

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Imobilizace a charakterizace bromelainu na
magnetických nosičích a jeho využití při stabilizaci
vína**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Jana Rohálová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
Rok:	2016

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 22.4.2016

.....
podpis diplomanta

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Ludmile Zajoncové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady, které mi pomohly při vypracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Miroslavu Jořenkovi a všem pracovníkům katedry biochemie PřF UP v Olomouci, kteří díky své ochotě a spolupráci vytvořili příjemné podmínky pro vypracování této diplomové práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Jana Rohálová
Název práce	Imobilizace a charakterizace bromelainu na magnetických nosičích a jeho využití při stabilizaci vína
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2016

Abstrakt

Bromelain je cysteinová proteasa extrahovaná z rostlin čeledi broméliovitých (Bromeliaceae), která má bohatou historii v lidovém léčitelství. V současnosti je bromelain široce používán v lékařství i v průmyslu. Teoretická část zahrnuje strukturu kmenového (EC 3.4.22.32) a ovocného bromelainu (EC 3.4.22.33), jejich charakteristiku, substrátovou specifitu, purifikaci, aplikaci v průmyslu a lékařství, dále imobilizaci kmenového bromelainu a jeho aplikaci při stabilizaci vína. Také se zabývá metodami imobilizace a různými typy nosičů. Experimentální část se věnuje kovalentní imobilizaci bromelainu na magnetické mikročástice, charakterizaci volného a imobilizovaného bromelainu (aktivita, vazebná kapacita, tepelná stabilita, pH optimum, funkční stabilita, operační stabilita, stabilita při skladování, hodnota K_m) a jeho aplikaci při stabilizaci vína.

Klíčová slova	bromelain, imobilizace, magnetické mikročástice, stabilizace vína
Počet stran	89
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Jana Rohálová
Title	The immobilization and characterization of bromelain on magnetic carriers and its use in stabilization of wine
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
The year of presentation	2016

Abstract

The bromelain is a cysteine protease extracted from the plant of the family Bromeliaceae, which has a rich history in folk medicine. At present, bromelain is widely used in the medicine as well as in the industry. The theoretical part involves the structure of the stem (EC 3.4.22.32) and the fruit bromelain (EC 3.4.22.33), their characterization, substrate specificity, purification and application in the industry and the medicine, the immobilization of the stem bromelain and its application in stabilization of wine. Furthermore, the thesis deals with the immobilization methods and various carriers types. The experimental part focuses on the covalent immobilization of the bromelain on magnetic microparticles, characterization of the free and the immobilized bromelain (activity, binding capacity, thermal stability, pH optimum, function stability, operation stability, storage stability, K_m value), and its application in stabilization of wine.

Keywords	bromelain, immobilization, magnetic microparticles, stabilization of wine
Number of pages	89
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1	Bromelain	10
2.1.1	Struktura bromelainu	10
2.1.1.1	Kmenový bromelain	12
2.1.1.2	Ovocný bromelain	14
2.1.2	Charakteristika bromelainu	15
2.1.3	Substrátová specifita bromelainu	16
2.1.3.1	Aktivátory a inhibitory	17
2.1.4	Purifikace bromelainu	18
2.1.5	Průmyslové aplikace bromelainu	20
2.1.6	Využití bromelainu v lékařství	21
2.1.6.1	Kardiovaskulární systém a krevní oběh	21
2.1.6.2	Osteoartróza	22
2.1.6.3	Vliv na krevní koagulaci a fibrinolýzu	22
2.1.6.4	Vliv na imunitu	22
2.1.6.5	Vliv na rakovinné buňky	23
2.1.6.6	Wobenzym	23
2.2	Imobilizace enzymů	24
2.2.1	Metody imobilizace	25
2.2.1.1	Adsorpce	26
2.2.1.2	Zachycení do polymerní matrice	26
2.2.1.3	Enkapsulace	27
2.2.1.4	Kovalentní vazba	27
2.2.1.5	Retikulace	30
2.3	Nosiče pro imobilizaci	30
2.3.1	Organické nosiče	32
2.3.1.1	Přírodní polymery	32
2.3.1.2	Syntetické polymery	33
2.3.2	Anorganické nosiče	34
2.3.2.1	Magnetické nosiče	35
2.4	Imobilizace bromelainu	39
2.4.1	Využití imobilizovaného bromelainu	40
2.4.1.1	Čiření a stabilizace vína	40
2.4.5.2	Stabilizace piva	41
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43
3.1	Materiál a chemikálie	43
3.2	Přístroje	44
3.3	Metody	45
3.3.1	Imobilizace bromelainu pomocí glutaraldehydu	45
3.3.2	Imobilizace bromelainu pomocí karbodiimidu	45
3.3.3	Imobilizace bromelainu pomocí jodistanu	46
3.3.4	Stanovení aktivity bromelainu I	47
3.3.5	Stanovení aktivity bromelainu II	47
3.3.6	Stanovení koncentrace proteinů pomocí BCA metody	48
3.3.7	Stanovení koncentrace proteinů pomocí Hartree-Lowryho metody	48
3.3.8	Stanovení koncentrace proteinů pomocí metody Bradfordové	49
3.3.9	Stanovení vazebné kapacity imobilizovaného bromelainu	49
3.3.10	Stanovení specifické aktivity	50

3.3.11	Stanovení teplotní stability volného a imobilizovaného bromelainu.....	50
3.3.12	Stanovení závislosti aktivity volného a imobilizovaného bromelainu na pH v McIlvainově pufru	51
3.3.13	Stanovení závislosti aktivity volného a imobilizovaného bromelainu na pH v K-Pi pufru	51
3.3.14	Stanovení závislosti aktivity volného a imobilizovaného bromelainu na pH v Tris-HCl pufru	51
3.3.15	Stanovení operační stability imobilizovaného bromelainu.....	51
3.3.16	Stanovení funkční stability volného a imobilizovaného bromelainu při laboratorní teplotě.....	52
3.3.17	Stanovení stability volného a imobilizovaného bromelainu při skladování	52
3.3.18	Stanovení Michaelisovy konstanty K_m	52
3.3.19	Vliv imobilizovaného bromelainu na množství proteinů ve vinném pufru	53
3.3.20	Vliv imobilizovaného bromelainu na množství proteinů ve víně.....	53
3.3.21	Vliv imobilizovaného bromelainu na zákal proteinů v modelovém víně.....	54
4	VÝSLEDKY	55
4.1	Stanovení koncentrace proteinů pomocí BCA metody.....	55
4.2	Stanovení koncentrace proteinů pomocí Hartree-Lowryho metody.....	55
4.3	Stanovení koncentrace proteinů pomocí metody Bradfordové.....	56
4.4	Stanovení vazebné kapacity imobilizovaného bromelainu.....	57
4.5	Stanovení specifické aktivity	58
4.6	Stanovení teplotní stability volného a imobilizovaného bromelainu.....	58
4.7	Stanovení závislosti aktivity volného a imobilizovaného bromelainu na pH v McIlvainově pufru	59
4.8	Stanovení závislosti aktivity volného a imobilizovaného bromelainu na pH v K-Pi pufru	60
4.9	Stanovení závislosti aktivity volného a imobilizovaného bromelainu v Tris-HCl pufru	61
4.10	Stanovení operační stability imobilizovaného bromelainu.....	62
4.11	Stanovení funkční stability volného a imobilizovaného bromelainu při laboratorní teplotě.....	63
4.12	Stanovení stability volné a imobilizovaného bromelainu při skladování	64
4.13	Stanovení Michaelisovy konstanty K_m	65
4.14	Vliv imobilizovaného bromelainu na množství proteinů ve vinném pufru	66
4.15	Vliv imobilizovaného bromelainu na množství proteinů ve víně.....	68
4.16	Vliv imobilizovaného bromelainu na zákal proteinů v modelovém víně.....	69
5	DISKUSE.....	70
6	ZÁVĚR	77
7	LITERATURA	79
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	88

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

- Vypracování literární rešerše na téma bromelain (jeho struktura, charakteristika, substrátová specifita, purifikace a využití v průmyslu a lékařství).
- Dále provedení rešerše na téma metody imobilizace proteinů na různé typy nosičů.
- Imobilizace bromelainu na různé typy nosičů a jeho využití v praxi.

Experimentální část:

- Cílem experimentální části byly různé metody imobilizace bromelainu na různé typy magnetických nosičů.
- Charakterizace imobilizovaného bromelainu na magnetických nosičích, srovnání s volným bromelainem (vazebná kapacita, specifická aktivita, teplotní stabilita, funkční stabilita, stabilita při skladování, operační stabilita, pH optimum, hodnota K_m).
- Aplikace imobilizovaného bromelainu při stabilizaci vína.

1 ÚVOD

Bromelain je cysteinová proteasa extrahovaná z ananasu z čeledi broméliovitých (Bromeliaceae). Pojem bromelain odkazuje rovnou na dvě proteasy, které mají řadu podobných vlastností, avšak liší se svou aminokyselinovou sekvencí a proteolytickou specifičností: kmenový bromelain (EC 3.4.22.32) získaný ze stonku ananasu a ovocný bromelain (EC 3.4.22.33) ze šťávy ananasu. Léčivé účinky ananasu, které jsou přisuzovány právě bromelainu, jsou řadu let uznávány v mnoha tradicích v Jižní Americe, Číně a jihovýchodní Asii. Vykazuje protizánětlivé, antitrombotické, fibrinolytické a protirakovinné účinky, díky kterým je široce využíván v lékařství. Vstřebává se do organismu bez významných vedlejších účinků, aniž by ztratil svou proteolytickou aktivitu. Vzhledem ke svým vlastnostem se stal také průmyslově používaným enzymem, a to v potravinářství při změkčování masa, v pivovarnictví, v textilním průmyslu a u mléčných a kosmetických výrobků.

Vzhledem k vysokým nákladům na izolaci a purifikaci enzymů a jejich častému vystavení extrémním podmínkám je běžné tyto enzymy imobilizovat. Imobilizace enzymů s sebou nese řadu výhod; ať už snadnou manipulaci s enzymem nebo jeho opětovné použití, tak i zlepšení vlastností enzymů, jako například zlepšení stability enzymů vůči pH, teplotě a denaturačním vlivům. V posledních letech je stále větším trendem imobilizace enzymů na magnetické částice, které jsou mechanicky odolné a lze je snadno ze směsi separovat použitím vnějšího magnetického pole. Proto jsme se zaměřili na imobilizaci bromelainu na magnetické celulosové mikročástice, na jeho charakterizaci se srovnání s volným bromelainem a také na jeho aplikaci při stabilizaci vína.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Bromelain

Bromelain je souhrnný název pro skupinu blízce příbuzných proteolytických enzymů nalezených v tkáni rostliny čeledi broméliovitých (Bromeliaceae), z nichž je nejznámější ananasovník chocholatý (*Ananas comosus*) (Benucci *et al.*, 2011). Ananasy jsou pěstovány v několika tropických a subtropických zemích včetně Filipín, Thajska, Indonésie, Malajsie, Keni, Indie a Číny (Mondal *et al.*, 2011).

Aktivní extrakt bromelainu byl chemicky znám od roku 1876 (Mondal *et al.*, 2011). Jeho první izolace je zaznamenána v roce 1891, chemik Vincente Marcano z Venezuely jej purifikoval z ananasu (Rowan *et al.*, 1990). V roce 1892 Chittenden s pomocí Joslina a Meara bromelain důkladně prozkoumali a nazvali jako bromelian. Poprvé byl představen jako terapeutický doplněk v roce 1957 (Sree *et al.*, 2012).

Ananas byl využíván v lidovém léčitelství jako léčivá rostlina a právě tyto léčivé účinky jsou připisovány bromelainu, který je součástí surového extraktu z ananasu. Využíval se jako protizánětlivá látka u revmatoidní artritidy, při poranění měkkých tkání, zánětu tlustého střeva, chronické bolesti a astmatu (Mondal *et al.*, 2011; Pavan *et al.*, 2012). V současné době narůstá počet komerčních producentů bromelainu, jelikož si po celém světě rychle našel využití v široké škále aplikací jak v lékařství, tak i v průmyslu, například v potravinářství, textilním průmyslu, pivovarnictví a u kosmetických a mléčných výrobků (Grzonka *et al.*, 2007).

2.1.1 Struktura bromelainu

Extrakt z bromelainu obsahuje směs cysteinových endopeptidas a dalších složek, jako jsou fosfatasy, glukosidasy, peroxidasy, celulasy, glykoproteiny, sacharidy a další (Pavan *et al.*, 2012). Tyto cysteinové proteasy jsou příbuzné s papainem (EC 3.4.22.2) z papainové superrodiny, která se skládá ze skupiny enzymů vykazující společný evoluční vztah (Cygler a Mort, 1997).

Pod pojem bromelain lze zahrnout dvě cysteinové proteasy, které mají podobné, ale odlišné aminokyselinové sekvence, jakož i rozdíly v proteolytické specifitě a citlivosti k inaktivaci. Kmenový bromelain (EC 3.4.22.32) je nejhojnější proteasa získaná ze stonku ananasu (cca 80 % z celkového množství proteas) a ovocný bromelain (EC 3.4.22.33), což je hlavní proteasa ve šťávě z ananasu (10 %). Označení bromelain u kmenového i ovocného bromelainu značí nejistotu ohledně toho, zda jsou tyto

proteasy rozdílné nebo jestli představují dvě formy stejného enzymu (Rowan a Buttle, 1994). V kmenu ananasu se nachází další proteasy, ale v mnohem menším množství, a to ananain (EC 3.4.22.31) a comosain. Tyto proteasy jsou také přítomny v kůře ananasovníku, v jádře, koruně a v listech, přičemž nejvyšší proteolytická aktivita a obsah proteinů byli detekovány v extraktu z kmene ananasu (Rowan *et al.*, 1990; Hale *et al.*, 2005; Chobotova *et al.*, 2010).

Pomocí kapalinové chromatografie s vysokým rozlišením (FPLC) a dalších biochemických metod byly izolovány cysteinové proteasy ze surového extraktu z ananasu a později byly částečně nebo zcela sekvenovány a charakterizovány. Zahrnují hlavně glykosylované proteasy s různými proteolytickými aktivitami, molekulovou hmotností mezi 20 a 31 kDa a izoelektrickými body mezi 10 a 4.6 (Tab. 1) (Ritonja *et al.*, 1989; Harrach *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1997; Harrach *et al.*, 1998).

V aminokyselinovém složení jsou mezi kmenovým bromelainem, ananainem a comosainem minimální rozdíly, jak je uvedeno v Tab. 2. U kmenového bromelainu patří mezi nejčastěji se vyskytující aminokyseliny alanin a glycin, na rozdíl od methioninu a histidinu, které jsou přítomny v minoritním množství (Murachi *et al.*, 1964; Ota *et al.*, 1964). Ve srovnání s anainem a comosainem se výrazně liší v počtu lysinu, argininu a isoleucinu (Napper *et al.*, 1994). Ananain se skládá z 216 aminokyselinových zbytků, vykazuje vyšší hydrofobicitu v oblasti blízko His-157 a také má vloženou sekvenci mezi zbytky aminokyselin 170 a 174. Tato vložená sekvence se nenachází u kmenového bromelainu, jinak je jejich sekvence aminokyselin velice podobná (Lee *et al.*, 1997).

Tab. 1 Cysteinové proteasy z ananasovníku (*Ananas comosus*).

Název	Molekulová hmotnost (kDa)	pI	Sekvence	Glykosylace	Literatura
<i>Z kmene ananasovníku:</i>					
Kmenový bromelain	23,800	9,5	kompletně sekvenován (212 AK)	ano	(Harrach <i>et al.</i> , 1995)
Ananain	23,464	>10	kompletně sekvenován (216 AK)	ne	(Harrach <i>et al.</i> , 1995; Lee <i>et al.</i> , 1997)
Comosain	24,500	>10	N-terminální sekvence	ano	(Rowan a Buttle, 1994)
<i>Z ananasu:</i>					
Ovocný bromelain	23,000	4,6	N-terminální sekvence	ano	(Maurer, 2001)

Tab. 2 Složení aminokyselin kmenového bromelainu, ananainu a comosainu (Napper *et al.*, 1994).

Aminokyselina	Kmenový bromelain	Ananain	Comosain
Asp	18	19	18
Thr	9	8	7
Ser	17	18	17
Glu	16	13	13
Gly	22	24	25
Ala	25	20	20
Val	14	14	13
Met	3	2	3
Ile	17	14	12
Leu	6	9	9
Tyr	14	12	12
Phe	6	5	7
His	1	2	2
Lys	15	11	10
Arg	6	10	11
Cys	7	7	7

Comosain je proteasa, která se strukturálně a kineticky velmi podobá kmenovému bromelainu, zatímco od ananainu se značně liší. Nicméně byly zaznamenány rozdíly v aminokyselinovém složení (Rowan *et al.*, 1988). Bylo zjištěno, že comosain má podobné složení sacharidů jako kmenový bromelain. Získaná data ohledně N-terminální sekvence aminokyselin ukazují na úzkou podobnost mezi comosainem, ananainem a kmenovým bromelainem (Napper *et al.*, 1994).

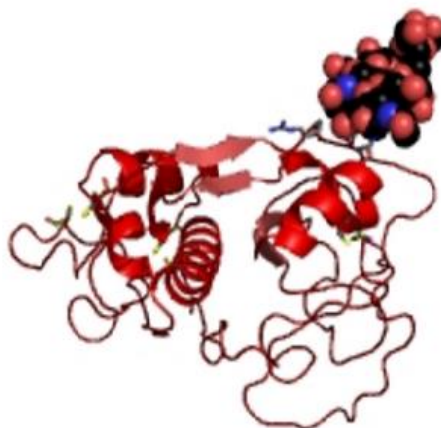
2.1.1.1 Kmenový bromelain

Kmenový bromelain (EC 3.4.22.32) se řadí mezi cysteinové proteasy, což je skupina enzymů, jejichž aktivita závisí na thiolové skupině (-SH) cysteinu. Vysoká koncentrace kmenového bromelainu je v ananasovém kmenu, což je odpadní produkt při zpracování ananasu. Díky tomu jsou náklady pro jeho extrakci nízké. Pro izolaci může být použito srážení síranem amonným, iontově výměnná chromatografie a lyofilizace (Heinicke a Gortner, 1957; Devakate *et al.*, 2009). Stejně jako ostatní cysteinové proteinasy patří do skupiny $\alpha+\beta$ bílkovin; jeho aminokyselinová sekvence má vysokou podobnost s papainem, aktinidinem (EC 3.4.22.1.4), proteinasou Ω (3.4.22.30) a chymopapainem (EC 3.4.22.6) (Ahmad *et al.*, 2006).

Kmenový bromelain tvoří jeden polypeptidový řetězec s 212 aminokyselinovými zbytky, z nichž je 15 lysinů. Katalytické místo je tvořeno Cys-26 a His-158 (Xue *et al.*, 2010). Jeho neobvyklost spočívá v tom, že aminokyselinový zbytek His-158 není

zapojen v katalýze, a proto poskytuje jedinečnou příležitost k příznivé a jednotné orientaci enzymu bez nutnosti jakýchkoliv úprav (Gupta *et al.*, 2007). Bromelain se svými aminokyselinovými sekvencemi podobá papainu (Rao *et al.*, 1998), ale oproti papainu a jemu podobným proteasam se liší nepřítomností Asn-175, dvěma sousedními aminokyselinovými zbytky a zmutovaným Ser-176 na Lys (Ritonja *et al.*, 1989). Tyto aminokyselinové zbytky lysinu nejsou zapojeny do katalýzy, ale poskytují možnost pro chemickou vazbu (Xue *et al.*, 2010).

Kmenový bromelain obsahuje čtyři hexosaminy a 2,1 % sacharidů. Sacharidy nemají žádnou významnou roli v katalytické funkci bromelainu (Murachi, 1964; Murachi *et al.*, 1964; Ishihara *et al.*, 1979). Toto zjištění bylo potvrzeno Ota *et al.* (1964), který v purifikovaném kmenovém bromelainu detekoval 1,5 % sacharidů včetně šesti glukosaminů. Později Murachi *et al.* (1967) izolovali 30 mg glykopeptidů z 1 g kmenového bromelainu pomocí gelové filtrace ve snaze potvrdit přítomnost glykoproteinu. Murachi *et al.* (1967) a Yasuda *et al.* (1970) pomocí plynové chromatografie zjistili, že kmenový bromelain obsahuje manosy, fukosy, xylosy a glukosaminy v poměru 3:1:1:4. Scocca a Lee (1969) detekovali metodou automatizované boritanové chromatografie stejné oligosacharidy, ale v poměru 2:1:1:2. Celková molekulová hmotnost glykosylované formy kmenového bromelainu, nesoucí jeden oligosacharid o hmotnosti 1000 Da, je 23,8 kDa (Ishihara *et al.*, 1979). Na Obr. 1 se nachází teoretický 3D model kmenového bromelainu.



Obr. 1 Teoretický 3D model kmenového bromelainu (převzato z <https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=1w0q&template=main.html>, staženo dne 3.1.2016).

2.1.1.2 Ovocný bromelain

Ovocný bromelain (EC 3.4.22.33), původně nazvaný jako bromelin, je hlavní proteolytickou složkou v ananasu. Od kmenového bromelainu se liší jak specifičností, tak imunologicky. Na rozdíl od kmenového bromelainu se jedná o kyselý protein (ScoCCA a Lee, 1969). Surový ovocný bromelain se připraví z ananasu centrifugací, ultrafiltrací a závěrečnou lyofilizací (Corzo *et al.*, 2012).

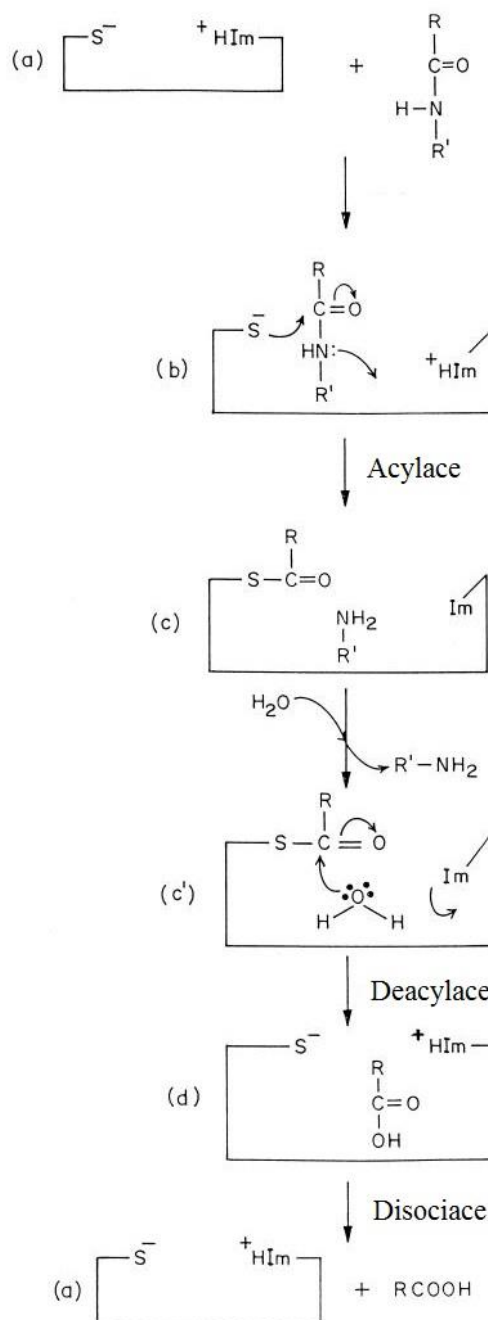
Ovocný bromelain je glykoproteinová proteasa přítomná v ananasovém džusu, která katalyzuje hydrolýzu uvnitř polypeptidového řetězce (Rowan a Buttle, 1994). I když byl objeven mnohem dříve než kmenový, biochemická charakterizace kmenového enzymu je popsána mnohem podrobněji (Harrach *et al.*, 1998). Složení aminokyselin ovocného bromelainu ve zralých i nezralých plodech je uvedeno v Tab. 3.

Tab. 3 Složení aminokyselin (%) ovocného bromelainu (Murachi, 1976).

Aminokyselina	Zralé ovoce	Nezralé ovoce
Lys	7,8	8,3
His	1,4	1,3
Arg	8,6	9,1
Asp	29,8	29,8
Thr	13,8	13,8
Ser	32,2	32,0
Glu	23,2	23,4
Pro	11,6	12,0
Gly	32,6	32,2
Ala	23,8	24,4
Cys	10,0	10,0
Val	19,8	20,1
Met	6,0	5,8
Ile	16,4	16,2
Leu	10,0	10,0
Tyr	22,4	22,2
Phe	7,6	8,0
Trp	5,6	-

2.1.2 Charakteristika bromelainu

Jak už bylo řečeno výše, bromelain se svým aminokyselinovým složením podobá papainu. Výrazná podobnost je taktéž pozorována u mechanismu jejich účinku (Obr. 2). Nejprve se na nekovalentní vazbu naváže volný enzym (a) a substrát, přičemž se vytvoří komplex (b). Dalším krokem je acylace enzymu (c). Vzniká amin, kdy $R'-NH_2$ je prvním produktem. Nakonec probíhá deacylace mezi acyl-enzymem a vodou za uvolnění karboxylové skupiny a volného enzymu (Rao *et al.*, 1998).



Obr. 2 Katalytický mechanismus účinku cysteinových proteas. Im – imidazol, +HIm – protonizovaný imidazol (přepřacováno dle Rao *et al.*, 1998).

Optimální pH nativního bromelainu je 8 a optimální teplota je 25°C, při teplotě 35°C dochází k nevratné denaturaci enzymu. Termostabilitu enzymu lze zvýšit navázáním na termosensitivní polymer *N*-isopropylakrylamid s imobilizovanými polyklonálními protilátkami proti bromelainu. Bylo dokázáno, že protilátky zvyšují odolnost vůči degradaci a také chrání ohrožená místa na povrchu enzymu (Mahmood a Saleemuddin, 2007).

Chaurasiya a Umesh Hebbar (2013) dokázali, že při pH 7,0 a teplotě 30°C je bromelain nejvíce aktivní. Aktivita se sníží o 17 %, pokud je teplota zvýšena na 40-60°C. Podle Khana *et al.* (2003) je optimální teplota 40°C při pH 7 až 9, při pH 3,0 optimální teplota začne klesat. Extrakty z různých částí ananasu mají nejvyšší proteolytickou aktivitu při 50°C (Ketnawa *et al.*, 2012). Podle studie Ha *et al.* (2012) je u volného bromelainu optimální pH 6,0 a teplota 55°C, se zvyšující se teplotou dochází k jeho inaktivaci. Inaktivuje se při teplotě 70°C (Hale *et al.*, 2005).

U modifikovaného bromelainu, kdy jsou aminokyselinové zbytky lysinu modifikovány anhydridovými skupinami anhydridu kyseliny pyromellitové a maleinové, je pH optimum 7 až 9 a optimální teplota až 80°C. Vyšší teplotní stabilitu může způsobovat neutralizace kladných nábojů vedoucí ke snížení odpuzování náboje v polypeptidu. Bylo prokázáno, že teplotní stabilita nativních a takto modifikovaných proteas je částečně způsobena přítomností velkého počtu cysteinových zbytků v polypeptidovém řetězci (Xue *et al.*, 2010).

Studie stability ananasu při skladování při 30°C po dobu 30 dnů a 4°C po 60 dnů ukázala, že k enzymové inaktivaci dochází 3,3x pomaleji při 4°C. Ani po 180 dnech nebyl detekován žádný mikrobiální růst (Bhattacharya a Bhattacharyya, 2009a).

2.1.3 Substrátová specifita bromelainu

Substrátová specifita bromelainu je velice široká, a to od syntetických nízkomolekulárních amidů a dipeptidů až po vysokomolekulární přírodní substráty jako fibrin, albumin, kasein, angiotensin II a bradykinin (Tab. 4). Bromelain přednostně štěpí vazby glycyly, alanyly a leucyly (Taussig a Batkin, 1988). Specifita byla zkoumána s želatínou (jednotky trávení želatiny), kaseinem (jednotky trávení kaseinu), azokaseinem a azoalbuminem, hemoglobinem, kaseinátem sodným, benzyloxykarbonylarginyl-arginin-4-methylkumarin-7-ylamidem (*Z*-Arg-Arg-NHMec) a katepsinem B (*Z*-Arg-Arg-pNa) (Rowan *et al.*, 1990; Napper *et al.*, 1994; Iversen a Jørgensen, 1995; Gautam *et al.*, 2010; Corzo *et al.*, 2012).

Tab. 4 Optimální pH a optimální teplota bromelainu s různými substráty.

Zdroj bromelainu	Optimální pH	Optimální teplota (°C)	Substrát	Literatura
Ovoce	6.5	55	Azokasein	(Bhattacharya a Bhattacharyya, 2009a; Corzo <i>et al.</i> , 2012),
	7.5	55	Azoalbumin	
	7.7	59	Kasein	
	6.5	59	Kaseinát sodný	
	2.9	37	Hemoglobin	
Kůra	8	60	Kasein	(Ketnawa a Rawdkuen, 2011)
Rekombinant	4.6	45	<i>N</i> ^α -CBZ- <i>L</i> -lysin- <i>p</i> -nitrofenylester (LNPE)	(Amid <i>et al.</i> , 2011)
Kmen	7	40	Kasein	(Khan <i>et al.</i> , 2003)
	8	-	Bz-Phe-Val-Arg-pNA	(Benucci <i>et al.</i> , 2011)

Optimální hodnota pH kmenového bromelainu je v rozmezí pH 6,5 až 8,0 a optimální teplota je 55-60°C pro většinu substrátů, jak je uvedeno v Tab. 4. Enzymová aktivita bromelainu zahrnuje široké spektrum pH v rozmezí od 5,5 do 8,0 (Yoshioka *et al.*, 1991). Terciární struktura bromelainu je závislá na hodnotě pH, enzym může být při extrémních pH denaturován (Xue *et al.*, 2010). Vysoká kaseinolýtická aktivita bromelainu je v rozmezí pH 6,5 až 8,0 s maximem při pH 8. Aktivita bromelainu dramaticky klesá za kyselých (pH 3-4) a také za alkalických podmínek (pH 9-10) (Ketnawa *et al.*, 2012).

Maximální aktivitu při štěpení vykazuje ve vztahu k umělému substrátu Z-Arg-Arg-pNA při optimálním pH 8,0. Další umělý substrát *N*-benzoyl-Phe-Val-Arg-*p*-nitroanilid hydrochlorid (Bz-Phe-Val-Arg-pNA) je používán pro studium aktivity bromelainu v pokusech s vínem, protože nejvyšší aktivita proteasy byla pozorována při průměrné hodnotě pH vína (pH 3.2) (Benucci *et al.*, 2011).

2.1.3.1 Aktivátory a inhibitory

Aktivita kmenového bromelainu závisí na -SH skupině cysteinového zbytku, který je často aktivován redukčními činidly (Minami *et al.*, 1971). V aktivním místě se nachází imidazolová skupina histidinu, která polarizuje -SH skupinu cysteinu a umožňuje protonaci při neutrálním a slabě kyselém pH (Otto a Schirmeister, 1997). To způsobuje, že má afinitu k substrátu asi 5x vyšší při pH 5,0–7,0.

Benucci *et al.* (2011) sledovali vliv cysteinu jako redukčního činidla a kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) jako chelatačního činidla na aktivitu kmenového bromelainu ve víně. Specifická aktivita bromelainu se významně zvýšila v přítomnosti

cysteinu při obou testovaných hodnotách pH (37 % a 53 % při pH 3,2 a 8,0). Enzym byl aktivován cysteinem, jelikož Cys v aktivním místě, který je nezbytný pro aktivitu enzymu, byl udržován v redukované formě přítomností volného Cys v médiu (Minami *et al.*, 1971). EDTA měla zanedbatelný vliv na proteasovou aktivitu. Rovněž byl studován vliv ethanolu na bromelain. Ethanol se projevil jako kompetitivní inhibitor s poměrně omezeným účinkem (Benucci *et al.*, 2011).

Ahmad *et al.* (2007) porovnávali změny aktivity kmenového bromelainu za přítomnosti i nepřítomnosti močoviny a hydrochloridu guanidinu (GnHCl). Močovina aktivovala bromelain při koncentraci 5 mol.l⁻¹ a 8-9 mol.l⁻¹. GnHCl jej aktivoval při koncentraci 2 mmol.l⁻¹, zatímco při koncentraci 6 mol.l⁻¹ byl bromelain zcela inhibován (Ahmad *et al.*, 2007).

Dodecylsírán sodný (SDS) působí jako částečný nekompetitivní inhibitor, protože i při 100 mmol.l⁻¹ je zachována aktivita bromelainu (3 %); bromelain je odolný vůči SDS vazbě a denaturaci, což je vlastnost stabilních proteinů bohatých na struktury β-listů (Bhattacharya a Bhattacharyya, 2009b).

Těžké kovové ionty Hg²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺ a Ag⁺, *p*-hydroxymercuribenzoová kyselina, fenylmethylsulfonylfluorid a *N*-bromsukcinimid významně inhibují aktivitu bromelainu (Murachi a Neurath, 1960; Hung *et al.*, 2002; Shukor *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2011). Většina inhibitorů cysteinových proteas patří do superrodiny cystatinu, což je protein o velikosti 15 kDa dosud získaný ze zvířat (Kolodziejczyk *et al.*, 2010). Proteasový inhibitor cystatin z kuřecího bílku a sebevražedný substrát *trans*-epoxysukcinyln-*L*-leucylamido(4-guanidino)butan (E-64) velmi pomalu, nebo jen minimálně inhibuje ovocný i stonkový bromelain (Rowan *et al.*, 1990). Některé rostlinné tkáně obsahují také inhibitory cysteinových proteas, na druhé straně inhibitory bromelainu mají vlastnosti zcela odlišné od rostlinných a živočišných cystatinů. Je předpokládán podíl C-terminálního konce lehkého řetězce v reakčním místě, jelikož se inhibiční aktivita vůči bromelainu ztratí po jeho odstranění (Hatano *et al.*, 1995).

2.1.4 Purifikace bromelainu

Díky rozvoji moderních biotechnologií byly vyvinuty nové purifikační metody k získání bromelainu (Staub *et al.*, 2011). Neustálý zájem o bromelain v nejrůznějších aplikacích motivoval mnoho výzkumníků k extrakci a charakterizaci enzymu z ananasového džusu a z odpadů při zpracování ananasu (kůra, koruna, jádro a listy). Zralý ananasový kmen obsahuje nejvyšší koncentraci bromelainu. Odpad z ananasu je také bohatý

na bromelain, ale stále není využíván. Z tohoto důvodu Ketnawa *et al.* (2012) a řada dalších zkoumali fyzikálně chemické vlastnosti a proteolytickou aktivitu odpadu z ananasu.

Rozhodující je výběr extrakčního pufru a způsob homogenizace; závisí na cílovém proteinu a jeho aplikaci. Ketnawa *et al.* (2012) zkoušeli extrakci bromelainu z kůry ananasu pomocí různých extrakčních činidel. Nejvyšší aktivitu získali, když byla směs extrahována 100 mmol.l^{-1} fosfátovým pufrem s 15 mmol.l^{-1} cysteinem a 2 mmol.l^{-1} EDTA při pH 7,0. Gautam *et al.* (2010) homogenizovali buňky kmenového bromelainu pomocí extrakčního pufru s octanem sodným (pH=7).

K další purifikaci bromelainu je používána chromatografie, a to iontově výměnná, afinitní a gelová. V posledních letech byly využity nové purifikační metody, mezi ně patří reverzní micelární extrakce, dvoufázový vodný systém a adsorpce. Ty jsou ale v současné době využívány jen v laboratorním měřítku (Napper *et al.*, 1994; Hung *et al.*, 2002; Babu *et al.*, 2008; Devakate *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2012; Chaurasiya a Umesh Hebbar, 2013; Costa *et al.*, 2014).

Komerční bromelain se připraví zdlouhavou a nákladnou purifikací, která přináší bromelain v různých stupních čistoty. Proto byl bromelain připraven rekombinantně, kdy byl gen kódující kmenový bromelain amplifikován za použití polymerasové řetězové reakce (PCR). Tento gen byl nejdříve klonován do pENTR/TEV/D-TOPO vektoru, potom byl subklonován do pDEST17 expresního vektoru. DNA sekvencování amplifikovaných produktů vykazuje vysoký stupeň homologie odpovídající genu z databáze Národního centra pro biotechnologické informace (NCBI – National Center for Biotechnology Information). Exprese proteinu se provedla v kmenu BL21-AI *Escherichia coli*. Rekombinantní bromelain byl potom čištěn pomocí imobilizované kovové afinitní chromatografie, konkrétně pomocí Ni-NTA spinové kolony. Purifikovaný rekombinantní bromelain byl detekován pomocí Western blottingu. S vývojem rekombinantního bromelainu jsou očekávány nové aplikace v oblasti farmaceutického průmyslu (Amid *et al.*, 2011).

V dnešní době se bromelain purifikuje z vychlazené ananasové šťávy centrifugací, ultrafiltrací a lyofilizací. Tímto procesem se získá nažloutlý prášek aktivního bromelainu (Harrach *et al.*, 1995).

2.1.5 Průmyslové aplikace bromelainu

Bromelain má široké využití v mnoha oblastech biotechnologií, a to například při změkčování masa, pro přípravu bílkovinných hydrolyzátů, jako kultivační médium, v pekárenském průmyslu, ale i v pivovarnictví nebo kosmetickém průmyslu (Grzonka *et al.*, 2007). Přehled průmyslových aplikací bromelainu se nachází v Tab. 5.

Imobilizovaný bromelain je taktéž široce využíván. Jeho imobilizace je pravděpodobně nejpoužívanější technologií pro zlepšení provozní stability této proteasy (Cutiaño-Avila *et al.*, 2014).

Tab. 5 Přehled průmyslových aplikací bromelainu.

Aplikace	Důvod	Literatura
Pekárenský průmysl	Zlepšení kynutí a rovnoměrného kynutí těsta Produkce hypoalergenní mouky	(Watanabe <i>et al.</i> , 2000; Kong <i>et al.</i> , 2007)
Tenderizace	Hydrolyza myofibril masa Hydrolyzující činidlo pro maso, kuře, ústřice, olíhňě	(Sullivan a Calkins, 2010; Ketnawa a Rawdkuen, 2011)
Hydrolyzát rybího proteinu	Hydrolyza rybího proteinu pro tvorbu hydrolyzátu	(Ren <i>et al.</i> , 2008; Tanuja <i>et al.</i> , 2012 Elavarasan <i>et al.</i> , 2014)
Činidlo proti hnědnutí	Inhibice hnědnutí ovoce a oxidace fenolů	(Lozano-De-Gonzalez <i>et al.</i> , 1993; Srinath <i>et al.</i> , 2012)
Výroba alkoholu Zvířecí krmiva	Zvyšování stability pivních proteinů Odhadnutí degradace proteinů v krmivech pro přežvýkavce	(Benucci <i>et al.</i> , 2011) (Tománková a Kopečný, 1995)
Textilní průmysl	Minimalizace doby měkčení při vaření kokonů Odstranění nečistot z vlny a hedvábí Zlepšení barvení proteinových vláken	(Singh <i>et al.</i> , 2003; Koh <i>et al.</i> , 2006; Devi, 2012)
Bělení zubů	Odstranění skvrn a plaků na vnějším povrchu zubů	(Kalyana <i>et al.</i> , 2011; Chakravarthy a Acharya, 2012)
Kosmetický průmysl	Léčba akné, vrásek a suché kůže Redukce modřin a otoků po injekci	(Ozlen, 1995; Levy a Emer, 2012)

2.1.6 Využití bromelainu v lékařství

Bromelain obsahuje úzce související proteiny, které vykazují rozmanité fibrinolytické, antiedematózní, antitrombotické a protizánětlivé účinky *in vitro* a *in vivo* (Taussig a Batkin, 1988; Fitzhugh *et al.*, 2008). Bromelain je terapeuticky přínosný při léčbě anginy pectoris, zánětu průdušek, zánětu vedlejších nosních dutin, tromboflebitidy, v chirurgii pro prevenci nitrobršních srůstů (Sahbaz *et al.*, 2015) a při chirurgickém vyčištění ran. Byla prokázána lepší absorpce léků, zejména antibiotik. Také zmírňuje osteoartritidu, průjem a různé kardiovaskulární choroby, nemá žádné výrazné vedlejší toxické účinky. Bromelain rovněž inhibuje růst nádorových buněk a metastáz a podporuje apoptotickou buněčnou smrt. Ve všech případech se bromelain podává orálně; ukázalo se, že výrazně mírní bolesti a otoky a sníží dobu hojení na polovinu (Braun *et al.*, 2005; Mondal *et al.*, 2011; Pavan *et al.*, 2012; Dutta a Bhattacharyya, 2013).

Perorálně je dobře snášen ve vysokých dávkách (až 3 g.den⁻¹) po delší dobu léčby, dokonce až několik let (Chobotova *et al.*, 2010). Tělo je však schopné absorbovat mnohem větší množství (asi 12 g.den⁻¹) bez větších vedlejších účinků. Bromelain je absorbován z gastrointestinálního traktu ve funkčně intaktní formě; přibližně 40 % značeného bromelainu je absorbováno ze střeva ve vysokomolekulární formě (Castell *et al.*, 1997). Po absorbování rychle tvoří komplex s antiproteasami krve, hlavně s α_2 -makroglobulinem a α_1 -trypsinem, což činí kvantitativní stanovení bromelainu v séru velice obtížné. α_2 -Makroglobulin bromelain chrání, přičemž proteolytická aktivita bromelainu zůstane neporušená, ale je snížena (Maurer, 2001). Pokusy na myších ukázaly, že antacida, jako je hydrogenuhličitan sodný, zachovávají proteolytickou aktivitu bromelainu v gastrointestinálním traktu (Hale, 2004). V nedávné studii bylo prokázáno, že 3,66 mg.ml⁻¹ bromelainu bylo stabilní v umělé žaludeční šťávě po 4 hodinách reakce a také 2,44 mg.ml⁻¹ bromelainu zůstalo v náhražce krve po 4 hod reakce (Shiew *et al.*, 2010). Bromelain je považován za doplněk stravy a je volně dostupný pro širokou veřejnost v obchodech se zdravou výživou a v lékárnách v USA i v Evropě (Ley, 2011). Stávající studie naznačují, že může být slibným kandidátem pro vývoj perorální enzymoterapie u onkologických pacientů (Castell *et al.*, 1997; Chobotova *et al.*, 2010).

2.1.6.1 Kardiovaskulární systém a krevní oběh

Bromelain zabraňuje nebo minimalizuje závažnost anginy pectoris a tranzitorní ischemické atace (TIA), je užitečný při prevenci a léčbě tromboflebitidy. Může také

rozdělit plaky cholesterolu a vykazuje silnou fibrinolytickou aktivitu. Kombinace bromelainu a dalších živin chrání proti ischemii/reperfuznímu poškození v kosterním svalstvu (Neumayer *et al.*, 2006). Je účinný při léčbě kardiovaskulárních onemocnění (CVD) jako inhibitor agregace krevních destiček, čímž minimalizuje riziko arteriální trombózy a embolie, jako doplněk by mohl snížit výskyt některého z rizikových faktorů přispívající k rozvoji CVD. V nedávném výzkumu bylo zjištěno, že tlumí rozvoj alergie dýchacích cest, zatímco mění CD4+ (cluster of differentiation – diferenciační skupina) na CD8+ T lymfocyty. Mohl by mít podobné účinky při léčbě astmatu a alergických onemocnění člověka (Secor *et al.*, 2005).

2.1.6.2 Osteoartróza

Bromelain je doplněk stravy, který může poskytnout alternativní, popř. doplňkovou léčbu oproti nesteroidním protizánětlivým léčivům. Má analgetické vlastnosti, které jsou považovány za výsledek jeho přímého vlivu na mediátory bolesti jako bradykinin (Brien *et al.*, 2004). Hraje důležitou roli v patogenezi artritidy (Mojcik a Shevach, 1997). Akhtar *et al.* (2004) provedli studii, kdy zkombinovali bromelain, trypsin a rutin a srovnali ho s podáváním diklofenaku 103 pacientům s osteoartritidou kolene. Po šesti týdnech došlo v obou případech léčby k významnému a podobnému snížení bolesti a zánětu.

2.1.6.3 Vliv na krevní koagulaci a fibrinolýzu

Bromelain ovlivňuje krevní srážlivost zvýšením fibrinolytické schopnosti séra a inhibicí syntézy fibrinu, což je protein, který ovlivňuje srážení krve (Lotz-Winter, 1990). *In vitro* a *in vivo* studie ukázaly, že bromelain je účinné fibrinolytikum, protože stimuluje přeměnu plasminogenu na plasmin, což vede ke zvýšení fibrinolýzy degradací fibrinu (Taussig a Batkin, 1988).

2.1.6.4 Vliv na imunitu

Bromelain je doporučován jako adjuvantní terapeutický přístup při léčbě chronických zánětlivých, nádorových a autoimunitních onemocnění (Barth *et al.*, 2005). V pokusech *in vitro* bylo prokázáno, že má schopnost modulovat povrch adhezních molekul na T-buňkách, makrofázích a NK (natural killers – přirození zabíječi) buňkách, a také indukovat sekreci interleukinu (IL)-1, IL-6 a tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF- α) (Pavan *et al.*, 2012). Ošetření buněk bromelainem snižuje aktivaci CD4(+) T buněk a snižuje expresi CD25 (Secor *et al.*, 2005). Kromě toho existují důkazy, že perorální

lčba bromelainem vyvolává určité analgetické a protizánětlivé účinky u pacientů s revmatoidní artritidou, která je jednou z nejčastějších autoimunitních onemocnění (Leipner *et al.*, 2001).

3.1.6.5 Vliv na rakovinné buňky

Nedávné studie naznačují, že bromelain může sloužit jako účinná protirakovinná látka. Avšak molekulární mechanismus protirakovinné aktivity bromelainu není zcela objasněn. Bhui *et al.* (2009) zkoumal protirakovinný potenciál bromelainu u myšního kožního nádoru. Bromelain výrazně zpozdil vznik a nárůst nádoru. Snížení počtu nádorů a jejich objemu lze přičíst spuštění apoptózy. Opoždění vzniku nádoru bylo přičteno protizánětlivé aktivitě bromelainu (Bhui *et al.*, 2009).

Dhandayuthapani *et al.* (2011) potvrdili, že cytotoxický účinek bromelainu u rakoviny prsu buněčné linie GI-101A je závislý na dávkování bromelainu. Bromelain zvyšuje hladinu cytokeratinu štěpeného kaspasami (CK18), což je marker apoptózy. Apoptóza byla zvýšena v rakovinných buňkách prsu za zvýšené koncentrace bromelainu (Dhandayuthapani *et al.*, 2011).

Mahajan *et al.* (2012) zkoumali schopnost bromelainu indukovat apoptózu, tvorbu volných radikálů v makrofázích a také jeho antimykobakteriální vlastnosti a vliv na pěníte makrofágy. Zjistili, že bromelain snižuje tvorbu pěníných buněk (charakteristický znak u infekce *Mycobacterium tuberculosis*). Byla potvrzena indukce apoptózy v makrofázích. To značí, že léčba pomocí bromelainu vytváří oxidativní stres zvyšováním reaktivních forem kyslíku a dusíku v makrofázích (Mahajan *et al.*, 2012).

2.1.6.6 Wobenzym

Wobenzym je orálně podávaný lék složený z unikátní směsi hydrolytických enzymů (bromelain, trypsin, chymotrypsin, papain, lipasa, amylasa, pankreatin) a flavonoidů. Klinické studie u lidí i zvířat ukazují příznivý účinek na zánětlivá onemocnění, například na aterosklerózu u aortálního štěpu potkanů a revmatologická onemocnění. Bylo prokázáno, že užívání Wobenzymu po zranění obnoví mikrocirkulaci, uleví od bolesti, sníží zánět a otok a zmírní muskuloskeletální symptomy ve stejném rozsahu, jako nesteroidní protizánětlivé léky. Studie účinků Wobenzymu dále naznačují, že jde o účinný lék při osteoartróze. Nicméně je třeba zjistit potenciální mechanismus působení (Brien *et al.*, 2004; Ranchordas *et al.*, 2012; Grabs *et al.*, 2014).

2.2 Imobilizace enzymů

Enzymy mají celou řadu funkcí, které zvyhodňují jejich použití ve srovnání s běžnými chemickými katalyzátory. Mezi nejdůležitější patří vysoká úroveň katalytické účinnosti a vysoký stupeň specifčnosti. Existuje však i řada praktických problémů, jako například vysoké náklady na jejich izolaci a purifikaci, jejich nestabilita, citlivost na změnu prostředí a na působící inhibitory (Krajewska, 2004). Narozdíl od běžných heterogenních katalyzátorů jsou relativně drahé a v mnoha případech je z ekonomického hlediska vyžadováno jejich opětovně použití. Z toho důvodu jsou enzymy imobilizovány.

Imobilizace s sebou přináší řadu výhod; ať už vyšší stabilitu konečného enzymového přípravku, tak i zachování enzymové aktivity, specifčnosti a selektivity a v neposlední řadě snížení nákladů. Nelze opomenout ani snadnost odstranění enzymu z konečného produktu. Použití imobilizovaného enzymu vede k výrazně jednodušší konstrukci reaktoru a kontrole reakce (Mateo *et al.*, 2007). Imobilizace enzymu může zabránit intramolekulárním procesům, např. autolýze, proteolýze a agregaci. Když se enzymy nachází uvnitř porézní struktury nosiče, jsou chráněny před kontaktem s denaturačními činidly, jako jsou bublinky nebo nemísitelná rozpouštědla (Netto *et al.*, 2013).

Při imobilizaci většinou částečně dochází ke snížení nebo ztrátě aktivity enzymu a také ke snížení afinity enzymu k substrátu. Nesprávný výběr imobilizační metody může vést v některých případech ke snížení stability enzymu po imobilizaci (Lei *et al.*, 2007). U ideálních imobilizačních procesů by mělo být omezeno používání toxických nebo vysoce nestabilních činidel (Mateo *et al.*, 2007).

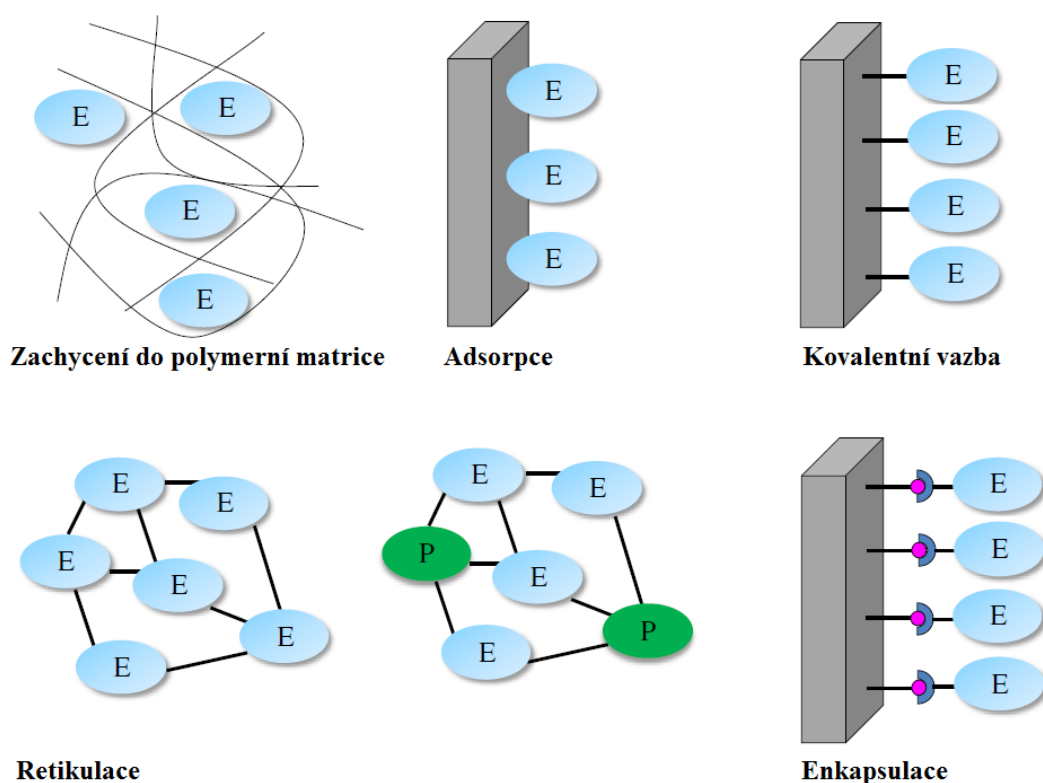
Za prvopočátky imobilizace můžeme považovat počátek 19. století, kdy byly využity imobilizované biokatalyzátory při mikrobiální výrobě octa a u filtrů při čištění odpadních vod (Brena a Batista-Viera, 2006). Ve druhé polovině 20. století bylo mnoho úsilí věnováno rozvoji metod imobilizace enzymů na různé typy nosičů s cílem usnadnit jejich použití v kontinuálních procesech (Cao *et al.*, 2003). V 60. letech došlo k rozvoji imobilizace jednoho enzymu (izomerace glukosy, syntéza *L*-aminokyselin), v 80. letech pak k rozvoji složitějších systémů zahrnující kofaktory regenerace a buněčnou imobilizaci (př. syntéza *L*-aminokyselin z α -ketokyselin aminací v membránových reaktorech). Na první Konferenci enzymového inženýrství v roce 1971 byl poprvé použit termín imobilizované enzymy, což značí enzymy, které jsou fyzicky omezeny nebo lokalizovány v určité definované oblasti prostoru při zachování jejich katalytických aktivit, jenž mohou být použity opakovaně a kontinuálně (Brena a

Batista-Viera, 2006). V současné době roste využití imobilizačních technik enzymů v průmyslových procesech a v potravinářství, také tvoří základ vytvoření množství biotechnologických produktů s aplikacemi v diagnostice, bioafinitní chromatografii a biosenzorech (Krajewska, 2004).

2.2.1 Metody imobilizace

Podstata imobilizace spočívá v zabránění pohybu enzymu připevněním k nosiči. Jelikož enzymy mohou během imobilizace změnit své vlastnosti a ztratit svou aktivitu, je třeba vybrat jak vhodný materiál nosiče, tak vhodnou techniku imobilizace pro zachování, případně zlepšení jejich vlastností, stability a aktivity (Netto *et al.*, 2013).

Existuje řada technik imobilizace, které jsou nejčastěji rozlišovány na fyzikální a chemické. U fyzikálních metod existují slabé interakce mezi nosičem a enzymem. Mezi nejběžnější patří zachycení enzymu do polymerní matrice, adsorpce na porézní nerozpustný nosič a enkapsulace do dutých vláken nebo váčků. U chemických metod jsou kovalentní vazby vytvořeny s enzymem. Mezi ně se řadí kovalentní vazba na nerozpustný nosič a agregace enzymů vícefunkčními činidly (Obr. 3) (Krajewska, 2004).



Obr. 3 Schematické znázornění hlavních metod imobilizace enzymů. E-enzym, P-inertní protein (přepřacováno dle Sassolas *et al.*, 2012).

2.2.1.1 Adsorpce

Adsorpce enzymů představuje nejjednodušší metodu reverzibilní imobilizace, kdy je enzym k povrchu nosiče vázán nekovalentně. Enzym je rozpuštěn v roztoku a pevný nosič se umístí do kontaktu s roztokem enzymu po určitou dobu, neadsorbovaný enzym se pak odstraní promytím puřem. Adsorpční interakce jsou založeny na slabých vazbách, jako jsou van der Waalovy síly, elektrostatické, iontové nebo hydrofobní vazby. Tato technika nevyžaduje žádnou funkcionalizaci nosiče a je obecně nedestruktivní pro aktivitu enzymu, přesto představuje řadu nevýhod. Enzymy jsou na nosič vázány volně a dochází k desorpci enzymu v důsledku změn teplot, pH a iontových sil. Biosenzory na bázi adsorbovaného enzymu mají špatnou funkční a operační stabilitu. Další nevýhodou je nespecifická adsorpce jiných proteinů nebo látek (Sassolas *et al.*, 2012).

Mezi nejčastější adsorpce patří adsorpce iontově vazebná a fyzikální. U fyzikální adsorpce jsou enzymy k nosiči připojeny prostřednictvím vodíkových vazeb, van der Waalových sil nebo hydrofobní interakce. Hydrofobní adsorpce je u chromatografie používána víc jak třicet let. U iontové adsorpce jsou iontové vazby k enzymům vázány přes solný můstek na elektrostaticky nabitě povrchy. V případě, že isoelektrický bod enzymu je nižší než hodnota pH roztoku, enzym je záporně nabit, a proto může být vázán k pozitivně nabitému nosiči (Sassolas *et al.*, 2012).

2.2.1.2 Zachycení do polymerní matrice

Existují různé způsoby zachycení enzymu, jako je například zachycení do hydrofilních gelů nebo do vláken. Tato metoda je založena na zachycení enzymu do obvykle anorganické nebo organické polymerní sítě, například na polymerní nosič polyakrylamid a silika sol-gel, polypeptidy jako želatinu a kasein, nebo na membránu, jako na dutá vlákna nebo mikrokapsle. Polymerní síť umožňuje průchod substrátu a produktu, ale zachovává volnost pohybu enzymu. Fyzikální omezení jsou obvykle příliš slabá, aby se zabránilo úniku enzymu, z toho důvodu jsou nutné další kovalentní vazby (Sheldon a van Pelt, 2013).

Praktické využití těchto metod je omezeno limitací přenosu hmoty přes membránu nebo přes gely. Zachycení obecně vyžaduje syntézu polymerní matrice v přítomnosti enzymu a následné zesíťování. Pokud jsou při polymerizaci upraveny podmínky, může být upravena struktura sítě, ale také pórovitost polymeru a velikost částic (Brady a Jordaán, 2009; Jafarizadeh *et al.*, 2014).

2.2.1.3 Enkapsulace

Podobně jako zachycení do polymerního gelu je enkapsulace irreverzibilní imobilizační metoda, kdy enkapsulace chrání enzym od vnějšího prostředí. Výhodou je, že enzym nemusí být chemicky modifikován, ale často je pozorován právě únik enzymu. Enzym by si však měl zachovat katalytickou aktivitu při polymeraci i při přechodu přes nosič (Zucca a Sanjust, 2014). Tato metoda má omezené použití, jelikož velké substráty nemohou projít přes semipermeabilní membránu. Většinou jsou používány mikrokapsule, které mají v průměru 10-100 μm (př. nitrocelulosa) (Brady a Jordaan, 2009).

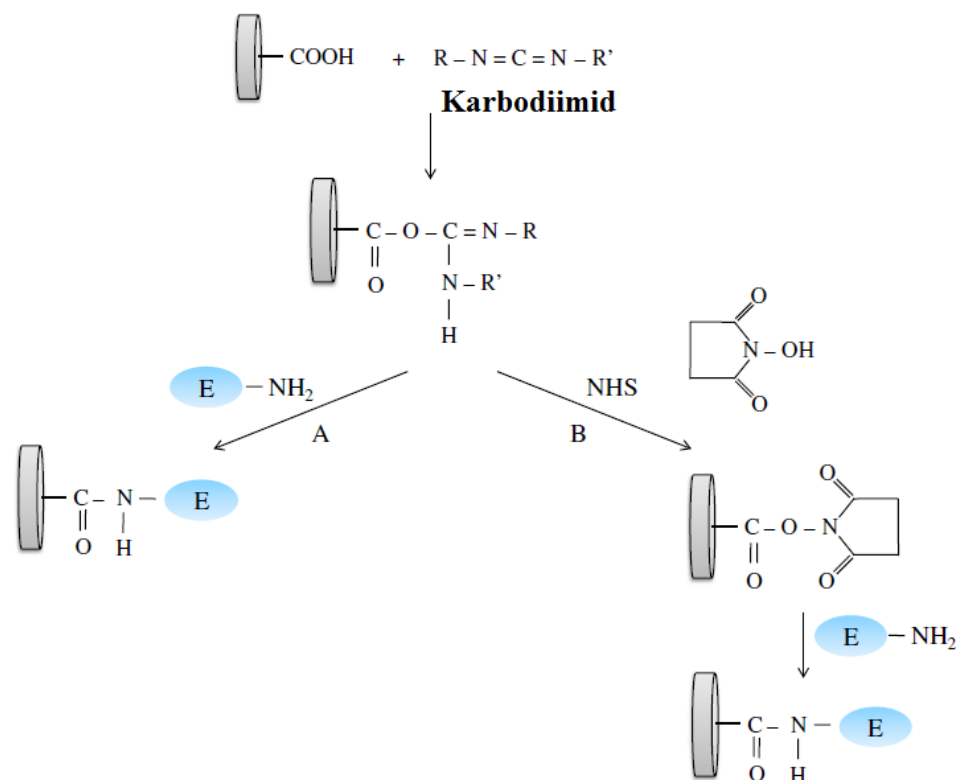
Pro enkapsulaci se často využívá oxid křemičitý, jelikož je nosič inertní a stabilní pro imobilizaci enzymu vzhledem k jeho ploše a ovladatelným průměrům pórů, které mohou být přizpůsobeny rozměrům konkrétního enzymu. Protože většina enzymů má průměr okolo 3-6 nm, nejčastěji jsou využívány mezoporezní materiály. Silika sol-gel enkapsulace se ukázala být univerzální alternativou pro širokou škálu biomolekul, což má zvláštní význam pro vývoj biosenzorů (Betancor a Luckarift, 2008).

2.2.1.4 Kovalentní vazba

Kovalentní vazba enzymů na polymerní nosiče patří mezi nejpoužívanější metody irreverzibilní imobilizace. Podstatou je navázání enzymu na povrch nosiče pomocí funkčních skupin, které nejsou součástí aktivního místa. Vazba enzymů na pevný nosič se obvykle provádí pomocí počáteční aktivace povrchu nosiče multifunkčními činidly (např. glutaraldehyd, karbodiimid) následované vazbou enzymu na aktivovaný nosič. V závěru jsou odstraněny přebytečné a nenavázané biomolekuly (Sassolas *et al.*, 2012).

Nejčastěji používané reakce zahrnují postranní řetězce aminokyselin lysinu (ϵ -aminoskupina), cysteinu (thiol), asparagové a glutamové kyseliny (karboxylové skupiny). Kovalentní vazba vznikne na základě vazby těchto skupin enzymů na nosič prostřednictvím amidové, etherové, thio-etherové nebo karbamátové vazby. Proto je navázaný enzym na nosič v mnoha případech velmi stabilní (Brena a Batista-Viera, 2006).

Aktivační činidlo karbodiimid umožní vazbu mezi karboxylovými skupinami nosiče a aminoskupinami enzymu. *N*-hydroxysukcinimid (NHS) může být spojen s karbodiimidem pro zlepšení účinnosti imobilizace (Obr. 4) (Sassolas *et al.*, 2012).

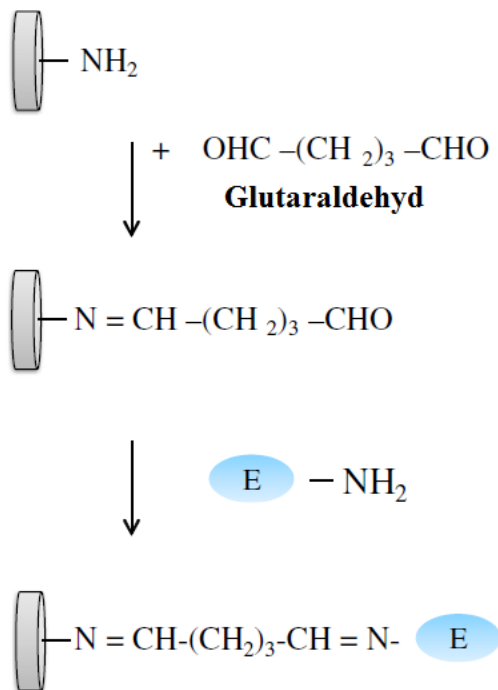


Obr. 4 Kovalentní imobilizace enzymu s karboxylem na povrchu nosiče pomocí karbodiimidového činidla. (A) bez NHS, (B) s NHS (přepřacováno dle Sassolas *et al.*, 2012).

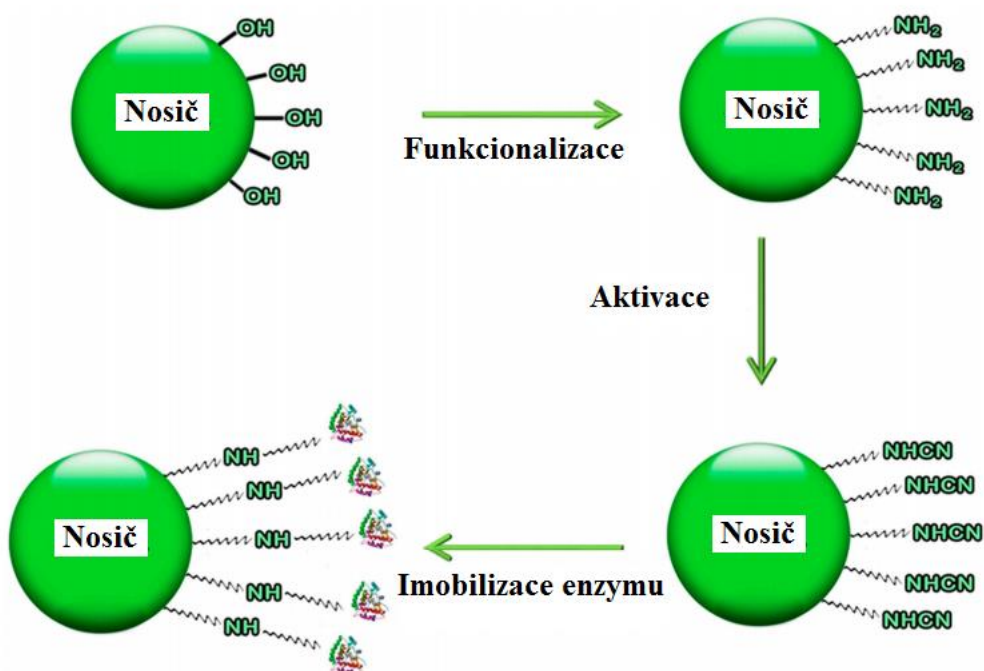
Pokud má nosič volné aminoskupiny, pro aktivaci se nejčastěji využívá glutaraldehyd, kdy se vytvoří nestabilní Schiffova báze mezi aldehydovou skupinou glutaraldehydu a aminoskupinou nosiče a pak druhá aldehydová skupina glutaraldehydu může reagovat s aminoskupinou enzymu (Obr. 5). Pro aktivaci hydroxylových skupin se používá bromkvan (Obr. 6) (Sassolas *et al.*, 2012).

Existuje mnoho komerčně dostupných nosičů pro imobilizaci; mohou být využity buď anorganické materiály (např. sklo s řízenou velikostí pórů), přírodní materiály (např. celuloza) nebo syntetické polymery (např. nylon). Také jsou využívány membrány (např. immunodyne, ultrabind), které jsou již předem aktivovány (Sassolas *et al.*, 2012).

Výhodou těchto metod je, že díky stabilnímu charakteru vazeb vytvořených mezi enzymem a matricí se enzym při použití neuvolňuje do roztoku. Nicméně aby se dosáhlo vysoké úrovně navázaného enzymu, aminokyselinové zbytky významné pro katalytickou činnost nesmí být zapojeny do kovalentní vazby k nosiči, což může být v některých případech velice obtížné. Orientace aktivního místa by mohla mít vliv na správnou interakci mezi enzymy a substráty (Mattiasson a Kaul, 1991).



Obr. 5 Kovalentní immobilizace enzymu s aminoskupinou na povrchu nosiče pomocí glutaraldehydového činidla (přepřacováno dle Sassolas *et al.*, 2012).



Obr. 6 Schéma funkcionalizace a aktivace anorganického nosiče pomocí kovalentní vazby (funktionalizace -NH₂ skupinou, aktivace bromkyanem) (přepřacováno dle Zucca a Sanjust, 2014).

2.2.1.5 Retikulace

Retikulace neboli zesítnění je další metodou irreverzibilní imobilizace, kdy jsou k zesítnění enzymů nebo krystalů využívány bifunkční zesítující činidla a není třeba využít nosiče. Použití nosiče nevyhnutelně vede ke snížení aktivity, což má za následek nižší produktivitu a výtěžky. V důsledku toho se zvyšuje zájem o imobilizaci enzymů bez nosičů, jako zesítnění enzymových krystalů (crosslinked enzyme crystals-CLECs) a zesítnění enzymových agregátů (CLEAs) (Sheldon a van Pelt, 2013).

Mezi nejčastěji používaná bifunkční činidla patří glutaraldehyd, který mezi molekulami vytváří kovalentní vazby a vzniká tak nerozpustná síť. Je využíván za účelem přípravy CLECs a CLEAs. Molekulová hmotnost zesítovacího činidla je zanedbatelná ve srovnání s enzymem; výsledný biokatalyzátor v podstatě obsahuje 100 % aktivního enzymu (Sheldon a van Pelt, 2013). Mezi další často využívaná činidla patří *bis*(imidoestery), glyoxal nebo hexamethyldiamin (Sassolas *et al.*, 2012).

Kovalentní povaha interakce se odráží v minimálním úniku enzymů, vysoké aktivitě enzymů, zvýšení provozní stability enzymů (i za drsných podmínek) a v nízkých výrobních nákladech v důsledku vyloučení dalšího drahého nosiče, zatímco negativní stránkou je možná chemická modifikace povrchu enzymů. Stupeň difúze substrátu/produktu může být rovněž ovlivněn. Navíc je často nezbytné použití toxických činidel za složitých podmínek reakce (Hartmann a Kostrov, 2013; Sheldon a van Pelt, 2013).

2.3 Nosiče pro imobilizaci

Pod pojmem nosič se uvádí nerozpustný materiál obsahující funkční skupiny, na které lze navázat aktivní molekuly. Vlastnosti imobilizovaných enzymů se odvíjí od vlastností enzymů i nosičů. Interakce mezi nimi dává imobilizovaným enzymům specifické fyzikálně-chemické a kinetické vlastnosti, které mohou být rozhodující pro jejich praktické využití (Krajewska, 2004).

Pro reakce neexistuje univerzální nosič, každý je něčím výjimečný. Pro každou reakci se musí zvolit ten nejvhodnější nosič za daných podmínek, který má odpovídající parametry a chemickou a fyzikální povahu k navázání enzymu a tím usnadnění jeho oddělení a opětovnému použití. Mezi ideální vlastnosti nosiče patří mechanická stabilita a odolnost, vysoká afinita k proteinům, dostupnost reaktivních funkčních skupin pro přímé reakce s enzymy a pro chemické modifikace, také hydrofilnost, regenerabilita

a snadnost přípravy. Je pochopitelné, že pro potravinářský a farmaceutický průmysl, lékařství a zemědělství je důležitá netoxičnost a biokompatibilita materiálů. Materiály by měly být rovněž biologicky rozložitelné a finančně dostupné (Krajewska, 2004).

Fyzikální a chemické vlastnosti nosičů silně určují katalytické vlastnosti enzymu, jako jeho aktivitu, selektivitu a stabilitu. V užším slova smyslu, nosič může být považován jako modifikátor enzymu. V důsledku toho bylo pro imobilizaci vyvinuto velké množství přírodních i syntetických nosičů s danými fyzikálními i chemickými vlastnostmi, různých tvarů a velikostí, s porézními či neporézními strukturami, navázanými funkčními skupinami a hydrofobicitou/hydrofilitou (Cao *et al.*, 2003). Na Obr. 7 je uvedeno rozdělení nosičů podle tvarů na pravidelné a nepravidelné. Dále se nosiče mohou dělit na porézní a neporézní typ nosičů nebo na organické a anorganické nosiče (Tab. 6).

Porézní nosiče jsou výhodnější v tom, že poskytují větší specifický povrch pro vyšší procento imobilizace enzymů. Enzymy jsou pak více chráněny vůči okolnímu prostředí. U porézních nosičů je nutná řízená distribuce pórů, aby bylo možné optimalizovat kapacitu a průtokové vlastnosti (Brena a Batista-Viera, 2006). Neporézní nosiče jsou specifické tím, že mají menší povrch k navázání substrátu, ale také nemají tolik difúzních omezení jako porézní nosiče. Přenos hmoty uvnitř pórů nosiče je často limitován nízkou rozpustností substrátu. Z toho důvodu je ve srovnání s volným enzymem běžně pozorována nižší specifická aktivita enzymů. Pro překonání limitace difúzí je vhodné použití neporézních magnetických částic (Magario *et al.*, 2008).

Tab. 6 Klasifikace nosičů (Brena a Batista-Viera, 2006).

Organické nosiče

Přírodní polymery:

polysacharidy: agar, agarosa, alginát, celulóza, dextransy, chitin

proteiny: albumin, kolagen

uhlík

Syntetické polymery:

polystyren, další polymery jako polyakryláty, polyakrylamidy, polymethakryláty, polyamidy, vinyl- a allyl-polymery

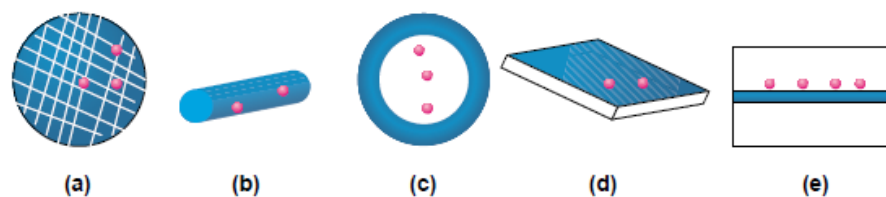
Anorganické nosiče

Přírodní minerály:

bentonit, oxid křemičitý

Zpracované materiály:

sklo (porézní/neporézní), kovy, oxidy kovů s póry



Obr. 7 Tvary nosičů pro imobilizaci enzymů. (a) korálky, (b) vlákna, (c) kapsule, (d) tenké filmy, (e) membrány (přepřacováno dle Cao *et al.*, 2003).

2.3.1 Organické nosiče

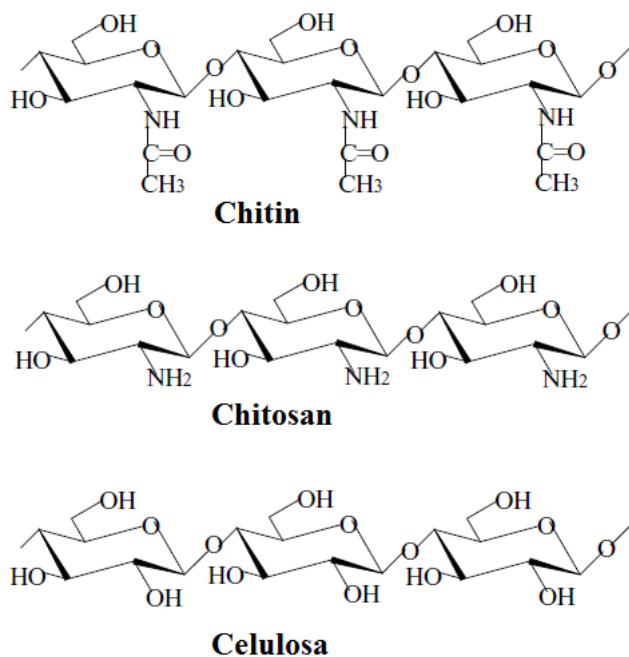
Většina průmyslových aplikací se provádí s organickými nosiči. Hydrofilní charakter je jedním z nejdůležitějších faktorů, které určují míru aktivity imobilizovaného enzymu (Brena a Batista-Viera, 2006).

2.3.1.1 Přírodní polymery

Velké množství přirozeně se vyskytujících polymerů, zejména ve vodě nerozpustných polysacharidů jako celulósa, škrob, agarosa, chitin a chitosan a proteinů jako je želatina a albumin, bylo široce používáno jako nosiče pro imobilizaci enzymů (Krajewska, 2004). Pro výrobu *L*-aminokyselin štěpením racemických acyl-aminokyselin se používá pevná aminoacylasa z *Aspergillus oryzae* imobilizovaná iontovou vazbou na DEAE-Sephadexu (Sheldon a van Pelt, 2013).

Mezi často používané nosiče patří agarosa. Má řadu výhod, ať už vysokou pórovitost, což vede k vysoké kapacitě pro proteiny, tak i komerční dostupnost, hydrofilní charakter, snadnost deproteinizace a nepřítomost nabitých částic bránící nespecifické adsorpci substrátů a produktů. Nicméně vysoká cena omezuje použití agarózy a dalších porézních nosičů. Tento problém lze obejít použitím reverzibilní imobilizační metody, která umožní regeneraci a opětovné použití nosiče (Brena a Batista-Viera, 2006).

Celulósa je nejpoužívanější porézní nosič charakteristický svou snášenlivostí k vyšším teplotám a pH. Chitin a chitosan jsou přírodní polyaminosacharidy, které jsou považovány za její analogy. Chitin je jeden z nejhoňějších obnovitelných zdrojů vyskytující se ve skořápkách korýšů, buněčných stěnách hub a exoskeletu hmyzu, v nichž poskytuje stabilitu a pevnost. Chitin se skládá z *N*-acetyl-*D*-glukosaminů spojených β -1,4 glykosidickou vazbou, které tvoří lineární polymer s dlouhým řetězcem (Krajewska, 2004). Na Obr. 8 se nachází struktura chitinu, chitosanu a celulósy.



Obr. 8 Struktura chitinu, chitosanu a celulosy (přepřacováno dle Krajewska, 2004).

Chitosan je hlavní derivát chitinu získaný *N*-deacetylací (kopolymer *N*-acetyl-*D*-glukosaminu a *D*-glukosaminu). Ve svých polyglukosaminových lineárních řetězcích obsahuje reaktivní aminoskupiny a hydroxylové skupiny, které mohou být chemicky modifikovány. Chitosan je v přírodě se volně vyskytující kationtový nosič, který obsahuje volné aminoskupiny (pKa \approx 6,5). Je rozpustný v kyselém prostředí při pH pod 6,5. Po rozpuštění má vysoký kladný náboj na NH_3^+ skupinách a váže se na negativně nabitě povrchy (Krajewska, 2004). Mezi jeho další vlastnosti patří agregace s polyanionty a vysoké procento navázání proteinů. Chitosan může být snadno zesíten činidly jako je např. glutaraldehyd, čímž se vytvoří pevný gel. Ve srovnání s alginátem je mnohem lepší variantou při výběru nosiče pro imobilizaci (Lei a Bi, 2007).

2.3.1.2 Syntetické polymery

Mezi hlavní důvody využití nosičů ze syntetických polymerů pro imobilizaci patří jejich vysoká odolnost a nízká cena. Nejpoužívanějšími polymery jsou polystyreny, dále pak polyakryláty, polyakrylamidy, polymethakryláty, polyamidy, vinyl- a allyl-polymery (Brena a Batista-Viera, 2006). Nosiče z polyakrylamidu jsou odolné vůči nespécifickým interakcím, také mají dobrou stabilitu pH, ale na druhé straně jsou mechanicky nestabilní a mají špatné průtokové vlastnosti. Zato nosiče z polyvinylalkoholu (PVA)

mají dobrou mechanickou i tepelnou stabilitu (Hermanson *et al.*, 1993). Polyamidy, jako např. nylon, také našly uplatnění jako syntetické polymery díky své dobré provozní stabilitě a dlouhodobé funkční stabilitě. Jejich nevýhodou je horší biokompatibilita a hydrofobicita (Nan *et al.*, 2009).

Pro imobilizaci enzymů se pomocí jednoduché adsorpce používají různé porézní akrylové pryskyřice, jako je Amberlit XAD-7. Dalším příkladem je NOVOZYM 435, který se skládá z enzymu (lipasa B z *C. antarctica*) adsorbovaného na makroporézních akrylových pryskyřicích. Nevýhodou imobilizace adsorpcí je, že enzym může být snadno vyluhován z nosiče ve vodném prostředí nebo v přítomnosti substrátů. Alternativně může být enzym imobilizovaný adsorpcí stabilizován vůči vyluhování a mechanickému namáhání vložením silikonového povlaku vytvořeného z levných, snadno dostupných materiálů (Sheldon a van Pelt, 2013).

Nové hybridní materiály jako acetátcelulosa a polymethylmethakryláty jsou vynikající nosiče pro imobilizaci enzymu glukosaoxidasy. Byla prokázána lepší funkční stabilita a stabilita při extrémních teplotách i pH. Nevýhodou je méně porézní struktura membrány a omezená difúze substrátů i produktů (Rauf *et al.*, 2006).

2.3.2 Anorganické nosiče

Anorganické nosiče jsou netoxické, vysoce odolné vůči chemické, fyzikální i mikrobiální degradaci (Brena a Batista-Viera, 2006). U imobilizace na anorganické nosiče je nejběžnější kovalentní vazba, jelikož zajišťuje nejvyšší pevnost vazby mezi nosičem a enzymem. Anorganické materiály musí splňovat přísná kritéria, jako nerozpustnost ve vodě, přiměřenou mechanickou pevnost a chemickou odolnost v provozních podmínkách, schopnost tvořit částice s velkým povrchem a být reaktivní vůči funkcionalizačním činidlům. Je třeba vzít vždy v úvahu nespecifickou adsorpci proteinů (Zucca a Sanjust, 2014).

Typická tuhost a pórovitost odlišuje anorganické nosiče od organických. Tuhost zaručuje neměnnost průměru i objemu pórů zaručující konstantní objem a tvar samotného nosiče. Komerčně dostupné jsou anorganické nosiče o různých průměrech pórů. Nicméně jako nejslibnější se ukazují mezoporézní nosiče z oxidu křemičitého označované jako nanosilikas, které jsou inertní a stabilní při zvýšených teplotách. Jejich průměr pórů se pohybuje mezi 2 až 50 nm a povrchová plocha má od 300 až do 1500 m².g⁻¹. Díky těmto rozměrům se imobilizací na mezoporézní nosiče naváže velké množství proteinů (Magner, 2013).

Pro praktické použití se jako nejvhodnější materiál pro anorganické nosiče jeví oxid křemičitý, oxid hlinitý, titaničitý a další oxidy, zeolity, křemičitany, organosilany, borosilikáty a hlinitokřemičitany. V poslední době bylo rovněž navrženo několik forem elementárního uhlíku a křemíku (Sheldon a van Pelt, 2013; Zucca a Sanjust, 2014).

Mezi nejvíce používané anorganické nosiče se řadí silikagel díky své pórovitosti a mechanické odolnosti, avšak jeho omezujícími faktory jsou chemická odolnost a náchylnost vůči specifickým interakcím. Během sušení dochází k znehodnocení materiálu, tomu lze zamezit použitím přídatných látek (Sassolas *et. al.*, 2012). Jeden z nejjednodušších a nejlevnějších materiálů pro imobilizaci enzymů je nosič z oxidu křemičitého. Používá se v čistících prostředcích, které uvolňují enzym do pracovního roztoku během praní (Sheldon a van Pelt, 2013). Dalším používaným anorganickým nosičem je i přes svou křehkost porézní sklo a křemičité materiály. Jejich výhodou je vysoká pórovitost, tepelná stabilita, mechanická odolnost a odolnost vůči nesespecifickým interakcím (Zucca a Sanjust, 2014).

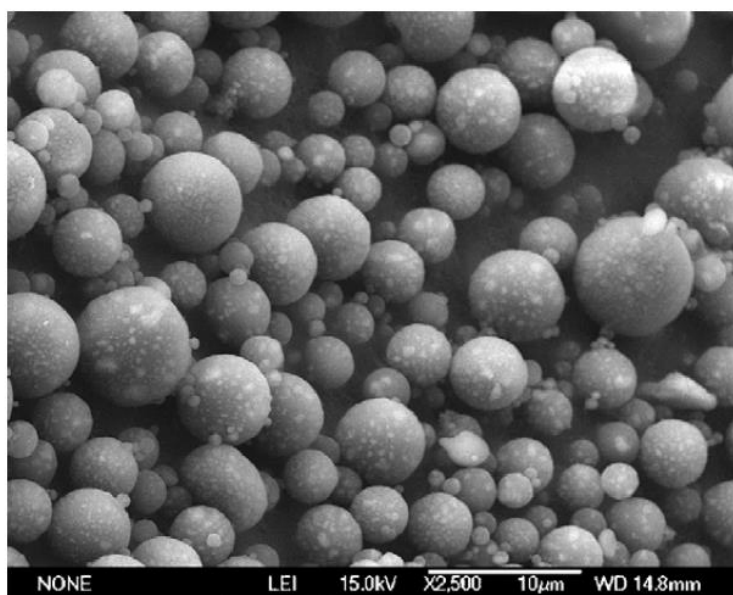
2.3.2.1 Magnetické nosiče

V posledních letech roste zájem o využití magnetických nosičů v biotechnologických procesech. Vysoký potenciál prokázaly při imobilizaci enzymů a bílkovin, při separaci buněk, v biomedicíně, DNA diagnostice a mnoha dalších oborech (Chen *et al.*, 2012). Ve srovnání s porézními nosiči mají částice minimální difúzní omezení, maximální plochu pro imobilizaci na jednotku hmotnosti, vysoké procento navázání enzymu a snadné oddělení z reakčního roztoku pomocí magnetického pole bez zdlouhavé dekantace, centrifugace či filtrace. Velkou výhodou je i opakované využití imobilizovaných makromolekul. Dalším klíčovým faktorem využití magnetických částic je, že se v ideálním případě dá snadno regulovat orientace enzymu na nosičích. Kromě toho imobilizované enzymy často vykazují lepší teplotní stabilitu, pH stabilitu a vyšší aktivitu ve srovnání s volnými enzymy (Jia *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2014).

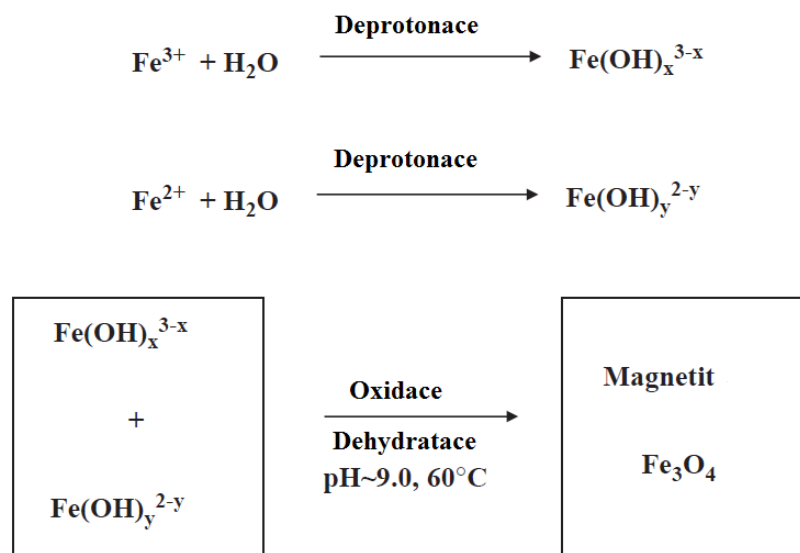
Částice se dělí dle velikosti, a to na mikročástice (0,1-100 μm), které jsou feromagnetické, a nanočástice (0,1-100 nm), které jsou superparamagnetické. S magnetismem je však spojena tendence shlukovat se, čímž se sníží povrchová energie částic. Částice je pak třeba stabilizovat (Lu *et al.*, 2007). Mezi nejběžněji používané materiály pro výrobu částic patří oxidy železa, a to magnetit (Fe_3O_4) a maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), které mají nízkou toxicitu a jsou biokompatibilní. Magnetit je feromagnetický oxid se silnou magnetizací, který ve své mřížce obsahuje Fe^{2+} a Fe^{3+} ionty. Naproti

tomu maghemit ve své mřížce obsahuje pouze Fe^{3+} ionty (Xu *et al.*, 2014). Mezi další materiály patří čisté kovy Fe, Ni, Co, jejich slitiny (Zucca a Sanjust, 2014) a ferity (př. CoFe_2O_4), které jsou výhodné pro své magnetické vlastnosti, tvrdost a chemicky inertní vlastnosti. Co a Ni jsou však toxické a náchylné k oxidaci (Wang *et al.*, 2008). Na Obr. 9 se nachází snímek zachycený pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM) polymethakrylátových mikročástic připravených polymerací (Zucca a Sanjust, 2014).

Magnetické částice mohou být připravené mnoha způsoby, přičemž zastaralé mechanické postupy, kdy se částice připravovaly v organickém rozpouštědle mletím sypkého magnetitu, ustupují novým chemickým a tepelným metodám (Horák *et al.*, 2007). Nanočástice z oxidů železa bývají nejčastěji připraveny koprecipitací, která spočívá ve srážení Fe^{2+} a Fe^{3+} vodných roztoků solí přidáním báze (Khalafalla a Reimers, 1980). Velikost, tvar a složení nanočástic odpovídá typu použitých solí, poměru Fe^{2+} a Fe^{3+} , pH a iontové síle srážecího média. Nevýhodou metody je upravování pH v průběhu syntézy (Liu *et al.*, 2004). Precipitace Fe_3O_4 je znázorněna na obr. 10.



Obr. 9 SEM magnetických polymethakrylátových mikročástic připravených polymerací (Ma *et al.*, 2005).



Obr. 10 Schéma znázorňující reakční mechanismus tvorby magnetických částic z vodné směsi železnatého a železitého chloridu přidáním báze. Magnetit je černého zbarvení (přepřacováno dle Gupta a Gupta, 2005).

V posledních letech byly vyvinuty nové metody, u kterých se dá lépe kontrolovat velikost magnetických částic, a to mikroemulze a rozklad organických prekurzorů za vysokých teplot. Mikroemulze byly úspěšně použity jako nanoreaktory pro syntézu magnetických nanočástic v rozmezí od 2 do 10 nm. Hlavní výhodou mikroemulze systémů je, že velikost nanočástic může být řízena změnou jejich složení a modulací velikosti vodného micelárního jádra (Lee *et al.*, 2005). Rozklad organických prekurzorů v přítomnosti organických povrchově aktivních rozpouštědel za vysokých teplot přineslo nanočástice s kontrolovatelnou velikostí, distribucí, dobrou tvorbou krystalů a dispergovatelností. Sun a Zeng (2002) připravili monodisperzní magnetitové nanočástice o velikosti 3 až 20 nm termálním rozkladem acetylacetonátu železitého ve fenyletheru v přítomnosti alkoholu, kyseliny olejové a oleylaminu při 265°C. Tuto metodu nelze aplikovat ve velkém měřítku kvůli složitým syntetickým krokům a vysoké reakční teplotě, navíc se obvykle používají drahá a toxická činidla (Sun a Zeng, 2002). Enkapsulace nebo disperze magnetických nanočástic do organických polymerů mohou zlepšit kompatibilitu s organickými složkami, snížit náchylnost k vyplavování a chránit povrch částic před oxidací. V důsledku enkapsulace se zlepšuje dispergovatelnost, chemická stabilita a snižuje se toxicita. Mnoho metod bylo vyvinuto pro přípravu magnetických kompozitních částic, včetně polymerního zesílení a polymerace monomeru (Ma a Liu, 2007). Magnetické nanočástice tvořené oxidy železa lze také získat izolací z magnetotaktických bakterií, např. z *Magnetobacterium bavaricum*,

Aquaspirillum magnetotacticum a *Desulfovibrio desulfurican*. Jsou to gramnegativní, vodné, pohyblivé mikroorganismy, které si samy produkují intracelulární krystaly (obvykle z magnetitu, sulfidů železa), jenž se shlukují v magnetosomech uspořádaných do řetízků. Tyto magnetosomy bakteriím slouží k pasivní orientaci v magnetickém poli Země (Schüler a Frankel, 1999).

Magnetické nosiče jsou tvořeny magnetickými jádry, která jsou obalená funkcionalizující slupkou. Ta jádra chrání před shlukováním a zároveň vnáší funkční skupiny pro kovalentní vazbu s bioaktivními sloučeninami. Magnetická jádra z oxidů železa mají hydrofobní povrchy s velkou plochou v poměru s objemem, proto jsou upravovány (Hamley, 2003). Pro modifikaci povrchů nosičů se využívají různé typy polymerů, a to buď přírodní a syntetické nebo organické a anorganické látky. Příklady látek používaných k potažení magnetických jader jsou uvedeny v Tab. 7.

Tab. 7 Příklady různých látek používaných k povrchové modifikaci magnetických částic a jejich využití.

Typ materiálu	Obalový materiál	Využití	Literatura
<i>Přírodní polymery</i>	Želatina	Biokompatibilní, emulgátor, gelovací činidlo, hydrofilní	(Olsen <i>et al.</i> , 2003)
	Chitosan	Biokompatibilní, hydrofilní, zemědělství, potravinářství, lékařství, biotechnologie, textil, čištění odpadních vod	(Khor a Lim, 2003)
	Dextran	Stabilizace koloidních roztoků	(Berry a Curtis, 2003)
<i>Syntetické polymery</i>	Polyethylenglykol	Zlepšení biokompatibility, usnadnění internalizace nanočástic do buněk	(Zhang <i>et al.</i> , 2002)
	Polyvinylalkohol	Zabránění koagulace částic, což vede k monodisperzi částic	(Shan <i>et al.</i> , 2003)
	Poly(<i>N</i> -isopropylakrylamid)	Termosensitivní pro podávání léků, separace buněk	(Chen a Hoffman, 1993)
<i>Anorganické látky</i>	Zlato	Zabránění agregace částic, chemicky inertní	(Jeong <i>et al.</i> , 2006)
	Oxid křemičitý	Zabránění agregace částic, zlepšení chemické stability a biokompatibility, hydrofilní povrch oxidu pomáhá vázat enzym ve vodném roztoku	(Chen <i>et al.</i> , 2009)
<i>Organické látky</i>	Kys. olejová, kys. stearová	Stabilizace koloidních roztoků	(Wooding <i>et al.</i> , 1991)

Modifikací získá jádro stabilitu, je chráněno před přímým kontaktem s prostředím a proti oxidaci. Také je zabráněno nežádoucím specifickým interakcím, shlukování částic a povrch získá funkční skupiny potřebné pro navázání požadovaných makromolekul. Mezi nejčastější obalový materiál nosičů patří celulóza, která poskytuje volné hydroxylové skupiny. Chemickou modifikací bylo vytvořeno velké množství derivátů celulózy (např. DEAE–celulóza, AE–celulóza, CM–celulóza) (Vatta *et al.*, 2006).

2.4 Imobilizace bromelainu

Stabilita enzymů omezuje jejich využití, při dlouhodobých procesech často dojde k inaktivaci volných enzymů. Například při zvýšených teplotách je enzym denaturován v důsledku zániku nekovalentních interakcí a drastické změny pH ovlivňují ionizační stav katalytických aminokyselin. Z technologických a ekonomických důvodů je proto vhodnější využití imobilizovaných enzymů, kdy mohou být enzymy imobilizovány na různých nosičích různými metodami. Zejména imobilizace kovalentní vazbou zachovává velmi vysokou enzymovou aktivitu v širokém rozsahu pH a teplot (Kunamneni *et al.*, 2008). Imobilizace bromelainu zajistí možnost opakovaného, popř. nepřetržitého použití tohoto biokatalyzátoru, stejně jako snadné oddělení od reakční směsi, aby se zabránilo kontaminaci produktu proteinem. V případě proteas je navíc imobilizace užitečná pro snížení míry autolýzy (Homaei *et al.*, 2010). V posledních letech výrazně vzrostla aplikace imobilizovaných enzymů v chemickém, farmaceutickém a potravinářském průmyslu (Hanefeld *et al.*, 2009).

Bromelain byl imobilizován různými způsoby na různých nosičích (anorganických i organických). V posledních letech se pro imobilizaci bromelainu často využívají magnetické částice. Tan *et al.* (2008) kovalentně imobilizovali bromelain na CM–chitosanové nanočástice, čímž se výrazně zlepšila stabilita bromelainu za vyšší teploty a také funkční stabilitu. Michaelisova konstanta (K_m) imobilizovaného bromelainu byla menší než u volného, což znamená, že kovalentní imobilizace pomocí karbodiimidu by mohla podporovat stabilitu enzymu a posílit afinitu enzymu k substrátu (Tan *et al.*, 2008). Častá je také kovalentní imobilizace bromelainu na chitosanové kuličky, kdy oproti volnému bromelainu dojde ke zlepšení substrátové specifity a funkční stability (Benucci *et al.*, 2012). Získá se tak slibný, potravinám bezpečný biokatalyzátor pro následnou aplikaci při stabilizaci zákalu ve víně, kdy po 24 hod míchání v reaktoru s modelovým vínem dochází přibližně k 70 % snížení zákalu vína (Benucci *et al.*, 2014). V Tab. 8 je uveden přehled metod imobilizace bromelainu na různé nosiče.

Tab. 8 Přehled metod imobilizace bromelainu na různé nosiče.

Nosič	Metoda	Literatura
Porézní chitosanové kuličky	Kovalentní vazba	(Hayashi a Ikada, 1991; Seo <i>et al.</i> , 1998; Benucci <i>et al.</i> , 2012, 2014; Esti <i>et al.</i> , 2015)
CM chitosanové nanočástice modifikované linoleovou kyselinou	Kovalentní vazba	(Tan <i>et al.</i> , 2008)
Kalcinované podvojně vrstevnaté hydroxidy (Mg-Al)	Adsorpce	(Shi <i>et al.</i> , 2007)
Termosensitivní <i>N</i> -isopropylakrylamid (prostřednictvím aminoskupin enzymu, přes oligosacharidový řetězec)	Kovalentní vazba	(Mahmood a Saleemuddin, 2007)
Iminodioctová kyselina Sepharosa 6B (přes His)	Adsorpce	(Gupta <i>et al.</i> , 2007)
Chitosanový film (z <i>Aspergillus niger</i> a z měkkýšů) s glycerolem	Kovalentní vazba	(Zappino <i>et al.</i> , 2015)
Sepharosa s konkavalinem A	Adsorpce	(Gupta a Saleemuddin, 2006)
Nanočástice s reaktivní červení 120 potažené chitosanem	Adsorpce	(Song <i>et al.</i> , 2011)
Glyoxyl-Sepharosa CL 4B	Kovalentní vazba	(Cutiño-Avila <i>et al.</i> , 2014)
Zesíťovaný alginát vápenatý	Zachycení do matrice	(Sree <i>et al.</i> , 2012)
Porézní kopoly(γ -methyl- <i>L</i> -glutamát/ <i>L</i> -leucin) kuličky	Kovalentní vazba	(Yodoya <i>et al.</i> , 2003)
Porézní PVA	Kovalentní vazba	(Hayashi <i>et al.</i> , 1993)
Aldehydové porézní skleněné kuličky	Kovalentní vazba	(Benucci <i>et al.</i> , 2012)
Akrylové kuličky aktivované epoxidem	Adsorpce	(Benucci <i>et al.</i> , 2012)
Fe ₃ O ₄ částice potažené SiO ₂	Kovalentní vazba	(Ruan <i>et al.</i> , 2013)

2.4.1 Využití imobilizovaného bromelainu

2.4.1.1 Čiření a stabilizace vína

Čiření a stabilizace vína jsou procesy, při kterých jsou nerozpustné látky rozsuspendované ve víně odstraňovány z vína před lahvováním. Mezi tyto látky patří kvasinky, bakterie, tartráty, bílkoviny, pektiny, různé třísloviny a další fenolické sloučeniny, ale také slupky a stopky z hroznů. Čiřením se odstraňují z vína především koloidy (částice o velikosti 1-100 nm) a to kladně nabitě bílkoviny, záporně nabitá kyselá barviva, zásaditá barviva, třísloviny a další látky. Koloidy způsobují opalescenci a matnost vín. Čiření se provádí tehdy, když už ve víně neprobíhá alkoholové kvašení a biologické odbourávání kyselin. Může zahrnovat rafinaci, filtraci, odstředování, flotaci, chlazení, pasterizaci, zrání v barelech a stáčení vína (Mierczynska-Vasilev a Smith, 2015).

Koncentrace bílkovin v bílém víně se pohybuje od 15 do 300 mg.l⁻¹. Ačkoliv jsou bílkoviny přítomny v poměrně malých množstvích, mají zásadní význam pro koloidní

stabilitu a čírost bílého vína. Při skladování vín může dojít k agregaci proteinů, čili k zákalu proteinů, což je vada komerčních vín, která je činí nepříjemnou pro spotřebitele (Batista *et al.*, 2009). Přídavek adsorbčních materiálů, jako bentonit, je nespecificky běžná praxe využívaná ve vinařství pro prevenci srážení bílkovin, kdy negativně nabitě částice bentonitu elektrostaticky interagují s kladně nabitými proteiny vína způsobující jejich flokulaci, což umožňuje jejich odstranění (Ferreira *et al.*, 2001). Bentonity jsou přírodní hlinité silikáty, které ve vodě bobtnají a srážejí se vlivem elektrolytů. Navzdory jeho účinnosti má bentonit negativní vliv na kvalitu vyčištěného vína, a to ztrátou barvy, chuti a změnou složení vína. Také manipulace s ním má negativní vliv na zdraví člověka. Z těchto důvodů je dnes stále větší pozornost věnována vývoji alternativních postupů pro eliminaci proteinů, kdy by byla zachována kvalita vína, udržitelnost a sníženy náklady pro výrobu vína (Waters *et al.*, 2005).

Možnost stabilizace bílého vína kyselými proteasami, které jsou schopné hydrolyzovat konkrétní proteiny a zároveň zůstat inertní vůči ostatním složkám, se jeví jako velmi zajímavá. Nicméně v současné době převládá v některých evropských zemích požadavek na potraviny bez aditiv (Feijoo-Siota a Villa, 2010). Z tohoto důvodu byla věnována rostoucí pozornost využití imobilizovaných proteas na pevném nosiči, což by mohlo mít uplatnění u stabilizace proteinů vína pomocí kontinuálního ošetření v různých typech bioreaktorů (Esti *et al.*, 2015).

V nedávné studii byl kmenový bromelain kovalentně a přímo navázán na chitosanové kuličky. Tento potravinářství bezpečný biokatalyzátor se zdá být vhodný pro aplikaci v médiu podobném vínu (Benucci *et al.*, 2012). Kromě toho byl zkoumán vliv očekávaných inhibitorů obvykle přítomných ve víně na aktivitu volného bromelainu v médiu podobném pufru, a to ethanolu, oxidu siřičitého, slupek hroznů a taninu, což vedlo k potvrzení reverzibilní inhibice proteasy ve volné formě. Jako nejsilnější kompetitivní inhibitor byl určen ethanol, ale pouze za výskytu v abnormálních koncentracích. Imobilizovaný bromelain je odolnější vůči inhibičnímu účinku a mohl by být použit jako alternativa bentonitu k hydrolyze proteinů vína, ale pro jeho využití jsou nezbytné další studie (Esti *et al.*, 2015).

2.4.5.2 Stabilizace piva

Při výrobě piva se také využívají enzymy, a to při stabilizaci piva, kdy vzniklé pivo není zcela čisté a je třeba jej pro zvýšení trvanlivosti přefiltrovat. Pro filtraci se používají různé typy filtrů (křemelinové, membránové), nebo se vzhledem ke své

finanční nenáročnosti využívá pasterace piva při 62°C. Pro delší trvanlivost piva se používají chemické stabilizátory, kdy je nejčastěji využíván tanin, silikagel, bentonit a enzymy (např. papain) (Siebert a Lynn 1997).

Pan a Lin (1993) studovali využití imobilizovaného bromelainu a papainu při stabilizaci piva v chladu. Bromelain byl imobilizován na CM-celulosu, DEAE-celulosu a přírodní celulosu pomocí glutaraldehydu jako zesíťovacího činidla. Jako nejúčinnější nosič pro imobilizaci se ukázala CM-celulosa, kdy se imobilizací posunulo pH optimum i teplotní optimum oproti volnému bromelainu a papainu. Při průtokové rychlosti 30 mL.hod⁻¹ přes kolony naplněné pivem mohlo probíhat zrání piva. Nejlepších výsledků dosáhli, když pro zrání použili směs 5 g imobilizovaného bromelainu a 5 g imobilizovaného papainu na CM-celulosový nosiče, kdy byl zákal piva snížen téměř asi 2,6x a obsah proteinů s molekulovou hmotností vyšší než 8000 Da byl snížen z 42,76 % na 13,10 %. Poté byla směs imobilizovaných enzymů používána kontinuálně po dobu 10 dnů, směs byla stále účinná při prevenci proti tvorbě zákalu v pivu (Pan a Lin, 1993).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a chemikálie

Bicinchoninová kyselina	Sigma-Aldrich (Německo)
Bromelain	dar firmy Wobenzym (Česká republika)
Coomasie Brilliant Blue G250	Bio-Rad (USA)
Cystein	Lachema (Česká republika)
Dihydrogenfosforečnan draselný	Sigma-Aldrich (Německo)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Německo)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich (Německo)
Ethanol (96%, denaturovaný)	lihovar Kojetín (Česká republika)
Ethanol 99,8 %, pro UV spektroskopii	Sigma-Aldrich (Německo)
Folin-Ciocalteu reagent	Sigma-Aldrich (Německo)
Glutaraldehyd 50%	Sigma-Aldrich (Německo)
Hovězí hemoglobin	Sigma-Aldrich (Německo)
Hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Německo)
Hydrogenfosforečnan draselný	Sigma-Aldrich (Německo)
Hydrogenfosforečnan sodný	Sigma-Aldrich (Německo)
Hydrogenuhlíčan sodný	Sigma-Aldrich (Německo)
Hydroxid draselný	Lachema (Česká republika)
Hydroxid sodný	Lach-Ner (Česká republika)
Chlorid draselný	Sigma-Aldrich (Německo)
Chlorid sodný	Lach-Ner (Česká republika)
Jodistan sodný	Sigma Aldrich (Německo)
Kyselina citronová	Sigma-Aldrich (Německo)
Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	Sigma-Aldrich (Německo)
Kyselina fosforečná (85%)	Lachema (Česká republika)
Kyselina chlorovodíková	Lach-Ner (Česká republika)
Kyselina mravenčí	Sigma-Aldrich (Německo)
Kyselina trichloroctová (TCA)	Lach-Ner (Česká republika)
Kyselina vinná	Lachema (Česká republika)
Magnetické mikročástice MG 100	Iontosorb (Česká republika)
Magnetické mikročástice MG CM 100	Iontosorb (Česká republika)

Magnetické mikročástice MG DEAE 100	Iontosorb (Česká republika)
Methanol	Lachema (Česká republika)
Močovina	Sigma-Aldrich (Německo)
<i>N</i> _α -benzoyl- <i>DL</i> -arginin 4-nitroanilid hydrochlorid (BAPNA)	Sigma-Aldrich (Německo)
<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N</i> '-ethylkarbodiimid hydrochlorid 99% (EDC.HCl)	Sigma-Aldrich (Německo)
<i>N</i> -hydroxysukcinimid 98% (NHS)	Sigma-Aldrich (Německo)
Síran měďnatý pentahydrát	Sigma-Aldrich (Německo)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	MP Biomedicals (Francie)
Tyrosin	Lachema (Česká republika)
Uhličitan sodný monohydrát	Sigma-Aldrich (Německo)
Vinan sodno-draselný	Sigma-Aldrich (Německo)
Vinan sodný	Sigma-Aldrich (Německo)
Víno 1 – Rulandské šedé (pH 3,37)	Albert (Česká republika)
Víno 2 – Tramín červený (pH 3,54)	Albert (Česká republika)

3.2 Přístroje

Analytické váhy	Sartorius (Německo)
Automatické pipety 1-5000 µl	Eppendorf (Německo)
Automatický rotátor Multi Bio RS-24	Biosan (Litva)
Centrifuga 5415R	Eppendorf (Německo)
Digitální pH metr inoLab Level 1	WTW, Německo
Digitální předvážky	Kern (Německo)
Elektromagnetická míchačka RCT-Basic	IKA, Německo
Mikrodestičkový reader Synergy HT	BioTek (USA)
Minicentrifuga miniSpin plus	Eppendorf (Německo)
Minitřepačka TTS 2	IKA (Německo)
Spektrofotometr Biochrom (WPA)	Biochrom Ltd. (Velká Británie)
Spektrofotometr UV-VIS	Agilent technologies (USA)
Termostat SUB 6	Grant (Velká Británie)
Třepačka s termostatem	BioSan (Litva)
Vodní lázeň	Grant (Velká Británie)
Vortex V1	BioSan (Litva)

3.3 Metody

3.3.1 Imobilizace bromelainu pomocí glutaraldehydu

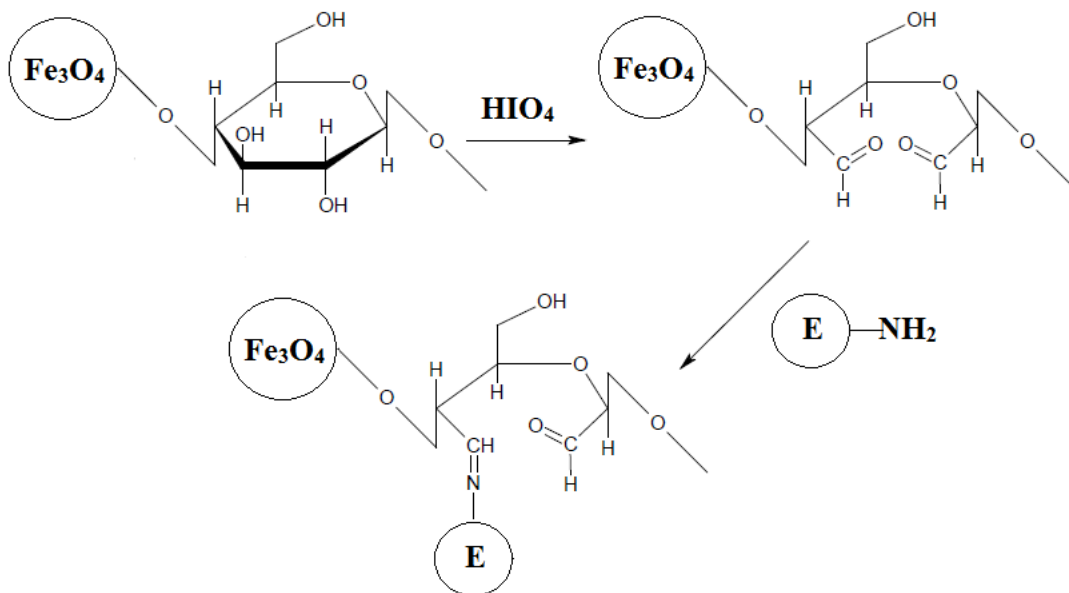
Do 2 ml mikrozkušavky bylo naváženo 100 mg magnetických mikročástic MG DEAE 100, k nim bylo napipetováno 1600 μl 5% glutaraldehydu ve vodě. Směs byla protřepávána 4 hod pomocí automatického rotátoru v lednici při 4°C. Poté byly magnetické částice separovány pomocí magnetického pole, roztok byl odpipetován a částice byly 5x promyty pufr (K-Pi, 0,1 mol.l⁻¹, pH 8,0), aby byl odstraněn všechen nenavázaný glutaraldehyd, který by mohl poté zesítovat přidaný bromelain. Následně bylo napipetováno 800 μl bromelainu v deionizované vodě (15 mg.ml⁻¹) a 800 μl pufru (K-Pi, 0,2 mol.l⁻¹, pH 8,0), kdy byly částice přidržovány u stěny pomocí magnetického pole kvůli adsorpci. Poté bylo odebráno 50 μl této směsi ke stanovení koncentrace proteinů bicinchoninovou (BCA) metodou. Směs byla protřepávána do dalšího dne pomocí automatického rotátoru v lednici při 4°C. Poté byly magnetické částice separovány pomocí magnetického pole, roztok byl odpipetován a v něm byla stanovena koncentrace proteinů BCA metodou. Na závěr byly částice 10x promyty pufr, pro porovnání byl použit pufr pro bromelain (K-Pi 0,1 mol.l⁻¹ pH 6,5, 0,3 mol.l⁻¹ KCl, 0,1 mol.l⁻¹ EDTA, 0,003 mol.l⁻¹ DTT) a K-Pi pufr (0,1 mol.l⁻¹, pH 7,0), aby byl odstraněn nenavázaný bromelain. Měření bylo prováděno ve třech opakováních.

3.3.2 Imobilizace bromelainu pomocí karbodiimidu

Do 2 ml mikrozkušavky bylo naváženo 100 mg magnetických mikročástic CM MG 100, k nim bylo napipetováno 400 μl 0,1 mol.l⁻¹ roztoku EDC.HCl v pufru (K-Pi, 0,2 mol.l⁻¹, pH 6,0), 400 μl 0,052 mol.l⁻¹ roztoku NHS v pufru (K-Pi, 0,2 mol.l⁻¹, pH 6,0) a 800 μl bromelainu v deionizované vodě (15 mg.ml⁻¹), kdy byly magnetické částice přidržovány u stěny pomocí magnetického pole kvůli adsorpci. Poté bylo odebráno 50 μl této směsi ke stanovení koncentrace proteinů BCA metodou. Směs byla protřepávána do dalšího dne pomocí automatického rotátoru v lednici při 4°C. Poté byly magnetické částice separovány pomocí magnetického pole, roztok byl odpipetován a v něm byla stanovena koncentrace proteinů BCA metodou. Na závěr byly částice 10x promyty pufr, pro porovnání byl použit pufr pro bromelain (K-Pi 0,1 mol.l⁻¹ pH 6,5, 0,3 mol.l⁻¹ KCl, 0,1 mol.l⁻¹ EDTA, 0,003 mol.l⁻¹ DTT) a K-Pi pufr (0,1 mol.l⁻¹, pH 7,0), aby byl odstraněn nenavázaný bromelain. Měření bylo prováděno ve třech opakováních.

3.3.3 Imobilizace bromelainu pomocí jodistanu

Do 2 ml mikrozkušavky bylo naváženo 100 mg magnetických mikročástic MG 100, k nim bylo napipetováno 2000 μl 0,05 mol.l^{-1} jodistanu sodného ve vodě. Směs byla protřepávána do dalšího dne pomocí automatického rotátoru v lednici při 4°C. Poté byly magnetické částice separovány pomocí magnetického pole, roztok byl odpipetován a částice byly 5x promyty pufr (K-Pi, 0,1 mol.l^{-1} , pH 8,0), aby byl odstraněn všechen nenavázaný jodistan. Následně bylo napipetováno 800 μl bromelainu v deionizované vodě (15 mg.ml^{-1}) a 800 μl pufru (K-Pi, 0,2 mol.l^{-1} , pH 8,0), kdy byly magnetické částice přidržovány u stěny pomocí magnetického pole kvůli adsorpci. Poté bylo odebráno 50 μl této směsi ke stanovení koncentrace proteinů BCA metodou. Směs byla protřepávána do dalšího dne pomocí automatického rotátoru v lednici při 4°C. Poté byly magnetické částice separovány pomocí magnetického pole, roztok byl odpipetován a v něm byla stanovena koncentrace proteinů BCA metodou. Na závěr byly částice 10x promyty pufr, pro porovnání byl použit pufr pro bromelain (K-Pi 0,1 mol.l^{-1} pH 6,5, 0,3 mol.l^{-1} KCl, 0,1 mol.l^{-1} EDTA, 0,003 mol.l^{-1} DTT) a K-Pi pufr (0,1 mol.l^{-1} , pH 7,0), aby byl odstraněn nenavázaný bromelain. Měření bylo prováděno ve třech opakováních. Schéma imobilizace enzymu pomocí jodistanu je znázorněno na Obr. 11.



Obr. 11 Imobilizace enzymu na magnetické částice pomocí jodistanu.

3.3.4 Stanovení aktivity bromelainu I

Aktivita bromelainu byla stanovena spektrofotometricky s použitím umělého substrátu BAPNA. Při hydrolýze tohoto substrátu se amidická vazba štěpí za vzniku aromatického aminu, žlutě zbarveného *p*-nitroanilinu (Erlanger *et al.*, 1961).

Aktivita volného bromelainu byla měřena v kyvetě, do které bylo napipetováno 1500 μl pufru (K-Pi 0,1 mol.l^{-1} pH 6,5, 0,3 mol.l^{-1} KCl, 0,1 mol.l^{-1} EDTA, 0,003 mol.l^{-1} DTT), 150 μl vody, 150 μl bromelainu (1 mg.ml^{-1}) v deionizované vodě (v případě blanku byla použita deionizovaná voda). Reakce byla startována přidáním 200 μl substrátu BAPNA v DMSO (0,05 mol.l^{-1}). Směs byla temperována 5 min ve vodní lázni na 30°C. Byla měřena absorbance po 10 s v délce 5 minut při $\lambda=405$ nm proti blanku. Měření bylo prováděno ve třech opakováních. Aktivita byla vypočítána ze vztahu:

$$\frac{\Delta n}{\Delta t} = \frac{\Delta A * V}{\Delta t * \epsilon * l}$$

kde $\Delta n/\Delta t$ je aktivita (kat), ΔA změna absorbance, Δt čas reakce (s), V celkový objem v kyvetě (l), ϵ molární absorpční koeficient (8270 $\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), l délka optické dráhy (cm).

3.3.5 Stanovení aktivity bromelainu II

Aktivita bromelainu byla stanovena spektrofotometricky s použitím hemoglobinového substrátu podle Ansona: 2 g hemoglobinu z hovězích erytrocytů a 9 g močoviny bylo rozpuštěno v deionizované vodě a bylo přidáno 8 ml 1 mol.l^{-1} NaOH, objem byl pak doplněn deionizovanou vodou na 100 ml a roztok se nechal hodinu stát při laboratorní teplotě, poté bylo přidáno 10 ml 1 mol.l^{-1} KH_2PO_4 a 4 g močoviny, roztok byl zfiltrován a hodnota pH byla upravena na 7,8. Proteasa má aktivitu, která se rovná 1 Ansonově jednotce, je-li hemoglobin štěpen rychlostí 1 mmol tyrosinu za minutu za standardních podmínek (Anson, 1938).

Při stanovení aktivity volného bromelainu bylo do 2 ml mikrozkušavky napipetováno 250 μl bromelainu (0,16 mg.ml^{-1}) v K-Pi pufru (0,1 mol.l^{-1} pH 7,0), v případě blanku pouze K-Pi pufr (0,1 mol.l^{-1} pH 7,0). Dále byl přidán 1 ml hemoglobinového substrátu, roztok byl inkubován 15 minut na třepačce s termostatem při teplotě 30°C. Po uplynutí časového intervalu byla reakce zastavena 0,5 ml 25% TCA a vzniklý precipitát byl odcentrifugován (10 min při 6000 g). 1 ml vzorku byl použit pro stanovení volného tyrosinu Hartree-Lowryho metodou. Aktivita volného bromelainu byla měřena v kyvetě při $\lambda=750$ nm proti blanku.

Aktivita volného bromelainu byla měřena v kyvetě při $\lambda=750$ nm proti blanku. Při stanovení aktivity bromelainu bylo k 100 mg částic s imobilizovaným bromelainem napipetováno 250 μ l pufru (K-Pi 0,1 mol.l⁻¹ pH 7,0), v případě blanku pouze pufr. Dále byl přidán 1 ml hemoglobinového substrátu, roztok byl inkubován 15 minut na třepačce s termostatem při teplotě 30°C. Poté byly magnetické částice separovány pomocí magnetického pole. Z roztoku byl odpipetován 1 ml, ten byl napipetován do 1,5 ml mikrozkušavky k 0,5 ml 25% TCA, čímž byla reakce zastavena. Vzniklý precipitát byl odcentrifugován (10 min při 6000 g). 1 ml vzorku byl použit pro stanovení volného tyrosinu Hartree-Lowryho metodou. Měření bylo prováděno ve třech opakováních.

3.3.6 Stanovení koncentrace proteinů pomocí BCA metody

Koncentrace proteinů byla stanovena spektrofotometricky s použitím kyseliny bicinchoninové. Tato metoda je založena na principu redukce peptidových vazeb tvořících komplex s měďnatými ionty na měďné ionty v alkalickém prostředí, kdy je vzniklý měďný ion chelatován kyselinou bicinchoninovou za vzniku červenofialového komplexu, který absorbuje světlo o $\lambda=562$ nm (Smith *et al.*, 1985).

Do zkumavky bylo napipetováno 20 μ l vzorku, 180 μ l destilované vody a 2 ml pracovního roztoku. Pracovní roztok byl připraven smísením roztoku A a B v poměru 50:1. Roztok A obsahoval 4,4'-dikarboxy-2,2'-bichinolin (dvojsodná sůl, konečná koncentrace 26 mmol.l⁻¹), uhličitan sodný (konečná koncentrace 0,16 mol.l⁻¹), hydroxid sodný (konečná koncentrace 0,1 mol.l⁻¹), vinan sodný (konečná koncentrace 7 mmol.l⁻¹), hydrogenuhličitan sodný (konečná koncentrace 0,11 mol.l⁻¹) a deionizovanou vodu. Roztok B obsahoval síran měďnatý (konečná koncentrace 16 mmol.l⁻¹) a deionizovanou vodu. Směs byla promíchána a inkubována 30 minut při 37°C, poté byla ochlazená na laboratorní teplotu. Byla změřena absorbance v kyvetě při $\lambda=562$ nm proti blanku (deionizovaná voda a pracovní roztok). Měření bylo prováděno ve třech opakováních. Pro sestavení kalibrační přímky byl jako standard použit BSA (koncentrace 0,1-1,0 mg.ml⁻¹).

3.3.7 Stanovení koncentrace proteinů pomocí Hartree-Lowryho metody

Koncentrace proteinů byla stanovena spektrofotometricky s použitím A a B Hartree-Lowryho reagensů. Tato metoda je založena na principu redukce peptidových vazeb tvořících komplex s měďnatými ionty na měďné ionty v alkalickém prostředí. Měďné ionty a zbytky tyrosinu, tryptofanu a cysteinu reagují s Folin-Ciocalteuovým činidlem

(polykyseliny fosfowolframové a fosfomolybdenové), které je redukováno za vzniku nestabilního modrého produktu absorbující světlo o $\lambda=750$ nm (Hartree, 1972).

Do zkumavky byl napipetován 1 ml vzorku, v případě blanku vzorek neobsahující bromelain. Dále byl přidán 1 ml činidla A: vinan sodno-draselný (konečná koncentrace 7 mmol.l^{-1}), uhličitan sodný (konečná koncentrace $0,81 \text{ mol.l}^{-1}$), hydroxid sodný (konečná koncentrace $0,5 \text{ mol.l}^{-1}$), deionizovaná voda. Směs byla promíchána na vortexu a inkubována 10 min, poté bylo přidáno 0,5 ml činidla B: vinan sodno-draselný (konečná koncentrace $0,07 \text{ mol.l}^{-1}$), síran měďnatý (konečná koncentrace $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$), hydroxid sodný (1 mol.l^{-1}), deionizovaná voda. Roztok C byl připraven zředěním 1 objemu Folin-Ciocalteu činidla 15 objemy deionizované vody. Směs byla rychle promíchána na vortexu a po 30 min inkubace byla změřena absorbance v kvyetě při $\lambda=750$ nm proti blanku. Měření bylo prováděno ve třech opakováních. Pro sestrojení kalibrační přímky byl jako standard použit tyrosin ($2-20 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$).

3.3.8 Stanovení koncentrace proteinů pomocí metody Bradfordové

Koncentrace proteinů byla stanovena spektrofotometricky s použitím metody Bradfordové, kdy se Coomassie barvivo váže na proteinové molekuly v kyselém prostředí (trifenylmethanová skupina na nepolární části proteinů a anion sulfoskupiny na vedlejší řetězce aminokyselin nesoucí kladný náboj, např. Arg a Lys). Po navázání barviva na proteiny dochází ke změně zbarvení, které je úměrné množství proteinu. Absorpční maximum se posunuje z 465 na 595 nm (Bradford, 1976).

Stanovení bylo prováděno na mikrodestičkovém readru v 96 jamkových mikrodestičkách. Do jednotlivých jamek bylo napipetováno 45 μl deionizované vody, 5 μl vzorku proteinu nebo standardu BSA (koncentrace $0,1-1,0 \text{ mg.ml}^{-1}$) a 200 μl pracovního činidla Bradfordové ($0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ Coomassie Brilliant Blue G250, $0,25 \text{ mol.l}^{-1}$ methanol, $0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ 85% kyselina fosforečná, roztok byl připraven naředěním 1:4 deionizovanou vodou). Jako blank byla použita deionizovaná voda s činidlem Bradfordové. Destička byla mírně protřepána, po 5 minutové inkubaci byla proměřena absorbance při 595 nm. Měření bylo prováděno ve třech opakováních.

3.3.9 Stanovení vazebné kapacity imobilizovaného bromelainu

Vazebná kapacita bromelainu byla stanovena spektrofotometricky BCA metodou, kdy bylo porovnáno množství proteinu ve vzorku před a po imobilizaci na magnetické mikročástice (MG DEAE 100, CM MG 100, MG 100). Měření bylo prováděno v kvyetě

ve třech opakováních. Množství navázaného bromelainu na magnetické mikročástice bylo vypočítáno pomocí vztahu:

$$\text{vazebná kapacita} = \frac{c_p * V_p - c_x * V_x}{m}$$

kde c_p je koncentrace proteinů (mg.ml^{-1}) před imobilizací a c_x po imobilizaci, objem roztoku (ml) před imobilizací je V_p a po imobilizaci V_x a m (mg) je hmotnost nosiče. Vazebná kapacita byla vyjádřena v hmotnostním množství imobilizovaného bromelainu na hmotnostní jednotku nosiče ($\text{mg bromelainu.mg}^{-1}$ mikročastic).

Byla stanovena účinnost imobilizace (EI, %), která určila, která z použitých metod imobilizace byla nejúčinnější. Aktivita byla stanovena spektrofotometricky v kyvetě změřením aktivity bromelainu metodou I i II. EI byla vypočítána ze vztahu:

$$EI = \left(\frac{A_x}{A_p - A_y} \right) * 100$$

kdy A_x je aktivita navázaného bromelainu na nosič, A_p aktivita přidaného bromelainu do směsi, A_y zbytková aktivita v supernatantu po imobilizaci.

3.3.10 Stanovení specifické aktivity

Specifická aktivita enzymu je aktivita v daném objemu vztažená na obsah proteinu ve vzorku. Specifická aktivita volného bromelainu ($1,0 \text{ mg.ml}^{-1}$) byla stanovena spektrofotometricky v kyvetě změřením aktivity bromelainu metodou II a obsahu proteinů ve vzorku BCA metodou, specifická aktivita imobilizovaného bromelainu (100 mg DEAE MG 100, CM MG 100, MG 100 mikročastic) byla stanovena stejně jako u volného bromelainu. V případě imobilizovaného bromelainu je specifická aktivita vztažena na 1 mg mikročastic. Specifická aktivita byla vyjádřena v nkat.mg^{-1} a v Ansonových jednotkách mg^{-1} ($\text{mmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) (Anson, 1938). Měření bylo prováděno v kyvetě ve třech opakováních.

3.3.11 Stanovení teplotní stability volného a imobilizovaného bromelainu

Vzorky volného bromelainu ($0,16 \text{ mg.ml}^{-1}$) v K-Pi pufru ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 7) a 50 mg magnetických mikročastic (CM MG 100) s imobilizovaným bromelainem v K-Pi pufru ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 7) byly inkubovány při teplotách 25°C , 30°C , 35°C , 40°C , 45°C , 50°C , 55°C , 60°C , 65°C , 70°C , 75°C a 80°C po dobu 30 min. Po inkubaci byly roztoky ochlazeny v ledové lázni. Magnetické mikročástice byly separovány pomocí magnetického pole a směs byla odpipetována. Pro určení zbytkové aktivity volného a imobilizovaného bromelainu byla použita metoda stanovení aktivity bromelainu II.

Nejvyšší aktivita u volného a imobilizovaného bromelainu byla označena jako 100 %. Pro srovnání teplotní stability volného a imobilizovaného bromelainu byla určena hodnota T_{50} , což je teplota, při které si enzym zachovává poloviční aktivitu oproti nejvyšší stanovené aktivitě. Měření bylo prováděno ve třech opakováních.

3.3.12 Stanovení závislosti aktivity volného a imobilizovaného bromelainu na pH v McIlvainově pufru

Vzorky volného ($0,16 \text{ mg.ml}^{-1}$) a imobilizovaného bromelainu na mikročasticích (50 mg CM MG 100) byly inkubovány v McIlvainově pufru (hydrogenfosforečnan sodný, kyselina citronová) při pH 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 a 6,0 po dobu 30 min. Poté byla měřena aktivita volného a imobilizovaného bromelainu v daném pufru metodou stanovení aktivity bromelainu II. Nejvyšší aktivita u volného i imobilizovaného bromelainu byla označena jako 100 %. Měření bylo prováděno ve třech opakováních.

3.3.13 Stanovení závislosti aktivity volného a imobilizovaného bromelainu na pH v K-Pi pufru

Vzorky volného ($0,16 \text{ mg.ml}^{-1}$) a imobilizovaného bromelainu na mikročasticích (50 mg CM MG 100) byly inkubovány v K-Pi pufru při pH 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 a 8,0 po dobu 30 min. Poté byla měřena aktivita volného a imobilizovaného bromelainu v daném pufru metodou stanovení aktivity bromelainu II. Nejvyšší aktivita u volného i imobilizovaného bromelainu byla označena jako 100 %. Měření bylo prováděno ve třech opakováních.

3.3.14 Stanovení závislosti aktivity volného a imobilizovaného bromelainu na pH v Tris-HCl pufru

Vzorky volného ($0,16 \text{ mg.ml}^{-1}$) a imobilizovaného bromelainu na mikročasticích (50 mg CM MG 100) byly inkubovány v Tris-HCl pufru při pH 7,0, 7,5, 8,0, 8,2, 8,4, 8,6 a 8,9 po dobu 30 min. Poté byla měřena aktivita volného a imobilizovaného bromelainu v daném pufru metodou stanovení aktivity bromelainu II. Nejvyšší aktivita u volného i imobilizovaného bromelainu byla označena jako 100 %. Měření bylo prováděno ve třech opakováních.

3.3.15 Stanovení operační stability imobilizovaného bromelainu

Za účelem stanovení operační stability imobilizovaného bromelainu byla změřena jeho zbytková aktivita v každém cyklu. K 50 mg magnetických částic (CM MG 100) s imobilizovaným bromelainem bylo napipetováno 250 μl K-Pi pufru ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 7)

a byla změřena aktivita imobilizovaného bromelainu metodou stanovení aktivity bromelainu II. Poté byly mikročástice 10x promyty K-Pi pufrům (0,1 mol.l⁻¹, pH 7). Mikročástice byly použity pro další cyklus stanovení aktivity, které probíhalo stejným způsobem. Takto bylo provedeno deset měření. Aktivita bromelainu po prvním měření byla označena jako 100 %. Měření bylo prováděno ve třech opakováních.

3.3.16 Stanovení funkční stability volného a imobilizovaného bromelainu při laboratorní teplotě

Byla stanovena funkční stabilita volného a imobilizovaného bromelainu na magnetických mikročásticích (50 mg CM MG 100) při laboratorní teplotě v K-Pi pufru (0,1 mol.l⁻¹, pH 7). U 250 µl volného bromelainu (0,16 mg.ml⁻¹) v K-Pi pufru (0,1 mol.l⁻¹, pH 7) a mikročástic s imobilizovaným bromelainem s 250 µl K-Pi pufru (0,1 mol.l⁻¹, pH 7) byla změřena aktivita bromelainu metodou stanovení aktivity bromelainu II. Dále byla změřena aktivita po dalších 2, 4, 6, 24, 28 a 72 hod skladování při laboratorní teplotě. Počáteční aktivita bromelainu byla určena jako 100 %. Pro srovnání funkční stability volného a imobilizovaného bromelainu byla určena hodnota t₅₀, což je čas, za který si enzym zachová poloviční aktivitu oproti počáteční naměřené aktivitě. Měření bylo prováděno ve třech opakováních.

3.3.17 Stanovení stability volného a imobilizovaného bromelainu při skladování

Byla stanovena stabilita volného a imobilizovaného bromelainu na magnetických mikročásticích (50 mg CM MG 100) při skladování v lednici při 4°C v K-Pi pufru (0,1 mol.l⁻¹, pH 7). U 250 µl volného bromelainu (0,16 mg.ml⁻¹) v K-Pi pufru (0,1 mol.l⁻¹, pH 7) a mikročástic s imobilizovaným bromelainem s 250 µl K-Pi pufru (0,1 mol.l⁻¹, pH 7) byla změřena aktivita bromelainu metodou stanovení aktivity bromelainu II. Dále byla změřena aktivita po 3, 5, 7, 9, 12, 15, 18, 25, 32, 39, 46, 53 a 60 dnech skladování v lednici při teplotě 4°C. Počáteční aktivita bromelainu byla určena jako 100 %. Pro srovnání funkční stability volného a imobilizovaného bromelainu byla určena hodnota t₅₀, což je čas, za který si enzym zachová poloviční aktivitu oproti počáteční naměřené aktivitě. Měření bylo prováděno ve třech opakováních.

3.3.18 Stanovení Michaelisovy konstanty K_m

Ke stanovení Michaelisovy konstanty K_m byl použit hemoglobinový substrát podle Ansona s různým množstvím hemoglobinu (0,8, 1,0, 1,33, 2,0 a 4,0 g na 110 ml). Stanovení u volného (0,16 mg.ml⁻¹) i imobilizovaného bromelainu na 50 mg

mikročástic (CM MG 100) probíhalo stejným způsobem jako metoda stanovení aktivity bromelainu II, kdy byla spektrofotometricky změřena absorbance barevného produktu v kyvetě. Hodnoty byly použity k sestavení Lineweaver-Burkova grafu závislosti $1/\Delta A$ (změna absorbance) na $1/[S]$ (koncentrace substrátu), z jehož rovnice byla vypočítána Michaelisova konstanta. Měření bylo prováděno ve třech opakováních.

3.3.19 Vliv imobilizovaného bromelainu na množství proteinů ve vinném pufru

Množství proteinů ve vinném pufru bylo stanoveno spektrofotometricky na 96 jamkové destičce pomocí metody Bradfordové. Do 5 ml mikrozkuvek s imobilizovaným bromelainem (50 mg CM MG 100 mikročastic) bylo napipetováno 5 ml vinného pufru ($0,03 \text{ mol.l}^{-1}$ kyselina vinná/vinan sodný, 12% ethanol, deionizovaná voda, pH 3,2) s BSA jako modelovým proteinem (0,5, 1,0, 2,0 mg.ml^{-1}), do dalších mikrozkuvek s imobilizovaným bromelainem (50 mg CM MG 100 mikročastic) bylo napipetováno 5 ml vinného pufru s cysteinem jako aktivátorem ($0,03 \text{ mol.l}^{-1}$ kyselina vinná/vinan sodný, 5 mmol.l^{-1} cystein, 12% ethanol, deionizovaná voda, pH 3,2) s BSA jako modelovým proteinem (0,5, 1,0, 2,0 mg.ml^{-1}). Ve směsích byla stanovena počáteční koncentrace proteinů při $\lambda=595 \text{ nm}$ proti blanku (deionizovaná voda a pracovní roztok), poté byly směsi protřepávány pomocí automatického rotátoru v lednici při 4°C . Po 4 hodinách bylo změřeno množství proteinů, směsi byly opět protřepávány pomocí automatického rotátoru v lednici při 4°C . Po 24 hodinách bylo změřeno množství proteinů. Měření bylo prováděno ve třech opakováních.

3.3.20 Vliv imobilizovaného bromelainu na množství proteinů ve víně

Množství proteinů ve víně bylo stanoveno spektrofotometricky na 96 jamkové destičce pomocí metody Bradfordové. Do 5 ml mikrozkuvek s imobilizovaným bromelainem (50 mg CM MG 100 mikročastic) bylo napipetováno 5 ml vína 1 (pH 3,37), do dalších mikrozkuvek s imobilizovaným bromelainem (50 mg CM MG 100 mikročastic) bylo napipetováno 5 ml vína 2 (pH 3,54). Ve směsích byla stanovena počáteční koncentrace proteinů při $\lambda=595 \text{ nm}$ proti blanku (deionizovaná vody a pracovní roztok), poté byly směsi protřepávány pomocí automatického rotátoru v lednici při 4°C . Po 4 hodinách bylo změřeno množství proteinů, směsi byly opět protřepávány pomocí automatického rotátoru v lednici při 4°C . Po 24 hodinách bylo změřeno množství proteinů. Měření bylo prováděno ve třech opakováních.

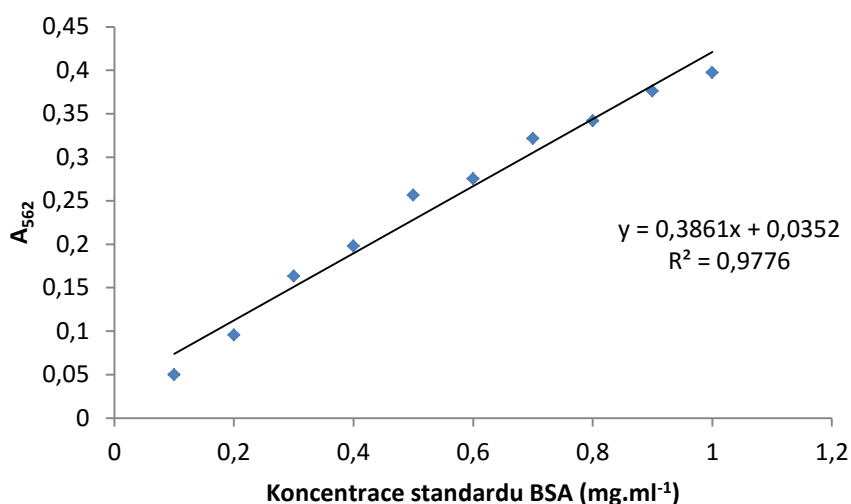
3.3.21 Vliv imobilizovaného bromelainu na zákal proteinů v modelovém víně

Změřením optické hustoty (OD) při $\lambda=600$ nm byl v kyvetě spektrofotometricky stanoven pokles zákalu v modelovém víně ovlivněný působením imobilizovaného bromelainu. Do 5 ml mikrokumavek s imobilizovaným bromelainem (50 mg CM MG 100 mikročástic) bylo napipetováno 5 ml vína 1 (pH 3,37), popř. vína 2 (pH 3,54), s BSA jako modelovým proteinem (0,5, 1,0, 2,0 mg.ml⁻¹). Ve směsích byla stanovena počáteční optická hustota proti blanku (modelové víno), poté byly směsi protřepávány pomocí automatického rotátoru v lednici při 4°C. Po 4 hodinách byla změřena optická hustota směsi. Směsi byly opět protřepávány pomocí automatického rotátoru v lednici při 4°C. Po 24 hodinách byla opět změřena optická hustota směsi. Měření bylo prováděno ve třech opakováních.

4 VÝSLEDKY

4.1 Stanovení koncentrace proteinů pomocí BCA metody

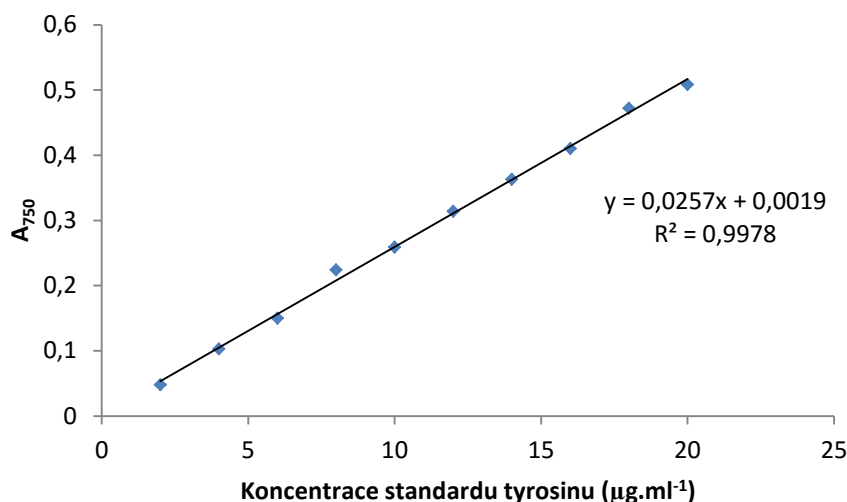
Celková koncentrace proteinů byla stanovena spektrofotometricky pomocí BCA metody při $\lambda=562$ nm proti blanku (deionizovaná voda a pracovní roztok). Ze závislosti absorbance a příslušných hodnot standardu BSA (koncentrace 0,1-1,0 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) byla sestrojena kalibrační přímka (Obr. 12). Z rovnice regrese byly poté stanoveny koncentrace proteinů ve vzorcích.



Obr. 12 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace proteinů pomocí metody BCA. Byly použity standardy BSA o koncentracích 0,1-1,0 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Absorbance byla měřena spektrofotometricky při $\lambda=562$ nm.

4.2 Stanovení koncentrace proteinů pomocí Hartree-Lowryho metody

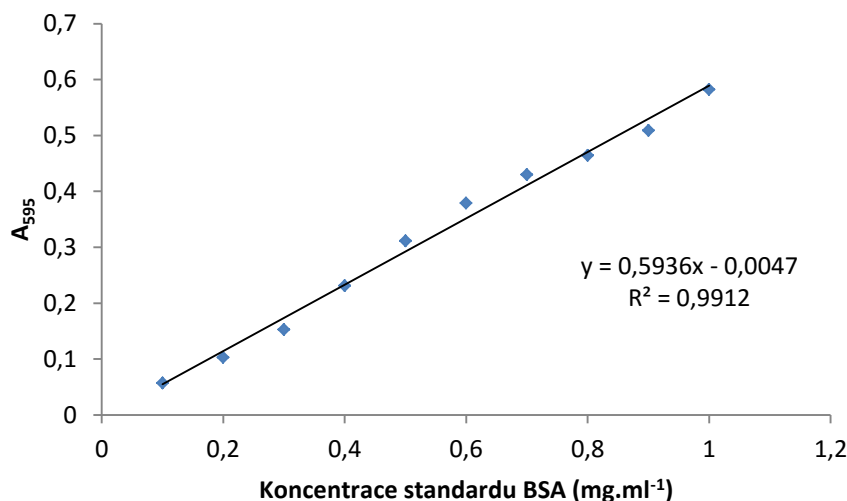
Celková koncentrace proteinů byla stanovena spektrofotometricky pomocí Hartree-Lowryho metody při $\lambda=750$ nm proti blanku (vzorek neobsahující bromelain, roztok A, roztok B). Ze závislosti absorbance a příslušných hodnot standardu tyrosinu (koncentrace 2-20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) byla sestrojena kalibrační přímka (Obr. 13). Z rovnice regrese byly poté stanoveny koncentrace proteinů ve vzorcích.



Obr. 13 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace proteinů pomocí Hartree-Lowryho metody. Byly použity standardy tyrosinu o koncentracích 2-20 µg.ml⁻¹. Absorbance byla měřena spektrofotometricky při λ=750 nm.

4.3 Stanovení koncentrace proteinů pomocí metody Bradfordové

Celková koncentrace proteinů byla stanovena spektrofotometricky pomocí metody Bradfordové při λ=595 nm proti blanku (deionizovaná voda a pracovní roztok). Ze závislosti absorbance a příslušných hodnot standardu BSA (koncentrace 0,1-1,0 mg.ml⁻¹) byla sestrojena kalibrační přímka (Obr. 14). Z rovnice regrese byly poté stanoveny koncentrace proteinů ve vzorcích.



Obr. 14 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace proteinů pomocí metody Bradfordové. Byly použity standardy BSA o koncentracích 0,1-1,0 mg.ml⁻¹. Absorbance byla měřena spektrofotometricky při λ=595 nm.

4.4 Stanovení vazebné kapacity imobilizovaného bromelainu

Bromelain byl imobilizován na mikročástice DEAE MG 100 pomocí glutaraldehydu, na CM MG 100 pomocí karbodiimidu a na MG 100 pomocí jodistanu. Pro promývání částic byl pro porovnání použit pufr pro bromelain (K-Pi 0,1 mol.l⁻¹ pH 6,5, 0,3 mol.l⁻¹ KCl, 0,1 mol.l⁻¹ EDTA, 0,003 mol.l⁻¹ DTT) a K-Pi pufr (0,1 mol.l⁻¹, pH 7,0). Při promývání pufr pro bromelain došlo k zakalení směsi, proto byl v dalších měřeních použit pouze K-Pi pufr (0,1 mol.l⁻¹, pH 7,0). Po imobilizaci bromelainu byla stanovena celková koncentrace proteinů před a po imobilizaci BCA metodou. Z rovnice lineární regrese kalibrační přímky bylo stanoveno množství proteinů ve vzorku. U DEAE MG 100 částic byla koncentrace proteinů před imobilizací 0,565 mg.ml⁻¹ a po 0,655 mg.ml⁻¹, u CM MG 100 částic před imobilizací 1,25 mg.ml⁻¹ a po 0,855 mg.ml⁻¹, u MG 100 částic před imobilizací 0,761 mg.ml⁻¹ a po 0,509 mg.ml⁻¹. Objem roztoku byl před i po imobilizaci 1,6 ml, hmotnost nosiče byla ve všech případech 100 mg. Vazebná kapacita byla stanovena rozdílem koncentrací před a po imobilizaci bromelainu na 1 mg mikročástic. Také byla stanovena účinnost imobilizace (%). Ta určila, která z použitých metod imobilizace byla tou nejúčinnější. V Tab. 9 jsou uvedeny jednotlivé vazebné kapacity částic a % účinnosti imobilizace bromelainu.

Tab. 9 Stanovení vazebné kapacity imobilizovaného bromelainu (na DEAE MG 100 mikročásticích glutaraldehydovou metodou, na CM MG 100 mikročásticích karbodiimidovou metodou, na MG 100 mikročásticích jodistanovou metodou) BCA metodou a stanovení účinnosti imobilizace bromelainu na různých částicích metodou stanovení aktivity II s hemoglobinovým substrátem podle Ansona. Koncentrace proteinů byla měřena spektrofotometricky při $\lambda=562$ nm, aktivita byla měřena spektrofotometricky při $\lambda=750$ nm.

Typ mikročástic	Vazebná kapacita (mg.mg ⁻¹)	Účinnost imobilizace (%)
DEAE MG 100	0,00	0,00
CM MG 100	$63,30 \cdot 10^{-3} \pm 6,49 \cdot 10^{-3}$	$31,64 \pm 1,68$
MG 100	$40,30 \cdot 10^{-3} \pm 4,23 \cdot 10^{-3}$	0,00

Při stanovení aktivity bromelainu metodou I nebyla zjištěna žádná aktivita. U DEAE MG 100 mikročástic se imobilizace bromelainu nezdařila, u MG 100 mikročástic byla vazebná kapacita $40,30 \cdot 10^{-3} \pm 4,23 \cdot 10^{-3}$ mg.mg⁻¹, ale navázaný bromelain byl neaktivní. U CM MG 100 mikročástic byla vazebná kapacita $63,30 \cdot 10^{-3} \pm 6,49 \cdot 10^{-3}$ mg.mg⁻¹ a účinnost imobilizace 32 %, proto byly pro další měření použity CM MG 100 mikročástice.

4.5 Stanovení specifické aktivity

Specifická aktivita u volného bromelainu byla stanovena po změření aktivity bromelainu pomocí metody I a II a obsahu proteinů ve vzorku BCA metodou. V případě imobilizovaného bromelainu byla specifická aktivita vztažena na 1 mg částic (v případě imobilizace pomocí glutaraldehydu na DEAE MG 100, pomocí karbodiimidu na CM MG 100 a pomocí jodistanu na MG 100). V Tab. 10 jsou uvedeny hodnoty specifické aktivity volného a imobilizovaného bromelainu.

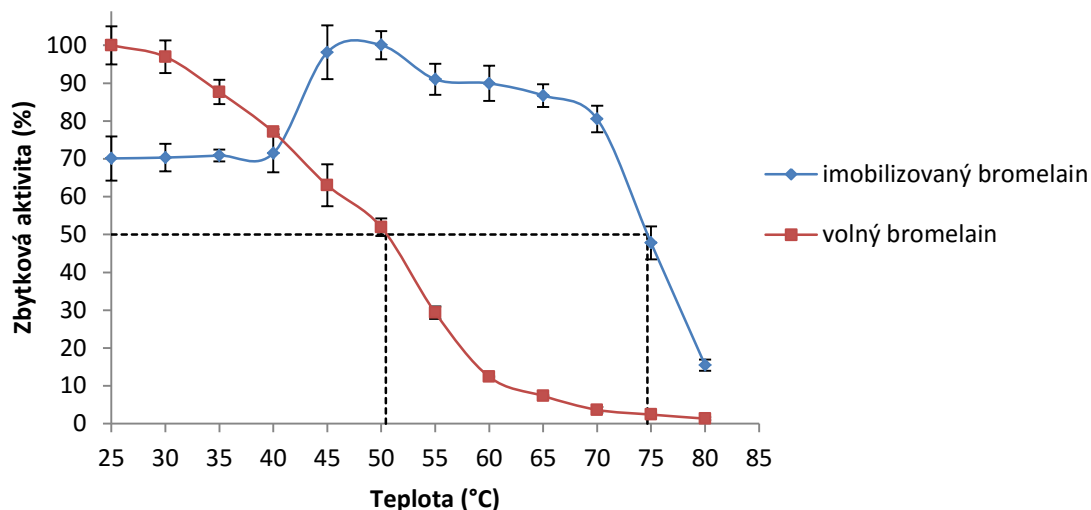
Tab. 10 Stanovení specifické aktivity volného a imobilizovaného bromelainu (na DEAE MG 100 mikročasticích glutaraldehydovou metodou, na CM MG 100 mikročasticích karbodiimidovou metodou, na MG 100 mikročasticích jodistanovou metodou) pomocí metody stanovení aktivity bromelainu II s hemoglobinovým substrátem podle Ansona a koncentrace proteinů BCA metodou. Koncentrace proteinů byla měřena spektrofotometricky při $\lambda=562$ nm, aktivita byla měřena spektrofotometricky při $\lambda=750$ nm.

	Specifická aktivita (nkat.mg ⁻¹)	Specifická aktivita (mmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)
Volný bromelain	154,91	92,95.10 ⁻⁴
Bromelain na DEAE MG 100	0,00	0,00
Bromelain na CM MG 100	0,00	0,00
Bromelain na MG 100	2,25	1,36.10 ⁻⁴

Specifická aktivita volného bromelainu byla 154,91 nkat.mg⁻¹ proteinů, u imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 mikročastice 2,25 nkat.mg⁻¹ částic.

4.6 Stanovení teplotní stability volného a imobilizovaného bromelainu

Při aplikaci v průmyslu a lékařství jsou na enzymy kladeny nároky na určitou termostabilitu; při vyšších teplotách může reakce probíhat rychleji a tím se dosáhne většího výtěžku. Proto byla stanovena teplotní stabilita volného a imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 mikročasticích v rozmezí teplot 25–80°C v K-Pi pufru (0,1 mol.l⁻¹, pH 7) po 30 min inkubaci (Obr. 15). Aktivita byla stanovena spektrofotometricky metodou stanovení aktivity bromelainu II. Pro srovnání teplotní stability volného a imobilizovaného bromelainu byla z grafu závislosti zbytkové aktivity (%) na teplotě inkubace (°C) určena hodnota T₅₀ (Tab. 11).



Obr. 15 Graf závislosti aktivity volného a imobilizovaného bromelainu na mikročástečích CM MG 100 na teplotě inkubace (25-80°C). Měření bylo prováděno spektrofotometricky při $\lambda=750$ nm po 30 min inkubaci v prostředí K-Pi pufru ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 7).

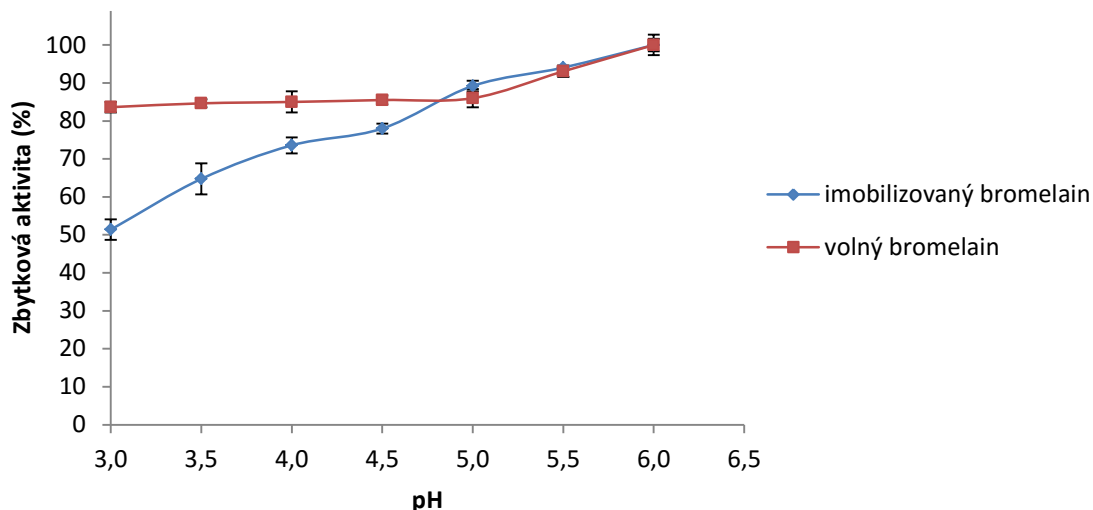
Tab. 11 Hodnoty T_{50} volného a imobilizovaného bromelainu na mikročástečích CM MG 100, po 30 minut inkubaci při teplotách 25-80°C v K-Pi pufru ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 7). Měření bylo prováděno spektrofotometricky při $\lambda=750$ nm.

	T_{50} (°C)
Volný bromelain	50,4
Imobilizovaný bromelain	74,7

Optimální teplota volného bromelainu byla 25°C a imobilizovaného bromelainu 45-50°C. Hodnota T_{50} se imobilizací 1,5x zvýšila.

4.7 Stanovení závislosti aktivity volného a imobilizovaného bromelainu na pH v McIlvainově pufru

Byla stanovena závislost aktivity volného a imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 mikročástečích na pH v McIlvainově pufru (pH 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 a 6,0) po 30 min inkubaci. Aktivita byla stanovena spektrofotometricky metodou stanovení aktivity bromelainu II. Porovnání aktivit volného a imobilizovaného bromelainu v závislosti na pH je zobrazeno na Obr. 16.

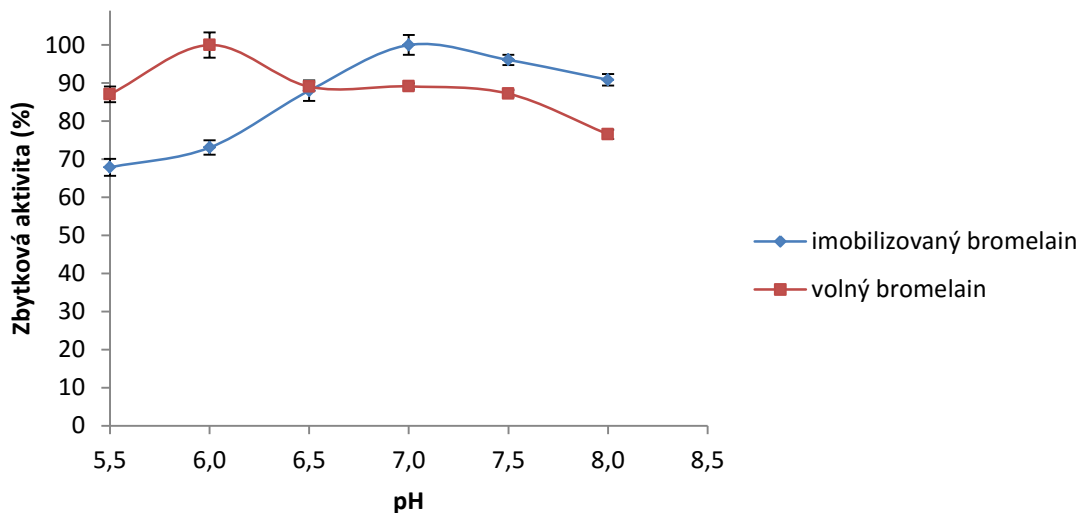


Obr. 16 Graf závislosti aktivity volného a imobilizovaného bromelainu na mikročasticích CM MG 100 na pH v McIlvainově pufru. Rozsah pH byl od 3,0 do 6,0. Měření bylo prováděno spektrofotometricky při $\lambda=750$ nm po 30 min inkubaci.

Optimální pH volného i imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 mikročasticích bylo v McIlvainově pufru 6. V kyselém prostředí je imobilizovaný bromelain méně aktivní než volný.

4.8 Stanovení závislosti aktivity volného a imobilizovaného bromelainu na pH v K-Pi pufru

Byla stanovena závislost aktivity volného a imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 mikročasticích na pH v K-Pi pufru (pH 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0) po 30 min inkubaci. Aktivita byla stanovena spektrofotometricky metodou stanovení aktivity bromelainu II. Porovnání aktivit volného a imobilizovaného bromelainu v závislosti na pH je zobrazeno na Obr. 17.

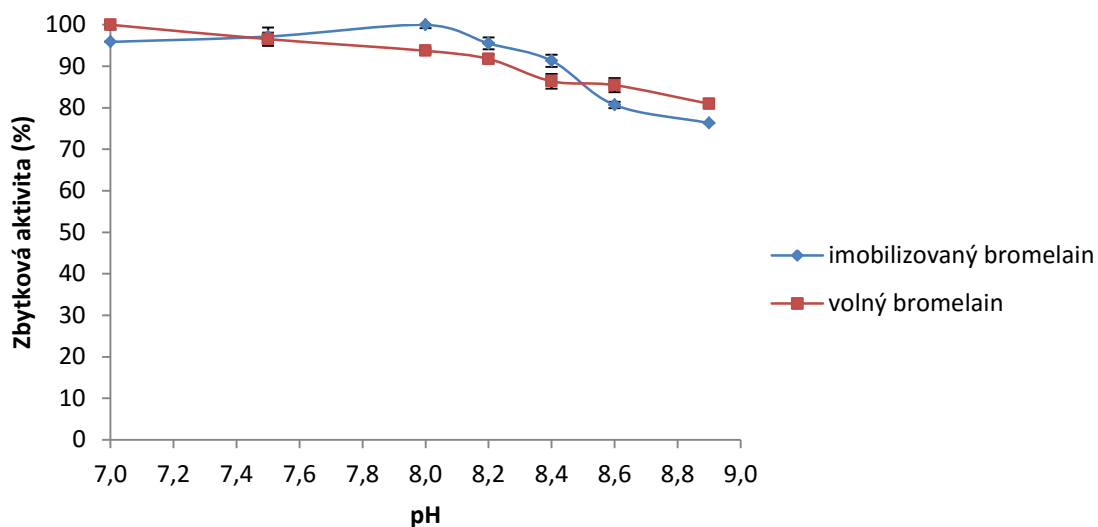


Obr. 17 Graf závislosti aktivity volného a imobilizovaného bromelainu na mikročasticích CM MG 100 na pH v K-Pi pufru. Rozsah pH byl od 5,5 do 8,0. Měření bylo prováděno spektrofotometricky při $\lambda=750$ nm po 30 min inkubaci.

Optimální pH volného bromelainu v K-Pi pufru bylo 6, imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 mikročasticích 7. V kyselém prostředí je aktivita imobilizovaného bromelainu nižší.

4.9 Stanovení závislosti aktivity volného a imobilizovaného bromelainu v Tris-HCl pufru

Byla stanovena závislost aktivity volného a imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 mikročasticích na pH v Tris-HCl pufru (pH 7,0, 7,5, 8,0, 8,2, 8,4, 8,6, 8,9) po 30 min inkubaci. Aktivita byla stanovena spektrofotometricky metodou stanovení aktivity bromelainu II. Porovnání aktivit volného a imobilizovaného bromelainu v závislosti na pH je zobrazeno na Obr. 18.

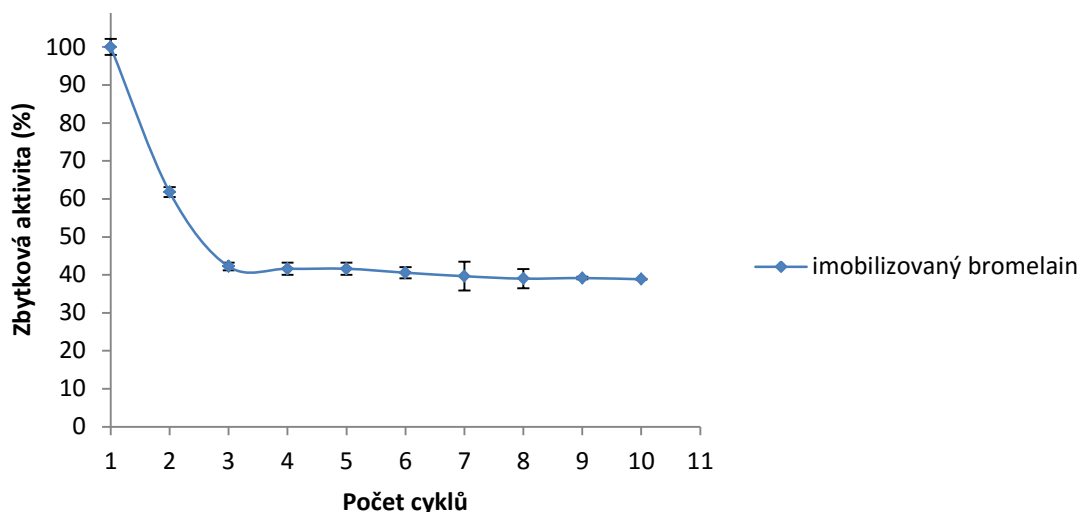


Obr. 18 Graf závislosti aktivity volného a imobilizovaného bromelainu na mikročasticích CM MG 100 na pH v Tris-HCl pufru. Rozsah pH byl od 7,0 do 8,9. Měření bylo prováděno spektrofotometricky po 30 min inkubaci při $\lambda=750$ nm.

Optimální pH volného bromelainu v K-Pi pufru bylo 7, imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 mikročasticích 8.

4.10 Stanovení operační stability imobilizovaného bromelainu

Opakovatelné použití enzymů je důležité převážně ve vsádkových reaktorech. Proto byla stanovena operační stabilita imobilizovaného bromelainu v prostředí K-Pi pufru ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 7) po každém cyklu (celkem 10 cyklů). Aktivita byla stanovena spektrofotometricky metodou stanovení aktivity bromelainu II. Závislost zbytkové aktivity imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 mikročasticích na počtu cyklů je zobrazena na Obr. 19.

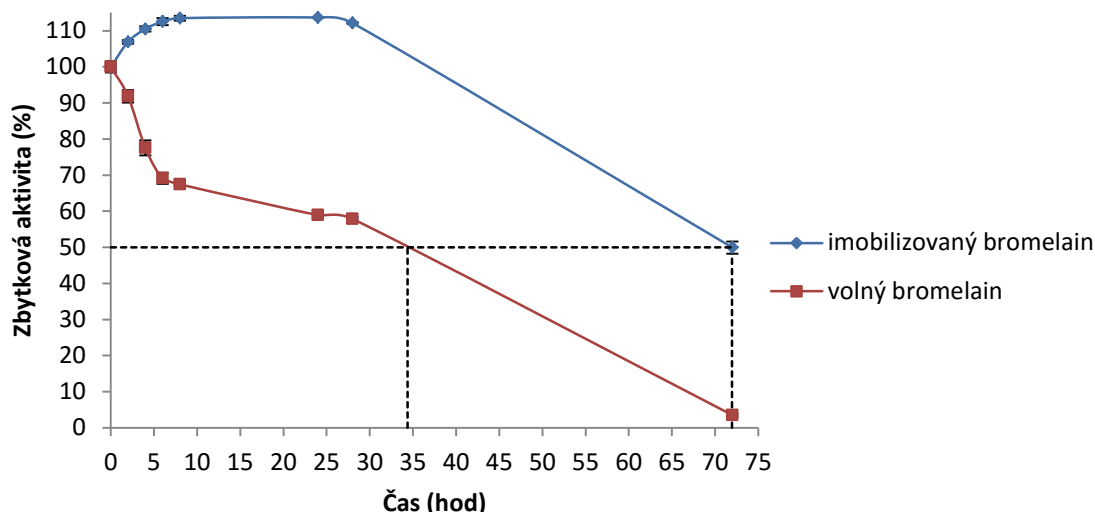


Obr. 19 Graf závislosti operační stability imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 mikročástečích na počtu provedených cyklů (celkem 10 cyklů). Měření bylo prováděno spektrofotometricky při $\lambda=750$ nm v prostředí K-Pi pufru ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 7).

Aktivita imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 mikročástečích klesla po 3. cyklu o 60 %, po dalších cyklech však už dále neklesala.

4.11 Stanovení funkční stability volného a imobilizovaného bromelainu při laboratorní teplotě

Funkční stabilita enzymů v roztocích se postupem času může snižovat. Proto byla stanovena funkční stabilita volného a imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 mikročástečích při laboratorní teplotě v prostředí K-Pi pufru ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 7). Aktivita byla stanovena spektrofotometricky metodou stanovení aktivity bromelainu II ihned, dále po 2, 4, 6, 8, 24, 28 a 72 hod. Stanovení funkční stability volného a imobilizovaného bromelainu při laboratorní teplotě je zobrazeno na Obr. 20. Pro srovnání funkční stability volného a imobilizovaného bromelainu byla z grafu závislosti zbytkové aktivity (%) na čase (hod) určena hodnota t_{50} (Tab. 12).



Obr. 20 Graf závislosti funkční stability volného a imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 mikročasticích na čase (hod) při laboratorní teplotě. Měření bylo prováděno spektrofotometricky při $\lambda=750$ nm v prostředí K-Pi pufru ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 7) ihned, dále po 2, 4, 6, 8, 24, 28 a 72 hod.

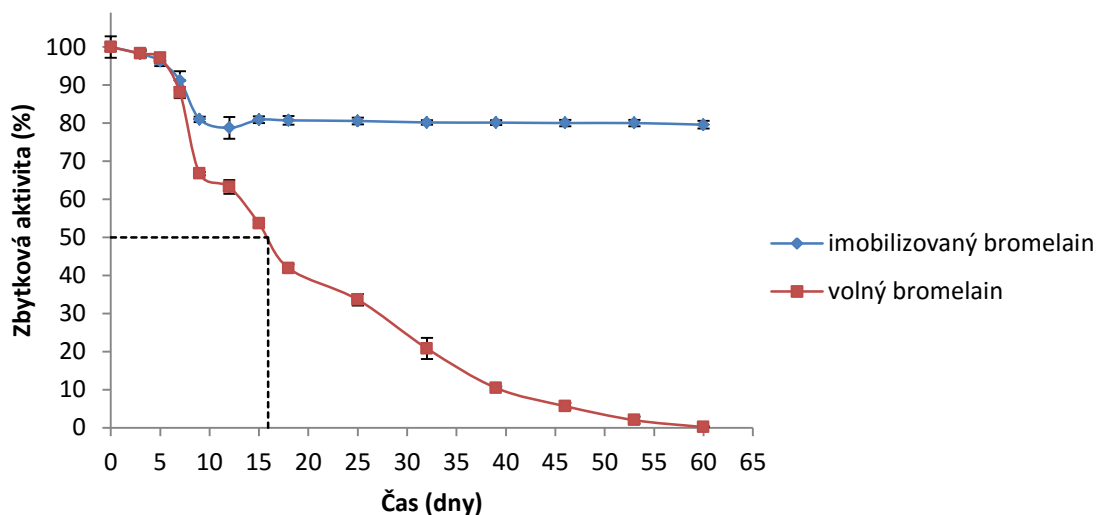
Tab. 12 Hodnoty t_{50} volného a imobilizovaného bromelainu na mikročasticích MG CM 100, po 72 hod inkubaci v K-Pi pufru ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 7) při laboratorní teplotě. Měření bylo prováděno spektrofotometricky při $\lambda=750$ nm ihned, dále po 2, 4, 6, 8, 24, 28 a 72 hod.

	t_{50} (hod)
Volný bromelain	34,4
Imobilizovaný bromelain	72,0

Volný bromelain byl po 72 hodinách téměř neaktivní, naproti tomu se aktivita imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 mikročasticích snížila pouze o 50 %. Hodnota t_{50} se imobilizací 2,1x zvýšila.

4.12 Stanovení stability volné a imobilizovaného bromelainu při skladování

Byla stanovena stabilita volného a imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 mikročasticích při skladování ve 4°C v prostředí K-Pi pufru ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 7). Aktivita byla stanovena spektrofotometricky metodou stanovení aktivity bromelainu II ihned, dále po 3, 5, 7, 9, 12, 15, 18, 25, 32, 39, 46, 53 a 60 dnech skladování v lednici. Stanovení funkční stability volného a imobilizovaného bromelainu při skladování ve 4°C je zobrazeno na Obr. 21. Pro srovnání stability volného a imobilizovaného bromelainu byla z grafu závislosti zbytkové aktivity (%) na čase (dny) určena hodnota t_{50} (Tab. 13).



Obr. 21 Graf závislosti funkční stability volného a imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 mikročástečích na čase (dny) při skladování v lednici. Měření bylo prováděno spektrofotometricky při $\lambda=750$ nm v prostředí K-Pi pufru ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 7) ihned, dále po 3, 5, 7, 9, 12, 15, 18, 25, 32, 39, 46, 53 a 60 dnech.

Tab. 13 Hodnoty t_{50} volného a imobilizovaného bromelainu na mikročástečích MG CM 100, po 60 dnech inkubace v K-Pi pufru ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 7) při skladování v lednici. Měření bylo prováděno spektrofotometricky při $\lambda=750$ nm ihned, dále po 3, 5, 7, 9, 12, 15, 18, 25, 32, 39, 46, 53 a 60 dnech.

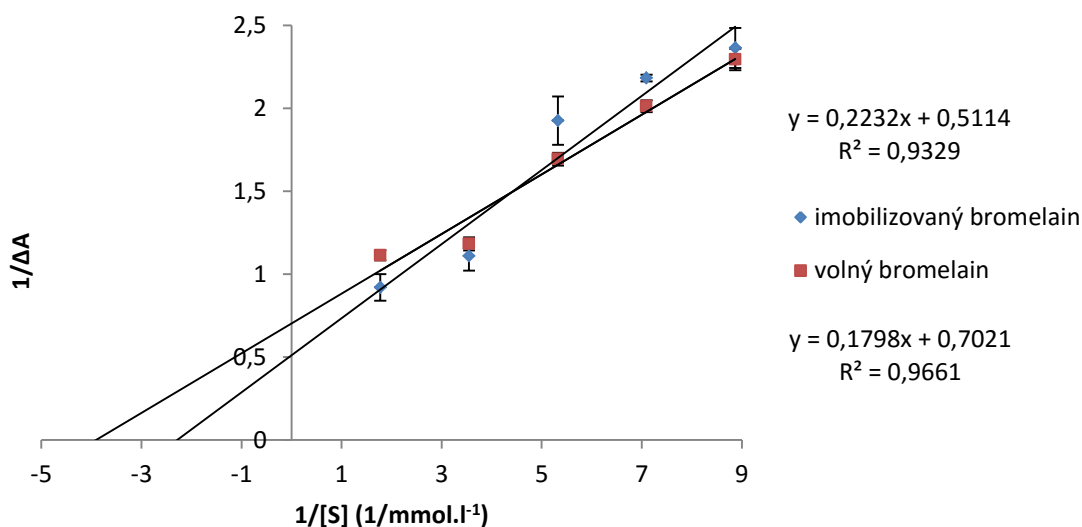
	t_{50} (dny)
Volný bromelain	15,9
Imobilizovaný bromelain	-

Volný bromelain byl po 60 dnech téměř neaktivní, naproti tomu imobilizovaný bromelain na CM MG 100 mikročástečích po 10 dnech ztratil pouze 20 % své aktivity, poté zůstal po dalších 50 dnů stejně aktivní. Hodnota t_{50} volného bromelainu byla 15,9 dnů, imobilizovaný bromelain ani po 60 dnech nedosáhl hodnoty t_{50} .

4.13 Stanovení Michaelisovy konstanty K_m

U volného a imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 mikročástečích v prostředí K-Pi pufru ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 7) byla stanovena hodnota Michaelisovy konstanty K_m , aby bylo zjištěno, zda se zvýšila afinita bromelainu k substrátu po imobilizaci na CM MG 100 mikročástečice. Byl použit hemoglobinový substrát podle Ansona s různým množstvím hemoglobinu (0,8, 1,0, 1,33, 2,0 a 4,0 g na 110 ml). Aktivita byla stanovena spektrofotometricky metodou stanovení aktivity bromelainu II. Byl sestrojen Lineweaver-Burkův graf závislosti $1/\Delta A$ na $1/[S]$. Po zvolení $y=0$ bylo vypočítáno x z rovnice regrese, byla stanovena hodnota K_m ze vztahu $x = -1/K_m$. Graf závislosti $1/\Delta A$

na $1/[S]$ volného a imobilizovaného bromelainu je zobrazen na Obr. 22. Hodnoty K_m volného a imobilizovaného bromelainu jsou uvedeny v Tab. 14.



Obr. 22 Stanovení K_m volného a imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 mikročasticích. Aktivita byla měřena spektrofotometricky v prostředí K-Pi pufru ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH 7) při $\lambda=750 \text{ nm}$ a byla vyhodnocena podle Lineweaver-Burka. Byl použit hemoglobinový substrát podle Ansona s různým množstvím hemoglobinu (0,8, 1,0, 1,33, 2,0 a 4,0 g na 110 ml).

Tab. 14 Hodnoty K_m volného a imobilizovaného bromelainu na magnetických mikročasticích CM MG 100 pro hemoglobinový substrát podle Ansona s různým množstvím hemoglobinu (0,8, 1,0, 1,33, 2,0 a 4,0 g na 110 ml). Aktivita byla měřena spektrofotometricky v prostředí K-Pi pufru ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, pH 7) při $\lambda=750 \text{ nm}$ a byla vyhodnocena podle Lineweaver-Burka.

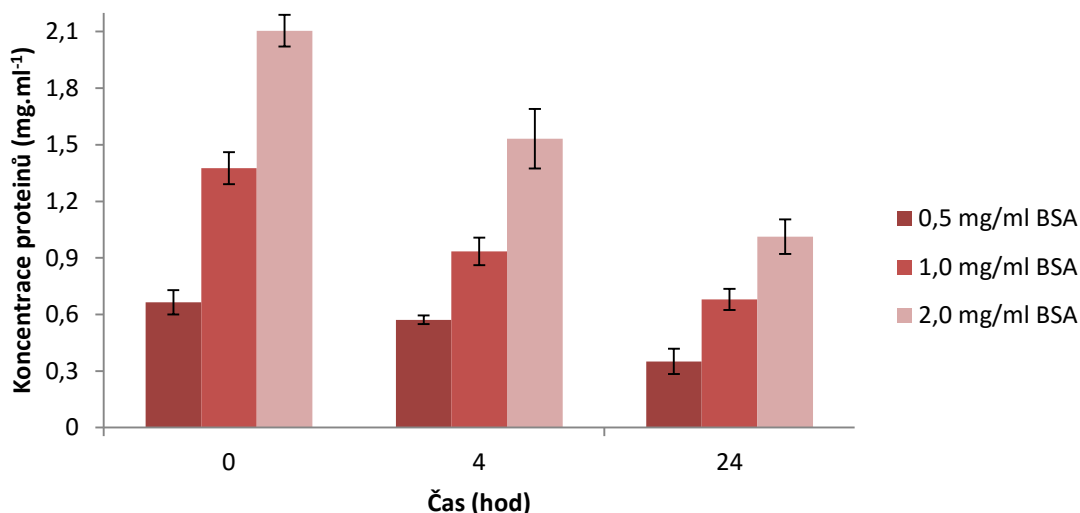
	K_m ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)
Volný bromelain	$0,256 \pm 0,040$
Imobilizovaný bromelain	$0,436 \pm 0,089$

Hodnota K_m volného bromelainu byla $0,256 \pm 0,040 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a imobilizovaného bromelainu $0,436 \pm 0,089 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Afinita bromelainu k hemoglobinovému substrátu se imobilizací 1,7x snížila.

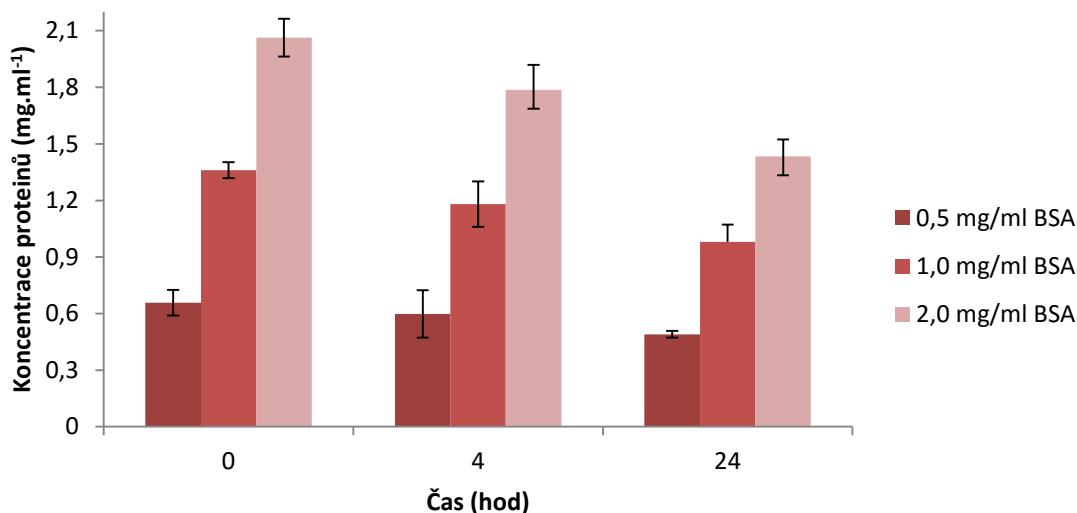
4.14 Vliv imobilizovaného bromelainu na množství proteinů ve vinném pufru

Množství proteinů ve vinném pufru bylo stanoveno spektrofotometricky na 96 jamkové destičce pomocí metody Bradfordové. V mikrozkuvkách s imobilizovaným bromelainem na CM MG 100 mikročasticích, vinným pufrům ($0,03 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kyselina vinná/vinan sodný, 12% ethanol, deionizovaná voda, pH 3,2) a BSA ($0,5, 1,0, 2,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) a v dalších s imobilizovaným bromelainem (50 mg CM MG 100 mikročastic) s vinným pufrům s cysteinem ($0,03 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kyselina vinná/vinan sodný, $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$

cystein, 12% ethanol, deionizovaná voda, pH 3,2) a BSA (0,5, 1,0, 2,0 mg.ml⁻¹) bylo stanoveno množství proteinů při λ=595 nm proti blanku (deionizovaná voda a pracovní roztok), dále po 4 a 24 hod třepání na rotátoru v lednici. Graf stanovení množství proteinů ve vinném pufru je zobrazen na Obr. 23 a graf stanovení množství proteinů ve vinném pufru s cysteinem na Obr. 24.



Obr. 23 Vliv imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 mikročasticích na množství proteinů ve vinném pufru (0,03 mol.l⁻¹ kyselina vinná/vinan sodný, 12% ethanol, deionizovaná voda, pH 3,2) s BSA (0,5, 1,0, 2,0 mg.ml⁻¹). Měření bylo prováděno spektrofotometricky při λ=595 nm ihned, po 4 a 24 hod.

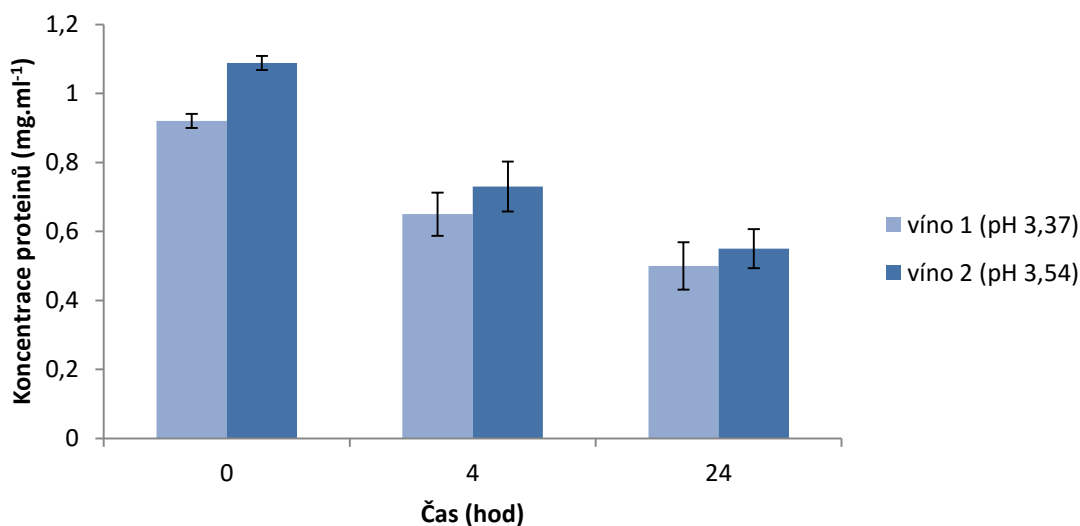


Obr. 24 Vliv imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 mikročasticích na množství proteinů ve vinném pufru s cysteinem (0,03 mol.l⁻¹ kyselina vinná/vinan sodný, 5 mmol.l⁻¹ cystein, 12% ethanol, deionizovaná voda, pH 3,2) s BSA (0,5, 1,0, 2,0 mg.ml⁻¹). Měření bylo prováděno spektrofotometricky při λ=595 nm ihned, po 4 a 24 hod.

Imobilizovaný bromelain na CM MG 100 mikročasticích nejvíce katalyzoval hydrolyzu BSA při původní koncentraci $2,0 \text{ mg.ml}^{-1}$ ve vinném pufru, kdy se po 24 hod snížila koncentrace proteinů o 51,9 %, dále při koncentraci 1 mg.ml^{-1} o 50,6 % a při koncentraci $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ o 47,3 %. Ve vinném pufru s cysteinem imobilizovaný bromelain nejvíce katalyzoval hydrolyzu BSA při jeho původní koncentraci $2,0 \text{ mg.ml}^{-1}$, kdy po 24 hod koncentrace proteinů klesla o 30,5 %, dále při koncentraci 1 mg.ml^{-1} o 27,9 % a při koncentraci $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ o 25,4 %. Cystein jako aktivátor nebyl potvrzen.

4.15 Vliv imobilizovaného bromelainu na množství proteinů ve víně

Množství proteinů ve víně bylo stanoveno spektrofotometricky na 96 jamkové destičce pomocí metody Bradfordové. V mikrozkuvkách s imobilizovaným bromelainem na CM MG 100 mikročasticích a 5 ml vína 1 (pH vína 3,37) a v dalších s imobilizovaným bromelainem (50 mg CM MG 100 mikročastic) a 5 ml vína 2 (pH vína 3,54) bylo stanoveno množství proteinů při $\lambda=595 \text{ nm}$ proti blanku (deionizovaná voda a pracovní roztok), dále po 4 a 24 hod třepání na rotátoru v lednici. Graf stanovení množství proteinů ve víně je zobrazen na Obr. 25.



Obr. 25 Vliv imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 mikročasticích na množství proteinů ve víně 1 (pH 3,37) a víně 2 (pH 3,54). Měření bylo prováděno spektrofotometricky při $\lambda=595 \text{ nm}$ ihned, po 4 a 24 hod.

Vlivem imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 mikročasticích došlo po 24 hod ve víně 2 (pH 3,54) k 49,5% úbytku množství proteinů, ve víně 1 (pH 3,37) k 45,7% úbytku množství proteinů.

4.16 Vliv imobilizovaného bromelainu na zákal proteinů v modelovém víně

V mikrozkuvkách s imobilizovaným bromelainem na CM MG 100 mikročásticích, 5 ml vína 1 (pH 3,37), popř. vína 2 (pH 3,54) a s BSA jako modelovým proteinem (0,5, 1,0, 2,0 mg.ml⁻¹) byla v kyvetě spektrofotometricky změřena počáteční optická hustota při $\lambda=600$ nm proti blanku (modelové víno). Dále byla optická hustota změřena po 4 a 24 hodinách. Vliv imobilizovaného bromelainu na zákal proteinů ve víně 1 je zobrazen v Tab. 15, ve víně 2 v Tab. 16.

Tab. 15 Vliv imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 mikročásticích na zákal proteinů v modelovém víně 1 (pH 3,37) s BSA (0,5, 1,0, 2,0 mg.ml⁻¹). Optická hustota byla měřena spektrofotometricky při $\lambda=600$ nm ihned, po 4 a 24 hod.

Koncentrace BSA (mg.ml ⁻¹)	OD v 0 hod	OD po 4 hod	OD po 24 hod
0,5	0,902 ± 0,002	0,853 ± 0,020	1,009 ± 0,045
1,0	0,930 ± 0,003	0,611 ± 0,016	0,813 ± 0,039
2,0	0,998 ± 0,005	0,401 ± 0,019	0,518 ± 0,038

Tab. 16 Vliv imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 mikročásticích na zákal proteinů v modelovém víně 2 (pH 3,54) s BSA (0,5, 1,0, 2,0 mg.ml⁻¹). Optická hustota byla měřena spektrofotometricky při $\lambda=600$ nm ihned, po 4 a 24 hod.

Koncentrace BSA (mg.ml ⁻¹)	OD v 0 hod	OD po 4 hod	OD po 24 hod
0,5	0,913 ± 0,004	0,830 ± 0,022	1,115 ± 0,049
1,0	0,950 ± 0,002	0,565 ± 0,015	0,810 ± 0,032
2,0	1,036 ± 0,006	0,323 ± 0,014	0,469 ± 0,037

Imobilizovaný bromelain na CM MG 100 mikročásticích ve víně 1 (pH 3,37) měl největší vliv na zákal při původní koncentraci BSA 2,0 mg.ml⁻¹ ve víně, kdy se po 4 hod snížilo OD 2,49x, dále při koncentraci 1,0 mg.ml⁻¹ se OD snížilo 1,52x a při koncentraci 0,5 mg.ml⁻¹ se OD snížilo 1,06x. Ve víně 2 (pH 3,54) měl největší vliv na zákal při původní koncentraci BSA 2,0 mg.ml⁻¹ ve víně, kdy se po 4 hod snížilo OD 3,20x, dále při koncentraci 1,0 mg.ml⁻¹ se OD snížilo 1,68x a při koncentraci 0,5 mg.ml⁻¹ se OD snížilo 1,10x. Po 24 hod se OD ve víně 1 i ve víně 2 oproti OD po 4 hod zvýšilo.

5 DISKUSE

Hlavním cílem diplomové práce byla imobilizace bromelainu na magnetické mikročástice DEAE MG 100 pomocí glutaraldehydu, na CM MG 100 pomocí karbodiimidu a na MG 100 pomocí jodistanu, kdy byla posouzena účinnost imobilizace, a to stanovením vazebné kapacity a specifické aktivity bromelainu. Dále byla porovnána teplotní stabilita volného a imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 mikročásticích, pH optimum (McIlvainův pufr, K-Pi pufr, Tris-HCl pufr), operační stabilita, funkční stabilita při laboratorní teplotě, stabilita při skladování a hodnota K_m . U imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 mikročásticích byl pozorován vliv na množství proteinů ve vinném pufru a víně a také jeho vliv na zákal proteinů ve víně.

Přírodní polymer celulosa patří mezi nejpoužívanější obalový materiál magnetických nosičů, který je charakteristický svou snášenlivostí k vyšším hodnotám pH a teplotám. Celulosa poskytuje volné hydroxylové skupiny, chemickou modifikací vzniká řada jejich derivátů (př DEAE-, CM-celulosa), které mohou poskytnout další funkční skupiny (Krajewska, 2004). K navázání enzymu je třeba aktivovat funkční skupiny nosičů vhodným činidlem. Při použití glutaraldehydu jako aktivačního činidla byly aktivovány aminoskupiny nosiče, v případě použití karbodiimidu a NHS byla umožněna vazba mezi karboxylovými skupinami nosiče a aminoskupinami bromelainu, v případě použití jodistanu byly aktivovány hydroxyskupiny nosiče.

Při stanovení vazebné kapacity bromelainu na jednotlivé nosiče bylo nejvyšší množství navázaného bromelainu pozorováno u imobilizace karbodiimidem na CM MG 100 mikročástice ($63,30 \cdot 10^{-3} \pm 6,49 \cdot 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$), dále u imobilizace jodistanem na MG 100 mikročástice ($40,30 \cdot 10^{-3} \pm 4,23 \cdot 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$). Imobilizací glutaraldehydem na DEAE MG 100 mikročástice se nepodařilo navázat žádný bromelain. Bromelain byl imobilizován na řadu nosičů pomocí různých metod s úspěšností imobilizace v rozmezí 20 až 90 % (Yodoya *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2008). Pan a Lin (1993) imobilizovali bromelain na CM-celulosu, DEAE-celulosu a přírodní celulosu s použitím glutaraldehydu jako zesilovacího činidla. Jako nejúčinnější nosič pro imobilizaci se ukázala CM-celulosa, kdy se imobilizací zlepšili provozní podmínky bromelainu (Pan a Lin, 1993). Mezi nejběžněji používané nosiče patří chitosanové kuličky. Touto kovalentní imobilizací se zlepšila substrátová specifita a provozní podmínky bromelainu. Úspěšnost imobilizace se pohybuje okolo 40 % (Hayashi a Ikada, 1991; Seo *et al.*, 1998, Benucci *et al.*, 2012, 2014; Esti *et al.*, 2015). Dále byla stanovena účinnost

imobilizace bromelainu pomocí metody stanovení aktivity I a II. Přednostní místo štěpení bromelainu je karboxylový konec lysinu, alaninu, tyrosinu a glycinu (Harrach *et al.*, 1998). Trypsin hydrolyzuje BAPNA na pNA při alkalickém pH. Arginin není přednostní místo štěpení bromelainu, takže nedochází k hydrolyze BAPNA (Wani a Mashru, 2014). Metodou I nebyla zjištěna žádná aktivita, proto BAPNA není substrátem bromelainu. Metodou II byla stanovena účinnost imobilizace na CM MG 100 mikročástice $31,64 \pm 1,68$ %, imobilizace bromelainu na MG 100 částice byla úspěšná, ale navázaný enzym nebyl aktivní. Imobilizací se nejspíš vazebná místa pro substrát stala nepřístupnými.

Byla stanovena specifická aktivita volného a imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 částice karbodiimidovou metodou pro hemoglobinový substrát podle Ansona. Specifická aktivita volného bromelainu byla $154,91 \text{ nkat.mg}^{-1}$ proteinů a imobilizovaného bromelainu $2,25 \text{ nkat.mg}^{-1}$, kdy byla aktivita vztažena na 1 mg částic. U imobilizovaného enzymu je specifická aktivita podstatně nižší, protože mikročástice poskytují menší povrch pro navázání enzymu, avšak oproti nanočásticím nemají tendenci vytvářet shluky (Lu *et al.*, 2007). Enzymy imobilizované na pevných nosičích jsou často méně aktivní než volné enzymy, ale zato se zlepšila jejich stabilita. Pokles aktivity navázaných enzymů je často přičítán změně struktury enzymu, což je výsledkem nepříznivých interakcí mezi enzymem a povrchem nosiče. Tyto interakce mohou také hrát významnou roli při denaturaci, stabilitě, svinutí a degradaci navázaného enzymu (Panchagnula *et al.*, 2002). Benucci *et al.* (2014) kovalentně imobilizovali bromelain na chitosanové kuličky a zkoumali jeho specifickou aktivitu ve víně za použití substrátu Bz-Phe-Val-Arg-pNA. Imobilizací se specifická aktivita snížila (volný bromelain $0,136 \text{ IU.mg}^{-1}$, imobilizovaný bromelain $0,004 \text{ IU.mg}^{-1}$). Zappino *et al.* (2015) kovalentně imobilizovali bromelain na chitosanový film s glycerolem. Ve své studii popisují, jak se imobilizací specifická aktivita bromelainu za použití substrátu Bz-Phe-Val-Arg-pNA ve víně taktéž snížila (volný bromelain 460 mIU.mg^{-1} , imobilizovaný bromelain $3,91 \text{ mIU.mg}^{-1}$) (Zappino *et al.*, 2015). Bromelain má širokou substrátovou specifitu. Mezi nejběžněji používané substráty patří kasein (optimum při pH 8) (Ketnawa *et al.*, 2012) a umělý substrát Bz-Phe-Val-Arg-pNA, který je využíván při studiu vína, kdy bromelain vykazuje nejvyšší aktivitu při pH 3,2 (Benucci *et al.*, 2011).

Důležitým kritériem pro využití bromelainu v průmyslu je jeho teplotní stabilita, neboť při vyšších teplotách může reakce probíhat rychleji a může vzniknout větší

množství produktu. Teplotní stabilita většiny enzymů klesá s rostoucí teplotou. Bromelain však ukazuje pozoruhodnou stabilitu při výrobě ananasové šťávy, kdy je šťáva zahřívána až na 60°C (Balls *et al.*, 1941). Proto byla stanovena teplotní stability volného a imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 částicích. Z naměřených hodnot vyplývá, že teplotní stabilita se imobilizací zvýšila. Volný bromelain měl optimální teplotu při 25°C, při zvyšování teploty jeho aktivita klesala. Teplotní optimum imobilizovaného bromelainu bylo v rozmezí 45-50°C. Jeho aktivita začala klesat až při 70-75°C. Po 30 min zahřívání při 80°C udržel imobilizovaný bromelain 22 % své počáteční aktivity, zatímco volný bromelain ztratil téměř veškerou aktivitu. Teplotní stabilita volného a imobilizovaného bromelainu byla porovnána také pomocí hodnoty T_{50} . Imobilizací došlo k nárůstu této hodnoty 1,5x (volný bromelain 50,4°C, imobilizovaný bromelain 74,7°C). Řada studií se zabývala teplotní stabilitou bromelainu. Mahmood a Saleemuddin (2007) a Chaurasiya a Umesh Hebbar (2013) stanovili teplotní stabilitu volného bromelainu na 25-30°C, kdy při 35°C docházelo k denaturaci bromelainu. Naproti tomu Ha *et al.* (2012) určili nejvyšší aktivitu volného bromelainu při teplotě 55-60°C, kdy při teplotě 70°C došlo k inaktivaci bromelainu. Tan *et al.* (2008) kovalentně imobilizovali bromelain na CM chitosanové nanočástice modifikované linoleovou kyselinou a jako teplotní optimum určili 60°C. Seo *et al.* (1998) imobilizovali bromelain na chitosanové kuličky a jako optimální teplotu určili 55-60°C, kdy byl imobilizovaný bromelain 3-4x více aktivní než volný bromelain. Lepší teplotní stabilita magnetických částic je přičítána více interakcím (např. elektrostatické interakce, vodíkové můstky a hydrofobní interakce) mezi bromelainem a částicemi. Nanočástice se jeví jako účinné řešení při imobilizaci enzymů (Hsieh *et al.*, 2000).

Dalším kritériem pro využití bromelainu je jeho pH stabilita. Volný a imobilizovaný bromelain na CM MG 100 mikročásticích byly vystaveny různým hodnotám pH v McIlvainově pufru, K-Pi pufru a Tris-HCl pufru. U volného bromelainu bylo stanoveno pH optimum 6, u imobilizovaného bromelainu se pH optimum posunulo na 7-8. Volný bromelain se jevil jako stabilnější, při alkalickém a kyselém pH imobilizovaný enzym rychleji ztrácel svou aktivitu. Dle literatury je optimální pH volného bromelainu 5,5-7,5 (Sree *et al.*, 2012), podle Ha *et al.* (2012) je optimum pH 6,0. Ve studii Chaurasiya a Umesh Hebbar (2013) bylo prokázáno jako optimální pH 7,0. Optimální pH imobilizovaného bromelainu na perličkách alginátu vápenatého bylo 7,5 (Sree *et al.*, 2012). Seo *et al.* (1998) kovalentně imobilizovali bromelain na porézní

chitosanové kuličky a pH optimum imobilizovaného bromelainu stanovili na 7, u volného na 6-7. Gupta a Saleemuddin (2006) imobilizovali bromelain adsorpcí na Sepharosu s konkavalinem A a studovali pH optimum v Tris-HCl a Na-Pi pufru. Jako neoptimálnější určili pH 7,5. Murachi a Yamazaki (1970) prokázali, že volný bromelain ztrácí aktivitu až nad pH 10,0. Zachování významných aktivit může souviset s celkovým zlepšením odolnosti proti rozvinutí a opětovnému sbalení enzymu (Murachi a Yamazaki, 1970).

Imobilizace enzymů umožnila jejich vícenásobné využití, čímž získává mnoho výhod nad volnými enzymy. Operační stabilita imobilizovaných enzymů je velmi důležitá, protože imobilizovaný enzym může katalyzovat hydrolýzu opakovaně. U imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 částice karbodiimidovou metodou byla sledována operační stabilita během 10 cyklů. Po třetím cyklu klesla aktivita na 40 %, ale k dalšímu snížení již nedošlo. Imobilizovaný bromelain lze tedy použít opakovaně. Během opakovaného užití enzymů může dojít ke ztrátě aktivity, což může být způsobeno částečnou denaturací enzymu. Gupta a Saleemuddin (2006) adsorpcí imobilizovali bromelain na Sepharosu s konkavalinem A a studovali operační stabilitu enzymu. Došlo k mírné desorpci enzymu, ale nedošlo k významné ztrátě aktivity, po 20. cyklu došlo k 25 % ztrátě aktivity (Gupta a Saleemuddin, 2006). Seo *et al.* (1998) kovalentně imobilizovali bromelain na porézní chitosanové kuličky. Po 10 cyklech byla aktivita bromelainu ekvivalentní k původní, nedošlo k žádné ztrátě aktivity. Yodoya *et al.* (2003) kovalentně imobilizovali bromelain na porézní kopoly(γ -methyl-*L*-glutamát/*L*-leucin) kuličky a 12x podrobili hydrolýze. Aktivita bromelainu byla téměř 100 %, nedošlo k žádné ztrátě aktivity (Yodoya *et al.*, 2003).

Funkční stabilita a stabilita při skladování jsou další charakteristiky volného a imobilizovaného enzymu. Bromelain byl inkubován 72 hodin při laboratorní teplotě, poté byla změřena jeho aktivita. Volný bromelain byl po 72 hod inkubování téměř neaktivní. Aktivita imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 mikročásticích nejprve stoupala, což bylo způsobeno rozvolňováním enzymu a tedy zpřístupněním aktivního místa pro vazbu substrátu. Po 28 hod došlo k pomalému poklesu aktivity, po 72 hod si bromelain zachoval přibližně jen 45 % své původní aktivity. Hodnota t_{50} (hod) byla u imobilizovaného bromelainu 2,1x vyšší (72,0 hod) než u volného (34,4 hod), funkční stabilita se tedy imobilizací zvýšila. Shi *et al.* (2007) imobilizovali bromelain adsorpcí na kalcinované podvojně vrstevnaté hydroxidy (Mg-Al) a inkubovali jej při laboratorní teplotě po dobu 3 měsíců. Bylo zjištěno, že nedošlo k žádné významné ztrátě enzymové

aktivity. Naproti tomu volný bromelain ztratil 60 % své původní aktivity za stejných podmínek (Shi *et al.*, 2007). Také byla stanovena stabilita při skladování při 4°C po dobu 60 dnů. Volný bromelain byl po 60 dnech neaktivní, hodnota t_{50} byla 15,93 dnů. Naproti tomu imobilizovaný bromelain po 10 dnech ztratil pouze 20 % své aktivity. Zbytkovou aktivitu 80 % si zachoval i po 60 dnech skladování, hodnoty t_{50} vůbec nedosáhl. Stabilita při skladování se kovalentní imobilizací zvýšila. Seo *et al.* (1998) kovalentně imobilizovali bromelain na porézní chitosanové kuličky a skladovali při 4°C po dobu 12 měsíců, aniž by došlo k významné ztrátě aktivity, vzhledem k tomu, že volný bromelain ztratil více jak 50 % své aktivity za stejných podmínek. Yodoya *et al.* (2003) kovalentně imobilizovali bromelain na porézní kopoly(γ -methyl-L-glutamát/L-leucin) kuličky a skladovali při 4°C po dobu 6 měsíců, aniž by došlo k významné ztrátě aktivity. Naproti tomu volný bromelain ztratil více než 50 % své aktivity za stejných podmínek (Yodoya *et al.*, 2003). Studie stability bromelainu při skladování při 30°C po 30 dnů a při 4°C po 60 dnů ukázala, že k inaktivaci bromelainu dochází 3,3x pomaleji při 4°C (Bhattacharya a Bhattacharyya, 2009a). Vyšší stabilitu imobilizovaného bromelainu při skladování lze přičíst prevenci autodigestce a tepelné denaturace v důsledku fixace molekul bromelainu na povrch nosiče (Yodoya *et al.*, 2003).

Také byla určena hodnota K_m podle Lineweaver-Burka. Hodnota K_m se po imobilizaci bromelainu na CM MG 100 mikročástice 1,7x zvýšila ($0,436 \pm 0,089$ mmol.l⁻¹) oproti K_m volného bromelainu ($0,256 \pm 0,040$ mmol.l⁻¹). Z toho lze vyvodit, že afinita bromelainu k hemoglobinovému substrátu podle Ansona se po imobilizaci snížila. To může být způsobeno sterickým bráněním nosiče, ztrátou flexibility enzymu nebo omezením difúzí pro substrát. Tan *et al.* (2008) kovalentně imobilizovali bromelain na CM chitosanové nanočástice modifikované linoleovou kyselinou a určili hodnotu K_m imobilizovaného bromelainu na 0,36 mmol.l⁻¹ a volného na 0,68 mmol.l⁻¹. To může být v důsledku imobilizačního procesu, který mírně ovlivňuje konstrukční nebo konformační integritu enzymu, a také elektrostatické nebo hydrofobní interakce mezi nanočásticemi a kaseinem. Tyto účinky mohou posílit afinitu enzymu pro kaseinový substrát (Tan *et al.*, 2008). Zappino *et al.* (2015) kovalentně imobilizovali bromelain na chitosanový film, což vedlo ke snížení hodnoty K_m více než 2,0x vzhledem k volnému bromelainu a tedy zvýšení afinity k substrátu a vyšší rychlosti uvolňování produktu. Benucci *et al.* (2014) kovalentně imobilizovali bromelain na chitosanové kuličky a studovali jeho kinetiku v bílých vínech. U převážné většiny

bílých vín se hodnota K_m imobilizovaného bromelainu zvýšila oproti volnému, čímž se snížila jeho afinita k substrátu. Změny jsou připisovány několika faktorům, jako jsou například konformační změny proteinu způsobené nosičem, sterickým bráněním a difúzním omezením. Tyto faktory mohou působit současně nebo zvlášť, také mohou měnit mikroprostředí okolo navázaného enzymu (Gürdaş *et al.*, 2012).

Další část této experimentální práce se zabývá aplikací imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 mikročasticích karbodiimidovou metodou při stabilizaci vína. Stabilizace vína je důležitou etapou při výrobě vína. Mechanismus vzniku zákalu ovšem stále není zcela objasněn (Waters *et al.*, 2005). Avšak je známo, že tvorba proteinového zákalu závisí na přítomnosti proteinových a neproteinových složek vína, včetně fenolických látek, polysacharidů a sulfátových aniontů (Marangon *et al.*, 2010). Proto byl sledován vliv na množství proteinů ve vinném pufru s BSA jako modelovým proteinem, pomocí kterého jsme se snažili napodobit podmínky ve víně. Pro srovnání byla použita také varianta pufru s cysteinem jako aktivátorem, jako ve studii Benucciho *et al.* (2011), kdy se po přidání cysteinu do vinného pufru aktivita bromelainu zvýšila. Aktivita bromelainu totiž závisí na $-SH$ skupině cysteinu, který se nachází v aktivním místě bromelainu (Minami *et al.*, 1971). Imobilizovaný bromelain v podmínkách podobným vínu katalyzoval hydrolyzu BSA, nejvíce při původní koncentraci BSA $2,0 \text{ mg.ml}^{-1}$ ve vinném pufru, kdy se snížila koncentrace proteinů po 24 hod skoro o 51,9 %, dále při koncentraci 1 mg.ml^{-1} o 50,6 % a při koncentraci $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ o 47,3 %. Imobilizovaný bromelain v podmínkách podobných vínu s cysteinem nejvíce katalyzoval hydrolyzu BSA při jeho původní koncentraci $2,0 \text{ mg.ml}^{-1}$, kdy koncentrace proteinů klesla po 24 hod o 30,5 %, dále při koncentraci 1 mg.ml^{-1} o 27,9 % a při koncentraci $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ o 25,4 %. Cystein jako aktivátor nebyl potvrzen. Vysoký přirozený obsah ethanolu ve víně (až 25 % v/v), který vzniká při alkoholovém kvašení hroznových sacharidů, by rovněž mohl mít vliv na aktivitu bromelainu. Alkoholy mohou denaturovat bromelain přerušením intramolekulárních vodíkových vazeb postranního řetězce. Nové vodíkové vazby mohou vznikat mezi alkoholem a postranními řetězci proteinů, kdy jsou polární amidové skupiny chráněny před rozpouštědly (Haq *et al.*, 2005). Benucci *et al.* (2011) zkoumali různé koncentrace ethanolu. Účinek ethanolu byl poměrně omezený při koncentraci podobné v průměrném obsahu vína (10 % v/v), kdy došlo ke ztrátě pouze 11 % aktivity. Zappino *et al.* (2015) kovalentně imobilizovali bromelain na chitosanový film s glycerolem. Chitosan s nízkou molekulovou hmotností ve směsi s 25% glycerolem byl považován

za nejvhodnější pro použití ve vinařství s ohledem na jeho mechanické a kinetické vlastnosti. Esti *et al.* (2015) kovalentně imobilizovali bromelain na chitosanové kuličky a zkoumali jeho vliv na koncentraci ve vinném pufru s inhibitory vína (ethanol, oxid siřičitý, slupky hroznů a taniny z pecek). Oproti volnému bromelainu se proteasa imobilizací stala odolnější vůči inhibičnímu účinku, což značí, že imobilizovaný bromelain může být použit v biotechnologických aplikacích při stabilizaci vína, ale jsou ještě nutné jeho další studie v reálném víně. Proto byl zkoumán vliv imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 mikročasticích na množství proteinů přímo ve víně. Ve víně s pH 3,54 po 24 hod došlo k 49,5% úbytku množství proteinů, ve víně s pH 3,37 k 45,7% úbytku množství proteinů. Imobilizací se zhoršila stabilita pH bromelainu, pH vína 2 se více blížilo pH optimu imobilizovaného bromelainu, proto byl úbytek proteinů vyšší. Benucci *et al.* (2012) kovalentně imobilizovali bromelain na chitosanové kuličky bez glutaraldehydu a inkubovali ho v reálném bílém víně. Imobilizace zvýšila afinitu bromelainu k substrátu a také funkční stabilitu ve srovnání s volným bromelainem. To může být v důsledku mírného imobilizačního postupu, který jen nepatrně ovlivňuje strukturu a konformaci bromelainu (Tan *et al.*, 2008). Získali potravinám bezpečný a slibný biokatalyzátor pro nestabilní vína, který je ale nutné dál prozkoumat.

Také byl studován vliv imobilizovaného bromelainu na CM MG 100 mikročasticích na zákal proteinů ve víně 1 (pH 3,37) a víně 2 (pH 3,54) s BSA jako modelovým proteinem. Imobilizovaný bromelain ve víně 1 měl největší vliv na zákal při původní koncentraci BSA $2,0 \text{ mg.ml}^{-1}$ ve víně, kdy se po 4 hod snížilo OD 2,49x, dále při koncentraci 1 mg.ml^{-1} se OD snížilo 1,52x a při koncentraci $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ 1,06x. Ve víně 2 měl největší vliv na zákal při původní koncentraci BSA $2,0 \text{ mg.ml}^{-1}$ ve víně, kdy se po 4 hod snížilo OD 3,20x, dále při koncentraci 1 mg.ml^{-1} se OD snížilo 1,68x a při koncentraci $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ 1,10x. Po 24 hod se OD ve víně 1 i víně 2 zvýšilo, což značí, že pokud je víno vystaveno imobilizovanému bromelainu dlouho, působí na něj další vlivy. Proto pro snížení zákalu imobilizovaným bromelainem byla doporučena kratší doba působení. Benucci *et al.* (2014) testovali kovalentně imobilizovaný bromelain na chitosanových kuličkách kvůli snížení proteinového zákalu v bílém víně, kdy imobilizovaný enzym spolu s vínem míchali 24 hod v průtočném reaktoru při laboratorních podmínkách. Imobilizovaný bromelain byl aktivní při snížení zákalu přibližně o 70 %. Proto se bromelain jeví jako vhodná alternativa pro ošetření vína bentonitem, jsou však důležité jeho další studie (Benucci *et al.*, 2014).

6 ZÁVĚR

- V této diplomové práci byl imobilizován bromelain na DEAE MG 100 mikročástice glutaraldehydovou metodou, na CM MG 100 mikročástice karbodiimidovou metodou a na MG 100 mikročástice jodistanovou metodou.
- U imobilizovaného bromelainu byla stanovena vazebná kapacita. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u CM MG 100 mikročástic, kde se navázelo nejvíce bromelainu. U DEAE MG 100 mikročástic se imobilizace nezdařila, u MG 100 mikročástic byl bromelain neaktivní. Pro další studium se tedy používali CM MG 100 mikročástice.
- U volného bromelainu bylo stanoveno pH optimum na 6, u imobilizovaného se posunulo na 7-8.
- Ze stanovení teplotní stability vyplývá, že imobilizovaný bromelain byl teplotně stabilnější než volný bromelain. Hodnota T_{50} se oproti volnému bromelainu zvýšila o 24°C.
- U imobilizovaného bromelainu byla stanovena operační stabilita. Enzym může být využíván opakovaně, po 3. cyklu klesla jeho aktivita na 40 % a dále už se nesnižovala.
- U volného a imobilizovaného bromelainu byla studována funkční stabilita a stabilita při skladování. Volný bromelainu se po 72 hod stal neaktivním, imobilizovaný bromelain si zachoval 45 % aktivity. Hodnota t_{50} se zvýšila o 37,6 hod. Studování stability při skladování po dobu 60 dnů ukázalo, že volný bromelain byl po 60 dnech neaktivní, hodnota t_{50} byla 15,9 dnů. Imobilizovaný bromelain si po 60 dnech zachoval 80 % své aktivity. Funkční stabilita a stabilita při skladování se imobilizací zvýšila.
- Hodnota Michaelisovy konstanty K_m se imobilizací 1,7x zvýšila oproti volnému bromelainu, což znamená, že se afinita bromelainu k hemoglobinovému substrátu imobilizací snížila.
- Vlivem imobilizovaného bromelainu došlo k poklesu koncentrace proteinů ve vinném pufru a ve víně. Po 24 hod se koncentrace proteinů ve vinném pufru snížila nejvíce při počáteční koncentraci BSA 2,0 mg.ml⁻¹, a to o 51,9 %. Ve víně s pH 3,54 došlo k 49,5% úbytku proteinů, ve víně s pH 3,37 k 45,7% úbytku proteinů. Vína s nižším pH vedou ke snížení aktivity imobilizovaného bromelainu.

- Vlivem imobilizovaného bromelainu došlo k částečnému odstranění zákalu proteinů ve víně, pro jeho působení byla na základě výsledků doporučena kratší doba působení.
- Imobilizovaný bromelain se jeví jako vhodný stabilizátor vína namísto bentonitu, ovšem pro jeho použití ve větším měřítku jsou potřeba další studie.

7 LITERATURA

- Ahmad B., Ansari M.A., Sen P., Khan R.H. (2006): Low versus high molecular weight poly(ethylene glycol)-induced states of stem bromelain at low pH: Stabilization of molten globule and unfolded states. *Biopolymers* **81**, 350–359.
- Ahmad B., Shamim T.A., Haq S.K., Khan R.H. (2007): Identification and Characterization of Functional Intermediates of Stem Bromelain During Urea and Guanidine Hydrochloride Unfolding. *Journal of Biochemistry* **141**, 251–259.
- Akhtar N.M., Naseer R., Farooqi A.Z., Aziz W., Nazir M. (2004): Oral enzyme combination versus diclofenac in the treatment of osteoarthritis of the knee—a double-blind prospective randomized study. *Clinical Rheumatology* **23**, 410–415.
- Amid A., Ismail N.A., Yusof F., Salleh H.M. (2011): Expression, purification, and characterization of a recombinant stem bromelain from *Ananas comosus*. *Process Biochemistry* **46**, 2232–2239.
- Anson M.L. (1938): The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *The Journal of General Physiology* **22**, 79–89.
- Babu B.R., Rastogi N.K., Raghavarao K.S.M.S. (2008): Liquid–liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* **47**, 83–89.
- Balls A.K., Thompson R.R., Kies M.W. (1941): Bromelin. Properties and Commercial Production. *Industrial & Engineering Chemistry* **33**, 950–953.
- Barth H., Guseo A., Klein R. (2005): *In vitro* study on the immunological effect of bromelain and trypsin on mononuclear cells from humans. *European Journal of Medical Research* **10**, 325–331.
- Batista L., Monteiro S., Loureiro V.B., Teixeira A.R., Ferreira R.B. (2009): The complexity of protein haze formation in wines. *Food Chemistry* **112**, 169–177.
- Benucci I., Esti M., Liburdi K. (2014): Effect of free and immobilised stem bromelain on protein haze in white wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **20**, 347–352.
- Benucci I., Esti M., Liburdi K., Garzillo A.M.V. (2012): Pineapple stem bromelain immobilized on different supports: catalytic properties in model wine. *Biotechnology Progress* **28**, 1472–1477.
- Benucci, I., Liburdi, K., Garzillo, A.M.V., Esti, M. (2011): Bromelain from pineapple stem in alcoholic-acidic buffers for wine application. *Food Chemistry* **124**, 1349–1353.
- Berry C.C., Curtis A.S.G. (2003): Functionalisation of magnetic nanoparticles for application in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics* **36**, 198–206.
- Betancor L., Luckarift H.R. (2008): Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis. *Trends in Biotechnology* **26**, 566–572.
- Bhattacharya R., Bhattacharyya D. (2009a): Preservation of Natural Stability of Fruit “Bromelain” from *Ananas Comosus* (pineapple). *Journal of Food Biochemistry* **33**, 1–19.
- Bhattacharya R., Bhattacharyya D. (2009b): Resistance of bromelain to SDS binding. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1794**, 698–708.
- Bhui K., Prasad S., George J., Shukla Y. (2009): Bromelain inhibits COX-2 expression by blocking the activation of MAPK regulated NF-kappa B against skin tumor-initiation triggering mitochondrial death pathway. *Cancer Letters* **282**, 167–176.
- Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Brady D., Jordaan J. (2009): Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnology Letters* **31**, 1639–1650.
- Braun J.M., Schneider B., Beuth H.J. (2005): Therapeutic use, efficiency and safety of the proteolytic pineapple enzyme Bromelain-POS in children with acute sinusitis in Germany. *In Vivo* **19**, 417–421.
- Brena B., Batista-Viera F. (2006): Immobilization of Enzymes. In: *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*. Vol. 2, (Guisan J. ed.), Humana Press, New Jersey, USA, 15–30.

- Brien S., Lewith G., Walker A., Hicks S.M., Middleton D. (2004): Bromelain as a Treatment for Osteoarthritis: a Review of Clinical Studies. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* **1**, 251–257.
- Cao L., Langen L. van, Sheldon R.A. (2003): Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Current Opinion in Biotechnology* **14**, 387–394.
- Castell J.V., Friedrich G., Kuhn C.S., Poppe G.E. (1997): Intestinal absorption of undegraded proteins in men: presence of bromelain in plasma after oral intake. *The American Journal of Physiology* **273**, 139–146.
- Chakravarthy P., Acharya S. (2012): Efficacy of Extrinsic Stain Removal by Novel Dentifrice Containing Papain and Bromelain Extracts. *Journal of Young Pharmacists* **4**, 245–249.
- Chaurasiya R.S., Hebbar H.U. (2013): Extraction of bromelain from pineapple core and purification by RME and precipitation methods. *Separation and Purification Technology* **111**, 90–97.
- Chen G., Hoffman A.S. (1993): Preparation and properties of thermoreversible, phase-separating enzyme-oligo(*N*-isopropylacrylamide) conjugates. *Bioconjugate Chemistry* **4**, 509–514.
- Chen G., Ma Y., Su P., Fang B. (2012): Direct binding glucoamylase onto carboxyl-functioned magnetic nanoparticles. *Biochemical Engineering Journal* **67**, 120–125.
- Chen X., Zhao T., Zou J. (2009): A novel mimetic peroxidase catalyst by using magnetite-containing silica nanoparticles as carriers. *Microchimica Acta* **164**, 93–99.
- Chobotova K., Vernallis A.B., Majid F.A.A. (2010): Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent: Current evidence and perspectives. *Cancer Letters* **290**, 148–156.
- Corzo C.A., Waliszewski K.N., Welti-Chanes J. (2012): Pineapple fruit bromelain affinity to different protein substrates. *Food Chemistry* **133**, 631–635.
- Costa H.B., Fernandes P.M.B., Romão W., Ventura J.A. (2014): A new procedure based on column chromatography to purify bromelain by ion exchange plus gel filtration chromatographies. *Industrial Crops and Products* **59**, 163–168.
- Cutiño-Avila B., Pradas D.G., Abreu C.A., Marrero Y.F., de la Torre M.F., Sarduy E.S., de los Ángeles Chávez Planes M., Seijas J.M.G., Brito J.D., del Monte-Martínez A. (2014): Computer-aided design of bromelain and papain covalent immobilization. *Revista Colombiana de Biotecnología* **16**, 19–28.
- Cyglér M., Mort J.S. (1997): Proregion structure of members of the papain superfamily. Mode of inhibition of enzymatic activity. *Biochimie* **79**, 645–652.
- Devakate R.V., Patil V.V., Waje S.S., Thorat B.N. (2009): Purification and drying of bromelain. *Separation and Purification Technology* **64**, 259–264.
- Devi R.Y. (2012): Biotechnological application of proteolytic enzymes in post cocoon technology. *International Journal of Science and Nature* **3**, 237–240.
- Dhandayuthapani S., Perez H.D., Paroulek A., Chinnakkannu P., Kandalam U., Jaffe M., Rathinavelu A. (2011): Bromelain-induced Apoptosis in GI-101A Breast Cancer Cells. *Journal of Medicinal Food* **15**, 344–349.
- Dutta S., Bhattacharyya D. (2013): Enzymatic, antimicrobial and toxicity studies of the aqueous extract of *Ananas comosus* (pineapple) crown leaf. *Journal of Ethnopharmacology* **150**, 451–457.
- Elavarasan K., Naveen Kumar V., Shamasundar B.A. (2014): Antioxidant and Functional Properties of Fish Protein Hydrolysates from Fresh Water Carp (*Catla catla*) as Influenced by the Nature of Enzyme. *Journal of Food Processing and Preservation* **38**, 1207–1214.
- Erlanger B.F., Kokowsky N., Cohen W. (1961): The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **95**, 271–278.
- Esti M., Benucci I., Liburdi K., Garzillo A.M.V. (2015): Immobilized pineapple stem bromelain activity in a wine-like medium: Effect of inhibitors. *Food and Bioprocesses Processing* **93**, 84–89.
- Feijoo-Siota L., Villa T.G. (2010): Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications. *Food and Bioprocess Technology* **4**, 1066–1088.
- Ferreira R.B., Piçarra-Pereira M.A., Monteiro S., Loureiro V.B., Teixeira A.R. (2001): The wine proteins. *Trends in Food Science & Technology* **12**, 230–239.

- Fitzhugh D.J., Shan S., Dewhirst M.W., Hale L.P. (2008): Bromelain treatment decreases neutrophil migration to sites of inflammation. *Clinical Immunology* **128**, 66–74.
- Gautam S.S., Mishra S.K., Dash V., Goyal A.K., Rath G. (2010): Comparative study of extraction, purification and estimation of bromelain from stem and fruit of pineapple plant. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences* **34**, 67–76.
- Grabs V., Nieman D.C., Haller B., Halle M., Scherr J. (2014): The effects of oral hydrolytic enzymes and flavonoids on inflammatory markers and coagulation after marathon running: study protocol for a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *BMC sports science, medicine and rehabilitation* **6**:8.
- Grzonka Z., Kasprzykowski F., Wiczak W. (2007): Cysteine Proteases. In: *Industrial Enzymes* (Polaina J., MacCabe A.P. eds.), Springer, Netherlands, 181–195.
- Gupta A.K., Gupta M. (2005): Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* **26**, 3995–4021.
- Gupta P., Maqbool T., Saleemuddin M. (2007): Oriented immobilization of stem bromelain via the lone histidine on a metal affinity support. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **45**, 78–83.
- Gupta P., Saleemuddin M. (2006): Bioaffinity based oriented immobilization of stem bromelain. *Biotechnology Letters* **28**, 917–922.
- Gürdaş S., Güleç H.A., Mutlu M. (2012): Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -Galactosidase onto Duolite A568 Resin via Simple Adsorption Mechanism. *Food and Bioprocess Technology* **5**, 904–911.
- Hale L.P. (2004): Proteolytic activity and immunogenicity of oral bromelain within the gastrointestinal tract of mice. *International Immunopharmacology* **4**, 255–264.
- Hale L.P., Greer P.K., Trinh C.T., James C.L. (2005): Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. *International Immunopharmacology* **5**, 783–793.
- Ha M., Bekhit A.E.-D.A., Carne A., Hopkins D.L. (2012): Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. *Food Chemistry* **134**, 95–105.
- Hamley I.W. (2003): Nanotechnology with soft materials. *Angewandte Chemie International Edition* **42**, 1692–1712.
- Hanefeld U., Gardossi L., Magner E. (2009): Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society Reviews* **38**, 453–468.
- Haq S.K., Rasheedi S., Sharma P., Ahmad B., Khan R.H. (2005): Influence of salts and alcohols on the conformation of partially folded intermediate of stem bromelain at low pH. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **37**, 361–374.
- Harrach T., Eckert K., Maurer H.R., Machleidt I., Machleidt W., Nuck R. (1998): Isolation and characterization of two forms of an acidic bromelain stem proteinase. *Journal of Protein Chemistry* **17**, 351–361.
- Harrach T., Eckert K., Schulze-Forster K., Nuck R., Grunow D., Maurer H.R. (1995): Isolation and partial characterization of basic proteinases from stem bromelain. *Journal of Protein Chemistry* **14**, 41–52.
- Hartmann M., Kostrov X. (2013): Immobilization of enzymes on porous silicas – benefits and challenges. *Chemical Society Reviews* **42**, 6277–6289.
- Hartree E.F. (1972): Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry* **48**, 422–427.
- Hatano K., Kojima M., Tanokura M., Takahashi K. (1995): Primary structure, sequence-specific ¹H-NMR assignments and secondary structure in solution of bromelain inhibitor VI from pineapple stem. *European Journal of Biochemistry* **232**, 335–343.
- Hayashi T., Hyon S., Cha W., Ikada Y. (1993): Immobilization of Thiol Proteases Onto Porous Poly(vinyl Alcohol) Beads. *Polymer Journal* **25**, 489–497.
- Hayashi T., Ikada Y. (1991): Protease immobilization onto porous chitosan beads. *Journal of Applied Polymer Science* **42**, 85–92.
- Heinicke R.M., Gortner W.A. (1957): Stem Bromelain: A New Protease Preparation from Pineapple Plants. *Economic Botany* **11**, 225–234.

- Hermanson G.T., Mallia A.K., Smith P.K. (1993): Immobilized affinity ligand techniques. *Trends in Biotechnology* **11**, 107–108.
- Homaei A.A., Sajedi R.H., Sariri R., Seyfzadeh S., Stevanato R. (2010): Cysteine enhances activity and stability of immobilized papain. *Amino Acids* **38**, 937–942.
- Horák D., Babič M., Macková H., Beneš M.J. (2007): Preparation and properties of magnetic nano- and micro-sized particles for biological and environmental separations. *Journal of Separation Science* **30**, 1751–1772.
- Hsieh H.-J., Liu P.-C., Liao W.-J. (2000): Immobilization of invertase via carbohydrate moiety on chitosan to enhance its thermal stability. *Biotechnology Letters* **22**, 1459–1464.
- Hung T.-H., Chang Y.-M., Sung H.-Y., Chang C.-T. (2002): Purification and characterization of hydrolase with chitinase and chitosanase activity from commercial stem bromelain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 4666–4673.
- Ishihara H., Takahashi N., Oguri S., Tejima S. (1979): Complete Structure of the Carbohydrate Moiety of Stem Bromelain - Application of the Almond Glycopeptidase for Structural Studies of Glycopeptides. *The Journal of Biological Chemistry* **254**, 715–719.
- Iversen S.L., Jørgensen M.H. (1995): Azocasein assay for alkaline protease in complex fermentation broth. *Biotechnology Techniques* **9**, 573–576.
- Jafarizadeh H., Najafi S., Pazhouhnia Z., Ahmadi O., Berenjian A. (2014): Chitosan nanoparticles and their applications in drug delivery: a review. *Current Research in Drug Discovery* **1**, 17–25.
- Jeong J., Ha T.H., Chung B.H. (2006): Enhanced reusability of hexa-arginine-tagged esterase immobilized on gold-coated magnetic nanoparticles. *Analytica Chimica Acta* **569**, 203–209.
- Jia H., Zhu G., Wang P. (2003): Catalytic behaviors of enzymes attached to nanoparticles: the effect of particle mobility. *Biotechnology and Bioengineering* **84**, 406–414.
- Kalyana P., Shashidhar A., Meghashyam B., Sreevidya K.R., Sweta S. (2011): Stain removal efficacy of a novel dentifrice containing papain and Bromelain extracts--an *in vitro* study. *International Journal of Dental Hygiene* **9**, 229–233.
- Ketnawa S., Chaiwut P., Rawdkuen S. (2012): Pineapple wastes: A potential source for bromelain extraction. *Food and Bioproducts Processing* **90**, 385–391.
- Ketnawa S., Rawdkuen S. (2011): Application of Bromelain Extract for Muscle Foods Tenderization. *Food and Nutrition Sciences* **2**, 393–401.
- Khalafalla S., Reimers G. (1980): Preparation of dilution-stable aqueous magnetic fluids. *IEEE Transactions on Magnetics* **16**, 178–183.
- Khan R.H., Rasheedi S., Haq S.K. (2003): Effect of pH, temperature and alcohols on the stability of glycosylated and deglycosylated stem bromelain. *Journal of Biosciences* **28**, 709–714.
- Khor E., Lim L.Y. (2003): Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* **24**, 2339–2349.
- Koh J., Kang S.-M., Kim S.-J., Cha M.-K., Kwon Y.-J. (2006): Effect of pineapple protease on the characteristics of protein fibers. *Fibers and Polymers* **7**, 180–185.
- Kolodziejczyk R., Michalska K., Hernandez-Santoyo A., Wahlbom M., Grubb A., Jaskolski M. (2010): Crystal structure of human cystatin C stabilized against amyloid formation. *FEBS Journal* **277**, 1726–1737.
- Kong X., Zhou H., Qian H. (2007): Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. *Food Chemistry* **102**, 759–763.
- Krajewska B. (2004): Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology* **35**, 126–139.
- Kunamneni A., Ghazi I., Camarero S., Ballesteros A., Plou F.J., Alcalde M. (2008): Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers. *Process Biochemistry* **43**, 169–178.
- Lee K.L., Albee K.L., Bernasconi R.J., Edmunds T. (1997): Complete amino acid sequence of ananain and a comparison with stem bromelain and other plant cysteine proteases. *Biochemical Journal* **327** (Pt 1), 199–202.

- Lee Y., Lee J., Bae C.J., Park J.-G., Noh H.-J., Park J.-H., Hyeon T. (2005): Large-Scale Synthesis of Uniform and Crystalline Magnetite Nanoparticles Using Reverse Micelles as Nanoreactors under Reflux Conditions. *Advanced Functional Materials* **15**, 503–509.
- Leipner J., Iten F., Saller R. (2001): Therapy with proteolytic enzymes in rheumatic disorders. *BioDrugs* **15**, 779–789.
- Lei Z., Bi S. (2007): The silica-coated chitosan particle from a layer-by-layer approach for pectinase immobilization. *Enzyme and Microbial Technology* **40**, 1442–1447.
- Lei Z., Bi S., Hu B., Yang H. (2007): Combined magnetic and chemical covalent immobilization of pectinase on composites membranes improves stability and activity. *Food Chemistry* **105**, 889–896.
- Levy L.L., Emer J.J. (2012): Complications of minimally invasive cosmetic procedures: prevention and management. *Journal of Cutaneous Aesthetic Surgery* **5**, 121–132.
- Ley C. (2011): A review of the use of bromelain in cardiovascular diseases. *Journal of Chinese Integrative Medicine* **9**, 702–710.
- Liang H.Y., Li M., Shi M., Liao A.P., Wu R.C. (2011): Study on the Stability of Fruit Bromelain. *Advanced Materials Research* **421**, 19–22.
- Liu Z.L., Wang H.B., Lu Q.H., Du G.H., Peng L., Du Y.Q., Zhang S.M., Yao K.L. (2004): Synthesis and characterization of ultrafine well-dispersed magnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **283**, 258–262.
- Lotz-Winter H. (1990): On the pharmacology of bromelain: an update with special regard to animal studies on dose-dependent effects. *Planta Medica* **56**, 249–253.
- Lozano-De-Gonzalez P.G., Barrett D.M., Wrolstad R.E., Durst R.W. (1993): Enzymatic Browning Inhibited in Fresh and Dried Apple Rings by Pineapple Juice. *Journal of Food Science* **58**, 399–404.
- Lu A.-H., Salabas E.L., Schüth F. (2007): Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angewandte Chemie International Edition* **46**, 1222–1244.
- Magario I., Ma X., Neumann A., Syldatk C., Hausmann R. (2008): Non-porous magnetic micro-particles: Comparison to porous enzyme carriers for a diffusion rate-controlled enzymatic conversion. *Journal of Biotechnology* **134**, 72–78.
- Magner E. (2013): Immobilisation of enzymes on mesoporous silicate materials. *Chemical Society Reviews* **42**, 6213–6222.
- Mahajan S., Chandra V., Dave S., Nanduri R., Gupta P. (2012): Stem Bromelain-Induced Macrophage Apoptosis and Activation Curtail Mycobacterium tuberculosis Persistence. *The Journal of Infectious Diseases* **206**, 366–376.
- Mahmood R., Saleemuddin M. (2007): Additional stabilization of stem bromelain coupled to a thermosensitive polymer by uniform orientation and using polyclonal antibodies. *Biochemistry (Moscow)* **72**, 307–312.
- Marangon M., Vincenzi S., Lucchetta M., Curioni A. (2010): Heating and reduction affect the reaction with tannins of wine protein fractions differing in hydrophobicity. *Analytica Chimica Acta* **660**, 110–118.
- Mateo C., Palomo J.M., Fernandez-Lorente G., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R. (2007): Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology* **40**, 1451–1463.
- Mattiasson B., Kaul R. (1991): Determination of coupling yields and handling of labile proteins in immobilization technology. *Bioprocess technology* **14**, 161–179.
- Maurer H.R. (2001): Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**, 1234–1245.
- Ma Z., Liu H. (2007): Synthesis and surface modification of magnetic particles for application in biotechnology and biomedicine. *China Particuology* **5**, 1–10.
- Ma Z.-Y., Guan Y.-P., Liu X.-Q., Liu H.-Z. (2005): Preparation and characterization of micron-sized non-porous magnetic polymer microspheres with immobilized metal affinity ligands by modified suspension polymerization. *Journal of Applied Polymer Science* **96**, 2174–2180.
- Mierczynska-Vasilev A., Smith P. (2015): Current state of knowledge and challenges in wine clarification. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **21**, 615–626.

- Minami Y., Doi E., Hata T. (1971): Fractionation, Purification and Some Properties of Proteolytic Enzymes from Stem Bromelain. *Agricultural and Biological Chemistry* **35**, 1419–1430.
- Mojcik C.F., Shevach E.M. (1997): Adhesion molecules: a rheumatologic perspective. *Arthritis & Rheumatology* **40**, 991–1004.
- Mondal S., Bhattacharya S., Pandey J.N., Biswas M. (2011): Evaluation of acute anti-inflammatory effect of *Ananas comosus* leaf extracts in rats. *Pharmacologyonline* **3**, 1312–1315.
- Murachi T. (1964): Amino Acid Composition of Stem Bromelain*. *Biochemistry* **3**, 932–934.
- Murachi T. (1976): Bromelain enzymes. In: *Methods in Enzymology*. Vol. 45, Part B: Proteolytic Enzymes (Lorad L. ed.), Academic Press, New York, USA, 475–485.
- Murachi T., Neurath H. (1960): Fractionation and specificity studies on stem bromelain. *The Journal of Biological Chemistry* **235**, 99–107.
- Murachi T., Suzuki A., Takahashi N. (1967): Evidence for Glycoprotein Nature of Stem Bromelain. Isolation of a Glycopeptide*. *Biochemistry* **6**, 3730–3736.
- Murachi T., Yamazaki M. (1970): Changes in conformation and enzymic activity of stem bromelain in alkaline media. *Biochemistry* **9**, 1935–1938.
- Murachi T., Yasui M., Yasuda Y. (1964): Purification and Physical Characterization of Stem Bromelain*. *Biochemistry* **3**, 48–55.
- Nan C., Zhang Y., Zhang G., Dong C., Shuang S., Choi M.M.F. (2009): Activation of nylon net and its application to a biosensor for determination of glucose in human serum. *Enzyme and Microbial Technology* **44**, 249–253.
- Napper A.D., Bennett S.P., Borowski M., Holdridge M.B., Leonard M.J., Rogers E.E., Duan Y., Laursen R.A., Reinhold B., Shames S.L. (1994): Purification and characterization of multiple forms of the pineapple-stem-derived cysteine proteinases ananain and comosain. *Biochemical Journal* **301**, 727–735.
- Netto C.G.C.M., Toma H.E., Andrade L.H. (2013): Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **85–86**, 71–92.
- Neumayer C., Fögl A., Nanobashvili J., Blumer R., Punz A., Gruber H., Polterauer P., Huk I. (2006): Combined enzymatic and antioxidative treatment reduces ischemia-reperfusion injury in rabbit skeletal muscle. *Journal of Surgical Research* **133**, 150–158.
- Olsen D., Yang C., Bodo M., Chang R., Leigh S., Baez J., Carmichael D., Perälä M., Hämäläinen E.-R., Jarvinen M., Polarek J. (2003): Recombinant collagen and gelatin for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **55**, 1547–1567.
- Ota S., Moore S., Stein W.H. (1964): Preparation and Chemical Properties of Purified Stem and Fruit Bromelains*. *Biochemistry* **3**, 180–185.
- Otto H.-H., Schirmeister T. (1997): Cysteine Proteases and Their Inhibitors. *Chemical Reviews* **97**, 133–172.
- Ozlen S.N. (Longevity Network. Ltd., USA): *Cosmetic composition containing alpha hydroxyacids, salicylic acid, and enzyme mixture of bromelain and papain*. US 5441740, A61K 7/48, 15.8.1995, 4 strany.
- Pan T.-M., Lin S.-H. (1993): Studies on the utilization of immobilized papain or/and bromelain for beer chillproofing. *Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society* **31**, 106–119.
- Panchagnula V., Kumar C.V., Rusling J.F. (2002): Ultrathin layered myoglobin-polyion films functional and stable at acidic pH values. *Journal of the American Chemical Society* **124**, 12515–12521.
- Pavan R., Jain S., Shraddha, Kumar, A. (2012): Properties and Therapeutic Application of Bromelain: A Review. *Biotechnology Research International* **2012**, e976203.
- Ranchordas M.K., Burd N., Senchina D.S., Burke L.M., Stea, S.J., Castell L.M. (2012): A–Z of nutritional supplements: dietary supplements, sports nutrition foods and ergogenic aids for health and performance--Part 29. *British Journal of Sports Medicine* **46**, 155–156.
- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. (1998): Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**, 597–635.

- Rauf S., Ihsan A., Akhtar K., Ghauri M.A., Rahman M., Anwar M.A., Khalid A.M. (2006): Glucose oxidase immobilization on a novel cellulose acetate–polymethylmethacrylate membrane. *Journal of Biotechnology* **121**, 351–360.
- Ren J., Zhao M., Shi J., Wang J., Jiang Y., Cui C., Kakuda Y., Xue S.J. (2008): Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry* **108**, 727–736.
- Ritonja A., Rowan A.D., Buttle D.J., Rawlings N.D., Turk V., Barrett A.J. (1989): Stem bromelain: Amino acid sequence and implications for weak binding of cystatin. *FEBS Letters* **247**, 419–424.
- Rowan A.D., Buttle D.J., Barrett A.J. (1988): Ananain: A novel cysteine proteinase found in pineapple stem. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **267**, 262–270.
- Rowan A., Buttle D., Barret, A. (1990): The Cysteine Proteinases of the Pineapple Plant. *Biochemical Journal* **266**, 869–875.
- Rowan A.D., Buttle D.J. (1994): Pineapple cysteine endopeptidases. In: *Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases*. Vol. 1, (Barrett A. ed.), Academic Press, New York, USA, 555–568.
- Ruan G., Chen Z., Wei M., Liu Y., Li H., Du F. (2013): The study on microwave assisted enzymatic digestion of ginkgo protein. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **94**, 23–28.
- Sahbaz A., Aynioglu O., Isik H., Ozmen U., Cengil O., Gun B.D., Gungorduk K. (2015): Bromelain: a natural proteolytic for intra-abdominal adhesion prevention. *International Journal of Surgery* **14**, 7–11.
- Sassolas A., Blum L.J., Leca-Bouvier B.D. (2012): Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances* **30**, 489–511.
- Schüler D., Frankel R.B. (1999): Bacterial magnetosomes: microbiology, biomineralization and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **52**, 464–473.
- Scocca J., Lee Y. (1969): Composition and Structure of Carbohydrate of Pineapple Stem Bromelain. *The Journal of Biological Chemistry* **244**, 4852–4863.
- Secor E.R., Carson W.F., Cloutier M.M., Guernsey L.A., Schramm C.M., Wu C.A., Thrall R.S. (2005): Bromelain exerts anti-inflammatory effects in an ovalbumin-induced murine model of allergic airway disease. *Cellular Immunology* **237**, 68–75.
- Seifert J., Ganser R., Brendel W. (1979): Absorption of a proteolytic enzyme originating from plants out of the gastro-intestinal tract into blood and lymph of rats. *Z Gastroenterol* **17**, 1–8.
- Seo H., Itoyama K., Morimoto K., Takagishi T., Oka M., Hayashi T. (1998): Spacer effects on enzymatic activity of bromelain immobilized onto porous chitosan beads. *European Polymer Journal* **34**, 917–922.
- Shan G.-B., Xing J.-M., Luo M.-F., Liu H.-Z., Chen J.-Y. (2003): Immobilization of *Pseudomonas delafieldii* with magnetic polyvinyl alcohol beads and its application in biodesulfurization. *Biotechnology Letters* **25**, 1977–1981.
- Sheldon R.A., van Pelt S. (2013): Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews* **42**, 6223–6235.
- Shiew P.S., Fang Y.L., Majid F.A.A. (2010): *In vitro* study of bromelain activity in artificial stomach juice and blood. In: *Proceedings of the 3rd International Conference on Biotechnology for the Wellness Industry*, Kuala Lumpur, Malaysia, 21 stran.
- Shi W., Wei M., Jin L., Li C. (2007): Calcined layered double hydroxides as a “biomolecular vessel” for bromelain: Immobilization, storage and release. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **47**, 58–65.
- Shukor M.Y., Masdor N., Baharom N.A., Jamal J.A., Abdullah M.P.A., Shamaan N.A., Syed M.A. (2008): An inhibitive determination method for heavy metals using bromelain, a cysteine protease. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **144**, 283–291.
- Siebert K.J., Lynn P.Y. (1997): Mechanisms of beer colloidal stabilization. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **55**, 73–78.

- Singh L.R., Ranjana Y., Devi R.Y. (2003): Enzymological characterization of pineapple extract for potential application in oak tasar (*Antheraea proylei* J.) silk cocoon cooking and reeling. *Electronic Journal of Biotechnology* **6**, 1-7.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150**, 76–85.
- Soares P.A.G., Vaz A.F.M., Correia M.T.S., Pessoa Jr A., Carneiro-da-Cunha M.G. (2012): Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation. *Separation and Purification Technology* **98**, 389–395.
- Song M.-M., Nie H.-L., Zhou Y.-T., Zhu L.-M., Bao J.-Y. (2011): Affinity Adsorption of Bromelain on Reactive Red 120 Immobilized Magnetic Composite Particles. *Separation Science and Technology* **46**, 473–482.
- Sree P.P.S., Jayakumar K., Vijay M., Chintu S., Sarath B.K. (2012): Immobilization and Kinetic Studies of Bromelain: A Plant Cysteine Protease From Pineapple (*Ananas Comosus*) Plant Parts. *International Journal Of Medical And Health Sciences* **1**, 10–16.
- Srinath R., Ramalingam C., Islam N.N. (2012): Isolation and characterization of Bromelain from pineapple (*Ananas Comosus*) and comparing its anti-browning activity on apple juice with commercial antibrowning agents. *Elixir Food Science* **45**, 7822–7826.
- Staub A., Guilleme D., Schappler J., Veuthey J.-L., Rudaz S. (2011): Intact protein analysis in the biopharmaceutical field. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **55**, 810–822.
- Stewart K.K. (1973): A method for automated analyses of the activities of trypsin, chymotrypsin and their inhibitors. *Analytical Biochemistry* **51**, 11–18.
- Sullivan G.A., Calkins C.R. (2010): Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and low-connective tissue. *Meat Science* **85**, 730–734.
- Sun S., Zeng H. (2002): Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **124**, 8204–8205.
- Tanuja S., Viji P., Zynudheen A., Joshy C. (2012): Composition, functional properties and antioxidative activity of hydrolysates prepared from the frame meat of Striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Egyptian Journal of Biology* **14**, 27-35.
- Tan Y., Liu C., Yu L., Chen X. (2008): Effect of linoleic-acid modified carboxymethyl chitosan on bromelain immobilization onto self-assembled nanoparticles. *Frontiers of Materials Science* **2**, 209–213
- Taussig S.J., Batkin S. (1988): Bromelain, the enzyme complex of pineapple (*Ananas comosus*) and its clinical application. An update. *Journal of Ethnopharmacology* **22**, 191–203.
- The European Bioinformatics Institute Home Page: <https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=1w0q&template=main.html> (3.1.2016)
- Tománková O., Kopečný J. (1995): Prediction of feed protein degradation in the rumen with bromelain. *Animal Feed Science and Technology* **53**, 71–80.
- Vatta L.L., Sanderson R.D., Koch K.R. (2006): Magnetic nanoparticles: Properties and potential applications. *Pure and Applied Chemistry* **78**, 1793–1801.
- Wang J., Deng T., Lin Y., Yang C., Zhan W. (2008): Synthesis and characterization of CoFe₂O₄ magnetic particles prepared by co-precipitation method: Effect of mixture procedures of initial solution. *Journal of Alloys and Compounds* **450**, 532–539.
- Wani S.S., Mashru R.C. (2014): Sensitive and selective methods for determination of proteolytic activity of formulation containing bromelain and trypsin as proteolytic enzymes. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **5**, 4838–4845.
- Watanabe M., Watanabe J., Sonoyama K., Tanabe S. (2000): Novel method for producing hypoallergenic wheat flour by enzymatic fragmentation of the constituent allergens and its application to food processing. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **64**, 2663–2667.
- Waters E.J., Alexander G., Muhlack R., Pocock K.F., Colby C., O'Neill, B.K., Høj P.B., Jones P. (2005): Preventing protein haze in bottled white wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **11**, 215–225.

- Wooding A., Kilner M., Lambrick D.B. (1991): Studies of the double surfactant layer stabilization of water-based magnetic fluids. *Journal of Colloid and Interface Science* **144**, 236–242.
- Xue Y., Wu C.-Y., Branford-White C.J., Ning X., Nie H.-L., Zhu L.-M. (2010): Chemical modification of stem bromelain with anhydride groups to enhance its stability and catalytic activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **63**, 188–193.
- Xu J., Sun J., Wang Y., Sheng J., Wang F., Sun M. (2014): Application of iron magnetic nanoparticles in protein immobilization. *Molecules* **19**, 11465–11486.
- Yasuda Y., Takahashi N., Murach, T. (1970): Composition and structure of carbohydrate moiety of stem bromelain. *Biochemistry* **9**, 25–32.
- Yin L., Sun C.K., Han X., Xu L., Xu Y., Qi Y., Peng J. (2011): Preparative purification of bromelain (EC 3.4.22.33) from pineapple fruit by high-speed counter-current chromatography using a reverse-micelle solvent system. *Food Chemistry* **129**, 925–932.
- Yodoya S., Takagi T., Kurotani M., Hayashi T., Furuta M., Oka M., Hayashi T. (2003): Immobilization of bromelain onto porous copoly(γ -methyl-L-glutamate/L-leucine) beads. *European Polymer Journal* **39**, 173–180.
- Yoshioka S., Izutsu K., Aso Y., Takeda Y. (1991): Inactivation Kinetics of Enzyme Pharmaceuticals in Aqueous Solution. *Pharmaceutical Research* **8**, 480–484.
- Zappino M., Cacciotti I., Benucci I., Nanni F., Liburdi K., Valentini F., Esti M. (2015): Bromelain immobilization on microbial and animal source chitosan films, plasticized with glycerol, for application in wine-like medium: Microstructural, mechanical and catalytic characterisations. *Food Hydrocolloids* **45**, 41–47.
- Zhang Y., Kohler N., Zhang M. (2002): Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials* **23**, 1553–1561.
- Zucca P., Sanjust E. (2014): Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: methods and mechanisms. *Molecules* **19**, 14139–14194.

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AE	aminoethyl
BAPNA	N_{α} -benzoyl- <i>DL</i> -arginin 4-nitroanilid hydrochlorid
BCA	bicinchoninová metoda
BSA	hovězí sérový albumin
Bz-Phe-Val-Arg- <i>p</i> NA	<i>N</i> -benzoyl-Phe-Val-Arg- <i>p</i> -nitroanilid hydrochlorid
CD4	cluster of differentiation – diferenciačná skupina
CLEAs	crosslinked enzyme aggregates – zesítené enzymové agregáty
CLECs	crosslinked enzyme crystals – zesítené enzymové krystaly
CM	karboxymethyl
CVD	kardiovaskulárny onemocnění
Da (kDa)	Dalton (kilodalton)
DEAE	diethylaminoethyl
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	dithiothreitol
E-64	<i>trans</i> -epoxysukcinyl- <i>L</i> -leucylamido(4-guanidino)butan
EDC.HCl	<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylkarbodiimid hydrochlorid
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
EI	účinnosť imobilizace
γ -Fe ₂ O ₃	maghemit
Fe ₃ O ₄	magnetit
FPLC	rychlá kapalinová chromatografie s vysokým rozlišením
GnHCl	hydrochlorid guanidín
+HIm	protonizovaný imidazol
IL	interleukín
Im	imidazol
K_m	Michaelisova konstanta
K-Pi	fosfátový pufr
LNPE	N^{α} -CBZ- <i>L</i> -lysin <i>p</i> -nitrofenylester
NCBI	National Center for Biotechnology Information – Národní centrum pro biotechnologické informácie
NHS	<i>N</i> -hydroxysukcinimid
NK	natural killers – prirodzené zabijáči

OD	optická hustota
PCR	polymerasová řetězová reakce
PVA	polyvinylalkohol
SDS	dodecylsírán sodný
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
TCA	kyselina trichloroctová
TIA	tranzitorní ischemické ataka
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TNF- α	tumor nekrotizující faktor- α
Z-Arg-Arg-NHMec	benzyloxykarbonylarginyl-arginin-4-methylkumarin-7-ylamid
Z-Arg-Arg- ρ Na	catepsin B