UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Eliminace močoviny ureasou imobilizovanou na magnetických nosičích

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Viktor Valtera
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
Rok:	2018

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

V Olomouci dne

podpis diplomanta

Poděkování

Poděkování patří vedoucí této diplomové práce doc. Ludmile Zajoncové za veškerou spolupráci, ochotu, pomoc, přátelský přístup a cenné rady při řešení dané problematiky; dále Sanje Zeljković Ćavar Ph.D. a v neposlední řadě celému oddělení katedry Biochemie za vstřícnost a ochotu poradit.

Bibliografická identifikace

Abstrakt

Jméno a příjmení autora	Viktor Valtera		
Název práce	Eliminace močoviny ureasou imobilizovanou na		
	magnetických nosičích		
Typ práce	Diplomová		
Pracoviště	Katedra biochemie		
Vedoucí práce	doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.		
Rok obhajoby práce	2018		

Ureasy jsou metaloenzymy katalyzující hydrolýzu močoviny. Vyskytují se u rostlin, mikroorganismů a bezobratlých. Především v imobilizované formě nalézají četná uplatnění v biotechnologiích, díky nespornému vylepšení chemických vlastností, které ve výsledku snižují náklady na provedení reakce. Navíc pokud je enzym imobilizován na magnetické nosiče, k jeho separaci od reakční směsi stačí použít vnější magnetické pole. Analýza moči je od pradávna způsob, pomocí kterého lékaři posuzovali zdraví jedince. Moč poskytuje podstatné informace užitečné ke stanovení diagnózy, ale i k sledování a léčbě široké škály onemocnění. Moč obsahuje spoustu iontů a metabolitů. Navíc ve srovnání s jinými tělními tekutinami jsou zde metabolity ve vyšších koncentracích, protože je zakoncentrují ledviny při tvorbě moči. Nicméně právě vysoké koncentrace močoviny v moči komplikuji mnoho stanovení, zejména pak metody založené na separaci pomocí plynového chromatografu. V současné době se pro eliminaci močoviny používá volná ureasa. Po hydrolýze močoviny se musí enzym odstranit centrifugací. Při použití imobilizované ureasy na magnetických nosičích se enzym oddělí externím magnetických polem, což vede k urychlení a zefektivnění celého procesu eliminace močoviny.

Klíčová slova	ureasa, imobilizace, magnetické nosiče, moč
Počet stran	59
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's	first	name	and	Viktor Valtera		
surname						
Title				Elimination of urea by immobilized urease on		
				magnetic carriers		
Type of the	esis			Diploma		
Departmen	nt			Department of biochemistry		
Supervisor	•			doc.RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.		
The year o	f prese	ntation		2018		

Abstract

Ureases are metaloenzymes that catalyze the hydrolysis of urea. They occur in plants, microorganisms and invertebrates. Especially in immobilized form, they have numerous applications in biotechnology, thanks to indisputable improvement of chemical properties, ultimately reducing the cost of reaction. In addition, if the enzyme is immobilized on magnetic carriers, it is sufficient to use an external magnetic field to separate it from the reaction mixture. Analysis of urine has long been for a way for physicians to assess the health of individual. Urine provides important information useful for diagnosis determination, but also for monitoring and treatment of a wide range of diseases. Urine contains a lot of ions and metabolites. In contrast to other biofluids, there are higher concentrations of metabolites, because the kidneys concentrate them while forming urine. However, the very high concentrations of urea in urine complicate many assays, especially those based on gas chromatography separation. Currently free urease is used to eliminate urea. After urea hydrolysis, the enzyme needs to be removed by centrifugation. When immobilized urease on magnetic carriers is used, the enzyme is separated by external magnetic field, resulting in the acceleration and streamlining of the whole process of urea elimination.

Keywords	urease, immobilization, magnetic carriers, urine
Number of pages	59
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1 ÚVOD	9
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1 Analýza moči	10
2.1.1 Způsoby eliminace močoviny ze vzorků moči	11
2.2 Ureasa	12
2.2.1 Výskyt ureas a jejich funkce	14
2.2.1.1 Ureasa v rostlinách	14
2.2.1.2 Ureolytické patogenní bakterie	15
2.2.1.3 Ureolytické bakterie v moči	16
2.2.1.4 Helicobacter pylori	17
2.2.1.5 Půdní ureasy a kolísání amoniaku v půdě	
2.2.1.6 Kyselé ureasy	19
2.2.2 Struktura ureas	19
2.2.2.1 Aktivní centrum ureas	21
2.2.3 Reakční mechanismus hydrolýzy	21
2.2.4 Inhibitory ureasy	22
2.3 Imobilizace enzymů	24
2.3.1 Aplikace ureas	26
2.3.1.1 Odstranění močoviny z vodných roztoků	26
2.3.1.2 Analytické aplikace	27
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	
3.1.1 Magnetické nosiče	
3.1.2 Biologický materiál	
3.1.3 Chemikálie a kity	
3.1.4 Přístroje a zařízení	31
3.1.5 Počítačový software	31
3.2 Metody	32
3.2.1 Syntéza magnetických mikročástic obalených chitosanem dle Pospis Safarik (2013)	kova a 32
3.2.1.1 Dynamický rozptyl světla magnetických mikročástic obalených ch	itosanem 32
3.2.2 Alikvotizace magnetických mikročástic Perloza MG 100	
3.2.3 Imobilizace ureasy na magnetické mikročástice	
3.2.3.1 Imobilizace karbodiimidovou metodou na chitosanem obalené mik	cročástice 33
3.2.3.2 Imobilizace jodistanovou metodou na mikročásticích Perloza MG	10033
3.2.3.3 Imobilizace glutaraldehydovou metodou na mikročásticích DEAE	MG 100.34
3.2.4 Stanovení vazebné kapacity magnetických nosičů	

3.2.5 Stanovení zbytkového substrátu ureasy - močoviny	
3.2.6 Plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem	
3.2.6.1 Kalibrační přímka močoviny	
3.2.7 Změna pH v průběhu reakce	
3.2.8 Stanovení teplotní stability	
3.2.9 Stanovení operační stability	
3.2.10 Stanovení vhodného pH pro reakci s imobilizovanou ureasou	
3.2.11 Spektrofotometrické stanovení močoviny pomocí komerčního kitu .	
3.2.12 Stanovení zbytkové močoviny ve vzorku moči	
4 VÝSLEDKY	
4.1 Příprava chitosanem obalených mikročástic	
4.2 Alikvotizace magnetických mikročástic Perloza MG 100	
4.3 Vazebná kapacita magnetických nosičů	40
4.4 Kalibrační přímka močoviny	41
4.5 Úbytek močoviny během reakce s volnou a imobilizovanou ureasou	42
4.6 Změna pH v průběhu reakce	43
4.7 Vliv pH na aktivitu ureasy	43
4.8 Stanovení teplotní stability volné a imobilizované ureasy	44
4.9 Stanovení operační stability imobilizované ureasy	46
4.10 Aplikace imobilizované ureasy pro odstranění močoviny ze vzorku m	oči47
5 DISKUZE	48
6 ZÁVĚR	
7 LITERATURA	53
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	59

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

- Literární rešerše zaměřená na ureasu a její vlastnosti, použití a imobilizaci
- Popis analýzy moči

Praktická část:

- Příprava imobilizované ureasy na komerční magnetické mikročástice Perloza MG 100, DEAE MG 100 a na připravené magnetické mikročástice obalené chitosanem
- Charakterizace imobilizované ureasy
- Aplikace imobilizované ureasy na vzorek moči

1 ÚVOD

Analýza moči byla po staletí jedním ze způsobů, pomocí kterého lékaři hodnotili zdraví jedince. Oproti ostatním tělním tekutinám se velmi snadno a neinvazivně získává ve velkém množství. Moč produkována savci, je čirá, sterilní, jantarově zabarvená kapalina tvořená ledvinami. Funkcí ledvin je odstranění rozpustných odpadních látek z krve. Ve výsledku pak moč obsahuje vysoké koncentrace močoviny (z metabolismu aminokyselin), anorganických solí (chlór, sodík, draslík), kreatinin, amonné ionty, organické soli, různá ve vodě rozpustná xenobiotika a pigmenty (urobilin) a jiné látky. Právě vysoké koncentrace močoviny komplikují stanovení ostatních metabolitů. V současnosti se před analýzou metabolomu moči plynovou chromatografií spojenou s hmotností spektrometrií (dále GC/MS) odstraňuje pomocí volné ureasy. Nicméně při použití volné ureasy v roztoku neexistuje rychlý a efektivní způsob odstranění enzymu z reakční směsi. Z tohoto důvodu se jeví imobilizace ureasy na magnetické nosiče jako chytré řešení. Po proběhnutí reakce stačí použít vnější magnetické pole k separaci imobilizovaného enzymu od reakční směsi. V dnešní době lze identifikovat ~ 3100 různých metabolitů v moči a kvantifikovat ~ 3900 koncentračních hladin (Bouatra et al., 2013). Existuje řada metod analýzy moči, GC/MS je obecně rozšířenou metodou metabolického profilování moči v praxi (Pasikanti et al., 2008).

Ureasy jsou metaloenzymy, které hydrolyzují močovinu na amoniak a oxid uhličitý. Vyskytují se napříč rostlinami, bakteriemi, řasami a bezobratlými, ale nejsou syntetizovány živočichy (Ligabue-Braun a Carlini, 2015). Stranou jejich biologické významnosti, ureasy nalézají uplatnění také v biotechnologické praxi, zejména pak v imobilizované formě. Imobilizací získají enzymy příznivé vlastnosti pro praktické využití. Patří mezi ně vyšší termostabilita, odolnost vůči změnám pH, lze je opakovaně použít a jsou stabilnější při skladování. Celkově tak značně snižují náklady na provedení reakce (Sahoo *et al.*, 2011).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Analýza moči

Analýzou moči lze zjišťovat celou řadu parametrů, které charakterizují zdraví jedince. V porovnání s ostatními tělními tekutinami se velmi snadno a neinvazivně získává ve velkých objemech, téměř neobsahuje interferující proteiny a lipidy a je chemicky komplexní. Moč je průhledná, sterilní, nažloutlá kapalina produkována ledvinami. Ledviny extrahují rozpustné odpadní látky z krevního oběhu, stejně jako nadbytečnou vodu, sacharidy a další různé sloučeniny. Močení je primární cesta vylučování ve vodě rozpustných odpadních látek. Průměrný dospělý člověk vygeneruje 1,5 až 2 litry moči za den (Bouatra *et al.*, 2013).

V současné době lze identifikovat ~ 3100 různých metabolitů v moči a kvantifikovat ~ 3900 koncentračních hladin (Bouatra *et al.*, 2013). Existuje řada metod analýzy moči, mezi které patří: LC/MS, NMR, CE/MS, FTIR, HPLC aj. Plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (dále GC/MS) je obecně nejrozšířenější metodou metabolického profilování moči v praxi, díky její vysoké citlivosti, rozlišení peaků a reprodukovatelnosti (Pasikanti *et al.*, 2008).

Moč na jedné straně téměř neobsahuje interferující proteiny a lipidy a je chemicky komplexní, ale na druhé straně obsahuje vysoké koncentrace močoviny (metabolismus aminokyselin), anorganické soli (chlór, sodík, draslík), kreatinin, amonné ionty, organické soli, různá ve vodě rozpustná xenobiotika a pigmenty produkované z rozkladu hemoglobinu např. urobilin, který utváří charakteristickou barvu moči (Bouatra *et al.*, 2013).

Přítomnost těchto látek v moči pak interferuje při stanovení metabolitů v moči. Zejména vysoká koncentrace močoviny znemožňuje stanovení metabolitů pomocí plynové chromatografie, a proto musí být před vlastním stanovením močovina ze vzorku nějakým způsobem eliminována.

Vysoká koncentrace močoviny v moči (9,3-23,3 g.l⁻¹; Putnam *et al.*, 1971) představuje problém v metabolomických analýzách na bázi GC-MS. Při ponechání močoviny ve vzorku dochází ke značné spotřebě derivatizačního činidla, které vede k neúplné derivatizaci jiných metabolitů (Webb-Robertson *et al.*, 2014). Močovina je tedy s nadsázkou *persona non grata* metabolitem při analýze moči. Nejstarší metodou "odstranění" močoviny z moči je extrakce kapalina-kapalina (Tanaka *et al.*, 1966), avšak tento postup je určen pouze k izolaci některých skupin organických sloučenin z vodné

10

fáze. V současné době se močovina eliminuje předběžným ošetřením enzymem ureasou. Wells *et al.*. r. 1964 poprvé informoval o použití ureasy k předběžnému ošetření vzorku moči, metoda byla poté vylepšena dalšími (Chan *et al.*, 2011).

2.1.1 Způsoby eliminace močoviny ze vzorků moči

Doposud bylo publikováno mnoho postupů, jak se zbavit močoviny před analýzou. Nejstarší z nich extrakce kapalina-kapalina (LLE) je stále často využívána (Tanaka *et al.*, 1966). Nicméně tato metoda byla primárně určena k izolaci vybrané skupiny organických látek z vodné fáze do určitého extrakčního činidla (např. ethylether nebo ethylacetát pro organické kyseliny - (Goodman a Markey, 1981); hexan pro silylazované cukry a polyoly - (Jansen *et al.*, 1986)) k zjednodušení chromatogramu, nikoli k odstranění močoviny. Při použití LLE je potřeba prostředí s velmi nízkým pH (hodnoty pH od 1 do 2), kde se močovina ionizuje a stává se tak málo rozpustná v organické fázi. Bohužel mnoho dalších močových metabolitů se také ionizuje (kreatinin, tryptofan, adenin) nebo se stává nerozpustnými (kyselina orotová, xanthin, močová kyselina). Z důvodů absence mnoha metabolitů, LLE není optimální metodou pro analýzu metabolomu. Pro analýzu kompletního metabolomu je tedy zapotřebí použít jiný přístup, který je vhodnější pro odstranění močoviny (Kuhara, 2002).

Enzym ureasa představuje příznivý specifický prostředek pro selektivní odbourávání močoviny ze vzorku moči. První použití ureasy pro odstranění močoviny bylo publikováno Wellsem v roce 1964. O tři desetiletí poté bylo zavedeno ošetření ureasou pro automatizovaný screening vzorků moči, který pokryl majoritu metabolitů, zejména sacharidů, organických kyselin a aminokyselin (Shoemaker a Elliott, 1991). Metoda nabízí dobrou opakovatelnost, přesně odráží kvantitativní rozdíly a očekávané relace mezi různými objemy moči, a v neposlední řadě umožnila kvalitativní identifikaci dalších metabolitů (Webb-Robertson *et al.*, 2014).

Nicméně použití ureasy k předúpravě vzorků je relativně pracné. Ureasa se musí po inkubaci odstranit precipitací. V důsledku precipitace pak může dojít ke zkreslení skutečného množství několika metabolitů. Při odstraňování ureasy může dojít k dalším chybám a nepřesnostem, např. strhávání některých metabolitů spolu se separací denaturované ureasy.

Při aplikaci imobilizované ureasy se celý proces značně zjednoduší a srážení enzymu již není zapotřebí. Imobilizace ureasy má kromě možné proteinové kontaminace volným enzymem také mnoho dalších výhod. Patří mezi ně možnost opakovaného použití enzymu, vyšší stabilita při skladování, rozšíření rozsahu teplotního a pH optima aj. (Pečová *et al.*, 2011). Např. ureasy imobilizované na různých polymerech byly použity jako biosenzory pro kvantifikaci močoviny ve vodných roztocích, krvi, moči, mléku nebo alkoholických nápojích (Krajewska, 2009b). Manipulace s enzymem je jednoduší, pokud použijeme magnetické látky jako nosiče pro imobilizaci (Safarik a Safarikova, 2009).

2.2 Ureasa

Ureasa (EC 3.5.1.5) je enzym široce rozšířený v přírodě. Vyskytuje se u rostlin, bakterií, hub, řas a bezobratlých. Primární funkcí ureas je hydrolýza močoviny. Konečnými produkty reakce jsou amoniak a kyselina uhličitá (Obr. 1). Zvyšují tak poměr rychlosti k nekatalyzované reakci o 8x10¹⁷ (Callahan et al., 2005). Funkčně ureasy patří do rodiny amidohydrolas a fosfotriesteras. Společným primárním znakem všech ureas je přítomnost kovových iontů v aktivních místech enzymu, jejichž úkolem je aktivace substrátu a vody pro následující reakci. Oproti ostatním dvoujaderným metalohydrolasam v "superrodině" isou unikátní obsahem nikelnatým právě v aktivních ureasy iontů místech (Krajewska, 2009b).

Oba hlavní protagonisté reakce - močovina a ureasa - mají speciální postavení z hlediska historie přírodních věd. Močovina, poprvé objevena v lidské moči Hillaire M. Roulle roku 1773 se později stala první organickou látkou syntetizovanou z anorganických látek (Wohler, 1828). Prvním objeveným ureolytickým mikroorganismem byl Micrococcus ureae v moči roku 1864 francouzským botanikem van Tieghem. O deset let později byl první ureolytický enzym objeven francouzským vědcem Fredericem Musculusem ve hnijící moči. Až objev ureasy v sóji (Glycine max) roku 1909 zajistil mnohem bohatší zdroj enzymu, což vyústilo v jeho mnohem intenzivnější studium (Fearon, 1923). Mezníkem v biochemii je bezpochyby krystalizace ureasy ze semen Canavalie ensiformis Jamesem Summerem roku 1926, která potvrdila

Obr. 1 Schéma katalyzované a nekatalyzované hydrolýzy močoviny (Krajewska, 2009a).



Obr. 2 Krystalová struktura ureasy ttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/4H9M (staženo 23.4.2018).

teorii proteinové povahy enzymů (Obr. 2). Neméně důležité bylo i zjištění, že ureasa z *C. ensiformis* obsahuje nikelnaté ionty v aktivním místě a jsou tak nezbytné pro její činnost (Nicholas *et al.*, 1975). Od svého objevu byla ureasa předmětem intenzivního výzkumu, který zahrnoval její výskyt a roli v přírodě, studium mechanismu účinku, specifičnost účinku a vliv cizích sloučenin na její aktivitu. Spolu s vývojem vědy a techniky zahrnoval výzkum dále i určení aminokyselinové sekvence, krystalické struktury nativních ureas, jejich inhibici a genetickou organizaci (Krajewska, 2009a).

Produkty ureasou katalyzované hydrolýzy močoviny jsou karbamát a amoniak, přičemž první spontánně hydrolyzuje za vzniku kyseliny uhličité a další molekuly amoniaku (viz Obr. 1). Močovina je díky resonanční energii odhadnuté na 30-40 kcal/mol stabilní ve vodných roztocích a odolává degradaci (Wheland, 1955). Nekatalyzovaný rozklad močoviny ve vodném prostředí, je eliminační reakce, při které vzniká isokyanát a ammoniak. Reakce je pomalá a probíhá nezávisle na hodnotě pH v rozmezí 2 až 12 (Alexandrova a Jorgensen, 2007).

2.2.1 Výskyt ureas a jejich funkce

Ureasy jsou enzymy široce rozšířené v přírodě. Jsou syntetizovány rostlinami, mikroorganismy, řasami, houbami, bezobratlými, a také se vyskytují volně v půdě. Z hlediska pH optima je můžeme rozdělit na kyselé a neutrální. Močovina je snadno dostupným substrátem. Její všudypřítomnost je zajištěna díky vylučování moči zvířaty, z rozkladu dusíkatých sloučenin z mrtvých organismů a také jako umělé hnojivo. Vzhledem k jejich relativně velkému výskytu hrají ureasy významnou úlohu v celkovém koloběhu dusíku v přírodě. Klíčovou funkcí je zajistit organismu dostatek dusíku ve formě amoniaku pro potřebný růst (Wang *et al.*, 2008).

2.2.1.1 Ureasa v rostlinách

Ureasa je esenciální enzym, který v rostlinách katalyzuje asimilaci močoviny po absorpci do rostlinných buněk (Obr. 3). U vyšších rostlin bylo prokázáno mnoho různých transportních systému močoviny jak pasivních, tak aktivních, které jim umožňují optimalizovat výživu dusíku v závislosti na tom, zda vznikla ve vnitřním prostředí rostliny nebo pochází z vnějšího. Z externího prostředí rostliny asimilují volnou močovinu skrz kořeny, zejména pak jako amoniak vzniklý z hydrolýzy močoviny díky přítomnosti ureas v půdě. Ostatně tato skutečnost je využívaná v praxi při hnojení močovinou. Na druhou stranu, vysoké dávky močoviny v dusíkatých hnojivech mohou představovat vážné riziko jak pro rostliny, tak celkově pro životní prostředí. Pro zlepšení hnojení se močovina aplikuje i na listovou část, ale vyšší dávky mohou být opět toxické. Je tedy zřejmé, že je potřeba získat další znalosti o mechanismech výživy rostlin močovinou, pro vývoj vyvážených strategií hnojení pro nejlepší a udržitelnou produkci zemědělských plodin (Wang *et al.*, 2008).

V rostlinných buňkách se ureasa účastní metabolismu dusíkatých látek. V něm je močovina důležitým meziproduktem dvou procesů, a sice rozkladem argininu katalyzovaný arginasou (Zonia *et al.*, 1995) a degradací purinových bazí a ureidů (Winkler *et al.*, 1988). Močovina se v rostlinných buňkách velmi rychle metabolizuje a prakticky se neakumuluje. Při nadbytečném množství může posloužit i jako zdroj dusíku. Předpokládá se, že díky vzniku amoniaku má ureasa i obrannou funkci proti rostlinným patogenům (Polacco a Holland, 1993) Ve stejném smyslu bylo nezávisle na jejich ureolytické aktivitě prokázano, že ureasy vykazují také insekticidní (Follmer *et al.*, 2004)

14



Obr. 3 Zjednodušené schéma vzniku, transportu a degradaci močoviny v rostlinných buňkách. Močovina vzniká intracelulárně nebo je přijímána z prostředí prostřednictvím transportních systémů HAT a LAT (z angl. high affinity transport resp. low affinity transport) umístěných v cytoplasmatické membráně. Enzymy tvořící močovinu jsou arginasa (1), agmatinasa (2), canavaninhydrolasa (3) a alantoátamidinohydrolasa (4). Močovina může být kompartmelizována z cytosolu do vakuol skrz transportéry TIPs (angl. tonoplast-targeted transporters) a aktivními transportéry (dosud neidentifikované), avšak zatím není jasné, zda je ve vakuole močovina uložena. Transport močoviny z mitochondrie zatím není popsána. Cytosolární močovina je hydrolyzována ureasou na amoniak, který může být asimilován glutaminsyntetasou (převzato a upraveno Wang *et al.*, 2008).

a antifungální vlastnosti (Postal *et al.*, 2012), což celkově podporuje teorii o jejich zapojení do celkové obranyschopnosti rostlin. Ureasy se vyskytují prakticky ve všech rostlinách, obzvláště pak v sóji luštinaté (*Glycine max*) obsahujících až 0,012% ureasy/suchá hmotnost a u rodu kanaválie (*Canavalia*) obsahující 0,07-0,14% ureasy/suchá hmotnost, přičemž poslední zmíněná je nejčastějším zdrojem enzymu (Summer, 1926).

2.2.1.2 Ureolytické patogenní bakterie

Ve středu pozornosti byly vždy zejména ty ureolytické bakterie, které škodí lidem a zvířatům. Patogeneze je způsobena především v důsledku hydrolýzy močoviny, která zvyšuje pH (až do ~9,2) a uvolňuje tak amoniak a jeho deriváty. Močovina, hlavní dusíkatý odpadní produkt organismu většiny pozemních živočichů, je produkována v játrech, dále transportována krevním řečištěm do ledvin, kde je exkretována močí. Koncentrace u zdravých lidských jedinců se pohybuje okolo 1-10 mM v séru a v moči až 0,5 M. Navíc 20-25 % z celkové produkce močoviny zůstává v intestinálním traktu,

přičemž koncentrace v žaludku se pohybuje okolo 1,7-3,4 mM. Vzhledem k této skutečnosti snadno dochází k častým infekcím jak v trávicí, tak vylučovací soustavě (Burne a Chen, 2000).

2.2.1.3 Ureolytické bakterie v moči

Infekce urinárního traktu zvyšuje pH moči, která je obvykle neutrální až slabě kyselá, a může způsobit řadu závažných komplikací. Jedním z nich je např. nekróza ledvinové tkáně odpovědná za vznik akutní pyelonefritidy. Dalším častějším jevem je precipitace normálně rozpustných iontů v moči, která vede k tvorbě močových kamenů. Chemicky jsou kameny složeny ze struvitu MgNH₄PO₄.6H₂O a karbonátapatitu Ca₁₀(PO₄)₆CO₃. Nejčastější bakterie způsobující jejich tvorbu je *Proteus mirabilis* (Obr. 4) a *Ureaplasma urealyticum*, dále bakterie rodu *Pseudomonas, Klebsiella* a *Staphylococcus* aj. (Collins a D'Orazio, 1993).

Mimochodem stejným způsobem dochází k vysrážení moči i mimo lidské tělo, zvláště pokud je moč oddělena z odpadních vod domácností. Srážení je opět nežádoucí a způsobuje zanášení trubek a zvyšuje tak náklady na údržbu. Na druhou stranu lze precipitaci i využít k řízenému získávání fosforu a dusíku z odpadních vod a procesech zpracování moči (Maurer *et al.*, 2006). Lidská moč se podílí na uvolnění až 80% celkového dusíku a 45% celkového množství fosfátu do komunálních odpadních vod. Znovuzískání těchto dvou dominantních živin dohromady ve formě struvitu, zvláště pak při oddělení moči od ostatního odpadu, představuje zajímavou alternativu k nyní používanému chemickému čištění při recyklaci moči (Wilsenach a van Loosdrecht, 2006).



Obr. 4 Role ureasy při infekci *P. mirabilis* vedoucí k tvorbě močových kamenů (Follmer, 2010).

2.2.1.4 Helicobacter pylori

H. pylori je hlavní ureolytickou bakterií infikující intestinální trakt. Bakterie obvykle kolonizuje slizniční epitel žaludku (Obr. 5), kde zvýšení pH silně kyselého prostředí vede k množení bakterií, které potřebují pH 6-8 k správnému růstu a přežití v nepřátelských podmínkách. V důsledku růstu pH dochází k poškození hostitelské tkáně a vzniká tak gastritida až gastroduodenální vředy. Škodlivými faktory jsou zde amoniak a monochloramin. Amoniak má přímý cytotoxicky účinek na žaludeční epiteliální buňky, zatímco chloramin indukuje mutagenní poškození DNA, které může vést v případě chronické infekce *H. pylori* až k rakovině žaludku. Mimo žaludečních komplikací, může infekce intestinálního traktu vyústit až k jaternímu selhání (Kusters *et al.*, 2006).

Zajímavá je činnost ureasy v horním zažívacím traktu, která se dá využít v neinvazivním dechovém testu pro diagnostiku bakteriálních infekcí *H. pylori*. V metodě se využívá značené močoviny ¹³C nebo ¹⁴C, která je pozřena pacientem. Pokud je patogen přítomen v žaludku, močovina je přeměněna na značený oxid uhličitý. Ten se absorbuje do krve, a poté vydechován dechem, kde je detekován hmotnostním spektrometrem nebo scintilátorem (Granstrom *et al.*, 2008).



Obr. 5 SEM fotografie *H. pylori* v kontaktu s buňkami lidského žaludečního epitelu. Při interakci mezi hostitelem a patogenem můžeme sledovat virulentní faktory flagella (červené šipky) a Cag-T4SS pili (žluté šipky). Účelem flagelly je proniknout do hostitelské tkáně skrz mukózní vrstvu. Cag-T4SS indukuje tvorbu prozánětlivých a onkogenních odpovědí hostitele (Haley a Gaddy, 2015).

2.2.1.5 Půdní ureasy a kolísání amoniaku v půdě

Ureolytická aktivita je významná vlastnost půdy v zemědělství. Tato schopnost pochází z mikroorganismů a z půdní ureasy. Zdrojem půdních ureas jsou buňky z mrtvých rostlin a mikroorganismů (Hasan, 2000). Vyskytují se zde především v imobilizované podobě na jílových a huminových látkách a proto jsou také mnohem stabilnější, než kdyby byly v půdě volně (Gianfreda *et al.*, 1995). Přítomnost této stabilní formy ureasy v půdě umožňuje použití močoviny jako účinného dusíkatého hnojiva. Díky vysokému obsahu dusíku, chemické stabilitě a nízkým výrobním nákladům zastupuje močovina více než 50 % používaných dusíkatých hnojiv na celém světě. Úlohou ureasy v půdě je přeměnit močovinu na amonné ionty, aby byly dostupné pro kořeny rostlin. Reakce může mít pro půdu i nepříznivé účinky, zejména pokud probíhá nadbytečně. Následkem je nežádoucí ztráta zásoby dusíku za vzniku amoniaku, který svou zásaditostí a toxicitou může vyvolat poškození rostlin tím, že ovlivní klíčení semen, vývoj sazenic a celkový počáteční růst.

Tyto skutečnosti pak způsobují enviromentální a ekonomické problémy (Bremner a Krogmeier, 1989).

2.2.1.6 Kyselé ureasy

Kyselé ureasy jsou zvláštní podskupinou mezi ureasami. Charakteristickou vlastností je na rozdíl od neutrálních ureas, pH optimum v rozmezí 2-4,5. Produkují je především střevní bakterie rodu *Lactobacillus, Streptococcus, Escheria, Morganella a Bifidobacterium* (Fidaleo *et al.*, 2006) a půdní bakterie *Arthrobacter mobilis* (Miyagawa *et al.*, 1999). Pozoruhodným faktem je, že doposud nebylo vysvětleno proč bakterie žijící v trávicím traktu, jehož pH je neutrální, produkují kyselé ureasy. Stejně jako neutrální ureasy, obsahují Ni²⁺ionty v aktivním centru a inhibují je stejné látky. Mají podobné K_M (kyselá K_M= 2,7 mM, neutrální K_M= 2,9 mM) ale jejich aktivita je většinou nižší (Kakimoto *et al.*, 1990).

2.2.2 Struktura ureas

Rostlinné a fungální ureasy jsou složeny z identických podjednotek velkých přibližně kolem 90 kDa, nejčaštěji pak v trimerech α_3 a hexametrech α_6 (Das *et al.*, 2002). α podjednotka z *C. ensiformis* je složena z 840 aminokyselin, její molekulová hmotnost bez Ni²⁺iontů činí 90,77 kDa, hmotnost hexameru včetně Ni²⁺ iontů je 545,34 kDa (*Dixon et al.*, 1980).

Na rozdíl od rostlin a hub jsou bakteriální ureasy složeny ze tří rozdílných podjednotek, jedné velké (α , 60-76 kDa) a dvou malých (β , 8-21 kDa a γ , 6-14 kDa), které běžně tvoří trimery ($\alpha\beta\gamma$)₃, s odpovídající molekulovou hmotností 190-300 kDa. Typickými příklady jsou pak ureasy bakterií *Klebsiella aerogenes* (Jabri *et al.*, 1995) a *Bacillus pasteuri* (Benini *et al.*, 1999). Naproti tomu ureasy z bakterie *H. pylori* jsou složeny ze dvou podjednotek α (61-66 kDa) a β (26-31 kDa), které se formují do dodekamerického komplexu (($\alpha\beta$)₃)₄ (Ha *et al.*, 2001).

Přestože jsou ureasy složeny z různých typů podjednotek, vykazují vysokou homologii aminokyselinových sekvencí napříč rostlinami i bakteriemi (Obr. 6). Srovnání ($\alpha\beta$) jednotky *H. pylori* s ($\alpha\beta\gamma$) jednotky ostatních bakterií společně s monomerem z *C. ensiformis* podporuje teorii, že všechny ureasy jsou evoluční varianty jednoho ancestrálního enzymu. Důležitou charakteristikou je také přítomnost aktivního místa pouze v α podjednotce (Krajewska, 2009b).

Všechny rostlinné a bakteriální ureasy kromě těch z *H. pylori* jsou lokalizovány pouze v cytoplasmě (Messerschmidt, 2001). Při rozpadu bakterie *H. pylori* se uvolněný enzym spojuje s povrchem neporušených buněk a reprezentuje tak přibližně 30 % celkové aktivity (Krishnamurthy *et al.*, 1998). Předpokládá se, že právě dodekamerická struktura enzymu spolu s nízkou hodnotou K_M (0,2-0,8 mM) zajišťuje účinnost i při nízkých koncentracích substrátu, poskytuje ochranu bakterie proti kyselému prostředí a umožňuje jí obývat žaludeční lumen (Scott *et al.*, 2002).



Obr. 6 Strukturní podjednotky ureas (převzato a upraveno Krajewska, 2009a).

2.2.2.1 Aktivní centrum ureas

Vlastnosti aktivního místa ureasy byly získány studiem krystalických struktur u bakterií K. aerogenes a B. pasteurii. Aktivní místo enzymu obsahuje binukleární nikelnaté centrum, kde vzdálenost Ni-Ni je 3,5Å u K. aerogenes a 3,7Å u B. pasteurii. V centru jsou kovové ionty spojeny karbamylovaným lysinem skrze jeho kyslíkové atomy s Ni(1), dále koordinovány dvěma histidiny přes dusíkové atomy, Ni(2) pak dvěma histidiny přes dusíkové atomy a navíc kyselinou asparagovou přes kyslíkové atomy. Mimoto, jsou ionty Ni můstkovány hydroxidovým iontem (WB), který společně se dvěma molekulami vody W1 na Ni(1) a W2 na Ni(1) a jednou molekulou vody W3 umístěným směrem k aktivnímu centru tvoří tetraedrální klastr ze zmíněných molekul vody, který plní dutinu aktivního místa. Právě tento klastr nahrazuje močovinu při vazbě na aktivní centrum v reakci. V konečném součtu je pak Ni(1) pětkrát koordinačně vázán a Ni(2) šestkrát (Obr. 7a), dohromady má jejich koordinační geometrie tvar pseudo-čtvercopyramidová a a pseudo-oktaedrální. Zásadní skutečností je, že obě zmíněné ureasy mají stejnou konformaci aktivního místa, a jsou tedy běžné pro všechny ureasy. Aminokyselinová residua v aktivním centru, se podílí na mobilní klapce, která je považována za bránu pro substrát. Zejména díky vodíkovým můstkům se residua účastní na vazbě substrátu, stabilizují katalytický přechodový urychlují reakci stav a (Jabri et al., 1995; Benini et al., 1999).

2.2.3 Reakční mechanismus hydrolýzy

V aktivním místě ureasy se močovina váže na více elektrofilní Ni(1) ion s kyslíkovým atomem karbonylové skupiny, čímž se stává karbonylový uhlík elektrofilnějším, a proto je náchylnější k nukleofilnímu ataku. Při nahrazování V1-V3 vod se močovina dále váže na Ni(2) přes dusík z jedné aminoskupin, a tímto je bidentátně navázána. Předpokládá se, že tato vazba usnadňuje nukleofilní napadení vody na karbonylovém uhlíku, což vede ke vzniku tetraedrického meziproduktu, ze kterého je posléze uvolněn amoniak a karbamát (Benini *et al.*, 1999).

Zatímco Benini *et al* (1999) navrhuje, že nukleofilní útok je proveden můstkovým hydroxidem, přičemž zároveň působí jako obecná kyselina, která je donorem protonu pro odštěpující se molekuly amoniaku, Karplus *et al* (1997) tvrdí, že His320 umístěný v pohyblivé klapce aktivního místa se chová jako kyselina a je donorem protonu. Navíc zcela nevylučují monodentátní vazbu močoviny pouze na Ni(1), a přitom Ni(2) zajistí molekulu vody jako nukleofil ke karbonylovém atomu uhlíku močoviny. Druhý

mechanismus je také podporován pomocí simulací molekulární dynamiky (Manunza *et al*, 1999) aj., nicméně doposud nebyl mechanismus zcela objasněn.

2.2.4 Inhibitory ureasy

Ureasy jsou inhibovány řadou látek. Vznikající amonné ionty a další substrátové analogy slabě inhibují enzym. Kinetická analýza inhibice substrátovými analogy je obtížná, protože obvykle ztrácí ureasa aktivitu již v počáteční fázi a nedochází k reaktivaci enzymu (Blakeley *et al.*, 1969).



Obr. 7 Schématické struktury aktivních míst ureas a) nativní ureasa, b) inhibice β -merkaptoethanolem, c) inhibice kys. acetohydroxamovou a d) inhibice fosfátem (převzato a upraveno Krajewska, 2009a).

Thioly inhibují ureasu kompetitivně jako anion thiolát (Obr. 7b). Krystalová struktura ureasy s β-merkaptoethanolem, modelovým zástupcem skupiny, ukázala navázání β-merkaptoethanolu k urease nahrazením všech čtyř molekul vody v aktivním místě. Sírový atom inhibitoru naváže Ni ionty místo vody, a sníží tak vzdálenost Ni(1)-Ni(2) na 3,1Å, zatímco hydroxylová skupina thiolu se koordinuje na Ni(1) místo vody (V1). Ve výsledku jsou oba Ni ionty pětkrát koordinované (Benini *et al.*, 1998).

Podobná penta-koordinace byla pozorována také u inhibice kyselinou acetohydroxamovou (Obr. 7c). V tomto případě přemostění zkracuje vzdálenost mezi Ni ionty na 3,5Å. Zprostředkováno je kyselým kyslíkem hydroxamátu, přičemž karbonylový kyslík liguje Ni(1) ion. Acylhydroxamové kyseliny R-NHOH jsou silnými kompetitivními inhibitory (Benini *et al.*, 2000). Díky nízké toxicitě jsou intenzivně studovány v lékařských terapiích, kde mohou být použity v patologických stavech indukovaných ureolytickými bakteriemi (Burne a Chen, 2000).

Fosfátový pufr, velmi častý v kinetických studiích ureasy, je dlouho znám pro inhibiční efekt v závislosti na pH (Obr. 7d). Síla inhibice klesá se zvyšujícím se pH kolem 7,0-7,5. Účinek inhibice se připisuje iontu $H_2PO_4^-$, který byl ověřen krystalovou strukturou komplexu ureasy-fosfát při pH 6,3. V aktivním místě tetraedr H_2PO_4 téměř dokonale nahradí klastr čtyř molekul vody v nativním enzymu a dojde ke snížení vzdálenosti Ni-Ni (Benini *et al.*, 2001).

Těžké kovy inhibují jak rostlinné, tak bakteriální ureasy přibližně v následujícím pořadí účinnosti: $Hg^{2+} Ag^+>Cu^{2+}>>Ni^{2+}>Cd^{2+}>Zn^{2+}>Co^{2+}>Fe^{3+}>Pb^{2+}>Mn^{2+}$. Inhibice je obvykle připisována reakci iontů těžkých kovů s thiolovými skupinami enzymu, což vedlo k tvorbě merkaptidů (Zaborska *et al.*, 2004). Nicméně ionty Cu²⁺ a Ag⁺ se váží kromě SH skupin také na funkční skupiny histidinu (přes dusík) a kyseliny asparagové (kyslík) resp. glutamové (Krajewska, 2008). V praxi je inhibice těžkými kovy významná ze dvou důvodů. Prvním a negativním je samozřejmě znečištění hospodářské půdy a ovlivnění aktivity půdních ureas. Druhým je, že tato inhibice může být využita při konstrukci sensorů založených právě na inhibici ureasy *in situ* a v reálném čase pro stanovení hladin iontů. Senzory pak mohou být využity při monitorování životního prostředí, ke kontrole potravin a medicínské analýze (Kuswandi, 2003).

2.3 Imobilizace enzymů

Širší použití enzymů ve srovnání s konvenčními chemickými katalyzátory je i přes jejich zřejmé výhody omezeno řadou praktických problémů. Vedle vysokých nákladů na izolaci a purifikaci enzymů je hlavním problémem jejich citlivost vůči jiným podmínkám než jim vlastním. Mezi ně patří zejména teplota, pH a citlivost na inhibitory. Výsledkem je pak omezená životnost enzymů (Sheldon, 2007).

Jedním ze způsobů zlepšení zmíněných omezení je imobilizace enzymů. Imobilizace enzymu rozumíme jeho přeměnu na nerozpustnou formu, nejčastěji fixací na pevné nosiče. Reakce pak probíhá v heterogenních enzymových systémech, kde je stabilizována jejich struktura a tím i jejich aktivita. Heterogenita reakční směsi umožňuje také snadné oddělení enzymu od reakční směsi. Imobilizace samozřejmě ovlivní vlastnosti enzymu oproti volnému enzymu, čehož lze využít pro přizpůsobení pro specifické aplikace (Cao, 2005).



Obr. 8 Schéma různých metod imobilizace enzymů (upraveno a převzato Sirisha et al., 2016).

Enzym (EC číslo)	Substrát	Produkt
Glukosaisomerasa (5.3.1.5)	Glukóza	Fruktóza (vysoko-fruktózový
		kukuřičný sirup)
β-Galaktosidasa (3.2.1.23)	Laktóza	Glukóza a fruktóza
		(bezlaktózové mléko a
		syrovátka)
Lipasa (3.1.1.3)	Triacylglyceroly	Kakaové máslo
Nitrilhydratasa (4.2.1.84)	Akrylonitril	Akrylamid
Aminoacylasa (3.5.1.14)	D,L-Aminokyseliny	L-aminokyseliny (methionin,
		alanin, fenylalanin, tryptofan,
		valin)
Rafinasa (3.2.1.22)	Rafinóza	Galaktóza a sacharóza
Invertasa (3.2.1.26)	Sacharóza	Směs glukózy/fruktózy
Aspartátamoniaklyasa (4.3.1.1)	Amoniak + kys. fumarová	Kyselina asparagová
Termolysin (3.4.24.27)	Peptidy	Aspartam
Glukoamylasa (3.2.1.3)	Škrob	D-glukóza
Papain (3.4.22.2)	Proteiny	Zamezení kalení piva
Penicilinamidasa (3.5.1.11)	Peniciliny G a V	6-aminopenicilanová kyselina
β-Tyrosinasa (4.1.99.2)	Pyrokatechol	L-3,4-dihydroxyfenylalanin

Tab. 1 Některé důležité průmyslové aplikace imobilizovaných enzymů (Krajewska, 2004).

Existují různé metody imobilizace enzymů. Tradiční klasifikace se dělí na chemické a fyzikální (Obr. 8), i když velmi často se používají jejich kombinace s následnou úpravou. Mezi chemické patří kovalentní připojení k pevným nosičům a zesíťování (crosslinking) nizkomolekulárními činidly, které se v některých případech provádí s přidáním neutrální sloučeniny (co-crosslinking). Na druhé straně fyzikální metody zahrnují adsorpci na pevné nosiče, zachycení v gelu, mikroenkapsulace v pevných nebo tekutých membránách, formace Langmuir-Blodgett filmů a vrstvení. Výběr materiálu, na který chceme enzym imobilizovat je prakticky neomezený, zahrnuje organické a anorganické, přírodní a syntetické materiály, které mohou být různě konfigurovány jako (mikro-, nano-) částice, membrány, vlákna, (mikro-)kapsule, houby dle povahy experimentu (Cao, 2005).

Doposud bylo imobilizováno mnoho různých enzymů (Tab. 1) na různé nosiče především v analytických, lékařských, průmyslových a biotechnologických oborech.

2.3.1 Aplikace ureas

2.3.1.1 Odstranění močoviny z vodných roztoků

Odstranit močovinu z vodných roztoků je častým problémem v mnoha oblastech jako je průmysl, zemědělství, lékařství aj. Vyplývá to i ze skutečnosti, že výroba močoviny dosahuje produkce 1x10⁸ tun po celém světě, z toho více než 90 % je použito jako hnojivo. Při výrobě jsou tekuté odpady obsahující močovinu (0,2-2%) výsledkem procesu čištění močoviny a následné regenerace po její syntéze. Před vypuštěním do životního prostředí je nutné, aby se obsah močoviny značně snížil (Simka a Piotrowksi, 2007). Dalšími zdroji močoviny v enviromentálním prostředí jsou zemědělská hnojiva na polích, odpad z domácností a z vylučování moči zvířaty. Koncentrace močoviny v hnojené půdě tak může dosahovat až 70 µM, tyto relativně nízké hodnoty jsou výsledkem rychlého působení ureas (Wang *et al.*, 2008). Přestože má močovina obecně malou ekotoxicitu, její nadměrné množství může mít nepřímý dlouhodobý dopad na životní prostředí. Především je to eutrofizace a znečištění podzemních vod. Navíc je vznikající amoniak z hydrolýzy močoviny toxický, zvyšuje pH půdy a často těká do ovzduší jako součást emisí (Krajewska, 2009b).

Katalýza imobilizovanou ureasou byla zkoumána na několika aplikacích, přičemž detoxifikace krve je pravděpodobně hlavní. Detoxifikace krve je proces, ve kterém se krev čistí od uremických toxinů, kde koncentrace krevní urei je snížena z 20-50 mM na méně než 10 mM (Della Ciana a Caputo, 1996). Základním konceptem je hledání technik detoxikace krve, které by mohly zjednodušit technickou stránku umělé ledviny a zmenšit její velikost, aby mohla být případně přenosná/nositelná (Chang, 1978). Umělá ledvina se používá při hemodialýze, kdy je potřeba nahradit funkci ledvin. Umělé ledviny jsou nákladné stroje, pro obsluhu je potřeba proškolený personál a v neposlední řadě velmi omezují pohyblivost pacienta. Mimoto spotřebují až 100-300 l dialyzačního roztoku za jednu hemodialýzu. Nápad použití ureasy k odstranění urei byl realizován Changem r. 1964 s objevem semipermeabilních mikrokapsulí. Ureasa byla zachycena v ultra-tenké, netoxické semipermeabilní membráně, která umožňovala volnou difuzi nízkomolekulárních látek (urea, amoniak) a byla nepropustná pro vysokomolekulární sloučeniny. Vynález byl dále vylepšen o sorbenty/iontové výměníky pro zachycení amonných iontů a byl testován v mimotělních hemoperfuzních systémech (Chang, 1966). Umělá ledvina je uzavřenou jednotkou, ve které recirkuluje malé množství dialyzátu, který je očištěn od uremických toxinů. Močovina se odstraňuje imobilizovanou ureasou,

vznikající amonné a uhličitanové ionty jsou zachyceny na iontoměničích a další toxiny jsou odstraněny adsorpcí na aktivním uhlí. Komerční dialyzáty potřebují 5 litrů dialyzátu nebo méně (Gordon *et al.*, 1971).

Enzymová hydrolýza močoviny může být provedena v podstatě za jakýchkoli okolností. Příkladem je konstrukce uzavřených systémů za účelem rekultivace vody pro posádku vesmírných lodí a stanic, důležitých především při delších pobytech (Schussel a Atwater, 1995).

Kyselé ureasy, zejména z *Lactobacilllů*, jsou v současné době komerčně dostupné v rozpustné i nerozpustné (imobilizované) formě, a jsou používány k odstranění močoviny z alkoholických nápojů (Esti *et al.*, 2007). Při neodstranění močoviny během výroby nebo skladování alkoholických nápojů, dochází k její reakci s ethanolem za vzniku ethylkarbamátu, který je karcinogenní. Při nízké hodnotě pH vína (3,2), mají kyselé ureasy optimální vlastnosti pro eliminaci močoviny na rozdíl od neutrálních (Fidaleo *et al.*, 2006).

2.3.1.2 Analytické aplikace

Pochopitelně, nejdůležitější analytickou aplikací ureasy je kvantifikace močoviny ve vodných roztocích. Přestože hlavním zájmem byla vždy její uplatnění v lékařské praxi, roste poptávka po rychlých a spolehlivých analytických postupech i v jiných oblastech, v souvislosti s životním prostředím, průmyslem, potravinářstvím apod. V lékařské praxi se urea analyzuje hlavně v krvi a moči. Kromě toho, že je důležitým ukazatelem funkce ledvin a jater, krevní urea se používá i jako marker pro kvantifikaci a sledování při hemodialýze. Naproti tomu v potravinářství se močovina rutinně kvantifikuje např. v kravském mléce v alkoholických а nápojích (Francis et al., 2002). Hlavní složkou neproteinového dusíku v mléce je právě močovina (3-6 mM), která je indikátorem účinnosti krmení bílkovinami. Pokud využijeme tuto informaci, můžeme výrazně zlepšit hospodaření s produkcí mléka a chovem zvířat (Sharma et al., 2008).

V porovnání s přímými postupy kvantifikace, nepřímé využívající ureasu jsou neméně přínosné. V těchto postupech se močovina stanoví pomocí měření množství produktů, zvýšením pH nebo vodivostí roztoku (Francis *et al.*, 2002). Amoniak může být stanoven kolorimetricky indofenolem (Weatherburn, 1967), Nesslerovým činidlem, potenciometricky s použitím selektivních elektrod pro amonné ionty

27

(Krajewska *et al.*, 2003), enzymovými metodami využívající glutamátdehydrogenasu, titrací oxidem uhličitým při použití značené močoviny ¹³C nebo ¹⁴C (Harris *et al.*, 1997).

Všechny zmíněné aplikace pracují s rozpustnou ureasou. Z toho se přímo nabízí využití imobilizované ureasy jako biosenzor (Obr. 9; Nakamura a Karube, 2003). Enzym je imobilizován buďto přímo na pracovní špičce nebo v membráně, která ho obaluje. První biosenzor močoviny byl připraven Guilbault *et al.* r. 1969, a doposud bylo publikováno mnoho dalších. Používají přitom různé techniky jako spektrometrie, potenciometrie, selektivní elektrody, konduktometrie, amperometrie, akustické a tepelné metody a další. Praktické, nízkonákladové a přenosné biosenzory, které jsou užitečné především pro měření *in situ* a v reálném čase, mají velký potenciál do budoucna, jakmile se zlepší jejich skladovací a provozní stabilita (Singh *et al.*, 2008).



Obr. 9 Schéma typického biosenzoru močoviny (převzato a upraveno Dhawanet al., 2009).

Stejně slibné vlastnosti mají ureasové biosenzory pro analýzu látek, které působí jako inhibitory ureas (Krawczynski a Krawczyk, 1998). Postup je založen na měření míry inhibice vyvolanou inhibitory a využívají tak citlivosti enzymu i na nepatrné koncentrace inhibitoru. Takové biosenzory nabízejí obrovský potenciál pro měření stopových množství znečisťujících látek v ekologickém screeningu a monitorování, kontrole potravin a lékařství. Díky své citlivosti je ureasa vhodná zejména pro stanovení těžkých kovových iontů, zejména rtuti (Krajewska *et al.*, 2004). Vedle problémů se stabilitou, trpí tyto biosenzory nedostatkem selektivity v reálných vzorcích. Navrhnutým řešením je sestavením hybridního enzymového systému, který vykazuje různé citlivosti na různé inhibitory (Soldatkin *et al.*, 2012).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1.1 Magnetické nosiče

Magnetické mikročástice (γ-Fe₂O₃, Fe₃O₄) MG100 a DEAE byly získány od firmy Iontosorb Anežky České 657/3 Ústí nad Labem 400 07.

Magnetické mikročástice (Fe₃O₄) obalené chitosanem byly připraveny dle Pospiskova a Safarik (2013).

3.1.2 Biologický materiál

Moč (vlastní).

3.1.3 Chemikálie a kity

Ureasa (Sigma-Aldrich, USA) z rostliny Canavalia ensiformis.

Pro imobilizaci ureasy jodistanovou metodou na MG100 byl použit jodistan sodný (Sigma-Aldrich, USA).

Pro imobilizaci glutaraldehydovou metodou na DEAE MG 100 byl použit 50 % glutaraldehyd (Fluka, Švýcarsko).

Pro imobilizaci karbodiimidovou metodou na chitosanem obalené mikročástice byl použit N-hydroxysukcinimid (NHS; Sigma-Aldrich, USA) a N-(3dimethylaminopropyl)-N⁴-ethylkarbodiimid hydrochlorid (EDC.HCL; Fluka, Švýcarsko).

Pro přípravu chitosanem obalených mikročástic byl použit heptahydrát síranu železnatého a chitosan (Sigma-Aldrich, USA).

Močovina byla derivatizována směsí *N*,*O*-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) s obsahem 1% trimethylchlorsilanu (TMCS) a pyridinu (obě Sigma-Aldrich, USA).

Pro spektrofotometrické stanovení močoviny byl použit komerční kit (BioSystems, Španělsko).

Množství navázaného enzymu bylo stanoveno Bradfordovou metodou na mikrodestičkovém readru pomocí barviva Coomassie Brilliant Blue G250 (Fluka, Švýcarsko).

Pro přípravu fosfátových pufrů byl použit hydrogenfosforečnan draselný a dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, ČR).

Ostatní použité chemikálie byly dodány následujícími firmami Lach-Ner (ČR), PENTA (ČR) či Sigma-Aldrich (USA).

3.1.4 Přístroje a zařízení

Analytické váhy	Sartorius (Německo)
Automatický rotátor	Biosan (Lotyšsko)
Elektromagnetická míchačka	IKA (Německo)
Inkubační lázeň suchá	Major Science (USA)
Lyofilizátor LYOVAC GT2	Leybold Heraeus (Německo)
Mikrodestičkový reader Synergy HT	BioTek (USA)
Mikrovlnná trouba	Tescoma (Česká Republika)
Digitální pH metr	InoLab (Německo)
Pipety 1µl-5ml	Eppendorf (Německo)
Plynový chromatograf Agilent 7820A	Agilent Technologies (USA)
Světelný mikroskop Olympus BX50	Olympus (Japonsko)
Termostat plus	Eppendorf (Německo)
Třepačka MS 3 digital	IKA (USA)
Vortex V-1 plus	Biosan (Lotyšsko)
Zetasizer Nano ZS	Malvern (Nizozemsko)

3.1.5 Počítačový software

Data z plynového chromatografu s detekcí ionizací plamenem byla vyhodnocena pomocí EZChrom Elite Compact (Agilent, USA).

3.2 Metody

3.2.1 Syntéza magnetických mikročástic obalených chitosanem dle Pospiskova a Safarik (2013)

1 g chitosanu byl rozpuštěn ve 250 ml 5 % (v/v) kyselině octové za neustálého míchání na elektromagnetické míchačce (300 RPM). Poté bylo do roztoku přidáno 250 ml deionizované vody a 100 ml 3,6% (w/v) roztoku FeSO₄. 7 H₂O. Po zalkalizování roztoku kapkami NaOH až do pH 10 se vysrážel černý precipitát oxidu železa. Poté se porce suspenze (200-250 ml) převedly do 800-1000 ml kádinek. Suspenze se v mikrovlnné troubě vařila při maximálním výkonu 700 W na 10 min. Takto připravené částice byly opakovaně promyty vodou. Obalené mikročástice byly vyhodnoceny pomocí světelného mikroskopu Olympus BX50.

3.2.1.1 Dynamický rozptyl světla magnetických mikročástic obalených chitosanem

Dynamický rozptyl světla (DLS) je vhodná absolutní metoda pro přesné stanovení velikosti částic v suspenzích (Ševčíková *et al.*, 2014). Zásobní roztok mikročástic byl 100x naředěn, a 2 ml naředěného roztoku bylo převedeno do kyvety a změřen dynamický rozptyl světla.



Obr. 10 Koloidní analyzátor Zetasizer Nano ZS (https://malvernpanalytical.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nanorange/zetasizer-nano-zs; staženo dne 9.4.2018)

3.2.2 Alikvotizace magnetických mikročástic Perloza MG 100



Obr. 11 Odebírání alikvotů mikročástic Perloza MG 100

Při alikvotizaci na 100 mg byly do 50 ml falkony přidány 2 g částic a 20 ml vody, resp. 1 g částic a 20 ml vody při alikvotizaci na 50mg. V obou případech se alikvoty odebíraly vždy po jednom mililitru. Směs se musí neustále protřepávat na třepačce při 200 RPM, protože jinak mají částice tendenci velmi rychle sedimentovat ke dnu.

3.2.3 Imobilizace ureasy na magnetické mikročástice

3.2.3.1 Imobilizace karbodiimidovou metodou na chitosanem obalené mikročástice

Do 2 ml mikrozkumavek bylo naváženo 100 mg magnetických mikročástic obalených chitosanem. K nim bylo přidáno 400 µl 0,1 mol.1⁻¹ NHS v 0,2 mol.1⁻¹ fosfátovém pufru pH 6 a 400 µl 0,052 mol.1⁻¹ EDC.HCL v 0,2 mol.1⁻¹ fosfátovém pufru pH 6. Dále bylo přidáno 500 µl roztoku ureasy ve vodě o koncentraci 10 mg.ml⁻¹, 450 µl vody a 150 µl 0,2 mol.1⁻¹ fosfátového pufru pH 6. Mikrozkumavky byly pak protřepávány v automatickém rotátoru 21 hodin v ledničce při 4 °C. Po inkubaci byly částice separovány vnějším magnetickým polem a roztok odpipetován. Následně byly částice 10x promyty 0,2 mol.1⁻¹ fosfátovým pufrem pH 7.

3.2.3.2 Imobilizace jodistanovou metodou na mikročásticích Perloza MG 100

Do 2 ml mikrozkumavek bylo naváženo 100 mg magnetických mikročástic Perloza MG 100. K nim byly přidány 2 ml 0,05 mol.1⁻¹ NaIO₄. Mikrozkumavky byly protřepávány 21 hodin v automatickém rotátoru při laboratorní teplotě. Poté byly 5x promyty 0,1 mol.1⁻¹ fosfátovým pufrem pH 8. K mikročásticím se přidalo 500 µl roztoku ureasy ve vodě o koncentraci 10 mg.ml⁻¹, 450 µl vody a 950 µl 0,2 mol.1⁻¹ fosfátového pufru pH 8.

Mikrozkumavky byly pak protřepávány v automatickém rotátoru 21 hodin v ledničce při 4 °C. Po inkubaci byly částice separovány vnějším magnetickým polem a roztok odpipetován. Následně byly částice 10x promyty 0,2 mol.l⁻¹ fosfátovým pufrem pH 7.

3.2.3.3 Imobilizace glutaraldehydovou metodou na mikročásticích DEAE MG 100

Do 2 ml mikrozkumavek bylo naváženo 100 mg magnetických mikročástic DEAE MG 100. K nim bylo přidáno 1900 μ l 5 % (v/v) glutaraldehydu ve vodě. Mikrozkumavky byly protřepávány 4 hodiny v automatickém rotátoru při laboratorní teplotě. Poté byly 5x promyty 0,1 mol.1⁻¹ fosfátovým pufrem pH 8. Mikrozkumavky byly pak protřepávány v automatickém rotátoru 21 hodin v ledničce při 4 °C. Po inkubaci byly částice separovány vnějším magnetickým polem a roztok odpipetován. Následně byly částice 10x promyty 0,2 mol.1⁻¹ fosfátovým pufrem pH 7.

3.2.4 Stanovení vazebné kapacity magnetických nosičů

Vazebná kapacita jednotlivých mikročástic byla stanovena Bradfordovou metodou. Z rozdílů koncentrace proteinů před a po imobilizaci ureasy byla stanovena celková vazebná kapacita na 1 mg mikročástic každého nosiče. Do destičky bylo napipetováno 50 µl vzorku před a po imobilizaci na mikročástice a 200 µl pracovního roztoku Bradfordova činidla. Ten byl připraven smícháním zásobního roztoku činidla Coomassie Brilliant Blue G250 a vody v poměru 1:4. Destička byla jemně protřepána, inkubována 5 minut a následně byla změřena absorbance při 595 nm.

Připraven byl také standardní roztok proteinu BSA o koncentraci 1 mg.ml⁻¹ a byla vytvořena kalibrační přímka o koncentraci 0,025 až 1 mg.ml⁻¹. Z rovnice přímky byla vypočítána celková koncentrace proteinů ve vzorcích.

Zásobní roztok činidla Coomassie Brilliant Blue G250 byl připraven rozpuštěním 50 mg Coomassie Brilliant Blue G250 v 25 ml methanolu a 50 ml 85 % kyseliny fosforečné a doplněn do 100 ml deionizovanou vodou.

3.2.5 Stanovení zbytkového substrátu ureasy - močoviny

Stanovení zbytkové (nezreagované) močoviny bylo provedeno pomocí plynového chromatografu s plamenovým ionizačním detektorem.

K připraveným mikročásticím s imobilizovanou ureasou bylo přidáno 800 μl vody a 1200 μl 500 mmol.l⁻¹ močoviny v 41,5 mmol.l⁻¹ fosfátovém pufru pH 7. Výsledná koncentrace močoviny reakci pak byla 300 mmol.l⁻¹ a koncentrace pufru 25 mmol.l⁻¹. Úbytek substrátu se sledoval po 5,10 a 20 minutách, kdy se reakce ukončila separací mikročástic vnějším magnetickým polem. Poté bylo odebráno 50 µl vzorku pro derivatizaci a následné stanovení množství nezreagované močoviny. Vše bylo provedeno při laboratorní teplotě 25 °C.

V porovnání s imobilizovanou ureasou byla reakce provedena i s volným enzymem, kde se k 60 μ l enzymu o koncentraci 10 mg.ml⁻¹přidalo 740 μ l vody. Zde byla reakce ukončena přidáním 6 μ l 10 % (v/v) kyseliny trifluoroctové.

Před derivatizací byly vzorky zamraženy na -80 °C na 30 minut a poté lyofilizovány 3 hodiny. Nezreagovaná močovina byla zderivatizována 300 μ l směsí, která byla připravena smícháním 100 μ l *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) s obsahem 1% trimethylchlorsilanu (TMCS) a 200 μ l pyridinu. Vše bylo prováděno v digestoři pod dusíkovou atmosférou, aby se zabránilo vniknutí vlhkosti. Vzorky byly po přidání derivatizační směsi inkubovány v termostatu 45 minut při 80 °C.

3.2.6 Plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem

Množství derivatizované močoviny bylo stanoveno plynovým chromatografem (GC) s plamenovým ionizačním detektorem (FID) Agilent 7820A GC. Zdrojem nosného plynu byla tlaková láhev dusíku za konstantní průtokové rychlosti 1 ml.min⁻¹. Pro detekci FID byla použita tlaková láhev vodíku s průtokem 25 ml.min⁻¹ a vzduchu s průtokem 400 ml .min⁻¹. 1 µl vzorku byl zaveden automatickým dávkovačem do proudu nosného plynu. Separace byla provedena na HP-5 kapilární koloně obsahující 5 %-fenyl-methylpolysiloxan o rozměrech 30m x 0,32 mm x 0,25 µl. Nastavení teploty bylo 80 °C od 0-4 minuty; 170 °C 4-8,5 min; 250 °C 8,5-11,7 min poté každou minutu po 25 °C až 300 °C. Teplota detektoru byla udržována při 300 °C. Čas analýzy jednoho vzorku byl 11,7 min. Píky silanyzované močoviny odpovídaly retenčním časům 8,4; 8,9 a 9,2 minuty. Obsahy jednotlivých píků byly sečteny a bylo stanoveno nezreagované množství zreagované močoviny.

3.2.6.1 Kalibrační přímka močoviny

Standardy o koncentraci močoviny 5 mmol.l⁻¹, 20 mM mmol.l⁻¹, 40 mmol.l⁻¹ a 60 mmol.l⁻¹ ¹ byly připraveny ředěním zásobního roztoku. Do vialek bylo odebráno 50 μl standardu následně byly lyofilizovány a derivatizovány analogicky jako vzorky.

3.2.7 Změna pH v průběhu reakce

V průběhu reakce bylo sledováno zvýšení pH způsobené vlivem vzniku amoniaku z reakce katalyzované ureasou. Změna pH byla sledována každých 30 s pomocí pH-metru dokud se pH neustálilo.

3.2.8 Stanovení teplotní stability

Vzorek imobilizované ureasy byl inkubován v termostatu 30 min při 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80 a 90 °C. Následně byl prudce ochlazen v ledové lázni a poté bylo stanoveno zbytkové množství nezreagované močoviny. Z toho bylo dopočítáno zreagované množství na základě znalosti počátečního množství močoviny. Nejvyšší množství zreagované močoviny při dané teplotě bylo zvoleno jako 100 %.

3.2.9 Stanovení operační stability

Při stanovení operační stability enzymu se stanovovalo zbytkové množství nezreagované močoviny během 8 cyklů. Na základě těchto hodnot bylo zjištěno množství zreagované močoviny. Po každém měření se imobilizovaný enzym separoval magnetem ke stěně kyvety, odpipetovala se reakční směs a mikročástice s navázaným enzymem se promyly 10x 0,1 mol.l⁻¹ fosfátovým pufrem pH 7. Zreagované množství močoviny po prvním cyklu bylo zvoleno jako 100 %.

3.2.10 Stanovení vhodného pH pro reakci s imobilizovanou ureasou

Imobilizovaná ureasa byla inkubována 30 minut při laboratorní teplotě v 0,2 mol.1⁻¹ fosfátovém pufru o pH 6, 7 a 8. Poté byly částice promyty 10x 0,1 mol.1⁻¹ fosfátovým pufrem pH 7 a následně se stanovilo zbytkové množství nezreagované močoviny. Z toho bylo dopočítáno zreagované množství na základě znalosti počátečního množství močoviny. Nejvyšší množství zreagované močoviny při daném pH bylo zvoleno jako 100 %.

3.2.11 Spektrofotometrické stanovení močoviny pomocí komerčního kitu

Principem metody je přeměna močoviny na barevný komplex, který lze měřit spektrofotometricky při 600 nm. Amonné ionty vzniklé z hydrolýzy močoviny ureasou, reagují s chlornanem a salicylátem za vzniku barevného (modrého) indofenolu. Spřaženou reakci lze vyjádřit následovně:

 $\begin{aligned} \text{Močovina} + \text{H}_2\text{O} &\xrightarrow{\text{ureasa}} 2 \text{ NH}_4^+ + \text{CO}_2 \\ \text{NH}_4^+ + \text{Salicylát} + \text{NaClO} &\xrightarrow{\text{nitroprussid}} \text{indofenol} \end{aligned}$

Vzorek moči byl před měřením 50x zředěn, přidala se činidla dle protokolu a byla změřena absorbance vzorku a standardu proti blanku při 600 nm.

3.2.12 Stanovení zbytkové močoviny ve vzorku moči

Moč byla zředěna na koncentraci 1 mmol.l⁻¹ kreatininu. Koncentrace kreatininu byla stanovena pracovištěm klinické biochemie a hematologie, tř. Svobody 32 779 00 Olomouc. K připraveným mikročásticím s imobilizovanou ureasou bylo přidáno 800 µl 62 mmol.l⁻¹ fosfátového pufru pH 7 a 1200 µl moči naředěné na koncentraci 1 mmol.l⁻¹ kreatininu. Výsledná koncentrace močoviny byla 18,4 mmol.l⁻¹ a pufru 25 mmol.l⁻¹. Úbytek močoviny se sledoval po 20 minutách, kdy se reakce ukončila separací mikročástic vnějším magnetickým polem. Poté bylo odebráno 50 µl vzorku pro stanovení zbytku močoviny, která byla derivatizována. Hydrolýza byla provedena při laboratorní teplotě 25 °C a při 37 °C.

4 VÝSLEDKY

4.1 Příprava chitosanem obalených mikročástic

Magnetické mikročástice obalené chitosanem byly připraveny dle postupu Pospiskova a Safarik (2013). Mikročástice byly sledovány pomocí mikroskopu Olympus BX50. Na Obr. 12 jsou vidět mikročástice před obalením a po obalení chitosanem. Dále byla změřena velikost připravených částic metodou dynamického rozptylu světla pomocí koloidního analyzátoru Zatasizer Nano ZS. Velikost připravených magnetických mikročástic obalených chitosanem měřená metodou DLS byla 4,0 μ m ±1,1 (n=6).



Obr. 12 Optická mikroskopie magnetických mikročástic před a po obalení chitosanem.

4.2 Alikvotizace magnetických mikročástic Perloza MG 100

Alikvotizace magnetických mikročástic byla provedena za účelem zjednodušit a zrychlit přípravu navážek. Mikročástice jsou uchovávány ve vodné suspenzi a neměly by vyschnout. Navažují se automatickou pipetou a po stáhnutí částic vnějším magnetickým polem (magnetem) se musí přebytečná voda znovu odpipetovat, zkontrolovat požadovaná navážka a případně přidat nebo odebrat na požadovanou hmotnost. Z tohoto důvodu byl vyvinut postup, jak tento postup zautomatizovat. Průměrná hodnota 100 mg alikvot byla 99,7 mg \pm 3,1, resp. 52,9 mg \pm 2,4 u 50 mg alikvot. Z krabicového grafu je zřejmé, že ze sta vzorků byla v obou případech pouze jedna odlehlá hodnota.



Obr. 13 Hmotností jednotlivých alikvotů při alikvotizaci na 100 a 50 mg.



Obr. 14 Krabicový graf hmotností alikvotů na 100 a 50 mg.

4.3 Vazebná kapacita magnetických nosičů

Po imobilizaci ureasy byly magnetické mikročástice separovány magneticky a u supernatantu byla stanovena celková koncentrace proteinů Bradfordovou metodou. Z rozdílu koncentrace proteinů před a po imobilizaci na mikročástice byla stanovena vazebná kapacita na 1 mg mikročástic (Tab. 2) dle rovnice regrese v Obr. 15 tj. množství proteinů, které se navázaly na 1 mg mikročástic.

Typ mikročástic	Vazebná kapacita (µg.mg ⁻¹ částic)
MG 100	7,3±0,5
DEAE MG 100	5,3±0,3
Chitosanem obalené mikročástice	4,0±0,4

Tab. 2 Vazebná kapacita mikročástic (n=6)



Obr. 15 Kalibrační přímka pro stanovení celkových proteinů Bradfordovou metodou mg.ml⁻¹.

4.4 Kalibrační přímka močoviny

Kalibrační přímka pro stanovení močoviny byla sestavena použitím močoviny o koncentraci 5 mmol.l⁻¹, 20 mmol.l⁻¹, 40 mmol.l⁻¹, 60 mmol.l⁻¹. Z obsahů jednotlivých píků na GC chromatogramu byla sestrojena kalibrační přímka (Obr. 16). Koncentrace močoviny byly vždy vypočítány z rovnice regrese.



Obr. 16 Kalibrační přímka pro stanovení močoviny.

4.5 Úbytek močoviny během reakce s volnou a imobilizovanou ureasou

Průměrná koncentrace močoviny se v lidské moči pohybuje kolem 234±46 mmol.l⁻¹(Bouatra *et al.*, 2013). Proto byla zvolena počáteční koncentrace močoviny 300 mmol.l⁻¹. Účinnost hydrolýzy močoviny volnou a imobilizovanou ureasou na mikročásticích DEAE, MG 100 a chitosanem obalených mikročásticích byla sledována stanovením zbytkové nezreagované močoviny.

Stanovení nezreagovaného substrátu reakce bylo provedeno stanovením koncentrace močoviny na plynovém chromatografu. Ze získaných hodnot byla stanovena závislost množství močoviny na čase (Obr. 17). Bylo stanoveno množství močoviny ve vzorcích po 5, 10 a 20 minutách. Již po 5 minutách kleslo množství močoviny v případě volné ureasy na 8,7 %, v případě imobilizované ureasy se pohybovalo množství nezreagované močoviny od 21,3 % po 26,5 %.



Obr. 17 Srovnání množství odstraněné močoviny za čas pomocí imobilizované a volné ureasy.

4.6 Změna pH v průběhu reakce

Při hydrolýze močoviny vzniká amoniak, který zvyšuje pH systému (Obr. 18) i přestože je reakční směs pufrována fosfátovým pufrem. Nicméně vyšší koncentrace pufru, které by zvýšily pufrační kapacitu nelze použit, protože fosfát by interferoval při měření na plynovém chromatografu. Zvýšená hodnota pH způsobuje, že ureasa mimo optimální oblast pH, je částečně inhibována, popřípadě může dojít až k její denaturaci. Při reakci volné ureasy se hodnota pH dramaticky zvyšuje a již po 100 sekundách se zvyšuje nad pH 9. V případě imobilizované ureasy je vzestup pH pozvolný a teprve po 700 sekundách se blíží k hodnotě 9.



Obr. 18 Vliv pH v průběhu reakce u imobilizované a volné ureasy.

4.7 Vliv pH na aktivitu ureasy

Optimální pH má stěžejní vliv na aktivitu enzymu. Imobilizovaná i volná ureasa byla inkubována ve fosfátovém pufru o pH 6,7 a 8. Nižší či vyšší hodnoty pH pufrů než uvedené, nebyly použity pro inkubaci, protože pufrační rozsah fosfátového pufru je přibližně od 6 do 8,5. Nejvyšší množství zhydrolyzované močoviny bylo zvoleno jako 100 % pro každý typ nosiče a bylo porovnáno s ostatními (Tab. 3).

	Typ nosiče		
pH	DEAE	MG100	Chitosan
6	95,6	98,1	98,6
7	100	100	100
8	98,4	99,5	95,6

Tab. 3 Heat mapa poměru aktivit imobilizovaných ureas po inkubaci v různém pH pufru (%).

4.8 Stanovení teplotní stability volné a imobilizované ureasy

Většina enzymů ztrácí se vzrůstající teplotou svoji aktivitu. Jak u imobilizované, tak u volné ureasy byla stanovena teplotní stabilita při 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80 a 90 °C, kde bylo ke 100 mg mikročástic s imobilizovanou ureasou přidáno 800 μ l 0,1 mol.l⁻¹. fosfátový pufr pH 7 resp. 740 μ l pufru k 60 μ l volné ureasy o koncentraci 10 mg.ml⁻¹. Směs byla inkubována při dané teplotě po dobu 30 minut a poté zchlazena v ledové lázni. Poté byl imobilizovaný, resp. volný enzym použit při hydrolýze močoviny. Stanovení teplotní stability bylo provedeno měřením residuálního množství močoviny na plynovém chromatografu. Ze získaných hodnot byla získána závislost residuálního množství močoviny (%) na teplotě inkubace (Obr. 19). Nejvyšší množství zhydrolyzované močoviny při dané teplotě bylo zvoleno jako 100 % pro každý typ mikročástic. Pro porovnání ureas imobilizovaných na různých nosičích a volné ureasy v závislosti na teplotě, byla zvolena hodnota T₅₀, při které je množství zreagované močoviny poloviční. Hodnoty T₅₀ jsou uvedeny v Tab. 4.

Tab. 4 Hodnoty T₅₀ imobilizované a volné ureasy.

Vzorek	T ₅₀ (°C)
Volná ureasa	70
MG 100	79
DEAE MG 100	78
Chitosan	77



Obr. 19 Teplotní stabilita imobilizované a volné ureasy.

4.9 Stanovení operační stability imobilizované ureasy

Charakteristickou vlastností imobilizovaných enzymů je možnost jejich opakovaného použití. V tomto smyslu byla stanovena operační stabilita imobilizované ureasy. Stanovení operační stability bylo provedeno měřením residuálního množství močoviny na plynovém chromatografu. Ze získaných hodnot byla získána závislost residuální koncentrace močoviny (%) na počtu provedených cyklů (Obr. 20). Množství zhydrolyzované močoviny v prvním cyklu bylo zvoleno jako 100 % pro každý typ mikročástic.



Obr. 20 Operační stabilita imobilizované ureasy.

4.10 Aplikace imobilizované ureasy pro odstranění močoviny ze vzorku moči

Ureasa imobilizovaná na magnetické mikročástice byla použita pro hydrolýzu močoviny ve vzorku moči. Pro analýzu metabolitů v moči byla moč naředěna na koncentraci 1 mmol.l-1 kreatininu (Bouatra *et al.*, 2013) Koncentrace kreatininu byla stanovena v laboratořích klinické biochemie a hematologie, tř. Svobody 32 779 00 Olomouc. Ve vzorku moči byla tato hodnota 8,5 mmol.l⁻¹, moč tedy byla naředěna 8,5x. Koncentrace močoviny ve vzorku moči byla stanovena pomocí komerčního setu Biosystems na 250 mmol.l⁻¹ a pomocí GC na 235 mmol.l⁻¹. Koncentrace močoviny ve vzorku moči byla koncentrace 27,6 mmol.l⁻¹. V takto upraveném vzorku moči byla močovina zhydrolyzována pomocí ureasy imobilizované na mikročásticích DEAE MG 100, MG 100 a chitosanem obalených mikročásticích při teplotách 25°C a 37 °C. Bylo stanoveno množství nezreagované močoviny ve vzorcích moči pomocí plynové chromatografie. Množství odstraněné (zhydrolyzované močoviny) pomocí ureas imobilizovaných na různých nosičích je uvedeno na Obr 21. Množství močoviny ve vzorku naředěné moči před hydrolýzou bylo označeno jako 100 %.



Obr. 21 Množství odstraněné močoviny ze vzorku moči (%). Modrý sloupec značí hydrolýzu při 25°C a oranžový při 37°C.

5 DISKUZE

Hlavním cílem praktické části diplomové práce bylo odstranění močoviny ze vzorku moči, která slouží k analýze metabolomu pomocí plynové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií, neboť močovina při této analýze interferuje. Pro odstranění močoviny byla využita hydrolýza katalyzovaná ureasou. Pokud se použije volná ureasa, nastane problém po hydrolýze, kdy je třeba odstranit enzym denaturací a následnou centrifugací. Během těchto kroků, dochází k řadě nepřesností, neboť s denaturovaným enzymem se mohou strhávat také některé metabolity a prodlužuje se čas analýzy. Proto byl navržen postup, kdy se ureasa imobilizuje na magnetický nosič a po skončení hydrolýzy se enzym odstraní pomocí vnějšího magnetického pole. Proto je náplní této diplomové práce optimalizace imobilizace ureasy a charakterizace imobilizovaného enzymu a testování podmínek hydrolýzy. Primárním cílem experimentální části diplomové práce byla imobilizace ureasy z C. ensiformis na tři druhy magnetických nosičů. Dva nosiče byly komerční magnetické mikročástice MG 100 a DEAE MG 100 od firmy Iontosorb Ústí nad Labem. Třetím nosičem byly chitosanem obalené magnetické mikročástice připravené mikrovlnou syntézou dle Pospiskova a Safarik (2013). Navíc pro každý nosič byla použita odlišná metoda kovalentní imobilizace. Pro mikročástice MG 100 byla ureasa imobilizovaná jodistanovou metodou, pro DEAE MG 100 glutaraldehydovou a pro chitosanem obalené mikročástice karbodiimidovou metodou. Pro jednotlivé mikročástice byla posouzena vazebná kapacita nosiče. Z hlediska enzymové aktivity poskytla takto imobilizovaná ureasa srovnatelné výsledky jako při použití volné ureasy. Navíc se imobilizovaná ureasa prezentovala dobrou stabilitou i po inkubaci při vyšších teplotách a při různém pH pufru. Mimo to mohla být opakovaně použita se zanedbatelným snížením aktivity. Imobilizovaná ureasa byla pak aplikována i na reálné vzorky moči, kde přeměnila u všech třech nosičů v podstatě 100 % substrátu. Dalším cílem bylo také zjednodušit přípravu jednotlivých navážek mikročástic, za účelem zrychlit a zefektivnit celý proces přípravy.

Příprava alikvotů magnetických mikročástic značně usnadnila celý proces přípravy vzorků imobilizované ureasy, která může být využita i pro komerční přípravu imobilizované ureasy. Rozdíly mezi jednotlivými takto připravenými vzorky byly max. u navážky 100 mg $\pm 3,1$ mg, resp. $\pm 2,4$ mg u 50 mg navážky.

Magnetické mikročástice obalené chitosanem byly připraveny syntézou pomocí mikrovlnného záření. Pomocí dynamického rozptylu světla byla stanovena velikost

připravených mikročástic na 4,0 μ m ±1,1, i když to není z Obr. 12 úplně zřejmé, protože takto připravené mikročástice mají tendenci shlukovat se. Obrázky z optické mikroskopie (Obr. 12) ukazují mikročástice oxidu železa (Fe₃O₄) před a po obalení chitosanem. Chitosan je populárním materiálem pro imobilizaci enzymů díky vysoké afinitě k proteinům, dostupnosti reaktivních funkčních skupin, stabilitě ale především díky jeho netoxicitě a biodegradaci (Costa-Silva *et al.*, 2015).

U každého nosiče byla stanovena vazebná kapacita, což je množství ureasy navázané na 1 mg částic. Nejvíce se navázalo 7,3 \pm 0,5 µg.mg⁻¹ částic na mikročástice MG 100, na DEAE MG 5,3 \pm 0,3 µg.mg⁻¹ částic a na chitosanem obalené mikročástice 4,0 \pm 0,3 µg.mg⁻¹ částic. Vzhledem k odlišným metodám imobilizace ureasy na každý nosič, nelze relevantně posoudit vztah mezi množstvím navázaného enzymu s množstvím hydrolyzované močoviny. Nicméně Jořenek a Zajoncová (2015) uvádějí, že na mikročástice MG 100 bylo imobilizováno až 13 µg.mg⁻¹ částic lakasy.

Přeměna substrátu enzymem byla v našem případě rychlejší při použití volné ureasy oproti jeho imobilizované formě. Všeobecně zvýšení enzymové aktivity při imobilizaci závisí na mikroprostředí, rozdělovacím koeficientu, difúzním efektu, konformační změně, molekulové orientaci a mnoha dalších faktorech (Singh *et al.*, 2013). Chellapandian a Krishnan (1998) použili k imobilizaci ureasy nosič na bázi chitosanu a dosáhli 82 % retenční aktivity oproti volnému enzymu. Naopak Yang a Lin (2001) uvádějí ve své práci, že imobilizovaná ureasa na polyakrylonitrilovém vlákně měla vyšší aktivitu oproti volné urease. Sníženou aktivitu enzymu si můžeme vysvětlit tím, že enzym se navázal na nosič v blízkosti aktivního centra nebo mohla imobilizace celkově pozměnit konformaci enzymu. Nicméně rozdíl v úbytku močoviny mezi imobilizovanými enzymy na různých nosičích a volnou ureasou je přibližně jen 15 %, což je stále relativně málo signifikantní rozdíl. Na druhou stranu je stále zachována výhoda jednoduché separace imobilizované ureasy po hydrolýze oproti odstranění volné ureasy pomocí centrifugace.

Úbytek močoviny v případě imobilizované ureasy limitoval přibližně k 20 % původní koncentrace substrátu. Důvodem mohla být inhibice v důsledku zvýšení pH v reakční směsi až k pH 9 (viz. Obr. 18). pH optimum ureasy z *C. ensifromis* je dle Cesareo a Langton (1992) 7,4. Další příčinou snížení aktivity enzymu může být inhibice amonnými ionty (inhibice produktem) které nekompetitivně inhibují ureasu (Hoare a Laidler, 1950). Z grafu lze sledovat i rychlejší vznik amoniaku v případě volné ureasy oproti její imobilizované formě. Byl sledován i vliv pH na aktivitu ureasy po inkubaci ve fosfátovém pufru při pH 6, 7 a 8. Z již zmíněné hodnoty pH optima je zřejmé, že

imobilizovaná ureasa vykazovala nejvyšší aktivitu po inkubaci v pufru o pH 7 na všech použitých magnetických mikročásticích. Nicméně i při inkubaci ve vyšším či nižším pH se aktivita snížila maximálně o 4,6 %.

Poněvadž aktivita enzymů vzrůstá se zvyšující se teplotou, byla stanovena teplotní stabilita připravené imobilizované ureasy a byla porovnána v kontrastu s nativním enzymem. Ze závislosti residuální aktivity na teplotě inkubace je zřejmé, že imobilizovaná ureasa na magnetických nosičích DEAE MG 100, MG 100 a chitosanem obalených mikročásticích je stabilnější než nativní enzym. Nativní enzym si zachoval po inkubaci při 70 °C 50 % původní aktivity, kdežto imobilizované enzymy si při stejné teplotě inkubace uchovaly ještě 80 % původní aktivity. Imobilizované enzymy si zachovaly 50 % původní aktivity ještě při 80 °C. Optimální teplota pro ureasu z C. ensiformis je dle výrobce 60 °C. V minulosti byly připraveny ještě termostabilnější varianty imobilizované ureasy na směsích akrylamidu s polyethylentereftalátu, které vydržely až 225 min při 80 °C, než klesla aktivita na polovinu (Elçin a Saçak, 1996). Pokud je enzym imobilizován na pevný nosič, zvyšuje se tím jeho odolnost vůči zvýšené teplotě, kovalentně imobilizovaná ureasa je tedy resistentnější oproti volné formě. Termostabilita je důležitou vlastností, která může být zohledněna pro další aplikace, neboť při vyšších teplotách probíhá hydrolýza rychleji a za stejný čas je zhydrolyzováno více močoviny.

Dále byla stanovena operační stabilita imobilizované ureasy. Operační stabilitou rozumíme, kolikrát můžeme enzym opakovaně použít bez výrazné ztráty aktivity imobilizovaného enzymu. Po 8 cyklech klesla operační stabilita u nosiče DEAE MG 100 jen o 6 %, v případě částic obalených chitosanem přibližně o 7 % a u MG 100 o 12 %. Byly publikovány i práce, kde si imobilizovaná ureasa na chitosanových nosičích zachovala 100 % původní aktivity i po 10 cyklech (Chen a Chiu, 1999). Operační stabilita je důležitým kritériem pro uplatnění imobilizovaného enzymu v praxi, kde může citelně ovlivnit celkové náklady reakce (Sheldon a van Pelt, 2013).

Imobilizovaná ureasa byla aplikována na reálné vzorky moči. Z grafu (Obr. 21) je zřejmé že imobilizovaná ureasa na všech použitých magnetických nosičích odstranila přibližně 95 % močoviny ze vzorku moči při 25 °C. Ještě lepšího účinku bylo dosaženo při 37 °C, kdy bylo eliminováno téměř 100 % močoviny. Nutné je však podotknout, že zde byla počáteční koncentrace močoviny 10,9x menší (z 300 mmol.l⁻¹ na 27,6 mmol.l⁻¹) oproti použití čisté močoviny, protože byla naředěna na 1 mmol.l⁻¹

50

kreatininu, stejně jako při standardní analýze moči metodou GC/MS v laboratořích klinické biochemie.

První metodou k odstranění močoviny z moči byla extrakce kapalina kapalina (LLE; Tanaka *et al.*, 1966). Extrakce byla poté nahrazena ošetřením ureasou (Chan *et al.*, 2011). Avšak doposud nebyla publikována práce s použitím imobilizované ureasy k odstranění močoviny z moči v rámci klinické biochemie. Na druhou stranu byly publikovány práce kdy se imobilizována používá při dialýze krve (Della Ciana a Caputo, 1996) nebo při odstranění močoviny z vína (Fidaleo *et al.*, 2006). Imobilizovaná ureasa na magnetických nosičích má tak do budoucna slibný potenciál pro použití v lékařské praxi a mohla by tak nahradit současně používaný protokol s volným enzymem.

6 ZÁVĚR

V teoretické části diplomové práce byla charakterizována ureasa. Byla objasněna její struktura, výskyt a možnosti imobilizace spojené s uplatněním v praxi. Také byla objasněna problematika spojená s eliminací močoviny před stanovením metabolomu moči metodou GC/MS.

Praktická část byla zaměřena na přípravu imobilizované ureasy z *C. ensiformis* na komerční magnetické mikročástice Perloza MG 100, DEAE MG 100 a na připravené chitosanem obalené mikročástice, přičemž na každý druh nosiče byla použita odlišná metoda kovalentní imobilizace. Imobilizovaná ureasa při eliminaci močoviny ze vzorku odstranila přibližně o 15 % méně substrátu než nativní enzym. Díky imobilizaci vykazovala ureasa lepší hodnoty termostability, byla stabilní v různém pH pufru a po 8 cyklech klesla jen nepatrně operační stabilita enzymu. Pomocí alikvotizace magnetických nosičů bylo pak dosáhnuto snadnější přípravy imobilizované ureasy.

Hlavním účelem imobilizované ureasy bylo pak odstranění močoviny ze vzorku moči. Při 25 °C bylo odstraněno 95 % močoviny, kdežto při 37°C bylo dosáhnuto téměř 100 % eliminace močoviny z moči.

7 LITERATURA

- Alexandrova A. N., Jorgensen W. L. (2007): Why Urea Eliminates Ammonia Rather than Hydrolyzes in Aqueous Solution. *Journal of Physical Chemistry* **111**, 720-730.
- Benini S., Ciurli S., Rypniewski W. R., Wilson K. S., Mangani S. (1998): Crystallization and preliminary high-resolution X-ray diffraction analysis of native and betamercaptoethanol-inhibited urease from Bacillus pasteurii. Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography 54, 409–412.
- Benini S., Rypniewski W. R., Wilson K. S., Miletti S., Ciurli S., Mangani S. (1999): A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from Bacillus pasteurii: why urea hydrolysis costs two nickels. *Structure* 7, 205–216.
- Benini S., Rypniewski W. R., Wilson K. S., Miletti S., Ciurli S., Mangani, S. (2000): The complex of Bacillus pasteurii urease with acetohydroxamate anion from X-ray data at 1.55 A resolution. *Journal of Biological Inorganic Chemistry : JBIC : A Publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* 5, 110–118.
- Benini S., Rypniewski W., Wilson K., Ciurli S., Mangani S. (2001): Structure-based rationalization of urease inhibition by phosphate: novel insights into the enzyme mechanism. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 6, 778–790.
- Blakeley R. L., Hinds J. A., Kunze H. E., Webb E. C., Zerner B. (1969): Jack bean urease (EC 3.5.1.5). Demonstration of a carbamoyl-transfer reaction and inhibition by hydroxamic acids. *Biochemistry* 8, 1991–2000.
- Bouatra S., Aziat F., Mandal R., Guo A. C., Wilson M. R., Knox C., Wishart D. S. (2013): The Human Urine Metabolome. *PLoS ONE* **8**.
- Bremner J. M., Krogmeier M. J. (1989): Evidence that the adverse effect of urea fertilizer on seed germination in soil is due to ammonia formed through hydrolysis of urea by soil urease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 8185–8188.
- Burne R. A., Chen Y. Y. (2000): Bacterial ureases in infectious diseases. *Microbes and Infection* **2**, 533–542.
- Callahan B.P., Yuan Y., Wolfenden R. (2005): The Burden Borne by Urease. *Journal of the American American Chemical Society* **127**, 10828-10829.
- Cao L. (2005): Immobilised enzymes: science or art? *Current Opinion in Chemical Biology* 9, 217–226.
- Cesareo S. D., Langton S. R. (1992): Kinetic properties of Helicobacter pylori urease compared with jack bean urease. *FEMS Microbiology Letters* **78**, 15–21.
- Collins C. M., D'Orazio S. E. (1993): Bacterial ureases: structure, regulation of expression and role in pathogenesis. *Molecular Microbiology* **9**, 907–913.
- Costa-Silva T. A., Marques P. S., Souza C. R. F., Said S., Oliveira W. P. (2015): Enzyme encapsulation in magnetic chitosan-Fe ₃ O ₄ microparticles. *Journal of Microencapsulation* **32**, 16–21.
- Das N., Kayastha A. M., Srivastava P. K. (2002): Purification and characterization of urease from dehusked pigeonpea (Cajanus cajan L) seeds. *Phytochemistry* 61, 513– 521.
- Della Ciana L., Caputo G. (1996): Robust, reliable biosensor for continuous monitoring of urea during dialysis. *Clinical Chemistry* **42**, 1079–1085.
- Dhawan G., Sumana G., Malhotra B. D. (2009): Recent developments in urea biosensors. *Biochemical Engineering Journal* 44, 42–52.
- Dixon N. E., Gazzola C., Blakeley R. L., Zerner B. (1975): Jack bean urease (EC 3.5.1.5). Metalloenzyme. Simple biological role for nickel. *Journal of the American Chemical*

Society **97**, 4131–4133.

- Dixon N. E., Hinds J. A., Fihelly A. K., Gazzola C., Winzor D. J., Blakeley R. L., Zerner B. (1980): Jack bean urease (EC 3.5.1.5). IV. The molecular size and the mechanism of inhibition by hydroxamic acids. Spectrophotometric titration of enzymes with reversible inhibitors. *Canadian Journal of Biochemistry* 58, 1323–1334.
- Elçin Y. M., Saçak M. (1996): Acrylamide grafted poly(ethylene terephthalate) fibers activated by glutaraldehyde as support for urease. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **60**, 19–32.
- Esti M., Fidaleo M., Moresi M., Tamborra P. (2007): Modeling of Urea Degradation in White and Rosé Wines by Acid Urease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 2590-2596.
- Fearon W. R. (1923): Urease. Part I. The Chemical Changes Involved in the Zymolysis of Urea. *The Biochemical Journal* **17**, 84–93.
- Fidaleo M., Esti M., Moresi M. (2006): Assessment of urea degradation rate in model wine solutions by acid urease from Lactobacillus fermentum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 6226–6235.
- Follmer C. (2010): Ureases as a target for the treatment of gastric and urinary infections. *Journal of Clinical Pathology* **63**, 424–430.
- Follmer C., Wassermann G. E., Carlini C. R. (2004): Separation of jack bean (Canavalia ensiformis) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity. *Plant Science* **167**, 241–246.
- Francis P. S., Lewis S. W., Lim K. F. (2002): Analytical methodology for the determination of urea: current practice and future trends. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **21**, 389–400.
- Gianfreda L., De Cristofaro A., Rao M. A., Violante A. (1995): Kinetic Behavior of Synthetic Organo- and Organo-Mineral-Urease Complexes. *Soil Science Society of America Journal* **59**, 811.
- Goodman S. I., Markey S. P. (1981): Diagnosis of organic acidemias by gas chromatography-mass spectrometry. *Laboratory and Research Methods in Biology and Medicine* **6**, 1–158.
- Gordon A., Better O. S., Greenbaum M. A., Marantz L. B., Gral T., Maxwell M. H. (1971): Clinical maintenance hemodialysis with a sorbent-based, low-volume dialysate regeneration system. *Transactions - American Society for Artificial Internal Organs* 17, 253–258.
- Granstrom M., Lehours P., Bengtsson C., Mégraud F. (2008): Diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* **13**, 7–12.
- Guilbault G. G., Montalvo J. G. (1969): Urea-specific enzyme electrode. *Journal of the American Chemical Society* **91**, 2164–2165.
- Ha N.-C., Oh S.-T., Sung J. Y., Cha K. A., Lee M. H., Oh B.-H. (2001): Supramolecular assembly and acid resistance of Helicobacter pylori urease. *Nature Structural Biology* **8**, 505–509.
- Haley K. P., Gaddy J. A. (2015): Helicobacter pylori: Genomic Insight into the Host-Pathogen Interaction. *International Journal of Genomics* **2015**, 386905.
- Harris E. B., Randhawa B., Prabhakaran K. (1997): Urease Assay Using a Rapid Radiometric Procedure. *Analytical Biochemistry* **249**, 117–118.
- Hasan H. A. H. (2000): Ureolytic microorganisms and soil fertility: A review. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **31**, 2565–2589.
- Hoare J. P., Laidler K. J. (1950): The Molecular Kinetics of the Urea-Urease System. II. The Inhibition by Products. *Journal of the American Chemical Society* **72**, 2487–

2489.

- https://malvernpanalytical.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs. (2.4.2018).
- https://ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/4H9M (21.3.2018)
- Chan E. C. Y., Pasikanti K. K., Nicholson J. K. (2011): Global urinary metabolic profiling procedures using gas chromatography–mass spectrometry. *Nature Protocols* **6**, 1483–1499.
- Chang T. M. (1966): Semipermeable aqueous microcapsules ("artificial cells"): with emphasis on experiments in an extracorporeal shunt system. *Transactions - American Society for Artificial Internal Organs* **12**, 13–19.
- Chang T. M. S. (1964). Semipermeable Microcapsules. Science 146, 524–525.
- Chang T. M. S. (1978). Artificial Cells for Artificial Kidney, Artificial Liver and Detoxification. In: Artificial Kidney, Artificial Liver, and Artificial Cells. Springer, Boston, USA, (57–77).
- Chellapandian M., Krishnan M. R. V. (1998): Chitosan-poly (glycidyl methacrylate) copolymer for immobilization of urease. *Process Biochemistry* **33**, 595–600.
- Chen J. P., Chiu S. H. (1999): Preparation and characterization of urease immobilized onto porous chitosan beads for urea hydrolysis. *Bioprocess Engineering* **21**, 323–330.
- Jabri E., Carr M. B., Hausinger R. P., Karplus P. A. (1995): The crystal structure of urease from Klebsiella aerogenes. *Science* **268**, 998–1004.
- Jansen G., Muskiet F. A., Schierbeek H., Berger R., van der Slik W. (1986): Capillary gas chromatographic profiling of urinary, plasma and erythrocyte sugars and polyols as their trimethylsilyl derivatives, preceded by a simple and rapid prepurification method. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* **157**, 277–293.
- Jořenek M., Zajoncová L. (2015): Immobilization of Laccase on Magnetic Carriers and Its Use in Decolorization of Dyes. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* **29**, 457-466.
- Kakimoto S., Sumino Y., Kawahara K., Yamazaki E., Nakatsui I. (1990): Purification and characterization of acid urease from Lactobacillus fermentum. *Applied Microbiology and Biotechnology* 32, 538–543.
- Karplus P. A., Pearson M. A., Hausinger R. P. (1997): 70 Years of Crystalline Urease: What Have We Learned? *Accounts of Chemical Research* **30**, 330-337.
- Krajewska B. (2004): Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology* **35**, 126–139.
- Krajewska B. (2008): Mono- (Ag, Hg) and di- (Cu, Hg) valent metal ions effects on the activity of jack bean urease. Probing the modes of metal binding to the enzyme. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **23**, 535–542.
- Krajewska B. (2009a): Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **59**, 9–21.
- Krajewska B. (2009b): Ureases. II. Properties and their customizing by enzyme immobilizations: A review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **59**, 22–40.
- Krajewska B., Chudy M., Drozdek M., Brzózka Z. (2003): Potentiometric Study of Urease Kinetics over pH 5.36-8.21. *Electroanalysis* 15, 460–466.
- Krajewska B., Zaborska W., Chudy M. (2004): Multi-step analysis of Hg2+ ion inhibition of jack bean urease. *Journal of Inorganic Biochemistry* **98**, 1160–1168.
- Krawczynski T., Krawczyk V. (1998): Analytical Applications of Inhibition of Enzymatic Reactions. *Chern. Anal. (Warsaw)* **43**, 135-158.

- Krishnamurthy P., Parlow M., Zitzer J. B., Vakil N. B., Mobley H. L., Levy M., Dunn B.
 E. (1998): Helicobacter pylori containing only cytoplasmic urease is susceptible to acid. *Infection and Immunity* 66, 5060–5066.
- Kuhara T. (2002). Diagnosis and monitoring of inborn errors of metabolism using ureasepretreatment of urine, isotope dilution, and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **781**, 497–517.
- Kusters J. G., van Vliet A. H. M., Kuipers E. J. (2006): Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. *Clinical Microbiology Reviews* **19**, 449–490.
- Kuswandi B. (2003): Simple optical fibre biosensor based on immobilised enzyme for monitoring of trace heavy metal ions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **376**, 1104–1110.
- Ligabue-Braun R., Carlini C. R. (2015): Moonlighting Toxins: Ureases and Beyond. In *Plant Toxins*. Springer, Dordrecht, Netherlands, 1–21
- Manunza B., Deiana S., Pintore M., Gessa C. (1999): The binding mechanism of urea, hydroxamic acid and N-(N-butyl)-phosphoric triamide to the urease active site. A comparative molecular dynamics study. *Soil Biology and Biochemistry* **31**, 789–796.
- Maurer M., Pronk W., Larsen T. A. (2006): Treatment processes for source-separated urine. *Water Research* **40**, 3151–3166.
- Messerschmidt A. (2001): *Handbook of metalloproteins*. Wiley, New York, USA, 1108 stran.
- Miyagawa K., Sumida M., Nakao M., Harada M., Yamamoto H., Kusumi T., Nakayama T. (1999): Purification, characterization, and application of an acid urease from Arthrobacter mobilis. *Journal of Biotechnology* **68**, 227–236.
- Nakamura H., Karube I. (2003): Current research activity in biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **377**, 446–468.
- Pasikanti K. K., Ho P. C., Chan E. C. Y. (2008): Gas chromatography/mass spectrometry in metabolic profiling of biological fluids. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **871**, 202–211.
- Pečová M., Zajoncová L., Poláková K., Čuda J., Šafaříková M., Šebela M., Šafařík I. (2011): Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich využití v biochemii a biotechnologii. *Chemicke Listy* **105**, 524–530.
- Polacco J. C., Holland M. A. (1993): Roles of Urease in Plant Cells. *International Review* of Cytology **145**, 65–103.
- Pospiskova K., Safarik I. (2013): Low-cost, easy-to-prepare magnetic chitosan microparticles for enzymes immobilization. *Carbohydrate Polymers* **96**, 545–548.
- Postal M., Martinelli A. H. S., Becker-Ritt A. B., Ligabue-Braun R., Demartini D. R., Ribeiro S. F. F., Carlini C. R. (2012): Antifungal properties of Canavalia ensiformis urease and derived peptides. *Peptides* 38, 22–32.
- Putnam D. F., Douglas M., Company A. (1971): Composition and concentrative properties of human urine, *National Aeronautics and Space Administration* **112**.
- Safarik I., Safarikova M. (2009): Magnetic nano- and microparticles in biotechnology. *Chemical Papers* **63**, 497–505.
- 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.
- Scott D. R., Marcus E. A., Weeks D. L., Sachs G. (2002): Mechanisms of acid resistance due to the urease system of Helicobacter pylori. *Gastroenterology* **123**, 187–195.
- Sharma R., Rajput Y. S., Kaur S., Tomar S. K. (2008): A method for estimation of urea using ammonia electrode and its applicability to milk samples. *Journal of Dairy Research* **75**, 466-470.

- Sheldon R. A. (2007): Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Advanced Synthesis & Catalysis* **349**, 1289–1307.
- Sheldon R. A., van Pelt S. (2013): Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 6223–6235.
- Shoemaker J. D., Elliott W. H. (1991): Automated screening of urine samples for carbohydrates, organic and amino acids after treatment with urease. *Journal of Chromatography* **562**, 125–138.
- Schussel L. J., Atwater J. E. (1995): A urease bioreactor for water reclamation aboard manned spacecraft. *Chemosphere* **30**, 985–994.
- Simka W., Piotrowksi J. (2007): Metody usuwania mocznika z roztworów wodnych 9, 841–845.
- Singh M., Verma N., Garg A., Redhu N. (2008): Urea biosensors. *Sensors and Actuators* B: Chemical **134**, 345–351.
- Singh R. K., Tiwari M. K., Singh R., Lee J.-K. (2013): From protein engineering to immobilization: promising strategies for the upgrade of industrial enzymes. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 1232–1277.
- Sirisha V. L., Jain A., Jain A. (2016): Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. *Advances in Food and Nutrition Research* **79**, 179–211.
- Soldatkin O. O., Kucherenko I. S., Pyeshkova V. M., Kukla A. L., Jaffrezic-Renault N., El'skaya A. V., Soldatkin A. P. (2012): Novel conductometric biosensor based on three-enzyme system for selective determination of heavy metal ions. *Bioelectrochemistry* 83, 25–30.
- Summer J. (1926): The isolation and crystallization of the enzyme urease: preliminary paper. *The Journal of Biological Chemistry* **69**, 435–441.
- Ševčíková P., Kašpárková V., Krejčí J., Vltavská P. (2014): Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. *Chemicke Listy* **108**, 479–482.
- Tanaka K., Budd M. A., Efron M. L., Isselbacher K. J. (1966): Isovaleric acidemia: a new genetic defect of leucine metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 56, 236–242.
- Wang W.-H., Köhler B., Cao F.-Q., Liu L.-H. (2008): Molecular and physiological aspects of urea transport in higher plants. *Plant Science* **175**, 467–477.
- Weatherburn M. W. (1967): Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry* **39**, 971–974.
- Webb-Robertson B.-J., Kim Y.-M., Zink E. M., Hallaian K. A., Zhang Q., Madupu R., Metz T. O. (2014): A statistical analysis of the effects of urease pre-treatment on the measurement of the urinary metabolome by gas chromatography–mass spectrometry. *Metabolomics* 10, 897–908.
- Wells W. W., Chin T., Weber B. (1964): Quantitative analysis of serum and urine sugars by gas chromatography. *Clinica Chimica Acta* **10**, 352–359.
- Wheland G. W. (1955): *Resonance in Organic Chemistry*. Wiley, New York, USA, 785-799.
- Wilsenach J. A., van Loosdrecht M. C. (2006): Integration of Processes to Treat Wastewater and Source-Separated Urine. *Journal of Environmental Engineering* 132, 331–341.
- Winkler R. G., Blevins D. G., Polacco J. C., Randall D. D. (1988): Ureide catabolism in nitrogen-fixing legumes. *Trends in Biochemical Sciences* **13**, 97–100.
- Yang M.-C., Lin C.-C. (2001): Urea permeation and hydrolysis through hollow fiber dialyzer immobilized with urease. *Biomaterials* **22**, 891–896.
- Zaborska W., Krajewska B., Olech Z. (2004): Heavy Metal Ions Inhibition of Jack Bean

Urease: Potential for Rapid Contaminant Probing. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **19**, 65–69.

Zonia L. E., Stebbins N. E., Polacco J. C. (1995): Essential role of urease in germination of nitrogen-limited Arabidopsis thaliana seeds. *Plant Physiology* **107**, 1097–1103.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BSTFA	N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
CE/MS	kapilární elektroforéza s hmotnostní spektrometrií (capillary
	electrophoresis/mass spectrometry)
DLS	dynamický rozptyl světla (dynamic light scattering)
EDC.HCl	N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid
FID	flame ionization detector (plamenoionizační detektor)
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (Fourier
	transform infrared spectroscopy)
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
LC/MS	kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
LLE	extrakce kapalina-kapalina (liquid-liquid extraction)
NHS	N-hydroxysukcinimid
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
TMCS	trimethylchlorsilan