístíme do plátěného pytle a zašijeme. Pytel se umístí mezi válce, kde se občas vyměňuje voda.

Čištění a sušení škrobového mléka probíhá stejně jako u předchozího postupu.

Škrobové mléko z válců putuje do nádob, kde se nechá usadit po dobu čtyř až pěti dnů. Naspodu je usazený škrob. Nad škrobem se vydělují vrstvy s lepem, spodní tmavší vrstva je směs škrobu a lepu a nejsvrchnější vrstvu tvoří pouze kyselý lep. Po odpuštění vody se obě svrchní vrstvy obsahující lep seškrábnou a zbylý škrob se znovu smíchá s vodou. Vzniklé mléko se proseje přes síto, aby se zbavilo nečistot. Znovu se nechá škrob usadit a oddělí se svrchní vrstvy. Jestliže je

žádoucí čistý bílý škrob, musí se důkladně odstranit lepek. Konečný škrob se po sušení rozpadá na tyčinky.



Obrázek 10. Schéma výroby pšeničného škrobu [19].

2.2.4 Kukuřičný škrob a jeho výroba

Surovinou pro výrobu kukuřičného škrobu je kukuřičné zrna získané z kukuřice seté (*Zea mays*), například z těchto kukuřičných odrůd: Reventador, Duro, Blando. Kukuřice obsahuje přibližně 88 % sušiny, 14 % vody a obsah škrobu v kukuřici je 72 % sušiny (tab. IV) [17].

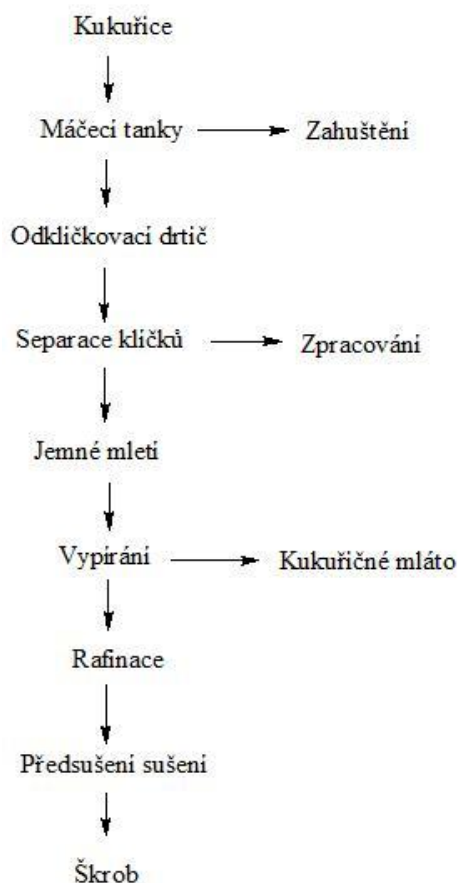
Tabulka IV. Látkové složení kukuřičného zrna [17].

Látka	Obsah látky [%]
voda	18,0 %
vláknina	2,4 %
škrob	56,0 %
bílkoviny	8,0 %
pentozany	5,0 %
tuky	3,0 %
popeloviny	1,5 %

Výroba kukuřičného škrobu

Výroba kukuřičného škrobu (obr. 11) je velmi podobná výrobě pšeničného škrobu pomocí kvašení. Dělí se na máčení, mačkaní, uvolňování škrobu z kaše chemickými činidly (NH_3 , NaOH), vypírání kaše, čištění surového škrobu a sušení.

Po přečištění síty se kukuřičná zrna máčí ve vodě tak dlouho, dokud nejdou rozmělnit mezi prsty. Dále se nechají mezi válci co nejjemněji rozmačkat na kaši a za přídavku vody se prosejí přes síto. Prošlá kaše pokračuje do nádob, kam se přidá za občasného míchání amoniak. Po usazení se voda oddělí a zbylá usazenina se přepere v děrovaných válcích a nechá se usušit [11].



Obrázek 11. Schéma výroby kukuřičného škrobu [19].

2.2.5 Rýžový škrob a jeho výroba

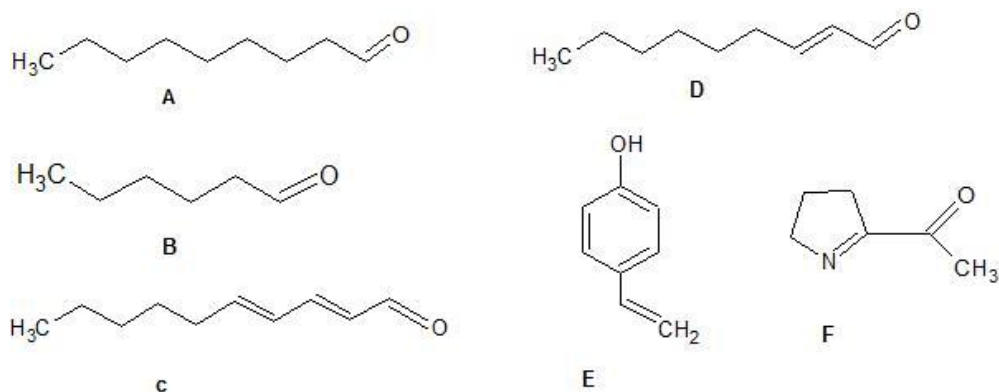
Rýže (*Oryza sativa*) je nejdůležitější obilovina světa. Složení jejích zrn je popsáno v tabulce V. Používá se buď loupaná, neloupaná, nebo jako rýžová mouka. Může se také zkvašovat a vyrábět se z ní alkoholové nápoje, nejznámější je rýžové pivo, víno nebo arak. Neloupaná rýže má zastoupení mezi léčebnými přípravky. Bylo zjištěno, že stabilizuje hladinu krevního cukru (glykémii), snižuje krevní tlak a zlepšuje zdravotní stav pacientů trpících lupenkou. Zevní aplikace rýžové škrobu zlepšuje hydrataci pokožky a zmírňuje její podráždění [22].

Tabulka V. Látkové složení rýže [23].

Látka	Obsah látky [%]
voda	11,5 %
bílkoviny	7,2 %
škrob	80,4 %
vláknina	1,7 %
popelovina	0,5 %

Rýže setá (*Oryza sativa*), čeleď lipnicovitá (*Poaceae*)

Aroma vařené rýže tvoří sloučenina 2-acetyl-1-pyrrolin připomínající vůni pražené kukuřice. Dále se v ní vyskytují aldehydy vznikající oxidací mastných kyselin, jako nonanal, hexanal, 2,4-deka-dienal a (2E)-non-2-ena, nebo 4-vinylfenol vznikající degradací fenolových kyselin (obr. 12) [18].



Obrázek 12. Strukturní vzorce: A – nonalu, B – hexanal, C – 2,4-dekadialu, D – (2E)-non-2-enu, E – 4-vinylfenolu, F – 2-acetyl-1-pyrrolinu.

Výroba rýžového škrobu

Rýžová zrna se ponechají 18 až 20 hodin namočená v hydroxidu sodném (NaOH). Po rozmočení se louh odpustí a zbylá hmota se nechá dvakrát za sebou promýt vodou. Dále se tato hmota rozemele mezi mlýnskými kameny na jemnou kaši. Další zpracování kaše probíhá v mísidlech po dobu pěti hodin, kdy se opakují stejné postupy (zředěním stejným množstvím vody jako u kaše a ponecháním 30 minut v klidu). Na dně se usadí škrob

s lepem, svrchní vrstvu tvoří škrobové mléko, které se opatrně oddělí. Škrobové mléko se proseje přes síto a škrob se nechá usadit během dvou dnů.

Dále se pokračuje jako u pšeničného škrobu. Škrobové mléko z válců putuje do nádob, kde se nechá usadit po dobu čtyř až pěti dnů. Naspodu je usazený škrob. Nad škrobem se vydělují vrstvy s lepem, spodní tmavší vrstva je směs škrobu a lepu a nejsvrchnější vrstvu tvoří pouze kyselý lep. Po odpuštění vody se obě svrchní vrstvy obsahující lep seškrábnou a zbylý škrob se znovu smíchá s vodou. Vzniklé mléko se proseje přes síto, aby se zbavilo přebytečných nečistot. Znovu necháme škrob usadit a oddělíme svrchní vrstvy. Jestliže chceme čistý bílý škrob, musíme důkladně odstranit lepek. Konečný škrob se po sušení rozpadá na tyčinky [11].

2.2.6 Kuzu

Kuzu je dřevnatá liána (*Pueraria lobata*) rostoucí v Japonsku, Číně, Koreji a v Americe, kde je známa pod pojmem „Kudzu“ [24]. V USA se vyskytuje jako plevelná rostlina, která se velmi rychle rozšiřuje a její denní přírůst může být až 30 cm. Kořeny kuzu obsahují škrob, který se získává z kořene rostliny vyplavováním a následným sušením na slunci. Dále obsahuje kromě škrobu (tab. VI) i izoflavonoidy (např. puerarin, daidzein) o průměrném množství od 2 % do 12 % v sušině, které mají očistné a léčivé účinky. Kořen kuzu může růst až do hloubky 1,5 metru [25].

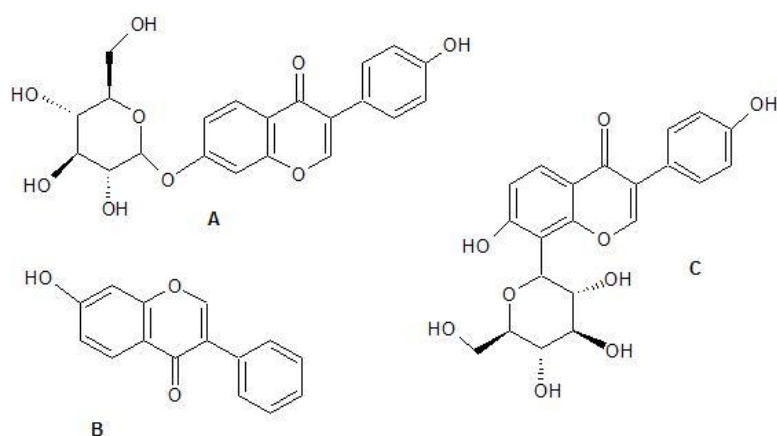
Při klinických testech bylo zjištěno, že kuzu má velmi dobrý vliv na lidský organismus. Pomáhá snižovat nebo úplně odstraňovat bolesti hlavy, což je způsobeno zlepšením průtoku krve. Dále má příznivé kardiovaskulární účinky, podporuje produkci hormonů (serotoninu, dopaminu) a doporučuje se i při onemocněních trávicího traktu, protože zabraňuje překyselení žaludku [25].

Tabulka VI. Látkové složení kuzu [26].

Látka	Obsah látky [%]
sušina	19,4 %
vláknina	33,0 %
bílkoviny	19,3 %
etherové extrakty	2,1 %
ostatní látky	26,2 %

Kuzu (*Pueraria lobota*)

Aktivní složky kuzu jsou daidzin, daidzein, puerarin, genistin, genistein a mnoho dalších (obr. 13) [27]. Daidzein je isoflavon, který má anti-oxidační, anti-karcinogenní a anti-aterosklerotické funkce. Puerarin řídí vstřebávání v gastrointestinálním traktu [28].



Obrázek 13. A – daidzin, B – daidzein, C – puerarin

2.2.7 Arabská guma

Arabská guma patří také mezi oblíbená polysacharidová pojiva. Již ve středověku byla využívána jako pojídlo barev, zejména pro tvorbu knižních iluminací (obr. 14). Je to koloidní látka získávaná z různých druhů akácií, které rostou v tropech a subtropích celého světa.



Obrázek 14. Příklad knižní iluminace, kde mohla být jako hlavní pojivo barev použita právě arabská guma [29].

Arabská guma obsahuje draselné a vápenaté soli kyseliny arbové ($C_5H_8O_4$)_n. V chladné vodě tvoří hustý, lepivý roztok. V suchém prostředí je velice stála, nezvětrává, nežloutne a nezakaluje se. Je ale velmi křehká, a proto je k ní nutné přidávat například glycerin, cukr, med nebo glukosu jako změkčovadla. Roztoky arabské gumy jsou mírně kyselé a snadno podléhají plísni. Pro desinfekční účinky se do nich přidává například borax (tetraboritan sodný) nebo zrníčka kafry [3].

V současné době je arabská guma nejvíce využívána v lékařství a potravinářství, kde se používá při stabilizaci nebo emulgaci různých potravin. Ve zmrzlinách přispívá k jemné konzistenci a v cukrovinkách brání vlhnutí polev a krystalizaci cukrů, díky stabilizaci emulze, kdy absorbuje kapky oleje pomocí přítomných proteinů vázaných na polysacharidy. Arabskou gumu lze dobře kombinovat s dalšími gumami, sacharidy, škroby nebo želatinou [3, 4, 8].

2.3 Proteinová pojiva

Proteinová pojiva (vaječná, kličová nebo mléčná) jsou tvořena bohatými směsmi proteinů. Proteiny (bílkoviny) jsou polypeptidické řetězce, jejichž základní stavební jednotkou jsou aminokyseliny. Pořadí aminokyselin v řetězci je zakódováno do dědičné genetické informace, DNA (deoxyribonukleové kyseliny). V buňce můžeme najít až

několik tisíc různých bílkovin, které se liší svým chemickým složením, prostorovým uspořádáním a funkcí [30, 31].

Proteiny lze rozdělit podle jejich rozpustnosti ve vodě na rozpustné (např. krevní albuminy, histony) a nerozpustné (keratin, kolagen atd.). Existují však i proteiny, které jsou běžně nerozpustné, ale v přítomnosti některých anorganických látek se mohou rozpouštět (např. globuliny) [32].

Podle tvaru a stavby molekul rozlišujeme proteiny:

- globulární – tvar připomínající rotační elipsu, rozpustné ve vodě, s velikou škárou funkcí a uplatnění.
- fibrilární (vláknité) – protáhlé, vláknité molekuly, většinou nerozpustné ve vodě. K této skupině patří skleroproteiny, látky vláknitého tvaru, nerozpustné a často se podílející na stavbě cytoskeletu, protože mají podpůrnou a strukturní funkci [32].

Do skleroproteinů řadíme kolagen, keratin a elastin. Elastiny nacházíme v elastických vláknech různých živočichů. Keratin je velmi odolná bílkovina, jejíž vláknitá šroubovitá struktura připomíná lano. Vlákna keratinu se vyskytují například ve vlasech, chlupcích, nehtech, nebo v ovčí vlně [7]. Kolageny jsou látky tvořící stavební podpůrnou jednotku bílkovin. Dále jsou tvořeny z tzv. tropokolagenu, který tvoří provazce ze tří navzájem stočených řetězců. V teplém prostředí za přítomnosti alkalických látek dochází k degradaci kolagenu a vzniká želatina. Tento proces nachází uplatnění při výrobě klišu, respektive klišových poživ [7].

Klih

Klih (obr. 15) je tvořen z bílkoviny zvané kolagen, jenž je získáván z kostí, chrupavek a z kůže. Patří mezi koloidní látky a tato vlastnost mu umožňuje pojmout množství vody stejné jako je jeho hmotnost. Klih se ve vodě nerozpouští, nýbrž pouze bobtná. Jeho nerozpustnost dále podporují látky jako například kamenec (podvojná sůl kyseliny sírové, nejčastěji $KAl(SO_4)_2$), formalin a tanin. Kamenec je považován za nejbezpečnější a do klišové vody se přimíchává v množství jedné třetiny váhy daného klišu. Zatímco formalin způsobuje nepropustnost vůči vodě [4].

Při zahřátí nabobtnalého klišu na 35 °C až 50 °C, ztrácí kliš svůj původní tvar, který později po vychladnutí znovu získá. Jedině v poměru 1:50 svého objemu zůstane kliš v kapalném stavu i za běžné teploty. Nespornou výhodou tohoto materiálu je jeho pružnost a stálost, díky čemuž drží například lepené části soch i celá staletí [3].

Kvalita klišu je závislá na původu a druhu produktu, z něhož byl vytvořen. Mezi klišy patří kožní kliš, králičí, kostní kliš a rybí kliš, jinak též také označovaný jako vyzina [3, 4].

- Kožní kliš je možné zakoupit v obchodech v podobě želatiny nebo králičího klišu. Od kostního klišu ho lze rozlišit pomocí kamence $KAl(SO_4)_2$, kdy se po jeho přidání vodní roztok nezakalí.
- Želatina se běžně prodává v tenkých, průhledných a bezbarvých lístcích, které se dají dobře svinovat. Vzhledem ke své vynikající pružnosti a elasticitě je želatina nenahraditelná ve výrobě křídových podkladů.
- Králičí kliš je dovážen z Francie. Prodává se v podobě tabulek čtvercového až obdélníkového tvaru s vystouplými okraji a hnědošedého zbarvení. Králičí kliš je hodnocen rámaři a pozlacovači jako nejlepší [4].
- Kostní kliš neboli kliš obyčejný má o trochu nižší lepící účinky, než kliš kožní. Najdeme ho v podobě silných tabulek nebo v hnědých perličkách. Tyto perličky se dají velmi těžko roztlouci, jejich lom je lasturový až sklovitě lesklý.
- Rybí kliš se vyrábí z kostí a kůží ryb. Je snadno rozpustný ve vodě a má nižší lepící účinky než kliš obyčejný. Mezi jeho nejkvalitnější druhy patří vyzina. Setkáváme se s ní v podobě průsvitných, plochých a vláknitých kousků, které se v horké vodě postupně rozpouštějí. Vyzina patří k nejsilnějším lepivým látkám používaným v malířských oborech. [4]



Obrázek 15. Klih v podobě granulí [33].

2.4 Pryskyřičná pojiva

Pryskyřice jsou přírodní, organické, nekystalické pevné látky vznikající z balzámů samovolným odpařením silic, jejich polymerizací a okysličením [3, 34]. Jsou to většinou zakalené, někdy čiré, dožluta až hněda zbarvené látky složené ze směsí pryskyřičných kyselin, esterů, fenolů, uhlovodíků a alkoholů [34]. Pryskyřice nejsou příliš rozpustné ve vodě, ale poměrně snadno se rozpouštějí v toluenu, xylenu, benzenu, acetonu nebo v terpentýnové silici [3, 4, 34].

Podle původu sběru dělíme pryskyřice na:

- Recentní pryskyřice – jsou získávány z poraněné kůry stromů; např. kalafuna, damara, dračí krev, mastix a některé měkké kopály.
- Fosilní pryskyřice – jsou získávány z půdy, odumřelých stromů; např. jantar, kopály [3].

Podle tvrdosti dělíme pryskyřice na:

- Měkké – zahrnují většinu recentních pryskyřic
- Tvrdé – zahrnují většinu fosilních pryskyřic

Důležitými vlastnostmi pryskyřic jsou zejména stálost, neurčitý bod tání, rozpustnost v organických rozpouštědlech, pružnost a vysoký stupeň kyselosti.

Stálost měkkých pryskyřic není příliš velká, jelikož podléhají atmosférickým vlivům, zejména působením světla respektive ultrafialovými paprsky, vlhkosti nebo oxidaci, urychlující jejich rozpad. Měkké pryskyřice, jako např. mastix, kalafuna a damara, se rozpouštějí v terpentýnu. Mastix je považován za nejkvalitnější pryskyřici, vytékající z kůry rostlin, rostoucí na pobřeží Středozemního moře. Kalafuna vzniká usazením pevného zbytku při destilaci terpentýnového balzámu z různých druhů borovic. Šelak, měkké manilské pryskyřice a sandarak se rozpouštějí v lihu. Šelak je jediný druh pryskyřice, která nevytéká samovolně z poraněné kůry stromů, ale je produktem červců. Z jehličnatých stromů rostoucí na pobřeží středomoří vytéká sandarak, který se komerčně dodává v podobě žlutých kousků [4].

Tvrdé pryskyřice jsou nepoměrně stálejší, ale nelze je dostatečně využít při výrobě laků, protože jsou obtížně rozpustné. Rozpouštějí se buď ve velmi silných rozpouštědlech, nebo v jejich přítomnosti jen bobtnají. Ve skutečnosti se jedná spíše o vzájemnou disperzi, kdy pryskyřice rozpouštědlo absorbuje. Z tohoto důvodu se tvrdé pryskyřice používají pro výrobu olejových laků, na rozdíl od laků těkavých [3, 4].

Pryskyřice postupným zahříváním měknou a tají. Jejich bod tání je udáván v rozmezí několika stupňů. Bod tání se liší u měkkých a tvrdých pryskyřic. Bod tání měkkých pryskyřic je udán v tabulce VII. Bod tání tvrdých pryskyřic je mnohem vyšší, uvádí se až 190 či 300 °C [3, 4].

Tabulka VII. Bod tání a měknutí měkkých pryskyřic [3].

Pryskyřice	Bod měknutí * [°C]	Bod tání [°C]
šelak	65	80–120
damara	55	85
mastix	80	95
kalafuna	80	110
sandarak	100	150
manilské měkké kopály	50–80	110–190

* Bod měknutí je průměrná teplota, při které vzorek změní svou konzistenci.

S termoplastičností pryskyřic souvisí jejich tvrdost a pružnost, která se mění podle teploty. S přibývajícím teplotou tvrdosti ubývá a naopak přibývá pružnost. Pro zvýšení pružnosti se přidává do pryskyřičných pojiv často přísada olejů nebo balzámů. Nynější moderní zvláčňovadla přidávaná do průmyslových laků se ale na umělecká díla nehodí [4]. V pryskyřicích je přítomno mnoho volných kyselin, a proto je při mísení pryskyřice s pigmenty tyto kyseliny nutné zneutralizovat. Jelikož pigmenty mají obvykle zásaditý charakter, tvoří s pryskyřicemi sraženiny [4].

Lom světla je u pryskyřic dosti vysoký, jeho index lomu různých druhů je udáván v rozmezí 1,515–1,540. Také proto dávají pryskyřice na rozdíl od ostatních pojidel barvám větší intenzitu [4].

Pryskyřice měly dříve nezastupitelné postavení v malířství. Byly přidávány do obrazových laků, balzámů a olejových barev. V restaurátorství byly nepostradatelné do nedávna, jako součást lepidel, tmelů a penetrační směsi, kterými se opravují narušené materiály památek [34].

Damara

Damara je pryskyřice původem ze stromu damaroně jižního (*Agathis Australis*) [35], který roste na území Nového Zélandu, Malajsie a Indie. Damara patří mezi recentní pryskyřice, tj. na její poraněné kůře nacházíme husté charakteristické tvary kapek, tyčinek nebo valounků. Samotná pryskyřice může vytékat samovolně, ale také při úmyslném poranění kůry nebo kořenů rostliny. V obchodech ji můžeme zakoupit v podobě beztvarych, průhledných hrudek (obr. 16) [3, 4].

Damara je rozpustná v terpentýnové silici, ale i v organických rozpouštědlech, kdy se rozpouští za normálních podmínek (0 °C, p = 101,325 kPa). Bod tání je udáván v intervalu 85–120 °C. Velikou výhodou je její optická stálost, kdy se stářím její zabarvení téměř nemění, a proto se využívá pro přípravu závěrečných laků na uměleckých dílech. Díky těmto vlastnostem je nejvyhledávanější výchozí látkou pro přípravu laků. Pro větší optickou trvanlivost se k pryskyřicím přidává tuhnoucí olej nebo vosk [3, 4].



Obrázek 16. Damara v podobě granulí [36].

2.5 Aditiva

Terpentýn

Terpentýn neboli terpentýnová silice je získávána destilací z dřevin jehličnatých stromů nebo destilací balzámů. Terpentýnová silice je složená z uhlovodíků a terpenů, částečně z pryskyřičných zbytků a vody. Obsah silic závisí na druhu borovic [3, 4].

Terpentýnová silice se v uměleckých dílech používá jako ředidlo olejových barev. Důležité je, aby byl terpentýn dostatečně rektifikován a neobsahoval zpryskyřičnatělé podíly, jež v něm vznikají samovolnou polymerizací a oxidací [3].

2.6 Pigmenty

Pigmenty jsou pevné látky anorganického nebo organického původu, které se používají k výrobě barev [34]. Historie použití pigmentu v uměleckých dílech je datováno už od pravěku. Znalost chronologie používání jednotlivých pigmentů může napomoci s určováním pravosti a datováním uměleckých děl [3].

V pravěku se jako pigmenty používaly nejběžněji přírodní hlínky, grafit, kostní nebo slonová černá atd. Ve starověku byly oblíbenými pigmenty azurit, křída a asfalt. Tehdy také došlo k používání širšího okruhu pigmentů, začaly se používat nové pigmenty jako například olovnato-cínčitá žlutá, horská modř, barytová žlutá, kadmiová oranž a červeň.

Postupem vývoje se starší pigmenty začaly nahrazovat novějšími a také se začalo s jejich syntetickou výrobou [34].

Pigmenty lze rozdělit do skupin podle různých kritérií [34].

Podle složení je dělíme na:

- Anorganické
- Organické – dělíme je dále do tří skupin na laky (v nichž můžeme rozpustit organická barviva), nerozpustné soli (vznikají srážením solí vápníku, hliníku, manganu, zinku, atd. ve vodném roztoku), pravé pigmenty (nerozpustnost je udaná v jejich molekulové struktuře) [34].
- Kovové – neboli bronze, se používaly pro náhražkové zlacení, vyrábějí se z bronzového prachu a rozmělněných bronzových šupin [34].

Podle původu:

- Přírodní - které se získávají přímo z přírody, většinou jako oxidy, sírany a uhličitany. Také se připravovaly z rostlinných nebo živočišných barviv (např. karmín z nachových mšic, brazilský purpur z barevných dřevin).
- Syntetické – uměle vyráběné, které nyní nahrazují přírodní pigmenty [3].

Pigmenty jsou nerozpustné ve vysychavých olejích, v organických rozpouštědlech a ve vodě. Každý pigment by měl také prokázat svou stabilitu v prostředí, v němž se vyskytuje. Měl by být chemicky neaktivní látkou, na kterou nepůsobí kyseliny ani zásady. Nejlépe tedy musí být stálý na světle, na vzduchu a v kontaktu s jinými pigmenty nebo pojivy [3, 4].

Další důležitou schopností pigmentu je jeho krycí mohutnost, tím rozumíme zakrytí barevného podkladu. Krycí mohutnost závisí přímo na lomu světla. To znamená, že čím vyšší je lom světla pigmentů, tím vyšší je jeho krycí schopnost a naopak. U barev, to závisí na rozdílu mezi indexy lomu pigmentu a pojidla. Čím je větší rozdíl indexu lomu, tím je lepší krycí schopnost [3, 37].

Pigmenty jsou definovány, také podle velikosti zrna, což ovlivňuje jejich jemnost. Hrubším zrnem jsou vyznačovány pigmenty získávané částečným rozkladem nebo

chemickou změnou při vysoké teplotě. Jemná zrna jsou získávána mletím nebo vyloučením z roztoku [3].

Pro nátěr je velmi důležité, aby se konkrétní pigment spojil s pojidlem a vytvořil pastu. Množství pojidla se liší druhem pigmentu. U těžkých pigmentů je spotřeba pojidla nižší než u pigmentů lehčích. Absorpce daného pojidla záleží na velikosti, tvaru, rozvrstvení a povrchu pigmentových částic [3].

V neposlední řadě je důležitou vlastností barvicí mohutnost. Udává se jako schopnost změnit barevný odstín jiného pigmentu [37]. V této práci byly vybrány pigmenty – oxid železitý (oddíl 2.6.1), síran vápenatý (oddíl 2.6.2) a uhličitan vápenatý (oddíl 2.6.3).

2.6.1 Oxid železitý (Fe_2O_3)

Oxid železitý (železitá červeň), (obr. 17), se vyrábí ze zelené skalice, která odpadáva při moření skla (v množství asi 1 % z hmotnosti mořeného skla).

Stupnice odstínu železitých červení obsahuje barevné tóny od světlé až po tmavohnědočervený. Jsou to jednoduché, velmi jemné pigmenty, dodávající dostatek sytosti barev s dokonalým krytím. Používají se na venkovní nátěry, pokud je železitá červeň dostatečně zbavena zbytků síranu, hodí se i do nátěru na železo [37].



Obrázek 17. Oxid železitý [38].

2.6.2 Síran vápenatý (CaSO₄)

Síran vápenatý (sádrovec, boloňská křída), (obr. 18), je krystalická látka. V přírodní formě se nejvíce vyskytuje na území Německa, Polska, Anglie a v České republice pak zejména u Opavy. Sádrovec je základem při výrobě pálené sádry a používá se také jako přísada v cementářství [37].



Obrázek 18. Síran vápenatý [39].

2.6.3 Uhličitan vápenatý (CaCO₃)

Uhličitan vápenatý (plavená křída), (obr. 19) je čistá, jemně pórovitá látka tvořená z odumřelých těl mořských jednobuněčných živočichů (*foraminifera*). Nejčastěji se těží na pobřeží Německa, Anglie a Francie. Po té se postupně upravuje pomocí drcení, mletí, plavení a sedimentací. Kvalita se hodnotí podle fyzikálních vlastností, např. barva, textura a jemnost (čím je křída jemnější, tím je cennější). Plavená křída se často používala pro přípravu podkladů malby, nebo se také mísila se zinkovou (ZnO) i olovnatou (2 PbCO₃.Pb(OH)₂) bělobou [37, 40].



Obrázek 19. Uhličitan vápenatý [41].

2.7 Analytické metody

K identifikaci polysacharidů a proteinů je potřeba provést kyselou hydrolyzu, kdy se proteiny štěpí na jednotlivé aminokyseliny a polysacharidy na jednoduché cukry, podle kterých pak lze látku identifikovat pomocí analytických metod [42].

Při identifikaci poživ se uplatňují analytické metody:

- Plynová chromatografie (GC), kterou můžeme využít u všech typů poživ, také jí můžeme kombinovat s hmotnostní spektrometrií pro přesnější identifikaci.
- Kapalinová chromatografie (HPLC), která lze využít pro analýzu proteinů.
- Hmotnostní spektrometrie (MS) je využívána ve spojení s kapalinovou nebo plynovou chromatografií, kdy můžeme identifikovat detailní složení poživ.
- Infračervená spektrometrie (IR) umožňuje identifikaci jen o jednotlivých typech poživ. Nesnadno se identifikují spektra směsí nebo poživ podobného chemického složení [42].

2.7.1 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je metoda založená na poměru hmotnosti (m) a náboje (z). Používá se pro měření hmotnosti částic, molekul nebo chemické struktury vzorku. Princip hmotnostní spektrometrie spočívá v převodu vzorku na plynnou ionizovanou fázi a následné ionty separuje podle jejich m/z (poměr hmotnosti iontu a náboje) [43-45].

Historie hmotnostní spektrometrie

Vědní obor hmotnostní spektrometrie sahá až do roku 1897 [46], kdy Wilhelm Wien analyzoval vychýlení magnetického pole a v roce 1899 postavil první zařízení s paralelním magnetickým polem, které oddělovalo paprsky podle jejich m/z (poměr hmotnosti iontu a náboje) [47]. Později Joseph Joen Thomson se svou prací založenou na analýze nabitých částic zlepšil W. Wienovu práci a položil základ pro výstavbu prvního hmotnostního spektrometru. Později byl hmotnostní spektrometr využíván pro měření hmotnosti nabitých částic pomocí paralelních elektrických a magnetických polí. Na začátku 20. století byla hmotnostní spektrometrie použita k měření hmotnosti atomů, díky čemuž byla prokázána existence izotopů [48]. Také Francis William Aston významně přispěl k objevu izotopů. Za svou práci obdržel v roce 1922 Nobelovu cenu za chemii [46]. Tento objev otevřel debaty o struktuře atomu. V roce 1940 byly hmotnostní spektrometry už komerčně využívány a byly velmi užitečnou technikou v chemickém průmyslu. Vědci a chemici začali hmotnostní spektrometrii využívat i pro kvalitativní účely, aby zjistili složení látek ve směsi. Možnosti využití hmotnostní spektrometrie byly však značně omezené [48].

V 60. letech se spojila hmotnostní spektrometrie s další analytickou metodou – plynovou chromatografií a následně v 70. letech i s kapalinovou chromatografií. Tyto poznatky vedly k širokému využití v multikomponentní analýzy složitějších organických směsí [49].

Princip hmotnostní spektrometrie

Všechny typy hmotnostních spektrometrů se skládají z iontového zdroje, analyzátoru a detektoru částic.

Iontový zdroj je nezbytnou součástí hmotnostního spektrometru. Ionty se zde převádí do plynné fáze do vakua a ionizují na kladné nebo záporné. V této fázi se mohou ionty rozpadat (fragmentovat). Iontových zdrojů je v současné době velké množství a lze je rozdělit do dvou základních skupin podle dodané energie na měkké nebo tvrdé. Mezi zástupce tzv. tvrdých ionizací patří elektronová ionizace (EI – elektron impact) [49]. Tato metoda ionizace se často používá ve spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Dalším typem ionizace je měkká ionizace, tzv. chemická ionizace. Tato technika je založena na ionizaci reakčního plynu (např. methanu) a pak následně molekul

analytů. Při této ionizaci je předáváno méně energie a nedochází k tak velké fragmentaci jako u tvrdé ionizace. Existuje mnoho dalších ionizačních technik pomocí např. UV záření, elektrického výboje, nebo vysokého napětí. Dále lze provádět desorpci pomocí laseru (MALDI – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation), metastabilního plynu (DART – Direct Analysis in Real Time) nebo elektrospreje (ESI – Electro-Spray Ionization) [49].

Hmotnostní analyzátor je důležitou součástí hmotnostního spektrometru, dochází v něm za vakua k separaci iontu na základně poměru hmotnosti a náboje (m/z). Vyvinuto bylo mnoho druhů analyzátorů, využívají dynamické, statické, elektrické nebo magnetické pole, popřípadě jejich kombinaci. Analyzátoři rozdělujeme do několika skupin. První skupina zahrnuje skenující analyzátoři, které separují a vysílají ionty s určitou hodnotou m/z přímo k detektoru. Typickými zástupci jsou sektorové přístroje nebo kvadrupólové analyzátoři. Druhá skupina zahrnuje analyzátoři s transmisí iontů, které dále pokračují do letové trubice, kde dochází k separaci na základě jejich rozdílné doby letu k detektoru. Jeden z detektorů, který lze využít, je Time-of-Flight (TOF), který zahrnuje separaci iontů podle jejich letového času, závisí na jejich molekulové hmotnosti. Předpokládáme-li, že všechny potencionální energie jsou přeměněny na kinetické energie, je rychlost vyjádřena na základě zákona o zachování energie podle rovnice [42]:

$$v = \sqrt{\frac{2zV_0}{m}}$$

Třetí skupina zahrnuje analyzátoři zachycující ionty v pasti, cele nebo elektrostatické iontové pasti [49].

Detektorem jsou zaznamenávány ionty, které projdou přes analyzátor, a jejich signál je převeden do digitálního formátu. Detektory dělíme do dvou skupin, v první skupině jsou detektory zaznamenávající všechny ionty bez ohledu na velikost m/z . Jsou založeny na měření elektrického proudu, který vznikne při srážce iontu s dynodou (elektroda uvnitř fotonásobiče) a po té je zesílen nejčastěji pomocí elektronového násobiče. V druhé skupině jsou detektory založené na komplexní detekci všech přítomných iontů s odlišnými hodnotami m/z [49].

2.7.2 Chromatografické metody

Chromatografie je fyzikálně-chemická separační metoda, ve které se komponenty selektivně rozdělují mezi dvě nemísitelné fáze. Mobilní fáze je pohyblivá, stacionární fáze je nepohyblivá [50]. Vzorek umístěný na začátku kolony ve stacionární fázi je pohybem mobilní fáze posunován. Části vzorku mohou být zachycovány stacionární fází, tím se od sebe složky separují [44].

Historie chromatografie

Vědní obor chromatografie sahá až do 19. století, kdy byl neocenitelným nástrojem pro analytickou a organickou chemii. Chromatografii ve stále větší míře využívá mnoho dalších oborů jako biologie, botanika, biochemie a související lékařské vědy. Zakladatel moderního chromatografu, Michail Semjonovič Cvěta, byl sám botanik [51]. Archer Martin a Richard L.M. Syngen v roce 1941 položili základ k procesu separace a sledovali praktický význam chromatografie. Oba získali Nobelovu cenu v roce 1952. S rozvojem chemického průmyslu po druhé světové válce došlo k velkému rozvoji separačních metod a jednotlivé chromatografické metody se udržely dodnes [52].

Princip chromatografie

Princip chromatografie spočívá v opakovaném ustanovení rozdílných rovnováh mezi stacionární a mobilní fází. Pomocí mobilní fáze je vzorek unášen prostorem, kde dochází k separaci. Stacionární fáze představuje nepohyblivý separační prostor. Části vzorku jsou při svém pohybu v separačním prostoru brzděny [49].

Chromatografie se dá roztrždit podle několika hledisek. Nejběžnější je dělení podle skupenství na plynovou (GC – Gas Chromatography) a kapalinovou chromatografii (LC – Liquid Chromatography). Dále podle uložení stacionární fáze na kolonovou chromatografii, kde je stacionární fáze uložena v koloně, a na tzv. plošné techniky, které zahrnují papírovou a tenkovrstvou chromatografii. V neposlední řadě lze chromatografii dělit podle povahy děje, který převládá při separaci, na rozdělovací, adsorpční, iontově-výměnnou, gelovou a afinitní [44, 52].

2.7.3 Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS)

V posledních letech nastal velký pokrok ve spojení separačních a spektrálních metod, jako je tomu u spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS, Liquid chromatography – Mass Spectrometry/Mass Spectrometry) [53]. Tato metoda může být aplikována na širokou škálu biologických molekul. Navíc je možné použití tandemové hmotnostní spektrometrie a stabilních izotopů vnitřních standardů umožňujících velmi citlivé a přesné testy. Je ovšem nutné některé metody optimalizovat, aby se minimalizovalo potlačení účinku iontů. Vysoká rychlost skenování umožňuje vysoký stupeň multiplexnosti u mnoha sloučenin, mohou být měřeny při jednom analytickém běhu. Výhodou spojení hmotnostní spektrometrie s chromatografickými metodami je citlivost a vysoká specifita ve srovnání s chromatografickými detektory. Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC-MS) bylo dosaženo v roce 1950, komerčně dostupnou se stala od roku 1970. Relativně levné a spolehlivé systémy GC-MS jsou nyní rysem mnoha klinických biochemických laboratoří a jsou nepostradatelné v mnoha oblastech, kde se vyžaduje analýza komplexních směsí a jednoznačné identifikace, například vzorky screeningu moči na vrozené chyby metabolismu, nebo analýza drog. Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC-MS) bylo po mnoho let omezeno vzhledem k relativní neslučitelnosti stávajících zdrojů MS iontů s kontinuálním proudem kapaliny. Tato situace se změnila s rozvojem elektrosprejové iontového zdroje od J. B. Fenna v roce 1980. J. B. Fenn získal Nobelovu cenu v roce 2002 s Koichi Tanakou, který vyvinul matici nápomocnou laserové desorpční ionizaci, což je další velmi užitečná ionizační technika pro analýzu biologických molekul. Existuje celá řada dalších aplikací LC-MS [54].

Princip kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií

Metoda LC-MS/MS obsahuje kapalinovou chromatografii spojenou se dvěma hmotnostními spektrometry, jako je kvadrupólový hmotnostní spektrometr (Q – Quadrupole) a detektor průletový (TOF – Time-of-Flight), neboli spojení LC a ESI-Q-TOF (ionizace elektrosprejem uskutečňována tandemovými analyzátory, kvadrupólovým a průletovým).

Výhodou použití ESI-Q-TOF analýzy pro stanovení hmotnosti proteinů je, že vzhledem k vysokému stavu nabití proteinů jejich m/z měření je obvykle menší než 2000 Da, a

detektor TOF má velmi dobré rozlišení a hmotnostní přesnost v tomto rozsahu skenování. Díky tomu je možné přesnější měření hmotnosti proteinů v ESI-Q-TOF [55]. Analyzátoři jsou součástí spektrometru a jsou uloženy ve vakuu, kdy separují ionty na základě podílu m/z . Nejčastěji se používají analyzátoři na měření doby průletu iontů (TOF), kvadrupólový analyzátor (Q), které se dají používat v kombinaci tandemovou hmotnostní spektrometrií [56].

Při metodě ESI (ionizace elektrosprejem) je vzorek rozpuštěný v roztoku vstříkovan kapilárou do iontového zdroje, kde v přítomnosti elektrického zdroje vznikají nabitě kapky, které se vlivem vyšší teploty nebo za pomoci vysušujícího plynu odpařují. Nabitě kapky zmenšují svou velikost tzv. Coulombickou explozí, kdy se kapky rozpadnou a vzniknou z nich vícenásobné nabitě ionty, které dále pokračují do spektrometru k analýze. Výhoda ionizace pomocí elektrospreje je jeho šetrnost a průběh za atmosférického tlaku, proto je snadno spojitelná s kapalinovou chromatografií. Pro zvýšení citlivosti a zmenšení průměru chromatografických kolon byly vyvinuty nanospreje [56].

Kvadrupólový analyzátor (Q) je složen ze čtyř paralelních kovových tyčí tvořících elektrické pole. Dvě protilehlé tyče mají vždy stejné napětí se stejnou směrnou a střídavou složkou. Napětí je nastaveno tak, aby v určitém okamžiku propouštělo jen ionty o určitém m/z . Touto plynulou změnou napětí můžeme zjistit analýzu všech iontů v určitém rozmezí m/z . Kvadrupólové analyzátoři se nejčastěji používají při analýze anorganických či středně těžkých organických sloučenin [56].

Průletový analyzátor (TOF) je jeden z nejjednodušejí postavených analyzátorů. Je tvořený průletovou trubicí, kde ionty přelétávají po dodání určité kinetické energie, která je pro všechny ionty stejná. Ionty jsou za letu separovány podle hmotnosti, těžší ionty se pohybují pomaleji než ionty lehčí. Součástí těchto analyzátorů také bývá iontové zrcadlo umístěné na konci trubice, které prodlužuje délku jejich letu a srovná drobné rozdíly v kinetické energii dodané iontům [56].

2.7.4 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

FT-IR je zkratka pro infračervenou spektroskopii s Fourierovou transformací. Metoda je založena na interakci infračerveného záření (IR) se vzorkem [57]. Tato metoda představuje výkonný nástroj pro identifikaci typů chemických vazeb v molekule tím, že produkuje infračervené absorpční spektrum, které je považováno za molekulární "otisk prstu" [58].

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR) je velmi užitečná pro identifikaci chemických látek, které jsou buď organické, nebo anorganické. Může být použita k analýze pevných látek, kapalin a plynů. Termín Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) se vztahuje na relativně nedávný vývoj ve způsobu, ve kterém se data shromažďují a jsou převedena z interferenčního vzorku na spektrum. Dnešní přístroje FT-IR, jsou vybaveny Michelsonovým interferometrem a navíc spojeny s počítači, což z nich dělá rychlejší a citlivější než starší disperzních přístrojů [58].

Původní infračervené přístroje byly disperzního typu. Tyto nástroje oddělovali jednotlivé frekvence energie od infračerveného zdroje, toho bylo dosaženo za pomoc hranolu nebo mřížky. Infračervený hranol funguje stejně jako viditelný hranol, který odděluje viditelné světlo od jeho barev (frekvencí). Mřížka je více disperzní a lépe se odděluje frekvence infračerveného záření. Detektor měří množství energii v každé frekvenci, která prošla vzorkem. Fourierova transformace infračervené spektroskopie probíhá disperzně nebo přes filtrační metodu infračervené spektrální analýzy z několika důvodů. Poskytuje přesné metody měření, které nevyžadují žádné externí kalibrace, to zapříčiní zvýšení rychlosti, dále zvyšuje citlivost a má větší optickou propustnost [57].

Princip infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací

FT-IR se opírá o skutečnost, že molekuly absorbují světlo v infračervené oblasti elektromagnetického spektra. Infračervená energie je vyzářena ze zářícího zdroje elektricky žhavené tyčinky z křemíku nebo jiných materiálů (keramické materiály, oxidy kovů vzácných plynů). Paprsek následně prochází otvorem, který řídí množství prošlé energie. Po té paprsek vstupuje do interferometru, kde proběhne tzv. spektrální kódování. Výsledný signál vstupuje do vzorku, kde je dále buď přenášen, nebo odražen z povrchu vzorku, v závislosti na typu analýzy. Paprsek nakonec projde do detektoru pro finální měření. Detektory jsou nastaveny tak, aby snímali signál z interferometru. Následný měřený signál je digitalizován a odeslán do počítače. Konečné infračervené spektrum je graficky znázorněno jako funkční závislost energie uváděné v procentech transmitance (T) nebo v jednotkách absorbance (A) na vlnové délce. Transmitance (propustnost) je poměr intenzity záření, které projde vzorkem (I) až k následné intenzitě záření výchozího zdroje (I_0). Absorbance je dekadický logaritmus $1/T$ [59, 60].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a chemikálie

Acetonitril	Lachema n.p. Brno
Arabská guma	Sklad PedF UK
Damara	Sandmayer F.O.
Kyselina mravenčí	Penta
Kyselina trifluoroctová	Sigma
Olej lněný	Sklad PedF UK
Oxid železitý (Fe_2O_3)	Lachema n.p. Brno
Síran vápenatý (CaSO_4)	Lachema n.p. Brno
Škrob bramborový	Natura, a.s.
Škrob kukuřičný	Natura, a.s.
Škrob kuzu	Country life s.r.o
Škrob pšeničný	Bezglutens.c
Škrob rýžový	Vivacomex spol s r.o
Terpentýn	Chema, n.p.
Trypsin	Promega Corporation
Uhličitan vápenatý (CaCO_3)	Lachema n.p. Brno
Zip Tip C18	Milipore Corporation

3.2 Použité analytické přístroje a chemikálie

Infračervený spektrometr: Omnic Impact 410, firma Nicolet, USA

Hmotnostní spektrometr: LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry /Mass Spectrometry), firma Bruker, Německo

Analýza proteinového složení byla provedena na kapalinovém chromatografu s tandemovou hmotnostní spektrometrií na Ústavu biochemie a mikrobiologie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze (VŠCHT Praha). Výrobce přístroje je firma Bruker, Německo.

3.3 Příprava polysacharidových pojiv

3.3.1 Roztok arabské gumy

Recept byl čerpán z Formulas for painters [1]. K 6 g damary bylo přidáno 15 ml terpentýnu. S touto směsí pak bylo každý den třepáno, až do doby než se pryskyřice úplně rozpustila. Dále byl připraven roztok arabské gumy, který obsahoval 50 ml rozdrčené arabské gumy rozpuštěné ve 100 ml vroucí vody. Takto vzniklá směs byla ponechána dva dny v klidu a následně smíchána s roztokem terpentýnu s damarou a 30 ml oleje. Roztokem bylo třepáno až do vytvoření emulze.

3.3.2 Výroba škrobových mazů

Ke škrobům (bramborovému, kukuřičnému, pšeničnému, rýžovému a kuzu) bylo přidáno potřebné množství vody uvedené v tabulce VIII. K této vzniklé směsi bylo za občasného míchání přidáno další množství zahřáté vody (tab. VIII). Po zhoustnutí směsi byl škrobový maz až do vychladnutí ponechán v klidu [1].

Tabulka VIII. Příprava škrobového mazu.

Škrobové pojivo	Množství škrobu [ml]	Voda [ml]	Teplá voda [ml]
Bramborový škrob	10,0	70,0	30,0
Kukuřičný škrob	10,0	50,0	30,0
Kuzu škrob	10,0	40,0	30,0
Pšeničný škrob	10,0	30,0	30,0
Rýžový škrob	10,0	40,0	30,0

3.4 Příprava barevných vrstev polysacharidových pojiv

Ke škrobům připravených podle receptur (oddíl 3.3.2) byly přidány tři různé pigmenty (oxid železitý, síran vápenatý, uhličitán vápenatý). Navážka škrobového pojiva byla vždy 3 g, s výjimkou kuzu, kdy byla navážka vždy 3,5 g, viz tabulka IX.

Tabulka IX. Příprava barevných vrstev polysacharidových pojiv s uvedenými navážkami anorganických pigmentů.

Škrobové pojivo	Navážka Fe ₂ O ₃ [g]	Navážka CaCO ₃ [g]	Navážka CaSO ₄ [g]
Bramborový škrob	1,0	1,0	1,0
Kukuřičný škrob	1,0	1,0	1,0
Kuzu škrob	1,0	1,0	1,0
Pšeničný škrob	1,0	1,0	1,0
Rýžový škrob	1,0	1,5	1,5

Na skleněná podložní sklíčka byla nanášena jak samotná polysacharidová pojiva, tak i pigmentované škroby. Každý vzorek byl připraven dvakrát. Jedna sada sklíček byla vystavena působení slunečního záření a druhá byla uložena na tmavé místo. Každý vzorek byl označen trojmístným kódem. První symbol označuje místo uložení (č. 1 – vzorek vystavený slunečnímu záření, č. 2 – vzorek uložený ve tmě), druhý symbol určuje druh polysacharidového pojiva (K – škrob kuzu, Pš – pšeničný škrob, KK – kukuřičný škrob,

Br – bramborový škrob, R – rýžový škrob, A – roztok z arabské gumy) a třetí symbol označuje přidaný pigment (P – uhličitan vápenatý, B – síran vápenatý, O – oxid železitý).

3.5 Identifikace metodou FT-IR

Polysacharidová pojiva byla měřena infračerveným spektrometrem Nicolet, ovládaným pomocí softwaru Omnic Impact 410. Tímto programem lze pozměnit nastavení vlastního měření, ale také upravit a podrobně analyzovat naměřená spektra. K dispozici je i knihovna, která umožňuje porovnání neměřených spekter.

Jednotlivé vzorky polysacharidový pojiv byly v podobě jemného prášku vloženy do měřících kalíšků. Následně byly proměřeny odrazovou metodou (ODRAZ).

3.6 Identifikace proteinů metodou peptidového mapování

3.6.1 Štěpení trypsinem

Proteiny obsažené ve vzorku byly štěpeny pomocí enzymu trypsinu. Nejdříve byl připraven štěpící roztok, který obsahoval 2 μl trypsinu (o původní koncentraci 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ve 100 μl 50mmol/l NH_4HCO_3 . Ke každému vzorku byl přidán roztok trypsinu o objemu 15 μl . Štěpení proteinů probíhalo po dvě hodiny při laboratorní teplotě.

3.6.2 Přečištění a zkoncentrování peptidových štěpů na reverzní fázi

Pomocí reverzní fáze obsažené v mikrokoloně Zip Tip C18 (C18 - oktadekan) bylo provedeno přečištění a zkoncentrování vzniklých peptidových štěpů. Níže je uvedeno složení promývacích roztoků:

- Aktivační roztok: 50% acetonitril v H_2O
- Ekvilibrační roztok: 0,2% kyselina trifluoroctová v H_2O
- Eluční roztok: 50% acetonitril s 0,1% kyselinou trifluoroctovou v H_2O

Pracovní postup:

- Aktivace reverzní fáze C18 za pomoci desetinasobného promytí 10 µl aktivačního roztoku.
- Ekvilibrace desetinasobným promytím 10 µl ekvilibračního roztoku.
- Návázání peptidů desetinasobným promýváním 10 µl vzorku.
- Odsolení navázaných peptidů prostřednictvím desetinasobného promytí 10 µl ekvilibračního roztoku.
- Eluce peptidů opětovným jednorázovým promytím 10 µl elučního roztoku.
- Eluce zbylých navázaných peptidů desetinasobným promytím 10 µl elučního roztoku.

3.6.3 Identifikace proteinů pomocí LC-MS/MS

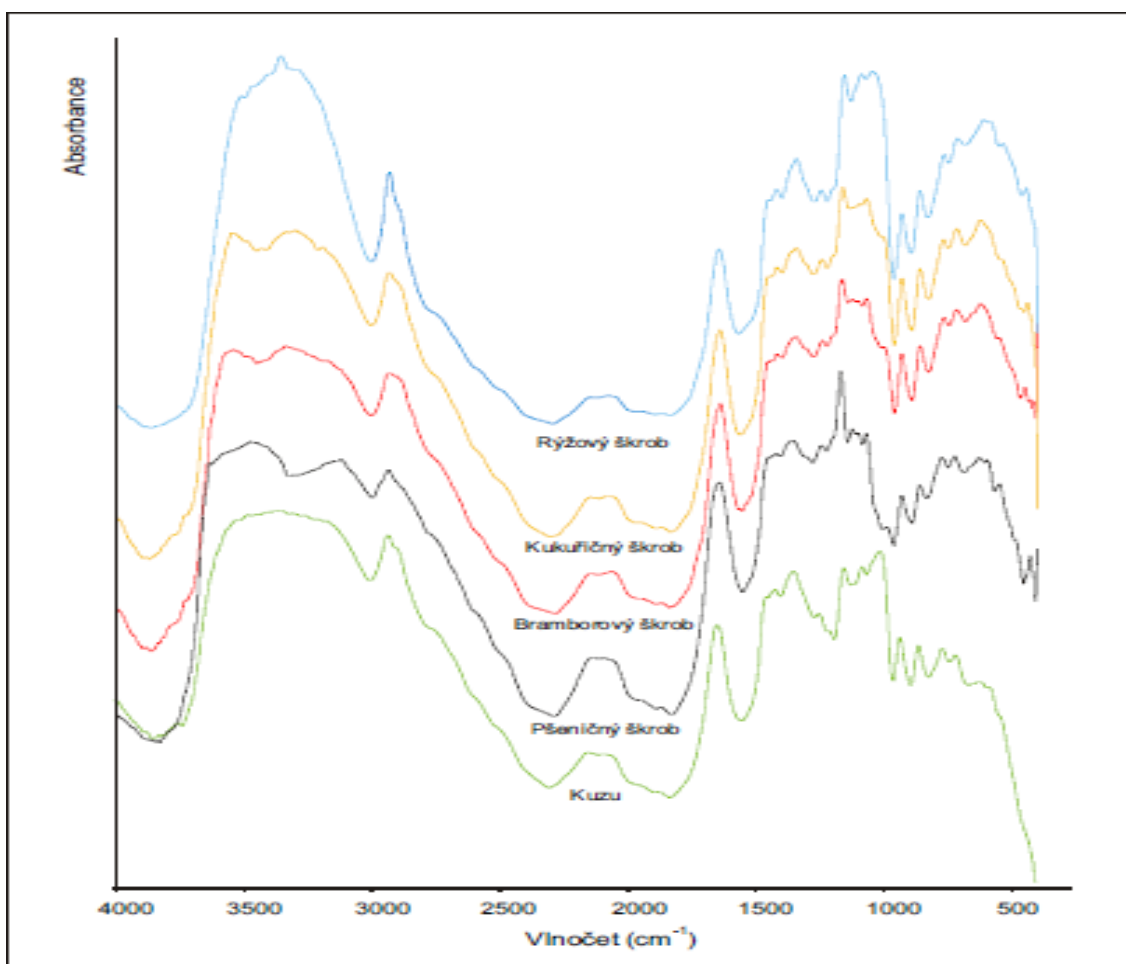
Měření probíhalo za použití kapalinového chromatografu (UHPLC Dionex Ultimate3000 RSLC nano) spojeného s hmotnostním spektrometrem ESI-Q-TOF Maxis Impact. Vzorky, rozpuštěné ve směsi o poměru 97:3:0,1 voda:acetonitril:kyselina mravenčí, byly nanášeny na zachytávací kolonu Acclaim PepMap 100 C18 (100 µm x 2 cm, velikost částic reverzní fáze 5 µm) s průtokem 5 µl/min po dobu pěti minut. Následovala chromatografie na reverzní fázi, která byla provedena s průtokem 0,3 µl/min prostřednictvím komerčně vyráběné kolony Acclaim PepMap RSLC C18 (75µm x 250 mm, velikost částic reverzní fáze 2 µm). Gradient měl následující průběh: 0 min 3 % B, 5 min 3 % B, 85 min 50 % B, 86 min 90 % B, 95 min 90 % B, 96 min 3 % B, 110 min 3 % B, mobilní fáze A byla 0,1% kyselina mravenčí ve vodě, mobilní fáze B byla 0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu. Měření probíhalo v DDA modu s výběrem prekurzoru v rozsahu 400–2200 Da.

Peaklisty byly ze zaměřených dat extrahovány programem Data Analysis 4.1. Proteiny byly identifikovány pomocí softwaru Mascot verze 2010-12 s následujícími parametry: oxidovaný metionin a hydroxylace prolinu jako variabilní modifikace, přesnost 50 ppm v MS modu a MS/MS přesnost přiřazení hmotnosti peptidových štěpů 0,05 Da.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Identifikace polysacharidových pojiv metodou infračervené spektroskopie (FT-IR)

Metodou FT-IR byly měřeny vzorky samotných, nepigmentovaných polysacharidových pojiv za účelem jejich identifikace. Avšak jak je patrné z obrázku 20, spektra zkoumaných vzorků jsou téměř všechna totožná. Jediné spektrum, které se mírně odlišuje je spektrum kuzu s méně výrazným pásem vlnočtu s hodnotou 1100 cm^{-1} . Spektra všech škrobů si jsou velmi podobná z důvodu obsahu stejných základních složek (amylosy a amylopektinu), proto tato metoda při pokusu o rozlišení jednotlivých polysacharidových pojiv nebyla úspěšná.



Obr. 20. Spektra modelových vzorku polysacharidových pojiv. Absorpční spektrum kuzu je znázorněno zelenou barvou, pšeničného škrobu černou, bramborového škrobu červenou, kukuřičného škrobu žlutou a rýžového škrobu modrou barvou.

4.2 Vyhodnocení pomocí LC-MS/MS

Kapalinovým chromatografem spojeným s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) byla získána data potřebná k identifikaci proteinů obsažených v polysacharidových pojivech. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách X–XV, kde jsou vždy v prvním sloupci uvedeny přístupové kódy proteinů, pod kterým jsou uváděny v proteomických databázích (např. Uniprot). Ve druhém sloupci jsou názvy nalezených proteinů, ve třetím sloupci jsou pak uvedeny jejich molekulové hmotnosti a v posledním sloupci počty peptidů, které určují, jak spolehlivě byl daný protein určen. Pro spolehlivou identifikaci jsou v současné době renomovanými proteomickými časopisy vyžadovány alespoň dva peptidy. Názvy proteinů byly ponechány v anglickém jazyce, protože ne všechny identifikované proteiny mají svůj český název.

V tabulce X jsou uvedeny výsledky proteinové analýzy vzorku obsahujícího bramborový škrob. Nalezené proteiny skutečně pochází z lilku bramborového (*Solanum tuberosum*) a mají většinou souvislost s tvorbou (granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic, 1,4-alpha-glucan-branching enzyme, soluble starch synthase 3, chloroplastic/amyloplastic) nebo degradací škrobu (alpha-glucan water dikinase, chloroplastic) v bramborové hlíze.

Tabulka X. Identifikované proteiny ve vzorku polysacharidového pojiva obsahujícím bramborový škrob.

Kód proteinu	Protein	Molekulární hmotnost [kDa]	Počet identifikovaných peptidů
SSG1_SOLTU	Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic	66,5	40
SSY2_SOLTU	Granule-bound starch synthase 2, chloroplastic/amyloplastic	85,2	39
GWD1_SOLTU	Alpha-glucan water dikinase, chloroplastic	163,1	18
API11_SOLTU	Aspartic protease inhibitor 11	20,6	6

Kód proteinu	Protein	Molekulární hmotnost [kDa]	Počet identifikovaných peptidů
GLGB_SOLTU	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	99,0	6
SSY3_SOLTU	Soluble starch synthase 3, chloroplastic/amyloplastic	139,0	5
CPI10_SOLTU	Cysteine protease inhibitor 10 (Fragment)	20,9	4
CPI6_SOLTU	Cysteine protease inhibitor 6 (Fragment)	15,7	4
CPI9_SOLTU	Cysteine protease inhibitor 9	24,7	3

V tabulce XI jsou shrnuty výsledky analýzy vzorku připraveného za použití kukuřičného škrobu. Ve vzorku byly nalezeny proteiny pocházející z kukuřice seté (*Zea mays L.*), které se rovněž většinou podílejí na syntéze škrobu (granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic, 1,4-alpha-glucan-branching enzyme 2, chloroplastic/amyloplastic, adenine nucleotide transporter BT1, chloroplastic/amyloplastic/mitochondrial) nebo na odbourávání sacharidů (fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme, triosephosphate isomerase, cytosolic nebo Sucrose synthase 1). Některé nalezené proteiny mají ale i jiné funkce, a to například zastavení proteosyntézy (ribosome-inactivating protein 3) nebo se podílí na obraně rostliny proti škůdcům (endochitinase A).

Tabulka XI. Identifikované proteiny ve vzorku polysacharidového pojiva obsahujícím kukuřičný škrob.

Kód proteinů	Proteiny	Molekulová hmotnost [kDA]	Počet identifikovaných peptidů
SSG1_MAIZE	Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic	65,9	49
GLGB_MAIZE	1,4-alpha-glucan-branching enzyme 2, chloroplastic/amyloplastic	90,5	37
SUS1_MAIZE	Sucrose synthase 1	91,7	14
G3PC3_MAIZE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3, cytosolic	36,4	6
RIP3_MAIZE	Ribosome-inactivating protein 3	33,2	6
BT1-MAIZE	Adenine nucleotide transporter BT1, chloroplastic/amyloplastic/mi tochondrial	46,6	4
TPIS_MAIZE	Triosephosphate isomerase, cytosolic	27,0	3
CHIA_MAIZE	Endochitinase A	29,1	3
ZEB1-MAIZE	Zein-beta	19,5	2
ALF_MAIZE	Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme	38,6	2

Výsledky získané analýzou vzorku obsahujícího pšeničný škrob jsou uvedeny v tabulce XII. Zde bylo nalezeno nejméně proteinů, jen dva, ale zato byly identifikovány vysokým počtem peptidů (35 a 23) a oba jsou spojeny se syntézou škrobu (granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic 1, starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic).

Tabulka XII. Identifikované proteiny ve vzorku polysacharidového pojiva obsahujícím pšeničný škrob.

Kód proteinu	Protein	Molekulová hmotnost [kDA]	Počet identifikovaných peptidů
SSG1_WHEAT	Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic 1	67,7	35
SSY1_WHEAT	Starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic	71,0	23

Nejvíce proteinů, a také jako jedny z nejspolehlivěji identifikovaných, bylo nalezeno ve vzorku připraveném za použití rýžového škrobu (tab. XIII). Kromě proteinů, které se v rýži seté (*Oryza sativa L.*) podílí na syntéze nebo odbourávání škrobu (většina z nich byl uvedena již výše) zde byly nalezeny zásobní proteiny (glutelin type-A 1, glutelin type-A 2, glutelin type-A 3, glutelin type-B 1, glutelin type-B 5), proteiny spojené s proteosyntézou (40S ribosomal protein S10, 40S ribosomal protein S4, 40S ribosomal protein S16, 60S ribosomal protein L3, elongation factor 1-beta a elongation factor 1-gamma 3), dýchacím řetězcem a tvorbou ATP (ATP synthase subunit beta, mitochondrial), sekreční protein způsobující alergii (seed allergenic protein RA5) a proteiny s odezvou na stresové podmínky (např. heat shock protein 81-3).

Tabulka XIII. Identifikované proteiny ve vzorku polysacharidového pojiva obsahujícím rýžový škrob.

Kód proteinu	Protein	Molekulová hmotnost [kDA]	Počet identifikovaných peptidů
SSG1_ORYGL	Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic	66,4	41
GLGB_ORYSJ	1,4-alpha-glucan-branching enzyme, chloroplastic/amyloplastic	93,2	46

Kód proteinu	Protein	Molekulová hmotnost [kDA]	Počet identifikovaných peptidů
GLUB5_ORYSJ	Glutelin type-B 5	56,8	23
GLUA3_ORYSJ	Glutelin type-A 3	56,0	20
GLUA1_ORYSJ	Glutelin type-A 1	56,2	18
GLGS_ORYSJ	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase small subunit, chloroplastic/amyloplastic	56,1	18
SSY23_ORYSI	Soluble starch synthase 2-3, chloroplastic/amyloplastic	88,3	21
GLUB1_ORYSJ	Glutelin type-B 1	56,5	20
SUS2_ORYSJ	Sucrose synthase 2	92,1	20
SUS3_ORYSJ	Sucrose synthase 3	93,1	16
G3PC3_ORYSJ	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3, cytosolic	36,5	13
PDI11_ORYSJ	Protein disulfide isomerase-like 1-1	56,8	13
SSY1_ORYSJ	Soluble starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic	70,9	13
TOC75-ORYSJ	Protein TOC75, chloroplastic	87,6	10
AATC_ORYSJ	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	44,5	11
AGLU_ORYSJ	Probable alpha-glucosidase	96,3	9

Kód proteinu	Protein	Molekulová hmotnost [kDA]	Počet identifikovaných peptidů
EF1A-ORYSJ	Elongation factor 1-alpha O	49,3	10
G3PC1_ORYSJ	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1, cytosolic	36,4	9
ENO_ORYSJ	Enolase 2	47,9	8
SUS4_ORYSJ	Sucrose synthase 4	92,2	9
IF4A1_ORYSJ	Eukaryotic initiation factor 4A-1	47,1	7
MDHC_ORYSJ	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	35,5	7
TBB7_ORYSJ	Tubulin beta-7 chain	49,8	6
ALF_ORYSJ	Fructose-bisphosphate aldolase cytoplasmic isozyme	38,8	4
EF1G3_ORYSJ	Elongation factor 1-gamma 3	47,4	6
ILV5_ORYSJ	Ketol-acid reductoisomerase, chloroplastic	62,3	4
ATPBM_ORYSJ	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	58,9	2
PDI14_ORYSJ	Protein disulfide isomerase-like 1-4	62,2	4
ATPBM_ORYSJ	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	58,9	2
PDI14_ORYSJ	Protein disulfide isomerase-like 1-4	62,2	4
LGUL_ORYSJ	Lactoylglutathione lyase	32,5	2
RIC1_ORYSJ	Ras-related protein RIC1	22,5	3
HSP83_ORYSJ	Heat shock protein 81-3	80,1	3
RS10_ORYSJ	40S ribosomal protein S10	20,3	3
RS4-ORYSJ	40S ribosomal protein S4	29,8	3
RS16-ORYSJ	40S ribosomal protein S16	16,8	3
REHYA_ORYSJ	1-Cys peroxiredoxin A	24,0	3

Kód proteinu	Protein	Molekulová hmotnost [kDA]	Počet identifikovaných peptidů
GBLPA_ORYSJ	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein A	36,2	3
EF1B_ORYSJ	Elongation factor 1-beta	23,8	2
PIP21-ORYSJ	Probable aquaporin PIP2-1	30,3	2
RA05_ORYSJ	Seed allergenic protein RA5	17,3	2
TPIS_ORYSJ	Triosephosphate isomerase, cytosolic	27,0	2
RL52_ORYSJ	60S ribosomal protein L5-2	34,6	2
NDK1_ORYSJ	Nucleoside diphosphate kinase 1	16,8	2
RL3_ORYSJ	60S ribosomal protein L3	44,4	2

V tabulce XIV jsou shrnuty výsledky analýzy vzorku připraveného ze škrobu, vyrobeném z kuzu. Ve vzorku byly nalezeny proteiny spojené se syntézou škrobu, ale není možné z nich zjistit biologický původ tohoto škrobu. Ani jeden z nalezených proteinů totiž neodpovídal proteinům pocházejícím z této rostliny, zato zde byly identifikovány (dle přístupových kódů) proteiny pocházející zejména z kukuřice (MAIZE) a rýže (ORYSJ). Podobnost proteinů, které se podílí na syntéze škrobu, je mezi různými rostlinami očekávána, neboť se jedná o proteiny se stejnou funkcí, které se řadí mezi vysoce konzervativní (jejich primární struktura je velmi podobná). Přesný rostlinný původ není možné určit pravděpodobně z důvodu, že proteiny této rostliny (kuzu, *Pueraria lobata*) nebyly dosud přidány do databází, proti kterým jsou peptidy nalezené ve vzorcích porovnávány.

Tabulka XIV. Identifikované proteiny ve vzorku polysacharidového pojiva obsahující škrob vyrobený z kuzu.

Kód proteinu	Protein	Molekulová hmotnost [kDa]	Počet identifikovaných peptidů
SSG1_ORYGL	Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic	66,4	21
SSG1_MAIZE	Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic	65,9	20
TRYP_PIG	Trypsin	24,4	5
SSG1_MANES	Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic	66,9	7
SSY2_ARATH	Starch synthase 2, chloroplastic/amyloplastic	87,5	5
GLUA1_ORYSJ	Glutelin type-A 1	56,2	7
SSG1_PEA	Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic	66,3	4
GLUA2_ORYSJ	Glutelin type-A 2	56,3	6
SSG1_IPOBA	Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic	66,6	4
SSG2_PEA	Granule-bound starch synthase 2, chloroplastic/amyloplastic	83,6	3
GLGB_MAIZE	1,4-alpha-glucan-branching enzyme 2, chloroplastic/amyloplastic	90,5	3
GLGB_SOLTU	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	99,0	2

V tabulce XV jsou uvedeny výsledky získané analýzou pojiva obsahujícím arabskou gumu připraveném dle receptu popsáném v oddílu 2.2.7. Ani jeden z nalezených proteinů neodpovídal proteinu z této rostliny (ze stejného důvodu, jaký byl popsán u kuzu). Navíc je pravděpodobné, že v případě této analýzy došlo ke kontaminaci vzorku, protože zde byly nalezeny proteiny obsažené v živočišných organismech (laktoglobuliny a kaseiny).

Tabulka XV. Identifikované proteiny ve vzorku, který obsahoval arabskou gumu.

Kód proteinu	Protein	Molekulová hmotnost [kDa]	Počet identifikovaných peptidů
LACB_BOVIN	Beta-lactoglobulin	19,9	6
SSG1_ORYGL	Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic	66,4	9
CASK_BOVIN	Kappa-casein	21,3	4
CASA1_BOVIN	Alpha-S1-casein	24,5	3
GLCM1_BOVIN	Glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1	17,1	3
CASB_CAPHI	Beta-casein	24,8	2
GP_RVVFZ	Envelope glycoprotein	130,7	2

5. ZÁVĚR

Přípravou vybraných polysacharidových pojiv (z bramborového, kukuřičného, pšeničného, rýžového a kuzu škrobu a také z arabské gummy) byl získán přehled o náročnosti a technice jejich přípravy. Samotná výroba škrobového mazu nebyla nijak náročná. Naopak příprava polysacharidového pojiva z arabské gummy byla poněkud zdoluhavější. Po smíchání každého ze šesti připravených polysacharidových pojiv s oxidem železitým (červeným okrem), síranem vápenatým (boloňskou křídou) a uhličitanem vápenatým (plavenou křídou) byly vzorky nanášeny na podložení sklíčka ve dvou provedeních; jedna sada vzorků byla vystavena dennímu světlu a druhá byla ponechána ve tmě. Většina takto připravených vzorků sloužila k doplnění databáze referenčních vzorků pro Vysokou školu chemicko-technologickou v Praze.

Pigmentovaná polysacharidová pojiva byla zkoumána nejdříve infračervenou spektroskopií FT-IR a dále metodou kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS).

Výsledná absorpční spektra získána pomocí FT-IR byla navzájem porovnána a bylo zjištěno, že touto metodou nelze mezi sebou rozlišit pojiva připravená z různých druhů škrobů. Spektra si jsou příliš podobná, a to kvůli převládající složce přítomné ve všech druzích škrobu, kterou je amyloza. Tato metoda se tedy ukázala být pro rozlišení biologického původu polysacharidových pojiv jako nevhodná.

Pomocí analytické metody LC-MS/MS byly zkoumány vzorky polysacharidových pojiv, u kterých byly úspěšně identifikovány proteiny obsažené v daném polysacharidovém pojivu. Na základě získaných informací, se můžeme dokonce v těchto případech pokusit i o zpětné určení druhu škrobu a rostliny, ze které byl pravděpodobně vyroben. U dalších zkoumaných pojiv připravených kuzu a arabské gummy nebyly nalezeny žádné proteiny, podle kterých by mohly být tyto látky spolehlivě identifikovány. Nicméně se podařilo prokázat, že technika LC-MS/MS může být použita pro detekci a dokonce i pro určení biologického původu alespoň základních polysacharidových pojiv používaných v uměleckých dílech, což může mít značný vliv na určení použité malířské techniky, při určení technologických postupů tvorby uměleckých děl a také při ověřování jejich pravosti.

6. LITERATURA

1. MASSEY, R. *Formulas for painters*. New York: Watson-Guption Publications, 1967. ISBN 0-8230-18776 / 0-8230-1877-6.
2. WYPLOSZ, N. *Laser desorption mass spectrometric studies of artists' organic pigments*. Amsterdam: The Netherlands, 2003. ISBN 90-77209-02-6.
3. SLÁNSKÝ, B. *Technika v malířské tvorbě*. Praha: SNTL, 1973.
4. SLÁNSKÝ, B. *Technika malby*. Praha: Paseka, 2003. ISBN 80-7185-610-X.
5. ČERNÁ, M. *Polysacharidy v potravinářství a jejich identifikace*. Praha, 2003. Disertační práce, VŠCHT.
6. SYNYTSYA, A. *Polysacharidy: Technologický význam, struktura a chemická modifikace*. Praha, 2010. Habilitační práce, VŠCHT.
7. KRÁLOVÁ, B., Z. VODRÁŽKA, a V. ŠÍCHO. *Potravinářská biochemie*. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1981. ISBN Dt- 577.1:664/(075.8), L17-C3-III-3lf/88 182.
8. VELÍŠEK, J. a J. HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin I*. Tábor: Osis, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.
9. Amylosa. *Wikipedia* [online]. 2007 [cit. 2014-03-06]; Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Amylose2.svg>.
10. Amylopektin. *Wikipedia* [online]. 2012 [cit. 2014-03-06]; Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Amylopectin>.
11. RYŠAVÝ, J. *Výroba škrobu jeho produktů a celulosy*. 1925.
12. Starch biosynthesis. *Meta Cyc* [online]. 2014 [cit. 2014-04-10]; Dostupné z: <http://biocyc.org/META/new-image?object=PWY-622>.
13. PROCHÁZKA, S., a kol. *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia 1998. ISBN 80-200-0586-2.
14. Starch synthesis. *Biocarta* [online]. [cit. 2014-04-10]; Dostupné z: <http://www.biocarta.com/pathfiles/starchpathway.asp>.
15. PŘÍHODA, J., P. SKŘIVAN, a M. HRUŠKOVÁ. *Cereální chemie a technologie I*. Praha: VŠCHT, 2006. ISBN 80-7080-530-7.
16. Starch and sucrose degradation. *Plants in Action* [online]. [cit. 2014-04-05]; Dostupné z: <http://plantsinaction.science.uq.edu.au/edition1/?q=content/2-4-1-starch-and-sucrose-degradation>.

17. ČEPIČKA, J. *Obecná potravinářská technologie*. Praha: VŠCHT, 1995. ISBN 95-164-19/95.
18. VELÍŠEK, J. a J. HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin II*. Tábor: Osis, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.
19. CHRVALOVÁ, L. *Výroba škrobů a jejich využití v průmyslu*. Zlín, 2008/2009. Bakalářská práce, Tomáše Bati ve Zlíně.
20. WIDDOWSON, E.M., a kol. The Chemical Composition of Wheat and Rye and of Flours derived therefrom. 1945, roč. 3, č. 39 [cit. 2014-04-10]. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1258209/pdf/biochemj00962-0007.pdf>>.
21. GROFOVÁ, Z. *Nutriční podpora* Grada, 2007. ISBN 978-80-247-1868-2.
22. BOTANY.CZ. Rýže setá. 2007-2014, [cit. 2014-03-10]. Dostupné z: <<http://botany.cz/cs/oryza-sativa/>>.
23. HOLASOVÁ, M. a E. MAŠKOVÁ. *Nutriční složení luštěnin, těstovin a brambor*. Praha, 2012.
24. Kuzu. *Slunečnice České Budějovice* [online]. 2014 [cit. 2014-03-06]; Dostupné z: <http://www.slunecnice-cb.cz/slunecnice-cb/7-O-LECIVYCH-POTRAVINACH/60-KUZU>.
25. Kudzu. *Kudzu root* [online]. [cit. 2014-04-01]; Dostupné z: <http://www.kudzu.cz/?s=menu&id=5&lang=CZ>.
26. Tropical Kudzu. *Feedipedia* [online]. 2012-2013 [cit. 2014-04-02]; Dostupné z: <http://www.feedipedia.org/node/12710>.
27. Kudzu (*Pueraria lobata*). *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2014-04-02]; Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/nutrition-research/learning-center/plant-profiler/pueraria-lobata.html>.
28. Diadzin. *Cayman Chemical Company* [online]. 2014 [cit. 2014-04-02]; Dostupné z: <https://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/13202/promo/e-molecules>.
29. Knižní iluminace. *Wikipedia* [online]. 2014 [cit. 2014-02-18]; Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Dalimilova_kronika.
30. KODÍČEK, M. Biochemické pojmy. In. Praha: VŠCHT, 2007.
31. NEURATH, H. *The proteins*. London: Academic Press, 1963. ISBN 63-23023.
32. VODRÁŽKA, Z. *Biochemie a mikrobiologie*. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1985.

33. Klih. *Wikipedia* [online]. 2013 [cit. 2014-03-10]; Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Klih>.
34. KUBIČKA, R. a J. ZELINGER. *Výkladový slovník malířství, grafiky, restaurátorství*. Praha: Grada Publishing, 2004. ISBN 80-247-9046-7.
35. Damaroň jižní. *Botany.cz* [online]. 2007-2014 [cit. 2014-04-10]; Dostupné z: <http://botany.cz/cs/agathis-australis/>.
36. Damara. *Wikipedia* [online]. 2013 [cit. 2014-03-06]; Dostupné z: [http://pl.wikipedia.org/wiki/Damara_\(%C5%BCywica\)](http://pl.wikipedia.org/wiki/Damara_(%C5%BCywica)).
37. MIKULÁŠ, G. *Anorganické pigmenty*. Bratislava, 1956.
38. Oxid železitý. *Wikipedia* [online]. 2014 [cit. 2014-02-18]; Dostupné z: [http://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%93xido_de_ferro_\(III\)](http://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%93xido_de_ferro_(III)).
39. Síran vápenatý. *Wikipedia* [online]. 2014 [cit. 2014-02-18]; Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/S%C3%ADran_v%C3%A1penat%C3%BD.
40. ŠIMŮNKOVÁ, E. a J. KARHAN. *Pigmenty, barviva a metody jejich identifikace*. Praha: VŠCHT, 1993. ISBN 93-121-10/94.
41. Uhličitan vápenatý. *Wikipedia* [online]. 2014 [cit. 2014-02-19]; Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/S%C3%ADran_v%C3%A1penat%C3%BD.
42. VŠCHT. Identifikace přírodních pojiv In. Praha: VŠCHT.
43. POUSTKA, J. *Hmotnostní spektrometrie - Mass spectrometry (MS)*. 2007.
44. KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Ostava: Nakladatelství Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
45. A.I.MALLET a S. DOWN. *Dictionary of Mass Spectrometry*. Wiley, 2009. ISBN 978-0-470-02761-5.
46. BAUM, K. High-accuracy mass spectrometry with stored ions. 2006, roč. 425, s. 1-78. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0370157305004643#>.
47. HOFFMAN, E.D., J. CHARETTE, aV. STROOBANT. *Mass Spectrometry Principles and Applications*. Paris: Wiley 1996. ISBN 0-471-96696-7.
48. GRIFFITHS, J. A Brief History of Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2008, roč. 80, č. 15, s. 5678-5683. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac8013065>.

49. FRIEDECKY, D. a K. LEMR. Úvod do hmotnostní spektrometrie. 2012, roč. 3, č. 20(41), s. 152-157. Dostupné z:<<http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2012/2012-3/KBM12-3-Friedecky-152.pdf>>.
50. OLSEN, R.V. a S. LIE. Profiles of Students' Interest in Science Issues around the World: Analysis of data from PISA 2006. *International Journal of Science Education*, 2011, roč. 33, č. 1, s. 97-120. Dostupné z: <Go to ISI>://WOS:000287453800006
51. SZABADVÁRY, F. *History of analytical chemistry*. Gordon and Breach Science 1960. ISBN 2-88124-569-2.
52. F.OPEKAR, a kol. *Základní analytické metody*. Praha: Karolinum, 2010. ISBN 978-80-246-1775-6.
53. HOLČÁK, M. a P. JANDERA. Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. *Chemické listy*, 1997, roč. 92, č., s. 278-286. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1998_04_278-286.pdf.
54. PITT, J.J. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. 2009, roč. 30 (1), [cit. 2014-03-06], s. 19-34. Dostupné z:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2643089/>>.
55. DIEGO, U.S. Protein Mass Determination. 2009-2010, [cit. 2014-02-18]. Dostupné z:<<http://massspec.ucsd.edu/bioms/protein-analysis/mass-esi-qtof.php>>.
56. SRBOVÁ, E. *Kvantifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie*. Brno, 2013 Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav biochemie.
57. NICOLET, T. Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry. 2001, [cit. 2014-03-06]. Dostupné z:<<http://mmrc.caltech.edu/FTIR/FTIRintro.pdf>>.
58. EXOVA. Fouier Transform Infrared Spectroscopy. In. Santa Fe Springs
59. W.M.DOYLE. Principles and applications of Fourier transform infrared (FTIR) process analysis. 1991, [cit. 2014-02-18], s. 41. Dostupné z:<http://www.goaxiom.com/pdf/Technical_Notes/AN_906_1.pdf>.
60. J.SCHMITT a H.-C. FLEMMING. FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. 1996, [cit. 2014-03-06]. Dostupné z:<http://ac.els-cdn.com/S0964830598800024/1-s2.0-S0964830598800024-main.pdf?_tid=03b30442-c51c-11e3-a261-00000aacb360&acdnat=1397621166_2c1453f2495a5d2cddcee010af19281b>.

7. SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A	Absorbance
DDA	Data Dependent Acquisition – způsob získávání dat v hmotnostní spektrometrii
DART	Direct Analysis in Real Time – Přímá analýza v reálném čase
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EI	Elektron Impact – Elektronová ionizace
ESI	Electro-Spray Ionisation – Ionisace pomocí elektrospreje
ESI-Q-TOF	Electrospray Ionisation-Quadrupole-Time-of-Flight Ionizace elektrosprejem uskutečňována tandemovými analyzátory, kvadrupólovým a analyzátorem doby letu
FT- IR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy Fourierova transformace infračervené spektroskopie
GC	Gas Chromatography – Plynová chromatografie
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry – Plynová chromatografie spojená s hmotnostním spektrometrem
IR	Infračervené záření
LC	Liquid Chromatography – Kapalinová chromatografie
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LC-MS/MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry , Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií

MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation – Matricí asistovaná desorpce pomocí laseru
m/z	Poměr hmotnosti a náboje iontů
MW	Molekulová hmotnost
T	Transmitance
TOF	Time-of-Flight – Průletový analyzátor
Q	Quadrupole – Kvadrupólový analyzátor