

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Katedra organické chemie



**Imobilizace laktasy na pevné nosiče a její využití
v biotechnologických procesech při výrobě
bezlaktosového mléka**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Kristýna Hozáková
Studijní program:	B1407 Chemie
Studijní obor:	Bioorganická chemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	26.7.2013

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným dohledem doc. RNDr. Ludmily Zajoncové, Ph.D. Veškerou použitou literaturu jsem uvedla na konci práce.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 24.7.2013

.....

Kristýna Hozáková

Ráda bych poděkovala svojí školitelce, paní doc. RNDr. Ludmile Zajoncové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a trpělivost. Mé poděkování patří také Mgr. Kristýně Pospíškové a Mgr. Miroslavu Jořenkovi za pomoc při práci v laboratoři.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Kristýna Hozáková
Název práce	Imobilizace laktasy na pevné nosiče a její využití v biotechnologických procesech při výrobě bezlaktosového mléka
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	Imobilizace enzymů vede ke stabilizaci jejich aktivity. Pro každý enzym je potřeba najít vhodný nosič a podmínky imobilizace. Vhodné spojení enzymu a nosiče může být využito k hydrolýze laktosy v mléce, které je vyhledáváno především lidmi s laktosovou intolerancí. Tato bakalářská práce je zaměřena na imobilizaci laktasy a její využití při výrobě bezlaktosového mléka. Teoretická část popisuje základní vlastnosti enzymu, metody imobilizace a možnosti využití v biotechnologických procesech. Experimentální část se zabývá imobilizací laktasy <i>Kluyveromyces lactis</i> na magnetické nanočástice obalené chitosanem a vysvětlením změn jejich vlastností.
Klíčová slova	laktasa, nanočástice, imobilizace, chitosan
Počet stran	48
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Kristýna Hozáková
Title	Immobilization of lactase onto solid carriers and their use in biotechnological processes by production of lactose free milk
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Ludmila Zajoncová, Ph.D.
The year of presentation	2013
Abstract	Immobilization of enzymes results in stabilization of their activity. It is necessary to find a proper carrier and immobilization conditions for each enzyme. Appropriate combination of an enzyme and its carrier can be used for lactose hydrolysis in milk, which is demanded mainly by people with lactose intolerance. This Bachelor thesis is focused on lactase immobilization and its use in production of lactose free milk. The theoretical part describes the main characteristics of the enzyme, methods of its immobilization and applications in biotechnological processes. The experimental part deals with immobilization of lactase from <i>Kluyveromyces lactis</i> onto magnetic nanoparticles coated with chitosan and explains the changes in its properties.
Keywords	lactase, nanoparticles, immobilization, chitosan
Number of pages	48
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1. CÍLE PRÁCE.....	7
2. ÚVOD.....	8
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	9
3.1. LAKTASA.....	9
3.1.1. VÝSKYT LAKTASY.....	9
3.2. CHARAKTERISTIKA LAKTASY.....	10
3.2.1. STRUKTURA LAKTASY	10
3.2.2. FUNKCE LAKTASY.....	12
3.2.3. VLASTNOSTI LAKTASY.....	13
3.2.4. SUBSTRÁTOVÁ SPECIFITA.....	14
3.2.5. AKTIVNÍ MÍSTO.....	15
3.2.6. MECHANISMUS ENZYMOVÉ REAKCE.....	15
3.2.7. AKTIVÁTORY A INHIBITORY LAKTASY.....	17
3.3. METODY STANOVENÍ AKTIVITY LAKTASY.....	18
3.4. IMOBILIZACE ENZYMŮ.....	19
3.4.1. IMOBILIZACE NA MAGNETICKÉ NOSIČE.....	22
3.4.1.1. ÚPRAVA MAGNETICKÝCH NOSIČŮ.....	22
3.5. VYUŽITÍ LAKTASY V PRAXI.....	23
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	25
4.1. MATERIÁL.....	25
4.2. PŘÍSTROJE.....	25
4.3. POUŽITÉ METODY.....	26
4.3.1. IMOBILIZACE LAKTASY.....	26
4.3.2. STANOVENÍ VAZEBNÉ KAPACITY LAKTASY.....	27
4.3.3. STANOVENÍ AKTIVITY LAKTASY.....	27
4.3.4. STANOVENÍ ZÁVISLOSTI AKTIVITY VOLNÉ A IMOBILIZOVANÉ LAKTASY NA pH.....	28
4.3.5. TERMOSTABILITA VOLNÉ A IMOBILIZOVANÉ LAKTASY.....	29
4.3.6. STANOVENÍ MICHAELISOVY KONSTANTY.....	29
4.3.7. OPERAČNÍ STABILITA IMOBILIZOVANÉ LAKTASY.....	30
4.4. VÝSLEDKY A DISKUSE.....	31
4.4.1. STANOVENÍ VAZEBNÉ KAPACITY LAKTASY.....	31
4.4.2. STANOVENÍ ZÁVISLOSI AKTIVITY VOLNÉ LAKTASY NA pH	31
4.4.3. TERMOSTABILITA VOLNÉ A IMOBILIZOVANÉ LAKTASY.....	33
4.4.4. STANOVENÍ MICHAELISOVY KONSTANTY.....	34
4.4.5. OPERAČNÍ STABILITA IMOBILIZOVANÉ LAKTASY.....	36
5. ZÁVĚR.....	37
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	38
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	48

1. CÍLE PRÁCE

- vypracování rešerše na téma vlastnosti laktasy a její využití v biotechnologických procesech
- optimalizace metody stanovení aktivity laktasy
- charakterizace laktasy
- imobilizace laktasy na magnetické nanočástice a studium vlastností vzniklého konjugátu

2. ÚVOD

Součástí mléka savců je mimo jiné disacharid laktosa, který je v gastrointestinálním traktu tráven pomocí laktasy, membránového enzymu epitelu tenkého střeva. S deficiencí laktasy se setkáváme převážně u dospělých lidí, konzumace mléčných výrobků a jiných produktů obsahujících laktosu u nich může vést k bolestem břicha, nadýmání, průjmům a dalším komplikacím. Příznaky se dají zmírnit enzymovými preparáty podávanými spolu s laktosovými potravinami, řada klinických studií jim však připisuje jen omezenou a proměnlivou účinnost. Tyto komerčně vyráběné produkty obsahují enzymy, jejichž fyzikálně-chemické vlastnosti nejsou příliš vhodné pro hydrolýzu laktosy in vivo, při níž je enzymová stabilita a aktivita ovlivňována působením pH a trávicích proteas. Navíc se jedná o finančně nákladnou metodu, protože enzymy nelze znovu použít. Další možností je hydrolýza mléčného sacharidu prostřednictvím imobilizované laktasy. Vzhledem k velkým možnostem průmyslového využití byla intenzivně zkoumána řada způsobů imobilizace, ale jen několik z nich bylo uplatněno při výrobě. První společností, která takto komerčně hydrolyzovala laktosu v mléce, byla Centrale del Latte of Milan a jednalo se o enzym kvasinkového původu navázaný na triacetátcelulosová vlákna. Enzymová hydrolýza laktosy je stále oblastí vědeckého a technologického zájmu. Kromě produkce bezlaktosových potravin je imobilizace laktasy využívána také k průmyslové výrobě galaktosy.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. LAKTASA

β -D-galaktosidasa (EC 3.2.1.23), známá také pod názvem laktasa, je enzym patřící do podtřídy glykosidických hydrolas, který katalyzuje hydrolyzu disacharidu laktosy na monosacharidy glukosu a galaktosu (Panesar et al., 2006).

3.1.1. VÝSKYT LAKTASY

Laktasa může být získána z nejrůznějších zdrojů, ať už mikroorganismů (Fowler a Zabin, 1970; O'Connell a Walsh, 2010), rostlin (Chaubet a Pareilleux, 1982; Bhalla a Dalling, 1984) nebo živočichů (Gatt, 1969; Samoylova et al., 2008). Pro průmyslové využití jsou hlavně díky snadné manipulaci a rychlému množení nejvhodnější mikroorganismy, velké množství z nich bylo vyhodnoceno jako potenciální zdroj tohoto enzymu. Laktasa byla izolována z celé řady bakteriálních, kvasinkových a houbových kultur, v některých případech byla klonována a převedena do dalších hostitelských buněk. Komerčně jsou dostupné pouze enzymy z bezpečných zdrojů, jejich příklady jsou uvedeny v Tab. 1 (Panesar et al., 2006). Nejdůkladněji prostudovaná je laktasa bakterií *Escherichia coli*, kódovaná genem *lacZ*, který slouží jako model pro vysvětlení katalytického působení enzymu. V důsledku toxicity *E. coli* spojené s tím, že patří mezi koliformní mikroorganismy, není tato laktasa vhodná pro aplikace v potravinářství (Joshi et al., 1989).

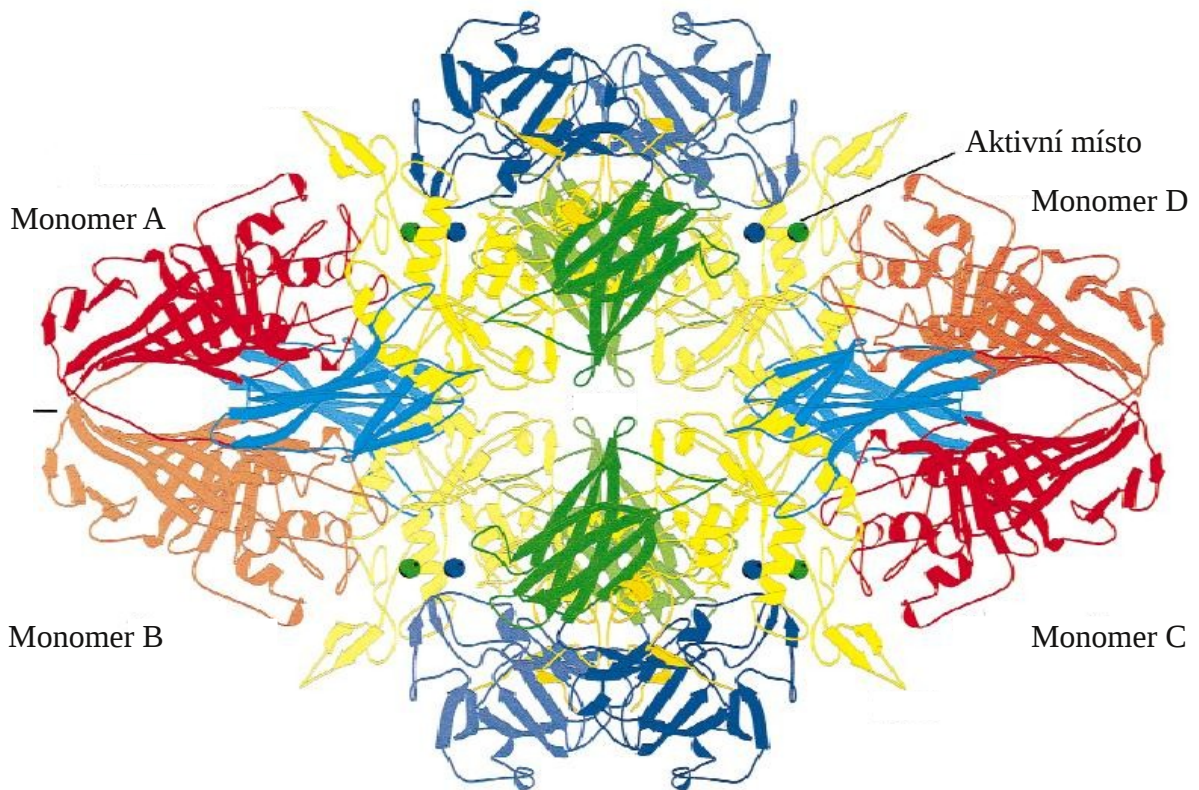
Tab. 1 Některé komerční zdroje laktasy (Panesar et al., 2006).

Zdroj laktasy	Obchodní název
Bakterie	
<i>Bacillus</i> sp.	Novozym 231
<i>Escherichia coli</i>	β -galactosidase
Kvasinky	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Maxilact Lactase β -galactosidase
<i>Saccharomyces fragilis</i>	β -galactosidase
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Lactozyme
<i>Kluyveromyces</i> sp.	Lactase NL
<i>Candida pseudotropicalis</i>	Neutral lactase
Plísně	
<i>Aspergillus niger</i>	Sumylact Lactase
<i>Aspergillus oryzae</i>	Fungal lactase Biolactase Lactase 2214C β -galactosidase

3.2. CHARAKTERISTIKA LAKTASY

3.2.1. STRUKTURA LAKTASY

Primární struktura laktasy *Escherichia coli* byla poprvé určena v osmdesátých letech dvacátého století (Fowler a Zabin, 1978). Následné sekvenování genu *lacZ* a určení třídídimenzionální struktury enzymu potvrdilo, že původní stanovení bylo téměř správné (Kalnins et al., 1983). Molekulová hmotnost laktasy činí 464 kDa. Skládá se ze čtyř stejných podjednotek A-D, tvořených 1023 aminokyselinami a vazebným místem pro aktivátor. Každý monomer je rozdělen do pěti domén, třetí doména má strukturu TIM soudku – 8 α -helixů a 8 paralelních β -skládaných listů – s aktivním místem na C-konci. Ostatní domény tvoří pouze β -skládané listy (Juers et al., 2000). Terciární struktura laktasy je zachycena na Obr. 1.



Obr. 1 Terciární struktura laktasy *Escherichia coli* (přepřacováno podle Juers et al., 2000).

Každý ze čtyř monomerů enzymu se skládá z domény 1 (modrá), domény 2 (zelená), domény 3 (žlutá), domény 4 (modrozelená) a domény 5 (červená). Tmavší a světlejší odstíny jednotlivých barev slouží k odlišení stejných domén různých podjednotek. Vazebná místa pro sodné kationty znázorňují zelené a pro hořečnaté kationty modré tečky (Juers et al., 2000).

Při porovnání laktasy *Escherichia coli* a *Kluyveromyces lactis* byla pozorována výrazná shoda v bílkovinných sekvencích, což svědčí o jejich blízkém evolučním vztahu (Pereira-Rodríguez et al., 2012).

Údaje týkající se struktury a počtu podjednotek laktasy *K. lactis* se liší v závislosti na použitých laboratorních metodách. Dickson et al. (1979) purifikoval laktasu ze surových extraktů kvasinek a po provedení elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného uvedl, že je tvořena dvěma identickými podjednotkami o molekulových hmotnostech 135 kDa.

Mbuyi-Kalala et al. (1988) na základě opakované ultrafiltrace popsal v komerčním preparátu Maxilact 40000 existenci 4 isoenzymů o molekulových hmotnostech 630 kDa, 550 kDa, 41 kDa a 19 kDa, u kterých pozoroval odlišnosti ve fyzikálních vlastnostech i kinetických parametrech.

Becerra et al. (1998) použil ke studiu laktasy *K. lactis* metody, které umožňují purifikaci proteinu z malého množství extraktu vysoce reprodukovatelným a přesným způsobem. Jednalo se o rychlou proteinovou kapalinovou chromatografii (FPLC) s kolonami Superose 12 PC 3.2/30 a Mono Q PC 1.6/5 a jedнокrokovou afinitní chromatografií se specifickým vázáním laktasy na agarosa-*p*-aminofenyl- β -D-thiogalaktopyranosid a následnou elucí borátovým pufrém, pH 10. S využitím surového extraktu i preparátu Maxilact LX-5000 bylo zjištěno, že je daný enzym složen z podjednotek o molekulových hmotnostech 124 kDa a je aktivní v dimerní i tetramerní formě. Převaha jedné formy nad druhou závisí na podmínkách stanovení. Dimerní forma převládala při provedení gelové filtrace na koloně Superose 12. Při elektroforetickém stanovení v nedenaturujícím akrylamidovém gelu inkubovaném s umělými substráty *o*-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosidem (ONPG) nebo 6-bromo-2-naftyl- β -D-galaktopyranosidem (BNG) vykazoval aktivitu v případě obou substrátů pouze tetramer.

Podle Tello-Solíse et al. (2005) je sekundární struktura laktasy preparátu Maxilact LX-5000 určená metodou cirkulárního dichroismu tvořena z 22 % β -kličkami, ze 14 % paralelními a 25 % antiparalelními β -skládanými listy, z 5 % α -helixy a ze 34 % neuspořádanými strukturami.

3.2.2. FUNKCE LAKTASY

Laktasa je klíčovým enzymem pro hydrolyzu disacharidu laktosy. Hraje důležitou roli v novorozeneckém období většiny savců i člověka, kdy je nezbytná pro výživu, poté se její aktivita obvykle snižuje.

Neschopnost trávit laktosu jako důsledek nízké hladiny laktasy je označována jako laktosová intolerance. Laktosa v tomto případě není štěpena a vstřebána v tenkém střevě, ale proniká dále do tlustého střeva, kde znesnadňuje absorpci vápníku a v přítomnosti mikroorganismů dochází k její anaerobní fermentaci na vodík, methan, oxid uhličitý a mastné kyseliny. Mezi typické příznaky vyvolané požitím mléka nebo mléčných výrobků obsahujících laktosu patří bolesti břicha, křeče, nevolnost, nadýmání a průjem.

Termínem laktosová deficiencie je označována nízká nebo žádná aktivita laktasy zjištěná prostřednictvím biopsie tenkého střeva. Primární deficiencie se objevuje

u nedonošených dětí jako důsledek nedokončeného vývoje střeva nebo velmi zřídka jako klinický syndrom zvaný lidský vrozený deficit laktasy. Nejčastěji se snížená aktivita enzymu projeví kolem pátého roku věku a poté hladina laktasy přetrvává snížená. Sekundární deficiencie je způsobena poškozením střevní sliznice v důsledku nemoci, kterou může být gastroenteritida, celiakie, Crohnova nemoc či parazitární infekce (Rings et al., 1994).

3.2.3. VLASTNOSTI LAKTASY

Laktasa izolovaná z různých zdrojů vykazuje různé vlastnosti, některé z nich jsou shrnuty v Tab. 2. Tato rozmanitost může být navíc podpořena i modifikací enzymu prostřednictvím chemických metod nebo genetickou manipulací. pH optimum laktasy houbového původu se pohybuje v kyselé oblasti v hodnotách 2,5-5,4, optimální teplota je poměrně vysoká, obvykle je průmyslově využívána při teplotách nad 50 °C, kdy je poměrně stabilní. Důležitým zdrojem z průmyslového hlediska jsou však hlavně kvasinky, neutrální pH optimum tohoto typu laktasy je vhodné pro hydrolýzu laktosy v mléce, navíc je považována za bezpečnou pro použití v potravinářství (Panesar et al., 2006).

Tab. 2 Vlastnosti mikrobiální laktasy (Mlichová a Rosenberg, 2006).

	Mikroorganismus	Opt. pH	Opt. t [°C]	Literatura
bakterie	<i>Escherichia coli</i>	7,2	40	Greenberg a Mahoney, 1981; Giacomini et al., 2001
	<i>Lactobacillus thermophilus</i>	6,2	55	Greenberg a Mahoney, 1981
	<i>Leuconostoc citrovorum</i>	6,5	66	Singh et al., 1979
	<i>Bacillus circulans</i>	6	65	Boon et al., 2000
kvasinky	<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,5-7,0	30-35	Boon et al., 2000; Roy a Gupta, 2003; Jurado et al., 2004
	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6,6	30-35	Boon et al., 2000; Jurado et al., 2004
plísně	<i>Aspergillus niger</i>	3,0-4,0	55-60	Greenberg a Mahoney, 1981
	<i>Aspergillus oryzae</i>	5	50-55	Boon et al., 2000; Tanaka et al., 1975; Tanriseven a Dogan, 2002a

3.2.4. SUBSTRÁTOVÁ SPECIFITA

Přirozeným substrátem laktasy je disacharid laktosa. Substrátová specifita byla zkoumána za použití řady substrátů podobajících se laktose. Bylo prokázáno, že změny v glukosové části molekuly mají na hydrolýzu mnohem větší inhibiční účinky než změny ve složce galaktosové. Všechny hydroxylové pozice byly nezávisle nahrazeny za vodíkové nebo methylové zbytky, jako zásadní se ukázala být zejména OH-6 poloha v glukosové části (Rings et al., 1994).

Laktasa je aktivní vůči velkému množství přirozeně se vyskytujících i umělých substrátů, což vedlo k vyzkoušení řady těch, které mají chromogenní vlastnosti. Mezi hojně využívané patří 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid (X-gal) a o-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosid (ONPG) (Matthews, 2005).

3.2.5. AKTIVNÍ MÍSTO

U každého ze čtyř monomerů laktasy *E.coli* nalezneme aktivní místo, jehož aminokyselinové zbytky pocházejí z různých segmentů polypeptidového řetězce. Z velké části je tvořeno hlubokou kapsou, která zasahuje do jádra TIM soudku třetí domény, avšak obsahuje i struktury z dalších domén a podjednotek. Nacházejí se zde smyčky z první a páté domény stejného monomeru a smyčka z druhé domény jiného monomeru. Monomer A poskytuje smyčku druhé domény aktivnímu místu monomeru D, stejně tak smyčka monomeru D zasahuje do aktivního místa monomeru A. Analogický je i vztah mezi monomery B a C. Takto vzniklá aktivní místa fungují pravděpodobně nezávisle na sobě. Nicméně, protože pro tvorbu aktivního místa jsou potřeba podjednotky dvě, samostatný monomer enzymu je patrně neaktivní (Matthews, 2005).

3.2.6. MECHANISMUS ENZYMOVÉ REAKCE

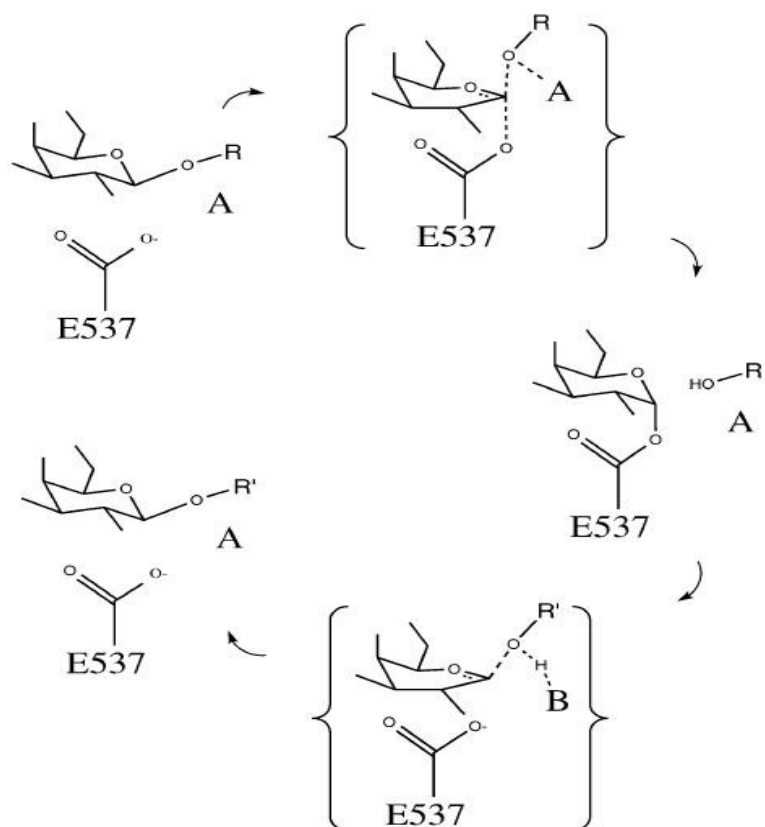
Laktasa vykazuje dvě katalytické aktivity, jednak hydrolyzuje laktosu, jednak ji převádí na její izomer, allolaktosu, který je přirozeným induktorem *lac* operonu. Allolaktosa je následně taktéž přeměněna na glukosu a galaktosu (Matthews, 2005).

Dvoukroková povaha katalytického mechanismu byla poprvé navržena Koshlandem (1953) a později demonstrována experimentálně Stokesem a Wilsonem (1972). Pro zjištění meziproductů katalýzy byla provedena řada krystalografických analýz. Z důvodu napodobení počátku reakce byl přírodní substrát navázán na mutantní enzym Glu 537 → Gln (E537Q), který je katalyticky neaktivní (Yuan et al., 1994). Také nehydrolyzovatelné substrátové analogy isopropylthiogalaktosid a 2-F-laktosa byly ponechány, aby zreagovaly s přírodním enzymem. Všechny ligandy se hromadily na indolu Trp999 v mělké oblasti aktivního místa. Pro zobrazení další části reakce byl jako substrát vybrán dinitrofenyl 2-F-galaktosid, protože rozdělení struktury enzym-substrát je v tomto případě mnohem pomalejší než jeho tvorba (McCarter et al., 1992). Došlo ke kovalentnímu navázání na Glu537 a k posunu hlouběji do aktivního místa. Galaktotetrazol a galaktonolakton sloužily k napodobení předpokládaných tranzitních stavů oxokarboniového iontu, které jsou trigonální na prvním uhlíku a vytvářejí pevnou vazbu (Huber a Brockbank, 1987; Heightman et al., 1995). Oba analogy se vázaly do hluboké oblasti na Glu461 obsahující atom odpovídající glykosidickému kyslíku. Krystalograficky bylo dále zjištěno, že produkt běžné katalytické reakce, galaktosa, se taktéž váže v hluboké oblasti aktivního místa enzymu (Juers et al., 2001). Analogy výchozího

substrátu se tedy navázaly do mělké oblasti, zatímco meziprodukty a produkt galaktosa pronikly 1-4 Å hlouběji do aktivního místa laktasy.

První polovina reakčního cyklu zahrnuje štěpení glykosidické vazby substrátu, vznik jeho kovalentního intermediátu s Glu537 laktasy a uvolnění aglykonu (Sinnott, 1990). Sporné je, zda k tomu dochází prostřednictvím Lewisovy katalýzy hořečnatým kationtem nebo Brønstedtovy katalýzy Glu461. Zdá se, že přímý elektrofilní atak iontem Mg^{2+} je nepravděpodobný, protože žádný z krystalograficky studovaných ligandů s ním nepřišel do přímého kontaktu. Také přechodné stavy analogů naznačují, že se Glu461 nachází v takové pozici, aby mohl poskytnout proton glykosidickému kyslíku a podpořit tak jeho roli katalyzátoru galaktosylace (Juers et al., 2001). Předpokládá se, že druhá polovina reakce, degalaktosylace, nastává prostřednictvím vytvoření tranzitního trigonálního oxokarboniového kationtu. Dvoukrokový mechanismus reakce je znázorněn na Obr. 2.

Laktasa funguje také jako transglykosylasa produkující allolaktosu. Ve studovaných komplexech vykazovala obecně struktura přítomná na vazebném místě aglykonu několik specifických interakcí s enzymem. Zde se mohou odrážet fyziologické požadavky enzymu na rovnováhu mezi transglykosylací a hydrolýzou. Pokud byla vazba glukosy na toto místo specifická a pevná, převládala transglykosylace. Naopak, jestliže byla slabá, dominovala hydrolýza (Matthews, 2005).



Obr. 2 Zobecněné schéma reakce katalyzované laktasou (převzato z Matthews, 2005).

Během prvního kroku reakce (nahore) tvoří substrát β -D-galaktopyranosid obsahující alkykon „OR“ s nukleofilem Glu537 a kyselinou „A“ (Glu461 nebo hořečnatý kation) kovalentní α -D-galaktosyl enzymový meziprodukt. Vznik meziproduktu v druhém kroku (dole) je umožněn přítomností báze „B“ (pravděpodobně Glu461), díky které je odštěpen proton z molekuly R'OH (Matthews, 2005).

3.2.7. AKTIVÁTORY A INHIBITORY LAKTASY

Jedním z faktorů ovlivňujících činnost a stabilitu laktasy je vliv iontů, jako jsou Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , NH_4^+ a K^+ . Bez ohledu na původ enzymu vápenaté ionty inhibují funkci, zatímco hořečnaté aktivitu zvyšují. Vliv ostatních závisí na jejich poloměru a na zdroji, ze kterého byla laktasa získána. Ionty mohou také posílit odolnost enzymu vůči tepelné inaktivaci snížením flexibility polypeptidového řetězce (Jurado et al., 2004).

Pro maximální aktivitu laktasy jsou potřebné ionty hořčíku a sodíku. Hořčnatý ion byl identifikován v aktivním místě obou krystalových forem enzymu (Jacobson et al., 1994; Juers et al., 2000). Nalezeno bylo i několik dalších možných vazebných míst, ale není jim připisována žádná funkce. Studie krystalů v přítomnosti draslíku a rubidia napomohly určení pěti předpokládaných vazebných míst pro sodné ionty, jednoho z nich v aktivním místě a ostatních na povrchu proteinu (Juers et al., 2000).

Příkladem látky, která se podobá substrátu, ale nemůže být hydrolyzována a vystupuje tedy jako inhibitor, je fenetyl- β -D-thiogalaktopyranosid (PETG). Experimenty ukázaly, že PETG vykazuje srovnatelnou afinitu k laktase jako *o*-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosid (ONPG). Mezi další inhibitory β -galaktosidasy patří například dusičnan stříbrný (Martino et al., 2009), chlorid rtuťnatý, jod nebo peroxid vodíku (Knopfmacher a Salle, 1941).

3.3. METODY STANOVENÍ AKTIVITY LAKTASY

Jednu z metod stanovení aktivity laktasy představuje měření absorbance, fluorescence či chemiluminiscence vzniklého produktu. Hydrolýzou chromogenních substrátů za přítomnosti laktasy vzniká barevný produkt. Substrát ONPG je štěpen na žlutý nitrofenol, jeho množství je poté stanoveno spektrofotometricky (Pardee et al., 1959). Vystavení bakterií X-galu vede ke vzniku modrého produktu 5-bromo-4-chloro-indigo a umožňuje tak kvalitativní identifikaci a zhodnocení aktivity kolonií produkujících laktasu (Horwitz et al., 1964). Další skupinou jsou fluorescenční substráty – resorufin- β -D-galaktopyranosid, 4-methylumbelliferyl- β -D-galaktopyranosid a chemiluminiscenční substráty – Galacton, Galacton-Star, které zvyšují citlivost stanovení (Serebriiskii a Golemis, 2000). Mezi faktory ovlivňující stanovení aktivity kvasinkové laktasy patří například podmínky pro růst kvasinek obsahujících *lacZ* reportérový gen, kdy se volí mezi pevným médiem (agarové plotny) a tekutou kulturou (zkumavky nebo mikrodestičky). Vybraný substrát lze přidat k aktivně rostoucím organismům nebo až po buněčné lyzi, které je možné dosáhnout zmrazováním a rozmrazováním, použitím detergentu či rozpouštědla (Serebriiskii a Golemis, 2000).

Další metodou je měření rychlosti tvorby produktu. Burin a Buera (2002) enzymaticky oxidovaly glukosu vznikající hydrolýzou laktasy na kyselinu glukonovou a peroxid vodíku. V přítomnosti peroxidasy docházelo oxidativním couplingem fenolu a 4-aminofenazonu ke vzniku červeného chromogenu, který byl stanoven spektrofotometricky. Aktivita laktasy byla

určena jako poměr hydrolyzované laktosy k jejímu počátečnímu množství. K experimentu byla použita laktasa izolovaná z mikroorganismů *Escherichia coli*, *Aspergillus oryzae* a *Saccharomyces lactis*.

Stanovení enzymové aktivity založené na jedнокrokové analýze produktů – glukosy, galaktosy a oligosacharidů – lze provést na základě aniontové chromatografie s pulzní amperometrickou detekcí (Tyagarajan et al., 1996).

3.4. IMOBILIZACE ENZYMŮ

Při práci s enzymy často nastává řada problémů, mezi které patří vysoké náklady na izolaci a purifikaci, nestabilita enzymů oddělených od přirozeného prostředí, citlivost vůči jiným než optimálním podmínkám a stopovým množstvím látek, které působí jako inhibitory. Na rozdíl od heterogenních chemických katalyzátorů, enzymy obvykle působí rozpuštěné ve vodě, z tohoto důvodu kontaminují produkt a nemohou být z reakční směsi získány v aktivní formě pro další použití. Jednou z metod pro překonání těchto omezení je imobilizace enzymu, která stabilizuje strukturu a tím i aktivitu enzymů napodobením přirozeného způsobu výskytu v živých buňkách, kde jsou ve většině případů vázány na buněčné membrány. Ve srovnání s volnými enzymy v roztoku jsou tedy ty imobilizované odolnější vůči okolním změnám, dále je umožněno jejich opětovné využití, nepřetržitý provoz enzymových procesů a rychlé ukončení reakce (Krajewska, 2004).

Univerzální nosič pro všechny enzymy a jejich aplikace neexistuje, každý však musí splňovat určité základní požadavky jako jsou vysoká afinita k bílkovinám, dostupnost reaktivních funkčních skupin pro přímé reakce s enzymy a pro chemické modifikace, hydrofilní charakter, mechanická stabilita a rigidita, snadnost přípravy v různých geometrických konfiguracích. Pro potravinářské, farmaceutické, lékařské a zemědělské využití je nutná také netoxičnost a biokompatibilita (Krajewska, 2004)

V případě laktasy bylo studováno několik postupů imobilizace: adsorpce na pórovitý materiál, zachycení v gelu, iontové interakce, tvorba komplexů s kovy nebo kovalentní vázání (Ladero et al., 2000). Některé z nich jsou uvedeny v Tab. 3.

Fyzikální adsorpce je nejstarší a nejjednodušší metodou imobilizace enzymu na nosiče nerozpustné ve vodě. Biokatalyzátory jsou k jejich povrchu vázány pomocí van der Waalových sil a často se na tomto spojení podílejí i další síly, hlavně hydrofobní interakce, vodíkové a iontové vazby. Výhodou adsorpce je jednoduché provedení a malé ovlivnění

konformace enzymu, nevýhodou je poměrně slabá adsorpční vazebná síla. Pro imobilizaci laktasy touto technikou byly testovány různé nosiče, z anorganických například oxid hlinitý, oxid křemičitý, porézní sklo, křemelina a z organických celuloza, škrob, aktivní uhlí, Sephadex (Panesar et al., 2010).

Metoda zachycení v gelu je využívána pro imobilizaci celých buněk a spočívá v uzavření částice v malém prostoru. Obzvláště vhodným materiálem jsou přírodní polymery – alginát, karagenan, pektin, agar, želatina – které nejsou toxické a snadno tuhnou. Hlavní výhodou je jednoduchost, se kterou lze částice získat, a to aplikací suspenze polymeru a buněk do média obsahujícího kladně nabitě ionty nebo tepelnou polymerací. Membrány běžně používané pro zachycení enzymů jsou nylonové, celulosové, polysulfonové nebo polyakrylamidové. Mezi hlavní problémy spojené s tímto typem imobilizace patří desorpce laktasy z imobilizační matrice a únik zachyceného enzymu v důsledku malé molekulové hmotnosti ve srovnání s póry gelu. Předcházet tomu lze použitím síťovacího činidla, například bis-oxiranu (Rogalski et al., 1994), karbodiimidu (Dominguez et al., 1988), octanu chromitého (Sungur a Akbulut, 1994), glutaraldehydu (Tanriseven a Dogan, 2002b), polyethyleniminu (Decleire et al., 1987), transglutaminasy (Zhang et al., 2010).

Při imobilizaci enzymů se často využívá kovalentní vazby. Enzymy se prostřednictvím funkčních skupin, které nejsou nezbytné pro katalytickou aktivitu, spojují s různými matricemi. Funkční skupiny nosiče jsou obvykle aktivovány pomocí chemického činidla – bromkyanu, karbodiimidu, glutaraldehydu. Kvůli chránění aktivního místa je vhodné imobilizaci provádět v přítomnosti substrátu nebo kompetitivního inhibitoru. Tato technika může být využita i pro změnu operačních vlastností enzymu (Panesar et al., 2010).

Tab. 3 Příklady imobilizace různých typů laktasy (Panesar et al., 2010).

Metoda	Zdroj laktasy	Nosič	Literatura
fyzikální adsorpce	<i>Bacillus circulans</i>	polyvinyl chlorid a oxid křemičitý	Bakken et al., 1992
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	chitosan	Di Serio et al., 2003
	<i>Escherichia coli</i>	chromosorb-W	Bodalo et al., 1991
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	chitosan	Gekas a Lopez-Leiva, 1985
	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	chitosan	
	<i>Aspergillus niger</i>	pórovitý keramický monolit	Papayannakos et al., 1993
	<i>Aspergillus oryzae</i>	polyvinyl chlorid a silikagelová membrána	Bakken et al., 1990
zachycení v gelu	<i>E. coli</i>	polyakrylamidový gel	Khare a Gupta, 1988
	<i>K. lactis</i>	polyvinylalkoholový hydrogel	Champluvier et al., 1988
	<i>Kluyveromyces bulgaricus</i>	alginát	Declaire et al., 1987
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	polyvinylalkoholový hydrogel	Champluvier et al., 1988
	<i>A. oryzae</i>	Nylon-6 a zeolit	Pietta et al., 1989
kovalentní vázání	<i>B. circulans</i>	Eupergit C (akrylový polymer)	Hernaiz a Crout, 2000
	<i>K. lactis</i>	povrch grafitu	Taqieddin a Amiji, 2004
	<i>K. fragilis</i>	silica-alumina	Ladero et al., 2000
	<i>A. niger</i>	magnetický polysiloxan-polyvinyl alkohol	Neri et al., 2008
	<i>A. oryzae</i>	chitosanové částice a nylonová membrána	Portaccio et al., 1998

3.4.1. IMOBILIZACE NA MAGNETICKÉ NOSIČE

Stále větší pozornost je v poslední době věnována magnetickým mikročásticím a nanočásticím coby neporézním nosičům pro imobilizaci enzymů. Jejich výhodou je velká povrchová plocha, možnost snadného oddělení od reakční směsi magnetickým polem i rychlost reakcí katalyzovaných na ně navázanými enzymy (Verma et al., 2012).

Magnetické nosiče mohou být připraveny celou řadou způsobů. Jedním z nejčastěji používaných je koprecipitace - syntéza Fe_3O_4 nebo $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ přidavkem báze k vodným roztokům solí obsahujících železnaté a železité kationty. Velikost a tvar vzniklých částic závisí na druhu použitých solí, poměru $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, teplotě a pH, při kterém reakce probíhá a na iontové síle. Další metody využívají k přípravě čisté kovy, feromagnetů nebo slitiny (Lu et al., 2007). K přípravě může být použita také například termolýza pentakarbonylu železa, hydrotermální metoda – reakce oxidů a hydroxidů železa a dalších kovů ve vodě při teplotě nad 200 °C a tlaku vyšším než 14 Mpa (Horák et al., 2007), izolace z magnetotaktických bakterií jako jsou *Magnetobacterium bavaricum*, *Aquaspirillum magnetotacticum* (Drzazga et al., 2006).

Mikročástice a nanočástice jsou obvykle nejlépe aplikovatelné pro účely imobilizace v případě, kdy se jejich velikost pohybuje v rozmezí 0,1-100 μm u mikročástic a 10-20 nm u nanočástic. Každá z nich se pak stává samostatnou paramagnetickou jednotkou, která dokáže rychle reagovat na vnější změny magnetického pole. S touto velikostí je však spojena další vlastnost, a to tendence částic shlukovat se do větších celků a snižovat tak povrchovou energii. Z toho důvodu je důležité je nejprve stabilizovat (Lu et al., 2007).

3.4.1.1. ÚPRAVA MAGNETICKÝCH NOSIČŮ

Ideální úprava magnetických nanočástic by měla poskytovat stálou ochranu před oxidací, tu může zajistit pokrytí jednotlivých částic tenkou povrchovou vrstvou, která má jen velmi malý nebo žádný vliv na jejich magnetické vlastnosti. Například obalení nanočástic zlatem vedlo právě k oslabení těchto vlastností. V jiném experimentu došlo při použití hořčíku ke vzniku nežádoucí směsi obou částic (Huber, 2005). V současné době jsou částice často pokrývány vrstvou oxidu křemičitého nebo vhodného polymeru. Povrchová úprava slouží také k dodání funkčních skupin důležitých pro další využití. Hlavním důvodem povrchové úpravy je však snaha zabránit shlukování částic (Lu et al., 2007).

Pro obalování částic se používají syntetické i přírodní polymery. Syntetickým povrchovým materiálem může být například polyethylenglykol (Nitin et al., 2004), polyvinylalkohol (Godovsky et al., 1999). Z přírodních to jsou zejména sacharidy a proteiny, jejichž biokompatibilita dovoluje využití v medicíně. Nevýhodou je však rozpustnost některých ve vodě, pórovitost či neselektivní adsorpce (Markovic, 2006).

Kombinace magnetického materiálu a chitosanu byla uplatněna v mnoha oblastech od afinitní izolace enzymu, separace proteinů a buněk až po imobilizaci enzymů. Chitin a chitosan patří mezi přírodní polyamino-sacharidy. Chitin, jako hlavní složka krunýře korýšů, exoskeletu hmyzu a buněčné stěny hub, kde zajišťuje pevnost, je v biosféře syntetizován a degradován v obrovských množstvích. Chemicky je tvořen $\beta(1 \rightarrow 4)$ vázanými 2-acetamido-2-deoxy- β -glukosovými podjednotkami (Peter, 1995). Derivát chitinu, chitosan, vzniká N-deacetylací v různém rozsahu. Komerčně je chitin a chitosan získáván z odpadu vzniklého při zpracování mořských plodů (Tharanathan a Kittur, 2003).

Chitosan obsahuje ve svém lineárním polyglukosaminovém řetězci reaktivní amino a hydroxylové skupiny, které mohou být chemicky modifikovány (Kurita, 2001; Dutta et al., 2002). Díky aminoskupinám je chitosan kationtovým polyelektrolytem ($pK \approx 6,5$), jedním z mála nacházejících se v přírodě. Je rozpustný ve vodném prostředí při pH nižším než 6,5, rozpuštěný vykazuje vysoce kladný náboj na NH_3^+ skupinách a je přitahován negativně nabitými povrchy (Krajewska, 2004).

3.5. VYUŽITÍ LAKTASY V PRAXI

Laktosa má ve srovnání s glukosou a galaktosou nízkou rozpustnost a sladkost. Hydrolyza laktosy umožňuje vývoj nových bezlaktosových produktů i další aplikace v potravinářském průmyslu. Rozlišujeme kyselou a enzymovou hydrolyzu katalyzovanou laktasou. Při použití kyseliny jako katalyzátoru proběhne reakce velmi rychle, ale je zapotřebí vyšší teploty ($150\text{ }^\circ\text{C}$) než u metody enzymové ($30\text{--}40\text{ }^\circ\text{C}$) a produkt může získat nežádoucí zbarvení a zápach, což zabraňuje jeho uplatnění na trhu s potravinami. Enzymová hydrolyza zachovává výživové vlastnosti surovin a je pro potravinářství mnohem vhodnější (Ladero et al., 2001).

Prvotním kritériem při výběru daného enzymu je rozsah pH. Enzymy houbového původu aktivní v kyselé oblasti pH se hodí pro výrobu kyselé syrovátky a sušené syrovátky. Kvasinky a bakterie jsou zdrojem enzymů s pH optimem v neutrální oblasti, vhodných pro zpracování mléka a sladké syrovátky (Panesar et al., 2006).

Hydrolyzované mléko se používá pro přípravu ochuceného mléka, sýrů a jogurtů, navíc urychluje proces acidifikace, jehož limitujícím krokem je obvykle právě hydrolýza mléčného cukru (Shukla, 1975). Hydrolýzou laktosy je také zabráněno její krystalizaci v mražených a kondenzovaných mléčných výrobcích. Kvalita zmrzliny byla výrazně zvýšena přidáním laktasy, která přeměnou laktosy na glukosu a galaktosu snižuje hrudkovitost. Stupeň přeměny laktosy dosahující až 90% byl pozorován při reakci s imobilizovanou laktasou *K. lactis* u odstředěného mléka, syrovátky a sušené syrovátky (Panesar et al., 2006).

Díky své transferasové aktivitě laktasa produkuje oligosacharidy, které mají příznivý vliv na růst střevní mikroflóry, selektivně zvyšují množství bifidobakterií a laktobacilů na úkor méně žádoucích mikroorganismů *E. coli*, *Clostridia* a proteolytických bakteroidů (Panesar et al., 2010). Kromě toho může sloužit transferasová reakce k připojení galaktosy na jiné chemické látky a následně být využita v potravinářství či farmacii. Množství a charakter vzniklých oligosacharidů závisí na původu enzymu, koncentraci a povaze substrátu a na reakčních podmínkách (Prenosil et al., 1987). Obecně platí, že při vyšší počáteční koncentraci laktosy vzniká větší počet a celkově větší oligosacharidy (Panesar et al., 2010).

Syrovátka vzniká jako vedlejší produkt při výrobě sýrů. Především v rozvojových zemích představuje její likvidace velký problém pro mlékárenský průmysl, značné množství je vypouštěno do vodních toků a je tak příčinou vážného znečištění. Laktosa ($44\text{-}52\text{ g.l}^{-1}$) obsažená v syrovátce vykazuje vysoké hodnoty biochemické a chemické spotřeby kyslíku. Řešením tohoto problému je hydrolýza syrovátky pomocí laktasy na glukosu a galaktosu a následné použití mikroorganismů, které jsou schopné tyto monosacharidy rozkládat například na komerčně využitelný produkt – ethanol (Mlichová a Rosenberg, 2006; Asraf a Gunasekaran, 2010).

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. MATERIÁL

Dihydrogenfosforečnan draselný	Sigma-Aldrich, Německo
EDC.HCl	Sigma-Aldrich, Japonsko
Hydrogenfosforečnan draselný	Sigma-Aldrich, Španělsko
Hydroxid sodný	Lach-Ner, ČR
Chlorid hořečnatý hexahydrát	Lachema, ČR
Kyselina boritá	Chemapol, ČR
Kyselina octová (99%)	Lach-Ner, ČR
Kyselina trihydrogenfosforečná (85%)	Chemapol, ČR
Laktozym	Sigma-Aldrich, USA
Magnetické nanočástice (Fe ₃ O ₄) obalené chitosanem	Nanocentrum, ČR
NHS (98%)	Sigma-Aldrich, Čína
ONPG	Sigma-Aldrich, Švýcarsko

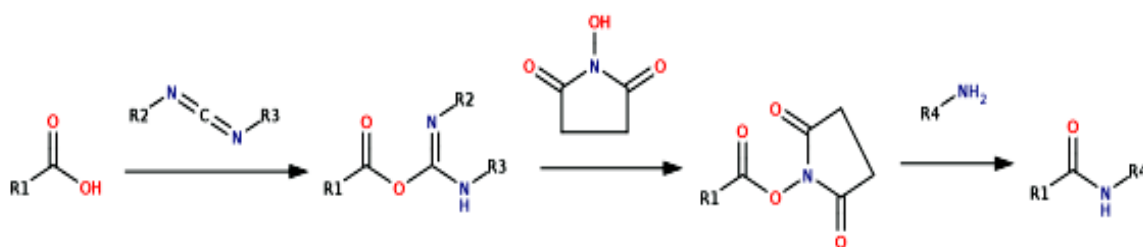
4.2. PŘÍSTROJE

Analytické váhy CPA225D	Sartorius, Německo
Automatický rotátor Multi Bio RS-24	Biosan, Litva
Digitální předvážky	Kern, Německo
Elektromagnetická míchačka	IKA, Německo
pH-metr inoLab Level 1	WTW, Německo
Pipety (2 µm-5 ml)	Biohit, Finsko
	Eppendorf, Německo
Spektrofotometr Biochrom WPA Lightwave II	Biochrom Ltd., Velká Británie
Termocykler TProfessional Gradient 96	Biometra, Německo
Vortex MS-1	IKA, Německo

4.3. POUŽITÉ METODY

4.3.1. IMOBILIZACE LAKTASY

Laktasa byla imobilizována na magnetické nanočástice pokryté vrstvou chitosanu. Do mikrozkušavky byly naváženy 2 mg nanočástic a byla přidána aktivační činidla: 100 μl 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochloridu (EDC.HCl, 32 mmol.l^{-1}) připraveného rozpuštěním 0,5 mg EDC.HCl ve 100 μl pufru (K-Pi 0,1 mol.l^{-1} , pH 7, obsahující 2 mmol.l^{-1} MgCl_2) a 100 μl roztoku N-hydroxysukcinimidu (NHS, 52 mmol.l^{-1}) připraveného rozpuštěním 0,6 mg NHS ve 100 μl tohoto pufru. Poté bylo přidáno 100 μl laktasy tisíckrát zředěné daným puftrem. Chlorid hořečnatý byl k fosfátovému pufru přidán za účelem zvýšení enzymové aktivity. Takto přichystané vzorky byly ponechány do druhého dne na automatickém rotátoru (300 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$). Reakční schéma imobilizace je zobrazeno na Obr. 3. Následně byly nanočástice odděleny od roztoku za použití magnetu, stejným puftrem třikrát promyty a v tomto puftu také uskladněny při teplotě 4 $^{\circ}\text{C}$ do doby, než byly použity.



Obr. 3 Imobilizace laktasy za katalýzy EDC a NHS (přepřacováno podle Nakajima a Ikada, 1995). Volný enzym (R1-COOH) reaguje s EDC a NHS, vzniká tak reaktivní meziprodukt, který v přítomnosti povrchově upraveného nosiče (R4-NH₂) vede k tvorbě amidové vazby.

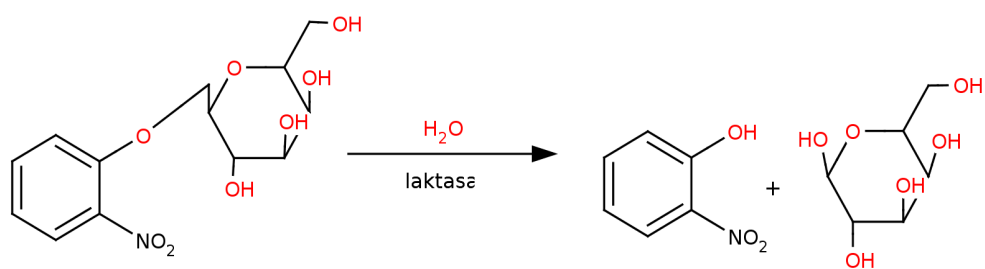
4.3.2. STANOVENÍ VAZEBNÉ KAPACITY LAKTASY

Vazebná kapacita byla stanovena metodou Bradfordové na základě srovnání množství enzymu ve vzorku roztoku laktasy (1:100) před imobilizací a enzymu obsaženého v supernatantu po imobilizaci laktasy na magnetické nanočástice pokryté chitosanem.

Po smíchání 1 ml vzorku pro stanovení proteinů a 2 ml činidla Bradfordové byly roztoky promíchány a po pěti minutách byla měřena jejich absorbance při vlnové délce 595 nm. Měření bylo provedeno ve třech opakováních. Kalibračním proteinem pro stanovení vazebné kapacity byl hovězí sérový albumin (BSA). Byla sestrojena křivka závislosti absorbance na koncentraci BSA. Z rovnice lineární regrese byla vypočtena koncentrace laktasy ve vzorcích. Množství navázané laktasy bylo vyjádřeno v procentech.

4.3.3. STANOVENÍ AKTIVITY LAKTASY

Pro enzymovou reakci byl použit umělý substrát ONPG, jehož hydrolýzou vzniká β -D-galaktopyranosa a žlutě zbarvený *o*-nitrofenol (ONP), reakce je zobrazena na Obr. 4.



Obr. 4 Hydrolýza umělého substrátu ONPG na ONP a galaktosu katalyzovaná enzymem laktasou.

Pro zjištění aktivity volné laktasy bylo v 1 cm kyvetě smícháno 1550 μl pufru (K-Pi 0,1 mol.l⁻¹, pH 7, obsahující 2 mmol.l⁻¹ MgCl₂) se 400 μl roztoku ONPG (5 mmol.l⁻¹) v tomtéž pufru, tato směs sloužila jako blank. Reakce byla startována přidavkem 50 μl roztoku laktasy ředěné v poměru 1:1000 stejným pufrům. Aktivita laktasy byla stanovena spektrofotometricky, kdy byla měřena změna absorbance při 410 nm v jednodominutových intervalech po dobu 5 minut, v průběhu měření byla reakční směs míchána pomocí magnetické míchačky.

Na základě zjištěných změn absorbancí lze vypočítat aktivitu laktasy pomocí vztahu

$$\frac{\Delta n}{\Delta t} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \cdot \frac{V}{\epsilon \cdot l}$$
 Podíl $\frac{\Delta n}{\Delta t}$ vyjadřuje aktivitu [kat], ΔA změnu absorbance, Δt časový interval [s], V objem kyvety [l], ϵ molární absorpční koeficient [l.mol⁻¹.cm⁻¹] a l šířku kyvety [cm].

Pro měření aktivity imobilizovaného enzymu byly 2 mg nanočástic s imobilizovanou laktasou přeneseny do kyvety. Bylo přidáno 1600 μl stejného pufru jako v případě volné laktasy a reakce byla startována přidavkem 400 μl roztoku ONPG (5 mmol.l⁻¹) v daném pufru. Nanočástice byly promíchávány a před každým měřením byly pomocí magnetu usazeny ke dnu kyvety.

4.3.4. STANOVENÍ ZÁVISLOSTI AKTIVITY VOLNÉ A IMOBILIZOVANÉ LAKTASY NA pH

Aktivita 50 μl roztoku laktasy ředěného pufrům (K-Pi 0,1 mol.l⁻¹, pH 7, obsahující 2 mmol.l⁻¹ MgCl₂) v poměru 1:1000 a vzorku 2 mg nanočástic s imobilizovanou laktasou byla stanovena spektrofotometricky v prostředí Britton-Robinsonových pufrů, pH 4-10, s obsahem 2 mmol.l⁻¹ MgCl₂. V sedmi kyvetách bylo k roztoku laktasy, případně ke vzorku nanočástic přidáno 1550 μl Britton-Robinsonova pufru pH 4; 5; 6; 7; 8; 9 a 10. Jako substrát a k nastartování reakce bylo použito 400 μl roztoku ONPG (5 mmol.l⁻¹) v K-Pi pufru (0,1 mol.l⁻¹, pH 7, obsahující 2 mmol.l⁻¹ MgCl₂).

4.3.5. TERMOSTABILITA VOLNÉ A IMOBILIZOVANÉ LAKTASY

Roztoky 50 μl tisíckrát zředěné volné laktasy, případně 2 mg nanočástic s imobilizovanou laktasou v pufru (K-Pi 0,1 mol.l⁻¹, pH 7, obsahující 2 mmol.l⁻¹ MgCl₂) byly v mikrozkuvkách inkubovány po dobu 30 minut při teplotách 20 °C; 25 °C; 30,1 °C; 36 °C; 41,2 °C; 46,3 °C a 50,3 °C a následně ochlazeny ledem. Ochlazené vzorky byly přeneseny do kyvet, nanočástice byly pomocí magnetu usazeny ke dnu a pufr odpipetován. K nanočásticím bylo přidáno 1550 μl pufru v případě volné, 1600 μl pufru v případě imobilizované laktasy. Reakce byla startována přidavkem 400 μl roztoku ONPG (5 mmol.l⁻¹) v daném pufru.

4.3.6. STANOVENÍ MICHAELISOVY KONSTANTY

Pro zjištění Michaelisovy konstanty (K_m) volné i imobilizované formy enzymu bylo zvoleno pět hodnot koncentrace substrátu: 0,4; 0,5; 0,7; 1,2; 4,0 mmol.l⁻¹. Do pěti kyvet bylo napipetováno 70 μl roztoku tisíckrát zředěné laktasy, nebo byly přidány 2 mg nanočástic s imobilizovanou laktasou. Reakce s volnou laktasou započala po přidání 1930 μl roztoku ONPG v pufru (K-Pi 0,1 mol.l⁻¹, pH 7, obsahující 2 mmol.l⁻¹ MgCl₂) o koncentracích odpovídajících již zmiňovaným hodnotám, k imobilizované laktase bylo přidáno 2000 μl roztoku substrátu odpovídající koncentrace ve stejném pufru. Byla zaznamenána změna aktivity enzymu s časem a výsledky byly použity pro sestavení Lineweaver-Burkova grafu a výpočet hodnot Michaelisovy konstanty.

4.3.7. OPERAČNÍ STABILITA IMOBILIZOVANÉ LAKTASY

2 mg nanočástic s imobilizovanou laktasou byly přeneseny do kyvety spolu s 1600 μl pufru (K-Pi 0,1 mol.l⁻¹, pH 7, obsahující 2 mmol.l⁻¹ MgCl₂), reakce byla startována přidavkem 400 μl ONPG (5 mmol.l⁻¹). Po první sérii spektrofotometrického stanovení změny aktivity s časem byly nanočástice promyty pufrům a použity pro další měření aktivity za stejných podmínek. S jedním vzorkem nanočástic bylo provedeno osm opakování. První stanovená aktivita byla označena jako 100%, následující výsledky pak byly vyjádřeny jako procentuální hodnoty zachované aktivity.

4.4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.4.1. STANOVENÍ VAZEBNÉ KAPACITY LAKTASY

Metodou Bradfordové byla stanovena vazebná kapacita laktasy *K. lactis*. Množství laktasy, které bylo navázáno na Fe₃O₄-chitosanové nanočástice pokryté chitosanem činilo 88 % z původního množství použitého k imobilizaci.

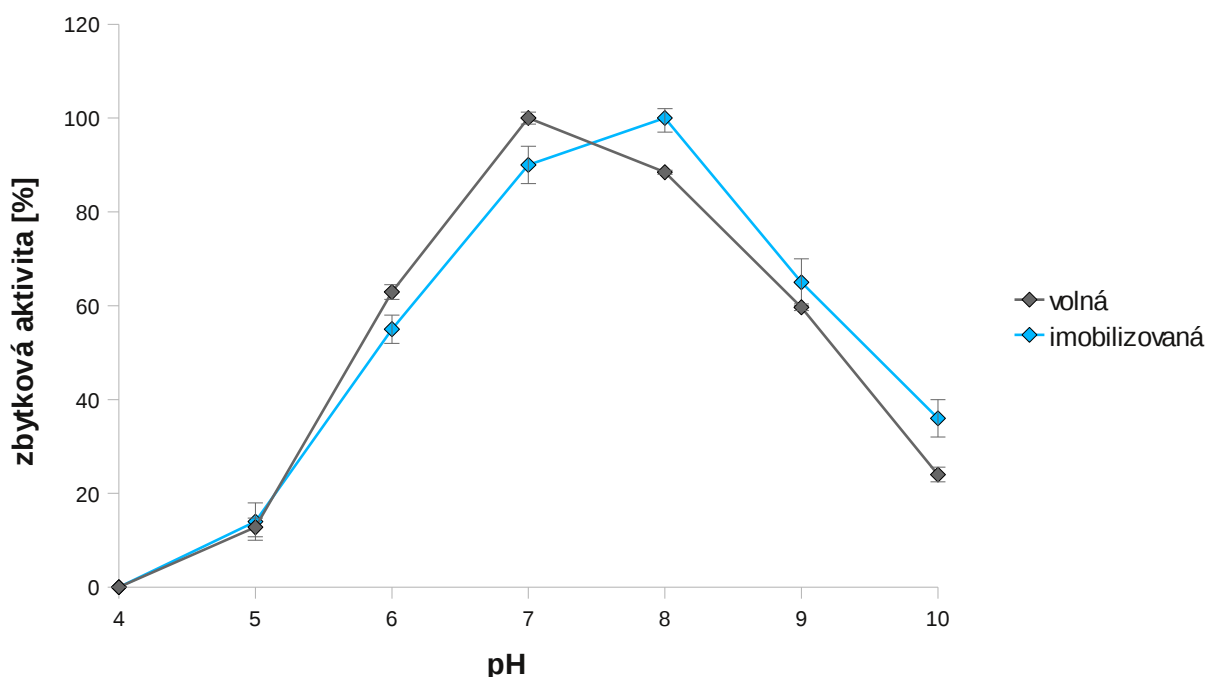
Na magnetické nanočástice byly imobilizovány různé druhy enzymů, kromě laktasy různého původu se jedalo o lipasy, proteasy, glukoamylasy, α-amylasy, penicilin G acylasy a další. V důsledku dipól-dipólových interakcí mezi jednotlivými částicemi dochází v kapalném prostředí k jejich shlukování do větších celků. Proto byla k modifikaci povrchu nanočástic vyzkoušena celá řada látek. Imobilizace prostřednictvím kovalentního navázání vede ke zvýšení rigidity enzymové struktury, což může snižovat vliv vnějších podmínek jako je teplota, pH či přítomnost organických rozpouštědel na změny konformace a tak zvyšovat stabilitu enzymu (Pan et al., 2009). Verma et al. (2012) kovalentně imobilizoval laktasu *K. lactis* na nanočástice pokryté oxidem křemičitým a dosáhl vazebné kapacity 87 %. Imobilizací laktasy *K. lactis* na glyoxylové nosiče dosáhla imobilizačního výtěžku nad 80 % i Bernal et al. (2013).

4.4.2. STANOVENÍ ZÁVISLOSI AKTIVITY VOLNÉ LAKTASY NA pH

Měření závislosti aktivity laktasy izolované z kvasinek *K. lactis* na pH bylo provedeno pro rozmezí pH 4-10. Závislost aktivity volného a imobilizovaného enzymu na pH použitého Britton-Robinsonova pufru je zobrazena na Obr. 5. Nejvyšší zjištěná hodnota aktivity byla označena jako 100%. Nejvyšší hodnotu enzymové aktivity vykazovala volná laktasa v prostředí pufru pH 7. V případě imobilizované laktasy byla nejvyšší aktivita naměřena při pH 8. V kyselém prostředí pH 4 jsou obě formy enzymu neaktivní, aktivita byla pozorována v rozmezí pH 5-10. Imobilizací došlo ke stabilizaci enzymu pro použití při pH 8-10 ve srovnání s jeho volnou formou. pH 7 bylo určeno jako optimální pro volnou a pH 8 pro imobilizovanou laktasu.

Imobilizací na chitosanové makročástece aktivované glutaraldehydem došlo k rozšíření rozmezí optimálního pH pro funkci laktasy *K. lactis* z 6,5 na 6,5-8. Nejvyšší

aktivitu si však enzym zachoval při pH 6,5 (Klein et al., 2013). pH 6,5 se ukázalo být nejlepší také pro dosažení maximální aktivity laktasy *K. lactis* ve volné formě i imobilizované v želatinovém gelu prostřednictvím glutaraldehydu. Imobilizací nedošlo ke změně pH optima, ale bylo pozorováno zvýšení aktivity při nižších i vyšších hodnotách pH ve srovnání s volným enzymem. I v tomto případě byla stabilita enzymu zvýšena procesem imobilizace (Numanoglu a Sungur, 2004). Lima et al. (2013) zjistila, že volná laktasa *K. lactis* dosahovala při pH 5,5 velmi nízké aktivity. Imobilizovaná na chitosanu ale vykazovala při stejném pH 60% aktivitu. Větší stabilita imobilizované laktasy byla zřejmě způsobena přítomností chitosanu. Při vyšších koncentracích H^+ jsou aminoskupiny chitosanu protonovány a přitahují ionty OH^- , což vede ke zvýšení okolního pH ve srovnání s roztokem (Wentworth et al., 2003). Laktasa *K. lactis* imobilizovaná adsorpcí na membránu obsahující oxid zirkoničitý vykazovala posun pH optima z 6,5 na 7 (Jochems et al., 2011).

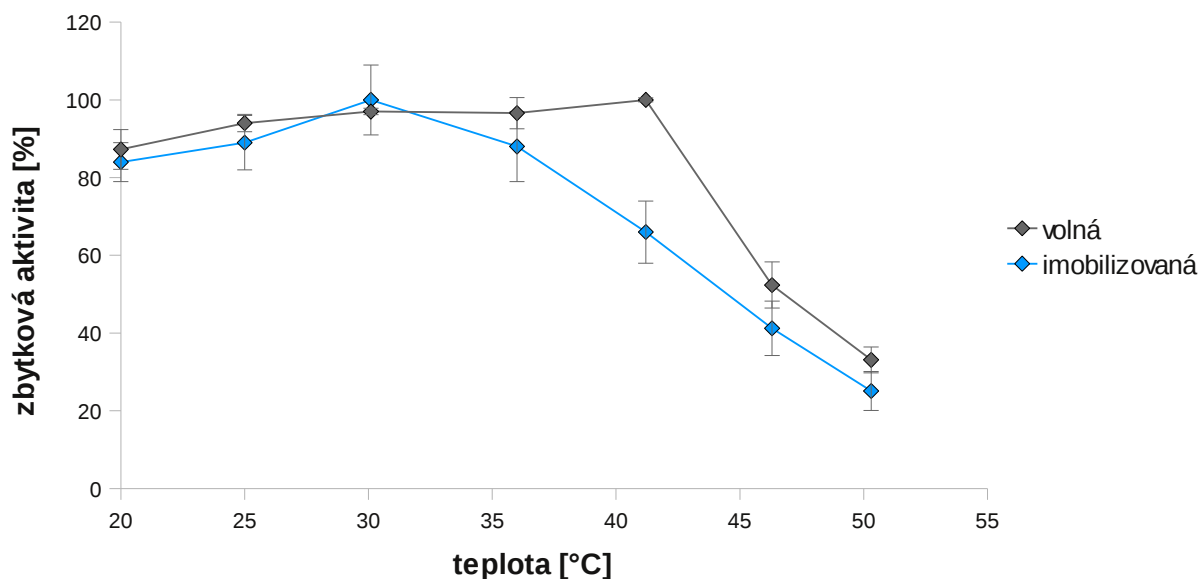


Obr. 5 Graf závislosti aktivity laktasy na pH. Pro stanovení byly použity Britton-Robinsonovy pufrы pH 4-10 ($2 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ MgCl}_2$). Měření bylo opakováno třikrát, chybové úsečky znázorňují směrodatné odchyly.

4.4.3. TERMOSTABILITA VOLNÉ A IMOBILIZOVANÉ LAKTASY

Byl sledován vliv teploty na aktivitu volné a imobilizované laktasy. Obr. 6 zachycuje závislost enzymové aktivity na teplotě inkubace, nejvyšší naměřené hodnotě byla přidělena relativní aktivita 100 %. Volná laktasa dosáhla nejvyšší aktivity po inkubaci při 41,2 °C. Poté pravděpodobně nastala denaturace enzymu, která se projevuje náhlým poklesem aktivity při 46,3 °C a 50,3 °C. V případě imobilizované laktasy byla nejvyšší aktivita naměřena po inkubaci enzymu při teplotě 30,1 °C. Ostatní hodnoty aktivit jsou nižší než je tomu u volného enzymu, pokles aktivity byl ale pozvolnější než u volné laktasy. Použitý způsob imobilizace není vhodný pro práci s laktasou při vyšších teplotách. Teplotní optimum volné laktasy bylo tedy stanoveno na 41,2 °C, optimální teplota pro imobilizovanou laktasu na 30,1 °C.

Inaktivace enzymu způsobená vysokou teplotou je limitujícím faktorem pro biotechnologické využití (Klein et al., 2013). Laktasa *K. lactis*, volná a imobilizovaná na nanočástice oxidu hlinitého pokryté konkavalinem A, nevykazovala žádné změny teplotního optima (Ansari a Husain, 2011). Laktasa *K. lactis* imobilizovaná na chitosanu si zachovávala vyšší aktivitu při nižších teplotách a rychleji ji ztrácela při vystavení teplotám vyšším než je 37 °C. Optimální teplota volného enzymu byla stanovena na 50 °C, pro imobilizovaný 37 °C. Pokles stability s rostoucí teplotou byl neočekávaný, jako možnou příčinu autoři uvádějí nečistoty obsažené v surovém extraktu, které mohly chránit enzym před teplotní inaktivací a které mohly být z okolí enzymu odstraněny během imobilizace (Lima et al., 2013). Zvýšení teplotního optima zaznamenal Zhou a Chen (2001), a to přibližně ze 40 na 50 °C imobilizací laktasy *K. lactis* na povrch grafitu.



Obr. 6 Graf závislosti aktivity laktasy na teplotě inkubace. Volná laktasa a laktasa kovalentně vázaná na magnetických nanočásticích pokrytých vrstvou chitosanu v pufru (K-Pi 0,1 mol.l⁻¹, pH 7, obsahující 2 mmol.l⁻¹ MgCl₂) byla inkubována při teplotě 20 °C; 25 °C; 30,1 °C; 36 °C; 41,2 °C; 46,3 °C a 50,3 °C po dobu 30 minut. Pro každou teplotu a formu enzymu byla provedena tři měření.

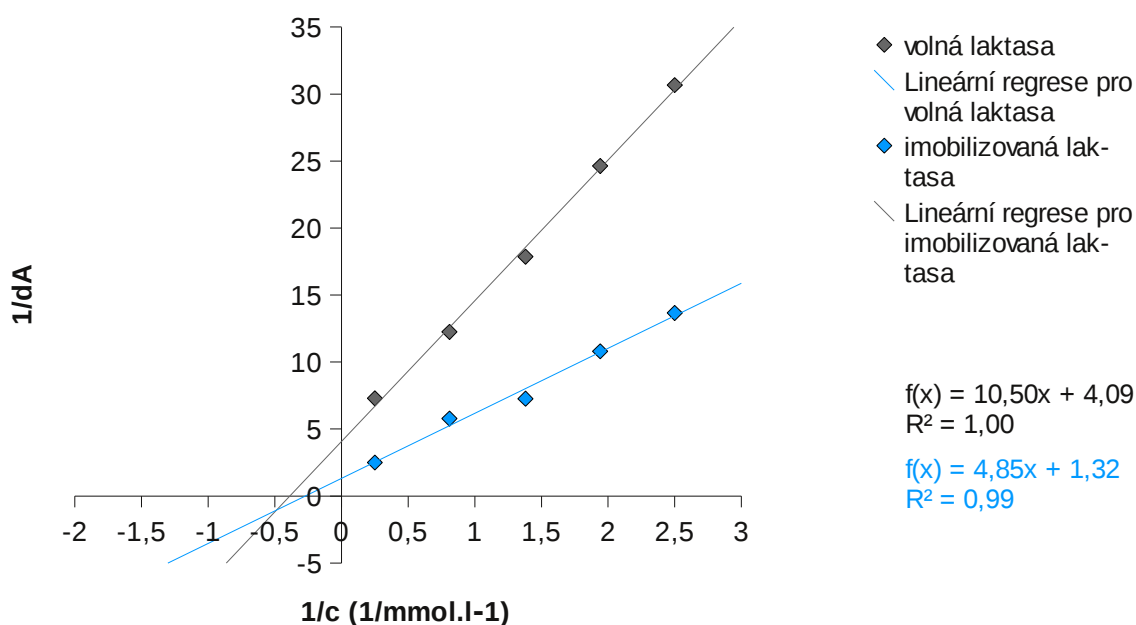
4.4.4. STANOVENÍ MICHAELISOVY KONSTANTY

Hodnoty K_m byla stanovena pro volnou a imobilizovanou laktasu *K. lactis*. Byl sestrojen graf $1/\Delta A = f(1/[S])$ a zaznamenanými body byla proložena lineární regrese.

Michaelisova konstanta byla vypočítána z rovnic regresních přímek ($x = -\frac{1}{K_m}$) za předpokladu, že $y = 0$. Výsledný graf je zobrazen na Obr. 7. Imobilizací laktasy došlo ke změně afinity enzymu k substrátu. Pro volnou laktasu byla zjištěna hodnota $K_m = 2,57 \pm 0,3$ mmol.l⁻¹, pro imobilizovanou formu $K_m = 3,67 \pm 0,5$ mmol.l⁻¹.

Zhou a Chen (2001) zjišťovali hodnotu Michealisovy konstanty pro laktasu *K. lactis*.

Pro volný enzym činila K_m $1,74 \text{ mmol.l}^{-1}$, po imobilizaci laktasy na povrch grafitu byl pozorován posun na $9,34 \text{ mmol.l}^{-1}$. V jiném experimentu byla hodnota K_m pro volnou laktasu *K. lactis* stanovena na $4,77 \text{ mmol.l}^{-1}$, imobilizací na SiO_2 -nanočástice došlo k jejímu přibližně dvojnásobnému zvýšení na $8,4 \text{ mmol.l}^{-1}$ (Verma et al., 2012). Zvýšení hodnoty Michaelisovy konstanty nasvědčuje tomu, že k nasycení enzymu je potřeba větší množství substrátu, to může být způsobeno zhoršením přístupnosti substrátu k aktivním místům enzymu v důsledku navázání na pevný nosič (Pessela et al., 2007). Kinetika byla zjišťována také u laktasy *K. lactis* imobilizované na chitosanu. Lima et al. (2013) určila hodnotu Michealisovy konstanty na $3,34 \text{ mmol.l}^{-1}$ pro volný a na $3,68 \text{ mmol.l}^{-1}$ pro vázaný enzym.

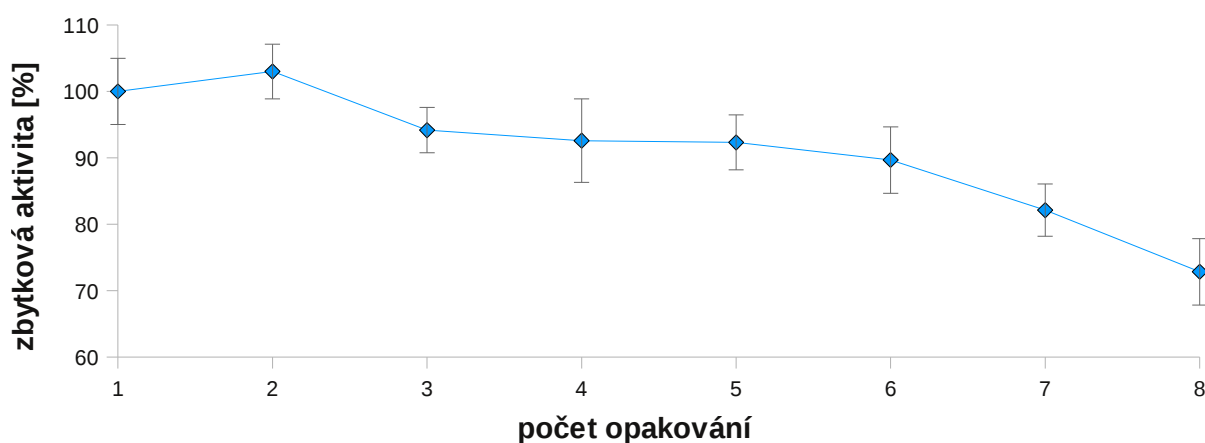


Obr. 7 Lineweaver-Burkův graf pro výpočet hodnot K_m . Aktivita byla stanovena spektrofotometricky s využitím umělého substrátu ONPG ($[S] = 0,4; 0,5; 0,7; 1,2; 4,0 \text{ mmol.l}^{-1}$) v pufru (K-Pi $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, pH 7, obsahující $2 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ MgCl}_2$). Byla provedena tři měření.

4.4.5. OPERAČNÍ STABILITA IMOBILIZOVANÉ LAKTASY

Operační stabilita enzymu souvisí s možností opakovaného využití jeho katalytických účinků. Obr. 8 znázorňuje pokles aktivity laktasy v důsledku jejího opakovaného použití, první naměřená aktivita byla označena jako 100%. Imobilizovaná laktasa si po osmi opakováních zachovala aktivitu přibližně 73 %.

Verma et al. (2012) uvedl, že laktasa *K. lactis* imobilizovaná na nanočásticích povrchově upravených oxidem křemičitým byla stabilní i po jedenácti provedených reakčních cyklech při teplotě 40 °C, přičemž si zachovala přibližně poloviční aktivitu ve srovnání s cyklem prvním. Opakované použití enzymu bylo umožněno imobilizací na pevný nosič, což je finančně výhodné při provádění sérií katalytických procesů. Imobilizací laktasy *K. lactis* na Fe₃O₄-chitosanové nanočástice byla zachována 92% aktivita po patnáctém opakování reakce (Pan et al., 2009).



Obr. 8 Graf závislosti aktivity imobilizované laktasy na počtu opakování měření. Aktivita Imobilizované laktasy *K. lactis* byla stanovena v prostředí ONPG a pufru (K-Pi 0,1 mol.l⁻¹, pH 7, obsahující 2 mmol.l⁻¹ MgCl₂) prostřednictvím osmi opakování, mezi kterými byly nanočástice promyty puforem. Měření bylo provedeno třikrát.

5. ZÁVĚR

Byla vypracována rešerše na téma laktasa a její využití v biotechnologickém průmyslu.

Laktasa izolovaná z kvasinek *Kluyveromyces lactis* byla pomocí aktivačních činidel EDC a NHS imobilizována na Fe₃O₄-nanočástice pokryté vrstvou chitosanu.

Bylo stanoveno množství enzymu, které bylo imobilizací na nanočástice kovalentně navázáno. Vazebná kapacita laktasy dosáhla 88 %.

Byly studovány vlastnosti volné laktasy *K. lactis* jako je pH optimum, teplotní optimum a afinita k umělému chromogennímu substrátu ONPG. Dále byla studována změna těchto vlastností způsobená imobilizací enzymu.

Optimální pH pro volnou laktasu bylo určeno jako pH 7, imobilizací laktasy došlo k posunu pH optima do alkaličtější oblasti na pH 8.

Studiem termostability byla stanovena optimální teplota volné laktasy na 41,2 °C, teplotní optimum imobilizované laktasy bylo zaznamenáno při nižší teplotě, a to 30,1 °C.

Byly stanoveny hodnoty Michaelisovy konstanty. Imobilizace laktasy způsobila změnu afinity enzymu k substrátu. Bylo zjištěno, že pro nasycení imobilizované laktasy byla potřebná přítomnost většího množství substrátu.

Bylo zjištěno, že imobilizovaná laktasa může být použita opakovaně. Stanovení operační stability ukázalo, že po osmi opakováních ztratila 27 % své aktivity.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Ansari S.A., Husain Q. (2011) Immobilization of *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase on concanavalin A layered aluminium oxide nanoparticles-Its future aspects in biosensor applications. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **70**, 119-126.

Asraf S. S., Gunasekaran P. (2010) Current trends of β -galactosidase research and application. V *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*, (Méndez.Vilas, ed), pp. 880-890, Formatex, Badajoz, Španělsko.

Bakken A. P., Hill C.G. Jr., Amundson C.H. (1990) Use of novel immobilized β -galactosidase reactor to hydrolyze the lactose constituent of skim milk. *Biotechnol. Bioeng.* **36**, 293-309.

Bakken A.P., Hill C.G. Jr., Amundson C.H. (1992) Hydrolysis of lactose in skim milk by immobilized β -galactosidase (*Bacillus circulans*). *Biotechnol. Bioeng.* **39**, 408-417.

Becerra M., Cerdan E., Siso M.I.G. (1998) Micro-scale purification of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* reveals that dimeric and tetrameric forms are active. *Biotechnol. Tech.* **12**, 253-256.

Bernal C., Marciello M., Mesa M., Sierra L., Fernandez-Lorente G., Mateo C., Guisan J.M. (2013) Immobilisation and stabilisation of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* using a glyoxyl support. *Int. Dairy J.* **28**, 76-82.

Bhalla P.L., Dalling M.J. (1984) Characteristics of a β -galactosidase associated with the stroma of chloroplasts prepared from mesophyll protoplasts of the primary leaf of wheat. *Plant Physiol.* **76**, 92-95.

Bodalo A., Gomez E., Maximo M.F., Gomez J.L., Bastida J. (1991) Immobilization of β -galactosidase by physical adsorption on chromosorb-W. *Biotechnol. Tech.* **5**, 393-394.

- Boon M.A., Janssen A.E.M., van't Riet K. (2000) Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Enzyme Microb. Technol.* **26**, -281.
- Burin L., Buera M.D. (2002) β -galactosidase activity as affected by apparent pH and physical properties of reduced moisture systems. *Enzyme Microb. Technol.* **30**, 367-373.
- Champluvier B., Kamp B., Rouxhet P.G. (1988) Immobilization of β -galactosidase retained in yeast: adhesion of the cells on a support. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 464-469.
- Chaubet N., Pareilleux A. (1982) Characterization of β -galactosidases of *Medicago sativa* suspension-cultured cells growing on lactose - effect of the growth substrates on the activities. *J. Plant Physiol.* **106**, 401-407.
- Declaire M., De Cat W., Van Huynh N., Motte J.C. (1987) Hydrolysis of whey by *Kluyveromyces bulgaricus* cells immobilized in stabilized alginate and in chitosan beads. *Acta Biotechnol.* **7**, 563-566.
- Di Serio M., Maturo C., De Alteriis E., Parascandola P., Tesser R., Santacesaria E. (2003) Lactose hydrolysis by immobilized β -galactosidase: the effect of the supports and the kinetics. *Catal. Today* **79**, 333-339.
- Dickson R.C., Dickson L.R., Markin J.S. (1979) Purification and properties of an inducible beta-galactosidase isolated from the yeast *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.* **137**, 51-61.
- Dominguez E., Nilsson M., Hahn-Hagerdal B. (1988) Carbodiimide coupling of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* to alginate. *Enzyme Microb. Technol.* **10**, 606-610.
- Drzazga Z., Dzierżewicz Z., Bartoszek M., Cholewka A. (2006) Magnetic properties of magnetotactic bacteria. *Pol. J. Environ. Stud.* **15**, 50-52.

- Dutta P.K., Ravikumar M.N., Dutta J. (2002) Chitin and chitosan for versatile applications. *J. Macromol. Sci.* **C42**, 307-354.
- Fowler A.V., Zabin I. (1970) Amino acid sequence of beta-galactosidase. I. Isolation and composition of tryptic peptides. *J. Biol. Chem.* **245**, 5032-5041.
- Fowler A.V., Zabin I. (1978) Amino acid sequence of beta-galactosidase. XI. Peptide ordering procedures and complete sequence. *J. Biol. Chem.* **253**, 5521-5525.
- Gatt S. (1969) Thermal lability of beta galactosidase from pink salmon liver. *Science* **164**, 1422-1423.
- Gekas V., Lopez-Leiva M. (1985) Hydrolysis of lactose: a literature review. *Process Biochem.* **20**, 2-12.
- Giacomini C., Irazoqui G., Batista-Viera F., Brena B.M. (2001) Influence of the immobilization chemistry on the properties of immobilized β -galactosidases. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **11**, 597-606.
- Godovsky D.Y., Varfolomeev A.V., Efremova G.D., Cherepanov V.M., Kapustin G.A., Volkov A.V., Moskvina M.A. (1999) Magnetic properties of polyvinyl alcohol-based composites containing iron oxide nanoparticles. *Adv. Mat. Opt. Elec.* **9**, 87-93.
- Greenberg N.A., Mahoney R.R. (1981) Immobilization of lactase (β -galactosidase) for use in dairy processing - a review. *Process Biochem.* **16**, 2-8.
- Heightman T.D., Ermert P., Klein D., Vasella A. (1995) Synthesis of galactose-derived and N-acetylglucosamine-derived tetrazoles and their evaluation as β -galactosidase inhibitors. *Helv. Chim. Acta* **78**, 514-532.
- Hernaiz M.J., Crout D.H.G. (2000) Immobilization/stabilization on Eupergit C of the β -galactosidase from *B. circulans* and an α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme Microb. Technol.* **27**, 26-32.

Horák D., Babič M., Macková H., Beneš M.J. (2007) Preparation and properties of magnetic nano- and microsized particles for biological and environmental separations. *J. Sep. Sci.* **30**, 1751-1772.

Horwitz J.P., Chua J., Curby R.J., Tomson A.J., DaRooge M.A., Fisher B.E., Mauricio J., Klundt I. (1964) Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-indolyl-beta-D-glycopyranosides. *J. Med. Chem.* **7**, 574-575.

Huber D.L. (2005) Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small* **1**, 482-501.

Huber R.E., Brockbank R.L. (1987) Strong inhibitory effect of furanoses and sugar lactones on β -galactosidase of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **26**, 1526-1531.

Jacobson R.H., Zhang X.J., DuBose R.F., Matthews B.W. (1994) Three-dimensional structure of β -galactosidase from *Escherichia coli*. *Nature* **369**, 761-766.

Jochems P., Satyawali Y., Van Roy S., Doyen W., Diels L., Dejonghe W. (2011) Characterization and optimization of β -galactosidase immobilization process on a mixed-matrix membrane. *Enzyme Microb. Technol.* **49**, 580–588.

Joshi M.S., Gowda L.R., Katwa L.C., Bhat S.G. (1989) Permeabilization of yeast-cells (*Kluyveromyces-fragilis*) to lactose by digitonin. *Enzyme Microb. Technol.* **11**, 439-443.

Juers D.H., Heightman T.D., Vasella A., McCarter J.D., Mackenzie L., Withers S.G., Matthews B.W. (2001) A structural view of the action of *Escherichia coli* (*lacZ*) β -galactosidase. *Biochemistry* **40**, 14781-14794.

Juers D.H., Jacobson R.H., Wigley D., Zhang X.J., Huber R.E., Tronrud D.E., Matthews B.W. (2000) High resolution refinement of β -galactosidase in a new crystal form reveals multiple metal-binding sites and provides a structural basis for alpha-complementation. *Protein Sci.* **9**, 1685-1699.

- Jurado E., Camacho F., Luzon G., Vicaria J.M. (2004) Kinetic models of activity for β -galactosidases: influence of pH, ionic concentration and temperature. *Enzyme Microb. Technol.* **34**, 33-40.
- Kalnins A., Otto K., Ruther U., Mullerhill B. (1983) Sequence of the *lacZ* gene of *Escherichia coli*. *Embo J.* **2**, 593-597.
- Khare S.K., Gupta M.N. (1988) Immobilization of *E. coli* β -galactosidase and its derivatives by polyacrylamide gel. *Biotechnol. Bioeng.* **31**, 829-833.
- Klein M.P., Fallavena L.P., Schöffner J.N., Ayub M.A.Z., Rodrigues R.C., Ninow J.L., Hertz P.F. (2013) High stability of immobilized β -D-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. *Carbohydr. Polym.* **95**, 465-470.
- Knopfmacher H.P., Salle A.J. (1941) Studies on the lactase of *Escherichia coli*. *J. Gen. Physiol.* **24**, 377-397.
- Koshland D.E. (1953) Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biol. Rev.* **28**, 416-436.
- Krajewska B. (2004) Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb. Technol.* **35**, 126-139.
- Kurita K. (2001) Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Prog. Polym. Sci.* **26**, 1921-1971.
- Ladero M., Santos A., García-Ochoa F. (2000) Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme Microb. Tech.* **27**, 583-592.
- Ladero M., Santos A., García J.L., García-Ochoa F. (2001) Activity over lactose and ONPG of a genetically engineered β -galactosidase from *Escherichia coli* in solution and immobilized: Kinetic modelling. *Enzyme Microb. Technol.* **29**, 181-193.

Lima A.F., Cavalcante K.F., deFreitas M.D.M., Rodrigues T.H.S., Rocha M.V.P., Goncalves L.R.B. (2013) Comparative biochemical characterization of soluble and chitosan immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564. *Process Biochem.* **48**, 443-452.

Lu A.H., Salabas E.L., Schuth F. (2007) Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **46**, 1222-1244.

Markovic G., Mutschler T., Wollner K., Gauglitz G. (2006) Application of surface acoustic waves for optimisation of biocompatibility of carboxymethylated dextran surfaces. *Surf. Coat. Technol.* **201**, 1282-1288.

Martino S., Tiribuzi R., Tortori A., Conti D., Visigalli I., Lattanzi A., Biffi A., Gritti A., Orlacchio A. (2009) Specific determination of β -galactocerebrosidase activity via competitive inhibition of β -galactosidase. *Clin. Chem.* **55**, 541-548.

Matthews B.W. (2005) The structure of E-coli beta-galactosidase. *C. R. Biol.* **328**, 549-556.

Mbuyi-Kalala A., Schnek A.G., Léonis J. (1988) Separation and characterization of four enzyme forms of β -galactosidase from *Saccharomyces lactis*. *Eur. J. Biochem.* **178**, 437- 443.

McCarter J.D., Adam M.J., Withers S.G. (1992) Binding energy and catalysis. Fluorinated and deoxygenated glycosides as mechanistic probes of *Escherichia coli* (*lacZ*) β -galactosidase. *Biochem. J.* **286**, 721-727.

Mlichová Z., Rosenberg M. (2006) Current trends of β -galactosidase application in food technology. *J. Food Nutr. Res.* **45**, 47-54.

Nakajima N., Ikada Y. (1995) Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. *Bioconjugate Chem.* **6**, 123-130.

- Neri D.F.M., Balcao V.M., Carneiro-da-Cunha M.G., Carvalho L.B., Teixeira J.A. (2008) Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto a polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic (mPOS-PVA) composite for lactose hydrolysis. *Catal. Commun.* **9**, 2334-2339.
- Nitin N., LaConte L.E.W., Zurkiya O., Hu X., Bao G. (2004) Functionalization and peptide-based delivery of magnetic nanoparticles as an intracellular MRI contrast agent. *J. Biol. Inorg. Chem.* **9**, 706-12.
- Numanoglu Y., Sungur S. (2004) β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose-gelatin carrier system. *Process Biochem.* **39**, 703-709.
- O'Connell S., Walsh G. (2010) A novel acid-stable, acid-active β -galactosidase potentially suited to the alleviation of lactose intolerance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**, 517-524.
- Pan C., Hu B., Li W., Sun Y., Ye H., Zeng X. (2009) Novel and efficient method for immobilization and stabilization of β -D-galactosidase by covalent attachment onto magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **61**, 208-215.
- Panesar P.S., Kumari S., Panesar R. (2010) Potential applications of immobilized β -galactosidase in food processing industries. *Enzyme Res.* **2010**, 1-16.
- Panesar P.S., Panesar R., Singh R.S., Kennedy J.F., Kumar H. (2006) Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **81**, 530-543.
- Papayannakos N., Markas G., Kekos D. (1993) Studies on modelling and simulation of lactose hydrolysis by free and immobilized β -galactosidase from *Aspergillus niger*. *Chem. Eng. J.* **52**, B1-B12.
- Pardee A.B., Jacob F., Monod J. (1959) The genetic control and cytoplasmic expression of inducibility in the synthesis of β -galactosidase of *E.coli*. *J. Mol. Biol.* **1**, 165-178.

Pessela B.C.C., Mateo C., Filho M., Carrascosa A., Fernandez-Lafuente R., Guisan J.M. (2007) Selective adsorption of large proteins on highly activated IMAC supports in the presence of high imidazole concentrations: Purification, reversible immobilization and stabilization of thermophilic α - and β -galactosidases. *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 242-248.

Pereira-Rodríguez A., Fernández-Leiro R., González-Siso M.I., Cerdán M.E., Becerra M., Sanz-Aparicio J. (2012) Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. *J. Struct. Biol.* **177**, 392-401.

Peter M.G. (1995) Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.* **A32**, 629-640.

Pietta P.G., Agnellini D., Pace M. (1989) Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase on nylon and zeolites: comparison of different methods. Proceedings of the 4th European Congress on Biotechnology **2**, 591-596.

Portaccio M., Stellato S., Rossi S., Bencivenga U., Eldin M.S.M., Gaeta F.S., Mita D.G (1998) Galactose competitive inhibition of β -galactosidase (*Aspergillus oryzae*) immobilized on chitosan and nylon supports. *Enzyme Microb. Technol.* **23**, 101-106.

Prenosil J.E., Stuker E., Bourne J.R. (1987) Formation of oligosaccharides during enzymatic hydrolysis of lactose: Part I: State of art. *Biotechnol. Bioeng.* **30**, 1019-1025.

Rings E.H.H.M., Vanbeers E.H., Krasinski S.D., Verhave M., Montgomery R.K., Grand R.J., Dekker J., Buller H.A. (1994) Lactase - origin, gene-expression, localization, and function. *Nutr. Res.* **14**, 775-797.

Rogalski J., Dawidowicz A., Leonowicz A. (1994) Lactose hydrolysis in milk by immobilized β -galactosidase. *J. Mol. Catal.* **93**, 233-245.

Roy I., Gupta M.N. (2003) Lactose hydrolysis by Lactozym (TM) immobilized on cellulose beads in batch and fluidized bed modes. *Process Biochem.* **39**, 325-332.

Samoylova T.I., Martin D.R., Morrison N.E., Hwang M., Cochran A.M., Samoylov A.M., Baker H.J., Cox N.R. (2008) Generation and characterization of recombinant feline β -galactosidase for preclinical enzyme replacement therapy studies in GM1 gangliosidosis. *Metab. Brain Dis.* **23**, 161-173.

Serebriiskii I.G., Golemis E.A (2000) Uses of *lacZ* to study gene function: Evaluation of β -galactosidase assays employed in the yeast two-hybrid system. *Anal. Biochem.* **285**, 1-15.

Shukla T.P. (1975) Beta-galactosidase technology: A solution to the lactose problem. *Crit. Rev. Food Technol.* **5**, 325-356.

Singh H.P., Rao M.V.R., Dutta S.M. (1979) Partial-purification and properties of *Leuconostoc citrovorum* beta-galactosidase. *Milchwiss.-Milk Sci. Int.* **34**, 475-478.

Sinnott M.L. (1990) Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chem. Rev.* **90**, 1171-1202.

Stokes T.M., Wilson I.B. (1972) A common intermediate in the hydrolysis of β -galactosidases by β -galactosidase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **11**, 1061-1064.

Sungur S., Akbulut U. (1994) Immobilisation of β -galactosidase onto gelatin by glutaraldehyde and chromium(III) acetate. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **59**, 303-306.

Tanaka Y., Kagamiishi A., Kichi A., Horiuchi T. (1975) Purification and properties of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *J. Biochem.* **77**, 241-247.

Tanriseven A., Dogan S. (2002a) Production of isomalto-oligosaccharides using dextransucrase immobilized in alginate fibres. *Process Biochem.* **37**, 1111-1115.

Tanriseven A., Dogan S. (2002b) A novel method for the immobilization of β -galactosidase. *Process Biochem.* **38**, 27-30.

Taqieddin E., Amiji M. (2004) Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules. *Biomaterials* **25**, 1937-1945.

Tello-Solís S.R., Jiménez-Guzmán J., Sarabia-Leos C., Gómez-Ruíz L., Cruz-Guerrero A.E., Rodríguez-Serrano G.M., García-Garibay M. (2005) Determination of the secondary structure of *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase by circular dichroism and its structure-activity relationship as a function of the pH. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 10200-10204.

Tharanathan R.N., Kittur F.S. (2003) Chitin - The undisputed biomolecule of great potential. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **43**, 61-87.

Tyagarajan K., Forte J.G., Townsend R.R. (1996) Exoglycosidase purity and linkage specificity: assessment using oligosaccharide substrates and high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Glycobiology* **6**, 83-93.

Verma M.L., Barrow C.J., Kennedy J.F., Puri M. (2012) Immobilization of β -D-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on functionalized silicon dioxide nanoparticles: Characterization and lactose hydrolysis. *Int. J. Biol. Macromol.* **50**, 432-437.

Wentworth D.S., Skonberg D., Donahue D.W., Ghanem A. (2003) Application of chitosan-entrapped β -galactosidase in a packed-bed reactor system. *J. Appl. Polym. Sci.* **91**, 1294-1299.

Yuan J., Martinez-Bilbao M., Huber R.E. (1994) Substitutions for Glu-537 of β -galactosidase from *Escherichia coli* cause large decreases in catalytic activity. *Biochem. J.* **299**, 527-531.

Zhang S., Gao S., Gao G. (2010) Immobilization of β -galactosidase onto magnetic beads *Appl. Biochem. Biotechnol.* **160**, 1386-1393.

Zhou Q.Z.K., Chen X.D. (2001) Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochem. Eng. J.* **9**, 33-40.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BNG	6-bromo-2-naftyl- β -D-galaktopyranosid
BSA	hovězí sérový albumin
EDC.HCl	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid
K-Pi	K-fosfátový pufr
NHS	N-hydroxysukcinimid
ONP	<i>o</i> -nitrofenol
ONPG	<i>o</i> -nitrofenyl- β -D-galaktopyranosid
PETG	fenetyl- β -D-thiogalaktopyranosid
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid