

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## **Imobilizace lipasy na magnetické nanočástice a její využití v biotechnologických procesech**

### **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Miroslav Jořenek</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	14. 5. 2010

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne 30. 4. 2010

*/vlastnoruční podpis/*

Poděkování: Chtěl bych poděkovat hlavně své vedoucí práce doc. RNDr. Ludmile Zajoncové, Ph.D. a také Mgr. Michaele Pečové a Mgr. Kristýně Pospíškové za cenné rady, odborné vedení a také za trpělivost a čas, jenž mi věnovaly. Dále bych chtěl poděkovat všem pracovníkům katedry biochemie za ochotu a spolupráci.

## Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Miroslav Jořenek
Název práce	Imobilizace lipasy na magnetické nanočástice a její využití v biotechnologických procesech
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2010
Abstrakt	

Tato bakalářská práce je hlavně zaměřena na imobilizaci lipasy z prasečího pankreatu a určení vlastností této imobilizované lipasy ve srovnání s volnou lipasou. Teoretická část pojednává o různých lipasach, jejich výskytu, vlastnostech a metodách purifikace. Především jsou zde popsány lipasy z mikroorganismů. Teoretická část také obsahuje přehled metod imobilizací enzymů a to především na magnetické nanočástice, u kterých jsou popsány hlavní metody jejich přípravy. Je zde také uvedeno využití imobilizovaných enzymů a lipasy v různých biotechnologických procesech. Experimentální část se zabývá imobilizací lipasy z prasečího pankreatu různými metodami, srovnáním těchto metod a srovnáním vlastností této imobilizované lipasy s její volnou formou.

Klíčová slova	lipasa, imobilizace, nanočástice, mikročástice, aktivita, $K_m$
Počet stran	43
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Miroslav Jořenek
Title	Immobilization of lipase on magnetic nanoparticles and its use in biotechnological processes
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
The year of presentation	2010
Abstract	

This bachelor thesis is mainly focused on immobilization of lipase from porcine pancreas and determine the properties of the immobilized lipase in comparison with free lipase. The theoretical part deals with various lipases, their incidence, characteristics and methods of purification. Above all, there are described lipase from microorganisms. The theoretical part also contains an overview of methods of immobilization of enzymes and mostly on magnetic nanoparticles, which are described the main methods of their preparation. It also noted a use of immobilized enzymes and lipase in various biotechnological processes. The experimental part deals with the immobilization of porcine pancreatic lipase from different methods, comparing these methods and comparing the properties of the immobilized lipase with its free form.

Keywords	lipase, immobilization, nanoparticles, microparticles, activity, $K_m$
Number of pages	43
Number of appendices	0
Language	Czech

# Obsah

1. Cíle práce .....	7
2. Úvod.....	8
3. Teoretická část .....	9
3. 1. Lipasa .....	9
3. 1. 1. Výskyt lipas.....	9
3. 1. 2. Vlastnosti lipas .....	11
3. 1. 2. 1. Struktura.....	13
3. 1. 2. 2. Chemické reakce, které katalyzují lipasy.....	15
3. 1. 2. 3. Substrátová specifita .....	16
3. 1. 2. 3. 1. Inhibice.....	16
3. 1. 3. Purifikace .....	17
3. 1. 3. 1. Srážecí metody .....	17
3. 1. 3. 2. Chromatografické metody.....	17
3. 1. 4. Metody stanovení lipasy .....	17
3. 2. Imobilizace enzymů .....	18
3. 2. 1. Historie .....	18
3. 2. 2. Metody imobilizace.....	18
3. 2. 2. 1. Adsorpce .....	19
3. 2. 2. 2. Zachycení .....	19
3. 2. 2. 3. Enkapsulace.....	20
3. 2. 2. 4. Zesíťování .....	20
3. 2. 2. 5. Kovalentní navázání.....	20
3. 2. 3. Imobilizace lipasy .....	21
3. 2. 4. Využití imobilizovaných enzymů v praxi .....	23
3. 2. 5. Magnetické nanočástice a mikročástice .....	23
3. 2. 5. 1. Příprava .....	24
3. 2. 5. 2. Povrchová úprava.....	25
4. Experimentální část.....	27
4. 1. Materiály .....	27
4. 2. Přístroje .....	27
4. 3. Metody .....	27
4. 3. 1. Příprava nanočástic .....	27
4. 3. 2. Stanovení aktivity lipasy .....	28
4. 3. 3. Stanovení závislosti aktivity lipasy na pH .....	28
4. 3. 4. Stanovení závislosti aktivity lipasy na teplotě inkubace.....	28
4. 3. 5. Imobilizace lipasy adsorpcí.....	29
4. 3. 6. Imobilizace lipasy pomocí karbodiimidu.....	29
4. 3. 7. Imobilizace lipasy na magnetické částice pomocí glutaraldehydu .....	30
4. 3. 8. Stanovení Michaelisovy konstanty ( $K_m$ ) .....	31
4. 3. 9. Opakované použití imobilizované lipasy .....	31
4. 4. Výsledky a diskuze .....	32
4. 4. 1. Stanovení aktivity lipasy .....	32
4. 4. 2. Stanovení závislosti aktivity lipasy na pH .....	33
4. 4. 3. Stanovení závislosti aktivity lipasy na teplotě inkubace.....	34
4. 4. 4. Stanovení Michaelisovy konstanty ( $K_m$ ) .....	35
4. 4. 5. Opakované použití imobilizované lipasy .....	36
5. Závěr .....	38
6. Literatura: .....	39

7. Seznam použitých zkratek .....	43
-----------------------------------	----

## 1. Cíle práce

---

- Provést literární rešerši na téma lipasa, imobilizace enzymů a magnetické částice jako nepórezní nosiče pro imobilizaci enzymů
- Imobilizace lipasy na nepórezní magnetické nosiče (nano a mikročástice)
- Stanovení vlastností volné a imobilizované lipasy z prasečího pankreatu

## 2. Úvod

---

Cena enzymů využívaných v biotechnologických procesech může být poměrně vysoká. V biotechnologiích se používá celá řada různých enzymů, které katalyzují významné chemické reakce. Zdroji těchto enzymů mohou být rostliny, živočichové či mikroorganismy. Mikrobiální enzymy jsou dnes velmi často používané, protože rekombinantní technologie mikroorganismů umožňuje připravit enzym podle požadovaných vlastností. Důležitou třídou enzymů jsou hydrolasy, jež se používají hlavně v průmyslu. Mezi hydrolasy patří lipasa hydrolyzující triacylglyceroly na mastné kyseliny, diacylglyceroly, monoacylglyceroly a glycerol. Avšak při zvolení správného množství vody v reakční směsi, může být směr reakce posunut k syntéze. Syntetické reakce s použitím lipasy se uplatňují hlavně ve farmaceutickém průmyslu k syntéze různých esterů. Lipasa se v dnešní době hodně používá k výrobě biopaliv. K imobilizaci enzymů na pevné nosiče vedou především vysoké náklady na izolaci a purifikaci enzymů, protože imobilizovaný enzym lze použít opakovaně. Dalšími přednostmi imobilizace jsou snadné odstranění enzymu z reakční směsi, zvýšená stabilita enzymu nebo jednodušší řízení enzymové reakce. Nejčastějšími způsoby imobilizace jsou kovalentní navázání nebo adsorpce. Novým trendem v imobilizaci enzymů je jejich imobilizace na neporézní nosiče a to především na magnetické nanočástice resp. mikročástice, které umožňují separaci imobilizovaných enzymů pomocí magnetického pole.



## 3. Teoretická část

---

### 3. 1. Lipasa

---

Lipasy patří do enzymové třídy hydrolas (EC 3) působící na esterové vazby (EC 3.1) esterů karboxylových kyselin (EC 3.1.1) hydrolyzující triacylglyceroly na mastné kyseliny, diacylglyceroly, monoacylglyceroly a glycerol (Joseph et al., 2008) a je známa jako triacylglycerol hydrolasa (EC 3.1.1.3). Lipasy většinou katalyzují hydrolyzu triacylglycerolů, které obsahují mastné kyseliny s dlouhým řetězcem. Představují velmi významnou skupinu biokatalyzátorů pro biotechnologické aplikace. Z rychlým rozvojem enzymových technologií se dnes dostává hodně pozornosti mikrobiálním lipasám. Existuje mnoho lipas s odlišnou substrátovou specifitou, ale poměrně málo enzymů bylo izolováno v čisté formě a vykryštalováno a je málo informací o jejich struktuře a funkci. V roce 1856 Claude Bernard poprvé objevil lipasu ve šťávách pankreatu, které hydrolyzovaly kapičky oleje a byly tak rozpustné. Lipasy byly tradičně získávány ze slinivky zvířat a byly používány jako prostředek pro podporu trávení, buď čisté nebo v surové směsi s jinými hydrolasami. Počáteční zájem o mikrobiální lipasy byl způsoben především z důvodu nedostatku lipasy ze slinivky a její problematickou izolací (Hasan et al., 2006). Významný podíl na průmyslovém enzymovém trhu mají hlavně hydrolytické enzymy, jako jsou proteasy, amylasy, amidasy, esterasy a lipasy. Vzhledem ke svým mnohostranným vlastnostem nacházejí využití v širokém spektru průmyslových aplikací např. potravinářské technologii, detergentech, chemickém průmyslu a biomedicíně (Gupta et al., 2004).

#### 3. 1. 1. Výskyt lipas

Lipasy jsou všudypřítomné v přírodě a jsou produkovány rostlinami, živočichy a mikroorganismy. Rostlinné lipasy nejsou komerčně využívány n rozdíl od živočišných a mikrobiálních. Nejvýznamnějším zdrojem lipasy je slinivka skotu, ovcí a prasat. Nevýhodou zvířecí pankreatické lipasy je, že je izolována z pankreatického extraktu, který obsahuje další enzymy, především trypsin. Rovněž může obsahovat i zbytky virů, hormonů atd. Z tohoto důvodu jsou mikroorganismy hlavním zdrojem průmyslově vyráběných lipas (Vakhlu a Kour, 2006). Extracelulární bakteriální lipasy mají značný komerční význam, protože jejich výroba je mnohem snazší a lipasy jsou stabilnější. Komerčně jsou využívány volně žijící nebo rekombinantní kmeny (Gupta et al., 2004). Biosféra je ovládána mikroorganismy, ale většina z těchto přírodních druhů nebyla zkoumána. Je to hlavně proto, že jediný způsob, jak spolehlivě charakterizovat mikroorganismus, byla izolace čisté kultury. Drtivou většinu mikroorganismů přítomných v prostředí nelze kultivovat v laboratoři a odhaduje se, že asi méně než 1 % bylo

identifikováno (Gupta et al., 2004). Kvasinky jsou používány v potravinářství už řadu let a je s nimi snadnější manipulace než s bakteriemi (Vakhlu a Kour, 2006). Zřejmě nejčastěji používanou lipasou je lipasa z kvasinek *Candida rugosa*. Další důležité mikrobiální rody produkující lipasu jsou *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium* a *Pseudomonas*. Lipasy z bakterií rodu *Pseudomonas* jsou široce používané pro různá odvětví biotechnologie (Vakhlu a Kour, 2006). Na chlad adaptované mikroorganismy jsou také potencionálním zdrojem enzymu. Lipasa aktivní při nízkých teplotách z *Candida antarctica* byla použita ve farmaceutickém, chemickém a potravinářském průmyslu. Tyto bakteriální druhy byly převážně izolovány z antarktických a polárních oblastí, kde byla stabilní teplota  $0 \pm 2$  °C. Ve vodním sloupci ledového moře byl zaznamenán vysoký počet bakterií (asi  $10^5 \cdot \text{ml}^{-1} - 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Ledovce a hory jsou také domovem mikroorganismů produkujících lipasu aktivní při nízkých teplotách, stejně jako země a led v Alpách (Joseph et al., 2008). Hypertermofilní mikroorganismy jsou definovány jako mikroorganismy s optimální teplotou růstu nad 80 °C (Levisson et al., 2009). Byly izolovány z moří i ze země a staly se potencionálními zdroji lipasy. Zdrojem mohou být na síru bohatá vřídla (pH v rozmezí mírně zásadité až extrémně kyselé), horké prameny, hydrotermální průrvy na dně oceánů. Tyto mikroorganismy tak mají velkou fyziologickou rozmanitost např. od aerobní respirace k methanogenní atd. (Levisson et al., 2009). S touto vysokou optimální teplotou může být lipasa za zachování aktivity použita v procesech, kde je této vysoké teploty třeba. Zdroje lipas jsou uvedeny v Tab.1.

**Tab.1 Zdroje lipas z živočichů, bakterií a vláknitých hub (Vakhlu a Kour, 2006).**

<b>Zdroj</b>	<b>izolována z</b>
živočichové	lidský pankreas koňský pankreas prasečí pankreas pankreas z morčete
vláknité houby	<i>Rhizomucor meihei</i> <i>Pencillium camberti</i> <i>Humicola lanuginosa</i> <i>Rhizopusoryzae</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Candida rugosa</i> <i>Candida antarctica</i> Lipase A <i>Candida antarctica</i> Lipase B <i>Geotrichium candidum</i>

---

	<i>Chromobacterium viscosum</i>
	<i>Pseudomonas cepacia</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
bakterie	<i>Pseudomonas fragi</i>
	<i>Bacillus thermocatenulatus</i>
	<i>Staphylococcus hyicus</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

---

### 3. 1. 2. Vlastnosti lipas

Většina lipas může působit v širokém rozsahu pH a teplot, i když alkalické bakteriální lipasy jsou běžnější. Mají vysokou stabilitu v organických rozpouštědlech (Gupta et al., 2004). Lipasa se v přírodě chová jako hydrolasa v biodegradaci, ale může být využita i v bioorganické syntéze. Reakce se provádí v prostředí s malým množstvím vody, které převede rovnováhu reakce k upřednostnění syntézy před hydrolýzou (Singh et al., 2007). Katalyzuje celou řadu reakcí jako je hydrolýza, interesterifikace, alkoholýza, acidolýza a esterifikace. Při hydrolýze lipasa hydrolyzuje esterové vazby mastných kyselin v triacylglycerolu za uvolňování volných mastných kyselin (Gandhi, 1997). Tato reakce je ireverzibilní a směr reakce závisí na množství vody v reakčním médiu. Lipasy z různých zdrojů jsou velmi různorodé s ohledem na specifickou, sekvenci aminokyselin a katalytické vlastnosti. Na základě inhibice enzymové aktivity chemickou modifikací, byly lipasy původně klasifikovány jako serinové hydrolasy. Serin se ukazuje jako konzervativní doména a představuje společný rys lipas (Vakhlu a Kour, 2006).

Důležité při práci s enzymy je také zvolení vhodného rozpouštědla, které ovlivní aktivitu enzymu. Použití terciárních alkoholů se jeví jako výhodné, neboť nejsou substrátem lipasy, nemají silný deaktivující účinek a lehce se dají odstranit. Rozpouštědla nesmí být toxická. Při použití vodného prostředí se musí zvolit správné množství vody, aby reakce byla posunuta k syntéze nebo hydrolýze (Villeneuve 2007). Lipasy lze použít i v organických rozpouštědlech, což je pro jejich použití velmi výhodné. Jejich katalytická aktivita je však ve většině případů o několik řádů nižší, než ve vodném prostředí (Rahman et al., 2004).

Bakteriální lipasy jsou většinou extracelulární a jsou velmi ovlivněny výživou a fyzikálně-chemickými faktory působícími na tyto mikroorganismy. Je to např. přítomnost lipidů, anorganických solí, míchání, koncentrace rozpuštěného kyslíku, teplota, pH a množství dusíkatých a uhlíkatých zdrojů. Vlastnosti bakteriálních lipas jsou závislé na organismu z něhož pochází. Různá je teplotní stabilita i pH. Některé bakterie jsou uzpůsobené pro zásadité, kyselé nebo neutrální pH, jiné jsou aktivní ve velkém rozmezí pH (některé bakterie rodu *Bacillus*, pH 3 – 12) (Gupta et al., 2004). V Tab.2 je uvedeno několik příkladů lipas a jejich některé vlastnosti (pH optimum, teplotní optimum, molekulová hmotnost enzymu, substrátová specifita aj.).

**Tab.2 Srovnání několika lipas.**

zdroj lipasy	M <sub>r</sub> (kDa)	pH optimum	teplotní optimum (°C)	substrátová specifita	literatura
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	51	11,0	95	pNP-C10	(Levisson et al., 2009)
<i>Bacillus subtilis 168</i>	19	9,9 - 10	35	preferuje C8 mastné kyseliny, 1,3 regiospecifická	(Gupta et al., 2004)
<i>Bacillus thermooleovorans ID-1</i>	34	7,5	75	široký rozsah	(Gupta et al., 2004)
<i>Candida rugosa</i>	60	8,0	30	dlouhé řetězce triacylglycerolů	(Benjamin a Pandey, 1998)
<i>Candida antarctica</i> (Lip-B)	36 nebo 52	8,0	35	krátké nebo střední řetězce mastných kyselin	(Adamczak, 2003)
<i>Pseudomonas aeruginosa EF2</i>	29	9,0	50	preferuje C18 mastné kyseliny, 1,3 regiospecifická	(Gupta et al., 2004)
<i>Serratia marcescens</i>	52	8,0 - 9,0	37	$K_m = 1,35 \text{ mmol.l}^{-1}$ pro tributyrin	(Gupta et al., 2004)
<i>Staphylococcus aureus</i>	46	6,5	-	preferuje krátké řetězce triacylglycerolů a pNP estery (kaprát)	(Gupta et al., 2004)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	45	8,5 - 9,5	28	vysoká aktivita pro tributyrin, tripropionin, trimyristin a pNP kaprylát	(Gupta et al., 2004)
<i>Thermosyntropha lipolytica</i> (Lip-A)	50	9,4	96	pNP-C12	(Levisson et al., 2009)
<i>Thermosyntropha lipolytica</i> (Lip-B)	57	9,6	96	pNP-C12	(Levisson et al., 2009)
Krocán (pankreatická lipasa)	45	8,5	37	dlouhé řetězce triacylglycerolů	(Sayari et al., 2000)

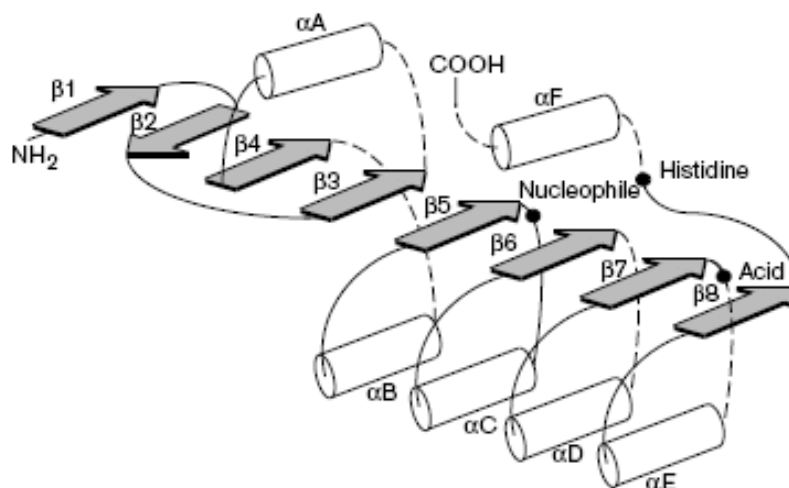
### 3. 1. 2. 1. Struktura

Lipasy se skládají z jednoduchých domén a mají  $\alpha / \beta$  hydrolasovou konformaci Obr.1. Základem těchto struktur je alfa / beta list (spíše než barel) a obsahuje osm vláken spojených helixy (Joseph et al., 2008). Aktivní místo lipasy z *Candida antarctica* obsahuje katalytickou triádu Ser 105 – His 224 – Asp 187, která je běžná pro všechny serinové hydrolasy, kde serin působí jako nukleofil, histidin jako basické reziduum a asparagová nebo glutamová kyseliny jako kyselé reziduum (Joseph et al., 2008). Přístup k aktivnímu místu této triády je kryt mobilním víkem, které toto místo otevírá nebo zavírá v závislosti na aktivní nebo neaktivní konformaci enzymu. Aktivace může být vysvětlena otevřením tohoto víka ve struktuře enzymu do prostředí. Lipasa s otevřeným víkem je aktivní forma enzymu a umožňuje substrátu přístup do aktivního místa. Vazebné místo pro substrát se nachází uvnitř kapsy na vrchní části centrálního  $\beta$ -listu. Velikost a geometrie vazebného místa dává enzymu substrátovou specifitu (Joseph et al., 2008).

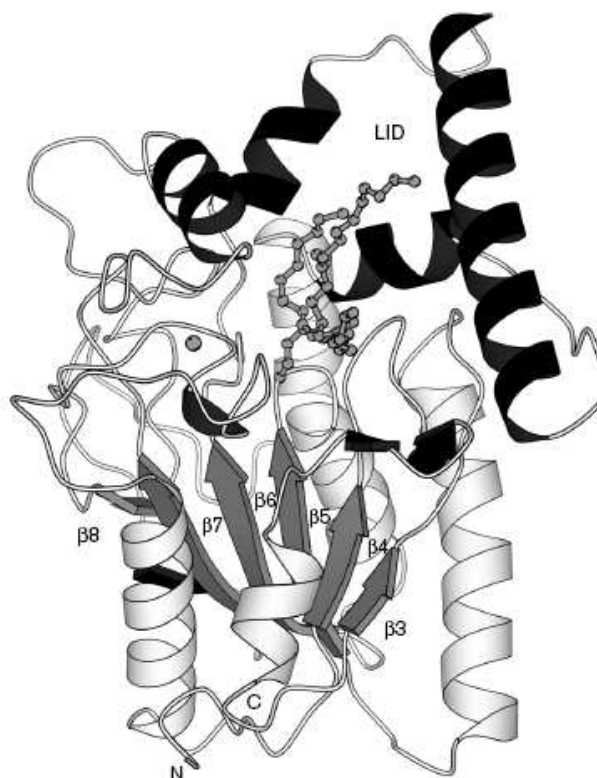
Lipasy různých organismů se velmi liší velikostí molekuly 20 – 65 kDa. Většina extracelulárních lipas z kvasinek jsou monomerní glykoproteiny s molekulovou hmotností 33 – 65 kDa (Vakhlu a Kour, 2006). Lipasa z *Candida rugosa* (CRL) má katalytickou triádu Ser 209, Glu 341 a His 449. Každá izoforma CRL má amfipatický helix, který slouží jako víko, které zavírá aktivní místo. V uzavřené struktuře lipasy, hydrofilní strana víka směřuje do prostředí a hydrofóbní strana k proteinovému jádru. Tato povaha víka a specifická sekvence aminokyselin může být důležitá pro aktivitu a specifickou lipasy (Akoh et al., 2004).

Velmi málo argininu ve srovnání s lysinem, málo prolinu, malé hydrofóbní jádro, velký počet iontových vazeb a interakcí dávají lipase schopnost aktivity při nízkých teplotách (Joseph et al., 2008). Byl také pozorován nízký počet disulfidových vazeb ve smyčkovité struktuře. Argininové zbytky jsou rozloženy jinak než v mezofilních enzimech a jen několik zbytků je stabilizováno intramolekulárními solnými můstky a hodně z nich je na povrchu proteinu, kde mohou přispívat ke konformační flexibilitě (Joseph et al., 2008). Lipasa aktivní v nízkých teplotách je např. lipasa z *Candida antarctica* Obr.2.

Funkce, které přispívají ke stabilitě hypertermofilních enzymů, zahrnují změny ve složení aminokyselin jako snížení termolabilního asparaginu a cysteinu, zvýšení hydrofóbních interakcí, zvýšení počtu iontových párů a solných můstků, zmenšení velikosti povrchových smyček a povrchu vystaveného prostředí a zvýšení interakcí mezi vnitřními podjednotkami (Levisson et al., 2009).



**Obr.1 Sekundární struktura  $\alpha$  /  $\beta$  hydrolasová konformace.**  $\alpha$  helixy jsou reprezentovány bílými válci a  $\beta$  skládané listy jsou znázorněny šedými šipkami. Umístění katalytické triády je znázorněno černými tečkami (Nardini a Dijkstra, 1999).



**Obr.2 Otevřená struktura lipasy z *Pseudomonas aeruginosa*.**  $\alpha$  helixy,  $\beta$  skládané listy a smyčky jsou reprezentovány helikálními válci, šipkami a vlákny.  $\alpha$  Helixy a  $\beta$  skládané listy jsou v základní struktuře zobrazeny bílou a tmavě šedou barvou. Další sekundární struktury jsou zobrazeny černě. Pozice helikálního víka je označena (LID). Fosfonátový inhibitor kovalentně navázaný na nukleofil je znázorněn spojenými kuličkami a vápenatý iont je zobrazen jako koule (Nardini a Dijkstra, 1999).

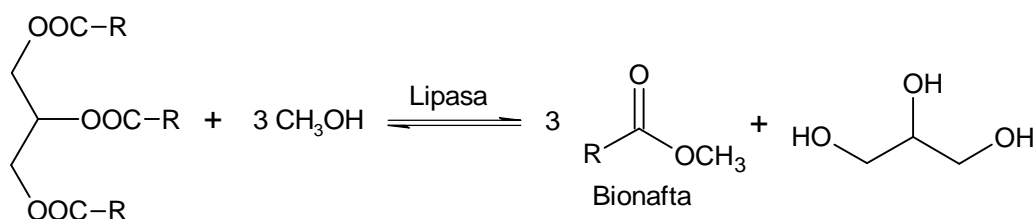
### 3. 1. 2. Chemické reakce, které katalyzují lipasy

Lipasy mohou katalyzovat jak hydrolýzu, tak několik typů syntetických reakcí. Přehledně jsou reakce uvedeny ve Tab.3.

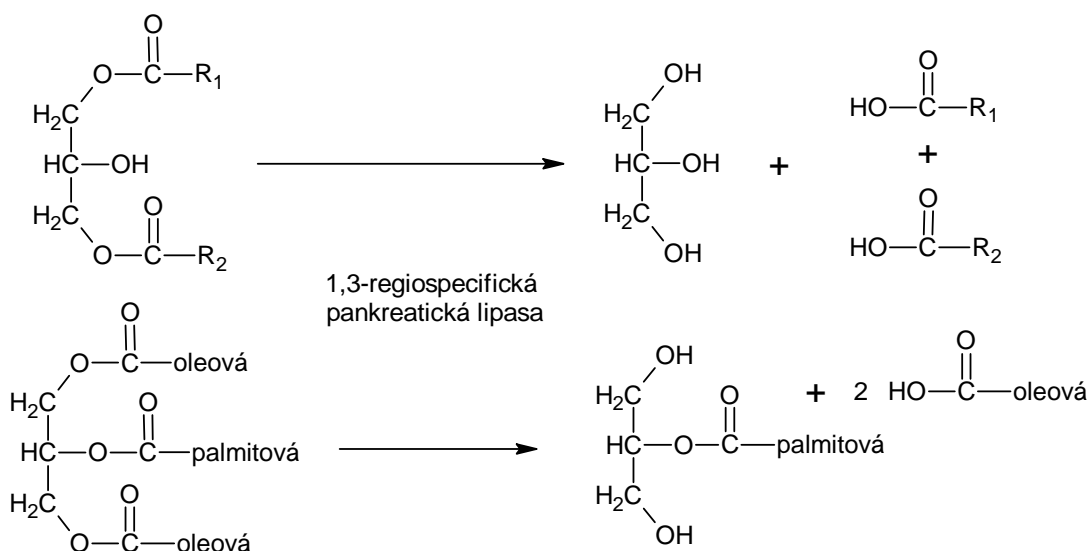
**Tab.3 Chemické reakce, které katalyzují lipasy.**

Hydrolýza	$RCOOR_2 + H_2O \longrightarrow RCOOH + R_2OH$
Esterifikace	$RCOOH + R_2OH \longrightarrow RCOOR_2 + H_2O$
Syntéza	Interesterifikace $RCOOR_2 + R_1COOR \longrightarrow RCOOR + R_1COOR_2$
	Alkoholýza $RCOOR_2 + R_1OH \longrightarrow RCOOR_1 + R_2OH$
	Acidolýza $RCOOR_2 + R_1COOH \longrightarrow R_1COOR_2 + RCOOH$

Poslední tři reakce z tabulky 3 Interesterifikace, alkoholýza a acidolýza lze seskupit pod jeden termín transesterifikace. (Červinka et al., 1980). Příklady těchto reakcí jsou uvedeny v Obr.3 a Obr.4.



**Obr.3 Možná metoda syntézy bionafty (přepřacováno podle Adamczak et al., 2009).**



**Obr.4 Zjednodušené schéma hydrolýzy strukturálních lipidů pankreatickou lipasou (přepřacováno podle Schörken a Kempers, 2009).**

### 3. 1. 2. 3. Substrátová specifita

Přírodními substráty lipasy jsou triacylglyceroly s dlouhým řetězcem, které mají velmi nízkou rozpustnost ve vodě a reakce je katalyzována na rozhraní voda-lipid. Přírodní lipasa (wild type) je směs mnoha lipas a esteraz působící často v přímé konkurenci nebo shodě ovlivňující proces. Tato lipasa má širší spektrum substrátů, než individuální lipasy (izomery, izoenzymy nebo izoformy) (Akoh et al., 2004). Mikrobiální lipasy lze rozdělit do tří kategorií: relativně nespecifické, regiospecifické a specifické na mastné kyseliny a substrát. Nespecifické lipasy štěpí triacylglyceroly náhodně a výsledkem je kompletní oddělení glycerolu a mastných kyselin. Příkladem této skupiny jsou lipasy např. z *Streptococcus aureus* a *Chromobacterium viscosum* (Gupta et al., 2004). Regiospecifické lipasy jsou např. 1,3-specifická lipasa, která hydrolyzuje pouze primární esterové vazby (t.j. esterové vazby atomů C1 a C3 glycerolu), extracelulární lipasy z *Bacillus subtilis 168* a *Pseudomonas sp. FB-24* atd. Třetí skupinou jsou lipasy specifické na mastné kyseliny, které tyto kyseliny výrazně preferují. Nicméně lipasy např. z *Pseudomonas fluorescens* dávají přednost středně malým kyselinám. Lipasa z *Streptococcus aureus 226* ukazuje preferenci pro nenasycené mastné kyseliny (Gupta et al., 2004). Další důležitou vlastností lipasy je její enantio-stereoselektivita, s níž má schopnost rozlišovat enantiomery v racemickém páru a patří sem většinou lipasy z rodu *Pseudomonas* (Gupta et al., 2004). Většina komerčně dostupných lipas vykazuje vyšší selektivitu pro nasycené a mononenasycené mastné kyseliny, než pro polynenasycené. Několik lipas také rozlišuje mezi EPA (eikosapentaenová kyselina) a DHA (dekosapentaenová kyselina) s preferencí pro EPA ve většině případů. Lipasy získané z rybích střev mají specifitu pro PUFA (mastné kyseliny z dlouhým řetězcem) a lipasa z *Candidum geotrichum* má silnou preferenci pro mastné kyseliny s dvojnou cis vazbou na C9 (Gupta et al., 2004).

#### 3. 1. 2. 3. 1. Inhibice

Specifické inhibitory jsou sloučeniny, které přímo interagují s aktivním místem enzymu. Takový průběh inhibice může být vratný nebo nevratný. Specifické reverzibilní inhibitory zahrnují deriváty kyseliny borité, které ale vytváří se serinem v lipase stabilní komplexy a substrátová analoga jako trietherglycerol, který je kompetitivní inhibitor pankreatické lipasy (Gupta et al., 2004). Specifické ireverzibilní inhibitory obvykle reagují s aminokyselinami, které se nacházejí v blízkosti aktivního místa nebo jsou jeho součástí. Kromě toho tyto inhibitory mohou také reagovat s SH skupinami a měnit konformaci proteinu. Lipasy patří do skupiny serinových hydrolas s katalytickou triádou Ser – His – Asp/Glu. Proto serinové inhibitory působící v aktivním místě jsou potenciálně ireverzibilní např. PMSF (fenylmethylsulfonyl fluorid), fenylboritá kyselina nebo diethyl-*p*-nitrofenylfosfát (Gupta et al., 2004).



### **3. 1. 3. Purifikace**

Mnoho lipas je purifikováno pomocí srážecích reakcí (solemi, alkoholy apod.) a pomocí chromatografických metod (iontová, hydrofóbní, afinitní, molekulová vylučovací chromatografie) (Vakhlu a Kour, 2006).

#### **3. 1. 3. 1. Srážecí metody**

Při purifikování mikrobiálních lipas, které jsou většinou extracelulární, bývá zařazen jako první krok odstranění buněk z fermentoru odstředěním nebo filtrací. Supernatant je pak zakonzentrován ultrafiltrací, srážením síranem amonným nebo srážením organickými rozpouštědly. Přibližně 80 % purifikačních systémů dosud používá srážecí krok, z nich 60 % za použití síranu amonného a 35% pomocí ethanolu, acetonu nebo kyseliny (obvykle HCl) (Saxena et al., 2003).

#### **3. 1. 3. 2. Chromatografické metody**

Mezi běžnou chromatografickou metodu používanou v laboratořích patří chromatografie na iontoměničích, která je asi nejčastější metodou využitou k purifikaci lipas. Většinou je použit diethylaminoethyl (DEAE) jako anex a karboxymethyl (CM) jako katex. Stále populárnější je však chromatografie založená na DEAE a Q-Sepharose (Saxena et al., 2003). Druhou běžnou metodou je gelová filtrace, kdy jsou molekuly separovány na základě jejich velikosti. Dalšími metodami jsou afinitní chromatografie, která může být použita bez předchozích purifikačních kroků (afinitní chromatografie na Con A-Sepharose), chromatografie s hydrofóbní interakcí (např. s aktivovaným raménkem s epoxyskupinou jako ligandem a polyethylenglykolem imobilizovaným na Sepharose) a adsorpční chromatografie, kde se často používá jako adsorbent hydroxyapatit (Saxena et al., 2003). K některým novým technologiím použitých při čištění patří membránové procesy, imunopurifikace, sloupcová chromatografie s polymery polyvinyl alkoholu jako stacionární fází a dvoufázový vodní systém (Saxena et al., 2003).

#### **3. 1. 4. Metody stanovení lipasy**

Enzymovou aktivitu lipasy lze stanovit pomocí spektrofotometrické metody s umělým substrátem (např. p-nitrofenylbutyrát a další estery jako palmitát, acetát, kapronát, kaprinát) (Kim et al., 2006; Huang et al., 2003; Lima et al., 2004), nebo pomocí titrace (NaOH) volných mastných kyselin po hydrolýze přírodních substrátů jako je olivový olej s přidavkem arabské gumy nebo polyvinylalkoholu (PVA) (Bayramoğlu a Arica, 2008; Liu et al., 2005) a dále také titrací trioleinu, trikaprylinu nebo tributyrinu (Lima et al., 2004). Volné mastné kyseliny lze také stanovit pomocí spektrofotometrické metody měřením vývoje barvy při použití měďnatého acetátu pyridinu jako chromoforu. Jedna jednotka aktivity lipasy je definována jako množství

enzymu, který katalyzuje uvolňování 1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  volných mastných kyselin z oleje za těchto podmínek. (Yeşiloğlu, 2005; Öztürk et al., 2007).

## 3. 2. Imobilizace enzymů

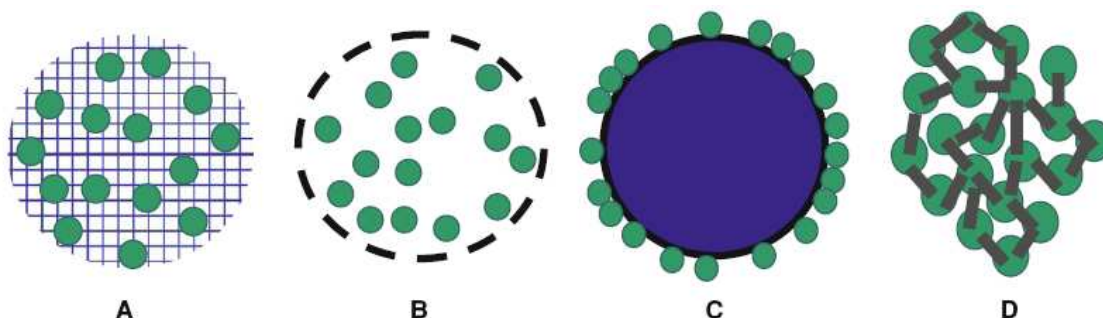
---

### 3. 2. 1. Historie

Imobilizace enzymů byla poprvé zavedena pro opětovnému použití drahých enzymů. Některé z prvních pokusů byly popsány už v prvních letech minulého století. V roce 1916 Nelson a Griffin imobilizovali invertasu na pevný povrch (aktivní uhlí, hydroxid hlinitý), ale takto imobilizované enzymy se ukázaly jako velmi nestabilní (Buchholz et al., 2005; www.chiralvision.com; 9. 3. 2010). Přibližně kolem roku 1950 se enzymy začaly imobilizovat na další nosiče. Georg Manecke byl jedním z prvních, kdo úspěšně imobilizovali proteiny na polymerní nosiče, avšak jeho návrh nebyl komerčně využit. Až vědci z Izraele prosadili používání imobilizovaných enzymů v průmyslu. První průmyslové využití imobilizovaných enzymů bylo k výrobě kukuřičného sirupu s vysokým obsahem fruktosy, výrobě opticky čistých aminokyselin (rok 1969) nebo pro hydrolýzu penicilinu G (rok 1979). V této době se také začaly imobilizovat enzymy mikrobiálního původu a v 70. letech, nástupem rekombinantních mikroorganismů a tím mnoha enzymů různých vlastností, došlo k velkému rozvoji používání enzymů v průmyslu (Buchholz et al., 2005). Experimenty s imobilizovanými enzymy přinesly neočekávané výsledky jako změnu aktivity enzymu v porovnání s volnými rozpustnými enzymy (Tischer a Kasche, 1999) a zlepšení dalších vlastností jako je stabilita, termostabilita, opakované použití..

### 3. 2. 2. Metody imobilizace

Vysoké náklady na izolaci a purifikaci enzymů, nestabilita jejich struktury při izolaci z vodného prostředí, citlivost na jiné než optimální podmínky při zpracování nebo citlivost na stopové množství látek, které mohou působit jako inhibitory, kde poslední dvě většinou znamenají krátkou provozní dobu enzymu, vedou k tomu, aby byly enzymy imobilizovány. Dalším důvodem je, že volný enzym rozpuštěný ve vodě nelze zpravidla získat zpět v aktivní formě z reakční směsi pro další použití (Krajewska, 2004). Důvodem pro imobilizaci je také jednodušší odstranění enzymů z produktů. Imobilizace enzymů je technika navržená na omezení volnosti pohybu enzymu. První se rozhoduje o materiálu matrice, potom o metodě imobilizace. Existuje několik principů metod imobilizace – adsorpce, zachycení, enkapsulace, zesíťování a kovalentní navázání (Bickerstaff, 1997), jež jsou uvedeny na Obr.5.



**Obr. 5 Metody imobilizace enzymů. (A) zachycení, (B) zapouzdření, (C) adsorpce nebo kovalentní navázání, (D) zesíťování.** Zelená kulička znázorňuje enzym (Brady a Jordaan, 2009).

### 3. 2. 2. 1. Adsorpce

Imobilizace adsorpcí je nejjednodušší metoda. Zahrnuje reverzibilní povrchovou interakci mezi enzymem a nosičem. Síly zde působící jsou zejména elektrostatické jako van der Waalsovy, iontové a vodíkové vazby. Tyto síly jsou sice velmi slabé, ale existuje zde velké množství těchto vazeb. Tento proces je založen na smíchání biologické komponenty s nosičem, na který se má komponenta navázat, za optimálních reakčních podmínek (pH, iontová síla aj.). Po inkubaci je materiál promyt pro zbavení nenavázaných biologických komponent. Tato metoda je jednoduchá, levná a rychlá, nedochází k žádným chemickým změnám na matrici nebo enzymu a reverzibilní reakce umožňuje regeneraci enzymu. Nevýhodami jsou ztráta enzymu z nosiče do produktu, nespecifická vazba nebo přetížení nosiče (Bickerstaff, 1997).

### 3. 2. 2. 2. Zachycení

Imobilizace zachycením se liší oproti adsorpci nebo kovalentnímu navázání tím, že molekula enzymu je volná v roztoku, ale pohyb je omezen mřížkou gelu. Velikost pórů v gelu je kontrolována, aby se zabránilo ztrátě enzymu z gelu, ale zároveň musí být umožněn přístup substrátu k enzymu a eliminace produktu ven z gelu. Metodami používanými k zachycení jsou ionotropická gelace, kdy alginát vytváří gel s póry (alginát), které jsou pokryté roztokem multivalentních kationtů (Dittrich et al., 2006), teplotou indukovaná gelace (agarosa, želatina), organická polymerizace chemickou nebo fotochemickou reakcí (polyakrylamid) nebo precipitace z nemísitelného roztoku (polystyren) (Bickerstaff, 1997). Postupem může být smíchání enzymu s polymerem a následné zesíťování nebo také smíchání enzymu s monomery a poté polymerizace a zesíťování, kdy enzym je zachycen v mřížce. Druhý uvedený postup je více využíván v imobilizaci (Bickerstaff, 1997). Úpravou podmínek při polymerizaci lze změnit pórovitost polymeru, strukturu sítě i velikost částic. Pórovitost lze také změnit zejména způsobem sušení, povrchovým napětím rozpouštědla nebo polymerovým složením gelu (Brady a Jordaan, 2009).

### **3. 2. 2. 3. Enkapsulace**

Enkapsulace enzymů může být dosaženo obalením enzymu semipermeabilní membránou. Enkapsulace je jednoduchá, pokud je enzym v roztoku volný. Velké proteiny nebo enzymy nemohou projít dovnitř nebo ven z kapsule, ale malé substráty nebo produkty mohou volně procházet přes semipermeabilní membránu. Jsou používány většinou mikrokapsule od 10 do 100  $\mu\text{m}$  v průměru (nylon, nitrocelulosa). Může však dojít k porušení membrány při rychlé akumulaci produktů uvnitř. Je možné také použít buňky jako kapsule (např. erythrocyty) (Bickerstaff, 1997). Enkapsulace také umožňuje imobilizovat mikroorganismy do pevného nosiče z PVA. Tento nosič má vynikající fyzikálně-mechanické vlastnosti, které poskytují dlouhodobou mechanickou stabilitu, je biologicky obtížně odbouratelný a netoxický (www.lentikats.eu; 10. března 2010).

### **3. 2. 2. 4. Zesíťování**

Tento typ imobilizace nepotřebuje matrici, neboť enzymy se spojují navzájem do velké třídímní struktury, což je umožněno různými chemickými a fyzikálními metodami. Chemickou metodou mohou být kovalentní vazby mezi sebou. Pro tuto metodu je vhodný glutaraldehyd, jenž vytváří vazby mezi  $\text{NH}_2$  skupinami enzymů, kterými umožňuje jejich zesíťování (Mateo et al., 2007). Fyzikální metodou může být flokulace, kde činidly mohou být polyaminy, polyethyleniminy, sulfonáty polystyrenu a různé fosfáty. Tato metoda je většinou používána, když ostatní metody nejsou vhodné (Bickerstaff, 1997).

### **3. 2. 2. 5. Kovalentní navázání**

Vazby jsou převážně vytvářeny mezi funkčními skupinami nosiče a amino nebo karboxy skupinami, které poskytuje enzym. Využívá se amino skupina z argininu nebo lysinu, karboxylová skupina asparagové nebo glutamové kyseliny, hydroxylová skupina serinu nebo threoninu či thio skupina cysteinu.

Polysacharidové polymery, které jsou hydrofilní, jsou vhodným materiálem pro imobilizaci enzymů např. celuloza, dextran (Sephadex), škrob a agarosa (Sepharsa) (Bickerstaff, 1997). Cukerné zbytky v těchto polymerech obsahují velké množství hydroxylových skupin, což jsou ideální skupiny pro chemickou aktivaci a provedení kovalentního navázání. Hydroxylové skupiny také mohou vytvářet vodíkové vazby s molekulami vody a mohou tak vytvářet vodné (hydrofilní) prostředí na nosiči. Dalším vhodným materiálem je pórovitý oxid křemičitý a pórovité sklo. Funkční skupiny na nosiči musí být aktivovány specifickým činidlem, aby mohlo dojít ke spojení enzymu a materiálu kovalentní vazbou. Bromkyan ( $\text{CNBr}$ ) je často používán k aktivaci hydroxylových skupin polysacharidů. Aktivace karbodiimidem se používá, když materiál obsahuje karboxylové

skupiny. Pokud materiál obsahuje aromatickou funkční aminoskupinu může dojít k diazotaci použitím kyseliny dusité. Obvyklými funkčními skupinami v celulóse jsou hydroxylové skupiny, ale chemickou modifikací byla vytvořena řada derivátů celulósy jako např. AE – celulósa (aminoethyl), CM – celulósa (karboxymethyl) a DEAE – celulósa (diethylaminoethyl). Tím se zvedl počet možností k imobilizaci (Bickerstaff, 1997). Imobilizace pomocí glutaraldehydu je velmi univerzální technikou imobilizace. Imobilizace pomocí primární aminoskupiny dosahuje v mnoha případech velmi dobrých výsledků, protože umožňuje zesíťování mezi molekulami glutaraldehydu vázaných na enzym a mezi molekulami glutaraldehydu vázaných na nosič. To však znamená chemickou modifikaci celého enzymového povrchu (Mateo et al., 2007).

### 3. 2. 3. Imobilizace lipasy

Izolovaná lipasa vykazuje obvykle dobrou stabilitu a lze ji imobilizovat na různé nosiče. Cílem imobilizace většinou je, aby lipasa zlepšila své vlastnosti jako katalytickou aktivitu, substrátovou specifitu, stabilitu (pH nebo tepelnou) nebo schopnost být recyklována. Enzym k imobilizaci by měl mít vysokou katalytickou aktivitu, avšak v některých případech mohou mít dvě izoformy enzymu velmi odlišnou aktivitu. Pokud by se podařilo imobilizovat izoformu enzymu, která má vyšší aktivitu, mohla by mít její imobilizovaná forma ještě větší aktivitu. Obě izoformy jsou v rovnováze v závislosti na experimentálních podmínkách. Za přítomnosti hydrofóbních kapek substrátu může být lipasa adsorbována na rozhraní těchto kapek a konformační rovnováha je posunuta k otevřené formě (Mateo et al., 2007). Imobilizace na hydrofóbní povrch ukázala, že po imobilizaci se stabilizuje aktivní forma lipasy. Pokud je však substrát velmi velký nebo hydrofilní, může přítomnost hydrofóbního povrchu generovat stericke překážky, které snižují aktivitu lipasy (Mateo et al., 2007). Některé příklady imobilizace lipasy jsou uvedeny v Tab.4. Imobilizovanou lipasu (*Candida antarctica*) je možné použít k výrobě bionafty ze sojového oleje (Watanabe et al., 2002), k produkci strukturních lipidů obsahující dokosaheptaenové a kaprylové kyseliny (imobilizovaná 1,3-regiospecifická lipasa z *Rhizopus delemar*) (Shimada et al., 1996), k syntéze izoamylacetátu (imobilizovaná lipasa z *Rhizomucor miehei*) (Krishna et al., 2001), k biosyntéze ethylbutyrátu (imobilizovaná lipasa z *Candida antarctica*) (Rodriguez-Nogales et al., 2005), k transesterifikaci kukuřičného oleje a tristearinu (imobilizovaná lipasa z *Thermomyces lanuginosa*) (Torres et al., 2002) nebo mnoha dalších látek.

**Tab.4 Příklady imobilizace lipasy.**

lipasa	nosič	metoda	literatura
z <i>Candida rugosa</i>	methylem modifikovaný křemičitý aerogel	adsorpce	(Gao et al., 2009)
prasečí pankreatická lipasa	poly(GMA-DVB-MAA) magnetické Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nanočástice pokryté kyselinou oleovou	kovalentní navázání	(Lei et al., 2009)
z <i>Candida rugosa</i>	poly(GMA-MMA) magnetické Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> částice	kovalentní navázání	(Bayramoğlu a Arica, 2008)
z <i>Candida cylindracea</i>	poly(MA-DVB) magnetické Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> mikročástice	kovalentní navázání	(Liu et al., 2005)
neutrální lipasa	nanočástice obalené chitosanem	adsorpce	(Tang et al., 2007)
z <i>Candida rugosa</i>	poly(HEMA-MAPA) nanočástice	adsorpce	(Öztürk et al., 2007)
z <i>Candida rugosa</i>	magnetické Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nanočástice potažené PAA	adsorpce	(Huang et al., 2006)
z <i>Mucor javanicus</i>	GA nebo NCS aktivované křemičité nanočástice	kovalentní navázání	(Kim et al., 2006)
z <i>Candida rugosa</i>	bentonit	adsorpce	(Yeşiloğlu, 2005)
z <i>Rhizopus delemar</i>	keramický nosič	-	(Shimada et al., 1996)
prasečí pankreatická lipasa	polyakrylamidové částice	kovalentní navázání nebo adsorpce	(Bagi et al., 1997)

### 3. 2. 4. Využití imobilizovaných enzymů v praxi

Imobilizované enzymy jsou obvykle stabilnější, mohou být použity opakovaně a zároveň umožňují okamžité ukončení reakce. Mnoho imobilizovaných enzymů je použito v potravinářství, farmacii nebo k výrobě speciálních látek. Mohou být použity při konstrukci biosensorů nebo jsou součástí diagnostických proužků (Krajewska, 2004). Enzymy imobilizované na pevných nosičích byly využity při výrobě bioethanolu z melasy, sirupů z cukrové třtiny a cukrové řepy a škrobnatých surovin (kukuřice, pšenice) (glukoamylasa, invertasa), kdy největší množství imobilizovaného enzymu (glukosaizomerasa) je slouží k výrobě kukuřičného sirupu s vysokým obsahem fruktosy (Krajewska, 2004; www.lentikats.eu; 10. března 2010). Imobilizované enzymy se dají dále použít k výrobě D-galaktosy a galaktooligosacharidů z laktosy ( $\beta$ -galaktosidasa) (www.lentikats.eu; 10. března 2010). Ve farmacii se používají imobilizované enzymy k výrobě 6-aminopenicilinové kyseliny (6-APK), 7-aminodeacetoxycefalosporové kyseliny (7-ADCK) a syntéze amoxicilinu (enzym s aktivitou penicilin G-acylasy) (www.lentikats.eu; 10. března 2010). Imobilizované enzymy mohou být využity tam, kde se nyní používají volné enzymy, a to nejenom ke snížení pracovních nákladů opakovaným použitím enzymu, ale i k urychlení reakce snadnou disperzibilitou enzymu, která umožňuje hladký kontakt se substrátem. Imobilizované enzymy vykazují také vyšší tepelnou a skladovací stabilitu (Horák et al., 2007). Jako nosiče se používaly doposud porézní pevné nosiče, ale do výroby jsou, zatím jen experimentálně, zaváděny také nanočástice. Velmi velký specifický povrch nanočástic usnadňuje imobilizaci většího množství enzymu, který je někdy doprovázen zvýšením jeho specifické aktivity.

### 3. 2. 5. Magnetické nanočástice a mikročástice

K nejnovějším trendům v imobilizaci enzymů patří imobilizace na magnetické nosiče, a to především na magnetické nanočástice a mikročástice. Nanočástice se připravují především v rozměrech 10 – 20 nm, kdy fero či ferimagnetický materiál vykazuje unikátní formu magnetismu zvanou superparamagnetismus (asi do 40 nm) (Huber, 2005). Jako mikročástice jsou většinou uváděny částice o velikostech od 0,1  $\mu\text{m}$  do 100  $\mu\text{m}$ . K dispozici je mnoho magnetických materiálů s různými magnetickými vlastnostmi. Nicméně mnoho z těchto materiálů (např. kobalt, nikl, chrom, mangan) jsou toxické pro organismus a proto je jejich použití omezené. Materiály založené na oxidech železa jsou relativně bezpečné a nacházejí využití také ve zdravotnictví (Huber, 2005; McBain et al., 2008). Magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nebo ( $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ ) je černý feromagnetický oxid obsahující ve své mřížce ionty  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ , což vykazuje velmi silnou magnetizaci. Maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) má stejnou strukturu mřížky jako magnetit, ale pouze s ionty  $\text{Fe}^{3+}$ . Maghemit je jedním z nejvhodnějších materiálů pro jádra magnetických částic, protože je zde nejmenší pravděpodobnost, že bude nebezpečný pro zdraví. Oxidů kovů

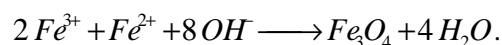
na bázi železa existuje mnoho a mnoho z nich vykazuje magnetické vlastnosti a mohou být použity pro výstavbu směsných magnetických částic ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ). Jako materiál jsou použity také slitiny železa jako FePt a FeAu nebo slitiny jiných kovů (Huber, 2005; McBain et al., 2008). Použití magnetických materiálů závisí na jejich vlastnostech jako magnetizace, tvar, disperze nebo velikost. Z mnoha tvarů (tyče, trubky, desky) je forma kulovitěho tvaru nejvýhodnější. Výhodou této formy je snadná manipulace v separačních procesech. Oproti tomu jsou nepravidelné formy mnohem více náchylné k mechanickému opotřebení. Monodisperzní částice (nebo alespoň úzký rozsah velikostí) poskytují větší výhodu, protože mají jednotné fyzikální a chemické vlastnosti a neagregují tak snadno v kapalinách jako polydisperzní částice. Velké částice mají nevýhodu malého specifického povrchu, jež je potřebný k navázání funkčních skupin. Toto jsou důvody proč jsou mikro a nanokuličky tak výhodné k použití při různých procesech. Příliš malé částice však přestávají být magneticky citlivé. Musí být tedy nalezen kompromis mezi dostatečnou plochou a magnetickou citlivostí (Horák et al., 2007).

### 3. 2. 5. 1. Příprava

Existuje mnoho způsobů přípravy nanočástic a mikročástic mezi něž můžeme zařadit mechanické postupy, koprecipitační postupy, termolýzu, hydrotermální reakci, mechanismus reverzních micel nebo izolaci z magnetotaktických bakterií.

Mechanickým postupem se superparamagnetický magnetit připraví mokřým mletím sypkého magnetitu v organickém rozpouštědle v přítomnosti velkého množství kyseliny olejové jako povrchově aktivní látky. Povrchově aktivní látka usnadňuje mletí a také inhibuje shlukování částic. Protože metoda je nákladná, časově náročná a částice mají široký rozsah velikostí, byla nahrazena chemickými a tepelnými metodami (Horák et al., 2007).

Koprecipitační postup je nejrozšířenější způsob přípravy, který se provádí ve vodě, což má za následek poměrně úzký rozsah velikostí částic. Proces dává částice magnetitu do 10 nm v průměru. Výrobu nanočástic magnetitu lze vyjádřit rovnicí:



Roztok amoniaku se za stálého míchání přidává do vodného roztoku trojmocné a dvojmocné soli železa. Vedle magnetitu jsou částice jiných feritů připraveny koprecipitací odpovídajících dvojmocných solí kovů ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) s  $\text{Fe}^{3+}$  a roztokem amoniaku (Horák et al., 2007).

Další metodou k přípravě nanočástic je termolýza zejména organokovových prekurzorů, kde např. dvoukrokový tepelný rozklad pentakarbonylželeza v přítomnosti stabilizujícího polymeru poskytuje 10 – 20 nm monodisperzní magnetické nanočástice (Narain et al., 2007).



Tato metoda byla úspěšně zobecněna pro syntézu jiných magnetických částic jako  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ,  $\text{MnO}$ ,  $\text{Co}_3\text{O}_4$  a  $\text{NiO}$ .

Hydrotermální reakcí smíšených oxidů nebo hydroxidů železa a dalších vybraných kovů, která se provádí ve vodě za superkritických podmínek (teplota vyšší než  $200\text{ }^\circ\text{C}$ , tlak větší jak  $14\text{ MPa}$ ), lze připravit částice, kdy jejich velikost a morfologie je řízena reakčním časem a teplotou (Horák et al., 2007).

Částice se dají také vyrobit pomocí mechanismu reverzních micel. Normální micely se tvoří ve vodném prostředí (např. pomocí detergentů), ale reverzní micely se tvoří v uhlovodíkových médiích (např. hexan). Uprostřed těchto micel je hydrofilní část, která ukládá anorganické složky reakční směsi. S pomocí micely můžeme snadno ovládat velikost částic, a proto jsou částice připravené touto metodou obvykle co do velikosti velmi homogenní. Pomocí této metody byly např. připraveny magnetické nanočástice s anorganickým (oxid křemičitý) povlakem. Velikost těchto nanočástic je závislá na velikosti micel, které obvykle mají rozsah  $20 - 500\text{ nm}$  (McBain et al., 2008).

Magnetické nanočástice se dají také získat z magnetotaktických bakterií. Magnetotaktické bakterie jsou mikroorganismy obsahující intracelulární krystaly, které si sami produkují. Produkované krystaly jsou obvykle z magnetitu ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). Tyto magnetosomy jsou magnetické částice o rozměrech  $40-100\text{ nm}$  řazené do korálek. Slouží jako kompas a bakteriím tak umožňují orientaci v magnetickém poli Země. Magnetotaktické bakterie jsou Gram-negativní, pohyblivé, mikroaerofilní a vodní. Tyto organismy byly nalezeny v různém vodním prostředí, půdách, geotermálních sedimentech a aerobním prostředí. Bakterie obsahují různé druhy magnetosomů, které byly zjištěny pomocí světelného a elektronového mikroskopu, elektronovou difrakcí a dalšími metodami. V závislosti na druhu, bakterie obsahují buď magnetit, sulfidy železa jako greigit,  $\text{Fe}_3\text{S}_4$  nebo  $\text{FeS}$ . Magnetické bakterie se výrazně liší v jejich buněčné morfologii stejně jako v morfologii magnetosomů a počtem řetězků v buňce. Mezi magnetotaktické bakterie lze uvést *Aquaspirillum magnetotacticum*, *Magnetobacterium bavaricum* nebo *Desulfotribrio desulfuricans* (Drzazga et al., 2006).

### **3. 2. 5. 2. Povrchová úprava**

Povrchová úprava magnetických nanočástic je nezbytná pro stabilizaci nanočástic, zajišťuje biokompatibilitu, zabraňuje nežádoucím interakcím s prvky média (nespecifické interakce s proteiny, fosfáty apod.), zabraňuje shlukování částic a poskytuje funkční skupiny pro imobilizaci. Kromě toho jsou kovové částice velmi náchylné k oxidaci vzduchem, což vede ke ztrátě magnetismu. Proto je nutné je nějakým způsobem ochránit. Povrchovou úpravu tvoří např. organické nátěry, povrchově aktivní látky či polymery nebo anorganický povlak jako je oxid křemičitý, uhlík nebo zlato (Lu et al., 2007).

Přírodní polymery jako sacharidy a bílkoviny se často používají na povrchovou úpravu nanočástic. Mnohé přírodní polymery jsou biokompatibilní, a proto jsou vhodné pro biomedicínské aplikace. Dextran se používá samotný nebo ve směsi s jinými polymery (chitosan, polymléčná kys., oxid křemičitý) (McBain et al., 2008). Chitin a chitosan nabízí unikátní soubor vlastností jako biokompatibilitu, biologickou rozložitelnost na neškodné produkty, netoxicitu, fyziologickou inertnost, antibakteriální vlastnosti, chelataci iontů těžkých kovů, hydrofobicitu, tvorbu gelu, pozoruhodnou afinitu k proteinům a jeho nízkou cenu (Krajewska, 2004). Bohužel některé z těchto přírodních materiálů jsou rozpustné ve vodě a mají nedostatečnou mechanickou pevnost. K rozkladu ve vodě jim může zabránit zesíťování (McBain et al., 2008).

Syntetické organické polymery jako polyethylenglykol (PEG), polyvinylalkohol (PVA) a poly-L-mléčná kyselina (PLA) jsou jen některé z velkého množství těchto látek používaných k pokrytí magnetických částic (McBain et al., 2008). Polystyren (PS) nebo polymethylmetakrylát (PMMA) jsou historicky nejčastěji používané povlaky na magnetických mikročásticích. Navzdory jejich širokému používání, vykazují některé nevýhody související s jejich hydrofobností. Proto se začal používat hydrofilní materiál (hydrogel) poly-2-hydroxyethylmetakrylát (PHEMA), který je také biokompatibilní, což je důležité v oblasti medicíny (Horák et al., 2007).

Oxid křemičitý je amorfni materiál s vysokou mechanickou pevností. Pokrytí částic oxidu železa oxidem křemičitým může být obtížné, protože jeho amorfni struktura neumožňuje vytvoření homogenní vrstvy na povrchu částice (McBain et al., 2008).

Zlato je velmi stabilní a také umožňuje funkcionalizaci přes thiolové skupiny (McBain et al., 2008).

## 4. Experimentální část

---

### 4. 1. Materiály

---

4-nitrofenylbutyrát	Sigma Aldrich (USA)
Dihydrogenfosforečnan draselný	Merck (Německo)
Ethanol (96%, denaturovaný)	lihovar Kojetín
Glutaraldehyd 50%	Fluka (Švýcarsko)
Hydrogenfosforečnan draselný	Merck (Německo)
Lipasa z prasečího pankreatu	Sigma Aldrich (USA)
Magnetické mikročástice ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) obalené chitosanem	Ivo Šafařík (České Budějovice)
Magnetické nanočástice ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) obalené chitosanem	Ivo Šafařík (České Budějovice)
EDC-HCl	Fluka (Švýcarsko)
N-hydroxysukcinimid (NHS) (98%)	Sigma Aldrich (USA)

### 4. 2. Přístroje

---

Analytické váhy	Sartorius (Německo)
Elektromagnetická míchačka	IKA (Německo)
Minitřepačka TTS 2	IKA (Německo)
pH metr inoLab Level 1	WTW (Německo)
Pipety 1µl – 5 ml	Eppendorf (Německo), Biohit (Finsko)
Spektrofotometr Biochrom (WPA)	Biochrom Ltd. (Velká Británie)
Termostat SUB 6	Grant (Velká Británie)
Vortex MS-1	IKA (Německo)
Digitální předvážky	Kern (Německo)

### 4. 3. Metody

---

#### 4. 3. 1. Příprava nanočástic

Magnetické ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nanočástice byly připraveny smícháním hexahydrátu síranu amonno-železnatého s roztokem hydroxidu draselného. Pro pokrytí chitosanem byly nanočástice smíchány s roztokem chitosanu v kyselině octové (Belessi et al., 2008).

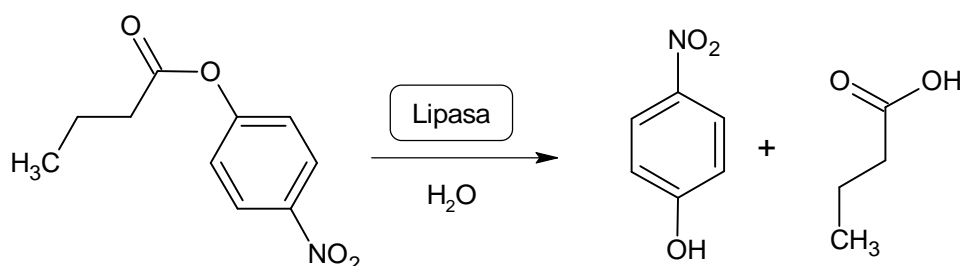
### 4. 3. 2. Stanovení aktivity lipasy

Aktivita lipasy byla stanovena spektrofotometrickou metodou s použitím umělého substrátu p-nitrofenylbutyrátu. Lipasa štěpí hydrolyticky umělý substrát za vzniku p-nitrofenolu, který má maximální absorbanci při 405 nm (žluté zbarvení) (Obr.6). Pro měření byla použita skleněná kyveta. Do kyvety bylo napipetováno: 1938  $\mu\text{l}$  pufru ( $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ , K-P<sub>i</sub>, pH = 8), 42  $\mu\text{l}$  substrátu ( $28,6 \text{ mmol.l}^{-1}$  v ethanolu) a reakce byla startována přidavkem 20  $\mu\text{l}$  roztoku lipasy ( $2 \text{ mg.ml}^{-1}$ ). Bylo zahájeno měření změny absorbance po dobu 4 časových intervalů v délce 1 minuty při  $\lambda = 405 \text{ nm}$ . Aktivita byla vypočítána podle vztahu:

$$\frac{\Delta n}{\Delta t} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \cdot \frac{V}{\epsilon \cdot l}, \text{ kde } \frac{\Delta n}{\Delta t} \text{ je aktivita (kat), } \Delta A \text{ je změna absorbance, } \Delta t \text{ je časový interval (s),}$$

$V$  je celkový objem v kyvetě ( $l$ ),  $\epsilon$  je molární absorpční koeficient ( $l.\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) a  $l$  je šířka kyvety ( $\text{cm}$ ). Pro roztok substrátu v ethanolu byl zvolen molární absorpční koeficient ( $\epsilon = 4500 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) (Hotta et al., 2002). Šířka kyvety byla 1 cm.

U měření aktivity imobilizované lipasy byly na dno kyvety umístěny 2 mg nanočástic s imobilizovanou lipasou, přidán pufr a substrát, po 60 sekundách byla změřena změna absorbance a směs byla opět promíchána. Před každým měřením byly částice usazeny ke dnu pomocí magnetického separátoru.



Obr.6 Hydrolýza umělého substrátu za přítomnosti lipasy

### 4. 3. 3. Stanovení závislosti aktivity lipasy na pH

Pro stanovení aktivity lipasy bylo použito 1938  $\mu\text{l}$  pufru (Brittonův-Robinsonův) sedmi různých hodnot pH (4,35; 5,33; 6,37; 7,00; 7,96; 8,95; 9,15), 42  $\mu\text{l}$  substrátu ( $28,6 \text{ mmol.l}^{-1}$  v ethanolu) a 20  $\mu\text{l}$  roztoku lipasy ( $2 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) v pufru ( $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ , K-P<sub>i</sub>, pH = 8). Za stejných podmínek byla stanovena závislost aktivity lipasy na pH i pro imobilizovanou lipasu pomocí karbodiimidu.

### 4. 3. 4. Stanovení závislosti aktivity lipasy na teplotě inkubace

Sedm roztoků lipasy ( $2 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) v pufru ( $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ , K-P<sub>i</sub>, pH = 8) bylo inkubováno při sedmi různých teplotách (4 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 37 °C, 40 °C) po dobu 30 minut. Po

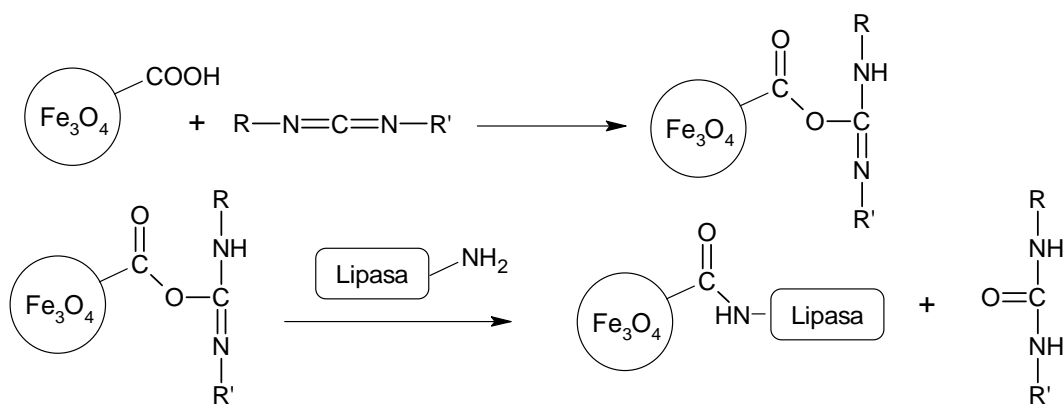
inkubaci byly roztoky ponechány v ledu. Pro stanovení aktivity bylo použito 1938  $\mu\text{l}$  pufru ( $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ , K-P<sub>i</sub>, pH = 8), 42  $\mu\text{l}$  substrátu ( $28,6 \text{ mmol.l}^{-1}$  v ethanolu) a 20  $\mu\text{l}$  roztoku lipasy inkubované při různých teplotách. Za stejných podmínek byla stanovena závislost aktivity lipasy na teplotě inkubace i pro imobilizovanou lipasu pomocí karbodiimidu. Pro srovnání teplotní stability volné a imobilizované lipasy z prasečího pankretu byla určena hodnota T<sub>50</sub>, což je teplota, při které si enzym zachovává poloviční aktivitu oproti nejvyšší změřené aktivitě.

#### **4. 3. 5. Imobilizace lipasy adsorpcí**

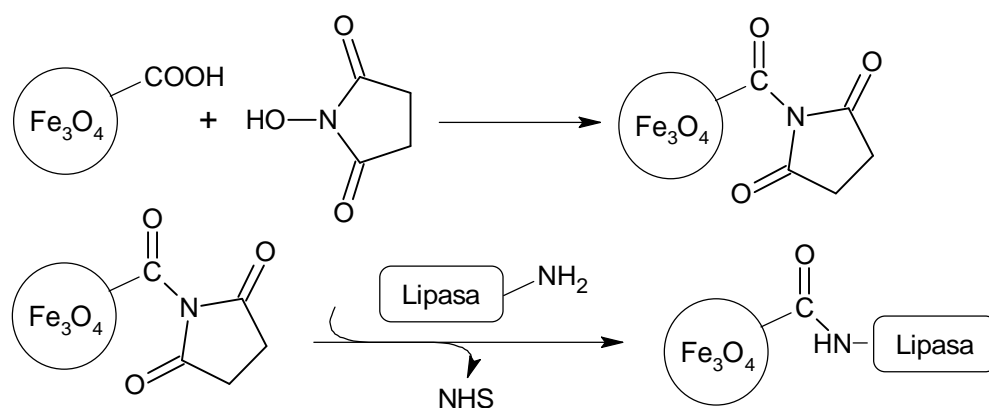
Do ependorfky byly naváženy 2 mg magnetických nanočástic obalených chitosanem. Poté bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  pufru ( $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ , K-P<sub>i</sub>, pH = 8) a 100  $\mu\text{l}$  roztoku lipasy ( $3 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) v pufru ( $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ , K-P<sub>i</sub>, pH = 8). Směs byla protřepávána přibližně 4 h při laboratorní teplotě při 300 rpm. Magnetické nanočástice byly odděleny od roztoku magnetickým separátorem, propláchnuty stejným pufrem a použity pro stanovení aktivity lipasy na nich navázané.

#### **4. 3. 6. Imobilizace lipasy pomocí karbodiimidu**

Do ependorfky byly naváženy 2 mg magnetických nanočástic nebo mikročástic obalených chitosanem. Poté bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  roztoku 99 % EDC.HCl v pufru ( $50 \text{ mmol.l}^{-1}$ , K-P<sub>i</sub>, pH = 6) (pH = 7,5 pro mikročástice), který byl připraven smícháním 0,5 mg EDC.HCl se 100  $\mu\text{l}$  tohoto pufru (přibližně  $26 \text{ mmol.l}^{-1}$  roztok). Dále bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  roztoku NHS v tomto pufru připraveného smícháním 0,6 mg NHS se 100  $\mu\text{l}$  pufru (přibližně  $52 \text{ mmol.l}^{-1}$  roztok). Po promíchání bylo ke směsi přidáno 100  $\mu\text{l}$  roztoku lipasy vzniklého smícháním 0,5 mg lipasy se 100  $\mu\text{l}$  pufru. Tato směs byla protřepávána asi 8 h při laboratorní teplotě a při 300 rpm. Po ukončení protřepávání byla směs několikrát promyta stejným pufrem ( $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ , K-P<sub>i</sub>, pH = 6) (pH = 7,5 pro mikročástice) a pak pufrem ( $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ , K-P<sub>i</sub>, pH = 7) (pH = 7,5 pro mikročástice). Magnetické nanočástice nebo mikročástice byly separovány od roztoku magnetickým separátorem a použity pro stanovení aktivity lipasy na nich navázané. Reakce je zobrazena na Obr.7. Reakce probíhá za současné aktivace karboxyskupiny pomocí NHS viz Obr.8.



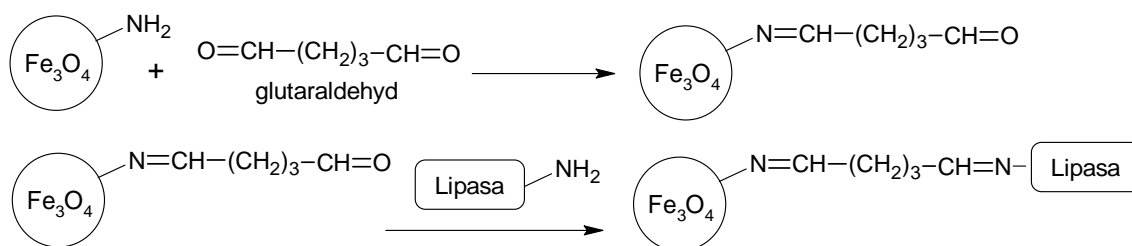
**Obr. 7. Imobilizace lipasy na magnetických nanočásticích pomocí karbodiimidu.**



**Obr. 8 Aktivace karboxyskupiny na nanočásticích obalených chitosanem pomocí NHS a imobilizace lipasy**

#### 4. 3. 7. Imobilizace lipasy na magnetické částice pomocí glutaraldehydu

Do endporfky byly naváženy 2 mg (1 mg pro opakované použití) magnetických nanočástic obalených chitosanem. Poté bylo přidáno 200  $\mu$ l roztoku 5% glutaraldehydu a směs byla 3 hodiny protřepávána. Po protřepání byla směs několikrát promyta pufrům (0,01 mol.l<sup>-1</sup>, K-P<sub>i</sub>, pH = 8) pro odstranění nenavázaného glutaraldehydu a magnetické nanočástice byly separovány. K separovaným nanočásticím bylo přidáno 100  $\mu$ l roztoku lipasy (2 mg.ml<sup>-1</sup>) v pufru (0,01 mol.l<sup>-1</sup>, K-P<sub>i</sub>, pH = 8). Směs byla protřepávána přibližně 12 h při laboratorní teplotě při 300 rpm. Magnetické nanočástice byly odděleny od roztoku magnetickým separátorem a použity pro stanovení aktivity lipasy na nich navázané. Reakce je zobrazena na Obr.9.



**Obr.9 Imobilizace lipasy na magnetické částice obalené chitosanem pomocí glutaraldehydu.**

#### 4. 3. 8. Stanovení Michaelisovy konstanty ( $K_m$ )

Bylo zvoleno pět různých koncentrací substrátu v kyvetě (150; 300; 450; 600; 850  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ). Podle těchto koncentrací bylo do kyvety přidáváno určité množství substrátu (28,6  $\text{mmol.l}^{-1}$  v ethanolu), a to 10,5; 21; 31,5; 42; 59,5  $\mu\text{l}$ . Do kyvety bylo také přidáváno vždy 20  $\mu\text{l}$  lipasy (1  $\text{mg.ml}^{-1}$ ) a takové množství pufru (0,01  $\text{mol.l}^{-1}$ , K-P<sub>i</sub>, pH = 8), aby výsledný objem v kyvetě byl 2 ml. Pomocí spektrofotometru byla změřena změna absorbance vzniklého barevného produktu za 1 minutu. Hodnoty byly použity k sestrojení Lineweaver-Burkova grafu, z jehož rovnice byla vypočítána Michaelisova konstanta. Za stejných podmínek byla stanovena Michaelisova konstanta i pro imobilizovanou lipasu pomocí karbodiimidu.

#### 4. 3. 9. Opakované použití imobilizované lipasy

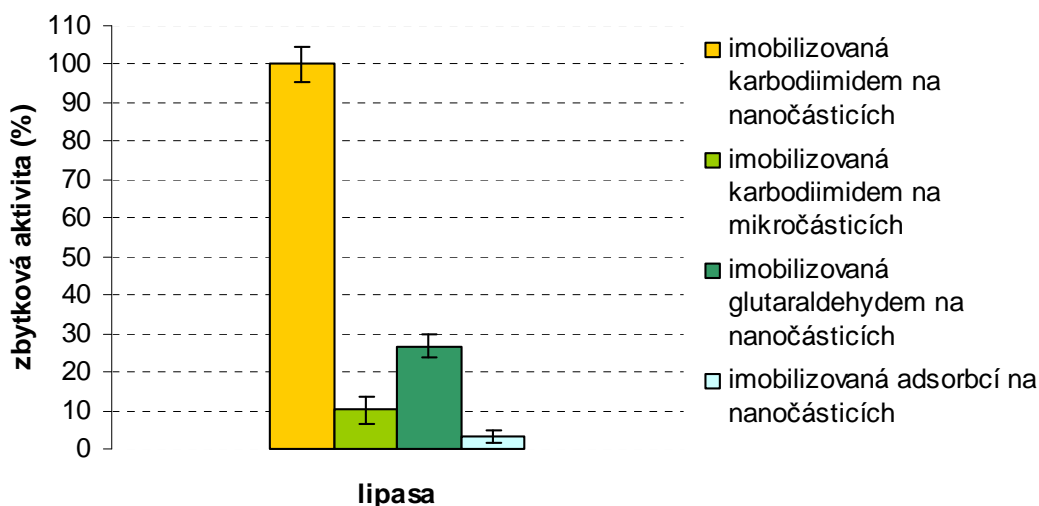
Magnetické nanočástice s imobilizovanou lipasou pomocí karbodiimidu byly přeneseny do kyvety. Pro stanovení aktivity bylo do kyvety přidáno 1938  $\mu\text{l}$  pufru (0,01  $\text{mol.l}^{-1}$ , K-P<sub>i</sub>, pH = 8) a 42  $\mu\text{l}$  substrátu (28,6  $\text{mmol.l}^{-1}$  v ethanolu). Po prvním měření, které bylo zaznamenáno jako 100%, byly nanočástice promyty a použity pro další měření se stejným množstvím pufru i substrátu. Bylo provedeno 8 opakování.

Magnetické nanočástice s imobilizovanou lipasou pomocí glutaraldehydu byly přeneseny do kyvety. Pro stanovení aktivity bylo do kyvety přidáno 1,5 ml pufru (0,01  $\text{mol.l}^{-1}$ , K-P<sub>i</sub>, pH = 8) a 30  $\mu\text{l}$  substrátu (0,43  $\text{mol.l}^{-1}$  v ethanolu). Po prvním měření, které bylo zaznamenáno jako 100%, byly nanočástice promyty a použity pro další měření se stejným množstvím pufru i substrátu. Bylo provedeno 8 opakování.

## 4. 4. Výsledky a diskuze

### 4. 4. 1. Stanovení aktivity lipasy

Lipasa z prasečího pankreatu byla imobilizována na magnetické nanočástice resp. mikročástice. Imobilizace lipasy byla provedena adsorpcí a pomocí aktivačních činidel glutaraldehydu a karbodiimidu. Aktivita lipasy na jednotlivých nosičích byla měřena pomocí umělého substrátu p-nitrofenylbutyrátu v prostředí pufru ( $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ , K-P<sub>i</sub>, pH = 8). Nejvyšší naměřená aktivita byla pro lipasu imobilizovanou na magnetických nanočásticích pomocí karbodiimidové metody označena jako 100%. Porovnání účinnosti jednotlivých způsobů imobilizace je uvedeno v Obr. 10. Nejlepších výsledků bylo dosaženo imobilizací lipasy na magnetické nanočástice metodou s karbodiimidem. Nejméně účinná se jeví imobilizace pouhou fyzikální adsorpcí, při které se navázala na magnetické nanočástice pouze 3,3 % lipasy oproti imobilizaci pomocí karbodiimidu. Pouhé 3,3 % lipasy imobilizované na nanočásticích lze vysvětlit působením pouze malých sil, které umožňují udržení lipasy na nosiči. Vysoká účinnost imobilizace lipasy pomocí karbodiimidu na nanočástice oproti imobilizaci lipasy na mikročástice je způsobena velmi velkým povrchem nanočástic, který umožňuje navázání většího množství enzymu kovalentní vazbou. Z grafu je patrné, že pro imobilizaci lipasy z prasečího pankreatu je výhodná, oproti jiným metodám, imobilizace pomocí karbodiimidu na nanočástice.

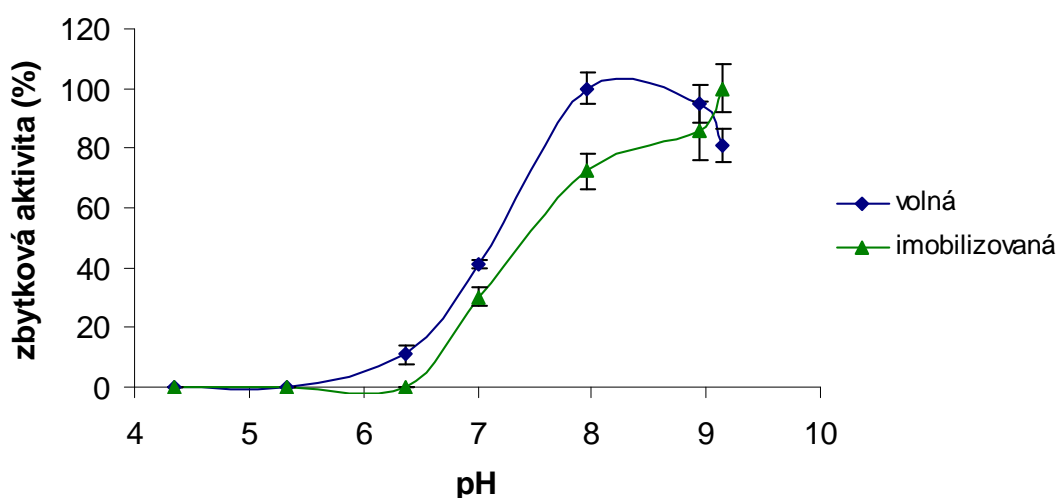


**Obr.10. Srovnání aktivit (v %) pro různě imobilizovanou lipasu.** Lipasa z prasečí pankreatu byla imobilizována na magnetické mikro resp. nanočástice adsorpcí a pomocí karbodiimidu a glutaraldehydu. Byly provedeny tři měření.



#### 4. 4. 2. Stanovení závislosti aktivity lipasy na pH

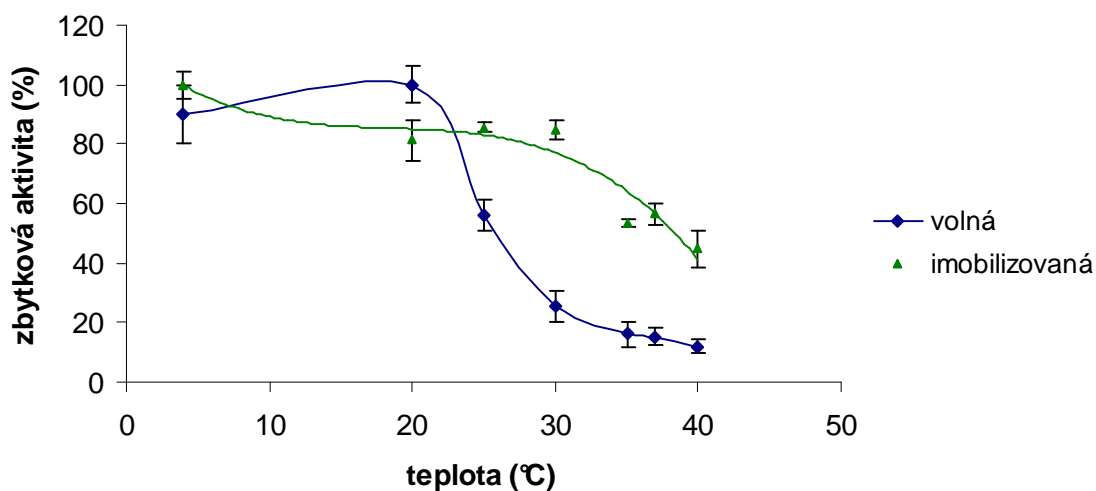
Aktivita volné lipasy z prasečího pankreatu byla měřena pomocí umělého substrátu p-nitrofenylbutyrátu v prostředí Britton-Robinsonových pufrů s rozdílným pH (4,35; 5,33; 6,37; 7,00; 7,96; 8,95; 9,15). Lipasa z prasečího pankreatu byla imobilizována pomocí karbodiimidové metody na nanočástice obalené chitosanem a použita ke stejnému měření. Porovnání aktivit obou lipas v závislosti na pH je zobrazeno na Obr.11, kdy nejvyšší naměřená hodnota byla označena jako 100 %. pH optimum volné lipasy bylo určeno na pH asi 8,3. U volné lipasy se začala objevovat aktivita asi od pH = 6. Při nižších hodnotách pH nebyla nalezena žádná aktivita lipasy. Hodnoty aktivity u imobilizované lipasy byly odlišné od volné. U imobilizované lipasy se začala objevovat aktivita až při pH asi 6,5. pH optimum pro imobilizovanou lipasu nebylo určeno, protože při pH = 9,15 začalo docházet k rozkladu umělého substrátu. Bylo zjištěno, že již při pH 9,15 po přidavku substrátu bez přítomnosti lipasy do roztoku Britton-Robinsonova pufru došlo ke změně absorbance o 0,015 za 1 minutu. U pH = 8,95 nebyla tato změna absorbance vzniklá rozkladem substrátu zaznamenána. Do budoucna by bylo dobré vyzkoušet pro určení pH optima imobilizované lipasy jinou metodu stanovení aktivity.



**Obr.11 Graf závislosti aktivity lipasy na pH.** Byla použita pankreatická lipasa ve volné formě a formě imobilizované pomocí karbodiimidu na nanočásticích obalených chitosanem. Měření bylo prováděno v prostředí Britton-Robinsonových pufrů v rozsahu pH od 4,35 do 9,15. Byly provedeny dvě měření.

#### 4. 4. 3. Stanovení závislosti aktivity lipasy na teplotě inkubace

Aktivita lipasy z prasečího pankreatu byla měřena pomocí umělého substrátu p-nitrofenylbutyrátu v prostředí pufru ( $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ ,  $\text{K-P}_i$ ,  $\text{pH} = 8$ ). Lipasa byla imobilizována pomocí karbodiimidové metody na nanočásticích a použita ke stejnému měření. Obě lipasy byly inkubovány při teplotách ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ) po dobu 30 minut a poté byla stanovena jejich zbytková aktivita. Porovnání aktivit obou lipas v závislosti na teplotě jejich inkubace je zobrazeno na Obr.12, kdy nejvyšší naměřená hodnota byla označena jako 100 %. Nejvyšší aktivita pro volnou lipasu byla změřena po inkubaci při  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Od této hodnoty aktivita výrazně klesala. Po inkubaci při  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  byla aktivita volné lipasy rovna asi 12 % aktivity lipasy inkubované při  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nejvyšší aktivita pro imobilizovanou lipasu byla změřena po inkubaci při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Po inkubaci při  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  byla aktivita lipasy rovna asi 45 % aktivity změřené po inkubaci při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Tato stanovení ukázala, že imobilizovaná lipasa, oproti volné lipase, je schopna si při vyšších teplotách zachovat vyšší aktivitu. Pro srovnání teplotní stability volné a imobilizované lipasy z prasečího pankreatu byla určena hodnota  $T_{50}$ , což je teplota, při které si enzym zachovává poloviční aktivitu oproti nejvyšší stanovené aktivitě. U imobilizované lipasy byla hodnota  $T_{50}$  určena u teploty asi  $38,5 \text{ }^\circ\text{C}$  a u volné u teploty asi  $26 \text{ }^\circ\text{C}$ .



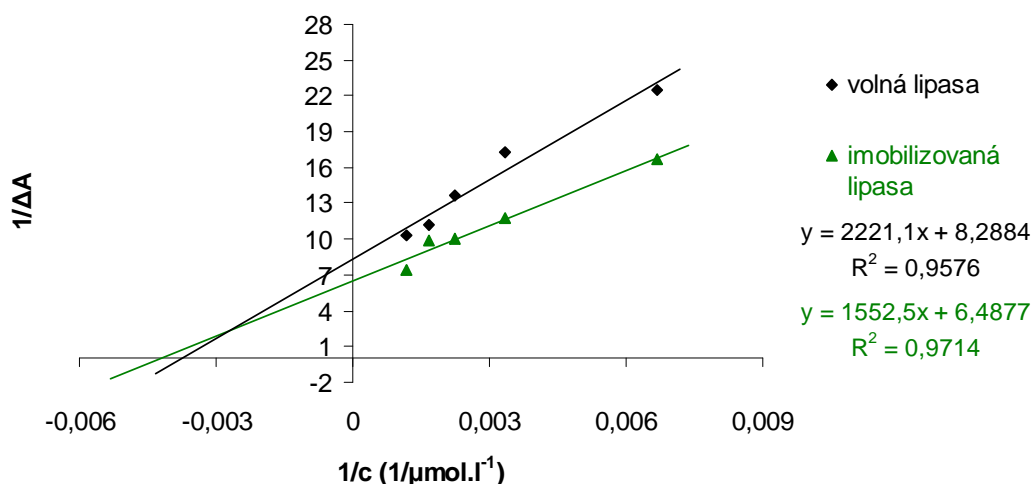
**Obr.12 Graf závislosti aktivity lipasy na teplotě její inkubace.** Byla použita pankreatická lipasa ve volné formě a imobilizovaná pomocí karbodiimidu na nanočástice obalené chitosanem. Měření bylo prováděno v prostředí pufru ( $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ ,  $\text{K-P}_i$ ,  $\text{pH} = 8$ ). Byly provedeny dvě měření u lipas inkubovaných při sedmi různých teplotách ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

#### 4. 4. 4. Stanovení Michaelisovy konstanty ( $K_m$ )

U volné a imobilizované lipasy z prasečího pankreatu byla stanovena hodnota Michaelisovy konstanty  $K_m$ , aby se zjistilo, zda po imobilizaci lipasy na nanočástice dojde zlepšení afinity lipasy k umělému substrátu. Byla změřena změna absorbance při 405 nm za minutu pro zvolené koncentrace umělého substrátu (150; 300; 450; 600; 850  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) a sestrojena závislost  $1/\Delta A_{405}$  proti  $1/[S]$ . Po zvolení  $y = 0$  bylo z rovnice regrese spočítáno  $x$  a ze

vztahu  $x = -\frac{1}{K_m}$  spočítána Michaelisova konstanta ( $K_m$ ). Graf závislosti  $1/\Delta A$  na  $1/c$  a rovnice

regrese pro volnou a imobilizovanou lipasu jsou zobrazeny na Obr.13. Hodnoty Michaelisovy konstanty pro volnou a imobilizovanou lipasu jsou uvedeny v Tab.5. Michaelisova konstanta u volné i u imobilizované lipasy byla vzhledem k odchýlkám měření stejná, což znamená, že afinita enzymu k substrátu se u imobilizované lipasy nezměnila.



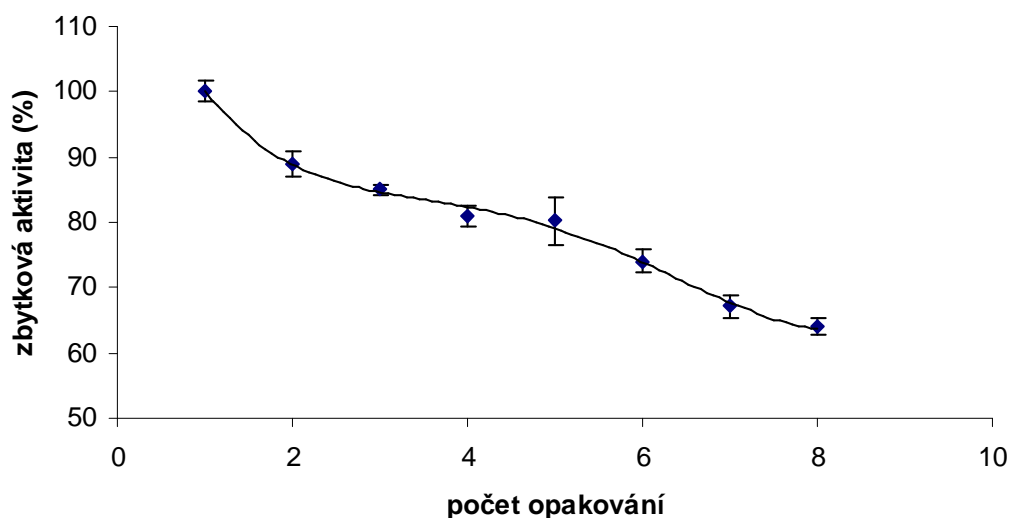
**Obr.13 Stanovení  $K_m$  pro umělý substrát lipasy p-nitrofenylbutyrát.** Aktivita volné a imobilizované lipasy z prasečího pankreatu byla měřena pomocí umělého substrátu p-nitrofenylbutyrátu v pufru (0,01  $\text{mol.l}^{-1}$ , K-P<sub>i</sub>, pH = 8) při laboratorní teplotě. Byla zaznamenána změna absorbance při 405 nm za 1 minutu. Vyhodnocení podle Lineweaver-Burka.  $1/c$  je převrácená hodnota koncentrace substrátu v reakční směsi. Konečné koncentrace substrátů byly v rozmezí 150 - 850  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ .

**Tab.5. Hodnoty  $K_m$  pro volnou a imobilizovanou lipasu.**

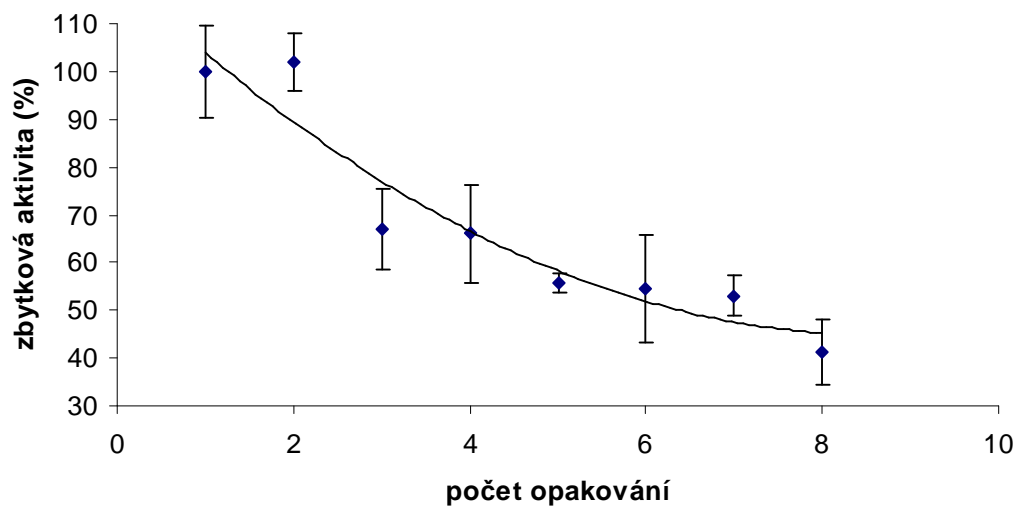
lipasa	$K_m$ ( $\text{mmol.l}^{-1}$ )
volná	$0,268 \pm 0,067$
imobilizovaná	$0,239 \pm 0,089$

#### 4. 4. 5. Opakované použití imobilizované lipasy

Aktivita lipasy z prasečího pankreatu, která byla imobilizována pomocí karbodiimidové resp. glutaraldehydové metody na nanočásticích, byla měřena pomocí umělého substrátu p-nitrofenylbutyrátu v prostředí pufru ( $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ , K-P<sub>i</sub>, pH = 8). První měření bylo určeno jako 100 %. Částice byly promyty a použity opakovaně v osmi měřeních. Procentová změna aktivity lipasy v závislosti na počtu opakování je zobrazena pro imobilizovanou lipasu pomocí karbodiimidu na Obr.14 a pro imobilizovanou lipasu pomocí glutaraldehydu na Obr.15. Po osmi opakováních si lipasa imobilizovaná pomocí karbodiimidu zachovala asi 64 % původní aktivity a lipasa imobilizovaná pomocí glutaraldehydu asi 41 % své původní aktivity. Velké chybové úsečky u opakovaného použití imobilizované lipasy pomocí glutaraldehydu byly zřejmě způsobeny nedostatečným promytím nenavázaného glutaraldehydu před přidáním lipasy, což mohlo způsobit vzájemné sesíťování enzymu. Opakované použití enzymu umožňuje používat enzym vícekrát a tím snížit náklady u reakcí, kde se tento enzym používá.



**Obr.14 Graf závislosti aktivity imobilizované lipasy pomocí karbodiimidu v procentech na počtu provedených opakování.** Byla použita pankreatická lipasa imobilizovaná pomocí karbodiimidu na nanočásticích obalených chitosanem. Měření bylo prováděno v prostředí pufru ( $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ , K-P<sub>i</sub>, pH = 8). Z imobilizovaným enzymem bylo uskutečněno osm opakování. Byly provedeny tři měření.



**Obr.15 Graf závislosti aktivity imobilizované lipasy pomocí glutaraldehydu v procentech na počtu provedených opakování.** Byla použita pankreatická lipasa imobilizovaná pomocí glutaraldehydu na nanočásticích obalených chitosanem. Měření bylo prováděno v prostředí pufru ( $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ , K-P<sub>i</sub>, pH = 8). Z imobilizovaným enzymem bylo uskutečněno osm opakování. Byly provedeny dvě měření.

## 5. Závěr

---

- Byla vypracována rešerše na téma lipasa a imobilizace enzymů na pevné nosiče.
- Na magnetické mikro a nanočástice obalené chitosanem byla imobilizována pankreatická lipasa metodou adsorpce, glutaraldehydovou a karbodiimidovou. Nejvýhodnější způsob imobilizace lipasy byl pomocí karbodiimidové metody na magnetické nanočástice.
- Byly studovány vlastnosti volné a imobilizované lipasy z prasečího pankreatu (pH optimum, tepelná stabilita a afinita lipasy k umělému substrátu p-nitrofenylbutyrátu). Pro volnou lipasu bylo stanoveno pH optimum 8,3. Pro imobilizovanou lipasu se pH optimum posouvalo k alkaličtější oblasti. Jeho přesná hodnota nemohla být stanovena, neboť při hodnotách vyšších jak pH 8,96 docházelo k rozkladu umělého substrátu a k spontánnímu vzniku p-nitrofenolu.
- Lipasa imobilizovaná na magnetických nanočásticích měla vyšší tepelnou stabilitu. Hodnota  $T_{50}$  se oproti volné pankreatické lipase zvýšila o 12,5 °C.
- Byly stanoveny hodnoty Michaelisovy konstanty pro volnou a imobilizovanou lipasu. Hodnoty obou konstant byly srovnatelné, což znamenalo, že imobilizací se afinita lipasy k umělému substrátu p-nitrofenylbutyrátu neměnila.
- U imobilizované lipasy byla testována operační stabilita a bylo zjištěno, že lipasa imobilizovaná pomocí karbodiimidové metody na nanočástice může být použita opakovaně. Po 8 násobném použití klesne její aktivita o 36 %. Opakované použití lipasy má význam v různých biotechnologických procesech.

## 6. Literatura:

---

- Adamczak M. (2003) Synthesis, properties, and application of lipase from *Candida antarctica* for high yield monoacylglycerol biosynthesis. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **12**, 3-8.
- Adamczak M., Bornscheuer U. T., Bednarski W. (2009) The application of biotechnological methods for the synthesis of biodiesel. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **111**, 808–813.
- Akoh C. C., Lee G.-Ch., Shaw J.-F., (2004) Protein engineering and applications of *Candida rugosa* lipase isoforms. *Lipids* **39**, 513–526.
- Bagi K., Simon L. M., Szajáni B. (1997) Immobilization and characterization of porcine pancreas lipase. *Enzyme Microb. Technol.* **20**, 531-535.
- Bayramoğlu G., Arica M. Y. (2008) Preparation of poly(glycidylmethacrylate-methylmethacrylate) magnetic beads: application in lipase immobilization. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **55**, 76-83.
- Belessi V., Zbořil R., Tuček J., Mašláň M., Tzitzios V., Petridis D. (2008) Ferrofluids from magnetic-chitosan hybrids. *Chem. Mater.* **20**, 3298–3305.
- Benjamin S., Pandey A. (1998) *Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast* **14**, 1069–1087.
- Bickerstaff G. F. (1997) Immobilization of enzymes and cells - some practical considerations, pp. 1-10, Humana Press Totowa 1997.
- Brady D., Jordaan J. (2009) Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnol. Lett* **31**, 1639–1650.
- Buchholz K., Kasche V., Bornscheuer U. T. (2005) Biocatalysts and enzyme technology, pp. 11-14, Wiley-VCH Weinheim 2005.
- Červinka O., Dědek V., Ferles M. (1980) Organická chemie, pp. 585-631, SNTL Praha 1980.
- Dittrich R., Despang F., Bernhardt A., Mannschatz A., Hanke Th., Tomandl G., Pompe W., Gelinsky M. (2006) Mineralized scaffolds for hard tissue engineering by ionotropic gelation of alginate. *Adv. Sci. Technol.* **49**, 159-164.
- Drzazga Z., Dzierżewicz Z., Bartoszek M., Cholewka A. (2006) Magnetic properties of magnetotactic bacteria. *Pol. J. Environ. Stud.* **15**, 50-52.
- Gandhi N. N. (1997) Applications of lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **74**, 621–634.
- Gao S., Wang Y., Wang T., Luo G., Dai Y. (2009) Immobilization of lipase on methyl-modified silica aerogels by physical adsorption. *Bioresour. Technol.* **100**, 996-999.
- Gupta R., Gupta N., Rathi P. (2004) Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 763–781.
- Hasan F., Shah A. A., Hameed A. (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.* **39**, 235–251.

- Horák D., Babič M., Macková H., Beneš M. J. (2007) Preparation and properties of magnetic nano - and microsized particles for biological and environmental separations. *J. Sep. Sci.* **30**, 1751 – 1772.
- Hotta Y., Ezaki S., Atomi H., Imanaka T. (2002) Extremely stable and versatile carboxylesterase from hyperthermophilic Archaeon. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3925-3931.
- [http://www.chiralvision.com/pdf/carrier-bound\\_enzymes\\_chiralvision.pdf](http://www.chiralvision.com/pdf/carrier-bound_enzymes_chiralvision.pdf) (9. 3. 2010).
- Huang S.-H., Liao M.-H., Chen D.-H. (2003) Direct binding and characterization of lipase onto magnetic nanoparticles. *Biotechnol. Prog.* **19**, 1095-1100.
- Huang S.-H., Liao M.-H., Chen D.-H. (2003) Fast and efficient recovery of lipase by polyacrylic acid-coated magnetic nano-adsorbent with high activity retention. *Sep. Purif. Technol.* **51**, 113-117.
- Huber D. L. (2005) Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small* **1**, 482 – 501.
- Joseph B., Ramteke P. W., Thomas G. (2008) Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments. *Biotechnol. Adv.* **26**, 457–470.
- Kim M. I., Ham H.O., Oh S.-D., Park H. G., Chang H. N., Choi S.-H. (2006) Immobilization of *Mucor javanicus* lipase on effectively functionalized silica nanoparticles. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **39**, 62-68.
- Krajewska B. (2004) Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb. Technol.* **35**, 126–139.
- Krishna S. H., Divakar S., Prapulla S.G., Karanth N.G. (2001) Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. *J. Biotechnol.* **87**, 193–201.
- Lei L., Bai Y., Li Y., Yi L., Yang Y., Xia Ch. (2009) Study on immobilization of lipase onto magnetic microspheres with epoxy groups. *J. Magn. Magn. Mater.* **321**, 252-258.
- Levisson M., van der Oost J., Kengen S. W. M. (2009). Carboxylic ester hydrolases from hyperthermophiles. *Extremophiles* **13**, 567–581.
- Lima V. M. G., Krieger N., Mitchell D. A., Baratti J. C., de Filippis I., Fontana J. D. (2004) Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **31**, 53–61.
- Liu X., Guan Y., Shen R., Liu H. (2005) Immobilization of lipase onto micron-size magnetic beads. *J. Chromatogr. B* **822**, 91-97.
- Lu A-H., Salabas E. L., Schüth F. (2007) Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 1222 – 1244.
- 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 Microb. Technol.* **40**, 1451–1463.



- McBain S. C., Yiu H. HP., Dobson J. (2008) Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *Int. J. Nanomed.* **3**, 169–180.
- Narain R., Gonzales M., Hoffman A. S., Stayton P. S., Krishnan K. M. (2007) Synthesis of monodisperse biotinylated p(NIPAAm)-coated iron oxide magnetic nanoparticles and their bioconjugation to streptavidin. *Langmuir* **23**, 6299-6304.
- Nardini M., Dijkstra B. W. (1999)  $\alpha/\beta$  Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 732–737.
- Öztürk N., Akgöl S., Arisoy M., Denizli A. (2007) Reversible adsorption of lipase on novel hydrophobic nanospheres. *Sep. Purif. Technol.* **58**, 83-90.
- Rahman R. N. Z. A., Tejo B. A., Basri M., Rahman M. B. A., Khan F., Zain S. M., Siahaan T. J., Salleh A. B. (2004) Reductive alkylation of lipase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **118**, 11-20.
- Rodriguez-Nogales J. M., Roura E., Contreras E. (2005) Biosynthesis of ethyl butyrate using immobilized lipase: a statistical approach. *Process Biochem.* **40**, 63–68.
- Saxena R.K., Sheoran A., Giri B., Davidson W. S. (2003) Purification strategies for microbial lipases. *J. Microbiol. Methods* **52**, 1 – 18.
- Sayari A., Mejdoub H., Gargouri Y. (2000) Characterization of turkey pancreatic lipase. *Biochimie* **82**, 153–159.
- Shimada Y., Sugihara A., Maruyama K., Nagao T., Nakayama S., Nakano H., Tominaga I. (1996) Production of structured lipid containing docosahexaenoic and caprylic acids using immobilized *Rhizopus delemar* lipase. *J. Ferment. Bioeng.* **81**, 299-303.
- Schörken U., Kempers P. (2009) Lipid biotechnology: industrially relevant production processes. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **111**, 627–645.
- Singh A., Van Hamme J. D., Ward O. P. (2007) Surfactants in microbiology and biotechnology: part 2. application aspects. *Biotechnol. Adv.* **25**, 99–121.
- Tang Z.-X., Qian J.-Q., Shi L.-E. (2007) Characterization of immobilized neutral lipase on chitosan nano-particles. *Mater. Lett.* **61**, 37-40.
- Tischer W., Kasche V. (1999) Immobilized enzymes: crystals or carriers?. *Trends Biotechnol.* **17**, 326-335.
- Torres C. F., Munir F., Blanco R. M., Otero C., Hill Jr. Ch. G. (2002) Catalytic transesterification of corn oil and tristearin using immobilized lipases from *Thermomyces lanuginosa*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **79**, 775–781.
- Vakhlu J. and Kour A. (2006) Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electron. J. Biotechnol.* **9**, 9.
- Villeneuve P. (2007) Lipases in lipophilization reactions. *Biotechnol. Adv.* **25**, 515–536.

Watanabe Y., Shimada Y., Sugihara A., Tominaga Y. (2002) Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **17**, 151–155.

www.lentikats.eu; 10. března 2010

Yeşiloğlu Y. (2005) Utilization of bentonite as a support material for immobilization of *Candida rugosa* lipase. *Process Biochem.* **40**, 2155-2159.

## 7. Seznam použitých zkratek

---

ADCK	aminodeacetoxycefalosporová kyselina
AE	aminoethyl
APK	aminopenicilinová kyselina
CM	karboxymethyl
Con	konkanavalin
CRL	lipasa z <i>Candida rugosa</i>
DEAE	diethylaminoethyl
DHA	dekosapentaenová kyselina
DVB	divinylbenzen
EDC-HCl	N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid
EPA	eikosapentaenová kyselina
GA	glutaraldehyd
GMA	glycidylmethakrylát
HEMA	2-hydroxyethylmetakrylát
MA	methakrylát
MAA	methakrylová kyselina
MAPA	N-methakryloyl-(L)-fenylalaninmethylester
MMA	methylmetakrylát
NCS	1,4-fenylendiisothiokyanát
NHS	N-hydroxysukcinimid
PAA	polyakrylová kyselina
PEG	polyethylenglykol
PHEMA	poly-2-hydroxyethylmetakrylát
PLA	kyselina poly-L-mléčná
PMMA	polymethylmetakrylát
pNP	p-nitrofenyl
PS	polystyren
PUFA	mastné kyseliny z dlouhým řetězcem
PVA	polyvinylalkohol