

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra anorganické chemie



Imobilizace a charakteristika aminotransferas

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Nikol Krčová
Studijní program:	B1407 Chemie
Studijní obor:	Chemie pro víceoborové studium, Biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
Rok:	2015

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Ludmily Zajoncové, Ph.D. za použití literatury a zdrojů uvedených v závěru práce.

V Olomouci dne 5. 5. 2015

.....

Nikol Krčová

Chtěla bych poděkovat své vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Ludmile Zajoncové, Ph.D. za odborné vedení, rady a připomínky při vypracování této bakalářské práce. Poděkování patří také Mgr. Miroslavovi Jořenkovi za pomoc při práci s imobilizací aminotransferasy a vyhodnocením výsledků. Dále všem pracovníkům katedry biochemie PŘF UP v Olomouci za ochotu a spolupráci.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Nikol Krčová
Název práce	Imobilizace a charakteristika aminotransferas
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2015

Abstrakt

Tato bakalářská práce je zaměřena na imobilizaci aminotransferasy na různé magnetické nosiče a určení vlastností imobilizované aminotransferasy ve srovnání s volnou aminotransferasou. Teoretická část se zabývá obecnou charakteristikou aminotransferas (výskyt, struktura, klasifikace, reakční mechanismus, substrátová specifita, inhibice). Teoretická část zahrnuje imobilizaci aminotransferas a přehled způsobů imobilizace enzymů na různé nosiče a jejich využití v praxi.

Experimentální část se věnuje přípravě imobilizované aminotransferasy (*Chromobacterium violaceum*) různými metodami na magnetické celulosové mikročástice. Porovnává vlastnosti imobilizované aminotransferasy (aktivita, tepelná stabilita, funkční stabilita, operační stabilita, vazebná kapacita) ve srovnání s její volnou formou.

Klíčová slova	aminotransferasy, imobilizace, aktivita, stabilita
Počet stran	59
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Nikol Krčová
Title	Immobilization and characterization of aminotransferases
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
The year of presentation	2015

Abstract

This bachelor thesis is focused on immobilization of aminotransferase on various magnetic carriers and determine the properties of immobilized aminotrasferase in comparison to free aminotrasferase. The theoretical part deals with general characteristics of aminotransferase (occurence, structure, classification, reaction mechanism, substrate specificity, inhibition). The theoretical part also involves immobilization of aminotrasferases and an overview of methods of immobilization of enzymes on various carriers and their use in practice.

The experimental part deals with immobilization of aminotransferase (*Chromobacterium violaceum*) with various methods on magnetic cellulose microparticles. There is also a comparison of properties of immobilized aminotrasferase (aktivity, thermal stability, functional stability, operational stability and binding capacity) with free enzyme.

Keywords	aminotransferases, immobilization, activity, stability
Number of pages	59
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1	Cíle práce	8
2	Úvod.....	9
3	Teoretická část.....	10
3.1	Aminotransferasy	10
3.1.1	Výskyt	12
3.1.2	Struktura.....	14
3.1.2.1	Aktivní místo.....	15
3.1.3	Klasifikace aminotransferas	16
3.1.4	Reakční mechanismus	21
3.1.5	Substrátová specifita	23
3.1.5.1	Inhibice.....	23
3.2	Imobilizace enzymů.....	26
3.2.1	Výběr nosiče.....	26
3.2.1.1	Porézní nosiče	27
3.2.1.2	Neporézní nosiče	28
3.2.2	Metody imobilizace.....	29
3.2.2.1	Reverzibilní imobilizace	30
3.2.2.1.1	Adsorpce	31
3.2.2.2	Irreverzibilní imobilizace	31
3.2.2.2.1	Zachycení	32
3.2.2.2.2	Zesítnění	33
3.2.2.2.3	Enkapsulace.....	33
3.2.2.2.4	Kovalentní vazba.....	34
3.2.3	Využití imobilizovaných enzymů v praxi	34
3.3	Imobilizace aminotransferas	35
3.4	Aplikace v praxi	38
3.4.1	Historie ω -aminotransferas	38

4	Experimentální část	39
4.1	Materiály a chemikálie	39
4.2	Přístroje.....	40
4.3	Metody.....	40
4.3.1	Stanovení aktivity aminotransferasy	40
4.3.1.1	HPLC metoda stanovení produktů enzymové reakce	41
4.3.2	Imobilizace aminotransferasy pomocí jodistanu.....	42
4.3.3	Imobilizace aminotransferasy pomocí glutaraldehydu	42
4.3.4	Imobilizace aminotransferasy pomocí karbodiimidu.....	43
4.3.5	Stanovení vazebné kapacity aminotransferasy.....	43
4.3.6	Teplotní stabilita aminotransferasy	44
4.3.7	Funkční stabilita aminotransferasy	44
4.3.8	Operační stabilita aminotransferasy.....	45
4.4	Výsledky a diskuse	Chyba! Záložka není definována.
4.4.1	Stanovení aktivity aminotransferasy	Chyba! Záložka není definována.
4.4.2	Stanovení vazebné kapacity aminotransferasy.....	Chyba! Záložka není definována.
4.4.3	Teplotní stabilita aminotransferasy	Chyba! Záložka není definována.
4.4.4	Funkční stabilita aminotransferasy	Chyba! Záložka není definována.
4.4.5	Operační stabilita aminotransferasy	Chyba! Záložka není definována.
5	Závěr.....	Chyba! Záložka není definována.
6	Literatura.....	46
7	Seznam použitých zkratk.....	49

1 Cíle práce

- Vypracovat rešerši na téma „Imobilizace a charakteristika aminotransferas“
- Imobilizace aminotransferas na magnetické nosiče
- Stanovení vlastností volné a imobilizované aminotransferasy na magnetických celulosových mikročasticích

2 Úvod

Enzymy jsou relativně drahé biokatalyzátory, proto je z ekonomického hlediska vyžadováno jejich opětovné použití. Kromě použití v biotechnologických procesech se imobilizované enzymy využívají v analytické chemii, v bioafinitní chromatografii a slouží jako biorekogniční vrstva při konstrukci katalytických biosensorů.

Důležitou třídou enzymů jsou aminotransferasy, enzymy katalyzující transaminační reakce. Od objevů transaminací v biologických systémech význam aminotransferas pro metabolismus aminokyselin výrazně vzrostl. Aminotransferasy hrají důležitou roli v metabolismu aminokyselin, proto jsou značně rozšířeny v přírodě. Jsou všudypřítomné, nacházejí se jak v mikroorganismech, tak v eukaryotických buňkách. Aminotransferasy mají mnoho výhod oproti jiným systémům, nepotřebují externí přídavek kofaktoru, mají vysokou enantioselektivitu, širokou substrátovou specifitu, vysokou reakční rychlost a stabilitu. Vzhledem k těmto vlastnostem se aminotransferasy staly průmyslově používanými enzymy k výrobě aminokyselin, chirálních aminů, aminoalkoholů a aminocukrů, což jsou výchozí látky pro farmaceutický a agrochemický průmysl. Aminotransferasy mohou být klasifikovány jako α -aminotransferasy nebo ω -aminotransferasy podle polohy aminoskupiny, která je převedena s ohledem na karboxylovou skupinu substrátu. Pouze ω -aminotransferasy ukázaly katalytickou aktivitu vůči primárním aminům.

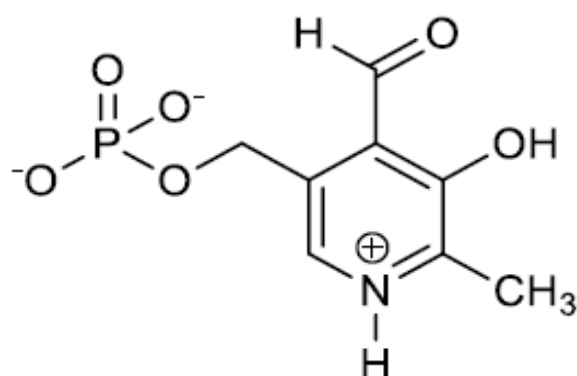
Vysoké náklady na izolaci a purifikaci enzymů jsou faktory, které vedou k imobilizaci enzymů na pevné nosiče. Hlavními přednostmi imobilizace jsou snadná separace enzymu z reakční směsi, snížení provozních nákladů, vysoká stabilita procesu, jednodušší řízení enzymové reakce a možnost opakovaného použití. Současným trendem je imobilizace enzymů na neporézní nosiče. Magnetické celulosové mikročástice se vyznačují vysokou chemickou rezistencí a snášenlivostí s nejrůznějšími rozpouštědly a pufrů. Jsou mechanicky odolné a pomocí magnetického pole se dají snadno separovat.

3 Teoretická část

3.1 Aminotransferasy

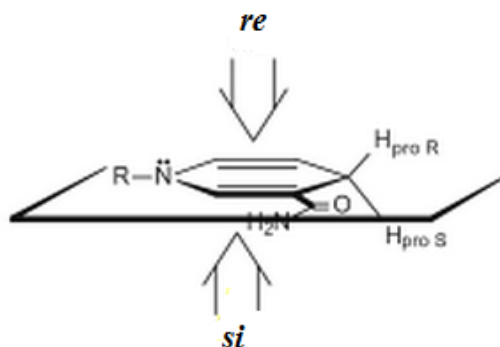
Aminotransferasy (starší název: transaminasy), patří do enzymové třídy transferas (EC 2), přenáší dusíkaté skupiny (EC 2.6). Jedná se o přenos aminoskupiny (EC 2.6.1) od dárce, obecně aminokyseliny, na akceptor, obecně 2-oxokyselinu.

Aminotransferasy jsou enzymy katalyzující transaminační reakce. Tyto reakce jsou reverzibilní. Dochází při nich k přenosu aminoskupiny z aminokyseliny na α -oxokyselinu (sloučenina s karboxylovou skupinou a s keto skupinou). Výsledkem je vznik jiné aminokyseliny a α -oxokyseliny. Aminotransferasy jsou specifické pro jeden pár aminokyseliny s její odpovídající α -oxokyselinou. Kofaktorem této reakce je pyridoxal-5'-fosfát (PLP, derivát vitamínu B6) znázorněný na Obr. 1, který vzniká fosforylací pyridoxalu. Ten spolu s pyridoxinem a pyridoxaminem tvoří funkční deriváty vitamínu B6. Pravděpodobně představuje nejuniversálnější organický kofaktor, který je používán různými enzymy ve všech organismech.



Obr. 1 Pyridoxal-5'-fosfát (převzato z Hopwood, 2012).

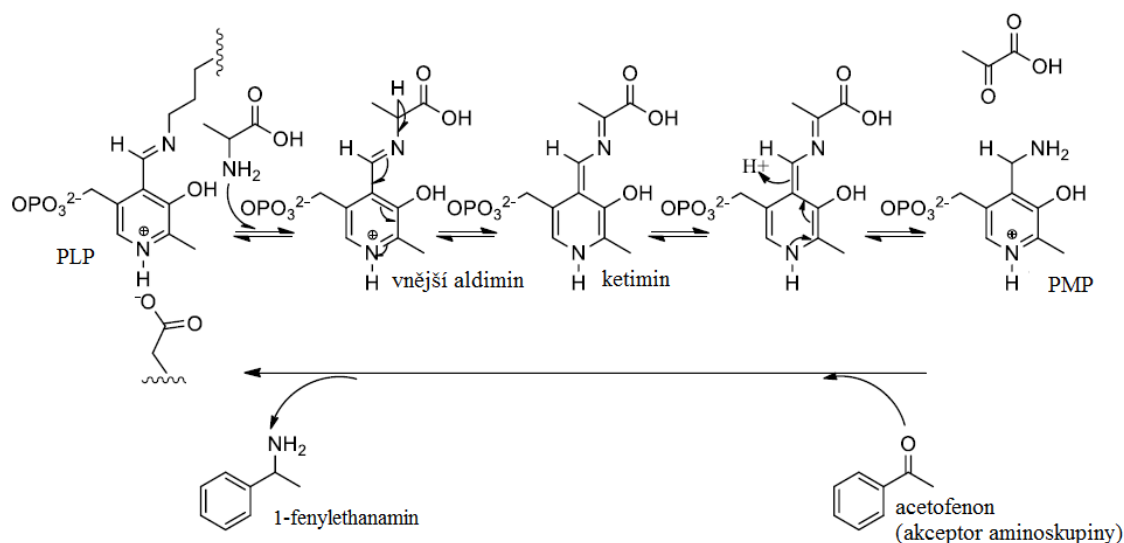
Všechny aminotransferasy mají kofaktor pyridoxal-5'-fosfát umístěn v aktivním místě četnými nekovalentními interakcemi, takže *si* plocha pyridinového kruhu leží směrem k rozpouštědлу a substrátu a *re* plocha pyridinového kruhu leží směrem k proteinu (Obr. 2). Jediná výjimka je v případě aminotransferas, které využívají rozvětvené aminokyseliny jako substráty a D-aminotranferas, kde dochází k dodání protonu z *re* strany pyridinového kruhu (Hwang *et. al.*, 2005).



Obr. 2 *si* a *re* plocha pyridinového kruhu (převzato z Dalton, 2011).

Aminotransferasy mají tedy v aktivním centru skupinu důležitou pro katalytickou činnost. Jelikož transaminační reakce jsou vratné, aminotransferasy hrají klíčovou roli při degradaci i biosyntéze aminokyselin. Syntéza jedné aminokyseliny často vyžaduje degradaci jiné aminokyseliny. Aminokyseliny mohou být v určitých případech nahrazeny aminy, které poskytují příslušné aminoskupiny. Jako akceptorové molekuly aminokyselin mohou sloužit i aldehydy.

Reakce běží, je-li přítomen pyridoxal-5'-fosfát (PLP), který je v průběhu reakce přeměněn na pyridoxamin-5'-fosfát (PMP) prostřednictvím přenosu aminoskupiny ze substrátu. Chová se jako druh transportu amoniaku a elektronů mezi oběma molekulami zapojenými do reakce. Zpočátku se dárce aminoskupiny musí navázat na enzym a koenzym se asimiluje, je tedy převeden na pyridoxamin-5'-fosfát (PMP). Tudiž vznikne ketokyselina a aminokyselina z koenzymu se převede na molekulu akceptoru. Transaminace je ukončena uvolněním koenzymu v jeho aldehydové formě (Tavares, 2011). Mechanismus je uveden na Obr. 3.



Obr. 3 Ping-ponk bi-bi mechanismus (upraveno dle Hopwood, 2012).

3.1.1 Výskyt

Aminotransferasy jsou všudypřítomné. Jsou to klíčové enzymy několika metabolických drah, proto jsou značně rozšířeny v přírodě. Nacházejí se v živočišných tkáních, rostlinách a mikroorganismech. Jsou přítomny v metabolismu většiny aminokyselin.

Aminotransferasy se nacházejí u všech rostlin v mnoha subcelulárních kompartmentech, jako například cytosol, mitochondrie, chloroplasty a peroxisomy. Jejich aktivita zahrnuje zejména redistribuci dusíku, fotorespiraci, syntézu potřebných aminokyselin, syntézu sekundárních metabolitů a udržování hladin potřebných aminokyselin (Neuberg, 2011). Aspartátaminotransferasa a glutamátaminotransferasa jsou dvě nejdůležitější a nejvíce se vyskytující aminotransferasy v rostlinných pletivech.

Živočišné aminotransferasy se nacházejí v játrech, ledvinách, mozku a srdci. Jsou to velmi důležité enzymy v klinické praxi (Westlake, 2012). Jde o typické nitrobuněčné enzymy, jež při poškození tkání pronikají přes buněčné stěny do mezibuněčného prostoru a odtud do krevního oběhu. Změny v aktivitě aminotransferas slouží jako ukazatele onemocnění jater (Westlake, 2012). Jedná se o indikátory míry buněčné smrti, ke které dochází v játrech. To je užitečné při diagnostice žloutenky a onemocnění jater například při nadměrné konzumaci alkoholu. Toto zjištění je důležité v cyklu glukosa-alanin, kde probíhá transaminace pyruvátu na alanin ve svalech, ten pak proniká krví do jater, kde je přeměněn zpět na pyruvát a pak na glukosu, což má být použito v energeticky aktivních svalových buňkách (Westlake, 2012).

Aktivita aminotransferas se zvyšuje v krvi při destrukci jaterních buněk, a to u všech nemocí jater: virová hepatitida, infekční nebo toxická rakovina jater. Zvýšení aktivity aminotransferas může být také spojené s autoimunitním onemocněním, obezitou nebo nadváhou, dále alkoholismem, myopatií, infarktem myokardu, svalovou námahou nebo svalovým traumatem (Fialová a Vejražka, 2005).

Při poškození jater se do krve nadměrně uvolňují některé enzymy (Fialová a Vejražka, 2005). V případě poškození pouze cytoplazmatické membrány jaterní buňky se do krve uvolňují enzymy lokalizované především v cytoplazmě (alaninaminotransferasa, cytoplazmatický isoenzym aspartátaminotransferasy a laktátdehydrogenasa, což je jaterní isoenzym). V případě těžkého poškození

hepatocytů (jsou zasaženy i mitochondrie), se do krve dostávají jak cytoplazmatické enzymy, tak i enzymy lokalizované v mitochondriích (mitochondriální izoenzym aspartátaminotransferasy, glutamátdehydrogenasa). Nejcitlivějšími indikátory poškození jsou aminotransferasy: alaninaminotransferasa a aspartátaminotransferasa (Fialová a Vejražka, 2005).

Alaninaminotransferasa (ALT) je nejvíce obsažena v játrech, v ostatních organelách (kosterní svalstvo, srdce, atd.) je její aktivita mnohem nižší. Je lokalizovaná pouze v cytoplasmě (Fialová a Vejražka, 2005). Fyziologická hodnota v krevním séru je $0,1 - 0,78 \mu\text{kat.l}^{-1}$ (Kotačková, 2011a). Aspartátaminotransferasa (AST) se vyskytuje ve větším množství v řadě orgánů (játra, srdce, kosterní svalstvo, ledviny, pankreat a erytrocyty). Je lokalizovaná jak v mitochondriích, tak v cytoplasmě. Cytoplazmatická frakce se uvolňuje do oběhu snadno i při mírném poškození hepatocytů (při poškození permeability buněčné membrány) (Fialová a Vejražka, 2005). Fyziologická koncentrace v krevním séru je $0,05 - 0,72 \mu\text{kat.l}^{-1}$ (Kotačková, 2011b). Zvýšení koncentrace AST je závažnější než zvýšení ALT, protože signalizuje uvolnění obou frakcí, tedy rozpad jaterních buněk (Fialová a Vejražka, 2005).

Aminotransferasy produkované mikroorganismy jsou důležité především pro komerční účely. Sušené extrakty *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* katalyzují tvorbu glutamátu v přítomnosti α -ketoglutarátu jako akceptoru aminokyseliny. Dárci aminoskupin jsou aspartát, alanin, valin, leucin, norleucin, tryptofan, tyrosin, fenylalanin a methionin. Donorem aminoskupiny může být i isoleucin, histidin, lysin, threonin a glycin. Glutamová-tyrosin a fenylalanin-glutamová aminotransferasy byly získány v extraktech z *E. coli*. Bylo prokázáno, že jak buněčné sušené přípravky, tak extrakty z buněk vyžadují PLP pro maximální aktivitu (Feldman a Gunsalus, 1950).

Obecně platí, že aminotransferasy živočišných tkání jsou specifické pro L-aminokyseliny. Některé bakterie obsahují aminotransferasy specifické pro D- i L-aminokyseliny (Moudgil a Sadasivudu, 2006). Bakterie mají kromě L-aminokyselin aminotransferas enzym schopný transaminace D-aminokyselin. Tento enzym je důležitý pro bakterie, protože katalyzuje syntézu D-glutamové kyseliny a D-alaninu, což jsou důležité složky bakteriální buněčné stěny, stejně jako celá řada dalších D-aminokyselin. V důsledku toho jsou D-alaninaminotransferasy cílové enzymy pro vývoj nových antimikrobiálních látek (Sugio *et. al.*, 1995). Aminotransferasy jsou

pravděpodobně nejdůležitější a všudypřítomné enzymy pro syntézu a degradaci chirálních aminokyselin a amidů v přírodě.

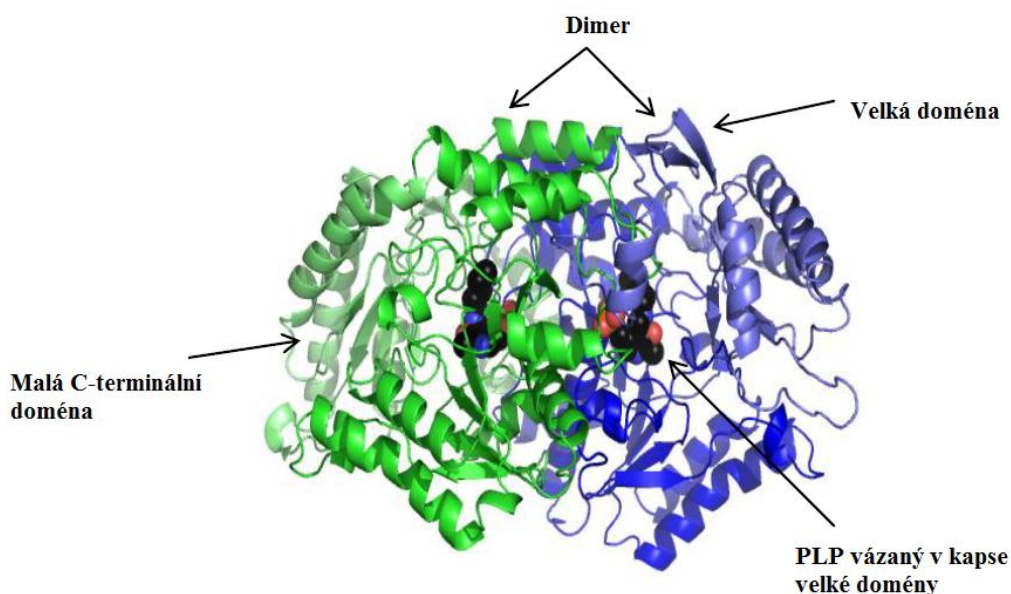
3.1.2 Struktura

Enzymy s kofaktorem PLP mohou být zařazeny do strukturních typů I–IV na základě podobnosti jejich terciárních struktur (Hirotsu *et. al.*, 2005). Pouze do dvou skupin byly zařazeny aminotransferasy. Všechny doposud známé aminotransferasy patří do strukturního typu I, s výjimkou aminotransferas, které využívají rozvětvené aminokyseliny jako substráty a D-alaninaminotransferasy, které byly zařazeny do strukturního typu IV. Mají různé druhy funkcí k rozpoznání obou substrátů, což je nezbytné pro transaminační reakce katalyzované aminotransferasami. K objasnění, jak aminotransferasy rozpoznávají dva různé druhy aminokyselin a katalyzují transaminační reakce, byly určeny trojrozměrné struktury různých aminotransferas pomocí rentgenového záření. Struktura byla řešena sledováním krystalů strukturních typů I a IV se substráty, inhibitory nebo bez nich. Tyto enzymy vytváří funkční homodimery, někdy mnohem rozsáhlejší komplexy (Hirotsu *et. al.*, 2005).

Aminotransferasy spolu s dalšími enzymy s kofaktorem PLP mají oblasti, kde aminokyselinová sekvence je u všech stejná. Obvykle ji tvoří lysin, který reaguje s aldehydovou skupinou PLP a karboxylový postranní řetězec, obvykle kyselina glutamová a aspartátová (Hopwood, 2012).

Krystalová studie aminotransferas patřících do typu I prokázala, že mají podobné trojrozměrné struktury. Aminotransferasy tvoří homodimery (Obr. 4) s průměrnou molekulovou hmotností monomeru 40 kDa (Hirotsu *et. al.*, 2005). Každý monomer se skládá z velké domény, v níž je vázán PLP. Má třívrstevnou $\alpha / \beta / \alpha$ konformaci. Skládá se z dvojice α -helixů, mezi nimi se nachází sedm spletených β -listů a malé C-terminální domény. Malá doména obsahuje malý β -list s α -helixy kolem něj, orientovaných kolmo na list (Westlake, 2012). Aktivní místo se nachází na dimerním rozhraní a rozhraní domény s koenzymem PLP nacházejícím se ve spodní části kapsy aktivního místa a tvořící Schiffovy báze s katalytickým zbytkem lysinu. Nejvýznamnější zástupce strukturního typu I je aspartátaminotransferasa, podle níž se tato skupina někdy nazývá. AST mění celou svou konformaci z otevřené do uzavřené formy v závislosti na vazbě substrátu. Podobně to platí i pro aromatické AT, které mají celkovou strukturu a aktivní místo zcela podobné AST (Hirotsu *et. al.*, 2005).

Skupina IV se strukturně podobá skupině I a odráží tak substrátovou specifitu enzymů, které vážou D-aminokyseliny (Sugio *et. al.*, 1995). D-alaninaminotransferasa je jedna z mála zástupců této skupiny.



Obr. 4 Terciární struktura holoenzymu z *Chromobacterium violaceum*, zástupce strukturního typu I. Kofaktor PLP je reprezentován kuličkami a světlejší stínované domény (světle zelená, světle modrá) jsou malé domény, a tmavé zbarvené domény jsou velké domény (upraveno podle Westlake, 2012).

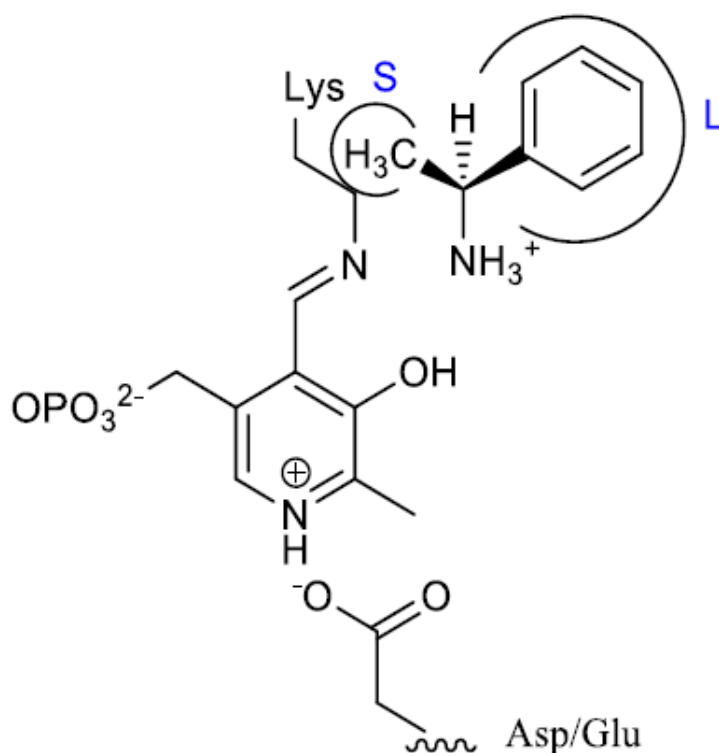
Aminotransferasy strukturního typu IV, jsou homohexadimery (trimer dimerů) a jejich substrátem jsou aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (BCAT) (Hirotzu *et. al.*, 2005). Molekulová hmotnost monomeru je 31,5 kDa. Každý monomer se skládá z malé a velké domény a mezidoménové smyčky (Hirotzu *et. al.*, 2005).

3.1.2.1 Aktivní místo

Shin a Kim (2002) navrhli model aktivního místa na základě vztahu mezi strukturou a reaktivitou substrátu. Model aktivního místa a trojrozměrné určení krystalové struktury byly použity k objasnění, jak enzym řídí substrátovou specifitu a stereoselektivitu (Turner a Truppo, 2013).

Na Obr. 5 je zobrazen model dvou vazebných míst, který se skládá z velké kapsy (L) a malé kapsy (S). Velká kapsa slouží jako karboxylová past a malá pojme řetězec na straně substrátu (Hopwood, 2012; Turner a Truppo, 2013). Klíčovými faktory

bylo rozpoznání obou substrátů, hydrofobních a karboxylových skupin v kapse (L) a silný elektrostatický odpor pro karboxylové skupiny v kapse (S) (Van Hauwermeiren, 2014). Navíc sférická omezení v malé kapse byla zásadní pro rozpoznání substrátu, zabraňují vstupu většího substituentu než ethylové skupiny a vykazují silný odpor ke kyselým skupinám. Každá skupina větší než ethylová vykazovala sníženou aktivitu. Dokonce i velká kapsa vykazuje limitující velikost substituentu. Větší substituent než sféricky objemná hexylová skupina byla inaktivní vůči enzymu (Hopwood, 2012).



Obr. 5 Model aktivního místa (převzato z Hopwood, 2012).

3.1.3 Klasifikace aminotransferas

V poslední době byly vytvořeny rozsáhlé databáze shromažďující informace o aminotransferasach (Rudat *et. al.*, 2012).

Aminotransferasy lze rozdělit do šesti tříd na základě srovnání sekvencí v databázi Pfam (Tab. 1) (Hwang *et. al.*, 2005). Třídy I a II, III a V patří do stejného typu PLP enzymů, na rozdíl od třídy IV, která patří do jiné skupiny. Zástupci třídy I a II jsou aspartátaminotransferasy a aromatické AT, třídy III ω -AT a třídy V fosfoserinaminotransferasy. D-alaninaminotransferasy a aminotransferasy, které využívají rozvětvené aminokyseliny jako substráty, patří do podskupiny IV (Rudat

et. al., 2012). Nejodlišnější skupinou jsou cukerné aminotransferasy, které byly zařazeny do podskupiny VI (Hwang *et. al.*, 2005).

Tab. 1 Klasifikace aminotransferas (převzato z Hwang *et. al.*, 2005).

Podskupina ^a	Enzym ^b	Hlavní substráty	
		Amino donor	Amino akceptor
I a II	AST	L-aspartát	2-Ketoglutarát
	ALT	L-Alanin	2-Ketoglutarát
	AroAT	L-Phenylalanin	2-Ketoglutarát
	HisPAT	L-Histidonol-fosfát	2-Ketoglutarát
III	AcornAT	N-Acetyl-L-ornithin	2-Ketoglutarát
	OrnAT	L-Ornithin	2-Ketoglutarát
	ω -AaAT	β -Alanin	Pyruvát
	GaBaAT	4-Aminobutyřát	2-Ketoglutarát
	DapaAT	7,8-Diaminopelargonát	Methylthio-2-oxobutanoát
IV	D-AlaAT	D-Alanin	2-Ketoglutarát
	BCAT	L-Leucin	2-Ketoglutarát
V	SerAT	L-Serin	Pyruvát
	PSerAT	3-Fosfo-L-serin	2-Ketoglutarát
(VI)	ArnB	L-Glutamát	UDP-2-acetamid-4-keto-2,6-dideoxyglukosa
	TylB	L-Glutamát	TDP-3-keto-6-deoxy-D-glukosa
	StsC	L-Glutamát	<i>scyllo</i> -inositol

^a podskupiny podle databáze Pfam

^bAST: aspartátaminotransferasa; ALT: alaninaminotransferasa; AroAT: aromatická aminotransferasa; HisPAT: histidinol-fosfátaminotransferasa; AcornAT: acetylornithinaminotransferasa; OrnAT: ornitinaminotransferasa; ω -AaAT: ω -aminokyselinaaminotransferasa; GaBaAT: 4-aminobutyřátaminotransferasa; DapaAT: diaminopelargonátaminotransferasa; D-AlaAT: D-alaninaminotransferasa; BCAT: aminotransferasa, která využívá rozvětvené aminokyseliny jako substrát; SerAT: serinaminotransferasa; PSerAT: fosfoserinaminotransferasa; ArnB: UDP-2-acetamid-4-amino-2,4,6-trideoxyglukosaaminotransferasa; TylB: TDP-3-keto-6-deoxy-D-glukosaaminotransferasa; StsC: L-glutamin-*scyllo*-inositolaminotransferasa.

Podskupina I a II, IV, V výhradně přenáší aminoskupiny vázané na α -uhlíku aminokyseliny. Zatímco aminotransferasy v podskupině III mohou přenášet aminoskupiny z atomu uhlíku, který nemá karboxylovou skupinu (Rudat *et. al.*, 2012).

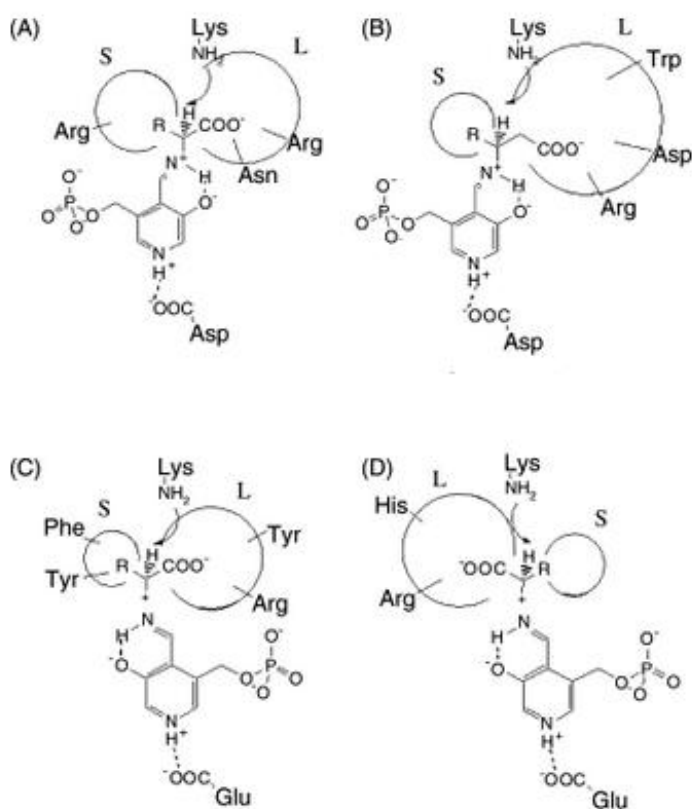
Podskupina I a II tedy zahrnuje aminotransferasy, které přenáší aminoskupiny těchto aminokyselin: aspartát, alanin, tyrosin, histidinol-fosfát a fenylalanin (AST, ALT, TyrAT, HisPAT a PheAT) (Mehta *et. al.*, 1993). AST a aromatické AT jsou nejvíce studované aminotransferasy (Westlake, 2012). Obecně platí, že AST a AroAT používají L-aspartát a L-tyrosin (nebo L-fenylalanin) jako donory aminoskupiny a α -ketoglutarát jako akceptor aminoskupiny. Podle informací o struktuře všechny tyto aminotransferasy jsou homodimerní enzymy a aktivní místo se skládá ze dvou vazebných kapes (Obr. 6). Karboxylová skupina donorové aminokyseliny je umístěna ve velké kapse a stabilizována argininem a asparaginem. Postranní řetězec aminokyseliny je umístěn v malé vazebné kapse (Hwang *et. al.*, 2005).

Do podskupiny III patří aminotransferasy, které přenáší aminoskupiny acetylornithinu, ornithinu, ω -aminokyseliny, γ -aminobutyátu a diaminopelargonátu (AcornAT, OrnAT, ω -AaAT, GaBaAT a DapaAT). Podle klasifikace enzymů dle polohy aminoskupiny, která je převáděna, jsou tyto enzymy označovány jako ω -aminotransferasy (Westlake, 2012). Tyto aminotransferasy mají širokou substrátovou specifitu a jsou velmi užitečné pro přípravu chirálních aminů a nepřirozených aminokyselin, jako jsou β -aminokyseliny. Velká vazebná kapsa ω -AT je větší než AST a AroAT (Obr. 6). Je možné, že ω -AT mohou přijímat substráty větší velikosti, než přírodní aminokyseliny (Hwang *et. al.*, 2005).

Podskupina IV zahrnuje D-alaninaminotransferasu a aminotransferasy, které využívají rozvětvené aminokyselina jako substrát (D-AlaAT a BCAT) a obě preferují 2-ketoglutarát jako substrát ketokyseliny. D-AlaAT je důležitý enzym pro všechny bakterie, které mají buněčnou stěnu (Westlake, 2012). Hlavní strukturální rozdíl mezi BCAT a D-AlaAT je hydrofobní charakter aktivních vazebných kapes: tj. zbytky histidinu a argininu jsou lokalizovány ve velké kapse v D-AlaAT, zatímco zbytky tyrosinu a fenylalaninu jsou v malé kapse v případě BCAT (Obr. 6). Srovnáním 3D struktur bylo zjištěno, že malá a velká kapsa BCAT je obrácená vzhledem k D-AlaAT, takže proton pochází z opačné strany. To vysvětluje opačnou enantioselektivitu obou skupin enzymů. L-terc-leucin může být syntetizován pomocí

BCAT, zatímco syntéza řady D-aminokyselin, jako jsou D-2-aminobutyrát, D-alanin a D-fenylalanin, probíhá za použití D-AlaAT. Kromě toho se zvyšuje konformační flexibilita oblasti smyčky spojující homodimer (Hwang *et. al.*, 2005).

Podskupina V zahrnuje serinaminotransferasu a fosfoserinaminotransferasu (SerAT a PSerAT), které využívají L-serin a 3-fosfo-L-serin jako donory aminokyselin (Hwang *et. al.*, 2005; Rudat *et. al.*, 2012).



Obr. 6 Schéma aktivních vazebných míst některých aminotransferas. A) AST nebo AroAT: karboxylová skupina substrátu je stabilizovaná argininem a asparaginem v malé vazebné kapse a pyridoxalový kruh kofaktoru PLP je stabilizován aspartátem. B) ω -AT: velká vazebná kapsa je větší než u AroAT nebo AST, tryptofan ve velké vazebné kapse může stabilizovat aromatický substrát π - π interakcí. C) BCAT: k odběru a dodání protonu dochází z *re* strany pyridinového kruhu a pyridoxalový kruh kofaktoru PLP je stabilizován glutamátem. D) D-AlaAT: k odběru a dodání protonu dochází z *re* strany pyridinového kruhu a malé a velké vazebné kapsy jsou umístěny na opačné orientaci ve srovnání s BCAT (převzato z Hwang *et. al.*, 2005).

Poslední a nejnovější podskupina VI zahrnuje cukerné aminotransferasy (SAT). Cukerné aminotransferasy se podílejí na amino cukerné syntéze vyskytující se v buňkách produkujících sekundární metabolity. Jsou speciálně rozděleny do podrodin aminotransferas v databázi Pfam. SAT se podílejí na syntéze antigenu O a lipopolysacharidů přítomných ve vnější membráně gram-negativních bakterií a sekundárních metabolitů, jako jsou antibiotika. Aminoakceptory těchto SAT jsou především NDP-keto-cukry nebo *scyllo*-inositol (scillitol) a dárce aminoskupin jsou především glutamát nebo glutamin. SAT ukazují specifitu i regiosektivitu nukleotidových skupin pro přenos aminoskupin, pokud jde o NDP-keto-cukry (Hwang *et. al.*, 2005).

Je známa širší klasifikace založená na katalytických reakcích, která byla představena v roce 1980 (Rudat *et. al.*, 2012). Aminotransferasy byly rozděleny do dvou skupin: α -aminotransferasy a ω -aminotransferasy. α -Aminotransferasy katalyzují transaminaci aminoskupiny na α -uhlíku a výhradně pojmu α -aminokyseliny a α -ketokyseliny jako páry substrátů. ω -Aminotransferasy působí na distální aminoskupinu substrátu. ω -Aminotransferasa je triviální název označující všechny aminotransferasy v podskupině III. Zatímco α -aminotransferasy představují všechny aminotransferasy v podskupině I, II, IV a V. Podle této klasifikace všechny AT působící na β -aminokyseliny jsou považovány za ω -AT. Při pozorování bylo zjištěno, že některé ω -AT jsou schopny katalyzovat transaminace primárních aminových sloučenin, které nejsou opatřeny karboxylovými skupinami (Rudat *et. al.*, 2012).

Řecké písmeno " ω " v tomto triviálním názvu není důležité pro aktuální polohu vzhledem k aminoskupině na atomu uhlíku vázaného na karboxylovou skupinu, ale představuje všechny pozice kromě α (Malik *et. al.*, 2012). V průběhu první poloviny reakce dochází k předání aminoskupiny do polohy vzdálené od α - uhlíku. K tomu dochází vždy, i když je zde možnost výběru druhé aminoskupiny na α skupině se stejnou konfigurací, přestože v průběhu druhé poloviny reakce α -transaminace probíhá stejně jako u většiny ostatních aminotransferas (Westlake, 2012).

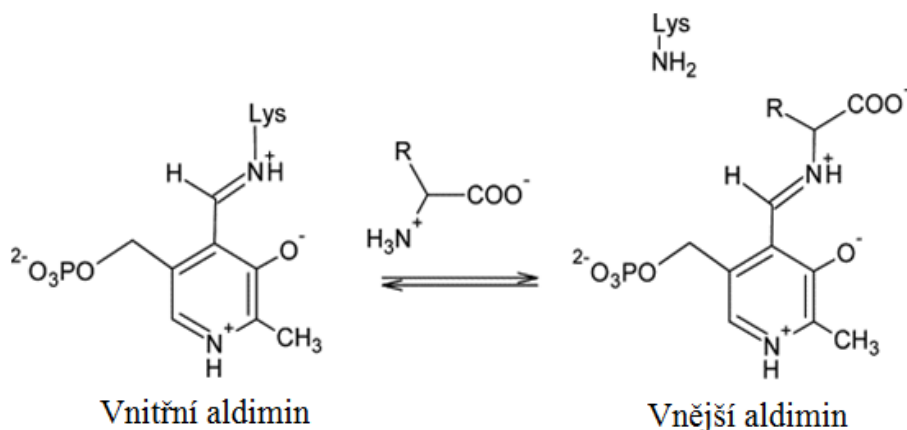
3.1.4 Reakční mechanismus

Kofaktor aminotransferas je pyridoxal-5'-fosfát (PLP) známý jako derivát vitamínu B6. Je to velmi rozšířený a všestranný katalyzátor. Používá se v různých katalytických reakcích od transaminací včetně dekarboxylace, racemizace a eliminace. Enzymy s kofaktorem PLP jsou tak univerzální, že se odhaduje, že 1,5 % z celkového počtu otevřených čtecích rámců v bakteriálních genomech kódují tyto enzymy. Pyridoxal-5'-fosfát hraje klíčovou roli v průběhu chemických reakcí se substráty, a to ze dvou důvodů. Díky své aldehydové skupině je schopen vytvářet iminy s NH_2 skupinou aminokyselin a také je schopen odebírat substrátu elektrony (Westlake, 2012).

Mechanismus reakce a strukturální vlastnosti aminotransferas byly velmi podrobně studovány. Reakce katalyzovaná aminotransferasami může být formálně považována za redoxní reakci s oxidační deaminací donoru ve spojení s redukční aminací akceptoru (Rudat *et. al.*, 2012).

Transaminační reakce je řízena ping-pong bi-bi mechanismem a skládá se ze dvou polovin reakcí, které regenerují kofaktor pyridoxal-5'-fosfát. (Hopwood, 2012; Rudat *et. al.*, 2012)

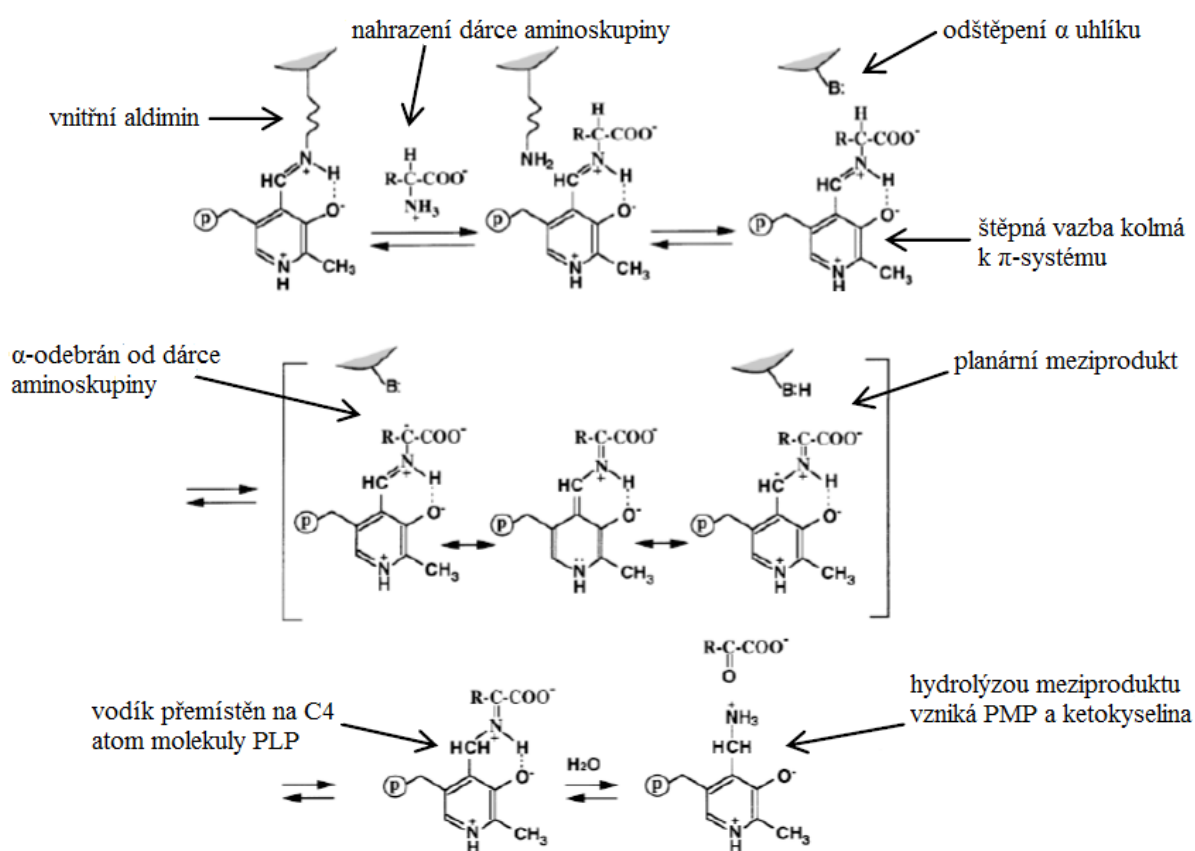
V klidovém stavu enzymu je pyridoxal-5'-fosfát vázán na ϵ -aminoskupinu lysinu v aktivním místě přes Schiffovu bázi (tj. apoenzym, vnitřní aldimin, Obr. 7). Prvním krokem je vznik Schiffovy báze mezi aktivním místem zbytku lysinu (přes ϵ -aminoskupinu lysinu) a aldehydovou skupinou PLP vázanou na enzym (vnitřní aldimin) (Hopwood, 2012). Při kontaktu se substrátem se vazba mezi kofaktorem a apoenzymem uvolňuje a pyridoxal-5'-fosfát tvoří se substrátem Schiffovu bázi (vnější aldimin, Obr. 7).



Obr. 7 Struktura vnitřního a vnějšího aldiminu (upraveno dle López *et. al.*, 2010).

Bylo předpokládáno, že další krok v reakci je závislý na tom, která ze tří vazeb na α -uhlíku bude štěpena (Westlake, 2012). Štěpná vazba vnějšího aldiminu musí být kolmá k π vazbě mezi koenzymem a donorem v důsledku nízké aktivační energie v této konkrétní konfiguraci tvořící karbanion jako meziprodukt. π -Systém PLP zajišťuje stabilitu takto vzniklého intermediátu, jež je dána resonanční strukturou mezi kruhem pyridinu a Schiffovou bází. Za stabilizací fenolového stavu stojí poloha sdíleného protonu mezi fenolovou skupinou pyridoxal-5'-fosfátu a Schiffovou bází (Westlake, 2012). Mechanismus je zobrazen na Obr. 8.

Zbytek lysinu, který se uvolňuje při tomto procesu, slouží jako základ pro další krok a katalyzuje 1,3-vodíkový posun zahrnující odběr α -protonu z vnějšího aldiminu a deprotonizaci iminu na koenzymu. α -Vodík je odebrán od dárce aminokyseliny za vzniku planárního meziproductu (ketiminu) předtím, než je přemístěn na C4 atom PLP molekuly. Tento meziprodukt se poté hydrolyzuje za vzniku pyridoxamin-5'-fosfátu (PMP) a ketokyseliny. Druhý krok reakce zahrnuje tvorbu komplexu mezi PMP vázaného na enzym a akceptorem aminokyseliny a zpětnou regeneraci PLP (Westlake, 2012).



Obr. 8 Mechanismus transaminační reakce zahrnující kofaktor PLP a jeho meziprodukty (upraveno podle Westlake, 2012).

3.1.5 Substrátová specifita

Všechny doposud známé aminotransferasy používají stejný koenzym ke katalýze, katalyzují stejný typ reakcí, liší se pouze v substrátové specifitě. Strukturální rozdíly mezi nimi odrážejí specializaci pro substrátovou specifitu, samozřejmě neutrální divergence a adaptace na evoluční omezení, které nejsou přímo spojené s jejich katalytickou funkcí. Enzymy dané podskupiny přijmou aminokyselinové substráty podobné struktury (Mehta *et. al.*, 1993).

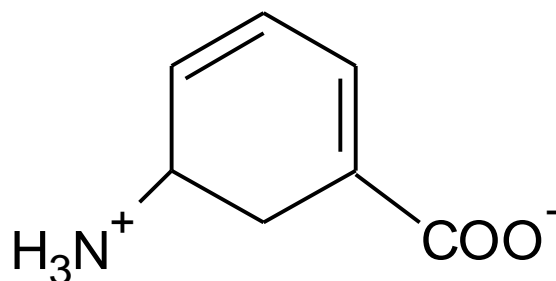
Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.1.3, substrátová specifita ω -aminotransferas je mnohem širší, než α -aminotransferas, jelikož α -AT mohou přijmout pouze α -aminokyseliny a α -ketokyseliny jako dvojice substrátů. Nejvýznamnější rozdíl mezi substráty α -AT a ω -AT lze čerpat z hlediska reaktivity primárních aminů a ketonů jako dárců a akceptorů aminoskupiny (Malik *et. al.*, 2012). Byla prokázána řada strukturně odlišných primárních aminů (arylalkylové aminy a alkylaminy) vykazující reaktivitu dárců aminoskupiny. Většina z reaktivních dárců aminoskupin byla nalezena mezi arylalkylovými aminy spíše než alifatickými aminy. V případě akceptoru aminoskupiny byla pozorována vysoká reaktivita s α -ketokyselinou (typicky pyruvát) a aldehydy (propanal a benzaldehyd). Reaktivita ketonů jako akceptorů aminoskupin je mnohem nižší než s pyruvátem, což je jedna z hlavních překážek asymetrické syntézy chirálních aminů (Malik *et. al.*, 2012; Van Hauwermeiren, 2014).

Všechny doposud známé ω -aminotransferasy ukázaly nejvyšší reaktivitu vůči α -methylbenzylaminu (α -MBA) až na dvě výjimky, které jsou reaktivnější než α -MBA, aminoindan a aminotetralin (Malik *et. al.*, 2012).

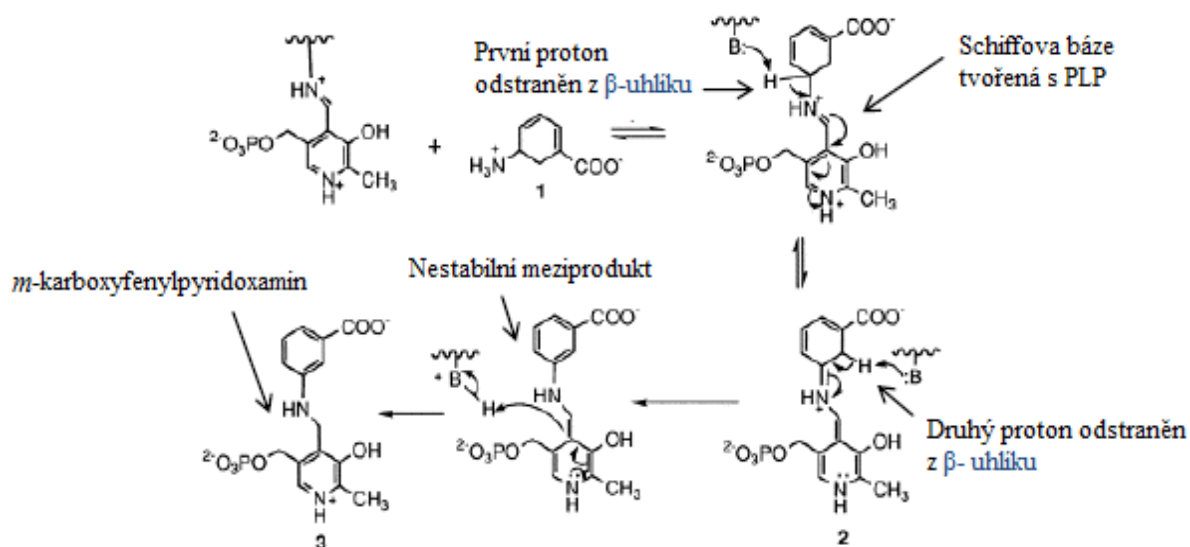
3.1.5.1 Inhibice

α -Aminotransferasy i ω -aminotransferasy jsou citlivé na inhibici gabaculinem (Obr. 9, Obr. 10) (Westlake, 2012). Tato sloučenina se chová jako neurotoxin v těle, který je schopen překročení hematoencefalitické bariéry v mozku. Inhibice gabaaminotransferasy, umožňuje Gaba, což je inhibiční neurotransmitter, aby její hladina výrazně vzrostla. Po navázání do aktivního místa je vytvořena Schiffova báze s PLP a dojde k odstranění protonu z β -uhlíku vázaného na řetězec, Asp 259 PLP Arg 416 Trp 57 PLP Trp 157, imino skupiny, jako by se stalo s normálním aminodonorem substrátu. Nicméně s gabaculinem je druhý proton převzat z β -uhlíku,

vytváří nestabilní meziprodukt. Poté dochází ke vzniku *m*-karboxyphenylpyridoxamin-fosfátu (mCPP), který je velmi stabilní, a jako takový irreverzibilně brání opětovnému vytvoření PLP (Westlake, 2012).



Obr 9. Vzorec inhibitoru gabaculinu (převzato z Westlake, 2012).



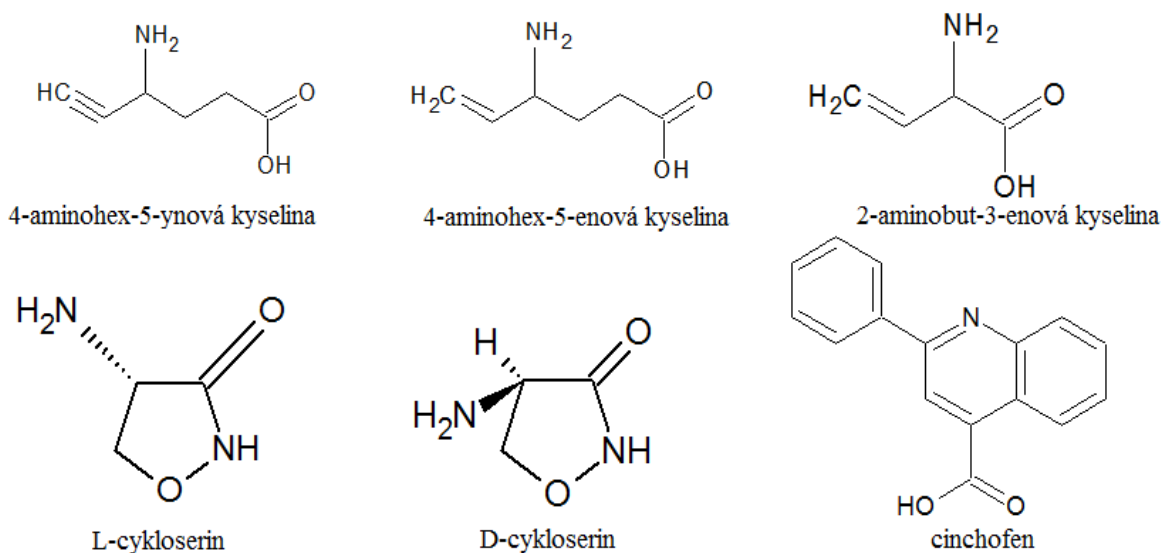
Obr. 10 Mechanismus inhibice aminotransferasy kofaktoru PLP gabaculinem (upraveno podle Westlake, 2012).

Dále také dvě sloučeniny, 4-aminohex-5-ynová kyselina a 4-aminohex-5-enová kyselina (Obr. 11), které mohou být považovány za acetylenové a vinylové deriváty 4-aminobutyátu, byly připraveny jako enzymové inhibitory 4-aminobutyátaminotransferasy. Také 2-aminobut-3-enová kyselina byla navržena jako inhibitor aspartátaminotransferasy, enzym indukuje reaktivitu zavedením konjugace dvojných vazeb (John *et. al.*, 1979).

Testováním krysích jater bylo prokázáno, že L-cykloserin (Obr. 11) inhibuje *in vitro* tři jaterní enzymy: alaninaminotransferasu, fenylalaninaminotransferasu

a tyrosinaminotransferasu. Inhibice je nevratná a nekompetitivní s ohledem na substráty aminokyselin. D-cykloserin byl méně účinný jako inhibitor. Pouze v ojedinělých, perfundovaných krysích játrech L-cykloserin inhiboval celkovou glukoneogenezi. Alaninaminotransferasa byla inhibována také v mozku, srdci a ledvinách (Wong *et. al.*, 1973).

Bylo také prokázáno, že cinchofen, zobrazen na obrázku 11 a jeho deriváty 3-,6-,7-,8-hydroxycinchofen inhibují aspartátaminotransferasu a alaninaminotransferasu v krysích játrech. ALT je mnohem více citlivější na tyto inhibitory než AST (Hänninen a Hartiala, 1965).



Obr. 11 Vzorce inhibitorů.

3.2 Imobilizace enzymů

Enzymy jsou relativně drahé biokatalyzátory, proto je z ekonomického hlediska v mnoha procesech vyžadováno jejich opětovné použití (Mateo *et. al.*, 2007).

Termín imobilizované enzymy se vztahuje na enzymy fyzikálně omezené nebo lokalizované v určité definované oblasti prostoru za současného zachování jejich katalytických aktivit a které mohou být použity opakovaně (Brena a Bratista-Viera, 2006; Zajkoska *et. al.*, 2013). Myšlenka opětovného použití tedy znamená, že aktivita imobilizovaného enzymu by měla být dostatečně vysoká, aby bylo možné uskutečnit toto opakované použití. Z toho důvodu musí být enzym dostatečně stabilní, nebo se musí stabilizovat imobilizací. Použití imobilizovaných enzymů umožňuje kontrolovat průběh reakce a zjednodušit konstrukci reaktoru (Mateo *et. al.*, 2007).

Hlavními přednostmi imobilizace jsou snadná separace enzymu z reakční směsi, snížení provozních nákladů, vysoká stabilita procesu a jednodušší řízení enzymové reakce. Nevýhodou jsou dodatečné náklady, difúzní omezení, která mohou snížit reakční rychlost (Zajkoska *et. al.*, 2013).

Kromě použití v biotechnologických procesech se imobilizované enzymy využívají v analytické chemii (diagnostika), v bioafinitní chromatografii a slouží jako biorekogniční vrstva při konstrukci katalytických biosensorů (Mateo *et. al.*, 2007).

3.2.1 Výběr nosiče

Vlastnosti nosiče mají zásadní význam při určování způsobu imobilizace enzymu. Ideální vlastnosti nosiče zahrnují fyzikální odolnost vůči stlačení, inertnost vůči enzymům (žádné nespecifické interakce s enzymem), tepelnou odolnost, biokompatibilitu, odolnost vůči napadení mikroorganismy a dostupnost při nízkých nákladech (Brena a Bratista-Viera, 2006).

Nosiče mohou být anorganické nebo organické podle jejich chemického složení. Dále je lze rozdělit na přírodní a syntetické (Tab. 2).

Tab. 2 Klasifikace nosičů (přepřacováno dle Brena a Batista-Viera, 2006).

Organické	Přírodní polymery	polysacharidy: celuloza, dextran, agar, agarosa, chitin, alginát proteiny: kolagen, albumin
	Syntetické polymery	polystyren polyamidy, vinyl- a alkyl-polymery
Anorganické	Přírodní minerální látky	bentonit, oxid křemičitý, kaolinit, zeolit, písky, uhličitany aktivní uhlí
	Syntetické materiály	sklo (neporézní a kontrolovatelně porézní) kovy, oxidy kovů s řízenou velikostí pórů silikagel

Fyzikální vlastnosti nosičů (jako je průměr částic, schopnost absorbovat vodu, mechanická odolnost, odolnost vůči tlaku atd.) mají zásadní význam pro určení imobilizačního systému a výběru reaktoru používaného za technických podmínek (reaktor s mícháním, průtokový nebo vsádkový reaktor). Zejména charakteristika pórů a velikost částic určují celkový povrch a tím kriticky ovlivňují kapacitu pro vazbu enzymů. Existují dva typy nosičů: porézní a neporézní (Brena a Batista-Viera, 2006).

3.2.1.1 Porézní nosiče

Porézní nosiče umožňují větší kapacitu vazby enzymu. Imobilizovaný enzym je více chráněn před okolním prostředím. Porézní nosiče by měly mít řízenou velikost a distribuci pórů s cílem optimalizovat jejich kapacitu. (Brena a Batista-Viera, 2006).

I přes mnoho výhod anorganických nosičů (vysoká stabilita proti fyzikálním, chemickým a mikrobiálním degradacím) se většina průmyslových aplikací provádí s organickými nosiči. Hydrofilní charakter je jedním z nejdůležitějších faktorů, které určují úroveň aktivity imobilizovaných enzymů (Brena a Batista-Viera, 2006).

Mezi nejpoužívanější porézní nosiče anorganického původu patří silikagel a porézní sklo. Silikagel je vysoce porézní, mechanicky odolný, ale má omezenou chemickou stabilitu (omezujícím faktorem je teplota a pH). Tato matrice trpí značným smršťováním během procesu sušení, což vede k praskání materiálu a kolapsu pórů. Za použití přídatných látek lze tyto problémy překonat (Sassolas *et. al.*, 2012). Porézní sklo je užitečné vzhledem ke své mechanické

odolnosti, vysoké pórovitosti, tepelné stabilitě a odolnosti vůči nesespecifickým interakcím. Nicméně je rozpustné v bazickém prostředí (Hermanson *et. al.*, 1992).

Nejpoužívanějším organickým, makroporézním hydrofilním nosičem je celulóza. Je to nejhojnější přírodní organický polymer charakteristický snášenlivostí k vyšším teplotám a pH (Hermanson *et. al.*, 1992). Chitin a chitosan jsou dalšími přírodními polysacharidy. Chitin je jedním ze světově nejvíce bohatých obnovitelných zdrojů. Je hlavní složkou schránek korýšů, exoskeletu hmyzu a buněčných stěn hub, kde poskytuje pevnost a stabilitu. Je nerozpustný ve většině rozpouštědel. Chitin a chitosan je možno chemicky považovat za analogy celulósy. Komerčně jsou získány při relativně nízkých nákladech ze skořápek korýšů (krabi, krevety, humři) (Krajewska, 2004). Vynikajícím nosičem organického původu, který se široce používá, je agarosa získaná z mořských řas (komerční název Sepharosa). Tento polysacharid je vysoce porézní, to vede k vysoké kapacitě pro proteiny. Další výhodou je hydrofilní charakter, absence nabitých částic (které brání nesespecifické adsorpci substrátu a produktu) a komerční dostupnost. Přírodní agarosa je mechanicky i chemicky nestabilní, ale po zesílení vhodným činidlem (např. epichlorhydrin) vzniká stabilní gel. Nicméně důležitým omezením v použití agarosy a jiných porézních nosičů je vysoká cena (Brena a Batista-Viera, 2006). Příkladem syntetického organického nosiče může být polyakrylamid, který je odolný vůči nesespecifickým interakcím a má dobrou stabilitu pH. Nevýhodou je mechanická nestabilita. Dalším používaným syntetickým polymerem je polyvinylalkohol (PVA). Tento polymer je rozpustný ve vodě a nerozpustný v organických rozpouštědlech. Poskytuje dobrou mechanickou a tepelnou stabilitu (Zhang *et. al.*, 2013).

Jelikož v případě porézních nosičů je rychlost enzymové reakce omežována difúzí substrátu k enzymu a produkt se musí dostat ven, proto se v poslední době stále více preferují nosiče neporézní (Brena a Batista-Viera, 2006).

3.2.1.2 Neporézní nosiče

Mezi tyto nosiče se řadí různé materiály o velikosti nanometrů až mikrometrů, podle toho, kde jsou použity. Tyto nosiče jsou zavedeny v biologických a chemických oborech, medicíně, biotechnologiích nebo environmentálních technologiích. Nejčastěji používané jsou magnetické částice vyrobené z oxidů železa (McBain *et. al.*, 2008). Například magnetit (Fe_3O_4) nebo maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Dalšími případnými materiály jsou oxid chromitý nebo čistě kovy jako železo, nikl

a jejich slitiny, např. FePt a FeAu (McBain *et. al.*, 2008). Největší výhodou v použití magnetických neporézních nosičů je snadná manipulace a separace vnějším magnetickým polem. Mezi potřebné vlastnosti také patří chemická rezistence s nejčastěji používanými pufrů a rozpouštědly, tepelná stabilita, mechanická odolnost, superparamagnetismus, velký povrch atd. (Hsing *et. al.*, 2007).

Povrchové vlastnosti magnetických i nemagnetických nosičů lze zvolit způsobem, v závislosti na konkrétních aplikacích, pro které se vyrábějí (Stratulat *et. al.*, 2000). Nosiče se obalují různými látkami a vytvoří tzv. funkcionalizující slupku, která zamezí shlukování částic a vnáší na povrch částic funkční skupiny vhodné pro vytvoření vazby s bioaktivní komponentou.

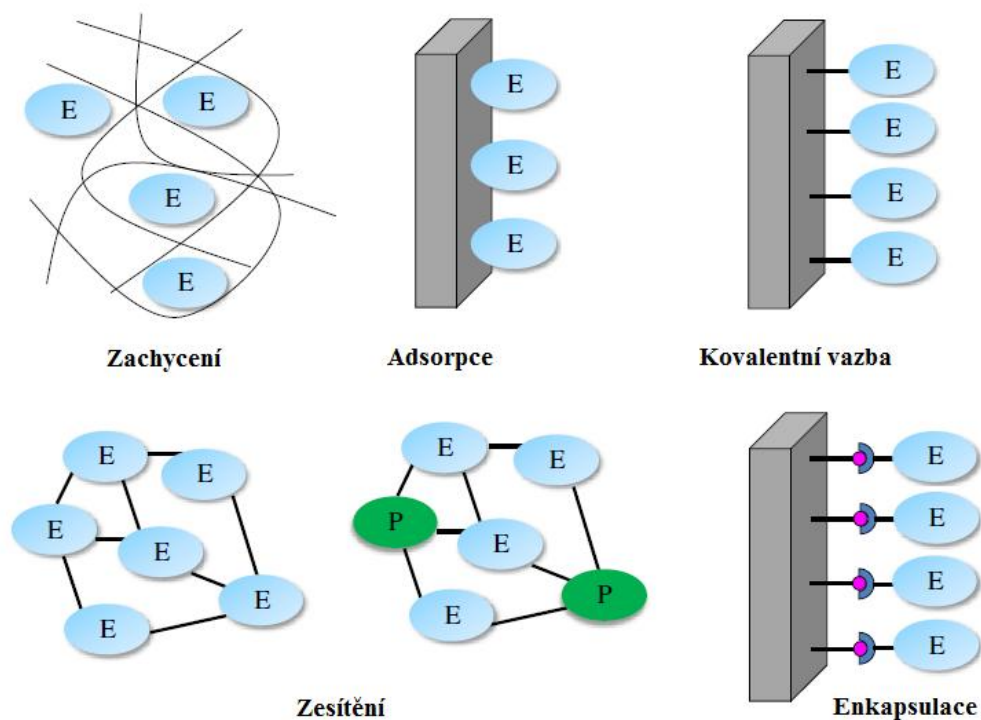
3.2.2 Metody imobilizace

Enzymy vykazují celou řadu vlastností (fungují za mírných reakčních podmínek, mají vysokou specifitu reakce nebo substrátovou specifitu), které usnadňují jejich výhodné použití ve srovnání s konvenčními chemickými katalyzátory (Krajevská, 2004). Existuje ale řada praktických problémů při jejich používání. Vysoké náklady na purifikaci enzymů, dále citlivost na jiné než optimální podmínky při purifikaci a citlivost na stopové množství látek, které mohou působit jako inhibitory. Jiné než optimální podmínky a inhibice mohou vést k denaturaci enzymu. Dalším důvodem je, že volný enzym v reakční směsi nelze po skončení reakce získat zpět v aktivní formě pro opakované použití. Navíc po skončení reakce je produkt znečištěn enzymem, který musí být odstraněn, obvykle denaturací a centrifugací. Řešením těchto problémů je imobilizace enzymů (Krajevská, 2004).

Ve srovnání s volnými enzymy v roztoku, imobilizované enzymy jsou většinou robustnější a odolnější vůči změnám prostředí. Dalším důležitým aspektem je heterogenita enzymových systémů umožňující snadnou separaci a oddělení jak enzymu, tak produktu, více opakovaných použití, nepřetržitý provoz enzymových procesů a rychlé ukončení reakce (Krajevská, 2004).

Imobilizace enzymů je založena na omezení volnosti pohybu enzymu, kdy se nejprve rozhoduje o materiálu nosiče a následně o metodě (Brena a Batista-Viera, 2006; Zhang *et. al.*, 2013). Jedním ze způsobů, jak řídit různé přístupy k imobilizaci je zařazení do dvou širokých kategorií: reverzibilní a irreverzibilní metody. Bylo navrženo mnoho metod za účelem dosažení imobilizace a každá z nich má výhody i nedostatky (Zhang *et. al.*, 2013). Enzymy byly použity v mnoha praktických

aplikacích, zejména v biomedicínských a biotechnologických oblastech prostřednictvím imobilizace na různých nosičích. Nejvyužívanějšími způsoby imobilizace jsou adsorpce, zesítění, zachycení, enkapsulace a kovalentní vazba (Obr. 12) (Sassolas *et. al.*, 2012; Zhang *et. al.*, 2013).



Obr. 12 Způsoby imobilizace enzymů - zachycení, adsorpce, kovalentní navázání, zesítění, enkapsulace. E: enzym, P: inertní protein (upraveno dle Sassolas *et. al.*, 2012).

3.2.2.1 Reverzibilní imobilizace

Vzhledem k druhu enzymu vázaného na nosič, je možné za mírných podmínek uvolnit reverzibilně imobilizované enzymy z nosiče. Použití reverzibilních metod pro imobilizaci enzymu je velmi atraktivní, zejména z ekonomických důvodů. Nosič může být znovu regenerován vložením nového enzymu. Reverzibilní imobilizace enzymů je zvláště důležitá pro imobilizaci nestabilních enzymů a pro aplikace v bioanalytických systémech (Brena a Batista-Viera, 2006).

3.2.2.1.1 Adsorpce

Imobilizace adsorpcí je poměrně jednoduchý a levný způsob imobilizace (Brady a Jordaan, 2009). Zahrnuje reverzibilní nekovalentní interakce mezi enzymem a nosičem. Enzym je přichycen na povrch nosiče prostřednictvím slabých sil, jako jsou van der Waalsovy síly, elektrostatické interakce, hydrofobní interakce a vodíkové vazby (Zhang *et. al.*, 2013). Povaha sil účastnících se nekovalentní imobilizace může být změněna úpravou podmínek, které ovlivňují sílu interakce (např. hodnota pH, iontová síla, teplota nebo polarita rozpouštědla) (Brena a Batista-Viera, 2006).

Imobilizace adsorpcí je mírný, jednoduchý proces, který obvykle zachovává katalytickou aktivitu enzymu, jelikož zde nedochází k chemické vazbě jako takové. Specifický povrch nosiče je také důležitým faktorem, který ovlivňuje množství adsorbovaného enzymu (Zhang *et. al.*, 2013).

Biologické komponenty jsou smíchány s vhodným adsorbentem, za vhodných reakčních podmínek (pH, iontová síla, atd.) (Sassolas *et. al.*, 2012). Po dostatečné době inkubace je neadsorbovaný materiál odstraněn promytím pufrům.

Tyto metody jsou tedy ekonomicky výhodné. Velkou výhodou je reverzibilita, díky ní je umožněno znovupoužití nosiče. Metoda také přináší některé nevýhody. Například imobilizovaný enzym připravený adsorpcí může mít špatnou operační a skladovací stabilitu. Množství adsorbovaného enzymu je závislé na teplotě, iontové síle a pH. Problémem mohou být slabé interakce, díky nim se enzym uvolní z matrice. Nevýhodami tedy jsou úbytek enzymu z nosiče do produktu, přetížení nosiče nebo nespecifická vazba (Chaplin a Bucke, 1990).

3.2.2.2 Irreverzibilní imobilizace

Pojem nevratná imobilizace znamená, že jakmile je biokatalyzátor připojen k nosiči, nelze jej oddělit bez zničení biologické aktivity enzymu nebo nosiče. Mezi nejčastější postupy nevratné imobilizace jsou, zachycení, zesítnění, enkapsulace a kovalentní vazba (Brena a Batista-Viera, 2006).

3.2.2.2.1 Zachycení

Metoda je založena na zachycení okluzí enzymu v polymerní síti, která umožňuje průchod substrátu a produktů, ale zadržuje enzym. Tato metoda se liší od ostatních metod tím, že enzym není vázán na nosič nebo membrány. Molekuly enzymu jsou volné v roztoku a jejich pohyb je omezen pouze mřížkou gelu (Brena a Batista-Viera, 2006).

Aby se zabránilo ztrátě enzymu z gelu, musí být kontrolována velikost pórů v gelu. Současně musí být poskytnut přístup substrátu k enzymu a vyloučení produktu ven z gelu. Nejčastěji se používá zachycení na přírodních nebo syntetických polymerech. Nejvíce jsou používány polypeptidy (želatina, kasein, kolagen), polysacharidy (agarosa, alginát, karragenan) a syntetické polymery (polyakrylamid, polyvinylalkohol).

Biokatalyzátory byly zachyceny v přírodních polymerech, jako jsou agar, agarosa nebo želatina tepelnou indukovanou gelací a alginát a karagen ionotropickou gelací. Dalšími metodami použitými k zachycení jsou organická polymerace fotochemickým nebo chemickým procesem (polyakrylamid) nebo srážení z nemísitelného roztoku (polystyren) (Bickerstaff, 1997).

Existují dva různé přístupy k zachycení enzymů. Prvním postupem je smíchání enzymu s polymerem, následně dochází k zesílení nosiče. Dalším a zároveň více používaným postupem je smíchání enzymů s monomery, kdy dochází k polymeraci a následnému zesílení nosiče. V obou případech je enzym zachycen v mřížce (Brady a Jordaan, 2009).

Jedním z hlavních omezení této techniky je difúzní a stérické omezení, zejména při použití makromolekulárních substrátů jako jsou škrob a proteiny (D'Souza, 1999; Cao, 2005).

Úpravou podmínek polymerace lze změnit pórovitost polymeru, strukturu sítě, povrchové funkce a velikosti částic. Pórovitost lze změnit zejména způsobem sušení, povrchovým napětím rozpouštědla a polymerní kompozicí gelu (Brady a Jordaan, 2009).

3.2.2.2.2 Zesítení

Při tomto způsobu imobilizace není potřeba použít matrici. Principem této metody je vzájemné spojení enzymů do třídimenzionální struktury (Sassolas *et. al.*, 2012). To je umožněno různými chemickými a fyzikálními metodami. Chemickou metodou může být vytvoření kovalentních vazeb mezi molekulami enzymu. Tímto způsobem vzniká nerozpustná síť. Nejběžnější aktivační činidlo je glutaraldehyd, který interaguje s aminoskupinami enzymů a vytváří mezi nimi vazby, a tak umožňuje jejich zesítení (Mateo *et. al.*, 2007). Dalšími používanými činidly jsou *bis*-diazobenzidin nebo hexamethylendiisokyanát. Fyzikální metodou může být například flokulace. Používaná činidla jsou polyaminy, polyethyleniminy, sulfonáty a různé fosfáty (Bickerstaff, 1997). Obecně platí, že zesítení je vhodné použít ve spojení s některou další metodou, např. fyzikální adsorpce, čímž se docílí větší stability enzymu (López-Gallego *et. al.*, 2005).

3.2.2.2.3 Enkapsulace

Podobně jako zachycení, enkapsulace chrání enzym z vnějšího prostředí, ale má omezené aplikace v biokatalýze velkých substrátů. Enkapsulace enzymů může být umožněna obalením enzymu semipermeabilní membránou. Jedná se o jednoduchou metodu, jestliže je enzym v roztoku volný. V ideálním případě je umožněn oboustranný volný pohyb malým substrátům a produktům přes semipermeabilní membránu. Velké proteiny a enzymy nemohou procházet dovnitř a ven z kapsule. V nejjednodušším případě je enzym na jedné straně polopropustné membrány, zatímco reakční složky a tok produktů jsou přítomny na straně druhé (Chaplin a Bucke, 1990).

Většinou jsou používány mikrokapsule o velikosti 10 až 100 μm v průměru (nitrocelulosa, nylon). Při rychlém přírůstku produktů uvnitř kapsule může dojít k porušení membrány (Bickerstaff, 1997). K dlouhodobému používání jsou vhodná komerčně dostupná dutá vlákna a ultrafiltrační membrány, které jsou odolné vůči mechanickým a chemickým vlivům.

3.2.2.2.4 Kovalentní vazba

Imobilizace založená na tvorbě kovalentních vazeb patří mezi nejpoužívanější metody. Výhodou těchto metod je stabilní charakter vazeb vytvořených mezi enzymem a maticí. Díky tomu není enzym uvolněn do roztoku (Brena a Batista-Viera, 2006). Tato metoda se používá k imobilizaci enzymu volné karboxy- či aminoskupiny (ϵ -aminoskupina lysinu či primární aminoskupina) a funkční skupiny nosiče. Reakce by měla probíhat za mírných podmínek, aby nedošlo k pozměnění aktivní konformace enzymu (Zhang *et. al.*, 2013). Funkční skupiny proteinů vhodné pro kovalentní vazbu za mírných podmínek zahrnují: aminoskupinu z lysinu nebo argininu, karboxylovou skupinu kyseliny asparagové nebo glutamové, hydroxylovou skupinu serinu nebo threoninu, fenolový kruh tyrosinu, thioskupinu cysteinu, imidazolovou skupinu histidinu a indolovou skupinu tryptofanu (Mateo *et. al.*, 2007).

Aby se enzym mohl navázat, je zapotřebí aktivovat funkční skupiny nosiče vhodným činidlem. Epichlorhydrin se používá k aktivaci nosiče nesoucí hydroxyskupinu. Jestliže nosič obsahuje více hydroxylových skupin (polysacharidy), k aktivaci se používá bromkyan (CNBr) nebo jodistan sodný (NaIO₄). Pokud podklad obsahuje karboxylové skupiny, aktivace se provádí karbodiimidem. Nosiče nesoucí aminoskupinu jsou nejčastěji aktivovány glutaraldehydem, což je poměrně levné a běžně dostupné činidlo. Imobilizace pomocí glutaraldehydu je značně univerzální metoda imobilizace. Imobilizace pomocí primární aminoskupiny nabízí v mnoha případech velice dobré výsledky, neboť poskytuje zesílení mezi molekulami glutaraldehydu navázaných na enzym a mezi molekulami glutaraldehydu vázaných na nosič. Důsledkem je chemická změna celého povrchu enzymu (Mateo *et. al.*, 2007).

3.2.3 Využití imobilizovaných enzymů v praxi

Jak již bylo uvedeno výše, imobilizované enzymy vykazují vyšší stabilitu, odolnost vůči vnějším vlivům, umožňují opakované použití a také okamžité ukončení reakce (Krajewska, 2004).

Imobilizované enzymy byly použity v potravinářském průmyslu, kde nahrazují enzymové procesy katalyzované volnými enzymy, ve farmaceutickém průmyslu a při výrobě jemných speciálních chemikálií. Velké množství imobilizovaných enzymů

v rozmezí až 10^6 tun ročně slouží k výrobě kukuřičného sirupu s vysokým obsahem fruktosy, jeden z nejvíce komerčně důležitých procesů (Krajewska, 2004).

Oblasti současných a potenciálních aplikací imobilizovaných enzymových systémů jiných než průmyslových patří organické syntéze (v laboratorním měřítku), analytickým a lékařským aplikacím. Poté co byla prokázána schopnost katalyzovat reakce nejen ve vodném roztoku, ale i v organickém prostředí, enzymy získaly velký potenciál pro organickou syntézu. Mohou zjednodušit chemické postupy snížením syntetických kroků, mohou zvýšit čistotu produktu a mohou katalyzovat regio- a stereoselektivní syntézy (Krajewska, 2004).

V analytických aplikacích jsou imobilizované enzymy používány hlavně při konstrukci biosenzorů a v menší míře jsou součástí diagnostických proužků. Katalytické biosenzory se využívají v klinické biochemii a při monitorování životního prostředí. Lékařské aplikace imobilizovaných enzymů zahrnují diagnostiku a léčbu nemocí (Krajewska, 2004). Imobilizované enzymy vykazují vyšší tepelnou a skladovací kapacitu. Mohou být využity všude, kde se používají volné enzymy, a to nejen ke snížení nákladů, ale i k urychlení reakce.

3.3 Imobilizace aminotransferas

Imobilizace biokatalyzátoru může být vhodná zejména při práci s bezbuněčným extraktem nebo purifikovanými enzymy, které jsou více v kontaktu s médiem, než když jsou použity celé buňky (Neto, 2013). Imobilizovaná ω -AT vykazuje lepší skladovací a provozní stabilitu (Päiviö a Kanerva, 2013).

K dispozici je omezené množství odborné literatury o imobilizaci ω -AT se zaměřením na práci s bezbuněčným extraktem nebo celými buňkami (Neto, 2013). Většinou byly imobilizovány celé buňky obsahující požadovanou ω -AT za použití různých metod jako je zapouzdření do kuliček alginátu a PVA-hydrogelu nebo zachycení v chitosanu. ω -AT byly také kovalentně navázány na kuličky chitosanu a zachyceny v sol-gelových maticích. Nedávné pokroky v použití ω -AT v organických rozpouštědlech spíše než ve vodných roztocích poskytly nové možnosti využití lyofilizované ω -AT a adsorpce na hydrofobní nosiče (Päiviö a Kanerva, 2013).

Např. imobilizace celých buněk ω -AT zachycením v kuličkách alginátu vápenatého byla použita pro kinetické štěpení chirálních aminů, což způsobilo

difúzní omezení, změny substrátu a inhibici produktu (Tufvesson *et. al.*, 2011; Neto, 2013). To bylo překonáno v jiné práci, kde celé buňky a permeabilizované buňky byly imobilizovány zachycením v PVA-gelu bez difúzního omezení s účinností imobilizace 100 % (pozorovaná aktivita / aktivita imobilizace) (Neto, 2013).

Pokusy o imobilizaci celých buněk *E.coli* zesítním glutaraldehydem, nebo zachycením v karagenanu a polyakrylamidu, byly neúspěšné. V případě zesítní a zachycení v polyakrylamidu bylo ztraceno 50 % aktivity, zatímco zachycení pomocí karagenanu vedlo k mechanicky nestabilním produktům. Ve stejné práci autoři uvádějí imobilizaci celých buněk pomocí hydratovaného oxidu titaničitého (adsorpční povrch), alginátu (zachycení) a chitosanu (buněčná flokulace). První z nich má údajně špatnou nosnost (méně než 1 g celých buněk (sušina) / g nosiče) a tudíž snižuje výnos imobilizace. Zatímco s alginátem vápenatým se snížila účinnost již při malém zatížení (0,2 g celých buněk (sušina) / g nosiče). Protikladem je imobilizace pomocí chitosanu, který umožňuje zatížení 3,2 g celých buněk (sušina) / g nosiče a více než 60 % zbytkové aktivity (Neto, 2013).

Byla zkoumána imobilizace (R)- a (S)-selektivní aminotransferasy na chitosan s cílem zlepšit jejich využití v biotechnologických procesech. Pro AT bylo popsáno několik imobilizačních přístupů, kde se chitosan ukázal jako slibný nosič pro tento enzym. Chitosan nabízí celou řadu možností pro imobilizaci enzymů, protože má volné hydroxylové skupiny a jednu aminoskupinu. Vzhledem ke své hydrofilnosti je vhodný pro adsorpci a díky své rozpustnosti v kyselinách a zásadách, může být použitý pro buněčnou flokulaci (Mallin *et. al.*, 2014).

AT byla také imobilizována na Sepabeads, vysoce hydrofobní nosič, který dostatečně zvýšil produktivitu procesu. Kromě toho imobilizovaná AT by mohla být použita v isopropylacetátu, kde volná AT byla zcela neaktivní. Imobilizace často stabilizuje biokatalyzátory, umožňuje dlouhodobé operace a zjednodušuje následné zpracování, pokud se použije heterogenních reakcí (Mallin *et. al.*, 2014).

Imobilizace nebuněčných extraktů ω -AT byla dosažena kovalentní vazbou na různé pevné nosiče a zachycením v sol-gelových maticích. Výtěžky imobilizace byly 20 – 50 % bílkovin (imobilizovaný protein/celý protein) a méně než 20 % zbytkové aktivity (Tufvesson *et. al.*, 2011; Neto, 2013). ω -AT imobilizované na kuličky chitosanu zachovaly 77 % aktivity, ale jsou citlivé na inhibici substrátu a produktu. Imobilizace ω -AT v sol-gelových maticích měla za následek zvýšení

aktivity enzymu při vyšším pH a teplotě v porovnání s volným enzymem. Snadná separace produktu ze sol-gelu imobilizované (R)-selektivní ω -AT je možná dvoustupňovou deracemizací, skládající se z kinetického štěpení R-selektivní imobilizované ω -AT a asymetrickou syntézou (S)-selektivní ω -AT, které mají být prováděny s výtěžkem 89 % (Tufvesson *et. al.*, 2011). Ostatní práce uvádí nízké výtěžky imobilizace i nízkou zbytkovou aktivitu (< 50 %) po imobilizaci kovalentní vazbou na nosič. Na druhé straně některé studie zaznamenávaly zvýšení stability při skladování, často vysvětlovaly imobilizaci nativních proteas z nebuněčných extraktů, které potom nejsou schopny degradovat ω -AT (Neto, 2013).

Truppo *et. al.* (2012) popsali imobilizaci ω -AT v organických rozpouštědlech (isopropylacetát, isopropanol, toluen). Nicméně není jasné, jestli je to výsledek imobilizace samotné nebo v důsledku předchozích zlepšení stability enzymu, díky proteinovému inženýrství (Neto, 2013).

ω -AT byly imobilizovány na magnetické částice (Ni *et. al.*, 2012). Nanočástice oxidu železa (IONPs), kompozity nesoucí adhezni zbytky se silnou povrchovou afinitou, byly modifikovány katechol-chitosanem (CCS). ω -AT byly imobilizovány na magnetické kompozity pomocí nukleofilních reakcí mezi katecholem a ω -AT. Za optimálních podmínek bylo imobilizováno 87,5 % ω -AT, čímž byla prokázána vysoká nosnost. Kromě vysoké aktivity enzymu se ukázalo, že imobilizovaná ω -AT na CSS-IONPs vykazuje zvýšené pH optimum a tepelnou stabilitu v porovnání s volným enzymem. Imobilizovaná ω -AT vykazovala více než 50 % své počáteční aktivity v 15 opakovaných reakčních cyklech za použití magnetické separace a 61,5 % své počáteční aktivity při skladování při 4°C ve fosfátovém pufru po dobu 15 dnů. Výsledky naznačují, že tyto adhezni magnetické kompozity poskytují lepší techniku pro imobilizaci biomakromolekul (Ni *et. al.*, 2012).

3.4 Aplikace v praxi

Aminotransferasy katalyzují přenos aminoskupiny z dárce na akceptor, což umožňuje syntézu široké škály chirálních aminů a aminokyselin. Mají velký potenciál pro výrobu opticky čistých β -aminokyselin. Opticky čisté β -aminokyseliny jsou zajímavé stavební kameny nejrůznějších významných farmaceutických látek. AT mohou být použity buď při kinetickém štěpení racemických sloučenin nebo pro asymetrickou syntézu z prochirálního substrátu (Rudat *et. al.*, 2012).

3.4.1 Historie ω -aminotransferas

ω -AT umožňují dva přípravné postupy pro výrobu chirálních aminů, tj. kinetické štěpení racemických aminů a asymetrická syntéza achirálních ketonů. Prvenství v použití ω -AT pro výrobu chirálních aminů patří společnosti Celgene Corporation (USA). To v roce 1997 odstartovalo vědecký výzkum (Malik *et. al.*, 2012).

Většina z raného počátku výzkumu ω -AT se zaměřila na řešení kinetických procesů (*S*) - selektivní ω -AT sledovaných z půdních mikroorganismů. Významného pokroku v kinetickém štěpení bylo dosaženo použitím různých procesních kroků, které zmírnily inhibici produktu, tj. enzymový membránový rektor (EMR). Nicméně, výzkum asymetrické syntézy zaostával z důvodu různých překážek. Jednou z nich je nepříznivá reakční rovnováha a nízká reaktivita ketonu jako akceptoru aminoskupiny (Malik *et. al.*, 2012).

První příklad asymetrické syntézy s použitím ω -AT spočíval v překonání nepříznivé rovnováhy odstraněním produktu. V poslední době výzkum ω -AT výrazně vzrostl. Organičtí chemici věnovali velkou pozornost katalytickým vlastnostem enzymu pro asymetrickou aminaci ketonů. V důsledku toho ω -AT leží v oblasti vysokého zájmu výzkumu, proto jsme v posledních letech byly svědky významné průlomové technologie ω -AT katalyzující asymetrické syntézy chirálních aminů (Malik *et. al.*, 2012).

4 Experimentální část

4.1 Materiály a chemikálie

Acetonitril (ACN)	Lab- Scan (Polsko)
Aminotransferasa z <i>Chromobacterium violaceum</i>	c-Lecta (Německo)
Amoniak	Merck (Německo)
Benzylaceton (2-fenyl-4-butanon, BA)	Sigma Aldrich (USA)
Bicincholinát sodný	Sigma Aldrich (USA)
Dihydrogenfosforečnan draselný	Sigma Aldrich (USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich (USA)
Glutaraldehyd	Sigma Aldrich (USA)
Hydrogenfosforečnan draselný	Sigma Aldrich (USA)
Hydroxid sodný	Lach-Ner (ČR)
Hydrogenuhlíčitan sodný	Sigma Aldrich (USA)
Isopropylamin (IPA)	Sigma Aldrich (USA)
Jodistan sodný	Sigma Aldrich (USA)
Kyselina chlorovodíková	Lach-Ner (ČR)
Kyselina octová	Sigma Aldrich (USA)
Kyselina trifluoroctová (TFA)	Sigma Aldrich (USA)
Magnetické mikročástice MG CM 100	Iontosorb (ČR)
Magnetické mikročástice MG DEAE 100	Iontosorb (ČR)
Magnetické mikročástice Perloza MG 100	Iontosorb (ČR)
N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid (EDC-HCl)	Sigma Aldrich (USA)
N-hydroxysukcinimid (NHS)	Sigma Aldrich (USA)
Pyridoxal-5'-fosfát mohohydrát (PLP)	Sigma Aldrich (USA)
Síran měďnatý pentahydrát	Sigma Aldrich (USA)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Sigma Aldrich (USA)
Uhlíčitan sodný monohydrát	Sigma Aldrich (USA)
Vinan sodný	Sigma Aldrich (USA)

4.2 Přístroje

Analytické váhy	Sartorius (Německo)
Automatické pipety 1-5000 μ l	Eppendorf (Německo)
Automatický rotátor	Biosan (Lotyšsko)
Centrifuga	Eppendorf (Německo)
Digitální předvážky	Kern (Německo)
Elektromagnetická míchačka	IKA (Německo)
HPLC systém Schimadzu LC - 2010C	Schimadzu (Japonsko)
pH metr inoLab Level 1	WTW (Německo)
Spektrofotometr Biochrom (WPA)	Biochrom Ltd. (GB)
Termostat SUB 6	Grant (Velká Británie)
Třepačka s termostatem	BioSan (Litva)
Vortex MS-1	IKA (Německo)

4.3 Metody

4.3.1 Stanovení aktivity aminotransferasy

Aktivita volné a imobilizované aminotransferasy byla stanovena vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC, Schimadzu LC - 2010C) s použitím benzylacetonu (BA) a isopropylaminu (IPA) jako substrátů.

2 ml reakční směs obsahovala Tris HCl pufr ($78,71 \text{ mmol.l}^{-1}$; $78,71 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ PLP, pH 8), isopropylamin (150 mmol.l^{-1}) jako donor aminoskupiny, HCl (150 mmol.l^{-1}) pro úpravu pH reakce a benzylaceton (10 mmol.l^{-1}) rozpuštěný v dimethylsulfoxidu (DMSO, 5% co-solvent). Pro měření aktivity imobilizovaného enzymu bylo použito 100 mg magnetických celulosových mikročástic s imobilizovanou AT z *Chromobacterium violaceum*. V případě měření aktivity volné AT byl k reakční směsi připipetován roztok volného enzymu (1 mg.ml^{-1}). Reakce probíhala za stálého míchání a třepání na automatickém rotátoru při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. Vzorek byl stopnut 1% TFA. Vzorek s denaturovaným enzymem byl přefiltrován a uschován pro měření aktivity pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Aktivita aminotransferasy byla vypočítána z plochy píku produktu (MPPA, 1-methyl-3-fenylpropylamin) v závislosti kalibrace na produkt.

Uvedený postup měření aktivity volné a imobilizované aminotransferasy je u všech podkapitol totožný, obměňují se jen proměnné (teplota, znovupoužití, atd.).

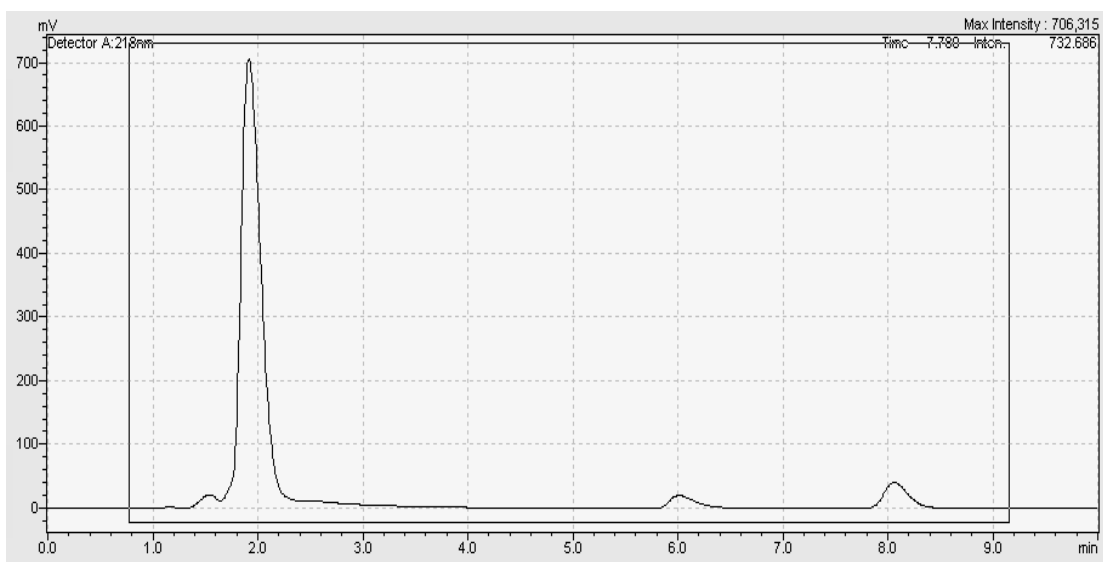
4.3.1.1 HPLC metoda stanovení produktů enzymové reakce

Měření bylo prováděno na HPLC přístroji – Shimadzu LC - 2010C. Do vialky s insertem bylo napipetováno 20 μl vzorku a 80 μl mobilní fáze. Mobilní fáze se skládala z 60 % 10 mmol.l^{-1} $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 11 (voda + kyselina octová, titrováno amoniakem na pH 11, poté byla nutná filtrace) s 40 % ACN (acetonitril). Vzorky byly dávkovány do mobilní fáze, která přenášela jednotlivé složky vzorku na kolonu (Gemini-NX 3 μm C18 110A, 150 x 2.0 mm), kde docházelo k opakovanému ustanovení rovnováhy mezi oběma fázemi a separaci analytu na základě fyzikálně-chemických vlastností.

Analyty byly detekovány v mobilní fázi v průtokové cele UV detektoru po průchodu separační kolonou. Průtok byl 0,2 ml.min^{-1} , detekce 218 nm, injekce vzorku byla 1 μl a doba separace 10 min. Standardy byly MPPA a BA. Retenční čas byl pro MPPA 6 minut a pro benzylaceton (BA) 8,1 minut.

Výstupem z UV detektoru je tzv. chromatogram, což je grafický záznam závislosti odezvy detektoru na retenčním čase. V chromatogramu se hodnotí plocha nebo výška píku.

Měření vzorků na HPLC přístroji prováděl Mgr. Miroslav Jořenek.



Obr. 13 Chromatogram. Na obrázku je znázorněn pík produktu MPPA v retenčním čase 6 minut a pík BA v retenčním čase 8,1 minut.

4.3.2 Imobilizace aminotransferasy pomocí jodistanu

Do 2 ml centrifugační zkumavky bylo naváženo 100 mg magnetických celulosových mikročastic (Perloza MG 100) o standardní velikosti částic 50 - 80 μm . Bylo přidáno 2000 μl 0,05 mol.l^{-1} roztoku NaIO_4 ve vodě (v pufru se nerozpouští). Směs byla třepána a míchána na rotátoru v lednici při 4°C. Přes noc probíhala aktivace mikročastic. Další den byl jodistan odstraněn a magnetické mikročastice byly sedmkrát promyty 800 μl fosfátového pufru (0,1 mol.l^{-1} , pH 8). Pufir byl odstraněn pomocí automatické pipety. Následně bylo k aktivovaným částicím přidáno 1600 μl fosfátového pufru (0,1 mol.l^{-1} , pH 8) s roztokem aminotransferasy (7,5 mg.ml^{-1}). Enzym se navazoval při 4°C po dobu 24 hodin. Směs byla třepána a míchána na automatickém rotátoru pro efektivní navázání enzymu. Poté byly částice separovány a promyty 10x fosfátovým pufrem (0,1 mol.l^{-1} , pH 8). Aktivita aminotransferasy byla u imobilizovaných částic zjištěna metodou HPLC.

4.3.3 Imobilizace aminotransferasy pomocí glutaraldehydu

Do 2 ml centrifugační zkumavky bylo naváženo 100 mg magnetických celulosových mikročastic (MG DEAE 100) o standardní velikosti částic 30 - 50 μm . Poté bylo přidáno 1900 μl 5% roztoku glutaraldehydu a směs byla 4 hodiny protřepávána a míchána při teplotě 4°C. Po aktivaci částic byly magnetické částice separovány magnetickým separátorem a nenavázaný glutaraldehyd byl odstraněn. Mikročastice byly 5x promyty fosfátovým pufrem (0,1 mol.l^{-1} , pH 8). Následně bylo k aktivovaným mikročasticím přidáno 1600 μl fosfátového pufru (0,1 mol.l^{-1} , pH 8) s rozpuštěnou aminotransferasou z *Chromobacterium violaceum* (7,5 mg.ml^{-1}). Imobilizace probíhala při 4°C po dobu 24 hodin za stálého míchání a protřepávání na automatickém rotátoru. Magnetické mikročastice byly separovány a roztok obsahující nevázanou aminotransferasu byl odpipetován a mikročastice byly 10x promyty 800 μl fosfátového pufru (0,1 mol.l^{-1} , pH 8). Byla stanovena aktivita aminotransferasy u těchto částic.

4.3.4 Imobilizace aminotransferasy pomocí karbodiimidu

Do 2 ml centrifugační zkumavky bylo naváženo 100 mg magnetických celulosových mikročástic (MG CM 100) o standardní velikosti částic 80 – 100 μm . Poté byla přidána aktivační činidla ve fosfátovém pufru (0,1 mol.l^{-1} , pH 6): EDC.HCl (13 mmol.l^{-1}) a NHS (25 mmol.l^{-1}). Následně byl přidán roztok aminotransferasy z *Chromobacterium violaceum* (7,5 mg.ml^{-1}). Tato směs byla protřepávána a míchána na automatickém rotátoru 24 hodin při teplotě 4°C. Po ukončení imobilizace byla směs separována a magnetické mikročástice byly 10x promyty stejným puftrem (0,1 mol.l^{-1} , pH 6). Reakce probíhala za současné aktivace karboxyskupiny pomocí NHS. Byla stanovena aktivita aminotransferasy u těchto částic.

4.3.5 Stanovení vazebné kapacity aminotransferasy

Vazebná kapacita aminotransferasy byla stanovena metodou s kyselinou bicinchoninovou (BCA metoda) (Luhová *et. al.*, 2013) na základě porovnání množství proteinu ve vzorku roztoku aminotransferasy před imobilizací a po imobilizaci na různé magnetické celulosové mikročástice (MG 100, MG DEAE 100, MG CM 100).

Reakce probíhala smícháním 200 μl 10x naředěného vzorku a 2 ml BCA činidla. Roztoky byly promíchány a inkubovány při 37°C po dobu 30 minut. Poté byly ochlazeny na laboratorní teplotu. Následně byla měřena jejich absorbance při vlnové délce 562 nm proti blanku (200 μl destilované vody a 2 ml BCA činidla)

Množství navázané AT z *Chromobacterium violaceum* na magnetické mikročástice bylo vypočítáno podle vztahu:

$$\text{vazebná kapacita} = c_1 \cdot V_1 - c_2 \cdot V_2 / m$$

kde c_1 je koncentrace proteinů před imobilizací a c_2 po imobilizaci. Koncentrace je vyjádřena mg.ml^{-1} , objem roztoku V_1 a V_2 je dán v ml a m je hmotnost pevného nosiče v mg. Vazebná kapacita byla uvedena v hmotnostním množství imobilizovaného proteinu na hmotnostní jednotku každého nosiče ($\mu\text{g AT/mg}$ mikročástic).

4.3.6 Teplotní stabilita aminotransferasy

Vzorky volné aminotransferasy v Tris HCl pufru ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 8) a 100 mg magnetických celulosových mikročastic (Perloza MG 100) s imobilizovanou aminotransferasou ve fosfátovém pufru ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 8) byly inkubovány při osmi různých teplotách (5°C , 15°C , 25°C , 35°C , 45°C , 55°C , 65°C , 75°C) po dobu 60 minut. Po inkubaci byly roztoky ponechány v ledu. Magnetické mikročastice byly separovány a pufr byl odpipetován. Pro určení aktivity volné a imobilizované AT byla použita metoda HPLC. Pro porovnání teplotní stability volné a imobilizované AT z *Chromobacterium violaceum* byla určena hodnota T_{50} , což je teplota, při které si enzym zachovává poloviční aktivitu oproti nejvyšší určené aktivitě.

4.3.7 Funkční stabilita aminotransferasy

Byla měřena funkční stabilita volné a imobilizované aminotransferasy z *Chromobacterium violaceum* na magnetických celulosových mikročasticích (Perloza MG 100). Bylo provedeno 5 měření v rozmezí 14 dní.

Vzorek volné aminotransferasy a imobilizované aminotransferasy pomocí jodistanové metody byl inkubován při laboratorní teplotě po dobu 14 dní. Aktivita volné i imobilizované aminotransferasy při stanovení funkční stability AT byla měřena v různých časových intervalech. Aktivita obou vzorků byla měřena metodou HPLC. Volná AT byla měřena hned po přípravě enzymu, po 1., 6., 7., a 13. dni inkubace při laboratorní teplotě. Mikročastice s imobilizovanou AT byly měřeny hned po imobilizaci, po 1., 7., 8. a 14. dni stání při laboratorní teplotě. V případě volné aminotransferasy musel být denaturovaný vzorek centrifugován po dobu 15 minut při $10\,000 \text{ g}$ z důvodu ucpávání filtru denaturovaným enzymem při filtrování vzorku.

Každé měření probíhalo s novým vzorkem, který byl inkubován při laboratorní teplotě po určitou dobu. Byla měřena aktivita v závislosti na čase. Měření s nejvyšší aktivitou aminotransferasy bylo určeno jako 100 %. Pro porovnání funkční stability volné a imobilizované AT byla určena hodnota t_{50} , což je čas, za který si enzym zachová poloviční aktivitu oproti nejvyšší naměřené hodnotě.

4.3.8 Operační stabilita aminotransferasy

Byla měřena operační stabilita volné a imobilizované aminotransferasy z *Chromobacterium violaceum*. Magnetické celulosové mikročástice (Perloza MG 100) s imobilizovanou aminotransferasou pomocí jodistanu byly po imobilizaci promyty 10x fosfátovým pufrem ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 8) a použity pro měření aktivity v závislosti na počtu použití. Aktivita byla stanovena metodou HPLC. Enzymová reakce probíhala za teploty 4°C .

S jedním vzorkem mikročástic s imobilizovanou AT bylo provedeno 9 opakování, kdy mezi jednotlivými cykly byly magnetické mikročástice separovány a produkt a substrát byly odpipetovány a mikročástice byly promyty 10x fosfátovým pufrem ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 8¹). První stanovená aktivita byla označena jako 100 %, následující výsledky byly vyjádřeny jako procentuální hodnoty zachované aktivity. Aktivita byla stanovena průměrem ze čtyř měření.

5 Literatura

- Bickerstaff G. F. (1997): *Immobilization of enzymes and cells - some practical considerations*. Humana Press Totowa, 1-10.
- Brady D., Jordaan J. (2009): Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnology letters*, **31**, 1639-1650.
- Brena B. M., Batista-Viera F. (2006): Immobilization of enzymes. In: *Immobilization of enzymes and cells*. 2 nd ed., (Guisan J. M., ed), Humana Press Totowa, New Jersey, USA, 15-30.
- Cao L. (2005): *Carrier-bound immobilized enzymes - Principles, applications and design*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- Dalton D. R. (2011): *Foundations of organic chemistry: Unity and diversity of structures, pathways, and reactions*. 1 st. ed., John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA, 1251stran.
- D'souza S. F. (1999): Immobilized enzymes in bioprocess. *Current Science*, **77**, 69-79.
- Feldman L. I., Gunsalus I. C. (1950): The occurrence of a wide variety of transaminases in bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, **187**, 821-830.
- Fialová L., Vejražka M. (2005): *Játra a vybraná biochemická vyšetření u jaterních onemocnění*. Praha: Ústav lékařské biochemie 1. lékařské fakulty UK.
- Hänninen O., Hartiala K. (1965): Inhibition of transaminases by cinchophen and its derivatives. *Biochemical pharmacology*, **14**, 1073-1076.
- Hermanson G. T., Pallia A. K., Smith P. K. (1992): *Immobilized affinity ligand techniques*. Academic Press, San Diego, USA, 454 stran.
- Hirotsu K., Goto M., Okamoto A., Miyahara I. (2005): Dual Substrate Recognition of Aminotransferases. *The Chemical Record*, **5**, 160-172.
- Hopwood J. (2012): *Development of Transaminases for the Synthesis of Enantiomerically Pure Chiral Amines*. Ph.D. thesis, University of Manchester, United Kingdom.
- Hsing I.-M., Xu Y., Zhao W. (2007). Micro-and Nano-Magnetic Particles for Applications in Biosensing. *Electroanalysis*, **19**, 755-768.
- Hwang B. Y., Cho B. K., Yun H., Koteswar K., Kim B. G. (2005): Revisit of aminotransferase in the genomic era and its application to biocatalysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **37**, 47-55.
- Chaloupková Z. (2013): *Charakterizace α -amylasy a její imobilizace na magnetické mikročástice a nanočástice*. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Chaplin M. F., Bucke C. (1990) *Enzyme technology*. 1st ed., Cambridge University Press, New York, USA, 280 stran.
- John R. A., Jones E. D., Fowler L. J. (1979): Enzyme-induced inactivation of transaminases by acetylenic and vinyl analogues of 4-aminobutyrate. *Biochemical Journal*, **177**, 721-728.
- Koszelewski D., Müller N., Schrittwieser J. H., Faber K., Kroutil W. (2010): Immobilization of ω -transaminases by encapsulation in a sol-gel/celite matrix. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **63**, 39-44.
- Kotačková L. (2011): *Laboratorní hodnoty. Alaninaminotransferáza*. *Top Lékař*. <http://www.toplekar.cz/laboratorni-hodnoty/alaninaminotransferaza.html>.
- Kotačková L. (2011): *Laboratorní hodnoty. Aspartátaminotransferáza*. *Top Lékař*. <http://www.toplekar.cz/laboratorni-hodnoty/aspartataminostransferaza.html>.
- Krajewska B. (2004): Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, **35**, 126-139.
- López C., Ríos S. D., López-Santín J., Caminal G., Álvaro G. (2010): Immobilization of PLP-dependent enzymes with cofactor retention and enhanced stability. *Biochemical Engineering Journal*, **49**, 414-421.

- López-Gallego F., Betancor L., Mateo C., Hidalgo A., Alonso-Morales N., Dellamora-Ortiz G., Guisan J. M., Fernández-Lafuente R. (2005): Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. *Journal of Biotechnology*, **119**, 70-75.
- Luhová L., Peč P., Šebela M., Frébort I., Zajoncová L., Petřivalský M., Piterková J., Šmehilová M. (2013): *Laboratorní cvičení z biochemie*. 2nd ed., Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, Česká republika, 141 stran.
- Malik M. S., Park E.-S., Shin J.-S. (2012): Features and technical applications of ω -transaminases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **94**, 1163-1171.
- Mallin H., Höhne M., Bornscheuer U. T. (2014): Immobilization of (*R*)- and (*S*)-amine transaminases on chitosan support and their application for amine synthesis using isopropylamine as donor. *Journal of Biotechnology*, **191**, 32-37.
- 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.
- McBain S. C., Yiu H. HP., Dobson J. (2008) Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *International journal of nanomedicine*, **3**, 169-180.
- Mehta P. K., Hale T. I., Christen P. (1993): Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups. *European Journal of Biochemistry*, **214**, 549-561.
- Moudgil K. D., Sadasivudu B. (2006): Metabolism of proteins and non-protein nitrogenous compounds. In: *Textbook of Biochemistry nad Human Biology*. 3rd ed., (Talwar G. P., Srivastava L. M., eds.). Prentice-Hall of India Private Limited, India, 398-431.
- Neto W. (2013): *Process Considerations for the Asymmetric Synthesis of Chiral Amines using ω -Transaminase*. Ph.D. thesis, Technical University of Denmark, Denmark.
- Neuberg M. (2011): *Vliv příjmu a využití dusíku v metabolismu vyšších rostlin*. Disertační práce, Česká zemědělská univerzita v Praze, Česká republika.
- Ni K., Zhou X., Zhao L., Wang H., Ren Y., Wei D. (2012): Magnetic catechol-chitosan with bioinspired adhesive surface: Preparation and immobilization of ω -transaminase. *PloS one*, **7**, 1-8.
- Päiviö, M., Kanerva L. T. (2013): Reusable ω -transaminase sol-gel catalyst for the preparation of amine enantiomers. *Process Biochemistry*, **48**, 1488-1494.
- Pečová M. (2008): *Imobilizace trypsinu na magnetické nanočástice a další využití v protěticke*. Diplomová Práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká Republika.
- Rudat J., Brucher B. R., Syldatk C. (2012): Transaminases for the synthesis of enantiopure beta-amino acids. *AMB express*, **2**, 1-10.
- Sassolas A., Blum J. L., Leca-Bouvier B. (2012): Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, **30**, 489-511.
- Shin J.-S., Kim B.-G. (2002): Exploring the active site of amine: pyruvate aminotransferase on the basis of the substrate structure-reactivity relationship: How the enzyme controls substrate specificity and stereoselectivity. *The Journal of organic chemistry*, **67**, 2848-2853.
- Stratulat R., Calugaru G., Badescu V. (2000): Magnetic carriers particles for selective separation in environmental and industrial processes. *Analele Stiintifice Ale Universitatii "AL. I. CUZA" IASI Tomul XLV-XLVJ, s. Fizica Starii Condensate*, 45-50.
- Sugio S, Petsko G. A., Manning J. M., Soda K., Ringe D. (1995): Crystal structure of a D-amino acid aminotransferase: how the protein controls stereoselectivity. *Biochemistry*, **34**, 9661-9669.
- Tavares R. (2011): *Surface expression of Chromobacterium violaceum transaminase in Escherichia coli*. Student thesis, The Royal Institute of Technology, Sweden.
- Truppo M. D., Strotman H., Hughes G. (2012): Development of an immobilized transaminase capable of operating in organic solvent. *ChemCatChem*, **4**, 1071-1074.
- Tufvesson P., Lima-Ramos J., Jensen J. S., Al-Haque N., Neto W., Woodley J. M. (2011): Process considerations for the asymmetric synthesis of chiral amines using transaminases. *Biotechnology and bioengineering*, **108**, 1479-1493.

- Turner N. J., Truppo M. D. (2013): Synthesis of Chiral Amines Using Transaminases. In: *Sustainable Catalysis: Challenges and Practices for the Pharmaceutical and Fine Chemical Industries* (Dunn P. J, Hii K. K., Krische M. J., Williams M. T, eds.), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. 63-74.
- Van Hauwermeiren D. (2014): *Model-based analysis of the transaminase process*. Diploma thesis, Universiteit Gent, Belgium.
- Westlake A. C. (2012): *Crystallisation and Structural Studies on Omega Transaminase Enzymes*. Dissertation thesis, University of Exeter, United Kingdom.
- Wong D. T., Fuller R. W., Molloy B. B. (1973): Inhibition of amino acid transaminases by L-cycloserine. *Advances in enzyme regulation*, **11**, 139-154.
- Yi S. S., Lee C. W., Kim J., Kyung D., Kim B. G., Lee Y. S. (2007): Covalent immobilization of ω -transaminase from *Vibrio fluvialis* JS17 on chitosan beads. *Process Biochemistry*, **42**, 895-898.
- Zajkoska P., Rebroš M., Rosenberg M. (2013): Biocatalysis with immobilized *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**, 1441-1455.
- Zhang D. H., Yuwen L. X, Peng L. J. (2013): Parameters affecting the performance of immobilized enzyme. *Journal of Chemistry*, **vol. 2013**, 1-7.

6 Seznam použitých zkratk

ACN	acetonitril
AcornAT	acetylnornithinaminotransferasa
ALT	alaninaminotransferasa
ArnB	UDP-2-acetamid-4-amino-2,4,6-trideoxyglukosaaminotransferasa
AroAT	aromatická aminotransferasa
AST	aspartátaminotransferasa
AT	aminotransferasa
BA	benzylaceton
BCA	bicinchoninová kyselina
BCAT	aminotransferasa, která využívá rozvětvené aminokyseliny jako substrát
BT	hovězího trypsin
CCS	katechol-chitosan
CCS-IONPs	nanočástice oxidu železa obalené katechol-chitosanem
CM	karboxymethyl
CS-IONPs	nanočástice obalené chitosanem
D-AlaAT	D-alaninaminotransferasa
DapaAT	diaminopelargonátaminotransferasa
DEAE	diethylaminoethyl
DMSO	dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC.HCl	N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid
EMR	enzymový membránový rektor
Gaba	4-aminobutyrate
GaBaAT	4-aminobutyrateaminotransferasa
HisPAT	histidinol-fosfátaminotransferasa
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IONPs	nanočástice oxidu železa
IPA	isopropylamin
kDa	kilodalton
MAT-BT	hovězí trypsin modifikovaný maltotriosou
mCPP	<i>m</i> -karboxyphenyl-pyridoxamin-fosfát

MPPA	1-methyl-3-fenylpropylamin
NHS	N-hydroxysukcinimid
OrnAT	ornitinaminotransferasa
PheAT	fenylalaninaminotransferasa
PLP	pyridoxal-5'-fosfát
PMP	pyridoxamin-5'-fosfát
PSerAT	fosfoserinaminotransferasa
PVA	polyvinylalkohol
RAF-BT	hovězí trypsin modifikovaný rafinosou
SAT	cukerné aminotransferasy
SerAT	serinaminotransferasa
StsC	L-glutamin- <i>scyllo</i> -inositolaminotransferasa
t ₅₀	čas, za který si enzym zachová poloviční aktivitu vůči nejvyšší naměřené hodnotě
T ₅₀	teplota, při které si enzym zachovává poloviční aktivitu oproti nejvyšší určené aktivitě
TFA	kyselina trifluorotová
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
TylB	TDP-3-keto-6-deoxy-D-glukosa-aminotransferasa
TyrAT	tyrosinaminotransferasa
α-AT	α-aminotransferasa
α-MBA	α-methylbenzylamin
ω-AaAT	ω-aminokyselinaaminotransferasa
ω-AT	ω-aminotransferasa