

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

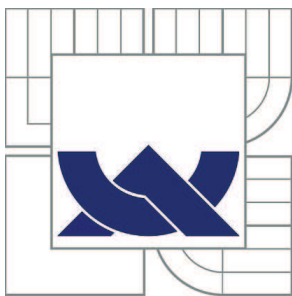
VÝZNAM A VYUŽITÍ CELULÁZ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

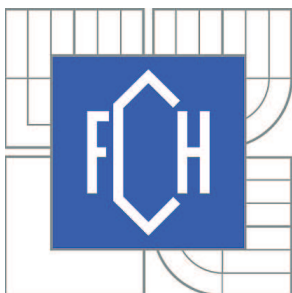
OLGA STUHLÍKOVÁ

BRNO 2012



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VÝZNAM A VYUŽITÍ CELULÁZ

IMPORTANCE AND UTILIZATION OF CELLULASES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

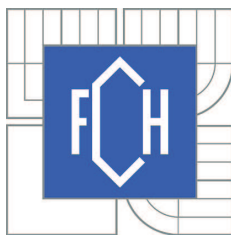
OLGA STUHLÍKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. JIŘINA OMELKOVÁ, CSc.

BRNO 2012



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0706/2011** Akademický rok: **2011/2012**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Olga Stuchlíková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)
Studijní obor: Biotechnologie (2810R001)
Vedoucí práce **doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.**
Konzultanti:

Název bakalářské práce:

Význam a využití celuláz

Zadání bakalářské práce:

- 1) Vypracujte literární přehled k dané problematice
- 2) Popište použité metody hodnocení
- 3) Zpracujte naměřené výsledky z experimentů
- 4) Zhodnoťte získané výsledky formou diskuse

Termín odevzdání bakalářské práce: 4.5.2012

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Olga Stuchlíková
Student(ka)

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.2.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Teoretická část práce pojednává o struktuře rostlinné buňky a o polysacharidech, ze kterých se skládá buněčná stěna, přičemž pozornost je zaměřena hlavně na celulózu. Dále jsou popsány celulólytické enzymy a mikroorganismy, které tyto enzymy produkují. V práci je popsáno i aktuální využití celulólytických enzymů v průmyslu a zemědělství. Poslední podkapitola teoretické části je pak věnována imobilizaci a imobilizovaným enzymům, jejich přínosu a využití v praxi.

Praktická část se týká především stanovení základních vlastností komerčního celulózového komplexu Celluclast 1.5 L. Experimentálně je tedy stanoveno teplotní optimum, pH optimum, tepelná stabilita a pH stabilita.

Byla věnována pozornost i imobilizaci tohoto celulózového komplexu na synteticky připravený nosič „Sorsilen“. Následně pak stejně, jako pro rozpustnou formu komerčního preparátu, byly stanoveny základní charakteristiky.

ABSTRACT

The theoretical part of my bachelor thesis focuses on studying plant cells and polysaccharides, from which the cell wall is made of. The main attention is held on cellulose. Secondly, cellulases and microorganisms, which produce these enzymes, are mentioned. This work also deals with the actual use of cellulases in industry and agriculture. The last chapter of the theoretical part is devoted to immobilization, immobilized enzymes and their use in practice.

The practical part of my bachelor thesis focuses on determination of basic properties of commercially used enzyme Celluclast 1.5 L. The temperature and pH optimum and temperature and pH stability were determined experimentally.

The attention is also held on immobilization of these cellulases on synthetically prepared carrier „Sorsilen“. Subsequently, basic characteristics were determined as well as for soluble form of commercial enzyme.

KLÍČOVÁ SLOVA

Celulóza, celulólytické enzymy, mikroorganismy, imobilizace.

KEYWORDS

Cellulose, cellulases, microorganisms, immobilization.

STUHLÍKOVÁ, O. *Význam a využití celulózy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 51 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala doc. Ing. Jiřině Omelkové, CSc. za odborné konzultace, čas, který mi věnovala a cenné rady, kterými přispěla k vypracování mé bakalářské práce.

OBSAH

1 Úvod	8
2 Cíl práce	9
3 Rostlinná buňka.....	10
3.1 Rostlinná buněčná stěna.....	11
4 Polysacharidy buněčné stěny.....	11
4.1 Celulóza.....	11
4.1.1 Struktura.....	11
4.1.2 Vlastnosti	12
4.2 Hemicelulózy	12
4.2.1 Heteroglukany.....	12
4.2.2 Heteroxylany.....	13
4.3 Pektin.....	13
4.4 Lignin	14
5 Enzymy.....	14
5.1 Celulolytické enzymy.....	15
5.1.1 Endoglukanáza.....	15
5.1.2 Exoglukanázy	15
5.1.3 β -Glukosidáza.....	15
6 Původ celulolytických enzymů	16
6.1 Mikroorganismy produkující celulolytické enzymy	16
7 Význam a využití celulolytických enzymů	17
7.1 Celulázy v potravinářské biotechnologii.....	17
7.2 Celulázy v pivní a vinařské biotechnologii.....	18
7.3 Celulázy v papírenském průmyslu	18
7.4 Celulázy v textilním průmyslu	18
7.5 Celulázy při výrobě bioetanolu	19
7.6 Celulázy v zemědělství	19
8 Imobilizované enzymy	19
8.1 Způsoby imobilizace	20
8.1.1 Imobilizace založená na adsorpci	20
8.1.2 Kovalentní imobilizace.....	21
8.1.3 Imobilizace síťováním (Cross-linking).....	22
8.1.4 Imobilizace uzavřením enzymu do gelu nebo mikrokapslí	22

8.2	Druhy nosičů pro imobilizaci enzymu	23
8.2.1	Syntetické organické polymery jako nosiče	23
8.2.2	Biopolymery jako nosiče	23
8.2.3	Hydrogely jako nosiče	24
8.2.4	Anorganické nosiče.....	24
9	Vlastnosti volných a imobilizovaných enzymů	24
10	Experimentální část.....	25
10.1	Seznam použitých přístrojů a chemikálií	25
10.1.1	Použité přístroje	25
10.1.2	Použité chemikálie.....	25
10.1.3	Použitý substrát.....	26
10.1.4	Použitý nosič.....	26
10.1.5	Použitý enzym	26
10.2	Příprava roztoků	26
10.2.1	Příprava 0,2 M roztoku octanu sodného	26
10.2.2	Příprava substrátu CMC	26
10.2.3	Příprava citran – fosforečnanových pufrů	26
10.2.4	Použitý enzym	27
10.2.5	Příprava Somogyiho činidel	27
10.3	Stanovení redukujících látek podle Somogyiho a Nelsona	27
10.4	Charakteristiky volného enzymu.....	27
10.4.1	Stanovení kalibrační křivky	27
10.4.2	Výpočet aktivity enzymu	28
10.4.3	Stanovení pH optima volného enzymu.....	28
10.4.4	Stanovení teplotního optima volného enzymu.....	29
10.4.5	Stanovení tepelné stability volného enzymu	29
10.4.6	Stanovení pH stability volného enzymu	30
10.5	Imobilizace komerčního celulóзовého preparátu.....	30
10.5.1	Stanovení aktivity volného enzymu ve filtrátu	30
10.5.2	Stanovení aktivity imobilizovaného enzymu.....	31
10.5.3	Stanovení aktivity enzymu uchovávaného pět dní v pufru.....	31
10.6	Stanovení optimálních podmínek působení imobilizovaného enzymu	32
10.6.1	Stanovení pH optima imobilizovaného enzymu	32
10.6.2	Stanovení teplotního optima imobilizovaného enzymu.....	32

10.6.3	Stanovení tepelné stability imobilizovaného enzymu	33
10.6.4	Stanovení pH stability imobilizovaného enzymu	33
11	Výsledky a diskuze	34
11.1	Charakteristiky volného enzymu	34
11.2	Imobilizace komerčního celulázového preparátu	36
11.3	Stanovení optimálních podmínek působení imobilizovaného enzymu	38
12	Závěr	41
13	Seznam použitých zdrojů	42
14	Seznam použitých zkratk.....	45
15	Seznam příloh.....	46
16	Přílohy	47

1 ÚVOD

Celulóza je nejrozšířenější polymer na zemi. S hemicelulózou, pektinem a ligninem patří mezi strukturní polysacharidy rostlin [1].

Celulóza může být štěpena komplexem celulólytických enzymů, tzn. enzymaticky [2].

V přírodě jsou celulólytické enzymy produkovány poměrně velkým množstvím bakterií, hub a plísní a jsou odpovědné za rozklad celulózového materiálu [2].

Mezi nejvýznamnější producenty celulólytických enzymů patří aerobní plísně rodů *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* a bakterie rodu *Bacillus* [3, 4].

Celulólytické enzymy mají široký rozsah aplikací. Hojně jsou využívány v potravinářské, pивní a vinařské biotechnologii. Nezanedbatelný je také papírenský a textilní průmysl nebo zemědělství. Další oblasti, kde hrají celulólytické enzymy významnou roli, jsou farmacie, medicína, genetické inženýrství, odpadové hospodářství a v poslední době intenzivně studovaná výroba bioetanolu [3, 4].

Od poloviny minulého století je velká pozornost věnována také enzymům v nerozpustné formě, takzvaným imobilizovaným enzymům. Jejich aplikace a využití v průmyslu přináší nezanedbatelné výhody, jak po výkonnostní, tak i ekonomické stránce [5].

2 CÍL PRÁCE

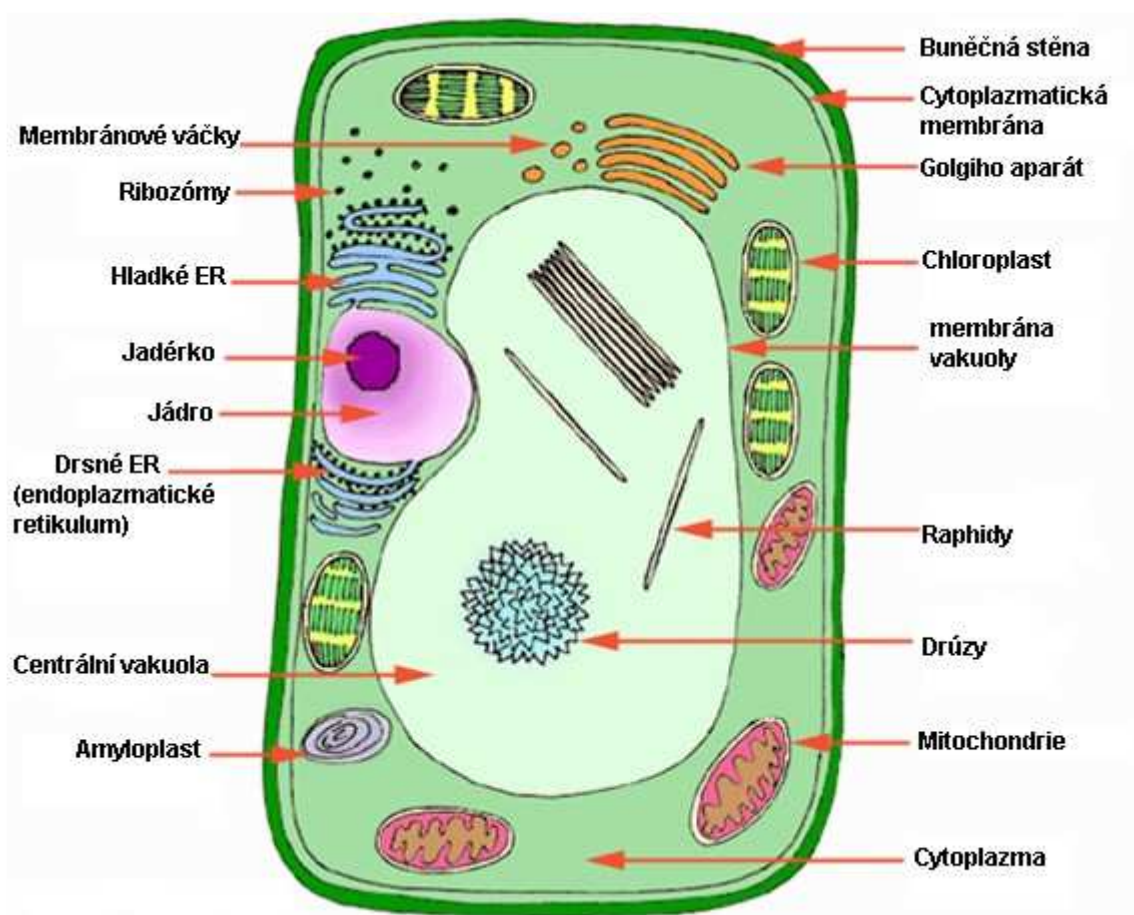
- 1) Zpracovat literární rešerši k dané problematice
- 2) Charakterizovat komerční celulázový komplex
- 3) Provést imobilizaci
- 4) Porovnat změnu vlastností imobilizovaného enzymu s volným enzymem

3 ROSTLINNÁ BUŇKA

Rostlinná eukaryotická buňka je tvořena na povrchu buněčnou stěnou a buněčným obsahem – protoplastem. Protoplast je ohraničen jednoduchou cytoplazmatickou biomembránou – plazmalemou a obsahuje cytoplazmu s jádrem a ostatními buněčnými organelami, soustavou membrán, vakuolami, sférozómy a metaplazmatickými součástmi – inkluzemi. Všechny tyto části jsou rozptýleny v základní substanci – cytozolu – cytoplazmy [6].

K organelám řadíme především jádro, plastidy a mitochondrie, které jsou ohraničeny dvojjednotkovou membránou, zatímco ribozómy, vakuoly, diktyozómy (z nichž se skládá Golgiho aparát), endoplazmatické retikulum a některé další ohraničují jednoduché membrány. Z uvedených struktur buňky lze optickým mikroskopem dobře sledovat buněčnou stěnu, jádro s jadérky, plastidy a vakuoly, případně některé buněčné inkluze jako škrobová zrna, krystaly a olejové krůpěje. Mitochondrie jsou na hranici rozlišitelnosti používaných světelných mikroskopů. Soustava membrán zastoupena endoplazmatickým retikulem a Golgiho aparátem (tzv. endomembránový systém) lze pozorovat pouze za pomoci elektronového mikroskopu [6].

U živých rostlinných buněk se cytoplazma zpravidla pohybuje a toto proudění označujeme jako cyklóza. Zprostředkuje rychlou výměnu látek uvnitř buňky. Rozlišujeme rotaci cytoplazmy, kdy se obsah buňky pohybuje jedním směrem podél buněčné stěny kolem centrální vakuoly a cirkulaci, kdy cytoplazma proudí různými směry kolem stěn, ale i v praménkách mezi vakuolami [6].



Obr. 1. Schéma rostlinné buňky [7]

3.1 Rostlinná buněčná stěna

Přítomnost buněčné stěny je jednou z charakteristik odlišujících rostlinnou buňku od živočišné. Buněčná stěna (BS) omezuje velikost protoplastu a zabraňuje narušení buňky při zvětšování souvisejícím s příjmem vody vakuolou. Je významná při absorpci, transportu a sekreci látek v rostlinách, vnímání signálů v interakci s patogeny a symbionty, má klíčovou úlohu v morfogenezi rostlin [6].

BS sestává ze čtyř skupin polymerů: celulózy, pektinu, hemicelulózy a proteinů. Stavbu buněčné stěny rostlinných buněk určuje celulóza. Celulózová kostra BS je prostoupena matrix necelulózních molekul, hemicelulózy a pektinových látek. Důležitou složkou je glykoprotein označovaný jako extenzin, dále se ve stěnách mnoha buněk vyskytuje lignin (sloužící ke zpevnění BS) a tukové látky – kutin, suberin a vosky, zabraňující ztrátám vody z rostlin impregnací BS. Mimo to mohou být BS inkrustovány anorganickými látkami, např. SiO₂ nebo CaCO₃ [6].

V rostlinných buňkách byly zjištěny dvě vrstvy BS: střední lamela a primární stěna. Střední lamela, složená hlavně z pektinových látek, se nachází mezi primárními stěnami přilehlých buněk. Proces lignifikace BS začíná právě ve střední lamele a pokračuje na primární, případně sekundární stěně. Primární stěna je složena hlavně z celulózy, hemicelulózy, pektinových látek (důležité pro plasticitu BS) a glykoproteinu. Ve stěně buněčné se často vyskytují ztenčeniny, tzv. tečky, nebo dvůrkaté ztenčeniny, tzv. dvojtečky, kterými procházejí cytoplazmatické praménky – plazmodesmy, spojující živé obsahy sousedících buněk [6].

U některých buněk se v průběhu vývoje vytváří i sekundární BS. K jejímu vytvoření dochází většinou po ukončení růstu buňky, kdy primární stěna není schopna dalšího plošného růstu. Sekundární BS obsahuje hlavně celulózu a lignin, pektinové látky a glykoprotein zde chybějí. Je tudíž neelastická. Proto jsou sekundární stěny důležité u specializovaných buněk sloužících ke zpevnění a k vedení vody. U těchto buněk po vytvoření sekundární BS protoplast odumírá [6].

Buněčná stěna může růst do tloušťky (apozicí - vrstvením celulózních mikrofibril) nebo do plochy (intususcepce – vmezeřováním, vkládáním nových mikrofibril do již existující struktury BS) [6].

4 POLYSACHARIDY BUNĚČNÉ STĚNY

4.1 Celulóza

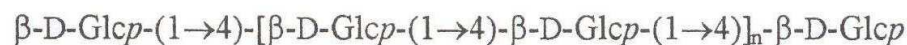
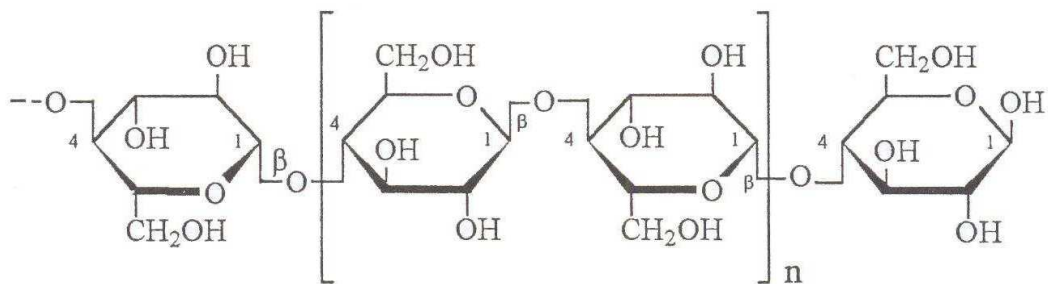
Celulóza je nejrozšířenější organická sloučenina na Zemi, ročně jí biosyntézou vzniká asi 10¹¹ tun. Pro většinu obratlovců je nestravitelná, protože nevytvářejí enzymy, které ji štěpí, přežvýkavci však mají v trávicím ústrojí mikroorganismy, které ji umějí rozkládat. Jako základní strukturní polysacharid se vyskytuje v buněčných stěnách vyšších rostlin. Můžeme ji také najít v zelených řasách, houbách a výjimečně i ve stěnách buněk jednoduchých mořských bezobratlých živočichů [2, 8].

4.1.1 Struktura

Homoglukan celulóza je vysokomolekulární lineární polymer D-glukózových jednotek vázaných glykosidovými vazbami β-(1→4). Každá z vázaných glukózových jednotek v řetězci je otočena vzhledem k předchozí a v této poloze je udržována intramolekulárními vodíkovými vazbami mezi hydroxyskupinami na C-3 a kyslíkem pyranózového cyklu a mezi hydroxyskupinami na C-2 a C-6. Stupeň polymerace může být až 15 000 [2].

Jednotlivé makromolekuly celulózy vzájemně reagují prostřednictvím vodíkových vazeb a tvoří ve stěnách rostlinných buněk více či méně uspořádané trojrozměrné struktury, které se nazývají celulózová vlákna nebo celulózové mikrofibrily. Mají tloušťku přibližně 10 – 20 nm a obsahují zhruba 30 – 100 makromolekul celulózy. Makromolekuly jsou v mikrofibrilách seřazeny paralelně a tvoří rovinný útvar – list. Jednotlivé listy se na sebe skládají tak, že jsou střídavě posunuty o polovinu délky glukózové jednotky. Uspořádání je stabilizováno intermolekulárními vodíkovými vazbami mezi glukózovými jednotkami v sousedních listech. Takovéto uspořádané oblasti mikrofibril s vysokým počtem intermolekulárních vazeb je krystalické, méně uspořádané oblasti jsou amorfní. Krystalické a amorfní oblasti se střídají. Vyšší podíl krystalických oblastí se nachází v mikrofibrilách sekundárních buněčných stěn (např. dřevní hmota), amorfní oblasti se nacházejí ve větším množství ve stěnách primárních buněk (např. dužina ovoce a zeleniny) [2].

Celulóza tvoří v potravinách značný podíl neškrobových polysacharidů. V ovoci a zelenině bývá přítomno kolem 1 – 2 % celulózy, v obilovinách a luštěninách 2 – 4 %, v pšeničné mouce 0,2 – 3 %. Celulóza tvoří 40 – 50 % dřevní hmoty, 80 % lněných a 90 % bavlněných vláken [2].



Obr. 2. Primární struktura celulózy [2]

4.1.2 Vlastnosti

Celulóza je ve vodě, zředěných kyselinách, zásadách a většině rozpouštědel nerozpustná. Rozpouští se v koncentrovaných kyselinách, neboť podle podmínek, jako je koncentrace kyseliny nebo teplota, dochází k hydrolýze na rozpustné fragmenty s kratším řetězcem. V roztocích hydroxidů je bobtnání intenzivnější než ve vodě a v kyselých roztocích při vyšších teplotách dochází k hydrolýze, případně oxidaci [2].

4.2 Hemicelulózy

Termín hemicelulózy je společným názvem pro strukturní necelulózové polysacharidy buněčných rostlin, které vyplňují prostory mezi celulózovými vlákny. Mezi hemicelulózy se řadí dvě hlavní skupiny polysacharidů – heteroglukany a heteroxylany [2].

4.2.1 Heteroglukany

Hlavními strukturními heteroglukany, které se řadí mezi hemicelulózy, jsou xyloglukany a β -glukany [2].

Xyloglukany:

Základem molekuly xyloglukanů je β -D-(1 \rightarrow 4)-glukan s jednotkami D-xylopyranosy

v postranních řetězcích, které jsou vázány na glukózu α -(1→6) glykosidovými vazbami. Na rozdíl od příbuzných rezervních xyloglukanů, přítomných v semenech rostlin, obsahují strukturální xyloglukany zbytek D-galaktózy vázaný na D-xylózu blízko redukujícího konce polysacharidu vazbami β -(1→2). Také mohou obsahovat L-fruktopyranosu vázanou na galaktosu α -(1→2) vazbou [2].

Xyloglukany hemicelulózového typu (strukturální xyloglukany) jsou dominantními hemicelulózami BS dvouděložných rostlin, kam se řadí ovoce, většina zelenin, okopaniny a luštěniny. U jednoděložných rostlin, kam náleží některé zeleniny (cibulové zeleniny, chřest)

a především obiloviny, jsou přítomny v menším množství. Větší část xyloglukanů je složkou nerozpustné vlákniny [2].

β -glukany:

Polysacharidy nazývané β -glukany se nacházejí v zanedbatelném množství v buněčných stěnách dvouděložných rostlin, ale ve větším množství jsou přítomny v buněčných stěnách některých obilovin, jako je ječmen nebo oves [2].

β -glukany jsou částečně rozpustnou, částečně nerozpustnou vlákninou potravy. Rozpustnost ve vodě závisí především na jejich struktuře a ta souvisí s původem [2].

Čím více je v molekule vazeb (1→4), tím nižší je rozpustnost polymerů. Nejvíce rozpustné jsou polymery obsahující asi 30 % vazeb (1→3) a 70 % vazeb (1→4), jejichž řetězec je složen z 2 – 3 jednotek β -D-glukózy spojených vazbami (1→4), mezi nimiž se nachází jednotka vázaná vazbou (1→3). Rozpustnost β -glukanů se zvyšuje s teplotou. β -glukany vázané na proteiny jsou nerozpustné [2].

4.2.2 Heteroxylany

Heteroxylany jsou hlavními polysacharidy primárních BS jednoděložných rostlin (jejich vegetativních částí) a lignifikovaných buněk jednoděložných i dvouděložných rostlin, které mají jako složky potravy značný význam. Jsou zastoupeny v lodyhách rostlin a v dřevní hmotě [2].

Hlavní řetězec heteroxylanů je tvořen D-xylanopyranózovými jednotkami vzájemně vázanými vazbami (1→4). Většina xylózových jednotek řetězce není substituována, některé jsou substituovány α -L-arabinofuranozou vázanou vazbami (1→3), méně často vazbami (1→2). Xylóza bývá substituována také dvěma molekulami arabinofuranózy (na C-2 a C-3), která tvoří i krátké postranní řetězce spojené prostřednictvím vazeb (1→2), (1→3) nebo (1→5) [2].

Některé heteroxylany (např. heteroxylany otrub) bývají na C-2 xylózových zbytků acetylovány. V molekulách heteroxylanů se také vyskytují úseky, ve kterých jsou xylózové jednotky substituovány dvakrát, jednou nebo vůbec [2].

S ohledem na primární strukturu se tyto heteroxylany nazývají arabinoxylany a často také starším názvem pentosany. U heteroxylanů je průměrný obsah xylosy 52 – 60 %, arabinózy 36 – 46 %, glukosy 1,5 – 4,8 % [2].

4.3 Pektin

Pektiny jsou skupinou značně polydisperzních, komplexních a kyselých polysacharidů o proměnném složení. Nacházejí se v pletivech vyšších rostlin jako součást stěn primárních buněk a mezibuněčných prostor. Vznikají a ukládají se hlavně v raných stádiích růstu, kdy se

zvětšuje plocha BS. Přítomnost pektinů a jejich změny během růstu, zrání, skladování a zpracování mají značný vliv zejména na texturu ovoce a zeleniny [2].

Základní struktura pektinů je tvořena lineárním řetězcem, který je složen z 25 – 100 jednotek D-galakturonové kyseliny spojených vazbami α -(1→4). Tento polymer se často nazývá polygalakturonová kyselina. Jednotky galakturonové kyseliny jsou do různého stupně esterifikovány methanolem, zatímco zbývající jednotky obsahují disociované karboxylové skupiny. Některé α -D-galaktopyranuronáty nebo methyl-(α -D-galaktopyranuronáty) jsou acetylovány v poloze C-2 nebo C-3 [2].

Stupeň esterifikace (methylace) je definován jako % esterifikovaných karboxylovaných skupin. Je-li stupeň methylace > 50 %, hovoří se o vysokomethoxylových nebo vysokoesterifikovaných pektinech, je-li < 50 %, jedná se o nízkomethoxylové neboli nízkoesterifikované pektiny [2].

Obecným termínem pektinové látky se dnes označují dříve rozlišované kategorie, což jsou polygalakturonáty s větším počtem methoxylových skupin (pektinové kyseliny), jejich soli pektinany, neesterifikované polygalakturonáty, tzv. pektové kyseliny a jejich soli pektáty a také doprovodné neutrální polysacharidy (arabinany a arabinogalaktany různých struktur) [b]. Pro nerozpustné nativní pektiny BS asociované s celulórou se používá název protopektiny. Enzymovou hydrolýzou komplexem enzymů zvaných protopektináza se přeměňují na více či méně rozpustné nízkomolekulární pektinové látky [2].

Pektiny se nacházejí prakticky ve všech druzích ovoce a zeleniny. Jejich obsah však není vysoký, v ovocné dužině kolísá okolo 1 % [2].

Pektiny jsou obecně nerozpustné ve vodě a nerozpustné ve většině organických rozpouštědel. Rozpustnost ve vodě klesá s rostoucí molekulovou hmotností a stupněm esterifikace karboxylových skupin [2].

Působením enzymů dochází k hydrolýze pektinových látek [2].

4.4 Lignin

Lignin je kopolymerem fenylypropanových jednotek, známých jako monolignoly, kterými jsou podle druhu rostlin 4-kumarylalkohol, ferulylalkohol (neboli koniferylalkohol) a sinapylalkohol. Tyto fenylypropanové jednotky (převládají *trans*-isomery) jsou nepravidelně vázány do trojrozměrných struktur etherovými vazbami (C-O-C) nebo vazbami mezi dvěma atomy uhlíku (C-C) [2].

Lignin je jednou z hlavních komponent dřevní hmoty, kde tvoří asi 25 % biomasy. Podobné složení mají také skořápky ořechů. V menším množství je lignin součástí vlákniny ovoce, zeleniny a obilovin. Stěny primárních buněk lignin prakticky neobsahují. Vysoký obsah je ve stěnách lignifikovaných sekundárních buněk, které obsahují kolem 8 % ligninu [2].

Lignin se v malém množství vyskytuje i v lihovinách zrajících v dubových sudech, kam se dostává výluhem ze dřeva [2].

5 ENZYMY

Život, tak jak jej známe, by bez enzymů nebyl možný. Zajištění přísunu energie a stavebního materiálu z okolí a jejich využití pro provoz organismu a výstavbu jejich součástí zajišťuje složitá síť chemických dějů. Na řízení a koordinaci tohoto systému se podílí řada biokatalyzátorů. Jejich nejpočetnější a nejdůležitější skupina je tvořena bílkovinnými makromolekulami s katalytickými funkcemi. Pokud urychlují chemické přeměny, nazýváme je enzymy [9].

Enzymy jako biokatalyzátory regulující rychlost fyziologických procesů a mají ústřední úlohu ve zdraví i nemoci [10].

5.1 Celulolytické enzymy

Celulóza je štěpena komplexem celulolytických enzymů, které v přírodě rozkládají odumřelé rostliny [2].

Protože makromolekuly nemohou být transportovány přes buněčnou stěnu, degradace je možná pouze pomocí extracelulárních enzymů [11].

Celulolytické enzymy jsou produkovány širokým množstvím bakterií, plísní a hub, které mohou být aerobní, anaerobní, mesofilní nebo termofilní [12].

Celulolytické enzymy představují složitý enzymový systém katalyzující hydrolýzu nativní celulózy. Patří do enzymového vybavení některých mikroorganismů prvoků a vyšších hub. Vzhledem k tomu, že kultivace prvoků nebyla dosud v průmyslovém měřítku zvládnuta, mají průmyslový význam pouze celulolytické enzymy mikrobní. Celá řada mikroorganismů je však vybavena jen nekompletním celulázovým systémem. Proto pro přípravu celulolytických preparátů je nutné vybrat takový mikrobní kmen, u něž jsou složky celulázového systému v co nejvýhodnějším poměru [13].

Celulolytické enzymy patří do hydrolytického enzymatického systému. Tento hydrolytický systém produkuje enzymy hydrolázy, které jsou odpovědné za degradaci celulózy a hemicelulózy [14].

Celulolytické enzymy tvoří komplex čtyř enzymů složený z endo-1,4- β -D-glukanázy, exo-1,4- β -D-glukanáz a β -glukosidázy, které působí synergicky [2].

5.1.1 Endoglukanáza

Endo-1,4- β -D-glukanáza náhodně hydrolyzuje vnitřní β -(1 \rightarrow 4)-D-glykosidové vazby celulóзовého řetězce. Tímto štěpením vznikají glukooligosacharidy a celobióza. Pro stanovení aktivity endoglukanáz se jako substráty používají rozpustné celulózové deriváty, které mají vysoký stupeň polymerace, patří mezi ně např. karboxymethylcelulóza (CMC). Endoglukanázy významně snižují hydrolýzou viskozitu CMC a to díky intramolekulárnímu štěpení vazeb. Aktivita endoglukanáz je měřena na základě snížení viskozity substrátu, nebo na základě růstu počtu redukujících skupin [2, 11, 15].

5.1.2 Exoglukanázy

Mezi exo-1,4- β -D-glukanázy patří, jak název napovídá, dva exogenní enzymy:

Celobiohydroláza štěpí volné konce molekul celulózy. Degraduje vazby β -(1 \rightarrow 4) od redukujícího nebo neredukujícího konce řetězce. Tímto rozkladem vznikají oligosacharidy a celobióza (tri- a di-sacharidy). Avicel, neboli modifikovaná celulóza, je používán pro měření exoglukanázové aktivity. Enzymy vykazující malou aktivitu na rozpustnou CMC, ale relativně vysokou aktivitu na Avicel, jsou identifikovány jako exoglukanázy [2, 11, 12, 15, 16].

Exoglukanáza neboli glukohydroláza odštěpuje glukózové jednotky z neredukujícího konce řetězce [12].

5.1.3 β -Glukosidáza

β -D-glukosidáza neboli celobiáza odštěpuje z parciálně hydrolyzované celulózy celobiózu. Vyšší oligosacharidy hydrolyzuje na β -D-glukózu. Rychlost hydrolýzy zřetelně klesá se

zvyšujícím se polymeračním stupněm substrátu [2, 15].

Na stanovení aktivity β -D-glukosidázy lze využít velké množství jednoduchých citlivých metod, které jsou založené na změně zbarvení nebo vzniku fluoreskujících produktů, uvolňujících se z *p*-nitrofenyl- β -D-1,4-glukopyranosidu, β -naftyl- β -D-glukopyranosidu, 6-bromo-2-naftyl- β -D-glukopyranosidu nebo 4-methylumbelliferyl- β -D-glukopyranosidu [11, 15].

6 PŮVOD CELULOLYTICKÝCH ENZYMŮ

Celulolytické enzymy jsou enzymy syntetizované širokým spektrem mikroorganismů zahrnujícím jak houby, tak bakterie, produkující celulózy při růstu na celulóзовém materiálu. Jako producenti celulolytických enzymů jsou nejintenzivněji studovány rody *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Bacilli*, *Pseudomonads*, *Actinomucor*, *Streptomyces* [3, 4].

6.1 Mikroorganismy produkující celulolytické enzymy

Celulolytické mikroorganismy degradují uhlovodíky a nejsou schopny používat proteiny nebo lipidy jako energetické zdroje pro svůj růst. Celulolytické mikroorganismy, zejména rody *Cellulomonas* a *Cytophaga*, a hlavně houby mohou využívat řadu dalších uhlovodíků kromě celulózy. Zatímco anaerobní druhy mají omezený uhlovodíkový rozsah, limitovaný celulózou a jejími hydrolytickými produkty. Schopnost produkovat velké množství extracelulárních proteinů je charakteristická pro určité houby a tyto kmeny jsou nejvhodnější pro produkci vysokého množství extracelulárních enzymů [3].

Jedna z nejvíce studovaných hub je *Trichoderma reesei*, která převádí nativní, stejně tak i derivovanou, celulózu na glukózu [3].

Zatímco různé druhy hub mohou metabolizovat celulózu jako energetický zdroj, pouze pár kmenů je schopných vylučovat komplex celulolytických enzymů, který má praktické využití v enzymatické hydrolýze celulózy. Kromě *T. reesei* také ostatní houby, jako rody *Humicola*, *Penicillium* a *Aspergillus*, mají schopnost poskytovat vysoké množství extracelulárních enzymů. Mikroorganismy komerčně využívané pro získávání celuláz jsou především *T. reesei*, *Humicola insolens*, *Aspergillus niger* a *Bacillus sp.* [3].

V poslední době se ukázalo, že i ostatní termofilní aerobní houby (*Sporotrichum thermophile*, *Thermoascus aurantiacus*, *Chaetomium thermophile*), mesofilní anaerobní houby (*Neocallimastix frontale*, *Piromonas communis*, *Sphaeromonas communis*), mesofilní a termofilní aerobní bakterie (*Cellvibrio sp.*, *Microbispora bispora*) a mesofilní a termofilní anaerobní bakterie (*Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacteroides cellulosolvens*, *Bacteroides succinogens*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavofaciens*) produkují aktivní celulolytické enzymy. Z výše uvedených jsou zvláště zajímavé celulolytické termofilní mikroorganismy, protože jsou schopny produkovat termostabilní celulózy, které jsou stabilní při nadstandardních podmínkách, jako je kyselé nebo zásadité pH a teploty nad 90 °C. Jsou schopny fermentace na širokém množství substrátů s minimální hrozbou kontaminace patogeny [12].



Obr. 3. *Trichoderma viride* [17]

7 VÝZNAM A VYUŽITÍ CELULOLYTICKÝCH ENZYMŮ

Celulóza je nejběžnější organický polymer, což představuje asi $1,5 \cdot 10^{12}$ tun celkové roční produkce biomasy fotosyntézou, zejména v tropech, a je považována za téměř nevyčerpatelný zdroj surovin pro různé produkty. Je také nejhojnější a nejlépe obnovitelný biopolymer na zemi a je dominujícím odpadním materiálem v zemědělství. Slibná strategie pro efektivní využití tohoto znovu obnovitelného zdroje je mikrobiální hydrolýza lignocelulóзовého odpadu a fermentace výsledných redukujících cukrů pro produkci požadovaných metabolitů nebo biopaliva [3].

Biotechnologické zpracování a přeměny celulolytické biomasy umožňují objevovat nové bioproceny a produkty. Mikrobiální celulolytické enzymy se staly, díky jejich přirozené komplexnosti a širokému rozsahu průmyslového využití, klíčovými biokatalyzátory [4].

Celulázy mají široký rozsah využití. Hlavní potenciály aplikace jsou v potravinářském průmyslu, krmení pro zvířata, textilním průmyslu, palivu a chemickém průmyslu. Jiné oblasti aplikace jsou papírenský průmysl, odpadové hospodářství, farmacie, medicína a genetické inženýrství. Biotechnologie celuláz začala v 80. letech minulého století v oblasti krmení zvířat a poté se dostala až do potravinářství [19].

7.1 Celulázy v potravinářské biotechnologii

Celulázy mají v potravinářském průmyslu velmi široký rozsah aplikací. V průmyslové výrobě pomáhají řešit různé problémy, hlavně s výrobou ovocných nápojů. Macerační enzymy jsou používány při extrakci a čěření ovocných a zeleninových šťáv a olejů ze semínek. Enzymy nejen zlepšují stabilitu a texturu, ale také významně snižují viskozitu nápoje. Dále jsou využívány v pekařském odvětví pro zlepšení kvality těsta, pečiva, sušenek, dortů a dalších výrobků. Mají také vliv na manipulaci s těstem, objem pečiva, texturu a stabilitu pekařských produktů. Celulázy se také mohou používat pro zvýšení nutriční kvality fermentovaných výrobků. Dále se využívají pro získávání oligosacharidů, glukózy a ostatních rozpustných cukrů z celulóзовého odpadu, pro odstranění buněčné stěny, což usnadní uvolnění chuti, enzymů, polysacharidů a proteinů, nebo také k izolaci proteinů ze sojových fazolí nebo kokosových ořechů [3, 4, 19].

Uvedené enzymy se také používají při výrobě olivového oleje. Jejich použitím se zvyšuje kvalita oleje, snižuje jeho hořkost a roste množství vitamínu E a antioxidantů v extra panenském olivovém oleji. Komerčně se používá Olivex, pektinázový přípravek s celulázami

a hemicelulázami z *Aspergillus aculeatus*. Olivex byla první enzymová směs používaná pro zlepšení extrakce olivového oleje [4, 19].

Celulázy jsou také využívány při extrakci karotenoidů, které se dále používají jako potravinářská barviva [3].

7.2 Celulázy v pivní a vinařské biotechnologii

Obojí, vaření piva i příprava vína, zahrnují kroky fermentace, enzymatické technologie tedy hrají v obou případech významnou roli. Enzymy mají vliv na kvalitu a výtěžnost při fermentaci [19].

V pivovarském a vinařském průmyslu jsou enzymy používány pro hydrolýzu β -1,3 a β -1,4-glukanů přítomných v ječmeni a pomáhají při filtraci piva. Dále se používají také pro zlepšení vinného aroma [12].

Technologie vaření piva je založena na působení enzymu během sladování a kvašení. Mikrobiální β -glukanázy, které štěpí β -glukan a snižují viskozitu sladiny, jsou přidávány do primární fáze fermentace. Obvykle se používají β -glukanázy z kultur *Penicillium emersonii*, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* a *Trichoderma reesei* [4, 19].

Při produkci vína patří mezi tři nejvíce používané exogenní enzymy pektinázy, β -glukanázy a hemicelulázy. Mezi hlavní výhody používání těchto enzymů patří: 1) lepší povrchová macerace a lepší barva extraktu. 2) snadnější čiření a filtrace. 3) zvýšení kvality a stability vína [19].

7.3 Celulázy v papírenském průmyslu

V posledním desetiletí významně roste využití celuláz v tomto odvětví. Celulázy a hemicelulázy se využívají při biomechanických procesech, kdy dochází k rozvláknování a mletí surového dřeva na dřeň s malými částicemi [3, 4].

Celulázy jsou také používány, pro její lepší biorozložitelnost, při výrobě lepenky. Jejich další uplatnění je při výrobě jemného papíru, jako jsou hygienické kapesníčky nebo sanitární papír [3].

Celulázy samotné nebo v kombinaci s xylanázami se používají pro odbarvování papírového odpadu. Celulázy a hemicelulázy uvolňují inkoust z povrchu vláken částečně hydrolyzovaných uhlovodíkových molekul. Hlavní výhody enzymatického odbarvování je eliminace používání alkalických látek zlepšujících zářivost barev na papíře. Používání enzymů v kyselém prostředí při odstraňování tiskařského inkoustu z papírů navíc brání alkalickému žloutnutí papírů, zjednodušuje celý proces a snižuje znečištění životního prostředí [4].

Zároveň je nutné vyvarovat se nadměrnému používání enzymů, a to z důvodů nadměrné hydrolýzy a tedy snížení vazebnosti vláken. Přesto používání enzymů ve výrobě celkově zvýšilo výkonnost papíren [4].

7.4 Celulázy v textilním průmyslu

Celulázy se staly třetí největší skupinou enzymů používaných v textilním průmyslu již po deseti letech od jejich zavedení do praxe. Jejich hlavní využití je ve výrobě látek pro džínové oděvy. Používají se ke změně vzhledu povrchu džínoviny a nahrazují pemzu, která je v tomto průmyslu tradičně využívána. Odstraňují vlákna vyčnívající z povrchu látek a celkově zjemňují jejich povrch. Jejich další výhodou je, že nemají negativní vliv na životní prostředí [3].

Využívají se také při obnově vláken a barev vlněných oděvů poškozených opakovaným používáním a praním. Přidávají se do pracích prostředků pro efektivnější odstraňování nečistot zachycených mezi vlákny [4].

7.5 Celulázy při výrobě bioetanolu

Enzymatické zcukření lignocelulózových materiálů, jako je vylisovaná cukrová třtina, kukuřičné a rýžové klasy, rákos nebo zbytky dřeva, celulázami na biopalivo je v poslední době velmi intenzivně prozkoumáváno a řešeno [4].

Biokonverze lignocelulózových materiálů na produkty dále použitelné zahrnuje víceřadový proces. Do tohoto procesu patří předběžné úpravy (mohou být mechanické, chemické nebo biologické), hydrolýza polymerů k vyprodukování rychle metabolizovatelných molekul (např. hexóza nebo pentóza cukrů), biokonverze těchto menších molekul k podpoře mikrobiálního růstu a produkci chemických látek a nakonec separace a purifikace požadovaných produktů [4].

Náklady při používání hydroláz jsou nižší než v případě kyselých nebo alkalických hydrolýz, protože enzymatická hydrolýza může být prováděna za mírných podmínek (pH 4 – 6, teplota 45 – 50 °C) [4].

Aktuálně jsou dostupné technologie pro všechny kroky biokonverze lignocelulózy. Avšak některé z těchto procesů musí být ještě vylepšeny, aby produkovaly biopaliva a vedlejší produkty v cenách, které mohou konkurovat více konvenčním výrobním systémům [4].

7.6 Celulázy v zemědělství

Mnohé enzymové přípravky obsahující různé kombinace celuláz, hemiceluláz a pektináz mají široké využití v zemědělství pro zlepšení růstu plodin a pro odstraňování chorob rostlin. Celulázy a příbuzné enzymy získané z určitých plísní jsou totiž schopny rozkládat buněčnou stěnu patogenů. Tuto schopnost mají například plísňové β -glukanázy [4].

Celulolytické plísně rodů *Trichoderma sp.*, *Geocladium sp.*, *Chaetomium sp.* a *Penicillium sp.* hrají v zemědělství klíčovou roli. Usnadňují klíčení semen, zvyšují růstovou rychlost rostlin, jejich působením rostliny dříve kvetou, mají pozitivní vliv na kořenový systém rostlin a zvyšují výtěžnost pěstovaných plodin. Všechny tyto plísně mají přímý (podpora růstu) a nepřímý (regulace onemocnění a patogenů) vliv na rostliny. Doteď ale není přesně jasné, jak tyto plísně usnadňují zlepšení růstového výkonu [4].

8 IMOBILIZOVANÉ ENZYMY

Imobilizované enzymy jsou definovány jako enzymy fyzikálně uchycené nebo umístěné v určité části prostoru tak, aby si zachovaly katalytickou aktivitu a aby byly opakovaně a kontinuálně použitelné [20].

Od poloviny minulého století bylo věnováno velké úsilí na prozkoumávání nerozpustných imobilizovaných enzymů a jejich aplikací. Postupem času se začalo ukazovat, že je výhodnější používat imobilizované enzymy než enzymy v rozpustné formě. Příkladem jsou opakovaně používané heterogenní biokatalyzátory s cílem snížit nákladnost procesu efektivní recyklací, nebo selektivní absorbenty využívané pro čištění proteinů a enzymů [21].

Imobilizace je často klíčem k optimalizaci výkonu enzymů v průmyslových procesech [5].

Metody pro imobilizaci enzymů jsou rozděleny do tří hlavních kategorií:

- a) enzymy vázané na nosič
- b) enzymy zachycené v organické nebo anorganické

polymerní matici

c) zesítnění molekul enzymu navzájem

Vazba mezi enzymem a některou formou nosiče může být fyzikální (jako jsou hydrofobní anebo van der Waalsovy interakce), iontová nebo kovalentní. Avšak van der Waalsovy interakce jsou příliš slabé na to, aby udržely enzym navázaný na nosiči za reakčních podmínek s vysokou koncentrací reaktantů i produktů a velkou iontovou silou. Iontová vazba je obecně pevnější. Kovalentní vazba je nejsilnější a zabraňuje vyplavení enzymu z povrchu. I to ale může mít nevýhodu. Enzym může být vazbou na nosič deaktivován a enzym i nosič se už nedají znovu použít [5].

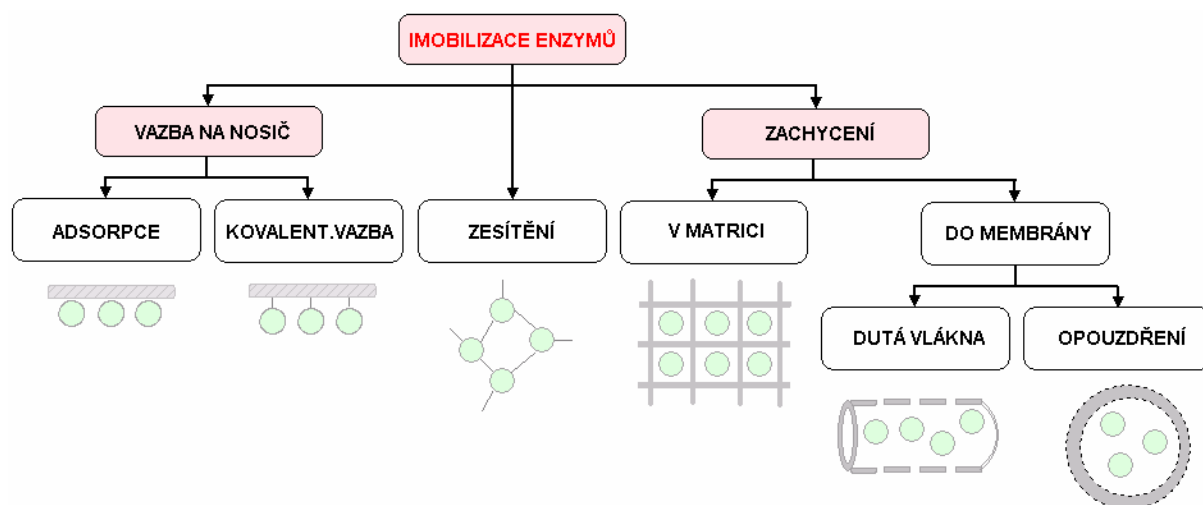
Nosič může být syntetická pryskyřice, biopolymer nebo anorganický polymer, jako je například porézní oxid křemičitý nebo zeolit [5]

Pro použití enzymů v imobilizované formě existuje řada důvodů. Kromě pohodlnější manipulace s enzymem je to také snadnější oddělení enzymu z produktu a zabránění jeho kontaminaci. Imobilizace také umožňuje kontinuální a opětovné použití enzymu. Dalším významným důvodem je stabilita enzymu. To vše vede k celkově vyšší účinnosti enzymu [5].

Imobilizace je obvykle nutná pro optimalizaci výkonu v bezvodém prostředí [5].

8.1 Způsoby imobilizace

Existuje poměrně velké množství způsobů imobilizace, největší pozornost je však věnována dvěma základním metodám imobilizace: kovalentní a adsorpční [20].



Obr. 4. Techniky používané pro imobilizaci enzymů [22]

8.1.1 Imobilizace založená na adsorpci

Imobilizace enzymů založená na procesu adsorpcce je nejstarší a první způsob provedení imobilizace. První imobilizovaný enzym byl připravený adsorpcí v roce 1916, kdy se ukázalo, že invertáza fyzikálně adsorbovaná na uhlí je stále katalyticky aktivní [21].

V dalších desetiletích imobilizace enzymů adsorpcí byla intenzivně studována z důvodů podstatných výhod, jaké imobilizované enzymy mají. Mezi výhody patří nejen reverzibilita, která umožňuje čištění proteinů nebo obnovení nosičů a enzymů, ale také jednoduchost, která dovoluje imobilizaci enzymu za mírných podmínek. Je to také poměrně ekonomicky výhodný

způsob pro průmyslové využití [20, 21].

Adsorpční imobilizace v nejširším slova smyslu zahrnuje všechny postupy, při kterých je enzym vázaný na fázovém rozhraní nekovalentními vazbami. Vazby, kterými je enzym vázán z mobilní vodní fáze na tuhou stacionární fázi, oscilují od slabých van der Waalsových přes hydrofobní po silně iontové. Specifičnost vazby se pohybuje od všeobecných dipólových interakcí přes solné můstky a interakce mezi proteiny po vysoce selektivně vázané, zahrnující afinitu mezi dvěma biochemickými povrchy [20].

Jak již bylo zmíněno, adsorpce enzymu z roztoku na povrch je tím nejjednodušším způsobem imobilizace. Vyžaduje pouze prosté promíchání enzymu s nosičem. Imobilizace enzymů adsorpcí většinou nevyžaduje zvláštní úpravu nosiče, vhodná je většina komerčně dostupných materiálů pro adsorpční a iontovou chromatografii, tedy přírodní a syntetické polymery. Za těchto okolností jde o nespecifickou adsorpci [20].

Pod pojmem adsorpce jsou chápány dva typy vazeb enzymu na nosič:

1. důsledek interakce nabitých molekul (iont-iont, solný můstek)
2. vodíkové vazby [20].

Rychlost adsorpce enzymu na nosič je řízena povrchovým nábojem a molekulovou hmotností enzymu a na výsledné vazbě se podílí i vodíkové můstky [20].

Důležitými faktory ovlivňujícími průběh imobilizace enzymu jsou: plocha povrchu, průměr pórů nosiče a průměr molekul enzymu a substrátu [20].

Katalytickou účinnost je možné kontrolovat nejlépe tehdy, když se použije nosič s minimální šířkou pórů, umožňující minimálně úzkou distribucí pórů [20].

Je rozlišena specifická a nespecifická adsorpce enzymů. Typickým příkladem specifické adsorpce jsou hydrofobní interakce [20].

Kromě obvyklého vsádkového způsobu adsorpce enzymu na nosič jsou známy i elektrodové a kolonové způsoby. Pro technologické použití je perspektivní průtokový způsob, při kterém protéká fluát, obsahující enzym, kolonou naplněnou nosičem [20].

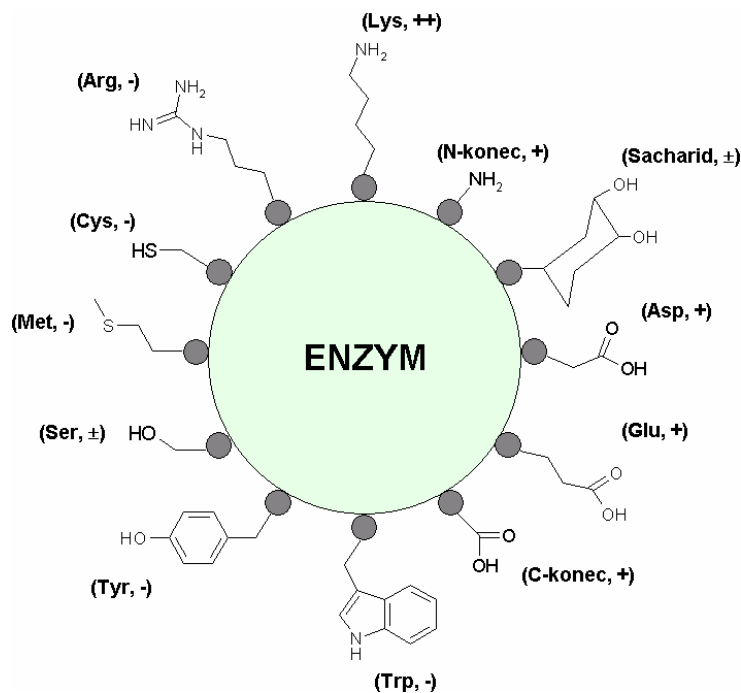
8.1.2 Kovalentní imobilizace

Kovalentní způsob imobilizace vede k vytvoření kovalentní vazby mezi enzymem a nosičem. Jeho velkou výhodou je stálost vazby. Imobilizační postupy jsou kombinací známých reakcí z chemie bílkovin a makromolekulárních sloučenin [20].

Kovalentní navázání enzymu na nosič je jedním ze způsobů chemické modifikace enzymu. Při volbě způsobu chemické modifikace enzymu se vychází z poznatků o reaktivitě, frekvenci, výskytu a přístupnosti aminokyselinových zbytků, které svoji reaktivitou přicházejí v úvahu místo vazby [20].

Zvláštní pozornost je potřeba věnovat aminokyselinovým zbytkům v aktivním místě enzymu. Tyto aminokyselinové zbytky projevují odlišné fyzikální a chemické vlastnosti. Ne vždy dochází k imobilizaci přes zbytky v aktivním místě. Důvodem může být snížená dostupnost těchto skupin [20].

Někdy při kovalentní imobilizaci klesne aktivita enzymu v důsledku chemické modifikace aminokyselinového zbytku v aktivním místě [20].



Obr. 5. Kovalentní imobilizace [22]

8.1.3 Imobilizace síťováním (Cross-linking)

Dalším způsobem imobilizace využívajícím kovalentní vazbu je imobilizace síťováním. Při tomto způsobu, na rozdíl od kovalentní imobilizace, se enzym neváže na nerozpustný nosič. Při imobilizaci se vytvoří intermolekulové vazby mezi funkčními skupinami aminokyselinových zbytků proteinu a polyfunkčními síťovacími činidly. Na síťování se nejčastěji používá Glutardialdehyd, Diazobenzidin nebo Izokyanáty a Izothiokyanáty [20]. Stejně jako při kovalentní imobilizaci může i zde docházet k modifikacím esenciálních skupin aktivního místa, což se projeví ztrátami aktivity imobilizovaného enzymu. V těchto případech je nevyhnutelná ochrana aktivního místa reverzibilní chemickou reakcí nebo přidáním substrátu případně kompetitivního inhibitoru před imobilizací [20].

8.1.4 Imobilizace uzavřením enzymu do gelu nebo mikrokapslí

Tyto metody jsou založené na uzavření enzymu v polymerní nerozpustné matrici nebo v polopropustné membráně a nedochází v tomto případě k chemické modifikaci enzymu [20]. Když se k uzavření používá chemická polymerizační reakce, může dojít k částečné denaturaci enzymu a tím k poklesu jeho aktivity [20].

A) Imobilizace uzavřením do gelu:

Tento způsob je založený na uzavření enzymu do vnitřku síťované, ve vodě nerozpustné, matrice [20].

Na imobilizaci mohou být použité různé syntetické (např. polyakrylamid, polyvinylalkohol) nebo přírodní (např. škrob, dextransy) polymery [20].

Z polymerních syntetických materiálů se nejčastěji používá polyakrylamidový gel [20].

B) Imobilizace uzavřením do mikrokapslí:

Metoda je založená na uzavření enzymu v mikrokapslích z polopropustné membrány [20].

Průměrný rozměr mikrokapslí se pohybuje mezi 1 až 100 μm [20].

Podle způsobu uzavření v mikrokapslích rozlišujeme:

- polymerizace na rozhraní fází
- odpaření organického rozpouštědla z disperze
- fázová separace [20].

Polymerizace na rozhraní fází:

Polopropustná membrána, která ohraničuje enzym, vzniká na základě polymerizace hydrofobního a hydrofilního monomeru na fázovém rozhraní voda – organické rozpouštědlo. Polymerizační reakcí vzniká kapsle obsahující roztok enzymu ve vodě [20].

Odpaření organického rozpouštědla z disperze:

Uzavření v kapslích je důsledkem dispergování vodného roztoku enzymu v organickém rozpouštědle, ve kterém je rozpustný polymer [20].

Tato směs se dále disperguje ve vodě a organické rozpouštědlo se odpaří. Polymer je rozpuštěný v organickém rozpouštědle, které se nemísí s vodou a má nižší teplotu varu než voda. Vodný roztok enzymu se emulguje v organické fázi. Tato emulze se dále disperguje ve vodné fázi obsahující emulgátory, jako je želatina nebo polyvinylalkohol. Za stálého míchání se organické rozpouštědlo odpaří ve vakuu [20].

Fázová separace:

Uzavření v kapslích umožňuje reprecipitace polymeru rozpustného v organickém rozpouštědle s emulgovaným roztokem enzymu druhým, s ním mísitelným, rozpouštědlem, ve kterém je polymer nerozpustný [20].

8.2 Druhy nosičů pro imobilizaci enzymu

Způsoby imobilizace jsou ovlivňovány vlastnostmi enzymu i nosiče. Jsou to chemické, biochemické, kinetické a mechanické vlastnosti. Nosič může být syntetický organický polymer, biopolymer nebo anorganická pevná látka [5].

8.2.1 Syntetické organické polymery jako nosiče

Velmi často jsou jako nosiče používány akrylové pryskyřice, jako je Eupergit[®]C, což je makroporézní kopolymer s průměrem částic 170 μm a průměrem pórů 25 nm. Je velmi hydrofilní a stabilní, a to jak chemicky, tak mechanicky, v rozsahu pH od 0 do 14. Imobilizace prostřednictvím kovalentní vazby na Eupergit[®]C byla v průmyslu mnohokrát úspěšně provedena u velkého množství enzymů [5].

Dále se jako nosiče hojně využívají Amberlity, což je obchodní název pro celou řadu ionexových pryskyřic. Zde se uplatňuje spíše adsorpce než kovalentní vazba. Příkladem je široce používaný enzym lipáza, který je komerčně dostupný v imobilizované formě pod názvem Novozym 435. Nevýhodou této imobilizace je, že když enzym není kovalentně vázán na nosič, může dojít k jeho vyplavení ve vodném prostředí [5].

8.2.2 Biopolymery jako nosiče

Jako nosiče enzymů je používáno velké množství biopolymerů. Příkladem jsou: celulóza, škrob, agaróza a bílkoviny, jako je želatina nebo albumin [5].

Jedna z prvních aplikací, před více než čtyřiceti lety, byla imobilizace enzymu aminoacylázy, získaného z kultury *Aspergillus oryzae*, iontovou adsorpcí na DEAE-Sephadex [5].

8.2.3 Hydrogely jako nosiče

V bezvodém prostředí může být enzym imobilizován na přírodní nebo syntetické hydrogely a kryogely (makroporézní gely s polymerací v částečně zmrzlém stavu, kdy krystalky ledu tvoří mezi sebou póry) [5, 23].

Například kryogely vytvořené z polyvinylalkoholu jsou široce využívány pro imobilizaci celých buněk [5].

Tyto nosiče vykazují dobrou mechanickou stabilitu a odolnost vůči rozkladu [5].

Avšak volné enzymy, díky své malé velikosti, mohou být ve vodném prostředí vyplaveny ven z gelové struktury. Zabránit tomu lze, například zesíťováním enzymu do větších struktur nebo vytvoření komplexu s polyelektrolytem (vysokomolekulární látka, která obsahuje postranní skupiny schopné elektrolytické disociace) [5, 24].

8.2.4 Anorganické nosiče

Pro imobilizaci enzymů může být použita také řada anorganických látek, jako jsou oxid hlinitý, oxid křemičitý, zeolity a silikáty [5].

Jeden z nejjednodušších a nejlevnějších způsobů je křemenná granulace. Ta se používá například při zachycování enzymů v pracích prášcích, které uvolňují enzym postupně během praní [5].

Ve vodném prostředí musí být enzym kovalentně vázán na křemenný nosič, aby nedošlo k vyplavení enzymu [5].

9 VLASTNOSTI VOLNÝCH A IMOBILIZOVANÝCH ENZYMŮ

Vlastnosti imobilizovaných enzymů se vlivem vazby na nosič v porovnání s volnými enzymy mohou měnit. Změnu těchto vlastností ovlivňují především dva faktory. Prvním faktorem je vliv fyzikálních a chemických vlastností nosiče a druhým konformační změna enzymu vlivem reakce. Pozorované změny jsou výsledkem působení těchto faktorů [25].

Důležité vlastnosti pro aplikaci volných i imobilizovaných enzymů jsou pH optimum, teplotní optimum, pH stabilita a tepelná stabilita. Vlivem imobilizace také dochází ke změně specifické aktivity enzymu [25].

V experimentální studii byla při teplotách 37 – 60 °C zkoumána hydrolytická aktivita volného celulólytického enzymu a enzymu imobilizovaného na křemíkové destičky o ploše 1 cm². Jako substrát byla při tomto experimentu použita dispergovaná celulóza a nejvyšší aktivita enzymu byla pozorována při teplotě 60 °C [26].

Další experimenty byly prováděny s komplexem celulólytických enzymů, zahrnujícího endoglukanázu, exoglukanázu a celobiázu, produkovaného askomycetou *Nectria catalinensis*. Pozorován byl hlavně vliv teploty a pH na tento komplex [27].

Optimální podmínky pro aktivitu tohoto komplexu byly stanoveny na 50 – 55 °C a pH 4,2 – 5,8. Pro 72 hodinovou inkubaci tohoto enzymatického komplexu bylo stanoveno optimální teplotní rozmezí 23 – 37 °C a zároveň při pH 4,8 vykazoval komplex nejlepší stabilitu [27].

Celulázy produkované dvěma kmeny rodu *Bacillus* (CH43 a RH68), které byly izolovány z termálních pramenů, byly přečištěny a podrobeny analýze [28].

Nejvyšší aktivita těchto enzymů byla pozorována v rozmezí pH 5 – 6,5 a při teplotě 65 a 70 °C. Stabilita enzymu získaného z kmene CH43 byla nejvyšší při pH 6 – 10 a 50 °C a enzymu izolovaného z kmene RH68 při pH 6 – 8. U obou enzymů byla během inkubace při 50 °C po dobu 24 hodin zachována původní aktivita [28].

V čínské studii byla experimentálně studována produkce extracelulárních celulólytických

enzymů nově izolovanou termoacidofilní plísní *Aspergillus terreus* M11, kultivovanou na lignocelulóзовých materiálech. Výsledky experimentu ukazují, že největší aktivita enzymů byla při 45 °C a pH 3. Dále endoglukanáza a β -Glukosidáza vykazovaly největší aktivitu při pH 2 – 3 a 70 °C a obecně nejstabilnější byly v rozmezí pH 2 – 5 [29].

Z výsledků těchto experimentálních studií vyplývá, že většina volných i imobilizovaných enzymů má teplotní optimum v rozmezí 50 – 65 °C. Některé enzymy i okolo 45 nebo 70 °C. Teplotní optima se tedy pohybují spíše ve vyšších teplotách, než je teplota laboratorní. Proto je při experimentech nutné provádět kultivace za optimálních teplot a určení takovýchto základních charakteristik daného volného nebo imobilizovaného enzymu by mělo předcházet každé práci s enzymem.

Velmi podobné je to i u pH optima. Většina enzymů totiž působí katalyticky jen v určité oblasti pH. Tato vlastnost souvisí s disociačním stavem kyselých a bazických skupin aktivního centra. pH optimum většiny enzymů se pohybuje v neutrálním či slabě kyselém prostředí, jak také ukazují výsledky uvedených experimentů. Většina studovaných enzymů má pH optimum v rozmezí pH 4 – 6,5, platí to i pro enzymy imobilizované.

10 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

10.1 Seznam použitých přístrojů a chemikálií

10.1.1 Použité přístroje

- spektrofotometr UV/VIS Helios Delta
- vodní lázeň, HUBER A11
- pH metr, Merci
- vortex, Heidolph – Reax Top
- kuchyňský vaříč, ETA
- chladič box
- váhy, Scaltec, SAS 50
- centrifuga, EPPENDORF
- třepačka, KS 130 B-IKA

10.1.2 Použité chemikálie

- octan sodný - CH_3COONa
- kyselina octová - CH_3COOH , Lachema, a.s
- kyselina citrónová - $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$
- fosforečnan sodný - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- NaHCO_3
- Na_2CO_3
- Na_2SO_4 , bezvodý
- CuSO_4
- $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
- $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- H_2SO_4 , koncentrovaná

10.1.3 Použitý substrát

- karboxymethyl celulóza (CMC)

10.1.4 Použitý nosič

- Sorsilen – polyethylentereftalát

10.1.5 Použitý enzym

Celluclast 1.5 L je kapalný celulózový preparát produkovaný submerzní fermentací vybraného kmene houby *Trichoderma reesei*. Enzym katalyzuje rozklad celulózy na glukózu, celobiózu a vyšší polymery glukózy. Je to hnědá kapalina o hustotě přibližně 1,2 g/ml. Má významný vliv na snížení viskozity rozpustných celulózových substrátů.

Výrobce: NOVOZYMES A/S, Dánsko

Dovozce: EKOZYM s.r.o.

Datum výroby: 01. 05.

Číslo šarže:CCN 03083

Enzymový protein (10-40%)

Celulóza 232-734-4

10.2 Příprava roztoků

10.2.1 Příprava 0,2 M roztoku octanu sodného

0,2 M roztok octanu sodného byl připraven rozpuštěním 2,72 g $C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$ ve 100 ml destilované vody.

10.2.2 Příprava substrátu CMC

1% roztok CMC v octanovém pufru o pH 4,8 byl připraven rozpuštěním 1 g CMC v 50 ml destilované vody. Po rozpuštění bylo přidáno 30 ml základního roztoku octanu sodného a pH bylo upraveno přikapáváním kyseliny octové na 4,8. Roztok byl poté doplněn destilovanou vodou do 100 ml.

Obdobným způsobem byly připraveny roztoky CMC v octanovém pufru o pH: 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5.

10.2.3 Příprava citran – fosforečnanových pufrů

17,9 g fosforečnanu sodného ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) bylo rozpuštěno v 200 ml destilované vody a poté doplněno na objem 250 ml. 1 lžice kyseliny citrónové byla rozpuštěna ve 30 ml vody. Podle **Tab. 1.** byl smícháván roztok fosforečnanu sodného a destilované vody, poté byla na magnetické míchačce přikapávána kyselina citrónová do požadovaného pH a nakonec byl pufr doplněn do objemu 100 ml. Byly připraveny pufrы o pH: 3,5; 4,0; 4,5; 4,8; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0.

Tab. 1. Příprava citran – fosforečnanového pufru

x	y	pH
34,9	15,1	3,5
30,7	19,3	4,0
27,2	22,8	4,5
25,2	24,8	4,8
24,3	25,7	5,0
21,6	28,4	5,5
17,9	32,1	6,0
14,5	35,5	6,5
6,4	43,6	7,0

x ml G + y ml K ředit na 100 ml

G – destilovaná voda

K – fosforečnan sodný

10.2.4 Použitý enzym

Pro experimentální účely byl komerční preparát ředěn 1:10 000.

10.2.5 Příprava Somogyiho činidel

Somogyi-Nelson I: 12 g $C_4H_4O_6KNa \cdot 4 H_2O$, 16 g $NaHCO_3$ a 18 g Na_2CO_3 bylo rozpuštěno v 200 ml destilované vody. Poté bylo za stálého míchání a zahřívání rozpuštěno 144 g Na_2SO_4 v 600 ml destilované vody. Následně byly oba připravené roztoky smíchány.

Somogyi-Nelson II: 4 g $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ a 36 g Na_2SO_4 bylo rozpuštěno v 200 ml destilované vody.

Somogyi-Nelson III: 25 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4 H_2O$ bylo rozpuštěno v 450 ml destilované vody. Poté bylo pozvolna přidáno 21 ml koncentrované H_2SO_4 . 3 g $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ byly rozpuštěny v 25 ml destilované vody. Oba roztoky byly následně smíchány. Výsledný roztok byl poté umístěn na 48 hodin do termostatu při teplotě 37 °C

10.3 Stanovení redukujících látek podle Somogyiho a Nelsona

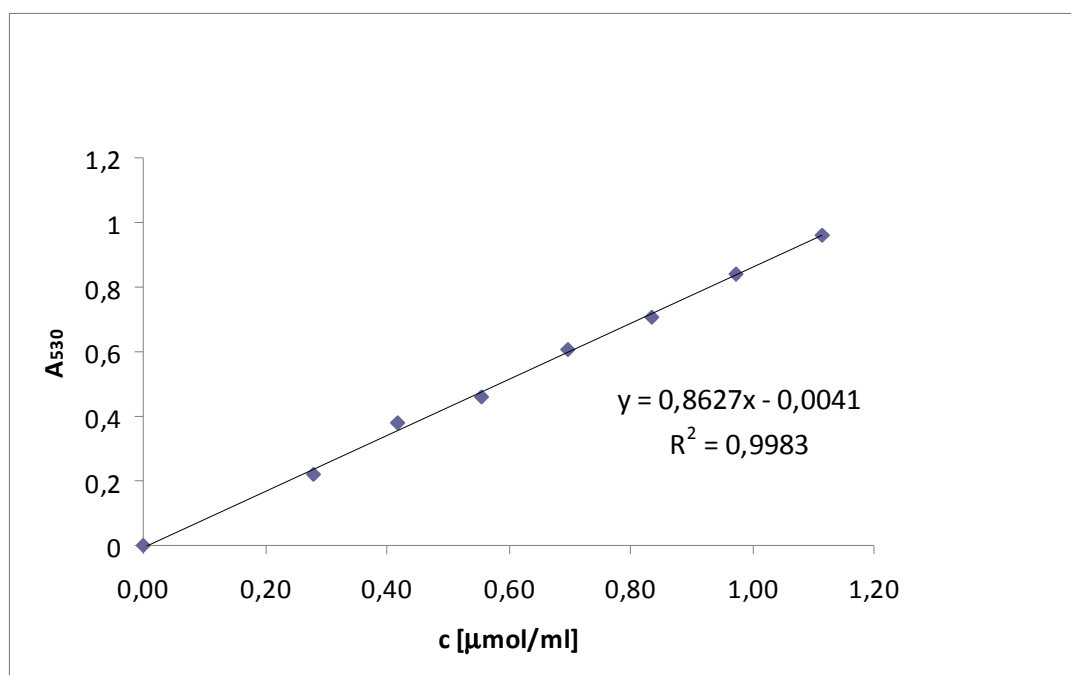
Podstatou všech měření je stanovování aktivity enzymu za zvolených podmínek – teploty a pH a základním principem je sledování přírůstku redukujících cukrů metodou Somogyiho Nelsona. V průběhu enzymové degradace substrátu vzniká barevný arzeničnano-mednatý komplex.

10.4 Charakteristiky volného enzymu

10.4.1 Stanovení kalibrační křivky

Pro sestavení kalibrační křivky glukosy (**Graf 1.**) byl použit základní roztok glukosy o koncentraci 0,2 g/l. Z tohoto roztoku byla připravena kalibrační řada 0,175; 0,15; 0,125; 0,1; 0,075 a 0,05 mmol/l. Do každé zkumavky bylo potom přidáno po 1 ml Somogyiho činidla (I + II v poměru 4:1). Zkumavky byly 10 minut povařeny a ochlazeny na laboratorní teplotu. Pak byl přidán 1 ml Nelsonova činidla - činidlo III. Obsah zkumavek byl zředěn 7 ml destilované vody, promíchán a následně byla změřena absorbance při 530 nm proti blanku

(blank obsahoval místo vzorku 1 ml destilované vody).



Graf 1. Kalibrační křivka glukózy

10.4.2 Výpočet aktivity enzymu

Aktivita enzymu se stanoví za využití kalibrační křivky glukózy podle vztahu:

$$A = \frac{A_{530} \cdot f}{t \cdot c_E}$$

kde A ... aktivita stanovovaného enzymu (μmol/min.ml E),

A₅₃₀ ... absorbance naměřená po dvacetiminutové inkubaci enzymu,

f ... přepočítávací faktor koncentrace redukujících skupin pro absorbanci rovnou 1 (μmol/ml) určený z regresní přímky kalibrační křivky glukózy,

t ... čas (20 min),

c_E ... koncentrace enzymu v reakční směsi.

Určení přepočítávacího faktoru f z regresní přímky:

$$y = ax + b, x = f$$

$$y = 0,8627f - 0,0041$$

pro y = 1:

$$1 = 0,8627f - 0,0041$$

$$f = 1,16$$

10.4.3 Stanovení pH optima volného enzymu

Postup:

1. Do zkušavky s 1 ml CMC (CMC o jednotlivých pH viz kap. 10.2.2.) byl přidán 1 ml enzymu a směs byla inkubována při 50 °C na vodní lázni.
2. Po 20 minutách bylo 0,5 ml z reakční směsi odebráno do zkušavky s 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla I a II (směs I a II v poměru 4:1) a tato směs byla 10 minut povařena.

- Po ochlazení bylo přidáno 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla III a 3,5 ml destilované vody.
- Směs byla promíchána na vortexu a přefiltrována přes filtrační papír.
- Na spektrofotometru byla změřena absorbance při 530 nm proti blanku (0,5 ml směsi Somogyi-Nelsonova činidla I a II, 0,25 ml enzymu, 0,25 ml CMC o pH 4,8, 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla III a 3,5 ml destilované vody). Naměřené hodnoty jsou uvedeny v **Tab. 5**.

Kalkulace:

Aktivita enzymu byla vypočítána postupem uvedeným v kapitole č. 10.4.2.

Určení koncentrace enzymu c_E : zředění 1:10 000, do reakce 0,25 ml.

$$c_E = 0,25 \cdot 10^4 \text{ ml/ml}$$

10.4.4 Stanovení teplotního optima volného enzymu

Postup:

- Jednotlivé zkumavky s 1 ml CMC byly temperovány při teplotách 25-70 °C.
- Do vytemperované zkumavky s CMC byl přidán 1 ml enzymu a reakční směs byla inkubována 20 minut.
- Po 20 minutách bylo 0,5 ml z reakční směsi odebráno do zkumavky s 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla I a II (směs I a II v poměru 4:1) a tato směs byla 10 minut povařena.
- Po ochlazení bylo přidáno 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla III a 3,5 ml destilované vody.
- Směs byla promíchána na vortexu a přefiltrována přes filtrační papír.
- Na spektrofotometru byla změřena absorbance při 530 nm proti blanku (0,5 ml směsi Somogyi-Nelsonova činidla I a II, 0,25 ml enzymu, 0,25 ml CMC o pH 4,8, 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla III a 3,5 ml destilované vody). Naměřené hodnoty jsou uvedeny v **Tab. 6**.

Kalkulace:

Aktivita enzymu byla vypočítána postupem uvedeným v kapitole č. 10.4.2.

Určení koncentrace enzymu c_E : zředění 1:10 000, do reakce 0,25 ml.

$$c_E = 0,25 \cdot 10^4 \text{ ml/ml}$$

10.4.5 Stanovení tepelné stability volného enzymu

Postup:

- Do zkumavek s 1 ml CMC vytemperovaných na 50 °C byl postupně přidáván 1 ml enzymu, který byl po dobu 30 minut temperován na vodní lázni při teplotách 25-70 °C.
- Po 20 minutách inkubace bylo 0,5 ml z reakční směsi odebráno do zkumavky s 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla I a II (směs I a II v poměru 4:1) a tato směs byla 10 minut povařena.
- Po ochlazení bylo přidáno 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla III a 3,5 ml destilované vody.
- Směs byla promíchána na vortexu a přefiltrována přes filtrační papír.
- Na spektrofotometru byla změřena absorbance při 530 nm proti blanku (0,5 ml směsi Somogyi-Nelsonova činidla I a II, 0,25 ml enzymu o teplotě 25 °C, 0,25 ml CMC o pH 4,8, 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla III a 3,5 ml destilované vody). Naměřené hodnoty jsou uvedeny v **Tab. 7**.

Kalkulace:

Aktivita enzymu byla vypočítána postupem uvedeným v kapitole č. 10.4.2.

Určení koncentrace enzymu c_E : zředění 1:10 000, do reakce 0,25 ml.

$$c_E = 0,25 \cdot 10^{-4} \text{ ml / ml}$$

10.4.6 Stanovení pH stability volného enzymu

Postup:

1. Podle návodu byly připraveny citran-fosforečnanové pufrы o jednotlivých pH (viz kap. 10.2.3) a do pufrů byl přidán 1 ml enzymu.
2. Do zkumavek s 1 ml CMC vytemperovaných na 50 °C byl postupně přidáván 1 ml enzymu v pufru.
3. Po 20 minutách inkubace bylo 0,5 ml z reakční směsi odebráno do zkumavky s 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla I a II (směs I a II v poměru 4:1) a tato směs byla 10 minut povařena.
4. Po ochlazení bylo přidáno 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla III a 3,5 ml destilované vody.
5. Směs byla promíchána na vortexu a přefiltrována přes filtrační papír.
6. Na spektrofotometru byla změřena absorbance při 530 nm proti blanku (0,5 ml směsi Somogyi-Nelsonova činidla I a II, 0,25 ml enzymu o teplotě 25 °C, 0,25 ml CMC o pH 4,8, 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla III a 3,5 ml destilované vody). Naměřené hodnoty jsou uvedeny v **Tab. 8**.

Kalkulace:

Aktivita enzymu byla vypočítána postupem uvedeným v kapitole č. 10.4.2.

Určení koncentrace enzymu c_E : zředění 1:10 000, do reakce 0,25 ml.

$$c_E = 0,25 \cdot 10^{-4} \text{ ml / ml}$$

10.5 Imobilizace komerčního celulóзовého preparátu

Postup:

1. Do čtyř baněk bylo odváženo 0,5 gramu nosiče a přidáno 20 ml octanového pufru o pH 4,8.
2. Do baněk bylo po 10 minutách třepání na třepačce přidáno 10, 50, 100 a 250 μ l koncentrovaného enzymu.
3. Poté byla směs třepána další 4 hodiny.

10.5.1 Stanovení aktivity volného enzymu ve filtrátu

Postup:

1. Po čtyřech hodinách třepání byla směs odfiltrována na fritě a ve filtrátu byla stanovena aktivita volného enzymu.
2. Filtrační koláč byl promyt 250 ml vody a v získaném filtrátu byla opět stanovena aktivita volného enzymu.
3. Filtrační koláč byl promyt dalšími 50 ml vody a ve filtrátu byla znovu stanovena aktivita volného enzymu.
4. Do zkumavek s 1 ml CMC vytemperovaných na 50 °C byl postupně přidáván 1 ml filtrátů, které byly získány předchozím postupem.
5. Po 20 minutách inkubace bylo 0,5 ml z reakční směsi odebráno do zkumavky s 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla I a II (směs I a II v poměru 4:1) a tato směs byla 10 minut

povařena.

- Po ochlazení bylo přidáno 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla III a 3,5 ml destilované vody.
- Směs byla promíchána na vortexu a přefiltrována přes filtrační papír.
- Na spektrofotometru byla změřena absorbance při 530 nm proti blanku (0,5 ml směsi Somogyi-Nelsonova činidla I a II, 0,25 ml filtrátu o teplotě 25 °C, 0,25 ml CMC o pH 4,8, 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla III a 3,5 ml destilované vody). Naměřené hodnoty jsou uvedeny v **Tab. 2**.

Kalkulace:

Aktivita enzymu byla vypočítána postupem uvedeným v kapitole č. 10.4.2.

Určení koncentrace enzymu c_E : $c_E = 0,25 \text{ ml} / \text{ml}$

10.5.2 Stanovení aktivity imobilizovaného enzymu

Postup:

- Do zkumavky s 1 ml CMC byl přidán 1 ml imobilizovaného enzymu (u imobilizovaného enzymu, který byl připravený imobilizací 250 μl enzymu na Sorsilen bylo zředění dvakrát větší) a směs byla inkubována při 50 °C na vodní lázni.
- Po 20 minutách bylo 0,5 ml z reakční směsi odebráno do zkumavky s 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla I a II (směs I a II v poměru 4:1) a tato směs byla 10 minut povařena.
- Po ochlazení bylo přidáno 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla III a 3,5 ml destilované vody.
- Směs byla promíchána na vortexu a přefiltrována přes filtrační papír.
- Na spektrofotometru byla změřena absorbance při 530 nm proti blanku (0,5 ml směsi Somogyi-Nelsonova činidla I a II, 0,25 ml imobilizovaného enzymu, 0,25 ml CMC o pH 4,8, 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla III a 3,5 ml destilované vody). Naměřené hodnoty jsou uvedeny v **Tab. 3**.

Kalkulace:

Aktivita enzymu byla vypočítána postupem uvedeným v kapitole č. 10.4.2.

Určení koncentrace enzymu c_E :

0,5 g nosič.....10 ml susenze

0,05 g1 ml suspenze

2 ml suspenze + 2 ml pufru $\Rightarrow \Rightarrow c_{im.nosič} = 0,1 \text{ g}$

0,1 g.....4 ml

0,25 g.....1 ml

Do reakční směsi bylo vzato 0,5 ml:

$\frac{0,025}{2} \text{ g} + 0,5 \text{ ml CMC} \Rightarrow 0,0125 \text{ g v 1 ml}$

Bylo vzato 0,5 ml $\Rightarrow c_{im.nosič} = 0,00625 \text{ g}$

10.5.3 Stanovení aktivity enzymu uchovávaného pět dní v pufru

Postup:

- Do zkumavky s 1 ml CMC byl přidán 1 ml pufru o pH 4,8, ve kterém byl imobilizovaný enzym (10 μl , 50 μl , 100 μl a 250 μl) pět dní inkubován, a tato reakční

- směs byla inkubována při 50 °C na vodní lázni.
- Po 20 minutách bylo 0,5 ml z reakční směsi odebráno do zkumavky s 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla I a II (směs I a II v poměru 4:1) a tato směs byla 10 minut povařena.
 - Po ochlazení bylo přidáno 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla III a 3,5 ml destilované vody.
 - Směs byla promíchána na vortexu a přefiltrována přes filtrační papír.
 - Na spektrofotometru byla změřena absorbance při 530 nm proti blanku (0,5 ml směsi Somogyi-Nelsonova činidla I a II, 0,25 ml imobilizovaného enzymu (100 µl), 0,25 ml CMC o pH 4,8, 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla III a 3,5 ml destilované vody). Naměřené hodnoty jsou uvedeny v **Tab. 4**.

Kalkulace:

Aktivita enzymu byla vypočítána postupem uvedeným v kapitole č. 10.4.2.

Určení koncentrace enzymu c_E : $c_E = 0,25 \text{ ml / ml}$

10.6 Stanovení optimálních podmínek působení imobilizovaného enzymu

10.6.1 Stanovení pH optima imobilizovaného enzymu

Postup:

- Do zkumavky s 1 ml CMC (CMC o jednotlivých pH viz kap. 10.2.2.) byl přidán 1 ml imobilizovaného enzymu (100 µl) a směs byla inkubována při 50 °C na vodní lázni.
- Po 10 minutách bylo 0,5 ml z reakční směsi odebráno do zkumavky s 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla I a II (směs I a II v poměru 4:1) a tato směs byla 10 minut povařena.
- Po ochlazení bylo přidáno 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla III a 3,5 ml destilované vody.
- Směs byla promíchána na vortexu a přefiltrována přes filtrační papír.
- Na spektrofotometru byla změřena absorbance při 530 nm proti blanku (0,5 ml směsi Somogyi-Nelsonova činidla I a II, 0,25 ml imobilizovaného enzymu, 0,25 ml CMC o pH 4,8, 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla III a 3,5 ml destilované vody). Naměřené hodnoty jsou uvedeny v **Tab. 9**.

Kalkulace:

Aktivita enzymu byla vypočítána postupem uvedeným v kapitole č. 10.4.2.

Určení koncentrace enzymu c_E : $c_{im.nosič} = 0,00625 \text{ g}$

10.6.2 Stanovení teplotního optima imobilizovaného enzymu

Postup:

- Jednotlivé zkumavky s 1 ml CMC byly temperovány při teplotách 25 – 70 °C.
- Do vytemperované zkumavky s CMC byl přidán 1 ml imobilizovaného enzymu (100 µl) a reakční směs byla inkubována 10 minut.
- Po 10 minutách bylo 0,5 ml z reakční směsi odebráno do zkumavky s 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla I a II (směs I a II v poměru 4:1) a tato směs byla 10 minut povařena.
- Po ochlazení bylo přidáno 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla III a 3,5 ml destilované vody.
- Směs byla promíchána na vortexu a přefiltrována přes filtrační papír.

6. Na spektrofotometru byla změřena absorbance při 530 nm proti blanku (0,5 ml směsi Somogyi-Nelsonova činidla I a II, 0,25 ml imobilizovaného enzymu, 0,25 ml CMC o pH 4,8, 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla III a 3,5 ml destilované vody). Naměřené hodnoty jsou uvedeny v **Tab. 10**.

Kalkulace:

Aktivita enzymu byla vypočítána postupem uvedeným v kapitole č. 10.4.2.

Určení koncentrace enzymu c_E : $c_{im.nosič} = 0,00625 \text{ g}$

10.6.3 Stanovení tepelné stability imobilizovaného enzymu

Postup:

1. Do zkumavek s 1 ml CMC vytemperovaných na 50 °C byl postupně přidáván 1 ml imobilizovaného enzymu (100 µl), který byl po dobu 30 minut temperován na vodní lázni při teplotách 25 – 70 °C.
2. Po 20 minutách inkubace bylo 0,5 ml z reakční směsi odebráno do zkumavky s 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla I a II (směs I a II v poměru 4:1) a tato směs byla 10 minut povařena.
3. Po ochlazení bylo přidáno 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla III a 3,5 ml destilované vody.
4. Směs byla promíchána na vortexu a přefiltrována přes filtrační papír.
5. Na spektrofotometru byla změřena absorbance při 530 nm proti blanku (0,5 ml směsi Somogyi-Nelsonova činidla I a II, 0,25 ml imobilizovaného enzymu o teplotě 25 °C, 0,25 ml CMC o pH 4,8, 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla III a 3,5 ml destilované vody). Naměřené hodnoty jsou uvedeny v **Tab. 11**.

Kalkulace:

Aktivita enzymu byla vypočítána postupem uvedeným v kapitole č. 10.4.2.

Určení koncentrace enzymu c_E : $c_{im.nosič} = 0,00625 \text{ g}$

10.6.4 Stanovení pH stability imobilizovaného enzymu

Postup:

1. Byly připraveny citran-fosforečnanové pufrы o různých pH (viz kap. 10.2.3).
2. Do zkumavek byl odpipetován 1 ml imobilizovaného enzymu a 1 ml citran-fosforečnanového pufru.
3. Zkumavky byly přikryty parafilmem a ponechány do druhého dne. Imobilizovaný enzym se přes noc usadil na dno zkumavky.
4. Ze zkumavek bylo odpipetováno 1,5 ml pufru nad usazeninou tak, aby usazenina nebyla zvířena a přidáno 1,5 ml destilované vody.
5. Do zkumavek s 1 ml CMC vytemperovaných na 50 °C byl postupně přidáván 1 ml imobilizovaného enzymu ve vodě získaný v předchozím kroku.
6. Po 20 minutách inkubace bylo 0,5 ml z reakční směsi odebráno do zkumavky s 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla I a II (směs I a II v poměru 4:1) a tato směs byla 10 minut povařena.
7. Po ochlazení bylo přidáno 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla III a 3,5 ml destilované vody.
8. Směs byla promíchána na vortexu a přefiltrována přes filtrační papír.

9. Na spektrofotometru byla změřena absorbance při 530 nm proti blanku (0,5 ml směsi Somogyi-Nelsonova činidla I a II, 0,25 ml imobilizovaného enzymu o teplotě 25 °C, 0,25 ml CMC o pH 4,8, 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla III a 3,5 ml destilované vody). Naměřené hodnoty jsou uvedeny v **Tab. 12**.

Kalkulace:

Aktivita enzymu byla vypočítána postupem uvedeným v kapitole č. 10.4.2.

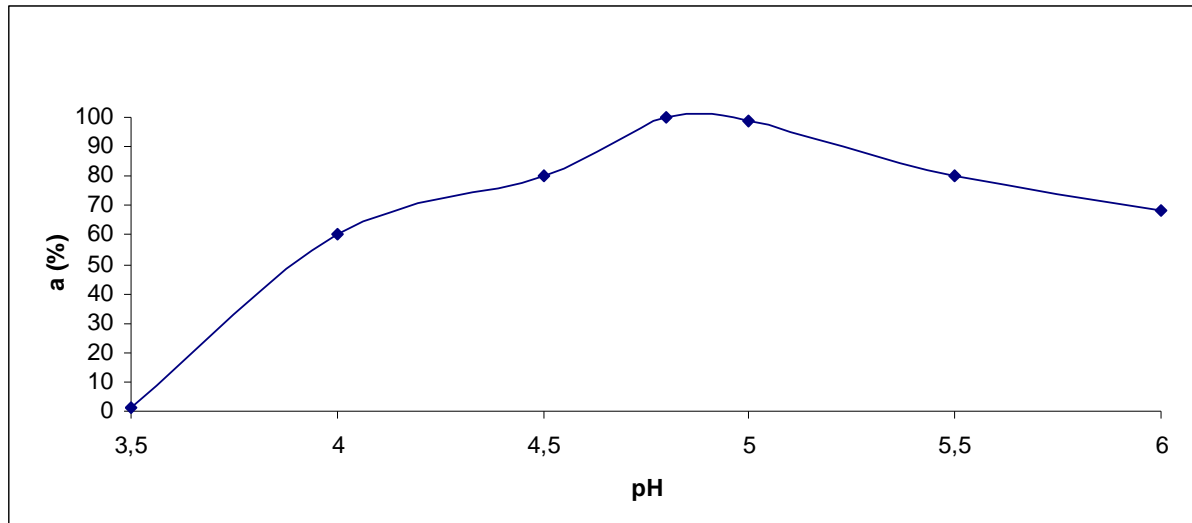
Určení koncentrace enzymu c_E : $c_{im.nosič} = 0,00625 \text{ g}$

11 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem experimentální práce bylo stanovit základní charakteristiky volného komerčního enzymového preparátu Celluclast 1.5 L, jako je pH optimum, teplotní optimum, pH stabilita a teplotní stabilita. Následně provést imobilizaci enzymu na Sorsilen a také u něj stanovit základní charakteristiky a poté je porovnat s charakteristikami volného preparátu. Všechny získané hodnoty jsou zpracované ve formě grafu v textu anebo jsou uvedené v tabulkách v kapitole Přílohy.

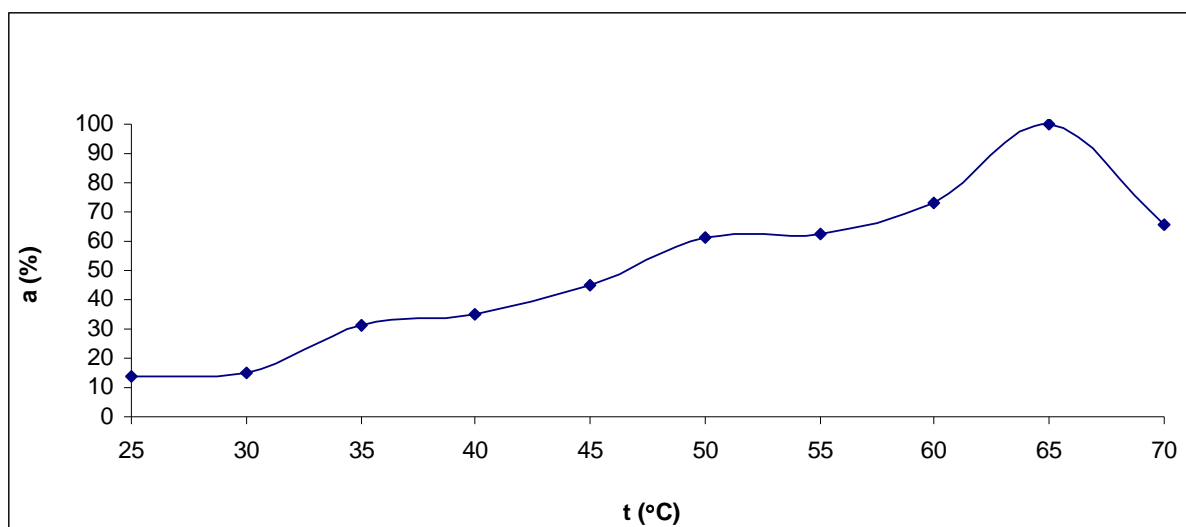
11.1 Charakteristiky volného enzymu

Optimální podmínky působení volného enzymu byly stanoveny na CMC jako substrát. Parametr jako je pH optimum byl sledován v rozpětí pH 3,5 – 6 v octanovém tlumivém roztoku. **Graf č. 2**. Z výsledků je patrné, že hodnota 4,8 je hodnota optimálního pH daného enzymu.



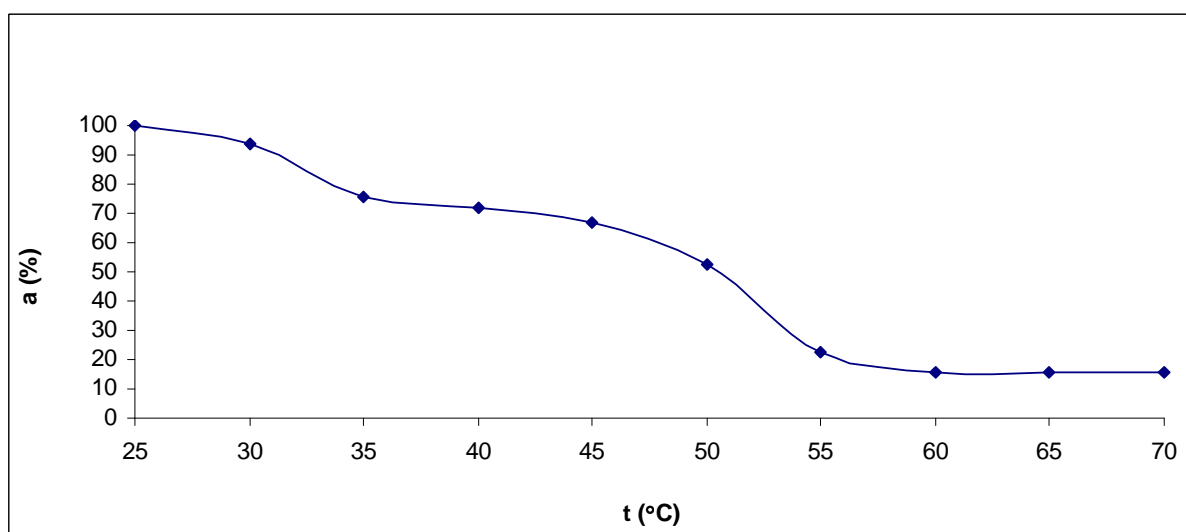
Graf 2. pH optimum volného komerčního enzymu

Teplotní optimum komerčního enzymového preparátu bylo stanoveno na základě aktivity, která byla měřena v průběhu dvaceti minutové inkubace reakční směsi při různých teplotách od 25 °C do 70 °C. **Graf č. 3**. Z výsledků je patrné, že teplota 65 °C je teplotním optimem daného enzymu.



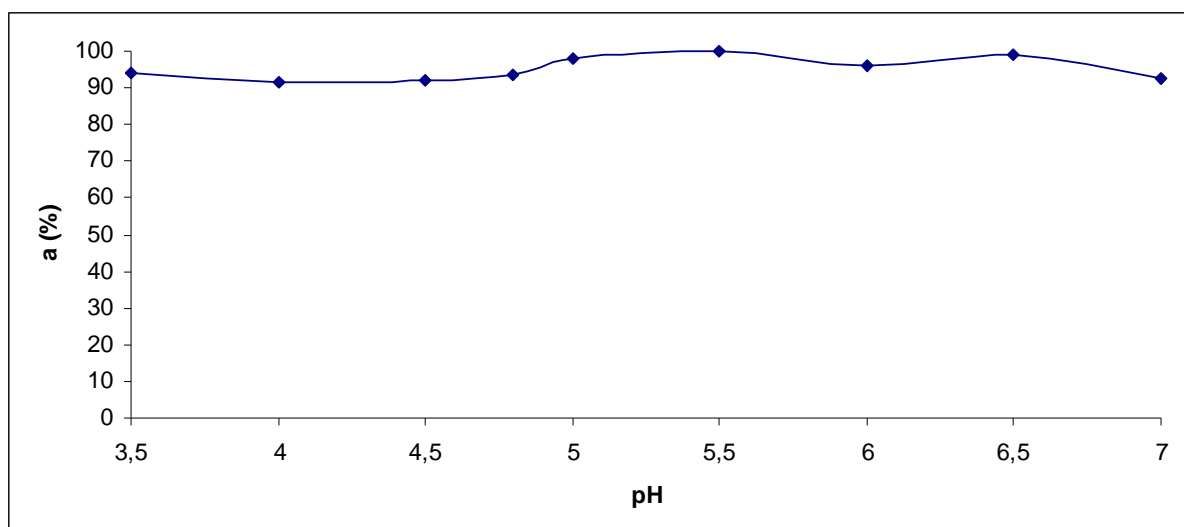
Graf 3. Teplotní optimum volného komerčního enzymu

Dále byla sledována tepelná stabilita komerčního enzymového preparátu pomocí stanovení aktivity v průběhu dvaceti minutové inkubace substrátu s enzymem temperovaným na různé teploty v rozmezí 25 až 70 °C. **Graf č. 4.** Z výsledků je patrné, že s rostoucí teplotou stabilita enzymu klesá. Při teplotě 55 °C a výše byla aktivita enzymu již velmi nízká.



Graf 4. Tepelná stabilita volného komerčního enzymu

V případě stanovení pH stability komerčního celulóзовého preparátu byla měřena aktivita v průběhu dvaceti minutové inkubace substrátu s enzymem v citran-fosforečnanovém pufru o pH 3,5 – 7. **Graf č. 5.** Z výsledků je patrné, že daný enzym je ve zkoumaném rozmezí pH poměrně stabilní a hodnoty aktivit jen nepatrně kolísají.



Graf 5. pH stabilita volného komerčního enzymu

11.2 Imobilizace komerčního celulóзовého preparátu

Na imobilizaci byl použit komerčně dostupný celulóзовý preparát Celluclast 1.5 L a jako nosič polyethyltereftalát neboli Sorsilen. Jedná se o netoxický materiál, který má vysokou světelnou, tepelnou a chemickou stabilitu a je rezistentní vůči působení mikroorganismů a díky tomu je vhodný pro přípravu imobilizovaných enzymů určených pro praktickou aplikaci. Polyethyltereftalát je polymer na bázi kyseliny tereftalové a ethylenglykolu. Imobilizace byla provedena na základě adsorpce. Pro tento způsob imobilizace byl vypracován optimální postup a charakterizovány základní vlastnosti imobilizovaného enzymu. Imobilizace se uskutečnila za laboratorní teploty na třepačce inkubací 0,5 g nosiče suspendovaného ve 20 ml octanového tlumivého roztoku o pH 4,8, které je pH optimum enzymu. Tím se do největší míry snížila možnost inaktivace enzymu během imobilizace vlivem prostředí. Sorpční kapacita enzymu se zjišťovala v sérii čtyř pokusů, ve kterých se inkuboval nosič postupně s 10, 50, 100 a 250 μ l enzymového preparátu. Směs byla na třepačce inkubována po dobu čtyř hodin a poté byla zfiltrována. **Tab. 2.** Se zvyšujícím se množstvím enzymu použitého na imobilizaci se zvyšovalo i množství volného enzymu ve filtrátu. Pouze v případě imobilizace 10 μ l enzymu na 0,5 g nosiče nebyla ve filtrátu detekována žádná aktivita. Nosič s imobilizovaným enzymem byl následně promyt 250 ml vody, přičemž znovu byla stanovena aktivita volného enzymu ve filtrátu. Pouze v případě imobilizace 250 μ l enzymu byla v promývací vodě ještě zjištěna aktivita volného enzymu. Po následném promytí enzymu dalšími 50 ml vody nebyla již ani v jednom případě zaznamenána aktivita volného enzymu ve filtrátu.

Tab. 2. Naměřené hodnoty aktivity volného enzymu ve filtrátu

Množství imobilizovaného enzymu (μl)	Množství vody na promytí (ml)	A (530 nm)	A (μmol/min.ml)
10	0	0	0,00
	250	0	0,00
	50	0	0,00
50	0	0	0,00
	250	0,0203	0,00
	50	0	0,00
100	0	0,025	0,01
	250	0	0,00
	50	0	0,00
250	0	0,119	0,03
	250	0,133	0,03
	50	0	0,00

Aktivita imobilizovaného enzymu byla u všech preparátů značně snížena v porovnání s volným enzymem a byla závislá na množství vázaného enzymu. Jak je vidět z **Tab. 3.**, obsahující hodnoty aktivity preparátů s různým množstvím adsorbovaného enzymu, aktivita se zvyšujícím se poměrem enzymu k nosiči vzrůstá.

Tab. 3. Naměřené a vypočítané hodnoty aktivity imobilizovaného enzymu

Množství imobilizovaného enzymu (μl)	A (530 nm)	A (μmol/min.g)
10	0,061	0,57
50	0,212	1,97
100	0,579	5,37
250	0,965	8,96

U imobilizované celulózy byla sledována stabilita během uchovávání preparátu v tlumivém roztoku a pevnost zakotvení enzymu na nosiči. Imobilizovaný enzym byl uchováván pět dní při laboratorní teplotě v octanovém pufru o pH 4,8. **Tab. 4.** Z výsledků vyplývá, že v průběhu uchovávání preparátu ve výše uvedených podmínkách nedocházelo k uvolňování enzymu do prostředí. Pouze v případě preparátu s 250 μl enzymu imobilizovaného na 0,5 g nosiče byla detekována v uchovávacím roztoku aktivita 0,01 μmol/min.ml.

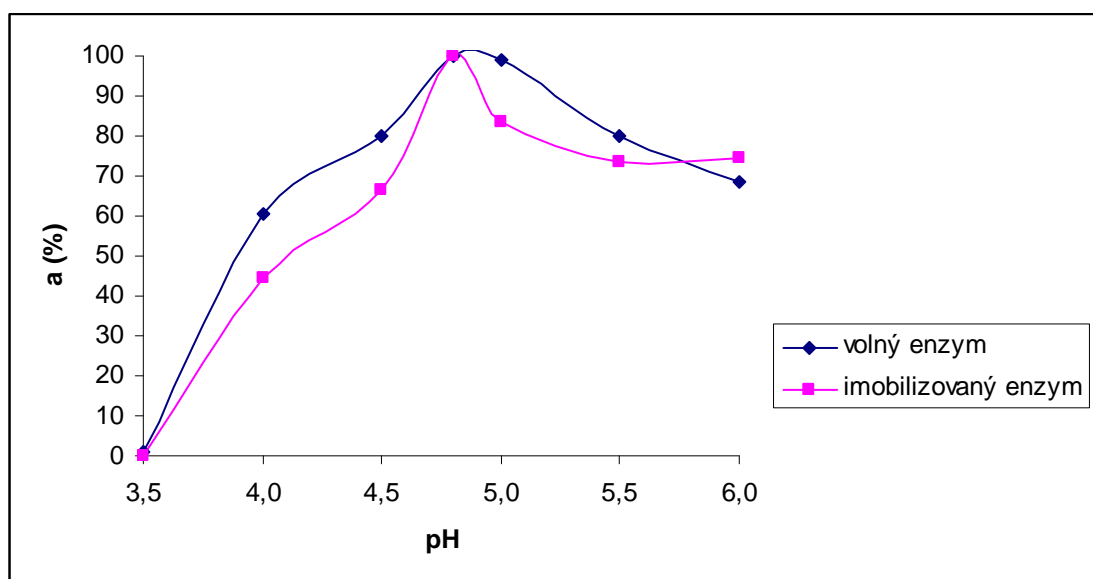
Tab. 4. Naměřené a vypočítané hodnoty aktivity enzymu uchovávaného pět dní v pufru

Množství imobilizovaného enzymu (μl)	A (530 nm)	A (μmol/min.ml)
10	0,000	0,00
50	0,000	0,00
100	0,000	0,00
250	0,044	0,01

Pro další měření byl použit imobilizovaný preparát připravený sorpcí 100 μl volného komerčního enzymu na 0,5 g Sorsilenu.

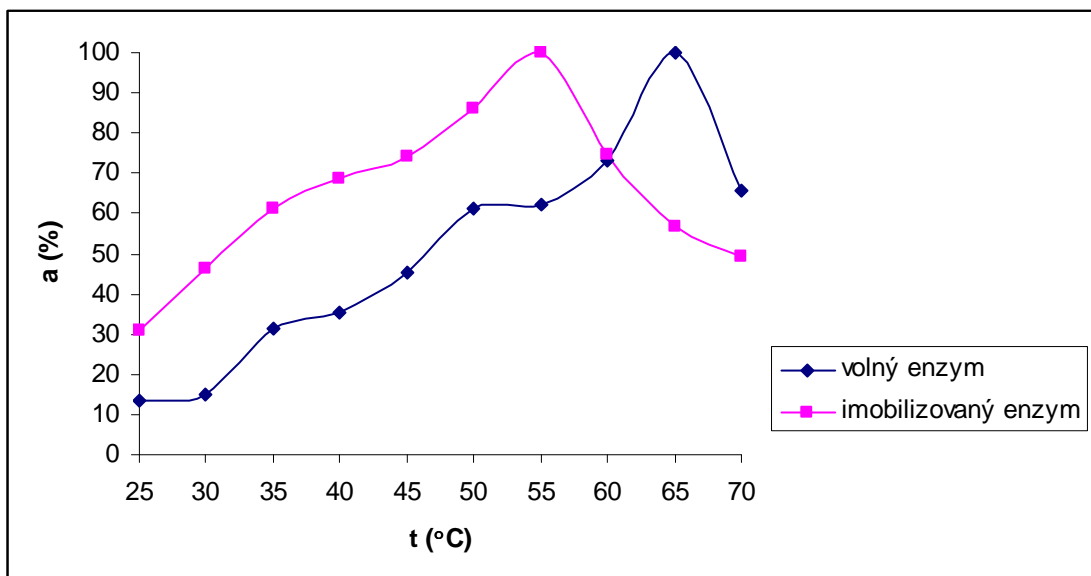
11.3 Stanovení optimálních podmínek působení imobilizovaného enzymu

Dále byly u imobilizátu připraveného sorpcí 100 μl volného enzymu na nosič charakterizovány optimální podmínky působení jako je pH optimum, teplotní optimum, pH stabilita a tepelná stabilita. První parametr byl sledován v rozpětí pH 3,5 – 6,0 v octanovém tlumivém roztoku během deseti minutové inkubace reakční směsi při 50 °C. **Graf č. 6.** Z výsledků je patrné, že volný i imobilizovaný preparát mají shodné pH optimum, a to o pH 4,8.



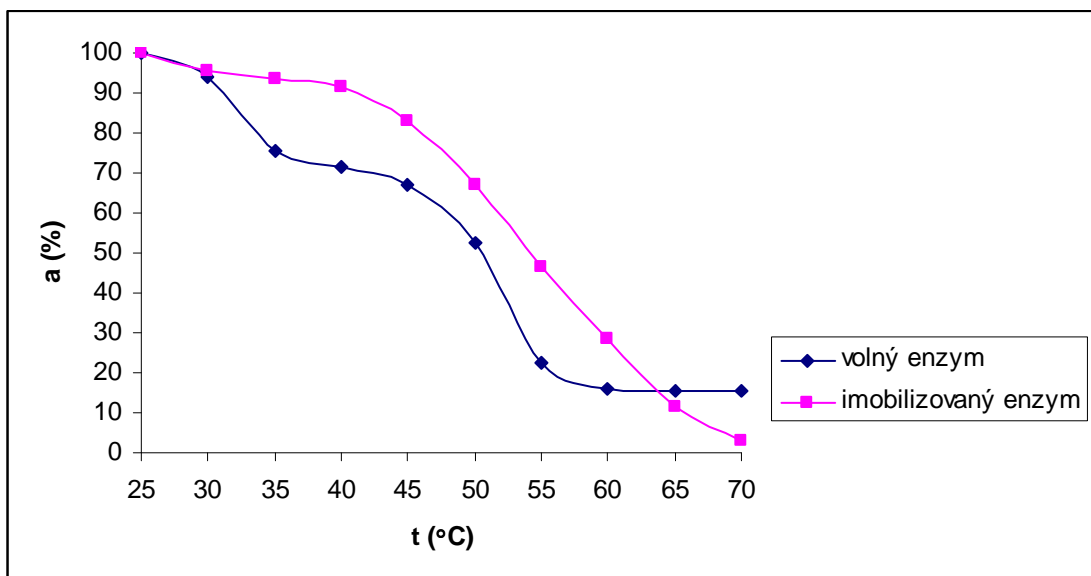
Graf 6. pH optimum

Teplotní optimum imobilizovaného enzymu bylo stanoveno, obdobně jako u enzymu volného, na základě aktivity, která byla měřená v průběhu deseti minutové inkubace reakční směsi při různých teplotách od 25 °C do 70 °C. **Graf č. 7.** Z výsledků je patrné, že teplotní optimum imobilizovaného enzymu se vlivem imobilizace snížilo z 65 °C rozpustného enzymu na 55 °C.



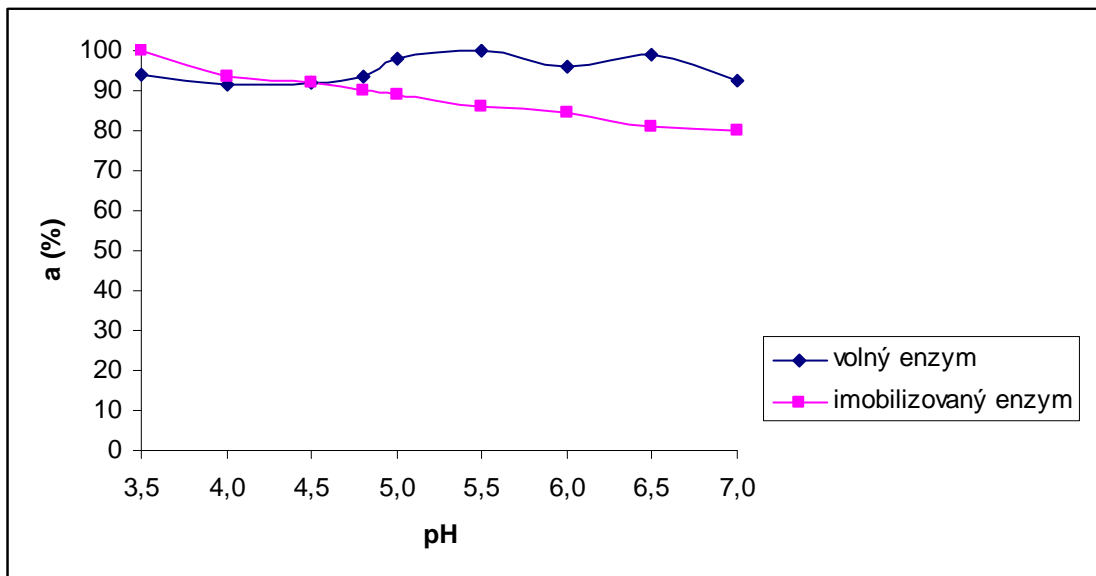
Graf 7. Teplotní optimum

Stejně jako u enzymu volného i u imobilizovaného enzymu byla sledována tepelná stabilita pomocí měření aktivity během dvaceti minutové inkubace substrátu s imobilizovaným enzymem předtemperovaným po dobu třiceti minut na teploty v rozmezí 25 až 70 °C. **Graf č. 8.** Z výsledků je patrné, že imobilizovaný enzym vykazuje lepší tepelnou stabilitu než enzym rozpustný. Aktivita imobilizovaného enzymu začíná rapidně klesat při 40 °C, zatímco aktivita volného enzymu již při 30 °C.



Graf 8. Tepelná stabilita

Při sledování posledního parametru, tedy pH stability imobilizovaného preparátu, byla opět měřena aktivita v průběhu dvaceti minutové inkubace substrátu s enzymem, který byl po dobu 24 hodin inkubován v citran-fosforečnanových pufrách o pH 3,5 – 7,0. **Graf č. 9.** Z výsledků je patrné že stabilita imobilizovaného enzymu s rostoucím pH neustále mírně klesá, zatímco stabilita volného enzymu v daném rozmezí pH kolísá.



Graf 9. pH stabilita

12 ZÁVĚR

Cílem experimentální části práce bylo provést charakteristiky volného enzymu Celluclast 1.5 L a jeho imobilizaci na polymerní nosič SORSILEN. Následně pak stanovit optimální podmínky působení získaného imobilizovaného preparátu.

Výsledky této práce jsou formulovány do následujících bodů:

- 1) U volného komerčního enzymového preparátu bylo experimentálně stanoveno pH optimum na hodnotu pH 4,8 a teplotní optimum na teplotu 65 °C.

Z výsledků zkoumání tepelné stability volného enzymu vyplývá, že s rostoucí teplotou stabilita enzymu klesá a při teplotě 55 °C a vyšší je už velmi malá. Naopak enzym vykazuje dobrou stabilitu v rozmezí pH 3,5 až 7.

- 2) Volný enzym byl ve čtyřech různých množstvích (10, 50, 100 a 250 µl) imobilizován na Sorsilen.

Měřením aktivity bylo zjištěno, že se zvyšujícím se množstvím enzymu použitého na imobilizaci se zvyšuje i množství volného enzymu ve filtrátu.

Naměřená aktivita imobilizovaného enzymu je u všech čtyř preparátů značně snižená v porovnání s volným enzymem a je závislá na množství vázaného enzymu.

- 3) Také u imobilizovaného preparátu byly stanoveny optimální podmínky. pH optimum je shodné s volným enzymem, tedy pH 4,8. Teplotní optimum však bylo stanoveno na teplotu 55 °C, tedy nižší než u volného enzymu.

Z experimentů také plyne, že imobilizovaný enzym vykazoval lepší tepelnou stabilitu než enzym volný. V rozmezí hodnot pH 3,5 až 7 aktivita imobilizovaného enzymu s rostoucím pH mírně klesala.

13 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] BRAINARD, A. P., TSAO, G. T. Recent progress in bioconversion of lignocellulosics [online]. Berlin [u.a.]: Springer, 1999 [cit. 2012-04-03]. ISBN 35-406-5577-8.
Dostupné z: http://www.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=zKnqYqrM8qUC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Recent+Progress+in+Bioconversion+of+Lignocellulosics&ots=JtFR6NZ-M7&sig=kTrw6l42xxk9qj0VoHIO0IAdZR8&redir_esc=y#v=onepage&q=Recent%20Progress%20in%20Bioconversion%20of%20Lignocellulosics&f=false.
- [2] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin: výkladový slovník*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 580 s. ISBN 978-80-86659-17-6 (SOUBOR).
- [3] SUKUMARAN, K. J., SINGHANIA, R. R., PANDEY, A.: Microbial cellulases – Production, applications and challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research* [online]. 2005, roč. 64, č. 11, s. 832-844 [cit. 2012-04-02]. ISSN 0022-4456. Dostupné z: <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/5375/1/JSIR%2064%2811%29%20832-844.pdf>.
- [4] KUHAD, R. CH., GUPTA R., SINGH, A. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research* [online]. 2011, roč. 2011, s. 1-10 [cit. 2012-04-04]. ISSN 2090-0414. DOI: 10.4061/2011/280696. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/er/2011/280696/>.
- [5] SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Advanced Synthesis* [online]. 2007-06-04, roč. 349, 8-9, s. 1289-1307 [cit. 2012-02-15]. ISSN 16154150. DOI: 10.1002/adsc.200700082. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/adsc.200700082>.
- [6] MZLU [online]. Brno [cit. 2012-04-03].
Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_211_multitext/obecna_botanika/texty-cytologie-rostlinna_bunka.html.
- [7] SOCHOR, M. Struktura rostlinné buňky. [online]. [cit. 2011-11-02]. Dostupné z: <http://botanika.borec.cz/schemata/bunka.jpg>.
- [8] KODÍČEK, M. *Biochemické pojmy: výkladový slovník*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2004, 171 s. ISBN 80-708-0551-X.
- [9] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie I: Živé systémy, jejich složení a organisace. Biopolymery - základ živých systémů. Obdivuhodné katalysátory - enzymy*. 1. vyd. Praha: Academia, 1992, 180 s. ISBN 80-200-0439-4.
- [10] MURRAY, R. K. *Harperova biochemie: Živé systémy, jejich složení a organisace. Biopolymery - základ živých systémů. Obdivuhodné katalysátory - enzymy*. 4. čes. vyd.

Jinočany: Nakladatelství a vydavatelství H H, 2002, 872 s. ISBN 80-731-9013-3.

- [11] *Biopolymers*. Weinheim: Wiley-VCH, 2002, 636 s. ISBN 35-273-0227-1.
- [12] BHAT, M. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances* [online]. 1999, roč. 15, 3-4, s. 583-620 [cit. 2011-11-12]. ISSN 07349750. DOI: 10.1016/S0734-9750(97)00006-2.
- [13] VODRÁŽKA, Z., KÁŠ, J., RAUCH, P. *Enzymologie: Živé systémy, jejich složení a organizace. Biopolymery - základ živých systémů. Obdivuhodné katalysátory - enzymy*. 3. přeprac. vyd. Praha: VŠCHT, 1998, 171 s. ISBN 80-708-0330-4.
- [14] PÉREZ, J., MUNOZ - DORADO, J., de la RUBIA, T., MARTINEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology* [online]. 2002, roč. 5, č. 2, s. 53-63 [cit. 2012-03-07]. ISSN 1139-6709. DOI: 10.1007/s10123-002-0062-3. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/openurl.asp?genre=article>.
- [15] ZHANG, Y. P., HIMMEL, M., MIELENZ, J. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances* [online]. 2006, roč. 24, č. 5, s. 452-481 [cit. 2012-02-15]. ISSN 07349750. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.03.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975006000413>.
- [16] JAYANI, R. S., SAXENA, S., GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes. *Process Biochemistry* [online]. 2005, roč. 40, č. 9, s. 2931-2944 [cit. 2012-03-23]. ISSN 13595113. DOI: 10.1016/j.procbio.2005.03.026. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511305001765>.
- [17] KUBÁTOVÁ, A. *Trichoderma viride*, teleomorfa *Hypocrea rufa*. [online]. [cit. 2011-10-10]. Dostupné z: <http://www.sci.muni.cz/mikrob/MiniAtlas/images/plisne/kolonie/Trichoderma%20viride%20CCF%203231%20MEA%2014-25.jpg>.
- [18] ABD EL-NASSER, N. H., HELMY, S. M., EL-GAMMAL, A. A. Formation of enzymes by biodegradation of agricultural wastes with white rot fungi: an overview. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 1997, roč. 55, č. 3, s. 249-255 [cit. 2012-02-04]. ISSN 01413910. DOI: 10.1016/S0141-3910(96)00117-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391096001176>.
- [19] BHAT, M. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* [online]. 2000, roč. 18, č. 5, s. 355-383 [cit. 2011-11-05]. ISSN 07349750. DOI: 10.1016/S0734-9750(00)00041-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975000000410>.
- [20] GEMEINER, P. *Enzymové inženýrstvo*. 1. vyd. Bratislava: Vydavatelství Alfa, 1987, 268 s. ISBN 063-041-87.

- [21] CAO, L. *Carrier-bound immobilized enzymes: principles, applications and design* [online]. Weinheim: Wiley-VCH, c2005, 563 s. [cit. 2012-04-03]. ISBN 35-273-1232-3. Dostupné z: http://books.google.cz/books?id=h_78o7-0hrQC&pg=PR7&lpq=PR7&dq=Introduction:+Immobilized+Enzymes:+Past,+Present+and+Prospects&source=bl&ots=fY78mis05g&sig=wE9Gam2f5wpQqEH2s8nxwpt_dx4&hl=cs&sa=X&ei=tcFCT5CtKYK3-waxzNHSBQ&ved=0CFYQ6AEwBQ#v=onepage&q=Introduction%3A%20Immobilized%20Enzymes%3A%20Past%2C%20Present%20and%20Prospects&f=false.
- [22] POSPÍŠILOVÁ, M. *Imobilizace alfa-amylas na magnetické nosiče* [online]. Olomouc, 2010 [cit. 2012-03-09]. Diplomová práce. Univerzita Palackého, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Ludmila Zajoncová. Dostupné z: <http://theses.cz/id/tmn9mv/>.
- [23] LUND UNIVERSITY [online]. 2012. Lund [cit. 2012-04-03]. Dostupné z: http://www.biotek.lu.se/research/new_materials/cryogels/.
- [24] VSCHT [online]. Praha [cit. 2012-04-03]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vsch.cz/knihy/uid_es-001/hesla/polyelektrolyt.html.
- [25] REXOVÁ-BENKOVÁ, L., OMELKOVÁ, J., KUBÁNEK, V. Endo-D-galacturonanase immobilized by adsorption on porous polyethyleneterephthalate. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 47, 2716. 1982.
- [26] TÉBÉKA, I. R. M., SILVA, A. G. L., PETRI, F. S. Hydrolytic Activity of Free and Immobilized Cellulase. *Langmuir* [online]. 2009, roč. 25, č. 3, s. 1582-1587 [cit. 2012-04-06]. ISSN 0743-7463. DOI: 10.1021/la802882s. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la802882s>.
- [27] PARDO, A. G., FORCHIASSIN, F. Influence of temperature and pH on cellulase activity and stability in *Nectria catalinensis*. *Revista Argentina de microbiología* [online]. 1999, roč. 20, č. 1-3. [cit. 2012-04-06]. ISSN 0325-7541. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10327458>.
- [28] MAWADZA, C., HATTI-KAUL, R., ZVAUYA R., MATTIASSON, B. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. *Journal of Biotechnology*. 2000, roč. 83, č. 3, s. 177-187 [cit. 2012-04-08]. ISSN 01681656. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00305-9. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165600003059>.
- [29] GAO, J., WENG H., ZHU, D., YUAN, M., GUAN, F. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. *Bioresource Technology*. 2008, roč. 99, č. 16, s. 7623-7629 [cit. 2012-04-08]. ISSN 09608524. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.02.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096085240800120X>.

14 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	aktivita
A (530 nm)	absorbance při 530 nm
a	relativní aktivita
BS	buněčná stěna
c _E	koncentrace volného komerčního enzymu
cit.	citováno
CMC	karboxymethylcelulóza
např.	například
s.	stran
tzv.	takzvaný
vyd.	vydání

15 SEZNAM PŘÍLOH

<i>Tab. 5. Naměřené a vypočítané hodnoty pro stanovení pH optima volného enzymu.....</i>	<i>47</i>
<i>Tab. 6. Naměřené a vypočítané hodnoty pro stanovení teplotního optima volného enzymu....</i>	<i>47</i>
<i>Tab. 7. Naměřené a vypočítané hodnoty pro stanovení tepelné stability volného enzymu.....</i>	<i>47</i>
<i>Tab. 8. Naměřené a vypočítané hodnoty pro stanovení pH stability volného enzymu.....</i>	<i>48</i>
<i>Tab. 9. Naměřené a vypočítané hodnoty pro stanovení pH optima imobilizovaného enzymu.....</i>	<i>48</i>
<i>Tab. 10. Naměřené a vypočítané hodnoty pro stanovení teplotního optima imobilizovaného enzymu.....</i>	<i>48</i>
<i>Tab. 11. Naměřené a vypočítané hodnoty pro stanovení tepelné stability imobilizovaného enzymu.....</i>	<i>49</i>
<i>Tab. 12. Naměřené a vypočítané hodnoty pro stanovení pH stability imobilizovaného enzymu .</i>	<i>49</i>
<i>Obr. 6. Zkumavky s citran-fosforečnanovým pufrem o různých pH.....</i>	<i>50</i>
<i>Obr. 7. Vodní lázeň s temperujícími se zkumavkami CMC.....</i>	<i>50</i>
<i>Obr. 8. Zkumavky po povaření, které obsahují 0,5 ml reakční směsi (CMC a volný enzym) a 0,5 ml směsi Somogyi-Nelsonova činidla I a II.....</i>	<i>51</i>
<i>Obr. 9. Zkumavky po povaření, které obsahují 0,5 ml reakční směsi (CMC a volný enzym), 0,5 ml směsi Somogyi-Nelsonova činidla I a II, 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla III a 3,5 ml destilované vody.....</i>	<i>51</i>

16 PŘÍLOHY

Tab. 5. Naměřené a vypočítané hodnoty pro stanovení pH optima volného enzymu

pH (CMC)	A (530 nm)	A ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{ml}$)	relativní aktivita a (%)
3,5	0,008	18,56	1,1
4,0	0,462	1071,84	60,6
4,5	0,609	1412,88	79,8
4,8	0,763	1770,16	100,0
5,0	0,754	1749,28	98,8
5,5	0,610	1415,20	79,9
6,0	0,521	1208,72	68,3

Tab. 6. Naměřené a vypočítané hodnoty pro stanovení teplotního optima volného enzymu

t (CMC) ($^{\circ}\text{C}$)	A (530 nm)	A ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{ml}$)	relativní aktivita a (%)
25	0,116	269,12	13,6
30	0,125	290,00	14,7
35	0,266	617,12	31,3
40	0,300	696,00	35,3
45	0,385	893,20	45,2
50	0,521	1208,72	61,2
55	0,531	1231,90	62,4
60	0,621	1440,72	72,9
65	0,851	1974,32	100,0
70	0,558	1294,56	65,6

Tab. 7. Naměřené a vypočítané hodnoty pro stanovení tepelné stability volného enzymu

t (Enzym) ($^{\circ}\text{C}$)	A (530 nm)	A ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{ml}$)	relativní aktivita a (%)
25	0,723	1677,36	100,0
30	0,678	1572,96	93,8
35	0,545	1264,40	75,4
40	0,518	1201,76	71,6
45	0,483	1120,56	66,8
50	0,379	879,28	52,4
55	0,164	380,48	22,7
60	0,114	264,48	15,8
65	0,113	262,16	15,6
70	0,111	257,52	15,4

Tab. 8. Naměřené a vypočítané hodnoty pro stanovení pH stability volného enzymu

pH (pufr)	A (530 nm)	A ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{ml}$)	relativní aktivita a (%)
3,5	1,022	2371,04	94,2
4,0	0,991	2299,12	91,3
4,5	0,997	2313,04	91,9
4,8	1,016	2357,12	93,6
5,0	1,061	2461,52	97,8
5,5	1,085	2517,20	100,0
6,0	1,044	2422,08	96,2
6,5	1,072	2487,04	98,8
7,0	1,005	2331,60	92,6

Tab. 9. Naměřené a vypočítané hodnoty pro stanovení pH optima imobilizovaného enzymu

pH (CMC)	A (530 nm)	A ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$)	relativní aktivita a (%)
3,5	0	0,00	0,0
4,0	0,137	2,54	44,5
4,5	0,205	3,80	66,5
4,8	0,308	5,72	100,0
5,0	0,257	4,77	83,4
5,5	0,226	4,19	73,3
6,0	0,23	4,27	74,6
6,5	0,251	4,66	81,4

Tab. 10. Naměřené a vypočítané hodnoty pro stanovení teplotního optima imobilizovaného enzymu

t (CMC) ($^{\circ}\text{C}$)	A (530 nm)	A ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$)	relativní aktivita a (%)
25	0,123	2,28	30,8
30	0,184	3,42	46,1
35	0,244	4,53	61,1
40	0,274	5,09	68,6
45	0,295	5,48	73,9
50	0,344	6,38	86,2
55	0,399	7,41	100,0
60	0,297	5,51	74,4
65	0,227	4,21	56,9
70	0,196	3,64	49,1

Tab. 11. Naměřené a vypočítané hodnoty pro stanovení tepelné stability imobilizovaného enzymu

t (Enzym) (°C)	A (530 nm)	A ($\mu\text{mol}/\text{min.g}$)	relativní aktivita a (%)
25	0,396	3,67	100,0
30	0,377	3,50	95,3
35	0,369	3,42	93,3
40	0,362	3,36	91,5
45	0,328	3,04	82,9
50	0,265	2,46	67,0
55	0,183	1,70	46,3
60	0,113	1,05	28,6
65	0,045	0,42	11,4
70	0,011	0,10	2,8

Tab. 12. Naměřené a vypočítané hodnoty pro stanovení pH stability imobilizovaného enzymu

pH (pufr)	A (530 nm)	A ($\mu\text{mol}/\text{min.g}$)	relativní aktivita a (%)
3,5	0,421	3,91	100,0
4,0	0,395	3,67	93,7
4,5	0,387	3,59	91,9
4,8	0,379	3,52	90,0
5,0	0,375	3,48	89,0
5,5	0,363	3,37	86,2
6,0	0,357	3,31	84,7
6,5	0,341	3,16	80,9
7,0	0,338	3,14	80,2



Obr. 6. Zkumavky s citran-fosforečnanovým pufrem o různých pH



Obr. 7. Vodní lázeň s temperujícími se zkumavkami CMC



Obr. 8. Zkumavky po povaření, které obsahují 0,5 ml reakční směsi (CMC a volný enzym) a 0,5 ml směsi Somogyi-Nelsonova činidla I a II



Obr. 9. Zkumavky po povaření a ochlazení, které obsahují 0,5 ml reakční směsi (CMC a volný enzym), 0,5 ml směsi Somogyi-Nelsonova činidla I a II, 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla III a 3,5 ml destilované vody