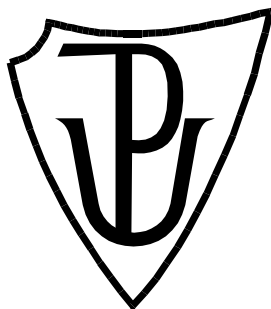


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Katedra organické chemie



Imobilizácia ureasy na magnetické nosiče

BAKALÁRSKA PRÁCA

Autor: Martina Drábiková
Študijný program: B1407 Chemie
Študijný odbor: Bioorganická chemie
Forma štúdia: Prezenčná
Vedúci práce: doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
Rok: 2015

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som záverečnú prácu vypracovala samostatne a že som uviedla všetky použité zdroje a literatúru. Táto práca, ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu. Súhlasím s tým, aby bola moja práca prístupná v knižnici Katedry organickej chémie, Prírodovedeckej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci,

Podpis

.....

Rada by som poďakovala hlavne vedúcej mojej práce doc. RNDr. Ludmile Zajoncovej, Ph.D. a tiež Mgr. Miroslavovi Jořenkovi za odborné vedenie a konzultácie pri vypracovávaní tejto bakalárskej práce. Tiež by som chcela poďakovať všetkým pracovníkom katedry biochémie za ochotu a spoluprácu.

Bibliografická identifikácia:

Meno a priezvisko autora	Martina Drábiková
Názov práce	Imobilizácia ureasy na magnetické nosiče
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Katedra biochémie
Vedúci práce	doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2015
Abstrakt	<p>Táto bakalárska práca je zameraná na imobilizáciu ureasy na magnetické nosiče. Teoretická časť pojednáva o vlastnostiach ureasy, jej výskyte a metódach purifikácie a inhibície enzýmu. Taktiež o metódach imobilizácie enzýmov a ureasy a stanovení aktivity imobilizovanej ureasy. Sú tu tiež uvedené možnosti využitia voľnej a imobilizovanej ureasy.</p> <p>Experimentálna časť sa zaoberá imobilizáciou ureasy na magnetické nosiče, stanovením aktivity enzýmu a charakterizáciou vlastností imobilizovanej ureasy.</p>
Kľúčové slová	ureasa, imobilizácia, močovina, magnetické častice
Počet strán	45
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Martina Drábiková
Title	Immobilization of urease on magnetic carriers
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc.RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
The year of presentation	2015
Abstract	<p>This bachelor thesis is mainly focused on immobilization of urease on magnetic carriers. The theoretical part deals with the characteristics of urease, occurrence in nature and methods of purification and inhibition. There is also an overview of methods of immobilization of enzymes and urease and methods of determination of urease activity. Finally, there are examples of applications of free and immobilized urease.</p> <p>The experimental part is focused on immobilization of urease on magnetic carriers, determination of urease activity and on characterization of properties of immobilized urease.</p>
Keywords	urease, immobilization, urea, magnetic carriers
Number of pages	45
Number of appendices	0
Language	Slovak

Obsah

1. Ciele práce.....	8
2. Úvod.....	9
3. Teoretická časť	10
3.1 Ureasa a jej charakterizácia.....	10
3.1.1 Ureasa	10
3.1.2 Výskyt ureasy	10
3.1.2.1. Rastlinné ureasy.....	12
3.1.2.2 Mikrobiálne ureasy.....	13
3.1.2.3. Kyslé ureasy	14
3.2 Štruktúra ureasy	14
3.3 Substrátová špecificita ureasy.....	15
3.4 Inhibícia ureasy	15
3.4.1 Štruktúrne analógy substrátu.....	15
3.4.2 Inhibítory, ktoré ovplyvňujú mechanizmus reakcie	16
3.5 Purifikácia ureasy.....	18
3.5.1 Kryštalizácia	19
3.5.2 Chromatografické metódy.....	19
3.6 Metódy stanovenia aktivity ureasy.....	19
3.6.1 Stanovenie aktivity ureasy na základe úbytku substrátu	19
3.6.2 Stanovenie aktivity ureasy na základe množstva vznikajúceho produktu.....	21
3.7. Imobilizácia ureasy	23
3.7.1. Metódy imobilizácie.....	23
3.7.2 Imobilizácia ureasy.....	25
3.8 Aplikácia ureasy.....	28
3.8.1 Ďalšie možnosti využitia ureasy	30
3.9 Aplikácia imobilizovanej ureasy.....	30
4. Experimentálna časť	32
4.1 Materiály	32
4.2 Prístroje	32
4.3 Metódy	33
4.3.1 Imobilizácia ureasy.....	33
4.3.2 Stanovenie aktivity ureasy.....	33

4.3.3 Stanovenie množstva imobilizovaného enzýmu	33
4.3.4 Stanovenie špecifickej aktivity ureasy	34
4.3.5 Funkčná časová stabilita ureasy	34
4.3.6 Skladovacia stabilita ureasy	34
4.3.7 Operačná stabilita imobilizovanej ureasy.....	34
4.4 Výsledky a diskusia.....	35
4.4.1 Stanovenie množstva imobilizovaného enzýmu	35
4.4.2 Stanovenie špecifickej aktivity ureasy	35
4.4.3 Funkčná časová stabilita ureasy	36
4.4.4 Skladovacia stabilita	37
4.4.5 Operačná stabilita ureasy.....	39
5. Záver	41
6. Literatúra	42
7. Zoznam skratiek	45

1. Ciele práce

- Vypracovať rešerš na tému ureasa a jej charakterizácia, imobilizácia ureasy, aplikácia imobilizovanej ureasy a detekcia močoviny
- Imobilizácia ureasy na magnetické častice
- Detekcia a stanovenie močoviny

2. Úvod

V oblasti biotechnológií, medicíny, či priemyslu je v dnešnej dobe kladený veľký dôraz na nízku nákladnosť enzýmových procesov a zároveň jednoduchosť ich prevedenia. Možnosť imobilizácie je pre praktické využitie vhodnou alternatívou pre zjednodušenie práce s enzýmami. Poskytuje výhody, ako sú napríklad nižšia cena procesu, často lepšia stabilita enzýmu, možnosť opakovaného použitia a jednoduché oddelenie enzýmu od produktu. Imobilizácia na magnetické mikro- a nanočastice má zjednodušiť prácu s imobilizovaným enzýmom, nakoľko vonkajším magnetickým poľom sa častice odstránia od produktu bez zásahu do reakčnej zmesi.

Jedným z príkladov dôležitých enzýmových procesov je hydrolýza močoviny ureasou za vzniku oxidu uhličitého a amoniaku. Enzýmová reakcia s ureasou sa využíva k odstráneniu močoviny z krvi v regeneračnom systéme dialyzátu v umelej obličke.

Voľná ureasa nachádza uplatnenie pri rozklade močoviny vo vzorke moču určenej k stanoveniu rôznych metabolitov v moči novorodencov. Tieto metabolity sú charakteristické pre rôzne metabolické poruchy a ich včasné odhalenie umožňuje nasadenie vhodnej terapie už v počiatku života novorodencov. Metabolity sa stanovujú metódou GC/MS a močovina vo vzorke moču sa nachádza vo vysokých koncentráciách a silne interferuje. Doposiaľ sa močovina hydrolyzovala voľnou ureasou a po hydrolýze bol enzým odstránený denaturáciou a centrifugáciou. Často sa stávalo, že vzniknutá zrazenina strhla taktiež aj niektoré metabolity. Preto bolo navrhnuté imobilizovať ureasu na magnetický nosič a po skončení enzýmovej reakcie ju eliminovať zo zmesi pomocou vonkajšieho magnetického poľa.

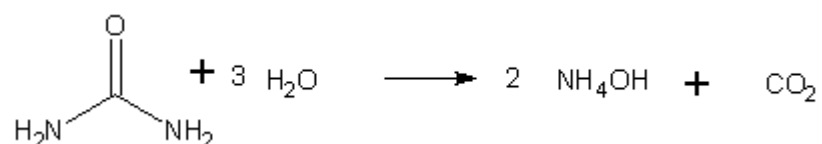
Táto bakalárska práca je zameraná na imobilizáciu a charakterizáciu ureasy a možnosť hydrolýzy močoviny v modelových vzorkách.

3. Teoretická časť

3.1 Ureasa a jej charakterizácia

3.1.1 Ureasa

Ureasa (urea amidohydrolasa, EC 3.5.1.5) je široko rozšírený enzým v prírode hlavne v rastlinách, hubách, riasách a bezstavovcoch, aj keď s rozličnou proteínovou štruktúrou má rovnakú funkciu: katalyzuje hydrolýzu močoviny na konečný produkt amoniak a oxid uhličitý.



Obr. 1: Hydrolýza močoviny v prítomnosti ureasy.

Funkčne patrí ureasa medzi amidohydrolasy a fosfotriesterasy. Dôležitým znakom týchto enzýmov je prítomnosť kovov v ich aktívnych centrách, ktorých úlohou je aktivovať substrát a vodu pre reakciu. Spomedzi dvojjadrových metalohydrolas z tejto nadrodiny ureasy obsahujú v ich aktívnom centre nikelnaté ióny (Krajewska, 2009).

Okrem významu v prírode má však ureasou katalyzovaná hydrolýza aj význam pre využitie v praxi hlavne v medicíne, analytickej chémii, v oblasti životného prostredia a v potravinárstve. Nahradenie voľnej ureasy imobilizovanou má veľa výhod najmä ekonomické, ale aj praktické, pretože je zjednodušená eliminácia produktu od enzýmu po skončení reakcie.

3.1.2 Výskyt ureasy

Ureasa je v prírode veľmi široko rozšírený enzým vyskytujúci sa v rastlinách, hubách, riasách a bezstavovcoch.

Tab. 1: Prehľad zdrojov ureasy (upravené podľa Krajewska, 2009)

<u>Zdroj</u>	<u>izolovaná z</u>
rastliny	<i>Canavalia ensiformis</i> <i>Glycine max</i> <i>Cajanus Cajan</i> <i>Gossypium hirsutum</i>
huby	<i>Aspergillus nidulans</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Coccidioides immitis</i> <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
baktérie	<i>Aerobacter aerogenes</i> <i>arthobacter oxydans</i> <i>Bacillus pasteurii</i> <i>Brevibacterium ammoniagenes</i> <i>Helicobacter pylori</i> <i>Klebsiella aerogenes</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Providencia rettgeri</i> <i>Selenomonas ruminantium</i> <i>Staphylococcus leei</i> <i>Streptococcus mitior</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus reuteri</i> <i>Arthrobacter mobilis</i>
riasy	<i>Nitellopsis obtusa</i>
bezstavovce	<i>Otala lactea</i>

Prítomnosť substrátu (močoviny) je zaisťovaná hlavne vylučovaním moču zvieratami, ale aj rozkladom dusíkatých zlúčenín z mŕtvych organizmov a tiež z aplikácie močoviny ako hnojiva.

Vysoké množstvo močoviny je produkované ako výsledok biologického spracovania. Každý človek vyprodukuje v priemere 10 kg močoviny za rok. Spontánna

degradácia močoviny je spojená s jej polčasom rozpadu približne 3,6 roka v prítomnosti ureasy je hydrolyza močoviny 104 krát rýchlejšia (Sujoy a Aparna, 2013).

Ureasa má veľkú úlohu v metabolizme dusíku v prírode. Kľúčovou funkciou je aj poskytovanie živým organizmom dusík vo forme amoniaku pre rast (Follmer, 2008).

Močovina v krvi prežúvavcov je hlavným produktom metabolizmu dusíku. Jej koncentrácia indikuje efektivitu využitia dusíku v potrave. Obsah močoviny v krvi prežúvavcov však nemôže byť rutinne kontrolovaný, preto sa množstvo močoviny detekuje v mlieku. Rôzne metódy stanovenia močoviny v mlieku potom môžu určiť kvalitu výživy prežúvavcov napr. množstvo proteínov v závislosti na energii vo vzťahu so stravovacími štandardmi. Kontrola mlieka teda môže dopomôcť pri kontrole efektivity diéty a nutričného príjmu, čo môže zlepšiť produkciu a kvalitu mlieka (Nousiainen *et al.*, 2004).

3.1.2.1. Rastlinné ureasy

Ureasa, je nevyhnutný močovinu odbúravajúci enzým v rastlinách, ktorý katalyzuje asimiláciu močoviny po vniknutí do rastlinnej bunky. U vyšších rastlín boli dokázané rôzne transportné systémy močoviny pasívne a aktívne, ktoré im zabezpečujú optimalizáciu výživy dusíkom v závislosti od dusíku prijatého z okolia alebo syntetizovaného vnútorne. Z vonkajšieho prostredia rastliny asimilujú močovinu cez korene ako močovinu, ale hlavne ako amoniak vytvorený hydrolyzou močoviny pomocou ureas prítomných v pôde, čo je využívané pri hnojení močovinou. Dôležité je však, že veľké hnojenie močovinou môže znamenať riziko jednak pre rastliny, ale aj životné prostredie. Vysoká aktivita ureasy spôsobuje enviromentálne a ekonomické problémy spojené s vysokou produkciou amoniaku do atmosféry, čo indukuje poškodenie rastlín a stratu ich esenciálnych živín, toxicita amoniaku a produkcia oxidu uhličitého spôsobuje zvýšenie pH pôdy (Krajewska, 2009).

V bunkách rastlín sa ureasa zúčastňuje na metabolizme látok, ktoré obsahujú dusík. V tomto prípade je močovina dôležitým medziproduktom z dvoch metabolických procesov: arginasou katalyzovaný rozklad arginínu a odbúranie purínov a ureidov. Keďže je močovina rýchlo metabolizovaná, neakumuluje sa, ale je konštantne odbúravaná ako zdroj dusíku (Krajewska, 2009).

3.1.2.2 Mikrobiálne ureasy

Zdrojmi mikrobiálnych ureas sú *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri* a *Klebsiella aerogenes* a huby ako napríklad *Rhizopus oryzae*. Vlákňité huby sú zdrojom 40 % dostupných ureas. Ureasová aktivita infekčných mikroorganizmov môže viesť k vývinu močových kameňov, pyelonefritídy, žalúdočných vredov či iných chorôb. Okrem patogénneho účinku majú mikrobiálne ureasy dôležitú úlohu v metabolizme u prežívavcov a v prírode pri transformácii dusíkatých zlúčenín. Aktivita ureasy môže slúžiť ako indikátor potenciálnej patogenity, ale i odolnosť na liečivá niektorých druhov baktérii (Sujoy a Aparna, 2013).

Spomedzi početného množstva ureolytických baktérií, sú podstatné tie patogénne pre živočíchy a ľudí. Patogenéza vzniká z efektov hydrolýzy močoviny, ktorá zvyšuje pH (až na 9.2) a toxicita vznikajúcich produktov (amoniaku a jeho derivátov) (Burne a Chen, 2000). Močovina ako hlavný odpadný produkt väčšiny živočíchov je produkovaná v pečeni, prenesená do krvného obehu z ktorého sa dostáva do obličiek a je vylučovaná v moči. Koncentrácia v sére u zdravých ľudí je 1-10 mmol.l⁻¹ a v moči 0,5 mol.l⁻¹. Močovina je však produkovaná najmä v intestinálnom trakte, čo zvyšuje náchylnosť ľudí na infekcie spôsobované ureolytickými baktériami (Krajewska, 2009).

Helicobacter pylori je ureolytická baktéria, ktorá spôsobuje infekcie intestinálneho traktu. Táto baktéria kolonizuje slizničnú výstelku žalúdka, v ktorej zvýšenie pH v silne kyslom prostredí zabezpečuje vhodné podmienky pre rast. Súčasne vzniká poškodenie tkaniva, čím sa zvyšuje riziko vzniku gastritídy a duodenálnych vredov. Poškodzujúcimi faktormi sú amoniak a monochloramín, ktorý vzniká z oxidatívneho prasknutia imunitných buniek. Bolo dokázané, že amoniak má cytotoxický efekt na žalúdočné epitelové bunky, zatiaľ čo monochloramín môže indukovať mutagénne poškodenie DNA, čo pri chronickej infekcii môže spôsobiť vznik rakoviny žalúdka (Krajewska, 2009).

Činnosť ureasy v tráviacej sústave sa stanovuje ureasovým dychovým testom pre diagnózu infekcie spôsobenej *Helicobacter pylori*. Pri teste sa podá izotopicky značená močovina ¹³C a ¹⁴C a pokiaľ existuje aktivita baktérie je močovina premieňaná na izotopovo značený oxid uhličitý, ktorý je absorbovaný do krvi, vydýchnutý a detekovaný pomocou hmotnostnej spektrometrie (Granstrom *et al.*, 2008).

3.1.2.3. Kyslé ureasy

Kyslé ureasy sú skupina ureas, ktoré na rozdiel od neutrálnych ureas majú pH optimum v rozmedzí od 2 po 4.5. Sú produkované hlavne črevnými baktériami (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Escherischia*) a pôdnymi baktériami (*Arthrobacter mobilis*). Využívajú sa pre odstránenie močoviny z alkoholických nápojov (Krajewska,2009).

3.2 Štruktúra ureasy

Rastlinné a hubové ureasy sú homooligoméne proteíny (skladajúce sa z identických podjednotiek), zatiaľ čo bakteriálne ureasy sú multiméry formované z komplexu dvoch alebo troch rovnakých podjednotiek. Významné aminokyselinové podobnosti boli zistené u všetkých známych ureas. Konečné zbytky aminokyselín monomérov rastlinných a hubových ureas sú podobné malým podjednotkám bakteriálnych enzýmov (napr. UreA z *Helicobacter pylori*). Veľké podjednotky bakteriálnych ureas (napr. UreB v *Helicobacter pylori*) sa podobajú konečným karboxylovým častiam rastlinných ureas. Vysoká podobnosť jednotlivých sekvencií ukazuje, že všetky ureasy sú variantami rovnakého enzýmu a poskytujú rovnakú terciárnu štruktúru a katalytické mechanizmy. Toto zhrnutie je podporované biochemickými a štruktúrnymi dátami získanými z najlepšie charakterizovaných ureas izolovaných z *Canavalia ensiformis* a *Klebsiela aerogenes*. Ureasa z *Canavalia ensiformis* existuje ako homotrimér schopný sa agregovať do homohexamérov. Bakteriálne ureasy nadobúdajú podobné štruktúry (Sirko a Brodzik, 2000).

Každá katalytická podjednotka obsahuje aktívne miesto obsahujúce dva nikelnaté ióny. V prípade kryštalizovanej ureasy z *K. Aerogenes* sú vzdialené 3,5 Å od seba. V tomto enzýme je jeden atóm niklu viazaný na dva histidínové zvyšky (His-246 a His-272), zatiaľ čo druhý atóm niklu je viazaný na dva ďalšie histidínové zvyšky (His-134 a His-136) a kyselinu asparágovú (Asp-360). Navyše karbamátový ligand odvodený od Lys-217 spája dva nikelnaté ióny (Mobley *et al.*, 1995). Proces začlenenia vyžaduje prítomnosť mnohých aktivačných proteínov, ktoré majú funkciu ureasovo špecifických shaperonov. Tieto proteíny sú potrebné pre stavbu aktívnej ureasy, ako v rastlinách, tak aj v baktériách.

V okolí aktívneho miesta sa nachádzajú aminokyselinové zvyšky, ktoré fungujú ako pohyblivá klapka pri ureasou katalyzovaných reakciách. Hlavne vďaka vodíkovým väzbám

stabilizujú katalytický prechodový stav a akcelerujú reakciu. Táto klapka funguje ako brána pre substrát (Krajewska, 2009).

3.3 Substrátová špecificita ureasy

Ureasa má absolútnu substrátovú špecificitu, čo znamená, že katalyzuje len jednu reakciu- premenu močoviny na oxid uhličitý a amoniak.

3.4 Inhibícia ureasy

Inhibítory ureas majú širokú aplikáciu v agrikultúre, klinických vedách a pri pochopení enzýmovej kinetiky. Majú významnú úlohu v redukování straty dusíku z močoviny používanej ako hnojiva vo forme prchavého amoniaku- tým sa zlepšuje využitie močoviny ako hnojiva. Známy je ich účinok, ako efektívne liečivo proti urease produkovanej bakteriálnymi infekciami pri terapii infekcie spôsobenej napríklad *Helicobacter pylori*. (Upadhyay, 2012)

Mechanizmy inhibície ureas sa rozdeľujú do dvoch hlavných skupín:

- a) štruktúrne analógy substrátu (kyselina hydroxámová, hydroxymočovina)
- b) inhibítory, ktoré ovplyvňujú mechanizmus reakcie

3.4.1 Štruktúrne analógy substrátu

Inhibítory riadené pre inhibíciu aktívneho centra sú chemotypy a ich analógy. Majú spoločnú vlastnosť- každý inhibítor spojí dva paramagnetické nikelnaté ióny v aktívnom centre enzýmu. Preto sa oktaedrické nikelnaté ióny a aminokyselinové zbytky orientujú podobne ako v prítomnosti substrátu (močoviny) (Upadhyay, 2012).

Hydroxymočovina inhibuje niektoré bakteriálne a rastlinné ureasy vrátane ureasy z *C. ensiformis* a *Helicobacter pylori*. V nedávnej dobe bolo dokázané, že N substituovaná hydroxymočovina je novým inhibítorom enzýmu. Zo šestnástich testovaných derivátov boli najlepšie inhibujúcimi zlúčeninami *m*-metyl a *m*-metoxy-fenyl substituovaná hydroxymočovina (Ueasato *et al*, 2002).

Štúdia na urease pochádzajúcej z *C. ensiformis* a bakteriálnych ureas ukázala, že kyselina hydroxámová a jej deriváty sú vysoko špecifické a kompetitívne inhibítory

(Fishbein a Carbone, 1965). Bolo dokázané, že je reverzibilným inhibítorom, ktorý sa pomaly viaže na rastlinné aj bakteriálne ureasy. Kyselina acetohydroxámová je najviac preskúmaným inhibítorom z tejto skupiny (Upadhyay, 2012).

Inhibícia ureasy z *C. ensiformis* pomocou kyseliny hydroxámovej je kompetitívna, vyžaduje prítomnosť $-CONHOH$ skupiny. Kinetické a rovnovážne dáta ukázali, že súťaží o nikelnatý ión. Kyselina hydroxámová sa chová ako monodentálny ligand, ktorý sa viaže na nikelnatý ión v pseudo- tetraedrálnom usporiadaní, tak ako sa viaže aj močovina (Upadhyay, 2012).

Thiolové zlúčeniny sú kompetitívne inhibítory ureasy. Thioly, ktoré majú pozitívne nabitú β -aminokyselinu (cysteín) sú veľmi účinné inhibítory, zatiaľ čo thioly, ktoré obsahujú negatívne nabitú karboxylovú skupinu sú slabými inhibítormi. Nevýhodou je nešpecifita ich reakcie (Upadhyay, 2012).

Merkaptoetanol vo forme tiolátového aniónu je tiež kompetitívnym inhibítorom ureasy. Naviaže sa do aktívneho centra enzýmu a nahradí v ňom štyri molekuly vody a hydroxidovú skupinu (Krajewska, 2009).

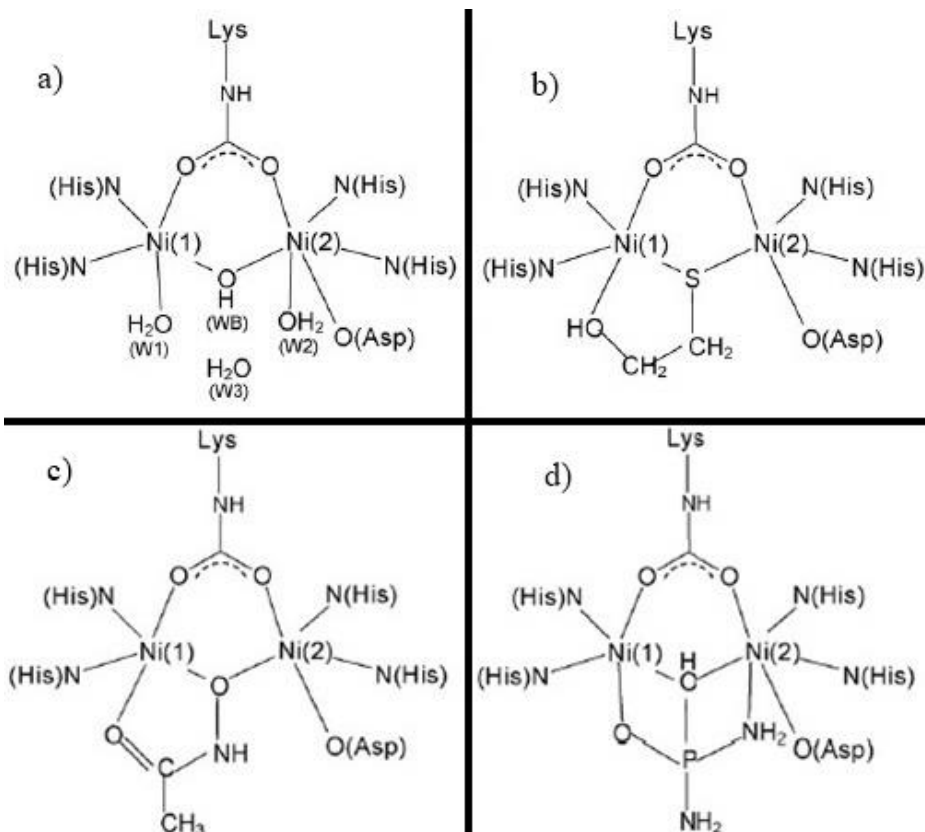
3.4.2 Inhibítory, ktoré ovplyvňujú mechanizmus reakcie

Nesubstrátové inhibítory nemajú štruktúrnu podobnosť so substrátom enzýmu (močovinou). Sú vytvárané pre interferenciu s enzýmovým katalytickým mechanizmom vedúcou k inaktivácii enzýmu. Tieto zlúčeniny sú nazývané aj inhibítory založené na mechanizme. Fosfodiamidy a imidazoly sú takými inhibítormi. Enzým premení tieto látky na reaktívnu formu, čo inaktivuje cieľový enzým pred jeho uvoľnením z aktívneho miesta (Upadhyay, 2012).

Aj napriek tomu, že tieto inhibítory sú potenciálnymi liečivami, nie sú do klinického používania zavedené inhibítory na báze inaktivácie mechanizmu reakcie.

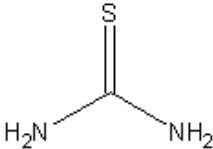
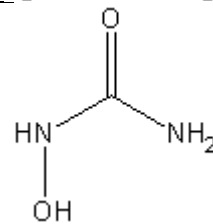
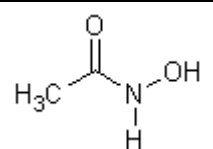
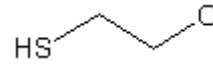
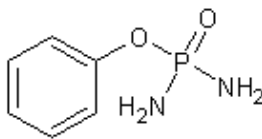
Ureasa z *C. ensiformis* bola reversibilne inhibovaná fosfoamidom ($K_i = 1,9$ mM, disociačná konštanta $8,4 \times 10^{-4}$ s). Inhibícia pomocou N acyl fosforovaných triamidov a fenylfosfodiamidov bola účinná s rovnakou disociačnou konštantou u ureasy z *C. ensiformis* a *K. aerogenes*. Fenylfosfodiamidy sú pomalý a pevne sa viažúci inhibítor

s vyššou afinitou k rastlinným ureasam. Monoamid kyseliny fosforečnej a fenyfosfodiamidy vytvárajú chelátový komplex v aktívnom centre enzýmu (Blakeley a Zerner, 1984).



Obr. 2: Aktívne centrum ureasy: a) bez inhibície, b) inhibované merkaptóetanolom, c) kyselinou acetohydroxámovou, d) fenyfosfodiamidom (upravené podľa Krajewska, 2009).

Tab. 2: Stručný prehľad inhibítorov ureasy.

a) Štruktúrne analógy substrátu	
tiomočovina	
hydroxymočovina	
acetohydroxámová kyselina	
merkptoetanol	
b) Inhibítory ovplyvňujúce mechanizmus reakcie	
fenylfosfodiamid	

3.5 Purifikácia ureasy

Ureasa sa purifikuje pomocou rôznych postupov, najčastejšie pomocou zrážacích reakcií (soli, organické rozpúšťadlá, atď.) a pomocou chromatografických metód (iónovo-výmenná, gelová filtrácia, afinitná, absorbčná) (Lynn, 1967).

Pri purifikácii ureasy je prvým krokom homogenizácia enzýmu pomocou extrakčného pufru. Homogenát je centrifugovaný a supernatant je zakoncentrovaný zrážaním síranom amónnym alebo pomocou acetónu (Das *et al.*, 2002).

3.5.1 Kryštalizácia

Kryštalizácia nie je často používaná metóda pri purifikácii enzýmov, ale pokiaľ sú splnené niektoré podmienky, ako napríklad maximálna čistota produktu, minimum reakčných krokov, vysoká katalytická aktivita enzýmu a krátka doba spracovania, potom je to vhodná a najmä lacnejšia metóda pri industriálnej výrobe enzýmov. Pri purifikácii ureasy z *Canavalia ensiformis* sú všetky tieto podmienky splnené. Purifikačný proces sa skladá z dvoch hlavných krokov: extrakcia a kryštalizácia. Extrakcia prebiehala pridaním acetónu. Enzým bol kryštalizovaný ochladením na teplotu 4° C. Purifikačný proces prebiehal v prítomnosti merkaptoetanolu, síranu nikelnatého a etyléndiamíntetraoctovej kyseliny (Weber *et al.*, 2008).

3.5.2 Chromatografické metódy

Bežnou chromatografickou metódou pri purifikácii ureasy je iónovo-výmenná chromatografia, kde býva ako anex použitá dietylamoetylcelulosa (DEAE celulosa). Ureasa je zachytená v kolóne a zmenou gradientu mobilnej fáze (napr. chloridu draselného) dochádza k elúcii enzýmu (Das *et al.*, 2002).

Medzi ďalšie často používané metódy patrí gélová filtrácia, kde sú molekuly separované na základe rôznej veľkosti. Pre purifikáciu ureasy sa používa Sephadex. Ďalšou metódou je absorpčná chromatografia, kde sa často využíva ako sorbent hydroxyapatit (Mahadevan *et al.*, 1976). Použitá môže byť aj jednokroková afinitná chromatografia na agarosovej kolóne substituovanej hydroxymočovinou (Bassanio *et al.*, 1974).

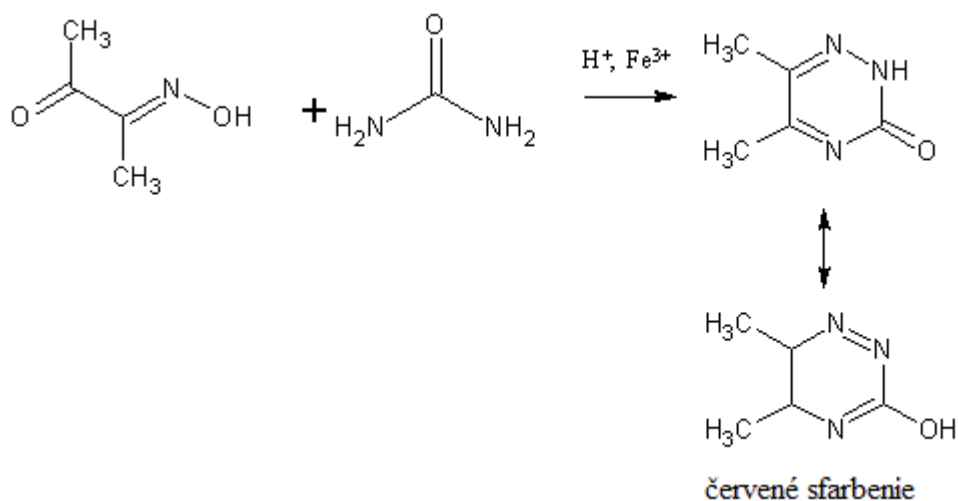
3.6 Metódy stanovenia aktivity ureasy

Aktivita enzýmov sa stanovuje dvomi spôsobmi a to stanovenie úbytku substrátu alebo stanovenie množstva vznikajúceho produktu. Produkty, ktorých množstvo sa dá sledovať sú amónne ióny a oxid uhličitý.

3.6.1 Stanovenie aktivity ureasy na základe úbytku substrátu

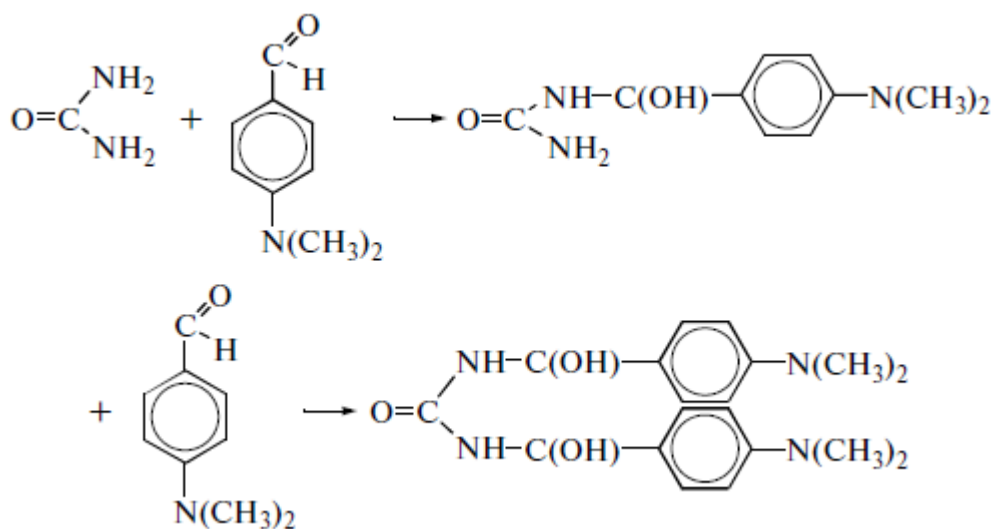
Úbytok substrátu pri reakcii je dôkazom toho, že enzýmom katalyzovaná reakcia prebieha. Jednou z metód stanovenia koncentrácie močoviny je stanovenie pomocou diacetylmonoximu. Močovina tvorí s diacetylmonoximom v silne kyslom prostredí za prítomnosti tiosemikarbazidu tmavo červený sfarbený komplex vhodný

k spektrofotometrickému stanoveniu pri absorpčnom maxime diacetylmonoximu 480-485 nm (Rosenthal, 1955).



Obr. 3: Reakcia diacetylmonoximu s močovinou (upravené podľa Rosenthal, 1955).

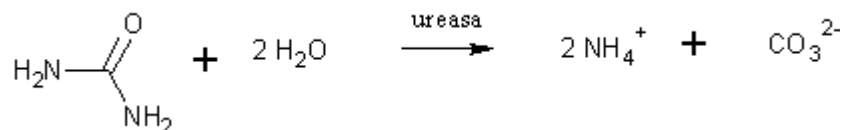
Stanovenie pomocou *p*-dimethylaminobenzaldehydu (DMABA) v prítomnosti kyseliny chlorovodíkovej je ďalšou metódou vhodnou k stanoveniu koncentrácie močoviny. DMABA vytvára s močovinou žltú zlúčeninu a má detekčný limit 2 mg.l⁻¹ (Basova *et al.*, 2011)



Obr. 4: Reakcia *p*-dimethylaminobenzaldehydu s močovinou za vzniku žltého sfarbenia (Basova *et al*, 2011).

3.6.2 Stanovenie aktivity ureasy na základe množstva vznikajúceho produktu

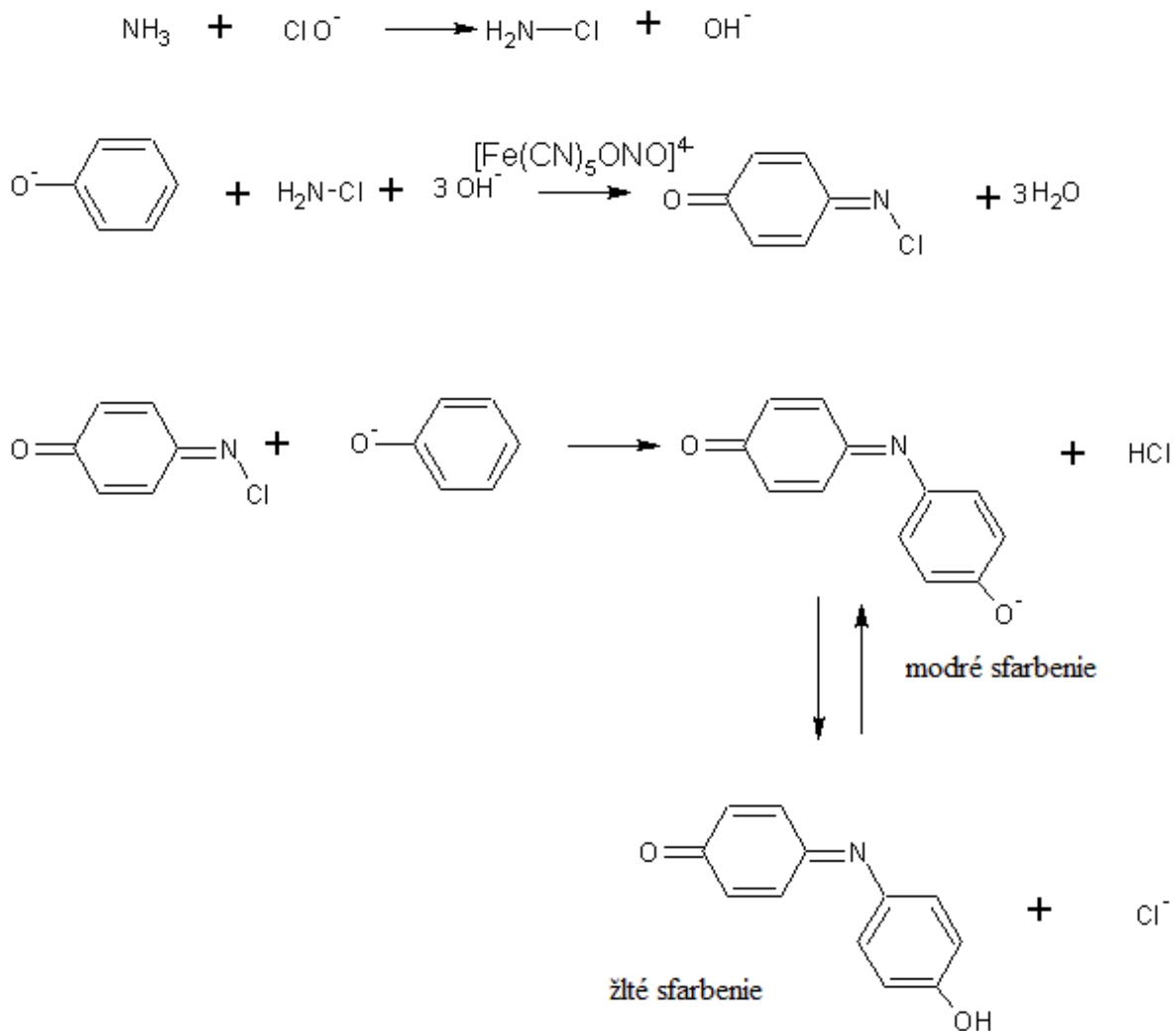
Aktivita ureasy sa môže stanoviť aj detekciou vznikajúceho produktu. V prípade ureasy je produktom katalytickej reakcie oxid uhličitý a amónne ióny.



Obr. 5: Hydrolýza močoviny ureasou.

Vznik amónnych iónov a ich množstvo sa určuje pomocou Nesslerovho činidla. Nesslerovo činidlo je tetrajodoortuťnatan draselný, ktorý detekuje už malé množstvá vznikajúcich amónnych iónov meniacim sa sfarbením a vznikom hnedo-žltej zrazeniny. Spektrofotometricky sa potom stanoví absorbancia sfarbenia pri absorpčnom maxime 400-435 nm (Francis *et al*, 2002).

Ďalšou metódou je reakcia amoniaku s fenolom a chlórnanom za vzniku modrého sfarbenia v prítomnosti nitritopentakyanoželezitého komplexu a detekuje sa v UV oblasti spektra (Weatherburn, 1967).



Obr. 6: Reakcia amoniaku s chlórnanom a fenolom (upravené podľa Weatherburn, 1967).

Metóda stanovenia amónnych iónov iónovo-selektívnou elektródou je založená na vytesnení amoniaku z roztoku silnou zásadou následne prechádza medzi pórmí membrány do vnútorného prostredia, kde dôjde k zmene potenciálu elektródy. Z hodnôt potenciálu štandardných roztokov sa metódou kalibračnej priamky vyhodnotia potenciály a vypočíta koncentrácia amónnych iónov (Francis *et al*, 2002).

3.7. Imobilizácia ureasy

Využitie rozpustných enzýmov v praxi má veľa nevýhod, ako sú vysoká cena enzýmov, nízka stabilita a problémy s oddelením produktu od enzýmu. Riešením týchto nevýhod je často imobilizácia enzýmu na vhodný pevný nosič. Imobilizácia je proces, ktorý prevádza rozpustný enzým na nerozpustnú formu. Výhodou imobilizácie enzýmov na pevné nosiče je zníženie finančných nákladov, pretože je možné enzým použiť opakovane, ale aj zjednodušenie práce s enzýmami, nakoľko sa produkt od enzýmu dá ľahko odstrániť. Vo väčšine prípadov je výhodou aj možnosť vykonávania enzýmových procesov kontinuálne, či zvýšenie teplotnej a skladovacej stability enzýmu. Nevýhodou pri imobilizácii enzýmu je v mnohých prípadoch strata katalytickej aktivity a zníženie afinity enzýmu k substrátu (Brady a Jordaan, 2009).

Voľba vhodných materiálov nosičov je pri týchto technikách široká, môžu to byť organické a anorganické látky, prírodné a syntetické materiály v podobe magnetických častíc, membrán, vlákien, kapsúl. Obecne sa materiály pre nosiče delia na porézne a neporézne. Porézne nosiče sú preferovanejšie, pretože väčší povrch zabezpečuje lepšiu kapacitu väzby enzýmu a zároveň imobilizovaný enzým je chránený od prostredia, čiže je stabilizovaný od interakcií s inými molekulami, zabraňuje sa agregácii, autolýze či kontaktu s hydrofóbnym povrchom (Mateo *et al*, 2007). Porézne nosiče by mali mať kontrolovanú veľkosť a distribúciu pórov pre optimalizáciu kapacity a prietokových vlastností systému. Do tejto skupiny patrí napr. pórovité sklo, silikagél, hydroxyapatit. Neporézne nosiče majú difúzne obmedzenie, ale zároveň veľkú kapacitu väzby enzýmu (napr. magnetické častice) (Brena a Batista-Viera, 2006).

3.7.1. Metódy imobilizácie

Zachytenie je metóda založená na zachytení enzýmu v polymérnej sieti, čo dovoľuje substrátu a produktom prechádzať, ale enzým ostáva zachytený. Od ostatných metód sa líši tým, že enzým nie je viazaný na maticu alebo membránu. K zachyteniu dochádza rôznymi metódami napríklad zachytenie na géloch, zachytením na vláknach a mikroenkapsuláciou. Využitie v praxi je obmedzené výberom správnej veľkosti pórov tak, aby enzým ostával zachytený a zároveň substrát a produkt mohli voľne prechádzať (Brena a Batista-Viera, 2006).

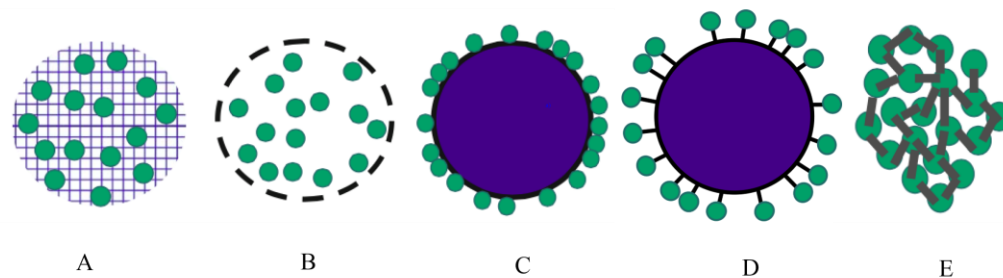
Absorpcia je jednoduchá metóda imobilizácie, založená na povrchovej interakcii medzi enzýmom a nosičom. Pri fyzikálnej absorpcii dochádza k pripojeniu enzýmu vodíkovými väzbami, Van der Waalsovými interakciami či hydrofóbnymi interakciami. Táto metóda imobilizácie je ekonomicky atraktívna, takto viazaný enzým si zachováva katalytickú aktivitu. Problémom nestabilné spojenie medzi nosičom a enzýmom z dôvodu slabých interakcií (Brena a Batista-Viera, 2006).

Podobne ako pri zachytení enkapsulácia ochraňuje enzým pred vonkajším prostredím, ale má obmedzené využitie pre veľké substráty z dôvodu obmedzenia prenosu hmoty cez polopriepustnú membránu. (Brady a Jordaan, 2009) Nová metóda enkapsulácie je založená na zmiešaní β -glukuronidasy zmiešanej s karboxymetyl celulosou a chloridom vápenatým. Zmes bola vytlačená cez ihlu do 1% roztoku alginátu. V tejto zmesi vznikajú kapsule a zároveň vhodné prostredie pre enzýmy. (Zhang *et al.*, 2008)

Pre metódu imobilizácie zosieťovaním nie sú potrebné nosiče, keďže dochádza ku spájaniu enzýmov navzájom a vzniku trojdimenzionálnej štruktúry. Dochádza k tvorbe kovalentnej väzby s vhodným funkčným činidlom napr. glutaraldehydom, ktoré vytvára väzby medzi NH_2 skupinami enzýmov (Brady a Jordaan, 2009).

Najčastejšie používanou metódou imobilizácie je kovalentná väzba, kde dochádza k tvorbe silnej väzby medzi nosičom a enzýmom, čím sa redukuje riziko uvoľnenia enzýmu do roztoku. Pri tejto metóde dochádza k chemickej reakcii medzi funkčnou skupinou na nosiči a proteínom. Vhodným materiálom sú polysacharidové polyméry ako napr. celulóza, škrob, dextrans, agarosa (Mateo *et al.*, 2007).

Obvyklou funkčnou skupinou na celulóze je OH skupina, ktorá môže byť chemicky modifikovaná na napr. AE (aminoetyl) celulóza, CM (karboxymetyl) celulóza, DEAE (dietylaminoetyl) celulóza. Funkčné skupiny na nosiči musia byť aktivované vhodným špecifickým činidlom, aby došlo k tvorbe väzby medzi nosičom a enzýmom. Využíva sa aktivácia pomocou karbodiimidu, pokiaľ nosič obsahuje karboxylové skupiny a aktivácia pomocou brómkyanu, ak nosič obsahuje hydroxylové skupiny (Bickerstaff, 1997).



Obr. 7: Metódy imobilizácie enzýmov. A) zachytenie, B) zapúzdrenie, C) absorpcia, D) kovalentná väzba, E) zosieťovanie (upravené podľa Brady a Jordaan, 2009).

3.7.2 Imobilizácia ureasy

V dôsledku rastúceho záujmu o využívanie imobilizovaných enzýmov v oblasti biotechnológie a medicíny sa pripravujú stále nové metódy imobilizácie ureasy. Ureasa bola imobilizovaná na veľké množstvo nosičov, avšak nie vždy spĺňajú jej vlastnosti po imobilizácii podmienky pre praktické využitie (Pogoryliy *et al*, 2013).

Ureasa bola imobilizovaná na porózny dialdehyd škrobu rôznymi metódami (absorpciou a kovalentnou väzbou. Výhodou tejto metódy je, že škrob je ľahko obnoviteľný, odbúrateľný a lacný. Imobilizácia na dialdehyd škrobu je vhodným základom pre prípravu biosenzorov a bioreaktorov (Luo a Fu, 2010).

Polysulfónové membrány sú vhodné nosiče enzýmov vďaka ich vysokej termálnej, chemickej a biologickej stabilite. Ďalšou výhodou je možnosť zavedenia rôznych funkčných skupín na polymérny reťazec napríklad amino skupín. Ureasa imobilizovaná na

membráne môže byť využitá k odstráneniu močoviny z krvi v regeneračnom systéme dialyzátu v umelej obličke (Pozniak *et al.*, 1995).

Biopolyméry ako chitosan a alginát sú vhodné matrice pre imobilizáciu enzýmov. Chitosanové a alginátové častice vznikli pridaním hydroxidu draselného k roztoku chitosanu alebo alginátu a následne boli aktivované glutaraldehydom. Takto imobilizovaná ureasa je vhodná pre stanovenie množstva močoviny v krvi (Kumar *et al.*, 2009).

Ureasa bola imobilizovaná na magnetitové častice pokryté funkčnými polysiloxánovými vrstvami. Často pri imobilizácii ureasy na magnetické častice dochádza k zníženiu aktivity pri skladovaní vzoriek, avšak pri imobilizácii na častice pokryté N-[3-trimetoxypropyl] ethylendiamínom nedošlo počas 42 dní k poklesu aktivity. Jednoduché zaobchádzanie s magnetickými časticami a vhodné vlastnosti enzýmu naviazaného na týchto časticách sú predpokladom na ich využitie v magneticky riadenej biokatalýze (Pogoryliy *et al.*, 2013).

Imobilizácia na magnetické nanočastice je spojená s mnohými výhodami ako napr. nízka cena, recyklovateľnosť, netoxičita, ľahké oddelenie enzýmu od produktu a veľmi často dochádza k zlepšeniu stability enzýmu a neporušeniu katalytickej aktivity. Jednou z metód je imobilizácia ureasy na magnetitové nanočastice stabilizované fosfátom a funkcionalizované pomocou N-fosfonometyliminodioctovej kyseliny (PMIDA). Ureasa bola imobilizovaná po aktivácii častíc pomocou karbodiimidu. Enzým imobilizovaný na nanočasticách je možné využiť vo všetkých biotechnologických procesoch a medicínskych aplikáciách. (Sahoo *et al.*, 2011).

Tab. 3: Prehľad imobilizácie ureasy rôznymi metódami (Krajewska, 2009)

Ureasa	Nosič	Metóda	Literatúra
<i>Canavalia ensiformis</i>	polyakrilonitrilové duté vlákna	kovalentná väzba	(Lin a Yang, 2003)
<i>Cajanus cajan</i>	alkyl aminové sklenené častice	kovalentná väzba	(Reddy a Kayatsha, 2006)
<i>Canavalia ensiformis</i>	hydroxyapatit	adsorpcia	(Marzadon <i>et al.</i> , 1998)
<i>Cajanus cajan</i>	DEAE celulosový papier	adsorpcia	(Reddy <i>et al.</i> , 2004)
<i>Dalichos biflorus</i>	porózný silikón	adsorpcia	(Chauthari <i>et al.</i> , 2005)
<i>Canavalia ensiformis</i>	nylonové kapsule	zapúzdrenie	(Sundaram, 1973)
<i>Helicobacter pylori</i>	hydrofóbne modifikované alginátové kapsule	zapúzdrenie	(Leonard, <i>et al.</i> , 2004)
<i>Citrullus vulgaris</i>	alginátové kapsule	zapúzdrenie	(Prakash a Upadhyay, 2006)
<i>Canavalia ensiformis</i>	polyakrilamidový gel spojený s N,N'-bisakrylamidom	zachytenie	(Rupcich a Brennan, 2003)
<i>Cajanus cajan</i>	agarový gel	zachytenie	(Mullagalapalli <i>et al.</i> , 2007)
<i>Bacillus pasteurii</i>	polyuretanová pena	zachytenie	(Bachmeier <i>et al.</i> , 2002)
<i>Canavalia ensiformis</i>	BSA film zosieťovaný s GA na polyuretanovej pene	zosieťovanie	(Huang a Cheng, 1992)

3.8 Aplikácia ureasy

Odstránenie močoviny z vodných roztokov je problém riešený v mnohých oblastiach najmä v agrikultúre, priemysle produkujúcom močovinu, v prírode, produkcii potravín a medicíne. Ročne je produkované približne 1×10^8 ton močoviny a z tohto množstva je 90 % používaných ako hnojivo. V priemysle produkujúcom močovinu v odpadoch (0,2 - 2 %) pred vypustením týchto odpadov do prostredia musí byť množstvo močoviny redukované na 0,006 %. V životnom prostredí sa však močovina nevyskytuje len z odpadov, ale i iných zdrojov, ako napríklad z produkcie zvierat a domácností. Aj napriek tomu, že má močovina nízku eko-toxicitu, aj nepriame dlhodobé pôsobenie môže spôsobiť eutrofikáciu a znečistenie podzemných vôd. Následnou hydrolýzou močoviny dochádza k nadmernej produkcii amoniaku, z čoho vyplýva zvýšenie bazicity, toxicity a uvoľňovanie výparov do ovzdušia. Preto je veľmi dôležité odstraňovať močovinu vhodnými technikami (Krajewska, 2009).

Močovina je nepolárna zlúčenina, dobre rozpustná a stabilná vo vode a vykazuje afinitu k dostupným rozpúšťadlám, preto je náročné odstrániť ju z vodných roztokov. Priemyselne je používaná metóda neenzymatickej hydrolýzy a metóda založená na biologickej konverzii dusíku z močoviny na dusík. Prvá metóda vyžaduje vysoké teploty a tlaky pri prevedení, druhá má nevýhodu v nestabilite mikrobiálneho prostredia. Obidve sú cenovo náročné (Krajewska, 2009).

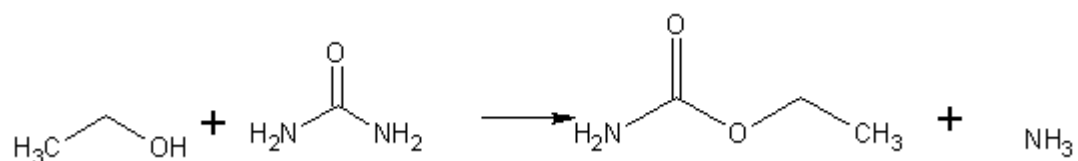
V medicínalnom prostredí sa močovina odstraňuje pomocou dialýzy pomocou umelej obličky. Iné metódy sú založené na elektrochemickom a katalytickom rozklade, oxidácii zo silnými činidlami a adsorpcia sú v dnešnej dobe laboratórne skúmané (Sujoy a Aparna, 2013).

V tomto kontexte je veľmi užitočné využitie enzýmovej hydrolýzy pomocou ureasy. Táto metóda bola skúmaná v mnohých využitíach, ale najmä na odstránenie močoviny z krvi. Detoxifikačný proces sa využíva pre odstránenie uraemických toxínov z krvi, kde je koncentrácia močoviny redukovaná z 20 - 50 mmol.l^{-1} na menej ako 10 mmol.l^{-1} (Della Ciana, 1996).

Medzi ďalšie aplikácie patrí odstránenie močoviny z moči počas prípravy vzorky pre skúmanie vrodených metabolických porúch. Táto metóda je založená na skúmaní aminokyselín, organických kyselín, cukrov a nukleových kyselín pomocou GC/MS analýzy v predpripravenej vzorke moču. Takto môžu byť zistené vrodené metabolické poruchy novorodenciat, pokiaľ sú včas zistené dá sa predísť klinickým následkom, ako napríklad mentálnej retardácii (Kuhara, 2002).

Hydrolýza močoviny môže prebiehať za akýchkoľvek podmienok. Príkladom je zariadenie, v ktorom sa používa ureasa pre obnovu vody pri dlhých letoch v raketách či na vesmírnych staniciach (Krajewska, 2009).

V súčasnosti je veľký záujem zabrániť prítomnosti etylkarbamátu (karcinogénu) vo víne, ktorý vzniká reakciou etanolu s močovinou počas skladovania vína. Ako bezpečnostné opatrenie sa pridávajú do vína mŕtve bunky obsahujúce kyslé ureasy, ktoré odstraňujú močovinu z vína, ako potenciálny zdroj etylkarbamátu a tým zabraňujú jeho vytvoreniu (Sujoy a Aparna, 2013)



Obr. 8: Vznik etylkarbamátu reakciou etanolu s močovinou.

Analytická aplikácia ureasy je zameraná na kvantifikáciu močoviny. Hlavne v medicínalnej oblasti avšak rýchle a spoľahlivé metódy, ktorými sa dá určiť koncentrácia močoviny sú potrebné i v oblasti potravinárstva, ekológie a priemyslu (Krajewska, 2009).

V medicínalnej oblasti je analyzovaná močovina najmä v krvi a v moči. Močovina je hlavným indikátorom funkcie pečene a obličiek, ale taktiež test močoviny v krvi slúži pre kontrolu hemodialýzy (Sujoy a Aparna, 2013).

Medzi priame metódy kvantifikácie močoviny patrí reakcia s diacetylmonoximom, medzi nepriame metódy patria tie, kde sa využíva ureasa. Ich výhoda je v nenáročnom

prevedení. Močovina je kvantifikovaná pomocou merania produktov hydrolyzy prípadne meraním efektov vyskytujúcich sa pri reakcii (zmena pH, zmena konduktivity). Vznikajúci amoniak môže byť stanovovaný kolorimetricky pomocou Nesslerovho činidla prípadne indofenolu. (Francis *et al*, 2002).

3.8.1 Ďalšie možnosti využitia ureasy

Vyvolaním katabolizmu močoviny v medzi tkanivovom priestore obklopujúcom rakovinové bunky, činnosťou ureasy dochádza k produkcii metabolitov (amoniaku a hydroxidových iónov). Tieto produkty činnosti ureasy stresujú rakovinové bunky priamou toxicitou. Amoniak je toxický a rozklad močoviny zvyšuje pH. Zvýšená bazicita neutralizuje nepriaznivý efekt kyslého mikroprostredia na slabo bázické liečivá a zvyšuje účinnosť chemoterapeutík (Sujoy a Aparna, 2009).

Cucumis melo je rastlinný zdroj ureasy a taktiež vykazuje diuretický efekt. Využíva sa pre zníženie krvného tlaku. Zvyšuje vylučovanie moču z tela a množstvo sodíku v moči (Sujoy a Aparna, 2009).

Ureasa z *C. ensiformis* bol prvý kryštalizovaný enzým, ktorý je možné použiť ako antigén, má schopnosť stimulovať silnú imunoglobulínovú odpoveď. Enzým bol používaný ako vakcína založená na inhibícii katalytickej aktivity pre vysvetlenie mechanizmu ochrany proti infekcii *H. pylori*, ktorá spôsobuje vznik žalúdočných vredov a môže viesť k rakovine žalúdka (Sujoy a Aparna, 2013).

3.9 Aplikácia imobilizovanej ureasy

Aplikácia dutých vlákien je široká najmä pre imobilizáciu enzýmov pre biokatalytické systémy a v medicínskej terapii. Ureasa bola imobilizovaná na povrch polyakrylonitrilového dutého vlákna kovalentnou väzbou v prítomnosti glutaraldehydu. Táto metóda bola vytvorená pre odstránenie močoviny z krvi v dialyzačnom prístroji a ukázalo sa, že močovina bola z krvi odstránená dva krát rýchlejšie, ako pri použití klasického dialyzačného prístroja (Lin a Yang, 2003).

Ureasa z *Cajanus cajan* bola imobilizovaná zosieťovaním na alkylamínové sklo aktiváciou s glutaraldehydom. Imobilizovaná ureasa bola pripojená k pH elektróde a bola

použitá pre potenciometrické stanovenie močoviny vo vzorkách krvi (Reddy a Kayastha, 2006).

Ureasa z *Cajanus cajan* bola taktiež imobilizovaná na agar, ktorý bol následne vyformovaný do tabliet. Takto imobilizovaná ureasa bola použitá pre stanovenie močoviny v krvi pacientov so zníženou funkciou obličiek či urémiou. Takto imobilizovaná ureasa nie je nákladná na prípravu, má dobrú stabilitu a môže byť použitá v bioreaktoroch (Mulagalapalli *et al.*, 2007).

Medzi metódy stanovenia koncentrácie močoviny v mlieku patrí špecifická enzymovo vodivostná metóda Ureakvant. Prístroj sa skladá z temperovacieho bloku, dvoch prietokových elektród a komory s enzýmovým reaktorom. Pomocou náberovej pipety a peristaltickej pumpy prechádza vzorka cez temperovací blok a enzýmový reaktor, na ktorého vnútornej vrstve je imobilizovaná ureasa. Vznikajúce produkty reakcie spôsobujú rast elektrickej vodivosti (rýchlosť rastu je úmerná koncentrácii močoviny v mlieku). Prístroj sa kalibruje na päť štandardov mlieka so známou koncentráciou močoviny (Hanuš *et al.*, 2008).

4. Experimentálna časť

4.1 Materiály

Močovina (Lach-Ner s.r.o, Česká republika)

Ureasa z *Canavalia ensiformis* (Fluka, Švajčiarsko)

Magnetické celulosové mikročastice MG CM 100 (Iontosorb, ČR)

EDC.HCl (Fluka, Švajčiarsko)

N-hydroxysukcinimid (NHS) (Sigma Aldrich, USA)

Dihydrogénfosforečnan draselný (Sigma Aldrich, USA)

Hydrogénfosforečnan draselný (Sigma Aldrich, USA)

4.2 Prístroje

Analytické váhy (Sartorius, Nemecko)

Elektromagnetická miešačka (IKA, Nemecko)

Programovateľný rotátor (Biosan, Litva)

Vortex (IKA, Nemecko)

Digitálny pH meter (WTW, Nemecko)

Automatické pipety 1 µl- 5 ml (Eppendorf, Nemecko)

Spektrofotometer Biochrom (WPA) (Biochrom Ltd., Veľká Británia)

4.3 Metódy

4.3.1 Imobilizácia ureasy

Ureasa bola imobilizovaná na magnetické celulosové mikročastice MG CM 100. Navážených bolo 5 mg magnetických mikročastíc a pridalo sa 100 μl NHS ($0,025 \text{ mol.l}^{-1}$) a 100 μl CDI ($0,013 \text{ mol.l}^{-1}$). K roztoku sa pridalo 200 μl ureasy (5 mg.ml^{-1}) vo fosfátovom pufre ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 6). Po 24 hodinách boli častice s imobilizovanou ureasou premyté sedem krát fosfátovým pufrom ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 6) .

4.3.2 Stanovenie aktivity ureasy

Aktivita ureasy bola stanovovaná spektrofotometricky pomocou Nesslerovho činidla. Bol pripravený roztok močoviny o koncentrácii $0,7 \text{ mol.l}^{-1}$. Do 2 ml eppendorfky bol odpipetovaný 1 ml močoviny ($0,35 \text{ mol.l}^{-1}$), 1 ml fosfátového pufru ($0,05 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 7) a bolo pridaných 5 mg magnetických mikročastíc s imobilizovanou ureasou. Za stáleho miešania prebiehala reakcia 5 minút a v časovom intervale 1 minúta bolo odobratých 20 μl zmesi po usadení častíc na dne eppendorfky (pomocou magnetu) a pridaných k 50 μl Nesslerovho činidla. Po 10 minútach boli vzorky doplnené do 1 ml destilovanou vodou. Merala sa absorbancia pri 420 nm.

4.3.3 Stanovenie množstva imobilizovaného enzýmu

Množstvo imobilizovaného enzýmu bolo stanovené pomocou Bradfordovej metódy na mikrodštičkách. Pred imobilizáciou bolo odobraných 50 μl zo zmesi, ktorá obsahovala 100 μl NHS ($0,025 \text{ mol.l}^{-1}$), 100 μl CDI ($0,013 \text{ mol.l}^{-1}$), 200 μl ureasy (5 mg.ml^{-1}) a po imobilizácii bolo odobraných 50 μl zo zmesi 100 μl NHS ($0,025 \text{ mol.l}^{-1}$), 100 μl CDI ($0,013 \text{ mol.l}^{-1}$), 200 μl ureasy (5 mg.ml^{-1}). Do jamiek bol odpipetovaný ako slepý pokus 50 μl destilovanej vody a 200 μl Bradfordovej činidla (riedeného v pomere 1:4). Do troch jamiek bolo odpipetovaných 50 μl vzorky pred imobilizáciou a 200 μl Bradfordovej činidla a do troch jamiek bolo odpipetovaných 50 μl vzorky po imobilizácii 200 μl Bradfordovej činidla. Po 5 minútach bola odmeraná absorbancia pri 595 nm. Z rozdielu nameraných absorbancií pred a po imobilizácii ureasy bolo zistené množstvo imobilizovaného enzýmu.

4.3.4 Stanovenie špecifickej aktivity ureasy

Špecifická aktivita ureasy bola stanovená z merania aktivity a obsahu proteínov vo vzorke Bradfordovej metódou. Špecifická aktivita je vyjadrená v nkat. mg^{-1} .

4.3.5 Funkčná časová stabilita ureasy

Aktivita voľnej a viazanej ureasy pri stanovení funkčnej stability bola premeriavaná každé 2 hodiny po dobu 48 hodín. Vzorky boli skladované a meranie prebiehalo pri laboratórnej teplote. Pri meraní aktivity voľnej ureasy bol pripravený roztok o koncentrácii 1 mg.ml^{-1} . Reakčná zmes obsahovala 1 ml roztoku močoviny ($0,35 \text{ mol.l}^{-1}$), $950 \mu\text{l}$ fosfátového pufru ($0,05 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 7) a $50 \mu\text{l}$ roztoku voľnej ureasy. Reakcia prebiehala za stáleho premiešavania 5 minút a po každej minúte bolo odobratých $20 \mu\text{l}$ vzorky a pridaných k $50 \mu\text{l}$ Nesslerovho činidla. Po 10 minútach boli vzorky doplnené na objem 1 ml destilovanou vodou. Pri meraní aktivity imobilizovanej ureasy bol odpipetovaný 1 ml močoviny ($0,35 \text{ mol.l}^{-1}$), 1 ml fosfátového pufru ($0,05 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 7) a bolo pridaných 5 mg magnetických mikročastíc s imobilizovanou ureasou. Za stáleho miešania prebiehala reakcia 5 minút a v časovom intervale 1 minúta bolo odobratých $20 \mu\text{l}$ zmesi po usadení častíc na dne eppendorfky (pomocou magnetu) a pridaných k $50 \mu\text{l}$ Nesslerovho činidla. Každé meranie bolo opakované 3 krát. Merala sa absorbancia pri 420 nm.

4.3.6 Skladovacia stabilita ureasy

Stabilita voľnej a viazanej ureasy pri skladovaní bola stanovovaná tak, že bola premeriavaná aktivita každý mesiac po dobu 4 mesiacov. Vzorky boli skladované v mrazničke.

4.3.7 Operačná stabilita imobilizovanej ureasy

Pre zistenie operačnej stability imobilizovanej ureasy bola použitá jedna vzorka u ktorej sa opakovane merala aktivita. Pri meraní aktivity imobilizovanej ureasy bol odpipetovaný 1 ml močoviny ($0,35 \text{ mol.l}^{-1}$), 1 ml fosfátového pufru ($0,05 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 7) a bolo pridaných 5 mg častíc s imobilizovanou ureasou. Za stáleho miešania prebiehala reakcia 5 minút a v časovom intervale 1 minúta bolo odobratých $20 \mu\text{l}$ zmesi po usadení častíc na dne eppendorfky (pomocou magnetu) a pridaných k $50 \mu\text{l}$ Nesslerovho činidla. Každé meranie bolo opakované 3 krát. Merala sa absorbancia pri 420 nm. Po premeraní

aktivity bol odstránený substrát a častice s naviazaným enzýmom boli 7 krát premyté fosfátovým pufrom pH 7. Meranie bolo opakované 6 krát.

4.4 Výsledky a diskusia

4.4.1 Stanovenie množstva imobilizovaného enzýmu

Po imobilizácii ureasy na magnetické nosiče boli častice odstránené pomocou magnetu a v supernatante bolo stanovené množstvo proteínov. Z rozdielu koncentrácie proteínov pred a po imobilizácii bolo stanovené množstvo imobilizovaného enzýmu. Na magnetické častice pokryté karboxymetyl celulosou bolo naviazaných 128,42 μg ureasy na 1 mg častíc.

Pri imobilizácii ureasy z *Canavalia ensiformis* na magnetické nanočastice obsahujúce N-fosfometylminodiectovú kyselinu ako ligand sa naviazalo 240 μg ureasy na 1 mg častíc (Sahoo *et al.*, 2013). Imobilizáciou ureasy na paramagnetické polyakroleinové častice bolo množstvo enzýmu imobilizovaného na časticiach 3 μg ureasy na 1 mg častíc (Varlan *et al.*, 1996). Vytvorením vhodných podmienok pri imobilizácii a výberom vhodného nosiča je možné naviazať väčšie množstvo enzýmu na nosič.

4.4.2 Stanovenie špecifickej aktivity ureasy

Špecifická aktivita ureasy bola stanovená zo zmeranej aktivity a obsahu proteínov vo vzorke. Špecifická aktivita voľnej ureasy je 13,99 nkat. mg^{-1} . Špecifická aktivita ureasy imobilizovanej na magnetické nosiče je 3,79 nkat. mg^{-1} . Účinnosť imobilizácie je 27 %.

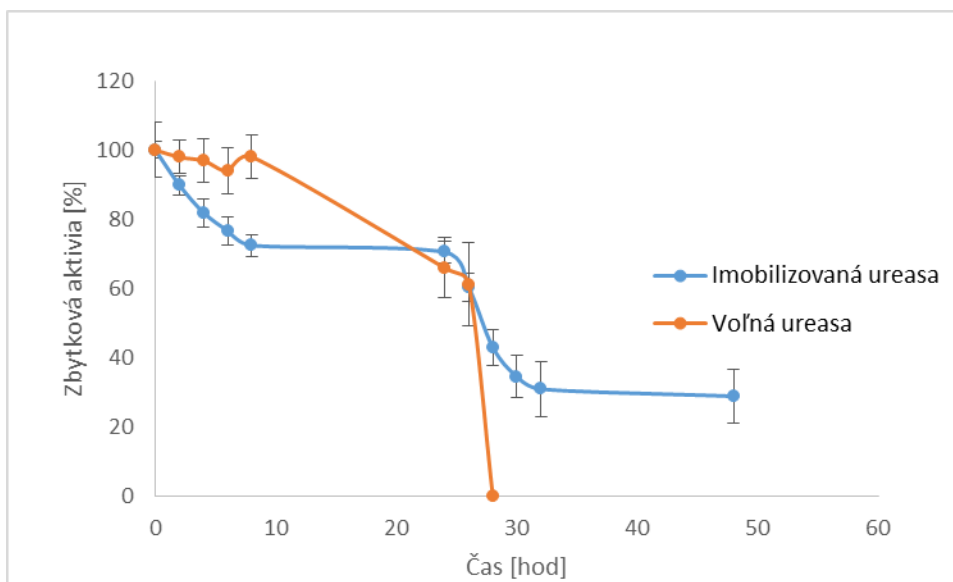
Pri imobilizácii ureasy na magnetitové nanočastice pokryté vrstvou polysiloxánu bola špecifická aktivita imobilizovanej a voľnej ureasy rovnaká (Pogorilyi *et al.*, 2013). Podľa Sahoo *et al.* (2011) si imobilizovaná ureasa zachovala 57 % pôvodnej aktivity voľnej ureasy. Kayastha *et al.* (2009) uvádza, že pri imobilizácii dochádza k zníženiu špecifickej aktivity imobilizovanej ureasy v porovnaní s voľnou ureasou.

4.4.3 Funkčná časová stabilita ureasy

Funkčná časová stabilita ureasy bola stanovená tak, že bola aktivita enzýmu skladovaného za laboratórnej teploty meraná každé dve hodiny po dobu 48 hodín. Z Obr. 9 vyplýva, že voľná ureasa stratila svoju aktivitu po 28 hodinách skladovania pri laboratórnej teplote. Imobilizovaná ureasa si zachovala po 48 hodinách skladovania 29 % svojej pôvodnej aktivity.

Počas skladovania ureasy imobilizovanej na polysulfónovej membráne pri teplote 25° C stratila voľná ureasa aktivitu počas 12 dní, zatiaľ čo imobilizovaná ureasa si zachovala 40 % aktivity po 25 dňoch. Stanovenie prebiehalo v prítomnosti fosfátového pufru s obsahom etyléndiamíntetraoctovej kyseliny pre ochránenie ureasy od deaktivácie v prítomnosti ťažkých kovov (Pozniak *et al.*, 1995). Podľa Pithawala *et al.* (2010) stratila voľná ureasa skladovaním pri laboratórnej teplote svoju aktivitu po mesiaci a ureasa imobilizovaná na parafinovom vosku si zachovala 73 % aktivity. Rozdielna aktivita enzýmu môže byť spôsobená neprítomnosťou etyléndiamíntetraoctovej kyseliny ako chelatačného činidla a imobilizácia ureasy na neporézne nosiče.

Zmerania vyplýva, že ureasa nie je stabilná a nemala by sa skladovať pri laboratórnej teplote. Imobilizáciou ureasy na magnetické celulosové mikročastice došlo k zlepšeniu stability oproti voľnej urease.



Obr. 9: Závislosť zbytkovej aktivity ureasy na čase. Bola použitá ureasa z *Canavalia ensiformis* imobilizovaná na magnetických celulosových mikročasticách. Meranie prebiehalo v prostredí fosfátového pufru ($0,05 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 7). Každé meranie bolo opakované tri krát.

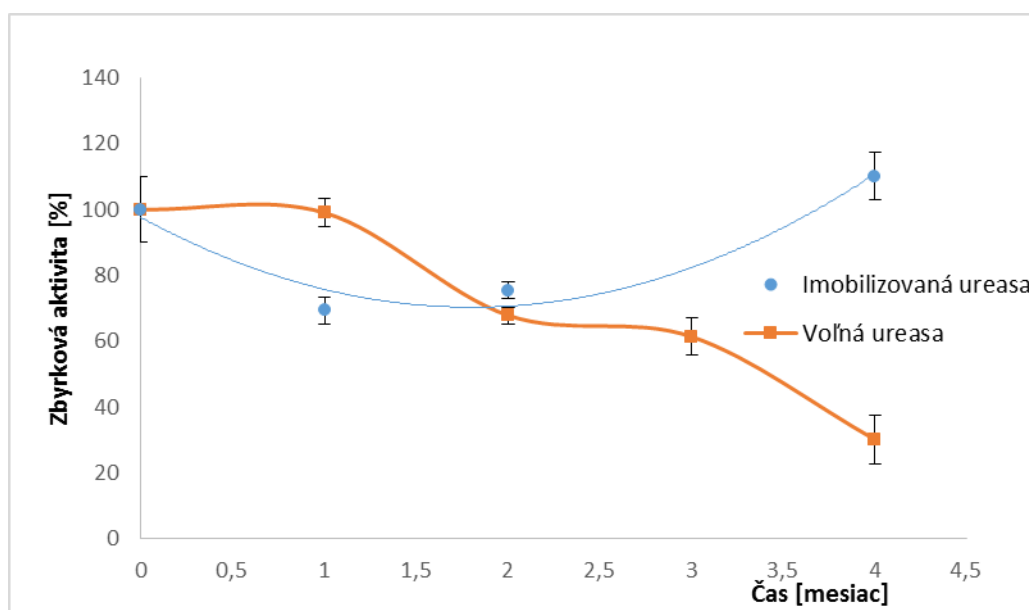
4.4.4 Skladovacia stabilita

Enzymy skladované v roztoku nie sú stabilné a postupne strácajú svoju aktivitu. Skladovacia stabilita ureasy bola stanovená pri skladovaní imobilizovanej ureasy na magnetických celulosových mikročasticách a pri skladovaní voľnej ureasy v prostredí fosfátového pufru ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 7) v mrazničke. Z Obr. 10 závislosti zbytkovej aktivity enzýmu na čase skladovania vyplýva, že voľná ureasa po skladovaní počas štyroch mesiacov si zachovala 30 % svojej pôvodnej aktivity. Zatiaľ čo pri skladovaní ureasy imobilizovanej na magnetických celulosových mikročasticách došlo k nárastu aktivity.

Ureasa z *Canavalia ensiformis* imobilizovaná na magnetických nanočasticách si počas 45 dní skladovania pri teplote 4°C zachovala 70 % svojej pôvodnej aktivity. Voľná ureasa pri skladovaní stratila po tomto čase všetku katalytickú aktivitu (Sahoo *et al.*, 2011). Pri imobilizácii ureasy na magnetické častice s etyléndiamínom ako funkčnou skupinou bolo zistené, že počas 42 dní skladovania nestratili katalytickú aktivitu (Pogorilyi *et al.*, 2013). Ureasa imobilizovaná na paramagnetických polyakroleinových časticách stratila počas 10 mesiacov skladovania vo fosfátovom pufré s obsahom azidu sodného pri teplote

4°C len 10 % svojej katalytickej aktivity (Varlan *et al.*, 1996). Pogorilyi *et al.* (2013) uvádza, že pri imobilizácii ureasy na polysiloxánové matrice dochádza pri skladovaní k nárastu aktivity imobilizovaného enzýmu, čo je spôsobené vytvorením vhodného prostredia pre enzým, ktoré pripomína prostredie v bunke.

Z porovnania výsledkov z viacerých zdrojov vyplýva, že imobilizovaná ureasa sa dá dlhodobo skladovať pri nízkej teplote, zatiaľčo voľná ureasa stráca skladovaním svoju katalytickú aktivitu.



Obr. 10: Závislosť zbytkovej aktivity enzýmu na čase skladovania. Skladovacia stabilita imobilizovanej a voľnej ureasy z *Canavalia ensiformis* uchovávanéj počas štyroch mesiacov v mrazničke v prostredí fosfátového pufru ($0,05 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 7).

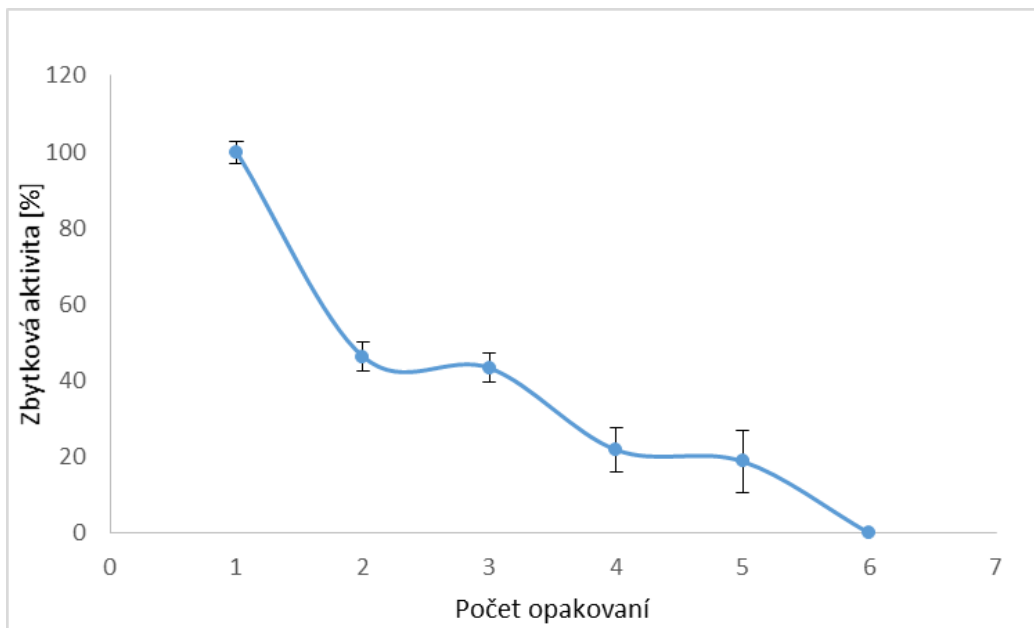
4.4.5 Operačná stabilita ureasy

Aktivita ureasy z *Canavalia ensiformis* imobilizovanej na magnetických celulosových mikročasticiach bola meraná v prítomnosti substrátu močoviny v prostredí fosfátového pufru ($0,05 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 7). Prvé meranie bolo určené ako 100 %. Častice boli premyté a opakovane použité v šiestich meraniach. Percentuálna zmena aktivity v závislosti na počte použití je zobrazená na Obr. 11. Po piatom použití si enzým zachoval 20 % pôvodnej aktivity.

Ureasa z *Canavalia ensiformis* imobilizovaná na magnetitových nanočasticiach stabilizovaných fosfátom a funkcionalizovaných pomocou PMIDA. Takto imobilizovaná ureasa si zachovala po 5 opakovaných použitíach 70 % svojej pôvodnej aktivity (Sahoo *et al.*, 2011). Pri imobilizácii ureasy na polysulfónové membrány klesla pri prvom použití aktivita imobilizovaného enzýmu, po následných 17 opakovaníach sa však aktivita nezmenila a imobilizovaná ureasa si zachovala 60% pôvodnej aktivity. (Pozniak *et al.*, 1995). Ureasa imobilizovaná na chitosanových časticiach si po 14 opakovaných použitíach zachovala 80% pôvodnej aktivity, zatiaľ čo na alginátových časticiach len 54%. Imobilizovaná ureasa bola skladovaná v trisacetátovom pufré pH 7,6 (Kumar *et al.*, 2009).

Opakované použitie enzýmu umožňuje viacnásobné použitie enzýmu a tým možnosť zníženia nákladov na enzymové reakcie, pri ktorých sa imobilizované častice používajú.

Imobilizovanú ureasu je možné po skončení reakcie eliminovať z roztoku, produkt teda hydrolyzovaná močovina nie je znečistená enzýmom. Takto imobilizovanú ureasu je možné použiť pre odstránenie močoviny zo vzorky moču určenej pre stanovenie rôznych metabolitov pomocou GC/MS.



Obr. 11: Závislosť aktivity imobilizovanej ureasy na počte opakovaní.

Bola použitá ureasa z *Canavalia ensiformis* imobilizovaná na magnetických celulosových mikročasticách. Meranie prebiehalo v prostredí fosfátového pufru (0,05 mol.l⁻¹, pH 7). Bolo uskutočnených 6 opakovaní. Pre každú vzorku boli uskutočnené 3 opakovania.

5. Záver

- V tejto práci bola imobilizovaná ureasa z *Canavalia ensiformis* na magnetické celulosové mikročastice karbodiimidovou metódou. Podarilo sa naviazať 128,42 µg ureasy na 1 mg častíc.
- Zo stanovenia špecifickej aktivity vyplýva, že ureasa imobilizovaná na magnetických celulosových mikročasticiach si zachovala 30 % pôvodnej aktivity voľnej ureasy.
- Stanovením funkčnej časovej stability bolo zistené, že ureasa imobilizovaná na magnetických celulosových mikročasticiach si po 48 hodinách zachovala 29 % svojej aktivity. Voľná ureasa stratila svoju aktivitu po 28 hodinách skladovania. Zo stanovenia vyplýva, že ureasa nemôže byť skladovaná pri laboratórnej teplote. Imobilizáciou ureasy na magnetické celulosové mikročastice sa zlepšila stabilita enzýmu v porovnaní s voľnou ureasou.
- Skladovaním ureasy imobilizovanej na magnetických celulosových časticiach v mrazničke sa aktivita počas 4 mesiacov zvýšila. Voľná ureasa si po 4 mesiacoch skladovania v chladničke zachovala 30 % svojej pôvodnej aktivity.
- Po piatich opakovaných použitíach si ureasa imobilizovaná na magnetických celulosových mikročasticiach zachovala 20 % pôvodnej aktivity. Opakované použitie enzýmu môže mať význam v biotechnologických procesoch.
- Ureasa imobilizovaná na magnetické celulosové mikročastice môže mať využitie pri odstránení močoviny z moču pri stanovení metabolitov pomocou GC/MS.

6. Literatúra

Basova E.M., Bulanova M.A., Ivanov V.M. (2011): Photometric detection of urea in natural waters. *Moscow University Chemistry Bulletin* **66**, 345-350.

Bassanio, Wong L., Shobe Ch. R. (1974): Single-step purification of urease by affinity chromatography, *Canadian Journal of Microbiology* **20**, 623-630.

Bickerstaff G.F., Gordon F. (1997): Immobilization of enzymes and cells: Some practical considerations. *Methods in Biotechnology* **1**, 1-11.

Blakeley R.K., Zerner B. (1984): Urea and urease. *Advances in inorganic biochemistry* **6**, 245-283.

Brady D., Jordaan J. (2009): Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnology Letters* **31**, 1639–1650.

Brena B.M., Batista-Viera F. (2006): Immobilization of enzymes. *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells* **22**, 15-30.

Burne R.A., Chen Y.Y.M. (2000): Bacterial ureases in diseases. *Microbes and Infection* **2**, 533-542.

Das N., Kayastha A.M., Srivastava P.K. (2002): Purification and characterization of urease from dehusked pigeon pea (*Cajanus cajan*) seeds. *Phytochemistry* **61**, 513-521.

Della Ciana L., Cupto G. (1996): A robust and reliable biosensor for continuous monitoring of urea during dialysis. *Abstracts of Papers American Chemical Society* **212**, 51.

Fishbein W., Carbone P. (1965): Urease catalysis II. Inhibition of the Enzyme by Hydroxyurea, Hydroxylamine and Acetohydroxamic acid. *Journal of Biological chemistry* **240**, 2407-2414.

Follmer Ch. (2008): Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochemistry* **69**, 18–28.

Francis P.S., Lewis S.W., Lim K.F. (2002): Analytical methodology for the determination of urea: current practice and future trends. *Trends in Analytical chemistry* **21**, 389-399.

Granstrom M., Lehours P., Bengtsson C., Mégraud F. (2008): Diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* **13**, 7-12.

Hanuš O., Hering P., Frelich J., Jilek M., Genčurova V., Jedelska R. (2008): Reliability of results of milk urea analysis by various methods using artificial milk control samples. *Czech Journal of Animal Science* **53**, 152–161.

Krajewska B. (2009): Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review, *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic* **59**, 9-21.

Krajewska B. (2009): Ureases. II. Properties and their customizing by enzyme immobilizations. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic* **59**, 22-40.

- Krajewska B., Zaborska W. (2007): Jack bean urease: The effect of active-site binding inhibitors on the reactivity of enzyme thiol groups. *Bioorganic Chemistry* **35**, 355–365.
- Kuhara T. (2002): Diagnosis and monitoring of inborn errors of metabolism using urease-pretreatment of urine, isotope dilution, and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **781**, 497-517.
- Kumar S., Dwevedi A., Kayastha A.M. (2009): Immobilization of soybean (*Glycine max*) urease on alginate and chitosan beads showing improved stability: Analytical applications. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic* **58**, 138-145.
- Lin Ch.Ch., Yang Ch.M. (2003): Urea permeation and hydrolysis through hollow fiber dialyzer immobilized with urease: storage and operation properties. *Biomaterials* **24**, 1989-1944.
- Luo Z., Fu X. (2010): Immobilization of urease on dialdehyde porous starch. *Starch-Stark* **62**, 652-657.
- Lynn K.R. (1967): Some properties and purification of urease. *Biochimica et biophysica acta* **146**, 205-218.
- Mahadevan S., Sauer F.D., Erfle J.D. (1976): Purification and Properties of Urease from Bovine Rumen. *Biochemistry Journal* **63**, 495-501.
- Mateo C., Palomo J.M., Fernandez-Lorente G., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R. (2007): Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology* **40**, 1451–1463.
- Mobley H.L., Island M.D., Hausinger R.P. (1995): Molecular biology of microbial ureases. *Microbiological reviews* **59**, 451-480.
- Mulagalapalli S., Kumar S., Kayastha A.M. (2007): Immobilization of Urease from Pigeonpea (*Cajanus cajan*) on Agar Tablets and Its Application in Urea Assay. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **142**, 291-297.
- Nousiainen J., Shingfield K. J., Huhtanen P. (2004): Evaluation of Milk Urea Nitrogen as a Diagnostic of Protein Feeding. *Journal of Dairy Science* **87**, 386-398
- Pithawala K., Mishra N., Bahadur A. (2010): Immobilization of urease in alginate, paraffin and lac. *Journal of the Serbian Chemical Society* **75**, 175-183.
- Pogorilyi R.P., Melnyk I.V., Zub Y.L. (2013): Urease adsorption and activity on magnetite nanoparticles functionalized with monofunctional and bifunctional surface layers. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **68**, 447–454.
- Pozniak G., Krajewska B., Trochimczuk W. (1995): Urease immobilized on modified polysulphone membrane: preparation and properties. *Biomaterials* **16**, 129-134.
- Reddy R.CH., Kayastha A.M. (2006): Improved stability of urease upon coupling to alkylamine and arylamine glass and its analytical use. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic* **38**, 104-112.

- Rosenthal H.L. (1955): Determination of Urea in Blood and Urine with Diacetyl Monoxime. *Analytical Chemistry* **27**, 1980-1982.
- Sahoo B., Sahu S.K., Pramanik P. (2011): A novel method for the immobilization of urease on phosphonate grafted iron oxide nanoparticle. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic* **69**, 95-102.
- Sirko A., Brodzik R. (2000) Plant ureases: Roles and regulation. *Acta biochimica polonica* **47**, 1189-1195.
- Sujoy B., Aparna A. (2013): Enzymology, Immobilization and Applications of Urease Enzyme. *International Research Journal of Biological Sciences* **2**, 51-56
- Upadhyay L.S.B. (2012): Urease inhibitors: A review. *Indian Journal of Biotechnology* **11**, 381-388.
- Varlan A.R., Sansen W., Van Loey A., Hendickx M. (1996): Covalent enzyme immobilization on paramagnetic polyakrolein beads. *Biosensors and bioelectronics* **11**, 443-448.
- Weatherburn, M.W. (1967): Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry* **39**, 971-974.
- Weber M., Jones M.J., Ulrich J. (2008): Optimisation of isolation and purification of the jack bean enzyme urease by extraction and subsequent purification. *Food and bioproducts processing* **86**, 43-52.
- Zhang Y.F, Wu H., Li J., Li .L, Jiang Y.J., Jiang Y., Jiang Z.Y. (2008): Protamine-templated biomimetic hybrid capsules: efficient and stable carrier for enzyme encapsulation. *Chemical Materials* **20**, 1041-1048.

7. Zoznam skratiek

AE	aminoetyl
CDI. HCl	N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid
CM	karboxymetyl
DEAE	dietylaminoetyl
DMABA	<i>p</i> -dimethylaminobenzaldehyd
GC/MS	plynová chromatografia s detekciou hmotnostným spektrometrom
NHS	N-hydroxysukcinimid
PMIDA	fosfonometyliminodioctová kyselina